

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：13802
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24590689
研究課題名(和文) 甲状腺刺激ホルモン、副腎皮質刺激ホルモンのリニアール・ログな負の調節機構の解析

研究課題名(英文) The molecular mechanism of the linear-log relation between thyrotropin synthesis and T3

研究代表者
佐々木 茂和 (Sasaki, Shigekazu)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20303547
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体甲状腺刺激ホルモン(TSH)ならびに副腎皮質刺激ホルモンの分泌は血清甲状腺ホルモン(T3、T4)、グルココルチコイドによってどちらもリニアール・ログの様式で抑制される。私達はかつてT3結合したT3受容体が転写因子GATA2の機能を阻害する事でGATA2依存性のTSH遺伝子発現を抑制することを報告している。本課題では主にTSH産生を制御する転写因子GATA2の発現に対するT3の作用を検討しリニアール・ログの様式のネガティブフィードバックの基盤となる基本的なメカニズムの存在を追求した。

研究成果の概要(英文)：There is a linear-log relationship between the syntheses of thyroid-stimulating hormone (TSH) in pituitary and serum thyroid hormone (T3, T4) as in the case between the adrenocorticotrophic hormone and glucocorticoid. Based on our tethering model where transactivating function of transcription factor GATA2, which is essential for the TSHbeta expression, is interfered with by T3 in the presence of its receptor (TR), we have studied the role of T3-bound TRbeta 2 in the transcriptional auto-regulation of the GATA2 gene. Our current results may provide the insight for the expression of the TSHbeta gene which is negatively regulated by T3 with linear-log relationship.

研究分野：内分泌学

キーワード：甲状腺刺激ホルモン 甲状腺ホルモン 転写因子 甲状腺ホルモン受容体 GATA2 ネガティブフィードバック 下垂体 副腎皮質刺激ホルモン

1. 研究開始当初の背景

甲状腺刺激ホルモン(TSH)は甲状腺ホルモン(T3、T4)によってその産生が抑制(負の調節)される。これは単なる反比例ではなく、T3、T4の整数的変化に対してTSHは指数関数的(リニアール・ログ)に変動する。全身にとって真に必須なのはT3、T4であることから、これらの恒常性を維持するためTSHが鋭敏に上下しホメオステシスを維持することは極めて合目的と言える。TSH程ではないがリニアール・ログの逆相関はまたグルココルチコイド(GC)による血清の副腎皮質刺激ホルモン(adreno-corticotrophic hormone、ACTH)への抑制でも認められる。しかしその分子メカニズムは実は未だ明らかでない。言い換えればホメオステシスを維持する基本原理は今なお不明といえる。TSHは鎖(-glycoprotein subunit、GSU)と鎖(TSH)のヘテロダイマーである。どちらの遺伝子も転写レベルでT3によって負に調節されるが、TSHの方がやや顕著である。TSH遺伝子のへ負の調節のメカニズムとして、従来支配的であった仮説は、図1に示すように、転写開始点直下に負のT3応答配列(negative TRE、nTRE)が存在するというものである(Wondisford FE et al. J. Biol. Chem. 1989 264(25):14601-4)。しかしnTRE上のT3受容体(TR)にT3が結合した後、何が起るかは私達の検討(Sasaki S. et al. EMBO J. 1999 18:5389-98)を含め不明のままであった。

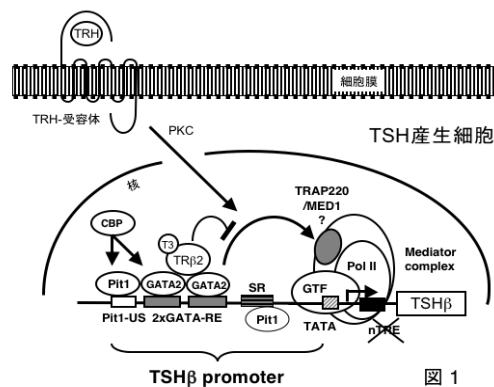


図 1

その後私達は、下垂体と無関係な細胞、例えばT3による活性化(正の調節)の研究で頻用された腎由来のCV1細胞であっても、TSH発現に必須な転写因子Pit1とGATA2を共発現すれば、負の調節が観察できる事を見いだした(Nakano K et al. Biochem J. 2004 378(Pt 2):549-57.)。そして図1に示すように、(1)Pit1とGATA2の内、TSH遺伝子の真の活性化因子はGATA2であり、GATA2の機能を安定化させているのがPit1であること(Kashiwabara Y et al. J Mol Endocrinol. 2009 42(3):225-37.)、(2)甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(thyrotropin releasing hormone、TRH)のシグナルがGATA2の転写活性化能を刺激すること(Ohba K et al. PLoS One. 2011 6(4):e18667)、(3)予想外なことにnTREを破

壊してもTSH遺伝子の負の調節は維持されること(Matsushita A et al. Mol. Endocrinol. 2007 21(4):865-84)(4)TSHの負の調節の本質はTRがGATA2と蛋白-蛋白相互作用して、T3依存性にGATA2の転写活性化を阻害する事(tethering)であって、直接TSHプロモーターのDNA、すなわちnTRE(図1)に結合するのではないこと、(5)GSU発現もGATA2によって活性化され、T3結合TRで抑制されることを報告した(Matsushita A et al. Mol. Endocrinol. 2007 21:865-84)。

私達の系では図2に示すようにPit1、GATA2、TRの共存下でTSH遺伝子の転写活性は約

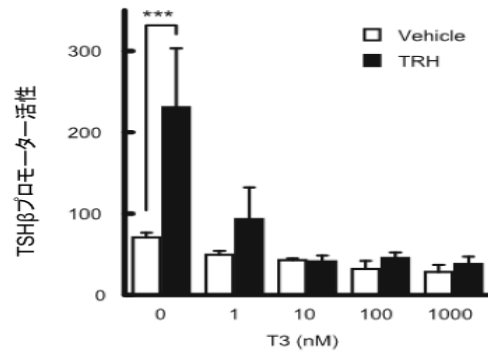


図 2

1/3程度に、予めTRHを添加しておくと、約1/8まで低下した(Ohba K et al. PLoS One. 2011 6(4):e18667)。図1のモデルはTR欠失マウス、GATA2、TRHの欠失マウスの知見をも忠実に反映していた。しかし、図2の縦軸は整数軸、横軸は対数軸であり、生体内でのリニアール・ログの反応は再現できていない。

潜在性甲状腺機能低下症は血清遊離T3、T4(fT3、fT4)が正常下限であるにも関わらず、血清TSHが正常上限を超える病態である。本症は全人口の約4~10%を占め、心機能の低下(虚血性の機序による機序とよらない機序がある)や脂質の上昇をもたらす。この病態はTSHの鋭敏さを反映にしていると解釈される。しかし図1のモデルによれば、その制御機構はT3による正の調節の分子機構とは全く異なる。心臓や肝臓においてはT3の標的遺伝子の内、負に調節されるものが20~40%を占める。私達は最近そのような遺伝子であるミオシン重鎖(MHC)遺伝子の転写制御を解析した。その結果、基本的な原理はTSH遺伝子と同じくtetheringであり、GATA2の役割をMHC遺伝子においては転写因子TEAD1が担っている事を報告した(Iwaki H. et al. PLoS One. 9:e88610. 2014)。しかし、それらが潜在性甲状腺機能低下症でTSHのように極めて鋭敏な発現パターンの変動を示すかどうか、心機能にどのように関わるは明らかにされていない。

GATA2 をコードする遺伝子は 6 個のエクソンからなる(図 3A)。この内、エクソン 1 は 1S(上流)と 1G(下流)の 2 つがある。胎盤の trophoblast では 1S プロモーターとイントロ

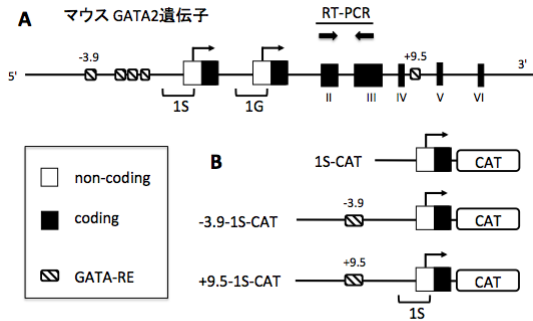


図3

ン 4 のエンハンサーが機能し GATA2 を発現している。興味深い事に、1S の上流とイントロン 4 のエンハンサーには機能的 GATA 応答配列が存在する(図 3A)。すなわち GATA2 はそれ自身の発現をポジティブフィードバック、すなわち非線形に auto-regulation する。さら

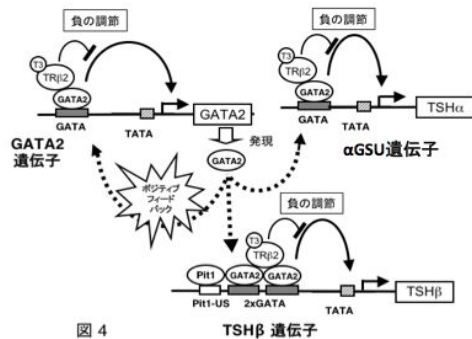


図 4

に trophoblast では GSU も発現しており、GATA2 依存性に転写が活性化され、T3 で抑制される(図 4 右上)。これらを総合すれば以下のネットワークが予想される。

- (i) GATA2 は GSU (図 4 右上)、そして TSH (図 4 下)の主な活性化因子として機能する。
- (ii) この GATA2 はそれ自身の転写を活性化し(図 4 左上)、ポジティブフィードバックを形成する。
- (iii) T3 は GSU、TSH 遺伝子を直接抑制するばかりでなく、GATA2 遺伝子の発現自体を抑制する。このことで、T3 は非線形に急峻な転写抑制作用を発揮し得る。

2. 研究の目的

TSH や ACTH、MHC など強い生物活性をもつ蛋白の発現には必ず強力な発現抑制機構、すなわちネガティブフィードバックの機構が存在するはずである。たとえば TSH の場合 GATA2 の発現制御、特にそのプロモーター構造と T3 による負の調節が重要な意義をもつと推定される。本研究ではまず TSH における

リニアール・ログの関係の分子機構の解明を目指した。このような着眼点での解析は国内外で全くなされていない。

3. 研究の方法

本研究ではまず、TSH 遺伝子の発現を維持している GATA2 に注目し、これをコードする GATA2 遺伝子自体にポジティブフィードバックが存在することを下垂体細胞において確認、ついで GATA2 遺伝子のポジティブフィードバックに T3 がどのように影響することを検討した。

私達が TSH 遺伝子の負の調節(図 1)を解析した腎由来 CV1 細胞は TR や GATA2 を発現せず、核受容体による正の調節の研究に頻用された歴史がある。そのため正と負の調節との比較には有利であった。しかし、T3 と TSH のリニアール・ログの関係を理解するためには下垂体細胞を用いた実験系が必要である。かつて GSU プロモーターの下流に SV40-LargeT 抗原を融合させ、そのトランスジェニックマウスから T T1 細胞が樹立された。しかし、TSH 産生細胞として樹立された T T1 細胞であったが GATA2 発現は僅かであった(Ohba K. et al. PLoS One.2011 6(4):e18667)。GSU プロモーターには GATA 応答配列が存在するため(図 4 右上)、GATA2 が高発現すると SV40-LargeT 抗原が増加して TSH 産生細胞としての表現型を保てない可能性が考えられた。一方、黄体化ホルモン鎖(LH)プロモーターに SV40-LargeT 抗原を融合した遺伝子をもつマウスから L T2 細胞が樹立された。ゴナドトロピン産生細胞は分化の途上で TSH 産生細胞と近縁にあり、GATA2 や GSU 遺伝子を発現している。私達の検討では L T2 細胞では T T1 細胞の約 5 倍の GATA2 蛋白発現を認めた。残念ながら L T2 には Pit1 がなく、TSH は発現していない。しかし GSU が発現し、そのプロモーターには機能的 GATA 応答配列が存在する(図 4、Matsushita A et al. Mol. Endocrinol. 2007 21(4):865-84)。また L T2 には下垂体特異的な TR である TR₂が存在し、事実、RT-PCR では T3 による GSUmRNA の低下が観察された(data not shown)。

4. 研究成果

私達は L T2 細胞、T T1 細胞、CV-1 細胞を用い、以下の解析をおこなった。

- (1) 図 3A に示すようにマウス GATA2 遺伝子のエクソン II と III を挟む領域

にプライマーを設定した。L T2 細胞を種々の濃度の T3 存在下で培養し、その後抽出した mRNA を鋳型とし定量的リアルタイム PCR を行ったところ、図 5 に示すように顕著な T3

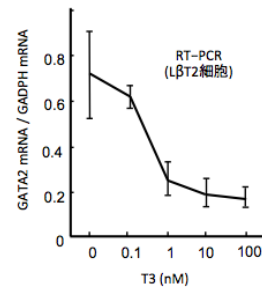


図5

依存性の抑制を認めた。

(2)L T2 細胞から蛋白の粗分画を抽出し GATA2 に対する抗体でウエスタンブロッティングを行った。その結果蛋白レベルにおいて

も T3 による抑制が認められた。予想通り T1細胞では GATA2 蛋白の基礎値は L T2 細胞より低いレベルであったがやはり T3 による抑制が認められた。このような変化はアクチンでは認めなかった。

(3)GATA2 蛋白の発現は T3 の濃度依存性に低下した(図 7A)。一方、遺伝子導入で外因性に発現した FLAG-タグの

GATA2 は T3 の効果を認めなかった(図 7B)。(4)100nMT3 存在下では時間経過とともに GATA2 蛋白の減少が認められた(図 8)。

(5)GATA2 蛋白は半減期 30 分でユビキチン化され分解されることが白血病細胞株で報告されている。L T2 細胞においてもプロテアーゼ阻害剤

MG132 を長作用させると GATA2 のレベルは上昇した(図 9A)。しかし MG132 存在下でも T3 の抑制効果は維持された(図 9B)。

(6)PKC を介する TRH シグナルの標的もまた GATA2 であることを私達は報告している。そこで L T2 細胞を用いて PKC 活性化剤 TPA の作用をウエスタンブロットで調べたところ

GATA2 蛋白は約 3 倍に増加していた。この所見は GATA2 遺伝子が PKC 系によって TSH 遺伝子に似た制御を受けている事に一致し

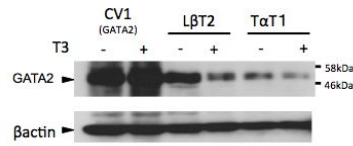


図6

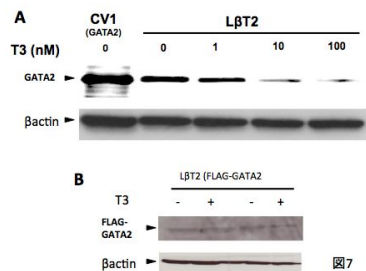


図7

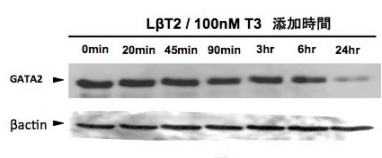


図8

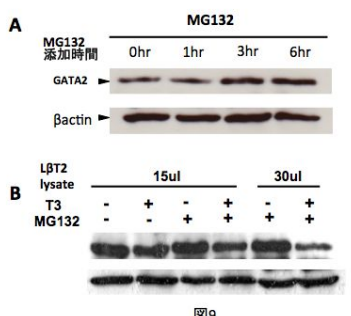


図9

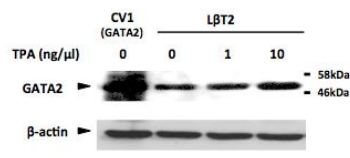


図10

た。(7)前述のように GATA2 をコードする遺伝子には複数の GATA-RE が存在し、胎盤の絨毛細胞では GSU ならびに GATA2 が発現している。それらの GATA-RE のうち比較的顕著な転写活性化作用が報告されている -3.9kb と +9.5kb の GATA-RE を 1S プロモーターに融合し CAT レポーター遺伝子を作成した(図 3B)。これらを GATA2、TR 2 発現プラスミドとともに CV-1 細胞にコトランスフェクションした。図 11 に示すように +9.5kb の GATA-RE をもつ CAT レ

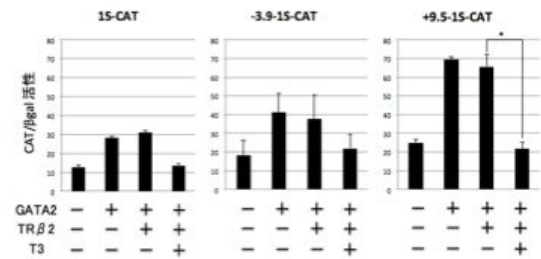


図11

ポーター遺伝子(+9.5kb-1S-CAT)は GATA2 自身によって活性化された。T3 によって負に調節された。1S プロモーターのみの 1S-CAT、-3.9kb の GATA-RE を 1S プロモーターに融合した -3.9kb-1S-CAT(図 3B)もまた T3 による抑制の傾向を認めたが統計な有意差はなかった。

(8)+9.5kb-1S-CAT を用いて GATA2 によるオートレギュレーションを検討した。図 12 に示すように GATA2 発現プラスミドの量に応じて CAT 活性は上昇した。

(9)+9.5kb-1S-CAT レポーター遺伝子に GATA2

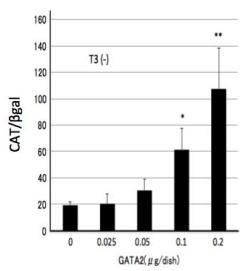


図12

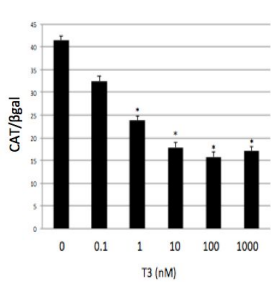


図13

発現プラスミド、TR 2 発現プラスミドとともに CV-1 細胞にコトランスフェクションし、種々の T3 濃度の効果を検討したところ、図 13 に示すように生理的濃度の T3 による負の調節が認められた。

本研究について今後、以下の様な考察と今後の課題とがある。

(A) 私たちは T3 による TSH 遺伝子へネガティブフィードバックの本質は T3 結合 TR が GATA2 の転写活性化能を阻害することにあることを報告している (Matsushita A et al. Mol. Endocrinol. 200721(4):865-84)。上記の成績は GATA2 遺伝子の機能的 GATA 応答領域を介し、GATA2 はそれ自身の発現を促進すると予想され、それは非線形なポジティブフィードバ

クと考えられる(図11)。今回の結果はこのポジティブフィードバックもまたT3によって抑制されることを示した(図12)。すなわちGATA2遺伝子発現のポジティブフィードバックがT3によって抑制されるというメカニズム(図14A)がT3に対するTSHのリニア・ログなネガティブフィードバックの背後に存在すると予想され、(a)GATA2遺伝子のプロモーター活性、

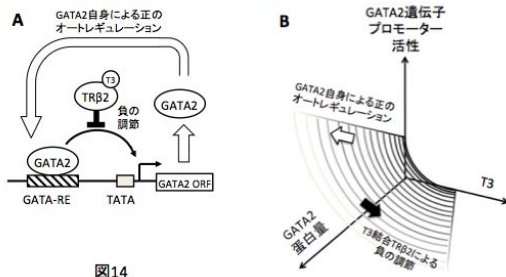


図14

(b)GATA2蛋白量、(c)T3濃度の3者は図14Bに示すような3次元の局面を形成すると考えられる。現在私達は種々のGATA2発現プラスミド、TR 2 発現プラスミド存在下で検討し、この曲面を近似的に記述する関数を作成することを試みている。おそらく偏微分方程式が得られると考えられ、これをシュミレーションする事によって図14Aのモデルが生体内でのリニアログの関係にどこまで寄与しているか考えたい。

(B)今回の結果から、T3で抑制される実の主体はGATA2なのかもしれない。一方、図1、図4に示すようにTSH 遺伝子上や GSU遺伝子上でのGATA2もまたT3結合TR 2によって抑制される。これがリニア・ログ関係の維持には必要なのか否かを確認する必要がある。

(C)trophoblastではエクソン1Sおよびイントロン4のGATA応答配列が機能しているとされるが、下垂体細胞では明らかではない。L T2細胞を用い、まずGATA応答配列でクロマチン免疫沈降法(ChIP)を行う必要がある。

(D)生体内では視床下部傍室核から下垂体に流入する甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)がTSH産生細胞(thyrotroph)内のPKC系を活性化し、TSH、GSUの発現を刺激する。また図10ではGATA2蛋白の発現もまた促進されると予想される。このTRHの産生もT3結合TR 2によって負に調節されることに留意する必要がある。興味深い事にこのTRHの産生に対するT3の効果はまたリニアログの関係になる事が報告されている他、私達は最近TRH自身の発現がGATA2によって活性化されT3結合TR 2によって抑制される可能性を見いだしている。

(E)私達はthyrotroph内の2型脱ヨード酵素(D2)の転写もまたGATA2で活性化され、T3結合TR 2で負に調節されることを見いだした(投稿準備中)さらにPit1遺伝子も同様の制御を受ける事(未発表)やTR 2遺伝子発現もT3で負に調節されることが知られている。前述もTRHも含めて考えると、thyrotrophにおける負の調節の機序は極めて複雑と予想される。全てを包括するモデルの構築は容易ではないが、本研究がその嚆矢となる事を期待したい。

(F) CATレポーターアッセイではTSH-CAT(図2)や+9.5kb-1S-CATの活性(図13)が整数軸、T3濃度が対数軸である。しかし生体内で観察される血清TSHとT3のリニアログの関係ではTSHが対数軸、T3が整数軸である。この相違を説明するのに単純に数学的な操作で解消できるかどうか、あるいは前述の様なTSH 遺伝子上や GSU遺伝子上でのGATA2とT3結合TR 2の関連も考慮する必要があるのかをさらに検討の必要がある。

(G)心筋MHC 遺伝子は心不全のマーカーであり、その発現は転写因子TEADファミリーによって維持される。転写因子MEF2cはそのコアクチベーターとして働き、TEAD1の転写活性化能を5~10倍に増強する。MEF2cの発現もT3で抑制される可能性があることからこれら負に調節される遺伝子の転写制御機構の解明に洞察を与える事が期待される。この点について最近、マイクロRNAであるmiR-133aがT3によって誘導され、これがTEAD1の発現を抑制する可能性が報告された(JCB 22; 207(6)753-766, 2014)。メカニズムの詳細に差があるものの、上流の転写の機能や発現がT3によって制御されるという点では共通部分のあるコンセプトと言える。

(H)TSHほど鋭敏ではないが、GCによるACTH産生の抑制にもリニア・ログの関係が推定される。ACTH前駆体であるPOMCの産生は転写因子Nur77によって維持される。興味深い事に、Nur77の発現はGCで抑制される可能性がある。これは本課題の表題の一部であり、試薬、サンプル(プラスミドなど)はあるものの上記(D)(E)(F)の新たなパラメーターをどのように組み入れるかという問題や人的資源の制約もあったため具体的な実験にはいたっていない。しかし今後TSH、GSUの系でリニア・ログ関係を維持する原理がGCによるACTH産生への負の調節にも当ては拡張できるかどうかを何らかの形で確認する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

甲状腺ホルモン(T3)による転写因子 GATA2 蛋白の発現抑制：TSH へのネガティブフィードバックにおける役割 佐々木茂和、三沢啓子、松下明生、大場健司、岩鬼裕之、松永英之、鈴木伸吾、石塚恵子、中村浩淑 第84回日本内分泌学会 2011年4月23日(神戸)

TSH 遺伝子の転写活性化因子 GATA2 蛋白は T3 によって負に調節される 佐々木茂和、松下明生、大場健司、岩鬼裕之、松永英之、三沢啓子、中村浩淑 第54回日本甲状腺学会 2011年11月22日(大阪)

T3-bound TR inhibits the expression of transcription factor GATA2, which is the key activator for the TSH gene. Shigekazu Sasaki, Hiroko Misawa, Hideyuki Matsunaga, Akio Matsusita, Kenji Ohba and Yutaka Oki The Endocrine Society 's 95th annual meeting & Expo 2013年6月17日(San Francisco)

TSH の発現をT3がリニア・ログの様式で負に調節する機序の解明-in vitro再構成系を用いた検討 平原直子、佐々木茂和、松下明生、黒田豪、中村啓子、森田浩、沖隆 第8回日本内分泌学会 2015年4月23日(東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.hamamatsu-endo.com/sinryoka/group.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐々木茂和 SASAKI, Shigekazu
浜松医科大学医学部附属病院 講師

研究者番号： 20303547

(2)研究分担者

松下明生 MATSUSHITA, Akio
浜松医科大学医学部附属病院 助教
研究者番号： 50402269

(3)連携研究者

()

研究者番号：