

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09425

研究課題名(和文) 甲状腺ホルモンによる甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンへの負の調節機構

研究課題名(英文) GATA2 Mediates the Negative Regulation of the Prepro-Thyrotropin-Releasing Hormone Gene by Liganded T3 Receptor beta2 in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus.

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：T3は甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)産生を阻害するが機序は不明であった。我々はかつて甲状腺刺激ホルモン 鎖(TSH)遺伝子のT3による負の制御ではTSH の発現に必須な転写因子GATA2の機能をT3結合したT3受容体(TR) 2が阻害する事を報告した。今回、TRHニューロンにもGATA2発現が確認された。TRH をコードするpreproTRH遺伝子のプロモーター領域を解析すると機能的GATA応答配列がnt-357/-352に同定された。GATA2による活性化はTR 2存在下でT3により約30%まで低下した。即ちTRHとTSH は共通の機構で負に調節されると考えられた。

研究成果の概要(英文)：T3 inhibits thyrotropin-releasing hormone (TRH) in hypothalamus. Although T3 receptor (TR) 2 is known to mediate the negative regulation of prepro-TRH gene, its mechanism is unknown. We previously studied the T3-dependent negative regulation of the thyrotropin subunit (TSH) gene, and reported that T3-bound TR 2 inhibits the function of transcription factor GATA2, which is essential for TSH expression. Here, we found the expression of GATA2 in the TRH neuron by immunostaining. Using CAT reporter assay, we found that the promoter is activated by GATA2 approximately 6-fold. We identified a functional GATA-responsive element (nt. -357 and nt. -352). When TR 2 was co-expressed, T3 reduced GATA2-dependent promoter activity to approximately 30%. The negative regulation of prepro-TRH gene was maintained even after the mutation of so called negative T3 responsive element. Thus, the prepro-TRH gene may be negatively regulate by the mechanism common to the TSH gene.

研究分野：内分泌学

キーワード：甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン 甲状腺刺激ホルモン 甲状腺ホルモン 甲状腺ホルモン受容体 GATA2 下垂体 視床下部 転写

1. 研究開始当初の背景

視床下部-下垂体-甲状腺(H-P-T)系の恒常性は甲状腺ホルモン(T3)によるネガティブフィードバック(負の調節)によって維持される。下垂体前葉で産生される甲状腺刺激ホルモン(TSH) 鎖、鎖遺伝子、視床下部傍室核(PVN)で産生される甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン(TRH)をコードする preproTRH の遺伝子発現はいずれも T3 受容体 (TR) のノックアウト(KO)マウスで増加する。従って H-P-T系への負の調節機構に TR が関与する事は明白であるが、それ以降の機序は実は不明な点が多い。

T3 の標的遺伝子の約 60%は T3 によって発現が活性化され(正の調節)、残りの約 40%は抑制される(負の調節)。核受容体である TR の機能が解析されてきたのは主に正の調節で、典型的には T3 応答配列(T3-responsive element、TRE)は AGGTCA という配列(half-site)のペアが任意の 4 塩基を挟んで直列に並び、その DNA 上で TR はレチノイド X 受容体と 2 量体を形成し T3 による活性化を媒介する。

一方、前述の負の調節の分子機序は確立しておらず、内分泌学の根幹である H-P-T 系(上述)も例外ではない。永く引用されてきた仮説は preproTRH 遺伝子には site 4 と呼ばれる負の T3 応答配列(negative TRE、nTRE)が存在するという物である(文献 1)。図 1 に示すように nTRE は逆向き単一の half-site であり、TR モノマーが結合すると想像されてきた。その下敷きになったのは TSH 遺伝子で提唱された nTRE であり、やはり単一の half-site 様の配列(GGGTCA)であった(文献 2)。

このような nTRE であったが、half-site の数や配列の違いだけで本当に TR の機能が逆

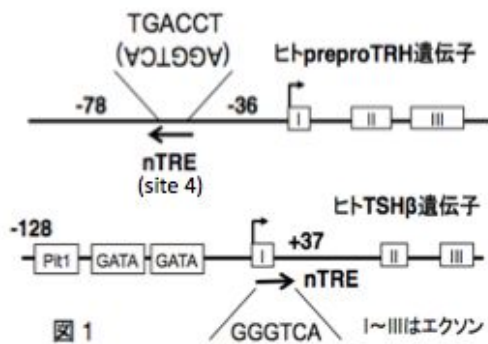


図 1

転するのは確認できていなかった(文献 3、4)。下垂体特異的因子が推定されたが、TRH や TSH の産生細胞 (thyrotroph) を模倣できる実験系は永く存在しなかった。さらに nTRE は以下の様な論理的、実験的な問題点があった(文献 4)。

(a) 甲状腺機能低下症では TSH、preproTRH 遺伝子の発現は上昇する。そこで「負の調節では T3 の結合していない TR は転写の活性化因子である」という仮説が生まれた。TSH プロモーターの欠失解析が行われ前述の

nTRE が報告された(文献 2)。しかしもし TR が TSH や preproTRH 遺伝子の活性化因子であるならば、TR-KO マウスでは T3 濃度によらず両者の発現は減弱するはずである。しかし現実には TSH や preproTRH 遺伝子発現はむしろ増加していた。すなわち nTRE の定義自体の見直が必要であった。

(b) 上記の preproTRH 遺伝子に加え、多くの報告で nTRE の同定についてはルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として用いていた。しかし、私達の報告(文献 5)も含め既に 4 論文でルシフェラーゼ遺伝子がアーチファクトとして T3 結合 TR による負の調節を生じる事が報告されている。

(c) preproTRH 遺伝子の nTRE と TR の結合に関する gelshift assay を用いた検討では TR のモノマーの結合が推定された。しかしこの方法では i) 過剰量の TR による人為的結合が除外できない。ii) モノマーでは受容体選択性は説明困難である。これはクロマチン免疫沈降(ChIP)でも解消され得ない問題である。(d) 驚くべき事に TSH 遺伝子の nTRE が報告された論文(文献 2)で使われた HEK293 細胞は TR が発現していない事が判明した(文献 4)。

ところで thyrotroph の分化を決定するのは転写因子 Pit1 と GATA2 であり、TSH 発現に必須でもある事が知られている(文献 6)。私達は下垂体と無関係な腎由来 CV1 細胞でさえ Pit1、GATA2 および下垂体特異的 TR である TR 2 も共発現させると、負の調節が容易に観察できるという意外な事実を見いだした(文献 7)。そして以下の結論を得た(図 2)。

CV1 は正の調節の研究で頻用された細胞で

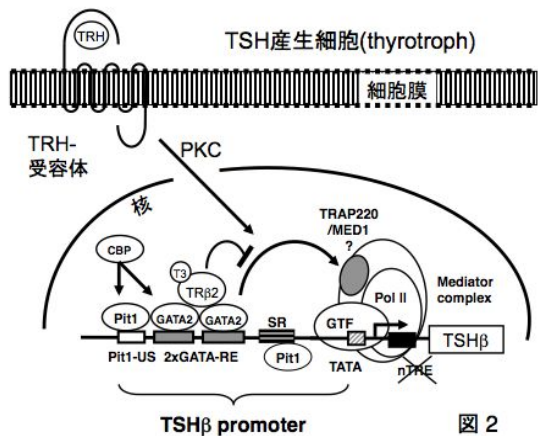


図 2

ある。Pit1、GATA2、TR 2 さえ共存すれば負の調節が観察できるという事実は他の下垂体特異的な因子はなくとも負の調節が起こり得る事を意味した。

Pit1 と GATA2 の内、TSH 遺伝子の真の活性化因子は GATA2 であり、Pit1 は GATA2 の機能の安定化に必要であった(文献 8)。

TRH 受容体のシグナルは GATA2 の転写活性化能を刺激する事で TSH 発現を増強した(文献 9)。

既報の nTRE を徹底的に破壊しても負の調節は維持され、nTRE は必要ない事が分かった。

TSH の負の調節の本質は TR の DNA 結合領域が 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であり、nTRE(すなわち DNA)に直接結合するのではないことが判明した。

ビタミン D3 やレチノイン酸を各々の受容体存在下で投与しても負の調節は認めず、GATA2 の文脈でも正の調節と同じく受容体選択性が観察された。

T3 は TSH の 鎖遺伝子の発現も抑制するが、そのプロモーター活性も CV1 細胞で GATA2 により刺激され T3 結合 TR で抑制された(④～文献 10)。心筋ミオシン重鎖 (MYH7) 遺伝子も T3 で抑制されるが、その nTRE も負の調節には不要な事を私達はまた報告している(文献 11)。

負に調節される遺伝子の内、preproTRH 遺伝子は視床下部傍室核(PVN)の TRH ニューロンが産生する。その負の調節には以下のように GATA2 が関与する可能性がある。

1.前述のように TSH 遺伝子の真の活性化因子は GATA2 である。GATA2 は元々血球系の化に必須な転写因子として報告された。しかし興味深い事に GATA2 は血球系や下垂体 thyrotroph ばかりでなく、種々の神経細胞にも発現が認められる。

2.血清 T4 の濃度上昇に伴って TSH は減衰するが、単なる反比例ではなく TSH は指数関数的に減衰する(リニア・ログの関係)。実は PVN の preproTRH の発現も T4 によってリニア・ログの関係で減弱する(文献 12)。この事は下垂体の TSH の遺伝子と共通したシステムで視床下部の preproTRH 遺伝子が制御されている可能性を示唆する。

3.前述のように preproTRH は視床下部の PVN で産生される。PVN の発生には転写因子 Sim1 が必須である事が知られている(文献 13)。大変興味深い事にニューロン由来 Neuro2a 細胞を用いた Sim1 の標的遺伝子の網羅的検討では GATA2 と TR 2 の mRNA がそれぞれ 2.56 倍、2.90 倍に誘導される事が報告された(文献 14)。これは PVN ニューロンの核内に GATA2 と TR 2 が存在することを示唆する。また Sim1 のヘテロ KO マウスでは preproTRH 発現が低下する事も報告された(文献 15)。

2. 研究の目的

本研究は T3 による preproTRH 遺伝子発現への負の調節のメカニズム、特に転写因子 GATA2 が関与する可能性について追求する。

3. 研究の方法

PVN の TRH ニューロンにおける GATA2 蛋白の発現についてはラット視床下部の凍結切片を作製し、TRH ならびに GATA2 に対する特異抗体で 2 重免疫染色を行った。-547~+84bp の領域を有するラット preproTRH プロモーターを CAT レポーター遺伝子に融合して GATA2 発現プラスミドと共に CV-1 細胞にコトランスフェクションし、欠失解析ならびに変

異解析を行い(図 3)、GATA 応答配列(GATA-RE)を同定した。また TR 2 を共発現して T3 による負の調節を確認した。また甲状腺様癌由来の CA77 においては GATA2 を共発現し同

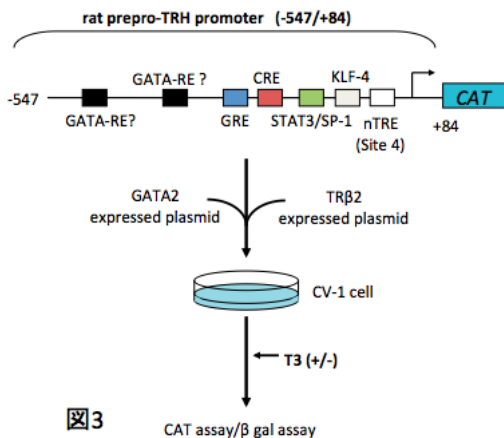


図3

様の解析を行った。

4. 研究成果

まず、ラット PVN の凍結切片を作製し TRH ならびに GATA2 に対する抗体で 2 重染色を行ったところ、TRH ニューロンにおける GATA2

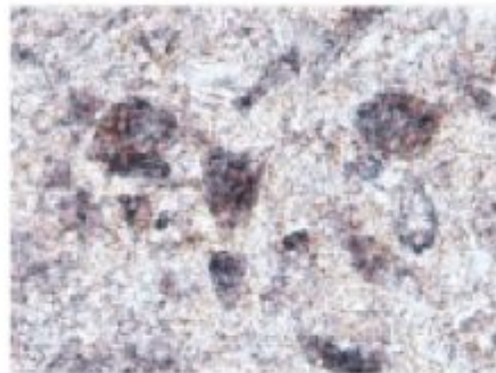


図4 TRH はHRPで細胞質に褐色に、GATA2はALPで核内に青色に染色(x100)。

の局在が示された(図 4)。ラット preproTRH プロモーターを用いたトランスジェニックマウスの検討から -547~+84bp の領域に視床

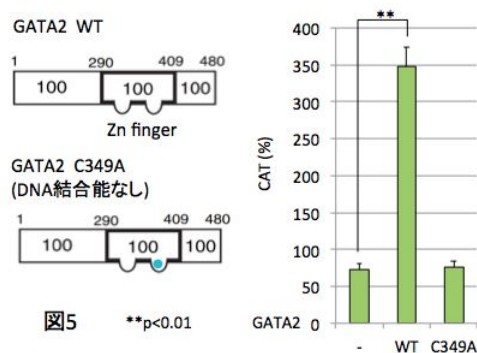
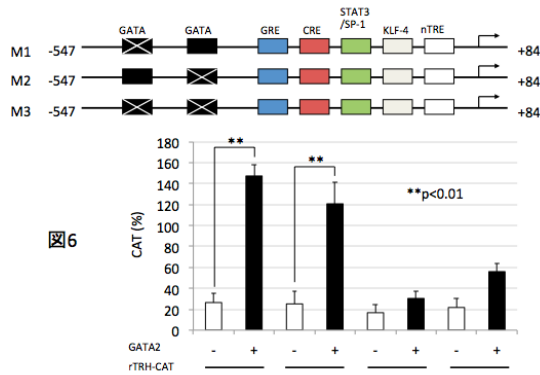


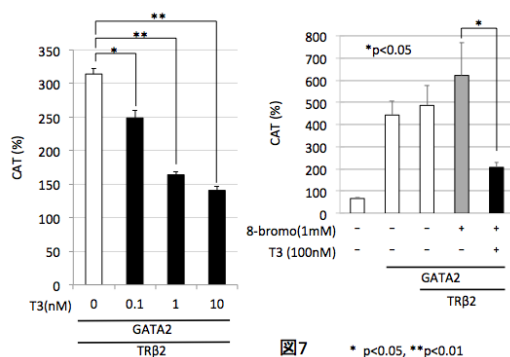
図5

下部特異的な強い転写活性がある事が報告されている(文献 16)。私達は-547~+84bp の preproTRH プロモーター領域をルシフェラーゼでなく CAT レポーター遺伝子に融合し rTRH-CAT を作製した(図 3)。CV1 細胞でレポーターアッセイを行うと、その転写活性は

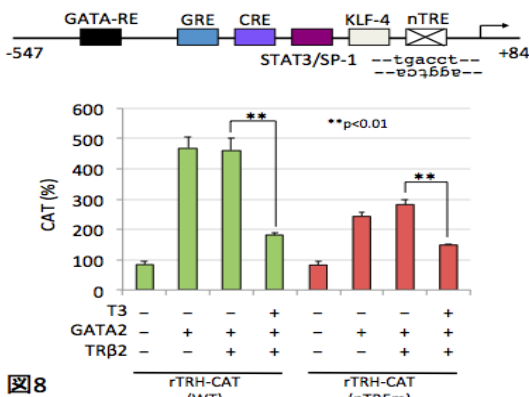
GATA2 発現プラスミドによって約 5 倍に上昇し、DNA 結合能が障害された変異体 (C349A) では活性化を認めなかった (図 5)。preproTRH プロモーターの欠失ならびに変異解析から



機能的 GATA-RE の存在が明らかとなった (図 6)。視床下部の主な TR もまた TR 2 であるが (文献 4)、その発現プラスミドも共発現すると、T3 存在下で rTRH-CAT の活性は約 40% に抑制された (図 7 左)。PVN での preproTRH 発現は 4 型メラノコルチン受容体 (MC4R) を介する PKA シグナルで活性化される (文献 17)。

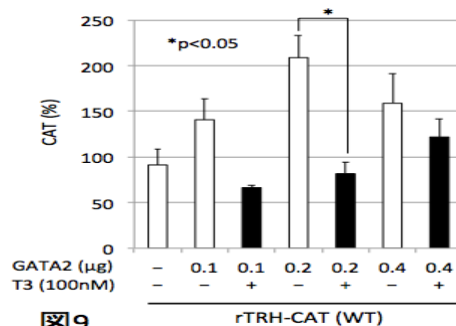


実際 preproTRH プロモーター活性は 8-bromo-cAMP によって刺激された。しかしこの活性は T3 結合 TR 2 によって抑制され、T3 による負の調節の方が PKA 系よりも優位であると考えられた (図 7 右)。preproTRH 遺伝子において提唱されてきた nTRE (site4) を破壊しても T3 結合 TR による負の調節は維持され、この配列は preproTRH 遺伝子への負の調節には必要ないと考えられた (図 8)。甲状腺

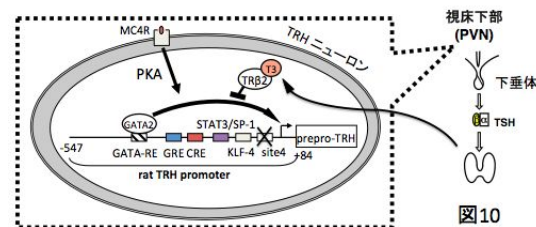


髄様癌由来の CA77 細胞には転写因子 KLF10 が存在し preproTRH 発現を維持している事が

知られている。私達はこの細胞には GATA2 が存在しないが、内因性 TR 2 が少量発現している事を確認した。実際、CA77 細胞に GATA2 を強制発現すると T3 添加によって負の調節が観察された (図 9)。



以上より (A) PVN の TRH ニューロンには GATA2 が発現していること、(B) preproTRH 遺伝子には機能的 GATA-RE が存在し GATA2 によって活性化されること、(C) GATA2 依存性の preproTRH プロモーターの活性を T3 結合 TR 2 は負に調節すること、(D) この抑制は MC4R の下流の PKA シグナルよりも優位である事、(E) 既報の nTRE (site4) は負の調節には関わらない事が判明した。従って T3 による視床下部における TRH 発現への負の調節のメカニズムは下垂体 thyrotroph へのそれと基本的におなじメカニズムが存在すると考えられた (図 10)。



【文献】

- Hollenberg AN. et al. Mol Endocrinol.9:540-50,1995
- Wondisford FE. et al. J. Biol. Chem. 264: 14601-4,1989
- Sasaki S. et al. EMBO J. 18: 5389-98, 1999
- Sasaki S, et al. Vitam Horm. 106: 97-127, 2018
- Misawa H. et al. PLoS One. 7: e28916,2012
- Dasen JS. et al. Cell. 97: 587-98, 1999
- Nakano K. et al. Biochem J. 378 (Pt 2): 549-57, 2004
- Kashiwabara Y. et al. J Mol Endocrinol. 42:225-37, 2009
- Ohba K. et al. PLoS One. 6: e18667, 2011
- Matsushita A. et al. Mol. Endocrinol. 21: 865-84, 2007
- Iwaki H. et al. PLoS One. 9: e88610,2014
- Fekete C et al. Front Neuroendocrinol. 28: 97-114, 2007
- Michaud JL et l. Genes Dev. 12: 3264-75, 1998
- Liu, C et al. J Biol Chem 278: 44857-67, 2003
- Kublaoui BM. Et al. Mol. Endocrinol.22:1723-1734, 2008
- Balkan W. et al. Endocrinology 139: 252-259, 1998
- Vella KR. Et al. Cell Metabolism 14: 780-790, 2011

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 1 件)

黒田豪、松下明生、佐々木茂和 甲状腺臨床

の最前線:T3による甲状腺刺激ホルモン 遺伝子の転写制御-負の調節は解明できるか-最新医学 72(10)19-23, 2017

〔学会発表〕(計 6 件)

佐々木茂和、三沢啓子、松下明生、大場健司、松永英之、沖隆 preproTRH 遺伝子における転写因子 GATA2 ならびに T3 受容体 2 の作用 第 90 回日本内分泌学会学術総会 2013.4.25~27. (仙台)

Kuroda G, Sasaki S, Matsushita A, Nakamura H, Yamashita M, Oki Y. The role of GATA2 in the negative regulation of the prepro-thyrotropin-releasing hormone gene by liganded T3 receptor

2. Annual meeting of Endocrine Society 2017.04 (Orlando, USA)

黒田 豪、佐々木茂和、松下明生、中村啓子、沖隆: preproTRH 遺伝子の T3 によるネガティブフィードバック機構には転写因子 GATA2 が関与する. 第 90 回日本内分泌学会学術総会 2017.4.20~22. (京都)

黒田 豪、佐々木茂和、松下明生、中村啓子、酒井勇輝、沖 隆 T3 による prepro-TRH 遺伝子の負の調節における転写因子 GATA2 の役割と視床下部傍室核における GATA2 の局在 第 60 回日本甲状腺学会学術集会 2017.10.5~7. (別府)

Kuroda G, Sasaki S, Matsushita A, Sakai Y, Nakamura H, Oki Y. GATA2 Mediates the Negative Regulation of the prepro-thyrotropin-releasing hormone gene by liganded T3 receptor $\beta 2$ in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. Annual meeting of Endocrine Society 2018.03 (Chicago, USA)

黒田 豪、佐々木茂和、松下明生、酒井勇輝、中村啓子、沖隆: 甲状腺ホルモンによる負の転写調節: 視床下部と下垂体に共通な分子機構は存在するか? 第 91 回日本内分泌学会学術総会 2018.4.26~28. (宮崎)

〔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 :

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 :

(4) 研究協力者

()