

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591092

研究課題名（和文）

2型脱ヨード酵素遺伝子制御機構の解析

研究課題名（英文）

Molecular mechanism of the type 2 deiodinase gene transcription

研究代表者

中村浩淑 (Hirotohi Nakamura)

浜松医科大学 医学部 教授

研究者番号：60164331

研究成果の概要（和文）：下垂体甲状腺刺激ホルモン産生細胞、ならびに骨格筋における2型脱ヨード酵素遺伝子の転写調節メカニズムの解析をおこなった。

研究成果の概要（英文）：We have studied the molecular mechanism of the transcriptional regulation of the type 2 deiodinase gene in the thyrotrophs and skeletal muscle cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計			4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

甲状腺より分泌される thyroxine (T4) はプロホルモンと考えられ、5'-脱ヨード反応によって活性型の tri-iodothyronine (T3) へ変換される。この反応を触媒する脱ヨード酵素 (deiodinase) には1型、2型、3型があるが、2型脱ヨード酵素 (D2) のノックアウトマウスのみが T3 による甲状腺刺激ホルモン (TSH) 産生に対する抑制（ネガティブフィードバック）を障害される。D2 は下垂体での発現が著明で、T3 とその受容体 (TR) により負の調節を受けることから、下垂体-甲状腺系における恒常性維持に重要と考えられている⁶。D2 はまた骨格筋に発現している主要な脱ヨード酵素でもある。従って生理的条件下で全身の T3 濃度を規定し、エネルギー代謝の要となる分子であると考えられる。D2 遺伝子が T3 により転写レベルで抑制されることは極めて重要であるが、分子機序は明らかになっ

ていない。D2 のヒト心筋、甲状腺での発現制御には cAMP、Nkx-2.5、GATA-4、TTF-1 など種々の因子の関与が報告されている。また近年、細胞膜に存在する胆汁酸受容体のシグナルが蛋白リン酸化酵素 A (PKA) を介して D2 プロモーターを刺激し、インスリン抵抗性を改善する事が報告されている。一方、下垂体の TSH の産生細胞においてはその分化を決定するのは転写因子 Pit1 と GATA2 であり、また骨格筋分化に特異的な転写因子としては serum responsive factor (SRF) が知られている。これらはそれぞれ TSH 産生細胞、骨格筋細胞の表現型を決定する因子であるが、D2 発現における意義は不明である。本研究において下垂体ならびに骨格筋における T3 による D2 遺伝子への負の調節機序を検討した。

2. 研究方法

① レポーターアッセイ：本研究では従来か

ら T3 による転写活性化 (正の調節) の解析に頻用されて来た腎由来の CV1 細胞のほか、下垂体 TSH 産生細胞由来の T α T1 細胞、成長ホルモン産生細胞由来の GH3 細胞、骨格筋由来の C2C12 細胞を用いた。ヒト D2 プロモーターに CAT 遺伝子を結合させ、レポーター遺伝子を作成した (以下 hDIO2-CAT)。下垂体の分化に関わる転写因子として GATA2、Pit1、骨格筋の分化に関わる転写因子として SRF が知られている。また T3 受容体 (TR) としては下垂体では TR β 2、骨格筋では TR α 1 が主に発現している。これらの発現プラスミドを hDIO2-CAT と共にリン酸カルシウム法で CV1 細胞に遺伝子導入した。24 時間後に培地を交換し、T3 (0~1 μ M) を添加した。さらに 24 時間後に細胞を回収し、CAT 活性を測定した。またヒト D2 プロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合させ、レポーター遺伝子を作成した (以下 DIO2-hRluc)。内因性に TR β 2 を発現する下垂体 TSH 産生細胞由来 T α T1 細胞、成長ホルモン産生細胞由来 GH3 細胞あるいは骨格筋由来 C2C12 細胞を用いて、DIO2-hRluc を、GATA2 と共にリポフェクション法で遺伝子導入した。5 時間後に ligand として T3 (0~1 μ M) を添加し、さらに 24 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を評価した。

② ゲルシフトアッセイ: CV-1 細胞にトランスフェクションを行って GATA2 を発現させ、その核抽出液を採取した。後述する 2 つの GAT を含む配列 (図 1A) のセンス、アンチセンス DNA をアニールさせ γ -³²P-ATP で放射ラベルした。これを CV1 細胞の核抽出液とを室温で 20 分インキュベートした。結合反応は 10mM HEPES-NaOH (pH 7.9), 50mM KCl, 0.1mM EDTA, 10% glycerol, 0.5mM dithiothreitol を含んだ buffer と 0.1mg/ml poly (dI-dC) の条件で行い、1 レーンあたりの総量が 20 μ l となるよう調整した。インキュベートした complex を 5% polyacrylamide gel に 150V で 2 時間泳動し、その後ゲルを乾燥させ、FLA-3000 オートラジオグラフィーを用いて評価した。

3. 研究成果

I. 下垂体における D2 遺伝子の転写制御

転写因子 GATA2 は GATA という DNA 配列に結合する事が知られている。hDIO2 プロモーターの配列をコンピュータサーチすると、GATA 配列が 4 つ見いだせた (図 1A)。さらに Pit1 結合配列類似の配列が予想された。CV-1 細胞を用いたレポーターアッセイの結果、hDIO2-CAT の活性は Pit1 は基礎活性に影響しなかったが GATA2 を共発現させることにより 10~20 倍上昇した (図 1B)。

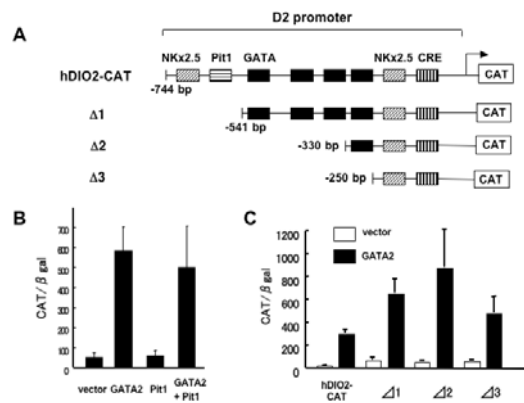


図 1

次に 3 種類の D2 プロモーターの欠失変異体を作成した (図 1A)。意外な事に既報の GATA サイトを全て欠如した場合 (Δ3) でも、基礎活性は維持され、これら GATA という配列はこのプロモーターの活性化には必須でないと考えられた。Δ3 よりも下流には GATA という配列は存在しないが、GAT あるいは GATC という配列も GATA-RE として機能することが知られている。D2 プロモーターの cAMP 応答領域 (CRE) の直下に 2 箇所の GAT 配列、その逆行の 2 箇所の ATC 配列が存在することを見出した (図 2A)。そこでその欠失変異体 Δ4、Δ5 を作成したところ、Δ4 では基礎活性が残存していたが、Δ5 では活性が有意に低下していた (図 2B)。

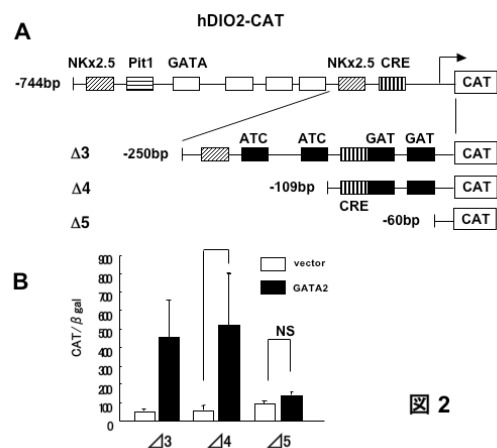


図 2

いずれか一方あるいは両方に変異を導入し (図 3A)、内因性に GATA2 を発現している下垂体 TSH 産生細胞由来の T α T1 細胞でレポーターアッセイを行ったところ、D2 プロモーターの活性化は低下した (図 3B)。

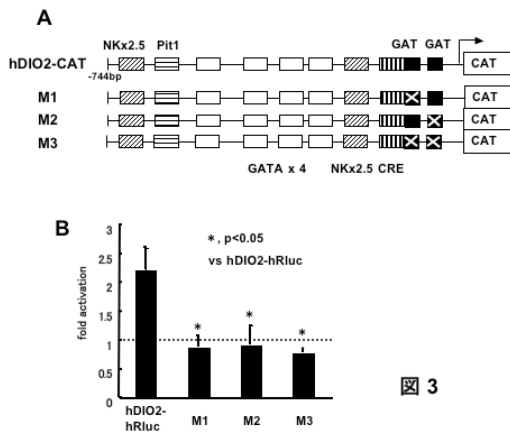


図 3

これら 2 つの GAT を含む配列のプロープ (Wt、図 4A) を放射標識し、ゲルシフトアッセイを行った。蛋白として GATA2 を発現させた CV-1 細胞の核抽出液と反応させたところ、バンドが出現した(図 4B)。このバンドは cold competitor (M1-M3、図 4A) で消失し、さらに GAT 配列を破壊した oligo DNA では競合が消失した。また GATA 抗体でスーパーシフト (SS) することから GATA2 の結合が証明された(図 4B)。2 つの GAT 領域にプライマーを設定し(図 4C)、T α T1 細胞を用いて chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay を行った。GATA2 に対する特異抗体で PCR 増幅産物の増加傾向を認めた(図 4D)。

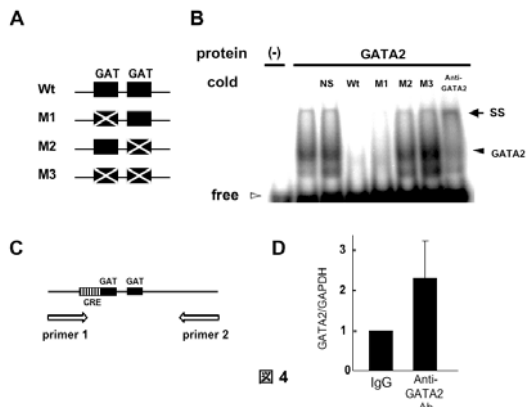


図 4

今回我々が発見した GATA-RE の直上には典型的な CRE が存在する(図 5A)。そこで蛋白リン酸化酵素 A(PKA) の活性化剤である forskolin を添加したところ、され単独では 2 倍程度の活性の上昇であったが、ここに GATA2 を共存させると相乗的な上昇が認められた。同様の所見は T α T1 細胞でも認められた。

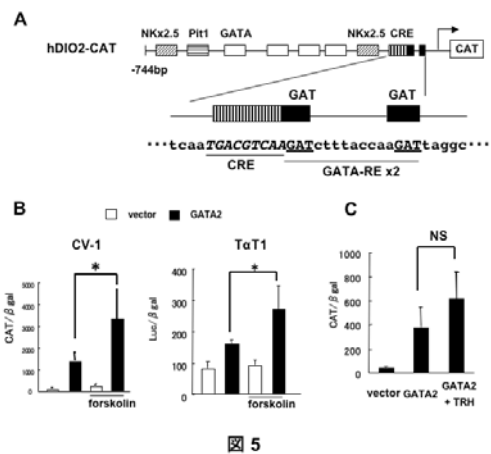


図 5

TSH β 遺伝子プロモーターに GATA-RE が存在し、TRH 受容体からのシグナルによって GATA2 の転写活性化能が促進されることを我々は最近報告した (PLoSOne. 2011 6(4): e18667)。hDIO2-CAT の活性は、TRH と TRH-R を共発現させると、GATA2 単独刺激の場合よりも増加したが、その割合は約 1.6 倍と軽度であり、GATA-RE 配列の違いによる可能性が示唆された(図 5C)。

すでに我々は、GATA2 による転写活性化が T3 結合 TR による TSH β プロモーターへの負の調節の本質であることを報告している (Mol Endocrinol. 2007, 21(4):865-84)。そこで TR β 2 を共発現させた条件下で hDIO2-CAT への T3 の効果を検討した。転写活性は T3 依存性に抑制され(図 6A)、この抑制は forskolin であらかじめプロモーター活性を増強しておいた場合にも認められた

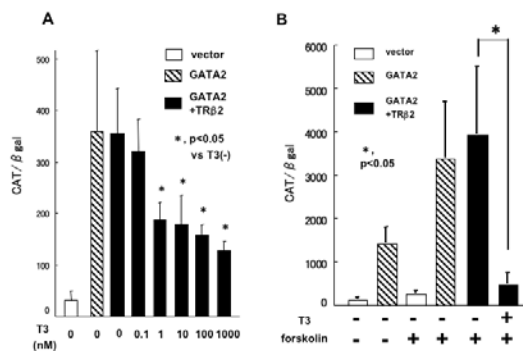


図 6

(図 6B)。PKA 系による刺激よりも T3 による負の調節の方が優位であると考えられた。内因性に Pit1 と TR β 2 が発現している下垂体 GH3 細胞に GATA2 を共発現すると、hDIO2-luc の活性はやはり T3 依存性に抑制された(図 7)。

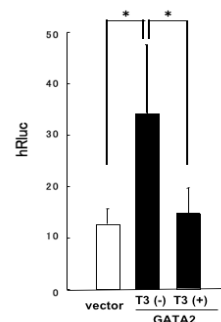


図 7

II. 骨格筋における D2 遺伝子の転写制御

膜型胆汁酸受容体のシグナルは PKA 系を介して D2 プロモーターに存在する CRE を刺激する事が知られている。CV1 細胞を用いたレポーターアッセイで調べると forskolin による PKA の活性化は T3 結合した TR α 1 によって抑制を受ける事が分かった(図 8A)。一方、骨格筋の分化に関わる転写因子として SRF が知られている。我々は CV1 細胞に遺伝子導入した hDIO2-CAT の活性が SRF の共発現で著しく増強することを見いだした。しかし forskolin による活性化と異なり T3 結合 TR α 1 による負の調節は軽微であった(図 8 B)。

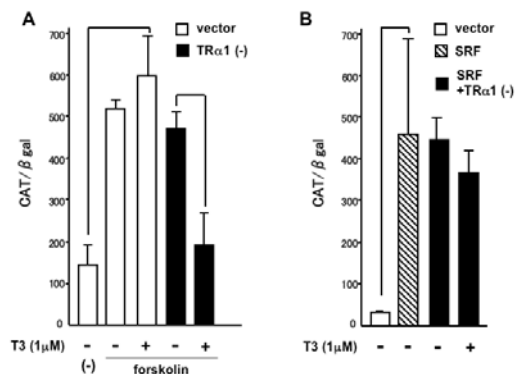


図 8

SRF の発現は運動など機械的刺激で増加することが知られている。そこで骨格筋由来の C2C12 細胞に SRF を過剰発現させたところ、T3 結合 TR α 1 が存在していても hDIO2-CAT 活性は用量依存的に増加した(図 9)。PKA とは異なり SRF を介する経路は T3 による負の調節に対し抵抗性である可能性が考えられる。

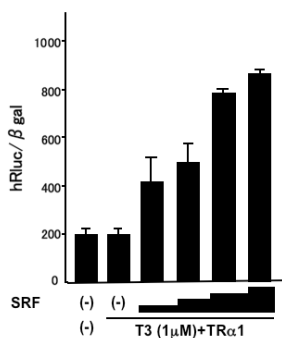


図 9

考察

1. 下垂体 TSH 産生細胞における D2 の発現調節について

末梢の甲状腺ホルモンの標的臓器では D2 酵素はユビキチン化され、その過程は T4 によって促進される。すなわち D2 の酵素活性はむしろ翻訳後の段階で制御される。これと対照的に下垂体 TSH 産生細胞では D2 はむしろ転写レベルで制御されており、T3 による負の調節が重要であることが報告されている (Endocrinology 147: 1735-1743, 2006)。T3 が TSH 産生を抑制することは良く知られているが、D2 が T3 で抑制されることが下垂体-甲状腺系においてどのような意義を持つのかは明らかでない。下垂体 TSH 産生細胞において、T3 は TSH 産生に対し負に働く一方、D2 の転写を抑制することで細胞内 T3 濃度の増加を抑えている。このような相反する微妙な調節機構で、刻々と変化する血清 T4 レベルをリアルタイムに TSH 産生に反映させているのかもしれない。この点については今後の検討である。

今回の検討で下垂体 TSH 産生細胞において GATA2 が D2 産生への負の調節にも関与していることを明かにした。GATA2 は D2 の基礎転写活性ならびに PKA 依存性の活性を維持し、その活性は T3 結合 TR β 2 によって抑制された。TSH β プロモーターにも GATA-RE が存在する。我々はこれまでに (1) このプロモーターの真の活性化因子は Pit1 でなく GATA2 であること、(2) GATA2 は TR β 2 と相互作用して T3 による負の調節を担っていること、(3) さらに GATA2 は TRH 受容体からのシグナルを媒介することを報告してきた。今回の検討で、D2 は TSH β と同じく GATA2 で活性化されるが、TRH シグナルによる刺激効果はより軽微であった。一方、D2 とは対照的に GATA2 と Pit1 による TSH β 遺伝子プロモーターの活性化には PKA は極めて軽微な影響しか及ぼさない (PLoS One. 2011 6(4):e18667)。このことは、D2 と TSH はどちらも T3 で負の調節を受けるが、両者の基礎転写活性はそれぞれ異なった機序で維持されていることを意味する。このような差異は D2 と TSH β プロモーターが異なる GATA-RE 配列を有する事、あるいは D2 では CRE の直下に存在している事と関係しているのかもしれない。下垂体 TSH 産生細胞における PKA 系がどのようなメカニズムで活性化されるかは現在明らかではないが、それが T3 によるネガティブフィードバックのセットポイントを制御している可能性があり、今後の検討課題と考えている。

2. 骨格筋における D2 の発現調節について

骨格筋の細胞膜には胆汁酸受容体が存在して PKA を介して D2 発現を促進する事が報

告されている。しかし図8に示すように、PKA系の刺激によって促進されるD2の発現は骨格筋内のT3を増加させてD2発現を抑制し、PKAの効果を打ち消す可能性がある。一方、骨格筋特異的転写因子SRFによるD2プロモーターの活性化はT3による負の調節を受け難い(図8B、9)。SRFの発現は運動刺激によって増加する。今回得た所見は運動によるインスリン抵抗性改善機序の一つである可能性があり、現在詳細な解析を行っている。

4. 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9件)

2型脱ヨード酵素遺伝子転写調節機序：GATA2の重要性 松永英之、佐々木茂和、松下明生、大場健司、岩鬼裕之、鈴木伸吾、三沢啓子、石塚恵子、中村浩淑 第50回日本甲状腺学会総会、2007年 (神戸)

甲状腺ホルモン(T3)による2型脱ヨード酵素の転写調節機構におけるGATA2の意義 松永英之、佐々木茂和、松下明生、長山浩士、大場健司、岩鬼裕之、鈴木伸吾、三沢啓子、石塚恵子、中村浩淑 第81回日本内分泌学会総会、2008年 (弘前)

T3/T3受容体による2型脱ヨード酵素遺伝子の転写制御機構 松永英之、佐々木茂和、松下明生、大場健司、岩鬼裕之、鈴木伸吾、三沢啓子、石塚恵子、中村浩淑 第51回日本甲状腺学会総会、2008年 (宇都宮)

2型脱ヨード酵素遺伝子の転写調節におけるGATA2の意義 松永英之、佐々木茂和、松下明生、大場健司、岩鬼裕之、鈴木伸吾、三沢啓子、石塚恵子、中村浩淑 第82回日本内分泌学会総会、2009年 (前橋)

心筋における2型脱ヨード酵素の発現調節機構の検討-転写因子GATA2の意義 鈴木伸吾、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、石塚恵子、中村浩淑 第52回日本甲状腺学会総会、2009年 (名古屋)

GATA2 regulates the transcription of type 2 deiodinase in thyrotroph. Hideyuki Matsunaga, Shigekazu Sasaki, Akio Matsushita, Kenji Ooba, Hiroyuki Iwaki, Shingo Suzuki, Hiroko Misawa, Keiko Ishizuka and Hirotohi Nakamura The 9th Congress of the Asia and Oceania Thyroid

Association 2009 (Nagoya)

GATA2はthyrotrophにおける2型脱ヨード酵素の発現を制御する 松永英之、佐々木茂和、松下明生、大場健司、岩鬼裕之、鈴木伸吾、松永英之、三沢啓子、石塚恵子、中村浩淑 (若手奨励賞受賞演題) 第53回日本甲状腺学会総会、2010年 (長崎)

骨格筋における2型脱ヨード酵素の発現調節機構の検討 鈴木伸吾、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、石塚恵子、中村浩淑 第53回日本甲状腺学会総会、2010年 (長崎)

2型脱ヨード酵素遺伝子の転写調節においてGATA2とPKAは相乗的に作用する 松永英之、佐々木茂和、松下明生、大場健司、岩鬼裕之、鈴木伸吾、三沢啓子、石塚恵子、中村浩淑 第84回日本内分泌学会総会、2011年 (神戸)

[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

中村浩淑 (NAKAMURA HIROTOSHI)

浜松医科大学 医学部 教授

研究者番号：60164331

(2) 研究分担者

佐々木茂和 (SASAKI SHIGEKAZU)

浜松医科大学 医学部付属病院 講師

研究者番号：20303547

(3)連携研究者 なし