

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461378

研究課題名(和文) 甲状腺ホルモンとその受容体による転写調節における転写伸長因子の関わり

研究課題名(英文) Involvement of transcription elongation factor in transcriptional regulation by thyroid hormone and its receptor

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺ホルモン(T3)は核内の甲状腺ホルモン受容体(TR)に結合し、標的遺伝子の転写活性を調節することでホルモン作用を発揮している。私達はTRの転写調節に関与する因子の解析から、mRNA合成反応を進行させる転写伸長促進因子P-TEFbの構成要素であるcyclin dependent kinase 9 (CDK9)がTRと結合することを発見した。TRはCDK9を呼び込んで転写伸長反応を進行させることで標的遺伝子の転写活性を増強している可能性が考えられた。

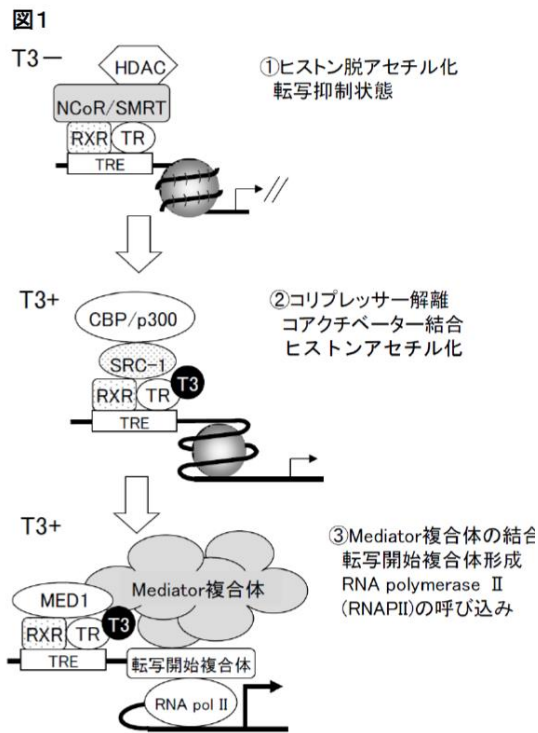
研究成果の概要(英文)：Thyroid hormone (T3) binds to the thyroid hormone receptor (TR) in the nucleus and exerts hormonal action by regulating the transcriptional activity of the target gene. From the analysis of factors involved in transcriptional regulation of TR, we found that cyclin dependent kinase 9 (CDK9), which is a component of the positive transcriptional elongation factor (P-TEFb) that promotes mRNA synthesis reaction, binds to TR. By recruiting CDK9, TR promotes the transcriptional elongation reaction and enhances the transcriptional activity of the target gene.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：甲状腺ホルモン 核内受容体 転写制御 転写伸長反応

1. 研究開始当初の背景

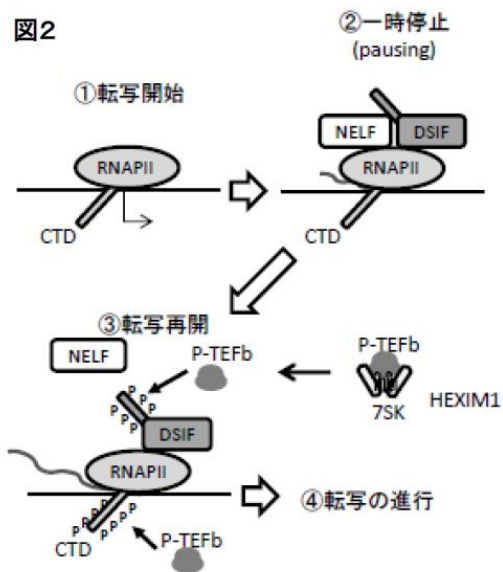
甲状腺ホルモン(T3)は生体の成長、発達、分化、エネルギー代謝などに必須のホルモンであり、その作用は甲状腺ホルモン受容体(TR)を介して発揮される。TRは核内受容体スーパーファミリーの一員であり、T3依存性に標的遺伝子の転写を活性化(正)または抑制(負)に変化させる転写因子として働いている。T3により正に調節される遺伝子では、TRにT3が結合することにより①コリプレッサー(NCoR, SMRT)の解離、②コアクチベータ(p160, CBP/p300)の結合、ヒストンのアセチル化、③メディエーター複合体の結合、基本転写因子およびRNA polymerase II (RNAPII)の呼び込み、が生じ転写が開始される(図1)。



一方、T3/TRによる負の転写調節機構の詳細は明らかとなっていない。さらにT3/TRが、ある遺伝子では正、ある遺伝子では負、というように、転写調節をどのように切り替えており、その切り替えの鍵となる因子は何か、という根本的なメカニズムが不明である。TRの転写制御にはいまだ未知部分が残されている。

最近、多くの遺伝子発現の過程でRNAPIIは転写開始点から下流へ約25-50塩基ほど進

行したところでDSIF, NELFという2つの転写伸長阻害因子が結合して一時停止(pausing)し、mRNA合成が休止することが明らかとなっている。pausingの解除に働くのが転写伸長促進因子positive transcription elongation factor b(P-TEFb)である。P-TEFbはcyclin dependent kinase (CDK)9とcyclin Tからなる複合体である。抑制因子であるHexamethylene bis-acetamide inducible protein 1 (HEXIM1)が解離して活性化状態となると、P-TEFbはRNAPIIの最大サブユニットであるRpb1のC端に存在する7アミノ酸の繰り返し配列(C terminal repeat domain, CTD)の2番目のセリン(Ser2)をリン酸化することでNELFをRNAPIIから解離し、さらにDSIFをリン酸化することによりDSIFを転写伸長促進因子に変化させmRNA合成を進行させる(図2)。



このような転写伸長反応の制御はmRNA合成過程の律速段階となっており、転写調節の重要なステップであるが、甲状腺ホルモンによる転写調節と転写伸長反応との関係を検討した研究報告はなく、我々はこの新たな相互作用発見の可能性があると考えた。

2. 研究の目的

TRと転写伸長因子との相互作用を検討し、TRの転写制御機構に関する新規メカニズムを解明することを目的とする。

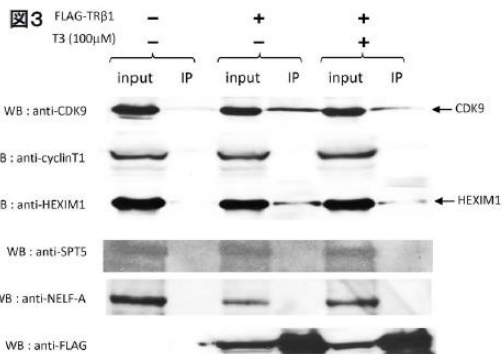
### 3. 研究の方法

- ① TR と転写伸長因子との結合を免疫共沈降法 (Co-IP) で検討し、GST-pull down 法を用いて詳細な結合部位を同定した。
- ② 転写伸長反応の鍵となる P-TEFb の構成要素である CDK9 のキナーゼ活性阻害剤を投与して T3/TR の転写調節への影響を検討した。
- ③ RNAi を用いて CDK9 をノックダウンした場合の T3/TR の転写調節への影響を検討した。

### 4. 研究成果

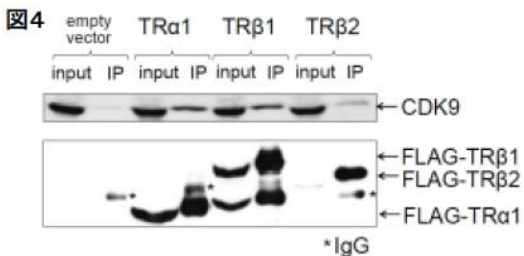
#### ① TR と転写伸長因子の結合の確認

FLAG-TRβ1 発現プラスミドを 293T 細胞に遺伝子導入して核蛋白を抽出し、抗 FLAG 抗体 (Sigma 社) を用いて Co-IP を施行した。結合蛋白は各転写伸長因子特異的抗体を用いてイムノブロットで検出した (図 3)。



P-TEFb の構成要素である CDK9 と TR との結合が認められ、両者の結合は T3 非依存性であった。

次に TR の機能的な 3 つのアイソフォーム TRα1、β1、β2 と CDK9 の結合を FLAG-TR を 293T 細胞に遺伝子導入し Co-IP で確認した。

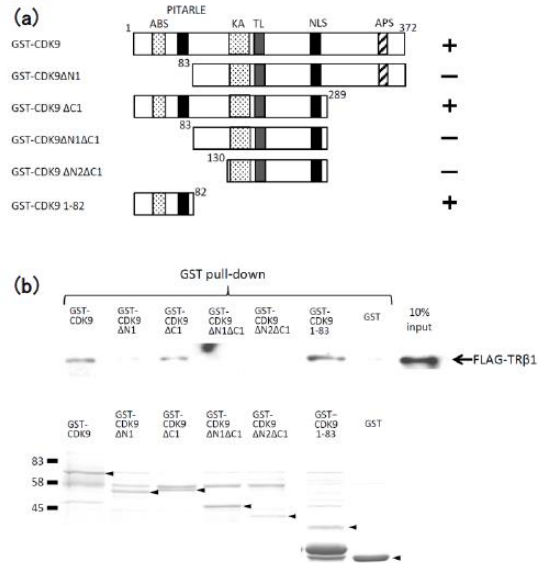


すべての機能的 TR アイソフォームが CDK9 と結合可能であることが示された (図 4)。

続いて CDK9 の各領域を欠失した変異体を GST と結合させた融合蛋白を作成し、GST-pull down 法で TR との結合部位の同定を

行った。

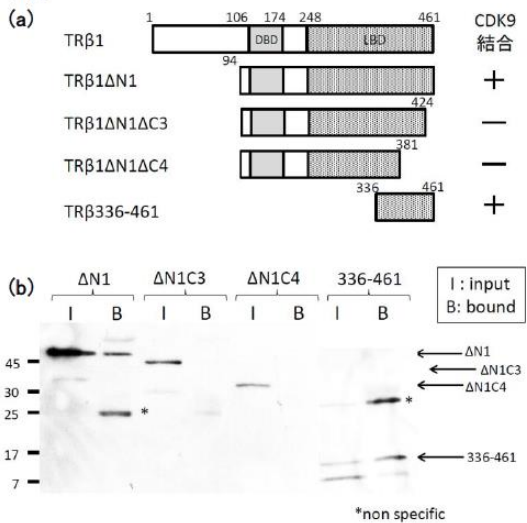
図 5



CDK9 の N 末端の欠失で TR との結合が消失し、CDK9 の N 端 82 アミノ酸のみで TR との結合が確認できた (図 5)。

次に TR の欠失変異を作成し、GST-CDK9 との pull down assay で結合部位を調べた。

図 6



TRβ1 の C 末端を欠失すると結合が消失し、C 端側の 135 アミノ酸のみで両者の結合が確認された (図 6)。

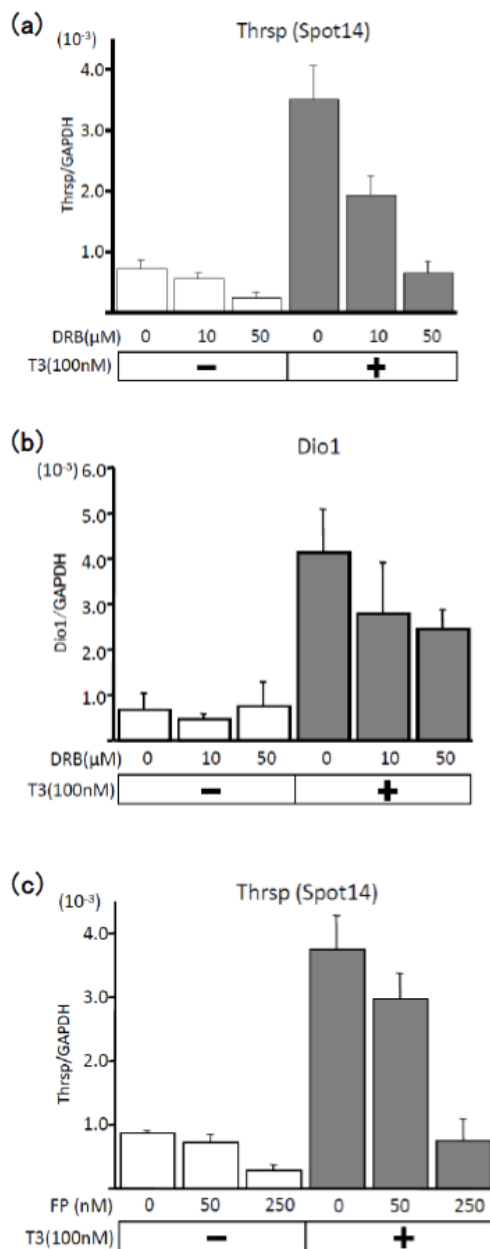
以上から TR の C 末端と CDK9 の N 末端が結合することが示された。

#### ② P-TEFb の阻害剤を用いた検討

CDK9 のキナーゼ活性阻害剤である 5,6-dichloro-1β-D-ribofuranosyl benzimidazole (DRB) と flavopiridol (FP) を下垂体由来の細胞株 LβT2 細胞に添加し、T3/TR 標

的遺伝子の発現に対する影響を定量的 RT-PCR で検討した。

図7



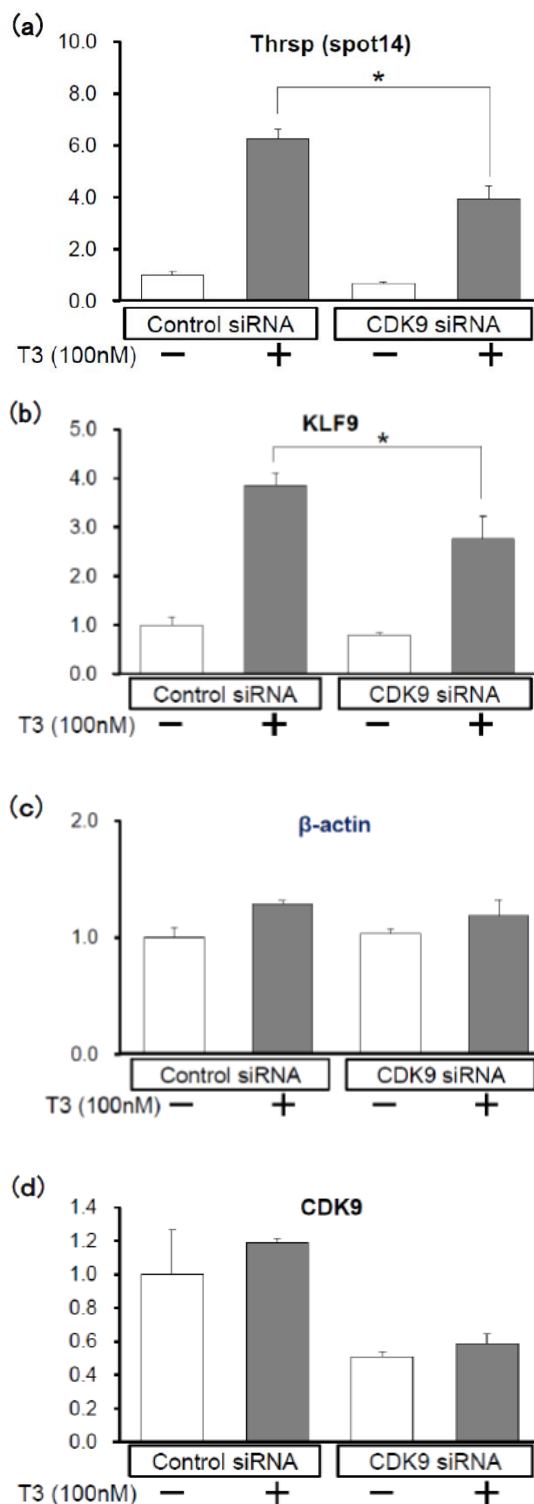
T3により正に制御される thyroid hormone responsive spot14 (Thrsp, Spot14)および1型脱ヨード酵素(Dio1)の発現はDRB, FP添加により濃度依存性に抑制された(図7)。

以上より、薬剤投与によりCDK9の活性を阻害するとT3/TRによる転写活性化が障害されることが確認された。

### ③CDK9のRNAiによるノックダウン

CDK9特異的siRNAをリポフェクション法でL $\beta$ T2細胞に導入し、T3/TRの転写制御への影響を定量的RT-PCRで確認した(図8)。

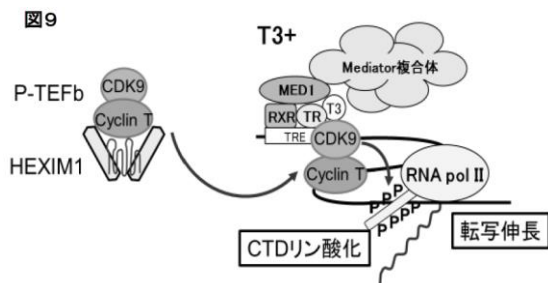
図8



CDK9 siRNAの導入によりCDK9の遺伝子発現を約50%抑制したところ、T3/TR標的遺伝子であるThrsp, KLF9のT3依存性の転写活性化は約30%有意に抑制された。一方、ハウスキーピング遺伝子である $\beta$ -actinの発現はCDK9発現を抑制しても変化しなかった。

この結果からCDK9がT3/TRの転写活性化作用に重要な因子であることが確認された。

TRはT3依存性にRNAPIIを呼び込んで標的遺伝子のmRNA合成を開始させるとともに、CDK9との相互作用を介して転写伸長因子P-TEFbを呼び込んで速やかに転写伸長反応を進行させることで転写を活性化していると考えられた(図9)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Iwaki H, Sasaki S, Matsushita A, Ohba K, Matsunaga H, Misawa H, et al. : Essential Role of TEA Domain Transcription Factors in the Negative Regulation of the MYH 7 Gene by Thyroid Hormone and Its Receptors. PLoS ONE 9(4): e88610, 2014.
2. Matsunaga H, Sasaki S, Suzuki S, Matsushita A, Nakamura H, Nakamura HM, Hirahara N, Kuroda G, Iwaki H, Ohba K, Morita H, Oki Y, Suda T. : Essential Role of GATA2 in the Negative Regulation of Type 2 Deiodinase Gene by Liganded Thyroid Hormone Receptor  $\beta$ 2 in Thyrotroph. PLoS One. 10(11): e0142400, 2015.

〔学会発表〕(計3件)

1. 甲状腺ホルモン受容体は転写伸長因子P-TEFbと結合して転写を促進する. 松下明生, 佐々木茂和, 平原直子, 三沢啓子, 沖隆、日本内分泌学会学術集会、2014年4月24-26日(福岡)
2. Sasaki S, Matsushita A, Nakamura HM, Hirahara N, Oki Y. Thyroid Hormone Receptor (TR) Interacts with Cyclin-Dependent Kinase 9, a Constituent of Transcription Elongation Factor P-TEFb.

Annual meeting of Endocrine Society, June 21-24, 2014. (Chicago)

3. Hirahara N, Sasaki S, Matsushita A, Kuroda G, Nakamura HM, Yamashita M, Oki Y. Molecular aspect of the linear-log relationship between thyrotropin and T3 analyzed by the reconstitution system using reporter assay of the GATA2 promoter in CV1 cells. Annual meeting of Endocrine Society, April 1-4, 2016. (Boston)

〔図書〕(計1件)

松下明生, 佐々木茂和: I 甲状腺の基礎 5. 甲状腺ホルモンの作用: 甲状腺専門医ガイドブック, 診断と治療社, 2016年, p21-25.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

なし

○取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hamamatsu-endo.com/sinryoka/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし