

博士(医学) 柏原裕美子

## 論文題目

Functions of PIT1 in GATA2-dependent transactivation of the thyrotropin beta promoter

(甲状腺刺激ホルモンβ鎖プロモーターのGATA2依存性転写活性化におけるPIT1の機能)

## 論文の内容の要旨

[はじめに]

甲状腺刺激ホルモン(thyrotropin、TSH)はα、β鎖(TSHβ)からなるヘテロ2量体で、ホルモンとしての特異性はTSHβによって決定される。TSHβの発現ならびにTSH産生細胞の分化に必須な転写因子として下垂体特異的なPIT1に加え、元来血球系の転写因子として同定されたGATA2が知られている。TSHβ遺伝子のプロモーターには2つのGATA応答配列(GATA-RE)が存在し、その5'側に機能的なPIT1結合配列(PIT1-US)が報告されている。またGATA-REの下流には種を超えて保存された30塩基対の領域があり、その中にはPIT1-USに類似するが機能は不明の配列(PIT1-like)が含まれる事が報告されている。TSHβ発現にはPIT1との共存が必須であり、事実PIT1遺伝子に変異を有する複合型下垂体機能低下症(CPHD)の症例ではTSHβ発現が障害される。しかし、GATA2は血球系遺伝子の転写を単独で活性化し得ることが知られており、TSHβ発現におけるPIT1の役割は明らかではない。下垂体のTSH産生細胞の分化と機能において、PIT1とGATA2の協調作用は重要な意義を持つと考えられる。本研究では両転写因子の協調作用の分子機構を検討した。

[材料ならびに方法]

プラスミドの作製: ヒトTSHβプロモーターをクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子に挿入しレポーター遺伝子(TSHβ-CAT)とした。TSHβプロモーターはまたレニラルシフェラーゼ遺伝子に融合させ、TSHβ-hRlucを作製した。TSHβ-CATにおけるPIT1-USの変異、PIT1-USとGATA-REによって挟まれる塩基数の改変などは部位指向性突然変異誘発キット(Stratagene社)を用いて作製した。同じようにCPHDで報告された変異PIT1であるE250XとP24Lを作製した。TSHβ-CATにおける種々の欠失あるいは挿入変異体は制限酵素とT4-DNAリガーゼを用いた標準的な遺伝子操作によって作製した。

レポーターアッセイ: TSHβ-CATをリン酸Ca法によって腎由来CV1細胞にPIT1、GATA2、β-ガラクトシダーゼの発現プラスミドと共に共発現させCAT活性を測定した。またTSHβ-hRlucは成長ホルモン(GH)の産生細胞株GH3にGATA2発現プラスミドと共にリポフェクション法にて遺伝子導入しレニラルシフェラーゼ活性を測定した。遺伝子導入効率はβ-ガラクトシダーゼ活性で補正した。

電気泳動移動度シフト法(EMSA): PIT1、GATA2をリン酸Ca法にてCV1細胞に発現させ核抽出液を調整した。PIT1-USとGATA-REの両者を含むDNA断片を<sup>32</sup>Pで標識した。これを核抽出液と反応させた後、電気泳動を行った。

[結果]

CV1細胞におけるTSHβ-CATの活性はGATA2単独では極めて軽微であったが、PIT1を共発現するとGATA2の濃度依存性に活性化された。PIT1-USを変異したTSHβ-CATの活性は

著減していた。同様の所見は内因性に PIT1 を有する下垂体由来 GH3 細胞に GATA2 を共発現した場合においても観察された。変異 PIT1 として DNA 結合能が障害されている E250X および cAMP-binding protein binding protein (CBP) との相互作用に障害がある P24L の機能を調べたところ、GATA2 との協調作用がそれぞれ消失、減弱していた。GATA2 の欠失変異体を用いて検討すると、GATA2 の Zn フィンガー領域(DNA 結合領域)が PIT1 との協調作用には必要であった。EMSA 法の結果では PIT1 と GATA2 は物理的にはそれぞれ独立して DNA に結合していた。一方、PIT1-US と GATA-RE の間の塩基数を増やすと TSH $\beta$ -CAT の活性は減弱し、PIT1 と GATA2 の協調作用は DNA 上での両者の位置関係が規定していた。さらに TSH $\beta$  プロモーターにおいて SR を欠失すると PIT1 依存性が消失し、GATA2 単独での活性化が可能となった。GATA2 への抑制が SR 欠失によって解除される効果はプロモーターの方向や TATA box からの距離には影響されなかった。SR をプローブとする EMSA 法により CV1 細胞には SR に結合する因子 (SR 結合蛋白) が存在することが示唆された。EMSA で検討すると PIT1 は SR 中の PIT1-like 配列に結合することが確認された。さらに SR 結合蛋白の DNA 結合は PIT1 を加えると阻害された。また PIT1-like 配列を破壊すると TSH $\beta$ -CAT における PIT1 と GATA2 の協調作用は消失した。

#### [考察]

Pit1/PIT1 と GATA2 は物理的には独立してそれぞれ PIT1-US と GATA-RE に結合するものの、両者の協調的な作用には相対的な位置関係が重要であった。PIT1 のコアクチベーターである CBP/p300 はまた GATA2 の機能にも必要である。今回の検討から PIT1 と GATA2 が DNA 2 重鎖の同じ側に結合する事が CBP/p300 の呼び込みに必要である可能性が示唆された。

本研究から PIT1 と GATA2 の協調作用は単純な相乗効果ではなく、SR による GATA2 機能の阻害を PIT1 が解除すること(脱抑制)と考えられた。これは下垂体に特異的な TSH $\beta$  遺伝子の発現には PIT1 と GATA2 の共存が必要であることの機序の一つと考えられた。

#### [結論]

PIT1 と GATA2 の協調的な作用は PIT1-US と GATA-RE との相対的な位置関係によって規定される。また GATA2 の活性は SR により阻害されているが、その抑制効果は PIT1 が PIT1-like 配列に結合することによって解除される。PIT1 と GATA2 はこれらの機序によって下垂体における TSH 産生細胞に特異的な TSH $\beta$  発現を維持している。

### 論文審査の結果の要旨

下垂体ホルモン産生細胞は前駆細胞から分化する。今までの研究から、成長ホルモン産生細胞 Somatotrope では転写因子 PIT1 と甲状腺ホルモン受容体(TR)により成長ホルモンが、プロラクチン産生細胞 Lactotrope では PIT1 とエストロゲン受容体によりプロラクチンが、甲状腺刺激ホルモン(TSH)産生細胞 Thyrotrope では PIT1 と転写因子 GATA2 により TSH が発現することが提唱されている。申請者は TSH 産生細胞特異的に発現している TSH $\beta$  遺伝子の転写制御機構を研究課題とした。それまでに、TSH $\beta$  遺伝子の特異的遺伝子発現には、-128 から-29 の領域で十分であり、その中に 1 個の PIT1 結合部位 (PIT-US) と 2 個の GATA

反応性エレメント (GATA-RE) があり、それに結合する 1 個の PIT1 と 2 個の GATA2 の転写因子の協調作用により細胞特異性が説明されていた。

申請者は、まず約 10 塩基の感覚で並んでいる PIT1-US と 5'側の GATA-RE の間に 2 個から 8 個の塩基を挿入した場合、および 5'側の GATA-RE と 3'側の GATA-RE の間に 3 塩基を挿入した場合、PIT1 と GATA2 の協調的転写活性化が低下すること示した。次に、申請者は 3'側の GATA-RE の 3'側に抑制性領域(SR ; -82~-52)が存在することを発見した。SR 内に AP-1 結合部位に似ている塩基配列と PIT1 結合配列に似ている配列が一部重複して存在している。申請者はまず、SR 領域を欠失させると TSH $\beta$  遺伝子の活性化が PIT1 の非存在下でも GATA2 のみによりおこることを示した。そして、多くの実験の結果、PIT1 非存在下では AP-1 結合配列様配列に結合する未知の抑制因子を、PIT1 が PIT1 結合部位様配列に結合することによって結合できなくして、GATA2 による TSH $\beta$  遺伝子の活性化がおこるというまったくあたらしい「脱抑制」メカニズムを見いだした。

本論文は Thyrotrope 内での PIT1 の役割として、従来言われている「活性化」の外に「脱抑制」もあることを初めて示した論文であり、Thyrotrope 内での TSH $\beta$  遺伝子の細胞特異的遺伝子発現についての大きな洞察を与える内容であることを高く評価した。

以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 三浦 直行  
副査 瀬藤 光利 副査 永田 年