

様式4)

学位論文の内容の要旨

(岡村孝志) 印

(学位論文のタイトル)

Pituitary NR4A1 is negatively regulated by thyroid hormone without direct binding of thyroid hormone receptors on the gene.

(下垂体NR4A1の発現は甲状腺ホルモンにより甲状腺ホルモン受容体の遺伝子への直接結合なしに抑制される。)

(学位論文の要旨)

【背景】血中の甲状腺ホルモン(TH)は、視床下部(TRH)-下垂体(TSH)-甲状腺系により制御されている。THは末梢の組織で作用する一方で、視床下部TRHや下垂体TSH合成分泌を抑制しフィードバック系を確立している。

甲状腺ホルモン(TH)の作用は、主に甲状腺ホルモン受容体(TR)を介し標的遺伝子の発現を促進する系と抑制する系がある。促進系では、TH非存在下ではTRは標的遺伝子の甲状腺ホルモン応答領域(TRE)に結合し、NCoRなどのco-repressorがリクルートされ、ヒストン脱アセチル化によりクロマチンは凝集状態にあり転写が抑制されている。THが加わるとco-repressorが解離し、co-activatorがリクルートされてヒストンがアセチル化されクロマチンは弛緩状態になり、種々の転写因子が誘導され転写が活性化される。一方、THによる転写が抑制される遺伝子として下垂体TSH β 遺伝子などがあるが、その詳細な機構は明らかでない。

私たちはTRHノックアウトマウスを用いた検討で、TRHによる下垂体TSH β の転写活性機構にオーファン核内受容体であるNR4A1が関与する事を明らかとした。NR4A1は特異的なリガンドがなく、TRHなどの種々の刺激に応答し短時間にその発現が誘導されるearly response geneである。

本研究では、甲状腺ホルモンによるTSH β 遺伝子抑制系へのNR4A1の関与を検討する一歩として、甲状腺ホルモンによる下垂体NR4A1の制御について検討した。

【方法】1) マウスにTHや抗甲状腺剤を2週間投与し、実験的甲状腺中毒症および機能低下症を作成した。その後、下垂体NR4A1 mRNA発現量をリアルタイムPCRにて定量した。2) TH投与24時間後に同様の検討を行った。3) *in vitro*で甲状腺ホルモンによるNR4A1遺伝子発現への影響を検討するため、内因性TRの発現のないCV-1細胞を用い、NR4A1遺伝子プロモーター領域をルシフェラーゼ発現ベクターに導入したベクターを、リン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、TRやNCoRの強制発現、種々の甲状腺ホルモン濃度でプロモーター活性を検討した。4) CV-1細胞にsiRNAを用い内因性NCoRの発現を減少させ、NR4A1遺伝子プロモーター活性への影響を検討した。5) 種々のTR変異体を用い、NR4A1遺伝子プロモーター活性への影響を検討した。6) 種々のNR4A1遺伝子プロモーターの欠失変異体を作成し甲状腺

ホルモン応答領域を同定した。7) NR4A1遺伝子プロモーター上へのTRやNCoRの結合をElectrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) とChromatin immuno-precipitation (ChIP) アッセイにて検討した。

【結果】 マウス下垂体のNR4A1 mRNA発現は、2週間の薬理的T4を連日腹腔内投与による甲状腺機能中毒症により有意に減少した。しかし、抗甲状腺剤投与による慢性的甲状腺機能低下症では変化は認めなかった。そこでTHによるNR4A1 mRNAの変化は、前日に投与したTHによるものと考え、TH投与24時間後の下垂体NR4A1 mRNAを検討すると、NR4A1mRNAは有意に減少していた。

次にin vitroの検討では、NR4A1遺伝子プロモーター活性はTR β の強制発現によりTH非依存性に刺激され、TH濃度依存性に抑制された。また、同様の系でコリプレッサーNCoRを過剰発現させると、TR β による転写刺激は有意に増加し、THによる転写抑制は減少した。逆に、内因性NCoRをsiRNAにて減少させると、TR β によるNR4A1遺伝子プロモーター活性の刺激はほぼ消失した。

さらに種々の変異TRを用いた検討で、NCoRの解離障害を呈するF455S変異TRによりTH非依存性NR4A1遺伝子プロモーター転写刺激は野生型TRと比較しさらに増加し、DNA結合領域に変異を持つGS125ではTH非依存性TRによる転写刺激、THによる転写抑制のいずれも消失した。

NR4A1遺伝子プロモーターの種々の欠損変異体を用いた検討で、TH応答領域は転写開始点近傍の-27~+152に存在することが判明した。EMSAでは、この領域にTR β との直接結合は認めなかったが、ChIPアッセイでは-147~+148領域にTR β とNCoRのリクルートを認め、TH添加によりいずれも解離した。

【考察】 これまでの多くの報告で、NR4A1は種々の刺激に対しearly response geneとして発現が増加する報告が多い。今回の検討で、THにより下垂体NR4A1発現は抑制され、極めて希な現象を発見した。

私たちは以前、コリプレッサーNCoRが、TRのTRH遺伝子プロモーター活性刺激にコアクチベーター様に作用することを報告した。今回のTHによる下垂体NR4A1の転写抑制機構においても同様の結果であった。したがって、NR4A1とTRH遺伝子のTHによる転写抑制系にはTRやNCoRによる類似の機構が存在することが示唆された。

【結論】 下垂体NR4A1mRNA発現はTHにより抑制される。その機構としてTHはNR4A1遺伝子プロモーターへTRの直接結合なく転写を抑制している。