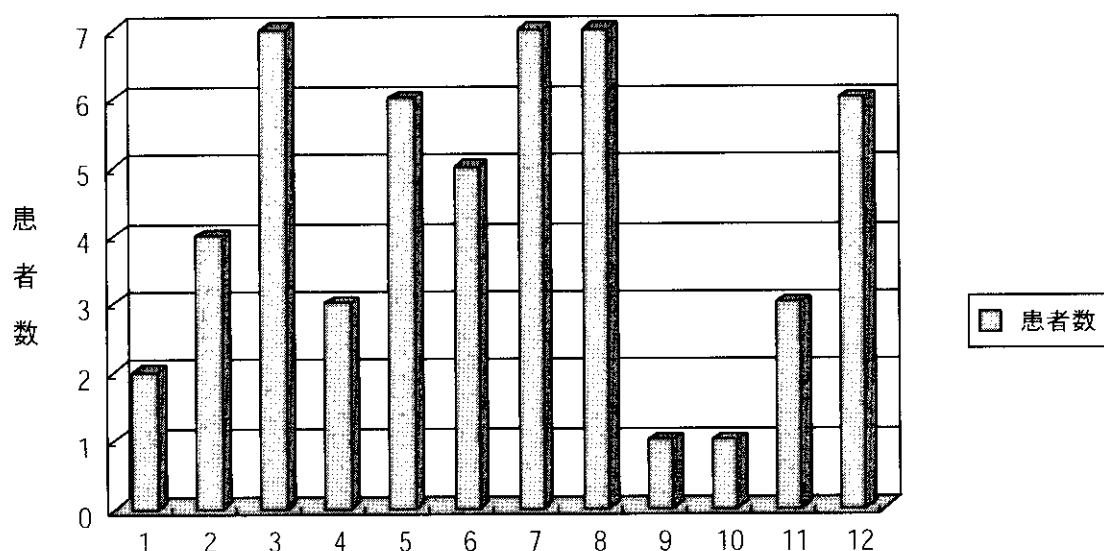


月別再発患者数



近の症例では、休薬時には沈降法ではほとんどの例で陰性、再発時には16/29 (69.0%) で陽性であった。これに対し、固相法では再発前直近の採血時にすでに6/8 (75.0%)、再発時には14/16 (87.5%) で陽性であった。

#### D. 考 察

バセドウ病が春期に多く発症する原因として、アレルギー性鼻炎の関与が示唆されている。系統立った問診は行っていないが、2例で再発前に鼻炎のエピソードが記録されており、因果関係は否定できない。

ヨード欠乏地域であるオーストリアで、食物へのヨード添加開始後に甲状腺機能亢進症の発症時期に季節差が現れ、春夏が秋冬よりも多くなった、との報告がある。米国の文献には季節差を否定するものが多いが、人種差やバセドウ病の診断に眼症を重視するか否か等、対象集団の違いにより、今回の我々の成績と相違した可能性がある。

#### E. 結 論

バセドウ病の再発は春と夏に起こりやすい。固相法TBI I測定法は沈降法よりも鋭敏に再発時に陽性を示す。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表：固相化リコンビナントヒト TSH 受容体を用いるTSH結合阻害性イムノグロブリンの高感度測定法について 笠木寛治、御前隆、小西淳二。ホルモンと臨床、印刷中。
2. 学会発表：笠木寛治、御前 隆、小西淳二。TSH結合阻害性イムノグロブリンの高感度測定法の臨床応用。第44回日本甲状腺学会（沖縄）、2001年11月8-10日

#### H. 知的財産権の出願・登録

なし。

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

バセドウ病における抗TSH受容体抗体の性質と  
治療による甲状腺機能正常化および寛解との関係

分担研究者 網野 信行 大阪大学大学院医学系研究科生体情報医学教授

研究要旨

未治療バセドウ病における抗TSH受容体抗体のうち、刺激型抗体は殆どの例で認められるが、それ以外に阻害型抗体も3分の1の症例で認められた。阻害型抗体共存例では、抗甲状腺剤の初期治療にはより反応しやすいが、寛解し難い傾向が見られた。

A. 研究目的

バセドウ病甲状腺中毒症は、抗TSH受容体抗体により発生するものと考えられている。抗TSH受容体抗体は、甲状腺を刺激しホルモンを過剰産生する刺激型抗体と、TSH刺激作用を阻害する阻害型抗体とに大別できる。最近我々は、バセドウ病においてもかなりの頻度で刺激型抗体のみならず阻害型抗体が共存していることを明らかにした。しかし、これらの抗TSH受容体抗体の性質が患者の病態に及ぼす影響や、抗甲状腺剤治療による反応性や治療後の寛解との関連については全く分かっていない。

今回我々は、バセドウ病における抗TSH受容体抗体の性質と、臨床像および治療効果との間になんらかの関係があるかどうかを検索した。

B. 研究方法

28例の未治療バセドウ病患者を対象として未治療時の臨床症状・所見、抗TSH受容体抗体、抗甲状腺抗体を測定した。さらに抗甲状腺剤に

よる早期治療効果（T4正常化）および疾病寛解との関連を最長13年にわたり経過観察し、検索を加えた。

抗TSH受容体抗体は、radioreceptor assayでTBII、bioassayで甲状腺刺激抗体（TSAb）および阻害型TSH受容体抗体（TSBAbs）を測定した。さらに、感度よく阻害型抗体を測定する方法として抗ヒトIgG-Fab抗体を用いたconversion assayを行い、阻害型抗体の共存の有無を検索した。Conversion assayでは患者血清に応用する前に、in vitroの基礎実験を行い、TSAbおよびTSBAbsを混合し、TSBAbsの混在を確認できるか否かを予め検討した。

C. 研究結果

まず始めにin vitroで阻害型抗体と刺激型抗体との混合実験を行った。TSAb陽性血清に萎縮性甲状腺炎による甲状腺機能低下症患者から得られたTSBAbs血清を0.5～4.0%まで漸増して添加し、検索を行った。混合検体のTBII活性は高値のまま変化はなかったが、TSAb活性がTSBAbsを加えるとともに漸減し、逆にTSBAbs

活性は陽性となった。TSBAb血清の0.5%及び1.0%添加では、TSAAb活性がより強いためTSBAb活性は陰性であったが、conversion assayを行うと陽性となった。これらのことからconversion assayが、共存する微量のTSBAb活性を感度よく検知するのに有用であることが判明した。これらの方法を用いて未治療バセドウ病患者28人を対象にTBII、TSAAb、TSBAbおよびconversion assayによる阻害型抗体活性の測定を行った。最終的に8例(28.6%)に阻害型抗体の共存が確認出来た。バセドウ病28例におけるconversion assayによるconversion ratioはTSBAbと正の相関を、TSAAbと負の相関を示した。阻害型抗体陽性と陰性のバセドウ病患者間で未治療時での甲状腺腫大度、TBII値、TSAAb値、マイクロゾーム抗体価、サイログロブリン抗体価を比較したが、両群間で有意差は見られなかった。抗甲状腺剤治療開始後血中T4正常化までに要する期間は、阻害型抗体共存例(3.0±1.2週, p<0.01)では非共存例(10.7±8.5週)に比べ有意に短かった。逆に寛解までに要する期間(8.0±4.3年, p<0.05)は非共存例(5.1±4.4年)に比し有意に長かった。

#### D. 考 察

抗TSH受容体抗体にはかなりのheterogeneityがあり、我々が少なくとも5つのタイプがあることを明らかにしてきた。このうち刺激型抗体と阻害型抗体とは生物学的に相反する活性を有するものであり、両者が共存している場合は正確な測定が困難であった。これまでの我々の研究及び今回の検索から、測定系の工夫により両抗体の共存が比較的容易に検出できるようになった。以前の我々の検索でバセドウ病の約3割に阻害型抗体が認められたが、今回対象とした

症例でも、bioassayおよびconversion assayを用いた結果、やはり同様に約3割の患者が阻害型抗体を共存していることが明らかにされた。

これまで抗TSH受容体抗体のheterogeneityに関して多くの報告が見られるが、臨床病態との関連を検索した成績はChoらのグループの報告を除くと、殆どみられていない。ましてやバセドウ病の寛解との関連を検索した報告はこれまで全く見られていない。今回、抗甲状腺剤治療により甲状腺機能が正常化する期間は、以前の我々の検索と同様、阻害型抗体共存例ではより早いことが確認された。一方で、予測に反し阻害型抗体共存例では、長期間病態は寛解せず、非共存例に比べ寛解までの期間が有意に長いことが初めて明らかにされた。他の臨床像や抗体価では、両群間に差が見られなかったことから、バセドウ病をより効果的に抗甲状腺剤で治療するためには、未治療時での抗TSH受容体抗体の性質を分析する必要があるものと考えられる。阻害型抗体共存例では、おそらく抗TSH受容体抗体産生系が長期間強く刺激状態になっており、寛解し難いものと推測される。バセドウ病ではTBII、TSAAb抗体を測定するのみならず、阻害型抗体共存の有無を確認することが治療のために重要であると考えられた。

#### E. 結 論

未治療バセドウ病における抗TSH受容体抗体のうち、刺激型抗体は殆どの例で認められるが、それ以外に阻害型抗体も3分の1の症例で認められた。阻害型抗体共存例では、抗甲状腺剤の初期治療にはより反応しやすいが、寛解しにくい傾向が見られた。

## G. 研究報告

### 1. 論文発表

Watanabe Y, Tahara K, Hirai A, Tada H, Kohn LD, Amino N: Subtypes of anti-TSH receptor antibodies classified by various assays using CHO cells expressing wild type or chimeric human TSH receptor. *Thyroid* 7: 13-19, 1997

Watanabe Y, Tada H, Hidaka Y, Takano T, Amino N: Effect of solubilization of porcine thyrotropin (TSH) receptor on TSH binding and on radio-receptor assay for anti-TSH receptor antibodies. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 110-114, 1998

Watanabe Y, Tada H, Hidaka Y, Takano T, Takeoka K, Fukata S, Kuma K, Amino N: Polyethylene glycol increases the detection of anti-thyrotropin (TSH) receptor antibodies by a radioreceptor assay. *Clin Chem* 45: 407-409, 1999

Tada H, Izumi Y, Watanabe Y, Takano T, Fukata S, Kuma K, Hidaka Y, Amino N: Blocking type anti-TSH receptor antibodies detected by radioreceptor assay in Graves' disease. *Endocr J* 48: 703-710, 2001

Tada H, Mizuta I, Takano T, Tatsumi K, Izumi Y, Hidaka Y, Amino N: Blocking type anti-TSH receptor antibodies and relation to anti-thyroid drug response and remission in Graves' disease. (Submitted)

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

甲状腺ホルモン不応症の成立機序に関する研究  
（3）不適切TSH分泌状態の発症機序：  
甲状腺ホルモン受容体によるTSH遺伝子転写抑制

分担研究者 中村浩淑 浜松医科大学第二内科 教授

研究要旨

甲状腺ホルモン(T3)とその受容体(TR)によるTSHのnegative regulationは、甲状腺機能維持の中心的調節機構であり、この異常が甲状腺ホルモン不応症でみられる不適切TSH分泌状態(SITSH)を生じる。T3/TRによるTSH遺伝子転写抑制機序は、適切な実験細胞系がなかったことから、これまでほとんど研究が進んでこなかった。私たちは昨年、サル腎臓由来CV1細胞に下垂体特異的転写因子Pit1およびGATA2を発現させると、TSH $\beta$ 遺伝子プロモーターを組み込んだレポーター遺伝子の高い基礎転写活性が得られ、T3/TRによる転写抑制を高感度で観察できることを確認した。この系を用いてTRのTSH $\beta$ 遺伝子転写制御を検討した。TRはT3非存在下では転写活性を高めることはなく、それ自身が転写促進因子ではないこと、TR以外の核内ホルモン受容体は作用しないこと、いくつかの変異TRで検討した結果、TRのDNA結合領域が重要であること、コレプレッサーおよびコアクチベーターがTRに結合できなくても転写抑制は発揮されることなどを見出した。さらにTSH遺伝子プロモーターの機能を調べ、-80/-55の領域を除去すると基礎転写活性が著明に増大すること、したがって何らかの強力な転写抑制因子がここに作用している可能性があることを発見した。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症ではTR遺伝子異常の結果、下垂体に対するネガティブフィードバックが障害されSITSHが生じるが、SITSHは不応症のもっとも特徴的な臨床所見であり、患者発見の糸口となるものである。SITSHの分子機構を解明するには、T3/TRによるTSH遺伝子の転写抑制機構を明らかにしなければならないが、これまで適切な培養細胞系がないことから、まったく研究が進んでこなかった。昨年私たちは、遺伝子実験で頻用されているサル腎臓

由来CV1細胞を用い、TSH遺伝子発現を高感度で測定できる系を確立した。本年度はこの系を用いてTRのTSH $\beta$ 遺伝子転写制御機構を検討した。

B. 研究方法

CV1細胞にPit1、GATA2、レポーター遺伝子、受容体の各発現プラスミドをリン酸カルシウム法で導入し、20時間後リガンドを添加した。24時間培養後細胞抽出液を回収しCAT活性を測定、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性で導入効率の補

正を行い、CMVコントロール遺伝子発現に対する相対的活性を算出した。レポーター遺伝子はヒトTSH $\beta$ 遺伝子プロモーター(-128/+37)にCAT遺伝子を結合させたものを用いたが、プロモーター領域に種々の欠失を導入した変異レポーターも作成した。受容体は正常TRのほか種々の変異TRを用いた。

(倫理面への配慮)

In vitroの実験であり、倫理面では問題がない。

### C. 研究結果

CV1細胞にPit1、GATA2を導入するとTSH $\beta$ プロモーターを組み込んだレポーター遺伝子のCAT活性が上昇し、ここにTR $\beta$ を発現させるとT3の濃度依存性にCAT活性は有意に抑制された。T3が存在しないときは、TR $\beta$ を過剰発現しても転写活性は影響されず、TRそれ自身がTSH $\beta$ 遺伝子の転写刺激因子ではないことが示された。TRと同じサブファミリーに属するレチノイン酸受容体、ビタミンD3受容体、PPARはそれぞれのリガンド存在下でもTSH $\beta$ 遺伝子活性を抑制することはなく、受容体選択性が認められた。種々の変異TRを用い、転写抑制に関与する受容体領域を調べたところ、N端のA/B領域を欠失させても影響はなかったが、リガンド結合領域を欠失させたものは予想通り転写抑制は見られなかった。DNA結合領域を欠失させたものも、Zn fingerにアミノ酸置換を導入した3種類の変異TRも転写抑制作用を失っていたことから、少なくともTRのDNA結合ドメインが必須であると考えられた。またCoR-boxに変異を入れコレプレッサー結合を障害した2種類の異常TR(P214R、AHT)、お

よびT3結合能は正常でコアクチベーター結合が侵されている異常TR(E457A)とも転写抑制作用は保たれていた。このことから、TSH $\beta$ 遺伝子に対するnegative regulationにコアクチベーター、コレプレッサーは必ずしも関与していないことが示唆された。

一方、TSH $\beta$ 遺伝子プロモーターにおける責任領域を同定するため、種々の欠失レポーター遺伝子を作成して検討した。予想外のことに、従来TRが結合する塩基配列領域と考えられていた-1/+6およびその周辺に変異を導入したり欠失させても、T3/TRによるnegative regulationが確認された。さらに詳細な検討が必要であるが、TRは-1/+6領域に単純に結合しているものではない可能性がある。さらに驚いたことに、TSH $\beta$ プロモーターの-80/-55を欠失させると基礎転写活性が10倍も高まることを発見した。この部位に関与するなんらかの因子が、TSH $\beta$ 遺伝子発現に非常に強力な抑制をかけている可能性も考えられ、検討を行っている。

### D. 考 察

昨年私たちが確立したCV1細胞で高感度にTSH $\beta$ 遺伝子活性を観察できる実験系を用いて、T3/TRによるTSH $\beta$ 遺伝子の転写抑制作用を検討した。これまでに得られた結果で注目すべき第一は、TRそれ自体はTSH $\beta$ 遺伝子発現の刺激因子ではないことである。甲状腺機能低下症でTSHが上昇することから、TRはT3と結合しないときTSH遺伝子を高め、T3結合によって転写を抑制するといった想像がなされていた。私たちの実験で、TSH $\beta$ 遺伝子活性を高めるのはPit1、GATA2などの下垂体特異的転写因子であり、TRではないことが明らかと

なった。また転写抑制に必要な受容体領域はDNA結合領域であり、コアクチベーターやコレプレッサーは必ずしも関与しないことが示された。これは、T3非結合TRはコレプレッサーをTSHプロモーター領域から奪い取ることによってTSH遺伝子活性を高め、その際TRのDNA結合領域は関与しない、とするTagamiらの成績とはまったく異なっている。Tagamiらは例外的にTSH遺伝子活性が観察できるJEG細胞を用いており、JEG細胞にはなんらかの内在するTSH遺伝子転写促進因子があると考えられるため、TRはそれを間接的に高めたのかもしれない。また彼らはルシフェラーゼ(Luc)遺伝子を使ったレポーター遺伝子を用いているが、Luc遺伝子はそれ自体T3/TRによる抑制を受けることが知られている。

TRはTSH  $\beta$  遺伝子プロモーターのどこに結合するのか、あるいは結合しないで蛋白-蛋白相互作用で働いているのか、という問題はまだ未解決である。私たちは先に、TSH  $\beta$  遺伝子プロモーターにおいて、TRはT3依存性にヒストン脱アセチル化酵素のHDAC2をリクルートすることを報告した。したがってHDAC2を伴ったT3/TRはPit1、GATA2に干渉し、これらのもつTSH  $\beta$  遺伝子転写促進作用を打ち消すことで負調節を行っているモデルが想定される。また、TSH  $\beta$  プロモーターの機能解析の過程で見出した-80/-55領域は非常に興味深い。この領域を欠失させると基礎転写活性が10倍も高まることは、ここに強力な転写抑制因子が作用している可能性がある。TSH  $\beta$  遺伝子が非下垂体細胞では発現しないことに関係するかもしれない。

## E. 結 論

TSH遺伝子の転写を刺激する因子はPit1、GATA2などの下垂体特異的転写因子であり、TRではない。T3/TRはPit1、GATA2を標的として作用し、転写を抑制している可能性が高い。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Nakano K, Sasaki S, Matsushita A, Natsume H, Misawa H, Nakamura H:

Detection of Thyroid Hormone Dependent Negative Regulation of Thyrotropin beta Gene by Thyroid Hormone Receptor in CV1 Cells (submitting)

Matsushita A, Misawa H, Andoh S, Natsume H, Nishiyama K, Sasaki S, Nakamura H: Very strong correlation between dominant negative activities of mutant thyroid hormone receptors and their binding avidity for corepressor SMRT. *J Endocrinol.* 167(3):493-503, 2000.

Nishiyama K., Matsushita A, Natsume H, Mikami T, Genma R, Sasaki S, Nakamura H: Differences between the silencing-related properties of the extreme carboxyl-terminal regions of thyroid hormone receptors alpha and beta1. *J. Endocrinol.* 167(2):219-227, 2000.

佐々木茂和、中村浩淑：転写調節と疾患. 診断と治療 89(2):309-315, 2001.

### 2. 学会発表

Identification of the binding proteins on the negative regulatory element in TSH  $\beta$  gene.

(Nakamura H, Sasaki S eta al.) 第24回欧州甲状腺学会 2001年8月29日 (J Endocrinol Invest 24 Suppl 6:120, 2001 Abst #239)

甲状腺ホルモンとその受容体によるTSH $\beta$ 遺伝子へのnegative regulation (浜松医科大学第二内科 佐々木茂和、中村浩淑、他)第74回日本内分泌学会総会 1999年6月2日(日本内分泌学会雑誌 77 (1): 26, 2001 Abst #S6-2)

TSH $\beta$ 遺伝子のnegative regulatory elementに結合する因子の解析 (浜松医科大学第二内科 松下明生、中村浩淑、他) 第44回日本甲状腺学

会 2001年11月17日 (日本内分泌学会雑誌 77 (2): 242, 2001 Abst #23)

CV1細胞を用いたTSH $\beta$ 鎖の負の調節におけるホルモン核受容体選択性の検討 (浜松医科大学第二内科 中野桂子、中村浩淑、他) 第44回日本甲状腺学会 2001年11月17日 (日本内分泌学会雑誌 77 (2): 242, 2001 Abst #26)

### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

甲状腺ホルモン不応症発症機序に関する研究

分担研究者 妹尾 久雄 名古屋大学環境医学研究所 内分泌・代謝分野教授

研究要旨

SRC-1 (steroid hormone coactivator-1)は、ステロイドホルモン受容体スーパーファミリー のコアクチベーターとして初めて同定され、受容体を介したリガンド依存性の転写活性化に重要な役割を果たしていることが示された。しかしながら、SRC-1の欠如が甲状腺ホルモン不応症 (RTH) の発症をもたらすか否かの詳細な検討はされていない。そこでSRC-1 遺伝子ノックアウトマウスを用い、甲状腺ホルモンによる転写制御を種々の組織で検討した。その結果、SRC-1遺伝子ノックアウトマウスは、T4高値にも関わらずTSH高値を示す全身型RTHの特長を示した。また、SRC-1が下垂体、肝臓において甲状腺ホルモン受容体の特異的アイソフォームとの結合或いはホルモン応答性領域の特異的配列に結合する甲状腺ホルモン受容体以外の因子との相互反応により、甲状腺ホルモン依存性の負或いは正の転写制御に関わっていることが示唆された。

A. 研究目的

甲状腺ホルモン不応症 (Resistance to Thyroid Hormone = RTH) は、甲状腺ホルモンに対する応答性の低下した病態で、多くは常染色体優性遺伝を示し、 $\beta$ 型甲状腺ホルモン受容体 (TR $\beta$ ) 遺伝子の点突然変異がその原因として報告されてきた。しかしながら、RTHにはTRをコードする2つの遺伝子、 $\alpha$ 、 $\beta$ の何れにも異常が認められない家系も報告され、受容体を介したホルモン作用の発揮に必要とされるコアクチベーターやコリプレッサーの異常がRTHの発症に関わることが示唆されてきた。

一方、SRC-1 (steroid hormone coactivator-1) は、ステロイドホルモン受容体スーパーファミリー のコアクチベーターとして初めて同定され (Onate SA et al. Science 270, 1354-1357, 1995)、甲状腺ホルモン受容体を介したリガ

ンド依存性の転写活性化にも重要な役割を果たしていることが示されている。しかしながら甲状腺ホルモン受容体の属する核受容体スーパーファミリーに対するコアクチベーターにはSRC-1のみならず、TIF/SRC-2/GRIP1 (Voegel JJ et al. EMBO J 15, 3667-3675, 1996)、AIB1 (Anzik SL, et al. Science 277, 965-968, 1997)/ACTR (Chen H, et al. Cell 90, 569-580, 1997)、RAC3 (Li H, et al. Proc Natl. Acad Sci USA 94, 8479-8484, 1997)、pCIP (Torcha J et al. Nature 387, 677-684, 1997)、TRAM-1 (Takeshita A, et al. J Biol Chem 272, 27629-27634, 1997) /SRC-3 (Suen CS, et al. J Biol Chem 273, 27645-27653, 1998)など多くの蛋白質の存在が知られ、in vivoでのSRC-1欠損がどのような甲状腺ホルモン作用にどのような影響を与えるかはこれまで殆ど研究されていない。Weissらは、SRC-1ノックア

ウトマウスの血中甲状腺刺激ホルモン (TSH)、甲状腺ホルモンを測定し、サイロキシン(T4)高値にも関わらず、TSHが抑制されないRTHの特有の表現型を示すことを報告した (Wess RE et al. EMBO J 18, 1900-1904, 1999)。しかしながら、SRC-1の欠損がTRを介した種々の組織における転写制御にどのような影響を与え、RTHを発症するのは、未だ検討されていない。そこで本研究では、SRC-1ノックアウトマウスを用い、甲状腺ホルモンによる転写制御を検討した。

## B. 研究方法

SRC-1ノックアウトマウス (SRC-1)<sup>-/-</sup>は、Xuら (Science 278, 1922-1925, 1998)より供与を受けた。野生型 (SRC-1)<sup>+/+</sup>およびSRC-1<sup>-/-</sup>に低ヨードの餌に0.15%のプロピルチオウラシル (PTU) を加えたものを与えてマウスを甲状腺機能低下状態にし、最後の4日間T3を投与し、血中のTSH、T4の測定と共に、ノーザンブロット法によりT3による種々の遺伝子の転写制御を検討した。標的遺伝子としては、下垂体のTSH $\beta$ 、成長ホルモン、心臓のsarcoplasmic reticulum calcium adenosine triphosphatase 2 (SERCA2)、 $\alpha$ ,  $\beta$  ミオシン重鎖、肝臓の5'-脱ヨード酵素 (% DI)、Spot 14、malic enzyme を対象とした。

## C. 研究結果

血中のTSHは、SRC-1<sup>-/-</sup>およびSRC-1<sup>+/+</sup>共にPTU投与により著しく上昇し、血中T4レベルは何れの群においても測定感度以下であった (図1)。T3投与にTSHレベルは、両群で低下した。しかしながらSRC-1<sup>-/-</sup>では、T3によるTSHの低下は減弱し、Weissらの報告(Wess RE,

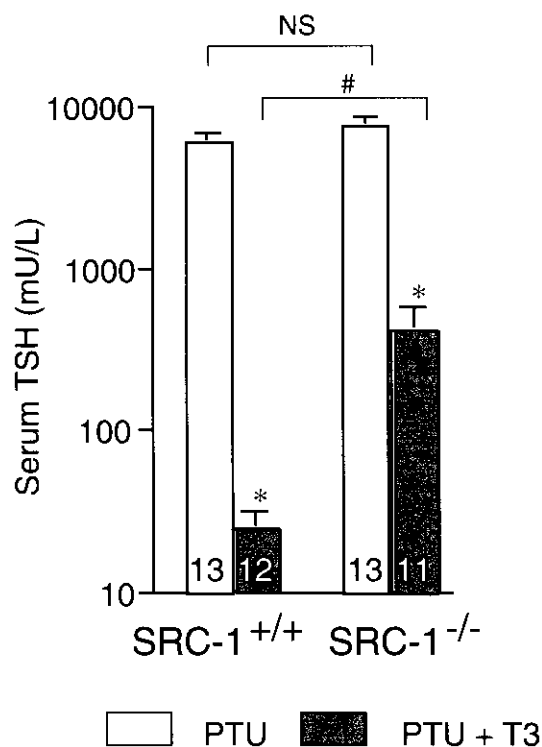


図1. SRC-1<sup>+/+</sup>およびSRC-1<sup>-/-</sup>における血中TSHレベル

et al. EMBO J 18, 1900-1904, 1999)と同じく、下垂体におけるサイロトロフの甲状腺ホルモンに対する応答性の減弱が認められた。

## 下垂体におけるT3依存性のTSH $\beta$ 、GH遺伝子の発現制御

TSH $\alpha$ および $\beta$ 遺伝子の転写は、甲状腺機能低下状態で著しく増加し、T3投与により低下することがよく知られている (Shupnik MA, et al. Endocrinology 117, 1940-1946, 1985)。このT3によるTSH $\beta$ 遺伝子発現に対するネガティブレギュレーションにSRC-1が関わっているかを検討するため、下垂体におけるTSH $\beta$  mRNAの発現を検討した。図2 A, Bに示すように、低ヨード食とPTUにより甲状腺機能低下としたマウスでは、SRC-1<sup>-/-</sup>、SRC-1<sup>+/+</sup>ともにTSH $\beta$  mRNAは著しく高く、T3投与によりそのレベルは低下した。しかしながら、T3によるTSH $\beta$  mRNAの発現抑制は、SRC-1<sup>-/-</sup>におい

て著しく減弱、血中TSHの変動とよく呼応した(図1)。

一方、T3により正の制御を受けるGH遺伝子の発現を検討すると、図2に示す如く、甲状腺機能低下とした場合には、GH mRNAレベルは、SRC-1<sup>+/+</sup>に比し、SRC-1<sup>-/-</sup>で有意の低値を示した。T3の投与によりSRC-1<sup>-/-</sup>ではSRC-1<sup>+/+</sup>に比しGH mRNAの増加が大きく、両群ともほぼ同じレベルとなった(図2)。SRC-1<sup>+/+</sup>では、低ヨード、PTU処置によっても完全に抑制されなかった内因性の甲状腺ホルモンによりSRC-1の存在下でGH mRNAレベルの完全な抑制が無かったためと考えられる。

### 肝臓におけるT3応答性遺伝子の発現変化

肝臓では、T3により正の制御を受ける3つの遺伝子、5'-DI、Spot 14、malic enzymeの発現を検討した。これらの遺伝子のT3による転写制御はよく知られている(Berry MJ, et al. Nature 349, 438-440, 1991、Jump DB, et al. J Biol Chem 264, 4698-4703, 1989、Song MK, et al. J Biol Chem 263, 17970-17974)。図3に示すごとく、Spot 14のみがSRC-1欠損により影響を受けることが明らかにされた。即ち、甲状腺機能低下状態で、リガンドが結合していない甲状腺ホルモン受容体による転写抑制がSRC-1欠損により消失することが示された。

### 心臓におけるT3-応答性遺伝子の発現変化

心臓ではT3によりSERCA2、MHC  $\alpha$  の遺伝子発現が正の、MHC  $\beta$  遺伝子の発現が負の制御を転写レベルで受けることが知られている(Rohere D, et al. J Biol Chem 263, 6941-6944, 1988、Gustafson TA, et al. Cir Res 59, 194-201, 1986)。これらT3正或いは負の調節を受ける遺

伝子群は、SRC-1<sup>+/+</sup>およびSRC-1<sup>-/-</sup>において、T3に対する応答性は全く影響を受けないことが示された(図4)。

### D. 考 察

本研究により、SRC-1の欠損が幾つかの甲状腺ホルモン応答性遺伝子の発現を変化させることが明らかにされた。しかしながら、検討した全ての遺伝子の中で、下垂体におけるTSH $\beta$ 、GH、肝臓におけるSpot 14遺伝子の発現のみが影響をうけた。

ソマトトロフにおけるGH遺伝子の発現は、SRC-1<sup>+/+</sup>に比し、SRC-1<sup>-/-</sup>で有意の低値を示した。下垂体ではTRアイソフォームの中、TR  $\beta$  2の発現が有意であり(Hodin R, et al. Science 244, 76-79, 1989)、T3非存在下ではSRC-1はTR  $\beta$  2のみと結合し、他のアイソフォームTR  $\beta$  1、TR  $\alpha$  1との結合は認められない(Oberste-Berghaus C. J Biol Chem 275, 1787-1792, 2000)。従って、甲状腺機能低下SRC-1<sup>+/+</sup>では、このリガンドと結合していないTRとSRC-1<sup>+/+</sup>の結合によりGH遺伝子の転写が促進されている可能性が考えられる。

下垂体サイロトロフにおける甲状腺ホルモンによるTSH遺伝子の発現抑制がSRC-1の欠損により減弱することが初めて示された。この結果は、SRC-1欠損がRTHの原因となり得ることを初めて示したものである。甲状腺ホルモンによるTSH  $\beta$  遺伝子発現の負の制御のメカニズムは必ずしも明らかにされていない。In vitroのトランスフェクション法を用いてTagamiらは、TSH  $\alpha$  遺伝子のT3依存性の転写抑制がコアクチベーターにより促進され、TRによる遺伝子の転写抑制は遺伝子によってはコアクチベーターが関与し得ることを示した(J Biol Chem

2774, 22345-22353, 1999)。我々のSRC-1を用いた今回の結果は、T3によるTSH $\beta$ 遺伝子の負の制御にSRC-1が関わっていることを明らかにし、Tagamiらの成績を支持するものと考えられる。しかしながら、心臓におけるMHC $\beta$ 遺伝子のT3によるネガティブレギュレーションはSRC-1欠損により影響を受けない。この組織により異なる応答性は、遺伝子に固有の甲状腺ホルモン応答領域の構造の差異、あるいは下垂体に主として発現しているTR $\beta$ 2、心臓に主と

して発現しているTR $\alpha$ 1といった組織特異的TRアイソフォームとSRC-1との相互反応が異なる可能性あるいは、SRC-1とTRとの結合に他のアイソフォーム特異的因子の存在の可能性を示唆している。

肝臓、心臓における他の遺伝子群のT3依存性の転写活性化にはSRC-1欠損は影響を与えず、肝臓におけるSpot 14遺伝子のリガンド結合の無いTR依存性の転写抑制にSRC-1が関与している結果は、予想外であった。この結果は、

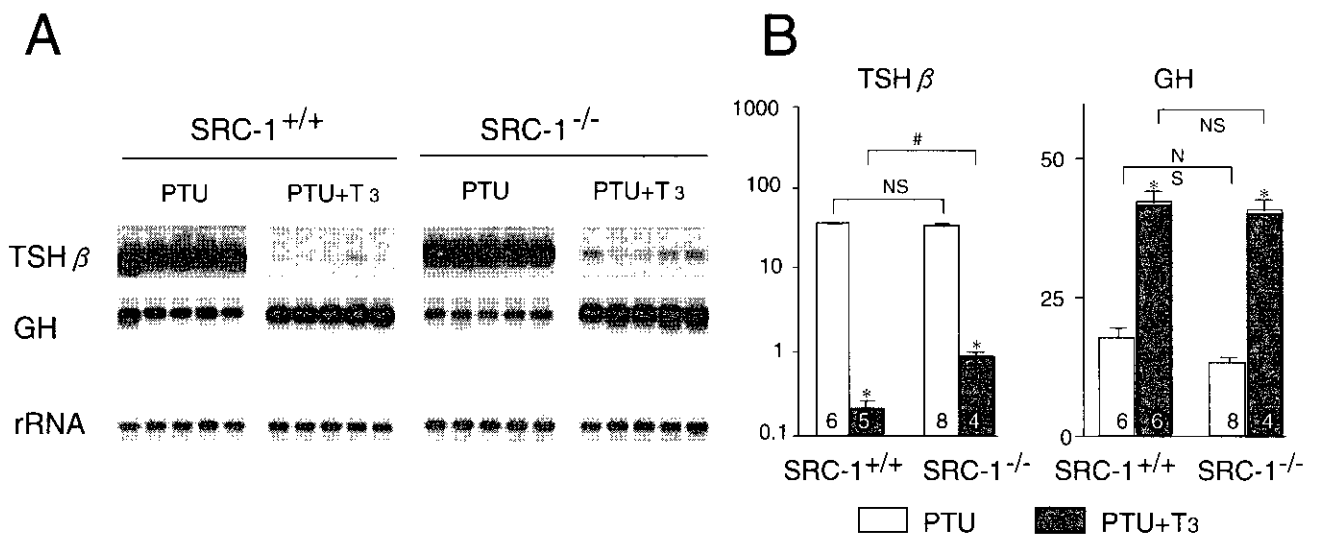


図2. SRC-1およびSRC-1<sup>+/+</sup>におけるTSH $\beta$ およびGHmRNAの変化

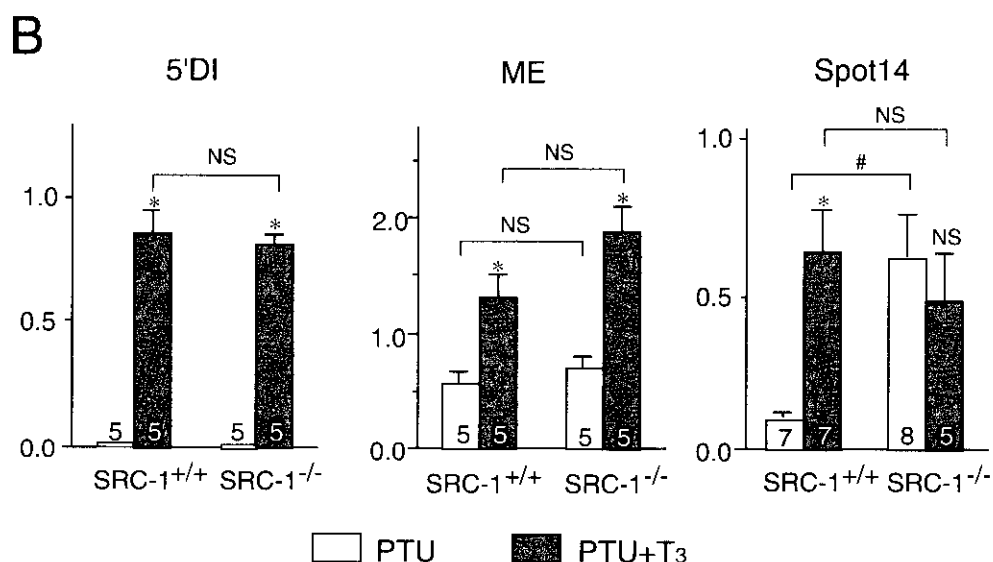


図3. SRC-1およびSRC-1<sup>+/+</sup>における5'-DI、malic enzyme (ME)およびSpot 14 mRNAの変化

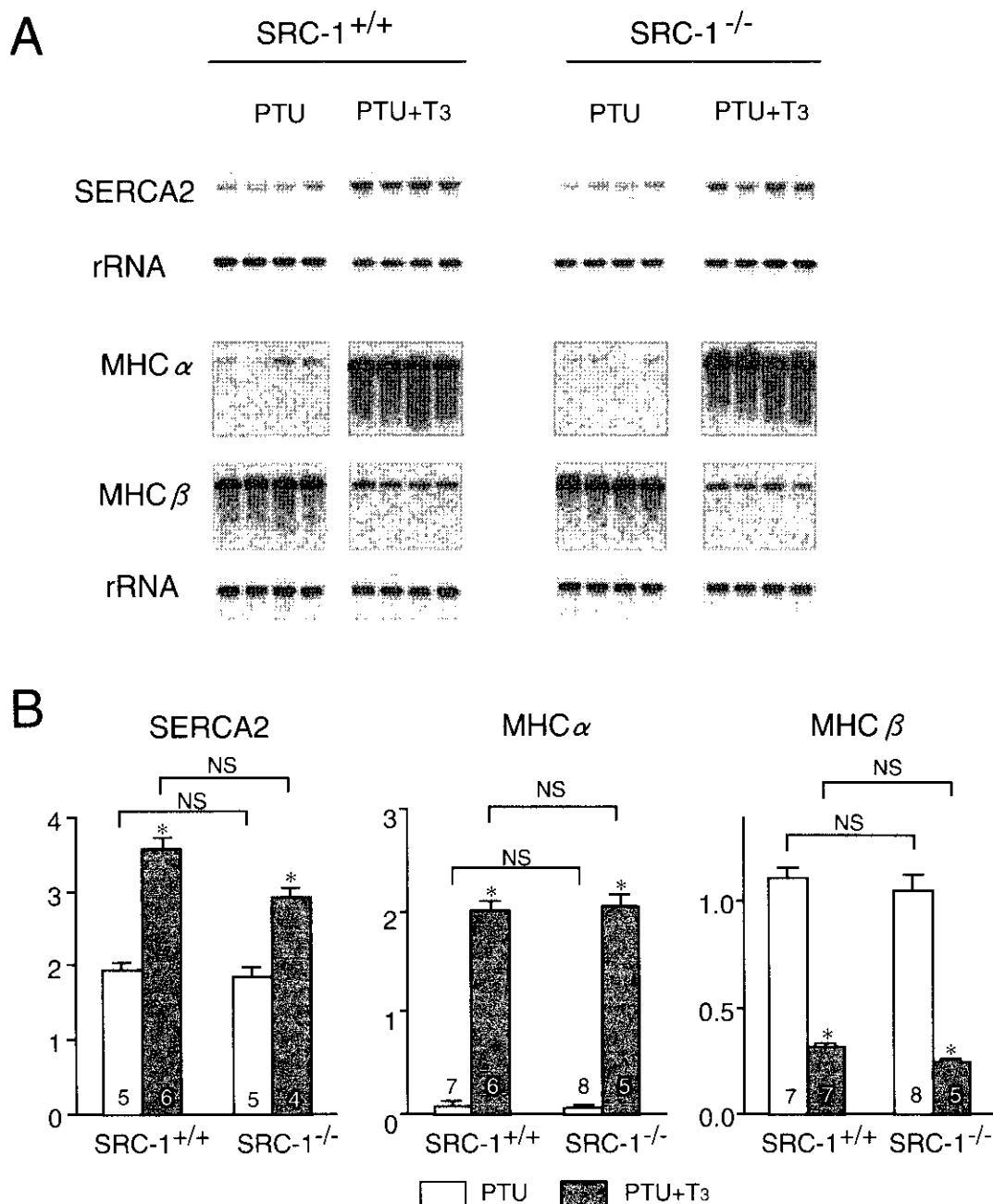


図4. SRC-1<sup>+/+</sup>およびSRC-1<sup>-/-</sup>におけるSERCA2、MHC $\alpha$ およびMHC $\beta$ mRNAの変化

Spot 14遺伝子のunliganded TRによる転写抑制にSRC-1が関与していることを示している。この結果は、SRC-1がリガンド結合の有無によりSRC-1が転写抑制あるいは活性化に作用することをin vitroで示したOberste-Berghousらの結果(J Biol Chem 275, 1787-1792, 2000)を支持するものである。Spot 14の甲状腺ホルモン応答性領域は転写開始起点より2.5~2.8 kbと、malic enzymeや5'-DIの応答領域(-270~700kb)

と比べて遠くに位置しており、こうした応答性領域の部位あるいは配列がSRC-1の関与に影響を与えている可能性も否定できない。

## E. 結 論

SRC-1ノックアウトマウスにおいて種々の標的遺伝子のT3に対する応答性を検討することにより、ノックアウトマウスがRTHの表現型をとること、応答性遺伝子の中では、T3によ

り正の調節を受ける遺伝子のみならず、負の調節を受ける遺伝子もノックアウトマウスで影響を受けることが示された。しかし、その影響は遺伝子により異なり、組織特異的TRアイソフォームとSRC-1との結合の差異、あるいはTRとSRC-1との間に組織あるいは遺伝子特異的因子が介在する可能性を示している。

## F. 健康危険情報

甲状腺ホルモン不応症の発症に、 $\beta$ 型甲状腺ホルモン受容体遺伝子の異常以外に、コアクチベーター遺伝子の異常が関与する場合のある可能性が示された。

## G. 研究発表

1. P. E. Macchia, Y. Takeuchi, T. Kawai, K. K. Cua, O. Chassande, H. Seo, Y. Hayashi, J. Samarut, Y. Murata, R. E. Weiss, S. Refetoff: Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proceedings of National Academy of Science, U.S.A.* 98(1): 349-354, 2001.
2. T. Kikumoti, F. Kambe, T. Nagaya, H. Funahashi, H. Seo: Thyrotropin modifies activation of nuclear factor-kB by tumor necrosis factor in rat thyroid cell line. *Biochemical Journal*, 354: 573-579, 2001.
3. D. Sarkar, T. Imai, F. Kambe, A. Shibata, S. Ohmori, S. Hayakawa, H. Funahashi, H. Seo: Overexpression of glutathione-S-transferase A1 in benign adrenocortical adenomas from patients with Cushing's syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(4): 1653-1659, 2001.
4. A. Siddiq, T. Miyazaki, Y. Takagishi, Y. Kanou, S. Hayakawa, M. Inoue, H. Seo, Y. Murata: Expression of ZAKI-4 messenger ribonucleic acid in the brain during rat development and the effect of hypothyroidism. *Endocrinology*, 142(5): 1752-1759, 2001.
5. A. Shibata, Y. Hayashi, T. Imai, H. Funahashi, A. Nakao, H. Seo: Somatic gene alteration of A1B1 gene in patients with breast cancer. *Endocrine Journal*, 48(2): 199-204, 2001.
6. T. Sakai, F. Kambe, N. Ishiguro, K. Kurokouchi, M. Takigawa, H. Iwata, H. Seo: TNF- $\alpha$  induces expression of genes for matrix degradation in human chondrocyte-like HCS-2/8 cells through activation of NF-kB: Abrogation of the TNF- $\alpha$  effect by proteasome inhibitors. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(7): 1272-1280, 2001.
7. T. Imai, D. Sarkar, A. Shibata, H. Funahashi, T. Matsuiyama-M, T. Kikumori, S. Ohmori, H. Seo: Expression of adrenocorticotropin receptor gene in adrenocortical adenomas from patients with Cushing syndrome: Possible contribution for the autonomous production of cortisol. *Annals of Surgery*, 234(1): 85-91, 2001.
8. D. Sarkar, T. Imai, F. Kambe, A. Shibata, S. Ohmori, A. Siddiq, S. Hayakawa, H. Funahashi, H. Seo: The human homolog of *Diminuto/Dwarf1* gene (*hDiminuto*): A novel ACTH-responsive gene

overexpressed in benign cortisol-producing adrenocortical adenomas. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86(11), 5130-5137, 2001.

9. N. Mutsuga, Y. Iwasaki, M. Morishita, A. Nomura, E. Yamamori, M. Yoshida, M. Asai, N. Ozaki, F. Kambe, H. Seo, Y. Oiso, H. Saito: Homeobox protein Gsh-1-dependent regulation of the rat growth hormone-releasing hormone gene promoter. Molecular Endocrinology, in press, 2001.
10. Y. Takeuchi, Y. Murata, P. Sadow, Y. Hayashi, H. Seo, J. Xu, B. W. O' Malley, R. E. Weiss, S. Refetoff: Steroid Hormone Receptor Coactivator-1 Deficiency Causes Variable Alterations in the Modulation of T3-Regulated Transcription of Genes in vivo. Endocrinology, in press

## 2. 学会発表

1. 林 良敬, 上条隆司, 山本美智代, 小川正道, 妹尾久雄: II型成長ホルモン単独欠損症の遺伝子解析と発症機序. 第26回東海遺伝子医療研究会プログラム, P5, 2001.
2. N. Mutsuga, Y. Iwasaki, E. Yamamori, M. Yoshida, M. Asai, M. Morishita, A. Nomura, E. Yamamori, M. Yoshida, M. Asai, N. Ozaki, F. Kambe, H. Seo, Y. Oiso, H. Saito: Homeobox protein GSH-1-Dependent regulation of the rat growth hormone gene promoter. The Endocrine Society' s 83<sup>rd</sup> Annual Meeting, Meeting & Exhibit Guide, P3-532, 2001.
3. D. Sarkar, T. Imai, F. Kambe, A. Siddiq, A.

Shibata, S. Ohmori, H. Funahashi, H. Seo: Possible involvement of human homologue of diminuto/dwarf-1 (Hdiminuto) in the pathogenesis of benign adrenocortical adenomas in patients with cushing' s syndrome. The Endocrine Society' s 83<sup>rd</sup> Annual Meeting, Meeting & Exhibit Guide, P1-105, 2001.

4. 妹尾久雄, 山本美智代, 小川正道: GH-1遺伝子異常(複合ヘテロ結合体)によるIGHDの1男児例. 第74回日本内分泌学会学術総会抄録集, 53, 2001.
5. 李 鍾国, 林 良敬, 三輪佳子, 張 麗艷, 妹尾久雄, 児玉逸雄: 甲状腺ホルモン受容体遺伝子導入による心臓電気特性の調節. 第74回日本内分泌学会学術総会抄録集, 69, 2001.
6. D. Sarkar, 今井常夫, 神部福司, 柴田有宏, 大森幸子, 舟橋啓臣, 妹尾久雄: Possible involvement of glutathione S-transferase A1 (GSTA1) and human homologue of diminuto/dwarfl (hdiminuto) in the pathogenesis of benign adrenocortical adenomas in patients with Cushing' s syndrome. 第74回日本内分泌学会学術総会抄録集, 239, 2001.
7. 柴田有宏, 長屋 敬, 今井常夫, 中尾昭公, 舟橋啓臣, 妹尾久雄: 転写因子NF- $\kappa$ BによるVEGF遺伝子発現機構: 新たな乳癌治療のターゲット. 第74回日本内分泌学会学術総会抄録集, 243, 2001.
8. 加藤美穂子, 長屋 敬, 斉藤 清, 吉田純, 妹尾久雄: PPAR $\gamma$ リガンドによる悪性脳腫瘍細胞株のアポトーシス誘導. 第74回日本内分泌学会学術総会抄録集, 246, 2001.

9. 曹 霞, 神部福司, サーカーデバナンド, 妹尾久雄: TSH-dependent activation of thyroglobulin (TG) gene expression through reduction of Pax-8 by redox factor-1(Ref-1). 第74回日本内分泌学会学術総会抄録集, 310, 2001.
10. 長屋 敬, 妹尾久雄: 甲状腺ホルモンとサイトカイン作用のクロストローク. 第74回日本内分泌学会学術総会抄録集, シンポジウムS-6, 2001.
11. X. Cao, F. Kambe, H. Seo: A novel gene, ZAKI-4 encoding a calcineurin inhibitor: gene organization and regulation of its expression. The 3<sup>rd</sup> Korea-China-Japan Thyroid Conference Program & Abstract, P26, 2001.
12. X. Cao, F. Kambe, H. Seo: Critical cysteine residues in the paired domain of pax-8 responsible for redox factor-1(REF-1)mediated TSH-dependent redox regulation. The 3<sup>rd</sup> Korea- China- Japan Thyroid Conference Program&Abstract, P49, 2001.
13. F. Kambe, X. Cao, H. Seo: Expression of Diminuto gene in thyroid follicular cells and its regulation by TSH. The 3<sup>rd</sup> Korea-China-Japan Thyroid Conference Program & Abstract, P47, 2001.
14. 神部福司, 曹 霞, SARKAR Devanand, 妹尾久雄: Diminuto遺伝子の甲状腺細胞における発現とそのTSHによる調節. 第44回日本甲状腺学会誌, 29, 2001.
15. X. Cao, F. Kambe, H. Seo: Critical cysteine residues in the paired domain responsible for TSH-dependent redox regulation of Pax-8. 第44回日本甲状腺学会誌, 30, 2001.
16. 長屋 敬, 藤條美幸, 加藤美穂子, 妹尾久雄: 甲状腺ホルモンの破骨細胞分化調節因子に対する影響. 第44回日本甲状腺学会誌, 72, 2001.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし



厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）  
分担研究報告書

ホルモン受容機構異常に関する研究

分担研究者 森 昌朋 群馬大学医学部第1内科 教授

研究要旨

近年、核内ホルモン受容体(nuclear hormone receptor, NR)によるリガンド依存性転写化における転写共役因子の役割に関する知見が集積しており、共役因子病という新たな疾患概念が生まれつつある。甲状腺ホルモン不応症患者の中には、甲状腺ホルモン受容体(thyroid hormone receptor, TR)に異常を認めない家系が存在し、その病因としてTRの共役因子に異常が存在する可能性が指摘されている。一方、多くの共役因子はNRのリガンド結合領域に結合するが、NRのDNA結合ドメイン(DBD)が、種々の細胞内白との結合領域として機能することが明らかとなりつつある。本研究では、酵母ツーハイブリット法を用いて、TRのDBDに結合し、TRに選択的に機能する新たな共役因子の単離に成功した。現在、この共役因子の異常が、TRに異常を認めない甲状腺ホルモン不応症の病因となりうるか検討を進めている。

A. 研究目的

核内ホルモン受容体 (nuclear hormone receptor; NR)は、生体内において発育、分化、恒常性の維持に重要な役割を果たす転写因子である。NRは、スーパーファミリー内で保存された共通のモジュール構造を取っており、DNA結合に必要なDNA結合ドメイン(DNA-binding domain; DBD)、リガンドが結合するリガンド結合ドメイン (ligand-binding domain; LBD)、DBDとLBDを接続するヒンジドメイン、そしてアミノ(N)末端にAF (activation function)-1、カルボキシル(C)末端にAF-2という別々の転写活性化ドメインを有する。

NRのDBDは、DNAへの結合ならびに受容体の二量体形成に重要な役割を果たすことが明らかとなっているが、近年この領域が、癌抑制遺伝子、原癌遺伝子、転写因子、RNA結合蛋白、

ウイルス蛋白、シグナル伝達系酵素などさまざまな細胞内蛋白との直接的な結合部位として機能することが明らかとなりつつある。そのうちいくつかの例においては、NRはDNAに結合することなく、これら結合蛋白の機能を阻害することが知られている。DBD結合蛋白が、NRによるリガンド依存性転写活性化に直接関与するという最初の報告は、Lazarらのグループによってなされ、TRとRARのDBDに結合するp45/NFE2がcAMP response element binding protein (CREB)-binding protein (CBP)と協調的にリガンド依存性に転写活性を増強することが示された。一方、Palvimoらは、アンドロゲン受容体(androgen receptor; AR)のDBDとヒンジ領域の一部をベイトに用いた酵母ツーハイブリッド(yeast two-hybrid; YTH)法にて、転写共役因子Small nuclear ring finger protein (SNURF)

をクローニングした。また、寒冷暴露によって誘導され、褐色脂肪組織特異的な発現を示す peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) の転写共役因子である PPAR  $\gamma$  coactivator-1 (PGC-1) も DBD とヒンジ領域の一部に直接結合する。これらの報告を考え併せると、DBD 結合因子は、NR による転写制御における新たな共役因子グループを形成する可能性が示唆されるが、その作用機構は明らかではない。

今回、我々は TR の DBD に結合する共役因子のリガンド依存性転写活性化における役割を更に解析する目的で、TR の新たな転写共役因子のクローニングを試みた。

## B. 研究方法

ヒト TR  $\beta 1$  の DBD とヒンジ領域の一部を bait として、酵母ツーハイブリッド (yeast two-hybrid, YTH) 法にて Hela 細胞およびヒト肺 cDNA library のスクリーニングを行った。クローニングした蛋白と TR との結合を、YTH 法ならびに glutathione-S-transferase (GST) pull-down assay にて解析した。クローニングした蛋白が NR のリガンド依存性転写活性化に及ぼす影響ならびに他の coactivator との相互作用について transient transfection 法にて検討した。

## C. 研究結果

1. ヒト TR  $\beta 1$  の DBD に結合する蛋白として、1990 年に Rosen らによってクローニングされたヒト 1 型免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus type 1) の転写活性化因子 Tat に結合する蛋白としてクローニングされた Tat binding protein-1 (TBP-1) を単離した。TBP-1 は、N 末端側にロイシン

ジッパー構造を有し、C 末端側に ATPases with a variety of cellular activities (AAA) family に特徴的なヌクレオチド結合モチーフと RNA/DNA ヘリケースモチーフを有する conserved ATPase domain が存在した。

2. TBP-1 は、リガンド存在下においても LBD と結合せず、また A/B ドメインにも結合しないことが判明し、TBP-1 が DBD に特異的に結合することが判明した。また、免疫沈降法にて、FLAG 標識した TBP-1 と TR が細胞内で複合体を形成することも明らかとなった。TBP-1 の TR 結合領域を、GST pull-down 法にて検討した結果、TR は、leucine zipper 構造を含む TBP-1 の N 末端部分に結合することが判明した。
3. CV-1 細胞への transient transfection 法を用いて機能解析した結果、TBP-1 は TRE に結合した TR を介して転写活性を増強するコアクチベーターとして機能した。
4. TBP-1 は RAR、retinoid X receptor (RXR)、PPAR  $\gamma$ 、estrogen receptor (ER) によるリガンド依存性転写活性化には影響を及ぼさず、これらの NR と TBP-1 との直接的な結合も YTH 法ならびに GST pull-down assay では検出されなかった。以上の成績から、TBP-1 は TR に選択的なコアクチベーターとして機能することが明らかとなった。
5. Mammalian one-hybrid assay 法にて TBP-1 の CAD 領域に内因性の転写活性化ドメインを有することが判明した。更に、ATP 結合モチーフの変異 (K233H) により転写増強作用は消失した。一方、ヘリケースモチーフに変異を導入した TBP-1 (D286A) は野生型 TBP-1 同様の転写増強作用を示したことより、TBP-1 の ATPase としての機

能がTRによるリガンド依存性転写活性化増強作用に重要であることが示唆された。

6. TBP-1によるTRのT3依存性転写活性化増強作用はAF-2依存性であることが判明した。更に、TBP-1はTRのAF-2に結合する他のコアクチベーターと協調的に作用することが示唆された。

#### D. 考 察

TBP-1は最初に、HIV-1の転写活性化因子Tatに結合する蛋白として単離され、HIV-1 long terminal repeat (LTR)のTatによる転写活性化を抑制すると報告された。ヒトTBP-1に高い相同性を有する蛋白が、多くの種で単離されており、TBP-1は種を超えて保存された機能を有することが推察される。ヒトではTBP-1遺伝子は、11番染色体長腕に位置しており、TBP-1 mRNAは種々のヒト由来培養細胞株やラット組織において広く発現していることが報告されている。しかしながら、生体内でTBP-1が遺伝子転写調節に果たす役割は不明であり、本研究により、TBP-1が甲状腺ホルモン応答性遺伝子の発現制御に関与する可能性が初めて明らかとなった。

TBP-1は、CADを有するAAA family に属する蛋白であり、TBP-1のCAD領域は同じAAA family メンバーでありTRのAF-2に結合するTrip1/mSUG1のCAD領域と比較的高いホモロジーを有する。Trip1/mSUG1と比較して、TBP-1はいくつかの特徴な点を有することが本研究で判明した。まず、TBP-1はTRにリガンド結合の有無に関わらず結合するが、Trip1/mSUG1はリガンド依存性にTRに結合する。次に、TBP-1はTRのDBDに結合するのに対し、Trip1/mSUG1はAF-2に結合する。また、

TBP-1の過剰発現はTRのリガンド依存性転写活性化を増強するが、Trip1/mSUG1を過剰発現させても転写活性にほとんど影響を及ぼさない。最後に、TBP-1はTRに選択的に作用するが、Trip1/mSUG1はTR以外にも、RAR、RXR、vitamin D receptor (VDR)、ERとも結合可能である。

更に、TBP-1によるTRによる転写活性化増強作用は、AF-2依存性であることが判明した。NRのAF-2は、リガンド存在下においてコアクチベーターやコインテグレーターを含む蛋白複合体と結合することが近年明らかとなっている。本研究によって、TBP-1が直接Trip1に結合し、Trip1と相乗的にTRのリガンド依存性転写活性化を増強することが判明した。また、TBP-1は他のAF-2に結合するコアクチベーター、SRC-1、p120、CBPと直接は結合しないが、これらの蛋白と相乗的に作用することが明らかとなった。以上の成績より、TBP-1は、AF-2にリガンド依存性に結合する他の転写共役因子と協調的に作用して、TRによる転写活性化を増強するものと考えられた。

Rosenらの報告と一致して、TBP-1は内因性転写活性化ドメインをCAD領域に有することが判明した。CAD領域内のATP結合モチーフの変異により転写増強作用が消失したが、ヘリケースモチーフの変異は転写増強に影響を及ぼさなかった。リコンビナントラットSUG1は、RNA依存性ATPase活性を有することが報告されている。また、mSUG1はヘリケース活性を有し、TFIIHのp89/XPB subunitと結合することが報告されている。DEAD box蛋白であるeukaryotic translation 4Aやp68はRNA-unwinding活性とともにRNA-stimulated ATPase活性を有することが知られている。近

年Endohらは、このp68がERのAF-1に結合し、ヘリケース活性はp68のコアクチベーター機能には不要であることを報告している。本研究の成績も考えあわせると、TBP-1のATPase活性がリガンド依存性転写活性化増強に重要である可能性が示唆された。

TBP-1やTripl/mSUG1は、ユビキチン化された蛋白を分解する26Sプロテアソームの19S regulatory subunitの構成蛋白であることも知られている。また近年ERやVDRなどのNRがこの26Sプロテアソームによって分解を受けるとの報告もある。従って、TBP-1を過剰発現させることによって、この蛋白分解複合体の機能が損なわれ、TR蛋白量が増加し、見かけ上転写活性を増強させている可能性も考えられる。しかしながら、TBP-1はTRに選択的に作用し、transient transfectionと同じ条件でTBP-1を過剰発現させても、定量したTR $\beta$ 1蛋白量に明らかに変化は認められなかった。更にMakinoらは、近年プロテアソームを構成するATPase複合体がTATA box-binding proteinと直接結合することを報告し、TBP-1がTripl/mSUG1など他のATPaseと共に、そのcomplexの中に存在することを報告している。また、酵母においてもこの19S regulatory subunitが、プロテアソーム機能とは別に、RNAの効率的な伸長に関与しているとの報告もなされている。本研究の成績も含めてこれらの知見から、他のプロテアソームATPase同様に、TBP-1も蛋白分解機能とは別に、遺伝子転写調節に直接関与する機能を有するものと考えられた。

## E. 結 論

ヒトTR $\beta$ 1のDBDに結合し、TR選択的に機能する転写コアクチベーターTBP-1のクローニ

ングに成功した。

## F. 健康危険情報

TBP-1は、TR特異的に機能することから、TBP-1の構造異常がTRに変異を認めない甲状腺ホルモン不応症の病因となる可能性が考えられる。ヒトゲノムプロジェクトによりヒトTBP-1ゲノム遺伝子の全構造がすでに明らかとなっており、現在、そうした患者のゲノムDNAのTBP-1遺伝子に変異がないか遺伝子解析を進めている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Human Immunodeficiency Virus Type1 Tat Binding Protein-1 Is a Transcriptional Coactivator Specific for TR. Ishizuka T, Satoh T, Monden T, Ozawa A, Hashida T, Yamada M, Mori M. Mol Endocrinol 15: 1329-1343, 2001

Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\gamma$  Stimulates the Growth Arrest and DNA-damage Inducible 153 Gene in Non-small Cell Lung Carcinoma Cells. Satoh T, Toyoda M, Hoshino H, Monden T, Yamada M, Shimizu H, Miyamoto K, Mori M. Oncogene, in press.

### 2. 学会発表

Human immunodeficiency virus (HIV) type1 Tat binding protein-1 (TBP-1)は甲状腺ホルモン受容体(TR)のcoactivatorとして機能する。

石塚高広、佐藤哲郎、登丸琢也、門伝 剛、山田正信、森 昌朋 第74回日本内分泌学会学術総会