

thyroid hormone and its receptors. Keystone Symposia (Nuclear Receptor Superfamily) 2002年4月 (Snowbird, Utah, USA)

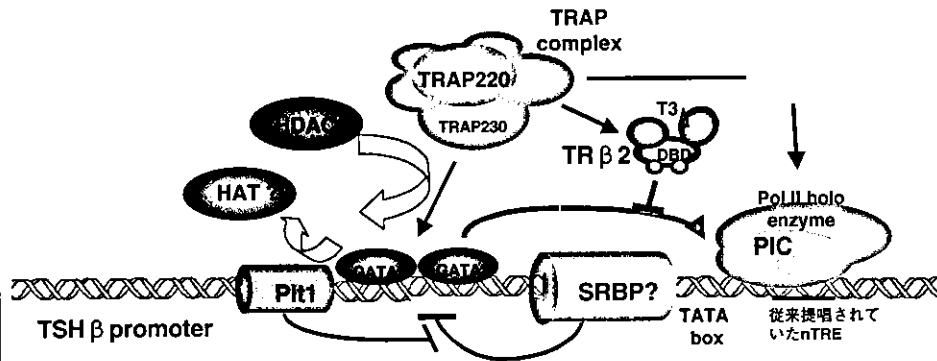
Sasaki S, Nakamura H et al.: Involvement of GATA2 in the T3 dependent negative regulation of the thyrotropin beta and alpha gene promoters

by thyroid hormone receptor. 第74回米国甲状腺学会. 2002年10月 (Los Angeles, CA, USA)

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 |

研究課題： 甲状腺ホルモン不応症の発症およびその病態に関する研究



<内容> 甲状腺ホルモン不応症における中心的病態である不適切TSH分泌状態の機序を明らかにするため、まずTSH遺伝子が甲状腺およびその受容体によって転写抑制されるメカニズムを追求し、次のような結果を得た。

<難治性疾患克服研究>

解説

TSH β 遺伝子の転写を活性化するアクチベーターは転写因子GATA2である。甲状腺ホルモン受容体 (TR) β 2はT3依存性にGATA2の作用を阻害することにより、転写抑制に働く。TRはTSH β 遺伝子プロモーターに直接結合しないが、DNA結合領域は重要で、この部分でGATA2のZn fingerと連関する。従来想定されていたTR結合領域 (nTRE) は必要ではない。またTSH β 遺伝子プロモーターには、転写活性に抑制的に働く因子の結合部位 (SRBP) がGATA2結合サイトに隣接して存在する。Pit 1はGATA2とダイマーを形成し、この抑制を防御している。TRにT3が結合すると、ヒストンの脱アセチル化が生じ、クロマチンがコンパクトに織り込まれて転写が抑制される。T3依存性にヒストンの脱アセチル化が起きるのが、HDACが呼び込まれるためかHATが除去されるためかは未解決である。GATA2による転写活性化とT3/TRによる阻害には、TRAP220の関与が想定されるが、その作用機序の解明は今後の課題である。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

甲状腺ホルモン不応症の病態解明の研究
—TRH遺伝子をモデルとした甲状腺ホルモン受容体による
ネガティブフィードバック機構の分子メカニズムの解析—

分担研究者 森 昌朋 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学 教授

A. 研究目的

甲状腺ホルモン受容体（thyroid hormone receptor; TR）は、標的遺伝子の転写をリガンド依存性に活性化するのみならず、そのネガティブフィードバック作用として下垂体甲状腺刺激ホルモン（thyroid stimulating hormone; TSH）や視床下部TSH放出ホルモン（thyrotropin-releasing hormone; TRH）遺伝子などの発現をリガンド依存性に抑制することが知られている。しかしながら、TRによる詳細な転写抑制機構の分子メカニズムは未だ確立されていない。私達は、TRH遺伝子プロモーター領域をクローニングし、そのnegative thyroid hormone response element（nTRE）が転写開始点下流に存在し、その領域にはTRは直接結合しないが、機能的にTRのDNA結合領域（DBD）が必須である事を報告した。本研究では、TRH遺伝子のnTREに結合する未知の因子を同定し、その蛋白とTRとの結合解析を行い、更に転写抑制に関与する他の転写共役因子の役割について解析する事を目的とした。本研究により、TRによるリガンド依存性転写抑制の新たな分子機構が明らかとなり、甲状腺ホルモン不応症（resistance to thyroid hormone; RTH）の新たな病態メカニズムの解明に寄与するものと思われる。

B. 研究方法

TRH遺伝子のnTREに既存の転写因子結合配列が存在するかコンピューター解析を行う。GH4C1細胞核蛋白とnTREとの結合をゲルシフトアッセイにて検討し、結合した核蛋白がコンピューター解析によって得られた転写因子と同一のものであるか確認する。その転写因子にTRが直接結合するか否かを*in vivo*ならびに*in vitro*結合解析で確認する。Histone deacetylase（HDA）やnuclear receptor corepressorなどのTRの転写共役因子とこの転写因子が*in vivo*においてTRHプロモーターにリクルートされるかクロマチン免疫沈降（chromatin immunoprecipitation; ChIP）法を用いて検討する。更に、この新規転写共役因子に対するshort interfering RNA（siRNA）を用いて内因性蛋白を消失させることにより、T3による転写抑制が減弱するか検討した。

（倫理面への配慮）

全ての研究は、組み換えDNA実験に関する指針に則って、当学倫理委員会にて承認を得た上で遂行した。

C. 研究結果及び考察

コンピューター解析の結果、負の転写制御に必須のプロモーター領域に転写因子Leader-

binding protein-1 (LBP-1) のコンセンサス結合配列が3ヶ所存在することが判明した。LBP-1は、元来human immunodeficiency virus (HIV) type 1 long terminal repeat (LTR) の転写開始点近傍領域に結合し、LTRの転写を抑制する因子として単離された蛋白である。実際に、LBP-1がnTREに結合するか検討したところ、GH4C1細胞核蛋白ならびに*in vitro*で作製したLBP-1蛋白がこの領域に同様に結合し、両者の結合がLBP-1に対する特異抗体によりスーパーシフトした。この結果より、LBP-1がTRHプロモーターのnTREに実際に結合することが明かとなった。次にTRとLBP-1が結合するか否か確認したところ、LBP-1がTRのDBDに直接結合することが判明した。培養細胞を用いた一過性遺伝子導入実験では、LBP-1のcotransfectionはTRの存在下においてTRHプロモーターのTRによるリガンド非依存性活性化を強く増強した。続いてT3による転写抑制にヒストン脱アセチル化が関与するかHDAC阻害剤であるトリコスタチンA (TSA) を用いて検討した。TSAはT3による転写抑制を解除したことより、TRによるTRHプロモーターのリガンド非依存性転写活性化にはヒストンアセチル化が、転写抑制にはヒストン脱アセチル化が関与することが示唆された。次に、LBP-1やTRが*in vivo*においてTRHプロモーターにリクルートされるかChIP法を用いて検討した。T3非存在下では、LBP-1とTRはプロモーターにすでにcorecruitされており、TRHプロモーターはアセチル化ヒストン3に結合していた。一方、T3添加1時間後に内因性HDAC2、3がプロモーターに一過性にリクルートされたが、HDAC1のリクルートは全く認められなかった。HDACのリクルートに伴って、アセチル化ヒス

トンに結合したTRHプロモーターも減少した。LBP-1特異的siRNAにより、LBP-1 mRNAならびに蛋白量は容量ならびに時間依存性に減少したが、コントロールであるcyclophilin蛋白量に明らかな変化を認めなかった。LBP-1特異的siRNA存在下では、TRによるリガンド非依存性活性化及び依存性抑制が有意に減弱した。*In vitro*結合解析においてLBP-1とHDAC2ならびに3が直接結合することも明かとなった。

以上の成績から、LBP-1/TR複合体がHDACなどの転写共役因子をTRHプロモーターにリクルートし、ヒストン蛋白のアセチル化状態を変化させることによりT3非依存性および依存性転写制御を惹起することが明かとなった。

D. 評 価

1) 達成度について

私達は一昨年及び昨年度、RTH症例において同定された変異TRによるヒストンアセチル化の異常がRTHの病態に関与する可能性を報告した。本年度はほぼ当初の予定通り、TRHプロモーターのnTREに結合する蛋白の同定、その蛋白とTRとの結合解析ならびに*in vivo*におけるこの蛋白のプロモーターへのリクルートを確認した。更に、リガンド依存性に特異的なクラスI HDACが一過性にリクルートされ、ヒストンアセチル化状態が変化することにより転写調節が行われることも明かとした。

2) 研究成果の学術的、国際的、社会的意義について

従来の多くの研究にもかかわらず、TRによるネガティブフィードバック機構の詳細な分子機構は現在まで明かとなっておらず、本研究によりHDACなどの転写共役因子を含めたより詳

細なTRH遺伝子の転写抑制分子機構が世界に先駆けて明かとなった。正の刺激系とは全く異なるDNAへの直接的な結合を介さないTRによる転写調節機構は、甲状腺ホルモンによって発現抑制を受けるTRH以外の標的遺伝子の調節機構にも共通点を有すると考えられ、また他の核内受容体による転写抑制機構の解明にも応用されると思われる。こうした転写調節機構の理解は、RTHの病態や他の核内受容体の関与する疾病の病因解明に寄与すると思われる。

3) 今後の展望について

本研究は、主に*in vitro*の実験系や培養細胞を用いて遂行されており、実際に生体内で同じことが起るのか確証はなく、今後更にマウスなどを用いた*in vivo*の系（例えば*in vivo* ChIP assayなど）で確認することは重要である。また、甲状腺ホルモンによって正の転写調節をうける遺伝子において、多くの蛋白を含んだ異なるクラスの転写共役因子複合体が順次プロモーターにリクルートされて転写が活性化される事が報告されている。負の転写抑制系においても、本研究で明かとなった蛋白以外にも多くの共役因子群が転写調節に関与しているものと思われる。今後の継続研究により、これら共役因子複合体が精製、同定されることによって、TRによる転写抑制機構の理解が更に深まり、甲状腺ホルモン不応症の真の病態解明ならびに他の核内受容体の関与する種々の疾患の病態解明や治療にも応用可能と予想される。

4) 研究内容の効率性について

RTH症例において同定した変異TRによるヒストンアセチル化の異常についての成績は原著論文としてMolecular Endocrinology誌に掲載

された。また、本年度研究成果は、12th International Congress of Endocrinologyにて発表し、現在投稿中である。

E. 結 論

TRによる視床下部TRH遺伝子の転写調節分子機構の詳細が明らかとなった。RTH症例に認められた変異TRによるTRH遺伝子転写調節機構異常の本態が、ヒストン修飾の異常によるものであることが強く示唆された。

F. 研究発表

平成14年度

学会発表

1. Tomaru T, Satoh T, Ishizuka T, Nihei Y, Ishii S, Ozawa A, Hashimoto K, Hashida T, Monden T, Yamada M, Mori M. Regulation by retinoids of the expression of the hypothalamic TRH and pituitary TSH β gene in mouse. 9th International Symposium on Molecular Thyroidology.
2. Tomaru T, Satoh T, Ishizuka T, Ishii S, Ozawa A, Hashimoto K, Monden T, Yamada M, Mori M. Regulation by retinoids of the expression of the Hypothalamic TRH and pituitary TSH β gene in mouse. 84TH Annual Meeting of the Endocrine Society.
3. Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Monden T, Wondisfort FE, Mori M. Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Modulates Phenotypes of Resistance to Thyroid Hormone. 84TH Annual Meeting of the Endocrine Society.

4. S.Ishii, M.Yamada, T.Satoh, T.Monden, K.Hashimoto, Y.Nihei, K.Onigata, A.Morikawa, M.Mori Involvement of Coactivators in the Dominant Negative Potency of the Mutant TRs in RTH: Analysis of a Novel Nutant, F455S. 74th Annual Meeting of the American Thyroid Association
 5. Nihei Y, Monden T, Ishii S, Hashimoto K, Satoh T, Yamada M, Mori M. Down-Regulation of Thyroid Hormone Receptor Expressions by Thyroid Hormone in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells and Medulloblastoma HTB-185 Cells. 74th Annual Meeting of the American Thyroid Association
 6. 石井角保、山田正信、小澤厚志、橋田哲、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲朗、鬼形和道、森川昭廣、森昌朋 新たな変異甲状腺ホルモン受容体F455Sによる甲状腺ホルモン不応症の病態生理。第75会日本内分泌学会学術総会
 7. 登丸琢也、佐藤哲郎、石塚高広、小澤厚志、橋本貢士、門伝剛、山田正信、森昌朋 レチノイドによる中枢性甲状腺機能低下症の病態生理機構。第75会日本内分泌学会学術総会
 8. 佐藤哲郎、登丸琢也、石塚高広、橋本貢士、門伝剛、山田正信、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体 (TR) 選択的coactivator、Tat-binding protein1 (TBP1) に結合する TBP1-interacting proteiのTRによる転写活性化に及ぼす影響 第75会日本内分泌学会学術総会
 9. 橋本貢士、山田正信、石井角保、登丸琢也、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 甲状腺ホルモン不応症における thyrotropin-releasing hormone (TRH) の役割: TRHノックアウトTRb ($\Delta 337T$) ノックインマウスの解析 第75会日本内分泌学会学術総会
 10. 橋田哲、山田正信、小澤厚志、石井角保、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 RHノックアウトマウスを用いた新たな脳内ペプチドのクローニング 第75会日本内分泌学会学術総会
 11. 門伝剛、二瓶康代、橋田哲、小澤厚志、橋本貢士、佐藤哲郎、山田正信、森昌朋 髄芽細胞腫HTB-185細胞及び神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞における甲状腺ホルモンの甲状腺ホルモンレセプター及びコアクチベーターの発現調節 第45回日本甲状腺学会
 12. 山田正信、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 TRHは下垂体TSH遺伝子の甲状腺ホルモンへの感受性を制御している 第45回日本甲状腺学会
 13. 佐藤哲郎、登丸琢也、橋本貢士、佐藤哲郎、山田正信、森昌朋 TRH遺伝子転写開始点下流領域に結合する Leader binding protein-1(LBP-1)と甲状腺ホルモン受容体 (TR)の結合解析 第45回日本甲状腺学会
- 平成15年度
学会発表
1. Shibusawa N, Hashimoto K, Yamada M, Wondisfort FE, Mori M. DNA-binding function of thyroid hormone receptor-b in

- mice. 10th International Symposium on Molecular Thyroidology.
2. Satoh T, Tomaru T, Ishizuka T, Hashimoto K, Nihei Y, Ishii S, Monden T, Yamada M, Mori M. Negative regulation of the mouse TRH gene by thyroid hormone requires direct interaction between leader binding protein-1 and the DNA-binding domain of thyroid hormone receptor. 85TH Annual Meeting of the Endocrine Society.
 3. Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Monden T, Hashida T, Ishii S, Tomaru T, Nihei Y, Mori M, Wondisfort FE. The role of the unliganded thyroid hormone receptor in cholesterol metabolism. 85TH Annual Meeting of the Endocrine Society.
 4. 橋本貢士、山田正信、佐藤哲郎、門伝剛、橋田哲、石井角保、登丸琢也、二瓶康代、Wondisfort FE、森昌朋 コレステロール代謝における甲状腺ホルモン受容体 (TR) bΔ337T変異体とLXRαとのクロストーク 第76会日本内分泌学会学術総会
 5. 石井角保、山田正信、橋田哲、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 新たな変異甲状腺ホルモン受容体によるTRH遺伝子発現機構 第76会日本内分泌学会学術総会
 6. 橋田哲、山田正信、二瓶康代、登丸琢也、石井角保、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 TRHにより制御される新たな脳内ペプチドMDP1の解析 第76会日本内分泌学会学術総会
 7. 渋谷信行、橋本貢士、橋田哲、山田正信、Wondisfort FE、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体TRb DNA-binding domain変異体 (GS125TRb) ノックインマウスの作成と解析 第76会日本内分泌学会学術総会
 8. 佐藤哲郎、登丸琢也、橋本貢士、門伝剛、山田正信、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体 (TR) によるTRH遺伝子転写抑制機構の解析 第76会日本内分泌学会学術総会
 9. 橋本貢士、梅沢良平、二瓶康代、登丸琢也、石井角保、橋田哲、渋谷信行、門伝剛、佐藤哲郎、山田正信、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体 (TR) によるマウスSREBP1-c遺伝子制御機構の解析 第46回日本甲状腺学会
 10. 門伝剛、二瓶康代、登丸琢也、石井角保、橋田哲、渋谷信行、橋本貢士、佐藤哲郎、山田正信、森昌朋 甲状腺ホルモンの甲状腺ホルモンレセプターの新たなコアクチベーター-SCRT (Small Coactivating Protein of TR) の機能解析 第46回日本甲状腺学会
 11. 渋谷信行、橋本貢士、橋田哲、山田正信、Wondisfort FE、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体TRb DNA結合ドメイン変異体 (GS125TRb) ノックインマウスにおける甲状腺ホルモン調節 第46回日本甲状腺学会
 12. 佐藤哲郎、登丸琢也、橋本貢士、門伝剛、山田正信、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体

(TR) によるTRH遺伝子転写抑制における histone deacetylaseの役割 第46回日本甲状腺学会

13. 石井角保、山田正信、渋谷信行、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 クロマチン構造の変化によるTRH遺伝子発現制御機構の解明 6回日本甲状腺学会

14. 梅沢良平、山田正信、石井角保、橋田哲、登丸琢也、二瓶康代、渋谷信行、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 TRAP220の甲状腺ホルモンの負の遺伝子制御機構における役割 第46回日本甲状腺学会

15. 山田正信、橋本貢士、渋谷信行、石井角保、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 甲状腺ホルモン不応症の分子機 第45回日本甲状腺学会シンポジウム

16. 渋谷信行、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、山田正信、森昌朋 小脳Purkinje細胞の発達におけるTRbの役割 第30回日本神経内分泌学会

17. 橋田哲、山田正信、渋谷信行、橋本貢士、門伝剛、森昌朋 TRHにより制御される新たな脳内ペプチドMDP1の解析 第30回日本神経内分泌学会

論文発表

1. Monden T, Yamada M, Ishii S, Hosoya T, Satoh T, Wondisford FE, Hollenberg AN, Mori M Leucine at codon 428 in the ninth heptad of thyroid hormone receptor beta

is necessary for interactions with the transcriptional cofactors and functions regardless of dimer formations. Thyroid. 2003 13(5): 427-35.

平成16年度

1) 国内

口答発表	13件
原著論文による発表	0件
それ以外(レビュー等)の発表	1件

そのうち主なもの

論文発表

1. 渋谷信行、橋本貢士、山田正信、Wondisford Fredric E.、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体TR- β のDNA結合能の生体における意義 GS125 TR- β ノックインマウスの作製と解析. ホルモンと臨床(0045-7167)52巻3号 Page 193-199(2004.03)

学会発表

1. 佐藤哲郎、橋本貢士、山田正信、森昌朋 甲状腺ホルモンによる遺伝子発現制御機構に関する最近の知見。第77回日本内分泌学会学術総会

2. 橋田 哲、山田正信、梅沢良平、登丸琢也、石井角保、渋谷信行、橋本貢士、佐藤哲郎、森昌朋 TRHにより制御される新たな脳内ペプチドCyhr1の解析。第77回日本内分泌学会学術総会

3. 渋谷信行、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、山田正信、森昌朋 TR- β 遺伝子変異ノッ

クインマウスにおける小脳Purkinje細胞発達への影響。第77回日本内分泌学会学術総会

4. 登丸琢也、佐藤哲郎、石塚高広、梅沢良平、中島康代、石井角保、橋田哲、渋沢信行、小澤厚志、門伝剛、山田正信、森昌朋 PDIP-1は甲状腺ホルモン受容体の転写共役因子として機能する。第77回日本内分泌学会学術総会

5. 石井角保、山田正信、渋沢信行、橋本貢士、門伝剛、山田正信、森昌朋 転写因子病における標的遺伝子のクロマチン構造のダイナミクス異常。第77回日本内分泌学会学術総会

6. 橋本貢士、梅沢良平、中島康代、登丸琢也、石井角保、橋田哲、渋沢信行、門伝剛、佐藤哲郎、山田正信、森昌朋 マウス SREBP-1c遺伝子発現の甲状腺ホルモン受容体(TR) β による負の制御機構。第77回日本内分泌学会学術総会

7. 梅沢良平、山田正信、渋沢信行、橋本貢士、門伝剛、佐藤哲郎、森昌朋 甲状腺ホルモンによる下垂体TSH発現分泌調節へのTRHの制御機構。第77回日本内分泌学会学術総会

8. 橋田哲、山田正信、渋沢信行、橋本貢士、佐藤哲郎、森昌朋 TRHにより制御される脳内ペプチドMDPIの解析およびELISA測定系の確立。第31回日本神経内分泌学会

9. 石井角保、山田正信、橋田哲、渋沢信行、橋本貢士、佐藤哲郎、佐藤哲郎、森昌朋 甲状腺ホルモン不応症における標的遺伝子のクロマチン構造のダイナミクス異常。第47回日本甲状腺学会

10. 橋本貢士、梅沢良平、中島康代、石井角保、橋田哲、渋沢信行、佐藤哲郎、山田正信、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体(TR) β Δ 337T変異ノックインマウスにおけるコレステロール代謝の包括的解析。第47回日本甲状腺学会

11. 梅沢良平、山田正信、石井角保、登丸琢也、橋田哲、渋沢信行、橋本貢士、佐藤哲郎、森昌朋 TRAP220の甲状腺ホルモンの負の制御機構に与える影響。第47回日本甲状腺学会

12. 登丸琢也、佐藤哲郎、石塚高広、吉野聡、梅沢良平、石井角保、橋本貢士、山田正信、森昌朋 新規転写共役因子PDIP-1と甲状腺ホルモン受容体 (TR) との結合解析 第47回日本甲状腺学会

13. 渋沢信行、橋本貢士、橋田哲、佐藤哲郎、山田正信、森昌朋 甲状腺ホルモン受容体 TR- β DNA結合ドメイン変異体 (GS125 TR- β) ノックインマウスにおける感覚器異常。第47回日本甲状腺学会

2) 海外

口答発表	3件
原著論文による発表	3件
それ以外(レビュウ等)の発表	0件

そのうち主なもの

論文発表

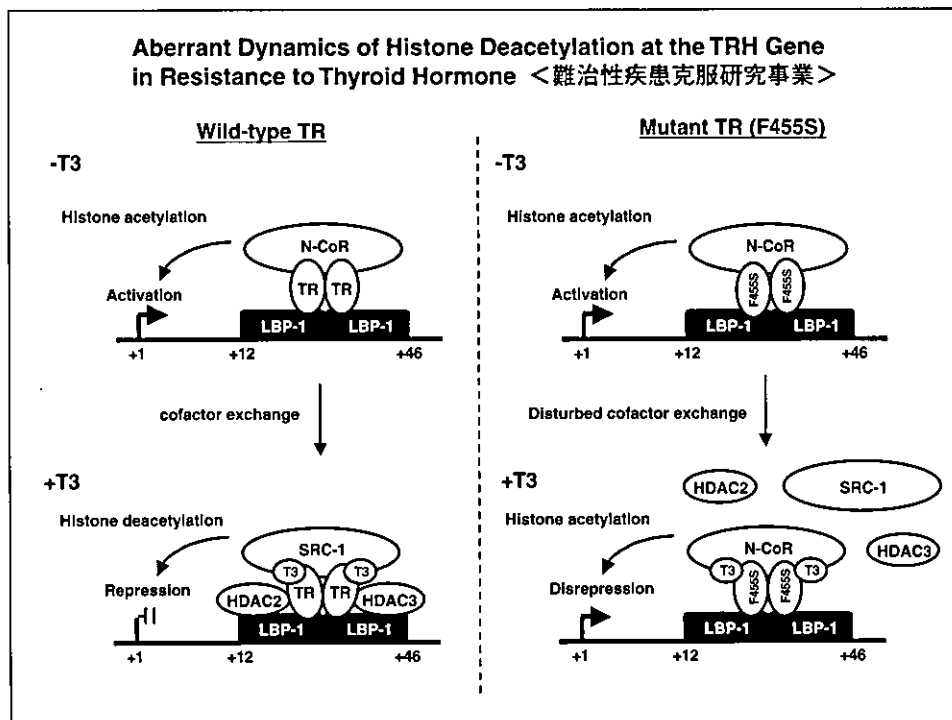
1. Ishii S, Yamada M, Satoh T, Monden T, Hashimoto K, Shibusawa N, Onigata K, Morikawa A, Mori M. Aberrant dynamics of histone deacetylation at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol*. 2004, 18:1708-20.
2. Monden T, Yamada M, Nihei Y, Kishi M, Tomaru T, Ishii S, Hashida T, Shibusawa N, Hashimoto K, Satoh T, Kasai N, Mori M. Unliganded RXR acts as an inhibitory factor on troglitazone-induced activation. *Life Sci* 2004, 76: 731-741
3. Hashimoto K, Yamada M, mondén T, Satoh T, Wondisford FE, Mori M. Thyrotropin-releasing hormone specifically induces P-Lim-CBP binding to activate the glycoprotein hormone (α -subunit gene promoter. *J Mol Endocrinol* (in press)

学会発表

1. Mori M. Management of hyperthyroidism. 12th International Congress of Endocrinology.
2. Satoh T, Tomaru T, Ishizuka T, Ishii S, Hashimoto K, Monden T, Yamada M, Mori M. Negative regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by thyroid hormone requires direct interaction between Leader binding protein-1c and the DNA-binding domain of thyroid hormone receptor. 12th International Congress of Endocrinology.
3. Tomaru T, Satoh T, Ishizuka T, Hashida T, Shibusawa N, Hashimoto K, Monden T, Yamada M, Mori M. Isolation of a novel DNA binding cofactor that binds the DNA-binding domain of peroxisome proliferator-activated receptor γ 12th International Congress of Endocrinology.

G. 知的所有権の出願、取得状況

現在のところなし



(解 説)

T3非存在下において、TRHプロモーターの負の甲状腺ホルモン応答領域(+12~+46)にLBP-1が結合し、TRがそのDNA結合領域を介してLBP-1に結合する。この状態でTRにnuclear receptor corepressor (N-CoR)がリクルートされ、おそらく他の未知の共役因子を介してプロモーター近傍のヒストンテールがアセチル化され、転写が活性化される。T3が結合すると、TRのAF2領域に立体構造変化が起る結果N-CoRが解離し、新たにsteroid receptor coactivator-1 (SRC-1)、histone deacetylase (HDAC)2と3がリクルートされることによりヒストン脱アセチル化が惹起され転写が抑制される (スライド左半)。

一方、RTH症例において同定されたF455S変異TRでは、T3は野生型TR同様の親和性で結合するが、その立体構造異常のためT3が結合してもN-CoRの解離が障害される結果、転写抑制に必要な他の共役因子がプロモーターにリクルートされないためヒストン脱アセチル化が起らず、転写が活性化されたままの状態となり抑制がかからなくなる (スライド右半)。

以上の成績より、変異TRによるクロマチン修飾異常がRTHの病態に深く関与していることが示唆された。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
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

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、 β 型甲状腺ホルモン受容体（TR β ）遺伝子の点突然変異がその原因として報告されてきた。突然変異の多くは、リガンド結合領域に存在し、甲状腺ホルモン（T₃）との結合を欠き、正常の受容体機能を阻害するドミナントネガティブ作用がその発症機序であることが多くの*in vitro*の研究により示されてきた。更に、マウスのTR β 遺伝子にヒトと同様の突然変異を導入したノックインマウスなどを用いて*in vivo*での発症機序も解明されつつあるが、ヒト細胞を用いた研究は殆ど認められない。ヒト皮膚繊維芽細胞は検体が得られやすく、継代可能なため、RTH発症機序の解明に有用であると考えられ、我々は、ヒト皮膚繊維芽細胞からmRNA differential display法を用いて甲状腺ホルモン応答性遺伝子ZAKI-4をクローニングした（J Biol Chem., 271: 14567, 1996）。近年、ZAKI-4に相同性を有する一群の遺伝子が同定され、ヒトではDSCR1（Down's syndrome candidate region1）、ZAKI-4（DSCR1L1）、DSCR1L2が報告されている。これらの遺伝子産物のカルボキシル端がよく保存され、DSCR1はこのC端を介してカルシニューリン（CN）と結合し、その活性を抑制すること

が報告された。しかしながら、ZAKI-4遺伝子産物の機能に関しては報告されていない。本研究ではZAKI-4遺伝子の構造を決定するとともに、その遺伝子産物の機能を明らかにし、この新たな機能分子がRTH発症にどのように関わっているかを検討した。

B. 研究方法

1) ZAKI-4遺伝子転写産物の解析

ZAKI-4遺伝子が脳に高発現していることからグリオーマ摘出時に得られた正常脳組織よりRNAを抽出し、RACE（Rapid Amplification of cDNA Ends）により転写産物を解析した。解析の結果得られた配列をBlast Searchし、ゲノム構造を明らかにした。

2) ZAKI-4遺伝子座の決定

FISH（Fluorescence *In Situ* Hybridization）法を用い、遺伝子座を決定した。

3) ZAKI-4 mRNAの発現部位の検討

転写産物の解析により3つのtranscriptが確認されたため、各々のtranscriptの発現を種々の組織から抽出したRNAを用いたNorthern blot法により検討した。

4) ZAKI-4遺伝子産物の機能解析

ZAKI-4遺伝子から2つのアイソフォームが

産生されることが明らかにされたため、各々のアイソフォームにカルシニューリン (CN) 活性抑制作用があるか否かを検討した。CNとアイソフォームとの結合は翻訳産物の免疫沈降法を用いて検討した。また、Constitutively active calcineurin (Δ CN) を発現するプラスミドと ZAKI-4 α 或いは ZAKI-4 β をコトランスフェクトし、カルシニューリン活性を測定した。更に、IL-2遺伝子の下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したreporter geneをヒトT細胞由来のJurkat細胞に導入し、カルシウム-カルモジュリンシグナリン系の活性化によるルシフェラーゼ活性の上昇が、ZAKI-4 α 或いは β を発現するプラスミドの導入より抑制されるか否かを検討した。

5) 甲状腺ホルモンによるZAKI-4遺伝子発現調節

正常および甲状腺ホルモン不応症 (RTH) 患者から得られた皮膚線維芽細胞を甲状腺ホルモン除去した牛胎仔血清5%を含む培地で2日間培養した後、 10^{-8} MのT3を添加し更に12時間培養し、RNAを抽出した。Real time PCR法およびノーザンブロット法を用いてZAKI-4 α 、 β mRNAを検出した。各mRNA量はGAPDH mRNA量により補正した。CN阻害剤FK506 (1μ M) とrapamycin (10μ M) は、T3添加30分前に培養液に添加した。

6) 甲状腺ホルモンによるmTORの活性化

正常および甲状腺ホルモン不応症 (RTH) 患者から得られたヒト皮膚線維芽細胞を甲状腺ホルモン除去した牛胎児血清を5%含む培地で24時間培養した後、 10^{-8} MのT3を添加し、経時的に細胞を採取し、蛋白を抽出した。同量の蛋白 (40μ g) を7.5% SDSポリアクリルアミド

ゲルで電気泳動後、Western blot法を用いて磷酸化mTORと磷酸化p70^{S6kinase} (p70^{S6K}) を検出した。Rapamycin (10μ M) あるいはサイクロヘキシミド (CHX) はT3添加30分前に培養液に加えた。Western blotには、抗mTOR抗体 (磷酸化の有無に関わらずmTORを認識する抗体)、抗磷酸化mTOR抗体 (S2448の磷酸化を認識)、抗磷酸化p70^{S6K}抗体 (T389の磷酸化を認識)を用いた。

7) TRを介したT3によるmTORの活性化：ドミナントネガティブTRによる阻害

正常TR β および強いドミナントネガティブ作用を発揮するTRG345R (TR β の345番目のグリシンがアルギニンに置換されたmutant) を発現するアデノウイルスベクターを用いた。ヒト皮膚線維芽細胞を90%confluenceまで培養し、無血清培地DMEMに各々のアデノウイルス (MOI: 200) を感染させ、1時間後甲状腺ホルモン除去した牛胎児血清を含む培養液で2日間培養した。その後、T3 (10^{-8} M) を添加し30分後に細胞を採取し、蛋白を抽出した。mTORの活性化は上述の如くWestern blot法により検討した。Green Fluorescent Protein (GFP) を発現するアデノウイルスベクターを構築し、最も適当なMOIを検討すると共にコントロールとして用いた。

8) T3によるPI3K→Akt/PKBによる活性化機序の検討

mTORがT3により活性化されることが明らかになったため、その上流に位置するPI3K→Akt/PKBがT3によりどのように活性化されるかをPI3Kの阻害剤LY294002、wortmanninやPI3Kの調節サブユニットp85 α のドミナントネ

ガティブフォーム ($\Delta p85 \alpha$) を発現するアデノウィルスベクターを用いて検討した。

9) 甲状腺ホルモン受容体 (TR) を介したT3によるPI3Kの活性化

ヒト皮膚線維芽細胞を緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin, 1 mM Na_3VO_4 and 1 mM NaF] にて溶解し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、114,000 gにて15分間遠心後、上清を、非動化した抗p85 α 抗体、抗TR β 抗体による免疫沈降に供した。PI3Kの活性はEchelon Biosciences Inc. 製のELISAキットを用いて測定した。

(倫理面への配慮)

ヒト線維芽細胞は米国シカゴ大学のRefetoff教授より供与されたものであり、研究への使用につき患者からのinformed consentが得られている。

C. 研究結果及び考察

1) ZAKI-4 転写産物の解析

脳組織から得られたRNAを鋳型として5'-RACE (Rapid amplification of cDNA end) および3'-RACEを行った。その結果、ZAKI-4には3種類の転写産物が存在し、 α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ と名付けた。我々は、ヒト皮膚線維芽細胞より甲状腺ホルモン応答性遺伝子としてZAKI-4 cDNAをクローニングしたが (J Biol Chem., 271: 14567, 1996)、このcDNAは、今回明らかにした α アイソフォームに相当していた。 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ は、5'-端が異なり3'-端は同一であった。 α アイソフォームのN-端のcoding sequenceは、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ と異なり、C-端およびnon-coding

sequenceは同一であった。

2) ZAKI-4遺伝子構造と局在する染色体

α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の塩基配列のホモロジー解析の結果、5つの重複するゲノムクローンが検出され、ZAKI-4遺伝子の構造が明らかにされた。単一のZAKI-4遺伝子は7つのエクソンより構成され、 α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ の3つの産物を転写すると考えられる。これらの転写産物は5'-端が異なり、一つの遺伝子から、転写開始点とスプライシングの差異により生成する。 $\beta 1$ mRNAは、エクソン1, 3, 5~7から構成され、 $\beta 2$ は、エクソン2, 3, 5~7から構成させる。一方、 α mRNAはエクソン4, 5~7から構成される。翻訳開始コドンは、エクソン3と4に存在し、終止コドンは、エクソン7に存在する。従って、 $\beta 1$ と $\beta 2$ mRNAsは同一の蛋白産物、ZAKI-4 β アイソフォームを生成し、 α mRNAは、 β と同一のC端を持つがN端が全く異なるアイソフォーム α を生成する。ZAKI-4 α cDNAを用いたFISHにより、この遺伝子が第6染色体短腕に存在することが示された。

3) ZAKI-4 転写産物の発現解析

各転写産物に特異的なエクソン (β : エクソン3、 α エクソン4) をプローベをとして、ヒト組織における発現を検討すると、 α mRNAは主に脳に、 β mRNAは種々の臓器に発現が認められたが、特に脳、心臓、筋肉、と腎臓に多く発現していた。 β 、 β mRNAに特異的なオリゴヌクレオチドを用いた検討では、両者の発現パターンがほぼ同様であることが示された。ZAKI-4 α と β の発現分布の差異はこれらのアイソフォームの発現が組織特異的に調節されることを示唆している。

4) ZAKI-4アイソフォームの機能解析

ZAKI-4遺伝子産物の機能は未だ知られていないが、最近、DSCR1がyeast two hybrid systemを用いた検討により、CN結合することが報告された (Hum Mol Genet 9, 1681, 2000)。ZAKI-4とDSCR1のC端のアミノ酸配列は高い相同性を示すため、各ZAKI-4アイソフォームとCNとの結合を検討した。

ZAKI-4 α 、 β 及び α と β 共通のC端をコードする塩基をpGEM-T Easy プラスミドにクローニングし、無細胞網状赤血球翻訳系を用いて、 ^{35}S -標識メチオニンの存在下で蛋白を合成した。同様にCNサブユニットAも翻訳した。これらの蛋白はSDS-PAGEで単一のバンドとして確認された。また、抗ZAKI-4抗体によってZAKI-4 α 、 β 及びそのC端蛋白は免疫沈殿されたが、CNサブユニットAは沈殿されなかった。ZAKI-4 α 、 β 及びC端の蛋白をそれぞれCNサブユニットAと共に翻訳し、ZAKI-4抗体による免疫沈殿を行った。その結果、ZAKI-4 α 、 β 及びC端の蛋白だけではなく、CNサブユニットAもZAKI-4抗体によって免疫沈殿された。従って、ZAKI-4 α と β は共にそのC端を介してCNサブユニットAと結合し、N端アミノ酸配列の差異はこの結合に影響を与えなかった。CNサブユニットAは酵素活性を持つため、この分子間の結合が酵素活性にどんな影響を与えるか、次のように reporter gene assay を用いて検討した。

CNはセリン・スレオニン脱リン酸化酵素であり、T細胞の転写因子NF-AT (nuclear factor of activated T cell) を活性化することにより、サイトカイン、IL-2などの発現を調節することはよく知られている。T細胞にionomycinを加え、カルシウム-カルモジュリンシグナリン系を活性化し、CNを活性化すると、その基質

NF-ATが脱リン酸化され、その核内移行が促進される。PMAによって活性化されるAP-1はNF-ATと共にIL-2プロモーター領域に結合して、IL-2遺伝子の転写を活性化する。免疫抑制剤サイクロスポリンA (CsA) は、その結合蛋白と複合体を形成し、CNを抑制し、NF-ATを介するIL-2遺伝子の活性化を抑制する。

我々は、IL-2プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したreporter geneを作成し、上述のZAKI-4 α 、 β 及びC端をcodingするcDNAをpShuttleにクローニングし、それぞれIL-2 reporter geneと共にelectroporation法によってヒトT細胞由来のJurkat細胞に導入した。導入24時間後にionomycinとPMA、或いはCsAを添加し、更に24時間後にルシフェラーゼの活性を測定した。ZAKI-4 α 、 β 或いはC端を強制発現させた細胞のルシフェラーゼ活性はCsA添加した細胞と同程度に抑制された。また、ZAKI-4 α と β の間にはルシフェラーゼの活性の抑制度に差が認められなかった。以上の結果から、ZAKI-4アイソフォームは、C-端を介してCNと結合し、その活性を抑制することが明らかとなった。一方、N端は、ZAKI-4とCNの結合、及びCN活性の抑制に影響しないことが示された。

5) 甲状腺ホルモンによるZAKI-4遺伝子発現の調節

ZAKI-4は甲状腺ホルモン応答性遺伝子としてヒト皮膚線維芽細胞よりクローニングされたが、新たなアイソフォームが同定されたため、ヒト皮膚線維芽細胞におけるZAKI-4 α と β の発現と甲状腺ホルモンによる調節を検討した。ZAKI-4 α は、当初甲状腺ホルモン応答性遺伝子としてクローニングされたが、 β アイソフォー

ムは、ヒト組織に普遍的に発現していることから、このアイソフォームもヒト線維芽細胞に発現していることが予測された。事実、線維芽細胞にはZAKI-4 α 、 β 共に発現が観察された。そこで、甲状腺ホルモン (T3 = triiodothyronine; 10^{-8} M) 添加12時間後、RNAを抽出し、ZAKI-4 α と β の発現量の変化をNorthern Blot法により検討した。ZAKI-4 α mRNAは甲状腺ホルモンによって著しく増加したが、 β mRNAは変化しなかった。これはZAKI-4 α と β が組織特異的に調節されるだけでなく、甲状腺ホルモンによる調節も異なることを示している。

T3によるZAKI-4 α の発現増加が内因性のCN活性を抑制するか否かを検討するため、T3添加後のCN活性を経時的に検討した。CN活性は、経時的に減少し、ZAKI-4 α mRNAの増加に伴う α アイソフォームの増加がこの減少をもたらしたと考えられた。

2人の健常者から得られた皮膚線維芽細胞ではT3の濃度依存性にZAKI-4 α mRNAの増加が認められ、 β mRNAの増加は認められなかった。この結果は、既報の結果と (Biochem J, 367: 459, 2002) と合致する。一方、TR β 遺伝子異常 (TRG345RあるいはTRA317T) を有するRTH患者からの得られた皮膚線維芽細胞ではT3依存性のZAKI-4 α mRNAの増加は認められなかった。この結果は、甲状腺ホルモン不応症の病態形成にT3依存性のZAKI-4 α mRNA増加の欠如が関わっている可能性を示唆している。

最近、ZAKI-4遺伝子ファミリーの1つであるDSCR1の発現がCNの活性化により増加することが報告された (Circ Res, 87: E61, 2000)。そこで我々は、CNが甲状腺ホルモンによるZAKI-4 α アイソフォームの増加にCNの活性化が関わっているか否かを検討するため、CNの

抑制剤FK506とそのアナログrapamycinを用いた検討を行った。その結果、ZAKI-4 α の発現増加はFK506によっては抑制されず、rapamycinにより抑制されることが明らかにされた。Rapamycinはセリン・スレオニンキナーゼであるmTOR (mammalian target of rapamycin) の特異的阻害剤として知られる。従って、甲状腺ホルモンはCNの活性化ではなく、mTORの活性化を介してZAKI-4 α の発現を増加させることが推測された。

6) 甲状腺ホルモンにはmTORの磷酸化して活性化する

上述のrapamycinを用いた検討により、T3がmTORを活性化する可能性が示されたため、その活性化機序につき検討した。mTORの活性化には2つのセリン残基、S2481とS2448の磷酸化が重要とされている。S2481の磷酸化は、mTOR自身による自己磷酸化によるとされている。そこで、T3がS2448の磷酸化を介してmTORを活性化するか否かを抗S2448磷酸化mTOR抗体を用いて検討した。活性化の確認にはmTORの基質p70^{S6K}の磷酸化 (T389) を指標とした。T3はmTORのS2481の磷酸化を誘導し、この磷酸化はrapamycinにより完全に抑制された。mTORのS2448の磷酸化は、p70^{S6K}の磷酸化 (T389) を伴い、mTORがT3により活性化されることが示された。

T3によるmTORのS2448の磷酸化は、添加後30分から認められ、12時間まで持続した。そこで、30分以内の短時間でT3によるS2448の磷酸化が誘導されるか否かを検討すると、T3は10分で既に磷酸化を誘導し、この磷酸化はp70^{S6K}の磷酸化 (T389) を伴っていた。T3によるmTORの磷酸化は、蛋白合成阻害剤cycloheximideの

添加により抑制されず、このT3作用にde novoの蛋白合成が必要とされないことが示された。以上の結果はT3が転写を介すること無く、mTORを活性化することを示し、いわゆるT3のnongenomic actionが示された。また、TR β 遺伝子異常 (TRG345RあるいはTRA317T) を有するRTH患者からの得られた皮膚線維芽細胞ではT3依存性のmTORの活性化は認められなかった。T3作用の発揮に蛋白合成を必要としないこと、更に作用発現までの時間が極めて短いことから、T3によるmTORの活性化は転写を介さないnon-genomic actionと考えられた。

7) 甲状腺ホルモン受容体 (TR) を介したT3によるmTORの活性化：ドミナントネガティブTRによる阻害

RTH患者からの皮膚線維芽細胞では、T3によるZAKI-4 α mRNAの増加、mTORの活性化が認められないため、mTORの活性化には正常TR β の発現が示唆された。一方、T3が標的遺伝子の転写調節を介さず作用するnongenomic actionにTRが必要か否かは明らかにされていない。そこでT3依存性のmTORの活性化にTRが必要とされるか否かをドミナントネガティブ変異TR (G345R) を発現するアデノウイルスを用いて検討した。TRG345RはTRのリガンド結合ドメインのアミノ酸置換によりホルモン結合能を欠き、正常のTR機能を強く抑制するドミナントネガティブ作用を発揮する。皮膚線維芽細胞にコントロールアデノウイルス (ADGFP)、正常TR発現ウイルス (wild type)、変異TR発現ウイルス (G345R) をMOI 200にて感染し、1時間後甲状腺ホルモンを除去した牛胎児血清を含む培養液で2日間培養した後T3 (10⁻⁸M) を添加し30分後に細胞を採取し、蛋白を抽出し

た。コントロール (GFP) とwild type TR発現アデノウイルスの感染により、T3によるmTORの活性化は影響を受けなかったが、TRG345Rの発現によりT3-依存性のmTORのS2448の磷酸化は著しく抑制された。この結果は、nongenomic actionによるmTORの活性化にT3と結合したTRが必要とされることを強く示唆するものと考えられた。

8) T3によるPI3K→Akt/PKB→mTOR→p70^{S6K}シグナリングカスケードの活性化

インスリンがmTORを活性化することはよく知られている。インスリンが受容体に結合すると、受容体自身とIRS (insulin receptor substrate) を磷酸化しPI3Kの調節サブユニットp85 α と会合することによりPI3Kを活性化し、phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂ = PIP₂) をPtdIns (3,4,5)P₃ (PIP₃) に転換する。PIP₃はAkt/PKBを細胞質から細胞膜に誘導し、Akt/PKBのT308及びS473の磷酸化を介して活性化する。T308の磷酸化はPDK1によるとされているが、S473の磷酸化酵素はまだ同定されていない。T3によりAkt/PKBのS473の磷酸化が誘導されるか否かを検討すると、T3添加5分以内という短時間に磷酸化が観察された。

Akt/PKBの基質の多くが核内に存在することは知られているが、磷酸化により活性化されたAkt/PKBの核内移行については殆ど報告が見られない。そのため、T3により活性化を受けたAkt/PKBとmTORの細胞内局在を各々の抗磷酸化抗体を用いて検討した。その結果、T3の添加により活性型Akt/PKBは細胞質から核内へ速やかに移行した。一方、mTORは初めから核内に存在し、Akt/PKBの核内移行に伴

い磷酸化を受けた。また、このAkt/PKBの活性化と核内への移行は、PI3Kの阻害剤であるwortmanninにより完全に阻止された。以上の結果は、T3によるAkt/PKB→mTOR→p70^{S6K}の活性化の第一段階としてPI3Kの活性化が必要であることを示唆した。事実、PI3Kの阻害剤であるwortmannin、LY294002を添加するとT3によるAkt/PKB→mTOR→p70^{S6K}の活性化が完全に抑制された。また、PI3K活性を抑制するドミナントネガティブp85(Δp85)を発現するアデノウイルスを感染すると、T3によるAkt/PKB→mTOR→p70^{S6K}の活性化が阻害された。またT3によるZAKI-4 α の発現増加もwortmannin、LY294002、Δp85により完全に抑制された。

我々は、T3によるZAKI-4 α の発現増加には*de novo*の蛋白合成が必要とされることを報告した(J Biol Chem, 1996)。従って、T3によるAkt/PKB→mTOR→p70^{S6K}の活性化により合成される蛋白がZAKI-4 α の発現調節に関わっていると考えられる。p70^{S6K}の標的蛋白はS6 ribosomal proteinであり、その磷酸化は5'TOP mRNAの翻訳を促進し翻訳伸長因子、リボゾーム蛋白などの合成を促す。従って、mTOR→p70^{S6K}の活性化は蛋白の翻訳促進に重要な役割を果たしている。mTOR→p70^{S6K}の活性化に伴う翻訳マシナリーのT3によるZAKI-4 α の発現増加に関わっている可能性が示唆される。

T3はZAKI-4 α の発現増加を介してCN(protein phosphatase 2B = PP2B)の活性を抑制することが示されたが、活性型mTORは、protein phosphatase 2A (PP2A)の磷酸化を介して4E-BP1とp70^{S6K}の脱磷酸化を抑制することが知られ、T3がPP2BのみならずPP2Aの活性調節に関わっている可能性がある。

9) TRを介したT3によるPI3K活性化

近年、エストロゲン受容体(ER)が内皮細胞においてリガンド依存性にp85 α と結合し、PI3Kを活性化することが報告された。TRはERと共にステロイドホルモン受容体ファミリーに属するため、TRがp85 α と結合するか否かを正常TR β 或いは変異TR β (G345R)を発現するアデノウイルスを繊維芽細胞に感染させた後、24時間後、T3添加後30分に細胞を採取し、溶解液を抗TR β 抗体にて免疫沈降し、沈降産物を抗p85 α 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。その結果、正常TR β 、変異TR β 共にp85 α と結合することが示され、この結合はT3非依存性であった。p85 α は、SH2、SH3、Rho-GAPなどの機能ドメインを持ち、これらのドメインを介して幾つかの蛋白と結合することが知られている。インスリン受容体やIRSはSH2ドメインを介し、Rhoファミリー蛋白(Rac、Cdc42等)は、Rho-GAPドメインを介してp85 α と結合し、PI3Kを活性化する。SH2ドメインへの結合にはインスリン受容体やIRSのチロシン磷酸化が必要とされるが、TRにはチロシン磷酸化部位は存在しないため、SH2ドメインを介した結合ではないと考えられる。一方、Rho-GAPドメインにはTRと結合する共役因子(SRC-1、TIF2等)との結合モチーフLXXLLが3つ存在する。従ってTRはRho-GAPドメインとの結合によりPI3Kを活性化すると考えられる。

TRがp85 α とT3非依存性に結合することが示されたため、PI3Kの活性化にはTRとT3の結合が必要であることが推測された。この証明のため、正常TR β 或いは変異TR β (G345R)を過剰発現後、T3を添加し、細胞溶解液を調整し、PI3K活性をELISAにて測定した。その結果、変異TR β を過剰発現した場合にはT3の添

加によりPI3Kの活性化は認められず、正常TR β の過剰発現あるいはコントロール（GFAP過剰発現）細胞では、T3の添加によりPI3K活性が誘導された。従って、TRとp85 α との結合はT3を必要としないが、PI3Kの活性化にはTR-T3複合体の形成が必要であることが示された。

D. 評 価

1) 達成度について

本研究は、甲状腺ホルモン不応症（RTH）の発症機序解明のため、1) 我々が正常ヒト皮膚繊維芽細胞よりdifferential mRNA displayにより同定したZAKI-4の遺伝子構造、遺伝子産物の機能を解明し、甲状腺ホルモン（T3）によるZAKI-4 mRNA発現の調節機序を明らかにすること、2) 正常人及びRTH患者から得られた繊維芽細胞におけるZAKI-4発現調節の比較検討することによりRTH発症機序の解明を目的とした。3年間の研究により初期の目的を達成することが出来た。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

これまでT3の作用は、核内の受容体（TR）を介して標的遺伝子の発現を調節するgenomic actionと考えられてきた。しかし、本研究により、T3が転写を介さないnongenomic作用によってZAKI-4 α の発現を調節していることが明らかにされた。即ち、T3が核外に存在するTRと結合し、この複合体がPI3Kのregulatory subunit p85 α と結合することによりPI3Kを活性化し、その下流のAkt/PKB \rightarrow mTOR \rightarrow p70S6Kからなるキナーゼカスケードを活性化することによりZAKI-4 α の転写を促進することを明らかにした（Mol Endocrinol, in press

2004）。このT3のnon-genomic actionはこれまで報告が無く、新たなT3の作用機序の発見と共にRTHの症状、特にattention deficit、精神・知能発育遅延などの中枢神経系症状の発症に本研究により明らかにされたPI3K \rightarrow Akt/PKB \rightarrow mTOR \rightarrow p70S6K \rightarrow ZAKI-4 α が関与している可能性が示された。この研究はRTH研究の第一人者であるシカゴ大学Refetoff教授との共同研究により遂行されたものであり、その成果は国際学会のPlenary Lectureなどで発表されてきた。

3) 今後の展望について

ZAKI-4 α は、中枢神経系において高発現している。一方カルシニューリン（CN）はカルシウム/カルモジュリンの調節を受ける唯一の蛋白脱リン酸化酵素（protein phosphatase 2B）である。CNは神経の可塑性や神経細胞のアポトーシスに重要な役割を担っていることが明らかにされている。従って、T3依存性のZAKI-4 α 調節を介したCN活性の調節は中枢神経系の機能に大きく関与していると考えられる。一方、T3によるZAKI-4 α 増加にはPI3K \rightarrow Akt/PKB \rightarrow mTOR \rightarrow p70S6Kの活性化が関与している。PI3K \rightarrow Akt/PKB \rightarrow mTOR \rightarrow p70S6Kシグナリングカスケードは、軸索の伸展、シナプス形成に重要な役割を果たしている。従って、本研究で明らかにされた知見をもとに中枢神経系におけるこのシグナリングカスケードの役割を明らかにすることにより、これまで不明なことが多いとされてきた甲状腺ホルモンの中枢神経系への作用解明に大きく貢献できると考えられる。

4) 研究内容の効率性について

シカゴ大学Refetoff教授、スペイン生物医学

研究所長Bernal博士などとの共同研究を行うことにより、甲状腺不応症患者の繊維芽細胞の供給、多くのアデノウイルスベクターの開発など効率よく研究を行うことが出来た。

E. 結 論

本研究により、甲状腺ホルモンが核外に存在する受容体と結合し、PI3K→Akt/PKB→mTOR→p70S6Kシグナリングカスケードを賦活し、カルシニューリン阻害蛋白ZAKI-4 α を増加させること世界で初めて明らかにした。この甲状腺作用はTR β 遺伝子変異を有する甲状腺ホルモン不応症患者の繊維芽細胞においては認められず、不応症発症の少なくとも一因となることが示された。

F. 研究発表（平成14年～16年）

1) 国内

口頭発表	27件
原著論文による発表	4件
それ以外（レビュー等）の発表	6件

そのうち主なもの

論文発表

1. 神部福司, 妹尾久雄: チロキシン(T4), トリヨードチロニン(T3). 清野裕他 (編) ホルモンの事典. 朝倉書店, in press, 2004.
2. 妹尾久雄: 甲状腺刺激ホルモンと甲状腺ホルモン. (編) 標準生理学, in press, 2004.
3. 曹 霞, 妹尾久雄: 甲状腺ホルモン受容体を介したカルシニューリンの内因性阻害蛋白ZAKI-4の発現調節に対するmammalian target of rapamycinの活性化の関与: 新たな甲状腺ホルモン作用. ホルモンと臨床, 52: 17-21, 2004

4. 妹尾久雄, 神部福司: 甲状腺濾胞細胞の stimulus-secretion coupling. 内分泌・糖尿病科, 18(5): 411-417, 2004.
5. 妹尾久雄, 曹 霞, 村田善晴: 内分泌疾患の遺伝子学. 臨床遺伝子学 2004, 最新医学 93-103, 2004.
6. 上條隆司, 山本美智代, 小川正道, 林良敬, 妹尾久雄, 西美和: 日本人IGHD II型患者におけるGH-1遺伝子異常の多様性. ホルモンと臨床, 「特集 小児内分泌学の進歩 2003」 35-39, 2003.
7. 上條隆司, 林良敬, 妹尾久雄, 山本美智代, 小川正道, 西美和: GH-1遺伝子第5 exonにおけるmissence変異が同定されたIGHDの2症例. ホルモンと臨床, 増刊号「内分泌 興味ある症例 第43集」 51: 31-34, 2003.
8. 曹 霞, 神部福司, 宮崎高志, SARKAR D, 妹尾久雄: 甲状腺ホルモン応答性遺伝子ZAKI-4: その構造と発現調節. ホルモンと臨床, 「特集 分子甲状腺学の進歩 2003」 131-136, 2003.
9. 村田善晴, 妹尾久雄: 甲状腺機能低下症による神経機能異常と甲状腺ホルモン応答性遺伝子. 最新医学, 特集 甲状腺疾患研究の最前線—基礎研究から治療への応用—. 58(7): 82-88, 2003.
10. 神部福司, 妹尾久雄: TBG異常症. よくわかる甲状腺疾患のすべて. (伴 良雄 編) 355-358, 永井書店 (大阪) 2003.

学会発表

1. 小林宏暢, 今井常夫, 神部福司, 村田善晴, 妹尾久雄: 副腎皮質幹細胞の同定とACTHによるその増殖と分化: 第77回日本内分泌