The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	TIP27 : a novel repressor of the nuclear orphan receptor TAK1/TR4
Author(s)	中島, 武之
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48896
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【46】

氏　　名	中　島　武　之（なかじま たけし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２１５２７　号
学位授与年月日	平成 19 年８月 22 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	TIP27 : a novel repressor of the nuclear orphan receptor TAK1/TR4 （TIP27：核内オーファンレセプターTAK1/TR4 の新たな転写抑制因子）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　片山　一朗 （副査） 教　授　板見　　智　　教　授　奥山　明彦

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

核内オーファンレセプター TAK1/TR4（TAK1）は脳、胸腺、精巣をはじめ生体内の種々の組織で発現していることが知られているが、その役割はほとんど解明されていない。TAK1 はホモ二量体としてまたは核内オーファンレセプター TR2 あるいはアンドロゲンレセプターとヘテロ二量体をつくり特定の DNA 配列へ結合し、下流遺伝子の発現調節を行うことが知られている。また、PPAR、RXR、RAR、VDR など他の核内レセプターと、特定の DNA 配列への結合を競合することによりそれらによる遺伝子発現を制御することも知られている。しかしその転写活性をつかさどる共役因子についてはこれまでほとんど知られていなかった。そのような転写活性を調節するタンパク質の同定を行い、生体内での役割を明らかにすることが本研究の目的である。

〔　方法ならびに成績　〕

TAK1 に結合し転写調節を行いうるタンパク質を同定するために、TAK1 を gal4 DNA 結合領域とのキメラとして、ヒト精巣の cDNA ライブラリーを gal4 活性化領域とのキメラとして、両者をイースト内で発現させ TAK1 結合タンパクを得る yeast two hybrid 法によるスクリーニングを行った。そこで結合が認められた数種類のタンパク質の中でイーストでのβガラクトシダーゼ活性の最も高い、すなわち最も TAK1 との結合力が強いと考えられた未知のタンパク質を TAK1-interacting protein（TIP27）と名付け、この遺伝子の全長を得た。ノーザンブロットでは比較的広範な組織で TIP27 の発現が認められた。特に TAK1 を高発現している精巣での TIP27 の高発現が認められた。

次に CV-1 細胞を用い、TAK1 を gal4 DNA 結合領域とのキメラとして、TIP27 を VP16 活性化領域とのキメラとして、細胞内で発現させる mammalian two hybrid 法を行い、TIP27 と TAK1 とが哺乳類細胞内でも結合しうることを示した。なお、mammalian two hybrid 法では TIP27 は TAK1 と特異的に結合し、アンドロゲンレセプターなどその他数種類の核内レセプターとの結合は認められなかった。

TIP27 と TAK1 とが互いに結合するために必要な領域を同定するために、それぞれの欠失変異体や単アミノ酸変異体を作成し mammalian two hybrid 法を行った。その結果、TAK1 ではリガンド結合領域の helix 3 から helix 12 までが保たれていることが必要であり、TIP27 では 40 アミノ酸領域 TAK1-interaction domain（TID）が必要であることを示した。これらのタンパク質が上記の領域を介して直接結合していることを示すために、GST と野生型あるい

はTIDを欠失させた変異型TIP27とのキメラタンパクを用いたGSTプルダウンアッセイを行い、in vitroで発現させたTAK1がこれに結合することを示した。また、COS1細胞にflag tagのついたTAK1と、myc tagのついた野生型TIP27あるいはTIDを欠失させた変異型TIP27を強制発現させ、抗flag抗体で免疫沈降した後に抗myc抗体によるウエスタンブロットを行い、TAK1との結合におけるTIDの必要性を示した。

細胞内でのTAK1とTIP27の共存を確認するために、COS1細胞にflag tagのついたTAK1と、GFPとTIP27のキメラタンパクを強制発現させ、TAK1を単光免疫染色した後にレーザー共焦点顕微鏡にて観察を行い、これらの分子が細胞内で点状に共存することを示した。

COS1細胞ではTAK1は転写活性を持っているが、TAK1とTIP27を共発現させるとTIP27の容量依存性にTAK1の転写活性は抑制される。TIP27によるこの効果はTIDを欠失させたTIP27の変異体では認められず、またRORγやPPARαによる転写活性に対してTIP27は抑制効果を持たなかった。CV1細胞中でTAK1をgal4 DNA結合領域あるいはVP16活性化領域とのキメラとして両者を発現させ、TAK1がホモ２量体を作ることにより生じる転写活性をTIP27が抑制しうるか否かをレポーター遺伝子の活性により計測し、TIP27はTAK1のホモ２量体形成を阻害しない結果を得た。

〔　総　　括　〕

イーストトゥーハイブリッド法により核内オーファンレセプター TAK1と結合する未知のタンパク質TIP27の同定を行った。TIP27は腸管、胎盤などでの発現が認められたが、TAK1が高発現している精巣では高発現していた。マンマリアントゥーハイブリッド法で、TIP27はアンドロゲンをはじめ数種類の核内レセプターとの結合は認められず、特異的にTAK1のリガンド結合領域と結合した。この結合はTIP27の特定の領域（TID）を介して行われ、このことはGSTプルダウン法や免疫沈降法によっても確認できた。TAK1とTIP27が細胞内で共存することはレーザー共焦点顕微鏡による観察で確認した。TAK1の転写活性に対しTIP27は抑制的に作用し、この転写活性の抑制はRORγやPPARαに対しては認められなかった。またこの抑制効果はTAK1の２量体形成の阻害によるものではなかった。以上の実験結果よりTIP27はTAK1に対して特異的に転写活性を阻害する因子として重要な役割を担っていることを示した。

論文審査の結果の要旨

TAK1は核内レセプタースーパーファミリーに属する転写因子であるが、TAK1による下流遺伝子の転写を調節するリガンドや共役因子は未知である。生体内での役割も不明であったが、近年TAK1のノックアウトマウスが作成され、発育、生殖、行動などにおけるTAK1の役割が明らかになってきた。

本研究の目的は TAK1 の転写活性を調節する共役因子を同定しその機能を解析することであった。Yeast two hybrid法によるスクリーニングでTAK1と結合するタンパク質としてTIP27を同定し、ほ乳類細胞でも両者の結合を確認した。TIP27遺伝子の発現組織の解析ではTAK1が高発現している精巣や卵巣でのTIP27の高発現を示した。TIP27は細胞内では核内に存在し、TIDという40アミノ酸領域を介してTAK1のリガンド結合領域と結合し、TAK1による転写を抑制することを明らかにした。また、TIP27のTAK1との結合および転写調節作用における特異性を示した。本研究により明らかとなったTIP27による特異的な転写抑制は、TAK1による転写調節機構の解明に役立つものであり、学位の授与に値すると考えられる。