



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

氏 名	中 島 武 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 5 2 7 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う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 抗体によるウェ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 ROR γ や PPAR α 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 〕

イーストツ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。マンマリアントツ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 ROR γ や PPAR α 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。