Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Involvement of mPOU(Brn-5) a class VI POU protein in the gene expression of Pit-1 as well as PRL

戸田, 圭三

(Degree)
博士（保健学）
(Date of Degree)
2008-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲4233
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004233

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏　　名	戸田　圭三
博士の専攻分野の名称	博士（保健学）
学　位　記　番　号	博い第 56 号
学位授与の　要　件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の　日　付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Involvement of mPOU(Brn-5) a class Ⅵ POU protein in the gene expression of Pit-1 as well as PRL（プロラクチンおよび Pit-1 遺伝子発現における mPOU(Brn-5)の関与）

審　査　委　員

主　査	教　授	伊藤　光宏
	教　授	渡邊　　信
	教　授	松村　末夫
	准教授	置村　康彦

論文内容の要旨

氏　名　戸田　圭三

Involvement of mPOU (Brn-5), a class VI POU protein,
in the gene expression of Pit-1 as well as PRL
(プロラクチンおよびPit-1遺伝子発現におけるmPOU (Brn-5)の関与)

下垂体前葉ホルモンであるプロラクチン(PRL)の発現調節機構において、下垂体特異的な転写因子である Pit-1 が極めて重要な役割を果たすことが報告されている。しかし、他の因子の作用も重要であり、PRL遺伝子のプロモーター内に散在するPit-1結合部位へのPit-1の結合に加え、さらに他の転写因子・co-factorがそこにリクルートされることによって、PRL遺伝子発現が強力に活性化される。今回検討したmPOUはその様な因子の１つであり、yeast-twoハイブリッドシステムにより、PRLプロモーター内の Pit-1 結合部位に結合する Pit-1 以外の転写因子として、ヒト下垂体cDNAライブラリーからクローニングされたものである。

mPOUはPit-1と同じPOUファミリーに属する転写因子で、POU specific domainとPOU homeodomainから構成されるPOUドメインを有する。ヒト以外では、Brn-5(ラット)、Emb(マウス)、POUc(ゼブラフィッシュ)がorthologueとして同定され、これらの蛋白レベルでの検討では脳や中枢神経系での発現が強い。下垂体においてはPRL産生細胞に存在し、ACTH産生腫瘍や非機能性下垂体腫瘍には発現しないことが報告されているが、下垂体における内因性mPOU(Brn-5)の意義は明確ではない。そこで今回、Brn-5をRNA interference (RNAi)でノックダウンすることにより、ラットPRL産生細胞であるGH3細胞におけるBrn-5の生理学的意義を明確にすることを試みた。

Brn-5 small interfering RNAまたはBrn-5 short hairpin RNAを用いて、内因性Brn-5 mRNAをノックダウンしたGH3細胞では、対照群に比べてPRL mRNA量は減少傾向をしめし、細胞中のPRL蛋白量は有意に低下した。さらに、PRL遺伝子発現を活性化するPit-1のmRNA量も有意に低下していた。

mPOUが直接PRL、Pit-1遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにするために、GH3、HEK293細胞にmPOU発現ベクターおよびPRL、Pit-1レポータープラスミドをトランスフェクションし一過性発現実験を行ったところ、mPOUはいずれの細胞においても、Pit-1結合エレメントを有する 0.6kb PRL-Luc レポータープラスミドと 0.6kb Pit-1-Luc レポータープラスミドの転写活性を亢進させた。この成績は、mPOUはPRL遺伝子発現のみならず、Pit-1遺伝子発現をも亢進させ、直接的および間接的にPRL遺伝子発現を増加させる可能性を示唆する。また、PRLプロモーター中に４つ存在するPit-1結合エレメントのうち、最も近位にあるPit-1 結合エレメントである1Pを変異させたmutant 0.6kb PRL-Luc レポータープラスミドではmPOUの転写活性亢進作用を認めなかったことより、PRL遺伝子におけるmPOUの作用点として1Pを介することが示唆された。

今回行った一過性発現実験において、mPOUはPRL転写活性を単独で亢進したが、その作用はPit-1より弱かった。しかし、Pit-1をmPOUを共にトランスフェクションすることにより、PRL転写活性は相乗的に増加した。また、ヒストンをアセチル化する酵素活性を有し、転写コアクチベーターとして機能する CBP を同時にトランスフェクションすることによっても、mPOUのPRL遺伝子発現促進作用が亢進した。

ゲノムDNAにおいても、mPOUがPRL、Pit-1遺伝子に結合し得るのか明らかにするため、Flag-mPOUを発現させたGH3細胞を使用してChIP assayを行った。抗Flag抗体により免疫沈降したサンプルをテンプレートとしたとき、PRL、Pit-1 プロモーターに由来する PCR 産物は増幅されたが、マウス IgG を使用し免疫沈降を行った対照群ではその増幅は明確ではなかった。

以上の成績より、mPOUは1Pを介してPit-1と相乗的にPRL遺伝子発現を亢進させること、さらにその直接機構以外に、mPOUはPit-1遺伝子発現の活性化を介して間接的にPRL遺伝子発現を亢進させることが考えられ、mPOUによる新たなPRL遺伝子発現活性化機構の存在が示唆された。

（別紙１）

論文審査の結果の要旨

氏　名	戸田圭三		
論文題目	Involvement of mPOU (Brn-5), a class VI POU protein, in the gene expression of Pit-1 as well as PRL (プロラクチンおよびPit-1遺伝子発現におけるmPOU(Brn-5)の関与)		
審査委員	区　分	職　名	氏　名
	主　査	教授	伊藤光宏
	副　査	教授	松村末夫
	副　査	教授	渡邊　信
	副　査	准教授	置村康彦

要　旨

下垂体前葉ホルモンPRLの転写はPit-1など下垂体特異的転写因子の協調的な調節を受けている。PRLプロモーターのP1エレメントに結合する転写因子mPOUはPit-1と相乗的にPRLレポーター遺伝子活性を上昇させることがわかっているが、これまでmPOUの生理的意義が不明であった。本研究はmPOUの生理的意義とその機序を明らかにするものである。

細胞培養系で内因性mPOUをRNAi法にて減少させると、PRL蛋白が減少するとともにPit-1 mRNAも減少した。また、外因性のmPOUは外因性のPit-1と相乗的にPRLレポーターのみならずPit-1レポーター遺伝子活性をも上昇させた。さらにChIPアッセイを用いてmPOUがPit-1とPRL両者のプロモーターにリクルートされることを示し、mPOUによるこれらの効果が直接であることを証明した。これらの成績は、mPOUがPRL遺伝子に直接作用する他に、Pit-1発現を増強してPRL発現を間接的に活性化する機序の存在を示唆する。

以上のように、本研究はPRL遺伝子の発現制御について重要な知見を示すものとして価値ある集積であると認める。よって，学位申請者の戸田圭三氏は，博士（保健学）の学位を得る資格があると認める。

論文名：Involvement of mPOU (Brn-5), a class VI POU protein, in the gene expression of Pit-1 as well as PRL.
掲載誌名：Molecular and Cellular Endocrinology
著者名：Toda, K., Yamamoto, D., Fumoto, M., Ikeshita, N., Herningtyas, E.H., Iida, K., Takahashi, Y., Kaji, H., Chihara, K. and Okimura, Y.
巻（号）、頁、発行年：280(1-2):20-29, 2008.