

学位論文抄録

Regulation of growth hormone biosynthesis by Cdk5 regulatory subunit associated protein 1-like
1 (CDKAL1) in pituitary adenomas
(下垂体腺腫における CDKAL1 による成長ホルモン生合成の制御)

武 末 吉 広

指導教員

武笠 晃丈 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻脳神経外科学

富澤 一仁 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻分子生理学

Abstract of the Thesis

Purpose: Cdk5 regulatory subunit associated protein 1-like 1 (CDKAL1) is one of the most reproducible risk factors correlated with the development of type 2 diabetes (T2D). CDKAL1 catalyzes 2-methylthiolation (ms^2) formation at the position of 37 of tRNA^{Lys(UUU)}, which is required for the accurate protein translation at Lys codon. Downregulation of CDKAL1 by the single-nucleotide polymorphism mutation of *Cdkal1* suppresses ms^2 modification, which impairs insulin biosynthesis in pancreatic cells, leading to the development of T2D. Interestingly, an association between T2D and release of growth hormone (GH) has been reported in humans. However, whether CDKAL1 is important for GH biosynthesis in the pituitary gland has been unknown. In the present study, I investigated the regulatory mechanism of GH biosynthesis by CDKAL1.

Methods: DNA and RNA were extracted from tissue samples collected from patients with GH-producing pituitary adenomas (GHPAs) and non-functioning pituitary adenomas (NFPAs), and the genotype and mRNA expression level of *CDKAL1* and the levels of ms^2 were analyzed. Moreover, the fine morphology of the endoplasmic reticulum (ER) in each clinical samples were observed using the transmission electron microscope. To investigate the regulatory mechanism of GH biosynthesis, siRNA and shRNA against *Cdkal1* were introduced into GH3 cell line, which is derived from rat pituitary adenoma. The level of GH secreted into the culture supernatant of GH3 cells was analyzed using ELISA kit. Intracellular GH levels were examined by Western blotting. To investigate calcium mobilization, calcium indicator Fluo-4 was added to GH3 cells, followed by confocal laser microscope.

Results: CDKAL1 activity was suppressed in GHPAs, as evidenced by a decrease in ms^2 , compared with NFPAs. Downregulation of *Cdkal1* using siRNA and shRNA enhanced both biosynthesis and secretion of GH in rat GH3 cells. Downregulation of *Cdkal1* enhanced cytosolic calcium level via downregulation of DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C10 (Dnajc10), which is an ER protein related to calcium homeostasis. The upregulation of calcium level activated transcription of *GH* via Pit-1. In addition, the morphology of ER was markedly impaired in GHPAs when compared to NFPAs. In accordance with the morphological change in GHPAs, the expression levels of genes related to the proteostatic stress response were significantly higher in GHPAs than those in NFPAs. Furthermore, *Cdkal1* activity was suppressed by the proteostatic stress in GH3 cells.

Discussion: In GHPAs, excessive GH production promotes proteostatic stress, which suppresses *Cdkal1* activity. Subsequently, downregulation of *Cdkal1* enhances the calcium signal, which leads to upregulation of both transcription and secretion of GH. Thus, *Cdkal1*-calcium axis serves as new feedback enhances mechanism, which contributes to the excessive production of GH in GHPAs.

Conclusion: The present study revealed that ms^2 modification of tRNA by *Cdkal1* is involved in GH biosynthesis in GHPAs.

学位論文抄録

【目的】 Cdk5 regulatory subunit associated protein 1-like 1 (CDKAL1) は 2 型糖尿病の発症と最も相関する危険因子の一つである。CDKAL1 は、リジンに対応する tRNA の 37 位のアデノシンをチオメチル化修飾をすることにより、リジンコドンにおける正確なタンパク質翻訳に必要である。CDKAL1 遺伝子の一塩基多型変異により CDKAL1 の活性が低下し、チオメチル化修飾が障害されると、膵細胞におけるインスリンの生合成が障害れ、2 型糖尿病が発症する。興味深いことに、ヒトにおいて 2 型糖尿病と成長ホルモン (GH) の放出との関連性が報告されている。しかしながら、CDKAL1 が下垂体における GH の生合成に重要であるか否かは不明である。そこで本研究は、CDKAL1 による GH の産生制御機構の解明を目的とした。

【方法】 GH 産生性下垂体腺腫 (GHPAs) および非機能性下垂体腺腫 (NFPAs) の患者摘出標本から DNA と RNA を抽出し、各標本における CDKAL1 の遺伝子型、mRNA 発現量、チオメチル化修飾量を解析した。また、電子顕微鏡を用いて各標本における小胞体の微細形態を観察した。Cdkal1 による GH の産生機構を検討するために、ラット下垂体腺腫に由来する GH3 細胞に siRNA や shRNA を導入し、Cdkal1 の遺伝子発現を抑制した。GH3 細胞の培養上清に分泌された GH は ELISA 法を用いて測定した。細胞内の GH レベルについては、ウェスタンブロット法を用いて調べた。Cdkal1 によるカルシウムイオンの制御機構を調べるために、GH3 細胞にカルシウム指示薬である Fluo-4 を加え、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

【結果】 GHPAs では NFPAs に比べてチオメチル化修飾が減少しており、CDKAL1 の活性が抑制されていた。ラット GH3 細胞において、siRNA や shRNA を用いて Cdkal1 の遺伝子発現を抑制すると、GH の生合成および分泌が増加した。Cdkal1 の抑制により、カルシウム恒常性に関連する小胞体タンパク質である Dnajc10 が減少し、その結果、細胞質内カルシウムレベルが上昇した。このカルシウムシグナルの亢進が、GH 遺伝子の転写因子である Pit-1 を介して転写を刺激した。一方、カルシウムシグナルの亢進に加えて、GHPAs では NFPAs に比べて小胞体の形態が顕著に障害され、小胞体ストレスに関わる遺伝子の発現量が上昇していた。さらに、GH3 細胞において小胞体ストレスを惹起すると、Cdkal1 の活性が低下していた。

【考察】 GH 産生細胞では、GH の過剰産生により、小胞体ストレスが亢進する。このことが引き金となり、Cdkal1 の活性が低下し、その結果、カルシウムシグナルが変容し、GH の転写と分泌がさらに亢進する。このようなフィードバック機構が GHPAs における GH の過剰産生の一因であることが示唆された。

【結論】 本研究により、Cdkal1 による tRNA のチオメチル化修飾が GH 産生性下垂体腺腫において GH の産生に関わることが明らかになった。