

厚生科学研究費補助金

(特定疾患対策研究事業)

## 副腎ホルモン産生異常に関する研究班

ANNUAL REPORT OF RESEARCH PROJECT FOR DISORDERS OF  
ADRENOCORTICAL HORMONE PRODUCTION

RESEARCH ON SPECIFIC DISEASES,  
THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE, JAPAN

平成11年度研究報告書

平成12年3月

主任研究者 宮地 幸隆

厚生科学研究費補助金  
(特定疾患対策研究事業)

## 副腎ホルモン産生異常に関する研究班

ANNUAL REPORT OF RESEARCH PROJECT FOR DISORDERS OF  
ADRENOCORTICAL HORMONE PRODUCTION

RESEARCH ON SPECIFIC DISEASES,  
THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE, JAPAN

平成11年度研究報告書

平成12年3月

主任研究者 宮地 幸隆

## はじめに

平成11年度厚生省科学研究費補助金による特定疾患対策研究事業の公募があり内分泌関連領域からは「ホルモン受容体機構異常症」と「副腎ホルモン産生異常に関する研究」の二つの研究事業が承認されました。平成11年度より新しくスタートした「副腎ホルモン産生異常に関する研究」班は(1)副腎腫瘍、(2)先天性副腎低形成(先天性アジソン病)、(3)副腎性血圧異常症、(4)ステロイドホルモン不応症の4つの疾患を研究対象として設定し、この領域を専門に活躍されている先生方に分担研究者(7人)と研究協力者(11人)を依頼しました。平成10年度までの厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症調査研究班(名和田新班長)」を引継ぎ新しく発展する研究班と考えております。

平成12年2月10日(木)に「副腎ホルモン産生異常に関する研究」班の研究報告会を開催しました。

(1) 副腎腫瘍の自律的ホルモン産生機構の獲得と癌化のメカニズムについて分子生物学的手法を駆使して明らかにし、それに基づき新しい診断法と治療法の開発を目指しました。副腎腫瘍でのCYP17の発現調節因子としてCOUP-TFおよびN-CoRの関与、ヒトHDL受容体遺伝子CLA-1の発現が検討されました。原発性アルドステロン症の新しい診断法としてACTHまたはACTHおよびAT1拮抗薬負荷副腎静脈採血法の有用性、治療法として副腎腺腫の腹腔鏡手術について検討がなされました。一方副腎偶発腫瘍のlongitudinalな疫学的長期予後調査も開始しました。

(2) 先天性副腎低形成の原因として副腎の発生・分化に関与するAd4BP, DAX-1などの転写調節因子の異常およびそれらの制御についての研究が行われました。

(3) 副腎性血圧異常のうちミネラルコルチコイド作用過剰による高血圧時の組織障害とLOX-1との関連、塩誘導性キナーゼ(SIK)の活性化、特発性アルドステロン症でのCYP11B1、CYP11B2遺伝子並びにキメラ遺伝子の発現、ミネラルコルチコイドレセプターAB領域の2つの転写活性化領域、偽性低アルドステロン症I型の家系でミネラルコルチコイドレセプター遺伝子のL924P変異などについての新しい知見が得られました。11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase(11 $\beta$ HSD)2の測定法、胎盤やヒト胎児肺組織での遺伝子発現、11 $\beta$ HSD1の下垂体での存在ならびにアルドステロンと心筋の線維化への影響についての研究が行われました。

(4) ステロイドホルモン不応を来す病因としてグルココルチコイドレセプターの転写調節共役因子の異常や酸化還元状態が検討されました。

以上のように本研究班で対象とした疾患の病因の解明、診断法や治療法の発展、副腎ホルモンの合成および作用について分子生物学的研究など多くの成果があげられました。新しくスタートした研究班の目標に向かってこの1年間ご尽力頂きました分担研究者および研究協力者の方々にこころから感謝致しますとともに、多くの御助言を頂きました厚生省保健医療局エイズ疾病対策課の方々に厚く御礼申し上げます。

平成12年4月7日

主任研究者 宮地幸隆

# 目 次

## はじめに

### I 総括研究報告 ..... 1

主任研究者 宮 地 幸 隆

### II 分担研究報告

#### (1) ステロイドホルモン受容体

1. ミネラルコルチコイドレセプターの転写制御メカニズムの解明 ..... 5  
東京大学分子細胞生物学研究所 加 藤 茂 明
2. 副腎ホルモン合成に関するヒト HDL 受容体 CLA-1 の役割 ..... 13  
香川医科大学第一内科 高 原 二 郎
3. グルココルチコイド受容体による転写調節機構の研究 ..... 19  
東京大学医科学研究所付属病院ウイルス疾患診療部 田 中 廣 壽
4. 転写制御因子 AP-1 とグルココルチコイド受容体 ..... 22  
東京大学医科学研究所 伊 庭 英 夫

#### (2) アルドステロン

5. ステロイド 17 $\alpha$ -水酸化酵素 (CYP17) 遺伝子転写調節における核内オーファンレセプター  
および転写共役因子の機能的役割  
—副腎皮質腫瘍におけるホルモン産生異常のメカニズム— ..... 25  
慶應義塾大学医学部内科 猿 田 享 男
6. ミネラルコルチコイドレセプターのミスセンス変異による偽性低アルドステロン症 1 型  
(PHA1) の 1 家系 ..... 31  
北海道大学医学部小児科 藤 枝 憲 二
7. 特発性アルドステロン症におけるアルドステロン合成酵素遺伝子 5'-上流調節領域の解析 ..... 37  
福井医科大学第三内科 宮 森 勇
8. アルドステロンによる心筋の線維化と DHEA による抑制 ..... 41  
横浜市立大学医学部第三内科 関 原 久 彦
9. 原発性アルドステロン症 (PA) における新しい局在診断法の開発に向けて ACTH 連続負荷・  
アンジオテンシン II タイプ 1 (AT1) 受容体拮抗薬投与下副腎静脈サンプリング ..... 44  
京都大学大学院医学研究科臨床病態医科学・第二内科 伊 藤 裕
10. ACTH 負荷副腎静脈採血法による副腎疾患鑑別法の検討 ..... 50  
横浜労災病院内科 西 川 哲 男

1 1. 原発性アルドステロン症に対する外科的治療 .....	57
大阪大学大学院医学系研究科臓器制御外科学講座 (泌尿器科学)      奥 山 明 彦	
1 2. DOCA 食塩高血圧における LOX-1 発現調節 .....	62
東京大学大学院医学系研究科内科      藤 田 敏 郎	
<b>(3) 11<math>\beta</math>-hydroxysteroid dehydrogenase</b>	
1 3. 尿中遊離コルチゾール/遊離コルチゾン比からみた腎 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase タイプ2活性 .....	66
岐阜大学医学部第三内科      安 田 圭 吾	
1 4. 母体の 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 阻害が仔の糖代謝に与える影響について...	72
浜松医科大学小児科      大 関 武 彦	
1 5. ヒト呼吸器における 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 の発現とその制御 ...	78
東北大学大学院医学系研究科医科学専攻病理学講座 病理診断学分野      笹 野 公 伸	
1 6. Cushing 病下垂体における 11 $\beta$ -HSD 免疫組織化学的検討 .....	95
東邦大学医学部第一内科      宮 地 幸 隆	
<b>(4) 副腎の発生分化</b>	
1 7. ヒト DAX-1 遺伝子変異の機能解析 .....	98
九州大学大学院医学系研究科病態制御内科学・第三内科      名和田 新	
1 8. 副腎皮質形成過程における核内受容体の機能に関する研究 .....	104
岡崎国立共同研究機構 基礎生物学研究所      諸 橋 憲一郎	
1 9. 急性ストレス負荷ラットの副腎皮質に誘導される新規プロテインキナーゼ S I K .....	109
大阪大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座      岡 本 光 弘	
<b>(5) 副腎偶発腫全国調査の概要</b>	
東邦大学医学部第一内科      宮 地 幸 隆 .....	114
<b>III 研究成果の刊行に関する一覧表 .....</b>	<b>117</b>
<b>IV 研究班構成員名簿 .....</b>	<b>127</b>

# I . 総括研究報告

## 総括研究報告

### 1. 研究目標

厚生科学研究費補助金による特定疾患対策研究事業として平成11年度より副腎ホルモン産生異常に関する研究班の編成が認められ、その班長として研究班を発足させていただきました。この班として、次の対象疾患を取り上げ、その研究課題として以下のような目標を設定しました。

(1) 副腎腫瘍：副腎偶発腫瘍のアルドステロン、コルチゾール、カテコールアミンの自律的産生機構の獲得と癌化のメカニズムについて分子生物学的手法を駆使して明らかにし、それに基づき新しい診断法と治療法を開発する。アポトーシス関連遺伝子、癌抑制遺伝子、細胞増殖遺伝子、細胞周期蛋白、Zog遺伝子などの関与を研究する。一方副腎偶発腫瘍のlongitudinalな疫学的長期予後調査も行う。

(2) 先天性副腎低形成（先天性アジソン病）：副腎の発生・分化に関与するAd4BP,DAX-1などの転写調節因子の異常症、ACTH不応症、病因不明の先天性副腎低形成を解明し治療法の確立を目指す。

(3) 副腎性血圧異常症：副腎ホルモンの異常による高血圧症は内分泌性高血圧の中で重要である。原発性アルドステロン症は多くが見逃されている可能性がありその診断法を再検討するとともに、特発性アルドステロン症、偽性低アルドステロン症の病態の解明と診断法の確立を研究する。

(4) ステロイドホルモン不応症：ステロイドホルモン不応症の病因としての転写調節共役因子の異常を解明し、共役因子の観点から診断法や治療法を開発を目指す。

### 2. 研究の成果

上記の目標に従い、副腎ホルモン産生異常に関する研究班の平成11年度の研究報告会を平成12年2月10日東京において行い、分担研究者ならびに研究協力者の研究成果について発表を行った。発表終了後評価小委員会を開催した。以下に研究成果の概要について述べる。

#### (1) 副腎腫瘍

グルココルチコイド合成酵素である17 $\alpha$ hydroxylase(CYP17)は、プロモーター領域のcyclic AMP 応答配列2に核内オーファンレセプターのSF-1及びCOUP-TFが相互拮抗的に結合することにより正または負に転写が調節される。副腎腫瘍ではCYP17の発現調節因子としてCOUP-TFおよびN-CoRが関与し、これらに動員結合する転写共役因子のcoactivatorまたはcorepressorの比率が転写の方向を規定することが示された(猿田)。

マウスscavenger receptor class B type 1の相同遺伝子であるCLA-1はヒトHDL受容体遺伝子であり、副腎で強く発現されている。ステロイドホルモンが自律的かつ過剰に産生されているCushing症候群および原発性アルドステロン症の副腎皮質腺腫では、CLA-1の発現が増加しており、CLA-1過剰発現はHDL cholesterol ester を取込み、

ステロイドホルモンの自律的産生機序に重要な役割を担っていることが示された（高原）。

原発性アルドステロン症は、高血圧症の5-10%を占める頻度の高い治癒可能な高血圧症であるが、従来の診断法には限界がある。内分泌検査でアルドステロン症と診断し、ACTH負荷副腎静脈採血法でアルドステロンが1400ng/dl以上の場合、片側または両側の副腎からアルドステロンが過剰に分泌されているかを確認でき治療を正しく行うことが出来る（西川）。

原発性アルドステロン症や特発性アルドステロン症を診断するには従来の局在診断法では困難なことがあり、ACTH連続負荷ならびにAT1受容体拮抗薬投与下の副腎静脈サンプリングによるアルドステロン測定が有用であることが示された（伊藤）。

原発性アルドステロン症を呈する副腎腺腫の腹腔鏡手術は患者回復のパラメーターに関して開腹手術より優れており、腹腔鏡手術の最も良い適応症であることが示された（奥山）。

このように副腎腫瘍について腫瘍化や自律的ホルモン産生獲得機序の一部の解明ならびに臨床的に診断法と治療法の改善が成果として得られた。

### （2）先天性副腎低形成（先天性アジソン病）

DAX-1は低ゴナドトロピン性性腺機能低下症を伴うX-染色体連鎖型先天性副腎皮質低形成の原因遺伝子として知られており、Ad4BP/SF-1により活性化された転写を抑制するサイレンシング機能を有している。DAX-1異常症の患者に見いだされたC368Y変異ではDAX-1のサイレンシング機能が失われており、DAX-1の機能低下を来すことが示された（名和田）。

DAX-1の副腎皮質での発現はテストステロンにより制御を受け、思春期以後に見られるDAX-1発現の性差の原因がテストステロンによることが明らかにされた（諸橋）。先天性副腎皮質低形成の原因の一つとして副腎の発生・分化に関わるDAX-1遺伝子異常が明らかにされた。

### （3）副腎性血圧異常症

副腎性高血圧のうちミネラルコルチコイド作用過剰による高血圧は、食塩感受性高血圧を呈し一般に予後が悪い。ミネラルコルチコイドであるDOCAおよび食塩投与高血圧ラットの大動脈および腎臓に内皮型新規酸化LDL受容体LOX-1の遺伝子発現が著明に増強していた。レニン・アンギオテンシンが抑制されるミネラルコルチコイド関連高血圧においてもLOX-1の発現と組織障害の関連が明らかにされた（藤田）。

高塩食で飼育したラットの副腎皮質で特異的に塩誘導性キナーゼ(SIK)の転写が活性化される。SIK mRNAの発現はACTH/cAMPによって誘導されること、ACTH/cAMPを介するシグナル伝達機構を修飾することによりステロイドホルモン合成酵素の遺伝子発現の調節に密接に関連すること、SIKの機能の発現には核内から核外への移行が重要であることが明らかにされた（岡本）。

グルココルチコイド反応性アルドステロン症に見られるCYP11B1遺伝子とCYP11B2遺伝子のキメラ遺伝子の発現は特発性アルドステロン症では認められなかったが、CYP11B2遺伝子の発現が増強していた。CYP11B2遺伝子5'上流領域の-463塩基がCからTへのホモ変異を認め、CYP11B2遺伝子転写活性調節との関連が示唆された（宮



森)。

電解質代謝の中心的役割を果たすミネラルコルチコイドレセプター(MR)ではAB領域に2つの転写活性化領域(AF1)があり、AF2coactivatorのうちTIF2,p300のみがAF1の転写を活性化するがその間に直接の結合はなく未知の因子が存在することが示された(加藤)。

アルドステロンに不応を示す偽性低アルドステロン症I型の家系でミネラルコルチコイドレセプター遺伝子の第8エクソンの第924番目の塩基ロイシンがプロリンへ置換するL924P変異がヘテロで認められた。L924P変異レセプターはアルドステロン依存性のレポーター活性を上昇することが出来ず機能を完全に喪失していた(藤枝)。

11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase(11 $\beta$  HSD)2活性の低下はapparent mineralcorticoid excess syndrome(AME)やグリチルリチン投与時に見られ高血圧症や低カリウム血症などミネラルコルチコイド作用の亢進が認められる。11 $\beta$  HSD2活性の測定はこれまで困難であったが、尿中遊離コルチゾールとコルチゾンとをELISA法で測定しその比から腎11 $\beta$  HSD2活性を検討し、11 $\beta$  HSD2がアルドステロンからは独立したミネラルコルチコイド作用の調節因子であることを明らかにした(安田)。

11 $\beta$  HSD2は胎盤においては胎児を過剰なグルココルチコイドから防御する役目を持っており、11 $\beta$  HSD2活性が低下すると、出生時の体重低下や成熟後の耐糖能の低下が示された(大関)。

11 $\beta$  HSD2はミネラルコルチコイドレセプターと同時にヒト胎児肺組織に広く存在しており、グルココルチコイドにより誘導されることから、グルココルチコイド療法時の治療効果の修飾やlung liquidの制御に関与していることが示唆された(笹野)。

11 $\beta$  HSD1は下垂体のcorticotrophには発現していないが、ACTH産生下垂体腫瘍には発現しており、Cushing病でのグルココルチコイドによるネガティブフィードバック異常との関連が示された(宮地)。

アルドステロンによる心筋の線維化をdehydroepiandrosterone(DHEA)が抑制し、心機能の低下を改善する可能性が示された(関原)。

#### (4) ステロイドホルモン不応症

グルココルチコイドの生理作用の細胞特異性、多様性はグルココルチコイドレセプター(GR)と転写制御因子 AP-1との相互排他的な抑制作用が関与している。AP-1を結合出来る55KDの蛋白因子を同定し、これがクロマチンのremodelingに関与し、グルココルチコイド生理作用の相互排他的な抑制作用を担うkey分子である可能性が報告された。この相互作用を研究するに必要となる遺伝子導入系として優れたVSV-G シュードタイプレトロウィルスベクターも開発した(伊庭)。

細胞質内の酸化還元状態がGRの細胞内局在の制御を通じてグルココルチコイド作用を修飾し一部の病態におけるグルココルチコイド抵抗性と関連することが示唆された(田中)。

## II. 分担研究報告

## (1) ステロイドホルモン受容体

## ミネラルコルチコイドレセプターの転写制御メカニズムの解明

加藤 茂明

東京大学分子細胞生物学研究所

### 研究要旨

ミネラルコルチコイドレセプター(MR)のN端側AB領域の恒常性転写促進領域(AF1)の活性は細胞種により異なり、またMR全長においてもリガンド依存的に出現することを示した。rat MRより各種のAB領域deletion mutantの転写促進能を測定したところ、AB領域には2つの転写活性化領域が存在することが判明した。更に既知のAF2coactivatorの内TIF2,p300のみがAF1の転写活性を上昇させることが判明した。さらにそれらの直接の結合はin vitro実験やyeast two hybrid assayにても認められないことから未知の因子がそれらを仲介していることが示唆された。

目下その未知因子の検索をタンパク精製にて行っているところである。

### A. 研究目的

ミネラルコルチコイドは生体内の電解質代謝に中心的な役割を果たし、各種代謝疾患に深く関わっている。その作用は核内に局在する核内受容体(MR)を介し、標的遺伝子群の発現制御を介すると理解されるようになった。本研究ではMRの転写因子としての性状及び共役する補助因子群の検索を目的とする。

### B. 研究方法

#### 1:AF1の同定

humanMR、ratMRよりそれぞれDNA結合領域つきのconstructを作製し、細胞種を変えてAF1活性をCATassayにて測定した。また同時にMR全長におけるAF1とAF2の割合を比較した。

#### 2:MR全長におけるAF1活性の確認

E/F領域の転写活性化中心領域(ADcore)に点突然変異を導入することによりAF2活性

が消失することが分かっている(3)。今回ratMRに同様点突然変異を導入し、全長においてAF2活性が消失した時のAF1活性を測定した。

#### 3:AF1転写活性化領域の同定

1の実験に用いたconstructからいくつかのdeletion mutantを作製し、それぞれの活性をCAT assayにて測定した。

#### 4:既知の転写共役因子のAF1転写活性化への関与の測定

既知の転写共役因子の内p160familyに含まれるSRC1、TIF2,AIB1とp300についてAF1転写活性化能を上昇させるかを測定した。また実験3で同定したこの転写活性化領域のいずれを活性化するのかを明らかにした。

#### 5:Baculo virus発現系を用いたMRAAF1タンパクの作成とそれを用いたHeLa細胞核抽出液からのinteracting proteinの精製

3にて同定した2つのAF1存在領域の内N

末端の1-169aa.部分を含むGST融合タンパクをBaculo virus発現系を用いて作成し、それに結合するタンパクをHeLa細胞核抽出液より精製する。  
(倫理面への配慮)

使用している生物材料は培養細胞であり、倫理面への配慮は必要ないと考えられる。

### C.研究結果

#### 1:AF1の同定

Cos-1 cell、CV1 cell いずれにおいてもAF1活性は存在するが、それぞれAF2,Full lengthに対する AF1の活性は異なることが判明した。(Fig. 1)。

#### 2:MR全長におけるAF1活性の確認

導入したmutationによりAF2活性はほぼ消失したがその状態においても MR全長の活性は残存し、生理的な条件でのAF1活性の存在を確認できた(Fig. 2)。

#### 3:AF1転写活性化領域の同定

作成した deletion mutant の活性を CAT assayにて測定することによりN端1-170a.a.にAF1a ,450-600a.a.にAF1bという2箇所の転写活性化領域が存在することが判明した(Fig. 3)。

#### 4:既知の転写共役因子のAF1 転写活性化への関与の測定

CAT assayにてMR全長では既知の転写共役因子は転写活性化能があるもののAF1活性を上昇させるのはTIF2,p300のみであることが判明した。さらに決定したAF1a,AF1bそれぞれに対する転写活性化能を検討した結果TIF2はAF1bのみを、p300はAF1a,AF1b両方の活性を上昇させることが判明した。

### D.考察

多くの核内レセプターでは、レセプタータンパクN末端側にAF1、C末側にAF2の計2ヶ所の転写促進領域が存在し、両者が協調して転写活性を示すことが知られている。MRの場合AF1の転写促進能を積極的に示す報告はこれまでなかったが 今回初めてAF1活性を直接測定することができた<sup>(1)</sup>。また細胞種によってAF1活性が異なることは興味深く、AF1に結合する転写共役因子は細胞により異なる可能性があると思われる。またレセプター全長におけるAF1活性が認められたことは生理的な状況下でもAF1がある程度の転写活性化の役割を分担している事を示している。p300,TIF2が転写を上昇させるが、いずれもindirectにしか結合しないことからその間を介在する未知のタンパクが存在するものと思われる<sup>(2)</sup>。最近主流を占めている転写共役因子複合体の考えも含め、今回の我々が出した結果からは AF1,AF2が転写共役因子複合体を共有している可能性を示唆するものと考えている。

MRには生体内にaldosteroneとcortisolという2つのリガンドが存在し、そのリガンド選択性は11βHSDが担っていると考えられている<sup>(3)</sup>。しかしMR自身がリガンドを選択している可能性があり<sup>(4)</sup>、それが転写共役因子の種類、もしくは結合の強度などに関係している可能性も示唆されている<sup>(5)</sup>。今後はMR特異的な転写共役因子が含まれると思われるAF1領域に結合する因子を検索することによってこれらの問題の解決の糸口としていきたい。

## E. 結論

MRには他の核内受容体と同様にA/B領域にAF1が存在する。その領域は2つあり、既知のAF2coactivatorの内のTIF2,p300が転写活性を上昇させる。しかしそれらは直接結合はせず、未知の因子の関与が想定され、目下それをタンパク精製にて検索中である。

### 【参考文献】

- 1) Hiroaki Fuse, Hirochika Kitagawa, and Shigeaki Kato: Characterization of Transactivational Property and Coactivator Mediation of Rat Mineralocorticoid Receptor AF-1. *Molecular Endocrinology* in press
- 2) Sergio A. Onate et al.: The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1(AF1) and AF2 domains of steroid receptors. *Journal of Biological Chemistry* 273:12101-12108, 1998
- 3) Kitanaka S et al.: A new compound heterozygous mutation in the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene in a case of apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4054-4058, 1997.
- 4) Marc Lombes et al.: The mineralocorticoid receptor discriminates aldosterone from glucocorticoids independently of the 11 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 135:834-840, 1994
- 5) Loffreda N J, Chabret C and Pons M. Role of the A/B region of the human mineralocorticoid receptor in aldosterone response selectivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205:1610-1616, 1994.

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300 mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  by interacting directly with the N-terminal A/B domains. *J. Biol. Chem.*, 2000 (in press).
2. Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, 2000 (in press).
3. Tai, H., Kubota, N., Kato, S.: Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen-dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000 (in press).
4. Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., Seino, Y.: Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, 2000 (in press).

5. Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., Kato, S.: FGF10 is essential for the limb and lung formation. *Nature Genetics*, 21, 138-141, 1999.
6. Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1049-1055, 1999.
7. Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D., Hashimoto, S., Kato, S.: Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor  $\alpha$ . *Mol. Cell. Biol.*, 19, 5363-5372, 1999.
8. Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF- $\beta$  and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional co-activators. *Science*, 283, 1317-1321, 1999.
9. Yanagi, Y., Suzawa, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Yanagisawa, J., Kato, S.: Positive and negative modulation of vitamin D receptor function by transforming growth factor- $\beta$  signaling through Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, 274, 12971-12974, 1999.
10. Kato, S., Sekine, K.: FGF-FGFR signaling in vertebrate organogenesis. *Cell. Mol. Biol.*, 45, 631-638, 1999.
11. Kitanaka, S., Murayama, A., Sakaki, T., Inoue, K., Seino, Y., Fukumoto, S., Shima, M., Yukizane, S., Takayanagi, M., Niimi, H., Takeyama, K., Kato, S.: No enzyme activity of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene product in pseudovitamin D-deficiency rickets including that with mild clinical manifestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 4111-4117, 1999.
12. Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Kodera, Y., Kawaguchi, Y., Hosoya, T., Kato, S.: Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 $\alpha$ , 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in intact animals. *Endocrinology*, 140, 2224-2231, 1999.
13. Suzawa, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kato, S., Ueno, Naoto, Miyazono, K., Matsumoto, T., Fujita, T.: Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation

- of murine osteoblastic cells *in vitro*. *Endocrinology*, 140, 2125-2133, 1999.
14. Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K., Kato, S., Matsumoto, T., Fujita, T.: Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: Studies using VDR knockout mice. *Endocrinology*, 140, 1005-1008, 1999.
15. Sawada, N., Sakaki, T., Kitanaka, S., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase coexpression with adrenodoxin and NADPH-adrenodoxin reductase in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 265, 950-956, 1999.
16. Sakaki, T., Sawada, N., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of mouse 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 259, 731-738, 1999.
17. Kato, S., Takeyama, K., Kitanaka, S., Maruyama, A., Sekine, K., Yoshizawa, T.: *In vivo* function of VDR in gene expression-VDR knock-out mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 69, 247-251, 1999.
18. Kato, S.: Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 156, 7-12, 1999.
19. Sasaki-Iwaoka, H., Maruyama, K., Endoh, H., Komori, T., Kato, S., Kawashima, H.: A *trans*-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, 14, 248-255, 1999.
20. Okuno, M., Sato, T., Kitamoto, T., Imai, S., Kawada, N., Suzuki, Y., Yoshimura, H., Moriwaki, H., Onuki, K., Masushige, S., Muto, Y., Friedman, S. L., Kato, S., Kojima, S.: Increased 9,13-di-*cis*-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF- $\beta$  mediated fibrogenesis *in vivo*. *J. Hepatol.*, 30, 1073-1080, 1999.



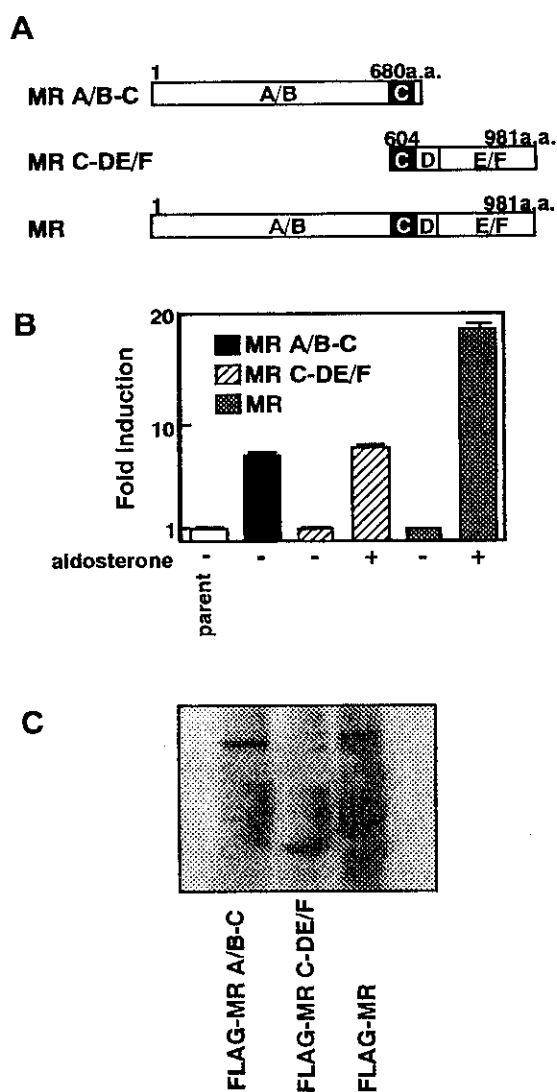


Fig.1. The A/B domains of rat MR have a transactivation function (AF-1)

A, Scheme of rat MR A/B domain and E/F domain deletion mutants fused to FLAG in their N-terminal ends. Rat MR A/B-C contains a.a.1-680 and lacks the E/F domain. MR C-DE/F contains a.a.604-981 and lacks the A/B domain. Wild-type MR is shown at the bottom.

B, Transcriptional activities of MR deletion mutants in COS-1 cells. Each of the receptor expression vectors (1 mg) was transfected together with 3mg of GRE2-tk-CAT reporter plasmid, in the absence (-) and presence (+) of 10nM of aldosterone. CAT-assay was performed as described in Materials and Methods. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of three individual transfections and is shown as fold induction from the background activity of the reporter plasmid.

C, Western blot analysis of the MR deletion mutants. A portion of the cell extracts used for the CAT-assay was analyzed by a Western blotting with a specific antibody to FLAG as described in Materials and Methods.

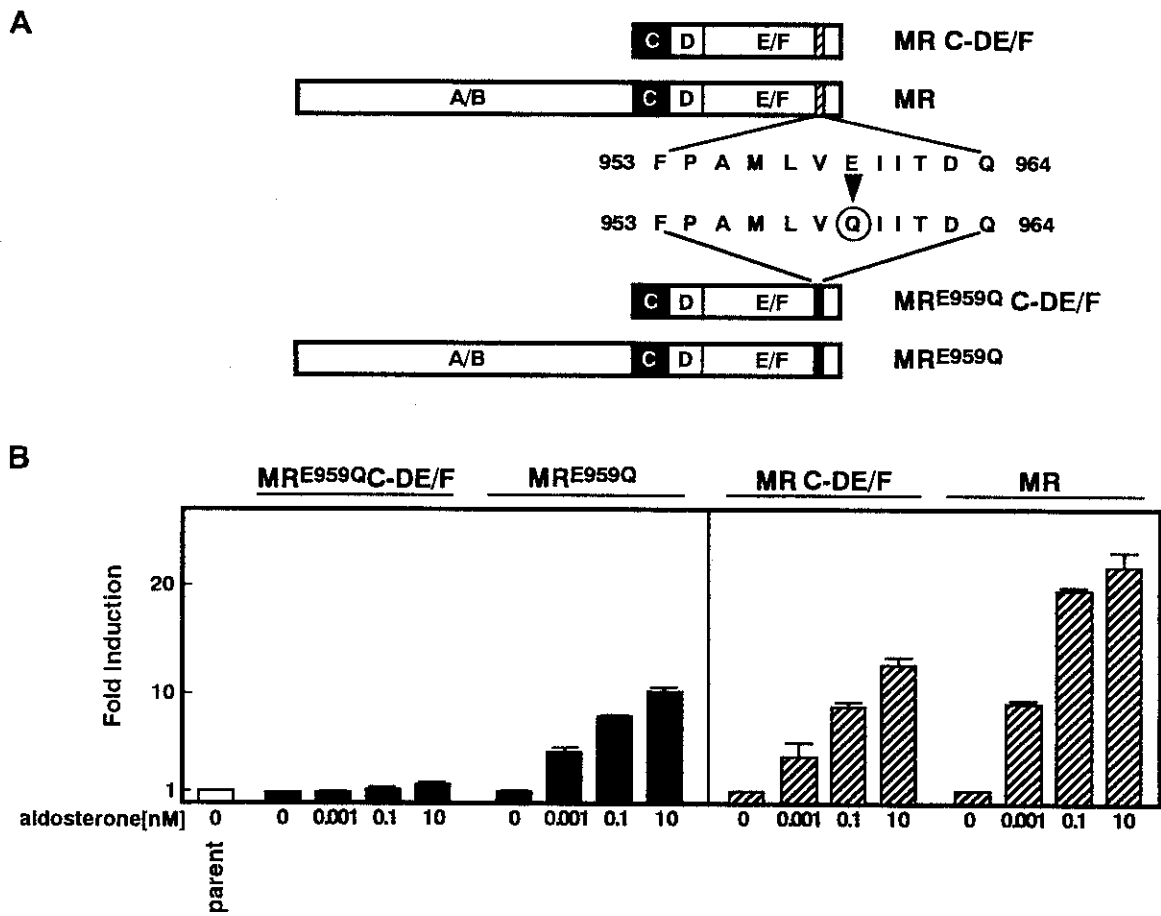


Fig. 2. Ligand-induced AF-1 function in the full-length MR

A, Scheme of rat MRAAF-2 AD core point-mutants. Glu959 of the rat MR was replaced with Gln (E959Q point-mutation). This mutation was introduced to the MR C-DE/F deletion mutant (MRE959Q C-DE/F) and the full-length MR (MRE959Q).

B, The ligand-induced transactivation function of MRAAF-2 AD core point-mutants (left side) was compared to that of wild-type (right side). Each of the receptor expression vectors (1 mg) was transfected to COS-1 cells, together with 3mg of GRE2-tk-CAT reporter plasmid in the presence of increasing concentrations (0-10 nM) of aldosterone. CAT-assay was performed as described in Materials and Methods. Each value represents the mean  $\pm$  7 S.E. as in Fig. 1.

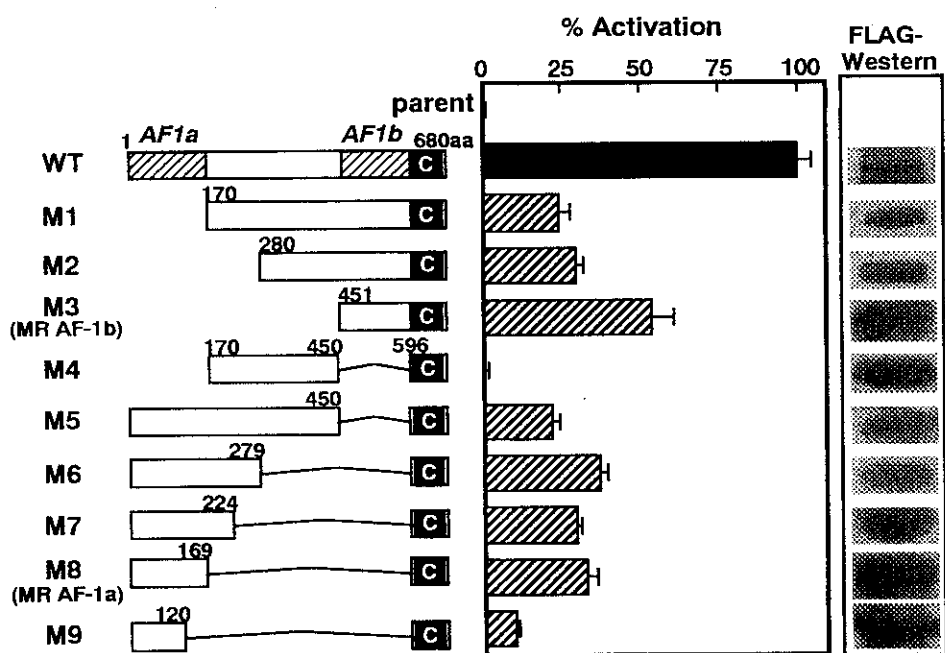


Fig. 3. Mapping of core regions for the MRAF-1 activity. Scheme of deletion mutants of the A/B domain (M1~M9) are shown in the left panel along with the full-length of MRA/B-C (WT). Each receptor expression vector (1 mg) was transfected to COS-1 cells, together with 3mg of GRE2-tk-CAT reporter plasmid and the transactivation function of each mutant receptor was measured by CAT-assay as described in Materials and Methods. Each value represents the mean  $\pm$  S.E. of three individual transfections and is expressed as a percentage ratio to the full-length A/B-C activity (the background activity of the reporter plasmid was expressed as 0). Deduced core regions of MRAF-1 are shown in the top column and designated as AF-1a and AF-1b. Expression levels of the A/B domain deletion mutants estimated by a Western blot analysis as described in Fig. 1 are shown in the right panel.

## 副腎ホルモン合成に関するヒトHDL受容体CLA-1の役割

高原二郎、村尾孝児、井町仁美  
香川医科大学第一内科

### 研究要旨

副腎におけるステロイド産生の最初の基質はコレステロールである。我々は副腎にコレステロールを提供するHDL受容体(CLA-1)とステロイド産生について検討した。HDL-HDL受容体を介するコレステロールの取り込みが、副腎におけるステロイドホルモン合成を促進していることが判明した。また自立的ステロイドホルモン合成が盛んな副腎腫瘍においては、HDL受容体が強く発現されており、病態との関係が推定された。

### A. 研究の目的

1996年 Acton らによりマウス scavenger receptor class B type 1 (SR-B1)が HDL 受容体であると報告された。また我々はマウス SR-B1 相同遺伝子である CLA-1 がヒト HDL 受容体であり、副腎で強く発現されていることを報告してきた。また副腎におけるステロイド産生の最初の基質はコレステロールであり、副腎にコレステロールを提供する HDL-HDL 受容体とステロイドホルモン合成には密接な関係があることが推定される。今回は HDL の代謝が生理的および病的ステロイド合成に果たす役割について検討する。

### B. 研究方法

ヒト副腎皮質腫瘍由来細胞株(SW-13)およびマウス副腎皮質腫瘍由来細胞株(Y-1)はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入した。正常副腎は患者の同意を得て腎癌の根治的手術時に採取した。また副腎腫瘍も手術時に-80Cで凍結保存した。その内訳は、Cushing's syndrome 5 症例、原発性アルドステロン症 2 症例、褐色細胞腫 3 症例である。

免疫組織染色：サンプルをホルマリン固定後、パラフィン包埋し薄切し切片を作成した。脱パラフィン後 3%の過酸化水素にて内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックし、10%正常ヤギ血清で1時間処理した。anti-CLA-1抗体でインキュベート後、ビオチン化2次抗体で