

1時間、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼコンプレックスで1時間処理した。その後DABにて可視化した。

RT-PCR：副腎由来細胞株および副腎腫瘍よりtotal RNAを抽出しcDNAを作成した。CLA-1 mRNAを既報のPCR法にて検出した。内因性コントロールとして β -actinを使用した。

Western blot：副腎由来細胞株および副腎腫瘍より細胞膜成分を抽出し7.5% SDS-PAGEにて分画した。PVDF膜に転写後、1次抗体、anti-CLA-1抗体で1時間処理後、2次抗体、HRP 抱合 anti-モルモット IgG 抗体で1時間振盪しECLにて可視化した。

Transfection：full length CLA-1 cDNAを含む発現ベクターをマウス副腎皮質腫瘍由来細胞株(Y-1)にリポソーム法にて遺伝子導入し、CLA-1 過剰発現 stable clone を樹立した。

HDL cholesterol ester uptake：cholesterol ester を ^3H でラベルしたHDLを作成し、CLA-1 過剰発現細胞におけるcholesterol 取り込みについて検討した。

corticosterone 測定：CLA-1 過剰発現細胞にHDLを添加後、その培養液中のcorticosterone濃度をAmersham社のRIAキットにて測定した。

C. 研究結果

既にNorthern blotの検討により、CLA-1が副腎に強く発現されていることが判明していたので、さらに副腎における組織内分布について免疫組織学的に検討した。CLA-1は主にz. glomerulosaおよびz. fasciculataの細胞膜表面に発現されており、副腎髄質ではその発現が認められなかった。

(図1)

次に副腎におけるステロイド産生を刺激するACTHの影響について検討した。ACTHおよび8-bromo-cAMP (8-Br-cAMP)は、副腎由来細胞株SW-13におけるCLA-1の発現を濃度依存的に増強させ、図1に示すように、10 nMのACTHおよび1 μM の8-Br-cAMP刺激によりCLA-1の発現が最も強く認められた。

そこで臨床的にステロイドホルモンを過剰に産生することが知られているAdrenocortical tumor (Cushing's 症候群および原発性アルドステロン症)におけるCLA-1の発現を検討した。血中ACTHレベルが正常である褐色細胞種の非腺腫部分をcontrolとみなし、Western blot法にて副腎腫瘍におけるCLA-1の発現を定量した。図2に示すとおり、血中ACTHが抑制されているにもかかわらずコントロールに比べCushing's 症候群の腺腫部分ではCLA-1の発現が約3倍に増加していた。

また原発性アルドステロン症の腺腫部分でも CLA-1 の発現は増加していた。Cushing's 症候群の非腺腫部分では CLA-1 の発現が著明に減少していた。一方褐色細胞腫では CLA-1 は発現していなかった。

さてマウスでは HDL が主な cholesterol 供給物質であるが、ヒトでは LDL であることが知られている。そこでヒト遺伝子 CLA-1 の役割を検討するために CLA-1 を過剰発現させた細胞を作成し、HDL によるステロイド産生が CLA-1 を介するかどうかを検証した。CLA-1 遺伝子導入・その過剰発現については RT-PCR 法および Western blot 法にて確認した。

Selective cholesterol ester uptake について検討するため cholesterol ester を [³H] でラベルした HDL を作成し、HDL 添加後 0-5 時間、作成した CLA-1 過剰発現細胞を培養した。CLA-1 過剰発現細胞ではコントロールである mock 細胞に比較して、HDL の取り込みが亢進していることを確認した。(図 3) また CLA-1 過剰発現細胞におけるステロイドホルモン産生能について検討した。遺伝子導入細胞に HDL を 0-500 µg/ml 添加し 24 時間反応後、その培養液中の corticosterone 濃度を RIA にて測定した。図 4 に示すように、HDL 非存在下では mock 細胞

(Mock) と比較してステロイドホルモン産生に差は認められなかったが、HDL を添加することにより CLA-1 過剰発現細胞(CLA-1)の培養液中へのステロイドホルモン分泌が mock 細胞に比較して有意に増加した。(図 4)

D. 考察

マウス SR-B1 およびヒト CLA-1 はステロイド産生組織で発現されており、特に副腎において強く発現されている。マウスにおいては SR-B1 のノックアウトマウスが作製されており、SR-B1 ノックアウトマウスでは副腎におけるコレステロール含量が 72% も低下することが報告された。また Temel らは SR-B1 に対する抗体で HDL との結合を阻害すると副腎細胞からのステロイドホルモン合成が極端に低下すると報告している。一方 ACTH の投与によりマウス副腎における SR-B1 の発現が増すことが報告されており、SR-B1 および CLA-1 がステロイド合成に関与することが推定された。マウスでは HDL が主な cholesterol 供給物質であり、ヒトでは LDL であることが知られているが、ヒトにおける cholesterol 供給物質としての HDL の役割については不明である。そこで今回我々はヒトにおける CLA-1 の機能および発現を副腎および副腎腺腫において検討し、

以下の結果を得た。(1)CLA-1 は主に副腎皮質の *z. glomerulosa* および *z. fasciculata* の細胞膜表面に発現されており、副腎髄質ではその発現が認められなかった。(2)ACTH およびそのセカンドメッセンジャーcAMP は、ヒト副腎由来細胞株における CLA-1 の発現を増強させた。(3)臨床的にステロイドホルモンを自立的にかつ過剰に産生することが知られている副腎皮質腺腫 (Cushing's 症候群および原発性アルドステロン症)では、血中 ACTH が抑制されているにもかかわらず CLA-1 の発現が増加していた。(4)CLA-1 過剰発現細胞においては HDL の取り込みが亢進しており、HDL 非存在下では対照細胞と比較してステロイドホルモン産生に差は認められなかったが、HDL を添加することにより培養液中へのステロイドホルモン分泌が有意に増加した。以上よりマウス SR-B1 だけでなく、ヒト CLA-1 を介して HDL cholesterol ester を取り込む経路は、副腎皮質におけるステロイドホルモン産生機構において重要な役割を演じていることが推定された。また副腎腫瘍で認められるステロイドホルモンの自立的産生機序にも HDL 受容体を介したコレステロールの取り込みが重要な役割を担っていることが推定された。

E. 結論

副腎におけるステロイドホルモン合成の基質としてのコレステロールの供給には、HDL 受容体を介するコレステロールの取り込みも関与している。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Metabolism. 48, 627-630, 1999

Endocrine Journal 46, 27-34, 1999

2. 学会発表

第72回日本内分泌学会総会 1999.6

第7回日本ステロイドホルモン学会

1999.11

G. 知的所有権の取得状況

特になし

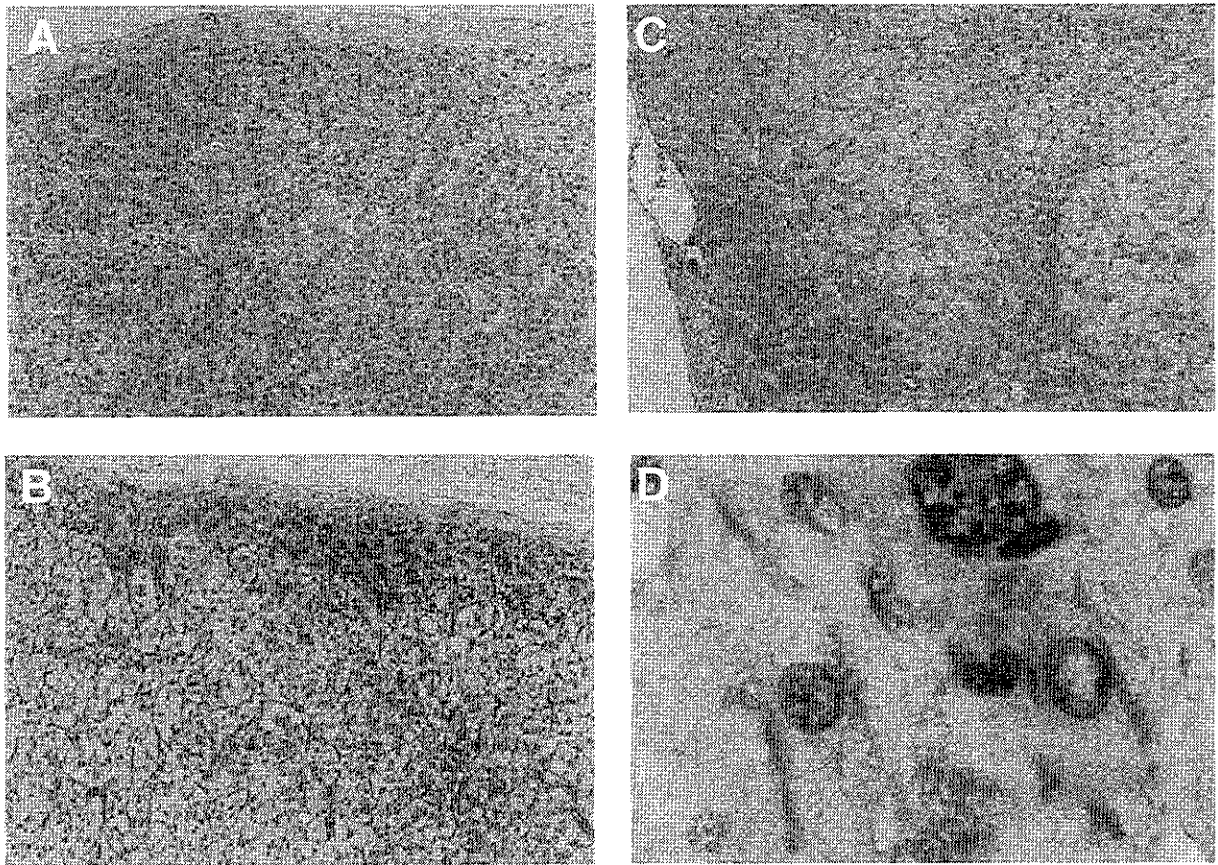


図1 副腎における CLA-1 の局在
 A. 正常副腎、B. Cushing's syndrome の非腺腫部分、C. Cushing's syndrome の腺腫部分、D. Cushing's syndrome の腺腫部分の強拡大

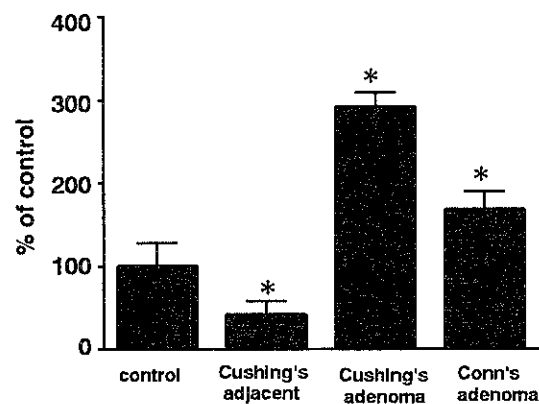


図2 副腎腫瘍における CLA-1 蛋白の発現レベル
 control:褐色細胞腫の健常部分、Cushing's adjacent:Cushing's syndrome の非腺腫部分、Cushing's adenoma: Cushing's syndrome の腺腫部分、Conn's adenoma:原発性アルドステロン症の腺腫部分

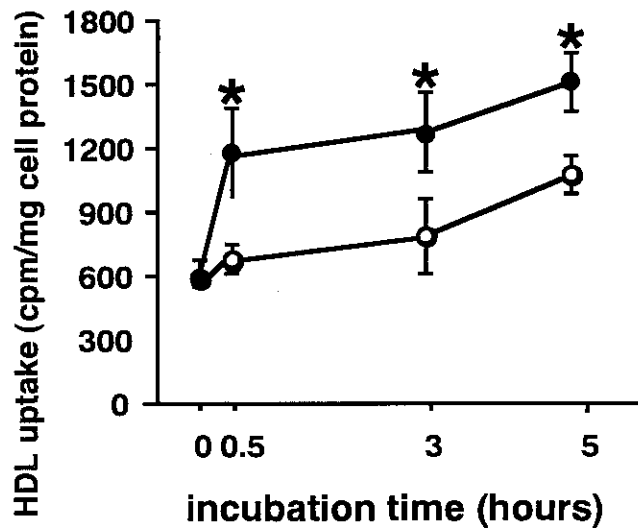


図3 CLA-1 遺伝子導入細胞における HDL からのコレステロールの取り込み
○mock 細胞 ●CLA-1 遺伝子導入細胞

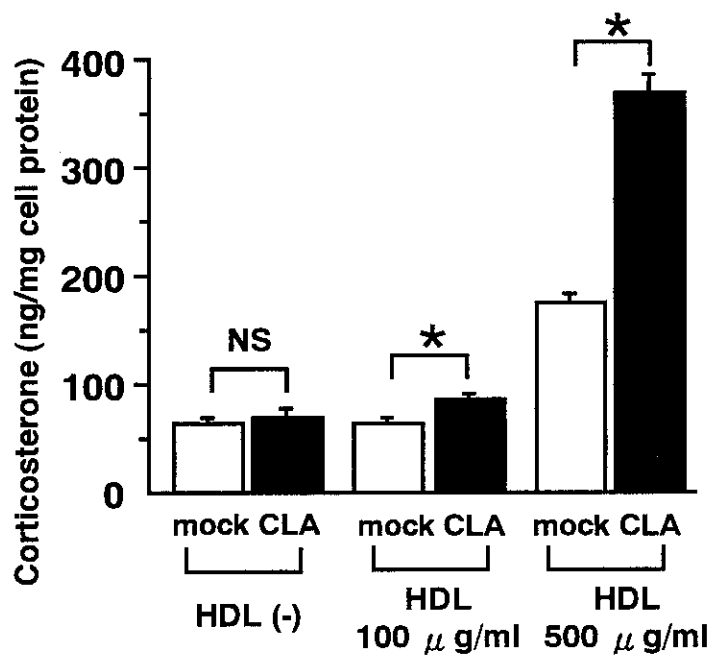


図4 CLA-1 遺伝子導入細胞におけるステロイドホルモン産生能
mock および CLA-1 遺伝子導入細胞に HDL を添加し、培養液中への corticosterone 濃度を測定

グルココルチコイド受容体による転写調節機構の研究

田 中 廣 壽

東京大学医科学研究所ウイルス疾患診療部

研究要旨

グルココルチコイドは細胞内に存在するグルココルチコイド受容体を通じて作用を発現する。近年、グルココルチコイド受容体機能がリガンド以外の因子によっても制御されることが明らかになりつつある。われわれは細胞内酸化還元状態が受容体機能の修飾を通じて細胞レベルにおけるグルココルチコイドの作用を調節することを明らかにし、一部の病態におけるグルココルチコイド抵抗性との関連を示唆した。

A. 研究目的

グルココルチコイド (GC) と細胞質内のグルココルチコイド受容体 (GR) は結合後、GC-GR 複合体として核に移行し標的遺伝子の転写活性を調節する。今回、GR の核移行のレドックス制御を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

GR の核移行は GFP-GR キメラ蛋白を発現させることによって検討した。転写活性化能は GRE-luciferase レポータープラスミドを用いて測定した。すべて動物由来培養細胞株を用いた実験であり倫理的問題はない。

C. 研究結果

COS7 細胞で発現させた GFP-GR はグルココルチコイドアゴニストである dexamethasone によって濃度依存性に核に移行した。GFP-GR は野生型 GR と同等の転写活性化能を有していた。酸化条件下 (過酸化水素存在下) において、GFP-GR のリガンド依存性核移行は抑制

された。この酸化的条件に対する感受性は細胞種によって大きく異なっていた。すなわち、HeLa 細胞、CHO 細胞は感受性が高く、COS7 細胞は感受性が低かった。核移行シグナル NL1 に存在するシステイン (ヒト GR では Cys 481) の機能を明らかにするため、リガンド非依存性に核に存在する変異体 (リガンド結合領域を欠失させた GFP-GR- Δ LBD) を作成した。酸化的条件下では GFP-GR- Δ LBD の局在は細胞質にも認められ、NL1 のかかるシステインが GR のレドックス制御の標的アミノ酸である可能性が示された。このシステインをセリンに変異させるとかかる酸化ストレスによる抑制効果は消失した。一方、SV40 の核移行シグナルの機能には酸化ストレスは影響を与えなかった。

D. 考察

GR のリガンド依存性核移行はレドックス制御を受けることが明らかになった。また、核移行シグナル自体も独自にレドックス制御を受ける可能性が示唆された。すなわち、細

胞質の酸化還元状態により GR の核移行の制御を介してグルココルチコイド作用が調節されることが明らかになった。GR の核移行シグナル内に存在するシステインは調べた限りの核内レセプターに保存されており、核内レセプターのレドックス制御を考える上で興味深く思われた。

E. 結論

細胞質の酸化還元状態は 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する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yuichi Makino, Noritada Yoshikawa, Kensaku Okamoto, Kiichi Hirota, Junji Yodoi, Isao Makino, Hirotoshi Tanaka.

Direct association with thioredoxin allows redox regulation of the glucocorticoid receptor function.

J. Biol. Chem., 1999;274(5): 3182-3188

Kensaku Okamoto, Hirotoshi Tanaka, Hidesato Ogawa, Yuichi Makino, Kazuhiko Umesono, Isao Makino.

Redox regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor.

J. Biol. Chem., 274(15):10363-10371.

Kunimasa Yan, Akihiko Kudo, Hiroshi Hirano, Takashi Watanabe, Tetsuya Tasaka, Saeko Kataoka, Noriko Nakajima, Yukino Nishibori, Toru Shibata, Takao Kohsaka, Eiji Higashihara, Hirotoshi Tanaka, Hidehiro

Watanabe, Toshihiko Nagasawa, Shouichi Awa.

Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus.

Kidney International, 1999;56:65-73

Kotaro Maekawa, Noritada Yoshikawa, Jinhang Du, Shinichi Nishida, Hidetoshi Kitasato, Kensaku Okamoto, Hirotoshi Tanaka, Yutaka Mizushima, Shinichi Kawai
The molecular mechanism for inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by *Tripterygium wilfordii* Hook F extract in human synovial cells.

Inflammation Res. 1999;48:575-581

Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L
Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and

SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha.
Mol Cell Biol 2000 Jan;20(1):402-415

2. 学会発表

核内レセプターのレドックス制御
第7回日本ステロイドホルモン学会

Redox-dependent regulation of nuclear import of the glucocorticoid receptor
International Symposium for Oxidative Stress, Redox Regulation, and Signal Transduction. Nov. 1999

G. 知的所有権

特許、実用新案登録ともになし。

転写制御因子 AP-1 とグルココルチコイド受容体

伊庭 英夫

東京大学医科学研究所

研究要旨

副腎で分泌される多種のステロイドホルモンの生理作用は主としてその受容体タンパク質を介しているものと考えられるが、これらの転写制御因子とは別のグループに属する転写制御因子 AP-1 (Fos ファミリータンパク質と Jun ファミリータンパク質から形成される)との間に見られる相互排他的な抑制作用もこの生理作用の細胞特異性、多様性に大きく関与するものと考えられる。本研究では転写制御因子 AP-1 とグルココルチコイドレセプターを例に取り、AP-1 の側からこの相互作用の分子機構を追求した。

そして c-Fos/c-Jun ダイマーを同時に結合できることのできる分子量 55KD のタンパク因子を同定し、それがクロマチンの remodeling に関わっている証拠を見出した。今後この因子と GR との相互作用を検討する。こうした遺伝子の機能を解析するためにヒ

ト培養細胞に対する効率のよい遺伝子導入法が必須であるが、そのために VSV-G シュードタイプレトロウイルスベクター産生系の開発を行い、これも確立した。

A. 研究目的

副腎で分泌される多種のステロイドホルモンの生理作用は主としてその受容体タンパク質を介しているものと考えられるが、これらの転写制御因子とは別のグループに属する転写制御因子 AP-1 (Fos ファミリータンパク質と Jun ファミリータンパク質から形成される)との間に見られる相互排他的な抑制作用もこの生理作用の細胞特異性、多様性に大きく関与するものと考えられる。本研究は転写制御因子 AP-1 とグルココルチコイドレセプターを例に取り、AP-1 の側からこの相互作用の分子機構を追求するとともに、その解析に用いるヒト培養細胞に対する遺伝子導入法として VSV-G シュードタイプレトロウイルスベクター系を開発・確立していくことを目標とする。

B. 研究方法

(1) AP-1 に結合するタンパク質の検索

酵母 two ハイブリッド法を用いて c-Jun の転写活性化ドメインと結合する遺伝子を検索し、転写活性化に関してホルモンレセプターと競合する可能性のある遺伝子を研究対象に選びその分子の機能解析を進める。

(2) VSV-G シュードタイプウイルスの産生系の樹立とヒト由来固形癌由来細胞への遺伝子導入
これまでに我々は VSV-G シュードタイプウイルスベクターを安定して産生するパッケージ細胞を作製しているので導入効率と、産生されたウイルスを種々のヒト固形癌由来細胞に対して導入して、そのウイルス学的性質を記述する。

C. 研究結果

(1) AP-1 に結合するタンパク質の検索

酵母 two ハイブリッド法により新規の遺伝子(遺伝子産物の分子量 55KDa) を検出した。これは c-Jun と強く結合するものの、その他の Jun ファミリータンパク質である JunB や JunD との結合性は弱い。また驚いたことに Fos ファミリータンパク質の中では c-Fos タンパク質とのみ結合活性を有し、c-Fos/c-Jun ダイマーを同時に結合できることがわかった。現在この因子がクロマチンの remodeling に関わっている証拠が蓄積している。グルココルチコイドレセプター (GR) にもクロマチンの remodeling に関わっている事が知られることから、AP-1(この場合は c-Fos/c-Jun) とグルココルチコイドレセプターが共通の因子を介して remodeling に関わっているか否かを検討し、相互抑制機構に関わる可能性を追求する。

(2) VSV-G シュードタイプレトロウイルスベクターの産生系の樹立とヒト由来固形癌由来細胞への遺伝子導入

この産生系を用いて得られたベクターには以下のような性質があった。

1. 線維芽細胞やヒト腫瘍由来細胞株を対象とした場合、高い MOI でトランスダクションしても全 population の一部にしか導入できない通常のアンフォトロピックウイルスベクターとは異なり、このシュードタイプベクターは、全 population に厳密にポアソン分布に従った効率 ($1 - e^{-MOI}$) で導入が可能であり、さらに 10 コピー以上の多重トランスダクションを容易に行い、きわめて高い物質産生能力の細胞を作製できる。
2. このような トランスダクション条件下で 転写制御因子 AP-1 の活性を General に阻害する、Dominant negative 変異体の発現ベクターを導入すると、ほとんど

全てのヒト固形癌由来細胞株の軟寒天中でのコロニー形成を高い効率で抑制する。

3. ヒト、マウス、ニワトリに効率の良い伝子導入が可能で、同じベクターがヒト以外の種を対象とした基礎研究やモデル動物にも使用できる。

また細胞増殖抑制性又は細胞障害性の遺伝子を発現する高力価のベクターの産生が今後の一つの重要な課題である。我々は、こうした細胞障害性の導入遺伝子の発現をさせない型で pre-packaging cell line をつくり、VSV-G 遺伝子と同様にこの外来遺伝子の発現も Cre-recombinase で誘導されるようなベクターを開発し、実際に高力価の p53 発現ベクターをデザインどりに作製することに成功している。

D. 考察

P53 の機能解析を進めることにより、今後 AP-1 と GR の両転写因子と相互作用する事が示されれば、この分子が相互排他的抑制作用を担う key 分子である可能性が出てくるものと期待したい。ウイルスベクターの開発もほぼ予定通り進んだが、今後は SW637 など副腎癌由来のものへの導入も進める必要がある。

E. 結論

c-Fos/c-Jun ダイマーを同時に結合できることのできる分子量 55KD のタンパク因子を同定し、それがクロマチンの remodeling に関わっている証拠を見出した。今後この因子と GR との相互作用を検討する。その際必要となる遺伝子導入系として、優れたレトロウイルスベクターも開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Murakami, M., Ui, M. and Iba, H. Fra-2 positive autoregulatory loop triggered by MAP kinase and Fra-2 phosphorylation sites by MAP kinase. *Cell Growth and Differentiation*, 10: 333-342, 1999.

2. Arai, T., Takada, M., Ui, M. and Iba, H. Dose-dependent transduction of vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector into human solid tumor cell lines and murine fibroblasts. *Virology*, 260: 109-115, 1999.

3. Ui, M., Takada, M., Arai, T., Matsumoto, K., Yamada, K., Nakahata, T., Nishiwaki, T., Furukawa, Y., Tokino, T. Nakamura, Y. and Iba, H. Retrovirus vectors designed for efficient transduction of cytotoxic or cytostatic genes. *Gene Therapy*, 6: 1670-1678, 1999.

4. Iba, H. Gene transfer into chicken embryos by retrovirus vectors, *Develop. Growth. Differ.*, in press

(2) アルドステロン

ステロイド 17 α -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 —

柴田洋孝^{1, 2}, 栗原 勲², 安藤 孝², 鈴木利彦², 林 晃一², 猿田享男²
慶應義塾大学保健管理センター¹, 同 医学部内科²

研究要旨

糖質コルチコイド産生の鍵となるステロイド 17 α -水酸化酵素 (CYP17) の転写調節は、そのプロモーター領域の cyclic AMP 応答配列 2 (CRS2) に核内オーファンレセプターの SF-1 および COUP-TF が相互拮抗的に結合することにより正または負に調節されることが報告されている。Transient Transfection Assay を用いた検討によると、SF-1 または COUP-TF に動員結合する転写共役因子の coactivator または corepressor の比率が CYP17 遺伝子の転写の方向を規定することが示された。

さらに、転写共役因子の細胞内における発現量のみならず、レセプターと転写共役因子の蛋白質-蛋白質相互作用の強さも重要な転写規定因子となることが示唆された。このように、in vitro の検討では、coactivator および corepressor はすべて同等に規定因子となることが推察された。しかし、昨年度の副腎腫瘍における検討では、CYP17 の発現調節因子として、特に COUP-TF および N-CoR の有意な関与が示唆されたことから、副腎腫瘍では in vitro と異なり、オーファンレセプターと転写共役因子の機能的役割が異なっている可能性がある。

A. 研究目的

近年、健康診断などで偶然発見される頻度が増えている副腎偶発腫瘍の取り扱いが問題となっているが、その悪性化やホルモンの自律的産生をきたす可能性は不明である。ホルモン過剰産生を示す副腎腫瘍でステロイド 17 α -水酸化酵素 (CYP17) 発現異常を認めることから、本研究では CYP17 遺伝子の転写調節機序を in vitro で検討することにより、副腎腫瘍における同酵素発現異常の病因に迫ることを目的とする。

B. 研究方法

マウス副腎皮質由来 Y-1 細胞およびヒト副腎皮質由来 H295R 細胞を用いて、CYP17 遺伝子プロモーターの cyclic AMP 応答配列 2 (CRS2) を thymidine kinase promoter-luciferase と連結したレポーター遺伝子の転写活性を transient transfection assay により測定する。レポーター遺伝子とともに、核内オーファンレセプターの SF-1 および COUP-TF1 の発現ベクターおよび、転写共役因子として coactivator (SRC-1, CBP, TIF2 など) と corepressor (N-CoR, SMRT) の発現ベクターを強制的に共発現させレポーター遺伝子活性を測定する。さらに、cyclic AMP 処置により核内オーファンレセプターと転写共役因子の蛋白質-蛋白質相互作用が変化するかも検討する。培養細胞としては、マウス副腎皮質由来 Y-1 細胞と非ステロイド産生細胞である COS-1 細胞を用いた。発現ベクターおよびレポーター遺伝子などのプラスミド

DNA は、TransFast (Promega, Madison, WI) を用いて行った。そして、Transfection して 48 時間後に luciferase assay を TD-20/20 Luminometer (Turner Designs, CA) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本年度の検討は、マウス副腎皮質由来細胞を用いた in vitro での転写調節の検討を主体としているが、その結果をヒト副腎皮質腫瘍における発現量と比較する際に

副腎皮質腫瘍の手術時の摘出標本を用いた。この点に関しては、術前に各々の患者に病理組織診断に用いる以外にも、ホルモン異常の原因を検討するための研究に用いることのインフォームド・コンセントを得た。

1. 研究結果

1. coactivator および SF-1 による CYP17 promoter (4CRS2) 活性の増強

bovine CYP17 promoter 領域の cyclic AMP-responsive sequence 2 (CRS2) には、核内オーファンレセプターの SF-1 および COUP-TF が相互拮抗的に結合して、その転写を活性化または抑制することが報告されている。我々は、この転写調節機序を詳細に検討するために、CYP17 遺伝子の CRS2 を含むレポーター遺伝子を用いて、transient transfection assay を行った。dibutylryl cyclic AMP で処置して、protein kinase A (PKA) の catalytic subunit を発現させると、4CRS2 活性が増加する。さらに、外因性に coactivator である SRC-1, TIF-2 または CBP/p300 を外因性に過剰発現させると用量依存性に CYP17 転写

活性が上昇した。Y-1 細胞では内因性に SF-1 が発現していることから、この転写活性化は内因性 SF-1 に coactivator が結合することによることが示された。また、同時に SF-1 による CYP17 転写活性化には、SF-1 に coactivator が結合することが必須であることが示唆された。

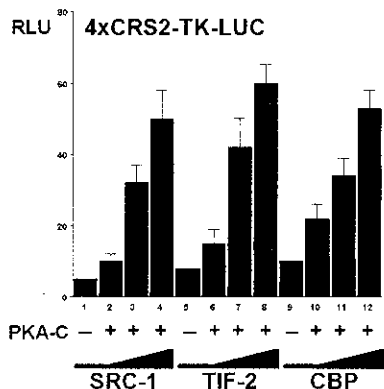


図1 coactivator (SRC-1, TIF-2 および CBP) による CYP17 プロモーター転写活性化

2. COUP-TF および corepressor による CYP17 promoter (4CRS2) 活性の抑制

同様に、SF-1 による CYP17 転写活性化に対して、外因性の COUP-TFI を過剰発現させると、用量依存性に抑制された。しかし、COUP-TFI の C 末端から corepressor 結合部位を含む 35 アミノ酸を欠失させた COUP-TFI Δ 35 を過剰発現させても、SF-1 による CYP17 転写活性化の抑制を認めなかった。以上より、COUP-TF による CYP17 転写抑制には、corepressor の結合が不可欠であることが示唆された。

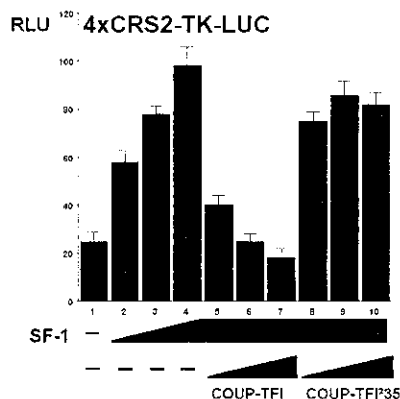


図2 SF-1 依存性 CYP17 プロモーター活性に対する COUP-TFI による転写抑制

3. corepressor による COUP-TFI 依存性の CYP17 転写抑制の増強

SF-1 による CYP17 転写活性の上昇に対して、COUP-TFI の過剰発現により抑制されるが、さらにそれに加えて外因性に corepressor である N-CoR または

SMRT を過剰発現させると用量依存性に転写抑制が増強された。以上より、corepressor である N-CoR および SMRT は、いずれも COUP-TFI の corepressor として CYP17 転写抑制に機能することが示された。

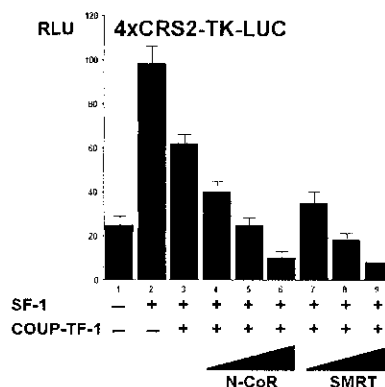


図3 corepressor の N-CoR および SMRT による COUP-TFI による CYP17 プロモーター転写抑制の増強

4. COUP-TF による CYP17 転写抑制におけるヒストン脱アセチル化酵素の関与

SF-1 による CYP17 転写活性化にして、COUP-TF は転写抑制にはたらく。一般に corepressor は Sin 3 およびヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が複合体を形成してはたらくと想定されている。本実験では、HDAC の blocker である trichostatin A (TSA) を用いて HDAC を抑制すると、COUP-TF による CYP17 転写抑制が TSA の濃度依存性に解除され転写活性化が認められた。以上より、COUP-TF による CYP17 転写抑制においても、corepressor とともに複合体を形成している HDAC の関与が重要であることが示唆された。

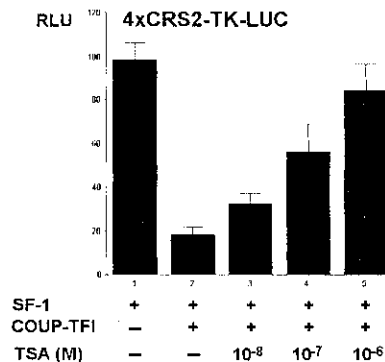


図4 COUP-TFI による CYP17 プロモーター活性抑制に対する TSA による効果

5. coactivator/corepressor の相対的発現量の比による CYP17 転写調節

Y-1 細胞または COS-1 細胞に SF-1 お

よび COUP-TF を過剰発現させておき、外因性に coactivator および corepressor の発現量の比を変化させると、その発現量の相対的比率により CYP17 転写活性が規定された。したがって、CYP17 転写活性は、SF-1/COUP-TF 比および coactivator/corepressor 比により規定されることが示された。

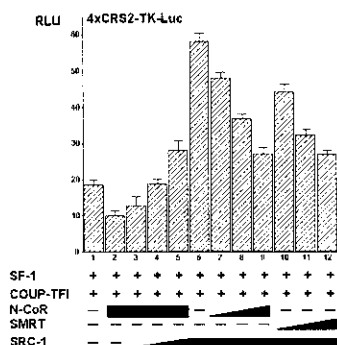


図5 coactivator および corepressor の相対的発現量比率による CYP17 プロモーター活性調節

6. cyclic AMP 処置による COUP-TF および corepressor の蛋白-蛋白相互作用の影響

cyclic AMP 処置により、SF-1 はリン酸化などの修飾により SF-1 と coactivator との相互作用の強度が変化することが示されている。そこで、同様の処置により、COUP-TF と corepressor との相互作用に影響の有無を検討した。今回は、Gal4 結合部位-TK-luciferase レポーター遺伝子を用いた。すると、Gal4-COUP-TFI は Gal4 単独と比べて有意に転写抑制を示した。さらに、それに加えて外因性の corepressor を過剰発現させると、用量依存性に転写抑制を認めた。しかし、cyclic AMP 処置により COUP-TFI と N-CoR の相互作用のみが選択的に減弱した。したがって、cyclic AMP 処置により SF-1 と COUP-TF の少なくとも 2 つの点で CYP17 転写活性化に導くようにはたらいっていることが示された。このことは、2 種類の相同性の高い corepressor である N-CoR および SMRT 分子が、機能的に重複しておらず選択的機能を有していることの可能性が示唆された。

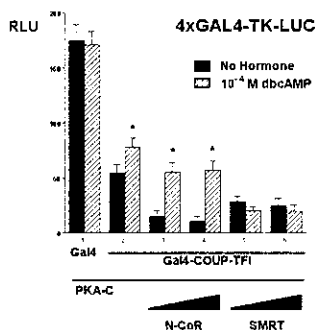


図6 Gal4-COUP-TFI および corepressor の相互作用に対する cyclic AMP による効果

D. 考察

本研究結果より、CYP17 遺伝子転写調節に関しては、核内オーファンレセプターである SF-1 および COUP-TF による相互拮抗的な調節が示された。すなわち、CYP17 遺伝子の CRS2 領域に、SF-1 が優位に結合すると転写活性化され、COUP-TF が同部位に優位に結合すると転写抑制が認められた。また、この拮抗的な転写調節の本体は、各々のオーファンレセプターに結合できる coactivator または corepressor の発現量または、オーファンレセプターと cofactor の相互作用の強度によることが示された。本研究は、in vitro の培養細胞を用いた transient transfection assay による検討であり、検討した範囲の coactivator や corepressor の中では、機能的には重複していることが示唆された。この結果は、以前に我々が Gal4 結合部位-TK-luciferase レポーター遺伝子を用いて検討した結果と一致している。しかし、cyclic AMP 処置によりレセプターと cofactor の相互作用を修飾した実験結果からは、corepressor の N-CoR と SMRT は必ずしも機能的に重複ではなく、cyclic AMP 処置による CYP17 転写活性化には N-CoR の COUP-TF からの解離の方が優位に関与していることが示唆された。

また、corepressor はそれのみならず、Sin 3 や HDAC など複合体を形成して機能していることが類推されている。TSA を用いた実験結果からは、やはり COUP-TF による転写抑制にも corepressor と共に複合体を形成する HDAC が転写抑制に導く標的分子であることが示唆された。しかし、本実験はすべて transient transfection assay であることから、TSA の作用が現れにくいと考えられるが、O'Malley らのグループの報告では、progesterone receptor の場合にも TSA 処置により PR の転写活性化が認められたことが報告されている。

COUP-TF はいくつかの代謝酵素遺伝子の調節に関与していることが報告されている。現に CYP17 の他にも、CYP11A, CYP11B1, CYP11B2, CYP21, CYP19 などのステロイド合成酵素遺伝子や、核内オーファンレセプターである DAX-1 など SF-1 および COUP-TF による相互拮抗的な調節を受けていることが報告されている。

本研究の in vitro の結果を in vivo である副腎皮質腫瘍で検討した結果は一部、昨年度の本班研究において発表した。コルチゾール産生腫瘍では CYP17 の過剰発現および COUP-TF の低発現、デオキシコルチコルステロン産生腫瘍では

CYP17 の低発現および COUP-TF の高発現を認めることを報告した。副腎皮質腫瘍では、SF-1 の発現量は疾患による差を認めなかったことから、*in vitro* と *in vivo* でのこれらの転写調節因子の発現量は異なっており、*in vivo* の副腎皮質腫瘍では COUP-TF および corepressor である N-CoR がより機能的に優位に CYP17 の発現調節に関与している可能性が示唆された。

今後の展望としては、これらの *in vitro* と *in vivo* の結果に基づいて、副腎腫瘍に特異的に発現している SF-1 および COUP-TF に相互作用のある転写因子または転写共役因子をスクリーニングしていくことにより、ステロイド合成酵素である CYP17 または CYP11B2 の発現異常に導く転写調節因子を明らかにすることが可能であると考えられる。

E. 結論

ステロイド 17 α -水酸化酵素(CYP17)は、cyclic AMP 刺激に反応して誘導され、糖質コルチコイドおよび副腎アンドロゲンの産生の鍵となる酵素である。マウス副腎皮質由来 Y-1 細胞を用いた *in vitro* の研究の結果、cyclic AMP 応答配列(CRS2)に少なくとも核内オーファンレセプターの SF-1 および COUP-TF が相互拮抗的に結合して、その転写を活性化または抑制することが示された。さらに、その転写調節の機序としては、各々のオーファンレセプターに動員結合する転写共役因子の coactivator または corepressor によることから、細胞内に発現している転写共役因子の量およびレセプターと cofactor の相互作用の強さにより、CYP17 の転写が調節されることが示された。

F. 参考文献

- H. Shibata, H. Suzuki, T. Ogishima et al. *Acta Endocrinol.* 128:235-242, 1993.
- J. Lund, M. Bakke, G. Mellgren, et al. *Steroids* 62:43-45, 1997.
- J. Lund, A. Jacob, R. Aesoy, et al. *Endocr. Res.* 24:497-504, 1998.
- M. Bakke, J. Lund. *Mol. Endocrinol.* 9:327-339, 1995.
- H. Shibata, T.E. Spencer, S.A. Onate et al. *Recent Prog. Horm. Res.* 52:141-165, 1997.
- H. Shibata, Z. Nawaz, S.Y. Tsai et al. *Mol. Endocrinol.* 11:714-724, 1997.
- H. Shibata, T. Ando, T. Suzuki et al. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:4520-4523, 1998.
- H. Shibata, T. Ando, T. Suzuki et al. *Endocr. Res.* 24:881-885, 1998.
- G.D. Hammer, I. Krylova, Y. Zhang et al. *Mol. Cell* 3:521-526, 1999.
- G. Jenster, T.E. Spencer, M.M. Burcin et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7879-7884, 1997.
- P. Zhang and S.H. Mellon. *Mol. Endocrinol.* 11:891-904, 1997.
- R.N. Yu, M. Ito, and J.L. Jameson. *Mol. Endocrinol.* 12:1010-1022, 1998.
- A.L. Jacob and J. Lund. *J. Biol. Chem.* 273:13391-13394, 1998.
- D.A. Rice, A.R. Mouco, A.M. Bogerd et al. *Mol. Endocrinol.* 5:1552-1561, 1991.
- G.L. Wagner, J.D. Norris, T.A. Knotts, et al. *Mol. Cell Biol.* 18:1369-1378, 1998.
- P.A. Crawford, C. Dorn, Y. Sadovsky et al. *Mol. Cell Biol.* 18:2949-2956, 1998.
- K. Zeitoun, K. Takayama, M. Dod Michael et al. *Mol. Endocrinol.* 13:239-253, 1999.
- D. Szapary, Y. Huang, S.S. Simons Jr.. *Mol. Endocrinol.* 13:2108-2121, 1999.
- X. Chu, C.J. Corbin, M.A. Kaminski, et al. *Endocrinology* 140:632-640, 1999.
- C.D. Clyne, Y. Zhang, L. Slutsker, et al. *Mol. Endocrinol.* 11:638-649, 1997.
- Z. Liu and E.R. Simpson. *Mol. Cell Endocrinol.* 153:183-196, 1999.
- Z. Liu and E.R. Simpson. *Mol. Endocrinol.* 11:127-137, 1997.
- J. Lund, R. Ahlgren, D. Wu, et al. *J. Biol. Chem.* 265:19422-19428, 1999.
- R. Ahlgren, G. Suske, M.R. Waterman, et al. *J. Biol. Chem.* 274:19422-19428, 1999.
- U. Wehrenberg, R. Ivell, Martina Jansen et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1440-1444, 1994.
- C.E. Robinson, X. Wu, Z. Nawaz, et al. *Endocrinology* 140:1586-1593, 1999.
- S.H. Mellon, N.A. Compagnone, P. Zhang. *Endocr. Res.* 24:505-513, 1998.
- L.J. Bioshuf, N. Kagawa, M.R. Waterman. *Endocr. Res.* 24:489-495, 1998.
- N. Kagawa, A. Ogo, Y. Takahashi, et al. *J. Biol. Chem.* 269:18716-18719, 1994.
- E. Bertolino, B. Reimund, D. Wildt Perinic et al. *J. Biol. Chem.* 270:31178-31188, 1995.
- T. Sugiyama, J.-C. Wang, D.K. Scott, D.K. Granner. *J. Biol. Chem.* 275:3446-3545, 2000.
- F.A. Pereira, Y. Qiu, G. Zhou, M.-J. Tsai, S.Y. Tsai. *Gene & Dev.* 13:1037-1049, 1999.
- K.M. Zeitoun, S.E. Bulun. *Fertil. Steril.* 72:961-969, 1999.
- J.A.A. Ladias, S.K. Karathanasis. *Science* 251:561-565, 1991.
- L.H. Wang, S.Y. Tsai, R.G. Cook, W.G. Beattie, M.-J. Tsai, B.W.O. Malley. *Nature* 340:163-166, 1989.
- S. Malik, S. Karathanasis. *Nucleic Acids Res.* 23:1536-1543, 1995.
- S.Y. Tsai, M.-J. Tsai. *Endocr. Rev.* 18:229-240, 1997.
- D. Szapary, Y. Huang, S.S. Simons, Jr. *Mol. Endocrinol.* 13:2108-2121, 1999.

G. 研究発表

1. 論文発表

1. H. Shibata, T. Ando, T. Suzuki, I. Kurihara, K. Hayashi, M. Hayashi, I. Saito, M. Murai, T. Saruta. COUP-TFI expression in human adrenocortical adenomas: Possible role in steroidogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:4520-23, 1998.
2. H. Shibata, T. Ando, T. Suzuki, I. Kurihara, K. Hayashi, M. Hayashi, I. Saito, H. Kawabe, M. Tsujioka, M. Murai, T. Saruta. Differential expression of an orphan receptor COUP-TFI and corepressors in adrenal tumors. *Endocrine Research* 24:881-5, 1998.
3. H. Shibata, T. Ando, I. Kurihara, T. Suzuki, J. Lund, K. Morohashi, H. Sasano, K. Hayashi, M. Hayashi, M. Murai, I. Saito, T. Saruta. Functional role of nuclear orphan receptor COUP-TF and corepressors in human adrenocortical adenomas. *Molecular Steroidogenesis* (edited by M. Okamoto, Y. Ishimura, H. Nawata) p.345-8, 1999.
4. A. Sato, Y. Suzuki, H. Shibata, T. Saruta. Plasma aldosterone concentrations are not related to the degree of angiotensin converting enzyme inhibition in essential hypertensive patients. *Hypertens. Res.* 23:25-31, 2000.
5. H. Kawabe, H. Shibata, H. Hirose, M. Tsujioka, I. Saito, T. Saruta. Sexual differences in relationships between birth weight or current body weight and blood pressure or cholesterol in young Japanese students. *Hyperntes. Res.* 22:169-172, 1999.
6. 柴田洋孝, 安藤 孝, 栗原 勲, 鈴木利彦, 林 晃一, 林 松彦, 諸橋憲一郎, 齋藤郁夫, 猿田享男 COUP-TFI, Ad4BP/SF-1 および転写共役因子による CYP17 遺伝子転写調節 ホルモンと臨床 (増刊号) 47 : 83-89, 1999.
7. 栗原 勲, 柴田洋孝, 鈴木利彦, 安藤 孝, 林 晃一, 林 松彦, 齋藤郁夫, 猿田享男 デキサメサゾン投与ラットにおける coactivator の組織特異的発現調節 ホルモンと臨床 (増刊号) 47 : 90-95, 1999.
8. 柴田洋孝, 猿田享男 非機能性副腎皮質腺腫 ホルモンと臨床 14 : 161-170, 1999.
9. 柴田洋孝, 猿田享男 病態にみる内分泌疾患の治療 アルドステロン症

医学と薬学 41 : 561- 567, 1999.

10. 柴田洋孝, 齋藤郁夫 ステロイド使用中の副腎皮質機能評価法 日本医事新報 3922 : 107-108, 1999.
11. 柴田洋孝, 猿田享男 内分泌性高血圧—診断と治療— クッシング症候群 血圧 7 : 1-7, 2000.
12. 柴田洋孝, 安藤 孝, 栗原 勲, 鈴木利彦, 猿田享男 内分泌腫瘍と遺伝子異常—副腎内分泌・糖尿病科 9 : 225-232, 1999.
13. 柴田洋孝 IV-5 副腎疾患内科研修医マニュアル (編集 慶應義塾大学医学部内科学教室) p.631-647, 1999.
14. 菊地栄次, 矢内原仁, 大東貴志, 中島 淳, 橋 政昭, 柴田洋孝, 猿田享男, 本間桂子, 村井 勝 副腎皮質癌の診断:尿中ステロイドの分析を中心に 日本内分泌外科雑誌 16 : 171-176, 1999.

2. 学会発表

1. 第 25 回日本医学会総会シンポジウム「核内受容体と個体発生」(1999年, 東京) 核内受容体コアクチベーター, コリプレッサーの作用機構と生理について 柴田洋孝, 齋藤郁夫, 猿田享男
2. 第 96 回日本内科学会講演会 (1999年, 東京) “Aldosterone escape”:心肥大を合併した本態性高血圧患者での臨床的検討 佐藤敦久, 鈴木義之, 柴田洋孝, 猿田享男, John W. Funder.
3. 第 96 回日本内科学会講演会 (1999年, 東京) 医療関係者の結核予防対策—ツベルクリン反応検査と事後管理について— 森 正明, 横山裕一, 吉田 正, 柴田洋孝, 広瀬 寛, 和井内由充子, 辻岡三南子, 河邊博史, 齋藤郁夫
4. 第 72 回日本内分泌学会総会 (1999年, 横浜) CYP17 遺伝子転写調節におけるオーファンレセプターCOUP-TFI, SF-1/Ad4BP および転写共役因子の役割 柴田洋孝, 安藤 孝, 栗原 勲, 鈴木利彦, 諸橋憲一郎, Johan Lund, 林 晃一, 林 松彦, 齋藤郁夫, 猿田享男
5. 第 72 回日本内分泌学会総会 (1999年, 横浜) デオキシコルチコステロン産生副腎皮質腺腫におけるステロイド合成酵素発現の検討—P-450C17 低発現の病因的意義— 林 松彦, 柴田洋孝, 安藤 孝, 栗原 勲, 鈴木利彦, 林 晃一, 笹野公伸, 矢内原 仁, 村井 勝, 齋藤郁夫, 猿田享男
6. 第 72 回日本内分泌学会総会 (1999年, 横浜) 本態性高血圧患者におけるグルココルチコイド感受性に対する転写共役因子の関与についての検討 栗原 勲, 柴田洋孝, 安藤 孝, 鈴木利彦, 林 晃一, 林 松彦, 齋藤郁夫, 猿田享男
7. 第 72 回日本内分泌学会総会 (1999年, 横浜) 副腎癌が疑われた巨大副腎皮質腺腫による Pre-clinical Cushing 症候群の一例 林 晃一, 柴田洋孝, 安藤 孝, 鈴木利彦, 栗原 勲, 笹野公伸, 林 松彦, 齋藤郁夫,

- 猿田享男
8. 第72回日本内分泌学会総会 (1999年, 横浜)
ヒト副腎癌由来 H295R 細胞におけるアポトーシス関連遺伝子 *mcl-1/EAT* 遺伝子の発現調節
安藤 孝, 柴田洋孝, 栗原 勲, 鈴木利彦, 林 晃一, 林 松彦, 齋藤郁夫, 猿田享男
 9. 第72回日本内分泌学会総会 (1999年, 横浜)
原発性アルドステロン症の術後成績に及ぼす因子の影響—当院における48例の検討—
鈴木利彦, 安藤 孝, 柴田洋孝, 栗原 勲, 林 晃一, 林 松彦, 齋藤郁夫, 猿田享男
 10. 第72回日本内分泌学会総会 (1999年, 横浜)
アルドステロンと心肥大: ラット培養心筋細胞における検討
佐藤敦久, 柴田洋孝, 猿田享男
 11. 81st Annual Meeting of the Endocrine Society (San Diego, 1999)
Coactivator and corepressor regulation of the bovine CYP17 gene transcription -New actors in steroidogenesis-
H. Shibata, T. Ando, I. Kurihara, T. Suzuki, J. Lund, K. Morohashi, K. Hayashi, M. Hayashi, I. Saito, T. Saruta.
 12. International Symposium on Molecular Steroidogenesis (Nara, 1999)
Functional role of COUP-TFI, SF-1, and nuclear receptor coregulators in the steroidogenesis of adrenocortical adenomas.
H. Shibata, T. Ando, I. Kurihara, T. Suzuki, J. Lund, K. Morohashi, K. Hayashi, M. Hayashi, I. Saito, T. Saruta.
 13. 第42回日本腎臓学会学術総会 (1999年6月, 横浜)
男子高校生における運動習慣と血圧, 心血管系危険因子の関係
河邊博史, 柴田洋孝, 辻岡三南子, 齋藤郁夫, 猿田享男
 14. 全国大学保健集会
理系大学生の生活環境の変化が肝機能, 血中脂質に及ぼす影響
藤井 香, 広瀬 寛, 柴田洋孝, 齋藤郁夫, 勝川史憲
 15. 第39回臨床内分泌代謝研究会 (東京, 1999年)
原発性アルドステロン症に preclinical Cushing 症候群を合併した一例
安藤 孝, 柴田洋孝, 栗原 勲, 鈴木利彦, 林 晃一, 猿田享男
 16. 心血管内分泌代謝学会 (東京, 1999年)
原発性アルドステロン症の術後血圧の長期予後に及ぼす因子の検討
安藤 孝, 柴田洋孝, 栗原 勲, 鈴木利彦, 林 晃一, 林 松彦, 猿田享男
 17. 第22回日本高血圧学会総会 (香川, 1999年)
若年者における血圧の推移とその背景因子—13歳から22歳までの追跡調査—
村田和子, 猿田享男, 柴田洋孝, 広瀬 寛, 辻岡三南子, 河邊博史, 齋藤郁夫
 18. 第22回日本高血圧学会総会 (香川, 1999年)
若年男性の血圧・体重と血清レブチン濃度の関係—2年間の追跡調査—
広瀬 寛, 辻岡三南子, 柴田洋孝, 河邊博史, 齋藤郁夫
 19. 第11回日本内分泌外科学会総会 (山形, 1999年5月)
シンポジウム 内分泌悪性腫瘍の診断と治療
副腎皮質癌の診断と尿中ステロイドプロフィール
菊地栄次, 矢内原仁, 大東貴志, 中島 淳, 橋 政昭, 柴田洋孝, 猿田享男, 本間桂子, 村井 勝
 20. 第27回内分泌代謝研究会 (東京, 1999年12月)
副腎皮質癌における尿中ステロイドの検討
菊地栄次, 矢内原仁, 大東貴志, 中島 淳, 橋 政昭, 柴田洋孝, 猿田享男, 本間桂子, 村井 勝
 21. 第7回日本ステロイドホルモン学会 (東京, 1999年11月)
副腎皮質癌における尿中ステロイドの検討
菊地栄次, 矢内原仁, 大東貴志, 中島 淳, 橋 政昭, 柴田洋孝, 猿田享男, 本間桂子, 村井 勝
 22. 第7回日本ステロイドホルモン学会 (東京, 1999年11月)
本態性高血圧患者のアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬治療における血漿アルドステロン濃度と ACE 阻害薬作用程度の相関について
佐藤 敦久, 柴田洋孝, 猿田享男
 23. 第64回日本泌尿器科学会東部総会 (東京, 1999年10月)
機能性副腎腫瘍における尿中ステロイドプロフィール
菊地栄次, 矢内原仁, 大東貴志, 中島 淳, 橋 政昭, 柴田洋孝, 猿田享男, 本間桂子, 村井 勝
 24. 臨床内分泌 Update (香川, 2000年3月)
一側副腎にアルドステロン産生腫瘍とコルチゾール産生腫瘍が併存し, preclinical Cushing 症候群を伴う原発性アルドステロン症の病態を呈した一例
谷山松雄, 柴田洋孝, 安藤 孝, 笹野公伸, 大塚敏彦, 伴 良行, 猿田享男, 村井 勝, 伴 良雄
- H. 知的所有権の取得状況
特になし。

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

藤枝憲二¹，田島敏広¹，北川浩史²，加藤茂明²，安達昌功³，立花克彦³
北海道大学医学部小児科¹，東京大学分子生物学研究所²，
神奈川こども医療センター内分泌代謝科³

研究要旨

偽性低アルドステロン症 1 型(PHA1)は腎臓，大腸，唾液腺，肺などのアルドステロン標的臓器におけるアルドステロンの不応を示す疾患である。症状は乳幼児早期から塩喪失を示し、脱水、低 Na 血症、高 K 血症、代謝性アシドーシス等を伴うが、アルドステロン分泌は亢進し、さらに外因性のミネラルコルチコイドにも不応を認める。今回我々は常染色体優性遺伝を示した PHA1 の 1 家系を経験した。この家系では上記の臨床症状は無治療で乳児期以降改善した。本症の原因を検索するためミネラルコルチコイドレセプター遺伝子を解析した。その結果、発端者、その弟、母親に第 8 エクソンのコドン 924 のロイシンがプロリンへ置換する変異(L924P)をヘテロで認めた。さらにこの変異レセプターの機能を *in vitro* で解析したところ、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させることができなかった。また各種転写共役因子群(co-activator)との相互作用についても検討したが、その作用も認められなかった。よってこの変異レセプターは完全に機能を喪失しており、この変異がこの家系でのアルドステロンの不応の原因であることを証明した。

A 研究目的

アルドステロンは生体内で分泌される最も強力なミネラルコルチコイドで副腎皮質の球状層で合成される。分泌されたアルドステロンは腎尿細管で Na の再吸収 K の排泄に関わり体内の電解質バランスを保持している。その作用はその特異的核内受容体であるミネラルコルチコイドレセプター(以

下 MR)と特異的に結合することにより発揮される。MR 等の核内受容体はその高い相同性と機能から A-F までの領域に N 末端から分割される (図 1-1)。DNA 結合領域は C 領域にまたリガンド結合領域は E 領域に存在する。また核内受容体はホモあるいはヘテロとして 2 量体を形成するが 2 量体化形成能は C、E 領域に存在する。核移行

シグナルは、D 領域に存在する。転写促進能は A/B と E の 2 箇所が担っている。

アルドステロンは受容体と結合後、Amiloride sensitive epithelial sodium channel (ENaC)やアルドステロンにより誘導される蛋白の遺伝子の転写効率を調節し、これら蛋白を介してミトコンドリアでのクエン酸合成や Na-K ATPase の合成に影響を与えている。このように MR は標的遺伝子の転写制御因子として働き、アルドステロン結合依存的に遺伝子の発現を転写レベルで制御する。このような核内受容体による転写制御には基本転写因子群と並んで共役転写因子群が必要である。

偽性低アルドステロン症 1 型(PHA1)は腎臓、大腸、唾液腺、肺などのアルドステロン標的臓器におけるアルドステロンの不応を示す疾患である。症状は乳幼児早期から塩喪失をきたし、脱水、低 Na 血症、高 K 血症、代謝性アシドーシスを示すがアルドステロン分泌は亢進しさらに外因性ミネラルコルチコイドの投与も無効である。本症には二つのタイプが認められる。一つは常染色体劣性遺伝を示すもので、全身性のアルドステロンの抵抗性を示す重症型であり、一生涯の治療が必要となる。一方常染色体優性遺伝形式あるいは、孤発生例では腎のみのアルドステロン不応を示し、乳児期以降治療することなく臨床症状は自然に改善する。近年これら PHA1 の病因が同定され、常染色体劣性遺伝型は Epithelial sodium channel(ENaC)遺伝子の異常、常染色体優性または孤発生型は MR 遺伝子の

異常であることが、各々明らかにされた。今回我々は染色体優性型 PHA1 の 1 家系を経験した。そのアルドステロン不応の機構を明らかにするため MR 遺伝子を解析し、さらに変異 MR の機能を in vitro で検討した。

B 研究方法

家系

発端者は生後 15 日目の女児。体重増加不良を主訴に受診、その時点で血清 Na 132mEq/L, K 6.8mEq/L, BUN 22.3 mg/dl であったため入院精査となった。この時点で血漿アルドステロン 896ng/dl、血漿レニン活性(PRA) >25ng/ml/hr と著明に上昇し、他の内分泌機能は正常、腎機能も正常であったため、PHA1 と診断した。食塩補充にて症状は改善、体重増加良好となり 1 才以降無治療で経過している。この時点で母親が乳児期に体重増加不良があったことが判明し、現在は無症状、血清 Na, K も正常であったが、血漿アルドステロン 59.8ng/dl と上昇していた。そのため母親も PHA1 が疑われた。後日、第 2 子である弟を出生したが、発端者と同じく体重増加不良があり、血漿アルドステロン、PRA の著しい上昇を認めた。同じく食塩補充にて軽快し現在無治療で経過している。以上より発端者、弟、母親を常染色体優性型の PHA1 を診断した。

MR 遺伝子の解析

MR 遺伝子の解析、診断については両親よりインフォームドコンセントを得たのち