

図6. canalicular phase (胎生 21 週) の気管 (A) 及び terminal sac phase (胎生 31 週) の肺 (B) における 11βHSD2 の免疫染色。A: 11βHSD2 は線毛上皮や気管腺の collecting duct 上皮において陽性である。B: 11βHSD2 は terminal bronchiole の線毛上皮細胞において陽性像を示すが、肺胞領域では陰性である。(各々、230 倍)

表1. 今回のRT-PCRの実験で用いたoligonucleotide primer sequences

mRNA	Reference	Primer	Sequence
11 β HSD1	#6	PCR sense PCR antisense	5'-CTC GAG TCG GAT GGC TT-3' 5'-ACT TGC TTG CAG AAT AGG-3'
11 β HSD2	#6	PCR sense PCR antisense	5'-ACC GTA TTG GAG TTG AAC AGC-3' 5'-TCA CTG ACT CTG TCT TGA AGC-3'
MR	#7	PCR sense PCR antisense	5'-CGC AAC TGC AGC TGA GTC CAT GGG-3' 5'-CGA TTG GGA CTG GAG ACT GGA GC-3'
GR	#8	PCR sense PCR antisense	5'-CCT AAG GAC GGT CTG AAG AGC-3' 5'-GCC AAG TCT TGG CCC TCT AT-3'
β -actin	#9	PCR sense PCR antisense	5'-GAT TCC TAT GTG GGC GAC GAG-3' 5'-CCA TCT CTT GCT CGA AGT CC-3'

表2. ヒト胎児肺組織における11 β HSD 2、MR、GRの局在

Cell types	11 β HSD2	MR	GR
<i>Pseudoglandular phase</i>			
Bronchus (columnar epithelia)	-/+*	-/+*	++
Mesenchyme	-	-	++
<i>Canalicular phase</i>			
Respiratory bronchiole (columnar epithelia)	++	++	++
Terminal bronchiole (columnar epithelia)	-	-	++
Mesenchyme	-	-	++
Bronchus and trachea (ciliated epithelia)	++	++	++
Collecting ciliated duct of their glands	++	++	++
Acinar cells of their glands	-	-	++
<i>Terminal sac phase</i>			
Alveolus (type 1 and 2 epithelial cells)	-	-	++
Terminal bronchiole (ciliated epithelia)	++	++	++
Bronchus and trachea (ciliated epithelia)	++	++	++
Collecting ciliated duct of their glands	++	++	++
Acinar cells of their glands	-	-	++
<i>After birth</i>			
Alveolus (type 1 and 2 epithelial cells)	-	-	++
Terminal bronchiole (ciliated epithelia)	+ /+++*	+ /+++*	++
Bronchus and trachea (ciliated epithelia)	- /+*	- /+*	++
Collecting ciliated duct of their glands	++	++	++
Acinar cells of their glands	-	-	++

Immunoreactivity is graded as follows: ++, strongly positive; +, weakly positive, and -, negative.

*Variations in the immunointensity were observed.

Cushing 病下垂体における 11 β -HSD の免疫組織化学的検討

下条正子、葉師寺史厚、上芝 元、宮地幸隆
東邦大学医学部第一内科

研究要旨

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 β -HSD1)はコルチゾールとコルチゾンの相互変換をする酵素で、主としてコルチゾンをコルチゾールに変換する reductase として作用する。下垂体にも 11 β -HSD1 が存在することが知られており、視床下部—下垂体—副腎系のネガティブフィードバックに影響を与えていることが推測される。免疫組織化学染色で、正常ヒト下垂体の corticotrophs には 11 β -HSD1 の存在が認められなかった。一方、Cushing 病の ACTH 産生腫瘍には 11 β -HSD1 が発現しており、コルチゾンをコルチゾールに変換する 11 β -HSD1 が下垂体腫瘍に発現することと、Cushing 病のグルココルチコイドによる視床下部—下垂体系へのネガティブフィードバック異常との関連が示唆される。

A. 研究目的

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase(11 β -HSD)はコルチゾールとコルチゾンの相互変換をする酵素で、コルチゾールとコルチゾンの相互変換する 11 β -HSD type 1 (11 β -HSD1)と、コルチゾールをコルチゾンに変換する 11 β -HSD type2(11 β -HSD2)が知られている。11 β -HSD1 は肝臓などの組織に存在し、主としてコルチゾンをコルチゾールに変換する reductase として作用する。11 β -HSD2 は腎臓などミネラルコルチコイドの標的組織に存在する。また 11 β -HSD1 は副腎、下垂体などグルココルチコイド産生に関与する組織にも存在することが報告されている。

下垂体に 11 β -HSD1 が存在する意義については明らかにされていないが、視床下部—下垂体—副腎系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に影響を与えているのではないかと推察される。そ

こで、今回特に正常下垂体の corticotrophs および Cushing 病における 11 β -HSD1 の発現を、免疫組織学的に検討した。

B. 研究方法

(1) 検体

正常ヒト下垂体は、Queen Elizabeth Hospital, Department of Pathology (英国 Birmingham) より供された標本を用いた。ACTH 産生下垂体腺腫の検体は、東邦大学大森病院で経蝶形骨洞下垂体腺腫摘出術を受けた Cushing 病の患者の病理標本を用いた。

(2) 免疫組織化学染色

1) ホルマリン固定後パラフィン包埋した切片を、脱パラフィンの後、0.1M citric buffer と共に圧力鍋にて前処理を行った。以下の操作はすべて室温で行った。

2) 11 β -HSD1 の染色

内因性のペルオキシダーゼを block した後、一次抗体として、ヒツジ抗 11 β -HSD1 抗体

を一時間反応させた。二次抗体として、ペルオキシダーゼ結合抗ヒツジ抗体を 30 分反応させた。発色の後にヘマトキシリンで核を染色した。蛍光染色では、二次抗体として FITC 結合抗マウス IgG 抗体を 30 分反応させた後、bisBENZIMIDE で核を染色した。

3) ACTH の染色

一次抗体として、マウス抗 ACTH 抗体を一時間反応させた。二次抗体として、アルカリホスファターゼ結合ウサギ抗マウス抗体を 30 分反応させた。発色の後にヘマトキシリンで核を染色した。蛍光染色では、二次抗体としてアルカリホスファターゼ結合抗ヒツジ IgG 抗体を 30 分反応させ、Vector Red で発色させた後、純エタノールで洗浄し、bisBENZIMIDE で核を染色した。

C. 研究結果

(1) 正常下垂体

正常下垂体では蛍光色素を用いた二重染色のみ行った。蛍光染色で 11 β -HSD1 は Vector Red により赤色に、ACTH は FITC により緑色に染色される。緑色に染まった corticotrophs には 11 β -HSD1 は発現していなかった。

(2) ACTH 産生下垂体腺腫

ACTH 産生下垂体腺腫の標本で 11 β -HSD1、ACTH をそれぞれ染色すると、ACTH はアルカリホスファターゼで赤色に、11 β -HSD1 はペルオキシダーゼで茶色に染色される。連続した 2 枚の切片を ACTH と 11 β -HSD1 で染色すると ACTH 陽性の部分は 11 β -HSD1 も陽性であった。

さらに一枚の切片で蛍光抗体を用いた二重染色を行ったところ、11 β -HSD1 は

Vector Red により赤色に、ACTH は FITC により緑色に染色され、ACTH 陽性の細胞は 11 β -HSD1 陽性であった。

D. 考察

通常 11 β -HSD1 はコルチゾンを活性型のコルチゾールに変換する方向に働くと考えられている。正常な下垂体の corticotrophs には 11 β -HSD1 は発現していないが、ACTH 産生下垂体腺腫では 11 β -HSD1 が発現し、腎臓などに由来するコルチゾンを、腫瘍内という局所でコルチゾールに変換し、コルチゾールの濃度を上昇させることでネガティブフィードバックの機能を働かせ、ACTH 産生を低下させる方向に働いているのではないかと考えられる。ACTH 産生下垂体腺腫で 11 β -HSD1 が発現するようになった理由は今後の検討課題である。

E. 結論

正常な下垂体の corticotrophs には 11 β -HSD1 は発現していないが、ACTH 産生下垂体腺腫では 11 β -HSD1 も同時に発現しており、Cushing 病のグルココルチコイドによる視床下部一下垂体系へのネガティブフィードバック異常との関連を示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) M. Shimojo, M. L. Ricketts, M. D. Petrelli, P. Moradi, G. D. Johnson, A. R. Bradwell, M. Hewison, A. J. Howie, P. M. Stewart : Immunodetection of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human mineralocorticoid target tissues : Evidence for nuclear localization.

Endocrinology 138 : 1305-1311, 1997

2) 下条正子、宮地幸隆 : ヒト 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type2(11 β -HSD2)の細胞内における局在. ホルモンと臨床 46 増刊号:115-118, 1998

2. 学会発表

1) 下条正子、宮地幸隆 :

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type2(11 β -HSD2)の各種 ヒト組織における局在. 第4回日本内分泌学会ステロイドホルモン分科会 東京 1996.11.

2) 下条正子、宮地幸隆 :

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase Type IIの mineralocorticoid target tissue とその他の組織における局在. 厚生省特定疾患内分泌系疾患調査研究班分科会 副腎ホルモン産生異常症調査研究班 平成8年度公開講座. 東京 1996.12

3) 下条正子、上芝 元、宮地幸隆 : 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2の分布および活性調節. 第5回日本内分泌学会ステロイドホルモン分科会 東京 1997.11.

4) 下条正子、宮地幸隆 :

11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type2(11 β -HSD2)の細胞内における局在. 厚生省特定疾患内分泌系疾患調査研究班分科会 副腎ホルモン産生異常症調査研究班 平成9年度公開講座. 東京 1997.12

5) 下条正子、上田恭代、宮地幸隆 : ヒト下垂体 corticotrophs における 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β -HSD)type1,type2 の発現に関する免疫組織学的検討. 第7回日本内分泌学会ステロイドホルモン分科会 東京 1999.11

(4) 副腎の発生分化

ヒト DAX-1 遺伝子変異の機能解析

市野 功¹、柳瀬敏彦¹、大庭功一²、野村政壽¹、後藤公宣¹、名和田新¹
九州大学大学院医学系研究科病態制御内科¹、麻生飯塚病院²

研究要旨

性腺副腎の発生分化やステロイドホルモン合成には、Ad4BP/SF-1、DAX-1、SOX-9 などの転写調節因子が密接に関与している。DAX-1 は低ゴナドトロピン性性腺機能低下症(HHG)を伴う X-染色体連鎖型先天性副腎皮質低形成(AHC)の原因遺伝子と知られており、また、Ad4BP/SF-1 により活性化された転写を抑制するいわゆるサイレンシング機能を有している。今回、DAX-1 異常症の患者に見いだされた変異について、ルシフェラーゼアッセイ法により機能解析を行い、C368Y 変異はサイレンシング機能を有しており DAX-1 の機能低下に関与していることを示した。Q4E と A118T 変異は、今回確立した実験系ではサイレンシング機能が保たれており、AHC の関与は証明できなかった。

A. 研究目的

現在、性腺機能低下症 (HHG) を伴う X 染色体連鎖型先天性副腎皮質低形成(AHC) の原因遺伝子として DAX-1 遺伝子が同定されている。この遺伝子は 470 アミノ酸残基なる蛋白質をコードし、その構造上、DNA 結合領域とリガンド結合領域によって特徴づけられる核内受容体に分類されている。

Ad4BP/SF-1 は組織特異的にあるいは c-AMP 反応性に、ステロイド合成酵素あるいは StAR 遺伝子の発現を制御している。一方、DAX-1 を、ステロイド合成能を持つ細胞に過剰発現させると、StAR, CYP11A あるいは 3 β HSD の基礎転写レベルを抑制すること、c-AMP の刺激によって上昇する転写を抑制すること、また、DAX-1 の過剰発現により、Ad4BP 依存性に転写が活性化される遺伝子、たとえば StAR, DAX-1 あるいは MIS の転写を抑制することが知られている。

また、Ad4BP/SF-1 と DAX-1 が蛋白質結合を行うことで、核内受容体のコリプレッサーである N-CoR をリクルートし、結果として Ad4BP の転写活性を著明に減少させるということがもう一つの転写抑制機構として考えられている。

DAX-1 異常症はほとんどナンセンス変異として見つかったが、いくつかの症例ではミスセンス変異も報告されている。しかしながら、ミスセンス変異がその疾患の発症に関与しているかあるいは、遺伝子多

型であるのかを判断するには機能的解析が必要である。我々の教室では今までに 8 例の DAX-1 異常症を経験したが、そのうち 3 例にミスセンス変異を見いだした (3 例のうち 2 例は同変異) (Table. 1)。この 3 例において、その DAX-1 変異が先天性副腎皮質低形成の原因と成りうるかどうかを明らかにするために、解析方法を確立し、また、DAX-1 変異の機能的解析を行った。

B. 研究方法

(症例 1)

17 歳男性

主訴：色素沈着、全身倦怠感。

家族歴：兄が 4 歳で、さらに母親の兄、弟もそれぞれ 1 歳、3 歳で副腎クリーゼを示唆する症状で急死。従兄がアジソン病。

現病歴：発症は 1.5 歳、4 歳でアジソン病と診断される。17 歳になっても 2 次性徴の発現を認めなかった。皮膚口腔の色素沈着は著明で恥毛は無く、腋毛は粗。睾丸は Tanner stage2 と発育不良。腹部 CT、超音波検査にて両側とも副腎は検出されなかった。

内分泌学的検査成績：副腎皮質機能検査で 3 系統とも低値を示しました。血漿 ACTH は著明高値で、コルチゾールは ACTH-Z 連続負荷でも反応を認めなかった。性腺機能検査ではテストステロンの基礎値は低値であったが hCG 負荷試験には反応を認めた。

LHRH 負荷試験では基礎値、頂値とも低値、低反応であった (Table 2)。

以上の検査結果より DAX-1 異常症疑い、遺伝子を検索した結果 Trp171Stop (W171X) の変異が検出された。

(症例 6)

岐阜大学第三内科の宗友厚先生、タイ国の Chulalongkorn 病院 Sumarlee Srivuthama 先生より提供していただいた AHC の 2 症例には Ala118Thr (A118T) の変異が検出された。

(症例 7)

28 歳男性

主訴：色素沈着、全身倦怠感、性欲減退

家族歴：特記事項なし

現病歴：12 歳が初発でありアジソン病と診断。20 歳まで性欲減退を認めていない。

20 歳以降性欲減退、射精不能を認めている。

入院時現症：著明な色素沈着を認める。睾丸は発育不良。

内分泌学的検査成績：負荷試験では LHRH 負荷試験のみ低反応を示した (Table 2)。

この症例の DAX-1 遺伝子の解析で Gly4Glu (Q4E) および Cys338Tyr (C368Y) の 2 つのミスセンス変異を認めた。

(DAX-1 機能解析の原理)

Ad4BP/SF-1 は下流の遺伝子プロモーター領域に存在する Ad4 site に結合しその遺伝子の転写活性を上昇させることが知られている。DAX-1 は Ad4BP/SF-1 による転写活性化を抑制する機能 (サイレンシング機能) を有しているため、その機能が正常ならば、Ad4BP/SF-1 によって活性化された転写は抑制される。変異 DAX-1 がサイレンシング機能を失うならば、転写抑制は認められないと予測される。

(方法)

ヒト Ad4BP/SF-1 cDNA [RSV/Ad4BP] およびヒト DAX-1 cDNA (野生型、変異型) は RSV プロモーターの下流に連結し強制発現に供した [RSV/DAX-1]。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子 (pGL3-basic Promega) の上流に CYP11A のプロモーター領域 0.6k (岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所の諸橋憲一郎教授、河邊顕先生より分与) を連結した [CYP11A-luc]。内部コン

トロールには pRL/CMV (Promega) を用いた。実験には、サル腎臓癌由来の CV-1 細胞 (内因性の Ad4BP を発現していない細胞) およびマウス副腎癌由来の Y-1 細胞 (内因性の Ad4BP を発現している細胞) を用いた。これらの細胞は DMEM+10%FCS 培地で培養した。6-well plate にて 1.0 μ g [RSV/Ad4BP]、1.0 μ g [RSV/DAX-1]、2.0 μ g [CYP11A-luc]、0.1 μ g [pRL/CMV] (Promega) を lipofectamine (GIBCOBRL) を用いて一過性に遺伝子導入を行い、48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。細胞と [RSV/DAX-1] の組み合わせは、まず最初に、CV-1 細胞を用いて野生型、A118T および W171X の変異について検討した。次に、Y-1 細胞を用いて野生型、Q4E、C368Y および W171X について検討を加えた。

(倫理面への配慮)

患者、家族の同意を得た上で DNA 採取および遺伝子解析を行った。

C. 研究結果

CV-1 細胞は内因性 Ad4BP/SF-1 を発現していないため、[CYP11A-luc] のみ遺伝子導入してもルシフェラーゼ活性は認められなかった。[RSV/Ad4BP] を同時に遺伝子導入し強制発現させると有意なルシフェラーゼ活性を認めた。これを 100% とし DAX-1 のサイレンシング機能を検討すると、野生型 DAX-1 では 40% のルシフェラーゼ活性しか認めなかった。この結果により、この実験系は DAX-1 のサイレンシング機能を検討できる系であると考えられた。W171X 変異 DAX-1 は 115% のルシフェラーゼ活性を認め、サイレンシング機能が失われていることを確認した。しかしながら A118T 変異 DAX-1 では 45% のルシフェラーゼ活性しか認めずサイレンシング機能が保持されていた (Fig. 1)。以上より患者 1 の DAX-1 の機能低下は W171X 変異がもたらすもので、AHC の病態に関与していると考えられた。しかしながら、患者 6 の A118T 変異は DAX-1 の機能低下には関与していないと考えられた。

次に Y-1 細胞を用いてルシフェラーゼ活性を検討した。Y-1 細胞を用いた理由は、内因性 Ad4BP/SF-1 が存在するため Ad4BP を

強制発現する必要がなく実験系がより簡便になるからである。事実、[CYP11A-luc]のみ遺伝子導入を行うと有意なルシフェラーゼ活性を認めた。また、野生型 DAX-1 を導入すると 60%のルシフェラーゼ活性しか認めず、W171X 変異 DAX-1 を導入すると 100%の活性が認められた (Fig. 2)。このことより、この実験系も DAX-1 のサイレンシング機能を検討する上で有用な実験系と考えられた。この系で患者 7 に認められた Q4E/C368Y 変異を検討した。Q4E および C368Y の二つの変異を持つ Q4E/C368Y 変異を遺伝子導入すると 100%のルシフェラーゼ活性が認められ、DAX-1 のサイレンシング機能は失われていた。さらに、いずれの変異がこの機能低下に関与しているのかを検討するために、おのおのの変異を持つ DAX-1 を作製し遺伝子導入を行った。Q4E 変異 DAX-1 を導入した場合は 60%の活性しか認められなかったが、C368Y 変異 DAX-1 を導入した場合は 100%の活性が認められた。すなわち、C368Y 変異が DAX-1 の機能低下に関与していると推察された。

D. 考察

我々は、ルシフェラーゼアッセイ法を用いた DAX-1 遺伝子の機能解析法を今回確立した。既に Gal4-VP16 系を利用した解析法が報告されているが、ヒト SCC 遺伝子の転写抑制能を指標とする本解析法は簡便で、より生理的と考えられる。しかしながら、今回示した解析法は Ad4BP/SF-1 に対するサイレンシング機能を利用しているが、本方法で検出できない他の機能を DAX-1 には存在しているかもしれない。その点において、患者 6 に存在する A118T 変異がサイレンシング機能の低下を示さなかったのは非常に興味深い。

患者 7 は副腎不全の発症推定年齢が 12 歳と遅発発症であり、家族歴を有しないが、完成された臨床像としては DAX-1 異常症と一致する。DAX-1 の推定リガンド結合ドメインにはホルモン受容体間に保存された II 領域、III 領域と AF-2 コア領域が存在するが、未だその機能的意義は明らかにはない。II 領域の R267P 及び dV269 変異

の機能消失については既に Gal4-VP16 系を利用した解析にて証明されている。一方、本例で認められた C368Y の機能消失変異は既報の V385G、E377K 及び K382N 変異と同じ III 領域に位置しており、同部位の機能的重要性が示唆された。

The Human Gene Mutation Database のサイトで DAX-1 異常症を検索すると 55 の変異が報告されている。

http://www.uwcm.ac.uk/search/mg/all_genes そのうち、11 種類がミスセンス変異であり、10 種類が推定リガンド結合ドメインに存在する。残り 1 種類の DNA 結合ドメインに存在する変異は V126M であるが、この症例は W171X との double-point mutant であり、V126M が AHC の原因となっているかは定かではない。すなわち、DNA 結合ドメインのミスセンス変異による DAX-1 異常症は、現在のところはっきりとは見いだされておらず、患者 7 の他方の Q4E は遺伝子多型である可能性が考えられた。

しかし、DAX-1 遺伝子に変異を見いだせない AHC も存在するため、AHC の発症には未だ知られていない原因があると考えられる。上記の DNA 結合ドメインに存在する変異があるいはそれに関与しているのかもしれない。

E. 結論

先天性副腎低形成症例に見い出される DAX-1 遺伝子変異の機能的意義を推定する上で、今回提示した *in vitro* の解析法は有用であると考えられた。患者 6 に見いだされた A118T および患者 7 に見いだされた Q4E 変異は本病態への関与は現在のところ薄いと考えられた。患者 7 に見いだされた C368Y 変異は機能的に重要な III 領域に存在し、AHC 発症の原因と考えられた。

F. 研究発表

学会発表

第 6 回日本内分泌学会ステロイドホルモン分科会

先天性副腎低形成症例における遺伝子解析 (第二報): DAX-1 遺伝子変異の機能解析
九州大学医学部第三内科、同総合診療部*

大庭功一、柳瀬敏彦、市野 功、後藤公宜*、
高柳涼一、名和田 新

第 72 回日本内分泌学会学術総会

先天性副腎低形成症例における遺伝子解析

(第三報)

: DAX-1 遺伝子変異の機能解析

九州大学医学部第三内科、

*現、麻生セメント(株)飯塚病院

大庭功一*、柳瀬敏彦、市野 功、後藤公
宣、高柳涼一、名和田 新

International Symposium on Molecular
Steroidogenesis

Analysis of adrenal hypoplasia
congenita : DAX-1 mutation

Ichino, I. Yanase, T. Oba, K. Takayanagi,
R. Nawata, H.

Table. 1 当教室で経験した低ゴナドトロピン性性腺機能低下症と
先天性副腎皮質低形成におけるDAX-1変異

Pt	Age/Sex	Race	Inheritance	DAX-1
1	17/M	Japanese	X-linked	Trp 171 Stop
2	18/M	Japanese	X-linked	1-bp del (codon 280)
3	20/M	Japanese	X-linked	1-bp del (codon 49)
4	20/M	Japanese	X-linked	Cys 109 Stop
5	22/M	Japanese	X-linked	1-bp del (codon 209)
6	14/M	Thai/Japanese	X-linked	Ala 118 Thr
7	28/M	Japanese	X-linked	Gly4Glu/Cys338Tyr

Table 2. 患者1と患者7の副腎および性腺機能成績

Mutation	Age at diagnosis (yr)	Cortisol (mg/dl)	ACTH (pg/ml)	Basal/Peak (LHRH) LH (IU/L) FSH (IU/L)	Basal/post-hCG Testosterone (ng/dl)
Nonsense W171X	1.5	<1.0	4100	1.2 / 10.3 9.3 / 10.7	10.1 / 419
Missense Q4E, C368Y	12	<1.0	2603	1.1 / 3.1 5.3 / 7.1	58.9 / 598

Fig.1 患者1と患者6のDAX-1の転写抑制能

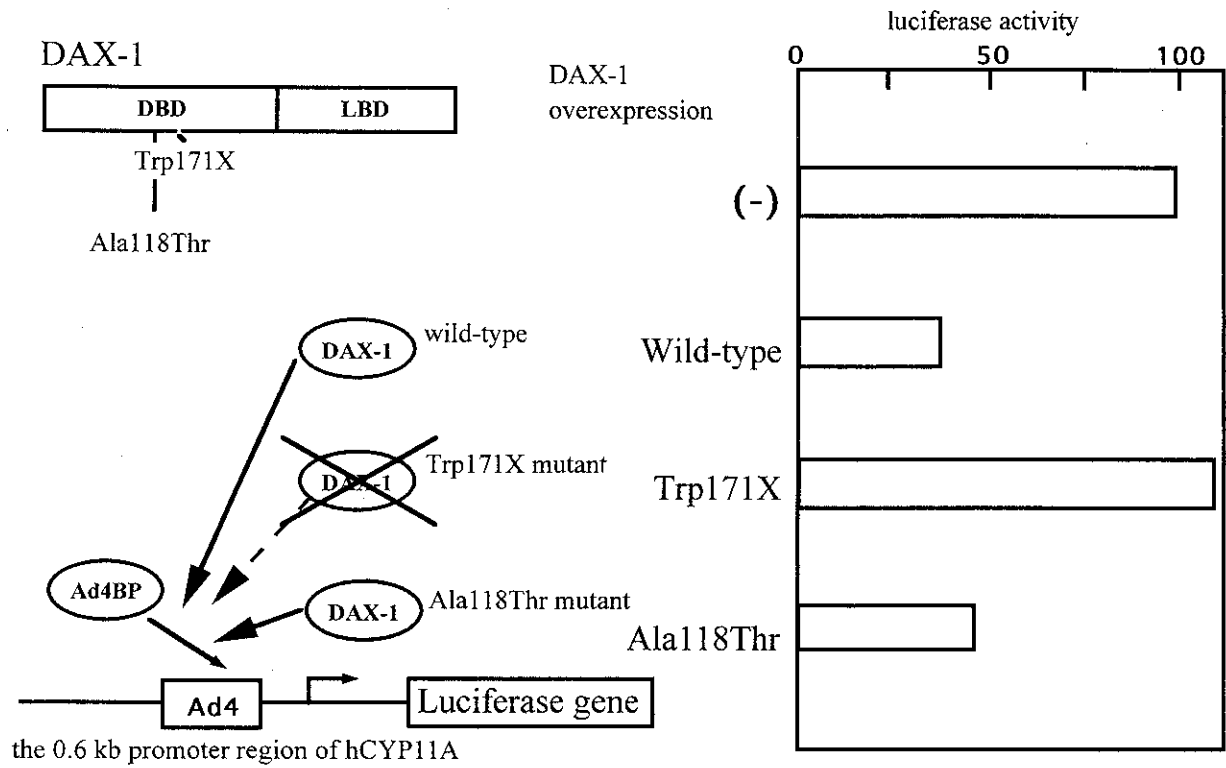
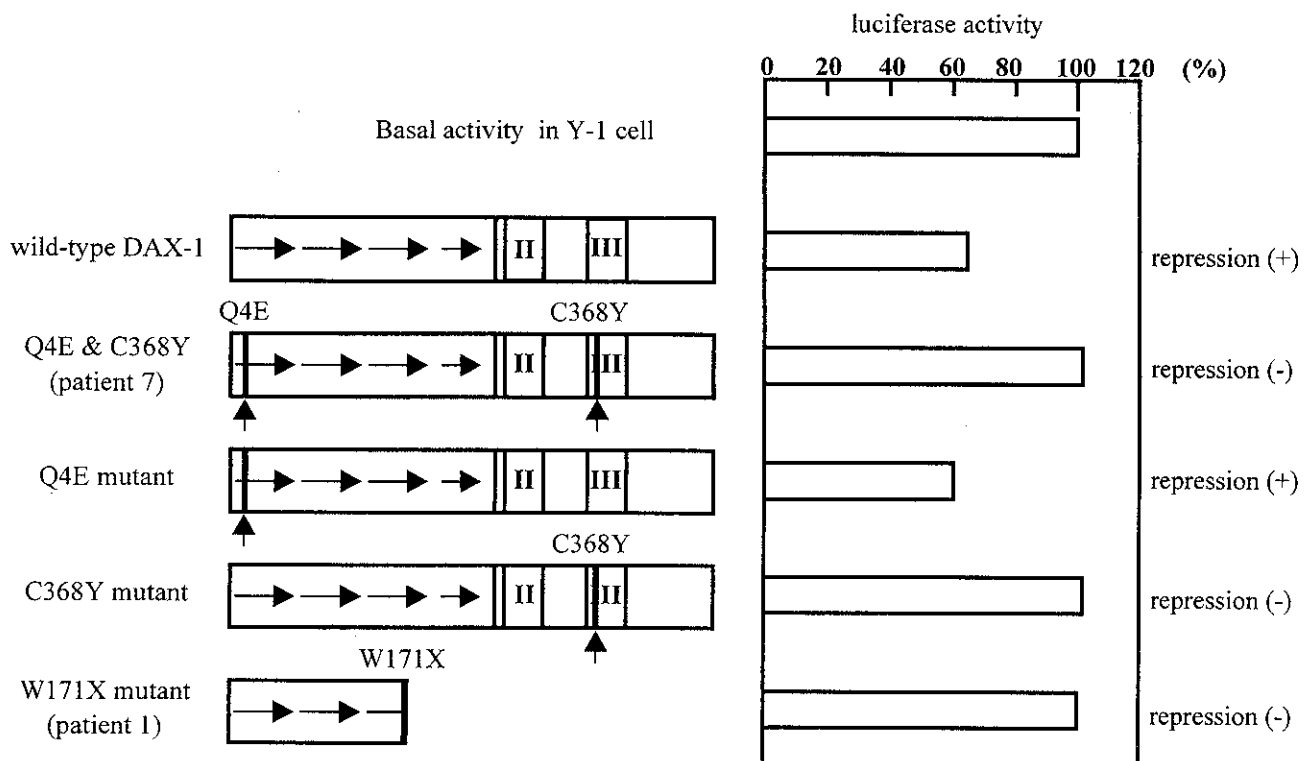


Fig.2 患者7のDAX-1の転写抑制能



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

諸橋 憲一郎

岡崎国立共同研究機構、基礎生物学研究所

発生生物学研究系細胞分化研究部門

研究要旨

副腎皮質は各種ステロイドホルモンを産生、分泌することで生体の恒常性の維持に不可欠な役割りを担っている。本研究では、副腎皮質を含むステロイドホルモン産生組織で発現する Dax-1 遺伝子の発現を調べた。本遺伝子の副腎皮質における発現はテストステロンによって制御を受けることが明らかになった。

A. 研究目的

Dax-1 遺伝子は副腎皮質と性腺の機能低下症の原因遺伝子として単離されたことから本遺伝子が副腎皮質の形成過程で重要な働きを担っていることが推測された。本研究では Dax-1 遺伝子の発現調節機構と機能の解明を通じ、副腎皮質機能低下症の発症機序、及びの副腎皮質の形成機構を明らかにするためにために行われた。

B. 研究方法

マウス Dax-1 cDNA をもとに大腸菌内で Dax-1 タンパク質の発現をおこなった。発現した Dax-1 タンパク質をゲル電気泳動にて精製し、モルモットに免疫した。得られた抗血清の力価が弱かったため、抗原カラムを作製し抗体の精製を行った。精製抗体は免疫染色、ウエスタンブロッティングなどの実験に使用可能であった。胎仔副腎における mRNA の定量を行うにあたり、サー

マルサイクラー社製のライトサイクラーを使用した。ライトサイクラーは PCR によって、mRNA の定量を可能にするもので、マウス Dax-1 に対するプライマーを設定し、検量線を作製したところ、定量性、及び再現性ともに安定した機器であった。

本研究にはマウスなどの実験動物を使用した。動物の取り扱いに関しては岡崎国立共同研究機構で定められた動物実験の指針にそって行われた。

C. 研究成果

胎仔期より成獣までの、雌雄副腎における Dax-1 の発現を検討したところ、胎仔副腎から思春期以前の副腎における Dax-1 の発現には性差が認められなかったが、思春期以降の副腎では雌副腎における発現が雄の発現より高かった。これらの結果はタンパク量と mRNA 量の両方で確認された。そこで、副腎皮質における発現分布を調べたと

ころ、雌副腎皮質では球状層と柵状層に強い発現が認められたが、雄副腎皮質では球状層にのみその発現が認められた。一方、副腎皮質の形成に不可欠な Ad4BP/SF-1 の発現は雌雄ともに副腎皮質の全層に観察された。Dax-1 における発現の性差は思春期以降に現れることから、この差は性ホルモンの影響のもとに形成されると推測された。そこで雌雄成獣マウスの生殖腺を摘出し、その影響を検討した。卵巣摘出マウスにおいては発現分布に顕著な変化が認められなかったが、精巣摘出マウスでは、発現分布が雌型に変化することが確かめられた。これらの変化は、同様に Dax-1 発現量の増加として検出された。次いで、精巣摘出マウスにテストステロン投与を行ったところ、増加した発現量が正常の雄マウスにおける発現量まで低下することが確認された。分布も同様に雌が型から雄型へ変化した。

D. 考察

副腎皮質における Dax-1 の発現には性差があり、これはテストステロンによる影響であることを明らかにすることが出来た。また、これらの性差は副腎皮質の機能に性差があることを強く示唆するものであった。Dax-1 の機能は不明な点が残されてはいるものの、Ad4BP/SF-1 の転写活性に対し抑制的に働くことは種々の遺伝子プロモーターを用いることで確かめられてきた。このような転写抑制活性が雌雄で異なることになるが、Ad4BP/SF-1 と Dax-1 の標的遺伝子であるチトクローム P450 遺伝子の発現量に

顕著な性差が認められず、正常な常態での副腎機能の性差を作り出しているものではないかもしれない。

Dax-1 遺伝子発現のテストステロンによる抑制メカニズムの解明のため、Dax-1 遺伝子の転写活性に対するアンドロゲンレセプターの効果を検討している。副腎機能の性差は重要な問題であるが、今後は転写因子の発現と活性をもとに検討することができるものと思われる。

E. 結論

副腎皮質における Dax-1 の発現には、その発現分布と発現量に明瞭な性差が認められた。この性差はテストステロンによって作り出されることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1, Morohashi, K., Tsuboi-Asai, H., Matsushita, S., Suda, M., Nakashima, M., Sasano, H., Hataba, Y., Li, C-L., Fukuta, J., Irie, J., Watanabe, T., Nagura, H., & Li, E. (1999) Structural and Functional and Functional Abnormalities in the Spleen of *mFtz-F1* Gene Disrupted Mouse. *Blood* 93, 1586-1594.
- 2, Kawabe, K., Shikayama, T., Tsuboi, H., Oka, S., Oba, K., Yanase, T., Nawata, H., & Morohashi, K. (1999) *Dax-1* as One of the Target Genes of Ad4BP/SF-1. *Mol. Endocrinol.*, 13,

- 1267-1284.
- 3, Kabe, Y., Goto, M., Shima, D., Imai, T., Wada, T., Morohashi, K., Shirakawa, M., Hirose, H., & Handa, H. (1999)
The Role of Human MBF1 as a Transcriptional Coactivator. *J. Biol. Chem.* 274, 34196-34202.
- 4, Nagamine, C.M., Morohashi, K., Carlisle, C., & Chang, D.K. (1999)
Sex Reversal Caused by *Mus musculus domesticus* Y Chromosomes Linked Variant Expression of the Testis-Determining Gene *Sry*. *Dev. Biol.* 216, 182-194.
- 5, Morohashi, K. (1999)
Gonadal and Extragonadal Functions of Ad4BP/SF-1 -Developmental Aspects-. *Trends in Endocrinol. Metab.* 10, 169-173.
2. 学会発表
- 1、招待講演
- (1) 第25回日本医学会総会
「生殖腺の形成を制御する核内レセプター」
諸橋憲一郎
- (2) 第72回日本内分泌学会「生殖腺形成過程における内分泌攪乱物質の影響」
諸橋憲一郎
- (3) 第18回日本アンドロロジー学会「生殖腺の分化を支えるメカニズム」
諸橋憲一郎
- (4) 第8回産婦人科内分泌懇話会
「性分化のメカニズム」 諸橋憲一郎
- (5) 第71回日本生化学会「生殖腺の分化を支える核内レセプター」 諸橋憲一郎
- (6) 第71回日本生化学会「性分化機構と内分泌攪乱化学物質」 向井徳男、百々哲史、佐神文郎、諸橋憲一郎
- (7) 第71回日本生化学会「生殖腺の分化を支える核内レセプター」 諸橋憲一郎
- (8) 第49回日本泌尿器科学会中部総会
「性分化の分子的メカニズム」 諸橋憲一郎
- (9) 第2回 生殖毒性シンポジウム「生殖腺の分化を支える核内レセプター」
諸橋憲一郎
- (10) 第22回 日本分子生物学会年会
「生殖腺形成過程におけるオーファンレセプターの機能」 諸橋憲一郎、川辺顕、向井徳男、水崎博文、石原悟
- (11) 第18回高峰カンファレンス「核内レセプターと転写制御」「性の分化と核内レセプター」 諸橋憲一郎
- (12) 第4回環境ホルモン学会講演会
「性分化の分子メカニズム」 諸橋憲一郎
- (13) The 4th International Symposium on Molecular Steroidogenesis.
Ken-ichirou Morohashi
"Transcription factors implicated in the gonadal and adrenocortical steroidogenesis"
- (14) Japanese-Hungarian Binational Symposium on "Developmental and Environmental control of cell differentiation"
Ken-ichirou Morohashi

"Transcription factors implicated in the gonadal and adrenocortical development"

(15) International Symposium on Environmental Disruptors
Ken-ichirou Morohashi

"Expression and Function of Transcription Factors Implicated in Differentiation of the Gonads"

2、一般演題

(1) 横井勇人、諸橋憲一郎、小林亨、長濱嘉孝、若松佑子、尾里健二郎 メダカの性と SOX9 第32回日本発生生物学会

(2) 柴田洋孝、安藤孝、栗原勲、鈴木利彦、諸橋憲一郎、Johan Lund、林晃一、齋藤郁夫、

猿田享男 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 第72回日本内分泌学会

(3) 廣谷真樹、手島教介、町田屋久子、升田暢之、貞野宏之、諸橋憲一郎、大隅隆 転写関連蛋白質と核マトリックスの相互作用 第72回日本生化学会

(4) 升田暢之、相沢正和、井口尚子、平野伸二、鈴木信太郎、諸橋憲一郎、塚本利朗、

大隅隆 核内レセプターERR γ の機能解析—SHPによって抑制される転写活性化能 第22回日本分子生物学会年会

(5) 松嶋良次、諸橋憲一郎、田中実、若松佑子、木下政人、長濱嘉孝、尾里健二郎

メダカの発生過程における P-450 アロマトーゼ発現の解析 第22回日本分子生物学会年会

(6) 下野明彦、岡早苗、諸橋憲一郎、Richard R. Behringer マウス Lim1 変異体を用いた頭部オーガナイザー特異的遺伝子の単離

第22回日本分子生物学会年会

(7) 向井徳男、鹿山達司、岡早苗、藤枝憲二、名和田新、諸橋憲一郎 マウス副腎における Dax-1 の発現 第22回日本分子生物学会年会

(8) Shibata, T. Ando, I. Kurihara, G. T. Suzuki, J. Lund, K. Morohashi, K. Hayashi, M. Hayashi, I. Saito, T. Saruta

"Coactivator and corepressor regulation of the bovine CYP17 gene transcription - New actors in steroidogenesis" 81th Annual Meeting of American Endocrine Society

(9) K. Kawabe, T. Shikayama, H. Tsuboi, S. Oka, K. Oba, T. Yanase, H. Nawata, and K. Morohashi "Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-

1" The 4th International Symposium on Molecular Steroidogenesis

(10) T. Mukai, T. Shikayama, S. Oka, K. Fujieda, and K. Morohashi "Expression of Dax-1 in the Adrenal gland" The 4th International Symposium on Molecular Steroidogenesis

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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 SIK

岡本 光弘

大阪大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学講座

研究要旨

高塩食で飼育したラットの副腎皮質で特異的に転写が誘導される遺伝子をサブトラクション法により単離した。その遺伝子産物はキナーゼドメインを有する新規のタンパク質であることが明らかとなり、塩誘導性キナーゼ (SIK) と名付けた。SIK mRNA の発現誘導機構の解析と強制発現の実験の結果、SIK は ACTH/cAMP によって誘導されること、SIK は 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生合成酵素等の遺伝子発現の調節に密接に関係すること、そして 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などが明らかとなった。また SIK の副腎皮質における生理的機能は ACTH による細胞の過剰応答の抑制であることを示唆する結果が得られた。

A. 研究目的

ステロイドホルモン生合成酵素の遺伝子を解析することにより、副腎皮質ホルモンの産生異常症の多くが容易に検査できるようになった。一方これら酵素の発現を直接制御する転写因子等の遺伝子も単離され、転写因子の遺伝子異常に基づく副腎皮質ホルモン産生異常症も実際に報告されるようになった。しかしながら副腎皮質細胞の外界からの刺激を核に伝える細胞内シグナル伝達機構に関しては説明が遅れており、シグナル伝達に関わる遺伝子の異常とステロイドホルモン産生異常症との関係は今後の大きな課題である。

下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) は副腎皮質細胞に作用し、cAMP を主要な 2 次メッセンジャーとしてステロイドホルモンの分泌、ステロイドホルモン生合

成酵素の発現誘導、細胞増殖等を促進することが知られている。しかしこれらの応答は ACTH の濃度や刺激後の時間に依存して様々に変化する。例えばステロイドホルモンの分泌は低濃度の ACTH ($<10^{-10}$ M) で数秒～分内に起こる応答 (即時型反応) であるのに対して、ステロイドホルモン生合成酵素の誘導は高濃度の ACTH ($>10^{-8}$ M) が必要で、刺激後 6 時間以降に起こる (遅延型反応)。近年 ACTH の刺激応答に cAMP 以外の 2 次メッセンジャーの関与や新たに合成される未知因子が ACTH/cAMP シグナル伝達系に修飾を加える可能性が示唆されているが、分子機構の詳細は不明である。

我々は最近、高塩食で飼育したラットの副腎皮質に特異的に誘導される遺伝子の中に SIK と命名した遺伝子を単離することに成功した。その遺伝子の発現を解析した結果、SIK が副腎皮質における ACTH/cAMP の

シグナル伝達系を調節する事が示唆された。本研究では細胞に SIK を強制発現実験させることにより、SIK の生理的役割を解明することを目的とした。

B. 研究方法

SIK のタンパク質翻訳領域の cDNA の単離には 5'/3'-RACE 法を用いた。生体レベルでの SIK mRNA の発現変動を検討するため高 K⁺ または高 Na⁺ 食で飼育したラット、あるいは ACTH、0.1mg/kg/day、を腹腔内に 7 日間投与したラットから全身麻酔下に副腎を摘出し RNA を調製した。

副腎皮質に由来する細胞株 Y-1 細胞を利用して ACTH の濃度および時間依存性に SIK mRNA が発現する現象を解析した。SIK の ACTH を介した誘導が cAMP/A-キナーゼによるシグナル伝達経路であるか否かを検討する目的でフォルスコリンおよび 8-ブロム cAMP で Y-1 細胞を処理し SIK mRNA の発現を検査した。

恒常的に SIK を高発現させるため、pIRES プラスミドに SIK のタンパク質翻訳領域の cDNA を挿入し、それを Y-1 細胞へ導入後ネオマイシン感受性選択を行うことにより SIK 高発現 Y-1 細胞株を得た。得られた細胞株での CYP11A、StAR、Ad4BP の mRNA の発現をノーザン法で解析した。

SIK に蛍光蛋白質 GFP を結合したプラスミドを Y-1 細胞に導入し、ACTH で刺激した後の SIK-GFP 蛋白質の細胞内移動を蛍光顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

SIK は最初高 K⁺ 負荷したラット副腎に特

異的に発現する遺伝子としてサブトラクション法を利用して単離された。SIK の発現誘導特性を高 K⁺ 食または高 Na⁺ 食で飼育したラット副腎から RNA を抽出しノーザン法を用いて再検討した (図 1)。SIK は通常食 (N) で飼育した場合はほとんど発現が見られないが、高 K⁺ または高 Na⁺ 食で飼育した副腎に高い発現が観察された。

図 2 に SIK の cDNA 配列と予想されるアミノ酸配列を示す。単離された SIK cDNA は全長 2331bp で、776 アミノ酸からなるタンパク質をコードする。SIK タンパク質の N 末端にはセリン・トレオニン・キナーゼに特徴的な活性ドメイン (枠内) が存在する。SIK のキナーゼドメインは各種ストレスによって誘導されることが報告されているキナーゼ (SNF-1/AMPK) ファミリーのドメインに高い相同性を有していた。一方 C 末端側はこれまで報告されているタンパク質とは全く相同性を有しない。

SIK の誘導とステロイドホルモン生合成の相関を検討する目的で ACTH 処理を行ったラットの副腎皮質 (図 3-A) と副腎皮質由来細胞株 Y-1 (図 3-B) における SIK の発現を検討した。その結果 SIK は ACTH によって誘導されることが明らかとなった。また ACTH の主なシグナル伝達系である cAMP/A-キナーゼの関与を検討したところ、SIK は A-キナーゼのアゴニストであるフォルスコリンおよび 8-ブロム cAMP でも ACTH 同様に誘導されることから、ACTH による SIK の誘導には A-キナーゼを介するシグナル伝達系が関与することが示唆された。また SIK の