

## E. 結論

マウスにおいては副腎、性腺ともに Foxo 1 が発現していることを確認することができた。さらに、副腎における組織内発現部位は髄質および皮質球状層であることも確認できた。また、これら組織における発現量の推移に関しては副腎では大きな変化・性差が存在しないが、性腺においては性差の存在が明らかとなった。今後の課題としてこれらステロイド産生組織における Foxo 1 の機能の解明に迫りたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tajima T, Hattori T, Nakajima T, Okuhara K, Sato K, Abe S, Nakae J, Fujieda K : Sporadic heterozygous frameshift mutation of HESX 1 causing pituitary and optic nerve hypoplasia and combined pituitary hormone deficiency in a Japanese patient. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 45-50, 2003
- 2) Kawajiri K, Ikuta T, Suzuki T, Kusaka M, Muramatsu M, Fujieda K, Tachibana M, Morohashi K : Role of the LXXLL-motif and AF 2 domain in subcellular localization of Dax-1. *Mol Endocrinol*, 17 : 994-1004, 2003
- 3) Tajima T, Okuhara K, Sato K, Nakae J, Fujieda K : Two novel aquaporin-2 mutations in a sporadic Japanese patient with autosomal recessive nephrogenic diabetes insipidus. *Endocrine J*, 50 : 473-476, 2003
- 4) Ogawa E, Fujieda K, Tachibana K, Inomata H, Kinoshita E, Kusuda S, Nishi M, Okada T, Saisho S, Tajima T, Tanaka T : Mortality in patients with congenital 21-hydroxylase deficiency diagnosed after the introduction of a newborn screening program in Japan. *Clin Pediatr Endocrinol* 12 : 19-23, 2003
- 5) Fujieda K, Okuhara K, Abe S, Tajima

T, Mukai T, Nakae J : Molecular pathogenesis of lipoid adrenal hyperplasia and adrenal hypoplasia congenita. *J Steroid Biochem & Mol Biology* 85 : 483-489, 2003

6) Ueda O, Fujine M, Mukai T, Ito Y, Fujieda K : A male patient with growth retardation, immunodeficiency and diabetes mellitus : A new syndrome. *Clin Pediatr Endocrinol* 12 (Suppl 20) : 47-49, 2003

7) Tajima T, Sasaki S, Tanaka Y, Kusunoki H, Nagashima T, Nonomura K, Fujieda K : 46, XY phenotypic male with focal segmental glomerulosclerosis caused by the WT 1 splice site mutation. *Horm Res* 60 : 302-305, 2003

8) Tajima T, Nakae J, Fujieda K : Two heterozygous mutations of CLDN16 in a Japanese patient with FHHNC, *Pediatr Nephrol* 18 : 1280-1282, 2003

9) Fluck C, Tajima T, Pandey AV, Arlt W, Okuhara K, Verge CF, Jabs EW, Mendoca BB, Fujieda K, Miller WL : Mutant P450- oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome. *Nature Genet* : in press

10) 田中敏幸、藤枝憲二、横谷進、西美和、立花克彦、長谷川行洋、一色玄 : 高インスリン血症性低血糖症に対する diazoxide の有効性と安全性 : 日本小児科学会雑誌、107 : 29-34, 2003

11) 向井徳男、上田修、藤根美穂、中江淳、伊藤善也、澤村豊、高橋博之、今野武津子、佐藤考平、藤枝憲二 : PRKAI1A 遺伝子の解析を行った Carney complex の 1 例 : ホルモンと臨床、51 増刊号「内分泌 興味ある症例 第 42 集」 : 181-185, 2003

### 2. 学会発表

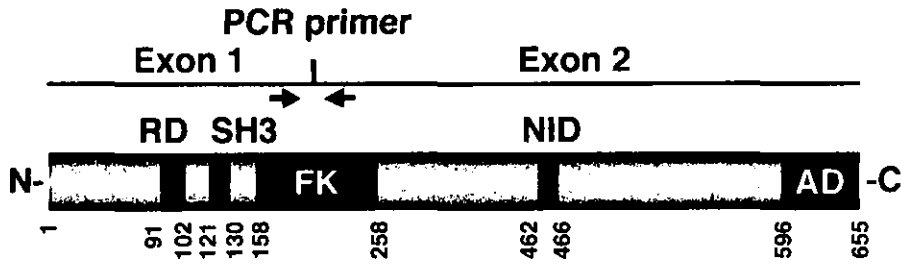
なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況

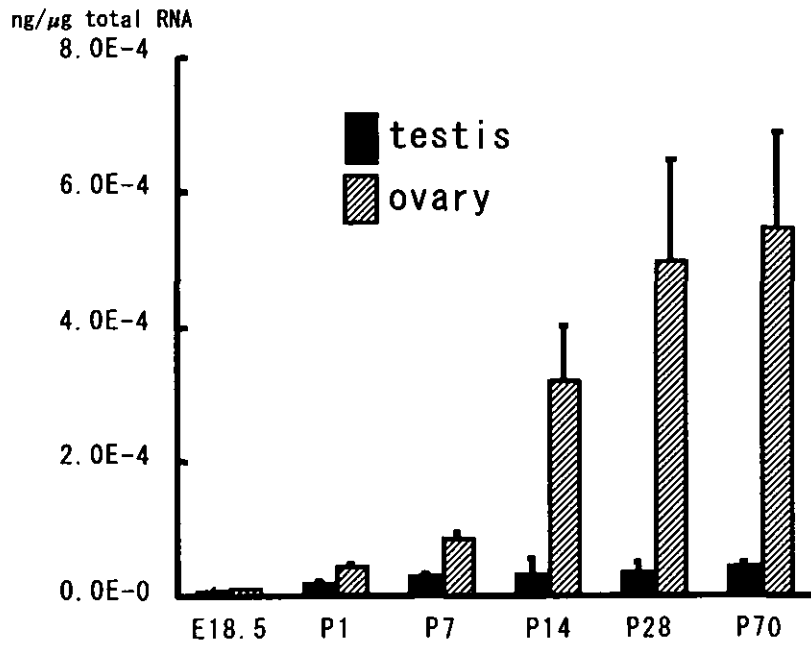
1. 特許取得 : なし
2. 実用新案登録 : なし
3. その他 : なし

(图 1)

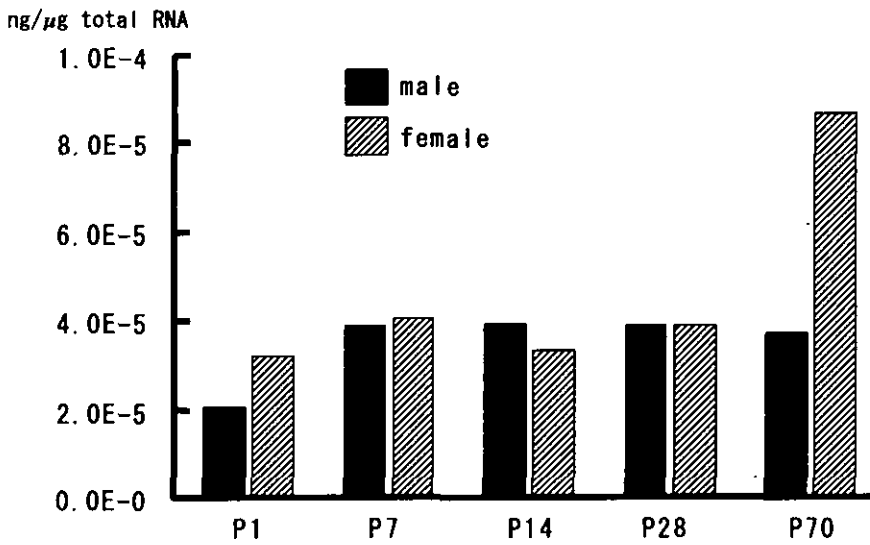
mouse Foxo1



(图 2)

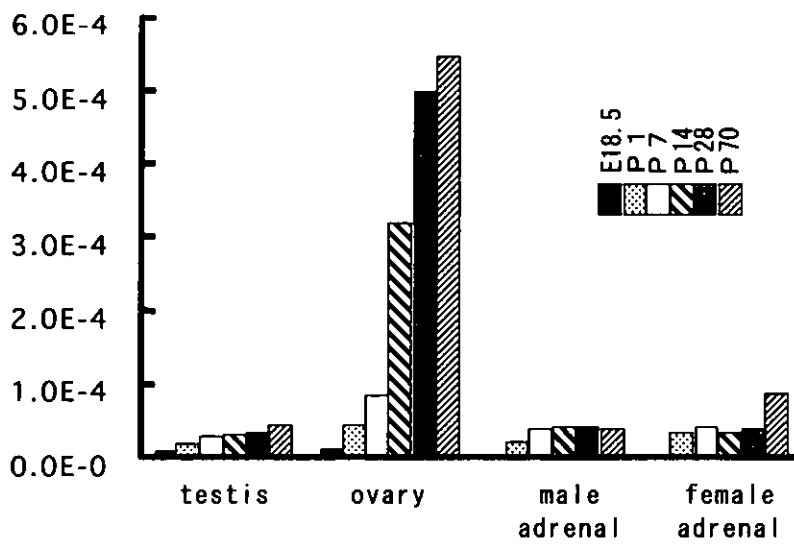


(图 3)



(图 4)

ng/ $\mu$ g total RNA



(图 5)



# 塩誘導性キナーゼ (SIK) による cAMP 依存的遺伝子の発現制御

岡本光弘

大阪大学大学院生命機能研究科細胞ネットワーク研究室

## 研究要旨

我々がクローニングした新規プロテインキナーゼ SIK が副腎皮質細胞において ACTH 刺激-ステロイドホルモン分泌応答のシグナル伝達を調節する分子機構を研究した。その結果、ACTH 刺激の直後に起こる StAR 遺伝子の転写を SIK は抑制する。そして SIK による抑制は ACTH-cAMP-PKA-CREB-転写活性化というシグナル伝達の最終過程、つまり StAR 遺伝子プロモーター領域にある CRE に CREB が結合して転写開始複合体が作動する点であることが明らかになった。これらのことより、SIK はステロイドホルモン産生の初期段階のタイミングを決定する調節因子であると推定される。

ヒト StAR 遺伝子プロモーターにも CRE 配列を介する cAMP 応答シグナルが存在することが明らかとなった。SIK は P450scc プロモーターの場合と同様に StAR プロモーターの cAMP/PKA 依存的な転写活性を抑制する。興味深いことにヒト StAR プロモーターにある 2 個の CRE のうち近位の CRE だけが SIK の標的配列としてはたらく。

## A. 研究目的

副腎皮質におけるステロイド合成酵素の遺伝子発現は主に、下垂体から分泌される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) によって制御されている。ACTH が副腎皮質細胞の表面膜にある受容体に結合すると、G-タンパク質を介してアデニル酸シクラーゼが活性化され、細胞内 2 次メッセンジャーとして cAMP が合成される。細胞内の cAMP 濃度が上昇すると cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) が活性化され、PKA は次に標的遺伝子の上流にある cAMP 応答配列 (CRE) に結合している転写因子 CREB 等のリン酸化を起こす。リン酸化された CREB は転写共役因子と結合して、その結果標的遺伝子のプロモーター活性が上昇する。これらの一連のカスケード反応の効率は当然のことながら ACTH の濃度や刺激後の時間経過に依存して変動す

る。またこのシグナル伝達カスケードの効率は、cAMP 以外の 2 次メッセンジャーやカスケードの主経路から分岐した経路で新たに合成された因子によって修飾される可能性も示唆されている。

我々はナトリウムあるいはカリウム負荷をしたラットの副腎皮質において特異的に誘導される新しいセリン・トレオニンプロテインキナーゼ SIK (Salt-inducible kinase) を単離した (1)。SIK は N-末端側にキナーゼ領域を持ち、その一次構造は SNF 1 / AMPK ファミリーと相同性が高い。その後の研究の結果 SIK は副腎皮質由来の Y 1 細胞株を ACTH で刺激すると迅速に誘導されることが分かった。また ACTH による SIK 誘導のシグナル伝達は cAMP/PKA カスケードを介すること、SIK は cAMP/PKA で活性化された CRE を抑制するが、そのためには SIK のタンパク質

リン酸化活性が必要であることも明らかになった(2)。SIKによるCRE抑制は、CREB/ATFファミリーの転写活性を抑制することによるものである(3)。

実際、Y1細胞においてSIKを高発現させると、ACTHによるステロイド合成酵素遺伝子の誘導が抑制された(2)。特に注目すべき点は、ステロイド合成の原料であるコレステロールをミトコンドリアへ輸送するタンパク(StAR)の遺伝子発現誘導の時間経過である(図1)。Y1細胞にSIKを強制発現させるとcAMPによるStAR遺伝子誘導の初期過程は対照細胞株と差がないが、数時間経過すると誘導は抑制される。このことはSIKによるcAMP依存的遺伝子発現の抑制効果は時間に依存することを示唆する。SIKによるCRE抑制の時間依存性はSIKタンパクのC-末端欠損変異体では観察されない(4)。またSIKはACTHで刺激する以前のY1細胞では主に核に局在しているが、ACTH処理後にSIKは細胞質へ移動する。SIKのC-末端にはPKAによりリン酸化されるSer577が存在しており、Ser577をAlaに置換した変異SIKはACTH刺激後も核内に留まる。同時にSIKによるCRE抑制の時間依存性も失われる。これらのことから、SIKの核-細胞質間移動が遺伝子発現の調節に重要であると考えられた。

本研究ではStAR遺伝子が実際にcAMP-PKA-CRE-SIK系によって制御されるかを検証し、SIKのPKAによるリン酸化と細胞内局在変化の重要性を明らかにすることを試みた。

## B. 研究方法

ヒトStAR遺伝子の配列はGenbankのNo.00065を参考にした。StARプロモーターの遠位CREに対するCREBの結合

能は、

5'-gagagaTTCTAGAAgagtc/5'  
ggactcTTCTAGAAAtctctをKlenowで標識したオリゴヌクレオチドを利用したゲルシフト法で検証した。ヒトStAR遺伝子プロモーター(-1.3kb)は北海大学の菅原照夫先生から御供与頂いた。-2.0-1.3kb断片はPCRで増幅した(4)。

## C. 研究結果

図2にヒトStAR遺伝子プロモーターの上流約2 kbまでの構造を示す。転写開始点近くにSF-1/Ad4BP結合配列と一部重複してCREが存在する。マウスではこの近位CREにCREBファミリー因子が結合することが示されており(5)、ドミナントネガティブCREBを高発現させるとStARプロモーター活性が抑制されることが報告されている。ヒトのStARプロモーターではさらに上流の約2 kbの領域にSF-1/Ad4BP結合配列と10数塩基離れてCREが存在する。この配置はヒトP450sccプロモーターのcAMP応答領域に酷似しているためStARプロモーターの遠位CREもcAMP応答に重要であることが予想された。そこで遠位CREにCREBが実際に結合するか否かをゲルシフト法で検討した。

図3に示す様に、Y1細胞核から調製した抽出液をStARの遠位CRE配列と反応させると移動度の小さいバンドが現れた。このバンドはP450sccや $\alpha$ CGプロモーターのCREプローブでも観察される(図3A)。さらに $\alpha$ CG由来の無標識CREプローブを加えると現れない(図3B)。したがってStARプローブで現れたバンドはStAR遺伝子の遠位CREにCREBが結合して現れたものと結論した。

次にStAR遺伝子の遠位CREおよび近位CREがPKAやSIKの制御を受けるか

否かをルシフェラーゼを利用したレポーター系を構築して検討した。図4-AにヒトStARプロモーターのレポーターアッセイの結果を示す。なおこの実験ではSIKとしてC-末端を欠失させてCRE抑制が常時観察される変異体を利用した。遠位CRE(-2.0-1.8kb)を欠損させたプロモーターを用いるとPKAによる活性化はわずかに減少した。この系にSIKを加えると、PKAによる活性化は効果的に抑制を受けた。PKAによるStARプロモーターの活性化は-150bp断片でも顕著に現れ、この活性化はSIKによって効率的に抑制された。さらに近位CREも欠失させた断片を用いると、PKAによる活性化とSIKによるその抑制効果がともに観察されなかった。このことはStAR遺伝子の近位CREがSIKによる抑制に最も重要であることを示唆している。図4-Bに、PKAでリン酸化されない核局在型SIK(CREを常時抑制)と野生型SIKのヒトStARプロモーター活性に及ぼす影響を示す。野生型SIKはPKAによるStARプロモーター活性の上昇をほとんど抑制しないが、PKA非感受性の変異SIKは強力に抑制した。

#### D. 考察及び結論

本研究によりヒトStAR遺伝子プロモーターにもCRE配列を介するcAMP応答シグナルが存在することが明らかとなった。SIKはP450sccプロモーターの場合と同様にStARプロモーターのcAMP/PKA依存的な転写活性を抑制する。興味深いことにヒトStARプロモーターにある2個のCREのうち近位のCREだけがSIKの標的配列としてはたらく。このことはSIKによる遺伝子発現の抑制作用はCREに結合している

CREBに単純に働くのではなく、CREの周辺の塩基配列もSIKの作用に重要であることを示唆している。またPKAでリン酸化を受けない変異SIKは野生型SIKよりも強いStARプロモーター抑制活性を示した。このことはY1細胞に野生型SIKを強制発現させたとき、ACTH/cAMP刺激によるStAR mRNAの初期誘導は正常に起こるが後期誘導はSIKによって抑制されることを説明できる。今後SIKがリン酸化する標的基質を同定することにより詳細な解析を行う必要がある。

#### 参考文献

- 1) Wang ZN, et al: FEBS Lett 453: 135-139, 1999
- 2) Lin, X-z., et al: Mol. Endocrinol 15: 1264-1276, 2001
- 3) Doi J, et al: J. Biol. Chem. 277:15629-15637, 2002
- 4) Takemori H, et al: J. Biol. Chem. 277: 42334-42343, 2002
- 5) Manna P. R. et al: Mol Endocrinol. 16 184-199, 2002

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takemori, H., Doi, J., Horike, N., Katoh, Y., Min, L., Lin, X-z., Wang, Z-n., Muraoka, M., and Okamoto, M. (2003) Salt-inducible kinase-mediated regulation of steroidogenesis at the early stage of ACTH-stimulation. J. Steroid Biochem. & Mol. Biol. 85, 397-400.
- 2) Horike, N., Takemori, H., Katoh, Y., Doi, J., Min, L., Asano, T., Sun, X-J., Yamamoto, H., Kasayama, S., Muraoka, M., Nonaka, Y., and Okamoto, M. (2003) Adipose-specific expression, phosphorylation of Ser-794 in insulin receptor substrate-1, and activation in diabetic animals of salt-inducible kinase-2. J. Biol. Chem., 278, 18440-18447.

3) Katoh, Y., Takemori, H., Horike, N., Doi, J., Muraoka, M., Min, L., and Okamoto, M. (2003) Salt-inducible kinase (SIK) isoforms: their involvement in steroidogenesis and adipogenesis Mol. Cell. Endocrinol., in the press.

4) Min, L., Takemori, H., Nonaka, Y., Katoh, Y., Doi, j., Horike, N., Hatano, O., Raza, F., Vinson, G. P., and Okamoto, M. (2003) Characterization of the adrenal-specific antigen IZA (Inner Zone Antigen) and its role in the steroidogenesis. Mol. Cell. Endocrinol., in the press.

5) Okamoto, M., Takemori, H., and Katoh, Y. (2004) Salt-inducible kinase in steroidogenesis and adipogenesis. Trends in Endocrinol. Metab. 15, 21-26, 2004

## 2. 学会発表

1) Min, L., Takemori, H., Doi, J., Nonaka, Y., Okamoto, M. (2003): Characterization of adrenal inner zone

antigen (IZA): 76th Japan Biochemistry Society, Yokohama.

2) Horike, N., Takemori, H., Okamoto, M. (2003): Adipose-specific kinase, salt-inducible kinase -2: 76th Japan Biochemistry Society, Yokohama.

3) ミン・リー、竹森洋、野中泰樹、岡本光弘 (2003): 副腎皮質内層特異的抗原 (IZA) の分子的性質とステロイド産生における役割: 第11回日本ステロイドホルモン学会、岐阜

## G. 知的財産権の出願・登録状況

特 願 2003-369227

名 称 スクリーニング方法

出願日 平成15年10月29日

発明人 竹森洋、岡本光弘

出願人 竹森洋、岡本光弘、  
株式会社

プロテイン・エクスプレス

図1 野生型 Y1 細胞と SIK を高発現させた Y1 細胞 (IRES-SIK1) を cAMP 刺激したときの StAR mRNA の誘導とその時間依存性

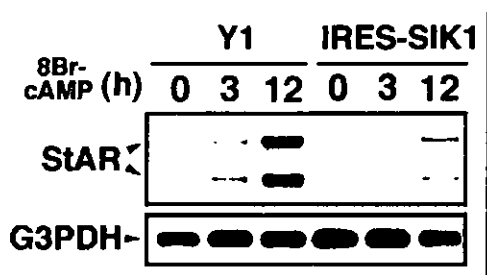


図2 ヒト StAR プロモーターの構造

CRE と SF-1 /Ad4BP 結合配列を示す。数値は図4で利用した欠失プロモーターの位置を示す。

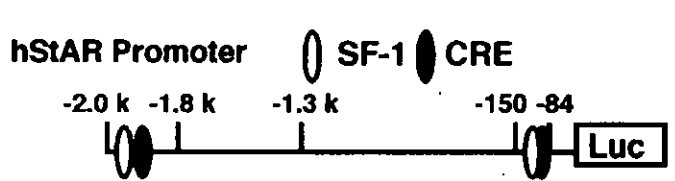


図3 ヒト StAR プロモーターの遠位 CRE(-2.0 k b)への CREB の結合 A) P450<sub>scc</sub> (CYP11A) および  $\alpha$  CG の CRE 配列を含むオリゴ DNA を利用したゲルシフト法による StAR-CRE 結合タンパクの解析。 B) StAR-CRE オリゴ DNA による CRE の  $\alpha$  CG の CREB に対する結合阻害。 \* は非特異的結合を示す。

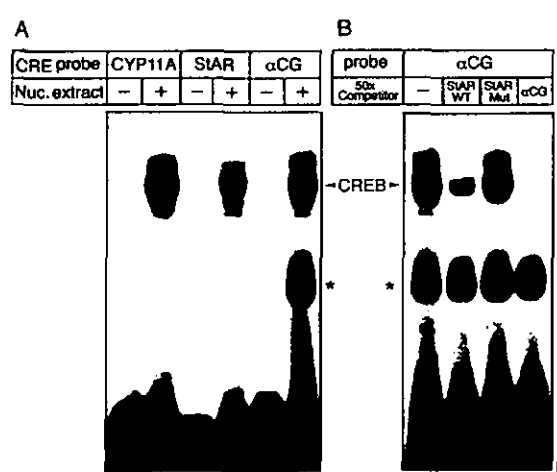
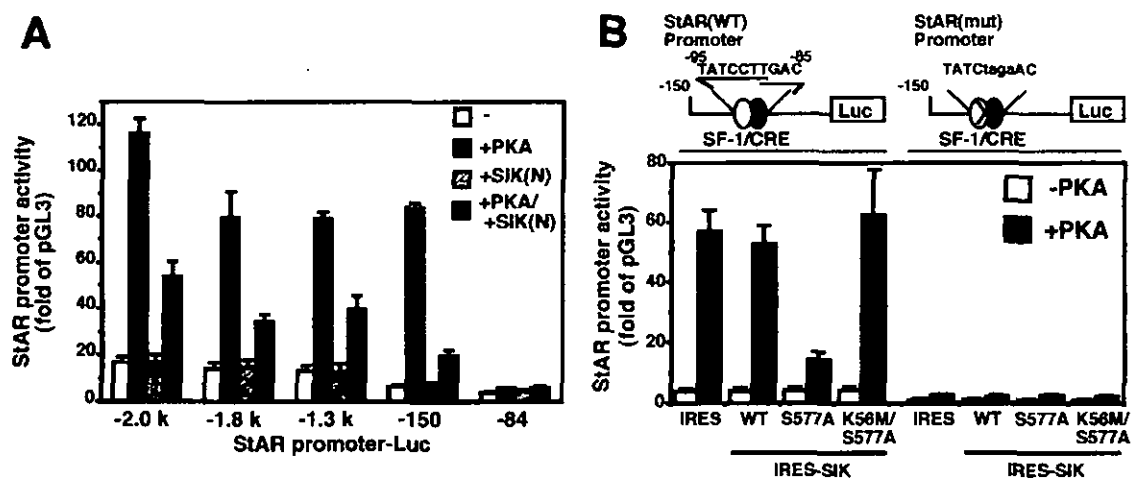


図4 SIK のヒト StAR プロモーター活性に及ぼす影響。 A) StAR プロモーターの欠失解析。 SIK の高発現には C-末端欠損の恒常的抑制型 SIK を使用した。 B) 核内型 PKA 非感受性変異体 SIK (S577A) による StAR プロモーターの抑制





# PKA による Ad4BP/SF - 1 の転写活性化機構

柳瀬敏彦、范 吳強、野村政壽、岡部泰二郎、後藤公宣、名和田 新  
九州大学病態制御内科（第三内科）

## 研究要旨

Protein Kinase A (PKA) は Ad4BP/SF - 1 の転写活性を劇的に増強するが、その機序を共焦点レーザー顕微鏡並びに FRAP 技術を駆使して行った。PKA 活性化剤である forskolin (FK) はヒト卵巣顆粒膜細胞株 KGN における CYP19SF - 1 の転写活性化能を増強したが、その際、元来、核内でびまん性分布を示す SF - 1 は PKA 刺激により foci を形成し、核内局在コンパートメントの変化を認めた。一方、G35E 変異 SF - 1 では、PKA による転写活性化能の増強も foci 形成も認めなかった。新規共役因子複合体である TRRAP 及び GCN 5 は、SF - 1 の転写活性化能を促進し、PKA 刺激により、両者は SF - 1 の 核内 foci に一致して集積した。一方、DAX - 1 は SF - 1 による CYP19 の転写活性化能を阻害したが、PKA 活性化はこの阻害効果を解除した。SF - 1、DAX - 1 は共存下では、両者の局在は完全に一致し、一方、PKA 刺激により両者の局在の解離が認められた。さらに FRAP による蛋白動態解析の結果、DAX - 1 との結合で SF - 1 は不動化され、PKA 刺激はその不動化をレスキューし得た。PKA は SF - 1 へ GCN5/TRRAP 等のコアアクチベーターのリクルートを促進し、また抑制蛋白の DAX - 1 を SF - 1 から解離させることによって、統合的に SF - 1 の転写活性化能を増強すると考えられた。

## A. 研究目的

Protein Kinase A (PKA) の活性化は Ad4BP/SF - 1 の転写活性を劇的に増強するが、その機序は不明である。核内受容体は細胞内での動的特性が作用発現に極めて重要であり、リガンド結合や蛋白-蛋白相互作用がその動的特性を変化させ、生物学的作用に影響する。我々は PKA の SF - 1 転写活性化促進機序を蛋白動態解析の観点から研究した。

## B. 研究方法

(1) 我々が樹立したヒト卵巣顆粒膜細胞株 (KGN) を培養し、SF - 1、DAX - 1 の発現ベクター、CYP19 プロモーター領域 (Promoter II, PII) 含有 Luciferase を一過性遺伝子導入し、forskolin (FK) 刺激、非刺激下での PII

転写活性化能をルシフェラーゼアッセイにて検討した。なお、非活性型 SF - 1 として G35E 変異を有する SF - 1<sup>1)</sup> を発現ベクターに導入して使用した。(2) 蛍光色素の GFP、YFP 等の蛍光蛋白と SF - 1、DAX - 1 等の融合蛋白質を細胞で強制発現させ、その局在を共焦点顕微鏡下で観察した。また SF - 1 と DAX - 1 の蛋白相互作用について、FRAP (fluorescent recovery after photobleaching) 解析を行った。FRAP は蛍光物質を強い光刺激により褪色させその蛍光回復を追うことにより、分子の時間、空間分布を検討する方法である。

## C. 研究結果

(1) FK による PKA 活性化は SF - 1 を発現する KGN 細胞において、PII の転

写活性を強力に促進したが、SF-1を発現しないNIH3T3細胞ではそのような作用は認めなかった。NIH3T3細胞にSF-1を導入するとPKAによるSF-1の転写活性化促進を認めたが、G35E変異SF-1を導入しても上記効果は認めなかった(図1)。PKA活性化はKGN細胞におけるSF-1の核内分布をび漫性からfoci形成へと変化させ、SF-1の核内局在コンパートメントの変化が示唆された。一方、G35E変異SF-1では、PKAによる転写活性化能の増強もfoci形成も認めなかった(図2)。これらの事実はSF-1がPKAによる転写活性化促進に必須であることを示す。

(2) TRRAP/GCN5は第3の共役因子複合体として最近同定されたが<sup>2)</sup>、KGN細胞へのTRRAPあるいはGCN5の導入はSF-1によるPIIの転写活性化能をさらに促進した(図3)。予想外の結果としてGCN5は核内に、TRRAPは細胞質にび漫性に存在しその局在は解離したが、PKA刺激により両者は核内のSF-1のfociに一致して集積した。

(3) DAX-1はSF-1の転写活性化能を阻害することが知られる。DAX-1はKGN細胞においてSF-1によるPIIの転写活性化を阻害したが、興味深いことにPKA活性化はこの抑制を一部解除した(図4)。SF-1、DAX-1は単独では核内にび漫性に分布したが、共存下では、両者の局在は完全に一致しドット状分布を示した。しかしその同一局在パターンはPKA刺激により崩れ、DAX-1とSF-1の局在の解離が認められた(図5)。FRAP解析によるSF-1の動態解析の結果、DAX-1との結合でSF-1は不動化され、PKA活性化がその不動化をレスキューすることが示された(図6)。これらの結果から、PKAはSF

-1へGCN5/TRRAP等のコアアクチベーターをリクルートさせ、また抑制蛋白のDAX-1をSF-1から解離させることによって、SF-1の転写活性化能をさらに増強すると考えられた。

#### D. 考察

PKAによるAd4BP/SF-1の転写活性化機序の一つとしてPKAによるAd4BP/SF-1のリン酸化が想定され、実際Ser203とSer430がそれぞれ、MAPK、PKAにより*in vitro*でリン酸化され得ることが報告されているが、PKAによる転写活性化能の増強とは必ずしもリンクしていない<sup>3)</sup>。また、PKAによるAd4BPの発現増強効果に関しては、転写レベルではnegative、蛋白レベルでは、僅かに増加するとの報告もあるが、否定的な成績もある<sup>4)</sup>。少なくとも下垂体摘出下において副腎のAd4BPの発現は不変であることが報告されている<sup>4)</sup>。今回、我々はPKA刺激はSF-1へGCN5/TRRAP等のコアアクチベーターをリクルートさせることにより、転写増強効果がもたらされること、また抑制蛋白のDAX-1をSF-1から解離させることによって、SF-1の転写活性化能が、さらに増強する機序を明らかにした。Ad4BP/SF-1と標的遺伝子のAd4 siteへの結合は、DAX-1の存在によって影響されないことが、Gel shift解析の結果から明らかにされていたが<sup>5)</sup>、FRAP解析の結果もこのことを支持し、Ad4BP/SF-1はDAX-1と結合している時にはトラップされた形で転写活性化能を発揮できないが、PKA刺激によりDAX-1が解離することによって、Ad4 siteに結合し転写活性化能を回復するものと考えられた。

以上の機序を図7にまとめた。

## E. まとめ

1. ヒト卵巣顆粒膜細胞の KGN 細胞において PKA の活性化は Ad4BP/SF-1 の核内局在を変化させ、foci を形成した。
2. この過程は新しい coactivatorComplex の GCN5/TRRAP のリクルートメントとサプレッサー DAX-1 の Ad4BP/SF-1 からの解離を伴った。DAX-1 による Ad4BP の転写活性化抑制機構の一つとして、相互作用による Ad4BP/SF-1 の不動態化機序が考えられた。
3. これらのデータから、PKA 活性化に伴い Ad4BP/SF-1 と coactivator 複合体、あるいは Ad4BP/SF-1 とサプレッサーの DAX-1 の蛋白-蛋白間相互作用の統合的再編が、PKA による Ad4BP/SF-1 の転写活性化増強作用機序と考えられた。

## F. 結論

PKA 活性化は SF-1 とコアクチベーター (GCN5/TRRAP) やサプレッサー (DAX-1) との相互作用を統合的に修飾し、SF-1 の転写活性化をさらに増強する。

## G. 参考文献

- 1) Achermann JC et al. : Nat Genet 22, 125-126, 1999
- 2) Yanagisawa J et al. : Mol Cell 9, 553-562, 2002
- 3) Awsoy R et al. : Endocrinol 143, 295-303, 2002
- 4) Nomura M et al. : J Biochem (Tokyo) 124, 217-224, 1998
- 5) Ito M et al. : Mol Cell Biol 17, 1476-1483, 1997

## H. 研究発表

- 1) Fujii A, Harada T, Yamauchi N, Iwabe T, Nishi Y, Yanase T, Nawata H,

Terakawa N. : Interleukin -8 gene and protein expression are up-regulated by interleukin -1beta in normal human ovarian cells and a granulosa tumor cell line. Fertil Steril. 79 : 151-7, 2003

2) Mukasa C, Nomura M, Tanaka T, Tanaka K, Nishi Y, Okabe T, Goto K, Yanase T, Nawata H : Activin signaling through type IB receptor stimulates aromatase activity in the ovarian granulosa cell-like KGN cells. Endocrinology 144:1603-11, 2003

3) Lu ZH, Mu YM, Wang BA, Li XL, Lu JM, Li JY, Pan CY, Yanase T, Nawata H. : Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular Leydig cell. Biochem Biophys Res Commun 303 : 1002-7, 2003

4) Goto K, Zhao Y, Saito M, Tomura A, Moribaga H, Nomura M, Okabe T, Yanase T, Takayanagi R., Nawata H : Activation function -1 domain of androgen receptor contributes the interaction between two distinct sets of subnuclear compartments. J Steroid Biochem Molec 85:201-208, 2003

5) Fan W, Yanase T, Wei L, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Nawata H. : Functional characterization of a new human Ad4BP/SF-1 variation, G146A. Biochem Biophys Res Commun. 311 : 987-94, 2003

6) Yanase T, Suzuki S, Goto K, Nomura M, Okabe T, Takayanagi R, Nawata H : Aromatase in Bone : Roles of Vitamin D3 and Androgens J Steroid Biochem Molec 86 : 393-7, 2003

7) Mu YM, Oba K, Yanase T, Ito T, Ashida K, Goto K, Ikuyama S, Takayanagi R, Nawata H : Human Pituitary Tumor Transforming Gene (hPTTG) Inhibits Human Lung Cancer A549 Cell Growth through Activation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup>

8) Fan W, Yanase T, Yin W, Kawate H, Saitoh M, Oba K, Nomura M, Okabe T, Goto K, Yanagisawa J, Kato S, Takayanagi R, Nawata H: Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1 : a laser confocal imaging study in living KGN cells. Mol Endocrinol 18 : 127-141, 2004

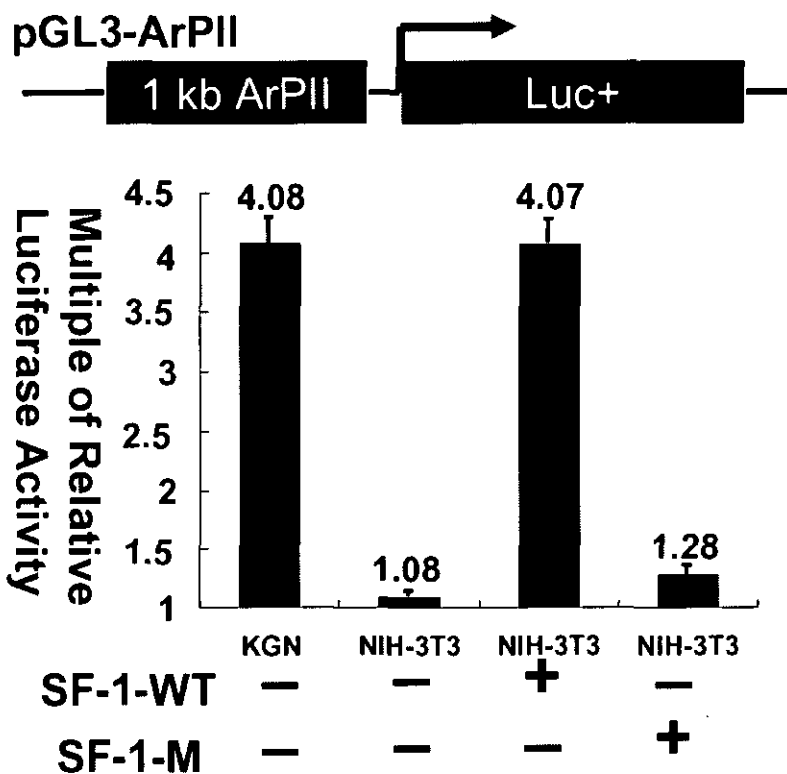
9) Morinaga H, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H :

A Benzimidazole Fungicide, Benomyl and Its Metabolite Carbendazim Induce Aromatase Activity in Human Ovarian Granulosa-Like Tumor Cell Line (KGN) Endocrinology in press

10) Yanase T : Physiological significance of replacement therapy of dehydroepiandrosterone. Internal Medicine in press

**I. 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



**図 1 PKA は Ad4BP/SF-1 の存在下では Aromatase promoter II の転写活性を増強する。**

Aromataze Promotor IIの相対的転写活性

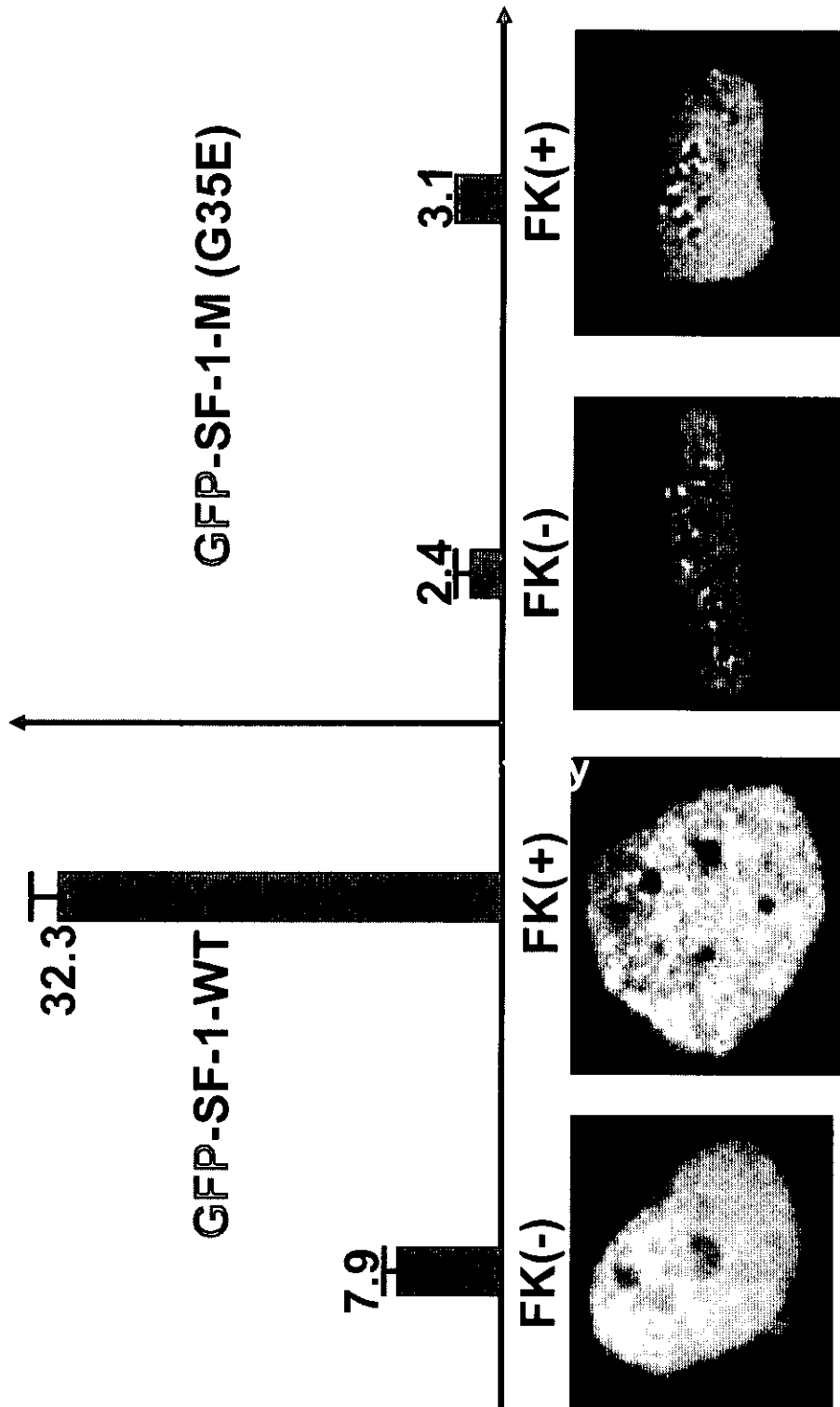


図2: KGN 細胞において Forskolin(FK) はAd4BP/SF-1 の転写活性を4倍以上に増強するが、その際、共焦点顕微鏡画像下で、Ad4BP/SF-1の核内局在をび慢性分布よりfoci形成へ核内局在を変化させる(左図)。一方、G35E変異を有するAd4BP/SF-1 ではそのような変化を認めず、核小体への局在を認める(右図)。

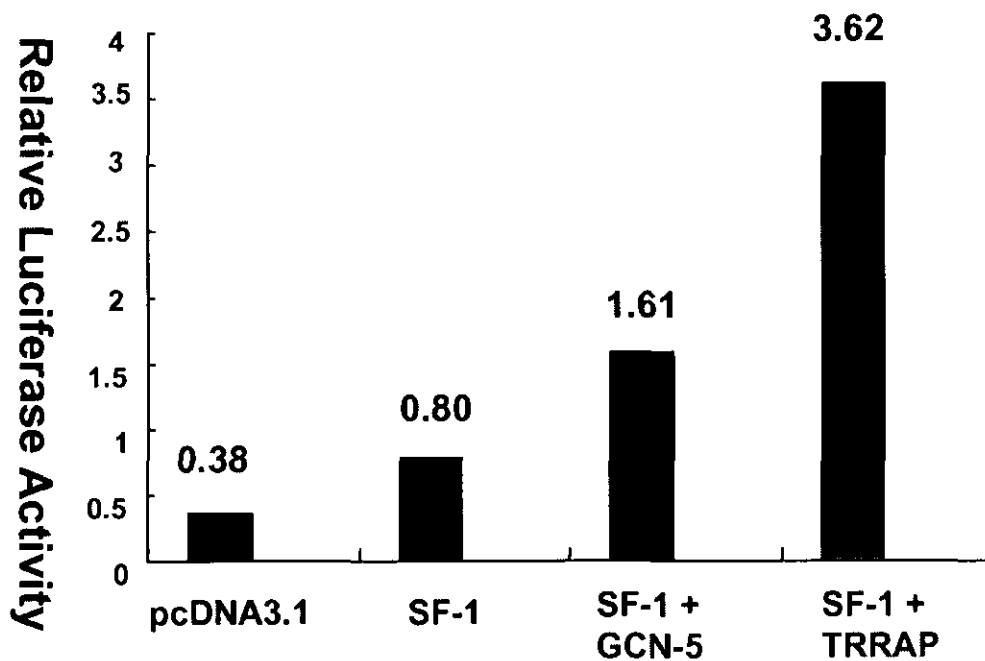


図3: GCN5 と TRRAP は coactivator として Ad4BP/SF-1 の転写活性化能 (KGN 細胞における aromatase promotor II の転写活性) を促進する。

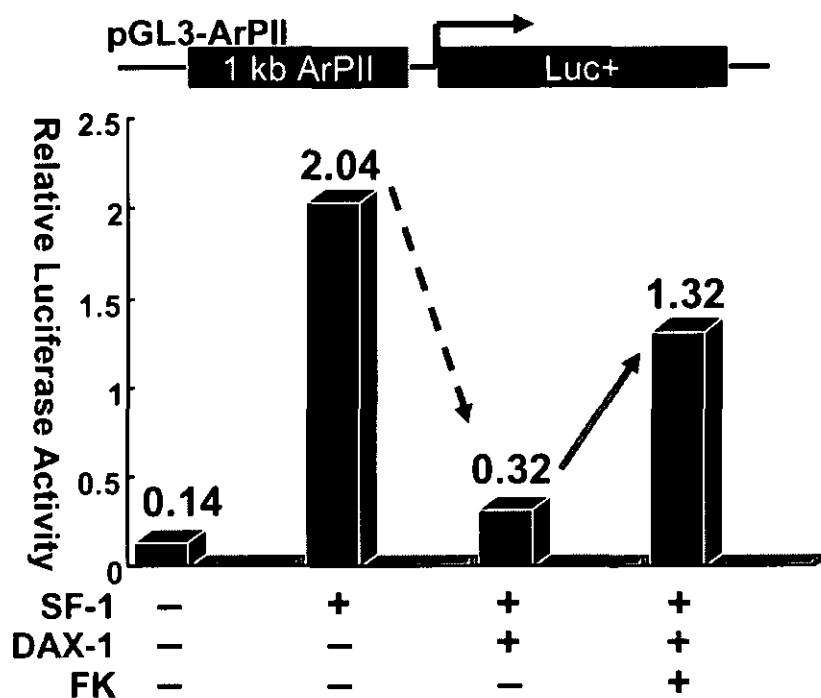


図4: DAX-1 は Ad4BP/SF-1 依存性の aromatase Promotor II の転写活性を抑制する (KGN 細胞) が、PKA 刺激はその抑制を部分的に解除する。

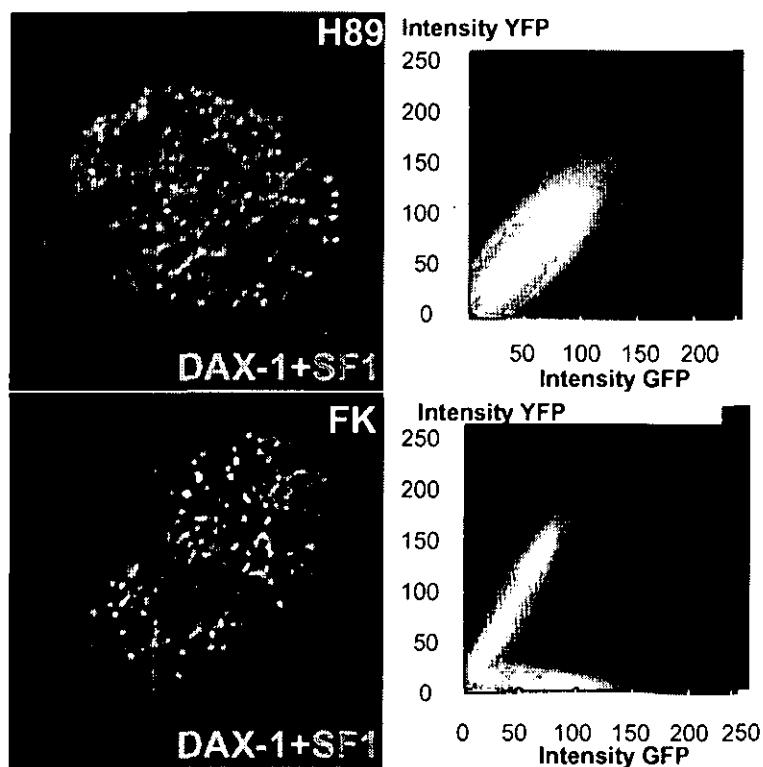


図5 DAX-1とSF-1の核内局在は完全に一致するが、Forskolin(FK) 刺激により、その局在が解離してくる

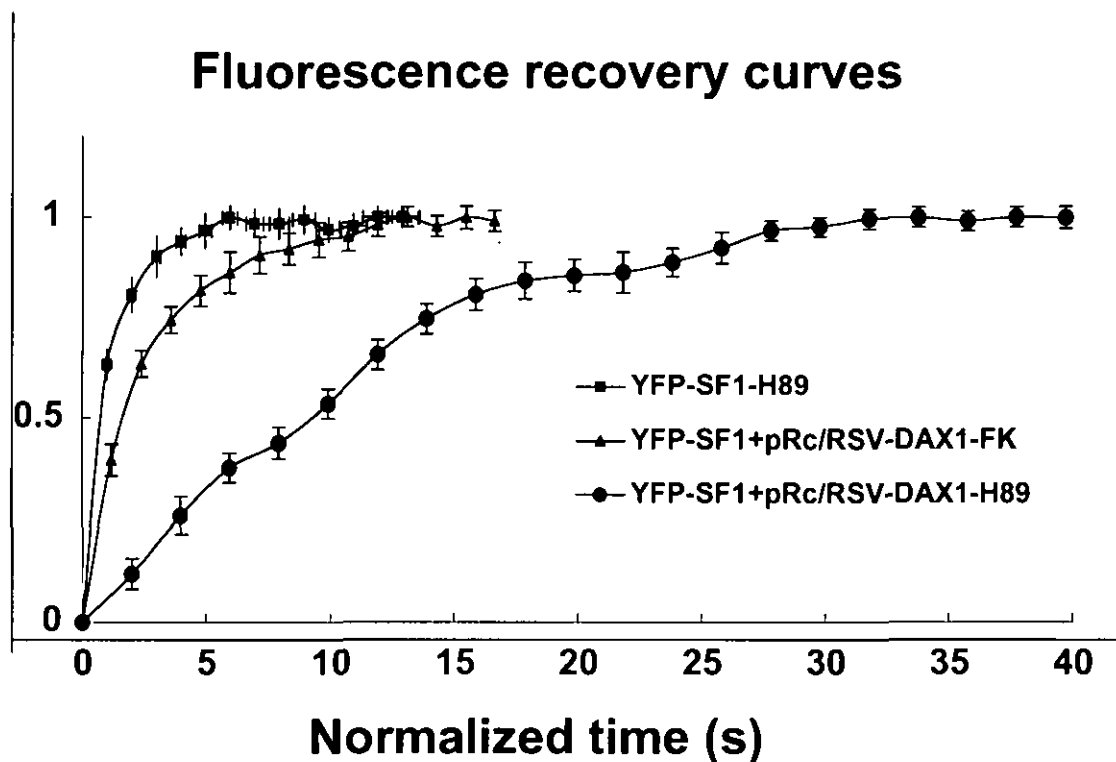


図6 :YFP-SF-1とpRc/RSV-DAX-1をKGN細胞に同時強制発現させた際のFRAP解析 蛍光強度の回復が早い程、SF-1のmobilityが早いことを意味する。DAX-1にトラップされたSF-1のmobilityは著しく低下するが、FK処理によりDAX-1が解離し、SF-1のmobilityが回復していることを示す。

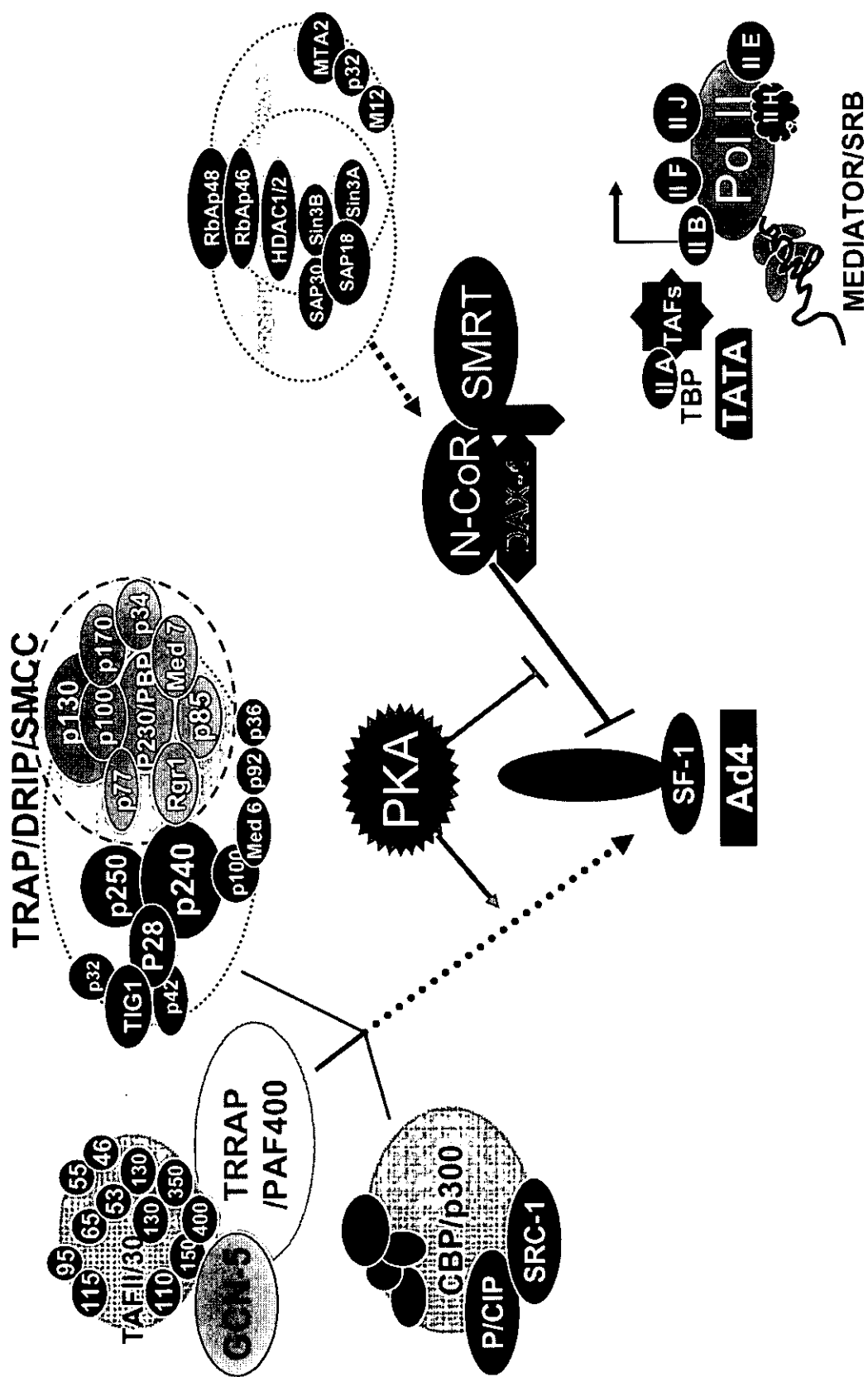


图 7 PKA Re-integrates Interaction of Ad4BP/SF-1 with Co-regulators



# 副腎低形成における HDL 受容体 CLA - 1 の役割に関する研究

村尾孝児、井町仁美、曹 聞銘、郁 暁、高原二郎、石田俊彦  
香川大学医学部第一内科

## 研究要旨

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。今回はヒト HDL 受容体 CLA-1 に変異を導入した Decoy CLA-1 を作成し、その機能について解析した。Decoy CLA-1 は副腎細胞におけるステロイドホルモン合成には影響を与えなかったが細胞増殖の抑制、アポトーシスの促進作用を示した。今後 Decoy CLA-1 の解析により、副腎細胞の増殖、発生への CLA-1 の関与が推察された。

### A. 研究の目的

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も報告してきた。今回の目的は HDL 受容体 CLA-1 の副腎におけるステロイドホルモン産生とともに副腎細胞増殖におよぼす影響について検討し、副腎機能低下および副腎萎縮の機序について検討する。

### B. 研究方法

#### プラスミドの作成

CLA-1 の発現ベクターにランダムな mutation および deletion mutant (C 末端欠損) を挿入した。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。mutant 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 G418 の抵抗性にて樹立した。HDL 結合

性コレステロール非取込みクローンを DiI-HDL の取り込みを指標にして選択した。

副腎ステロイドホルモン合成および細胞増殖能

ステロイドホルモン分泌能については、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。CLA-1 mutant 導入細胞の細胞増殖能について細胞数の測定、 $[^3\text{H}]$ -Thymidine uptake 法で評価した。アポトーシスに関しては、annexin-V FITC stain および FACS にて検討した。さらに propidium iodide (PI) 法にてアポトーシスについて検討を加えた。

#### 転写因子活性化の検討

mutant CLA-1 遺伝子導入細胞より核内タンパクを抽出し、種々の転写因子の活性化を評価した。既報方法に基づき EMSA および reporter gene assay にて AP-1, NF- $\kappa$ B, NF-IL6 の発現および活性化を検討した。

### C. 研究結果

遺伝子変異型 CLA-1 発現副腎細胞の細胞増殖能について

C 端の欠損変異 CLA-1 を Y-1 細胞 (Decoy CLA-1) に遺伝子導入し、stable transformant を作成した。Decoy CLA-1 導入細胞は、コレステロール取込みは mock 細胞と比較して有意な差を認めなかった。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  $\mu$  g/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。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は有意な差を認めなかった。HDL を添加することにより Decoy CLA-1 過剰発現細胞の培養液中へのステロイドホルモン分泌は mock 細胞に比較して有意に上昇した。一方、細胞増殖に及ぼす遺伝子変異型 CLA-1 (Decoy CLA-1) の影響について検討した。Decoy CLA-1 発現細胞においては、明らかに細胞数の増加抑制が認められた (図 1)。また [ $^3$ H]-Thymidine uptake で検討すると mock 細胞においては、HDL の添加により [ $^3$ H]-Thymidine の取り込みが亢進するが、Decoy CLA-1 発現細胞においては HDL の添加によっても [ $^3$ H]-Thymidine の取り込みの亢進が認められなかった (図 2)。また転写因子の解析では、HDL による細胞増殖は転写因子 AP-1 を介することが明らかになった (図 3)。さらには、HDL による転写因子 AP-1 の活性化は情報伝達系 PI 3-K/Akt のカスケードを介することが明らかになった (図 4)。さらに Decoy CLA-1 遺伝子導入によるアポトーシス誘導作用についても検討をおこなった。Mock 細胞に比較して Decoy CLA-1 発現細胞においては、有意にアポトーシス細胞の割合が上昇していた。TNF- $\alpha$  はアポトーシスを誘導することで知られて

いるが、HDL は TNF- $\alpha$  作用に拮抗して抗アポトーシス作用があることが報告されている。そこで Decoy CLA-1 細胞での HDL のアポトーシス抑制効果を検討した。Mock 細胞では TNF- $\alpha$  によりアポトーシスが誘導され、HDL の添加によりアポトーシスが抑制された。一方、Decoy CLA-1 発現細胞では、TNF- $\alpha$  によりアポトーシスが誘導されるが、HDL による抑制効果が認められなかった (図 5)。

#### D. 考察

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 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ことが報告されている。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。我々は CLA-1 が副腎細胞にコレステロールを供給することにより、ステロイドホルモン合成に寄与することを報告してきた。今回の検討によって、HDL からのコレステロールの取り込みには細胞外ドメインが重要であり、C 末端の欠損ではコレステロールの取り込みは減少しないことが判明した。ステロイドホルモン合成が亢進している副腎皮質腫瘍で CLA-1 の発現が増強されていることより、腫瘍による自立的なステロイドホルモン合成に CLA-1 が関与することが考えられる。以前より、

HDLの細胞増殖作用が指摘されていた。また最近の報告によるとSR-BIのC末端側に細胞内情報伝達機能が存在することが指摘されている。今回我々が作成したDecoy CLA-1はC-末端を欠いており、細胞内情報伝達系PI3-K/Aktカスケードを抑制する可能性が考えられた。C-末端を欠いたdecoy CLA-1は細胞増殖の抑制、アポトーシスの促進を示すことより、CLA-1の副腎細胞の増殖への関与が考えられた。今後、CLA-1と副腎細胞の形成、増殖への影響について分子メカニズムを明らかにしたい。

## E. 結論

ヒトHDL受容体CLA-1に変異を導入したDecoy CLA-1は、副腎細胞におけるステロイドホルモン合成には影響を及ぼさなかったが細胞増殖の抑制、アポトーシスの促進作用を示した。今後、CLA-1と副腎細胞の形成、増殖への影響について検討していく。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Cao WM, Murao K, Imachi H, Hiramane C, Abe H, Yu X, Dobashi H, Wong NCW, Takahara J, Ishida T  
Phosphatidylserine Receptor Cooperates with High Density Lipoprotein Receptor on Recognition of Apoptotic Cells by Thymic Nurse Cells.  
J Mol Endocrinol. (in press)

Cao WM, Murao K, Imachi H, Yu X, Abe H, Yamauchi A, Niimi M, Miyauchi A, Wong NCW, Ishida T  
A Mutant HDL Receptor Inhibits Proliferation of Human Breast Cancer Cells.  
Cancer Res (in press)

Yu X, Murao K, Sayo Y, Imachi H, Cao WM, Ohtsuka S, Niimi M, Tokumitsu H,

Inuzuka H, Wong NCW, Kobayashi R, Ishida T  
Role of calcium-calmodulin dependent protein kinase cascade in glucose upregulation of insulin gene expression.  
Diabetes (in press)

Imachi H, Murao K, Cao WM, Tada S, Taminato T, Wong NCW, Takahara J, Ishida T  
Expression of human scavenger receptor B1 on and in human platelets  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 23:898-904, 2003

### 2. 学会発表

MEN1遺伝子meninの乳腺における役割について  
郁 暁、村尾孝児、曹 聞銘、井町仁美、山内清明、林、石田俊彦  
第75回 日本内分泌学会総会 2003, 6

乳癌細胞の増殖におよぼすHDL受容体の役割について  
曹 聞銘、村尾孝児、井町仁美、郁 暁、新見道夫、石田俊彦  
第75回 日本内分泌学会総会 2003, 6

下垂体におけるTSHの転写活性に与える転写因子JIP-1の影響について  
村尾孝児、阿部 博、井町仁美、吉田和矢、新見道夫、曹 聞銘、高原二郎、石田俊彦  
第75回 日本内分泌学会総会 2003, 6

異所性下垂体腺腫によるCushing's病の一例  
村尾孝児、井町仁美、佐用義孝、吉田和矢、松原修司、新見道夫、高原二郎、石田俊彦  
第75回 日本内分泌学会総会 2003, 6

膵β細胞におけるIslet-brain 1 (IB1)の役割  
阿部 博、村尾孝児、井町仁美、曹 聞銘、郁 暁、佐用義孝、松原修司、永尾 幸、大塚章司、吉田和矢、高原次郎、石田俊彦  
第64回 日本糖尿病学会総会 2003, 5

膵β細胞におけるScavenger receptor (SR)の発現

佐用義孝、村尾孝児、井町仁美、松原修司、  
石田俊彦  
第64回 日本糖尿病学会総会 2003, 5

転写因子 PREB の血管内皮細胞における役割について

大塚章司、村尾孝児、佐用義孝、曹 聞銘、  
井町仁美、阿部 博、永尾 幸、松原修司、  
細川 等、石田俊彦  
第64回 日本糖尿病学会総会 2003, 5

IGF-I のラット膵β細胞由来細胞株 INS-1  
における Glucokinase (GK) 発現に及ぼす影響について

吉田和矢、村尾孝児、阿部博、佐用義孝、井  
町仁美、石田俊彦  
第64回 日本糖尿病学会総会 2003, 5

### G. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

### 図の説明

図1 mutant CLA-1 (mCLA) 遺伝子導入細胞における細胞増殖能

図2 mutant CLA-1 (mCLA) 遺伝子導入細胞における細胞増殖能におよぼす HDL の影響について (Thymidine uptake 法で評価)

図3 mutant CLA-1 遺伝子導入による転写因子 AP-1 への影響について EMSA 法にて検討

図4 HDL による転写因子 AP-1 の活性化は Akt-DN により阻害される。

図5 HDL による抗アポトーシス効果におよぼす mutant CLA-1 の影響について

図1

