

(图 4)

P450 oxidoreductase(POR) deficiency

症例	変異	骨病変	酵素活性
1-J*	R457H, 731+1G→A	++	
2-J*	R457H, E580Q ?	-/+	
3	V492 hetero	++	C569Y
4-E	A287P hetero	++	V608F
5-E	C569Y, V608F	-	A287P
6	Y181D, C569Y	++	R457H
7-E, J	R457H, A287P	+	V492E
8-J	R457H, L612_W620del ins R	++	
9-J	R457H, L612_W620del ins R	++	
10-J	I444fsX449, Y578C	++	
11-J	I444fsX449, Y578C	++	
12-J	G5G, R457H	+	
13-J	R457H homo	++	生存?
14-J	R457 H hetero	+	表現型?
15-J	R457H homo	++	
16-J	I444fsX449, R457H	+	
17-J	R457H homo	-	致死的!!
18-E	A287P	++	

尿ステロイドプロファイルによる P450 oxidoreductase 異常症の生化学的診断

長谷川 奉延
慶應義塾大学医学部小児科

本間 桂子
慶應義塾大学医学部中央臨床検査部

【研究要旨】

2004年、あらたに骨系統異常と外性器異常を合併する疾患の一つが P450 oxidoreductase (POR) の異常によることが明かにされた。本疾患 (PORD) では、臨床症状の個体差が大きく、臨床症状だけから診断はできない。本研究では、遺伝子解析により診断の確定した PORD22 例について、GCMS による尿ステロイドプロファイル 63 種を測定し、1) 対照、および、2) 新生児期に高 17OHP 血症を呈する他の疾患、21-hydroxylase 欠損症および一過性高 17OHP 血症、との鑑別における、尿ステロイド代謝物(和) 13 種および代謝物比 13 種の有用性を検討した。その結果、1) 対照との鑑別において 6 種の代謝物および 2 種の代謝物比、2) 新生児 21-hydroxylase 欠損症および一過性高 17OHP 血症との鑑別において 1 種の代謝物および 1 種の代謝物比が、疾患検出感度 80-100% と高く、PORD 診断に有用であることが明らかとなった。これらの生化学的診断指標により、臨床所見の乏しい PORD も含め早期診断可能と考える。

【序】 2004年、骨系統異常と外性器異常を合併する疾患の遺伝子異常があらたに同定された。本疾患は、マイクロゾームに局在し、P450 酵素反応に必要な不可欠な電子を供給する酵素 P450 oxidoreductase (POR) の異常により、POR から電子供給される複数のステロイド合成酵素

Lanosterol 14-demethylase (P450 14DM)
17 α -hydroxylase/17, 20-lyase (P450c17)
21-hydroxylase (P450 c21)
Aromatase (P450 arom)

において活性低下が生じ(図1)、特徴的な臨床症状(図2)を呈すと考えられる。ただし、本疾患は、臨床症状の個体差が大きく、臨床症状だけから診断はできな

い。すなわち、臨床所見の乏しい PORD を早期診断するには、生化学的な診断指標が重要となる。

【目的】 遺伝子解析により診断の確定した PORD について、尿ステロイドプロファイル分析を行い、新生児～成人 PORD と対照(検討1)、および、PORD 新生児・乳児と高 17OHP 血症を呈する他の疾患(21-hydroxylase 欠損症および一過性高 17OHP 血症)の新生児・乳児(検討2)との鑑別に有用な生化学的診断指標を特定する。

<検討1>

【対象】 生後 10 日から 29 歳の POR 遺伝子異常を認めた遺伝学的男性 11 例および女性 11 例(表1)、と生後 3 日から 50

歳の control 2065 例。患者およびコントロール（対象が未成年の際は保護者）全員からインフォームドコンセントを得た。患者の骨および外性器は、全く異常を認めないものから典型的な Antley-Bixler 徴候、陰核肥大、小陰茎等を認める症例まで、さまざまである。患者の採尿は1から8回。

【方法】対象の蓄尿または随時尿について、酵素水解、有機溶媒抽出、誘導化処理後、ガスクロマトグラフ質量分析—選択的イオンモニタリング法により、ステロイド代謝物 63 種を測定した（図 3）。血中ステロイド 13 種の動態を反映する尿ステロイド代謝物（または代謝物）13 種（①～⑬）と、酵素活性の指標となる代謝物比（生成物／基質比）12 種（1～12）について、PORD22 例が、年齢の一致した対照群と比較し、高値（上限以上）、正常（基準値範囲内）、低値（下限以下）を示す頻度を求めた。

【結果】尿ステロイド代謝物では、PORD が対照に比し、17 α -hydroxylase の基質である pregnenolone、progesterone、corticosterone、17,20-lyase の基質である 17OHpregnenolone、17OHP、21-hydroxylase の基質である progesterone、17OHP、21-deoxycortisol の代謝物①②④⑥⑦⑧において、80 から 100%の頻度で高値、17,20-lyase の生成物である DHEA の代謝物③において、68%の頻度で低値を示した（図 4）。尿ステロイド代謝物比では、17,20-lyase 活性低下を示唆する DHEA/17OHpregnenolone、androstenedione/17OHP 代謝物比 3、4 において、86%の頻度で低値を示した（図 5）。

【考察】尿ステロイドプロファイルにより、PORD における P450c17 と P450c21 の複合型活性低下を示唆するステロイド産生異

常を、PORD22 例全例において確認した。診断指標には、6 種のステロイド代謝物と 2 種のステロイド代謝物比が有用であり、これらを総合的に判定した場合の疾患検出感度は、POR 遺伝子変異の種類、臨床症状、年齢、性別に関わらず 100%であった。

<検討 2>

【対象】表 1 の新生児・乳児 PORD5 例（症例 1、6、12、13、17）と生後 3 日から 1 歳の control 896 例、一過性高 17OHP 血症 231 例、21-hydroxylase 欠損症 117 例（表 2）。患者およびコントロールの保護者全員からインフォームドコンセントを得た。PORD の主訴および濾紙血 17OHP 値 (ng/ml)（直接法）を表 3 に示す。症例 1 を除き、臨床的に 21-hydroxylase 欠損症、一過性高 17OHP 血症と鑑別することはできなかった。

【方法】図 3 のステロイド代謝物②、⑧、⑬および代謝物比 13 について、PORD と他の高 17OHP 血症の分布が重複するか否かを検討した。

【結果】1) 21-deoxycortisol 代謝物⑧（図 6）：PORD は対照および一過性高 17OHP 血症に比し、重複なく高値を示した。PORD と 21OHD の分布は重複した。2) progesterone 代謝物②（図 7）：PORD と 21OHD の分布は重複した。11-OHandrostenedione 代謝物⑬（図 7）：PORD は、同日齢の 21OHD より重複なく低値を示したが、差はわずかだった。3) 11-OHandrostenedione 代謝物と progesterone 代謝物の比 13（図 8）：PORD は、同日齢の 21OHD より重複なく低値を示した。

【考察】新生児乳児 PORD を 21OHD および一過性高 17OHP 血症と鑑別するには、まず尿 21-deoxycortisol 代謝物⑧

(pregnanetriolone) により、PORD と 21OHD をスクリーニングし、次に尿 11-OAndrostenedione 代謝物と progesterone 代謝物の比 13 (11-OH androstenedione / pregnanediol) により、PORD を 21OHD と鑑別することにより、可能であった。

【結論】P450 oxidoreductase 異常症は、尿ステロイドプロフィール検査により、新生児から成人いずれの年齢においても対照と鑑別可能である。また、新生児・乳児期には、臨床症状や血中 17OHP 検査で鑑別できない 21-hydroxylase 欠損症あるいは一過性高 17OHP 血症との鑑別も可能である。

【発表】

1. 論文発表

1) Fukami M, Horikawa R, Nagai T, Tanaka T, Naiki Y, Sato N, Okuyama T, Nakai H, Soneda S, Tachibana K, Matsuo N, Sato S, Homma K, Nishimura G, Hasegawa T, Ogata T 2005 Cytochrome P450 oxidoreductase gene mutations and Antley-Bixler syndrome with abnormal genitalia and/or impaired steroidogenesis: molecular and clinical studies in 10 patients.

J Clin Endocrinol Metab 90:414-426

2) Fukami M, Hasegawa T, Horikawa R, Ohashi T, Nishimura G, Homma K, Ogata T Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in three patients initially regarded as having 21-hydroxylase deficiency and/or aromatase deficiency. *Pediatr Res* (in press)

2. 学会発表

1) 第 78 回日本内分泌学会示説

”尿ステロイドプロフィールによる Antley-Bixler 症候群における P450 oxidoreductase (POR) 異常症の生化学的診断”

本間桂子、深見真紀、堀 尚明、曾根田瞬、竹下栄子、松尾宣武、緒方 勤、長谷川奉延。(慶應義塾大学医学部中央臨床検査部、慶應義塾大学医学部小児科、国立成育医療センター、聖マリアンナ医科大学)

2) 第 39 回日本小児内分泌学会口演

“尿ステロイドプロフィールによる新生児・乳児 P450 oxidoreductase 異常症の生化学的診断”

本間桂子、深見真紀、堀 尚明、武田良淳、大橋十也、藤原幾磨、竹下栄子、松尾宣武、緒方 勤、長谷川奉延。(慶應義塾大学医学部中央臨床検査部、国立成育医療センター、慶應義塾大学医学部小児科、白河厚生総合病院、東京慈恵会医科大学、東北大学)

図1. PORの機能喪失変異は、PORから電子供給される複数のP450ステロイド合成酵素 (P45014DM, P450 c17, P450 c21, P450 arom)における活性低下を引き起こし、複合型ステロイド産生異常を発症する。PORにおいては、灰色の背景で示した血中ステロイド、およびその代謝物の高値が報告されている。

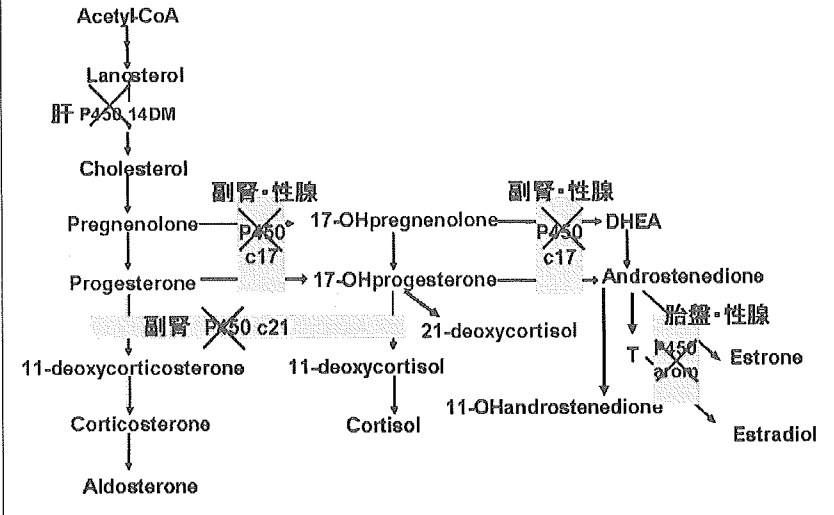
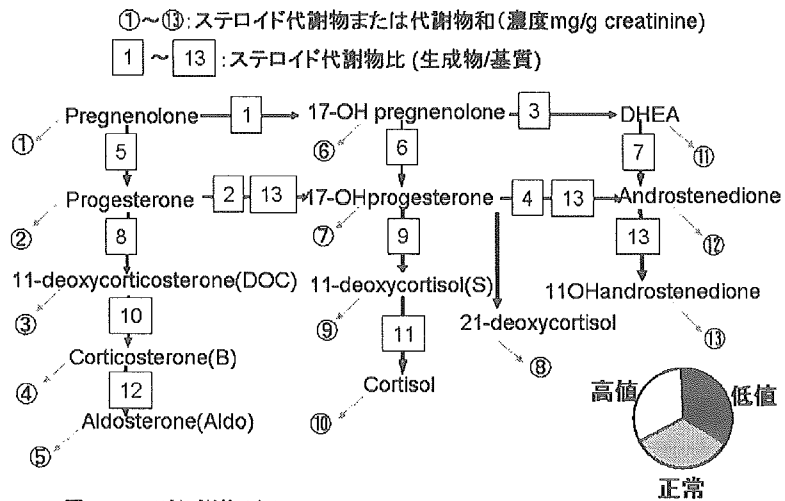


図2. POR異常症(PORD)の臨床症状

- 1) 骨系統異常 (Antley-Bixler症候群)
頭蓋骨早期癒合、上腕骨橈骨癒合、くも状指、多発性関節拘縮、顔貌異常
 - 2) 外性器異常
 女児の外陰部男性化 陰核肥大
 男児の外陰部女性化 小陰茎、尿道下裂
 - 3) 思春期遅発
- 個体差が大きく、臨床症状から診断できない。

図3. 方法: 随時尿について、GCMS-SIMによる尿ステロイドプロファイル分析(63種)



尿ステロイド代謝物(和)

- ①pregnenediol、②pregnenediol、③THDOC、④ α THA+ β THA+ α THB+ β THB
 ⑤THAldo、⑥pregnenetriol、⑦pregnanetriol、⑧pregnanetriolone、⑨THS、
 ⑩ α THE+ β THE+ α THF+ β THF ⑪DHEA+androstenediol+16 α -OHDHEA
 +16 β -OHDHEA+16-oxoandrostenediol+androstenetriol、⑫androsterone+
 etiocholanolone、⑬11 β -OHandrosterone

尿ステロイド代謝物比

- 1=⑥/①、2=⑦/②、3=⑪/⑥、4=⑫/⑦、5=②/①、6=⑦/⑥、7=⑫/①、8=③/②
 9=⑨/⑦、10=④/③、11=⑩/⑨、12=⑤/④、13=⑬/②

表1. 対象(検討1)

症例	POR遺伝子異常	骨異常	外性器異常	採尿年齢
<遺伝学的男性 46XY>				
1	R457H/R457H	(-)	(-)	3 m, 1 y
2	R457H/R457H	(-)	(-)	22 y
3	R457H/R457H	(-)	(-)	23 y
4	R457H/Q201X	(++)	(-)	15 y
5	R457H/Q201X	(++)	(-)	16 y
6	R457H/A462_S463insA	(++)	(+)	10 d, 1, 2, 3 & 4 m
7	R457H/I444fsX49	(++)	(-)	14 y
8	R457H/L612_W620delinsR	(++)	(+)	23, 28, & 29 y
9	R457H/L612_W620delinsR	(++)	(+)	18, 19, 23, 25, 26 & 27 y
10	R457H/G5G	(++)	(+)	17 y
11	Y578C/ I444fsX449	(++)	(-)	17 y
<遺伝学的女性 46XX>				
12	R457H/R457H	(±)	(+)	1 & 4 m
13	R457H/R457H	(±)	(+)	3 & 4 m
14	R457H/R457H	(+)	(+)	2 & 3 y
15	R457H/R457H	(+)	(+)	8, 9, 10, 11 & 13 y
16	R457H/R457H	(±)	(+)	14 & 17 y
17	R457H/E580Q	(±)	(+)	4 & 8 m
18	R457H/IVS6+1G>A	(++)	(+)	5 y
19	R457H/L565fsX574	(++)	(+)	10 y
20	R457H/I444fsX49	(++)	(+)	13 y
21	R457H/Q201X	(++)	(-)	12 y
22	R457H/?	(++)	(+)	3 y

表2. 対象(検討2)

診断名	例数	在胎週数	採尿日
PORD	5	37-41週	10日-8ヶ月
古典型21OHD	102	31-41週	3日-5ヶ月
非古典型21OHD	15	37-41週	13日-4ヶ月
一過性高17OHP血症	231	25-42週	3日-1歳
対照	896	37-42週	3日-1歳

表3. PORD(検討2)

症例	性別	主訴	濾紙血17OHP(ng/ml) (直接法)
1	男	骨異常	5.3 (生後5日)
6	男	17OHP高値	6.6 (生後23日)
12	女	陰核肥大	正常
13	女	陰核肥大	18.6(生後4日)
17	女	陰核肥大	軽度高値

図4 PORDの尿中ステロイド代謝物濃度(mg/gcreatinine) (検討1)

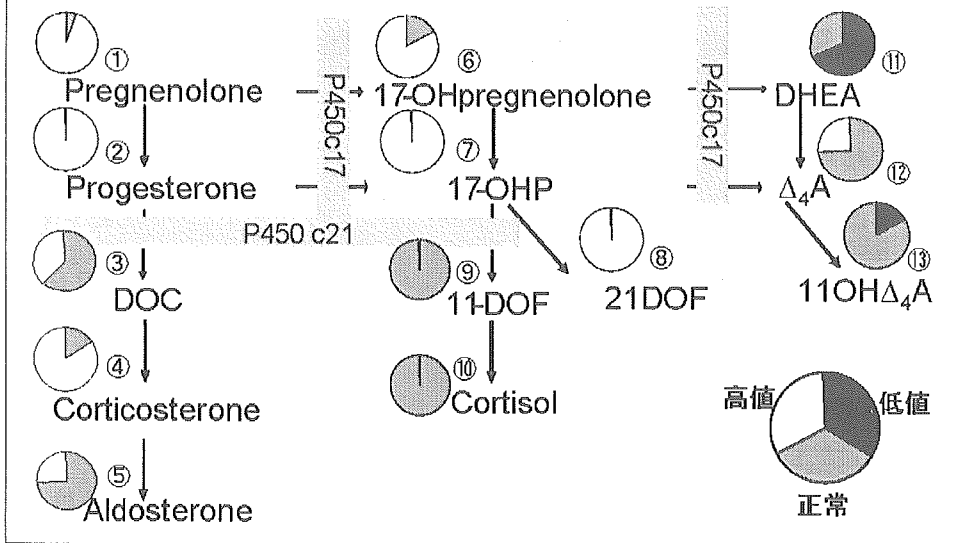


図5 PORDの尿中ステロイド代謝物比(mg/gcreatinine) (検討1)

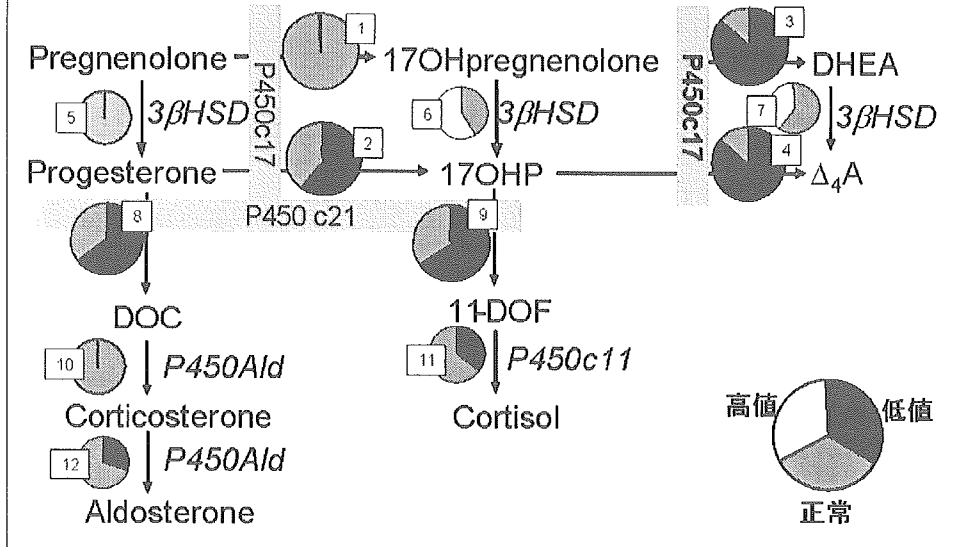


図6 新生児・乳児のPORD・21OHD・一過性高17OHP血症・対照における
21-deoxycortisol代謝物⑧の分布 (検討2)

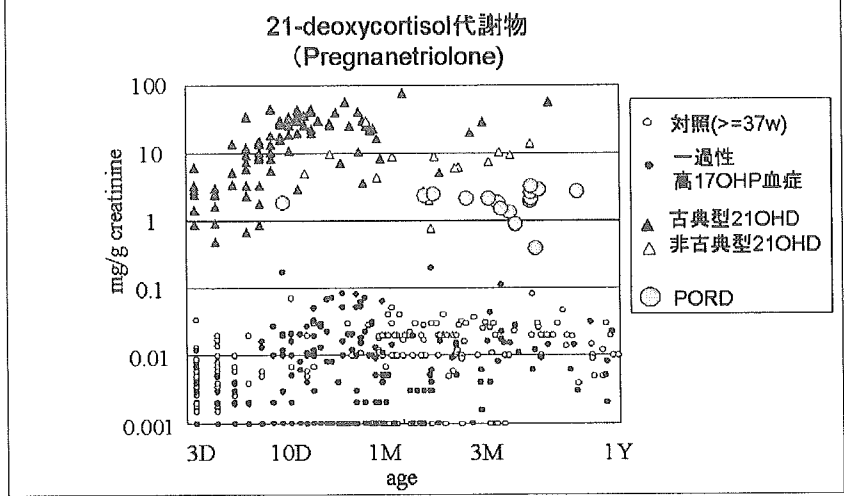


図7 新生児乳児のPORDと21OHDにおける
Progesterone代謝物②と11-OHandrostenedione代謝物⑬の分布 (検討2)

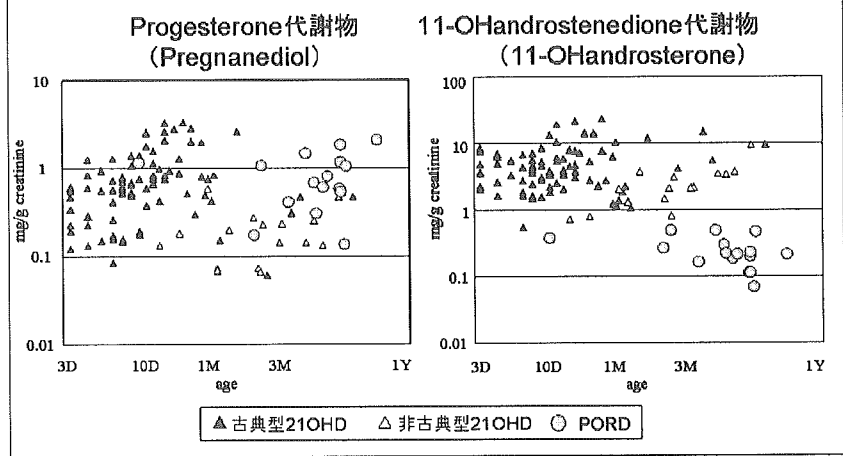
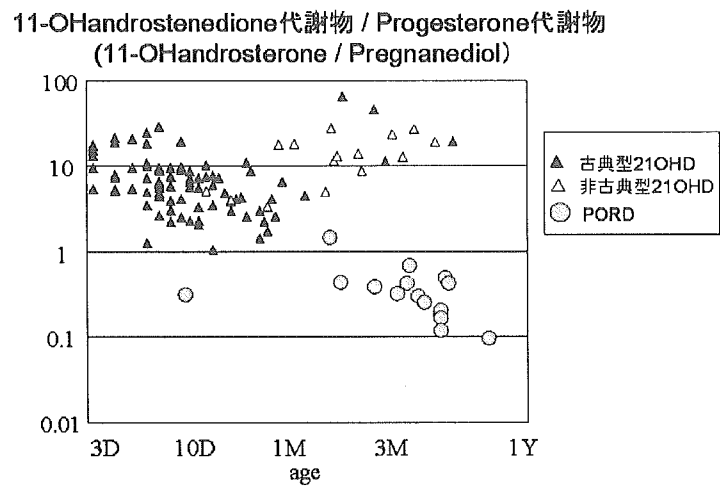


図8 新生児乳児のPORDと21OHD における
 11-OHandrostenedione代謝物とProgesterone代謝物比 13 の分布
 (検討2)



副腎皮質の発生初期過程に関する解析

諸橋 憲一郎

自然科学研究機構 基礎生物学研究所
発生生物学研究領域 性差生物学研究部門

【研究要旨】

副腎皮質は生殖腺と同様にステロイドホルモン産生能を有する組織であり、初期発生の解析から生殖腺と極めて密接な関係にあることが分かっている。我々が着目してきた Ad4BP/SF-1 遺伝子は発生初期から両組織に発現するのみならず、視床下部や脳下垂体などの生殖活動に重要な組織に発現する。更に、この遺伝子の破壊マウスでは副腎と生殖腺が形成されないことから、本遺伝子がこれらの組織形成過程で重要な役割を担っていることが示唆された。そこで、トランスジェニックマウスの作製を通じ、Ad4BP/SF-1 がいかなるメカニズムのもとに副腎皮質に発現するのかを解析した。この解析からは副腎皮質の形成過程が明らかになってきているが、本研究は副腎皮質の形成メカニズムの解明を通じ、種々の副腎疾患の原因解明や副腎皮質の再生に向けた基礎的取り組みである。

A. 研究目的

Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎皮質特異的発現を調節するエンハンサーを用い、副腎皮質原基に遺伝子を強制発現することで、副腎皮質の分化メカニズムを明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

Ad4BP/SF-1 遺伝子の副腎皮質エンハンサーの制御下に Ad4BP/SF-1 自身をおくプラスミドを作製した。このプラスミドを用いてトランスジェニックマウスを作製し、胎仔副腎皮質で Ad4BP/SF-1 を強制発現するマウスをえた。また、このプラスミドの Ad4BP/SF-1 を lacZ 遺伝子で置換したプラスミドを作製し、同様にトランスジェニックマウスを作製した。このマウスは胎仔副腎原基で lacZ を発現するので、胎仔副腎原基をブルーに染めることが可能である。これらの2種のマウスを交配し、胎仔副腎皮質における

Ad4BP/SF-1 を強制発現の影響を検討した。

(倫理面への配慮)

本実験には遺伝子破壊マウスを用いるが、全ての動物実験は自然科学研究機構動物実験指針に従って行なわれた。なお本研究は自然科学研究機構実験動物委員会の承認を得たものである。

C. 研究成果

本研究では、Ad4BP/SF-1 遺伝子中に同定した胎児副腎皮質特異的エンハンサーを用い、内在性の Ad4BP/SF-1 の発現を lacZ の発現をもって再現するトランスジェニックマウスが得られた。胎児副腎皮質特異的エンハンサーを詳細に解析するために、トランスジェニックマウスラインを作成し、発生にともなう lacZ の発現の変動を調べた。X-gal 染色による lacZ の活性は胎仔 9.5 日齢にはじめて観

察された。この発現は生後まで続いたが、副腎皮質と髄質の間の層にしか見られなかった。さらに、雄では生後35日に発現消失することから、胎仔副腎(X-zone)と呼ばれる層に特異的なエンハンサーであることが明らかになった。

次いで、胎仔副腎皮質エンハンサーの制御下に Ad4BP/SF-1 を発現するトランスジェニックマウスを作製し、前述のマウスと掛け合わせ、Ad4BP/SF-1 の強制発現の影響を lacZ の発現を通してみるのが可能なマウスを作製した。このマウスにおける副腎皮質の形成を調べたところ、副腎皮質の大幅な増大が確認された。この増大は副腎皮質の形成初期(マウス胎齢10.5日)に始まり、胎生後期には副腎より頭部側に散在性に lacZ 陽性細胞が認められる。マーカー遺伝子の発現を検討したところ、これらの散在性の細胞は副腎皮質であることが分かった。

D. 考察

従来から指摘されているように、胎仔副腎と成人副腎では、その構造や機能が異なることが知られている。しかしながら、両者を構成する細胞の起源は明らかではなかった。本研究では胎仔副腎の形成が Ad4BP/SF-1 の発現量によって制御されることを明らかにした。この増大は細胞増殖の亢進によるものか、細胞死の低下によるものかは明確でないため、その点は今後の問題として残されている。ただし、いずれの場合においても Ad4BP/SF-1 の量はその制御に関わっていることは明らかであり、そのメカニズムの解明は重要である。

E. 結論

Ad4BP/SF-1 遺伝子のイントロン内に存在する胎仔副腎皮質特異的発現を制御

するエンハンサーを用い Ad4BP/SF-1 を強制発現したところ、胎仔副腎皮質の大幅な増大が確認された。胎生初期の副腎皮質における Ad4BP/SF-1 の発現量が副腎皮質の大きさの決定に関わることが推測される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1, Expression of the estrogen-inducible EGFP gene in aromatase-deficient mice reveals differential tissue-response to estrogenic compounds.
K. Toda, Y. Hayashi, T. Okada, K. Morohashi, and T. Saibara
Mol. Cell. Endocrinol. 229, 119-126, 2005
- 2, Identification of the boundary for histone acetylation between nuclear receptor genes, Ad4BP/SF-1 and GCNF, aligned in tandem.
S. Ishihara and K. Morohashi
Biochem. Biophys. Res. Commun. 329, 554-562, 2005
- 3, Mesonephric *FGF* signaling is associated with the development of sexually indifferent gonadal primordium in chick embryos.
H. Yoshioka, Y. Ishimaru, N. Sugiyama, N. Tsunekawa, T. Noce, M. Kasahara, and K. Morohashi
Dev. Biol. 280, 150-161, 2005
- 4, Novel Isoform of Vinexin, Vinexin γ Regulates *Sox9* Gene Expression through activation of MAPK Cascade in Mouse Fetal Gonad
M. Matsuyama, H. Mizusaki, A. Shimono, T. Mukai, K. Okumura, K.

- Abe, K. Shimada, and K. Morohashi
Genes Cells 10, 421-434; 2005
- 5, A steroidogenic cell line with differentiation potential from mouse granulosa cells, transfected with Ad4BP and SV40 large T antigen genes.
Kamei Y, Aoyama Y, Fujimoto T, Kenmotsu N, Kishi C, Koushi M, Sugano S, Morohashi K, Kamiyama R, Asakai R.
J. Endocrinol. 185, 187-195, 2005
- 6, Mouse *Polycomb M33* is required for splenic vascular and adrenal gland formation through regulating *Ad4BP/SF-1* expression.
Y. Katoh-Fukui, A. Owaki, Y. Sotoyama, M. Kusaka, Y. Shinohara, M. Maekawa, K. Toshimori, and K. Morohashi
Blood 106, 1612-1620, 2005
- 7, VMH Specific Enhancer of *Ad4BP/SF-1* Gene.
Y. Shima, M. Zubair, S. Ishihara, Y. Shinohara, S. Oka, S. Kimura, S. Suita, and K. Morohashi
Mol Endocrinol 19, 2812-2823, 2005
- 8, Ah (dioxin) receptor as a key factor in the regulation of female reproduction.
T. Baba, J. Mimura, N. Nakamura, N. Harada, M. Yamamoto, K. Morohashi* and Yoshiaki Fujii-Kuriyama*
(*; The last two authors equally contributed to this work.)
Mol. Cell. Biol. 25, 10040-10051, 2005

2. 学会発表

(招待講演)

- 1、第78回日本内分泌学会（東京）シンポジウム「核内受容体によるホルモン作用の新展開」
「Ad4BP/SF-1のSUMO下による転写制御」 諸橋憲一郎、小松朋子、小川英知
- 2、第78回日本内分泌学会（東京）教育講演「性決定の分子メカニズム」
諸橋憲一郎

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

ステロイドホルモンレセプターの転写制御メカニズムの解明 に関する研究

加藤 茂明

東京大学分子細胞生物学研究所

【研究要旨】

以前より我々は当研究室で確立した生化学的手法による核内受容体転写共役因子複合体同定法により、ミネラルコルチコイドレセプター(MR)の転写制御メカニズムの解明を目指してきた。その結果、RHA/CBP複合体がリガンド選択的にMRのN末端側AB領域に結合し、転写制御する事を明らかにした(H. Kitagawa et al, MCB 2002)。今回はさらに、心血管領域で注目されている酸化還元刺激による影響とMRの転写の関係について検討し、酸化還元刺激がMRの転写に影響し、その一因としてRHA/CBP複合体の関与を明らかにした。

A. 研究目的

近年、核内受容体の転写制御には様々な転写共役因子複合体が関与する事が知られているが、その機能や結合因子群について未だ不明な点が多い。従って蛋白精製の手法を用いて核内受容体と相互作用する因子群の取得が必要と考えられる。またMRやグルココルチコイドレセプター(GR)等の核内受容体はリガンド依存的な転写活性化能に加え、恒常的な転写活性を有する領域AF1が存在する。しかしながらAF1に結合する転写共役因子群については不明な点が多い。このような核内受容体の特徴を考え、核内受容体の独特の転写制御機構に迫りたいと考えている。今回は特に動脈硬化などの成人病との関与が強く示唆されている酸化還元刺激とMRの転写制御メカニズムの関与を明らかにしようと考えた。

B. 研究内容

1: タンパク質複合体精製系の発展

大量の培養細胞より核抽出液を取得し、

核内受容体に結合する因子群を取得した。更に得られた巨大な複合体についてその複合体の機能を明らかにするとともに構成因子を同定した。今回新しくTAP tagを用いた二段階精製法を開始した。

2: タンパク質同定系の発展

MALDI-TOF MSを用いたタンパク質同定法を駆使し、取得した複合体の同定を行っている。現在LC-MS/MSを更に用いた多角的な解析に着手している。

3: 酸化還元刺激のMRの転写における役割

心血管系には昔から酸化刺激が影響し、動脈硬化や心臓の繊維化などの一因と考えられている。一方MRのそのような現象に関与していることが注目されており、その関連のメカニズムを明らかにすることは創薬という意味でも重要と考えられる。酸化刺激としてのH₂O₂刺激、還元刺激としてCoCl₂刺激を行い、MRの2種類の生体内リガンド存在下でレポーターアッセイを行う。

4: RHA/CBP複合体の酸化還元刺激に対する

る関与の解析

すでに取得している RHA/CBP の MR 標的遺伝子プロモーター上へのリクルートの変化を ChIP アッセイで明らかにする。

5: MR 転写共役因子群の全貌の解明

MR の生理作用を解明するためには MR に結合する因子群のさらなる解明が急務である。そのため、MR 全長の恒常発現株を用いた精製系を構築し、結合因子の同定を進めていく。

(倫理面への配慮)

使用している生物材料は主に培養細胞であり、倫理面への配慮は必要ないと考えられる。また実験動物に関しても所定の規則に則って実験を行っている。

C. 研究結果

1: タンパク質複合体精製系の発展

TAP tag を用いた 2 段階精製系を用いて実際にグルココルチコイドレセプター (GR) の恒常発現株を作成し、精製を開始した。実際にリガンド依存性に核内に GR 結合因子群が出現することが明らかになった。

2: タンパク質同定系の発展

LC-MS/MS を用いることにより、これまでの TOF MS では同定できない因子群の同定が出来ることが明らかになった。

3: 酸化還元刺激の MR 転写における役割

酸化刺激で転写活性は低下し、還元刺激ではヒドロコルチゾン存在下でのみ転写活性の上昇が認められた。アルドステロン存在下では還元刺激でも転写活性は低下する (fig1)。

4: RHA/CBP 複合体の酸化還元刺激に対する関与の解析

RHA/CBP 複合体はアルドステロン存在下でのみ MRAF1 に結合する (fig2)。

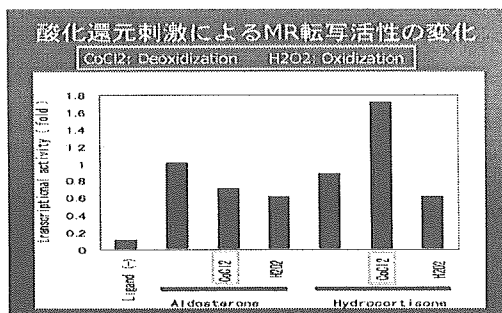


fig 1

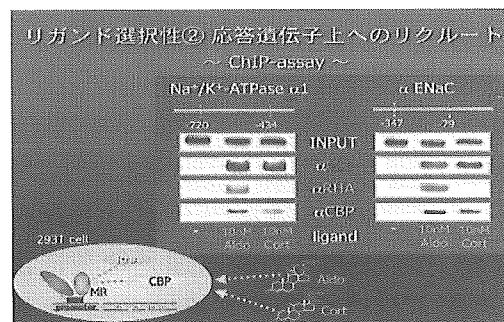


fig 2

還元刺激による CBP の標的遺伝子上へのリクルートは、ヒドロコルチゾン存在下では上昇し、アルドステロン存在下では低下することが明らかになった (fig3)。

5: MR 転写共役因子群の全貌の解明

TAP tag 付きの MR の全長の恒常発現株の作成に成功した。

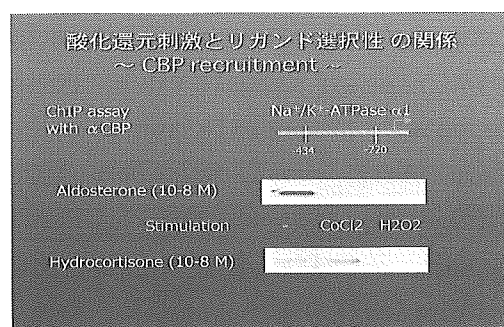


fig 3

D. 考察

MR の内在性に存在する 2 種類のリガンドの作用と酸化還元刺激に関して今後はさらなる解析を進める予定であるが、その全貌は RHA/CBP を含めた結合する因子群の全貌の解明によって明らかになる

と考えている (fig 4)。今後はMRの全長を用いた精製系を構築し、さらに結合因子群の解明を行っていく予定である。

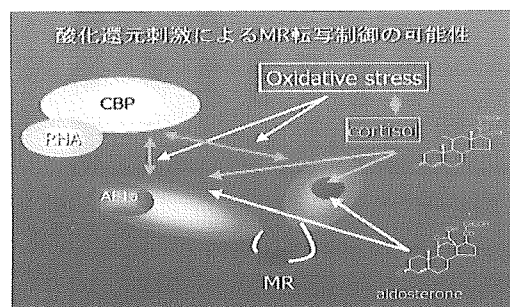


fig 4

E. 結論

MRの内在性の2種類のリガンド存在下で、酸化還元刺激、特に還元刺激によるMRの転写活性の変化に違いがあり、その原因としてRHA/CBPのMR標的遺伝子プロモーターへのリクルートが関与していることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masuhiro, Y., Mezaki, Y., Sakari, M., Takeyama, K., Yoshida, T., Inoue, K., Yanagisawa, J., Hanazawa, S., O'Malley, B. W., Kato, S.: Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 8126-8131, 2005.
- 2) Fujiki, R., Kim, M., Sasaki, Y., Yoshimura, K., Kitagawa, H., Kato, S.: Ligand-induced transrepression by VDR through association of WSTF with acetylated histones. *EMBO J.*, 24, 3881-3894, 2005.
- 3) Shiina, H., Matsumoto, T., Sato, T., Igarashi, K., Miyamoto, J.,

Takemasa, S., Sakari, M., Takada, I., Nakamura, T., Metzger, D., Chambon, P., Kanno, J., Yoshikawa, H., Kato, S.: Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, in press.

- 4) Oishi, H., Kitagawa, H., Wada, O., Takezawa, S., Tora, L., Kouzu-Fujita, M., Takada, I., Yano, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: An hGCN5/TRRAP HAT complex coactivates BRCA1 transactivation function through histone modification. *J. Biol. Chem.*, 2005, in press.
- 5) Ogawa, S., Oishi, H., Mezaki, Y., Kouzu-Fujita, M., Matsuyama, R., Nakagomi, M., Mori, E., Murayama, E., Nagasawa, H., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S.: Repressive domain of unliganded human estrogen receptor α associates with Hsc70. *Genes to Cells*, 10, 1095-1102, 2005.
- 6) Furutani, T., Takeyama, K., Koutoku, H., Ito, S., Taniguchi, N., Suzuki, E., Kudoh, M., Shibasaki, M., Shikama, H., Kato, S.: Human expanded polyQ androgen receptor mutants in neurodegeneration as a novel ligand target. *J. Pharm. Experim. Therapeutics*, 2005, in press.
- 7) Furutani, T., Takeyama, K., Koutoku, H., Ito, S., Taniguchi, N., Suzuki, E., Kudoh, M., Shibasaki, M., Shikama, H., Kato, S.

- S.: A role of androgen receptor protein in cell growth of an androgen-independent prostate cancer cell line. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69, 2236–2239, 2005.
- 8) Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J., Kato, S.: TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 327, 933–938, 2005.
- 9) Takada, I., Suzawa M., Kato, S.: Nuclear receptors as targets for drug development: crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor γ and cytokines in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Pharmacol. Sci.*, 97, 184–189, 2005.
- 10) Kato, S., Fujiki, R., Kitagawa, H.: Chapter 17, Promoter targeting of vitamin D receptor through a chromatin remodeling complex. *In Vitamin D*, 2nd Edition, ed. by Feldman, D., Pike, JW., Glorieux, FH., Elsevier, Inc., San Diego, CA, pp. 305–312, 2005.
- 11) Nakagawa, K., Kawaura, A., Kato, S., Takeda, E., Okano, T.: $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 is a preventive factor in the metastasis of lung cancer. *Carcinogenesis*, 26, 429–440, 2005.
- 12) Capuano, P., Radanovic, T., Wagner, C. A., Bacic, D., Kato, S., Uchiyama, Y., St-Arnaud, R., Murer, H., Biber, J.: Intestinal and renal adaptation to a low Pi-diet of type II Na-Pi-cotransporters in VDR and 1α -OHase deficient mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 288, C429–C434, 2005.
- 13) Meindl, S., Rot, A., Hoetzenecker, W., Kato, S., Cross, S., Elbe-Burger, A.: Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *Br. J. Dermatol.*, 152, 231–241, 2005.
- 14) Wada-Hiraike, O., Yano, T., Nei, T., Matsumoto, Y., Nagasaka, K., Takizawa, S., Oishi, H., Arimoto, T., Nakagawa, S., Yasugi, T., Kato, S., Taketani, Y.: The DNA mismatch repair gene hMSH2 is a potent coactivator of oestrogen receptor α . *Br. J. Cancer*, 92, 2286–2291, 2005.
- 15) Fan, W., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Sato, T., Kawano, H., Kato, S., Nawata, H.: Androgen receptor null male mice develop late-onset obesity caused by decreased energy expenditure and lipolytic activity but show normal insulin sensitivity with high adiponectin secretion. *Diabetes*, 54, 1000–1008, 2005.
- 16) Saito, H., Maeda, A., Ohtomo, S., Hirata, M., Kusano, K., Kato, S., Ogata, E., Segawa, H., Miyamoto, K., Fukushima N.: Circulating FGF-23 is regulated by $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 and

- phosphorus *in vivo*.
J. Biol. Chem., 280, 2543-2549,
 2005.
- 17) Bando, T., Sekine, K., Kobayashi, S., M. Watabe, A., Rump, A., Tanaka, M., Suda, Y., Kato, S., Morikawa, Y., Manabe, T., Miyajima, A.: Neuronal leucine-rich repeat protein 4 functions in hippocampus-dependent long-lasting memory.
Mol. Cell. Biol., 25, 4166-4175, 2005.
- 18) Nakagawa, K., Sasaki, Y., Kato, S., Kubodera, N., Okano, T.: 22-Oxa-1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer.
Carcinogenesis, 26, 1044-1054, 2005.
- 19) Kallay, E., Bises, G., Bajna, E., Bieglmayer, C., Gerdenitsch, W., Steffan, I., Kato, S., Armbrecht, H. J., Cross, H. S.: Colon-specific regulation of vitamin D hydroxylases—a possible approach for tumor prevention.
Carcinogenesis, 2005, in press.
- 20) Yamamoto, K., Uchida, E., Urushino, N., Sakaki, T., Kagawa, N., Sawada, N., Kamakura, M., Kato, S., Inouye, K., Yamada, S.: Identification of amino acid residue of CYP27B1 responsible for binding of 25-hydroxyvitamin D₃ whose mutation causes vitamin D-dependent rickets type I.
J. Biol. Chem., 2005, in press.
- 21) Yamamoto, K., Sokabe, T., Matsumoto, T., Yoshimura, K., Shibata, M., Ohura, N., Fukuda, T., Sato, T., Sekine, K., Kato, S., Isshiki, M., Fujita, T., Masuda, H., Kobayashi, M., Kawamura, K., Kamiya, A., Ando, J.: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice.
Nature Medicine, 2005, in press.
- F. 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

塩誘導性キナーゼ (SIK) 機能不全時のステロイド合成酵素の発現異常

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】

副腎皮質細胞において ACTH シグナルの下流にある cAMP-PKA 経路は多くのステロイド合成酵素遺伝子の発現を調節する。塩誘導性キナーゼ (SIK) は PKA の活性化によって誘導され、PKA で活性化される CREB 依存的な遺伝子の発現を負に制御することが明らかとなった。SIK がリン酸化する基質を検索したところ、TORC (Transducers of Regulatory Coactivators) と呼ばれる新しいグループに属する CREB 特異的転写共役因子であった。一方、SIK は癌抑制キナーゼの 1 つである LKB1 でリン酸化され活性化されることが報告された。今回われわれは、LKB1 を欠損した細胞内でのステロイドホルモン合成酵素遺伝子の発現を検討した。またスタウロスポリンを用いて SIK を阻害した場合の同遺伝子の発現も検討した。

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にある受容体に結合すると、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 は次に標的遺伝子上流にある cAMP 応答配列 (CRE) に結合する転写因子 CREB 等を活性化する。リン酸化された CREB は転写共役因子と結合し、その結果標的遺伝子のプロモーター活性が上昇する。

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・スレオニン・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 SNF1/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 Y1 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 ファミリーの転写共役因子 TORC をリン酸化し、その転写共役活性を抑制することによるものである (3-6)。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)。しかし、SIK の機能不全状態でステロイド合成が攪乱されるかは不明である。SIK には機能的に相補可能な 3 種類のアイソフォームが存在し、程度は異なるものの、副腎皮質でそれら全てが発現していることが SIK 機能不全状態の再現を困難にしている。