そこで、今回は全てのSIKファミリー酵素の共通の上流キナーゼとして同定されたLKB1（7）を欠く細胞を利用して、SIK活性欠損時のCREB活性を検討した。さらに、低分子化合物でLKB1欠損状態を再現することを試み、その化合物を副腎皮質細胞へ作用させた場合の副腎ステロイド合成酵素の発現異常を検討した。

B.研究方法

LKB1欠損細胞としては、HeLa細胞を利用した。CREB活性の指標としては、アデノウイルスにCRE配列を持つプロモーターとルシフェラーゼレポータ遺伝子を構築し、これをHeLa細胞へ導入することで検討した。その他のレポーターはプラスミドで構築した。アルドステロンプロモーターは上流400bpをH295R細胞のゲノムDNAからPCR法によって増幅し、pGL3レポータープラスミドへ導入した。細胞へのプラスミドの導入にはLipofectAMIN2000を利用した。

キナーゼ活性は抗体で精製したSIK1を基質と^{32}P-ATPの存在下で反応させ、基質への放射活性の取り込みを指標とした。LKB1 cDNAはインビトロジェン社のIMAGEクローンを利用した。

SIK活性阻害剤としては、スタウロスポリンを利用した。スタウロスポリンまたはACTHを副腎皮質培養細胞株Ｙ１に投与し、一定時間後にRNAを抽出した。個々のステロイド合成酵素のmRNAの発現量はリアルタイムPCR法にて定量した。SIK-スタウロスポリン複合体の構造予測はthe Swiss Modelを利用した。
(http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html)

C.研究結果

SIKの細胞内基質であり、CREB共役因子として機能するTORCはSIKによりリン酸化されると核から細胞質へと移行する。この現象がSIKによるCREB抑制機構の中心であろうと予想される。興味深いことに、SIK上流キナーゼLKB1を欠くHeLa細胞ではTORCは絶えず核内へ止まることが報告されている。また、TORCには３種類のアイソフォームが存在し、これら全てがSIK依存的に細胞内局在を変化させるかは不明である。そこで、蛍光レポータータンパクGFPに結合させたTORC各アイソフォームをLKB1欠損HeLa細胞と、LKB1を発現しているCOS-7細胞に発現させ、SIK共発現下でのTORCの細胞内局在を検討した。図１に結果を示す。まず、TORC1の大部分は絶えず細胞質に局在しその度合いはSIKの発現の有無およびLKB1発現状況で変化は見られなかった。このことから、TORC1の活性化された分子はTORC1全体のごく僅かな集団でGFPを利用した方法では検出不可能であろうと予想される。次にTORC2であるが、TORC2はCOS-7細胞内ではSIKの強制発現に依存した細胞質移行が観察された。HeLaではこの現象が見られないことから、SIKの酵素活性がLKB1に依存していることが裏付けられた。最後に、TORC3はTORC2同様にSIK依存的核外移行を示すが、TORC2ほどは顕著では無く、SIKの活性化を議論するには適していないことが示唆された。

HeLa細胞でSIK依存的なTORC2の核外移行がLKB1の欠損によるものかを検証するする目的で、図１で示したGFP-TORC2のアッセイ系にLKB1も強制発現させた。結果（図２）、HeLa細胞でのTORC2のSIK依存的細胞質移行はLKB1の強制発現で回復することが明らかとなった。

TORC2の細胞内局在がLKB1によるSIK

の活性化に依存していることは明らかとなったが、TORC の機能である CREB 共役活性が LKB1 で支配されているかは不明である。そこで、ルシフェラーゼレポーター遺伝子の上流に CREB 結合配列(CRE)を含むプロモーターを内部に持つアデノウイルスを構築し、HeLa 細胞へ導入することで、CREB 活性を検出した。図 3A に示すように、HeLa 細胞では非刺激（cAMP やフォルスコリン未処理）状態において、比較的高いレベルのレポーター活性が検出された。このことは CREB が活性化状態であることを示唆する。次にフォルスコリンで細胞を刺激したが、レポーター活性はさほど上昇しなかった。LKB1 を強制発現させた HeLa 細胞は、未刺激のレポーター活性は 1/10 まで減少し、フォルスコリンによる誘導も観察されたが、そのレベルは LKB1 非発現状態で観察されるレポーターのレベルまでは達しなかった。しかし、LKB1 発現状態を長時間（４８時間以上）維持すると、フォルスコリンによる反応性が上昇することが明らかとなった。同様な結果は内因性の CREB 依存的転写産物（NR4A2）でも観察された。このことは、LKB1-SIK シグナル欠損では絶えず TORC が活性化するものの、CREB の活性化は最大状態にはいたらないものと予想される。一旦、LKB1 シグナルが回復すると CREB が非刺激時には抑制されるものの刺激時の CREB 活性はむしろ最大値に近づくこととなり、結果的に高くなることが示唆される。これはおそらく、TORC の恒常的活性化によって CREB 依存的な他のフィードバック因子が CREB 活性を抑制しているものと予想される。

LKB1-SIK シグナル欠損を SIK の RNAi を利用した発現抑制で検討することを試みたが結果は必ずしも有意とはいえなかった。その理由は SIK にも３種のアイソフォームが存在し、１つを抑制しても他がその欠損を相補するからであろうと予想される。そこで、低分子化合物で SIK 活性を阻害しうる化合物をスクリーニングすることにした。SIK 活性が阻害されれば、CREB 活性は上昇するはずである。そこで CRE レポーターを導入した 293 細胞（LKB1 発現細胞）へキナーゼ阻害剤に分類されている化合物を投与し、CRE レポーターの活性を測定した。結果、スタウロスポリンが CREB の活性を促進させることが示唆された（図４）。スタウロスポリンは種々のキナーゼを阻害することが知られている。そこで、in vivo および in vitro の IC50 を検討した。スタウロスポリンの SIK1 に対する IC50 は in vitro が 0.2 nM、in vivo（培養細胞）が 5 nM であった。このことは、SIK はスタウロスポリンに対して非常に感受性が高く、これまで報告されているスタウロスポリン感受性キナーゼである PKC に匹敵する。スタウロスポリンの濃度を低く抑えることにより、SIK の阻害効果を中心的に解析可能であろうと期待される。

そこで、スタウロスポリンによる CREB 活性化が TORC に依存するものかを検証した。図５に示すように、LKB1 で活性化された SIK に依存的な TORC の細胞質局在化はスタウロスポリン処理で完全に阻害された。また、この効果は全ての SIK アイソフォームで確認された。しかし、この TORC の核局在は LKB1 の活性阻害でも説明できる。そこで、LKB1 による SIK のリン酸化抗体を用いて検証した。結果、スタウロスポリンは SIK のリン酸化を阻害していないことが明らかとなった。

そこで、同一条件で副腎皮質細胞にスタウロスポリンを作用させた際のステロイド合成酵素の発現異常を検討した。ス

タウロスポリンを作用させた細胞ではACTHによるステロイド合成酵素の発現が延長されるだけでは無く、数十倍上昇することが明らかとなった。この事実は、SIKファミリー酵素がステロイド合成酵素の遺伝子発現を負に調節しており、SIKがいったん活性化された遺伝子発現はもとの状態へ戻す役割を担っていることが示唆された。

次に、SIKによるTORCのリン酸化の意義を検討した。まず、TORCを培養細胞で強制発現させると、CREB活性が上昇した。このときSIKも強制発現させると、TORC依存的なCREB活性化は阻害された。また、Ser171を破壊したTORC2はSIKによるTORC依存的CREB活性化阻害を弱めた。SIKは細胞質に局在していても核内に局在していてもCREBを抑制することができるが（4，5)、この現象は細胞内基質であるTORCが核と細胞質を行き来する可能性を示唆している。

D.考察及び結論

本研究により、ステロイド合成酵素の遺伝子発現調節におけるフィードバックの機構の存在とそれを担うSIKの重要性が再確認された。SIKが機能しない場合は過剰のステロイド産性に繋がるものと予想される。今後はSIKアイソフォーム間の役割分担とその異常に伴う疾患との関連の解明が必要である。

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) Katoh Y, et al: Eur. J. Biochem. 271: 4307-4319 2004
6) Screaton RA, et al: Cell 119: 61-74 2004
7) LiZcano JM. et al: EMBO J. 23: 833-843

F.研究発表

１．論文発表

1. Molecular identity and gene expression of aldosterone synthase cytochrome P450.
   Okamoto M, Nonaka Y, Takemori H
   J. Biochem Biophys Res Commun. 2005 338: 325-30
2. Molecular identification of adrenal inner zone antigen as a heme-binding protein.
   Min L, Strushkevich NV, Harnastai IN, Iwamoto H, Gilep AA, Takemori H, Usanov SA, Nonaka Y, Hori H, Vinson GP, Okamoto M.
   FEBS J. 2005 272: 5832-43.

２．学会発表

1. 竹森洋、加藤芳子、岡本光弘： CREB is a constitutive active transcription factor.
   第78回日本生化学会大会
   平成17年10月　神戸
2. 林星子、竹森洋、 岡本光弘：
   Characterization of the mouse SIK1 promoter
   第78回日本生化学会大会
   平成17年10月　神戸

G.知的財産権の出願・登録状況

無し

図１　GFＰ-TORC1-3の細胞内局在の解析。LKB1発現細胞としてCOS-7 (A)細胞を、非発現細胞としてHeLa (B)を利用した。DAPIは核染色を示す。

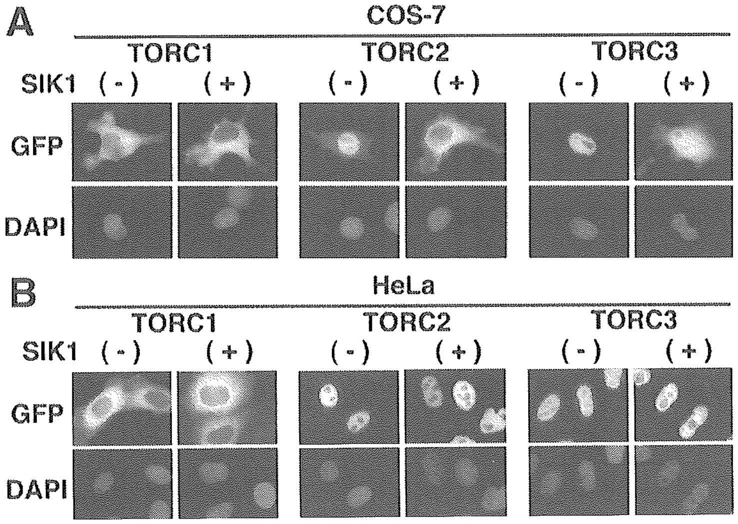


図２　SIK依存的GFP-TORC2の細胞質局在のLKB1による支配。

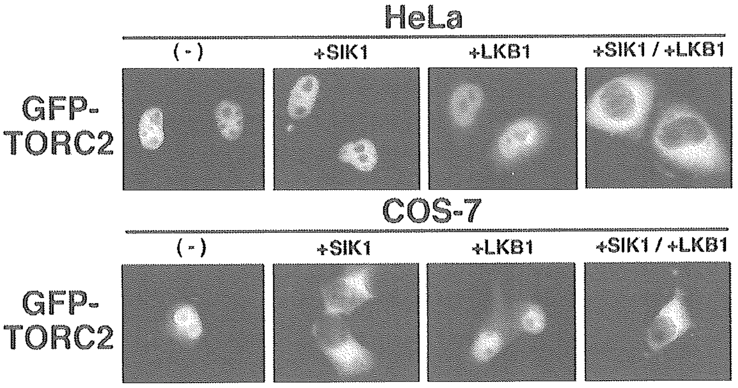


図3　アデノウイルス(A)または内因性遺伝子発現（NR4A2：B）を利用したCREB活性の検討。HeLa細胞を利用。

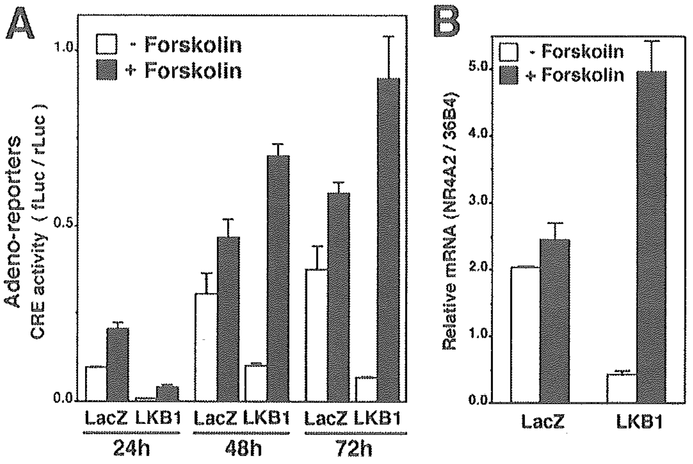


図4　スタウロスポリン（STS）はCREBを活性化させる。LKB1発現細胞として293細胞を利用した。

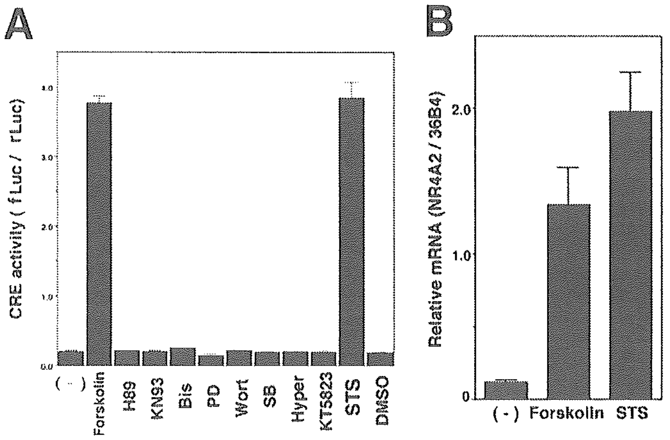


図5　スタウロスポリンによる LKB1-SIK 依存的な TORC2 細胞質局在の阻害。

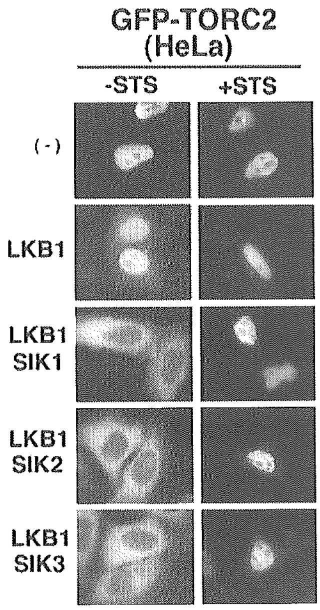
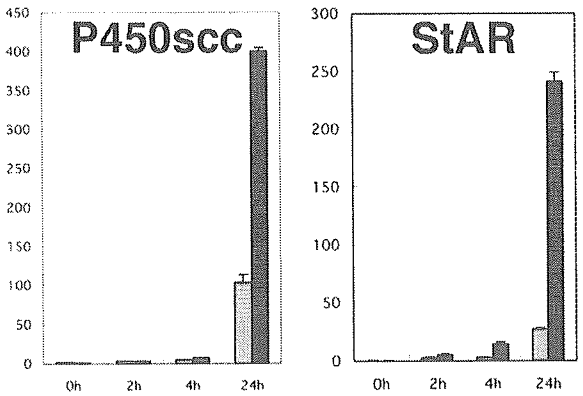


図6　スタウロスポリンによるステロイド合成酵素の遺伝子プロモーター活性の亢進。
左バー：ACTH 単独処理。右バー：ACTH＋スタウロスポリンの同時処理。



StAR 蛋白質のステロイドホルモン産生における

ステロイドスルファターゼ関与の可能性

菅原　照夫
北海道大学大学院医学研究科分子医科学

【研究要約】

ステロイドホルモンの生合成の第一段階はコレステロールをプレグネノロンに変換する過程である。StAR タンパク質はコレステロールのミトコンドリア内の移行に重要な役割を演じる。　ステロイドスルファターゼ（ＳＴＳ）はステロイドホルモン産生臓器である胎盤、副腎、睾丸と卵巣に存在している。ＳＴＳはステロール硫酸塩を脱硫酸化する。本研究はＳＴＳの StAR 蛋白質合成に対する効果とステロイド産生について解析することを目的とした。コレステロール側鎖切断酵素システム（F2)、StAR 蛋白質発現ベクターおよびＳＴＳ発現ベクターをサル腎癌細胞である COS-1 細胞に遺伝子導入し、細胞のステロイドホルモン産生能を調べた。ＳＴＳを遺伝子導入すると COS-1 細胞のプレグネノロンの産生は２倍に増加した。ウエスタンブロット解析の結果では StAR 蛋白質は増加した。*In vitro* translation ではＳＴＳ存在下では StAR 蛋白質の翻訳量は増加した。パルス－チェイス実験ではＳＴＳが遺伝子導入した COS-1 細胞における 37kDaStAR 蛋白質の前駆体の分解は低下した。StAR 蛋白質のレベルの増加は StAR 蛋白質の翻訳の増加と StAR 蛋白質前駆体の半減期が延長した結果である。結論として、ＳＴＳは StAR 蛋白質を増加させ、ステロイドホルモンの生産を促進する。

A.　研究目的

コレステロールからのステロイドホルモン生合成にはいくつかの段階を必要とする。合成の第一ステップはミトコンドリア内膜にあるチトクローム P450 側鎖切断酸素（ P450scc ）によってコレステロールからプレグネノロンの変換である。StAR 蛋白質はコレステロールをミトコンドリア内膜の移行に関与している。StAR 蛋白質は先天性リポイド副腎過形成の原因因子のひとつであり、StAR 蛋白質がステロイドホルモンの合成律速因子であることは明らかになっている。StAR 蛋白質は３７ｋDa の前駆体で合成され、ミトコンドリアに輸送されて３０kDa の成熟蛋白質になる。

ステロイドスルファターゼ（STS）は小胞体に局在する蛋白質でステロイド硫酸を脱硫酸化する。ＳＴＳの基質はコレステロール硫酸(CS)、プレグネノロン硫酸、デヒドロエピアンドロステロン硫酸とエストロン硫酸などのステロール硫酸である。ＳＴＳはステロイドホルモン産生臓器である卵巣、精巣、副腎に発現している。ＳＴＳはCS を脱硫酸化して遊離のコレステロールを産生し、StAR 蛋白質はそれをミトコンドリアに輸送する。ステロイドホルモン産生に関するＳＴＳの効果はあまり良く知られていない。この研究はステロイド産生関して、StAR 蛋白質に

対するＳＴＳの効果を調べることを研究の目的とした。

B.　研究方法

遺伝子

StAR 蛋白質発現ベクター（ pStAR ）およびＳＴＳ発現ベクター（ pSTS ）をもちいた。F2 システム（チトクローム P450scc システム）はカリフォルニア大学、サンフランシスコ校のミラー博士によって供与された。

細胞培養

サル腎癌細胞（COS-1 細胞）は理研の細胞バンクより給与されたものを用いた。

遺伝子導入

COS-1 細胞に FuGENE 6をもちいて遺伝子導入した。遺伝子導入後、48 時間の細胞培養をおこなった。

プレグネノロンの測定

培養液中のプレグネノロンはRIA で測定した。

ＳＴＳ酵素活性の測定

１％トライトン X を含んだ 20mM の Tris-HCl(pH8.0) の緩衝液中で 50,000dpm の 7-[^{3}H] デヒドロエピアンドロステロン硫酸塩（ DHEAS ）(16Ci / mmol) に 25μｌの酵素原を 37℃で１時間培養した。１単位は蛋白質１mg あたり１時間に DHEAS の 1pmol を加水分解する酸素の量と定義した。

ウエスタンブロット解析

遺伝子導入された COS-1 細胞から抽出した蛋白質をもちいて、ウエスタンブロット解析した。抗 P450scc、抗ＳＴＳ血清および StAR 抗体をもちいて解析した。

In vitro translation

StAR 蛋白質および STS 蛋白質が TNT-reticulocyte *in vitro* translation によって合成された。翻訳産物は 12%アクリルアミドゲルの SDS 電気泳動後ウエスタンブロット解析した。

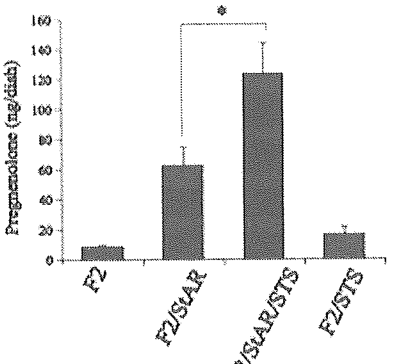
パルス - チェイス実験

COS-1 細胞に pStAR および pSTS を遺伝子導入し、[^{35}S] メチオニン (0.4mCi /ml) でアイソトープラベルした。RIPA 緩衝液 (50mM Tris-HCl, 1 %Nonidet p-40、0.1% デオキシコール酸、 0.1 % SDS 、 150mMNaCl 、 1mMEDTA 、 1 mMDTT 、 0.1mMPMSF、1x プロテイナーゼインヒビター）400μｌで細胞を溶解した。プロテインG sepharose と StAR 蛋白質の血清あるいは抗 GAPDH 抗体とインキュベートした。RIPA バッファで洗浄後、SDS 電気泳動し、オートラジオグラフ解析をした。

C. 研究結果

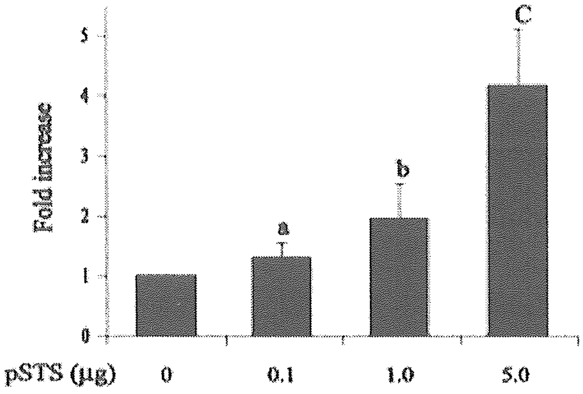
ステロイドホルモン生産に対するＳＴＳの効果

COS-1 細胞に F2 システム、pStAR および pSTS を遺伝子導入した。ステロイドホルモンの産生性を評価するために、プレグネノロン量を測定した。F2、pSTS と pStAR を遺伝子導入するとプレグネノロン産生は増加した。

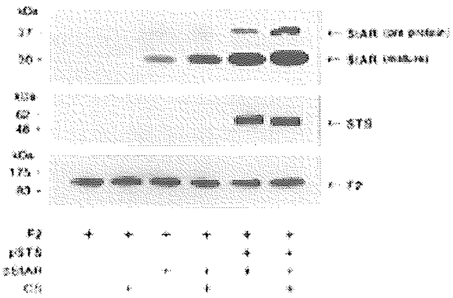


STS の容量依存性

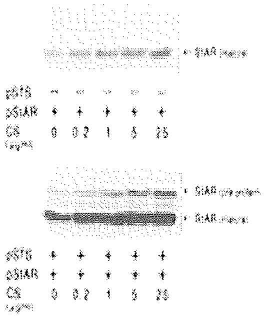
pSTS の導入量を変化させて（0 から５ μg）COS-1 細胞に遺伝子導入した。COS-1 細胞で産生されたプレグネノロンは容量依存性に増加した。



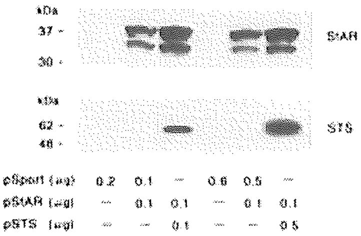
StAR 蛋白質発現に対する STS の効果
StAR 蛋白質レベルに対する STS の効果を調べるために、遺伝子導入した COS-1 細胞のウエスタンブロット解析をした。STS が遺伝子導入されると StAR 蛋白質の前駆体蛋白質(37kDa)と成熟体(30kDa)の蛋白質レベルは増加した。



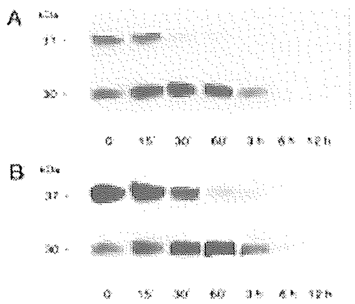
StAR 蛋白質発現に対する CS の効果
F2 、 pSTS と pStAR が遺伝子導入された COS-1 細胞における CS の影響を明らかにするために CS を培養液中に添加し、ウエスタンブロット解析した。StAR 蛋白質レベルは培養液に添加した CS の容量依存性に増加した。



In vitro translation
STS 存在下における StAR 蛋白質の翻訳効率を調べた。 翻訳産物をウエスタンブロット解析した。pSTS が *In vitro* translation 反応系に加えられると StAR 蛋白質の翻訳産物は増加した。



StAR 蛋白質の代謝
StAR 蛋白質レベルの増加が蛋白質の寿命との関連性を調べるためにパルス - チェイス実験を行った。pSTS で遺伝子導入されなかった COS-1 細胞（A）と比較すると pSTS で遺伝子導入された COS-1 細胞（B）における StAR 蛋白質の前駆体である３７kDa の蛋白質量の増加があり、代謝時間が延長した。



StAR 蛋白質のレベルの増加は StAR 蛋白質の翻訳と StAR 蛋白質の前駆体である 37kDa の蛋白質の半減期が延長したためである。

D.考察

ステロイドホルモン産生細胞では、LDL から供給されたコレステロールがステロイドホルモンの前駆体となる。また、小胞体では遊離のコレステロールを供給するために STS が CS を脱硫酸化する。STS によって 産生されたコレステロールの輸送経路は LDL と異なっている。CS を含んでいる培養液での COS-1 細胞のプレグネノロン生産の増加は STS に依存し、CS は細胞のステロイドホルモンの生産に重要である。ＳＴＳと StAR 蛋白質発現ベクターを COS-1 細胞に遺伝子導入すると、遊離のコレステロールの産生量の増加は StAR 蛋白質のコレステロール輸送能力を高めるかもしれない。Leydig 腫瘍 R2C 細胞では、StAR 蛋白質は高いレベルで発現している。R2C 細胞ではホルモン感受性リパーゼの発現が高いために、細胞内では遊離のコレステロールが増加しており、そのためにステロイドホルモンの産生は増加している。

Oxysterol である 25-hydroxycholesterol と 27-hydroxycholesterol が、翻訳効率を高め、また蛋白質の半減期を増すことによって、StAR 蛋白質の細胞内のレベルを高めることが報告されている。StAR 蛋白質はミトコンドリアにおけるコレステロールの水解酵素活性も促進する。ＳＴＳにより細胞中の遊離コレステロールを増加させると StAR 蛋白質により oxysterols 生産が増加するため、StAR 蛋白質の翻訳が高まることが予想される。

合成された３７kDa の StAR 蛋白質前駆体はミトコンドリアに移行し、ミトコンドリア内で 30kDa の成熟体となる。その機能はミトコンドリア外膜で作用する。ステロイドホルモン産生活性はミトコンドリアの輸送速度に依存している。ＳＴＳが遺伝子導入された COS-1 細胞における StAR 蛋白質の半減期はＳＴＳが導入されていない COS-1 細胞に比べて延長している。StAR 蛋白質がコレステロールを結合し、そのために蛋白質の立体構造を変え、StAR 蛋白質の寿命を増やすかもしれない。実際、リガンドが結合することによって、核レセプターの立体構造に変わることが報告されている。StAR 蛋白質がその立体構造の変化のためにミトコンドリア外膜に滞在する時間が延長し、ステロイドホルモン生産を促進するかもしれない。

細胞内コレステロールの移動についての詳細な解析は少ないが、StAR 蛋白質の発現の機構は明らかになりつつある。StAR 遺伝子のプロモーター領域はステロール応答エレメント結合蛋白質(SREBP)が関与する。STS が遺伝子導入された COS-1 細胞では遊離のコレステロールが増加する。ステロイドホルモン産生細胞ではＳＴＳは SREBP の発現レベルに影響を与えるかもしれない。　ＳＴＳ発現は StAR 遺伝子発現に重要であると思われるが、ＳＴＳの発現制御機構の解析は進んでいない。ステロイドホルモン産生細胞における StAR 蛋白質の発現レベルを明確にするために、ステロイドス

ルファターゼ遺伝子発現の制御機構を明らかにする必要があると思われる。

E．結論、

StAR 蛋白質の増加は翻訳の増加と37kDaのStAR蛋白質の前駆体の半減期が延長した結果である。ステロイドスルファターゼはStAR蛋白質を増やして、ステロイドホルモンの生産を促進する。

G．論文発表

１．論文発表

1. Teruo Sugawara: Development of a recombinant yeast assay to detect Ah-receptor ligands.
   Toxicology Mechanisms and Methods. In press.
2. Teruo Sugawara, Eiji Nomura and Nobuhiko Hoshi: Both N-terminal and C-terminal regions of steroid sulphatase are important for enzyme activity.
   J Endocrinology In press.

3. 学会発表

1. Teruo Sugawara: Steroid sulfatase increases steroidogenic acute regulatory protein expression level and stimulates steroid production.
   ASBMB 2005 April 2-6 in San Diego
2. Teruo Sugawara, Noriaki Sakuragi, Hisanori Minakami: Cholesterol sulfate inhibits production of steroid hormones by reducing StAR protein level in cells.
   ENDO 2005 June 4-7, 2005 in San Diego, USA

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

副腎におけるHDL受容体CLA-1の転写調節機構

村尾　孝児、井町　仁美、曹　聞銘、郁　暁、高原　二郎、石田　俊彦
香川大学医学部内分泌代謝・血液・免疫・呼吸器内科

【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。CLA-1の過剰発現はステロイドホルモン合成を促進し、変異を導入したDecoy CLA-1はその機能を抑制した。一方CLA-1のC末端を介する細胞内情報伝達系は副腎細胞増殖を刺激した。副腎におけるCLA-1の発現調節は様々な転写因子が関与しているが、新たに調節因子として転写因子PREBを同定した。転写因子PREBはcAMP刺激に反応して発現が増強し、PREBのknock-downでは、cAMPのCLA-1転写促進作用が阻害された。またPREBは、副腎のCYP11B1遺伝子の転写も促進し、ステロイドホルモン合成に重要な役割を演じることが推定された。

A. 研究の目的

1996年Actonらによりマウスscavenger receptor class B type 1 (SR-B1)がHDL受容体であると報告された。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、CLA-1遺伝子の転写調節機能について検討し、ステロイドホルモン合成メカニズムについて検証した。

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

CLA-1 mutant導入細胞の細胞増殖能について細胞数の測定、[^{3}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)法にてもアポトーシスについて検討を加えた。

Transfection：転写因子PREB cDNA full lengthを含む発現ベクターおよびCLA-1 promoter、CYP11B1 promoterを挿入したreporter gene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, CYP11B1の転写活性に

与える転写因子 PREB の影響について検討した。

C. 研究結果

遺伝子変異型 CLA-1 発現副腎細胞の生物学的特性

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 transformat を作成した。Decoy CLA-1 導入細胞は、HDL 結合性は mock 細胞と比較して高く、DiI-HDL からのコレステロールの取り込み能が有意に高値を示した。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。薬理学的な検討により、CLA-1 C 末端を介する細胞内情報伝達系は PI3-K/Akt カスケードを介し、転写因子 AP-1 の活性化が細胞増殖に関与していることが判明した。

CLA-1 発現にあたえる転写因子 PREB の影響

副腎における CLA-1 の遺伝子発現調節機構に関して新たな知見をえた。cAPM 依存性の転写因子 PREB が副腎に発現し、CLA-1 の転写促進作用を有していることが判明した（##）。CLA-1 promoter 内には２カ所の PREB 結合領域が存在し、結合領域の mutation にて PREB の作用が阻害された（##）。また PREB の knock-down にて CLA-1 の転写活性が減弱し、また cAMP による CLA-1 転写促進作用が阻害されることも判明した（##）。結合領域の検索により、副腎特異的遺伝子 CYP11B1 の promoter 内にも PREB 結合領域が存在することが判明した。PREB は cAMP に応答し、CYP11B1 の転写を促進することが判明した。

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 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、cAMP 依存性転写因子 PREB が cAMP の濃度依存性に CLA-1 遺伝子の転写を促進することが判明した。ACTH から CLA-1 遺伝子転写にいたる情報伝達系の解明がなされた。また PREB の結合配列は他のステロイドホルモン合成酵素の promoter（CYP11B1）にも存在することより、ACTH 刺激を仲介する転写因子として PREB が注目される。HDL からのコレステロールの取り込みを抑制することにより、ステロイドホルモン合成が低下することからも裏付けられる。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および腫瘍増殖に 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おり、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、細胞内情報伝達を抑制する可能性が考えられた。

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影響を与えず、細胞増殖の抑制、アポトーシスの促進作用を示した。またCLA-1転写を促進する転写因子としてPREBを同定した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Niimi M, Murao K.：Neuropeptide W as a stress mediator in the hypothalamus.
Endocrine 27:51-54, 2005
2) S. Ohtsuka, K. Murao, H. Imachi, WM. Cao, X. Yu, J. Li, H. Iwama, NCW. Wong, C. Bancroft, and T. Ishida: PREB, prolactin regulatory element binding protein, as a potential transcriptional factor for the insulin gene in response to glucose stimulation.
Diabetologia (in press)
3) Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu X, Li J, Yoshida K, Kitanaka N, Matsumoto K, Nishiuchi T, Wong NCW, Ishida T: HDL is a potential growth factor for adrenocortical cells.
Cancer (in press)
4) 汎下垂体機能低下症を認めた頭蓋咽頭腫の特殊型Xanthogranulomaの一症例
村尾孝児、井町仁美、串田良生、羽場礼次、松本義人、田宮　隆、石田俊彦
日本内科学会雑誌　94：2597-2600, 2005

2. 学会発表

1) 汎下垂体機能低下症を認めた下垂体部腫瘍Xanthogranulomaの症例
井町仁美，村尾孝児，石田俊彦，田宮隆，松本義人，羽場礼二
第15回臨床内分泌代謝Updaate（札幌，3.05）
2) 1型糖尿病と橋本病(APS III型)に褐色細胞腫を合併した一例
村尾孝児，井町仁美，佐藤誠，石田俊彦
第15回臨床内分泌代謝Update （札幌，3.05）
3) PDGFのABCA1発現に及ぼす影響について
永尾幸，村尾孝児，阿部博，井町仁美，佐用義孝，松原修司，石田俊彦
第48回日本糖尿病学会年次学術集会（東京，5.05）
4) 転写因子PREBのglucokinase遺伝子発現に与える影響について
村岡都美江，村尾孝児，井町仁美，吉田和矢，阿部博，忽那則子，石田俊彦
第48回日本糖尿病学会年次学術集会（東京，5.05）
5) IB-1の血管内皮細胞における機能解析
吉田和矢，村尾孝児，井町仁美，阿部博，北中則 子，村岡都美江，石田俊彦
第48回日本糖尿病学会年次学術集会（東京，5.05）
6) 膵β細胞におけるIslet-brain 1(IB1)の発現調節機構
忽那則子，村尾孝児，井町仁美，阿部博，吉田和矢，村岡都美江，石田俊彦
第48回日本糖尿病学会年次学術集会（東京，5.05）

7) Transcriptional Factor, IB1 Regulates MCP-1 Expression in HUVECs
Koji Murao, Hitomi Imachi , Hiroshi Abe, Tomie Muraoka, Noriko Kitanaka, Toshihiko Ishida
65th American Diabetes Association Scientific Sessions
(San Diego, 6.05)

8) Glucose-Response Transcriptional Factor, PREB Regulates Adiponectin Expression in Adipocytes
Hitomi Imachi, Koji Murao, Wen M. Cao, Xiao Yu, Jun-Hua Li, Toshihiko Ishida
65th American Diabetes Association Scientific Sessions
(San Diego, 6.05)

9) PREB Regulates the Pancreatic Glucokinase Transcription in Response to Glucose
Tomie Muraoka, Koji Murao, Hitomi Imachi, Kazuya Yoshida, Noriko Kitanaka, Wen M. Cao, Xiao Yu, Toshihiko Ishida
65th American Diabetes Association Scientific Sessions
(San Diego, 6.05)

10) がんの増殖進展と内分泌学的メカニズム
副腎腫瘍および乳癌におけるHDL受容体CLA-1の意義
村尾孝児, 井町仁美, 石田俊彦
第78回日本内分泌学会学術総会
(東京,7.05)

11) MEN1遺伝子meninの内分泌腫瘍形成に与える影響について
井町仁美(香川大学 医学部第一内科), 村尾孝児, 石田俊彦
第78回日本内分泌学会学術総会
(東京,7.05)

12) 副腎におけるHDL受容体CLA-1発現におよぼす転写因子PREBの役割
村尾孝児, 井町仁美, 吉田和矢, 村岡都美江, 北中則子, 石田俊彦
第78回日本内分泌学会学術総会
(東京,7.05)

13) 膵β細胞におけるIGF-IのGlucokinase発現に及ぼす影響について
村尾孝児, 井町仁美, 吉田和矢, 村岡都美江, 北中則子, 石田俊彦
第78回日本内分泌学会学術総会
(東京,7.05)

14) 高血糖はp38 MAP kinaseを介してHDL受容体の発現を抑制する
井町仁美, 村尾孝児, 永尾幸, 吉田和矢, 村岡都美江, 北中則子, 石田俊彦
第78回日本内分泌学会学術総会
(東京,7.05)

15) OP' DDDで長期観察している異所性下垂体腺腫によるCushing病の一例
村尾孝児、井町仁美、吉田和矢、北中則子、永尾幸、松本謙介、西内崇将、新見道夫、石田俊彦
第5回日本内分泌学会四国地方会
(香川, 9.05)

16) IGF-1の膵Glucokinaseに及ぼす影響について
吉田和矢、村尾孝児、井町仁美、曹聞銘、郁暁、李軍華。北中則子、松本謙介、西内崇将、石田俊彦
第5回日本内分泌学会四国地方会
(香川, 9.05)

17) 転写因子PREBの膵内分泌に及ぼす影響について
村尾孝児、井町仁美、大塚章司、吉田和矢、曹聞銘、郁暁、李軍華。北

中則子、松本謙介、西内崇将、石田俊彦
第5回日本内分泌学会四国地方会
(香川, 9.05)

18) IB-1のHUBECsにおけるMCP-1, スカベンジャー受容体CD36活性化に及ぼす影響について
吉田和矢、村尾孝児、井町仁美、阿部博、曹聞銘、郁暁、李軍華。北中則子、松本謙介、西内崇将、石田俊彦
第5回日本内分泌学会四国地方会
(香川, 9.05)

19) HDL 受容体 CLA-1 は副腎におけるステロイドホルモン合成と細胞増殖を促進作用
村尾孝児、井町仁美、吉田和矢、曹聞銘、郁　暁、李　軍華、北中則子、松本謙介、西内崇将、石田俊彦
第１３回日本ステロイドホルモン学会　(名古屋, 11.05)

20) 副腎における転写因子 PREB による HDL 受容体 CLA-1 発現調節機構
村尾孝児、井町仁美、吉田和矢、曹聞銘、郁　暁、李　軍華、北中則子、松本謙介、西内崇将、石田俊彦
第１３回日本ステロイドホルモン学会　(名古屋, 11.05)

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１，　　CLA-1 転写活性にあたえる PREB の影響

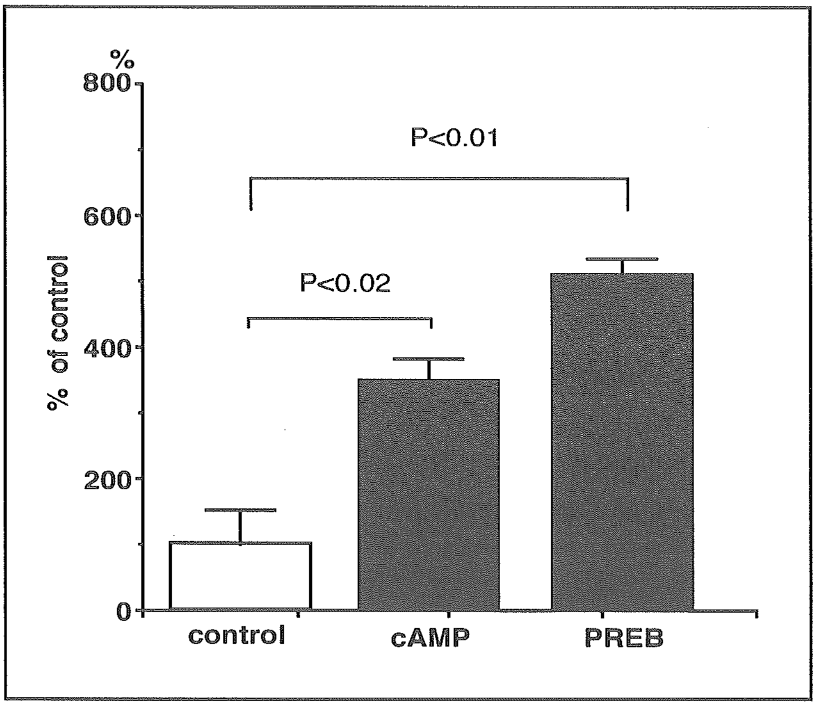


図２，　　PREB発現におよぼすcAMPの影響

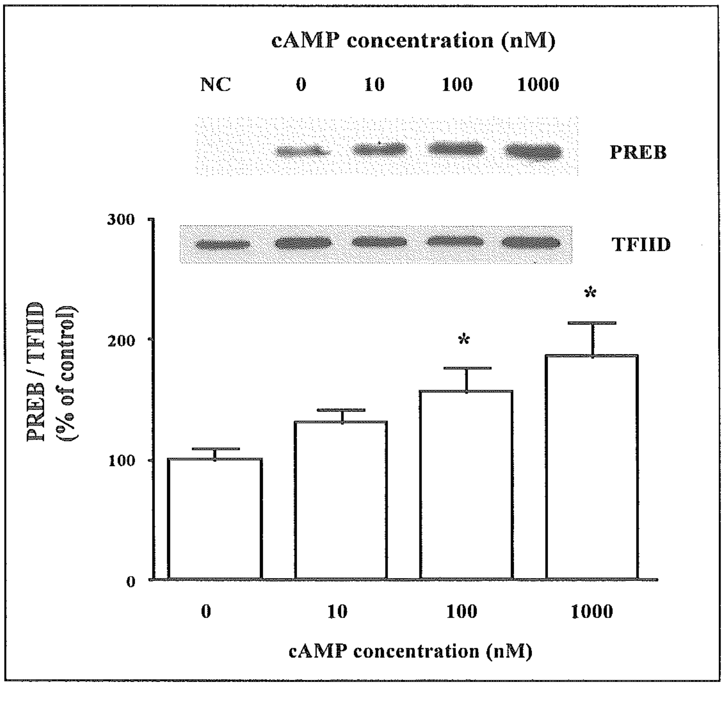


図 3,　　PREB knock-down による CLA-1 の転写活性への影響

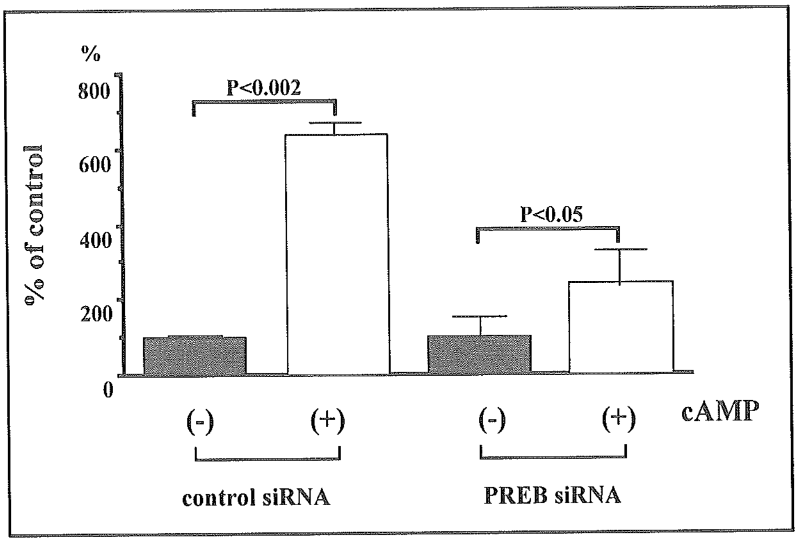
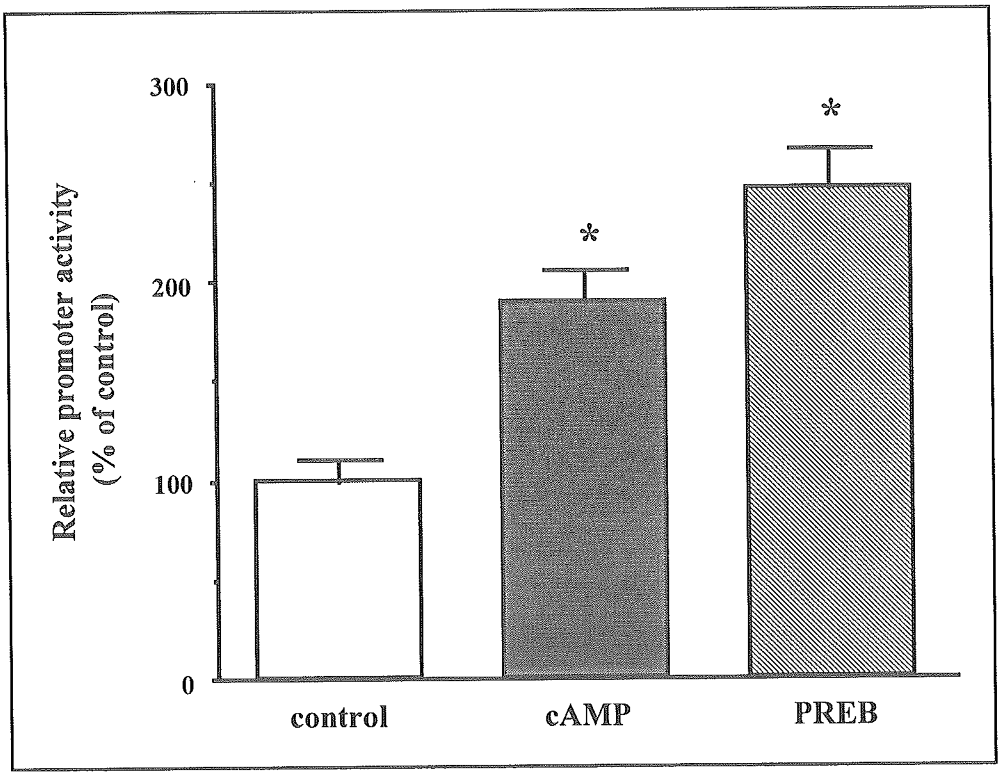


図４,　　CYP11B1 遺伝子活性におよぼす PREB の影響



内分泌攪乱物質アトラジンによる
SF-1 依存性副腎性アロマターゼ転写活性化機構

柳瀬　敏彦、范　呉強、
九州大学大学院医学研究院病態制御内科

小松　朋子、諸橋　憲一郎
自然科学研究機構基礎生物学研究所

高柳　涼一
九州大学大学院医学研究院病態制御内科

名和田　新
九州大学大学院医学研究院

【研究要旨】
atrazine はおそらく世界でも最頻用の除草剤であるが、その作用機構としてaromatase活性化を介した機序が提唱され、生態系への様々な影響が懸念されている。aromataseの活性化そのものについても明確な結論が得られていないが、今回、我々はatrazineは、SF-1の高発現を必須の条件として、aromataseの活性化を引き起こすことを見いだした。atrazine によるヒトaromatase遺伝子の転写活性化は、Promoter II を介して転写レベルで起こり、その転写活性の刺激にはAd4BP/SF-1の高発現が、必須であった。その作用機序の一端として、atrazineとSF-1の直接的結合が認められたことから、AtrazinはSF-1の外因性リガンドとして作用している可能性が示唆された。

A．研究目的

除草剤のatrazine は米国で最頻用の除草剤であり、おそらく世界中でも最頻用と考えられているが (1) 、その使用の是非をめぐり、論争の渦中にある。土壌や表面水のもっともありふれた汚染化学物質としてその広範な使用が野生ガエルの世界的な減少を含め、生態系への様々な影響を及ぼす可能性が懸念されている。Atrazineが aromatase 活性の上昇作用を介してオスガエルのメス化、半陰陽や不妊を引き起こす可能性が指摘されているが、aromatase 活性の上昇に関しては異論もある。一方では、エストロゲン依存性癌との関連で、その井戸水汚染と乳癌との関係やatrazine製造工場の周辺における高率の前立腺癌の発生等も指摘され、懸念されている。今回、我々はchloro-s-triazine 系の除草剤であるatrazine/shimazineは細胞環境によってはaromataseの活性化を引き起こすこと、すなわちその活性化には、SF-1 の高発現が必須であることを見いだしたので、その機序の解析とともに報告する。

B. 研究方法

我々は以前、NIH3T3細胞にSF-1を遺伝子導入した系においてforskolin はSF-1依存性 aromatase promoter II (ArPII) 活性を増強することを見い出し報告した(2)。今回、56種類の内分泌攪乱候補物質のうち、この系に干渉する化学物質が存在するか否かを検討した。ArPII活性の測定は既報の如く、ルシフェラーゼアッセイによった(2)。陽性と見いだされた化学物質については、SF-1依存性 ArPII 活性に対するその物質単独の効果を検討した。また、同様の検討を我々自身が樹立したaromatase発現細胞であるヒト卵巣顆粒膜細胞株KGN (3)とヒト副腎皮質際細胞癌株 H295R細胞を用いて検討した。これらの細胞におけるSF-1 の内因性の発現レベルはRT-PCR あるいは Western blottingにより検討した。一方、SF-1の外因性の過剰発現は、アデノウイルスによる発現系を用いて、SF-1 発現のためにAdx-bSF-1を、コントロールとしてAdx-LacZ をKGN細胞に感染させた(4)。H295R細胞におけるArPIIプロモーターとSF-1の相互作用の検討は既報(5)の如く、SF-1 抗体を用いた Chromatin Immunoprecipitation assay (ChIP assay)にて行なった。SF-1蛋白の産生と精製は、既報の如く(6), baculovirusの系を用いて行った。精製SF-1はamincoupling法によりsensor chip (CM5, Biacore) に固定後、Biacore T100 biosensoring system (Biacore, Tokyo) による表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いて精製SF-1蛋白と内因性リガンド16PC(1,2-dihexadecanoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine)並びに化学物質との結合の有無を検討した。

(倫理面への配慮)

in vitro 研究であり、倫理的問題はない。

C. 結果

最初のスクリーニングの結果、atrazine/simazine が、NIH3T3細胞におけるfoskolin 刺激下でのSF-1 依存性ArPII転写活性をさらに増強することが判明した。さらのこの２化学物質は単独でSF1依存性にArPII 転写活性を濃度依存性に増強したが(図１A)、10^{-5} Mにおけるその強度はfoskoliin単独の強度より、若干、弱めであった(図 1B)。また、NIH3T3細胞にSF-1を発現導入しなければ、atrazine/simazineによるこのような効果は認められなかった(図１C)。一方、ステロイド産生細胞で同様の効果を検討したところ、既に我々自身が報告しているように (7) 、KGN 細胞では atrazine/simazineによるArPII活性の増強効果が認められなかったが、 H295R (副腎癌細胞) では既報(8)のとうり、atrazineによるH295R細胞のaromatase活性の上昇を確認した (図２A)。この違いが何に由来するかを検討するために内因性のSF-1 mRNAの発現量をRT-PCRにて比較検討したところ、H295RではKGN細胞に比べ、約60倍の内因性SF-1 の高発現を認め (図２B)、蛋白レベルにおける検討でも同様であった。そこでKGN細胞にAdx-bSF-1を導入させたところ、atrazine/simazine により P450arom mRNAレベルも，アロマターゼ活性レベルも (図３A) 上昇を認めた。一方、コントロールのAdx-lacZ の発現導入では、以上の効果は認められなかった。すなわち、SF-1 の発現量の増加に伴い atrazine/simazineに対するaromatase遺伝子の反応性を回復させ得ることが判明した。H295R細胞を用いたChIP assayにより、10^{-5} M atrazine/ simazineは10^{-6} M