

SF-1/Ad4BP による新たな転写調節メカニズム

水谷 哲也, 河邊 真也, 石兼 真, 宮本 薫

福井大学医学部生命情報医科学講座分子生体情報学領域

はじめに

転写因子 Steroidogenic Factor 1/Ad4 binding protein (SF-1/Ad4BP) は, 性腺や副腎の発育・分化に必須であり, ステロイドホルモン代謝を含むさまざまな機能に重要であることが明らかになっている [1-3]. そのため SF-1/Ad4BP による転写調節メカニズムやその標的遺伝子を明らかにすることは, 性腺や副腎の機能を解明するうえで極めて重要だと考えられる. 一方, 私どもは間葉系幹細胞に SF-1/Ad4BP を導入することでステロイドホルモン産生細胞への分化誘導系を確立している [4, 5]. この分化誘導系を用いて, ①網羅的な SF-1/Ad4BP 標的遺伝子の同定と, ②核内 SF-1/Ad4BP 複合体構成タンパク質の同定を行い, 包括的に SF-1/Ad4BP の機能解析を行った. 本稿ではこれらの解析から得られた最近のデータを中心に概説する.

網羅的な SF-1/Ad4BP 標的遺伝子の同定

上述のように SF-1/Ad4BP は性腺や副腎の発生・分化およびステロイドホルモン産生を制御するマスター因子である. そのため, その標的遺伝子は副腎・性腺の形成やステロイドホルモン産生疾患の原因遺伝子として同定されているものが多い. 一方, 未だ原因遺伝子が特定されない副腎低形成, 性分化異常およびステロイドホルモン産生疾患も多く残されている. これらの原因遺伝子として新たな SF-1/Ad4BP 標的遺伝子の存在も考えられる. そこで私どもは DNA microarray と Promoter tiling array を併用したゲノムワイドな解析より, 新たな SF-1/Ad4BP 標的遺伝子の同定を試みた. その結果, 今まで SF-1/Ad4BP の標的遺伝子とは考えられていなかった 10 遺伝子を同定した [6]. その中には, glutathione S-transferase (GST) A3 [7], 5-aminolevulinic acid synthase

1 (ALAS1) [6] および ferredoxin reductase (FDXR) [8] が含まれていた.

1. GSTA ファミリー

GSTA3 を含む GSTA ファミリー (A1-A4) は約 250kb にわたりクラスターを形成している. 間葉系幹細胞および副腎由来 H295R 細胞を用いて GSTA ファミリーの発現を検討したところ, GSTA ファミリーすべての発現は SF-1/Ad4BP 依存的であった. また ChIP-on-Chip 法の解析より, GSTA1, A2 の転写開始点近傍に SF-1/Ad4BP の結合が認められなかったことから, これらの遺伝子発現は SF-1/Ad4BP 依存的な高次クロマチン構造変化を介していることが示された. この仮説を証明するために Chromosome Conformation Capture assay を行ったところ, SF-1/Ad4BP 依存的に GSTA3 上流の SF-1/Ad4BP 結合領域が GSTA1 プロモーターに近接していることが明らかとなった (図 1). また SF-1 転写活性化領域を VP16 のそれに置き換えたキメラタンパク質 (SF-1/VP16) を幹細胞に導入したところ, 転写開始点近傍に SF-1/Ad4BP が結合する GSTA3, A4 の転写は促進されたが, SF-1/Ad4BP 依存的な高次クロマチン構造変化が必要だと考えられる GSTA1, A2 の転写は促進されなかった. さらにドメインマッピングの結果, Hinge 領域がクロマチン構造変化に重要であることが示された. これらのことから, SF-1/Ad4BP の Hinge 領域を介した特異的なクロマチン構造変化が GSTA ファミリーの発現に重要であることが示された [7].

一方, GST は一般的に解毒作用を持つタンパク質として知られているが, GSTA ファミリーにはイソメラーゼ活性を有することがリコンビナントタンパク質の解析より明らかになっている [9]. しかし細胞内におけるステロイドホルモン産生の役割は明らかになっていない. そこで GSTA ファミリーのアデノウイルス発現系を構築し, その役割を検討した. 卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞を用いて, それぞれの GSTA ファミリーまたは 3β Hydroxy Steroid Dehydrogenase (3β -HSD) の過剰発現によるアンドロステンジオンおよびプロゲステロン産生における役割を検討した. その結果, GSTA ファ

連絡先: 水谷哲也, 福井大学医学部生命情報医科学講座分子生体情報学領域

〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3

TEL: 0776-61-8316

FAX: 0776-61-8102

E-mail: mizutani@u-fukui.ac.jp

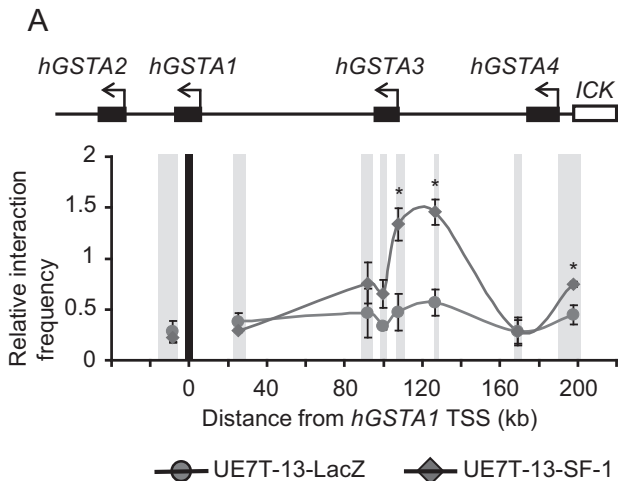


図1 GSTAファミリークラスター領域におけるSF-1依存的なクロマチン構造変化
GSTA1プロモーター領域とSF-1結合領域が3次元的に近接しているかを明らかにするために、Chromosomal Conformation Capture法を用いて検討した。その結果、アデノウィルスを用いてSF-1を導入した間葉系幹細胞(UE7T-13)では、GSTA3プロモーター領域がGSTA1プロモーター領域に近接し転写制御していることが示された。

ミラーの中でGSTA1-1とA3-3には 3β -HSDと同様、3-ケト- Δ^4 -ステロイドから3-ケト- Δ^5 -ステロイドへのイソメラーゼ活性を有していることが明らかとなった。これらのことから、GSTA1-1とA3-3が新たなステロイドホルモン代謝酵素のメンバーであることが示された[7]。

2. ALAS1

ALAS1は、ヘム生合成の律速酵素でユビキタスに発現が認められる[10]。しかしその発現は肝臓、副腎および性腺で高い。多くのステロイドホルモン代謝酵素がシトクロムP450ファミリーに属し活性部位にヘムをもつことから、高発現のALAS1がステロイドホルモン産生に寄与していると考えられた。そこでステロイドホルモン産生細胞におけるALAS1の転写調節メカニズムについて解析したところ、ALAS1転写開始点上流約3.5kb(-3.5kb領域)にSF-1/Ad4BP結合領域が存在し、この領域を介してALAS1の転写が促進されることが明らかとなった。また、副腎由来(H295RおよびY1細胞)および卵巣由来の細胞(KGN細胞)を用いてALAS1の発現を検討すると、SF-1/Ad4BPの過剰発現によりALAS1の発現が誘導され、そのノックダウンによりALAS1の発現は抑制された。以上より、ユビキタスに発現しているALAS1は、ステロイドホルモン産生細胞ではSF-1/Ad4BPによって正に転写制御されていることが示された[6]。

Liver Receptor Homolog 1 (LRH-1)はSF-1/Ad4BPと共にNR5Aファミリーに属する転写因子で、これら

は同様なDNA配列に結合し転写を調節する[11, 12]。LRH-1の卵巣特異的コンディショナルノックアウトマウスでは、排卵障害により不妊になることから、卵巣においても重要な転写因子であることが示されている[13]。一方、LRH-1は肝臓でも発現し、胆汁酸合成因子などの転写に重要なことが明らかになっている[14, 15]。LRH-1とALAS1が発現している肝臓由来HepG2細胞とKGN細胞を用いて、ALAS1の発現に対するLRH-1の影響を検討したところ、KGN細胞では-3.5kb領域にLRH-1のリクルートが認められたが、HepG2細胞では-3.5kb領域へのリクルートは認められなかった。さらにLRH-1の過剰発現において、KGN細胞ではALAS1の発現誘導が認められたが、HepG2細胞ではその影響は認められなかった。これらのことから、LRH-1によるALAS1の発現誘導には組織特異性が示された[6]。

また、私どもは転写共役因子Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Coactivator-1 α (PGC-1 α)が卵巣においてNR5Aファミリーと相互作用して転写活性を増強することを明らかにしている[16]。ALAS1においても同様、PGC-1 α がNR5Aファミリーを介して顕著に発現誘導させることを明らかにした。一方、肝臓では卵巣の場合とは異なり、そのプロモーター付近に結合したforkhead box protein O1とnuclear respiratory factor-1がPGC-1 α と相互作用することで転写が促進されると報告されている[17]。このことから、肝臓と性腺・副腎(特に卵巣)ではPGC-1 α がALAS1の転写を調節する共通の因子だが、その調節メカニズムには組織特異性が存在すると推察された[6]。

3. FDXR

FDXRはミトコンドリア内でFDX1と協調して、NADPHからP450酵素へ電子を伝達する。そのため、これらはP450_{scc}、P450_{aldo}、P450_{11 β} などのステロイド代謝酵素の活性に必須である。FDXRおよびFDX1のSF-1/Ad4BPによる転写調節メカニズムについて検討したところ、FDXRはイントロン2に存在するSF-1/Ad4BP結合領域を介して[8]、FDX1は転写開始点上流600-800ベースにSF-1/Ad4BPとcAMP responsive element binding proteinが結合し、これらが協調して転写調節していることを明らかにした[18]。一方、ミクロソームの電子伝達を行うP450シトクロムオキシドレダクターゼ(POR)においてもSF-1/Ad4BPによって発現誘導されることを明らかにしている[19]。さらにヒトPOR遺伝子変異において、ステロイドホルモン産生障害を呈することが明らかになっており、その重要性が示されて

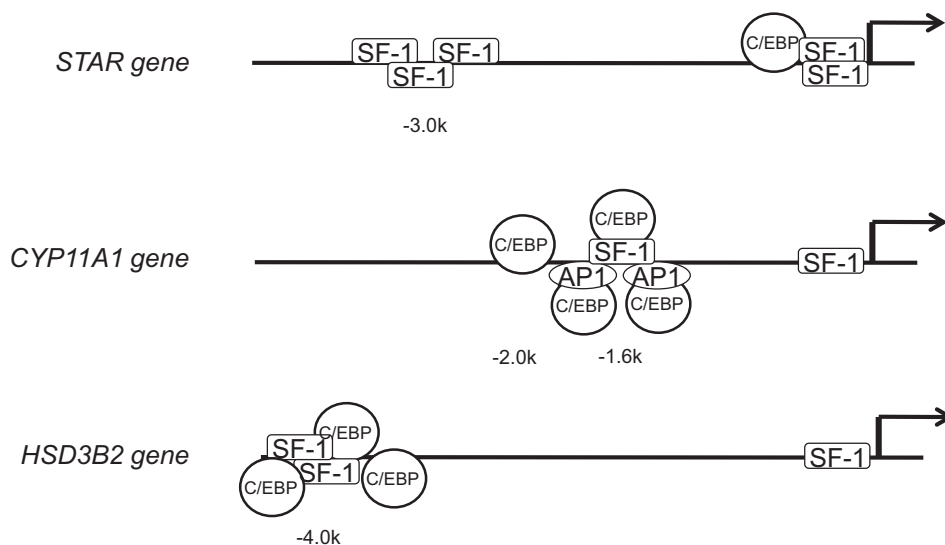


図2 SF-1とC/EBPファミリーによるプロゲステロン産生関連因子の遺伝子発現調節
ヒト *STAR*, *CYP11A1* および *HSD3B2* 遺伝子上流域における SF-1 と C/EBP ファミリー結合領域を示す。これらの遺伝子上流域には、SF-1 と C/EBP ファミリーの結合領域が近接して存在する。これらの中で、*CYP11A1* 遺伝子上流-1.6kb 付近では、C/EBP ファミリーは DNA へ結合せず SF-1 や AP1 と protein-protein interaction を介して転写制御に関与する。

いる [20, 21]。このようにミクロソームおよびミトコンドリア内における P450 酵素への電子伝達系においても、SF-1/Ad4BP によって調節されていると推察された。

核内 SF-1/Ad4BP 複合体構成タンパク質の同定

転写因子が標的遺伝子の転写を調節する際、さまざまなタンパク質とともに複合体を形成することで作用を発揮する。そのため、転写因子複合体を構成するタンパク質を同定することは、その機能を理解するうえで重要である。そこでアフィニティークロマトグラフィーと MALDI-TOF MS/MS 解析より SF-1 複合体構成因子の同定を試みたところ、24 の SF-1 複合体構成因子を同定した [22]。その中には、転写関連因子以外にも DNA 修復因子や RNA 結合タンパク質なども含まれていた。私どもはこれらのタンパク質の中から転写因子 CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP β) に着目した。C/EBP β (および C/EBP α) は、Preovulatory Follicle で LH サージによって誘導される転写因子で、これらの遺伝子改変マウスの解析より排卵および黄体形成に必須であることが明らかになっている [23-25]。しかしながら、その分子機構はほとんど明らかになっていない。そこで C/EBP β の機能解析として、プロゲステロン産生に対する影響を検討した。KGN 細胞を用いて C/EBP β ノックダウンによるステロイドホルモン産生に対する影響を検討したところ、cAMP 刺激時のプロゲステロン産生が顕著に減少した。このことから C/EBP β がプロゲステロ

ン産生に必須な因子である *STAR*, *CYP11A1* および *HSD3B2* のすべてまたはその一部の遺伝子発現に影響を及ぼしていると推察された。そこでこれらの遺伝子発現に対する影響を検討したところ、すべての遺伝子が C/EBP β によって転写制御されていることが示された。さらにこれらの遺伝子上流域には SF-1/Ad4BP と C/EBP β の結合領域が近接して存在し、SF-1/Ad4BP と C/EBP β が協調することで転写調節していることが明らかとなった(図2)。以上より、C/EBP β (および C/EBP α) は SF-1/Ad4BP (および LRH-1) とともに転写レベルでプロゲステロン産生を調節する重要な転写因子であることが示された。

おわりに

SF-1/Ad4BP は、ステロイド代謝酵素の転写調節因子として発見されたが、多くの研究によりその機能は多岐にわたることが明らかになっている。本稿でも示すように、ステロイドホルモン産生を間接的に支える因子も SF-1/Ad4BP (および LRH-1) により転写制御を受け、効率的にステロイドホルモン産生を調節している。またステロイドホルモン産生のみならず、SF-1/Ad4BP 発現細胞の維持や分化に重要であることが示唆されている。今後、さらなる SF-1/Ad4BP の解析より、予想外の機能や重要性が明らかになっていくと考えられる。

引用文献

1. Morohashi KI, Omura T (1996) Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB J* 10, 1569-1577.
2. Parker KL, Schimmer BP (1997) Steroidogenic factor 1: A key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18, 361-377.
3. Schimmer BP, White PC (2010) Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Mol Endocrinol* 24, 1322-1337.
4. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K (2006) Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology* 147, 4104-4111.
5. Miyamoto K, Yazawa T, Mizutani T, Imamichi Y, Kawabe S, Kanno M, Matsumura T, Ju Y, Umezawa A (2011) Stem cell differentiation into steroidogenic cell lineages by NR5A family. *Mol Cell Endocrinol* 336, 123-126.
6. Ju Y, Mizutani T, Imamichi Y, Yazawa T, Matsumura T, Kawabe S, Kanno M, Umezawa A, Kangawa K, Miyamoto K (2012) Nuclear receptor 5A (NR5A) family regulates 5-aminolevulinic acid synthase 1 (ALAS1) gene expression in steroidogenic cells. *Endocrinology* 153, 5522-5534.
7. Matsumura T, Imamichi Y, Mizutani T, Ju Y, Yazawa T, Kawabe S, Kanno M, Ayabe T, Katsumata N, Fukami M, Inatani M, Akagi Y, Umezawa A, Ogata T, Miyamoto K (2013) Human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes are regulated by steroidogenic factor 1 (SF-1) and are involved in steroidogenesis. *FASEB J* 27, 3198-3208.
8. Imamichi Y, Mizutani T, Ju Y, Matsumura T, Kawabe S, Kanno M, Yazawa T, Miyamoto K (2014) Transcriptional regulation of human ferredoxin reductase through an intronic enhancer in steroidogenic cells. *Biochim Biophys Acta* 1839, 33-42.
9. Johansson AS, Mannervik B (2001) Human glutathione transferase A3-3, a highly efficient catalyst of double-bond isomerization in the biosynthetic pathway of steroid hormones. *J Biol Chem* 276, 33061-33065.
10. May BK, Dogra SC, Sadlon TJ, Bhasker CR, Cox TC, Bottomley SS (1995) Molecular regulation of heme-biosynthesis in higher vertebrates. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 51, 1-51.
11. Fayard E, Auwerx J, Schoonjans K (2004) LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol* 14, 250-260.
12. Krylova IN, Sablin EP, Moore J, Xu RX, Waitt GM, MacKay JA, Juzumiene D, Bynum JM, Madauss K, Montana V, Lebedeva L, Suzawa M, Williams JD, Williams SP, Guy RK, Thornton JW, Fletterick RJ, Willson TM, Ingraham HA (2005) Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120, 343-355.
13. Duggavathi R, Volle DH, Matakci C, Antal MC, Messaddeq N, Auwerx J, Murphy BD, Schoonjans K (2008) Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Genes Dev* 22, 1871-1876.
14. Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, Galardi C, Wilson JG, Lewis MC, Roth ME, Maloney PR, Willson TM, Kliewer SA (2000) A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell* 6, 517-526.
15. Lu TT, Makishima M, Repa JJ, Schoonjans K, Kerr TA, Auwerx J, Mangelsdorf DJ (2000) Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6, 507-515.
16. Yazawa T, Inaoka Y, Okada R, Mizutani T, Yamazaki Y, Usami Y, Kuribayashi M, Orisaka M, Umezawa A, Miyamoto K (2010) PPAR-gamma coactivator-1alpha regulates progesterone production in ovarian granulosa cells with SF-1 and LRH-1. *Mol Endocrinol* 24, 485-496.
17. Handschin C, Lin J, Rhee J, Peyer AK, Chin S, Wu PH, Meyer UA, Spiegelman BM (2005) Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. *Cell* 122, 505-515.
18. Imamichi Y, Mizutani T, Ju Y, Matsumura T, Kawabe S, Kanno M, Yazawa T, Miyamoto K (2013) Transcriptional regulation of human ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 370, 1-10.
19. Inaoka Y, Yazawa T, Mizutani T, Kokame K, Kangawa K, Uesaka M, Umezawa A, Miyamoto K (2008) Regulation of P450 oxidoreductase by gonadotropins in rat ovary and its effect on estrogen production. *Reprod Biol Endocrinol* 6, 62.
20. Fukami M, Nishimura G, Homma K, Nagai T, Hanaki K, Uematsu A, Ishii T, Numakura C, Sawada H, Nakacho M, Kowase T, Motomura K, Haruna H, Nakamura M, Ohishi A, Adachi M, Tajima T, Hasegawa Y, Hasegawa T, Horikawa R, Fujieda K, Ogata T (2009) Cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: identification and characterization of biallelic mutations and genotype-phenotype correlations in 35 Japanese patients. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 1723-1731.
21. Soneda S, Yazawa T, Fukami M, Adachi M, Mizota M, Fujieda K, Miyamoto K, Ogata T (2011) Proximal promoter of the cytochrome P450 oxidoreductase gene: identification of microdeletions involving the untranslated exon 1 and critical function of the SP1 binding sites. *J Clin Endocrinol Metab* 96, E1881-1887.
22. Mizutani T, Ju Y, Imamichi Y, Osaki T, Yazawa T, Kawabe S, Ishikane S, Matsumura T, Kanno M, Kamiki Y, Kimura K, Minamino N, Miyamoto K (2014) C/EBPbeta (CCAAT/enhancer-binding protein beta) mediates progesterone production through transcriptional regulation in co-operation with SF-1 (steroidogenic factor-1). *Biochem J* 460, 459-471.
23. Sterneck E, Tessarollo L, Johnson PF (1997) An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev* 11, 2153-2162.
24. Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS (2009) MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 324, 938-941.
25. Fan HY, Liu Z, Johnson PF, Richards JS (2011) CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP) -alpha and -beta are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Mol Endocrinol* 25, 253-268.