

核内受容体 *Ad4BP/SF-1* による ステロイドホルモン産生の統括的制御

馬場 崇¹⁾, 大竹 博之¹⁾, 井上 実紀¹⁾, 佐藤 哲也²⁾, 石原 康宏³⁾, 宮林香奈子¹⁾
嶋 雄一¹⁾, 山崎 岳³⁾, 須山 幹太²⁾, Choi Man-Ho⁴⁾, 大川 恭行⁵⁾, 諸橋憲一郎¹⁾

- 1) 九州大学大学院医学研究院分子生命科学系部門性差生物学講座
- 2) 九州大学生体防御医学研究所情報生物学分野
- 3) 広島大学大学院総合科学研究科分子脳科学研究室
- 4) Korea Institute of Science and Technology
- 5) 九州大学生体防御医学研究所トランスクリプトミクス分野

はじめに

コレステロールは生体膜の構成要素であり、膜の正常な機能発現に必須である。生体膜の機能異常はさまざまな障害を引き起こすことから、細胞内のコレステロール量は厳密に制御されている。これまでに転写因子 SREBP-2がコレステロールの恒常性維持のキーファクターであることが示されている。生体膜の構成要素であることに加え、コレステロールはステロイドホルモン（性ホルモン、および副腎皮質ホルモン）の合成に利用される。コレステロールはすべての細胞で合成されるのに対し、ステロイドホルモンは生殖腺や副腎皮質に存在するステロイド産生細胞のみで合成される。このことは、ステロイド産生細胞特異的なコレステロール供給システムの存在を予想させた。そして実際に、ステロイド産生のキーファクターである *Ad4BP/SF-1*（下記）が、ステロイドホルモン産生刺激にตอบสนองして HDL 受容体遺伝子の転写を活性化することにより、細胞内へのコレステロールの取り込みを促進することが示された [1]。しかし、ステロイド産生細胞におけるコレステロール合成制御とステロイド産生制御の関連に関する詳細はこれまでに不明であった。

Ad4BP/SF-1 (NR5A1) は、副腎皮質や生殖腺のステロイド産生細胞に特異的な発現を示す核内受容体型転写因子である [2-6]。従来の研究から、本因子はコレステロールからステロイドホルモンまでの代謝に関与するすべての酵素遺伝子の発現を制御することが示されている [7-9]。加えて、ノックアウトマウスの解析から、副腎

および生殖腺の発現に必要不可欠であることが示された [10-13]。一方、過剰発現マウスにおいては副腎の肥大化および腫瘍化が引き起こされることから、*Ad4BP/SF-1* は細胞増殖制御に重要な役割を果たすことがわかったが、その分子メカニズムに関しては不明であった [14-17]。そこでわれわれは、トランスクリプトームおよび ChIP-sequence による標的遺伝子の網羅的な同定を通じ、*Ad4BP/SF-1* による細胞増殖制御メカニズムの解明を行った。その結果、*Ad4BP/SF-1* はグルコース代謝（解糖系およびペントースリン酸経路）を制御することにより、細胞内エネルギーである ATP、および電子供与体である NADPH の供給に重要な役割を果たしていることがわかった [18]。*Ad4BP/SF-1* はこれら補酵素の供給を通じて、細胞増殖に寄与していると考えられた。

ステロイド産生細胞の代謝制御を *Ad4BP/SF-1* を中心に考えるうえでさらに興味深い点は、グルコース代謝の最終産物であるピルビン酸はアセチル CoA に変換された後、数段階の代謝過程を経ることで、コレステロールに変換されるという点である（図 1）。前述のとおり、*Ad4BP/SF-1* はコレステロールからステロイドホルモンまでの代謝、およびグルコースからピルビン酸までの代謝を制御する。もし、*Ad4BP* がアセチル CoA からコレステロールまでの代謝の制御も行うとすると、グルコースからステロイドホルモンまでの代謝系全体を制御するということになる（図 1）。このようなステロイド産生細胞特異的な代謝制御系の存在の可能性を検証すべく本研究を行った。

Ad4BP/SF-1 のノックダウンにより、すべてのコレステロール合成遺伝子群の発現が低下する

マウス副腎皮質由来の細胞株 Y-1 に siRNA を導入し、*Ad4BP/SF-1* のノックダウン (*Ad4BP* KD) を行った。

連絡先：馬場 崇，九州大学大学院医学研究院分子生命科学系部門性差生物学講座
〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3 丁目 1-1
TEL：092-642-6183
FAX：092-642-6182
E-mail：takbaba@cell.med.kyushu-u.ac.jp

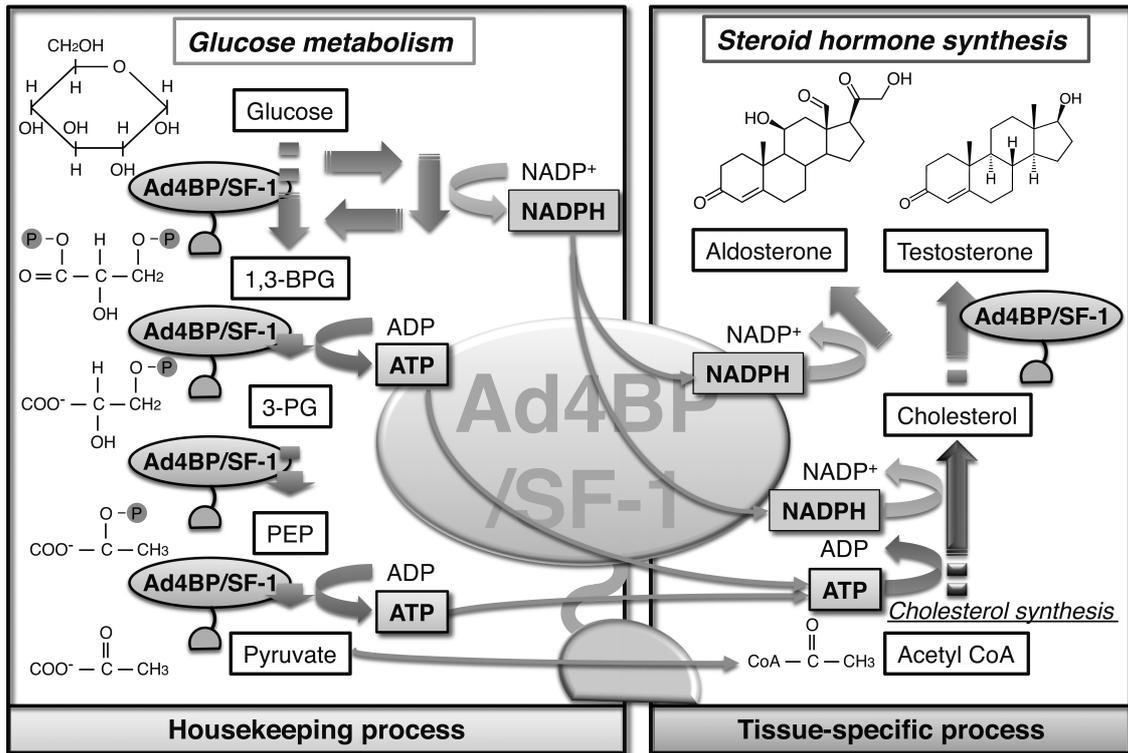


図1 グルコースからステロイドホルモンまでの代謝の概略
*Ad4BP/SF-1*はコレステロールからステロイドホルモンまでの代謝、およびグルコースからピルビン酸までの代謝を制御する。コレステロール合成の出発物質となるアセチル CoAの一部は、グルコース代謝の最終産物であるピルビン酸の代謝により供給される。

表1 *Ad4BP* KDによるコレステロール合成系遺伝子群の発現低下トランスクリプトーム解析の結果の概要を示す。*Ad4BP* KDおよびコントロールのY-1細胞におけるトランスクリプトーム解析の結果を比較した。コレステロール合成系を構築する遺伝子群の発現が、*Ad4BP* KDにより低下していることがわかる。

Y-1			
gene name	Control	<i>Ad4BP</i> KD	Ratio
<i>Acat2</i>	68.0	35.0	0.51
<i>Hmgcs1</i>	267.3	138.7	0.52
<i>Hmgcr</i>	131.1	66.0	0.50
<i>Mvk</i>	38.2	29.1	0.76
<i>Pmvk</i>	46.3	30.2	0.65
<i>Mvd</i>	94.2	40.1	0.43
<i>Fdps</i>	467.2	233.7	0.50
<i>Idi1</i>	171.6	100.8	0.59
<i>Fdft1</i>	67.2	39.3	0.58
<i>Sqle</i>	221.2	111.6	0.50
<i>Lss</i>	56.7	27.9	0.49
<i>Cyp51</i>	131.9	67.7	0.51
<i>Tm7sf2</i>	38.0	43.3	1.14
<i>Msmo1</i>	381.8	218.0	0.57
<i>Nsdhl</i>	72.6	49.9	0.69
<i>Hsd17b7</i>	25.7	23.4	0.91
<i>Ebp</i>	48.9	37.6	0.77
<i>Sc5d</i>	110.6	60.6	0.55
<i>Dhcr7</i>	101.7	46.9	0.46
<i>Dhcr24</i>	136.1	93.3	0.69
			1/3 3.0

そして、mRNA-sequenceによるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、非常に興味深いことに、アセチル CoA からコレステロールまでの代謝系を構築する遺伝子群の発現が、*Ad4BP* KDにより顕著な低下を示した(表1, 図2)。また、ChIP-sequenceにより *Ad4BP/SF-1*のコレステロール合成遺伝子群への結合を解析したところ、およそ半数のコレステロール合成遺伝子座に結合が認められた(図3)。以上の結果から、コレステロール合成遺伝子群は *Ad4BP/SF-1*による転写制御を受け、少なくともその半数は直接制御されるということがわかった。

*Ad4BP/SF-1*は細胞のコレステロール合成を制御する

次に、*Ad4BP/SF-1*が遺伝子発現制御を介してコレステロール合成の制御を行うかについて検証した。細胞に取り込まれた酢酸はアセチル CoAに変換される。そこで、¹⁴C 標識酢酸を細胞に取り込ませ、その代謝によって合成された¹⁴C コレステロールの定量を行うことによりその合成能を評価した。その結果、*Ad4BP* KDにより、コレステロール合成能が低下することがわかった(図

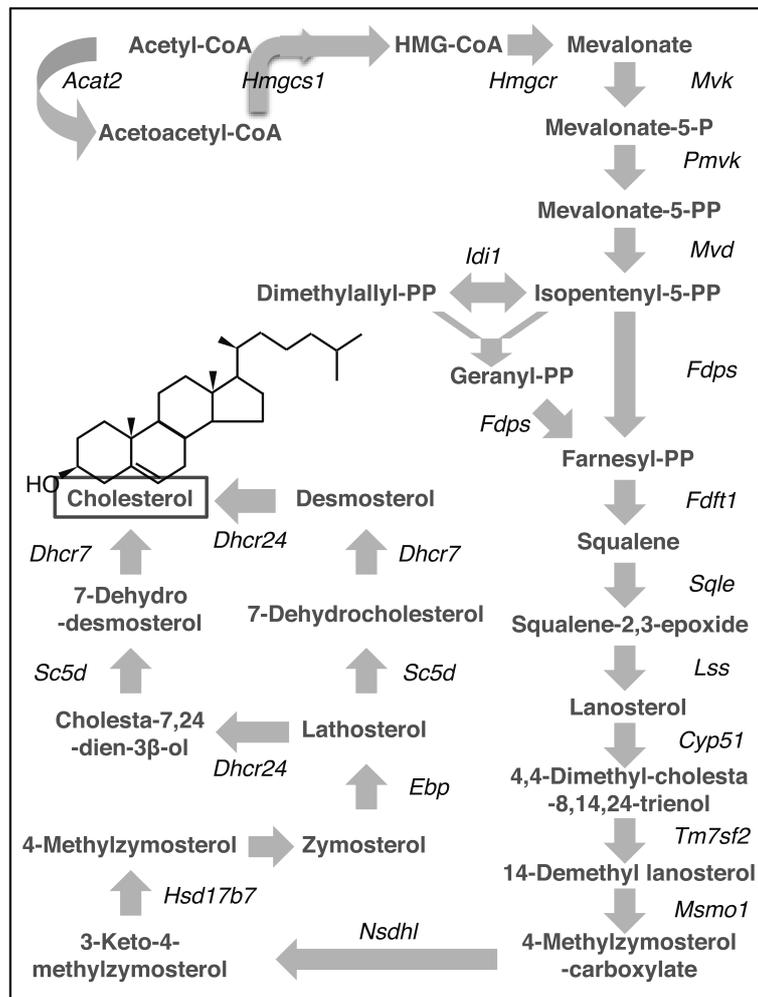


図2 アセチル CoA からコレステロールまでの代謝経路
コレステロールは20段階の代謝反応を経てアセチル CoA から合成される。

4). また、コレステロール合成の中間代謝産物 (Lanosterol, Lathosterol, Desmosterol, 7-DHC) の定量を行ったところ、*Ad4BP* KD により顕著に低下することがわかった。以上により、*Ad4BP/SF-1* は遺伝子発現制御を介してコレステロール合成をまさに制御することがわかった。

Ad4BP/SF-1 はコレステロールのミトコンドリアへの輸送を制御する

アセチル CoA からコレステロールへの代謝は主に小胞体で行われる。一方、コレステロールからステロイドホルモンへの代謝はミトコンドリア内膜で開始するため、コレステロールは小胞体からミトコンドリアへと輸送される必要がある。これまでに、ミトコンドリア外膜から内膜への輸送は StAR タンパク質が行っていること、そして *Star* 遺伝子は *Ad4BP/SF-1* によって制御さ

れることが知られている。小胞体からミトコンドリア外膜への輸送の仕組みに関しては長らく不明であったが、近年ミトコンドリア外膜タンパクである HUMMR がこの輸送を制御するとの報告がなされた [19]。そこで HUMMR も *Ad4BP/SF-1* の標的遺伝子である可能性について検討した。その結果、HUMMR をコードする *Mgar* 遺伝子が *Ad4BP/SF-1* の標的遺伝子であること (図5)、そして *Ad4BP* KD によりミトコンドリアのコレステロール量が顕著に減少することがわかった。以上により、*Ad4BP/SF-1* がアセチル CoA からコレステロールへの代謝制御に加え、小胞体からミトコンドリア内膜へのコレステロール輸送を制御することがわかった。

まとめ

従来の研究、および近年のわれわれの成果により、*Ad4BP/SF-1* はグルコースからステロイドホルモンに至る代

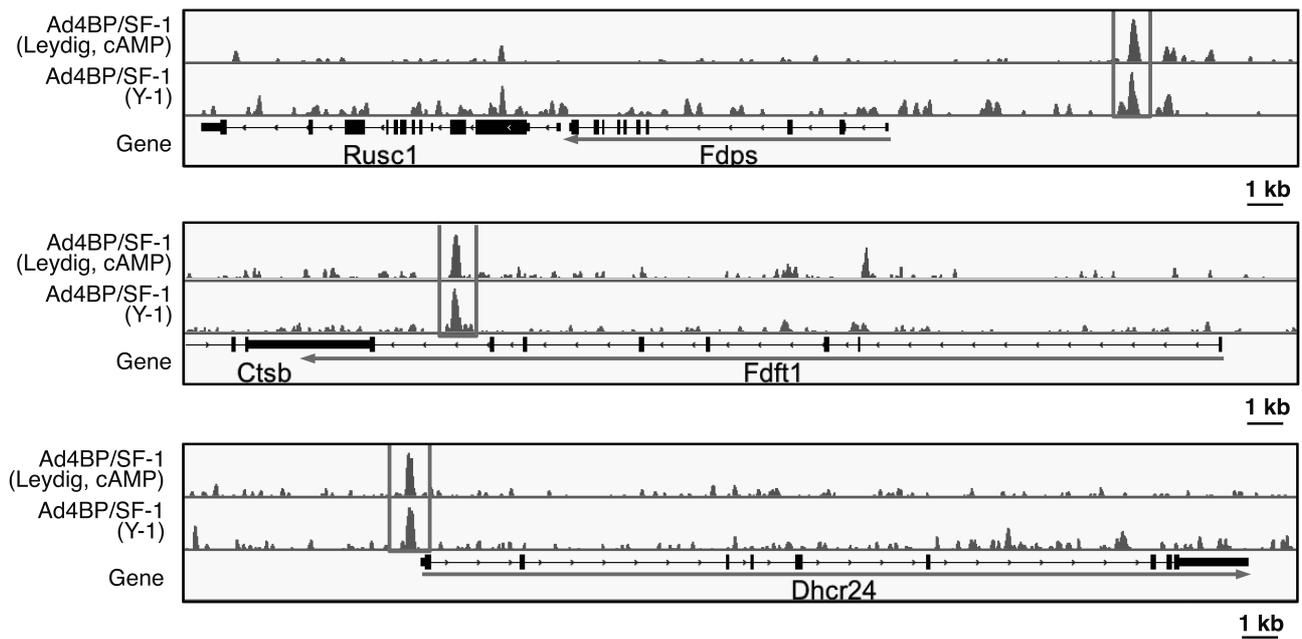


図3 *Ad4BP/SF-1*のコレステロール合成系遺伝子座への結合
ChIP-sequenceにより *Ad4BP/SF-1*の結合領域をゲノムワイドに同定した。コレステロール合成系遺伝子座への *Ad4BP/SF-1*の結合が示された。ここでは代表的な例として、*Fdps*, *Fdft1*および *Dhcr24*遺伝子座への *Ad4BP/SF-1*の結合を示す。

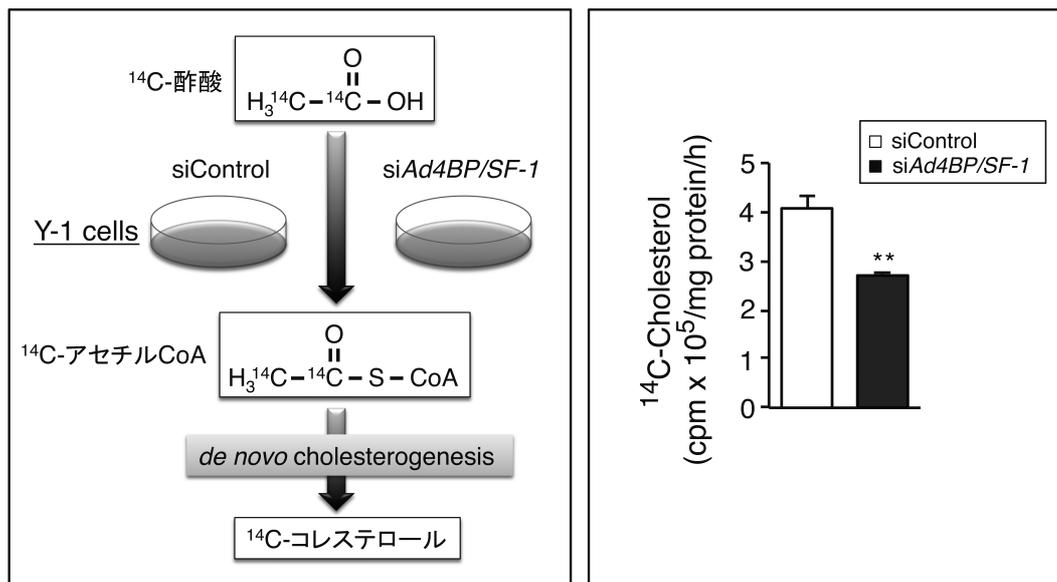


図4 *Ad4BP/SF-1*によるコレステロール合成の制御
 ^{14}C 標識酢酸を細胞に取り込ませ、その代謝によって合成された ^{14}C コレステロールの定量を行うことによりコレステロール合成能を評価した。その結果、*Ad4BP* KDにより、コレステロール合成能が低下することがわかった。

謝経路の全体を制御することが明らかとなった(図6)。このように、1つの転写因子が複数の代謝経路(解糖系, コレステロール合成系, ステロイドホルモン産生系)を一斉に制御する意義は何であろうか? アセチル CoA を材料としたコレステロール合成, コレステロールを材料としたステロイドホルモン合成には、それぞれ補酵素として ATP および NADPH が必要である。これらの補酵

素はグルコース代謝によって産生される(図1)。よって、*Ad4BP/SF-1*はグルコースからステロイドホルモンまでの代謝経路全体を統括的に制御することで、ATP および NADPH の供給と消費のバランスを調整し、効率的なステロイドホルモン産生を可能にしていると考えられる。このような視点で考えると、ステロイドホルモン産生経路の開始点はコレステロールではなくグルコー

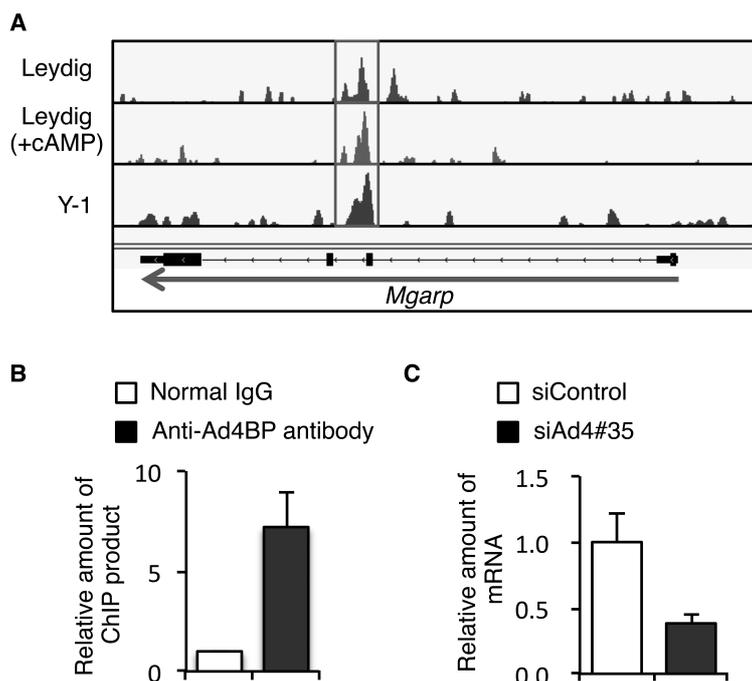


図5 *Ad4BP/SF-1*によるコレステロール輸送の制御
 A: ChIP-sequenceにより, *Ad4BP/SF-1*のHUMMRをコードする *Mgarp* 遺伝子座への結合が示された。
 B: *Ad4BP/SF-1*の *Mgarp* 遺伝子座への結合を ChIP-qPCR で確認した。
 C: *Ad4BP* KDにより *Mgarp* 遺伝子の発現は顕著な低下を示した。

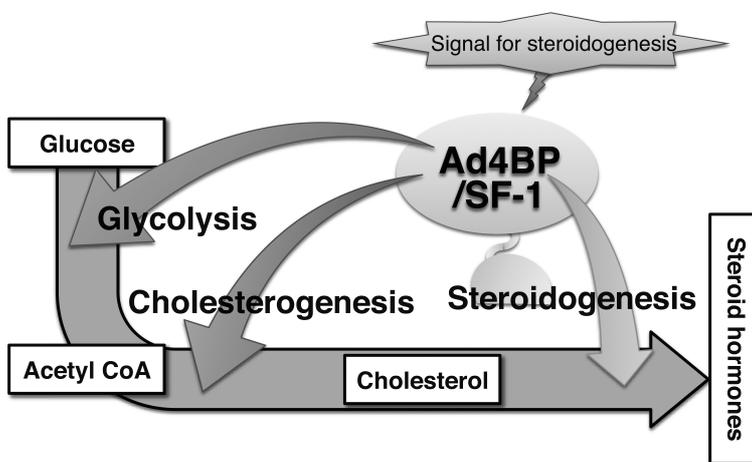


図6 *Ad4BP/SF-1*によるステロイドホルモン産生の統括的な制御
*Ad4BP/SF-1*はグルコースからステロイドホルモンへと至る代謝経路の全体を統括的に制御する。

スであるにとらえることも可能であり, そもそも解糖系, コレステロール合成系, およびステロイドホルモン産生系と代謝経路を区別して考えること自体が不必要なのかもしれない (図6)。

また今回われわれは, *Ad4BP/SF-1*が代謝の制御に加え, コレステロールの輸送制御も行うことを明らかにした。いくら代謝経路を活性化したとしても, その材料と

なる物質が運ばれてこない限り代謝は起こらないので, 代謝と輸送が同時に制御されるというのは理にかなっている。以上のように, ステロイド産生細胞の最も重要な機能であるステロイドホルモンの産生に向けて, 関連するすべてのプロセスが1つの転写因子 *Ad4BP/SF-1*により統括的に制御されているということが明らかとなった。今後はこのような制御の意義を個体レベルで明らか

にしていくつもりである。また, *Ad4BP/SF-1*と同じDNA配列に結合する核内受容体型転写因子が複数存在し, そのいくつかに関しては代謝制御を行うことが報告されている [20, 21]。これらの核内受容体が, それぞれの発現組織 (細胞) でどのような代謝経路を制御しているのかという点も興味深い。

引用文献

1. Cao G, Zhao L, Stangl H, et al (1999) Developmental and hormonal regulation of murine scavenger receptor, class B, type 1. *Mol Endocrinol* 13, 1460-1473.
2. Hammer GD, Parker KL, Schimmer BP (2005) Minireview: transcriptional regulation of adrenocortical development. *Endocrinology* 146, 1018-1024.
3. Hatano O, Takayama K, Imai T, et al (1994) Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. *Development* 120, 2787-2797.
4. Hoivik EA, Lewis AE, Aumo L, et al (2010) Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). *Mol Cell Endocrinol*, 315, 27-39.
5. Morohashi K, Honda S, Inomata Y, et al (1992) A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J Biol Chem* 267, 17913-17919.
6. Val P, Lefrançois-Martinez AM, Veyssi re G, et al (2003) SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept* 1, 8.
7. Clemens JW, Lala DS, Parker KL, et al (1994) Steroidogenic factor-1 binding and transcriptional activity of the cholesterol side-chain cleavage promoter in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134, 1499-1508.
8. Morohashi K, Zanger UM, Honda S, et al (1993) Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *Mol Endocrinol* 7, 1196-1204.
9. Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou M et al (1996) Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry* 35, 9052-9059.
10. Luo X, Ikeda Y, Parker KL (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481-490.
11. 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.
12. Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, et al (1995) Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10939-10943.
13. Shinoda K, Lei H, Yoshii H, et al (1995) Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dyn* 204, 22-29.
14. Almeida MQ, Soares IC, Ribeiro TC, et al (2010) Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 1458-1462.
15. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, et al (2007) Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol* 21, 2968-2987.
16. Sbiera S, Schmill S, Assie G, et al (2010) High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 95, E161-171.
17. Zubair M, Oka S, Parker KL, et al (2009) Transgenic expression of Ad4BP/SF-1 in fetal adrenal progenitor cells leads to ectopic adrenal formation. *Mol Endocrinol* 23, 1657-1667.
18. Baba T, Otake H, Sato T, et al (2014) Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Nat Commun* 5, 3634.
19. Jinn S, Brandis KA, Ren A, et al (2015) snoRNA U17 regulates cellular cholesterol trafficking. *Cell Metab* 21, 855-867.
20. Charest-Marcotte A, Dufour CR, Wilson BJ, et al (2010) The homeobox protein Prox1 is a negative modulator of ERR {alpha}/PGC-1 {alpha} bioenergetic functions. *Genes Dev* 24, 537-542.
21. Chaveroux C, Eichner LJ, Dufour CR, et al (2013) Molecular and genetic crosstalks between mTOR and ERRalpha are key determinants of rapamycin-induced nonalcoholic fatty liver. *Cell Metab* 17, 586-598.