



ステロイド合成律速因子であるコレステロール輸送タンパク質 StAR の新たな転写調節機構

1. はじめに

ステロイドホルモンは主に副腎および性腺で産生される脂溶性ホルモンである。副腎からはグルココルチコイド、ミネラルコルチコイドが産生され、それぞれエネルギー代謝や抗炎症作用および電解質代謝を調節する。また性腺からはプロゲステロン、アンドロゲン、エストロゲンが産生され、性腺の分化や機能維持のみならず多くの組織に作用しさまざまな生理作用を調節している。これらすべてのステロイドホルモンは、ミトコンドリア内に局在する酵素 P450_{sc} によってプレグネノロンへと代謝されることから始まる。しかしコレステロールはミトコンドリア膜を透過できないため、それを細胞質からミトコンドリア内へと輸送するタンパク質 steroidogenic acute regulatory protein (StAR) が必要となる。実際 StAR 遺伝子の変異により、コレステロールがミトコンドリア内に輸送されないため、副腎・性腺でステロイドホルモンが産生されず、出生時より副腎不全および性分化異常を伴う。

一方、筆者らの研究室では脂肪や骨などへの分化能を有する骨髄幹細胞が、ステロイドホルモン産生細胞への分化能も有すること、さらに間葉系幹細胞に転写因子 steroidogenic factor-1/adrenal 4 binding protein (SF-1) や liver receptor homolog-1 (LRH-1) を導入することにより効率よくステロイドホルモン産生細胞へ分化誘導させ、生体内同様 cAMP 刺激によりステロイドホルモン産生を増強する細胞の創出に成功している^{1,2)}。この成果は、ステロイドホルモン産生低下症に対する再生医療法の開発へと道を拓くと共に副腎や性腺の発生・分化のメカニズムを解析する有用なツールであると考えられる。本稿では StAR の転写調節機

構について、筆者らが間葉系幹細胞からの分化誘導系を用いて明らかにした新たなメカニズムを中心に概説する。

2. StAR 遺伝子上流の新たな SF-1 結合領域の同定とその転写活性

StAR はステロイドホルモン産生器官である副腎および性腺で発現しており、下垂体ホルモン（副腎へは副腎皮質刺激ホルモン、性腺へは黄体形成ホルモンおよび卵胞刺激ホルモン）により早期に発現誘導され、ステロイドホルモン産生を律速的に調節している。現在までに、多くの転写因子が StAR の発現調節に関与していることが報告されており、その中で SF-1 が StAR の転写調節に中心的な役割を担っていることが明らかとなっている。

転写因子 SF-1 は、ステロイドホルモンの代謝酵素をはじめステロイド産生に関連する遺伝子のプロモーター領域にその結合配列が存在しており、これらの転写に重要であることが明らかになっている^{3,4)}。さらに SF-1 のノックアウトマウスでは副腎・性腺が形成されないことから、ステロイド産生のみならず副腎や性腺の発生・分化に必須であることも明らかになっている⁵⁾。実際、様々な種においても StAR プロモーター領域で SF-1 の結合領域が同定されており、この領域が転写活性に重要であることが報告されている。そのため StAR の転写は、そのプロモーター付近（転写開始点より約 150base）を中心に制御されていると長い間考えられてきた⁶⁾。

上述のように、筆者らは間葉系幹細胞に SF-1 を導入することでステロイドホルモン産生細胞へと分化誘導することに成功している。そこで SF-1 によって引き起こされる分化誘導時にどのようなクロマチン構造変換を伴うのか検討し、その分子メカニズムを解明しようとした。まず SF-1 結合領域をゲノムワイドに明らかにするために、Flag SF-1 導入幹細胞を用いて抗 Flag 抗体により ChIP-on-Chip アッセイを行った。その結果、StAR 遺伝子近傍では転写開始点のみならず上流 3 kb、15 kb 付近において新たな SF-1 結合領域が同定された。この領域の転写活性化能をルシフェラーゼアッセイにより検討してみると、上流 3 kb 付近の SF-1 結合領域のみが転写活性化能を有することから、この領域が StAR の転写を調節する新たな領域 (distal control region) であることが示唆された。またさまざまな長さのレポーターや SF-1 結合領域の点変異レポーターを用いた解析より、新たな SF-1 結合領域が転写の活性化に重要であることが明らかとなった (図 1(A))。さらにこの領域は、内在性に SF-1 を発現するヒト卵巣顆粒膜

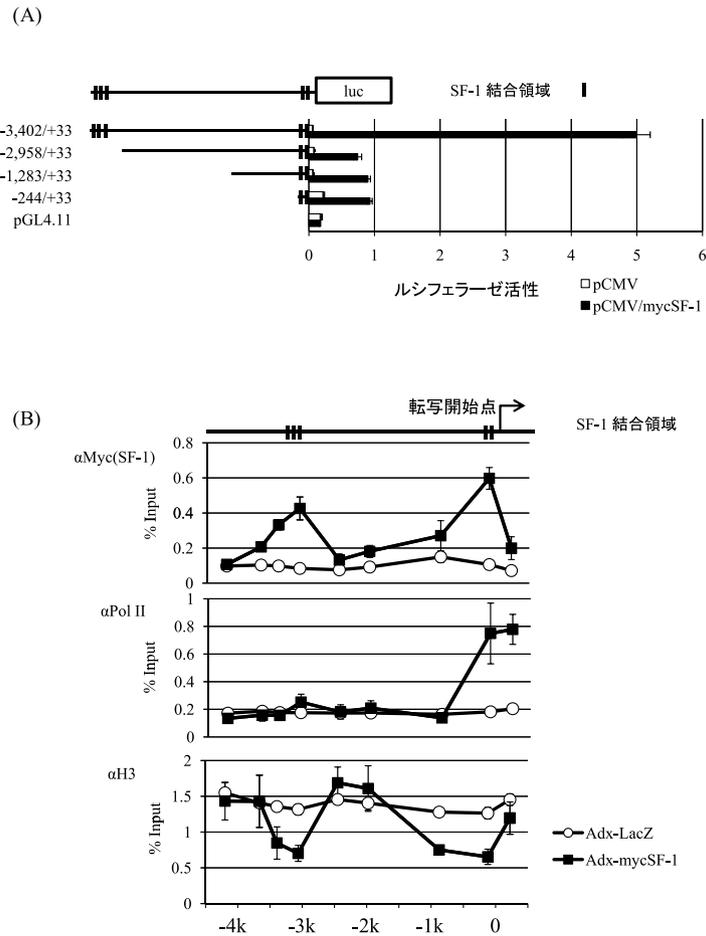


図1 ヒト *StAR* 遺伝子の新規 SF-1 結合領域における転写活性とクロマチン構造変換

- (A) ヒト *StAR* 遺伝子の新規 SF-1 結合領域は転写活性に重要である
 HEK293 細胞に、様々な長さの *StAR* プロモーター領域を含むルシフェラーゼベクターと SF-1 発現ベクター（またはコントロールベクター）を導入し、その影響を検討した。その結果、新たに同定した上流約 3 kb の SF-1 結合領域が転写活性に重要であることが示された。
- (B) ヒト *StAR* 遺伝子の SF-1 結合領域では、nucleosome eviction が引き起こされる
 ヒト間葉系幹細胞株 UE7T13 細胞に GFP または myc タグ付 SF-1 発現用アデノウイルスを感染後、*StAR* 転写開始点上流 4.5 kb までの myc (SF-1)、RNA polymerase II (Pol II) およびヒストン H3 量を ChIP 法により検討した。その結果、幹細胞への SF-1 導入により、プロモーター領域のみならず上流 3 kb 付近においても SF-1 の結合に依存して nucleosome eviction が引き起こされることを見出した。

細胞腫由来 KGN 細胞においても転写活性に重要であることが示されたことから、distal control region に存在する新たな SF-1 結合領域が内在性にステロイドホルモンを産生する細胞においても、重要であることが明らかとなった⁷⁾。

3. SF-1 による *StAR* 遺伝子のクロマチン構造変換

クロマチン構造変換が転写調節に重要な役割を果たしていることは、近年の多くの報告により明らかになってい

る。クロマチン構造を規定する上で、ヒストン上のアミノ酸修飾（アセチル化、メチル化、ユビキチン化、リン酸化等）は重要な因子の一つである。StAR 遺伝子においても、そのプロモーター領域でマウスライディッチ細胞由来 MA-10 細胞への cAMP 刺激によって、ヒストンアセチル化の促進およびヒストンメチル化（H3K4 および H3K9）の減少⁸⁾、また卵巣顆粒膜細胞の黄体への分化によってヒストンアセチル化が促進されることが報告されている⁹⁾。筆者らは幹細胞への SF-1 の導入によって、どのようなクロマチン構造変換が引き起こされるかを明らかにするため、SF-1 の導入前後におけるヒストン修飾の変化を検討した。その結果 StAR 遺伝子のプロモーター領域では、予想に反してほとんどのヒストン修飾が減少した。しかしこの領域では、ヒストン修飾のみならず非修飾ヒストン H3 および H2B の量も減少していたため、StAR プロモーターではヒストン修飾の変化ではなくヒストン量の変化、すなわち nucleosome eviction が引き起こされていると考えられた

(図 1(B))。酵母¹⁰⁾や HeLa 細胞¹¹⁾におけるゲノムワイドな解析結果から、転写活性の強いプロモーター領域で nucleosome eviction が引き起こされることが報告されており、StAR プロモーターにおいても同様な現象が起きていると考えられた。さらに幹細胞への SF-1 の導入によって、プロモーター領域のみならず distal control region においても nucleosome eviction が引き起こされた。エンハンサーやインスレーター領域では、ヒストン H3K4 のモノメチル化、ジメチル化の促進^{12,13)}やヒストン H3.3 と H2A.Z の両ヒストンバリエントの取り込みにより nucleosome eviction を含むヌクレオソームの不安定化が促進することで、転写因子の結合が容易になり転写が促進されると考えられる¹⁴⁾。StAR 遺伝子においても、SF-1 が引き金となってさまざまなヒストン修飾酵素やシャペロンがリクルートされ、結果的に nucleosome eviction が引き起こされることが考えられた。まとめると、幹細胞への SF-1 の導入によりプロモーターと distal control region に SF-1 およびその複合

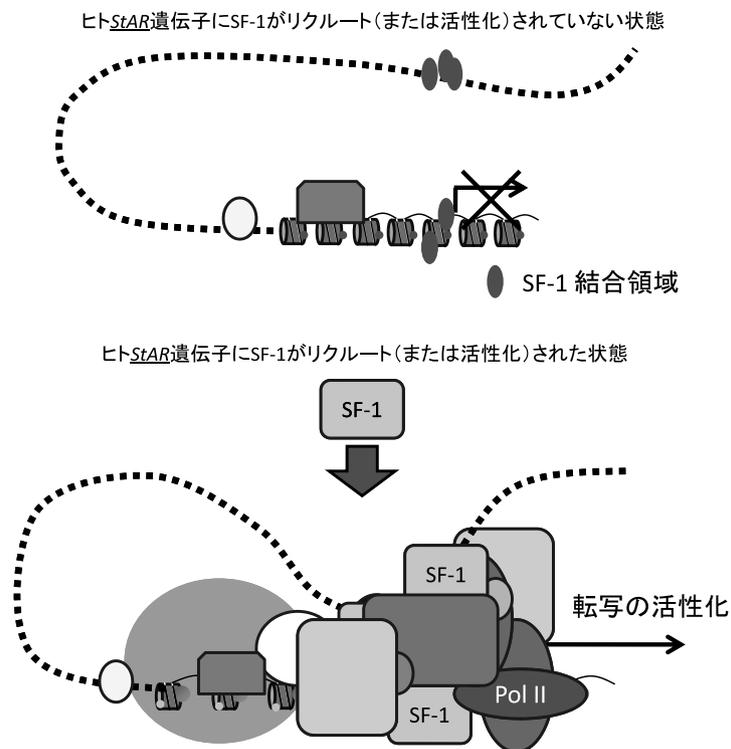


図 2 ヒト *StAR* 遺伝子における SF-1 を介したクロマチン構造変換モデル

ヒト *StAR* 遺伝子では、SF-1 がその結合領域に結合することで SF-1 と共にその複合体がリクルートされ、nucleosome eviction やループ形成を含めたクロマチン構造変換が引き起こされ、転写が活性化されると考えられる。

体がリクルートされ nucleosome eviction がひき起こされると同時にプロモーターと distal control region でループ構造が形成され、これらの領域が近接することで転写がさらに活性化されると考えられる。

chromosome conformation capture assay (3C アッセイ) は、核内で三次元的に近接する領域を検出する方法である。幹細胞における *StAR* の発現誘導の際、SF-1 を介してループが形成されることが予想されたので、この方法を用いてプロモーターと distal control region 間でループ構造をとり核内で近接しているか検討した。その結果、SF-1 を導入していない幹細胞では、これらの領域でループ形成は認められなかったが、SF-1 の導入によりプロモーターと distal control region 間でのループ形成が認められた。しかしプロモーター領域と他の領域 (上流 8 kb および 12 kb) ではループ形成は認められなかった。この結果から、SF-1 導入幹細胞ではプロモーターと distal control region との間で特異的にループが形成 (三次元的に近接) され、*StAR* の転写が活性化されると考えられた。次に KGN 細胞を用いて 3C アッセイを行ったところ、プロモーターと distal control region との間でループ形成が認められたことから、内在性に SF-1 が発現する細胞においても、*StAR* 遺伝子上で SF-1 導入幹細胞と同様のクロマチン構造により *StAR* が転写されると考えられた。さらに SF-1 特異的な siRNA を KGN 細胞へ導入し、内在性の SF-1 の発現をノックダウンしたところ、*StAR* の転写活性が抑制されると同時にプロモーターと distal control region との間で形成されていたループが消失した。以上の結果からステロイド産生器官では、*StAR* 遺伝子のプロモーターと distal control region に結合した SF-1 (およびその複合体や後にリクルートされる因子) により、ヌクレオソームが不安定化されると共に SF-1 を主要構成因子とする転写複合体上でループを形成して、*StAR* の転写が促進されると考えられた (図 2)⁷⁾。

4. おわりに

幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導系を用いることで、解析が困難なヒトのステロイド産生器官への分化やその機能解析が可能となった。現在 ChIP-on-Chip アッセイを用いて SF-1 結合領域を網羅的に解析しており、新たな SF-1 標的遺伝子や結合領域を同定している。また既知の SF-1 標的遺伝子についても、プロモーター領域以外に SF-1 結合領域が存在することを明らかにしており、*StAR* 遺伝子の場合だけでなく、多くの SF-1 標的遺伝子の転写においてもクロマチン構造変換が主要な転写制御

装置であることが示唆された。これらの解析を通して新たな再生医療法の開発と同時に副腎・性腺の発生・分化や機能の分子メカニズムを明らかにしていきたい。

- 1) Yazawa, T., Mizutani, T., Yamada, K., Kawata, H., Sekiguchi, T., Yoshino, M., Kajitani, T., Shou, Z., Umezawa, A., & Miyamoto, K. (2006) *Endocrinology*, 147, 4104-4111.
- 2) Yazawa, T., Inanoka, Y., Mizutani, T., Kuribayashi, M., Umezawa, A., & Miyamoto, K. (2009) *Endocrinology*, 150, 3885-3893.
- 3) Morohashi, K.I. & Omura T. (1996) *FASEB J.*, 10, 1569-1577.
- 4) Parker, K.L. & Schimmer, B.P. (1997) *Endocr. Rev.*, 18, 361-377.
- 5) Luo, X.R., Ikeda, Y., & Parker, K.L. (1994) *Cell*, 77, 481-490.
- 6) Manna, P.R., Wang, X.J., & Stocco, D.M. (2003) *Steroids*, 68, 1125-1134.
- 7) Mizutani, T., Yazawa, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Uesaka, M., Inaoka, Y., Matsuura, K., Kamiki, Y., Oki, M., Umezawa, A., & Miyamoto, K. (2010) *J. Biol. Chem.*, 285, 28240-28251.
- 8) Hiroi, H., Christenson, L.K., Chang, L., Sammel, M.D., Berger, S.L., & Strauss, J.F. (2004) *Mol. Endocrinol.*, 18, 791-806.
- 9) Christenson, L.K., Stouffer, R.L., & Strauss, J.F. (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 27392-27399.
- 10) Lee, W., Tillo, D., Bray, N., Morse, R.H., Davis, R.W., Hughes, T.R., & Nislow, C. (2007) *Nat. Genet.*, 39, 1235-1244.
- 11) Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y.T., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C.X., Ching, K.A., Wang, W., Weng, Z.P., Green, R.D., Crawford, G.E., & Ren, B. (2007) *Nat. Genet.*, 39, 311-318.
- 12) Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H., & Glass, C.K. (2010) *Mol. Cell*, 38, 576-589.
- 13) He, H.H., Meyer, C.A., Shin, H., Bailey, S.T., Wei, G., Wang, Q., Zhang, Y., Xu, K., Ni, M., Lupien, M., Mieczkowski, P., Lieb, J.D., Zhao, K., Brown, M., & Liu, X.S. (2010) *Nat. Genet.*, 42, 343-347.
- 14) Jin, C.Y., Zang, C.Z., Wei, G., Cui, K.R., Peng, W.Q., Zhao, K.J., & Felsenfeld, G. (2009) *Nat. Genet.*, 41, 941-945.

水谷 哲也, 宮本 薫

(福井大学医学部分子生体情報学領域)

A novel transcriptional regulation of human *StAR* gene
Tetsuya Mizutani and Kaoru Miyamoto (Department of Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, 23-3 Shimoaizuki, Matsuoka, Eiheiji, Fukui 910-1193, Japan)