

61. 代謝酵素 – 転写因子間連携による遺伝子発現調節

諸橋 憲一郎

九州大学 大学院医学研究院 性差生物学講座

Key words : 代謝, 転写調節, Ad4BP/SF-1

緒言

代謝系は複数の酵素による連続した反応によって構築される。これまでの代謝制御機構に関する研究は主に律速酵素の活性調節の観点から進められてきた。一方、遺伝子の発現調節の観点からは、代謝系を構築する全ての遺伝子を一つのユニットとして、その発現を一斉に制御するシステムは非常に合理的である。我々が同定した核内受容体 Ad4BP/SF-1 (Adrenal-4 Binding Protein/Steroidogenic Factor-1)^{1,2)} はステロイドホルモン産生細胞に発現し、ステロイドホルモン合成に関与するほぼ全ての遺伝子の発現を制御する転写因子であった³⁾。一方、本因子の遺伝子破壊マウスからはステロイドホルモン産生組織である副腎と精巣、卵巣が消失することから⁴⁾、本因子はこれらの組織の発生に不可欠であると考えられてきた。実際に我々は、本因子が種々の転写因子と直接または間接的相互作用を通じ、これらの組織の発生を制御していることを明らかにしてきた⁵⁾。これらの結果は本因子がステロイドホルモン合成、ならびにこれらの組織形成に必須の役割を果たすことを示すものであったが、本因子の遺伝子破壊によって、なぜ副腎と生殖腺が消失するかとの問いに対する答えは得られていなかった。

近年、次世代シーケンサーの登場により、全ゲノムを解析対象とする研究が可能となった。そこで Ad4BP/SF-1 の標的遺伝子を全ゲノムレベルで調べた結果、Ad4BP/SF-1 が解糖系を構築するほぼ全ての遺伝子の転写調節領域に結合し、これらの遺伝子を一つのユニットとして制御することを明らかにした⁶⁾。実際、Ad4BP/SF-1 の消失で細胞内 ATP 量は大幅に減少した。ATP 量の減少は細胞増殖の低下を招くことから、遺伝子破壊が副腎と生殖腺の消失を招く原因になったと考えられた。またその後、解糖系に加え、本因子がコレステロール合成系を構築する多くの遺伝子の制御を示唆する結果を得た。そこで、本研究では Ad4BP/SF-1 によるコレステロール合成系遺伝子の制御を明らかにすることを目的とした。

方法

マウス副腎皮質腫瘍由来の Y-1 細胞、マウス精巣ライディッヒ細胞ならびにマウス胎仔精巣のライディッヒ細胞より mRNA を調製し、シーケンスにて遺伝子発現を調べた。個々の遺伝子発現については qRT-PCR 法によって定量した。また、Ad4BP/SF-1 抗体を用いた ChIP-sequence を行い、Ad4BP/SF-1 の集積領域を全ゲノムレベルで明らかにした。コレステロール合成量はトリチウムラベルのアセチル-CoA を培地に添加することで測定した。細胞中のコレステロールならびにコレステロール合成経路の中間産物量を質量分析によって測定した。

結果

1. AdBP/SF-1 によるコレステロール合成系遺伝子発現の制御

Ad4BP/SF-1 によって制御される遺伝子を明らかにするため、マウス副腎皮質腫瘍由来の Y1 細胞において、siRNA による Ad4BP/SF-1 ノックダウン実験を行ったところ、Ad4BP/SF-1 の発現はほぼ 10 % に抑制された。そこで、無処理の細胞とノックダウン細胞で発現する遺伝子をシーケンス法によって決定した。その結果、解糖系遺伝子と同様に、多くのコレステロール合成系遺伝子の発現が siRNA 処理によって低下することが分かった。

次に、Ad4BP/SF-1 抗体を用い、ChIP-sequence 解析を行った。Y-1 細胞ではコレステロール合成に関与する 20 の遺伝子のうち、半数の 10 遺伝子座に Ad4BP/SF-1 の集積が認められた (図 1)。同様に、マウス精巣より調製したライディッシュ細胞を用い、ChIP-sequence を行ったところ、12 遺伝子座に集積が認められた。

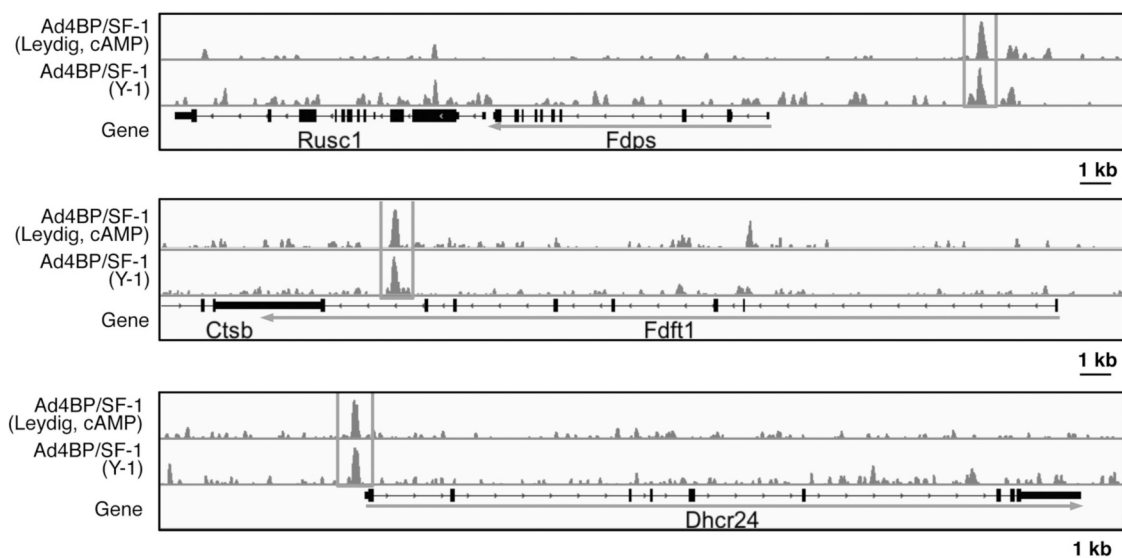


図 1. コレステロール合成関連遺伝子座への Ad4BP/SF-1 の集積

コレステロール合成関連遺伝子 *Fdps* (farnesyl diphosphate synthase) (上段)、*Fdft1* (farnesyl diphosphate farnesyl transferase) (中段)、*Dhcr24* (24-dehydrocholesterol reductase) (下段) における Ad4BP/SF-1 の集積を示す。マウス精巣のライディッシュ細胞と副腎皮質由来の Y-1 細胞における集積、ならびに遺伝子構造を示す。

得られた集積領域については、通常の ChIP アッセイにて、Ad4BP/SF-1 が集積することを確認した。これらの集積領域は通常、転写の活性化に寄与する。そこでこれらの領域を用い、レポーター遺伝子を作製し、その活性を調べたところ、これらの領域は Y-1 細胞において遺伝子発現を活性化した。また、その活性は Ad4BP/SF-1 ノックダウンによって抑制された。内在性の Ad4BP/SF-1 の発現が認められない HeLa 細胞に Ad4BP/SF-1 の発現ベクターとともにレポーター遺伝子を導入したところ、発現ベクター依存的に転写活性が増加したことから、Ad4BP/SF-1 の集積領域は Ad4BP/SF-1 の結合を通じ、転写を活性化すると考えられた。

2. AdBP/SF-1 によるコレステロール合成活性の制御

Ad4BP/SF-1 がコレステロール合成関連遺伝子の転写を活性化するのであれば、本因子のノックダウンはコレステロール合成活性の低下につながることを期待される。そこで、ノックダウン Y-1 細胞と無処理の Y-1 細胞において、アセチル-CoA からのコレステロール合成活性を測定した。その結果、ノックダウン細胞では無処理の細胞に比べ、およそ 30 % の合成活性の低下を確認した。しかしながら、細胞内のコレステロールはおよそ 10 % の低下にとどまった。これは Ad4BP/SF-1 のノックダウンによってステロイドホルモンの合成が低下しており、コレステロールの消費が抑制されたものと考えられる。一方、コレステロール合成過程の後半に位置する中間代謝産物であるラノステロールは 40 % に、7-デヒドロコレステロールは 30 % に、そしてデスモステロールは 20 % に低下しており、Ad4BP/SF-1 のノックダウンによって全体としてコレステロール合成が抑制されていると考えられた (図 2)。

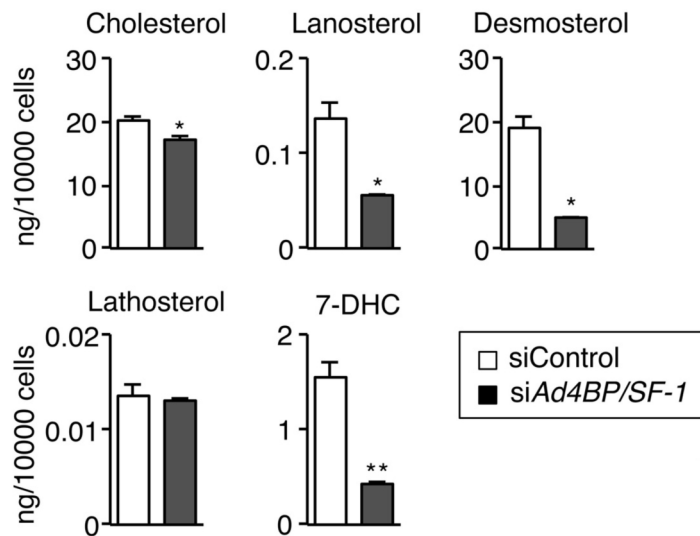


図2. Ad4BP/SF-1 のノックダウンによるコレステロールと中間産物量の変動

Ad4BP/SF-1 をノックダウンした Y-1 細胞と無処理の Y-1 細胞において、cholesterol、lanosterol、desmosterol、lathosterol、7-DHC (7-dehydrocholesterol) を測定した。t 検定を行った。*P < 0.05、**P < 0.01。

考 察

これらの結果はコレステロール合成を Ad4BP/SF-1 が遺伝子発現レベルで調節していることを示すものであった。Ad4BP/SF-1 はステロイドホルモン合成を行う細胞に特異的に発現する転写因子で、当初はステロイドホルモン合成に関与する遺伝子の転写を制御する因子として同定されたのであった。ステロイドホルモン合成に加え、最近の結果は本因子が解糖系遺伝子の制御を行うことが明らかになっていたが、今回の研究ではさらにコレステロール合成に関与する遺伝子の制御を行うことが明らかになった (図3)。

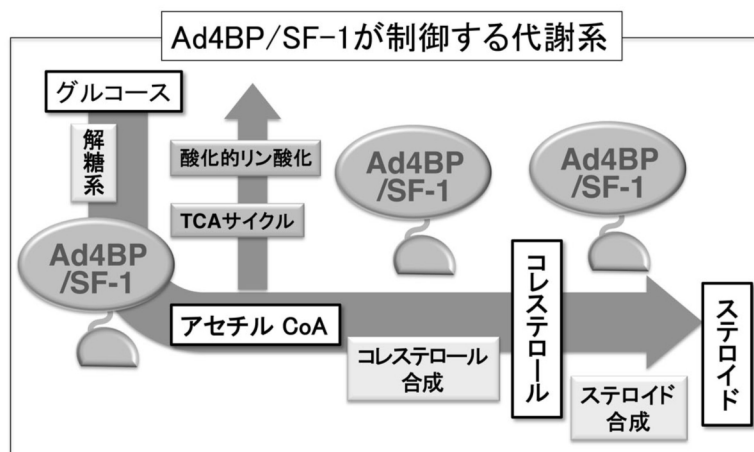


図3. Ad4BP/SF-1 によって制御される代謝系

Ad4BP/SF-1 はほぼ全ての解糖系関連遺伝子、ステロイドホルモン合成関連遺伝子の制御を行っていることが知られていた。今回の研究でこの両者をつなぐコレステロール合成系関連遺伝子の制御を行っていることが明らかになった。

解糖系がアセチル-CoA を産生し、アセチル-CoA からコレステロールが合成され、コレステロールよりステロイドホルモン合成が進むことを考えれば、これらの3つの代謝系は相互に協調的に制御されていると考えるのは妥当であろう。Ad4BP/SF-1 はこれらの代謝関連遺伝子の発現を協調的に制御することで、副腎皮質や生殖腺におけるステロイドホルモンの産生制御において中心的な役割を果たしていると考えられる。

共同研究者

共同研究者は、九州大学大学院生体防御医学研究所の大川恭行教授、須山幹太教授、および Korea Institute of Science の Man-Ho Choi 博士である。

文 献

- 1) Morohashi K, Honda S, Inomata Y, Handa H, Omura T. A common trans-acting factor, Ad4-binding protein, to the promoters of steroidogenic P-450s. *J Biol Chem.* 1992 Sep 5;267(25):17913-9. PMID: 1517227.
- 2) Honda S, Morohashi K, Nomura M, Takeya H, Kitajima M, Omura T. Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. *J Biol Chem.* 1993 Apr 5;268(10):7494-502. PMID: 8463279.
- 3) Morohashi K, Zanger UM, Honda S, Hara M, Waterman MR, Omura T. Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *Mol Endocrinol.* 1993 Sep; 7(9):1196-204. PMID: 8247022.
- 4) Morohashi KI, Omura T. 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.* 1996 Dec;10(14): 1569-77. PMID: 9002548.
- 5) Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, Omichi K, Suzuki R, Kato-Fukui Y, Kamiirisa K, Matsuo M, Kamiyo S, Kasahara M, Yoshioka H, Ogata T, Fukuda T, Kondo I, Kato M, Dobyns WB, Yokoyama M, Morohashi K. Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet.* 2002 Nov; 32(3):359-69. Epub 2002 Oct 15. PMID: 12379852.
- 6) Baba T, Otake H, Sato T, Miyabayashi K, Shishido Y, Wang C-Y, Shima Y, Kimura H, Yagi M, Ishihara Y, Hino S, Ogawa H, Nakao M, Yamazaki T, Kang D, Ohkawa Y, Suyama M, Chung B-C, Morohashi K. Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Nature Commun.* 2014; 5:3634, doi: 10.1038/ncomms4634.