

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591231

研究課題名(和文)

BAC 遺伝子導入マウスを用いた StAR のミトコンドリア標的シグナルの必要性の解析

研究課題名(英文) The role of the mitochondrial targeting signal in the function of steroidogenic acute regulatory protein revealed by BAC transgenesis *in vivo*

研究代表者

石井 智弘 (ISHII TOMOHIRO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70265867

研究成果の概要(和文):

本研究は、急性期ステロイドホルモン生合成の第一ステップでコレステロールをミトコンドリア外膜から内膜へ転送する steroidogenic acute regulatory protein (StAR) の機能解明を目指したものである。ミトコンドリア標的シグナルを利用した StAR 蛋白自身のミトコンドリアマトリックスへの移動が、StAR のコレステロール転送能に重要な役割を果たすことを *in vivo* で明らかとした。

研究成果の概要(英文):

The present study clarified the mechanism of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that transfers cholesterol from the outer to the inner mitochondrial membrane in the first step of acute steroidogenesis. It demonstrated the important role of mitochondrial entry of StAR by its mitochondrial targeting signal on the function of the StAR *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：steroidogenic acute regulatory protein, ステロイドホルモン, 細菌人工染色体 (BAC), トランスジェニックマウス, ミトコンドリア標的シグナル

1. 研究開始当初の背景

Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) はすべての急性期ステロイドホルモン生合成においてミトコンドリア外膜から内膜へのコレステロール転送を制御している。STAR 変異が同定されたヒト先天性リポイド副腎過形成患者と gene targeting 法により作成された Star 欠損マウス (*Star^{tm(NEO)/tm(NEO)}* マウス; 以下 *Star^{-/-}* マウス) で副腎不全, 男性外性器形成不全, 卵巣機能不全が認められたことは, ステロイドホルモン生合成における StAR の重要性を示唆する

所見である。ヒトとマウスの副腎, 性腺におけるステロイド生合成においては, StAR のコレステロール転送能は必須と考えられている。

StAR のステロイドホルモン生合成における重要性は明らかにされたが, コレステロール転送の分子機構は未解明である。StAR はアミノ末端のミトコンドリア標的シグナルとカルボキシ末端の脂質転送ドメインからなるプレ蛋白の状態で細胞質側から外膜に作用し, コレステロールを内膜へ移動させると提唱されている。この提唱に合致して, サル腎臓由来 COS-1 細胞を用いた研究から, ミト

コンドリア標的シグナルを欠失させた変異型 StAR およびミトコンドリア外膜上の蛋白と結合させたキメラ型 StAR が野生型 StAR と同様のコレステロール転送能を保持すると報告されており、StAR のミトコンドリア標的シグナルはコレステロール転送能に不要と推測されている。一方で、マウス副腎皮質腫瘍由来 Y-1 細胞を用いた研究から、ミトコンドリアマトリックス内に新たに移動した StAR の産生量とコレステロール転送能との正の相関が報告されている。この結果は StAR がミトコンドリア内部で作用することを示唆する。以上のデータはすべて非ステロイドホルモン産生細胞を用いた *in vitro* の実験系で行われており、生体内での StAR 機能を反映するか否か不明である。

2. 研究の目的

研究全体の最終的な目標は、ステロイドホルモン生成の律速段階であるミトコンドリア外膜から内膜へのコレステロール転送の分子機構を解明すること、である。本研究では、コレステロール転送の主たる調節分子である StAR のミトコンドリア標的シグナルの必要性を *in vivo* で解明することを目指す。

3. 研究の方法

野生型 Star (Star⁺) およびミトコンドリア標的シグナルを欠失させた変異 Star (Star^{Met1-Trp47del}; 以下 Star^{N47}) を発現する BAC トランスジーンを持った Star⁻ マウス [Star^{tm(NEO)/tm(NEO)} TgN(Star-Star⁺) マウスおよび Star^{tm(NEO)/tm(NEO)} TgN(Star-Star^{Met1-Trp47del}) マウス; 以下 Star⁺ レスキューマウスおよび Star^{N47} レスキューマウス] を作成し、表現型を解析した。

(1) Star⁺ レスキューマウスの作成と表現型解析

Star 遺伝子、5' 非翻訳領域 47 kb、3' 非翻訳領域 62 kb を含む細菌人工染色体 (BAC) (Star⁺ BAC) を精製して、トランスジェニックマウス [TgN(Star-Star⁺) マウス] を作成した。Founder の同定に関しては、BAC の DNA 配列に特異的なプライマーを用いた PCR でスクリーニングし、Star 遺伝子をプローブとして用いたサザンプロットで確認した。

TgN(Star-Star⁺) マウスの founder と Star^{tm(NEO)/+} マウスで交配を重ね、Star⁺ レスキューマウスを作成し、表現型を解析した。具体的には、副腎皮質ステロイドホルモン非補充下での生存率、雌雄の妊孕性、血清ステロイドホルモン濃度 (コルチコステロン、テストステロン、エストラジオール、プロゲステロン)、ステロイドホルモン産生細胞細胞質への脂肪滴蓄積 (オイルレッド O 染色) を解

析し、Star⁻ マウスと比較した。

(2) 大腸菌内相同組み換えによる Star^{N47} BAC の作成

Star⁺ BAC を改変し、ミトコンドリア標的シグナルを欠失させた変異 Star^{N47} を発現する BAC (Star^{N47} BAC) を作成した。具体的には、Star 翻訳開始コドンおよびアミノ末端から 48 番目の Met コドンを含む約 1,000 bp の領域 A を PCR で増幅しクローニングした。Site directed mutagenesis を用いて、領域 A の蛋白翻訳領域に内包されかつ 48 番目の Met の 5' 側に位置する 3 つの ATG を TTG へ置換し、48 番目の Met コドンの 5' 側 3 番目の塩基を Kozak 配列に合致するよう T A へ置換した。

Star^{N47} BAC を精製して、トランスジェニックマウス [TgN(Star-Star^{Met1-Trp47del}) マウス] を作成した。Founder の同定に関しては、Star^{N47} に特異的な DNA 配列を用いた P-PCR でスクリーニングし、Star 遺伝子をプローブとして用いたサザンプロットで確認した。

(3) Star^{N47} レスキューマウスの作成と表現型の解析

TgN(Star-Star^{Met1-Trp47del}) マウスの founder と Star^{tm(NEO)/+} マウスで交配を重ね、Star^{N47} レスキューマウスを作成した。Star^{N47} レスキューマウスの副腎・性腺の表現型に関しては、副腎皮質ステロイドホルモン非補充下での生存率、雌雄の妊孕性、血清ステロイドホルモン濃度 (コルチコステロン、テストステロン、エストラジオール、プロゲステロン)、ステロイドホルモン産生細胞細胞質への脂肪滴蓄積 (オイルレッド O 染色) を解析し、Star⁺ レスキューマウスおよび Star⁻ マウスと比較した。

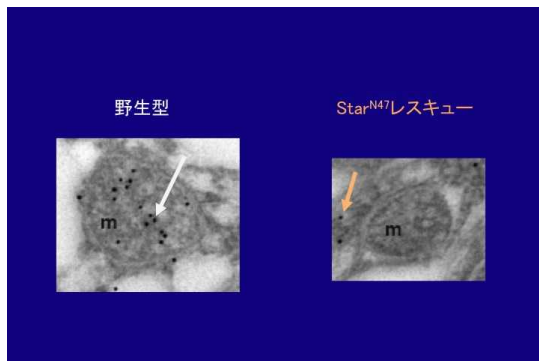
(4) Star⁺ レスキューマウスと Star^{N47} レスキューマウスの Star 蛋白の発現量と細胞内局在の解析

Star⁺ レスキューマウスと Star^{N47} レスキューマウスの副腎および性腺のミトコンドリア分画から蛋白を抽出し、Star⁺ および Star^{N47} 蛋白の発現量及び細胞内局在をウェスタンプロットで確認し、野生型マウスおよび Star⁻ マウスと比較する。また、Star⁺ レスキューマウスと Star^{N47} レスキューマウスの副腎皮質細胞において、免疫金染色で Star 蛋白を標識し、電子顕微鏡下に細胞内局在を観察した。

4. 研究成果

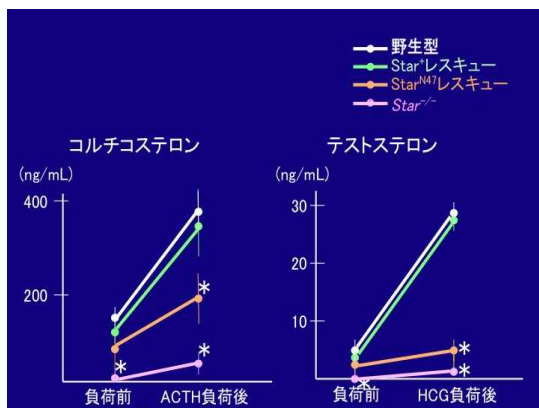
Star⁺ レスキューマウスと Star^{N47} レスキューマウスの副腎・精巣の Star mRNA 発現量には有意差は認められなかった。副腎のミトコンドリア分画を用いたウェスタンプロット

および電子顕微鏡を用いた免疫金染色(図1)により, Star⁺蛋白はマトリックス, Star^{N47}蛋白は細胞質に主に局在することを確認した.

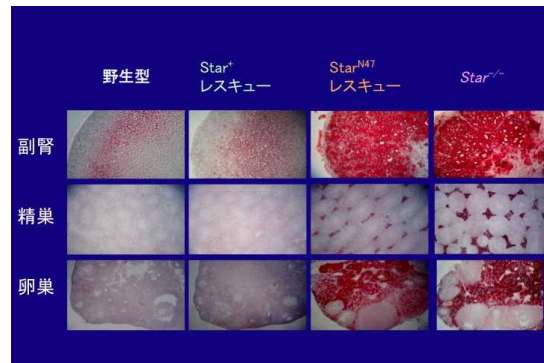


(図1) 電子顕微鏡下での副腎皮質細胞の免疫金染色. 矢印で示す黒点は Star 蛋白を示す. m: ミトコンドリア.

Star⁺レスキューマウスは野生型マウスと同様の表現型を示した. Star^{N47}レスキューマウスは日齢7以内に副腎皮質ホルモン補充なしでは70%, 補充下でも30%死亡したが, それぞれ Star^{-/-}マウスよりは有意に生存した. Star^{N47}レスキューマウスの妊孕性は Star⁺レスキューマウスに比し雌雄ともに有意に低下していた. Star^{N47}レスキューマウスの ACTH 負荷後血清コルチコステロン, 雄の HCG 負荷後血清テストステロン, 雌の HMG/HCG 負荷後血清プロゲステロンはすべて Star⁺レスキューマウスに比し有意に低下していた(図2). Star⁺レスキューマウスと Star^{N47}レスキューマウスの雌の血清エストラジオールでは有意差は認められなかった. Star^{N47}レスキューマウスの日齢0および月齢2の副腎, 精巣, 卵巣への脂肪滴蓄積は Star^{-/-}マウスと同程度に著明であった(図3).



(図2) 月齢2の各遺伝子型マウスの ACTH 負荷試験, HCG 負荷試験結果.



(図3) 月齢2の各遺伝子型マウスの副腎, 精巣, 卵巣ステロイドホルモン産生細胞細胞質への脂肪滴蓄積(オイルレッド-O染色).

本研究の結果, Star^{N47}によるミトコンドリア標的シグナル非依存性のコレステロール転送能は Star^{-/-}マウスの表現型を完全には救済できなかった. ミトコンドリア標的シグナルを利用した StAR 蛋白自身のミトコンドリアマトリックスへの移動が, *in vivo*における Star のコレステロール転送能に重要な役割を果たすことが初めて明らかとなった.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Ishii T, Sasaki G, Jeyasuria P, Jo Y, Bahat A, Orly J, Hasegawa T, Parker KL. (2008). Complex role of the mitochondrial targeting signal in the function of steroidogenic acute regulatory protein revealed by bacterial artificial chromosome transgenesis *in vivo*. *Molecular Endocrinology*, 22(4), 951-964. 査読有

[学会発表](計1件)

1. 石井 智弘. Steroidogenic acute regulatory protein の *in vivo* における機能解析 (2009年6月19日, 第28回東京成長ホルモン成長因子セミナー, 東京)

[図書](計0件)

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者
石井 智弘 (ISHII TOMOHIRO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70265867

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし