

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590347

研究課題名(和文) 新たなステロイド合成酵素の同定と高次クロマチン構造変換を介した転写調節機構の解明

研究課題名(英文) Identification of a novel steroidogenic-enzyme and analysis of its transcriptional regulation through alternations of chromatin structure

研究代表者

水谷 哲也 (MIZUTANI, Tetsuya)

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：90322734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子SF-1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。我々は、網羅的なSF-1標的遺伝子の探索を行ったところ、Glutathione S-Transferase A (GSTA)ファミリーを同定した。GSTAファミリーのステロイド産生に対する役割と転写調節について検討した結果、GSTA1とA3がイソメラーゼ活性を有する新たなステロイド代謝酵素であること、およびゲノム上でクラスターを形成しているGSTAファミリー遺伝子(A1-A4)すべてがSF-1依存的にクロマチン構造の変化を介して転写調節されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Steroidogenic factor 1 (SF-1, also known as Ad4BP) plays a pivotal role in the regulation of expression of steroidogenesis-related genes. To identify novel SF-1-target genes, a genome-wide analysis was carried out. We found that human glutathione S-transferase A (GSTA) family genes (hGSTA1&#8211;4) are regulated by SF-1. All hGSTA genes were upregulated by transduction of SF-1 into hMSCs, while knockdown of endogenous SF-1 in H295R cells downregulated all hGSTA genes. CHIP and 3C assays revealed that the coordinated expression of the genes was based on changes in higher-order chromatin structure triggered by SF-1. In steroidogenesis, the gene products of hGSTA1 and hGSTA3 were shown to function in a coordinated fashion with 3 $\beta$ -HSD II. This result indicates that enzymes hGSTA1-1 and hGSTA3-3 could be considered new members of the group of SF-1 controlled steroidogenic enzymes and to participate in 5 $\alpha$ -4 isomerization of steroid hormone precursors.

研究分野：内分泌学

キーワード：GSTAファミリー SF-1 ステロイドホルモン クロマチン

## 1. 研究開始当初の背景

我々は世界に先駆け、間葉系幹細胞に転写因子 SF-1 を導入することで、ヒト骨髄間葉系幹細胞からステロイドホルモン産生細胞への分化誘導に成功している。そこでステロイドホルモン産生細胞への分化誘導メカニズムを解明するため、DNA マイクロアレイと ChIP-on-Chip 法を併用し網羅的な SF-1 標的遺伝子の探索を行った。その結果、10 の新たな因子が同定された。その 1 つが GSTA ファミリーに属する GSTA3 であった。

GSTA ファミリー (A1~A4) は約 250 kb にわたりクラスターを形成している。そこでまず、GSTA3 を含む GSTA ファミリーの発現を検討したところ、その発現は SF-1 依存性であった。また ChIP-on-Chip 法の解析結果より、GSTA3 および A4 以外では転写開始点近傍に SF-1 結合が認められなかったことから、これら遺伝子の発現は SF-1 依存的な高次クロマチン構造変換を介していることが推測された。本研究では、SF-1 によるクロマチン構造変化を介した GSTA ファミリーの転写調節機構について解析した。

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、その中で GSTA ファミリーは、イソメラーゼ活性を有することが明らかになっている。ステロイド合成経路でも、イソメラーゼによる 5- $\alpha$  変換が必須であるが、従来は 3 $\beta$ -Hydroxy Steroid Dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) がこの反応を触媒していると考えられてきた。本研究では、GSTA ファミリーがステロイド産生細胞で実際にその産生に関与しているか検討した。

## 2. 研究の目的

- (1) GSTA ファミリーのステロイドホルモン産生に対する役割を解明する。
- (2) SF-1 によって GSTA ファミリー遺伝子クラスターがどのようにクロマチン構造変化されるかを明らかにする。

(3) SF-1 依存性の高次クロマチン構造変化に重要な SF-1 のアミノ酸領域を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) GSTA ファミリーのステロイドホルモン産生に対する役割

3 $\beta$ -HSD を内在的に発現するヒト卵巣顆粒膜細胞由来 KGN 細胞を用いて、3 $\beta$ -HSD、GSTA ファミリー - 遺伝子のアデノウイルス過剰発現系を構築し、それらの過剰発現によるステロイドホルモン産生量への影響を明らかにする。

### (2) SF-1 による GSTA ファミリー遺伝子クラスターのクロマチン構造変化

それぞれの GSTA ファミリープロモーター領域が、SF-1 によりどのような 3 次元構造変化を起こして、その転写活性化につながるかを、Chromosome Conformation Capture 法を用いて明らかにする。

### (3) 高次クロマチン構造変化を司る SF-1 領域の同定

SF-1 と VP16 との様々なキメラタンパク質を用いることで、SF-1 依存的なクロマチン構造変化メカニズムを明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) GSTA ファミリーのステロイドホルモン産生に対する役割

GSTA ファミリーのステロイド産生における役割を明らかにするために、GSTA ファミリーのアデノウイルス発現系を構築した。そして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 3 $\beta$ -HSD の過剰発現によるアンドロステ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 ファミリーの中で GSTA1 と A3 には 3 $\beta$ -HSD と同様、3-ケト-5-ステロイドから 3-ケト-4-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。以上の結果から、

GSTA1とA3が新たなステロイド代謝酵素のメンバーであることが示された。

### (2) SF-1によるGSTAファミリー遺伝子クラスターのクロマチン構造変化

遺伝子クラスターを形成しているGSTAファミリー(A1~A4)は、SF-1によって発現誘導される。しかし、GSTA3およびA4以外では転写開始点近傍にSF-1結合が認められなかったことから、SF-1によるGSTA1とA2の転写制御にはクロマチン構造の変化を介していると推察された。そこで

Chromosome Conformation Capture assayを用いて検討したところ、SF-1導入間葉系幹細胞(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(図1)。この結果からSF-1によるGSTAファミリーの転写は、SF-1によって引き起こされるクロマチン構造の変化を介していることが示唆された。

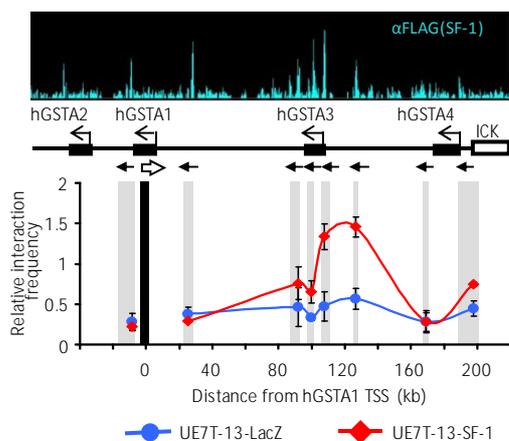


図1 GSTAファミリークラスター領域におけるSF-1結合領域の同定とクロマチン構造変化

### (3) 高次クロマチン構造変化を司るSF-1領域の同定

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、GSTA3、A4の転写は促進されたがGSTA1、A2の転写は促進されなかった。そこでクロマチン構造変化に

重要な領域を明らかにするために、様々な領域のSF-1とVP16とのキメラタンパク質を作製しGSTA1の発現を指標にドメインマッピングを行ったところ、Hinge領域が同定された。この結果からSF-1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。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

1. Mizutani, T., Kawabe, S., Ishikane, S., Imamichi, Y., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Identification of novel steroidogenic factor 1 (SF-1)-target genes and components of the SF-1 nuclear complex. *Molecular and Cellular Endocrinology* 408,133-137, 2015. 査読有. DOI: 10.1016/j.mce.2014.11.019.
2. Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Yazawa, T., Miyamoto, K.: Transcriptional regulation of human ferredoxin reductase through an intronic enhancer in steroidogenic cells. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms* 1839(1), 33-42, 2014. 査読有. DOI:10.1016/j.bbagr.2013.11.005
3. 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.: C/EBP $\beta$  (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, 2014. 査読有. DOI:10.1042/BJ20131522
4. Kanno, M., Yazawa, T., Kawabe, S.,

- Imamichi, Y., Usami, Y., Ju, Y.,  
Matsumura, T., Mizutani, T., Fujieda,  
S., Miyamoto, K. : Sex-determining  
region Y-box 2 and GA-binding proteins  
regulate the transcription of liver  
receptor homolog-1 in early embryonic  
cells. *Biochem. Biophys. Acta.*  
1839(5),406-414,2014. 査読有.  
DOI:10.1016/j.bbagr.2014.03.016
5. Orisaka, M., Hattori, K., Fukuda, S.,  
Mizutani, T., Miyamoto, K., Sato, T.,  
Tsang, B.K., Kotsuji, F., Yoshida, Y. :  
Dysregulation of ovarian follicular  
development in female rat: LH  
decreases FSH sensitivity during  
preantral-early antral transition.  
*Endocrinology* 154(8), 2870-2880, 2013.  
査読有. DOI:10.1210/en.2012-2173
6. Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M.,  
Mizutani, T., Imamichi, Y., Ju, Y.,  
Matsumura, T., Yamazaki, Y., Usami,  
Y., Kuribayashi, M., Shimada, M.,  
Kitano, T., Umezawa, A., Miyamoto,  
K. : Androgen/Androgen receptor  
pathway regulates expression of the  
genes for cyclooxygenase-2 and  
amphiregulin in periovulatory  
granulosa cells. *Molecular and Cellular  
Endocrinology* 369, 42-51, 2013. 査読有.  
DOI:10.1016/j.mce.2013.02.004
7. Kawabe, S., Yazawa, T., Kanno, M.,  
Usami, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y.,  
Ju, Y., Matsumura, T., Orisaka, M.,  
Miyamoto, K. : A novel isoform of liver  
receptor homolog-1 is regulated by  
steroidogenic factor-1 and the  
specificity protein family in ovarian  
granulosa cells. *Endocrinology* 154(4),  
1648-1660, 2013. 査読有.  
DOI:10.1210/en.2012-2008
8. Imamichi, Y., Mizutani, T., Ju, Y.,  
Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M.,  
Yazawa, T., Miyamoto, K. :  
Transcriptional regulation of human  
ferredoxin 1 in ovarian granulosa cells.  
*Molecular and Cellular Endocrinology*  
370, 1-10, 2013. 査読有.  
DOI:10.1016/j.mce.2013.02.012
9. 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. :  
Human glutathione S-transferase A  
(GSTA) family genes are regulated by  
steroidogenic factor 1 (SF-1) and are  
involved in steroidogenesis. *The  
FASEB Journal* 27(8), 3198-3208, 2013.  
査読有. DOI:10.1096/fj.12-222745
10. Ju, Y., Mizutani, T., Imamichi, Y.,  
Yazawa, T., Matsumura, T., Kawabe, S.,  
Kanno, M., Umezawa, A., Kangawa, K.,  
Miyamoto, K. : Nuclear receptor  
5A(NR5A) family regulates  
5-aminolevulinic acid synthase  
1(ALAS1) gene expression in  
steroidogenic cells. *Endocrinology* 153,  
5522-5534, 2012. 査読有.  
DOI:10.1210/en.2012-1334
11. 水谷哲也, 今道力敬, 河邊真也, 矢澤隆志,  
宮本 薫 : 卵巣における遺伝子発現とその  
調節メカニズム. *日本生殖内分泌学会雑  
誌*. 17, 11-16, 2012. 査読無.

〔学会発表〕(計 53 件)

1. 水谷哲也, 宮本 薫 : SF-1 による新たな  
転写調節メカニズム. **生殖内分泌学~基  
礎から臨床への架け橋**. 第 19 回日本生  
殖内分泌学会学術集会. 2015,1,10, 千里  
ライフサイエンスセンター (大阪府豊中

- 市)。
2. 水谷哲也, 河邊真也, 石兼 真, 今道力敬, 宮本 薫: SF-1 と C/EBP によるステロイドホルモン産生調節機構. 平成26年度日本動物学会中部支部大会. 2014,11,22-24. のと勤労プラザ(石川県鳳珠郡)。
  3. 水谷哲也, 今道力敬, 河邊真也, 石兼 真, 宮本 薫: C/EBP $\beta$  による CYP11A1 の新たな転写調節機構. 第32回内分泌代謝学サマーセミナー. 2014,7,10-12, 富士レークホテル(山梨県南都留郡)。
  4. Mizutani, T., Imamichi, Y., Kawabe, S., Ishikane, S., Osaki, T., Minamino, N., Miyamoto, K.: Steroidogenic Factor 1 (SF-1) and C/EBP $\beta$  cooperatively regulate progesterone production. 16<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology. The Endocrine Society's 96th Annual Meeting & EXPO 2014. 2014,6,21-24, Chicago (USA).
  5. Mizutani, T., Miyamoto, K.: SF-1 dependent regulation of GSTA family genes and their implication for adrenocortical function. **Adrenal growth and development. Session 7: Steroidogenic Factor.** The XVIth Conference on the Adrenal Cortex. 2014,6,17-20, Chicago (USA).
  6. 水谷哲也, 今道力敬, 河邊真也, 尾崎 司, 南野直人, 宮本 薫: SF-1 複合体構成因子の同定とプロゲステロン産生に対する役割. 第87回日本内分泌学会学術総会. 2014,4,24-26, 福岡国際会議場(福岡市)。
  7. 水谷哲也, 具 云峰, 今道力敬, 河邊真也, 矢澤隆志, 尾崎 司, 南野直人, 宮本 薫: SF-1 複合体構成因子 C/EBP $\beta$  のプロゲステロン産生に対する役割. 第18回日本生殖内分泌学会学術集会. 2013,12,7, シェーンバッハ・サボー(東京都)。
  8. 水谷哲也, 松村健大, 今道力敬, 河邊真也, 宮本 薫: 新たなステロイド代謝酵素 GSTA ファミリーの転写調節機構. 第17回日本心血管内分泌代謝学会学術総会. 2013,11,22-23, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府豊中市)。
  9. 水谷哲也, 松村健大, 今道力敬, 具 云峰, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 宮本 薫: SF-1 による Glutathione S-transferase(GST)A family の転写制御機構. 第31回内分泌代謝学サマーセミナー. 2013,7,11-13, ゆふいん山水館(大分県由布市)。
  10. 水谷哲也, 宮本 薫: GSTA ファミリーのクロマチン構造の変化を介した転写制御とステロイド産生に対する役割. **シンポジウム17 卵胞発育・排卵・卵成熟の調節機構の分子メカニズム.** 第86回日本内分泌学会学術総会. 2013,4,25-27, 仙台国際センター(仙台市)。
  11. 水谷哲也, 具 云峰, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 尾崎 司, 南野直人, 宮本 薫: SF-1 複合体の同定とその機能解析. 第37回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム. 2012,11,29-12,1, 福井大学(福井市)。
  12. Mizutani, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Matsumura, T., Yazawa, T., Kawabe, S., Kanno, M., Osaki, T., Minamino, N., Umezawa, A., Miyamoto, K.: Steroidogenic factor 1 (SF-1) and C/EBP cooperatively regulate human HSD3B2 gene expression. The 15<sup>th</sup> International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. 2012,11.15-17, 石川県立音楽堂(金沢市)。
  13. Mizutani, T., Ju, Y., Imamichi, Y., Yazawa, T., Matsumura, T., Kawabe, S., Kanno, M., Umezawa, A., Miyamoto,

K.: Transcriptional regulation of human 5-aminolevulinic synthase 1(ALAS1) gene in steroidogenic cells. The 94th Annual Meeting & Expo (ENDO 2012). 2012,6,23-26, Houston, TEXAS (USA).

14. 水谷哲也, 具 云峰, 今道力敬, 松村健大, 矢澤隆志, 河邊真也, 菅野真史, 松浦かおる, 上木康衣, 梅澤明弘, 尾崎 司, 南野直人, 宮本 薫: SF-1 複合体 C/EBPβ による HSD3B2 の転写調節機構の解明. 第 85 回日本内分泌学会学術総会. 2012,4,19-21, 名古屋国際会議場 (名古屋市).

[ 産業財産権 ]

出願状況 (計 3 件)

名称: 子宮肉腫転移モデル

発明者: 吉田好雄、河邊真也、水谷哲也、宮本 薫、石兼 真、清野 泰

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2014-149007 号

出願年月日: 平成 26 年 7 月 22 日

国内外の別: 国内

名称: 卵子の受精可能性の検査のためのバイオマーカーおよびそれを用いた判定

発明者: 宮本 薫、水谷哲也、折坂 誠、田中 憲次、李 良子、野中大輔、麻田恭一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許願 2013-156672 号

出願年月日: 平成 25 年 7 月 29 日

国内外の別: 国内

名称: 体外受精における成熟卵子マーカーおよびその使用

発明者: 宮本 薫、水谷哲也、折坂 真

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/74486 号

出願年月日: 平成 24 年 9 月 25 日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 哲也 ( MIZUTANI, Tetsuya )

福井大学・医学部・准教授

研究者番号: 90322734