

令和元年6月5日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04395

研究課題名(和文) 原点「ミネラルコルチコイドの普遍的機能」から俯瞰するステロイドホルモンの機能分化

研究課題名(英文) Principal function of mineralocorticoid signaling suggested by constitutive knockout of the mineralocorticoid receptor in fish

研究代表者

坂本 竜哉 (Sakamoto, Tatsuya)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：10294480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：副腎皮質ホルモン・プロゲステロン・アンドロゲン受容体サブファミリーの祖先であるミネラルコルチコイド受容体の機能の本質と分化の検討のため、そのノックアウトの系統化に初めて成功し、中枢神経-行動制御が脊椎動物に普遍的な本来の機能と提唱した。性ステロイドを合成しない変異メダカでは、配偶子は形成されるが性行動は見られないことも発見した。これは性ステロイド系の本来の機能も行動制御であることを示唆している。即ちこのファミリーの機能の本質の可能性もある。鳥類、魚類、原始的な軟骨魚類の下垂体-副腎系も検討した。そして、脊椎動物の進化における副腎皮質ホルモン系の体液調節/腎臓機能の獲得も示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定遺伝子を欠損した小型魚類の変異体が注目されている。本成果は、ステロイド系の機能分化に新概念を提唱できたと思う。脊椎動物の本能行動の内分泌制御を理解する基礎にもなりうる。小型魚類は簡単に飼育・解析ができる。多産で精子の凍結保存も容易である。簡便で迅速なゲノム編集法として注目されている人工ヌクレアーゼも用いた本研究は、小型魚類の行動神経内分泌学のベストモデルとしての確立に貢献するであろう。作出した遺伝子改変メダカは、適応生物学、生殖生物学をはじめ幅広く使用できる。鬱や性同一性障害は副腎皮質ホルモンや性ステロイドの脳における機能が鍵であるが、機序など不明である。その基礎研究にもなりうる。

研究成果の概要(英文)：Corticosteroid receptors are critical for homeostasis maintenance including stress response, but understanding of the principal roles of the glucocorticoid receptor (GR) and mineralocorticoid receptor (MR) throughout vertebrates is limited. In addition to lines of constitutive GR knockout zebrafish, we have recently generated that of MR-knockout medaka as the first adult-viable corticosteroid receptor-knockout animals, in contrast to the lethality of these receptor knockouts in mice. We found behavioral and physiological modifications following disruption of corticosteroid receptor function in these animal models. We suggest these data point toward a potentially conserved function of corticosteroid receptors in integrating brain-behavior and visual responses in vertebrates. Roles in behaviors might be the principal and original functions of steroid hormone systems.

研究分野：生理学

キーワード：副腎皮質ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミネラルコルチコイド・グルココルチコイド・プロゲステロン・アンドロゲンの各受容体(MR・GR・PR・AR)は、核内受容体内でサブファミリーを形成する。各々のリガンドと結合して認識する標的遺伝子のプロモーターの応答配列 GRE も共通する。そしてこのファミリーの分子多様化の原点が MR であると、配列の系統樹から示唆されている (Bridgham ら Science 2006)。従って、MR の役割から、このグループの機能的な原点にも迫りうる。しかし哺乳類では、MR ノックアウト (KO) が腎障害で致死となり、その解明は困難であった。申請者らは、特定遺伝子を破壊できる TALEN により、MR (魚類でも 1 種類) KO の系統化に初めてメダカで成功した。ホモ KO 個体も成体になっており、ついに MR 研究に突破口が開かれた。この腎機能が必須の淡水中での MRKO の成長は、四足動物の定説に反し体液調節に MR は重要でないのかもしれない。発現パターン解析や投与実験も併せ、魚類では、

ミネラルコルチコイド系でなく、グルココルチコイド系が、体液調節に重要である。

MR は脳や視覚系に多く発現する。この中枢神経系における高発現は魚類で顕著であるが、脳内の分布は高等脊椎動物 (Wada ら Dev Neurobiol 2010 ; Kaouane ら Science 2011) と類似する。

という興味深い知見を得つつある。従って、脊椎動物に普遍的な MR の機能は、中枢神経系における作用と思われる。さらに、プロゲステロン・アンドロゲンを含む性ステロイド全般の合成に関わる酵素 P450c17-1 を喪失した自然突然変異 scl メダカでは、配偶子は形成されるが性行動は見られないことも発見している。これは性ステロイド系の本来の機能が行動制御であることを示唆している。よって、中枢神経 - 行動制御は、このファミリーの本質的な機能の可能性もある。そこで本研究では、哺乳類では成しえなかった MRKO により、原点と提唱する MR の中枢作用を解明する。

2. 研究の目的

ミネラルコルチコイド系は、哺乳類ではその受容体 (MR) のノックアウト (KO) が致死となり、機能解明が困難であった。申請者らは、この系の魚類での同定につき、MRKO の初めての系統化にメダカで成功した。まずこれにより、脊椎動物に普遍的な本来の機能の可能性がある神経-行動制御を明らかにする。

ついでこの機能が、MR を祖先とする副腎皮質ホルモン・プロゲステロン・アンドロゲン受容体サブファミリーの進化と共にいかに多様化したか検討する。そして標的/作用のファミリー内の相違を明らかにする。

3. 研究の方法

MR を祖先とする GR・PR・AR の機能分化を検討するため、発現動態から推定されるミネラルコルチコイド系の役割を、系統化済み MRKO メダカにより解明する。視運動/遊泳、適応、性行動、胚の運動をはじめとした各種の行動、及び体液調節を解析する。ファミリーの機能の原点と提唱する MR の中枢-行動制御とその作用機序が、各受容体の進化でいかに分化したか考察する。

4. 研究成果

魚類のグルココルチコイド受容体 (GR) は、神経系、鰓や腸などの体液調節器官、生殖器官で一樣に存在する一方、ミネラルコルチコイド受容体 (MR) は体液調節器官ではない脳や眼といった中枢神経系に極めて多く存在した。メダカの発生過程を見ても、まず網膜、次いで脳で遺伝子発現が誘導された。このことは魚類のミネラルコルチコイドが体液調節には関わっていないことを示唆する。成魚の脳において MR は、記憶や情動行動に関わる海馬に相当する終脳背側野側部、ストレス応答に重要な視索前野-視床下部-下垂体系に存在した。とくに、視運動に関係する視蓋や縦隆起、小脳での局在が顕著であった。神経系のこれらの領域における MR の局在は哺乳類や鳥類でも報告されており、ミネラルコルチコイドの脊椎動物における普遍的な機能を反映していることを想像させる。しかし、哺乳類において mr 遺伝子をノックアウトしてしまうと腎障害で致死となり、生命維持に重要ではあるが、その機能の検討が困難であった。近年、メダカなどの魚類でもゲノム編集が可能となった。そこで、人工ヌクレアーゼ (TALEN) を利用して mr 遺伝子をノックアウトしたメダカ (mr-/-メダカ) を作出して調べてみると、哺乳類のように発生段階で致死とはならず、ノックアウトの影響は外部形態や摂餌などにも認められなかった。体液調節能についても、淡水中と海水適応過程において、野生型と mr-/-メダカに明らかな差は認められなかった。このことは、MR は魚類、少なくともメダカの体液調節には必須の因子でないことを示す。MR の体液調節作用は、進化の過程で四肢動物においてのみ獲得されたものなのかもしれない。

mr 遺伝子をノックアウトしたメダカ (mr - / - メダカ) を作出して、ミネラルコルチコイドの本質的な役割を調べてみた。水槽に接したモニターでオブジェクトを動かした際のメダカの行動を解析するシステムを用いて、mr - / - メダカの視運動への影響を検討してみると、通常の遊泳 (運動量) には野生型 (対照魚) と mr - / - メダカで顕著な差はないが、動くオブジェクトが現れると、野生型はオブジェクトをよく見て追従行動を示すのに対し、mr - / - メダカはオブジェクトに集中できず速いスピードで泳ぎ回った。このときの mr - / - メダカ

の運動量は、野生型やオブジェクト提示前に対して明らかに増加した。つまり、mr - / - メダカは動くオブジェクトを認識しているものの追従できず、無駄な行動が多いのである。このことは、MR が視運動の制御に関与していることを示している。

これは一例ではあるが、MR の中枢機能は、脊椎動物全般を通じてみられる機能の可能性がある。全身の MR を機能喪失した動物が魚類ではじめて作出できたことで、未知であったミネラルコルチコイドの作用の本質が解き明かされたと言える。今後、このメダカを用いることで、不明な点の多い記憶や情動行動など副腎皮質ホルモン系の中枢機能の解明が期待される。MR は、副腎皮質ホルモン・プロゲステロン・アンドロゲン受容体からなる核内受容体サブファミリーの原型とされている。MR の中枢作用から、このファミリーの機能の原点が解明されるかもしれない。

性ステロイドを合成しない変異メダカでは、配偶子は形成されるが性行動は見られないことも発見した。これは性ステロイド系の本来の機能も行動制御であることを示唆している。即ちこのファミリーの本質的機能の可能性もある。魚類の体液調節のグルココルチコイドによる支配も解明した。鳥類や原始的な軟骨魚類の下垂体 - 副腎系も検討した。そして、脊椎動物の進化における副腎皮質ホルモン系の体液調節/腎臓機能の獲得を示唆した。以上の評価は高く、核内受容体分野を先導する Vincent Laudet 教授らから総説を依頼された。明暗選択水槽等を用いた嗜好テストによる情動解析、標的遺伝子の網羅的同定、性ステロイド系の進化も、進めている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計38件)

以下は全て査読有

- (1) Sakamoto T, Sakamoto H. 'Central' Actions of Corticosteroid Signaling Suggested by Constitutive Knockout of Corticosteroid Receptors in Small Fish. *Nutrients*. 2019 Mar 13;11(3). pii: E611. doi: 10.3390/nu11030611.
- (2) Katayama Y, Sakamoto T, Takanami K, Takei Y. The Amphibious Mudskipper: A Unique Model Bridging the Gap of Central Actions of Osmoregulatory Hormones Between Terrestrial and Aquatic Vertebrates. *Front Physiol*. 2018 Aug 14;9:1112. doi: 10.3389/fphys.2018.01112.
- (3) Myosho T, Takahashi H, Yoshida K, Sato T, Hamaguchi S, Sakamoto T, Sakaizumi M. Hyperosmotic tolerance of adult fish and early embryos are determined by discrete, single loci in the genus *Oryzias*. *Sci Rep*. 2018 May 2;8(1):6897. doi: 10.1038/s41598-018-24621-7.
- (4) Oti T, Takanami K, Ito S, Ueda T, Matsuda KI, Kawata M, Soh J, Ukimura O, Sakamoto T, Sakamoto H. Effects of Sex Steroids on the Spinal Gastrin-Releasing Peptide System Controlling Male Sexual Function in Rats. *Endocrinology*. 2018 Apr 1;159(4):1886-1896. doi: 10.1210/en.2018-00043
- (5) Sakamoto T, Hyodo S, Takagi W. A possible principal function of corticosteroid signaling that is conserved in vertebrate evolution: Lessons from receptor-knockout small fish. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018 Nov;184:57-61. doi: 10.1016/j.jsbmb.2018.02.011.
- (6) Katayama Y, Sakamoto T, Saito K, Tsuchimochi H, Kaiya H, Watanabe T, Pearson JT, Takei Y. Drinking by amphibious fish: convergent evolution of thirst mechanisms during vertebrate terrestrialization. *Sci Rep*. 2018 Jan 12;8(1):625. doi: 10.1038/s41598-017-18611-4.
- (7) Tsutsui N, Kotaka S, Ohira T, Sakamoto T. Characterization of distinct ovarian isoform of crustacean female sex hormone in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2018 Mar;217:7-16. doi: 10.1016/j.cbpa.2017.12.009.
- (8) Thomas AL, Maekawa F, Kawashima T, Sakamoto H, Sakamoto T, Davis P, Dores RM. Analyzing the effects of co-expression of chick (*Gallus gallus*) melanocortin receptors with either chick MRAP1 or MRAP2 in CHO cells on sensitivity to ACTH(1-24) or ACTH(1-13)NH(2): Implications for the avian HPA axis and avian melanocortin circuits in the hypothalamus. *Gen Comp Endocrinol*. 2018 Jan 15;256:50-56. doi: 10.1016/j.ygcen.2017.09.002.
- (9) Sakamoto T, Yoshiki M, Sakamoto H. The mineralocorticoid receptor knockout in medaka is further validated by glucocorticoid receptor compensation. *Sci Data*. 2017 Dec 12;4:170189. doi: 10.1038/sdata.2017.189.
- (10) Luo YJ, Kanda M, Koyanagi R, Hisata K, Akiyama T, Sakamoto H, Sakamoto T, Satoh N. Nematode and phoronid genomes reveal lophotrochozoan evolution and the origin of bilaterian heads. *Nat Ecol Evol*. 2018 Jan;2(1):141-151. doi: 10.1038/s41559-017-0389-y.

- (11) Ito T, Oti T, Takanami K, Satoh K, Ueda Y, Sakamoto T, Sakamoto H. A sexually dimorphic peptidergic system in the lower spinal cord controlling penile function in non-human primates. *Spinal Cord*. 2018 Jan;56(1):57-62. doi: 10.1038/sc.2017.105.
- (12) Takanami K, Inoue K, Mukai H, Tamura K, Jogahara T, Oda SI, Kawata M, Sakamoto T, Sakamoto H. Comparative Anatomy of Gastrin-releasing Peptide Pathways in the Trigeminal Sensory System of Mouse and the Asian House Musk Shrew *Suncus murinus*. *Acta Histochem Cytochem*. 2016 Dec 28;49(6):181-190. doi: 10.1267/ahc.16030.
- (13) Sakamoto T, Yoshiki M, Takahashi H, Yoshida M, Ogino Y, Ikeuchi T, Nakamachi T, Konno N, Matsuda K, Sakamoto H. Principal function of mineralocorticoid signaling suggested by constitutive knockout of the mineralocorticoid receptor in medaka fish. *Sci Rep*. 2016 Nov 29;6:37991. doi: 10.1038/srep37991.
- (14) Tsutsui N, Sakamoto T, Arisaka F, Tanokura M, Nagasawa H, Nagata K. Crystal structure of a crustacean hyperglycemic hormone (CHH) precursor suggests structural variety in the C-terminal regions of CHH superfamily members. *FEBS J*. 2016 Dec;283(23):4325-4339. doi: 10.1111/febs.13926.
- (15) Tamura K, Kobayashi Y, Hirooka A, Takanami K, Oti T, Jogahara T, Oda SI, Sakamoto T, Sakamoto H. Identification of the sexually dimorphic gastrin-releasing peptide system in the lumbosacral spinal cord that controls male reproductive function in the mouse and Asian house musk shrew (*Suncus murinus*). *J Comp Neurol*. 2017 May 1;525(7):1586-1598. doi: 10.1002/cne.24138.
- (16) Takahashi A, Davis P, Reinick C, Mizusawa K, Sakamoto T, Dores RM. Data for amino acid alignment of Japanese stingray melanocortin receptors with other gnathostome melanocortin receptor sequences, and the ligand selectivity of Japanese stingray melanocortin receptors. *Data Brief*. 2016 Apr 26;7:1670-7. doi: 10.1016/j.dib.2016.04.050.
- (17) Takahashi H, Sato T, Ikeuchi T, Saito K, Sakaizumi M, Sakamoto T. High levels of plasma cortisol and impaired hypoosmoregulation in a mutant medaka deficient in P450c17 α . *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Jul 15;430:25-32. doi: 10.1016/j.mce.2016.04.009.
- (18) Takahashi A, Davis P, Reinick C, Mizusawa K, Sakamoto T, Dores RM. Characterization of melanocortin receptors from stingray *Dasyatis akajei*, a cartilaginous fish. *Gen Comp Endocrinol*. 2016 Jun 1;232:115-24. doi: 10.1016/j.ygcen.2016.03.030.
- (19) Katayama N, Oti T, Takanami K, Sakamoto T, Sakamoto H. Postnatal development of the gastrin-releasing peptide system in the lumbosacral spinal cord controlling male reproductive function in rats. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2016;92(2):69-75. doi: 10.2183/pjab.92.69.
- (20) Oti T, Takanami K, Katayama N, Edey T, Satoh K, Sakamoto T, Sakamoto H. Perinatal testosterone exposure is critical for the development of the male-specific sexually dimorphic gastrin-releasing peptide system in the lumbosacral spinal cord that mediates erection and ejaculation. *Biol Sex Differ*. 2016 Jan 12;7:4. doi: 10.1186/s13293-016-0058-x.
- (21) Kobayashi Y, Mototani T, Murayama F, Sakamoto T. Basic reproductive biology of daggertooth pike conger, *Muraenesox cinereus*: A possible model for oogenesis in Anguilliformes. *Zoological Lett*. 2015 Sep 3;1:25. doi: 10.1186/s40851-015-0025-0.
- (22) Ogoshi M, Kato K, Sakamoto T. Effect of environmental salinity on expression of adrenomedullin genes suggests osmoregulatory activity in the medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Lett*. 2015 Mar 10;1:12. doi: 10.1186/s40851-015-0012-5.
- (23) Sakamoto T, Ogawa S, Nishiyama Y, Akada C, Takahashi H, Watanabe T, Minakata H, Sakamoto H. Osmotic/ionic status of body fluids in the euryhaline cephalopod suggest possible parallel evolution of osmoregulation. *Sci Rep*. 2015 Sep 25;5:14469. doi: 10.1038/srep14469.
- (24) Satoh K, Takanami K, Murata K, Kawata M, Sakamoto T, Sakamoto H. Three-dimensional visualization of multiple synapses in thick sections using high-voltage electron microscopy in the rat spinal cord. *Data Brief*. 2015 Jul 26;4:566-70. doi: 10.1016/j.dib.2015.07.005.
- (25) Takihara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Kreymerman A, Miyake S, Ueno S, Nagaya M, Nakanishi A, Iwao K, Takamura Y, Sakamoto H, Satoh K, Kondo M, Sakamoto T, Goldberg JL, Nabekura J, Tanihara H. In vivo imaging of axonal transport of mitochondria in the diseased and aged mammalian CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Aug 18;112(33):10515-20. doi: 10.1073/pnas.1509879112.

- (26) Sakamoto T, Nishiyama Y, Ikeda A, Takahashi H, Hyodo S, Kagawa N, Sakamoto H. Neurohypophysial Hormones Regulate Amphibious Behaviour in the Mudskipper Goby. PLoS One. 2015 Jul 31;10(7):e0134605. doi: 10.1371/journal.pone.0134605.
- (27) Satoh K, Takanami K, Murata K, Kawata M, Sakamoto T, Sakamoto H. Effective synaptome analysis of itch-mediating neurons in the spinal cord: A novel immunohistochemical methodology using high-voltage electron microscopy. Neurosci Lett. 2015 Jul 10;599:86-91. doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.031.
- (28) Satoh K, Oti T, Katoh A, Ueta Y, Morris JF, Sakamoto T, Sakamoto H. In vivo processing and release into the circulation of GFP fusion protein in arginine vasopressin enhanced GFP transgenic rats: response to osmotic stimulation. FEBS J. 2015 Jul;282(13):2488-99. doi: 10.1111/febs.13291.

〔学会発表〕(計64件)

Sakamoto T. A PRINCIPAL FUNCTION OF CORTICOSTEROID SIGNALING SUGGESTED BY RECEPTOR-KNOCKOUT SMALL FISH [13th International Congress on the Biology of Fish] 2018

〔図書〕(計4件)

Prolactin-releasing peptide. T. Tachibana, T. Sakamoto, In: Handbook of Hormones: Comparative and General Endocrinology. Y. Takei, H. Ando, K. Tsutsui (eds.) Elsevier (2016) 108-109

Growth hormone/prolactin family. T. Sakamoto, In: Handbook of Hormones: Comparative and General Endocrinology. Y. Takei, H. Ando, K. Tsutsui (eds.) Elsevier (2016) 112-113

Prolactin. T. Sakamoto, In: Handbook of Hormones: Comparative and General Endocrinology. Y. Takei, H. Ando, K. Tsutsui (eds.) Elsevier (2016) 19-20

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：荻野 由紀子

ローマ字氏名：(OGINO, yukiko)

所属研究機関名：九州大学

部局名：農学研究院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：00404343

研究分担者氏名：坂本 浩隆

ローマ字氏名：(SAKAMOTO, hirotaka)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：自然科学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20363971

研究分担者氏名：中町 智哉

ローマ字氏名：(NAKAMACHI, tomoya)

所属研究機関名：富山大学

部局名：大学院理工学研究部(理学)

職名：講師

研究者番号(8桁)：30433840

研究分担者氏名：今野 紀文

ローマ字氏名：(KONNO, norifumi)

所属研究機関名：富山大学
部局名：大学院理工学研究部（理学）
職名：講師
研究者番号（8桁）：50507051

研究分担者氏名：松田 恒平
ローマ字氏名：(MATSUDA, kouhei)
所属研究機関名：富山大学
部局名：大学院理工学研究部（理学）
職名：教授
研究者番号（8桁）：60222303

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。