

令和元年6月7日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07419

研究課題名(和文)ステロイド膜受容体の機能・構造解析を中心とした卵成熟・排卵誘導機構の解明

研究課題名(英文)Studies on functions of membrane steroid receptors and molecular mechanism of oocyte maturation and ovulation

研究代表者

徳元 俊伸 (TOKUMOTO, Toshinobu)

静岡大学・創造科学技術大学院・教授

研究者番号：30273163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：メダカゲノム中に存在する4種類のmPRの遺伝子変異メダカ系統の4重変異系統を樹立した。4重変異系統では妊性の低下が確認された。

排卵誘導の鍵遺伝子候補11遺伝子を選択できた。これらの候補遺伝子についてCRISPR/Cas9システムにより機能欠失系統を樹立した。stm遺伝子ノックアウト系統では排卵には異常が見られなかったものの受精率に低下が見られ、stm遺伝子が耳石形成だけでは無く受精にも関与するという新たな知見が得られた。また、pax2a遺伝子ノックアウト系統でも受精率の低下、受精卵においても発生異常が観察され、受精から胞胚形成期にも機能を有するという新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステロイド膜受容体(mPR)4重変異体メダカで見られた妊性の低下は初めての知見となる。ステロイド膜受容体を介したステロイドホルモンの作用が生理学的意味を持つことを示す実験的証拠と成り得る。今後、卵巣の細胞レベルでの観察などにより詳細を調べる。さらにゼブラフィッシュを用いたゲノム編集技術によるmPR遺伝子群のゲノム編集系統を樹立し、確証を得る。排卵誘導遺伝子候補については二つの遺伝子について受精前後の新たな機能を示すことができた。引き続き残りのゲノム編集系統の表現型解析を進め、排卵誘導の鍵遺伝子の解明を目指す。

研究成果の概要(英文)：We established quadruple mutant strain of membrane progesterin receptors in Medaka fish. The mutant strain showed defect in their fecundity.

We selected 11 candidate genes for induction of ovulation in zebrafish. Then we established gene knock-out strains of these genes by CRISPR/Cas9 system. Among them, starmaker (stm) gene knock-out strain showed low fertilization rate and abnormal embryos were developed. The results demonstrated that stm gene possesses the roles in fertilization in addition to formation of ear stones. Pax2a gene knock-out strain also showed low fertilization rate and abnormal development. Pax2a is known to have an important role in early development but also have function during on the beginning of development.

研究分野：生殖生物学

キーワード：ステロイド膜受容体 卵成熟 排卵 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

新規ステロイド膜受容体, mPR は長年、同定が待たれていた卵成熟誘起ホルモンの受容体として 2003 年に発表された (Zhu et al. PNAS 2003)。本分子の発見は卵成熟誘起ホルモンの受容体として動物生理学の分野で脚光を浴びただけではなく、ステロイドホルモンの引き起こす急性反応であるノンゲノミック反応を仲介する新規受容体として内分泌学分野でも大きな反響を呼んでいる。mPR 分子の発表以降、ノンゲノミック反応に関する研究が世界的に進められ、エストロゲンの膜受容体候補としてオーファン受容体である GPR30 が候補分子として報告された。

研究代表者らは、ジエチルstilbestロール(DES)の卵成熟誘導作用を発見し(Tokumoto et al. PNAS 2004)、その標的候補である新規ステロイド膜受容体(mPR)を同定し (Tokumoto et al. Gen Comp Endo 2006)、DES が mPR に作用して卵成熟を誘起することを明らかにした (Tokumoto et al. Endocrinology 2007)。DES は人工合成エストロゲンである。エストロゲンが全く誘導活性の無い卵成熟誘起に対して DES が作用した驚くべき結果であった。しかも通常は核内受容体に作用するエストロゲン作用とは異なる卵細胞の細胞表面からの作用であったことから、内分泌かく乱物質の新規作用経路を明確に示した最初の例として注目された (Endocrinology News 2007 年 7 月号掲載)。その後、個体レベルでの DES の作用を解明するためゼブラフィッシュ生体を用いた生体アッセイ法を確立し (特許 4501002、4528973 号、Tokumoto et al. PLOS ONE 2011)、DES の卵成熟誘導作用がインビボでもみられることを明らかにした。この一連の研究成果を背景として研究代表者らは卵成熟誘起ホルモン受容体として、一方で内分泌かく乱物質の新規作用分子としてステロイド膜受容体の機能解析を中心にステロイドホルモンによる卵成熟・排卵誘導機構の解明を目指している。

2. 研究の目的

これまでの研究成果をもとに、本研究はステロイド膜受容体の機能について決定的な証明をもたらすため、また、ステロイドホルモンのノンゲノミック反応とゲノミック反応との関係について明らかにするため、両反応の連動により誘導される卵成熟・排卵の遺伝子経路を解明するための研究を行う。研究期間内には以下のことを明らかにする。

1. ステロイド膜受容体遺伝子変異メダカの系統樹立を中心とした膜受容体の機能解析

システムティックな逆遺伝学の系として魚類において初めて確立された遺伝子変異メダカの作製系と最近になって確立された CRISPR/Cas9 システムを用いて 3 種類の mPR 遺伝子の変異メダカ系統を樹立する。その表現型解析からステロイド膜受容体分子の機能について明確な証明をもたらす。

2. 生体アッセイ法による排卵誘導遺伝子の同定

研究代表者らが開発したインビボで卵成熟・排卵誘導が可能な生体アッセイ法により生体内で卵成熟のみを誘導された状態の卵、卵成熟・排卵の両方が誘導された卵を調製し、それぞれに発現誘導または発現が低下されている遺伝子を RNA-seq 法によりリストアップする。これらのリストを誘導未処理の対照群と比較することによりそれぞれの処理で発現変化する遺伝子を明らかにする。発現変化を定量 PCR により検証し、排卵誘導の鍵遺伝子候補については遺伝子変異系統樹立を開始し、機能解明に繋げる。

3. 研究の方法

ステロイド膜受容体遺伝子変異メダカの系統樹立

これまでの実験では確証に至っていなかった mPR の生理機能を明確にするため遺伝子変異メダカ系統を樹立する。その表現型を調べることで卵巣だけでなく全身に発現する mPR 分子の機能解明にもつながると考えられる。

これまでノックアウトメダカ作製系によりメダカゲノム中に存在する 4 種類の mPR (、 -2, 、) の遺伝子変異メダカ系統、15 系統を樹立した。その結果、それぞれ 1 遺伝子の変異では特に異常は見られず、mPR 遺伝子間で遺伝子機能に冗長性が見られることが明らかになった。また、これまでの変異系統は全て点突然変異であり、表現型を示す程の mPR タンパク質の変化を起こすものではなかった可能性もある。点突然変異の結果、終始コドンに変化し、タンパク質の構造に大きな変化をもたらす変異は mPR の 1 系統のみであった。そこで、それぞれの掛け合わせによる 2 重、3 重の変異体の系統樹立を進めると共に、近年、確立され急速に普及した遺伝子編集技術である CRISPR/Cas9 システムにより確実な機能欠失系統の樹立を進め

る。その際、変異導入個体はこれまで樹立した変異系統を用いての多重変異体の作出を効率的に進める。

インビボ卵成熟・排卵誘導法による排卵誘導遺伝子の同定

研究代表者らが開発した新規卵成熟・排卵誘導法を用いて排卵誘導遺伝子群を同定する。卵成熟誘起のための反応経路と排卵誘導のための反応経路を明確に区別できる新たな手法を導入することでこれまで不明であった排卵誘導経路の解析が可能になると考える。

研究代表者らは内分泌かく乱物質のインビボにおける作用を調べるためのアッセイ系の開発を進め、ステロイドホルモンや内分泌かく乱物質を飼育水に直接に添加し、サカナの生体そのものに作用させる新しい手法を確立した。

この手法により魚類の卵成熟誘起ホルモンである 17,20 β -DHP をゼブラフィッシュの生体そのものに作用させた場合、卵成熟が完了するとともに排卵まで進行し、受精可能な卵が得られた。これに対し、DES の場合は卵成熟のみが進行し、排卵は起きなかった。そこで、この卵の3種類の状態、すなわち卵成熟も排卵も誘起されていない状態、卵成熟のみ誘導されている状態、卵成熟・排卵の両方が誘導されている状態が明確に区別された状態の試料を調製することができる新しい方法を用いて排卵誘導の分子機構を解明する。これまで mRNA 発現レベルの解析はゼブラフィッシュにおいて既に確立市販されているおよそ 15,000 遺伝子の解析の可能なマイクロアレイを使用して行ってきた。しかし、マイクロアレイ解析では偽陽性がみられる他、配列情報の不正確さの問題があり、その後のリアルタイム PCR による各遺伝子の発現解析との不一致が見られた。ところが平成 26,27 年度とゲノム支援プロジェクトに採択され、ゲノムシークエンサーによる RNA-seq による解析が実施できた。RNA-seq の場合はシークエンスデータとともにその遺伝子の発現量の変動が調べられることからより正確なデータが得られる。これまで一つの転写因子 (Ptf2) が排卵誘導群で特異的な発現上昇を示すことが明らかになった(2015 年動物学会発表)。本研究では 27 年度分の RNA-seq のデータを含めて候補遺伝子を選択し、リアルタイム PCR による発現変動の確認を進める。

4. 研究成果

ステロイド膜受容体、mPR 遺伝子に変異をもつノックアウトメダカを逆遺伝学的手法による分離を進め、メダカゲノム中に存在する受容体遺伝子群 4 種類について各 3~4 系統を分離した。本研究ではこれらの内、特にタンパク質の構造に影響の出やすいと推定されるアミノ酸置換の変異体を選定し、それらの 4 重変異系統の作出に成功した。4 重変異系統では妊性の低下が確認された。この結果は mPR の生理学的機能を示すはじめての遺伝学的証拠となり得る。今後、妊性低下の原因の詳細について調べていく必要がある。一方で長期間を有しているステロイド膜受容体の遺伝子変異動物を用いた機能証明についてゼブラフィッシュを用いてゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9 法) による遺伝子編集も進め機能の証明を目指す。

研究代表者らは mPR 安定発現酵母株を樹立してホルモン結合活性を有する mPR 分子の発現、精製に成功している (Babul et al. PLOS ONE 2015)。本研究期間に出願していた特許について再審査請求を進め、特許の取得に至った (特許第 6516956 号)。この方法を用いた mPR の高度な精製を進め立体構造解析を進めていく。

これまでのマイクロアレイ解析に加え RNA-seq 解析を実施できたことで排卵誘導の鍵遺伝子候補 11 遺伝子を選択できた。これらの候補遺伝子について CRISPR/Cas9 システムにより遺伝子ノックアウト系統を樹立した。stm 遺伝子ノックアウト系統では排卵には異常が見られなかったものの受精率に低下が見られ、stm 遺伝子が耳石形成だけでは無く受精にも関与するという新たな知見が得られた。また、pax2a 遺伝子ノックアウト系統でも卵巣形成異常、受精率の低下、受精卵においても発生異常が観察され、卵形成、受精から胞胚形成期にも機能を有するという新たな知見が得られた。今後は、他の系統の表現型解析も順次進めていくと共に、RNA-seq で選択した 297 遺伝子の内、排卵に関連する可能性のある遺伝子をさらに選定し、排卵誘導に関わる遺伝子の同定を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. A. Akhter, M. Rahaman, R. Suzuki, Y. Murono, T. Tokumoto (2018) Next-generation and further transgenerational effects of bisphenol A on zebrafish reproductive tissues. **Heliyon** 4(9), 1-20. (査読有)
2. T. Miyazaki, M. Fukui, E. Inagaki, K. Miki, S. Takabayashi, H. Katoh, Y. Ohira, M. Noguchi, T. Tokumoto (2018) Identification of two additional genomic loci responsible for experimentally induced testicular teratoma 2 and 3 (*ett2* and *ett3*). **Zoological Science** 35(2), 172-178. (査読有)
3. W. Klangnurak, T. Fukuyo, MD. Rezanujjaman, M. Seki, S. Sugano, Y. Suzuki, T. Tokumoto (2018)

Candidate gene identification of ovulation-inducing genes by RNA sequencing with an *in vivo* assay in zebrafish. **PLOS ONE** 13 (5), 1-19. (査読有)

4. T. Tokumoto, S. Kodani, T. Miyazaki, Y. Suzuki, B. Casareto, T. Bahorun, and R. Bhagooli (2017) Detecting membrane progesterin receptor (mPR)-interacting compounds from coral seawater in Mauritius. **WIOMA** (Western Indian Ocean Journal of Marine Science). Special Issue 1/2017, 77-84. (査読有)
5. S. R. Roy, J. Wang, M. Nakashima, T. Tokumoto (2017) Characterization of membrane progesterin receptor α (mPR α) of the medaka and role in the induction of oocyte maturation. **Biomedical Research** 35, 47-59. (査読有)
6. W. Klangnurak, T. Tokumoto (2017) Fine selection of up-regulated genes during ovulation by *in vivo* induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish. **Zoological Letters** 3, (2) , 1-10. (査読有)
7. T. Tokumoto, Md. B. Hossain, J. Wang (2016) Establishment of procedures for studying mPR-interacting agents and physiological roles of mPR. **Steroids** 100, 21-26. (査読有)

[学会発表] (計 15 件)

1. 「 Role of *Starmarker (stm)* Gene for Fertilization in Zebrafish 」 Taketo Fukuyo, Wanlada Klangnurak, Md.Rezanujjaman, Toshinobu Tokumoto 2019 9th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB2019) at Singapore, Singapore, Jan 7-8, 2019
2. 「 Establishment of Gene Knock-out Strain of *pax2a* Selected as an Ovulation-inducing Gene by *in vivo* Assay by Genome Editing in Zebrafish 」 Theeranukul Pachoensuk, Fukuyo Taketo, Klangnurak Wanlada, Toshinobu Tokumoto 2019 9th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (ICBBB2019) at Singapore, Singapore, Jan 7-8, 2019 (Best oral presentation)
3. 「 プロゲステロン膜受容体 (mPR) 遺伝子群変異メダカ系統の表現型解析 」 王軍、Abdullah AN Naser、徳元俊伸 第 4 3 回日本比較内分泌学会大会、宮城、仙台 2018 年 12 月 9-11 日
4. 「 IDENTIFICATION OF OVULATION-INDUCING GENES SELECTED BY *IN VIVO* ASSAY BY GENOME EDITING IN ZEBRAFISH 」 Theeranukul, P., Fukuyo, T., Klangnurak, W., Tokumoto, T. 日本動物学会第 89 回大会、北海道、札幌 2018 年 9 月 14-16 日
5. 「ゼブラフィッシュの *starmaker (stm)* 遺伝子のゲノム編集による機能解析」ワンラダクラングヌラック、福與健人、エムディレザヌツジャマン、徳元俊伸 日本動物学会第 89 回大会、北海道、札幌 2018 年 9 月 14-16 日
6. 「 Coral reefs stay on new frontiers of natural compounds 」 T. Tokumoto Workshop 「 State and conservation of our coral reefs 」 Ebene, Mauritius, Mar 3, 2018
7. 「キンギョ脳におけるプロゲステロン膜受容体 (mPR) の局在」王 軍、原口省吾、徳元俊伸 第 4 2 回日本比較内分泌学会大会、奈良、奈良、2017 年 11 月 18-19 日
8. 「ゼブラフィッシュ生体内卵成熟・排卵誘導法による排卵誘導候補遺伝子の特異的選択」ワンラダクラングヌラック、福與健人、エムディレザヌツジャマン、今村聖実、堀内映実、菅野純夫、鈴木穰、徳元俊伸 日本動物学会第 88 回大会、富山、富山 2017 年 9 月 20-23 日
9. 「ゼブラフィッシュの *starmaker (stm)* 遺伝子のゲノム編集による機能解析」ワンラダクラングヌラック、福與健人、エムディレザヌツジャマン、徳元俊伸 日本動物学会第 88 回大会、富山、富山 2017 年 9 月 20-23 日
10. 「実験的精巣性テラトーマの形成に関わる候補領域の同定」宮寄岳大、高林秀次、加藤秀樹、野口基子、徳元俊伸 日本動物学会第 88 回大会、富山、富山 2017 年 9 月 20-23 日
11. 「キンギョ脳におけるプロゲステロン膜受容体 (mPR) の発現とステロイドとの結合親和性」王 軍、原口省吾、徳元俊伸 第 4 1 回日本比較内分泌学会大会 神奈川、相模原、2016 年 12 月 9-11 日

12. 「An application of in vivo assay to identify ovulation-inducing genes in zebrafish」 Klangnurak W, Tosaka M, Imumura K, Horiuchi T, Sugano S, Suzuki Y, Tokumoto T. The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan at Okinawa convention center, Okinawa, Naha, Nov 14-19, 2016
13. 「Establishment of membrane progesterin receptor (mPR) mutant Medaka strains to analyse central roles of mPRs」 J. Wang, S.R. Roy, I. Hara, K.Naruse, Y. Kamei, Y. Taniguchi, T. Tokumoto The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan at Okinawa convention center, Okinawa, Naha, Nov 14-19, 2016
14. 「Identification of ovulation-inducing genes selected by the method for in vivo induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish」 Klangnurak W, Tosaka M, Imumura K, Horiuchi T, Sugano S, Suzuki Y, Tokumoto T. The Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (JMZM) at NIBB, Aichi, Okazaki, Aug 20-22, 2016
15. 「Approaches for detailed analysis of membrane progesterin receptor (mPR) protein and for physiological roles of mPR」 T. Tokumoto 8th International Symposium of Fish Endocrinology, Sweden, Gothenburg Jun 28-Jul 2, 2016

〔図書〕(計 1 件)

徳元俊伸 (2016) ステロイドホルモンの新しい作用のしくみ ナノバイオ・テクノロジー, 静岡大学ナノバイオ科学研究分野編, 199-214. 静岡学術出版 (分担執筆)

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 1 件)

名称：ステロイドホルモン膜受容体の精製方法
発明者：徳元俊伸、大島卓之
権利者：国立大学法人静岡大学
種類：特許
番号：特許第 6516956 号
取得年：平成 31 年
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。