

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14601

研究課題名(和文) 老化・がん化耐性げっ歯類ハダカデバネズミ特異的な核内受容体遺伝子重複の機能解析

研究課題名(英文) Characterization of nuclear receptor gene duplication in the longest-living rodent, the naked mole-rat

研究代表者

岡 香織 (Oka, Kaori)

熊本大学・大学院先導機構・特別研究員 (SPD・PD・RPD)

研究者番号：50755907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ハダカデバネズミ(デバ)はアフリカ原産の小型齧歯類であり、乾燥したサバンナの地下という水にアクセスできない環境に暮らす。本課題では、体液恒常性に関わる遺伝子の発現制御に重要な遺伝子、ミネラルコルチコイド受容体がデバにおいて遺伝子重複していることに着目し、その機能解析を行った。解析の結果、重複した変異型ミネラルコルチコイド受容体は、ステロイド産生に関わる組織に高発現し、正常型受容体の転写活性を補助する機能を有することを見出した。また、この重複が近縁種では見られないことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステロイドホルモン受容体は祖先型受容体からの遺伝子重複を経て、多様な機能を持つファミリーが生じてきた。一方これまで、ミネラルコルチコイド受容体の重複が起きた例はほとんど知られておらず、フタコブラクダに続き、デバが二例目となる。本課題で明らかとなった遺伝子重複とその新たな機能は、比較内分泌学の基盤的知見として重要なものであり、また、水の乏しい環境でのミネラルコルチコイド受容体の多様化の可能性を示す進化的にも興味深い成果といえる。

研究成果の概要(英文)：The naked mole-rat is a subterranean rodent that lives in the dry African savannah and unable to access free water. In this study, I focused on the gene duplication of the mineralocorticoid receptor, which is an important gene for the regulation of the gene expressions involved in body fluid homeostasis. As a result, I found that the duplicated mutant mineralocorticoid receptor is highly expressed in the tissue involved in steroidogenesis and has a function to support the transcriptional activity of the canonical receptor. This duplication was not found in the related species.

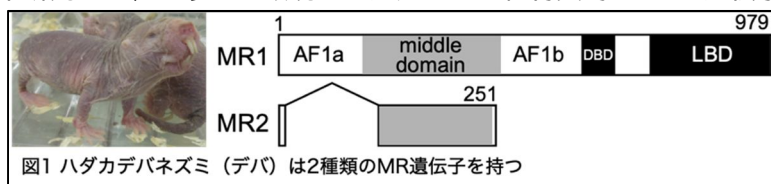
研究分野：比較生物学

キーワード：ハダカデバネズミ 核内受容体 遺伝子重複 遺伝子制御

1. 研究開始当初の背景

ミネラルコルチコイド受容体 (MR) は生体内の浸透圧調節を含む様々な生理機能に関わる転写因子である。MR の発現低下は複数のがん種の増悪と関連することが知られる一方、過剰な活性化は組織線維化や炎症の引き金となるなど、MR シグナル伝達系の適切な制御は個体の健康に非常に重要である。

ほぼ全ての脊椎動物はゲノム中にただひとつの MR 遺伝子を持つことが知られるが、著しい老化・がん化耐性をもつ小型齧歯類ハダカデバネズミ (デバ) は MR 遺伝子重複変異を有し、他生物種が持つ MR と相同な野生型 MR (MR1) に加え、N 末端ドメインの一部、DNA 結合ドメイン、リガンド結合ドメインを欠いた変異型 MR (MR2) をもつ (図 1)。デバは野生下ではアフリカのサバンナの地下に生息し、水にアクセスできない環境に暮らす。そのため、飲水はせず、水分摂取は餌に頼っている。本研究では、こうした環境への適応として種特異的な MR 遺伝子重複が獲得され、デバの特殊な生態や疾患耐性になんらかの影響を与えているのではないかと考え、機能解析を行うこととした。



2. 研究の目的

本研究では、デバで見出した MR 遺伝子重複変異が生体にどのような影響を与えているかを解明し、新規の遺伝子変異がデバの特殊な生態及び疾患耐性に寄与するかを明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) デバおよび近縁の齧歯類における MR 遺伝子の発現解析
組織あるいは皮膚線維芽細胞より抽出した RNA を用い、MR バリエーションの発現を解析した。また、公共データベースに寄託されているトランスクリプトームデータの再解析を実施し、各組織におけるバリエーションの探索および MR 発現量の定量を行った。

(2) デバ MR のレポーターアッセイ
デバ MR1 を恒常発現させた 293T 細胞に MR 標的配列 (MMTV-LTR) を含むレポーターベクターおよび MR2 発現ベクターをトランスフェクトし、各種リガンドの存在かでの転写活性を評価した。

(3) デバ MR のタンパク質発現解析
デバ MR1 を恒常発現させた 293T 細胞に MR2 発現ベクターをトランスフェクトした際の MR1 発現量変化をウェスタンブロットにより解析した。また、リン酸化動態を Phos-tag SDS-PAGE 後にウェスタンブロットすることで解析した。

(4) xenograft 系を用いたデバ MR 発現による抗腫瘍効果評価
ヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 にレンチウイルスを用いてデバ MR1 および MR2 を恒常発現させ、免疫不全マウス (ヌードマウス) に移植し、担がんマウスの腫瘍体積を計測・算出した。

4. 研究成果

(1) 変異型 MR はデバ特異的であり、ホルモン産生に関わる組織に高発現する
変異型 MR は最終エキソン-エキソンジャンクションの上流 55 塩基以上に終止コドンが存在することから、ナンセンス変異依存 mRNA 分解 (NMD) の標的となりうる。NMD 阻害剤であるシクロヘキシミドおよび転写阻害剤アクチノマイシン D を添加した細胞での発現解析を行なった結果、メカニズムは不明であるが、MR2 が NMD を回避していることを示唆する結果を得た。

そこで、変異型 MR がどの進化段階で獲得されたかを明らかにするため、ラットおよびマウスの腎臓における遺伝子発現解析を行なった。その結果、両種において MR2 の発現はみられなかった。さらに、より近縁であるモルモットおよびダマラランドデバネズミの腎臓トランスクリプトームデータの de novo アセンブリを行い、MR2 様配列を探索した。両種共に MR2 様配列は検出されなかったことから、変異型 MR はダマラランドデバネズミとの分岐以後に獲得されたことが推測された。

さらに公共データベースに寄託されている 11 種類の組織由来 (247 サンプル) のトランスクリプトームデータの再解析を行い、各組織における MR1 および MR2 の発現量を比較した。MR1 は腎臓、中枢神経系といった MR 機能がよく知られている組織で高い発現が認められたのに対し、MR2 は生殖腺、副腎、甲状腺といったホルモン産生に関わる組織において高く発現していた (図 2)。予備的解析から、デバ MR1 および MR2 は同染色体内でタンデムデュプリケーションにより重複したことが明らかとなっていたことから、両遺伝子の非翻訳領域の変化による発現制御について検討した。その結果、両遺伝子には複数の 5'UTR バリエーションが存在し、多くの 5'UTR は共通して保存されているものの、その頻度が遺伝子間で異なることがわかった。プロモーターの使い分けが、それぞれの MR 発現の組織特異性を規定していると考えられる。

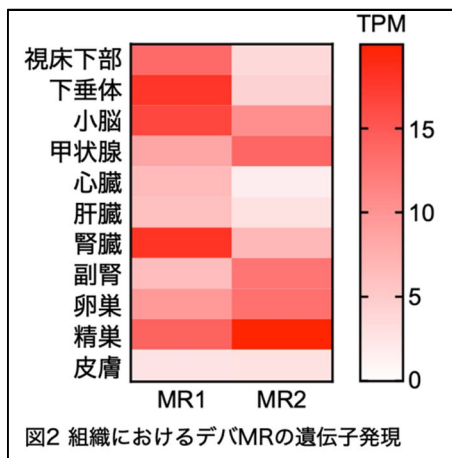


図2 組織におけるデバMRの遺伝子発現

(2) 変異型 MR は野生型 MR の転写活性を亢進する

変異型 MR がどのような機能を有するかを明らかにするため、レポーターアッセイを行なった。MR2 は、MR の機能に重要な DNA 結合ドメインおよびリガンド結合ドメインを欠く。その構造から予測される通り、MR2 は単独ではリガンド依存的な転写活性化を示さなかった。一方で、MR2 を MR1 と共発現させると、MR1 単独のときと比べ、有意に MR1 の転写活性が亢進された。この MR2 による MR1 の転写活性化は、各種の MR リガンドに対して認められ、とくに高濃度領域において顕著であった (図 3)。

当初、MR2 による MR1 の転写活性化は、MR1 の発現亢進や安定化を介するものと予想したが、MR2 の共発現による RNA やタンパク質レベルでの MR1 発現変化はみられなかった。そこで、翻訳後修飾が MR 活性に影響するという報告に着目し、MR1 のリン酸化について検討した。解析の結果、MR2 を共発現した場合、リガンド添加後のリン酸化 MR1 の割合がわずかに増加するということが明らかとなった。MR2 は、種々の転写共役因子との結合に関与する MR の N 末端ミドルドメインと相同であることから、共役因子との相互作用や翻訳後修飾の調節を介し、MR1 の活性調節を行なっている可能性がある。

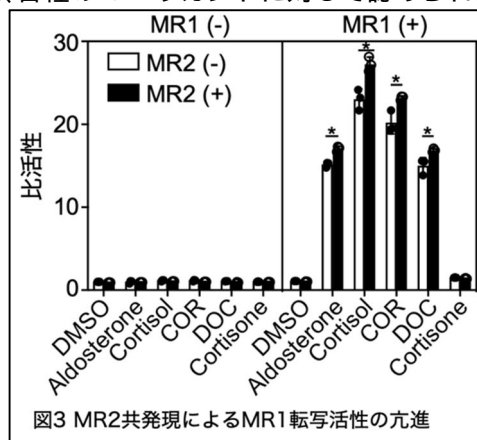


図3 MR2共発現によるMR1転写活性の亢進

(3) MR の高発現は腫瘍増殖抑制効果を有するが、変異型 MR の寄与に関しては今後の検討が必要である

様々ながん種において MR の発現低下が悪性化と関連することが報告されている。変異型 MR の獲得が、デバにおいてがん化耐性に関与するかを検討するため、ヒト膵臓がん細胞 MIA PaCa-2 の xenograft 系を用いて解析を行なった。その結果、MR1 のみを発現させた細胞を移植したマウスでほとんど腫瘍の増殖が見られず、MR1 および MR2 を共発現させた細胞でのさらなる腫瘍増殖抑制効果の評価は困難であった。ただ、デバ MR 非発現細胞移植による腫瘍形成時点をエンドポイントとした腫瘍重量を評価すると、複数の実験回で MR1 および MR2 共発現細胞のほうが、腫瘍重量が小さい傾向がみられた。腫瘍増殖における MR の役割を詳細に明らかにするためには、発現量の調節や細胞種の選定について、さらなる検討が必要である。

本研究課題により、デバ特異的に獲得された変異型 MR の発現や機能の一端を明らかにすることができた。MR の遺伝子重複は、これまでフタコブラクダのゲノム解析によってその存在が示唆されたのみであり、機能解析が行われたのは初めての例となる。ステロイド受容体は祖先型受容体からの遺伝子重複を経て多様な機能に分化したことが知られており、本成果は比較内分泌学研究的基盤として重要である。フタコブラクダとの類似性から鑑みるに、重複により生じた第二の MR は水の乏しい環境における MR シグナル伝達の適切な調節に関わっている可能性がある。また、デバ MR2 は MR1 とは異なる組織特異性をもち、生殖腺などホルモン産生に関わる組織に高発現することから、MR 以外のシグナル系とのクロストークも示唆される。デバは限られた個体のみが繁殖し、他個体はワーカーとしてコロニーの維持を行う真社会性を持つ。当初予想していた体液調節、抗老化・がん化といった機能の他、特異な繁殖様式への関与も含め、体内での役割については今後検討を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oka Kaori, Bono Hidemasa, Kuroiwa Asato, Fujioka Shusuke, Shimizu Atsushi, Katsu Yoshinao, Miura Kyoko	4. 巻 66
2. 論文標題 Diversification of mineralocorticoid receptor genes in a subterranean rodent, the naked mole-rat	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 299 ~ 311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JME-20-0325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kaori Oka, Shusuke Fujioka, Hidemasa Bono, Asato Kuroiwa, Yoshinao Katsu, Kyoko Miura
2. 発表標題 Functional diversification of duplicated mineralocorticoid receptors in naked mole-rat (<i>Heterocephalus glaber</i>)
3. 学会等名 Keystone Symposia, Intra- and Intercellular Mechanisms of Aging (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡香織、大岩祐基、河村佳見、杉浦悠毅、南嶋洋司、末松誠、上原ひかる、松田史生、和氣正樹、武田憲彦、城戸康年、稲岡 健ダニエル、北潔、三浦恭子
2. 発表標題 老化・がん化耐性齧歯類ハダカデバネズミの代謝制御と疾患との関わり
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡香織、大岩祐基、河村佳見、杉浦悠毅、南嶋洋司、末松誠、上原ひかる、松田史生、和氣正樹、武田憲彦、城戸康年、稲岡 健ダニエル、北潔、三浦恭子
2. 発表標題 ハダカデバネズミにおける代謝制御と疾患耐性
3. 学会等名 第89回日本動物学会札幌大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------