

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007 年～2008 年

課題番号：19870006

研究課題名（和文） 魚類の浸透圧調節におけるコルチコイド産生制御機構の解明

研究課題名（英文） Osmoregulatory regulation of corticosteroids in teleosts

研究代表者

氏名（アルファベット） 日下部 誠 (Kusakabe Makoto)

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・海洋研究所・助教

研究者番号 40451893

研究成果の概要：

コルチコイドの標的細胞において、哺乳類では 1 型と 2 型ステロイド代謝酵素の一つである 11-β-水酸化脱水素酵素 (11-β-HSD) が存在しコルチゾルの標的器官で相互に作用しあうことにより、コルチゾル量を必要に応じて最適化する働きがあることが分かっている。そこで本研究では、真骨類においても 2 種類の 11-β-HSD が存在し、海水・淡水適応時にコルチゾルを必要に応じて鰓にて局所的に調節することにより、浸透圧調節機能を制御しているとの仮説を検証した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	1,370,000	0	1,370,000
平成 20 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：浸透圧、ステロイド代謝酵素、コルチゾル、コルチゾン、サケ科魚類、鰓

1. 研究開始当初の背景

申請者は哺乳類の 2 型 11-β-HSD のオーソログをニジマスから単離し、その遺伝子が鰓を含めた様々な組織で発現していることを明らかにした。しかしながら、魚類では哺乳類の 1 型 11-β-HSD のオーソログはまだ単離されていない。GeneBank データベースにメダカ、フグ、イトヨおよびゼブラフィッシュに 3 型 11-β-HSD という遺伝子が存在することが報告されている。これまでにこれらの 3 型 11-β-HSD の機能を調べた報告はないが、遺伝配列の系統解析から 3 型は 1 型の祖先型の可能性が高いことが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究において次の 2 つの仮説を検証することを目的とした。(1) 真骨類にも哺乳類と同様に 2 種類あるいはそれ以上の 11-β-HSD が存在するか。(2) 硬骨魚類における主要な浸透圧調節器官である鰓において、局所的にこれらの 11-β-HSD がコルチゾル濃度を調節しているか。これらの研究から、これまで考えられていた間腎から分泌されるコルチゾルだけではなく、海水・淡水適応時にコルチゾルを必要に応じて鰓にて局所的に調節することにより、真骨類の浸透圧調節機能を制御しているとの仮説を検証した。

3. 研究の方法

(1) 3型 11 HSD 遺伝子の単離と機能解析
ニジマス²の鰓より RNA を抽出し RACE 法を用いて 3 型 11 HSD 様遺伝子全長の単離を行う。その後、単離した遺伝子がステロイド代謝活性を持つかどうかを遺伝子発現実験にて調べる。発現実験には小麦胚芽無細胞タンパク質合成システムあるいは COS-7 あるいは HEK293 細胞を使い、3 型 11 HSD 様遺伝子を発現させる。その後、培養液に NAD⁺ あるいは NADPH 等の補酵素の存在下でコルチゾルおよびコルチゾン³を添加し、3 型 11 HSD のステロイド代謝活性を調べる。

(2) Real-time PCR の定量系を確立

3 型 11 HSD 遺伝子の単離が完了した後、11 HSD 遺伝子の発現を定量するため蛍光標識された目的遺伝子に特異的なプローブを用いる Real-time PCR の定量系を確立する。3 型 11 HSD については研究計画(1)で得られた遺伝子配列を用いて特異的プライマーおよびプローブを作成する。ニジマス² 型 11 HSD については申請者がこれまでの研究で既に測定系の確立が完了している。プローブを用いない SYBR Green Real-time PCR 法と比較して、蛍光標識されたプローブを用いる Real-time PCR 法により測定系の特異性と感度が改善されることが期待される。

(3) 鰓における 11 HSD 遺伝子の発現変化
ニジマスを用いて、海水・淡水馴致実験群を作り、それぞれの馴致群の鰓を経時的に採取し 2 型および 3 型 11 HSD 遺伝子発現変化を Real-time PCR 法を用いて解析する。鉱質コルチコイド受容体および糖質コルチコイド受容体についても Real-time PCR 法の測定系を確立し、2 型および 3 型 11 HSD 遺伝子と合わせて解析し、11 HSD とコルチコイド受容体の遺伝子発現変化を検証する。

4. 研究成果

本研究では平成 19 年度にニジマスより 3 型 11 HSD 遺伝子のクローニングを試み、3 型 11 HSD 様遺伝子の全長を単離することに成功した。次に 3 型 11 HSD 様遺伝子の組織分布を解析したところ、鰓で特異的に発現していることが明らかになった。次に、単離した遺伝子がステロイド代謝活性を持つかどうかを調べるため、小麦胚芽無細胞タンパ

ク質合成システムを用いて 3 型 11 HSD 様遺伝子の合成を行い、その酵素活性の解析を試みたが得られたタンパク質に酵素の活性が見られなかった。

そこで次に動物性培養細胞を用いて 3 型 11 HSD 遺伝子を発現させることにより酵素活性の解析を行ったが、この発現系においてもコルチコイドに対する代謝活性は見られなかった。しかしながら、3 型 11 HSD 遺伝子は鰓で特異的に発現しており、大西洋サケにおいては異なる塩分環境において発現変化をしていることが Real-time PCR 法による解析で明らかになった。このことから 3 型 11 HSD 遺伝子⁴がなんらかの形で浸透圧調節に関わっている可能性は高いと考えられる。今後、ノックダウン等の方法を用いて 3 型 11 HSD の生理学的機能を同定する必要があると考えている。また、鉱質コルチコイド受容体および糖質コルチコイド受容体との関連も合わせて解析を継続していきたいと考えている。

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)

[学会発表](計 2 件)

Makoto Kusakabe, Steve McCormick, Yoshio Takei and Graham Young: Molecular cloning, sequence analysis, and salinity regulation of gill 11 hydroxysteroid dehydrogenase type 3 in salmonids. Sixth International Symposium on Fish Endocrinology, 平成 20 年 6 月 22 - 27 日, Calgary, Canada

Makoto Kusakabe, Steve McCormick, Yoshio Takei and Graham Young: Roles in multiple types of 11 hydroxysteroid dehydrogenases for osmoregulation in rainbow trout gill? Joint symposium on ocean and coastal sciences, 平成 20 年 3 月 13 -15 日, 東京大学 海洋研究所

6 . 研究組織

(1)研究代表者

日下部 誠 (Kusakabe Makoto)

東京大学・海洋研究所・助教

研究者番号 40451893

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし