

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570064

研究課題名 (和文) 性ステロイドホルモン受容体の分子進化の解析

研究課題名 (英文) Analysis of molecular evolution of sex steroid hormone receptors

研究代表者

勝 義直 (KATSU YOSHINAO)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：00332180

研究成果の概要 (和文)：

エストロゲンはヒトを含めた脊椎動物の卵巣の分化・発達に必要なホルモンである。このエストロゲンは転写制御因子であるエストロゲン受容体を介して働く。エストロゲン受容体遺伝子の分子進化を解明するために、ナメクジウオや古代魚など様々な生物種からの遺伝子単離と機能解析を行なった。その結果、無脊椎動物であるナメクジウオは既にヒトと同じエストロゲン受容体遺伝子を持っており、その後の生物進化に伴って機能を獲得した事が推測された。

研究成果の概要 (英文)：

Estrogens are necessary for ovarian differentiation in most vertebrates including human. Estrogen actions are largely mediated through the estrogen receptors (ERs), which are hormone activated transcription factors. To understand the molecular evolution of ER, we tried to isolate cDNAs encoding ERs from amphioxus, ancient fishes, and other species. We found that amphioxus that is an invertebrate has already possessed the ER gene. Our functional analyses suggest that the function of ER as a hormone-dependent transcription factor might be gained through the evolutionary process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：比較内分泌・進化内分泌

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：比較内分泌・分子進化・ホルモン受容体

1. 研究開始当初の背景

ステロイドホルモン受容体は核内受容体のファミリーの一員である。このうち、性ステロイドホルモン受容体であるエストロゲン受容体・アンドロゲン受容体・プロゲステロン受容体はホルモン依存的な転写制御因子であり、これまでに様々な脊椎動物から遺伝子の単離が行なわれてきた。さらに最近、

申請者は脊椎動物に最も近い脊索動物であるナメクジウオから高等脊椎動物のエストロゲン受容体の相同遺伝子の単離に成功した。しかし、ホルモンとの結合は認められず、転写活性も持たなかった。この事は、生物進化の過程で(ある段階で)ホルモンとの結合能、転写制御因子としての機能が獲得された事を意味する。しかし、その詳細な分子基盤

は不明であった。

2. 研究の目的

性ステロイドホルモンは受容体と結合する事により、生体の恒常性維持や内分泌器官への作用等様々な組織で多様な作用機構を發揮している。しかし、この性ステロイドホルモン受容体が「どのように分子進化したのか?」「生物進化のどの段階から存在するのか?」「どのように機能獲得をしてきたのか?」という疑問は残されたままである。本研究課題は、この性ステロイドホルモン受容体の分子進化の全体像を理解することを目的としている。

3. 研究の方法

性ステロイドホルモン受容体の一員であるエストロゲン受容体の分子進化を解明する為に、これまで存在が確認されていない古代魚から遺伝子のクローニングを行い、レポーター遺伝子アッセイを用いたホルモンに対する感受性・DNAとの結合能・転写活性化能を調べる。さらに、爬虫類・軟骨魚類等生物進化の重要な分岐点に位置する生物からの遺伝子単離・機能解析を行なう。また、ホルモンに結合しない受容体を持つナメクジウオについて別のタイプの受容体の検索等を行ない、エストロゲン受容体遺伝子の分子進化・機能進化を解析する。

4. 研究成果

本研究において4つの大きな成果を得る事ができた。まず、エストロゲン受容体の記載が少ない爬虫類から2種類のエストロゲン受容体(高等脊椎動物が持つアルファ型とベータ型)を単離し、機能解析を行なった。さらに染色体マッピングにより、ヘビの2種類のエストロゲン受容体はいずれも1番染色体に位置する事が判った(論文②、⑪)。爬虫類エストロゲン受容体の染色体上の位置関係を明らかにできた事は、エストロゲン受容体及び受容体遺伝子の近傍に位置する遺伝子との共進化を解明する上で非常に有用な結果である。

次に、古代魚であるハイギョ、ガチョウザメからのエストロゲン受容体遺伝子の単離に取り組み、いずれもアルファ型、ベータ型の2種類の遺伝子の単離に成功した。全てのエストロゲン受容体はホルモン(エストロゲン)に反応し、転写活性を保持していた。この結果は、古代魚の段階で高等脊椎動物と同様に機能的なエストロゲン受容体を持っているという事を意味する(論文⑩)。古代魚のエストロゲン受容体を明らかとした最初の報告であり、海外の研究者による総説にも引用されている。

軟骨魚類は硬骨魚類とは分かれて独自に

進化を遂げた生物種である。内分泌学的に重要な生物であるが詳しい解析はなされていない。今回軟骨魚類であるトラザメとジンベエザメからエストロゲン受容体遺伝子の単離に成功した。ホルモンに反応し転写活性を誘導することが判った。しかし、高等脊椎動物とは異なり、アルファ型のエストロゲン受容体は単離できず、ベータ型のみが得られた(論文③)。この事は、軟骨魚類は1種類(ベータ型)のエストロゲン受容体のみを持っており、アルファ型の機能はベータ型が補っている可能性を示唆している。エストロゲン受容体遺伝子の成り立ち・分子進化を理解する上で非常に重要な知見をもたらす結果である。

ナメクジウオは脊椎動物に最も近い無脊椎動物のグループに属している。本研究に先立ち高等脊椎動物のエストロゲン受容体の相同遺伝子を単離しホルモンに反応しない事を見いだしていた。そこで、さらにステロイドホルモン受容体の単離を試みたところ、別のタイプのホルモン受容体の遺伝子の単離に成功した。遺伝子配列を用いた進化系統樹を作成したところ、いわゆるケトステロイド(アンドロゲンやプロゲステロンなど)に対する受容体の仲間である事が判明した。レポーター遺伝子アッセイによる機能解析を行なったところ、ケトステロイドには反応しないが、エストロゲンに反応する事が判った。通常エストロゲン受容体はエストロゲン応答配列(ERE)と呼ばれるDNAを認識・結合し転写制御を行なっている。新たに得られたナメクジウオのケトステロイドホルモン受容体はEREを認識し、転写制御を行なう事が示された。さらにEREとともにケトステロイドホルモン受容体が結合できるDNA配列(ARE)とも結合可能で、EREとAREの両方のDNA配列を介して転写活性を調節することが判った。それでは、ナメクジウオのエストロゲン受容体の機能は何か?その答えの一つとして、ケトステロイドホルモン受容体のEREを介した転写活性をエストロゲン受容体は抑制できることがわかり、標的DNAを奪い合う事で転写活性の抑制を行なう事が推測された(論文①)。初めてナメクジウオのステロイドホルモン受容体を明らかとしたグループのひとつであり、海外の研究者による総説にも既に引用されている。

以上のように、エストロゲン受容体の分子進化の解明を目指して研究を進め、開始前と比べ非常に大きな進歩を遂げたと思う。そして「ナメクジウオから現れたエストロゲン受容体の機能はどのように獲得されたのか?」「軟骨魚類のエストロゲン受容体は1種類だけなのだろうか?」「ナメクジウオなど下等動物のエストロゲン受容体の機能は?さらに標的遺伝子は何なのか?」などさらに多

くの課題が残され、そして新たに疑問が提起された。今後は、これらの課題に取り組むとともに生物進化の重要な位置付けである最も下等な脊椎動物である無顎類（ヤツメウナギ、ヌタウナギ）のエストロゲン受容体遺伝子の解析が待ち望まれる。この解析により、エストロゲン受容体遺伝子の分子進化の全体像が明らかになり、エストロゲン受容体の新たな機能・新たなリガンドの解明が進むだろう。そして多くの疾患との関連があるヒトのエストロゲン受容体の新規の機能、またはエストロゲン受容体関連疾患に対する新薬の開発にも結びつく事が期待される。

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)

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① Katsu Y, Kubokawa K, Urushitani H, Iguchi T, Estrogen-dependent transactivation of amphioxus steroid hormone receptor via both estrogen- and androgen-response elements. *Endocrinology* 151: 639-648 (2010) (査読有り)
- ② Katsu Y, Matsubara K, Kohno S, Matsuda Y, Toriba M, Oka K, Guillette LJ, Ohta Y, Iguchi T, Molecular cloning, characterization and chromosome mapping of reptilian estrogen receptors. *Endocrinology* 151: 5710-5720 (2010) (査読有り)
- ③ Katsu Y, Kohno S, Narita H, Urushitani H, Yamane K, Hara A, Clauss TM, Walsh MT, Miyagawa S, Guillette LJ, Iguchi T, Cloning and functional characterization of Chondrichthyes, cloudy catshark, *Scyliorhinus torazame* and whale shark, *Rhincodon typus* estrogen receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 168: 496-504 (2010) (査読有り)
- ④ Katsu Y, Taniguchi E, Urushitani H, Miyagawa S, Takase M, Kubokawa K, Tooi O, Oka T, Santo N, Myburgh J, Matsuno A, Iguchi T, Molecular cloning and characterization of ligand- and species-specificity of amphibian estrogen receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 168: 220-230 (2010) (査読有り)
- ⑤ Davis L, Katsu Y, Iguchi T, Lerner DT, Hirano T, Grau EG, Transcriptional activity and biological effects of mammalian estrogen receptor ligands on three hepatic estrogen receptors in Mozambique tilapia. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122: 272-278 (2010) (査読有り)
- ⑥ Moore BC, Milnes MR, Kohno S, Katsu Y, Iguchi T, Guillette LJ, Influences of sex, incubation temperature, and environmental quality on gonadal estrogen and androgen receptor messenger RNA expression in juvenile American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Biol. Reprod.* 82: 194-201 (2010) (査読有り)
- ⑦ Miyagawa S, Katsu Y, Ohta Y, Sudo T, Lubahn DB, Iguchi T, Estrogen receptor ESR1 is indispensable for the induction of persistent vaginal change by neonatal 5alpha-dihydrotestosterone exposure in mice. *Biol. Reprod.* 82: 497-503 (2010) (査読有り)
- ⑧ Lange A, Paull GC, Coe TS, Katsu Y, Urushitani H, Iguchi T, Tyler CR, Sexual reprogramming and estrogenic sensitization in wild fish exposed to ethinylestradiol. *Environ. Sci. Technol.* 43: 1219-1225 (2009) (査読有り)

- 有り)
- ⑨ Tyler CR, Filby AL, Bickley LK, Cumming RI, Gibson R, Labadie P, Katsu Y, Liney KE, Shears JA, Silva-Castro V, Urushitani H, Lange A, Winter MJ, Iguchi T, Hill EM, Environmental health impacts of equine estrogens derived from hormone replacement therapy. *Environ. Sci. Technol.* 43: 3897-3904 (2009) (査読有り)
- ⑩ Katsu Y*, Braun EL*, Guillette LJ, Iguchi T (* These authors contributed equally), From reptilian phylogenomics to reptilian genomes: analyses of c-Jun and DJ-1 proto-oncogenes. *Cyto. Gen. Res.* 127: 79-93 (2009) (査読有り)
- ⑪ Katsu Y, Ichikawa R, Ikeuchi T, Kohno S, Guillette LJ, Iguchi T, Molecular cloning and characterization of estrogen, androgen and progesterone nuclear receptors from a fresh turtle (*Pseudemys nelsoni*). *Endocrinology* 149: 161-173 (2008) (査読有り)
- ⑫ Milnes MR, Bryan TA, Katsu Y, Kohno S, Moore BC, Iguchi T, Guillette LJ, Increased post hatching mortality and loss of sexually dimorphic gene expression in alligator (*Alligator mississippiensis*) from a contaminated environment. *Biol. Reprod.* 78: 932-938 (2008) (査読有り)
- ⑬ Kohno S, Bermudez D, Katsu Y, Iguchi T, Guillette LJ, Gene expression patterns in juvenile American alligator (*Alligator mississippiensis*) exposed to environmental contaminants. *Aqua. Toxicol.* 88: 95-101 (2008) (査読有り)
- ⑭ Milnes MR, Garcia A, Grossman E, Grun F, Shiotsugu J, Tabb MM, Kawashima Y, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T, Blumberg B, Activation of steroid and xenobiotic receptor (SXR, NR112) and its orthologs in laboratory, toxicological, and genome model species. *Environ. Health Perspect.* 116: 880-885 (2008) (査読有り)
- ⑮ Lange A, Katsu Y, Ichikawa R, Paull GC, Chidgey LL, Coe TS, Iguchi T, Tyler CR, Altered sexual development in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to environmental concentrations of the pharmaceutical 17 α -ethinylestradiol and associated expression dynamics of aromatases and estrogen receptors. *Toxicol. Sci.* 106: 113-123 (2008) (査読有り)
- ⑯ Katsu Y, Kohno S, Hyodo S, Ijiri S, Adachi S, Hara A, Guillette LJ, Iguchi T, Molecular cloning, characterization and evolutionary analysis of estrogen receptors from phylogenetically ancient fish. *Endocrinology* 149: 6300-6310 (2008) (査読有り)
- ⑰ Naidoo V, Katsu Y, Iguchi T, The influence of non-toxic concentrations of DDT and DDE on the old world vulture estrogen receptor alpha. *Gen. Comp. Endocrinol.* 159: 188-195 (2008) (査読有り)
- ⑱ Nakamura T, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T, Estrogen receptor subtypes selectively mediate female mouse reproductive abnormalities induced by neonatal exposure to estrogenic chemicals. *Toxicology* 253: 117-124 (2008) (査読有り)

⑱ Kohno S, Katsu Y, Iguchi T, Guillette LJ, Novel approaches for the study of vertebrate steroid hormone receptors. *Integ. Comp. Biol.* 48: 527-534 (2008)
(査読有り)

⑳ Iguchi T, Katsu Y, Commonality and difference in mechanisms of endocrine disruption in various animal species. *BioScience* 58: 1061-1067 (2008) (査読有り)

[学会発表] (計7件)

① 勝 義直・井口 泰泉 「無顎類ヤツメウナギのエストロゲン受容体の単離」2010年9月23日:日本動物学会第81回東京大会

② 岡 香織・勝 義直 「ワニのコルチコイド受容体遺伝子の単離と機能解析」2010年8月21日:日本動物学会北海道支部大会(旭川)

③ 成田 晴香・勝 義直 「軟骨魚類のエストロゲン受容体-遺伝子単離と機能解析」2010年8月21日:日本動物学会北海道支部大会(旭川)

④ 勝 義直・窪川かおる・漆谷博志・井口泰泉 「ナメクジウオの2種類のステロイドホルモン受容体遺伝子の単離と機能解析」2009年9月19日:日本動物学会第80回静岡大会

⑤ Katsu Y, Lange A, Tyler CR, Iguchi T, Comparative responsiveness and sensitivity of fish oestrogen receptors to steroid oestrogens and environmental oestrogens. Oct, 2008: The 10th UK-Japan Annual Scientific Workshop, Devon, UK (10月6日)

⑥ 勝 義直・井口 泰泉 「古代魚のエストロゲン受容体の単離」2008年9月5日:日本動物学会第79回福岡大会

⑦ Katsu Y, Molecular cloning, characterization and evolutionary analysis of estrogen receptor from phylogenetically ancient fish. Aug, 2008: Summer Program in University of Hawaii (8月22日)

[図書] (計1件)

① Iguchi T, Watanabe H, Katsu Y, Toxicogenomics and ecotoxicogenomics: Studying chemical effects and basic biology in vertebrates and invertebrates. In: *Toxicogenomics: A powerful Tool for Toxicology Assessment*. John Wiley & Sons. (2008)

[その他]

ホームページ等

<http://www.repdev-katsu.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝 義直 (KATSU YOSHINAO)
北海道大学・大学院理学研究院・准教授
研究者番号: 00332180

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし