

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22770053

研究課題名（和文）真骨類におけるコルチコイドの局所代謝調節メカニズムの解析

研究課題名（英文）Regional regulation of corticosteroid in teleosts

研究代表者

日下部誠 (KUSAKABE MAKOTO)

東京大学 大気海洋研究所・助教

研究者番号：40451893

研究成果の概要（和文）：真骨類ではコルチゾルが浸透圧調節に重要な働きがあることが分かっている。頭腎で産生されるコルチゾルがどのように鰓で局所的に浸透圧調節に働いているのかについては分かっていない。本研究により、ステロイドホルモンはステロイド産生組織で作られるだけでなく、それぞれの標的組織で代謝酵素の働きなどにより局所的に必要な量を調整している可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Cortisol is a major hormone and known to have multiple effects and also known to be an osmoregulatory hormone in teleosts. However, how fish tissues discriminate between these distinct corticosteroid actions is not clearly understood. The present study showed that levels of cortisol appeared to be locally regulated to the optimal levels by the action of steroidogenic enzymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：(1)浸透圧調節、(2)鰓、(3)コルチゾル、(4)コルチコイド受容体、(5)ステロイド代謝酵素、(6)11 β -HSD、(7)ニジマス、(8)大西洋サケ

1. 研究開始当初の背景

広塩性真骨類では、ステロイドホルモンであるコルチゾルが海水および淡水適応に重要な役割を果たしていることが知られているが、同じホルモンであるコルチゾルがいかに淡水と海水という全く異なる環境への適応を制御しているかについての制御機構は全く分かってない。近年の研究により、哺乳類では浸透圧調節器官に到達したコルチゾル

はステロイド代謝酵素によってさらに局所的に代謝され、細胞内でより細やかにコルチコイドの作用を調節していることが明らかとなってきた。しかしながら、真骨類におけるコルチゾルの局所的な代謝調節機構についてはその存在すら明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究はコルチゾルが浸透圧調節器官において局所的に代謝されるという真骨類ではこれまで明らかにされていないメカニズムを解明することを目的として研究を進めた。また、コルチゾル産生あるいは代謝に関与する可能性のある新規のペプチドについても、ステロイドの制御機構と合わせて解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 3型 11 β -HSD 遺伝子の機能解析

先行研究によりニジマスの鰹より単離した3型 11 β -HSD 様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 COS-7 あるいは HEK293 細胞を使い、3型 11 β -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を追加し、3型 11 β -HSD のステロイド代謝活性を調べる。

(2) 遺伝子の発現解析法の確立

コルチゾルのシグナルを受けるコルチコイド受容体 (GR1, GR2, MR) および代謝に関わるステロイド代謝酵素 11 β -HSD (11 β -HSD 2、11 β -HSD 3) 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。また、コルチゾルと共に浸透圧調節に重要な働きをする成長ホルモン (GHR) とプロラクチン (PRLR) 受容体の遺伝子発現を定量するため、プローブを用いない SYBR Green を用いた定量系を確立する。また、目的遺伝子の細胞内での局在を検討するため、コルチコイド受容体、11 β -HSD、成長ホルモン受容体およびプロラクチン受容体を認識する DIG で標識した RNA プローブを作製し、in situ ハイブリダイゼーション法による発現解析法を確立する。

(3) コルチコイド受容体および 11 β -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組織 (13 種の組織) 採取し 2型および 3型 11 β -HSD 遺伝子発現変化を Real-time PCR 法を用いて解析する。

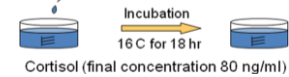
(4) 鰹におけるコルチコイド受容体、11 β -HSD、成長ホルモン受容体およびプロラクチン受容体遺伝子の発現変化

太平洋サケを用いて、海水・淡水馴致実験群を作り、それぞれの馴致群から鰹を継続的に採取しコルチコイド受容体、2型および 3型 11 β -HSD、成長ホルモン受容体およびプロラクチン受容体遺伝子発現変化を Real-time

PCR 法を用いて解析する。鰹におけるそれぞれの遺伝子の発現部位を in situ ハイブリダイゼーション法を用いて解析する。

(5) 組織培養系を用いた鰹におけるコルチゾルの代謝実験

ニジマスの鰹を単離し、コルチゾルを添加した培養液中で培養する。培養液を継続的に採取し、培養液中のコルチゾル濃度を測定する。



4. 研究成果

(1) 3型 11 β -HSD 遺伝子の機能解析

動物性培養細胞 (HEK293 細胞) を用いて 3型 11 β -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、現時点でいまだにコルチコイド (ステロイド) に対する代謝活性は見られていない。しかしながら、3型 11 β -HSD 遺伝子は鰹および皮膚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若干の発現変化をしている。このことから 3型 11 β -HSD 遺伝子がなんらかの形で浸透圧調節に関わっている可能性は否定できない。

(2) 遺伝子の発現解析法の確立

予定通り、すべての標的遺伝子についての Real-time PCR と in situ ハイブリダイゼーション法による発現系の解析法を確立した。

(3) コルチコイド受容体および 11 β -HSD 遺伝子の発現変化

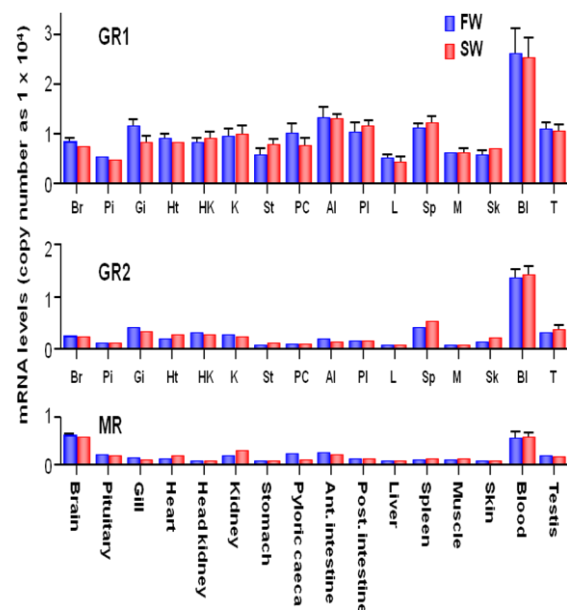


図 1. GR1、GR2 および MR 遺伝子の発現分布

ニジマス GR1、GR2 及び MR 遺伝子は調べたすべての組織で発現しており、海水馴致と淡水馴致群で発現量に違いは見られなかった。発現量に関しては、GR1 が平均して最も高く、次に GR2、最も発現量が低いのが MR であることが明らかになった (図 1)。

ニジマス 11 β -HSD2 遺伝子は調べた血液を除くすべての組織で発現しているが、特に浸透圧調節を行う組織でその発現が多い傾向にあった。11 β -HSD3 遺伝子は鰓と皮膚に特に高い発現がみられた。11 β -HSD2 および-3 遺伝子発現は海水馴致と淡水馴致群で発現量に違いは見られなかった (図 2)。

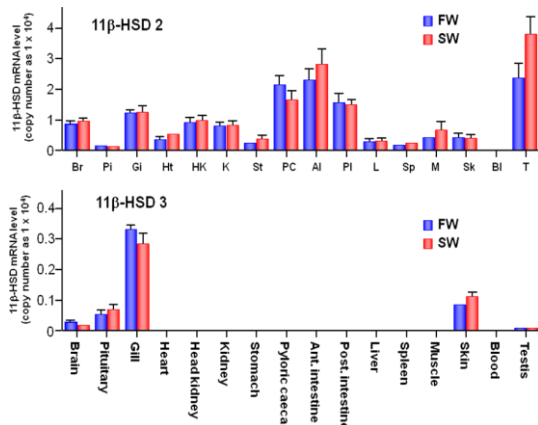


図 2. 11 β -HSD2 および-3 遺伝子の発現分布

(4) 鰓におけるコルチコイド受容体、11 β -HSD、成長ホルモン受容体およびプロラクチン受容体遺伝子の発現変化

研究 (1) ~ (3) についてはニジマスを実験魚として扱ってきた。しかしながら、研究 (3) において、海水馴致したニジマスの GR1、GR2 及び MR 遺伝子発現が淡水と比べて低い傾向であった。このことから、本来の生活史において海水域への回遊を行わないニジマスをもちいて海水馴致実験を行うことが実験として正しい結果が得られるかどうかを検証する必要性が生じた。そこで、大西洋サケを用いて海水および淡水への馴致実験を行った。

その結果、コルチコイド受容体、2 型および 3 型 11 β -HSD、成長ホルモン受容体およびプロラクチン受容体遺伝子発現はほぼすべてのタイムポイントにおいて海水馴致群の方が低いという結果が得られた。このことは先行研究と異なる結果でもあり、本研究における結果がいかなる意味を持つのかを現在解析中である (図 3 - コルチコイド受容体、2 型および 3 型 11 β -HSD のみの結果を示した)

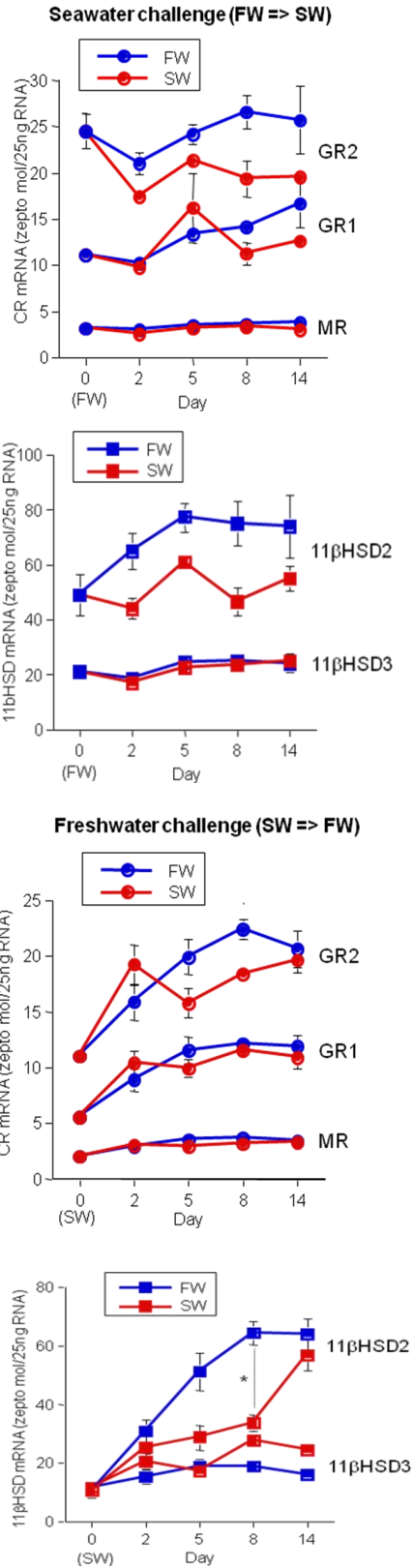


図 3. 海水馴致および淡水馴致におけるコルチコイド受容体、2 型および 3 型 11 β -HSD 遺伝子の発現変化

(5) 組織培養系を用いた鰓におけるコルチゾルの代謝実験

鰓を用いた組織培養を行った結果、培養液にコルチゾルを添加した数時間後に培養中のコルチゾル量が減少する傾向がみられた。培養条件等を改善する必要があるが、このことは鰓において局所的にコルチゾル量を調節できる可能性を示す直接的な実験結果が得られた (図4)。

培養開始 18 時間後に培養液中のコルチゾル量が増加していることに関しては現在検討中である。鰓はステロイド産生組織ではないことから、培養開始時に添加したコルチゾル以外にコルチゾルが増加する可能性はない。鰓に残存した血液から培養液中に混ざってきた可能性が考えられるため、培養開始までの準備を検討する必要があると考えている。

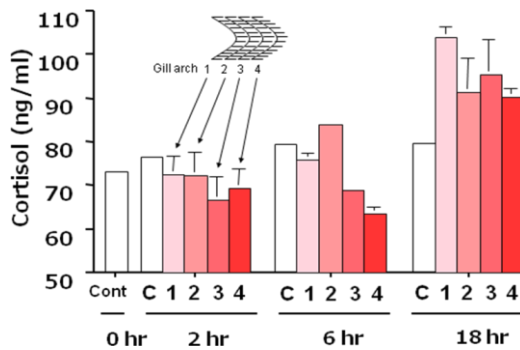
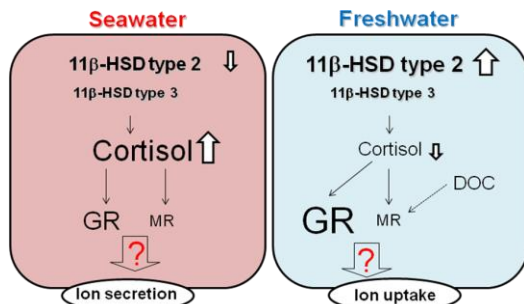


図4. ニジマス鰓におけるコルチゾルの代謝

まとめ

本研究により、これまで明らかにされていなかった真骨類の鰓における、コルチゾルの代謝メカニズムの一端が明らかになった (図5)。コルチゾル受容体とステロイド代謝酵素の組み合わせにより、組織内でコルチゾルのシグナルが精緻に調節されていることが分かってきた。しかしながら、淡水馴致群でコルチコイド受容体の遺伝子発現が高いこと、あるいは鰓の培養系確立など、今後検討をする



必要のある課題も多く残されている。
図5. 鰓におけるコルチゾル代謝メカニズム

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3件)

目下部誠、Stephen D. McCormick、Graham Young、竹井祥郎、サケ科魚類の鰓におけるコルチゾルの代謝調節メカニズム、第35回日本比較内分泌学会大会及びシンポジウム2010 静岡、2010年11月18-20日、静岡グランシップ

目下部誠、北野潤、石川麻乃、Difference in the seawater tolerance of anadromous and stream resident morphs of three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)、第82回日本動物学会大会、2011年9月21-23日、旭川市大雪クリスタルホール

Makoto Kusakabe, Yoshio Takei, J. Adam Luckenbach、Relaxin-3 and relaxin/insulin-like family peptide receptor3 in rainbow trout: sites of gene expression and changes in mRNA levels during spermatogenesis in testes、9th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish、2011年8月9-14日、Lulu International Convention Center and Garden Hotels, India

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目下部誠 (KUSAKABE MAKOTO)
東京大学 大気海洋研究所・助教
研究者番号：40451893

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし