

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658165

研究課題名(和文) 魚類最終成熟誘起ステロイド産生メカニズムの定説を覆す

研究課題名(英文) A novel mechanism model for producing maturation-inducing steroid in fish

研究代表者

足立 伸次 (Adachi, Shinji)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：40231930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、魚類の主な最終成熟誘起ステロイドであるDHP産生を担う酵素が、これまで説明されてきたCR20 HSDではないことを示し、サクラマス(DHP合成酵素として初めてhsd17b3likeを同定した。in vivoでは、hsd17b3like mRNAは卵成熟期の卵濾胞においてのみ発現し、また、その発現と血中DHP量は極めて良く一致することを示した。さらに、卵成熟直前の培養顆粒膜細胞において、生殖腺刺激ホルモンなどで強烈に発現誘導されること、また、その時初めてDHP合成能が獲得されることを示した。以上、サクラマス卵成熟を誘起するDHP産生制御の分子機構を初めて矛盾なく示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：CR20bHSD has been believed to be the enzyme responsible for DHP (maturation-inducing steroid) production during oocyte maturation in fish. The present study demonstrated that CR20bHSD is not responsible for DHP production and identified a novel enzyme, termed hsd17b3like, as the genuine enzyme responsible for conversion of 17aOHP to DHP during final oocyte maturation in masu salmon. The expression pattern of the mRNA was well matched with serum DHP level. Incubated granulosa cells, just before oocyte maturation period, could convert efficiently exogenous 17aOHP to DHP as well as increasing the mRNA levels when incubated with gonadotropic preparations. These results clearly indicated that hsd17b3like is the enzyme responsible for DHP production during oocyte maturation in the masu salmon, and not CR20bHSD. The present study clearly demonstrated the molecular mechanisms underlying DHP production during oocyte maturation in the masu salmon.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：水産学 生理学 最終成熟 サクラマス

1. 研究開始当初の背景

硬骨魚類の卵母細胞の最終成熟誘起機構に関する研究は、1980~90年代にサケ科魚類のアマゴをモデルにした一連の研究によって急速に進展した。まず、1985年に世界で初めて卵母細胞のMISが17 β ,20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン(DHP)であることが長濱と足立(本申請代表)によって同定された。次に、DHP合成酵素として、ブタ精巣から20 β -HSDタンパクが精製され、それを基に初めてカルボニル還元酵素様ステロイド-20 β -水酸基脱水素酵素(CR20 β -HSD)のcDNAが同定された。以降、ブタcDNAをプローブにアマゴをはじめ様々な魚種から次々にCR20 β -HSD cDNAが同定され、その発現制御研究を基にしてDHP産生制御メカニズムは説明されている。しかし、ブタのCR20 β -HSDは細胞質に存在するタンパクであり、それを基に同定された魚類のCR20 β -HSDも全てこのタイプである。しかもCR20 β -HSDは様々な化学物質を還元し、むしろDHP合成能は弱い。申請者らは、ニホンウナギ卵巣から2種類のCR20 β -HSD cDNAをクローニングしてその酵素活性を測定したが、それらからはDHP合成酵素活性は見いだせなかった。さらに、卵濾胞の細胞画分の20 β -HSD酵素活性を測定し、20 β -HSD活性は膜画分に存在することを突き止めている。最近に至り、サクラマス顆粒膜細胞培養系では、20 β -HSDの酵素活性を誘導してもCR20 β -HSD mRNAの発現は上昇しないことを見いだした。これらの状況証拠から、申請者らは、最終成熟期にDHP産生を担う酵素は現在信じられているCR20 β -HSDではないという考えに至った。また、最終成熟期における、エストラジオール合成系からDHP合成系へのステロイド合成経路の転換機構は長い間未解明であった。しかし最近、新タイプの

ステロイドC17水酸化酵素(CYP17A2)がティラピアから発見され、それがプロゲステロンを17 β -ヒドロキシプロゲステロン(17OHP)に転換する能力のみを担うこと、最終成熟期に発現上昇することが示され、ステロイド合成経路転換メカニズムの説明が初めて提示された。このメカニズムが他魚種でも共通であり、また、CRとは別タイプの膜結合型20 β -HSDが存在し、それら発現がDHP合成能の変化と一致すれば、魚類の卵母細胞の最終成熟を誘起する分子制御機構は初めて矛盾なく説明されることになる。

2. 研究の目的

本申請では、サクラマスを材料に用いて、CR20 β -HSDではない、膜結合型の新規20 β -HSDの同定を行なう。また、ティラピアで報告のある新タイプのCYP17A2もクローニングする。さらに、成熟に伴うこれら遺伝子の発現動態をin vivoで調べると共に、in vitroでは、卵濾胞を取り囲むステロイド合成組織である莢膜細胞および顆粒膜細胞培養系を用いて、20 β -HSDとCYP17A2発現制御メカニズムを解明する。これによって、最終成熟を誘起するステロイド合成転換のメカニズムを明らかにする。

申請時、CRとは別タイプの20 β -HSDの存在を予想するものはなかった。しかし、独自の数々の反証から申請者らは疑問を抱いた。細胞質存在型ではない、膜結合型20 β -HSDの新規同定を行なうことが、本研究の最大の目的である。CRとは別タイプの20 β -HSDが発見されれば、現在のCR20 β -HSDを基にした説明を訂正するものとなり、最終成熟の研究分野に与える影響は大きい。これによって、ステロイド合成経路の転換機構を遺伝子の発現レベルから初めて解析することができる。

最終成熟の誘起には、卵濾胞で生じるス

ステロイドホルモン産生経路の劇的な転換が必須であり、その転換は卵黄形成から最終成熟への転換を直接制御するメカニズムである。現在の説では、卵黄形成を完了した卵濾胞で、CR20 HSD の発現が誘導され、その結果、17OHP から DHP が合成され、引き続き産生された DHP が卵母細胞に作用し、最終成熟が開始されると説明されている。しかし、ニホンウナギおよびサクラマスで申請者が調べた CR20 HSD の発現挙動は DHP 産生能とは一致せず、また、アンドロステンジオン産生から 17OHP 産生への転換メカニズムも不明瞭である。本申請は、現在 20 HSD として同定されている CR20 HSD 以外に、DHP 産生に寄与する別タイプ（新規）の 20 HSD が存在するのではないかとの仮説を基に、その同定を狙うものである。

本研究では、現在説明されている、魚類卵濾胞の最終成熟におけるステロイド合成経路の転換機構を、CR とは別タイプの膜結合型 20 HSD の同定と、新タイプ CYP17 の同定により、矛盾なく説明できる新たな分子制御メカニズムの説明を確立する。また、膜結合型 20 HSD が同定され、加えて CYP17A2 が同定されれば、最終成熟誘起ステロイド合成系へとステロイド合成経路が転換する分子機構を解析する為のツールとして必要となる、ステロイド合成酵素遺伝子は全て同定されることになる。これによって初めて、最終成熟を誘起するステロイド合成転換メカニズムを正確に分子レベルから調べることができるようになる。本研究で膜結合型 20 HSD が新規同定されれば、追隨して他魚種でも次々と同定されると予想される。これによって、最終成熟期のステロイド合成経路転換機構の解明に向けた研究は大きく進展するものと期待される。

3. 研究の方法

(1) スクリーニングに用いるサンプルの準備；サクラマスの卵黄形成中期から最終成熟期に亘る卵巣をサンプリングする。それら卵濾胞から莢膜細胞層と顆粒膜細胞層を分離する。分離した顆粒膜細胞のみをフォルスコリンおよび 17OHP と共に培養し、培養液中の DHP 濃度を測定する。LH 添加により 20 HSD 活性が強く誘導され、かつフォルスコリン添加なしの対照群では 20 HSD 活性が無い顆粒膜細胞の大量培養サンプルを準備する。

(2) 新規 20 HSD 候補遺伝子のスクリーニング；20 HSD 活性が誘導された顆粒膜細胞特異的に発現上昇する全候補配列に対するプライマーセットを設計する。まず、上記 1) で準備された *in vitro* の顆粒膜細胞サンプルを用いて定量 PCR を行ない、20 HSD 活性誘導顆粒膜細胞で発現上昇した配列を選抜する。次に、選抜された配列で、*in vivo* の卵濾胞サンプルを用いて定量 PCR を行ない、最終成熟期に急激に発現上昇する配列を選抜する。それらの BLAST 解析を行ない、HSD ファミリーに近い構造を持つものに絞った上で、それらの全翻訳領域をクローニングし、ホ乳類細胞発現プラスミドを構築する。これら発現プラスミドを各々動物細胞に導入して 17OHP と共に培養し、培養後培養液中の DHP を測定することで、実際に 20 HSD 活性を持つ遺伝子を同定する。

(3) 膜結合型 20 HSD の発現動態の解析；卵黄形成中、卵黄形成完了後、最終成熟中および排卵後卵巣まで様々な発達段階にある卵濾胞、莢膜細胞層および顆粒膜細胞層における 20 HSD の mRNA の発現動態を、定量 PCR によって解析する。

(4) 膜結合型 20 HSD の発現機構の解析；卵黄形成中から最終成熟に至るまで、様々な発達段階にある卵濾胞、莢膜細胞層

および顆粒膜細胞層を、生殖腺刺激ホルモン系試薬と共に培養し、20 HSD の発現誘導を定量 PCR 法で測定する。この実験で、サクラマスの卵濾胞の発達に伴い、どの時点でどの細胞において 20 HSD の発現誘導が生じるのかを明らかにする。

(5) 以上の結果を取りまとめ、サクラマス卵成熟期における卵成熟誘起ステロイド産生機構の分子メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

サクラマス卵濾胞から分離した顆粒膜細胞層の培養を行ない、フォルスコリンにより 20 HSD 活性が強く誘導された複数の顆粒膜細胞サンプルが得られた。以前の次世代シーケンサーのリードカウント解析から 20 HSD 活性が誘導された顆粒膜細胞層で発現誘導される約 100 の配列について定量 PCR 用のプライマーセットを設計した。それらを用いて、上述の 20 HSD 活性が誘導された、または、20 HSD 活性を持たない対照群の培養顆粒膜細胞の間で、定量 PCR 解析を行なった。そのうち mRNA 発現量が実際に高まっていた配列からステロイド水酸基脱水素酵素様構造を持つ配列が同定された。その全長配列をクローニングし、分子系統樹解析を行った結果、17 水酸基脱水素酵素タイプ 3 とタイプ 12 の間に位置することが分かり、omhsd17b3like と名付けた。その翻訳領域をホ乳類細胞 HEK293T で発現させたところ、極めて強い 17 OHP からの DHP 転換能 (20 HSD 活性) を持つことが分かった。omhsd17b3like の卵濾胞における mRNA 発現変化を調べたところ、卵黄形成中は極めて低く、卵成熟期に急速に発現量が高まることが解った。卵黄形成期から卵成熟期に亘る omhsd17b3like mRNA 量変化は血中 DHP 量変化と極めてよく一致することを示した。

さらに、培養顆粒膜細胞における hsd17b3like 遺伝子発現誘導を調べ、以下の点を明らかにした。(1) 早くも、卵黄形成後期の卵成熟 2 ヶ月前の顆粒膜細胞において、サケ脳下垂体抽出物 (SPE) によって 20 HSD 遺伝子発現は誘導される。しかし、DHP の前駆体である 17 OHP を添加してもほとんど DHP が合成されないことから発現酵素量は比較的少ないのではないかと考えられた。(2) 卵成熟直前の顆粒膜細胞では SPE によって強烈に 20 HSD 遺伝子の発現が上昇する。17 OHP を DHP に転換する能力も同時に高まる。(3) 卵成熟完了後の排卵後卵濾胞では低量ながら hsd17b3like mRNA が残存しているが、SPE を添加しても再びその遺伝子発現を誘導することはできない。(4) 一方、卵成熟期の 17 OHP 産生制御機構については cyp17a2 遺伝子の完全長クローニングが完了しておらず、未解明に終わった。

以上、omhsd17b3like は、動物細胞強制発現系において 17 OHP に対する強い 20 HSD 活性を示すこと、in vivo の顆粒膜細胞培養において 20 HSD 活性の誘導と mRNA 発現上昇が一致すること、in vivo の卵濾胞における mRNA 発現量が血中 DHP 量に一致することが示された。これら実験的証拠から、omhsd17b3like がサクラマス卵成熟期に顆粒膜細胞で 17 OHP を DHP に転換する役割を担う真の 20 HSD 酵素であると結論された。以上の結果から、これまで 20 HSD 酵素として考えられていた CR20 HSD ではなく、hsd17b3 と hsd17b12 の間に位置する新規酵素 hsd17b3like が、サクラマス最終成熟期に DHP 産生を制御する酵素であることを、in vivo の発現状況と血中 DHP 量との関係、および in vitro における hsd17b3like 遺伝子発現誘導と DHP 産生能との関係を明らかにすることで証明した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

17th International Congress of Comparative Endocrinology. July 15-19, 2013.

“Identification of a novel type of 20beta-hydroxysteroid dehydrogenase responsible for maturation-inducing hormone production during oocyte maturation in masu salmon”

Shigeho Ijiri, Yasushi Shibata, Nonoha Takezawa, Yukinori Kazeto, Naoki Takatsuka, Erika Kato, Yuichi Ozaki, Shinji Adachi, Kohei Yamauchi and Yoshitaka Nagahama.

(口頭発表)2013年7月16日 バルセロナ大学、バルセロナ、スペイン

竹澤野葉・井尻成保(北大院水)・柴田安司(基生研)・風藤行紀・鈴木博史(水研セ増養殖研)・足立伸次(北大院水)・山内皓平・長濱嘉孝(愛媛大南水研)

サクラマスの卵成熟誘起ステロイド産生を担う 20βHSD 遺伝子の同定

平成 25 年度日本水産学会春季大会. 講演番号 321 要旨集 p39. 東京海洋大学品川キャンパス 平成 25 年 3 月 27 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

足立 伸次 (ADACHI Shinji)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：40231930

(2)研究分担者

井尻 成保 (IJIRI Shigeho)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：90425421

(3)連携研究者

なし