

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440154

研究課題名(和文)ステロイド膜受容体の機能解析を中心とした卵成熟・排卵誘導機構の解明

研究課題名(英文)Studies on functions of membrane steroid receptors and molecular mechanism of oocyte maturation and ovulation

研究代表者

徳元 俊伸 (TOKUMOTO, Toshinobu)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：30273163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規ステロイド膜受容体mPRの4種類の遺伝子それぞれについてメダカ点突然変異体3-4系統を選択し、系統を樹立できた。それぞれの表現型解析の結果、mPR遺伝子には冗長性が見られ、1種類の遺伝子では異常を示さないことが明らかになった。さらに二重変異体を作出したが同様に異常は見られなかった。今後、mPRの初の生理機能の証明を目指して3重変異体の作出を目指す。

排卵誘導遺伝子については明確な排卵特異的発現を示す、排卵誘導遺伝子候補3遺伝子が選択できた。今後、これらの遺伝子の変異系統を作出し、機能の証明を目指す。

研究成果の概要(英文)：To obtain decisive evidence for the roles of mPRs, we are establishing strains of medaka fish that are deficient in mPRs. In medaka, four subtypes of mPR genes (, , , and 2) have been identified. By reverse genetic screening, we have selected three to four strains in which a point mutation has been induced in the coding sequence of the mPR subtypes. However, homozygous mutants of each mPR gene showed no phenotype. The results suggested that mPR genes share redundancy. We are currently producing double and triple mutants of the mPR subtypes.

In vivo bioassay which enables to induce oocyte maturation and ovulation in living fish have been applied to select ovulation-inducing genes in this study. Using genome wide microarray of zebrafish, genes that showed ovulation specific elevation were selected. The mRNA expression levels of genes have been confirmed by qPCR analysis. It is indicated that in vivo assay will be a new way to identify ovulation-inducing genes.

研究分野：生殖生物学

キーワード：ステロイド膜受容体 卵成熟 排卵 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

新規ステロイド膜受容体, mPR は長年、同定が待たれていた卵成熟誘起ホルモンの受容体として 2003 年に発表された。本分子の発見は卵成熟誘起ホルモンの受容体として動物生理学の分野で脚光を浴びただけではなく、ステロイドホルモンの引き起こす急性反応であるノンゲノミック反応を仲介する新規受容体として内分泌学分野でも大きな反響を呼んでいる。

研究代表者らは、ジエチルstilbestロール (DES) の卵成熟誘導作用を発見し (Tokumoto et al. PNAS 2004)、その標的候補である新規ステロイド膜受容体 (mPR) を同定し (Tokumoto et al. Gen Comp Endo 2006)、DES が mPR に作用して卵成熟を誘起することを明らかにした (Tokumoto et al. Endocrinology 2007)。

その後、個体レベルでの DES の作用を解明するためゼブラフィッシュ生体を用いた生体アッセイ法を確立し (特許 4501002、4528973 号、Tokumoto et al. PLoS ONE 2011)、DES の卵成熟誘導作用がインビボでもみられることを明らかにした。

2. 研究の目的

新規ステロイド膜受容体 (mPR) は、卵成熟誘起ホルモン受容体として働くこと、さらに内分泌かく乱化学物質の標的分子にもなっていることを見いだした。そして、そのホルモン作用を個体レベルで検出するために、生体アッセイ法を開発した。

本研究は以下の 2 つの事項を目的としている。

(1) mPR 遺伝子群の変異メダカの系統を作り、変異個体の表現型から mPR の機能について探る。

(2) 生体アッセイ法を使い、mPR に作用する天然ホルモンまたは内分泌かく乱化学物質を加えた実験群の個体を用いて、mPR が働いた後に引き起こされる排卵誘導遺伝子群の同定を行い、mPR の機能との関連性や連続性について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) システムティックな逆遺伝学の系として魚類において初めて確立された遺伝子変異メダカの作製系を用いて 4 種類の mPR 遺伝子の変異メダカ系統を樹立する。その表現型解析からステロイド膜受容体分子の機能について明確な証明をもたらす。

(2) 研究代表者らが開発したインビボで卵成熟・排卵誘導可能な生体アッセイ法により排卵時に発現誘導または発現が低下されている遺伝子をマイクロアレイ法によりリストアップする。これらのリストを誘導未処理の対照群と比較することによりそれぞれの処理で発現変化する遺伝子を明らかにする。発現変化を定量 PCR により検証する。

4. 研究成果 新規ステロイド膜受容体 mPR の 4 種類の遺伝子それぞれについてメダカ点突然変異体 3-4 系統を選択し、系統を樹立できた。それぞれの表現型解析の結果、mPR 遺伝子には冗長性が見られ、一種類の遺伝子では異常を示さないことが明らかになった。さらに二重変異体を作成したが同様に異常は見られなかった。今後、mPR の初の生理機能の証明を目指して 3 重変異体の作出を目指す。

排卵誘導遺伝子については明確な排卵特異的発現を示す、排卵誘導遺伝子候補 3 遺伝子が選択できた。今後、これらの遺伝子の変異系統を作成し、機能の証明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. T. Tokumoto, Md. B. Hossain, J. Wang (2016) Establishment of procedures for studying mPR-interacting agents and physiological roles of mPR. **Steroids** in press. (査読有)
2. M. Nakashima, M. Suzuki, M. Saida, Y. Kamei, Md. B. Hossain, T. Tokumoto (2015) Cell-based assay of nongenomic actions of progestins revealed inhibitory G protein coupling to membrane progestin receptor α (mPR α). **Steroids** 100 21-26. (査読有)
3. Md. B. Hossain, T. Oshima, S. Hirose, J. Wang, T. Tokumoto (2015) Expression and purification of human membrane progestin receptor α (mPR α). **PLOS ONE** 10 (9), 1-16. (査読有) 静岡新聞に掲載
4. T. Oshima, R. Nakayama, S. R. Roy, T. Tokumoto (2014) Purification of the goldfish membrane progestin receptor α (mPR α) expressed in yeast *Pichia pastoris*. **Biomedical Research** 35, 47-59. (査読有)
5. T. Tokumoto (2014) ZEBRAFISH AS A MODEL FOR REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENVIRONMENTAL SCREENING. "Zebrafish: Topics in Reproduction and Development" (C.A Lessman and E. Carver ed) published by "NOVA Science Publishers Inc., USA" 107-122. (査読有)
6. T. Miyazaki, Y. Ikeda, I. Kubo, S. Suganuma, N. Fujita, M. Itakura, T. Hayashi, S. Takabayashi, H. Katoh, Y. Ohira, M. Sato, M. Noguchi, T. Tokumoto (2014) Identification of genomic locus responsible for experimentally induced

testicular teratoma 1 (ett1) on mouse Chr 18. **Mammalian Genome** 25, 317-326. (査読有) 静岡新聞に掲載

7. J. Wang, Y. Yamada, A. Notake, Y. Todoroki, T. Tokumoto, J. Dong, P. Thomas, H. Hirai, H. Kawagishi (2014) Metabolism of bisphenol A by hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 under non-ligninolytic condition. **Chemosphere** 109, 128-133. (査読有)
8. T. Tokumoto Membrane progesterin receptor, a key mediator of final oocyte maturation in fish. (2013) "**Sexual Plasticity and Gametogenesis in Fishes**" (*B. Senthikumar* ed) published by "**NOVA Science Publishers Inc., USA**" 423-440. (査読有)
9. K. Takatsu, K. Miyaoku, S. R. Roy, Y. Muroho, T. Sago, H. Itagaki, M. Nakamura, T. Tokumoto (2013) Induction of Female-to-Male Sex Change in Adult Zebrafish by Aromatase Inhibitor Treatment. **Scientific Reports** 3, Article number: 3400. (査読有) 静岡新聞に掲載
10. T. Miyazaki, and T. Tokumoto (2013) Induction of pairing in *Xenopus* by adding steroids into the water, a novel method for pairing. **Zoological Science** 30, 565-569. (査読有) 静岡新聞に掲載
11. J. Wang, R. Yamamoto, Y. Yamamoto, T. Tokumoto, J. Dong, P. Thomas, *H. Hirai, H. Kawagishi (2013) Hydroxylation of bisphenol A by hyper lignin-degrading fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 under non-ligninolytic condition. **Chemosphere** 93, 1419-1423. (査読有)

[学会発表](計 18 件)

1. 「アロマトーゼ阻害剤によるゼブラフィッシュ雌成魚の性転換」 徳元俊伸 科研費終了研究成果報告会 名城大学総合研究所、沖縄、名護 平成 27 年 1 月 30 日
2. 「ゼブラフィッシュの新規産卵誘発法を用いた排卵誘導遺伝子群の選択」 徳元俊伸、ワンラダ クラングヌラック 日本動物学会 2015 年 9 月 17-19 日 新潟
3. 「ESTABLISHMENT OF PROCEDURES FOR mPR INTERACTING AGENTS AND STUDY ON PHYSIOLOGICAL

ROLES OF mPR」Toshinobu Tokumoto 9th Rapid Responses to Steroid Hormones 7-10 Jun, 2015 Taipei TAIWAN

4. 「Membrane progesterin receptor (mPR) a possible target for new drugs; Translational Sciences and Drug Discovery」Toshinobu Tokumoto, MD Babul Hossain, Jun Wang, Takehiro Miyazaki *Impact on Health, Wellness, Environment and Economics* July 27-29, 2015 Hennessy Park Hotel, Mauritius
5. 「サンゴ礁海水に検出された天然ホルモン活性物質の単離同定」広瀬静香、中山 亮、徳元俊伸 シーズ&ニーズビジネスマッチング研究発表会 ホテルブリヴィエ静岡ステーション、静岡、平成 26 年 12 月 4 日
6. 「Expression and purification of human membrane progesterin receptor alpha (mPR α)」Md. Babul Hossain、大島卓之、広瀬静香、徳元俊伸 シーズ&ニーズビジネスマッチング研究発表会 ホテルブリヴィエ静岡ステーション、静岡、平成 26 年 12 月 4 日
7. 「An Evaluation of the effects of endocrine disrupting chemicals on reproductive functions of fish and its effects on next generation」Mst. Afroza Akhter, Toshinobu Tokumoto, JSCE 2014, Okazaki, Japan, Nov 7-9, 2014
8. 「Establishment of the mutant strains of membrane progesterin receptors (mPRs) in the Medaka fish and investigate their central roles」Shimi Rani Roy, Takayuki Oshima, Kaori Miyaoku, Etsuko Sugita, Kanae Takatsu, Miki Ogusu, Babul Hossain, Jun Wang, Ikuyo Hara, Kiyoshi Naruse, Yasuhiro Kamei, Yoshihito Taniguchi, Toshinobu Tokumoto, JSCE 2014, Okazaki, Japan, Nov 7-9, 2014
9. 「マウス精巢性テラトーマ形成の新規原因遺索」徳元俊伸 静岡実験動物研究会 静岡市清水文化会館マリナート、静岡、清水 平成 26 年 10 月 10 日
10. 「In vivo induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish; an ideal model to distinguish between genomic and nongenomic actions of steroids」Toshinobu Tokumoto, Workshop in Ramkhamhaeng University, Thailand, Oct 27, 2014
11. 「ゼブラフィッシュの新規産卵誘発法を用いた排卵誘導遺伝子群の同定」徳

元 俊伸、穠山雄一、栄 雄太 日本動物学会 東北大学川内北キャンパス、宮城、仙台、平成 26 年 9 月 10-13 日

12. 「マウス精巢性テラトーマ形成の新規原因遺伝子候補領域 ett1」 宮崎岳大、大平幸夫、高林秀次、加藤秀樹、佐藤 正宏、野口 基子、徳元 俊伸 日本動物学会 東北大学川内北キャンパス、宮城、仙台、平成 26 年 9 月 10-13 日
13. 「セルベースアッセイ法によるプロゲステン膜受容体と抑制性 G タンパク質 (Gi) の共役の証拠」 中島美記子 鈴木愛美 亀井保博 斎田美佐子 徳元俊伸、日本動物学会 東北大学川内北キャンパス、宮城、仙台、平成 26 年 9 月 10-13 日
14. 「Emergence of educational leaders of environmental issues in Academia」 Toshinobu Tokumoto, ELSU Symposium 2014, Shizuoka, Japan Sep 29,30,2014
15. 「Towards elucidation of the roles of membrane progesterin receptors (mPRs) in the non-genomic steroidal actions.」 Toshinobu Tokumoto “**Rapid Responses to Steroid Hormones 8th International Meeting**”, 19-21 September 2013 Eri, PA, USA
16. 「魚類卵成熟の研究から発見されたプロゲステン膜受容体, mPR の機能解明に向けて」徳元俊伸 静岡県立大学環境科学専攻セミナー 静岡県立大学、清水 平成 25 年 7 月 16 日
17. 「魚類の卵成熟・排卵誘導機構-ステロイドホルモン作用の研究モデル」 徳元俊伸 日本動物学会北海道支部 支部講演会 北海道大学札幌キャンパス、札幌、北海道、平成 25 年 8 月 7 日

〔図書〕(計 1 件)

徳元俊伸 (2016) ステロイドホルモンの新しい作用のしくみ ナノバイオ・テクノロジー, 静岡大学ナノバイオ科学研究分野編, 199-214. (分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: ステロイドホルモン膜受容体の精製方法

発明者: 徳元俊伸

権利者: 国立大学法人静岡大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-136980

出願年月日: 2013 年 6 月 28 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称: 発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳元 俊伸 (TOKUMOTO Toshinobu)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号: 30273163

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: