

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440159

研究課題名(和文) 生物進化に伴う副腎ステロイド受容体の機能進化の解明

研究課題名(英文) Study of functional evolution of adrenal steroid receptor in evolutionary process

研究代表者

勝 義直 (Katsu, Yoshinao)

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：00332180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：副腎ステロイド受容体は、副腎皮質から分泌される副腎ステロイドと結合して動物の内分泌の恒常性維持の機構に関与している。しかし、高等脊椎動物で認められる副腎ステロイド受容体による内分泌恒常性維持機構は生物進化のどの段階から出現したのかは未だ不明である。本研究課題は、生物進化における副腎ステロイド受容体遺伝子の出現と機能獲得のプロセスの解明を目指した。その結果、ガーやチョウザメという古代魚の進化段階からヒトと同様に副腎ステロイド受容体遺伝子を持つこと、また機能的にもヒトの受容体と同等の能力を有することを明らかにした。以上の成果は副腎ステロイド受容体の分子進化を解明する上で重要な手がかりとなる。

研究成果の概要(英文)：The adrenal steroid receptor binds to adrenal steroids such as glucocorticoids and mineralocorticoids secreted from the adrenal cortex and is involved in the mechanism of maintaining the homeostasis of animals and endocrine secretions. However, it is still unknown at which stage of biological evolution the mechanism of maintaining endocrine homeostasis by adrenal steroid receptors found in higher vertebrates such as humans. The purpose of this research project was to clarify the process of adrenal steroid receptor gene appearance and function acquisition in evolution process. As a result, ancient fishes, gar and sturgeon have the adrenal steroid receptor genes like humans, and the adrenal steroid receptors from ancient fishes have functionally equivalent to human receptors. These results can be expected to serve as important clues to elucidate the molecular evolution of the adrenal steroid receptor.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：副腎ステロイド ステロイドホルモン ホルモン受容体 分子進化

1. 研究開始当初の背景

副腎ステロイドホルモン受容体は核内受容体ファミリーの一員である。副腎ステロイドには糖質コルチコイドと鉱質コルチコイドの2種類があり、副腎皮質で合成・分泌されている。それら副腎ステロイドの受容体である糖質コルチコイド受容体・鉱質コルチコイド受容体はホルモン依存的な転写制御因子である。これまでに哺乳類から魚類まで様々な脊椎動物から遺伝子の単離が行われてきた。申請者は副腎ステロイド受容体遺伝子の分子進化を解明する目的で様々な動物種から遺伝子を単離し、ホルモン応答性を調べている。しかし、この副腎ステロイドが脊椎動物の進化の過程でどのように生理的な機能を持つに至ったのか、そして受容体遺伝子がどの進化段階から出現したのかという疑問の答えは見出されていない。

2. 研究の目的

副腎皮質で合成分泌される副腎ステロイドは受容体と結合する事により、生体の恒常性維持やストレス応答などへの作用等様々な組織で多様な作用機構を発揮している。この副腎ステロイドは糖質コルチコイドと鉱質コルチコイドの2種類に大別され、それぞれのコルチコイドに応答する受容体(糖質コルチコイド受容体と鉱質コルチコイド受容体)が存在する。しかし、これらコルチコイド受容体が「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、この副腎コルチコイド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

副腎コルチコイド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、培養細胞を用いたレポータージーンアッセイによるホルモンに対する感受性・転写活性化能を調べる。さらに、様々な生物種から単離した副腎ステロイド受容体遺伝子の配列および機能の比較を行うことにより副腎ステロイド受容体遺伝子の分子進化・機能進化の全体像を解析する。

4. 研究成果

古代魚は現存する魚類のうち、真骨魚類の祖先型と考えられる種類を指している。魚類の進化にとどまらず脊椎動物の進化を解明する上で重要な生物である。これまでに申請者は古代魚であるガー、チョウザメ、肺魚からエストロゲン受容体遺伝子の単離・機能解析を行っている。これから古代魚は真骨魚類が経験した遺伝子重複の起こる前の進化段階の魚類であることを示した。さらに、ヒトなど高等脊椎動物がもつ2種類のエストロ

ゲン受容体遺伝子を有することを明らかにした(2010年発表)。今回、古代魚であるガーとチョウザメから糖質コルチコイド受容体と鉱質コルチコイド受容体の遺伝子の単離に成功した。真骨魚類は2種類の糖質コルチコイド受容体と鉱質コルチコイド受容体を持つことが判明している。これは真骨魚類へと進化した際に起こった遺伝子重複によるものであると推測されている。今回単離に成功したガーとチョウザメの糖質コルチコイド受容体と鉱質コルチコイド受容体はそれぞれ1種類であった。この結果は、エストロゲン受容体と同じであり、古代魚は真骨魚類の祖先型であり、遺伝子重複を経験していない魚類であることを強く示唆する結果である(文献①、⑦)。次に、これら単離した受容体を使って、ホルモン応答性を調べた。その結果、古代魚の受容体は脊椎動物が合成する多くの副腎ステロイドに応答し、認識配列を介した転写を誘導することが判明した(文献①、⑦)。さらに哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類の糖質コルチコイド受容体との比較を行ったところ、古代魚の糖質コルチコイド受容体は魚類であるゼブラフィッシュの受容体とホルモン応答性が似ていることがわかった(文献③、⑦)。この知見は、古代魚は遺伝子重複前の段階ではあるが、生体内での機能は真骨魚類と同様である可能性を示唆している。要するに、生理的な機能が確立したのちに、遺伝子の重複が起こり真骨魚類において独自の進化を経ることになったことを意味する。

糖質コルチコイド受容体は他のステロイドホルモン受容体と同様にタンパク質の構造から4つの部位(N末側からA/B領域、C領域、D領域、E領域)に分けることができる。E領域はホルモンと結合する領域であり本来ならばこの領域がホルモンとの結合と転写誘導を担う。しかしながら、N末側を欠失したコンストラクトを準備してホルモン応答性を調べたところ、N末を含む全長のクローンとは異なり、著しくホルモン応答性が低下することを見出した。この結果は、糖質コルチコイド受容体は、E領域がホルモンとの応答に重要な役割を担うが、N末側の領域は受容体がホルモンに応答して十分に活性化するために必要な立体構造を形成するために必要であることを物語っている。さらにホルモン応答性とN末領域の関連について調べる必要があるだろう。

鉱質コルチコイド受容体については、ヒトの受容体との比較によりホルモン応答性の差を明らかにした。スピロラクトンという化学物質はヒトの鉱質コルチコイド受容体にはアンタゴニストとして働く(よって、鉱質コルチコイドの作用を抑える薬として臨床では使用されている)。興味ふかいことに、古代魚の鉱質コルチコイド受容体はスピロラクトンに応答した転写活性を誘導することが判明した。さらに、ヒトの鉱質コルチ

コイド受容体の転写活性をほとんど誘導しないプロゲステロンが古代魚の鉱質コルチコイド受容体の転写を誘導することが分かった(文献①)。

さらに、本研究成果で確立した手法を利用した研究論文を多数報告している(文献②、④、⑤、⑧、⑨など)。以上のように、副腎ステロイド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われる。そして「古代魚の副腎ステロイド受容体の生理機能は?」「古代魚よりも下位に位置する軟骨魚類や無顎類の副腎ステロイド受容体は?」などさらに多くの課題が残され、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さらに詳細なホルモン依存性・特異性、細胞内局在、2量体化、転写制御機構の解析が待ち望まれる。これらの解析により、副腎ステロイド受容体遺伝子の分子進化の全体像が明らかになり、副腎ステロイド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副腎ステロイド受容体の新規の機能、または副腎ステロイド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 15 件)

- ① Sugimoto A, Oka K, Sato R, Adachi S, Baker ME, Katsu Y, Corticosteroid and progesterone transactivation of mineralocorticoid receptors from American sturgeon and tropical gar. **Biochem J** 473: 3655-3665 (2016) doi: 10.1042/BCJ20160579. 査読有
- ② Katsu Y, Cziko PA, Chandsawangbhuwana C, Thornton JW, Sato R, Oka K, Takei Y, Baker ME, Iguchi T, A second estrogen receptor from Japanese lamprey (*Lethenteron japonicum*) does not have activities for estrogen binding and transcription. **Gen Comp Endocrinol** 236: 105-114 (2016) doi: 10.1016/j.ygcen.2016.07.014. 査読有
- ③ Katsu Y, Kohno S, Oka K, Baker ME, Evolution of corticosteroid specificity for human, chicken, alligator and frog glucocorticoid receptors. **Steroids** 113: 38-45 (2016) doi: 10.1016/j.steroids.2016.06.005. 査読有
- ④ Oka K, Kohno S, Ohta Y, Guillette LJ Jr, Iguchi T, Katsu Y, Molecular cloning and characterization of the aryl hydrocarbon receptors and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocators in the American alligator. **Gen Comp Endocrinol** 238: 13-22 (2016) doi: 10.1016/j.ygcen.2016.05.002. 査読有
- ⑤ Yatsu R, Katsu Y, Kohno S, Mizutani T, Ogino Y, Ohta Y, Myburgh J, van Wyk JH, Guillette LJ Jr, Miyagawa S, Iguchi T, Characterization of evolutionary trend in squamate estrogen receptor sensitivity. **Gen Comp Endocrinol** 238: 88-95 (2016) doi: 10.1016/j.ygcen.2016.04.005. 査読有
- ⑥ Yatsu R, Miyagawa S, Kohno S, Saito S, Lowers R, Ogino Y, Fukuta N, Katsu Y, Ohta Y, Tominaga M, Guillette LJ, and Iguchi T, TRPV4 associates environmental temperature and sex determination in the American alligator. **Sci Rep** 5: 18581 (2015) doi:10.1038/srep18581. 査読有
- ⑦ Oka K, Hoang A, Okada D, Iguchi T, Baker ME, Katsu Y, Allosteric role of the amino-terminal A/B domain on corticosteroid transactivation of gar and human glucocorticoid receptors. **J Steroid Biochem Mol Biol** 154: 112-119 (2015) doi: 10.1016/j.jsbmb.2015.07.025. 査読有
- ⑧ Tohyama S, Miyagawa S, Lange A, Ogino Y, Mizutani T, Tatarazako N, Katsu Y, Tanaka M, Ishibashi H, Kobayashi T,

- Tyler C, Iguchi T, Understanding the molecular basis for differences in responses of fish estrogen receptor subtypes to environmental estrogens. **Environ Sci Technol** 49: 7439-7447 (2015) doi: 10.1021/acs.est.5b00704. 査読有
- ⑨ Miyagawa S, Yatsu R, Kohno S, Doheny BM, Ogino Y, Ishibashi H, **Katsu Y**, Ohta Y, Guillette LJ, Iguchi T, Identification and characterization of the androgen receptor from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. **Endocrinology** 156: 2795-2806 (2015) doi: 10.1210/en.2015-1037. 査読有
- ⑩ Kodama M, Suda M, Sakamoto D, Iwasaki T, Matsuo Y, Uno Y, Matsuda Y, Nakamura Y, Maekawa S, **Katsu Y**, Nakamura M, Molecular Cloning and Characterization of Anti-Müllerian Hormone (AMH) from the Japanese Wrinkled Frog, *Rana rugosa*. **Endocrinology** 156: 1914-1923 (2015) doi: 10.1210/en.2013-2053. 査読有
- ⑪ Kohno S, Bernhard MC, **Katsu Y**, Zhu J, Bryan TA, Doheny BM, Iguchi T, Guillette LJ Jr., Estrogen Receptor 1 (ESR1; ERa), not ESR2 (ERb), modulates estrogen-induced sex reversal in the American alligator, a species with Temperature-Dependent Sex Determination. **Endocrinology** 156: 1887-1899 (2015) doi: 10.1210/en.2014-1852. 査読有
- ⑫ Hagiwara A, Ogiwara K, **Katsu Y**, Takahashi T, Luteinizing hormone-induced expression of Ptger4b, a prostaglandin E2 receptor indispensable for ovulation of the medaka *Oryzias latipes*, is regulated by a genomic mechanism involving nuclear progesterin receptor. **Biol Reprod** 90: 126 (2014) doi: 10.1095/biolreprod.113.115485. 査読有
- ⑬ Hagiwara A, Ogiwara K, **Katsu Y**, Takahashi T, Luteinizing hormone-induced expression of Ptger4b, a prostaglandin E2 receptor indispensable for ovulation of the medaka *Oryzias latipes*, is regulated by a genomic mechanism involving nuclear progesterin receptor. **Biol Reprod** 90: 126 (2014) doi: 10.1095/biolreprod.113.115485. 査読有
- ⑭ Takahashi K, Kotani T, **Katsu Y**, Yamashita M, Possible involvement of insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 in zebrafish oocyte maturation as a novel cyclin B1 mRNA-binding protein that represses the translation in immature oocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 448: 22-27 (2014) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.04.020. 査読有
- ⑮ Miyagawa S, Lange A, Hirakawa I, Tohyama S, Ogino Y, Mizutani T, Kagami Y, Kusano T, Ihara M, Tanaka H, Tatarazako N, Ohta Y, **Katsu Y**, Tyler C, Iguchi T, Differing species responsiveness of estrogenic contaminants in fish is conferred by the ligand binding domain of the estrogen receptor. **Environ Sci Technol** 48: 5254-5263 (2014) doi: 10.1021/es5002659. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 佐藤 塁・勝 義直「特異的アゴニストに対するエストロゲン受容体の種特異性」
2016 年 12 月 10 日：日本比較内分泌学会

(神奈川県相模原市)

- ② Katsu Y 「Cloning and characterization of Holocephalan elephant shark, *Callorhinchus milii*, estrogen receptor」 2015 年 12 月 1 日 : NIBB Conference “Environment to Bioresponse” (愛知県岡崎市) (招待講演)
- ③ 勝 義直 「古代魚の糖質コルチコイド受容体のホルモン応答性」 2015 年 9 月 17 日 : 日本動物学会 (新潟県新潟市)
- ④ Oka K, Sasaki M, Ohta Y, Iguchi T, Katsu Y 「Glucocorticoid affects the sex determination pathway in reptiles with temperature-dependent sex determination」 2014 年 11 月 7 日 ISAREN2014: The 8th International Symposium on Amphibian and Reptilian Endocrinology and Neurobiology (愛知県岡崎市)
- ⑤ 高橋 一樹・小谷 友也・勝 義直・山下 正兼 「ゼブラフィッシュ卵成熟過程におけるサイクリン B1 mRNA 翻訳制御に関わる新規蛋白質の同定とその機能解析」 2014 年 9 月 11 日 : 日本動物学会 (宮城県仙台市)
- ⑥ 谷津 遼平・宮川 信一・河野 郷通・斎藤 茂・荻野 由起子・勝 義直・富永 真琴・Louis Guillette・井口 泰泉 「ミシシッピワニの性決定における温度受容機構の解明」 2014 年 9 月 11 日 : 日本動物学会 (宮城県仙台市)
- ⑦ 岡 香織・岡田 大二郎・杉本 章・勝 義直 「糖質コルチコイド受容体によるリガンド特異的転写活性における A/B 領域の必要性」 2014 年 9 月 11 日 : 日本動物学会 (宮城県仙台市)
- ⑧ 西宮 攻・勝 義直・稲川 裕之・平松 尚志・東藤 孝・原 彰彦 「ヌタウネギ 2 種ピテロジェニン遺伝子のプロモーター領

域の機能解析」 2014 年 8 月 23 日 日本動物学会 (北海道函館市)

[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・教授
研究者番号 : 00332180

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし