

平成 21 年 6 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19580221

研究課題名（和文） 変異体導入による魚類性ステロイド受容体機能の解析

研究課題名（英文） Functional analysis for sex steroid receptors using over-expressing mutant receptors in teleost.

研究代表者

池内 俊貴（IKEUCHI TOSHITAKA）

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・講師

研究者番号：00367898

研究成果の概要：

8 種類の変異体発現ベクター（アンドロゲン受容体 2 分子種、最終成熟誘起ステロイド受容体 2 分子種の転写活性化ドメインまたはホルモン結合ドメイン欠失変異体発現コンストラクト）を作製し、メダカ受精卵に導入した。その結果、導入に成功した個体においても正常に配偶子形成が進行し F1 世代も得られた。変異体の発現にヒトサイトメガロウィルスプロモーターを使っているために十分な機能を発揮していない可能性が考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

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、内分泌学、環境

1. 研究開始当初の背景

性ステロイドは性的二型の確立、生殖腺の発達、受精能の獲得といった生殖に関わる生命現象を制御する重要な液性因子である。性ステロイドは脂溶性であるために細胞膜を容易に通過し、核内に存在する受容体を介して直接標的遺伝子の転写を調節する。申請者らはニホンウナギにおいて性ステロイドのうちアンドロゲンおよび最終成熟誘起ステロイドの核内受容体がそれぞれ 2 種類ずつ存在することを明らかにした。また、それら受容体は生殖に関わる組織のみならず鰓や脾臓、腎臓などにも存在し、性ステロイドが影

響を与える組織が多岐に渡ることを示した。しかしながら、それらの受容体がどのような遺伝子発現を介してホルモン作用を発揮しているのか明らかではない。

2. 研究の目的

性ステロイド受容体は特定のドメインを除くことで機能獲得型あるいは機能欠損型変異体を作ることが出来る。

本研究は受容体の変異体を強制発現することでその機能を解析し、各受容体が担う役割を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 機能欠失型変異体発現コンストラクトの構築

性ホルモン受容体では転写活性化ドメインを欠落させると競合的に野生型受容体の作用を抑制するドミナントネガティブ変異体となることがいくつかの分子種で報告されている。この変異体を過剰発現させるとホルモン存在下でもその機能は抑制される。そこで、現在所有しているアンドロゲン受容体2分子種、最終成熟誘起ステロイド受容体2分子種の転写活性化ドメイン欠失変異体発現コンストラクトを構築し、それぞれの野生型受容体とレポーター遺伝子が導入されている細胞系にトランスフェクションし、その抑制効果を確認する。

(2) 機能獲得型変異体発現コンストラクトの構築

性ホルモン受容体ではホルモン結合ドメインを欠落させると恒常的に活性化された状態を呈するコンスティテューティブアクティブ変異体となることがいくつかの分子種で報告されている。この変異体を過剰発現させるとホルモン非存在下でもその機能が亢進される。そこで、現在所有しているアンドロゲン受容体2分子種、最終成熟誘起ステロイド受容体2分子種のホルモン結合ドメイン欠失変異体発現コンストラクトを構築し、細胞系にトランスフェクションし、その転写活性化能を確認する。

(3) 変異体ベクターの導入

機能を確かめた変異体発現コンストラクトをメダカの受精卵にエレクトロポレーション法またはマイクロインジェクション法により導入する。

(4) 表現型の解析

変異体ベクターを導入されたメダカの表現型についてまず、形態学的に観察する。特に生殖腺に着目し、配偶子形成過程を詳細に観察する。受精可能な配偶子が産出された場合は、受精率・発眼率・孵化率を調べる。

4. 研究成果

(1) 機能欠失型メダカ最終成熟誘起ステロイド受容体コンストラクトの構築

メダカ最終成熟誘起ステロイド受容体の翻訳領域では翻訳開始点から 883 bp までが転写活性化領域に相当するので 884 bp め以降をポリ A 付加シグナルまで PCR により増幅し、発現ベクター pcDNA 3.1 に挿入した。

DNA シークエンスにより配列を確認後、ステロイド応答性レポーターと共に、野生型メダカ最終成熟誘起ステロイド受容体コンス

トラクトと様々な構成比でヒト 293 細胞に導入し、最終成熟誘起ホルモン (DHP) を 10nM 添加した。

その結果、野生型発現ベクターに対して変異体発現ベクターを導入する量比に依存して、レポーターの転写活性化能が低下した (図 1)。

このことから作製したコンストラクトはメダカ最終成熟誘起ホルモン受容体のドミナントネガティブ変異体を発現させることが明らかとなった。

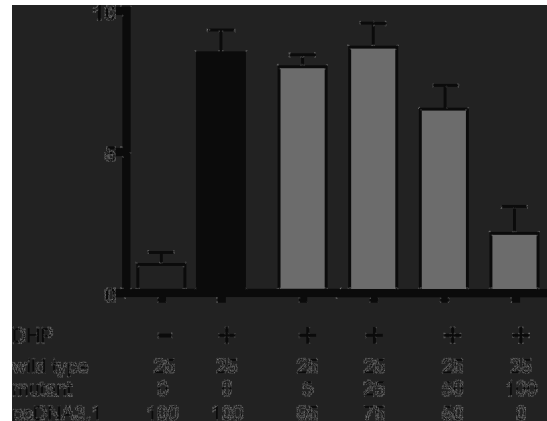


図 1. 機能欠失型最終成熟誘起ホルモン受容体変異体ベクターの抑制効果

(2) 機能欠失型メダカアンドロゲン受容体 β 変異体コンストラクトの構築

メダカアンドロゲン受容体 β の翻訳領域では翻訳開始点から 1143 bp までが転写活性化領域に相当するので 1144 bp め以降をポリ A 付加シグナルまで PCR により増幅し、発現ベクター pcDNA 3.1 に挿入した。

DNA シークエンスにより配列を確認後、ステロイド応答性レポーターと共に、野生型メダカアンドロゲン受容体 β コンストラクトと様々な構成比でヒト 293 細胞に導入し、アンドロゲンである 11-ケトテストステロン (KT) を 10nM 添加した。

その結果、野生型発現ベクターに対して変異体発現ベクターを導入する量比に依存して、レポーターの転写活性化能が低下した。

このことから作製したコンストラクトはメダカアンドロゲン受容体 β のドミナントネガティブ変異体を発現させることが明らかとなった。

(3) 機能欠失型メダカアンドロゲン受容体 α 変異体コンストラクトの構築

メダカアンドロゲン受容体 α は新たにクローニングした。メダカアンドロゲン受容体 α の翻訳領域では翻訳開始点から 900 bp までが転写活性化領域に相当するので 901 bp め以降をポリ A 付加シグナルまで PCR に

より増幅し、発現ベクター pcDNA 3.1 に挿入した。

DNA シークエンスにより配列を確認後、ステロイド応答性レポーターと共に、野性型メダカアンドロゲン受容体 α コンストラクトと様々な構成比でヒト 293 細胞に導入し、KT を 10nM 添加した。

その結果、野性型発現ベクターに対して変異体発現ベクターを導入する量比に依存して、レポーターの転写活性化能が低下した。

このことから作製したコンストラクトはメダカアンドロゲン受容体 α のドミナントネガティブ変異体を発現させることが明らかとなった。

(4) 機能欠失型ウナギ最終成熟誘起ステロイド受容体 β コンストラクトの構築

最終成熟誘起ステロイド受容体 β のホモログはメダカゲノムデータベース上には存在しなかった。メダカには β サブタイプは存在しない可能性がある。しかしながら、現在得られている最終成熟誘起ステロイド受容体は α サブタイプに近いので、解読されていない領域に β サブタイプが存在するかもしれない。そこで、ウナギ最終成熟誘起ステロイド受容体 β コンストラクトを構築することにした。

ウナギ最終成熟誘起ステロイド受容体の翻訳領域では翻訳開始点から 951 bp までが転写活性化領域に相当するので 952 bp 以降をポリ A 付加シグナルまで PCR により増幅し、発現ベクター pcDNA 3.1 に挿入した。

DNA シークエンスにより配列を確認後、ステロイド応答性レポーターと共に、野性型ウナギ最終成熟誘起ステロイド受容体 β コンストラクトと様々な構成比でヒト 293 細胞に導入し、最終成熟誘起ホルモン (DHP) を 10nM 添加した。

その結果、野性型発現ベクターに対して変異体発現ベクターを導入する量比に依存して、レポーターの転写活性化能が低下した (図 1)。

このことから作製したコンストラクトはウナギ最終成熟誘起ホルモン受容体 β のドミナントネガティブ変異体を発現させることが明らかとなった。

(5) 機能獲得型メダカ最終成熟誘起ステロイド受容体 β コンストラクトの構築

メダカ最終成熟誘起ステロイド受容体の翻訳領域では翻訳開始点から 1249 bp 以降がリガンド結合ドメインに相当するので、転写開始点から 1248 bp までの配列にストップコドン付加し PCR により増幅し、発現ベクター pcDNA 3.1 に挿入した。

DNA シークエンスにより配列を確認後、ス

テロイド応答性レポーターと共に、ヒト 293 細胞に導入し、DHP を 10nM 添加した。

その結果、DHP 非依存的にレポーターの転写活性を誘導した。

このことから作製したコンストラクトはメダカ最終成熟誘起ホルモン受容体のコンステイテューティブアクティブ変異体を発現させることが明らかとなった。

(6) 機能獲得型メダカアンドロゲン受容体 β 変異体コンストラクトの構築

メダカアンドロゲン受容体 β 変異体の翻訳領域では翻訳開始点から 1394 bp までが DNA 結合ドメインに相当するので、転写開始点から 1394 bp までの配列にストップコドン付加し PCR により増幅し、発現ベクター pcDNA 3.1 に挿入した。

DNA シークエンスにより配列を確認後、ステロイド応答性レポーターと共に、ヒト 293 細胞に導入し、KT を 10nM 添加した。

その結果、KT 非依存的にレポーターの転写活性を誘導した。

このことから作製したコンストラクトはメダカアンドロゲン受容体 β 変異体のコンステイテューティブアクティブ変異体を発現させることが明らかとなった。

(7) 機能獲得型メダカアンドロゲン受容体 α 変異体コンストラクトの構築

メダカアンドロゲン受容体 α 変異体の翻訳領域では翻訳開始点から 1158 bp までが DNA 結合ドメインに相当するので、転写開始点から 1158 bp までの配列にストップコドン付加し PCR により増幅し、発現ベクター pcDNA 3.1 に挿入した。

DNA シークエンスにより配列を確認後、ステロイド応答性レポーターと共に、ヒト 293 細胞に導入し、KT を 10nM 添加した。

その結果、KT 非依存的にレポーターの転写活性を誘導した。

このことから作製したコンストラクトはメダカアンドロゲン受容体 α 変異体のコンステイテューティブアクティブ変異体を発現させることが明らかとなった。

(8) 機能獲得型ウナギ最終成熟誘起ステロイド受容体 β コンストラクトの構築

ウナギ最終成熟誘起ステロイド受容体 β の翻訳領域では翻訳開始点から 1314 bp 以降がリガンド結合ドメインに相当するので、転写開始点から 1313 bp までの配列にストップコドン付加し PCR により増幅し、発現ベクター pcDNA 3.1 に挿入した。

DNA シークエンスにより配列を確認後、ステロイド応答性レポーターと共に、ヒト 293 細胞に導入し、DHP を 10nM 添加した。

その結果、DHP 非依存的にレポーターの転

写活性を誘導した。

このことから作製したコンストラクトはウナギ最終成熟誘起ホルモン受容体 β のコンステイテューティブアクティブ変異体を発現させることが明らかとなった。

(9) 変異体ベクターの導入と表現型の解析

8種類の変異体発現ベクターが構築されたので、をそれぞれメダカ受精卵にエレクトロポレーション法により導入を試みたが、導入効率が悪かったため、マイクロインジェクションにより導入し直した。その結果、導入に成功した個体においても正常に配偶子形成が進行し F1 世代も得られた。変異体の発現にヒトサイトメガロウィルスプロモーターを使っているために十分な機能を発揮していない可能性が考えられる。

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 1 件)

1. Y. Katsu, R. Ichikawa, T. Ikeuchi, S. Kohno, LJ Jr, Guillette, T. Iguchi
Molecular Cloning and Characterization of Estrogen, Androgen, and Progesterone Nuclear Receptors from a Freshwater Turtle (*Pseudemys nelsoni*). Endocrinology 148, 161-173 (2008)、査読有り

[学会発表] (計 2 件)

1. 川崎一馬・池内俊貴
アンドロゲン受容体 β 導入細胞を用いたアンドロゲン活性の評価
(平成 20 年度日本水産学会春期大会)
2008 年 3 月 28 日 東海大学

2. 池内俊貴

メダカのリセリン受容体
(日本動物学会第七十八回大会)
2007 年 9 月 22 日 弘前大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池内俊貴 (IKEUCHI TOSHITAKA)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
講師
研究者番号：00367898

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者
なし