

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06734

研究課題名(和文)ステロイドホルモン受容体タンパク質の機能進化の解明

研究課題名(英文)Study of functional evolution of steroid hormone receptor protein

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、軟骨魚類であるゾウギン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、さらにプロゲステロン受容体遺伝子の単離に成功した。この結果は、軟骨魚類の進化段階からヒトなど高等脊椎動物がもっている副腎ステロイド受容体とプロゲステロン受容体がすでに備わっていることを示唆している。次に、これら単離した受容体を使ってホルモン応答性を詳細に調べた。その結果、軟骨魚類の受容体とヒトの受容体間の幾つかの相違を見出し、原因となる部位の同定も行った。このように軟骨魚類のステロイド受容体の機能を解析することで、受容体の機能進化につながる幾つかの知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、軟骨魚類であるゾウギンザメから糖質コルチコイド受容体、鉱質コルチコイド受容体、さらにプロゲステロン受容体遺伝子の単離に成功し、ホルモン応答性を詳細に調べた。ホルモン応答性の結果から、受容体のN末端領域の重要性を示唆するデータを得ることができた。これまで機能が不明だったN末端領域の機能解明につながる大きな学術的成果である。さらに、軟骨魚類のプロゲステロン受容体はヒトのプロゲステロン受容体のアンタゴニストであるミフェプリストンに反応しないことが判明した。この結果は、生殖医療への応用を視野に入れた新たな研究を進展させる基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we succeeded in isolating glucocorticoid, mineralocorticoid, and progesterone receptor genes from the cartilaginous fish elephant shark. This result suggests that the adrenal steroid receptor and progesterone receptor possessed in higher vertebrates such as humans are already expressed from the evolutionary stage of cartilage fish. Next, these isolated receptors were used to investigate hormone responsiveness in detail. As a result, we found some differences between cartilaginous fish receptors and human receptors, and then we identified the causative site. By analyzing the function of steroid receptors in cartilaginous fish in this way, we were able to obtain some findings that lead to the functional evolution of the receptors.

研究分野：比較内分泌学

キーワード：ステロイドホルモン受容体 軟骨魚類 分子進化 機能進化 ホルモン応答性

## 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物では、生殖腺および副腎から分泌されるステロイドホルモンが様々な内分泌制御に関わっている。ステロイドホルモンはその受容体に結合し、標的遺伝子の転写を制御することで生理機能を発揮している。そのため、ヒトではステロイドホルモン受容体の異常が内分泌疾患の原因に直結している。従って、ステロイドホルモン受容体の機能の全体像を、その進化的起源までを含めて分子レベルで理解することは、内分泌学分野における基礎的な研究だけではなく医療への応用面からも非常に有意義である。1985年に最初のステロイドホルモン受容体の遺伝子単離が報告されて以来、様々な動物から受容体遺伝子の単離・機能解析が行われてきた。しかし、脊椎動物の恒常性維持や生殖活動の基盤を制御するステロイドホルモン受容体は、進化の過程でどの段階から出現したのか、また高等脊椎動物で確認されているホルモン依存的な転写制御因子としての機能はどのように獲得されたのか、という受容体の成立に関わる根本的な問いかけに対する答えは未だ得られていない。

## 2. 研究の目的

内分泌腺で合成分泌される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、さらに生殖などへの作用等様々な組織で多様な作用機構を發揮している。しかし、「内分泌システム」が生物の進化に伴ってどのように出現し、どのように構築されたのかは不明であり、その全体像を理解するためには解明するべき多くの課題が残っている。その一つが「受容体タンパク質の機能獲得の進化的プロセスの解明」である。その課題解決のために、本研究では女性ホルモン受容体と副腎ステロイド受容体に焦点を当てて、アミノ酸の変異導入とキメラタンパク質の作成による受容体の機能解析をもとにして『ステロイドホルモン受容体タンパク質の機能獲得の進化的プロセス』の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

ステロイドホルモン受容体の機能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および軟骨魚類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でホルモン感受性に必要な領域を同定し、アミノ酸置換やキメラコンストラクトを作成することによりステロイド受容体タンパク質の機能進化の全体像を解明する。

## 4. 研究成果

軟骨魚類を用いた研究は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、ハイギョ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としてきた。今回、軟骨魚類の全頭類であるゾウギン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。古代魚や真骨魚類は2種類の副腎ステロイド受容体である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。今回軟骨魚類のゾウギン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を単離することに成功した (Katsu et al., 2019, 2021)。この結果は、軟骨魚類の進化段階からヒトなど高等脊椎動物がもっている副腎ステロイド受容体が備わっていることを示唆している。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、軟骨魚類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、高等脊椎動物の受容体と同様に認識配列を介した転写を誘導することが判明した (Katsu et al., 2019, 2021)。さらに哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類の鉱質コルチコイド受容体との詳細な比

較を行ったところ、軟骨魚類の鉱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おり、ヒトの鉱質コルチコイド受容体のアンタゴニストであるプロゲステロンに応答して転写活性を発揮することがわかった。さらに、遺伝子の発現解析から軟骨魚類の鉱質コルチコイド受容体は生殖腺での発現量が高いことを明らかにした (Katsu et al., 2019)。この成果は、軟骨魚類の鉱質コルチコイド受容体の生理的なリガンドの一つはプロゲステロンであり、生殖腺で機能を発揮している可能性を示唆するものである。今後、さらに生殖腺での機能の解析を行う必要があり、この研究は、鉱質コルチコイド受容体の新しい機能の発見につながると期待される。

副腎ステロ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。今回単離した軟骨魚類の2種類の副腎ステロイド受容体について、N末端配列であるA/B領域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、軟骨魚類の糖質コルチコイド受容体は、N末を含む全長のクローンとは異なりN末端配列を除去することで著しくホルモン応答性が低下することを見出した。一方で、軟骨魚類の鉱質コルチコイド受容体はA/B領域を欠失させてもホルモン応答性が低下することは確認できなかった (Katsu et al., 2021)。この結果は、糖質コルチコイド受容体は、N末側の領域は受容体がホルモンに反応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示唆している。2つの受容体の差をもとにして、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と思われる。

黄体ホルモンであるプロゲステロンは、ヒトなど高等脊椎動物では性周期や出産など生殖に関連する機能を有する。今回、軟骨魚類からプロゲステロン受容体を単離することに成功し、ホルモン応答性を調べた。様々なプロゲステロンに反応して転写活性を高める特性は、他の脊椎動物のプロゲステロン受容体と同じであるが、ヒトのプロゲステロン受容体のアンタゴニストであるミフェプリストン (妊娠中絶薬として医療現場で使用されている薬品) に、反応しないことが判明した。さらに、解析を進めた結果、リガンド結合領域中の1つのアミノ酸によってミフェプリストンに反応するかないかが起こることが明らかになった (Lin et al., 2021)。この結果は、生物の進化過程で、プロゲステロン受容体の機能が変化したことを示唆するものであり、この成果をもとにして新たなプロゲステロン受容体に対するアンタゴニストの開発につながると期待できる。

さらに、古代魚であるハイギョの鉱質コルチコイドの単離に成功し、詳細なホルモン応答性を調べ報告している (Katsu et al., 2022)。また、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 (Oka et al., 2021, McNabb et al., 2020)。これら以外にも、ステロイドホルモン受容体に関する総説を発表しており、当該分野の推進に多いに寄与している (Baker & Katsu, 2019, 2020)。以上のように、特に軟骨魚類からのステロイド受容体の単離および機能解析をおこなうことで研究を進め、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「ステロイド受容体のN末端領域の機能は?」「古代魚や軟骨魚類よりも下位に位置する無顎類の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、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、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ステロイド受容体の新規の機能、または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

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 McNabb NA, Bernhard MC, Brunell A, Lowers RH, Katsu Y, Spyropoulos DD, Kohno S	4. 巻 40
2. 論文標題 Oil dispersant Corexit 9500 is weakly estrogenic, but does not skew the sex ratio in Alligator mississippiensis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Toxicology	6. 最初と最後の頁 245-256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jat.3900.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Baker ME, Katsu Y	4. 巻 177
2. 論文標題 Progesterone: An enigmatic ligand for the mineralocorticoid receptor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 113976
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2020.113976.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Katsu Y, Kohno S, Oka K, Lin X, Otake S, Pillai NE, Takagi W, Hyodo S, Venkatesh B, Baker ME	4. 巻 12
2. 論文標題 Transcriptional activation of elephant shark mineralocorticoid receptor by corticosteroids, progesterone, and spironolactone.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aar2668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Baker ME, Katsu Y	4. 巻 109
2. 論文標題 Evolution of the mineralocorticoid receptor.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Vitamins and Hormones	6. 最初と最後の頁 17-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/bs.vh.2018.10.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 勝 義直、Xiaozhi Lin, Michael E. Baker	4. 巻 86
2. 論文標題 ミネラルコルチコイド受容体の分子進化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 循環器内科	6. 最初と最後の頁 215-222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Katsu Yoshinao, Oana Shin, Lin Xiaozhi, Hyodo Susumu, Baker Michael E.	4. 巻 215
2. 論文標題 Aldosterone and dexamethasone activate African lungfish mineralocorticoid receptor: Increased activation after removal of the amino-terminal domain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 106024 ~ 106024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2021.106024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Lin Xiaozhi, Takagi Wataru, Hyodo Susumu, Ijiri Shigeho, Katsu Yoshinao, Baker Michael E.	4. 巻 5
2. 論文標題 Regulation by Progestins, Corticosteroids, and RU486 of Transcriptional Activation of Elephant Shark and Human Progesterone Receptors: An Evolutionary Perspective	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Pharmacology & Translational Science	6. 最初と最後の頁 52 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscptsci.1c00191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Oka Kaori, Bono Hidemasa, Kuroiwa Asato, Fujioka Shusuke, Shimizu Atsushi, Katsu Yoshinao, Miura Kyoko	4. 巻 66
2. 論文標題 Diversification of mineralocorticoid receptor genes in a subterranean rodent, the naked mole-rat	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 299-311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JME-20-0325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsu Yoshinao, Shariful Islam M.D., Lin Xiaozhi, Takagi Wataru, Urushitani Hiroshi, Kohno Satomi, Hyodo Susumu, Baker Michael E.	4. 巻 210
2. 論文標題 N-terminal domain regulates steroid activation of elephant shark glucocorticoid and mineralocorticoid receptors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 105845 ~ 105845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2021.105845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 林 暁智・兵藤 晋・勝 義直
2. 発表標題 ゾウギンザメのプロゲステロン受容体の生理的リガンドの研究
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 陳 澤・林 暁智・勝 義直
2. 発表標題 ヌタウナギのプロゲステロン受容体とコルチコステロン受容体の単離と機能解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 暁智・兵藤 晋・勝 義直
2. 発表標題 ゾウギンザメのプロゲステロン受容体のヘリックス3 ヘリックス5の相互作用の研究
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 暁智・兵藤 晋・勝 義直
2. 発表標題 プロゲステロン受容体の11-デオキシコルチゾール結合のin vitroおよびin silico解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小穴 進・兵藤 晋・勝 義直
2. 発表標題 ハイギョミネラルコルチコイド受容体の構造解析
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学 生殖発生生物学講座1b <a href="https://www.repdev-katsu.jp/index.html">https://www.repdev-katsu.jp/index.html</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	漆谷 博志  (Urushitani Hiroshi)  (30571301)	会津大学短期大学部・食物栄養学科・准教授    (41601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

## 8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	University of California, San Diego	St. Cloud State University		