

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06719

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)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・創造科学技術大学院・教授

研究者番号：30273163

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)：ステロイド膜受容体mPRの一部の変異系統で発生異常を示すものが得られた。今後、詳細な表現型解析を進める。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、これらの表現型解析を進め論文発表できた。ステロイド膜受容体mPR分子をグラフェンQドットナノ粒子にmPRを結合させたナノ粒子(mPR-GQD)を調製し、プロゲステロン特異的な反応性を得ることに成功した。海藻ウミウチワの分泌する天然ホルモン活性物質、2種類についてHPLCによる精製に成功し、mPR-GQDを用いたアッセイでmPR反応性を示す物質であることが確かめられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステロイド膜受容体mPRの個体レベルでの機能証明ができれば、ステロイド膜受容体の研究は世界的に広がる事が予想され、ステロイドホルモンのノンゲノミック作用の理解が深まることにより医学、薬学応用へ繋がる事が期待される。そこでCRISPR/Cas9法により作出した遺伝子破壊系統の表現型解析により、機能証明を進める必要がある。研究代表者らが開発した新規卵成熟・排卵誘導法を用いて選択した排卵誘導遺伝子群についてもゲノム編集魚を用いて同様の解析を進める。排卵誘導機構が解明されれば排卵障害による不妊の問題への対処法のヒントを与えることも期待される。

研究成果の概要(英文)：Some mutant lines of steroid membrane receptor mPR showing developmental abnormalities were obtained. Detailed phenotypic analysis will be conducted in the future. Three candidate ovulation-inducing genes that show clear ovulation-specific expression were selected for further phenotypic analysis. The results were published. We succeeded in obtaining progesterone-specific reactivity of the steroid membrane receptor mPR molecule by preparing nanoparticles, graphene Q-dot nanoparticles with mPR (mPR-GQDs). Two fractions of natural hormonal active substances secreted by the seaweed were successfully purified by HPLC and confirmed to be mPR-reactive substances by an assay using mPR-GQD.

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 ゲノム編集 スクリーニング法 天然活性物質 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

本研究の第一の目的は細胞膜表面のステロイド膜受容体 **mPR** を介したノンゲノミックなシグナル伝達経路の生理学的意味を示すことである。さらに、これまでの **mPR** の研究実績を生かして未同定となっているコルチコイドの膜受容体(**mGCR**)の新規発見も目指す。一方で研究代表者らはサンゴ礁海水中に **mPR** 反応性の天然ホルモン活性物質が存在することを発見し、これを分泌する海藻を特定している。本研究では人工合成に成功(特許技術)している **mPR** 分子を用いた **mPR** 反応性物質の新規アッセイ法を開発し、この天然ホルモン活性物質の同定を目指す。一方、研究代表者らが開発した新規卵成熟・排卵誘導法を用いて選択した排卵誘導遺伝子群を同定する。この手法は卵成熟誘導反応経路と排卵誘導経路を明確に区別できる初めての方法であり、世界的にも非常に特色のある研究になると思われる。

2. 研究の目的

研究代表者らは、これまでに魚類の卵成熟・排卵の研究において以下の成果を得た。1.ステロイド膜受容体(**mPR**)が卵成熟誘起ホルモン受容体として働くこと 2. **mPR** が内分泌かく乱化学物質の標的分子にもなっていること 3. 内分泌かく乱化学物質のホルモン作用を個体レベルで検出できる生体アッセイ法を開発した。4. 生体アッセイ法により排卵期に特異的に発現上昇する排卵誘導遺伝子候補群を特定した。5. **mPR** の人工合成に成功した。本研究はこれらの成果を発展させる以下の4つの事項を目的としている。(1)**mPR** 遺伝子群のノックアウトゼブラフィッシュシステムを作り、変異個体の表現型から **mPR** 遺伝子群の機能について探る。(2)人工合成膜受容体を用いた新規膜受容体リガンドのアッセイ法を開発し、天然ホルモン活性物質を同定する。(3)生体アッセイ法を使って選択した排卵誘導遺伝子群の同定を進める。(4)発見の待たれているグルココルチコイド膜受容体(**mGCR**)を新規同定する。

3. 研究の方法

1. ステロイド膜受容体群 (**mPR**) の機能解析と天然ホルモン活性物質の探索

CRISPR/Cas9 システムにより確実な機能欠失システムの樹立を進める。5種類、計7個の **mPR** 遺伝子のノックアウトゼブラフィッシュシステムを樹立する。その表現型解析からステロイド膜受容体群の機能について明確な証明をもたらす。

ヒトの **mPR** についても発現株を樹立し、精製法に改良を加えた結果、ミリグラム単位の **mPR** タンパク質の精製が可能になった (Babul et al., PLOS ONE 2015, 特許 6516956 号)。最近になり半導体ナノ粒子であるグラフェン量子ドット (GQD) が開発された。独特な光特性をもつ GQD はタンパク質等を結合させることで生体分子の結合解離を検出に利用できる。本研究では GQD に **mPR** を結合させたナノ粒子の調製法を確立し、簡便な **mPR** リガンドのアッセイ法を開発する。確立した簡便な **mPR** リガンドのアッセイ法により海藻の分泌する天然ホルモン活性物質の探索に応用する。

2. グルココルチコイド膜受容体 (**mGCR**) 分子の新規同定

キンギョの各種臓器から調製した細胞膜画分についてアイソトープラベルされたグルココルチコイドを用いたステロイド結合実験を実施し、**mGCR** の発現の高い臓器を選定した。カラムクロマトグラフィーによる部分精製と飛行時間型質量分析法 (TOF-MS) によるタンパク質の同定により、3種類の機能未知な膜受容体候補を同定した。得られた候補タンパク質を培養細胞に発現させ、そのグルココルチコイド結合活性を調べ、受容体候補分子を特定する。

3. 排卵誘導遺伝子群の同定

これまでに選択している 11 遺伝子のノックアウトゼブラフィッシュシステムの樹立については既に開始しており F2 系統で変異ホモ系統を選別する段階に入っている。これらの表現型解析から排卵誘導における機能を証明する。

4. 研究成果

新規ステロイド膜受容体 **mPR** の 5 種類、計 7 個の **mPR** 遺伝子のノックアウトゼブラフィッシュ (KO) システムを CRISPR/Cas9 システムにより樹立できた。一部の変異系統で発生異常を示すものが得られた。今後、詳細な表現型解析を進める。

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。転写因子 *pax2a* についてはこれまで脳の発生に関する報告はなされていたものの卵や初期卵割段階での機能は不明であった。我々の KO システムを用いた解析により *pax2a* が卵形成段階で発現し、卵の成長や初期発生に関わることが明らかになった (Pachoensuk et al., BBRC, 2020)

論文発表)。耳石の正常な形態形成に必要であることが示されていた *starmaker(stm)* 遺伝子も排卵時に高発現する遺伝子として我々が同定したが、この遺伝子の KO 系統では受精膜の機能が不全となり発生率が低下することが明らかになった (Pachoensuk et al., **Reproduction and Fertility**, 2021)。その原因として受精膜上のドアノブ状の突起構造の形成異常が起きていることが明らかになった。さらにトリプシン様酵素である *prss59.1* の KO 系統でも受精膜の形成異常が確認された。今後、詳細な解析を進めるとともに他の遺伝子の変異系統を作出し、機能の証明を目指す。

ステロイド膜受容体 mPR 分子を用いた mPR 反応性物質の新規アッセイ法についてはグラフェン Q ドットナノ粒子に mPR を結合させたナノ粒子 (mPR α -GQD) を調製し、プロゲステロン特異的な反応性を得ることに成功した (Jyoti et al., **BBRC** 2022)。海藻ウミウチワの分泌する天然ホルモン活性物質、2 種類について HPLC による精製に成功し、mPR α -GQD を用いたアッセイで mPR 反応性を示す物質であることが確かめられた (Acharjee et al., **Natural Product Research**, 2022)。さらにウミウチワのゲノム解読についても先進ゲノム支援プロジェクトに採択され、現在ゲノム解読が進行中である。解読されれば世界的にも未解明な分類群となっている海藻の一属の解明となり、今後の海藻類全体のゲノム解明に向けた大きな一歩となることが期待される。また、新規天然化合物の合成経路解明のための重要な情報源となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Md. Rubel Rana, Md. Forhad Hossain, Md. Hasan Ali, Md. Maisum Sarwar Jyoti and Toshinobu Tokumoto	4. 巻 560
2. 論文標題 Biochemical characterization of zebrafish Prss59.1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 32-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.04.118	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 Md. Maisum Sarwar Jyoti, Md. Rubel Rana, Md. Hasan Ali and Toshinobu Tokumoto	4. 巻 592
2. 論文標題 Establishment of a steroid binding assay for membrane progesterone receptor alpha (PAQR7) by using graphene quantum dots (GQDs)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.002	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 Ali Md. Hasan, Md. Maisum Sarwar Jyoti, Md. Rubel Rana Md. Rezanujjaman and Toshinobu Tokumoto	4. 巻 19
2. 論文標題 Purification and identification of the 20S proteasome complex from zebrafish	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Zebrafish	6. 最初と最後の頁 18-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/zeb.2021.0064	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 Md. Rezanujjaman, Razain Tanvir, Md. Hasan Ali and Toshinobu Tokumoto	4. 巻 592
2. 論文標題 An agonist for membrane progesterin receptor (mPR) induces oocyte maturation and ovulation in zebrafish in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 347-352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.208	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 Theeranukul Pachoensuk, Taketo Fukuyo, Klangnurak Wanlada, Md. Rezanujjaman, Md. Mostafizur Rahaman, Kagura Sasaoka, Md. Maisum Sarwar Jyoti, Md. Rubel Rana, Md. Hasan Ali and Toshinobu Tokumoto	4. 巻 533
2. 論文標題 Pax2a is expressed in oocytes and is responsible for early development and oogenesis in zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 592-599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.059	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 Theeranukul Pachoensuk, Taketo Fukuyo, Md. Rezanujjaman, Klangnurak Wanlada, Chihiro Yamamoto, Akiteru Maeno, Md. Mostafizur Rahaman, Md. Hasan Ali and Toshinobu Tokumoto	4. 巻 2
2. 論文標題 Zebrafish stm is involved in the development of otoliths and of the fertilization envelope	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reproduction and Fertility	6. 最初と最後の頁 7-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/RAF-20-0040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 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、大島卓之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6795214	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------