

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570067

研究課題名(和文) 生物進化に伴うエストロゲン受容体の遺伝子重複と機能獲得の解明

研究課題名(英文) Elucidation of a gene duplication and the gain of function of the estrogen receptor during the evolution

研究代表者

勝 義直 (Katsu, Yoshinao)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00332180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン受容体は女性ホルモンであるエストロゲンと結合して、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、ヒト等の高等脊椎動物で認められるエストロゲン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、生物進化に伴ったエストロゲン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て実施された。その結果、軟骨魚類であるサメの進化段階からヒトと同様にエストロゲン受容体遺伝子を持つこと、さらに機能的にもヒトの受容体と同等の能力を持つことを明らかにした。以上の成果はエストロゲン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と期待できる。

研究成果の概要(英文)：The estrogen receptor interacts with estrogen which is female sex hormone, and participates in mechanism of the homeostatic maintenance of the vertebrates. However, it is yet unknown that the molecular evolution of estrogen receptor gene and protein. This research theme was carried out for the appearance of the estrogen receptor gene with the organic evolution and the elucidation of the process of the gain of function. As a result, it became clear that the elasmobranchii has the estrogen receptor genes that encode a functional receptor like higher vertebrates. Our functional analysis suggest that the function of estrogen receptor as a hormone-dependent transcription factor might be gain through the evolutionary process. The above-mentioned result will become the important clue in elucidating the molecular evolution of the estrogen receptor.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：エストロゲン受容体 ステロイドホルモン 分子進化 比較内分泌

### 1. 研究開始当初の背景

性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。このうち女性ホルモン(エストロゲン)の受容体であるエストロゲン受容体はホルモン(エストロゲン)依存的な転写制御因子であり、これまでに様々な脊椎動物から遺伝子の単離が行われてきた。申請者はエストロゲン受容体遺伝子の分子進化を解明する目的で古代魚のエストロゲン受容体遺伝子の単離を行っている。最近の成果として、脊椎動物に最も近い脊索動物であるナメクジウオから高等脊椎動物のエストロゲン受容体の相同遺伝子の単離に成功した。しかし、ホルモンとの結合は認められず、転写活性も持たなかった。この事は、生物進化の過程で(ある段階で)ホルモンとの結合能、転写制御因子としての機能が獲得された事を意味する。しかし、その詳細な分子基盤は不明であった。

### 2. 研究の目的

女性ホルモンであるエストロゲンは受容体(エストロゲン受容体)と結合する事により、生体の恒常性維持や内分泌器官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。しかし、このエストロゲン受容体が「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、このエストロゲン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

エストロゲン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無顎類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遺伝子アッセイによるホルモンに対する感受性・転写活性化能、ゲルシフトアッセイ法を利用した DNA との結合能を調べる。さらに、様々な生物種から単離したエストロゲン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エストロゲン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

軟骨魚類は硬骨魚類とは分かれて独自に進化を遂げた生物種である。内分泌学的に重要な生物であるが詳しい解析はなされていない。これまでに申請者は軟骨魚類の中の板鰓類であるトラザメとジンベエザメからベータ型のエストロゲン受容体遺伝子を単離している。今回同じ軟骨魚類であるが板鰓類ではなく全頭類に属するゾウギンザメのエストロゲン受容体遺伝子の単離に成功した。そして驚くべきことにこれまでは軟骨魚類はベータ型のエストロゲン受容体のみを有すると考えられていたが、高等脊椎動物と同じくアルファ型とベータ型の2種類

のエストロゲン受容体を有することが判明した(学会発表)。この結果は、軟骨魚類の進化段階ですでに2種類のエストロゲン受容体遺伝子を持つことを示しており、エストロゲン受容体遺伝子の分子進化を理解する上で非常に重要な知見をもたらすと考えられる。さらに、エストロゲンに反応した転写活性を示し(学会発表)、エストロゲン反応 DNA 配列(ERE 配列)に結合することも判明した(未発表データ)。

ナメクジウオは脊椎動物に最も近い無脊椎動物のグループに属している。本研究に先立ち高等脊椎動物のエストロゲン受容体の相同遺伝子を単離しているが、ホルモンに反応しない事を見いだしていた。この結果は、脊椎動物への進化の際にエストロゲン依存的な転写活性能という機能を獲得したと推測された。そこで、最も下等な脊椎動物であると考えられている無顎類であるヤツメウナギからのエストロゲン受容体遺伝子の単離を試みた。その結果、高等脊椎動物と同様に2種類(ER1 と ER2)のエストロゲン受容体遺伝子の単離に成功した(学会発表)。しかし、遺伝子配列を用いた進化系統樹を作成したところ、高等脊椎動物のアルファ型・ベータ型にクレードされず、無顎類の中で遺伝子重複によって2種類に分かれたことが推測された(学会発表)。この結果は無顎類から有顎類への進化に伴ってアルファ型・ベータ型のエストロゲン受容体遺伝子が出現したことが推測された。培養細胞を使ったレポーター遺伝子アッセイによる機能解析を行なったところ、1つ(ER1)はエストロゲンに反応した転写活性を示したが、ER2 はエストロゲンに反応した転写活性を示さなかった(学会発表)。さらに ER1 は ERE 配列をもつ DNA と結合できるが、ER2 は結合できないことをゲルシフトアッセイによって示すことができた(未発表データ)。現在、ヤツメウナギにおける ER1 と ER2 の機能は不明であり今後の研究が求められる。

さらに、魚類のエストロゲン受容体遺伝子の単離、発現解析、さらに様々なホルモンに対する応答性、種特異性について調べ論文発表を行っている(文献、、、)。以上のように、エストロゲン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「無顎類のエストロゲン受容体の生理機能は?」「下等動物のエストロゲン受容体の標的遺伝子は何なのか?」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、エストロゲン受容体遺伝子の分子進化の全体像が明らかになり、エストロゲン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エストロゲン受容体の新規の機能、また

はエストロゲン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 13 件)

Katsu Y, Lange A, Miyagawa S, Urushitani H, Tatarazako N, Kawashima Y, Tyler CR, Iguchi T, Cloning, expression and functional characterization of carp, *Cyprinus carpio*, estrogen receptors and their differential activations by estrogens.

**J. Appl. Toxicol.** 査読有 33: 41-49 (2013) DOI: 10.1002/jat.1707.

Oka T, Mitsui-Watanabe N, Tatarazako N, Onishi Y, Katsu Y, Miyagawa S, Ogino Y, Yatsu R, Kohno S, Takase M, Kawashima Y, Ohta Y, Aoki Y, Guillette LJ, Iguchi T, Establishment of transactivation assay systems using fish, amphibian, reptilian and human thyroid hormone receptors. **J. Applied Toxicology** 査読有 33: 991-1000 (2013) DOI: 10.1002/jat.2825.

Oka K, Kohno S, Urushitani H, Guillette LJ, Ohta Y, Iguchi T, Katsu Y, Molecular cloning and characterization of the corticoid receptors from the American alligator. **Mol. Cell. Endocrinol.** 査読有 365: 153-161 (2013) DOI:p11: S0303-7207(12) 00466-2. 10.1016/j.mce.2012.10.014.

Urushitani H, Katsu Y, Ohta Y, Shiraishi H, Iguchi T, Horiguchi T, Cloning and characterization of the retinoic acid receptor-1 like protein in the rock shell, *Thais clavigera*. **Aquat. Toxicol.** 査読有 142-143C: 403-413 (2013) DOI:10.1016/j.aquatox.2013.09.008.

Lange A\*, Katsu Y\*, Miyagawa S, Ogino Y, Urushitani H, Kobayashi T, Hirai T, Shears JA, Nagae M, Yamamoto J, Ohnishi Y, Oka T, Tatarazako N, Ohta Y, Tyler CR, Iguchi T (\* These authors contributed equally), Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. **Aquat. Toxicol.** 査読有 109: 250-258 (2012) DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.09.004.

Hirakawa I, Miyagawa S, Katsu Y, Kagami Y, Tatarazako N, Kobayashi T, Kusano T, Mizutani T, Ogino Y, Takeuchi T, Ohta Y, Iguchi T, Gene expression profiles in the testis associated with testis-ova in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. **Chemosphere** 査読有 87: 668-674 (2012) DOI: 10.1016/j.chemosphere.2011.12.047.

Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Watanabe H, Mizutani T, Sato T, Morohashi KI, Takeuchi T, Iguchi T, Ohta Y, Wnt family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice. **Toxicology** 査読有 296: 13-19 (2012) DOI: 10.1016/j.tox.2012.02.010.

Chakraborty T, Katsu Y, Zhou LY, Miyagawa S, Nagahama Y, Iguchi T, Estrogen receptors in medaka (*Oryzias latipes*) and estrogenic environmental contaminants: an *in vitro-in vivo* correlation. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 査読有 123: 115-121 (2011) DOI:

10.1016/j.jsbmb.2010.11.015  
Chakraborty T, Shibata Y, Zhou LY, **Katsu Y**, Iguchi T, Nagahama Y, Differential expression of three estrogen receptor subtype mRNAs in gonads and liver from embryos to adults of the medaka; *Oryzias latipes*. **Mol. Cell. Endocrinol.** 査読有 333: 47-54 (2011) DOI: 10.1016/j.mce.2010.12.002  
Urushitani H, **Katsu Y**, Miyagawa S, Kohno S, Ohta Y, Guillet L, Iguchi T, Molecular cloning of anti-Müllerian hormone from the American alligator, *Alligator mississippiensis*. **Mol. Cell. Endocrinol.** 査読有 333: 190-199 (2011) DOI: 10.1016/j.mce.2010.12.025.  
Moore BC, Milnes MR, Kohno S, **Katsu Y**, Iguchi T, Woodruff TK, Guillet L, Altered gonadal expression of TGF- $\beta$  superfamily signaling factors in environmental contaminant-exposed juvenile alligators. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** 査読有 127: 58-63 (2011) DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.01.004.  
Urushitani H, **Katsu Y**, Ohta Y, Shiraishi H, Iguchi T, Horiguchi T, Cloning and characterization of retinoid X receptor (RXR) isoforms in the rock shell, *Thais clavigera*. **Aquat. Toxicol.** 査読有 103: 101-111 (2011) DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.02.012.  
Southam, AD, Lange A, Hines A, Hill EM, **Katsu Y**, Iguchi T, Tyler CR, Viant MR, Metabolomics reveals target and off-target toxicities of a model organophosphate pesticide to roach (*Rutilus rutilus*): Implications for biomonitoring. **Environ. Sci. Technol.**

査読有 45: 3759-3767 (2011) DOI: 10.1021/es103814d.

〔学会発表〕(計9件)

**勝 義直**「爬虫類の温度依存的な性決定のメカニズムの謎」2013年10月26日: 日本比較内分泌学会(招待講演)(宮崎) 宮川信一・河野郷通・谷津遼平・**勝 義直**・Louis Guillette・井口 泰泉「ワニのアンドロゲン受容体の機能解析」2013年10月25日: 日本比較内分泌学会(宮崎)

**勝 義直**・岡 香織・杉本 章・井口 泰泉「古代魚のコルチコイド受容体の単離」2013年9月26日: 日本動物学会(岡山)

**勝 義直**「エストロゲン受容体の分子進化と機能進化」2012年8月21日: 日本進化学会(招待講演)(東京)

**勝 義直**・井口 泰泉「無顎類ヤツメウナギのエストロゲン受容体の単離」2012年9月13日: 日本動物学会(大阪)

岡 香織・太田 康彦・井口 泰泉・**勝 義直**「アメリカアリゲーターのアリル炭化水素受容体の単離と機能解析」2012年9月13日: 日本動物学会(大阪)

岡 香織・太田 康彦・井口 泰泉・**勝 義直**「アメリカアリゲーターのコルチコイド受容体の単離と機能解析」2011年9月21日: 日本動物学会(旭川)

成田 晴香・兵藤 晋・**勝 義直**「ゾウギンザメのエストロゲン受容体および機能解析」2011年9月21日: 日本動物学会(旭川)

**勝 義直**・松原 和純・松田 洋一・鳥羽 通久・岡 香織・太田 康彦・井口 泰泉「爬虫類のエストロゲン受容体の単離と種・リガンド特異性の解析」2011年9月21日: 日本動物学会(旭川)

〔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・准教授

研究者番号：00332180

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし