SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

ステロイド膜受容体(mPR)遺伝子群変異メダカ系統の樹立と卵成熟誘起における役割

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2017-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Shimi, Rani Roy メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00010202

（課程博士・様式７）（Doctoral qualification by coursework,Form 7）

学 位 論 文 要 旨

Abstract of Doctoral Thesis

専　　攻：　バイオサイエンス　　氏　名：　Shimi Rani Roy

論文題目：

ステロイド膜受容体（mPR）遺伝子群変異メダカ系統の樹立と卵成熟誘起における役割

論文要旨：

本研究はステロイドホルモンの新規作用経路であるノンゲノミック反応経路へのプロゲスチン膜受容体（mPR）の関与を決定づけることを目指した研究である。卵成熟において細胞膜上に局在する mPR は卵成熟誘起シグナルのノンゲノミック反応を引き起こす分子である。2003 年にテクサス大学の Peter Thomas らの研究により Spotted Seatrout から mPR が同定された。mPR は魚類の卵成熟誘起ホルモン(MIH)の受容体であることがキンギョでも報告された。当研究室の研究により、キンギョ mPR の 4 つサブタイプα、β、γ− 1、γ− 2 がクローニングされ、この内、mPRα、mPRβが MIH の受容体として機能していることがアンチセンスモルフォリノによるノックダウン実験から示唆された。また、mPR サブタイプ群は脳や腎臓をはじめ、あらゆる組織に発現していることが明らかにされた。mPR 遺伝子は脊椎動物に保存されており、一般に知られてきたステロイドホルモンの作用機能と別の経路を介在する分子として注目されている。すなわち、これまでステロイドホルモンの唯一の作用経路と考えられてきた細胞内の核受容体を介するゲノミック反応経路とは異なる膜受容体を介するノンゲノミック反応経路が存在することが示唆されたのである。しかしながら mPR の生理学的機能の証明は上記の卵成熟誘起の他、培養細胞での実験はあるものの、いずれもアンチセンスを用いたものであった。近年では決定的な証明として、遺伝子破壊による機能阻害の証明が求められるようになった。そこで、私は逆遺伝学的に mPR の遺伝子変異メダカを作出することにより、mPR 分子の機能を証明することを試みた。また、遺伝子変異系統樹立の材料としたメダカ mPRα分子の遺伝子配列、ホルモン選択性などの特性を決定し、アンチセンスモルフォリノによるノックダウン実験によりメダカ mPRα も MIH の受容体として機能していることを示した。

この研究では Targeting Induced Local Lesion IN Genome　(TILLING) 法によってステロイド膜受容体遺伝子群(mPRα、β、α-２＆γ)に点突然変異が導入された遺伝子変異メダカ系統の樹立を進めた。メダカは、小型魚類で哺乳類以外の脊椎動物で最初に性決定遺伝子が同定され、モデル生物として多くの研究に使用されている。遺伝子変異メダカを選択する TILLING 法は逆遺伝学的に変異体をスクリーニングする方法、つまり、標的遺伝子の変異体を得る方法である。TILLING 法によってライブラリーのスクリーニングを行い、mPRα３系統、mPRβ４系統、mPRα-2 ３系統、および mPRγ４系統の変異メダカが得られた。人口授精された F2 系統の受精卵の飼育、Cab とのバッククロスを繰り返し、mPR 遺伝子変異メダカの系統樹立を

進めた。系統樹立のため、成長したメダカの尾ヒレからゲノム DNA を抽出（Fin Clip 法）をし、PCR Restriction fragment length polymorphism（PCR-RFLP）解析および DNA シークエンスにより遺伝子型判定を行った。mPRα系統について F5 世代のヘテロ変異メダカ同士の交配による F6 ホモ個体の表現型解析を行ったが、異常は観察されなかった。変異体で表現型が得られなかったのは mPRα－ 2による冗長性が原因だと考えられる。一方、F２ mPRα、βおよびα-2 変異メダカ同士の交配による F3 ホモ mPR 遺伝子変異メダカの予備的な表現型解析を行ったが、異常は見られなかった。

単一遺伝子の変異による表現型解析の結果から mPR 遺伝子には冗長性が見られると判断され、2 重 3 重変異メダカの樹立を進めた。2 重変異メダカのホモおよび 3 重変異メダカのヘテロまで樹立を進めたが、異常が確認できなかった。今後、mPR 3 重変異、さらなる 4 重変異メダカによる表現型解析が期待される。このノックアウトメダカの研究はステロイドホルモンの新しい作用機能であるノンゲノミック反応の研究を進めていく上での大きな一歩となると期待される。

一方、メダカ mPRα遺伝子の性質についても解析を進めた。メダカ mPRα遺伝子の安定発現培養細胞株を樹立するため、新たに目的遺伝子と蛍光タンパク質が同時に発現される pIRES2 DsRed-Express2 ベクターを用いた。ヒト MDA-MB-231 乳ガン細胞に導入させるため pIRES2 ベクターにメダカ mPRα遺伝子を組込んだベクターを作製し、安定発現株を樹立した。遺伝子導入細胞が DsRed の蛍光や RT-PCR で確認できたため、初めて遺伝し導入細胞のクローニングに成功した。発現した mPRαタンパク質を含む膜画分を用いてホルモン結合活性を調べたところ魚類の MIH である 17, 20β-DHP に対する mPRα の特異的結合活性が得られた。この結果により mPRα は 17, 20β-DHP の受容体として働いていることが示唆される。飽和曲線とスキャッチャードプロット解析からも 17, 20β-DHP に対する mPRα の結合親和性が高かったことが示された。さらに 17, 20β-DHP、プロゲステロン（P4)、エストラジオール-17β（E2)、テストステロン（T)、diethylstilbestrol（DES）との競合実験から mPRα の結合特性を調べたところ、17, 20β-DHP に対して強い競合活性が示唆されたが、DES に対して弱い競合活性が示唆された。この結果は DES がメダカの卵成熟を誘導しないことを示される結果であった。これらの結果からメダカ mPRαが 17, 20β-DHP の受容体として作用していることが示唆された。

メダカ mPRαの卵成熟誘導に関わる直接の証拠として Vivo-morpholino antisense oligonucleotides によるノックアウト実験を試みた。*in vivo* で LH が分泌される時間帯の前、腹空内に Vivo-morpholino antisense oligonucleotides を注射することでメダカの卵成熟が抑制された。ウエスタンブロット解析により得られた卵母細胞のタンパク質の量を調べた結果、タンパク質が減少していた。この結果からメダカ mPRαが卵成熟誘起の受容体として働いていることが示された。

今後、他の mPR サブタイプ群の特徴付けと mPR 遺伝子の多量変異体の樹立によりこれまで不明であったステロイドホルモンの作用機能であるノンゲノミック反応経路の存在が明確になることが期待される。