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

静岡大学博士論文

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

SHIMI RANI ROY

大学院自然科学系教育部

バイオサイエンス専攻

2016 年 12 月

目次

第１章　予論 ―――――――――――――――― １頁
１．１　プロゲスチンとプロゲスチン膜受容体（mPR）
１．２　mPR によるシグナル伝達
１．３　組換え mPR
１．４　Targeting Induced Local Lesion IN Genome (TILLING)
第２章　材料と方法 ―――――――――――――――― ５頁
２．１　実験動物
２．２　TILLING 法による mPR 変異メダカの作製
２．２　遺伝子型の判定
２．３　DMY 遺伝子による雄雌の判別
２．４　系統樹立
２．５　コンピテントセルの再現
２．６　メダカ mPRα タンパク質発現プラスミドの構築
２．７　ヒト MDA-MB-231 乳ガン細胞でのメダカ mPRα 発現
２．８　ステロイド結合実験
２．９　卵成熟阻害実験
２．１０ SDS-PAGE および Western blotting 解析
第３章　結果 ―――――――――――――――― 14 頁
３．１　TILLING 法による mPR 変異メダカ作製
３．２　遺伝子型の判定
３．３　系統樹立
３．４　メダカ mPRα タンパク質発現プラスミドの構築
３．５　ヒト MDA-MB-231 乳ガン細胞でのメダカ mPRα 発現
３．６　ステロイド結合実験
３．７　卵成熟阻害実験
３．８　mPRα の cDNA 解析
第４章　考察 ―――――――――――――――― 21 頁
論文要旨 ―――――――――――――――― 26 頁
参考分献 ―――――――――――――――― 29 頁
図と表 ―――――――――――――――― 35 頁
謝辞 ―――――――――――――――― 77 頁

第 1 章

序論

1.1 プロゲスチンとプロゲスチン膜受容体

ステロイドホルモンのグループであるプロゲスチンは化学シグナル分子として幅広い種類の脊椎動物の標的組織に作用してさまざまな生理反応を引き起こす。卵成熟誘起ホルモン（Maturation Inducing Hormone, MIH）は魚類や両生類の生殖組織において最終的な成熟を制御する重要なステロイドホルモンである。プロゲスチンの一種である 17, 20β-dehydroxy-4-pregnen-3-one（17,20β-DHP）はサケ科のアマゴ（*Oncorhynchus rhodurus*）から卵成熟誘起ホルモンとして脊椎動物で初めて同定されたステロイドである（Nagahama and Yamashita 2008）。よく研究されているアフリカツメガエルではプロゲステロンが卵成熟誘起ホルモンであると考えられている。プロゲスチンは天然型と合成型の 2 種類があり、天然型プロゲスチンはヒトといくつかの動物で同定されている（Stanczyk 2003）。ヒトのプロゲスチンはプロゲステロンと呼ばれる。

ステロイドホルモンの作用はゲノミック反応とノンゲノミック反応に分けられる。これまでステロイドホルモンは核内受容体として働いていること、つまりゆっくりとしたゲノミック反応がよく知られている。しかし、ゲノッミック反応で説明のつかない数分で誘導される素早い反応が存在する。カエルの卵成熟におけるステロイドホルモンの作用は細胞膜表面からの反応だと予想されている（Ishikawa *et al.* 1977）。ヒトデにおいて卵成熟誘起ホルモンの結合実験により MIH の受容体は卵母細胞表面上に存在することが示唆された（Yoshikuni *et al.* 1988）。2003 年に Spotted seatrout の卵巣からクローニングされた cDNA はプロゲスチン膜受容体（membrane progestin receptor; mPR）としての特徴を持っていることが示された（Zhu *et al.* 2003; Zhu *et al.* 2003; Thomas *et al.* 2004）。すなわち、この受容体のアミノ酸配列は GPCR (G protein-coupled receptor）の特徴である 7 回膜貫通ドメインを持っていることが示唆された（図 4）。

ゲノム解析の結果により mPR は GPCR (G-protein couple receptor）の新規ファミリーである PAQR (progestin and adipoQ receptors）ファミリーに分類された。このファミリーの中では mPR 分子のα、β、γの 3 種類はそれぞれ PAQR7、PAQR8 と PAQR5 になる。その後の研究によって同定された mPRδ とε は PAQR6 と PAQR9 に相当し、プロゲスチン結合活性があると推定された。つまり mPR 遺伝子は PAQR の 11 種類の中で 5 種類とされている。本研究で用いたメダカでは cDNA クローニングにより、mPRα、mPRβ & mPRγの 3 つの遺伝子が登録されていた。その後のゲ

ノム解読により登録されていた mPRγ遺伝子は mPRα遺伝子の重複遺伝子である事が分かり、mPRα−2 と名付けた（Tokumoto *et al.* 2016)。mPRγについては、PAQR5 がゲノム上に見つかっている（図 3)。

1.2 mPR によるシグナル伝達

魚類の卵成熟が開始されるには、プロゲスチンが卵細胞膜上の mPR と結合し、減数分裂が再開される。この経路では、脳下垂体(Pituitary gland)から分泌される生殖腺刺激ホルモンである黄体形成ホルモン（LH）がろ胞細胞に作用し、ステロイド性の卵成熟誘起ホルモン（MIH)、17, 20β–DHP が作られる。そして MIH が卵母細胞膜上に局在するプロゲスチン膜受容体（mPR）に作用し、卵成熟のシグナル伝達が行われると考えられる（図 1)。mPR は細胞外のプロゲスチン（17, 20β–DHP）と結合することで細胞内に共役している G タンパク質のαサブユニット（Giα）を活性化する。G タンパク質が細胞内のアデニル酸シクラーゼ(adenylyl cyclase)活性を抑制し、サイクリック AMP（Cyclic AMP;cAMP）の濃度が下がる。プロゲスチン刺激により cAMP 合成が抑制されることでサイクリン B (cycline B) の新規合成が促進され、卵成熟促進因子（Maturation promoting factor; MPF）が活性化される。MPF が最終的に卵核胞崩壊（Germinal vesicle breakdown; GVBD）を引き起こす(Karteris *et al.* 2006; Thomas *et al.* 2007; Yoshikuni *et al.* 1994; Zhu, Rice *et al.* 2003) (図.2)。

当研究室の研究では、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、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（Tokumoto *et al.* 2006; Tokumoto *et al.* 2012)。これらの研究において mPRα とβの morpholino antisense oligonucleotides の Microinjection により卵成熟が阻害され、MIH の受容体として作用していることが示唆された。

また、メダカのろ胞細胞における mPR の mRNA の発現解析が行なわれ、卵成熟に関与していることが新たに報告された（Hagiwara *et al.* 2016)。小型魚類であるメダカは飼育が容易でモデル生物として卵成熟に関する研究にも使用されてきた。メダカは 14 時間明期と 10 時間暗期の 24 時間周期でホルモン分泌が制御され、朝の点灯 1 時間以内に排卵する。メダカの 17, 20β-DHP は天然の MIH として働くことが示唆された（Fukada *et al.* 1996)。

1.3 組換え mPR

mPR と結合する 17,20β-DHP との分子間相互作用を調べるためにリコンビナント

mPR タンパク質が必要である。大腸菌と nPR (Nuclear progestin receptor) が欠損しているヒト乳ガン由来 MDA-MB-231 細胞において Spotted seatrout の mPRα組換えタンパク質が発現された (Zhu, Rice *et al.* 2003)。ヒト mPRα 、δ、εにおいても MDA-MB-231 細胞に組換えタンパク質が発現された (Pang *et al.* 2013, Thomas, Pang *et al.* 2007)。MDA-MB-231 細胞 およびヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞において、ゼブラフィッシュ mPRα、β組換えタンパク質が発現された (Hanna *et al.* 2006; Hanna *et al.* 2009)。ヒツジ mPRαでは、CHO 細胞で組換えタンパク質が発現できることが示された (Ashley *et al.* 2009)。このように脊椎動物の mPR のプロゲスチン結合活性は哺乳類細胞での発現で確かめられた。当研究室では、キンギョ mPRαを用いた研究で組換えタンパク質が作製され、MDA-MB-231 細胞での発現でプロゲスチンに対する高い結合活性が示された (Tokumoto, Nagahama *et al.* 2006; Tokumoto *et al.* 2007))。さらにキンギョ mPR の他のサブタイプβ、γ-1、γ-2 も MDA-MB-231 細胞で発現された (Tokumoto, Tokumoto *et al.* 2012)。キンギョ mPRα発現細胞株において、細胞内 cAMP レベルが下がることが示唆された (Nakashima *et al.* 2015)。また、酵母 (*P. pastoris*) を用いた人工合成によりキンギョとヒトの組換え mPRαタンパク質の発現および精製に成功した (Hossain *et al.* 2015; Oshima *et al.* 2014)。本研究では、メダカ mPRαの MDA-MB-231 細胞での発現とステロイド結合特性の解析を試みた。

1.4 TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genome)

遺伝子変異体を選択する TILLING (Targeting induced local lesion in gene) 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。メダカでは、TILLING 法により逆遺伝学的表現型解析が可能になっている (Taniguchi *et al.* 2006; Ishikawa, Kamei Y *et al.* 2010)。TILLING 法では変異原物質 ENU (N-ethyle-N-nitrosourea) により雄のメダカを処理する事で、ランダム変異を起こす。ENU は高率に突然変異を誘導する事ができる化学変異原物質である。ENU 処理した雄から得られた F1 の精子を凍結保存し、同時に魚体からゲノム DNA を抽出してライブラリーを作製する。ゲノム DNA ライブラリーを鋳型にして標的遺伝子に変異を持つものをスクリーニングする方法である (図 5)。

本研究の共同研究先である基礎生物学研究所におけるメダカ TILLING ライブラリーのスクリーニング法は、HRM 法 (high-resolution melting curve analysis) である (Taniguchi, Takeda *et al.* 2006; Ishikawa, Kamei Y *et al.* 2010; Erali *et al.* 2008) 。この方法によりゲノム DNA ライブラリーを標的遺伝子増幅用プライマーで目的領域を PCR 増幅し、最後に得られた DNA 断片の変性/再結合反応 (加温/冷却) をする。

変異が含まれる場合は二重鎖が形成されるので、その後、温度を上昇させると、変異を含まない大多数に対して変異を含む DNA が先に解離を始める。蛍光インターカレーターの SYTO9 を使って融解温度曲線を測定し、解析が行われる。私は TILLING 法を用いて逆遺伝学的に mPR 遺伝子変異メダカの作製および mPR 遺伝子変異メダカの系統樹立による機能解明を試みた。

第 2 章

材料と方法

2.1 実験動物と試薬

メダカ（*Oryzias latipes*）はダツ目（Beloniformes）メダカ科（Adrianichthyoidae）に属し、体長 3.5cm ほどの小型の魚。目が大きく、頭部の上端から飛び出していることが、名前の由来になっている。メダカは飼育が容易なため、様々な目的の科学研究に用いられている（岩松鷹司、メダカ学、1993; Wittbrodt *et al.* 2002)。本研究おいて受精卵、ふ化仔魚には 5-10 cm シャーレを使用し、0.1%Methylene blue を加えた飼育水を用いて 28℃のインキュベーターで飼育した。毎日、発生が正常に進んでいる卵と死卵数をカウントし、記録表に記入した。そして、生まれた稚魚は約 20 匹ずつ大きいガラス水槽に移した。稚魚には、ゾウリムシもしくはブラインシュリンプのたまごを材料に作られた粉のエサを 1 日 2 回の割合で与え、成長に合わせて徐々にブラインシュリンプ幼生へ切り替えた。メダカは水温約 26℃で飼育し、成魚にはブラインシュリンプもしくは、乾燥飼料であるクロマ（food type）を 1 日 2 回の割合で与えた。受精卵から遺伝子型の判定に実施できるには 2 -3 ヶ月ぐらいかかる。従って、それまでの期間全ての稚魚は十分に管理や育成を行った。遺伝子型判定のため成長したメダカの尾ヒレを切り取り、個分けの水槽で 1 匹ずつ移して飼育した（図. 23)。

17,20β–DHP、バッファーと試薬は Sigma chemical co (St. Louis, MO.）と Wako pure chemical industries, Ltd (大阪、日本)。[1,2,6,7 ^{3}H]-17α-hydroxyprogesterone (85 Ci/mmol）は Amersham Biosciences（Piscataway, NJ）から購入し、3α, 20β-hydroxysteroid dehydrogenase（Sigma, St Louis, MO）により放射性 17,20β-DHP に酵素的に変換された（Scott *et al.* 1982)。

2.2 TILLING 法による mPR 変異メダカの作製

スクリーニングは変異体を選別するための一番重要な手法である。mPR 変異メダカのスクリーニングは HRM 法を用いて行った（図 5)。まず、スクリーニングするためにプライマーデザインを行った。mPR サブタイプそれぞれの DNA 配列の長さを考え、目的としている部分（N-末端、C-末端）が中央になるようにプライマーを設計した（Primer list : For screening)。プライマーデザインするには National Center for Biotechnology Information (NCBI）の Primer-BLAST および解離曲線解析の専用のサイトを利用した。メダカ mPR（α、β、α－2 & γ）の各遺伝子に対する複数のプ

ライマーを設計し、オペロン社に合成を依頼した。
メダカの１種である京都 Cab 系統のオス 100 匹に化学変異原物質であるアルキル化剤 ENU 処理が行われ、その後は Cab のメスと交配させた。得られた F１のオスの 5760 匹の魚体から抽出したゲノム DNA （gDNA）と凍結精子をセットでライブラリーとしたものがスクリーニングに用いられた。ENU を処理した F１オスのゲノム DNA ライブラリーを鋳型にし、標的遺伝子増幅用プライマーで mPR の目的領域を PCR 増幅した。

メダカ TILLING ライブラリーの PCR は KOD-Plus-Neo（TOYOBO）ポリメラーゼのプロトコールに従って次の手順で行った。反応液（distilled water 2.8μl, 10× PCR buffer for KOD plus 1μl, 2 mM each dNTPs 1μl、25 mM $MgSO_4$ 0.5μl、KOD plus 0.2μl, SYTO9 0.5μl, KOD plus 1μl, 2μM sense Primer 1μl , 2μM antisense Primer 1μl, Template DNA 4 ng）を 10μl になるように調製した。反応液には、最後に SYTO9 と KOD-Plus-Neo を加えた。Biometra Thermocycler を用いて 95℃２分間変性した後、PCR（mPRα:95℃で 10 秒間、57℃で 30 秒間、68℃で 30 秒間を 45 サイクル）を行った。その後、95℃で 30 秒間変性した後、25℃で３分間再アニーリングした。最後に Lightscanner® System（Idaho Technology Inc., ID, USA）を用いて得られた DNA 断片の融解温度曲線解析（HRM）を行った。変異が含まれる場合はヘテロデュプレックスが形成され、その後、温度を上昇させることによって変異を含まない大多数に対して変異を含む DNA が先に解離を始める。蛍光インターカレーターの SYTO9 を使って融解温度曲線を測定し、変異体を選別する。大多数の融解温度曲線から先に外れたサンプルを選んで２次スクリーニングを行った。こうして mPR それぞれの 5760 匹分ずつゲノム DNA をスクリーニングし、遺伝子変異メダカの選択を行った。

１次と２次スクリーニングで同様の結果が得られた個体試料について PCR 産物を用いて DNA シークエンス 解析を行った。PCR 産物を Exo SAP という酵素混合液で処理することにより、PCR 反応液中にまだ残っている未反応の dNTPs やプライマーの分解を行った。反応液（DW 4.5μl、Exo SAP 0.5μl と PCR 産物 5μl）を 10μl になるように調製した。そして、TAITEC の Dry thermo unit DTU- 2B を用いて 37℃で 15 分間と 80℃で 15 分間インキュベートした。その後、DNA シークエンシングを外部委託解析により行なった。

F1 はヘテロ（m/+）である。従って凍結保存されている精子はヘテロ変異（m）と野生型（+）が１:１の割合で変異が含まれる。これらの凍結精子が解凍され、人工授精が行われた。ここまでの研究操作は共同研究先である岡崎の基礎生物学研究所で行われた。人工授精によって得られた受精卵の飼育から当研究室で系統樹立を実施した。

2.3 遺伝子型の判定

人工授精された F2 世代の受精卵の飼育から mPR 遺伝子変異メダカの系統樹立を進めた。F2 世代でヘテロ変異と野生型は 1:1 の割合で含まれる。ランダムミュータジェネシスした変異体ライブラリーからスクリーニングしているので、1 回の野生型との交配でバックグラウンド変異（標的遺伝子の変異以外）が半分になる。バックグラウンド変異を除くため、さらに 3 回以上野生型と交配する必要がある。野生型 との交配により F5 世代でバックグラウンド 変異が約 97%の除けると予想される。最終的には F 5 世代以上の変異ヘテロ同士の交配をし、F 6 世代のホモ遺伝子変異メダカの表現型を解析する（図 10)。一方、F 2 変異メダカ同士の交配による F3 ホモ遺伝子変異メダカの予備的な表現型解析も計画された。

遺伝子型の判定用ゲノム DNA（gDNA）は Fin Clip 法を用いて成長したメダカの尾ヒレから抽出した。まず、メダカ 1 匹に対して、1.5ml Tube に 200μl の SDS-lysis buffer を入れ、使用直前に Protenase-K 終濃度 100μg/ml となるように SDS-lysis buffer に加えた（200μl に 2μl)。個体識別する魚を水で湿らせたコットンで包み、尾ヒレの 1/2 をハサミで切った。このメダカを個分けの水槽に放し、番号を付けた。切った尾ヒレを同じ個体番号を付けたチューブの液に入れた。全てのメダカの尾ヒレを同様に切り、毎回、ハサミをアルコールで消毒した。尾ヒレを入れたチューブは TAITEC の Dry thermo unit DTU- 2B を用いて 50℃で 2 時間ーover night インキュベートした。途中で何回かタッピングしてよく混ぜた。尾ヒレが完全に溶解されたのを確認し、100μl の phenol/chloroform を加え、タッピングでかき混ぜ、TOMY の MX-300 (high speed refrigerated micro centrifuge）を用いて 15000rpm で 5min 遠心した。この間に新しい 1.5ml tube に番号を書いておいた。遠心後、上清（水層） を新しい tube に移した。100μl の chloroform を加え、タッピングでかき混ぜ、15000rpm で 5min 遠心した。また、この間に新しい 1.5ml tube に番号を書いておいた。上清（水層）を新しい tube に移し、4 M NaCl を 25μl 加え混ぜた。次、100% EtOH を 475μl 加えさらに混ぜ、15000rpm で 10min 遠心した。上清を捨て、70% EtOH を 200μl 加えてリンスし、15000rpm で 10min 遠心した。上清を完全に捨て、100μl の滅菌水を加えてよく混ぜた。このゲノム DNA は遺伝子型の判別に用いた。

変異部位の確認のため F2 世代の遺伝子型判定は DNA シークエンス解析により行った。F3 世代以降の遺伝子型の判定については以下のようにより安価な PCR-RFLP 解析が可能であった系統は PCR-RFLP 解析、それから PCR-RFLP 解析が不可能であった系統は DNA シークエンス解析によって遺伝子型判定を行った。

Ⅰ） PCR-RFLP 解析法:

遺伝子変異体を同定する方法として DNA シークエンス法の信頼性が最も高いが、我々は短時間で判定ができる安価な PCR−RFLP 解析法を用いた（図 11)。RFLP (Restriction fragment length polymorphism) は制限酵素で PCR 増幅された断片を切断し、得られた断片の長さから変異の有無を判定する方法である。まず、GENETYX-MAC で RFLP 解析に使用する制限酵素の選択を行った。制限酵素によって DNA 断片が切断されるので、野生型や変異系統それぞれの断片が切断できるような制限酵素があるかどうかを調べた。変異部位の近傍で野生型と変異体の内、どちらかの断片だけが切断されるような制限酵素を選んだ。全系統に対して、このように変異あるいは 野生型 の PCR 産物が切断される制限酵素を選んだ。そして、制限酵素によって切断される断片や配列の長さを考え、PCR 増幅用のプライマーを設計した。遺伝子型判定では、NCBI の Primer-BLAST を使用して全てのプライマーを設計した（Primer list: For genotyping)。制限酵素サイトが中央付近にくるように、また電気泳動で分離しやすい大きさになるようにプライマーを設計した。PCR product のサイズは約 500-600bp になるようなプライマーを選択した。

PCR するための反応液（DW 13.4μl, 10×PCR buffer for Ex Taq 2.5μl, 2mM each dNTPs 2μl、Ex Taq 0.1μl, 10μM sense Primer 2.5μl , 10μM antisense Primer 2.5μl, Template DNA 4ng）を 25μl になるように調製した。(例) mPRα の PCR 増幅（プログラムは 94℃：5 分間、94℃：5 秒間、アニーリング温度 62℃で 1 分間 、72℃で 30 秒間、72℃10 分間、40 サイクル）を行い、1％アガロースゲルを用いて電気泳動し、増幅を確かめた。mPRβ と α−2 の場合、PCR 増幅の他の温度は同じでアニーリング温度が 64℃と 68℃で行った。PCR 増幅が十分であることが確認できた後、PCR 産物の制限酵素処理を行った。PCR 増幅が十分でない場合は制限酵素処理による断片が検出できないため、サイクル数を増やしたりして条件を変更した。制限酵素処理には、buffer やそれぞれの制限酵素を合わせて 5 μl と PCR 産物を 5 μl 入れて、制限酵素のマニュアル通りに処理を行なった。インキュベーション後、2-3% アガロースゲルを用いて電気泳動し、切断された断片による変異体の遺伝子型判定を行った。このように PCR-RFLP 解析が可能な系統の遺伝子型の判定を行った。以上の方法で mPRα の 2 系統、β の 3 系統、α−2 の 3 系統の遺伝子型判定ができた（図 25)。

Ⅱ）DNA シークエンス解析法:

F2 世代の遺伝子型判定については変異部位の確認のため RFLP 解析が可能な系統とできなかった系統の全てを DNA シークエンシングにより判定を行った（図 11)。

DNA シークエンシングをするにはまず反応液（distilled water 8.25μl, 10×PCR buffer for KOD plus 2.5μl, 2mM each dNTPs 2μl、25mM $MgSO_4$ 1.25μl、KOD-Plus-Neo 0.5μl, 2μM sense Primer 2.5μl , 2μM antisense Primer 2.5μl, Template DNA 4ng）を 25μl なるように調製し、PCR 増幅を行った。RFLP 解析と同様のプライマーを用い、 mPRαの PCR 増幅（プログラムは 94℃：5 分間、94℃：5 秒間、アニーリング温度 62℃で 1 分間、72℃で 30 秒間、72℃10 分間、35 サイクル）を行った。mPRβとα−2 の場合、アニーリング温度は 64℃と 68℃で PCR 増幅を行った。PCR 後、1% アガロースゲルを用いて電気泳動し、増幅の確認を行った。確認後、PCR 産物を Exo SAP という酵素混合液で処理することにより、PCR 反応液中にまだ残っている未反応の dNTPs やプライマーの分解を行った。反応液（DW 4.5μl、Exo SAP 0.5μl と PCR 産物 5μl）を 10μl になるように調製した。そして、TAITEC の Dry thermo unit DTU- 2B を用いて３７℃で１５分間と 80℃で１５分間インキュベートした。その後、DNA シークエンシングが行われた。F3 世代以降の世代では PCR-RFLP 解析が不可能だった系統について DNA シークエンシング法により遺伝子型判定を行なった（図 25)。

2.4 DMY 遺伝子による雄雌の判別

メダカの性決定遺伝子である DMY 遺伝子（Y-specific DM-domain gene）の PCR 増幅によりオスとメスの判定ができる（ Matsuda M. *et* al., 2002)。メダカが小さいときや性別を確認しづらいとき、DMY プライマーを用いて、PCR 増幅を行い、性別の確認をした。DMY 遺伝子は Y Chromosome （♂）に存在するので、雌（♀）ならバンドが出ない。反応液（DW 4.96μl, 10×PCR buffer for Ex Taq 1μl, 2mM each dNTPs 1μl、Ex Taq 0.04μl, 10μM DMY sense Primer 1μl , 10μM DMY antisense Primer 1μl, Template DNA 2ng）を 10μl になるように調製し、PCR 増幅（94℃：5 分間、94℃：5 秒間、68℃：30 秒間 、72℃10 分間、40 サイクル）を行った。PCR 後、1%アガロースゲルにより断片の確認を行った（図 22)。

2.5 系統樹立

F2 世代で得られた変異メダカ（ヘテロ）の中から健康なメス１匹とオス１匹を選び、野生型（Cab）との交配を行った。得られた受精卵、ふ化仔魚は直径 5-10 cm のシャーレに 0.1%メチレンブルー入りの飼育水中で 28℃のインキュベーターで飼育した（図. 23)。毎日、発生が正常に進んでいる卵と死卵カウントを行い、記録表に記入した。生まれた稚魚は 20 匹ずつを大きいガラス水槽に移した。受精卵と稚魚は十分管理や育成を行った。バックグラウンドの変異を除くため、３回以上つまり、F5

世代まで野生型との交配を行った。野生型 との交配により F5 世代でバックグラウンド 変異が約 97%除去される。mPRαについて、F5 世代の変異ヘテロ同士の交配をし、F6 世代のホモ遺伝子変異メダカの表現型解析を行った（図 10)。mPRβとα-2 について、F5 世代まで野生型との交配を続けた。一方、F3 世代での予備的な表現型解析のため、F2 世代でヘテロ変異メダカ同士の交配も行った。

mPR 遺伝子には冗長性が見られ、それが原因で表現型が観察されなかったと推定された。従って、2 重 3 重変異メダカの作製を進めた（図 26)。まず、mPRαとβ、βとα-2 およびαとα-2 のいくつかの系統を選んで 2 重変異メダカの作製を行った。私はいくつかの組み合わせについて 2 重の変異遺伝子ホモ個体（H/H)、一方の遺伝子が変異ホモでもう一方の遺伝子が変異ヘテロの個体（H/h）2 重の変異遺伝子ヘテロ個体（h/h）の 2 重変異メダカを作製した。これらの 2 重変異メダカを別のサブタイプの変異メダカと交配し、さらに 3 重変異（h/h/h）メダカの作製まで系統樹立を進めた。

2.6 コンピテントセルの調製

本研究では大腸菌（Escherichia coli; E. coli）の 1 種である XL-1 blue を用いた。通常の状態で冷凍保存（-80℃）されていた XL-1 blue のコロニーを取り出し、37℃で Tetracyclin を含む LB (Luria-Bertani）培地（Bacto tryptone 1%, Becto yeast 0.5%, NaCl 0.5% & pH 7.5）を用いて over night で 4ml 培養を行った。翌日、この 4ml 培養液を 400ml 培地に移して、OD600 が 0.4 になるまで over night で培養した。培養した大腸菌を 50ml falcon tube に移し、10min ice 中においた。その後、Rotor S4、3000rpm、7min、4℃で遠心した。上清を捨て、冷やした 10ml $CaCl_2$ solution (60mM $CaCl_2$, 15% glycerol, 10mM PIPES & pH 7）を加え、ピペッティングしてよく混ぜた。これを 10min ice 中においておき、Rotor S4、2500rpm、5min、4℃で遠心した。上清を捨て、冷やした 2ml $CaCl_2$ を加え、ピペッティングしてよく混ぜた。分注をしながら液体窒素で凍らせて、-80℃に保存して形質転換に使用した。また、XL-1 blue 株は長期間保存用に LB 培地での培養液に終濃度 15% glycerol を加えて-80℃で保存した。

2.7 メダカ mPRαタンパク質発現プラスミドの構築

本研究に用いた pIRES2 DsRed-Express2（pIRES2）ベクター（Clontech Laboratories, Inc.）は Encephalomyocarditis virus（脳心筋炎ウイルス:ECMV）の IRES（internal ribosome entry sites/ mRNA内部のリボソーム進入サイト）が含まれており、目的遺伝子と蛍光タンパク質を同時に発現するためのベクターである(図

29)。

まず、大量のベクターを得るため大腸菌（XL-1 blue）への形質転換を行った。凍結保存した大腸菌を溶かし、1.5ml tube に大腸菌 50μl と pIRES2 ベクター　2μl (10ng) を加え、ice 中 30min、42℃のお湯で 1min の Water bath、ice 中 2min による形質転換をした。50μg/ml カナマイシン含む LB 寒天培地上で選択され、LB 培地を用いて液体培養を行った。Plasmid Plus Midi Kit (QIAGEN) のプロトコルに従ってプラスミドを抽出した。遺伝子組換えの有無は Ex Taq ポリメラーゼ（TaKara）で 5'DsRed プライマー（5'-GGCTCCAAGGTGTACGTGAA）と 3' DsRed プライマー (3'-GGTGTAGTCCTCGTTGTGGG) を用いた PCR 増幅あるいは制限酵素（BamH Ⅰ / EcoR Ⅰ）処理により確かめられた（図 30)。一方、メダカ mPRα gDNA は Fin-Clip 法を用いて抽出した。5' mPRα（5'-CGGAATTCATGGCAACGGTTGTGATGGA)、3' mPRα（3'-GCGGATCCTCACTCCTCTTTGTCGTGGAGT）プライマーを使用して PCR 増幅を行い、大量の PCR 産物が得られた。プライマーの 5'mPRα は BamH I の切断サイトと N-末端の開始コドンそして 3'mPRα は EcoR I の切断サイトと最終コドンが含まれるように設計した。

大量に得られたmPRαのPCR産物とベクターをBamH Ⅰ とEcoR Ⅰ 制限酵素処理により切断し、Phenol-chloroform-IsoamylalchoholとGel Extraction Kit、QIAEX Ⅱ（QIAGEN）を用いてマニュアル通り精製した（図31)。DNA ligation kit (Mighty Mix, TaKara）用い、プロトコルに従ってligationを行った。Ligation後、大腸菌への組換えベクターの形質転換を行い、500μl のSOC培地（0.5% yeast extract, 2% tryptone, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 20 mM $MgSO_4$, 20 mM Glucose) 中で180rpm、37℃、1時間培養をした。3,300rpm、25℃、1min遠心をし、沈殿をLB寒天培地のプレート上で選択した。また、液体培地で培養し、プラスミド抽出を行い、制限酵素で確認した（図32)。発現に用いるためカナマイシンを含むLB寒天培地のプレートを4℃で保存した。細胞に導入させるためLB培地で液体培養をし、Plasmid Plus Midi Kit (QIAGEN) を用いて精製を行なった。長期間保存用にLB培地での培養液に終濃度15% glycerolを加えて-80℃で保存した。

2.8 ヒト MDA-MB-231 乳ガン細胞でのメダカ mPRα 発現

メダカ mPRα 遺伝子を発現させたヒト MDA-MB-231 乳ガン細胞は 37℃、5% CO_2、5% FBS、100μg/ml Gentamycin (Invitrogen) が含まれる D-MEM/ Ham's F-12 (Wako) 培地で培養、維持した。培養液は 2 日ごとに交換され、90% confluent になるまで培養した後、継代をした。pIRES2 および mPRα 組換えプラスミド (pIRES2-mPRα) は Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いてプロトコルに従っ

て 90%confluent 細胞に遺伝子導入を行った。導入 2 日後から 500μg/ml G 418 solution (Roche, Germany) で細胞の選別を始めた。安定発現細胞株を得る得るために耐性コロニーを 500μg/ml G 418 solution を用いて増殖させ、最終的には限界希釈法によってクローニングを行った。まず、蛍光顕微鏡下で蛍光を確認した（図 33)。そして、プロトコル通り mRNA（ISOGEN-LS）を抽出し、RT-PCR（Reverse Transcription-PCR）増幅により遺伝子導入した組換え遺伝子の発現を確かめた（図 34)。

2.9 ステロイド結合実験

ステロイド結合実験のためにヒト MDA-MB-231 乳ガン細胞、pIRES2 および pIRES2-mPRαの 90%confluent になるように培養した細胞を用いた。細胞を 1 X PBS で 3 回洗い、HAED buffer (25mM HEPES, 10mM NaCl, 1 mM Dithiothreitol, 1mM EDTA, pH 7.6) に懸濁した。それを超音波で破砕し、遠心により細胞膜画分を回収した。この膜画分を用いてステロイド結合実験を行なった。放射性リガンドとして[1, 2, 6, 7 ^{3}H]-17α-hydroxyprogesterone (40 Ci/mmol、Amersham Bioscience 社) を 3α, 20β-hydroxysteroid dehydrogenase (Sigma) により放射性 17,20β-DHP に転換したものが用いられた。非特異的結合を測定するために試験管に膜画分と 3-12nM [^{3}H]-17, 20β-DHP および 100 倍高い濃度の非放射線性 17,20β-DHP を添加した。30 分間 4℃で静置した後、2.5% Tween 80 で処理した。
全てのステロイド結合実験の分析および解離定性（Kd）の最大結合能（Bmax）の算出は GraphPad Prism for Macintosh (version 4.0c) を用いて行った。

2.10 Vivo-morpholino による阻害実験

10 時間暗期と 14 時間明期の光周期内で朝の 11:00 時頃メダカの脳下垂体から GTH (Gonadotropin hormone) の 1 種である LH が分泌される(Iwamatsu 1978)。その後、減数分裂が再開され、卵成熟過程が開始される。LH が分泌される前、つまり 9 時から 10 時の間に Vivo-morpholino antisense oligonucleotide (ATGGCAAACTTGCGACTGTAGATGC) あるいは Standard control morpholino antisense oligonucleotide (CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA) をメダカの腹腔内に 0.2mM 溶液 50μl を注射した。次の日に卵巣を取り出し、Iwamatsu Ringer's solution を使用し、卵の単離を行った (Iwamatsu 1978)。実体顕微鏡下で未成熟卵と成熟卵および排卵をカウントした。HAED buffer 中で homogenize をし、1,000g、4℃で 7 分、そして 5,000g、4℃で 5 分および 20,000g、4℃で 20 分の遠心により膜

画分を回収し、ウエスタンブロットを行った。データ解析は GraphPad Prism プログラムを用いて行った。

2.11 SDS-PAGE およびウエスタンブロット解析

組換え細胞およびメダカ卵母細胞から回収した細胞膜画分を用いて mPRα発現のウエスタンブロット解析を行なった。タンパク質は Laemmli 法の SDS ポリアクリルアミド（10%）ゲルの電気泳動（SDS-PAGE）により分離され、Immobilon transfer membrane（Millipore）に転写された。Membrane は 5%スキムミルク入り TTBS (20mM Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20, pH 7.6）中で冷蔵庫に一晩置き、TBS (20 mM Tris-buffered saline, pH 7.6）で 500 倍希釈した抗メダカ mPRα ポリクローナル抗体（Eurofins Genomics、 Tokyo、Japan）による一次抗体反応を行った。TBS buffer で 1,000 倍希釈した HRP-anti Rabitt 抗体（Invitrogen）でニ次抗体反応を行い、ECL detection Kit (PerkinElmer）を用いて Enhanced chemiluminescence 法により mPRα タンパク質を検出した。発光シグナルの検出は Luminescent Image Analizer LAS-4000 (Fujifilm）を用いて行った。

第 3 章

結果

3.1 TILLING 法による mPR 変異メダカ系統のスクリーニング

TILLING 法を用いたスクリーニングおよび DNA シークエンシングによって mPR 群（α、β、α-2 およびγ）遺伝子変異メダカの F1 が同定された。mPRα変異メダカの３系統(H52E、 H265R、 L269X)、mPRβの４系統（T39A、V45A、 E51G、H282R)、mPRα-2 の３系統（M25K、 R49W、 Y121C)、および mPRγの４系統(P32K、N52K、 Q257K、 M271V)が得られた。

mPRs 変異メダカのスクリーニング結果は以下のようになった：

ア）mPRα：

スクリーニングにより mPRα では H52E、 H265R および L269X 変異メダカ系統が得られた（図 6)。H52E 系統で DNA 配列の 155 番の Cytosine が Adenine に置換された結果、52 番目のアミノ酸が Histidine から Glutamic acid に置換する変異であることが確認された。H265R 系統では 794 番の Adenine が Guanine に置換された結果、265 番目のアミノ酸が Histidine から Arginine に置換する変異であることが確認された。L269X 系統で 806 番の Thymine が Adenine に置換された結果、269 番目のアミノ酸が Leucine から Stop codon に変わることが確認された。L269X の場合、268 番目の serine 以降の C 末端側が欠失した変異体になる。

イ）mPRβ：

スクリーニングにより mPRβ では T39A、V45A、 E51G および H282R 変異メダカ系統が得られた（図 7)。T39A 系統で 115 番目の Adenine が Guanine に置換された結果、39 番目のアミノ酸 Threonine から Alanine に置換する変異であることが確認された。V45A 系統で 134 番目の Thymine が Cytosine に置換された結果、45 番目のアミノ酸が Valine から Alanine に置換する変異であることが確認された。E51G 系統で 152 番目の Adenine が Guanine に置換された結果、51 番目のアミノ酸が Glutamic acid から Glycine に置換する変異であることが確認された。H282R 系統で 845 番の Adenine が Guanine に置換された結果、282 番目のアミノ酸が Histidine から Arginine に置換する変異であることが確認された。

ウ）mPRα-2：

スクリーニングにより mPRα-2 では M25K、R49W および Y121C 変異メダカ系統が得られた（図 8)。M25K 系統で配列 75 番の Thymine が Adenine に置換された

結果、25 番目の行動するアミノ酸が Methionine から Lysine に置換する変異であることが確認された。R49W 系統で 145 番の Cytosine が Thymine に置換された結果、49 番目のアミノ酸が Arginine から Tryptophan に置換する変異であることが確認された。Y121C 系統で 362 番の Adenine が Guanine に置換された結果、121 番目のアミノ酸が Tyrosine から Cysteine に置換する変異であることが確認された。

エ）mPRγ：

スクリーニングにより mPRγでは P32A、N52K、 Q257K および M271V 変異メダカ系統が得られた（図 9)。P32A 系統で 94 番目の Cytosine が Guanine に置換された結果、32 番目のアミノ酸が Proline から Alanine に置換する変異であることが確認された。N52K 系統で 156 番目の Cytosine が Adenine に置換された結果、52 番目のアミノ酸が Asparagine から Lysine に置換する変異であることが確認された。Q257K 系統で 769 番目の Cytosine が Adenine に置換された結果、257 番目のアミノ酸が Glutamine から Lysine に置換する変異であることが確認された。M271V 系統で 811 番の Adenine が Guanine に置換された結果、271 番目のアミノ酸が Methionine から Valine に置換する変異であることが確認された。

3.2 遺伝子型の判定

PCR-RFLP 解析あるいは DNA シークエンスによる判定結果を mPR サブタイプそれぞれの塩基配列の位置する順番に示した。以下、それぞれの系統の遺伝子型の判定法の結果をまとめた。mPR 群遺伝子型判定の全ての結果は F2 の変異同士の交配により得られた F3 世代で行ったものである。

1）mPRαH52E 系統の DNA シークエンシングの結果：

DNA シークエンス用 KOD-Plus-Neo ポリメラーゼを用いた PCR 増幅後、1%アガロースゲルの電気泳動で mPRαH52E 系統の目的断片（609bp）が確認された（図 12 上)。DNA シークエンスにより mPRαH52E 系統の野生型は Adenine で、ヘテロ変異体の場合は DNA の 1 本はまだ野生型であるため Adenine と Cytosine のピークが重なって検出された。ホモ変異体の配列は Adenine から Cytosine に置換されていることが確認された（図 12 下)。

2）mPRαH265R 系統の PCR-RFLP 解析結果：

PCR-RFLP 解析により mPRαH265R 系統の遺伝子型の判定ができた。Ex-Taq ポリメラーゼを用いた PCR 増幅後の電気泳動によって目的（556bp）の断片が確認された （図 13 上)。PCR 産物を制限酵素（Hph I）処理した結果、DNA 断片の切断

が確認された（図 13 下)。制限酵素で野生型の断片が 157bp、188bp と 255bp の 3 本が検出され、ヘテロ変異体の DNA の一本はまだ 野生型であり、157bp、188bp、255bp と 443bp の 4m 本のバンドが検出され、そして 変異体のホモでは 157bp と 443bp の 2 本の断片が検出された。

3) <u>mPRαL269X 系統の PCR-RFLP 解析結果：</u>

PCR-RFLP解析によりmPRαL269X系統の遺伝子型判定ができた。PCR増幅後、電気泳動によって目的（556bp）の断片が確認された （図 14 上)。PCR 産物を制限酵素［XspI (BfaI, MaeI)］処理した後、2%アガロースの電気泳動によってDNA断片の切断が確認された（図 14 下)。制限酵素で変異体の断片が切断され、ホモ変異体の断片 が 288bp で、ヘテロ変異体の DNA の一本はまだ 野生型であり、288bp と 556bp の２本で、そして 野生型ではPCR断片が切断されないので、556bp の断片のみが検出された。

4) <u>mPRβT39A 系統の DNA シークエンシング結果:</u>

DNA シークエンス 用 KOD-Plus-Neo ポリメラーゼを用いた PCR 増幅後の電気泳動で mPRβT39A 系統の目的断片（428bp）が確認された（図 15 上)。 DNA シークエンスにより mPRβT39A 系統の野生型は Adenine で、ヘテロ変異体の DNA の１本はまだ野生型であるため Adenine と Guanine のピークが重なって検出された。ホモ変異体の配列が Adenine から Guanine に置換されていることが確かめられた(図 15 下)。

5) <u>mPRβV45A 系統の PCR-RFLP 解析結果：</u>

PCR-RFLP 解析により mPRβV45A 系統の遺伝子型判定ができた。Ex-Taq ポリメラーゼを用いた PCR 増幅後、1%アガロースゲルの電気泳動によって 428bp の断片が確認された （図 16 上)。その PCR 産物を制限酵素（HaeⅢ）処理した後、2%アガロースゲルの電気泳動によって DNA 断片の切断が確認された（図 16 下)。制限酵素で野生型の断片が 151bp と 310bp の 2 本検出され、ヘテロ変異体の DNA の一本はまだ野生型であるため 151bp, 159bp と 310bp の 3 本の断片が検出され、変異型ホモでは 151bp と 159bp の 2 本の断片が検出された。

6) <u>mPRβE51G 系統の PCR-RFLP 解析結果：</u>

PCR-RFLP 解析により mPRβE51G 系統の遺伝子型判定ができた。Ex-Taq ポリメラーゼを用いた PCR 増幅後、1%アガロースゲルの電気泳動によって目的（428bp)

の断片が確認された （図 17 上)。PCR 産物を制限酵素（HaeⅢ）処理し、2%アガロースゲルの電気泳動によって DNA 断片の切断が確認された（図 17 下)。制限酵素で野生型の断片が 139bp と 310bp の 2 本に切断され、ヘテロ変異で DNA の一本はまだ野生型であり、139bp、171bp と 310bp の 3 本の断片が検出され、それから、変異型ホモでは 139bp と 171bp の 2 本の断片が検出された。

7) <u>mPRβH282R 系統の PCR-RFLP 解析結果：</u>

PCR-RFLP 解析により mPRβH282R 系統の遺伝子型判定ができた。Ex-Taq ポリメラーゼを用いた PCR 増幅後、1%アガロースゲルの電気泳動によって目的（514bp）の断片が確認された （図 18 上)。その PCR 産物を制限酵素（Hph I）処理し、2%アガロースゲルの電気泳動で DNA 断片の切断が確認された（図 18 下)。制限酵素により野生型で 139bp、171bp と 204bp の 3 本の断片が検出され、ヘテロ変異体の DNA の一本はまだ野生型であるため変異型の DNA と合わせて 4 本に切断され、139bp, 171bp、204 と 310bp が検出された。それから変異型ホモでは 171bp と 310bp の 2 本の断片に切断された。

8) <u>mPRα−2 M25K 系統の PCR-RFLP 解析結果：</u>

PCR-RFLP 解析により mPRα−2 M25K 系統の遺伝子型判定ができた。Ex-Taq ポリメラーゼを用いた PCR 増幅後、1%アガロースゲルの電気泳動で目的（501bp）の断片が確認された （図 19 上)。その PCR 産物を制限酵素（Sph I）処理した後、3%アガロースゲルの電気泳動によって断片の切断が確認された（図 19 下)。制限酵素で野生型の断片が 56bp（この断片が見えなくても判定できる）と 445bp に切断され、ヘテロ変異体の DNA の一本はまだ 野生型であり、445bp と 501bp に切断され、変異型ホモでは DNA 断片が切断されないため 501bp の 1 本の断片が検出された。

9) <u>mPRα−2 R49W 系統の PCR-RFLP 解析結果：</u>

PCR-RFLP 解析により mPRα−2 R49W 系統の遺伝子型判定ができた。Ex-Taq ポリメラーゼを用いた PCR 増幅後、1%アガロースゲルの電気泳動で目的（501bp）の断片が確認された （図 20 上)。その PCR 産物を制限酵素（BsrBI）処理し、2%アガロースゲルの電気泳動によって断片の切断が確認された（図 20 下)。制限酵素で野生型の断片が 128bp（この断片が見えなくても判定できる）と 373bp に切断され、ヘテロ変異体の DNA の一本はまだ 野生型であり、373bp と 501bp に切断され、それから変異型ホモでは断片が切断されないため 501bp の 1 本の断片が検出された。

10) <u>mPRα−2 Y121C 系統の PCR-RFLP 解析結果：</u>

PCR-RFLP 解析により mPRα−2 Y121C 系統の遺伝子型判定ができた。Ex-Taq ポリメラーゼを用いたPCR増幅後、1%アガロースゲルの電気泳動で目的（501bp）の断片が確認された （図 21 上)。その PCR 産物を制限酵素（Bsp12861)処理し、3% アガロースゲルの電気泳動によって DNA 断片の切断が確認された（図 21 下)。制限酵素で変異体の断片が何箇所も切断されるが、特別の断片だけを判定に使用した。野生型の断片が 304bp で、ヘテロ変異体の DNA の一本はまだ 野生型であり、変異型と合わせて 258bp と 304bp の断片が検出された。それから変異型ホモでは 258bp の 1 本の断片が検出された。

3.3 系統樹立

バックグラウンドの変異を除くため、3 回以上は野生型との交配を行う必要がある。mPRαについて F6 世代以上、そしてβとα-2 世代まで野生型との交配を進めた（図 25)。全ての系統について F2 世代でヘテロ同士の交配を行い、F3 世代で予備的な表現型解析を行ったが、異常は観察されなかった（図 24)。mPRαについて、F5 世代でヘテロ同士の交配をし、F 6 世代のホモ遺伝子変異メダカの表現型解析を行ったが、異常は見られなかった（図 24)。これまで異常は出なかったことから mPR 遺伝子の冗長性が原因であると考えられた。その後、2 重 3 重変異体の作製を計画し、2 重 3 重 mPRs 変異メダカの系統樹立も進めた。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系統樹立を進めたが、異常が観察できなかった（図 27)。

3.4 メダカ mPRαタンパク質発現プラスミドの構築

pIRES2 DsRed-Express2 ベクター（pIRES2）の IRES 配列の前後に存在する遺伝子は CMV ポロモーターにより同時に、しかし、独立に転写されるベクターである（図 29)。大量のベクターを得るため大腸菌（XL-1 blue）の形質転換されたコロニーを LB 培地で 200ml 培養し、大量のベクターを調製した。制限酵素処理（BamH I / EcoR I) によりベクターの形質転換が確かめられた（図 30)。 pIRES2 ベクターの MCS サイトに mPRα遺伝子の形質転換を行い、形質転換で得られた単離クローンについて液体 LB 培地で培養後、プラスミドの抽出を行った。mPRα 遺伝子の形質転換で得られたコロニーの内 10 個について 2ml 培養により調べた。BamH I（N-末端で切断される)と EcoR I（C-末端で切断される）を用いた制限酵素処理により 1 個のコロニーから mPRα遺伝子の導入が確認できた（図 32)。また、DsRed プライマーおよび目的遺伝子の mPRαプライマーを用いる PCR 増幅でもそれぞれの断片を確認した。すなわち、メダカ mPRα遺伝子と蛍光タンパク質が同時に発現される pIRES2

DsRed-Express2 ベクターを用いて mPR 発現用ベクターの構築ができた。

3.5 ヒト MDA-MB-231 乳ガン細胞でのメダカ mPRα発現

目的遺伝子および蛍光タンパク質マーカーである DsRed 遺伝子の mRNA が IRES を介して転写されるため、蛍光タンパク質発現が検出される細胞のほとんど 100%で目的タンパク質も発現していると予想される。pIRES2-mPRα組換えベクターをヒト乳ガン由来 MDA-MB-231 細胞に遺伝子導入を行い、抗生物質 G418 による選択を約 1 ヶ月行なった後、細胞を蛍光顕微鏡下で観察したところ DsRed の赤色蛍光が確かめられた。最終的に限界希釈法によって pIRES2-mPRα遺伝子導入細胞をクローニングした。クローニングした細胞株は全ての細胞が蛍光を発することにより確認できた（図 33)。細胞株から抽出した mRNA の RT-PCR により DsRed および mPRα遺伝子の mRNA 発現が確かめられた（図 34)。細胞膜画分のウエスタンブロット解析でもタンパク質の発現が確認された（図 35)。

3.6 ステロイド結合実験

MDA-MB-231 細胞で発現した mPRαタンパク質は MIH のリガンドとして働いているかどうかを調べるため細胞膜画分を用いてメダカの卵成熟誘起ホルモンである 17,20β-DHP に対する結合実験を行った。コントロール（pIRES2）および mPRαの膜画分に対して[^{3}H]-17、20β-DHP の結合を測定した結果、mPRαでは 17、20β DHP に対してコントロールより高い特異的な結合活性が示された（図 36)。従って、mPRαは 17、20β-DHP の受容体として働くことが示唆された。

また、細胞膜画分の 17, 20β-DHP に対する結合飽和曲線とスキャッチャードプロット解析から解離定数（Kd = 5.42 nM）と最大結合能（Bmax = 0.02 nM）が得られた（図 37)。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）の 17, 20β-DHP 結合への競合結合実験を行った。その結果、17, 20β-DHP に強い競合活性が得られ、DES は弱い競合活性が得られた（図 38、図 39)。この結果はメダカ卵の場合にはキンギョやゼブラフィッシュと異なり DES が MIH として作用しないという実験結果と一致した結果が得られた。

3.7 卵成熟阻害実験

メダカの腹腔内に mPR α Vivo-Morpholino antisense oligonucleotide (Vivo-Morpholino）注射をし、*in vivo* で卵成熟（GVBD）誘導への影響を調べた。その結果、Vivo-Morpholino 処理群で 40%、コントロール群で 89%の卵成熟率となっ

た（図 40 左)。そしてこれらの卵母細胞を用いてウエスタンブロット解析を行い、mPRαタンパク質の発現を調べた。その結果、コントロールで多くの mPRαタンパク質発現が検出されたに対して Vivo-Morpholino 処理群では mPRαの発現量が減少していた（図 40 右)。この結果から mPRαがメダカの卵成熟を誘導する受容体として働いていることが示唆される。

3.8 mPRαの cDNA 解析

メダカ mPRαをコードする cDNA のデータベースでの解析を行なった (図 28)。mPRαの推定アミノ酸配列は GPCR（G protein-coupled receptor）の特徴である 7 回膜貫通ドメインを持っていることが予測された (SOSUI, http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html) (Hirokawa *et al.* 1998)。メダカ mPRαの配列は他の魚類と高い同一性 (77-93%) を示し、哺乳類とは低い (54-56%) 同一性を示した。mPRs に保存する N-glycosylation site (N{P}S/T{P}) がメダカ mPRαでも保存されており、この配列はリガンド結合部位の有力候補である。PAQR ファミリーには mPRs の 3 つの共通配列が存在されることが明らかになった。この中の 1 つである P{X}GYR{X}E{2}N{3}H はメダカ mPRαにも存在されていた。キンギョ mPRαと同様にメダカ mPRαの N-末端の細胞外領域にある 1 つ配列 (L{6}L{6}L{6}L) がロイシン ジッパー パターンに非常に似ている。すなわち、これらの配列は mPRαと mPRβの間にホモダイマーあるいはヘテロダイマーの形成に貢献できる可能性がある。

第4章

考察

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である。この方法では、化学変異原物質であるアルキル化剤ENUの処理により配偶子ゲノムに突然変異を導入する（Russell *et al.* 1982)。その雄を野生型の雌と交配してF１個体を作る。変異をヘテロで持つF1個体のゲノムDNAと、凍結精子をセットでライブラリー化し、ゲノムDNAライブラリーを鋳型にして標的遺伝子をPCRベースでスクリーニングする。最終的に該当する個体の凍結精子を人工授精により個体に戻す。人工授精には野生型の未受精卵使用するため得られた個体は変異をヘテロで有する。従ってさらにヘテロ個体同士を交配することでホモ変異体を得る。

変異のスクリーニング系にはいくつかの方法がある。ダイレクトシークエンス法はライブラリー全てをシークエンスすることで、変異を直接検出する方法であるが、コストが高い。基礎生物学研究所におけるメダカ TILLING ライブラリーのスクリーニングは、融解温度曲線解析 （HRM） 法で行われている（Taniguchi, Takeda *et al.* 2006; Erali, Voelkerding *et al.* 2008; Ishikawa *et al.* 2010)。この方法では約 400bp の増幅子を設定してプライマーを設計する。この手法はライブラリーのゲノム DNA を鋳型にして標的遺伝子のプライマーで PCR を行って標的遺伝子を増幅し、最後に高温から急冷してヘテロニ重鎖を形成させ、HRM 解析によって行うものである。ライブラリーに供された F１は変異ヘテロを有するので標的遺伝子に変異がある場合はヘテロ二重鎖を形成するために融解温度に差が生じるので変異の有無を検出できる。メダカ TILLING ライブラリーは今までにスクリーニングした情報を元にするとおよそ 60bp に１つの変異を有する。スクリーニングするゲノム DNA は 96 穴プレート 60 枚分で、PCR は 96 穴プレートで行う。PCR 液には蛍光インターカレーターである SYTO9 を加えておき、最後にヘテロ二重鎖形成反応を行う。SYTO9 は DNA 二重鎖に結合して蛍光を発する。高温処理により DNA 二重鎖が解離すると、SYTO9 も解離し、消光する。PCR 産物をそのまま HRM 解析装置にかける。詳細な HRM 解析により通常プレート 1 枚当たり数個が他の大多数の融解温度曲線から外れるのでこれを候補としてダイレクトシークエンスにより変異の有無や変異の種類を同定する。同じメダカ TILLING ライブラリーにおけるダイレクトシークエンス法と比較して HRM 法もほぼ同程度で変異を検出できることが分かっている（Graham *et al.* 2005; Palais *et al.* 2005; Taniguchi, Takeda *et al.* 2006)。ナンセンス変異やアミノ酸が置換されるミスセンス変異が見つかれば、凍結精子を使って人工授精することと

なる。TILLING はランダムに突然変異を導入しているので、標的遺伝子以外の変異も多く含まれる。そのため通常はバックグラウンド変異を減らすために数世代野生型との交配を行う必要がある。

我々はモデル生物であるメダカを使って遺伝子機能の分子レベルの解析を目指した。メダカ（*Oryzias latipes*）は、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た（Matsuda *et al.* 2003)。飼育が簡単で、世代当たりの時間が短いことが遺伝学的研究に適している（岩松鷹司、メダカ学、1993; Wittbrodt *et al.* 2002)。メダカにおいては逆遺伝学的手法により変異体を得る TILLING 法が確立されている。この研究では kyoto cab 系統のメダカが用いられた。Drosophila をはじめ、ゼブラフィッシュ、メダカなど様々な植物や動物類で TILLING 法による機能解析が行なわれている（McCallum *et al.* 2000; Taniguchi, Takeda *et al.* 2006; Sood *et al.* 2006; Winkler *et al.* 2011）。TILLING ライブラリーをスクリーニングする HRM 法によりダイレクトシークエンスと同程度の確率で p53, atr, atm 遺伝子変異メダカが同定されている（Taniguchi, Takeda *et al.* 2006; Cimprich *et al.* 2008; Shiloh 2006; Ishikawa, Kamei Y *et al.* 2010)。メダカにおける TILLING 法による機能解析の最初の成功例はがん抑制遺伝子である p53 遺伝子変異メダカ系統であった。p53 E241X 系統で腎臓、目、脳や鰓など広い領域に腫瘍が形成され、p53 遺伝子はアポトーシスを起こさず、他の生物種で示されている p53 遺伝子の機能から予測される表現型が示された。これらの結果は変異体メダカによる解析の有効性を示した（Taniguchi, Takeda *et al.* 2006)。そこで我々はこの遺伝学的手法によりプロゲスチン膜受容体（mPR）の機能について決定的な証拠をもたらすため変異メダカの系統樹立を試みた。

この研究は基礎生物学研究所のバイオリソース研究室との共同研究で、遺伝子変異メダカを選択するTILLING法により逆遺伝学的に変異体をスクリーニングし、標的遺伝子の変異体が得られた。ENU処理した雄から得られたゲノムDNA（gDNA）をスクリーニングした。この方法によりゲノムDNAライブラリーを鋳型にして標的遺伝子増幅用プライマーで目的領液（N-末端とC-末端）をPCR増幅し、最後に得られたDNA断片の変性/再結合反応（加温/冷却）によるHRM解析を行った（Ishikawa, Kamei Y *et al.* 2010)。

HRM法により得られた変異メダカのPCR産物についてさらにDNA シークエンスを行い、変異体を同定した。スクリーニングとDNA シークエンスによってmPRαの３系統（H52E、H265R、L269X)、βの4系統（T39A、V45A、E51G、H282R)、α−２の4系統（M25K、R49W、Y121C）およびγの4系統（P32A、N52K、Q257K、M271V）の変異系統が得られた。これらのナンセンス変異や、アミノ酸が置換されたミスセンス変異を持つF1精子を解凍し、人工授精によってF２変異体系統が得られた。

当研究室では、F2世代の変異メダカの受精卵の飼育からmPR遺伝子変異メダカの系統樹立を行っている。ランダムミュータジェネシスした変異体ライブラリーからスクリーニングされているので、1回の野生型との交配でバックグラウンドの変異（標的遺伝子の変異以外）は半分になる。バックグラウンドの変異を除くため、さらに３回以上野生型とかけ合わせする必要がある。野生型とのかけ合わせによりF5世代でバックグラウンド変異が約97%除けると推定される。

遺伝子変異体の遺伝子型判定する方法としてDNAシークエンス法の信頼性が最も高いが、我々は１日で判定ができるPCR−RFLP解析を優先した。RFLPは制限酵素でPCR断片を切断し、得られた断片の長さから変異の有無を判定する方法である。RFLP解析するには、まずPCR増幅を行い、1% アガロースゲルの電気泳動により増幅の確認をした。そのPCR産物の制限酵素処理を行い、2~3%ガロースゲルを用いた電気泳動によって切断された断片を検出した。RFLP解析はmPRαで2系統（H265R、L269X)、βで３系統（V45A、E51G、H282R)、α−２で３系統（M25K、R49W、Y121C)およびγで2系統（P32A、M271V）が可能になった。RFLP解析用PCR増幅がうまくできなかった系統、または制限酵素で DNA の切断できなかった系統について、DNA シークエンシングにより遺伝子型の判定を行った（mPRα H52E、mPRβ T39A、mPRγ N52K、Q257K)。DNA シークエンスするには、まずKOD Plus によるPCR増幅を行い、1% アガロースゲルの電気泳動により増幅を確認した。このPCR産物を用いて、Exo SAP処理し、DNA シークエンスが行われた。

また、メダカの性決定遺伝子であるDMY遺伝子のPCR増幅によりオスとメスの判定ができる(Matsuda, Sato *et al.* 2003)。DMY遺伝子は Y Chromosome （♂）に存在するので、雌（♀）ならバンドが出ない。メダカが小さいときや性別の判定が難しい場合はDMY プライマーを用いて、PCR増幅を行い、性別の確認をした。

この方法は最終的にはF５世代以上の変異体ヘテロ同士のかけ合わせをし、F６世代のホモ遺伝子変異メダカの表現型を解析する方法である。従って、次の世代を得るため遺伝子型の判定ができた個体の内、系統ごとに変異体ヘテロの健康なオス１匹とメス１匹を選び、野生型とかけ合わせを行った。予備的な表現型を観察するため、全ての系統でF２世代のヘテロ同士のかけ合わせも行った。しかし、F２変異メダカ同士のかけ合わせによるF3ホモ遺伝子変異メダカの産卵と発生に対する表現型解析の結果、野生型とほぼ同じ割合で産卵し、受精卵の発生も確認され、異常が見られなかった。冗長性により表現型が出なかった可能性があると推定される。なぜなら、メダカのゲノム解読によりmPRαの重複遺伝子であるmPRα−２が存在することが明らかになっているからである。

mPRα、βおよびα−2 の全ての系統について、F２世代からF5世代まで野生型との交配による遺伝子型の判定を行い、F５世代のヘテロ同士のかけ合わせを行った。そして、F６世代のホモ遺伝子変異メダカの表現型解析を行ったが、異常が観察されなかった。今回、mPR遺伝子の各サブタイプの変異体群で表現型が見られなかったのは遺伝子の冗長性が原因だと考えられる。従って、通常の系統を維持しながら2重3重変異体の樹立も進めた。逆遺伝学的に2重3重変異体によるプロゲスチン膜受容体（mPR）遺伝子変異メダカの樹立が可能になれば、プロゲスチン膜受容体を介した反応経路の役割が明確に示される（Tokumoto *et al.* 2016; Tokumoto 2012)。また、各組織におけるステロイド膜受容体の機能が明らかになることも期待される。

今回、メダカ mPRαをコードするゲノム DNA をヒト MDA-MB-231 乳ガン細胞に発現させた。データベース解析によりメダカ mPRαの配列は他の魚類と高い（77-93%）相同性を示し、哺乳類と低い（54-56%）相同性を示した。膜タンパク質の構造予測解析の結果により mPRs は７回膜貫通ドメインを持っていることが示唆され、メダカ mPRαも７回膜貫通ドメインであることが示された（Tokumoto, Nagahama *et al.* 2006)。mPRs には N-glycosylation site (N{P}S/T{P}) が保存されており、これはリガンド結合および他に決定機能の有力候補である。PAQR ファミリーには mPRs の３つ共通配列が存在されることが明らかになった（Smith, Kupchak *et al.* 2008)。これらの配列（P{X}GYR{X}E{2}N{3}H）はメダカ mPRαにも存在されている。キンギョ mPRαと同様にメダカ mPRαの N-末端の細胞外領域にロイシンジッパー パターン（L{6}L{6}L{6}L）が見つかった。これらの配列は mPRαと mPRβの間にホモダイマーあるいはヘテロダイマーの形成に貢献できる可能性がある。

pIRES2 ベクターを使用することで mPRαと DsRed が同時に発現する組換えベクターの構築を行った。ヒト乳ガン由来 MDA-MB-231 細胞に pIRES2-mPRα組換えベクターの遺伝子導入を行った。クローニングした細胞株は全ての細胞から蛍光が確認された。細胞株から抽出した mRNA の RT-PCR により DsRed および mPRα遺伝子の発現が確かめられた。それから、細胞膜画分のウエスタンブロット解析でもタンパク質の発現が確認できた。

メダカ mPRα組換え遺伝子が発現された MDA-MB231 細胞から回収した膜画分の 17,20β-DHP 結合活性はゼブラフィッシュおよびキンギョと同様であるが示唆された（Zhu, Bond *et al.* 2003; Tokumoto, Tokumoto *et al.* 2007; Tokumoto, Tokumoto *et al.* 2012)。この結果はこれらの魚類では、17,20β-DHP は MIH として作用していることが示される。以前、当研究室の研究により EDC（endocrine disrupting chemical）である DES がゼブラフィッシュおよびキンギョの卵成熟を引き起こすことが証明された（Tokumoto *et al.* 2004; Tokumoto *et al.* 2005; Tokumoto,

Tokumoto *et al.* 2007)。本研究ではメダカ mPRα発現細胞が確立され、DES の結合活性を調べた。その結果、メダカ mPRα はキンギョ mPRα と比べて DES に対して非常に弱い結合活性しか示さないことが明らかになった。この結果は DES がメダカ卵成熟を誘導しないことと一致した結果である。DES に対する弱い結合活性からメダカ卵母細胞が DES に反応しないと説明できる。

本研究では、さらにメダカ 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。この実験では、Vivo-Morpholino を使用し、*in vivo* でメダカ mPRα タンパク質レベルを減少させ、卵成熟への影響を調べた。以前、キンギョ mPRα、β、γ-1、γ-2 の morpholino antisense oligonucleotides を用いた *in vitro* での microinjection によるノックダウン実験が行われ、mPRα および β がキンギョの卵成熟誘起ホルモンの受容体であることが証明されている（Tokumoto, Nagahama *et al.* 2006; Tokumoto, Tokumoto *et al.* 2012)。メダカ卵母細胞への microinjection が比較的困難であることや 1 個体から得られる卵母細胞数が限られることから、その後開発された Vivo-Morpholino antisense oligonucleotides を用いることにより、卵母細胞に microinjection すること無しに *in vivo* でその作用を見られる実験法を採用した。前例が無かったことから予備実験により、メダカ腹腔内への注入法、注入量について検討したが、高濃度（1mM）の 50μl の注入では数時間後にメダカが死亡した。最終的に採用した 0.2mM の 50μl とはわずか 5 倍濃度差であり、 Morpholino antisense oligonucleotides がそのような急性毒性を示すことは考えにくい。このことは、全身に発現する mPRα タンパク質が様々な機能を持つことを示唆する結果であると考えられる。すなわち、腹腔内注射後に Vivo-Morpholino antisense oligonucleotides が浸透した組織における mPRα タンパク質のノックダウンが生命維持に関わる重要な反応経路を遮断したと推測することができる。今後の mPR 遺伝子変異メダカの表現型解析においても考慮すべき結果である。濃度検討の結果、今回は *in vivo* で LH が分泌されるタイミングの前に腹腔内に Vivo-Morpholino antisense oligonucleotides を注射することによって卵母細胞の mPRα タンパク質が減少され、メダカの卵成熟が抑制されるという結果が得られた。本研究によりメダカにおいても mPRα タンパク質は卵成熟誘起ホルモンの受容体であることが証明できた。

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、mPRαの３系統、mPRβの４系統、mPRα-2 の３系統、および mPRγの４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。

参考文献

Ashley, RL, Arreguin-Arevalo JA and Nett TM (2009). "Binding characteristics of the ovine membrane progesterone receptor alpha and expression of the receptor during the estrous cycle." Reprod Biol Endocrinol **7**: 42.

Cimprich, KA and Cortez D (2008). "ATR: an essential regulator of genome integrity." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 616-27.

Erali, M, Voelkerding KV and Wittwer CT (2008). "High resolution melting applications for clinical laboratory medicine." Exp Mol Pathol **85**(1): 50-8.

Fukada, S, Tanaka M, Matsuyama M, Kobayashi D and Nagahama Y (1996). "Isolation, characterization, and expression of cDNAs encoding the medaka (Oryzias latipes) ovarian follicle cytochrome P-450 aromatase." Mol Reprod Dev **45**(3): 285-90.

Graham, R, Liew M, Meadows C, Lyon E and Wittwer CT (2005). "Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting." Clin Chem **51**(7): 1295-8.

Hagiwara, A, Ogiwara K and Takahashi T (2016). "Expression of Membrane Progestin Receptors (mPRs) in Granulosa Cells of Medaka Preovulatory Follicles." Zoolog Sci **33**(1): 98-105.

Hanna, R, Pang Y, Thomas P and Zhu Y (2006). "Cell-surface expression, progestin binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progestin receptors alpha and beta in transfected cells." J Endocrinol **190**(2): 247-60.

Hanna, RN and Zhu Y (2009). "Expression of membrane progestin receptors in zebrafish (Danio rerio) oocytes, testis and pituitary." Gen Comp Endocrinol **161**(1): 153-7.

Hirokawa, T, Boon-Chieng S and Mitaku S (1998). "SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins." Bioinformatics **14**(4): 378-9.

Hossain, MB, Oshima T, Hirose S, Wang J and Tokumoto T (2015). "Expression and Purification of Human Membrane Progestin Receptor alpha (mPRalpha)." PLoS One **10**(9): e0138739.

Ishikawa, K, Hanaoka Y, Kondo Y and Imai K (1977). "Primary action of steroid hormone at the surface of amphibian oocyte in the induction of germinal vesicle breakdown." Mol Cell Endocrinol **9**(1): 91-100.

Ishikawa, T, Kamei Y, Otozai S, Kim J, Sato A, Kuwahara Y, Tanaka M, Deguchi T, Inohara H, Tsujimura T and Todo T (2010). "High-resolution melting curve analysis for rapid detection of mutations in a Medaka TILLING library." BMC Mol Biol **11**: 70.

Iwamatsu, T (1978). "Studies on oocyte maturation of the medaka, Oryzias latipes. VI. Relationship between the circadian cycle of oocyte maturation and activity of the pituitary gland." J Exp Zool **206**(3): 355-63.

Karteris, E, Zervou S, Pang Y, Dong J, Hillhouse EW, Randeva HS and Thomas P (2006). "Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term." Mol Endocrinol **20**(7): 1519-34.

Matsuda, M, Sato T, Toyazaki Y, Nagahama Y, Hamaguchi S and Sakaizumi M (2003). "Oryzias curvinotus has DMY, a gene that is required for male development in the medaka, O. latipes." Zoolog Sci **20**(2): 159-61.

McCallum, CM, Comai L, Greene EA and Henikoff S (2000). "Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics." Plant Physiol **123**(2): 439-42.

Nagahama, Y and Yamashita M (2008). "Regulation of oocyte maturation in fish." Dev Growth Differ **50 Suppl 1**: S195-219.

Nakashima, M, Suzuki M, Saida M, Kamei Y, Hossain MB and Tokumoto T (2015). "Cell-based assay of nongenomic actions of progestins revealed inhibitory G protein coupling to membrane progestin receptor alpha (mPRalpha)." Steroids **100**: 21-6.

Oshima, T, Nakayama R, Roy SR and Tokumoto T (2014). "Purification of the goldfish membrane progestin receptor alpha (mPRalpha) expressed in yeast Pichia pastoris." Biomed Res **35**(1): 47-59.

Palais, RA, Liew MA and Wittwer CT (2005). "Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping." Anal Biochem **346**(1): 167-75.

Pang, Y, Dong J and Thomas P (2013). "Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and ε (mPRδ and mPRε) and mPRδ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis." Endocrinology **154**(1): 283-95.

Russell, LB and Montgomery CS (1982). "Supermutagenicity of ethylnitrosourea in the mouse spot test: comparisons with methylnitrosourea and ethylnitrosourethane." Mutat Res **92**(1-2): 193-204.

Scott, AP, Sheldrick EL and Flint AP (1982). "Measurement of 17 alpha, 20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one in plasma of trout (Salmo gairdneri Richardson): seasonal changes and response to salmon pituitary extract." Gen Comp Endocrinol **46**(4): 444-51.

Shiloh, Y (2006). "The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape." Trends Biochem Sci **31**(7): 402-10.

Smith, JL, Kupchak BR, Garitaonandia I, Hoang LK, Maina AS, Regalla LM and Lyons TJ (2008). "Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors." Steroids 73(11): 1160-73.

Sood, R, English MA, Jones M, Mullikin J, Wang DM, Anderson M, Wu D, Chandrasekharappa SC, Yu J, Zhang J and Paul Liu P (2006). "Methods for reverse genetic screening in zebrafish by resequencing and TILLING." Methods 39(3): 220-7.

Stanczyk, FZ (2003). "All progestins are not created equal." Steroids 68(10-13): 879-90.

Taniguchi, Y, Takeda S, Furutani-Seiki M, Kamei Y, Todo T, Sasado T, Deguchi T, Kondoh H, Mudde J, Yamazoe M, Hidaka M, Mitani H, Toyoda A, Sakaki Y, Plasterk RH and Cuppen E (2006). "Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis." Genome Biol 7(12): R116.

Thomas, P, Pang Y, Dong J, Groenen P, Kelder J, de Vlieg J, Zhu Y and Tubbs C (2007). "Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progestin membrane receptor alpha subtypes and their evolutionary origins." Endocrinology 148(2): 705-18.

Thomas, P, Pang Y, Zhu Y, Detweiler C and Doughty K (2004). "Multiple rapid progestin actions and progestin membrane receptor subtypes in fish." Steroids 69(8-9): 567-73.

Tokumoto, T, Hossain MB and Wang J (2016). "Establishment of procedures for studying mPR-interacting agents and physiological roles of mPR." Steroids 111: 79-83.

Tokumoto, T (2012). "Identification of membrane progestin receptors (mPR) in goldfish oocytes as a key mediator of steroid non-genomic action." Steroids 77(10): 1013-6.

Tokumoto, T, Tokumoto M, Oshima T, Shimizuguchi K, Fukuda T, Sugita E, Suzuki M, Sakae YT, Akiyama Y, Nakayama R, Roy SR, Saydur Rahman M, Pang Y, Dong J and Thomas P (2012). "Characterization of multiple membrane progestin receptor (mPR) subtypes from the goldfish ovary and their roles in the induction of oocyte maturation." Gen Comp Endocrinol **177**(1): 168-76.

Tokumoto, T, Tokumoto M and Thomas P (2007). "Interactions of diethylstilbestrol (DES) and DES analogs with membrane progestin receptor-alpha and the correlation with their nongenomic progestin activities." Endocrinology **148**(7): 3459-67.

Tokumoto, M, Nagahama Y, Thomas P and Tokumoto T (2006). "Cloning and identification of a membrane progestin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation." Gen Comp Endocrinol **145**(1): 101-8.

Tokumoto, T, Tokumoto M and Nagahama Y (2005). "Induction and inhibition of oocyte maturation by EDCs in zebrafish." Reprod Biol Endocrinol **3**: 69.

Tokumoto, T, Tokumoto M, Horiguchi R, Ishikawa K and Nagahama Y (2004). "Diethylstilbestrol induces fish oocyte maturation." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3686-90.

Winkler, S, Gscheidel N and Brand M (2011). "Mutant generation in vertebrate model organisms by TILLING." Methods Mol Biol **770**: 475-504.

Wittbrodt, J, Shima A and Schartl M (2002). "Medaka--a model organism from the far East." Nat Rev Genet **3**(1): 53-64.

Yoshikuni, M, Ishikawa K, Isobe M, Goto T and Nagahama Y (1988). "Characterization of 1-methyladenine binding in starfish oocyte cortices." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(6): 1874-7.

Yoshikuni, M and Nagahama Y (1994). "Involvement of an inhibitory G-protein in the signal transduction pathway of maturation-inducing hormone (17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one) action in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) oocytes." Dev Biol **166**(2): 615-22.

Zhu, Y, Bond J and Thomas P (2003). "Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2237-42.

Zhu, Y, Rice CD, Pang Y, Pace M and Thomas P (2003). "Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2231-6.

岩松鷹司、メダカ学(1993)、サイエンティスト株式会社、東京、日本。

図と表

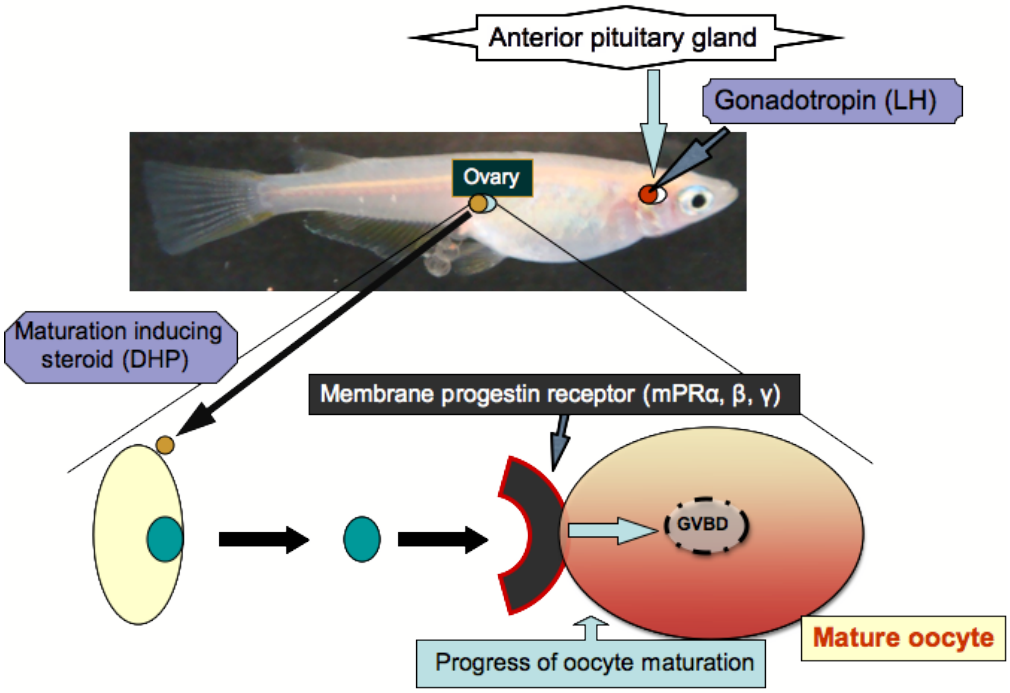

図1.　推定される魚類のプロゲスチン産生経路と卵成熟誘起の機構

魚類の脳下垂体（Pituitary gland）から分泌された生殖腺刺激ホルモンである黄体形成ホルモン　（LH）　がろ胞細胞に作用し、ステロイド性の卵成熟誘導ホルモン(MIH),17、20β–DHP が作られる。MIH により、卵成熟が誘導され、卵膜上に局在するプロゲスチン膜受容体（membrane progestin receptor,　mPR）に作用し、受精可能な卵へと成熟（OM）すると予想されている。つまり、mPR は卵成熟誘起シグナルを伝達すると考えられている。

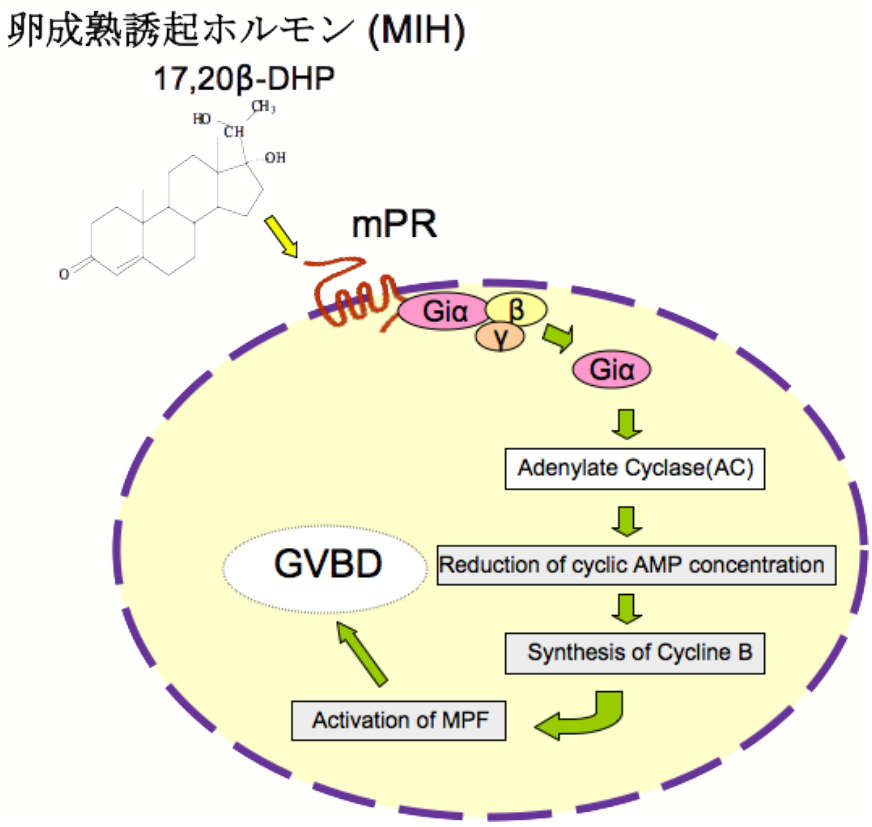

図 2. mPR による細胞内のノンゲノミックシグナル伝達経路

卵細胞膜上に局在する mPR はプロゲスチン（17、20β–DHP）と結合することで細胞内に共役している G タンパク質のαサブユニット（Giα）を活性化する。G タンパク質が関与すると細胞内のアデニル酸シクラーゼ（adenylyl cyclase）活性が抑制され、サイクリック AMP （Cyclic AMP; cAMP）の濃度が下がる。プロゲスチン刺激により cAMP 合成が抑制されることでサイクリン B (cycline B) の新規合成が促進され、卵成熟促進因子（Maturation promoting factor; MPF）が活性化される。MPF が最終的に卵核胞崩壊（Germinal vesicle breakdown; GVBD）を引き起こす。

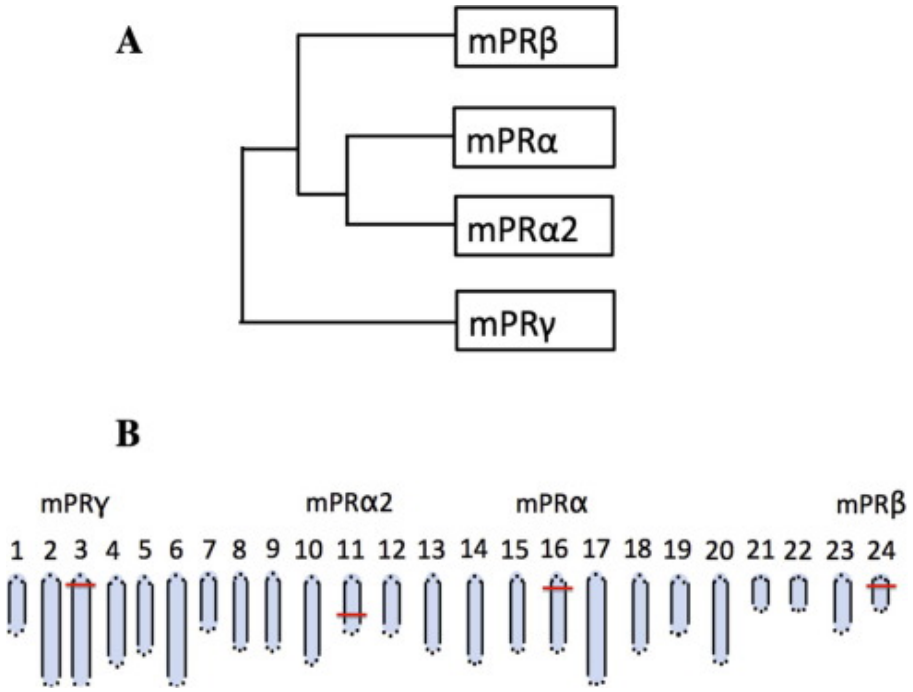

図 3.メダカ mPR 遺伝子遺伝子群系統関係と染色体上の位置

A. 本研究で遺伝学的解析に用いるメダカでは cDNA クローニングにより、mPR α、mPR β & mPR γ の 3 つの遺伝子が登録されていたが、その後のゲノム解読により登録されていた mPR γ 遺伝子は mPR α 遺伝子の重複遺伝子である事が分かった。この論文では、mPR α－2 とした。mPR γ はゲノム上に見つかっている。

B. Ensembl Genome Browser でメダカゲノムにおける mPR 遺伝子群の位置を調べた。メダカ mPR α が 16 番目の染色体に、mPR α−2 が 11 番目の染色体に、mPR β が 24 番目の染色体に、そして mPR γ が 3 番目の染色体に存在する。

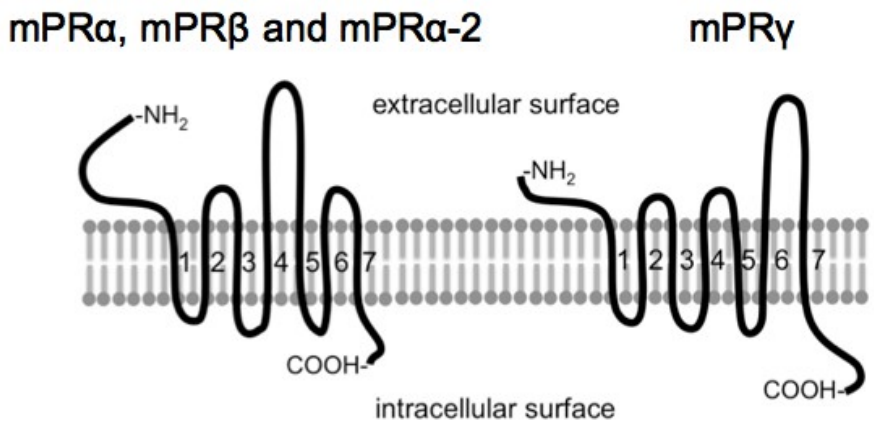

図4. メダカmPRタンパク質の推定構造

SOSUIやDAS、TopPred2によるmPRのアミノ酸配列の親水性や電荷の解析からメダカmPRは細胞膜上に局在し、7回膜貫通型構造をとることが予想される。メダカmPRα、mPRα-2およびmPRβは第2細胞外ループが大きく突出した構造、mPRγは第3細胞 外ループが大きく突出した構造をとると推定される。

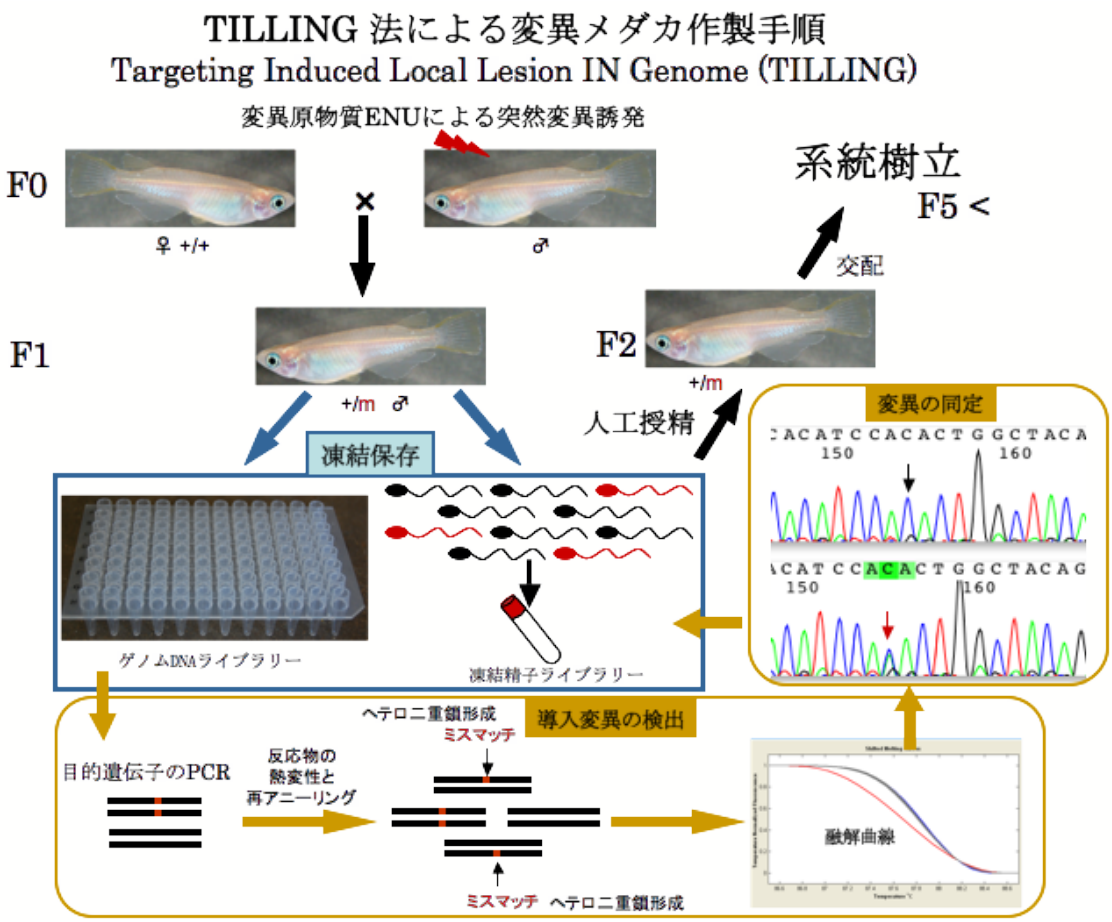

図 5. TILLING 法による変異メダカの作製

TILLING 法によりサカナでは初めて逆遺伝学的解析が可能になった。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（Targeting induced local lesion in gene）法では変異原物質 ENU（N-ethyle-N-nitrosourea）により雄のメダカを処理する事で、ランダム変異が起こる。ENU は高率に突然変異を誘導する事ができる化学変異原物質である。ENU を処理した雄から得られた F1 の精子を凍結保存し、同時に魚体からゲノム DNA を抽出してライブラリーを作製する。まず、ゲノム DNA ライブラリーを鋳型にして標的遺伝子に変異を持つものをスクリーニングする。本研究の共同研究先である基礎生物学研究所におけるメダカ TILLING ライブラリーのスクリーニング法は、HRM 法（high-resolution melting curve analysis）である。

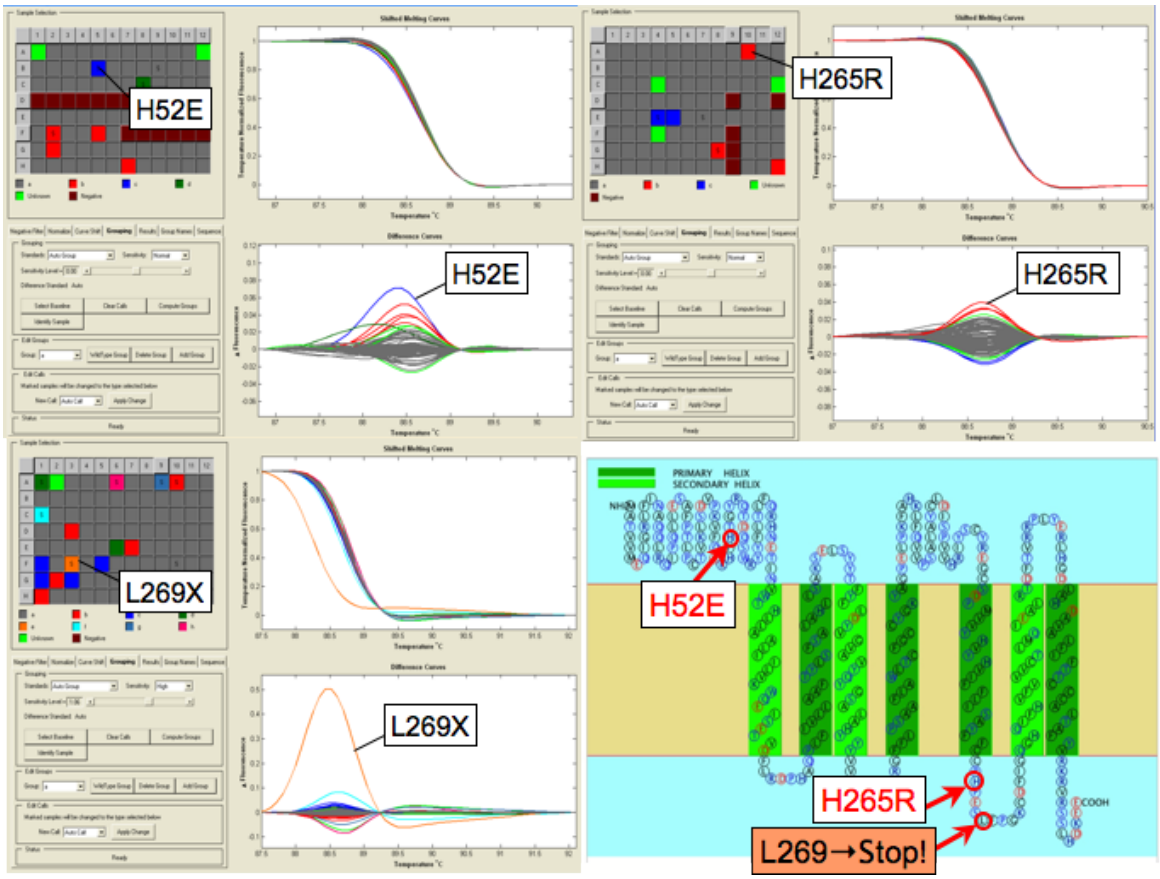

図 6. mPRα の融解温度曲線と置換するアミノ酸の位置

スクリーングにより mPRα については 3 系統、H52E、 H265R、 L269X が得られた。(上&左下) ここではプレート内のウエルおよびHRM解析の曲線を示している。温度を上昇させると DNA の二重鎖が解離していき、ウエルのサンプルは先に解離するのが検出される。(右下) DNA シークエンスによって mPRα で 3 種類 (H52E、H265R、 L269X) の変異部位が明らかになった。L269X の場合、268 番目の serine の C 末端側が欠失した変異系統になる。

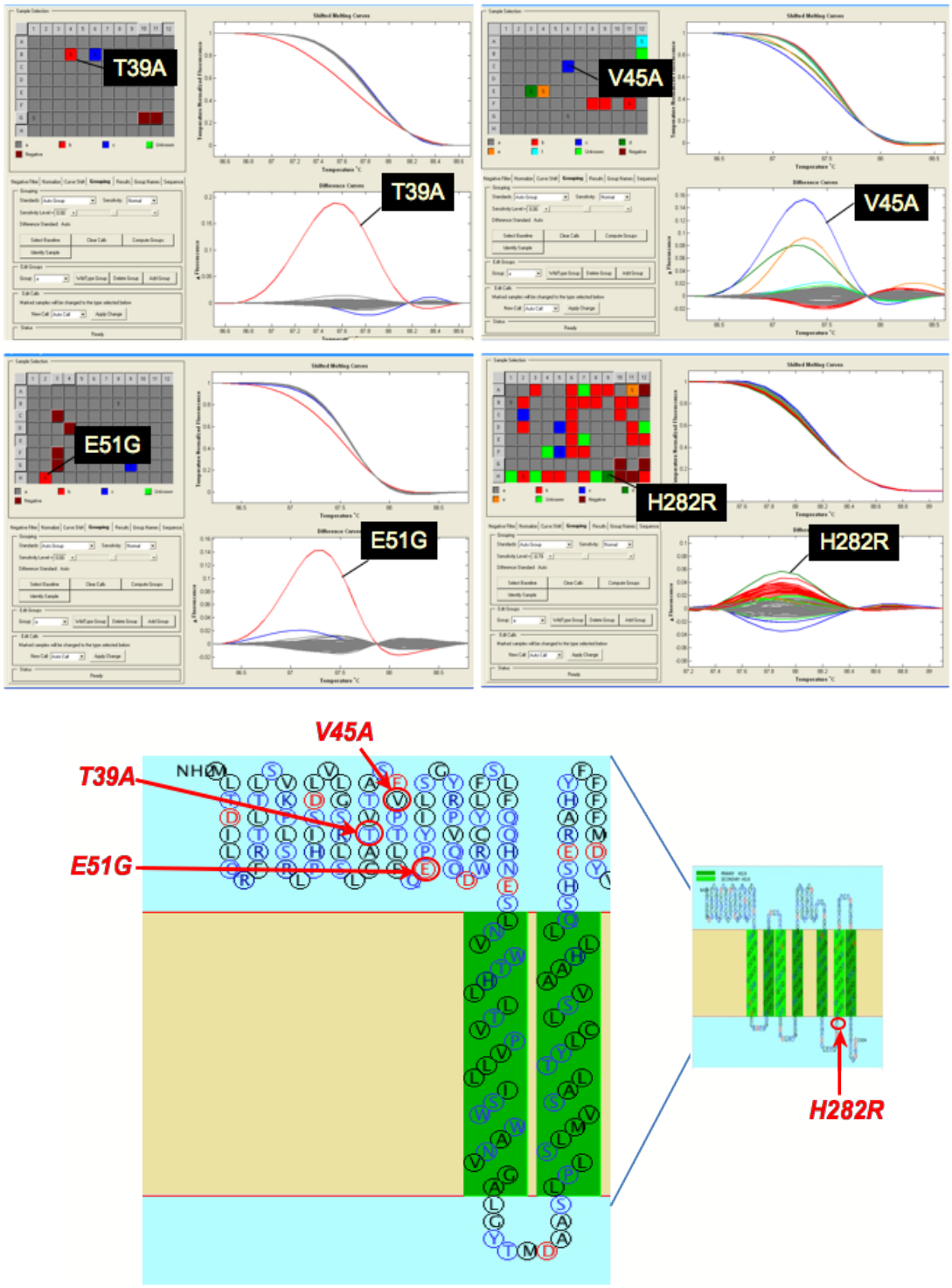

図 7. mPR β の解温度曲線と置換するアミノ酸の位置

（上）スクリーングにより mPR β の 4 系統 T39A、 V45A、 E51G と H282R が得られました。ここではプレート内のウエルおよび HRM 解析の曲線を示している。(下) DNA シークエンスにより mPR β の 4 種類（T39A、 V45A、 E51G と H282R）の変異部位が明らかになった。

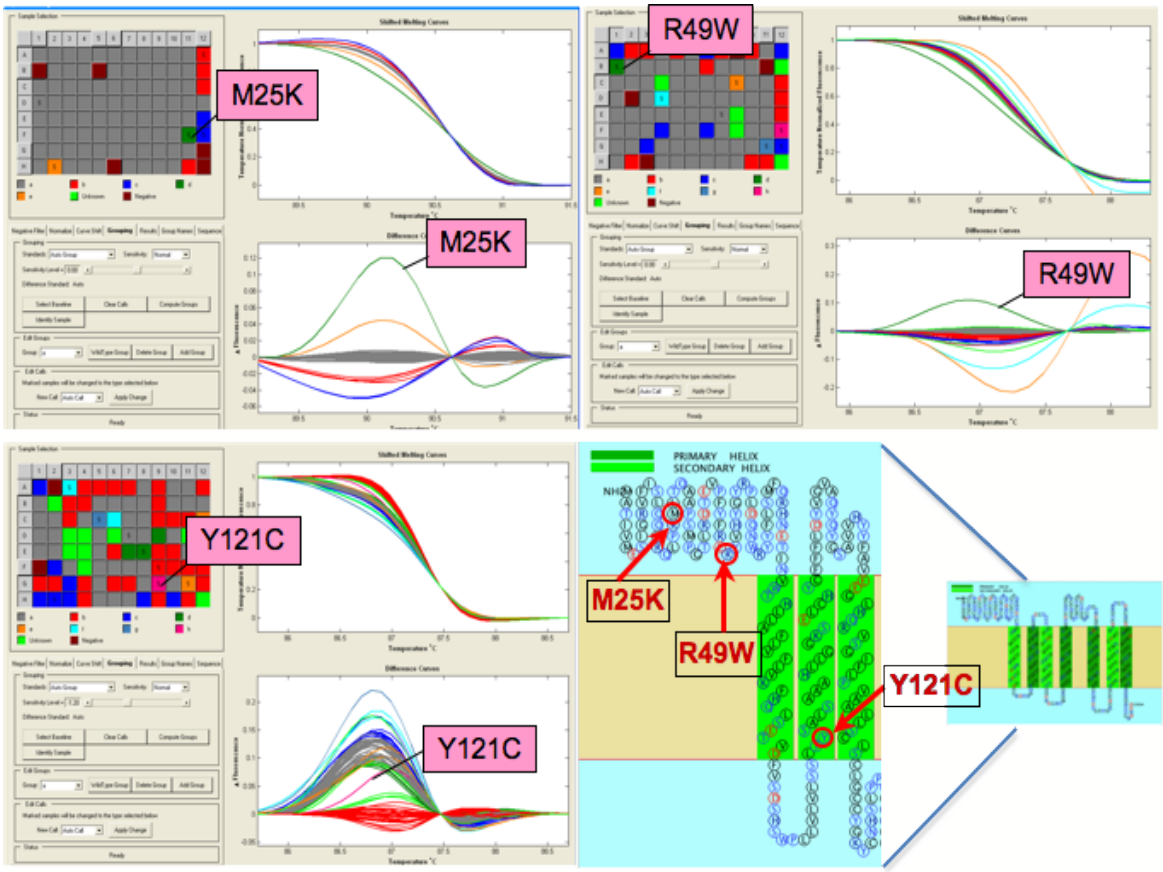

図 8. mPRα-2 の融解温度曲線と置換するアミノ酸の位置

スクリーングにより mPRα−2 において 3 系統 M25K、R49W、Y212C が得られた。ここではプレート内のウエルおよび HRM 解析の曲線を示している。（右下）DNA sequence により mPRα−2 の 3 種類（M25K、R49W、Y212C）の変異部位が明らかになった。

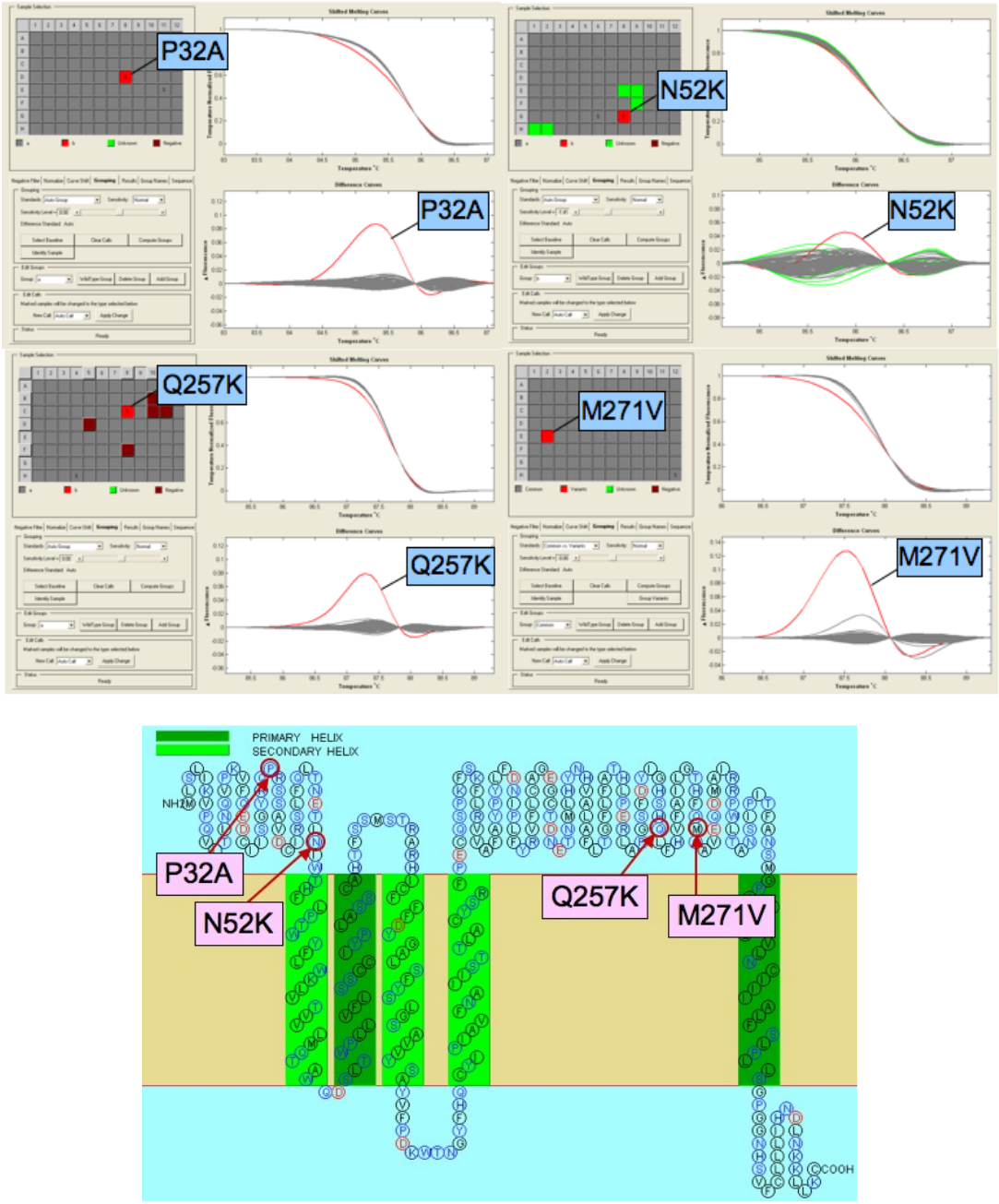

図 9. mPRγの融解温度曲線と置換するアミノ酸の位置

（上）スクリーングにより mPRγにおいて 4 系統 P32A、N52K、Q257K および M271V が得られた。ここではプレート内のウエルおよび HRM 解析の曲線を示している。(下) DNA sequence により mPRγの 4 種類（P32A、N52K、Q257K、M271V）の変異部位が明らかになった。

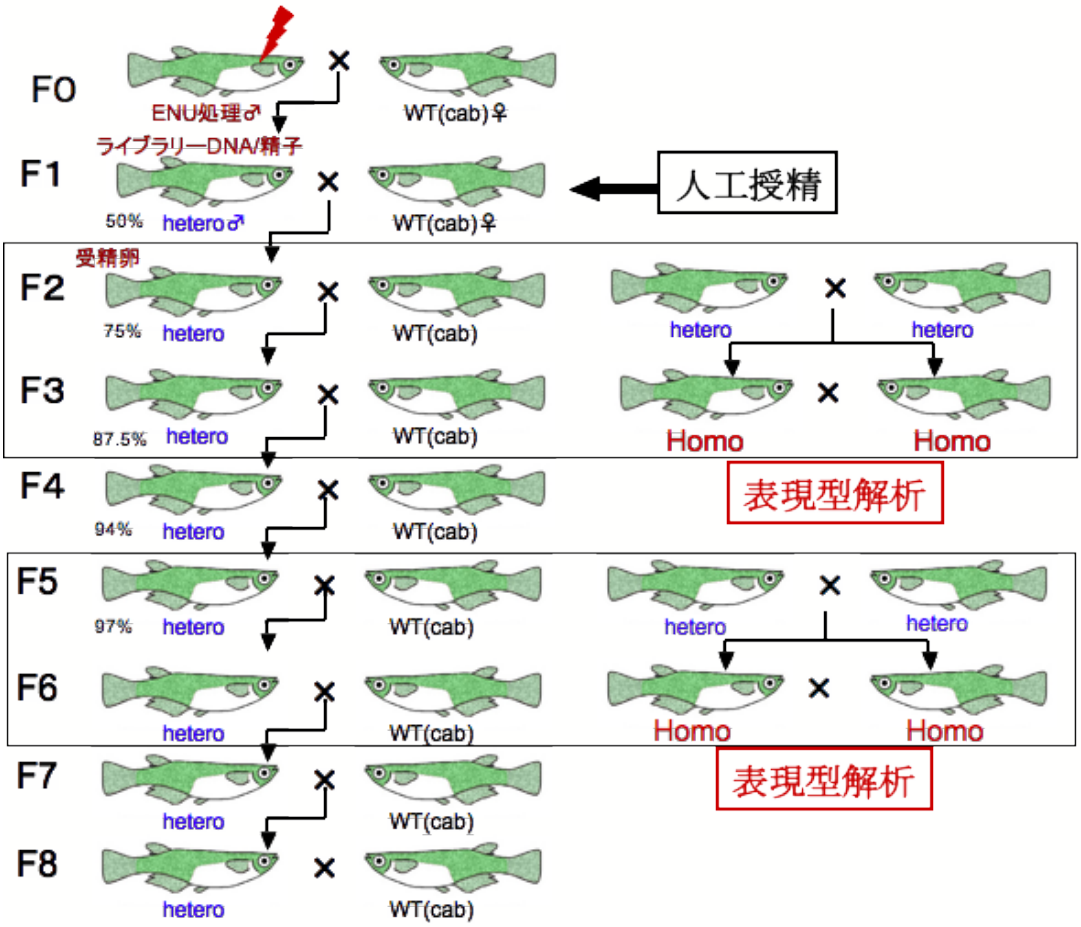

図 10：予定されている変異メダカ系統樹立法

私は、人工授精された F2 世代の受精卵の飼育から mPR 遺伝子変異メダカの系統樹立を進めた。F5 世代まで野生型との交配を行い、最終的に F5 世代以上の変異 ヘテロ同士の交配をし、F6 世代の ホモ遺伝子変異メダカの表現型を解析する方法である。一方、F2 変異メダカ同士の交配による mPR の F3 ホモ遺伝子変異メダカの予備的な表現型解析も予定された。

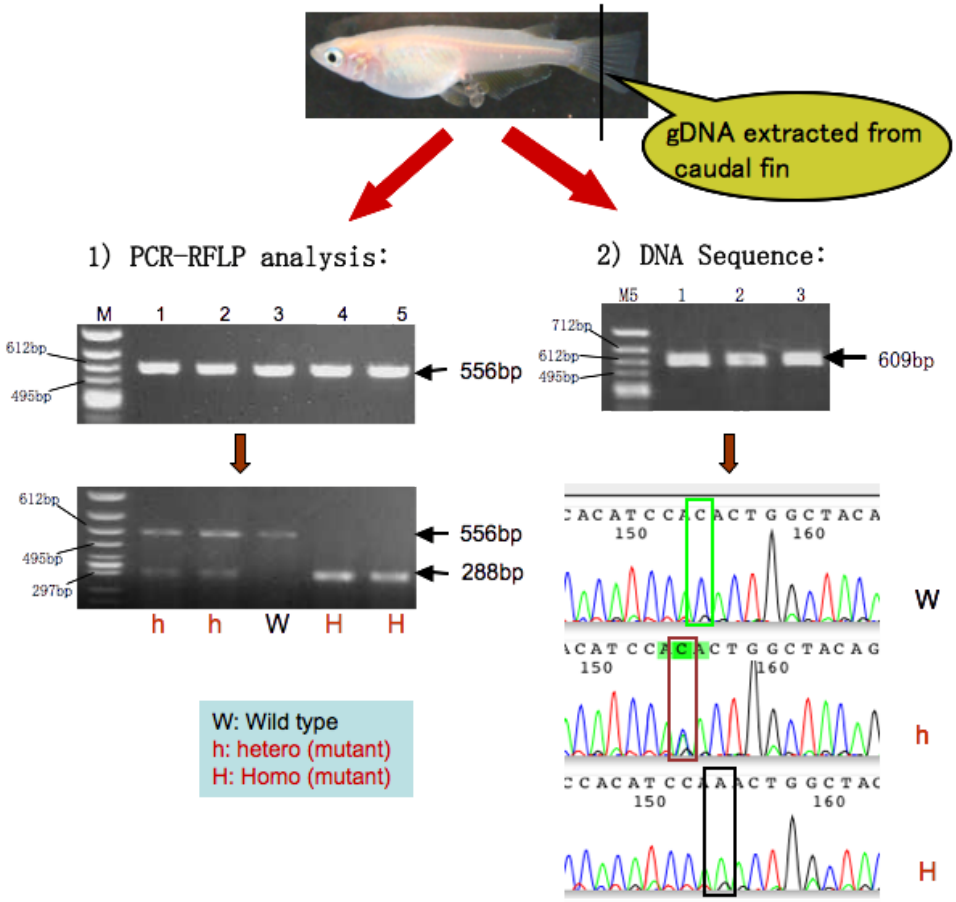

図 11. 遺伝子型判定法

この図は遺伝子型判定法を示す。Finclip 法により尾ヒレから gDNA を抽出し、PCR-RFLP 法および DNA シークエンス法を用いて遺伝子型判定を行った。W; Wild, h; hetero (mutant), H; Homo (mutant)

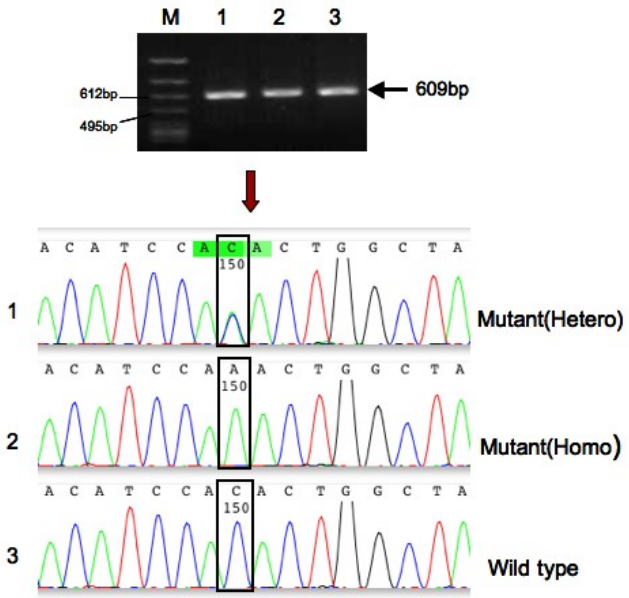

図 12. mPRαH52E 系統の遺伝子型判定結果

（上）KOD Neo ポリメラーゼを用いた PCR 増幅により mPRαH52E 系統の目的断片（609bp）が確認された。M5； marker 5、1-3； 個体番号

（下）DNA シークエンスにより mPRαH52E 系統の遺伝子型判定結果。個体番号（左）、判定結果（右）、□；変異部位。

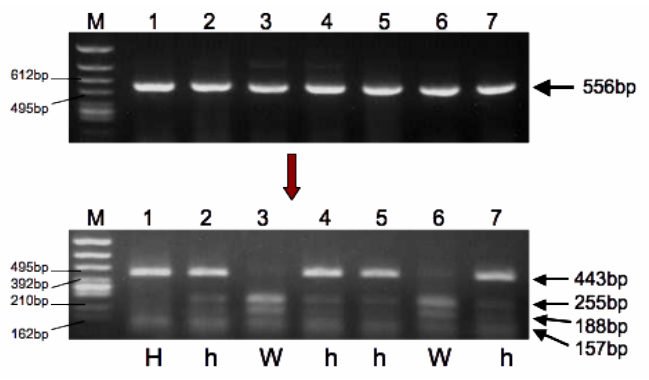

図 13. mPRαH265R 系統の遺伝子型判定結果

mPRα H265R 系統の Ex-Taq を用いた PCR 増幅結果（上）と制限酵素処理結果(下)。 M5； Marker 5、 W； Wild type、 h ; mutant hetero、 H; mutant Homo、 1-7； 個体番号

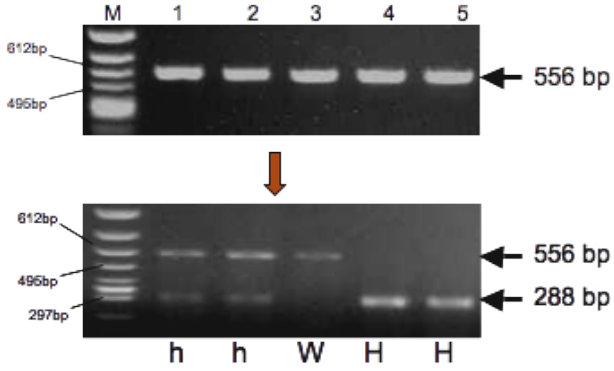

図 14. mPRαL269X 系統の遺伝子型判定結果

mPRα L269X 系統の Ex-Taq を用いた PCR 増幅結果（上）と制限酵素処理結果(下)。M5: Marker 5, W: Wild type、 h: mutant hetero、 H; mutant Homo、 1-5; 個体番号

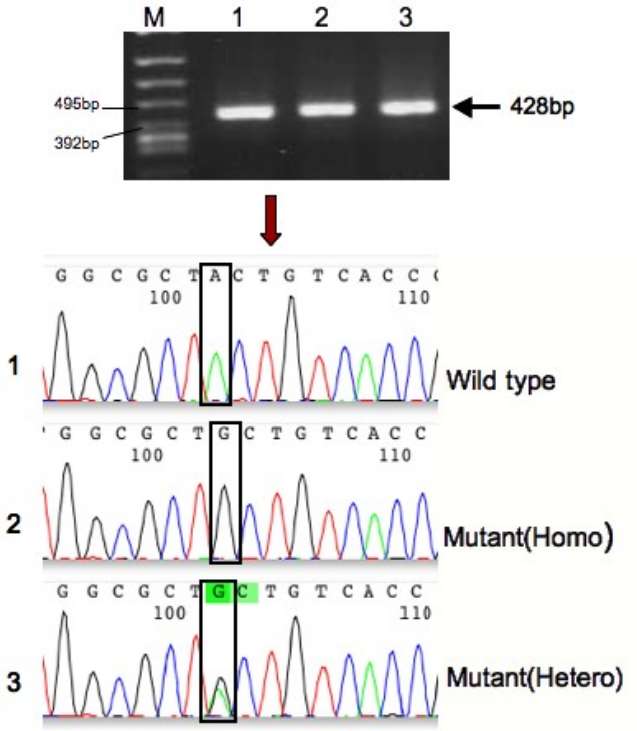

図 15. mPRβT39A 系統の遺伝子型判定結果

（上）KOD Neo ポリメラーゼを用いた PCR 増幅により mPRβT39A 系統の目的断片（428bp）が確認された。M5； marker 5、1-3； 個体番号

（下）DNA シークエンスにより mPRβT39A 系統の遺伝子型判定結果。個体番号（左）、判定結果（右）、▯；変異部位。

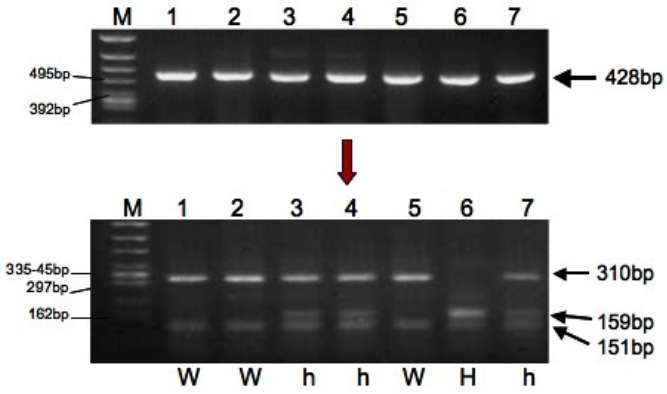

図 16. mPRβV45A 系統の遺伝子型判定結果

mPRβ V45A 系統の Ex-Taq を用いた PCR 増幅結果（上）と制限酵素処理結果（下）。M5; Marker 5、 W; Wild type、 h; hetero、 1-7; 個体番号

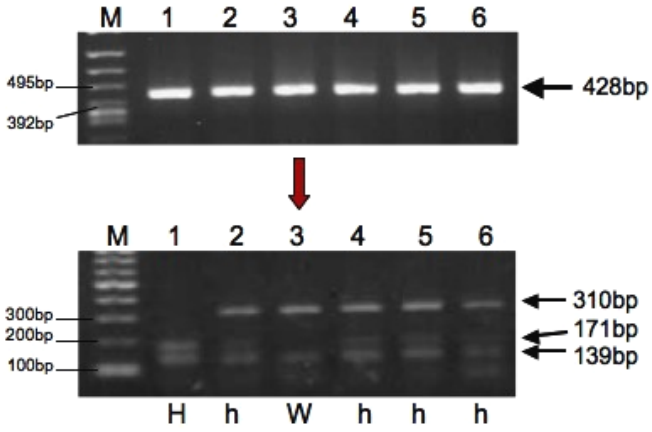

図 17. mPRβE51G 系統の遺伝子型判定結果

mPRβ E51G 系統の Ex-Taq を用いた PCR 増幅結果（上）と制限酵素処理結果（下）。M5; Marker 5、 W; Wild type、 h; hetero、 1-6; 個体番号

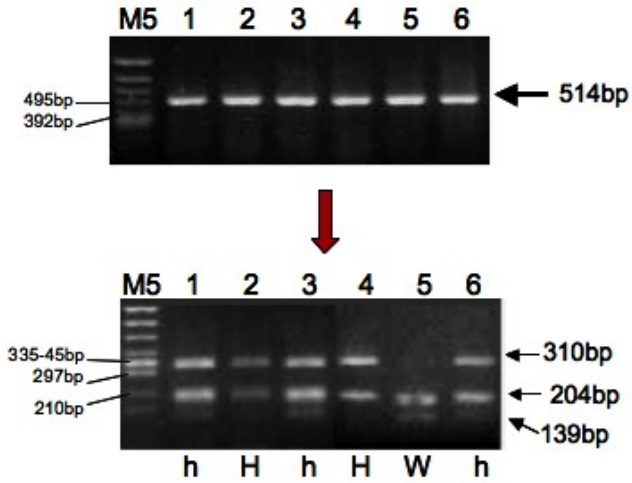

図 18. mPRβH282R 系統の遺伝子型判定結果

mPRβ H282R 系統の Ex-Taq を用いた PCR 増幅結果 （上） と制限酵素処理結果（下)。M5; Marker 5、 W; Wild type、 h; hetero、 H; mutant Homo 1-6; 個体番号

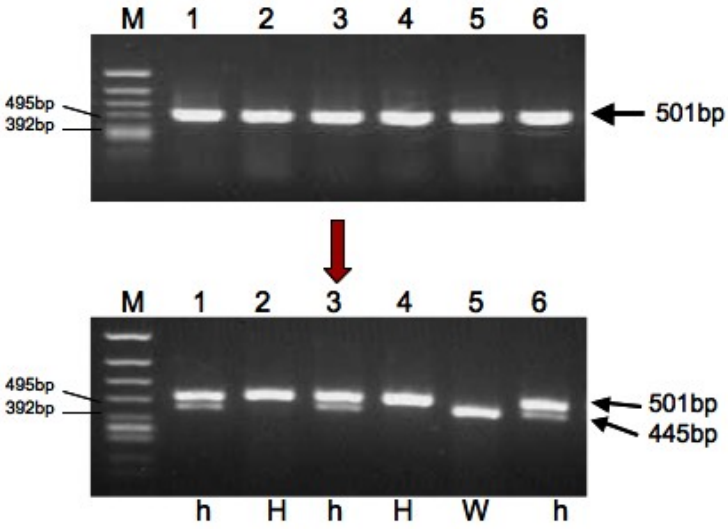

図 19. mPRα-2 M25K 系統の遺伝子型判定結果

Ex-Taq を用いた mPRα-2 M25K 系統の PCR 増幅結果 （上） と制限酵素処理結果（下)。M5; Marker 5、 W; Wild type、 h; mutant hetero、H; mutant Homo、 1-6; 個体番号

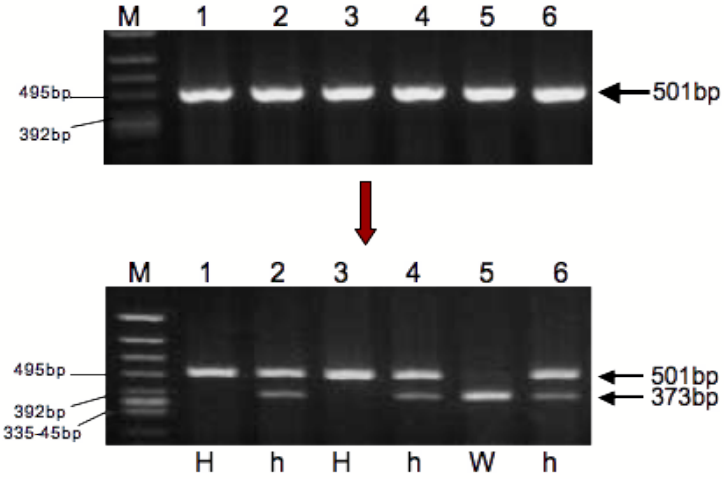

図 20. mPRα-2 R49W 系統の遺伝子型判定結果

Ex-Taq を用いた mPRα-2 R49W 系統の PCR 増幅結果 （上） と制限酵素処理結果（下)。 M5; Marker 5、 W; Wild type、 h; mutant hetero、H; mutant Homo、 1-6; 個体番号

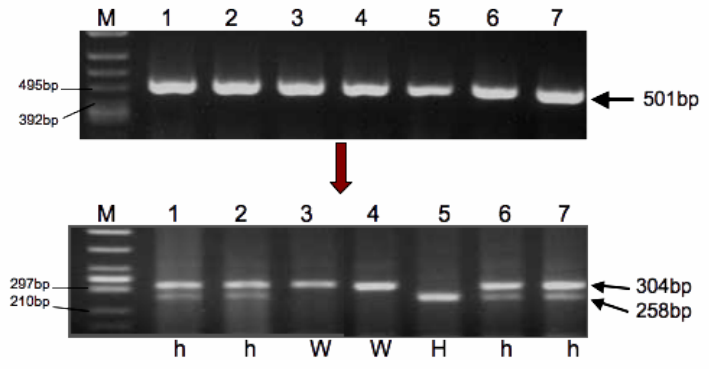

図 21. mPRα-2 Y121C 系統の遺伝子型判定結果

Ex-Taq を用いた mPRα-2 Y121C 系統の PCR 増幅結果 （上） と制限酵素処理結果（下)。M5; Marker 5、 W; Wild type、 h; mutant hetero、H; mutant Homo、1-7; 個体番号

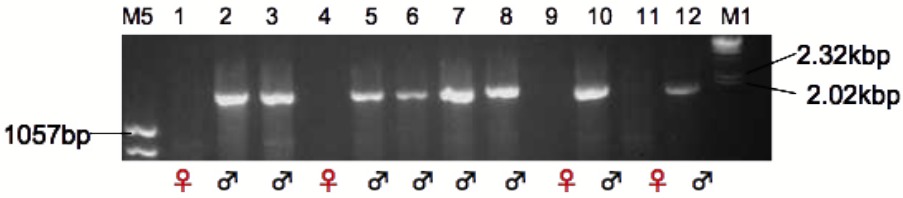

図 22： 性別の判別法

メダカの性決定遺伝子である DMY 遺伝子の PCR 増幅によりオスとメスの判定ができる。DMY 遺伝子は Y Chromosome （♂）に存在するので、雌（♀）でバンドが出ない。この結果によると 1, 4, 9, 11 がメスで、その他がオスである。M5； Marker 5、 M1； Marker 1、 1-12；個体番号、 ♀； メス、 ♂； オス。

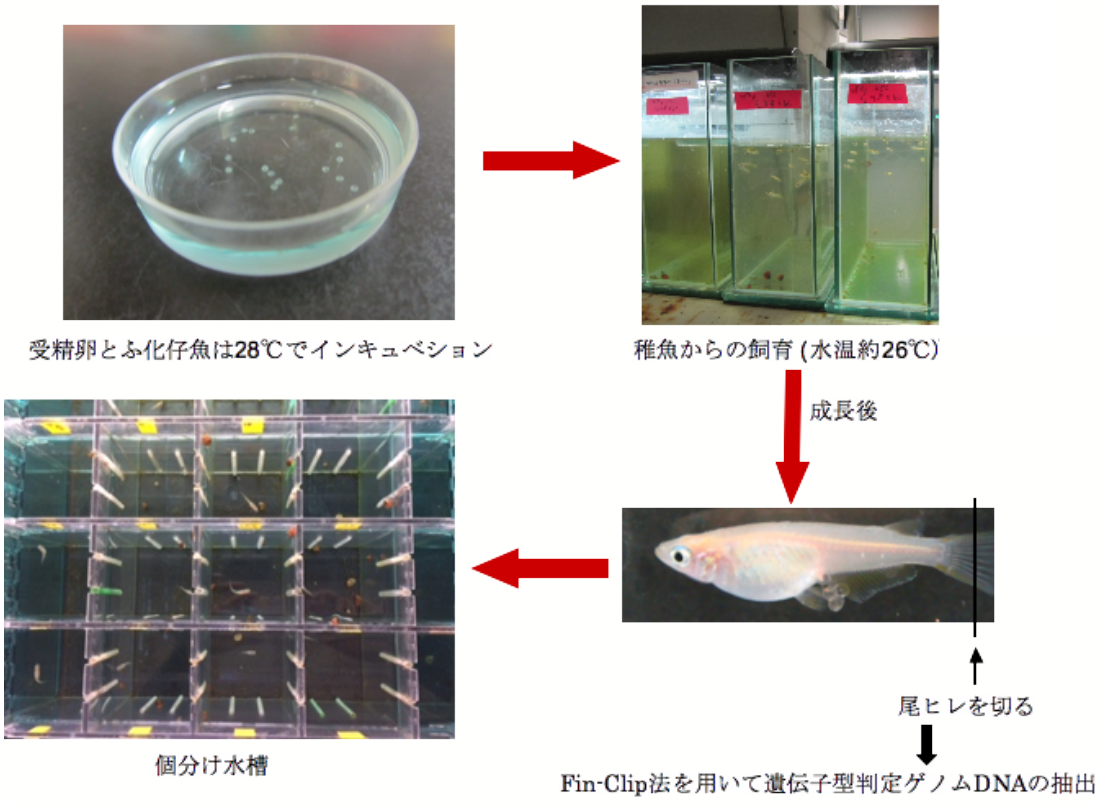

図 23. メダカの飼育法

これはメダカの受精卵から成長するまでの飼育および尾ヒレを切り取った後の個分け水槽での管理を示す。

ペア	受精卵	稚魚 (%)
Cab ♂ × Cab ♀ (Control)	61	56 (92%)
α H52E F_3 H 3♀ × α H52E F_3 H 6♂	62	52 (84%)
α H265R F_6 H 4♂ × α H265R F_6 H 10♀	49	35 (71%)
α L269X F_6 H 1♂ × α L269X F_6 H 2♀	47	32 (68%)
β T39A F_3 H 2♀ × β T39A F_3 H 8♂	50	38 (76%)
β V45A F_3 H 6♀ × β V45A F_3 H 18♂	66	49 (74%)
β HE51G F_3 H 6♀ × β HE51G F_3 H 9♂	76	46 (61%)
α-2 R49W F_3 2♀ × α-2 R49W F_3 4♂	52	48 (92%)
α-2 Y121C F_3 H 10♀ × Cab♂	50	41 (82%)

H: Homo

図 24. 各系統の表現型解析結果

これは産卵および授精卵の発生率に関わる表現型解析の結果を示す。各系統のペア、受精卵の数および稚魚の数と率（%）をまとめた。

Subtype	Number	Strain	Method	Generation
mPRα	1	H52E (0017)	DNA sequence	F_6
	2	H265R (4138)	PCR-RFLP	F_8
	3	L269X (4959)	PCR-RFLP	F_8
mPRβ	4	T39A (5392)	DNA sequence	F_5
	5	V45A (1950)	PCR-RFLP	F_5
	6	E51G (1622)	PCR-RFLP	F_6
	7	H282R (1437)	PCR-RFLP	F_5
mPRα-2	8	M25K (0167)	PCR-RFLP	F_5
	9	R49W (1741)	PCR-RFLP	F_5
	10	Y121C (3729)	PCR-RFLP	F_5

図 25. 系統樹立のまとめ

これは私が進めた mPR 遺伝子群変異メダカの系統樹立のまとめである。サブタイプ名、系統数、系統名、遺伝子型判定法および続けた世代数を表している。

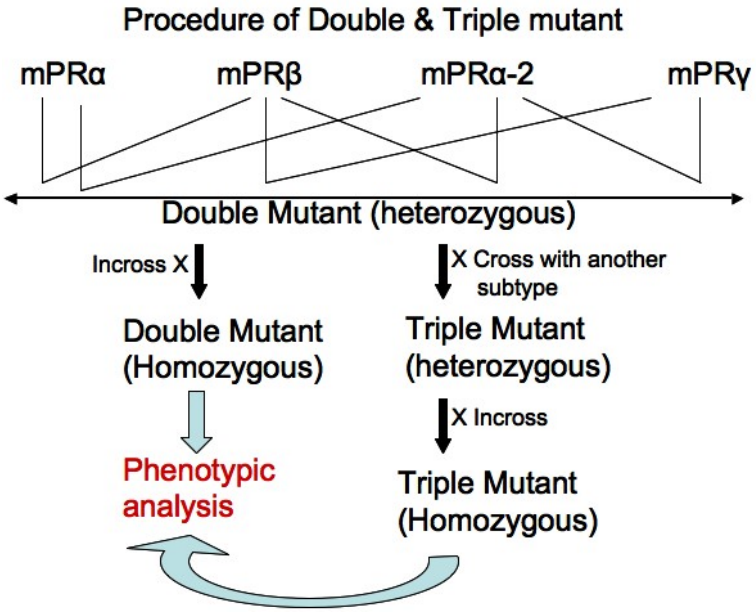

図 26. 2 重 3 重 mPR 変異メダカの作製法

まず、mPR サブタイプ同士のホモあるいはヘテロ変異メダカとの交配をし、2 重ヘテロ変異メダカが得られた。その後、2 重ヘテロ変異同士の交配によって得られた 2 重変異メダカの表現型解析を行なった。また、2 重変異メダカと別のサブタイプとの交配することによって 3 重変異メダカのヘテロまで樹立した。

ペア	受精卵	稚魚 (%)
Cab ♀× Cab ♂ (Control)	57	49 (86%)
D αH52E H - β T39A H 6♂ × Cab ♀	51	37 (73%)
D αH265R H - β V45A H 7♂× D αH265R H - β V45A H 18♀	82	73 (89%)
D αL269X H - β E51G H 10♀× D αL269X H - β E51G H 33♂	48	30 (63%)
D αL269X H - α–2 Y121C H 19♀× D αL269X H - α–2 Y121C H 29♂	29	27 (93%)

図 27. 2 重変異メダカの表現型解析結果

mPRα、βおよびα-2 変異メダカ系統において 2 重変異体の表現型解析結果を示す。2 重変異体のペア、受精卵の数および稚魚の数と率（%）をまとめた。D; double mutant, H; Homo (mutant)

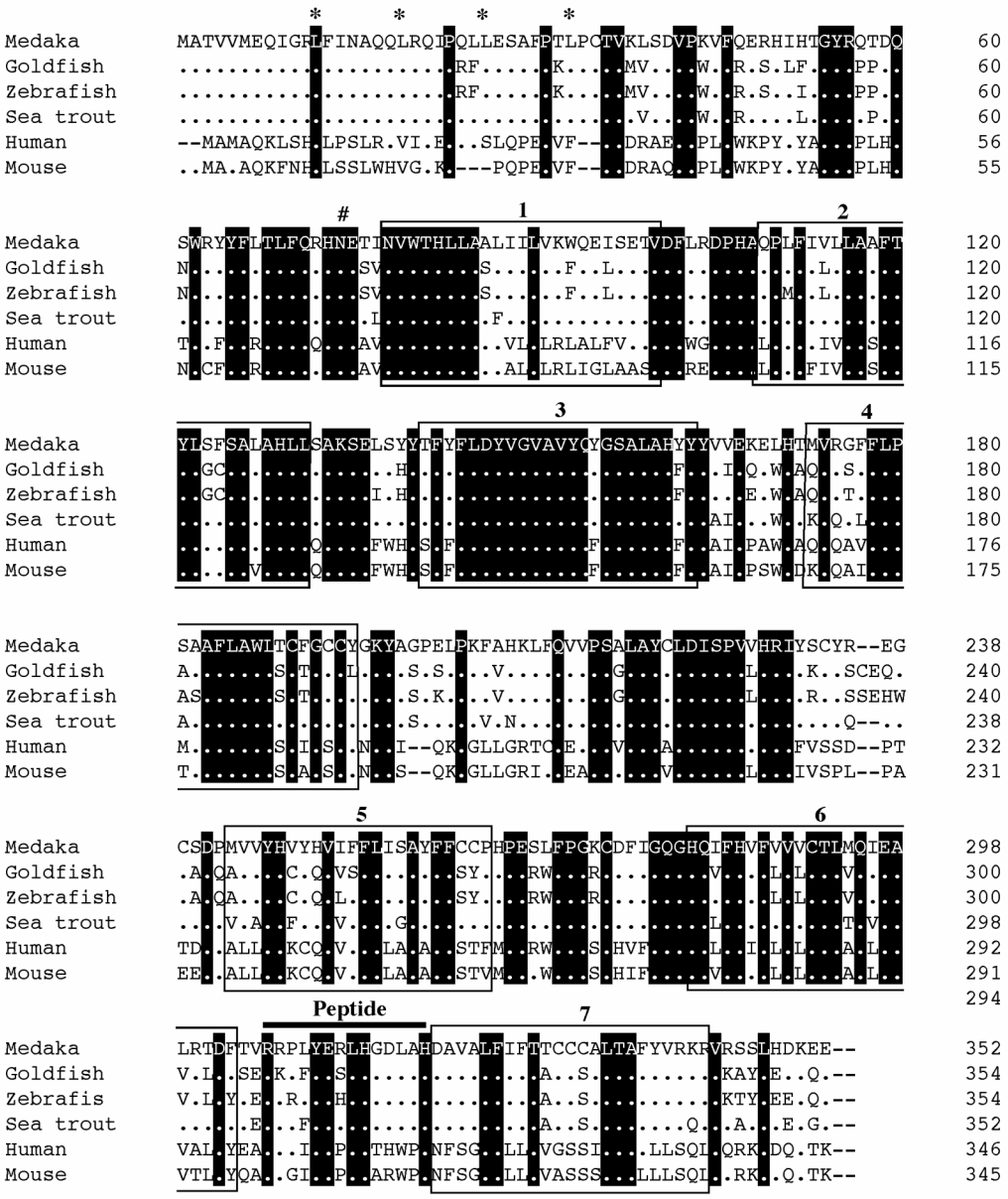

図 28. メダカ mPRα推定アミノ酸配列の他種とのアライメント

メダカ mPRαをコードする cDNA のデータベースでの解析が行われた。左; 動物の名前、 右; アミノ酸番号、 黒い部分; アミノ酸の同一性、 □; 7 回膜貫通ドメインとその上に 7 回膜貫通番号、*; ロイシン ジッパー パターン、#; N-glycosylation site、 Peptide ; 抗−メダカ mPRαポリクローナル抗体の抗原配列

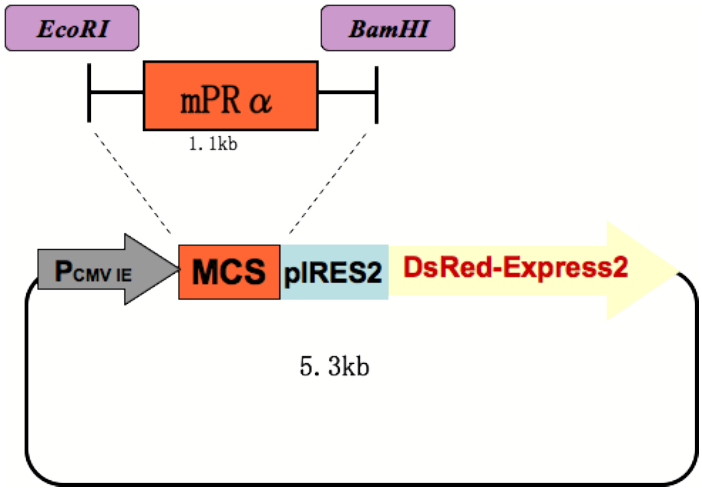

図 29. メダカ mPR α 遺伝子導入用の pIRES2-DsRed-Express2 ベクター

培養細胞へのmPR α 遺伝子導入用に作製したpIRES2-DsRed-Express2のコンストラクトを膜式的に示した。IRES 配列の前後に存在する遺伝子はCMVプロモーター により同様に、しかも独立に転写される。このことからDsRedを遺伝子導入のレポーターとして利用でき、しかも従来のような融合遺伝子ではなく、目的遺伝子であるmPR α を単独で合成させることが可能となっている。

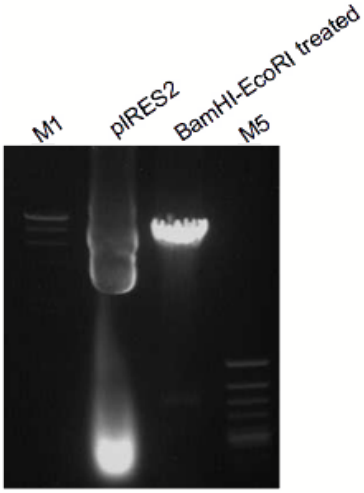

図 30. 形質転換された pIRES2-DsRed-Express2 (pIRES2)

pIRES2 ベクターの大腸菌への形質転換を行い、ベクターの大量調製を行った。調製したベクターを BamHI および EcoRI 制限酵素で切断し、1% agarose ゲルを用いた電気泳動により DNA の長さを確認した。

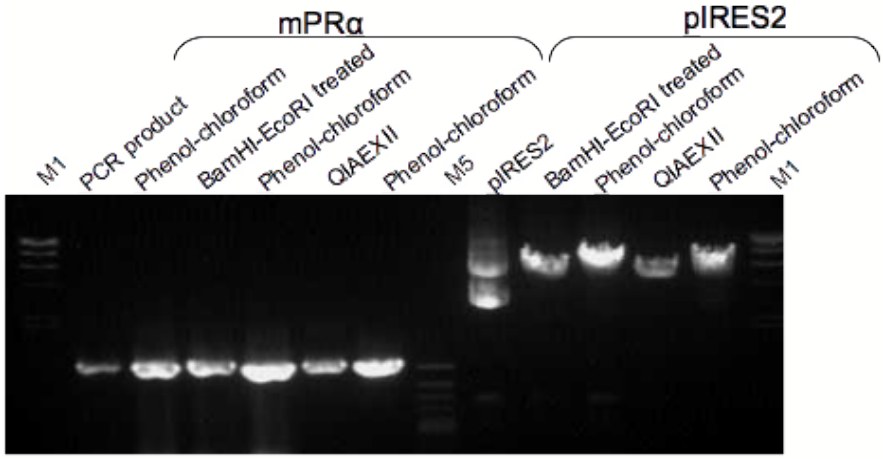

図 31. mPRαおよび pIRES2 ベクターの精製

これは pIRES2 ベクターおよび mPRα DNA の精製結果を示す。大量に得られた mPRαの PCR 産物とベクターを BamH I と EcoR I 制限酵素処理により切断し、Phenol-chloroform-Isoamylalchohol と Gel Extraction Kit、QIAEXⅡ（QIAGEN）を用いて精製した。

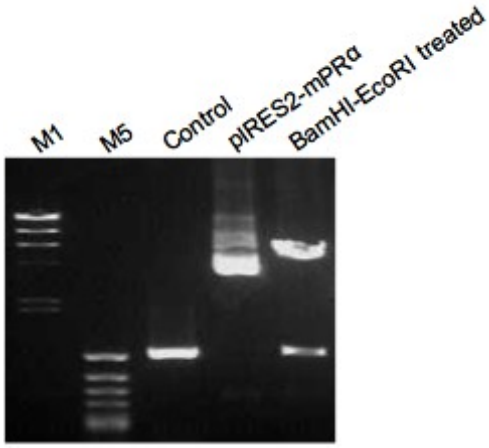

図 32. 形質転換された pIRES2-mPRα

これは形質転換した大腸菌から抽出した pIRES2-mPRαベクターを精製し、制限酵素、BamH I および EcoR I で処理した結果を示す。

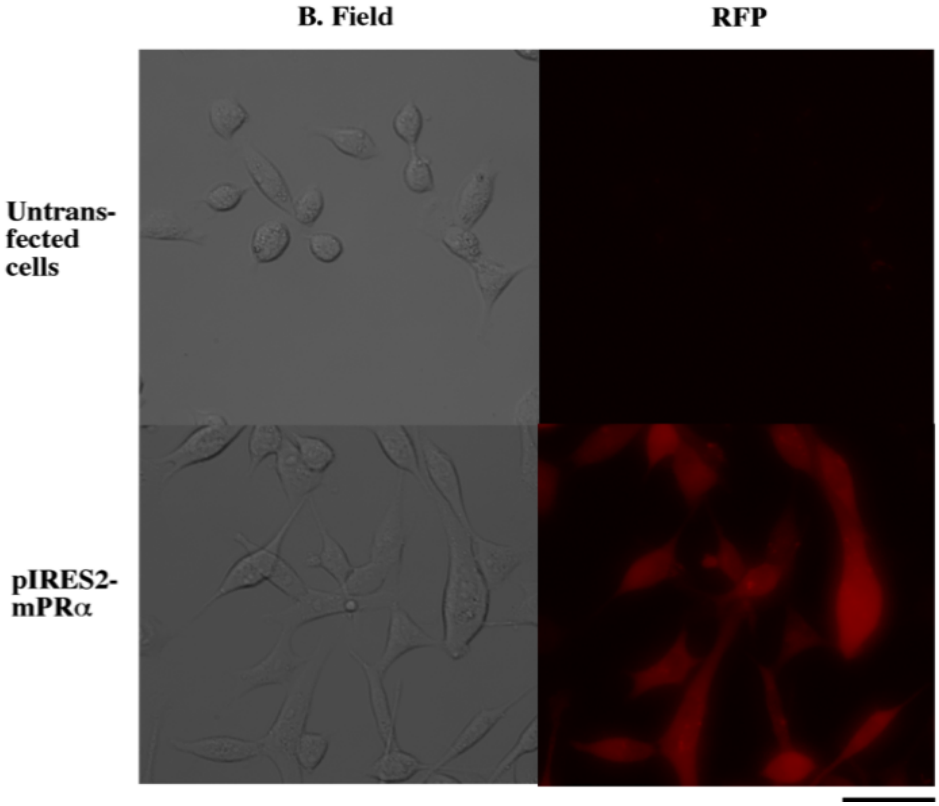

図33. 組換えpIRES2-mPRαベクターを導入したMDA-MB-231細胞の蛍光観察結果

遺伝子導入後、G418による導入細胞の選択を進めた後、限界希釈法による細胞のクローニングを行った。クローン化された細胞を蛍光顕微鏡で観察した。写真は明視野（B. Field）および Texas red filter (RFP: Red fluorescent protein）で蛍光撮影した。遺伝子導入していないヒト乳ガン由来MDA-MB-231細胞（Untransfected Cells）およびメダカ組替えmPRα細胞（pIRES2-mPRα）を観察した。スケールバーは50μMを示す。

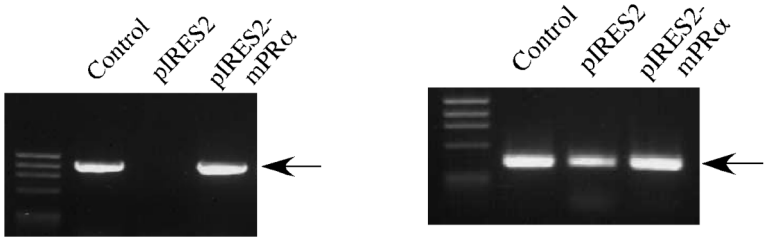

図34. RT-PCRによるmPRα遺伝子導入の確認

ヒト乳ガン由来MDA-MB231細胞へのメダカmPRαの遺伝子導入の結果を示す。（左）空ベクター（pIRES2）およびメダカmPRα組換え細胞から抽出したcDNA（pIRES2-mPRα）のmPRαプライマーを用いたRT-PCRの結果。（右）空ベクター（pIRES2）およびメダカmPRα組換え細胞から抽出したcDNA（pIRES2-mPRα）のDsRedプライマーを用いたRT-PCRの結果。Controlはメダカ mPRα遺伝子発現用のpIRES2-DsRed-Express2ベクターを用いた。

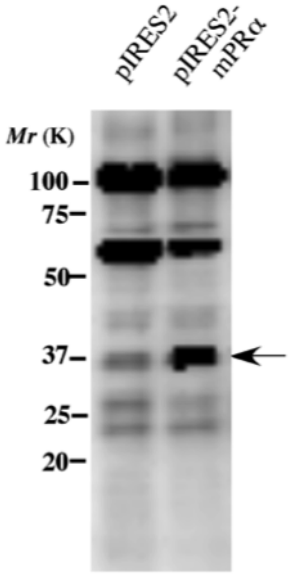

図35. mPRα発現のウエスタンブロット解析

メダカ pIRES2 および mPRα が発現されている細胞（pIRES2-mPRα）の膜画分において約 40kDa でタンパク質が検出された。

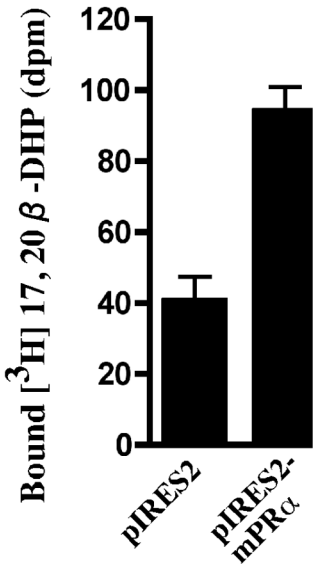

図36. mPRα発現細胞膜画分の[3H]-17,20β-DHP結合活性

空くベクター（pIRES2）および mPRα（pIRES2-mPRα）発現細胞から得られた膜画分の[3H] -17,20β-DHP に対する結合活性を測定した。

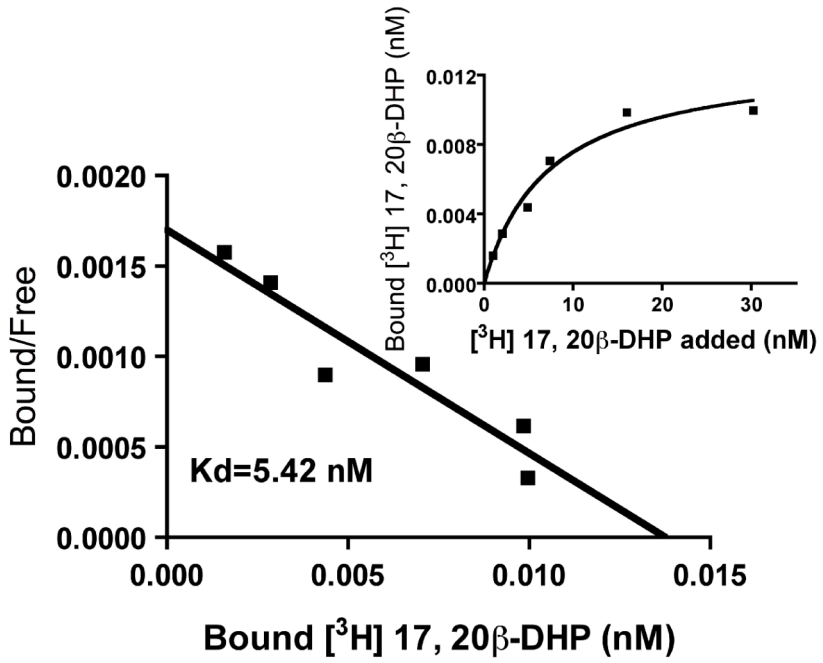

図37. mPRα発現細胞膜画分への[3H]-17,20β-DHP結合の飽和曲線とスキャッ チャードプロット

mPRα発現細胞の膜画分を用いたステロイド結合実験の飽和曲線およびスキャッチャードプロット解析から解離定数（Kd = 5.42 nM）と最大結合能（Bmax = 0.02 nM）を求めた。0.5 - 32nM の[3H]-17,20β-DHP (specific activity, 40 Ci/ mmol）を膜画分の試験管に加え、卵成熟誘起ホルモンである 17,20β-DHP を有り（nonspecific）と無し（total）で結合親和性を調べた。

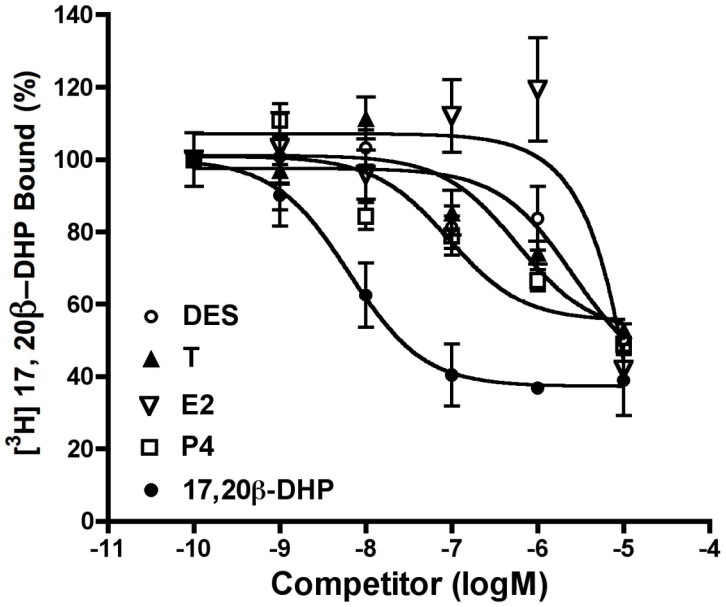

図 38. ステロイド ホルモンおよび DES による競合阻害実験

mPRα膜画分に 2nM [3H]-17,20β-DHP および 1nM~10μM の 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) をそれぞれ加え競合阻害による[3H]-17,20β-DHP 結合量の低下を測定した。ステロイド ホルモンおよび DES の競合曲線は 17,20β-DHP の最大結合を 100%とした相対値により示した。

	mPRα	
Compound	IC_{50} nM	RBA
17,20β-DHP	6.4	100.0
Progesterone	92.3	6.9
Testosterone	584.1	1.1
Estradiol-17β	ND	ND
DES	2626.0	0.2

図 39. mPRαに対するステロイドホルモンと DES の競合結合

これは膜画分の mPRαに対するステロイドホルモンと DES の競合結合順位を示す。IC_{50} は DHP 結合の 50%を置換した競合結合濃度と相対的競合結合親和性（RBA: relative binding affinity）は 17, 20β-DHP の割合（%）である。 ND; not determined, displacement < 50% at 10^{-5} M

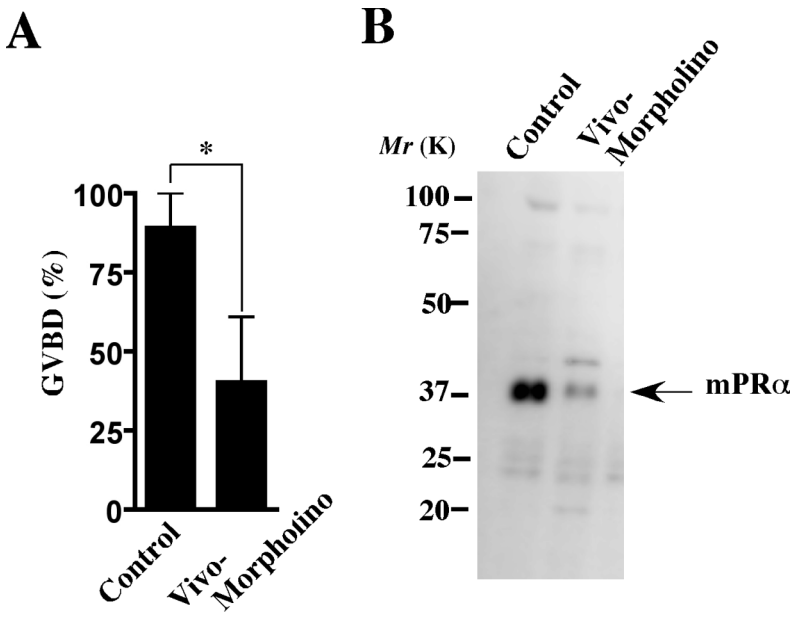

図 40.　メダカ mPR α Vivo-Morpholino の注射による卵成熟阻害の割合
およびウエスタンブロット解析

A. メダカの腹腔に mPR α Vivo-Morpholino antisense oligonucleotide (Vivo-Morpholino) および Standard control (Control) を注入して *in vivo* で卵成熟 (Germinal vesicle break down: GVBD) への影響を調べた (mean ± SD、 n = 5; *, P < 0.05)。

B. ウエスタンブロット解析を行い、mPR α Vivo-Morpholino antisense oligonucleotide (Vivo-Morpholino) および Standard control (Control) のタンパク質発現を調べた。

Primer list

For screening		
Gene	Primer name	Sequence
mPRα	mPR1aF	TTACTATGCAGTCGCAAGTTT
	mPR1aR	GCAACCAAAGCAGGTAAG
	mPR1bF	GCCTTCTGCAGCATTTC
	mPR1bR	AAACCGTCACTATAAGGTCAA
mPRβ	MbN-3F	GAAGGGATGCTGACTGA
	MbN-2R	AGCAAGTGAGTCCATAC
	mPR2bF	GCTCTTTCTTCCTGGAGC
	mPR2bR	ACATTTGCATAATAATAAACAATTAAATCA
mPRα-2	ga2F	CTGGGCGTGTCCGTTGCTTC
	ga2R	GGAAGGCCAGCAGGTGGGTCC
	gb2F	GGGTCTGCACCAACGGGTGA
	gb2R	GCCGCTGGTACAACTCCCGA
mPRγ	exon3F2	AACAAGTTTGTCACACTCG
	exon3R1	CGAGGTTAAGATAATCAAATTACCTAAATA
	exon8F2	GTGGCTCGACTACTCCC
	exon8R1	GGCTTGGGTCTTTCTAGG

For genotyping			
Gene	Mutant	Primer name	Sequence
mPRα	H52E	1aF	TTACTATGCAGTCGCAAGTTT
		1aR	GCAACCAAAGCAGGTAAG
	H265R, L269X	1bF	GCCTTCTGCAGCATTTC
		1bR	AAACCGTCACTATAAGGTCAA
mPRβ	T39A, V45A, E51G	beta F	TGTTAGGTGCAGCAGAAGGG
		beta R	ACACATCAGAGCCGACATGG
	H282R	1437F	ACACATCAGAGCCGACATGG
		1437R	TGCTGTCAGGAAGCAACACA
mPRα-2	M25K, R49W, Y121C	alpha-2F	TGTTGATCGGAGTCTGCTGG
		alpha-2R	TTGGTGCAGACCCTCCTCTA

For recombinant mPRα		
Gene	Primer name	Sequence
mPRα	EcoR1 F	CGGAATTCATGGCAACGGTTGTGATGGA
	BamH1 R	GCGGATCCTCACTCCTCTTTGTCGTGGAGT
pIRES2	DsRed F	GGCTCCAAGGTGTACGTGAA
	DsRed R	GGTGTAGTCCTCGTTGTGGG

謝辞

研究をはじめ様々な面でご協力をいただいた私の指導教員である静岡大学大学院の徳元俊伸教授に心より感謝いたします。本研究テーマと素晴らしい研究環境を与えて下さり、大学院生から 5 年間にわたり研究に際して熱心にご指導賜りまし た。私が本研究テーマに興味を抱くきっかけを与えていただいき、心より感謝を申し上げます。研究室における生活環境など、徳元研究室の全てのメンバーのご協力にお礼申し上げます。この研究を共同で進めていただいた徳元研究室の皆さんのご協力に心より感謝いたします。この研究は基礎生物学研究所のバイオリソース研究室との共同研究で、バイオリソース研究室のみなさんに感謝致します。また、グリーン科学技術研究所の研究支援室には DNA シークエンスの受託解析を依頼していただき、感謝いたします。創造科学技術大学院の先生方、学生および職員の皆様にお礼申し上げます。最後に私の生活を支え、研究活動に専念させてくれた家族に深く感謝します。