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

魚類プロゲスチン膜受容体(mPR)の遺伝子変異系統の作出と脳における発現解析および透明キンギョ系統の作出

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2017-12-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 王, 軍 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/10502

（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：王　軍

論文題目：魚類プロゲスチン膜受容体（mPR)の遺伝子変異系統の作出と脳における発現解析および透明キンギョ系統の作出

論文要旨：

一般にステロイドホルモンは核受容体を介して作用するものと考えられてきた。しかし、卵成熟誘起において、ステロイドホルモンは核受容体ではなく細胞膜表面のステロイド膜受容体を介して、遺伝子発現を必要としないノンゲノミック反応による作用することが示されてきた。20 年以上に及ぶ探索の結果、ステロイド膜受容体の候補として membrane progestin receptor (mPR) が報告された。mPR は G タンパク質との共役など、それまで予想されていた卵成熟誘導ホルモン受容体の性質を説明できるものであった。さらにモルフォリノアンチセンスノックダウン実験により、卵成熟誘起ホルモンの受容体であることが示された。この分子の発見により他の系でも示唆されていたステロイドの急性反応の信憑性が高まった。mPR は卵だけではなく、そのサブタイプを含めると脳や腎臓を始め、あらゆる組織に発現することが明らかになり、卵巣以外の組織でも機能していることが示唆された。また、内分泌かく乱物質の標的となることも報告された。しかし、遺伝子ノックアウト動物を用いた *in vivo* での機能証明はなされていないこと、核受容体が細胞膜にも存在し、ノンゲノミック反応を介在し得るとの報告もあることからステロイド膜受容体の生理機能については依然として世界的な議論になっている。本研究では小型魚類のメダカを用いて、mPR の遺伝子変異系統の樹立により、mPR 分子の生理機能について決定的証拠を示すことを目的とする。これまでノックアウトメダカ作製系によりメダカゲノム中に存在する 4 種類の mPR (α, α-2, β, γ) の遺伝子変異メダカ系統、14 系統を樹立した。その結果、それぞれ 1 遺伝子の変異では特に異常は見られず、mPR 遺伝子間で遺伝子機能に冗長性が見られることが明らかになった。また、これまでの変異系統は全て点突然変異であり、表現型を示す程の mPR タンパク質の変化を起こすものではなかった可能性もある。そこで、それぞれの掛け合わせによる 2 重、3 重変異体の系統樹立を進められたが、いずれも変異が見つかれなかった。さらに、4 重変異体の系統を作ることに決めた。現在、F1 の 4 重ヘテロ個体により F2 のホモ個体を作られている。4 重変異体により表現型が

観察されることを期待している。

一方、mPR は様々な臓器に存在していることが近年の研究により報告されてきた。ヒトを含み、体の各部位の細胞がステロイドの作用を受け取っている可能性があると考えられた。私たちは卵巣から mPRα を同定されたキンギョを材料として、キンギョ脳の中に mPR の局在とその機能の解析を試みた。キンギョの全体の脳から膜画分し、プロゲスチンとの結合活性を検討した。その結果、全体の脳膜画分は卵巣からの膜画分と相当するようなプロゲスチン結合活性があった。競合阻害結合実験では卵巣膜画分と同様に、全体の脳膜画分は他のステロイド種類と比較することにより相対的な高い親和性であった。プロゲステロン、プロゲステロン由来ニューロンステロイドとアロプレグナノロンには類似的な結合親和性であることが分かった。これらの結果により、プロゲステロンと密接に関連している膜受容体 mPRα は脳の中に発現していることが示された。実際に、mPRα 蛋白質の発現は脳膜画分で検出された。脳における mPRα の分布は免疫組織化学解析により調べた。特異的なシグナルを小脳のプルキンエ細胞と GnRH2 ニューロン細胞に検出された。これらの結果は mPRα が脳におけるプロゲスチンの受容体であることを示唆された。

これまでに、減数分裂-卵成熟誘起ホルモン（MIH）の受容体であるメンブレンプロゲスチン受容体（mPR）が同定され、卵成熟の誘導において mPRs の役割を明らかに解明された。mPR を介して内分泌攪乱物質の影響や作用メカニズムの解明も注目されてきた。金魚の卵細胞を用いて行った *in vitro* 解析では、卵成熟を誘導されるジエチルスチルベストロール（DES）のアゴニスト活性が明らかになった。DES は非ステロイド性物質の一種であり、内分泌撹乱物質として知られて、その効果作用も広範に研究された。世界中に広範でよく使われている農薬の一種であり、強力阻害剤の機能を持つペンタクロロフェノールは MIH と DES によって卵成熟を誘導することも証明された。*in vitro* 卵成熟実験では、卵巣を金魚から取り出すことが必要である。しかし、金魚の体は自然的に不透明であること、それらの卵巣を外側から可視化できないため、実験に一番よいタイミングに使える雌金魚を決めることが難しいであった。従って、我々は透明な金魚を作成することを試みた。

金魚はペット動物として長い歴史の間に様々な変異体を開発された。その中に 1 つの変異体であるミューズは多数の虹色素胞を失ったように見えるが、不透明で白色な体がであった。雌のミューズと ENU 処理した雄の和金の交配により F1 を得られ、F1 のファミリーからより透明なキンギョを選び出して、閉鎖交雑により F2 ファミリーを作られた。同じように、F3 世代まで交配を続いた。F3 の閉鎖交雑により完全に透明な F4 の世代を得られた。生殖器官を魚体の外部から観察できる系統を樹立されが、目がない且つ透明な変異体も得られた。