

魚類卵成熟の研究から発見された新規ステロイド膜受容体

静岡大学理学部生物科学科

徳元 俊伸

はじめに

ステロイドホルモンの一種である $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17, 20\beta$ -DHP) は、魚類の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 [1]。ステロイドホルモンの作用は、受容体として核内受容体が古くから同定され、解析が進められていたため、一般にステロイドホルモンは核内受容体を介して作用するものと考えられてきた。ところが、種々の実験から、卵成熟誘起において、このホルモンは核内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作用すると予想された。そのため25年以上もの間、ステロイド膜受容体の同定に向け多くの努力がはらわれたが、同定には至らなかった。しかし、テキサス大学の Thomas らにより、ついに卵成熟誘起ステロイドの膜受容体候補である mPR 分子が発見された。本稿ではプロゲステンのノンゲノミック反応誘起を介在すると推定される mPR の発見から最近の知見をまとめた。

mPR の発見と卵成熟誘起における役割

プロゲステロンをカエルやサカナの卵母細胞に作用させると数時間で卵核胞の消失が誘導されるが、この反応はアクチノマイシン D で阻害されないことやホルモンの暴露が数分で十分であることなどから、受容体が卵膜上にあることが示唆されていた。さらに卵成熟誘起ホルモンの受容体が卵の細胞膜上にあるということの決定的な証拠として、アガロースビーズにステロイドを共有結合させた不溶性のステロイドホルモンによっても卵成熟が誘導されるという実験結果が、アフリカツメガエルで最初に示された [2, 3]。そして、この結果は、ステロイドを顕微注入しても成熟を誘起しないという結果により支持された。その後、卵母細胞を体外に取り出して減数分裂誘導実験が可能であるという利点を生かして、両生類、魚類、無脊椎動物など各種動物の卵を用いた試験管内実験により、卵成熟誘起ホルモン刺激により開始される卵細胞内シグナル伝達経路が推定された。それは、卵成熟誘起ホルモンが卵細胞膜上の抑制性 G タンパク質を介在する受容体に作用し、卵細胞内の cAMP 濃度

を下げ、mRNA の合成を介さないノンゲノミック反応により卵成熟促進因子 (MPF) の活性化をもたらすというシグナル伝達経路である [4] (図1)。卵膜上の受容体の分子実体については、ヒトデにおいて、卵細胞膜上に卵成熟誘起ホルモン結合活性が存在することが生化学的に示された [5]。その後、同様の結合活性は魚類、両生類においても検出され、細胞膜上の新規受容体を分離精製しようという試みが長年にわたって続けられてきた。多くの試みが失敗に終わったことから、ステロイド膜受容体の存在が疑問視される結果にもなった。

しかし、ついにその難問に解答を与える候補分子が突き止められた [6]。部分精製した膜画分に対して作製されたモノクローナル抗体群から卵成熟誘起ホルモンのステロイド結合を阻害するものを選別するという方法により、候補分子を認識する抗体が分離され、その抗体を用いたイムノスクリーニング法による遺伝子クローニングの結果、受容体候補遺伝子が同定された。候補遺伝子の推定アミノ酸配列や遺伝子を用いたその後の解析から、この遺伝子がこれまでの実験から推定されてきた卵成熟誘起ホルモン受容体の性質をすべて兼ね備えていた。すなわち、細胞膜上に存在する G タンパク質共役型受容体の典型的な構造である 7 回膜貫通型の構造をとり、培養細胞や大腸菌で発現したりコンビナントタンパク質は、プロゲステンに対してホルモン受容体の結合特性を示した。さらに、この遺伝子のモルフォリノアンチセンスオリゴによるノックダウン実験により、卵成熟が阻害されるという決定的な証拠も得られた。これらの事実、この分子が卵成熟研究者の追い求めてきた卵成熟誘起ホルモン受容体そのものであることを強く指示する衝撃的な報告であった。この分子は細胞膜上のプロゲステン受容体 membrane progestin receptor (mPR) と名付けられた。mPR の最初の分子は発見者である Thomas らの研究グループで、長年卵成熟の研究に用いられてきた Spotted seatrout というスズキ科のサカナから上記の方法により同定されたが、すぐにオーソログの解析が進められ、mPR には 3 種類の遺伝子があり、脊椎動物間で保存された分子種であることが明らかにされた [7]。その後さらにゲノムレベルでの解析が進められ、同時期

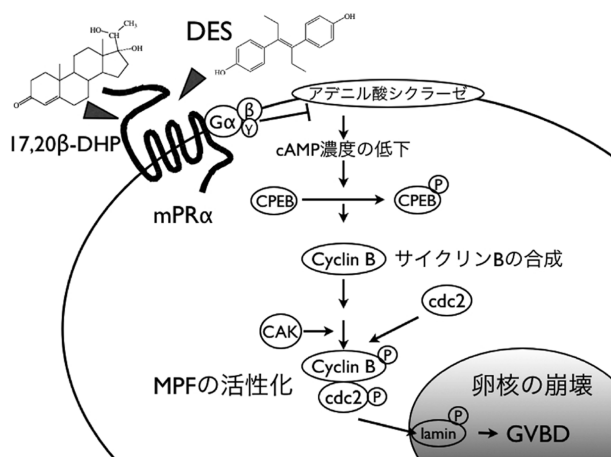


図1 魚類の卵成熟誘起メカニズム

に同定された AdipoQ 受容体と相同性を示す11遺伝子からなる新規 GPCR ファミリーを形成することが明らかになり, progestin and adipoQ receptors (PAQR) ファミリーと命名された [8]. 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 PAQR 7, 8と5に対応する. mPR 分子の生理機能については, 卵成熟誘起におけるプロゲステロン受容体としての機能がゼブラフィッシュ, キンギョでも確認された [9].

また, キンギョやゼブラフィッシュの卵を用いた実験から合成エストロゲンであるジェチルスチルベストロール (DES) が卵成熟を直接誘起する作用をもつことが発見された [10]. さらに DES はキンギョの mPR α 分子に結合することが, 培養細胞で発現された mPR α 分子との結合実験により直接に証明された [11] (図1). これらの結果は, mPR α 分子が卵成熟誘起ホルモン受容体であることを示す, さらなる証拠と位置づけられる. その他, 間接的なデータではあるが, 卵成熟過程における遺伝子発現の変動について, ゼブラフィッシュやニジマスで調べられている [12, 13]. 減数分裂誘導における卵のホルモン感受性は Maturation competence (MC) と呼ばれ, 卵が最大径に成長するタイミングで獲得される. キンギョでの解析結果も含め mPR 分子の発現量と MC の獲得には対応関係は見られず, mPR 分子自体の発現は卵形成の早い段階から始まることが明らかになった. したがって, MC 獲得時には mPR 分子の翻訳後修飾等による構造変化などが関わっていることが予想される.

mPR 分子の α , β , γ の3種類はそれぞれ異なった

組織分布を示すものの, mPR 分子はあらゆる組織で発現することが, ヒトではドットプロット解析により [7], 魚類では RT-PCR 解析により, 明らかになった. このことから, これまでその作用機序が明確でなかったさまざまな組織におけるプロゲステロンの誘導する素早いノンゲノミック反応を mPR 分子が介在する可能性が考えられる.

おわりに

mPR 分子の発見について発表した2003年の原著論文は, 大きな衝撃を与えるとともに多くの疑問をも与える報告となった [6, 7]. 主な点は, 大腸菌で発現したリコンビナント mPR 分子がプロゲステロン結合活性を示したことや, Spotted seatrout の卵成熟誘起ホルモンとされる20 β -S に対してよりもプロゲステロンの方がより高い親和性を示した点が挙げられる. 一方, ヒト mPR 分子の機能解析に早くから取り組んできた Gellersen らにより, そのプロゲステロン結合性, 細胞内局在について, 異なる実験結果が提出された [14]. Thomas らはその後, 遺伝子導入培養細胞株に mPR 分子を発現させる実験系に移行し, Spotted seatrout とヒトの mPR 分子のホルモン結合特性について再検討した [15]. その結果, 培養細胞で発現させた Spotted seatrout の mPR 分子は20 β -S に高い特異性をもつことが確認された. また, セルソーターを用いた解析結果により, mPR 分子が細胞膜上に局在する点についても新たな証拠を示している [16]. つい最近, これまでの一連の mPR 研究の歴史について, Gellersen らにより総説が発表された [17]. 彼らも書いているように mPR 分子の発見は近年の内分泌学上最も注目すべきものであり, この分子がプロゲステロンのノンゲノミック反応を介在する中心的な分子である可能性が高い. この論争に決着をつけるためにも, mPR 分子群のステロイド結合部位の構造決定や細胞内局在についての確たるデータが望まれ, 今後の研究の進展が期待される.

謝辞

本稿の執筆の機会を与えていただいた早稲田大の筒井和義教授に深謝いたします.

文献

1. Nagahama Y, Adachi S (1985) Identification of maturation-inducing steroid in a teleost, the amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). *Dev Biol* 109, 428-435.
2. Ishikawa K, Hanaoka Y, Kondo Y, 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, 91-100.
3. Godeau JF, Schorderet-Slatkine S, Hubert P, Baulieu EE (1978) Induction of maturation in *Xenopus laevis* oocytes by a steroid linked to a polymer. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 2353-2357.
4. Nagahama Y, Yoshikuni M, Yamashita M, Tokumoto T, Katsu Y (1995) Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Curr Top Dev Biol* 30, 103-145.
5. Yoshikuni M, Ishikawa K, Isobe M, Goto T, Nagahama Y (1988) Characterization of 1-methyladenine binding in starfish oocyte cortices. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 1874-1877.
6. Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P (2003) Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2231-2236.
7. Zhu Y, Bond J, Thomas P (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2237-2242.
8. Tang YT, Hu T, Arterburn M, Boyle B, Bright JM, Emata PC, Funk WD (2005) PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *J Mol Evol* 61, 372-380.
9. Tokumoto M, Nagahama Y, Thomas P, Tokumoto T (2006) Cloning and identification of a membrane progesterin receptor in goldfish ovaries and evidence it is an intermediary in oocyte meiotic maturation. *Gen Comp Endocrinol* 145, 101-108.
10. Tokumoto T, Tokumoto M, Horiguchi R, Ishikawa K, Nagahama Y (2004) Diethylstilbestrol induces fish oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 3686-3690.
11. Tokumoto T, Tokumoto M, Thomas P (2007) Interactions of diethylstilbestrol (DES) and DES analogs with membrane progesterin receptor- α and the correlation with their nongenomic progesterin activities. *Endocrinology* 148, 3459-3467.
12. Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Trant JM (2005) Membrane-bound progesterin receptors in channel catfish and zebrafish ovary: changes in gene expression associated with the reproductive cycles and hormonal reagents. *Gen Comp Endocrinol* 142, 204-211.
13. Mourot B, Nguyen T, Fostier A, Bobe J (2006) Two unrelated putative membrane-bound progesterin receptors, progesterone membrane receptor component1 (PGMRC1) and membrane progesterin receptor (mPR) β , are expressed in the rainbow trout oocyte and exhibit similar ovarian expression patterns. *Reprod Biol Endocrinol* 4, 6.
14. Krietsch T, Fernandes MS, Kero J, Losel R, Heyens M, Lam EW, Huhtaniemi I, Brosens JJ, Gellersen B (2006) Human Homologs of the Putative G Protein-Coupled Membrane Progesterin Receptors (mPR $\{\alpha\}$, $\{\beta\}$, $\{\gamma\}$) Localize to the Endoplasmic Reticulum and are Not Activated by Progesterone. *Mol Endocrinol* 20, 3146-3164.
15. Thomas P, Pang Y, Dong J, Groenen P, Kelder J, de Vlieg J, Zhu Y, Tubbs C (2007) Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progesterin membrane receptor α subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology* 148, 705-718.
16. Hanna R, Pang Y, Thomas P, Zhu Y (2006) Cell-surface expression, progesterin binding, and rapid nongenomic signaling of zebrafish membrane progesterin receptors α and β in transfected cells. *J Endocrinol* 190, 247-260.
17. Fernandes MS, Brosens JJ, Gellersen B (2007) Honey, we need to talk about the membrane progesterin receptors. *Steroids* 73, 942-952.