



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	In silico and in vitro investigations on the molecular mechanism of steroid hormone response of elephant shark, <i>Callorhynchus milii</i> , progesterone receptor [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	林, 晓智
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14834号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86000
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Xiaozhi_Lin_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士 (生命科学) 氏 名 林 曉智 (Xiaozhi LIN)

審査担当者	主査	教 授 勝 義直
	副査	教 授 山下 正兼
	副査	准教授 木村 敦
	副査	准教授 荻原 克益

学 位 論 文 題 名

In silico and *in vitro* investigations on the molecular mechanism of
steroid hormone response of elephant shark, *Callorhinchus milii*, progesterone receptor
(*In silico* 及び *in vitro* 解析を用いたゾウギンザメの
プロゲステロン受容体のホルモン応答性の分子基盤解明)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

ステロイドホルモンは生殖腺や副腎で合成・分泌される脂溶性の生理活性物質である。脊椎動物の生殖に関連する生理作用だけではなく、生体内の恒常性維持や様々な行動に関与することが知られている。脊椎動物のステロイドホルモンは大きく5種類(エストロゲン、アンドロゲン、黄体ホルモン、糖質コルチコイド、鉱質コルチコイド)に分けられ、それぞれに対する受容体(エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、糖質コルチコイド受容体、鉱質コルチコイド受容体)が認められている。脊椎動物が持つステロイドホルモンの合成経路と合成酵素群は頭索動物であるナメクジウオの進化段階で出現したと考えられているが、受容体はその後の生物進化に合わせて段階的に受容体遺伝子が出来上がってきたと推測されている。しかし、生物の進化に沿ってどのように受容体が発現し、どのように生理作用を発揮できるようになったのかなどは未明である。著者は、軟骨魚類を材料として、これまで解析されていない黄体ホルモンの受容体であるプロゲステロン受容体の機能解析に取り組んだ。本研究成果は、軟骨魚類のプロゲステロン受容体の解析にとどまらず、脊椎動物における黄体ホルモンの生理作用の理解につながり、さらに疾患とも関連があるプロゲステロン受容体に対する新薬の開発の手がかりとなるなど、内分泌学そして医学の分野において非常に大きなインパクトを与えるものとして高く評価できる。

ステロイドホルモン受容体遺伝子が単離されて、30年が経ち様々な種類の動物種からステロイドホルモン受容体が単離され、ホルモンに対する応答性の解析にとどまらず遺伝子のノックアウトや標的遺伝子の網羅的同定など多方面から解析が行われてきた。しかし、動物の扱いや入手

の観点から進化的に重要な段階の動物からの受容体の研究は遅れているのが現状である。著者は、これまで単離及び解析が行われていなかった軟骨魚類のステロイドホルモン受容体に着目し、特に研究報告がないプロゲステロン受容体の解析に取り組んだ。まず、全長の配列の決定を行い、世界に先駆けて軟骨魚類のプロゲステロン受容体の単離に成功している。次に、様々なホルモンに対する応答性を解析した。調べた様々なプロゲステチンに応答したが、プロゲステロンに対して強い感受性を持つことがわかった。硬骨魚類のプロゲステロン受容体はプロゲステロンよりも 17, 20-DP という魚類の卵の成熟を促進するステロイドホルモンに強く反応することから、硬骨魚類とは異なる生理作用を持つことが推測された。さらに、軟骨魚類のプロゲステロン受容体は、副腎ステロイドである 11-deoxycorticosterone に強く応答することがわかった。この結果は、軟骨魚類ではプロゲステロンとともに 11-deoxycorticosterone が生理的リガンドである可能性を物語っている。

RU486 は合成ステロイド剤であり、プロゲステロン受容体と結合することで受容体とリガンドであるプロゲステロンとの相互作用を阻害するアンタゴニストとして作用する。そして、実際に医療の現場で使用される薬である。著者は、ヒトのプロゲステロン受容体と軟骨魚類の受容体では RU486 に対する応答が異なることを見出した。ヒトのプロゲステロン受容体にはアンタゴニストとして働く RU486 が軟骨魚類のプロゲステロン受容体には作用しないことを発見した。さらに、ヒトと軟骨魚類のプロゲステロン受容体のアミノ酸配列を比較して異なる 1 つのアミノ酸に着目した。そしてそのアミノ酸の置換を行うことで RU486 に対する応答性が逆転することを示した。さらにプロゲステチンや副腎ステロイドに対する応答性を調べることで、11-deoxycortisol に対する応答性がアミノ酸置換によって大きく変化することがわかった。1 つのアミノ酸変異によってステロイドに対する応答性が変化するという発見は非常に興味深いものであり、本研究の価値を高める成果である。

近年、タンパク質の構造解析の技術が大いに進歩することで、X 線による結晶構造解析を行わなくても、コンピュータ解析 (in silico 解析) によりタンパク質の構造やリガンドとの相互作用を解析することが可能となってきた。著者は、アミノ酸置換をすることで 11-deoxycortisol に対する応答性が変化した結果をもとに in silico 解析を行っている。ドッキングシミュレーションにより受容体と 11-deoxycortisol の結合状態を解析し、MD シミュレーションにより受容体と 11-deoxycortisol の相互作用の安定性を解析している。ステロイドホルモン受容体とリガンドとの相互作用の in silico 解析を利用した報告はあるが、MD シミュレーションによる結合状態の解析まで行っている研究報告はほとんどなく、今後のステロイドホルモン受容体とリガンドとの相互作用の解析の指標となる研究成果であると思われる。

以上のように著者は、ステロイドホルモン受容体の研究分野、そして脊椎動物の内分泌学の分野にとって非常に重要な知見を提供する研究成果をあげている。また、in silico 解析を導入することで、ステロイドホルモン受容体研究のさらなる発展が期待できる研究手法を確立した。これらの研究成果から、著者は北海道大学 (生命科学) の学位を授与される資格があるものと認められる。