

令和元年6月17日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07058

研究課題名(和文) 神経細胞でのCaMキナーゼファミリーによるチロシンキナーゼ系の活性化反応

研究課題名(英文) Activation of tyrosine kinases by CaM kinase family in neurons

研究代表者

山本 秀幸 (Yamamoto, Hideyuki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60191433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：CaMキナーゼIIとプロテインキナーゼDは活性化機構は異なるが、どちらもCaMキナーゼファミリーに属し、同様の生理機能を有する可能性が示唆されていた。今回、マウスの視床下部の培養神経細胞株であるGT1-7細胞を用いて、ゴナドトロピン放出ホルモン受容体刺激後の細胞内情報伝達機構について検討した。その結果、両キナーゼがproline-rich tyrosine kinase 2(Pyk2)と上皮成長因子受容体(EGFR)の活性化に関与することを見出した。今回の研究は、神経細胞ばかりではなく、Gタンパク質共役型受容体刺激後の細胞内情報伝達機構を解明する上でも有用な知見を提供するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞間の情報伝達機構を理解することは、脳機能の分子基盤を理解する上で重要である。様々な神経伝達物質が神経細胞の膜状に存在する受容体を刺激して、細胞内の情報伝達機構を変化させることで神経細胞機能を制御している。今回、マウス視床下部の培養神経細胞を用いて、ゴナドトロピン放出ホルモン受容体刺激後の細胞内情報伝達機構について詳細に検討した。その結果、これまで異なる系と考えられていたCaMキナーゼファミリー系とチロシンキナーゼ系が密接に関連することを見出した。今回の研究は、神経細胞機能の制御機構を理解する上で極めて有用な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：The receptor of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) belongs to the G-protein-coupled receptors (GPCR), and the stimulation of the receptor activates proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) and EGFR family. In the present study, we examined the signal transduction pathways after GnRH receptor stimulation using cultured hypothalamic neurons (GT1-7 cells). We first found that GnRH activated CaM kinase II and protein kinase D (PKD), both of which belong to CaM kinase family. And then, we examined the possibility that these two protein kinases were involved in the activation of Pyk2 and EGFR family. Overexpression, knockdown, and inhibitor studies revealed that CaM kinase II and PKD activated Pyk2 through enhancement of interaction of Pyk2 and Fyn. And then, activated Pyk2 induced activation of EGFR. The present study will contribute to the understanding of the physiological roles of CaM kinase family in neurons.

研究分野：神経化学・神経薬理学

キーワード：CaMキナーゼII 神経細胞 プロテインキナーゼD リン酸化反応 GnRH GT1-7細胞 Pyk2 Fyn

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1)神経細胞には、Fyn や proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2)などのチロシン残基をリン酸化するタンパク質リン酸化酵素(チロシンキナーゼ)が多量に発現している。これらのチロシンキナーゼ系は神経細胞の分化やシナプス機能に重要であることが知られている。Pyk2 は、発見された 1995 年に、細胞内カルシウムイオンの増加や C キナーゼの活性化によって活性化されることが報告されていた。その後、Pyk2 の活性化は数カ所のチロシン残基のリン酸化によって起こることが報告された。しかし、C キナーゼとカルシウムイオンによる活性化機構については 20 年ほど不明であった。

(2)我々は、マウスの視床下部神経細胞の培養細胞株である GT1-7 細胞を用いて、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH) 受容体刺激後のシグナル伝達機構について検討してきた。この受容体は G タンパク質共役型受容体(GPCR)の一つであり、様々な受容体刺激のモデル系と考えている。2015 年に本受容体刺激により活性化された C キナーゼが D キナーゼ(PKD)を活性化して、PKD が Pyk2 を活性化することを世界で初めて見出した(J. Biol. Chem., 2015)。PKD は、触媒ドメインの構造と基質特異性の類似性から CaM キナーゼファミリーに属し、CaM キナーゼと類似した生理機能を持つことが示唆されていた。また、我々は、GnRH 受容体刺激後に細胞内カルシウムイオンが増加して CaM キナーゼの中の CaM キナーゼ II が活性化されることを見出した(Arch. Biochem. Biophys., 2007)。

### 2. 研究の目的

- (1)CaM キナーゼ II が PKD と同様に Pyk2 の活性化に関与するとの仮説を立てて検証する。
- (2)Pyk2 の数カ所のチロシン残基のリン酸化機構を明らかにし、活性化の分子機構を解明する。
- (3)PKD と CaM キナーゼ II はセリン残基とトレオニン残基をリン酸化するが、チロシン残基はリン酸化しない。両キナーゼにより、Pyk2 のチロシン残基のリン酸化が引き起こされる分子機構を明らかにする。
- (4)活性化された Pyk2 が上皮成長因子受容体(EGFR)を活性化する可能性を検討する。

### 3. 研究の方法

- (1)GT1-7 細胞の CaM キナーゼ II をノックダウンするために、発現しているアイソフォームを同定する。CaM キナーゼ II のノックダウンにより、Pyk2 の活性化が阻害されるかを検討する。CaM キナーゼ II の阻害剤の影響も検討する。
- (2)Pyk2 のチロシン残基のリン酸化の分子機構を明らかにする。すなわち、これらのリン酸化が分子間自己リン酸化反応によるか Fyn によるかを検討する。この目的で、Pyk2 と Fyn の阻害剤および、siRNA を用いたノックダウン実験を行う。また、両キナーゼの変異体の過剰発現系を用いて検討する。
- (3)それぞれのチロシン残基のリン酸化が、Fyn と Pyk2 の相互作用を制御する可能性を免疫沈降実験により検討する。
- (4)Pyk2 の阻害タンパク質として FIP200 が知られている。このタンパク質が、PKD と CaM キナーゼ II の共通の基質タンパク質である可能性を siRNA を用いたノックダウン実験と過剰発現実験により検討する。
- (5)活性化された Pyk2 が EGFR の活性化に関与する可能性を、GT1-7 細胞での EGF 様因子(ヘパリン結合型 EGF)の産生の変化から検討する。

### 4. 研究成果

- (1)GT1-7 細胞では CaM キナーゼ II のアイソフォームの中のデルタ 2 のみが発現していた。CaM キナーゼ II デルタ 2 の siRNA 及び阻害剤により、GnRH 受容体刺激による Pyk2 の活性化が阻害された。したがって、CaM キナーゼ II が Pyk2 を活性化することが明らかになった(J. Cell. Physiol., 2019)。すなわち、C キナーゼの活性化は PKD を介して、また、細胞内カルシウムイオンの増加は CaM キナーゼ II を介して、それぞれ Pyk2 を活性化することが明らかになった。
  - (2)Pyk2 の 402 番目のチロシン残基(Y402)は主に自己リン酸化により、Y579、Y580、Y881 は Fyn によりリン酸化されることが明らかになった。
  - (3)Y402 のリン酸化は Fyn との結合を引き起こし、Y579 と Y580 のリン酸化は Pyk2 の触媒活性を増加させることが明らかになった。さらに Y881 のリン酸化は活性化された Pyk2 を Fyn から解離させることが示唆された。なお、PKD と CaM キナーゼ II は、Pyk2 同士の結合を増強させることで、Y402 の分子間自己リン酸化反応を促進させることが明らかになった。
  - (4)PKD と CaM キナーゼ II は、FIP200 と Pyk2 との結合を阻害することが示唆された。現在、FIP200 のセリン残基かトレオニン残基が両キナーゼでリン酸化される可能性を検討している。
  - (5)Pyk2 の阻害剤を用いた実験から Pyk2 が HB-EGF の産生に関与することが示唆された。
- これらの研究から、神経細胞において、CaM キナーゼ II と PKD による Pyk2 と Fyn の活性化機構の全貌、及び活性化された Pyk2 の生理機能が明らかになってきた。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件) 全て査読あり

1. Okitsu-Sakurayama S, Higa-Nakamine S, Torihara H, Takahashi H, Higashiyama S, Yamamoto H. Activation of Pyk2 by CaM kinase II in cultured hypothalamic neurons and gonadotroph cells. *J Cell Physiol* 234: 6865-6875, 2019.doi:10.1002/jcp.27443.
2. Sugaya K, Nishijima S, Kadekawa K, Noguchi K, Ashitomi K, Ueda T, and Yamamoto H. Pelvic venous congestion induces lower urinary tract dysfunction in rats. *Biomed Res* 39: 269-277, 2018.doi:10.2220/biomedres.39.269.
3. Sugaya K, Nishijima S, Kadekawa K, Ashitomi K, and Yamamoto H. Relationship between Voided Urine Volume and Urinary ATP in Healthy Volunteers. *Open J Urol* 8: 275-280, 2018.doi:10.4236/oju.2018.810031.
4. Higa T, Takahashi H, Higa-Nakamine S, Suzuki M, Yamamoto H. Up-regulation of DUSP5 and DUSP6 by gonadotropin-releasing hormone in cultured hypothalamic neurons, GT1-7 cells. *Biomed Res* 39: 149-158, 2018.doi:10.2220/biomedres.39.149.
5. Sugaya K, Nishijima S, Kadekawa K, Ashitomi K, Ueda T, Yamamoto H, Hattori T. Action of naftopidil on spinal serotonergic neurotransmission for inhibition of the micturition reflex in rats. *Neurourol Urodyn* 36: 604-609, 2017.doi:10.1002/nau.23028.
6. Izumi S, Higa-Nakamine S, Nishi H, Torihara H, Uehara A, Sugahara K, Kakinohana M, Yamamoto H. Phosphorylation of epidermal growth factor receptor at serine 1047 in cultured lung alveolar epithelial cells by bradykinin B2 receptor stimulation. *Pulm Pharmacol Ther* 48: 53-61, 2018.doi:10.1016/j.pupt.2017.09.002.
7. Sugaya K, Nishijima S, Kadekawa K, Ashitomi K, Ueda T, Yamamoto H. Naftopidil Improves Symptoms in a Rat Model of TraniLAST-Induced Interstitial Cystitis. *Low Urin Tract Symptoms* 9: 107-110, 2017.doi:10.1111/luts.12113.
8. Omoto Y, Higa-Nakamine S, Higa A, Yamamoto H. ErbB4 cleavage by gonadotropin-releasing hormone receptor stimulation in cultured gonadotroph cells. *Eur J Pharmacol* 799: 171-179, 2017.doi:10.1016/j.ejphar.2017.02.006.
9. Sugaya K, Nishijima S, Kadekawa K, Ashitomi K, Ueda T, Yamamoto H, Hattori T. Action of naftopidil on spinal serotonergic neurotransmission for inhibition of the micturition reflex in rats. *Neurourol Urodyn* 36: 604-609, 2017.doi:10.1002/nau.23028.
10. Sugaya K, Nishijima S, Kadekawa K, Ashitomi K, Ueda T, Yamamoto H. Effects of silodosin on bladder activity in rats with frequent urination induced by pelvic venous congestion. *Int J Urol* 23: 881-887, 2016.doi: 10.1111/iju.13158.
11. Nishijima S, Sugaya K, Kadekawa K, Ashitomi K, Ueda T, Yamamoto H. Propiverine increases urethral wall catecholamine levels and bladder leak point pressure in rats. *Int J Urol* 23: 93-99, 2016.doi:10.1111/iju.12991.
12. Sugaya K, Nishijima S, Kadekawa K, Ashitomi K, Ueda T, Yamamoto H. Pelvic venous congestion with castration causes chronic prostatitis in rats. *Int J Urol* 23: 431-435, 2016.doi:10.1111/iju.13061.
13. Sugaya K, Nishijima S, Kadekawa K, Ashitomi K, Ueda T, Yamamoto H. Naftopidil improves locomotor activity and urinary frequency in rats with pelvic venous congestion. *Biomed Res* 37: 221-226, 2016.doi:10.2220/biomedres.37.221.
14. Kondo Y, Higa-Nakamine S, Maeda N, Toku S, Kakinohana M, Sugahara K, Kukita I, Yamamoto H. Stimulation of Cell Migration by Flagellin Through the p38 MAP Kinase Pathway in Cultured Intestinal Epithelial Cells. *J Cell Biochem* 117: 247-58, 2016.doi:10.1002/jcb.25272.

〔学会発表〕(計 23 件)

1. 澳津志帆, 仲嶺三代美, 鳥原英嗣, 東山繁樹, 山本秀幸: GnRH 受容体刺激による ERK の活性化反応と ProHB-EGF の切断反応への Pyk2 の関与. 第 71 回日本薬理学会西南部会, 福岡市, 2018 年 11 月.
2. 仲嶺三代美, 澳津志帆, 山本秀幸: 培養視床下部神経細胞における GnRH 受容体刺激後の Pyk2 と Fyn の相互作用. 第 71 回日本薬理学会西南部会, 福岡市, 2018 年 11 月.
3. 鳥原英嗣, 仲嶺三代美, 前田紀子, 上地球代, 吉浜麻生, 中島由香里, 剣持直哉, 山本秀幸: ゼブラフィッシュ DBA モデルを用いたリボソームタンパク質 S19 のリン酸化および赤血球造血制御の解析. 71 回日本薬理学会西南部会, 福岡市, 2018 年 11 月.
4. 和泉俊輔, 仲嶺三代美, 上原綾子, 須加原一博, 垣花学, 山本秀幸: 肺胞上皮細胞でのブラジキニンによる EGFR のリン酸化反応. 平成 30 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡市, 2018 年 7 月.
5. 澳津志帆, 仲嶺三代美, 鳥原英嗣, 山本秀幸:  $G_{q/11}$  と共役する GPCR 刺激による Pyk2 の活性化反応. 平成 30 年度日本生化学会九州支部例会, 福岡市, 2018 年 7 月.
6. 喜名振一郎, 山本秀幸, 仲嶺(比嘉)三代美, 鳥原英嗣, 金城貴夫, 新崎章: 受容体型チ

- ロシキナーゼ EphA4 の高分化型腫瘍における抗癌剤耐性能について. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸市, 2017 年 12 月.
7. 山本秀幸, 大本裕次郎, 澳津志帆, 仲嶺(比嘉)三代美: ゴナドトロピン産生細胞での GnRH 受容体刺激による ERK の活性化反応と ErbB4 の切断反応. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸市, 2017 年 12 月.
  8. 和泉俊輔, 仲嶺(比嘉)三代美, 西啓亨, 鳥原英嗣, 上原綾子, 須加原一博, 垣花学, 山本秀幸: G タンパク質共役型受容体刺激による上皮成長因子受容体の 1047 番目のセリン残基のリン酸化反応. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸市, 2017 年 12 月.
  9. 仲嶺(比嘉)三代美, 桑江一希, 山本秀幸: 培養視床下部神経細胞における Fyn による PYK2 の活性化機構. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸市, 2017 年 12 月.
  10. 澳津志帆, 仲嶺(比嘉)三代美, 鳥原英嗣, 東山繁樹, 山本秀幸: 培養視床下部神経細胞での GnRH による PYK2 活性化反応への CaM kinase の関与. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸市, 2017 年 12 月.
  11. 鳥原英嗣, 仲嶺(比嘉)三代美, 渡名喜健, 前田紀子, 上地珠代, 中島由香里, 剣持直哉, 山本秀幸: ゼブラフィッシュ DBA モデルを用いたリボソームタンパク質 S19 のリン酸化による造血機能制御の解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸市, 2017 年 12 月.
  12. 山本秀幸, 仲嶺(比嘉)三代美, 澳津志帆, 鳥原英嗣: Involvement of the CaM kinase family in signal transduction that stimulates the tyrosine kinase pathway in response to gonadotropin-releasing hormone. 第 60 回日本神経化学学会大会, 仙台市, 2017 年 9 月.
  13. Yamamoto H, Higa-Nakamine S, Okitsu S, Torihara H. Activation of PYK2 by PKD and CaM kinase II in cultured hypothalamic neurons. INS-ENS meeting, Paris, August 2017.
  14. Higa-Nakamine S, Omoto Y, Yamamoto H. Cleavage of ErbB4 after G-protein-coupled receptor stimulation in hypothalamic neurons and anterior pituitary cells. INS-ENS meeting, Paris, August 2017.
  15. 鳥原英嗣, 仲嶺(比嘉)三代美, 渡名喜健, 前田紀子, 上地珠代, 中島由香里, 剣持直哉, 山本秀幸: ゼブラフィッシュを用いたリボソームタンパク質 S19 のリン酸化による造血機能制御の解析. 平成 29 年度日本生化学会九州支部例会, 宮崎市, 2017 年 5 月.
  16. 澳津志帆, 高橋華, 仲嶺(比嘉)三代美, 鳥原英嗣, 山本秀幸: GnRH 受容体刺激によるチロシキナーゼ PYK2 の活性化反応への CaM キナーゼ II の関与. 平成 29 年度日本生化学会九州支部例会, 宮崎市, 2017 年 5 月.
  17. 鳥原英嗣, 澳津志帆, 仲嶺(比嘉)三代美, 徳誠吉, 東山繁樹, 山本秀幸: 神経細胞における HB-EGF 切断への PKC の関与. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2016 年 12 月.
  18. 仲嶺(比嘉)三代美, 山本秀幸: GPCR 刺激による pyk2 活性化への PKD1 および Fyn の関与. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2016 年 12 月.
  19. 澳津志帆, 仲嶺(比嘉)三代美, 山本秀幸: 培養視床下部神経細胞(GT1-7)での GnRH 受容体刺激による ERK の活性化反応への CaM キナーゼ 2 の関与. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2016 年 12 月.
  20. 山本秀幸, 仲嶺三代美, 澳津志帆, 鳥原英嗣: 培養視床下部神経細胞における CaM キナーゼ と PKD1 によるチロシキナーゼ系の活性化反応. 第 89 回日本生化学会大会, 仙台市, 2016 年 9 月.
  21. 山本秀幸, 仲嶺三代美, 澳津志帆, 鳥原英嗣: 培養視床下部神経細胞における CaM キナーゼファミリーによる PYK2 の活性化反応. 第 59 回日本神経化学学会大会, 福岡市, 2016 年 9 月.
  22. 澳津志帆, 仲嶺三代美, 鳥原英嗣, 山本秀幸: 視床下部神経細胞での GnRH 受容体刺激による ERK の活性化反応への CaM キナーゼ 2 の関与. 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会, 鹿児島市, 2016 年 5 月.
  23. 大本裕次郎, 仲嶺三代美, 山本秀幸: 下垂体前葉細胞での GnRH 受容体刺激による ErbB4 の切断反応. 平成 28 年度日本生化学会九州支部例会, 鹿児島市, 2016 年 5 月.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

琉球大学大学院医学研究科 生化学講座

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：仲嶺 三代美

ローマ字氏名：Nakamine Sayomi

所属研究機関名：琉球大学

部局名：医学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20381105

研究分担者氏名：鳥原 英嗣

ローマ字氏名：Torihara Hidetsugu

所属研究機関名：琉球大学

部局名：医学研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：50757218

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。