

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20770111  
 研究課題名（和文）：GnRH 受容体とオーファン受容体のヘテロダイマー形成によるシグナル伝達調節機構  
 研究課題名（英文）：Regulatory mechanisms of signaling pathways through GnRH receptor heterodimerization with a species-specific orphan receptor subtype  
 研究代表者  
 酒井 翼 (SAKAI TSUBASA)  
 財団法人 サントリー生物有機科学研究所・研究員  
 研究者番号：40414122

## 研究成果の概要（和文）：

ホヤの神経ペプチド tGnRH の受容により細胞内  $Ca^{2+}$  動員と cAMP 生成を行う Ci-GnRHR1(R1)と、いずれの tGnRH 種も受容しない種特異的パラログ Ci-GnRHR4(R4)のヘテロダイマー形成をホヤ卵巣膜と強制発現系 HEK 細胞膜上において確認した。そして R4 と R1 のヘテロダイマー形成が tGnRH-6 選択的な  $Ca^{2+}$  依存的 Protein kinase C (PKC) と tGnRH-5,-6 による  $Ca^{2+}$  非依存的 PKC の活性を上昇させることにより ERK シグナルを増強させる機構を明らかにした。本研究により、オーファン受容体サブタイプがヘテロダイマー形成を介して GnRHR シグナル伝達をリガンド選択的に調節するという新規の GnRH 制御機構を全生物を通じて初めて明らかにすると共に GnRH 受容体機能の進化を見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

Four GnRH receptors (Ci-GnRHR1-4) were identified in the protochordate, *Ciona intestinalis*. A *Ciona*-specific GnRHR paralog, Ci-GnRHR4 (R4) has been regarded as an orphan or non-functional receptor. The dimerization between R1 and R4 in the ovary and in the transfected HEK293MSR cells was detected. The heterodimerization of R1 with R4 led to potentiation of  $Ca^{2+}$ -dependent activation of PKC by tGnRH-6 and  $Ca^{2+}$ -independent activation of PKC by tGnRH-5 and 6, eventually leading to up-regulation of ERK phosphorylation in the MAPK cascade. These results provide evidence that R4 serves as an endogenous modulatory factor for the fine-tuning of signal transduction via heterodimerization with R1, and that GPCR heterodimerization with an orphan receptor is involved in the evolution of a unique pattern of signaling cascade regulation widely conserved in organisms.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：GPCR ヘテロダイマー、GnRH、機能進化

1. 研究開始当初の背景

神経ペプチド Gonadotropin-releasing hormones (GnRH) が生殖機能を制御するという基本的な役割は種を超えて保存されながらも、GnRH とその受容体の分子種数やその制御機構の多様性が動物界において見出されている。しかしこれまで GnRH 受容体機能をヘテロダイマー機構によって解析した例がなかった。

2. 研究の目的

原索動物カタユレイボヤの GnRH 受容体パラログの一つ、Ci-GnRHR4 がオーファン受容体であることに着目し、オーファン受容体がヘテロダイマー形成により、他の Ci-GnRHR パラログの細胞内シグナル伝達機能調節を解明し、オーファン受容体のヘテロダイマー形成による GnRH の種特異的制御機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

Ci-GnRHR4 のヘテロダイマー形成によるシグナル伝達機能調節メカニズムの解明を目的とし、本研究では(1) ホヤ生体組織における Ci-GnRHR ヘテロダイマー形成を免疫共沈法で確認、(2) 培養細胞強制発現系で Ci-GnRHR1 と R4 のヘテロダイマー形成の有無を免疫共沈と FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) により確認、(3) Ci-GnRHR ヘテロダイマー形成による MAPK シグナルへの影響をカルシウム動員、cAMP 生成、ERK リン酸化活性、PKC 活性を指標として解析することを実験計画の大きな柱として研究を遂行した。

4. 研究成果

リガンド tGnRH の受容により細胞内カルシウム動員と cAMP 生成を行う Ci-GnRHR1 (R1) と、いずれの tGnRH 種とも反応しない Ci-GnRHR4 (R4) のヘテロダイマー形成をホヤ卵巣膜上と強制発現系 HEK 細胞膜上において確認した。(図 1)

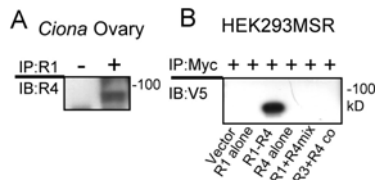


図 1 免疫共沈による R1-R4 ヘテロダイマー形成の確認

結合実験により、R4 はいずれの tGnRH とも結合しないこと、及び R1-R4 ヘテロダイマーは R1 と同様の結合親和性を示すこと確認した。ところが、R1-R4 ヘテロダイマー形成によって tGnRH-5 及び-6 における ERK リン酸化

シグナルが増強することを見出した。R1-R4 系では tGnRH-6 選択的に細胞内カルシウム動員へ感度が約 10 倍上昇したことから、tGnRH-5 のヘテロダイマーによる ERK 活性増強に tGnRH-6 と異なるパスウェイが考えられた。そして R1-R4 ヘテロダイマー形成による ERK 活性増強は R1 を介した tGnRH-5、-6 それぞれによる特定の Protein kinase C サブタイプの活性化によることを解明した(図 2)。

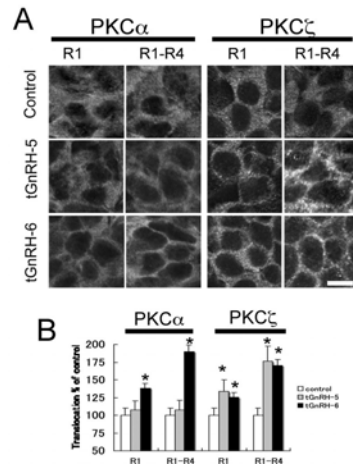


図 2 R1-R4 ヘテロダイマー形成による PKC 膜移動活性の増強

本課題研究により、オーファン受容体サブタイプがヘテロダイマー形成を介して GnRHR シグナル伝達を調節するという新規の GnRH 制御機構を全生物を通じて初めて明らかにすると共に GnRH 受容体機能の進化を見出した(図 3)

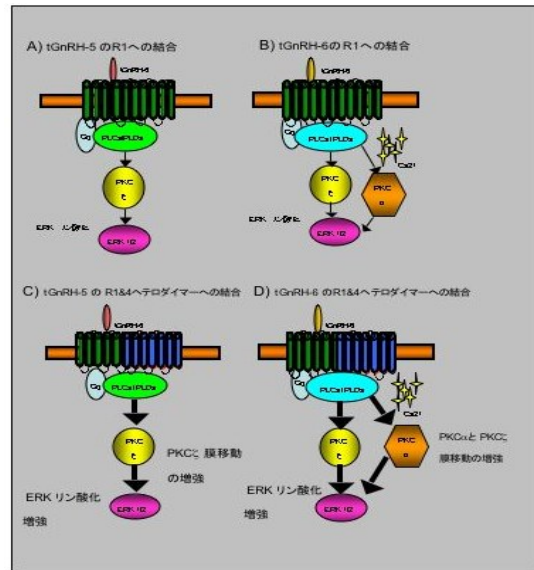


図 3 リガンド選択的な R1-R4 ヘテロダイマーによるシグナル伝達制御機構

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Tsubasa Sakai, Masato Aoyama, Takehiro Kusakabe, Motoyuki Tsuda, Honoo Satake. Functional Diversity of Signaling Pathways through G Protein-Coupled Receptor Heterodimerization with a Species-Specific Orphan Receptor Subtype. *Molecular Biology and Evolution*. 査読有. Vol.27. 2010. 1097-1106.

[学会発表] (計 5 件)

① 酒井翼、青山雅人、佐竹炎、オーファン受容体パラログとのヘテロダイマー形成によるホヤGnRH受容体の cAMPシグナル伝達調節、日本分子生物学会、2009年12月9日、第32回年会(横浜)

② 酒井翼、青山雅人、日下部岳広、津田基之、佐竹炎 ホヤGnRH受容体ヘテロダイマーのPKC分子種特異的活性化によるERKシグナル調節、日本動物学会、2009年9月17日、第80回大会(静岡)

③ 酒井翼、青山雅人、日下部岳広、津田基之、佐竹炎、ホヤにおけるGnRH受容体とオーファン受容体のヘテロダイマー形成によるシグナル伝達調節、GPCR研究会、2009年5月8日、第6回GPCR研究会(東京)

④ 酒井翼、青山雅人、日下部岳広、津田基之、佐竹炎、ホヤGnRH受容体とオーファン受容体のヘテロダイマー形成によるリガンド特異的なシグナル伝達調節、日本分子生物学会、2008年12月12日、第31回大会(神戸)

⑤ 酒井翼、青山雅人、日下部岳広、津田基之、佐竹炎、ホヤGnRH受容体ヘテロダイマーのリガンド特異的なERKリン酸化シグナル伝達経路、日本動物学会、2008年9月4日、第79回大会(福岡)

[その他]

ホームページ等

[http://www.sunbor.or.jp/egs/news/file/PUBLICATIONS\\_2009-009.pdf](http://www.sunbor.or.jp/egs/news/file/PUBLICATIONS_2009-009.pdf)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 翼 (SAKAI TSUBASA)

財団法人 サントリー生物有機科学研究所  
研究者番号：40414122

(2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

(3) 連携研究者

( )  
研究者番号：