

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700381

研究課題名(和文) 神経細胞における ErbB4 受容体の切断機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of ErbB4 cleavage in neuronal cells

研究代表者

仲嶺 三代美 (Nakamine, Sayomi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20381105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)は、視床下部のGnRHニューロンから分泌される。GnRHニューロンの機能を解明するために、GT1-7細胞を用いてGnRH受容体刺激によるERKの活性化およびErbB4切断の分子機構を検討した。その結果、GnRH受容体刺激によるERKの活性化にはGq/11タンパク質、PKC、PKD、PYK2そしてFynが関与することが示された。一方で、ErbB4の切断にはPKD、PYK2、Fynは関与しないことが明らかになった。これらの結果は、両反応が異なる分子機構により起こることを示している。

研究成果の概要(英文)：Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is secreted from hypothalamic neurons (GnRH neurons). To investigate function of the GnRH neuron, we examined the molecular mechanisms of GnRH-induced ERK activation and ErbB4 cleavage in GT1-7 cells. We found that Gq/11 proteins, PKC, PKD, PYK2 and Fyn were involved in ERK activation, while PKD, PYK2 and Fyn did not affect ErbB4 cleavage. These results suggest that ERK activation and ErbB4 cleavage are induced by different molecular mechanisms.

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：GnRH GT1-7細胞 ErbB4 GPCR PKD Gタンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) ニューレグリン1 (NRG1) は EGF 様ドメインをもつ成長因子で神経発生、神経伝達、シナプス可塑性において重要な役割を担うことが知られている。NRG1 は EGF 受容体ファミリーの ErbB4 に結合する。NRG1 が ErbB4 に結合すると ErbB4 が活性化されて、チロシン残基の自己リン酸化が起こる。ErbB4 の活性化は、神経細胞の軸索の成長に必須であることが分かっている。また、遺伝子解析によって NRG1 と ErbB4 遺伝子が統合失調症の原因遺伝子であることが明らかになった (Nat Rev Neurosci, 2008)。特に、NRG1 遺伝子の5'転写調節領域に多型が見つかったことから、統合失調症の患者では NRG1 の発現が障害を受けていることが示唆されているが、詳細は分かっていない。

(2) これまでに、視床下部由来の GT1-7 細胞を用いて、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のひとつであるゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 受容体の短時間の刺激によって、MAP キナーゼの中の ERK が活性化されることを見出した (J Cell Physiol, 2011)。この反応は ErbB ファミリーの活性化阻害剤の存在下で抑制されることから、ErbB ファミリーのトランスな活性化が関わると考えられる。GPCR を介して EGFR がトランスに活性化する例は報告されているが (Trends Neurosci, 2004)、この相互作用は複雑で、受容体が活性化される方法も様々であり、不明な点も多い。また、GnRH 受容体の長時間の刺激によって ErbB4 が切断されることを見出した。ErbB4 の切断によって細胞膜上の ErbB4 が減少し、リガンドである NRG1 によるシグナル伝達が阻害されると考えられる。

2. 研究の目的

視床下部由来の培養細胞株である GT1-7 細胞を用いて、GnRH 受容体刺激による ERK の活性化および ErbB4 の切断に関与する因子を明らかにする。GnRH 刺激によって、発現の変動する遺伝子群を網羅的に解析する。これらを明らかにすることによって、GnRH ニューロンにおける GnRH 刺激による細胞内シグナル伝達機構が明らかになる。

3. 研究の方法

(1) 阻害剤および siRNA による抑制実験：GnRH 刺激による ERK の活性化および ErbB4 の切断に関わる因子を同定する。G タンパク質、プロテインキナーゼ C (PKC)、Src ファミリーの選択的阻害剤および siRNA を用いる。

(2) PKC の膜へのトランスロケーションを同定：GT1-7 細胞を GnRH の刺激後に Buffer (20mM HEPES pH7.4, protease inhibitor, phosphatase inhibitor, 1mM Na₃VO₄)にて溶解し、遠心後の上清を 100,000g で 1 時間遠心し、

細胞質分画と膜分画に分離した。

(3) マイクロアレイによる発現解析：ErbB4 の切断によって細胞質内に 80k の断片が蓄積する。この断片が核内に移行して遺伝子発現を制御している可能性がある。そこで、GnRH 刺激によって発現の変動する遺伝子群を網羅的に解析する。GT1-7 細胞を GnRH で 5 分、30 分刺激し、全 RNA を精製した。マイクロアレイは Agilent 社の SuperPrint G3 Mouse GE を使用した。

4. 研究成果

(1) ERK の活性化に PKC δ が関与する：細胞を PMA 存在下で長時間処理すると PKC α, β, γ, δ, ε, θ, η がダウンレギュレーションされることが知られている。GT1-7 細胞を PMA 存在下で 20 時間培養し、その後 GnRH 処理を行った結果、ERK の活性化がほぼ完全に抑制された (図 1A)。PKC の選択的阻害剤 (Bisindolylmaleimide I) と siRNA を用いた実験によって、ERK の活性化には PKCδ が関与することが分かった。また、GnRH 刺激による ERK の活性化では、PKCδ が PKD を活性化することが示唆された。また、GnRH 刺激による ErbB4 の切断は PKC のダウンレギュレーションによって顕著に抑制された (図 1B)。

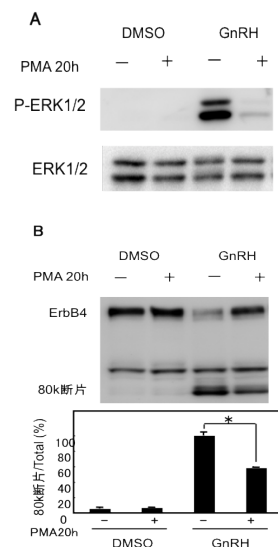


図 1. PKC は GnRH 刺激による ERK の活性化および ErbB4 の切断に必須 A: GT1-7 細胞を PMA 存在下で 20 時間培養し、その後 GnRH で刺激を与えると ERK の活性化 (P-ERK1/2) は顕著に抑制された。B: 同様な処理の結果、ErbB4 の切断は約 40% が抑制された。

(2) PKC は活性化される際に、細胞質から細胞膜に移行して働くことが知られている。GnRH 刺激後の PKC の活性化を検討するために、PKC の膜への移行を検討した。細胞質分画と膜分画に分離したサンプルを用いたウェスタンブロットングでは、PKCδ、PKCε、PKD の膜への移行が高まっていることが分かった。次に PKC δ と PKCε の siRNA によるノックダウン実験によって、PKD の活性化および膜への移行には PKCδ が関与することが

分かった。以上の結果から、GnRH 刺激によって PKCδは膜へ移行し、PKD の活性化に働くことが示唆された。

(3) Fyn は GnRH 刺激による PYK2 の活性化に必須： GT1-7 細胞では、Src ファミリーが GnRH の刺激に関係なく常に活性化された状態で存在することが、Src ファミリーのリン酸化抗体を用いた免疫プロット法によって明らかとなった。Src ファミリーの活性化阻害剤である Dasatinib で細胞を処理し、その後 GnRH にて刺激を与えた結果、PYK2 の活性化および ERK の活性化が抑制された。さらに、Src ファミリーの Fyn に特異的な抗体を用いた免疫沈降実験では、PYK2 との相互作用が確認された。これら結果より、Fyn は GnRH 刺激による PYK2 の活性化に関与することが示唆された。

(4) $G_{q/11}$ タンパク質は GnRH 刺激による ERK の活性化および ErbB4 の切断の両方に必須： G タンパク質の選択的阻害剤を用いて、GnRH 刺激への影響を検討した。その結果、 $G_{q/11}$ タンパク質は ERK の活性化と ErbB4 の切断の両方に必須であることが示された。

(5) GnRH 刺激によって発現が変動する遺伝子群： ErbB4 の切断によって、細胞質内に 80k 断片が蓄積することが分かった。この断片は核に移行して転写を調節している可能性があるため、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析を行った。その結果、GnRH 刺激後 30 分では ERK の脱リン酸化酵素 (DUSPs) の発現が増加していることが示された。RT-PCR 法による DUSP の発現解析では、少なくとも 2 種類の DUSP の発現が GnRH 刺激の 30~60 分後に増加していることが分かった。ERK の活性化は GnRH 刺激後 5 分でピークとなり、30 分以降に減少することから、DUSP の発現によって ERK の活性化が抑制されることによって調節されていることが示唆された。

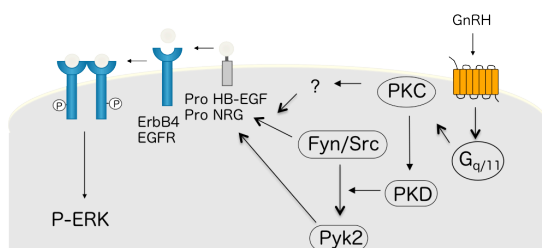


図 2. GnRH 刺激によって EGFR/ErbB4 がトランスに活性化され、ERK が活性化される機構

以上の結果から、GnRH 刺激による ERK の活性化には、 $G_{q/11}$ タンパク質が必須で、PKC δ による PKD の活性化が行われる。その反応には、Fyn によって活性化された PYK2 も必要であることが分かった (図 2)。一方で

ErbB4 の切断には $G_{q/11}$ と PKC は関与するが、PKD、Fyn、PYK2 は関与しないことが分かった。両経路は異なる因子が関与していることが示唆された。

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 7 件)

- ① Yamamoto H, Higa-Nakamine S, Noguchi N, Maeda N, Kondo Y, Toku S, Kukita I & Sugahara K. Desensitization by Different Strategies of Epidermal Growth Factor Receptor and ErbB4. *J Pharmacol Sci* 124: 287-293, 2014. 査読有
DOI: 10.1254/jphs.13R11CP
- ② Noguchi N, Kondo Y, Maeda N, Higa-Nakamine S, Toku S, Maruyama J, Isohama Y, Kukita I, Sugahara K & Yamamoto H. Phosphorylation of epidermal growth factor receptor at serine 1047 by MAP kinase-activated protein kinase-2 in cultured lung epithelial cells treated with flagellin. *Arch Biochem Biophys* 529:75-85, 2013. 査読有
DOI: 10.1016/j.abb.2012.11.006.
- ③ 山本秀幸, 近藤豊, 野口信弘, 仲嶺三代美, 前田紀子, 徳誠吉, 磯濱洋一郎, 久木田一郎, 須加原一博: レジオネラ肺感染症におけるフラジェリンの II 型肺胞上皮細胞に対する影響. *日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌* 44: 57-58, 2013. 査読無
<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=di5inter&ye=2013&vo=44&issue=>
- ④ 山本秀幸, 仲嶺三代美: 視床下部神経細胞での GnRH 受容体刺激による ErbB4 の切断反応. *生体の科学* 64(5): 468-469, 2013. 査読無
<http://medicalfinder.jp/ejournal/2425101519.html>
- ⑤ Higa-Nakamine S, Maeda N, Toku S, Yamamoto T, Yingyuenyong M, Kawahara M & Yamamoto H. Selective cleavage of ErbB4 by G-protein-coupled gonadotropin-releasing hormone receptor in cultured hypothalamic neurons. *J Cell Physiol* 227: 2492-2501, 2012. 査読有
DOI:10.1002/jcp.22988
- ⑥ Higa-Nakamine S, Suzuki T, Uechi T, Ghakraborty A, Nakajima Y, Nakamura M, Hirano N, Suzuki T, Kenmochi N. Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. *Nucleic Acids Res* 40(1): 391-398, 2012.

査読有

DOI: 10.1093/nar/gkr700.

- ⑦ Kondo Y, Higa-Nakamine S, Noguchi N, Maeda N, Toku S, Isohama Y, Sugahara K, Kukita I & Yamamoto H. Induction of epithelial-mesenchymal transition by flagellin in cultured lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303: L1057-L1069, 2012. 査読有
DOI: 10.1152/ajplung.00096.2012.

[学会発表] (計 17 件)

- ① 仲嶺三代美: 視床下部神経細胞での GnRH 刺激による G_{q/11} を介した ErbB4 の切断と ERK の活性化反応. 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 神戸市
- ② 徳誠吉: 細胞周期を通じて翻訳後修飾を受けにくいヒストンの性質. 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 神戸市
- ③ 仲嶺三代美: 視床下部の培養細胞株における ErbB ファミリーの切断と MAP キナーゼの活性化反応. 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日 横浜市
- ④ 山本秀幸: 視床下部神経細胞での GnRH による ERK の活性化への PYK2 の関与. Neuro2013 2013 年 6 月 21 日 京都市
- ⑤ 仲嶺三代美: タンパク質共役型受容体刺激による MAP キナーゼの活性化と ErbB ファミリーの切断. 平成 25 年度日本生化学会九州支部例会 2013 年 5 月 19 日 佐賀市
- ⑥ 野口信弘: 培養肺胞上皮細胞でのフラジェリン処理による FGF 受容体のリン酸化反応. 平成 25 年度日本生化学会九州支部例会 2013 年 5 月 19 日 佐賀市
- ⑦ 剣持直哉: Loss of snoRNA expression leads to developmental defects in zebrafish. Keystone symposia "Noncoding RNAs in Development and Cancer" 2013 年 1 月 20-25 日 Vancouver, Canada.
- ⑧ 仲嶺三代美: G タンパク質共役型受容体刺激による PKC 依存的な ERK の活性化反応. 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日 福岡市
- ⑨ 徳誠吉: ヒストン H3 の M 期特異的新規リン酸化部位の同定. 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日 福岡市
- ⑩ 山本秀幸: 神経細胞における ErbB4 受容体の GnRH による制御機構. 第 65 回日本薬理学会西南部会 2012 年 11 月 23 日 熊本市
- ⑪ 山本秀幸: レジオネラ肺感染症におけるフラジェリンの II 型肺胞上皮細胞に対する影響. 日本肺サーファクタント・界面医学会第 48 回学術研究会 2012 年 10 月 27 日 熊本市
- ⑫ 山本秀幸: 視床下部神経細胞での GnRH

による ERK の活性化への PYK2 の関与. 第 55 回日本神経化学学会大会 2012 年 10 月 1 日 神戸市

- ⑬ 剣持直哉: Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. International Conference on Ribosome Synthesis, 2012 年 8 月 22-26 日 Banff, Canada.
- ⑭ 剣持直哉: RNA 修飾の欠損はゼブラフィッシュの初期発生に重要な影響を与える. 第 14 回日本 RNA 学会年会 2012 年 7 月 18-20 日 仙台市
- ⑮ 剣持直哉: Impairment of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. The 17th Annual Meeting of the RNA Society, 2012 年 5 月 29 日-6 月 3 日 Ann Arbor, USA.
- ⑯ 仲嶺三代美: 神経細胞における ErbB4 の活性化と切断機構の解明. 平成 24 年度日本生化学会九州支部例会 2012 年 5 月 26 日 福岡市
- ⑰ 近藤豊: 培養肺胞細胞のフラジェリン処理による上皮間葉移行の誘導. 平成 24 年度日本生化学会九州支部例会 2012 年 5 月 26 日 福岡市

[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

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/biochemistry/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲嶺 三代美 (NAKAMINE, Sayomi)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号: 20381105