

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：37116

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890286

研究課題名(和文)新規細胞膜エストロゲン受容体のシグナル伝達機構の解析と受容体タンパク質の同定

研究課題名(英文) Analysis of a novel membrane estrogen receptor signaling and identification of its gene

研究代表者

高橋 圭太 (TAKAHASHI, Keita)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：50634929

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲンは核内受容体を介して種々の遺伝子の発現を調節し、作用すると考えられているが、細胞膜に存在する受容体を介する作用があることも知られている。

本研究ではウシ副腎髄質細胞細胞膜に存在する未知のエストロゲン受容体のシグナル伝達機構の解析と受容体のクローニングを試みた。既知の細胞膜エストロゲン受容体にエストロゲンが結合すると細胞内カルシウム濃度やcAMP濃度の増加が起こることが報告されているが、ウシ副腎髄質細胞ではどちらも増加しなかった。また、ファージディスプレイ法を用いた受容体分子のクローニングではいくつかの興味深い遺伝子を発見した。

研究成果の概要(英文)：Most of estrogen actions are mediated by classic nuclear receptor, which called genomic action and regulate expression of various genes. Recently, membrane receptor mediated effects of estrogen have been identified.

In this study, I tried to analysis of a novel membrane type estrogen receptor signaling in bovine adrenal medullary cells and to cloning the receptor gene. Although, activation of already known receptors leads to increase of intracellular calcium and cAMP, estrogen did not stimulate both reactions in bovine adrenal medullary cells. These results indicated that signaling pathway of the novel receptor is completely different from the known estrogen membrane receptors. To explore the receptor gene, phage cDNA library made from mRNA of bovine adrenal medullary cells was subjected to panning with polyclonal antibody against cell membrane fraction of bovine adrenal medulla. As a result, I identified several interesting genes.

研究分野：14

科研費の分科・細目：6904

キーワード：エストロゲン 細胞膜受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) エストロゲンは女性の第2次性徴の発現を促す作用に加えて、物質代謝、骨代謝、心臓血管系への作用や神経保護作用等の幅広い生理活性を有する。エストロゲンは核内受容体を介して種々の遺伝子の発現を調節し、作用すると考えられている。

(2) 古くからエストロゲンの作用に細胞膜に存在する受容体を介する作用があることが知られていたが、詳細なメカニズムは不明であった。最近、従来の核内受容体が細胞膜に局在するものや G タンパク共役型受容体の GPER が細胞膜に存在するエストロゲン受容体として機能することが報告されている。

(3) 筆者が所属する研究室では、ウシ副腎髄質から分離した細胞膜において、 ^3H -17- β -エストラジオールと高い親和性のある特異的結合部位の存在を証明 (BBRC, 2006) している。さらに、エストロゲン (BBRC, 2006) や植物性エストロゲンのダイゼイン (大豆成分) (Endocrinol, 2007; Mol Nutr Food Res., 2010)、およびレスベラトロール (赤ワイン成分) (Biochem Pharmacol., 2007) が、核内受容体とは異なる未知の細胞膜エストロゲン受容体を介して副腎髄質細胞のチロシン水酸化酵素の活性化およびカテコールアミン合成を促進することを報告している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) ウシ副腎髄質細胞に存在する未知の細胞膜エストロゲン受容体の活性化が、チロシン水酸化酵素の活性化およびカテコールアミン合成の促進を誘導するシグナル伝達機構の解析、および(2) この未知の受容体タンパク質を同定することである。

3. 研究の方法

(1) エストロゲンおよび植物性エストロゲンが、未知の細胞膜エストロゲン受容体を介してチロシン水酸化酵素を活性化するシグナル伝達機構を明らかにするため以下の点を解析した。

チロシン水酸化酵素のリン酸化に及ぼす影響をウェスタンブロッティングによって検討した。

細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響をカルシウムインジケータである Fura-2 を用いた蛍光法によって検討した。

細胞内 cAMP 濃度に及ぼす影響を ELISA によって検討した。

(2) 受容体タンパク質の同定

ポリクローナル抗体を用いた細胞膜エストロゲン受容体候補タンパク質の探索を以下の方法で行った。

ウシ副腎髄質細胞より mRNA を精製し、逆転写して作成した cDNA を、T7 ファージゲノムに組み込み、ファージディスプレイライブラリーを構築した。

ウシ副腎髄質細胞から分離調整した細胞膜でウサギを免疫し、ポリクローナル抗体を作成した。このポリクローナル抗体から非特異的抗体を吸収した抗体 (吸収抗体) と結合するファージを濃縮した。非特異的抗体の吸収には、新規細胞膜エストロゲン受容体が発現していないと考えられる組織の膜精製物に加えて、ファージおよび大腸菌の破碎物を用いた。上記の操作で得られたファージクローンの塩基配列を解読し、BLAST 検索によってウシゲノムあるいはヒトゲノムから発現タンパク質を推定した。

4. 研究成果

(1) 未知の細胞膜エストロゲン受容体のシグナル伝達機構の解析

チロシン水酸化酵素のリン酸化に及ぼすエストロゲンの影響

チロシン水酸化酵素の活性は複数のセリン残基のリン酸化によって調節されることが知られている。培養ウシ副腎髄質細胞を 0.1-1000 nM のエストロゲンで 5-15 分間刺激し、チロシン水酸化酵素の Ser31 および Ser40 のリン酸化に及ぼすエストロゲンの影響を調べた。しかし、チロシン水酸化酵素のリン酸化状態にエストロゲン刺激による有意な変化はみられなかった (図 1)。エストロゲン存在下ではチロシン水酸化酵素の活性が上昇するが、この酵素活性の上昇は Ser 残基のリン酸化状態の変化によるものではないことが示唆された。

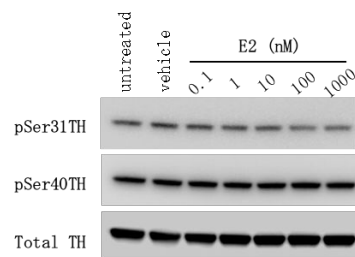


図1 チロシン水酸化酵素のリン酸化に及ぼすエストロゲンの影響

24-wellプレートにて培養したウシ副腎髄質細胞に0.1-1000 nMのエストロゲンを添加した。5分後、細胞をPBSで洗浄し、NP-40含有 lysis bufferにて細胞を溶解した。一定量のタンパク質をSDS-PAGEで分離し、PVDF膜に転写後、リン酸化THに特異的な抗体で検出した。

細胞内カルシウム濃度の変化に及ぼすエストロゲンの影響

カルシウムインジケータである Fura-2 を取り込ませた培養ウシ副腎髄質細胞に、蛍光顕微鏡観察下で 1-1000 nM のエストロゲンを作用させ、蛍光強度の変化を経時的に観察した。しかし、エストロゲン刺激による有意な蛍光強度の変化はみられず、エストロゲンは細胞内カルシウム濃度に影響しないことが示唆された。既知の細胞膜エストロゲン受容体は、エストロゲン刺激によって細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こすと報告されていることから、ウシ副腎髄質細胞の細胞膜に存在する受容体は既知のエストロゲン受容体とは異なる性質を示す可能性が示唆された。

細胞内 cAMP 濃度に及ぼすエストロゲンの影響

ホスホジエステラーゼ阻害剤である IBMX で前処理した培養ウシ副腎髄質細胞を 1-1000 nM のエストロゲンで刺激し、15 分後の細胞内 cAMP 濃度を ELISA で測定した。しかし、細胞内 cAMP 濃度はエストロゲン刺激によって変化しなかった (図 2)。

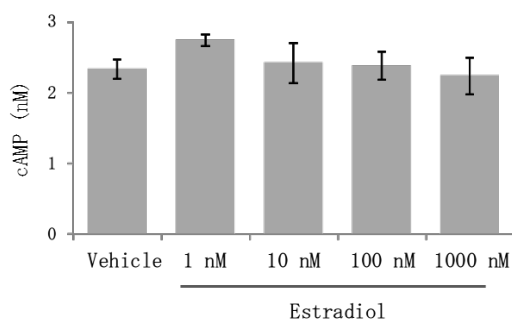


図 2 cAMP 産生に及ぼすエストロゲンの影響
24-wellプレートにて培養したウシ副腎髄質細胞を IBMX で前処理し、1-1000 nM のエストロゲンを添加し刺激した。15 分後、細胞を溶解し、cAMP 濃度を ELISA にて測定した。

以上 (1) ~ (3) の結果から、エストロゲンによるチロシン水酸化酵素の活性上昇は、これまでに知られているチロシン水酸化酵素活性の調節機序とは全く異なる機序で起こっていること可能性が考えられた。

(2) 受容体タンパク質の同定

ポリクローナル抗体中の非特異的抗体の吸収に使用する組織の選択

非特異的抗体を除去するため、エストロゲン受容体を発現していない細胞の細胞膜タンパク質を使用する。吸収操作には大量のタンパク質を必要とするため、容易に大量の細胞を調製することが可能なリンパ節中のリンパ球、および副腎皮質細胞の細胞膜にエストロゲンに対する特異的結合部位が存在するかどうかを $[^3\text{H}]-17\beta\text{-E}$ を用いて検討した。副腎皮質細胞の細胞膜にはエストロゲンの特異的結合部位が存在した。副腎皮質にはエストロゲンの核内受容体が

発現していることが知られていることから、細胞膜に局在している核内受容体が検出されたと考えられた。リンパ球の細胞膜にはエストロゲンの特異的結合がみられなかった。そこで、ポリクローナル抗体中の非特異的抗体の吸収操作にはリンパ球由来細胞膜を使用した。

ポリクローナル抗体中の非特異的抗体の吸収

リンパ球由来細胞膜を調製し、これを磁気ビーズと架橋し固定した。このビーズとポリクローナル抗体を混合し、インキュベーションした後、ビーズと結合しなかった抗体を吸収抗体として回収した。

ファージライブラリーのパニング

吸収抗体を磁気ビーズに固定し、 1×10^8 個のファージと混合した。抗体と結合しなかったファージを除去後、結合したファージを溶出し、約 1×10^4 個のポジティブクローンを得た。

ポジティブクローンの塩基配列解析

約 300 個のポジティブクローンからゲノム DNA を抽出し、挿入した cDNA 領域の塩基配列を解析した。得られた塩基配列を NCBI の BLAST で検索した。パニング操作によって得られた約 1×10^4 個のポジティブクローンのうち、その大部分がノンコーディング領域や、挿入方向が実際の遺伝子とは逆になっているもの、リボソーム RNA、ミトコンドリア由来の RNA であり、偽陽性であった。タンパク質のコーディング領域がインサートとして入っていたクローンは全体の 3 割程度であったが、いくつかの膜タンパク質が見つかった。その中には、酸化型 LDL コレステロール受容体や HDL コレステロール受容体などステロイド骨格を有する各種コレステロールに対する受容体や、脂溶性ビタミンでエストロゲンと同様に核内受容体に対する作用が一般的に知られているビタミン D3 に対する膜型受容体 Pdia3 などが含まれていた。また、コーディング領域を持つクローンは全て別の遺伝子をコードしており、パニングによるファージの濃縮が不十分であったと思われる。

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)

なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 圭太 (TAKAHASHI, Keita)

産業医科大学・医学部薬理学講座・助教

研究者番号：5063492