

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：18001
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K07112
研究課題名(和文) ErbB4受容体切断の統合失調症発症における役割の解明

研究課題名(英文) Role of ErbB4 receptor in schizophrenia

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)・准教授

研究者番号：20381105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス視床下部由来のGT1-7細胞および下垂体前葉のゴナドトロピン産生細胞では、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)受容体の刺激によって、Gq/11タンパク質を介したErbB4の限定分解による脱感作現象を見出した。また、GT1-7細胞ではCキナーゼにより活性化されたPKD1とSrcファミリーのFynによるPyk2(チロシンキナーゼ)の活性化機構も明らかになった。さらに、Pyk2の発現を抑制したゼブラフィッシュ胚は、受精後24時間で顕著な発育遅滞、脳構造の形成異常が認められた。今回の研究によって、神経細胞における機能制御を理解する上で有用な知見が得られたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞における細胞内の情報伝達機構の解明は、統合失調症などの発症機序を解明する上で重要である。ゴナドトロピン受容体(GnRH)はGタンパク質共役型受容体の一つで、Gq/11タンパク質と共役している。今回、マウスの視床下部由来のGT1-7細胞で、GnRH受容体刺激によってCキナーゼによってPKD1が活性化され、Fynを介したチロシンキナーゼPyk2を活性化する詳細な機構が明らかになった。Gq/11タンパク質はアドレナリンの β 1受容体など様々な受容体刺激で活性化されることが知られており、本研究はGq/11タンパク質が関与する細胞内情報伝達機構の解明に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The receptor for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) belongs to the G-protein coupled receptors, and is highly expressed in hypothalamic neurons, as well as in anterior pituitary gonadotrophs. In our previous study, we found that GT1-7 cells expressed ErbB4 as well as EGFR, and GnRH treatment induced the cleavage of ErbB4 to suppress the function of ErbB4. In the present study, we found that ErbB4 was expressed in undifferentiated gonadotroph aT3-1 cells and GnRH induced the cleavage of ErbB4. We found that stimulation of the GnRH receptor activated protein kinase D1 (PKD1), and PKD1 was involved in the Fyn-mediated activation of proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) in GT1-7 cells. Pyk2 indicated that tyrosine 402 (Tyr402) was phosphorylated both by autophosphorylation and by Fyn, whereas Tyr579 was phosphorylated mainly by Fyn. Our present data may suggest that fully activated Pyk2 dissociates from Fyn after Fyn-mediated phosphorylation of Pyk2 at unknown sites.

研究分野：分子生物学

キーワード：Pyk2 Fyn 神経細胞 GT1-7細胞 GnRH PKD1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経発生に関与しているニューレグリン1 (*NRG1*) と *ErbB4* は統合失調症の原因遺伝子として知られている (Nat Rev Neurosci, 2008)。NRG1 は ErbB 受容体ファミリーの ErbB4 のリガンドであり、NRG1 が ErbB4 に結合すると ErbB4 が活性化されて、NRG1-ErbB4 シグナルが動き出す。NRG1-ErbB4 シグナルの低下が疾患発症に関与していると報告されているが、その詳細は不明である。また、ErbB4 は選択的スプライシングによって、膜貫通領域が異なる JMa または JMb 型が存在するが、最近、統合失調症患者の脳では JMa 型の発現が増加していることが報告された (Mol Psychiatry, 2014)。

私達は視床下部由来の培養神経細胞である GT1-7 細胞を用いて、細胞内シグナル伝達機構について検討してきた。これまでに、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の一つであるゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 受容体刺激によって、ErbB4 がトランスに活性化され、その結果 MAP キナーゼファミリーの中の ERK が活性化されることを明らかにした (Higa-Nakamine, 2012)。しかしながら、ErbB4 の活性化および切断に至る詳細な機構は不明な部分が多かった。また、GT1-7 細胞の ErbB4 は JMa 型のみ発現していることが分かった。さらに、GT1-7 細胞では ErbB4-JMa は強い GnRH 刺激によって切断され、細胞膜上から減少し脱感作されることを見出した。その結果、リガンドである NRG1 との作用が抑制され、NRG1-ErbB4 シグナル伝達が阻害されることを明らかにした (Higa-Nakamine, 2015)。この機構は GnRH ニューロンの機能に大きな影響をもつ可能性が考えられた。

GnRH 受容体刺激による ErbB4 を介した MAP キナーゼ系の活性化には、G_{q/11} タンパク質が共役しており、C キナーゼが PKD1 (セリントレオニンキナーゼ) を活性化することを見出した。さらに、この反応系には PKD1 が活性化され、Fyn (Src ファミリータンパク質) と Pyk2 からなるチロシンキナーゼ系を活性化させることが分かった (Higa-Nakamine, 2015)。

2. 研究の目的

- (1) GT1-7 細胞での GnRH 受容体刺激による細胞内情報伝達機構を詳細に解析し、ErbB4 の活性化および切断機構を解明する。
- (2) GT1-7 細胞で見られた ErbB4 の脱感作現象が、他の細胞にも共通しているかを検討する。GnRH 受容体が発現している下垂体前葉細胞の培養細胞株を用いる。
- (3) ErbB4 の機能低下が脳の発達に障害を起し、環境因子等の影響も加わって、統合失調症の発症につながる可能性も考えられる。そこで、受精卵から発生初期胚が透明で、遺伝子のノックダウン胚も作成可能であるゼブラフィッシュを用いて、GnRH 受容体刺激後の ErbB4 シグナル伝達に関与するタンパク質が脳の発達にどのような影響を及ぼすのか解析を試みる。

3. 研究の方法

- (1) GT1-7 細胞での GnRH 受容体刺激で活性化された Fyn および Pyk2 の活性化機構を明らかにする。Pyk2 の阻害薬 (PF431396)、Fyn の阻害薬 (ダサチニブ、PP2) および siRNA にて GT1-7 細胞を処理した後、GnRH 受容体刺激を行う。細胞抽出液を精製し、Pyk2 または Fyn と結合するタンパク質を同定するために、抗 Pyk2 抗体または抗 Fyn 抗体にて免疫沈降実験を行う。
- (2) Pyk2 の活性化には 3 つのチロシン残基 (402, 579, 580 番目) のリン酸化が重要であることが報告されている。これらリン酸化の詳細な機構を明らかにするために、チロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した Pyk2 変異体 (Y402F, Y579/580F) を作成し、Pyk2 のリン酸化機構および Fyn との結合を検討する。
- (3) ErbB4 の活性化機構を検討するために、ErbB4 のリン酸化を検討したが、ErbB4 は GnRH 受容体刺激にて限定分解を受けることから、その活性化を直接検出することは難しいと考えられる。そのため、GT1-7 細胞で発現している ErbB ファミリーの一つである EGFR の活性化を検討する。GnRH 受容体刺激後に、抗 EGFR 抗体にて免疫沈降実験を行い、EGFR のチロシンリン酸化抗体を用いて EGFR の活性化を検出する。
- (4) GnRH 受容体刺激による EGFR と ErbB4 のリガンドである HB-EGF の前駆体 ProHB-EGF を恒常的に発現させた細胞株を用いて、リガンドとの結合を検討する。この GT1-7 細胞は、ProHB-EGF はアルカリフォスファターゼ (AP) で標識されているため、細胞膜上の ProHB-EGF の切断を AP 活性にて測定することができる。
- (5) ErbB4 の脱感作現象を下垂体前葉細胞のゴナドトロピン産生細胞 (α T3-1 細胞、L β T2 細胞) を用いて検討する。
- (6) ゼブラフィッシュの受精卵に ErbB4 の発現を抑制するアンチセンスオリゴを微量注入し、受精後 24、48 時間の表現系を解析する。

4. 研究成果

(1)GT1-7 細胞での Pyk2 と Fyn との結合が、ダサチニブ (Src ファミリー阻害薬) 存在下では増強されることを見出した。また、Fyn と PKD 1 との結合は検出できなかった。また、Pyk2 は不活性化の状態では、FIP200 タンパク質と結合していることが明らかになった。GnRH 受容体刺激によって活性化された PKD1 は、Pyk2 と Fyn の結合を促進させる役割が示唆された。また、PKD1 は不活性型の Pyk2 から FIP200 を解離させ、Pyk2 の活性化を促進させる役割もあるのではないかと考えている。

(2) Pyk2 の過剰発現系を用いた免疫沈降実験によって、Pyk2 の活性化は 402 番目のチロシン残基は主に自己リン酸化によるものであることが分かった。その際、Pyk2 は多量体を形成していることも見出した。Fyn は Pyk2 のリン酸化された Y402 に結合し、Y579 と Y580 をリン酸化することが阻害剤を用いた実験によって明らかになった。また、Y579/580 のリン酸化は、Pyk2 の触媒機能を亢進させることが分かった。完全に活性化された Pyk2 は Y881 のリン酸化によって Fyn から解離すると考えられた。

(3)GnRH 受容体刺激後に、EGFR のチロシン残基のリン酸化は僅かに検出された。一方で、EGFR のリガンドである HB-EGF および EGF による刺激では、EGFR の顕著な活性化が認められた。

(4) ProHB-EGF の切断機構の解析によって、GnRH 受容体の長時間の刺激では、ProHB-EGF の切断が検出された。この切断は、タンパク質分解酵素の TACE の阻害薬の存在下で抑制された。また、PKD1 の阻害薬 (CRT0066101) の存在下では、僅かに抑制された。GT1-7 細胞では長時間の GnRH 刺激によって HB-EGF が切断されて、EGFR および ErbB4 へ結合する可能性が示唆された。GT1-7 細胞で得られた(1)-(4)の結果を図で示した (図 1)。

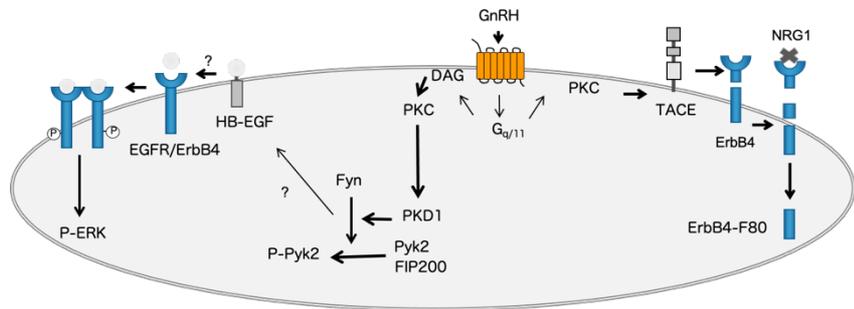


図 1. GT1-7細胞でのGnRH受容体刺激による細胞内情報伝達機構の概要

(5)GnRH 受容体を発現している下垂体前葉のゴナドトロピン産生細胞 (α T3-1 細胞) では、GT1-7 細胞同様に ErbB4 の脱感作現象が起こることを見出した。一方で L β T2 細胞には ErbB4 が発現していないことが分かった。

(6)ErbB4 の発現を抑制したゼブラフィッシュ胚は、受精後 48 時間の野生胚と比べて頭部の形態異常が認められた。また、Pyk2 のノックダウン胚は、受精後 24~48 時間では脳領域に異常が認められ、神経細胞死が起こっている可能性が示唆された。

これらの研究から、神経細胞において G_{q/11} タンパク質を介した細胞内情報伝達機構での Pyk2 の活性化および ErbB4 の活性化と脱感作作用への新しい知見が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Higa T, Takahashi H, Higa-Nakamine S, Suzuki M, Yamamoto H.	4. 巻 39
2. 論文標題 Up-regulation of DUSP5 and DUSP6 by gonadotropin-releasing hormone in cultured hypothalamic neurons, GT1-7 cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 149-158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.39.149.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Izumi Shunsuke, Higa-Nakamine Sayomi, Nishi Hiroyuki, Torihara Hidetsugu, Uehara Ayako, Sugahara Kazuhiro, Kakinohana Manabu, Yamamoto Hideyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Phosphorylation of epidermal growth factor receptor at serine 1047 in cultured lung alveolar epithelial cells by bradykinin B2 receptor stimulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pulm Pharmacol Ther	6. 最初と最後の頁 53～61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pupt.2017.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okitsu-Sakurayama S, Higa-Nakamine S, Torihara H, Takahashi H, Higashiyama S, Yamamoto H.	4. 巻 234
2. 論文標題 Activation of Pyk2 by CaM Kinase II in Cultured Hypothalamic Neurons and Gonadotroph Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Cell Physiol	6. 最初と最後の頁 6865-6875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcp.27443.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakayama I, Higa-Nakamine S, Uehara A, Sugahara K, Kakinohana M, Yamamoto H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Expression and Morphology of Lung Epithelial Cells by Interleukin-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Higa-Nakamine S, Okitsu-Sakurayama S, Kina S, Yamamoto H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Fyn-mediated Phosphorylation of Pyk2 Promotes Its Activation and Dissociation Downstream of Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS J	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15231.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計29件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 仲嶺三代美、澳津志帆、山本秀幸
2. 発表標題 視床下部由来の培養神経細胞におけるPyk2とFynの相互作用におけるダサチニブの増強作用
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本秀幸、中山泉、比嘉一仲嶺 三代美
2. 発表標題 培養肺胞上皮細胞でのIL-1 による上皮成長因子受容体の制御機構
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥原 英嗣、仲嶺(比嘉) 三代美、澳津 志帆、山本 秀幸
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたリボソームタンパク質S19のリン酸化反応による先天性貧血モデルの解析
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 間妃向子, 仲嶺三代美, 澳津志帆, 金城渉, 新川慎之助, 桑江一希, 山本秀幸
2. 発表標題 視床下部由来の培養神経細胞におけるチロシンキナーゼPyk2の活性化機構
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山泉, 仲嶺三代美, 上原綾子, 須加原一博, 垣花学, 山本秀幸
2. 発表標題 培養型肺胞上皮細胞でのIL-1 による上皮成長因子受容体の制御機構
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新垣かおる, 上原綾子, 仲嶺三代美, 垣花学, 山本秀幸
2. 発表標題 培養腸管上皮細胞でのポリスルフィドの作用
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澳津志帆, 仲嶺三代美, 山本秀幸
2. 発表標題 ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)受容体刺激によるERK活性化経路の解明
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲嶺三代美, 澳津志帆, 間妃向子, 金城渉, 新川慎之助, 山本秀幸
2. 発表標題 Pyk2活性化におけるFynとFIP200の役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥原英嗣, 仲嶺三代美, 澳津志帆, 上地珠代, 剣持直哉, 山本秀幸
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いたリボソームタンパク質S19のリン酸化反応による赤血球造血制御の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲嶺三代美, 澳津志帆, 山本秀幸
2. 発表標題 培養神経細胞におけるPyk2活性化機構の解明
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澳津志帆, 仲嶺三代美, 山本秀幸
2. 発表標題 ゴナドトロピン放出ホルモン受容体刺激によるFynからのPyk2の遊離とGrb2の結合反応
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澳津志帆、仲嶺三代美、鳥原英嗣、山本秀幸
2. 発表標題 Gq/11と共役するGPCR刺激によるPyk2の活性化反応
3. 学会等名 平成30年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 平成30年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澳津志帆、仲嶺三代美、鳥原英嗣、東山繁樹、山本秀幸
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲嶺三代美、澳津志帆、山本秀幸
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鳥原英嗣、仲嶺三代美、前田紀子、上地珠代、吉浜麻生、中島由香里、 剣持直哉、山本秀幸
2. 発表標題 セブラフィッシュ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
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲嶺三代美、 澳津志帆、山本秀幸
2. 発表標題 GnRH受容体刺激後のPyk2とFynの相互作用におけるダサチニブの増強作用
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澳津志帆、仲嶺三代美、鳥原英嗣、東山繁樹、山本秀幸
2. 発表標題 GnRH受容体刺激後によるPyk2の活性化反応とproHB-EGFの切断反応
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澳津 志帆、高橋 華、仲嶺 三代美、鳥原 英嗣、山本 秀幸
2. 発表標題 GnRH 受容体刺激によるチロシンキナーゼPYK2 の活性化反応への CaM キナーゼ II の関与
3. 学会等名 平成29年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 平成29年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hideyuki Yamamoto, Sayomi Higa-Nakamine, Shiho Okitsu, Hidetsugu Torihara
2. 発表標題 Activation of PYK2 by PKD and CaM kinase II in cultured hypothalamic neurons
3. 学会等名 ISN-ENS meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sayomi Higa-Nakamine, Yujiro Omoto, Hideyuki Yamamoto
2. 発表標題 Cleavage of ErbB4 after G-protein-coupled receptor stimulation in hypothalamic neurons and anterior pituitary cells
3. 学会等名 ISN-ENS meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本 秀幸、仲嶺 三代美、 澳津 志帆、鳥原英嗣
2. 発表標題 Involvement of the CaM kinase family in signal transduction that stimulates the tyrosine kinase pathway in response to gonadotropin-releasing hormone
3. 学会等名 第60回日本神経化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 喜名 振一郎、山本 秀幸、仲嶺 三代美、鳥原 英嗣、金城 貴夫、新崎 章
2. 発表標題 受容体型チロシンキナーゼEphA4 の高分化型腫瘍における抗癌剤耐性能について
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本 秀幸、大本 裕次郎、澳津 志帆、仲嶺 三代美
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 和泉 俊輔、仲嶺 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 仲嶺 三代美、桑江 一希、山本 秀幸
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 澳津 志帆、仲嶺 三代美、鳥原 英嗣、東山 繁樹、山本 秀幸
2. 発表標題 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 IIの関与
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鳥原 英嗣、仲嶺 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

琉球大学医学研究科生化学講座 http://biochem.med.u-ryukyu.ac.jp

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鳥原 英嗣 (Torihara Hidetugu) (50757218)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (18001)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山本 秀幸 (Yamamoto Hideyuki) (60191433)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (18001)	
研究 協 力 者	澳津 志帆 (Okitsu Shiho)		