

平成21年5月14日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006-2008

課題番号：18380078

研究課題名（和文） 受容体シグナリングを活性化する機能性食品因子の
ケミカルバイオロジー研究課題名（英文） Chemical biology on functional foods that activate
receptor signaling

研究代表者

内田 浩二 (Uchida Koji)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授

研究者番号：40203533

研究成果の概要：

神経成長因子 (Nerve Growth Factor; NGF) は神経細胞の分化を促進し、その生存を維持する作用のある一群のタンパク質である。NGF 受容体 TrkA の過剰発現細胞を樹立し、TrkA の脱リン酸化に関与するプロテインチロシンホスファターゼ(PTP)の同定を行った。方法としては PTP 発現系を用い、NGF 刺激による TrkA のリン酸化を免疫ブロットにより調べた。その結果、TrkA リン酸化の制御にプロテインホスファターゼ PTP1B が関与していることを初めて明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：神経成長因子、ケミカルバイオロジー、受容体活性化、チロシンホスファターゼ、イソチオシアネート、神経細胞

1. 研究開始当初の背景

神経成長因子 (Nerve Growth Factor; NGF) は神経細胞の分化を促進し、その生存を維持する作用のある一群のタンパク質である。NGF は成人の脳においても、神経細胞の生存を維持するのみでなく、神経回路を保全・修復し、高次機能を再生させる機能を有する。申請者の研究グループでは、これまでに植物野菜成分あるいは酸化脂質代謝物など様々な生理活性物質の神経細胞生理作用に関する化学生物学的研究を行ってきた。この

研究過程において、ある種の食品成分（わさびに含まれるイソチオシアネート化合物、6-HITC）が NGF の作用を増強することを見いだした。この食品に含まれる“NGF 作用増強因子”による神経突起伸張を指標にした神経細胞分化促進作用の詳細な分子メカニズム解析の結果、増強因子は右図において NGF シグナル伝達における最上流に位置する NGF 受容体 TrkA の持続的な活性化（チロシン残基の自己リン酸化）を亢進することを見いだした。

2. 研究の目的

上記背景から、6-HITC が TrkA の脱リン酸化酵素に何らかの作用をすることで TrkA の持続的なリン酸化を引き起こし、NGF のシグナルを増強するという機構が推定され、更にその TrkA の脱リン酸化酵素として PTP1B が関与することが示唆されてきた。そこで、本研究課題では、PTP 過剰発現系および PTP 発現抑制系などによる基質のリン酸化レベルの影響の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞の培養

PC12 細胞は名古屋大学大学院生命農学研究科分子機能モデリング研究室の小鹿一教授より寄贈いただいた。

(2) 神経突起伸長の評価

24 穴 plate に細胞を 2×10^4 cells/dish となるように播き、培養し 37°C、5% CO₂ で 12~16 時間培養した。その後、FBS 0.5% を含んだ DMEM 培地に交換した。さらに 24 時間後、薬剤と NGF 1.5 ng/ml を投与し、8-72 時間後、顕微鏡を用いて観察を行った。この時、適当な場所から約 100 個の細胞を選び、細胞の長さよりも長い突起を有する細胞数を測定した。1 well につき 2 ヶ所で測定を行った。

(3) 発現プラスミド

PTP 発現プラスミドは三重大学生物資源学部の青木直人准教授より頂いた。SHP-2 発現プラスミドは Myc、その他はすべて HA もしくは GST との融合タンパク質として発現されるので抗 Myc 抗体、抗 HA 抗体もしくは抗 GST 抗体により検出することができる。

(4) siRNA

ネガティブコントロールと PTP1B に対する siRNA は Invitrogen 社より購入した。5'-UAACGAGCCUUUCUCAUGAUGCGG-3'

(5) 細胞への遺伝子導入

過剰発現及び発現抑制実験での遺伝子の導入はリポフェクション法により行った。

4. 研究成果

(1) PTP1B 過剰発現系における神経突起伸長活性の影響

当研究室において、TrkA のリン酸化制御に PTP1B が関与していることが示唆されてきた。またその検討の中で、PTP1B 一過的過剰発現系における NGF による TrkA の影響についての検討が行われている。それによると、

コントロールの細胞に比べて PTP1B 過剰発現細胞は TrkA のリン酸化が有意に抑制されることが確認されている。また TrkA の下流に位置する ERK のリン酸化においても TrkA と同様な結果が得られており、コントロールに比べて PTP1B 過剰発現細胞は ERK のリン酸化が抑制していることが確認されている。そこで PTP1B を安定的過剰発現させた PC12 細胞を用い、PTP1B を過剰発現させたときの神経突起伸長に与える影響を確認した。高濃度 NGF を投与し、投与後 0-72 時間、突起伸長活性について経時的に観察を行ったところ、コントロールの細胞では有意な神経突起伸長活性が認められたのに対し、PTP1B 過剰発現細胞においては伸長活性がコントロールの細胞に比べて約半分の 20%程度であり、低い伸長活性であった (Fig. 1)。

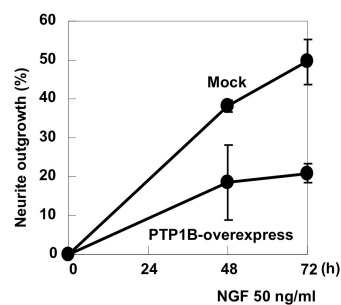
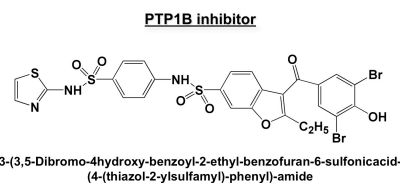


Fig. 1. PTP1B過剰発現による神経突起伸長活性の抑制

(2) PTP1B 特異的阻害剤を用いた解析

これまでの検討で、PTP1B の過剰発現系において TrkA のリン酸化が抑制され、さらに神経突起伸長活性においても抑制することが確認され、TrkA のリン酸化とそれに伴う突起伸長に PTP1B が関与している可能性が示唆された。しかしながらこれらの結果は、過剰発現といった通常以上の PTP1B が細胞内に存在することに由来して引き起こされた特異性の低下による脱リン酸化作用の影響

A



B

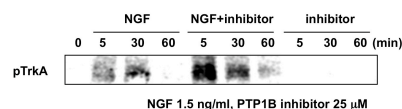


Fig. 2. PTP1B特異的阻害剤によるTrkAのリン酸化

である可能性が否定できない。そこで、そういった問題を解決するために、次の検討をした。当研究室におけるこれまでの検討で、PTP1B 特異的阻害剤 (Fig. 2)を用いた神経突起伸長についての検討も行われている。それによると、阻害剤投与によるリン酸化 TrkA への影響は、6-HITC 投与による突起伸長活性への影響と同様の結果で、低濃度 NGF 存在下で阻害剤の濃度依存的に神経突起伸長が観察されることが確認されている。そこで、PTP1B と TrkA の関係を明らかとするため、この PTP1B の特異的な阻害剤を用いて TrkA のリン酸化における解析を行った。PC12 細胞に低濃度 NGF 単独で投与した場合には、TrkA のリン酸化もレベルが弱く、また短時間のうちに TrkA のリン酸化が減少していくのに対し、低濃度 NGF 存在下で PTP1B の特異的な阻害剤を投与した場合には TrkA のリン酸化が亢進し、60 分まで TrkA のリン酸化が持続することが明らかとなった。また、PTP1B の特異的な阻害剤単独投与の場合には TrkA のリン酸化は認められなかった (Fig. 2)。以上から、PTP1B を阻害することで TrkA のリン酸化が持続・亢進することが明らかとなり、PTP1B が TrkA の脱リン酸化に関与していることが示唆された。

(3) PTP1B 発現抑制系における TrkA シグナル伝達への影響

更に、PTP1B の関与を確かめるために次の検討をした。近年、RNA interference (RNAi) を用いた標的遺伝子の発現抑制が注目を集めている。RNAi とは short interfering RNA (siRNA) とよばれる 21-23 塩基の二本鎖 RNA により配列特異的に遺伝子発現が抑制される現象のことである。この方法は、標的遺伝子 (mRNA) を破壊することで発現を抑制する為、遺伝子の機能解析に有効な方法であるといわれている。また、RNAi による検討は、このようにもともと細胞内に存在する遺伝子の発現を抑えることから、発現ベクターを用いた過剰発現系での問題を解決できると考えられている。そこで、siRNA を用いた PTP1B 抑制系において、TrkA のリン酸化について検討を行うこととした。PC12 細胞にネガティブコントロールと PTP1B siRNA をトランスフェクションし、低濃度 NGF を処理し、TrkA のリン酸化の経時的変化について検討を行った。その結果、低濃度 NGF 処理したコントロールの細胞においては投与後 5 分をピークに TrkA のリン酸化が減少していく傾向にあったのに対し、siRNA による PTP1B 発現抑制系においては、TrkA の有意なリン酸化が NGF 投与後 5 分から 60 分まで持続することが明らかとなった (Fig.3)。またこの時、神経突起伸長活性についても同様にトランスフェクションし、低濃度 NGF 投与による

伸長活性についての検討を行った。その検討の結果、siRNA による PTP1B 発現抑制した細胞はコントロールの細胞に比べて NGF の感受性が高く、濃度依存的により顕著な神経突起伸長活性が認められた (Fig. 3)。以上の結果から、PTP1B は TrkA のリン酸化を抑制することで、その下流である神経突起伸長活性を負に制御していることが確認された。

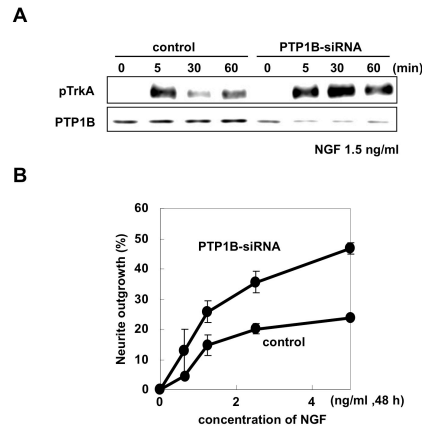


Fig. 3. PTP1B siRNAによる発現抑制系の検討

(4) PTP1B 過剰発現系における NGF シグナル伝達への影響

上述の検討から NGF 刺激による PTP1B が TrkA の脱リン酸化酵素であることが証明された。そこで6-HITC 処理による TrkA のリン酸化の持続亢進にも PTP1B が関与するかどうかについて検討を行うこととした。PTP1B が TrkA のリン酸化とその下流のシグナル伝達に与える影響について解析するために、まず TrkA と PTP1B を過剰発現させた PC12 細胞を用いて、低濃度 NGF と 6-HITC を投与し、TrkA のリン酸化の経時的変化をウェスタンブロットングで解析した。その結果、コントロールの細胞においては NGF 投与 5 分後に TrkA の顕著なリン酸化が認められ、リン酸化は 60 分後まで持続したのに対し、PTP1B

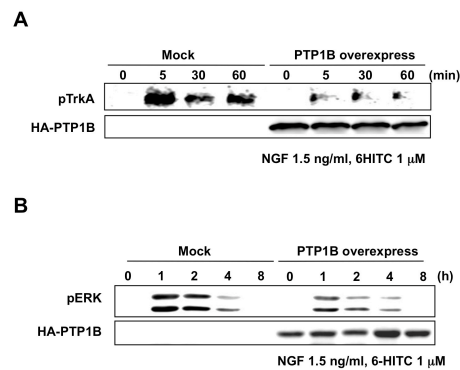


Fig. 4. PTP1B過剰発現によるNGFシグナリングの抑制

過剰発現細胞ではわずかな程度のリン酸化しか認められなかった (Fig. 4A)。次に、その下流に位置する ERK のリン酸化と、神経突起伸長についても検討を行った。PTP1B を一過的過剰発現させた PC12 細胞に低濃度 NGF と 6-HITC 同時投与による ERK のリン酸化について検討した結果は、コントロールの細胞に比べて PTP1B 過剰発現細胞は ERK のリン酸化レベルが抑制されていた (Fig. 4B)。また神経突起伸長活性について、PTP1B 安定的過剰発現細胞を用いて検討を行った。低濃度 NGF 存在下において 6-HITC を 0-5 mM で投与したところ、コントロールの細胞では 6-HITC の濃度依存的に有意な伸長活性が認められたのに対し、PTP1B 過剰発現細胞においては 6-HITC の濃度依存的な活性ではあるものの、最大濃度である 5 mM の 6-HITC 処理においてもコントロールに比べて約半分の伸長活性であった (Fig. 5)。

以上の検討から、PTP1B を過剰発現させたときの TrkA のリン酸化、その下流の ERK のリン酸化、さらには神経突起伸長活性への影響が NGF 処理と同様の結果となり、6-HITC 処理においても PTP1B がリン酸化 TrkA に関与することが確認された。前項までの検討から PTP1B が TrkA のリン酸基を脱リン酸化することが明らかとなったことから推測すると、6-HITC は PTP1B に何らかの作用をすることで TrkA のリン酸化を持続・亢進させていることが予測できる。

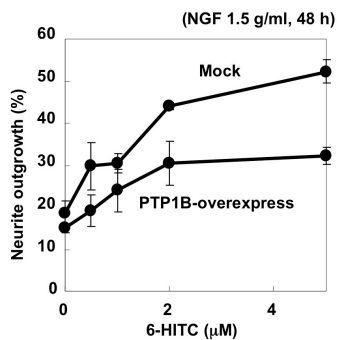


Fig. 5. PTP1B過剰発現による神経突起伸長活性の抑制

(5) 6-HITC 処理による TrkA と PTP1B の相互作用の解析

これまでの Substrate-trapping 変異体を用いた検討などから、NGF の処理によりリン酸化した TrkA が PTP1B と相互作用していることが明らかとなっている (data not shown)。また、NGF シグナリングと同様に、6-HITC 処理による TrkA のリン酸化にも PTP1B の関与が示唆された。そこで 6-HITC 処理によってリン酸化 TrkA と PTP1B の相互作用にどのような影響があるかについて検討した。まず、TrkA

安定的過剰発現細胞に PTP1B-D181A を一過的過剰発現させ、低濃度 NGF と 6-HITC を任意の濃度で投与した。その後、lysis buffer で回収した lysate に GSH-agarose beads を加えて 4 時間振とうした。lysis buffer で洗浄し、SDS-PAGE sample buffer を加えて加熱変性後、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、低濃度 NGF を単独処理したものに比べて 6-HITC を同時処理したサンプルは、6-HITC の濃度依存的に PTP1B-D181A と共沈降してくるリン酸化 TrkA の量が減少した (Fig. 6)。つまり、6-HITC を処理することで PTP1B とリン酸化 TrkA の相互作用する量が減少したことが分かり、6-HITC が何らかの作用をして、PTP1B とリン酸化 TrkA の相互作用を阻害していることが示唆された。

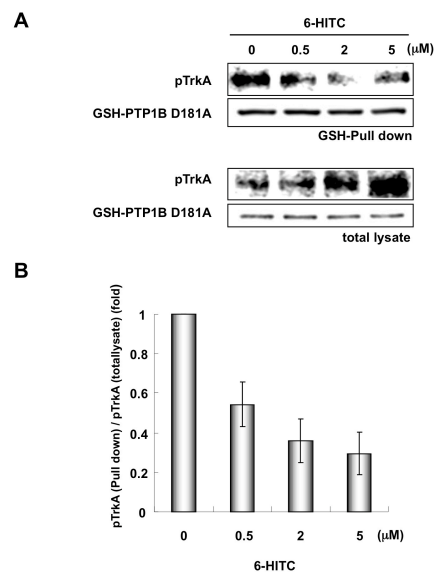


Fig. 6. 6-HITC処理によるPTP1BとTrkAの相互作用の変化

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 8 件)

1. Shibata, T., Nakahara, H., Kita, N., Matsubara, Y., Han, C., Morimitsu, Y., Iwamoto, N., Kumagai, Y., Nishida, M., Kurose, H., Aoki, N., Ojika, M., and Uchida, K. (2008) A food-derived synergist of NGF signaling: Identification of protein tyrosine phosphatase 1B as a key regulator of NGF receptor-initiated signal transduction. *J. Neurochem.* 170, 1248-1260. 査読有
2. Takahashi, N., Mizuno, Y., Kozai, D., Yamamoto, S., Kiyonaka, S., Shibata, T., Uchida, K., and Mori, Y. (2008) Molecular characterization of TRPA1 channel activation by cysteine-reactive inflammatory mediators.

- Channels*, in press. 査読有
3. Kawai, K., Nishikawa, T., Shiba, Y., Saito, S., Murota, K., Shibata, N., Kobayashi, M., Kanayama, M., Uchida, K., and Terao, J. (2008) Macrophage as a target of quercetin glucuronides in human atherosclerotic arteries: Implication in the anti-atherosclerotic mechanism of dietary flavonoids. *J. Biol. Chem.* 283, 9424-9434. 査読有
 4. Kusano, Y., Horie, S., Shibata, T., Satsu, H., Shimizu, M., Hitomi, E., Nishida, M., Kurose, H., Itoh, K., Kobayashi, A., Yamamoto, M., and Uchida, K. (2008) Keap1 regulates the constitutive expression of GST A1 during differentiation of Caco-2 cells via the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Biochemistry* 47, 6169-6177. 査読有
 5. Iwamoto, N., Sumi, D., Ishii, T., Uchida, K., Cho, A. K., Froines, J. R., and Kumagai, Y. (2007) Chemical knockdown of protein tyrosine phosphatase 1B by 1,2-naphthoquinone through covalent modification causes persistent transactivation of epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* 282, 33396-33404. 査読有
 6. Kobayashi, A., Kang, M.-I., Shibata, T., Uchida, K., and Yamamoto, M. (2006) Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of the Keap1-Clu3 complex. *Mol. Cell. Biol.* 26, 221-229. 査読有
 7. Shibata, T., Iio, K., Kawai, Y., Shibata, N., Kawaguchi, M., Toi, S., Kobayashi, M., Kobayashi, S., Yamamoto, K., and Uchida, K. (2006) Identification of a lipid peroxidation product as a potential trigger of the p53 pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 1196-1204. 査読有
 8. Vindis, C., Escargueil-Blanc, I., Elbaz, M., Marcheix, B., Grazide, M.-H., Uchida, K., Salvayre, R., and Nègre-Salvayre, A. (2006) Desensitization of platelet-derived growth factor receptor-b by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions. Prevention by Aldehyde Scavengers. *Circ. Res.* 98, 785-792. 査読有
- 会 (小樽) 2008 年 12 月 5 日
4. 内田浩二: 酸化ストレス研究が栄養食糧学にもたらすもの. 日本栄養食糧学会シンポジウム (坂戸) 2008 年 5 月 2 日
 5. 内田浩二: 親電子性物質によるケミカルバイオロジー. 学長重点研究「脳保護に向けたケミカルバイオロジー」シンポジウム (弘前) 2008 年 2 月 15 日
 6. Uchida, K.: 6-Methylsulfinylhexyl isothiocyanate as a multifunctional electrophile. International Conference on Food Factors for Health Promotion (Kyoto) 2007.11.27
 7. 内田浩二: 親電子性物質のケミカルバイオロジー. 内因性および外因性因子の毒性発現にかかわる分子標的と生体応答を担うシステム. 北陸大学学術フロンティアサテライトミーティング (岐阜) 2007 年 7 月 27 日
 8. 内田浩二: NGF 作用増強因子: NGF 受容体活性化を指標にした食品成分の評価. 日本動物細胞工学会 2007 年度大会シンポジウム (高崎) 2007 年 7 月 3 日
 9. 内田浩二: NGF 作用増強因子: 食べ物による神経細胞機能改善は可能か. 第 61 回日本栄養食糧学会記念シンポジウム (京都) 2007 年 5 月 19 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 浩二 (Uchida Koji)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号: 40203533

(2) 研究分担者

小鹿 一 (Ojika Makoto)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授
研究者番号: 50152492

[学会発表] (計 9 件)

1. 内田浩二: 受容体シグナリングを活性化
する低分子シネルギスト. お茶の水女
子大学セミナー (東京) 2009 年 1 月 14
日
2. 内田浩二: 受容体シグナリングを活性化
する低分子シネルギスト. 京都大学ウ
ィルス研究所セミナー (京都) 2008 年
12 月 19 日
3. 内田浩二: 生体内におけるタンパク質の
変成と疾病. 北海道薬科大学特別講演