

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20790658
 研究課題名 (和文) 甲状腺ホルモンのノンゲノミック作用の分子基盤とその生理的意義
 研究課題名 (英文) The molecular mechanism and physiological significance of thyroid hormone non-genomic action

研究代表者

曹 霞 (SOU KASUMI)
 名古屋大学・環境医学研究所・助教
 研究者番号：70432218

研究成果の概要 (和文)：最近我々は甲状腺ホルモン (T3) が PI3K→Akt キナーゼカスケードを活性化することを報告した。この T3 作用が受容体 (TR) を介するが、TR による遺伝子発現調節を伴わない、いわゆるノンゲノミック (non-genomic) 作用である。本研究は T3 が TR/ Src / p85 の複合体の形成を促進することにより、Src 及びその下流の p85 をリン酸化し、PI3K→Akt カスケードを活性化する分子機序を明らかにした。また、こうしたシグナルカスケードの活性化は神経細胞に対する T3 の抗アポトーシス作用に重要であることも証明した。

研究成果の概要 (英文)：We have reported previously that thyroid hormone (T3) stimulates the PI3K/Akt pathway through thyroid hormone receptor (TR). It is a non-genomic action since the novel protein synthesis is not involved in. In the present study we demonstrated that T3 promotes the complex formation of TR/ Src / p85, which induces the phosphorylation of Src and p85 sequentially and results in the activation of PI3K→Akt. This novel T3 action plays important role in neuronal cell survival.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 ・ 内分泌学

キーワード：甲状腺ホルモン、ノンゲノミック作用 PI3K→Akt、

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は T3 がその受容体 (TR) を介して PI3K を活性化し、次に Akt、mTOR、p70 S6 kinase からなるキナーゼカスケードを活性化することを見出した (Mol Endocrinol, 19:102, 2005)。こうした T3 作用は、TR を介するが TR による遺伝子発現調節を伴わない、

新しいノンゲノミック作用である。

(2) PI3K→AktR カスケードはインシュリンや成長因子によっても活性化され、細胞の増殖・生存や蛋白合成を調節する重要な制御系である。けれども T3 によるこうした系の直接制御のメカニズムはまだ不明である。

2. 研究の目的

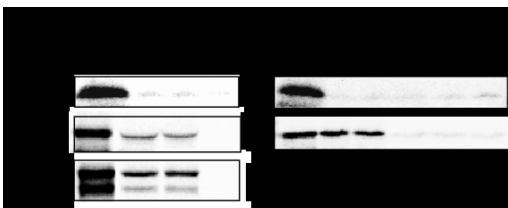
- (1) T3 による PI3K→Akt キナーゼカスケードの活性化する分子基盤を明らかにする。
- (2) 神経細胞には T3 による PI3K→Akt キナーゼカスケードの活性化の生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

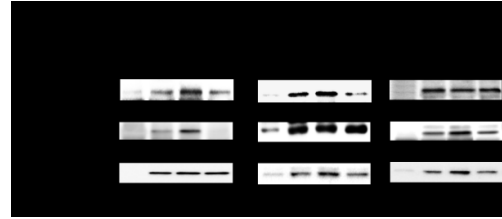
- (1) T3 による TR α /p85 α の複合体の形成を *in vitro*において、GST-pull down 法で検討した。また、N2aTR α 細胞において Src/TR α /p85 α の複合体の形成を共免疫沈殿法で検討した。
- (2) T3 による Src、PI3K-Akt のリン酸化を TR α 過剰発現するマウス神経芽細胞腫株 Neuro2a (N2aTR α) において、Western Blot 法で検討した。また、p85 抗体を用いて免疫沈殿を行い、PI3K の活性を測定した。
- (3) T3 による PI3K-Akt の活性化は神経細胞の生存を制御するか否かを検討するため、N2aTR α 及び神経細胞において、血清除去によってアポトーシスを誘導し、T3 存在下と非存在下でフローサイトメトリ法により細胞のアポトーシスを検討した。
- (4) 出生直後のマウス大脳皮質由来の神経細胞の初代培養を行い、Akt のリン酸化と T3 抗アポトーシス作用を Western Blot 法と免疫染色法で検討した。

4. 研究成果

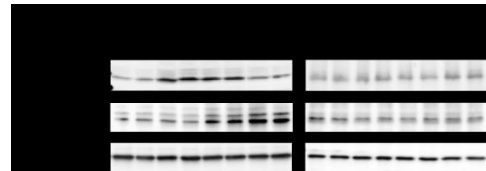
- (1) TR α はリガンド結合ドメインを介し、p85 の C 端側と T3 非依存性的に結合する。p85 とその N 端側 (NT) と C 端側 (CT) 欠失変異体の GST 融合蛋白は *E. coli* において合成されました。TR α とその欠失変異体は *in vitro* で転写・翻訳された同時に 35S メチオニンでラベリングされました。GST pull-down assay の結果示すように、TR-CT、TR-WT は p85 と結合して pull down されましたが、TR-NT は pull down されませんでした。一方、p85-CT は TR-CT を pull down しましたが、p85-NT ができませんでした。PI3K の活性は T3 の添加により調節されるため、細胞内に他の蛋白も T3 による PI3K の調節に関与することを示唆しました。



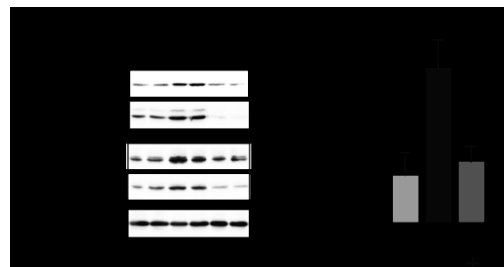
- (2) 細胞内 TR α 、p85 と Src は複合体を形成し、T3 は Src の活性かを介してその複合体形成を促進する。抗 p85 抗体で沈降されたサンプルを抗 TR 抗体或いは抗 Src 抗体でウエスタンブロットをしますと、T3 により p85/Src 或いは p85/TR 複合体の形成が増加することが判りました。これらの複合体の形成は Src 阻害剤 PP1 によって抑制されました。また、抗 TR 抗体或いは抗 Src 抗体で沈降されたサンプルを用いても、同様の結果が得られました。



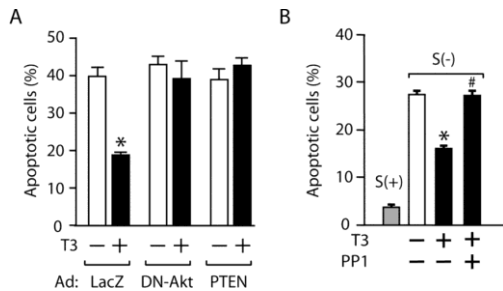
- (3) T3 による PI3K-Akt の活性化には Src の活性化が必要である。TR α を恒常的に発現する細胞株 N2aTR α に T3 を添加し、ウエスタンブロット法で、Src の活性化に必要な Y416 のリン酸化と Src の下流の ERK リン酸化を検討しました。N2aTR α 細胞では T3 による Src と ERK のリン酸化が 30 分以内に観察されました。一方、野生型 N2a細胞ではこうした T3 作用は認められなかった。この結果から、T3 は TR α を介して Src を活性化することが示されました。



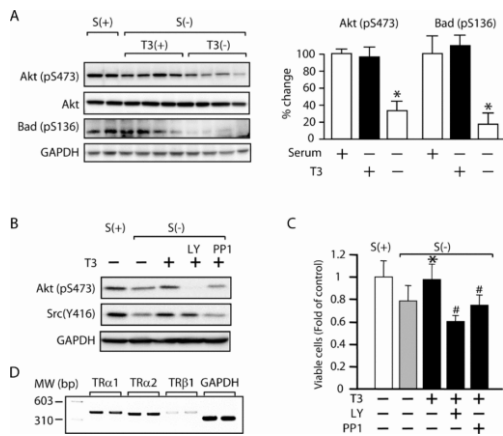
- また、T3 による Src と ERK のリン酸化は、Src の阻害剤 PP1 により抑制されました。同時に、T3 による Akt や GSK3 β のリン酸化も抑制されました。更に、PI3K 活性を測定すると、T3 により増加した PI3K の活性は PP1 によって抑制されました。



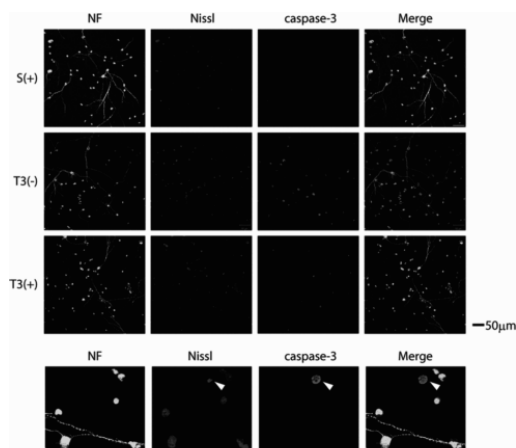
(4) T3 は Src 及び PI3K-Akt の活性化により神経細胞の生存を促進する。まずは、N2aTR α 細胞において、T3 の細胞保護作用は PI3K、Akt 及び Src の活性を抑制することによって減弱された。



マウス大脳皮質神経細胞においても、T3 は Src 及び PI3K-Akt の活性化によって、神経細胞の生存を促進した。



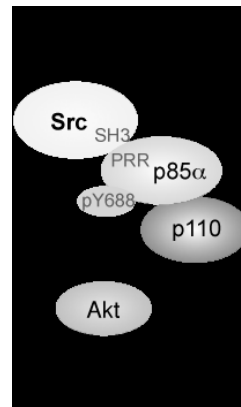
(5) T3 はマウス大脳皮質初代培養した神経細胞に抗アポトーシス作用を発揮する。



(6) 結論

T3 は Src のリン酸化を介して、Src/TR α /p85 α の複合体の形成を促進し、PI3K-Akt シグナリング経路を活性化する。こうした T3 の作用

が神経細胞の生存を促進する。



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)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Cao X, Kambe F, Yamauchi M, Seo H. Thyroid-hormone-dependent activation of the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade requires Src and enhances neuronal survival. *Biochem J.* 査読無 424(2), 2009 201-209

② Asai S, Cao X, Yamauchi M, Funahashi K, Ishiguro N, Kambe F. Thyroid hormone non-genomically suppresses Src thereby stimulating osteocalcin expression in primary mouse calvarial osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 387(1), 2009 92-96

③ Funahashi K, Cao X, Yamauchi M, Kozaki Y, Ishiguro N, Kambe F. Prostaglandin E2 negatively regulates AMP-activated protein kinase via protein kinase A signaling pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 査読無 88(1-2) 2009 31-35

④ Lu X, Kambe F, Cao X, Kozaki Y, Kaji T, Ishii T, Seo H. 3 β -Hydroxysteroid- Δ 24 reductase is a hydrogen peroxide scavenger, protecting cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Endocrinology.* 査読有 149(7) 2008 3267-73

⑤ Yamauchi M, Kambe F, Cao X, Lu X, Kozaki Y, Oiso Y, Seo H. Thyroid hormone activates adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, via intracellular calcium mobilization and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase beta. *Mol Endocrinol.* 査読有 22(4) 2008 893-903

⑥ Lu X, Kambe F, Cao X, Yamauchi M and Seo H. Insulin-like growth factor-I activation of Akt survival cascade in neuronal cells requires the presence of its cognate receptor in caveolae. Exp Cell Res. 査読無 314(2) 2008 342-51

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曹 霞 (SOU KASUMI)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：70432218