

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月19日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590254

研究課題名（和文）エストロゲン受容体とG蛋白共役型受容体の相互作用に関する分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism for the interaction between estrogen receptor and G protein-coupled receptor

研究代表者

有田 順（ARITA JUN）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：80128587

研究成果の概要（和文）：

エストロゲン受容体を介する機能調節に、G蛋白共役型受容体を介する相互作用がどのように関与しているかについては未解明である。本研究は、下垂体プロラクチン産生培養細胞を用いて、視床下部由来のドーパミンがG蛋白共役型ドーパミン受容体を介してエストロゲン受容体の転写活性化能を抑制する機構を解明した。本研究の結果は、核内受容体と細胞膜受容体の間の相互作用に関して、従来提唱されてきたものとは全く異なる、新規のメカニズムを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

It remains unknown how the interaction by G protein-coupled receptor is involved in the functional regulation of estrogen receptor. We showed that hypothalamic dopamine inhibited transcriptional activation of estrogen receptor through G protein-coupled dopamine receptor in pituitary lactotrophs in culture. The results suggest a novel mechanism of the interaction between nuclear receptors and cell membrane receptors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：エストロゲン、エストロゲン受容体、エストロゲン反応性配列、ドーパミン受容体、プロモクリプチン、プロラクチン産生細胞

## 1. 研究開始当初の背景

女性ホルモンであるエストロゲンは多くの標的器官に働いて、生殖だけではなく、生殖とは無関係と思われる機能に対しても多彩な作用を及ぼしている。エストロゲンの作用は、一部は膜受容体の下流にある蛋白リン

酸化酵素による情報伝達経路を介して非ゲノム性に現れることが最近示唆されているが、多くは、核内受容体であるエストロゲン受容体(ER)を介して、標的遺伝子の転写を修飾することによって現われる。エストロゲンと結合した ER は、標的遺伝子のプロモータ

一およびエンハンサー領域にある estrogen response element (ERE)と呼ばれる特定の DNA 配列に結合し、さらに、coactivator と呼ばれる蛋白質及び RNA polymerase を動員するとともに、これらの蛋白質と ER が蛋白質複合体を形成し、この蛋白質複合体が最終的に転写を実行することが明らかとなっている。

しかし、これらエストロゲン依存性の機能は、同時に、他の生体シグナルによっても修飾的調節を受けており、性格が異なる調節因子による巧妙な複合的調節が生殖という大きな目標の達成を可能としているといっても過言ではない。エストロゲンと共同して働く生体シグナルの一つである epidermal growth factor 等の増殖因子が、細胞膜受容体である tyrosine kinase 型受容体(RTK)を介して ER 系に相互作用を及ぼすことは、多くのエストロゲン標的細胞において研究されてきた。その結果、ER 系と RTK 系の両者の間に双方向性のクロストークが存在することが明らかとなり、これら相互作用の分子メカニズムに関して多くが解明されている。しかし、もう一つの代表的な細胞膜受容体である G 蛋白質共役型受容体(GPCR)を介するシグナル伝達系と ER 系との間での相互作用のメカニズムは未だに不明である。

我々がこれまで研究してきた下垂体前葉のプロラクチン産生細胞も代表的なエストロジェンの標的細胞である。このプロラクチン産生細胞において、プロラクチン産生や細胞増殖といった重要な機能がエストロゲンによって促進され、この促進が視床下部ホルモンであるドーパミンによって、GPCR であるドーパミン受容体 D2R を介して、抑制されている。このようなプロラクチン産生細胞に見られる、卵巣由来の情報と視床下部由来の情報の収斂は、上記の ER 系と GPCR 系の間での相互作用に基づく機能調節の典型例と考えられる。最近、我々は、ERE を介する ER の転写活性化能をプロラクチン細胞特異的に測定することができるリポーターアッセイ系を確立し、さらにこれを使って、正常プロラクチン産生細胞ではエストロゲンによる ER の転写活性化をドーパミン作動薬は著明に抑制することを見出した。これらの結果は、エストロゲン依存性プロラクチン分泌や細胞増殖に対するドーパミンの抑制作用が、少なくとも ER 転写活性化レベルで説明することが可能であることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、これら予備実験の結果に基づいて、以下に述べる実験を行い、ER の転写活性化能に対する D2R 受容体の抑制作用の分子機構を解明することを目指す。

- (1) プロラクチン産生初代培養細胞において、ドーパミン作動薬 bromocriptine (BC)による D2R 受容体刺激が ER 転写活性化能を抑制するのに関与する、D2R の下流のシグナル伝達経路を同定する。
- (2) ER の転写活性化は、ERE への結合を介さずに、他の転写因子に結合してその作用を修飾することによっても発現する。この ERE 非依存性の ER の転写活性化に対しても、BC は抑制効果を及ぼすか否かを調べる。
- (3) 初代培養プロラクチン産生細胞に見られたような BC による ER 転写活性化の抑制を再現できる株化細胞実験モデルを確立する。
- (4) ER の転写活性化能に影響を及ぼす coactivator および corepressor の ER への結合状態、また ER のセリン残基のリン酸化といった ER 受容体レベルでの変化が D2R による抑制時に起きているかを調べる。

## 3. 研究の方法

実験動物は、SLC 8 週令の Wistar 系 (slc:Wistar/ST) メスラットを用いた。プロラクチン細胞の増殖率は、増殖マーカーである BrdU 投与による BrdU 標識率をプロラクチン免疫陽性細胞を対象として求めた。下垂体前葉はメスラットから摘出し、酵素処理によって単一細胞に分散後、無血清培養下で培養し、実験に用いた。

## 4. 研究成果

(1) D2R 受容体刺激が ER 転写活性化能を抑制するのに関与する D2R の下流のシグナル伝達経路の同定

① ERE を介する ER の転写活性化能をプロラクチン細胞特異的に測定することができるリポーターアッセイ系を使って、正常プロラクチン産生細胞ではエストロゲンによる ER の転写活性化を BC は著明に抑制することを確認した。

② BC による抑制現象が内因性エストロゲン感受性遺伝子の発現に関して見られるか否かを調べた。Percoll 法によってプロラクチン産生細胞を濃縮した初代培養細胞集団に vehicle, estradiol, あるいは estradiol+BC 投与を行い、これら細胞の遺伝子発現を quantitative real time PCR 法によって定量した。BC は estradiol によって増加する Wnt4, Gal, Tgfa, Vip 遺伝子の発現を抑制した。BC は逆に estradiol によって増加する Oxt, Ckb, S100g 遺伝子の発現を促進した。

③ ER 転写活性のリポーターである luciferase の活性だけでなく luciferase mRNA レベルでの BC による抑制が起きているかを quantitative real time PCR 法によって調べたところ、エストロゲン及び BC の同時投与によって mRNA

はluciferase活性と並行して変化することが確認された。

④D2Rを介したBCのER転写活性化能に対する抑制作用の伝達経路を調べた。Ca ionophoreであるA23187を投与してもBCによる抑制は変化せず、Caイオンキレーター剤であるBAPTA-AMを投与してもエストロゲンによるER転写活性促進は阻害されなかったことから、細胞内Caの変化はBCの抑制作用には関与しないことが示唆された。次に、protein kinase C inhibitorであるcalphostin Cを、またMAPK inhibitorであるU0126、あるいはPI3 kinase inhibitorであるLY294002を投与しても、エストロゲンによるER転写活性促進は抑制されなかったことから、protein kinase C、PI3 kinase 及びMAPKも関与しないことが示唆された。次に、glycogen synthase kinase 3 (GSK3) をSB216763投与によって阻害するとエストロゲンによるER転写活性促進が抑制されたことから、GSK3はER転写活性調節に促進的役割を果たすことが考えられた。GSK3を活性化の上流protein kinaseであるAktの活性化をリン酸化認識抗体を使ったWestern blottingで調べると、エストロゲンによってリン酸化Aktが増加するが、BC投与によって変化しないことが明らかとなった。これらの結果より、AktおよびGSK3の抑制経路への関与の可能性は低いことが示唆された。

(2) D2R受容体刺激のERE依存性ER転写活性化能抑制に関する特異性の検討

①ERE非依存性のER転写活性化能についても、BCによる抑制性作用が認められるかを調べるため、AP1結合配列を含むプロモーター活性のレポーターアッセイを行ったが、エストロゲン反応性の活性上昇は認められず、一方、BCはAP1プロモーターの基礎活性に対しては抑制効果を及ぼした。

②BCがER転写活性化能だけでなく、他のプロモーター活性に対しても影響を及ぼすか否かを検討した。SRE依存性プロモーター活性は血清によって増加したが、BCはこの増加に影響を与えなかった。また、NFκB依存性プロモーター活性はIL-1bによって増加したが、この増加もBCによって変化を受けなかった。

(3) D2R受容体刺激のER転写活性化能抑制に関する株化細胞を用いた証明

プロラクチン産生初代培養細胞だけでなく細胞株においてもBCの抑制作用が現れるか否かを、ERおよびドーパミン受容体を持つプロラクチン産生細胞株細胞であるGH4ZR7細胞を用いて調べた。GH4ZR7細胞ではエストロゲンによってER転写活性化能が増加し、この増加はBC同時投与によって初代培養細胞程ではないが抑制された。

(4) D2R受容体刺激のER転写活性化能抑制とER downregulation及びリン酸化の関係

①BCによるERE依存性のER転写活性化能の抑制がER蛋白発現抑制によるものではないことを、Percoll法によってプロラクチン産生細胞の割合を50%から90%にまで濃縮した初代培養細胞集団を用いてWestern blotting法によって調べた。ER蛋白はエストロゲン24時間後には大きく減少したが、この発現レベルはエストロゲン及びBCの同時投与によってさらに減少することはなかった。

②エストロゲンによるERを介した転写活性化に重要と考えられるER Ser118のリン酸化の変化によってBCがERの転写活性化を抑制する可能性を調べた。vehicle, estradiol, あるいはestradiol+BCの投与を受けた下垂体細胞から蛋白を抽出し、ER Ser118のリン酸化を特異的に検出する抗体を用いてWestern blotting法によってリン酸化の程度を定量した。その結果、BC投与は細胞内のER含量およびER Ser118のリン酸化レベルに影響を与えない事が明らかとなった。ドーパミンによるER活性化能の抑制は、ER蛋白の分解やリン酸化機構の抑制によるものではないことが示唆された。

## 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6件)

① Mitsui, T., Taniguchi, N., Kawasaki, N., Kagami, Y., Arita, J.

Fetal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces expression of the chemokine genes Cxcl4 and Cxcl7 in the perinatal mouse brain.

Journal of Applied Toxicology 査読有, 31:279-284, 2011.

② Iguchi, H., Mitsui, T., Ishida, M., Kanba, S., Arita, J.

cAMP response element-binding protein (CREB) is required for epidermal growth factor (EGF)-induced cell proliferation and serum response element activation in neural stem cells isolated from the forebrain subventricular zone of adult mice.

Endocrine Journal 査読有, 58:747-759, 2011.

③ Mitsui, T., Ishida, M., Izawa, M., Kagami, Y., Arita, J.

Inhibition of Bcl3 gene expression mediates the anti-proliferative action of estrogen in pituitary lactotrophs in primary culture.

Molecular & Cellular Endocrinology 査読有,

345:68-78, 2011.

④ Ishida, M., Arita, J.

Inhibition of estrogen receptor transcriptional activity by dopamine D2 receptor activation in pituitary lactotrophs

Journal of Physiological Sciences 査読無  
61:S223, 2011

⑤ Ishida, M., Mitsui T., Izawa M., Arita, J.

Absence of ligand-independent transcriptional activation of the estrogen receptor via the estrogen response element in pituitary lactotrophs in primary culture.

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 査読有 118:93-101, 2010.

⑥ Hagihara, H., Ishida, M., Arita, J., Mitsushima, D., Takahashi, T., Kimura, F., Funabashi, T.

The cAMP response element-binding protein in the bed nucleus of the stria terminalis modulates the formalin-induced pain behavior in the female rat.

European Journal of Neuroscience 査読有  
30:2379-2386, 2009.

[学会発表] (計2件)

① 石田真帆、有田順

下垂体プロラクチン細胞におけるドーパミン D2 受容体活性化によるエストロゲン受容体転写活性の抑制

第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会 2011年3月29日神奈川県

② 石田真帆、有田順

プロラクチン産生細胞の増殖制御におけるエストロゲン作用

第82回日本内分泌学会 2009年4月24日群馬県

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/basic/physio01/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

有田 順 (ARITA JUN)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授  
研究者番号：80128587

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

石田 真帆 (ISHIDA MAHO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教  
研究者番号：80362086

三井 哲雄 (MITSUI TETUO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教  
研究者番号：20402084