

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500451

研究課題名(和文) 神経伝達物質のG蛋白質共役型受容体刺激によるErbB4の制御とシナプス機能

研究課題名(英文) Regulation of ErbB4 via stimulation of GPCR for neurotransmitter and synaptic functions

研究代表者

山本 秀幸 (Yamamoto, Hideyuki)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60191433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：ErbB4はシナプス機能に重要な役割を演じている。以前に、我々は、視床下部の神経細胞(GT1-7細胞)を用いて、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)がErbB4をトランスに活性化することを見いだした。さらに、高濃度のGnRH処理ではErbB4が切断されることを見いだした。今回の検討で、ErbB4の活性化には、Gq/11タンパク質、PKC、PKD、FynおよびPYK2が関与することが明らかになった。これに対し、ErbB4の切断には、PKD、FynおよびPYK2は関与しないことが明らかになった。これらの結果は、二つの反応ではPKCの活性化後の分子機構が異なることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：ErbB4 belongs to the ErbB protein family and is abundantly expressed in neurons. It plays important roles in synaptic functions. In the previous work, we found that gonadotropin-releasing hormone (GnRH) transactivated ErbB4 in hypothalamic neurons (GT1-7 cells). We also found that the higher concentration of GnRH induced the cleavage of ErbB4. In the present study, we examined the molecular mechanisms of GnRH-induced activation and cleavage of ErbB4. ErbB4 activation was measured by the ErbB4-induced activation of ERK. We found that Gq/11 proteins, PKC, PKD, Fyn and PYK2 were involved in the activation of ErbB4. In contrast, only Gq/11 proteins and PKC, but not PKD, Fyn and PYK2, were involved in the cleavage of ErbB4. These results suggest that the activation and cleavage of ErbB4 are induced by different molecular mechanisms after PKC activation.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：GT1-7細胞 G蛋白質共役型受容体 ゴナドトロピン放出ホルモン ErbB4 Gq/11蛋白質 PKC Fyn 脱感作現象

1. 研究開始当初の背景

ErbB4 は、EGF 受容体 (EGFR) ファミリーの一つであり、神経細胞で多量に発現している。Heparin-binding-EGF (HB-EGF) やニューレグリン 1 (NRG1) などのリガンドが ErbB4 に結合すると、チロシン残基の自己リン酸化が起こり活性化される。ErbB4 の活性化は、シナプスの形成・機能発現に重要であることが知られている。また、遺伝子解析により、*ErbB4* 遺伝子が統合失調症の原因遺伝子の一つであることも報告されている (Nat Rev Neurosci, 2008)。すなわち、ErbB4 の機能異常がシナプスの形成や機能の障害を引き起こし統合失調症の発症に関与すると考えられる。しかし、EGFR に比べて ErbB4 の制御機構については不明な点が多い。

これまでに、我々は視床下部神経細胞由来の培養神経株細胞である GT1-7 細胞を用いて、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) のひとつであるゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 受容体の刺激による細胞応答を検討してきた (Arch Biochem Biophys, 2007)。2012 年に、GnRH 受容体の短時間の刺激により、ErbB4 が活性化されることを見いだした (J Cell Physiol, 2012)。その後の研究で、GnRH 受容体の刺激が ErbB4 をトランスに活性化し、MAP キナーゼの中の ERK を活性化することが明らかになった。さらに、GnRH 受容体の長時間の刺激によって、ErbB4 が細胞膜上で切断されて脱感作を受けることを見いだした (J Cell Physiol, 2012; J Pharmacol Sci, 2014)。

2. 研究の目的

GT1-7 細胞を用いて、GnRH 受容体刺激による ErbB4 の活性化と ErbB4 の切断に関与する分子機構を、細胞内情報伝達機構を中心に検討することを目的とした。また、GnRH 受容体刺激後の細胞応答の特徴を明らかにする目的で、GnRH 受容体刺激によって、発現の変動する遺伝子を網羅的に解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞内情報伝達機構の検討

ErbB4 の活性化は、ERK の活性化を指標に検討した。ERK の活性化と ErbB4 の切断に関わる候補分子を、主に、siRNA を用いたノックダウン実験と阻害剤により検討した。候補分子として、今回は、各種の G タンパク質、プロテインキナーゼ C (PKC)、プロテインキナーゼ D (PKD)、Src ファミリーを検討した。

PKC と PKD の活性化は、細胞膜へのトランスロケーションにより検討した。

(2) マイクロアレイによる発現解析

GnRH 受容体刺激によって発現が変化する遺伝子を網羅的に解析した。GT1-7 細胞を GnRH で 30 分間刺激し、全 RNA を精製した。マイクロアレイは Agilent 社の SuperPrint G3

Mouse GE を使用した。

4. 研究成果

(1) ERK の活性化および ErbB4 の切断への $G_{q/11}$ タンパク質の関与

様々な G タンパク質の選択的阻害剤を用いて、関与する G タンパク質を検討した。その結果、 $G_{q/11}$ タンパク質のみが GnRH 受容体刺激後の ERK の活性化と ErbB4 の切断の両方に必須であることが明らかになった。

(2) PKC の活性化反応

細胞質分画と膜分画を分離して、PKC のトランスロケーションを指標に PKC の活性化を検討した。GnRH 受容体刺激により、PKC δ と PKC ϵ の細胞質から細胞膜へのトランスロケーションが起こることが明らかになった。

(3) ERK の活性化および ErbB4 の切断への PKC の関与

GT1-7 細胞を PMA 存在下で 20 時間培養し、PKC をダウンレギュレーションさせた。その後 GnRH 処理を行うと、ERK の活性化がほぼ完全に抑制された (図 1A)。PKC の阻害剤 (Bisindolylmaleimide I) と siRNA を用いた実験により、ERK の活性化には PKC δ が関与することが明らかになった。また、GnRH 受容体刺激による ErbB4 の切断も PKC のダウンレギュレーションによって顕著に抑制された (図 1B)。本反応には、PKC δ 以外の PKC も関与することが示唆された。

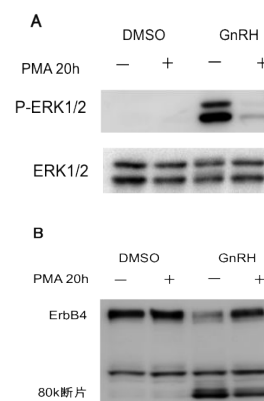


図 1. GnRH 受容体刺激による ERK の活性化および ErbB4 の切断への PKC の関与 A: GT1-7 細胞を PMA で 20 時間処理し、その後 GnRH で処理すると ERK の活性化 (P-ERK1/2) は顕著に抑制された。B: 同様な処理の結果、ErbB4 の切断は約 40% が抑制された。

(4) PKC による PKD の活性化反応

GnRH 受容体刺激により、PKD が活性化されることを見いだした。そこで、PKD が PKC により活性化される可能性を検討した。PKC のノックダウン実験により、PKD の活性化には、PKC δ が関与することが明らかになった。

(5) ERKの活性化へのSrcの関与

Srcファミリーのリン酸化抗体を用いた免疫プロットにより、GT1-7細胞では、SrcファミリーがGnRH受容体の刺激に関係なく、常に活性化されていることが明らかになった。Srcファミリーの阻害剤であるDasatinibでの細胞の前処理により、GnRH受容体刺激によるERKの活性化が抑制された。すなわち、ERKの活性化へのSrcファミリーの関与が示唆された。しかし、ErbB4の切断の抑制は見られなかった。

(6) FynによるPYK2の活性化反応

GnRH受容体刺激により、PYK2も活性化されることを見いだした。そこで、PYK2がSrcファミリーにより活性化される可能性を検討した。Dasatinibでの前処理により、GnRH受容体刺激によるPYK2の活性化が阻害された。さらに、SrcファミリーのFynに特異的な抗体を用いた免疫沈降実験により、FynとPYK2との相互作用が確認された。これらの結果より、FynがPYK2の活性化に関与することが示唆された。

(7) ERKの活性化へのPKDとPYK2の関与

PKDとPYK2のノックダウン実験により、両者がERKの活性化に関与することが明らかになった。しかし、ErbB4の切断の抑制は見られなかった。さらに、PKDがPYK2の活性化に関与することが明らかになった。これらの検討から、GnRH受容体刺激後のERKの活性化(ErbB4のトランスな活性化)に至る細胞内情報伝達機構として、図2のカスケード機構の存在が示唆された。

また、ErbB4の切断には $G_{q/11}$ とPKCは関与するが、PKD、Fyn、PYK2は関与しないことが明らかになった。すなわち、ErbB4の活性化と切断では、PKCの活性化後の分子機構が異なることが示唆された。

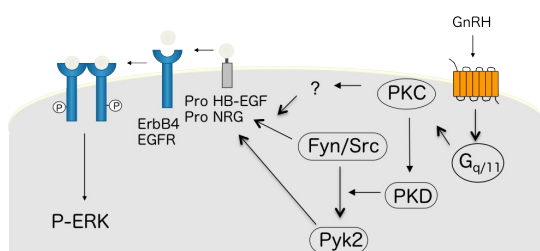


図2. GnRH刺激によってEGFR/ErbB4がトランスに活性化され、ERKが活性化される機構

(8) 遺伝子発現の変化

GnRH受容体刺激による遺伝子発現の変化を、DNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、GnRH処理後30分で、ERKの脱リン酸化酵素(DUSPs)の発現が増

加することが示唆された。RT-PCR法による解析では、2種類のDUSPsの発現がGnRH受容体刺激の30~60分後に増加することが明らかになった。ERKの活性化は、GnRH受容体刺激後5分でピークとなり、30分以降には減少する。すなわち、DUSPsの発現を増加させて、ネガティブフィードバック機構により、ERKの活性化を抑制する可能性が示唆された。今後は、GnRH受容体刺激によるDUSPsの遺伝子発現の分子機構を詳細に検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

(雑誌論文)(計13件)

Yamamoto H, Higa-Nakamine S, Noguchi N, Maeda N, Kondo Y, Toku S, Kukita I & Sugahara K. Desensitization by Different Strategies of Epidermal Growth Factor Receptor and ErbB4. J Pharmacol Sci 124: 287-293, 2014. 査読有

DOI: 10.1254/jphs.13R11CP

Noguchi N, Kondo Y, Maeda N, Higa-Nakamine S, Toku S, Maruyama J, Isohama Y, Kukita I, Sugahara K & Yamamoto H. Phosphorylation of epidermal growth factor receptor at serine 1047 by MAP kinase-activated protein kinase-2 in cultured lung epithelial cells treated with flagellin. Arch Biochem Biophys 529:75-85, 2013. 査読有

DOI: 10.1016/j.abb.2012.11.006.

山本秀幸, 近藤豊, 野口信弘, 仲嶺三代美, 前田紀子, 徳誠吉, 磯濱洋一郎, 久木田一郎, 須加原一博: レジオネラ肺感染症におけるフラジェリンの型肺胞上皮細胞に対する影響. 日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌 44: 57-58, 2013. 査読無

<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=di5inter&ye=2013&vo=44&issue=>

山本秀幸, 仲嶺三代美: 視床下部神経細胞でのGnRH受容体刺激によるErbB4の切断反応. 生体の科学 64(5): 468-469, 2013. 査読無

<http://medicalfinder.jp/ejournal/2425101519.html>

Higa-Nakamine S, Maeda N, Toku S, Yamamoto T, Yingyuenyong M, Kawahara M & Yamamoto H. Selective cleavage of ErbB4 by G-protein-coupled gonadotropin-releasing hormone receptor in cultured hypothalamic neurons. J Cell Physiol 227: 2492-2501, 2012. 査読有

DOI:10.1002/jcp.22988

Higa-Nakamine S, Suzuki T, Uechi T, Ghakraborty A, Nakajima Y, Nakamura M, Hirano N, Suzuki T, Kenmochi N. Loss of ribosomal RNA modification causes developmental defects in zebrafish. *Nucleic Acids Res* 40(1): 391-398, 2012. 査読有

DOI: 10.1093/nar/gkr700.

Nishijima S, Kadekawa K, Ashitomi K, Yamamoto H & Sugaya K. Effect of chemical stimulation of the medial frontal lobe on the micturition reflex in rats. *J Urol* 187: 116-1120, 2012. 査読有

DOI: 10.1016/j.juro.2011.10.128.

Sugaya K, Nishijima S, Kadekawa K, Ashitomi K & Yamamoto H. Effect of distigmine combined with propiverine on bladder activity in rats with spinal cord injury. *Int J Urol* 19: 480-483, 2012. 査読有

DOI:10.1111/j.1442-2042.2011.02953.x

Taniguchi S, Kimura T, Umeki T, Kimura Y, Kimura H, Ishii I, Itoh N, Naito Y, Yamamoto H & Niki I. Protein phosphorylation involved in the gene expression of the hydrogen sulphide producing enzyme cystathionine γ -lyase in the pancreatic β -cell. *Mol Cell Endocrinol* 350: 31-38, 2012. 査読有

DOI: 10.1016/j.mce.2011.11.016.

Kadekawa K, Nishijima S, Ashitomi K, Yamamoto H & Sugaya K. Excitatory effect of propiverine hydrochloride on urethral activity in rats. *Int J Urol* 19: 575-582, 2012. 査読有

DOI:10.1111/j.1442-2042.2012.02977.x

Kondo Y, Higa-Nakamine S, Noguchi N, Maeda N, Toku S, Isohama Y, Sugahara K, Kukita I & Yamamoto H. Induction of epithelial-mesenchymal transition by flagellin in cultured lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303: L1057-L1069, 2012. 査読有

DOI: 10.1152/ajplung.00096.2012.

Mizutani A, Maeda N, Toku S, Higa-Nakamine S, Isohama Y, Sunakawa H, Sugahara K, Yamamoto H. Interaction of ethyl pyruvate in vitro with NF- κ B subunits, RelA and p50. *Eur J Pharmacol* 2011;650:151-156. 査読有

DOI: 10.1016/j.ejphar.2010.10.020.

Nishijima S, Sugaya K, Kadekawa K, Ashitomi K, Yamamoto H. Efficacy of propiverine, an anticholinergic agent, in young and old rats. *Life Sci*

2011;89:456-459. 査読有

DOI: 10.1016/j.lfs.2011.07.013.

[学会発表](計 17 件)

仲嶺三代美: 視床下部神経細胞での GnRH 刺激による Gq/11 を介した ErbB4 の切断と ERK の活性化反応. 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 神戸市

徳誠吉: 細胞周期を通じて翻訳後修飾を受けにくいヒストンの性質. 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 神戸市

仲嶺三代美: 視床下部の培養細胞株における ErbB ファミリーの切断と MAP キナーゼの活性化反応. 第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日 横浜市

山本秀幸: 視床下部神経細胞での GnRH による ERK の活性化への PYK2 の関与.

Neuro2013 2013 年 6 月 21 日 京都市

仲嶺三代美: タンパク質共役型受容体刺激による MAP キナーゼの活性化と ErbB ファミリーの切断. 平成 25 年度日本生化学会九州支部例会 2013 年 5 月 19 日 佐賀市

野口信弘: 培養肺胞上皮細胞でのフラジェリン処理による FGF 受容体のリン酸化反応. 平成 25 年度日本生化学会九州支部例会 2013 年 5 月 19 日 佐賀市

仲嶺三代美: G タンパク質共役型受容体刺激による PKC 依存的な ERK の活性化反応. 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日 福岡市

徳誠吉: ヒストン H3 の M 期特異的新規リン酸化部位の同定. 第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日 福岡市

山本秀幸: 神経細胞における ErbB4 受容体の GnRH による制御機構. 第 65 回日本薬理学会西南部会 2012 年 11 月 23 日 熊本市

山本秀幸: レジオネラ肺感染症におけるフラジェリンの型肺胞上皮細胞に対する影響. 日本肺サーファクタント・界面医学第 48 回学術研究会 2012 年 10 月 27 日 熊本市

山本秀幸: 視床下部神経細胞での GnRH による ERK の活性化への PYK2 の関与. 第 55 回日本神経化学学会大会 2012 年 10 月 1 日 神戸市

仲嶺三代美: 神経細胞における ErbB4 の活性化と切断機構の解明. 平成 24 年度日本生化学会九州支部例会 2012 年 5 月 26 日 福岡市

近藤豊: 培養肺胞細胞のフラジェリン処理による上皮間葉移行の誘導. 平成 24 年度日本生化学会九州支部例会 2012 年 5 月 26 日 福岡市

仲嶺三代美: 神経細胞における G タンパク質共役型受容体による ErbB ファミリーの制御. 第 34 回日本分子生物学会年

会 2011年12月16日 横浜市
仲嶺三代美：GnRH 受容体刺激による EGF
受容体の活性化と切断反応の分子機構。
第38回日本脳科学会 2011年10月9日
那覇市
山本秀幸：視床下部神経細胞での GnRH 受
容体刺激による ErbB4 の切断反応。第
84回日本生化学会大会 2011年9月22
日 京都市
仲嶺三代美：GnRH 受容体刺激による EGF
受容体の切断反応。日本生化学会九州支
部例会 2011年5月22日 久留米市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3.u-ryukyu.ac.jp/biochemistry/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 秀幸 (YAMAMOTO, Hideyuki)

琉球大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60191433

(2) 研究分担者

仲嶺 三代美 (NAKAMINE, Sayomi)

琉球大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20381105