

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：33905

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011年～2012年

課題番号：23791858

研究課題名（和文） 胎盤特異的転写因子 GCMA/1 の機能制御における PKC の役割の解明

研究課題名（英文） The roles of PKC in regulating the function of placenta-specific transcription factor GCMA/1

## 研究代表者

安井 裕子（YASUI YUKO）

金城学院大学・付置研究所・その他

研究者番号：80434554

## 研究成果の概要（和文）：

GCMA の機能制御メカニズムにおいて、PKC および MEK 依存的なシグナルの活性化により、GCMA の 328、378 および 383 番目のセリン残基がリン酸化され、このリン酸化が GCMA のユビキチン化レベルの増加による分解を促進するとともに、GCMA の転写活性化能の促進に働いていることを見出した。分解系と転写活性化能の促進が同時に起こることから、PKC 依存的シグナルが GCMA の活性の上限を設定する役割を担っている可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

Serines 328, 378 and 383 on GCMA are phosphorylated by the PKC- and MEK-dependent signaling pathway. The phosphorylation of GCMA contributes to enhance its degradation by increase of the ubiquitination level as well as its transcriptional activity.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：GCMA（GCM1）、胎盤

## 1. 研究開始当初の背景

胎盤の形成異常や機能不全は妊娠高血圧症候群をはじめ、様々な妊娠病態の要因のひとつとして考えられている。胎盤は、ほ乳類の受精卵から最初に分化してくる組織であり、正常な胎盤形成は、妊娠の確立、胎児の発育に必須の過程である。胚が子宮に着床後、ヒト胎盤の幹細胞である cytotrophoblast が extravillous または villous の2つの経路に分かれて分化する。extravillous 経路では、基底脱落膜に深く浸潤する増殖性 invasive trophoblast に分化し、さらにその一部が、

interstitial trophoblast または endovascular trophoblast に分化、子宮内の間質や血管に浸潤し、胎盤血流の増大を引き起こす。一方、villous 経路では、cytotrophoblast が細胞融合することによって syncytiotrophoblast に分化し、絨毛の表層を構成する。syncytiotrophoblast はエストロゲンやヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）、ヒト胎盤性ラクトゲン（hPL）などのホルモンを分泌することにより、正常妊娠の継続に寄与している。妊娠高血圧症候群ではこれらの2つの経路の細胞分化それぞれに異常が

見られ、これを端に症状が進行するという報告がなされている。このような胎盤の分化過程に本研究が対象としている Glial cells missing a (GCMa, GCM1 と呼ばれる) が関与していることが知られている。

GCMa は絨毛の構成細胞である syncytiotrophoblast 特異的に発現しており、cytotrophoblast から syncytiotrophoblast への分化を制御していることが示唆されている。また GCMa 遺伝子のノックアウトマウスは、胎児には異常は認められないが、母体と胎児間の栄養やガス、老廃物の交換に重要な胎盤の絨毛構造が形成されず、胎盤機能不全により胎生致死を示す。

これらのことから、GCMa は胎盤の分化、発達、機能発現に重要な役割を担っていることが示唆されるが、胎盤の分化過程においてどのように GCMa の発現が制御されているのか、その全貌は明らかではない。これまでに protein kinase A (PKA) 依存的なシグナル経路が、GCMa の発現増加、タンパク質安定性の増加、DNA 結合性の増加など様々な段階で、GCMa の転写活性 GCMa の活性を正に制御することが明らかとなっているが、他のシグナル経路の関連についてはほとんど報告されていない。

## 2. 研究の目的

これまでに protein kinase C (PKC) 活性化剤である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) が、PKA 依存的シグナルの活性化および GCMa の転写活性の増加によって見られるような絨毛細胞の細胞融合や hCG 産生を増加させることが報告されたが、PKC 依存的シグナルが GCMa に対してどのように作用するのかが検討されていなかった。そこで、本研究では、GCMa の機能制御において PKC がどのような役割を担っているのか解明することを目指し、GCMa の発現や活性に対する PKC 依存的シグナルの影響について検討することとした。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞

JEG-3 細胞および HEK293T 細胞は American Type Culture Collection (MD, USA) より購入し、JEG-3 細胞は 1 mM sodium pyruvate、1% MEM Non-Essential Amino Acids、10% Fetal Calf Serum (FCS) を含む DMEM を用い 5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で培養した。HEK293T 細胞は 10% FCS を含む DMEM を用い 5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C で培養した。薬剤添加の際は JEG-3 細胞を FCS を含まない培養液で培養した。HEK293T 細胞はトランスフェクション後、FCS を含まない培養液に交換し、薬剤を添加した。トランス

フェクションは FugeneHD (Promega, WI, USA) を用いて行った。

### (2)イムノブロット

HEK293T 細胞および JEG-3 細胞は cell lysis buffer を用いて回収し、SDS-PAGE サンプルを作製した。8%、10% または 12% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離、PVDF メンブレンに転写した。1 次抗体、2 次抗体で処理した後、ECL Western blotting detection reagents (GE Healthcare Bio-Science Co., NJ, USA) または ImmunoStarLD reagents (和光純薬工業、大阪) を用いてシグナルを検出した。バンドの強度は画像解析ソフト ImageJ を用いて数値化した。

### (3)RNA 抽出および定量的 RT-PCR

JEG-3 細胞を各種薬剤で処理後、total RNA を精製した。これをテンプレートとし、PrimeScriptII 1st strand cDNA Synthesis kit (タカラバイオ、滋賀) を用いて cDNA を合成した。TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, CA, USA) を用い GCMa (Hs00172692\_m1) の mRNA を定量した。内在性コントロールとして 18s rRNA (Pre-Developed TaqMan Assay Reagents) を用いた。

### (4)GCMa リン酸化の検出

SDS-PAGE サンプルを Phos-tag acrylamide (ナード研究所、広島) を含むアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、通常のイムノブロットと同様、PVDF メンブレンに転写し、目的のバンドを検出した。

### (5)パルスチェイス実験

JEG-3 細胞または各種 GCMa 発現プラスミドをトランスフェクションした HEK293T 細胞を薬剤で処理後、回収し、イムノブロットにより GCMa タンパク質量を検出した。

### (6)統計学的解析

データはエクセル統計を用い、次元配置分散分析および Turkey、または Kruskal-Wallis および Sheffe の多重検定を行った。

### (7)ELISA によるヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の定量

JEG-3 細胞を薬剤で処理し、培養液中の hCG 量を Chorionic Gonadotropin, Human, ELISA kit (Immunospec Corporation, CA, USA)

を用いて測定した。

#### (8) 免疫沈降法

FLAG タグを付加した野生型 GCMA (GCMA WT) 発現プラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、細胞を回収した。Universal Magnetic Co-IP Kit (Active Motif, CA, USA) のプロトコールに従い、抗 GCMA 抗体を用いて免疫沈降した。免疫沈降物は、蛋白用グラジェントゲル (5-20%) を用いた SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンに転写した。1 次抗体に抗 Ubiquitin 抗体または抗 DYKDDDDK tag モノクローナル抗体、2 次抗体に Clean-Blot IP Detection Reagent (Thermo Fisher scientific, IL, USA) を用い、イムノブロットを行った。

#### (9) ルシフェラーゼアッセイ

HEK293T 細胞に各種 GCMA 発現プラスミドと GCMA 結合配列-ACCCTCAT-の 5 回リピート配列を含むルシフェラーゼレポータープラスミドをトランスフェクションし、その後 FCS を含まない培養液に交換し、薬剤で処理した。細胞上清を回収し、Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega, WI, USA) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) PKC シグナルの GCMA の発現に対する影響

JEG-3 細胞を PKC 活性化剤である PMA 処理し、GCMA タンパク質量の変化を調べた。その結果、DMSO 処理したコントロールの細胞に比べ、PMA 処理 1 時間後から減少するが、6 時間後にはその減少が見られなかった。次に PMA の GCMA の転写レベルに対する影響を調べたところ、GCMA mRNA 量は PMA の濃度依存的に、また時間経過とともに減少する傾向が見られた。

#### (2) PMA の GCMA 分解に対する影響

GCMA タンパク質量が PMA 処理後すばやく減少することから、タンパク質分解系の促進による影響が考えられた。そこで、タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド (CHX) を用いて GCMA タンパク質の分解について検討した。その結果、わずかではあるが、PMA によって GCMA タンパク質減少が促進された。また、PKC および MEK 阻害剤によって PMA の作用が抑制されたことから、PKC および MEK 依存的なシグナルによって GCMA の分解が促進される可能性が示唆された。

#### (3) PMA による GCMA のリン酸化

過去に、GSK-3 $\beta$  による GCMA のリン酸化が GCMA 分解を促進することが報告されており、PMA による GCMA 分解にも GCMA のリン酸化が関与している可能性が考えられた。そこで、PMA 処理による GCMA のリン酸化の変化について検討した。その結果、PMA の濃度依存的に GCMA のリン酸化レベルが増加することが明らかとなった。また、このリン酸化は PKC および MEK 阻害剤によって抑制されたことから、PKC および MEK/ERK 依存的なシグナルによって GCMA のリン酸化が促進されることが示唆された。

#### (4) PMA による GCMA リン酸化部位の同定

次に、PMA による GCMA のリン酸化部位の同定を試みた。タンパク質のリン酸化アミノ酸残基を予測するデータベース、NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>) を用いて、GCMA アミノ酸配列上の PKC および ERK によりリン酸化されるアミノ酸残基を調べ、これらのアミノ酸をアラニンに置換した点変異体発現プラスミドを作製した。これらを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、PMA 処理によるリン酸化に影響があるか検討したところ、328 番目、378 番目、および 383 番目のセリン残基が PMA によってリン酸化されることが示唆された。

#### (5) GCMA 分解におけるリン酸化セリン残基の関与

PMA によってリン酸化されるセリン残基が GCMA の分解に関与しているか調べるため、それぞれの変異体を発現させた HEK293T 細胞を CHX 存在下 PMA で処理し、変異体タンパク質量の変化を検討した。その結果、GCMA wild type (WT) および S328A、S378A、S383A は PMA 処理後減少した。一方、S328、378、383A では、PMA 処理による減少が見られなかったことから、GCMA の分解はこれらの 3 箇所のセリン残基リン酸化が必要である可能性が示唆された。また、GCMA はユビキチン-プロテアソーム系により分解されることが報告されているので、PMA 処理によってユビキチン化レベルがどのように変化するか検討したところ、GCMA WT では PMA 処理によりユビキチン化レベルが増加するのに対し、S328、378、383A ではユビキチン化レベルが変化しないことが明らかとなった。よって、PMA 処理による GCMA のリン酸化が、GCMA のユビキチン化レベルを増加させることによって、分解を促進していることが示唆された。

#### (6) PKC および MEK/ERK 依存的シグナルの

#### GCMa 転写活性化能への影響

PMA およびそれによる GCMa のリン酸化が GCMa の転写活性化能に及ぼす影響を検討した。GCMa の DNA 結合配列の 5 回リピート配列を含むルシフェラーゼレポータープラスミドを構築し、ルシフェラーゼ活性を測定したところ、PMA によって GCMa の転写活性化能が促進されることがわかった。この PMA の作用は、PKC および MEK/ERK 依存的であった。また GCMa の 328 番目、378 番目および 383 番目のセリン残基のリン酸化がそれぞれ GCMa の転写活性化能の促進に関与しているか調べたところ、これらのセリン残基の変異箇所が増えるに従い PMA による転写活性化能の促進作用が減少し、S328, 378, 282A を発現した細胞で最も抑制された。以上の結果から、3 箇所のセリン残基が PMA による GCMa の転写活性化能促進に寄与していることが示唆された。

#### (7) hCG 産生における PKC および MEK/ERK 依存的シグナルの関与

GCMa は hCG 産生の発現制御に関与していることが示唆されており、hCG 産生増加に働くと考えられる。そこで PMA により hCG の産生量がどのように変化するか検討した。その結果、PKC および MEK/ERK シグナル依存的に、hCG 量の産生を約 2 倍に増加させることが明らかとなった。これまでに hCG 量を増加させることが明らかとなっている cAMP では約 13 倍増加したのに比べると、PMA の hCG 産生増加に対する作用は小さかった。

#### (8) 考察

本研究で得られた結果から、PKC および MEK/ERK 依存的なシグナルが GCMa の機能制御に関与していることが明らかとなった。GCMa の分解の促進と、転写活性化能の増加が同時に起こるのは矛盾しているようにも思われたが、過去にそのような制御を受ける転写因子 AML1 が報告されており、転写因子の活性の異常な上昇を抑制するための機構なのかもしれない。本研究期間内に GCMa に関与する PKC のサブタイプを特定すること、また *in vivo* で胎盤の発達段階で PKC および MEK/ERK 依存的シグナルの活性がどのように変化しているのか調べるができなかったため、今後の研究課題として検討していきたいと考えている。

#### 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 5 件)

① Y. YASUI, D. MIYAZAWA, H. UEDA, K. SATO, Y. KITADE and K. YAMADA. PMA induces GCMa phosphorylation and alters its stability via the PKC- and ERK-dependent pathway. *Biomedical Research*, 33(2012)217-224, 査読有

② Y. YASUI, K. YAMADA, S. TAKAHASHI, M. SUGIURA-OGASAWARA, K. SATO, D. MIYAZAWA, T. SUGIYAMA, Y. KITADE and H. UEDA. PMA induces GCMa phosphorylation and alters its stability via the PKC- and ERK-dependent pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(2012)1127-1132 査読有

[学会発表] (計 13 件)

① 安井 裕子 「胎盤特異的転写因子 GCMa/1 の PMA による発現調節機構-リン酸化部位の同定」 第 84 回日本生化学会大会、平成 23 年 9 月 22 日、国立京都国際会館

② 安井 裕子 「胎盤特異的転写因子 GCMa/1 の発現調節機構における新規リン酸化部位の同定」 第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会、平成 23 年 7 月 9 日、金城学院大学

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安井 裕子 (YUKO YASUI)  
金城学院大学・付置研究所・その他  
研究者番号：80434554