

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461398

研究課題名(和文) エストロゲンの非遺伝子作用を担うアロマトラーゼの翻訳後二段階調節機構

研究課題名(英文) Post-translational dual regulation of cytochrome P450 aromatase responsible for non-genomic actions of estrogens

研究代表者

原田 信広 (Harada, Nobuhiro)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号：00189705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではエストロゲンの非遺伝子作用を担うアロマトラーゼの翻訳後修飾による急激な発現調節機構を研究する。アロマトラーゼは細胞内キナーゼ及びホスファターゼによるリン酸化・脱リン酸化により急激な活性、さらに分解調節を受けていることが、再構成系及び阻害剤、siRNAによるノックダウン実験により明らかになった。急速な刺激応答に関わる神経細胞でもグルタミン酸刺激での活性及び酵素量低下、ノルアドレナリン、セロトニン、GABA刺激での活性亢進などを確認した。分解機構にはリン酸化によるユビキチン化、プロテアソーム分解系が関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Post-translational acute regulation of aromatase responsible for non-genomic actions of estrogens was studied. Microsomal aromatase in JEG-3 cells was rapidly inactivated and subsequently degraded in the presence of cytosol fraction, calcium, and ATP. Experiments using various kinase and phosphatase inhibitors, and siRNAs indicated that aromatase is regulated acutely at the catalytic level and subsequently at the enzyme content level by phosphorylation/dephosphorylation. In nerve cells, a major site of non-genomic actions of estrogens, aromatase activity was suppressed within 10 min after glutaminergic stimulations, whereas it was enhanced by GABAergic, noradrenergic, and serotonergic stimulations. The degradation was suppressed by proteasome inhibitor, MG132. The knockdown and siRNA inhibition revealed the involvement of ER-associated heat shock protein/ubiquitination and then proteasome systems in the rapid degradation of the phosphorylated aromatase in nerve cells.

研究分野：生化学

キーワード：エストロゲン 非遺伝子作用 翻訳後修飾 リン酸化 ユビキチン化 プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

エストロゲン合成を律速する調節酵素であるアロマターゼについては、その生殖生理機能への関与、さらに乳癌・子宮内膜癌を始めとした癌増殖制御、アルツハイマー痴呆症などの脳神経機能への関与など多くの研究者が興味を持ち、アロマターゼの組織特異的転写調節機構を介するエストロゲンの遺伝子作用の研究がなされてきた。しかしエストロゲンには急速な生理応答を伴う非遺伝子作用も知られており、こうした急速な応答を可能にするアロマターゼの活性調節機構については報告が少ない現状である。

申請者はアロマターゼの急速な活性調節の機構として糖鎖付加及びリン酸化の翻訳後修飾の可能性を報告してきた。最近までの研究で、糖鎖付加では観察されるアロマターゼ活性調節は難しいが、リン酸化による不活性化については申請者を含めて幾つかの研究室から示唆するデータが提出されている。しかし阻害剤レベルやタンパク質化学レベルの仕事が多く、実際の細胞内反応や *in vitro* 再構成系を使用した詳細な解析は少ない。またアロマターゼの分解調節については IGF-I によるアロマターゼのオートファージ分解調節も最近報告したが、生理機能としての関与は得られていない。一方、リン酸化についてはアロマターゼの分解促進を示唆するデータを最近得ており、分解制御によるアロマターゼ発現調節機構の詳細な解析も必要と思われる。

2. 研究の目的

エストロゲンには核内受容体を介する遺伝子作用 (Genomic Action) と膜受容体を介する非遺伝子作用 (Non-genomic Action) が報告されている。エストロゲンの遺伝子作用は数時間から数日スケールでの生体反応を代表しており、エストロゲン合成を担うアロマターゼが先ず転写誘導されてエストロゲン合成能を増加させ、その結果、生成したエストロゲンが受容体に結合して生理作用を発揮することで可能になっている。一方、エストロゲンの非遺伝子作用に関しては、エ

ストロゲンによる秒単位の生理反応であり、この時のエストロゲン生成・刺激に関わる調節機構は不明である。こうした急速な生理応答を可能にするエストロゲンの速やかな供給は、アロマターゼ遺伝子の転写誘導によるエストロゲン合成能の増加では時間的に無理があると考えられる。

申請者が従来より注目している脳内アロマターゼの生殖行動に関する神経機能形成への関与に関しても、局所性エストロゲン産生を通して脳の性分化 (性的二型核の形成) の神経ネットワーク形成を導く組織化効果 (Organization Effects) と成熟後の性的刺激に応じて反応する性行動の誘導に関わる活性化効果 (Activation Effects) がある。組織化効果はアロマターゼ遺伝子の脳特異的プロモーターへの発達段階特異的転写因子や領域特異的な転写因子の結合による発現調節で、申請者等はエストロゲン産生が転写制御される機構を明らかにしてきた。しかし成熟後の性的刺激による局所性エストロゲンの上昇、それに伴った性行動の発現といった速やかな生体応答を導く活性化効果は迅速なアロマターゼ活性の翻訳後調節が不可避と考えられる。本研究は、こうしたエストロゲンの速やかな合成調節を可能にするアロマターゼ活性の活性化・不活性化機構に焦点を当てて、翻訳後調節の詳細を明らかにする。

ニューロステロイドとしてのエストロゲンは種々の神経機能に関与していることが考えられ、性行動の活性化因子としてのみならず、現在までにエストロゲンの寄与が報告されているアルツハイマー病などの神経変性疾患や脳梗塞時の神経保護作用、広汎性発達障害などの病因・診断・治療に関しての有用な情報提供が期待される。

3. 研究の方法

本研究ではエストロゲンの非遺伝子作用を担うと考えられるアロマターゼの翻訳後修飾による活性調節に焦点を絞って研究を進めていく。研究には胎盤由来のアロマターゼ強発現株、

JEG3 細胞及び視床下部神経由来の N38 細胞を使用して、細胞培養時での種々の発現調節因子刺激による小胞体アロマターゼのリン酸化・脱リン酸化レベル、比活性、そしてタンパク質量レベルの変化、そしてキナーゼやホスファターゼ遺伝子導入や遺伝子ノックダウンなどで翻訳後修飾に關与する分子を同定していく。同定されたキナーゼを使用して精製アロマターゼのリン酸化を行い、酵素活性(比活性)レベルでの制御を確認するとともに、LC/MS/MS 解析でリン酸化部位を同定する。

(1) アロマターゼ遺伝子(野性型及び FLAG/Myc タグ付加型)を安定導入した JEG3 細胞及び神経細胞株を作成する。

(2) アロマターゼ遺伝子を導入した JEG3 細胞及び神経細胞株を用いて、細胞内アロマターゼの酵素活性及びタンパク質量に対するホルモン、増殖因子、神経伝達物質などの刺激の効果、各種キナーゼ及びホスファターゼの活性化因子や阻害因子の効果、さらに siRNA 導入によるリン酸化・脱リン酸化酵素のノックダウンの効果等を調べる。

(3) 部位特異的変異導入によりリン酸化部位の確認を行なうと共に、リン酸化部位の Ser/Thr を Ala や Glu に変異させ、活性化・不活性化及び酵素タンパク質の安定性等を調べる。

(4) 単離されてきたクローンの同定を行い、実際にアロマターゼ分解系で機能しているかどうか、強制発現及びノックダウンなどにより確認する。

(5) アロマターゼの翻訳後修飾調節に關わる全ての同定酵素の精製標品を用いて、活性及び酵素量レベルの調節を再構成して確認する。

4. 研究成果

先ずアロマターゼ高発現細胞株である JEG-3 細胞を用いてアロマターゼの翻訳後修飾による調節を調べた。細胞よりアロマターゼの局在する小胞体及び細胞質分画を調製し、両分画を含む *in vitro* 再構成系でアロマターゼの酵素量と活性の経時的变化を解析した(図1)。

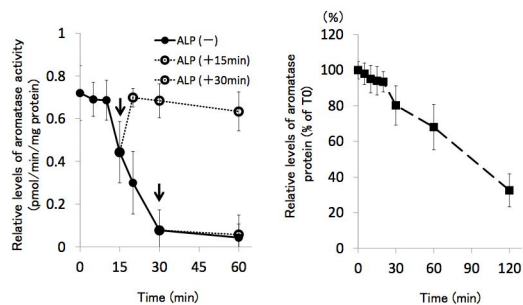


図1. 細胞質/ATP 依存性のアロマターゼ活性・タンパク質の経時変化

その結果、アロマターゼはリン酸化により活性低下が起こり、30 分くらいではほぼ活性を消失した。その後、酵素タンパク質の分解が進行し、2 時間後には最初のレベルの 30% くらいにまで減少していた(図1)。

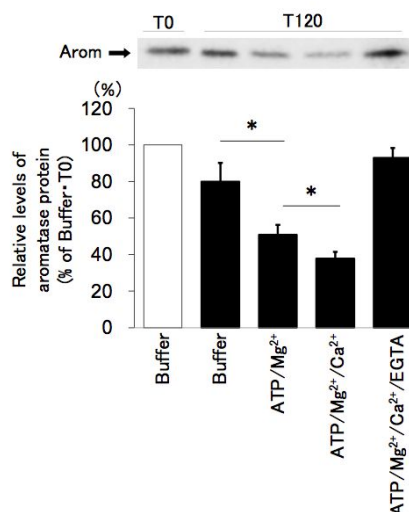


図2. 細胞質及び ATP/Mg²⁺/Ca²⁺ 依存性の小胞体局在アロマターゼの活性制御

この現象には細胞質と小胞体膜成分の両画分が必要で、活性低下及びその後続く酵素タンパク質の低下は Ca²⁺ 及び ATP 依存性だった(図2)。またアルカリホスファターゼの添加により阻害されること、反応液のウェスタンブロット解析でリン酸化アミノ酸に対する抗体でアロマターゼが検出できることより、このアロマターゼの翻訳後修飾としてリン酸化による活性及び酵素量の二段階調節機構が考えられた(図4)。

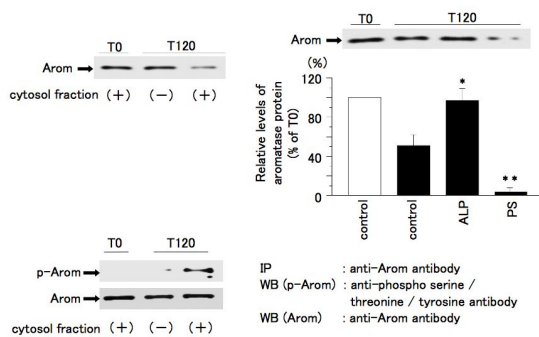


図3. アロマトラーゼの細胞質依存性リン酸化とタンパク質分解

リン酸化による活性低下は可逆的に調節されており、リン酸化状態が持続すると、さらに酵素タンパク質の不可逆的低下が起こる事が明らかになった。

リン酸化及び脱リン酸化酵素について種々の特異的阻害剤を使って調べてみると、アロマトラーゼ分解はリン酸化酵素である Ca^{2+} -カルモジュリン依存性キナーゼ (CaMK) の阻害剤である KN-62 や KN-93 で阻害され、逆に脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの阻害剤であるサイクロスポリンや FK506 で促進した(図4)。

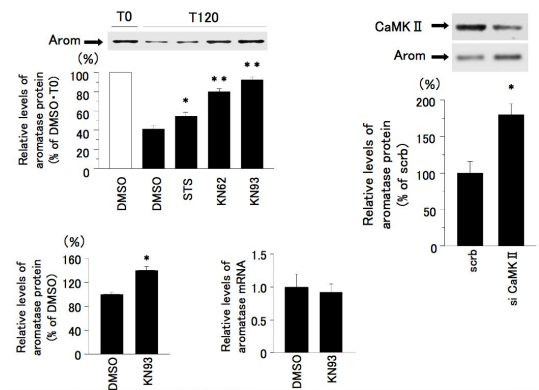


図4. CaMKII によるリン酸化依存性のアロマトラーゼタンパク質の分解

この観察は、細胞内アロマトラーゼ量が CaMK とカルシニューリンの siRNA によるノックダウンにより増加・減少すること、また CaMK とカルシニューリン遺伝子の細胞内強制発現により逆に減少・増加することより支持された(図4、5)。

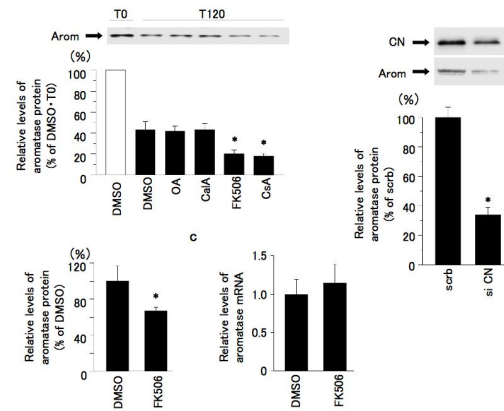


図5. プロテインホスファターゼによるアロマトラーゼタンパク質の分解抑制

同様の条件下で、遺伝子組み換え体アロマトラーゼタンパクを用い、リン酸化されたアロマトラーゼが増加していることも確認した。以上の結果はアロマトラーゼはカルシニューリンによる脱リン酸化制御で安定性を増し、CaMKII によるリン酸化で不安定になる事が示唆され、生体内エストロゲン量がアロマトラーゼの翻訳後修飾による分解によって調節されることが明らかになった。

脳神経で局所性に産生され機能するニューロエストロゲンは、多くの生理活性分子と協調して生殖行動などの生理的短期応答に関与している。外的刺激に応じてニューロエストロゲン産生を担うアロマトラーゼの短期的発現応答は翻訳後修飾による急激な活性調節の有用なモデルとなると考え、マウス視床下部神経由来の N38 細胞を用いて実験を続けた。神経伝達物質によってカルシウムシグナル伝達経路を活性化した場合、神経内アロマトラーゼの活性に急激な影響を及ぼした。グルタミン酸/NMDA によってアロマトラーゼ活性は 5 分以内に急速に低下した。一方、ノルアドレナリン、セロトニン、GABA は 5 分以内に急速な活性増加を誘導した。この急速な活性の増減はリン酸化酵素阻害薬により阻止できること、また Phos-tag ゲルによるリン酸化アロマトラーゼの検出及びリン酸化アミノ酸抗体を用いたウェスタンブロット解析によるアロマトラーゼの検出よりリン酸化による調節が示唆された。JEG3 細胞と同様

に、神経細胞 N38 でもアロマターゼ活性は神経伝達物質による刺激に応じたリン酸化により二段階調節されており、先ずアロマターゼはリン酸化により数分以内に酵素活性を低下させる。その後、数時間後にはアロマターゼ蛋白質の安定性低下により細胞内アロマターゼ蛋白含量を減少させる事が明らかになった。性行動誘発との関連で注目される GnIH やキスペプチン等の生理活性神経ペプチドもまたアロマターゼの活性化を引き起こした。こうしたアロマターゼ活性の調節にはリン酸化・脱リン酸化が伴っており、複数の調節因子によるニューロエストロゲンの産生調節機構が示唆された。

神経細胞 N38 のアロマターゼの分解はプロテアソーム阻害剤である MG132 で著しく阻害され、細胞内に多量の未分解アロマターゼの蓄積が観察された。神経細胞内でのアロマターゼ蛋白質の半減期は他組織・細胞とは異なり、2時間程度と非常に短いことから考えて、アロマターゼの分解は Ubiquitin ligase UBE2R2・CHIP によるユビキチン化の後に細胞質のプロテアソームに移って進行する事、さらに分解速度の調節がカルシウムシグナル依存的なアロマターゼのリン酸化修飾と小胞体に局在のシャペロンタンパク質 GPR94 によってなされる事が明らかになった。

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 10 件)

Estrogen-Related Factors in the Frontal Lobe of Alzheimer's Disease Patients and Importance of Body Mass Index. (Honma, N., Saji, S., Mikami, T., Yoshimura, N., Mori, S., Saito, Y., Murayama, S., & Harada, N.) *Sci. Rep.*, 7, 726, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-00815-3

The Proportion of Chromatin Graded between Closed and Open States Determines the Level of Transcripts Derived from Distinct Promoters in the CYP19 Gene. (Kotomura, N., Harada N., & Ishihara, S.) *PLoS One* (査読有), 10 (5), e0128282, 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0128282

Aromatase Controls Sjogren's Syndrome-Like Lesions through Monocyte Chemotactic Protein-1 in Target Organ and

Adipose Tissue-Associated Macrophages. (Iwasa, A., Arakaki, R., Honma, N., Ushio, A., Yamada, A., Kondo, T., Kurosawa, E., Kujiraoka, S., Tsunematsu, T., Kudo, Y., Tanaka, E., Yoshimura, N., Harada, N., Hayashi, Y., & Ishimaru, N.) *Am. J. Pathol.*, 185(1), 151-161, 2015, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.09.006

Aromatase knockout mice reveal an impact of estrogen on drug-induced alternation of murine electrocardiography parameters. (Kurokawa, J., Sasano, T., Kodama, M., Li, M., Ebana, Y., Harada, N., Honda, S.-I., Nakaya, H., & Furukawa, T.) *J. Toxicol. Sci.*, 40(3), 339-348, 2015, doi: 10.2131/jts.40.339

Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviour by increasing neuroestrogen synthesis. (Ubuka, T., Haraguchi, S., Tobari, Y., Narihiro, M., Ishikawa, K., Hayashi, T., Harada, N., & Tsutsui, K.) *Nat. Commun.*, 5, 3061, doi: 10.1038/ncomms4061

Post-translational dual regulation of cytochrome P450 aromatase at the catalytic and protein levels by phosphorylation/dephosphorylation. (Hayashi, T. & Harada, N.) *FEBS J.*, 281(21), 4830-4840, 2014, doi: 10.1111/febs.13021

Aromatase and estrogen receptor beta expression in the rat olfactory bulb: Neuroestrogen action in the first relay station of the olfactory pathway? (Hoyk, Z., Csakvari, E., Gyenes, A., Siklos, L., Harada, N., & Parducz, A.) *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)*, 74(1), 1-14, 2014, <http://journals.indexcopernicus.com/masterlist.php>

Calcineurin and CRTC2 mediate FSH and TGFbeta1 upregulation of Cyp19a1 and Nr5a in ovary granulosa cells. (Lai, W. A., Yeh, Y. T., Fang, W. L., Wu, L. S., Harada, N., Wang, P. H., Ke, F. C., Lee, W. L., & Hwang, J. J.) *J. Mol. Endocrinol.*, 53(2), 259-270, 2014, doi: 10.1530/JME-14-0048

Brain endogenous estrogen levels determine responses to estrogen replacement therapy via regulation of BACE1 and NEP in female Alzheimer's transgenic mice. (Li, R., He, P., Cui, J., Staufenbiel, M., Harada, N., & Shen, Y.) *Mol. Neurobiol.*, 47 (3), 857-867, 2013, doi: 10.1007/s12035-012-8377-3

Aromatase expression in the brain of the ruffed grouse (*Bonasa umbellus*) and comparisons with other galliform birds (Aves, Galliformes). (Cornfield, J.R., Harada, N., & Iwaniuk, A.N.) *J Chem Neuroanat.*, 47 :15-27, 2013, doi: 10.1016/j.jchemneu.2012.12.001

[学会発表](計 17 件)

神経内アロマターゼに対する神経伝達物質の影響とメカニズム 林孝典、原田信広 日本ステロイドホルモン学会 2016年12月3日 ホルトホール大分(大分県・大分市)

アロマターゼの翻訳後修飾による発現調節 原田信広 日本ステロイドホルモン学会 2016年1月15日 倉敷市芸文館(岡山県、倉敷市)

エストロゲン合成酵素(アロマターゼ)欠損症における新規ナンセンス変異 宗綱栄二、Lulus Derya、Andiran Nesibe、原田信広 日本ステロイドホルモン学会 2016年1月15日 倉敷市芸文館(岡山県、倉敷市)

神経内アロマターゼによるニューロエストロゲン合成の調節機構 林孝典、原田信広 日本ステロイドホルモン学会 2016年1月15日 倉敷市芸文館(岡山県、倉敷市)

神経刺激により惹起される脳内エストロゲン合成酵素・アロマターゼのリン酸化・脱リン酸化の重要な役割 原田信広、林孝典 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2015年12月2日 神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

ユビキチン-プロテアソーム系によるニューロエストロゲンの合成調節機構 林孝典、原田信広 日本病態プロテアーゼ学会 2015年8月21日 ANAクラウンプラザホテルグランコート名古屋(愛知県、名古屋市)

外的刺激に対するニューロエストロゲン産生応答を可能にする脳内アロマターゼ活性制御機構 原田信広 内外環境応答・代謝酵素研究会 2015年7月18日 雪の屋(北海道、旭川市)

Rapid regulation of cyp19A1 (P450arom) in nerve cells as neuroestrogen synthase Harada N., Honda S.-I., & Hayashi T. 19th International Conference on Cytochrome P450 2015年6月14日 National Olympics Memorial Youth Center (Tokyo, Shibuya-ku)

Phosphorylation is responsible for 2 step regulation of P450arom in cultured hypothalamic nerve cells Hayashi T. & Harada N. 19th International Conference on Cytochrome P450 2015年6月13日 National Olympics Memorial Youth Center (Tokyo, Shibuya-ku)

アロマターゼの脳特異的プロモーターに存在するシスエレメント All サイトに結合する転写因子の解析 山口貴広、本田伸一郎、小迫知弘、相川晃慶、坂田晃、原田信広、添田泰司 日本薬学会九州支部大会 2014年12月7日 第一薬科大学(福岡県、福岡市)

神経細胞に発現するアロマターゼのリン

酸化とユビキチンによるニューロエストロゲン合成制御 林孝典、原田信広 日本生化学会 2014年10月17日 国立京都国際会議場(京都府、京都市)

転写量を反映する CYP19 遺伝子プロモーターのクロマチン構造 琴村直恵、原田信広、石原悟 日本分子生物学会 2013年12月5日 神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)

アロマターゼの活性及び安定性の調節 林孝典、宗綱栄二、原田信広 日本ステロイドホルモン学会 2013年11月16日 千里ライフサイエンスセンター(大阪府、豊中市)

エストロゲンの非遺伝子作用を担うアロマターゼの翻訳後二段階調節機構 原田信広、林孝典、宗綱栄二 日本生化学会 2013年9月13日 パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

神経内アロマターゼの活性及び安定性調節機構 林孝典、宗綱栄二、原田信広 日本生化学会 2013年9月12日 パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

A biphasic post-translational regulation of cyp19A1 (P450AROM) by phosphorylation/dephosphorylation.

Hayashi T, Munetsuna E, Harada N. 18th International Conference on Cytochrome P450, 2013年6月21日 University of Washington (Seattle, USA)

Genomic and non-genomic regulation of brain aromatase. Harada N. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo, 2013年6月18日 Moscone Center (San Francisco, USA)

[図書](計 1 件)

Molecular Mechanisms Controlling Brain Aromatase expression. (Harada, N.) in Behavioral Neuroendocrinology "Brain Aromatase, Estrogens, and Behavior" Eds. Balthazart, J. & Ball, G. F., pp 138-152, Oxford University Press, New York, 2013, ISBN: 978-0-19-984119-6

[その他]

ホームページ等

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~biochem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 信広 (Harada Nobuhiro)

藤田保健衛生大学・医学部・教授

研究者番号: 00189705