

新規細胞膜上、女性ステロイドホルモン受容体を介した生理・病態機能の解明

東京農工大学大学院農学研究院応用生命化学専攻

木村 郁夫

Sex steroid hormones are involved in not only reproductive functions but also aggression, maternal behavior, learning, memory, moods, feeding, and so on. Some of these actions are related to unknown rapid non-genomic action, as which cannot be currently explained by the genomic action of nuclear receptors. Recently, several sex steroid receptors were found on the plasma membrane. Hence, it implies that these membrane receptors may be related to the non-genomic actions. In these receptors, a progesterone membrane receptor (mPR), a putative G-protein coupled receptor, is activated by progesterone and abundantly expressed in the brain. Here, we examined neurotrophic effects of mPR and the intracellular signaling in central nervous system. In the future, further functional analysis of mPR will provide new insights into not only understanding of neurotrophic activity but also physiological function by progesterone in brain and may represent an important avenue of research for drug development for the treatment of infertility, metabolic disorders, and dysrhythmia targeting this receptor.

1. 緒言

性ステロイドホルモンは核内受容体を介して働き、遺伝子発現調節を介した性成熟等の長期的な機能に関与することが知られてきた。しかし近年、攻撃性や摂食、睡眠、そして記憶や学習といった高次脳機能に至るまで、性機能以外の様々な作用にも性ステロイドホルモンが関与することが明らかになった。これらは核内受容体による転写調節を介した genomic な反応では説明づけられない作用が多数であり、その分子実体は近年まで明らかにされていなかった。

近年、性ステロイドホルモンの細胞膜上受容体として、エストロゲンに対し GPR30¹⁾、プロゲステロンに対し mPR (membrane progesterone receptor) ファミリー²⁾、MAPR (membrane-associated progesterone receptor) ファミリー³⁾ が同定され、これらが性ステロイドホルモンによる即時性作用に関与する可能性が示唆された。これらの細胞膜上ステロイドホルモン受容体は一般的に知られている核内受容体を介した genomic な作用に対し、即時性の non-genomic な作用 (MAPK 経路の活性化、細胞内 Ca 濃度の上昇等) を有する。そのために、ステロイドホルモンが関与する乳癌細胞等の増殖の直接的な原因であると予想され、創薬開発の観点からも非常に有用な標的として注目されている。加えて、これらの受容体は卵成熟期だけではなく、成体においても種々の組織において高い発現が確認されていることから成体においても重要な生理機能を担っ

ていると予想される。しかしながら、詳細な機能に関しては未だ明らかにされていない。我々は MAPR ファミリーに属する neudesin、neuferricin を世界で初めて単離・同定し^{4,5)} 機能解析を進める一方で、もう一つのプロゲステロン細胞膜上受容体ファミリーである mPR ファミリーの解析にも着手した。mPR ファミリーは 7 回膜貫通型と予測されており、GPCR である可能性が高いと考えられていた⁶⁾。また、mPR ファミリーのうちいくつかの受容体は中枢神経系に高発現することが報告されており²⁾、これらの受容体を介したプロゲステロンによる即時的作用が生体にとって重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで我々は、これらプロゲステロン細胞膜上受容体のうち、特に中枢神経系に高発現すると報告されている受容体に着目した。そしてその詳細な発現解析、プロゲステロンによる細胞内シグナル伝達機構解析を行った。

2. 実験

2.1. 定量 RT-PCR

マウスの各組織から total RNA を抽出し、逆転写後、SYBR green を用いたインターカラー法により PCR 産物を定量した。

In situ hybridization マウス胎児全身、成体脳の凍結切片を作製し、35S-標識アンチセンス RNA プローブを用いて切片中の mRNA を標識した。その後 X 線フィルムに感光させシグナルを検出した。

2.2. 細胞培養

Flp-in mPR T-REx HEK293 細胞は 10% FBS、ハイグロマイシン、ブラストサイジン を添加した DMEM 培地を用い培養した。ラット副腎褐色細胞腫由来 PC12 細胞は 10% HS、5% FBS、ペニシリン、ストレプトマイシン を添加した DMEM 培地で培養した。全ての細胞は 37℃、



Physiological function via novel progesterone membrane receptor

Ikuo Kimura

Department of Applied Biological Science,
Tokyo University of Agriculture and
Technology Graduate School of Agriculture

5% CO₂ 条件下で培養した。

cAMP assay 細胞を24wellプレートに播種し、HEK293細胞にはドキシサイクリン、PC12細胞には神経成長因子NGFを添加し24時間インキュベートした。細胞は各濃度のプロゲステロンで10分間刺激し、0.1N HClで回収した。得られたサンプルについて、cAMP kit (cayman) のプロトコルに従ってcAMP濃度の測定を行った。

2. 3. Ca²⁺ assay

細胞をコラーゲンコート96wellプレートに播種し、HEK293細胞にはドキシサイクリン、PC12細胞にはNGFを添加し24時間インキュベートした。FLIPR Calcium 4 assay kitを用いて細胞内Ca²⁺の変動を測定した。

ERK1/2 assay 細胞を24wellプレートに播種し、HEK293細胞にはドキシサイクリン、PC12細胞にはNGFを添加し24時間インキュベートした。細胞は各濃度のプロゲステロンで10分間刺激し、Lysis bufferで回収した。各サンプルについて、Western blot法によりERK1/2、Phospho-ERK1/2量を測定した。

突起伸長活性評価 リジンコート6wellプレートにPC12細胞を播種し、Lipofectamine 2000を用いてsiRNAを導入した。その後NGF・プロゲステロンを添加し、3日後に写真撮影した。神経突起が細胞体以上に伸長している細胞の最大突起長のみをimageJ (NIH)で測定した。

2. 4. ERK1/2 assay

細胞を24wellプレートに播種し、HEK293細胞にはドキシサイクリン、PC12細胞にはNGFを添加し24時間インキュベートした。細胞は各濃度のプロゲステロンで10分間刺激し、Lysis bufferで回収した。各サンプルについて、Western blot法によりERK1/2、Phospho-ERK1/2量を測定した。

2. 5. 突起伸長活性評価

リジンコート6wellプレートにPC12細胞を播種し、

Lipofectamine 2000を用いてsiRNAを導入した。その後NGF・プロゲステロンを添加し、3日後に写真撮影した。神経突起が細胞体以上に伸長している細胞の最大突起長のみをimageJ (NIH)で測定した。

2. 6. mPRノックアウト(KO)マウスの作製

mPRのコーディング領域を含む配列の一部をLacZ配列に置換したターゲティングベクターを設計し、ジーンターゲティング法によりmPRKOマウスを作製した。

3. 結果

3. 1. mPRは中枢神経系に高発現する

各組織におけるmPRの発現量をRT-PCRにより解析すると、mPRは脳、精巣において高発現していた(図1A)。更に、胎児、成体マウス脳切片を用いてin situ hybridizationを行ったところ、mPRは胎児期から中枢神経系に発現しており、成体脳においては部位特異的に発現が見られることが確認できた(図1B)。

mPRがどの細胞に発現しているか調べるため、神経細胞、アストロサイト、神経幹細胞それぞれについてのRT-PCRによるmPR発現量を調べた結果、mPRはアストロサイトではなく神経細胞、神経幹細胞に発現しており、成熟ニューロンまたは分化過程のニューロンにおいて何らかの役割を果たしていることが示唆された。

3. 2. 強制発現系を用いたmPR下流シグナルの検討

Flp-in mPR T-REx HEK293細胞にドキシサイクリンを添加してmPRを強制発現させ、プロゲステロン刺激による細胞内シグナリングを調べた。mPRファミリーはGPCRであると予測されていたため、GPCRの下流シグナルであるCa²⁺、cAMP濃度の測定を行ったところ、どちらもプロゲステロン刺激によっては反応が見られなかった。次にプロゲステロン刺激によるERK1/2のリン酸化を調べたところ、mPR発現下でプロゲステロン濃度依存的にERK1/2の活性化が見られた。したがって、mPRはプロ

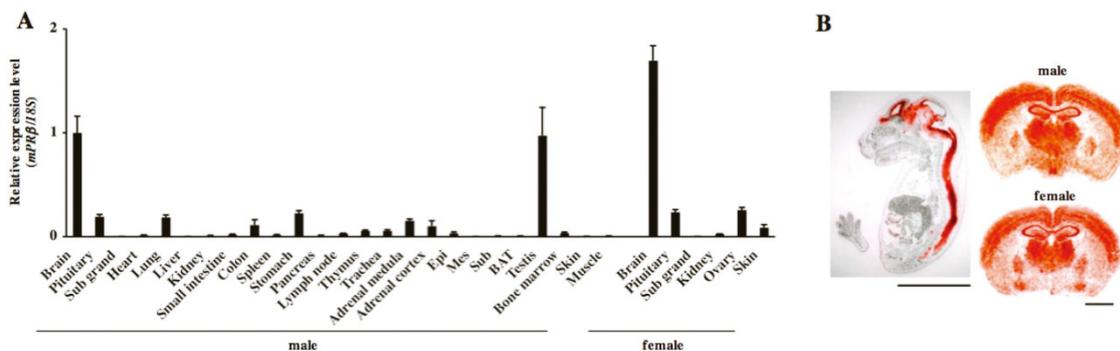


図1 mPRの発現：(A) 7週齢マウスのmPR mRNA発現量解析(n=3)。(B) 35S標識アンチセンスmPRプローブを用いたin situ hybridization法による胎生15.5日齢マウス切片(左, Scale bar: 5 mm)、7週齢マウス脳切片(右, Scale bar: 2 mm)のmPR発現部位確認。

ゲステロン刺激を受けERK1/2を活性化させることが示唆された。

3. 3. 内因性mPR発現細胞株を用いたプロゲステロン下流シグナルの検討

次に、mPRを内因性に発現する細胞を用いてプロゲステロン刺激による下流シグナルを調べた。ラット副腎褐色細胞腫由来PC12細胞は神経成長因子NGFを添加することで神経細胞様に分化するため、神経分化のモデルとして用いられる。NGFによる分化誘導開始後、各時間におけるプロゲステロン受容体の発現を調べたところ、mPRの発現のみが細胞の分化に伴い急激に上昇していたため、PC12細胞の分化の過程もしくは分化後にmPRが何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

mPRの発現が神経分化の初期段階から急激に上昇することから、プロゲステロンがmPRを介して神経分化に何らかの影響を与えるのではないかと考え、以下の実験を行った。PC12細胞をNGFで分化誘導する際、プロゲステロンを同時添加すると、神経突起の伸長が有意に促進された。更に、mPRに対するsiRNAを導入した後に同様の実験を行うと、プロゲステロンによる神経突起伸長促進作用が抑制される傾向が見られた。したがって、mPRがプロゲステロンによる神経分化促進作用に関与していることが示唆された。

また、NGFで分化誘導し、mPRの発現が上昇した状態でプロゲステロン刺激による各シグナルについて検討したところ、強制発現系における結果と同様にPC12細胞においてもプロゲステロン刺激によるGPCR下流シグナルは見られなかったが、ERK1/2のリン酸化はプロゲステロン濃度依存的に亢進していた。このプロゲステロンによるERK1/2リン酸化の亢進について、どの受容体を介したのか確かめるため、核内受容体PRの阻害剤RU486またはMAPRファミリーに属する細胞膜上プロゲステロン受容体PGRMC-1の阻害剤AG205で前処置したものについて、ERK1/2のリン酸化を測定した。しかし各受容体の阻害によってERK1/2リン酸化亢進の抑制は見られなかった。

3. 4. mPRKOマウスの表現型

我々は独自にmPRKOマウスを作製し、その表現型について検討を行うことでin vivoにおける機能解析も行った。mPRKOマウスはほぼメンデル則に従って得られた。また、WTマウスとKOマウスで体重に差は見られなかったが、脳、精巣といったmPRが発現する組織の重量がWTマウスに比べてKOマウスで軽かった。

4. 考 察

本研究では、近年その存在が明らかになり注目を浴びて

いる性ステロイドホルモンの細胞膜上受容体のうち、プロゲステロンをリガンドとするmPRに着目した。mPRファミリーは7回膜貫通型と予測されており、GPCRであると考えられていたが⁶⁾、GPCRとは異なる構造を持つという報告もあった⁷⁾。当研究室では脂肪酸受容体を中心としたGPCRの機能解析を行っており⁸⁻¹⁰⁾、その経験を活かしてGPCR下流シグナルの解析を行うことでmPRがGPCRであるかどうかについて検討を行った。その結果、mPRを強制的または内因性に発現する細胞において、プロゲステロン刺激によってCa²⁺動員、cAMP濃度の変化といったGPCR下流シグナルは確認されなかった。したがって、我々では、mPRはGPCRとは異なるシグナル伝達に関与している可能性が高いと考えている。今後更にmPRを介したシグナル伝達機構の解明を進めていく予定である。

また今回、プロゲステロンがERK1/2のリン酸化を亢進させることを示した。しかしPC12細胞におけるプロゲステロン10 μMによるERK1/2のリン酸化は各受容体の阻害によっては抑制が見られず、今回PC12細胞におけるプロゲステロンのERK1/2リン酸化亢進作用がどの受容体を介するものか確かめることはできなかった。強制発現系においてはmPR発現時にプロゲステロン1 μM、10 μMでリン酸化亢進が見られるため、本来プロゲステロンの作用が1 μMで現れる可能性を考え、今後PC12細胞においてもこの濃度において解析を行う必要があると考えている。

本研究は、中枢神経系に高発現するプロゲステロン受容体mPRが生体において果たす役割の解明において、基礎的データを提供するものである。mPRノックアウトマウスの作製が完了した現在、今後更にmPRファミリーの機能解析を進めることにより、性ステロイドホルモンが関与する高次脳機能の解明、更にはこれらの受容体をターゲットとする性ステロイドホルモン関連疾患、中枢神経系疾患領域における新規治療薬開発への新たな知見を提供するものと期待される。

(参考文献)

- 1) Revankar CM, Climino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER : A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.*, 307, 1625-1630, 2005.
- 2) Zhu Y, Bond J, Thomas P : Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 100, 2237-2242, 2003.
- 3) Mifsud W, Bateman A : Membrane-bound progesterone receptors contain a cytochrome b5-like ligand-binding domain. *Genome Biol.*, 3,

- RESEARCH0068, 2002.
- 4) Kimura I, Yoshioka M, Konishi M, Miyake A, Itoh N : Neudesin, a novel secreted protein with a unique primary structure and neurotrophic activity. *J Neurosci Res.*, 79, 287-294, 2005.
 - 5) Kimura I, Nakayama Y, Kinishi M, Kobayashi T, Mori M, Ito M, Hirasawa A, Tsujimoto G, Ohta M, Itoh N, Fujimoto M : Neuferricin, a novel extracellular heme-binding protein, promotes neurogenesis. *J Neurochem.*, 112, 1156-1167, 2010.
 - 6) Thomas P, Pang Y, Dong J, Groenen P, Kelder J, de Vlieg J, Zhu Y, Tubbs C : Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progesterin membrane receptor subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology.*, 148, 705-718, 2007.
 - 7) Smith JL, Kupchak BR, Garitaonandia I, Hoang LK, Maina AS, Regalla LM, Lyons TJ : Heterologous expression of human mPRalpha, mPRbeta and mPRgamma in yeast confirms their ability to function as membrane progesterone receptors. *Steroids.*, 73, 1160-1173, 2008.
 - 8) Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, Kimura I, Leloire A, Liu N, Iida K, Choguët H, Besnard P, Lecoœur C, Viveguin S, Ayukawa K, Takeuchi M, Ozawa K, Tauber M, Maffei C, Morandi A, Buzzetti R, Elliott P, Pouta A, Jarvelin MR, Korner A, Kiess W, Pigeyre M, Caiazzo R, Van Hul W, Van Gaal L, Horber F, Balkau B, Levy-Marchal C, Rouskas K, Kouvastaki A, Hebebrand J, Hinney A, Scherag A, Pattou F, Meyre D, Koshimizu TA, Wolowczuki U, Tsujimoto G, Froguel P : Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature.*, 483, 350-354, 2012.
 - 9) Kimura I, Inoue D, Maeda T, Hara T, Ichimura A, Miyauchi S, Kobayashi M, Hirasawa A, Tsujimoto : Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41). *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108, 8030-8035, 2011.
 - 10) Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, Terasawa K, Kashihara D, Hirano K, Tani T, Takahashi T, Miyauchi S, Shioi G, Inoue H, Tsujimoto G : The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun.*, 4, 1829, 2013.