

# LH Receptorからのチロシンリン酸化シグナル伝達経路の解明

水谷 哲也<sup>1)</sup>, Mario Ascoli<sup>2)</sup>, 宮本 薫<sup>1)</sup>

1) 福井大学医学部医学科生命情報医科学講座分子生体情報学領域

2) Department of Pharmacology, Carver College of Medicine, The University of Iowa

## はじめに

黄体形成ホルモン受容体 (LHR) は、精巣および卵巣で発現するGタンパク質共役型受容体の1つで、下垂体から分泌される黄体形成ホルモン (LH) と特異的に結合し、細胞内にシグナルを伝達し、性腺機能を調節している。

LHRの遺伝子異常によって引き起こされる思春期早発症は男性のみ発症し、2歳前後より急激な性早熟が発現する。これはLHR遺伝子の変異により、リガンド非依存的にレセプターが恒常的に活性化されるために引き起こされ、アンドロゲン産生の亢進とともに、精巣ライディッヒ細胞の腺腫や過形成を伴うケースが多い [1, 2]。このことは、恒常的なLHRの活性化が、ライディッヒ細胞の増殖異常と密接に関係している可能性を示唆している。ライディッヒ細胞におけるLHからのシグナリングのうち、ステロイドホルモン産生メカニズムに関しては多くの研究報告がある。しかし、細胞増殖・分化に対するLHの役割に関しては、Erkの活性化メカニズムに関する報告 [3] はあるものの非常に限られているのが現状である。

一方、タンパク質のチロシンリン酸化は、さまざまな細胞機能に関与し、とくに細胞増殖と密接に関係するシグナル伝達の1つである。われわれは、マウスライディッヒ細胞由来MA-10細胞で、LHによって、早期にチロシンリン酸化が促進されるタンパク質を同定し、それがどのようなシグナル伝達経路を経てリン酸化されるのか明らかにした。

## MA-10細胞

MA-10細胞は、約25年前に樹立されたマウスライデ

連絡先：水谷哲也、福井大学医学部医学科生命情報医科学講座分子生体情報学領域

〒910-1193 福井県吉田郡永平寺町松岡下合月23-3

TEL: 0776-61-8316

FAX: 0776-61-8102

E-mail: mizutani@fmsrsa.fukui-med.ac.jp

ィッヒ細胞腫由来のCell Lineである [4]。この細胞の特徴は、内在的にLHRが発現していることと、ステロイドホルモン産生能をもつことである。しかしながら近年、理由は不明だがMA-10細胞における内在的なLHRの発現が著しく低下している。そこで最近では、MA-10細胞にLHRの発現ベクターをトランスフェクトして、過剰発現させることによりLHRの機能やシグナリングについて検討することが多い [5]。

## MA-10細胞で、hCGによってチロシンリン酸化が誘導されるタンパク質の同定

MA-10細胞で、hCGによって早期にチロシンリン酸化が誘導されるタンパク質の同定を試みた。

ヒトLHR (hLHR) を過剰発現させたMA-10細胞にhCGを添加後、経時的に細胞を回収し細胞抽出液を作成した。これらのサンプルをSDS-PAGEで分離後、抗チロシンリン酸化抗体 (4 G10) を用いて、ウェスタンブロットティングを行った (図1)。その結果、約120 kDaのタンパク質がhCGによって早期にチロシンリン酸化さ

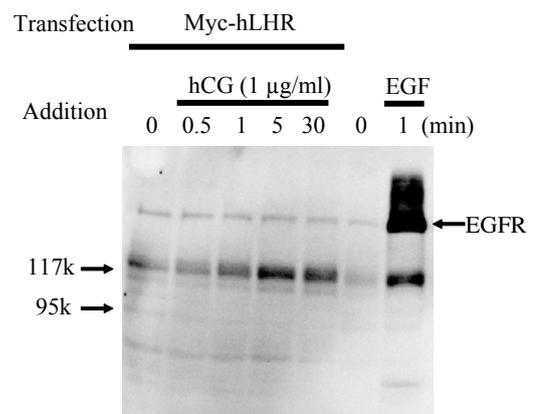


図1 MA-10細胞でのhCGによる約120kDaのタンパク質のチロシンリン酸化

hLHR発現ベクターをトランスフェクトしたMA-10細胞にhCGまたはEGFを添加し、一定時間後に細胞を回収して、細胞溶解物を作成した。この細胞溶解物を抗チロシンリン酸化抗体を用いてWestern blotを行った。hCGによって約120kDaのタンパク質がチロシンリン酸化を受けた。

れることが明らかとなった。しかしながら、EGF receptorと考えられる約180 kDaのタンパク質や他のタンパク質では、hCGによるチロシンリン酸化はみられなかった。

そこでまず、hCGによってチロシンリン酸化が誘導される、約120kDaのタンパク質を同定するためにMALDI-TOF MS解析を行った。hCG刺激後のMA-10細胞、約 $1 \times 10^7$ 個より、細胞抽出物を作成し、先ほどの抗チロシンリン酸化抗体によって、免疫沈降を行った。そして、そのサンプルをSDS-PAGEで分離後、silver-stainingで可視化し、約120 kDaのタンパク質を回収した。そのサンプルをトリプシン消化後、MALDI-TOF MSにより解析した結果、このタンパク質はFocal Adhesion Kinase (FAK) であることが示された。

### Focal Adhesion Kinase (FAK)

FAKはviral Srcの基質として同定された、非レセプター型チロシンキナーゼである[6]。発現はユビキタスであり、細胞内では細胞接着斑に多く局在する。FAKの活性化により接着点複合体自身を含む多数の標的をリン酸化し、細胞の形態変化や移動に関与している。がん細胞の多くはFAKの量が多く、これががん細胞のより高い運動性に関わっているかもしれない。またFAKは、インテグリンのみならずシグナル伝達受容体とも結合し、チロシンリン酸化シグナルを含む、さまざまなシグナル伝達にも関与している。

またFAKには、少なくとも6カ所のチロシンリン酸化部位が明らかにされている。その中で、397番目のチロシン(FAKpY397)は、インテグリンの活性化に伴い、FAK自身により自己リン酸化される。さらに、FAKpY397のリン酸化によって、その領域(SH2ドメイン)にSrc Family Kinases (SFK) が結合し、SFKによってFAKの397番目以外のチロシン残基がリン酸化される。また576番目(FAKpY576)と577番目(FAKpY577)のチロシン残基は、FAKキナーゼドメイン中に含まれるチロシン残基で、このリン酸化がFAKの酵素活性に重要であることが明らかになっている[7,8]。

### FAKチロシンリン酸化部位の同定

MA-10細胞ではhCGによってFAKのどのチロシン残基がリン酸化されるかを、部位特異的リン酸化抗体を用いてウェスタンブロット解析した。その結果、FAKの576番目のチロシン残基(FAKpY576)が、hCGにより、

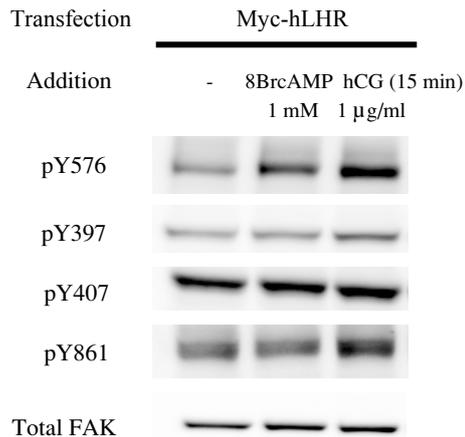


図2 MA-10細胞でhCGによって誘導されるFAKのリン酸化は、576番目のチロシン残基(FAKpY576)特異的である。hLHR発現ベクターをトランスフェクトしたMA-10細胞にhCG添加し、15分後に細胞を回収して、細胞溶解物を作成した。この細胞溶解物を、FAKリン酸化特異的抗体を用いてWestern blotを行った。FAKpY576のみに、hCGによるリン酸化の誘導が見られた。

リン酸化されることが明らかとなった(図2)。また577番目のチロシン残基でもリン酸化が促進される傾向がみられた。しかしながら、397番目、407番目および861番目のチロシン残基ではhCGによるリン酸化の促進はみられなかった。FAKpY576(およびFAKpY577)のリン酸化は、FAKのキナーゼ活性に重要なことが明らかになっているので、LHによってFAKのキナーゼ活性が促進されるものと推察された。

### Src Family Kinases (SFK) の関与の検討

MA-10細胞でhCGによるFAKpY576のリン酸化を、SFKが仲介しているか検討した。SFK特異的インヒビターであるPP2でMA-10細胞を前処理した後hCGを添加し、15分後に細胞抽出液を作成し、ウェスタンブロット解析によりFAKpY576のリン酸化を検討した。その結果、hCGによって誘導されたFAKpY576のリン酸化が、PP2の前処理により消失した。またMA-10細胞へ酵素活性を消失したDominant Negative SFKを過剰発現させることによって、hCGによるFAKpY576のリン酸化の誘導が消失した(図3)。

次に、MA-10細胞におけるSFKの発現をウェスタンブロットにより解析した。SFKの中で、ユビキタスに発現していると考えられているSrc、FynおよびYesについて検討した結果、MA-10細胞ではFynとYesの発現は認められたが、Srcの発現は認められなかった(図4)。このことから、MA-10細胞におけるSFKは、FynとYesが中心的な役割を担っていると考えられた。またSrc、

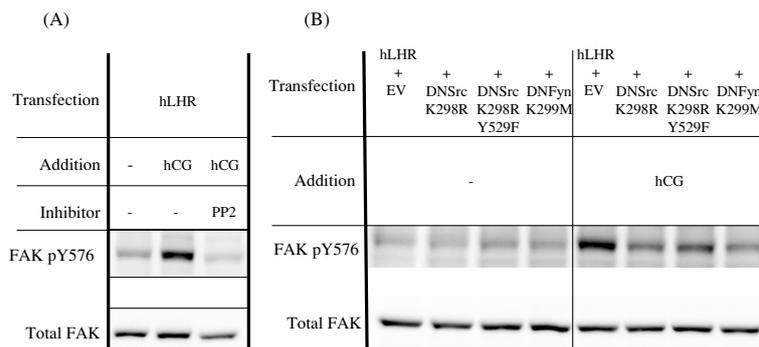


図3 MA-10細胞でhCGによるFAKpY576のリン酸化は、Src Family kinasesによって仲介される

(A) hLHR発現ベクターをトランスフェクトしたMA-10細胞を、Src Family Kinases特異的の抑制剤であるPP2で前処理した後hCGを添加し、15分後に細胞を回収して、細胞溶解物を作成した。この細胞溶解物を、抗FAKpY576抗体を用いてWestern blotを行った。PP2によってhCGによるリン酸化の誘導は消失した。

(B) hLHR発現ベクターと共に酵素活性を消失させたDominant negative SrcおよびFynをトランスフェクトしたMA-10細胞にhCGを添加し、15分後に細胞を回収して、細胞溶解物を作成した。この細胞溶解物を、抗FAKpY576抗体を用いてWestern blotを行った。Dominant negative SrcおよびFynによってhCGによるリン酸化の誘導は消失した。

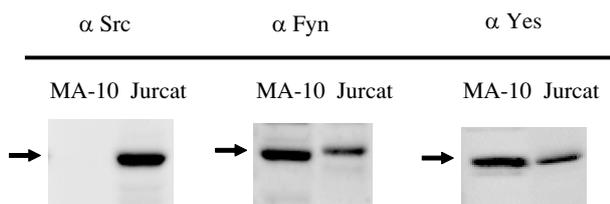


図4 MA-10細胞におけるSrc Family Kinasesの発現  
MA-10細胞におけるSrc Family Kinasesの発現をそれぞれ特異的な抗体を用いてWestern blotにより検討したところ、FynとYesの発現は認められたがSrcの発現は認められなかった。(文献10より一部改変)

Fyn, Yesは構造的に類似しているため、その機能の多くも重複する [9]。そのためそれぞれのDominant Negative SFKを用いても、これらの活性が影響を受けるため、Srcの発現していないMA-10細胞でもDominant Negative Srcの過剰発現の影響がみられたものと考えられる。さらにMA-10細胞でのFynおよびYesの活性を、ホスホトランスフェラーゼ活性測定により検討したところ、hCGによって、FynおよびYesの酵素活性が増大することが明らかとなった(表1)。

以上の結果から、SFKを介してhCGによりFAKpY576のリン酸化が誘導されることが示唆された。

#### Gタンパク質の関与の検討

LHRはリガンドであるLHと結合し、*Gas*, *Gαq/11*お

表1 hCGはFynおよびYes活性を促進する

| Kinase Assayed | Cell Stimulated with hCG (fold-over-basal) |
|----------------|--|
| Fyn            | 1.54 ± 0.12 <sup>a</sup> (n=7)             |
| Yes            | 1.26 ± 0.05 <sup>a</sup> (n=6)             |

MA-10細胞にhLHR発現ベクターをトランスフェクトし、無処理またはhCG添加後10分で細胞を回収し、細胞溶解物を作成した。この細胞溶解物を抗Fyn抗体または抗Yes抗体を用いて免疫沈降を行った後、免疫沈降されたサンプル中のホスホトランスフェラーゼ活性を測定し、その活性は無処理のサンプルに対する倍率で表した。a(P<0.05, paired t test)(文献10より一部改変)

および*Gai/o*を活性化する。そこで、まずMA-10細胞で恒常的活性型Gタンパク質(*Gas*, *Gαq*, *Gα11*, *Gai*, *Gαo*)を過剰発現させ、これらGタンパク質のFAKpY576リン酸化に対する影響を検討した。その結果、恒常的活性型*Gas*, *Gαq*および*Gα11*の過剰発現によってFAKpY576のリン酸化が誘導された(図5)。このことから、hCGによるFAKpY576リン酸化の誘導に、*Gαs* pathwayおよび*Gαq/11* pathwayが関与していることが示唆された。

#### *Gαs* pathway

*Gas*のセカンドメッセンジャーであるcAMPアナログの添加により、MA-10細胞でFAKpY576のリン酸化が誘導された(図2)。

#### *Gαq/11* pathway

MA-10細胞に*Gαq/11*のみを活性化することが知られているGタンパク質共役型受容体(エンドセリンA受容

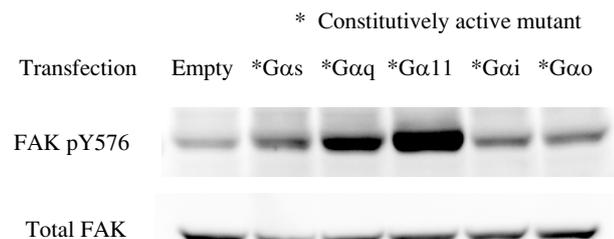


図5 MA-10細胞でGαs, GαqおよびGα11の恒常的活性型変異体の過剰発現によりFAKpY576のリン酸化が誘導される。Emptyベクターまたは様々なGαサブユニットの恒常的活性型変異体をトランスフェクトしたMA-10細胞より、細胞溶解物を作成した。この細胞溶解物を、抗FAKpY576抗体を用いてWestern blotを行った。FAKpY576のリン酸化はGαs, GαqおよびGα11の恒常的活性型変異体の過剰発現によって誘導された。(文献10より一部改変)

表2 LHRまたはETAをトランスフェクトしたMA-10細胞でのcAMPおよびイノシトールフォスフェイト産生の効果

| Addition | Transfection | cAMP<br>(pmol/106 cells) | Inositol Phosphates<br>(cpm/106cells) |
|----------|--------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Buffer   | hLHR         | 52±13                    | 1861±242                              |
| hCG      | hLHR         | 2,021±50 <sup>a</sup>    | 13,399±1,861 <sup>a</sup>             |
| Buffer   | ETA          | 36±13                    | 1732±283                              |
| ET 1     | ETA          | 70±22                    | 23,263±2,233 <sup>a</sup>             |

hLHRまたはエンドセリンETAレセプターの発現ベクターをトランスフェクトしたMA-10細胞にhCGまたはET 1を添加し、30分後(cAMP産生測定用)または60分後(イノシトールフォスフェイト産生測定用)にサンプルを回収し、それぞれの産生量を測定した。<sup>a</sup>(P<0.05, paired t test)(文献10より一部改変)

体)を過剰発現させて、そのリガンド(エンドセリン-1)を添加したところ、FAKpY576のリン酸化が誘導された(図6, 表2)。このことから、MA-10細胞では、Gαq/11の活性化によっても、FAKpY576のリン酸化が誘導されることが示された。おそらくLHRのhCGによる活性化の際にも、GαsのみならずGαq/11の双方を介してFAKpY576のリン酸化が誘導されると考えられる。

以上の結果から、hCGの刺激によりLHRからGαsおよびGαq/11両方のpathwayが活性化され、続いてSFKの活性化を介して、FAKのリン酸化が促進されるものと推察された。

## おわりに

本研究により、マウスライディッヒ細胞由来MA-10細胞でhCGによってFAKのチロシンリン酸化が誘導されることが明らかとなった。さらに、このリン酸化の誘導はFAKのキナーゼドメイン中のチロシン残基で惹き起こされ、このリン酸化によりFAKの酵素活性が増強されると考えられる。実際、hCGによってFAKの基質

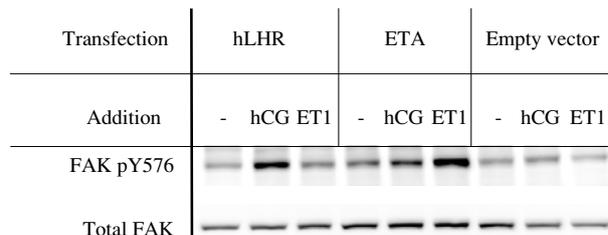


図6 MA-10細胞でGαq/11の活性化によってFAKpY576のリン酸化が誘導される。hLHRまたはエンドセリンETAレセプターの発現ベクターをトランスフェクトしたMA-10細胞にhCGまたはET 1を添加し、15分後に細胞を回収して、細胞溶解物を作成した。この細胞溶解物を、抗FAKpY576抗体を用いてWestern blotを行った。FAKpY576のリン酸化はGαq/11のみを活性化するエンドセリンETAレセプターによっても誘導された。(文献10より一部改変)

として知られているパキシリンのチロシン残基のリン酸化が促進されることから、hCGによりFAKの酵素活性が増強され、その結果パキシリンのリン酸化が促進されたものと推察される。

またhCGによるFAKのリン酸化を、SFKが仲介することが示された。SFKはさまざまなシグナル系、すなわち、さまざまな機能に関与することが知られているチロシンキナーゼである。本研究により、hCGによってSFKの活性化が促進されることが明らかになったことから、MA-10細胞ではFAKのみならずSFKを介して、さまざまなチロシンリン酸化シグナル系がhCGにより活性化されると推察された。

これらの結果は、LHRを介してチロシンリン酸化シグナルが活性化されることを初めて示したものである。今後さらにLHによって活性化されたSFKやFAKがどのような役割を担っているか、検討していきたいと考えている。

## 文献

- Liu G, Duranteau L, Carel J-C, Monroe J, Doyle DA, Shenker A (1999) Leydig-cell tumors caused by an activating mutation of the gene encoding the luteinizing hormone receptor. *N Engl J Med* 341, 1731-1736.
- Richter-Unruh A, Wessels HT, Menken U, Bergmann M, Schittmann-Ohters K, Schaper J, Tapeser S, Hauffa BP (2002) Male LH-independent sexual precocity in a 3.5-year-old boy caused by a somatic activating mutation of the LH receptor in a Leydig cell tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1052-1056.
- Hirakawa T, Ascoli M (2003) The lutropin/choriogonadotropin receptor-induced phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinases in leydig cells is mediated by a protein kinase a-dependent activation of ras. *Mol Endocrinol* 17, 2189-2200.

4. Ascoli M (1981) Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells : gonadotropin receptors and steroidogenic responses. *Endocrinology* 108, 88-95.
5. Hirakawa T, Galet C, Ascoli M (2002) MA-10 cells transfected with the human lutropin/choriogonadotropin receptor (hLHR). A novel experimental paradigm to study the functional properties of the hLHR. *Endocrinology* 143, 1026-1035.
6. Schaller MD, Borgman CA, Cobb BS, Vines RR, Reynolds AB, Parsons JT (1992) pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5192-5196.
7. Parsons JT (2003) Focal adhesion kinase : the first ten years. *J Cell Sci* 116, 1409-1416.
8. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD (2005) Focal adhesion kinase : in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68.
9. Stein PL, Vogel H, Soriano P (1994) Combined deficiencies of Src, Fyn, and Yes tyrosine kinases in mutant mice. *Genes Dev* 8, 1999-2007.
10. Mizutani T, Shiraishi K, Welsh T, Ascoli M (2006) Activation of the lutropin/choriogonadotropin receptor in MA-10 cells leads to the tyrosine phosphorylation of the focal adhesion kinase by a pathway that involves Src family kinases. *Mol Endocrinol* 20, 619-630.