The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Activation of the Luteinizing Hormone β Promoter by Gonadotropin-releasing Hormone Requires c-Jun NH2-terminal Protein Kinase
Author(s)	横井, 猛
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43113
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【36】

氏　　名	横　井　　猛（よこい　たけし）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16449　号
学位授与年月日	平成13年6月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学　位　論　文　名	Activation of the Luteinizing Hormone β Promoter by Gonadotropin-releasing Hormone Requires c-Jun NH_2-terminal Protein Kinase （GnRH による LHβ 合成における JNK の役割）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　村田　雄二 （副査） 教　授　高井　義美　　教　授　奥山　明彦

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

下垂体ゴナドトロフからの LH の合成、分泌は GnRH により調節されているが、GnRH による LH 合成、分泌の細胞内情報伝達経路は現時点では確立されていない。近年 LHα 合成、分泌細胞である αT3-1 細胞において、GnRH が mitogen-activated protein kinase（MAPK）ファミリーの extracellular signal regulated kinase（ERK）と c-Jun NH_2-terminal Protein Kinase（JNK）を活性化し、ERK が LHα 合成に関与するということが報告された。LH の生理学的特異性をもつ β サブユニット遺伝子がその合成、分泌にとって重要であると考えられるが、LHβ サブユニット遺伝子を発現している下垂体腫瘍細胞がなかったため、その合成、分泌のメカニズムについては不明な点が多かった。また、GnRH により活性化される JNK の生物学的機能も不明であった。そこで今回我々は、近年樹立されたマウス下垂体由来 LHβ 合成分泌細胞である $L\beta T_2$ 細胞株を用いて、GnRH による LHβ 合成において細胞増殖因子の基本的な情報伝達経路を構成する MAPK ファミリーの ERK および JNK カスケードの役割を検討した。

【方法ならびに成績】

1）$L\beta T_2$ 細胞株を用いて、GnRH アゴニスト添加により MAPK ファミリーの ERK および JNK が活性化されるかどうかを検討した。ERK の活性化は ERK の抗体で免疫沈降後、Myeline Basic Protein（MBP）への ^{32}P の取り込みにより、また JNK の活性化は基質である GST-cJun のリン酸化にて検討した。また、ERK および JNK の活性化が PKC 経路やカルシウムチャンネルを介するかを検討した。これらについては PMA の長時間添加や PKC インヒビターである GF109230X による前処理、またカルシウムチャンネルブロッカーであるニフェジピン、カルシウムキレート剤である BAPTA-AM、EGTA の前処理を行った上で、同様の手法を用いて検討した。GnRH アゴニスト添加により、ERK の活性化は 5 分でピークを迎え、その後次第に減弱した。一方 JNK は 5 分からリン酸化が認められ30分から 3 時間でピークを迎えるという ERK より時間的に遅い活性化を認めた。また、GnRH アゴニスト添加による ERK 活性化は、PKC や細胞内外カルシウムイオンに依存していたが、JNK 活性化はそれらに依存していなかった。

2）ラット LHβ プロモーター（−156−+7）luciferase 遺伝子を $L\beta T_2$ 細胞に導入し、プロモーター活性を測定した。GnRH 添加によって、4 時間、12時間、24時間と時間依存性に LHβ プロモーター活性の上昇を認めた。

3）GnRH による LHβ プロモーター活性化への ERK および JNK カスケードの関与をそれぞれのカスケードを

遮断することにより検討した。まずERKカスケードを遮断するために、ERKの上流にあるMEKの特異的阻害剤であるPD98059をGnRH添加前に投与し、またERKを不活化するiMAPK遺伝子を導入した。JNKカスケードを遮断するために、dominant negative JNK遺伝子を導入した。ERKカスケードを遮断したときにはGnRHによるLHβプロモーター活性は抑制されなかったが、JNKカスケードを遮断したときには有意な抑制を認めた。

4） GnRHによるLHβプロモーター活性がERKとJNK共通の転写因子であるEts、AP-1を介するかを検討するために、Etsを抑制する遺伝子のdominant negative Etsの導入およびAP-1を抑制するTAM-67の導入を行った。dominant negative Etsの導入では、GnRHによるLHβプロモーター活性に有意な抑制は認められなかったが、TAM-67の導入ではほぼ完全な抑制を認めた。

5） AP-1蛋白を構成し、JNKの基質であるc-Junが、LHβプロモーター活性に影響するかを検討するために、JNKによるc-Junのリン酸化部位Ser63、Ser73をpoint mutationした遺伝子dominant negative c-Junの導入を行った。また、LβT$_2$細胞株にdominant negative c-Junを安定導入した細胞株（dn.Jun-LβT$_2$）を作成した。dominant negative c-Junの導入およびdnJun-LβT$_2$細胞株両方において、GnRHによるLHβプロモーター活性は有意な抑制を認めた。

【総括】

本研究は、GnRHがMAPKファミリーのうちのERKおよびJNKをそれぞれ異なった時間経過で活性化し、そのなかのJNKが活性化することによって、そのシグナルは転写因子のAP-1を構成するc-Junを介してラットLHβプロモーターを活性化するということを初めて明らかにした。この結果、GnRHによるLHβ合成促進にMAPKファミリーのうちJNKが関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者は、本研究でマウス下垂体由来LHβ合成分泌細胞であるLβT2細胞株を用いて、細胞増殖因子の基本的な情報伝達機構を構成するmitogen-activated protein kinase（MAPK）ファミリーのextracellular signal regulated kinase（ERK）とc-Jun NH2-terminal kinase（JNK）がGnRHにより活性化されることを明らかにし、JNKはERKと比較して時間的に遅い活性化を認めることを示した。つぎに、GnRHによるLHβプロモーター活性化へのERKおよびJNKの関与を検討し、JNKが活性化することにより、LHβプロモーターが活性化することを初めて明らかにした。さらにJNKが活性化することにより、そのシグナルは転写因子のAP-1を構成するc-Junを介してLHβプロモーターを活性化することを初めて明らかにした。この結果、GnRHによるLHβ合成促進にMAPKファミリーのうちJNKが主に関与することが初めて明らかになった。GnRHによるLH合成のメカニズムは現時点では充分解明されていないが、生理学的特異性を有するLHβの合成メカニズムに関する新知見は生殖内分泌領域の機構解明につながる重要な進歩である。

本研究の結果は、生殖系における月経異常、不妊症等の内分泌学的疾患の解明にもつながる重要な知見であり、学位の授与に値すると考えられる。