

Title	Activation of the Luteinizing Hormone $\beta$ 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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43113">https://hdl.handle.net/11094/43113</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	横井 猛
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 $\beta$ Promoter by Gonadotropin-releasing Hormone Requires c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal Protein Kinase (GnRH による LH $\beta$ 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 LH  $\alpha$  合成、分泌細胞である  $\alpha$ T3-1 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<sub>2</sub>-terminal Protein Kinase (JNK) を活性化し、ERK が LH  $\alpha$  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  $\beta$  サブユニット遺伝子はその合成、分泌にとって重要であると考えられるが、LH  $\beta$  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 LH  $\beta$  合成分泌細胞である L $\beta$ T<sub>2</sub>細胞株を用いて、GnRH による LH  $\beta$  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<sub>2</sub>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 <sup>32</sup>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 LH  $\beta$  プロモーター (-156+7) luciferase 遺伝子を L $\beta$ T<sub>2</sub>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 LH  $\beta$  プロモーター活性の上昇を認めた。
- 3) GnRH による LH  $\beta$  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 LH $\beta$  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 LH $\beta$  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 LH $\beta$  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、LH $\beta$  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、L $\beta$ T<sub>2</sub> 細胞株に dominant negative c-Jun を安定導入した細胞株 (dn.Jun-L $\beta$ T<sub>2</sub>) を作成した。dominant negative c-Jun の導入および dnJun-L $\beta$ T<sub>2</sub> 細胞株両方において、GnRH による LH $\beta$  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 LH $\beta$  プロモーターを活性化するという事を初めて明らかにした。この結果、GnRH による LH $\beta$  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 LH $\beta$  合成分泌細胞である L $\beta$ T<sub>2</sub> 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 NH<sub>2</sub>-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 LH $\beta$  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、LH $\beta$  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 LH $\beta$  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 LH $\beta$  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 LH $\beta$  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思われる。