

# 神経細胞内アロマターゼの翻訳後修飾による エストロゲン合成調節機構

林 孝典・原田信広  
(藤田保健衛生大学医学部・生化学講座)

## 1. 緒 言

アロマターゼは Cytochrome P450 superfamily に属するタンパクで、脊椎動物において唯一、エストロゲン生合成を律速している酵素である<sup>1,2</sup>。この酵素は性腺のみならず皮膚や骨、血管内皮など生体内の至る所で発現している 503 アミノ酸からなる小胞体局在性膜タンパク質である<sup>1,3,4</sup>。本酵素は X 線解析よりその立体構造と基質特異性が 2009 年に解明され、酵素活性維持に小胞体膜への係留が必要な理由が明らかとなった<sup>5</sup>。各組織で生合成されるエストロゲンが性分化や卵巣・子宮成熟、妊娠の維持、精子の運動性、心血管系の機能維持、骨リモデリング調節など生体にとって重要な生理機能において様々な役割を果たしていることが解明されてきた<sup>6,7</sup>。特に、脳神経内にて de novo 合成されるエストロゲンは、自己分泌・傍分泌作用を介して、樹状突起の伸長やスパインの形成、脳の性的二型核の形成、神経保護作用などの生命現象の重要な過程に関与していること、その発現異常は摂食障害や自閉症などの疾患の病因となることが報告されている。そのため、神経内で合成されたエストロゲンはニューロエストロゲンと呼ばれ、他器官とは区別されて多数の研究が進められている<sup>8-12</sup>。

アロマターゼ遺伝子の転写調節機構については現在までに多数の報告がなされ、ユニークな多重エクソン 1 が各々持っている組織特異的プロモーターと組織特異的発現調節因子との相互作用を通じた調節機構の詳細が明らかになりつつある。しかしながら、生体内で短期的なエストロゲン合成調節する場合、酵素分子の翻訳後調節が、より重要と考えられる。こうした翻訳後調節を支持する実験観察として、これまでにアロマターゼ酵素分子に対する二つの翻訳後修飾が見出されている。1 つ目の修飾は N 末端から 12 番目の Asn<sup>13</sup> への糖鎖の付加、2 つ目は 118 番目の Ser<sup>14</sup>、162 番目の Thr<sup>15</sup>、361 番目の Tyr<sup>16</sup> のリン酸化修飾であるが、

これらを調節する機構に関しては依然不明な点が多い。我々はアロマターゼが calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2 (CaMK2) によってリン酸化されることにより酵素的に不活性化され、タンパク質的には不安定化されること、逆にリン酸化されたアロマターゼはタンパク脱リン酸化酵素である calmodulin-dependent serine/threonine protein phosphatase calcineurine (CN) によって脱リン酸化されることで再活性化し、安定性を維持する<sup>17</sup>ことを明らかにしたので、本論文で紹介する。

また、生体内においてアロマターゼのリン酸化によってエストロゲン合成調節が行われているかどうかは重要な点である。神経内分泌学・行動学的解析で多用されるウズラは視床下部に大量のアロマターゼが発現しており、ニューロエストロゲンをはじめとする神経内ステロイドと、これらによって制御される生殖行動の研究によく用いられる。このウズラの視床下部に存在するニューロペプチド gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) は、ゴナドトロピン分泌と生殖行動を抑制することが知られている。これまでの研究により脳のアロマターゼによってアンドロゲンから合成されたエストロゲン (ニューロエストロゲン) は、雄の生殖行動を調節することが明らかになり、GnIH とエストロゲン合成が関係していると考えられてきた。そこで、雄ウズラを用いて GnIH とアロマターゼのリン酸化に関する解析を行い、新たな知見を得たので、これも本論文で紹介する。

## 2-1. アロマターゼはリン酸化修飾によって活性、安定性を制御される

アロマターゼ高発現細胞株であるヒト絨毛由来細胞 (JEG-3) を用いて、アロマターゼに対するリン酸化修飾と酵素活性・分解速度の関連について解析を行った。JEG-3 細胞からアロマターゼが局在する小胞体

分画及び ATP/Mg<sup>2+</sup> (5 mM) と Ca<sup>2+</sup> (1 mM) を添加した細胞質分画を調製して *in vitro* でこれらを再構成, アロマトラーゼがリン酸化される条件下でアロマトラーゼ活性の時間依存的な変化を観察した。その結果, 開始 10 分以降にアロマトラーゼ活性は急速に低下, 15 分後には 65%, 30 分後には 10% 以下となった。生体内で精微にエストロゲン合成を調節するためには, このリン酸化による活性の低下が可逆的である必要があると考えられる。そこで, 反応開始から 15 分後に alkaline phosphatase を添加し, 脱リン酸化してみるとアロマトラーゼは再活性化した。しかし, 活性が 10% 以下になった 30 分後に alkaline phosphatase を添加

してもアロマトラーゼの再活性化は起こらなかった (図 1 a)。再活性化が見られなくなった 30 分後, ちょうどこの時点からタンパクの分解が始まっている事が観察された (図 1 b)。これらの結果は, アロマトラーゼがリン酸化によって活性のみならず, タンパクの安定性も調節されていることを示している。その後の研究からアロマトラーゼのリン酸化 (失活) は CaMK2, 脱リン酸化 (再活性化) は CN によって調節される事が明らかになっている (図 2 a)。また前述したように, このリン酸化修飾はアロマトラーゼタンパクの安定性も調節している。実際に CaMK2 ノックダウンによって細胞内アロマトラーゼタンパク量は増加 (図 2 b) し, CN

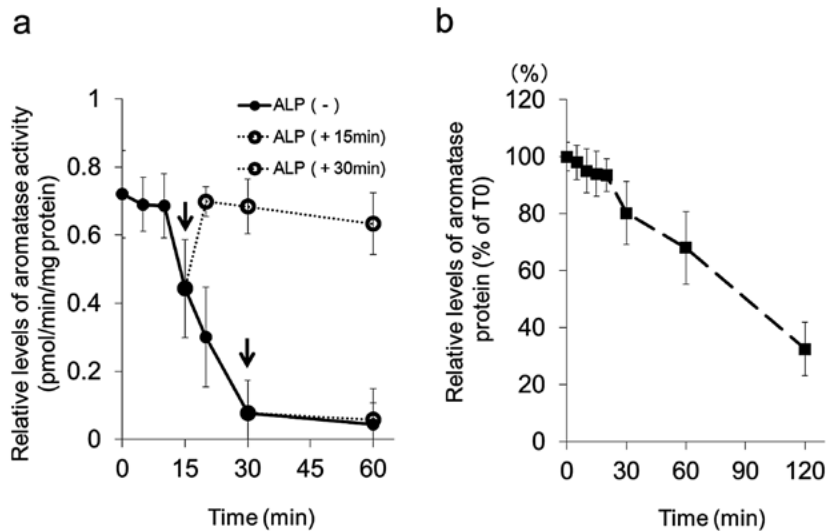


図 1 リン酸化による aromatase 活性およびタンパク量の経時的変化 (文献 17 より改変)  
 JEG-3 から疎精製された小胞体分画と細胞質分画を調整した後, ATP/Mg<sup>2+</sup> (終濃度 5 mM) Ca<sup>2+</sup> (終濃度 1 mM) を加えて 37°C に加温し, 活性およびタンパクの経時変化 (0-120min) を測定した。a: aromatase 活性 (●および実線; n = 4)。alkaline phosphatase を測定開始から 15, 30 分後に添加した場合の aromatase 活性 (○および点線; n = 3)。b: a と同様の条件時のタンパク量変化を western blotting 法を用いて解析した。(■および点線; n = 4)。

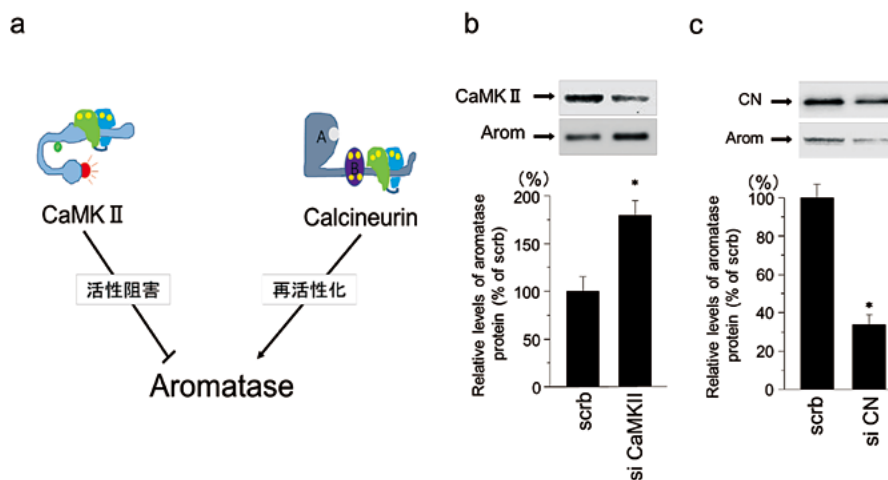


図 2. アロマトラーゼは CaMK2 によってリン酸化, CN によって脱リン酸化される (文献 17 より改変)  
 a: アロマトラーゼは CaMK2 によって活性阻害, CN に再活性化をされる。  
 JEG-3 細胞が 50% コンフルエントになるように播種したもの, にノックダウン用ベクター (b: si CaMK II, c: si CN), コントロール用ベクター (scrb) の DNA 量は 10pg/ml に調整した。ベクター導入後 60 時間培養し, 回収したサンプル中のアロマトラーゼおよび CaMK II, CN の WB 像と同条件の scrb を 100% とした場合の相対アロマトラーゼタンパク量 (\*p<0.001 対 scrb)。

ノックダウンはアロマトラーゼタンパク量を減少させた(図2c)<sup>17</sup>。

これまでにリン酸化修飾によってアロマトラーゼ活性が変化することは報告されているが、リン酸化・脱リン酸化を担う kinase/phosphatase の特定など詳細な機構解明には至っていなかった。今回明らかになった CaMK2, CN は共に calcium/calmodulin 依存的な酵素であり、生体内においてエストロゲン合成がカルシウムシグナル伝達経路の支配を受けている可能性があり、非常に興味深い。

## 2-2. アロマトラーゼのリン酸化修飾を介して雄ウズラ視索前野 GnIH はニューロエストロゲン合成を調節する

前項で紹介したようなリン酸化修飾によるアロマトラーゼの活性制御が実際に生体内で働いているかどうかを確認する必要がある。視索前野 (POA) でのアロマトラーゼ活性とニューロエストロゲン濃度は、ウズラが活発に行動する朝は低い、ウズラが不活発になる夕方にかけてニューロエストロゲン合成は増加する。ニューロエストロゲン濃度が低い朝、ウズラの視床下部に GnIH を投与すると、POA でのニューロエストロゲン合成が増加し、これによって生殖行動は低下する。また、高濃度のエストロゲン ( $17\beta$ -エストラジオール) をウズラの視床下部に投与した場合も同様に生殖行動が抑制される。GnIH 投与によってエストロゲン合成が増加した POA のアロマトラーゼは vehicle 投与群に比べてリン酸化修飾が減少していた (図3)。これらの結果は GnIH が、直接アロマトラーゼのリン酸化

を抑制することにより活性化し、ニューロエストロゲン合成を生殖行動の発現に最適な濃度を越えて増加させて、その結果として雄の生殖行動を抑制させることを示している。この報告は、ニューロエストロゲン合成を担う脳内アロマトラーゼの活性を直接調節する視床下部ニューロペプチドを初めて明らかにした報告であった。

## 3. おわりに

これまでエストロゲンに関する研究は、卵巣・子宮成熟、妊娠の維持など中長期的な作用が注目され、転写調節に関しては多くの報告がなされてきた。しかし、アロマトラーゼの翻訳後修飾による調節機構が明らかになってきたことで、エストロゲンの短期的な作用とその機構解明が大きく前進すると期待できる。特にニューロエストロゲンは樹状突起の伸長やスパインの形成、脳の性的二型核の形成、摂食障害や自閉症など多くの短期的な生理現象や疾患に関係しているため<sup>7, 20, 21</sup>、神経内アロマトラーゼの翻訳後修飾と様々な生理現象や疾患との関係解明が重要になるであろう。まさに、今回紹介した雄ウズラの生殖活動が GnIH を介したアロマトラーゼのリン酸化レベルの調節を通して発揮されることを示した報告は、その先駆けになったといえる。

ニューロエストロゲンは Kisspeptin や GnRH、さらにエストロゲン以外の神経内ステロイドなど、多くの生理活性分子と協調して生理的短期応答に関与している。現在著者らは、これら生理活性分子とアロマトラーゼの翻訳後修飾の詳細な機構解明に取り組んでおり、研究成果を上げ始めている。これらの研究は短期

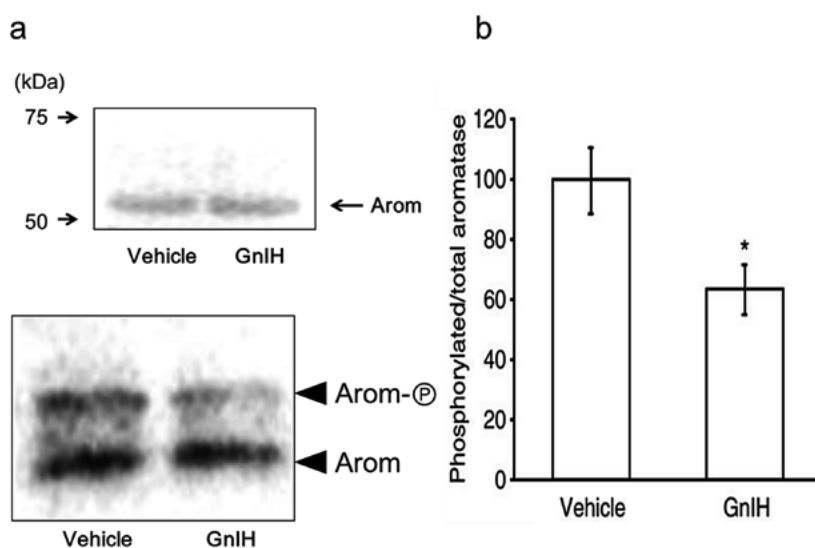


図3 POA 内アロマトラーゼのリン酸化に対する GnIH の影響。  
POA に GnIH (100pmol) を投与し、2 時間後に POA を採取。アロマトラーゼは 8% SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)、リン酸化されたアロマトラーゼの量は selective phosphate-binding tag 分子を含んだ 8% SDS-polyacrylamide gel (Phos-Tag SDS-PAGE)、PVDF に転写した後に抗アロマトラーゼ抗体を反応させ、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いて検出した (図3a)。リン酸化アロマトラーゼ量は vehicle 投与を基準にして GnIH 投与群を相対的に評価した (図3b)。

的なニューロエストロゲン合成調節メカニズム解明の一助になると期待される。今後、神経内アロマターゼの研究が、ニューロエストロゲンが関与する生理現象解明や疾患の治療につながっていくことを期待している。

## 謝 辞

本校執筆にあたり、日ごろからご指導ご鞭撻頂いております医学部生化学講座の教室員の皆様に深く感謝いたします。また、御協力賜りました福岡大学薬学部生化学・病態生化学教室准教授・本田伸一郎先生、早稲田大学 教育・総合科学学術院 生物学教室 統合脳科学研究室 教授・筒井和義先生、研究員・産賀崇由先生に心から感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Thompson EA Jr and Siiteri PK : Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J. Biol. Chem.* 1974 ; 249 : 5364 – 5372.
- 2) Reed KC and Ohno S : Kinetic properties of human placental aromatase. Application of an assay measuring  $^3\text{H}_2\text{O}$  release from 1 $\beta$ , 2 $\beta$ -3 $\text{H}$ -androgens. *J. Biol. Chem.* 1976 ; 251 : 1625 – 1631.
- 3) Honda S, Harada N, and Takagi Y : Novel exon 1 of the aromatase gene specific for aromatase transcripts in human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994 ; 198 : 1153 – 1160.
- 4) Harada N, Utsumi T, and Takagi Y : Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P-450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993 ; 90 : 11312 – 11316.
- 5) Ghosh D, Griswold J, Erman M, and Pangborn W : Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature.* 2009 ; 457 : 219 – 223.
- 6) Shozu M, Akasofu K, Harada T, and Kubota Y : A new cause of female pseudohermaphroditism : placental aromatase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1991 ; 72 : 560 – 566.
- 7) Wu MV, Manoli DS, Fraser EJ, Coats JK, Tollkuhn J, Honda S, Harada N, and Shah NM : Estrogen masculinizes neural pathways and sex-specific behaviors. *Cell.* 2009 ; 139 : 61 – 72.
- 8) Cornil CA, and Charlier TD : Rapid behavioural effects of oestrogens and fast regulation of their local synthesis by brain aromatase. *J. Neuroendocrinol.* 2010 ; 22 : 664 – 673.
- 9) Cornil CA, Ball GF, and Balthazart J : Rapid control of male typical behaviors by brain-derived estrogens. *Front. Neuroendocrinol.* 2012 ; 33 : 425 – 446.
- 10) Ubuka T, Haraguchi S, Tobari Y, Narihiro M, Ishikawa K, Hayashi T, Harada N, and Tsutsui K : Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviour by increasing neuroestrogen synthesis. *Nat. Commun.* 2014 ; 5 : 3061.
- 11) McConn B, Wang G, Yi J, Gilbert ER, Osugi T, Ubuka T, Tsutsui K, Chowdhury VS, Furuse M, and Cline MA : Gonadotropin-inhibitory hormone-stimulation of food intake is mediated by hypothalamic effects in chicks. *Neuropeptides.* 2014 ; 48 : 327 – 334.
- 12) Honda S, Wakatsuki T, and Harada N : Behavioral analysis of genetically modified mice indicates essential roles of neurosteroidal estrogen. *Front. Endocrinol(Lausanne).* 2011 ; 2 : 40.
- 13) Sethumadhavan K, Bellino FL, and Thotakura NR : Estrogen synthetase (aromatase). The cytochrome P-450 component of the human placental enzyme is a glycoprotein. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1991 ; 78 : 25 – 32.
- 14) Miller TW, Shin I, Kagawa N, Evans DB, Waterman MR, and Arteaga CL : Aromatase is phosphorylated in situ at serine-118. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 2008 ; 112 : 95 – 101.
- 15) Beausoleil SA, Villen J, Gerber SA, Rush J, and Gygi SP : A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nat. Biotechnol.* 2006 ; 24 : 1285 – 1292.
- 16) Catalano S, Barone I, Giordano C, Rizza P, Qi H, Gu G, Malivindi R, Bonfiglio D, and Ando S : Rapid estradiol/ER $\alpha$  signaling enhances aromatase enzymatic activity in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 2009 ; 23 : 1634 – 1645.
- 17) Hayashi T and Harada N : Post-translational dual regulation of cytochrome P450 aromatase at the catalytic and protein levels by phosphorylation/dephosphorylation. *FEBS. J.* 2014 ; 281 :

- 4830 – 4840.
- 18) Absil P, Ritters LV, and Balthazart J : Preoptic aromatase cells project to the mesencephalic central gray in the male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Horm. Behav.* 2001 ; 40 : 369 – 383.
- 19) Mills AD, Crawford LL, Domjan M, and Faure JM : The behavior of the Japanese or domestic quail *Coturnix japonica*. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1997 ; 21 : 261 – 281.
- 20) Murakami G, Hojo Y, Ogiue-Ikeda M, Mukai H, Chambon P, Nakajima K, Ooishi Y, Kimoto T, and Kawato S : Estrogen receptor KO mice study on rapid modulation of spines and long-term depression in the hippocampus. *Brain Res.* 2014[Epub ahead of print].
- 21) Cui H, Lu Y, Khan MZ, Anderson RM, McDaniel L, Wilson HE, Yin TC, Radley JJ, Pieper AA, and Lutter M : Behavioral disturbances in estrogen-related receptor alpha-null mice. *Cell Rep.* 2015 ; 11 : 344 – 350.