



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	エストロゲンによる異なった受容体を介するマクロファージ様細胞のNa, K-ATPase活性促進作用
Author(s)	平沢, 宏太; Hirasawa, Kota; 出山, 義昭 他
Citation	北海道歯学雑誌, 44, 16-25
Issue Date	2023-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90488
Type	journal article
File Information	44_05-2.pdf



原 著

エストロゲンによる異なった受容体を介するマクロファージ様細胞の Na, K-ATPase活性促進作用

平沢 宏太¹⁾ 出山 義昭²⁾ 吉村 善隆²⁾ 野谷 健治¹⁾ 鈴木 邦明²⁾

抄 録 : 単球-マクロファージ系の多くの細胞がエストロゲンによって制御されている。また、Na, K-ATPaseが17 β -エストラジオール (E2) の標的である可能性が、様々な細胞で示唆されている。本研究は、マクロファージ様RAW264.7細胞のNa, K-ATPaseに対するE2の作用を検討することを目的に行った。RAW264.7細胞をE2で処理すると、Na, K-ATPase活性は、細胞表面のGPR30受容体を介する初期活性化と、核内エストロゲン受容体 (ER) を介する後期活性化という二相性の変化を示した。GPR30においてE2と拮抗するG15により、E2によるNa, K-ATPaseの初期活性化は消失した。一方、fulvestrantを用いてERを介したE2の作用を阻害すると、fulvestrantの用量依存的にNa, K-ATPase活性の後期活性化を抑制した。また、E2を短時間作用させると、Na, K-ATPaseの α 1-サブユニットのTyr-10でのリン酸化が誘導され、Na, K-ATPaseのNa⁺に対する親和性が増大した。これらの結果は、E2によるRAW264.7細胞のNa, K-ATPaseの制御に2つの異なるシグナル伝達経路が関与することを示唆する。

キーワード : Na, K-ATPase, マクロファージ様RAW264.7細胞, 17 β -エストラジオール, GPR30受容体, 核内エストロゲン受容体

緒 言

Na, K-ATPaseは細胞内のNa⁺と細胞外のK⁺を交換する膜貫通型のヘテロ二量体ポンプである。サブユニット α と β から構成され、これらのサブユニットにはいくつかのアイソフォームが存在する^{1, 2)}。Na, K-ATPaseは細胞内のNa⁺とK⁺濃度の維持に重要な役割を果たし、細胞容積と電気化学的勾配の維持に関与している。細胞におけるNa, K-ATPase活性調節の重要な機構の一つは、プロテインキナーゼによるNa, K-ATPaseのリン酸化である。プロテインキナーゼA (PKA)とプロテインキナーゼC (PKC)を介したNa, K-ATPase α サブユニットのリン酸化は、細胞で最初に証明された³⁻⁵⁾。サメ直腸腺Na, K-ATPaseのPKAによるリン酸化はその活性を刺激するが、ブタ腎臓Na, K-ATPaseの活性はPKAによるリン酸化を受けても変化しない⁶⁾。同様に、 α サブユニットのPKCによるリン酸化に反応して、Na, K-ATPase活性は刺激されるか⁷⁾、阻害されるか⁸⁾、あるいは変化しない⁹⁾。 α 1サブユニットの細胞質NH2末端には2つのPKCによるリン酸化部位が存在し、それらはSer-16¹⁰⁾とSer-23⁹⁾であった。また、Tyr-10におけるNa, K-ATPase α 1サブユニットのリン酸化が同定された¹⁰⁾。

インスリン様成長因子I (IGF-I)¹¹⁾ や上皮成長因子 (EGF)¹²⁾ 受容体を含む受容体チロシンキナーゼの活性化に反応したNa, K-ATPase活性の増加は一般的に報告されており、Tyr-10のリン酸化に依存することが示唆される¹³⁾。

女性ホルモンである17 β -エストラジオール (E2) は、性分化、内分泌調節、生殖行動の開始を調節するだけでなく¹⁴⁾、脳の成熟、ニューロンの形態、シナプス可塑性も調節する¹⁵⁾。エストロゲンは、ゲノム効果と非ゲノム効果という2つの異なる機構でその効果を発現することが知られている。ゲノム効果は、E2が効果を発揮する古典的な機構であり、E2はその核内受容体であるER α またはER β に結合する。E2/ER複合体は、標的遺伝子のプロモーター領域にあるエストロゲン応答エレメント (ERE) に結合することにより、特定の遺伝子発現をアップレギュレートまたはダウンレギュレートする¹⁶⁾。一般的に、E2はこの機構によって遺伝子発現を調節するのに数時間から数日必要とする。E2の非ゲノム的作用は、別の機構で調節される。最近の研究では、E2がシグナル伝達経路の活性化¹⁷⁾ やイオンチャネル¹⁸⁾ などの迅速な生理学的事象も介して作用することが立証されている。このような事象は、核内ER α 、ER β を介した古典的なE2シグナル伝達では説明できない。これらの非ゲ

1) 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目
北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座 高齢者歯科学教室 (主任:野谷 健治 准教授)

2) 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目
北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座 細胞分子薬理学教室 (主任:鈴木 邦明 教授)

ノムの作用の機構は、エストロゲンが細胞表面でGタンパク質共役型受容体であるGPR30と相互作用し、細胞内シグナルを迅速に誘導することであるとされる。

GPR30は、主に成長因子受容体に関連する細胞内シグナル伝達経路の膜関連活性化を介して、E2の生物学的効果を発現する¹⁹⁾。GPR30に結合すると、E2は上皮成長因子受容体(EGFR)を活性化し、それに続いてERK1/2が活性化される¹⁷⁾。また、GPR30は神経成長因子(NGF)とBcl-2をアップレギュレートし^{20, 21)}、神経細胞のカシウム放出を促進する²²⁾。GPR30の機能は、その選択的リガンドであるG1を用いて主に研究されており²³⁾、細胞増殖と腫瘍形成に関与するGPR30の役割が確立された²⁴⁾。

閉経後のエストロゲン産生の低下は、骨粗鬆症、神経炎症性疾患、血管壁変性などのいくつかの変性疾患の発症と関連しており、単球-マクロファージ系細胞の活性化の関与が示唆される。エストロゲンは、この系譜の多くの細胞タイプの分化、成熟、機能を直接的あるいは間接的に制御している。本研究では、マクロファージ様RAW 264.7細胞におけるNa, K-ATPase活性に対するE2の作用とその分子機序を検討した。

材料と方法

1. 試薬および抗体

DasatinibはSelleck Chemicals社(Houston, TX)、G1およびG15はMerck社(Darmstadt, Germany)、E2とfulvestrantはSigma-Aldrich社(St. Louis, MO)、抗GPR30抗体はAbcam plc.(Cambridge, UK)、抗Na, K-ATPase $\alpha 1$ サブユニット抗体はEMD Millipore Corp.、抗Na, K-ATPase $\beta 1$ サブユニット抗体はAviva Systems Biology Corp.(San Diego, CA)、phospho-Na, K-ATPase $\alpha 1$ (Tyr10)抗体はCell Signalingから購入した。その他の試薬は特級あるいは生化学用を使用した。

2. 細胞培養

RAW 264.7ヒトマクロファージ様細胞は、10% FBSおよび50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)を用い、37°C、加湿5% CO₂存在下で培養した。細胞を10 cmのディッシュに播種し、24時間接着させた。その後、培地を、G1とG15の存在下/非存在下で、適切な濃度のE2を含む新鮮な培地に交換した。

3. ウェスタンブロッティング

タンパク質(1レーンあたり10 μg)を10%ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動(SDS-PAGE)により分離し、transfer buffer(25 mM tris-HCl, 192 mM グリシン, 20%メタノール, pH 8.3)中、108 mAで90分間ニトロセルロース膜に転写した。次に、膜

をTBS(25 mM tris-Cl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)で2回洗浄し、ImmunoBlock[®](DS Pharma Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan)を使用して60分間室温でブロッキングした。さらに、Na, K-ATPase $\alpha 1$ または $\beta 1$ サブユニット、phospho-Na, K-ATPase $\alpha 1$ サブユニット(Tyr10)、GPR30の検出に特異的な抗体と4°Cで一晩インキュベーションした。その後、膜をTBS-Tで3回、室温で15分間洗浄し、Can Get Signal[®](Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan)中の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて一次抗体を室温で60分間検出した。結合した二次抗体は、TBS-T中、室温で3回、合計15分間洗浄した後、強化化学発光(ECL)を用いて可視化した。

4. Na, K-ATPase活性測定

細胞ホモジネート(30 μl)を、220 μl の反応液(ATP添加後の最終濃度として160 mM NaCl, 16 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 25 mM tris-HCl, pH 7.4)に加えた。1 mMのouabainを添加しても測定される活性をouabain非感受性ATPase活性とし、バックグラウンドとして活性から差し引いた。37°Cで50 μl のATP-tris溶液(最終ATP濃度5 mM)を加えて反応を開始し、30分後に300 μl の12% SDSを加えて反応を停止した。加水分解の結果生じた無機リンをChifflet法²⁵⁾により定量した²⁵⁾。すべての測定は同一の条件につき3本ずつ行った。

結 果

マクロファージ様細胞株におけるNa, K-ATPase活性、タンパク質発現およびチロシン酸化に対するE2の短時間誘導効果を解析した。RAW 264.7細胞(Fig. 1A)とJ774細胞(Fig. 1B)をE2(10^{-11} - 10^{-5} M)存在下で1時間刺激したのち、Na, K-ATPase活性を測定した。これらのマクロファージ様細胞のE2誘導Na, K-ATPase活性はE2の濃度に依存して増加したのち、さらに高濃度では減少した。両細胞株とも、E2濃度が 10^{-9} Mで最大値を示し、 10^{-5} Mでは、controlと同程度まで低下した。Na, K-ATPaseサブユニットのタンパク質量とTyr-10のリン酸化レベルも、活性の変化と同様にE2濃度に依存した増減を示した(Fig. 1C)。

GPR30は、E2に応答する非ゲノムのあるいは迅速なシグナル伝達経路の活性化に関与するとされる。そこで、マクロファージ様細胞株であるMCF-7、RAW 264.7及びJ774細胞がGPR30を発現しているかを調べた。抗GPR30抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、これらの細胞にGPR30が存在することが示された(Fig. 2A)。E2によるNa, K-ATPaseの短時間活性化に対するGPR30の役割を明らかにするために、 10^{-9} M E2によるNa, K-ATPase活性化に対する選択的GPR30拮抗薬であるG15の作用を調べた。G15は、E2によるNa, K-ATPase活性の上昇を濃度依存的に抑制し、

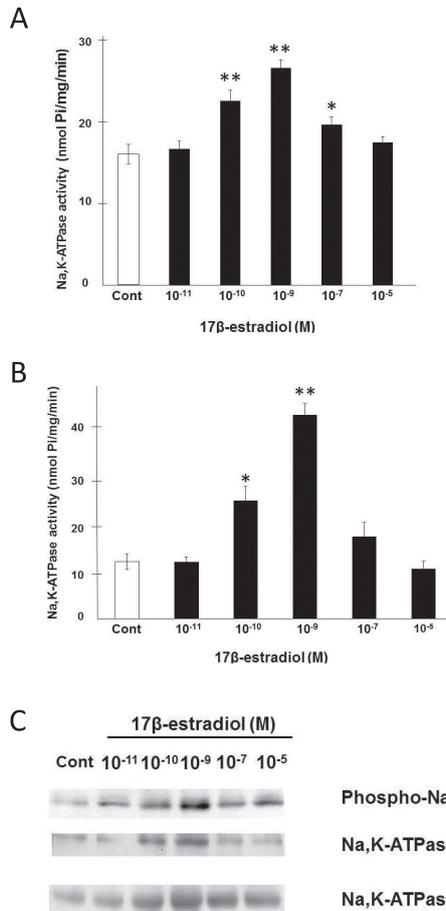


Fig. 1

Fig. 1 Effects of 17β-estradiol on the Na, K-ATPase of macrophage-like cells.

The macrophage-like cells (A) RAW 264.7 cells and (B) J774 cells were cultured for 1 hour in the presence of the indicated concentrations of 17β-estradiol and Na, K-ATPase activity was then assayed. (C) The protein expression of the Na, K-ATPase α1 and β1 subunits, and Tyr-10 phosphorylation of the α1 subunit of RAW 264.7 cells were examined by western blot analysis. Data are shown as means ± S.E. (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01 versus control) in (A) and (B).

10⁻⁹Mでは完全に抑制した (Fig. 2B). また, Fig. 2Cに示すように, G15は濃度依存的にE2によるNa, K-ATPase α1サブユニットのチロシンリン酸化を低下させ, Na, K-ATPase α1およびβ1サブユニットの発現も低下させた. これらの結果は, 観察されたE2の作用がGPR30を介した作用であることを示唆した.

RAW 264.7細胞においてNa, K-ATPaseを迅速に活性化するE2の作用がGPR30を介することを確認するために, GPR30選択的作用薬であるG1の効果調べた. Fig. 3Aに示すように, RAW 264.7細胞をG1で1時間処理すると, 濃度依存的にNa, K-ATPase活性が上昇した. また, G1は

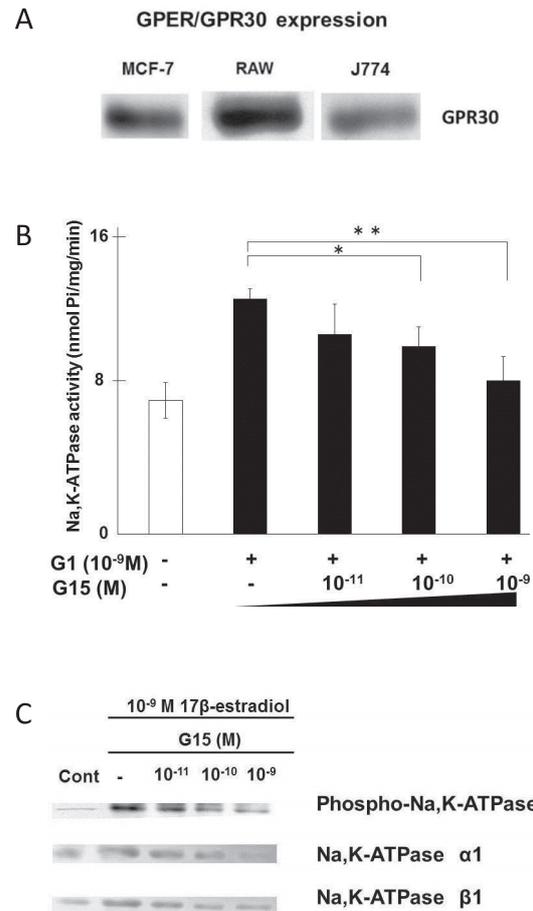


Fig. 2

Fig. 2 The GPR30 antagonist G15 inhibited estrogen-upregulation of Na, K-ATPase activity.

Macrophage-like cells, MCF-7, RAW 264.7 and J774 were treated with 10⁻⁹ M 17β-estradiol and the expression of the GPR30 protein was assessed by western blotting (A). RAW 264.7 cells were treated with 10⁻⁹ M 17β-estradiol in the presence or absence of increasing concentrations of G15 for 1 h and the cells were analyzed as follows. (B) Na, K-ATPase activity was assayed. (C) Immunoblotting for Na, K-ATPase α1 and β1 subunits, and for phospho-Na, K-ATPase α1 was performed. The results in B are expressed as means ± S.E. (n = 3) (*p < 0.05, **p < 0.01).

Na, K-ATPaseのα1サブユニットのタンパク質発現とリン酸化を誘導した (Fig. 3B). 次に, GPR30の拮抗薬であるG15より作用薬G1の効果を阻止できるかを調べた. G15は濃度依存的にG1によるNa, K-ATPase活性の誘導を阻止した (Fig. 3C). これらの結果から, E2はGPR30受容体を介してRAW細胞のNa, K-ATPase活性の迅速な上昇を誘導することが示された.

そこで, E2によるNa, K-ATPase活性化の機構を明らかにするために, RAW 264.7細胞を種々濃度のE2存在下で1時間処理したのち, Na, K-ATPase活性のNa⁺濃度依存性を測定した. その結果, Na⁺濃度依存性の曲線は, コン

エストロゲンによる異なった受容体を介するマクロファージ様細胞の
Na, K-ATPase活性促進作用

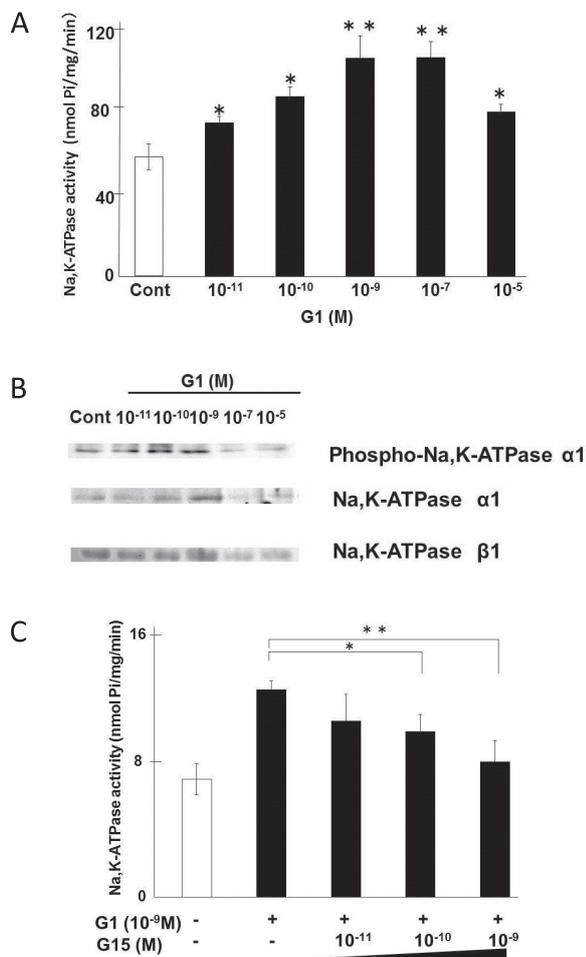


Fig. 3

Fig. 3 Effects of the GPR30 selective agonist G1 on the Na, K-ATPase of RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated with G1 (A, B) or with G1 in the presence or absence of the indicated concentrations of G15 (C) for 1 hour. Cellular Na, K-ATPase activity was then measured (A, C), and the protein expression of Na, K-ATPase $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits, and the Tyr-10 phosphorylation of the $\alpha 1$ subunit were determined by immunoblotting of cell lysates with specific antibodies (B). Data in (A) and (C) are means \pm S.E. of values of three replicates from three representative experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ versus control value).

コントロールと比較して、E2の用量依存的に左方へシフトし、Na, K-ATPaseの見かけのNa⁺親和性の増加を示唆した (Fig. 4). Na, K-ATPase活性は、コントロールでは50 mM、10⁻⁹ M E2処理細胞では25 mM NaCl存在下で最大に達した。これらの結果は、E2の用量依存的な α サブユニットのチロシンリン酸化とATPase活性の増加 (Fig. 1) も10⁻⁹ M E2で最大となることと一致していた。一方、K⁺親和性については、コントロールとE2刺激RAW 264.7細胞の間に有意差は認められなかった (データは示さない)。

Na, K-ATPase活性に対するE2の作用とチロシンリン酸

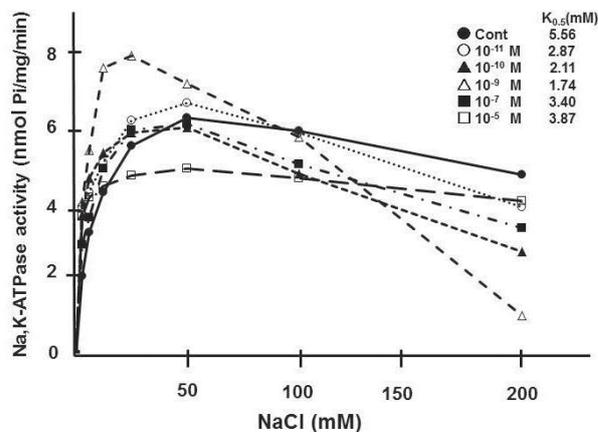


Fig. 4

Fig. 4 Effect of 17 β -estradiol on the Na⁺ affinity of the Na, K-ATPase in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with 17 β -estradiol at the indicated concentrations for 1 h. Cellular Na, K-ATPase activity was then measured in the presence of increasing NaCl concentrations. The Pi released by ATP hydrolysis was measured as described in Materials and Methods. Data are given as means \pm S.E. of three experiments (n = 3) performed in triplicate. Half maximal concentrations for Na⁺ (K_{0.5}) of Na, K-ATPase were obtained by fitting the data from each individual experiment.

化との関係をさらに検討するために、選択的チロシンキナーゼ阻害薬であるgenisteinのE2依存性Na, K-ATPase活性化に対する影響を調べた。E2刺激前にRAW 264.7細胞をgenistein存在下でインキュベーションすると、E2誘導性のNa, K-ATPase $\alpha 1$ サブユニットのTyr-10リン酸化が用量依存的に阻害された (Fig. 5A)。このTyr-10リン酸化の減少と一致して、genisteinは飽和Na⁺濃度存在下で測定されたNa, K-ATPase活性も阻害した (Fig. 5B)。これらの結果は、E2によるTyr-10リン酸化依存的なNa, K-ATPase活性の増加が、Na, K-ATPase活性の機能的特性の変化に関連する可能性を示す。そこで、genisteinの有無でE2刺激RAW 264.7細胞のNa, K-ATPase活性のNa⁺濃度依存性を測定した。GenisteinはNa⁺濃度に依存した活性化曲線を右方シフトさせた (Fig. 5C)。この結果は、genisteinがE2誘導Na, K-ATPase活性のNa⁺感受性も低下させたことを示唆する。

以上の実験では、RAW 264.7細胞Na, K-ATPaseのE2に対する短時間の反応を調べた。そこで、E2がゲノム応答によってもRAW 264.7細胞のNa, K-ATPaseを調節するかどうかを調べるために、E2の長時間効果を解析した。RAW 264.7細胞を10⁻⁹~10⁻⁵ MのE2で24時間処理すると、濃度依存的にNa, K-ATPase活性が増加した (Fig. 6A)。最大活性を与えるE2濃度は、短時間作用の場合とは異なって10⁻⁵ Mであった。 $\alpha 1$ -および $\beta 1$ -サブユニットのタンパク質発現も

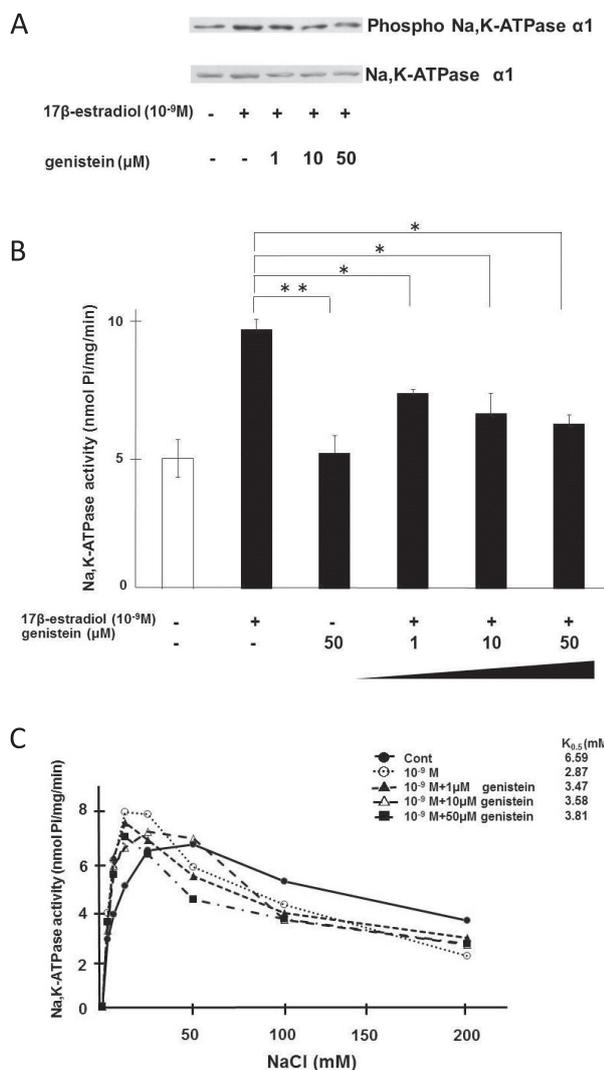


Fig. 5 Tyrosine phosphorylation of the $\alpha 1$ subunit enhanced the Na^+ sensitivity of the Na, K-ATPase activity in 17β -estradiol-stimulated RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were incubated for 1 h with 10^{-9} M 17β -estradiol in combination with genistein at the indicated concentrations and the cells were then analyzed as follows. (A) Phosphorylation of the Na, K-ATPase $\alpha 1$ subunit at Tyr-10 was determined by immunoblotting. (B) Na, K-ATPase activity was evaluated as described in Materials and Methods. Data represent means \pm S.E. ($n = 3$) (** $p < 0.01$). (C) Na, K-ATPase activity was measured in the presence of various concentrations of Na^+ from 0 to 200 mM. The results shown are from three independent experiments.

同様のE2濃度依存性に増加した。一方、このE2処理では、 $\alpha 1$ サブユニットのリン酸化は有意な変化を示さなかった (Fig. 6B)。

長時間のE2に対する応答は、転写因子として働く古典的なエストロゲン受容体ER α およびER β との関連が示唆される。そこで、E2の長時間刺激によるNa, K-ATPaseの活

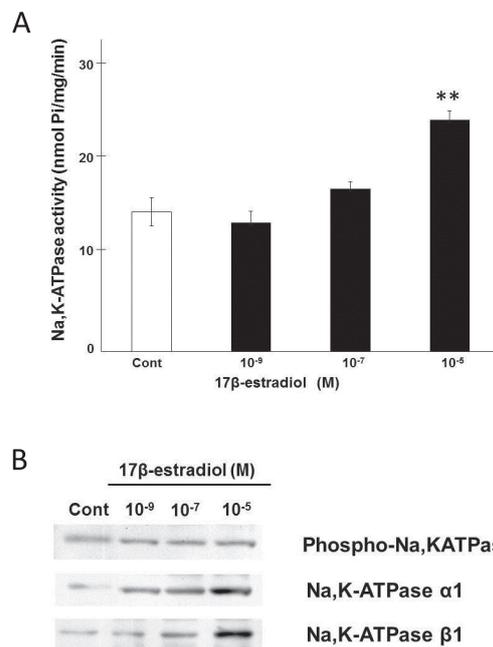


Fig. 6

Fig. 6 ER-mediated effect of 17β -estradiol on Na, K-ATPase. RAW 264.7 cells were exposed to vehicle or to various concentrations of 17β -estradiol for 24 h following which (A) ouabain-sensitive ATPase activity was measured and (B) $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits of the Na, K-ATPase were analyzed by immunoblotting. The results are representative of three independent experiments (** $p < 0.01$).

性化に対するERの関与を検討した。ER特異的拮抗薬であるfulvestrantはE2の長期的刺激によるNa, K-ATPase活性を阻害した (Fig. 7A)。また、fulvestrantはE2依存的なNa, K-ATPaseの $\alpha 1$ -サブユニットの増加も抑制した (Fig. 7B)。

最後に、E2の長時間刺激によるNa, K-ATPase活性の増加に対するGPR30拮抗薬であるG15の作用を検討した。Fig. 8に示すように、G15はE2による後期Na, K-ATPase活性上昇に顕著な影響を示さなかった。

考 察

本稿では、E2が細胞表面GPR30受容体の短期的刺激とER受容体を介した長期的刺激の両方を通して、マクロファージ様RAW 264.7細胞のNa, K-ATPase活性を制御することを示した。この結果は、Na,K-ATPaseが様々な組織においてホルモン制御の標的であると認識されていることと一致する²⁶⁾。E2は、虚血によって引き起こされるNa, K-ATPase活性の抑制に拮抗し、心筋細胞へのRbのouabain感受性取り込みを刺激した²⁷⁾。この作用は、E2の心臓保護作用を説明すると示唆される。E2はまた、マウスの精巣輸尿管におけるNa, K-ATPase $\alpha 1$ サブユニット発現の調節にも関与

エストロゲンによる異なる受容体を介するマクロファージ様細胞の
Na, K-ATPase活性促進作用

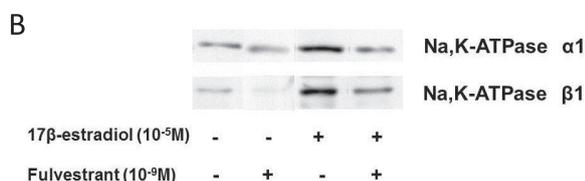
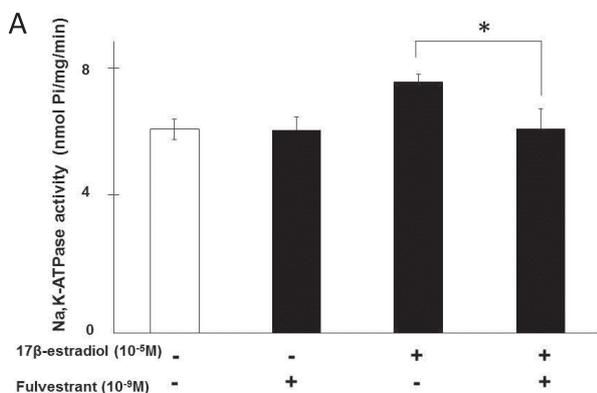


Fig. 7

Fig. 7 Effect of the ER-specific inhibitor fulvestrant on Na, K-ATPase in RAW 264.7 cells treated with 17β-estradiol. RAW 264.7 cells were preincubated for 24 h in the absence or presence of 10⁻⁹ M fulvestrant and were then treated with 10⁻⁹ M 17β-estradiol for 24 h. The ouabain-sensitive Na, K-ATPase activity (A) and the tyrosine phosphorylation of the α1 subunit of the Na, K-ATPase were then determined (B). The values are the means ± S.E. of three independent experiments. Data are expressed relative to a control value (**p < 0.01).

している²⁸⁾. Brubakerらの論文では、E2に対する破骨細胞応答の脱分極におけるNa, K-ATPaseの役割が強調されている²⁹⁾. 破骨細胞は、単球/マクロファージ系譜の中の骨髓系前駆体の融合によって形成される。そこで、E2がRAW 264.7細胞におけるNa, K-ATPaseの調節に関与している可能性を仮定した。その結果、E2の濃度依存的に、RAW 264.7細胞におけるNa, K-ATPase活性の二相性（1時間後と24時間後）の増強の誘導が示された(Fig.1A, 1B, 6A).

マクロファージ様細胞であるRAW264.7とJ774細胞が、GPR30を発現していることが示された(Fig.2A)。これまでの研究では、マクロファージにおけるGPR30シグナルを介した神経成長因子(NGF)産生³⁰⁾とTLR4発現³¹⁾が報告されている。本研究において、RAW 264.7細胞は、E2またはGPR30リガンドG1の存在下でNa, K-ATPase活性の増加を示した。RAW 264.7細胞Na, K-ATPase活性のE2用量依存性は、NGF分泌誘導のE2用量依存性と一致している。

本研究のRAW 264.7細胞では、Na, K-ATPase α1サブユニットのTyr-10でのリン酸化が、エストロゲンによる活性刺激に必要であることが示された。Na, K-ATPaseの機能制御には様々な機構が関与している。長時間的な制御には遺伝子発現の変化が関与することが多いが、短時間的な制

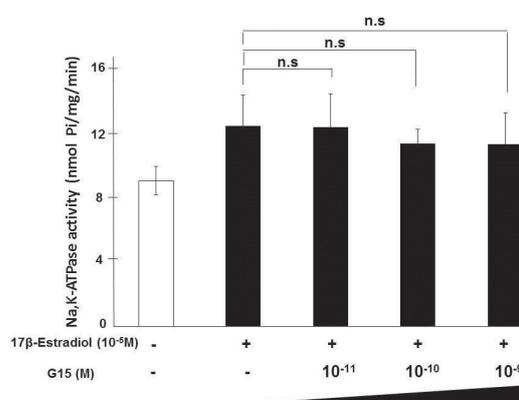


Fig. 8

Fig. 8 Effect of the GPR30 antagonist G15 on long-term 17β-estradiol-stimulated Na, K-ATPase activity. RAW 264.7 cells were cultured with or without various concentrations of G15 (10⁻¹¹, 10⁻¹⁰ or 10⁻⁹ M) for 30 min, and were then treated with 10⁻⁹ M 17β-estradiol for 24 h. The cells were then permeabilized using ultrasonication and the Na, K-ATPase activity was measured. Results are means ± S.E. from 3 independent experiments. n.s.; not significant.

御はプロテインキナーゼが関与するリン酸化の関与が多く、PKAやPKCのようなセリン/スレオニンキナーゼの作用は、広く研究されている^{32, 33)}。一方、Na, K-ATPaseの制御におけるチロシンキナーゼの役割については不明な点が多い。チロシンキナーゼ阻害薬であるgenisteinは、腎臓近位尿細管、水晶体、毛様体上皮などの組織において、様々なアゴニストによって誘導されるNa, K-ATPase活性の変化を消失させることが示されている³⁴⁻³⁶⁾。腎臓近位尿細管細胞におけるインスリンのNa, K-ATPase活性誘導には、Na, K-ATPase α1サブユニットのTyr-10でのリン酸化が必要である¹³⁾。本研究では、genisteinがG1誘導によるNa, K-ATPase活性を低下させることから、GPR30を介したNa, K-ATPase活性増加の過程に、チロシンキナーゼの関与が示唆された。そこで、E2によるNa, K-ATPase活性化にチロシンキナーゼであるSrcが関与する可能性を検討した。しかし、Src選択的阻害薬であるdasatinibはGPR30選択的アゴニストG-1によるNa, K-ATPase活性増加を阻害しなかった(データは示さない)。本研究におけるGPR30を介したNa, K-ATPase活性の上昇には、Src以外のチロシンキナーゼの関与が示唆された。

本研究において、RAW 264.7細胞で観察されたTyr-10リン酸化依存的なNa, K-ATPase活性の増加は、見かけのNa⁺親和性の増加を伴う可能性が示唆された。E2はNa, K-ATPaseのNa⁺感受性を上昇させ、この効果はE2によるATPase活性の増加を十分に説明できるほど大きかった(Fig. 4)。Na, K-ATPaseのαサブユニットには、ヌクレオ

チド結合部位, 特異的阻害薬ouabainの結合部位, 陽イオン (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , NH_4^+) 結合部位, プロテインキナーゼによるリン酸化部位が含まれており, α 1サブユニットのNH2末端ドメインはNa, K-ATPaseの構造変化に関与している³⁷⁾. チロシンリン酸化部位は α 1サブユニットの細胞質NH2末端のTyr-10に位置していることから, Tyr-10のリン酸化によりNa, K-ATPaseのコンフォメーション平衡がE1 (Na結合型) 側へシフトし, Na, K-ATPase活性を増加させることが可能かもしれない.

一方, Na, K-ATPase活性の持続的な変化は, 組織の成長と修復に必要である. Na,K-ATPaseサブユニットの転写産物およびタンパク質レベルの変化は, 一般にホルモンの持続的な存在に反応して起こる. 甲状腺ホルモン³⁸⁾ はNa, K-ATPaseサブユニットの発現に持続的な変化をもたらし, インスリン³⁹⁾ やアルドステロン⁴⁰⁾ は迅速な変化と持続的な変化の両方を引き起こす. 本研究でも, RAW 264.7細胞を24時間E2処理すると, ERシグナルの活性化を介して新しい α , β サブユニットの合成が誘導され, Na, K-ATPaseの酵素活性が上昇した.

結論として, E2はRAW264.7細胞への短時間および長時間投与により, 異なった作用機序でNa, K-ATPase活性を増加させることを本研究は示した.

References

- 1) Skou JC: The Na,K-pump. *Methods Enzymol* 156, 1-25, 1988.
- 2) Blanco G, Mercer RW: Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol Renal Physiol* 275, F633-650, 1998.
- 3) Béguin P, Beggah AT, Chibalin AV, Burgener-Kairuz P, Jaisser F, Mathews PM, Rossier BC, Cotecchia S, Geering K: Phosphorylation of the Na,K-ATPase α -subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 269:24437-24445, 1994.
- 4) Li D, Cheng SXJ, Fisone G, Caplan MJ, Ohtomo Y, Aperia A: Effects of okadaic acid, calyculin A, and PDBu on state of phosphorylation of rat renal Na^+ - K^+ -ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 275: F863-F869, 1998.
- 5) Owada S, Larsson O, Arkhammar P, Katz AI, Chibalin AV, Berggren PO, Bertorello AM: Glucose decreases Na^+ , K^+ -ATPase activity in pancreatic β -cells. An effect mediated via Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 and protein kinase C-dependent phosphorylation of the α -subunit. *J Biol Chem* 274:2000-2008, 1999.
- 6) Cornelius F, Logvinenko N: Functional regulation of reconstituted Na,K-ATPase by protein kinase A phosphorylation. *FEBS Lett* 380:277-280, 1996.
- 7) Pedemonte CH, Pressley TA, Lokhandwala MF, Cinelli AR: Regulation of Na,K-ATPase transport activity by protein kinase C. *J Membr Biol* 155:219-227, 1997.
- 8) Chibalin AV, Pedemonte CH, Katz AI, Féraille E, Berggren PO, Bertorello AM: Phosphorylation of the catalytic α -subunit constitutes a triggering signal for Na^+ , K^+ -ATPase endocytosis. *J Biol Chem* 273:8814-8819, 1998.
- 9) Feschenko MS, Sweadner KJ: Phosphorylation of Na, K-ATPase by protein kinase C at Ser¹⁸ occurs in intact cells but does not result in direct inhibition of ATP hydrolysis. *J Biol Chem* 272:17726-17733, 1997.
- 10) Féraille E, Béguin P, Carranza ML, Gonin S, Rousselot M, Martin PY, Favre H, Geering K: Is phosphorylation of the α 1 subunit at Ser-16 involved in the control of Na,K-ATPase activity by phorbol ester-activated protein kinase C? *Mol Biol Cell*. 11(1):39-50, 2000.
- 11) Matsuda T, Murata Y, Tanaka KI, Hosoi R, Hayashi M, Tamada K, Takuma K, Baba A: Involvement of Na, K-ATPase in the mitogenic effect of insulin-like growth factor-I on cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 66:511-516, 1996.
- 12) Dai H, Song D, Xu J, Li B, Hertz L, Peng L: Ammonia-induced Na,K-ATPase/ouabain-mediated EGF receptor transactivation, MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling and ROS formation cause astrocyte swelling. *Neurochem Int*. 63(6):610-625, 2013.
- 13) Féraille E, Carranza ML, Gonin S, Béguin P, Pedemonte C, Rousselot M, Caverzasio J, Geering K, Martin PY, Favre H: Insulin-induced stimulation of Na^+ , K^+ -ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the α -subunit at Tyr-10. *Mol Biol Cell* 10: 2847-2859, 1999.
- 14) Woolley CS, McEwen BS: Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci* 12(7): 2549-2554, 1992.
- 15) Nagai M, Kawata M, Watanabe H, Ogawa M, Saito K, Takesawa T, Kanda K, Sato T: Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology* 149 (Pt 9): 2455-2462, 2003.
- 16) Beato M, Herrlich P, Schutz G: Steroid hormone

- receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83(6): 851-857, 1995.
- 17) Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr: Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14(10): 1649-1660, 2000.
- 18) Wu TW, Wang JM, Chen S, Brinton RD: 17 β -estradiol induced Ca²⁺ influx via L-type calcium channels activates the Src/ERK/cyclic-AMP response element binding protein signal pathway and BCL-2 expression in rat hippocampal neurons: a potential initiation mechanism for estrogen-induced neuroprotection. *Neuroscience* 135(1): 59-72, 2005.
- 19) Carmeci C, Thompson DA, Ring HZ, Francke U, Weigel RJ: Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 45(3): 607-617, 1997.
- 20) Kanda N, Watanabe S: 17 β -estradiol inhibits oxidative stress-induced apoptosis in keratinocytes by promoting Bcl-2 expression. *J Invest Dermatol* 121(6):1500-1509, 2003.
- 21) Kanda N, Watanabe S: 17 β -estradiol inhibits MCP-1 production in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 120(6) 1058-1066, 2003.
- 22) Brailoiu E, Dun SL, Brailoiu GC, Mizuo K, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER, Dun NJ: Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *J Endocrinol* 193(2): 311-321, 2007.
- 23) Bologa CG, Revankar CM, Young SM, Edwards BS, Arterburn JB, Kiselyov AS, Parker MA, Tkachenko SE, Savchuck NP, Sklar LA, Oprea TI, Prossnitz ER: Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nat Chem Biol* 2(4):207-212, 2006.
- 24) Albanito, L., Madeo, A., Lappano, R., Vivacqua, A., Rago, V., Carpino, A., Oprea, T. I., Prossnitz, ER., Musti, AM., Ando, S., Maggiolini, M. (2007) *Cancer Res* 67, 1859-1866
- 25) Chifflet S, Torriglia A, Chiesa R, Tolosa S: A method for the determination of inorganic phosphate in the presence of labile organic phosphate and high concentrations of protein: application to lens ATPases. *Anal Biochem.* 168(1):1-4, 1988.
- 26) Ewart HS, Klip A: Hormonal regulation of the Na⁺, K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol.* 269(2 Pt 1):C295-C311, 1995.
- 27) Dzurba A, Ziegelhöffer A, Vrbjar N, Styk J, Slezák J: Estradiol modulates the sodium pump in the heart sarcolemma. *Mol Cell Biochem.* 176(1-2):113-118, 1997.
- 28) Lee KH, Finnigan-Bunick C, Bahr J, Bunick D: Estrogen regulation of ion transporter messenger RNA levels in mouse efferent ductules are mediated differentially through estrogen receptor (ER) α and ER β . 65(5):1534-1541, 2001.
- 29) Brubaker KD, Gay CV: Depolarization of osteoclast plasma membrane potential by 17 β -estradiol. *J Bone Miner Res.* 14(11):1861-1866, 1999.
- 30) Kanda N, Watanabe S: 17 β -estradiol enhances the production of nerve growth factor in THP-1-derived macrophages or peripheral blood monocyte-derived macrophages. *J Invest Dermatol.* 121(4):771-780, 2003.
- 31) Rettew JA, McCall SH IV, Marriott I: GPR30/ GPER-1 mediates rapid decreases in TLR4 expression on murine macrophages. *Mol Cell Endocrinol.* 328(1-2) : 87-92, 2010.
- 32) Ewart HS, Klip A.:Hormonal regulation of the Na⁺-K⁺-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 269: C295-C311, 1995.
- 33) Therien AG, Blostein R: Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol* 279: C541-C566, 2000.
- 34) Feraille E, Carranza ML, Rousselot M, Favre H.: Modulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity by a tyrosine phosphorylation process in rat proximal convoluted tubule. *J Physiol* 498: 99-108, 1997.
- 35) Nakai Y, Dean WL, Hou Y, Delamere NA.: Genistein inhibits the regulation of active sodium-potassium transport by dopaminergic agonists in nonpigmented ciliary epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 1460-1466, 1999.
- 36) Okafor MC, Delamere NA.: The inhibitory influence of endothelin on active sodium-potassium transport in porcine lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 1018-1023, 2001.
- 37) Kaplan JH: Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 71:511-535, 2002.
- 38) Hensley CB, Azuma KK, Tang MJ, McDonough AA: Thyroid hormone induction of rat myocardial Na(+)-K(+)-ATPase: α 1-, α 2-, and β 1-mRNA and -protein

- levels at steady state. Am J Physiol. 262(2 Pt 1):C484-C492, 1992.
- 39) McGill DL, Guidotti G: Insulin stimulates both the $\alpha 1$ and the $\alpha 2$ isoforms of the rat adipocyte (Na^+, K^+) ATPase. Two mechanisms of stimulation. J Biol Chem. 266(24):15824-15831, 1991.
- 40) Ikeda U, Hyman R, Smith TW, Medford RM: Aldosterone-mediated regulation of Na^+, K^+ -ATPase gene expression in adult and neonatal rat cardiocytes. J Biol Chem. 266(18):12058-12066, 1991.

ORIGINAL

The activation effects of estrogen on Na, K-ATPase activity in a macrophage-like cell through different receptors.

Kota Hirasawa¹⁾, Yoshiaki Deyama²⁾, Yoshitaka Yoshimura²⁾
Kenji Notani¹⁾ and Kuniaki Suzuki²⁾

ABSTRACT : Many types of cells in the monocyte–macrophage lineage have been shown to be regulated by estrogen. In addition, a body of information suggests that the Na, K-ATPase pump could be a target of 17β -estradiol (E2) in various types of cells. In this study, we explored the effects of E2 on the Na, K-ATPase in macrophage-like RAW 264.7 cells. E2 treatment of RAW 264.7 cells led to biphasic stimulation of Na, K-ATPase activity: an early activation via the cell surface receptor GPR30 and a late upregulation by nuclear estrogen receptor (ER)-activated signals. Antagonization of GPR30 by G15 abolished E2-induced early activation of Na, K-ATPase, while inhibition of ER signals nullified its late upregulation of Na, K-ATPase activity in a dose-dependent manner. Furthermore, short-term treatment with E2 induced phosphorylation of the Na, K-ATPase α 1-subunit at Tyr-10, which related on was related to an increase in the Na⁺ affinity of Na, K-ATPase. These results illustrate the involvement of two different signaling pathways in the regulation of Na, K-ATPase by E2.

Key Words : Na,K-ATPase, RAW 264.7 cells, 17β -estradiol, GPR30, estrogen receptor

¹⁾ Department of Gerodontology

²⁾ Department of Molecular Cell Pharmacology, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University