

平成 31 年 4 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07963

研究課題名(和文) ERK5によるカテコラミン生合成促進機構とその生理的・病理的な役割の解明

研究課題名(英文) Pathophysiological roles of ERK5 in catecholamine biosynthesis

研究代表者

小原 祐太郎 (OBARA, Yutaro)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：40400270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：MAPKファミリーのERK5は、神経突起伸長やドパミン・ノルアドレナリンなどのカテコラミンの生合成に関与する。in vitro、in vivoおよび臨床面からのERK5に関連した本研究の結果より、神経細胞の分化誘導時にERK5がankrd1、MIDN、Kv4.2の遺伝子発現を引き起こし、その結果として神経突起の伸長、神経伝達物質としてのカテコラミンの生合成の促進、神経細胞の膜興奮性を高めることが明らかになった。この一連のERK5シグナルが破綻すると、パーキンソン病や副腎髄質褐色細胞腫の発症や病態進展につながるものと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにERK5の神経機能の調節機構はほとんど不明であったが、本研究によりin vitro、in vivoさらには臨床面でのERK5のカテコラミン生合成に対する役割が明らかになった。これは独創的な研究結果であり、学術的に意義が大きいと思われる。さらにERK5は、カテコラミンと関連する高血圧症や中枢神経疾患の治療を目指した創薬の標的であり、ERK5を利用した新しいタイプの分子標的薬の開発が期待されることが社会的な意義である。

研究成果の概要(英文)：ERK5 is a member of MAPK family and involved in neurite outgrowth and biosynthesis of catecholamines including dopamine and noradrenalin. In the present study, we found that ERK5 promotes gene expression of ankrd1, MIDN and Kv4.2 during differentiation towards mature neurons, causing neurite outgrowth, catecholamine biosynthesis and increase in membrane excitability. These results suggest that disruption of this ERK5 signaling results in development and progress of Parkinson's disease and adrenal pheochromocytoma.

研究分野：薬理学

キーワード：神経栄養因子 NGF ERK5 MAPK カテコラミン チロシンヒドロキシラーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

MAPK (mitogen-activated protein kinase) ファミリーに属する ERK5 (extracellular signal-regulated kinase 5) は、NGF (nerve growth factor) などの増殖・神経栄養因子によりその活性が顕著に上昇する。しかし、同じ MAPK ファミリーに属する ERK1/2 と比較して、ERK5 に関する研究は著しく遅れているのが現状である。特に神経細胞の分化誘導時における ERK5 の役割に関した知見の報告例は、国内外を含めて極めて少なく不明な点が多い。

我々は ERK5 の活性化が PC12 細胞 (副腎髄質由来で神経細胞モデル) や交感神経細胞の分化を誘導することを報告した。特に、ドパミン、ノルアドレナリンおよびアドレナリンといったカテコラミンの生合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼの発現とその活性制御について、ERK5 が ERK1/2 以上に重要な役割を担うことを明らかにした。加えて、マイクロアレイ法により ERK5 依存的に発現が誘導される数多くの遺伝子 (ankyrin repeat domain 1 (ankrd1)、midnolin (MIDN)、Kv4.2 など) を同定した。

カテコラミンは高血圧症などの循環器疾患に加えてパーキンソン病、うつ病、統合失調症、睡眠障害といった中枢神経疾患など、現在社会問題となっている疾患とも関連することが知られている。ERK5 とカテコラミンの生合成制御あるいはその異常に基づく様々な疾患との関連性が示唆されるが、研究開始当初まで報告はほとんどなかった。

それゆえに、中枢神経疾患や循環器疾患の病因、病態進展の側面に ERK5 の機能とカテコラミンの働きがあることを示す必要がある。

## 2. 研究の目的

これまでの研究内容を発展させて、ERK5 によるカテコラミン生合成の制御機構の分子基盤を求めるとともに、ERK5 活性を抑制したマウスやヒト臨床サンプルを用いて、ERK5 の生理的・病理的な役割を明確にしなが、創薬の標的としての ERK5 の有用性を明らかにすることを目的とする。

具体的には、(1) ERK5 依存的に誘導される ankrd1 の詳細なチロシンヒドロキシラーゼ安定化メカニズムに加えて、同じく ERK5 依存的に誘導され、その機能が全く不明な MIDN に注目して、カテコラミン生合成における役割を明らかにする。さらに、神経細胞において K<sup>+</sup>電流を制御する Kv4.2 に対する ERK5 の役割を解明する。

(2) ERK5 コンディショナルノックアウト (cKO) マウス、ERK5 shRNA をコードするアデノ随伴ウイルス、ERK5 シグナル阻害薬 BIX02189 などを利用しながら、副腎髄質あるいは中脳黒質のドパミン神経細胞や青斑核のノルアドレナリン神経細胞といった脳神経細胞の ERK5 活性を消失させ、循環器系や中枢神経系に対する影響を明らかにする。

(3) カテコラミンを過剰に産生するヒト副腎髄質褐色細胞腫の摘出サンプルの ERK5 活性、発現量およびその遺伝子配列を調べながら、副腎髄質褐色細胞腫と ERK5 の関連性を検討する。

以上のように、*in vitro*、*in vivo* さらには臨床面から、循環器系や中枢神経系における ERK5 の生理的・病理的な役割を解明していく。

## 3. 研究の方法

PC12 細胞の培養は、ウシ胎仔血清とウマ血清および抗生物質を加えた DMEM 中で培養した。さらに、ERK5、ankrd1、MIDN などの遺伝子発現をゲノム編集 (CRISPR/Cas9) または RNA 干渉 (siRNA/shRNA) で抑制し (あるいは過剰発現させながら)、神経突起伸展を指標とした形態的な分化やカテコラミン類の生合成能を指標とした機能的な分化の解析を行った。Ankrd1、MIDN、Kv4.2 およびチロシンヒドロキシラーゼなどの遺伝子発現量は、RT-qPCR 法によって行った。また各タンパク質の発現量やリン酸化などは、特異的抗体を用いたウエスタンブロット法によって行った。カテコラミン類の生合成量は、LC-MS を用いて定量した。K<sup>+</sup>電流はパッチクランプ法により測定した。

## 4. 研究成果

(1) ERK5 により遺伝子発現が誘導される ankrd1、MIDN、Kv4.2 の生理的な役割について検討した。

① Ankrd1 について: PC12 細胞を NGF で刺激すると、2 時間をピークとした一過性の ankrd1 の

遺伝子発現が誘導された。Ankrd1 の発現を siRNA でノックダウンすると、カテコラミンの生合成に必須であるチロシンヒドロキシラーゼのタンパク質レベルが減少したが、その mRNA の発現量は抑制されなかった。また、ankrd1 のノックダウンにより、チロシンヒドロキシラーゼタンパク質のコピキチン化が促進された。つまり、ankrd1 はチロシンヒドロキシラーゼのコピキチン化を抑制して、その安定性を増加していると推定された。Ankrd1 をノックダウンしても、神経突起伸長には影響がなかった。さらに、ankrd1 のノックダウンによりドパミンおよびノルアドレナリンの生合成量が抑制されたことから、ankrd1 はカテコラミン類の生合成に重要な役割を担っているものと示唆された (Obara et al., 2016)。

② MIDN について : PC12 細胞を NGF で刺激すると、2 時間をピークとした一過性の MIDN の遺伝子発現が誘導された。この MIDN の遺伝子発現は ERK5 および ERK1/2 シグナルの阻害薬 (BIX02189 および U0126) で有意に抑制された。MIDN の細胞内の局在は、主に核と小胞膜であった。共同研究者によるパーキンソン病患者のゲノム解析の結果、山形の健康な人 100 人では MIDN 遺伝子のコピー数に異常が全く認められなかったが、孤発性パーキンソン病患者 86 人のうち 9 人 (10.5%) のコピー数が 1 に減少していた。すなわち、MIDN の異常がパーキンソン病の発症に関与していることが明らかになった。MIDN の発現をゲノム編集でノックアウトすると、チロシンヒドロキシラーゼのタンパク質レベルは減少しなかったが、PC12 細胞の神経突起伸長は完全に抑制された。また、パーキンソン病の原因遺伝子の一つで、ユビキチン E3 リガーゼとして機能する Parkin の遺伝子およびタンパク質の発現レベルが、MIDN のノックアウト・ノックダウンにより有意に減少した。以上のことから、MIDN は神経突起の伸長と種々のタンパク質の品質管理に重要な役割を担い、その MIDN 遺伝子異常によりパーキンソン病が引き起こされるものと推定された (Obara et al., 2017;2018)。

③ Kv4.2 について : PC12 細胞に ERK5 を恒常的に活性化させる MEK5 の活性化変異体を過剰発現させると、電位依存性 K<sup>+</sup>チャネル (Kv4.2 および 4.3) の mRNA 発現量が増大したが、電位依存性 Ca<sup>2+</sup>チャネル (L、N、P/Q 型) および Kv4.2 の  $\beta$  サブユニットである K channel-interacting protein3 の発現量は変化しなかった。また、Kv4.2 タンパク質の発現量を調べてみたところ、ERK5 シグナルによって Kv4.2 mRNA の発現上昇が認められるにもかかわらず、Kv4.2 タンパク質の有意な発現上昇は認められなかった。しかし、Kv4.2 のリン酸化について調べたところ、ERK5 の活性化によって Kv4.2 のリン酸化が亢進し、ERK5 のドミナントネガティブ変異体では Kv4.2 のリン酸化が抑制された。Kv4.2 が担う一過性外向き電流 (A 電流) に対する ERK5 シグナルの影響を電気生理学的に調べたところ、A 電流の不活性化が抑制することが明らかになった。すなわち、ERK5 による Kv4.2 のリン酸化によって A 電流の不活性化が抑制され、古典的 Hodgkin-Huxley のモデルにより神経の発火頻度が増大することことが明らかになった (Kashino et al., 2018)。

(2) *in vivo* における ERK5 の役割を解明するために、ERK5 シグナルの自発運動量への影響について検討した。ERK5 阻害薬 BIX02189 をマウス脳室内に投与すると、メタンフェタミン腹腔内投与による自発運動量の増加が有意に抑制された。さらにメタンフェタミン投与後に線条体における ERK5 の活性化が認められ、その活性化も BIX02189 で抑制された。つまり、ERK5 阻害薬が何らかのメカニズムでカテコラミンの作用を抑制して、自発運動量を減少させたものと推定された。

(3) ERK5 の病態時の役割を解明するために、カテコラミンを過剰に産生するヒト副腎髄質褐色細胞腫と ERK5 の関連性について検討した。ヒト正常副腎髄質検体 7 例と副腎褐色細胞腫 11 例における ERK5 とチロシンヒドロキシラーゼの発現量を比較検討すると、正常副腎髄質では両者の発現量に比較的高い相関性が認められた (R=0.79)。一方、褐色細胞腫ではチロシンヒドロキシラーゼの高発現が認められたが、ERK5 の発現量は逆に低下しているという予想外の結果が得られた。腫瘍化した副腎髄質では、ERK5 によるカテコラミンの生合成制御機構が破綻し、何らかの別の機構が働いていると示唆された (Obara et al., 2016; Sunenaga et al., 2016)。

以上の *in vitro*、*in vivo* および臨床面からの ERK5 に関連した研究結果より、神経細胞の分化誘導時に ERK5 が ankrd1、MIDN、Kv4.2 の遺伝子発現を引き起こし、その結果として神経突起の伸長、神経伝達物質としてのカテコラミンの生合成の促進、神経細胞の膜興奮性を高めることが明らかになった。この一連の ERK5 シグナルが破綻すると、パーキンソン病や副腎髄質褐色細胞腫の発症や病態進展につながるものと示唆された。本研究による研究成果は大きなインパクトを有するものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Yurina Kashino, Yutaro Obara\*, Yosuke Okamoto, Takeo Saneyoshi, Yasunori Hayashi and Kuniaki

- Ishii. ERK5 phosphorylates K<sub>v</sub>4.2 and inhibits inactivation of the A-type current in PC12 cells. *Int. J. Mol. Sci.* (2018) 19, pii: E2008. 査読有り
2. Yutaro Obara<sup>\*</sup>, Kuniaki Ishii. Transcriptome analysis reveals that midnolin regulates mRNA expression levels of multiple Parkinson's disease causative genes. *Biol. Pharm. Bull.* (2018) 41, 20-23. 査読有り
  3. Yutaro Obara<sup>\*</sup>, Toru Imai, Hidenori Sato, Yuji Takeda, Takeo Kato, Kuniaki Ishii. Midnolin is a novel regulator of parkin expression and is associated with Parkinson's Disease. *Sci. Rep.* (2017) 7, 5885. 査読有り
  4. Shinta Suenaga, Osamu Ichiiyanagi, Hiromi Ito, Sei Naito, Tomoyuki Kato, Akira Nagaoka, Tomoya Kato, Mitsunori Yamakawa, Yutaro Obara, Norihiko Tsuchiya. Expression of extracellular signal-regulated kinase 5 and ankyrin repeat domain 1 in composite pheochromocytoma and ganglioneuroblastoma detected incidentally in the adult adrenal gland: a case report. *Intern. Med.* (2016) 55, 3611-3621. 査読有り
  5. Yutaro Obara<sup>\*</sup>, Ryusuke Nagasawa, Wataru Nemoto, Michael J Pellegrino, Maho Takahashi, Beth A Habecker, Philip J.S Stork, Osamu Ichiiyanagi, Hiromi Ito, Yoshihiko Tomita, Kuniaki Ishii, Norimichi Nakahata. ERK5 induces ankrd1 for catecholamine biosynthesis and homeostasis in adrenal medullary cells. *Cell. Signal.* (2016) 28, 177-189. 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

1. 菅野秀典、内藤整、伊藤裕美、一柳統、小原祐太郎、成澤貴史、加藤智幸、長岡明、石井邦明、土谷順彦 ERK5 は腎細胞癌に対する薬物治療の新規ターゲットになりうる 日本薬理学会北部会 2017 年 9 月 (山形)
2. 小原祐太郎、今井亨、佐藤秀則、武田裕司、加藤丈夫、石井邦明 Midnolin とパーキンソン病の関連性の解明 日本薬理学会北部会 2017 年 9 月 (山形)
3. 榎野友利奈、小原祐太郎、石井邦明 各種イオンチャネルの発現における ERK5 の役割の解明 第 89 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 (長崎)
4. 今井亨、小原祐太郎、佐藤秀則、加藤丈夫、石井邦明 神経細胞における Midnolin の生理的・病的な役割について 日本薬理学会北部会 2015 年 9 月 (富山)

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者ローマ字氏名 : STORK, Philip

研究協力者ローマ字氏名 : HABECKER, Beth

研究協力者氏名 : 中川西 修

ローマ字氏名 : NAKAGAWASAI, Osamu

研究協力者氏名 : 一柳 統

ローマ字氏名 : ICHIYANAGI, Osamu

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。