

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890031

研究課題名（和文） ストレスシグナルによって制御される核内受容体 Nurr1 の生理機能解析

研究課題名（英文） Regulation of nuclear receptor Nurr1 by stress-responsive signaling

研究代表者

関根 悠介 (SEKINE YUSUKE)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任研究員

研究者番号：00583981

研究成果の概要（和文）：核内受容体 Nurr1 は転写因子として遺伝子発現を誘導することで、ドパミン神経の分化段階において必須の役割を果たす。本研究において、細胞に酸化ストレスが負荷されたときに、Nurr1 がストレス応答性 p38 MAP キナーゼシグナル伝達系を介したリン酸化による制御を受け、その細胞内局在を核内から細胞質へと変化させることが明らかとなり、酸化ストレス応答における Nurr1 の転写因子とは別の新たな機能の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：A nuclear receptor, Nurr1, plays critical roles for development of dopaminergic neurons as a transcription factor. In this study, I found that, in response to oxidative stress, Nurr1 was phosphorylated through the p38 MAP kinase pathway and was exported from nucleus to cytosol. These results suggest that Nurr1 has potential roles other than transcription factor in oxidative stress response.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、生物系薬学

キーワード：ストレス、シグナル伝達、核内受容体

1. 研究開始当初の背景

核内受容体 NR4A ファミリーに属する Nurr1 (NR4A2) は、ドパミン合成関連酵素である Tyrosine hydroxylase (TH) などを転写誘導することで、ドパミン神経細胞の分化過程において必須の役割を果たすことが明らか

となっている。一方で近年、Nurr1 の発現低下を引き起こすような遺伝子変異と晩発性の家族性パーキンソン病との関連が少例ながら報告され、分化後の成熟ドパミン神経細胞の生存・恒常性維持における Nurr1 の関与が示唆されている。パーキンソン病でのドパ

ミン神経細胞死においては、酸化ストレスや炎症反応が関与していることが明らかとなりつつあり、ドパミン神経細胞の恒常性維持機構としてのストレス応答分子メカニズム研究の重要性が増している。しかしながら、そのようなストレス応答における Nurr1 の機能ならびに Nurr1 の活性を制御する細胞内シグナル伝達機構については依然不明な点が多い。

ストレス応答性 MAP キナーゼ経路と呼ばれる細胞内シグナル伝達機構のひとつである p38 MAP キナーゼ経路は、細胞内外で生じる物理化学的ストレスや病原体などによって活性化され、細胞レベルでの適切なストレス応答を誘導することで生体の恒常性を維持している。p38 は、炎症性細胞や神経細胞をはじめ、広範な組織・細胞種において、細胞の生死の運命決定に重要な役割を果たすことが知られているが、そのシグナル下流でストレス応答を実行するエフェクター分子に関しては未同定の部分が残されている。

我々は、ショウジョウバエを用いた遺伝学的アプローチから、この p38 MAP キナーゼ経路の新たなシグナルコンポーネントの探索を行ってきた。その過程において、核内受容体 NR4A ファミリーが、種を超えて保存された p38 の新たなエフェクター分子であることを見いだした。哺乳類培養細胞で NR4A ファミリーの DNA 結合配列を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、p38 の活性化依存的に Nurr1 の転写活性が亢進すること、また *in vitro* キナーゼアッセイにより Nurr1 の p38 依存的なリン酸化が検出されることを明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究は、p38 MAP キナーゼ経路によるリン酸化を介した Nurr1 活性制御の分子機構およびストレスに対する細胞の恒常性維持機構における p38-Nurr1 経路の役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

主に哺乳類培養細胞を用いて、(1)Nurr1 のリン酸化を誘導するストレス刺激、上流シグナル伝達経路、細胞種の探索、(2)p38 による Nurr1 リン酸化部位の同定とリン酸化による転写調節機構の解析、(3) p38-Nurr1 経路によって発現調節される遺伝子の同定などを行い、p38 による Nurr1 転写活性制御の分子機構を明らかにする。

(1) 哺乳類培養細胞に Nurr1 とともに、p38 の上流キナーゼである ASK1 もしくは MKK6 の活性化型変異体を共発現させ、p38 を活性化させると、ウェスタンブロット解析によってリン酸化による Nurr1 のシフトアップ (SDS-PAGE の泳動度の遅延) が検出される。p38 は様々な物理化学的ストレスや病原体感染によって活性化することから、そのようなストレス刺激を細胞に加えた際に、Nurr1 のリン酸化が起こるか否かをシフトアップを指標に検討する。パーキンソン病との関与が示唆されている酸化ストレスやミトコンドリア傷害性のストレス、炎症性サイトカインなどがまず検討すべき候補である。ストレス刺激依存的なリン酸化が p38 依存的か否かは、p38 阻害剤や ASK1 などの p38 上流キナーゼのノックダウン細胞およびノックアウト細胞を用いて検討する。

(2)シフトアップした Nurr1 ならびに定常状態の Nurr1 のリン酸化状態を質量分析計を用いて解析することで、p38 活性化依存的な Nurr1 のリン酸化部位の同定を行う。同定された Nurr1 リン酸化部位のアラニン置換体について、NR4A ファミリーの結合配列を用いたルシフェラーゼアッセイにより、p38 依存的な Nurr1 の転写活性化に対する効果を調べる。

(3)Nurr1 は、ドパミン神経の分化段階においては、ドパミン合成経路に関与する TH や Aromatic L-amino acid decarboxylase の発現を誘導することがよく知られているが、ストレス応答において転写調節する遺伝子に

については不明な点が多い。NR4A ファミリー分子は、細胞種や組織依存的に、転写活性化因子としてだけでなく、転写抑制因子として機能することも知られている。これらの細胞種において、Nurr1 の p38 リン酸化部位のアラニン置換体を安定的に発現させ、ストレス刺激依存的な遺伝子発現の変化を、DNA マイクロアレイを用いて網羅的に検討する。

4. 研究成果

(1)Nurr1 のシフトアップを指標として、p38 依存的な Nurr1 のリン酸化を誘導するストレス刺激の探索を行った。その結果、HEK293 細胞や、HeLa 細胞において過酸化水素刺激依存的に Nurr1 のシフトアップがおこることを見いだした。このシフトアップは、p38 の阻害剤の前処置によって抑制されることから、p38 経路依存的であることが明らかとなった。また、p38 の上流に位置する MAP3 キナーゼである ASK ファミリー分子は、酸化ストレスによる p38 の活性化において主要な役割を果たしていることが明らかとなっている。ASK ファミリー分子をノックダウンした細胞でも、Nurr1 の過酸化水素刺激依存的なシフトアップが抑制されたことから、過酸化水素刺激依存的な Nurr1 のリン酸化は、ASK-p38 経路依存的であることが示唆された。

(2)本研究期間中には、質量分析計による Nurr1 の p38 依存的なリン酸化部位の同定には至らなかったが、そのかわり Nurr1 の一次配列上の p38 によりリン酸化され得るセリン/スレオニン残基をアラニンに置換した変異体を作製し、Nurr1 のシフトアップを指標に過酸化水素刺激依存的な Nurr1 のリン酸化部位の同定を試みた。その結果、Nurr1 の N 末端領域に存在する Cluster II と名付けた 7 つのリン酸化部位が、過酸化水素依存的な p38 経路活性化による Nurr1 のリン酸化部位の候補であることが明らかとなった。この Cluster II 領域は、活性型 ASK1 依存的な p38 の活性化を介した Nurr1 のリン酸化において

もリン酸化を受けていることが明らかとなっている。現在、Cluster II 内のどのリン酸基が重要かそれぞれのリン酸化部位のアラニン置換体を用いてさらに検討を行うとともに、引き続き、質量分析計を用いたリン酸化部位の同定も試みている。

(3)Nurr1 の転写因子としての機能に着目し、過酸化水素刺激時に Nurr1 の転写活性化能が変化するか否かの検討を行ったが、顕著な変化はみられず、その先に予定していた遺伝子発現解析には至らなかった。しかしながら、おどろいたことに、通常核に局在する Nurr1 が、過酸化水素刺激依存的に核外に移行することを見いだした。この Nurr1 の核外移行は、転写因子としての核内での働きとは別の役割を有することを示唆している。Nurr1 と同じく核内受容体 NR4A ファミリーに属する NUR77 は TPA などの刺激依存的に核外に移行し、ミトコンドリアに局在して、アポトーシスを誘導することが知られている。ASK1-p38 シグナル伝達系も、酸化ストレス依存的な細胞死に必要であることから、過酸化水素刺激による Nurr1 の核外移行と細胞死の関連について検討を行った。HeLa 細胞において、過酸化水素刺激によって誘導される細胞死は、ASK1 ノックダウン、p38 の阻害剤、Nurr1 のノックダウンによって抑制されたことから、酸化ストレス依存的な細胞死に ASK-p38-Nurr1 経路が寄与していることが示唆された。Nurr1 の核外移行の細胞死における役割について今後さらに詳細に検討することで、酸化ストレス依存的な細胞死誘導機構の解明につながるものと期待される。また、この機構が働く生理的局をマウスなどを用いた個体レベルでの解析から明らかにしていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Ishida, Y., Sekine, Y., Oguchi, H., Chihara, T., Miura, M., Ichijo, H., and Takeda, K.

“Prevention of apoptosis by mitochondrial phosphatase PGAM5 in the mushroom body is crucial for heat shock resistance in *Drosophila melanogaster*.”

PLoS ONE, 7, e30265, 2012, 査読有,
DOI:10.1242/jcs.085902

2. Sekine, Y., Takagahara, S., Hatanaka, R., Watanabe, T., Oguchi, H., Noguchi, T., Naguro, I., Kobayashi, K., Tsunoda, M., Funatsu, T., Nomura, H., Toyoda, T., Matsuki, N., Kuranaga, E., Miura, M., Takeda, K. and Ichijo, H.

“p38 MAP kinase regulates the expression of genes in the dopamine synthesis pathway through phosphorylation of NR4A nuclear receptors.” *J. Cell Sci.*, 124, 3006-3016, 2011, 査読有,

DOI: 10.1371/journal.pone.0030265

3. 関根 悠介, 武田 弘資, 一條 秀憲

“ストレスシグナルによるアポトーシス制御と癌形成における役割”

実験医学増刊, 羊土社, 29, pp222-228, 2011, 査読無

4. 畑中 良, 関根 悠介, 一條 秀憲

“哺乳類細胞のストレス受容・伝達機構とそれに起因する疾患”

化学と生物, 学会出版センター, 48, pp471-477, 2010, 査読無

[学会発表] (計 4 件)

1. 関根 悠介, 一條 秀憲

“ストレス応答キナーゼによる酸化ストレス応答と細胞死”

第 84 回 日本生化学会大会, 京都国際会館, 2011 年 9 月 21-24 日

2. Sekine Y., Hatanaka, R., Watanabe, T., Mosallanejad, K., Takeda, K. and Ichijo, H.

“Roles of the kelch repeat protein KLHDC10 in oxidative stress-induced ASK1 activation”

13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, May 15-18, 2011

3. Sekine Y., Hatanaka, R., Watanabe, T., Takeda, K. and Ichijo, H.

“Roles of the kelch repeat protein KLHDC10 in oxidative stress-induced ASK1 activation”

1st Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference, Taipei, Taiwan, March 22-25, 2011

4. 関根 悠介, 武田弘資, 一條 秀憲

“酸化ストレス依存的な ASK1 活性制御機構における KLHDC10 の役割”

BMB2010(第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会 合同大会) 神戸ポートアイランド, 2010 年 12 月 7-10 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 悠介 (SEKINE YUSUKE)

東京大学・大学院薬学系研究科・特任研究員

研究者番号: 00583981