

平成 22 年 4 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790053

研究課題名 (和文) 神経細胞における ERK5 の新しい生理的意義の解明

研究課題名 (英文) Clarification of novel physiological roles of ERK5 in neurons

研究代表者

小原 祐太郎 (OBARA YUTARO)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：40400270

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、未分化神経細胞のモデル細胞である PC12 細胞の分化時の ERK5 の関与を解明することを目的とした。ERK5 シグナルを抑制すると、NGF による PC12 細胞の分化が有意に抑制され、神経伝達物質合成酵素のチロシンヒドロキシラーゼの発現レベルが大幅に低下することが明らかになった。さらに、分化誘導時に発現される遺伝子群を調べたところ、ERK5 選択的な遺伝子が 57 個同定された。ERK5 は様々な遺伝子発現を引き起こし、神経細胞の分化を誘導していると示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The purpose of this study is to clarify the involvements of ERK5 in differentiation of PC12 cells, a model cell line of immature neurons. By inhibiting ERK5-dependent signaling, neurite outgrowth by NGF was significantly blocked and expression level of tyrosine hydroxylase, a neurotransmitter synthesizing enzyme, was largely reduced. Furthermore, 57 ERK5-selective genes that were up-regulated during the differentiation were identified. These results suggest ERK5 causes neuronal differentiation accompanied by various gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：シグナル伝達、神経科学、痴呆、脳・神経、薬理学

1. 研究開始当初の背景

ERK1/2 と同じ MAPK ファミリーに属する ERK5 は、NGF などの神経栄養因子による神経細胞の生存、分化、再生促進作用において、重要な役割を担うことが示唆されているにもかかわらず、ERK1/2 と比較して、その詳細な研究はるかに遅れているのが現実である。特に神経細胞の分化に対する ERK5 の生理的な意義に関しては、その知見が乏しい未開拓の分野であり本研究の進展が期待される。

2. 研究の目的

ERK5 は NGF などの代表的な神経栄養因子によりその活性が顕著に上昇することから、ERK5 の活性化と神経細胞の機能改善の関連性が推測される。本研究では、**未分化神経細胞のモデル細胞である PC12 細胞を NGF や cAMP で刺激し、その結果として引き起こされる形態的・機能的な神経様の分化における ERK5 の関与とそのシグナル伝達経路を詳細に解明することを目的とする。**

3. 研究の方法

siRNA 法により ERK5 の発現を消失させた PC12 細胞株およびキナーゼ活性を消失している ERK5 ドミナントネガティブ体を安定的に発現する細胞株を樹立する。その ERK5 の発現を消失させた細胞またはその機能を阻害させた PC12 細胞を、NGF や cAMP アナログ刺激により分化誘導し、その細胞の形態変化（神経突起伸展）の度合いを観察する。さらに、ERK2 ドミナントネガティブ体の過剰発現

や U0126 などの阻害薬を用いて ERK1/2 の機能を阻害し、その生理的な役割について ERK5 のそれと比較する。また、細胞の形態変化だけでなく神経機能の維持に必須であるタンパク質（神経細胞の分化マーカータンパク質）の発現レベルを RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、ELISA 法により測定し、ERK5 の関与について検討を加える。さらに、上記の神経細胞関連遺伝子の発現を制御する転写因子（CREB、AP-1、NF- κ B など）の活性をルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイ法により定量し、実際に上記の遺伝子発現を制御する転写因子を同定する。また、それら転写因子の活性に対する ERK5 の影響を検討する。ERK5 活性化シグナル機構の解析については、Ras、Rap1 などの低分子量 G タンパク質の関与に焦点を当てながら、詳細を明らかにしていく。また、ERK5 を不活化させた細胞を NGF や cAMP で刺激後、マイクロアレイ法を用いて ERK5 により発現が誘導される遺伝子を網羅的に解析する。

4. 研究成果

われわれは神経細胞における ERK5 の生理的な意義について検討を加えた。まず、神経細胞のモデル細胞の PC12 細胞を NGF およびジブチリル cAMP で刺激すると、両薬物により ERK1/2 は持続的に活性化されたが、ERK5 は NGF のみによって活性化された。PC12 細胞の神経細胞への分化に関する ERK5 の関与を検討したところ、NGF による PC12 細胞の分化は ERK5 選択的阻害薬の BIX02188 により顕著に抑制された。さらに、ERK5 のキナーゼ活性を消失させた変異体や ERK5 活性化因子の MEK5 のドミナントネガティブ体によっても、NGF による PC12 細胞の分化は有意に抑制され

たが、ジブチリル cAMP による分化に対しては全く影響を与えなかった。つまり、NGF は ERK5 を活性化させることにより、PC12 細胞の形態的な分化を誘導していることが示唆された。さらに、神経伝達物質の合成酵素の一つであるチロシンヒドロキシラーゼの発現レベルを定量したところ、ERK5 あるいは MEK5 のドミナントネガティブ体で ERK5 シグナルを抑制し、かつ U0126 で ERK1/2 シグナルを抑制したところ、チロシンヒドロキシラーゼタンパク質の発現レベルが大幅に低下することが明らかになった。すなわち、ERK5 は ERK1/2 と協調しながら、神経特異的遺伝子の発現を調節し、神経細胞の機能的な分化に関与していることが示唆された。

一方、NGF による ERK5 活性化機構を低分子重量 G 蛋白質の Ras や Rap1 の関与に焦点をあてて検討した。まず、Ras のドミナントネガティブ体をアデノウイルスを用いて PC12 細胞に過剰発現させたところ、NGF や EGF による ERK1/2 の活性化が顕著に抑制された一方、両薬物による ERK5 の活性化は全く影響されなかった。また、恒常的に活性化している Ras 変異体を過剰発現させたところ、ERK1/2 の活性化が引き起こされたが ERK5 は全く活性化されなかった。また、Rap1 を不活性化する RapGAP を細胞に過剰発現させても、NGF や EGF による ERK5 の活性化は阻害されなかった。以上より、NGF による ERK5 の活性化には低分子重量 G 蛋白質の Ras と Rap1 は関与しないことが明らかとなった。

さらに、PC12 細胞を NGF で刺激し神経分化時に ERK5 あるいは ERK1/2 依存的に発現が誘導される遺伝子群をマイクロアレイ法で網羅的に調べた。その結果、NGF4 時間刺激により 482 個の遺伝子の発現レベルが 3 倍以上促進された。さらに U0126 で ERK1/2 シグナルを抑制すると、482 個中 360 個の遺伝子 (75%)

の発現レベルが 50%以上抑制された。また、BIX2189 で ERK5 シグナルを抑制すると、482 個中 336 個の遺伝子 (70%) の発現が 50%以上抑制された。ERK1/2 非依存的かつ ERK5 依存的に発現が誘導される遺伝子は 57 個 (12%) だった。そこでわれわれは ERK5 選択的に誘導される遺伝子の一つ (gene X) に注目し研究を進めた。NGF は刺激後 1 時間をピークに gene X の遺伝子発現を時間依存的かつ濃度依存的に誘導した。また siRNA 法により ERK5 発現をノックダウンさせたところ、NGF による gene X の発現が抑制されることを確認した。さらに gene X の遺伝子発現を siRNA 法でノックダウンしたところ、NGF による神経突起伸展作用が部分的に抑制され、チロシンヒドロキシラーゼタンパク質やニューロフィラメントタンパク質の発現レベルも低下することが明らかになった。つまり、NGF は ERK5 を介して gene X の発現を誘導し、神経細胞の分化を誘導しているものと思われる。

以上の研究結果から、神経細胞の分化時において、ERK5 は gene X などの遺伝子発現を誘導することによって、神経細胞の形態的・機能的な分化に積極的に関与することが示唆された。

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 6 件) すべて査読有
*はコレスポンディングオーサー

1. Yutaro Obara*, Norimichi Nakahata. The signaling pathway leading to ERK5 activation via G-proteins and ERK5-dependent neurotrophic effects. *Mol Pharmacol* (2010) **77**, 10-16.
2. Kotomi Uchiyama, Masaki Saito, Masako Sasaki, Yutaro Obara, Shigeki Higashiyama,

- Norimichi Nakahata. Thromboxane A₂ receptor-mediated epidermal growth factor receptor transactivation: Involvement of PKC-delta and PKC-epsilon in the shedding of epidermal growth factor receptor ligands. *Eur J Pharm Sci* (2009) **38**, 504-511.
3. Yutaro Obara*, Arata Yamauchi, Shin Takehara, Wataru Nemoto, Maho Takahashi, Philip J.S. Stork, Norimichi Nakahata. ERK5 activity is required for NGF-induced neurite outgrowth and stabilization of tyrosine hydroxylase in PC12 cells. *J Biol Chem* (2009) **284**, 23564-23573.
 4. Yutaro Obara*, Norimichi Nakahata, Philip J.S. Stork. ERK activation by cAMP signaling in neuronal cells (Review). *Nippon Yakurigaku Zasshi* (2009) **133**, 63-68.
 5. Koichiro Mori, Yutaro Obara, Mitsuru Hirota, Yoshihito, Adumi, Satomi Kinugasa, Satoshi Inatomi, and Norimichi Nakahata. NGF-inducing activity of Hericium erinaceum in 1321N1 human astrocytoma cells. *Biol Pharm Bull* (2008) **31**, 1727-1732.
 6. Yutaro Obara*, Yumiko Okano, Sachiko Ono, Arata Yamauchi, Tomohiro Hoshino, Hitoshi Kurose, Norimichi Nakahata. $\beta\gamma$ subunits of G_{i/o} suppress EGF-induced ERK5 phosphorylation, whereas ERK1/2 phosphorylation is enhanced. *Cell Signal* (2008) **20**, 1275-1283.

[学会発表] (計 11 件)

1. ○小原祐太郎、山内新、竹原伸、根本互、高橋麻穂、Philip Stork、中畑則道 PC12 細胞の分化におけるERK5 の役割について。日本薬理学会年会 2010 年 3 月 18 日 (大

阪)

2. ○小原祐太郎、山内新、根本互、竹原伸、高橋麻穂、Philip Stork、中畑則道 PC12 細胞の分化におけるERK5 の生理的意義について。第 1 回 Gタンパク質班会議若手研究会 2010 年 2 月 7 日 (東京)
3. ○小原祐太郎、山内新、竹原伸、根本互、高橋麻穂、Philip Stork、中畑則道 ERK5 mediates neurite outgrowth and stabilization of tyrosine hydroxylase protein by NGF in PC12 cells. 第 2 回 International Symposium on Cellular Signaling 2009 年 11 月 19 日 (つくば)
4. ○小原祐太郎、山内新、竹原伸、根本互、高橋麻穂、Philip Stork、中畑則道 ERK5 is required for NGF-induced neurite outgrowth and stabilization of tyrosine hydroxylase protein in PC12 cells. 第 39 回神経科学学会 2009 年 10 月 21 日 (シカゴ、アメリカ)
5. ○小原祐太郎、柳畑佳未、阿部友大、中畑則道 PKA/ホタルルシフェラーゼ融合タンパク質 (GloSensor cAMP) を用いた新しいcAMPの定量法について。科学研究費特定領域班会議 2009 年 9 月 10 日 (千葉)
6. ○小原祐太郎、山内新、竹原伸、根本互、高橋麻穂、Philip Stork、中畑則道 ERK5 はPC12 細胞の神経突起伸展とチロシンヒドロキシラーゼタンパク質の安定化を媒介する。第 8 回 生命科学研究会 2009 年 6 月 27 日 (有馬)
7. 山内新、○小原祐太郎、竹原伸、根本互、高橋麻穂、Philip Stork、中畑則道 NGF によるPC12 細胞の神経突起伸展とチロシンヒドロキシラーゼタンパク質の安定化にERK5 が関与する。第 6 回東北大学バイオサイエンスシンポジウム 2009 年 6 月 16 日 (仙台)

8. 山内新、○小原祐太郎、竹原伸、Philip J.S. Stork、中畑則道 ERK5 はPC12 細胞の神経突起伸展とチロシンヒドロキシラーゼの発現を制御する。日本薬理学会年会 2009 年 3 月 18 日 (横浜)
9. 阿部友大、柳畑佳美、○小原祐太郎、中畑則道 トロンボキサンA2 受容体シグナル伝達における非典型的Ghタンパク質の役割について。科学研究費特定領域”Gタンパク質シグナル” &”膜輸送複合体”合同若手ワークショップ 2009 2009 年 1 月 29 日 (神戸)
10. 山内新、○小原祐太郎、竹原伸、Philip Stork、中畑則道 PC12 細胞におけるERK5 の生理的な意義について 科学研究費特定領域班会議 2008 年 9 月 19 日 (新潟)
11. 山内新、○小原祐太郎、竹原伸、中畑則道 NGFの神経細胞の形態的・機能的な分化誘導作用とERK5 の役割について 東北大学若手萌芽研究発表会 2008 年 7 月 16 日 (仙台)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小原 祐太郎 (OBARA YUTARO)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：40400270

(2) 研究分担者

()
研究者番号：

(3) 連携研究者

()
研究者番号：