

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790063

研究課題名(和文) ERK5による新しい神経機能調節の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Novel molecular mechanism of neuronal functions by ERK5

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： われわれは、ERK5選択的に発現が誘導される多数の遺伝子を同定し、その中でもp36遺伝子に焦点を当てて研究活動を行った。その結果、p36はカテコラミン生合成酵素の一つであるチロシンヒドロキシラーゼを安定化して、その生合成を促進することが明らかとなった。つまり、神経細胞の分化の過程においてERK5/p36のシグナル伝達経路は、神経機能を強化する役割を担っていることが示唆された。

また、ERK1/2がERK5のThr732をリン酸化することにより、ERK5の核移行が促進され、長く不明であったERK5とERK1/2のクロストークメカニズムを明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)： We have indentified many genes regulated by ERK5 selectively. Among them, we focused on p36 and examined its roles. We found that p36 stabilized catecholamine-synthesizing enzyme, tyrosine hydroxylase, and promoted its biosynthesis. Hence, it is assumed that ERK5 and p36 play roles in strength of the neuronal functions during the neuronal differentiation.

In addition, we found that ERK1/2 phosphorylated ERK5 Thr732 and promoted nuclear translocation of ERK5. We could clarify the novel cross-talk mechanism between ERK5 and ERK1/2.

研究分野：薬理学

キーワード：神経栄養因子 NGF ERK5 MAPK

1. 研究開始当初の背景

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ファミリーに属する extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) は、nerve growth factor (NGF) や basic fibroblast growth factor (bFGF) などの代表的な神経栄養因子や増殖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。特に神経系細胞における ERK5 の知見は乏しく、神経細胞の形態的・機能的な分化メカニズム、さらにはグリア細胞における神経栄養因子の生合成メカニズムに関連した知見はほとんど報告されていない。申請者らはこれまでの研究により、未分化神経細胞のモデル細胞である PC12 細胞を NGF で刺激すると、ERK5 が活性化されて、その結果 PC12 細胞の形態的・機能的な分化を引き起こされることを報告した (Obara et al., *J. Biol. Chem.* 2009)。特に、神経伝達物質カテコラミンの合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼの発現について、ERK5 は ERK1/2 以上に重要な役割を担うことが明らかになった。さらに、研究を進展させるために、ERK5 特異的に発現が誘導され、かつ PC12 細胞の分化に関与すると予想される遺伝子候補群 (46 個) をマイクロアレイ法により同定した。それらの遺伝子群の中で、神経系における何かしらの役割が示唆されているにも関わらず、その機能が全く不明な p36 遺伝子に注目している。一方、脳グリア細胞のモデル細胞であるラット C6 グリオーマ細胞を bFGF で刺激すると、ERK5 が活性化されて、神経栄養因子である NGF および glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) の遺伝子発現が促進されることを報告した (Obara et al., *Cell.*

Signal. 2010)。近年、アルツハイマー病やパーキンソン病などに代表される神経変性疾患が大きな社会問題となっているが、上記の NGF や GDNF はそれぞれアルツハイマー病やパーキンソン病に有効な神経栄養因子と期待されていることから、NGF や GDNF の産生に関わる ERK5 の活性と神経変性疾患との関連性が予測される。

2. 研究の目的

NGF 刺激による PC12 細胞の神経細胞様への分化に ERK5 が不可欠な役割を果たしていること、また、C6 グリオーマ細胞における神経栄養因子の生合成に ERK5 が関与する可能性があることがわかっている。そこで、本研究では ERK5 の活性制御機構および生理的な役割を詳細に解析することにより、神経回路が機能的に制御される分子メカニズムを包括的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

我々は、以前に ERK1/2 と ERK5 をそれぞれ特異的に抑制する阻害薬を利用し、マイクロアレイ法を用いて ERK5 選択的に発現が誘導される 46 個の遺伝子を予備試験において同定することに成功した。そこで、この ERK5 選択的に発現する遺伝子群の中でも特に、神経系における機能がほとんど知られていない p36 遺伝子に着目して研究を行った。PC12 細胞または NGF 応答性の交感神経細胞において、これらの遺伝子の発現を siRNA 法で抑制し (あるいは過剰発現させながら)、(1) 神経突起/軸索伸展を指標とした神経細胞の形態的な分化、(2) 神経伝達物質の生合成・分泌能の増強を指標とした機能的な分化、(3) (1)(2)に関連する神経細胞特異的遺伝子 (ニューロフィラメント、チロシンヒドロキシラーゼ、イオンチャネルなど) の発現量に対す

るERK5およびERK5関連遺伝子の影響を詳細に観察した。上記(1)に関しては、申請者らがメーカーとの共同開発した独自のソフトウェアを用いて、形態的な分化を解析した。(2)に関しては、エチレンジアミン縮合法を利用して、カテコラミンなどの神経伝達物質の生合成量を定量した。(3)に関しては、申請者らが独自に開発し効果が確認されているERK5 shRNA、ERK5シグナル阻害薬、ERK5やMEK5遺伝子の変異体を用いながら、RT-qPCR法やウエスタンブロット法により神経細胞特異的遺伝子の発現量を定量した。

また、ERK1/2とERK5のクロストーク機構についても考察した。特に、ERK1/2によるERK5C末端部位のリン酸化の可能性に着目し、申請者らがメーカーとの共同研究にて作成したERK5C末のリン酸化部位を認識する独自の抗体を用いて検討し、そのリン酸化とERK5の活性との関連性を検討した。

4. 研究成果

われわれは、ERK5選択的に発現が誘導される多数の遺伝子を同定したが、その中でもp36遺伝子に焦点を当てて研究活動を行った。その結果、p36をsiRNA法でノックダウンすると、カテコラミン生合成酵素の一つであるチロシンヒドロキシラーゼタンパク質の発現が抑制されること、さらにカテコラミンの生合成も抑制されることが明らかとなった。PC12細胞の形態的な分化に対しては、p36は特に影響を与えなかった。また、p36のノックダウンにより、チロシンヒドロキシラーゼmRNAの遺伝子発現は影響を受けなかったが、チロシンヒドロキシラーゼタンパク質のユビキチン化が増大したことから、p36はチロシンヒドロキシラーゼタンパク質のユビキチン化を阻害して、安定化することが示唆された。ERK5をノックダウンしても同様の

表現形が示されることから、神経細胞の分化の過程においてERK5/p36のシグナル伝達経路は、神経伝達物質の生合成といった神経機能を強化する役割を担っていることが示唆された。

さらにERK5とERK1/2のクロストーク機構についても検討した。免疫沈降の実験を行うと、ERK5とERK2は共沈して両者が結合することが明らかになったが、この両者の結合はNGF刺激に依存しなかった。ERK5とERK2のリコンビナントタンパク質を用いた*in vitro*の実験系で同様の実験を行ったところ、両者は相互作用しなかった。つまり両者は未同定のタンパク質などを介して間接的に結合しているものと予想された。また、我々独自で作製した抗体を用いて、ERK5のC末付近のThr732がERK1/2によりリン酸化されることが明らかになった。そこで、ERK5のThr732のリン酸化を模倣するERK5 T732E変異体を作製して、HEK293細胞に発現させたところ、ERK5の野生型あるいはERK5 T732A変異体が主に細胞質に局在したのに対して、ERK5 T732E変異体は核に局在する割合が大きく上昇することが示された。さらに、ERK5下流で活性化されるMEF2Cの活性を定量したところ、ERK5 T732A変異体がMEF2Cの活性化を抑制することがわかった。つまり、ERK5 Thr732のリン酸化依存的に転写因子MEF2Cの活性が上昇することが示された。この現象はERK5の核移行が促進することが大きな理由の一つであることが予想された。つまり、これまで長く不明であったERK5のC末部位による転写活性化機構の一端が、本研究によって解明されたと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計12件)

*はコレスポンディングオーサー

1. Takuto Honda, Yutaro Obara*, Arata Yamauchi,

- Anthony D. Couvillon, Justin J. Mason, Kuniaki Ishii, Norimichi Nakahata. Phosphorylation of ERK5 on Thr732 is associated with ERK5 nuclear localization and ERK5-dependent transcription. *PLoS ONE* (2015), 10, e0117914. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0117914
2. Kuniaki Ishii, Minghua Wu, Yutaro Obara. Is PIP₂ involved in the insulin effect? *Channels* (2014) 8, 391-392. 査読有 doi: 10.4161/19336950.2014.948758
 3. Minghua Wu, Yutaro Obara, Ikuo Norota, Yoshinobu Nagasawa, Kuniaki Ishii. Insulin suppresses IKs (KCNQ1/KCNE1) currents, which require β -subunit KCNE1. *Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* (2014) 466, 937-946. 査読有 doi: 10.1007/s00424-013-1352-7
 4. Atsuyoshi Nishina, Hirokazu Kimura, Hiroyuki Tsukagoshi, Kuniyoshi Kozawa, Mamoru Koketsu, Masayuki Ninomiya, Daisuke Sato, Yutaro Obara, Shoen Furukawa. Neurite Outgrowth of PC12 Cells by 4'-O- β -D-glucopyranosyl-3',4'-dimethoxychalcone from Brassica rapa L. 'hidabeni' was enhanced by pretreatment with p38MAPK inhibitor. *Neurochem. Res.* (2013) 38, 2397-2407. 査読有 doi: 10.1007/s11064-013-1152-7
 5. Koji Ando, Shigetomo Fukuhara, Takahiro Moriya, Yutaro Obara, Norimichi Nakahata, Naoki Mochizuki. Rap1 potentiates endothelial cell junctions by spatially controlling myosin II activity and actin organization. *J. Cell. Biol.* (2013) 202, 901-906. 査読有 doi: 10.1083/jcb.201301115
 6. Yutaro Obara*, Kuniaki Ishii. Multiple functions of G_i/transglutaminase 2. *Nippon Yakurigaku Zasshi* (2013) 141, 225. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1254/fpj.141.225>
 7. Yutaro Obara*, Kuniaki Ishii. Roles of ERK5 in neuronal cells. *Nippon Yakurigaku Zasshi* (2013) 141, 354. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1254/fpj.141.354>
 8. Yutaro Obara*. Roles of ERK5 in neuronal cells (Review). *Nippon Yakurigaku Zasshi*. (2013) 141, 251-255. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1254/fpj.141.251>
 9. Yutaro Obara*, Yoshimi Yanagihata, Tomohiro Abe, Laila Dafik, Kuniaki Ishii, Norimichi Nakahata. G α_{i1} /transglutaminase-2 activity is required for maximal activation of adenylyl cyclase 8 in human and rat glioma cells. *Cell. Signal.* (2013) 25, 589-597. 査読有 doi: 10.1016/j.cellsig.2012.11.021
 10. Kuniaki Ishii, Ikuo Norota, Yutaro Obara. Endocytic regulation of voltage-dependent potassium channels in heart. *J. Pharmacol. Sci.* (2012) 120, 264-269. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.12R12CP>
 11. Shinji Goto, Masaki Saito, Yutaro Obara, Takahiro Moriya, Norimichi Nakahata. Involvement of lipid rafts in multiple signal transductions mediated by two isoforms of thromboxane A₂ receptor: dependency on receptor isoforms and downstream signaling types. *Eur. J. Pharmacol.* (2012) 693, 15-24. 査読有 doi: 10.1016/j.ejphar.2012.07.046
 12. Teigo Asai, Luo Dan, Yutaro Obara, Toru Taniguchi, Kenji Monde, Kouwa Yamashita, Yoshiteru Oshima. Dihydrobenzofurans as cannabinoid receptor ligands, from *Cordyceps annullata*, an entomopathogenic fungus, cultivated in the presence of HDAC inhibitor. *Tetrahedron lett.* (2012) 53, 2239-2243. 査読有 doi:10.1016/j.tetlet.2012.02.088
- [学会発表](計7件)
1. 小原祐太郎、長澤隆介、根本互、Mike J. Pellegrino、高橋麻穂、Beth A Habecker、Philip J.S Stork、一柳統、伊藤裕美、富田善彦、石井邦明、中畑則道 “ERK5 は神経系細胞とヒト副腎髄質においてカテコラミン生合成とその恒常性を制御する” 第88回日本薬理学会年会 2015年3月20日 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
 2. 小原祐太郎、本多拓人、山内新、Anthony D. Couvillon, Justin J. Mason、石井邦明、中畑則道 “ERK5 と ERK1/2 のクロストーク機構について” 第65回日本薬理学会北部会 2014年9月27日 コラッセ福島(福島県・福島市)
 3. 小原祐太郎、Philip Stork, Beth Habecker、石井邦明、中畑則道 “NGF activates ERK5 in Ras and Rap1-independent manners and promotes neurite outgrowth and

catecholamine biosynthesis” 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19 日 仙台国際会議場（宮城県・仙台市）

4. 小原祐太郎、柳畑佳未、阿部友大、Laila Dafik、石井邦明、中畑則道 “ $G\alpha_h$ /TG2 enhances adenylylcyclase 8 activity in human and rat glioma cells ” 第 87 回日本薬理学会年会 2014 年 3 月 19 日 仙台国際会議場（宮城県・仙台市）
5. 小原祐太郎、柳畑佳未、阿部友大、Laila Dafik、石井邦明、中畑則道 “ $G\alpha_h$ /TG2 promotes cAMP production accompanied by a modification of adenylylcyclase 8 in human and rat glioma cells ” 第 43 回神経科学学会 2013 年 11 月 12 日（サンディエゴ、アメリカ）
6. 小原祐太郎 “ 神経栄養因子の作用メカニズムとその生合成機構に関する薬理学的研究 ” 第 86 回日本薬理学会年会 学術奨励賞受賞講演 2013 年 3 月 22 日 福岡国際会議場（福岡県・福岡市）
7. 小原祐太郎、本多拓人、山内新、石井邦明、中畑則道 “ERK5 と ERK1/2 のクロストーク機構の解析” 第 63 回日本薬理学会北部会 2012 年 9 月 14 日 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター（新潟県・新潟市）

6. 研究組織

(1) 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