

## 高浸透圧刺激による細胞内シグナル伝達機構の解析

加納良男 中桐佐智子\* 平上二九三\*\* 小池好久 三宅優紀 河村顕治\*\*

### Signal Transduction Induced by Osmotic Shock

Yoshio KANO, Sachiko NAKAGIRI\*, Fukimi HIRAGAMI\*\*,  
Yoshihisa KOIKE, Yuki MIYAKE, Kenji KAWAMURA\*\*

#### 要 旨

神経成長因子 (NGF) による神経分化は、古典的 MAP キナーゼである ERK の持続的活性化が重要な作用をすると言われている。しかしその時同時に活性化しているもう 1 つのキナーゼである p38 MAPK の働きはまだ解っていない。p38 MAPK の働きを解明するため我々は NGF ではなく、高浸透圧刺激によって神経突起が誘導される特殊な神経細胞である PC12m32 細胞を開発した。MAPK 阻害剤を用いた実験から、この PC12m32 細胞は高浸透圧ショックが与えられると p38 MAPK を活性化することで神経突起を誘導していることが解った。PC12m32 細胞における高浸透圧による p38 MAPK の活性化は PC12 親細胞より高く、また p38 MAPK の上流にある MKK3 と MKK6 も高い値を示した。さらに p38 MAPK の特異的阻害剤である SB203580 は、高浸透圧によって活性化する転写因子である CREB の作用を抑制した。これらの結果、高浸透圧刺激は、NGF によって活性化される経路とは異なる p38 MAPK 経路によって活性化される CREB を働かせることで、神経突起形成に作用していることが明らかになった。

キーワード：PC12m32 細胞、高浸透圧刺激、p38 MAP キナーゼ、CREB

Key Words：PC12m32 cell, Osmotic shock, p38 MAP kinase, CREB

#### はじめに

細胞内シグナル伝達系は、ほ乳類の細胞において主として 3 種類の MAP キナーゼ経路が働いている。1 つ目は、細胞外シグナル伝達調節リン酸化酵素 (ERK) を活性化する経路であり、2 つ目は、Jun 転写因子リン酸化酵素 (JNK) を活性化する経路であり、3 つ目が p38 MAP キナーゼ (p38 MAPK) を活性化する経路である<sup>1), 2)</sup>。その内 ERK 経路は主に成長因子によって活性化されるのに比べ、JNK と p38 MAPK 経路は炎症性サイトカインやストレスによって活性化される。

ERK はその働きは解明されているが、JNK と

p38 MAPK はその機能は不明な点が多かった。しかし遺伝的解析の結果、JNK の働きは解ってきた。例えば、ノックアウトマウスを使った解析により、JNK は細胞死に関与していることが明らかとなった<sup>3)</sup>。また最近 Troemel らは、線虫の嗅覚神経の系を用いて、p38 MAPK 経路が非対称的な細胞分化に重要であることを発見した<sup>4)</sup>。2 つの同等な嗅覚神経が、軸索接触の後に異なる運命決定を行い、Ca<sup>2+</sup> に依存した UNC43 (CaMKII) → NSY1 (ASK1) → SEK1 (MKK6) → MAPK (p38 MAPK) という経路が分化実行に働いている。

さらに p38 MAPK はラット副腎髄質褐色細胞腫

吉備国際大学保健科学部作業療法学科  
〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町 8

\*吉備国際大学保健科学部看護学科

〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町 8

\*\*吉備国際大学保健科学部理学療法学科

〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町 8

Department of Occupational Therapy, School of Health Science, Kibi International University  
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, 716-8508, Japan

\* Department of Nursing, School of Health Science, Kibi International University  
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, 716-8508, Japan

\*\* Department of Physical Therapy, School of Health Science, Kibi International University  
8, Iga-machi, Takahashi-City, Okayama, 716-8508, Japan

由来の PC12 細胞における、増殖因子や cAMP 誘導の神経分化に必要であることが示唆された。

我々は新しい PC12 変異細胞である PC12m3 と PC12m32 細胞を樹立したのであるが<sup>5)</sup>、これらの細胞は NGF 刺激によって正常な持続した MAP キナーゼ活性を示すにもかかわらず神経突起の形成がわずかにしか起こらない。しかし、PC12m3 細胞に NGF と同時にカルシウムイオノホア<sup>6)</sup>や免疫抑制剤 FK506<sup>7)</sup>などの薬剤を投与するか、あるいは熱ショック<sup>8)</sup>、高浸透圧<sup>5)</sup>あるいは電磁波刺激<sup>9)</sup>を与えると高い神経突起の形成が見られた。

高浸透圧にさらされた細胞は、細胞から水が失われることで細胞自身が縮んでしまう。このような危機に陥った細胞は元の状態に戻すために縮んだ細胞を元のようにふくらませて細胞骨格を保護強化するための適応反応を起こす<sup>10), 11), 12)</sup>。ほ乳類の細胞では高浸透圧にさらされると p38 MAPK が活性化する<sup>13)</sup>。しかし、高浸透圧によって活性化された p38 MAPK の標的となる転写因子は何かまだ解明されていない。

そこで我々は、自ら開発した PC12m32 細胞を用いて高浸透圧刺激によるシグナル伝達機構を解明することを試みた。

## 方 法

### 1. 細胞と培養

実験に使用した PC12 細胞は、グリーンらによってラット副腎髄質褐色細胞腫から単離された神経分化能を有する細胞である<sup>14)</sup>。この細胞は、米国 Rockville, ME の American type culture collection より購入した。

細胞は、10% ウマ血清と 5% 牛胎児血清それに 80  $\mu\text{g/ml}$  のカナマイシンを含む高グルコース型 DME 培地を用いて継代し維持した。細胞の培養は、炭酸ガス培養器を用い、5%  $\text{CO}_2$  で 37°C で行ない、培地交換は 3 日おきに行なった。継代は、細胞が培養シャーレ一杯になるとピペettingし、 $1 \sim 3 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$  で新しいシャーレに蒔きなおすという方法により行なった。細胞は常時マイコプラズマ感染の有無を Hoechst 33258 で染色して調べ、感染のないことを確認して実験を行なった。

### 2. 細胞への高浸透圧刺激処理

細胞への物理的刺激としては高浸透圧ショックを試みた。高浸透圧処理は培地に 4M の NaCl 溶液を最終濃度が 1.42% になるように加えることで行った。4M の NaCl 溶液はニトロセルロースフィルター（ポアサイズ 2  $\mu\text{m}$ ）で濾過することによって作製したものである。高浸透圧処理を施した細胞は 7 日間培養後神経突起形成を測定した<sup>5)</sup>。

### 3. p38 MAP キナーゼと CREB の検出

活性化した p38 MAP キナーゼと CREB の検出は免疫ブロット方によって行った<sup>15)</sup>。方法は、PC12m32 の細胞 100 万個を 25  $\text{cm}^2$  のフラスコに蒔き、5 日間培養後無血清下で高浸透圧処理または熱処理を行い酵素活性の計測を行った。測定は細胞から全蛋白質を抽出し 10% ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画後ポリビニールメンブレンにブロットした。ブロットした蛋白質はホスホ p38 抗体またはホスホ CREB 抗体を作用させてリン酸化した p38 MAP キナーゼと活性化した CREB の検出を行った。

## 結 果

### 1. 物理的刺激による神経突起の形成

まず最初、高浸透圧の効果を調べた。PC12m32 の細胞 100 万個を 25  $\text{cm}^2$  のフラスコに蒔き、精製された NGF 1  $\mu\text{l}$  と高浸透圧になるように NaCl の濃度を 1.42% に調整して 1 週間培養したところ、PC12m32 細胞において、NGF のみを与えた対照に比べ非常に高い神経突起の形成が観察された（図 1）。PC12m32 細胞における高浸透圧処理による神経突起の形成は NGF を与えた PC12 親細胞と同じくらい高い誘導率であった（図 1）。また高浸透圧処理による神経突起形成は p38 MAP キナーゼ阻害剤である SB203580 によって大きく抑制された。

### 2. 高浸透圧刺激による p38 MAPK と MKK3/6 の活性化

NGF による ERK の活性化は PC12 細胞の神経分化に重要な役割をもっているが p38 MAP キナーゼはどうだろうか。

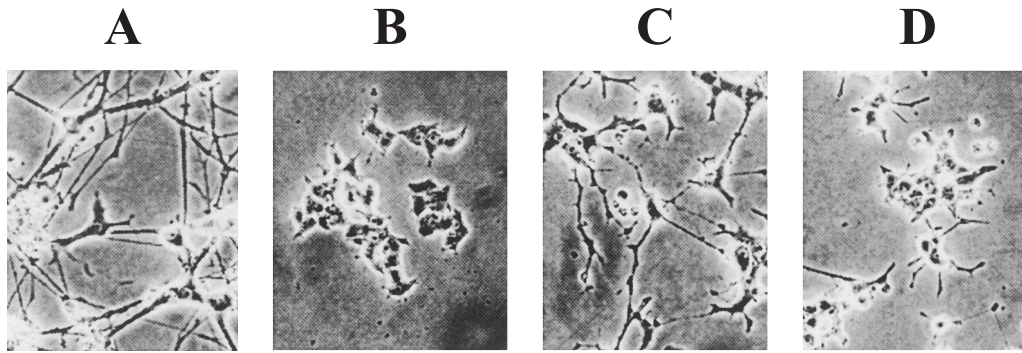


図1 高浸透圧による神経突起形成と MAPK 阻害剤の作用

PC12 親細胞に NGF1  $\mu$ l を添加したものを 1 週間培養した (A)。神経突起形成変異細胞である PC12m32 細胞に NGF1  $\mu$ l を添加したもの (B)、NGF1  $\mu$ l と 1.42%NaCl による高浸透圧処理を行ったもの (C)、高浸透圧処理に p38 MAPK 特異的阻害剤 SB023580 を添加したもの (D) を 1 週間培養し位相差顕微鏡で写真撮影を行った ( $\times 200$ )。

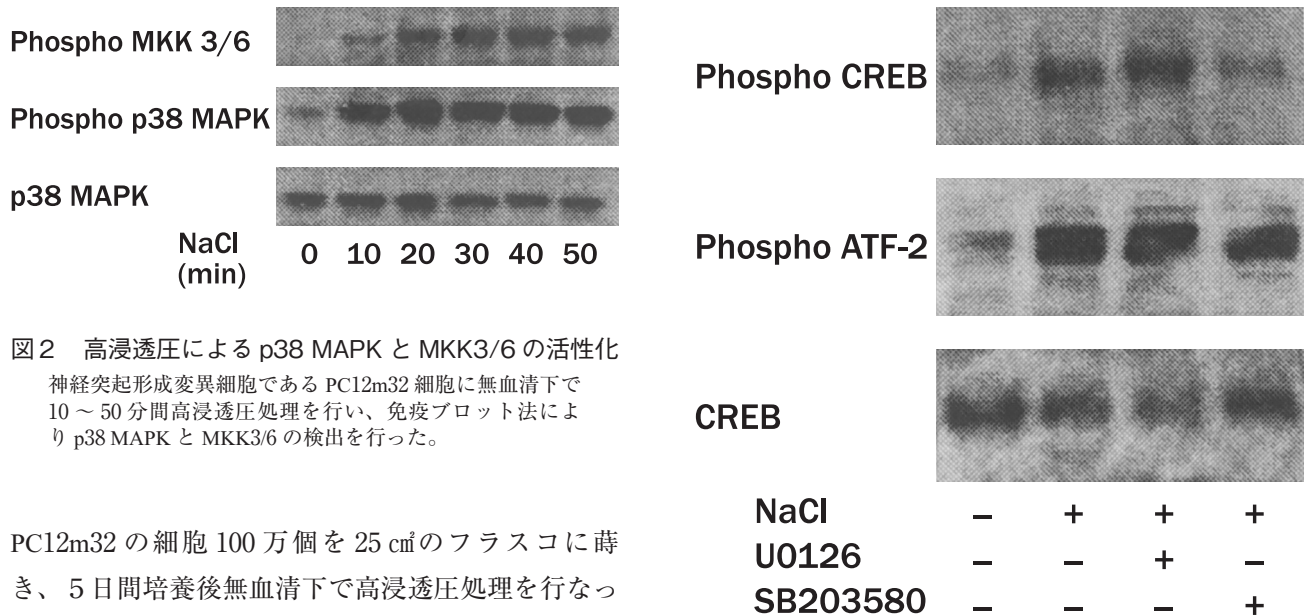


図2 高浸透圧による p38 MAPK と MKK3/6 の活性化

神経突起形成変異細胞である PC12m32 細胞に無血清下で 10 ～ 50 分間高浸透圧処理を行い、免疫ブロット法により p38 MAPK と MKK3/6 の検出を行った。

PC12m32 の細胞 100 万個を 25  $\text{cm}^2$  のフラスコに蒔き、5 日間培養後無血清下で高浸透圧処理を行なったところ高浸透圧刺激によって高い p38 MAPK キナーゼの活性が見られた (図 2)。p38 MAPK は高浸透圧処理後 10 分で高い活性が見られ、50 分処理したものでも高い活性が観察されたことから p38 MAPK は高浸透圧処理によって高い p38 MAPK が持続していることが判明した。さらに PC12m32 細胞においては、p38 MAPK を活性化する酵素である MKK3/6 においても高浸透圧処理によって高い活性の持続が見られた (図 2)。

### 3. 高浸透圧による p38 MAPK 経路を介した CREB 転写因子の活性化

PC12 親細胞では、NGF 処理を行うと ERK 経路が活性化し最終的に転写因子の CREB が活性化する

図3 高浸透圧による転写因子 CREB の活性化と MAPK 阻害剤の作用

神経突起形成変異細胞である PC12m32 細胞に無血清下で 30 分間高浸透圧処理を行い、ERK 阻害剤 U0126 あるいは p38 MAPK 特異的阻害剤 SB023580 を添加し、免疫ブロット法により CREB と ATF-2 の検出を行った。

ことで神経突起の誘導が起こっている。CREB は 4 つのファミリーが確認されている。それは CREB、ATF1、ATF2 それに ATF3 である。CREB と ATF1 はダイマーをつくり、ATF2 と ATF3 はダイマーをつくることで転写因子として働いている<sup>16)</sup>。そこで PC12m32 細胞では、CREB 組と ATF2 組のどちらが働いているかを調べたところ、高浸透圧によって CREB 組が活性化することが認められた (図 3)。



また高浸透圧によって CREB の活性は p38 MAPK の阻害剤によって抑制されることから (図 3)、高浸透圧による PC12m32 細胞の神経突起の誘導は p38 MAPK と CREB によって起こることが判明した。

## 討 論

高浸透圧は細胞の p38 MAPK と ERK の両方を活性化することができる。p38 MAPK の阻害剤である SB203580 は高浸透圧が誘導する CREB の活性を抑制するが、ERK の阻害剤である U0126 は作用しないことから、ERK ではなく p38 MAPK が高浸透圧によって CREB を活性化するための上流のシグナル伝達タンパク質であることを示している。

PC12 親細胞では NGF による神経突起の誘導には ERK と p38 MAPK の両方の活性が必要であるが、PC12m32 細胞の神経分化には p38 MAPK の活性のみが必要であるように思われる。PC12 親細胞では NGF によって ERK の持続した活性化が誘導され、それによって CREB が活性化して神経突起の形成に働いている<sup>17)</sup>。今回 PC12m32 細胞では高浸透圧によって p38 MAPK の持続した、しかも高い活性化が起こっていることから高浸透圧は CREB を活性化して神経突起の誘導に働いていると考えられる。では PC12m32 細胞における p38 MAPK の活性は何に起因しているのであろうか。p38 MAPK を活性化する酵素は MKK3/6 である。PC12m32 細胞では高浸透圧によって MKK3/6 も持続して高い活性があることから (図 2)、これが p38 MAPK の高活性化の原因と考えられる。それでは高浸透圧で大きな神経突起の誘導が見られない PC12 親細胞と高浸透圧で大きな神経突起の誘導が見られる PC12m32 細胞の違いは何であろうか。それで、PC12 親細胞と PC12m32 細胞での MKK3/6 蛋白質の量を調べてみた<sup>5)</sup>。その結果、PC12 親細胞に比べ PC12m32 細胞では多量の MKK3/6 蛋白質が存在することが判明し、これが MKK3/6 と p38 MAPK の高い活性化の原因であることが解った。

## Abstract

The sustained activation of classical mitogen-induced

protein kinase (MAPK, also known as ERK) induced by nerve growth factor (NGF) plays an important role in the induction of neurite outgrowth. However, the role of p38 MAPK in neural cell function is still not clear. We developed a neuronal cell lines from PC12 cells, PC12m32, in which NGF-induced neurite outgrowth is impaired and that show neurite outgrowth in response to hyperosmotic shock. The p38 MAPK pathway inhibitor SB20358 but not the ERK pathway blocker U0126 inhibited the ability of PC12m32 cells to induce neurite outgrowth in response to osmotic shock. The extent of phosphorylation of p38 MAPK induced by osmotic shock in PC12m32 cells was much greater than that in PC12 parental cells. The upstream kinases MKK3 and MKK6, which phosphorylate and activate p38 MAPK, also showed higher levels in PC12m32 cells than in PC12 parental cells when treated with osmotic shock. Inhibition of p38 MAPK by SB203580 resulted in inhibition of the activity of the transcription factor CREB, which is activated by osmotic shock. These findings indicate that activation of CREB mediated by a p38 pathway distinct from the NGF signaling pathway may be required for neurite outgrowth.

## 文 献

1. Zhu X, Rottkamp CA, Hartzler A et al (2001) Activation of MKK6, an upstream activator of p38, in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 79 : 311-318
2. Huang C, Borchers CH, Schaller MD et al (2004) Phosphorylation of paxillin by p38MAPK is involved in the neurite extension of PC-12 cells. *J Cell Biol* 164 : 593-602
3. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J et al (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 24 : 1326-31
4. Troemel ER, Sagasti A, Bargmann CI (1999) Lateral signaling mediated by axon contact and calcium entry regulates asymmetric odorant receptor expression in *C. elegans*. *Cell* 12 : 387-98
5. Kano Y, Nohno T, Shimada K et al (2007) Osmotic

- shock-induced neurite extension via activation of p38 mitogen-activated protein kinase and CREB. *Brain Res* 1154 : 1-7
6. Kano Y, Nohno T, Takahashi R et al (2001) cAMP and calcium ionophore induce outgrowth of neuronal processes in PC12 mutant cells in which nerve growth factor (NGF)-induced outgrowth of neuronal processes is impaired. *Neurosci Lett* 303 : 21-24
  7. Kano Y, Nohno T, Hasegawa T et al (2002) Immunosuppressant FK506 induce neurite outgrowth in PC12 mutant cells with impaired NGF-promoted neuritogenesis via a novel MAP kinase signaling pathway. *Neurochem Res* 27 : 1655-1661
  8. Kano Y, Nakagiri S, Nohno T et al (2004) Heat shock induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Brain Res* 1026 : 302-306
  9. Inoue S, Motoda H, Koike Y et al (2008) Microwave irradiation induces neurite outgrowth in PC12m3 cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Neurosci Lett* 303 : 21-24
  10. Wadegger S, Lang F (1998) Cell volume and gene expression. *J Membr Biol* 162 : 95-100
  11. Novick P, Botstein D (1985) Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell* 40 : 405-416
  12. Chowdhury S, Smith KW, Gustin MC (1992) Osmotic stress and the yeast cytoskeleton : phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J Cell Biol* 118 : 561-571
  13. Han J, Lee JD, Bibbs L (1994) A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265 : 808-811
  14. Greene L A, Tischler A S (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 2424-2428
  15. Sakai T, Furuyama T, Ohoka Y (1999) Mouse semaphoring H induces PC12 cell neurite outgrowth activating ras-mitogen-activated protein kinase signaling pathway via  $Ca^{2+}$  influx. *J Biol Chem* 274 : 29666-29671
  16. van Dam H, Castellazzi M (2001) Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimmers in oncogenesis. *Oncogene* 20 : 2453-2462
  17. York R D, Yao H, Dillon T et al (1998) Rap1 mediates sustained MAP kinase activation induced by nerve growth factor. *Nature* 392 : 622-626

