

胎仔マウス顎下腺における新規 MAP キナーゼ Erk 5 の発現と機能的役割

小 山 典 子¹⁾ 大 野 健 二²⁾ 松 本 嗣 央¹⁾
高 井 良 招²⁾ 柏 俣 正 典¹⁾

The Role of Erk5 in Developing Fetal Mouse Submandibular Gland

KOYAMA NORIKO¹⁾, OHNO KENJI²⁾, MATUMOTO TUGUTERU¹⁾, TAKAI YOSHIKI³⁾ and KASHIMATA MASANORI¹⁾

Erk 5 は近年発見された MAPK の新しいファミリー分子であるが、その機能はあまり明らかにされていない。本研究でわれわれは、胎生期顎下腺の Erk 5 について検討を行った。ウエスタンブロット法による解析から、マウス顎下腺には Erk 5 が発現していることがわかった。また、胎仔マウス顎下腺に発現している Erk 1/2 と Erk 5 が EGF (epidermal growth factor) 刺激に応答性を示すのか否かについて調べた。胎生14日齢 (E14)、胎生16日齢 (E16) および胎生18日齢 (E18) の顎下腺に EGF (50ng/ml) を添加して0分、5分、10分、30分および60分間培養した。刺激後の顎下腺を回収し、一定量のタンパク質 (10 μ g あるいは50 μ g) を SDS ポリアクリルアミドゲルで分離し、リン酸化 Erk1/2 抗体ならびにリン酸化 Erk 5 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。Erk1/2 は全ての胎生齢で EGF の刺激に応答したリン酸化の上昇が認められた。しかし、Erk 5 のリン酸化は E14、E16 で促進されたが、E18 ではほとんど変化がないことがわかった。Erk1/2 と Erk 5 が顎下腺の分枝形態形成に及ぼす機能を調べるために U0126 を添加して48時間器官培養したところ、対照の顎下腺と比較して著しい分枝形成の抑制が認められた。以上の結果から、Erk 5 は Erk1/2 と同様に発達過程の顎下腺における分枝形成に重要な役割を持つものと考えられた。

キーワード：Erk 5, Erk1/2, 胎仔マウス顎下腺, 分枝形態形成, シグナル伝達

Erk 5, also called "big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1)", was recently found as a member of MAPK, and its biological roles are largely unknown. In this study, we investigated the expression of Erk 1/2 and Erk 5 in developing fetal mouse submandibular gland (SMG). Phosphorylation of Erk 1/2 was clearly induced by epidermal growth factor (EGF) of SMG rudiments at embryonic day 14 (E 14), embryonic day 16 (E 16) and embryonic day 18 (E 18); however, the phosphorylation of Erk 5 by EGF was observed at E 14 and E 16, but not at E 18. Branching morphogenesis of cultured embryonic day 13 (E 13) SMG rudiments was suppressed by administration of a MEK specific inhibitor, U 0126, is known to inhibit the activation of both Erk 1/2 and Erk 5. Therefore, Erk 1/2 and Erk 5 cascade might play an important role in the regulation of branching morphogenesis of fetal mouse SMG.

Key words: Erk 5, Erk1/2, Fetal mouse SMG, Branching morphogenesis, Signal transduction

緒 言

唾液腺の発生は口腔底の粘膜上皮細胞が直下の間葉組織細胞に向かって索状に陥入して行くことから始まる。陥入した上皮は間葉細胞につつまれながら伸展し、次いで上皮の先端は2方向に分岐する。胎生期唾液腺は分岐と伸展を繰り返しながら発達を続け、やが

て高度に分化した外分泌腺へ発達して行く。このような一連の反応は分枝形態形成 (branching morphogenesis) とよばれている。

胎生顎下腺を取り出し、血清を含まない培養液中で器官培養しても分枝形態形成の促進が起こる¹⁾。この事実は、顎下腺の分枝形態形成は血清に含まれる栄養成分が必要ではなく、腺組織自身に発達を促す物質が

¹⁾朝日大学歯学部口腔感染医療学講座歯科薬理学分野

²⁾口腔病態医療学講座高齢者歯科学分野
501 0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

³⁾Department of Dental Pharmacology, Division of Oral Infections and Health Sciences

²⁾Department of Geriatric Dentistry, Division of Oral pathogenesis and Disease Control

Asahi University School of Dentistry
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501 0296, Japan
(平成18年8月1日受理)

存在していることを意味している。一方、胎生期の顎下腺上皮から間葉細胞を除去して培養を行った場合、上皮の発達は完全に停止する²⁾。したがって、唾液腺上皮が正常な器官へ発達するためには間葉細胞との接触が必要であると考えられる。すなわち上皮-間葉相互作用が、唾液腺の正常な発生過程に重要であり、分枝形態形成は上皮-間葉相互作用に基づいて制御されていると考えられる。

近年の研究から、上皮-間葉相互作用の制御分子の1つとして上皮成長因子(epidermal growth factor, EGF)が存在することが明らかになった^{1,2)}。Kashimata ら³⁾は顎下腺原基に EGF を添加して器官培養を行うと、上皮の分枝形態形成が促進すること、また、EGF による分枝形態形成の促進には、extra cellular regulated protein kinase (Erk) 1/2カスケードの活性化が関与していることを明らかにした。

EGF 受容体はチロシンキナーゼ型受容体に属する細胞膜受容体である。EGF 受容体がリガンドと結合すると、受容体分子は細胞膜上で集合して二量体を形成する。それに引き続いて、細胞内ドメインでは活性化したチロシンキナーゼによって分子内のいくつかのチロシン残基にリン酸化が起こり(自己リン酸化)、そこへ SH2 ドメインや PTB ドメインをもつアダプタータンパク質が結合して下流へシグナルを送る⁴⁻⁶⁾。EGF 受容体の自己リン酸化によって活性化されるシグナル伝達の主なものに、Ras-MAPK (mitogen activated protein kinase)カスケードがある。MAPK カスケードは MAPK キナーゼキナーゼ(MAPKKK; Raf), MAPK キナーゼ(MAPKK; MEK), MAPK の三段階のキナーゼによるカスケードからなっている⁷⁻⁹⁾。MAPK はアミノ酸配列の相同性によって、Erk を含むいくつかのサブファミリー(JNK/SAPK および p38 MAPK)に分類されるリン酸化酵素であり、これらの酵素は種々の刺激によって活性化される。活性化された MAPK は転写因子などをリン酸化することにより、細胞の増殖や分化など多様な生物活性を伝達すると考えられている。

1995年、Zhou ら¹⁰⁾によって MAPK と相同性の高い遺伝子である Erk 5 が単離された。Erk 5 は、古典的 MAPK (Erk1/2)と同様に TEY 配列を持つが、MAPK/Erk キナーゼである MEK 1 および MEK 2 では活性化されず、MEK 5 によってのみ活性化される¹¹⁾。また、Erk 5 はキナーゼドメイン以外に他のファミリー分子と比較してかなり長い C 末端領域をもつことから、big-MAPK 1 を略して BMK 1 とよばれる。Erk 5 / BMK 1 は、当初は高浸透圧や酸化ストレスなどの刺激で活性化するキナーゼとして報告され^{12,13)}、JNK/

SAPK や p38 MAPK と同様にストレス応答性の MAPK 分子と考えられていた。しかし、近年、Erk 5 / BMK 1 は EGF や NGF および血清刺激などの trophic 因子でも活性化することが報告されたことから¹⁴⁻¹⁷⁾、その機能は広範であると考えられる。

本研究でわれわれは、Erk 5 / BMK 1 が胎生期顎下腺に発現しているかどうか、および胎仔マウス顎下腺の器官形成過程における Erk 5 の機能について以下のような検討を行った。

材料と方法

1. 実験材料

組換え型 EGF は、R&D System 社(Minneapolis, MN, USA) から購入した。Erk1/2 抗体、リン酸化 Erk1/2 抗体、Erk 5 抗体およびリン酸化 Erk 5 抗体、HRP-linked 抗ウサギ IgG 抗体は Cell Signaling 社(Beverly, MA, USA) のものを使用した。U0126 は和光純薬(大阪, 日本) から購入した。

2. 実験動物

実験には ICR 系マウスを使用した。胎仔マウスは膣栓が確認された日を妊娠 0 日齢(E=0)として用いた。なお、本実験は朝日大学動物実験指針に従い、朝日大学動物倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号: 05 013)。

3. 顎下腺の器官培養

顎下腺原基は DMEM-F/12 無血清培地(GIBCO Invitrogen Cell Culture, Carlsbad, CA, USA) に浮かべた Track-Etch Membrane(Whatman International, Brantford, UK) 上で 37℃, 5%CO₂, 95%湿度の条件下で器官培養を行った。胎生14日齢, 16日齢および18日齢の顎下腺を採りだし EGF を 50ng/ml の濃度になるように添加して 0 分, 5 分, 10 分, 30 分および 60 分間作用させた。分枝形態形成の観察には胎生13日齢の同一個体から得られる顎下腺原基対の一方を対照群, もう一方を処理群として用いた。処理群には dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した MEK 阻害剤(U0126) を 10μM の濃度になるように培地中に溶解した。対照群には溶媒である DMSO を同量添加し, 37℃, 5%CO₂, 95%湿度の条件下で 48 時間器官培養を行い, 分枝形態形成の変化を実体顕微鏡下で観察した。

4. 顎下腺ホモジネートの作成

顎下腺原基は、氷冷した 1 mM Na₃VO₄ を含む phosphate-buffered saline (PBS) を用いて membrane から回収し, さらに 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1%

Triton X 100 ,2.5mM sodium pyrophosphate , 1mM -glycerophosphate, protease inhibitor cocktail(Sigma, St. Luis, MI, USA) phosphatase inhibitor cocktail 2(Sigma) 含有の50mM Tris-HCl(pH7.4)を加えてホモジネートを作成した。ホモジネートを4℃で1時間ゆっくり攪拌した後、12,000xg, 4℃で20分間遠心分離を行った。得られた上清をウエスタンブロット解析の試料として用いた。また、ホモジネートのタンパク質量はブロテインアッセイキット(BioRad 社 ,Hercules ,CA , USA) を用いて定量した。

5. ウエスタンブロット解析

顎下腺ホモジネートの一定量 (10および50μg タンパク質量) を SDS-sample buffer (10% SDS, 10mM 2-mercaptoethanol, 20% Glycerol, 0.05% bromphenolblue 含有の0.2M Tris-HCl(pH6.8) 中で100℃5分間処理を行った。その後、試料のタンパク質を8% (Erk 5 分析用) あるいは12% (Erk1/2分析用) 濃度の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した後、PVDF膜に転写した。膜上のタンパク質は抗 p44/42 MAP kinase 抗体 (1 : 1000) , 抗 phospho-p44/42 Map kinase (Thr 202/tyr 204) 抗体 (1 : 2000) , 抗 Erk 5 抗体 (1 : 1000) , 抗 phospho-Erk 5 (Thr 218/Tyr 220) 抗体 (1 : 1000) それぞれを用いて ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Science 社 ,NJ ,USA) にて検出した。

結果および考察

1. 胎仔マウス顎下腺に発現する Erk1/2およびErk 5

MAPK カスケードは、酵母から植物、哺乳類にいたるまで広範な生物に保存されている細胞内情報伝達機構であり、主に細胞増殖、細胞分化、ストレスなどの細胞外刺激によって活性化される。Erk1/2は、最初に同定された MAPK ファミリー分子 (古典的 MAPK) であり、42kDa と44kDa の2つのアイソフォームが存在することが知られている。図1には胎生13日齢から成熟期マウス顎下腺の Erk1/2と Erk 5 の発現パターン変化を示した。Erk1/2は胎生14日齢 (E14) の顎下腺から生後7日齢 (P7) の顎下腺に発現が認められ、その発現量は発達に伴い増加していた。また、胎生13日齢 (E13) および成熟期マウス (Ad) の顎下腺ではほとんど発現していないことがわかった。Erk 5 は、MAPKK と同源性の高い遺伝子として単離された MEK 5 と親和性を示す MAPK ファミリーの1つである¹⁰⁾。Erk 5 の発現は、胎生13日から認められ、胎生16日齢の顎下腺で最も多いことが明らかになった。また、発現は生後7日齢まで徐々に減少し、成熟期マウ

スの顎下腺では Erk 5 は発現していないことがわかった (図1) 。

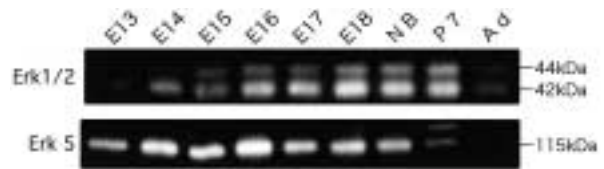


図1 胎仔マウス顎下腺に発現している Erk1/2と Erk 5 の発現パターン

胎生13日から成熟期マウスの顎下腺からタンパク質を抽出してウエスタンブロット解析を行った。Erk1/2と Erk 5 は胎仔マウス顎下腺に発現していた。E13 : 胎生13日齢, E14 : 胎生14日齢, E15 : 胎生15日齢, E16 : 胎生16日齢, E17 : 胎生17日齢, E18 : 胎生18日齢, NB : 新生仔, P7 : 生後7日齢, Ad : 成熟期

2. EGF による Erk1/2および Erk 5 の活性化

図2にEGFを添加して培養した顎下腺の Erk1/2 のリン酸化状態の変化を示した。Erk1/2のリン酸化状態は胎生14日齢, 16日齢および18日齢でともにEGF添加後5分後にリン酸化の上昇 (活性化) が認められ、そのリン酸化状態は60分間持続した。Erk 1 と Erk 2

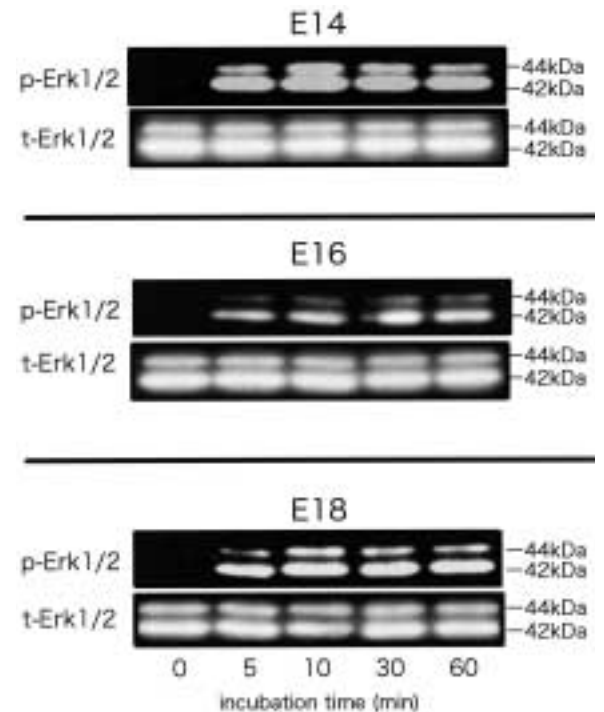


図2 EGF 処理後の胎生14日 (E14) , 16日 (E16) および18日 (E18) の顎下腺原基の Erk1/2リン酸化パターン

それぞれの顎下腺から抽出されたタンパク質をウエスタンブロットにより解析した。EGF の処理によってリン酸化 Erk1/2は E14, E16および E18日齢で顕著に上昇した。p-Erk1/2 : phosphorylated Erk1/2, and t-Erk1/2 : total Erk1/2 proteins

はともに EGF や FGF などの細胞成長因子や TPA のような発癌プロモータによって活性化され、おもに細胞増殖シグナルとして知られている¹⁷⁾。EGF による胎生期顎下腺の Erk1/2 のリン酸化が亢進することはわれわれが既に報告した結果と一致する³⁾。図 3 には EGF 処理による Erk 5 のリン酸化状態の変化を示した。Erk5 は、胎生14日齢および16日齢で EGF 添加5分後にリン酸化の上昇が認められた。胎生14日齢の顎下腺ではリン酸化状態は刺激後60分まで持続したが、胎生16日齢の顎下腺では EGF 添加5分後にピークがあり、徐々に減少することがわかった。また、胎生18日齢の顎下腺では EGF を添加してもリン酸化の上昇は非常にわずかであることがわかった。Erk 5 は Erk1/2 と同様に EGF 受容体あるいは NGF 受容体などのチロシンキナーゼ受容体によって活性化されることが知られている^{14,18)}。前述のように、EGF による Erk のリン酸化は、Erk1/2 では E14 から E18 までの顎下腺で亢進するのに対し、Erk 5 では E14 と E16 で認められ E18 では起こらないという結果は非常に興味深い。しかし、現段階では、この差が顎下腺器官形成過程をどのように調節しているかは明らかではない。

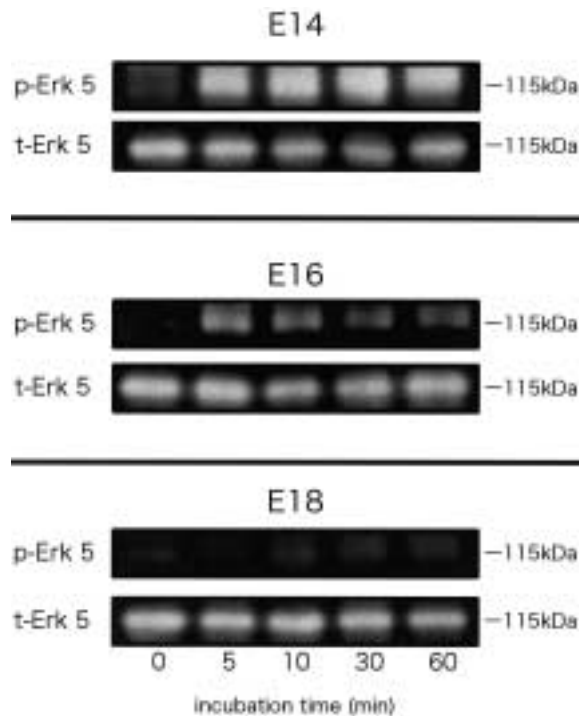


図3 EGF 処理後の胎生14日 (E14)、16日 (E16) および18日 (E18) の顎下腺の Erk 5 のリン酸化パターン。それぞれの顎下腺から抽出されたタンパク質をウエスタンブロットにより解析した。EGF の処理によってリン酸化 Erk 5 は E14 と E16 で顕著に上昇したが、E18 では Erk 5 のリン酸化反応はほとんど促進しなかった。p-Erk 5 : phosphorylated Erk 5, and t-Erk 5 : total Erk 5 proteins

3. 分枝形態形成過程における Erk1/2 および Erk 5 の機能

Yan ら¹⁹⁾や Hayashi ら²⁰⁾によって、Erk 5 を knockout すると胎生10日齢で死亡してしまうこと、また、胎生9日齢から10日齢にかけて血管や心臓の発育あるいは胎盤の欠損および頭部の間葉組織のアポトーシスの促進といった発達過程における種々異常が認められることが明らかにされている。そこで胎生期顎下腺の分枝形態形成過程において Erk 5 がどのような機能を有しているのかを明らかにするために、特異的酵素阻害剤である U0126 を用いて検討を行った。U0126 は Erk1/2 の上流に位置する MEK 1 と MEK 2 の特異的な阻害剤である。近年、Kamakura ら¹⁴⁾によって U0126 は Erk1/2 同様 Erk 5 の活性も阻害することが報告された。図 4 a に対照の顎下腺を、図 4 b に Erk1/2 および Erk 5 の阻害剤 (U0126: 10 μ M) を添加して48時間器官培養した顎下腺をそれぞれ示した。U0126 の存在下では、分枝形態形成が著しく抑制されることが分かった。したがって、Erk 5 は Erk1/2 と同様に顎下腺原基の分枝を促進するシグナル伝達経路であると考えられた。

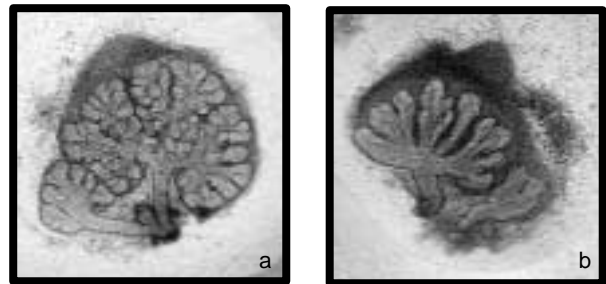


図4 MEK 阻害剤添加による顎下腺形態形成の変化。a : 対照顎下腺, b : U0126 (10 μ M) 処理した顎下腺 ($\times 60$)。それぞれの顎下腺原基は、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 湿度の条件下で48時間器官培養を行った。対照顎下腺 (a) と比較して、酵素阻害剤で処理した顎下腺 (b) では、著しく分枝形成が抑制された。

結 論

顎下腺の発達過程における Erk1/2 および Erk 5 について検討を行った。ウエスタンブロット解析の結果から、胎仔マウス顎下腺には Erk1/2 と Erk 5 が発現しており、その発現パターンはそれぞれ異なることがわかった。胎生14、16および18日齢の顎下腺に EGF を作用させた結果、胎生14および16日齢の顎下腺では Erk1/2, Erk 5 のリン酸化状態が顕著に上昇した。一方、胎生18日齢の顎下腺では Erk1/2 のリン酸化は胎生14および16日齢のものと同様明らかに上昇したが、

Erk 5 のリン酸化の促進は非常にわずかであることがわかった。Erk1/2および Erk 5 の酵素阻害剤 U0126で顎下腺を処理すると分枝形成が著しく抑制された。以上の結果から、Erk 5 は Erk1/2と同様に顎下腺の分枝形成に重要な役割を持つものと考えられた。

引用文献

- 1) Nogawa H and Takahashi Y. Substitution for mesenchyme by basement-membrane-like substratum and epidermal growth factor in inducing branching morphogenesis of mouse salivary epithelium. *Development*. 1991; 112: 855 861.
- 2) Takahashi Y and Nogawa H. Branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in basement membrane-like substratum separated from mesenchyme by membrane filter. *Development*. 1991; 111: 327 335.
- 3) Kashimata M, Sayeed S, Ka A, Muda O, Sakagami H, Faraggiana T and Gresik EW. The Erk 1/2 signaling pathway is involved in the stimulation of branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands by EGF. *Dev Biol*. 2000; 220: 183 196.
- 4) Cohen S, Carpenter G and King L jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem*. 1980; 225: 4834 4842.
- 5) Choen S, Ushiro H, Stoscheck C and Chinkers M. A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles. *J Biol Chem*. 1982; 257: 1523 1531.
- 6) Buhrow SA, Choen S and Staros JV. Affinity labeling of the protein kinase associated with the epidermal growth factor receptor in membrane vesicles from A 431 cells. *J Biol Chem*. 1980; 257: 4019 4022.
- 7) 河崎洋志, 後藤由季子, 西田栄介. MAP キナーゼカスケード. 蛋白質核酸酵素. 1997; 42: 424 430.
- 8) 西田栄介. MAP キナーゼスーパーファミリー. 実験医学. 1996; 14: 24 26.
- 9) 西田栄介. MAP キナーゼシグナル伝達の鍵分子. 実験医学. 1999; 17: 96 99.
- 10) Zhou G, Zhao QB and Dixon JE. Components a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*. 1995; 270: 12665 12669.
- 11) Xin W and Cathy T. Regulation of cellular function by ERK5 signaling pathway. *Cell Signal*. 2006; 18: 753 760.
- 12) Abe J, Kusuhara M, Ulevitch RJ, Berk BC and Lee JD. Big mitogen-activated protein kinase1 (BMK1) is redox-sensitive kinase. *J Biol Chem*. 1996; 271: 16586 16590.
- 13) Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ and Lee JD. BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *EMBO J*. 1997; 16: 7054 7066.
- 14) Kamakura S, Moriguchi T and Nishida E. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 1999; 274: 26563 26571.
- 15) Karihallo A, O'Rourke DA, Nickel C, Spokes K and Cantley LG. Differential MAPK pathways utilized for HGF- and EGF-dependent renal epithelial morphogenesis. *J Biol Chem*. 2001; 276: 9166 9173.
- 16) Richard IT, Kato Y, Chao TH, Hayashi M, Lo JF, Kim SW and Lee JD. Investigating the cellular BMK1/ERK5 signaling pathway. *Methods Mol Biol*. 2004; 250: 89 96.
- 17) Lemmon MA and Schlessinger J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci*. 1994; 19: 459 463.
- 18) Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ and Lee JD. Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature*. 1998; 395: 713 716.
- 19) Yan L, Carr J, Ashby PR, Murry-Tait V, Thompson C and Arthur JS. Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol*. 2003; 3: 1 21.
- 20) Hayashi M and Lee JD. Role of BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice. *J Mol Med*. 2004; 82: 800 808.