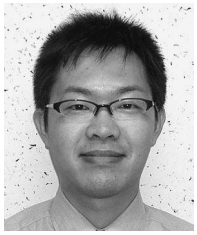
薬 剤 学, **66** (6), 420–424 (2006)

≪若手研究者紹介≫



PACAP 遺伝子の神経特異的発現調節機序の解析

菅 原 英 輝 Hideki Sugawara
鹿児島大学医学部・歯学部附属病院薬剤部

1. は じ め に

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide（PACAP）は，1989 年，ラット下垂体細胞のサイクリック AMP 産生刺激活性を指標としてヒツジ視床下部抽出物より単離，構造決定された神経ペプチドである[1]．38 残基からなる PACAP38 とその N 末 27 残基からなる PACAP27 の 2 つの分子様式があり，Vasoactive intestinal polypeptide（VIP）に 68% の相同性を示し，セクレチン・グルカゴンファミリーに属する[2]．ラット生体内分布において，PACAP27 及び 38 はともに視床下部に最も高濃度に存在する．PACAP38 は低濃度ながら末梢組織にも広く分布し，精巣，副腎，消化管などに比較的高濃度に存在し，精巣での濃度が脳における濃度に匹敵するのは興味深い．

PACAP は，中枢神経系においては主に preganglionic なニューロトランスミッターとして機能しており，末梢神経系では感覚刺激の伝達，血管拡張及び内分泌作用などを制御するニューロトランスミッターあるいはニューロモデュレーターとして機能している[2]．さらに興味深い神経栄養因子としての作用が挙げられ，様々な神経細胞死モデルにおいて，神経保護作用あるいは神経栄養作用が報告されている[2]．このような神経系における PACAP の作用機序を解析する上で PACAP 生合成分泌の調節機序を明らかにすることは必須と思われるが，PACAP の細胞特異的な遺伝子発現調節についての詳細はいまだ明らかにされていない．本稿では，PACAP の神経特異的発現調節に関する我々の研究成果を紹介する．

筆者紹介：平成 12 年熊本大学大学院薬学研究科博士前期課程修了，同年鹿児島大学医学部附属病院薬剤部勤務を経た後，平成 13 年鹿児島大学大学院医学研究科博士課程に進学．平成 17 年 3 月 PACAP 遺伝子発現調節機序における神経選択的サイレンサーに関する研究で，博士（医学）の学位を取得．同年 4 月から鹿児島大学医学部・歯学部附属病院薬剤部勤務．現在に至る．基礎から臨床まで幅広く活躍する研究者を目指して日々研鑽中．

2. PACAP の遺伝子構造と生合成機序

Fig. 1 は，ヒト PACAP 遺伝子及び前駆体をコードする mRNA から，PACAP の生合成過程を模式化したものである．ヒトの PACAP 遺伝子は第 18 番染色体 p11 に位置し，約 7 kb の領域に存在する 5 つのエクソンからなる[3]．PACAP38 の配列は長い 3' 非翻訳領域とともに 5 番目のエクソンにコードされる．転写及び翻訳される PACAP 前駆体蛋白質は，24 アミノ酸のシグナルペプチドを含む 176 個のアミノ酸からなり，PACAP 配列はその C 末端部に位置している．他のホルモン前駆体に見られるように，PACAP 配列は典型的なプロセシングシグナル（塩基性アミノ酸対）ではさまれており，C 末端側の塩基性アミノ酸対の前に位置する Gly は PACAP の C 末端アミド構造の供与体になると考えられる．さらに，PACAP38 内に C 末端のアミド供与に関わる Gly と塩基性アミノ酸対が存在し，ここでプロセシングを受けると PACAP27 が産生されてくる．しかも PACAP 構造の N 末側に GHRH にホモロジーの高い領域があり，プロセシングを受けることにより PRP（PACAP related peptide）と呼ばれるペプチドが生成されてくると考えられているが，その分泌動態及び生理作用は今のところ不明である．このよ

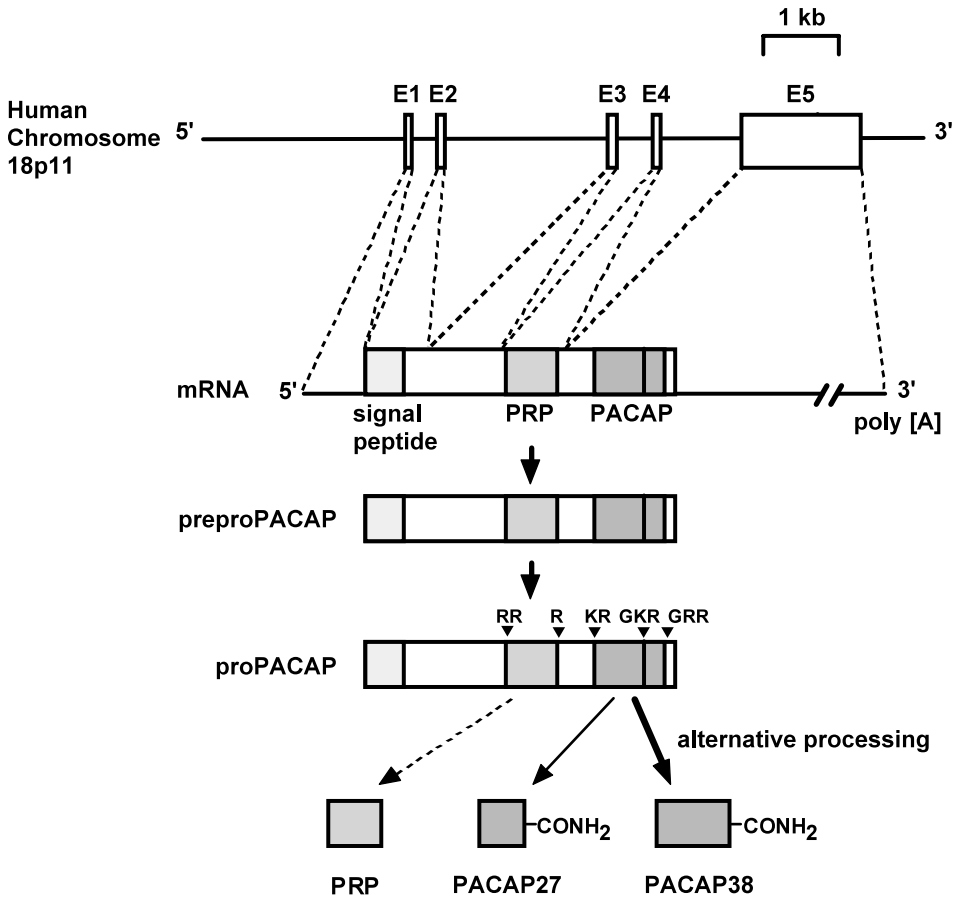


Fig. 1. Schematic Structures of PACAP Gene and mRNA Encoding Its Precursor.
PACAP27 and PACAP38 are generated by alternative processing of its precursor protein at two amidation sites. PRP : PACAP related peptide, E1-5 : common exon 1-5.

うに PACAP38 と PACAP27 の 2 分子種は，イントロンの alternative スプライシングではなく，翻訳後に 2 カ所のアミド化部位における alternative プロセシングにより生じるというユニークな生合成を受けている．

3. PACAP の遺伝子発現調節と神経選択的サイレンサー

ヒト PACAP 遺伝子のプロモーター領域は約 400 bp にわたり，P1 と P2 の 2 カ所が存在するが，それらには，正統な TATA ボックス或いは CCAAT ボックスは見出されていない[4]．その代わりに P1 領域には Initiator（Inr）-like 配列が，P2 領域には GC ボックスや CT リッチ配列が存在することが報告されている．Inr-like 配列は，TATA ボックスを持たない遺伝子において，イニシエイターエレメントとして機能することが知られており，それらの組織特異的あるいは，発生段階特異的な発現に関与することが示唆されている．また，CT リッチ配列は，TATA ボックスと同じようにコアプロモーターとして機能しうることから，これらの領域が PACAP 遺伝子発現調節にとって重要であろうと示唆されている．

我々は，PACAP 遺伝子プロモーターのさらに 5' 上流を解析する過程において，本遺伝子の転写活性を強く抑制する領域を見出し，この領域に 2 カ所の神経選択的サイレンサー（neural restrictive silencer element, NRSE）と類似した配列が存在することを明らかにした[5,6]．NRSE とは神経特異的遺伝子の発現を抑える DNA エレメントである．21 塩基からなる NRSE が，今までに少なくとも 20 種類以上の神経特異的遺伝子の発現制御の中核を担うことが分かってきた[7]．NRSE は，非神経細胞での神経特異的遺伝子の発現を抑えることで，逆に，神経細胞における神経特異的遺伝子の発現を保証するものと考えられている．また，細胞特異的に働くことと，神経伝達物質合成酵素，イオンチャネル，受容体，シナプス顆粒蛋白質などターゲットとなる遺伝

子の数が多いことで，他に類を見ない．NRSE は，神経特異的遺伝子の発現制御に関与するだけでなく，神経細胞の最終分化に関与していると考えられている．

NRSE を制御する特異的な転写制御因子は NRS binding factor（NRSF）である．NRSF は，非神経細胞の核内において神経特異的遺伝子の NRSE に結合し，そこでヒストン脱アセチル化酵素を含む転写抑制複合体を形成することでその遺伝子発現を抑制する．一方，神経細胞においては NRSF の神経特異的バリアント(NRnV)が発現しており，これがドミナントネガティブ的に働くことにより NRSF の転写抑制複合体の形成を阻害すると考えられる[8]．

4. PACAP 遺伝子上流に存在する NRSE の性状解析

NRSE に相同性が高く，NRSE-like element 1, 2（NRSLE1，2）と名付けた 2 つのエレメントは，PACAP 遺伝子の開始コドンから −1.9 kb と −1.7 kb 上流に存在し，マウス，ラット，ヒトにおいて，Fig. 2 に示すように塩基配列，翻訳開始コドンからの位置がよく保存されていた[6]．

つぎに，NRSLE1 と NRSLE2 に対する特異的な結合蛋白をゲルシフトアッセイ法を用いて解析したところ，マウス胚線維芽細胞株 3T3 細胞の核蛋白抽出物と，NRSLE1 及び NRSLE2 のアイソトープ標識プローブによる結合コンプレックスは，それぞれ NRSE として機能が明らかにされている Na イオンチャネル 2 型遺伝子の NRSE 由来のプローブ（Na II）による結合コンプレックスと同様なシフトを示した．これは，未標識の competitor により用量依存的にシグナルが減少することから，特異的な結合体であることが確認された．また，Na II を competitor として用いても用量依存的にシグナルが減少することから，NRSLE 1 と NRSLE 2 は Na II と共通の核蛋白質と結合していることが示唆された．

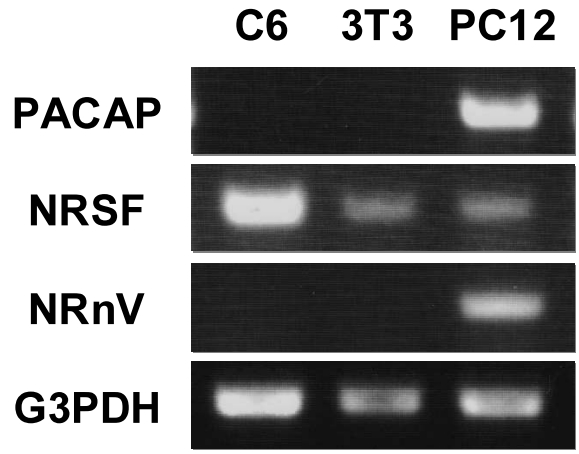
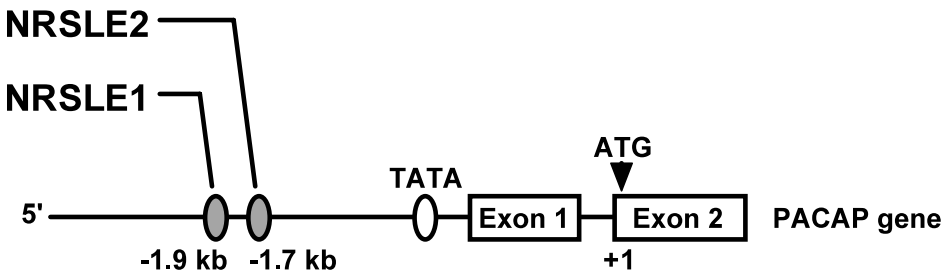


Fig. 3. The RT-PCR Analysis of the Expression of PACAP, NRSF, NRnV mRNAs in PC12, 3T3, C6 Cell Lines.




```
consensus sequence              TTCAGCACCACGGACAGCGCC

NRSLE1 Mouse  (-1.9 upstream)  gTaAGagCCACGGAgAGtGtg
       Human  (-1.9 upstream)  gTaAGagCCACaGAagGtGtg
       Rat    (-1.9 upstream)  gTaAGagCCACaGAgtGtGaa

NRSLE2 Mouse  (-1.7 upstream)  aagAGCACCACtGcCAaaGCt
       Human  (-1.7 upstream)  aatAGCACtACtGcCAaatCt
       Rat    (-1.7 upstream)  aagAGCACCACtGcCAaacCt
```

Fig. 2. Alignment of Neural Restrictive Silencer Like Elements among Human, Rat and Mouse. The identical amino acids with the consensus sequence are denoted by capital letter.

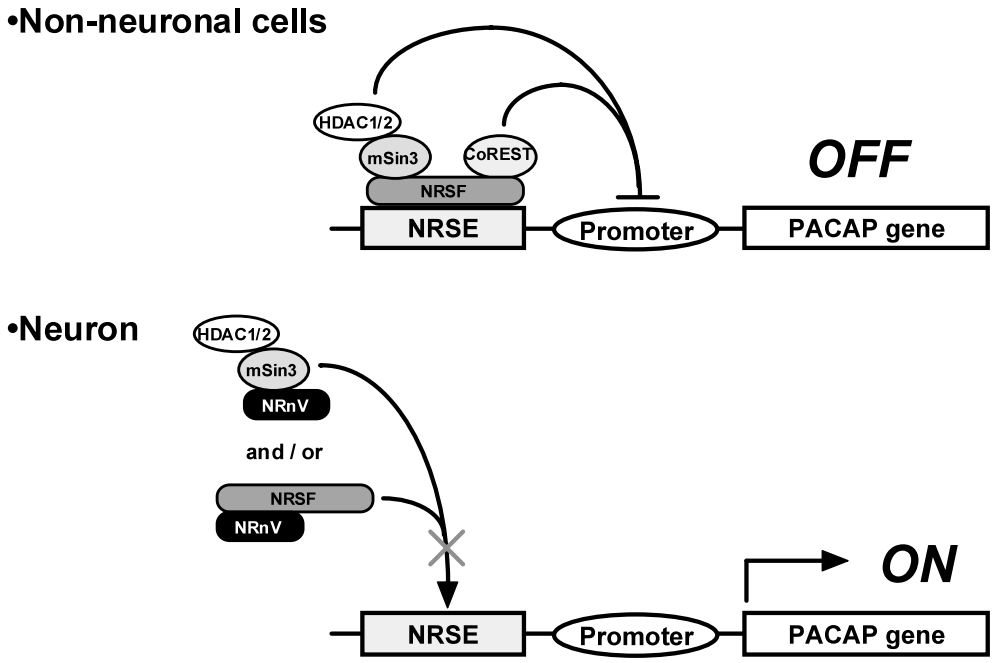


Fig. 4. Proposed Regulatory Mechanism of PACAP Gene Expression by Neural Restrictive Silencer System.
In non-neuronal cells, NRSF suppresses the promoter activity of PACAP gene. In neuronal cells, NRnV, an NRSF truncated form, could produce repression by heterodimer formation with NRSF or by binding the transcriptional co-repressor mSin3, which binds to NRSF.

さらにSV40プロモーターに，PACAP遺伝子のNRSLE1とNRSLE2を含む領域をつなげたルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いた解析において，非神経細胞の3T3細胞では，SV40プロモーター活性の抑制が観察された．また，NGF処理により神経細胞様に分化させたPC12細胞（ラット褐色細胞腫）では，SV40プロモーター活性の抑制は観察されなかった．これらの結果から本エレメントはPACAP遺伝子のプロモーターだけでなくSV40プロモーターをも抑制することができ，さらにその抑制活性の細胞選択性が示唆された．

また，NRSFの神経特異的バリアント，NRnVが，NRSFのドミナントネガティブとして機能し，神経細胞における神経特異的遺伝子の発現に関与することから，非神経細胞株のC6細胞（ラットグリオーマ細胞株），3T3細胞と，神経様に分化させたPC12細胞において，PACAP，NRSF及びNRnVの発現をRT-PCR法を用いて解析した．Fig. 3に示すように，NRSFの発現が，神経細胞，非神経細胞に関係なく観察されるのに対し，NRnVの発現は，PACAPの発現が見られるPC12細胞において観察された．これらのことから，Fig. 4に示すように，PACAP遺伝子の神経特異的発現調節においても，本遺伝子上流に存在するNRSEにおけるNRSFの機能を，NRnVがドミナントネガティブとして阻害する様式で関与することが示唆された．さらに，PC12細胞の未分化及び分化誘導した細胞において，NRSF関連遺伝子群の発現およびNRSLE1，2のサイレンサー活性を解析したところ，分化にともない，PACAP遺伝子発現が増加するとともに，NRnVのmRNAが著名に増加すること，またNRSLE1，2のPACAP遺伝子プロモーターに対する抑制活性が，分化したPC12細胞では減弱することが観察されたことから，PC12細胞の神経様分化に伴うPACAP遺伝子発現に，NRnVの発現が関与することが示唆された（現在投稿準備中）．

5. 終 わ り に

PACAPは，中枢神経系だけでなく末梢にも存在し，多機能神経ペプチドとしての生理作用の多様性が明らかとなってきている．従って内在性PACAPの生合成･分泌動態を解析することにより，PACAPの作用機序の特異性が明らかとなり，中枢神経系における脳血管障害治療あるいは内分泌系における糖尿病治療などといった幅広い臨床的応用への展開が期待される．

引 用 文 献

1) A. Miyata, A. Arimura, R.D. Dahl, N. Minamino, A. Uehara, L. Jiang, M.D. Culler, D.H. Coy, Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 567–574 (1989).
2) A. Arimura, Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems, *Jpn. J. Physiol.*, **48**, 301–331 (1998).
3) M. Hosoya, C. Kimura, K. Ogi, S. Ohkubo, Y. Miyamoto, M. Shimizu, H. Onda, M. Oshimura, A. Arimura, M. Fujino, Structure of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene, *Biochem. Biophys. Acta*, **1129**, 199–206 (1992).
4) S. Ohkubo, K. Ogi, C. Kimura, K. Okazaki, H. Onda, M. Fujino, Expression of the PACAP gene in a human neuroblastoma cell line: cDNA cloning and analyses of the upstream regulatory region, *Endocrine J.*, **2**, 135–145 (1994).
5) 宮田篤郎, 菅原英輝, 岩田真一, 清水隆雄, 寒川賢治, PACAP 遺伝子の神経特異的発現調節機序, 日本薬理学会雑誌, **123**, 235–242 (2004).
6) H. Sugawara, K. Inoue, S. Iwata, T. Shimizu, K. Yamada, N. Mori, A. Miyata, Neural-restrictive silencers in the regulatory mechanism of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene expression, *Regul. Peptides*, **123**, 9–14 (2004).
7) C.J. Schoenherr, A.J. Paquette, D.J. Anderson, Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 9881–9886 (1996).
8) L.B. Hersh, M. Shimojo, Regulation of cholinergic gene expression by the neuron restrictive silencer factor/repressor element-1 silencing transcription factor, *Life Sci.*, **72**, 2021–2028 (2003).