

## 概要

目的： 神経ペプチド pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)は、強力なアデニル酸シクラーゼ活性を指標に発見された。PACAP の組織分布は中枢神経系に多く含まれるが、末梢組織では副腎髄質に多量に存在する。PACAP 受容体は PACAP に特異的な type I と vasoactive intestinal polypeptide (VIP)と共有する type II 受容体が存在し、副腎髄質には type I 受容体が認められている。PACAP の作用はアデニル酸シクラーゼ活性化だけではなく、ホスホリパーゼ C 活性化促進や細胞外  $Ca^{2+}$ 流入作用が知られており、ホルモン分泌、細胞増殖・分化などの多彩な生体反応に関与している。われわれの研究グループでは、PACAP が副腎髄質細胞に対して電位依存性  $Ca^{2+}$ チャネル活性化によるカテコールアミン分泌促進作用を明らかにし、さらに、カテコールアミン合成の律速段階を担う Tyrosine hydroxylase (TH) 遺伝子発現増強効果が cAMP とプロテインキナーゼ C (PKC) のセカンドメッセンジャー経路によることを明らかにしてきた。今回は、PACAP の TH 発現制御機構を解明するために、関連すると思われる初期応答遺伝子の動態と TH 遺伝子 5'-flanking 領域に存在するシスエレメントとの関連について検討した。

対象と方法： PACAP による TH 遺伝子発現の制御機構解明のため、ラット褐色細胞腫由来株化細胞 PC12 を継代培養して以下の実験に供した。

1. 初期応答遺伝子 (*c-fos*, *fosB*, *fra-1*, *fra-2*, *c-jun*, *junB*, *junD*) mRNA 発現量をノーザンブロット分析した。

2. PACAP 刺激 PC12 細胞から核蛋白を抽出し、TH 遺伝子 5'-flanking 領域に存在する TPA responsive element (TRE) ならびに cAMP responsive element (CRE) 配列を持つオリゴヌクレオチドプローブによるゲル移動度シフト分析を行った。

3. 抗 Fos ファミリー, Jun ファミリー, CRE binding protein (CREB) 特異抗体を用いてスーパーシフト分析を行い、DNA-核蛋白複合体の構成蛋白質を特定した。

4. TRE-核蛋白複合体におけるニコチンによる刺激と PACAP との比較検討を行った。

結果： 初期応答遺伝子 *fos*, *jun* ファミリーの発現変化は、PACAP 刺激により *c-fos*, *fosB*, *junB*, *junD* mRNA の発現増強が認められた。時間的には *c-fos*, *fosB*, *junB* は 30~60 分で著しい発現増加があり、その後減少した。*junD* は緩やかに増加し、8 時間後でも持続した発現増強を認め、他の因子とは異なる動

態を示した。

ゲル移動度シフト分析では、PACAP 処理により TRE, CRE プローブと PC12 細胞核蛋白との複合体は時間依存性に増加し、刺激後 2~4 時間で結合活性は最大であった。8 時間後のシフトバンドはさらに移動度が若干シフトする傾向を認めた。

特異的抗体によるスーパーシフト分析では、TRE 結合蛋白は FosB, JunB, JunD の関与が強く c-Fos の関与はわずかであった。刺激後 4 時間では JunB が優位であったが、12 時間では JunD の結合性が増加した。また、CRE 結合性因子としては CREB と JunD の関与が認められた。

ニコチン 10 $\mu$ M で PC12 細胞刺激後、抽出核蛋白と TRE との結合性をゲル移動度シフト分析した。PACAP の作用に比べて結合活性増加は弱く、比較的ゆっくりと増強する傾向であった。スーパーシフト分析では、JunB, JunD の関与が認められ、PACAP と同様の構成であったが Fos 系の関与は認められなかった。また、刺激後時間経過による構成蛋白の変化は確認されなかった。

考察： PACAP は副腎髄質細胞において、カテコールアミン合成酵素遺伝子発現促進を介して長期的なカテコールアミン生合成に関与している。そこで、

TH 遺伝子の発現制御機構を調べるため、PACAP による初期応答遺伝子の動態を、カテコールアミン産生細胞である PC12 細胞を用いて検討した。

*fos*, *jun* ファミリーの発現を分析すると、PACAP 用量依存性に *c-fos*, *fosB*, *junB*, *junD* mRNA の発現増強が認められた。これは、PACAP が cAMP, PKC, Ca<sup>2+</sup> のセカンドメッセンジャー系を同時に活性化するためと思われる。この発現増強は PACAP 刺激後 30~60 分で最大となり以降減少したが、*junD* mRNA はゆるやかに発現増加が続き 8 時間後でも減少を認めなかった。さらに、これら核蛋白の TH プロモーター部に存在する関連シスエレメントモチーフへの結合をゲル移動度シフト分析により確認し、特異的抗体によるスーパーシフト分析で関連蛋白を特定した。*c-Fos* は mRNA 発現増加が著しかったが、TRE, CRE モチーフへの結合活性はわずかであり、DNA-蛋白相互作用ではなく蛋白-蛋白相互作用の存在が示唆された。Jun 系では JunB と JunD が関与したが、mRNA の動態と同様に、結合活性に時間的差異が認められた。JunD は遺伝子発現抑制的作用も報告されており、TH 遺伝子発現制御において、JunB と JunD は異なる作用を持つことが考えられる。CRE への結合因子は CREB と JunD が関与していたが、ゲル移動度シフト分析により 3 本のシフトバンドの存在が示唆され、さらに異

なる因子の関与も疑われた。

カテコールアミン分泌・合成の調節機構であるアセチルコリンニコチン作動性受容体を介するストレス性の刺激と比較するため、ニコチン刺激を行い TRE-核蛋白結合性を調べた。PACAP の効果と比較して結合活性増強は弱く、時間的变化も異なったことから、アセチルコリンによる TH 遺伝子発現調節は PACAP による経路とは異なる機構で作用していることが示唆された。

結論： PACAP は PC12 細胞に対して初期応答遺伝子 *fos*, *jun* ファミリー mRNA の発現を用量・時間依存性に増加させた。翻訳後の初期応答遺伝子蛋白は TH 5'-flanking 領域に存在する TRE・CRE 配列に結合し、その作用は PACAP 刺激時間依存的に増加した。ゲル移動度シフト分析の結果、TRE 結合蛋白は JunB の結合性が強く、また、JunD の結合性が経時的に増加する傾向を認めた。また、CRE への核蛋白結合活性も PACAP により増加し、CREB および JunD の少なくとも 2 種類の核因子の関与が認められた。すなわち PACAP によって発現増強した初期応答遺伝子は TH 遺伝子の転写調節因子として作用し、カテコールアミン合成を促進する機序が示唆された。また、PACAP による効果はニコチンの作用よりも迅速かつ強力であり、カテコールアミン産生細胞に対して PACAP は

アセチルコリンによる調節とは独立した機構で作用することが示唆され、短期的なカテコールアミン分泌促進だけでなく、長期的なカテコールアミン合成系に重要な生体成分であると思われる。