

Ⅲ. 結果

1. PC12 細胞における PACAP の *fos*, *jun* mRNA 発現作用

1-1. 経時的変化

PC12 細胞において、PACAP が初期応答遺伝子 *fos*, *jun* ファミリー発現におよぼす効果を見るためノーザンブロット分析を行った。

PACAP 3 nM で刺激した後、経時的な変化が認められた。刺激直後では、*fos*, *jun* ファミリーすべての mRNA は極わずかに発現しているにすぎなかったが、*c-fos*, *fosB*, *junB* は刺激後 30~60 分で著しい発現増加 (basal レベルの 3~90 倍) のピークを認めた。*junD* は緩やかに発現増加し、2 時間で約 2.5 倍となり 8 時間後も増加が持続していた (Figure 5 A, B)。しかし、*fra-1*, *fra-2* および *c-jun* mRNA の発現増加は認めなかった (data not shown)。

1-2. PACAP 用量依存性

初期応答遺伝子 *fos*, *jun* ファミリー、*c-fos*, *fosB*, *junB*, *junD* mRNA の発現増強効果は、PACAP 用量依存的に変化した。

c-fos, *junB* mRNA は PACAP 0.1 nM という低い濃度で発現増加が起こり、*fosB*, *junD* は PACAP 濃度感受性がやや鈍い傾向を示した (Figure 6 A, B)。

2. TRE (AP-1) 配列と PC12 核蛋白との相互作用

2-1. TH-TRE (AP-1) モチーフのゲル移動度シフト分析

PACAP により発現増強した初期応答遺伝子が翻訳後にとる動態を調べるため、Fos/Jun 複合体の転写因子 AP-1 が結合する TRE モチーフを用いたゲル移動度シフト分析を行った。

ラット TH 5'-flanking 領域の TRE 配列を持つ標識オリゴヌクレオチドプローブと、PACAP 刺激 (3 nM) した PC12 細胞核蛋白との結合が生じ、核蛋白を添加しない状態のフリープローブと比較して移動度が遅れたバンド形成が認められた。DNA-核蛋白の結合活性は、PACAP 未刺激時と比較して明らかに増強した。DNA-核蛋白結合量は経時的に変化し、PACAP 刺激後 2~4 時間で最大であったが、8~12 時間後においても DNA-核蛋白結合量の著しい減弱は起きなかった。また、刺激後 8 時間においては 4 時間と比較して、シフトバンドの移動度が若干速くなる傾向を認めた (Figure 7 A)。

PACAP 刺激後に現れた DNA (TRE)-核蛋白結合活性の特異性を確認するため、過剰の非標識 TRE オリゴヌクレオチドプローブを添加し競合反応を行った。非標識プローブの添加量を増やすと、標識 DNA-核蛋白複合体バンドの減弱が認

められ結合の特異性を確認した (Figure 7 B)。

2-2. 特異抗体を用いた TRE (AP-1) プローブスーパーシフト分析

DNA-核蛋白複合体を形成する蛋白種を特定するため、Fos, Jun ファミリーに対する特異抗体を用いてスーパーシフト分析を行った。PACAP 刺激後の PC12 細胞核蛋白と DNA (TRE)-核蛋白複合体に抗体が結合することにより、バンド移動度がさらに遅くなる。

抗 c-Fos, FosB, JunB, JunD 抗体によりスーパーシフトバンドが認められた。しかし、mRNA 発現増加に比較すると c-Fos の関与は極わずかであった。PACAP 刺激後 4 時間にくらべ 12 時間では JunD の結合が増加する傾向を認めた (Figure 8)。

3. CRE 配列と PC12 核蛋白との相互作用

3-1. TH-CRE モチーフのゲル移動度シフト分析

PACAP は強力なアデニル酸シクラーゼ活性化作用を持ち、cAMP 産生をもたらす。その cAMP 経路が TH mRNA 発現を促進する (50) ことから、CRE モチーフへの核蛋白相互作用をゲル移動度シフト分析により確かめた。

PACAP 刺激後、時間依存性に DNA (CRE)-核蛋白結合活性は変化し、刺激後 4~8 時間で最大となった (Figure 9 A)。

過剰の非標識 CRE プローブを用いた競合反応によって、標識 DNA-核蛋白複合体バンドは減弱・消失し、結合バンドの CRE モチーフ特異性が確認できた (Figure 9 B)。

3-2. 特異抗体を用いた CRE プローブスーパーシフト分析

DNA (CRE)-核蛋白複合体を形成する蛋白種を特定するため、Fos, Jun ファミリーおよび CREB に対する特異抗体を用いてスーパーシフト分析を行った。

CRE-核蛋白複合体においては、Fos ファミリー因子の関与は認められなかったが、抗 JunD 抗体によりスーパーシフトしたバンドがみられ、JunD の結合関与が認められた。また、抗 CREB 抗体を用いたときには、移動度の最も速いシ

フトバンドの結合活性が減弱し、このことは抗体により CREB の CRE への結合が阻害されることを意味しており、CREB の関与が確認された (Figure 10)。

3-3. TRE と CRE の交差反応

TRE, CRE コンセンサス配列は類似した配列を持つため、TRE (AP-1) 結合複合体の非標識 CRE プローブによる競合反応と、CRE 結合複合体の非標識 TRE (AP-1) プローブによる競合反応により反応の交差性を調べた。

TRE 複合体は非標識 CRE プローブ添加により結合阻害は受けなかったが、CRE 複合体は非標識 TRE (AP-1) プローブ添加により結合活性が阻害された (Figure 11)。

4. ニコチン作用との比較

PACAP とニコチンの作用を比較するため、ニコチンの最大効果濃度 $10 \mu\text{M}$ で PC12 細胞を刺激した後の抽出核蛋白で TRE (AP-1) のゲル移動度シフト分析を行った。ニコチンの場合も時間依存性に TRE (AP-1) 結合活性は増強したが、PACAP の作用に比較して弱い増強作用であり、持続的な結合活性増加の傾向を認めた (Figure 12 A)。

また、スーパーシフト分析では、JunB, JunD の関与が示され、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 (Figure 12 B)。

TRE (AP-1) モチーフへの PC12 細胞核蛋白の結合活性について、PACAP とニコチンの効果をグラフで比較すると、Figure 12 C に示したように結合活性強度と経時的変化に差異が認められた。