

## 論 文 要 旨

### Characterization of the testis-specific promoter region in the human Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) gene.

ヒト Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) 遺伝子の精巣特異的プロモーター領域の解析

富永 愛子

#### 【序論および目的】

PACAP は精巣において脳に匹敵する濃度で存在しており、その発現は精子形成ステージ特異的に制御されている。更に 2000 年、ラット精巣において、PACAP 遺伝子翻訳開始点から 13.5 kb 上流に新規の精巣特異的エクソンが同定された(Daniel et al., 2000)。このことから PACAP 遺伝子には精巣特異的なプロモーターが存在し、それが精子形成サイクルにおいて高度に制御されていることが示唆される。しかしそのメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。従ってこれらのメカニズムを明らかにするため、ヒトにおける PACAP 遺伝子の精巣特異的プロモーターの解析を行った。

#### 【材料および方法】

- ヒト精巣 cDNA を用いて、RT-PCR と 5'-RACE により、ヒト PACAP 精巣特異的エクソンとその転写開始点を解析、またそれを含む転写物の構造解析を行った。
- 精巣特異的エクソン上流域 1176 bp について、レポーターベクターを作製し、Dual-luciferase assay により、マウス精巣由来細胞 F9 におけるヒト PACAP 精巣特異的プロモーターの解析を行った。
- Gel shift assay により、F9 細胞においてプロモーター活性を示した領域に結合する F9 細胞核タンパク質の解析を行った。
- DNA affinity chromatography により F9 細胞でプロモーター活性を示した領域に結合するタンパク質を精製し、Mass spectrometry によりそれらの結合タンパク質を同定した。
- siRNA を用い結合タンパク質をノックダウンし、それによるプロモーター活性への影響を Dual-luciferase assay により評価した。

## 【結果】

- ヒト精巣において、PACAP 遺伝子の精巣特異的エクソンを翻訳開始点から約 10.9kb 上流に同定し、そのエクソンを含む転写物の発現を確認した。一方ヒト脳では確認されなかった。精巣特異的転写物の構造は、脳などに見られるエクソン 1, 2 を含まず、イントロン 2 に繋がっていた。この配列から予測されるアミノ酸配列は、シグナルペプチドを含まないことが推測された。
- F9 細胞において、特異的にプロモーター活性を示す 80bp のコアプロモーター領域を同定した。この領域には GATA と AML-1a が結合することが予測されており、これらの結合配列にポイントミューテーションを入れ、プロモーター活性への影響を評価したところ、GATA 結合配列の変異は影響しなかったが、AML-1a 結合配列に変異を入れることによりプロモーター活性が減少した。
- 同定したコアプロモーター領域 80bp と F9 細胞核タンパク質との結合を確認した。プロモーター活性には、推定上の AML-1a 結合配列が必要であったが、結合においては AML-1a タンパク質は関与しなかった。
- 結合タンパク質を精製し、40kDa と 119kDa に位置するタンパク質をそれぞれ TIAR と PARP-1 と同定した。
- PARP-1 のノックダウンにより、F9 細胞における 80bp のプロモーター活性が抑制され、TIAR のノックダウンにより促進された。

## 【結論及び考察】

ヒトにおいて、PACAP 遺伝子の精巣特異的転写物が産生され、その転写物からシグナルペプチドを含まない非分泌型の PACAP 前駆体が産生されることが示唆された。このことは近年提唱された”intracrine”を支持する(Li et al., 2004)。“intracrine”とは細胞内においてリガンドとレセプターが結合し作用する機序であり、彼らは精巣生殖細胞において PACAP が細胞内の受容体に直接作用していることを報告している。従って、本研究で明らかにした精巣特異的転写物が非分泌型 PACAP 前駆体を産生し、直接細胞内受容体に結合することが推測される。

本研究では、精巣由来細胞において顕著なプロモーター活性を示す 80bp のコアプロモーター領域を同定した。そしてその領域に特異的に結合するタンパク質として PARP-1 と TIAR を同定した。PARP-1 のタンパク質をノックダウンすることにより 80bp のプロモーター活性が抑制されたことから、PARP-1 がプロモーター活性に促進的に作用するエンハンサーとして働いていることが示唆された。しかし PARP-1 はエンハンサーとしての機能の報告はあるものの、組織特異性を持たないことから、組織特異性を有する因子と相互作用し、機能していることが考えられる。一方、TIAR のタンパク質をノックダウンすると、80 bp のプロモーター活性は上昇したことから、80bp に対し抑制的に働くことが示唆された。TIAR については、精子形成に対する作用が多く報告されており、そのことからこのタンパク質が組織特異性を有し、特異的に 80bp の領域に結合し遺伝子発現調節に関与していることが示唆される。この抑制作用に関しては、更なる解析が必要である。80bp のプロモーター活性に影響するこれらのタンパク質 PARP-1 と TIAR が、精巣特異的 PACAP 遺伝子発現の制御メカニズム解明への大きな鍵となることが期待される。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 103 号		学位申請者	富永 愛子
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学)
	副査	乾 明夫	副査	秋山 伸一
	副査	武田 泰生	副査	原口 みさ子

### Characterization of the testis-specific promoter region in the human Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) gene.

(Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) 遺伝子の精巣特異的プロモーター領域の解析)

PACAP は脳に匹敵する濃度で精巣に多く発現しており、ライディッヒ細胞からのテストステロンの分泌誘導、生殖細胞における分泌タンパク質合成制御などの生理作用が報告されている。更にはラット精巣において PACAP 遺伝子の翻訳開始点から約 13.5kb 上流に精巣特異的エクソンが存在し、それを含む転写物が精子形成ステージ特異的に制御されていることから、PACAP 遺伝子には精巣特異的に機能するプロモーターの存在が示唆される。そこでこの制御メカニズムを解明するため、本研究ではヒト PACAP 遺伝子の精巣特異的プロモーターの解析を行った。学位申請者らは、ヒト精巣 cDNA を用い、5'-RACE 法により精巣特異的エクソンとその転写開始点を同定し、精巣特異的エクソンを含む転写物の構造解析を行った。またヒト精巣特異的エクソン上流域のプロモーター領域をマウス精巣由来細胞 F9 を用いて luciferase assay により解析した。それにより同定されたプロモーター領域に結合するタンパク質の存在を gel shift assay により確認し、その結合タンパク質を DNA affinity chromatography により精製、Mass spectrometry により同定を行った。同定したタンパク質の特異性を検討するため、siRNA を用いてノックダウンし、プロモーター活性に対する影響を luciferase assay により確認した。

その結果、以下のような知見が得られた。

- ・ ヒト精巣において翻訳開始点から約 10.9kb 上流に、PACAP 精巣特異的エクソンを同定し、それを含む転写物は、脳とは異なり、予測されるアミノ酸配列からはシグナルペプチドを含まないことが推測された。
- ・ F9 細胞において活性を示すプロモーター領域である 80bp を同定し、その領域と核タンパク質との結合を確認した。またその結合タンパク質として PARP-1 と TIAR を同定した。これらタンパクをノックダウンすると、80bp のプロモーター活性が変化した。

ヒト精巣において、シグナルペプチドを含まない PACAP を産生、つまり非分泌型の PACAP が産生されることが示唆され、このことは PACAP が "intracrine" として細胞内にて受容体と結合し作用するという報告(Li et al., 2004)を支持する。また本研究で同定したプロモーター領域 80bp に結合することにより、PARP-1 と TIAR が PACAP 遺伝子を精巣特異的に発現調節していることが示唆される。

本研究は、ヒト PACAP 遺伝子の精巣特異的エクソン及びプロモーター領域について解析したものであり、精巣における生殖細胞の発生、分化、機能維持における PACAP の生理的意義の解明にせまる知見であり、大変興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第103号		学位申請者	富永 愛子
審査委員	主査	小澤 政之	学位	博士 (医学)
	副査	乾 明夫	副査	秋山 伸一
	副査	武田 泰生	副査	原口 みさ子

主査および副査の5名は、平成22年3月4日、学位申請者 富永 愛子 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) EMSAにより検出された2本のバンドはPARP-1及びTIAR由来か。

(回答) これらのタンパク質とコアプロモーター領域との結合について直接的な検証は、抗体の入手困難により確認はできていない。しかし、PARP-1及びTIARタンパク質のノックダウンがプロモーター活性に影響していることから、コアプロモーターと相互作用していることが示唆される。

質問2) 通常の転写物から産生されるペプチドとTSEを含む転写物から産生される最終的なペプチドは同じものか。また非分泌型PACAPは実際に機能するのか。

(回答) PACAP前駆体がシグナルペプチドの有無の違いがあるので、分泌型か非分泌型かの違いが出てくることが考えられるが、どちらの転写物からも生物活性を有するPACAP38が産生されることが示唆される。また生物活性型PACAPを認識する抗体を用いた免疫活性では、精巣におけるPACAPの量は脳に匹敵することが報告されている。本研究において、mRNAレベルではあるが、精巣における分泌型PACAPを産生する転写物が、脳での発現の2/3程度であったことから、この残りの1/3が非分泌型のPACAPを産生することが示唆される。

質問3) TSEが翻訳部位から10.9kbも離れているのはなぜか。

(回答) おそらく脳などに見られる分泌型ではなく非分泌型のPACAPを生合成するために、脳とは異なる発現調節機構が必要なためであると考えられる。また10.9kbの長さは例外的ではなく、例として同じペプチドファミリーであるGHRHにおいても第一エクソンが10kb離れたバリエーションが存在する。

質問4) TIARはPACAPの発現を抑制し、精子形成を亢進しているのか。また脳などで機能するプロモーターには結合するのか。

(回答) TIARは、コアプロモーター領域に結合するタンパク質として精製し同定している。本研究ではTIARのノックダウンによりTIARが抑制的に働くことが確認されたが、ノックダウンしていないF9細胞においてコアプロモーター活性が十分に高いことから、その抑制作用よりもTIARが持つ組織特異性が重要であると考えられる。このTIARはコレギュレーターとして組織特異性を決定する因子であることが示唆される。脳などで機能するプロモーター領域への結合は今後検証しなければならない。

質問5) 精巣では精子形成時にPACAPが発現しているか。

(回答) PACAPは精子形成サイクルの特異的ステージ、成熟後期に近い精子細胞における発現が報告されている。

質問6) イントラクリンする因子は他にも存在し、イントラクリンが精巣以外の組織でも見られる機序か。

(回答) イントラクリンについては良くまだ分かっていない点が多く、細胞内の分泌顆粒あるいはリソソームなどの分解顆粒以外の細胞内小器官に存在し、細胞内で作用する増殖因子や多くのペプチドホルモンが作用することが報告されており、厳密な定義はない。

## 最終試験の結果の要旨

質問7) PACAP のイントラクリンについて、シグナルはリガンドとレセプターどちらの量に依存しているのか。またシグナルペプチドを持たないペプチドが実際に細胞質内でプロセッシングされるのか。細胞質内レセプターの構造はどうなっているのか。

(回答) PACAP とそのレセプターの発現は、精子形成過程のステージ特異的に発現しており、その発現ステージも PACAP とレセプターが同調していることが報告されている。このことから PACAP とそのレセプターが、同時期に発現が増加し、シグナルに影響していることが示唆される。精巣においては脳とは異なり、精巣に特異的に発現する酵素 PC4 により、PACAP はプロセッシングされる。しかし、シグナルペプチドがない PACAP 前駆体が実際にプロセッシングされるかは不明であり、今後分泌型と非分泌型の PACAP を産生するプロセッシング酵素が同一の物なのか、そしてどういうプロセスを経て活性型 PACAP が産生されるのか更なる解析が必要である。レセプターの構造については、膜結合型の PAC1 レセプターの C 末端を認識する抗体により、細胞質中に免疫活性を示す PAC1 様タンパクが確認されるが、そのサイズは膜結合型のレセプター (ヘテロ三量体 G タンパク型レセプター) とは異なることが報告されている。また膜結合型の PAC1 レセプターはアデニル酸シクラーゼを活性化させるのに対し、細胞質中の可溶性レセプターと PACAP の結合は MAPK を刺激することも報告されている。このことから膜結合型と細胞質中のレセプターは、異なるものであることが示唆される。

質問8) PARP-1 と TIAR の精巣における発現時期はいつか。また PARP-1 と TIAR はコアプロモーター領域に対し直接的に結合するのか。非特異的な結合ではないのか。

(回答) PARP-1 はコピキタスなタンパク質であるため、組織特異性を持っておらず、精巣での発現時期の特異性も有していないことが考えられる。一方 TIAR に関しては精巣への特異性を有していることが示唆されるが、精子形成過程における発現時期に関しては報告されていない。また結合については、DNA と直接的に、あるいは介在タンパクを介した結合かは特定できないが、PARP-1 と TIAR のノックダウンが、コアプロモーター活性に対し影響していることから、足場となる介在タンパクとして、あるいは発現の増減を調節するレギュレーターとして、コアプロモーター活性には必要なタンパク質であることが示唆されている。

質問9) TSE 上流域約 1.2kb の下流の方のサイレンサーと、本研究で同定したプロモーターとのバランスにより、実際は発現調節しているのではないか。

(回答) 実際の発現には、組織特異的にサイレンサーが解除される必要があり、本研究で同定したプロモーターが組織特異的に活性化されて発現を促すことが示唆される。従って、組織特異的に制御されているのは、プロモーター領域だけではなく、サイレンサーの領域も必要であり、そのバランスが重要であることが考えられる。

質問10) AML-1a 結合配列に変異を入れたレポーターベクターで転写活性が消失するが、EMSA で AML-1a のコンセンサス配列にて競合反応が生じないのはなぜか。

(回答) 80bp のコアプロモーターにおける AML-1a が結合すると予測されている配列は、コンセンサス配列とわずかに異なる。EMSA にてコンセンサス配列により競合しなかったのは、AML-1 が関与しなかったため、配列の変異により転写活性が消失したのは、コンセンサスとはわずかに異なる配列が、結合に重要であるためと考えられる。

質問11) なぜ F9 細胞だけではなく NEC14 細胞でも検討しなかったか。

(回答) F9 細胞が NEC14 細胞よりも安定的で高い活性を得ることができ、且つ培養面においても扱い易かったため。勿論本来ならば正常の生殖細胞を使用し検討しなければならない。

質問12) PACAP の発現は PARP-1 や TIAR のノックダウンで抑制されるか。

(回答) PACAP を発現している精巣由来細胞における検討が難しいため、本研究では実際には PACAP を発現していない細胞を用いている。今後これらのノックアウト動物を得て in vitro において検討したい。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。