

論 文 要 旨

Sp1 is involved in not only positive but also negative expression of PAC1 gene

Sp1 は PAC1 遺伝子の正と負の発現調節に関与する

三 浦 綾 子

【序論および目的】

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)は、宮田らによりラット下垂体細胞の cAMP 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、主に中枢神経系に分布し、ニューロトランスマITTER、ニューロモデレーターとしての機能の他、神経栄養因子としての作用が注目されている。PACAP の受容体は、3 種類(PAC1・VPAC1・VPAC2)がクローニングされ、いずれもロドプシンスーパーファミリーに属する G 蛋白質共役型受容体である。

当研究室では、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12 細胞で Nerve Growth Factor(NGF)刺激後、NGF は PACAP や PAC1 の発現を増強させること、PACAP は、ER ストレス因子である糖鎖合成阻害薬(Tunicamycin;TM)より分化 PC12 細胞で保護作用を示すことを報告している。

本研究では、NGF による神経様分化における PAC1 の発現増強と虚血誘導による小胞体(ER)ストレスにおける PAC1 の発現抑制メカニズムの解明を目的とした。

【材料および方法】

1. 細胞 ; ラット副腎髄質由来褐色細胞腫 PC12 細胞、マウス神経芽細胞腫 Neuro2a 細胞、マウス primary 皮質神経細胞
2. mRNA 発現 ; real-time PCR 法、RT-PCR 法
3. タンパク質発現確認 ; Western blotting 法
4. プロモーター活性の測定 ; Dual-luciferase reporter assay 法
5. Sp1 の結合配列の解析 ; Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)法
6. TG2, CLSp1 の発現確認 ; Immunocytochemistry 法
7. TG2 発現抑制 ; TG2 特異的 siRNA トランスフェクション
8. 統計学的解析 ; Student's t-test、Tukey's test

【結 果】

<正の発現調節機序 -NGF による PAC1 の発現増強メカニズムの解明->

1. PAC1 のプロモーター活性を調べるために 8 つの長さの異なる 5'上流領域を組み込んだ Luciferase reporter vector (hPIL-1~hPIL-8)を作製した。これらの NGF (50ng/ml, 24hr)によるプロモーター活性は、hPIL-1 から hPIL-5 まで有意に増強していた。

2. hPIL-5 の 5 つの Sp1 サイトへ点変異を挿入したレポーターベクター(5mut1~5mut5)を作製した。これらの NGF によるプロモーター活性増強は、5mut2 では消失していた。よって、5mut2 の位置に存在する-282/-273bp は、NGF による PAC1 の発現増強に関与することが示唆された。
3. -282/-273bp を含むプローブを用いて EMSA を行ったところ、PC12 細胞の核抽出物と特異的に結合することを確認した。よって、この配列は、Sp1 結合配列であることを確認した。
4. NGF 刺激は、Sp1 のタンパク質発現を増強させた。
5. NGF の受容体である TrkA の下流に存在する MEK の阻害剤、U0126 (10 μ M, 24hr)及び、Sp1 DNA 阻害剤である MithramycinA (50nM, 24hr)は、hPIL-5 の NGF による発現増強を有意に阻害した。

<負の発現調節機序 -虚血誘導による ER ストレスにおける PAC1 の発現抑制メカニズムの解明->

1. Oxygen-glucose deprivation(OGD)虚血 6 時間、及び ER ストレス誘導剤 Tunicamycin(0.5 μ g/ml, 24hr)により、PAC1 の発現減少及び細胞死を誘発した。
2. OGD 虚血により ER ストレスが誘導されていることを確認した。
3. ER ストレスの阻害剤である Salubrinal(50 μ M)により OGD 虚血による PAC1 の発現抑制、及び細胞生存率を回復させた。
4. Luciferase assay により hPIL-5 に含まれる Sp1 が ER ストレスによる PAC1 発現抑制に関与することが示された。
5. ER ストレスの下流で、Transglutaminase2(TG2)の発現が細胞質及び、核内で上昇していることを western blot 及び、免疫染色により確認した。この発現上昇は、TG 活性阻害剤である Cystamine(500 μ M)や Salubrinal により阻害された。
6. 核内に蓄積した TG2 により Sp1 が架橋(Crosslinked Sp1;CLSp1)され、PAC1 の発現抑制に寄与していることを免疫染色にて確認した。
7. TG2 の siRNA を用いたノックダウンにより PAC1 の発現が維持されていることを確認した。

【結論及び考察】

正の調節機序として、PC12 細胞における NGF による PAC1 発現増強を確認し、TrkA 受容体を介して、Ras/MAPK 経路による Sp1 の活性化が PAC1 遺伝子の神経特異的発現調節機序に関与することを同定した。MEK 阻害剤によるプロモーター活性抑制の結果は、NGF による PAC1 の発現増強には Ras/MAPK 経路が関与するという以前の報告と一致している。さらに、Sp1 DNA 阻害剤によるプロモーター活性抑制の結果は、Sp1 が神経突起伸長に関与すること、NGF により Sp1 の DNA 結合が上昇するという以前の報告と一致している。

負の調節機序として、*in vivo* 全脳虚血による PAC1 の抑制が報告されていたが、そのメカニズムは解明されていなかったため、Neuro2a 細胞やマウス primary 皮質神経細胞を用いて PAC1 発現抑制機序の解明を行った。Neuro2a 細胞における OGD 虚血誘導による ER ストレス経路を介して TG2 の核内への蓄積による Sp1 の架橋体の形成により PAC1 の Sp1 配列に結合できなくなったことが、PAC1 の発現抑制に繋がることを初めて明らかにした。これらの結果は、虚血による TG2 の発現上昇が梗塞層を増悪させるという以前の報告と一致している。さらに、Sp1 は細胞保護的に働くことが報告されており、Sp1 が架橋されることによりこの効果が失われていることが示唆された。また、ER ストレスによる CLSp1 の形成の報告はアルコール性肝疾患でのみ報告されていたが、神経系での報告は初めてである。

よって、PAC1 の正と負の発現調節機序において、転写因子 Sp1 が中心的な役割を果たしており、その活性化と不活性化において PAC1 がダイナミックに生体応答して発現変動していることを明らかにした。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 233 号	学位申請者	三浦 綾子
審査委員	主査	武田 泰生	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	古川 龍彦	副査 堀内 正久
	副査	浅川 明弘	副査 原口 みさ子

Sp1 is involved in not only positive but also negative expression of PAC1 gene (Sp1はPAC1遺伝子の正と負の発現調節に関与する)

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)は、ヒツジ視床下部より単離、構造決定された神経ペプチドで、血管作動性腸管ペプチド (VIP)と高い相同性を示し、セクレチン・グルカゴンファミリーに属する。PACAP の受容体には、PACAP 特異的な PAC1、VIP と共有する VPAC1、VPAC2 の3種類が存在する。PACAP は、中枢神経系においては非アドレナリン性、非コリン性の主に 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、血管拡張およ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レーターとして機能している。また、神経保護作用あるいは神経栄養因子としての作用が注目されている。同研究室では、PC12 細胞において、NGF が PACAP と PAC1 の発現を増強することを報告している。さらに、in vivo 虚血により、PAC1 遺伝子の発現が抑制されることが報告されている。しかしながら、神経系における PAC1 の正と負の発現調節メカニズムの詳細については明らかにされていない。そこで学位申請者らは、神経栄養因子(NGF)による PAC1 の正の発現調節メカニズムと虚血に誘導される小胞体(ER)ストレスによる PAC1 の負の発現調節メカニズムの解明を試みた。神経細胞株(PC12 細胞、Neuro2a 細胞)やマウス初代培養皮質神経細胞を用いて、real-time PCR や RT-PCR 法による mRNA 発現解析、Western blotting 法によるタンパク質検出、Dual-luciferase reporter assay 法を用いたプロモーター活性の測定、Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)法による結合配列解析、transglutaminase2 (TG2)の発現や crosslinked Sp1 (CLSp1)の形成を検出するための免疫細胞染色、siRNA を用いた TG2 特異的ノックダウンによる解析を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

<正の発現調節メカニズム>

- 1) NGF 刺激により、PAC1 の mRNA 及びタンパク質発現は増強した。
- 2) 点変異挿入されたレポーターベクターによる Luciferase assay により、-282/-273bp に存在する Sp1 サイトが NGF による PAC1 の発現増強に関与することが示唆された。
- 3) EMSA により、-282/-273bp は Sp1 結合サイトであることを確認した。
- 4) NGF による PAC1 の発現増強は、MEK 阻害剤 (U0126)実験により、Ras/MAPK 経路を介していることを確認した。

<負の発現調節メカニズム>

- 1) In vitro 虚血(Oxygen-glucose deprivation;OGD)誘導における ER ストレスにより、PAC1 の mRNA 及びタンパク質発現は減少した。
- 2) 欠失変異レポーターベクターによる Luciferase assay により、Sp1 サイトが Tunicamycin (ER ストレス誘導体)による PAC1 の発現抑制に関与することが示唆された。
- 3) OGD 虚血により、核内での TG2 の発現・活性増強が Sp1 の架橋体形成に関与することが示唆された。
- 4) Sp1 の架橋体形成は、Salubrinal (ER ストレス阻害剤)や Cystamine (TG 活性阻害剤)により抑制された。
- 5) TG2 のノックダウンにより CLSp1 の形成、細胞死、PAC1 の発現抑制が解除された。
- 6) マウス初代神経細胞においても、OGD 虚血による TG2 の発現増強、CLSp1 の形成、PAC1 の発現抑制を認めた。

以上の結果より、NGF 刺激による PAC1 の正の発現調節機序として、Ras/MAPK 経路を介した、Sp1 の活性化が主経路であること、さらに、OGD 虚血誘導における ER ストレスによる負の発現調節機序として、PERK 経路の下流で TG2 が核内に蓄積し、活性化することで Sp1 を架橋して、不活性化することが主経路であることを明らかに示したという点で、これらは学術的に非常に興味深い。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 233 号	学位申請者	三浦 綾子
審査委員	主査	武田 泰生	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	古川 龍彦	副査 堀内 正久
	副査	浅川 明弘	副査 原口 みさ子

主査および副査の5名は、平成25年2月15日、学位申請者 三浦 綾子 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) Sp1 DNA inhibitor (Mithramycin A)はどのような作用機序で働くのか。また、Mithramycin A では、hPIL-5 の NGF による発現増強が完全には抑制されていないのはどうしてか。

(回答) Mithramycin A は、DNA の GC 配列が豊富な部位に結合し、Sp1 タンパク質の結合を阻害する。Ras/MAPK 経路の他に PLC 経路があり、PLC 阻害剤 U73122 の添加により PAC1 のプロモーター活性は上昇することから、PLC 経路の負に働く作用が影響していると考えられる。

質問2) TG2 の核内移行機序、さらに、Sp1 の架橋化はどのようにして形成されるのか。また、架橋 Sp1 に対する抗体はどの部位を認識しているのか。また、架橋 Sp1 の分子量はどのくらいか。

(回答) TG2 はタンパク質のグルタミン-リシン残基間に共有結合を形成する翻訳後架橋酵素である。TG2 の核-細胞質移行シグナルにスイッチが入ることにより核内へ移行し、この移行シグナルが排除された shortTG2 が核内に蓄積することが示唆されている。グルタミン残基を多く持つ Sp1 は、反応性の高い基質として、架橋され CLSp1 を形成している。また、抗体は架橋された Sp1 を抗原としてウサギに投与し、ウサギから採取した架橋 Sp1 抗体画分から Sp1 結合担体を用いた精製により未架橋 Sp1 を認識する抗体を除去することにより作製されたものである。単量体の Sp1 抗体は 106kDa 分子を認識するが、架橋 Sp1 抗体は 450kDa 以上の CLSp1 を認識するように作製されている。

質問3) TG2 の二面性について議論しているが、生存または細胞死に関与する時に TG2 の動態は変化するのか。

(回答) TG2 は生体構造の構築や安定化を行う一方、細胞の増殖・分化、アポトーシスに働き、多様な生命現象、さらには動脈硬化、肝疾患、神経変性疾患など、様々な病態形成に深く関係している。TG2 には架橋活性のほかに GTPase 活性、リン酸化活性、インテグリン細胞接着活性があり、通常の高濃度 Ca^{2+} (10-20nM) の存在下では GTPase 活性(G タンパク複合体の構成成分である $G\alpha h$ として働く)を示し、細胞が障害を受けて高濃度 Ca^{2+} (700-800nM) 存在下になると、架橋活性の活性中心が露出し、架橋酵素として働くことが報告されている。

質問4) cck-8 assay とはどのような原理のものか。さらに、cck-8 は虚血条件でも使用できるのか。

(回答) Cell Counting Kit-8 (Dojindo) は細胞増殖または化学物質の感受性試験において、新規テトラゾリウム塩 WST-8 を発色基質として、細胞内脱水素酵素により還元され、生成される水溶性のホルマザンの吸光度を直接測定することにより、生細胞数を評価することができる。虚血誘導生細胞死を測定する目的で、cck-8 Kit を用いた論文は数多く発表されているので、使用可能であると考えられる。

質問5) Cystamine は TG 活性阻害剤であるが、TG2 の活性のみならず TG2 発現を抑制しているのはなぜか。

(回答) ヒトでは9つの TG 遺伝子が同定され、TG アイソフォームの活性阻害剤として Cystamine は幅広く使用されている。数多くの論文で、Cystamine による TG2 発現の抑制は報告されているが、未だに発現抑制メカニズムは解明されていない。神経系における Cystamine による核内の TG2 発現抑制は報告が少ないことから、Cystamine の TG2 阻害剤としての有用性を強固にするものと考えられる。

質問6) Sp1 はリン酸化されて機能するが、架橋された Sp1 はリン酸化されているのか。

(回答) 架橋体 Sp1 はリン酸化されていることが確認されているが、このリン酸化が Sp1 の転写誘導に正に働くのか負に働くのかは未だに解明されていない。

質問7) PAC1 発現の正と負の制御で用いた細胞の種類をなぜ変更したのか。また、Neuro2a 細胞でも NGF による PAC1 の発現増強は認められるのか。

(回答) 正の発現調節機序の解明には、PC12 細胞、負の発現調節機序の解明には Neuro2a 細胞を用いた。PC12 細胞では NGF を添加することで PAC1 を安定的に発現できるが、発現上昇させたものをさらに Tunicamycin にて減弱させると Luciferase assay の結果が安定しなかった。さらに、Neuro2a 細胞は PACAP を発現していないため、抑制メカニズムの検討を行うのには最適であると考えたためである。また、Neuro2a 細胞における NGF による PAC1 の発現増強、神経突起伸長を認めている。

質問8) 負の発現調節機序の図6の Luciferase assay では、hPIL-1 から4まではプロモーター活性があまり見られず、

最終試験の結果の要旨

Tunicamycin で抑制されないのはなぜか。この領域の発現制御上の重要性は何か。

(回答) hPIL-4 までは Zac1(アポトーシスに関与する転写因子)が含まれているので活性があまり見られず、Zac1 が除かれた hPIL-5 では活性が見えるようになったのではないかと考えている。ヒト、マウス、ラット間で相同性の高い保存された領域を用いて検討しており、OGD 虚血でも同様の実験を行ったが、この場合は hPIL-1 から 8 までの全てのプロモーター活性が虚血により低下していた。よって、今回はより反応性が顕著であった Tunicamycin のデータを提示した。

質問 9) 虚血下における VIP、VPAC1、VPAC2 の動態は変化しているのか。

(回答) VIP、VPAC1、VPAC2 は主に肝、腸、肺など末梢組織に分布している。近年、肝臓における虚血では、VIP と VPAC2 の発現は時間依存的に増加、VPAC1 は一過性に増加、その後減少することが報告されている。しかしながら、相反する報告も数多くあり、議論の余地がある。

質問 10) PACAP の神経伝達物質としての役割はどのようなものがあるか。

(回答) 中枢・末梢神経系において、神経細胞の分化・生存維持や神経分泌系の活性化などに関与しており、神経シナプス可塑性の調節、神経前駆細胞の分化、グルコース依存的インスリン分泌の促進作用、痛覚伝達、その他多くの生理作用があることが報告されている。

質問 11) PAC1 KO マウスや TG2 KO マウスは存在するのか。その場合、虚血に対する反応はどのようなのか。

(回答) PAC1 KO マウスや TG2 KO マウス共に存在しており、これらを用いた多くの論文が発表されている。Control マウスと比べて、PAC1 KO マウスでは脳虚血により虚血梗塞層が増悪することが報告されているが、TG2 KO マウスでは脳梗塞モデルの報告はまだない。当研究室でも脳梗塞モデルマウスの作製に取り組んでおり、今後検討していく予定である。

質問 12) PAC1 や関連シグナルで遺伝的変異を持っているヒトでの報告はあるのか。

(回答) ヒト PACAP 遺伝子の変異が統合失調症の海馬機能低下の脆弱因子であるとの報告や、ヒト PAC1 遺伝子の一塩基多型 SNP では心的外傷後ストレス障害 PTSD の予後が悪化しているとの報告がある。

質問 13) ヒトへ臨床応用する場合は、どのような戦略があるのか。

(回答) 現在、PACAP の臨床試験等ははまだ進んでいない。しかしながら、マウスやラットの報告では、pmol オーダーでの静脈内投与で PACAP が血液脳関門を通過し、脳虚血梗塞巣の縮小を認めている。さらに、梗塞後の PACAP 投与においても改善を認めているため、PACAP は脳梗塞治療薬として有用である可能性があり、今後さらなる研究の進展が求められている。

質問 14) PAC1 の合成リガンドはが臨床的に応用できる可能性はあるのか。

(回答) 現在、合成リガンドの開発はほとんど進んでいないために、治療薬となるかは未知数である。しかしながら、PAC1 の特異的アゴニストであるマキサディランが存在する。マキサディランは、南米の吸血砂バエの唾液から単離された血管拡張性のペプチドであるが、PACAP とはほとんど構造上の相同性を有さない。しかしながら、PAC1 に対して PACAP と同程度の親和性を示すものの、VPAC1 および VPAC2 にはほとんど親和性を示さない PAC1 特異的アゴニストとして大変興味深いペプチドである。

質問 15) NRSE が PACAP の発現に関与するメカニズムはどのようになっているのか。

(回答) 未分化 PC12 細胞において、NRSE 阻害剤である TrichostatinA の添加は濃度依存的に PACAP の発現を増強させた。よって、NRSE は PACAP の発現を負に調節していると考えられる。

質問 16) 負の発現機序の解明における新規の知見は何か。

(回答) TG2 による架橋 Sp1 の形成は肝臓におけるアルコール誘発性の ER ストレスでのみ報告されている。今回、神経系での虚血に誘導される ER ストレスによる架橋 Sp1 の形成は初めての報告である。

質問 17) TG2 活性の測定はどのように行っているのか。

(回答) 5-(biotinamido) pentylamine (5-BAPA)を基質として用いて、TG2 活性があるとビオチン標識されるので、蛍光アビジン抗体により免疫染色にて検出している。

質問 18) Sp1 は広範な分子を制御していると考えられるが、他に Sp1 が関与している病態の報告はあるのか。

(回答) 神経系における TG2 による Sp1 の関与は、ポリグルタミン病であるハンチントン病や脊髄小脳変性症、アルツハイマー病において多く報告されている。しかしながら、CLSp1 の形成を確認した報告はなく、神経系においては初めての報告である。

質問 19) PAC1 のプロモーター領域ではラット、マウス、ヒト間での保存性はあるのか。

(回答) 今回、実験で用いた PAC1 領域(-2160/+268bp(2428bp:chr7:31056490-31058917))は、種間で部分的に高い保存性があり、特に hPIL-5 に含まれている Sp1 の 2 番目の領域は完全に保存されていたため、転写活性に重要な領域であることが考えられる。

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。