

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591182

研究課題名（和文）：多機能神経ペプチドPACAPの精巣特異的生合成調節機序とその生理的意義の解明

研究課題名（英文）：Testis-specific production and its physiological significance of PACAP

研究代表者：宮田 篤郎 (MIYATA ATSURO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60183969

研究成果の概要（和文）：

多機能神経ペプチドPituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は、精巣に高濃度に存在し、PACAPおよびそのレセプター発現が精子形成のステージにより周期的に変化する事から、生殖への関与が示唆されている。我々は、ヒトPACAP遺伝子の精巣特異的発現調節機構を目指し、精巣特異的エクソン上流に精巣特異的プロモーター領域を同定した。さらにこ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。これらタンパクをsiRNAでノックダウンすると、80bpのプロモーター活性が変化しPACAPの精巣特異的機能への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Pleiotrophic neuropeptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) is abundantly localized in testis. It was reported that gene expression of PACAP and its specific receptor PAC1 are periodically changed according to stage of spermatogenesis, suggesting its involvement in gonadal function. We attempted to clarify the testis specific regulatory mechanism of PACAP gene expression, and identified the promoter region responsible for testicular specific expression in 5' upstream region of human testicular specific exon. In addition, we also identified PARP-1 and TIAR as a protein which specifically bind this region. Knock down of them with specific siRNA changed the testis specific promoter activity, suggesting that these proteins might be involved in testis specific function of PACAP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学
キーワード：生殖内分泌学

1. 研究開始当初の背景

(1) 多機能神経ペプチドPACAPの発見：
Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は、1989年、申請者らによりラット下垂体細胞のcyclic 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。申請者らは発見後直ちに、PACAPの特異的RIAを開発し、脳特に視床下部に最も多く局在する一方で、低濃度ながら末梢組織にも広く分布し、精巣には脳と同程度に高濃度に存在することを世界に先駆け報告した。PACAPは、内分泌系、神経系、循環器系等において多様な生理活性を示す多機能神経ペプチドとして注目されている。

(2) PACAP遺伝子の神経特異的発現調節：
申請者らは、PACAPの発見以来、ヒトやマウスの遺伝子構造のみならず、その発現調節についてもTATAエレメントを含む誘導的発現を行う領域とGCボックスなどを含む構成的発現を行う領域による2相性の発現調節を受けることや、神経選択的サイレンサーが本遺伝子の神経特異的発現調節に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。

(3) 精巣におけるPACAPの遺伝子発現：
精巣におけるPACAP及びその受容体の遺伝子発現が精子形成のステージにより周期的に変化することから、精子形成に関与することが示唆されているが、その精巣における分泌動態についてはほとんど解明されていない。最近申請者らは、Danielらにより報告されたラットPACAPの精巣特異的エクソンに対応するヒト精巣特異的エクソンを、ヒトゲノムデータベース検索により、PACAP前駆体蛋白の翻訳開始点より10.9kb上流に見出し、ヒト精巣全

RNAのRT-PCRによりその発現を確認した(未発表)。さらに、その精巣特異的エクソンを含む約1.2 kb上流領域をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターアッセイによりプロモーター活性を検討したところ、精巣由来腫瘍株であるF9では顕著な転写活性を示したが、非生殖腫瘍細胞(Swiss3T3、PC12)では活性を示さなかったことから、PACAP遺伝子の精巣特異的発現調節機序の存在が示唆された。そこで申請者らはヒト精巣特異的エクソンの上流域の欠失変異体のレポーターベクターを作成し、その転写活性の詳細な解析により80bpの領域に、精巣特異性に関与するエレメントが存在することを突きとめた。

(4) 精巣におけるイントラクライン(intracrine)：ヒト精巣RNAのRT-PCRにより同定したPACAPmRNAは、精巣特異的エクソンからイントロン2の後半へのスプライスバリエーションであり、フレームシフトの結果としてシグナルペプチドを持たない非分泌型PACAP前駆体蛋白が翻訳され、PACAPが細胞質にとどまる可能性が示唆された。他方、有村らにより、精巣に存在するPACAP特異的受容体が、細胞膜ではなく可溶性画分に存在し、PACAPが、イントラクラインとして精子細胞の内部で機能することが報告された。このようなPACAP特異的細胞内受容体の存在は、申請者らの非分泌型PACAP生合成機序との関連性を強く示唆するものであるが、我々以外のグループからの報告は、まだなされていない。

2. 研究の目的

(1) PACAP遺伝子の精巣特異的エクソンの上流域に存在する精巣特異的転写制御領域の性状解析を行い、未知の転写調節エレメントを同定する。

(2) PACAP遺伝子の精巣特異的転写調節エレメントに結合する転写制御因子蛋白を同定し、その転写制御メカニズムの解明を行う。

(3) 精子形成の各ステージでの PACAP の生合成及び PACAP 特異的細胞内受容体との関連性を明らかにし、イントラクラインとしての生理的意義の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒト精巣特異的エレメントの同定と転写因子結合部位の解析

①すでに絞り込んだ 80bp についてさらにエレメントとして機能する配列を明らかにするため、ルシフェラーゼレポーターベクターにおいて、その方向依存性、PACAP 以外の CMV、SV40 など他のプロモーターの上流に導入することによりプロモーター依存性を検討する。また、点突然変異を導入し、そのエレメント配列の塩基特異性を検討する。

②F9 細胞、マウス精巣細胞、ヒト精巣由来腫瘍細胞 (NEC14 など) より核蛋白を抽出し、ゲルシフトアッセイにおいて、既知転写エレメントなど様々な箇所に突然変異を導入したプローブを作成し、既知の転写因子蛋白に対する市販の抗体を用いて、既知エレメントの関与を解析する。その際、既知転写制御エレメントの非標識プローブを用いたコンペティションアッセイも行う。

③F9 細胞、マウス精巣細胞、ヒト精巣由来腫瘍細胞 (NEC14 など) より核蛋白を抽出し、フットプリント法により、未知転写因子蛋白の結合部位を同定するとともに、遺伝子と複数の蛋白との相互作用を解析する。

(2) ヒト精巣特異的転写エレメント結合因子の精製及び構造解析

ゲルシフトアッセイやフットプリント法により特異的な転写制御因子が結合する転写制御エレメントを検討した結果、この転写制

御因子が未知のものであれば、特定した領域の 2 本鎖 DNA を合成し、ビーズに結合させ、核蛋白抽出物についてアフィニティクロマトグラフィーを行う。吸着した蛋白は 2 次元電気泳動にて展開し。スポットとして単離した蛋白は、トリプシン等で消化後、質量分析にかけて構造解析を行い、データベースの既知蛋白との照合を行う。

(3) スプライスバリエント由来 PACAP 前駆体蛋白の組織化学的解析

①精巣特異的エクソンからのスプライスバリエントに由来する非分泌型 PACAP 前駆体蛋白においては、これまで報告されている前駆体蛋白には見られないアミノ酸配列を持つペプチドが生成してくる可能性があることから、そのペプチドの合成品に対する抗体をウサギに免疫することにより作成する。得られた抗体について、特異性と力価を評価して、免疫組織化学的検討を行う。

②マウス或いはラットにおいてスプライスバリエントの mRNA の存在を確認し、それに対する cRNA をプローブとして *in situ* ハイブリダイゼーション法により、精巣特異的エクソンを含むバリエント mRNA の精巣内局在を検討する。

(4) 精巣特異的転写エレメントへ特異的に結合する因子として同定した蛋白について、His タグをつけた発現ベクターを構築してリコンビナント蛋白を得る。ゲルシフトアッセイにより精巣特異的転写エレメントとの結合の特異性を検討する。

(5) ラット精巣より精子形成のステージごとに細胞を分画し、精巣特異的転写エレメント結合因子の遺伝子発現レベルを、*in situ* hybridization 法やリアルタイム RT-PCR により検討する。

(6) PACAP のイントラクライン動態と精巣特異的転写エレメント結合蛋白との

関連性の観点から、マウス PACAP の精巣特異的エクソン及びその上流を欠損させたノックアウトマウスを作成し、PACAP の生合成・分泌動態について PACAP 特異的抗体を用いて検討する。

4. 研究成果

多機能神経ペプチド Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は、中枢神経系に分布する他、精巣にも比較的高濃度に存在しており、PACAP およびそのレセプター発現が精子形成のステージにより周期的に変化する事から、生殖細胞の分裂増殖、分化あるいは生存への関与が示唆されている。我々はまず最初に、ヒト精巣における PACAP 遺伝子発現調節機構を解明する目的で、ヒト PACAP 遺伝子において、精巣特異的 PACAP プロモーター領域の同定と解析を行った。ヒト PACAP 遺伝子の精巣特異的エクソン上流の転写調節領域の中の約 80bp の領域に精巣特異的プロモーターの存在を確認していたことから、F9 核蛋白においてこの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。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。その結果今年度同定された結合タンパク質は PARP-1 と TIAR であった。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。このうち TIAR はそのノックアウトマウスの雄において無精子

症を呈することが報告されており、PACAP の精巣特異的機能への関与が示唆された。さらに、PACAP 特異的受容体である PAC1 についても、精巣特異的遺伝子発現調節を明らかにするため、ヒト PAC1 遺伝子の 5' 上流域をクローニングし、エクソン 1 を含む-372/+268 領域(hP1L-5)において、NGF 刺激により誘導されるプロモーター活性を見出した。NGF 刺激による hP1L-5 のプロモーター活性は MEK 阻害剤(U0126)によりほぼ完全に抑制され、SP1 阻害剤(Mithramycin)により有意に抑制された。hP1L-5 に存在する 2ヶ所の SP1 サイトに点変異を導入し、プロモーター活性を比較検討したところ、-282/-272 に存在する SP1 が主に関与することを明らかにした。さらに ERストレスや虚血において、PAC1 遺伝子発現が抑制されることを見いだした。その負の発現調節機序に関して興味ある知見が得られた。即ち細胞にストレスが加わることにより、トランスグルタミナーゼ2が活性化され核内に移行すると、様々な蛋白の架橋を促進するが、その際Sp1も架橋されることにより、Sp1エレメントに結合できなくなり、その結果遺伝子発現が抑制される。このことは、ERストレス負荷時に、トランスグルタミナーゼ2の核内移行が促進され、ERストレス阻害薬である Salburinal によって、その移行が抑制されること。また TG2 の阻害薬である Cystamine によって、ストレスにより抑制される PAC1 の転写活性が回復することから明らかとなった。これらの知見は精巣における PAC1 の発現調節の解明に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

①Miura A, Odahara N, Tominaga A, Inoue

K., Kambe Y, Kurihara T, Miyata A.
Regulatory mechanism of PAC1 gene
expression via Sp1 by Nerve Growth Factor
in PC12 cells. FEBS Letters in press (査読
有)

②Tominaga A, Sugawara H, Futagawa T,
Inoue K., Sasaki K, Minamino N,
Hatakeyama M, Handa H, Miyata A
Characterization of the testis-specific
promoter region in the human pituitary
adenylate cyclase-activating polypeptide
(PACAP) gene. Genes to Cells (査読有)
15(6): 595-606, 2011.

③Ushiyama M, Ikeda R, Yoshida M, Mori
K, Kangawa K, Sugawara H, Inoue K.,
Yamada K, Miyata A. Alternative Splicing
of the Pituitary Adenylate Cyclase-activating
Polypeptide (PACAP) Receptor Contributes to
Function of PACAP-27. Journal of
Molecular Neuroscience (査読有) 42(3):
341-348, 2010.

[学会発表] (計35件)

①宮田篤郎、Pituitary adenylate cyclase
activating polypeptide in pain
transmission、日中合同薬理シンポジウム、
2011年8月7-8日、中国・ウルムチ

②宮田篤郎、富永愛子、佐々木一樹、南野
直人(6人中1番目)「多機能神経ペプチド
PACAPの精巣特異的機能発現」第28回内分
泌代謝学サマーセミナー、2010年7月8-10
日、長崎

③宮田篤郎、「PACAPの神経特異的発現調節と
機能の多様性の解明：臨床への応用展開を目
指して」、トランスレーショナルリサーチ推
進センターセミナー、2010年2月15日、福
井

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田篤郎 (MIYATA ATSURO)
鹿児島大学医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60183969

(2) 研究分担者

井上 和彦 (INOUE KAZUHIKO)
鹿児島大学医歯学総合研究科・助教
研究者番号：30363641

(3) 連携研究者

寒川 賢治 (MINAMINO NAOTO)
国立循環器病センター研究所・所長
研究者番号：00112417
塩田 清二 (SHIODA SEIJI)
昭和大学医学部・教授
研究者番号：80102375
半田 宏 (HANDA HIROSHI)
東京工業大学生命理工学研究科・教授
研究者番号：80107432

(4) 研究者協力者

富永 愛子 (TOMINAGA AIKO)
鹿児島大学医歯学総合研究科・大学院生
齊藤 弘樹 (SAITO HIROKI)
鹿児島大学医歯学総合研究科・大学院生
竹ノ内 里奈 (TAKENOUCHI RINA)
鹿児島大学医歯学総合研究科・大学院生