

Title	マウスPACAPとその受容体に関する分子薬理学的研究
Author(s)	山本, 恭平
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41976
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	山本 恭平
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 15376 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用薬学専攻
学位論文名	マウス PACAP とその受容体に関する分子薬理学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 馬場 明道 (副査) 教授 前田 正知 教授 松田 敏夫 教授 岡部 勝

論文内容の要旨

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は、vasoactive intestinal polypeptide (VIP) とアミノ酸配列で約70%という高い相同性を有するホルモンである。PACAP は脳や副腎、消化器などに発現しており、下垂体ホルモンやカテコラミン、インスリンなどの分泌を調節する因子として機能する他、神経成長因子あるいは神経伝達物質としての役割を担うことも示唆されている。このような PACAP の多岐にわたる生理作用は、標的細胞膜上に存在する特異的な受容体を介して発揮される。これまでのところ、PACAP 受容体には3種類のサブタイプ、すなわち PAC 1 受容体、VPAC1 受容体ならびに VPAC 2 受容体が存在することが明らかにされている。リガンド結合活性については、PAC 1 受容体は PACAP に選択性が高く、VIP に対しては低親和性である。一方、VPAC 1 受容体および VPAC 2 受容体は、PACAP と VIP の両者にほぼ同程度の高い親和性を示す。以上のように、PACAP と VIP が受容体に対する結合交叉性を有すること、受容体サブタイプが存在することなどの理由により、これらのペプチドおよび受容体サブタイプの一つ一つが果たす生理的な役割の詳細は、現時点では不明な点が数多く残されている。そこで、本研究においては、PACAP の生理作用を分子レベルで解明することを目的として、分子薬理的に研究を進めた。まず、マウスにおける PAC 1 受容体の遺伝子と cDNA、および PACAP の遺伝子を単離し、それらの構造を解析した。次に、単離した遺伝子を用いて、PAC 1 受容体の遺伝子ターゲティングマウスおよび脾臓特異的に PACAP を過剰発現させるトランスジェニックマウスを作製し、PAC 1 受容体と PACAP の生理的役割について検討を行った。

ラット PAC 1 受容体 cDNA をプローブとして、マウス遺伝子ライブラリーをスクリーニングし、PAC 1 受容体遺伝子を単離した。本遺伝子は、50kb以上におよび、18個のエクソンで構成されていた。本遺伝子の5'-隣接領域には、TATA box は存在しなかったが、CCAAT box や Sp1、AP-2、NF-1 などの転写因子の結合配列が見出された。また、マウス脳 poly (A)⁺RNA から RT-PCR 法を用いて PAC 1 受容体 cDNA を単離し、その構造を解析した。本 cDNA を用いて、マウス PAC 1 受容体を COS 7 細胞に強制発現させ、その薬理学的特性について検討したところ、PACAP は VIP に比べ本受容体に対して非常に高い結合親和性を示し、低濃度から強く細胞内 cAMP の産生を促進した。

リガンドである PACAP についても、ラット PACAP cDNA をプローブとしてマウス遺伝子ライブラリーからその遺伝子を単離し、5'-上流および3'-下流領域を含む全塩基配列を決定した。加えて、5'-RACE 法を用いた

解析から、マウスの脳において、PACAP 遺伝子から alternative splicing 機構および alternative transcription initiation 機構によって、3種の異なる 5'-非翻訳領域をもつ mRNA が産生されることを明らかとした。PACAP 遺伝子の 5'-隣接領域には、cAMP responsive element (CRE)、TPA responsive element (TRE) および GHF-1 などの転写因子の結合配列が見い出された。また、PC12細胞を用いて本遺伝子の転写活性をルシフェラーゼアッセイで検討した結果、本遺伝子の転写は cAMP シグナル伝達系を介して調節されることが示唆された。

単離した PAC 1 受容体遺伝子を用いて、本遺伝子のエクソン 2 を欠損したマウス (PAC1R exon 2^{-/-}) を作製した。本エクソンは、PAC 1 受容体の翻訳開始コドンを含むシグナルペプチド領域をコードすると予想される。まず、脳の膜画分に対するリガンド結合実験をはじめとする解析から、PAC1R exon 2^{-/-}においても PAC 1 受容体が発現しているものの、細胞膜に移行して機能的な働きをする受容体量は大幅に減少していることを証明した。次に、PAC1R exon 2^{-/-}について *in vivo* 解析を行った。PAC1R exon 2^{-/-}は、野生型マウスと比べて成長、生殖能および行動についての変化は認められなかった。また、PAC 1 受容体の強い発現がみられる脳や副腎においても、形態学的な異常は確認できなかった。さらに、耐糖能についても野生型マウスと比較して有意な差は認められなかった。以上の結果から、1) PAC 1 受容体には予備受容体が存在するために、少数の受容体がリガンドと結合するだけで十分にシグナルが伝達される可能性、もしくは 2) PAC 1 受容体数が減少するに伴って代償的なメカニズムが働く可能性が考えられた。

膵臓における PACAP の役割を追求するため、膵島β細胞特異的に強い転写活性を有するヒトインスリンプロモーターの制御下で PACAP を発現させるトランスジェニックマウスを作製した。グルコース負荷による血漿グルコース濃度の変動について、本トランスジェニックマウスはノントランスジェニックマウスと同等であったが、血漿インスリン値については、トランスジェニックマウスの方が高値を示す傾向が認められた。また、膵島β細胞を傷害する streptozotocin の投与によって引き起こされる血漿グルコース値の上昇が、本トランスジェニックマウスにおいて抑制されていた。さらに、本トランスジェニックマウスの膵臓の形態学的解析から、PACAP が膵島の量的変動を調節する役割を担っている可能性が示された。以上の結果から、PACAP は膵臓において、細胞の分化・増殖もしくは保護といった機能を調節する因子として働くことが推察された。

本研究で得られた情報は、PAC 1 受容体および PACAP の転写調節機構、PAC 1 受容体の機能、さらには PACAP シグナル系薬物の抗糖尿病薬としての応用を検討する上で重要な手がかりになると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、脳下垂体アデニレートシクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) の生理機能を解明するための PACAP 関連遺伝子改変マウス作成を目指したものである。その結果、マウス PACAP 及び PACAP 受容体 (PAC₁) 受容体遺伝子構造を明らかにし、PACAP 受容体遺伝子エクソン 2 を欠損したターゲティングマウスと膵臓特異的に PACAP を過剰発現させたトランスジェニックマウスの作成に成功し、それらの薬理的解析を行ったものである。

以上の成果は、薬学博士の学位に十分に値するものである。