



Title	PC12 細胞の分化および PACAP 遺伝子発現における MAP キナーゼ系の役割に関する研究
Author(s)	酒井, 啓行
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46528
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	酒 井 啓 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 7 1 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 17 年 5 月 16 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	PC12 細胞の分化および PACAP 遺伝子発現における MAP キナーゼ系の役割 に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 馬 場 明 道 (副査) 教 授 八 木 清 仁 教 授 前 田 正 知 教 授 土 井 健 史

論 文 内 容 の 要 旨

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は、secretin/glucagon/VIP ファミリーに属するペプチドホルモンであり、神経細胞への分化誘導など多くの生理作用を有することが報告されている。これまで当研究室では、PACAP がオートクライン/パラクライン様に PACAP 遺伝子発現を誘導していること、さらに NGF などの neurotrophin と協調的に作用し、シグナルの増強を誘発していることを示唆する知見を報告している(1)。本研究では PC12 細胞を用いて、PACAP 遺伝子発現とその生理的意義、さらにそれらへの栄養因子の関与を明らかにすることを目的として、PACAP 遺伝子発現の調節機構について解析し、さらに PACAP による神経細胞突起伸展作用とその作用機構について検討を行った。

PACAP mRNA 発現について検討を行った結果、PACAP 10^{-9} ~ 10^{-6} M 単独処置で、用量依存的な PACAP mRNA 発現の上昇が認められ、また NGF 100 ng/mL でわずかな発現上昇が認められた。さらに PACAP と 100 ng/mL NGF を同時処置すると、PACAP の単独処置に比べ、PACAP 10^{-11} ~ 10^{-6} M で用量依存的な PACAP mRNA 発現の増強が認められた。次に PACAP による PACAP mRNA 発現作用、さらに PACAP と NGF によって誘導される PACAP mRNA 発現の増強作用は、どのような細胞内シグナルによって調節されているか解析するために、細胞内情報伝達系の阻害剤の影響について検討した。その結果、MEK 阻害剤 PD98059 は、PACAP による PACAP mRNA 発現を抑制したが、PACAP と NGF の併用による PACAP mRNA 発現に対しては、部分的にしか抑制しなかった。一方、p38 MAPK 阻害剤 SB203580 は、どちらの mRNA 発現に対しても強く抑制した。抗リン酸化 p38 抗体を用いて、PACAP による p38 のリン酸化量を測定した結果、PACAP によって p38 が活性化されていた。さらに、PACAP と NGF の同時処置により、p38 MAPK のリン酸化においても増強作用が認められ、また、この増強作用は PACAP mRNA 発現のそれとほぼ相関していた。以上の結果より、PACAP によって誘導される細胞内シグナルとして p38 MAPK 系が活性化されること、さらに PACAP 遺伝子発現の調節機能として p38 MAPK が重要な役割を担っていることが示唆された。

PACAP は NGF と協調することによって、PACAP 遺伝子発現を相乗的に増加させたことから、生体内で PACAP は NGF などの neurotrophin との相互作用により、シグナルを増強させ、多様な生理作用を引き起こす neuromodulator として作用しているのではないかと考え、PACAP と NGF による PACAP 遺伝子発現増強の生理的意義について検討するために、両者による PC12 細胞の突起伸展促進作用について検討を行った。

PACAP は、時間依存的かつ用量依存的に神経突起の伸展した細胞数を増加させた。さらに、NGF と PACAP を同時処置することにより、PACAP の用量依存的な増強作用が認められた。また突起の長さにおいても、NGF および PACAP の単独作用に比べ、より長く伸展している傾向が認められた。次に、PACAP と NGF による突起伸展の増強に関与しているシグナル系を明らかにするために、これらによる突起伸展における MAPK 系の阻害剤の作用について検討した。PACAP および NGF による突起伸展作用は、SB203580 では抑制されず、PD98059 で抑制された。したがって、PACAP と NGF による突起伸展増強作用には MAPK/ERK シグナルが深く関与している可能性が考えられた。そこでこれら両者による ERK の活性化について検討した結果、PACAP および NGF は、それぞれ ERK のリン酸化を引き起こすが、これらを同時処置することによって、ERK のリン酸化においても活性の増強が認められ、さらに持続性も亢進していた。

持続的な ERK の活性化は、神経突起作用の伸長段階に必要であると考えられているが、この持続的な ERK の活性化だけでは突起伸展作用を誘発するには不十分であり、伸長の前段階として、神経突起の起始部の形成が必要であると考えられている(2)。そこで次に、PC12 細胞の神経突起起始部の形成に関与していると考えられる低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーの Rac1 に対する PACAP の作用について検討を行った。PACAP および NGF は、それぞれ Rac1 活性の上昇とそれに伴う Rac1 の局在の変化を伴う突起伸展作用を誘導したが、PACAP と NGF を同時処置させても、突起伸展に見られるような活性増強は認められなかった。このことから、PACAP と NGF による突起伸展増強作用には、Rac1 よりも ERK が深く関与している可能性が考えられた。

以上、本研究での検討の結果、PACAP によって活性化される細胞内シグナルとして新たに p38 MAPK を見出し、この p38 MAPK の活性化は、PACAP 遺伝子発現において、重要な役割を担っている可能性が示唆された。また PACAP は、Rac1 および ERK を活性化するが、NGF と PACAP による突起伸展作用においては、ERK が重要な役割を担っている可能性が考えられた。NGF が PACAP のオートクライン作用を増強しており、突起伸展作用においても、PACAP と NGF によって増強作用が認められることから、PACAP 遺伝子発現は交感神経系において、細胞分化に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

参考文献

- (1) Hashimoto, H., Hagihara, N., Koga, K., Yamamoto, K., Shintani, N., Tomimoto, S., Mori, W., Koyama, Y., Matsuda, T., and Baba, A. (2000) *J. Neurochem.* 74, 501-507
- (2) Yasui, H., Katoh, H., Yamaguchi, Y., Aoki, J., Fujita, H., Mori, K., and Negishi, M. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 15298-15305

論文審査の結果の要旨

神経ペプチド PACAP は、ホルモン作用の他に神経伝達物質、神経栄養因子として多くの生理作用に関与していると考えられている。

本研究では PC12 細胞を用い PACAP 発現と、その生理的意義、さらにそれらへの栄養因子の関与を明らかにすることを目的として、PACAP 発現の調節機構について解析し、さらに PACAP による神経細胞突起伸展作用とその作用機構について検討を行った。

その結果、以下の知見を明らかにした。

- NGF が PACAP のオートクライン作用を増強しており、突起伸展作用においても、PACAP と NGF によって増強作用が認められることから、交感神経系において、PACAP 発現が、細胞分化に重要な役割を果たしている可能性を示した。
- PACAP によって活性化される細胞内シグナルとして p38 MAPK を見出し、この p38 MAPK の活性化は、PACAP 遺伝子発現において、必須な役割を担っていることを示した。
- PACAP は、Ras 経路とは異なったシグナル系を介して、Rac1 および MAPK/ERK を活性化しており、NGF と

PACAP による突起伸展作用には、MAPK/ERK が重要な役割を担っている可能性を明らかにした。

以上のことから、PACAP は生体内において、NGF などの neurotrophin や他の栄養因子と協調し、シグナルの増強および細胞分化などの多様な生理作用を誘発する neuromodulator としての役割を果たすことを明らかにし、また神経細胞分化について、その作用様式の一局面を解明することができた。

本研究は博士（薬学）の学位授与に充分値するものと判断した。