

遺伝子改変マウスを用いた神経ペプチドPACAP の中樞神経機能の研究



橋本 均*

Study on central nervous system function of
neuropeptide PACAP using knockout mice

Key Words : Mortality Rate, Psychomotor Behavior, Schizophrenia, Human Disease, VIP

1. はじめに

ライフサイエンス研究において、従来の遺伝学では、細胞や個体に現れる形質(表現型)からそれを司る遺伝子を割出し、そのコードする産物タンパク質を研究するという手順がとられていた。それとは逆に、遺伝子を同定して塩基配列を解析し、それに変異を導入することにより、その遺伝子の支配する表現型を研究しようとする方法を逆遺伝学(reverse genetics)とよんでいる。とくに、標的とする特定遺伝子を計画的に破壊(遺伝子ノックアウト)したマウス個体(ノックアウトマウス)は、特定の遺伝子機能を個体レベルで解析できるので、生体機能研究のツールとして有用であり、ヒト疾患のモデルとして動物実験の資材ともなる。

神経ペプチドPACAP(pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)は、1989年有村らによって、下垂体のアデニル酸シクラーゼを活性化作用を指標に、ヒツジ脳の視床下部から単離・同定されたニューロペプチドである。PACAPは、vasoactive intestinal polypeptide(VIP)とアミノ酸配列の相同性が68%と高く、VIP/セクレチン/グルカゴンファミリーに属している。PACAPの一次構造は哺乳類以外にも多くの種で解析されており、魚類からヒトまで、ほぼ完全に保存されていることから、その生理作用の重要性が示唆される¹⁾。さら

に、以前から知られているショウジョウバエの短期記憶に関する行動突然変異体 *amnesiac* は、PACAPとホモロジーのあるニューロペプチドの変異体であることが最近明らかにされた。

哺乳類においてもPACAPとその受容体の組織分布の解析や *in vitro*, *in vivo* での薬理学研究から、PACAPの多様な生理的役割が明らかになってきた。しかし中枢神経系の *in vivo* 研究に有効な低分子性リガンドがないことから、内因性PACAPの働きやその機構は十分には理解されていない。そこで、著者らは、PACAPの生理機能解明を目指して、PACAP受容体PAC₁サブタイプ²⁾及びPACAPノックアウトマウス³⁾を作製することに成功した^{4,5)}。そしてこの変異マウスの解析により、PACAPが精神機能の制御に関与し、PACAPシグナルの低下が、統合失調反応(精神分裂病)や注意欠陥多動性障害など何らかの精神疾患の表現型につながることをはじめて明らかにした。

以下、これらの研究経過について述べ、逆遺伝学により得られる遺伝子変異マウスを用いたヒト疾患研究の今後の展開について考察する。

2. PAC₁受容体cDNAクローニング、PAC₁受容体およびPACAPゲノムDNAの解析

PACAP発見後の薬理学的研究から、PACAPを選択的に結合する受容体が脳に存在することが知られていた。著者らは1993年に、脳に発現する神経ペプチド受容体を探索する目的で、ラット大脳皮質及び海馬cDNAライブラリーをプラスミドベクターを用いて作製し、low stringency条件のcolony hybridization法によっていくつかのcDNAをクローニングした^{6,7)}。COS7細胞のリコンビナント発現系を用いて解析した結果、その内の一つは、PACAPを高親和性で結合し、VIPにはその約1,000分の1



*Hitoshi HASHIMOTO
1965年1月生
平成元年京都大学大学院・薬学研究科・修士課程薬学専攻修了
現在、大阪大学大学院・薬学研究科・神経薬理学分野、助教授、薬学博士、分子神経薬理学
TEL 06-6879-8183
FAX 06-6879-8184
E-Mail hasimoto@phs.osaka-u.ac.jp

の低親和性で結合する、PACAP選択的受容体PAC₁サブタイプであることが明らかになった。また非常に弱くハイブリダイズしたクローンの一つは、後に副甲状腺ホルモン受容体cDNAであることが判明した⁸⁾。

ラットPAC₁受容体は495アミノ酸からなる7回膜貫通G蛋白共役型受容体であった。またN末の19アミノ酸はシグナル配列であると予想され、成熟型受容体は476アミノ酸であり、分子量は約54.4 kDaであると推定された。細胞外領域には5つのN結合型糖鎖付加配列(Asn-X-Thr/Ser)が認められており、実際の分子量は糖鎖付加により大きくなっている。図1に成熟型PACAP受容体の構造を模式的に示す。

著者らは、得られたcDNAを用いて *in situ* hybridization等の方法により、mRNAの組織分布の解析⁹⁾、神経細胞での発現調節、それに関連した細胞内シグナル伝達系の解析などを行った^{10,11)}。その結果、PACAPは、MAPキナーゼの活性化を介してPACAP自体によってその発現が促進され、自己

分泌因子として、神経成長因子(NGF)などと協調的に、神経生存維持および分化促進因子としての役割を担うことを明らかにした。

ところで、現在も低分子性で非ペプチド構造の安定なPACAP受容体リガンドは開発されていないことから、その *in vivo* 機能研究が困難な状況にある。そこで、著者らは、遺伝子改変マウスの作製が必須であると考えた。それにはまず、ゲノムDNAの単離が必要であることから、これまでに、マウスPAC₁受容体¹²⁾、そのサブタイプVPAC₁受容体¹³⁾、さらにPACAP(リガンド)¹⁴⁾のゲノムDNAを単離し、構造を決定した。

3. 遺伝子変異マウス

まず、PAC₁受容体エクソン2ノックアウトマウスを作製した(詳細は文献2,4,5,15参照)。

また著者らはPACAPノックアウトマウスを常法により以下の通り作製した³⁾。図2に示すように、マウス胚幹細胞(ES細胞)の野生型PACAP遺伝子上の

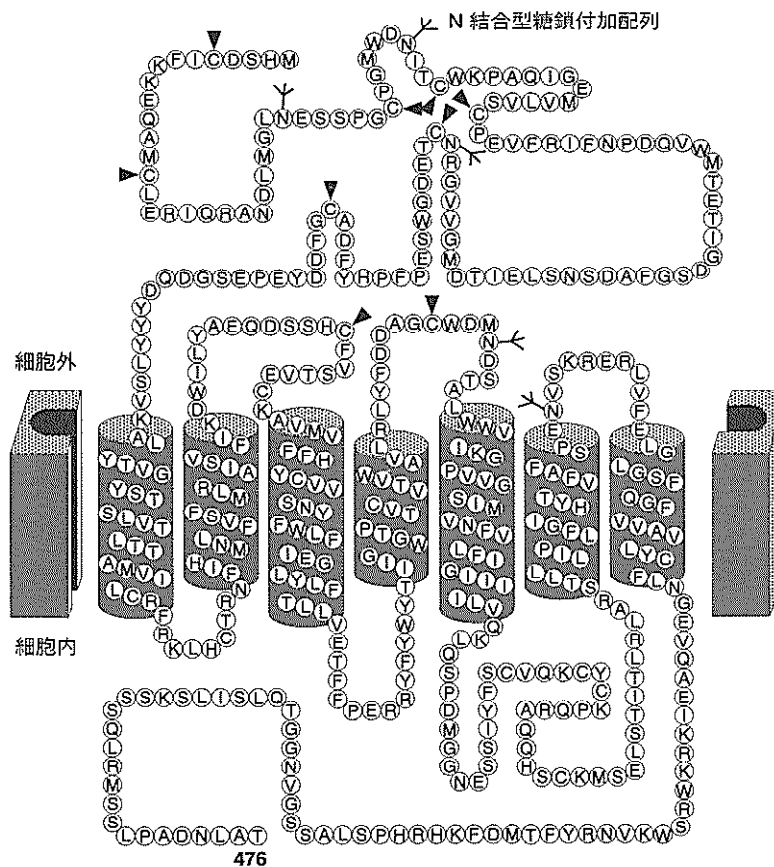


図1. 成熟型マウスPAC₁受容体の構造を示す模式図
推定される細胞外領域における、N結合型糖鎖付加配列のアスパラギン(N)残基を▼で示し、同族の受容体に共通に保存されているシステイン(C)残基を矢頭で示す。文献7)より改変。

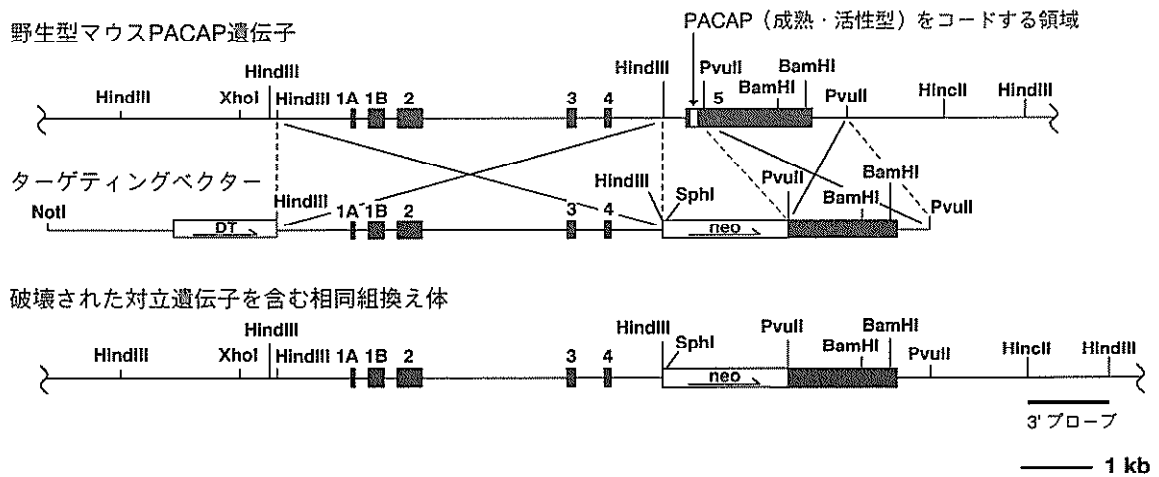


図2. マウスPACAP 遺伝子のターゲティング破壊を示す模式図
 1A～5はエクソン1A～5, DTはジフテリアトキシンA-フラグメント,
 neoはネオマイシン耐性遺伝子をそれぞれ表す。

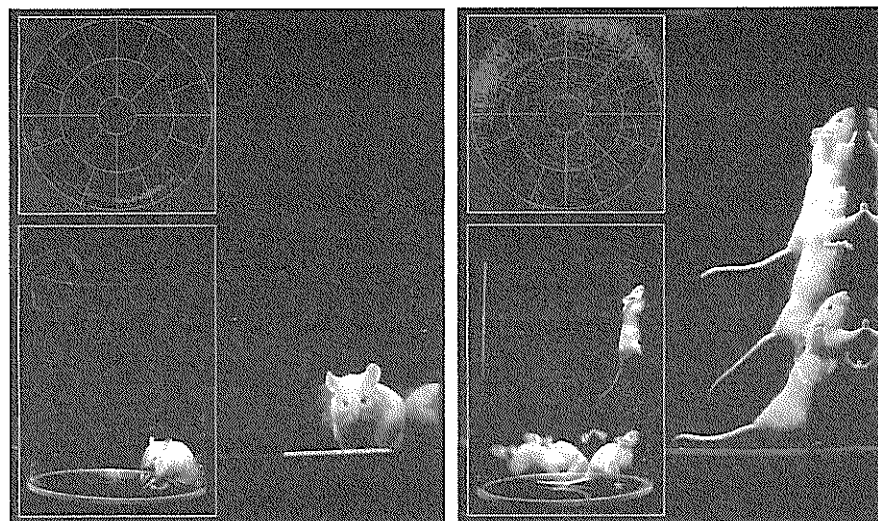


図3. PACAPノックアウトマウスの異常行動
 左：野生型マウス，右：ノックアウトマウス。
 挿入図(上)はマウスの軌跡を示す。文献4)より引用。

成熟型で活性型PACAPをコードする領域を、neo (ネオマイシン耐性) 遺伝子との相同組換えによって欠失させたES細胞クローンを単離した後、マウス胚(胚盤胞)に注入し、キメラマウスを得た。それらを野生型マウスと交配することにより、キメラマウスの生殖細胞を通して子孫に変異が伝達され、ヘテロ変異マウスが得られた。さらにヘテロ型の雌雄の交配によってホモ型変異マウス(二倍体の対立遺伝子の両方が変異したマウス、ノックアウトマウス)を得た。

PACAPノックアウトマウスは生後約3週間ごろの離乳までに約半数が死亡した。生き延びたマウスに

ついて、その行動パラメーターを画像処理装置によって測定すると、マウスにとって新規な環境での探索行動が亢進し、不安関連行動の低下、好奇心の増大、さらには異常なジャンプ行動を示した(図3)。また脳内ではセロトニン代謝回転が減少するなど、きわめて特異的な中枢神経系の表現型を示した。これらの行動異常はドパミン受容体遮断薬ハロペリドール、選択的セロトニン取込阻害薬SSRIによって抑制された。このようにPACAPが精神機能調節に関与することは、従来の研究からは全く予想外であったもので、本マウスが精神疾患研究の有用なモデルマウス

になるものと期待される。

4. 遺伝子変異マウスを用いたヒト疾患研究の 今後の展開

著者らは末梢においても、糖代謝恒常性における PACAP の働きを解明する目的で、膵臓特異的 PACAP 過剰発現トランスジェニックマウスを作製して、さらに遺伝的肥満・糖尿病マウスと交雑するゲノム薬理学的手法による研究を行っている。精神疾患や糖尿病などのヒト疾患は、多数の遺伝的因子に加えて、非遺伝的(環境)因子が関与して発症する多因子疾患であると考えられている。ヒトゲノム DNA の配列が解析された後、逆遺伝学による生命機能の解析と病気の研究に、今後も遺伝子変異マウスが優れたツールとして利用されるものと予想されるが、単一遺伝子を変異させた個体が必ずしもヒト疾患の分子病態を反映しているとは限らない。今後は、例えば種々のストレスを負荷したり、他の遺伝的病態マウス(例として糖尿病マウスなど)との交雑を行うなどの方法により、目的遺伝子の真の機能と疾患における意義を追求していくことが必要であると考えている。著者らは PACAP という神経ペプチドを標的に研究を進めてきているが、今後もこのような研究ストラテジーで、生命機能の研究とヒト疾患の創薬標的分子の探索および治療薬の開発を目指したいと考えている。

文 献

- 1) Arimura, A.: Jpn. J. Physiol., 48: 301-331, 1998.
- 2) Hashimoto, H. et al.: J. Neurochem., 75: 1810-1817, 2000.
- 3) Hashimoto, H. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98: 13355-13360, 2001.
- 4) 馬場明道, 他: 脳21, 4: 4-7, 2001.
- 5) 橋本 均, 他: 脳21, 4: 30-34, 2001.
- 6) Hashimoto, H. et al.: Neuron, 11: 333-342, 1993.
- 7) 橋本 均, 他: ビタミン, 71: 285-296, 1997.
- 8) Hashimoto, H. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 200: 1042-1048, 1994.
- 9) Hashimoto, H. et al.: J. Comp. Neurol., 371: 567-577, 1996.
- 10) Hashimoto, H. et al.: J. Neurochem., 74: 501-507, 2000.
- 11) Sakai, Y. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 285: 656-661, 2001.
- 12) Aino, H. et al.: Gene, 164: 301-304, 1995.
- 13) Hashimoto, H. et al.: Genomics, 58: 90-93, 1999.
- 14) Yamamoto, K. et al.: Gene, 211: 63-69, 1998.
- 15) Shintani, N. et al.: Biochim. Biophys. Acta, 1509: 195-202, 2000.

