

論 文 要 旨

Characterization of the testis-specific promoter region in the human Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) gene.

ヒト Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)
遺伝子の精巣特異的プロモーター領域の解析

富永 愛子

【序論および目的】

PACAP は精巣において脳に匹敵する濃度で存在しており、その発現は精子形成ステージ特異的に制御されている。更に 2000 年、ラット精巣において、PACAP 遺伝子翻訳開始点から 13.5 kb 上流に新規の精巣特異的エクソンが同定された(Daniel et al., 2000)。このことから PACAP 遺伝子には精巣特異的なプロモーターが存在し、それが精子形成サイクルにおいて高度に制御されていることが示唆される。しかしそのメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。従ってこれらのメカニズムを明らかにするため、ヒトにおける PACAP 遺伝子の精巣特異的プロモーターの解析を行った。

【材料および方法】

- ヒト精巣 cDNA を用いて、RT-PCR と 5'-RACE により、ヒト PACAP 精巣特異的エクソンとその転写開始点を解析、またそれを含む転写物の構造解析を行った。
- 精巣特異的エクソン上流域 1176 bp について、レポーターベクターを作製し、Dual-luciferase assay により、マウス精巣由来細胞 F9 におけるヒト PACAP 精巣特異的プロモーターの解析を行った。
- Gel shift assay により、F9 細胞においてプロモーター活性を示した領域に結合する F9 細胞核タンパク質の解析を行った。
- DNA affinity chromatography により F9 細胞でプロモーター活性を示した領域に結合するタンパク質を精製し、Mass spectrometry によりそれらの結合タンパク質を同定した。
- siRNA を用い結合タンパク質をノックダウンし、それによるプロモーター活性への影響を Dual-luciferase assay により評価した。

【結 果】

- ヒト精巣において、PACAP 遺伝子の精巣特異的エクソンを翻訳開始点から約 10.9kb 上流に同定し、そのエクソンを含む転写物の発現を確認した。一方ヒト脳では確認されなかった。精巣特異的転写物の構造は、脳などに見られるエクソン 1, 2 を含まず、イントロン 2 に繋がっていた。この配列から予測されるアミノ酸配列は、シグナルペプチドを含まないことが推測された。
- F9 細胞において、特異的にプロモーター活性を示す 80bp のコアプロモーター領域を同定した。この領域には GATA と AML-1a が結合することが予測されており、これらの結合配列にポイントミューテーションを入れ、プロモーター活性への影響を評価したところ、GATA 結合配列の変異は影響しなかったが、AML-1a 結合配列に変異を入れることによりプロモーター活性が減少した。
- 同定したコアプロモーター領域 80bp と F9 細胞核タンパク質との結合を確認した。プロモーター活性には、推定上の AML-1a 結合配列が必要であったが、結合においては AML-1a タンパク質は関与しなかった。
- 結合タンパク質を精製し、40kDa と 119kDa に位置するタンパク質をそれぞれ TIAR と PARP-1 と同定した。
- PARP-1 のノックダウンにより、F9 細胞における 80bp のプロモーター活性が抑制され、TIAR のノックダウンにより促進された。

【結論及び考察】

ヒトにおいて、PACAP 遺伝子の精巣特異的転写物が産生され、その転写物からシグナルペプチドを含まない非分泌型の PACAP 前駆体が産生されることが示唆された。このことは近年提唱された”intracrine”を支持する(Li et al., 2004)。 ”intracrine”とは細胞内においてリガンドとレセプターが結合し作用する機序であり、彼らは精巣生殖細胞において PACAP が細胞内の受容体に直接作用していることを報告している。従って、本研究で明らかにした精巣特異的転写物が非分泌型 PACAP 前駆体を産生し、直接細胞内受容体に結合することが推測される。

本研究では、精巣由来細胞において顕著なプロモーター活性を示す 80bp のコアプロモーター領域を同定した。そしてそ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。PARP-1 のタンパク質をノックダウンすることにより 80bp のプロモーター活性が抑制されたことから、PARP-1 がプロモーター活性に促進的に作用するエンハンサーとして働いていることが示唆された。しかし PARP-1 はエンハンサーとしての機能の報告はあるものの、組織特異性を持たないことから、組織特異性を有する因子と相互作用し、機能していることが考えられる。一方、TIAR のタンパク質をノックダウンすると、80 bp のプロモーター活性は上昇したことから、80bp に対し抑制的に働くことが示唆された。TIAR については、精子形成に対する作用が多く報告されており、そのことからもこのタンパク質が組織特異性を有し、特異的に 80bp の領域に結合し遺伝子発現調節に関与していることが示唆される。この抑制作用に関しては、更なる解析が必要である。80bp のプロモーター活性に影響するこれらのタンパク質 PARP-1 と TIAR が、精巣特異的 PACAP 遺伝子発現の制御メカニズム解明への大きな鍵となることが期待される。