

交感神経・中枢神経の神経ペプチド NPY の遺伝子発現と機能

— 神経分化, 記憶に関わる遺伝子制御 —

新潟大学医学部薬理学教室

樋口宗史

Gene Expression and Function of Neuropeptide Y in the Sympathetic Neurons
and Central Nervous System—Gene Regulation Involved
in Neural Differentiation and Memory.

Hiroshi HIGUCHI

*Department of Pharmacology
Niigata University School of Medicine*

It is an unsolved question how the neuron-specific genes are regulated in the mature neurons. The neuronal regulation of neuropeptide Y (NPY) gene which is a cotransmitter of sympathetic neurons and expressed abundantly in the central nervous system. The regulation of this gene resembles that of tyrosine hydroxylase gene. Both the membrane depolarization induced by neural activity and neurotrophic factors such as NGF induced the transcriptional activation of NPY and enkephalin genes. These mechanisms are due to both Ca/calmodulin and MAPK (mitogen-activated protein kinase) dependent processes, respectively. These findings indicated that the transcriptional activations of neural genes are due to the novel transactivational mechanisms. The novel transcriptional factors will be reported.

Key words: Gene expression, transcription, transcriptional factor, Neuropeptide Y, enkephalin A, cDNA cloning, neural differentiation, NGF, sympathetic neuron, synaptic plasticity, memory, depolarization, calmodulin

遺伝子発現, 転写, 転写因子, 神経ペプチドY, エンケファリンA,
cDNAクローニング, 神経分化, 神経成長因子, 交感神経, シナプス可塑性, 記憶,
脱分極, カルモジュリン

Reprint requests to: Hiroshi HIGUCHI
Department of Pharmacology
Niigata University School of Medicine
1-757 Asahimachi-dori, Niigata, 951-8510,
JAPAN

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通1番町757
新潟大学医学部薬理学教室 樋口宗史

1. はじめに

神経系の形成後に、神経細胞内で神経特異遺伝子がどのように発現調節され、かつ機能するかはまだ未解決の問題である。交感神経のコトランスミッターであり、中枢神経系で最も豊富に存在する Neuropeptide Y (NPY) 遺伝子の神経特異シグナルによる調節は交感神経のチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 遺伝子のそれによく似ている。NPY 前駆体 cDNA をクローニングし、NPY ペプチド前駆体構造と遺伝子発現を研究したところ、NPY は生理的条件や薬理学的処理により、神経系で最もよく変動する神経ペプチドであることが解った¹⁾⁻⁶⁾。その遺伝子発現の調節メカニズムを研究する過程で、NPY 遺伝子の発現が神経活動により変化することで、多くの神経シナプスの伝達効率の変化を伴い、シナプス可塑性を生じることが明らかになった⁴⁾⁷⁾。実際、NPY の変動は記憶保持に直接関わる神経遺伝子としても知られている。

今回、交感神経の活動増加による膜脱分極や神経成長因子 (NGF) による交感神経への分化によって、神経ペプチド NPY 遺伝子転写活性化が著しく誘導されることを報告した。この2つの NPY 遺伝子転写活性化機構はそれぞれカルシウム-カルモジュリンと MAPK を介する神経系にみられる新しい遺伝子転写活性化機構であった。

2. 神経特異 NPY 遺伝子の発現変化

Neuropeptide Y (NPY) は神経系においてオピオイドペプチドと同程度に、最も豊富に存在する神経ペプチドである。特に高次中枢、視床下部、大脳皮質、海馬に広範に存在し、重要な生理作用として視床下部ホルモンの遊離調節、食欲、記憶、血圧調節に関与している¹⁾⁸⁾⁹⁾。一方、末梢神経系では、交感神経の cotransmitter としてカテコールアミンの遊離抑制に働いている。血管周囲交感神経や副腎クロマフィン細胞に豊富に存在する。NPY はシナプス後性には、ノルエピネフリンと協調して強い持続性の血管収縮を引き起こす昇圧ペプチドである¹⁰⁾。

NPY のペプチド構造・遺伝子構造はこれまで調べられた神経ペプチドのうちで最も系統的に保存され、かつ、多くの神経ペプチドの中でも最も単純な構造を持っている。NPY 前駆体は神経ペプチド前駆体の特徴であるシグナルペプチド、NPY、C 末ペプチドしか持たない²⁾¹¹⁾。つまり、他の神経ペプチド遺伝子、例えば

preproenkephalin A 遺伝子で見られるようなエキソン重複が無く、安定な遺伝子構造を保っていることがわかる。ペプチド構造の高度保存性は、インスリンのヒト-ラット間では93%であるが、NPY のそれは100%であることから理解され、NPY は系統的に極めて重要な神経ペプチドであると考えられている²⁾¹²⁾。NPY は、類縁ペプチド Peptide YY (PYY)、Pancreatic polypeptide (PP) とともに NPY スーパーファミリーを形成している。

NPY の特異的抗体で NPY の生体内での量的変化を調べてみると、NPY は最も単純な神経ペプチド前駆体から派生するため、その遺伝子発現によって NPY 量が第一義的に決まっていることが明らかになった⁵⁾⁶⁾¹³⁾⁻¹⁷⁾。

一般に、交感神経の神経伝達に関わるカテコラミン合成酵素 tyrosine hydroxylase (TH)、神経ペプチド NPY、preproenkephalin A (ENK) の遺伝子発現は、その生体内での発現調節のされ方が非常に似ているが、これらの交感神経遺伝子のプロモーター上には共通の転写活性化メカニズムがあると考えられる。

この中で最も著しい変化は、ラットの副腎クロマフィン細胞における生体内での加齢に伴う NPY 量の210倍もの変化である。この増加は特徴的で、ラット7-18週ではほとんど変わらないが、20週令以上、ヒトでいえば中年ぐらいから著しく増加する。NPY は循環系では強い血管収縮作用や血管中膜の増殖作用を持っているので、中年以後の NPY の増加は高血圧や動脈硬化の原因になるかもしれない⁵⁾¹³⁾。Northern blot 分析では、ラット副腎での NPY 量の変化には NPYmRNA の増加と mRNA 前駆体の増加の両者が伴うことが認められた⁵⁾。NPYmRNA と NPYmRNA 前駆体がともに増加することから、これは mRNA の安定化ではなく、交感神経節細胞や副腎クロマフィン細胞で NPY 遺伝子の転写活性化が起こっていることを示している。

このような変化は、支配神経の活動に依存する。副腎支配内臓神経 splanchnic nerve を除神経すると、これらの NPY や NPYmRNA 量の増加は完全に抑えられる(経シナプス性)。加齢における副腎での著明な NPY 量の増加も完全に抑制されるので、生体内では交感神経活動が上昇し、それに伴うクロマフィン細胞の活動増加によって NPY の遺伝子発現が増加してくることが明らかになった⁵⁾¹⁸⁾。

神経活動に伴う NPY 遺伝子発現の増加は、交感神経系に留まらない。中枢神経系においても神経活動・膜

脱分極刺激は NPY 量, NPY 遺伝子発現をともに増加させる¹⁹⁾²⁰⁾. 従って, 神経活動に伴う NPY 遺伝子発現変化は NPY を発現する神経細胞で一般的にみられる NPY 遺伝子発現の調節機構である.

どのような細胞内シグナルが神経遺伝子 NPY 遺伝子発現を変化させるのだろうか?

3. 神経特異後期遺伝子 NPY 遺伝子の転写制御

一般に神経細胞は分裂終了細胞であるが, 代謝的には非常に活発であり, mRNA や蛋白質を高速度で合成している.

NPY 遺伝子が神経特異発現に関与するのに重要な塩基配列は Cap site 上流-700bp の中に種々存在する. この中で神経系に特異的なエンハンサー配列は, 神経成長因子 (NGF) 反応エレメント (NGFRE) と Ca 反応エレメント (CaMRE) である¹⁸⁾²¹⁾²²⁾. いわゆる神経特異的リプレッサー NRSF 結合部位は NPY 遺伝子のプロモーター部にはみられない. 他に存在するシスエレメントは神経外組織にも存在する普遍的転写因子 (CREB, AP1, AP2, Sp1 等) が結合するものと思われる. 上流から順に, 正あるいは負のエレメントが付加される毎に, CAT 活性の総和がそれに呼応して変動するので, 神経遺伝子 NPY 遺伝子の転写活性制御は, 普遍的転写因子と神経特異転写因子の NPY プロモーターに与える転写活性性能の総和で決まるとされる⁷⁾.

4. 脱分極で誘導される, 新しい Ca²⁺調節系による NPY 遺伝子転写活性化機構

神経細胞膜の興奮や抑制のような短期の神経活動に加えて, 神経系には記憶のような長期の情報変換保持機能がある. この長期の機能変化には, 遺伝子発現を介する神経蛋白質の新たな合成が不可欠と考えられている. 神経細胞の興奮後に生じる細胞内の cAMP や Ca²⁺ の変化が, どのような機構により遺伝子発現を引き起こすかに興味が集まっている²³⁾.

シナプス活動に伴う神経活動・膜脱分極は, シナプス後膜の神経細胞の遺伝子発現を時間的に二相性に变化させる. まず最初に, c-fos を含む IEGs の急速な誘導が起こる. この遺伝子群の誘導は既に存在している転写制御因子の活性化によって生じ, 蛋白合成誘導に依存しない. 細胞膜興奮による IEGs の誘導される種類は, 神経分化によって誘導される IEGs のそれとは違っている²⁴⁾. 続いて, 神経系に特異的な後期遺伝子群 (late

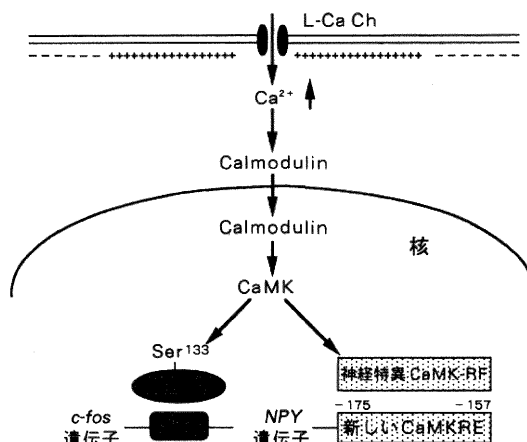


図1 脱分極を介する, 新しい Ca 依存性転写活性化機構 (詳しくは本文参照のこと)

response genes; LRGs) の誘導 (もしくは抑制) が蛋白合成に依存して起こってくる.

神経活動によって生じる神経細胞膜の脱分極に反応する LRGs としては, 神経ペプチド (Neuropeptide Y (NPY), エンケファリン, ソマトスタチン, カテコラミン合成酵素 tyrosine hydroxylase (TH), 神経栄養因子とその受容体などが報告されている⁴⁾⁵⁾⁷⁾²⁵⁾⁻²⁷⁾. これら LRGs の転写誘導は新規の蛋白質合成に依存しており, IEGs にコードされる一群の転写因子によって制御されていると考えられる.

神経活動・細胞膜脱分極で活性化される, 最も一般的なセカンドメッセンジャーは Ca²⁺系と考えられるが, Ca²⁺による遺伝子転写の調節には多様なメカニズムが知られつつある. 例えば, IEGs の1つである c-fos 遺伝子転写において, 神経細胞の興奮をおこすグルタミン酸と KCl の2つの膜脱分極シグナルには, Ca²⁺を介する転写活性化機構に違いがあることが報告されている²³⁾⁻²⁸⁾. 海馬の神経細胞では, グルタミン酸を経由する Ca²⁺伝達系は CaM キナーゼに依存せずに c-fos 遺伝子の活性化を行うが, 一方, KCl の場合は CaM キナーゼの関与が必須であった. これらの Ca²⁺シグナルの転写因子はそれぞれ SRF+Elk-1 (SRE 結合蛋白質) と CREB であり, KCl で活性化される L タイプ Ca チャンネルを介する c-fos 遺伝子の転写活性化には CREB が関与しており, グルタミン酸受容体 (NMDA 受容体) を介する Ca²⁺シグナル系の転写活

表1 生体における NPY 遺伝子発現の変化 (交感神経副腎: 詳細は本文参照のこと)

	NPY mRNA 量	NPY 量	調節レベル
短期変動 (1週間以内)			
レセルピン処理<24時間	→	↓ (50%)	遊離
>24時間	↑↑ (5倍)	↑↑ (2.1倍)	転写 (経シナプス性神経活動↑)
クロニジン処理<24時間	↑	↑	転写
インスリン	↑↑ (5倍)	↑↑ (6倍)	転写 (経シナプス性神経活動↑)
ストレス	↑ (2倍)	↑	転写 (経シナプス性神経活動↑)
長期変動			
加齢	↑↑↑ (30倍)	↑↑↑ (210倍)	転写 (経シナプス性神経活動↑)
フェオクロモサイトーマ	↑↑↑ (17倍)	↑↑↑ (93倍)	転写

性化には SRE 結合蛋白質が関わっていた²⁸⁾。

神経ペプチド NPY 遺伝子は脱分極シグナルの後期遺伝子で、神経細胞を脱分極すると、緩やかな時間経過でその発現が増加し、その変化が持続した⁷⁾。この標的 NPY 遺伝子の誘導には神経細胞膜の脱分極シグナルのセカンドメッセンジャーのうち何が関与するかを調べたところ、膜脱分極に伴う電位依存性 L-type Ca²⁺ チャンネルを通しての細胞内 Ca²⁺ の増加であり、これまで NPY 遺伝子発現を活性化するシグナルとして知られていた cAMP 系やグルココルチコイド、プロテインキナーゼ C 系等は全く関与しないことが解った²⁾⁽⁴⁾⁽⁶⁾⁽²¹⁾⁽²⁹⁾。さらに、この Ca²⁺ 増加による NPY 遺伝子発現の増加は、カルモジュリン阻害薬の W-7, trifluoperazine, KN-62 で完全に抑制されるので、Ca/calmodulin 依存性キナーゼ (CaM キナーゼ) が関与していると考えられた⁷⁾。この CaM キナーゼによる NPY 遺伝子発現の増加は mRNA の安定性の変化ではなく、NPY 遺伝子自体の転写活性の増加に依っていた。種々の NPY-CAT レポーター遺伝子を用いた解析で 200 塩基の CaM キナーゼ 反応性 cis-エレメント (CaMKRE; -344/-145) を NPY 遺伝子プロモーター上に同定した。この 200 bp の CaMKRE は、データベース上、既知のエレメントは全く存在しない、新しいエレメントであった。このことは、NPY 遺伝子の Ca/calmodulin に依存性の転写活性化は CREB はもちろんのこと、NF-AT, C/EBP β , SRF など介さない、これまで報告されていない、新しい転写因子を介するシグナル伝達系

であることを示していた⁷⁾。このように、神経特異後期遺伝子 Neuropeptide Y (NPY) 遺伝子の CaRE は最初期遺伝子 fos 遺伝子の CRE と全く異なっており、別のメカニズムであることが明らかになった。

この CaMKRE 結合因子は、神経活動に伴う神経特異遺伝子の発現誘導に関与すると思われる、今後この因子の同定が必要であると考えている。神経細胞において、IEGs と LRGs では Ca²⁺ シグナルによる遺伝子転写活性化のメカニズムが異なっている。1つのセカンドメッセンジャーである Ca²⁺ が神経細胞の IEGs や LRGs に対して異なったメカニズムで転写調節を行えることが、Ca²⁺ の多彩な神経機能調節に基礎になっている。

5. NGF 誘導性の NPY 遺伝子転写活性化に関与する新規転写因子 NDF1

交感神経分化のモデル細胞 PC12細胞を NGF で交感神経に分化させると、NPY 遺伝子はその遺伝子発現量が著しく増加する²⁹⁾。一方、NGF による PC12細胞の突起伸展の時間経過とそれに対するグルココルチコイドの抑制の様式は NPY 遺伝子発現の様式とよく一致する。このことは、交感神経の cotransmitter である NPY の遺伝子発現は NGF による交感神経の分化そのものの指標になることを示唆している²²⁾。

NGF による高親和性受容体 TrkA 活性化を介して、活性化型 Ras-GTP の増加と Raf1, MEK, MAPK の活性化が生じる。この過程は PC12細胞の生存維持・

終末神経分化に必須である。実際、Cowley らは MAPKK の1つ MEK 1の活性化が PC12細胞の神経分化に必要十分であることを報告した³⁰⁾。MEK を介する MAPK アイソフォームの活性化によって蛋白合成に依存しない転写制御因子 IEGs (immediate-early genes) の発現が誘導される。この初期過程はよく知られているが、IEGs の発現に続いて、どのように神経特異的な後期遺伝子が転写誘導されるかは解っていない。この未知の分化誘導転写因子を明らかにするには NPY 遺伝子プロモーターを指標にして調べればよい。

NPY 遺伝子は NGF 刺激の LRG であり、蛋白合成を介して著しい NPY 遺伝子転写活性化が生じる。この転写活性化は NPY 遺伝子のプロモーター上48bp の NGF-response element (NGFRE; -80/-33) によって引き起こされる。NGFRE の上流18bp (-80/-63) は、系統的に良く保存された28bp のパルンドロームの一部を形成しており、系統発生的に重要な転写因子が結合する。私達はこれまで NGFRE の二本鎖塩基配列に特異的に結合する DNA 結合蛋白質の存在と神経系での発現を報告してきた²²⁾。二本鎖 DNA 結合蛋白質のうち、AP1-like site (-74/-63) に結合する NDF1 は NGF の刺激に伴い DNA 結合量が増加するので、NGF による NPY 遺伝子の転写調節における重要な転写因子と考えられている。

この因子 NDF1 が、ラット PC12細胞及び脳 λ gt11cDNA ライブラリーからこの蛋白質がクローニングされた。この新しい転写因子 NDF1 が NGF による NPY 遺伝子の転写誘導を完全に抑制する転写抑制因子 repressor であった。つまり、NPY 遺伝子転写活性化は NDF2 あるいは未同定の他の因子に関わるが、その時同時に抑制性の転写因子も NGF で誘導されてきたと考えられる。

NDF1 はいままでの転写因子と違い、leucine zipper や helix-loop-helix のような構造は持たないが、一部 ROR α にホモロジーを持ち、2つの核移行シグナルを持っている。多くのセカンドメッセンジャー依存性リン酸化酵素によるリン酸化推定部位があり細胞内セカンドメッセンジャーで調節されると思われる。転写抑制因子 NDF1 はこれまでの所、NGF による PC12細胞の交感神経様細胞への分化も抑制する、分化抑制因子であることも解ってきた。

6. おわりに

神経系の長期の機能変化を担う機構として、神経細胞

の活動に伴う神経遺伝子転写制御とニューロトロフィンによる転写調節が重要と思われる。これらは精密かつ多彩に、神経系の遺伝子を調節する。最近、核への情報伝達系と遺伝子転写制御の基本的メカニズムがよく解ってきたが、神経特異遺伝子の神経特異的なシグナルによる遺伝子制御は、まだまだ不明の点が多い。脳の記憶・学習の分子機構の解明にはこれらの研究が不可欠と思われる。

本研究は大阪大学大学院医学研究科情報薬理学講座において成された研究が主体であり、三木直正教授他多くの共同研究者に御礼申し上げます。また発表の機会を与えて頂いた新潟医学会、座長の労をとっていただいた木南凌教授に深謝いたします。

参考文献

- 樋口宗史: 日本薬理学雑誌 93: 203~218頁, 1989年.
- Higuchi, H., Yang, H.Y.T. and Sabol, S.L.: J. Biol. Chem. 263: 6288~6295, 1988.
- 樋口宗史, 李 炳生: 日本薬理学雑誌 106: 365~378, 1995.
- Higuchi, H., Iwasa, A., Yoshida, H., and Miki, N.: Mol. Pharmacol. 38: 614~623, 1990.
- Higuchi, H., Yokokawa, K., Iwasa, A., Yoshida, H. and Miki, N.: J. Neurochem, 57: 1840~1847, 1991a.
- Higuchi, H., Iwasa, A. and Miki, N.: Br. J. Pharmacol. 103: 1136-1140, 1991b.
- Higuchi, H., Nakano, K., Kim, C.-H., Li, B.-S., Kuo, C.-H., Taira, E. and Miki, N.: J. Neurochem, 66: 1802~1809, 1996.
- Adrian, T.E., Allen, J.M., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Rossor, M.N., Robert, G.W., Crow, T.J., Tatemoto, K. and Polak, J.M.: Nature, 306: 584~586, 1983.
- De Quidt, M.E. and Emson, P.C.: Neurosci, 18: 545~618, 1986.
- Walker, P., Grouzmann, E., Burnier, M. and Waeber, B.: TIPS, 12: 111~115, 1991.
- Kvetnansky, R., Nankova, B., Hiremagalur, B., Viskupic, E., Vietor, I., Rusnak, M., Larhammer, D., Soderberg, C. and Blomqvist, A.G.: The Biology of neuropeptide Y, edited by Colmers, W.F., and Wahlestedt, C., pp.1~41, 1993, Humana, Totowa, New Jersey.

- 12) Blomqvist, A., Soderberg, C., Lundell, I., Milner, R.J. and Larhammar, D.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 89: 2350~2354, 1992.
 - 13) Higuchi, H., Yang, H.Y.T. and Costa, E.: J. Neurochem, 50: 1879~1886, 1988.
 - 14) Higuchi, H., Nakano, K. and Iwasa, A.: Neuropeptides 25: 343~349, 1993.
 - 15) FischeR-Colbrie, R., Iacangelo, A. and Eiden, L.E.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 85: 3240~3244, 1988.
 - 16) Higuchi, H., Iwasa, A., and Yokokawa, K.: Clin. Exp. Pharmacol. Physiol, 21: 359-365, 1994.
 - 17) deS Senanayake, P., Denker, J., Bravo, E. and Graham, R.M.: J. Clin. Invest, 96: 2503~2509, 1995.
 - 18) Higuchi, H. and Yang, H.Y.T.: J. Neurochem, 46: 1658~1660, 1986.
 - 19) Mikkelsen, J.D., Woldbye, d., Kragh, J., Larsen, P.J. and Bolwig, T.G.: Mol. Brain Res. 23: 317~322, 1994.
 - 20) Zachrisson, O., Mathe, AA., Stenfors, C. and Lindfors, N.: Mol. Brain Res, 31: 71-85, 1995.
 - 21) Misaki, N., H. Higuchi, K. Yamagata. and Miki, N.: Neurochem. Int, 21: 185~189, 1992.
 - 22) Higuchi, H., Nakano, K. and Miki, N.: Biochem. Biophys. Res. Commun, 189: 153~1560, 1992.
 - 23) 樋口宗史, 郭 哲輝, 三木直正: 「神経細胞核への情報伝達と神経遺伝子発現」 生物学的精神医学シリーズ第14巻「脳シグナルカスケードと精神疾患」(三国雅彦・樋口輝彦編) 学会出版センター, 35~57頁, 1997年.
 - 24) Sheng, M. and Greenberg, ME.: Neuron 4: 477~485, 1990
 - 25) Farin, C.J., Kley, N. and Hokfelt, V.: J. Biol. Chem. 265: 19116~19121, 1990.
 - 26) Kilbourne, E.J. and Sabban, E.L.: Mol. Brain Res. 8: 121~127, 1990.
 - 27) Zafra, F., Hengerer, B., Leibrock, J., Thoenen, H. and Lindholm, D.: EMBO J. 9: 3545~3550, 1990.
 - 28) Bading, H., Ginty, D.D. and Greenberg, M.E.: Science 260: 181~186, 1993.
 - 29) Sabol, S.L. and Higuchi, H.: Mol. Endocrinol, 4: 384~392, 1990.
 - 30) Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. and Marshall, C.J.: Cell, 77: 841-852, 1994.
-