

マウス下垂体におけるプロオピオメラノコルチン遺伝子の発現制御

村上 逸雄・竹内 栄・高橋 純夫

岡山大学大学院自然科学研究科バイオサイエンス専攻

はじめに

プロオピオメラノコルチン (POMC)は、下垂体前葉から分泌される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)の前駆体タンパク質である (1)。ACTH は糖質コルチコイドの副腎皮質からの分泌を促進する。ACTH 産生細胞において、POMC の合成および分泌は視床下部から分泌される副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH)によって活性化される (2)。ACTH は糖質コルチコイドの分泌を介し、個体のストレス応答反応を制御する。下垂体における POMC 遺伝子の発現には、転写因子 *Tpit* が不可欠である (3, 4)。POMC 遺伝子のプロモーター領域には、*Tpit* の結合配列と下垂体全般に発現する転写因子 *Pitx1* の結合配列が隣接して存在し、それらは *Tpit/PitxRE* と呼ばれる。CRH の受容体として CRH-R1 と CRH-R2 の 2 種類が存在する (5)。CRH は細胞内 cAMP 濃度を上昇させ、カルシウムイオンの流入を起こす (6)。また、CRH は転写因子 Nur 因子を POMC プロモーターの NurRE に結合させ、POMC 遺伝子の転写を活性化する (7)。本稿では CRH による POMC 遺伝子の転写活性化に着目し、CRH 受容体の下垂体内における発現を調べた。さらに、ラット POMC 遺伝子プロモーター活性をマウス下垂体 ACTH 産生腫瘍 AtT-20 細胞におけるレポーターアッセイで解析した。

材料と方法

実験動物

2カ月齢の ICR 系雄マウスの器官から RNA を抽出した。Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法によって CRH 受容体 mRNA の発現を解析した。また、下垂体を 4%ホルムアルデヒドで固定してパラフィン切片を作成し、マウス CRH-R1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)で免疫染色した。

POMC 遺伝子プロモーターの解析

AtT-20 細胞を Dulbecco 改変の Eagle 培地に牛胎児血清を 1/10 量混ぜた培養液を用いて培養した。Lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて AtT-20 細胞にラット POMC 遺伝子のレポーター遺伝子をトランスフェクションした。24 時間後に細胞を CRH (ペプチド研究所、大阪)または 8-(4-chlorophenylthio) adenosine 3',5'-cyclic monophosphate (pCPT-cAMP, Sigma-Aldrich)を投与した。投与 4 時間後に細胞を溶解し、Dual luciferase Reporter Assay System (Promega)を用いて、プロモーター活性を測定した。カルシウム/カルモ

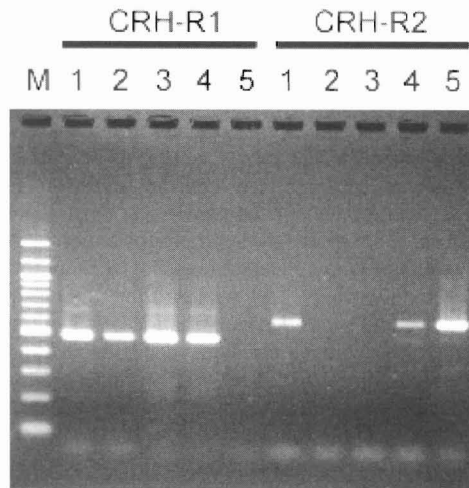


図1 マウス器官における CRH 受容体 (CRH-R1、CRH-R2) mRNA の発現。1, 下垂体前葉; 2, 下垂体中後葉; 3, AtT-20 細胞; 4, 脳; 5, 心臓。M, 分子量マーカー。

ジュリン依存性プロテインキナーゼ II (CAM-KII)阻害剤の KN-62 (和光純薬工業、大阪)は、CRH、pCPT-cAMP 投与の 1 時間前に細胞に処理した。

統計処理

データは平均値と標準誤差であらわし、Turkey-Kramer 法によって解析した。対照群と投与群の差の検定は Dunnet 法を用いた。

結果

マウス器官における CRH 受容体の発現

CRH-R1 と CRH-R2 の 2 種類存在する CRH 受容体の mRNA 発現を RT-PCR により調べた (図 1)。脳、下垂体前葉、下垂体中後葉、AtT-20 細胞で CRH-R1 mRNA が検出された。CRH-R2 mRNA は、脳、下垂体前葉、心臓で検出された。

下垂体前葉における CRH-R1 発現細胞の検出

マウス下垂体における CRH-R1 の発現を、CRH-R1 抗体を用いて免疫組織化学的に検出した (図 2)。CRH-R1 免疫陽性細胞は、下垂体前葉における分布と細胞の形態が ACTH 免疫陽性細胞と類似していた。

CRH と pCPT-cAMP による POMC プロモーターの活性化

POMC プロモーターの部位特異的変異導入コンストラクトの、CRH および pCPT-cAMP に対する応答性を調べた (図 3)。

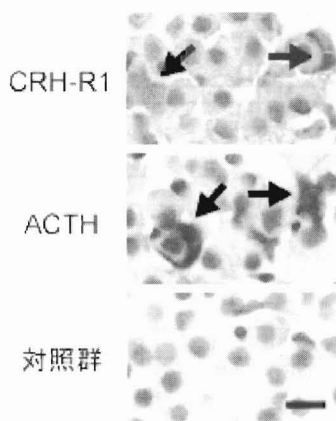


図2 マウス下垂体前葉における CRH-R1 免疫陽性細胞と ACTH 免疫陽性細胞の検出。各細胞は、抗 CRH-R1 抗体、抗 ACTH 抗体を用いて免疫細胞化学的に検出した。矢印が免疫陽性細胞を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

NurRE 変異コンストラクトは CRH および pCPT-cAMP による活性化が低下した。TpitRE 変異コンストラクトと PitxRE 変異コンストラクトでも CRH に対する活性化が減少した。

CRH と pCPT-cAMP による Tpit/PitxRE の CAM-KII 依存的活性化

(Tpit/PitxRE) \times 3 コンストラクトのプロモーター活性に対する CRH および pCPT-cAMP の効果を調べた (図 4)。(Tpit/PitxRE) \times 3 の活性は CRH および pCPT-cAMP によって上昇した。この活性上昇は CAM-KII 阻害剤 KN-62 によって減少した。

考察

下垂体において CRH が POMC 遺伝子の発現を活性化することは、個体のストレス応答の引き金となる反応である。本研究では、RT-PCR によって 2 種類の CRH 受容体の mRNA が異なる組織で発現

していることを明らかにした。AtT-20 細胞では CRH-R1 mRNA のみが発現していた。さらに免疫組織化学によって CRH-R1 免疫陽性細胞は ACTH 産生細胞様の細胞であったことから、CRH は ACTH 産生細胞に発現する CRH-R1 を介して POMC の転写を活性化していると考えられる。

レポーターアッセイによって、POMC 遺伝子プロモーター活性は CRH と pCPT-cAMP によって活性化された。Tpit は *in vitro* で Tpit/PitxRE プロンプトと結合することが示されている(3)。本研究では、AtT-20 細胞において Tpit/PitxRE への変異によって POMC プロモーターの活性が減少した。Tpit または Pitx1 の Tpit/PitxRE への結合が POMC の転写を維持するのに重要であることが示された。プロモーターへの変異導入実験では CRH と pCPT-cAMP による POMC の転写活性化は NurRE が最も重要であることが示された。また、Tpit/PitxRE プロモーターは CAM-KII 依存的に CRH と pCPT-cAMP によって活性化された。NurRE の活性も CAM-KII 系を介して CRH によって活性化される報告がある (8)。さらに Tpit と Nur 因子との結合が報告されており (9)、Tpit/PitxRE は NurRE と協調的に CRH による POMC の転写活性化に働いている可能性がある。このように、CRH は ACTH 産生細胞の CRH-R1 に結合して、cAMP 上昇と CAM-KII の活性化を起こし、NurRE と Tpit/PitxRE 依存的に POMC 遺伝子の転写を活性化していると考えられる (図 5)。

謝辞

本研究は文部科学省科学研究費補助金により行われた。

要約

マウス下垂体前葉の ACTH 産生細胞では、CRH-R1 を発現していた。POMC 遺伝子プロモーターの Tpit/PitxRE 配列は、POMC 遺伝子の転写活性を維持するのに重要であることを明らかにした。

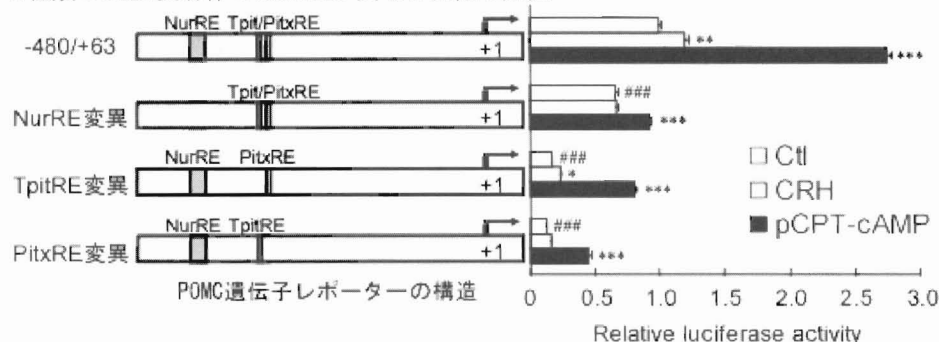


図3 ラット遺伝子 POMC プロモーターの CRH と cAMP 応答性の解析。ラット POMC プロモーター部位特異的変異導入コンストラクトを AtT-20 細胞に導入した。24 時間後に CRH (100 nM) と pCPT-cAMP (500 μ M) を投与した。各群 3 試料の平均値と標準誤差であらわす。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001、対照群 (CtI) と比較して有意の差。###<0.001、-480/+63 コンストラクトと比較して有意の差。

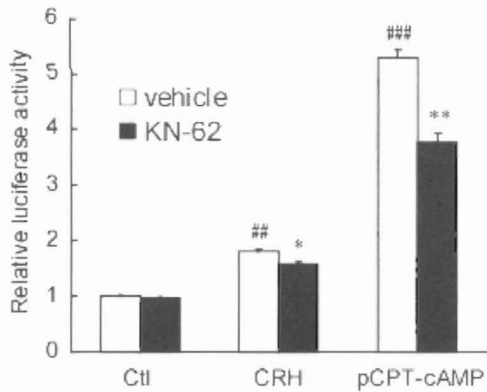


図4 Tpit/PitxRE の CAM-KII 依存的な活性化の解析。(Tpit/PitxRE)×3 を AtT-20 細胞に導入した。24 時間後に KN-62 (10 μ M) を処理した後、CRH (100 nM) と pCPT-cAMP (500 μ M) を投与した。各群 3 試料の平均値と標準誤差であらわす。* P <0.05, ** P <0.01、ベークル処理群と比較して有意の差。### P <0.01, #### P <0.001、対照群 (Ctl) と比較して有意の差。

CRH は主に POMC 遺伝子プロモーターの NurRE 配列依存的に POMC 遺伝子の転写を活性化したが、Tpit/PitxRE 配列の活性も CAM-KII 系を介して上昇させた。Tpit/PitxRE は NurRE と協調的に働いて POMC 遺伝子の転写を活性化していると考えられる。

参考文献

- (1) Smith AI, Funder JW. Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr Rev* 1 : 159-179 (1988)
- (2) Bruhn TO, Sutton RE, Rivier CL, Vale WW. Corticotropin-releasing factor regulates proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in vivo. *Neuroendocrinology* 39 : 170-175 (1984)
- (3) Lamolet B, Pulichino AM, Lamonerie T, Gauthier Y, Brue T, Enjalbert A, Drouin J. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104 : 849-859 (2001)
- (4) Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Couture C, Gauthier Y, Brue T, David M, Malpuech G, Deal C, Van Vliet G, De Vroede M, Riepe FG, Partsch CJ, Sippell WG, Berberoglu M, Atasay B, Drouin J. Human and mouse TPIT gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev* 17 : 711-716 (2003)

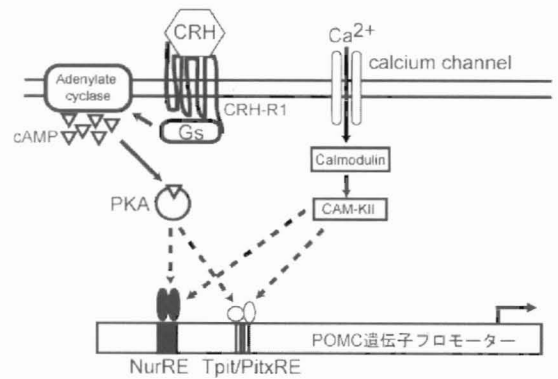


図5 ACTH 産生細胞における CRH による POMC 遺伝子の転写活性化機構

- (5) Grammatopoulos DK, Chrousos GP. Functional characteristics of CRH receptors and potential clinical applications of CRH-receptor antagonists. *Trends Endocrinol Metab* 13 : 436-444 (2002)
- (6) Kuryshev YA, Childs GV, Ritchie AK. Corticotropin-releasing hormone stimulates Ca^{2+} entry through L- and P-type Ca^{2+} channels in rat corticotropes. *Endocrinology* 137 : 2269-2277 (1996)
- (7) Philips A, Maira M, Mullick A, Chamberland M, Lesage S, Hugo P, Drouin J. Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol* 17 : 5952-5959 (1997)
- (8) Kovalovsky D, Refojo D, Liberman AC, Hochbaum D, Pereda MP, Coso OA, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E. Activation and induction of NUR77/NURR1 in corticotrophs by CRH/cAMP: involvement of calcium, protein kinase A, and MAPK pathways. *Mol Endocrinol* 16 : 1638-1651 (2002)
- (9) Maira M, Couture C, Le Martelot G, Pulichino AM, Bilodeau S, Drouin J. The T-box factor Tpit recruits SRC/p160 co-activators and mediates hormone action. *J Biol Chem* 278 : 46523-46532 (2003)