

学位申請論文

ニコチンはカテコールアミントランスポーター遺伝子の発現を制御する

岡山大学歯学部 RI 実験施設

大山和美

岡山大学医歯薬学総合研究科

ニコチンはカテコールアミントランスポーター遺伝子の発現を制御する

大山 和美

Nicotine Regulates The Expression of Catecholamine Transporter
Gene

Kazumi Ohyama

(平成 25 年 12 月 13 日 受付)

カテコールアミンは、ベンゼン環のパラ位とメタ位にヒドロキシ基を有するカテコール核とアミンを含む側鎖を持つ有機化合物を指し、神経伝達物質であるノルアドレナリンとドパミンが含まれる。これらの神経伝達物質は、生体内でチロシン水酸化酵素を介したチロシンからの L-Dopa 合成、次いでドーパ脱炭酸酵素による L-Dopa からドパミンへの変換、さらにドパミンβ水酸化酵素によるドパミンからノルアドレナリンへの変換という経路で生合成される。シナプス小胞に貯蔵された神経伝達物質は神経興奮により神経終末から遊離し、神経伝達が行われるが、神経伝達終結機構の1つとして神経終末に存在する神経伝達物質トランスポーターが機能している。

カテコールアミンの神経伝達終結機構であるドパミントランスポーター (DAT) とノルアドレナリントランスポーター (NET) は、ともに Na^+ および Cl^- 依存性神経伝達物質トランスポーター遺伝子ファミリーに属し¹⁾、 Na^+ , K^+ -ATPase の働きにより生じた細胞内外 Na^+ 濃度勾配を駆動力としてカテコールアミンを神経終末内に再取込みする²⁾。これらのカテコールアミントランスポーターは、12 の疎水性膜貫通領域と第3およ

び第 4 膜貫通領域の間に多くの糖付加部位を有する長い細胞外ループ構造を有し, アミノ基末端およびカルボキシ基末端が細胞内に配置されるという, 共通した構造を有している^{1, 3, 4)}。

一方, ニコチンは煙草に含まれる主要なアルカロイド成分であり, ニコチン性アセチルコリン受容体に結合し, 交感神経や副腎髄質クロマフィン細胞からカテコールアミンの遊離を促進する²⁾。シナプス間隙のカテコールアミン濃度は, 神経終末から遊離した量と神経終末に再取込みされた量の差し引きによる総量で示されることから, 神経伝達物質トランスポーターを介する再取込みは, 細胞外神経伝達物質量を調節する主要な機構であり, 神経活動を調節する鍵となる⁵⁾。

カテコールアミン作動性神経に対するニコチンの作用については, これまでに, 神経伝達物質遊離促進のほか, カテコールアミン合成律速酵素であるチロシン水酸化酵素の活性化による修飾作用や⁴⁾, 慢性的なニコチン摂取による DAT mRNA 発現の増加などが報告されている⁶⁾。しかし, ニコチンが転写調節に関与しているか否かを含め, カテコールアミントランスポーター mRNA 発現がニコチンによりどのように制御され

ているかについては未だ明らかになっていない。

したがって、本研究ではカテコールアミントランスポーター遺伝子発現に対するニコチンの作用を明らかにするため、DAT および NET 遺伝子転写活性に対するニコチンの影響をレポーターアッセイにより解析した。

方 法

1)レポーターコンストラクト作成

1. DAT

ヒト DAT 遺伝子 (SLC6A4) 全長を含む BAC クローン (RP11-94J21) は、BACPAC Resources (Children's Hospital Oakland, Oakland, CA, U.S.A.) より入手した。BAC DNA を EcoRI (東洋紡, 東京, 日本) で切出し, クローニングベクター pBluescript II SK(-) (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, U.S.A.) に挿入した後, PCR 法で DAT プロモーター領域を含む約 10kb の DAT 遺伝子 5' -領域が挿入されたクローンを

選択した。pPG Basic vector (ニッポンジーン, 東京, 日本) を用い, DAT 遺伝子 5'-領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポーターコンストラクト (pD10.1, pD5.7, pD3.2, pD2.8, pD2.4) を作成した。さらに, 各レポーターコンストラクトからイントロン 1 部分 (int1: +733 から +2207) を削除したコンストラクト (pD10.1-int1, pD5.7-int1, pD3.2-int1, pD2.8-int1, pD2.4-int1) を作成した⁸⁾ (図 1)。

2. NET

ヒト NET 遺伝子 (SLC6A2) を含む BAC クローン (RP11-2D4) は, BACPAC Resources より入手した。BAC DNA から, プロモーター領域を含む約 8.9Kb の NET 遺伝子 5' 領域を XhoI (東洋紡, 東京, 日本) で切り出し, ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとする発現プラスミド pPG Basic vector に挿入した。なお, この領域はエキソン 2 翻訳開始点とその下流のイントロン 2 の一部を含むため, 転写活性への影響を考慮し, レポーターコンストラクト作成前に, この領域を改変してコンストラクトを作製した。すなわち, PCR 法によりエキソン 2 の翻訳開始点上流に Hind

III 配列を導入し，これを pPG Basic vector の HindIII 部位に繋いだコンストラクトを作製し，これを pN8.9 (-7699 から +693) とした。これを基に，5' 欠失 mutant pN3.2, pN1.6 を作製した (図 2)。さらに各レポーターコンストラクトからイントロン 1 部分 (int1 : +253 から +652) を削除したコンストラクト (pN8.9-int1, pN3.2-int1) を作成した (図 2)。

2) 細胞培養

細胞は ATCC (Manassas, VA, U.S.A.) より購入し，5% CO₂，37°C 環境下で培養した。アフリカミドリザル腎臓由来 COS-7 細胞は，10% ウシ胎児血清，抗生物質および抗真菌薬 (ペニシリン G ; 100units/ml, ストレプトマイシン ; 100µg/ml およびアンホテリシン B ; 250ng/ml, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louise, MO, U.S.A.) を含む高グルコースダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM, 和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) で培養した。ヒト神経芽細胞腫由来 SK-N-SH 細胞と SK-N-AS 細胞，およびチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO 細胞は，10% ウシ胎児血清，ペニシリン G (100units/ml), ストレプトマイシン (100µg/ml)

およびアンホテリシン B (250ng/ml)を含む α 改変イーグル最小必須培地(α -MEM, 和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本)で培養した。

3) 遺伝子導入と DAT および NET 遺伝子転写活性測定

それぞれの細胞は, 24 穴プレートに播種後一日培養し, 50-60%コンフルエントで実験に用いた。

DAT および NET のそれぞれにおいて構築したルシフェラーゼレポーターコンストラクト (DNA 0.2 μ g) を, 血清無添加培地 (最終量 20 μ L) 中で FuGENE6 transfection reagent (0.6 μ L, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) と混合し, この混合液を細胞に添加することにより, 遺伝子導入を行った。遺伝子導入処理 48 時間後に細胞を回収し, Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega Corporation, Madison, WI, U.S.A.) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。なお, 遺伝子導入処理時に pRL-TK (5ng, Promega Corporation, Madison, WI, U.S.A.) を検討レポーターコンストラクトと同時に混合して遺伝子導入し, 内部標準とした。

4) ニコチン添加

ニコチン(和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本)は滅菌水に溶解し, 最終濃度対比 1000 倍に調整した。なお, 対照群には同量の滅菌水を使用した。遺伝子導入処理 24 時間後の細胞にニコチン(最終濃度: 5 μ M)を添加し, その 24 時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。

5) mRNA 発現

Isogen(日本ジーン, 東京, 日本)を用い, AGPC 法にて総 RNA を抽出した⁷⁾。全 RNA(1-10 μ g)を RNaseH(-)-MMLV 逆転写酵素(RivatraAce, 東洋紡, 東京, 日本)で逆転写後, KOD-Plus(東洋紡, 東京, 日本)および以下に示す特異的プライマーを用いて目的とする遺伝子配列を増幅(94 $^{\circ}$ C 2 分, 94 $^{\circ}$ C 15 秒・57 $^{\circ}$ C 30 秒・68 $^{\circ}$ C 2 分, 30 サイクル)した。PCR 産物は, 1.2%アガロースゲルで電気泳動した。リアルタイム PCR は, 抽出した全 RNA(1 μ g)を iScript cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.)を用いて逆転写後, iQ SYBR Green Supermix

(Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) および以下に示す特異的プライマー (Eurofins MWG Operon Inc., Huntsville, AL, U.S.A.) で目的とする遺伝子配列を増幅 (95°C 3 分, 95°C 10 秒・57°C 15 秒・72°C 30 秒, 40 サイクル), 定量した。

PCR 用プライマーセット (センス/アンチセンス)

DAT: 5' -GCTGCACCTCCACCAGAGCCATGGCATC

5' -GTGGTGACAATCGCGTCCCTGTAGCAG

NET: 5' -CTACTACAACGTCATCATCGCC

5' -AGATGGCGAACCCAGAGACG

nAChR_α 2: 5' -GTGGAGGAGGAGGACAGA

5' -CTTCTGCATGTGGGGTGATA

nAChR_α 3: 5' -CAGAGTCCAAAGGCTGCAAG

5' -AGAGAGGGACAGCACAGCAT

nAChR_α 4: 5' -GTGCATCTCCGTGCTGCTGTTCG

5' -TACCCAGGTGGGCATGGTGTGC

nAChR_α 5: 5' -CTTCACACGCTTCCCAAAC

5' -CTTCAACAACCTCACGGACA
 nAChR_ α 6: 5' -TCCATCGTGGTGACTGTGT
 5' -AGGCCACCTCATCAGCAG
 nAChR_ α 7: 5' -GTACGCTGGTTTCCCTTTGA
 5' -CCACTAGGTCCCATTCTC
 nAChR_ α 9: 5' -GAAAGCAGCCAGGAACAAAG
 5' -GCACTTGGCGATGTACTION
 nAChR_ α 10: 5' -ACACAAGTGCCCTGAGACCT
 5' -TCCCATCGTAGGTAGGCATC
 nAChR_ β 2: 5' -ATGCCGTGGTCTCCTATGAT
 5' -AGGGGATGATGAGGTTGATG
 nAChR_ β 3: 5' -AAGGGGAACAGAAGGGACGG
 5' -CGGTAACAATGATGGACAGG
 nAChR_ β 4: 5' -CAACAACCTGATCCGCCCAGC
 5' -GAAGGGAAAGTACTTCACCTC
 G3PDH : 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC

5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA (図 7B, 図 9A)

5' -CGTCTTCACCACCATGGAGA

5' -CGGCCATCACGCCACAGTTT (図 11A)

リアルタイム PCR 用プライマーセット (センス/アンチセンス)

nAChR_α 4: 5' -CTCACCGTCCTTCTGTGTC

5' -CTGGCTTTCTCAGCTTCCAG

nAChR_β 2: 5' -ACCGTCCCAATTGTATTCC

5' -AACAGCTTCTTGCCTATCC

hNET : 5' -CGCTTCCCCTACCTCTGCTA

5' -AGATTTTCCAAACGGTGGCA

G3PDH : 5' -AAATCCCATCACCATCTTCC

5' -GACTCCACGACGTA CT CAGC

6) 神経性ニコチン性アセチルコリン受容体リガンドの添加

方法 3) に従い, SK-N-SH 細胞にレポーターコンストラクト pD5.7

を遺伝子導入した。遺伝子導入処理 24 時間後に、ニコチン (10 μ M) あるいはアセチルコリン (10 μ M, ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) を添加した。ヘキサメソニウム (10 μ M, C6, 東京化成工業株式会社, 東京, 日本) はニコチンあるいはアセチルコリンと同時に添加した。薬物を 24 時間作用させた後, 細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。ニコチン, アセチルコリン, ヘキサメソニウムは滅菌水に溶解し, 最終濃度対比 1000 倍に調整した。なお, 対照群には同量の滅菌水を使用した。

7) NET mRNA 発現に対するニコチンの影響

SK-N-SH 細胞を 60mm ディッシュに播種し, 24 時間後にニコチン (10 μ M) を添加した。その後, 経時的 (1, 3, 6, 24 時間) に細胞を回収し, 方法 5) に従い, NET mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で定量した。短時間ニコチン作用の検討では 0 時間を, 長時間ニコチン作用の検討では同量の滅菌水を投与したものを対照とした。

8) NET 蛋白質発現

SK-N-SH 細胞を 60mm ディッシュに播種し 24 時間後にニコチン (10 μ M) を添加した。ニコチン添加 6, 24 および 48 時間後に, プロテアーゼ阻害剤混合液 (1:100, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louise, MO, U.S.A.) を含む RIPA バッファー (25mM Tris-HCl pH7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% デオキシコール酸, 0.1% SDS) で溶解した。NET 蛋白質発現は, 抗ヒト NET モノクローナル抗体 (1:500, MAb Technologies Inc., Stone Mountain, GA, U.S.A.), および抗マウス IgG 西洋ワサビパーオキシダーゼ (HRP) 標識 2 次抗体 (1:10000, Cell Signaling Technology, Inc, Danvers, MA, U.S.A.) を用いウエスタンブロット法で解析した。また, アクチン蛋白質発現は, 抗アクチン抗体 (1:200, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louise, MO, U.S.A.), および抗ウサギ IgG-HRP 標識 2 次抗体 (1:10000, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) を用いウエスタンブロット法で解析した。

8) 統計

各データは平均値 \pm 標準誤差で示した。3 群間以上の比較は ANOVA

および Bonferroni 法を用いて検定した。2 群間の比較は Mann-Whitney U test を用いて検定した。なお，危険率 5 % 未満を有意差有り と判定した。

結 果

1) 5' 領域の転写活性

a) DAT

非神経細胞由来 COS-7 細胞，神経細胞由来 SK-N-SH 細胞において，いずれのコンストラクトにも転写活性が認められた。また，COS-7 細胞では，コンストラクト間で転写活性に差は認められなかったが，SK-N-SH 細胞では，5' 上流を欠失させることにより転写活性が増強した。さらに，第 1 イントロン部分を欠失させると，COS-7 細胞および SK-N-SH 細胞双方で，いずれのコンストラクトにおいても転写活性が増強した。(図

3)

b) NET

非神経細胞由来 CHO 細胞，神経細胞由来 SK-N-SH 細胞において，いずれのコンストラクトにも転写活性が認められた。また，CHO 細胞では，5' 上流を欠失させることにより転写活性が増強した。一方，SK-N-SH 細胞では，5' 上流を一部欠失させた pN3.2 において pN8.9 と比べ転写活性が減弱し，より大きく 5' 上流を欠失させた pN1.6 においては，pN3.2 と比べ転写活性が増強した。さらに，第 1 イントロン部分を欠失させると，CHO 細胞では転写活性に変化は認められなかったが，SK-N-SH 細胞ではいずれのコンストラクトにおいても転写活性が増強した(図 4)。

2) 転写活性に対するニコチンの影響

a) DAT

SK-N-SH 細胞にニコチンを 24 時間作用させたところ，pD10.1 および pD5.7 コンストラクトで有意な増強作用が認められた⁸⁾。(図 5 A)。また，イントロン 1 部分の欠失は，ニコチンによる増強作用に影響しなかった⁸⁾(図 5 B)。

一方、COS-7 細胞ではニコチンによる増強作用は認められなかった(図 6)。

b) NET

SK-N-SH 細胞にニコチンを 24 時間作用させても転写活性に対する影響は認められなかった(図 7 A)。また、NET mRNA 発現量においてもニコチンの影響は認められなかった(図 7 B)。

3) ニコチンの DAT 転写活性増強作用における神経性ニコチン性アセチルコリン (N_N) 受容体の関与

ニコチン (10 μ M) は pD5.7 導入 SK-N-SH 細胞における DAT 転写活性を増強させた。また、その作用は N_N 受容体アンタゴニストであるヘキサメトニウム (C6) で遮断された⁸⁾。なお、アセチルコリンによってもニコチンと同様にヘキサメトニウム感受性の転写増強活性が認められた⁸⁾ (図 8)。

次いで、SK-N-SH 細胞の亜株である SK-N-AS 細胞を用いて、ニコチ

ンの転写活性増強作用を RT-PCR 法で検討した。SK-N-AS 細胞は，DAT を発現していると報告されており，本研究においても，SK-N-AS 細胞での DAT mRNA 発現を確認した(図 9 A)。しかし，SK-N-AS 細胞では DAT mRNA 発現量にニコチンによる影響は認められなかった(図 9 A)。また，SK-N-AS 細胞を用いた DAT レポーターアッセイにおいても，ニコチンの転写活性増強作用は認められなかった(図 9 B)。

さらに，RT-PCR 法およびリアルタイム RT-PCR 法によりニコチン性アセチルコリン受容体発現について検討した結果，SK-N-SH 細胞および SK-N-AS 細胞双方で $\alpha 3$ ， $\alpha 4$ ， $\alpha 5$ ， $\alpha 7$ ， $\beta 2$ ， $\beta 4$ サブユニット mRNA が発現していた(図 1 0)。しかし，SK-N-AS 細胞では，神経細胞において代表的なサブユニットである $\alpha 4$ および $\beta 2$ の mRNA 発現量が，SK-N-SH 細胞よりも有意に少なかった⁸⁾(図 1 1 A, B, C)。

4) NET mRNA 発現および NET 蛋白質発現に対するニコチンの影響

SK-N-SH 細胞にニコチンを添加すると，ニコチン添加後 3 時間および 6 時間で NET mRNA レベルは有意に減少し，24 時間でコントロールレ

ベルに戻った。また NET 蛋白質発現量は、ニコチン添加後 6 時間ではコントロールと比較して減少したが、24 時間以降では差は認められなかった(図 1 2)。

一方、SK-N-AS 細胞を用いて、ニコチンの転写活性増強作用を RT-PCR 法で検討したが、ニコチンによる影響は認められなかった(図 9 A)。

考 察

ニコチンは中枢並びに末梢神経系において、カテコールアミン神経活動を修飾することにより、様々な薬理作用を発揮している。しかし、カテコールアミン神経伝達を調節する DAT および NET の発現に対するニコチンの作用については、これまで殆ど研究されていない。したがって、本研究では、カテコールアミントランスポーター遺伝子発現に対するニコチンの作用を検討する端緒として、DAT および NET 遺伝子転写活性に対するニコチンの影響をレポーターアッセイにより解析し、DAT および

NET 遺伝子においてニコチンに応答する機能的制御因子を検討した。

DAT および NET 遺伝子の発現は主に中枢神経系に見られるが、その特徴を裏付けるようにプロモーター領域を含む遺伝子 5' 領域には神経特異的発現に関わる cis-element (NRSE, neuron-restrictive silencer element) が複数認められる (図 1 3)。本研究では、このような配列にニコチン応答が関わる可能性を考え、レポーターコンストラクトを作成した。

これらレポーターコンストラクトを使用した検討の結果、ニコチンは神経細胞由来 SK-N-SH 細胞においてヒト DAT 遺伝子の転写を促進することが明らかとなった (図 5 A)。しかし、非神経細胞由来 COS-7 細胞では、DAT 遺伝子転写に影響しなかったことから (図 6)、ニコチンによる作用は神経特異的である可能性が示唆された。また、SK-N-SH 細胞におけるニコチンの転写活性増強作用が pD5.7 コンストラクトで著明に認められたことは (図 5 A)、転写開始部位より上流 1.0kb から 3.5kb にニコチン応答配列が存在することを示している。

一方、SK-N-SH 細胞で、コンストラクトの 5' 上流を順次欠失させ

ることによりヒト DAT 転写活性が漸増したことは (図 5 A), DAT 遺伝子転写開始点より約 200bp 上流がコアプロモーター活性を有し, それより上流が抑制性の調節領域であることを示している。また, 第 1 イントロン部分を欠失させるといずれのコンストラクトも飛躍的に活性が増強されることから (図 5 A), この領域が強力な silencing cis-element であることが示唆された。この知見は, コアプロモーターとイントロン 1 の上流にサイレンシング活性を認めた Kouzmenko ら, および Sacchetti らの報告と一致している^{9, 10)}。

また, サイレンサーエレメントとして働くイントロン 1 領域を欠失させると, ニコチンによるヒト DAT 遺伝子の転写活性の増強作用は消失した (図 5 B)。この結果より, ニコチン応答配列はイントロン 1 領域と相互作用することにより促進効果を発揮する可能性が考えられる。

さらに, pD5.7 コンストラクトを用いてニコチン作用を検討した結果, ニコチンはヒト DAT 遺伝子の転写活性を増強した。しかし, このニコチン, およびアセチルコリンの増強作用は, 神経性ニコチン性アセチルコリン (N_A) 受容体アンタゴニストであるヘキサメトニウム (C6) でブ

ロックされたことから、ニコチンによるヒト DAT プロモーターの活性化は N_N 受容体を介していることが示唆された (図 8)。

本研究で SK-N-SH 細胞の亜株である SK-N-AS 細胞に DAT mRNA の発現を確認した (図 9 A)。これは、SK-N-AS 細胞がドパミン神経系の性格を有することを示した Wang と Bannon の報告と一致する¹¹⁾。しかし、SK-N-AS 細胞では、RT-PCR によるヒト DAT mRNA 発現、および種々の長さのコンストラクトを用いた転写活性の検討、いずれの場合もニコチンの影響は認められなかったこと、およびニコチンの作用はニコチン性アセチルコリン受容体を介して行われることが想定されることから、SK-N-AS 細胞では機能的ニコチン性アセチルコリン受容体が欠落していることが考えられた。

このため、SK-N-SH および SK-N-AS 細胞で、ニコチン性アセチルコリン受容体サブユニットの mRNA 発現を検討したところ、発現レベルに違いはあるが、両細胞とも $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ および $\beta 2$, $\beta 4$ サブユニットが発現していることが示された (図 10)。そこで、中枢神経系で最も代表的な $\alpha 4$, $\beta 2$ サブユニット¹²⁾の mRNA 発現を RT-PCR および

でリアルタイム RT-PCR により分析した結果, SK-N-AS 細胞では両サブユニットの mRNA 発現量が SK-N-SH 細胞と比して少ないことが明らかとなった。以上の結果は, これまでの報告で示されているように^{13, 14)}, ニコチン作用は $\alpha 4\beta 2$ サブタイプ受容体を介し, その結果起こる Ca^{2+} 流入の促進により仲介されていることを示唆している。

ニコチンがヒト DAT 遺伝子の転写活性を促進するという今回の知見は, ラット脳ではニコチン投与 24 時間後に DAT mRNA 量は変化していないとする報告とは一致しないが¹⁵⁾, 慢性的な喫煙やニコチン投与により DAT mRNA 発現が増加するというこれまでの報告と一致する⁶⁾。

文献やデータベースを検索してもヒト DAT5' 領域にニコチン応答エレメントは特定できなかった。このことは, 新規のニコチン応答領域がヒト DAT 遺伝子の -3478 から -1036 に存在していることを示唆している^{10, 16)}。この領域はこれまでに報告されている^{17, 18)}, おそらく DAT の神経特異的な発現に関与している神経限局性サイレンサーエレメント (NRSE) と共通したエレメントを含んでいると考えられる。このことは部分的ではあるが, ニコチンが, 何故, COS-7 などの非神経性細胞では DAT

転写活性に影響しないのかという問題についての説明となるかもしれない。ニコチン作用に対し，今回 DAT 遺伝子に同定された新規のシスエレメントは，チロシン水酸化酵素遺伝子やフェニルエタノールアミン N-メチル転移酵素遺伝子に認められるニコチン応答エレメントに関与する AP1 とは異なるようである^{19,20)}。なぜなら，Hiremagalur らは，ニコチンが PKA を介し Ca^{2+} 流入によって活性化する，AP1 に繋がる経路によりチロシン水酸化酵素遺伝子の発現を増加させることを報告しており¹⁹⁾，今回の結果は Ca^{2+} が仲介する機構に関与していることを示唆するが，ニコチン応答エレメントは AP1 関連領域には含まれていない。

一方，ニコチンによる交感神経系の修飾作用として，ノルアドレナリンの遊離と受容体応答に関わる種々の因子，例えば，チロシン水酸化酵素やアドレナリン受容体等)の制御についてはよく研究されているが^{2,4)}，ノルアドレナリンの再取り込みによりその神経伝達を速やかに終結させる膜機能蛋白質である NET についてはほとんど報告がなく，不明のままである。

本研究において，ニコチンは SK-N-SH 細胞で転写活性に影響せず，

NET mRNA 発現および蛋白質発現を抑制することが明らかとなった（図 7, 12）。これは，NET 発現調節機構において，ニコチンは転写後修飾に関与している可能性を示唆する。これまで，NET 遺伝子調節に関して，ニコチンが転写後調節により作用していることを示した報告はなく，本報告が最初のものである。この機序の 1 つとして，mRNA 安定化の低下が考えられる。細胞内 mRNA の半減期について，Schwanhäusse らは平均 9 時間²¹⁾，Rabani らは約 20 分と報告しており²²⁾，研究室により異なるが，ニコチンはニコチン性アセチルコリン受容体を介し，この細胞内 mRNA 分解機構に関与している可能性がある。Roe らは，ニコチンがチロシン水酸化酵素 mRNA の半減期を，チロシン水酸化酵素遺伝子 3' 非翻訳領域に存在する mRNA 結合蛋白質を介して延長させることを報告しており²³⁾，今後，検討を要する着目点であると思われる。

一方，Itoh らは培養ウシ副腎髄質細胞を用いた検討により，ニコチンの慢性投与が $\alpha 3 \beta 4$ ニコチン受容体を介し NET のノルアドレナリン再取り込み能を亢進させるが，mRNA 発現には影響しないことを報告しており²⁴⁾，mRNA 変動を伴うとする本研究結果とは異なる。これは，

先に DAT で示したように、神経系細胞と非神経系細胞による反応の違い、あるいは慢性投与と単回投与など、ニコチン暴露時間の違いなどによるのかもしれない。本研究においても、神経系細胞由来 SK-N-SH 細胞におけるニコチン単回投与では NET mRNA 発現が 24 時間後に定常レベルにまで戻っており、彼らの報告がニコチン添加 2 日後での結果であることを考えあわせると、mRNA 発現変動に関して本研究結果と矛盾しない。また、脳における最も普遍的なニコチン受容体は $\alpha 4 \beta 2$ サブタイプであり¹²⁾、ラット脳におけるノルアドレナリン遊離にも $\alpha 4 \beta 2$ ニコチン受容体が関与していることが報告されている²⁵⁾。しかし、副腎髄質細胞においては $\alpha 3 \beta 4$ (あるいは $\alpha 3 \beta 4 \alpha 5$) サブタイプが主であり²⁶⁾、ニコチン受容体サブタイプの違いにより NET 遺伝子の転写後修飾への影響が異なるのかもしれない。

本研究により、ニコチンは DAT を転写レベルで調節すること、および NET を転写後調節により制御することが明らかとなった。しかし、ニコチンによる DAT 転写調節機構における特異的配列とそれに関わるメカニズムや、NET に対する転写後調節の詳細については未だ不明である。

これらの解明には，ニコチン応答領域をさらに詳細に検討し，解析することが必要である。

謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う貴重な研究機会を与えていただき，ご指導，ご校閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科薬理学分野，故北山滋雄教授に心より感謝の意を表します。また，本研究を行うにあたり，貴重なご助言をいただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科薬理学分野の先生方に深くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Pacholczyk T., Blakely R.D., Amara S.G.: Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature*, **350**, 350-354, 1991.

- 2) Iversen L.L. : Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic neurotransmission. *Br. J. Pharmacol.*, **41**, 571-591, 1971.
- 3) Amara S.G., Kuhar M.J. : Neurotransmitter transporters: recent progress. *Ann. Rev. Neurosci.*, **16**, 73-93, 1993.
- 4) Kitayama S., Dohi T. : Cellular and molecular aspects of monoamine neurotransmitter transporters. *Jpn. J. Pharmacol.*, **72**, 195-208, 1996.
- 5) Langer Z.S., Schoemaker H. : Effects of antidepressants on monoamine transporters. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat.*, **12**, 193-216, 1988.
- 6) Li S., Kim K.Y., Kim J.H., Kim J.H., Park M.S., Bahk J.Y., Kim M.O. : Chronic nicotine and smoking treatment increases dopamine transporter mRNA expression in the rat midbrain. *Neurosci. Lett.*, **363**, 29-32, 2004.
- 7) Chomczynski P., Sacchi U. : Single step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-chloroform extraction. *Anal.*

Biochem., **162**, 156-159, 1987.

- 8) Ohyama K., Sogawa C., Sogawa N., Morita K., Dohi T. Kitayama S.: Nicotine stimulates transcriptional activity of the human dopamine transporter gene, *Neurosci. Lett.*, **471**, 34-37, 2010.
- 9) Kouzmenko A.P., Pereira A.M., Singh B.S.: Intronic sequences are involved in neural targeting of human dopamine transporter gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **240**, 807-811, 1997.
- 10) Sacchetti P., Brownschidle L.A., Granneman J.G., Bannon M.J.: Characterization of the 5' -flanking region of the human dopamine transporter gene. *Mol. Brain Res.*, **74**, 167-174, 1999.
- 11) Wang J., Bannon M.J.: Sp1 and Sp3 activate transcription of the human dopamine transporter gene. *J. Neurochem.*, **93**, 474-482, 2005.
- 12) Lindstrom J., Anand R., Gerzanich V., Peng X., Wang F., Wells G.: Structure and function of neuronal nicotinic acetylcholine

- receptors. *Prog Brain Res.*, **109**, 125-137, 1996.
- 13) Halvorsen S.W., Jiang N., Malek R.: Regulation of nicotinic acetylcholine receptors on human neuroblastoma cells during differentiation. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 1665-1671, 1995.
- 14) Noronha-Blob L., Gover R., Baumgold J., Calcium influx mediated by nicotinic receptors and voltage sensitive calcium channels in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **162**, 1230-1235, 1989.
- 15) Ferrari R., Novere N.L., Picciotto M.R., Changeux J.P., Zoli M.: Acute and long-term changes in the mesolimbic dopamine pathway after systemic or local single nicotine injections. *Eur. J. Neurosci.*, **15**, 1810-1818, 2001.
- 16) Bannon M.J., Michelhaugh S.K., Wang J., Sacchetti P.: The human dopamine transporter gene : gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **11**, 449-455, 2001.

- 17) Mandel G., Mckinnon D. : Molecular basis of neuron-specific gene expression, *Ann. Rev. Neurosci.*, **16**, 323-345, 1993.
- 18) Schoenherr C.J., Paquette A.J., Anderson D.J. : Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **93**, 9881-9886, 1996.
- 19) Hiremagalur B., Nankova B., Nitahara J., Zeman R., Sabban E.L. : Nicotine increases expression of tyrosine hydroxylase gene involvement of protein kinase A-mediated pathway. *J. Biol. Chem.*, **268**, 23704-23711, 1993.
- 20) Evinger M.J., Mathew E., Cikos S., Powers J.F., Lee Y.S.E., Sheikh S., Ross R.A., Tischler A.S. : Nicotine stimulates expression of the PNMT gene through a novel promotor sequence. *J. Mol. Neurosci.*, **26**, 39-56, 2005.
- 21) Schwanhäusser B., Busse D., Li N., Dittmar G., Schuchhardt J., Wolf J., Chen W., Selbach M. : Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, **473**, 337-342, 2011.

- 22) Rabani M., Levin J.Z., Fan L., Adiconis X., Raychowdhury R., Garber M., Gnirke A., Nusbaum C., Hacohen N., Friedman N., Amit I., Regev A.: Metabolic labeling of RNA uncovers principles of RNA production and degradation dynamics in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.*, **29**, 436-442, 2011.
- 23) Roe D.F., Craviso G.L., Waymire J.C.: Nicotinic stimulation modulates tyrosine hydroxylase mRNA half-life and protein binding to the 3' UTR in a manner that requires transcription. *Brain Res Mol Brain Res.*, **120**, 91-102, 2004.
- 24) Itoh H., Toyohira Y., Ueno S., Saeki S., Zhang H., Furuno Y., Takahashi K., Tsutsui M., Hachisuka K., Yanagihara N.: Upregulation of norepinephrine transporter function by prolonged exposure to nicotine in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **382**, 235-243, 2010.
- 25) Shimizu T., Tanaka K., Hasegawa T., Yokotani K.: Brain $\alpha 4$

β 2 nicotinic acetylcholine receptors are involved in the secretion of noradrenaline and adrenaline from adrenal medulla in rats. *Eur J Pharmacol.*, **654**, 241-248, 2011.

26) Sala F., Nistri A., Criado M.: Nicotinic acetylcholine receptors of adrenal chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)*, **192**, 203-212, 2008.

図表の説明

図 1 ヒト DAT 遺伝子 5' 領域とレポーターコンストラクト概略図 (文献 8 より引用)

図 2 ヒト NET 遺伝子 5' 領域とレポーターコンストラクト概略図

図 3 DAT 遺伝子レポーターコンストラクトの転写活性

神経系由来細胞 SK-N-SH (■) および非神経系由来細胞 COS-7 (□) に各レポーターコンストラクトを遺伝子導入し, 48 時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。測定値は pPGBasic との相対比として算出し, 平均値 ± 標準誤差 (n=3-6, *p<0.05 vs 含イントロン 1 コンストラクト) で示した。

図 4 NET 遺伝子レポーターコンストラクトの転写活性

神経系由来細胞 SK-N-SH (■) および非神経系由来細胞 CHO (□) に各レポーターコンストラクトを遺伝子導入し, 48 時間後に細胞を回

収してルシフェラーゼ活性を測定した。測定値は pPGBasic との相対比として算出し， 平均値±標準誤差 (n=9, *p<0.05 vs 含イントロン 1 コンストラクト)で示した。

図 5 SK-N-SH 細胞における DAT 遺伝子レポーターコンストラクトの転写活性に対するニコチンの影響

神経系由来細胞 SK-N-SH に各レポーターコンストラクト (A), および, イントロン 1 を除いた各レポーターコンストラクト (B) を遺伝子導入し, 24 時間後にニコチン (5 μ M, ■) を添加した。コントロール (□) には vehicle をニコチンと同量添加した。ニコチンを 24 時間作用させた後, 細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。測定値は pPGBasic との相対比として算出し, 平均値±標準誤差 (n=4-6, *p<0.05 vs コントロール)で示した。(A, B は文献 8 より転載)

図 6 COS-7 細胞における DAT 遺伝子レポーターコンストラクトの転写活性に対するニコチンの影響

非神経系由来細胞 COS-7 に各レポーターコンストラクトを遺伝子導入し，24 時間後にニコチン(5 μ M, ■)を添加した。コントロール(□)には vehicle をニコチンと同量添加した。ニコチンを 24 時間作用させた後，細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。測定値は pPGBasic との相対比として算出し，平均値 \pm 標準誤差(n=3)で示した。

図 7 NET 遺伝子レポーターコンストラクトの転写活性および NET 遺伝子 mRNA 発現に対するニコチンの影響

A: SK-N-SH 細胞に各レポーターコンストラクトを遺伝子導入し，24 時間後にニコチン(5 μ M, ■)を添加した。コントロール(□)には vehicle をニコチンと同量添加した。ニコチンを 24 時間作用させた後，細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。測定値は pPGBasic との相対比として算出し，平均値 \pm 標準誤差(n=6)で示した。

B: SK-N-SH 細胞における内因性 NET mRNA 発現に対するニコチンの影響を RT-PCR で評価した。総 RNA はニコチン(10 μ M)添加 24 時間後に回収した。(+) : RT あり，(-) : RT なし，(C) : ポジティブコントロール

ル, (W) : ネガティブコントロール, (M) : マーカーを示す。

図 8 ニコチンの DAT 転写活性増強作用における神経性ニコチン性アセチルコリン受容体の関与

pD5.7 を遺伝子導入した SK-N-SH 細胞に対するニコチン (10 μ M) とアセチルコリン (ACh, 10 μ M) の作用を薬理的に評価した。ヘキサメソニウム (C6, 10 μ M) はニコチンあるいはアセチルコリン投与と同時に添加した。薬物を 24 時間作用させた後, 細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。測定値は pPGBasic との相対比として算出し, 平均値 \pm 標準誤差 (n=3, *p<0.05, #p<0.05 vs コントロール) で示した。(文献 8 より引用)

図 9 SK-N-AS 細胞における DAT および NET mRNA 発現と DAT 遺伝子レポーターコンストラクトの転写活性に対するニコチンの影響

A : SK-N-AS における内因性 DAT および NET mRNA 発現に対するニコチンの影響を RT-PCR で評価した。総 RNA はニコチン (10 μ M) 添加 24

時間後に回収した。(+) : RT あり, (-) : RT なし, (C) : ポジティブコントロール, (W) : ネガティブコントロール, (M) : マーカーを示す。

増幅産物 DAT : 387bp, NET : 635bp, G3PDH : 452bp

B : SK-N-AS 細胞に各レポーターコンストラクトを遺伝子導入し, 24 時間後にニコチン (5 μ M, ■) を添加した。コントロール (□) には vehicle をニコチンと同量添加した。ニコチンを 24 時間作用させた後, 細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。測定値は pPGBasic との相対比として算出し, 平均値 \pm 標準誤差 (n=6) で示した。

図 10 SK-N-SH および SK-N-AS 細胞におけるニコチン性アセチルコリン受容体サブユニット mRNA 発現

RT-PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動像。

増幅産物 α 2 : 155bp, α 3 : 148bp, α 4 : 110bp, α 5 : 186bp, α 6 : 125bp, α 7 : 138bp, α 9 : 156bp, α 10 : 159bp, β 2 : 333bp, β 3 : 461bp, β 4 : 366bp, G3PDH : 299bp

図 1 1 SK-N-SH および SK-N-AS 細胞におけるニコチン性アセチルコリン受容体 $\alpha 4$, $\beta 2$ サブユニット mRNA 発現の RT-PCR 分析

A: RT-PCR 増幅産物のアガロースゲル電気泳動像。

増幅産物 $\alpha 4$: 202bp, $\beta 2$: 333bp, G3PDH: 300bp

BC: リアルタイム RT-PCR により $\alpha 4$ (B) および $\beta 2$ (C) サブユニットの mRNA 発現量を定量した。測定値は G3PDH との相対比として算出し、平均値 \pm 標準誤差 (n=3, *p<0.05) で示した。(A, B, C は文献 8 より転載)

図 1 2 SK-N-SH 細胞における NET 発現に対するニコチンの影響

SK-N-SH 細胞にニコチン (10 μ M) を指定時間作用させた後、細胞を回収して総 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR にて NET mRNA 発現量を定量した。A: ニコチン添加後 6 時間までの測定値は G3PDH との相対比として算出し、さらにそれぞれの発現量を 0 時間に対する相対値 (平均値 \pm 標準誤差, n=3, *p<0.05, vs 0 時間) で示した。B: ニコチン添加後 24 時間の測定値は G3PDH との相対比として算出し、発現量をコン

トロールに対する相対値(平均値±標準誤差, n=3)で示した。C: ヒト
NET 特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング

図 1 3 ヒト DAT およびヒト NET 遺伝子 5' 領域における神経限局性サ
イレンサーエレメント (NRSE)

ヒトDAT 遺伝子

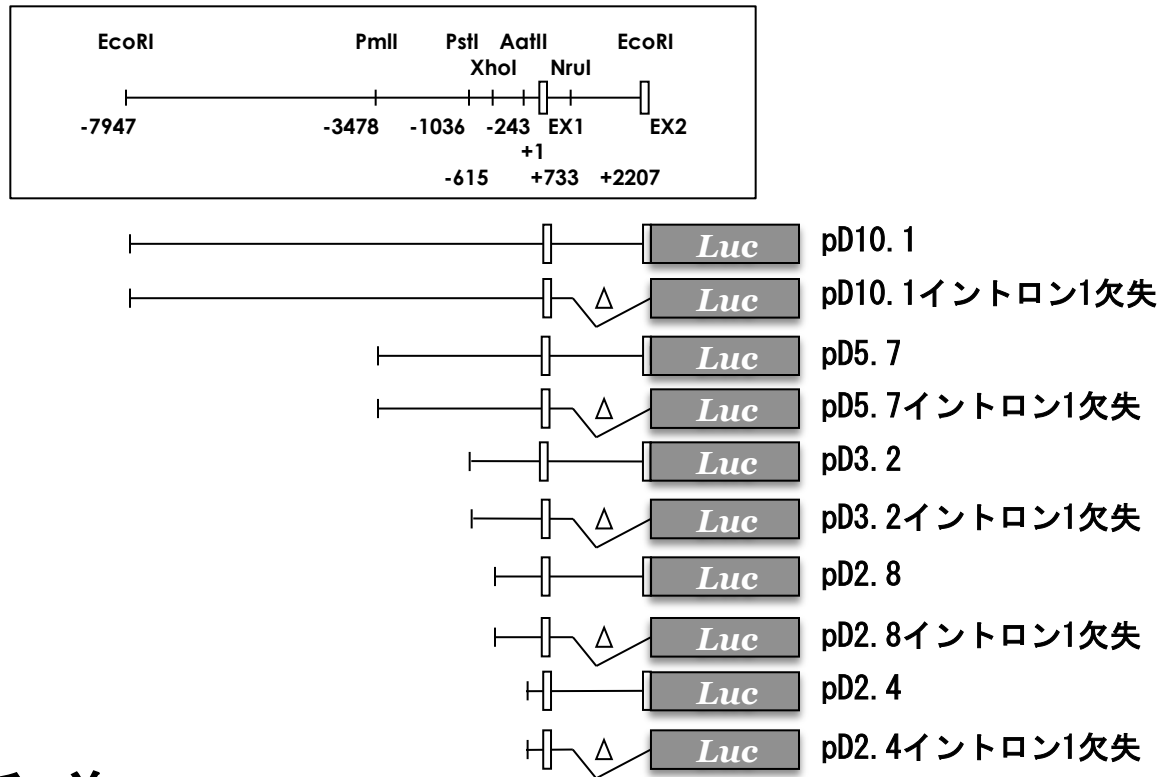


図 1 大山和美

ヒトNET 遺伝子

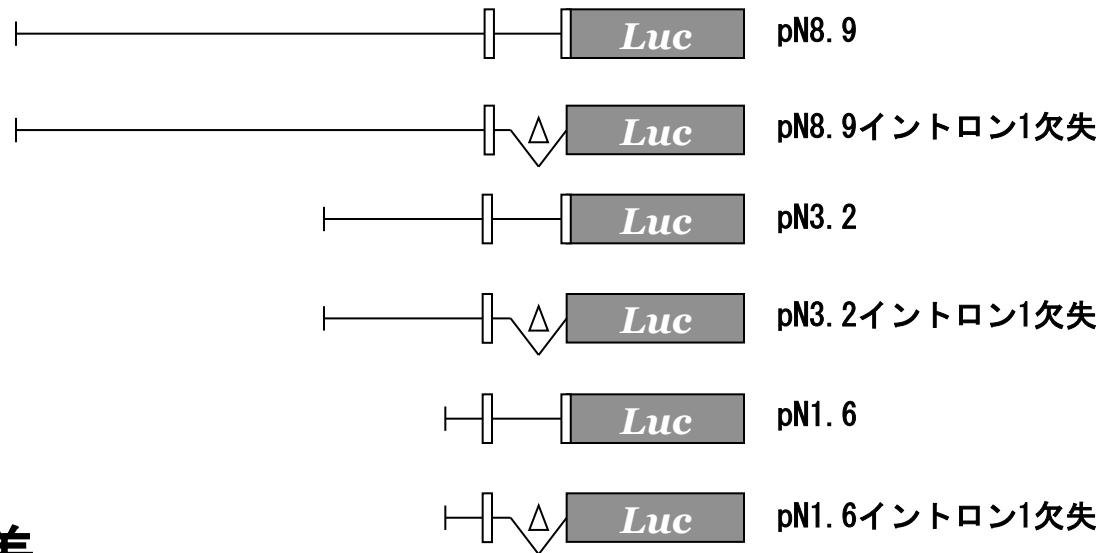
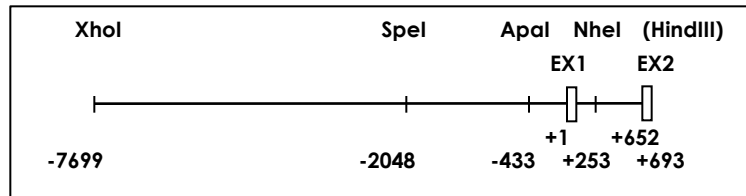


図2 大山和美

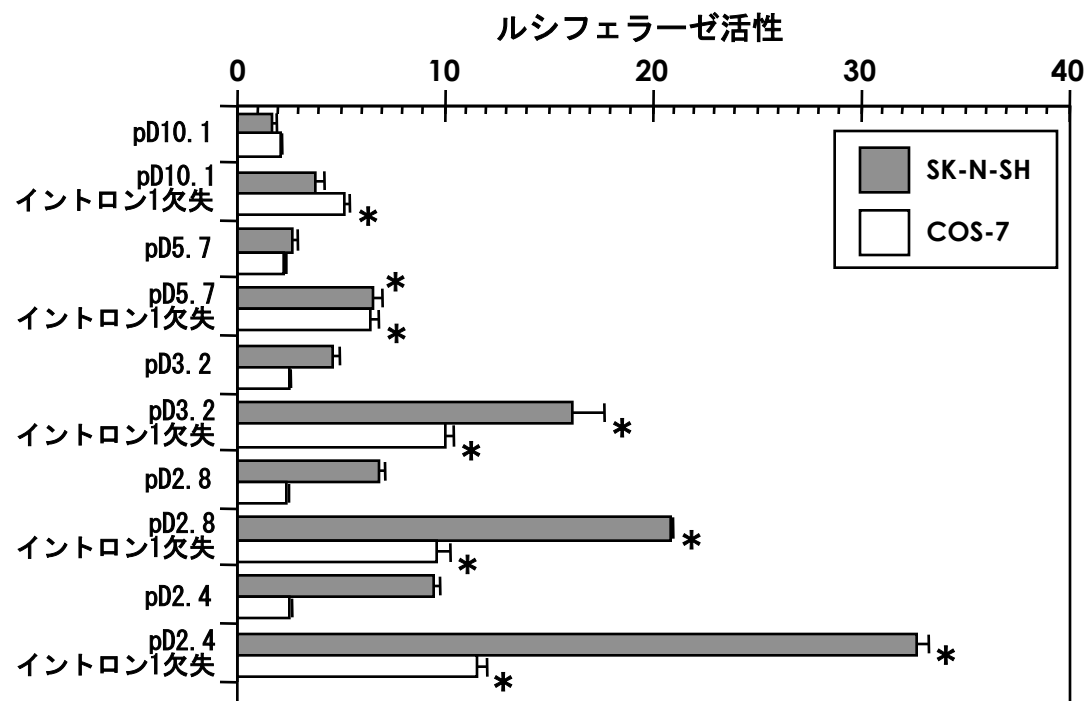


図3 大山和美

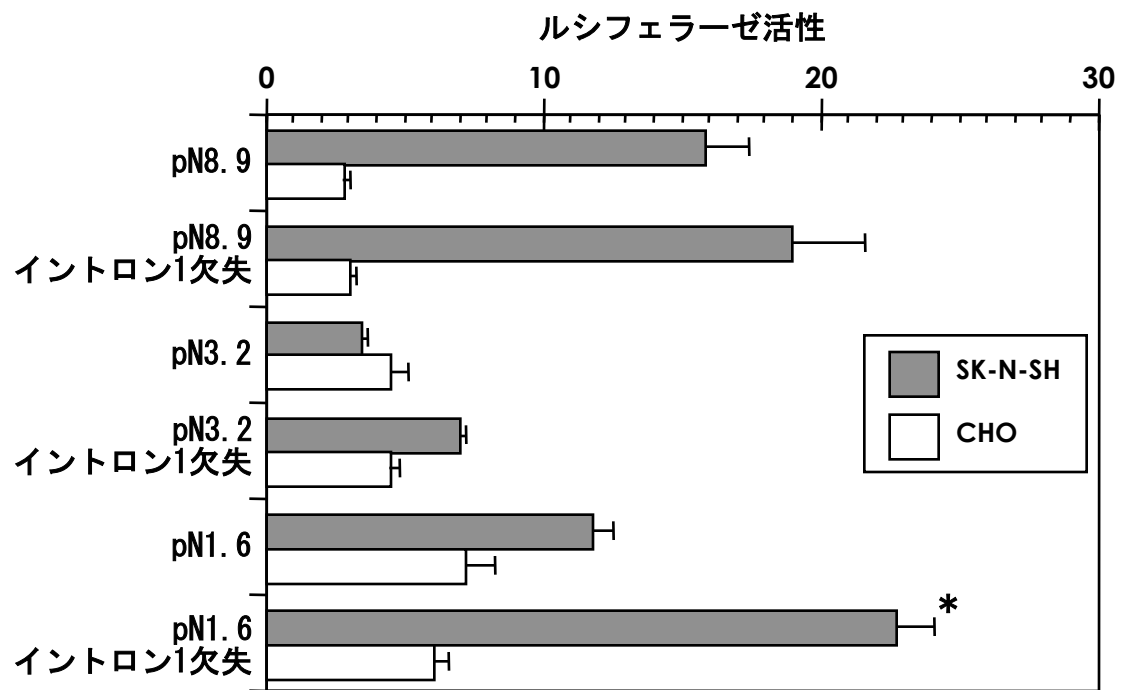
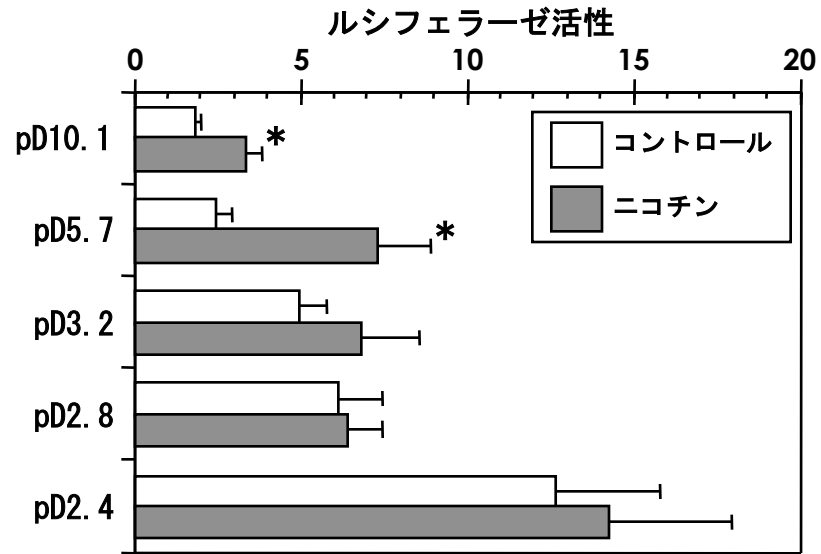
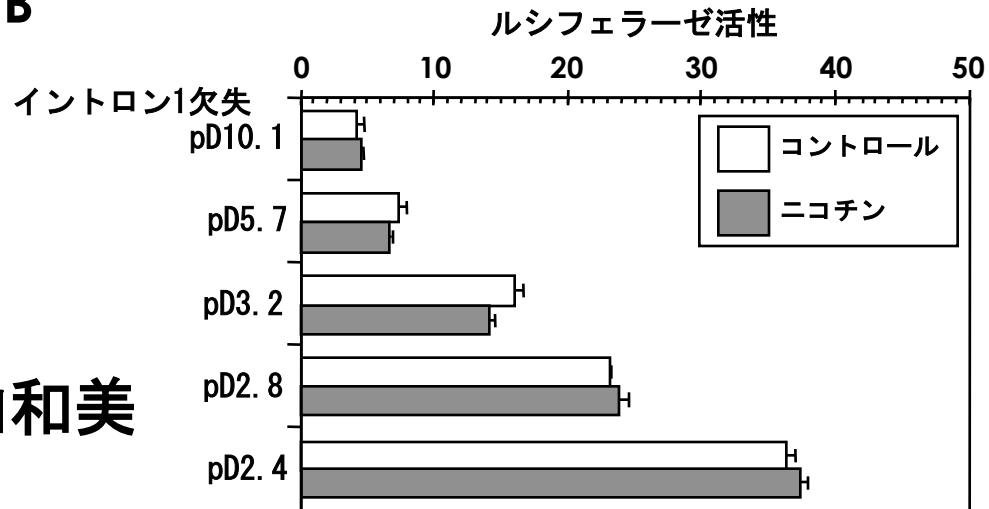


図 4 大山和美

A**B****図 5 大山和美**

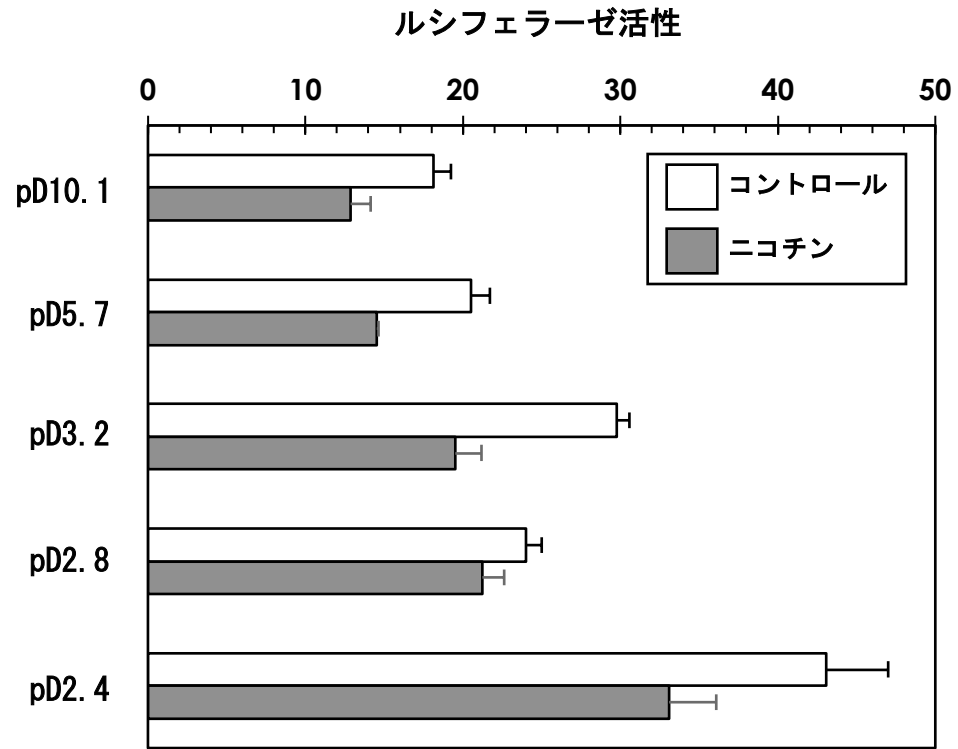


図6 大山和美

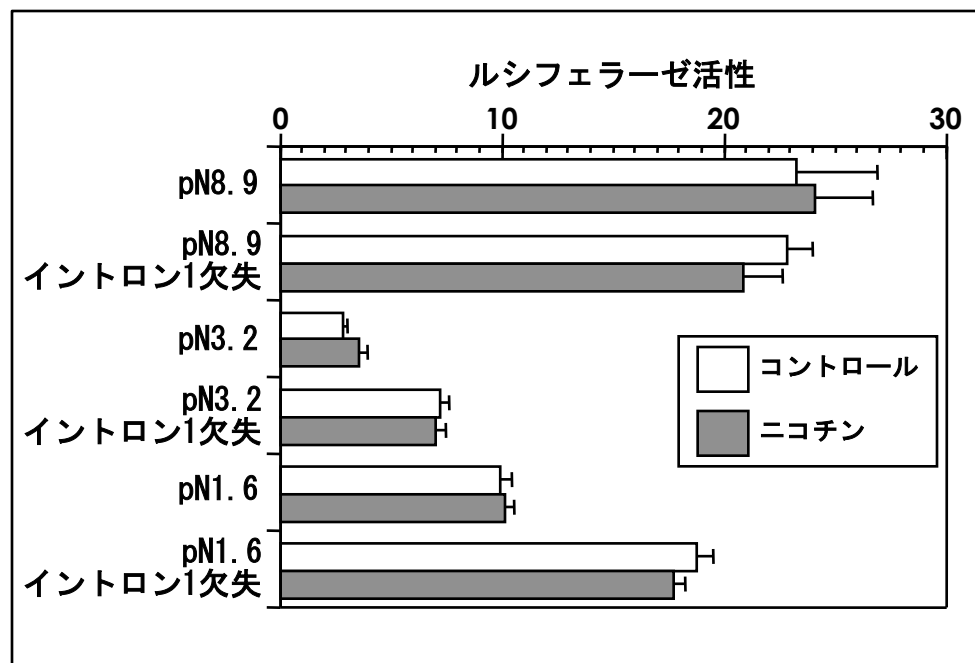
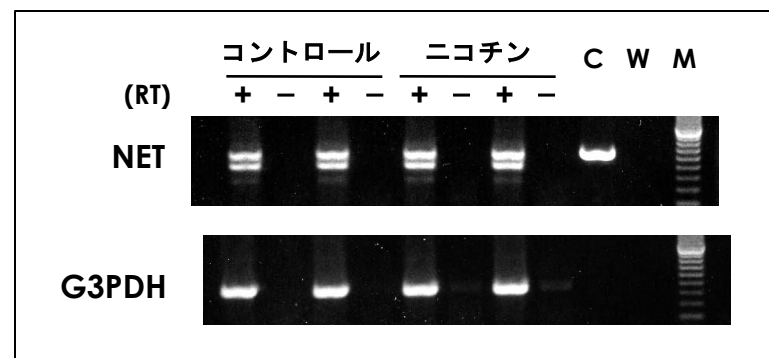
A**B**

図7 大山和美

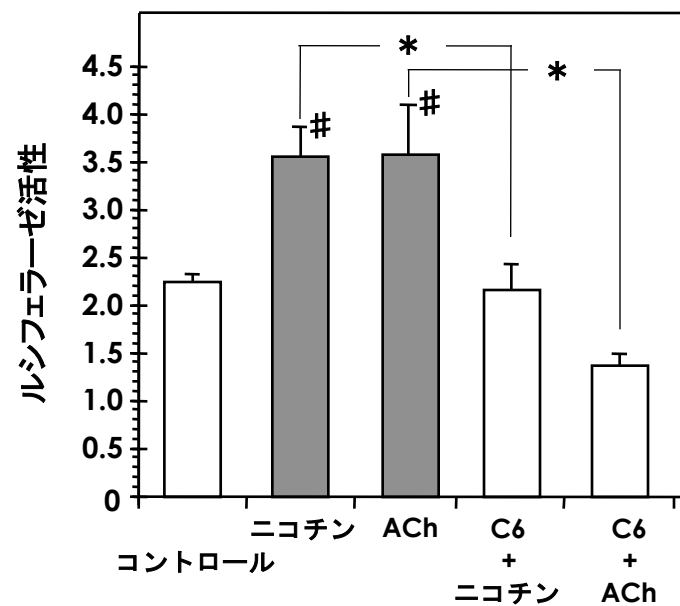


図8 大山和美

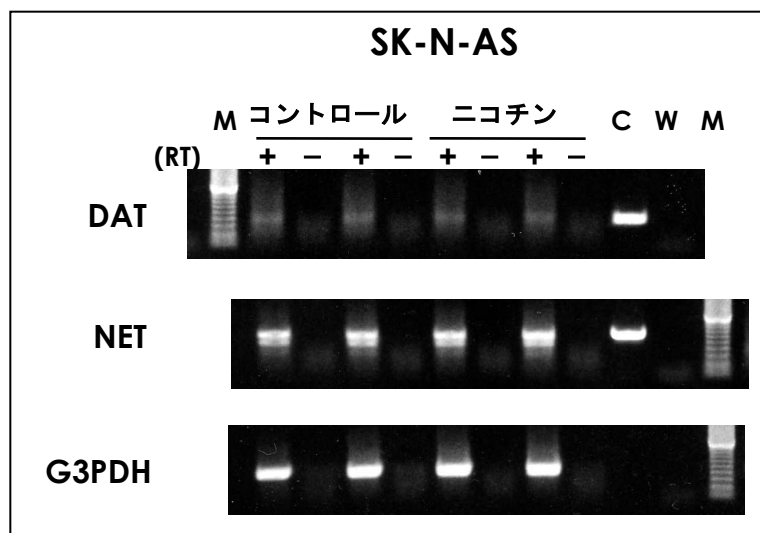
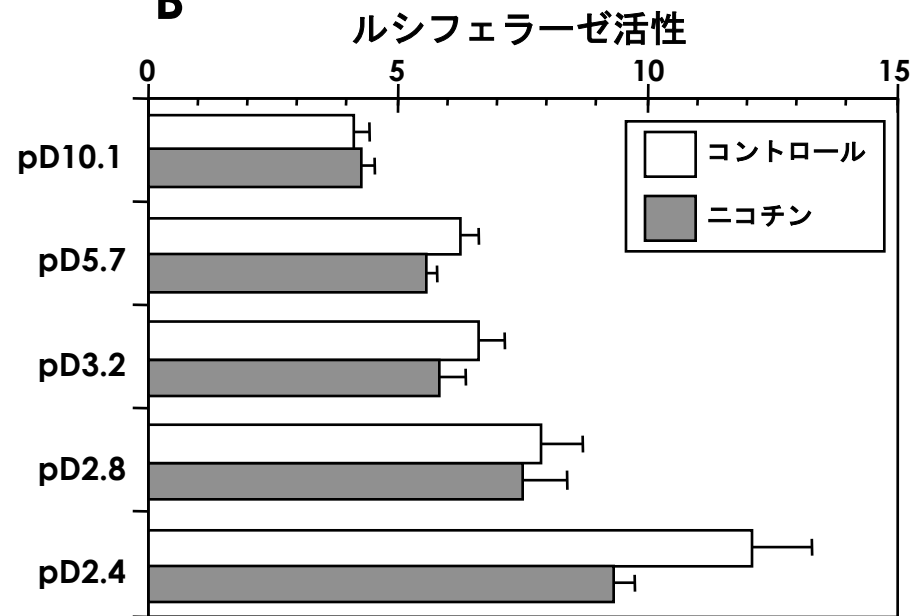
A**B**

図9 大山和美

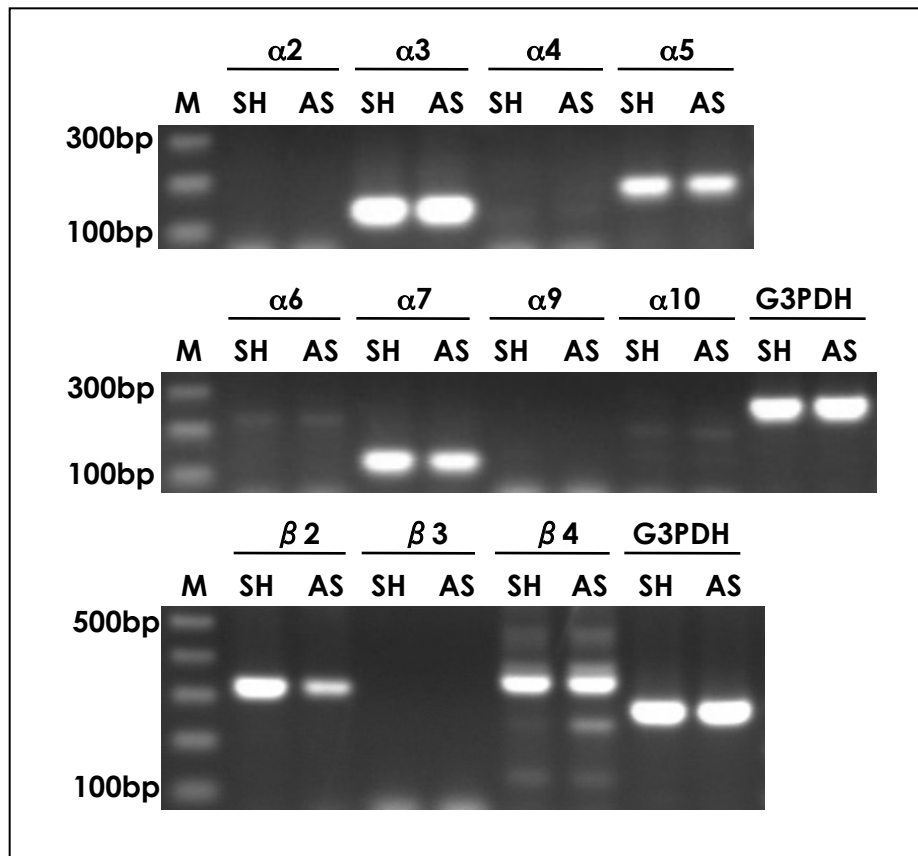


图 10 大山和美

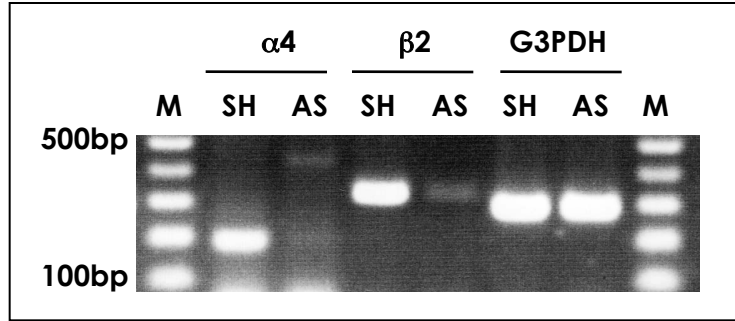
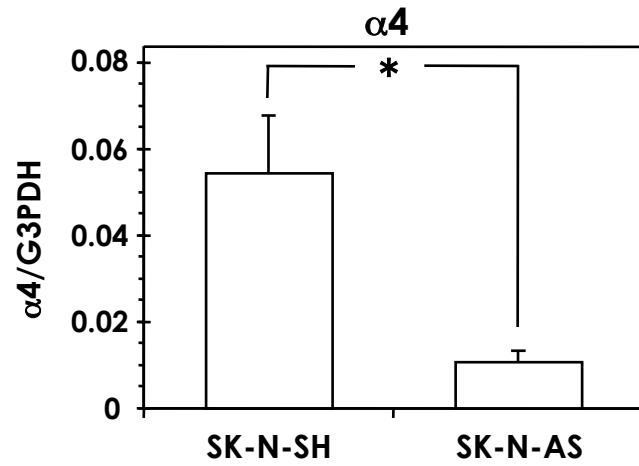
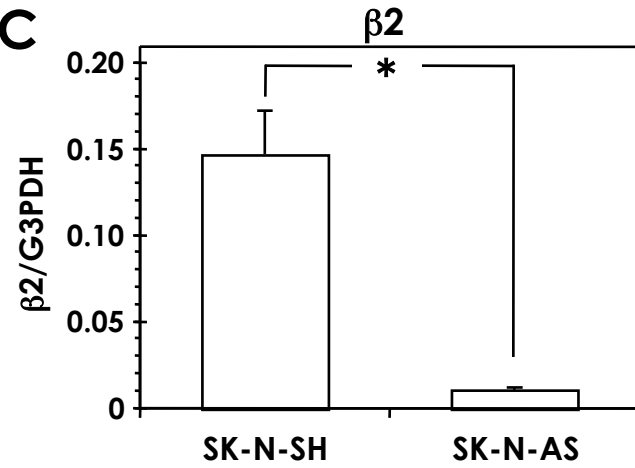
A**B****C**

图 1 1 大山和美

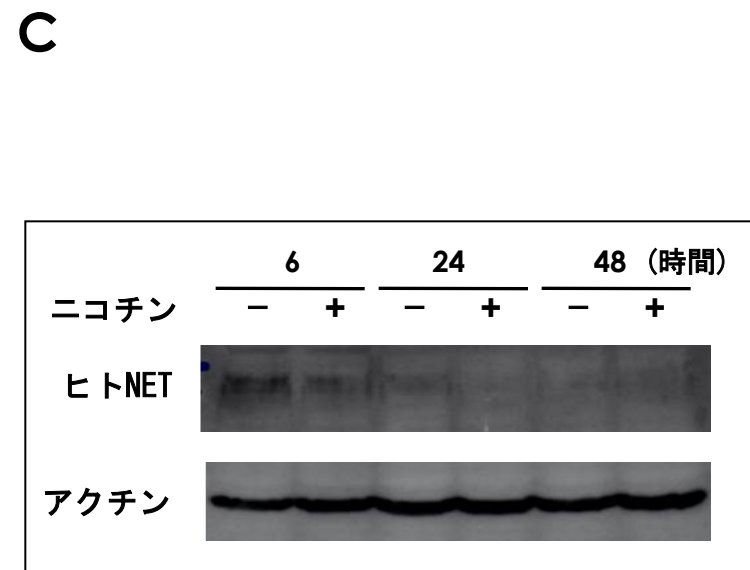
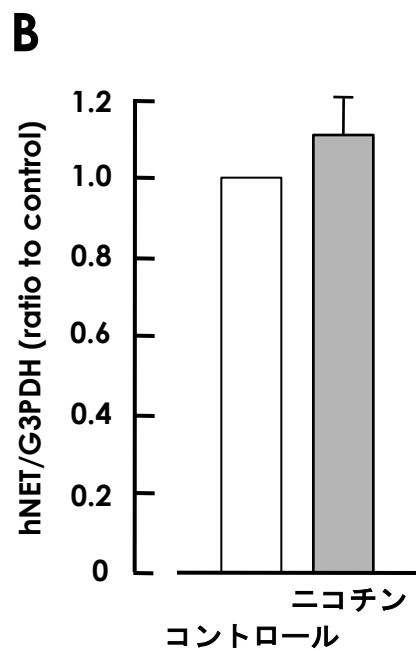
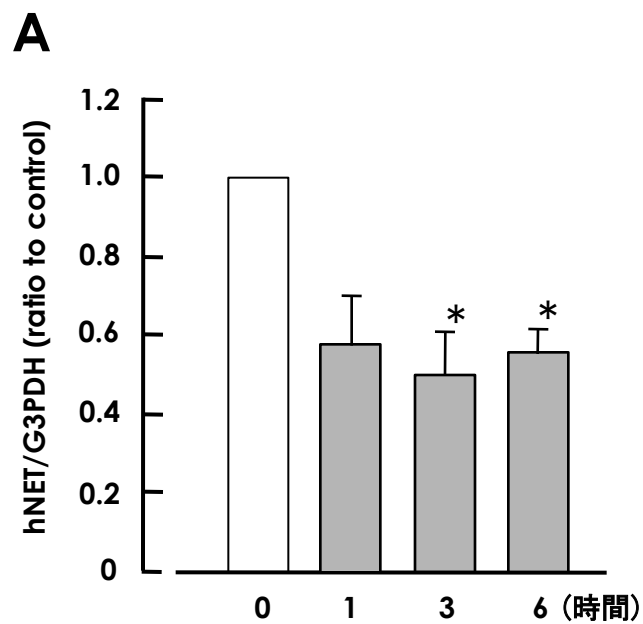


図 1 2 大山和美

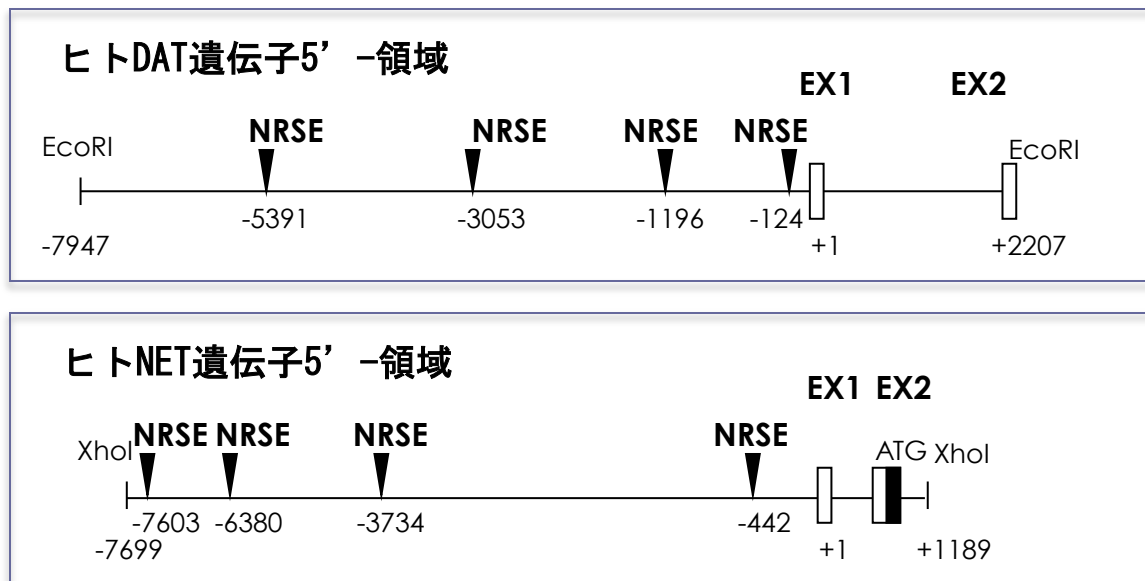


図 1 3 大山和美