サイクリックAMPおよびホルボールエステルによるVasoactive Intestinal Peptide/PHM-27遺伝子の発現調節機構－培養神経芽腫細胞（NB-1細胞）を用いての検討－

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 大沢, 謙三
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8282

金沢大学十全医学会雑誌　第100巻　第4号　585－600（1991）

サイクリック AMP およびホルボールエステルによる Vasoactive Intestinal Peptide/PHM-27 遺伝子の発現調節機構

－培養神経芽腫細胞（NB-1 細胞）を用いての検討－

金沢大学医学部内科学第一講座（主任：小林健一教授）
大　沢　謙　三

（平成3年6月12日受付）

Vasoactive intestinal peptide (VIP) は，28アミノ酸残基からなるC末端がアミド化された生理活性ペプチドであり，神経伝達物質として腸管や，中枢，および末梢神経系など各種臓器の機能調節に関与している．VIP は他の類似したペプチド PHM-27 と共に共通の前駆体プロ VIP/PHM-27 を経て生合成され，サイクリックアデノシン一リン酸 (cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, cAMP) は培養ヒト神経芽腫細胞 (NB-1 細胞) において，VIP/PHM-27 遺伝子の転写活性上昇を介してプロ VIP/PHM-27 の生合成を増加させることが知られている．本研究では VIP/PHM-27 遺伝子の発現調節機構をさらに明らかにする目的で，dibutyryl cAMP (Bt_2cAMP) あるいは，12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) や phorbol-12, 13-didecanoate (PDD) などのホルボールエステルによる VIP/PHM-27 遺伝子発現誘導とその機序につき検討した．1mM Bt_2cAMP あるいは 16nM TPA 存在下で9時間の培養後，NB-1 細胞の VIP/PHM-27 メッセンジャー RNA (mRNA) 量はそれぞれ10倍あるいは5倍に増加した．40nM PDD でも VIP/PHM-27 mRNA 量は3倍の増加を認めた．Bt_2cAMP と TPA の存在下では VIP/PHM-27 mRNA 量は約38倍と相乗的な増加反応を示した．細胞内 cAMP 量にはホルボールエステルにより有意の変化を認めなかった．次に種々の5'側欠失変異を作成したヒト VIP/PHM-27 遺伝子プロモーター領域を chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 遺伝子に結合させた CAT 発現ベクターを作成し，これらを NB-1 細胞に導入発現させて Bt_2cAMP あるいは TPA による CAT 活性の発現誘導の有無を検討した．その結果，cAMP あるいはホルボールエステルによる遺伝子発現に必要な DNA 領域（すなわち，cAMP/phorbol ester-response element）の5'末端部は，転写開始点の75塩基対上流から93塩基対上流の間にあることが明らかとなった．NB-1 細胞の核抽出液を用いた DNase I フットプリンティング実験，および dimethylsulfate (DMS) フットプリンティング実験により，VIP/PHM-27 遺伝子プロモーター領域には少なくとも3つの核内因子結合領域があり，その1つ（転写開始点の69塩基対上流から88塩基対上流までの領域）は，CAT 発現ベクターを用いた実験で認められた cAMP/phorbol ester-response element に符号した．DNase I フットプリンティング実験，あるいは DMS フットプリンティング実験では，核抽出液により DNase I による消化，あるいは DMS によるメチル化から保護された領域とその程度に誘導の有無で差異が認められなかった．以上の結果より，cAMP およびホルボールエステルは VIP/PHM-27 遺伝子プロモーターの5'側上流に存在する cAMP/phorbol ester-response element に結合する核内因子に，それぞれ異なる修飾を加えることによって VIP/PHM-27 遺伝子の転写を促進することが一つの可能性として考えられた．

Key words VIP/PHM-27 gene, cyclic AMP, phorbol ester, cAMP/phorbol ester-response element, nuclear factor

Vasoactive intestinal peptide (VIP) は，1974年にブタ腸管から初めて分離された28アミノ酸残基からなるC末端がアミド化されたペプチドである[1]．VIP は腸管ばかりでなく，中枢，および末梢神経系や，種々の内分泌腺組織を含む全身の諸臓器での存在が認められており，神経伝達物質 (neurotransmitter) の一つとして各種臓器の機能調節に関与しているものと考えられている．その生理作用として，血管拡張・血圧降下作用のほかに，気管支平滑筋弛緩作用，腸管からの水分・電解質分泌刺激作用，インスリン，グルカゴン，プロラクチンなどのホルモン分泌促進作用，生殖器や脳血管の血流調節作用などが知られている[2]．1983年，Itoh, Okamoto ら[3]は，ヒト VIP 前駆体およびそのメッセンジャー RNA の構造を決定し，VIP 前駆体には VIP 以外に，N末端がヒスチジンで始まりC末端がメチオニンで終わる27アミノ酸残基からなる新しいペプチド，PHM-27 が存在することを発見した．加えて，1985～1986年には Bodner ら[4], Tsukada ら[5], Yamagami ら[6]によってヒト VIP/PHM-27 遺伝子の全構造が決定され，VIP の生合成過程およびその調節機構を遺伝子のレベルで検討することが可能となった．一方，培養ヒト神経芽腫細胞の一つである NB-1 細胞では，サイクリックアデノシン一リン酸 (cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, cAMP) により VIP の生合成が誘導されることが知られていたが[7][8]，1984年 Hayakawa ら[9]は cAMP は主に VIP/PHM-27 遺伝子の転写を促進することによって VIP の生合成を誘導することを明らかにした．また，著者ら[10][11]は NB-1 細胞では，腫瘍プロモーターであるホルボールエステルも VIP/PHM-27 メッセンジャー RNA を増加させることを報告した．本研究では，VIP/PHM-27 遺伝子の発現調節機構を明らかにする目的で，VIP/PHM-27 遺伝子のプロモーター領域をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 遺伝子に結合したキメラ遺伝子を NB-1 細胞に導入・発現させる遺伝子導入実験，および NB-1 細胞の核蛋白の VIP/PHM-27 遺伝子プロモーター領域への結合をみる DNase I フットプリンティング実験，あるいは demethylsulfate (DMS) フットプリティング実験を行い，cAMP，およびホルボールエステルによる誘導に関与する遺伝子上の発現調節領域について検討した．

材料および方法

I．試 薬 類

特に会社名の記載のない各種制限酵素は宝酒造 (東京) の製品を，ジブチリル cAMP (N^6, $O^{2'}$-dibutyryl adenosine 3': 5'-monophosphate, Bt_2cAMP) はヤマサ醤油 (千葉)，12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) および phorbol-12, 13-didecanoate (PDD) は CCR 社 (Eden Prairie, USA) の製品をそれぞれ用いた．[α-^{32}P] dCTP (比活性3000 Ci/mmol)，[γ-^{32}P] ATP (比活性3000 Ci/mmol) および [^{14}C] クロラムフェニコールはいずれもアマシャム・ジャパン (東京) から購入した．これ以外の試薬で特に会社名の記載のないものはいずれも和光純薬 (大阪) の製品を用いた．

II．細胞培養

培養ヒト神経芽腫細胞株 NB-1 細胞は，1973年に三宅ら[12]により樹立された細胞株である．この細胞を非動化 (56°C，30分) 10%牛胎児血清 (GIBCO 社，New York, USA) および0.005%硫酸カナマイシン (明治製菓，東京) を含有するRPMI1640 培地 (日水製薬，東京) で培養した．

III．ノーザン (Northern) 法による RNA 解析

対数増殖期にある NB-1 細胞に種々の試薬 (表1) を添加し，1～24時間培養した後に培地を除去し，グアニジニウム/塩化セシウム法[13]により RNA を抽出した．すなわちグアニジンチオシアン酸溶液 (4M グアニジンチオシアン酸，0.5%N－ラウロイルサルコシン酸ナトリウム，25mM クエン酸ナトリウム (pH 7.0)，0.1M 2－メルカプトエタノール，0.1% Antifoam A) により細胞を溶解し，ポリアロマーチューブ内で，5.7M 塩化セシウム液の上に重層したのち，Beckman SW60Ti ローターで35,000回転，20°Cで16時間遠心した．沈殿したRNA をエタノール洗浄した後，水に溶解した．5 μg の RNA 試料を1.1M ホルムアルデヒドを含む1.5%アガロースゲルで泳動し[9]，ニトロセルロース膜 BA85 (Schleicher & Schuell 社，New York, USA) にブロットした後，80°Cで2時間処理し固定した．プレハイブリダイゼーションはプレハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミ

Abbreviations: AP-1, activator protein 1; AP-2, activator protein 2; bp, base pairs; Bt_2cAMP, N^6,$O^{2'}$-dibutyryl adenosine 3', 5' -monophosphate; cAMP, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; CRE, cAMP response element; CREB, CRE binding protein; DMS, demethylsulfate; DMSO, demethylsulfoxide; DTT,

ド，5×standard saline phosphate EDTA buffer (SSPE)，0.1%牛血清アルブミン，0.1%ポリビニルピロリドン，0.1%フィコール，0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecylsulfate, SDS)，100μg/ml変性サケ精子DNA) 中で42°C，2時間行った．プレハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド，5×SSPE，0.1%牛血清アルブミン，0.1%ポリビニルピロリドン，0.1%フィコール，0.1% SDS，100μg/ml変性サケ精子DNA) を加え，42°Cで12時間以上ハイブリダイゼーションを行った．フィルターの洗浄は，まず2×SSPE，0.1% SDS で室温下に10分間，2回行った後，0.1% SSPE，0.1% SDS で室温下に10分間，2回行った．洗浄後，オートラジオグラフィーは増感スクリーンを用い−80°Cで24時間行った．標識プローブの調整は［α-^{32}P］dCTP (<3000 Ci/mmol) を標識基質として，VIP/PHM-27 cDNA[9]をニックトランスレーション法 (比活性1〜2×10^8 cpm/μgDNA) により ^{32}P 標識し，ハイブリダイゼーション液中のプローブ濃度は 10ng/ml とした．

Ⅳ．細胞内 cAMP 含量の測定

一定時間細胞を種々の試薬の存在下で培養した後 (表1)，培地を除き，細胞を氷冷した燐酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) で3回洗浄し，rubber policeman で剝離し回収した．回収した細胞を0.1N塩酸の存在下に5分間煮沸し，3000回転，10分の遠心後，上清を回収して cAMP の測定に供した．cAMP 測定はヤマサ cAMP アッセイキット (ヤマサ醤油) を用いて測定した．

Ⅴ．組み換え DNA の作成および培養細胞への導入

1．組み換え DNA の作成 (図3)

ヒト VIP/PHM-27 遺伝子の転写開始部位およびプロモーター領域を含む2066塩基対 (base pairs, bp) の DNA 断片を EcoR I (−1923 bp) および HpaII (+143 bp) 消化により単離し (図 3A 参照)，両端の付着末端を大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の Klenow 断片により平滑化した後，CAT 発現ベクターである pMLCAT[14]の平滑化した HindIII 部位に挿入した．順方向に挿入されたものを pVIP (E-H) と仮に命名し以下の実験に用いた．pVIP (E-H) を上流のベクター内の EcoRV および挿入断片中の Nde I 部位で切断し，Nde I 末端を Klenow 断片により平滑化した後，分子内で再結合させてpVIP (−1372) を得た．同様に EcoRV と Nsi I 消化により pVIP (−333) を，EcoRV と Dra I 消化により pVIP (−201) を得た．次に pVIP (E-H) を Nsi I で消化し，Nsi I 末端を平滑化した後に exonuclease III により5〜30分間消化し，反応を停止させた後，mung bean nuclease により末端を修復し，EcoRV 消化後分子内再結合を行った．これらの再結合プラスミドを大腸菌 JM109 に導入しクローニングを行った後，5種類の5'側欠失変異を有するプラスミド，pVIP (−333), pVIP (−201), pVIP (−93), pVIP (−74), pVIP (−51) を得た．欠失部位はジデオキシ法による塩基配列決定により確認した．

2．培養細胞への導入

これらのプラスミドを，24時間前に 60mm ディシュ当たり2×10^6個に撒いた NB-1 細胞に燐酸カルシウムとの共沈殿法[15]により導入した．1ディシュあたり10μg の DNA を加え，37°C，18時間培養した後に，10%ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) で20分間処理し導入効率を高めた．DNA 添加39時間後から Bt$_2$cAMP あるいは TPA を加え，さらに9時間過経後に細胞を回収した．細胞は PBS で洗浄後エッペンドルフチューブに移し，3回の凍結融解を行った後，60°C，10分間処理により内在性のアセチラーゼ活性を欠失させ，14,000回転，10分間遠心して得られた上清を細胞抽出液として CAT 活性の測定に用いた．

Ⅵ．CAT 活性の測定[16)17)]

細胞抽出液を，3mM アセチル CoA (Sigma 社，St. Louis, USA) および0.4μCi [^{14}C] クロラムフェニコールと共に37°C，6時間インキュベートした後，エチルアセテートで抽出し，有機層を乾燥させ再度少量 (25μl) のエチルアセテートに溶解し，それを薄層クロマトグラフィープレート LK5D (Whatmann 社，Springfield Mill, England) にスポットし，クロロフォルム/メタノール (19:1) で展開した．展開後プレートを乾燥し，−80°C，24時間のオートラジオグラフィーを行った．

Ⅶ．核蛋白の抽出

NB-1 細胞の核蛋白の抽出は Ohlsson と Edlund の方法[18]に従った．即ち，未処理，あるいは Bt$_2$cAMP，または TPA で9時間の誘導を行った NB-1 細胞 (2×10^9) から培地を除き，40mM Tris-HCl (pH7.4)，140mM 塩化ナトリウム，1mM エチレンジアミン四酢

dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; PBS, phosphate buffered saline; PDD, phorbol-12,13-didecanoate; PHM-27, peptide having 27 amino acid residues with amino-terminal histidine and carboxy-terminal methionine amide; PMSF, phenylmethanesulfonyl

酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) を加えた後 rubber policeman で細胞を剝離し，2000回転，10分間の遠心後，PBS で洗浄しさらに2000回転，10分間の遠心により細胞を集めた．以後の処理は全て 0 °Cあるいは 4 °Cで行った．細胞に 4 倍容量のバッファーA (10mM HEPES (pH7.8)，15mM 塩化カリウム，2mM 塩化マグネシウム，0.1mM EDTA, 1mM ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT), 1mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF)) を加え懸濁し10分間静地後，55000回転，5 分間遠心 (RPR18B ローター (日立工機，勝田)) し，沈殿に等倍のバッファーAを加え再懸濁した後，ダウンスホモゲナイザーを用いてホモゲナイズした．90～95%の細胞が破壊されていることを顕微鏡で確かめた後，ホモジネートを9200回転10分間遠心し，沈殿した細胞核画分を10^9細胞当たり 3ml のバッファーAに懸濁した．懸濁液を遠心チューブ (日立 12PA チューブ) に移し，4M 硫酸アンモニウム (pH7.9) を最終濃度0.30M となるように加え，4 °Cで30分間遠心 (日立 RP65 ローター) し，DNA 画分を沈殿させ上清を回収した．次に上清に0.2g/ml の硫酸アンモニウムを加えた後，40000回転，15分間遠心し，沈殿を 1ml のバッファーC (50mM HEPES (pH7.8), 50mM 塩化カリウム，0.1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF，10%グリセロール) に溶解した．さらに，100倍容量のバッファーCに対して，4 °C，6 時間透析した後，10000回転，10分間の遠心により不溶物を沈殿させて除いた物を核抽出液とし，液体窒素で凍結させた後使用まで－70°Cで保存した．蛋白の定量は BCA 法による蛋白側定キット (Pierce 社，Rockford, USA) により行った．

Ⅶ. DNase Ⅰ および DMS フットプリンティング実験[19]

VIP/PHM-27 遺伝子の 5' 上流域を含む EcoR I 断片 (－1923～＋360 bp) を Nsi I で消化し，Nsi I-EcoR I 断片 (－337～＋360 bp) を得た．これを [γ-^{32}P] ATP (>3000 Ci/mmol) を標識基質とし，T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造) を用いて 5' 末端標識した．さらにこの断片を DraIII で消化し，Nsi I

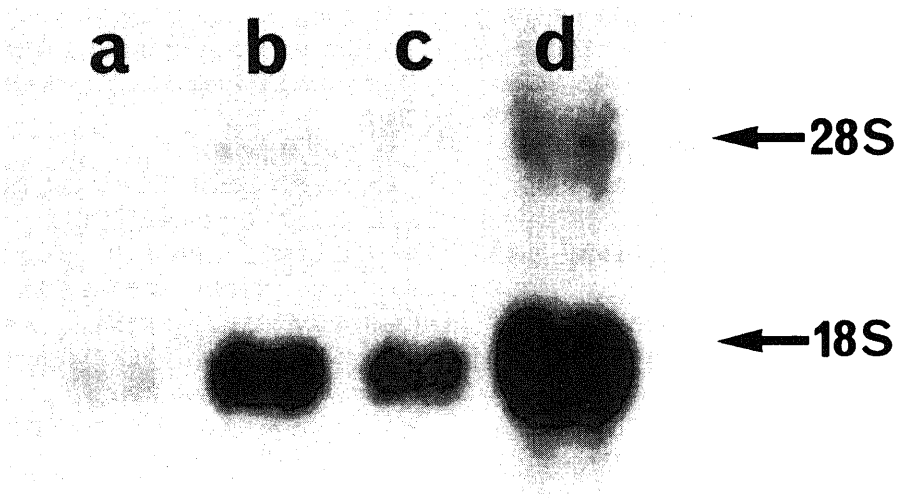

Fig. 1. Effects of Bt_2cAMP and TPA on VIP/PHM-27 mRNA levels. NB-1 cells were incubated for 9 hr without any addition (lane a), with 1 mM Bt_2cAMP (lane b), 16 nM TPA (lane c) or 1 mM Bt_2cAMP and 16 nM TPA (lane d). After incubation, the total cellular RNA was isolated and VIP/PHM-27 mRNA was analyzed by Northern blot hybridization as described in MATERIALS AND METHODS. Arrow indicate the relative migration of 28S and 18S RNAs run on the same gel. An RNA species comigrating with 28S RNA (lane d) is a possible precursor of VIP/PHM-27 mRNA.

fluoride ; SDS, sodium dodecylsulfate ; SSPE, standard saline phosphate EDTA buffer ; TPA, 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate ; TRE, TPA response element ; VIP, vasoactive intestinal peptide

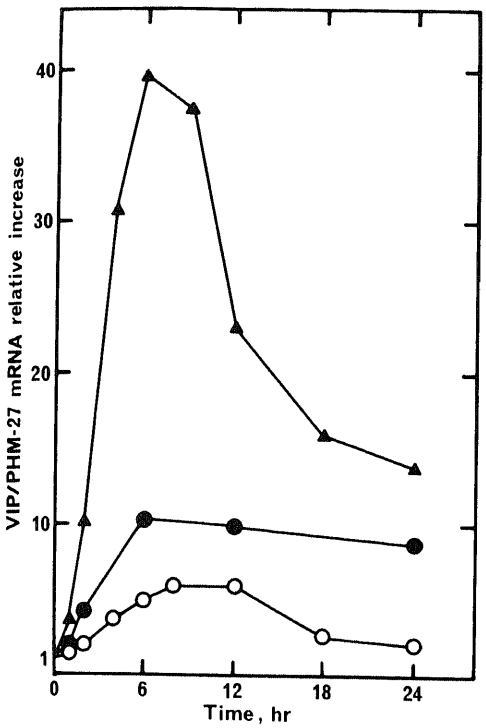

Fig. 2. Time course of VIP/PHM-27 mRNA induction either by Bt_2cAMP, TPA or by both. NB-1 cells were incubated with 1 mM Bt_2cAMP (●), with 16 nM TPA (○) or with 1 mM Bt_2cAMP and 16 nM TPA (▲) for the period indicated on the abscissa. mRNA levels were determined as described in MATERIALS AND METHODS. Each value was related to that for cells at time 0 without addition of reagents.

末端のみ ^{32}P 標識された NsiI-DraIII 断片 (−337〜−49 bp) を得た．1 μg の poly(dI-dC)・poly(dI-dC) (Pharmacia 社，Uppsala, Sweden) と共に25°C，20分間プレインキュベートした核抽出液に標識 DNA 断片を加え，さらに25°C，20分間インキュベートした後，1 μg /ml DNase I (Pharmacia 社，) で25°C，1分間の DNase I 消化，あるいは0.5%ジメチルサルフェート (dimethyl sulfate, DMS) で25°C，4分30秒のメチル化を行った．DNase I 消化は EDTA 添加により停止させ，フェノール抽出を行った．DMS によるメチル化はG反応停止液[20] (1M Tris-HCl, 1.5M 酢酸ナトリウム，1Mβ−メルカプトエタノール，50mM 酢酸マグネシウム，1mM EDTA，0.4mg/ml トランスファーRNA, pH7.5) を加えた後，フェノール抽出，エタノール沈殿を行い，沈殿を10%ピペリジンに溶解したものを95°C，30分間インキュベートした後に凍結乾燥，さらに蒸留水に溶解し凍結乾燥を2回繰り返した．両反応の最終産物をホルムアミド−色素混合液 (95%ホルムアミド，0.1%ブロモフェノールブルー) に溶解し，100°C，1分間処理した後，8%ポリアクリルアミド−8.3M 尿素ゲルにて電気泳動し，ゲルを固定し，乾燥後，オートラィオグラフィーを行った．

成　　績

I．Bt_2cAMP およびホルボールエステルによる VIP/PHM-27 mRNA の誘導

Bt_2cAMP およびホルボールエステルが NB-1 細胞の VIP/PHM-27 遺伝子発現に及ぼす影響をノーザン法により検討した．図1に示すように，細胞内 VIP/

Table 1. Effects of Bt_2cAMP and phorbol esters on the VIP/PHM-27 mRNA and cAMP levels in NB-1 cells

Treatment	VIP/PHM-27 mRNA cpm	cAMP pmol per mg protein
None	124± 41 (1.0)	12.4± 2.9 (1.0)
1 mM Bt_2cAMP	1053±124 (8.5)	297 ±90.2 (24.0)
69 nM 4_α-phorbol	186± 62 (1.5)	16.4± 7.2 (1.3)
16 nM TPA	669±136 (5.4)	23.8± 8.1 (1.9)
40 nM PDD	409±149 (3.3)	18.9± 4.1 (1.5)
1 mM Bt_2cAMP + 16 nM TPA	4436±496 (35.8)	319 ±26.9 (25.7)

Cells were incubated for 6 hr with various agents. Results from three independent experiments for VIP/PHM-27 mRNA quantitation, and from 4−6 independent experiments cAMP quantitation are expressed as mean±SD. Numbers in parentheses give values relative to those without the treatment.

PHM-27 mRAN 量は 1mM Bt_2cAMP 添加 9 時間後には約10倍，また 16nM TPA 添加 9 時間後には約 5 倍と共に明らかな増加を示した．1mM Bt_2cAMP，および 16nM TPA を共に添加して 9 時間培養した細胞では，mRNA 量は約30倍と著明な増加を示した．Bt_2cAMP および TPA を共に添加した場合の VIP/PHM-27 mRNA 量の増加反応は，それぞれ単独に加えた場合の mRNA 増加を足したものよりも明らかに大きく，Bt_2cAMP と TPA の効果は相乗的であった．TPA で認められた効果は，腫瘍プロモーター活性を有する他のホルボールエステルである phorbol-12, 13-didecanoate (PDD) でも同様に認められたが，腫瘍プロモーター活性を持たない 4α-phorbol では有意の mRNA の増加は認めなかった (表 1)．Bt_2cAMP あるいは TPA 添加後の細胞内 mRNA 量の時間的な変動を図 2 に示す．1mM Bt_2cAMP により，VIP/PHM-27mRNA 量は 2 時間後には約 4 倍の増加を示し，6 時間後には約10倍に増加して項値に達し，その増加は24時間後も持続していた．一方，16nM TPA 添加では，mRNA は 2 時間後より徐々に増加して 9 時間後に約 5 倍の項値に達した後，12時間後より減少して24時間後には最初のレベルに復した．Bt_2cAMP および TPA を同時に添加した細胞では，mRNA 量は 2 時間後に約10倍，4 時間後に約30倍と著明な増加を示し，6 時間後には38倍の項値に達したが，その後減少し始め24時間後には約14倍にまで低下していた．

II．Bt_2cAMP あるいは TPA による細胞内 cAMP 含量の変化

ホルボールエステルによる VIP/PHM-27 mRNA 増加の機序を調べる目的で，ホルボールエステル，あるいは Bt_2cAMP 添加 6 時間後の細胞内 mRNA 量，および cAMP 含量の変化を検討した (表 1)．4α-

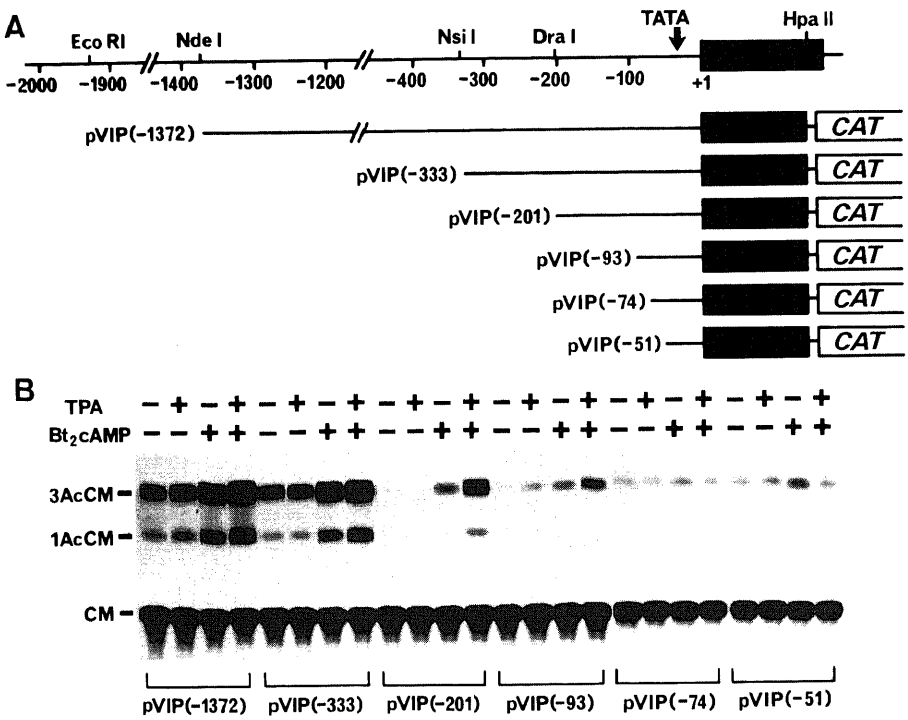

Fig. 3. Delimitation of cAMP/phorbol ester-response elements by deletion mapping. (A) Schematic representation of deletion mutants. Thin lines represent the 5'-flanking sequence of the human VIP/PHM-27 gene. The solid box indicates exon 1 of the gene, and CAT is the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene fused to the exon. Numbers in parentheses indicate distances in base pairs from the transcription start point. (B) CAT activities in NB-1 cells that were trasfected with the corresponding deletion mutants. Transfected cells were incubated with (+) or without (−) TPA and Bt_2cAMP for 9 hr before harvest. Positions of chloramphenicol (CM), 1-acetylchloramphenicol (1AcCM) and 3-acetylchloramphenicol (3AcCM) are shown on the left.

phorbol, TPA，あるいは PDD の添加では，mRNA 量はそれぞれ1.5倍，5.4倍，3.3倍と，TPA あるいは PDD で有意に増加していたのに対し，細胞内 cAMP 含量はそれぞれ1.3倍，1.9倍，1.5倍とわずかな増加を示したに過ぎなかった．Bt$_2$cAMP と TPA を同時に添加した場合，mRNA 量は約36倍に増加し，Bt$_2$cAMP 単独添加の約8.5倍に比し明らかに増加していたが，cAMP 含量は両者間でほとんど差を認めなかった．

Ⅲ．キメラ遺伝子の NB-1 細胞への導入と発現誘導

Yamagami ら[6]は 5'上流領域を含むヒト VIP/PHM-27 遺伝子の全塩基配列を決定し，第一エクソンの上流28，145，772そして900bp の部位に 4 個のプロモーター配列 (TATA box) が存在するが，Bt$_2$cAMP やホルボールエステルにより誘導される mRNA はすべて 28bp 上流にあるプロモーターを利用して転写されたものであることを示した．

Bt$_2$cAMP およびホルボールエステルによる VIP/PHM-27 mRNA 増加の機序をさらに明らかにするために，それらが働きかける遺伝子上の部位の同定を試みた．即ち，ヒト VIP/PHM-27 遺伝子の転写開始部位およびプロモーター領域を含む 2000bp の DNA 断片 (図 3 A の EcoR I から HpaII まで，すなわち −1923〜+143bp)，あるいはその 5'側を様々な長さに欠失させた DNA 断片を CAT 発現ベクターに順方向に挿入したキメラ遺伝子を作成し，それらを NB-1 細胞に導入して CAT 遺伝子の発現が Bt$_2$cAMP や TPA により誘導されるか否かを検討した．キメラ遺伝子導入後，NB-1 細胞を 100nM TPA，1mM Bt$_2$cAMP，あるいはその両者の存在下で 9 時間培養した後，細胞内の CAT 活性を測定した．図 3 に示すように，5'上流領域の 1372bp と第 1 エクソンの 143bp を含むキメラ遺伝子である pVIP (−1372) の導入により，TPA や Bt$_2$cAMP を加えない細胞においても CAT 活性の発現が認められたが，TPA 添加により幾分かの増加を，またBt$_2$cAMP 添加では約 5 倍の増加を示した．TPA と Bt$_2$cAMP の存在下では CAT 活性は約10倍に増加し，TPA と Bt$_2$cAMP の効果は相乗的であった．−333bp までの欠失では非誘導あるいは誘導後の CAT 活性の発現には変化は見られず pVIP (−1372) と同様であった．−201bp まで 5'上流領域を欠失させた pVIP (−201) では，非誘導時の CAT 活性は著明に低下したが TPA と Bt$_2$cAMP に対する反応性は保たれていた．−93bp まで欠失させた pVIP (−93) でも TPA あるいは Bt$_2$cAMP による誘導は可能であったが，−74bp まで欠失させた pVIP (−74) ではそれらに対する反応性は全く失われていた．従って，TPA あるいは Bt$_2$cAMP による遺伝子発現誘導に必要な領域は 5'上流の−93bp から−74bp までの間に存在することが考えられた．また，−333

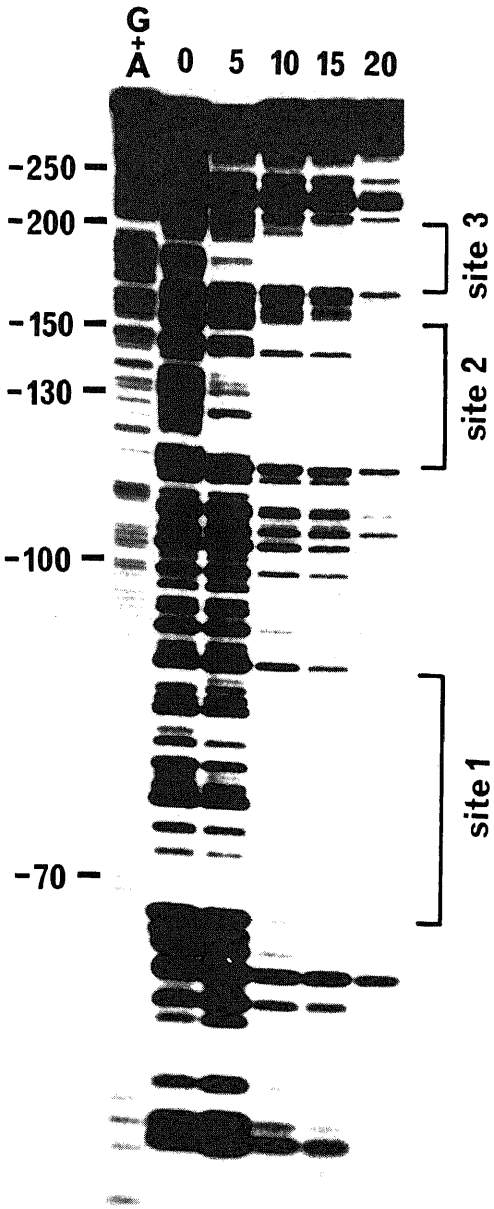

Fig. 4. DNase I foot-printing analysis of the VIP/PHM-27 5'-flanking region. The amounts of nuclear extracts (μ g protein) from NB-1 cells treated with both Bt$_2$cAMP and TPA are indicated above the lanes. G+A, a chemical degradation sequencing ladder used for size markers.

bp から－201bp までの間には NB-1 細胞における VIP/PHM-27 遺伝子の基礎発現 (basal expression) に必要な DNA 領域が存在する可能性が考えられた．

Ⅳ．DNase I フットプリンティング及び DMS フットプリンティング

次に，ヒト VIP/PHM-27 遺伝子の転写調節領域に結合する核内因子の有無を検討するために，NB-1 細胞の核抽出液を用いて DNase I および DMS によるフットプリンティング実験を行った．即ち，5'上流領域の－333から－49bp までの289bp の DNA 断片の非コード鎖 (noncoding strand) を ^{32}P で 5'末端標識し，0～20μg 蛋白量の核抽出液とインキュベートした後，DNase I あるいは DMS 処理を行い，次に，DNase I 処理の場合はフェノール抽出，DMS 処理の場合はピペリジン処理後に塩基配列決定用ポリアクリルアミド電気泳動を行った．図 4 に示したように，DNase I フットプリンティングでは少なくとも 3 個の DNA 領域が DNase I による消化を免れた．第 1 エクソンに近いものから順に仮に領域 1 (site 1)，領域 2 (site 2)，領域 3 (site 3) と命名すると，領域 1 は－88 から－69bp，領域 2 は－153から－117bp，領域 3 は－210から－170bp の領域に相当した．同様の結果は DMS フットプリンティングでも得られた (図 5B)．DMS によるメチル化をまぬがれた 9 個のグアニン残基のうち 7 個は領域 1～領域 3 の中に含まれていた．遺伝子導入実験の結果と照らし合わせて考えると，領域 1 は TPA および Bt_2cAMP による発現誘導に必要な領域に相当し，領域 3 は基礎発現の維持に関わって

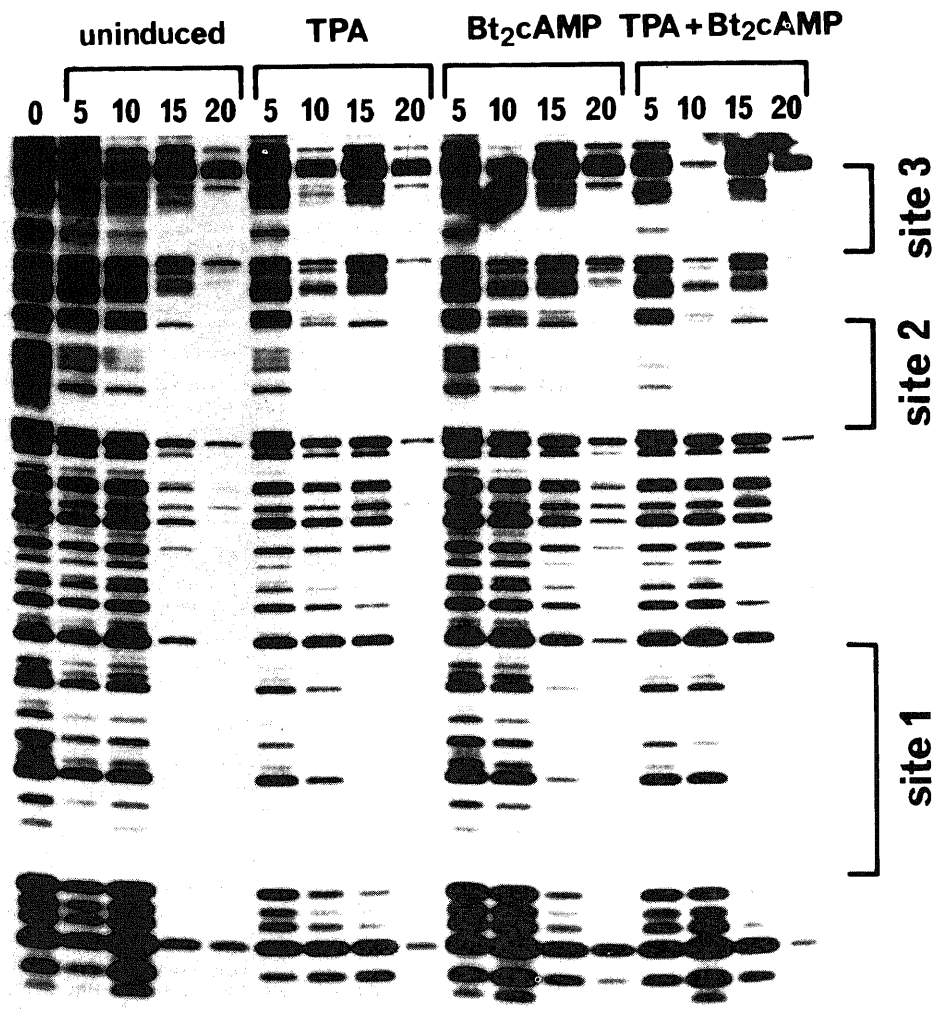

Fig. 5 A

いる領域である可能性が推測された．次に，TPA あるいは Bt_2cAMP によって細胞核内の DNA 結合活性に変化が生じるか否かを検討するために，非誘導または誘導後の NB-1 細胞から核抽出物を得，DNase I フットプリンティング実験，および DMS フットプリンティング実験を行った．誘導の有無によって DNase I 消化から保護された領域と保護の程度，あるいはメチル化から保護されたグアニン残基の部位とその保護の程度にはほとんど変化を認めなかった（図 5A および図 5B）．

考　　察

培養ヒト神経芽腫細胞の一つである NB-1 細胞では，cAMP により VIP の生合成が誘導されること[7,8]，

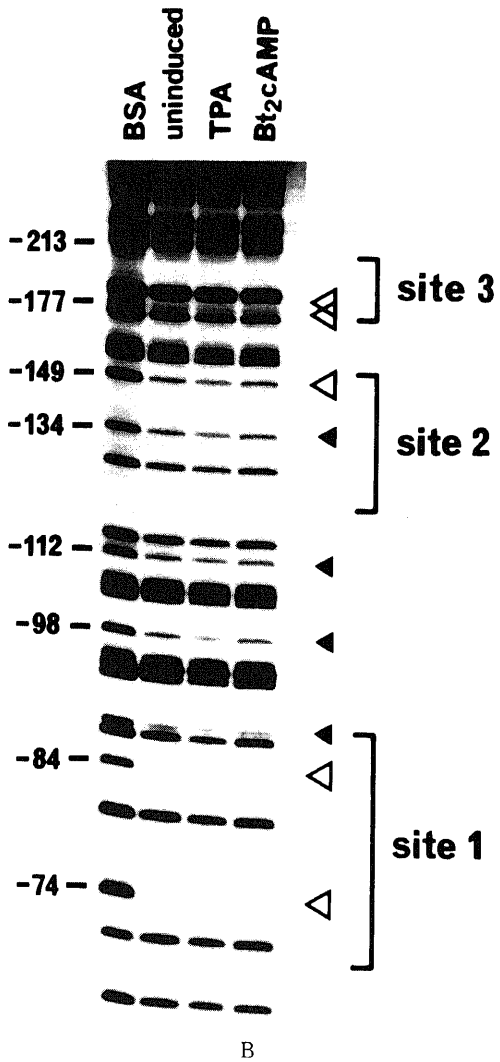

Fig. 5. DNase I and DMS foot-printing analyses of the VIP/PHM-27 5'-franking region treated with nuclear extracts from induced and uninduced NB-1 cells. (A) DNase I foot-printing analysis. The amounts of nuclear extracts (μ g protein) from induced and uninduced cells are indicated above the lanes. (B) DMS methylation protection analysis. The end-labeled DNA fragment was exposed to DMS in the presence of 40 μ g of bovine serum albumin (BSA) or nuclear extracts from cells which were uninduced, or induced either by TPA or Bt_2cAMP, or by both. The guanine residues which were protected strongly or weakly from DMS methylation are indicated with open or closed triangles, respectively.

また cAMP は主に VIP/PHM-27 遺伝子の転写を促進することによって VIP の生合成を誘導することが知られていた[9]. 今回の検討でも以前の報告と同様に, Bt$_2$cAMP により VIP/PHM-27 mRNA の約10倍の増加を認めたが, 加えて腫瘍プロモーターの一つであるホルボールエステルによっても, VIP/PHM-27 mRNA は約5倍の有意な増加を示すことが明らかとなった. さらに, Bt$_2$cAMP とホルボールエステルの同時添加により mRNA は約40倍と著明に増加した. この増加反応は両因子の単独添加の場合の mRNA の増加度を加えたものよりも2～3倍大きく, Bt$_2$cAMP とホルボールエステルの効果は相乗的であると考えられた. 同様の相乗効果はホルホジエステラーゼ阻害により細胞内サイクリック AMP を増加させるイソブチルメチルキサンチン (3-isobuty-1-methylxanthine) とホルボールエステルの同時添加でも認められており[10], Bt$_2$cAMP の効果はブチル基によるものではなく, cAMP そのものの効果を再現しているものと考えられる. 細胞内の cAMP 濃度は, 腫瘍プロモーター活性を有さない 4α-phorbol の添加と, 同活性を有する TPA あるいは PDD の添加では差を認めず, コントロールとほぼ同レベルであった. 一方, VIP/PHM-27 mRNA 量は 4α-phorbol では変化しなかったのに対し, TPA, あるいは PDD では3～5倍の明らかな増加を示した. また, Bt$_2$cAMP と TPA の共存下では, Bt$_2$cAMP 単独添加の場合に比べて mRNA 量は約4倍の増加を示したが, 細胞内 cAMP 濃度には両者の間に差は認めなかった. 従って, ホルボールエステルは cAMP の上昇を介さずにVIP/PHM-27 遺伝子発現を誘導しているものと考えられた.

cAMP, およびホルボールエステルによる発現誘導の機序を明らかにするため, VIP/PHM-27 遺伝子の転写調節領域およびそこに作用する因子の検討を行った. ヒト VIP/PHM-27 遺伝子の 5' 上流領域には4個のプロモーター配列 (TATA box) が存在するが, プライマー伸長 (primer extension) 実験や mung bean nuclease マッピングなどの実験によって, cAMP やホルボールエステルにより誘導される mRNA はすべて第1エクソン上流 28bp にあるプロモーターを利用して転写されたものであることが判っている[6]. 今回の CAT 発現ベクターを用いた遺伝子導入発現実験の結果では, cAMP やホルボールエステルによる誘導に必要な DNA 配列の 5' 側の境界は－93から－75bp の領域にあると考えられた (図3). また, DNase I プットプリンティングや DMS フットプリンティングの実験結果より, NB-1 細胞の核抽出物に含まれる何らかの核内因子が－88から－69bp の間の DNA 領域 (領域1) を認識して結合することが考えられた. 今回の実験で用いた核抽出物は, 単に硫酸アンモニウムで分画しただけの粗抽出液であり, DNase I フットプリンティングの結果は非特異的な結合も見ていることも懸念されるが, DNase I フットプリンティングに比べてより特異性の高い結合のみを検出すると考えられる DMS フットプリンティングでも, 領域1に存在する－88, －84, －74bp の3つのグアニン残基が明らかにメチル化から保護されたことより, その可能性は小さいものと考えられる. 従って, 遺伝子導入実験の結果と合わせて考えると, この領域1そのものが VIP/PHM-27 遺伝子発現誘導に必要な DNA 配列である可能性が示唆された. 即ち, 領域1に結合する何らかの核内因子が cAMP やホルボールエステルの効果を伝達しているものと考えられる. 我々とは別に, Tsukada ら[21]は種々の長さのヒト VIP/PHM-27 遺伝子 5' 上流断片を CAT 発現ベクターに挿入して遺伝子導入発現実験を行い, －86から－70bp の領域が cAMP による発現誘導に必要であると報告しているが, この DNA 領域は今回同定された領域1とほぼ一致する. 今まで cAMP で発現が誘導されることが判っている遺伝子, 例えばソマトスタチン遺伝子, プレプロエンケファリン遺伝子, ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ遺伝子, 絨毛性性腺刺激ホルモンαサブユニット遺伝子, コラゲナーゼ遺伝子などの 5' 上流プロモーター領域には, 今回同定された領域1と共通した塩基配列 5'-TGACGTC-3' が存在する[22].

Montminy はサイクリック AMP により発現誘導を受ける遺伝子に共通に存在し, かつその部分だけを他の cAMP 不応性の遺伝子のプロモーター部分に結合した場合に新しく cAMP 反応性を付与できる DNA 配列を "cAMP 応答配列 (cAMP response element, CRE)" と呼ぶことを提唱した[23]. CRE の共通配列は 5'-TGACGTCA-3' とされているが遺伝子間で多少の違いが存在する. 即ち, ソマトスタチン遺伝子, コラゲナーゼ遺伝子, 絨毛性性腺刺激ホルモンαサブユニット遺伝子などの CRE は, 5'-TGACGTCA-3' であるが, プレプロエンケファリン遺伝子では 5'-TGCGTCA-3' である[22]. 今回の VIP/PHM-27 遺伝子では 5'-TGACGTCT-3' である可能性が考えられる (図6).

cAMP による遺伝子転写誘導には上述の CRE に核内に存在する DNA 結合因子 (蛋白) が結合し, なんらかのシグナルを RNA ポリメラーゼIIを含む転写複合

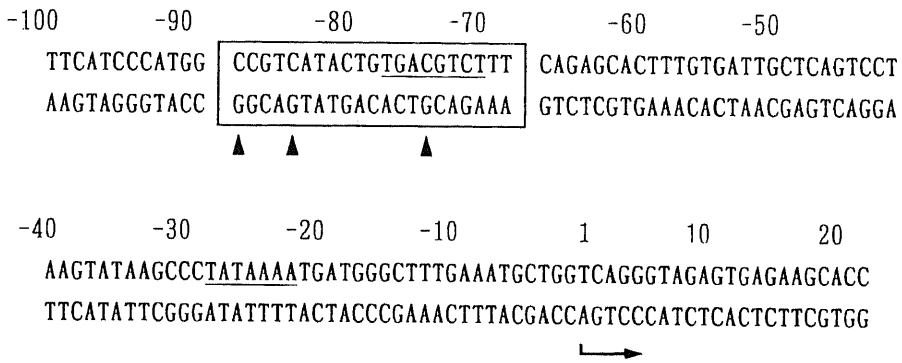

Fig. 6. The cAMP/phorbol ester-response element of the human VIP/PHM-27 gene. The nucleotide sequence is from the reference [6]. The cAMP/phorbol ester-response element is boxed. TGACGTCT motif and TATA box sequence are underlined. Closed triangles (▲) indicate guanine residues protected from DMS methylation. Arrow indicates the start point and direction of transcription.

体に伝達する必要がある．今回の DNase I フットプリント実験，および DMS フットプリント実験の結果より，NB-1 細胞においても核内に VIP/PHM-27 遺伝子の CRE に結合する DNA 結合因子が存在し，cAMP による転写誘導に関与していることが考えられた．また，Bt_2cAMP 処理した NB-1 細胞の核抽出液で行った DNase I，および DMS フットプリント実験では，コントロールの核抽出液でのものと比較して，DNase I 消化あるいは DMS によるメチル化から保護された領域または保護の程度に差が認められなかった．この結果より cAMP は CRE に結合する因子の量あるいは結合力の強さを調節するよりは，結合した因子からプロモーターの転写複合体になんらかの刺激を伝達するための活性を調節している可能性が推定された．最近 Montminy らはソマトスタチン遺伝子の CRE 配列を CL-2B セファロースに結合させて DNA アフィニティカラムを作成し，DNA アフィニティクロマトグラフィーを行い，培養褐色細胞腫細胞 PC-12 より CRE に結合する分子量 43K ダルトンの核蛋白を精製し，これを CRE 結合蛋白 (CRE binding protein, CREB) と命名した[24]．また CREB の一部分のアミノ酸配列をもとに作成した合成オリゴヌクレオチドプローブを用いて，ラット大脳皮質 cDNA ライブラリーより PCR 法により CREB cDNA をクローニングし，CREB の全構造を決定した[25]．また，Hoeffler ら[26]もほぼ同時期にヒトの CREB の cDNA クローニングに成功し，その全構造を報告している．ラット CREB，ヒト CREB はそれぞれ341，327アミノ酸残基からなり，アミノ酸配列からその基本構造は次の様に考えられている．即ち，C 末端部分には DNA 結合蛋白が二量体 (dimer) を形成するために必要なロイシンに富む配列 (leucine zipper) が存在し，それに隣接して N 末端側に塩基性アミノ酸に富み DNA 結合ドメインと考えられる領域が存在する．N 末端側約80%はプロリン，およびグルタミン酸やアスパラギン酸などの陰性に荷電したアミノ酸に富み，“陰性荷電領域 (negative noodle)”と称され，他の転写制御蛋白との相互作用に必要な領域と考えられている．この領域の中央部には種々の蛋白リン酸化酵素，即ち cAMP 依存性の A キナーゼ，リン脂質・ジアシルグリセロール依存性の C キナーゼやカゼインキナーゼ II などによりリン酸化される蛋白に共通のアミノ酸配列が認められている．Montminy ら[24]は CREB は A キナーゼの触媒サブユニット (catalytic subunit) により直接試験管内でリン酸化されること，および細胞内 cAMP を増加させることにより細胞内でもリン酸化されることを示した．さらに，試験管内変異導入法 (in vitro mutagenesis) を用いた実験により，cAMP によるソマトスタチン遺伝子の転写誘導には CREB の N 末端から133番目のセリン残基がリン酸化されることが必須であることが明らかになった[27]．また Yamamoto ら[28]は CREB の CRE への結合能は A キナーゼによるリン酸化では変化がなかったことを述べている．これらの報告と今回の実験で得られた結果より，cAMP による VIP/PHM-27 遺伝子の転写誘導機構は次のようなものが推定される．即ち，cAMP は A キナーゼを活性化

し，活性化されたAキナーゼの触媒サブユニットは核内に移行して，恐らく既に CRE に結合しているCREBのN末端側陰性荷電領域内セリン残基をリン酸化し，他の転写因子との相互作用を促すことによって遺伝子の転写を刺激するというものである．

一方，ホルボールエステルによる VIP/PHM-27 遺伝子転写誘導機構であるが，今回の結果よりホルボールエステルは cAMP と同じく−88から−69bp の間の DNA 領域に何らかの作用を為して VIP/PHM-27 遺伝子の転写を促進していることが示唆されたが，前述した様にその効果は cAMP 上昇を介さないものであると考えられた．また，DNase I フットプリンティング実験あるいは DMS フットプリンティング実験の結果では，TPA により誘導した細胞の核抽出液で認められた保護領域とその程度は，コントロール，あるいは Bt_2cAMP 誘導のものと差がなかったことより，ホルボールエステルは cAMP による転写誘導の場合と同じか，または極めて類似した DNA 結合因子を介して作用していることが示唆された．c-fos 遺伝子[29]，c-myc 遺伝子[30]，コラゲナーゼ遺伝子[31]，metallothionein II_A 遺伝子[30]などではホルボールエステルによる転写の誘導が知られている．ホルボールエステルはそれらの遺伝子のプロモーター領域に存在する共通の塩基配列 5'-TGAGTCA-3' を介して転写誘導に関与していることが明らかとなっており，その配列は TPA 応答配列 (TPA-response element, TRE) と称されている[33]．TRE に結合し，転写を活性化する DNA 結合蛋白として転写調節因子アクティベータープロテイン 1 (activator protein 1, AP-1) が同定されているが，ホルボールエステルで誘導した細胞では，AP-1 の TRE への結合活性の増加が認められている[34]．TRE (5'-TGAGTCA-3') と CRE (5'-TGACGTCA-3') は極めて類似しており，実際 CRE には AP-1 が低親和性ながら結合することが報告されている[28]．従って，今回認められたホルボールエステルによる VIP/PHM-27 遺伝子の発現誘導の機序として，CREB に AP-1 が結合することが一つの可能性として考えられる．しかしながら，フットプリンティング実験で，保護された領域のパターンや程度にコントロール，あるいは Bt_2cAMP 誘導のものとの差が見られなかったことは，異なる誘導でそれぞれ異なる転写因子が CREB に結合するという仮説にはやや矛盾している．一方ホルボールエステルによる転写誘導には TRE を介さないものも知られており，Methallothionein II_A 遺伝子，成長ホルモン遺伝子，プロラクチン遺伝子，プラスミノーゲンアクティベーター遺伝子，プロエンケファリン遺伝子などでは，転写調節因子アクティベータープロテイン 2 (activator protein 2, AP-2) が AP-2 結合部位 (5'-CCCCAGGC-3') に結合することが転写誘導に必要であることが示されている[22]．また，AP-2 結合部位は cAMP による転写誘導にもエンハンサーとして働くことも報告されている[35]．VIP/PHM-27 遺伝子の場合には，プロモーター領域には AP-2 結合部位やそれに類似した配列は存在せず，AP-2 を介する転写誘導は否定的であると考えられる．ホルボールエステルによる転写誘導機構としてもう一つの可能性として考えられるものに，CREB のリン酸化がある．即ち，前述したように CREB のN末端側の陰性荷電領域内にはCキナーゼによってリン酸化される蛋白に共通のアミノ酸配列が存在し，実際 Yamamoto ら[28]は CREB がCキナーゼにより試験管内でリン酸化されること，リン酸化部位はAキナーゼによるものとは異なること，さらにCキナーゼによるリン酸化により CREB の二量体化が促進されるがAキナーゼではそのようなことは起こらないことを示した．fos 蛋白，jun 蛋白，AP-1 などの DNA 結合因子が転写の活性化を起こすためには，同じものどうし，あるいは類似した蛋白との二量体を形成することが必要であることが知られており[36]，CREB でも同様の機構が働いていることが考えられる．ホルボールエステルがCキナーゼを活性化することはよく知られた事実であり[37]，ホルボールエステルによる VIP/PHM-27 遺伝子の発現もCキナーゼの活性化による CREB の二量体化によって転写を促進している可能性が考えられる．ホルボールエステルも cAMP と同じ転写因子を利用して転写を促進するとすれば，今回の CAT 遺伝子発現実験やフットプリンティング実験の結果は全て合致し，従ってこのリン酸化による CREB の二量体化による転写促進という機序が最も考え易い．

Goodman ら[38]はソマトスタチン遺伝子は cAMP のみでなくホルボールエステルによっても転写が促進されること，遺伝子発現実験によりホルボールエステルの作用は cAMP と同じ CRE を介すること，またフットプリンティング実験の結果はホルボールエステルで誘導したものと cAMP で誘導したものに差はなかったことを述べている．この結果は今回の VIP/PHM-27 遺伝子でのものとほとんど同じであり，最後に述べた可能性を支持している．また，cAMP が CRE を介して転写を促進する遺伝子の一部には，ホルボールエステルによっても CRE を介する転写誘導が生じ得るものがあり，従ってその様な遺伝子の CRE は，AP-2 結合部位とは異なるもう一つの

"cAMP/ホルボールエステル応答配列 (cAMP/phorbol ester-response element)" と称し得るのかも知れない.

以上に述べたように cAMP あるいはホルボールエステルが, 同じかまたは類似の転写因子を介するもののそれぞれ異なる機序, すなわち cAMP はAキナーゼによる CREB のリン酸化により他の転写因子との相互作用を活性化し, 一方, ホルボールエステルはCキナーゼを介するリン酸化により CREB の二量体化を促進することによって転写促進に働くものと考えると, それらの刺激が相乗的に作用することも理解可能である. しかしながら, これらの可能性を検証するためには, 単離精製した転写因子を用いた試験管内での遺伝子転写実験や, 変異を生じさせた転写因子を細胞内で発現させた場合での遺伝子発現実験などで検討する必要がある.

結　　論

Bt$_2$cAMP およびホルボールエステルによるヒト VIP/PHM-27 遺伝子発現誘導とその機序につき培養神経芽腫細胞 (NB-1 細胞) を用いて検討し, 以下の結論を得た.

1. NB-1 細胞の VIP/PHM-27 メッセンジャーRNA 量は Bt$_2$cAMP により約10倍, TPA や PDD などのホルボールエステルにより約3～5倍の増加を認めた.

2. Bt$_2$cAMP とホルボールエステルの効果は相乗的であり, 細胞内 cAMP 含量にはホルボールエステルにより有意の変化を認めなかったことより, ホルボールエステルは cAMP とは異なる機序で VIP/PHM-27 遺伝子の発現を誘導していることが考えられた.

3. CAT 遺伝子発現ベクターを利用した外来遺伝子導入発現実験により, cAMP あるいはホルボールエステルによる発現誘導に必要な DNA 領域は共にその 5' 末端が転写開始点の75～93bp 上流にあることが明らかとなった.

4. 核抽出液を用いたフットプリンティング実験により, VIP/PHM-27 遺伝子のプロモーター領域には少なくとも3箇所の核内因子結合領域があり, その内の一つ (−69bp から−88bp まで) は遺伝子導入発現実験で cAMP あるいはホルボールエステルによる発現に必要と考えらえた DNA 領域に一致すると考えらえた.

5. 誘導の有無によりフットプリンティングのパターンや程度に差は認められなかった.

6. 以上の結果より, cAMP とホルボールエステルは−69bp から−88bp までの領域に含まれる DNA 配列 ("cAMP/phorbol ester-response element") に結合する核内因子を介して VIP/PHM-27 遺伝子の転写を促進するが, cAMP とホルボールエステルは核内因子への作用がそれぞれ異なって可能性が示唆された.

謝　　辞

稿を終えるに臨み, 御指導と御校閲を賜りました恩師小林健一教授に深甚なる謝意を表します. また, 終始直接の御指導を賜りました恩師東北大学第一医化学講座岡本　宏教授に心から感謝いたします. あわせて, 本研究の機会を与えて戴き, 御指導と御鞭撻を賜りました恩師都立駒込病院院長服部信先生ならびに国立金沢病院能登　裕先生に深く感謝いたします. さらに, 本研究遂行に多大の御協力を戴きました金沢大学第二生化学講座山本　博教授, 東北大学第二医化学講座助手山上孝司博士, 大阪バイオサイエンス研究所西澤幹雄博士, (株) ニッポンジーン早川由美子氏ならびに金沢大学第一内科第一研究室の諸先生に御礼申し上げます.

文　　献

1) **Mutt, V. & Said, S. I.:** Structure of the porcine vasoactive intestinal octacosapeptide. Eur. J. Biochem., **42,** 581-589 (1974).

2) **Said, S. I. (ed.):** Vasoactive Intestinal Peptide. Advances in Peptide Hormone Research Series, 1st ed., Raven Press, New York, 1982.

3) **Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N. & Okamoto, H.:** Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature, **304,** 547-549 (1983).

4) **Bodner, M., Fridkin, M. & Gozes, I.:** Coding sequences of vasoactive intestinal peptide and PHM-27 peptide are located on two adjacent exons in the human genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82,** 3548-3551 (1985).

5) **Tsukada, T., Horovitch, S. J., Montminy, M. R., Mandel, G. & Goodman, R. H.:** Structure of the human vasoactive intestinal polypeptide gene. DNA, **4,** 293-300 (1985).

6) **Yamagami, T., Ohsawa, K., Nishizawa, M., Inoue, C., Gotoh, E., Yanaihara, N., Yamamoto, H. & Okamoto, H.:** Complete nucleotide sequence of human vasoactive intestinal peptide/PHM-27 gene and its inducible promoter. Ann. New York Acad. Sci., **527,** 87-102 (1988).

7) **Yanaihara, N., Suzuki, T., Sato, H., Hoshino, M., Okaru, Y. & Yanaihara, C.:**

Dibutyryl cAMP stimulation of production and release of VIP-like immunoreactivity in a human neuroblastoma cell line. Biomed. Res., **2**, 728-734 (1981).

8) **Obata, K., Itoh, N., Okamoto, H., Yanaihara, C., Yanaihara, N. & Suzuki, T.:** FEBS Lett., **136**, 123-126 (1981).

9) **Hayakawa, Y., Obata, K., Itoh, N., Yanaihara, N. & Okamoto, H.:** Cyclic AMP regulation of pro-vasoactive intestinal polypeptide/PHM-27 synthesis in human neuroblastoma cells. J. Biol. Chem., **259**, 9207-9211 (1984).

10) **Ohsawa, K., Hayakawa, Y., Nishizawa, M., Yamagami, T., Yamamoto, H., Yanaihara, N. & Okamoto, H.:** Synergistic stimulation of VIP/PHM-27 gene expression by cyclic AMP and phorbol esters in human neuroblastoma cells. Biochem. Biophyis. Res. Commun., **132**, 885-891 (1985).

11) **Ohsawa, K., Yamagami, T., Nishizawa, M., Inoue, C., Gotoh, E., Yamamoto, H. & Okamoto, H.:** Structure and expression of human vasoactive intestinal peptide/PHM-27 gene. Gunma Symposia on Endocrinology, **24**, 169-181 (1987).

12) **三宅清雄，下 嘉弘，北村忠久，野条良彰，仲村恒雄，今宿晋作，阿部達生**：ヒト副腎髄質神経芽細胞腫からえた体外培養株 NB-1 の性格．自律神経，**10**, 115-120 (1973).

13) **Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J.:** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry, **18**, 5294-5299 (1979).

14) **Fujisawa-Sehara, A., Sogawa, K., Nishi, C. & Fujii-Kuriyama, Y.:** Regulatory DNA elements localized remotely, upstream from the drug-metabolizing cytochrome P-450c gene. Nucleic Acids Res., **14**, 1465-1477 (1986).

15) **Graham, F. L. & van der Eb, A. J.:** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology, **52**, 456-467 (1973).

16) **Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H.:** Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. Mol. Cell. Biol., **2**, 1044-1051 (1982).

17) **Davis, L. G., Dibner, M. D. & Battey, J. F.:** Basic Methods in Molecular Biology, 1st ed., p298-300, Elsevier, Amsterdam, New York, 1986.

18) **Ohlsson, H. & Edlund, T.:** Sequence-specific interactions of nuclear factors with the insulin gene enhancer. Cell, **45**, 35-44 (1986).

19) **Janson, L., Bark, C. & Pettersson, U.:** Identification of proteins interacting with the enhancer of human U2 small nuclear RNA genes. Nucleic Acids Res., **15**, 4997-5016 (1987).

20) **Maxam, A. M. & Gilbert, W.:** Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. In Grossman, L. & Moldave, K.(eds.), Methods Enzymol., **65**, p499-560, 1980.

21) **Tsukada, T., Fink, J. S., Mandel, G. & Goodman, R. H.:** Identification of a region in the human vasoactive intestinal polypeptide gene responsible for regulation by cyclic AMP. J. Biol. Chem., **262**, 8743-8747 (1987).

22) **Roesler, W. J., Vandenbark, G. R. & Hanson, R. W.:** Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. J. Biol. Chem., **263**, 9063-9066 (1988).

23) **Montminy, M. R.,Sevario, K. A., Wagner, J. A., Mandel, G. & Goodman R. H.:** Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**, 6682-6686 (1986).

24) **Montminy, M. R. & Bilezikjian, L. M.:** Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. Nature, **328**, 175-178 (1987).

25) **Gonzalez, G. A., Yamamoto, K. K., Fischer, W. H., Karr, D., Menzel, P., Biggs III, W. H., Vale, W. W. & Montminy, M. R.:** A cluster of phospholylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. Nature, **337**, 749-752 (1989).

26) **Hoeffler, J. P., Meyer, T. E., Yun, Jameson, J. L. & Habener, J. F.:** Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein ; structure based on a cloned placental cDNA. Science, **242**, 1430-1433 (1988).

27) **Gonzalez, G. A. & Montminy, M. R.:** Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phospholylation of CREB at serine 133. Cell, **59**, 675-680 (1989).

28) **Yamamoto, K. K., Gonzales, G. A., Biggs III, W. H. & Montminy, M. R.**: Phospholylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. Nature, **334**, 494-498 (1988).

29) **Greenberg, M. E. & Ziff, E. B.**: Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. Nature, **311**, 433-438 (1984).

30) **Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D. & Leder, P.**: Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. Cell, **35**, 603-610 (1983).

31) **Whitham, S. E., Murphy, G., Angel, P., Rahmsdorf, H. J., Smith, B. J., Lyons, A., Harris, T. J. R., Reynolds, J. J., Herrlich, P. & Docherty, A. J. P.**: Comparison of human stromelsin and collagenase by cloning and sequence analysis. Biochem. J., **240**, 913-916 (1986).

32) **Angel, P., Poting, A., Mallick, U., Rahmsdorf, H. J., Schorpp, M. & Herrlich, P.**: Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. Mol. Cell. Biol., **6**, 1760-1766 (1986).

33) **Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. & Karin, M.**: Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. Cell, **49**, 729-739 (1987).

34) **Lee, W., Mitchell, P.& Tjian, R.**: Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. Cell, **49**, 741-752 (1987).

35) **Imagawa, M., Chiu, R. & Karin, M.**: Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways; protein kinase C and cAMP. Cell, **51**, 251-260 (1987).

36) **Halazonetis, T. D., Georgopoulos, K., Greenberg, M. E. & Leder, P.**: c-Jun dimerizes with itself and with c-fos, forming complexes of different DNA binding affinities. Cell, **55**, 917-924 (1988).

37) **Nishizuka, Y.**: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nature, **308**, 693-698 (1984).

38) **Goodman, R. H., Rehfuss. R. P., Verhave, M., Ventimiglia, R. & Low, M. J.**: Somatostatin gene regulation; an overview. Metabolism, **39** (Suppl 2), 2-5 (1990).

Regulation of the VIP/PHM-27 Gene Expression by Cyclic AMP and Phorbol Esters in Human Neuroblastoma Cells

Kensou Ohsawa, Department of Internal Medicine (Ⅰ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med Soc., **100**, 585—600 (1991)

Key words VIP/PHM-27 gene, cyclic AMP, phorbol ester, cAMP/phorbol ester-response element, nuclear factor

Abstract

Vasoactive intestinal peptide (VIP), a 28-amino acid peptide hormone, is synthesized in a variety of tissues including the central and peripheral nervous systems and small and large intestines. The precursor protein of human VIP contains not only VIP but also a 27-amino acid peptide. PHM-27. It has been previously reported that the synthesis of pro-VIP/PHM-27 is induced by cyclic AMP (cAMP) in human neuroblastoma cells (NB-1) and the induction is due to an increase in the rate of transcription of the VIP/PHM-27 gene. In the present study, the effects of dibutyryl cAMP (Bt_2-cAMP) and phorbol esters such as 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) and phorbol-12, 13-didecanoate (PDD) on VIP/PHM-27 gene expression in NB-1 cells were investigated. When NB-1 cells were cultured in the presence of 1 mM Bt_2cAMP or 16 nM TPA for 9 hours, the VIP/PHM-27 mRNA level increased by about 10- and 5-fold, respectively. 40 nM PDD also increased the mRNA level by about 3-fold. In the presence of both Bt_2cAMP and TPA, the VIP/PHM-27 mRNA level increased multiplicatively by about 38-fold. The intracellular cAMP level was essentially unaffected by phorbol esters. To further clarify the mechanism of the induction of VIP/PHM-27 gene by cAMP

and phorbol esters, the nucleotide sequence in the human VIP/PHM-27 gene responsible for the regulation by cAMP and phorbol esters was identified, by transient expression assay using a set of 5'-deletion mutants of the VIP/PHM-27-chloramphenicol acetyltransferase (CAT) fusion gene. The 5'-boundary of the region required for the induction by cAMP and phorbol esters resided between 93 and 75 bp upstresm of the transcription initiation site. A DNase I footprinting study and DMS methylation protection analysis using nuclear extracts from NB-1 cells, showed three protected sites in the upstream region of the promoter. One of the protected sites, the sequence between 88 and 69 bp upstream of the transcription initiation site, corresponded to the region required for the induction by cAMP and phorbol esters, indicating the presence of a nuclear factor which bound to this site and might mediate the induction of VIP/PHM-27 gene expression. The DNase I footprinting study and DMS methylation protection analysis showed no significant difference in DNA-binding activities among the extracts prepared from induced and uninduced cells. It is therefore suggested that cAMP and phorbol esters induced VIP/PHM-27 gene expression through the modification of pre-existing DNA-binding factor. Since the VIP/PHM-27 gene was multiplicatively induced by cAMP and phorbol esters, it is possible that the DNA-binding factor was synergistically activated, being phospholylated independently by cAMP-dependent protein kinase and by protein kinase C at the separate sites.