

神経系における下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) の生理的意義

橋本 均

Physiological Significance of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) in the Nervous System

Hitoshi HASHIMOTO

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,
1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

(Received August 29, 2002)

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has been conserved remarkably during evolution and is widely expressed in the nervous system across phyla. PACAP has an amino acid sequence homology of 68% with that of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and of 37% with that of secretin, indicating that PACAP is a member of the VIP/glucagon/secretin superfamily. PACAP exerts its actions via three heptahelical G-protein-linked receptors: one PACAP-specific (PAC_1) receptor and two receptors ($VPAC_1$ and $VPAC_2$) shared with VIP. PACAP stimulates several different signaling cascades in neurons, leading to the activation of adenylate cyclase, phospholipase C, and mitogen-activated protein kinase and mobilization of calcium. Although PACAP and VIP have no apparent homology with calcitonin and parathyroid hormone (PTH), PAC_1 , $VPAC$, secretin, glucagon, glucagon-like peptide 1, growth hormone-releasing hormone, calcitonin, and PTH/PTH-related peptide receptors are related to each other and constitute a subfamily of the G-protein-coupled receptors. Distribution analysis of PACAP and its receptors and pharmacological studies have elucidated its pleiotropic effects in the central and peripheral nervous systems. However, the relevance of the pharmacological PACAP effects to the actual physiological activities of endogenous PACAP has not been addressed, because potent and selective low-molecular-weight PACAP antagonists have not yet been developed. To assess the function of PACAP *in vivo*, we have recently generated PAC_1 receptor- and PACAP-targeted mice, and provided evidence that PACAP plays a previously uncharacterized role in the regulation of psychomotor behaviors. In this review, we focus on the physiological and or pathophysiological roles mediated by PACAP in the nervous system.

Key words—pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP); vasoactive intestinal polypeptide (VIP); knockout mice; receptor; gene expression; psychomotor behaviors

1. はじめに

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド; PACAP) は、1989年宮田らによって、ヒツジ脳の視床下部から下垂体細胞のアデニル酸シクラーゼを活性化作用を指標に、単離・同定されたペプチドホルモンである。¹⁾ PACAPとその受容体の組織分布の解析や、*in vitro*, *in vivo*での薬理学研究から、PACAPの多様な生理的役割が明らかになっ

てきており、現在では、PACAPはホルモン作用の他に神経伝達物質・調節因子としても働いているものと考えられている。^{2,3)}例えば中枢・末梢神経系において、神経細胞の分化・生存維持や神経分泌系の活性化などに関わっており、神経のシナプス可塑性の調節、神経前駆細胞の分化、グルコース依存的インスリン分泌の促進作用、痛みの調節、その他多くの生理作用があることが報告されている。著者らは1993年にまず、PACAP選択的受容体 PAC_1 のcDNAクローニングに成功し、PACAP/vasoactive intestinal polypeptide (VIP) シグナル系の受容体分類を明確にした。⁴⁾この発見を機に、当時ほとんど生理機能の不明であったPACAPの神経系での役割を解明することを目的に、次のような分子薬理学

大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 吹田市山田丘1-6)

e-mail: hasimoto@phs.osaka-u.ac.jp

*本総説は、平成14年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

的手法により研究を進めてきた。(1)まず、受容体及びリガンド mRNA の発現分布を Northern 及び *in situ* hybridization により解析し、(2)次に遺伝子ターゲティングマウスを作製することも1つの目的として、それらのマウス遺伝子の単離及び構造決定を行った。(3)得られたゲノム DNA を用いて、PACAP 遺伝子のプロモーター活性の調節等を *in vitro* 培養細胞で解析するとともに、それに関わる細胞内情報伝達系を調べた。(4)一方、PACAP の病態的意義を追求する目的で、脳虚血障害 (*in vivo*) と初代培養神経細胞へのグルタミン酸毒性 (*in vitro*) における PACAP 発現変化について調べた。(5)また、受容体の構造—機能研究を目的とし、PAC₁ と VPAC₁ 及びセクレチン受容体間のキメラ体を多種作製し、リガンド結合と G 蛋白活性化に関わるドメイン構造の存在を示唆した。ところで、有効な低分子性 PACAP リガンドは今もなく、*in vivo* 研究には遺伝子改変マウスの作製が必須であった。(6)そこで PAC₁ 受容体欠損マウス、さらに PACAP 欠損 (−/−) マウスをそれぞれ作製し、それらの表現型解析によりこれまで知られていなかった高次精神機能の制御という PACAP の新しい生理的役割を見出し、ヒト疾患との関連性を示すことができた。(7)他方、PACAP の末梢での役割に関する検討として、インスリン分泌の促進を含む糖代謝恒常性の維持における作用機序を調べたいと考え、膵臓 β 細胞特異的 PACAP トランスジェニックマウスを作製してゲノム薬理的な研究を行っている。

本稿では、以上のような著者らの研究結果を含めて、PACAP が神経系で果たす生理的意義について、現在解明されている知見を述べ、精神疾患や糖尿病などのヒト多因子疾患の創薬標的分子としての PACAP 関連シグナルに関する今後の研究に、方向性を示すことができると考えている。なお、著者らの他の総説についても参照されたい。⁵⁻⁸⁾

2. PACAP について

PACAP は 38 アミノ酸からなる PACAP38 と、その N 末の 27 アミノ酸からなる PACAP27 の 2 つのフォームからなり、これらは PACAP 前駆体 (プレプロ PACAP) からオルターナティブプロセッシングによって生成することが明らかにされている。PACAP27 は、VIP とアミノ酸配列の相同性が 68% であり、セクレチンとも 37% の相同性があることから、VIP/グルカゴン/セクレチンファミリーに属する。^{2,3)} Figure 1 に PACAP, VIP, セクレチンのアミノ酸配列の比較を示す。このファミリーにはさらに、有力な糖尿病の新薬として注目されているグルカゴン様ペプチド (GLP)-1, さらに GLP-2, 成長ホルモン分泌ホルモン (GHRH), glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), peptide histidine-methionine (PHM) などが属している。

PACAP38 の一次構造は、これまでに調べられた哺乳類のすべての種で完全に保存されており、下等脊椎動物や原索動物でもほとんど変化していない。このことは PACAP は約 7 億年以上にわたり保存されていることを示し、生命機能の維持において重要な役割を果たしていることを示唆する。^{2,3)} 進化過程における PACAP 遺伝子の変化に関しては他に優れた総説があるので参照されたい。^{9,10)}

3. PACAP 選択的 PAC₁ 受容体の分子クローニング

石原らは 1991 年に、哺乳動物細胞を用いた発現クローニング法を用いて、神経芽腫—グリオーマハイブリッド細胞 NG108-15 の cDNA ライブラリーからラットセクレチン受容体の cDNA を単離することに成功した。¹¹⁾ 次いで翌年に、その cDNA プローブを用いたホモロジースクリーニングにより、ラット肺から VIP 受容体 VPAC₁ サブタイプの cDNA も単離した。¹²⁾ COS7 細胞に発現させたりコンビナント VPAC₁ 受容体は、VIP を結合すると

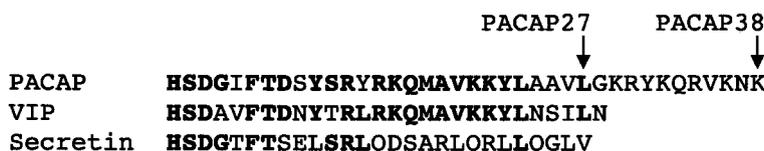


Fig. 1. Comparison of the Primary Structures of Two Forms of PACAP, PACAP38 and PACAP27, VIP, and Secretin in Rat. Amino acids identical in more than two polypeptides are shown in boldface type.

もに PACAP にも高い親和性を示した。それまでの薬理学的研究から、PACAP を選択的に結合する受容体が脳に存在することが知られていたことから、我々は石原らと共同して、PACAP 選択的 PAC₁ 受容体 cDNA をラット脳の大脳皮質から単離し、その構造と発現系での解析及び脳内発現分布について 1993 年に報告した。⁴⁾ さらに polymerase chain reaction (PCR) 法により、マウス PACAP 受容体 cDNA を単離した。¹³⁾ ラット PACAP 受容体のクローニングは、同時期に他のグループからも報告されている。¹⁴⁾ 一方、Lutz らはラット嗅球より VIP 受容体のもう 1 つのサブタイプである VPAC₂ 受容体 cDNA をクローニングして報告し、稲垣らもマウスインスリン分泌性 β 細胞株 MIN6 からマウス VPAC₂ 受容体 cDNA を単離している。¹⁴⁾

Figure 2 に、マウス PAC₁ 受容体 cDNA の塩基配列と、それより推定されるアミノ酸配列を示す。PAC₁ 受容体は 496 アミノ酸のポリペプチドであり、その疎水性分析の結果、7 回膜貫通 G 蛋白共役型受容体であると推定された。また N 末の 20 アミノ酸はシグナル配列であると予想され、成熟型受容体は 476 アミノ酸であり、分子量は約 54.5 kDa であると推定された。Figure 3 に成熟型 PAC₁ 受容体の構造の模式図を示す。細胞外領域には 5 つの N 結合型糖鎖付加配列 (Asn-X-Thr/Ser) が認められており、実際の分子量は糖鎖付加により大きくなっている。PAC₁, VPAC₁, VPAC₂ 受容体間のアミノ酸配列の相同性は約 45% であり、これらとセクレチン、GHRH 受容体との相同性は約 35—40% である。これらすべての受容体の細胞外領域には共通に保存された 9 つのシステイン残基が存在している (Fig. 3 において矢頭で示したシステイン (C) 残基)。これらのいくつかはジスルヒド結合することによって受容体のリガンド結合に必要な構造が維持されていると考えられている。事実、PAC₁ 受容体を発現する COS7 細胞膜への [¹²⁵I] PACAP27 結合は、 β -メルカプトエタノール (還元剤) によって完全に消失した。この受容体ファミリーにはさらにグルカゴン受容体、GLP-1 受容体、GHRH 受容体、カルシトニン受容体及び副甲状腺ホルモン (PTH)/PTH 関連ペプチド (PTHrP) 受容体が属する。カルシトニン受容体と PTH/PTHrP 受容体は、そのリガンドは VIP/グルカゴン/セクレチン

ファミリーに属するとは考えられていなかったが、受容体の一次構造が解明されて、その相同性からこの受容体ファミリーに加えられたものである。

マウス及びラット PAC₁ 受容体のアミノ酸配列を比較すると、シグナルペプチドにおいて 3 残基、N 末細胞外領域及び第 1 膜貫通領域のそれぞれにおいて 1 残基が異なるのみで、99% の高い相同性があり、先に述べた受容体ファミリーに共通に保存されたシステイン残基や N 結合型糖鎖付加配列は、マウス PAC₁ 受容体にも存在する (Fig. 3)。¹³⁾

4. 受容体のリガンド選択性

次に得られた PAC₁ 受容体の細胞内情報伝達系の活性化におけるリガンド選択性について検討した。PAC₁ 受容体と VPAC₁ 受容体 cDNA を DEAE-デキストラン法により COSG51 細胞 (促進性 G 蛋白 (Gs) を高発現する COS7 細胞の安定形質転換株) に発現させ、種々のリガンドで刺激して細胞内 cAMP 産生量をラジオイムノアッセイ法により測定した。その結果、PAC₁ 受容体においては、PACAP38 と PACAP27 がほぼ同程度の低い濃度から cAMP 産生を促進するのに対して、VIP やその関連ペプチドである PHM-27 によっては、高濃度においてのみ弱い cAMP 産生が認められた。セクレチンやグルカゴンは 1 μ M でも全く活性化作用を示さなかった。一方、VPAC₁ 受容体では、PACAP38, PACAP27, VIP, PHM-27 がともに同程度の低濃度で、cAMP 産生を促進した。また高濃度のセクレチンによっても弱い cAMP 産生が認められ、グルカゴンもわずかに活性化作用を示した。¹²⁾ VPAC₂ 受容体は、セクレチンに親和性がないことを除いて、VPAC₁ 受容体とよく似たりリガンド選択性を有していることが報告されている。²⁾ 石原らのセクレチン受容体の結果も加えて、これら各受容体のリガンド選択性を Table 1 にまとめて示す。

Table 1. Ligand-Selectivity^{a)} of PAC₁, VPAC₁, VPAC₂ and Secretin Receptors

Receptor	PACAP	VIP	Secretin
PAC ₁ receptor	High	Low	—
VPAC ₁ receptor	High	High	Low
VPAC ₂ receptor	High	High	—
Secretin receptor	Low	Low	High

a) IC₅₀ value of displacement of ligand binding by the peptide indicated: high, <10 nM; low, >10 nM; no, >1 μ M.

```

1
ATTTCGGGGTTGCGCGTCTCTCTGCGCCTTCAGCCCCGCGCCAGCAGTCCCAGCCGCCC
CGAGGCCATCAGCGCTGCATGCACAGTGGAGGGTGGTACTGACTCCCCAAGACTGGGAGCAACAGCCAGAGACAGTGGCTGGGAAGCACC
154
ATG GCC AGA ACC CTG CAG CTC TCC CTG ACT GCT CTC CTC CTG CTG CCT ATG GCT ATT GCT ATG CAC TCT
Met Ala Arg Thr Leu Gln Leu Ser Leu Thr Ala Leu Leu Leu Pro Met Ala Ile Ala Met His Ser
-20
GAC TGC ATC TTC AAG AAG GAG CAA GCC ATG TGC CTG GAG AGG ATC CAG AGG GCC AAC GAC CTG ATG GGC
Asp Cys Ile Phe Lys Lys Glu Gln Ala Met Cys Leu Glu Arg Ile Gln Arg Ala Asn Asp Leu Met Gly
CTA AAT GAG TCT TCC CCA GGT TGC CCT GGC ATG TGG GAC AAT ATC ACA TGT TGG AAG CCT GCT CAA ATA
Leu Asn Glu Ser Ser Pro Gly Cys Pro Gly Met Trp Asp Asn Ile Thr Cys Trp Lys Pro Ala Gln Ile
★
GGT GAG ATG GTC CTT GTG AGC TGC CCT GAG GTC TTC CGG ATC TTC AAC CCG GAC CAA GTC TGG ATG ACA
Gly Glu Met Val Leu Val Ser Cys Pro Glu Val Phe Arg Ile Phe Asn Pro Asp Gln Val Trp Met Thr
50
GAA ACC ATA GGG GAT TCT GGC TTT GCT GAT AGT AAT TCC TTG GAG ATC ACA GAC ATG GGG GTC GTG GGC
Glu Thr Ile Gly Asp Ser Gly Phe Ala Asp Ser Asn Ser Leu Glu Ile Thr Asp Met Gly Val Val Gly
CGG AAC TGC ACT GAG GAT GGC TGG TCG GAG CCC TTC CCC CAT TAC TTC GAT GCT TGT GGG TTT GAT GAC
Arg Asn Cys Thr Glu Asp Gly Trp Ser Glu Pro Phe Pro His Tyr Phe Asp Ala Cys Gly Phe Asp Asp
★
TAT GAG CCC GAG TCT GGG GAT CAG GAT TAT TAC TAC CTG TCG GTG AAG GCC CTC TAC ACA GTC GGC TAC
Tyr Glu Pro Glu Ser Gly Asp Gln Asp Tyr Tyr Tyr Leu Ser Val Lys Ala Leu Tyr Thr Val Gly Tyr
600
AGC ACC TCC CTC GTC ACC CTC ACC ACT GCC ATG GTC ATC TTG TGC CGC TTC CGG AAG CTG CAC TGT ACC
Ser Thr Ser Leu Val Thr Leu Thr Thr Ala Met Val Ile Leu Cys Arg Phe Arg Lys Leu His Cys Thr
150
CGT AAC TTC ATC CAC ATG AAC CTG TTT GTA TCC TTC ATG CTG AGA GCT ATC TCT GTC TTC ATC AAA GAC
Arg Asn Phe Ile His Met Asn Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Arg Ala Ile Ser Val Phe Ile Lys Asp
11
TGG ATC TTG TAT GCC GAG CAG GAC AGC AGT CAT TGC TTC GTT TCC ACC GTG GAA TGC AAA GCT GTC ATG
Trp Ile Leu Tyr Ala Glu Gln Asp Ser Ser His Cys Phe Val Ser Thr Val Glu Cys Lys Ala Val Met
800
200
GTT TTC TTT CAC TAC TGC GTG GTG TCC AAC TAC TTC TGG CTG TTC ATT GAA GGC CTA TAC CTC TTT ACA
Val Phe Phe His Tyr Cys Val Val Ser Asn Tyr Phe Trp Leu Phe Ile Glu Gly Leu Tyr Leu Phe Thr
111
CTG CTG GTG GAG ACC TTC TTC CCT GAG AGG AGA TAT TTC TAC TGG TAT ACC ATC ATT GGC TGG GGG ACA
Leu Leu Val Glu Thr Phe Phe Pro Glu Arg Arg Tyr Phe Tyr Trp Tyr Thr Ile Ile Gly Trp Gly Thr
250
CCT ACT GTG TGT GTA ACT GTG TGG GCT GTG CTG AGG CTC TAC TTT GAT GAT GCG GGA TGC TGG GAT ATG
Pro Thr Val Cys Val Thr Val Trp Ala Val Leu Arg Leu Tyr Phe Asp Asp Ala Gly Cys Trp Asp Met
1000
AAT GAC AGC ACA GCT CTG TGG TGG GTG ATC AAA GGC CCT GTA GTT GGC TCT ATA ATG GAT AAC TTT GTG
Asn Asp Ser Thr Ala Leu Trp Trp Val Ile Lys Gly Pro Val Val Gly Ser Ile Met Val Asn Phe Val
★
300
CTT TTC ATC GGC ATC ATC ATC ATC CTT GTG CAG AAG CTG CAG TCC CCA GAC ATG GGA GGC AAT GAG TCG
Leu Phe Ile Gly Ile Ile Ile Ile Leu Val Gln Lys Leu Gln Ser Pro Asp Met Gly Gly Asn Glu Ser
1200
AGC ATC TAC TTC AGC TGC GTG CAG AAA TGC TAC TGC AAG CCA CAG CGG GCT CAG CAG CAC TCT TGC AAG
Ser Ile Tyr Phe Ser Cys Val Gln Lys Cys Tyr Cys Lys Pro Gln Arg Ala Gln Gln His Ser Cys Lys
ATG TCA GAA CTA TCC ACC ATT ACT CTA CGG CTG GCC CGC TCC ACC CTG CTG CTC ATC CCA CTC TTT GGA
Met Ser Glu Leu Ser Thr Ile Thr Leu Arg Leu Ala Arg Ser Thr Leu Leu Leu Ile Pro Leu Phe Gly
350
ATC CAC TAC ACA GTA TTT GCC TTC TCT CCA GAG AAC GTC AGC AAG AGG GAA AGA CTT GTG TTT GAG CTT
Ile His Tyr Thr Val Phe Ala Phe Ser Pro Glu Asn Val Ser Lys Arg Glu Arg Leu Val Phe Glu Leu
★
1400
GGG CTG GGC TCC TTC CAG GGC TTT GTG GTG GCT GTA CTC TAC TGC TTC CTG AAT GGG GAG GTA CAG GCA
Gly Leu Gly Ser Phe Gln Gly Phe Val Val Ala Val Leu Tyr Cys Phe Leu Asn Gly Glu Val Gln Ala
400
GAG ATT AAG AGG AAA TGG AGG AGC TGG AAG GTG AAC CGT TAC TTC ACT ATG GAC TTC AAG CAC CGG CAT
Glu Ile Lys Arg Lys Trp Arg Ser Trp Lys Val Asn Arg Tyr Phe Thr Met Asp Phe Lys His Arg His
CCA TCC CTG GCC AGC AGT GGA GTG AAC GGG GGC ACC CAG CTG TCC ATC CTG AGC AAG AGC AGC TCC CAG
Pro Ser Leu Ala Ser Ser Gly Val Asn Gly Gly Thr Gln Leu Ser Ile Leu Ser Lys Ser Ser Ser Gln
1600
CTC CGC ATG TCC AGC CTC CCG GCC GAC AAC TTG GCC ACC TGA
Leu Arg Met Ser Ser Leu Pro Ala Asp Asn Leu Ala Thr End
476

```

Fig. 2. Sequences of the Mouse PACAP Receptor cDNA and Polypeptide

The nucleotide and predicted amino acid sequences of the mouse PAC₁ receptor cDNA. Numbers above and below each lane refer to the nucleotide and amino acid positions, respectively. Numbering of the amino acids begins at Met-1 of the postulated mature receptor, with negative numbers for the signal peptide. The seven putative transmembrane segments are underlined, and the potential N-glycosylation sites in the extracellular region are marked by stars (adapted from Ref. 13).

5. 受容体のキメラ化によるリガンド選択性に関する領域の解析

前項で述べたように、PAC₁受容体とVPAC₁受

容体は、PACAPに対しては共に高い親和性を示すが、VIPに対してはVPAC₁受容体は高親和性であるのに対して、PAC₁受容体はその約1000分の1

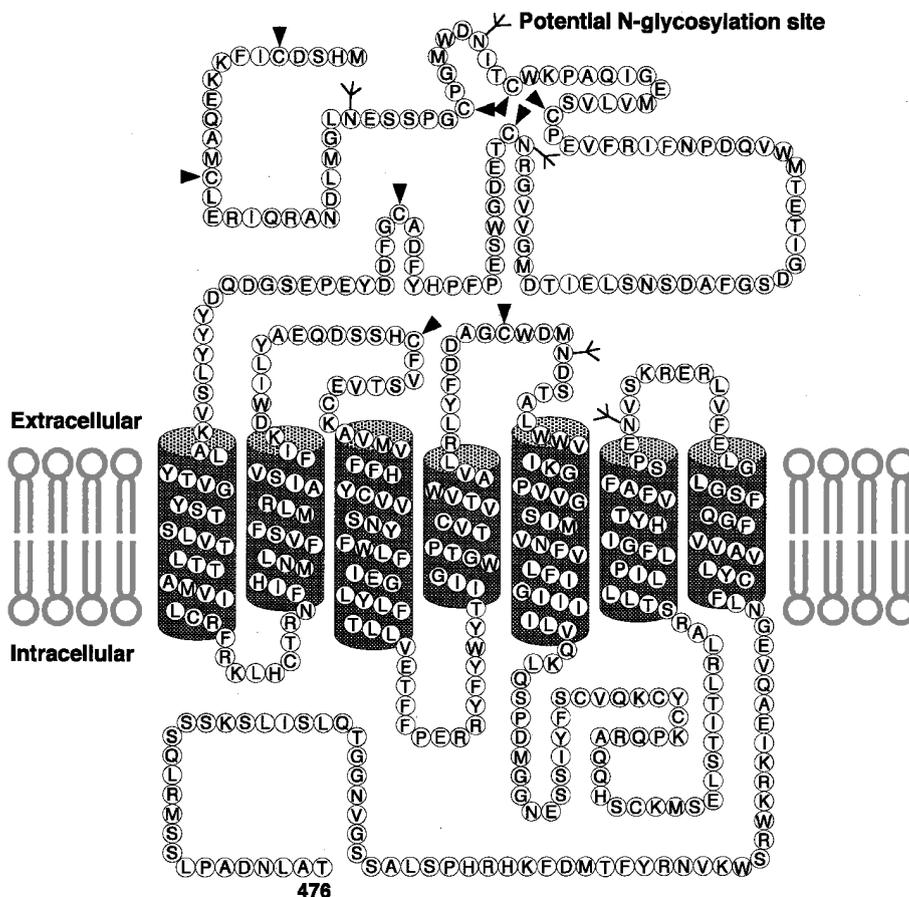


Fig. 3. Schematic Model of the Mouse PAC₁ Receptor

A cutaway view of the mouse PAC₁ receptor oriented in the lipid bilayer was illustrated. The receptor contains seven transmembrane helices connected by alternating extracellular and intracellular loops. In the putative extracellular region, the potential N-linked glycosylation sites were indicated by Ψ, and the cysteine residues conserved among the PAC₁, VPAC₁, VPAC₂, secretin and GHRH receptors are indicated by arrowheads.

程度の低親和性しか持っていない。ラット PAC₁ 受容体と VPAC₁ 受容体のアミノ酸配列の相同性は 45.5% であり、リガンドである PACAP と VIP は約 70% の高い相同性がある (Fig. 1)。著者らはこれら 2 つの受容体における VIP に対する親和性の差が、受容体のどのようなドメイン構造の違いに由来するのかについて究明し、これら各受容体サブタイプの特異的リガンドの開発に役立つ情報にしたいと考えた。そこで受容体のリガンド結合及びシグナル系の活性化に必要な構造について、PAC₁ 受容体と VPAC₁ 受容体又はセクレチン受容体とのキメラを作製して解析を行った。¹⁵⁾

キメラ受容体は各受容体 cDNA を用いて、後述する PAC₁ 受容体のゲノム構造解析から明らかになったエクソン-イントロン構造の情報をもとにして、エクソン単位で入れ替えるエクソンスイッチングによって作製することにした。キメラ受容体

cDNA はリコンビナント PCR 法を用いて作製し、哺乳類細胞発現ベクター pEF-BOS にサブクローニングした後 COS7 細胞に発現させ、リガンドの結合能と cAMP 産生能について解析した。

この解析により PAC₁ 受容体の VIP 選択性を大きく決定する領域は、(1) N 末細胞外領域の中央部分、(2) 第 1 膜貫通領域から第 1 細胞外ループ、(3) 第 3 細胞外ループ付近であることが明らかになった。また、上記 (3) の領域はとくに受容体の活性化に重要であることが示された。以上より、PAC₁ 受容体はいくつかの特定の細胞外領域とその付近の膜貫通領域で、リガンド結合のポケットを形成することが推定される。また、PACAP/VIP ファミリーのペプチドのアゴニスト活性に重要とされる N 末端付近の配列が、受容体の第 3 細胞外ループ付近と相互作用することが強く示唆された。Figure 4 にこれらの結果を模式的にまとめて示す。

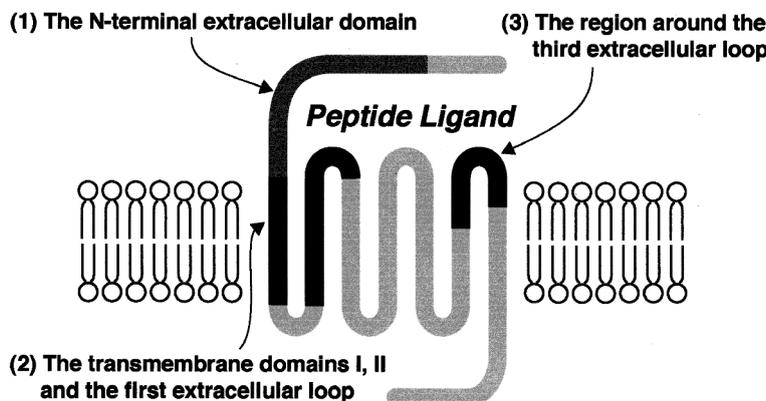


Fig. 4. A Model of the Structural Domains of the PACAP/VIP Receptors Involved in a Selectivity for VIP Binding and the Subsequent Receptor Activation

For an explanation of this model, see text.

6. PAC₁ 受容体 mRNA の中枢神経系における発現分布

Northern hybridization 法を用いてラットの各組織における PAC₁ 受容体 mRNA の発現分布を調べると、脳に多く末梢では副腎に発現していたが、調べた範囲の他の組織では発現していないか検出限界以下であった。そこで次に、脳、副腎さらに自律神経節における mRNA 発現を *in situ* hybridization 法を用いて詳細に調べることにした。^{4,16-18)}

まずラット PAC₁ 受容体 cDNA を用いて ³⁵S 標識アンチセンス RNA を合成しプローブを作製した。プローブの特異性は、非標識アンチセンス RNA 存在下における hybridization, あるいは関連する他の受容体プローブによる hybridization 結果との比較により確認した。

まずラット脳及び下垂体の半連続切片を作製し、ほとんどすべての脳神経核における発現レベルを評価した。¹⁶⁾ PAC₁ 受容体 mRNA は脳全域の神経細胞に広く発現しており、特に嗅球の糸球体周囲細胞や顆粒細胞、海馬歯状回の顆粒細胞、視床下部の視索上核、嘔吐に関連した化学受容器がある最後野に非常に強く発現していた。反対に、嗅球の僧帽状細胞や房飾細胞、海馬 CA1 及び CA3 の錐体細胞、視床後神経核群、側背膝神経核、小脳皮質のプルキンエ細胞、ゴルジ細胞及び顆粒細胞には有意な発現は観察されなかった。一方、小脳皮質の Bergmann グリアと推定される細胞には、中程度のシグナルが認められた。下垂体においては、前葉では中程度、後葉では弱から中程度の発現が見られたが、中葉では

発現が見られなかった。松果体における発現は、例えあるとしても非常に弱いものであった。

このように PAC₁ 受容体は神経細胞だけでなく、ある種のグリア細胞にも発現が認められた。この解析結果は、脳と下垂体における本受容体の正確な局在をはじめ明らかにしたものであり、その機能研究に一定の方向性を示したものと考えられる。

副腎では PAC₁ 受容体に加えて、VPAC₁、VPAC₂ 受容体の発現についても検討した。¹⁷⁾ PAC₁ 受容体は髄質のほとんどすべてのクロム親和性細胞に発現していたが、皮質領域には発現が検出されなかった。VPAC 受容体はいずれもバックグラウンドレベルのシグナルであった。PACAP と VIP はともに副腎のカテコラミン分泌を促進するが、PACAP は VIP の 100 分の 1 から 1000 分の 1 の低い濃度でこの作用を発揮することが知られている。このことは副腎髄質に PACAP に選択性の高い PAC₁ 受容体のみが発現することを示す今回の結果とよく一致する。また今回の結果は、従来報告されてきた副腎における PACAP 及び VIP のカテコラミン分泌促進作用は、PAC₁ 受容体を介したものであることを示すものと考えられる。ところでクロム親和性細胞のうち、ノルアドレナリン分泌細胞には PACAP (リガンド) が発現していることが報告されている。今回の結果と併せて考えると、PACAP は副腎髄質において PAC₁ 受容体を介してオートクリン・パラクリン調節因子として働いている可能性が示唆される。

末梢自律神経系での発現についての検討では、交

感神経節（上頸神経節）に PAC₁ 受容体の強い発現が観察された。そこで、VPAC₁, VPAC₂ 受容体と PACAP 及び VIP（リガンド）mRNA 発現についても調べた。¹⁸ PAC₁ 受容体 mRNA は、ほとんどすべての主ニューロン（principal neuron）に発現していた。一方、PACAP mRNA は約半数の主ニューロンに非常に強いものから弱いものまで様々なレベルで発現していた。VIP mRNA の発現は非常にわずかな主ニューロンに極めて強力に発現することが見いだされた。上頸神経節には VPAC₁ と VPAC₂ 受容体は発現していなかった。

副腎の場合と同様に、交感神経節においても PACAP は PAC₁ 受容体を介してオートクリン・パラクリン調節因子として働いている可能性が示唆される。しかし今回の結果は、PACAP が交感神経節前繊維から分泌されて、主ニューロンに発現する PAC₁ 受容体を活性化する可能性を否定するものではない。

以上の結果は、PACAP が神経節内の神経伝達物質として、シナプス伝達を調節する役割を果たしている可能性を示唆している。副腎髄質は交感神経節がとくに内分泌腺として発達したものであり、両者の類似性を考えると PACAP/PAC₁ 受容体システムの役割の共通点が浮かび上がり興味深い。

我々は主ニューロンにおける PACAP mRNA 発現が様々な強度であるのは、例えばシナプス伝達の活動性に依存して PACAP 発現が誘導的に促進されており、その結果、例えばシナプス伝達の効率が可塑的に変化しているのではないかという作業仮説を立てることができると考えた。次にこの仮説を確かめることにより、神経系における PACAP の作用機構の一端を明らかにしていくことにした。

7. PACAP 発現の調節機構

Pheochromocytoma PC12 細胞は、副腎髄質に由来する株化細胞であり、副腎クロム親和性細胞と同様に内在性に PAC₁ 受容体を発現している。¹⁷ そこで、本細胞を用いて PACAP の発現調節を調べることにした。¹⁹ まず、後述するマウス PACAP ゲノム DNA を単離して得られた遺伝子のプロモーターを含む 5'隣接配列 1.6 kb をルシフェラーゼレポーター遺伝子と連結して、PC12 細胞にトランスフェクションすることにより、PACAP 遺伝子の転写活性を測定した。その結果、PACAP 発現は非刺激時

には非常に低いレベルであるが、PACAP38 そのものによって刺激すると発現が誘導されることが明らかになった。さらに様々な検討を行った結果、神経成長因子 NGF によっても誘導された。興味深いことに、PACAP38 と NGF の両方を加えると PACAP 発現は相乗的に増加した。次に mRNA レベルを RT-PCR と Northern hybridization によって解析したところ、転写レベルの活性化と非常によく相関して、mRNA レベルが誘導的に増加していることが分かった。この PACAP mRNA 誘導は、PACAP38 と NGF による刺激後 3 時間でピークとなり、12 時間頃まで高いレベルが続き、48 時間後にはほぼ元のレベルに戻っていた。

次に、PACAP 発現誘導に関する細胞内情報伝達系を解析した。PAC₁ 受容体は PC12 細胞においては、アデニル酸シクラーゼとホスホリパーゼ C をともに活性化することが知られている。そこでこれらのシグナル系を含む種々のシグナル系の阻害剤を用いて調べたところ、プロテインキナーゼ A 及び C 阻害剤である H-89 及び calphostin C、加えて phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 長期曝露によるプロテインキナーゼ C 活性の阻害により、PACAP38 又は NGF 単独による PACAP 発現はある程度阻害された。さらに、mitogen-activated protein kinase (MAPK) である extracellular signal-regulated kinase (ERK) の阻害剤 PD98059 も、PACAP38 又は NGF 単独の作用を完全に阻害した。しかし、これら阻害剤は PACAP38 と NGF の同時刺激時の PACAP 発現増強作用を弱く阻害するかほとんど無効であった。¹⁹ そこで、さらに他のシグナル系が関与する可能性を検討したところ、p38 阻害剤 SB203580 が、PACAP38 と NGF それぞれ単独あるいは同時刺激による PACAP 発現をほとんど完全に抑制することを見出した。²⁰ PAC₁ 受容体が p38 MAPK を活性化することははじめての知見である。^{20,21}

PACAP 発現が PACAP 自体によって、また他の神経栄養因子と協調的に増強されることは、PACAP が神経伝達の活動性依存的に誘導されるとする仮説を支持する（必要条件を充たす）ものと考えられた。

8. PACAP による神経細胞の分化

PACAP と NGF による共同作用の生理的意義を

調べることに、また PAC₁ 受容体のシグナル系における ERK 及び p38 MAPK の役割を明らかにすることを目的として、PC12 細胞における PACAP38 及び NGF による神経突起伸長作用と、それに対する MAPK 阻害剤の作用について検討した。²⁰⁾

PACAP38 は用量依存的に神経突起を有する細胞の割合を増加させた。NGF との同時刺激時には、突起を持つ細胞割合の増加とともに突起そのものの長さも明らかに長くなった。このとき MAPK 阻害剤の作用について調べると、PACAP mRNA 発現に対する場合と異なり、PD98059 には阻害作用が認められたが、SB203580 は全く無効であった。

以上より、PACAP は NGF とともに神経細胞分化を支配する MAPK 系の調節に重要な役割を果たすことが示された。p38 MAPK は元来、stress-activated protein kinase の一員であると見なされていたが、現在では様々な機能に参与することが知られている。前項の結果も併せると、PAC₁ 受容体によって活性化される p38 は、PACAP 遺伝子発現に必要な役割を果たし、ERK は PACAP による神経分

化により重要な働きをしていることが示された。交感神経細胞における PACAP の働きを模式的に Fig. 5 に示す。

9. PACAP 発現の病態生理学的意義

次に著者らは、神経細胞における PACAP 発現が、何らかの病態時にどのように変化するか、またそれがどのような働きをするかについて検討を行った。

まず、四血管閉塞モデルにより一過性脳虚血障害を誘発したラットを用いて、*in vivo* 脳神経細胞障害時における PACAP の発現変化を、mRNA とペプチドレベルで解析した。²²⁾ その結果、海馬の CA1 錐体細胞、歯状回顆粒細胞での PACAP 発現は、再灌流後 24 時間で顕著に増加することが見出された。このことは、PACAP は虚血障害後の早期に発現が増加することにより、恐らく MAPK 系等の細胞内シグナルの活性化を介して、神経保護の働きを果たしている可能性を示唆するものである。

この可能性をさらに追求するために、ラット大脳皮質培養神経細胞を用いて *in vitro* での検討を行っ

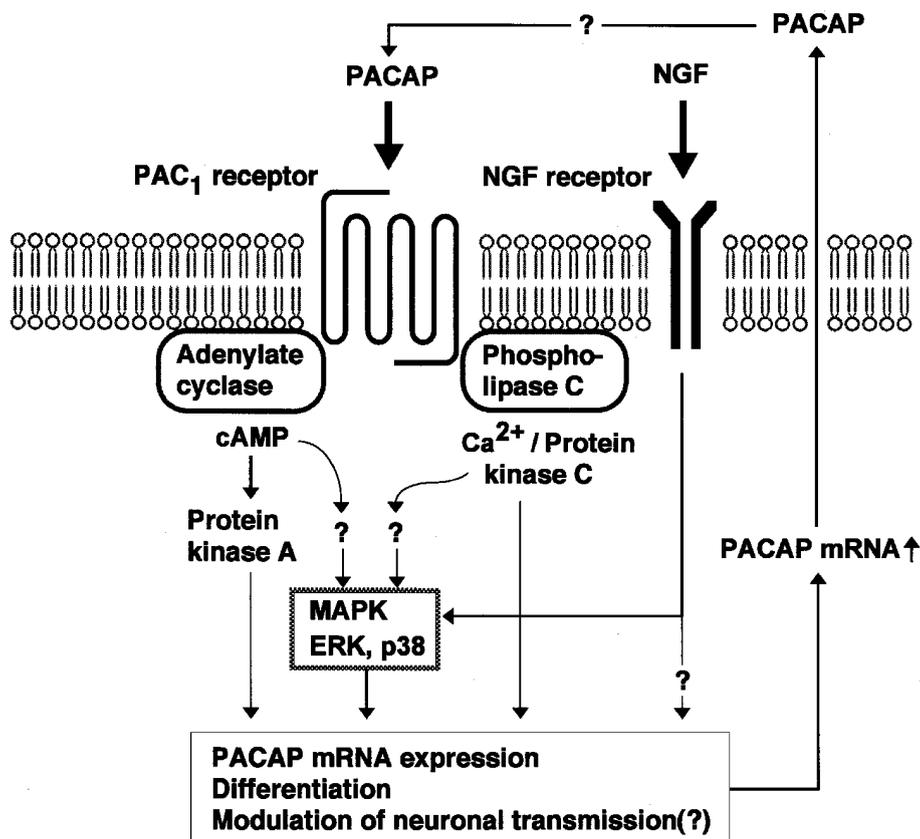


Fig. 5. A Schematic Representation of PACAP Signaling System in Sympathetic Neurons (PC12 Cells)
For an explanation of this scheme, see text.

た。²³⁾興奮性アミノ酸であるグルタミン酸神経毒性による PACAP 発現の変化を調べたところ、24 時間をピークに PACAP mRNA レベルが顕著に増加することが明らかになった。この発現増加は PACAP アンタゴニストである PACAP6-38 によって有意に阻害された。さらに PACAP6-38 は、培養神経細胞の生存率をも低下させた。

これらの結果は、内在性 PACAP は神経細胞障害により発現が誘導的に増加して、神経保護に働く因子であることを強く示唆するものである。

10. ゲノム DNA の単離と構造解析

ところで *in vivo* 研究に有効な低分子性 PACAP/VIP 受容体リガンドや、特異的な合成経路阻害剤が未だないことから、その研究には遺伝子改変マウスの作製が必須であると考えられた。そこで、遺伝子ノックアウトマウスの作製と遺伝子発現機構の解析なども目的として、まずマウスゲノム DNA の単離・構造解析を行った。

10-1. マウス PAC₁ 受容体遺伝子の構造 ラット PAC₁ 受容体 cDNA をプローブとして、129 系マウス遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行い、さらに遺伝子歩行を行うことによって、5'-プロモーター領域を含むほぼ全長のマウス PAC₁ 受容体遺伝子を単離した。²⁴⁾ PAC₁ 受容体遺伝子は 50 kb 以上であり、18 個のエクソンに分割された構造であった。また、各エクソンでコードされる受容体の翻訳領域は、概ねシグナルペプチド、N 末細胞外領域、細胞内・外のループや膜貫通領域などに対応していた。このことは各エクソンが受容体の機能的なサブドメインをコードすることを示唆するものである。これが第 5 項で述べたキメラ受容体をエクソンスワッピング法によって作製した理由である。

Southern hybridization 解析により、本遺伝子はマウス染色体の単相あたり 1 つだけ存在することが示された。また、マウス脳 mRNA を用いたプライマー伸長法による解析により、転写開始点は ATG 翻訳開始コドンの約 8.3 kb 上流であることが分かった。その 5'-隣接の配列は (G+C) が多いが、TATA box はなく、CCAAT box が認められた。また、Sp1, AP-2, NF-1 などの転写調節因子の結合配列が見い出された。AP-2 は発達段階の神経細胞に発現することが知られており、PAC₁ 受容体が発達期の脳に多く発現することと一致するものである。

PAC₁ 受容体遺伝子の構造解析の報告は種差も含めてこれがはじめてのものとなった。

10-2. VPAC₁ 受容体遺伝子の構造と染色体局在 PAC₁ 受容体の場合と同様に単離して構造を決定した。²⁵⁾ 本遺伝子は 16 kb 以上の長さがあり、13 個のエクソンに分割された構造であった。転写開始点は、ATG 翻訳開始コドンの 114 bp 上流であることが分かった。その 5'-隣接配列は (G+C) が多いが、TATA box はなく、CCAAT box が認められた。また、Sp1, AP-2 転写調節因子の結合配列が見い出された。さらに interspecific backcross 解析により、本遺伝子の染色体上の局在を解析し、本遺伝子 *Vipr1* は第 9 染色体の遠位領域に位置し、cholecystokinin (*Cck*) と少なくとも 3.4 cM 以内の近傍に存在することが明らかになった。*Cck* はヒトでは 3p22-p21.3 に局在する。

10-3. PACAP 遺伝子の構造 著者らは受容体のみならずリガンドからのアプローチも重要であると考え、マウス PACAP 遺伝子を単離し、隣接する配列も含めて全一次配列を明らかにした (Fig. 6)。²⁶⁾ 本遺伝子は 6.6 kb の配列からなり、オルターナティブエクソンも含めると 6 個のエクソンによってコードされており、5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法による解析の結果、3 種の転写開始が見い出された。成熟型 PACAP (PACAP38, 27) はエクソン 5 にコードされていた。5'-隣接配列には、cAMP 応答性エレメント、TPA 応答性エレメント、growth hormone factor-1 結合サイトが見られた。第 7 項における PACAP 転写活性の測定は、これらの転写調節配列を含む、ATG 翻訳開始コドンの上流 -1,593--6 base の約 1.6 kb の配列を用いて行った。

11. PACAP 欠損マウス

著者らは前項で得た PACAP ゲノム DNA を用いて、PACAP 遺伝子のターゲティングを行った。²⁷⁾ ES 細胞は、E14tg2a EB3 細胞を用いた。本細胞は、丹羽博士 (大阪大学医学系研究科、現、理研多能性幹細胞研究チーム) らが POU 転写因子 Oct-3 (ES 細胞又は未分化細胞系譜の維持に働くマスター因子) のプロモーター下流に薬剤耐性遺伝子 *BSD* を internal ribosome entry site (IRES) 配列を用いてノックインした細胞であり、フィーダー細胞を必要とせず高い germline competency も有している細

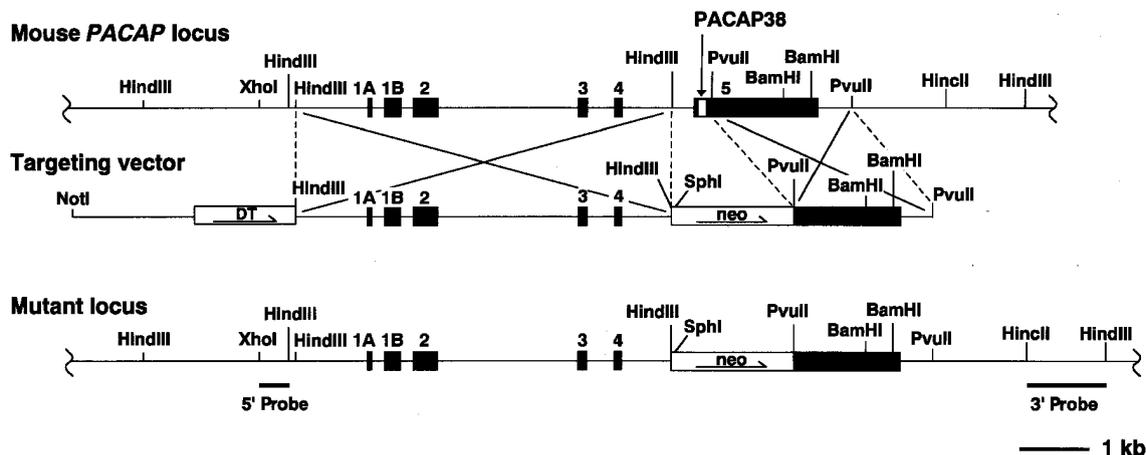


Fig. 6. Alignment of the *PACAP* Locus with the Targeting Vector and the Mutant Locus

Potential crossovers are indicated by crossed solid lines. Closed boxes 1A through 5, exons 1A through 5; DT, MC1 promoter with diphtheria toxin A-fragment gene; neo, phosphoglycerate kinase promoter with neomycin resistance gene; black bars, probes used for Southern blot analysis.

胞である。Figure 6 に示すターゲティングベクターを用いて ES 細胞の相同組換え体を得た後、胚盤胞に注入し、胚移植することによってキメラマウスを得た。さらに交配を行い 2 世代目にホモ変異 *PACAP* 欠損マウスを得た。

PACAP 欠損マウスは、飼育ケージを交換するときに落ち着きがなくすぐにケージから出てしまうなどの行動が目立った。また生まれてからすぐの若いマウスが突然死亡するケースが多いことに気づいた。そこで著者らはこれらについて詳しく解析した。²⁷⁾

11-1. *PACAP* 欠損マウスの生後死亡率

PACAP 欠損マウスはメンデル則による予想比率で誕生するものの、離乳までに約半数が死亡する。離乳後も順調に体重が増加していながら突然死ぬマウスが多く、出生から成熟するまでの死亡率は、60%からほぼ 100%に至るケースもあった。*PACAP* 欠損マウスは胎児期には野生型マウスと同程度の生存率であると考えられるが、生後に多くが突然死亡する原因については今のところまだよく分かっていない。生き延びた *PACAP* 欠損マウスの雌は、繁殖能力が大幅に低下していた。交配の頻度が少ないこと、また母性行動が不十分であることが原因（の一部）ではないかと考えられる。²⁸⁾

11-2. 精神行動の変化 *PACAP* 欠損マウスにはまた顕著な行動異常が観察された。オープンフィールドでは新規性誘発自発運動が亢進していた。マウスは新規環境に置かれると、最初は盛んに探索行動を行うが、時間とともに“慣れ (habituation)”

が起きて行動量が減少し、中心を避けて周囲の壁のそばを好むようになる (wall-hugging behavior)。しかし、*PACAP* 欠損マウスは少なくとも 1 時間の測定時間では慣れが起こらず、wall-hugging behavior の割合は有意に少なかった。さらに、ジャンプを異常に繰り返すという際立った表現型を示した (Fig. 7)。60 分間の測定中、最高 1,500 回以上ジャンプするマウスもいた。

そこで次にマウスの好奇心・不安レベルを調べる行動薬理的解析法 (高架式十字迷路, 他 3 種類) を用いて調べたところ、ホモ変異マウスは不安関連の行動が少なく、新規性の探索行動 (novelty-seeking behavior) をよく示した。探索やジャンプ行動を観察していると、マウスがその場所からの逃避や何らかの行為に固執しているかのようにも感じられ、目的指向性が強い行動ではないかと思われた。

興味深いことに、このような異常行動は抗精神病薬ハロペリドールの投与によって抑制された。また、脳内ではセロトニン (5-HT) 代謝物量が減少していた。さらに最近、5-HT_{1A} アゴニストによる体温下降の著減、音刺激驚愕反応の prepulse inhibition の減弱などの表現型も見い出しており、現在それぞれについて詳細な解析を進めている。

これらの結果は、*PACAP* 欠損マウスが何らかの精神神経疾患に関わる病態を示しており、*PACAP* が精神神経機能の調節に関わっている可能性を示すものである。このように *PACAP* が精神行動の調節に関与することは、従来の薬理学的研究からは全く予想されていなかったものであり、*PACAP* 欠損

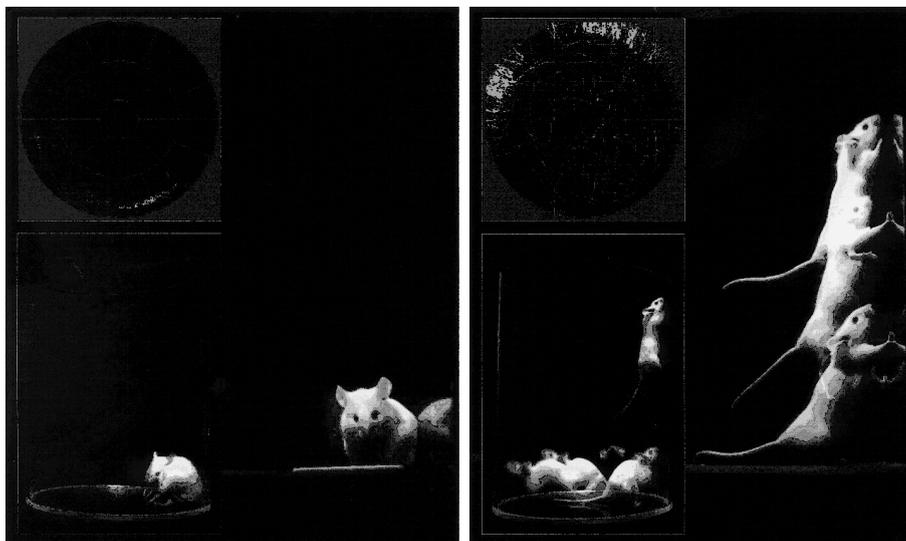


Fig. 7. Time-Lapse Photography Showing Hyperactivity and Abnormal Jumping Behavior of PACAP-Deficient Mice (Right) in Comparison with Wild-Type Control Mice (Left)

Upper insets, examples of locomotor patterns during the last 10 min of a 60-min recording. Tracks of 2 representative mice in each group are shown. These hyperactive and jumping phenomena were originally reported in Ref. 27. Reprinted with permission from Ref. 39.

マウスは高次脳・精神機能の制御と、その障害に伴う分子病態を探る上で全く新しいツールになるものと考えている。最近の遺伝連鎖解析研究によると、統合失調症及び双極性感情障害の遺伝子座が 18p11 にあることが示唆されている。この部位にはヒト PACAP 遺伝子も存在している。ヒト PACAP 遺伝子座の変異が、これら疾患に関与しているかどうかは今後の研究の重要な課題である。²⁷⁾

12. PAC₁ 受容体欠損マウス

PAC₁ 受容体欠損マウスも前項とほぼ同様に作製した。²⁹⁾

著者らは転写開始コドンとシグナル配列をコードするエクソン 2 をターゲティングしたマウスを作製した。このマウスの脳ではオルターナティブスプライシングによってエクソン 1 から 3 につながった mRNA が産生し、その結果 N 末が truncation した産物が一部発現していた。変異マウスの脳より、この cDNA を単離して発現系を用いて解析した結果、本受容体のシグナル配列は N 結合型糖鎖付加に必要であり、正常な細胞膜への移送に重要な働きを果たすことを明らかにした。^{29,30)}

その後、Jamen らはさらに下流のエクソンをターゲティングしたマウスについて報告している。³¹⁾ また最近 Otto らは、通常の全欠損型マウスとともに、Cre-loxP システムを用いた部位特異的なターゲティングマウスも作製している。³²⁾ Otto ら

は PAC₁ 受容体欠損マウスは、扁桃核依存的な恐怖条件付け行動は正常であるが、海馬依存的な連合学習の能力が低下していたこと、また、同じ海馬依存的な課題であってもモーリス水迷路での空間学習は正常であったと報告している。

13. 膵臓 β 細胞特異的 PACAP トランスジェニックマウス

著者らはまた PACAP の糖代謝調節機能を *in vivo* で解明する目的で、膵臓 β 細胞特異的 PACAP トランスジェニックマウスを作製し、遺伝的糖尿病マウスとの交雑等の遺伝薬理学的手法を用いて、PACAP が I 型及び II 型糖尿病態を改善し、β 細胞新生を制御する可能性をはじめて示した（投稿中）。一方、PACAP 欠損マウスではインスリン分泌能が低下していた。これらは PACAP シグナルが、ヒト新生児一過性糖尿病に関わるとする仮説を支持するものである。今後の臨床的展開も含めて興味ある知見である。

14. まとめと今後の展望

最近、*in vivo* 胎児脳で PACAP が神経前駆細胞の増殖を阻害し、*in vitro* では fibroblast growth factor (FGF) などの mitogen 作用を阻害するなど、内在性の前駆細胞増殖抑制シグナルであることが報告されている。³³⁾ 一方、zinc finger protein Zacl は p53 の coactivator であり、細胞周期阻止と apoptosis 誘導を伴う強い増殖阻害活性を持っており、³⁴⁾

functional screening の研究により p53 とともに PAC₁ 受容体発現を誘導する転写因子であることが示されている。³⁵⁾ PAC₁ 受容体³⁶⁾ と Zac1³⁷⁾ はともに、発達期神経系の神経管などの領域に発現することも報告されている。最近、Zac1 は刷り込み遺伝子の1つであり、PAC₁ 受容体の転写調節因子であることと、PACAP が膵β細胞インスリン分泌を既知の物質中で最も強く促進する因子であることから、Zac1 が新生児一過性糖尿病の原因遺伝子の候補であると報告されている。³⁸⁾ 刷り込み遺伝子は特に胎児期の発達と分化に影響を及ぼすものが多いことから、Zac1 が神経系の発達において果たす役割が、今後の重要な課題であると考えている。

記憶障害のショウジョウバエ変異体 *amnesiac* が、PACAP ホモログ遺伝子の機能欠失変異を有していることが1995年に報告され、優れた研究が展開されている。*Amnesiac* 研究の結果も含めて、PACAP 遺伝子は発達期及び成体脳の神経発生・新生の制御に関与し、また神経のシナプス伝達の効率を調節するなどの即時的な働きも持っていると考えられる。⁸⁾ したがって、PACAP 欠損マウスの神経系表現型は、アミン神経などの発達障害が少なくとも一部関与し、さらに成体における即時的な働きが障害されることも原因となって現れていると考えられる。PACAP は、発達期や糖尿病の進行過程で、β細胞の新生や恐らく他の種々の前駆細胞（神経前駆細胞など）の分化制御にも関与している可能性が高い。

今後は、発達期と成体における PACAP の役割を区別する目的で、例えば時間・場所特異的な遺伝子欠損マウスを用いた検討や、神経前駆細胞の培養系（ES細胞からの分化系譜や neurosphere 形成法による）を用いて、p53/Zac1 も含めた PACAP 関連シグナルの働きについて、特に微小環境における幹細胞運命の決定過程を中心に解析し、本ペプチドシグナルの生理的・病態的意義を解明したいと考えている。これらの研究を通して、高次精神・脳機能の障害や糖尿病などのヒト多因子疾患の機序と疾患本体の解明に向けた研究を進めていきたいと考えている。

謝辞 本総説で述べた著者らの研究はほとんどすべて、馬場 明道教授の御指導のもとに、大阪大

学大学院薬学研究科神経薬理学分野で行われたものであり、研究室の皆様の御努力によるものです。また学内外の共同研究者の方々にも、多大な御協力をいただきました。ここに心から深く感謝申し上げます。本研究の一部は、文部科学省科学研究費助成金、新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の研究助成金によって行われたものであり、併せて感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Miyata A., Arimura A., Dahl R. R., Minamino N., Uehara A., Jiang L., Culler M. D., Coy D. H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 567-574 (1989).
- 2) Review: Arimura A., *Jpn. J. Physiol.*, **48**, 301-331 (1998).
- 3) Review: Vaudry D., Gonzalez B. J., Basille M., Yon L., Fournier A., Vaudry H., *Pharmacol. Rev.*, **52**, 269-324 (2000).
- 4) Hashimoto H., Ishihara T., Shigemoto R., Mori K., Nagata S., *Neuron*, **11**, 333-342 (1993).
- 5) Review: Hashimoto H., Baba A., *Vitamins*, **71**, 285-296 (1997).
- 6) Review: Hashimoto H., *Seikagaku*, **72**, 191-193 (2000).
- 7) Review: Hashimoto H., *Prod. Tech.*, **54**, 50-53 (2002).
- 8) Review: Hashimoto H., Shintani N., Baba A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 427-432 (2002).
- 9) Review: Montero M., Yon L., Kikuyama S., Dufour S., Vaudry H., *J. Mol. Endocrinol.*, **25**, 157-168 (2000).
- 10) Review: Sherwood N. M., Krueckl S. L., McRory J. E., *Endocr. Rev.*, **21**, 619-670 (2000).
- 11) Ishihara T., Nakamura S., Kaziro Y., Takahashi T., Takahashi K., Nagata S., *EMBO J.*, **10**, 1635-1641 (1991).
- 12) Ishihara T., Shigemoto R., Mori K., Takahashi K., Nagata S., *Neuron*, **8**, 811-819 (1992).
- 13) Hashimoto H., Yamamoto K., Hagihara N., Ogawa N., Nishino A., Aino H., Nogi H., Imanishi K., Matsuda T., Baba A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1281**, 129-133 (1996).

- 14) Review: Harmar A. J., Arimura A., Gozes I., Journot L., Laburthe M., Pisegna J. R., Rawlings S. R., Robberecht P., Said S. I., Sreedharan S. P., Wank S. A., Waschek J. A., *Pharmacol. Rev.*, **50**, 265–270 (1998).
- 15) Hashimoto H., Ogawa N., Hagihara N., Yamamoto K., Imanishi K., Nogi H., Nishino A., Fujita T., Matsuda T., Nagata S., Baba A., *Mol. Pharmacol.*, **52**, 128–135 (1997).
- 16) Hashimoto H., Nogi H., Mori K., Ohishi H., Shigemoto R., Yamamoto K., Matsuda T., Mizuno N., Nagata S., Baba A., *J. Comp. Neurol.*, **371**, 567–577 (1996).
- 17) Nogi H., Hashimoto H., Fujita T., Hagihara N., Matsuda T., Baba A., *Jpn. J. Pharmacol.*, **75**, 203–207 (1997).
- 18) Nogi H., Hashimoto H., Hagihara N., Shimada S., Yamamoto K., Matsuda T., Tohyama M., Baba A., *Neurosci. Lett.*, **227**, 37–40 (1997).
- 19) Hashimoto H., Hagihara N., Koga K., Yamamoto K., Shintani N., Tomimoto S., Mori W., Koyama Y., Matsuda T., Baba A., *J. Neurochem.*, **74**, 501–507 (2000).
- 20) Sakai Y., Hashimoto H., Shintani N., Tomimoto S., Tanaka K., Ichibori A., Hirose M., Baba A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285**, 656–661 (2001).
- 21) Sakai Y., Hashimoto H., Shintani N., Ichibori A., Tomimoto S., Tanaka K., Hirose M., Baba A., *Regul. Pept.*, **109**, 149–153 (2002).
- 22) Koga K., Suetake S., Yamanaka T., Hashimoto H., Tomimoto S., Matsuda T., Baba A., *Jpn. J. Pharmacol.*, **82** (suppl 1), 104 (2000).
- 23) Suetake S., Ichibori A., Hashimoto H., Tomimoto S., Tanaka K., Hirose M., Baba A., *Jpn. J. Pharmacol.*, **85** (suppl. 1), 277 (2001).
- 24) Aino H., Hashimoto H., Ogawa N., Nishino A., Yamamoto K., Nogi H., Nagata S., Baba A., *Gene*, **164**, 301–304 (1995).
- 25) Hashimoto H., Nishino A., Shintani N., Hagihara N., Copeland N. G., Jenkins N. A., Yamamoto K., Matsuda T., Ishihara T., Nagata S., Baba A., *Genomics*, **58**, 90–93 (1999).
- 26) Yamamoto K., Hashimoto H., Hagihara N., Nishino A., Fujita T., Matsuda T., Baba A., *Gene*, **211**, 63–69 (1998).
- 27) Hashimoto H., Shintani N., Tanaka K., Mori W., Hirose M., Matsuda T., Sakaue M., Miyazaki J., Niwa H., Tashiro F., Yamamoto K., Koga K., Tomimoto S., Kunugi A., Suetake S., Baba A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 13355–13360 (2001).
- 28) Shintani N., Mori W., Hashimoto H., Imai M., Tanaka K., Tomimoto S., Hirose M., Kawaguchi C., Baba A., *Regul. Pept.*, **109**, 45–48 (2002).
- 29) Hashimoto H., Shintani N., Nishino A., Okabe M., Ikawa M., Matsuyama S., Itoh K., Yamamoto K., Tomimoto S., Fujita T., Hagihara N., Mori W., Koyama Y., Matsuda T., Nagata S., Baba A., *J. Neurochem.*, **75**, 1810–1817 (2000).
- 30) Shintani N., Hashimoto H., Kunugi A., Koyama Y., Yamamoto K., Tomimoto S., Mori W., Matsuda T., Baba A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1509**, 195–202 (2000).
- 31) Jamen F., Persson K., Bertrand G., Rodriguez Henche N., Puech R., Bockaert J., Ahren B., Brabet P., *J. Clin. Invest.*, **105**, 1307–1315 (2000).
- 32) Otto C., Kovalchuk Y., Wolfer D. P., Gass P., Martin M., Zuschratter W., Grone H. J., Kellendonk C., Tronche F., Maldonado R., Lipp H. P., Konnerth A., Schutz G., *J. Neurosci.*, **21**, 5520–5527 (2001).
- 33) Suh J., Lu N., Nicot A., Tatsuno I., DiCicco Bloom E., *Nat. Neurosci.*, **4**, 123–124 (2001).
- 34) Huang S. M., Schonthal A. H., Stallcup M. R., *Oncogene*, **20**, 2134–2143 (2001).
- 35) Ciani E., Hoffmann A., Schmidt P., Journot L., Spengler D., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **69**, 290–294 (1999).
- 36) Sheward W. J., Lutz E. M., Copp A. J., Harmar A. J., *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **109**, 245–253 (1998).
- 37) Valente T., Auladell C., *Mech. Dev.*, **108**, 207–211 (2001).
- 38) Kamiya M., Judson H., Okazaki Y., Kusakabe M., Muramatsu M., Takada S., Takagi N., Arima T., Wake N., Kamimura K., Satomura K., Hermann R., Bonthron D. T., Hayashizaki Y., *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 453–460 (2000).
- 39) Baba A., *Ann. Report Osaka Univ.*, 2001–2002, in press.