遺伝子改変マウスを用いた神経ペプチド PACAP の in vivo 機能解析

橋本 均, 新谷 紀人

要約: ターゲティングする特定遺伝子を計画的に破壊したノックアウトマウスは、特定の遺伝子機能を個体レベルで解析できるので、生体機能研究のツールとして有用であり、ヒト疾患のモデルとして動物実験の資材にもなり得る。従来から、突然変異による遺伝的病態マウスや、DNAの受精卵へのマイクロインジェクションによるトランスジェニックマウスが in vivo 研究に使用されてきているが、前者は、変異が偶然によっていることや、変異遺伝子の同定が困難であること、また後者は、遺伝子のランダムインテグレーションであることや、ドミナントネガティブ体が知られている場合などを除いて特定遺伝子の機能を低下させることが困難であるなどの制約がある。遺伝子ターゲティングは、特定の遺伝子のみを“精密”に標的破壊する方法であり、それに伴う表現型をもとにした遺伝子機能の解析方法であると言える。マウスの遺伝子ターゲティングによって、現在では、標的遺伝子導入（ノックイン）やコンディショナル・ターゲティングマウスなど、特定遺伝子の発現が自在に調節される個体の作製も可能になっている。当研究室では、神経ペプチド PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) の機能解析を目的として、これまでに PACAP とその受容体のノックアウトマウスあるいはトランスジェニックマウスを作製している。それらの表現型の解析を通じて、PACAP の予測された機能とともに、予測外の機能も見い出された。また、遺伝的背景や非遺伝的（環境）因子がノックアウト表現型に及ぼす影響についても検討してきているので、本稿では変異マウスの作製の概略とそれらの表現型解析の経緯についてまとめ、実験技術の紹介としたい。一方、遺伝子ター

ゲティングマウスを作製して解析する研究アプローチは既に広く普及しているものの、依然、時間と労力を要する点で比較的取り組みにくいのが現状である。したがって、導入する変異のデザイン、得られたマウスの表現型の解析方法、胎生致死などの問題が発生する可能性等、種々の要因を考慮し予測することが重要であると考えられる。本稿では、これらの点についても著者らの経験をもとにまとめてみた。

1. はじめに

ライフサイエンス研究において、従来の遺伝学では、細胞や個体に現れる形質（表現型）からそれを司る遺伝子を割り出し、そのコードする産物タンパク質を研究するという手順がとられていた。それとは逆に、遺伝子を同定して塩基配列を解析し、それに変異を導入することにより、その遺伝子の支配する表現型を研究しようとする方法は、逆遺伝学（reverse genetics）と呼ばれている。高等動物であり、モデル生物として繁用されているマウスを用いた逆遺伝学的解析は、とくにノックアウトマウスが生体機能研究の有用なツールとして、またヒト疾患のモデルとして動物実験の資材になり得ることからも、広く普及し活用されている。

1980年代のはじめには、トランスジェニックマウス作製の成功が報告された(1)。トランスジェニック動物は、ランダムインテグレーションによる過剰発現系であることが欠点であるが、逆遺伝学的な in vivo 解析を可能にした点で画期的である。この点を克服し、遺伝子産物の内在的な in vivo 機能を逆遺伝学的に調べることを可能にしたのが、1990年代に入って胚性幹（ES）細胞を用いた相同組換え体のクローニングおよび変異マウス作製技術である。以来、ES細胞の培養、相同組換え体の選別方法、ターゲティングベクター作製法、組換え体の発生等の個々の技術に改良が加えられ、ターゲティングマウス作製は確立した技術の一つとなった。しかし現在でも、他の実験系に比べて敷居が高い感がある。それは分子生物学的操作法、

キーワード: PACAP, PAC₁ 受容体,
遺伝子ターゲティング, 精神行動,
神経ペプチド

大阪大学大学院 薬学研究科神経薬理学分野
(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

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

原稿受領日: 2003 年 7 月 7 日, 企画教育委員会依頼原稿

細胞培養法, 胚発生, 動物系統維持など, 広範な技術・手技が必要であることに原因があると思われる。また, 下等モデル生物に比べてマウスの世代時間が長いこと, 実験のタイムスパンも長く, 例えば最終的にターゲットした遺伝子の変異が germ-line transmission (生殖系列への伝達) されるかどうか分かるまでに, 半年から1年はかかる。一般的な grant や thesis の時間的制約からも, 試行錯誤を繰り返す余裕が少なく, 他の実験と同様, 的確なトラブルシューティングが重要になる。しかし, 遺伝子変異マウスを用いた解析でもっとも重要で, またマウスを作製してから直面する問題点は, どの遺伝子を変異させるか, そして得られたマウスをどのように解析するかであると思われる。変異マウスの形質(表現型)は, ときには際立ったものではなく(一見では野生型と何の変化もなく), 様々な解析を進めていくことにより, 予想された変化に加え, 予測外の表現型が認められることもある。

著者らは, 神経ペプチドである PACAP の in vivo 神経機能解析を行う目的で, 選択的受容体のノックアウトマウス(2), PACAP ノックアウトマウス(3), また, 膵臓細胞特異的 PACAP トランスジェニックマウス(4)を作製して解析を行ってきた。これにより, PACAP が精神行動機能に関与すること, 糖尿病態における膵臓細胞の増殖に関与するという予測外の結果を得た。本稿では, 著者らのこれら研究経過について紹介させて頂き, 遺伝子改変マウスを用いた in vivo 機能解析について経験したことや考えていることをまとめてみたい。なお, コンディショナルノックアウトを含めて, 遺伝子ターゲティングに関する詳細な方法論は本稿には含めていない。またコンベンショナルなターゲティングについても, 詳細は優れた著書(5~7)等を参考にされたい。

2. 神経ペプチド PACAP

PACAP は, 1989 年に有村の研究グループの宮田らによって, 下垂体のアデニル酸シクラーゼを活性化作用を指標に, ヒツジ脳の視床下部から単離・同定されたニューロペプチドであり(8), vasoactive intestinal polypeptide (VIP) とアミノ酸配列の相同性が 68% と高く, VIP/セクレチン/グルカゴンファミリーに属している(9,10)。PACAP の一次構造は魚類からヒトまでほぼ完全に保存されており, 生命維持に必要な働きが示唆される。また, ショウジョウバエの短期記憶に関する行動突然変異体 *amnesiac* は, PACAP とホモロジーのあるニューロペプチドの変異体であることが最近明らかにされた(11)。

PACAP 発見後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。著

者らは 1993 年に, 脳に発現する神経ペプチド受容体を探索する目的で, ラット大脳皮質・海馬あるいはアストロサイト cDNA ライブラリーをプラスミドベクターを用いて作製し, VIP 受容体 (VPAC₁) cDNA をプローブに使用した low stringency 条件の colony hybridization 法によって PACAP 選択的受容体 PAC₁ cDNA をクローニングした(12)。また非常に弱くハイブリダイズしたクローンより, 副甲状腺ホルモン受容体 cDNA をクローニングした(13)。

ところで, 現在も低分子性, 非ペプチド構造の安定な PACAP 受容体リガンドは開発されていないことから, その in vivo 機能研究が困難な状況にある。そこで, 著者らは, 遺伝子改変マウスの作製が必須であると考え, まずゲノム DNA の単離が必要であることから, マウス PAC₁ 受容体(14), そのサブタイプ VPAC₁ 受容体(15), さらに PACAP (リガンド)(16)のゲノム DNA をそれぞれ単離し, 構造を決定した。

3. ノックアウトマウスの作製

PAC₁ 受容体と PACAP の変異マウス作製の概要を Table 1 にまとめて示す。

マウス PAC₁ 受容体遺伝子(14)は, エクソン 18 個, 全長 50 kb 以上からなるため, 翻訳開始 ATG コドンとそれに続くシグナルペプチドの一部をコードするエクソン 2 を neo (ネオマイシン耐性) 遺伝子と相同組換えによって置換して欠損させることにした(2)。非相同組換え体を排除するためのネガティブ選別には, tk (thymidine kinase) 遺伝子を用いた。D3 ES 細胞にターゲティングベクターを導入し, その相同組換え率は, 4/552 (0.72%) であった。実際には, カリオタイプ(染色体の核型)に異常のあるクローンを排除した結果がこの数字であり, 相同組換え率そのものはこの倍以上であった。

PACAP のノックアウトマウスは, 野生型 PACAP 遺伝子(16)上で成熟型で活性型の PACAP38 をコードする領域を, neo 遺伝子と置換して欠損させることにした(3)。ネガティブ選別には DT (ジフテリア毒素 A 断片) 遺伝子を用いた。E14tg2a EB5 ES 細胞にターゲティングベクターを導入し, その相同組換え率は, 4/244 (1.6%) であった。この場合は, カリオタイプの解析は行わなかった。PACAP 遺伝子, ターゲティングベクター, 変異遺伝子の構造を Fig. 1 に示す。E14tg2a EB5 細胞は, 丹羽 仁史博士(大阪大学大学院医学系研究科, 現, 理研 発生・再生科学総合研究センター)が作製したもので, E14tg2a ES 細胞に, Oct-3 (ES 細胞また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

Table 1 Generation of PAC₁ receptor exon 2- and PACAP-targeted mice

	PAC ₁ receptor exon 2-deficient mice	PACAP-deficient mice
The murine locus of the targeted gene	Chromosome 6 (<i>Adcyap1r1</i>) (Ref. 25) (Human: chromosome 7p14)	Chromosome 17 (<i>Adcyap1</i>) (Ref. 26) (Human: chromosome 18 p11)
Cells		
ES cell line	D3	E14tg2a EB5
Feeder cells	Mouse embryo fibroblasts	None
Targeting vector		
Homology length (long and short arms)	10.4 kb, 1.5 kb	5.3 kb, 2.1 kb
Positive selectable marker	Neomycin-resistance gene (neo)	Neomycin-resistance gene (neo)
Negative selectable marker	Thymidine kinase gene (tk)	Diphtheria toxin A-fragment (DT)
Detection method of homologous recombinant clones	PCR and Southern blot	Southern blot (non-radioisotope)
Results of screens for homologous recombinants		
Number of ES colonies analyzed	552	244
Number of homologous recombination events	4	4
Frequency of homologous recombination	0.72%	1.6%
Production of chimeric offspring	Blastocyst injection	Blastocyst injection
Number of mouse lines established	1	2

Fig. 1 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.

BSD を 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に高い生殖系列キメラ形成能を維持している(17). フィーダー細胞を用意しなくてよいことは, 相同組換え体のクローニングの労力を半減させる効果がある.

ところで, PAC₁ 受容体遺伝子のターゲティングの際の相同組換えクローンはまず PCR を用いて同定したが, 偽陽性が多く苦労したので, PACAP 遺伝子のターゲティングの際には, 最初からサザンブロット解析を行った.

それぞれの相同組換え ES 細胞クローンからマウス胚(胚盤胞)注入によりキメラマウスが得られ, それらを野生型マウスと交配することにより, キメラマウスの生殖細

胞を通して子孫に変異が伝達され, ヘテロ変異マウスが得られた. さらにヘテロ型の雌雄の交配によってホモ型変異マウスを得た.

4. ノックアウトマウスの表現型

PAC₁ 受容体エクソン 2 欠損マウスでは, エクソンスkipにより, エクソン 3 にある下流の ATG から翻訳が開始し, シグナルペプチドがないポリペプチドとして発現し, 非常に効率が低いながらも, わずかに細胞膜に局在して情報を伝達していた. 変異マウス脳におけるリガンド結合能は野生型の 25% 程度であったが, この中には PACAP の他の 2 つの高親和性受容体サブタイプの寄与が含まれてい

Table 2 Phenotypic abnormalities observed in PACAP- and PAC₁ receptor-deficient mice

Knockout phenotype	Reference
PACAP-deficient mice	
Mortality rate before weaning	(3, 22, 24)
70 - 90% (C57BL/6 background)	
~ 50% (ICR background)	
Psychomotor behavior	
Hyperactive locomotion, explosive jumping behavior, increased exploratory behavior, and less anxiety	(3)
Neurochemical change	
A slight decrease in the serotonin metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) in the cortex and striatum of PACAP ^{-/-} mice on a (129/Ola x C57BL/6) mixed background	(3)
Pharmacological response	
Suppression of the hyperactive behavior by an antipsychotic drug haloperidol	(3)
Sympathoadrenal system	
Impaired catecholamine regulation and glucohomeostasis (defect in long-term secretion of epinephrine)	(23)
Inadequate heat production due to insufficient norepinephrine stimulation of brown adipose tissue	(27)
PAC ₁ receptor-deficient mice	
Glucose homeostasis	
A slight feeding hyperinsulinemia and reduced glucose-stimulated insulin secretion	(20)
Higher brain function	
Impairment of hippocampal mossy fiber long-term potentiation (LTP) and hippocampus-dependent associative learning	(21)
LTP defect in synapse-specific and gene dosage-dependent manners	(19)
Circadian clock	
Dissociation between light-induced phase shift of the circadian rhythm and clock gene expression	(28)
Pain transmission	
Reduced chronic nociceptive response	(29)
Gastrointestinal tract	
Impairment of nonadrenergic, noncholinergic relaxation of longitudinal muscle of the proximal colon	(18)

Fig. 2 Apparatus for behavioral analysis used in the present study. (A) Open-field arena (60 cm in diameter, 30-cm-deep, illuminated with white light, 100 lux) equipped with automated video-tracking system AXIS-90 (Neuroscience, Inc., Tokyo). (B) Apparatus to measure prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle response. (C) Jumping behavior of PACAP-deficient mice in a plexiglass chamber, where the mouse is detected while jumping by an infrared sensor coupled to a camera and white LED or a xenon strobe via a timer circuit (D, E). Time-lapse photography can be taken with this device. Such a jumping phenomenon was originally reported in ref. (3).

る. このシグナルペプチドが欠損した変異型 PAC₁ 受容体 cDNA を, 変異マウスの脳から単離して発現系によりリガンド結合能を調べると, 野生型受容体の約 10% であった. したがって, 本マウスは null 変異ではないが, ノックダウンされたマウスであった.

本変異マウスは, これまでに, 近位結腸の縦走筋の nonadrenergic, noncholinergic (NANC) 弛緩に障害があることが示されている(18). また, 海馬シナプスにおける長期増強 (LTP) にも障害が認められている(19).

一方, PACAP のターゲティングにおいては, 成熟型ペプチド (PACAP38) をコードする mRNA 領域および成熟型ペプチドがともに完全に欠損していた. 両変異マウスの表現型の異常を Table 2 にまとめた. PAC₁ 受容体の変異マウスは, 著者らの作製以降 2 つのグループから報告があり(20, 21), PACAP の変異マウスは, やはり 2 つのグループが著者らとは独立に作製している(22, 23)(Table 2).

とくに顕著 (シビア) な表現型を示したのは, PACAP 欠損マウスであった(3, 24). ヘテロ型変異の雌雄を交配した場合, その子の遺伝型は, メンデル則による予想比率では, 野生型:ヘテロ型:ホモ型が 25%:50%:25% となるが, 離乳期である生後約 3 週齢のマウスの尾 DNA より遺伝型を調べると, ホモ型だけが 25% よりも大幅に少なかった. しかし, 生後すぐに遺伝型を調べると約 25% がホモ型であった. そこで経過的に観察すると, 順調に生育 (体重増加) しながら, ホモ型のみ突然死亡しているようであった. このように, PACAP 欠損マウスは, 生後から離乳までに約半数が死亡する, 早期高致死率を示すことがわかった.

次に著者らが気づいた表現型は, 飼育ケージの床敷チップの交換の際に, ケージの外に飛び出してしまうマウスがいることであった. そこで, 離乳期以降まで生き延びたマウスについて, その行動パラメーターを Fig. 2A に示すような画像処理装置によって測定した. その結果, マウスにとって新規な環境 (オープンフィールド) での探索行動が亢進し, 不安関連行動が低下あるいは好奇心が増大しており, さらに異常なジャンプをすることが分かった. このジャンプを記録するために, 赤外線を使用した通過センサーとタイマー回路を組み合わせて白色 LED またはキセノン管 (ストロボ) を発光させる装置を作製し, ジャンプを撮影したものが Fig. 2C~E である. また, 音による驚愕反応のプレパルス抑制が障害されていることを見出し, 本変異マウスは知覚フィルター機能が低下している可能性を明らかにした (Fig. 2B に使用した装置を示す).

一方, 神経化学的には, 脳内セロトニン代謝回転がわず

かながら減少しており, 行動薬理的には, ドパミン受容体遮断薬ハロペリドール, 選択的セロトニン取込阻害薬フルオキサセチンが, 異常行動を抑制することが明らかになった. このように PACAP が精神機能調節に関与することは, 従来の研究からは全く予想外であったもので, 今後, 本マウスが精神疾患研究の有用なモデルマウスになることが期待される. 他方, 本マウスは, ホモ変異型雌マウスの妊娠・出産率が低く, 出産した子供の保育行動にも異常が観察された. さらに高次脳機能, とくに海馬機能においても神経可塑性および記憶に障害が認められている. 詳細は現在解析中であるが, 短期記憶障害の行動突然変異体ハエ (*amnesiac*) の責任遺伝子産物と PACAP に相同性があることは, 偶然以上の関連性があるものと思われない興味深い.

5. 遺伝子改変マウス研究における種々の要因

遺伝子改変マウスを作成して解析する上で考慮すべき点, また変異マウスから得られる結果に及ぼす要因を, 創薬研究の観点から Fig. 3 にまとめてみた. まず, ノックアウト (変異) マウスから得られる情報は, 標的遺伝子が機能的に重要であるほど増加すると予想されるが, 生命維持に必須な遺伝子であれば, 胎生致死または生後生存率の低下により, 死亡時以降の情報が得られない (A).

次に変異マウスにおける表現型の発現は, コンベンショナルな null 変異マウスの場合には, 発達期の (不可逆的) 障害による場合と, 遺伝子産物の即時的な機能欠損 (またはそれらの両方) による場合がある (B). 即時的な機能欠損が原因である場合は, 例えばリガンドノックアウトの場合であればその一過性投与によってレスキューされる. さらに, 野生型マウスにアンタゴニストや阻害薬を投与しても変異マウスと同じ変化が見られる場合がある. ノックアウトマウスの病態モデル実験において, 野生型よりも変異マウスの方が症状が軽度であるとき, 野生型における病態時にその遺伝子の機能が (亢進することが) 病態発現に関与している可能性が示唆され, 当該遺伝子が創薬標的分子になり得るものと考えられる. この場合も, 即時的な機能欠損がノックアウトの表現型に関与するものと推定される.

一方, ホモ型変異マウスに見られる表現型がヘテロ型でも (軽度) に認められた場合は, 表現型の発現に遺伝子用量依存性があることを意味する (C). このような遺伝子では, その発現や機能が低下するだけでも発症につながるもので, ヒトでも何らかの疾患に関与する可能性が高いかも知れない.

ノックアウトマウスに何ら異常が認められなかった場合

Fig. 3 Multiple determinants that influence phenotypic expression in mutant mice.

は、ファミリーの内外を含めて、複数の遺伝子が機能的に重複している可能性がある (D)。また、例えば C57BL/6 や 129 系など遺伝的背景の違いによって、表現型の有無や程度が異なる場合がある (E)。非遺伝的 (環境) 要因が、表現型に及ぼす影響も大きい場合があり (F)、とくにマウスの表現型をヒト疾患に外挿する場合には、遺伝的背景とともに重要なファクターになってくる。

表現型発現が、遺伝子欠損の直接的な結果であるのか、あるいは何らかの経路を介した間接的 (二次的) な結果であるのかという点が、その遺伝子機能を決定する上では重要である (G)。また、例えば受容体リガンドのノックアウトである場合と、細胞内情報伝達の下流因子のノックアウトの場合では、表現型の発現に至るまでの経路の長さが異なるので、表現型のバリエーションや、G で述べた直接あるいは間接作用が関与する程度などが違って来るかも知れない (H)。最後に、ノックアウトと過剰発現の差については、前者は内因性の機能を評価することに優れ、後者は外因性に適用した際の作用 (薬物を長期投与した状態など) を反映すると考えることができる (I)。なお、ドミナントネガティブ体をトランスジェニックマウスで発現さ

せる場合はノックアウト (ダウン) と同様である。

創薬という観点からは、遺伝子の機能解明や病気の責任遺伝子を同定することに留まらず、創薬標的分子となる遺伝子産物を発見することが目的となるのであるが、この意味でも遺伝子改変マウスは有用であると思われる。なお以上は、思いついたことだけを列挙したもので、より重要な点や違う見方ができるところもあるものと思う。

6. PACAP 変異マウスを用いたヒト疾患研究

著者らは PACAP の中枢機能解析とともに末梢においても、糖代謝恒常性における役割を解明する目的で、膵臓特異的 PACAP トランスジェニックマウス (4) を作製して、さらに遺伝的肥満・糖尿病マウス KKAy と交雑するゲノム薬理学的手法による研究を行っている。精神疾患や糖尿病などのヒト疾患は、多数の遺伝的因子に加えて、非遺伝的 (環境) 因子が関与して発症する多因子疾患であると考えられている。単一遺伝子を変異させた個体が必ずしもヒト疾患の分子病態を反映しているとは限らない。今後は、例えば種々のストレスを負荷するなどにより、新たな表現型や目的遺伝子の真の機能と疾患における意義を追求して

いくことが必要であると考えている。著者らは PACAP という神経ペプチドを標的に研究を進めているが、今後もこのような研究ストラテジーで、生命機能の研究と創薬標的分子の探索および治療薬の開発を目指したいと考えている。

7. おわりに

PAC₁ 受容体をクローニングした 1993 年頃から、ノックアウトマウスの作製を計画して、ゲノム DNA の構造解析、ターゲティングを行ってきた。リガンドからの解析も行うことにし、結果的には PACAP 欠損マウスがより顕著なノックアウト表現型を示した。上述の通り、創薬的な視点からは、ノックアウトの表現型から示唆された創薬標的となる分子またはそのシグナル系の野生型における真の機能を追求し、次いで、例えばアンタゴニストを開発してその効果を検証する必要がある。ノックアウトの表現型はあくまでも null になった結果であり、アンタゴニストや阻害薬を用いた検討は、その遺伝子の機能評価にも重要な意味を持っている。遺伝的背景や非遺伝的因子を変化させて、ヘテロ変異マウスも含めた表現型の変化を調べて行くことも重要であると思う。

現在、著者らは長年培養を行ってきた ES 細胞（とくに薬剤による幹細胞選択も可能で、*in vitro* 分化系譜研究にも優れた E14tg2a EB5 細胞）を用いて *in vitro* での神経系への分化にも興味を持って研究を進めている。ES 細胞は、遺伝子導入が容易であることから、その特徴を活かして *in vitro* での検討を行うとともに、遺伝子導入した ES 細胞を発生させて個体レベルの解析を平行で進めるストラテジーも興味深いと考えている。

最後に、大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野馬場 明道教授および教室の方々、遺伝子ターゲティングについて御指導いただきました、遺伝情報実験センター岡部 勝博士、伊川 正人博士、医学系研究科幹細胞制御分野、宮崎 純一博士、丹羽 仁史博士（現、理研）に感謝致します。さらに、ノックアウトマウスの解析における学内外の共同研究者の皆様には感謝致します。

文 献

- 1) Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*. 1981;27:223-231.
- 2) Hashimoto H, Shintani N, Nishino A, et al. Mice with markedly reduced PACAP (PAC₁) receptor expression by targeted deletion of the signal peptide. *J Neurochem*. 2000;75:1810-1817.
- 3) Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, et al. Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:13355-13360.
- 4) Yamamoto K, Hashimoto H, Tomimoto S, et al. Overexpression of PACAP in transgenic mouse pancreatic cells enhances insulin secretion and ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. 2003;52:1155-1162.
- 5) 相沢 慎一. ジーンターゲティング. バイオマニュアルシリーズ 8. 羊土社; 1995.
- 6) Joyner AL. Gene targeting, a practical approach. In: Rickwood D, Hames BD, editors. *The Practical Approach Series*. 1993.
- 7) Wassarman PM, DePamphilis ML. *Guide to techniques in mouse development Vol. 225. Methods Enzymol*. 1993.
- 8) Miyata A, Arimura A, Dahl RR, et al. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;164:567-574.
- 9) Arimura A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol*. 1998;48:301-331.
- 10) Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev*. 2000;52:269-324.
- 11) Hashimoto H, Shintani N, Baba A. Higher brain functions of PACAP and a homologous *Drosophila* memory gene *amnesiac*: insights from knockouts and mutants. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;297:427-431.
- 12) Hashimoto H, Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Nagata S. Molecular cloning and tissue distribution of a receptor for pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Neuron*. 1993;11:333-342.
- 13) Hashimoto H, Aino H, Ogawa N, Nagata S, Baba A. Identification and characterization of parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor in cultured astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;200:1042-1048.
- 14) Aino H, Hashimoto H, Ogawa N, et al. Structure of the gene encoding the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Gene*. 1995;64:301-304.
- 15) Hashimoto H, Nishino A, Shintani N, et al. Genomic organization and chromosomal location of the mouse vasoactive intestinal polypeptide 1 (VPAC₁) receptor. *Genomics*. 1999;58:90-93.
- 16) Yamamoto K, Hashimoto H, Hagiwara N, et al. Cloning and characterization of the mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene. *Gene*. 1998;211:63-69.
- 17) Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000;24:372-376.
- 18) Mukai K, Satoh Y, Fujita A, et al. PAC1 receptor-mediated relaxation of longitudinal muscle of the mouse proximal colon. *Jpn J Pharmacol*. 2002;90:

- 97-100.
- 19) Matsuyama S, Matsumoto A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A. Impaired long-term potentiation *in vivo* in the dentate gyrus of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)- or PACAP type 1 receptor-mutant mice. *Neuroreport*. in press
- 20) Jamen F, Persson K, Bertrand G, et al. PAC1 receptor-deficient mice display impaired insulinotropic response to glucose and reduced glucose tolerance. *J Clin Invest*. 2000;105:1307-1315.
- 21) Otto C, Kovalchuk Y, Wolfer DP, et al. Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J Neurosci*. 2001;21:5520-5527.
- 22) Gray SL, Cummings KJ, Jirik FR, Sherwood NM. Targeted disruption of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene results in early postnatal death associated with dysfunction of lipid and carbohydrate metabolism. *Mol Endocrinol*. 2001;15:1739-1747.
- 23) Hamelink C, Tjurmina O, Damadzic R, et al. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:461-466.
- 24) Shintani N, Mori W, Hashimoto H, et al. Defects in reproductive functions in PACAP-deficient female mice. *Reg Pep*. 2002;109:45-48.
- 25) Mouse Genome Informatics (MGI) (ID: MGI 108449) <http://www.informatics.jax.org/>
- 26) Cummings KJ, Gray SL, Simmons CJ, Kozak CA, Sherwood NM. Mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene, expression and novel splicing. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;192:133-145.
- 27) Gray SL, Yamaguchi N, Vencova P, Sherwood NM. Temperature-sensitive phenotype in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. *Endocrinology*. 2002;143:3946-3954.
- 28) Hannibal J, Jamen F, Nielsen HS, Journot L, Brabet P, Fahrenkrug J. Dissociation between light-induced phase shift of the circadian rhythm and clock gene expression in mice lacking the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor. *J Neurosci*. 2001;21:4883-4890.
- 29) Jongsma H, Pettersson LM, Zhang Y, et al. Markedly reduced chronic nociceptive response in mice lacking the PAC1 receptor. *Neuroreport*. 2001;12:2215-2219.

Abstract - In vivo functional analysis of the neuropeptide PACAP using gene-targeted mice. Hitoshi HASHIMOTO and Norihito SHINTANI (Laboratory of Molecular Neuropharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan)

Folia Pharmacol. Jpn. (Nippon Yakurigaku Zasshi) **122**, 427 ~ 435 (2003)

Mutant strains of mice with precise genetic mutations generated by gene-targeting technology have proved to be useful tools for linking specific genes with biological processes *in vivo* and serve as models for human diseases. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a highly conserved neuropeptide that is widely expressed in the mammalian brain, and it has been implicated in a broad variety of physiological and pathophysiological processes. To assess the function of PACAP *in vivo*, recently, we have generated PAC₁ receptor- and PACAP-targeted mice and transgenic mice overexpressing PACAP in the pancreatic β -cells. The phenotypes of these mutant mice revealed both expected and unexpected roles of PACAP in the brain and pancreatic functions. A significant contribution of genetic background as well as environmental factors to the knockout phenotypes was also observed. In this article, we briefly describe the technique of gene targeting and discuss how this method was used to generate PACAP and its receptor deficient mice. We also analyze how these mutants can contribute to our understanding of the molecular mechanism underlying higher nervous functions.

Keywords: PACAP; PAC₁ receptor; gene targeting; knockout mouse; psychomotor behavior

著者プロフィール**橋本 均** (はしもと ひとし)

大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野, 助教授, 博士 (薬学).

1987 年京都大学薬学部卒業, '91 年同大学院薬学研究科博士後期課程退学, 同年, 大阪大学薬学部, 助手, '98 年同講師, '01 年現職.

研究テーマ: 神経ペプチドが果たす中枢機能の分子薬理的解析.

趣味: 工作や栽培などのもの作り, 各地を訪れ文化や自然に触れること.

新谷 紀人 (しんたに のりひと)

大阪大学大学院薬学研究科神経薬理学分野, 助手, 修士 (薬学).

1997 年大阪大学薬学部卒業, '01 年同大学院薬学研究科博士後期課程退学, 同年現職.

研究テーマ: 遺伝子改変手法による PACAP の中枢調節機能の解明.

趣味: 料理.

好きな言葉: 山椒は小粒でもピリリと辛い.