



トロンビンによるProtease Nexin-1遺伝子発現の転写後調節機構：神経芽細胞腫GOTO細胞における検討

安藤，康一

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 60(1):75-80

(Issue Date)

1999-06

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00042533>



トロンビンによる Protease Nexin-1 遺伝子発現の転写後調節機構 — 神経芽細胞腫 GOTO 細胞における検討 —

安 藤 康 一

神戸大学医学部小児科学教室
(指導: 中村 肇教授)
連絡先: 〒651-2113
高槻市古曾部町 2 丁目14-10-507
TEL : 0726-85-3855

(平成11年 2 月16日受付)

要 約

トロンビンは、その inhibitor である Serine Protease Nexin-1 (PN-1) との相互調節作用により、神経系の分化を制御していると考えられている。本研究では、トロンビンが PN-1 の発現を促進し、自身の活性を調節する autoregulation 機構が存在すると想定し、神経芽細胞腫株 GOTO 細胞を用いて、トロンビンによる PN-1 の遺伝子発現調節機構を解析した。トロンビンは血清除去下で培養した GOTO 細胞において、PN-1 の mRNA レベルを増加させることが確認できた。次に、PN-1 遺伝子の転写調節領域をルシフェラーゼ・レポーターベクターに融合させたプラスミドを作製し、GOTO 細胞に導入後トロンビンで刺激したところ、無処置群に比して転写活性の有為な増加は認められなかった。トロンビンによる PN-1 の遺伝子発現調節は、転写段階ではなく、転写後調節が重要であることが示唆された。

緒 言

近年、血液凝固系の key enzyme の一つであるトロンビンが、細胞表面に存在する固有のレセプターを介して、様々な生理活性を惹起することが明らかとなった¹⁾。培養神経細胞においては、トロンビンが神経突起を退縮させることが Cunningham らによって発見され、トロンビンの強力な inhibitor である Protease Nexin-1 (PN-1) には、逆に神経突起伸長活性が存在することが見い出された²⁾⁻⁴⁾。組織学的検討により、末梢神経系にも中枢神経系にも、トロンビンの前駆体であるプロトロンビンと PN-1 の発現が証明され、生体内で実際に両者の相互調節機構が存在し、神経系の

分化にとって重要であることが示された⁵⁾⁻⁷⁾。トロンビンは神経突起を退縮させることにより過剰な非機能的シナプスを除去し、逆に PN-1 はトロンビンを阻害して必要なシナプスを保護していると考えられ、両者の巧妙なバランスが、発達期あるいは障害修復期の脳の神経回路網形成に寄与していると考えられる⁸⁾⁹⁾。神経系における PN-1 の発現調節機構に関する検討はほとんどなされておらず^{10) 11)}、その分子機構の詳細は明らかにされていない。本研究では、トロンビンレセプターと PN-1 を共に発現している神経系細胞モデルとして神経芽細胞腫株 GOTO 細胞を用い、トロンビン刺激による PN-1 遺伝子発現調節機構を検討した。

方 法

神経芽細胞腫株 GOTO 細胞の培養は、10% ウシ胎児血清を添加した RPMI-1640 培地を用い、タイプ I コラーゲンを塗布した培養ディッシュにて行なった。5% CO₂ インキュベーター内にて 70-80% の密度まで培養した後、刺激実験に使用した。血清除去刺激は、培地吸引除去後 phosphate buffered saline にて 2 回洗浄し、非血清添加培地に変換した。トロンビン刺激には血清除去の下、ヒト・トロンビン (Sigma, T-7009) 100ng/ml (約 1 U/ml 相当) を添加した。一定刺激時間の後に細胞を回収し、acid-guanidine-phenol-chloroform (AGPC) 法にて RNA 分画を抽出した。各サンプル 20 μg の total RNA を northern blot 法に供し、formaldehyde 含有ゲルにて泳動し、10 x SSC (1 x SSC: 0.015M sodium citrate, 0.15 M NaCl) 溶液中でナイロンメンブレンへ転写した。ヒト PN-1 cDNA, ヒト thrombin functional receptor

キーワード: Thrombin, Protease Nexin-1 (PN-1), post-transcriptional regulation

cDNAを、GOTO細胞由来のRNAを用いたReverse transcription-PCR法により作成し、carrier plasmidに挿入して増幅切断後、 ^{32}P にてラベルして probes とした。選択したcDNAの領域は、ヒトPN-1がnt. 103~1117の1015 bps¹²⁾、ヒトthrombin functional receptorがnt. 511~1366の856 bps¹⁾である。ExperssHyb (CLONTECH)を用いて、プレ・ハイブリダイゼーションには68°Cで30分、引き続きprobeを加えてハイブリダイゼーションを68°Cで60分間行った。2 x SSC, 0.05% sodium dodecyl sulfate (SDS) 溶液中、室温にて20分間2回、0.1 x SSC, 0.1% SDS溶液中、50°Cで20分間2回wash後、-80°Cにてオートラジオグラフィに供した。

PN-1遺伝子の5'プロモーター領域は、ヒトGenome Walker Kits (CLONTECH)を用いてPN-1ゲノム5'領域を得て、そこからprobeを作製した。ヒトgenomic libraryをこのprobeにてスクリーニングし、陽性クローンを得た。その一部を切り出して、pGEM vectorにsubcloningし、その一部をシーケンスしてPN-1ゲノム5'領域を確認した。PN-1遺伝子の転写活性は、ルシフェラーゼ・レポーターベクター pGL3 (Promega)に、PN-1遺伝子の5'プロモーター領域 (nt. -1695~+172, SacI-BamHI fragment)^{13) 14)}を融合させたプラスミドを作製し、SuperFect (QIAGEN)を用いたリポフェクション法にてGOTO細胞に導入した。無血清刺激下、トロンビンで12時間刺激した後に細胞を回収し、Dual-luciferase Reporter Assay Systems (Promega)を用いてルシフェラーゼ活性を測定し、内因性コントロールで補正した転写活性を算出した。

結 果

GOTO細胞のtotal RNA分画を用いてreverse transcription-PCRを行ったところ、PN-1, thrombin receptor両者ともに単一バンドとして増幅可能であった。増幅された産物のサイズは、それぞれ既報告の遺伝子配列から計算されたサイズに合致し、5'側の部分配列(約200 bps)もシーケンサーにて適合を確認した。この増幅されたcDNAをprobesとしてnorthern blot法により発現を検討したところ、無刺激のGOTO細胞において、PN-1とthrombin receptorのmRNAをそれぞれ2.4 kb, 3.5 kbの単一バンドとして明瞭に確認できた(図1)。GOTO細胞を血清除去刺激すると、数時間で突起を伸長しはじめるが、トロンビンを前処置添加しておく、この突起伸長現象は阻害された。トロンビン刺激におけるPN-1 mRNAの変化

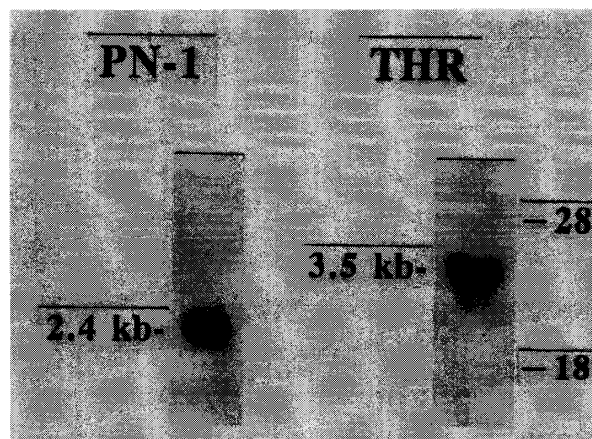


図1 GOTO細胞におけるPN-1, Thrombin Receptorの発現

神経芽細胞腫GOTO細胞でのPN-1, Thrombin Receptor (THR) の発現をnorthern blot 法で確認した。それぞれ2.4 kb, 3.5 kbに単一のバンドを確認できた。Ribosomal RNAの18S, 28Sの位置を同時に示した。

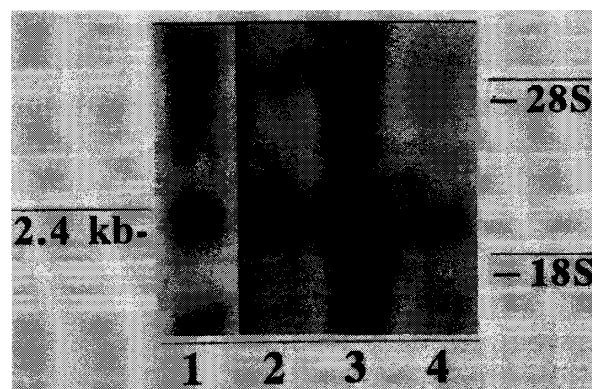


図2 トロンビンによるPN-1 mRNAレベルの変化

血清を除去した培養液にトロンビン100ng/mlを添加し、3, 6, 9時間刺激後に細胞を回収し、RNA分画をAGPC法にて抽出した。各サンプル20 μg を用いてnorthern blot法でPN-1 mRNAを検出した。

Lane 1: 刺激前, lane 2; 3時間後, lane 3; 6時間後, lane 4; 9時間後

を解析したところ、刺激後3時間より増加しはじめて、刺激後6時間でピークとなり、刺激前の2.8倍に増加した。その後減少し、刺激後9時間で前値にまで減少した(図2)。

PN-1 mRNAレベル増加の機構を解析するため、ルシフェラーゼ・アッセイ法により、トロンビン刺激時の転写活性の変化を検討した。プロモーター配列未導入のnegative control vectorを導入したものでは、ほとんどルシフェラーゼ活性を認めなかった。PN-1

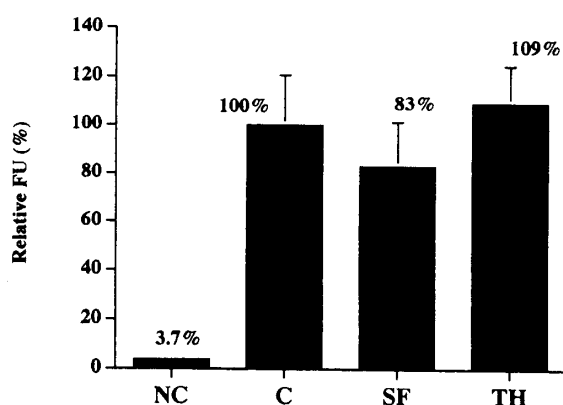


図3 トロンビンによるPN-1遺伝子転写活性の変化
ルシフェラーゼ・アッセイ法より、トロンビン刺激によるPN-1遺伝子の転写活性の変化を検討した。ルシフェラーゼ遺伝子の5'プロモーター領域約1.7 kbを融合させたレポータープラスミドを作製した。このプラスミド1 μ gをリポフェクション法でGOTO細胞に導入し、トロンビンで12時間刺激した後細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定した。Dual-luciferase systemを応用し、内因性コントロールによる補正後の3回の実験結果から平均+SEを算出し、グラフに示す。NC : Negative Control, C : Control (10%血清添加), SF : 血清除去, TH : Thrombin添加

プロモーター領域を融合させたレポーターベクターを導入したものは、10%血清存在下を対照とした転写活性が、血清除去刺激で83%、トロンビン刺激で109%の活性を示し、刺激の異なる各群間での転写活性に有為な差は認められなかった(図3)。

PN-1 mRNAレベルの増加に新たな蛋白合成が関与している可能性を、蛋白合成阻害剤を用いて検討した。Cycloheximide 10 μ g/mlを添加すると、GOTO細胞では新生蛋白合成 (3 H-methionineの取り込み率) が18%にまで抑制される¹⁵⁾。この条件で新たな蛋白合成を阻害すると、10%血清存在のもとCH刺激2時間では対照と差はなかったが、刺激4時間後にはPN-1 mRNAレベルが対照の1.3倍に増加した。2時間のCH刺激を负荷した後に、血清除去刺激をすると、2時間後にPN-1 mRNAレベルは対照の1.5倍まで増加した。トロンビン刺激でも対照の1.4倍に増加した(図4)。

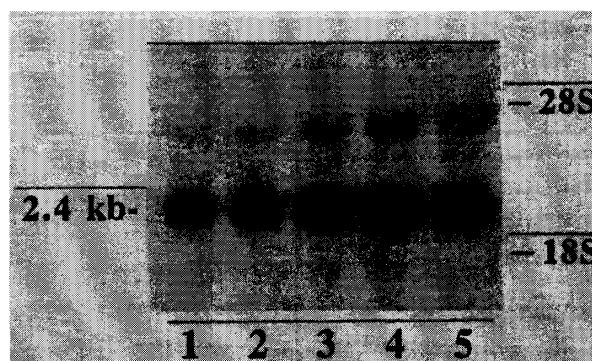


図4 蛋白合成阻害によるPN-1 mRNAレベルの変化

各種刺激処置前2時間の時点で、培養液中にcycloheximide (CH) 10 μ g/mlを添加して蛋白合成を阻害した後、血清除去、トロンビン100ng/ml刺激を行い、刺激2時間後に細胞を回収してnorthern blot法にてPN-1 mRNAを検出した。

Lane 1 ; コントロール, lane 2 : CH添加2時間後, lane 3 : CH添加4時間後, lane 4 : CH添加2時間後血清除去刺激2時間, lane 5 : CH添加2時間後トロンビン添加2時間

考 察

Monardらは、1985年ラット・グリオーマ C6細胞の培養上清より精製された神経突起伸長因子glia-derived neurite promoting factor (GdNPF) が、すでにserine protease inhibitorとして発見されていたPN-1と同一の物質であることを明らかにした^{12) 16)}。その後、トロンビンは凝固因子としての生理作用以外に、細胞表面に存在するレセプターを介して神経突起を退縮させることが示され、PN-1はトロンビンのレセプター活性化機構を阻害することにより神経突起を伸長させることが判明した⁴⁾。これにより、凝固因子とそのinhibitorsが、神経系において神経回路網形成に関与する可能性が示された¹⁷⁾。組織学的研究により、神経組織にトロンビンの前駆体であるプロトロンビン、さらにPN-1のmRNAが発現していることが証明されている^{5)-7) 13) 18)}。また、PN-1には神経栄養因子的活性が存在し、障害により誘導される脊髄運動神経のアポトーシスを防止することが報告されている¹⁹⁾。さらに、神経筋接合部においては、トロンビンが余分なシナプスを除去し、回路網形成に関与することが示されている^{8) 9)}。このように、トロンビンとPN-1の相互バランスは、神経系組織の分化発達、可塑性、アポトーシスに関与し、これらを制御してい

と考えられる。

このシステムが有効に作動するためには、精巧なフィードバック機構が必要であると考えられる。トロンビンが自身のinhibitorであるPN-1の発現を制御し、トロンビンレセプターの活性化を調節するautoregulation機構が存在することが想定される。線維芽細胞においてはPN-1の発現調節機構の検討が行われているが²⁰⁾、神経系細胞についてはいまだ十分には明らかになっていない^{10) 11)}。本研究の結果は、神経細胞においてトロンビンがPN-1の発現を増加させること、その主要な機序が転写促進によるものではなく、転写後のmRNAの安定性向上によることを示している。この結果は線維芽細胞でのCunninghamらの結果と合致している²⁰⁾。この調節機構は、PN-1ゲノム遺伝子が50 kb近くと長大で転写に時間を要するのに対し¹³⁾、mRNAレベルの増加がトロンビン刺激後3時間と比較的短時間で開始することから合理的と考えられる。また、PN-1遺伝子のプロモーター領域の解析にても¹⁴⁾、主要な転写制御因子はSp1であることが報告されており、発生段階や臓器に特異的な転写制御には適していないと考えられていることにも合致する。

新生蛋白合成阻害の結果からは、PN-1 mRNAを積極的に分解不活化する蛋白の存在が考えられる。また、血清除去刺激やトロンビン刺激がPN-1 mRNAを安定化する機構の存在が示唆され、複雑な転写後制御機構が働いているものと思われる。これら因子の分離同定、ならびに発現調節機構の解明は、PN-1の生体内での動態を明らかにするものと期待される。

トロンビンとPN-1の相互バランスは、胎児・新生児の神経回路網形成や脳内出血後の修復過程で重要な役割を果たすと考えられるが、トロンビンは凝固因子としての強力な作用のため、生体内に投与することは困難である。最近、トロンビンレセプターを活性化できる低分子ペプチドが開発され、トロンビンが有する凝固因子活性を除外した実験系を組むことが可能となり、臨床応用への道が開きつつある²¹⁾。また、トロンビンレセプターの下流で機能する細胞内情報伝達分子が明らかになりつつあり²²⁾、今後の研究により治療への応用が可能になることが期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました神戸大学医学部小児科中村 肇教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Vu, T.H., Hung, D.T., Wheaton, V.I., Coughlin S.R.: Molecular cloning of functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64 : 1057-1068, 1991
- 2) Gloor, S., Odink, K., Guenther, J., Nick, H., Monard, D.: A glia derived neurite promoting factor with protease inhibitory activity belongs to the protease nexins. *Cell* 47 : 687-693, 1986
- 3) Gurwitz, D., Cunningham, D.D.: Thrombin modulates and reverses neuroblastoma neurite outgrowth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 3440-3444, 1988
- 4) Gurwitz, D., Cunningham, D.D.: Neurite outgrowth activity of protease nexin-1 on neuroblastoma cells requires thrombin inhibition. *J. Cell. Physiol.* 142 : 155-162, 1990
- 5) Reinhart, E., Suidan, H.S., Pavlik, A., Monard, D.: Glia derived nexin/protease nexin-1 is expressed by a subset of neurons in the rat brain. *J. Neurosci. Res.* 37 : 256-270, 1994
- 6) Weinstein, J.R., Gold, S.J., Cunningham, D.D., Gall, C.M.: Cellular localization of thrombin receptor mRNA in rat brain : expression by mesencephalic dopaminergic neuron and codistribution with prothrombin mRNA. *J. Neurosci.* 15 : 2906-2919, 1995
- 7) Soifer, S.J., Peters, K.G., O'Keffe, J., Coughlin, R.: Disparate temporal expression of the prothrombin and thrombin receptor genes during mouse development. *Am. J. Pathol.* 144 : 60-69, 1994
- 8) Luthi, A., Putten, H., Botteri, F.M., Mansuy, M., Meins, M., Frey, U., Sansig, G., Portet, C., Schmutz, M., Achroder, M., Nitsch, C., Laurent, J.P., Monard, D.: Endogenous serine protease modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci.* 17 : 4688-4699, 1997
- 9) Liu, Y., Fields, R.D., Festoff, B.W., Nelson, P.D.: Proteolytic action of thrombin is

- required for electrical activity-dependent synapse reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 10300-10304, 1994
- 10) Vaughan, P.J., Cunningham, D.D.: Regulation of protease nexin-1 synthesis and secretion in cultured brain cells by injury-related factors. *J. Biol. Chem.* 268 : 3720-3727, 1993
 - 11) Bleuel, A., Gasparo, M., Whitebread, S., Puttner, I., Monard, D.: Regulation of protease nexin-1 in cultured Schwann cells is mediated by angiotensin receptors. *J. Neurosci.* 15 : 750-761, 1995
 - 12) Sommer, J., Gloor, S.M., Rovelli, G.F., Hofsteenge, J., Nick, H., Meier, R., Monard, D.: cDNA sequence coding for a rat glia derived nexin and its homology to members of the serpin superfamily. *Biochemistry* 26 : 6407-6410, 1987
 - 13) McGrogan, M., Kennedy, J., Golini, F., Ashton, N., Dunn, F., Bell, K., Tate, E., Scott, R.W., Simonsen, C.C.: Structure of the human protease nexin gene and expression of recombinant forms of PN-1: Serine Protease and Their Serpin Inhibitor in the Nervous System. Plenum Press, New York, p147-161, 1990
 - 14) Guttridge, D.C., Cunningham, D.D.: Characterization of the human protease nexin-1 promoter and its regulation by Sp-1 through a G/C-rich activation domain. *J. Neurochem.* 67 : 498-507, 1996
 - 15) Tsuneishi, S., Sano, K., Nakamura, H.: Serum depletion increases the neurofilament protein mRNA levels in a neuroblastoma cell line, GOTO. *Mol. Brain Res.* 17 : 119-128, 1993
 - 16) Knauer, D.J., Orlando, R.A., Rosenblatt, D.: The glioma cell-derived neurite promoting activity protein is functionally and immunologically related to human protease nexin-1. *J. Cell. Physiol.* 132 : 318-324, 1987
 - 17) Monard, M.: Cell-derived proteases and protease inhibitors as regulators of neurite outgrowth. *Trends Neurosci.* 11 : 541-544, 1988
 - 18) Choi, B.H., Suzuki, M., Kim, T., Wagner, S.L., Cunningham, D.D.: Protease nexin-1 : localization in the human brain suggests a protective role against extravasated serine proteases. *Am. J. Pathol.* 137 : 741-747, 1990
 - 19) Houenou, L.J., Turner, P.L., Li, L., Oppenheim, R.W., Festoff, B.W.: A serine protease inhibitor, Protease nexin-1, rescues motoneurons from naturally occurring and axotomy-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 895-899, 1995
 - 20) Guttridge, D.C., Lau, A.L., Cunningham, D.D.: Protease nexin-1, a thrombin inhibitor, is regulated by interleukin-1 and dexamethasone in normal human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 268 : 18966-18974, 1993
 - 21) Vaughan, P.J., Pike, D.J., Cotman, C.W., Cunningham, D.D.: Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J. Neurosci.* 15 : 5389-5401, 1995
 - 22) Yan, W., Tiruppathi, C., Lum, H., Qiao, R., Malik, A.B.: Protein kinase C β regulates heterologous desensitization of thrombin receptor (PAR-1) in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 274 : C 387-395, 1998

Post-transcriptional regulation of protease nexin-1 by thrombin in a neuroblastoma cell line, GOTO.

Kouichi Ando

Department of Pediatrics, Kobe University School of Medicine

Thrombin, a key enzyme of blood coagulation system, is revealed to have not only the main role in blood coagulation but also various activities through its functional receptor on cell membrane. In the nervous system thrombin retracts the neurites of the neuron. Protease nexin-1, a strong inhibitor of serine proteases, extends the neurites by inhibiting thrombin.

In vivo thrombin and PN-1 actually exist in the nervous system. Thrombin eliminates the excessive synapses and on the contrary PN-1 may protect the essential synapses on neuro-muscular junction. A feed-back system, thrombin increases the expression of its inhibitor(s) and its inhibitor(s) decreases activity of thrombin, is necessary for this system to act functionally. We investigated regulatory mechanism(s) of the expression of PN-1 gene induced by thrombin in a neuroblastoma cell line, GOTO, which expresses both PN-1 and thrombin receptor. Thrombin increased the PN-1 mRNA level at 6 hrs as peak by northern blot analysis. A promotor assay was revealed that thrombin did not increase the transcription of PN-1 gene compared with control. These results indicate that thrombin increases the expression of PN-1 gene by post-transcriptional regulation.