



プロテアーゼネクシン-1 の欠損マウス

上村 晃一朗*, 嘉悦 洋*, 濱本 高義*

Protease Nexin-1 Deficient Mice

Koichiro KAMIMURA*, Hiroshi KAETSU*, Takayoshi HAMAMOTO*

Key words : protease nexin-1, serpin, long-term potentiation, epileptiform activity, male fertility

はじめに

近年、凝固・線溶関連因子が止血機構のみでなく、炎症や動脈硬化、創傷治癒、癌の転移、血管新生、分化・発生、および生殖など幅広い生理現象に関わっていることが明らかにされてきた。また、脳などの神経系への密接な関与にも注目が集まっている。

プロテアーゼネクシン-1 (PN-1) は、トロンビンおよびウロキナーゼ (uPA) 活性を阻害し、不可逆的な複合体を形成することにより、これらプロテアーゼを特定の細胞に結合させるとともに、クリアランスに関与するヒト線維芽細胞の分泌成分として精製、同定された¹⁾²⁾。

一方、グリア由来の神経突起誘導因子 (glia-derived neurite promoting factor : GdNPF) と呼ばれる成分は、セリンプロテアーゼの阻害活性を示しかつ神経細胞の移動を調節するが、cDNA からの全アミノ酸配列から PN-1 と同一タンパク質であることが明らかとなった³⁾。こうした背景から、PN-1 はグリア由来のネクシン (glia-derived nexin : GDN) とも呼ばれる。PN-1 によって伸長した神経芽細胞腫の神経突起は、トロンビンにより特異的に退縮すること

から、トロンビンと PN-1 の量的関係により神経突起の伸長が制御されているという⁴⁾。

現在までに、PN-1 について以下のような知見がある。

① ヒト PN-1 は 379 アミノ酸残基からなる分子量約 43,000 の糖タンパク質である。PN-1 は強力なセリンプロテアーゼインヒビター (以下セルピンと略) であり、トロンビン、uPA、組織型プラスミノゲン活性化因子、およびトリプシンのようなセリンプロテアーゼと SDS 耐性複合体を形成する。また、PN-1 は高親和性のヘパリン結合部位をもっており、ヘパリンの存在下では、トロンビンとの結合速度が顕著に促進される。最近、PN-1 が活性化凝固 XI 因子 (FXIa) の強力なインヒビターであることが明らかにされたが、FXIa はアミロイド前駆体タンパク質をタンパク分解的に修飾し、生物活性を消失させる。それ故、アルツハイマー病の発症における血管外遊出 FXIa の阻害を介した PN-1 の保護的役割も示唆されている⁵⁾。実際、ヒト脳における PN-1 活性を調べると、アルツハイマー病患者では健常人のわずか 14% であり、これは PN-1 と FXIa の複合体形成による消費性の低下であると考えられている⁶⁾。

* (財) 化学及血清療法研究所 血液製剤研究部 [〒 860-8568 熊本市大窪 1-6-1]

Blood Products Research Department, The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute, KAKETSUKEN [1-6-1 Okubo, Kumamoto 860-8568, Japan.]

Tel : 096-344-2183 Fax : 096-344-9234

② PN-1の発現は、部位特異的で一過性という特性をもつ⁷⁾。マウス胚の脊髄では、PN-1は神経管に沿った細胞で発現している。出生後の発達過程の脳では、PN-1は多くの神経細胞群で一過性に発現しているという。また、成体では、大脳新皮質の第V細胞層の錐体細胞のような特定の神経細胞群が、検出可能なレベルのPN-1を発現している^{7,8)}。複数のインヒビターが知られている凝固・線溶系と異なり、中枢神経系において有意なレベルで存在している内在性のセルピンはPN-1のみである。したがって、PN-1は脳内で生理活性物質を処理、または遊離することが知られているセリンプロテアーゼ類の活性を調節している可能性が高い。

③ 雄の生殖管および哺乳動物の精液中には、多数のプロテアーゼおよびプロテアーゼインヒビターが同定されている。マウスの生殖管におけるuPAに対するインヒビターを探索する過程で、PN-1のmRNAが精囊に豊富に発現していることが見出された⁹⁾。その発現の様子を調べると、PN-1は精囊の上皮組織で合成され、精囊内腔に分泌されることが分かった。マウス精囊でのPN-1の遺伝子発現は、アンドロゲンの制御下にあり、PN-1レベルは未成熟期に低く、去勢処置を施すと著しく低下することも明らかにされた。

このような背景をもとに、PN-1の神経系および生殖系での働きを解析することを目的として、PN-1欠損マウスの作出が試みられた。

PN-1の欠損マウスから得られる情報

1997年、Lüthiらは、癲癇発作および海馬のシナプス伝達/可塑性におけるPN-1の役割を評価するために、脳特異的なThy-1プロモーター制御によるPN-1過剰発現(Thy-1/PN-1)マウス、およびPN-1ホモ欠損(PN-1^{-/-})マウスを作出した¹⁰⁾。

Thy-1/PN-1マウスは、脳特異的にPN-1を発現するが、それは出生前後から始まり、出生

後14日で最大レベルに達し、その後成体となってもそのレベルは維持された。このマウスの脳ホモジネートのトロンビン阻害活性は、正常マウスよりも2~4倍高かった。Thy-1/PN-1マウスは、カイニン酸およびイボテン酸のようなexcitotoxinで誘導される慢性痙攣の発症頻度が正常マウスよりも高く、慢性の癲癇性発作に至る例も見られた。また、このマウスでは、脳の長期増強状態(long-term potentiation: LTP)および海馬切片のCA1領域におけるNMDA受容体を介したシナプス伝達が増大していた。

一方、PN-1^{-/-}マウスは正常マウスと変わりなく成育し、健康状態および行動全般にも明らかな異常は認められなかったが、Thy-1/PN-1マウスと同様に、癲癇性の発作がexcitotoxinで誘導された。また、脳の長期増強状態(LTP)や海馬切片のCA1領域におけるNMDA受容体を介したシナプス伝達は、正常マウスよりも低下していた。これらの結果は、脳内でのセリンプロテアーゼとPN-1のようなインヒビターとの間の平衡が、持続した神経細胞の活性化における興奮と鎮静のバランスに寄与していることを示唆する。

ごく最近、Hengstらは、PN-1^{-/-}マウスの解析を進める中で、脳内にPN-1とは異なる新規なトロンビン阻害活性を検出し、それがホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質(PEBP)であるとした¹¹⁾。このように、脳内のセリンプロテアーゼに対するPN-1以外の内在性インヒビターの存在が明らかにされたので、PN-1^{-/-}マウスの神経系で微細な表現型の異常しか認められない理由は、PN-1の代償因子により神経系の機能がある程度維持されるためとも推定される。

次にPN-1と生殖系との関係に目を向けると、2001年、Murerらは生殖の分子メカニズムを明らかにし、さらに不妊および生殖不能を理解することを目的として、PN-1^{-/-}マウスを作出した¹²⁾。正常(PN-1^{+/+})、ヘテロ欠損

表 1 繁殖データ (文献 12 より引用・改変, 転載許可取得)

	交配					
	雄 雌	-/-	-/-	+/+	+/-	+/+
交配された雄の数		15	24	11	20	5
交配された雌の数		30	38	11	24	10
腔栓を形成できる雄の割合 (%)		93	64	100	100	100
妊娠した雌の割合 (%)		21	32	81	95	90
出産した雌の割合 (%)		7	9	81	95	90
同腹仔数の平均値		2.5	3.1	7.3	7.4	7.4

(PN-1^{+/-}),あるいはホモ欠損 (PN-1^{-/-})の雄マウスと雌マウスの交配により生殖への影響を調べた結果,PN-1^{+/-}およびPN-1^{-/-}の雌マウスでは,いずれについても繁殖能の障害は見られなかった.しかし,PN-1^{-/-}雄マウスの場合,交配後の妊娠の成立割合がPN-1^{+/+}およびPN-1^{+/-}の雄マウスに比べて低下しており,最終的な同腹仔の数も低下した(表 1).

PN-1^{-/-}雄成体の精巣の組織形態と精子形成には,異常が認められなかった.PN-1が関与する雄の生殖システムのうち,もっとも高濃度でPN-1 mRNAとタンパク質が検出されるのが精囊,特に分泌上皮であるが(図 1 A~D),PN-1^{-/-}マウスの精囊では4カ月齢に始まる累進的な異常が見られた(図 1 E~H).もっとも劇的な変化は,PN-1^{-/-}雄マウス9匹中4匹に見られる精囊の出血と,3倍までの肥大である.非染色の凍結切片を観察すると,精囊内腔は正常マウスとPN-1^{-/-}マウスで大きく異なっていた(図 1 I, J).PN-1^{-/-}マウスの精囊上皮の組織学的分析では,生後2カ月までは形態上正常であるが,10カ月の時点では精囊の上皮および間質に組織形成異常が確認された(図 1 K, L).

次に,精囊液中のプロテアーゼインヒビターレベルの低下による影響を調べるために,正常マウスおよびPN-1^{-/-}雄マウスにより形成される腔栓の比較が行われた.腔栓自体はPN-1^{-/-}雄マウスでも形成されるが(表 1),大きさと性状の点で正常マウスとPN-1^{-/-}マウスに差が見られた.正常の雄マウスで形成され

る腔栓の重量は平均22.5 mgであり,硬くしっかりと腔を埋め頸部に接しているのに対して,PN-1^{-/-}雄マウスで形成される腔栓は重量がわずかに6.255 mgに過ぎない小さなものであり,柔らかく線維性で,頸部の開口部にしっかりと止まることができなかった(図 2).腔栓の機能の1つは,精液の損失を防ぎ子宮に達する機会を高めることにあるので,交尾15分後の子宮角における精子数を調べたところ,PN-1^{-/-}雄マウスとの交配で不妊であった場合には,雌の子宮角には精子がまったく存在しなかった.PN-1^{-/-}雄マウスによるこの異常な腔栓形成は,腔栓の主要な構成成分であり,かつ前立腺トランスグルタミナーゼの基質ともなる38 kDaのタンパク質,セメノクロチンが,上昇したプロテアーゼ活性により分解されるためと考えられている.

一方,ヒトにおいても,射精直後に精液は固まりを形成し,これは5~20分で融解するが,この現象の働きは解明されていない.精囊や前立腺,精巣上体の分泌能を反映するフルクトース,亜鉛,カルニチンとの関連を調べたデータでは,フルクトースのみに低値が見られる精液異常のある男性で,PN-1が高値であることが報告されている¹²⁾.

おわりに

PN-1^{-/-}マウスを用いた解析から,以下のことが明らかとなった.

- ① PN-1^{-/-}マウスの胚発生に異常は認めら

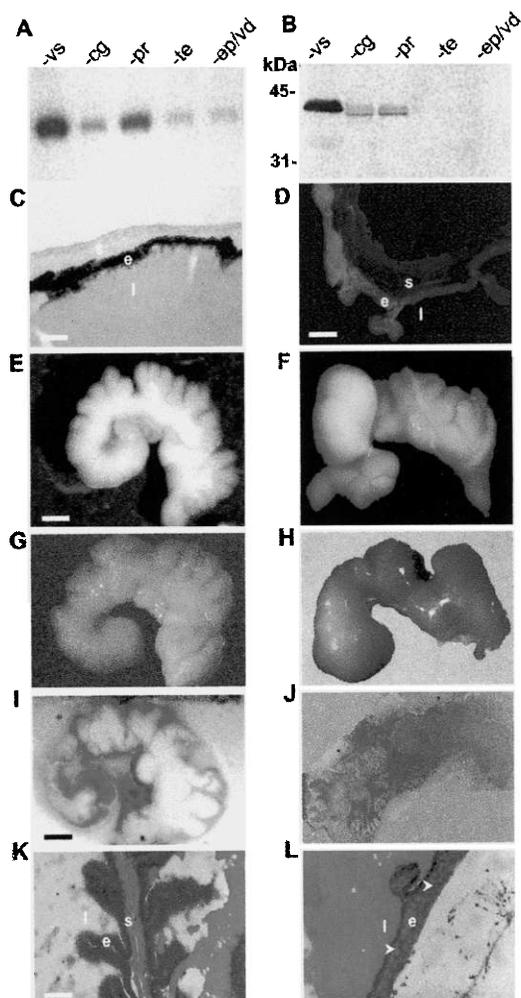


図1 正常 (PN-1^{+/+}) 雄マウスの生殖管における PN-1 の発現と PN-1^{-/-} 雄マウス精囊の形態分析。
 (A) 正常成体マウスでの PN-1 転写産物: vs, 精囊; cg, 凝固腺; pr, 前立腺; te, 精巣; ep/vd, 精巣上体から精管。
 (B) 正常成体マウスの各組織の PN-1 タンパク質含量。
 (C) 正常成体マウスの精囊における PN-1 の *in situ* ハイブリダイゼーション: e, 上皮; l, 内腔; s, 間質。
 (D) 正常成体マウスの精囊における PN-1 の免疫細胞学的分析。
 (E~H) 4~10 カ月齢の PN-1^{+/+} および PN-1^{-/-} マウス精囊の形態。
 (E): 4 カ月齢 PN-1^{+/+}。
 (F): 4 カ月齢 PN-1^{-/-}。
 (G): 10 カ月齢 PN-1^{+/+}。
 (H): 10 カ月齢 PN-1^{-/-}。
 (I): 6 カ月齢 PN-1^{+/+} マウスの精囊の非染色凍結切片による観察。
 (J): 6 カ月齢 PN-1^{-/-} マウスの精囊の非染色凍結切片による観察。
 (K): 2 カ月齢 PN-1^{-/-} マウスの精囊上皮の組織学的観察 (凍結切片のヘマトキシリン-エオシン染色)。
 (L): 10 カ月齢 PN-1^{-/-} マウスの精囊上皮の組織学的観察 (凍結切片のヘマトキシリン-エオシン染色)。
 (文献 12 より引用。 転載許可取得)。

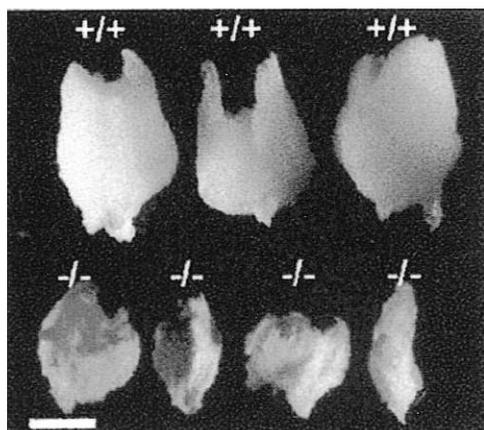


図2 正常 (PN-1^{+/+}) および PN-1^{-/-} の雄マウスの陰栓。PN-1^{-/-} マウスでは、正常に比べて、陰栓が顕著に小さく、外観も異なっている。陰栓は基部の末端を上に向けてある。
 (文献 12 より引用。 転載許可取得)。

れず、出生後の成育過程でも外観上の障害や異常は見られない。

② 成体マウスでPN-1が発現している脳神経系に対するPN-1欠損の影響を調べた結果、癲癇性の発作が誘導されやすくなることが明らかとなった。また、PN-1^{-/-}マウスでは、脳の長期増強状態(LTP)や海馬切片のCA1領域におけるNMDA受容体を介したシナプス伝達が低下していた。

③ PN-1^{-/-}雄マウスには不妊性が認められたが、これは精子形成または精液機能の変化によるものではなく、PN-1が欠損したためタンパク質分解が亢進され、精液はセメノクロチン欠乏状態となり、その結果、膣栓が奇形となり、精子が子宮に達する確率が低下するためである。こうしたタンパク質分解活性の制御破綻が、精囊の機能不全につながるものと推察される。

ヒトにおいても、一遺伝子の欠損によって引き起こされた精液中のタンパク構成の異常と不妊との関連が示唆される。このことは、精囊液の検討によって将来、新しい避妊法や男性不妊治療の開発に結びつくのではないだろうか。

謝 辞: 御校閲を戴きました片渕美和子先生(銀杏学園短大看護科)、米川幸裕先生(化血研診療室医師)、岩永貞昭先生(九州大学名誉教授)に深謝いたします。

文 献

- 1) Baker JB, Low DA, Simmer RL, Cunningham DD: Protease-nexin: a cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates their binding to cells. *Cell* **21**: 37-45, 1980.
- 2) Knauer DJ, Thompson JA, Cunningham DD: Protease nexins: cell-secreted proteins that mediate the binding, internalization, and degradation of regulatory serine proteases. *J Cell Physiol* **117**: 385-396, 1983.
- 3) 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.
- 4) Gurwitz D, Cunningham DD: Thrombin modulates and reverses neuroblastoma neurite outgrowth. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 3440-3444, 1988.
- 5) Knauer DJ, Majumdar D, Fong P-C, Knauer MF: Serpin regulation of factor XIa: The novel observation that protease nexin 1 in the presence of heparin is a more potent inhibitor of factor XIa than C1 inhibitor. *J Biol Chem* **275**: 37340-37346, 2000.
- 6) Wagner SL, Geddes JW, Cotman CW, Lau AL, Gurwitz D, Isackson PJ, Cunningham DD: Protease nexin-1, an antithrombin with neurite outgrowth activity, is reduced in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8284-8288, 1989.
- 7) Mansuy IM, van der Putten H, Schmid P, Meins M, Botteri FM, Monard D: Variable and multiple expression of *protease nexin-1* during mouse organogenesis and nervous system development. *Development* **119**: 1119-1134, 1993.
- 8) Reinhard E, Suidan HS, 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.
- 9) Vassalli J-D, Huarte J, Bosco D, Sappino A-P, Sappino N, Velardi A, Wohlwend A, Ernó H, Monard D, Belin D: Protease-nexin 1 as an androgen-dependent secretory product of the murine seminal vesicle. *EMBO J* **12**: 1871-1878, 1993.
- 10) Lüthi A, van der Putten H, Botteri FM, Mansuy IM, Meins M, Frey U, Sansig G, Portet C, Schmutz M, Schröder M, Nitsch C, Laurent J-P, Monard D: Endogenous serine protease inhibitor modulates epileptic activity and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci* **17**: 4688-4699, 1997.
- 11) Hengst U, Albrecht H, Hess D, Monard D: The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem* **276**: 535-540, 2001.
- 12) Murer V, Spetz JF, Hengst U, Altrogge LM, de Agostini A, Monard D: Male fertility defects in mice lacking the serine protease inhibitor protease nexin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 3029-3033, 2001.
- 1) Baker JB, Low DA, Simmer RL, Cunningham DD: Protease-nexin: a cellular component that links thrombin and plasminogen activator and mediates