

〔原 著〕

HSY-EA1 細胞におけるprotease-activated receptor(PAR)-1 とPAR-2 の相互脱感作機構

設楽 彰子, 谷村 明彦, 根津 顕弘, 森田 貴雄, 東城 庸介

北海道医療大学歯学部歯科薬理学教室

Cross-desensitization between PAR-1 and PAR-2 in HSY-EA 1 cells.

Akiko SHITARA, Akihiko TANIMURA,
Akihiro NEZU, Takao MORITA and Yosuke TOJYO

Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

The mechanisms for cross-desensitization between protease-activated receptor (PAR)-1 and PAR-2 in human parotid cell line, HSY-EA1 cells were examined. The HSY-EA1 cells strongly expressed mRNAs for PAR-1 and PAR-2, whereas the expression of PAR-3 and PAR-4 was very limited. Stimulation of HSY-EA1 cells with various concentrations of thrombin or trypsin produced a striking increase in $[Ca^{2+}]_i$, followed by a slow return to the basal level within 2-3 min. When cells were pretreated with various concentrations of trypsin, the subsequent Ca^{2+} response with thrombin diminished in a dose-dependent manner over the trypsin concentration, indicating that trypsin desensitized PAR-1. The desensitization of the thrombin-induced Ca^{2+} response was also induced by the pretreatment with PAR-2 agonist peptide, SLIGKV. These results suggest that trypsin-induced inactivation of PAR-1 is due to the heterologous desensitization of PAR-1 through the activation of PAR-2 in addition to a proteolytic degradation of PAR-1.

Key words : protease-activated receptor (PAR), thrombin, trypsin, SLIGKV, desensitization.

緒 言

Protease-activated receptor (PAR) は受容体分子内にリガンドとなるアミノ酸配列とリガンド

結合部を持つというユニークな構造をした7回膜貫通型受容体である。現在までに、PAR-1からPAR-4まで4つのサブタイプが同定され、PAR-1,3,4はトロンビン、PAR-2,4はトリ

受付：平成16年4月1日

プシンによって活性化されることが知られている¹⁻³⁾。これらのプロテアーゼはPARの細胞外N末端の特定部位を切断し、リガンドとなる新しいN末端を露出させる。このN末端が受容体分子内の細胞外第二ループに存在するリガンド結合部に結合することによって、GTP結合タンパク質 ($G_{q/11}$) を介した細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇を誘起する^{3,4)}。多くの場合、 $G_{q/11}$ を介する $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応では一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に続く持続相が認められるが、PARを介する反応では一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の後、速やかに刺激前の $[Ca^{2+}]_i$ まで戻るという特徴的なパターンを示す。この反応は、活性化されたPARが速やかに脱感作される同種脱感作によると考えられている。PARの同種脱感作には受容体のリン酸化や内在化、あるいはリガンド結合部位の不活性化が関与することが報告されている⁵⁻⁸⁾。このような受容体の同種脱感作の他に、異なる種類の受容体間で脱感作が起こる異種脱感作が知られているが、PARの異種脱感作についてはよくわかっていない。本研究では、ヒト耳下腺培養細胞 (HSY-EA1細胞) を用いてPAR-1とPAR-2間に起こる異種脱感作についての解析を行った。

材料および方法

1. 試薬類

PAR-2アゴニストペプチドであるSLIGKVはBachem (Bubendorf, Switzerland) から、牛血漿トロンピンは伊東ハム食品から、Fura-2アセトキシメチルエステル (Fura-2/AM) は同人化学研究所より入手した。

2. 細胞培養

ヒト耳下腺細胞株であるHSY-EA1細胞はDulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12Ham培地 (Sigma) に2mMグルタミン酸、100 μ g/mlのペニシリンとストレプトマイシンを加えた培地にて培養した⁹⁾。

3. 細胞内遊離カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 測定

HSY-EA1細胞は直径100mmのディッシュに 1×10^6 個、もしくは直径60mmのディッシュに 4×10^5 個の細胞を播種し、4~6日培養した。細胞は Ca^{2+} と Mg^{2+} を含まないリン酸バッファー (Gibco) でディッシュから遊離した後、20mMヘベス (pH7.4) と0.2%牛血清アルブミン (BSA) を添加したハンクス液 (HBSS-H) に懸濁した。細胞懸濁液に2 μ MのFura-2/AMを加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間振とうしたのち、新しいHBSS-Hに再懸濁し、使用まで室温で保持した。

Fura-2の蛍光強度は、蛍光光度計 (日立F2000) を用いて37 $^{\circ}$ Cで、340nmと380nmの励起光によって発生する510nmの蛍光強度を測定した。 $[Ca^{2+}]_i$ はGryniewiczらの方法¹⁰⁾に従って算出した。

4. PAR-1のRT-PCR分析

トライゾール (Gibco BRL) を用い、メーカーの指示するプロトコールに則って全RNAを抽出した。抽出したRNA (1mg) から、oligo-d(T)₁₆プライマー (Roche Molecular Biochemicals) と逆転写酵素 (東洋紡) を使ってcDNAを合成した。PAR受容体の各サブタイプのセンスおよびアンチセンスのプライマーは以下のとおりである。PAR-1: 5'-CTA GGT TGG TAG AGT TTA GCC C-3' (forward), 5'-TGA TCA GTT CAC AGC CAA TCC C-3' (reverse); ヒトのPAR-1 cDNA配列の1921~1942と2413~2434のヌクレオチドに対応。PAR-2: 5'-AAT GCT GCG ATC TTC TGC CAT G-3' (forward), 5'-CCT ACT GTG CAA TTC CCA TCT G-3' (reverse); ヒトのPAR-2 cDNA配列の948~969と1356~1377のヌクレオチドに対応。PAR-3: 5'-CGT CCA TCC TTT CAC CTA CCG G-3' (forward), 5'-TCT CTG TGA TGG CTG TCC TTG T-3' (reverse); ヒトのPAR-3 cDNA配列の729~750と1287~1308のヌクレオチドに対

応. PAR-4 : 5'-TCT ATG GTG CCT ACG TGC CCA-3' (forward), 5'-TTC TGA GGA CAC CAC CCA CAC TG-3' (reverse):ヒトの PAR-4 cDNA 配列の955~975と1313~1335のヌクレオチドに対応. 95°Cで10分のInitial denaturation stepに続いてPAR-1とPAR-3についての反応をGene Amp PCR system2400 (Perkin Elmer Biosystems) で, 94°Cで1分のdenaturation step, 64°Cで1分のannealing, 72°Cで1分のextension stepを30および35サイクル実行した. Final extension stepは72°Cで7分行った. GAPDHのRT-PCR分析のプライマーと条件はすでに述べられているとおりである¹¹⁾. PCR産物はエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲル(タカラ)を使用した電気泳動で分画し, ATTO Cool Severを使ったUVイルミネーターで分析した.

結 果

HSY-EA 1細胞に存在するPAR受容体のサブタイプを同定するためPAR-1, PAR-2, PAR-3, PAR-4それぞれに特異的なプライマーを用いてRT-PCR分析を行った. 各サブタイプに特異的なプライマーにより35サイクルでRT-PCRを行った結果, PAR-1とPAR-2の強いバンドが検出されたが, PAR-3とPAR-4は非常に微量であった(Fig. 1). PAR-3は30サイクルで増幅した時は検出できなかった(data not shown). 検出されたバンドのサイズはPAR-1で513bp, PAR-2で429bp, PAR-3で579bp, PAR-4で380bpであり予想通りの分子量であった. さらにPCR産物の制限酵素切断パターンから, それぞれのmRNAであることが同定された. これらのことからHSY-EA 1細胞にはPAR-1とPAR-2が主に発現しており, PAR-3とPAR-4はごくわずかしかな存在していないことが確認された.

PAR受容体に対するトロンビンとトリプシンの作用を明らかにするために, HSY-EA 1細胞をさまざまな濃度のトロンビンあるいはトリプシンで刺激した. HSY-EA 1細胞をPAR-1を活性化するトロンビン(0.2~20unit/ml)で刺激すると, 急激な一過性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がおこった. トロンビンによる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇のピーク

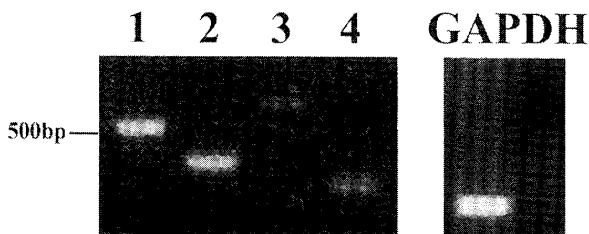


Fig. 1. RT-PCR analysis of PARs in HSY-EA1 cells. RT-PCR was performed using the primers specific to PAR-1 (lane1), PAR-2 (lane2), PAR-3 (lane3), PAR-4 (lane4) and GAPDH.

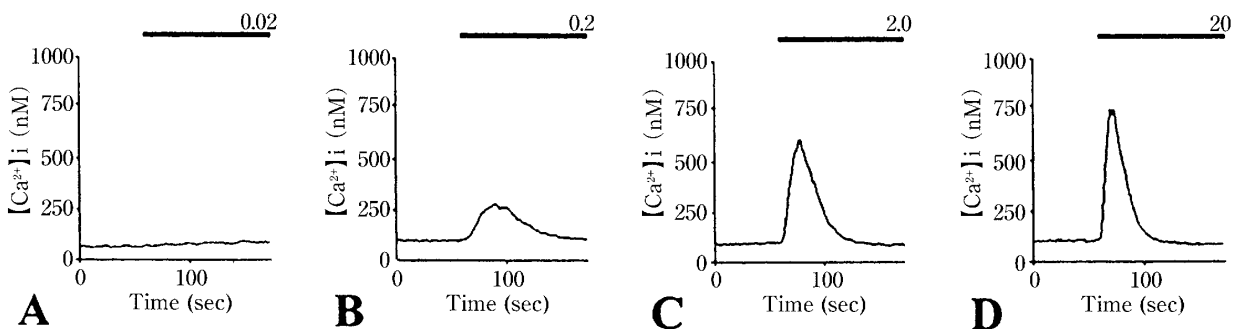


Fig. 2. Thrombin-induced Ca^{2+} mobilization in HSY EA 1 cells. The fura-2-loaded HSY-EA 1 cells were exposed to 0.02U/ml (A), 0.2U/ml (B), 2.0U/ml (C) and 20U/ml (D) of thrombin. The presence of thrombin in the medium is indicated by a horizontal bar.

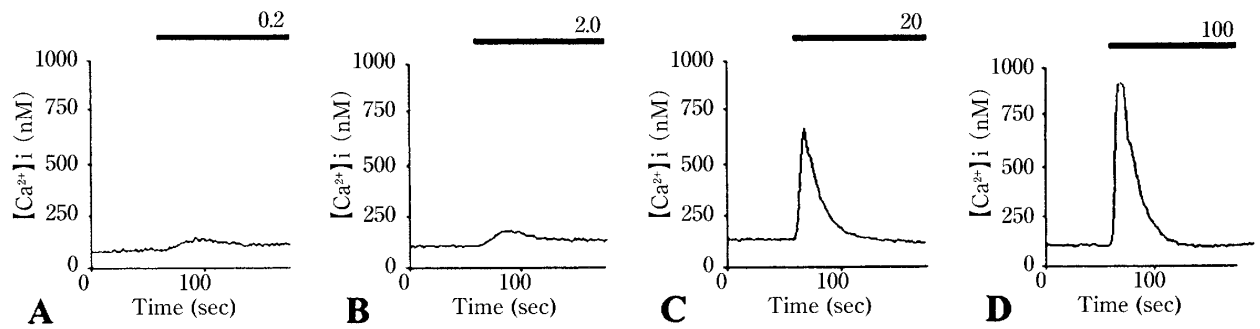


Fig.3. Trypsin-induced Ca^{2+} mobilization in HSY-EA 1 cells.

Fura-2-loaded HSY-EA 1 cells were exposed to 0.2U/ml (A), 2.0U/ml (B), 20U/ml (C) and 100 U/ml (D) of trypsin. The presence of trypsin in the medium is indicated by a horizontal bar.

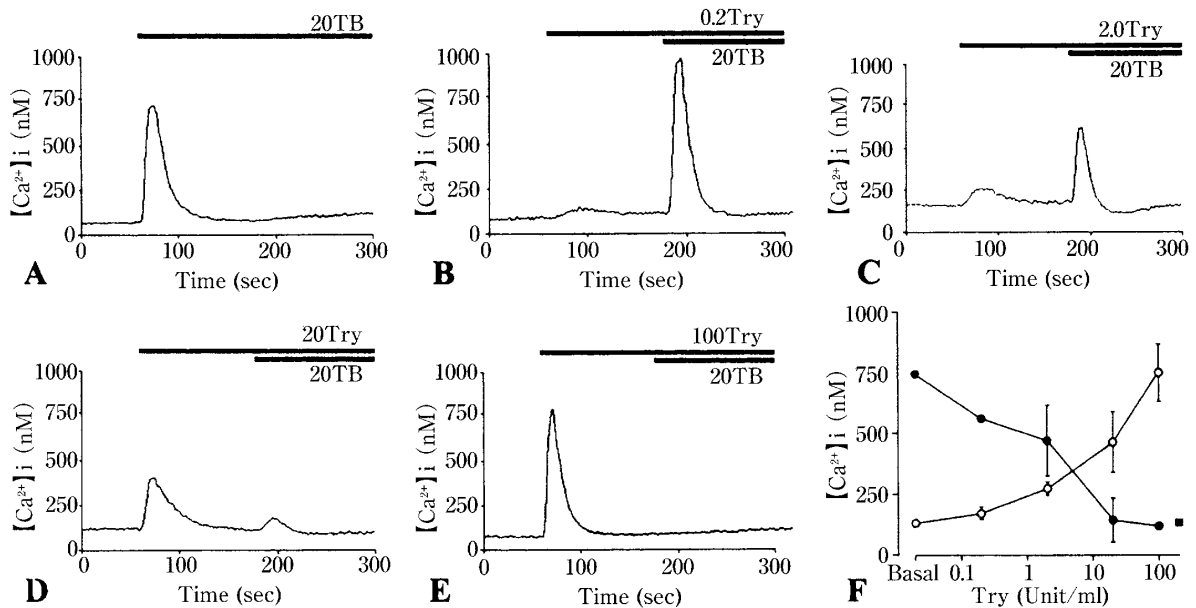


Fig. 4. Thrombin-induced Ca^{2+} responses in control (A) and trypsin-pretreated cells (B-E).

(A): Cells were stimulated with 20U/ml thrombin in the absence of trypsin pretreatment. (B) - (E): Cells were initially stimulated with 0.2U/ml (B), 2.0U/ml (C), 20U/ml (D), 100U/ml (E) of trypsin for 2min and were subsequently exposed to 20U/ml thrombin. The presence of trypsin and thrombin in the medium are indicated by a horizontal bar. (F): The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ above basal level after the first stimulation with various concentrations of trypsin (open circles) and after the second stimulation with 20U/ml thrombin (closed circles). Values shown are the mean \pm S.E. of six independent experiments.

の値はトロンビンの濃度に依存して増大するが、ピークから一分後ではいずれの濃度においても basal level まで低下しており、他のGタンパク質共役型受容体の刺激で見られるような一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇に続く持続相は認められなかった (Fig. 2A). HSY-EA 1 細胞を PAR-2 を活性化するトリプシン (0.2~100unit/ml) で刺激した場合も同様に濃度依存的な一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が観察された (Fig. 2B). このことから、トロンビンやトリプシンによる PAR 受容体

の活性化では、急激な Ca^{2+} 上昇に続いて受容体の脱感作が起こることが示された。

PAR-2 刺激が PAR-1 に与える影響を調べるため、HSY-EA 1 細胞に様々な濃度のトリプシン (0.2~100unit/ml) を 2 分間作用させた後、最大反応を起こす 20unit/ml のトロンビン刺激を行った。その結果、トロンビンによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇のピークの値は、前処置したトリプシンの濃度に依存して減少した (Figs. 3 & 4). このことから、トリプシンは PAR-1 を何らかの機

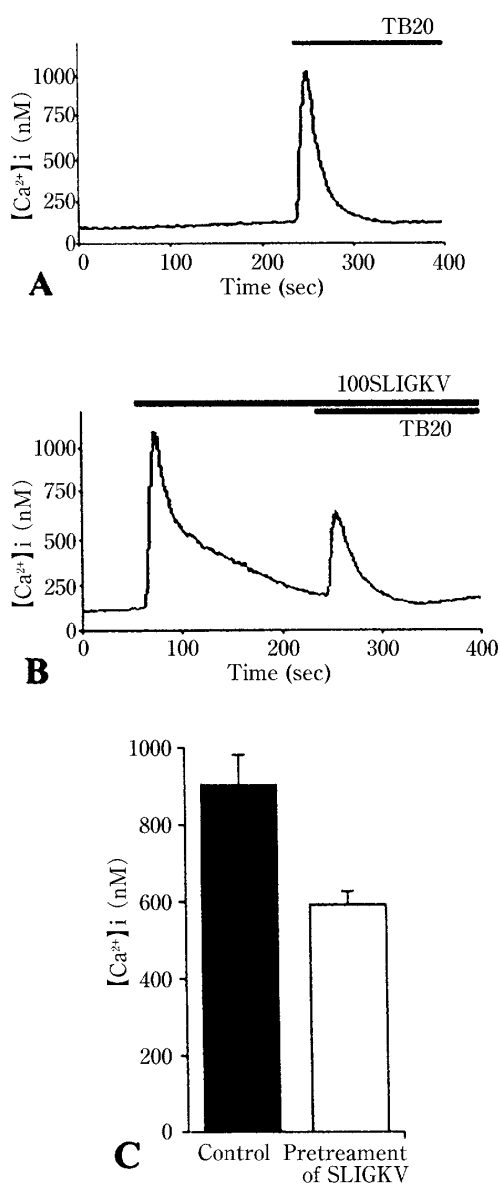


Fig.5. Effect of PAR-2 agonist peptide on the thrombin-induced Ca^{2+} responses. Thrombin-induced Ca^{2+} responses in the presence (A) and absence (B) of the pretreatment with PAR-2 agonist peptide (SLIGKV). The presence of SLIGKV (100U/ml) and thrombin in the medium are indicated by a horizontal bar. (C): Increases in $[Ca^{2+}]_i$ above basal level with or without pretreatment with 100 U/ml SLIGKV. Result shown are the mean \pm S.E. of ten independent experiments.

構で脱感作していることが示唆された。

PAR-1の脱感作がPAR-2の活性化によるものか、それともトリプシンのタンパク質分解作用によるものかを明らかにするために、PAR-2のアゴニストペプチドであるSLIGKVでHSY

-EA1細胞を前処置した3分後に最大反応を起こす20unit/mlのトロンビンを作用させた。前処置をしないコントロールと比較して、SLIGKVの前処置によりトロンビンの反応は~65%に減少した (Figs. 5& 6)。

考 察

本研究ではトロンビンやトリプシンがHSY-EA1細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を一過性に上昇させることを示した。トロンビンとトリプシンはPARを活性化して $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を起こすことが知られている。今回観察された $[Ca^{2+}]_i$ 反応は、一過性の急激な上昇とこれに続く速やかな脱感作というPARに特徴的な $[Ca^{2+}]_i$ 反応を起こした。HSY-EA1細胞ではPAR-1とPAR-2が強く発現していたことから、トロンビンとトリプシンはそれぞれPAR-1とPAR-2を介して $[Ca^{2+}]_i$ 反応を起こしたと考えられる。トロンビンはPAR-3とPAR-4に、トリプシンはPAR-4にも作用すると言われているが^{1,2)}、HSY-EA1細胞におけるPAR-3とPAR-4の発現量はごく少量であったことから、その影響はほとんど無いと考えられる。

本研究ではHSY-EA1細胞をトリプシンで前処置すると、トロンビンの反応が強く抑制されることを示した。トリプシンはPAR-2分子の細胞外ペプチド鎖を特定部位で切断することによって新しいN末端を露出させる。このN末端のアミノ酸配列 (SLIGKV) が受容体分子内のリガンド結合部に結合することによって $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応を誘起する。しかし、トリプシンがPAR-2のみでなくPAR-1にも作用して不活性化する可能性が考えられる。実際、PAR-1のリガンドのC末端にトリプシンの基質になる部分があることが知られている^{3,12)}。一方、PAR-2の活性化を介してPAR-1の脱感作が起こる可能性も否定できない。そこで、トリプシンがPAR-2の活性化を介してPAR-1を脱感作

するのか、それともPAR-1を酵素的に切断することによって不活性化するのかを確認するために、PAR-2のアゴニストペプチドであるSLIGKVを用いた実験を行った。SLIGKVはN末端のリガンド結合部分の配列に基づいて合成したペプチドであり、ペプチド鎖を切断することなく、PAR-2のリガンド結合部に直接結合して活性化する。SLIGKVでPAR-2を刺激した後にトロンビン刺激を行うと、トロンビンによる反応は最大で60%程度に抑制された。SLIGKVのPAR-2に対する特異性は高く、PAR-1には作用しないと考えられていることから¹³⁾、トリプシンはPAR-1の切断による不活性化のみではなく、PAR-2活性化によってPAR-1を抑制する異種脱感作を起こすことが示唆された。PARの同種脱感作機構には受容体の細胞内ドメインのリン酸化や内在化、リガンド部の不活性化が関与すると考えられている¹⁴⁻¹⁸⁾。一方、異種脱感作には異なるメカニズムの存在が示唆されている。ラット耳下腺腺房細胞ではATP前処置によってムスカリン受容体を介するカルシウム反応が強く抑制される異種脱感作が知られている。この脱感作ではATPによるP_{2z}受容体の刺激が、ホスホリパーゼDやプロテインキナーゼC(PKC)等のタンパクリン酸化酵素を介して、ムスカリン受容体を脱感作することが報告されている¹⁹⁾。PARにおいても上皮細胞でPKC-βの活性化を介して異なるサブタイプのPAR間に異種脱感作が起こるという報告がある²⁰⁾。HSY-EA 1細胞におけるPAR-1とPAR-2の間の異種脱感作にも同様な機構が働いている可能性が考えられるが、その詳しいメカニズムについては今後の検討が必要である。

今回の研究から、トリプシンによるPAR-1の直接的な作用と、PAR-2を介する異種脱感作によってトロンビンによるPAR-1の反応性を低下させることが明らかになった。最近、免疫系細胞から放出されるproteinase 3 (PR 3)

やhuman leukocyte elastase (HLE)、カテプシンGといったタンパク分解酵素がPAR-2を活性化することや、PAR-1を不活性化することが報告されている²¹⁾。これらのタンパク分解酵素の作用は、今回観察されたトリプシンの作用と基本的に同じと考えられる。今後は、PARの同種および異種脱感作のメカニズムを明らかにするとともに、その生理的重要性を含めて検討を行うことが必要と考えられる。

文 献

1. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC. : Cloning and characterization of human protease-activated receptor4. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 6642-6646, 1998.
2. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV Jr, Tam C, Coughlin SR. : A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* **394** : 690-694, 1998.
3. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. : Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* **53** : 245-282, 2001.
4. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. : Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64** : 1057-1068, 1991.
5. Tanimura A, Shitara A, Nezu A, Morita T, Tojyo Y. : Differential Ca²⁺ responses induced by thrombin and thrombin-receptor agonist peptides in HSY-EA 1 cells. *Cell Biol Int* **27** : 1017-1023, 2003.
6. Brass LF, Pizarro S, Ahuja M, Belmonte E, Blanchard N, Stadel JM, Hoxie JA. : Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization, and recycling. *J Biol Chem* **269** : 2943-2952, 1994.
7. Hoxie JA, Ahuja M, Belmonte E, Pizarro S, Parton R, Brass LF. : Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J Biol Chem* **268** : 13756-13763, 1993.
8. Woolkalis MJ, DeMelfi TM Jr, Blanchard N, Hoxie JA, Brass LF. : Regulation of thrombin receptors on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem*

- 270 : 9868–9875, 1995.
9. Morita T, Tanimura A, Nezu A, Tojyo Y : Visualization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type III with green fluorescent protein in living cells. *Cell Calcium* **31** : 59–64, 2002.
 10. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY : A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260** : 3440–3450, 1985.
 11. Mountian I, Manolopoulos VG, De Smedt H, Parys JB, Missiaen L, Wuytack F. : Expression patterns of sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and inositol, 1, 4, 5-trisphosphate receptor isoforms in vascular endothelial cells. *Cell Calcium* **25** : 371–380, 1999
 12. Kuliopulos A, Covic L, Seeley SK, Sheridan PJ, Helin J, Costello CE. : Plasmin desensitization of the PAR 1 thrombin receptor : kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. *Biochemistry* **38** : 4572–4585, 1999
 13. Kawabata A, Saifeddine M, Al-Ani B, Leblond L, Hollenberg MD. : Evaluation of proteinase-activated receptor-1 (PAR1) agonists and antagonists using a cultured cell receptor desensitization assay : activation of PAR 2 by PAR1-targeted ligands. *J Pharmacol Exp Ther* **288** : 358–370, 1999
 14. Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW. : Proteinase-activated receptors : novel mechanisms of signaling by serine proteases. *Am J Physiol* **274** : C1429–C1452, 1998.
 15. Hammes SR, Coughlin SR : Protease-activated receptor-1 can mediate responses to SFLLRN in thrombin-desensitized cells : evidence for a novel mechanism for preventing or terminating signaling by PAR 1' s tethered ligand. *Biochemistry* **38** : 2486–2493, 1999.
 16. Mizuno O, Hirano K, Nishimura J, Kubo C, Kanaide H. : Proteolysis and phosphorylation-mediated regulation of thrombin receptor activity in in situ endothelial cells. *J Pharmacol* **389** : 13–23, 2000.
 17. Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Trejo J. : beta -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *J Biol Chem* **277** : 1292–1300, 2002.
 18. Tiruppathi C, Yan W, Sandoval R, Naqvi T, Pronin AN, Benovic JL, Malik AB. : G protein-coupled receptor kinase-5 regulates thrombin-activated signaling in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** : 7440–7445, 2000.
 19. Fukushi Y. : Heterologous desensitization of muscarinic receptors by P_{2z} purinoceptors in rat parotid acinar cells. *Eur J Pharmacol* **364** : 55–64, 1999
 20. Yan W, Tiruppathi C, Lum H, Qiao R, Malik AB. : Protein kinase C beta regulates heterologous desensitization of thrombin receptor (PAR-1) in endothelial cells. *Am J Physiol* **274** : C387–C395, 1998.
 21. Uehara A, Muramoto K, Takada H, Sugawara S. : Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor2. *J Immunol* **170** : 5690–5696, 2003.