

受賞者

加治屋 勝子

山口大学大学院 医学系研究科 器官制御医科学講座 生体機能分子制御学

研究テーマ

血管病シグナル分子の反応の場である細胞膜ドメイン「膜ラフト」の可視化と
ナノ動態・機能解析

1. はじめに

狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患やくも膜下出血後の脳血管攣縮などの疾患は、合計すると我が国の死因の第2位を占める。これらの血管病の原因は二つあり、一つは、長い年月をかけて発症する動脈硬化であり、もう一つは、急性発症の血管攣縮、すなわち、血管平滑筋の異常収縮である。

正常な血管の収縮は、細胞質 Ca^{2+} 濃度によって調節されており、血圧維持に重要な役割を果たしている。細胞質 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、 Ca^{2+} はカルモジュリンと共同でミオシン軽鎖リン酸化酵素 (MLCK) を活性化し、活性化された MLCK が平滑筋ミオシン軽鎖 (MLC) をリン酸化すると、ミオシンが活性化され、アクチンとの滑り運動が可能となり、収縮が生じる。ミオシン脱リン酸化酵素 (MLCP) によって MLC が脱リン酸化されると、ミオシンは不活性化され、弛緩が起きる⁽¹⁾。これに対して、血管異常収縮は、Rho キナーゼを介した Ca^{2+} 非依存性の収縮で、 Ca^{2+} 非依存性に活性化された Rho キナーゼが、MLCP をリン酸化して不活性化し、結果的に MLC のリン酸化レベルを上昇させることによって異常収縮を引き起こす。Rho キナーゼは、低分子量 G 蛋白質の RhoA によって活性化される酵素として同定されたため、通常、RhoA/Rho キナーゼ系として議論されることが多い。しかしながら、RhoA は、G 蛋白質共役型受容体 (GPCR) を介して活性化され、GPCR アゴニストとしては、種々の生理的刺激が存在するため、血管異常収縮に特異的なシグナル伝達機構の上流分子として、RhoA が主要な分子とは考えにくい。そこで、RhoA や G 蛋白質を介さずに、特異的に Rho キナーゼを活性化するシグナル分子を探索した結果、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を同定した^(2, 3)。実際に、動物モデルにおいて、SPC を髄腔内に注入すると著明な脳血管攣縮を引き起こす。また、くも膜下出血の発症後に高率に起こる脳血管攣縮は予後を左右する重大な合併症であるが、タンデム型質量分析計を用いて髄液中の SPC 濃度を測定したところ、ヒトくも膜下出血患者の SPC 濃度は、対照群のくも膜下出血以外の疾患 (脳腫瘍、正常圧水頭症) 患者と比較して、異常に高値を示した⁽⁴⁾。これらの所見は、SPC が、血管異常収縮を引き起こす重要なシグナル分子であることを裏付けるものである。しかしながら、*in vitro*の実験系では、SPC は直接 Rho キナーゼを活性化しないことから、他のシグナル分子の介在が示唆された。我々は、この介在分子をスクリーニングし、Src ファミリーチロシンキナーゼの一種である Fyn を発見し、SP/Fyn/Rho キナーゼ系というシグナル伝達機構を明らかにした⁽⁵⁾。

SPC 刺激による血管異常収縮は、ヒトを含め複数の動

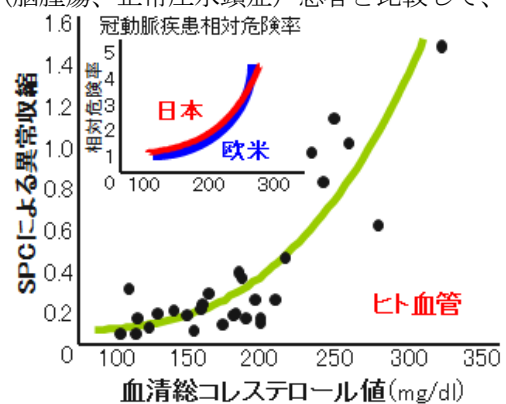


図 1. SPC によるヒトの血管異常収縮と血清総コレステロール値とは正相関しており、臨床メガスタディにおける「冠動脈疾患相対危険率」曲線と酷似している。

物種で観察されるが、血清コレステロール濃度が正常な動物やヒトの血管平滑筋では起こらず、血清コレステロール濃度が高い動物やヒトで観察されることを見出した (図 1)。すなわち、SPC による血管異常収縮は、血清総コレステロール値および LDL コレステロール値との間で正の相関関係を示し、HDL コレステロール値との間で負の相関関係を示した⁽⁶⁾。そこで、血管平滑筋の SPC 反応性に対するコレステロールの関与について、さらに検討した。・サイクロデキストリン (・-CD) 処理により、選択的にコレステロールを除去した血管平滑筋を用いて収縮実験をおこなったところ、SPC による収縮が抑制された。高 K⁺脱分極や、自律神経作動薬による収縮は、・-CD 処理で抑制されなかった。すなわち、血管平滑筋の SPC に対する反応性は、脂質異常症に伴う代謝性変化ではなく、コレステロールが直接的に血管平滑筋に作用することが明らかになった。

コレステロールは、細胞膜に均一に分布するのではなく、細胞膜上のマイクロドメインである膜ラフトに局限して蓄積する。膜ラフトとは、コレステロールやスフィンゴ脂質を主成分とする動的な膜ドメインであり、細胞内情報伝達分子が局在している⁽⁷⁾。・-CD 処理培養血管平滑筋細胞では、膜ラフトのマーカー蛋白であるカベオリン免疫染色や、膜ラフトに局在する糖蛋白の GM1 ガングリオシドに結合するコレラ毒素 B サブユニットの蛍光染色が著しく抑制され、膜ラフトの破壊が示唆された。また、・-CD 処理細胞において、SPC による Fyn および Rho キナーゼの細胞質から細胞膜への移動が抑制されたことから、Fyn や Rho キナーゼは、SPC 刺激によって細胞質から細胞膜上の膜ラフトに移動し、異常収縮のシグナル伝達をおこなうことが示唆された。すなわち、膜コレステロールを選択的に除去することで膜ラフトの消失と共に血管病シグナル伝達も遮断されることから、コレステロールが蓄積した膜ラフトが血管攣縮を引き起こすシグナル伝達の反応の場となっている可能性が高いと考えられた。

そこで、本研究では、膜ラフトを視覚化することで、ナノ動態・機能解析を行い、血管病のシグナル伝達経路を詳細に解析する事を目的とした。

2. 方法

膜ラフトは種々の細胞機能の反応の場であるため、従来の細胞や動物モデルを用いた実験系では、順粋に、ある特定の細胞機能における膜ラフトの役割を解析するのは困難である。この問題を解決するために、我々は、(1)独自に開発したハイブリッドリポソーム法を応用して、ラフトモデル膜を作製した。また、(2)モデル膜を用いて、膜ラフトの視覚化および血管異常収縮時のクラスター化に関する挙動について調べた。さらに、(3)膜ラフトと特定のシグナル分子との相互作用を純粋な実験系で検討した (図 2)。

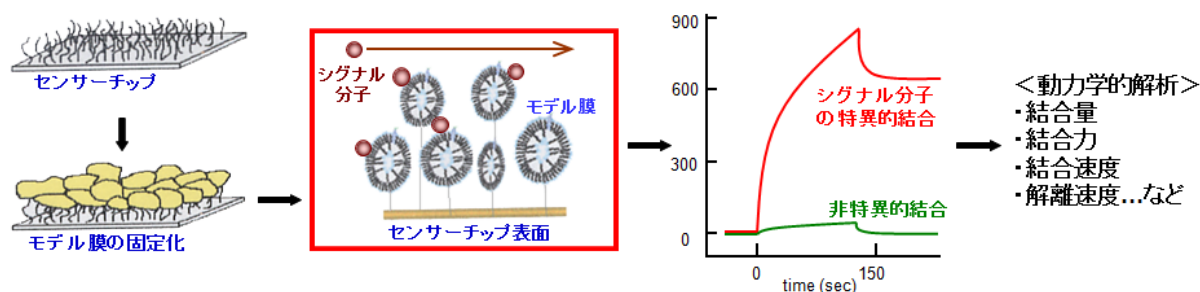


図 2. モデル膜に対する血管病シグナル分子の相互作用解析

3. 結果と考察

(1) ラフトドメインのモデル膜作製

コレステロールやスフィンゴミエリンを豊富に含むラフトドメインのモデル膜作製に成功した。これを、透過型電子顕微鏡を用いて形状観察をしたところ、直径 50-100 nm の球状小胞体形成を確認した。このモデル膜が、ラフトの機能を有している事を確認するため、ラフトモデル膜と、ラフトのマーカータンパクであるカベオリンとの結合性を分子間相互作用解析装置で調べる必要がある。そこで、遺伝子ベクターにより、カベオリンの発現・精製をおこなった。

(2) 膜ラフトの動態変化観察

SPC 刺激により、Fyn や Rho キナーゼが細胞質から膜ラフトへ移動すること、ラフトの形成（クラスター化）が顕著になること、を示唆する結果を得た。そこで、詳細なクラスター化現象の観察に必要な、種々の条件検討を行った。走査型電子顕微鏡による膜表面解析では、①非蒸着（試料を破壊しない）、②低加速電圧測定（微細形状の鮮明観察）、③三次元計測、が必要であることを明らかにした。また、原子間力顕微鏡による膜ラフト構成脂質分子の挙動解析には、①原子オーダーという極めて高い分解能、②膜最表面観測時間の縮小、③石英板への固定、④凹凸形状と位相像の同時取得、が必要であることを明らかにした。

(3) 分子間相互作用解析

分子間相互作用解析の一つとして、SPC を用いて膜ラフトとの親和性を調べたところ、膜中のコレステロール含有率が高くなるほど、SPC の結合性が増加する事を明らかにした。結合量のみならず、動力学解析を行った結果、膜中のコレステロール含有率に依存して、SPC が速く結合する事、SPC の結合力が強い事、一度膜に結合した SPC は、膜から離れにくい事を明らかにした。

4. まとめ

血管の異常収縮を引き起こす一連のシグナル伝達機構は、血管病の原因分子である SPC が、細胞膜の中でもコレステロールやスフィンゴミエリンを豊富に含む膜ラフトドメインに集積し、細胞質に局在している Fyn を膜ラフトの方へ移動して活性化する。さらに、活性化型の Fyn が、Rho キナーゼを膜ラフトへ移動させて活性化し、血管の異常収縮を引き起こす。一方、膜ラフトがない場合では、Fyn や Rho キナーゼが膜

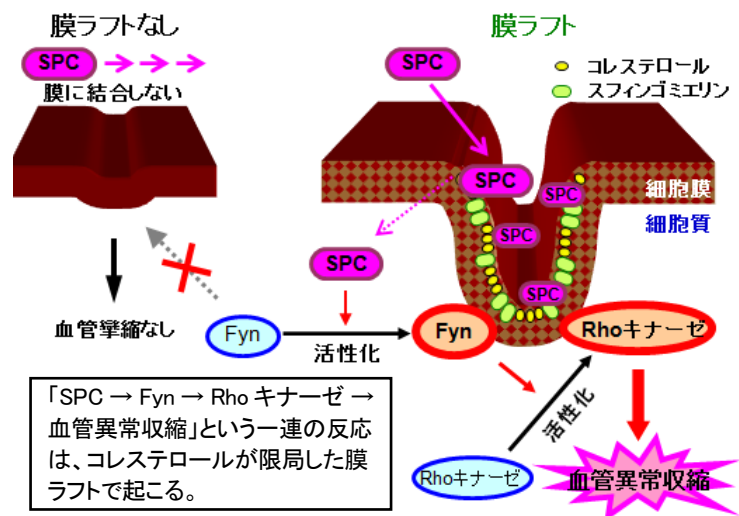


図 3. 膜ラフトは病的シグナル伝達の反応の場

へ移動できず、異常収縮が起こらない。つまり、膜ラフトが、血管異常収縮のシグナル伝達の反応の場であると言える（図 3）。しかしながら、この膜ラフトの詳細については不明瞭な点が多い。今後は、本研究で確立した実験条件や解析結果を基に、膜ラフトの全容解明に向けて、ラフトに局在するシグナル分子群のプロテオーム解析や、ラフト構成脂質の動態変化に伴うメタボローム解析を行い、血管異常収縮メカニズムを明らかにしていきたい。

最後に、本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました病態代謝研究会に深く感謝いたします。

5. 参考文献

- (1) Somlyo AP, Somlyo AV, *Physiol Rev* **83**: 1325-1358, 2003.
- (2) Todoroki-Ikeda N, Mizukami Y, Mogami K et al., *FEBS Lett* **482**: 85-90, 2000.
- (3) Shirao S, Kashiwagi S, Sato M et al., *Circ Res* **91**: 112-119, 2002.
- (4) Kurokawa T, *Yamaguchi Igaku* **54**: 13-22, 2005.
- (5) Nakao F, Kobayashi S, Mogami K et al., *Circ Res* **91**: 953-960, 2002.
- (6) Morikage N, Kishi H, Sato M et al., *Circ Res* **99**: 299-306, 2006.
- (7) Simons K, Ikonen E, *Nature* **387**: 569-572, 1997.