

論文の内容の要旨

論文題目 機械刺激負荷に対する細胞内 Ca^{2+} 応答機構に関する研究

氏名 佐野 稔

生体は常に様々な力を受けており、これをメカニカルストレスや機械刺激、力学刺激、物理刺激などと呼ぶ。生体には常に一定の重力がかかっており、生体が運動することでさまざまな部位への荷重が発生する。また生体外から力を受けるだけでなく、生理機能によって生体内部からの力学刺激負荷も発生している。たとえば、血管内腔面を覆う内皮細胞には血流による剪断応力が負荷され、その外周に位置する平滑筋細胞には拍動による伸張応力が負荷されている。このような力学刺激を細胞は何らかの手段をもって能動的あるいは受動的に認識し、組織・細胞の機能維を実現している可能性が強く示唆されている。内皮細胞や平滑筋細胞ではこのような力学刺激負荷が抗血液凝固物質や細胞増殖因子の産生、血管構造の弛緩・収縮といった機能に直接的な関与があることもわかってきた。血管だけでなく、筋肉や骨の代謝メカニズムへの関与、軟骨細胞での分化・脱分化制御などメカニカルストレスに対する細胞や組織の生理学的挙動についての研究が注目を浴びるようになり、Mechano-transduction や Mechano-biology として認知されるに至っている。

メカニカルストレスが生体の形態形成、機能維持に大きな役割を果たしているということは次第に明らかになってきたが、細胞がメカニカルストレスを感知してから最終的に生理学的な応答を示すに至るまでのメカニズム(シグナル伝達経路)の全容はまだ解明されていない。中でも応答経路での上流域、すなわち細胞に備わっていると想定されるストレスセンサーについては不明な点が多い。この受容機構は機械受容体(Mechano-receptor, Mechano-sensor)、機械感受性がある(Mechano-sensitive)と表現され、いくつかのモデルが提案されてきた。

本研究で着目したのは GTP 結合タンパク質(G タンパク)ーホスホリパーゼ(PLC)活性化経

路である。メカニカルストレスによって G タンパクや PLC の活性が導かれることは、内皮細胞や平滑筋細胞、心筋細胞などを用いた実験で報告されている。しかしながら活性化された PLC から細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇にいたる情報伝達を媒介するセカンドメッセンジャーであるイノシトール 1,4,5 トリスリン酸 (IP_3) のメカニカルストレスに対する挙動を直接に証明した報告はない。メカニカルストレスに応答する Ca^{2+} 濃度上昇は、ストレスの負荷に対して瞬時に上昇してから数分程度持続し、時間による勾配をみせる。また細胞内や細胞間で濃度勾配が発生するため時間的・空間的な挙動解析が有効である。これはそのまま IP_3 にも当てはまると考えられ、 IP_3 を検出するプローブ開発および Ca^{2+} との同時測定の実現、メカニカルストレス負荷環境下での測定などが求められている。

本研究の目的を次に示す。

1. Ca^{2+} および IP_3 のリアルタイム計測を実現する
2. メカニカルストレス負荷による IP_3 応答の有無を探る
3. メカニカルストレス負荷による Ca^{2+} の IP_3 依存性を探る
4. メカニカルストレス負荷による Ca^{2+} 波の IP_3 依存性を探る

本研究では蛍光イメージングによる IP_3 の可視化を試みた。生きた細胞でのシグナル伝達を観察するためのイメージング技術が急速に発達しており、green fluorescent protein (GFP) の変異体が盛んに使用されている。細胞内シグナル伝達研究において GFP を用いることの利点の一つは、cDNA がすでに単離されており、細胞内で産生させられる点である。GFP に機能タンパク質を融合させた複合タンパク質を産生させ、蛍光の局在変化を利用して機能タンパク質の移動を可視化するという実験手法を適用した。PLC- $\delta 1$ のプレクストリン相同ドメイン (PHD) は IP_3 の前駆体であるホスファチジルイノシトール 4,5 ビスリン酸 (PIP_2) と強く結合することが知られており、GFP と PHD との融合タンパク質を細胞に産生させることで、受容体刺激に応じて細胞膜から細胞質へと移動する GFP を観察する。本研究では GFP と PHD の融合について、GFP の N 末端に PH domain が結合される PHD-GFP と C 末端に結合される GFP-PHD とをコードする遺伝子ベクターを独自に作製し、また東京大学医学研究科の廣瀬博士より提供いただき、各種の細胞での機能発現を比較した。図1に代表例を示す。PHD-GFP では細胞質中に GFP による蛍光が均一に分布し、GFP-PHD では細胞膜への局在が確認された。PHD-GFP ではタンパク質同士をつなぐリンカー設計の不調もしくは GFP の N 末端の堅さが影響し、機能タンパクがフォールディングされなかったためと推定される。これ以降の実験

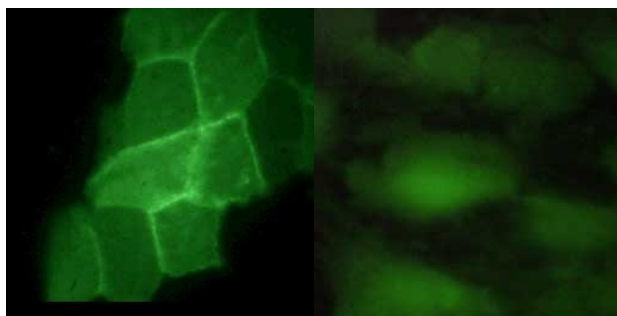


図1 左)GFP-PHD 右)PHD-GFP

では GFP-PHD を使用した. PHD が PIP_2 だけでなく IP_3 とも結合することができること, また, PHD-PIP_2 間より PHD-IP_3 間での親和性がより高いために, 細胞質中の IP_3 濃度が上昇すれば PHD は PIP_2 との結合が競合的に外れて IP_3 に結合することで結果的に GFP の局在変化が引き起こされていることが報告されている.

先に述べたように血管内皮細胞ではその機能保持へのメカニカルストレスの関与は様々に示されている. しかしながら, 遺伝子導入を試みるには導入効率の低さ, 細胞毒への過敏性などの問題により十分な実験効率が期待できないため, 本研究では腎臓尿管由来の細胞株である Mardin-Darby Canine Kidney Cells (MDCK) を使用した. 腎臓内では血液や体液が循環し, 細胞表面の物質交換も盛んであるため, その上皮細胞である MDCK はストレス応答性が高いと予想したが, Stretch や Poking に対して鋭敏な応答を確認することができた.

薬剤刺激負荷実験

GFP-PHD の細胞への導入にはリポソーム系試薬を用いた. 導入後 24~36 時間を経て細胞での発現を GFP の蛍光強度および膜近傍への局在によって確認し, 薬剤刺激付加実験および機械刺激負荷実験を行った. Ca^{2+} 指示薬として Fura-2 を使用し 380nm で励起した.

GFP-PHD が IP_3 の挙動を正確に追隨しているかを調べるため, ATP による薬剤刺激負荷実験を行った. ATP は P_2 レセプターに受容され G タンパク, PLC の活性化を導くので, IP_3 の局在変化が予想される. 結果は図2に示すように, ATP 添加後即座に, 細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と並行して IP_3 が産生されていることが確認された.

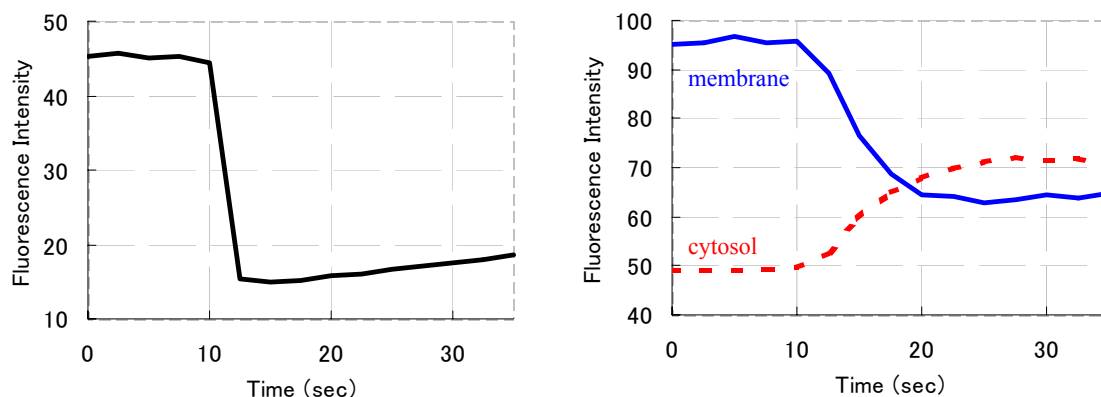


図2 蛍光強度変化. 左) Fura-2 右) GFP-PHD. 10 秒経過時点で ATP を負荷

各種の阻害実験での結果を図3に示す. PLC を阻害するため U-73122 で細胞を前処理して ATP を負荷すると, IP_3 の局在変化はみられなかった. PLC の阻害により IP_3 が産生していないと考えられるので, GFP-PHD は細胞内での IP_3 産生の有無を確かに指示している. また Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こす Ca^{2+} 源を細胞内小胞体と細胞外液とに区別し, それぞれ Thapsigargin による小胞体 Ca^{2+} 枯渇と細胞外液からの Ca^{2+} 除去 (HEPES(-)) によって阻害した. 結果は Ca^{2+}

濃度ではそれぞれ減少と上昇が観察されたのと対照的に、IP₃の局在変化に伴う蛍光強度変化はほぼ同じ上昇率をみせた。ここでCa²⁺源の枯渇はIP₃産生を直接に阻害するものではないが、controlと比較すると1/3程度の上昇率であった。このことはPLC阻害実験と同様に、GFP-PHDは細胞内でのIP₃産生を確かに指示していることを示しており、またIP₃の産生は細胞内外のCa²⁺源が同時に存在することで促進されることがわかった。

IP₃の非活性化をPLC阻害ではなく、産生されたIP₃を側から分解する阻害法を試みた。正常な細胞ではIP₃はセカンドメッセンジャーとしての役割をおえると、IP₃ホスファターゼによって脱リン酸化されるが、このIP₃ホスファターゼをコードするベクターを人為的に過発現させた。結果は図3にあるようにIP₃の局在変化が強く抑制されている。PLCによる阻害と比較してIP₃の産生が抑制されている点では共通であるが、Ca²⁺濃度変化が異なることがわかった。この理由に関しては不明である。

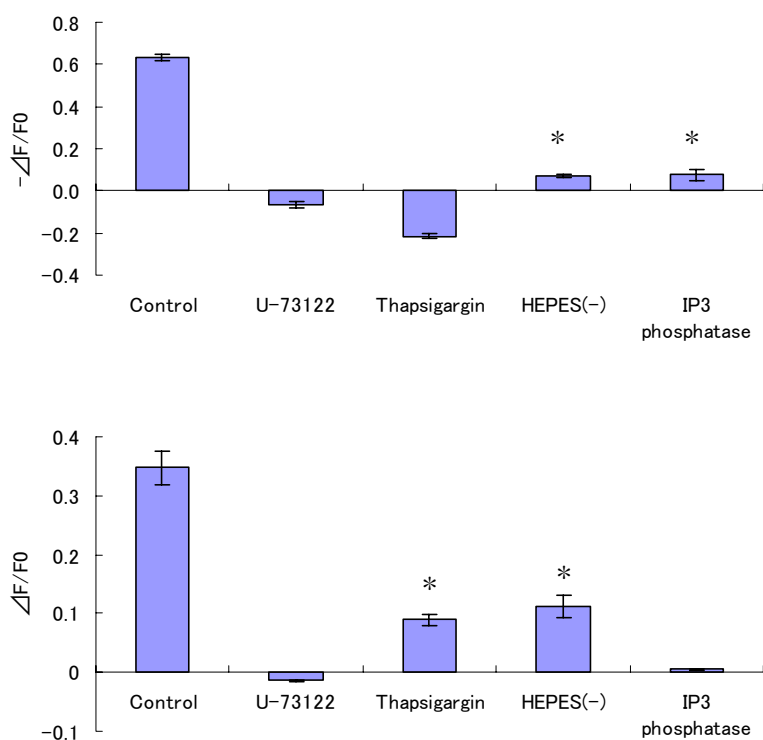


図3 上)ATP 刺激後 10 秒での変化率. Mean±S.E.M. (n = 3 to 15) *P < 0.001

下)ATP 刺激後 50 秒間での変化率の最大値. Mean±S.E.M. (n = 3 to 15) *P < 0.001

機械刺激負荷実験

GFP-PHD を発現させた細胞へ機械刺激を負荷し、応答を観察した。機械刺激には二通りの方法を試みた。一つはガラス管から作製したピペットによる、瞬間的な細胞表面の変形である(Poking)。ピペット先端形状は細胞を貫通しないよう丸めてあり、20μm 程度の直径である。他方はシリコンシート上へ播種した細胞への瞬間的な一軸引張負荷である(Stretch)。Stretch

では Ca^{2+} 上昇を導き易く、細胞非破壊であるひずみ量として 20%を予備実験の結果から選択した。Poking は細胞膜を刺激し、Stretch は細胞基底膜を伸張していると考えられるが、ATP 負荷に比較するとその上昇幅は小さいものの両者とも有意な IP_3 濃度上昇がみられた(図4)。これは IP_3 産生を引き起こす機械受容体が細胞膜に広く発現している可能性を示唆している。この可能性を検証すべく、U-73122を用いた PLC 阻害、 IP_3 ホスファターゼによる IP_3 分解を試みた。PLC 阻害では IP_3 の産生は全く確認されず、刺激負荷直後の Ca^{2+} 上昇は見られなかった(図5)。また、 IP_3 ホスファターゼを発現させた細胞での Ca^{2+} 応答率は control に比較して大きく減少した(図6)。これらの結果は IP_3 産生を引き起こす機械受容機構が存在し Ca^{2+} 濃度上昇に強く関与していることを示唆している。一方で原核細胞ではすでに同定されている Stretch activated チャンネル(SA チャンネル)は細胞膜への伸張刺激によって機械的に開口するとされるが、このイオンチャンネルの関与について調べた。SA チャンネルの特異的な阻害剤である Gd^{3+} で処理した細胞へ Poking を負荷したところ、 Ca^{2+} 上昇率は有意な減少はみられなかった。これらのことから Ca^{2+} の初期応答に関しては SA チャンネルとされる関与はあまりなく、 IP_3 の関与が大きいことが示された。

IP_3 産生からシグナル伝達を遡ると PLC 活性化、小分子 G タンパク活性化の順になる。機械刺激負荷によって G タンパクが活性化されることは以前にも提唱されてきたが、本研究でも G タンパクの関与について検証を行った。阻害方法として、G タンパクの PLC- β との結合部位へアンタゴニストとして作用するペプチドをベクター導入により細胞内へ多量に産生させる競合的阻害を試みた。このペプチドは小分子 G タンパク

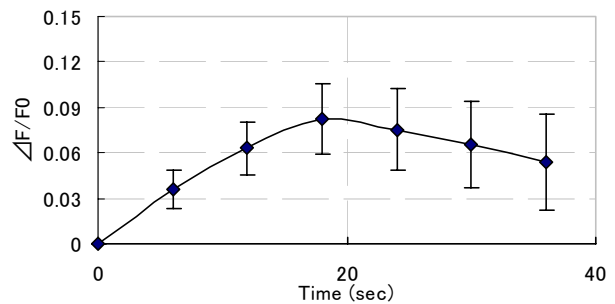


図4 Poking に対する GFP-PHD の蛍光強度変化
Mean ± S.E.M., n = 7 to 9

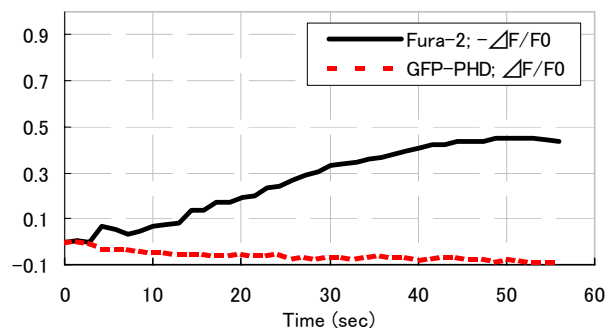


図5 PLC 処理を施した細胞での Poking に対する蛍光強度変化。

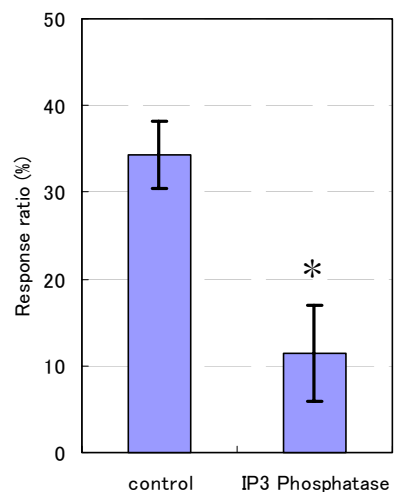


図6 Stretch に対する Ca^{2+} 応答率
Mean ± S.E.M (n=4) * p<0.05

グループの中で G_q および G_{11} へ作用し、 IP_3 の代謝物である IP の産生が有意に減少したとする報告がある。Poking に対する Ca^{2+} 応答率を計算したところ有意な減少がみられた(図7)。このことから、小分子 G タンパクグループでは G_q もしくは G_{11} の機械受容機構への関与が示唆される。

単一細胞へ Poking を負荷すると、負荷された細胞に引き続いて周辺細胞へと Ca^{2+} 濃度上昇が伝播していく Ca^{2+} 波がよく知られている。本研究では GFP-PHD を用いて IP_3 の挙動を調べたところ、周囲の細胞でも IP_3 産生がみられ、伝播していくことがわかった。また IP_3 ホスファターゼを発現させた周辺細胞では Ca^{2+} 上昇率は強く減少することがわかった(図8)。これにより Ca^{2+} 波は IP_3 波ともいふべき IP_3 の伝播によって引き起こされることが示された。

以上の結果から、GFP-PHD を用いた IP_3 動態の時

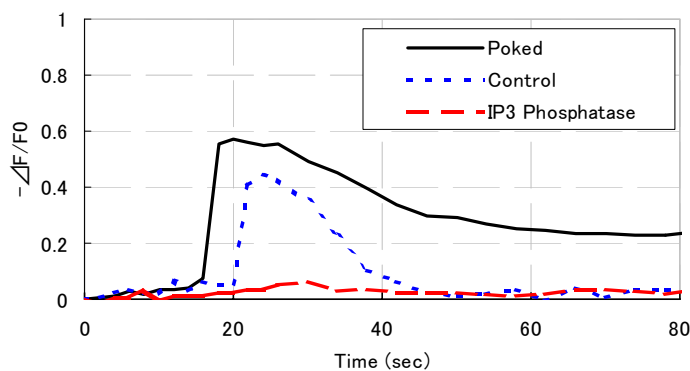


図8 Poking に対する Ca^{2+} 応答の伝播. 上) 蛍光強度の経時変化 右) 最大変化率の平均. Mean \pm S.E.M. (n = 9 to 10) *P < 0.001

間的・空間的な解析および Fura-2 染色の併用による Ca^{2+} 濃度との同時測定が可能であることがわかった。この実験系では Poking や Stretch の負荷に対する Ca^{2+} , IP_3 応答の観察が可能であり、刺激を負荷された細胞とその周辺細胞では Ca^{2+} , IP_3 の上昇および伝播が観察された。また阻害実験により IP_3 産生が Ca^{2+} 上昇を導くことが強く示唆されている。これは近年報告された機械刺激の負荷によって ATP が何らかの機構によって放出され、オートクリン・パラクリン的に作用するとするモデルと対立するものではない。なぜなら先に述べたように ATP の作用により IP_3 は産生されるからである。しかしながら本実験で検証した ATP 負荷による IP_3 の上昇率と機械刺激によるそれとは大きく異なっているため、詳細の解明が期待される。

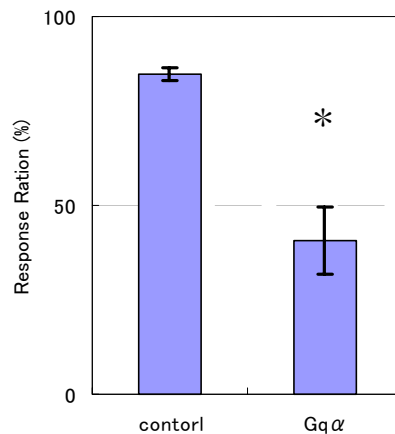


図7 Poking に対する Ca^{2+} 応答率 Mean \pm S.E.M (n = 3 to 5) *P < 0.01

