

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590948

研究課題名（和文）血管内皮カルシウム流入制御関連分子の細胞内動態イメージングとその生理的意義の解明

研究課題名（英文）Imaging of intracellular dynamics of Ca<sup>2+</sup>-influx-associated molecules and its physiological significance in endothelial cells.

研究代表者

一色 政志（ISSHIKI MASASHI）

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：70302734

研究成果の概要（和文）：培養血管内皮細胞において、Stim1は細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアの枯渇に応じて細胞内分布がダイナミックに変化し、その発現量は細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入サイズ調節を介してeNOS活性化・NO産生とリンクする。さらに、血管内皮特異的Stim1ノックアウトマウスにおいて、フェニレフリンによる収縮反応の増強、アセチルコリンによる内皮依存性血管弛緩反応の低下、血圧上昇が認められた。以上より、Stim1はeNOS/NO系を介して血管内皮機能を制御し、血圧調節に関与している事が証明された。

研究成果の概要（英文）：Intracellular Stim1 localization dynamically changes in response to Ca<sup>2+</sup> store depletion and its expression level is linked to eNOS activation and NO production via regulation of Ca<sup>2+</sup> influx level in cultured endothelial cells. We further analyzed endothelium specific Stim1 null mice and confirmed enhanced vascular contraction by phenylephrine, diminished endothelium-dependent vascular relaxation by acetylcholine, and elevation of blood pressure. Thus, Stim1 play a role in blood pressure regulation via eNOS/NO system and endothelial function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

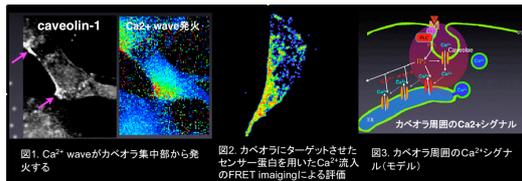
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：シグナル伝達・細胞生物学・循環器・高血圧・イメージング・マイクロドメイン

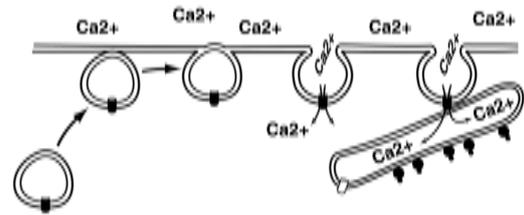
1. 研究開始当初の背景  
カルシウムイオン（Ca<sup>2+</sup>）は多岐にわたる生命現象を制御するセカンドメッセンジャー

であり、時・空間構成調節により細胞機能の多様性を発揮する。我々は、内皮細胞膜カベ

オラがストア依存性Ca<sup>2+</sup>流入部位でありNO産生とリンクする事(Isshiki et al. J Biol Chem, 2002)、カベオラ局在がERからのCa<sup>2+</sup>放出部位を制御する事(Isshiki et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1998)(Isshiki and Anderson Cell Calcium, 1999)、カベオラは外界の状況に応じてCa<sup>2+</sup>シグナル調節分子を伴って細胞内を移動しCa<sup>2+</sup>シグナル開始点を変化させる事(Isshiki et al. J Cell Sci, 2002)などを明らかにしてきた(図1・2・3)。



これら一連の研究成果からカベオラがCa<sup>2+</sup>シグナル調節分子複合体であると同時にCa<sup>2+</sup>それ自体のコンテナとして働くものと考えられる。我々は、このカベオラがカルシウム(Ca<sup>2+</sup>)トランスポートソームとして機能し、カベオラの細胞膜との融合・離脱によりCa<sup>2+</sup>流入が調節される **secretion coupling model** を提唱している(Isshiki and Anderson, Traffic, 2003)(図4)。このモデルは、量子的流入調節・流入部位の制御に都合がよい。実際、Ca<sup>2+</sup>流入チャネル候補であるTRPサブタイプ **TRPC1** がカベオラに同定された事は我々の仮説を支持する。また、ずり応力によってカベオラから開始するATP依存性Ca<sup>2+</sup>反応とP2x受容体との関連を共同研究で解析し(Yamamoto et al. Nat Med, 2006)、カベオラに複数のCa<sup>2+</sup>調節因子が存在する可能性を示した。最近2005年以降、ストア依存性Ca<sup>2+</sup>流入に関わる **Stim1** と **Orai1** という分子が同定され、その機能の重要性について特に注目されている。STIM1はER膜上に存在して細胞内Ca<sup>2+</sup>センサーとして働き、それに応じて膜上のOrai1とダイナミックに共局在してCa<sup>2+</sup>流入チャネルを形成するという。しかしながら、血管内皮細胞におけるそれら分子による局所Ca<sup>2+</sup>制御システム存在の有無、カベオラやTRPチャネルとの空間的および機能的な関連、心血管病などの病態に関する情報は極めて乏しく、我々の一連の研究の延長線上にこれら未解決の問題への糸口があると考えられる。



#### 【secretion coupling model】(図4)

膜カベオラ(=Ca<sup>2+</sup>トランスポートソーム)は必要に応じて細胞膜と融合・解離し、膜上のチャネルの外部への露出を介して量子的細胞内Ca<sup>2+</sup>流入をその局在により制御する。

#### 2. 研究の目的

本研究では、内皮細胞におけるStim1, Orai1, TRPC1の空間的制御と内皮機能・病態との関連の解明を目的として、以下(1)~(6)について細胞分子生物学的手法、FRETイメージングなどを駆使して検討する。

- (1) 血管内皮細胞内Ca<sup>2+</sup>ストア依存性Stim1, Orai1, TRPC1の局在・動態・分子間相互作用とカベオラとの関連。
- (2) 内皮細胞ストア依存性Ca<sup>2+</sup>流入に参与するコンポーネントの機能評価。
- (3) Ca<sup>2+</sup>トランスポートソームの構成分子・調節分子の同定・機能解析。
- (4) Stim1, Orai1, TRPC1の量・空間的制御を介した局所Ca<sup>2+</sup>の変化と内皮機能(NO産生・透過性・増殖・アポトーシス)に及ぼす影響。
- (5) カベオラの膜融合によるCa<sup>2+</sup>流入調節機構の評価。
- (6) 心血管病・代謝疾患内皮機能におけるStim1, Orai1, TRPC1, caveolin1の役割

#### 3. 研究の方法

- (1) 血管内皮細胞内Ca<sup>2+</sup>ストア依存性Stim1, Orai1, TRPC1の局在、動態、分子間相互作用とカベオラとの関連を、蛍光蛋白タグ融合、ウエスタンブロットティング、免疫蛍光染色、共焦点レーザー顕微鏡によって確認する。

(2) 内皮細胞ストア依存性Ca<sup>2+</sup>流入に寄与するコンポーネントをsiRNAを用いて培養細胞系で評価する。

(3) Stim1の量・空間的制御を介した局所Ca<sup>2+</sup>の変化と内皮機能 (NO産生)に及ぼす影響を蛍光NOセンサーDAF2を用いて評価する。

#### 4. 研究成果

(1) 培養内皮細胞において共焦点顕微鏡やウェスタンブロッティングにより以下の結果を得た。

① 内皮細胞において Stim1、Orail が内因性に発現する

② GFP-Orail および Stim1-TagRFP を発現させた細胞は、非刺激時にはそれぞれ細胞膜及び小胞体上に比較的びまん性に存在し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストア枯渇刺激に応じて Orail と Stim1 はよりシャープな斑状の分布へとダイナミックに移行し、両者が膜直下において共局在するように変化した。

③ Stim1 の過剰発現、ノックダウンは SOCE およびそれに伴う NO 産生をそれぞれ増大、減弱した。一方、Stim1 の発現量は ATP 刺激による細胞内ストアからの放出には影響を与えなかった。また、Stim1 を siRNA を用いてノックダウンした細胞では Ca<sup>2+</sup>流入刺激により誘導される eNOS の S1179 リン酸化、T497 脱リン酸化のいずれも抑制された。

以上より細胞内 Ca<sup>2+</sup>ストアに応じて内皮細胞における Stim1 と Orail はその局在をダイナミックに変化させ、両者の時・空間的な相互作用を介して SOCE に関与する。特に、Stim1 は細胞外からの Ca<sup>2+</sup>流入量を調節し、eNOS リン酸化にリンクして内皮機能制御に関与する可能性がある。

(2) また、生体内における Stim1 の血管内皮制御を解明するため、血管内皮特異的 Stim1 ノックアウトマウス (cKO) を作出し、血管内皮機能および血圧への影響を解析し、以下の結果を得た。

① Stim1 cKO マウスから単離培養した大動脈内皮細胞における Stim1 の発現は定量的 RT-PCR 法およびウェスタンブロッティング法により発現が著しく低下していることが確認された。

② Stim1 cKO マウスから単離培養した大

動脈内皮細胞において、SOCE 刺激に対する Ca<sup>2+</sup> 流入および eNOS の活性化抑制が認められた。

③ 10 週令の cKO マウス由来大動脈ではフェニレフリンによる収縮が有意に増強し、アセチルコリンによる内皮依存性血管弛緩反応は低下していた。さらに、10 週令の cKO マウスにおいて明期収縮期血圧の有意な上昇を認めた。

以上より Stim1 は eNOS/NO 系を介して血管内皮機能を制御し、血圧調節に関与している事が培養細胞および個体レベルで証明された。

(3) 膜直下カベオラ小胞内 Ca<sup>2+</sup>動態を評価するために、GFP 変異体キメラである Ca<sup>2+</sup>センサー蛋白カメレオンの変異体 D1 をカベオラ内に発現させるために、1 回膜貫通型蛋白である LOX-1 の細胞外領域である C 端に D1 を融合した蛋白をコードするコンストラクトを作成し、LOXD1 として以下の結果を得た。

① LOXD1 は主に細胞外膜表面にほぼ一様に発現し、細胞辺縁ではカベオラマーカーである caveolin-1 の分布と共局在した。

② 細胞膜直下 LOXD1 は、細胞外 Ca<sup>2+</sup> の有無にかかわらず ATP 刺激により一過性に Ca<sup>2+</sup>レベルが減少する事を検出した。

③ ATP 刺激でカベオラ内 Ca<sup>2+</sup>が有意に減少することがピロアンチモン酸法でも確認された。

以上より内皮細胞膜直下ではカベオラ小胞が IP<sub>3</sub>産生に応じて Ca<sup>2+</sup>放出可能なストアとして働く事が示された。これは ER ストレスを惹起しうる小胞体 Ca<sup>2+</sup>ストアからの放出を回避し、局所に効率よく Ca<sup>2+</sup>を供給する内皮機能制御システムの存在を意味する。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

① 一色政志ほか FRET 法およびピロアンチモン酸法によるカベオラ小胞内 Ca<sup>2+</sup>イメージング 第 85 回日本内分泌学

会総会 2012年4月21日 (名古屋)

- ② 一色政志ほか 内皮細胞膜直下カベオラ小胞は  $\text{Ca}^{2+}$ 放出可能な  $\text{Ca}^{2+}$ ストアサブコンパートメントとして機能する 第49回日本臨床分子医学会学術集会 2012年4月14日 (京都)
- ③ 一色政志ほか A FRET-based Sensor Detects Caveolae are Spatially Distinct  $\text{Ca}^{2+}$  Stores in Endothelial Cells. 第76回日本循環器学会学術総会 2012年3月17日 (福岡)
- ④ Masashi Isshiki et al. Intra-Endoplasmic Reticulum (ER)  $\text{Ca}^{2+}$  Flow Recharges Preferentially to ER Subcompartments at Caveolin-Rich Cell Edges in Endothelial Cells American Heart Association, Scientific Meeting Sessions, 2011年11月13日 (Orlando, FL)
- ⑤ 一色政志ほか 内皮細胞膜直下カベオラは  $\text{Ca}^{2+}$ 放出のためのストアとして働く 第34回日本高血圧学会総会 2011年10月22日 (宇都宮)
- ⑥ 西本光宏、一色政志 ほか Stim1 は血管内皮細胞において  $\text{TNF}\alpha$  刺激による LOX-1 発現を制御する 第34回日本高血圧学会総会 2011年10月22日 (宇都宮)
- ⑦ 一色政志ほか Intra-ER  $\text{Ca}^{2+}$  flow recharges preferentially to ER subcompartments at caveolin-rich cell edges in endothelial cells. 第84回日本内分泌学会総会 2011年4月21日 (神戸)
- ⑧ 一色政志ほか 内皮細胞膜カベオラ集中部位での  $\text{Ca}^{2+}$  wave 発火には局所  $\text{IP}_3$  産生開始とダイナミックな局所 ER 内  $\text{Ca}^{2+}$ 調節機構の存在を伴う 第33回日本高血圧学会総会 2010年10月15日 (福岡)
- ⑨ 西本光宏、一色政志 ほか血管内皮細胞における Stim1 はストア依存性  $\text{Ca}^{2+}$ 流入を制御して eNOS 活性とリンクする 第32回日本高血圧学会総会 2009年10月1日 (大津)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一色 政志 (ISSHIKI MASASHI)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：70302734

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

水野 理介 (MIZUNO RISUKE)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：30273080