

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570152

研究課題名(和文)

血流センサー P2X4 受容体のダイナミクス制御のイメージング解析

研究課題名(英文)

IMAGING ANALYSIS OF CELL SURFACE P2X4 RECEPTOR UP-REGULATED BY FLOW SHEAR STRESS

研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI TAKESHI)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40402565

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞に発現している ATP 作動性チャネル P2X4 は、血流ずり応力変化依存的な Ca^{2+} 流入に働き血流センサーとして機能する。その反応には細胞外 ATP を必要とすることから P2X4 分子は細胞膜上に局在すると考えられたが、定常状態ではそのほとんどが細胞内小胞に存在していた。さらに、リガンド刺激やずり応力刺激を受けた際、多くの P2X4 分子は細胞膜上へ移行した。P2X4 による血量感知における正のフィードバック調節機構の存在が示された。

研究成果の概要(英文)：P2X4 receptor, a non-selective ATP-operated cation channel, in vascular endothelial cells (ECs) mediates flow-induced Ca^{2+} influx and subsequent NO production to regulate vascular tone. Although P2X4 is thought to be activated by the ATP released into the extracellular space from ECs by shear stress, our fluorescence microscopic observation in ECs without shear stress showed that majority of P2X4 molecules is localized on the intracellular vesicles. In this study we found that the expression level of cell surface P2X4 of ECs is up-regulated by shear stress, leading to an apparent increase in the sensitivity to external ATP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：血流、P2X4、細胞内輸送、イメージング、機械刺激感知

1. 研究開始当初の背景

血流による shear stress (ずり応力) は、血管系の恒常性維持に大きな役割を果たしており、血管の再構築・心臓の発生・動脈硬化発症などの関連が知られている。血管内皮細胞は、血流の shear stress を感知し、血管平滑筋を介し血圧・血流の調節を行うが、その感知の仕組みは完全には理解されていない。Shear stress は一種の機械刺激であり、

強度・方向といったベクトル情報を含む。従って、内皮細胞はその刺激の感知とともに、ベクトル情報を保持しながら細胞内でシグナル伝達し応答反応を行うと考えられる。実際、shear stress に誘起される細胞内 Ca^{2+} 流入に関しても、細胞膜の微小陥入構造物であるカベオラが濃縮している部分や細胞の辺縁部が開始点になることが報告されており、空間情報を内包したものになっている。

近年、血管内皮細胞に発現した P2X4 が、shear stress 変化に応じて誘起される Ca²⁺流入に中心的な役割を果たすこと、すなわち、血流センサーとして機能していることが明らかにされた。さらに、P2X4 欠損マウスの解析により、P2X4 が、個体レベルでも血流増加による血管拡張反応や血流変化により誘導される血管のリモデリングに働いていることが確認されている。P2X4 は膜 2 回貫通分子で、膜上で ATP 作動性の 3 量体のカチオンチャンネルを形成するが、細胞レベルでの血流センサー制御の詳細は不明である。

2. 研究の目的

内皮細胞の shear stress 変化依存的な Ca²⁺流入には細胞外 ATP が必要とされることから、当初、P2X4 は細胞膜上に局在すると考えられた。しかし、予備的な解析では、定常状態では、ほとんどの P2X4 は細胞内の小胞に存在し、細胞膜上の発現量は極微量で通常の顕微鏡観察法では検出できなかった(図1)。従って、P2X4

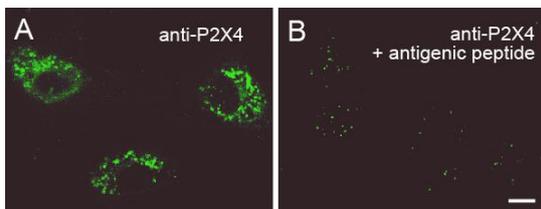


図1. 血管内皮細胞は主に細胞内小胞上に局在している。(A)抗P2X4抗体による蛍光染色した細胞の共焦点観察象。(B)コントロール画像。バーは、10 μm。

は、定常状態では細胞内プールに存在し、血流センサーとして機能する際に細胞内小胞より細胞膜へ移行する、と考えられた。本研究の目的は、(1) 実際に、この P2X4 の膜移行の亢進が shear stress に対する応答反応時に起きているのか? イメージング法や生化学的手法を用いて多角的に検証すること。また、(2) 1 分子計測法を用い、これまで捉えられていなかった細胞膜上の P2X4 分子を可視化し、その動態調節の解明を試みる。さらに、(3) 血流刺激のベクトル情報の感知・増幅・保持に対する P2X4 のダイナミクスの寄与を検討し、細胞膜上でのチャンネルの局在化を解析することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 生化学的手法では、先ず、細胞膜を透過しないビオチン化試薬により、氷上で細胞膜上に存在する P2X4 分子をビオチン化し、細胞を可溶性・P2X4 分子を免疫沈降した後に SDS-PAGE、Western immunoblotting 法により P2X4 分子(全体)とビオチン化した分子を分離・定量し、膜表面上の P2X4 分子量を測定した。イメージング法では、細胞に GFP 融合

P2X4 分子を発現させ、全反射蛍光顕微鏡を用いることにより P2X4 分子の膜移行、P2X4 分子を含む細胞内小胞の細胞膜への融合を可視化した。さらに、電気生理学的な手法としてパッチクランプ・ホールセル記録法を用いた。(2) においては、同じく、細胞に発現させた GFP 融合 P2X4 分子を全反射蛍光顕微鏡と画像増強装置+高感度カメラを用いて 1 分子レベルで可視化した。そして、その画像から、P2X4 分子の運動、蛍光強度分布(会合の程度)を解析した。(3) においては、カベオラ・マーカーとともに、Halo-tag を融合した P2X4 分子を細胞に発現し、Halo-tag を蛍光標識したのち、1 分子レベルで同時観察し、それらの局在を検討した。

4. 研究成果

(1) 先ず、血管内皮細胞における内在性 P2X4 と遺伝子導入により発現を誘導した P2X4 と GFP 融合 P2X4(P2X4-GFP) の発現を Western immunoblotting 法により確認した

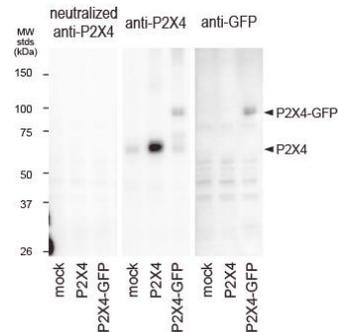


図2. 血管内皮細胞における内在性 P2X4 と遺伝子導入により発現誘導した P2X4-GFP の発現。

(図2)。その結果、P2X4-GFP の発現は、内在性 P2X4 分子の~2 倍の量であった。

次に、生化学的に、リガンド刺激前後の細胞膜上に存在する P2X4 の量を調べた。その結果、1 μM 以上の ATP で、刺激直後よりビオチン化された P2X4 分子、すなわち、細胞膜上の P2X4 分子量が 1.5~2 倍に増加した(図3)。

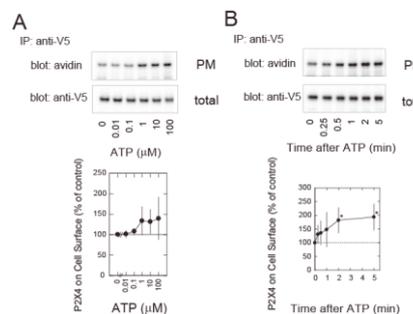


図3. 生化学的に調べた ATP 刺激により誘導された細胞膜上の P2X4 の増加。(A)濃度依存性。(B)経時変化。

細胞に shear stress(ずり応力)を負荷した際も、

同様な結果が得られた(図4)。

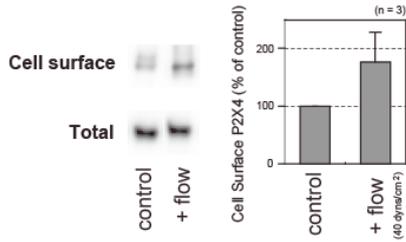


図4. 生化学的に調べた shear stress により誘導された細胞膜上の P2X4 の増加。

次に、全反射蛍光顕微鏡を用い P2X4 分子の細胞膜への移行を観察し解析した。定常状態の細胞においても、細胞膜に近い P2X4-GFP 分子を含む小胞が細胞膜に近づき(輝点の蛍光強度が明るくなり)、その後、細胞膜に融合する様子が観察された(図5)。この小胞の細胞膜へ

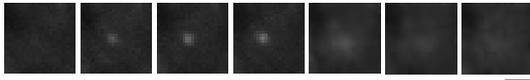


図5. 全反射蛍光顕微鏡により観察された P2X4-GFP を含む小胞と細胞膜との融合の様子(2秒間隔)。内皮細胞の細胞膜においてリガンド刺激や shear stress により著しく誘導された。Bar は、1 μ m。

の融合の頻度は、ATP 刺激や shear stress により処理直後より亢進した。同時に、細胞膜上の蛍光強度も上昇した。これらの観察から、細胞内小胞上の P2X4 分子が刺激依存的に膜移行することにより、細胞膜上の P2X4 が増加することが示唆された。

次に、実際にその膜移行した P2X4 分子がチャネルとして機能を発現しているか、電気生理学的に調べた。その結果、細胞膜上の P2X4 機

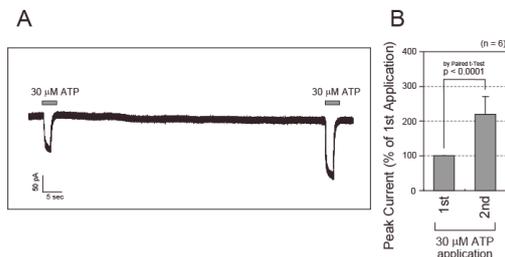


図6. ホールセル・パッチクランプ法で得られた ATP 刺激依存的な P2X4 チャネルの応答。2回目の刺激で優位な電流変化の亢進が確認された。また、P2X4 を発現していない細胞ではこの電流変化は認められなかった。

能レベルでも刺激依存的な亢進が確認された(図6)。

Shear stress に誘導される P2X4 を含む小胞の細胞膜への融合や細胞膜上の P2X4 量の増加は、細胞外 ATP を枯渇させることにより抑えられた。一方、ATP 以外の UTP によっても、細胞膜上の P2X4 の量は増加した(図7)。従って、P2X4 の膜移行は、細胞外の ATP が必要であり、その ATP は血管内皮細胞に発現している P2Y₄、あるいは P2Y 受容体を介して誘導されることが示唆された。

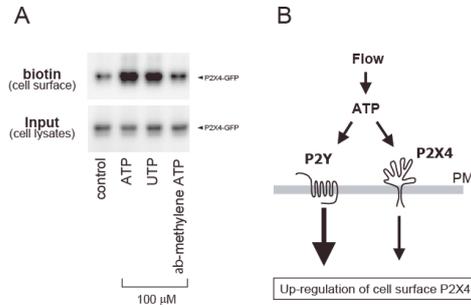


図7. Shear stress による P2X4 分子の膜移行へのシグナル伝達経路。(左) UTP 刺激による膜移行の促進。(右) 模式図。

(2) 細胞膜上の P2X4 分子の動態を解析するために、P2X4 分子を 1 分子レベルで可視化した。定常状態において細胞膜直下にも P2X4 を含む小胞が見られた。加えて、細胞膜上には蛍光強度から判断して 3 量体の P2X4 チャネルが観察された。ほとんどのチャネルは、早い単純拡散運動を示していた(図8)。細胞をリガンド刺激

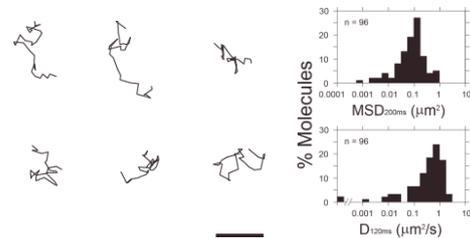


図8. 細胞膜上の P2X4 分子の運動。(左) 定常状態における細胞膜上の 1 秒間の軌跡。バーは、1 μ m。(右) 平均二乗変位と拡散係数の分布。細胞膜上の P2X4 分子のほとんどは早い拡散運動を行っていた。

した場合や Shear stress を負荷した場合、細胞膜上の P2X4 分子の運動に変化は見られなかった。また、3 量体より大きい会合体の形成も認められなかった。

(3) 細胞膜の微小陥入構造物であるカベオラとの相互作用を解析するために、カベオラ・マーカーと P2X4 分子の同時観察を行ったが、P2X4 分子のカベオラとの共局在は見られなかった(図9)。この結果は、電子顕微鏡を用いた解析によっても裏付けられた。

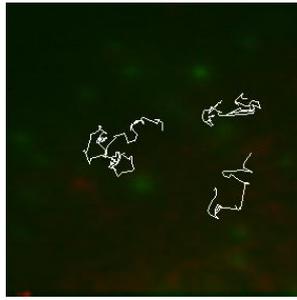


図9. 細胞膜上の P2X4 分子(白い軌跡)とカベオラ(緑)。P2X4 分子のカベオラとの特異的な共局在は見られなかった。

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 3 件)

- ① Kobayashi T, Sokabe M: Sensing substrate rigidity by mechanosensitive ion channels with stress fibers and focal adhesions. *Curr Opin Cell Biol.* 22:669-676, 2010. (査読有)
- ② Hachiya A, Sriwiriyanont P, Kobayashi T, Nagasawa A, Yoshida H, Ohuchi A, Kitahara T, Visscher MO, Takema Y, Tsuboi R, Boissy RE: Stem cell factor/KIT signaling plays a pivotal role in regulating pigmentation in mammalian hair. *J. Pathol.* 218:30-39, 2009. (査読有)
- ③ Adachi N, Kobayashi T, Takahashi H, Kawasaki T, Shirai Y, Ueyama T, Matsuda T, Seki T, Sakai N, Saito N: Enzymological analysis of mutant protein kinase C γ causing spinocerebellar ataxia type 14 and dysfunction in Ca²⁺ homeostasis. *J. Biol. Chem.* 283:19854-19863, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 曾我部正博、早川公英、小林 剛、辰巳仁史 「細胞・基質接着部位におけるメカトランスダクション：受動力覚から能動力覚へ」 BMB2010(第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会 合同大会 ワークショップ 1W6 「機械的ストレスの感知と疾患」2010 年 12 月 7 日-10 日 神戸

- ② Kobayashi T, Sokabe M “Single molecule imaging of signaling molecules and ion channels in living cells.” The 36th International Congress of Physiological Science, Satellite Symposium #8: Cardiac Electro-mechanical function, Cell-Organ Cross-Talk Revealed via Integration of Experiments and Models. Naoshima, Kagawa, Aug. 2-4, 2009.

- ③ 小林 剛、Fernando Lopez-Redondo、武田美江、田中瑞奈、古家喜四夫、山本希美子、安藤譲二、曾我部正博 Flow-induced up-regulation of cell surface P2X4 channels. 第 BMB2008 (第 81 回日本生化学会大会・第 31 回日本分子生物学会年会 合同大会) 2008 年 12 月 9 日-12 日 神戸

- ④ 小林 剛、Fernando Lopez-Redondo、武田美江、田中瑞奈、古家喜四夫、山本希美子、安藤譲二、曾我部正博 「流れ刺激により誘導される P2X4 チャンネルの細胞膜への移行」第 45 回日本生物物理学会年会 2008 年 12 月 3 日-5 日 福岡

[図書] (計 2 件)

- ① 小林 剛 「全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) を用いたイメージング」、 「組織細胞化学 2008」 日本組織細胞化学会, 137-147 (2008)
- ② 小林 剛 「細胞膜」 神谷 律、尾張部克志 編集 「ベーシックマスター 細胞生物学」 オーム社第 5 章, pp90-111 (2009)

[その他]

ホームページ等

[http:// www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/physiol2)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 剛 (KOBAYASHI TAKESHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：40402565

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし