

表1 先天性筋ジストロフィー

遺伝形式	病型	遺伝子	遺伝子産物	遺伝子座	OMIM number
X染色体劣性	デュシェンヌ型	<i>DMD</i>	dystrophin	Xp21.2	300377
	ベッカー型	<i>DMD</i>	dystrophin	Xp21.2	300377
	エメリ・ドレフス型	<i>EMN</i>	emerin	Xq28	300384
常染色体劣性	福山型	<i>FCMD</i>	fukutin	9q31	607440
	メロシン欠損症	<i>LAMA2</i>	laminin α -2 chain	6q22-q23	156225
	インテグリン欠損症	<i>ITGA7</i>	integrin α -7	12q13	600536
	ウーリッヒ型	<i>COL6A2</i>	collagen VI	21q22.3	120240
	筋・眼・脳(MEB)病	<i>POMGNT1</i>	POMGNT1	1p34-p33	606822
	Walker-Warburg病	<i>POMT1</i>	POMT1	9q34.1	607423
	肢帯型				
	LGMD2A	<i>CAPN3</i>	calpain-3	15q15.1-q21.1	114240
	LGMD2B(三好型)(遠位型)	<i>DYSF</i>	dysferlin	2p13	603009
	LGMD2C	<i>SGCG</i>	γ -sarcoglycan	13q12	253700
	LGMD2D	<i>SGCA</i>	α -sarcoglycan	17q12-q21.33	600119
	LGMD2E	<i>SGCB</i>	β -sarcoglycan	4q12	600900
	LGMD2F	<i>SGCD</i>	δ -sarcoglycan	5q33	601411
	LGMD2G	<i>TCAP</i>	telethonin	17q12	604488
LGMD2H	<i>TRIM32</i>	putative E3 ubiquitin ligase	9q31-q34.1	254110	
LGMD2I	<i>FKRP</i>	fukutin related protein	19q13.3	606596	
常染色体優性	肢帯型				
	LGMD1A	<i>MYOT</i>	myotilin	5q31	604103
	LGMD1B	<i>LMNA</i>	laminin A/C	1q21.2	150330
	LGMD1C	<i>CAV3</i>	caveolin-3	3p25	601253
	LGMD1D	不明	不明	7q	603511
	顔面肩甲上腕型 筋ジストロフィー	不明	不明	4q35	158900
	筋強直性ジストロフィー	<i>DMPK</i>	myotonic protein kinase	19q13.2-q13.3	605377
	筋失調症	<i>SGCE</i>	ϵ -sarcoglycan	7q21	604149

OMIM number : 各遺伝子異常に関する文献などは, The National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 参照.

■: 拡張型心筋症の原因遺伝子および原因遺伝子産物でもある.

POMGNT1 : protein O-mannose beta 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase.

POMT1 : protein O-mannosyltransferase.

細胞や myotubes における細胞内 Ca^{2+} 濃度測定が行われ, 非収縮時にも細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇しているとの報告が多くなされた^{1,4)}. しかしながら, 同じ測定法を用い, Ca^{2+} 濃度は正常細胞と有意差がないとの報告もまた多くあり^{1,5)}. 蛍光シグナルのキャリブレーション, 細胞単離法の相違, 細胞の収縮活性の有無などいくつかの問題点もあって結論は必ずしも明確

ではない. しかしながら, 最近, 電気生理学的に Ca^{2+} -activated K^+ channel 活性を測定することにより, *mdx* 単離筋細胞では細胞膜直下の Ca^{2+} 濃度が, コントロールの3倍程度大きいことを間接的に推定した報告がなされ⁶⁾, また, エクオリンを細胞内コンパートメントに発現させて Ca^{2+} 濃度を測定し, *mdx* myotubes では筋小胞体内の Ca^{2+} 濃度が正常細胞よ

り有意に大きいことが報告された⁷⁾。これらの結果から、Dys 欠失筋細胞の細胞質 Ca²⁺濃度は、低いレベルではあるが持続的に上昇していると考えられるようになった。この Ca²⁺調節の異常が、機械的ストレスに対する細胞膜の脆弱性にどの程度寄与するのか明らかではないが、持続的な Ca²⁺濃度上昇は、筋細胞の形質転換を引き起こす可能性が高く、Dys 欠失筋細胞の脆弱性の一部は、この形質の転換を反映する可能性がある。また、Dys 欠失筋細胞では、Ca²⁺依存性プロテアーゼであるカルパインの活性上昇が観察されており⁸⁾、カルパインの活性化による細胞膜機能蛋白質の構造変化も、細胞の脆弱性や膜透過性異常を引き起こし得る。Dys 欠失により起こる Dys 複合体の異常が、筋細胞変性を引き起こす機序はいまだ不明であるが、細胞 Ca²⁺調節の異常がこの病態の発症にかかわる最も重要なファクターであると考えられている。

筋細胞変性への関与が想定される Ca²⁺流入チャネル

上述の細胞 Ca²⁺濃度異常は、筋細胞膜を介する Ca²⁺流入の増大に起因する可能性が高く⁹⁻¹⁴⁾、これには、Ca²⁺を特異的に輸送する電位非依存性の Ca²⁺ leak チャネルと伸展刺激で活性化され、生理的イオン条件下では主に Ca²⁺を透過させる non-selective カチオンチャネルの関与が提唱されている。表2は、これらの Ca²⁺流入チャネルの性質を示す。Steinhardt らのグループは、*mdx* マウスや DMD 患者骨格筋からの myotubes では、Ca²⁺ leak チャネルの開口確率が有意に上昇していることを報告している¹⁰⁾。このチャネルは、電位依存性チャネル阻害薬である nifedipine で活性化され、また、カルパインの阻害薬はこのチャネル活性を抑制し、細胞内 Ca²⁺濃度異常を正常化させるという¹⁵⁾。彼らは、このチャネルのプロセッサを合成し、これを Dys 欠失筋細胞に投与すると、カルパイン活性化が抑制され、かつ、細胞内 Ca²⁺濃度異常が正常化するとも報告している^{8,16)}。また、このチャネルは、正常な筋細胞では、細胞内 Ca

ストアが枯渇したときに活性化される“store-operated Ca²⁺チャネル”の性質をもつという¹⁷⁾。このようなデータに基づき、Steinhardt らは、このチャネルの活性化と筋細胞変性に関し以下のユニークな機序を提唱している¹⁶⁾。すなわち、Dys 欠失筋細胞では筋活動により細胞膜の微小部分で物理的な破損が起こり、このため障害部位局所の細胞内 Ca²⁺濃度が上昇する。上昇した Ca²⁺はカルパインを活性化し、その蛋白分解作用が Ca²⁺ leak チャネルを活性化して Ca²⁺流入をさらに促進し、ついに、細胞膜の自己修復が追いつかず筋細胞変性に至るというものである。この解釈は大変興味深い、かなり speculative なものであり、今後さらに、このチャネルの実体の解明とこれを用いたくわしい検討が必要である。Franco and Lansman らは、*mdx* myotube や単離筋細胞では、この Ca²⁺ leak チャネルは観察されないと報告しており、Ca²⁺ leak チャネルの活性化とこれを介する Ca²⁺流入は、細胞変性により生じた二次的な現象ではないかと述べている¹¹⁾。

Franco and Lansman らは、2種の機械的刺激感受性(mechano-sensitive)チャネルを *mdx* myotube と単離筋細胞を用いて同定した^{9,11)}(表2)。ひとつは、ストレッチ刺激で活性化されるチャネル(stretch activated ion channel; SA-channel)であり、他方は、ストレッチ刺激で活性が抑制されるチャネル(stretch-inactivated channel; SI channel)である。しかし、その後の検討で彼らは、これらのチャネル活性は、同一のチャネルが測定条件などの違いにより異なったモードで作動した結果である可能性が考えられると述べている¹⁸⁾。いずれにせよ、彼らは筋活動に際し、このチャネルを介して過剰の Ca²⁺流入が起こり、病態を引き起こすと考えている。一方、Vandebrouck らは、DMD 患者の単離筋細胞において SA チャネルとよく似たチャネルの存在を報告している¹⁹⁾。最近、われわれもまた、Dys 複合体の成分である δ -sarcoglycan (SG)の遺伝子異常²⁰⁾により筋ジストロフィーおよび心筋症を発症する BIO14.6 ハムスターから調製した myotubes を用い、この病的細胞では、Ca²⁺透過性の

表2 筋変性に関与するチャネル

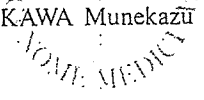
	活性化因子(剤)	阻害因子(剤)	イオン透過性	コンダクタンス	備考
stretch-activated (SA) channel	ストレッチ	Gd ³⁺ (<5 μM)	Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	7(Ca ²⁺)~19(Ba ²⁺)pS	P ₀ ; mdx > normal (文献 11)
	ストレッチ	Gd ³⁺ (<5 μM)	Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	8(Ca ²⁺)~20(Ba ²⁺)pS	P ₀ ; BIO > normal (文献 14)
	ストレッチ	Gd ³⁺		10(Ca ²⁺)pS	P ₀ ; DMD myotube > normal (文献 19)
stretch-inactivated (SI) channel		ストレッチ	Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	8(Ca ²⁺)~17.5(Ba ²⁺)pS	P ₀ ; mdx > normal (文献 9)
Ca leak channel	カルバイン Nifedipine (50 μM <)	ジヒドロピリジン系 薬物 (AN1043 など)	Ca ²⁺	12(Ca ²⁺)pS	P ₀ ; mdx > normal (文献 8-10, 15-17)
Ca leakage activity			Ca ²⁺	2~16 pS	P ₀ ; mdx > normal Ach receptor 活性と関係? (文献 25)
TRPC1 TRPC4	Ca ²⁺ Storeの枯渇 Ca ²⁺ Storeの枯渇		Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	16 pS* 17.5 pS**	(文献 21) (文献 21)
GRC	ストレッチ, Ca ²⁺	Gd ³⁺ (<5 μM) ルテニウムレッド	Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺	83(K ⁺)pS? (膜電位 > 0 mV の範囲) (村木ら未発表)	translocation (文献 22-24)

* : 文献 26

** : 文献 27

non-selective カチオンチャネルが活性化状態にあり、正常な細胞に比べてその開口率が数倍増加していることを明らかにした¹⁴⁾(表2)。このチャネルは伸展刺激で活性促進され、この際、BIO14.6 myotubes への⁴⁵Ca²⁺ 流入も促進された。したがって、Dys 欠損だけのみならず、δ-SG 欠損でも SA チャネルの活性化が観察されたわけである。これら以外にも、チャネル蛋白質のアンチセンスオリゴを用いた検討から、store-

operated Ca²⁺チャネル活性を示す Transient receptor potential (TRP)チャネルファミリーに属す TRPC1, TRPC4 が、mdx 骨格筋における異常な Ca²⁺流入に関与する可能性が報告された²¹⁾。しかしながら、これらのチャネルの筋変性への寄与などは未検討である。



ストレッチ感受性, Ca²⁺透過性カチオンチャンネルの同定と筋変性における役割の検討

われわれは最近, Dys または δ -SG を欠失するジストロフィー心筋および骨格筋の細胞膜に高発現し, ストレッチ刺激で活性化され, 生理的なイオン条件下で Ca²⁺を輸送する non-selective カチオンチャンネル (Growth factor regulated channel ; GRC または TRPV2 と呼称される) をクローニングした²²⁾. これまで, 哺乳動物の SA チャンネルはクローニングされて

いなかったもので, ショウジョウバエの機械刺激感受性チャンネル(NompC)や哺乳動物の TRP スーパーファミリーのうち系統樹上(図 1A)で近縁関係にあり, 熱などの物理的的刺激で活性化される TRPV ファミリーに着目し, 後者のいくつかのメンバー間で保存された部位(図 1B)を標的に多重プライマーを作成し, PCR を行った. さらに, 得られた DNA セグメントを用いて, low stringency の条件下でマウス心臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングした. この方法で単離した cDNA はほとんど GRC であった. GRC は, スト

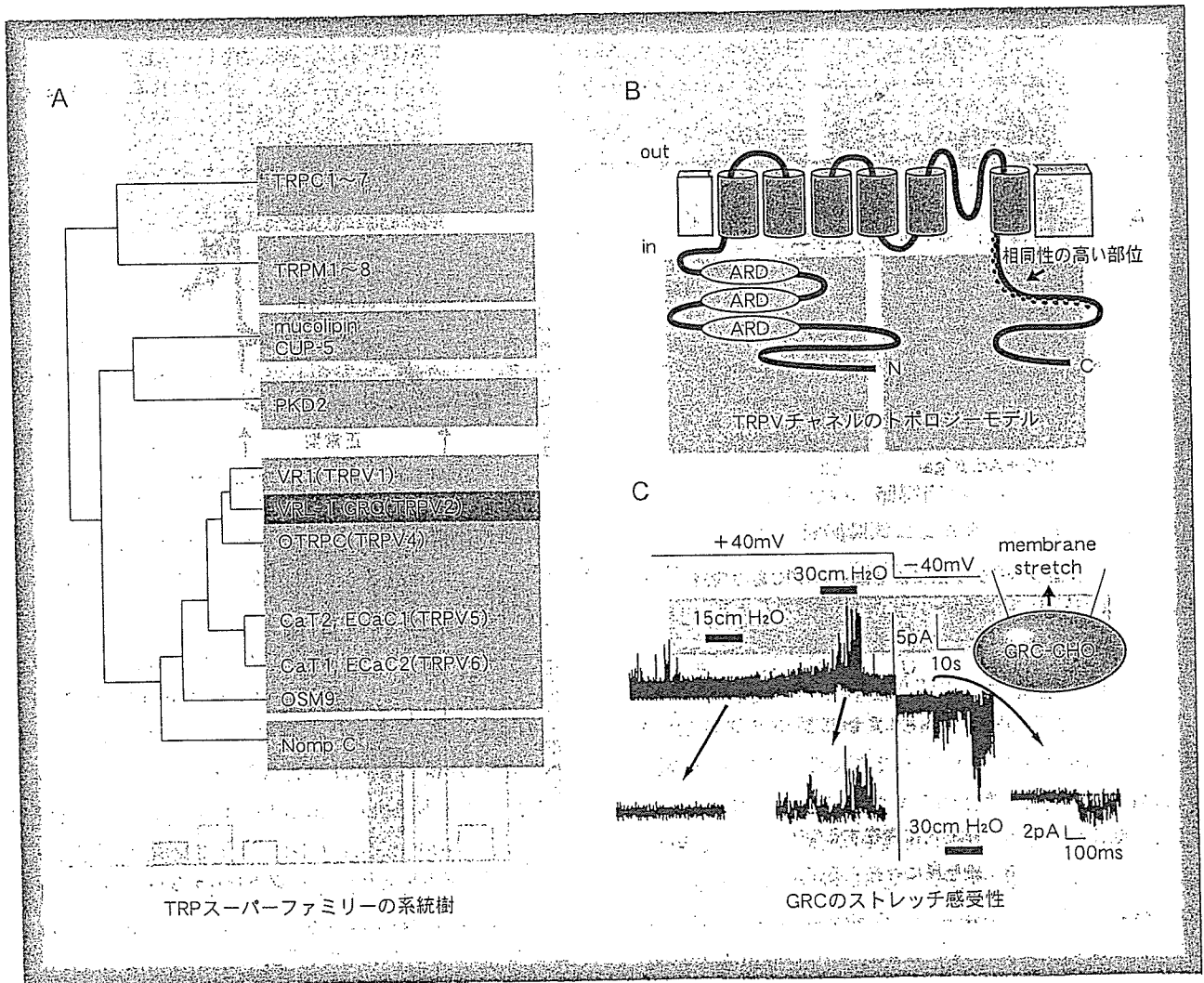


図1 筋に発現するストレッチ感受性チャンネルのクローニング

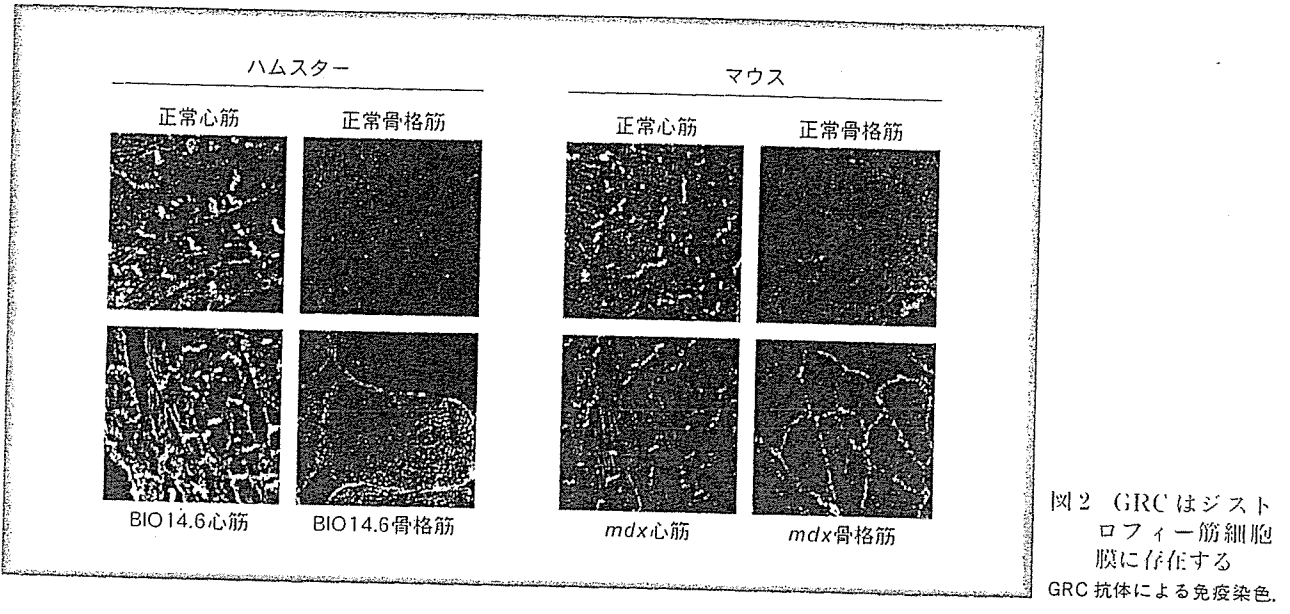


図2 GRCはジストロフィー筋細胞膜に存在するGRC抗体による免疫染色。

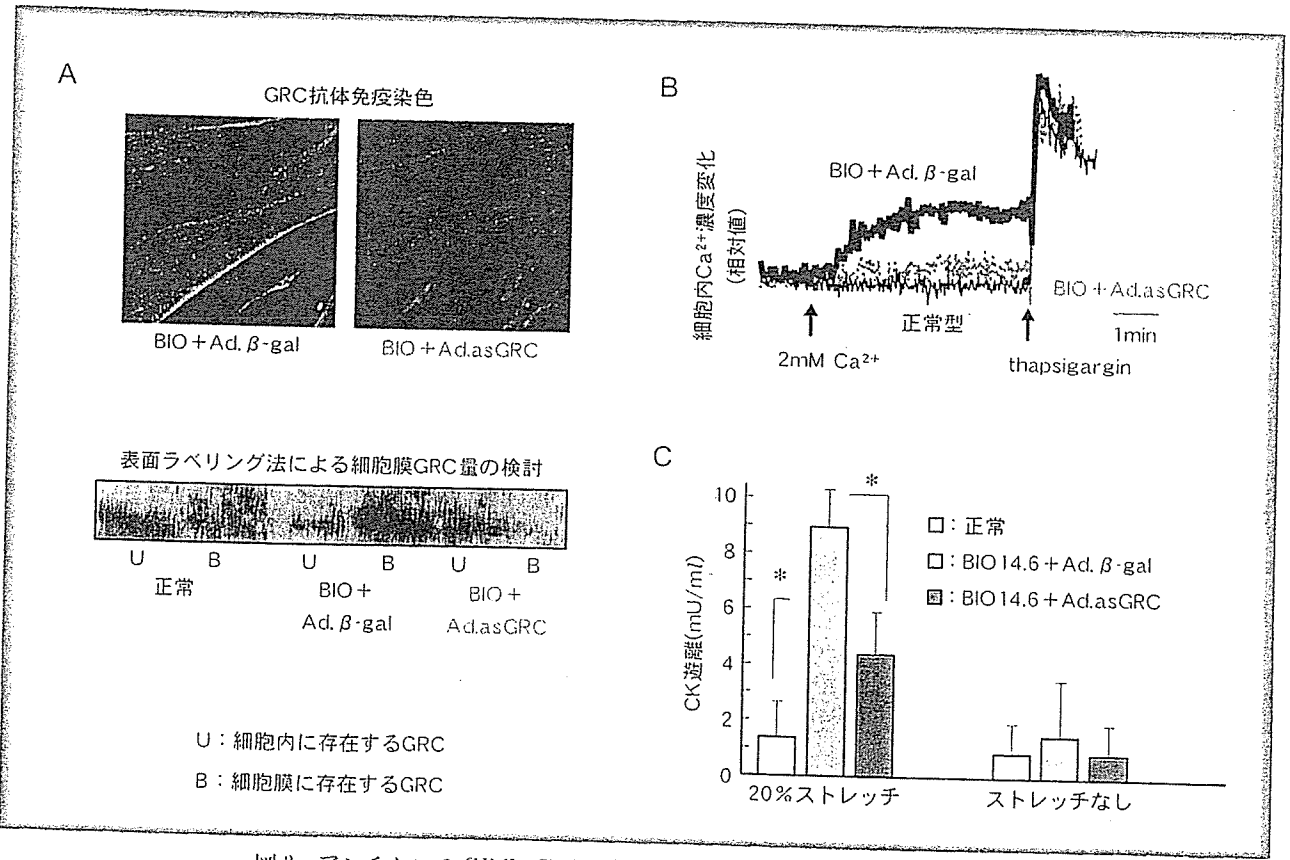


図3 アンチセンス GRC cDNA 導入による BIO14.6 筋細胞変性の抑制
BIO14.6 筋細胞にアデノウイルスを用いてアンチセンス GRC cDNA を導入すると、GRC の細胞膜発現が抑制され(A)、Ca 流入異常およびサイクリックストレッチ刺激による CK 遊離(筋変性)も抑制された(B,C)。

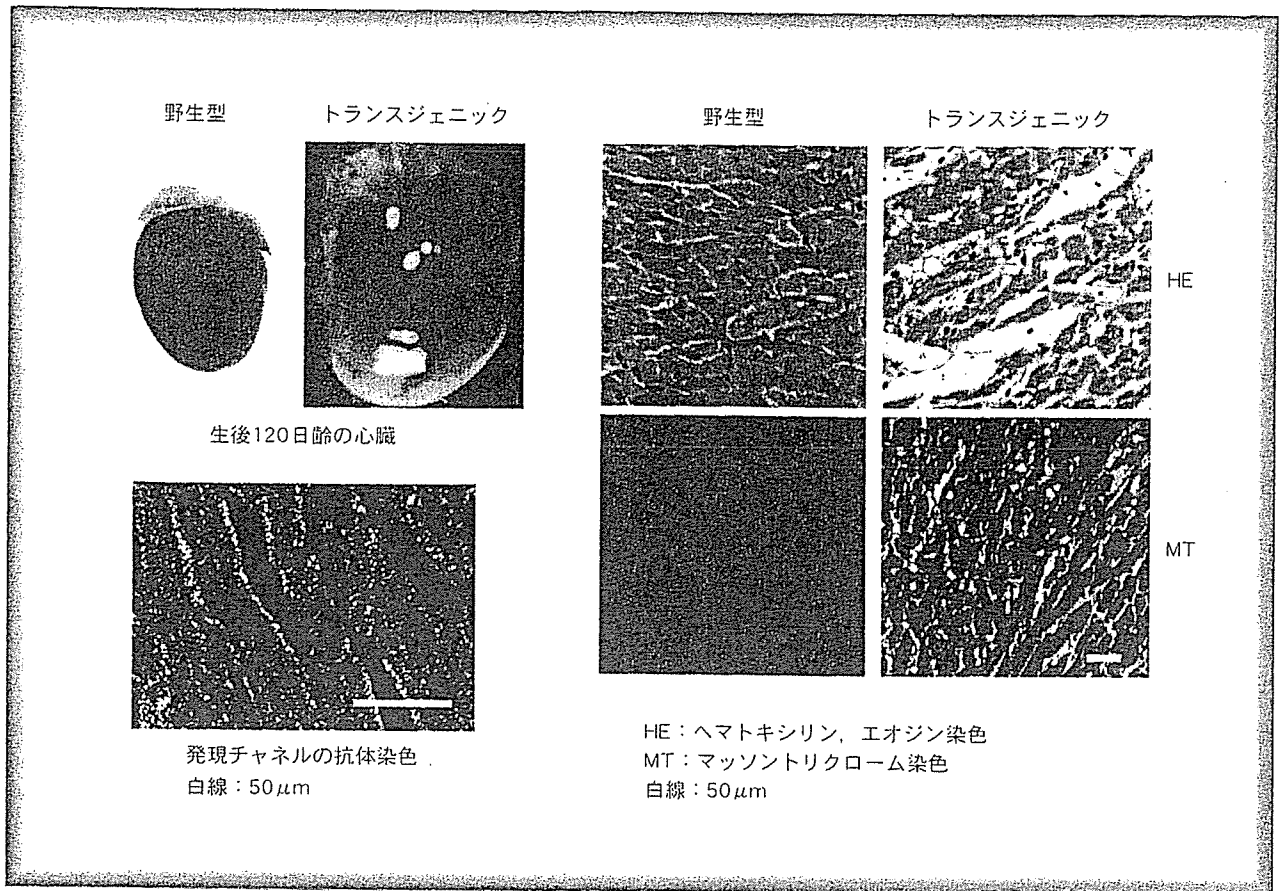


図4 GRCを心筋に過剰発現させると心筋症を発症する

レッチ感受性(図1C)^{22,23)}であるのみならず，細胞外から添加したIGFやserumに反応して細胞内のプールから細胞膜へ局在を変化させるというユニークな性質を示した^{22,24)}。このチャネルの正常な骨格筋細胞膜における発現レベルは低く，また，正常心筋においても介在板を除けば，細胞膜での発現は比較的低い(図2)。ジストロフィー骨格筋または心筋では(BIO14.6心筋症ハムスター心筋および骨格筋，*mdx*マウス骨格筋，Becker型およびLimb-girdle型ジストロフィー患者骨格筋，および，BIO14.6 myotubes)では，細胞膜におけるGRCの発現は著明に増強されていた(図2)。興味深いことに， δ -SG cDNAを導入したBIO14.6 myotubesでは，Dys複合体形成が正常化されるとともに，細胞膜におけるGRCの発現が減少

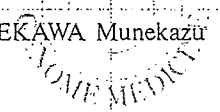
し，これにともない，細胞内へのCa²⁺流入異常が是正され，かつ，伸展刺激による細胞からのCK遊離が抑制された。また，BIO14.6 myotubesにGRCアンチセンスcDNAを導入して細胞膜のGRC発現を減少させた場合も，Ca²⁺流入異常および筋細胞からのCK遊離が抑制された(図3)²²⁾。一方，*in vivo*でのGRCの役割を検討するためにGRCを心臓特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作成したところ，GRCは，このマウスの心筋細胞の細胞膜に高発現しており，心室の著明な拡大，心筋細胞壊死，線維化などが認められ典型的な心筋変性病変を発症した(図4)²²⁾。これらの結果は，GRCが筋変性の発症に関与する可能性の高いチャネルであることを示す。

おわりに

Dys 複合体異常に基づく筋細胞変性に関与すると考えられるチャネルについての知見をまとめた。表2に示すように、Dys 複合体異常に起因する筋細胞内 Ca^{2+} 濃度異常にかかわる Ca^{2+} 流入チャネルとしていくつかの候補チャネルが見出されている。種々の病態筋細胞標品でみたコンダクタンスの差異などもあり、今後の詳細な検討が必要であるが、チャネルの機能的な性質は、ほかの蛋白との相互作用を含めてチャネル蛋白質の機能状態、活性測定条件などで変化する場合もあり、これらのチャネルの異同は必ずしもはっきりしない。また、病態が単一のチャネルの活性変化で起こるのか、本来、複数のチャネルが関与するのかも不明である。これらのチャネルのうち、その分子実体が明らかにされたのは GRC のみである。これまでに得られた結果からは、GRC が病態の発症に関与する可能性は高いが、細胞膜への GRC 発現の制御機序、GRC と Dys 複合体を含む細胞骨格系との関係、筋ジストロフィー症の動物および患者において GRC を標的とする病態治療が有効であるかどうかの検討など多くの問題が未解決である。これらとともに、筋細胞変性にかかわる可能性があるほかのチャネルの分子実体が明らかになれば、細胞骨格系異常による筋ジストロフィー症の発症機序の解明および治療へのアプローチが大きく進展すると思われる。

References

- 1) Brown SC, Lucy JA: Functions of dystrophin. In "Dystrophin. Gene, Protein and Cell Biology". (Brown SC et al eds). Cambridge University Press, Cambridge, 1997, pp.163-200
- 2) Blake DJ, Weir A, Newey SE et al: Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Phys Rev* 82: 291-329, 2002
- 3) Menke A, Jockusch H: Decreased osmotic stability of dystrophin less muscle cells from the mdx mouse. *Nature* 349: 69-71, 1991
- 4) Turner PR, Fong P, Denetclaw WF et al: Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J Cell Biol* 115: 1701-1712, 1991
- 5) Pressmar J, Brinkmeier H, Seewald MJ et al: Intracellular concentrations are not elevated in resting cultured muscle from Duchenne (DMD) patients and in MDX mouse muscle fibers. *Pflugers Archive* 426: 499-505, 1994
- 6) Mallouk N, Jacquemond V, Allard B: Elevated subsarcolemmal Ca^{2+} in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4950-4955, 2000
- 7) Robert V, Massimino ML, Tosello V et al: Alteration in calcium handling at the subcellular level in mdx myotubes. *J Biol Chem* 276: 4647-4651, 2001
- 8) Alderton JM, Steinhardt RA: Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *J Biol Chem* 275: 9452-9460, 2000
- 9) Franco Jr A, Lansman JB: Calcium entry through stretch-inactivated ion channels in mdx myotubes. *Nature* 344: 670-673, 1990
- 10) Fong P, Turner PR, Denetclaw WF et al: Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science* 250: 673-676, 1990
- 11) Franco-Obregon A Jr, Lansman JB: Mechanosensitive ion channels in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. *J Physiol (Lond)* 481: 299-309, 1994
- 12) Hopf FW, Reddy P, Hong J et al: A critical evaluation of resting intracellular free calcium regulation in dystrophic mdx muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 271: C1325-C1339, 1996
- 13) Tutdibi O, Brinkmeier H, Rudel R: Increased calcium entry into dystrophin-deficient muscle fibers of mdx and adr-mdx mice is reduced by ion channel blockers. *J Physiol (Lond)* 515: 859-868, 1999
- 14) Nakamura TY, Iwata Y, Sampaolesi M et al: Stretch-activated cation channels in skeletal muscle myotubes from sarcoglycan-deficient hamsters. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C690-C699, 2001
- 15) Turner PR, Schultz R, Ganguly B: Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle. *J Membrane Biol* 133: 243-251, 1993
- 16) Alderton JM, Steinhardt RA: How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes. *Trends Cardiovasc Med* 10: 268-272, 2000
- 17) Alderton JM, Ahmed SA, Smith LA et al: Evidence for a vesicle-mediated maintenance of store-operated calcium channels in a human embryonic kidney cell



- line. *Cell Calcium* 28 : 161-169, 2000
- 18) Franco-Obregon A, Lansman JB : Changes in mechanosensitive channel gating following mechanical stimulation in skeletal muscle myotubes from the mdx mouse. *J Physiol (Lond)* 539 : 391-407, 2002
- 19) Vandebrouck C, Duport G, Cognard C et al : Cationic channels in normal and dystrophic human myotubes. *Neuromuscul Disord* 11 : 72-79, 2001
- 20) Nigro V, Okazaki Y, Belsito A et al : Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene. *Hum Mol Genet* 6 : 601-607, 1997
- 21) Vandebrouck C, Martin D, Colson-Van Schoor M et al : Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* 158 : 1089-1096, 2002
- 22) Iwata Y, Katanosaka Y, Arai Y et al : A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol* 161 : 957-967, 2003
- 23) Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y et al : TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93 : 829-838, 2003
- 24) Kanzaki M, Zhang YQ, Mashima H et al : Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-1. *Nat Cell Biol* 1 : 165-170, 1999
- 25) Carlson CG : Spontaneous changes in acetylcholine receptor and calcium leakage activity in cell-attached patches from cultured dystrophic myotubes. *Pflugers Arch* 437 : 371-380, 1999
- 26) 森 泰生 : Caチャネルの構造・機能とその病態. *Mebio* 15 : 44-53, 1998
- 27) Walker RL, Koh SD, Sergeant GP et al : TRPC4 currents have properties similar to the pacemaker current in interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* 283 : C1637-C1645, 2002

Na⁺/H⁺交換輸送体： 生体プロトン環境を制御するイオントランスポータ

若林 繁夫、久光 隆、龐 天翔
国立循環器病センター研究所、循環分子生理部

The Na⁺/H⁺ exchanger : an ion transporter regulating pH homeostasis in life

Shigeo Wakabayashi, Takashi Hisamitsu, Tianxiang Pang
National Cardiovascular Center Research Institute

The Na⁺/H⁺ exchanger (NHE, SLC9) is a membrane transporter that catalyzes the electroneutral counter-transport of Na⁺ for H⁺. NHE is involved in various physiological and pathological aspects such as maintenance of ionic homeostasis, cell volume regulation, transepithelial transport of electrolytes, cell growth and apoptosis. To date more than 10 different NHE isoforms have been identified and their molecular and cellular biochemistry has been extensively studied. In this report, we will briefly summarize the structure-function of NHE, particularly focusing on our recent findings.

Key words : Na⁺/H⁺ exchanger, pH regulation, pH-sensor, signaling molecule, cancer

はじめに

本稿は、第22回聴覚生理研究会「細胞イオン透過のメカニズムと制御」で行った「イオントランスポータの最前線：Na⁺/H⁺交換輸送体を中心に」という口演内容をもとに、本輸送体に関する最近のさまざまなトピックスを加味してまとめたものである。内耳の音受容には、内耳特有のイオン代謝系の働きが重要である。遺伝性難聴の多くは、内耳イオン輸送に関与するさまざまな遺伝子、たとえば、K⁺/Cl⁻ (SLC12A7)、Na⁺/K⁺/Cl⁻共輸送体 (SLC12A2)、Zn²⁺輸送体 (SLC30A4)、アニオン輸送体 (SLC26A4) などの変異によって起こることが明らかになっている。こうしたことから、内耳イオン代謝を理解するうえで、トランスポータに関する理解は欠かせない。最近、トランスポータの研究は急速な進歩を遂げた。ここでは二つの点を指摘しておきたい。第一に、ヒトのゲノムがほぼ決まったことによって、トランスポータをコードする遺伝子の全貌がほぼ出揃ったことが挙げられる。トランスポータの一つの大きなグループである Major facilitated superfamily (MFS) は、ヒトでは solute carrier family (SLC) と名前が統一され、現在では SLC の数としては 43 種類、計 300 種類ほどの遺伝子が

登録されている。第二に、構造研究の最後の砦として残されてきたトランスポータの結晶構造がついに決定されたことである。バクテリアの異物排出タンパク質 AcrB、ラクトース輸送体、グリセロール 3-リン酸輸送体の結晶構造が相次いで解かれ、これまで謎とされてきた輸送の分子機序が明らかにされようとしていることを指摘しておきたい。本稿は、Na⁺/H⁺、交換輸送体 (NHE) に関する筆者らのこれまでの知見を中心にまとめたものである。内耳における NHE の研究はほとんど行われていないものの、NHE は多くの組織と同様に内耳においても Na⁺ や pH の制御に重要な役割を果たしていることは間違いない。本稿が聴覚生理の研究者に何らかのヒントを与えることができるならば筆者としても喜ばしいことである。

Na⁺/H⁺交換輸送体ファミリー

細胞内 pH・Na⁺濃度・細胞容積の調節は、生物の生死にかかわる重要な問題である。Na⁺/H⁺交換輸送体 (NHE、Na⁺/H⁺アンチポータとも呼ぶ) はこれらの細胞機能を担う中心的なトランスポータの一つであるが、以下に述べるように、バクテリアから高等動物に至るま

であらゆる生物種、あらゆる臓器、ほとんどすべての細胞膜系小器官に存在する大きなファミリーを形成することが最近の研究から明らかになってきた^{1)~3)} (表1)。NHEは、上皮系組織におけるイオンや水の吸収、体液調節、細胞増殖、アポトーシス、細胞接着など、単なる細胞内イオン調節だけにとどまらない多様な生理機能に関与する。また、NHE活性変化は、心臓や脳における虚血性疾患、心肥大・心不全、本態性高血圧などのさまざまな疾患に関与し、NHEの病態的役割の重要性は広く認識されている。

1989年に普遍型のNHE1が初めてクローニングされて以来、これまで10を超える異なったタイプの輸送体アイソフォームのcDNAが同定されている。その数はまだ増える可能性があり、また個々の構造・機能、疾患関連の研究も精力的に行われており、膨大な知識が蓄積され続けているのが現状である。アイソフォームのうち、NHE1-NHE5は基本的に形質膜に発現するタイプであり、NHE6-7は主としてエンドソームやゴルジ小胞などの内膜系にあると考えられる。NHE8-9はまだ研究途上にあり、詳しくはよくわかっていない。内耳には、主としてNHE1が発現しているが、NHE2-4の発現も確認さ

れている⁴⁾。最近また、精子の尾部に特異的に発現し、アミノ酸配列がNHEによく似た遺伝子が同定された⁵⁾。この分子サイズは、他のNHEよりも大きく、イオンチャンネルに見られる電圧センサーやcAMP結合部位と思われるアミノ酸配列を含む領域が付与されているのが特徴である。興味深いことに、この遺伝子をノックアウトしたマウスの精子は泳がないために受精できない。また、大腸の上皮細胞にはCl⁻依存性で、他のNHEよりも分子サイズがかなり小さいNHEが存在することが報告されている⁶⁾。他方、以前から高血圧症患者の赤血球ではNHE阻害剤非依存性のLi⁺-Na⁺交換活性が増加していることが明らかになっていたが、最近、この活性がNHE1のアミロライド結合部位として知られる領域を含む膜貫通部分が欠失したNHE1の別のスプライスフォームによって起こることが報告されている⁷⁾。

さて、NHE1はこれらのアイソフォームのなかでも特によく研究されており、あらゆる組織でpH制御などの基本的なイオン環境を整備する役割を担う。こうした生理機能からは想像しがたいことではあるが、NHE1のKOマウスでは脳に障害が起こり、てんかん、四肢の運動失調、高頻度の行動停止などの運動障害が見られ、生

表1 NHE アイソフォームの種類

アイソフォーム名	ヒト染色体上の位置	組織分布	細胞内分布	生理機能、阻害剤および分子的特徴
NHE1 (SLC9A1)	1p35	あらゆる組織	形質膜 (上皮細胞では基底膜側)	細胞内 pH、Na ⁺ 濃度、容積調節。アミロライドやHOEの同属体によって強く阻害される (K _d = 1 ~ 100nM)。ヒト赤血球における別のスプライスフォームの存在。
NHE2 (SLC9A2)	2q11	消化管、骨格筋、腎臓に多い	形質膜 (上皮細胞では管腔膜側)	体液分泌機能など。上記阻害剤に対する親和性は概ね NHE1 よりも 10 倍程度弱い。
NHE3 (SLC9A3)	5p15	消化管、腎臓	形質膜 (上皮細胞では管腔膜側) リサイクリングエンドソーム	Na ⁺ 、HCO ₃ ⁻ の再吸収などの機能。上記阻害剤に対する親和性は概ね NHE1 よりも 1000 倍程度弱い。
NHE4 (SLC9A4)	2q12-34	胃、その他腎臓や脳などに少量	形質膜 (上皮細胞では基底膜側)	細胞内 pH、容積調節?
NHE5 (SLC9A5)	16q22	脳の神経細胞	形質膜、リサイクリングエンドソーム	細胞内 pH、シナプス小胞の pH 調節? 阻害剤の効果は NHE3 に近い。
NHE6 (SLC9A6)	Xq26	あらゆる組織	エンドソーム	エンドソーム内 pH 調節? スプライシングの異なる少なくとも 3 種類の分子。
NHE7 (SLC9A7)	Xp11	あらゆる組織	トランスゴルジ小胞、エンドソーム	細胞内オルガネラの pH 調節? Na ⁺ あるいは K ⁺ と H ⁺ の交換輸送。
NHE8 (SLC9A8)	20q13	あらゆる組織	形質膜?	?
NHE9 (SLC9A9)	?	?	?	?
NHE10? spermNHE	?	精子の尾部	形質膜?	精子の swimming に必須。電位依存性?

後35-40日で90%以上のマウスが死ぬ⁸⁾。また、NHE1によるpH調節が細胞増殖に重要であることを反映してか、KOマウスでは全体的に成長不全が生じている。NHE1と心臓疾患との関係は以前から注目されており、アミロライド誘導体 (EIPAやDMA) やベンゾイルグアニジン誘導体 (HOE694やカリポライド) などのNHE1特異的阻害剤が開発され、これらを用いた疾患モデル動物実験および臨床テストが行われている。特に、虚血性心疾患およびそれに伴う心臓突然死にこれらNHE1阻害剤が有効であることは、少なくとも動物実験で確かめられている。これと一致して、NHE1のKOマウスでは虚血心筋障害が軽減されることが報告された。また、分子機序はよくわからないものの、NHE1阻害剤が心肥大を抑制することも報告されている。他方、NHE2やNHE3のKOマウスはNHE1のものとは全く異なったフェノタイプを示す。NHE2のKOマウスは胃壁細胞変性に伴う胃酸分泌異常、耳下腺における唾液分泌低下など、消化器系統に異常が起こる⁹⁾。他方、NHE3のKOマウスは血圧低下、尿細管による HCO_3^- などのイオン吸収異常など腎機能に異常が起こる¹⁰⁾。KOマウスはNHEの生理機能を浮かび上がらせるパワフルなツールであり、他のNHEアイソフォームについての今後の解析結果が大いに期待されることである。

Na⁺/H⁺交換輸送体の構造と機能

NHE分子は、アイソフォーム間で共通して、比較的保存されたアミノ (N) 末端側の12個の膜貫通領域 (TM) を含むドメイン (~500アミノ酸残基) と、相同性の低いカルボキシ (C) 末端側の細胞質ドメイン (~300アミノ酸残基) の構造的・機能的に異なる大きな二つのドメインに分けることができる。N末端領域はアミロライド誘導体などの阻害剤結合部位を持ち、イオン輸送を担う輸送体のいわば心臓部であるのに対して、C末端領域は輸送を制御する調節ドメインとして機能すると考えられている。最近私たちは、システインスキャン変異解析を行い、導入したシステイン残基がSH標識試薬によって細胞内外のどちらから標識されるかを詳細に検討し、新しいトポロジーモデルを提唱した¹¹⁾。このモデルでは、TM4-TM5およびTM8-TM9をつなぐ細胞内ループの一部が、細胞内外の両方からアクセスできることが明らかとなり、イオン輸送路の一部である可能性が考えられた。事実、TM4およびTM9には、イオン輸送活性、阻害剤結合に関わるいくつかの重要なアミノ酸残基が局在する。TM9とTM10の間には、疎水性の強い

ドメインが存在し、おそらくチャンネルタンパク質によく見られるような膜陥入型のP-loop様構造をとることによって、イオン輸送路を形成するのではないかと予想される。

NHEはNa⁺とH⁺を1:1のストイキオメトリーで反対方向に輸送する系であるが、NHE活性はアロステリックな細胞内H⁺濃度依存性を示すので、2個以上のH⁺結合が関与すると考えられる。このことは、NHEの細胞質側にH⁺輸送部位とは別のH⁺制御部位あるいは“pHセンサー”と呼ばれるH⁺結合部位が存在することを示唆するが、NHEの各アイソフォームにそのような部位が存在するかどうかは明らかでなかった。最近私たちは、NHEの逆反応すなわち細胞に負荷した²²Na⁺の流出を測定することによって、NHE1-3アイソフォームにおけるH⁺制御部位の存在を明らかにした¹²⁾。また、pHセンサーの制御に関わる保存されたアミノ酸残基 (NHE1のR440およびG455) を同定した¹³⁾ (図1)。pHセンサーはNHE活性調節のまさに中核をなす重要な概念であり、その存在は生理的にも重大な効果を生む。細胞内外のNa⁺濃度勾配に従えば細胞内pHは異常に高くなるはずであるが、そうならないのはpHセンサーからH⁺が遊離するからであり、また細胞内アシドーシスが起ったとしても細胞内pHが速やかに中性にもどるのは、pHセンサーにH⁺が結合してNHEを活性化するからなのである。

1. アルカローシスの保護
2. アシドーシスからの速やかな回復
3. 活性調節

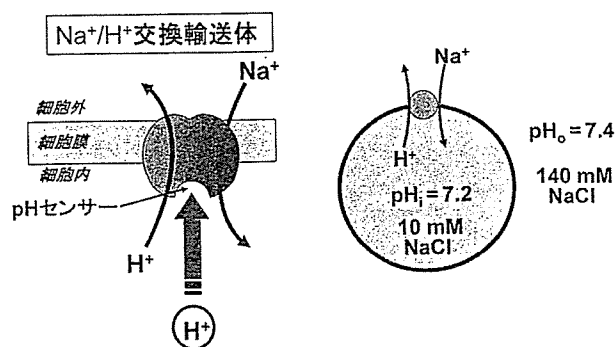


図1 pHセンサーの生理的役割

NHEには、細胞質側にH⁺輸送部位とは異なるpH制御部位 (pHセンサー) が存在し、生理的に重要な役割を果たす。

さて、NHEは、他の多くのトランスポーターがそうであるように、細胞膜上でホモ二量体として存在することが示唆されている¹⁴⁾。最も注目される問題は、基質輸送

単位が単量体なのか多量体なのかである。NHEでは両者の説が提唱されているが、いずれも明確な解を見出していない。NHEのスーパーファミリーである大腸菌のNa⁺/H⁺ antiporter, NhaAの二次元結晶構造解析を元にした三次元構造構築によれば、NhaAは12回膜貫通領域を持ったモノマー同士が二回対称軸を持ったダイマー構造をとることが明らかとなった¹⁵⁾。NHEと一次構造上の違いはあるが、おそらく同様な四次構造が保存されているものと考えられる。今後、二量体形成の意義について研究を重ねる必要がある。

Na⁺/H⁺交換輸送体の活性調節

NHE、とくに普遍型アイソフォームNHE1は、ホルモン、細胞増殖因子、発癌因子、サイトカイン、神経伝達物質、Li⁺などのイオン、あるいは高浸透圧、ストレッチ、ずり応力といった機械的刺激など、ほとんどすべての細胞外刺激によって活性化を受け、結果的に細胞内アルカリ化が生じることがよく知られている。NHE1の多様な反応性は、オーファンリセプターのリガンド探しにも利用されており、これほど制御系が発達したトランスポータは他には例を見ない。この活性調節には、NHE1のカルボキシル末端側に存在する長大な細胞質ドメインへ結合する多様なシグナル分子が関与すると考えられている。私たちは以前に、細胞質ドメインのほぼ中央にCa²⁺/カルモデリン (CaM) がCa²⁺依存的に結合することを発見した¹⁶⁾。私たちは、CaM結合部位は普通NHE1活性を阻害する自己阻害ドメインとして働き、Ca²⁺動員によるCaM結合によってこの阻害が解除されNHE1が活性化されるという説を発表した¹⁷⁾。これを契機にして、カルシニユリン様タンパク質 (CHP)、アダプタータンパク質14-3-3、ERMファミリー、Nck結合キナーゼ (NIK)、イノシトールリン脂質 (PIP₂) など、さまざまな結合因子が同定されてきた (図2)。増殖因子によるNHE1の活性化には、Ca²⁺動員のほかに、リン酸化を介する経路が存在する。一つ明らかなことは、MEK-ERKシグナル経路を介してリボソームS6キナーゼ (p90^{rsk}) が活性化され、NHE1のセリン703をリン酸化し、14-3-3の結合が促進される、ということである。しかし、上記のさまざまな制御因子のリン酸化を含めて、リン酸化によるNHE1の活性化の分子機構はまだ多くが不明のままである。

私たちは、NHE1の結合因子の一つ、CHP (CHP1-3)の生理機能を解析してきた。CHP1はあらゆる組織に普遍的に発現し、N末端側 (Gly²) がミリスチル化され

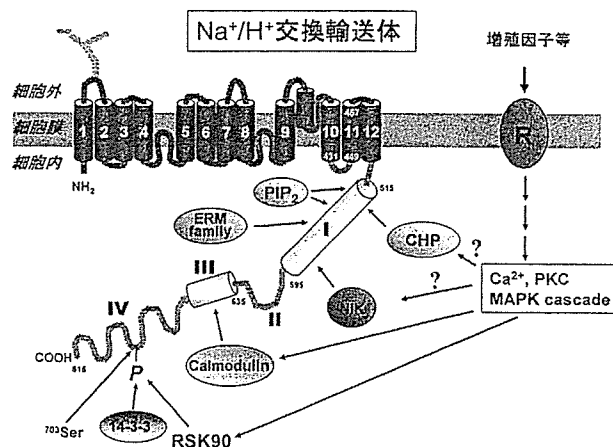


図2 NHE1の二次構造モデルと活性制御因子

システインスキャン変異実験¹¹⁾に基づく最新のトポロジーモデルを示した。また、NHE1の細胞質ドメインには多くの活性調節因子が結合する。

た、4つのEFハンドモチーフを持つCa²⁺結合タンパク質で、カルシニユリンのBサブユニットと相同性がある。私たちは最近、詳細な発現実験に基づいて、CHP1が形質膜タイプのアイソフォーム (NHE1-5)の活性に必須なタンパク質であることを明らかにした¹⁸⁾。CHP1を結合できない変異NHEも形質膜に発現できるが、その活性はNHE/CHP1複合体のわずか5-10%に過ぎない。従って、さまざまな組織におけるNHE活性はほぼNHE/CHP1複合体によって発揮されるものと考えられる。4つのEFハンドのうち、Ca²⁺が結合するのは実際にはC末端側の2つだけである ($K_d = \sim 90$ nM)。CHP1がNHE1に結合するとCa²⁺親和性が増加し、CHP1/NHE1複合体は生理的な細胞内Ca²⁺濃度 (0.1-10 μ M) よりもはるかに低いCa²⁺に対する解離定数 $K_d = \sim 2$ nMを示すようになる¹⁹⁾。従って、CHP1のEFハンドはCa²⁺センサーとしては機能せず、内在するCa²⁺はCHPの機能を保持する構造的な役割を持つと考えられる。CHP1のリン酸化やミリスチル化がNHEのどのような機能に関与するのはこれからの課題として残っている。

CHP1は普遍的に発現するタンパク質であるが、CHP2およびCHP3 (tescalcin) という組織発現パターンの異なるアイソフォームが存在する。CHP3は精巣と心臓に特異的に発現するが、この分子のNHEの機能に関する役割は不明である。私たちは最近、CHP2の機能に関して興味深い知見を得ることができた²⁰⁾ (図3)。CHP2は小腸を除いては通常ヒトの組織にはほとんど発現せず、細胞が癌化する際に発現するようになる。

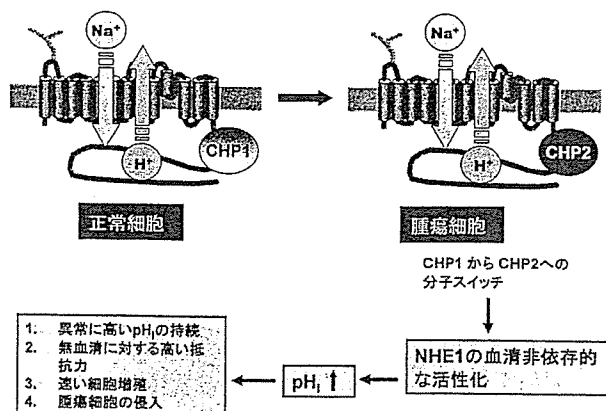


図3 癌細胞におけるNHE1活性化の仮説

細胞が癌化するとCHP2が発現し、CHP1に代わってNHE1に結合するようになる。これが血清非存在下でのNHE1の恒常的活性化をもたらし、 pH_i が上昇する。高い pH_i は癌細胞特有のフェノタイプに関与すると思われる。

CHP1発現細胞では、血清によるNHE1の活性化が見られるのに対して、CHP2発現細胞では血清非存在下でもNHE1はすでに活性化されており、高い細胞内pHが維持されることがわかった。さらに、CHP2発現細胞では、通常の細胞とは異なり、血清除去による細胞死がかなり抑制された。CHP2発現細胞におけるこれらの性質は、癌細胞で見られるフェノタイプに近い。以前から癌細胞の細胞内pHは異常に高いことが知られていたが、その分子機構は謎であった。私たちは、細胞が癌化するとCHP1を結合したNHE1からCHP2が結合したものへとスイッチングが起こり、NHE1が活性化されて細胞内pHが上昇するのであろうと考えている。細胞内pH上昇は、癌細胞の速い増殖、転移、血清非依存性などのフェノタイプの一因になると思われる。

謝 辞

本稿の要旨は2003年10月18日、千葉幕張メッセ国際会議場にて行われた聴覚生理研究会において行った口演内容をもとに、本輸送体に関する最近の知見を加味してまとめたものである。口演と本稿執筆の機会を与えて下さいました関係者の皆様に感謝いたします。

参考文献

- 1) Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J : Molecular Physiology of Vertebrate Na^+/H^+ Exchangers. *Physiol. Rev.* 77 : 51-74, 1997.
- 2) Orłowski J, Grinstein S : Diversity of The Mammalian Sodium/Proton Exchanger SLC9 Gene

Family. *Pflügers Arch.* 447 : 549-565, 2004.

- 3) Counillon L, Pouyssegur J : The expanding family of eucaryotic Na^+/H^+ exchangers. *J Biol Chem.* 275 : 1-4, 2000.
- 4) Goto S, Oshima T, Ikeda K, et al. : Expression and localization of the Na^+/H^+ exchanger in the guinea pig cochlea. *Hear Res.* 128 : 89-96, 1999.
- 5) Wang D, King SM, Quill TA, et al. : A new sperm-specific Na^+/H^+ exchanger required for sperm motility and fertility. *Nat. Cell Biol.* 5 : 1117-1122, 2003.
- 6) Sangan P, Rajendran VM, Geibel JP, et al. : Cloning and Expression of a Chloride-dependent Na^+-H^+ Exchanger. *J. Biol. Chem.* 277 : 9668-9675, 2002.
- 7) Zerbini G, Maestroni A, Breviario D, et al. : Alternative Splicing of NHE-1 Mediates Na-Li Countertransport and Associates With Activity Rate. *Diabetes* 52 : 1511-1518, 2003.
- 8) Bell SM, Schreiner CM, Schultheis PJ, et al. : Targeted Disruption of The Murine Nhe1 Locus Induces Ataxia, Growth Retardation, and Seizures. *Am. J. Physiol.* 276 : C788-795, 1999.
- 9) Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, et al. : Targeted Disruption of The Murine Na^+/H^+ Exchanger Isoform 2 Gene Causes Reduced Viability of Gastric Parietal Cells and Loss of Net Acid Secretion. *J. Clin. Invest.* 101 : 1243-1253, 1998.
- 10) Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, et al. : Renal and Intestinal Absorptive Defects in Mice lacking The NHE3 Na^+/H^+ Exchanger. *Nat. Genet.* 19 : 282-285, 1998.
- 11) Wakabayashi S, Pang T, Su X, et al. : A Novel Topology Model of The Human Na^+/H^+ Exchanger Isoform 1. *J. Biol. Chem.* 275 : 7942-7949, 2000.
- 12) Wakabayashi S, Hisamitsu T, Pang T, et al. : Kinetic Dissection of Two Distinct Proton Binding Sites in Na^+/H^+ Exchangers by Measurement of Reverse Mode Reaction. *J. Biol. Chem.* 278 : 43580-43585, 2003.
- 13) Wakabayashi S, Hisamitsu T, Pang T, et al. : Mutations of Arg440 and Gly455/Gly456 Oppositely Change pH Sensing of Na^+/H^+ Exchanger 1. *J. Biol. Chem.* 278 : 11828-11835, 2003.
- 14) Fafournoux P, Noël J, and Pouyssegur J : Evidence

- that Na^+/H^+ exchanger isoforms NHE1 and NHE3 exist as stable dimers in membranes with a high degree of specificity for homodimers. *J. Biol. Chem.* 269 : 2589-2596, 1994.
- 15) Williams KA : Three-Dimensional Structure of The Ion-Coupled Transport Protein NhaA. *Nature* 403 : 112-115, 2000.
- 16) Bertrand B, Wakabayashi S, Ikeda T, et al. : The Na^+/H^+ Exchanger Isoform 1 (NHE1) Is a Novel Member of The Calmodulin-Binding Proteins. *J. Biol. Chem.* 269 : 13703-13709, 1994.
- 17) Wakabayashi S, Bertrand B, Ikeda T, et al. : Mutation of calmodulin-binding site renders the Na^+/H^+ exchanger (NHE1) highly H^+ -sensitive and Ca^{2+} regulation-defective. *J. Biol. Chem.*, 269 : 13710-13715, 1994.
- 18) Pang T, Su X, Wakabayashi S, et al. : Calcineurin Homologous Protein as an Essential Cofactor for Na^+/H^+ Exchangers. *J. Biol. Chem.* 276 : 17367-17372, 2001.
- 19) Pang T, Wakabayashi S, et al. : Role of Calcineurin B Homologous Protein in pH Regulation by the Na^+/H^+ Exchanger 1 : Tightly Bound Ca^{2+} Ions as Important Structural Elements. *Biochemistry* 2004 43 : 3628-3636.
- 20) Pang T, Wakabayashi S, Shigekawa M : Expression of Calcineurin B Homologous protein 2 Protects Serum Deprivation-Induced Cell Death by Serum-Independent Activation of Na^+/H^+ Exchanger. *J. Biol. Chem.* 277 : 43771-43777, 2002.

別刷請求先 : 〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1

国立循環器病センター研究所、循環分子生理学部

若林 繁夫

PECAM-1 を介した血管内皮細胞のメカノセンシング

増田 道隆, 小形 尚子, 望月 直樹

要約: 血管内皮細胞に発現している PECAM-1 (CD31) は, 細胞間接着部位に集積し, 細胞外ドメインのホモフィリックな結合により内皮細胞間をつないでいる接着分子である。PECAM-1 の細胞内ドメインには 2 つのチロシンリン酸化部位があり, 内皮細胞に機械的刺激を加えるとリン酸化が起こる。このリン酸化は Fer キナーゼによる可能性がある。リン酸化により SHP2 が細胞間接着部位に集積し, ERK キナーゼの活性化が引き起こされる。シアストレスによる ERK の活性化には PECAM-1 と SHP2 が必須である。抗 PECAM-1 細胞外ドメイン抗体でコートした磁気ビーズを用いて PECAM-1 を直接引っ張ると, PECAM-1 のリン酸化と ERK の活性化が起きる。コントロールのポリリジン磁気ビーズではどちらも起こらない。これらの結果は PECAM-1 がシアストレスセンサーとして機能していることを示唆する。

1. はじめに

血液を体のすみずみに過不足なく行き渡らせること, これが循環系の根源的な役割である。たとえ狭い範囲で短時間であっても, 血流停止は生命に直結する危機である。心筋梗塞のように血管が詰まるということがない限り, “すみずみに過不足なく” がごく自然に実現されている。私たちの体では, これをたった 1 つのポンプ心臓と血管の収縮・弛緩による流量調節だけで行っているのである。例えば, 大都市の水道網を 1 つのポンプとバルブの調節だけで維持するようなもので, 途方もないことと言える。バルブの開閉を中央の指令だけで制御しようとする, 膨大なセンサー網と計算量を必要とし, 実現困難であることが予測される。循環系では, 自律神経系による中央制御と

共に, 局所における血管緊張の自律的調節が血流分配に重要な役割を果たしていると考えられる。内皮細胞は血流の強さに応じて NO などの血管作動因子を放出し, バルブである血管平滑筋細胞の収縮・弛緩を調節することにより, 局所的調節の主役を担っている。血管平滑筋細胞自身も, 血管壁の伸展・弛緩による張力変動を刺激として受容し, 張力発生を自己調節している。循環系を構成する細胞にとって力学的環境要因は大切な外的情報の 1 つであり, この情報をどのように感知し, どのような応答プログラムが準備されているのかを明らかにすることは重要な課題である。

2. 機械刺激センサーの同定

血管壁を構成する細胞には血液の流れにより 2 つの力が加わっている。1 つは流れの摩擦力であるシアストレスで, 血管の内面を覆う血管内皮細胞に, 流れの方向に平行な力として作用している。もう 1 つは血管内外の圧力差によって血管壁が円周方向に引き伸ばされる力である。これらの 2 つの力の大きさは心拍動にともない周期的に変化している。生理的に重要な血管緊張の調節のみならず, 内皮細胞と平滑筋細胞は, それぞれ, シアストレスが働く方向と伸展力が働く方向に配向する性質を持っており, このことが血管壁の構造や血管系の構築, すなわち血管のリモデリングに深く関わっている。

20 年余りの研究により, 内皮細胞がさまざまな機械刺激にどんな応答をするのかは, 細胞内情報伝達の仕組みを含めかなり明らかになってきている(1)。しかしセンシングに関してはまだ良くわかっていない。その理由の 1 つは, 機械刺激に特異性がないことにある。機械刺激を負荷された細胞では細胞全体にわたって影響が及び, 複数のセンシング機構とその下流の情報伝達経路が一斉に活性化されることが予想され, 実験では, それらの総和を観察している可能性が高い。さらに当然のことながら, 機械力のセンシングは細胞や組織の力学的性質・構築のされ方により, 大きく変化する。極端な例であるが, 仮に血管壁が鉄パイプのように硬いものであれば, 伸展力のセンシングは不可能

キーワード: 血管内皮細胞, シアストレス, PECAM-1, チロシンリン酸化, ERK

国立循環器病センター研究所・循環器形態部

(〒565-8565 吹田市藤白台 5)

e-mail: masuda61@ri.ncvc.go.jp

原稿受領日: 2004 年 8 月 30 日, 編集委員会依頼総説

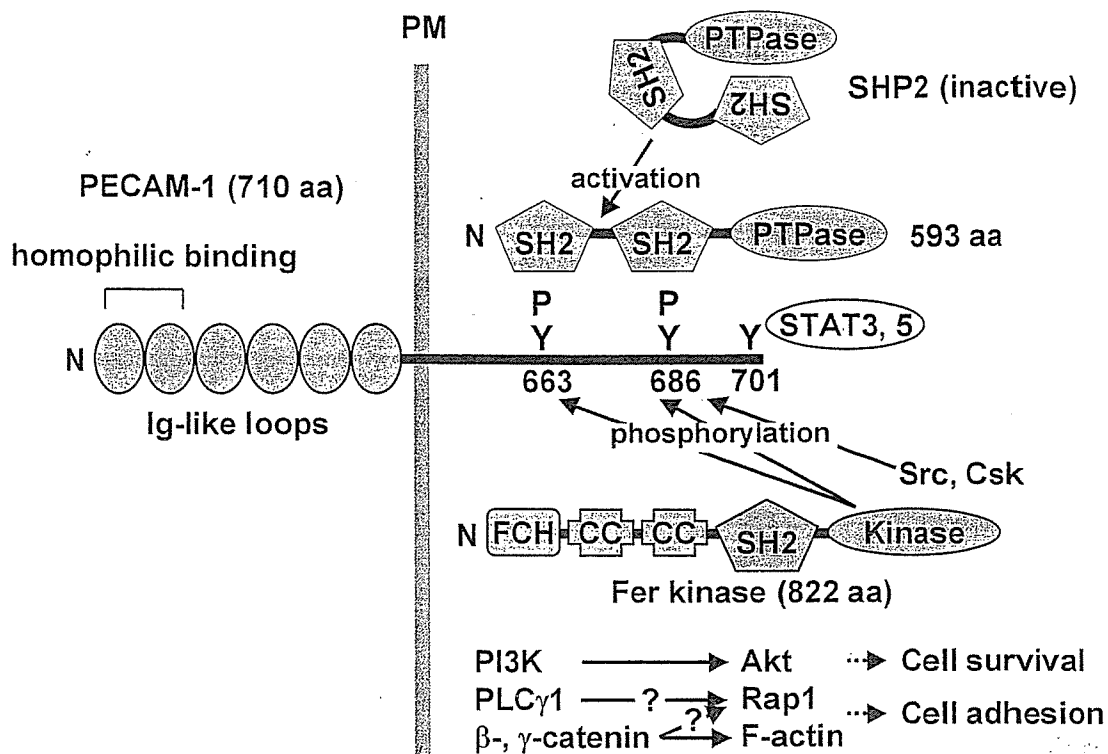


Fig. 1 A schematic representation of PECAM-1 and its binding partners.

である。したがって、同じ細胞が条件の違いで全く異なった応答をすることになる。本稿で紹介するシアストレスによる内皮細胞のERKの活性化でも、低密度培養条件ではPECAM-1非依存性の機構が主に働いている。我々は、PECAM-1からのシグナルを、おそらくインテグリンからのシグナルと分離するために実験デザインを工夫している。結局、機械刺激受容チャネルのような例外はあるものの、センシングの分子機構全体が解明されなければ、どの分子がセンサーとして機能しているかを特定することは困難である。このような状況では、とにかく機械刺激に起因すると思われる情報伝達分子の活性化をリストアップして、その信号経路がどの程度機械刺激の応答に貢献しているかを検討するとともに、経路を逆行することでセンシング分子の候補を探し出すのが妥当な方法であると思われる。

3. PECAM-1のチロシンリン酸化と細胞内情報伝達

我々は、生理的な強さのシアストレスや浸透圧ショックにより、30秒以内というはやい時間経過でチロシンリン酸化される内皮細胞の膜糖タンパク質を見だし(2)、PECAM-1と同定した(3)。血小板の凝集時にPECAM-1

のチロシンリン酸化が起こることが報告されており、これらの実験の共通点を考えると、PECAM-1のチロシンリン酸化の増大は細胞変形に依存して起こることが推定された。

PECAM-1はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子であり、細胞間接着部位に集積してホモフィリックな結合により細胞間をつないでいる(4)。この分子は内皮細胞、血小板に高発現しており、また単球、好中球、T細胞などでも発現がある。分子構造は6個のイムノグロブリン様ループからなる細胞外ドメイン、1つの膜貫通ドメイン、それに118アミノ酸残基(ヒト)からなる細胞内ドメインで構成されている(Fig. 1)。細胞内ドメインにある2カ所のチロシン残基Y663、Y686を含む領域はBTAM (bisphosphoryl tyrosine-based activation motif) またはITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) と呼ばれるモチーフとなっている。このモチーフはSH2ドメインを2つ持つタンパク質チロシン脱リン酸化酵素、SHP1とSHP2が結合し活性化を受ける部位である(5)。我々は、内皮細胞を機械刺激するとPECAM-1がSHP2とチロシンリン酸化依存的に結合し、PECAM-1

は内皮細胞における SHP2 の主要な結合相手であることを明らかにした(6)。また、リン酸化 Y686 は Src ファミリーキナーゼの SH2 ドメインが結合する認識配列にあり、実際に結合することを *in vitro* で確認した。種を超えて保存されている Y701 には STAT3,5 が結合し(7)、結合部位は未定であるが、PI3 キナーゼ(8)や β -, γ -カテニン(9) など10 を超える結合分子が報告されている(10)。これらのことは PECAM-1 が細胞接着・細胞骨格分子としてのみならず情報伝達分子としても機能することを示唆しており、少なくともその作用の一部が、チロシンリン酸化によりコントロールされている可能性を示している。

4. ERK の活性化と PECAM-1

SHP2 は EGF 受容体などの受容体型チロシンキナーゼの下流で ERK キナーゼをポジティブに制御していることが知られている。流れ刺激によって ERK の活性化が引き起こされることが、多くの研究室で確認されていることもあり、我々は機械刺激によって引き起こされる ERK の活性化に、PECAM-1 と SHP2 の関与があるのかどうか調べた(11)。PECAM-1 のチロシンリン酸化が起こる条件である流れ刺激 (15 dyn/cm^2) や、高浸透圧刺激 (300 mM ショ糖の添加) で、刺激後 10 分をピークとした一過性の ERK の活性化が起こった。アンチセンスオリゴ法により PECAM-1 の発現を抑制し、高浸透圧刺激を加えると ERK の活性化は抑制されたが、やはり高浸透圧刺激で活性化される p38MAP キナーゼの活性化は抑制されず、PECAM-1 の関与が ERK の活性化経路に特異的であることが示唆された (Fig. 2a)。

機械刺激による ERK の活性化に対して、PECAM-1 の細胞質ドメインがドミナントネガティブ効果を持つことが明らかとなった。内皮細胞に HA-PECAM-1cyt (HA タグ付加 PECAM-1 細胞内ドメイン) と FLAG-ERK2 を共発現して 10 分間の流れ刺激を負荷し、それぞれのタグに対する抗体で免疫沈降した。その結果、流れ刺激による ERK2 の活性化は HA-PECAM-1cyt を発現させた内皮細胞で約 70% の阻害を受けた (Fig. 2b)。高浸透圧刺激でも同様の結果が得られた。この阻害効果は上述の BTAM の Y663 と Y686 をフェニルアラニン残基に変異した HA-PECAM-1cyt-Y/F を用いた場合には観察されず、これらのチロシンが PECAM-1 の情報伝達に重要であることが示唆された。SHP2 が関与しないとされる VEGF による ERK2 の活性化は影響されなかったことから (Fig. 2c)、ERK 活性化に対する一般的阻害効果ではない。HA-PECAM-1cyt は細胞質に拡散して存在し、内在性の PECAM-1 や α -, β -カテニンなどの分布に影響しないので、HA-PECAM-1cyt により細胞間接着や細胞骨格が破壊された結果とは

考え難い。PECAM-1 の細胞内ドメインに結合し ERK の活性化に必要な分子が、リン酸化される HA-PECAM-1cyt によって細胞間接着部位から引き離されることが、ドミナントネガティブ効果の原因と考えられた。

ドミナントネガティブ効果のターゲットとしてまず SHP2 があげられる。SHP2 が ERK 活性化に必要なかを、酵素活性を持たない SHP2 の大量発現で調べた。活性中心のシステインをセリンで置換した SHP2-C/S は流れ刺激による ERK 活性化を強く阻害した (Fig. 2d)。機械刺激による ERK 活性化に SHP2 がどのように関わっているのかは不明であるが、活性化のメカニズムについて最近 2 つの経路が報告されている。1 つは PAG (phosphoprotein associated with glycosphingolipid-enriched microdomains, CBP Csk binding protein と呼ばれる膜タンパク質) の脱リン酸化を介して Csk (c-Src tyrosine kinase) の膜移行を負に制御し、Csk による Src ファミリーキナーゼの不活性化を阻害する経路である(12)。他方は、受容体チロシンキナーゼの下流でネガティブフィードバックを担っている Sprouty(13) を脱リン酸化し、阻害を解除するという Ras-ERK の経路に直接働くものである(14)。機械刺激において Src は PECAM-1 のチロシンリン酸化に遅れて活性化されることから、内皮細胞においても PAG/CBP の経路が成立するのかを調べる必要がある。

以上の過剰発現実験により、PECAM-1 のチロシンリン酸化を介した SHP2 の膜移行が内皮細胞の機械刺激受容に関与していることが示唆された。流れ刺激により内在性の SHP2 の分布が実際に変化するかどうかを特異抗体による免疫染色で調べた。SHP2 は無刺激の内皮細胞中では細胞質に拡散して存在しているが、流れ刺激で PECAM-1 が局在する細胞間接着部位に濃縮されるようになる(11)。SHP2 のドッキングタンパク質である Gab1(15) も細胞間接着部位に膜移行する。アンチセンスオリゴ法により PECAM-1 の発現を抑制すると、SHP2 と Gab1 の細胞間接着部位への移行は起こらなくなる。さらに、GFP (green fluorescence protein) でラベルされた SHP2-C/S を内皮細胞に発現させると、刺激の有無に関わらず常に細胞間接着部位に局在し、実際に PECAM-1 と結合していた。野生型の GFP-SHP2 の場合でも、酵素活性を阻害するパナジン酸で 30 分ほど処理すると、刺激のない状態で細胞間接着部位に濃縮されるようになる。これらの結果から、流れ刺激による ERK の活性化の少なくとも一部は、PECAM-1 のチロシンリン酸化と SHP2 の活性化を介するシグナル伝達によるものであると結論した。PECAM-1 は SHP2 で脱リン酸化されること、酵素活性のない SHP2 が常に PECAM-1 に結合していることなどから、PECAM-1 のチロシンリン酸化、SHP2 の結合と脱リン酸化、そして

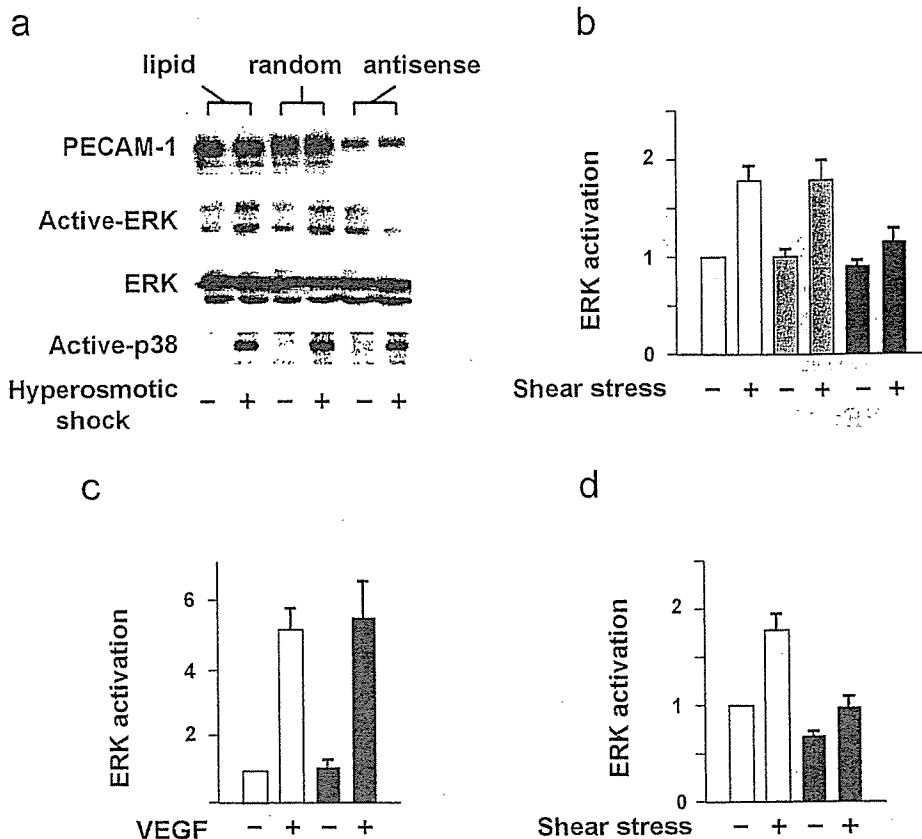


Fig. 2 Crucial requirements of PECAM-1 tyrosine phosphorylation and SHP2 phosphatase activity for flow-induced ERK activation in endothelial cells. (a) Bovine aortic endothelial cells (BAECs) were treated with PECAM-1 antisense S-oligo (antisense), scrambled S-oligo (random), or lipid carrier (lipid). Cells were grown to confluence and treated with (+) or without (-) hyperosmotic shock (+300 mM sucrose) for 10 min. Cell lysates were immunoblotted with antibodies indicated in the figure. (b) FLAG-ERK2 was coexpressed with HA-PECAM-1 cytoplasmic domain (filled bar), with Y663F/Y686F mutations (shaded bar), or vector only (blank bar) in BAECs. Confluent transfectants were exposed to laminar flow with fluid shear stress of 15 dyn/cm² (+) or below 1 dyn/cm² (-) for 10 min. Cell lysates were immunoprecipitating with anti-FLAG followed by immunoblotting with anti-active ERK. Relative levels of active FLAG-ERK2 are shown. The wild type PECAM-1 cytoplasmic domain, but not the Y/F mutant, showed a dominant negative effect. (c) HA-PECAM-1 cytoplasmic domain did not inhibit ERK activation by VEGF (50 ng/ml, 10 min). (d) FLAG-ERK2 was coexpressed with a phosphatase-inactive mutant of SHP2 (filled bar) or vector alone (blank bar). Overexpression of phosphatase-inactive SHP2 inhibited the flow-induced ERK activation.

SHP2の離脱というサイクルが回っており、常に低レベルの情報発信がなされているのではないかと考えている。流れ刺激はこのサイクルを活性化し有意な情報を伝えるのではないだろうか。

5. 引っ張り力に応答する PECAM-1

内皮細胞にはPECAM-1のチロシンリン酸化を介した流れ刺激のシグナル伝達機構があることはほぼ確実といえるが、PECAM-1の役割はどのようなものであろうか。シ

グナル増幅器として機能しているのか、あるいはセンサーの構成要素となっているのだろうか。この疑問に明確に答えることは容易ではないが、我々はPECAM-1に直接外力を加えることで回答に接近しようとしている。そもそものきっかけになった実験はわれわれにとって危機的なものであった。普通、培養内皮細胞は敷石状の単層になったものを使用する。生体内の内皮層のモデルとして考えるからである。隙間だらけの培養内皮を使って同じような実験を試みたところ、PECAM-1のチロシンリン酸化はほとん

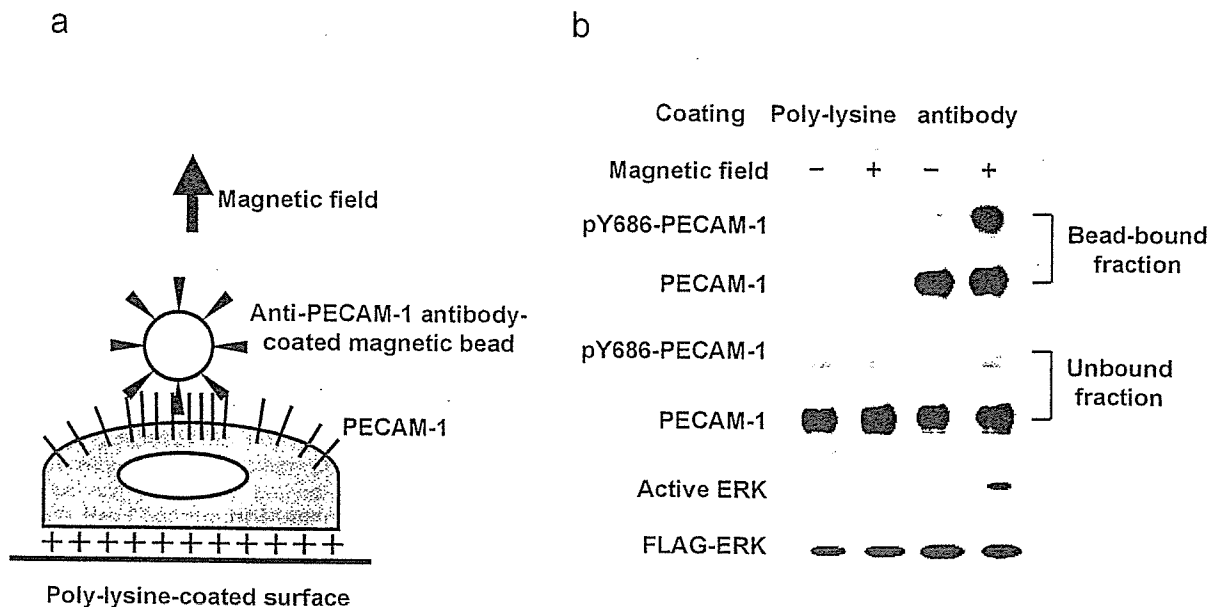


Fig. 3 PECAM-1 tyrosine phosphorylation and ERK activation by direct application of mechanical force to PECAM-1. (a) A scheme for the experiment. Bacteriological dishes were coated sequentially with poly-lysine and heat-inactivated BSA. BAECs plated sparsely on the coated-surface were cultured for 1 h in serum-free medium. BAECs transiently expressing FLAG-ERK2 were used in some experiments. Magnetic beads coated with anti-PECAM-1 extracellular domain (loops 1-2) or poly-lysine were allowed to adhere to the cell surface for 20 min and a strong static magnetic field was applied for 10 min. (b) The bead-bound fraction was collected from the cell lysate. The bound fraction and the remaining cell lysate (unbound fraction) were immunoblotted with anti-pY686-PECAM-1 and reprobbed with anti-PECAM-1. The lysates were also immunoprecipitated by anti-FLAG and immunoblotted with anti-active ERK. PECAM-1 bound to the anti-PECAM-1 beads was tyrosine phosphorylated in a magnetic-field dependent manner. ERK activation occurred in BAECs whose PECAM-1 was tugged by the antibody-coated beads.

ど起こらないのに ERK の活性化がみられた。アンチセンスオリゴで PECAM-1 発現を抑制しても ERK の活性化には影響がなく、このような条件では PECAM-1 を介さない流れ刺激応答があることが分かった。おそらく他の研究グループから報告されているインテグリンを介したシグナル伝達と考えられる(16)。その後の研究で、PECAM-1 が働くためには PECAM-1 がエンゲージしていることが必須であることが明らかになってきた。逆に、敷石状の単層構造をとっている内皮細胞では PECAM-1 非依存性の ERK 活性化は無視できる程度になっている。また、以前から PECAM-1 のチロシンリン酸化はアクチン細胞骨格を破壊すると強く抑制されることが分かっていた(17)。これらのことは PECAM-1 がセンサーの役割を果たしていることを示唆するものと考えられた。

そこで、PECAM-1 分子を直接引っ張ることを試みた (Fig. 3)。ホモフィリックな結合を担っているループ 1-2

に対する特異抗体を作製し、磁気ビーズ表面に結合した。内皮細胞をポリリジン処理した表面に低密度で接着させ、インテグリンも PECAM-1 もエンゲージできない状態を作った。インテグリンや PECAM-1 は細胞表面全体に拡散して分布するようになり、確かに高浸透圧処理しても ERK の活性化は見られない。このような内皮細胞に抗体ビーズを付着させると、PECAM-1 はビーズの周囲に集積する。ビーズを強力な静磁場で引っ張るとビーズに結合している PECAM-1 はチロシンリン酸化し、ERK の活性化が起きた(11)。抗体の代わりにポリリジンを共有結合させたビーズを用いると、ビーズは細胞膜に接着し、磁場をかけると細胞膜を引っ張るのにもかわらず、PECAM-1 のリン酸化も ERK の活性化も検出できない。ポリリジンビーズには PECAM-1 は結合しない。この結果は、細胞膜の変形が PECAM-1 を引っ張るように働いた時のみ PECAM-1 を介した ERK の活性化が起こることを示し、

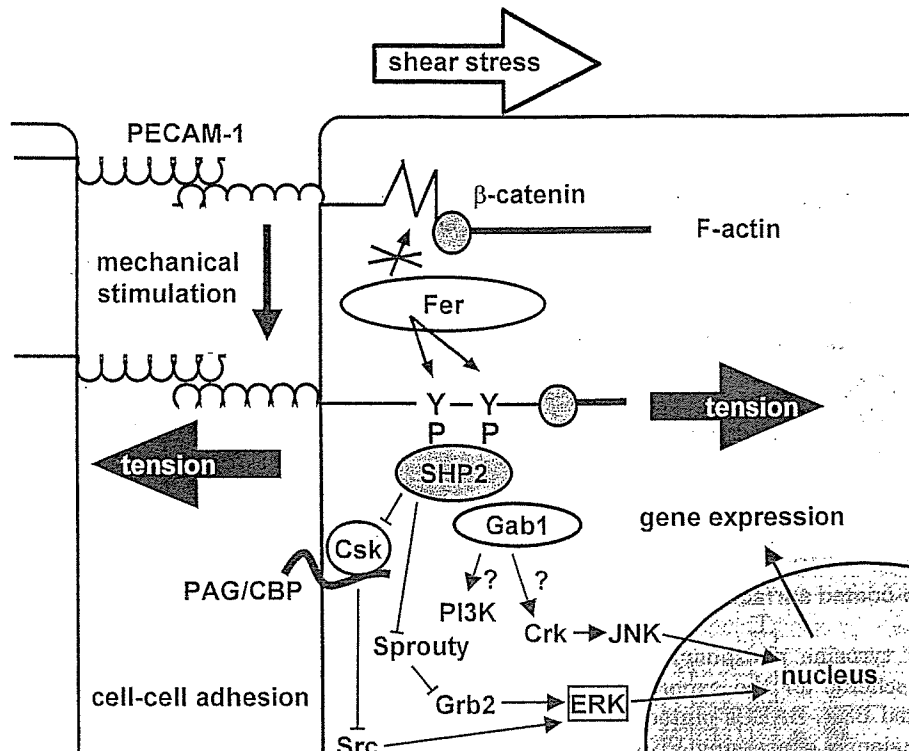


Fig. 4 A model for mechanosignal transduction by PECAM-1. The model depicts the following scenario. When an endothelial cell is under no mechanical stress, PECAM-1 is in a closed state in which Y663 and Y686 are unavailable to kinase. When mechanical force acts on PECAM-1, it is converted to an open state in which the tyrosine residues can be phosphorylated, presumably by Fer. SHP2 and Gab1 are recruited to phosphorylated PECAM-1 and trigger a signaling cascade leading to ERK activation.

PECAM-1 がセンサーあるいはセンサー複合体の構成要素となっていることを示唆する。

6. 流れセンシングの分子メカニズム

流れの力学作用を検出するためには、結局のところ、シアストレスにより直接、あるいは細胞変形を介して間接的に、ある分子がコンフォメーション変化を起こし、それが細胞内の化学的情報に転換されているはずだということになる。つまり、センシングのメカニズムを明らかにすることは、力学的作用でコンフォメーション変化を起こす分子あるいは分子集合体を特定し、その変化が化学的情報に転換される仕組みを明らかにすることに他ならない。こうした視点からこれまで紹介した実験結果を最も単純に説明するモデルが Fig. 4 である。PECAM-1 は外側で相手側の PECAM-1 と結合し、細胞内では何らかの分子を介してアクチン繊維と結合している。PECAM-1 の細胞内ドメインは折りたたまれており、BTAM の 2 つのチロシン

残基はリン酸化されにくい状態にある。細胞変形により PECAM-1 が引っ張られると、細胞内ドメインは開き、チロシンキナーゼがアクセス可能になり、シグナル伝達が始まる。実際には折りたたまれた状態と開いた状態が熱平衡にあり、この平衡が PECAM-1 分子にかかる張力で変化するであろう。

PECAM-1 の生理的チロシンリン酸化酵素が何であるのかは謎であったが、最近、Fer キナーゼがその有力候補であることを見出した(18)。Fer は Fes/Fps と共に特異なファミリーをなす非受容体形チロシンキナーゼであり、SH3 ドメインを持たない代わりに、FCH ドメインを持ち、細胞間や細胞基質間の接着制御に関与している(19)。Fer によるチロシンリン酸化で注目されるのは Y663 と Y686 をリン酸化することである。これまでに報告された Src や Csk は Y686 リン酸化酵素であり、SHP2 の活性化に対する寄与の大きい Y663 はリン酸化しない(20)。Fer は活性化機構を含めてまだ良くわかっていないキナーゼであり、