

原 著

血管平滑筋収縮時のスフィンゴシルホスホリルコリンによる
Ca²⁺感受性亢進における組織コレステロールと膜ラフトの重要性

王 晨

山口大学大学院医学系研究科生体機能分子制御学分野(生理学第一) 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 組織コレステロール, Ca²⁺感受性亢進, 膜ラフト, 血管平滑筋, 血管異常収縮

和 文 抄 録

心筋梗塞や狭心症などの血管病では、その原因として、よく知られている動脈硬化の他に、血管攣縮、即ち血管平滑筋の異常収縮がある。血管平滑筋の異常収縮の分子機構は、Rhoキナーゼ (ROK) を介する血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進である。当研究室では、ROKの上流因子としてスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) およびSrcファミリーチロシンキナーゼ (Src-TK) を同定し、血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進のシグナル伝達経路として、「SPC/Src-TK/ROK」経路を明らかにした。さらに、このSPCによるヒト血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進が、血清総コレステロール値およびLDL-コレステロール値と正相関し、血清HDL-コレステロール値と逆相関することを見出した。しかし、血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進に対する、組織コレステロール量、及びコレステロールが限局して蓄積する細胞膜ドメインである膜ラフトの役割はまだ不明であった。

そこで本研究では、それらの役割を解明するために、ブタ冠状動脈を用いて、血管平滑筋の組織コレステロール量、膜ラフトのマーカー蛋白質であるカベオリン-1の量、及びSPCによるCa²⁺感受性亢進という三者の相関関係について同一標本で検討した。その結果、ブタ冠状動脈では、これら三者、それぞれが、相互に正の相関を示すことが明らかとな

った。以上のことから、血管平滑筋の組織コレステロールと膜ラフトは、血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

緒 言

Rhoキナーゼ (ROK) を介する血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進は、血管攣縮などの血管異常収縮の本態として注目されており、虚血性心疾患やくも膜下出血後の脳血管攣縮などを引き起こす¹⁾。我々はこれまでに、その上流因子として、スフィンゴ脂質の一種である、スフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) を見出した。SPCは、ブタ冠状動脈及びウシ中大脳動脈において、Srcファミリーチロシンキナーゼ (Src-TK) /ROK経路により、細胞質Ca²⁺濃度を変化させることなく著明な異常収縮 (=Ca²⁺感受性亢進) を引き起こした²⁻⁴⁾。実際に、イヌ髄腔内に投与されたSPCは著明な脳血管攣縮を引き起こし⁵⁾、また、ヒトの脳血管攣縮患者では髄液中SPC濃度が上昇している事が確かめられたこと⁶⁾から、SPCは、血管攣縮の真の原因分子であると考えられている。

さらに、最近我々は、SPCによるヒト腸間膜動脈のCa²⁺感受性亢進が、血清総コレステロール値およびLDL-コレステロール値と正相関し、血清HDL-コレステロール値と逆相関することを初めて報告し⁷⁾、脂質異常症に合併する心血管イベントの発症機構に新たな視点を提供した。しかしながら、

血管収縮における Ca^{2+} 感受性亢進において、コレステロールが血管平滑筋に直接作用しているかは明らかでなく、脂質異常症によって二次的に産生された代謝産物やホルモン等が間接的に血管平滑筋に作用している可能性も否定できない。即ち、血管平滑筋の組織コレステロール量が、血管収縮における Ca^{2+} 感受性亢進を調節できるかについては不明であり、当然、その分子機構も解明されていない。

一方、膜ラフトは、コレステロール、スフィンゴ脂質などの脂質で構成され、Src-TKを含む膜蛋白質などを豊富に含む特殊な膜マイクロドメインとして知られている。様々なシグナル伝達に係る重要な機能性マイクロプラットフォームであり、多くの細胞系ではシグナル分子や膜蛋白質がダイナミックに関連する場として、考えられている^{8, 9)}。カベオリン-1 (cav-1) は、膜ラフトに局在している膜蛋白質であるが、膜ラフトに局在する他の蛋白質、または、膜ラフトに移動した蛋白質と結合する事により、様々なシグナル伝達の仲介分子としての役割を果たしている^{10, 11)}。以上のことから、膜ラフトに局在するSrc-TKが、血管平滑筋収縮における Ca^{2+} 感受性亢進に関与するというこれまでの我々の研究結果⁴⁾を加味すると、コレステロールが蓄積した膜ラフトが Ca^{2+} 感受性亢進のシグナル伝達に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

そこで、本研究では、血管平滑筋の組織コレステロール量が、膜ラフトの量とROKを介する血管平滑筋収縮における Ca^{2+} 感受性亢進と相関するかどうか、そして、膜ラフトの量が、 Ca^{2+} 感受性亢進と相関するかどうかを明らかにすることを目的とした。血管平滑筋の組織コレステロール量とSPCによる Ca^{2+} 感受性亢進の程度を測定すると共に、膜ラフトの量の指標として、膜ラフトマーカー蛋白質であるcav-1の量を測定し、これら三者の相関関係について、同一の血管標本を用いて検討した。

対象と方法

1. 血管平滑筋組織の採取と分離

北九州食肉センターにて、食用に屠殺されたブタから左冠状動脈を採取した。5% CO_2 と95% O_2 の混合ガスで通気した後、氷冷したphysiological salt solution (PSS) に血管サンプルを保存し、研究室

まで持ち込んだ。顕微鏡下、血管中膜の平滑筋層を傷つけないように注意しながら、脂肪、外膜と内皮を除去した。分離された血管中膜の平滑筋層は、常時、5% CO_2 と95% O_2 の混合ガスで通気したPSS中に保存した。血管の内皮を完全に除去したことは、1 μM ブラジキニン (ペプチド研究所) による内皮依存性弛緩反応が完全に消失したことにより確認した。外膜と内膜除去後の血管中膜は、長軸に沿って切開した後に、筋繊維の走行に沿って、平滑筋の条片 (幅1.0 mm×長さ4.0 mm) を作製した^{2, 4)}。

2. 張力と細胞質 Ca^{2+} 濃度の同時測定

血管平滑筋条片を、 Ca^{2+} 指示蛍光試薬である、Fura 2-AM (13 μM) (同仁化学研究所) と5% FBSを混入したPSS (5% CO_2 と95% O_2 の混合ガスで通気) に浸し、37°Cで4時間インキュベートした。Fura 2-AMを負荷した条片を用いて、張力と細胞質 Ca^{2+} 濃度の同時測定を行った。張力を張力トランスデューサー (TB-612T, 日本光電) で計測しながら、同時に、顕微2波長分光蛍光測定装置 (CAM-230, 日本分光) を用いて、細胞質 Ca^{2+} 濃度を測定した^{3-5, 7)}。

3. 張力測定

血管平滑筋の条片を用いて、張力の測定を行った。張力を張力トランスデューサーで計測した。SPC (Enzo Life Sciences) で引き起こされる Ca^{2+} 感受性亢進の大きさは、118 mM K^+ による収縮の大きさに対するパーセント (%) として表した。

4. 膜ラフトの精製

シヨ糖密度勾配遠心法を用いて、血管中膜の平滑筋組織の膜ラフトを精製した^{11, 12)}。血管平滑筋組織の特性により、バッファーの組成は原法から少し改変した。まず、液体窒素で凍らせた血管平滑筋サンプルを、SKミル (SK-100, フナコシ) で凍結粉末状に細かく破碎した。これ以下の処理は全て氷上で行った。粉末サンプルは、1% トリトンX-100を含む氷冷TNEバッファー (10 mM トリス-塩酸 (pH 7.5), 150 mM 塩化ナトリウム, 5 mM 塩化マグネシウム, 2 mM EGTA, 20 $\mu g/mL$ ロイペプチン, 20 $\mu g/mL$ アプロチニン, 1 mM オルトバナジン酸ナトリウム, 1 mM ピロリン酸ナトリウム) に懸濁

し、水中に30分間静置した。これをホモジナイズ（マイクロホモジナイザー、Radnoti）して、同量の80%シヨ糖を含む氷冷TNEバッファーと混合した。このホモジネートを含む40%シヨ糖溶液を、超遠心チューブに移し、その上に30%シヨ糖を含む氷冷TNEバッファーを上層し、更に、5%シヨ糖を含む氷冷TNEバッファーを上層した。ホモジネートを含む40%シヨ糖溶液、30%シヨ糖を含むTNEバッファー、5%シヨ糖を含むTNEバッファーの比率は、5:11:6であった。これを、55,000 rpm (TLS-55, Beckman Coulter) で4℃、26時間超遠心した。次に、超遠心チューブを氷の上に移し、超遠心チューブのトップからボトムまで、11×200 μL/フラクションを分取した。膜ラフトの蛋白質を濃縮するため、及び、シヨ糖のウエスタンブロッティングへの影響を軽減するため、各フラクション中の蛋白質は、20% (v/v) 三塩化酢酸で沈殿させた。

5. ウエスタンブロッティングによるcav-1の定量

シヨ糖密度勾配遠心により得られた各フラクションの試料を10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、PVDF膜へ転写した。cav-1を定量するため、既知量のリコンビナントcav-1 (Abnova) を、各フラクションと一緒に泳動させた。転写後のPVDF膜を、5% (w/v) スキムミルクを含む0.05% TBS-T中で1時間ブロッキングした後、室温で一次抗体と一晚反応させた。反応後のPVDF膜を0.05% TBS-Tで4回洗浄し、室温で1時間、二次抗体と反応させた後、再び、0.05% TBS-Tで4回洗浄し、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific) を用いてバンドを可視化した。

6. 組織コレステロールの定量

組織コレステロール量は、液体窒素で凍らせた血管中膜平滑筋組織を、SKミルで凍結粉末状に細かく破碎した後、Cholesterol/Cholesterol Ester Quantitation Kit (BioVision) を用いて測定した。

結 果

1. SPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進

細胞質Ca²⁺濃度と張力の同時測定において、ブタ冠状動脈血管平滑筋は、118 mM K⁺脱分極により大きな収縮を引き起こし、細胞質Ca²⁺濃度が著しく上昇した。SPC (30 μM) を投与すると、収縮はゆっくり誘発されたが、細胞質Ca²⁺濃度は上昇せず、SPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進を確認した (図1)。

2. Src-TK/ROK経路を介するSPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進

次に、SPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進の細胞内シグナル伝達について、薬理学的方法で検討した。Src-TKの特異的な阻害薬であるPP1は、SPCによる血管平滑筋収縮を抑制した (図2 a)。一方、PP1の不活性化誘導体であるPP3は、SPCによる血管平滑筋収縮を抑制しなかったため (図2 b)、観察されたPP1の抑制作用はSrc-TKの特異的な抑制によるものと考えられた。更に、ROK阻害薬であるY-27632は、SPCによる血管平滑筋収縮を抑制した (図2 c)。それぞれの実験を複数回行い、SPCによる血管平滑筋の張力に対する抑制率としてまとめ、統計解析を行った結果を図2 dに示した。以上の結果より、ブタ冠状動脈において、SPCは、Src-TK/ROK経路を介して、血管平滑筋収縮に

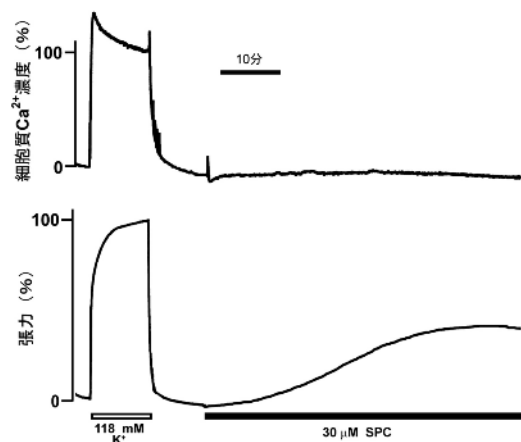


図1 細胞質Ca²⁺濃度と張力の同時測定

Fura 2-AMを負荷したブタ冠状動脈平滑筋条片を、118 mM K⁺とSPCで刺激し、細胞質Ca²⁺濃度 (上段) と張力 (下段) を同時に測定した。

におけるCa²⁺感受性亢進を引き起こすものと考えられた。

3. 血管平滑筋の組織コレステロール量とSPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進の相関関係

本研究では、ブタ冠状動脈血管平滑筋の全てのサンプルにおいて、組織コレステロール量を定量した(図3a)。

SPC (30 μM) は、ブタ冠状動脈平滑筋において持続的な収縮を引き起こした。SPCによる異常収縮の大きさと組織コレステロール量は、正の直線的な

相関を示した(図3a)。代表的な収縮記録のトレースで見ると、SPCによるCa²⁺感受性亢進は、組織コレステロール低値であるブタ冠状動脈(図3b)より、組織コレステロール高値であるブタ冠状動脈(図3c)の方が、はるかに大きかった。

異なる組織コレステロール量の血管平滑筋条片において、118 mM K⁺脱分極によるCa²⁺依存性収縮の形状と大きさは一定値を示した。即ち、118 mM K⁺脱分極によるCa²⁺依存性収縮は、組織コレステロール量の影響を受けなかった(データは未掲載)。従って、本研究では、SPCによる異常収縮の大きさは、「対象と方法」の項で示したように、118 mM

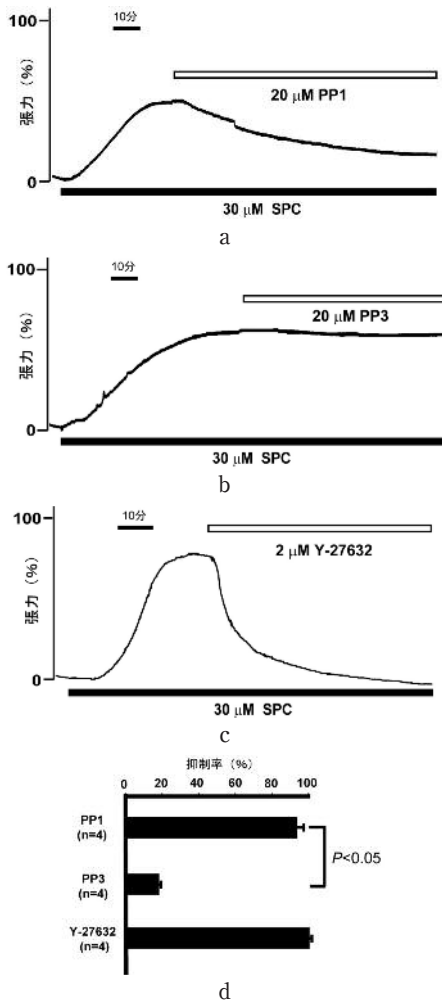


図2 SPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進のシグナル伝達

SPCによるCa²⁺感受性亢進に対する各種酵素阻害薬、Src-TK阻害薬PP1 (a)、Src-TK阻害薬の不活性化誘導体PP3 (b)、ROK阻害薬Y-27632 (c) の作用を検討した。(d) SPCによるCa²⁺感受性亢進に対するSrc-TK阻害薬とROK阻害薬の効果のまとめ。エラーバーは平均標準誤差である。有意差の検定にStudent's t-testを用いた。

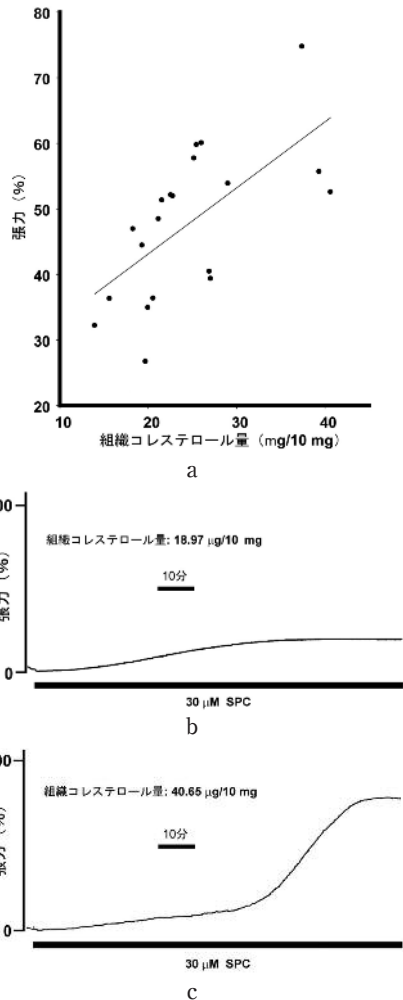


図3 組織コレステロール量とSPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進の相関関係

(a) 組織コレステロール量とSPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進の相関 (r=0.644, P=2.38 × 10⁻⁴, n=20)。各ドットはブター頭の実験結果を示している。回帰係数は単回帰分析で算出した(r値)。(b)と(c)組織コレステロールが低値(b)と高値(c)の場合の血管平滑筋における、SPCによるCa²⁺感受性亢進の大きさ。

K⁺脱分極によるCa²⁺依存性収縮の大きさに対し正規化し、%表示した。

4. 血管平滑筋の組織コレステロール量と膜ラフトに存在するcav-1の量の相関関係

コレステロールは、細胞膜上で優先的に膜ラフトへ集積することがよく知られているので¹³⁾、組織コレステロール量と膜ラフト量の相関関係を検討した。

ブタ冠状動脈血管平滑筋を、シヨ糖密度勾配遠心法で精製し、膜ラフトのマーカー (cav-1) と非膜ラフトのマーカー (β -アダプチン, β -ada) を指標として、各フラクションにおける膜ラフトの存在を確認した。膜ラフトは、密度が軽いフラクション

に分画されることが知られており¹⁴⁾、実際、 β -adaは存在せず、cav-1のみ存在する軽いフラクション3-5が確認された (図4a, 左パネル)。また、膜ラフトを含まないと考えられる密度の重いフラクション7-11にもcav-1は検出された。各フラクションのcav-1の量は、濃度既知のcav-1リコンビナント蛋白質の量を基に定量化し、最終的に、同重量 (6.57 mg) の血管平滑筋組織当たりのcav-1量として示した (図4a, 右パネル)。グラフから、膜ラフトの代表的なフラクションとしてフラクション4を、cav-1は含むが膜ラフトではないフラクションとしてフラクション8を選び、cav-1の量と組織コレステロール量との相関を検討した。cav-1の量と

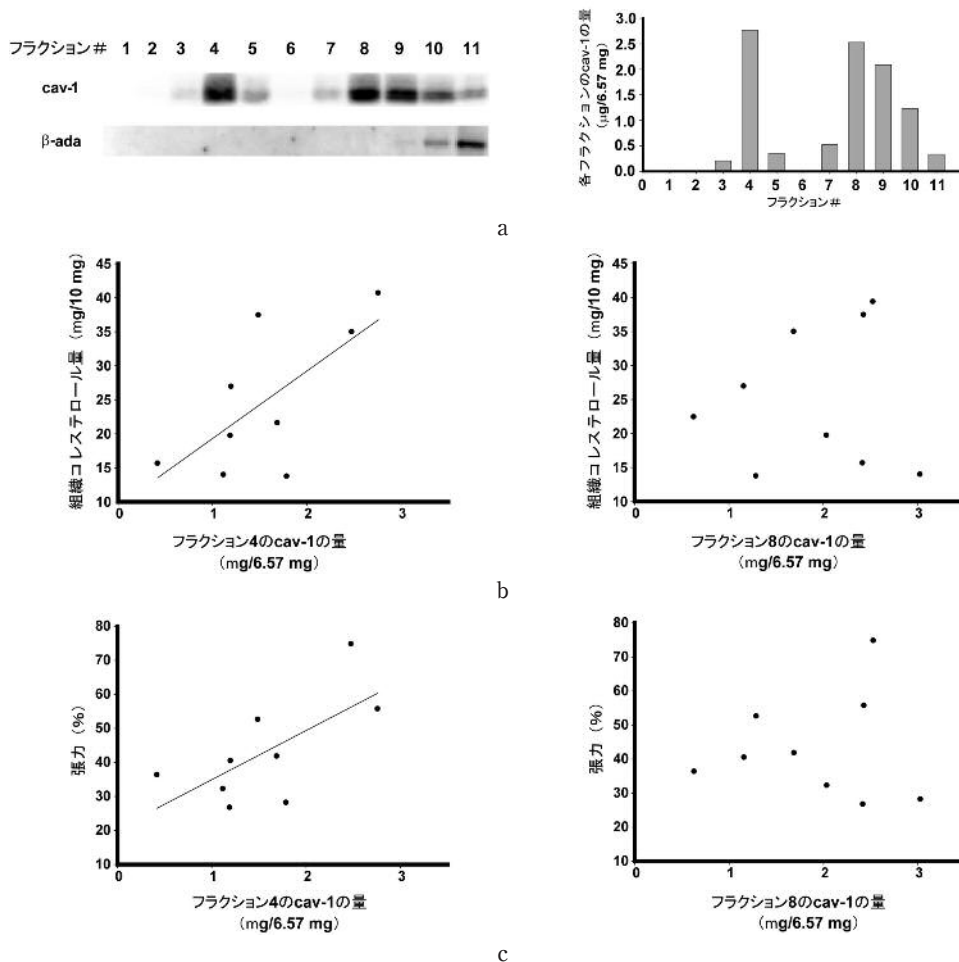


図4 膜ラフトに存在するcav-1の量と組織コレステロール量及びSPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進の相関関係

(a) 膜ラフト分画のウエスタンブロットの結果 (左パネル), 及び、左パネルと対応する各フラクションのcav-1の量 (右パネル)。 (b) フラクション4のcav-1の量と組織コレステロール量の相関 ($r=0.679$, $P=4.43 \times 10^{-2}$, $n=9$) (左パネル)。 フラクション8のcav-1の量と組織コレステロール量の相関 ($r=6.67 \times 10^{-2}$, $P=0.865$, $n=9$) (右パネル)。 (c) フラクション4のcav-1の量とSPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進の相関 ($r=0.669$, $P=4.86 \times 10^{-2}$, $n=9$) (左パネル)。 フラクション8のcav-1の量とSPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進の相関 ($r=4.98 \times 10^{-2}$, $P=0.899$, $n=9$) (右パネル)。 各ドットはブター頭の実験結果を示している。 回帰係数は単回帰分析で算出した (r値)。

組織コレステロール量は、フラクシオン4で高い正の相関を示す一方 (図4b, 左パネル), フラクシオン8では, そのような相関は見られなかった (図4b, 右パネル).

5. SPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進と膜ラフトに存在するcav-1の量の相関関係

図4bで組織コレステロール量を測定したのと同じブタ血管平滑筋組織を用いて, SPCによる異常収縮の大きさを測定し, cav-1の量との相関を検討した. 組織コレステロール量の場合と同様に, フラクシオン4で高い正の相関を示す一方 (図4c, 左パネル), フラクシオン8では, そのような相関は見られなかった (図4c, 右パネル).

以上, 図4の結果より, 軽い分画のフラクシオン4は, 組織コレステロール量に比例して構築された, 機能を有した膜ラフト分画であり, 血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進と相関していることが分かった. これに対して, 重い分画のフラクシオン8は, cav-1が存在しているも, 組織コレステロール量との相関関係に乏しく, 血管収縮のシグナル伝達にも関与していないことが示された.

考 察

SPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進と膜ラフトにおける組織コレステロール量の重要性を検討するために, まずは, ブタ冠状動脈血管平滑筋条片を用いて, 血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進を引き起こす細胞内シグナル経路について, 薬理学的手法によって検討した. その結果, Src-TK/ROK経路が関与していることを確認した (図2). 次に, 我々は, 同じブタ血管平滑筋サンプルを用いて, 組織のコレステロール量, 膜ラフト量及びSPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進という三者の直接的な相関関係を検討した. 実験結果より, 血管平滑筋の組織コレステロール量は, 膜ラフトの量 (=フラクシオン4のcav-1の量) に対し直線的な正の相関を示し, さらに, SPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進に対しても直線的な正の相関を示す事を, 新たに発見した. 従来より, 脂質異常症と心血管イベントの強い関連

が, 臨床医学において議論されているが, 本研究結果は, 心血管イベントの一因である血管攣縮を引き起こす血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進において, 血管平滑筋の組織コレステロール量, 及び, コレステロールに富んだ膜ラフトの重要性を示す最初の報告である.

シヨ糖密度勾配遠心法による膜ラフトの生化学的分離法は, 膜ラフトの存在を確認するための最も効果的な方法の1つとされている⁸⁾. 膜ラフトの存在は, 膜ラフトマーカー (cav-1) の検出と非膜ラフトのマーカー (β -ada) の不検出によって確認された. しかし, 従来膜ラフトとしてよく報告されている軽いフラクシオン (フラクシオン4)¹⁴⁾の他に, ブタ冠状動脈組織では, 重いフラクシオン8にもcav-1の量が多く, 即ち, 二つのピークが観察された. このような二つのピークは, ブタ冠状動脈に限られたものではなく, 他の複数の細胞系や¹⁵⁻¹⁷⁾, ヒト腸間膜および胃動脈の平滑筋組織でも観察され (データは未掲載), 単純にアーチファクトとは考えにくい. さらに興味深い点は, フラクシオン8ではなく, フラクシオン4のcav-1の量が, 組織コレステロール量に依存して, かつ, SPCによる異常収縮の大きさにも関与している事である. これらの結果は, 血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進において, 膜ラフトが重要な役割を果たす事を裏付けている. また, cav-1を含む重いフラクシオンがある種のシグナル伝達の機能を担っているという報告があり¹⁸⁾, 本研究で分画されたフラクシオン8は, Ca²⁺感受性亢進と相関関係はないが, 平滑筋の他の機能を制御している可能性がある.

我々の以前の研究では, ヒト腸間膜動脈平滑筋を用いて, 血清コレステロールとSPCによるCa²⁺感受性亢進との相関関係を示した⁷⁾. しかし, 腸間膜動脈に比べ, 冠状動脈や脳動脈は, 血管攣縮が起こると心筋梗塞や脳梗塞を発症する, 臨床的により重要な部位である. また, ヒト血管平滑筋サンプル, 特に冠状動脈は, 採取可能な量がかなり限られるため, 同じ血管サンプルで膜ラフトの量と組織コレステロール量の双方を測定する事は困難である. そこで, 本研究では, ヒト冠状動脈の代わりに, ブタ冠状動脈を用いた. 今後は, 食用ではなく, きちんと管理された研究用ブタを用いて, 血清コレステロール値および組織コレステロール量を関連づけて検討する

必要がある。

今回、組織のコレステロール量とコレステロールが限局して蓄積する膜ラフトが、SPCによる血管平滑筋収縮におけるCa²⁺感受性亢進において重要な役割を示す可能性を提示することができた。すなわち、ブタ冠状動脈血管平滑筋において、組織のコレステロールレベルは、膜ラフトの量に相関して、最終的にCa²⁺感受性亢進にも相関する可能性を初めて提唱した。しかしながら、本研究では、これら3因子の相関関係を観察しただけであり、それらの因果関係を検討していない。これら3因子のシグナル伝達における役割を明らかにするためには、細胞シグナル伝達研究における、いわゆる「loss of function」および「gain of function」について検討する必要がある。本研究結果は、血管平滑筋異常収縮に関する心血管イベントのメカニズムを検討する際に、新しい視点を提供するものであり、今後も精力的に本研究テーマの研究を続けて行きたい。

謝 辞

稿を終えるに当たり、ご指導とご高閲をいただきました山口大学大学院医学系研究科・生体機能分子制御学講座の小林 誠教授、岸 博子講師、加治屋勝子助教、川道穂津美助教及び特別研究員高田雄一先生に深謝申し上げます。また、本研究の実験遂行に際し、多大なるご協力をいただきました修士課程大学院生の木村友彦さん、宮成健司さん及び萩原弘さんに深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994 ; 372 : 231-236.
- 2) Todoroki-Ikeda N, Mizukami Y, Mogami K, Kusuda T, Yamamoto K, Miyake T, Sato M, Suzuki S, Yamagata H, Hokazono Y, Kobayashi S. Sphingosylphosphorylcholine induces Ca²⁺-sensitization of vascular smooth muscle contraction : possible involvement of Rho-kinase. *FEBS Lett* 2000 ; 482 : 85-90.
- 3) Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Miwa S, Nakao F, Kurokawa T, Todoroki-Ikeda N, Mogami K, Mizukami Y, Kuriyama S, Haze K, Suzuki M, Kobayashi S. Sphingosylphosphorylcholine is a novel messenger for Rho-kinase-mediated Ca²⁺ sensitization in the bovine cerebral artery : Unimportant role for protein kinase C. *Circ Res* 2002 ; 91 : 112-119.
- 4) Nakao F, Kobayashi S, Mogami K, Mizukami Y, Shirao S, Miwa S, Todoroki-Ikeda N, Ito M, Matsuzaki M. Involvement of Src family protein tyrosine kinases in Ca²⁺-sensitization of coronary artery contraction mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway. *Circ Res* 2002 ; 91 : 953-960.
- 5) Shirao S, Fujisawa H, Kudo A, Kurokawa T, Yoneda H, Kunitsugu I, Ogasawara K, Soma M, Kobayashi S, Ogawa A, Suzuki M. Inhibitory effects of eicosapentaenoic acid on chronic cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage : possible involvement of a sphingosylphosphorylcholine-rho-kinase pathway. *Cerebrovasc Dis* 2008 ; 26 : 30-37.
- 6) Kurokawa T, Yumiya Y, Fujisawa H, Shirao S, Kashiwagi S, Sato M, Kishi H, Miwa S, Mogami K, Kato S, Akimura T, Soma M, Ogasawara K, Ogawa A, Kobayashi S, Suzuki M. Elevated concentrations of sphingosylphosphorylcholine in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage : a possible role as a spasmogen. *J Clin Neurosci* 2009 ; 16 : 1064-1068.
- 7) Morikage N, Kishi H, Sato M, Guo F, Shirao S, Yano T, Soma M, Hamano K, Esato K, Kobayashi S. Cholesterol primes vascular smooth muscle to induce Ca²⁺ sensitization mediated by a sphingosylphosphorylcholine-Rho-kinase pathway : possible role for membrane raft. *Circ Res* 2006 ; 99 : 299-306.
- 8) Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev* 2000 ; 1 : 31-39.
- 9) Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 2001 ; 106 : 403-411.

- 10) Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 1999 ; **19** : 7289-7304.
- 11) Prinetti A, Chigorno V, Tettamanti G, Sonnino S. Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture : a compositional study. *J Biol Chem* 2000 ; **275** : 11658-11665.
- 12) Pike LJ, Han X, Chung KN, Gross RW. Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression : a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry* 2002 ; **41** : 2075-2088.
- 13) Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 2010 ; **327** : 46-50.
- 14) Tivodar S, Paladino S, Pillich R, Prinetti A, Chigorno V, van Meer G, Sonnino S, Zurzolo C. Analysis of detergent-resistant membranes associated with apical and basolateral GPI-anchored proteins in polarized epithelial cells. *FEBS Lett* 2006 ; **580** : 5705-5712.
- 15) Nebl T, Pestonjamas KN, Leszyk JD, Crowley JL, Oh SW, Luna EJ. Proteomic Analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membrane. *J Biol Chem* 2002 ; **227** : 43399-43409.
- 16) Baron CB, Coburn RF. Smooth muscle raft-like membranes. *J Lipid Res* 2004 ; **45** : 41-53.
- 17) Insel PA, Head BP, Ostrom RS, Patel HH, Swaney JS, Tang CM, Roth DM. Caveolae and lipid rafts : G protein-coupled receptor signaling microdomains in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2005 ; **1047** : 166-172.
- 18) Otáhal P, Angelisová P, Hrdinka M, Brdická T, Novák P, Drbal K, Horejsí V. A new type of membrane raft-like microdomains and their possible involvement in TCR signaling. *J Immunol* 2010 ; **84** : 3689-3696.

Importance of Tissue Cholesterol and Lipid Rafts in the Sphingosylphosphorylcholine-induced Ca²⁺ sensitization of Vascular Smooth Muscle Contraction

Chen WANG

Molecular Physiology and Medical Bioregulation (Physiology I), Yamaguchi University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan

SUMMARY

Rho-kinase (ROK) -mediated Ca²⁺ sensitization of vascular smooth muscle (VSM) contraction plays a pivotal role in the pathophysiology of abnormal VSM contraction such as vasospasm. As a novel upstream mediator of the ROK-mediated Ca²⁺ sensitization, we previously identified sphingosylphosphorylcholine (SPC). SPC induced sustained contraction without any change of cytosolic Ca²⁺ concentrations, which was blocked by inhibitors of Src-TK and ROK, suggesting the involvement of these kinases. A significant linkage was observed between the extent of SPC-induced contraction and serum total cholesterol level in both human and rabbits. However, possible importance of tissue cholesterol and cholesterol-enriched membrane microdomains, lipid rafts in SPC-induced Ca²⁺ sensitization has been unknown. In this study, putative links between three parameters (tissue cholesterol, lipid rafts, and SPC-induced Ca²⁺ sensitization) were explored in the same samples of porcine coronary VSM strips. Sucrose density gradient fractionation analysis showed the presence of two peaks of caveolin-1 content in the fractions, only lighter one of which depended on cholesterol and Ca²⁺ sensitization. Our findings in this report are the first to demonstrate the strong correlations between the three parameters. The data raise the possibility that tissue cholesterol and lipid rafts play important roles in the SPC-induced Ca²⁺ sensitization of VSM.