
テクニカルノート

スキンド法による血管の細胞内シグナル伝達の評価法

轟-池田奈津子, 白尾敏之, 佐藤正史, 山本 哲, 最上紀美子,
水上洋一, 小林 誠

山口大学医学部生理学第一講座 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)

Key words : 血管平滑筋収縮, カルシウム, 細胞内情報伝達, GTP結合蛋白, RhoA, Rho-kinase

はじめに

従来, 血管平滑筋の収縮は, 細胞質Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) の上昇が引き金となり, Ca²⁺-calmodulin (CaM) 依存性酵素であるmyosin light chain kinase (MLCK) が活性化され, 20kDaのmyosin light chain (MLC) がリン酸化を受けることによって, 収縮が引き起こされると考えられてきた。しかし, Ca²⁺蛍光指示薬を用いた[Ca²⁺]_i測定¹⁾が可能となり, [Ca²⁺]_iと血管平滑筋張力の同時測定により, アゴニストによって張力/[Ca²⁺]_i比が増加することが示された^{2,3)}。さらに, ブドウ球菌α-toxin⁴⁾やβ-escin⁵⁾処理によって, 細胞膜の情報伝達機構(受容体, G蛋白, 酵素など)を温存したまま細胞膜に小孔を開けること(スキンド法)が可能となり, [Ca²⁺]_iが一定の状態においても, 受容体とG蛋白の活性化により, 平滑筋のMLCリン酸化と張力のレベルが増加すること(Ca²⁺非依存性収縮)が直接証明された^{2,5)}。また, スキンド血管平滑筋標本を用い, リコンビナント蛋白を細胞内へ導入することによって, 低分子量G蛋白のRhoA, およびRho-kinaseがCa²⁺非依存性収縮を引き起こす新規の細胞内情報伝達分子であることが明らかにされた^{3,6)}。本稿では, まず, スキンド法の種類と利点について概説した後, スキンド血管標本の作成法について紹介する。

1. スキンド法の種類と利点(図1)

細胞内情報伝達を検索する上で, スキンド法は, 以下の3つの利点をもつ。1) 細胞膜に穴が開いており, Ca²⁺キレート剤(10mM EGTAなど)により[Ca²⁺]_iを一定値に固定できるため, 純粋にCa²⁺非依存性収縮を観察することが容易である。細胞内ストアは, A23187によって完全に枯渇させることが可能であり, A23187自体はCa²⁺非依存性収縮に影響がないことを確認している⁵⁾。実際に, スキンド血管標本の細胞質全体において, [Ca²⁺]_iが均一に一定値に固定されていることを, fura-2蛍光測光法およびElectron Probe X-ray Microanalysisにて確認している^{4,5)}。2) 通常は細胞膜を通過できないG蛋白制御因子(GTPやGDPなど)を細胞外から細胞内へ直接投与できるので, G蛋白の機能を容易に制御することが可能である。3) 多くの細胞内情報伝達因子は細胞膜を通過しないので, 細胞外から投与することは困難である。しかしながら, スキンド法では, 細胞内情報伝達因子の候補となる物質やリコンビナント蛋白を細胞内へ直接投与することによって, その因子の効果を直接観察できるため, 細胞内情報伝達因子のスクリーニングに最適である。

スキンド法には, 大別して, 1) 巨大な穴を細胞膜に開け, 細胞膜情報伝達機構が失活したスキンド法(Triton X-100法)と2) 細胞膜情報伝達機構を温存させたスキンド法(α-toxin法, β-escin法)がある。アゴニストとGTPγSは, G蛋白の機能を残

平成12年8月1日受理

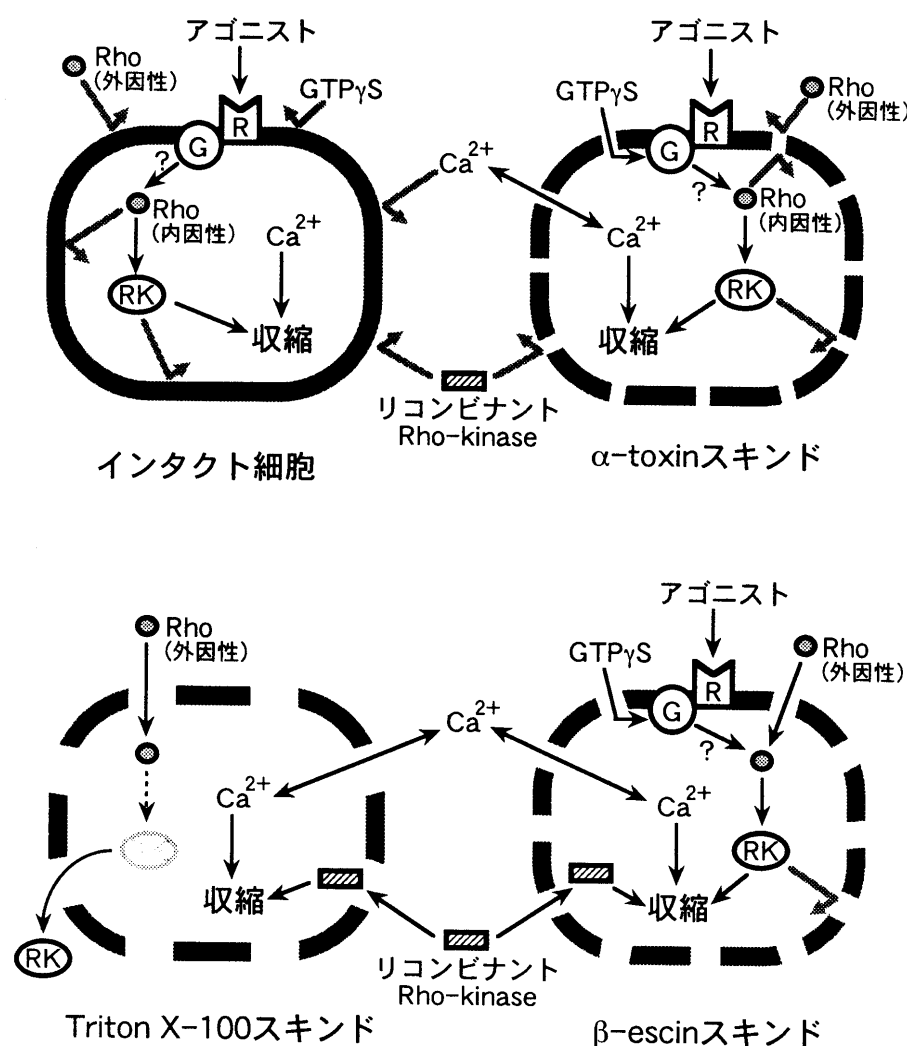


図1 平滑筋のスキンド (α -toxin, 右上; β -escin, 右下; Triton X-100, 左下) 標本とインтакт標本 (左上) におけるリコンビナント RhoA、リコンビナント Rho-kinase、および他の情報伝達物質投与の効果についての模式図。R: 細胞膜受容体、G: G蛋白、RK: Rho-kinase、リコンビナント Rho-kinase: Rho-kinaseの酵素触媒部位のリコンビナント蛋白。

したスキンド (α -toxinあるいは β -escin) 血管平滑筋において Ca^{2+} 非依存性収縮を引き起こすが、Triton X-100処理筋に対し無効である。アゴニストに対する受容体がG蛋白連結型の場合には、アゴニストが反応を引き起こすためには、溶液中にGTPが存在することが必須である。リコンビナント蛋白 (例えば、RhoAやRho-kinaseなど) は、 β -escinとTriton X-100処理筋の細胞質へ投与することができるが、 α -toxin処理筋の細胞質へは投与できない。 α -toxinで処理した場合は1 kDaまで、 β -escinで処理した場合は150 kDaまでの物質が、細胞膜を通過することができる。内因性のRho-kinaseのような高分子量の蛋白質は、 β -escin処理筋の細胞質に残る。

2. スキンド血管標本の作成法¹⁶⁾

いずれのスキンド法を行うにしても、まず、微小血管標本を作製することが必要である。バックライト付きの実体顕微鏡下で、平滑筋の筋線維の走行を確認しながら、幅50~200 μ mの微小条片に細切する。防振台に設置された高感度トランスデューサー (ミネベア社、UL-2gなど) にて、収縮を測定する。高K脱分極刺激に対して、一定の収縮反応が得られることを確認した後、血管標本を細胞内液 (74.1mM potassium methanesulphonate, 2mM methanesulphonate, 4.5mM MgATP, 1mM EGTA,

10mM creatine phosphate, 30mM PIPES, 1 μ M FCCP, 1 μ M leupeptin) にインキュベートする. Triton X-100および β -escin処理標本では, 細胞内液は1 μ M calmodulinを含む.

以下のような条件で細胞膜に穴を開けた後, pCa 6.3~6.5溶液 (10mM EGTAで緩衝させた低濃度Ca²⁺を含む細胞内液) に対する収縮反応を観察し, スキンドの程度を評価する. スキンド標本では, pCa 4.5で最大収縮が得られるが, 細胞膜がインタクトの場合には, 全く収縮を引き起こさない.

1) α -toxin法⁴⁾. α -toxinは, 直接細胞内液で溶解させる. 混和の際に泡立てないように注意する. 0.12 mg/ml α -toxinを含む細胞内液 (冷蔵庫にて保存) に40~50min作用させる.

2) β -escin法⁵⁾. β -escinは, 一旦DMSOに溶解させstock solutionを作製し (用時調整), 細胞内液で溶解させる. 30 μ M β -escinを含む細胞内液に20~30min作用させる.

3) Triton X-100法⁶⁾. Triton Xは, まず, 蒸留水にて50%程度に希釈しstock solutionとし (用時調整), 細胞内液で溶解させる. 0.5% Triton X-100を含む細胞内液 (用時調整) に20~30min作用させる.

おわりに

近年, 高血圧症や血管攣縮などの血管緊張異常の本態として, 血管平滑筋のCa²⁺非依存性収縮が注目されている^{2,3,7)}. その細胞内情報伝達経路の最下流の因子として, Rho-kinaseが同定されたが, 今後は, その上流の制御メカニズムを明らかにすることによって, 血管緊張異常の分子機構を解明することが必要であろう. スキンド法は, 新規の情報伝達分子を探索する上で, 有力な手法の1つとなると思われる.

引用文献

- 1) Kobayashi S, Kanaide H, Nakamura M. Cytosolic-free calcium transients in cultured vascular smooth muscle cells: Microfluorometric measurements. *Science* 1985;**229**:553-556.
- 2) Somlyo AP, Somlyo AV. Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 1994;**372**:231-236.
- 3) Kobayashi S, Kureishi Y, Todoroki-Ikeda N, Mोगami K, Ito M, Nakano T, Ohmura M, Yoshimoto Y. Potential signal mediators for Ca²⁺ sensitization of smooth muscle contraction: Rho-associated kinase, atypical protein kinase C, and arachidonic acid. In: *A Functional View of Smooth Muscle* (Ed. Barr L and Christ GJ), 2000;pp. 121-137, JAI press Inc., Greenwich, Connecticut.
- 4) Kitazawa T, Kobayashi S, Horiuti K, Somlyo AV, Somlyo AP. Receptor coupled, permeabilized smooth muscle: role of the phosphatidylinositol cascade, G-proteins and modulation of the contractile response to Ca²⁺. *J. Biol. Chem.* 1989;**264**:5339-5342.
- 5) Kobayashi S, Kitazawa T, Somlyo AV, Somlyo AP. Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca²⁺ release in smooth muscle: Physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. *J. Biol. Chem.* 1989;**264**:17997-18004.
- 6) Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K, Ito M. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1997;**272**:12257-12260.
- 7) Uehata M, Ishizaki T, Sato H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 1997;**389**:990-994.