

## 第5章 イノシトール3リン酸受容体サブタイプと細胞骨格タンパク質の結合の解析

### 5-1 緒言

生体を構成する細胞がそれぞれ特異的な機能を持つのは、それら細胞がそれぞれ固有の細胞内情報伝達経路および遺伝子発現系を持つからである。IP<sub>3</sub>受容体は細胞内Ca<sup>2+</sup>情報伝達系の中心的なタンパク質で、細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度を制御することによって細胞内の多くのタンパク質の活性制御を行う。たとえば遺伝子発現や細胞形態変化や分泌などの細胞特有の機能が制御されている。つまりIP<sub>3</sub>受容体は細胞の機能発揮において極めて重要なタンパク質と考えられている。

筆者らの解析から、IP<sub>3</sub>受容体には3つのサブタイプが存在して(Yamamoto-Hino et al., 1994)、それぞれ組織・細胞特異的な発現制御を受けていることがわかってきた(Sugiyama et al., 1994b, Sugiyama et al., 1996)。さらに細胞内局在もサブタイプによって異なることが示唆された(Sugiyama et al., 1996, Yamamoto-Hino et al., 1995, Yamamoto-Hino et al., 1998, Monkawa et al., 1998)。しかし一方で機能を考えると、IP<sub>3</sub>受容体の基本的機能は、細胞内に遊離したIP<sub>3</sub>に結合して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を増加させることにある。筆者らの解析結果は何を意味するか。細胞にとって、細胞内局在の異なるIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現を変化させ、細胞内分布も異なることによるようなメリットがあるのだろうか。おそらくその違いは、その細胞機能にとって必然性があるのだろう。一つの考え方として、サブタイプによって役割・機能が違うことがあげられる。

多くのタンパク質にみられるように、タンパク質の局在はその機能と密接な関係があると考えられる。染色体DNAに関連した機能を有するタンパク質は核に存在していることが一般的で、細胞膜に存在することはあまりない。

第3章でIP<sub>3</sub>受容体の細胞内分布をみたところ、サブタイプによって異なっていた(Sugiyama et al., 1994a, Sugiyama et al., 1996)。特にIP<sub>3</sub>受容体が細胞膜に近い領域

に多く存在することに興味を持たれた。細胞膜は細胞外からの様々な刺激を受容する最初の場所であると同時に、細胞内から細胞外に向けて分泌・運動などの動的な反応をする場所でもあって、細胞機能にとって重要な部位である。この領域に存在する  $IP_3$  受容体サブタイプは、その機能に関与していると考えられる。細胞膜周辺の細胞内には様々な細胞内情報伝達関連タンパク質や、細胞の形態を維持したり変化させたりする細胞骨格系タンパク質が存在する (Carraway and Carraway, 1995, Lelievre et al., 1996, Janmey, 1998)。これらタンパク質が、細胞膜の近傍で  $IP_3$  受容体サブタイプと作用している可能性が考えられた。 $IP_3$  受容体サブタイプの機能を解明するためには、サブタイプの局在に関する解析を詳細に行い、そこに存在する分子との相互作用の検討を進める必要があるだろう。

最近、非神経系の細胞では  $IP_3$  受容体タイプ 1 が細胞膜に存在して、細胞骨格タンパク質アクチンと結合していることを示唆する報告がなされている (Fujimoto et al., 1995)。また血球系の T 細胞ではアンキリンと結合していることが報告されている (Bourguignon et al., 1993b)。アンキリンは細胞膜と作用する細胞骨格タンパク質である。細胞骨格タンパク質は、細胞の形態に関するタンパク質であり、一見、細胞内情報伝達に関する  $IP_3$  受容体とは無関係に思われる。しかし第 4 章の考察で記したように、様々なイオンチャンネルがアクチンによって活性制御されることや、細胞骨格タンパク質に影響すると考えられる細胞への機械的な刺激が、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を増加させることから、 $IP_3$  受容体は細胞骨格タンパク質と密接な関係があることが考えられた。この情報伝達系タンパク質と細胞骨格系タンパク質という異なる範疇のタンパク質会合に関する解析は、細胞内情報伝達を多面的に理解するのに重要な知見を与えることが考えられた。

そこで本章では細胞骨格タンパク質と  $IP_3$  受容体の結合は重要と考え、その結合を解析することにした。解析の対象として、細胞骨格タンパク質が主要な役割を果たしている血管平滑筋細胞を解析することにした。血管平滑筋細胞は血管の収縮に関係する細胞で、血圧調節に関係しており、細胞内  $Ca^{2+}$  情報伝達に関する生理的

研究が多くなされていること、および形態的解析が比較的しやすい細胞の形をしているからである (Hori and Karaki, 1998, Karaki et al., 1997)。この特徴を活かして、これまでの研究で不足している点があった、一つの細胞の中で  $IP_3$  受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 が互いにどう分布しているかに関する検討を加え、細胞骨格タンパク質とサブタイプの局在を詳細に解析することにする。

## 5-2 材料と方法

### 5-2-1 試薬

IP<sub>3</sub>受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3特異的モノクローナル抗体としては、それぞれ KM1112, KM1083, KM1082 を使用した (Sugiyama et al., 1994a)。各種細胞骨格タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体としては、抗テーリン抗体、抗 $\alpha$ アクチニン抗体、抗パキシリン抗体、抗ビンキュリン抗体、抗平滑筋 $\alpha$ アクチン抗体を使用した (Sigma 社製)。FITC 標識ウマ抗マウス IgG1b 抗体、tetramethyl rhodamine isothiocyanate (TRITC) 標識ウマ抗マウス IgG1b 抗体および TRITC 標識ウマ抗マウス IgG2a 抗体は Southern Biotechnology 社製を使用した。ローダミン標識ヤギ抗ウサギ IgG は DAKO 社製を使用した。FITC 標識ファロイジンは Molecular Probe 社製を使用した。Pansorbin は Calbiochem 社製を使用した。Enhanced chemiluminescence (ECL) 検出キットは Amersham 社製を使用した。collagenase type II は Worthington 社製を使用した。elastase III は Boehringer mannheim 社製を使用した。RPMI-1640 medium および M199 medium は Gibco 社製を使用した。コラーゲン I 溶液は高研社製を使用した。その他の分析用試薬は、Sigma 社、和光純薬社、ペプチド研究所、Fisher Scientific 社および Schleicher & Schuell 社製を使用した。

### 5-2-2 細胞培養

ラット初代培養血管平滑筋細胞は胸部大動脈から以下のように調製した。成獣雄ウィスターラット (7~8週令) は日本チャールスリバーから入手した。屠殺後の操作は全て無菌的なクリーンベンチ内で行い、サンプルは全て無菌的な容器で取り扱った。使用したハサミは全てエタノールで消毒した器具を使用した。血管平滑筋細胞の単離と培養は Campbell らの方法に従った (Campbell et al., 1989)。胸部大動脈は背骨に結合組織によって固定されている。そこでラットからの血管の摘出には、屠殺後、

開胸して心臓をピンセットで摘んで経動脈を切断し、そのままハサミを胸部大動脈と背骨の間に入れて、背骨に沿って切り取り、ラット1匹から約2 cmほどの血管を含む組織を得た。次に、摘出した組織から心臓を切り取って洗浄用培地 (M199 medium, 100 units/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin) に浸漬し、適度に攪拌して血管内に残っている血球細胞を洗浄除去した。摘出した組織は結合組織に覆われており、その中に血管がある。さらに血管は、結合組織と外膜、中膜、内膜の3層構造になっていて、それぞれ線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞で構成されている。平滑筋細胞だけを選別して初代培養するために、次の一連の操作を行った。血管を含む組織をコラゲナーゼ溶液 (M199 medium, 600 units/ml collagenase type II, 0.5 mg/ml trypsin inhibitor, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) に浸漬して、37 °Cで10分間インキュベーションした。これをシャーレに移して実体顕微鏡 (ニコン社製) に設置し、血管の周りの組織を取り除き、薄白い血管を濾出させた。この過程で、組織をかるくしごくことによって剥がれやすい内膜は除去された。次に血管の外膜を顕微鏡で観察しながらピンセットを用いて剥離して除去した。この時点で血管は、裂けやすい白い円筒状の中膜からなる組織になった。次に中膜の細胞外マトリックスを分解して平滑筋細胞を単離するために、組織を更に酵素で処理した。すなわち血管を1.5 ml容量のエッペンドルフチューブに移し、500 µl コラゲナーゼ溶液を添加して37 °Cで1時間インキュベーションした。次に500 µl エラスターゼ溶液 (M199 medium, 1 mg/ml elastase III, 0.5 mg/ml trypsin inhibitor, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) を添加して37 °Cで1時間インキュベーションした。この間ときどきピペティングして固まりをほぐした。次に15 ml容量の遠心チューブに酵素処理した血管懸濁液を移し入れて、1 mlのM199培地を添加して、室温で900 x gで5分間遠心して細胞を沈殿させて回収した。これを血管平滑筋細胞とした。得られた血管平滑筋細胞の培養にはM199培養液 (M199 medium, 10% fetal bovine serum, 4 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) を使用した。細胞培養はコラーゲンIで表面コートされた培養シャーレを用いて、加湿した5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで37 °Cで行った。

### 5-2-3 ウェスタンブロッティング解析

培養シャーレに接着している細胞をPBSで洗浄した後、溶解緩衝液（50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10  $\mu$ M Pepstasin A, 10  $\mu$ M Leupeptin, pH 7.5）を添加して、4°Cで30分間インキュベーションして細胞を溶解させた。次にセルスクレーパーを用いて溶解性成分および不溶性成分をまとめて回収し、遠心チューブを用いて4°Cで900 x gで5分間遠心した上清を可溶化タンパク質とした。この可溶化タンパク質にサンプル緩衝液（0.1% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8）を添加して80°Cで3分間インキュベーションした後、6% SDS-PAGEを行ってタンパク質をアクリルアミドゲルに展開した。ゲル中のタンパク質は、エレクトロブロッティングによってニトロセルロース膜（Schleicher and Schuell社製）に転写した。すなわちゲルとニトロセルロース膜を密着させて、ブロッティング用緩衝液（10 mM Tris-HCl, 5 mM glycine, 1% SDS, pH 7.2）で湿らせた濾紙で挟み、膜の両側に電圧をかけて、200 mAの定電流で4°Cで1時間通電することによってゲルに展開したタンパク質をニトロセルロース膜にブロッティングした。次にブロッティングしたニトロセルロース膜をブロッキング溶液（PBS, 10% スキムミルク, 0.2% Tween 20）に浸漬して、室温で30分間インキュベーションした。次にブロッキング溶液で希釈したKM1112、KM1083、KM1082、抗テーリン抗体、抗 $\alpha$ アクチニン抗体、抗パキシリン抗体、抗ビンキュリン抗体または抗平滑筋 $\alpha$ アクチン抗体を添加して室温で2時間インキュベーションした。洗浄液（0.1% Tween 20, PBS）中で10分間の振盪を3回繰り返して、特異的な反応をしない抗体を洗浄して、次にペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体を添加して、室温で30分間インキュベーションした。これを洗浄液を用いて室温で10分間の振盪を3回繰り返して洗浄した。結合したモノクローナル抗体は化学発光検出システムECLを用いて検出した。

#### 5-2-4 免疫沈降

細胞の可溶化タンパク質に 1mM 2-mercaptoethanol を添加して、2 °C で 20,000 x g で 30 分間遠心して上清を回収し、免疫沈降のサンプルとして使用した。変性タンパク質をサンプルとした免疫沈降のためには、細胞の可溶化タンパク質 100 µl に対して、150 µl のタンパク質変性溶液（50 mM Tris-HCl, 6 M urea, 20 mM dithiothreitol, 1% SDS, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10 µM Pepstasin A, 10 µM Leupeptin, 1 mM 2-mercaptoethanol, pH 7.5）を添加して、100 °C で 5 分間インキュベーションし、タンパク質の様々な会合状態を解離・変性させた。次に透析緩衝液（10 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10 µM Pepstatin A, 10 µM Leupeptin, pH 7.2）に対して、4 °C で透析を行った。この可溶化タンパク質に 6 µg/ml のヤギ抗マウス IgG 抗体 (gamma chain specific) を 4 °C で 30 分間反応させ、さらに Pansorbin を添加して 4 °C で 30 分間反応させた。Pansorbin は、非特異的なタンパク質の吸着を抑制するためにアルブミン溶液（10% BSA, PBS）を添加し、4 °C で 1 時間のインキュベーション処理して使用した。Pansorbin を反応させたサンプルを遠心分離 (12,000rpm, 2min) して上清を回収し、6 µg/ml KM1112、KM1083、KM1082 をそれぞれ添加して 4 °C で 1 時間インキュベーションした。さらに 6 µg/ml のヤギ抗マウス IgG 抗体を添加して、4 °C で 1 時間インキュベーションした。この溶液に、Pansorbin を添加して、4 °C でさらに 1 時間、回転振盪培養機でインキュベーションした。次に 900 x g で 5 分間遠心して Pansorbin を沈殿させて上清を廃棄した。次に洗浄液（10% Nonident P-40, 10% Triton X-100, 0.1% BSA, PBS）を添加して懸濁し、900 x g で 5 分間遠心して上清を廃棄する操作を 3 回行って Pansorbin を洗浄した。最後に SDS-PAGE のサンプル緩衝液を添加して、100 °C で 5 分間インキュベーションして Pansorbin に結合しているイムノグロブリン/タンパク質複合体を遊離させた。これを室温で 900 x g で 5 分間遠心して上清を回収し、免疫沈降物とした。

### 5-2-5 免疫細胞化学解析

3～5代継代した血管平滑筋細胞を、コラーゲンIで表面コートしたスライドガラス上に培養した。スライドガラスの表面処理は、コラーゲンI溶液をスライドガラスに滴下して、室温で1時間インキュベーションした。スライドガラスはPBSで軽く洗浄した後、風乾させて、紫外線照射滅菌して使用した。スライドガラス上に培養した細胞はPBSで洗浄後、固定液（2% paraformaldehyde, PBS）を添加して室温で5分間インキュベーションして細胞をスライドガラスに固定した。次にPBSで洗浄後、細胞透過液（0.1% Triton X-100, PBS）を添加して室温で5分間インキュベーションした。次にPBSで洗浄後、ブロッキング溶液（2% normal horse serum, PBS）を添加して室温で30分間インキュベーションした。

IP<sub>3</sub>受容体タイプ1とタイプ2、またはタイプ3とタイプ2、またはIP<sub>3</sub>受容体タイプ2とテーリンの二重染色は以下のように行った。抗体の希釈はブロッキング溶液を使用した。最初に1 μg/ml KM1083を添加して、加湿箱の中で4℃で16時間インキュベーションした。次にPBSを添加して室温で10分間インキュベーションして、PBSを廃棄した。これを3回繰り返して洗浄した後、次にTRITC標識抗マウスIgG2a抗体を添加した。室温で30分間インキュベーションした後、PBSを添加して室温で10分間インキュベーションして、PBSを廃棄した。これを3回繰り返して洗浄した後、1 μg/ml KM1112、KM1082または1:100に希釈した抗テーリン抗体を添加した。4℃で16時間インキュベーションした後、PBSを添加して室温で10分間インキュベーションして、PBSを廃棄した。これを3回繰り返して洗浄した後、FITC標識抗マウスIgG1b抗体を添加した。室温で30分間インキュベーションした後、PBSを添加して室温で10分間インキュベーションして、PBSを廃棄した。これを3回繰り返して洗浄した。細胞はマウント剤（20% glycerol, PBS）でマウントした。尚KM1112、KM1083、KM1082による特異的な反応のコントロールとして、あらかじめこれらモノクローナル抗体を、10倍量のそれぞれのモノクローナル抗体に特異的なペプチドと4℃で1時間インキュベーションした



ものを使用した。

IP<sub>3</sub>受容体タイプ2とFアクチン、またはIP<sub>3</sub>受容体タイプ3とFアクチンの二重染色は以下のように行った。最初に1 μg/ml KM1083 または KM1082 を添加して、加湿箱の中で4 °Cで16時間インキュベーションした。次にPBSを添加して室温で10分間インキュベーションして、PBSを廃棄した。これを3回繰り返して洗浄した後、次にTRITC標識抗マウスIgG2a抗体またはTRITC標識抗マウスIgG1b抗体と、FITC標識Fアクチンを混合して添加して室温で30分間インキュベーションした。次にPBSを添加して室温で10分間インキュベーションして、PBSを廃棄した。これを3回繰り返して洗浄した後、マウント剤で細胞をマウントした。

標本は蛍光顕微鏡（Zeiss社製）で観察した。FITCはExcitation: BP 450-490, Emission: BP 515-565のフィルターセットで緑色に可視化し、TRITCはExcitation: BP 456, Emission: LP 590のフィルターセットで赤色に可視化した。共焦点レーザー顕微鏡はMelidian社製を使用した。

## 5-3 実験結果

### 5-3-1 培養血管平滑筋細胞における $IP_3$ 受容体サブタイプの発現

ラット一匹の胸部大動脈から、約  $3 \times 10^5$  個の血管平滑筋細胞が培養できた。培養シャーレ上で初代培養を開始して1週間は、ほとんど細胞数が増えなかった。その後徐々に増えて、3回ぐらい継代を重ねると細胞の倍加時間が約24時間になった。細胞は典型的な培養血管平滑筋細胞の紡錐形の形態を示し、コンフルエントになると低倍率の顕微鏡で観察すると Hill and Valley の模様を呈した。平滑筋細胞マーカーの平滑筋型  $\alpha$  アクチンの発現を免疫細胞染色解析した結果、培養した細胞は平滑筋型  $\alpha$  アクチン陽性であり、平滑筋細胞であることが確認された (Fig. 5-1)。

この血管平滑筋細胞の  $IP_3$  受容体サブタイプの発現を、モノクローナル抗体 KM1112、KM1083、KM1082 を用いてウエスタンブロッティング解析した。細胞の可溶化タンパク質を SDS-PAGE してニトロセルロース膜にブロッティングし、各モノクローナル抗体で解析した結果、KM1112、KM1083、KM1082 はそれぞれ約 250 kDa の分子量のバンドを特異的に検出した (Fig. 5-2)。したがって、培養平滑筋細胞は3つの  $IP_3$  受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3を発現していることが示された。

### 5-3-2 培養平滑筋細胞における $IP_3$ 受容体サブタイプの細胞内局在

培養血管平滑筋細胞は  $IP_3$  受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3を全て発現している。そこでこれら受容体が細胞内でどの様に分布しているか、そしてお互いにどう分布が違うか解析することにした。今までの報告では、1つの  $IP_3$  受容体の細胞内分布を解析した例はあるが、2種類以上のサブタイプの発現を一細胞内で同時に解析した例はない。筆者らは、気管上皮細胞では  $IP_3$  受容体サブタイプの細胞内分布

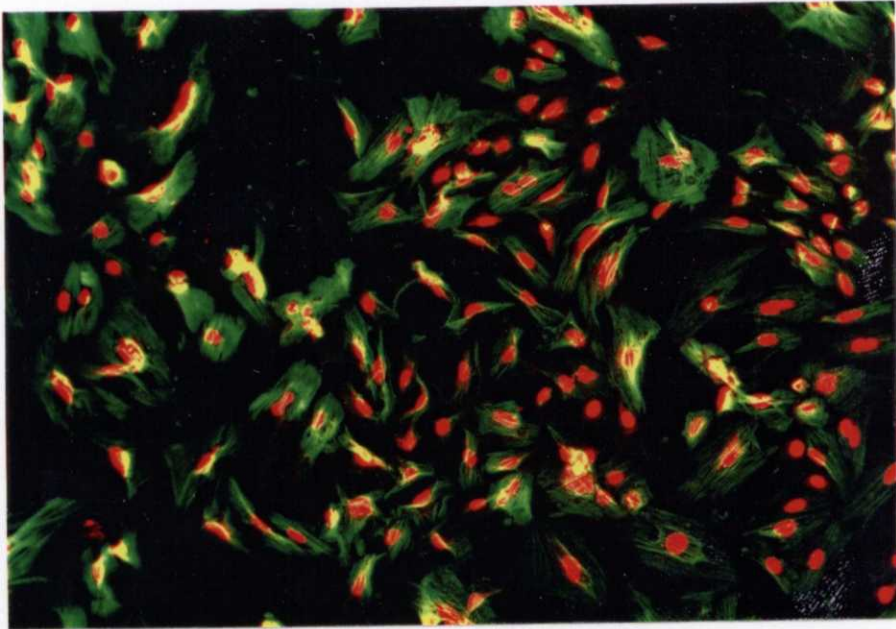


Fig. 5-1 初代培養血管平滑筋細胞の平滑筋型  $\alpha$  アクチンの免疫細胞染色  
ラット胸部大動脈から単離し、初代培養した血管平滑筋細胞を抗平滑筋型  
 $\alpha$  アクチン抗体で細胞染色し、FITC (緑の染色像) で可視化した。対象染  
色としてpropidium iodideを用いて細胞の核を染色した。すべての細胞が  $\alpha$   
アクチン陽性の細胞であることが観察される。

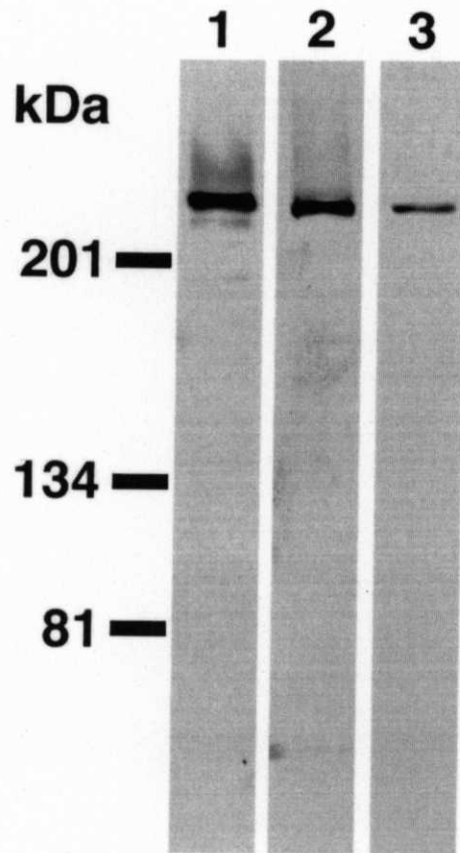


Fig. 5-2 血管平滑筋細胞は3つの $IP_3$ 受容体サブタイプを発現するモノクローナル抗体KM1112(レーン1)、KM1083(レーン2)、KM1082(レーン3)を用いて $IP_3$ 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3の発現をウエスタンプロテイング解析した。約250 kDaに特異的なバンドが検出され、血管平滑筋細胞は3つの $IP_3$ 受容体サブタイプを発現することがわかる。

が異なることを初めて示したが (Sugiyama et al., 1996) (第4章)、それは別々の組織切片を別々に  $IP_3$  受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体で解析した結果であり、間接的であった。そこで、同一細胞内での  $IP_3$  受容体サブタイプの発現を解析するために、蛍光抗体二重染色法を応用することにした。一般に蛍光抗体二重染色法は、異なる動物種で免疫して作製した2種類の抗体を一次抗体として用い、2次抗体にそれぞれ異なる蛍光で標識した動物種 IgG 特異的抗体を用いることによって、2種類の抗原を2つの蛍光色として染め分ける方法である。しかし、KM1112、KM1083、KM1082 は全てマウスのモノクローナル抗体なので、2次抗体に異なる蛍光で標識した動物種 IgG 特異的抗体を用いることによって、2種類の抗原を2つの蛍光色として染め分ける方法は不可能である。そこで KM1112、KM1083、KM1082 を用いた蛍光抗体二重染色を可能にするために、2次抗体としてマウス IgG アイソタイプ特異的抗体を用いることを考えた。KM1112、KM1082、KM1083 は、それぞれ IgG1b、IgG1b、IgG2a のアイソタイプであることがわかっている (Sugiyama et al., 1994a)。そこで2次抗体として KM1112 と KM1082 には FITC 標識抗マウス IgG1b 抗体を使用し、KM1083 には TRITC 標識抗マウス IgG2a 抗体を使用した。

培養血管平滑筋細胞をモノクローナル抗体 KM1112 と KM1083 を用いて蛍光抗体二重染色した。蛍光強度はタンパク質の発現量に比例している。図は1細胞を拡大した蛍光顕微鏡写真である。その結果、 $IP_3$  受容体タイプ1とタイプ2は異なる細胞内分布を示した (Fig. 5-3A,B)。 $IP_3$  受容体タイプ1は細胞の核周辺の細胞質にメッシュ状に広がった分布を示し、細胞の辺縁近辺の領域になるにしたがって発現が少なくなった (Fig. 5-3A)。細胞の縁にはほとんど発現が観察されなかったが、少しだけパッチ状に発現が観察された。尚、写真の中程の円形状に色が薄くなっている部分は細胞の核である。一方  $IP_3$  受容体タイプ2は細胞の核周辺の細胞質に広がった分布を示すと共に、細胞の辺縁領域においてパッチ状に集約した発現が認められた (Fig. 5-3B)。 $IP_3$  受容体タイプ1とタイプ2は細胞の辺縁部で共局在が観察

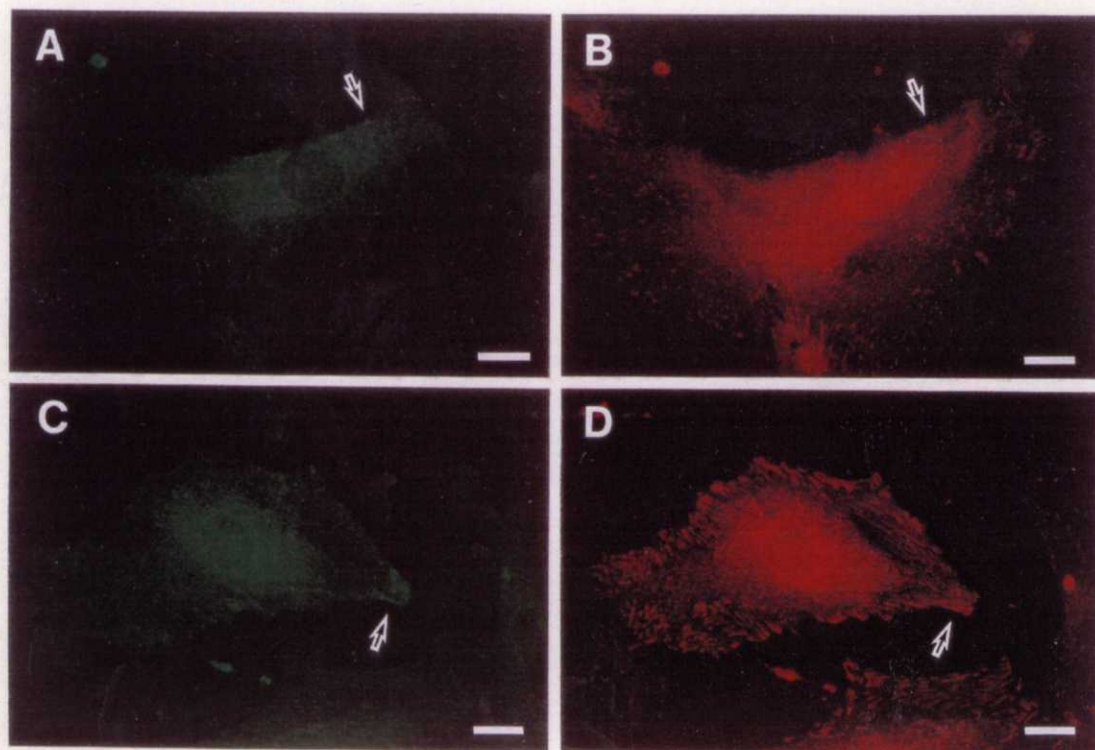


Fig. 5-3 血管平滑筋細胞の  $IP_3$  受容体サブタイプの蛍光二重染色

血管平滑筋細胞を固定し、Toriton X-100 で可溶化して、モノクローナル抗体 KM1112 (パネルA) と KM1083 (パネルB)、または KM1082 (パネルC) と KM1083 (パネルD) とインキュベーションして免疫細胞染色した。KM1083 は TRITC (赤の染色像) を用いて可視化した。KM1112 と KM1082 は FITC (緑の染色像) を用いて可視化した。一部の  $IP_3$  受容体タイプ2はタイプ1との共局在が認められる (A,B の矢印)。一部の  $IP_3$  受容体タイプ2はタイプ3と共局在が認められる (C,D の矢印)。Bar = 10  $\mu$ m。

された (Fig. 5-3A,B の矢印)。しかし、ほとんどの辺縁部では  $IP_3$  受容体タイプ1はタイプ2の様に高頻度な分布を示していなく、両タンパク質の分布は一致しなかった。次に培養血管平滑筋細胞をモノクローナル抗体 KM1082 と KM1083 を用いて蛍光抗体二重染色した。その結果、 $IP_3$  受容体タイプ2とタイプ3も異なる分布を示した (Fig. 5-3C,D)。 $IP_3$  受容体タイプ3は細胞の核周辺、および細胞の辺縁部の細胞質にメッシュ状に広がった分布を示し、細胞の縁にも明らかな分布が認められた (Fig. 5-3C)。 $IP_3$  受容体タイプ2とタイプ3は細胞の辺縁部で共局在が観察されたが (Fig. 5-3C,D の矢印)、タイプ3はタイプ2の様なパッチ状の分布は認められなかった。 $IP_3$  受容体タイプ1とタイプ3の二重染色は行っていないが、両タンパク質の細胞内発現を比較すると、タイプ3はタイプ1に比べて細胞の辺縁部にも多く発現していることから、タイプ1とタイプ3も互いに分布が違うことが強く示唆された。

尚、解析に使用した IgG アイソタイプ特異的な二次抗体は、IgG アイソタイプに特異的な結合を示し、異なるアイソタイプの IgG には全く反応しなかった。また、 $IP_3$  受容体サブタイプ特異的なペプチドであらかじめインキュベーションしたモノクローナル抗体では、細胞の染色像が全く観察されなく、モノクローナル抗体は  $IP_3$  受容体サブタイプを特異的に検出していることを確認した。

### 5-3-3 培養血管平滑筋細胞における $IP_3$ 受容体サブタイプと F アクチンの細胞内共局在性

$IP_3$  受容体タイプ1は細胞骨格タンパク質の F アクチンと共局在することが知られている。しかし、 $IP_3$  受容体タイプ2とタイプ3に関しては、細胞骨格タンパク質との結合について報告がない。そこで培養血管平滑筋細胞における F アクチンとこれら  $IP_3$  受容体サブタイプとの蛍光二重染色を行い、それらの共局在性を解析した。 $IP_3$  受容体タイプ2と F アクチンを蛍光二重染色した結果、F アクチンの局在 (Fig. 5-4A) はタイプ2の局在 (Fig. 5-4B) と大きく異なっていたが、一部の細胞



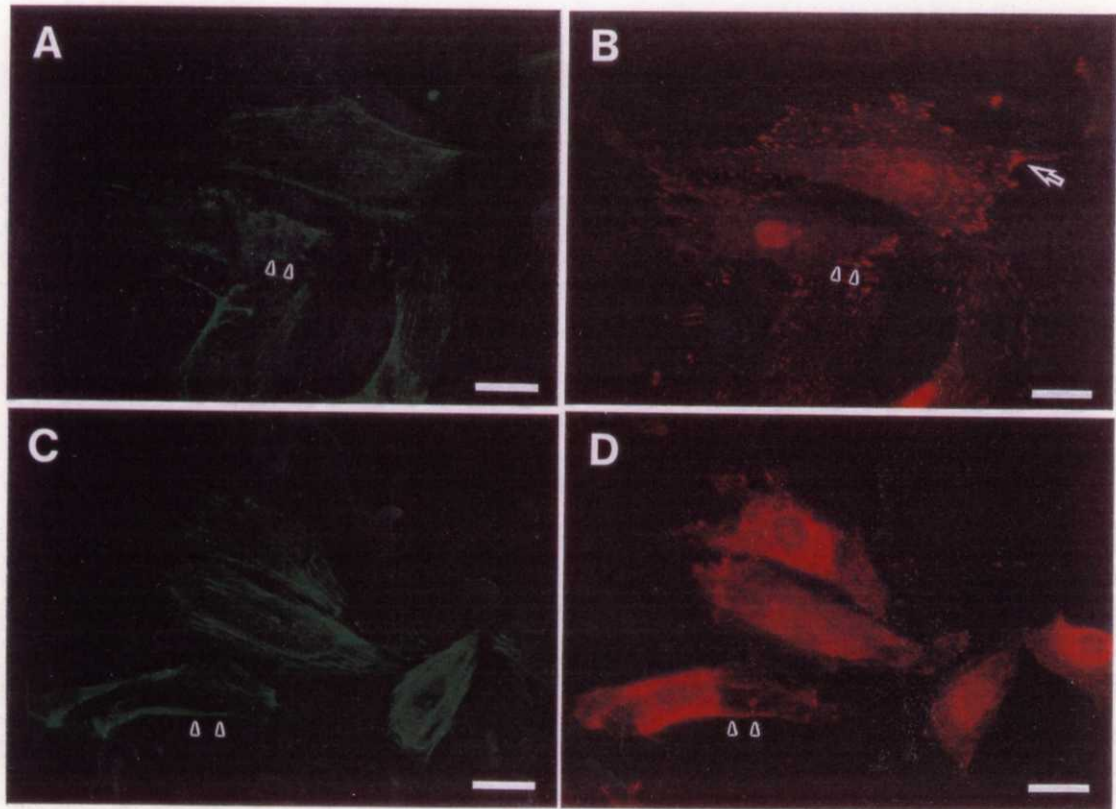


Fig. 5-4  $IP_3$  受容体サブタイプとアクチンフィラメントの蛍光二重染色  
 血管平滑筋細胞を固定化して、ファロイジン (パネルA) とKM1083 (パネルB)、  
 またはファロイジン (パネルC) とKM1082 (パネルD) で免疫染色した。ファ  
 ロイジン FITC (緑の蛍光像)、KM1083 と KM1082 は TRITC (赤の蛍光像) を  
 用いて可視化した。(A,B) 一部の  $IP_3$  受容体タイプ2は、アクチン繊維との共局  
 在が観察される (矢印)。特徴として  $IP_3$  受容体タイプ2の濃いシグナルが、アク  
 チン繊維の末端に観察される (Bの矢印)。(C,D) 一部の  $IP_3$  受容体タイプ3は、  
 アクチン繊維との共局在が観察される (矢印)。



内領域で両タンパク質の共局在が観察された (Fig. 5-4A,B の矢印)。興味深いことに  $IP_3$  受容体タイプ2の細胞内局在を示す強いシグナルが、Fアクチンフィラメントの端に観察された (Fig. 5-4B の大きい矢印)。 $IP_3$  受容体タイプ3とFアクチンを蛍光二重染色した結果、Fアクチンの局在 (Fig. 5-4C) はタイプ3の局在 (Fig. 5-4D) と大きく異なっていたが、一部の細胞内領域で両タンパク質の共局在が観察された (Fig. 5-4C,D の矢印)。Fアクチンフィラメントの端に  $IP_3$  タイプ3の強いシグナルは認められなかった。したがって以上の結果から、 $IP_3$  受容体タイプ2とタイプ3の一部はFアクチンと細胞内共局在することが示された。

#### 5-3-4 培養血管平滑筋細胞における $IP_3$ 受容体サブタイプとテーリンの細胞内共局在性

前節での解析で、 $IP_3$  受容体タイプ2がFアクチンフィラメントの端に局在していることが示された。一方アクチンフィラメントの端は、細胞が細胞膜を介して培養シャーレに接着する、いわゆる焦点接着と呼ばれる構造体であることが知られている。したがって  $IP_3$  受容体タイプ2がパッチ状に細胞内分布する細胞の辺縁部は、焦点接着である可能性が考えられた。そこでこの考えを確かめるために、焦点接着に特異的な細胞骨格タンパク質であるテーリンと (Goldmann et al., 1996)、 $IP_3$  受容体タイプ2の細胞内共局在性を検討した。モノクローナル抗体 KM1083 と抗テーリン抗体はそれぞれ IgG アイソタイプが違うので、異なる標識をした抗マウス IgG アイソタイプ特異抗体を用いて蛍光抗体二重染色を行った。抗テーリン抗体による細胞染色の細胞内分布は、Otey, Cらによって報告されている分布にほとんど同じであり、抗テーリン抗体は特異的にテーリンを検出したと考えられた。 $IP_3$  受容体タイプ2とテーリンの共局在の観察は、空間分解能の良い共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に解析した (Fig. 5-5)。赤色の  $IP_3$  受容体タイプ2の細胞内分布 (Fig. 5-5 左上) と緑色のテーリンの細胞内分布 (Fig. 5-5 右上) の蛍光抗体二重染色を重ねると、黄色になる部分があり (Fig. 5-5 中上)、両タンパク質の共局在が示された。

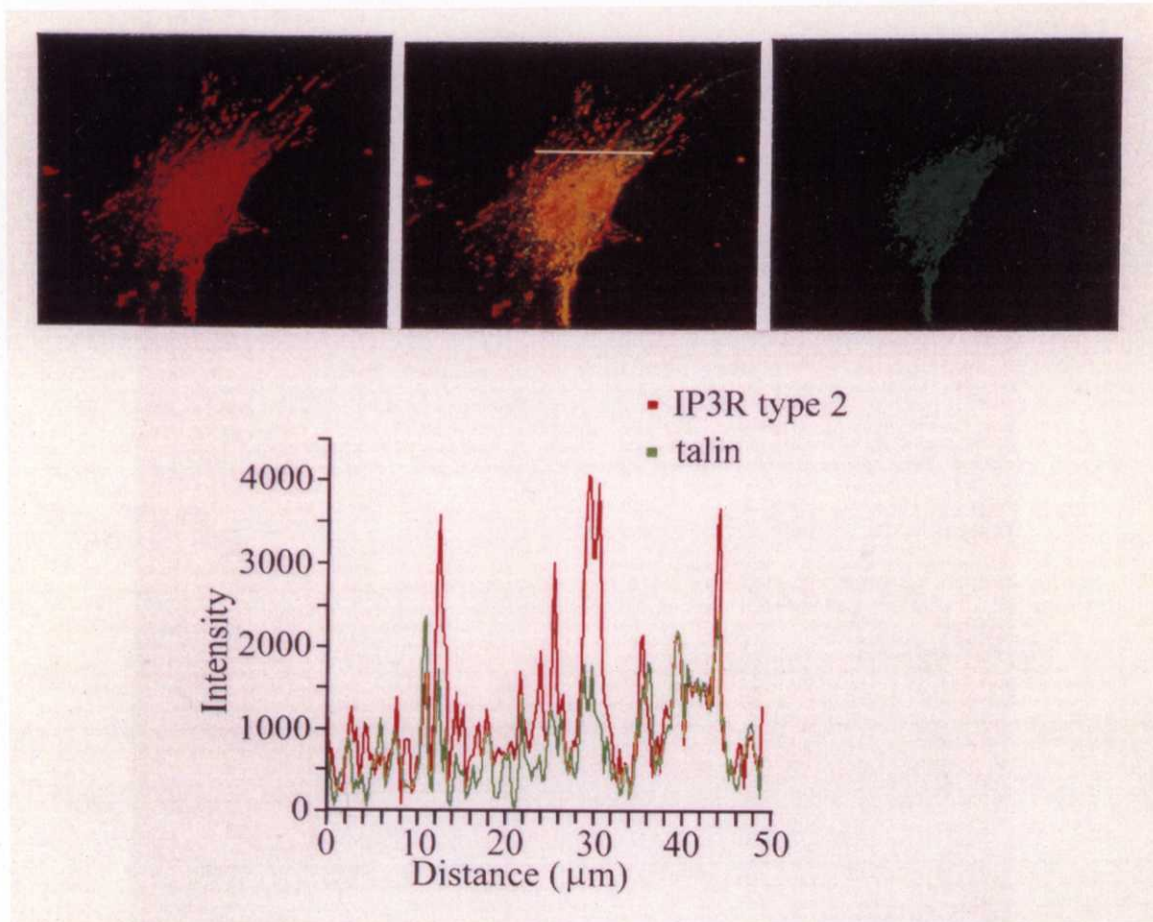


Fig. 5-5  $IP_3$ 受容体タイプ2とターリンの蛍光二重染色の共焦点レーザー顕微鏡解析  
 血管平滑筋細胞を固定化してKM1083 (左上) と抗ターリン抗体 (右上) で二重染色した。KM1083はTRITC (赤の蛍光像) を用いて可視化し、ターリン抗体はFITC (緑の蛍光像) を用いて可視化した。そして両者の画像を重ね合わせ (上中)、バーで示した部分の蛍光強度を測定した (下)。蛍光強度の上下変動が、 $IP_3$ 受容体タイプ2とターリンでよく似ていることがわかる。

任意の線上 (Fig. 5-5 中上の白線) での  $IP_3$  受容体タイプ2とテーリンのシグナルを比較すると、シグナルの強弱の振れが両タンパク質で似ていた (Fig. 5-5 下)。したがって  $IP_3$  受容体タイプ2は、予測したようにテーリンと細胞内共局在して、細胞接着に存在することが示された。

### 5-3-5 培養血管平滑筋細胞の $IP_3$ 受容体サブタイプとテーリンとの会合

次に  $IP_3$  受容体サブタイプがテーリンと会合しているか、サブタイプ特異的モノクローナル抗体や抗テーリン抗体を用いた免疫沈降とウエスタンブロッティング解析によって検討した。すなわちモノクローナル抗体 KM1112、KM1083、KM1082 を用いて、培養血管平滑筋細胞の可溶化タンパク質から  $IP_3$  受容体サブタイプを免疫沈降した。そして  $IP_3$  受容体サブタイプと一緒にテーリンが共免疫沈降しているかどうかを、免疫沈降したタンパク質のウエスタンブロッティング解析によって検討した (Fig. 5-6A)。レーン 1～3 はそれぞれ、KM1112、KM1083、KM1082 を用いて免疫沈降したタンパク質を示す。レーン 4 はコントロールの可溶化タンパク質である。Type 1、Type 2、Type 3、talín は、それぞれ  $IP_3$  受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3およびテーリンの発現を示す。 $IP_3$  受容体サブタイプは約 250 kDa の分子量にバンドが検出され、テーリンは約 200 kDa にバンドが検出された。KM1112 を使用して免疫沈降したサンプルからは  $IP_3$  受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3が検出された。同様に KM1083 や KM1082 を使用して免疫沈降したサンプルからも  $IP_3$  受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3が検出された。これらの結果は、培養血管平滑筋細胞では  $IP_3$  受容体がヘテロ 4 量体のチャンネル構造を採りうることを示唆した。一方、テーリンは KM1112、KM1083、KM1082 のどのモノクローナル抗体で免疫沈降した  $IP_3$  受容体からも検出され、 $IP_3$  受容体サブタイプと共免疫沈降することがわかった。

このテーリンと  $IP_3$  受容体サブタイプの共免疫沈降が免疫沈降の操作の非特異的なアーチファクト、あるいは抗体の非特異的な結合ではないことを確認するために、培養血管平滑筋細胞の可溶化タンパク質をタンパク質変性溶液で処理してタンパク質の

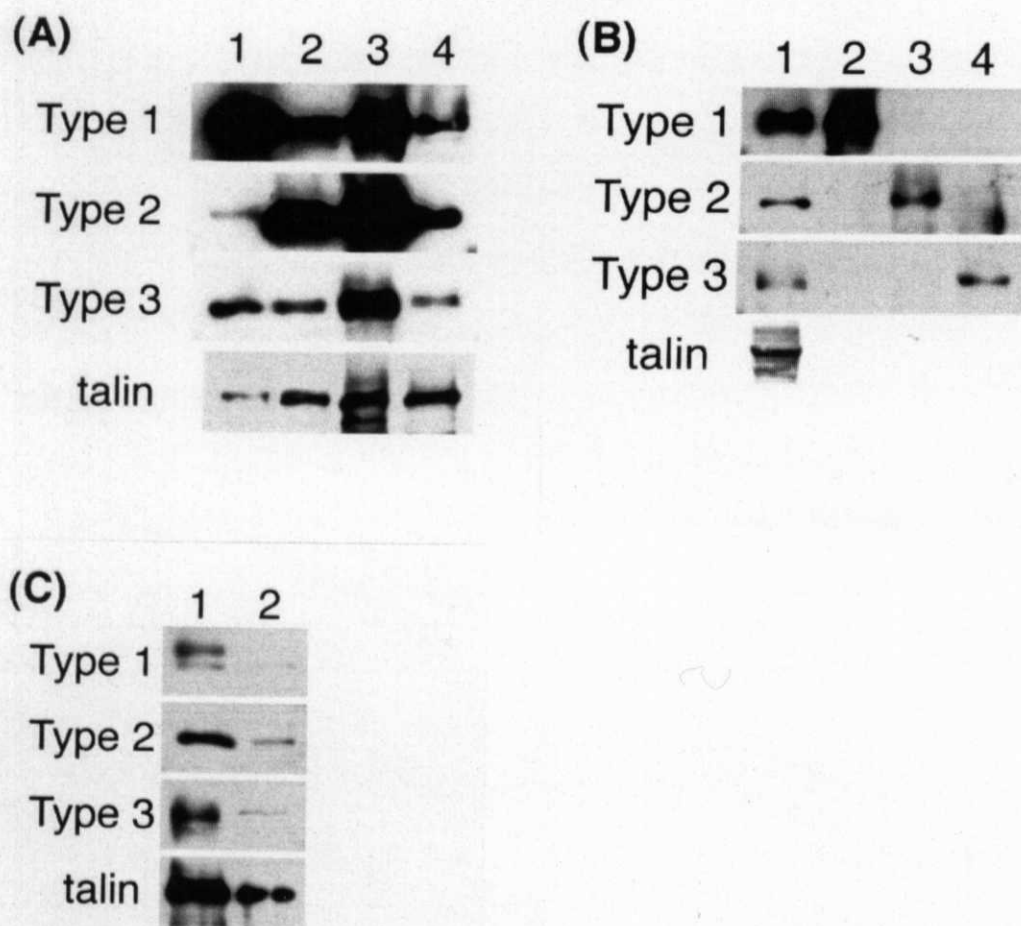


Fig. 5-6 IP<sub>3</sub>受容体サブタイプはテーリンと共免疫沈降する

(A) 血管平滑筋細胞の可溶化タンパク質の、モノクローナル抗体KM1112 (レーン1)、KM1083 (レーン2)、KM1082 (レーン3) による免疫沈降サンプル、およびコントロールの可溶化タンパク質 (レーン4) をSDS-PAGEして、KM1112 (Type 1)、KM1083 (Type 2)、KM1082 (Type 3)、抗テーリン抗体 (taln) でウエスタンブロッティング解析した。IP<sub>3</sub>受容体サブタイプとテーリンの共免疫沈降が観察される。(B) 血管平滑筋細胞の変性可溶化タンパク質の、モノクローナル抗体KM1112 (レーン2)、KM1083 (レーン3)、KM1082 (レーン4) による免疫沈降サンプル、およびコントロールの可溶化タンパク質 (レーン1) をSDS-PAGEして、KM1112 (Type 1)、KM1083 (Type 2)、KM1082 (Type 3)、抗テーリン抗体 (taln) でウエスタンブロッティング解析した。IP<sub>3</sub>受容体サブタイプとテーリンの共免疫沈降は観察されない。タンパク質-タンパク質相互作用の障害下では共免疫沈降しないことを示す。(C) 血管平滑筋細胞の可溶化タンパク質の、抗テーリン抗体による免疫沈降物 (レーン2)、およびコントロールの可溶化タンパク質 (レーン1) をSDS-PAGEして、KM1112 (Type 1)、KM1083 (Type 2)、KM1082 (Type 3)、抗テーリン抗体 (taln) でウエスタンブロッティング解析した。テーリンとIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの共免疫沈降が観察される。

様々な会合状態を解離・変性させたサンプルを用いて、共免疫沈降を解析した (Fig. 5-6B)。レーン 2～4 はそれぞれ KM1112、KM1083、KM1082 を用いて免疫沈降したタンパク質を示す。レーン 4 はコントロールである。KM1112、KM1083 または KM1082 を使用して免疫沈降したサンプルからは、それぞれ  $IP_3$  受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 が検出され、他のサブタイプは検出されなかった。この結果は、 $IP_3$  受容体の 4 量体構造が解離したことを示し、タンパク質の会合状態が解離したサンプルであることを示す。テーリンは、どのモノクローナル抗体で免疫沈降したサンプルからも検出されず、 $IP_3$  受容体サブタイプと共免疫沈降しなかった。したがって Fig 5-6A で示した  $IP_3$  受容体サブタイプとテーリンの会合が、免疫沈降の操作の非特異的なアーチファクトや抗体の非特異的な結合ではないことが確認された。

次に、抗テーリン抗体を用いたテーリンの免疫沈降によって、 $IP_3$  受容体サブタイプが共免疫沈降するか検討した (Fig. 5-6C)。レーン 1、2 はそれぞれコントロールのタンパク質、および抗テーリン抗体を用いて免疫沈降したタンパク質を示す。解析の結果、テーリンを免疫沈降したタンパク質から、 $IP_3$  受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 が検出され、 $IP_3$  受容体サブタイプがテーリンと共免疫沈降することが示された。以上の結果は、 $IP_3$  受容体サブタイプがテーリンと会合することを明確に示した。

### 5-3-6 培養血管平滑筋細胞の $IP_3$ 受容体サブタイプと焦点接着の細胞骨格タンパク質の会合

$IP_3$  受容体サブタイプが、焦点接着の細胞骨格タンパク質と会合することが判明したので、焦点接着のその他の細胞骨格タンパク質 (Critchley, 2000) とも会合する可能性を解析した。すなわち培養血管平滑筋細胞の可溶化タンパク質から  $IP_3$  受容体サブタイプを免疫沈降して、種々のモノクローナル抗体が焦点接着の細胞骨格タンパク質を検出するかを検討した (Fig. 5-7)。レーン 1～3 はそれぞれ  $IP_3$  受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 を免疫沈降したタンパク質を示す。レーン 4 はコントロールである。解析の結果、 $IP_3$  受容体サブタイプを免疫沈降したタンパク質か

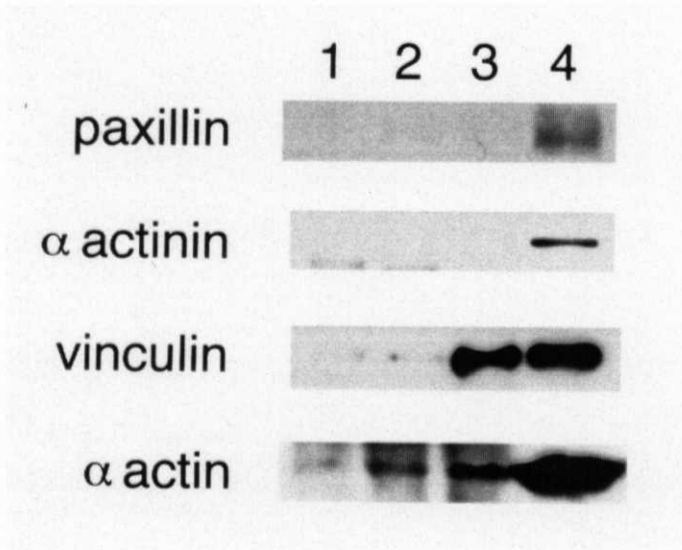


Fig. 5-7  $IP_3$  受容体サブタイプと共免疫沈降する細胞骨格タンパク質  
 血管平滑筋細胞の可溶化タンパク質を、KM1112 (レーン 1)、KM1083 (レーン 2)、KM1082 (レーン 3) 免疫沈降して、SDS-PAGE 後、ナイロン膜にブロットティングした。コントロールとして可溶化タンパク質を使用した (レーン 4)。そして抗パキシリン抗体 (paxillin)、抗  $\alpha$  アクチニン抗体 ( $\alpha$  actinin)、抗ビンキュリン抗体 (vinculin)、抗  $\alpha$  アクチン抗体 ( $\alpha$  actin) を用いてウエスタンブロットティングした。 $IP_3$  受容体サブタイプはビンキュリンと  $\alpha$  アクチンとは共免疫沈降したが、パキシリンや  $\alpha$  アクチニンとは共免疫沈降が認められなかった。

らは、パキシリンは検出されなかった。同様に $\alpha$ アクチニンは検出されなかった。しかし、 $\alpha$ アクチンとビンキュリンが検出され、特にビンキュリンは $IP_3$ 受容体タイプ1やタイプ2に比べて、タイプ3と共免疫沈降することを見いだした。これらの結果から、 $IP_3$ 受容体サブタイプは焦点接着の全てではないが特定の細胞骨格タンパク質と会合していることが示唆された。

#### 5-4 考察

血管平滑筋細胞には3つのIP<sub>3</sub>受容体サブタイプが発現するが、タイプ1に関しては免疫電子顕微鏡解析によって細胞質および細胞の辺縁部に存在することが報告されている(Nixon et al., 1994, Villa et al., 1993, Fujimoto et al., 1992)。さらに、IP<sub>3</sub>受容体タイプ1と考えられるタンパク質がアクチンフィラメントに結合していて、細胞膜の極近傍の小胞体やカベオラと呼ばれる特殊な細胞膜に存在することが報告されている(Fujimoto et al., 1992, Fujimoto et al., 1995)。しかしこれら細胞膜や細胞膜近傍のIP<sub>3</sub>受容体は全体からすると少数的な存在であり、細胞膜に近接した領域でのIP<sub>3</sub>受容体の役割を十分に認識されていなかった。

筆者らは、作製したIP<sub>3</sub>受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体のIgGアイソタイプが異なることを利用して、IP<sub>3</sub>受容体サブタイプの蛍光抗体二重染色像を初めて解析した。IP<sub>3</sub>受容体タイプ2が細胞の辺縁部にもパッチ状の分布を示すのに対して、タイプ1とタイプ3はそのような分布がなく、タイプ2とは異なっていた。さらにIP<sub>3</sub>受容体タイプ1とタイプ3の細胞内分布を比較すると、タイプ1は主に細胞の核の周囲に存在して細胞の辺縁部にほとんどないのに対し、タイプ3は細胞の辺縁部にも顕著に存在する傾向があり、両タンパク質の分布が異なることを示唆した。筆者らのIP<sub>3</sub>受容体タイプ1の結果は、IP<sub>3</sub>受容体が細胞の核周辺の細胞質に優性的に分布することを示していて、細胞膜や細胞膜近傍のIP<sub>3</sub>受容体は少数であるという報告(Fujimoto et al., 1992)に合致する結果であった。しかし、IP<sub>3</sub>受容体タイプ2とタイプ3の分布を解析すると、これらサブタイプが細胞の辺縁部にも明らかに存在することがわかり、IP<sub>3</sub>受容体は細胞の辺縁部にも存在することを再認識する結果となった。後でも触れるが、4章では細胞によるサブタイプ発現の違いが細胞機能の違いに関連する可能性を考察したが、本結果からは、細胞内局所でのサブタイプ発現の違いが局所での細胞機能に反映している可能性が考えられた。

最近、細胞膜にある細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵庫枯渇シグナル依存的なCa<sup>2+</sup>チャンネルのtransient receptor potential (TRP)のヒトホモログが、IP<sub>3</sub>受容体と会合することが示さ



れて注目されている (Boulay et al., 1999)。IP<sub>3</sub> 受容体もリアノジン受容体と電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルとの関係のように、TRP と共役して細胞質内の Ca<sup>2+</sup> 濃度を増加させる機構がある可能性も考えられている (Putney, 1999)。細胞の辺縁部の IP<sub>3</sub> 受容体は詳細に解析する必要があるだろう。

また、IP<sub>3</sub> 受容体サブタイプの分布の違いを示す結果は、細胞質全体に広がる小胞体に、IP<sub>3</sub> 受容体 Ca<sup>2+</sup> チャンネルがサブタイプの様々な構成比で存在することが考えられた。IP<sub>3</sub> 受容体タイプ2は極めて特異な分布を示し、解析の結果、そこが焦点接着という細胞接着装置の領域であることを見いだした。焦点接着に小胞体があるという直接的な報告はない。しかし小胞体に存在するプレセニリンというタンパク質が、焦点接着に特異的なフィラミンというタンパク質と共局在することが報告されている (Kovacs et al., 1996, Zhang et al., 1998)。筆者らの免疫沈降の検討では、IP<sub>3</sub> 受容体タイプ1とタイプ3も焦点接着のタンパク質であるテーリンと結合することから、少しはタイプ1とタイプ2も焦点接着に存在すると考えられる。以上から焦点接着にも小胞体は存在して、そこではおそらく IP<sub>3</sub> 受容体タイプ2が優勢的に分布していることが考えられた。

筆者らの結果はまた、IP<sub>3</sub> 受容体 Ca<sup>2+</sup> チャンネルが多様な構造を持つ可能性を示唆すると考えられた。IP<sub>3</sub> 受容体は4量体として1つの Ca<sup>2+</sup> チャンネルを形成し、ヘテロ4量体を構成しうることがわかっているが (Monkawa et al., 1995)、本研究は培養血管平滑筋細胞においても IP<sub>3</sub> 受容体がヘテロ4量体を構成することを示した。さらに、各 IP<sub>3</sub> 受容体サブタイプが細胞内で異なる分布を示したことから、細胞内の部位によってサブタイプの存在比が異なると考えられた。したがって、これら IP<sub>3</sub> 受容体サブタイプが4量体を形成して Ca<sup>2+</sup> チャンネルとなるときに、細胞内の部位によって4量体を形成するサブタイプの組み合わせが変わっている可能性が考えられた。細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度は、空間的・時間的に様々な上昇パターンがあることが知られている。例えば、平滑筋細胞は神経伝達物質の刺激を受けると、最初はゆっくりと細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を上昇させ、ある時に急速に増加させることが知られ

ている (Iino et al., 1993)。また、刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の最初の上昇は、細胞の辺縁部の細胞膜に近接した場所であることが報告されている (Nelson et al., 1995, Callamaras and Parker, 1999)。これらの違いを生み出す原因として、ひとつには  $\text{IP}_3$  受容体サブタイプの活性の違いが考えられる。 $\text{IP}_3$  受容体サブタイプは、プロテインキナーゼ A やカルモジュリンへの結合の違いや (Bezprozvanny et al., 1991, Yamada et al., 1995)、 $\text{IP}_3$  に対する親和性の違いが (Sudhof et al., 1991, Cardy et al., 1997)、その機能に影響していると考えられている。また最近、 $\text{IP}_3$  受容体サブタイプの1つのサブタイプだけを発現するように遺伝的な変異を与えた細胞系で、サブタイプによって  $\text{Ca}^{2+}$  上昇パターンが異なることが報告されている (Miyakawa et al., 1999)。本章での解析によると、細胞の局所によって多様な  $\text{IP}_3$  受容体  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが存在する可能性が示された。 $\text{IP}_3$  受容体  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの多様性は  $\text{IP}_3$  受容体による  $\text{Ca}^{2+}$  放出に多様なパターンがあることを示唆していると考えられている (Hirose and Iino, 1994)。以上から、 $\text{IP}_3$  受容体サブタイプの分布の違いが、局所での細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員に影響している可能性が考えられた。局在性と機能に関してさらに詳細な生理学的な検討が必要と考えられた。

アクチンフィラメントはアクチン結合性タンパク質によって制御を受ける構造体で、細胞の形態維持や細胞収縮の役割を担っている。 $\text{IP}_3$  受容体タイプ1はその一部がアクチンフィラメントと結合していることが報告されていたが (Fujimoto et al., 1995)、筆者らはタイプ2とタイプ3もその一部がアクチンフィラメントと共局在することを見いだした。一方、イノシトールリン脂質である  $\text{PIP}_2$  がアクチン結合性細胞骨格タンパク質に結合してアクチンフィラメントの分解を抑制することが知られており (Toker, 1998)、イノシトールリン脂質群の代謝が細胞骨格の構築に影響すると考えられている。すなわち  $\text{PIP}_2$  の代謝はアクチンフィラメントの分解を促進する。 $\text{IP}_3$  は  $\text{PIP}_2$  の分解物の一つである。 $\text{IP}_3$  をリガンドとする  $\text{IP}_3$  受容体サブタイプが、アクチン細胞骨格タンパク質を挟んで  $\text{PIP}_2$  と極めて近接した位置関係にあり、細胞形態変化と細胞内情報伝達が密接した関係にあることが考えられた。

IP<sub>3</sub>受容体タイプ2はタイプ3と違ってアクチンフィラメントの端に比較的多く存在していて、その場所が焦点接着であることがわかった。焦点接着のIP<sub>3</sub>受容体は図のように存在すると推定される (Fig. 5-8)。焦点接着はインテグリンを介して細胞外と連結した場所であり、細胞骨格タンパク質のみならず種々のキナーゼなどの情報伝達系のタンパク質が存在して、細胞の構造、運動、細胞接着と脱接着および細胞増殖に重要な役割を持つ構造体であることが知られている (Burrige et al., 1987, Mueller et al., 1992)。細胞外基質と結合するインテグリンは細胞内でテーリンと結合し、さらにテーリンはビンキュリンを介してアクチンフィラメントと連結している (Craig and Johnson, 1996)。重要なことに、ビンキュリンがPIP<sub>2</sub>と結合する事がこの細胞骨格タンパク質の再構成に必要なことが報告されている (Gilmore and Burrige, 1996)。したがってPIP<sub>2</sub>が代謝された場合は、細胞膜と細胞骨格タンパク質の連携が切断されて、細胞は骨格タンパク質の足場を失って新たな細胞形態の局面に移行すると考えられている。一方PIP<sub>2</sub>を代謝する酵素は、IP<sub>3</sub>を産生するPLC以外にもホスファチジルイノシトール4-リン酸 (PIP) を産生するイノシトール5-ホスファターゼや、ホスファチジルイノシトール3,4,5-三リン酸 (PIP<sub>3</sub>) を産生するホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3-キナーゼ) が存在し、PIP<sub>2</sub>の全てがIP<sub>3</sub>系の情報伝達をするわけではない。しかし少なくともPLCのサブタイプは焦点接着に存在することから (Zhang et al., 1999)、IP<sub>3</sub>濃度増加によるIP<sub>3</sub>受容体の活性化が、PIP<sub>2</sub>の減少による焦点接着の細胞骨格の再編成と関連する可能性が考えられた。

最近、細胞膜の極近傍に存在するIP<sub>3</sub>受容体はPIP<sub>2</sub>と結合していて、PIP<sub>2</sub>のPLCによる分解が、即IP<sub>3</sub>-IP<sub>3</sub>受容体の結合状態を形成して、Ca<sup>2+</sup>が放出されることが報告されている (Lupu et al., 1998)。筆者らの解析からは、細胞近傍のIP<sub>3</sub>受容体は細胞のその他の領域に存在するものと比べてサブタイプの構成比が異なることがわかっていて、特定のIP<sub>3</sub>受容体Ca<sup>2+</sup>チャンネルが細胞膜近傍でのCa<sup>2+</sup>情報伝達を担うことを示唆するものとして興味深い。特定のIP<sub>3</sub>受容体の必然性が、必要とされ

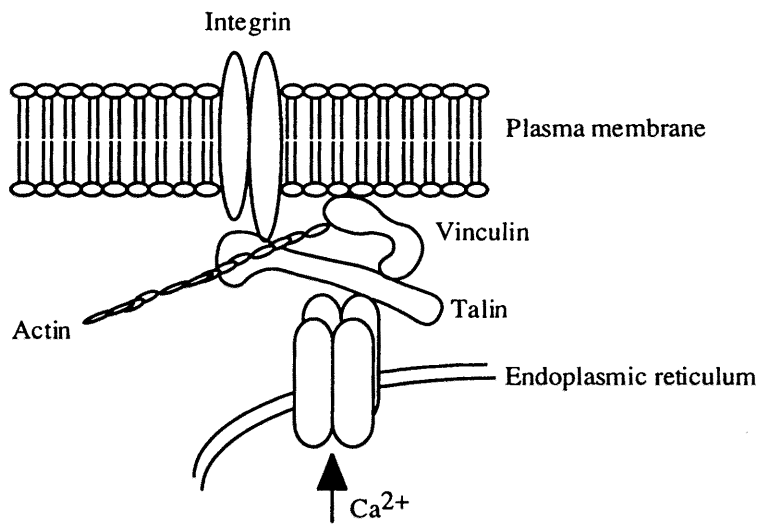


Fig. 5-8 焦点接着に存在する IP<sub>3</sub> 受容体の模式図

IP<sub>3</sub>受容体は焦点接着の細胞骨格タンパク質のテーリンと結合していることから、細胞膜に隣接した場所に存在すると考えられる。最近の報告から、IP<sub>3</sub>受容体はPIP<sub>2</sub>と結合していて、活性制御されていることや、細胞膜にあるTRP-Ca<sup>2+</sup>チャンネルと結合することがわかってきた。IP<sub>3</sub>受容体が細胞膜に近い局所でのCa<sup>2+</sup>の増加に関与していて、細胞の形態変化に影響していると考えられた。

る細胞内局所での特性によるのか、さらに解析が必要である。

焦点接着に存在する  $IP_3$  受容体は、細胞外のインテグリン刺激の細胞内情報伝達に関与する可能性がある。テーリンの欠損細胞では細胞接着が惹起されないことや (Priddle et al., 1998)、細胞にテーリンのアンチセンス RNA を発現させたり (Albiges-Rizo et al., 1995)、抗テーリン抗体を細胞にマイクロインジェクションすると細胞の spreading や遊走能が抑制されることは (Nuckolls et al., 1992)、インテグリンと結合するテーリンの重要性を示している。テーリンは  $Ca^{2+}$  感受性プロテアーゼのカルパイン II によって限定分解されることが知られており (Wencel-Drake et al., 1991)、テーリンが細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に制御されると考えられている。一方、インテグリン刺激は  $IP_3$  産生を誘起することが報告されていて (Sjaastad et al., 1996)、 $IP_3$  受容体はその細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇に関与すると考えられている。したがって  $IP_3$  受容体は機能的にもテーリンと密接な関係があり、インテグリン刺激に関与することが考えられる。

焦点接着に優勢的に発現する  $IP_3$  受容体タイプ 2 が、そこでの細胞内  $Ca^{2+}$  濃度増加に関与している可能性が高い。インテグリンの刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度増加は、好中球 (Jaconi et al., 1991)、血小板 (Poole and Watson, 1995)、単球 (Altieri et al., 1992)、リンパ球 (Kanner et al., 1993)、線維芽細胞 (McNamee et al., 1993)、内皮細胞 (Schwartz, 1993)、骨芽細胞 (Zimolo et al., 1994)、上皮細胞 (Sjaastad et al., 1994, Somogyi et al., 1994, Nebe et al., 1995) といった様々な細胞系で報告されており、細胞の正常な機能に重要と考えられる。また、インテグリンは病的な状態の細胞機能に重要な役割をす。癌の血管新生においてはインテグリンの発現増加が必要で (Brooks et al., 1994b, Brooks et al., 1994a)、その血管新生がカルシウムの制御によって抑制されることが報告されている (Kohn et al., 1995)。血管内膜肥厚においては血管平滑筋細胞のインテグリンによる遊走・増殖に関与している可能性が考えられている (Matsuno et al., 1994)。今後、 $IP_3$  受容体サブタイプと細胞接着および増殖の関係を詳細に検討する必要があるだろう。

## 5-5 結語

IP<sub>3</sub>受容体サブタイプの細胞内分布を詳細に解析するために、血管平滑筋細胞をラットの動脈から初代培養した。この培養血管平滑筋細胞は培養シャーレ内で良く増殖し、顕微鏡下で細胞質を観察するのに適した細胞であった。

この培養血管平滑筋細胞を用いて、IP<sub>3</sub>受容体サブタイプの細胞内分布を比較するために、これら抗体を組み合わせた蛍光抗体二重染色法を考案した。従来法は、異なる生物種で免役した一次抗体を用いて、二次抗体に生物種特異的な標識IgG抗体を使用する。しかし筆者らのモノクローナル抗体は全てマウス抗体なのでこの方法は採用できなかった。そこで、モノクローナル抗体のIgGアイソタイプが異なることに着目して、二次抗体にIgGアイソタイプ特異的な標識抗体を用いて蛍光抗体二重染色を行った。その結果、IgGアイソタイプ特異的な標識抗体は、使用したモノクローナル抗体のIgGアイソタイプ特異的に結合して、蛍光抗体二重染色解析ができることを実証した。

IP<sub>3</sub>受容体サブタイプの蛍光抗体二重染色を、培養血管平滑筋細胞を用いて検討した結果、各サブタイプによって分布が異なり、細胞内の部位によってサブタイプの構成比が異なることがわかった。IP<sub>3</sub>受容体タイプ1は主に細胞の核周囲の細胞質に分布し、細胞の辺縁部に従って存在量が減少した。IP<sub>3</sub>受容体タイプ2は細胞の核周囲の細胞質とともに、パッチ状に細胞の辺縁部に強く分布していた。IP<sub>3</sub>受容体タイプ3は細胞の核周囲から辺縁部に至る領域に広く存在した。これらの分布の違いが、IP<sub>3</sub>受容体Ca<sup>2+</sup>チャンネルのヘテロ4量体の形成に影響する可能性が考えられ、極めて多様なチャンネルがあることが示唆された。さらにこの多様性が細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度増加のパターン形成に影響している可能性が示唆された。

IP<sub>3</sub>受容体タイプ2とタイプ3が細胞骨格タンパク質と会合しているか、培養血管平滑筋細胞を用いて、IP<sub>3</sub>受容体とアクチンフィラメントの蛍光二重染色を検討した。その結果、IP<sub>3</sub>受容体タイプ2とタイプ3はアクチンフィラメントと共局在することを見いだした。またIP<sub>3</sub>受容体タイプ2はアクチンフィラメントの端に存

在することを見いだした。

アクチンフィラメントの端は細胞接着に関係する焦点接着であることから、 $IP_3$ 受容体タイプ2のパッチ状の分布が焦点接着である可能性を検討した。焦点接着特異的なタンパク質であるテーリンと $IP_3$ 受容体タイプ2の蛍光抗体二重染色を検討した結果、タイプ2の分布がテーリンと一致しており、焦点接着であることが確認された。

$IP_3$ 受容体サブタイプと焦点接着に存在する細胞骨格タンパク質との会合を免疫沈降法で検討した結果、 $IP_3$ 受容体サブタイプはテーリン、ビンキュリン、 $\alpha$ アクチンと会合する事を見いだした。これらの結果から、 $IP_3$ 受容体サブタイプは細胞骨格と密接な関係があり、細胞骨格の制御を介して細胞接着や増殖に影響する可能性が示唆された。

これまでの組織や細胞を用いた検討で、 $IP_3$ 受容体はサブタイプによって発現細胞・組織が異なること、およびサブタイプによって細胞内分布も異なることを示した。次章では、細胞機能と $IP_3$ 受容体サブタイプの発現を解析することにする。

## 第6章 細胞増殖とイノシトール3リン酸受容体サブタイプ発現の関連についての解析

### 6-1 緒言

第2章から第5章で明らかになったように、IP<sub>3</sub>受容体には3つのサブタイプが存在し、組織・細胞によって発現が異なる (Yamamoto-Hino et al., 1994, Sugiyama et al., 1994b, Sugiyama et al., 1994a, Sugiyama et al., 1996, Monkawa et al., 1998, Yamamoto-Hino et al., 1998)。さらに、第5章で明らかにしたようにIP<sub>3</sub>受容体サブタイプによって細胞内局在性が異なる (Sugiyama et al., 2000)。これらの事実はIP<sub>3</sub>受容体がサブタイプによってIP<sub>3</sub>細胞内情報伝達の役割が異なることを示唆している。しかし十分に解析されていない。そこでIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの機能に関する解析が必要と考え、血管平滑筋細胞を用いて解析することにした。

研究対象としての血管平滑筋細胞は、第5章においてIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの細胞内分布に関する基本的な解析があり、機能解析に応用するのに適当な系であると考えた。また、細胞内Ca<sup>2+</sup>変化に関する多くの研究がなされていることから、他の研究成果との比較考察においても有用と考えられたからである。血管平滑筋細胞の基礎研究の応用性にも着目した。

血管平滑筋細胞は血管壁を構成する主要な細胞で、イノシトール細胞内情報伝達系を惹起するアンジオテンシンII、エンドセリン、ノルアドレナリンなどの種々の血管作動性物質に応答して、血圧や血流を調整する役割を担っている (Alexander and Griendling, 1996)。高血圧や動脈硬化等の病的な状態では、収縮弛緩の異常や (Sato et al., 1994)、細胞増殖 (Ip et al., 1990)、細胞遊走 (Schwartz, 1997)、肥大等 (Siegman et al., 1997a, Siegman et al., 1997b) を引き起こし、病態形成に重要な役割をしていると考えられている。例えば動脈硬化を起こしている動脈の血管作動性物質応答性が変化していることが報告されている (Williams et al., 1988)。そしてこれらの血管作動物質の大部分が、IP<sub>3</sub>細胞内情報伝達系を作動させており、IP<sub>3</sub>受容体による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃



度の制御が、病的および正常な細胞応答に関与すると考えられてる。

本章では、細胞増殖との関係を解析することにする。

通常、血管平滑筋細胞を用いた機能解析の研究では、初代培養細胞または株化細胞が用いられるが、それぞれ解析に使用上の欠点がある。初代培養細胞は、継代によってアンジオテンシンIIなどの血管作動物質応答性や細胞特異的マーカータンパク質が減弱・消失したりする。株化細胞は初めから細胞特異的マーカータンパク質の発現や血管作動物質応答性が消失していることがある(Shanahan et al., 1994)。安定した実験系を計画するためには、血管平滑筋細胞に特異的な諸性質が安定して発現していることが望ましい。最近樹立された株化細胞SVS30-2-6(Hasegawa et al., 1997)やS7(Jahn et al., 1996)は、機能保持細胞株が得易いことで知られる温度感受性SV40 ラージT抗原トランスジェニックマウス(Yanai et al., 1991, Okuyama et al., 1995a, Okuyama et al., 1995b, Sugiyama et al., 1993)から作製され、特異的な平滑筋細胞マーカーの平滑筋型ミオシン重鎖(SM1)の発現が確認されているが、種々の血管作動物質応答性を失っていた。また広く利用されている細胞株A10やA7r5(Hirata et al., 1985)、およびSM-3(Sasaki and Uchida, 1989)は一部の血管作動物質応答性を維持しているが、SM1を発現しない。

そこで筆者らは、血管作動物質応答性を維持し、かつ主要な平滑筋細胞マーカータンパク質を発現する細胞株の樹立を試み、その細胞を使って細胞増殖におけるIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの役割を検討することにした。

## 6-2 方法と材料

### 6-2-1 試薬

IP<sub>3</sub>受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3特異的モノクローナル抗体としては、それぞれKM1112, KM1083, KM1082を使用した(Sugiyama et al., 1994a)。ラット抗平滑筋型ミオシン重鎖(SM1)モノクローナル抗体はKM995を使用した(Hasegawa et al., 1997)。マウス抗平滑筋型 $\alpha$ アクチン抗体はSigma社製を使用した。Enhanced chemiluminescence (ECL)検出キットはAmersham社製を使用した。Fura-2AMは同仁社製を使用した。[methyl-<sup>3</sup>H]-thymidineはDuPont NEN社製を使用した。collagenase type IIはWorthington社製を使用した。elastase IIIはBoehringer mannheim社製を使用した。M199 medium およびトリプシン溶液はGibco社製を使用した。ウシ胎児血清(FBS)はHyclone社製を使用した。コラーゲンI溶液は高研社製を使用した。エポキシ樹脂Quetol-812は日新EM社製を使用した。その他の分析用試薬は、Sigma社、Gibco BRL社、和光純薬社、ペプチド研究所、Fisher Scientific社およびSchleicher & Schuell社製を使用した。

### 6-2-2 血管平滑筋細胞の単離と細胞培養

温度感受性SV40ラージT抗原トランスジェニックマウスの初代培養血管平滑筋細胞は、胸部大動脈から以下のように調製した。温度感受性SV40ラージT抗原トランスジェニックマウスは(Yanai et al., 1991)、帯刀益夫先生から供与いただいた。屠殺後の操作は全て無菌的なクリーンベンチ内で行い、サンプルは全て無菌的な容器で取り扱った。使用したハサミは全てエタノールで消毒した器具を使用した。胸部大動脈は背骨に結合組織によって固定されている。マウスからの血管の摘出には、屠殺後、開胸して心臓をピンセットで摘んで経動脈を切断し、そのままハサミを胸部大動脈と背骨の間に入れて、背骨に沿って切り取り、マウス3匹から約1 cmほどの血管を含む組織を3つ得た。次に、摘出した組織から心臓を切り取って洗浄用培地(M199

medium, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) に浸漬し、適度に攪拌して血管内に残っている血球細胞を洗浄除去した。摘出した組織は結合組織に覆われており、その中に血管がある。さらに血管は、結合組織と外膜、中膜、内膜の3層構造になっていて、それぞれ線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞で構成されている。平滑筋細胞だけを選別して初代培養するために、次の一連の操作を行った。血管を含む組織をコラゲナーゼ溶液 (M199 medium, 600 units/ml collagenase type II, 0.5 mg/ml trypsin inhibitor, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) に浸漬して、37 °Cで10分間インキュベーションした。これをシャーレに移して実体顕微鏡 (ニコン社製) に設置し、血管の周りの組織を取り除き、薄白い血管を濾出させた。この過程で、組織をかくしごくことによって剥がれやすい内膜は除去された。次に血管の外膜を顕微鏡で観察しながらピンセットを用いて剥離して除去した。この時点で血管は、裂けやすい白い円筒状の中膜からなる組織になった。次に中膜の細胞外マトリックスを分解して平滑筋細胞を単離するために、組織を更に酵素で処理した。すなわち血管を1.5 ml容量のエッペンドルフチューブに移し、500 µl コラゲナーゼ溶液を添加して37 °Cで1時間インキュベーションした。次に500 µl エラスターゼ溶液 (M199 medium, 1 mg/ml elastase III, 0.5 mg/ml trypsin inhibitor, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) を添加して37 °Cで1時間インキュベーションした。この間ときどきピペッティングして固まりをほぐした。次に15 ml容量の遠心チューブに酵素処理した血管懸濁液を移し入れて、1 mlのM199培地を添加して、室温で900 x gで5分間遠心して細胞を沈殿させて回収した。これを血管平滑筋細胞とした。得られた血管平滑筋細胞の培養にはM199培養液 (M199 medium, 10% fetal bovine serum, 4 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin) を使用した。細胞培養はPrimaria<sup>(R)</sup> tissue-culture 培養6穴プレート (Falcon社製) の1穴を用いて、加湿した5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで33 °Cで行った。

細胞のクローニングはコロニー形成法で行った。すなわち細胞を10 cm細胞培養シャーレあたり約10細胞になるように植え込んで培養した。1~2週間後に細胞が

コロニーを形成したら、PBSで洗浄した後、コロニーを囲むように、グリセリンを塗布した直径50 mmのプラスチックリングを設置し、その中にトリプシン溶液を添加して細胞を脱着させた。細胞を回収してコラーゲンIで表面処理された細胞培養用96穴プレートに移し、コロニーごとにそれぞれ別々の培養穴に培養した。細胞がコンフルエントになったら、順次24穴プレート、12穴プレート、6穴プレートの順に培養プレートを大きくして継代した。

### 6-2-3 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度測定

血管平滑筋細胞を、コラーゲンIで表面コートした細胞培養用プラスチック製カバースリップ(住友ベークライト社製)上に培養した。カバースリップは表面処理のために24穴プレートに設置して、コラーゲンI溶液をカバースリップに滴下して、室温で1時間インキュベーションし、これをPBSで軽く洗浄した後、風乾させて、紫外線照射滅菌して使用した。コンフルエントに培養した細胞をハンクス緩衝液{8 g/l NaCl, 0.4 g/l KCl, 0.12 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O, 0.1 g/l MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 0.14 g/l CaCl<sub>2</sub> (anhydride), 1 g/l Glucose, 0.1 g/l MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O, 0.35 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 2.384 g/l HEPES; pH7.3}で洗浄した。次に0.003 mM Fura-2AM溶液(1 mM Fura-2AM:10% Cremophol EL:ハンクス緩衝液=5:1:1に混合し、超音波振動で20秒間処理したものをハンクス緩衝液で希釈した)を添加して、37°Cで暗所で30分間インキュベーションし、細胞内にCa<sup>2+</sup>濃度蛍光指示薬を動員した。

細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の測定は細胞内イオン測定装置CAF-110(日本分光社製)を用いて行った。すなわちFura-2を動員した細胞が接着しているカバースリップを専用ホルダーにセットして、2 mlハンクス緩衝液を添加してある石英キュベット内に設置した。溶液の攪拌のためにマグネチックスターラーバーを入れた。次にこれをCAF-110にセットして、励起光340 nmで励起し、405 nmと500 nmの2波長の蛍光およびその蛍光比を測定した。各種血管作動性物質はシリンジを用いて20 μlを添加し、キュベット内で目的の終濃度になるようにした。測定は37°Cまたは33°Cで行い、ペン

レコーダー LR4200 (横河電機社製) を用いて結果を記録した。

#### 6-2-4 ウェスタンブロッティング解析

培養シャーレに接着している細胞を PBS で洗浄した後、溶解緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 10  $\mu$ M Pepstasin A, 10  $\mu$ M Leupeptin, pH 7.5) を添加して、4 °C で 30 分間インキュベーションして細胞を溶解させた。次にセルスクレーパーを用いて溶解性成分および不溶性成分をまとめて回収し、遠心チューブを用いて 4 °C で 900 x g で 5 分間遠心した上清を可溶化タンパク質とした。この可溶化タンパク質 5 ~ 10  $\mu$ g にサンプル緩衝液 (0.1% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8) を添加して 80 °C で 3 分間インキュベーションした後、SDS-PAGE を行ってタンパク質をアクリルアミドゲルに展開した。ゲル中のタンパク質は、エレクトロブロッティングによってニトロセルロース膜 (Schleicher and Schuell 社製) に転写した。すなわちゲルとニトロセルロース膜を密着させて、ブロッティング用緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 5 mM glycine, 1% SDS, pH 7.2) で湿らせた濾紙で挟み、膜の両側に電圧をかけて、200 mA の定電流で 4 °C で 1 時間通電することによってゲルに展開したタンパク質をニトロセルロース膜にブロッティングした。次にブロッティングしたニトロセルロース膜をブロッキング溶液 (PBS, 5% スキムミルク, 0.1% Tween 20) に浸漬して、室温で 30 分間インキュベーションした。次にブロッキング溶液で希釈した KM1112、KM1083、KM1082、KM995 または抗平滑筋  $\alpha$  アクチン抗体を添加して室温で 2 時間インキュベーションした。洗浄液 (0.1% Tween 20, PBS) 中で 10 分間の振盪を 3 回繰り返して、特異的な反応をしない抗体を洗浄して、次に KM1112、KM1083、KM1082 と抗平滑筋  $\alpha$  アクチン抗体に対しては、ペルオキシダーゼ標識抗マウスイムノグロブリン抗体を添加して、室温で 30 分間インキュベーションした。KM995 に対してはペルオキシダーゼ標識抗ラットイムノグロブリン抗体を添加して、室温で 30 分間インキュベーションした。これを洗浄液を用いて室温で 10 分間の振盪を 3 回繰り返して洗浄し

た。結合した抗体は化学発光検出システム ECL を用いて検出した。バンドの濃さの定量は ImageMaster 2D Elite (ファルマシア社製) を用いて行った。

#### 6-2-5 DNA 合成能の解析

細胞をコラーゲンIで表面処理した6穴プレートに培養した。ポストコンフルエントになった細胞をPBSで洗浄した後、血清を含まないM199培養液に培地交換した。24時間後と48時間後に1  $\mu\text{Ci}/\text{well}$  の [methyl- $^3\text{H}$ ]-thymidine を添加して、それぞれ3時間インキュベーションした。次に氷冷したPBSで3回洗浄した後、5%トリクロロ酢酸を添加して氷上で30分間のインキュベーションした。次に100%エタノールで洗浄して、細胞溶解液 (0.1 N NaOH, 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) を添加して細胞を溶かし、水溶性シンチラントと混合した。放射活性は液体シンチレーター (Aloka社製) で測定した。

#### 6-2-6 電子顕微鏡解析

8 wells chamber slide (Nunc 社製) に細胞を培養した。培養液を除去後、細胞を0.1M リン酸緩衝液 (PB) で洗浄した。次に細胞に2% グルタルアルデヒド (PBで調製) を添加して4°Cで30分間インキュベーションし、細胞を固定した。次にPBで洗浄した後、2% 四酸化オスミウムを添加して室温で30分間インキュベーションした。次に細胞を70, 80, 90, 100%の各エタノール溶液に順次15分ずつ浸漬した。次に細胞にエポキシ樹脂 Quetol-812 を添加して、37°Cで1日間インキュベーション後、さらに60°Cで2日間インキュベーションして切片作製の樹脂包埋を行った。超薄切片 (80 nm 厚) の作製は、ULTRACUT N (Reichert-Nissei 社製) を用いて行った。切片は二重染色 (鉛染色を室温20分、酢酸ウラニル染色を室温20分) して、電子顕微鏡 H7100 (日立社製) にて観察した。

## 6-3 実験結果

### 6-3-1 アンジオテンシンII刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化を指標にした細胞の選択

3匹の温度感受性SV40ラージT抗原トランスジェニックマウスの大動脈から、血管平滑筋細胞を単離して初代培養した。初代培養は6穴プレートの2穴分から始めた。約1ヶ月間培養して細胞が増えたところで、細胞をクローニングするために細胞を限界希釈して10cmシャーレに継代した。約1ヶ月間培養した結果、合計319個のコロニーの形成が観察された。これらコロニーの細胞をそれぞれクローニングして細胞を増やし、その細胞の一部を使用してアンジオテンシンII応答性を検討した。細胞選択の指標としては、アンジオテンシンIIで細胞を刺激するとIP<sub>3</sub>受容体を介して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度を増加させることに着目し、アンジオテンシンIIで刺激した時の、340nmの励起光を照射したFura-2（細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度指示薬）の405nm蛍光シグナル値の増加と500nm蛍光シグナル値の減少、および両シグナル比（405nmシグナル/500nmシグナル）の増加を指標にした。一次スクリーニングとして、24クローンのアンジオテンシンII応答性を検討した。比較的よく反応するクローンを1つ選択して、細胞の単一化を進めた。すなわち、その細胞を再び限界希釈して培養し、コロニーを形成させて細胞の二次クローニングを行った。こうして得た43個のクローンに関して、アンジオテンシンIIで刺激したときの応答性を検討し、アンジオテンシンIIの刺激によって細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加が惹起される細胞株を選別した。そしてその血管平滑筋細胞株をSVSCと命名した。SVSCのアンジオテンシンII刺激に対する細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の経時変化を測定した結果、刺激によって一過性の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加が観察された（Fig. 6-1）。この細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加は、初代培養の血管平滑筋細胞と同等であった。したがってSVSCはアンジオテンシンII応答性をよく維持していることがわかった。比較のために他の血管平滑筋細胞株SVSとA10も同様に検討したが、これらの細胞株はアンジオテンシンIIに対して細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加を示さなかった。また、SVSCをアンジオテンシンII受容体アンタゴニストのlosartan存在下でアンジオテンシンII

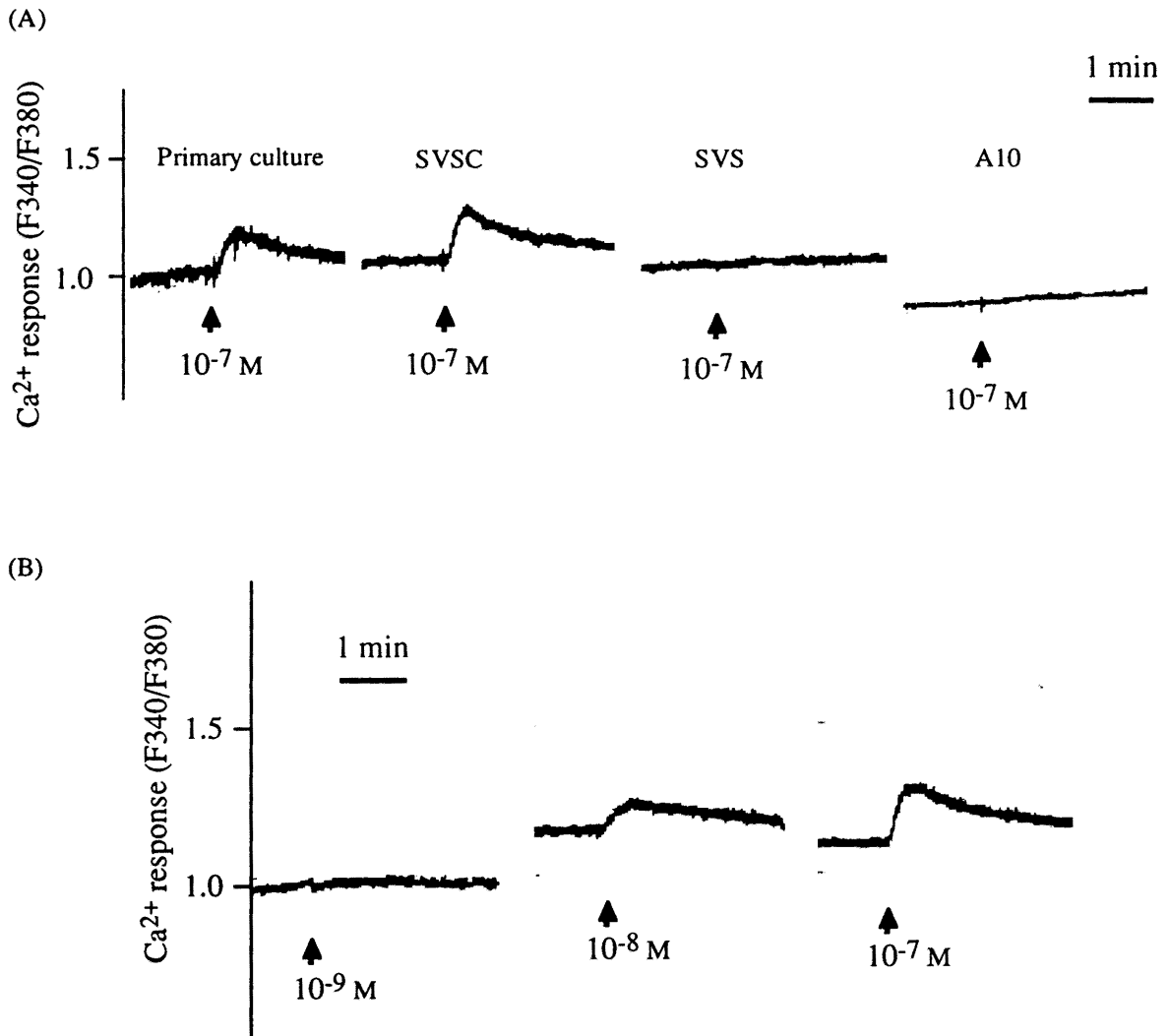


Fig. 6-1 SVSCのアンジオテンシンII刺激による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加  
 アンジオテンシンIIで刺激したときの、SVSCの細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の経時変化を、Ca<sup>2+</sup>濃度指示薬であるFura-2を用いて解析した。矢印で種々の濃度のアンジオテンシンIIを添加した。(A) 初代培養細胞、SVSC細胞、SVS細胞およびA10細胞の、アンジオテンシンIIに対する応答を比較した。SVSCは初代培養細胞と同等の応答が認められる。(B) 10<sup>-8</sup>M以上の濃度で細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加が認められる。



で刺激した結果、losartan はアンギオテンシン II による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加を完全に消失させた。これらの結果は、SVSC がアンギオテンシン II の刺激に対する特異的な情報伝達系を維持していることを示唆した。

### 6-3-2 新しい血管平滑筋細胞株 SVSC の種々の血管作動物質に対する応答性の維持

SVSC が、アンギオテンシン II 以外の種々の血管作動物質に対して応答性を示すか検討した。SVSC を種々の血管作動物質で刺激したときの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の経時変化を解析した結果、SVSC はノルアドレナリン、エンドセリン 1、バソプレッシン、セロトニン、カルバコール、ATP や高濃度カリウムイオン ( $\text{K}^+$ ) の刺激に応答して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を増加させた (Fig. 6-2)。したがって SVSC は、アンギオテンシン II の種々の血管作動物質に対しても細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  情報伝達系を維持していることが示された。

### 6-3-3 新しい血管平滑筋細胞株 SVSC の形態と平滑筋細胞マーカーの発現の解析

血管平滑筋細胞株 SVSC はスピンドル様の形を示したが、培養シャーレ内でコンフルエントになっても初代培養平滑筋細胞によくみられる hill and valley の形態を示さなかった。細胞増殖期の SVSC を電子顕微鏡で解析した結果、平滑筋細胞に特徴的な、マイクロフィラメント、カベオラと基底膜が観察された (Fig. 6-3)。また、小胞体やミトコンドリアが多数観察された。

SVSC の平滑筋細胞マーカーの発現を、ウエスタンブロッティング解析で確認した。コンフルエントの状態の細胞を溶解して試料を調製し、平滑筋型  $\alpha$  アクチンと平滑筋型ミオシン重鎖 (SM1) の発現を検討した結果、SVSC は平滑筋型  $\alpha$  アクチンと SM1 の両方を発現していることが確認された (Fig. 6-4)。比較のために、他の血管平滑筋細胞株の SVS と A10 を解析した。SVS は両方の細胞骨格タンパク質を発現しているが、A10 は平滑筋型  $\alpha$  アクチンを発現していて SM1 を発現していなかった。

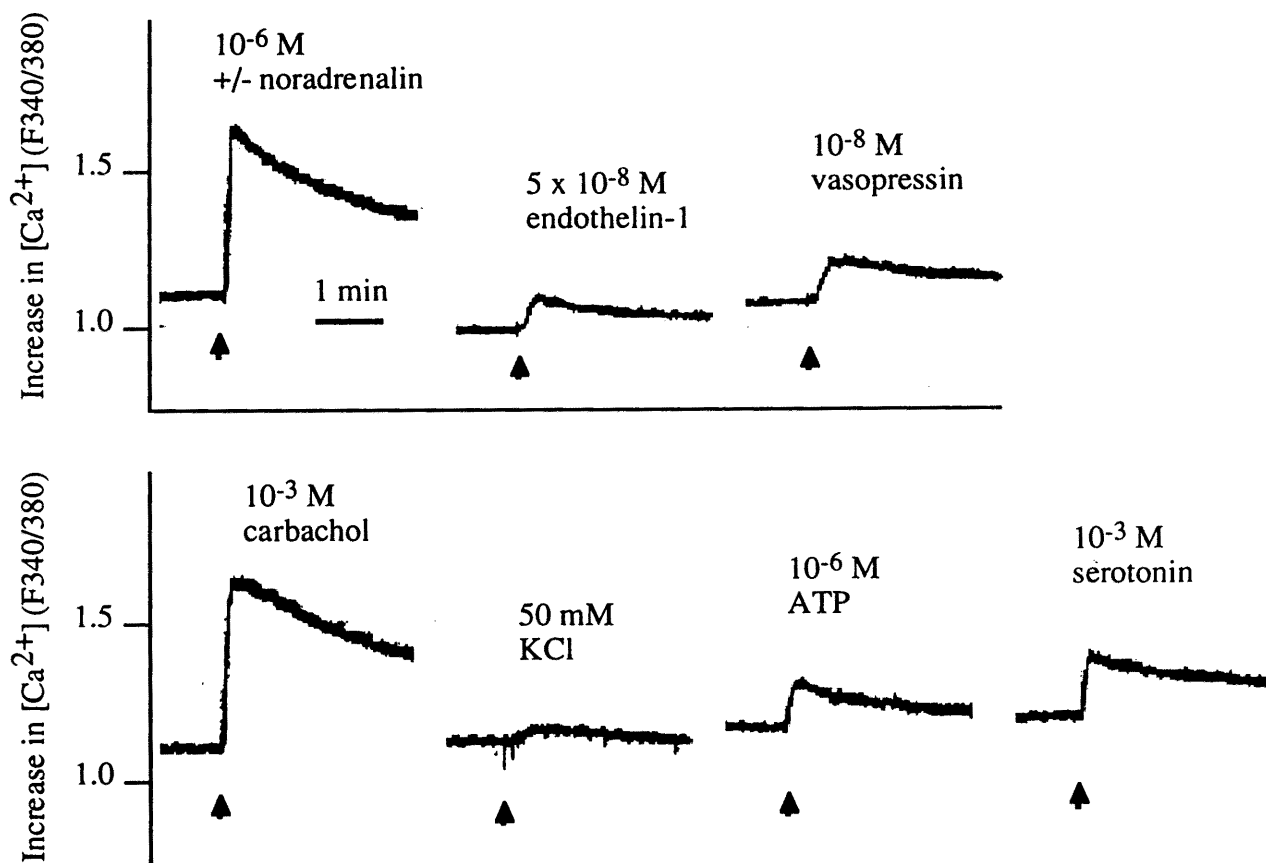


Fig. 6-2 種々の血管作動物質によるSVSCの細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化  
 SVSCを種々の血管作動物質で刺激して(矢印)、そのときの細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の経時変化を測定した。ノルアドレナリン、エンドセリン1、バソプレッシン、カルバコール、ATPとセロトニンには顕著な細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が認められる。高カリウムイオンでは、他の血管作動物質に比較して、大きな変化は認められない。

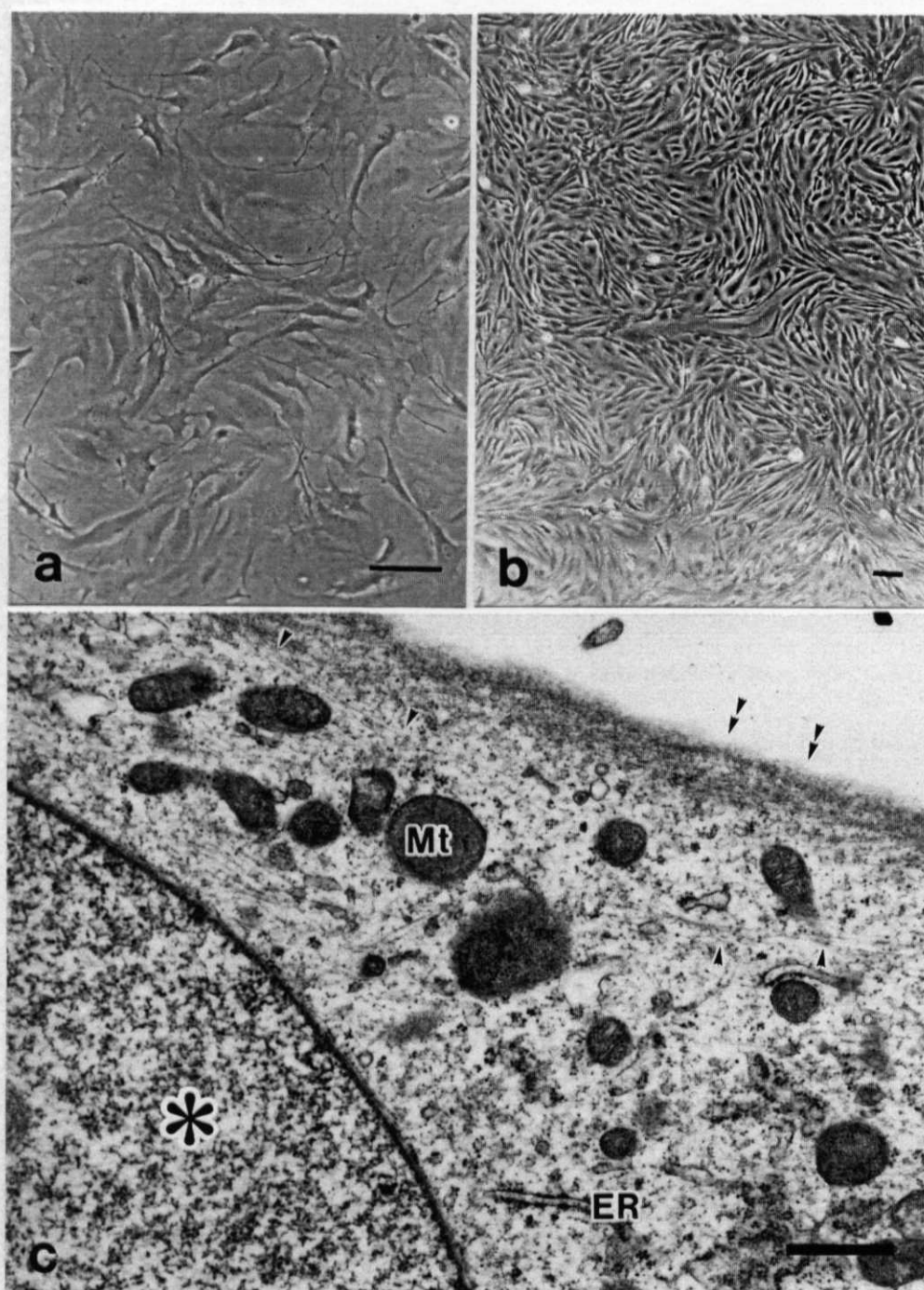


Fig. 6-3 血管平滑筋細胞株 SVSC の形態

SVSCの細胞形態を、光学顕微鏡 (a,b)、および電子顕微鏡 (c) を用いて観察した。(a) 増殖期の細胞。紡錘形の形態をしている。Bar = 100  $\mu\text{m}$ 。(b) コンフルエントに培養された細胞。hill and valley の模様を形作る。Bar = 100  $\mu\text{m}$ 。(c) 平滑筋細胞に特徴的なマイクロフィラメント (矢印) や、基底膜 (二重矢印) が観察される。ER : endoplasmic reticulum。Mt : mitochondria。\* : nuclei。Bar = 1  $\mu\text{m}$ 。

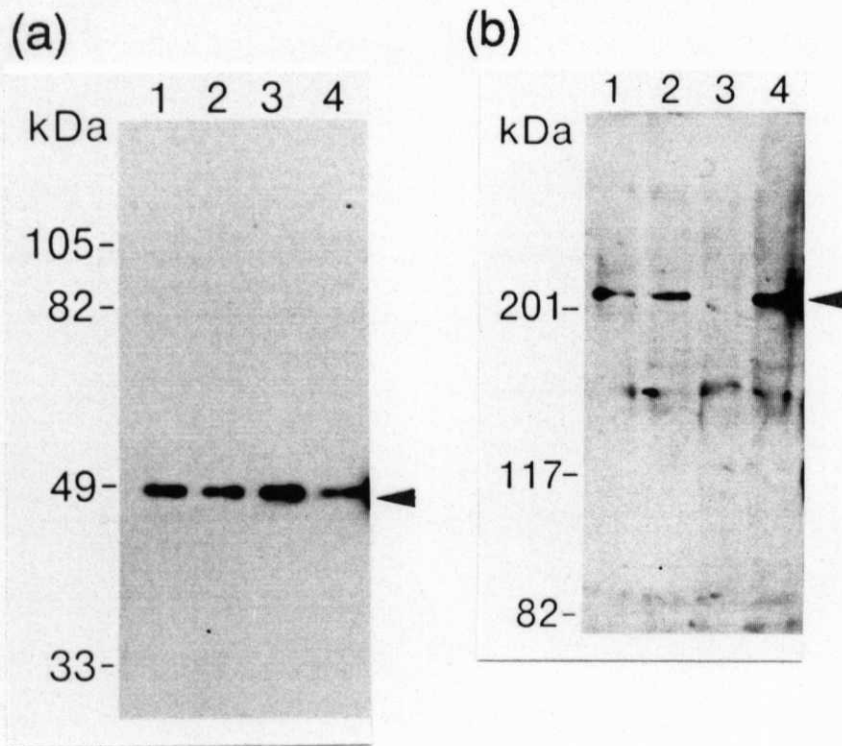


Fig. 6-4 SVSCは平滑筋細胞マーカータンパク質を発現する  
 コンフルエントに培養したSVSC細胞(レーン1)、SVSC細胞(レーン2)、A10  
 細胞(レーン3)の各細胞のタンパク質をSDS-PAGEして、(a)抗 $\alpha$ アクチ  
 ン抗体、および(b)KM995でウエスタブロッティング解析した。それぞ  
 れ、201 kDaと49 kDaに特異的なシグナルが検出され(矢印)、SVSCは平滑  
 筋型 $\alpha$ アクチンおよび平滑筋型ミオシン重鎖を発現しているのが確認される。  
 コントロールとして、血管の可溶化タンパク質を使用した(レーン4)。

#### 6-3-4 細胞増殖の血管作動物質応答性への影響

SVSCは温度感受性SV40 ラージT抗原によって不死化している。したがってその温度感受性SV40 ラージT抗原の活性を、細胞培養の温度によって制御することができる。すなわち、33 °Cの培養温度では温度感受性SV40 ラージT抗原が活性化して細胞が増殖するが、39 °Cの培養温度では不活化して細胞の増殖能が低下すると考えられる。そこでポストコンフルエントに増えたSVSCを33 °Cまたは39 °Cの培養温度でさらに24時間培養して、[methyl-<sup>3</sup>H]-thymidineの取り込み能を解析した。その結果、39 °Cで培養したSVSCはその取り込みが阻害されていた (Fig. 6-5)。したがって、39 °Cで培養したSVSCは増殖を静止させた細胞状態であることが確認された。

次に、細胞の増殖性がSVSCの血管作動物質応答性に影響するか検討した。ポストコンフルエントのSVSCを33 °Cまたは39 °Cで24時間培養して、それぞれの細胞の血管作動物質に対する応答性を細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化で解析した。ノルアドレナリンやエンドセリン1で刺激した、33 °Cで培養した細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加は、39 °Cで培養した細胞の50%に減少していた。しかしアンギオテンシンIIで刺激した場合は、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加に培養温度は影響せず安定していた (Fig. 6-6)。細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加の、ノルアドレナリン濃度の用量依存性を検討した結果、33 °Cまたは39 °Cの培養による違いはなかった (Fig. 6-7)。これらの結果から、細胞増殖が一部の血管作動物質による、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加に影響を及ぼすことが示唆された。

#### 6-3-5 細胞増殖のIP<sub>3</sub>受容体サブタイプ発現への影響

ノルアドレナリンやエンドセリン1やアンギオテンシンIIによって刺激された細胞の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加のピーク値は、IP<sub>3</sub>受容体による小胞体からのCa<sup>2+</sup>の放出に依存していることが知られている。そこで血管平滑筋細胞株SVSCの細胞増殖が、IP<sub>3</sub>受容体サブタイプ発現に与える影響を検討した。ポストコンフルエントのSVSCを33 °Cまたは39 °Cで24時間培養して、それぞれの細胞のIP<sub>3</sub>受容体サブタイプ

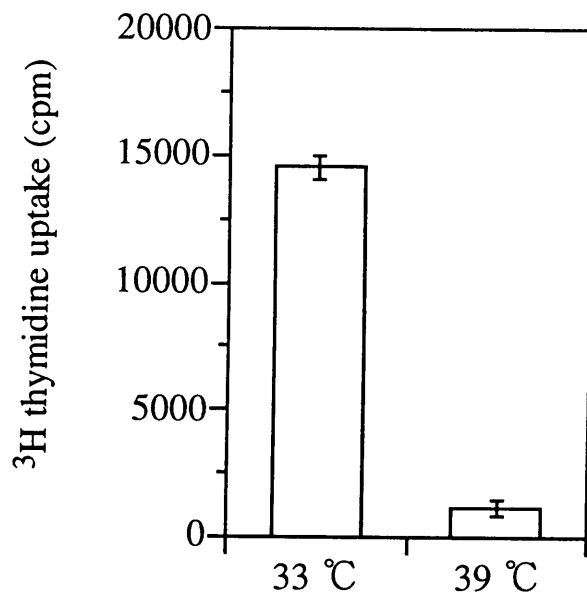


Fig. 6-5 DNA 合成能への細胞培養温度の影響  
ポストコンフルエントのSVSCを、33 °Cまたは39 °Cで血清不含有の培地に培養して、<sup>3</sup>H thymidineの取り込みを測定した。33 °Cで培養したSVSC細胞は、その取り込みが促進するのが認められる。n=3。

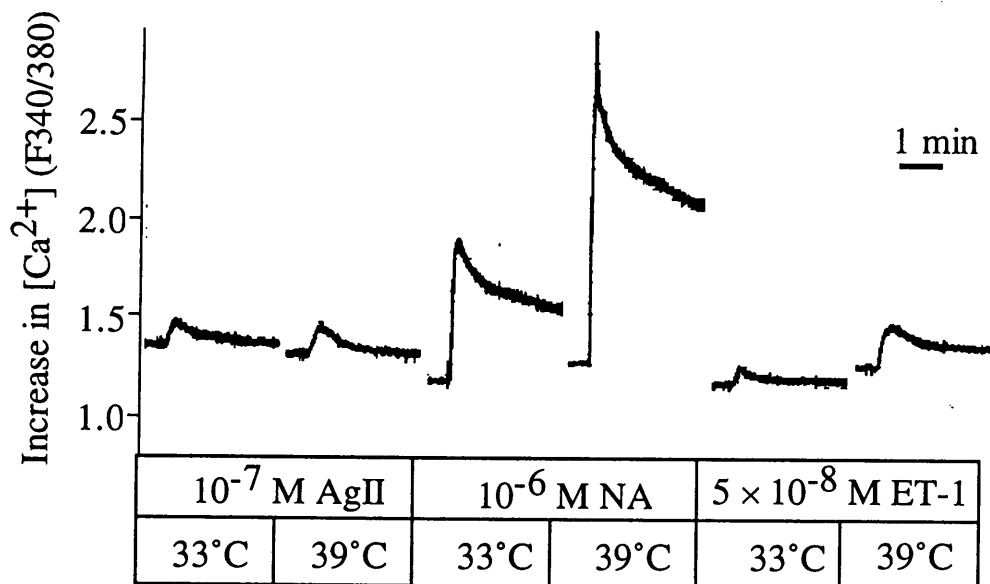


Fig. 6-6 血管作動物質による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化への細胞培養温度の影響

ポストコンフルエントのSVSC細胞を、33°Cまたは39°Cでさらに24時間培養して、アンギオテンシンII (AgII)、ノルアドレナリン (NA) またはエンドセリン1 (ET-1) で刺激したときの細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の経時変化を測定した。アンギオテンシンIIの刺激は、培養温度が細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化に影響しないが、ノルアドレナリンとエンドセリン1は、33°Cで細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加が抑制しているのが認められる。

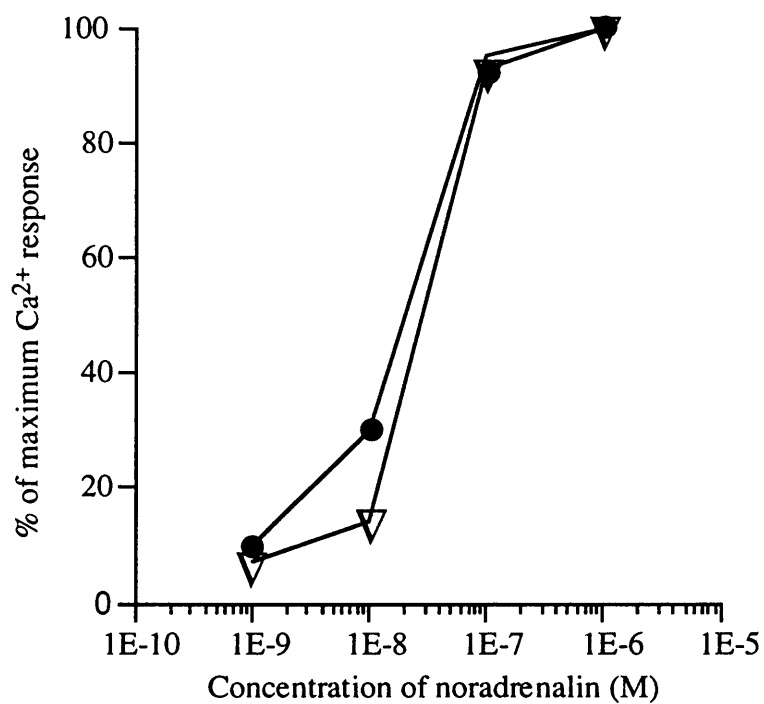


Fig. 6-7 ノルアドレナリンによる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化の用量依存性に対する細胞培養温度の影響  
 SVSC細胞を、 $33^\circ\text{C}$  (▽) または  $39^\circ\text{C}$  (●) で4日間培養し、ノルアドレナリン刺激時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化を測定した。 $10^{-6}\text{M}$ で刺激した時のピーク値を100%として示した。培養温度による違いは認められない。 $n=3$ 。



の発現をウエスタンブロッティング解析した。IP<sub>3</sub>受容体タイプ1とタイプ2は、33 °Cで培養したSVSCにおいて、39 °Cで培養した細胞のそれぞれ80%、65%に減少していた (Fig. 6-8)。IP<sub>3</sub>受容体タイプ3は、33 °Cで培養したSVSCにおいて、39 °Cで培養した細胞の160%に増加していた (Fig. 6-8)。

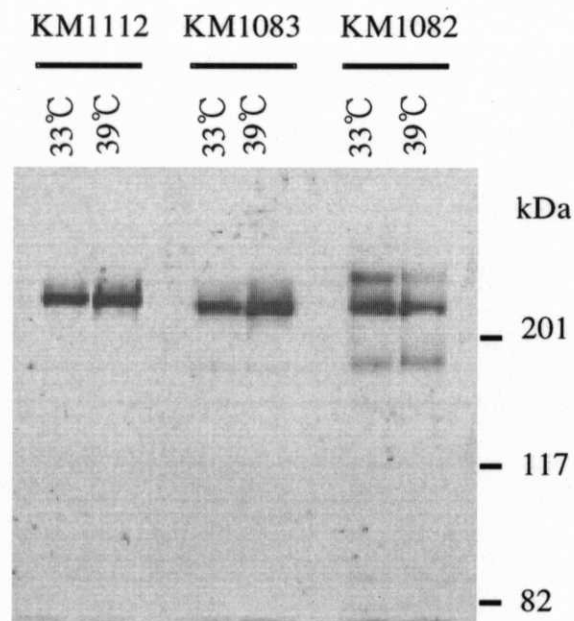


Fig. 6-8 SVSC細胞の培養温度の $IP_3$ 受容体サブタイプ発現への影響  
 ポストコンフルエントなSVSC細胞を、33°Cまたは39°Cで24時間日間培養し、可溶化タンパク質を調整した。これをSDS-PAGEして、モノクローナル抗体KM1112、KM1083、KM1082を用いてウエスタンブロッティング解析をした。約250 kDaの分子量の特異的なバンドが $IP_3$ 受容体サブタイプのシグナルである。

#### 6-4 考察

筆者らは新しい血管平滑筋細胞株 SVSC を樹立し、SVSC を用いて  $IP_3$  受容体サブタイプの発現と細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化に及ぼす細胞増殖の影響を検討した。様々な血管作動性物質に対する応答性を維持した血管平滑筋細胞株を樹立することによって、 $IP_3$  受容体サブタイプの役割を解析する有効なツールができたと考えられた。

血管平滑筋細胞株 SVSC は、他の平滑筋細胞株にはない特徴を持っていた。平滑筋細胞マーカーである SM1 は、血管では中膜の平滑筋細胞に特異的に発現しており、動脈硬化した血管の内膜に存在する増殖性の平滑筋細胞では発現しない、いわば正常な平滑筋細胞に特異的に発現するマーカーとして知られている (Miano et al., 1994)。よく使われている平滑筋細胞マーカーの平滑筋型  $\alpha$  アクチンは、内膜に遊走した平滑筋細胞でも発現しており、平滑筋細胞の形質 (増殖性または収縮性) に比較的に関係なく発現するマーカーである (Campbell et al., 1989)。数ある血管平滑筋細胞株の中で SM1 を発現する平滑筋細胞株は、SVS だけが報告されている (Hasegawa et al., 1997)。新しく樹立した細胞株 SVSC は SM1 を発現していることから (Damiani et al., 1998)、SM1 の発現のある希少な平滑筋細胞株の一つであると考えられた。一方、血管平滑筋細胞は、血管作動性物質に反応して細胞収縮や細胞の増殖・遊走するという特徴的な細胞機能を持っている。アンギオテンシン II やノルアドレナリンなどの血管作動性物質による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の増加は、それらの刺激による特徴的な細胞内情報伝達であり、血管平滑筋細胞を特徴づける細胞機能である。SVS は血管作動性物質に対する反応を消失している細胞株だが、新しく樹立した細胞株 SVSC はアンギオテンシン II、ノルアドレナリン、エンドセリン 1、バソプレッシン、セロトニン、カルバコール、ATP や高濃度カリウムイオンといった様々な刺激に反応して細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を増加させる。したがって以上の様な特徴を併せ持つ SVSC は、血管平滑筋細胞の血管作動物質の作用を解析するのに有用な細胞株であると考えられた。

動脈硬化は、主要な循環器関連疾患で、その主要な役割をするのが血管平滑筋細胞の形質変化と考えられている (Owens, 1995)。すなわち形質の変化によって、正常に

は収縮性の筋線維に富む細胞が、タンパク質合成と増殖を盛んにするようになり、血管の内膜の大部分を増殖性の平滑筋細胞で占めしまうのである。その結果、血流が細くなり、生命維持に重大な結果を及ぼすことになる。したがって、疾患の治療の観点から、平滑筋細胞の制御に関して多くの研究がなされ、増殖性の増大は、収縮性タンパク質の発現の減少と相関することが報告されている (Shanahan et al., 1994, Aikawa et al., 1995, Ohmi et al., 1997, Hasegawa et al., 1997)。しかし収縮や収縮系の情報伝達系の変化については、あまり解析が進んでいなかった。個体レベルの解析では、動脈硬化巣の血管平滑筋細胞は、エンドセリン 1 に選択的なエンドセリン A 受容体の発現が減少していることが報告されている (Hasegawa et al., 1994)。また実験的に内皮細胞を除去して血管の内膜肥厚を起こさせたラビットの大動脈では、アドレナリンの受容体である  $\alpha 1$  アドレノセプターを介した収縮反応の感受性が減少することが報告され (Manderson et al., 1995)、 $IP_3$ - $Ca^{2+}$  情報伝達系の関与が示唆されていた。一方、細胞レベルでの解析では、高濃度  $K^+$  の刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の増加が、ポストコンフルエントの細胞に比べて静止期から細胞増殖期の過程の細胞は減少しているが、アンギオテンシン II による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の増加はポストコンフルエントの細胞と増殖期の細胞との間で差がないことが、初代培養細胞の培養フェーズをサンプリングした細胞で示されていた (Masuo et al., 1991)。

まず筆者らはSVSCを用いて、培養温度コントロールによる増殖性の細胞での細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を解析した結果、エンドセリン 1 とノルアドレナリンによる細胞内  $Ca^{2+}$  の増加が、静止期の細胞に比べて減少していることを見いだした。したがって細胞増殖がノルアドレナリンやエンドセリン 1 による細胞内  $Ca^{2+}$  情報伝達系に影響していると考えられた。対照的にSVSCをアンギオテンシン II で刺激した時は、増殖性が停止している細胞と増殖性の細胞とでは、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の増加に変化がなく、この系では前述の報告を再現していなかった。これはおそらく、実験系による違いと考えられた。しかし筆者らの系においても、少なくとも使用する血管作動物質によって、細胞増殖が  $Ca^{2+}$  情報伝達系に影響することがわかり、増殖性の状態では、血管平滑

筋細胞は機能的にも正常な細胞と異なることが考えられた。

アンギオテンシンIIやエンドセリン1やノルアドレナリンによる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度変化の最初のピークはIP<sub>3</sub>によって惹起された小胞体からのCa<sup>2+</sup>の放出によって形成されるので (Alexander et al., 1985, Little et al., 1992, Murphy et al., 1995)、筆者らはIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現量に差がないか解析した。その結果、一様な変化ではないが、SVSCの細胞増殖がIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現増加や減少を引き起こしていることを見いだした (Sugiyama et al., 1999)。すなわちIP<sub>3</sub>受容体タイプ1とタイプ2は細胞増殖によって発現が減少し、タイプ3は発現が増加していた。これらの発現変化が、アンギオテンシンIIやエンドセリン1やノルアドレナリンによる細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の増加の程度に影響していた可能性が考えられた。言い換えれば細胞増殖によってIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現が異なるのは、細胞が機能的に基の正常な細胞（細胞周期が静止している状態の細胞）とは異なり、細胞機能の亢進や抑制を反映したためとと考えられた。

先に記したように、動脈硬化のモデル動物の血管では、IP<sub>3</sub>-Ca<sup>2+</sup>情報伝達系が変化し、平滑筋細胞増殖がその病態と関連すると考えられている。筆者らは培養細胞の系で、増殖性の増大によって、IP<sub>3</sub>受容体サブタイプ発現の減少と増加の両方があることを明らかにしたことから、動脈硬化巣の平滑筋細胞でもその発現が変化している可能性を示唆したと考えた。これらの結果は、動脈硬化の治療法を考える上でも有用な知見なるであろう。今後は、*in vitro*での解析を進めることによって、病態におけるIP<sub>3</sub>受容体サブタイプ発現変化の意味を明らかにする必要があるだろう。

## 6-5 結語

平滑筋細胞における細胞増殖の、血管作動性物質の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度増加に及ぼす影響と  $\text{IP}_3$  受容体サブタイプの発現を解析するために、温度感受性 SV40 ラージ T 抗原遺伝子トランスジェニックマウスから新しい血管平滑筋細胞株 SVSC を樹立した。ウエスタンブロッティング解析によって SVSC の発現する平滑筋細胞マーカーを検討した結果、SVSC は SM1 と平滑筋型  $\alpha$  アクチンを発現していた。したがって新しい血管平滑筋細胞株 SVSC は血管の中膜の平滑筋細胞マーカーの発現プロフィールを有していた。

新しい血管平滑筋細胞株 SVSC の血管作動性物質に対する応答性を検討するために、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の蛍光指示薬を用いて、血管作動性物質で刺激した時の細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を解析した結果、SVSC はアンギオテンシン II、ノルアドレナリン、エンドセリン 1、バソプレッシン、セロトニン、カルバコール、ATP や高濃度カリウムイオンといった種々の血管作動性物質に反応して細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を上昇させることを確認した。したがって新しい血管平滑筋細胞株 SVSC は従来の平滑筋細胞株にはない優れた特徴を有していた。またこれらの細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加が  $\text{IP}_3$  受容体を介した反応であることから、 $\text{IP}_3$  受容体サブタイプの役割を解析するのに有用な細胞であることが示された。

血管平滑筋細胞株 SVSC の細胞増殖性を、細胞培養温度によって抑制した細胞は、ノルアドレナリンとエンドセリン 1 の刺激に対する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加が促進した。しかし、アンギオテンシン II の刺激に対する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の増加は、細胞増殖性の有無に関わらず一定の増加を示した。したがって、血管作動性物質の刺激の種類によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度変化が細胞増殖性に影響を受けることが考えられた。

血管平滑筋細胞株 SVSC の  $\text{IP}_3$  受容体の発現をウエスタンブロッティング解析した結果、SVSC はタイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 の 3 つのサブタイプを発現していた。培養温度によって細胞増殖性を抑制した細胞では、 $\text{IP}_3$  受容体タイプ 1 とタイ

プ2の発現が増加していた。しかしタイプ3の発現は逆に減少していた。したがって細胞の増殖性がそれぞれのサブタイプの発現に影響をあたえることが考えられた。

SVSCの細胞増殖性を制御したときの $IP_3$ 受容体の発現変化が、血管作動性物質による細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の増加の程度に一様に影響していないことから、サブタイプによって伝達する血管作動性物質の細胞内 $Ca^{2+}$ 情報伝達系が異なる可能性が考えられた。これらの結果は、 $IP_3$ 受容体サブタイプの役割を解析する上で示唆に富むデータであると考えられ、さらに詳細に解析する必要があると考えられた。

## 第7章 結論

本研究は、 $IP_3$ 受容体サブタイプの mRNA およびタンパク質の発現・分布に関して、分子生物学的な解析を行った。

第1章「緒論」では、本研究の背景を述べ、 $IP_3$ 受容体の分子特性、構造、発現等に関して示した。そして  $IP_3$ 受容体サブタイプに関する解析の必要性を示した。

第2章「ヒトイノシトール3リン酸受容体サブタイプの発現変化」では、ヒト血球系細胞で発現する  $IP_3$ 受容体サブタイプの発現、およびその制御を mRNA レベルで解析した。血球系細胞として種々のリンパ球系細胞株と骨髄球系細胞株を培養した。ノーザンブロッティング解析によって  $IP_3$ 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3をそれぞれ特異的に検出するための DNA プローブを作製した。作製したプローブを用いて  $IP_3$ 受容体サブタイプの mRNA を検出した結果、タイプ1、タイプ2、タイプ3の約9 kb の mRNA をそれぞれ特異的に検出した。血球系細胞の発現する  $IP_3$ 受容体サブタイプの mRNA をノーザンブロッティング解析した結果、細胞の種類によって検出した  $IP_3$ 受容体サブタイプの mRNA が異なっていた。この結果から、細胞によって発現する  $IP_3$ 受容体サブタイプの mRNA が異なることが示された。また、一つの細胞に複数種類の  $IP_3$ 受容体サブタイプの mRNA が発現することが示された。生体内での血球系の細胞は、多能性の血液幹細胞があって、それが分化して様々な種類の細胞になり、供給されていることが知られているので、血球系の細胞分化が  $IP_3$ 受容体サブタイプ mRNA の発現を変化させている可能性が考えられた。

骨髄球系の細胞株を種々の薬剤存在下で培養して、単球/マクロファージ系の細胞、顆粒球系の細胞、巨核球系の細胞および赤芽球系の細胞に分化誘導した。分化誘導前、および分化誘導させた細胞の発現する  $IP_3$ 受容体サブタイプの mRNA をノーザンブロッティング解析およびドットブロッティング解析した結果、分化誘導前の細胞と分化誘導させた細胞では、検出した  $IP_3$ 受容体サブタイプの mRNA が異なっていた。さらに分化誘導による  $IP_3$ 受容体サブタイプの mRNA の発現は、分化



誘導刺激後の早い時期に変化していた。これらの結果は、血球系の細胞分化が $IP_3$ 受容体サブタイプ mRNA の発現を変化させるという考えを支持する結果であった。

分化誘導前と分化誘導させた細胞で、mRNA の発現が変化した $IP_3$ 受容体サブタイプを比較した結果、分化誘導系によって発現変化するサブタイプが異なっていた。

以上をまとめると、 $IP_3$ 受容体は細胞によっては複数種類のサブタイプの mRNA を発現し、さらに細胞分化誘導によってその発現が動的に変化することを示した。細胞によって発現する $IP_3$ 受容体サブタイプの mRNA が異なることは、その細胞の $IP_3$ を惹起する刺激応答において、利用される $IP_3$ 受容体サブタイプが異なることを示している。 $IP_3$ 受容体サブタイプによって細胞応答における役割が異なる可能性が示された。

第3章「イノシトール3リン酸受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体の作製」では、 $IP_3$ 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3のそれぞれのタンパク質に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を作製して、血球系細胞の発現する $IP_3$ 受容体サブタイプのタンパク質を解析した。

抗体を作製するための抗原としては、 $IP_3$ 受容体サブタイプのアミノ酸配列を持つペプチドを使用した。各 $IP_3$ 受容体サブタイプに特異的なアミノ酸配列としては、 $IP_3$ 受容体の第5と第6膜貫通領域に挟まれるループ領域、およびカルボキシル末端領域の配列を選択した。これらのアミノ酸配列を基にしてペプチドを合成した。これを抗原にしてマウスを免疫し、脾臓細胞を抽出して、抗体を産生するハイブリドーマを調製し、モノクローナル抗体産生細胞を作製した。作製したモノクローナル抗体の反応特異性を、ELISA、ウエスタンブロットティング、免疫沈降による解析で検討した結果、各モノクローナル抗体は抗原としたペプチドのアミノ酸配列を特異的に認識し、 $IP_3$ 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3タンパク質をそれぞれ特異的に検出することを確認した。これらモノクローナル抗体は他の $IP_3$ 受容体サブタイプにクロス反応することがなく、 $IP_3$ 受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3それぞれ

れに特異的なモノクローナル抗体であった。したがってIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現の解析を、タンパク質レベルで可能にすることができた。

作製したIP<sub>3</sub>受容体サブタイプ特異的抗体産生ハイブリドーマは、タイプ1、タイプ2、タイプ3のカルボキシル末端のアミノ酸配列に対するモノクローナル抗体について、それぞれ1クローン、6クローン、7クローン取得した。第5と第6膜貫通領域に挟まれるループ領域のアミノ酸配列に対するモノクローナル抗体については、IP<sub>3</sub>受容体タイプ3に対して5クローン取得した。こられの抗体の中から、IP<sub>3</sub>受容体サブタイプのそれぞれ特異的な検出と解析用に、カルボキシル末端のアミノ酸配列を認識するモノクローナル抗体のセット（タイプ1特異的抗体：KM1112、タイプ2特異的抗体：KM1083、タイプ3特異的抗体：KM1082）を選択した。モノクローナル抗体K1112、KM1083、KM1082は、IP<sub>3</sub>受容体サブタイプのウエスタンブロッティング解析、免疫沈降、免疫組織・細胞染色に使用可能な抗体であった。これらの抗体が、本章以降のタンパク質レベルでのIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの解析に非常に有用なツールとなった。

モノクローナル抗体K1112、KM1083、KM1082を用いて、炎症性の血球系細胞でのIP<sub>3</sub>受容体サブタイプのタンパク質の発現を検討した結果、細胞によって発現するサブタイプが異なっていて、複数種のサブタイプを発現する細胞もあった。これらの結果は、第2章に示したmRNAレベルでのIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現プロフィールの解析結果を支持する結果であった。

モノクローナル抗体K1112、KM1083、KM1082を用いて、IP<sub>3</sub>受容体タイプ1、タイプ2を発現する細胞株での、これらサブタイプのタンパク質の細胞内局在を検討した結果、分布に違いがあることを見いだした。T細胞株Jurkatの細胞膜にはIP<sub>3</sub>受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3は存在しないことを示唆した。さらにIP<sub>3</sub>受容体がヘテロ4量体を形成しうることを示唆した。

以上のように筆者らは初めて、IP<sub>3</sub>受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3をタンパク質レベルで解析するツールとしてのIP<sub>3</sub>受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3に対する

モノクローナル抗体を作製した。これらモノクローナル抗体を用いれば、組織・細胞におけるIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現や、IP<sub>3</sub>受容体と他のタンパク質との相互作用などの詳細な解析ができると考えられる。

第4章「イノシトール3リン酸受容体サブタイプの組織・細胞特異的発現の解析」では、モノクローナル抗体（KM1112、KM1083、KM1082）を、IP<sub>3</sub>受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3の免疫組織化学解析に応用して、タンパク質レベルでのサブタイプの組織・細胞発現を解析した。

これらモノクローナル抗体は組織切片中のIP<sub>3</sub>受容体発現細胞を特異的に検出した。また、これら抗体はIP<sub>3</sub>受容体発現細胞において、IP<sub>3</sub>受容体の細胞内局在を反映した組織染色像を検出した。したがって使用したモノクローナル抗体は、細胞が有するIP<sub>3</sub>受容体サブタイプを同定するのに有効であると考えられた。これらモノクローナル抗体は、IP<sub>3</sub>受容体サブタイプの細胞内分布を同定するのにも有効であると考えられた。

気道上皮細胞におけるIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現を、モノクローナル抗体KM1112、KM1083、KM1082を用いて解析した。気管でのIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現をウエスタンブロッティング解析で検討した結果、約250 kDaの分子量としてタイプ1、タイプ2、タイプ3の特異的なバンドが検出した。したがって気管には3つのIP<sub>3</sub>受容体サブタイプが発現していると考えられた。気管から細気管支に至る組織でのIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現を、免疫組織化学的解析で検討した結果、気管ではタイプ1、タイプ2、タイプ3が気管上皮細胞に特異的に発現していて、しかも様々な種類の上皮細胞の中で、線毛細胞だけに特異的に発現していることを明かにした。細気管支では、IP<sub>3</sub>受容体タイプ1、タイプ2、タイプ3は気管の場合と同様に、細気管支上皮細胞に特異的に発現することを示した。ただし詳細な解析の結果、気管と違ってIP<sub>3</sub>受容体タイプ3は線毛細胞のみならずクララ細胞にも発現していることを見いだした。したがってIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現が組織・細胞特異的に制御されていると考えられた。

またモノクローナル抗体 KM1112、KM1083、KM1082 は、 $IP_3$  受容体サブタイプのタンパク質を組織切片上で特異的に検出するのに有用であり、さらにそのサブタイプの細胞内局在を解析することを可能にしたと考えられた。 $IP_3$  受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体で免疫組織染色した細胞を詳細に解析すると、 $IP_3$  受容体を発現する線毛細胞では、タイプ1は線毛に隣接した細胞膜に面する細胞質に、薄い層の様に限定的に局在していた。タイプ2は細胞質全体的に分散していた。タイプ3は細胞の核上部の気道側に面した細胞質に分散していた。線毛細胞は、生理的な機能として気道内に異物が入ってきたときに、これを認知して漿粘液と共に生体外へ排出する役割をしている。 $IP_3$  受容体サブタイプは、細胞骨格タンパク質などの他のタンパク質と協調して、その細胞機能の役割を果たしている可能性が考えられた。

また、モノクローナル抗体 KM1083 は気管上皮細胞の線毛細胞を特異的かつ効率的に検出した。したがって  $IP_3$  受容体タイプ2は、気管から細気管支に至る組織の気道上皮に存在する線毛細胞の特異的マーカーとしても利用可能であると考えられた。

第5章「イノシトール3リン酸受容体サブタイプと細胞骨格タンパク質の結合の解析」では、血管平滑筋細胞における  $IP_3$  受容体サブタイプの細胞内分布を詳細に解析した。さらに  $IP_3$  受容体サブタイプと会合する細胞骨格タンパク質を解析した。

血管平滑筋細胞をラットの動脈から単離して初代培養した。 $IP_3$  受容体サブタイプ特異的モノクローナル抗体を用いて、サブタイプの細胞内分布を比較検討した。そのために、モノクローナル抗体のIgGアイソタイプが異なることに着目して、二次抗体にIgGアイソタイプ特異的な標識抗体を用いることによって、 $IP_3$  受容体サブタイプの蛍光抗体二重染色法を考案して実証した。 $IP_3$  受容体サブタイプの蛍光抗体二重染色を、培養血管平滑筋細胞を用いて検討した結果、各サブタイプによって分布が異なり、細胞内の部位によってサブタイプの構成比が異なることがわかった。 $IP_3$  受容体は4量体を形成していることが知られている。これらの分布の違いが、 $IP_3$  受容体  $Ca^{2+}$  チャンネルのヘテロ4量体の形成に影響する可能性が考えられ

た。また  $IP_3$  受容体サブタイプの組み合わせによって、極めて多様な  $IP_3$  受容体  $Ca^{2+}$  チャンネルが形成する可能性が考えられた。 $IP_3$  受容体サブタイプによって特性が異なることが考えられるので、この多様性が細胞内  $Ca^{2+}$  濃度増加のパターン形成に影響している可能性が考えられた。

$IP_3$  受容体タイプ2とタイプ3が細胞骨格タンパク質と会合しているか、 $IP_3$  受容体とアクチンフィラメントの蛍光二重染色を検討した。その結果、 $IP_3$  受容体タイプ2とタイプ3はアクチンフィラメントと共局在することを見いだした。また  $IP_3$  受容体タイプ2はアクチンフィラメントの端に存在することを見いだした。アクチンフィラメントの端は細胞接着に関係する焦点接着であることから、 $IP_3$  受容体タイプ2のパッチ状の分布が焦点接着である可能性を検討した。焦点接着特異的なタンパク質であるテーリンと  $IP_3$  受容体タイプ2の蛍光抗体二重染色を検討した結果、タイプ2の分布がテーリンと一致していた。したがって  $IP_3$  受容体タイプ2が焦点接着に存在することが示された。さらに  $IP_3$  受容体サブタイプと焦点接着に存在する細胞骨格タンパク質との会合を免疫沈降法で検討した結果、 $IP_3$  受容体サブタイプはテーリン、ビンキュリン、 $\alpha$  アクチンと会合する事を見いだした。これらの結果から、 $IP_3$  受容体サブタイプは細胞骨格と密接に関係し、細胞骨格の制御を介して細胞接着や増殖に影響する可能性が考えられた。

第6章「細胞増殖とイノシトール3リン酸受容体サブタイプ発現の関連についての解析」では、平滑筋細胞における細胞増殖の、血管作動性物質の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度増加に及ぼす影響と  $IP_3$  受容体サブタイプの発現を解析した。

最初に、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化を評価するためのツールとして、温度感受性 SV40 ラージ T 抗原遺伝子トランスジェニックマウスから新しい血管平滑筋細胞株 SVSC を樹立した。ウエスタンブロッティング解析によって SVSC の発現する平滑筋細胞マーカーを検討した結果、SVSC は SM1 と平滑筋型  $\alpha$  アクチンを発現していた。したがって新しい血管平滑筋細胞株 SVSC は、血管の中膜の平滑筋細胞マーカーの発現プロフィールを有していた。また、SVSC の発現する  $IP_3$  受容体サブタ

IP<sub>3</sub>をウエスタンブロッティング解析した結果、3つのサブタイプを有していた。

新しい血管平滑筋細胞株 SVSC の血管作動性物質に対する応答性を検討するために、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の蛍光指示薬を用いて、血管作動性物質で刺激した時の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を解析した結果、SVSC はアンギオテンシン II、ノルアドレナリン、エンドセリン 1、バソプレッシン、セロトニン、カルバコール、ATP や高濃度カリウムイオンといった種々の血管作動性物質に応答して細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を上昇させた。したがって、SVSC が細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の変化を評価するためのツールとして適している細胞であると考えられた。

血管平滑筋細胞株 SVSC の細胞増殖性を、細胞培養温度によって抑制した細胞は、ノルアドレナリンとエンドセリン 1 の刺激に対する細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加が促進した。しかし、アンギオテンシン II の刺激に対する細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加は、細胞増殖性の有無に関わらず一定の増加を示した。したがって、血管作動性物質の刺激の種類によって細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度変化が細胞増殖性に影響を受けることが考えられた。その培養温度によって細胞増殖性を抑制した細胞での IP<sub>3</sub> 受容体サブタイプの発現をウエスタンブロッティング解析した結果、IP<sub>3</sub> 受容体タイプ 1 とタイプ 2 の発現が増加していた。しかしタイプ 3 の発現は逆に減少していた。したがって細胞の増殖性がそれぞれのサブタイプの発現に影響をあたえることが考えられた。またその IP<sub>3</sub> 受容体サブタイプの発現の変化が、血管作動性物質による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加に影響していると考えられた。さらに IP<sub>3</sub> 受容体の発現変化が血管作動性物質による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加の程度に一樣に影響していないことから、サブタイプによって伝達する血管作動性物質の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 情報伝達系が異なる可能性が考えられた。これらの結果は、IP<sub>3</sub> 受容体サブタイプの細胞増殖における役割を解明する上で有用な知見を与えたと考えられた。

以上のように、本研究は IP<sub>3</sub> 受容体タイプ 1、タイプ 2、タイプ 3 について、mRNA およびタンパク質レベルで発現・分布の解析を行ったものであり、筆者ら

は、IP<sub>3</sub>受容体によるCa<sup>2+</sup>情報伝達が、生体の全ての細胞に共通の、単純な機構ではないとの仮定に基づいて解析を進めてきた。もしも単純であれば、1つのサブタイプだけが全ての細胞の情報伝達を担っていたはずである。

本研究の解析結果からは、(1) 機能の異なる細胞によって利用するIP<sub>3</sub>受容体サブタイプに多様性があることが示され、細胞機能によって利用されるサブタイプが異なることが考えられた。(2) さらに細胞内の部位によって、サブタイプの存在比が異なることが示され、1つの細胞内にサブユニット構成の異なる多様なチャンネルが存在し、細胞局所の機能の違いによって利用されるチャンネルが異なることが考えられた。(3) また、IP<sub>3</sub>受容体サブタイプの発現・分布は静的ではなく、細胞が分化や増殖などの変化をするときには、動的にサブタイプ発現も変わることが示され、細胞機能変化に関連していると考えられた。この様に、IP<sub>3</sub>受容体が発現・分布・ヘテロ4量体形成といった極めて多様な分子機構によって制御され、利用されていることが明らかにされた。細胞はIP<sub>3</sub>受容体サブタイプを適時適所で巧みに利用して、その時々に必要な細胞内Ca<sup>2+</sup>情報伝達を行っているに違いない。一方、IP<sub>3</sub>受容体サブタイプの機能を考える上で、(4) サブタイプが焦点接着の細胞骨格タンパク質と会合していることが示され、IP<sub>3</sub>受容体-細胞内Ca<sup>2+</sup>情報伝達系による細胞機能の発現における新たな研究視点が提供された。

筆者らの作製したモノクローナル抗体や細胞株といったツール、および解析が、今後のIP<sub>3</sub>受容体サブタイプの生理的役割の解明に貢献し、それを基にした医学、薬学、工学的な応用に寄与することが期待される。

## 引用文献

- Adachi, M., Ryo, R., Yoshida, A., Teshigawara, K., Yamaguchi, N., Hoshijima, M., Takai, Y. and Sato, T. (1989) *Cancer Res*, **49**, 3805-3808.
- Aikawa, M., Yamaguchi, H., Yazaki, Y. and Nagai, R. (1995) *J Atheroscler Thromb*, **2**, 14-23.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. and Weissman, I. L. (2000) *Nature*, **404**, 193-197.
- Albiges-Rizo, C., Frachet, P. and Block, M. R. (1995) *J Cell Sci*, **108**, 3317-3329.
- Alexander, R. W., Brock, T. A., Gimbrone, M. A., Jr. and Rittenhouse, S. E. (1985) *Hypertension*, **7**, 447-451.
- Alexander, R. W. and Griendling, K. K. (1996) *J Hypertens Suppl*, **14**, S51-54.
- Allbritton, N. L. and Meyer, T. (1993) *Cell Calcium*, **14**, 691-697.
- Allbritton, N. L., Meyer, T. and Stryer, L. (1992) *Science*, **258**, 1812-1815.
- Altieri, D. C., Stamnes, S. J. and Gahmberg, C. G. (1992) *Biochem J*, **288**, 465-473.
- Anderson, C. L. and Abraham, G. N. (1980) *J Immunol*, **125**, 2735-2741.
- Anderson, M. P. and Welsh, M. J. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6003-6007.
- Auwerx, J. (1991) *Experientia*, **47**, 22-31.
- Barnes, D. W., Sirbasku, D. A. and Sato, G. (1984) *Methods for serum-free culture of neuronal and lymphoid cells*, A.R. Liss, New York.
- Berridge, M. J. (1993) *Nature*, **361**, 315-325.
- Berridge, M. J. and Irvine, R. F. (1989) *Nature*, **341**, 197-205.
- Bezprozvanny, I. and Ehrlich, B. E. (1993) *Neuron*, **10**, 1175-1184.
- Bezprozvanny, I., Watras, J. and Ehrlich, B. E. (1991) *Nature*, **351**, 751-754.
- Blondel, O., Takeda, J., Janssen, H., Seino, S. and Bell, G. I. (1993) *J Biol Chem*, **268**, 11356-11363.
- Boitano, S., Dirksen, E. R. and Sanderson, M. J. (1992) *Science*, **258**, 292-295.



- Boulay, G., Brown, D. M., Qin, N., Jiang, M., Dietrich, A., Zhu, M. X., Chen, Z., Birnbaumer, M., Mikoshiba, K. and Birnbaumer, L. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14955-14960.
- Bourguignon, L. Y., Iida, N. and Jin, H. (1993a) *Cell Biol Int*, **17**, 751-758.
- Bourguignon, L. Y., Jin, H., Iida, N., Brandt, N. R. and Zhang, S. H. (1993b) *J Biol Chem*, **268**, 7290-7297.
- Bradford, P. G. and Autieri, M. (1991) *Biochem J*, **280**, 205-210.
- Bradford, P. G., Jin, Y. and Hui, P. (1993) *Mol Pharmacol*, **44**, 292-297.
- Bradford, P. G., Wang, X., Jin, Y. and Hui, P. (1992) *J Biol Chem*, **267**, 20959-20964.
- Brattsand, G., Cantrell, D. A., Ward, S., Ivars, F. and Gullberg, M. (1990) *J Immunol*, **144**, 3651-3658.
- Breitman, T. R., Selonick, S. E. and Collins, S. J. (1980) *Proc Natl Acad Sci U S A*; **77**, 2936-2940.
- Brent, L. H., Gong, Q., Ross, J. M. and Wieland, S. J. (1993) *J Cell Physiol*, **155**, 520-529.
- Brooks, P. C., Clark, R. A. and Cheresch, D. A. (1994a) *Science*, **264**, 569-571.
- Brooks, P. C., Montgomery, A. M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G. and Cheresch, D. A. (1994b) *Cell*, **79**, 1157-1164.
- Brundage, R. A., Fogarty, K. E., Tuft, R. A. and Fay, F. S. (1991) *Science*, **254**, 703-706.
- Burrige, K., Molony, L. and Kelly, T. (1987) *J Cell Sci Suppl*, **8**, 211-229.
- Callamaras, N. and Parker, I. (1999) *J Gen Physiol*, **113**, 199-213.
- Campbell, J. H., Kocher, O., Skalli, O., Gabbiani, G. and Campbell, G. R. (1989) *Arteriosclerosis*, **9**, 633-643.
- Carafoli, E. (1987) *Annu Rev Biochem*, **56**, 395-433.
- Cardy, T. J., Traynor, D. and Taylor, C. W. (1997) *Biochem J*, **328**, 785-793.
- Carraway, K. L. and Carraway, C. A. (1995) *Bioessays*, **17**, 171-175.
- Clancy, J. P., McCann, J. D., Li, M. and Welsh, M. J. (1990) *Am J Physiol*, **258**, L25-32.

- Clapham, D. E. and Sneyd, J. (1995) *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, **30**, 1-24.
- Clarke, L. L., Grubb, B. R., Yankaskas, J. R., Cotton, C. U., McKenzie, A. and Boucher, R. C. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 479-483.
- Collins, S. J., Ruscetti, F. W., Gallagher, R. E. and Gallo, R. C. (1978) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 2458-2462.
- Conti, A., Brando, C., DeBell, K. E., Alava, M. A., Hoffman, T. and Bonvini, E. (1993) *J Biol Chem*, **268**, 783-791.
- Craig, S. W. and Johnson, R. P. (1996) *Curr Opin Cell Biol*, **8**, 74-85.
- Critchley, D. R. (2000) *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 133-139.
- Damiani, E., Sugiyama, T., Shimamura, K., Greci, L. and Matsuda, Y. (1998) *FEBS Lett*, **425**, 123-125.
- Danoff, S. K., Ferris, C. D., Donath, C., Fischer, G. A., Munemitsu, S., Ullrich, A., Snyder, S. H. and Ross, C. A. (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 2951-2955.
- De Smedt, H., Missiaen, L., Parys, J. B., Bootman, M. D., Mertens, L., Van Den Bosch, L. and Casteels, R. (1994) *J Biol Chem*, **269**, 21691-21698.
- Desai, D. M., Newton, M. E., Kadlecsek, T. and Weiss, A. (1990) *Nature*, **348**, 66-69.
- Devor, D. C., Singh, A. K., Bridges, R. J. and Frizzell, R. A. (1996) *Am J Physiol*, **271**, L785-795.
- Dirksen, E. R. and Sanderson, M. J. (1990) *Biorheology*, **27**, 533-545.
- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C. and Healy, J. I. (1997) *Nature*, **386**, 855-858.
- Dolmetsch, R. E., Xu, K. and Lewis, R. S. (1998) *Nature*, **392**, 933-936.
- Dugas, B., Calenda, A., Delfraissy, J. F., Vazquez, A., Bach, J. F. and Galanaud, P. (1987) *Eur J Immunol*, **17**, 1323-1328.
- Faas, S. J., Rothstein, J. L., Kreider, B. L., Rovera, G. and Knowles, B. B. (1993) *Eur J Immunol*, **23**, 1201-1214.

- Fadool, D. A. and Ache, B. W. (1992) *Neuron*, **9**, 907-918.
- Feng, L. and Kraus-Friedmann, N. (1993) *Am J Physiol*, **265**, C1588-1596.
- Forgacs, G. (1995) *Biochem Cell Biol*, **73**, 317-326.
- Fujimoto, T., Miyawaki, A. and Mikoshiba, K. (1995) *J Cell Sci*, **108**, 7-15.
- Fujimoto, T., Nakade, S., Miyawaki, A., Mikoshiba, K. and Ogawa, K. (1992) *J Cell Biol*, **119**, 1507-1513.
- Furuichi, T., Shiota, C. and Mikoshiba, K. (1990) *FEBS Lett*, **267**, 85-88.
- Furuichi, T., Yoshikawa, S., Miyawaki, A., Wada, K., Maeda, N. and Mikoshiba, K. (1989) *Nature*, **342**, 32-38.
- Gillis, S. and Watson, J. (1980) *J Exp Med*, **152**, 1709-1719.
- Gilmore, A. P. and Burridge, K. (1996) *Nature*, **381**, 531-535.
- Gold, M. R., Jakway, J. P. and DeFranco, A. L. (1987) *J Immunol*, **139**, 3604-3613.
- Goldmann, W. H., Ezzell, R. M., Adamson, E. D., Niggli, V. and Isenberg, G. (1996) *J Muscle Res Cell Motil*, **17**, 1-5.
- Gootenberg, J. E., Ruscetti, F. W., Mier, J. W., Gazdar, A. and Gallo, R. C. (1981) *J Exp Med*, **154**, 1403-1418.
- Goss, G. G., Woodside, M., Wakabayashi, S., Pouyssegur, J., Waddell, T., Downey, G. P. and Grinstein, S. (1994) *J Biol Chem*, **269**, 8741-8748.
- Goy, M. F. (1991) *Trends Neurosci*, **14**, 293-299.
- Guglielmi, P. and Preud'homme, J. L. (1981) *Scand J Immunol*, **13**, 303-311.
- Gusovsky, F., Soergel, D. G. and Daly, J. W. (1991) *Eur J Pharmacol*, **206**, 309-314.
- Hansen, M., Boitano, S., Dirksen, E. R. and Sanderson, M. J. (1995) *J Cell Sci*, **108**, 2583-2590.
- Hardingham, G. E. and Bading, H. (1999) *Microsc Res Tech*, **46**, 348-355.
- Hartwig, J. H., Bokoch, G. M., Carpenter, C. L., Janmey, P. A., Taylor, L. A., Toker, A. and Stossel, T. P. (1995) *Cell*, **82**, 643-653.

- Hasegawa, K., Arakawa, E., Oda, S., Yanai, N., Obinata, M. and Matsuda, Y. (1997) *J Mol Cell Cardiol*, **29**, 2177-2186.
- Hasegawa, K., Fujiwara, H., Doyama, K., Inada, T., Ohtani, S., Fujiwara, T., Hosoda, K., Nakao, K. and Sasayama, S. (1994) *Hypertension*, **23**, 288-293.
- Hemmi, H. and Breitman, T. R. (1985) *Jpn J Cancer Res*, **76**, 345-351.
- Hemmi, H. and Breitman, T. R. (1987) *Blood*, **69**, 501-507.
- Hirata, Y., Tomita, M. and Ikeda, M. (1985) *Jpn Circ J*, **49**, 1043-1051.
- Hirose, K. and Iino, M. (1994) *Nature*, **372**, 791-794.
- Hishikawa, T., Cheung, J. Y., Yelamarty, R. V. and Knutson, D. W. (1991) *J Cell Biol*, **115**, 59-66.
- Hivroz, C., Grillot-Courvalin, C., Labaume, S., Miglierina, R. and Brouet, J. C. (1988) *Eur J Immunol*, **18**, 1811-1817.
- Honma, Y., Takenaga, K., Kasukabe, T. and Hozumi, M. (1980) *Biochem Biophys Res Commun*, **95**, 507-512.
- Hori, M. and Karaki, H. (1998) *Life Sci*, **62**, 1629-1633.
- Huang, K. P. (1990) *Biofactors*, **2**, 171-178.
- Iida, N., Lokeshwar, V. B. and Bourguignon, L. Y. (1994) *J Biol Chem*, **269**, 28576-28583.
- Iino, M. and Endo, M. (1992) *Nature*, **360**, 76-78.
- Iino, M., Yamazawa, T., Miyashita, Y., Endo, M. and Kasai, H. (1993) *Embo J*, **12**, 5287-5291.
- Ikebuchi, K., Yamaguchi, M., Niwa, K., Abe, H., Fujihara, M. and Sekiguchi, S. (1998) *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*, **26**, 549-558.
- Imaizumi, M. and Breitman, T. R. (1986) *Blood*, **67**, 1273-1280.
- Ip, J. H., Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J., Taubman, M. B. and Chesebro, J. H. (1990) *J Am Coll Cardiol*, **15**, 1667-1687.
- Jaconi, M. E., Theler, J. M., Schlegel, W., Appel, R. D., Wright, S. D. and Lew, P. D. (1991)

- J Cell Biol*, **112**, 1249-1257.
- Jafri, M. S. and Keizer, J. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 9485-9489.
- Jahn, L., Sadoshima, J., Greene, A., Parker, C., Morgan, K. G. and Izumo, S. (1996) *J Cell Sci*, **109**, 397-407.
- Janmey, P. A. (1998) *Physiol Rev*, **78**, 763-781.
- Joseph, S. and MacDermot, J. (1991) *Eur J Pharmacol*, **208**, 149-156.
- Kanner, S. B., Grosmaire, L. S., Ledbetter, J. A. and Damle, N. K. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7099-7103.
- Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Amano, K., Harada, K., Miyamoto, S., Nakazawa, H., Won, K. J. and Sato, K. (1997) *Pharmacol Rev*, **49**, 157-230.
- Kehrl, J. H., Muraguchi, A., Butler, J. L., Falkoff, R. J. and Fauci, A. S. (1984) *Immunol Rev*, **78**, 75-96.
- Khan, A. A., Steiner, J. P., Klein, M. G., Schneider, M. F. and Snyder, S. H. (1992a) *Science*, **257**, 815-818.
- Khan, A. A., Steiner, J. P. and Snyder, S. H. (1992b) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 2849-2853.
- Kieffer, N., Debili, N., Wicki, A., Titeux, M., Henri, A., Mishal, Z., Breton-Gorius, J., Vainchenker, W. and Clemetson, K. J. (1986) *J Biol Chem*, **261**, 15854-15862.
- Kishi, K. (1985) *Leuk Res*, **9**, 381-390.
- Knowles, M. R., Clarke, L. L. and Boucher, R. C. (1991) *N Engl J Med*, **325**, 533-538.
- Kohn, E. C., Alessandro, R., Spoonster, J., Wersto, R. P. and Liotta, L. A. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1307-1311.
- Komatsu, N., Suda, T., Moroi, M., Tokuyama, N., Sakata, Y., Okada, M., Nishida, T., Hirai, Y., Sato, T., Fuse, A. and et al. (1989) *Blood*, **74**, 42-48.
- Kondo, M., Weissman, I. L. and Akashi, K. (1997) *Cell*, **91**, 661-672.
- Korngreen, A. and Priel, Z. (1994) *Biophys J*, **67**, 377-380.

- Kovacs, D. M., Fausett, H. J., Page, K. J., Kim, T. W., Moir, R. D., Merriam, D. E., Hollister, R. D., Hallmark, O. G., Mancini, R., Felsenstein, K. M., Hyman, B. T., Tanzi, R. E. and Wasco, W. (1996) *Nat Med*, **2**, 224-229.
- Kudo, M., Nakamura, T. and Koyama, J. (1985) *J Biochem (Tokyo)*, **97**, 1211-1218.
- Kume, S., Muto, A., Aruga, J., Nakagawa, T., Michikawa, T., Furuichi, T., Nakade, S., Okano, H. and Mikoshiba, K. (1993) *Cell*, **73**, 555-570.
- Kuno, M. and Gardner, P. (1987) *Nature*, **326**, 301-304.
- Lechleiter, J., Girard, S., Peralta, E. and Clapham, D. (1991) *Science*, **252**, 123-126.
- Lelievre, S., Weaver, V. M. and Bissell, M. J. (1996) *Recent Prog Horm Res*, **51**, 417-432.
- Leung, A. Y., Wong, P. Y., Gabriel, S. E., Yankaskas, J. R. and Boucher, R. C. (1995) *Am J Physiol*, **268**, C708-712.
- Ling, N. R., Hardie, D., Lowe, J., Johnson, G. D., Khan, M. and MacLennan, I. C. (1989) *Int J Cancer*, **43**, 112-118.
- Little, P. J., Neylon, C. B., Tkachuk, V. A. and Bobik, A. (1992) *Biochem Biophys Res Commun*, **183**, 694-700.
- Lozzio, B. B., Lozzio, C. B., Bamberger, E. G. and Feliu, A. S. (1981) *Proc Soc Exp Biol Med*, **166**, 546-550.
- Lupu, V. D., Kaznatcheyeva, E., Krishna, U. M., Falck, J. R. and Bezprozvanny, I. (1998) *J Biol Chem*, **273**, 14067-14070.
- Maeda, N., Kawasaki, T., Nakade, S., Yokota, N., Taguchi, T., Kasai, M. and Mikoshiba, K. (1991) *J Biol Chem*, **266**, 1109-1116.
- Maeda, N., Niinobe, M. and Mikoshiba, K. (1990) *EMBO Journal*, **9**, 61-67.
- Manderson, J. A., Hayward, I. P., Pak, E., Horrigan, S., Hanley, G. E., Stephenson, J. A., Brown, L., Campbell, J. H. and Campbell, G. R. (1995) *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **22**, 912-918.
- Manger, B., Weiss, A., Weyand, C., Goronzy, J. and Stobo, J. D. (1985) *J Immunol*, **135**,

3669-3673.

Maranto, A. R. (1994) *J Biol Chem*, **269**, 1222-1230.

Marks, P. W. and Maxfield, F. R. (1990) *J Cell Biol*, **110**, 43-52.

Masseyeff, R. F., Albert, W. H. W. and Staines, N. (1993a) *Methods Immunol Anal*, **3**, 43.

VCH Verlagsgesellschaft; VCH Publishers, Weinheim (Federal Republic of Germany), New York, NY (USA).

Masseyeff, R. F., Albert, W. H. W. and Staines, N. (1993b) *Methods Immunol Anal*, **3**, 62-

64. VCH Verlagsgesellschaft; VCH Publishers, Weinheim (Federal Republic of Germany) New York, NY (USA).

Masuo, M., Toyooka, T., Shin, W. S. and Sugimoto, T. (1991) *Circ Res*, **69**, 1327-1339.

Matsuno, H., Stassen, J. M., Vermeylen, J. and Deckmyn, H. (1994) *Circulation*, **90**, 2203-2206.

Matter, N., Ritz, M. F., Freyermuth, S., Rogue, P. and Malviya, A. N. (1993) *J Biol Chem*, **268**, 732-736.

McConnell, F. M., Shears, S. B., Lane, P. J., Scheibel, M. S. and Clark, E. A. (1992) *Biochem J*, **284**, 447-455.

McNamee, H. P., Ingber, D. E. and Schwartz, M. A. (1993) *J Cell Biol*, **121**, 673-678.

Miano, J. M., Cserjesi, P., Ligon, K. L., Periasamy, M. and Olson, E. N. (1994) *Circ Res*, **75**, 803-812.

Michell, R. H., Conroy, L. A., Finney, M., French, P. J., Brown, G., Creba, J. A., Bunce, C. M. and Lord, J. M. (1990) *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **327**, 193-207.

Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiraoka, M., Yamada, M., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (1999) *Neuron*, **23**, 799-808.

Mignery, G. A., Newton, C. L., Archer, B. T. d. and Sudhof, T. C. (1990) *J Biol Chem*, **265**, 12679-12685.

Mignery, G. A., Sudhof, T. C., Takei, K. and De Camilli, P. (1989) *Nature*, **342**, 192-195.

- Mikoshiha, K. (1993) *Trends Pharmacol Sci*, **14**, 86-89.
- Mikoshiha, K. (1997) *Curr Opin Neurobiol*, **7**, 339-345.
- Miyakawa, T., Maeda, A., Yamazawa, T., Hirose, K., Kurosaki, T. and Iino, M. (1999) *Embo J*, **18**, 1303-1308.
- Miyazaki, S., Yuzaki, M., Nakada, K., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S. and Mikoshiha, K. (1992) *Science*, **257**, 251-255.
- Monkawa, T., Hayashi, M., Miyawaki, A., Sugiyama, T., Yamamoto-Hino, M., Hasegawa, M., Furuichi, T., Mikoshiha, K. and Saruta, T. (1998) *Kidney Int*, **53**, 296-301.
- Monkawa, T., Miyawaki, A., Sugiyama, T., Yoneshima, H., Yamamoto-Hino, M., Furuichi, T., Saruta, T., Hasegawa, M. and Mikoshiha, K. (1995) *J Biol Chem*, **270**, 14700-14704.
- Morikawa, S., Tatsumi, E., Baba, M., Harada, T. and Yasuhira, K. (1978) *Int J Cancer*, **21**, 166-170.
- Mueller, S. C., Yeh, Y. and Chen, W. T. (1992) *J Cell Biol*, **119**, 1309-1325.
- Muller, R., Curran, T., Muller, D. and Guilbert, L. (1985) *Nature*, **314**, 546-548.
- Murphy, T. V., Broad, L. M. and Garland, C. J. (1995) *Eur J Pharmacol*, **290**, 145-150.
- Nakade, S., Maeda, N. and Mikoshiha, K. (1991) *Biochem J*, **277**, 125-131.
- Nakade, S., Rhee, S. K., Hamanaka, H. and Mikoshiha, K. (1994) *J Biol Chem*, **269**, 6735-6742.
- Nakagawa, T., Okano, H., Furuichi, T., Aruga, J. and Mikoshiha, K. (1991a) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6244-6248.
- Nakagawa, T., Shiota, C., Okano, H. and Mikoshiha, K. (1991b) *J Neurochem*, **57**, 1807-1810.
- Nakanishi, S., Maeda, N. and Mikoshiha, K. (1991) *J Neurosci*, **11**, 2075-2086.
- Nebe, B., Rychly, J., Knopp, A. and Bohn, W. (1995) *Exp Cell Res*, **218**, 479-484.
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J. and Lederer, J. A. (1995) *J Biol Chem*, **270**, 14705-14710.



- W. J. (1995) *Science*, **270**, 633-637.
- Nguyen, H. Q., Hoffman-Liebermann, B. and Liebermann, D. A. (1993) *Cell*, **72**, 197-209.
- Nixon, G. F., Mignery, G. A. and Somlyo, A. V. (1994) *J Muscle Res Cell Motil*, **15**, 682-700.
- Nuckolls, G. H., Romer, L. H. and Burridge, K. (1992) *J Cell Sci*, **102**, 753-762.
- Oda, S., Akinaga, S., Kumagai, A., Inoue, A., Nakamizo, N. and Yoshida, H. (1986) *Hybridoma*, **5**, 329-338.
- Ogawa, H., Kunkel, S. L., Fantone, J. C. and Ward, P. A. (1981) *Am J Pathol*, **105**, 149-155.
- Ohmi, K., Masuda, T., Yamaguchi, H., Sakurai, T., Kudo, Y., Katsuki, M. and Nonomura, Y. (1997) *Biochem Biophys Res Commun*, **238**, 154-158.
- Okuyama, R., Koguma, M., Yanai, N. and Obinata, M. (1995a) *Blood*, **86**, 2590-2597.
- Okuyama, R., Yanai, N. and Obinata, M. (1995b) *Exp Cell Res*, **218**, 424-429.
- Olsson, I. L. and Breitman, T. R. (1982) *Cancer Res*, **42**, 3924-3927.
- Otsu, H., Yamamoto, A., Maeda, N., Mikoshiba, K. and Tashiro, Y. (1990) *Cell Struct Funct*, **15**, 163-173.
- Owens, G. K. (1995) *Physiol Rev*, **75**, 487-517.
- Parys, J. B., Sernett, S. W., DeLisle, S., Snyder, P. M., Welsh, M. J. and Campbell, K. P. (1992) *J Biol Chem*, **267**, 18776-18782.
- Ponte, P., Ng, S. Y., Engel, J., Gunning, P. and Kedes, L. (1984) *Nucleic Acids Res*, **12**, 1687-1696.
- Poole, A. W. and Watson, S. P. (1995) *Br J Pharmacol*, **115**, 101-106.
- Priddle, H., Hemmings, L., Monkley, S., Woods, A., Patel, B., Sutton, D., Dunn, G. A., Zicha, D. and Critchley, D. R. (1998) *J Cell Biol*, **142**, 1121-1133.
- Putney, J. W., Jr. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14669-14671.
- Quinton, T. M. and Dean, W. L. (1996) *Biochem Biophys Res Commun*, **224**, 740-746.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z.,

- Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L. and et al. (1989) *Science*, **245**, 1066-1073.
- Rosen, A., Clements, G., Klein, G. and Zeuthen, J. (1977) *Cell*, **11**, 139-147.
- Ross, C. A., Danoff, S. K., Schell, M. J., Snyder, S. H. and Ullrich, A. (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 4265-4269.
- Rovera, G., Santoli, D. and Damsky, C. (1979) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 2779-2783.
- Rugolo, M., Mastrocola, T., Whorle, C., Rasola, A., Gruenert, D. C., Romeo, G. and Galiotta, L. J. (1993) *J Biol Chem*, **268**, 24779-24784.
- Rutherford, T. R., Clegg, J. B. and Weatherall, D. J. (1979) *Nature*, **280**, 164-165.
- Rutherford, T. R. and Weatherall, D. J. (1979) *Cell*, **16**, 415-423.
- Sairenji, T. and Hinuma, Y. (1980) *Int J Cancer*, **26**, 337-342.
- Sakisaka, T., Itoh, T., Miura, K. and Takenawa, T. (1997) *Mol Cell Biol*, **17**, 3841-3849.
- Salathe, M. and Bookman, R. J. (1995) *J Cell Sci*, **108**, 431-440.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sanderson, M. J., Charles, A. C., Boitano, S. and Dirksen, E. R. (1994) *Mol Cell Endocrinol*, **98**, 173-187.
- Sanderson, M. J., Charles, A. C. and Dirksen, E. R. (1990) *Cell Regul*, **1**, 585-596.
- Sanderson, M. J., Chow, I. and Dirksen, E. R. (1988) *Am J Physiol*, **254**, C63-74.
- Sanderson, M. J. and Dirksen, E. R. (1986) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 7302-7306.
- Sasaki, T., Shimura, S., Wakui, M., Ohkawara, Y., Takishima, T. and Mikoshiba, K. (1994) *Am J Physiol*, **267**, L152-158.
- Sasaki, Y. and Uchida, T. (1989) *J Biochem (Tokyo)*, **106**, 1009-1018.
- Sato, T., Fuse, A., Eguchi, M., Hayashi, Y., Ryo, R., Adachi, M., Kishimoto, Y., Teramura, M., Mizoguchi, H., Shima, Y., Komori, I., Sunami, S., Okimoto, Y. and Nakajima, H. (1989) *Br J Haematol*, **72**, 184-190.

- Satoh, S., Kreutz, R., Wilm, C., Ganten, D. and Pfitzer, G. (1994) *J Clin Invest*, **94**, 1397-1403.
- Sawyer, D. W., Sullivan, J. A. and Mandell, G. L. (1985) *Science*, **230**, 663-666.
- Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F. and Ruth, P. (2000) *Nature*, **404**, 197-201.
- Schwartz, M. A. (1993) *Journal of Cell Biology*, **120**, 1003-1010.
- Schwartz, S. M. (1997) *Transpl Immunol*, **5**, 255-260.
- Shanahan, C. M., Cary, N. R., Metcalfe, J. C. and Weissberg, P. L. (1994) *J Clin Invest*, **93**, 2393-2402.
- Sharma, R. K. and Kalra, J. (1994) *Clin Invest Med*, **17**, 374-382.
- Shen, L., Graziano, R. F. and Fanger, M. W. (1989) *Mol Immunol*, **26**, 959-969.
- Shimizu, T., Nettesheim, P., Mahler, J. F. and Randell, S. H. (1991) *J Histochem Cytochem*, **39**, 7-14.
- Siegmán, M. J., Butler, T. M., Mooers, S. U., Trinkle-Mulcahy, L., Narayan, S., Adam, L., Chacko, S., Haase, H. and Morano, I. (1997a) *Am J Physiol*, **272**, G1571-1580.
- Siegmán, M. J., Butler, T. M., Mooers, S. U., Trinkle-Mulcahy, L., Narayan, S., Stirewalt, W. S. and Starcher, B. C. (1997b) *Am J Physiol*, **272**, G1560-1570.
- Siess, W. (1989) *Physiol Rev*, **69**, 58-178.
- Sjaastad, M. D., Angres, B., Lewis, R. S. and Nelson, W. J. (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8214-8218.
- Sjaastad, M. D., Lewis, R. S. and Nelson, W. J. (1996) *Mol Biol Cell*, **7**, 1025-1041.
- Somogyi, L., Lasic, Z., Vukicevic, S. and Banfic, H. (1994) *Biochem J*, **299** ( Pt 3), 603-611.
- Sormunen, R., Paakko, P., Palovuori, R., Soini, Y. and Lehto, V. P. (1994) *Am J Respir Cell Mol Biol*, **11**, 75-84.

- Sudhof, T. C., Newton, C. L., Archer, B. T. d., Ushkaryov, Y. A. and Mignery, G. A. (1991) *Embo J*, **10**, 3199-3206.
- Sugiyama, N., Tabuchi, Y., Horiuchi, T., Obinata, M. and Furusawa, M. (1993) *Exp Cell Res*, **209**, 382-387.
- Sugiyama, T., Furuya, A., Monkawa, T., Yamamoto-Hino, M., Satoh, S., Ohmori, K., Miyawaki, A., Hanai, N., Mikoshiba, K. and Hasegawa, M. (1994a) *FEBS Lett*, **354**, 149-154.
- Sugiyama, T., Hasegawa, K., Yanai, N., Mikoshiba, K., Obinata, M. and Matsuda, Y. (1999) *Biochem Biophys Res Commun*, **264**, 774-776.
- Sugiyama, T., Matsuda, Y. and Mikoshiba, K. (2000) *FEBS Lett*, **466**, 29-34.
- Sugiyama, T., Yamamoto-Hino, M., Miyawaki, A., Furuichi, T., Mikoshiba, K. and Hasegawa, M. (1994b) *FEBS Lett*, **349**, 191-196.
- Sugiyama, T., Yamamoto-Hino, M., Wasano, K., Mikoshiba, K. and Hasegawa, M. (1996) *J Histochem Cytochem*, **44**, 1237-1242.
- Sullivan, T. J., Parker, K. L., Stenson, W. and Parker, C. W. (1975) *J Immunol*, **114**, 1473-1479.
- Sun, F. F., Crittenden, N. J., Czuk, C. I., Taylor, B. M., Stout, B. K. and Johnson, H. G. (1991) *J Leukoc Biol*, **50**, 140-150.
- Sundstrom, C. and Nilsson, K. (1976) *Int J Cancer*, **17**, 565-577.
- Suzuki, M., Miyazaki, K., Ikeda, M., Kawaguchi, Y. and Sakai, O. (1993) *J Membr Biol*, **134**, 31-39.
- Tabilio, A., Rosa, J. P., Testa, U., Kieffer, N., Nurden, A. T., Del Canizo, M. C., Breton-Gorius, J. and Vainchenker, W. (1984) *Embo J*, **3**, 453-459.
- Takeda, K., Minowada, J. and Bloch, A. (1982) *Cancer Res*, **42**, 5152-5158.
- Takenawa, T., Itoh, T. and Fukami, K. (1999) *Chem Phys Lipids*, **98**, 13-22.
- Terzic, A. and Kurachi, Y. (1996) *J Physiol (Lond)*, **492**, 395-404.

- Toker, A. (1998) *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 254-261.
- Tsien, R. W. and Tsien, R. Y. (1990) *Annu Rev Cell Biol*, **6**, 715-760.
- Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. and Tada, K. (1982) *Cancer Res*, **42**, 1530-1536.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. and Tada, K. (1980) *Int J Cancer*, **26**, 171-176.
- Unkeless, J. C., Scigliano, E. and Freedman, V. H. (1988) *Annu Rev Immunol*, **6**, 251-281.
- Van Scott, M. R., Chinet, T. C., Burnette, A. D. and Paradiso, A. M. (1995) *Am J Physiol*, **269**, L30-37.
- Van Scott, M. R. and Paradiso, A. M. (1992) *Am J Physiol*, **263**, L122-127.
- Villa, A., Podini, P., Panzeri, M. C., Soling, H. D., Volpe, P. and Meldolesi, J. (1993) *J Cell Biol*, **121**, 1041-1051.
- Villeval, J. L., Pelicci, P. G., Tabilio, A., Titeux, M., Henri, A., Houesche, F., Thomopoulos, P., Vainchenker, W., Garbaz, M., Rochant, H., Breton-Gorius, J., Edwards, P. A. and Testa, U. (1983) *Exp Cell Res*, **146**, 428-435.
- Wagner, J. A., Cozens, A. L., Schulman, H., Gruenert, D. C., Stryer, L. and Gardner, P. (1991) *Nature*, **349**, 793-796.
- Wang, N., Butler, J. P. and Ingber, D. E. (1993) *Science*, **260**, 1124-1127.
- Wasano, K. and Hirakawa, Y. (1992) *Histochemistry*, **98**, 165-171.
- Watt, R., Stanton, L. W., Marcu, K. B., Gallo, R. C., Croce, C. M. and Rovera, G. (1983) *Nature*, **303**, 725-728.
- Wegner, M., Cao, Z. and Rosenfeld, M. G. (1992) *Science*, **256**, 370-373.
- Wencel-Drake, J. D., Okita, J. R., Annis, D. S. and Kunicki, T. J. (1991) *Arterioscler Thromb*, **11**, 882-891.
- Wenthold, R. J., Yokotani, N., Doi, K. and Wada, K. (1992) *J Biol Chem*, **267**, 501-507.
- Williams, J. K., Armstrong, M. L. and Heistad, D. D. (1988) *Circ Res*, **62**, 515-523.

- Yamada, M., Miyawaki, A., Saito, K., Nakajima, T., Yamamoto-Hino, M., Ryo, Y., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (1995) *Biochem J*, **308**, 83-88.
- Yamada, N., Makino, Y., Clark, R. A., Pearson, D. W., Mattei, M. G., Guenet, J. L., Ohama, E., Fujino, I., Miyawaki, A., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (1994) *Biochem J*, **302**, 781-790.
- Yamamoto, A., Otsu, H., Yoshimori, T., Maeda, N., Mikoshiba, K. and Tashiro, Y. (1991) *Cell Struct Funct*, **16**, 419-432.
- Yamamoto-Hino, M., Miyawaki, A., Kawano, H., Sugiyama, T., Furuichi, T., Hasegawa, M. and Mikoshiba, K. (1995) *Neuroreport*, **6**, 273-276.
- Yamamoto-Hino, M., Miyawaki, A., Segawa, A., Adachi, E., Yamashina, S., Fujimoto, T., Sugiyama, T., Furuichi, T., Hasegawa, M. and Mikoshiba, K. (1998) *J Cell Biol*, **141**, 135-142.
- Yamamoto-Hino, M., Sugiyama, T., Hikichi, K., Mattei, M. G., Hasegawa, K., Sekine, S., Sakurada, K., Miyawaki, A., Furuichi, T., Hasegawa, M. and et al. (1994) *Receptors & Channels*, **2**, 9-22.
- Yamaya, M., Ohrui, T., Finkbeiner, W. E. and Widdicombe, J. H. (1993) *Am J Physiol*, **265**, L170-177.
- Yanai, N., Satoh, T., Kyo, S., Abe, K., Suzuki, M. and Obinata, M. (1991) *Jpn J Cancer Res*, **82**, 1344-1348.
- Yellen, A. J., Glenn, W., Sukhatme, V. P., Cao, X. M. and Monroe, J. G. (1991) *J Immunol*, **146**, 1446-1454.
- Yoshikawa, S., Tanimura, T., Miyawaki, A., Nakamura, M., Yuzaki, M., Furuichi, T. and Mikoshiba, K. (1992) *J Biol Chem*, **267**, 16613-16619.
- Zhang, W., Han, S. W., McKeel, D. W., Goate, A. and Wu, J. Y. (1998) *J Neurosci*, **18**, 914-922.
- Zhang, X., Chattopadhyay, A., Ji, Q. S., Owen, J. D., Ruest, P. J., Carpenter, G. and Hanks,

S. K. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9021-9026.

Zimolo, Z., Wesolowski, G., Tanaka, H., Hyman, J. L., Hoyer, J. R. and Rodan, G. A. (1994)

*Am J Physiol*, **266**, C376-381.

## 謝辞

本研究を行うに当たり、多くのご指導を頂きました株式会社ダイナベック研究所・研究所長、長谷川護博士に感謝いたします。

本研究の全般にわたりいつも温かいご指導を頂きました、東京大学医科学研究所、御子柴克彦教授に感謝いたします。そして多くのご指導と助言を頂きましたと古市貞一助教授に感謝いたします。

実験で多くのご指導を頂きました理化学研究所、宮脇敦史博士に感謝いたします。いつも多くの助言と議論を頂きました理化学研究所、日野美紀博士に感謝いたします。

本研究を行うに当たり多くの議論を頂きました慶応大学医学部、門川俊明博士に感謝いたします。その機会を与えて頂きました慶応大学医学部、猿田享男教授と林松彦助教授に感謝いたします。

気管の実験に関する多くのご指導を頂きました九州大学医学部、和佐野公二郎助教授に感謝いたします。

本研究に対する温かいご批判とご指導を頂きました協和醗酵工業株式会社・創薬研究所・研究所長、松田譲博士に感謝いたします。抗体の作製に当たりご指導を頂きました協和醗酵工業株式会社・東京研究所・副所長、花井陳雄博士ならびに古谷安希子研究員に感謝いたします。細胞株の樹立で多くのご指導を頂きました協和醗酵工業株式会社・東京研究所、長谷川一英博士ならびに協和醗酵工業株式会社・創薬研究部、小田祥二博士に感謝いたします。動物実験で多くのご指導を頂きました協和醗酵工業株式会社・富士工場分析センター・センター長、大森健守博士ならびに医薬開発企画部、佐藤総一郎博士に感謝いたします。

温度感受性SV40 large T抗原トランスジェニックマウスをご供与頂きました東北大学加齢研究所、帯刀益夫教授に感謝いたします。そして多くの助言を頂きました矢内信昭助教授に感謝いたします。

平滑筋細胞の形態に関する多くの指導を頂いた帝京大学医学部、野々村禎昭教授に感謝いたします。



血液サンプルの扱いに関するご助言を頂きましたテルモ株式会社、島村京子研究員に感謝いたします。Universita' Degli Studi di Ancona、Elisabetta Damiani 博士と Lucedio Greci 教授に感謝いたします。

本研究をまとめるに当たり、温かいご指導を頂きました東京大学国際・産学共同研究センター・センター長、軽部征夫教授に感謝いたします。多くのご助言とご指導を頂きました東京大学先端科学技術研究センター、池袋一典講師に感謝いたします。そして多くのご指導を頂きました東京大学工学部、長棟輝行教授ならびに渡辺公綱教授と上田卓也教授に感謝いたします。