

内皮細胞カベオラからのCa²⁺シグナルとNO産生調節機構

一色 政志 藤田 敏郎

要旨：細胞は細胞内Ca²⁺は時間・空間的パターンを使い分けて多彩な機能を発揮する。血管内皮細胞においてはeNOSがカベオラに存在し、その活性はカベオラ周囲のCa²⁺濃度に依存する。我々は、Ca²⁺センサー蛋白カメレオンをカベオラにターゲットさせ、カベオラ直下でのCa²⁺動態を評価した。非刺激時にはカベオラ周囲は比較的高濃度のCa²⁺コンパートメントを形成している。さらに、カベオラはストア枯渇に伴うCa²⁺流入の主要な流入経路であり、NO産生とリンクする。また、ストアからのCa²⁺放出はカベオラ集中部位近傍で観察され、シェアストレスにより細胞内局在が変化する。従って、カベオラは細胞外の状況に応じて移動するCa²⁺シグナルのコンテナとして働いている可能性がある。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, 43: 87-93)

Key words : Caveolin, Cameleon, FRET, Capacitative Ca²⁺ entry, Shear stress

カベオラにおけるカルシウム依存性NO産生

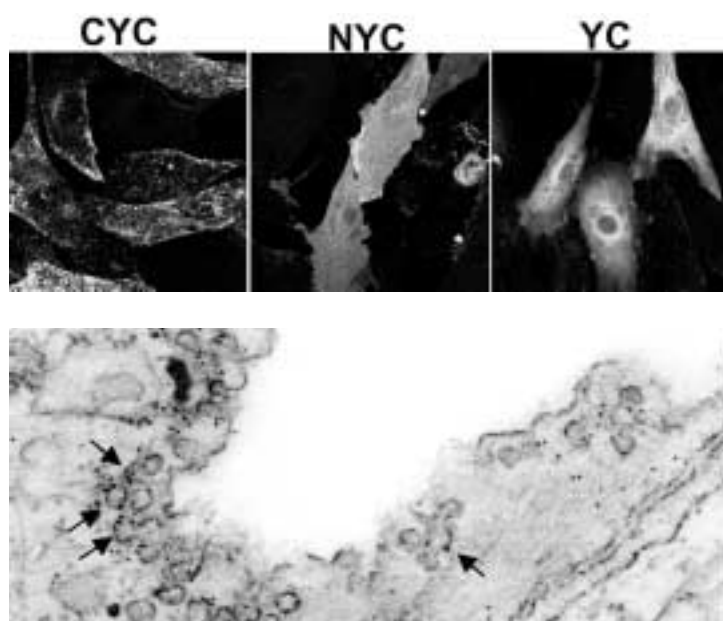
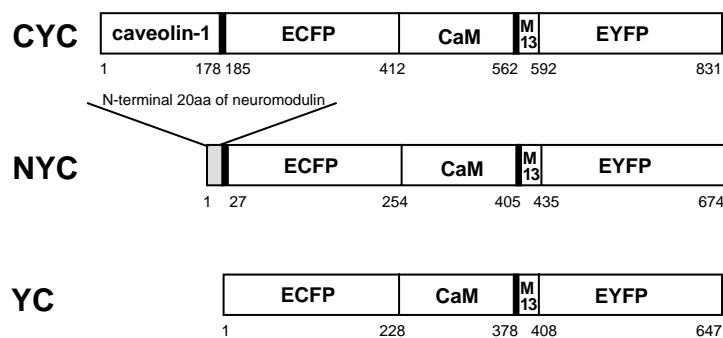
カルシウムイオン(Ca²⁺)は細胞内において多彩な時間・空間的なパターンをとることにより多岐にわたる細胞機能を発揮することを可能とする重要なセカンドメッセンジャーである¹⁾。内皮細胞から放出される一酸化窒素(NO)は血管トーンスの調節、抗動脈硬化に関わる重要な因子であり、その産生は内皮細胞内Ca²⁺依存性の経路とCa²⁺非依存性の経路が知られている。一酸化窒素合成酵素(eNOS)分子は内皮細胞膜に豊富に存在する膜陥入構造であるカベオラに局在し²⁾、非刺激時にはカベオリンと結合することによりその活性が抑制されている。カベオラ局所でのCa²⁺が上昇するとCa²⁺に結合したカルモジュリンはカベオリンと置換してeNOS分子と結合し、NO産生が刺激される³⁾。すなわち、血管平滑筋とは対照的に、内皮においては細胞内Ca²⁺上昇によりNO産生を介して血管拡張の方向へと作用する。一方、Ca²⁺非依存性の活性化経路としては、PI3キナーゼを介するセリン・スレオニンキナーゼであるAktの活性化によりeNOSが活性化するというカスケードが存在するが、本稿ではCa²⁺依存性のNO産生に焦点を絞る。

細胞内Ca²⁺はlocalなセカンドメッセンジャーであ

り、eNOS分子周囲、すなわちカベオラ周囲におけるCa²⁺濃度の調節は、NO産生の調節変化を介して高血圧や動脈硬化の病態に影響しうる重要なファクターであると推察される。実際、カベオラにはカルシウム制御蛋白(IP₃受容体様蛋白⁴⁾、Ca²⁺-ATPase⁵⁾)の存在が集中していることが報告されており、Ca²⁺調節部位として重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。しかしながら、膜直下およびカベオラ直下のCa²⁺を単一の生きた細胞レベルで測定することは技術的にも困難であり、それがどのようにNO産生と関連するかはこれまで未解決の問題であった。

FRETによる膜直下Ca²⁺イメージング

そこで我々は、Ca²⁺センサー蛋白カメレオン(cameleon)を用いてカベオラ直下のCa²⁺レベルを評価することを試みた。カメレオンはGFPミュータントであるCFPとYFPを含むCa²⁺感受性のキメラ蛋白である^{6,7)}。カメレオン分子周囲のCa²⁺濃度が上昇すると、カメレオン分子内のCFPとYFPとの距離が小さくなるような構造変化を起こし、ドナー分子であるCFPからアクセプター分子であるYFPへのFRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)と呼ばれる蛍光エネルギー遷移現象がおこる。このFRET効率は、アクセプターとドナーの蛍光



A
B
C

Figure 1 Construction and targeting of cameleon-based Ca²⁺ probes.

(A) Chimeric yellow cameleon probes. Chimeric cDNAs were constructed by fusing in tandem the cDNA for either full-length caveolin-1 (CYC) or the N-terminal 20 amino acids of neuromodulin (NYC) with the cDNA for yellow cameleon 2.1 (YC).

(B) Fluorescence and immunogold visualization of cameleon proteins. Primary bovine endothelial cells were transiently transfected with the indicated cDNA and processed for indirect immunofluorescence localization of caveolin-1.

(C) Immunogold labeling for CYC. Endothelial cells transiently transfected with CYC were processed for indirect immunogold (10 nm gold, arrows) localization of GFP. Thus, CYC is correctly targeted to invaginated caveolae.

の比で表され、Ca²⁺濃度の指標として用いることができる。カメレオンの一つの大きな特徴は、コードするcDNAを修飾することにより細胞内局所へ分子を発現させ、局所のCa²⁺変化をとらえることが出来る点にある。

カベオラ局所のCa²⁺変化を評価するために用いた3つのCa²⁺プローブを示す(Fig. 1A)。YCはオリジナルのカメレオン、CYCとNYCはそれぞれカベオラ直下、細胞膜直下全体の平均のCa²⁺を解析するためのコンストラクトである。CYCはカベオリンをコードするcDNAをカメレオンのN端に融合し、カメレオンがカベオラ直下にターゲットすることを期待した。NYCはneuromodulin(別名GAP-43)のN末20アミノ酸をコード

するcDNAをカメレオンのN端に融合し、細胞膜直下全体のCa²⁺変化をとらえるためにデザインされた。

それぞれのセンサー蛋白を培養内皮細胞に一過性に発現させたところ、CYC発現細胞ではその分布パターンがトランスフェクションされていないcaveolin分布パターンと同一であり内因性のcaveolin分布とほぼ完全にcolocalizeした(Fig. 1B)。NYCはcaveolin分布パターンに関係なく均一に膜にターゲットされており、YCはすでに知られているとおり細胞質全体に分布した(Fig. 1B)。さらに、GFPに対する免疫電顕によりCYCが正しくカベオラにターゲットしていることを確認した(Fig. 1C)。したがって、CYC、NYC、YCが発現する細胞における蛍光変化は、それぞれカベオラ直下、全

細胞膜直下, 細胞質の平均の Ca^{2+} 濃度変化を反映しているものと判定され, 実際に共焦点レーザー顕微鏡によるFRETの実験へと進んだ。

非刺激時におけるカベオラ周囲の Ca^{2+} 濃度

まず, これら3つのプローブをそれぞれ細胞に発現させ, (pHと Ca^{2+} 濃度をクランプすることにより) in-situでキャリブレーションを行い, Ca^{2+} 変化に対するFRET効率はプローブ間で差がないことを確認した。細胞外 Ca^{2+} フリーの条件下でカベオラ, 細胞膜全体, 細胞質全体における局所の Ca^{2+} 濃度を評価した。それぞれのセンサーを発現させた細胞の細胞外medium中 Ca^{2+} 濃度をコントロールすることにより, FRET効率を表すratioの最小値と最大値を求め, それをもとに実験開始時, つまり細胞外がnominally free Ca^{2+} であるときの各部位での Ca^{2+} 濃度をcalibrationした。その結果, カベオラ直下, 細胞膜全体, 細胞質全体での Ca^{2+} 濃度は, それぞれ約320nM, 260nM, 20nMであり, カベオラ直下 Ca^{2+} は他の部位に比較して有意に高濃度差であることが明らかとなった。

次に, 細胞外medium Ca^{2+} 濃度が生理的レベルでの局所の Ca^{2+} 濃度を評価した。細胞外フリーのmedium中 Ca^{2+} を1.2 mMに上昇させ, プラトーに達したレベルを各部位での Ca^{2+} 濃度としてcalibrationした。その結果, カベオラ, 細胞膜全体, 細胞質全体における Ca^{2+} 濃度はそれぞれ約620nM, 380nM, 60nMとなり, やはりカベオラ直下の Ca^{2+} 濃度は他の膜直下に比べても有意に高値であることが示された。ここまでをまとめると, 細胞外 Ca^{2+} の存在の有無にかかわらず, カベオラの細胞質側には有意に比較的高濃度の Ca^{2+} poolが存在することが示唆された(Fig. 2)。

カベオラでのストア依存性 Ca^{2+} 流入とNO産生の関連

それぞれのセンサーを各部位に発現させた細胞に対し, Ca^{2+} フリーの条件下で $4\mu\text{M}$ thapsigarginと $50\mu\text{M}$ ATPにより細胞内 Ca^{2+} ストアを枯渇させ, 5分後, 段階的に細胞外 Ca^{2+} 濃度を上昇させてそれぞれのセンサーで探知した Ca^{2+} 濃度のピークをプロットし, カベオラにおけるいわゆるstore-operated Ca^{2+} entryを定量評価した(Fig. 3A-D)。CYC発現細胞では $120\mu\text{M}$ 前後のより低濃度の Ca^{2+} 補充により大きな Ca^{2+} 変化が認められた。す

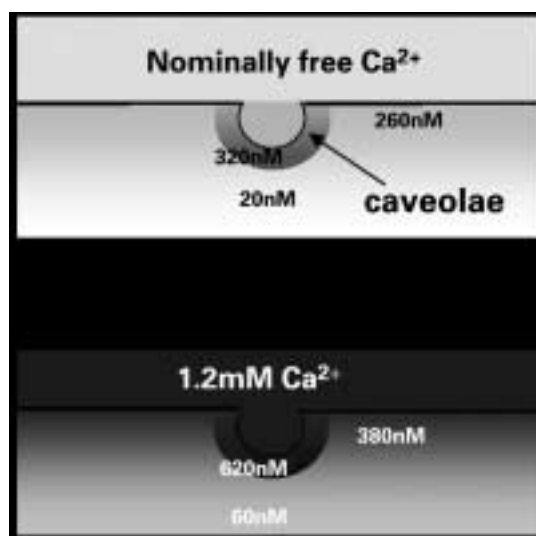


Figure 2 Localized Ca^{2+} concentration of cytoplasmic face of caveolae of unstimulated endothelial cells. Upper and lower schema show Ca^{2+} gradient across the plasma membrane in the absence (nominally free Ca^{2+}) or presence of extracellular Ca^{2+} , respectively. Note that $[\text{Ca}^{2+}]$ at caveolae is approximately 10 times higher than bulk cytosolic Ca^{2+} and even higher than that beneath non-caveolar plasma membrane.

なわち, Ca^{2+} を補充した際の Ca^{2+} の変化は予想通りカベオラで大きく, カベオラにおける Ca^{2+} 流入量は常に非カベオラ膜における Ca^{2+} 流入の約2倍以上である。したがって, カベオラはストア枯渇に伴う Ca^{2+} 流入(store-operated またはcapacitative Ca^{2+} entry)の主要な経路であることが示された⁸⁾。CYCを発現した細胞のFRET効率を疑似カラー表示したイメージにおいて, 典型的なカベオリンの局在部位においてFRET効率の上昇が認められている(Fig. 3E)。

続いて, Ca^{2+} 蛍光指示薬Fura RedとNO指示薬DAF2を同時に負荷し, 細胞内 Ca^{2+} 変化とNO産生を同時にモニターすることにより, スストア依存性 Ca^{2+} 流入とNO産生との関連を検討した(Fig. 4A, B)。その結果, 細胞外 Ca^{2+} フリーの状態ではATPとthapsigarginによる細胞内 Ca^{2+} 放出に対してNO産生はほとんど刺激されない。一方, 5分後, 細胞内ストア枯渇後にカベオラのみで Ca^{2+} 流入が起こる程度の低濃度 Ca^{2+} ($120\mu\text{M}$)を補充してやると, その直後に起こる細胞内への流入は, より強力にNO産生を刺激する。したがって, NO合成酵素がカベオラに局在すること, およびストア枯渇に伴う Ca^{2+}

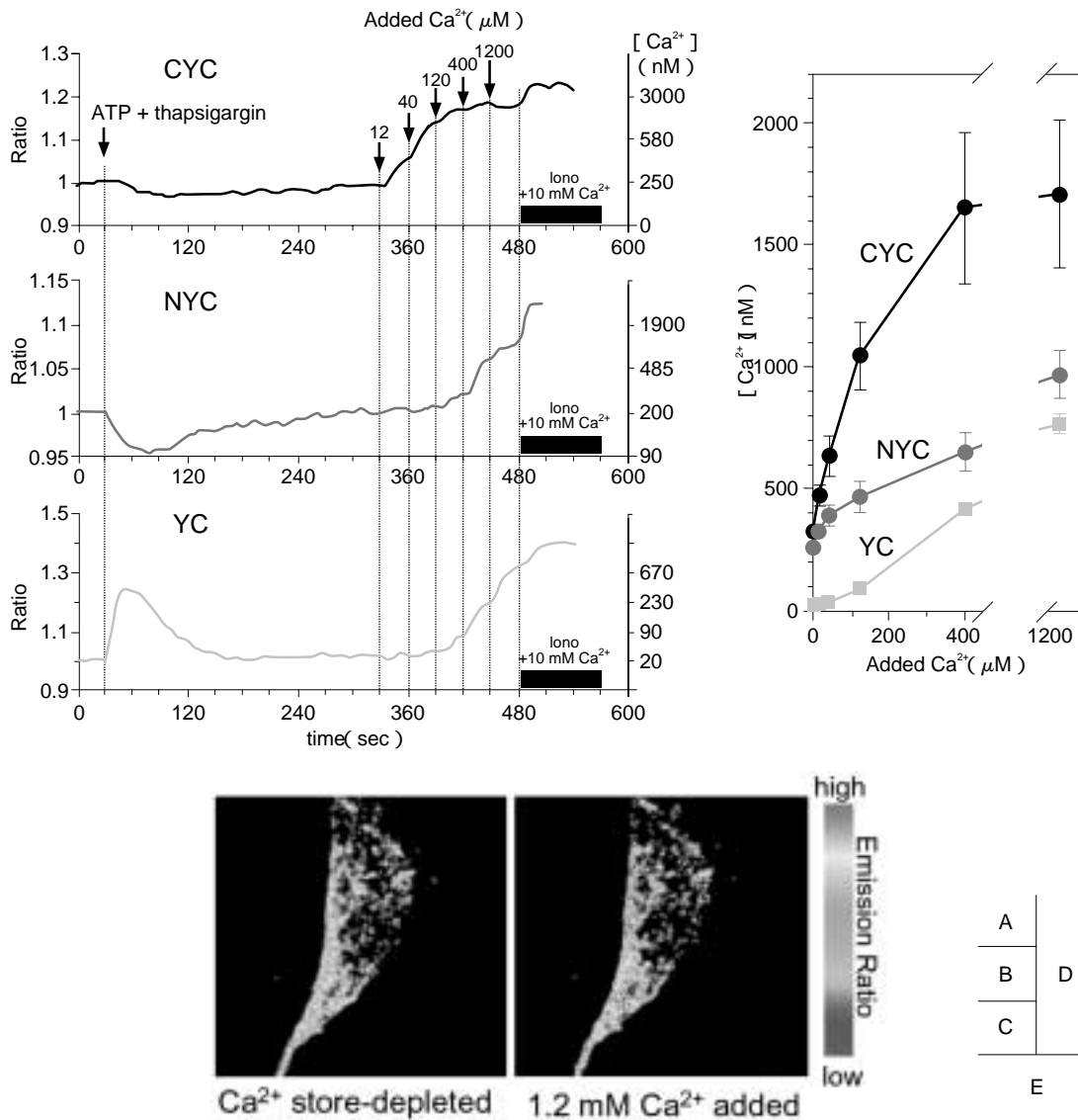


Figure 3 Ca²⁺ store depletion-induced changes in [Ca²⁺] detected by CYC, NYC, or YC.

Primary bovine endothelial cells were transiently transfected with the indicated cDNA. Cells were incubated in nominally Ca²⁺-free medium for 5 min after the addition of 50 μM ATP and 4 μM thapsigargin to deplete ER Ca²⁺ stores. (A-C) Five minutes later, the indicated concentration of Ca²⁺, from 12 μM to 1.2 mM, was sequentially added to the dish. (D) Average [Ca²⁺] detected by CYC, NYC, and YC when the extracellular concentration of Ca²⁺ is increased following depletion of ER stores. Note that Ca²⁺ influx detected by CYC is significantly larger than that of NYC, suggesting that caveolae are preferred sites for store-operated Ca²⁺ entry. (E) Pseudo-colored ratio images of a single cell transfected with CYC. Images are just before and after addition of 1.2 mM Ca²⁺, showing a Ca²⁺ increase at caveolin-rich cell edges.

流入がカベオラで起こることを考慮すると、NO産生はカベオラ周囲のCa²⁺上昇の空間的な構成パターンにより効率的にNO産生が調節されているといえる。

ATPで刺激によりカベオラからCa²⁺ waveが発火する

下段に示すように、カベオラの主要な構成蛋白であ

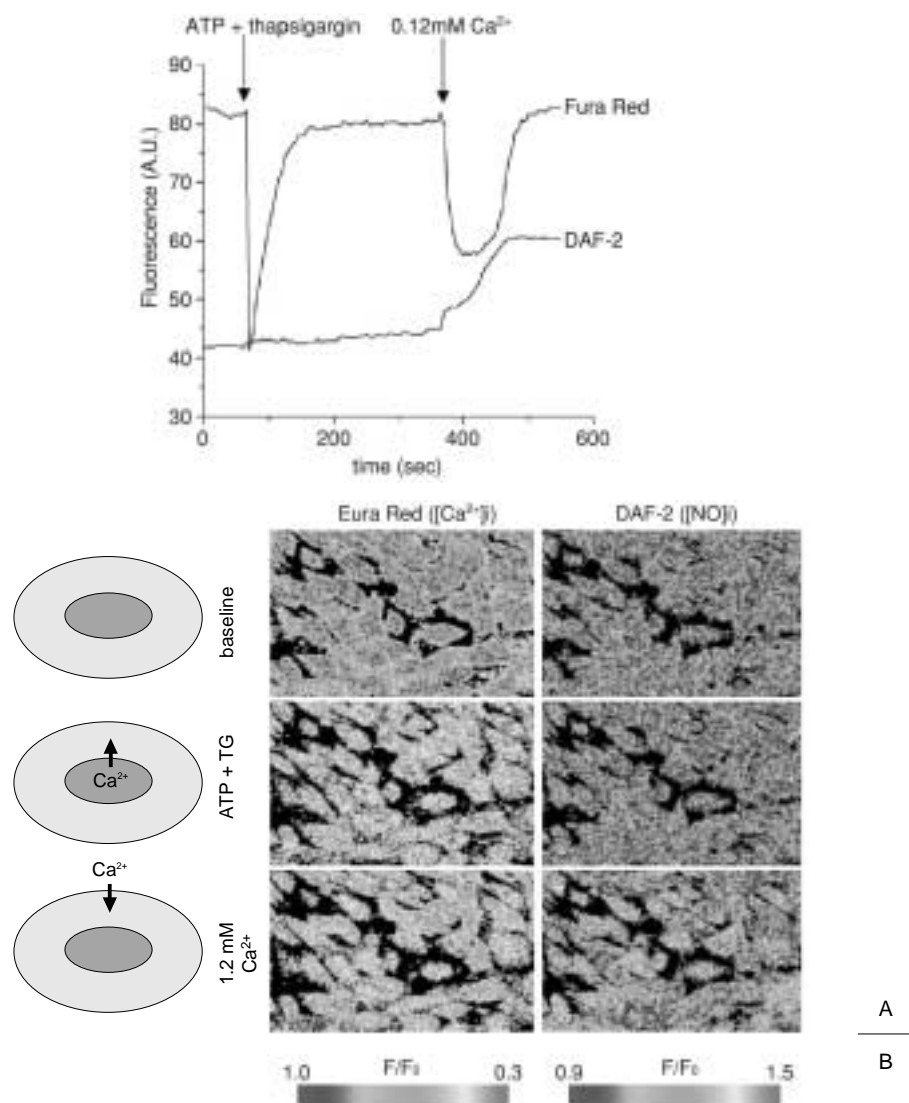


Figure 4 Store-operated Ca²⁺ entry strongly stimulates NO production.

(A) Following store depletion with 50 μM ATP and 4 μM thapsigargin in the absence of extracellular Ca²⁺, 120 μM Ca²⁺ was added. For simultaneous monitoring of [Ca²⁺]_i and NO production ([NO]_i), cells co-loaded with Fura Red and DAF-2 were excited with a 488nm Ar laser and an 8-bit pair images corresponding to emission 500-535nm for DAF-2 and emission 600 - 650nm for Fura Red were acquired. [Ca²⁺]_i and [NO]_i in grouped cells (50-60 cells) was expressed as fluorescence of Fura Red and DAF-2 fluorescence with an arbitrary unit shown in the left and right ordinate, respectively. Note that fluorescence of Fura Red decreases as [Ca²⁺]_i increases, while fluorescence of DAF-2 increases as [NO]_i increases. An acute peak in [Ca²⁺]_i evoked by ATP and thapsigargin stimulated little NO production. In contrast, re-addition of 120 μM Ca²⁺ strongly stimulated NO production. (B) Each image was processed by calculating the ratio of each pixel to the corresponding pixel of the basal image (F/F₀).

り、マーカー蛋白でもあるカベオリンは内皮細胞の辺縁の一部に集中する傾向がある。興味深いことに、ATP刺激によって細胞辺縁の一部よりCa²⁺ waveが発火し、数十 μm/secの速度で細胞全体へと伝搬する(Fig.

5A)。発火のメカニズムとしては、(1)カベオラ集中部位にはGPCR, Gq, PLCなど一連のIP₃産生機構が集中しており、IP₃産生の局在化の可能性、(2)カベオラ集中部位には細胞内ストアであるERがより近接してい

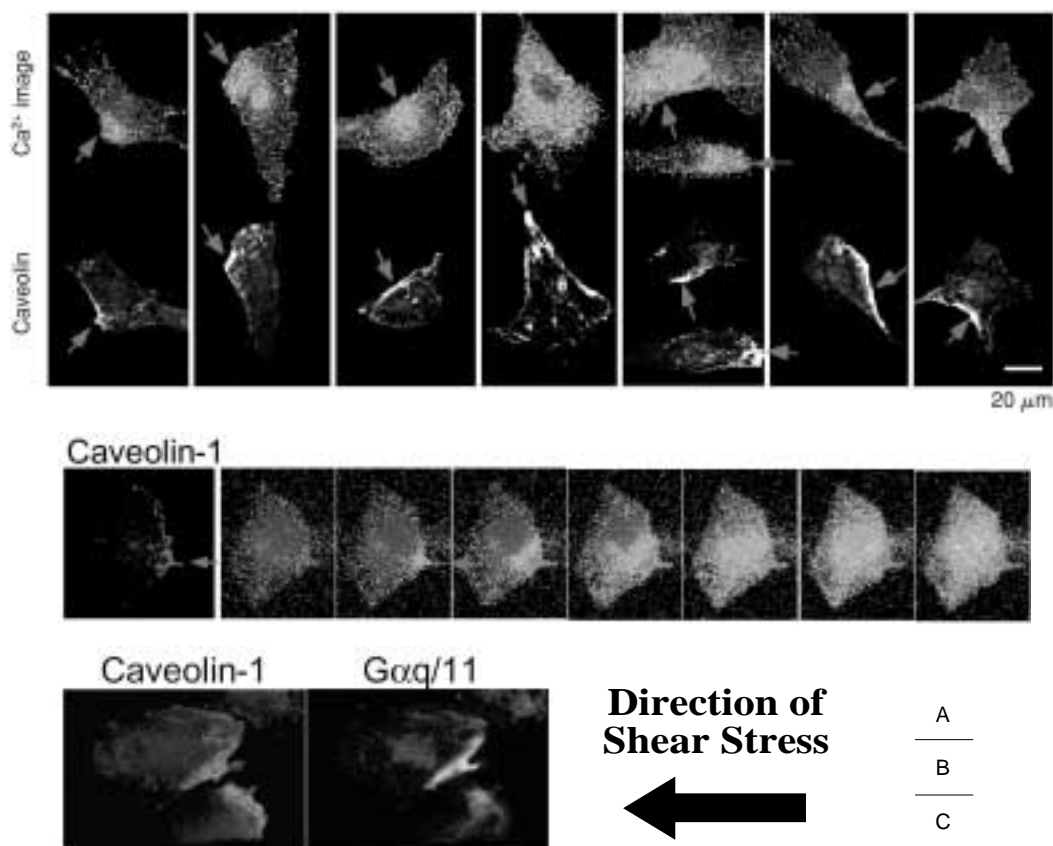


Figure 5 Sites of Ca²⁺ wave initiation move with caveolae to the upstream cell edges in response to fluid shear stress. (A) ATP-induced endothelial Ca²⁺ waves originate at caveolin-rich cell edges (arrows). Upper panel shows Indo-1 loaded cell images just beginning to initiate Ca²⁺ wave and lower panel shows corresponding immunofluorescence for caveolin-1. (B) Shear stress of 20 dynes/cm² for 24 hours induces caveolin localization (left images in red) and the initiation site of ATP-induced Ca²⁺ wave (arrows) to the upstream cell edges (sequential pseudo-colored ratio images). Direction of shear stress is from right to left. (C) Simultaneous relocation of caveolin-1 and G_{αq/11} in response to shear stress of 20 dynes/cm² for 24 hours.

ること、(3)カベオラ周囲のCa²⁺濃度は比較的高く、近接するER上に存在するIP₃受容体周囲のCa²⁺濃度を高くしてその感受性を高めている可能性、(4)カベオラに存在するCa²⁺流入経路がIP₃により活性化される可能性、などが考えられる¹⁰⁾。

このカベオリン集中部位はシエアストレスを負荷することにより流れの上流側に移動することが、カベオリンに対する免疫蛍光染色と電顕で確認されている (Fig. 5B)。この移動の程度はシエアストレスの強さおよび負荷する時間に依存した¹¹⁾。さらに、PLC 活性化、IP₃産生系に必須であるG_{αq/11} およびATP刺激によるCa²⁺ wave発火点もシエアストレスにより流れの上流側

に移動する。

まとめ

内皮細胞カベオラの細胞質側は比較的高濃度のCa²⁺を持つコンパートメントを形成しており、ストアからのCa²⁺放出開始点かつストア依存性Ca²⁺流入の主要な経路である。一方、カベオラ構造は外界刺激に伴い細胞内で局在変化をおこし、ときに極性を持つようになる。これは、細胞外の状況に応じて、Ca²⁺調節のための装置を備えたカベオラが細胞内を移動して、適切なCa²⁺上昇とNO産生の時空間的パターンを再構成するような適応機構が内皮細胞に備わっていると考えられ

る。ストア依存性Ca²⁺流入の詳細な機構, 具体的なチャンネルの関与をはじめ, 具体的な心血管病または内皮機能障害との関連など今後さらに解明すべき問題は多い。

文 献

- 1 Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD: The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, **1**: 11-21.
- 2 Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ et al: Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 6518-6522.
- 3 Michel JB, Feron O, Sase K et al: Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 25907-25912.
- 4 Fujimoto T, Nakade S, Miyawaki A et al: Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptorlike protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol*, 1992, **119**: 1507-1513.
- 5 Fujimoto T: Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol*, 1993, **120**: 1147-1157.
- 6 Miyawaki A, Llopis J, Heim R et al: Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 1997, **388**: 882-887.
- 7 Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R et al: Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96**: 2135-2140.
- 8 Isshiki M, Ying YS, Fujita T et al: A molecular sensor detects signal transduction from caveolae in living cells. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 43389-43398.
- 9 Isshiki M, Ando J, Korenaga R et al: Endothelial Ca²⁺ waves preferentially originate at specific loci in caveolin-rich cell edges. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 5009-5014.
- 10 Isshiki M and Anderson RGW: Calcium signal transduction from caveolae. *Cell Calcium*, 1999, **26**: 201-208.
- 11 Isshiki M, Ando J, Yamamoto K et al: Sites of Ca²⁺ wave initiation move with caveolae to the trailing edge of migrating cells. *J Cell Sci*, 2002, **115**: 475-484.

Ca²⁺ Signaling from Caveolae and Regulation of NO Production

Masashi Isshiki and Toshiro Fujita

Department of Nephrology and Endocrinology, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Key words: Caveolin, Cameleon, FRET, Capacitative Ca²⁺ entry, Shear stress

Intracellular Ca²⁺ is a second messenger that is organized spatially and temporally, exerting functional versatility. In endothelial cells, eNOS, which is regulated by Ca²⁺, is localized at small plasma membrane invaginations called caveolae. By targeting GFP-based Ca²⁺ sensing protein, cameleon, to caveolae or general plasma membrane, Ca²⁺ dynamics at such localized regions was evaluated. In the unstimulated condition, Ca²⁺ at caveolae is higher than that at non-caveolae. Importantly, caveolae are preferred sites for capacitative Ca²⁺ entry linked to NO production. ATP-induced Ca²⁺ waves, which are organized from IP₃-induced Ca²⁺ release from intracellular stores, originate at caveolin-rich cell edges. A higher Ca²⁺ concentration at caveolae may contribute to higher sensitivity of IP₃-induced Ca²⁺ release from IP₃ receptors. In response to shear stress, these initiation sites move to the upstream cell edges, where ATP-induced Ca²⁺ waves invariably originated and G_{αq11} molecules were co-localized. Thus, caveolae can work as Ca²⁺ signaling containers, which move to other locations on demand for the adjustment of cellular function including NO production.

(*J. Jpn. Coll. Angiol.*, 2003, **43**: 87-93)