

琉球大学学術リポジトリ

[総説] 血管平滑筋Ca²⁺チャンネルの調節機構： アクチンフィラメントの意義

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-07-02 キーワード (Ja): キーワード (En): L-type Ca ²⁺ channel, Actin filament, Vascular smooth muscle cells, Cytoskeleton, Colchicine 作成者: 中村, 真理子, 小杉, 忠誠, Nakamura, Mariko, Kosugi, Tadayoshi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016141

血管平滑筋 Ca^{2+} チャネルの調節機構 — アクチンフィラメントの意義 —

中村真理子, 小杉忠誠

琉球大学医学部生理学第一講座

Regulation of L-type Ca^{2+} channel activity in cultured vascular smooth muscle cells: — the role of actin filament —

Mariko Nakamura and Tadayoshi Kosugi

1st Department of Physiology, School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

ABSTRACT

Changes in the cytoskeletal network alter the mechanical properties of cells that are essential for functions such as locomotion and cytokinesis. The transmembrane receptors and intracellular signals have been extensively studied on cytoskeletal changes in response to extracellular stimuli. After the procedure of percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) and high-frequency rotational atherectomy (PTCR) for stenosis of blood vessels, restenosis may be observed. The restenosis were generated under the proliferation and migration of vascular smooth muscle (VSM) cells. In addition, until recently it has been expected that the physiological regulation of VSM cells was dependent on L-type Ca^{2+} (Ca_L) channel activity and structure of the cytoskeleton. To clarify the interactions between the structure of the cytoskeleton and activity of Ca_L channel in VSM cell, we used electrophysiological and morphological experiments concomitantly. We investigated the effect of disruption of the actin filaments and the microtubules on Ca_L channel activity (Ca^{2+} current) of cultured VSM cells (A7r5 cell line) using whole cell voltage clamp. The results of immunostaining using anti- α -actin and anti- α -tubulin antibodies showed that colchicines disrupted both actin filaments and microtubules, while cytochalasin D and nocodazole disrupted only actin filaments, and microtubules respectively. Ca^{2+} current was greatly reduced in cells that were exposed to colchicines or cytochalasin D but not to nocodazole. When the actin filaments were stabilized by phalloidine, the inhibition of Ca^{2+} current was not observed. Actin filaments disruption of VSM cells inhibits Ca_L channel activity, whereas the microtubules disruption gave no effect on the activity. These results suggested that the maintenance of physiological function in VSM cells involve the functional-structural relationship between the L-type Ca^{2+} channel and cytoskeleton. The development of restenosis is dependent on the pathophysiological proliferation and then migration of the VSM cells could be prevented by control of L-type Ca^{2+} channel activity and stabilization of the cytoskeleton in VSM cells. *Ryukyu Med. J.*, 21(1)1~7, 2002

Key words: L-type Ca^{2+} channel, Actin filament, Vascular smooth muscle cells, Cytoskeleton, Colchicine,

はじめに

近年, PTCA, PTCR あるいは静脈グラフト 後に出現する血管再狭窄を防止するための種々の方策が考案されている. しかしながら, 一定の評価が得られるに至る有効な方策は, 未だ見いだされていない. このような現状下では, 再狭窄の原因やその発現機序の解明を進めなければならない. 最近では, この再狭窄に血管平滑筋の分化異常の関与が指摘されている.

血管平滑筋細胞の増殖や分化, 遊走作用に関連する細胞骨格構造の変化と, 細胞の生理的機能維持に重要である Ca^{2+} チャネル活性との相互関係が注目されている. 血管平滑筋細胞の細胞骨格, Ca^{2+} チャネル活性の研究は, 血管機能の解析に重要な情報を提供するものと考えられる. 本総説では, 血管平滑筋細胞の Ca^{2+} チャネル活性およびその調節機構と細胞骨格について, 我々の研究グループにより得られた最近の新知見を中心に概説する. 血管細胞生物学の知見に基づく再狭窄の

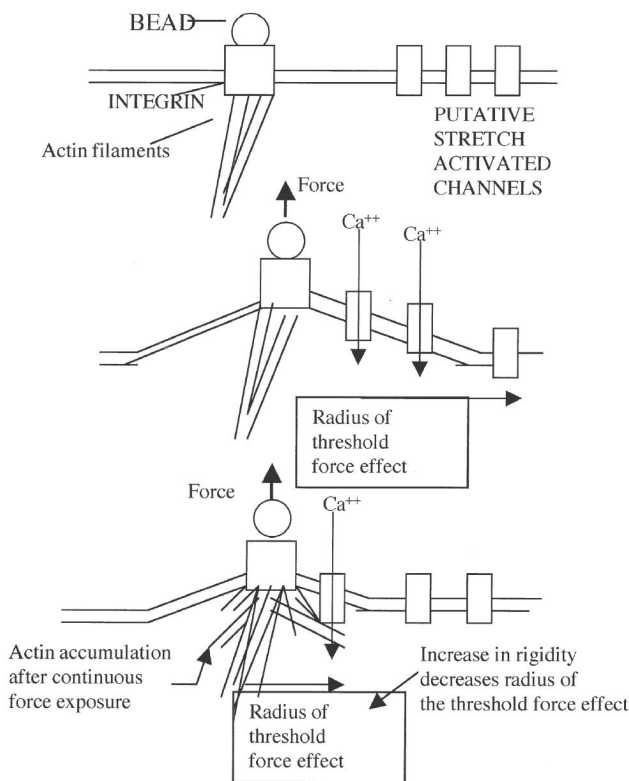


Fig. 1 Proposed theoretical model of the effects of force and cytoskeletal changes on calcium influx. Applied force to the membrane is translated into membrane tension which activates channel opening when above a given threshold. The horizontal arrows graphically indicate the radius of the threshold force effect exerted on the membrane by the individual beads. We propose that increased rigidity near the bead, and decreased rigidity further away, results in less displacement of the cell surface, and a decreased region in which stress exceeds the threshold required for channel opening. [Reproduced with permission from Fig.10 of Glogauer M. *et al.*, (1997). *J Cell Sci* 110: 11-21.]

予防・治療法の新しい展開を、血管平滑筋の形質変換調節の視点で進めるための基盤的知識としたい。

1) 細胞骨格とは

細胞骨格は、細胞内にあるタンパク質からなる線構造であり、細胞の形を内部から支持し、いろいろな細胞の特徴的形態を形成、維持し、さらには細胞の収縮や運動においても中心的な役割を果たすものである。筋原線維や軸索のように生理的機能が高度に分化した細胞にあっては、安定した構造を細胞骨格が担っている場合もあるが、他の細胞では一般的に細胞分裂時にみられる紡錘体や収縮管のように必要に応じて構築されたり、破壊されたりする性質を備えている。細胞骨格のネットワークの形態変化は、細胞の物理的特性を変える。すなわち、遊走作用や細胞分裂などの細胞機能の発現時には、その変化を示す^{1, 2)}。細胞骨格は、アクチンフィラメント、微小管、中間フィラメントの関連で構成されている。アクチンフィラメントは細胞膜に沿った分布を示す。細胞膜から遠く離れた部位でアクチンフィラメントをみることはほ

んどなく、束になり網目構造を作っている。微小管は核の近傍に位置し、中心粒から細胞全体に放射状に分布している。微小管は細胞全体に分布し、顆粒や小胞体などの細胞内膜系との関連が観察されるが、細胞膜との連結は一般的にはみられない。

2) Ca^{2+} チャネルの種類と特性

細胞内のカルシウムは、細胞の情報伝達を行うセカンドメッセンジャーである。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇や減少はその細胞の機能に反映する。その Ca^{2+} イオンを細胞外から細胞内へ通過させるのに、 Ca^{2+} イオンチャネルがその役割を担っている。 Ca^{2+} イオンチャネルには細胞膜にある電位依存性 Ca^{2+} チャネル、受容体作動性チャネル、容量依存性チャネル、小胞体にある Ca^{2+} 放出チャネルがある。電位依存性 Ca^{2+} チャネルには、わずかな脱分極で活性化される低閾値活性化型と大きな脱分極（ -35mV 以上）がないと活性化されない高閾値活性化型の2種類に大別される。前者の Ca^{2+} チャネルはT型 Ca^{2+} チャネルであり、後者の Ca^{2+} チャネルはL型 Ca^{2+} チャネルである³⁾。

電位依存性 Ca^{2+} チャネル（L型 Ca^{2+} チャネル）は、膜電位が脱分極するとその変化を感知して開口し、 Ca^{2+} を選択的に通過させる。細胞膜に電気的興奮（脱分極活動電位）の波が伝えられると細胞シグナルは、このチャネルを開口し Ca^{2+} イオンを通過させ、細胞内 Ca^{2+} 量の増加を引き起こす。このチャネルは、筋肉、神経、分泌細胞などの興奮性細胞に広く分布し、筋収縮、心臓の拍動、神経活動に必要な Ca^{2+} を供給する役割を担っている。 Ca^{2+} の供給は細胞の遊走をも制御している。

その他のイオンチャネルにおいても、細胞膜の表面に近い部位に分布し、細胞内外の環境の変化に対応し、その細胞を生理的に維持するのを目的として存在している。また、それらは、細胞骨格、特にアクチンフィラメントに接触し、その影響を受け入れやすい環境を構成している^{4, 5)}。アクチンやアクチン結合タンパクのいくつかは、イオンチャネルやポンプに結合しているともいわれている⁶⁾。細胞骨格の主な構成成分であるアクチンやアクチン結合タンパクのカルシウムイオンとの反応は、細胞を保護する目的で相互的に作用している⁷⁾（図1）。さらに、カルシウムイオンは、アクチンのネットワーク形成を調節、統御している^{8, 9)}。

3) 細胞骨格と Ca^{2+} チャネル

福田らは、Colchicineが活動電位を減弱させることから、細胞骨格がカルシウムチャネルの開閉を調節しているという仮説をたてた¹⁰⁾。さらに、細胞骨格に接触するカルシウムチャネルの存在を予想した。

JohnsonとByerly¹¹⁾は、微小管が神経活動電位の不活性化に関与する直接的な作用のあるのを示した。1994年Gallira¹²⁾は、Colchicineを用いて細胞骨格の構造を消失した際に、L型 Ca^{2+} チャネル活性が抑制されるのを心筋細胞を用いて証明した。しかしながら、GalliraはL型 Ca^{2+} チャネル活性の抑制が、細胞骨格のアクチンフィラメントと微小管のいずれの構造消失に基づくものであるかの確認がなされていない。

4) 血管平滑筋細胞のL型 Ca^{2+} チャネルと細胞骨格

L型 Ca^{2+} チャネルの活性に与える細胞骨格の影響は、血管

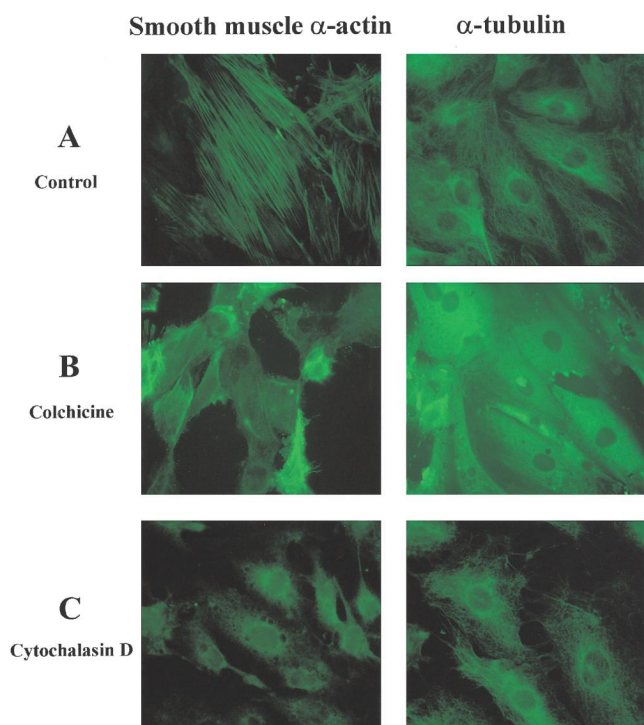


Fig. 2 Immunofluorescence staining for actin and microtubules in A7r5 cells treated with drug-free medium for 1 h (control, A), 100 μ M colchicine for 1 h (B), and 100 μ M cytochalasin D for 1 h (C). Subsequently, the cells were fixed and incubated with smooth muscle anti- α -actin and anti- α -tubulin monoclonal antibody, and then stained with FITC-labeled goat anti-mouse antibody. Total magnification, $\times 600$. [Reproduced with permission from Fig. 1 of Nakamura M. *et al.*, (2000). *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C480-487.]

平滑筋では未だ明らかにされていなかった。血管平滑筋L型 Ca^{2+} チャネルと細胞骨格との関連を追求し、我々が最近明らかにした実験結果を以下に述べる。

ラット大動脈由来の血管平滑筋培養細胞 (A7r5) のL型 Ca^{2+} チャネルの調節に、細胞骨格がいかに作用し、影響を与えるか否かを検討した¹³⁾。すなわち、細胞骨格を構成する成分 (アクチンフィラメント, 微小管) は, Cytochalasin D, Nocodazole, Colchicineを用いて, その構造を消失 (破壊) し, 免疫細胞染色法を用いてその構造消失状態 (破壊状態) を確認したのち, その環境下でL型 Ca^{2+} チャネルの活性を測定した。

細胞骨格を構築している各種フィラメントの構造消失は, 抗 α -actinと抗 α -tubulinの抗体を用いて免疫細胞染色法を行い確認した。対照実験では, α -actinおよび α -tubulinの構造は, アクチンフィラメントおよび放射状にのびた微小管が明らかにみられた (図2)。一方, 100 μ MのColchicineでは, アクチンフィラメントおよび微小管のいずれも構造消失がみられた。100 μ MのCytochalasin-Dは, アクチンフィラメントの構造消失はみられたものの, 微小管の構造は, 対照とほとんどかわらない構造を示していた。電位依存性 Ca^{2+} チャネルの活性測定は, whole cell voltage clamp法により行い¹⁴⁾, ガラスピペットに高濃度の Cs^+ を用い, EGTAを加えて細胞内の Ca^{2+} イオンを中和した。チャンバー内の溶液には, 5 mMの Ba^{2+} を含む溶液を用い, Ba^{2+} を Ca^{2+} チャネルの電荷輸送体

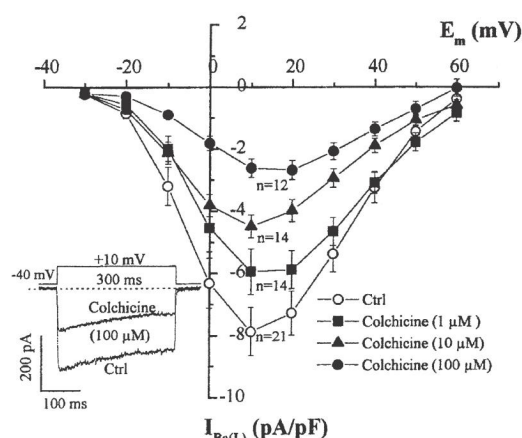


Fig. 3 Effect of colchicine (disrupter of actin and microtubules) on voltage-dependent Ca^{2+} current [$I_{Ba(L)}$]. Current-voltage (I - V) relationships were obtained for control (\circ , $n=21$) and after exposure to colchicine at 1 μ M (\blacksquare , $n=14$), 10 μ M (\blacktriangle , $n=14$), and 100 μ M (\bullet , $n=12$). Data are expressed as mean \pm SE. As can be seen, the voltage for maximum current was +10 mV. Inset: current traces for control and after application of colchicine (100 μ M). Cell capacitances were 59 pA (control cell) and 60 pA (colchicine-treated cell). E_m , membrane potential. [Reproduced with permission from Fig.2 of Nakamura M. *et al.*, (2000). *Am J Physiol Cell Physiol* 279,C480 - 487.]

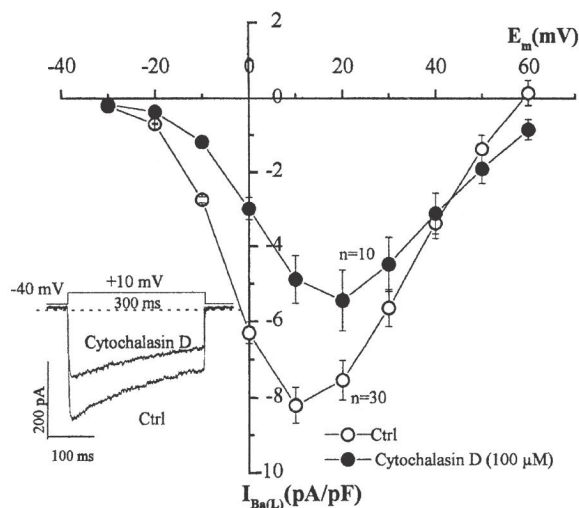


Fig. 4 Effect of cytochalasin D (disrupter of actin) on $I_{Ba(L)}$. I - V relationships are illustrated for control (\circ , $n=30$) and after exposure to 100 μ M cytochalasin D (\bullet , $n=10$). Data are expressed as means \pm SE. Inset: current traces for control and after application of cytochalasin D (100 μ M). Cell capacitances were 34 pA (control cell) and 30 pA (cytochalasin D-treated cell). [Reproduced with permission from Fig.3 of Nakamura M. *et al.*, (2000). *Am J Physiol Cell Physiol* 279,C480 - 487.]

とした。保持電位を -40 mVとし, 刺激電位を -40 から $+60$ mVまで 10 mVずつ上昇させた。その条件下で Ca^{2+} 電流を測定し, L型 Ca^{2+} チャネルの活性の測定を行った。

Colchicineを用いて, アクチンフィラメントと微小管の構造を消失した状態での Ca^{2+} 電流の変化は, Colchicineの濃度

Table 1 Effect on $I_{\text{Ba}}(L)$ produced by stabilization of actin filaments (phalloidin) and microtubules (taxol)

Drug	$I_{\text{Ba}}(L)$, pA/pF
Control	-8.70 ± 1.01 (n = 8)
Phalloidin (10 μM)	-7.18 ± 0.64 (n = 10)
Phalloidin (10 μM) + taxol (50 μM)	-8.52 ± 0.65 (n = 6)
Phalloidin (10 μM) + cytochalasin D (100 μM)	-7.03 ± 0.69 (n = 8)
Phalloidin (10 μM) + colchicines (100 μM)	-4.24 ± 0.64 *† ★ (n = 8)
Phalloidin (10 μM) + taxol (50 μM) + colchicines (100 μM)	-5.43 ± 0.56 *★ (n = 7)

Each value represents the mean \pm SE. * $P < 0.01$ vs. control, † $P < 0.01$ vs. phalloidin, ★ $P < 0.01$ vs. phalloidin + taxol (by one-way ANOVA).

[Reproduced with permission from table 2 of Nakamura M. *et al.*, (2000). Am J Physiol Cell Physiol 279, C480 - 487.]

Table 2 Effect on $I_{\text{Ba}}(L)$ produced by disruption of actin filaments (cytochalasin D) and microtubules (nocodazole)

Drug	$I_{\text{Ba}}(L)$, pA/pF
Control	-9.2 ± 1.02 (n = 12)
Nocodazole (10 μM)	-9.0 ± 1.07 (n = 10)
Cytochalasin D (10 μM)	$-5.1 \pm 0.67^*$ (n = 13)
Nocodazole (10 μM) + Cytochalasin D (10 μM)	$-5.73 \pm 0.65^*$ (n = 10)

Each value represents the mean \pm SE. * $P < 0.01$ vs. control (by one-way ANOVA).

[Reproduced with permission from table 3 of Nakamura M. *et al.*, (2000). Am J Physiol Cell Physiol 279, C480 - 487.]

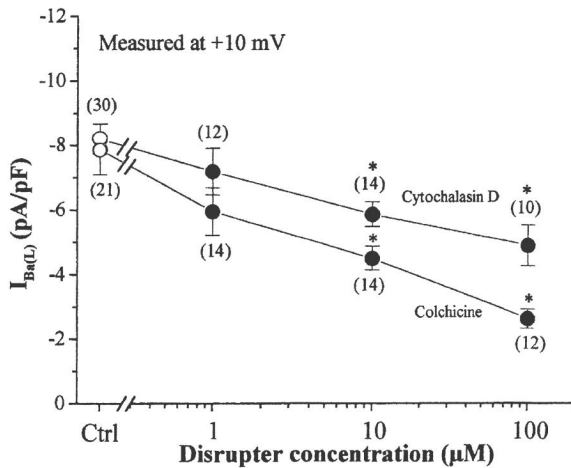


Fig. 5 Dose-response relation for changes in Ca^{2+} current [$I_{\text{Ba}}(L)$] produced by various concentrations of cytochalasin D and colchicine. Number of cells studied are shown in Data are expressed as means \pm SE. * $P < 0.01$ vs. control (by one-way ANOVA). [Reproduced with permission from Fig.4 of Nakamura M. *et al.*, (2000). Am J Physiol Cell Physiol 279, C480 - 487.]

上昇と共に、ピーク電流の減少がみられた (図3)。すなわち、アクチンフィラメント、微小管の両フィラメントの構造破壊により Ca^{2+} 電流の減少が見られた。アクチンフィラメントの構造だけを破壊した条件下での Ca^{2+} 電流の変化を知るために、Cytochalasin-Dを用いてアクチンフィラメントだけを消失し、同様に Ca^{2+} 電流の測定を行った結果を図4に示したが、アクチンフィラメントのみの構造消失は、 Ca^{2+} 電流の減少を示した。アクチンフィラメントと微小管両構造を消失した状態とアクチンフィラメントのみの構造を消失した状態との Ca^{2+} 電流の

違いを比較する目的で、作成した Colchicine と Cytochalasin-D の各種濃度のピーク電流を比較したグラフ (図5) では、両構造を消失した 100 μM の Colchicine の Ca^{2+} 電流は、アクチンフィラメントのみの構造を消失した Cytochalasin-D に比較して、 Ca^{2+} 電流の減少を示した。アクチンフィラメントの安定剤である Phalloidin を添加し、Cytochalasin-D と Colchicine を混合して使用すると、微小管のみの消失が見られ、アクチンフィラメントの構造は安定していた。このような条件下での Ca^{2+} 電流は、Colchicine の添加により、 Ca^{2+} 電流のさらに大きな減少が見られた (Table 1)。Colchicine による Ca^{2+} 電流の大きな減少は、微小管の構造消失に基づくものと推察し、微小管の安定をはかる目的で、微小管の安定剤である Taxol を Phalloidin と共に用いて、細胞骨格を安定させた後、Colchicine を添加し Ca^{2+} 電流への影響を検証した。その結果、 -5.43 ± 0.56 (n = 7) のピーク電流を生じた。これは、アクチンフィラメントや微小管が安定している状態の対照群 (-8.52 ± 0.65 (n = 6) よりも低い値であり、さらにアクチンフィラメントを安定化させて、Cytochalasin-D を添加した群 (-7.03 ± 0.69 (n = 8) よりも低い値を示していた。さらに、Nocodazole で微小管の構造を消失させ、微小管の構造消失の Ca^{2+} 電流へ与える影響を検証したが、その電流の減少は認められなかった (図6)。Cytochalasin-D と Nocodazole でアクチンフィラメントと微小管を消失させた状態 (-5.73 ± 0.65 , n = 10) と Cytochalasin-D のみでアクチンフィラメントを消失した状態 (-5.1 ± 0.67 , n = 13) では、 Ca^{2+} 電流の抑制に差はみられなかった (Table 2)。以上に述べたように、我々の実験結果から、アクチンフィラメントの構造消失だけでも、L 型 Ca^{2+} チャネルの活性に影響を与えるとの結論が得られた。

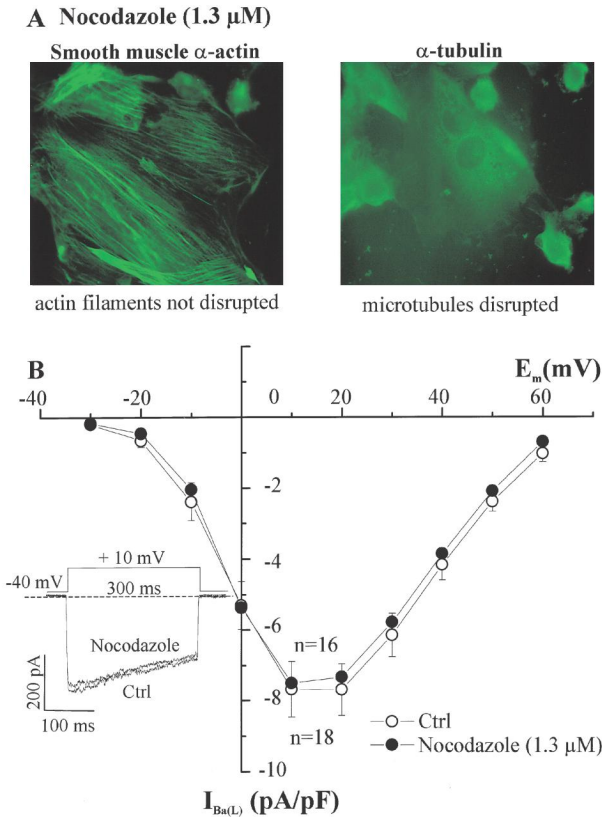


Fig. 6 Effect of nocodazole. A: immunofluorescence staining for smooth muscle anti- α -actin and anti- α -tubulin in A7r5 cells treated with nocodazole ($1.3 \mu\text{M}$ for 1 h). As can be seen, nocodazole disrupted the microtubules, but not the actin filaments. B: effect of nocodazole (disrupter of microtubules) on $I_{\text{Ba(L)}}$. I-V relationships were obtained for control (\circ , $n = 18$) and after exposure to $1.3 \mu\text{M}$ nocodazole (\bullet , $n = 16$). Data are expressed as means \pm SE. As shown, there was no effect of nocodazole on $I_{\text{Ba(L)}}$ [Reproduced with permission from Fig.7 of Nakamura M. *et al.*, (2000). *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C480 - 487.]

5) アクチンフィラメントとL型Ca²⁺チャネル活性の関係性の吟味

各種細胞のイオンチャネルタンパクと細胞骨格との相互関係の解析は、その細胞におけるイオンチャネルの機能-構造関連の生理学的意義に関する情報を我々に提供する。すなわち、イオンチャネル活性の調節とチャネルタンパクの空間的な位置関係をも含めて考察する必要性を我々に提示している。GalliとDeFelice¹⁹⁾は、Colchicineは心筋細胞のL型Ca²⁺チャネルの活性に強く影響を与えると報告している。彼らは、ひな鳥の心筋細胞の単一L型Ca²⁺チャネルは80 μM のColchicineによって、Ca²⁺チャネル活性が抑制されるのを示した。血管平滑筋細胞と心筋細胞の結果とは、現象的には一致するものである。Bonfocora¹⁵⁾は、Colchicineによって高濃度のK⁺が神経細胞内の脱分極を生じ、細胞内のCa²⁺濃度を上昇させ、その上昇はNifedipineによって抑制される点を論じている。彼らは、細胞骨格の消失は、L型Ca²⁺チャネル活性を刺激すると述べている。その結果は、血管平滑筋細胞の実験と比較すると、まったく反対の現象であった。しかしながら、Bonfocora

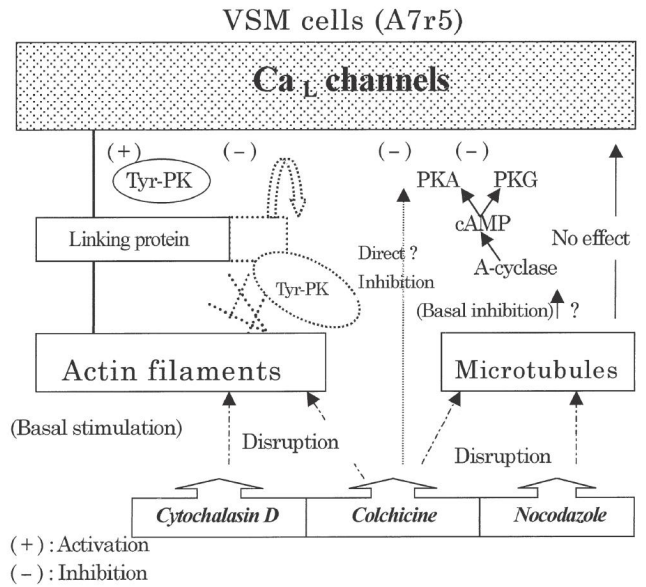


Fig. 7 Diagrammatic representation of the relationship between actin filament and Ca_v1 channel activation on VSM cells

らは、L型Ca²⁺チャネル活性の測定を行っておらず、細胞内のCa²⁺濃度の上昇が、細胞膜表面のL型Ca²⁺チャネルの刺激によって起こっているかどうかは明らかでない。もし、L型Ca²⁺チャネル活性がColchicineによって刺激されるのであれば、cAMP由来のPKAの関連回路を介した刺激から、その結果が導かれているかもしれない。また、Thionらは、ColchicineとOryzalinによる微小管の消失が、carrot細胞のL型Ca²⁺チャネル活性を上昇させる点を報告している¹⁶⁾。しかしながら、細胞内Ca²⁺濃度が上昇すると、Ca²⁺イオン自体によるL型Ca²⁺チャネル活性の抑制が引き起こされる可能性も考慮しなければならない。我々は、5 mMのBa²⁺を含むチャンネル液を使用し、10mMのEGTAをピペット内液に加え、細胞内Ca²⁺の上昇を生じさせない条件下で実験を行っており、我々の実験結果は、Ca²⁺に依存する抑制ではなくアクチンフィラメントの構造消失によって生じたL型Ca²⁺チャネル活性の抑制であると断定できる。

6) アクチンフィラメント構造消失によるCa²⁺チャネル活性抑制の機序

一般にCa²⁺チャネルの活性を引き起こす機序にはチロシンキナーゼ (Tyr-PK), pp60c-srcが関与するといわれている。すなわち、チロシンキナーゼのinhibitor (Genistein) は、ラット血管平滑筋のL型Ca²⁺チャネル活性を抑制し¹⁷⁾、またラット血管平滑筋細胞の単一チャネル活性も著しく抑制する¹⁸⁾。一方、非受容体型のTyr-PK, pp60c-srcは、ウサギの血管平滑筋細胞のCa²⁺チャネルを刺激する¹⁹⁾。これらの結果から、Ca²⁺チャネルはTyr-PKのリン酸化によって刺激され、Ca²⁺チャネル活性を上昇させると考えられる。細胞膜の細胞質表面に結合し、レセプターを介さないTyr-PKは、情報伝達の信号の役割を演じているかもしれない²⁰⁾。pp60c-srcは、細胞が活性化された後、細胞骨格を構成する線維を介して移動する点が見いだされたタンパクである。アクチンフィラメントがこの

転移に関与しているといわれている²¹⁾. 細胞が、細菌などによって刺激を受けると細胞質側から細胞骨格を介して、細胞膜の近くへc-srcは移動する. そしてアクチン結合タンパク Vinculin がそれに関与するという Ballmerらの報告もある²²⁾. トロンビンによる血小板の活性化は、c-srcのアクチン細胞骨格への移動が見られる²³⁾. Fibroblastsでは、細胞膜近くへのc-srcの移動はCytochalasin-Dによって抑制されるが、Nocodazoleではそれが見られない点もあわせて報告されている²¹⁾.

これらの報告から、アクチンフィラメントの構造消失が、非受容体型Tyr-PKの細胞骨格からの遊離と細胞膜から細胞質側への移動を引き起こし、非受容体型Tyr-PKのリン酸化によるL型 Ca^{2+} チャネル活性の発現を抑制すると推察される.

一方、Colchicineの Ca^{2+} チャネルに与える影響も考慮されなければならない. $1 \mu\text{M}$ のColchicineはアクチンフィラメントの構造を消失しない. この低濃度のColchicineはL型 Ca^{2+} チャネル活性を抑制した. さらに、アクチンフィラメントをPhalloidinで安定させた際、Colchicineは40%のL型 Ca^{2+} チャネル活性の抑制を示した. さらにPhalloidin, Taxolの両方で細胞骨格の構造を安定させたとき、ColchicineによりL型 Ca^{2+} チャネル活性の抑制は36%であった. これらの結果は、Colchicineが未解明の機序により、L型 Ca^{2+} チャネル活性を抑制していると予想される. このことは、Cytochalasin Dに比較してColchicineによるL型 Ca^{2+} チャネルの活性抑制が強いことから強く示唆される. すなわち、ColchicineがL型 Ca^{2+} チャネルに直接的にその抑制を引き起こしている可能性も予想される.

図7にまとめると、アクチンフィラメントの構造消失は、血管平滑筋のL型 Ca^{2+} チャネル活性を抑制したが、微小管の構造消失にはその傾向は見られなかった. イオンチャネルは、アクチン結合タンパクを介して結合し、そのアクチン結合タンパク上に非受容体型Tyr-PKが存在し、細胞質の表面に近い部分に存在しているTyr-PKが、細胞骨格の構造消失により細胞質側へと移動する. その結果、Tyr-PKがL型 Ca^{2+} チャネルのリン酸化を行うのが損なわれ、アクチンフィラメントの構造消失は、L型 Ca^{2+} チャネル活性の抑制へとつながる. その機序として、アクチンフィラメントとイオンチャネルの連結(結合)をしているアクチンフィラメント結合タンパクの重要な関与が示唆される. アクチンフィラメントに連結しているタンパク、すなわちビンキュリンやティリン(タイニン)などの裏打ちタンパクの存在が、 Ca^{2+} チャネルをリン酸化するTyr-PKの活性を高めるとする報告²⁴⁾から、アクチンフィラメントの構造消失は、結合タンパクの不安定性を生じ、 Ca^{2+} チャネルのリン酸化を起こしにくくするものであり、それによって Ca^{2+} チャネルの活性抑制を生じると推察される.

おわりに

これまでに多くの研究者が Ca^{2+} チャネルと細胞骨格について検討を行ってきたが、アクチンフィラメントの構造消失と Ca^{2+} チャネル活性の変化を同時に直接的に解析した研究はみられなかった.

アクチンフィラメントの構造消失は、 Ca^{2+} チャネルの活性を抑制するという現象を我々は見いだしたが、細胞生理学的観点からこの現象を解釈すると、細胞がアクチンフィラメントの構造の消失するときは、同時に細胞接着性を失うときであると考えられる. その不安定な時期に Ca^{2+} チャネル活性が

抑制されるということは、接着性を失っている細胞が生き残るために細胞の活動をなるべく静止状態へ維持させるという生理的機能と考えられる. 血管平滑筋の形質変換と Ca^{2+} チャネル活性、細胞骨格との関連性の追求は、血管平滑筋細胞の異常な増殖、遊走が主体となる. 血管狭窄、あるいは再狭窄の病態解明およびその治療法の開発に新たな局面を与えるものであろう.

文 献

- 1) Fishkind D. J. and Wang Y. L.: New horizons for cytokinesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7:23-31, 1995.
- 2) Mogilner A. and Oster G.: The physics of lamellipodial protrusion. *Eur. Biophys. J.* 25:47-53, 1996.
- 3) Sperelakis N.: Regulation of ion channels by phosphorylation: *Cell Physiology Source Book 2nd ed.*, (Sperelakis N. ed), p499-509, Academic Press, San Diego, : 1998.
- 4) Heinrich Horber J. K., Mosbacher J, Haberle W., Ruppertsberg J.P. and Sakmann B.: A look at membrane patches with a scanning force microscope. *Biophys. J.* 68: 1687-1693,1995.
- 5) Ruknudin A., Song M.J. and Sachs F.: The ultrastructure of patch-clamped membranes: a study using high voltage electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 112:125-134, 1991.
- 6) Cantiello H.F.: Role of the action cytoskeleton on epithelial Na^+ channel regulation. *Kidney. Int.* 48: 970-984, 1995.
- 7) Glogauer M. Arora P. Yao G. Sokholov I. Ferrier J. and McCulloch C.A.G. : Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective responses to stretching. *J. Cell. Sci.* 110:11-21, 1997.
- 8) Pollard T.D. and Cooper J.A.: Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 987-1035, 1986.
- 9) Weeds A. : Actin-binding proteins-regulators of cell architecture and motility. *Nature.* 296: 811-816, 1982.
- 10) Fukuda J. Kameyama M. and Yamaguchi K. : Breakdown of cytoskeletal filaments selectively reduces Na and Ca spikes in cultured mammal neurones. *Nature.* 294:82-85, 1981.
- 11) Johnson B.D. and Byerly L. : A cytoskeletal mechanism for Ca^{2+} channel metabolic dependence and inactivation by intracellular Ca^{2+} . *Neuron.* 10:797-804, 1993.
- 12) Galli A. and DeFelice L.J.: Inactivation of L-type Ca channels in embryonic chick ventricle cells: dependence on the cytoskeletal agents colchicine and taxol. *Biophys. J.* 67:2296-2304, 1994.
- 13) Nakamura M., Sunagawa M., Kosugi T. and Sperelakis N.: Actin filament disruption inhibits L-type Ca^{2+} channel current in cultured vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279: C480-C487, 2000.
- 14) Sunagawa M., Yokoshiki H., Seki T., Nakamura M.,

- Laber P. and Sperelakis N. Direct block of Ca^{2+} channels by calmidazolium in cultured vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 34: 488-496, 1999.
- 15) Bonfoco E., Ceccatelli S., Manzo L. and Nicotera P.: Colchicine induces apoptosis in cerebellar granule cells. *Exp. Cell. Res.* 218: 189-200, 1995.
- 16) Thion L., Mazars C., Thuleau P., Graziana A., Rossignol M., Moreau M. and Ranjeva R.: Activation of plasma membrane voltage-dependent calcium-permeable channels by disruption of microtubules in carrot cells. *FEBS. Lett.* 393: 13-18, 1996.
- 17) Yokoshiki H. Sumii K. and Sperelakis N.: Inhibition of L-type calcium current in rat ventricular cells by the tyrosine kinase inhibitor, genistein and its inactive analog, daidzein. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 28:807-814, 1996.
- 18) Liu H. and Sperelakis N.: Tyrosine kinases modulate the activity of single L-type calcium channels in vascular smooth muscle cells from rat portal vein. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75:1063-1068, 1997.
- 19) Wijetunge S. and Hughes A.D.: pp60c-src increases voltage-operated calcium channel currents in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217:1039-1044, 1995.
- 20) Resh M.D. and Ling H.P.: Identification of a 32K plasma membrane protein that binds to the myristylated amino-terminal sequence of p60v-src. *Nature.* 346:84-86, 1990.
- 21) Fincham V.J., Unlu M., Brunton V.G., Pitts J.D., Wyke J.A. and Frame M.C. Translocation of Src kinase to the cell periphery is mediated by the actin cytoskeleton under the control of the Rho family of small G proteins. *J. Cell. Biol.* 135: 1551-1564, 1996.
- 22) Ballmer-Hofer K., Ziegler A. and Burger M.M.: Association of polyoma virus middle T antigen and pp60src with cytoskeletal elements. *Oncogene* 3: 365-371, 1988.
- 23) Grondin P., Plantavid M., Sultan C., Breton M., Mauco G. and Chap H. Interaction of pp60c-src, phospholipase C, inositol-lipid, and diacylglycerol kinases with the cytoskeletons of thrombin-stimulated platelets, *J. Biol. Chem.* 266:15705-15709, 1991.
- 24) Terzic A. and Kurachi Y.: Cytoskeleton effects on ion channels.: *Cell Physiology Source Book* 2nd ed., (Sperelakis N. ed), p499-509, Academic Press, San Diego, 1998.