

グリア P2Y₆ 受容体がそのセンサーであることを明らかにした。ATP も UDP も神経細胞の傷害を周辺細胞に知らせる重要な分子として働き、共にミクログリアのダイナミックな動きを制御している。しかし ATP は P2Y₁₂ 受容体を介して化学走性を制御するが食食能には全く影響せず、逆に UDP は P2Y₆ 受容体を介して食食能を亢進させるが化学走性には関与していなかった。このように、ミクログリアは、細胞外ヌクレオチド ATP 及び UDP をそれぞれ厳密に見分け、それぞれの分子に応じた独立した応答を行うことにより、病態時の脳機能を極めて巧妙に制御しているのである。

本研究は、他に高坂新一所長（国立精神神経センター神経研究所）、最上由香里博士（国立医薬品食品衛生研究所）ら、計 10 名による共同研究による結果である。

- 1) Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., & Inoue, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11023–11028.
- 2) Honda, S., Sasaki, Y., Ohsawa, K., Imai, Y., Nakamura, Y., Inoue, K., & Kohsaka, S. (2001) *J. Neurosci.*, **21**, 1975–1982.
- 3) Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., & Inoue, K. (2003) *Nature*, **424**, 778–783.
- 4) Tozaki-Saitoh, H., Tsuda, M., Miyata, H., Ueda, K., Kohsaka, S., & Inoue, K. (2008) *J. Neurosci.*, **28**, 4949–4956.
- 5) Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., & Gan, W.B. (2005) *Nat. Neurosci.*, **8**, 752–758.
- 6) Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.B., & Julius, D. (2006) *Nat. Neurosci.*, **9**, 1512–1519.
- 7) Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S., & Inoue, K. (2007) *Nature*, **446**, 1091–1095.

小泉 修一¹, 井上 和秀²

¹山梨大学医学部薬理学,

²九州大学大学院薬学研究院薬理学)

Regulation of brain function mediated by glial ATP sensors
Schuichi Koizumi¹ and Kazuhide Inoue² (¹Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, 1110 Shimokato, Chuo, Yamanashi 409–3898, Japan; ²Department of Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University)

弾性線維形成におけるファイブリン (fibulin) ファミリータンパク質の役割

1. はじめに

我々の体は、細胞できているというよりも、細胞と細胞が住んでいる建物＝細胞外マトリックスできていると表現するほうが適切である。もともと引っ張りや圧迫に弱い細胞は、自らの回りに細胞外マトリックスを形成して、組織の形を保っている。組織の強度を担う細胞外マトリックスはコラーゲン線維やグリコサミノグリカンであるが、これらは強度は大きいものの伸び縮みができない。一方、肺や動脈や皮膚のように、伸び縮みはその機能に必須である組織もある。引き伸ばしても元に戻る特性を弾性というが、組織の弾性を担っているのが弾性線維という細胞外マトリックスである。

弾性線維のターンオーバーは非常に遅いため、加齢によって劣化が蓄積し、体の組織の弾性の低下をもたらす。弾性が低下する結果、皮膚はたるみ、動脈は硬化し、肺は無理に引き伸ばされて肺気腫となる。加齢だけでなく、弾性線維の分解につながる刺激はいくつもある。たとえば、紫外線は真皮における弾性線維分解酵素（エラスターゼ）の発現を誘導し、喫煙は肺にマクロファージを誘導してエラスターゼの分泌を促進する。エラスターゼのノックアウトマウスでは喫煙による肺気腫がおこらないことが報告されており、この疾患の発症において弾性線維分解が鍵となるステップであることがわかる。動脈においては、弾性線維は太い動脈の質量の実に半分を占めており、脈圧（収縮期圧－拡張期圧）を吸収している。加齢または何らかの理由によって弾性線維の機能が低下すると、動脈は硬い管となって脈圧が上昇する。脈圧の上昇は心疾患の予後を悪化させることがわかっている。これらの例でわかるように、弾性線維の劣化・分解によって組織が伸び縮みできなくなることは、高齢化社会における大きな問題となる疾患の直接原因となっている。

これらの問題に対する根本的な解決は、弾性線維の再生であろう。弾性線維の再生をめざすなら、弾性線維の成り方を知らねばならない。弾性線維の本体は、線維状にならないで多数の箇所を架橋されたエラスチンタンパク質である。架橋されて不溶化したエラスチンは、ゴムのように伸び縮みできる特殊な性質を帯びる。弾性線維形成の本質的

な問題は、どのようにしてエラスチンを線維状に並べて架橋するか、というところにある。これが思いのほか多くの因子が関わる複雑な過程であることが最近わかりつつある。本稿では、弾性線維形成に関わる因子について概説する。

2. エラスチン, リシルオキシダーゼ, fibrillin

エラスチンの単量体はトロポエラスチンといい、繰り返り配列の多い分子量 72 kDa の分泌タンパク質である¹⁾。生理的体温付近で自己凝集 (= コアセルベーション) をおこし、冷やすとまた可溶化するという性質をもっている。自己凝集により互いに近接したトロポエラスチンのリジン残基どうしがリシルオキシダーゼという酵素によって架橋され、伸縮性のある弾性線維となる。トロポエラスチンを構成するアミノ酸の 4% はリジンであるが、成熟した弾性線維ではそのほほすべてが架橋されている。架橋ははじめ二つのリジンの側鎖どうしでおこるが、反応が進むと四つのリジンの側鎖がつながったもの (デスモシン) が形成される。

トロポエラスチンを架橋するリシルオキシダーゼは、50 kDa のプロペプチド (proLOX) から BMP1 (bone morphogenetic protein 1) というメタロプロテアーゼによって切り出された 32 kDa の酵素である²⁾。その活性には銅イオンが必要とされる。リシルオキシダーゼはコラーゲン分子どうしの架橋も行っており、その基質特異性がどのようにして決まっているのかはよくわかっていない。リシルオキシダーゼ遺伝子欠損マウスは、動脈が破裂して生後すぐに死亡する^{3,4)}が、これがエラスチンどうしの架橋不足によるものなのかコラーゲンどうしの架橋不足によるものなのかははっきりしない (電子顕微鏡では弾性線維の形成不全は明らかであるが、コラーゲン線維の異常はよく見えない)。

さてエラスチンの凝集と架橋はどこでおこってもよいというわけではない。しかるべき場所で線維状にならなドトロポエラスチンが架橋される必要がある。その足場となるのがマイクロフィブリルという線維である¹⁾。マイクロフィブリルは直径 10~12 nm の線維で、fibrillin-1, 2 という 350 kDa の細長いタンパク質が重合してできている。fibrillin-1 遺伝子変異で Marfan 症候群 (解離性大動脈瘤, 水晶体亜脱臼, 高身長), fibrillin-2 遺伝子変異で先天性拘縮性クモ指症といういずれも常染色体優性遺伝の遺伝性疾患がおこることが知られている。しかしこれらの患者に弾性線維形成異常はなく、fibrillin-1 遺伝子欠損マウスや fibrillin-2 遺伝子欠損マウスにも弾性線維形成に異常がなかったの

で⁵⁾、弾性線維形成におけるマイクロフィブリルの役割に疑問がもたれたことがあった。この問題は、最近 fibrillin-1, 2 のダブルノックアウトマウスで弾性線維形成不全になることが報告されたので、現在は fibrillin-1 と 2 は弾性線維形成において同じようにはたらいて互いを補償できると理解されている⁶⁾。

3. ファイブリン (fibulin) ファミリー分子

エラスチンがマイクロフィブリルに沿って沈着しリシルオキシダーゼによって架橋される。これが弾性線維形成のメインストーリーのように見える。しかしこれらの分子だけでは弾性線維が形成されることはないことが筆者らの研究によって明らかとなった。

筆者らは発生期の心血管に発現する新たな分泌タンパク質をクローニングするプロジェクトの中で、発生期動脈に強く発現するインテグリンリガンドを見つけ、DANCE (developmental arteries and neural crest EGF-like) と名付けた⁷⁾。DANCE は別名 fibulin-5 ともよばれるが、fibulin は前述の fibrillin とは全く別の遺伝子ファミリーであり、また血液凝固タンパク質の fibrin とも無関係なので注意が必要である。DANCE 遺伝子欠損マウスを作成してみると、皮膚のたるみ、肺気腫、動脈の硬化といった、あたかもヒトの老化でみられるような表現型を示した。このマウスでは全身の弾性線維の形成不全がみられ、これが上記の表現型の原因であると考えられた^{8,9)}。すなわち、DANCE は弾性線維形成に必須の分泌タンパク質であるといえる。

なぜ DANCE が弾性線維形成に必要なのだろうか。皮膚線維芽細胞の無血清培養では弾性線維ができないが、リコンビナント DANCE タンパク質を培地中に加えておくと弾性線維が形成された (図 1)。DANCE タンパク質によってエラスチン、リシルオキシダーゼ、fibrillin などの発現は変わらなかったため、これらの弾性線維構成分子は無血清培養でも発現しているものの DANCE の助けなしには弾性線維としてオーガナイズされないのではと理解された⁹⁾。言いかえると、DANCE はシグナル分子としてではなくオーガナイザー分子として弾性線維形成に寄与していると言える。

DANCE はトロポエラスチンと結合してそのコアセルベーションを促進すること、マイクロフィブリルに結合すること、五つのリシルオキシダーゼファミリーのうち三つと結合することがこれまでにわかった。DANCE はこれら弾性線維構成分子を引き合わせて弾性線維構築を促進しているのではないかと考えている¹⁰⁾。

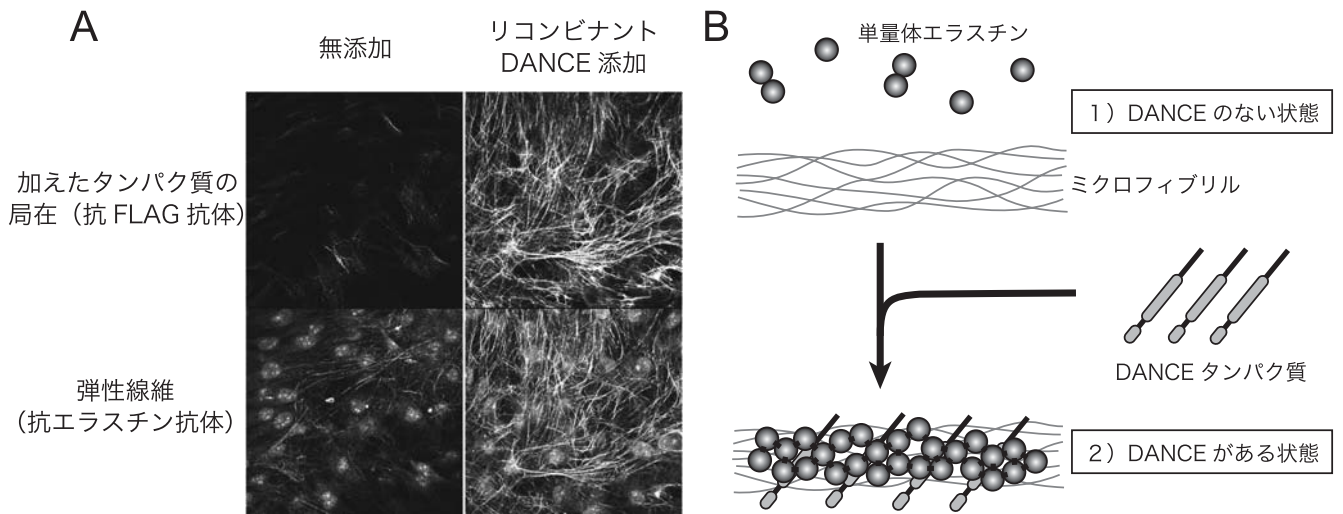


図1 リコンビナント DANCE による弾性線維形成誘導

A. ヒト線維芽細胞の無血清培養にリコンビナント DANCE タンパク質を添加すると、抗エラスチン抗体で染まる弾性線維が形成される。このとき加えた DANCE タンパク質は弾性線維に局在する。B. DANCE はシグナル分子としてではなく、弾性線維構成分子をオーガナイズする分子としてはたらく。

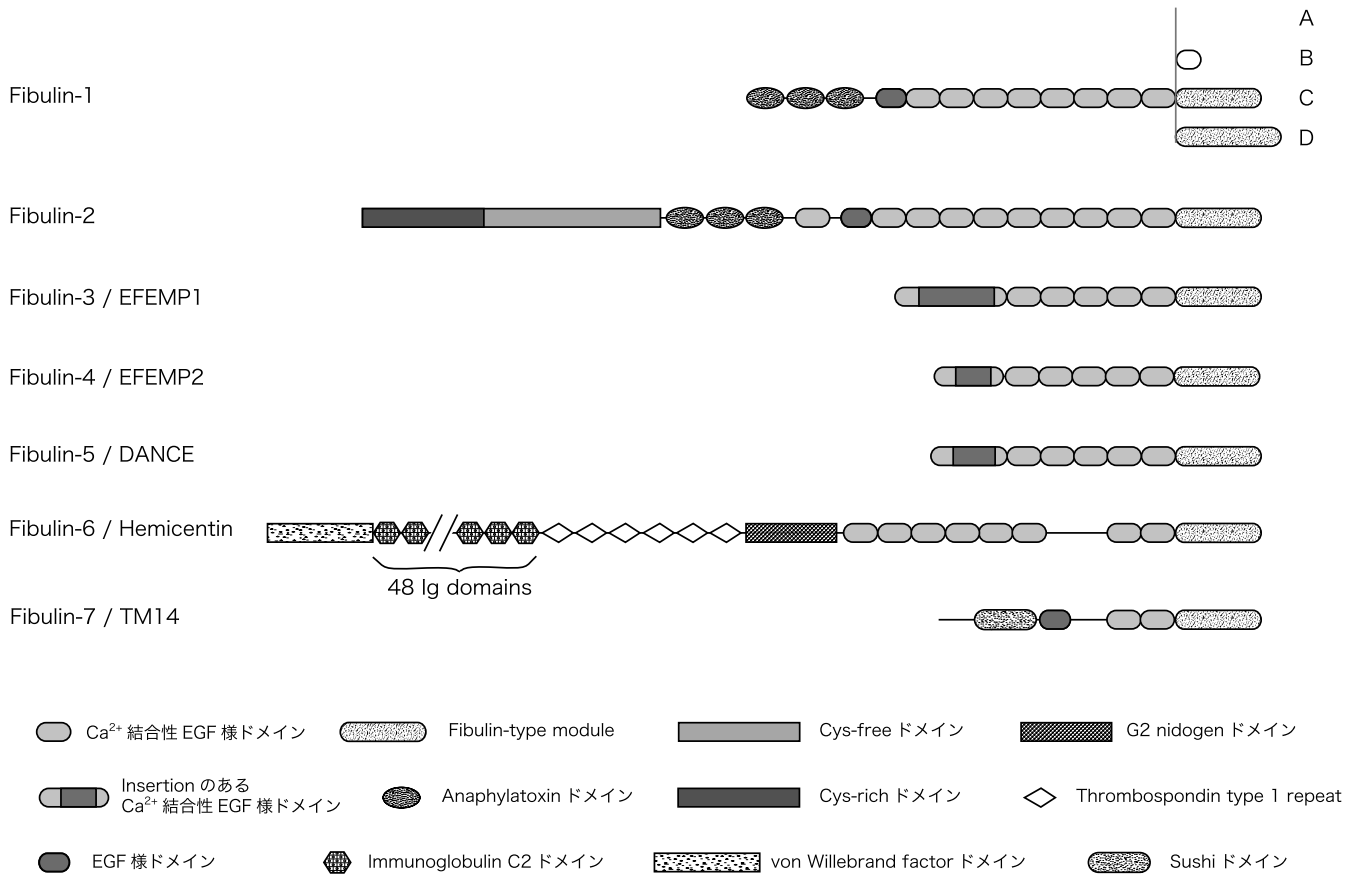


図2 fibulin ファミリー分子のドメイン構造 fibulin-3, 4, 5 が特に似通っている。

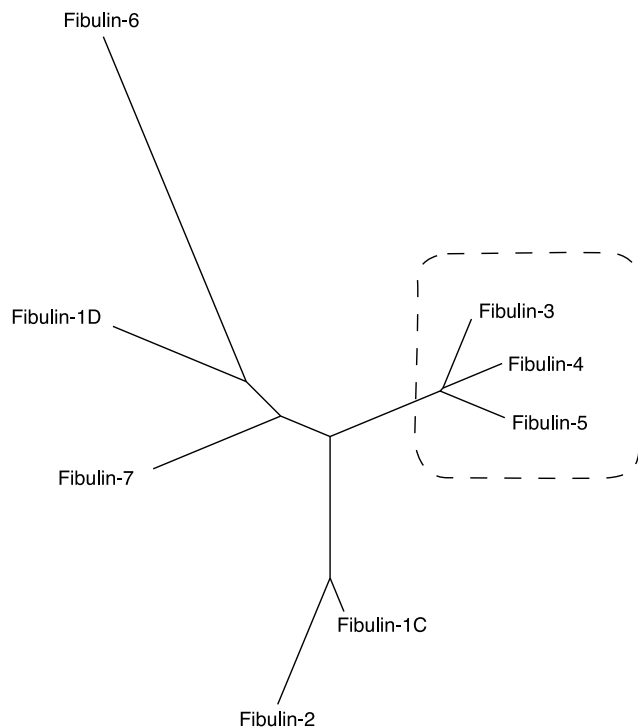


図3 ヒト fibulin1-7のカルボキシ末端ドメイン配列 (fibulin-like module) の類似性

fibulin ファミリーはカルボキシ末端 120 アミノ酸の配列 (fibulin-type module) に類似性があることが特徴である (逆にこのドメインをもてば fibulin とよばれているようである)。ヒト fibulin1-7 のカルボキシ末端 120 アミノ酸の配列の類似性を CLUSTALW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) で解析し、その結果を Genetyx-Tree ソフトウェアを用いて系統樹であらわした。特に配列の近い fibulin-3, 4, 5 を点線で囲んだ。

fibulin と名のつく分子は DANCE (fibulin-5) を含めて七つある (図 2)。これらはカルボキシ末端に似た配列をもっており、カルシウム結合性 EGF 様ドメインを複数もっているという特徴がある。この中でも fibulin-3, 4, 5 は大きさが似通っており、カルシウム結合性 EGF 様ドメインの数も同じであり、カルボキシ末端ドメインの配列も特に相同性が高い (図 3) など、他の fibulin とは異なったサブファミリーを形成しているように見える。fibulin-4 遺伝子欠損マウスはほとんど弾性線維を作れず、また生後 1 日で動脈破裂により死んでしまうことが報告された¹¹⁾。fibulin-4 が弾性線維だけでなく他の線維の形成にも影響しているのかどうかはまだ明らかではないが、少なくとも弾性線維形成に関しては DANCE と異なる必須の役割を果たしているといえる。

fibulin-3 遺伝子欠損マウスは、DANCE や fibulin-4 遺伝

子欠損マウスほどではないが、やはり弾性線維の異常をきたすことが報告されている¹²⁾。したがって、fibulin-3, 4, 5 は互いに似通ってはいるが、それぞれが弾性線維形成に別々の役割をもっており、互いに代償できないわけである。これら fibulin サブファミリーそれぞれのはたらきを知ることは、弾性線維の組み立て方を理解する鍵であると考えられる。

ちなみに、fibulin-1 遺伝子欠損マウスは小血管・毛細血管が脆弱となって胎生致死となるが、弾性線維の異常はない¹³⁾。また、fibulin-2 遺伝子欠損マウスには弾性線維をはじめとして特に異常が見つかっていない¹⁴⁾。

4. その他の因子

弾性線維やマイクロフィブリルと共局在するといわれる分子は他にも数多くあるが、そのなかでも LTBP (latent TGFβ-binding protein) ファミリーは興味深い。LTBP は fibrillin と同じスーパーファミリーに属する大きなタンパク質で、不活性な latent TGFβ を結合することにより TGFβ をマトリックス内に不活性なまま貯蔵し、必要ときにそこから TGFβ を動員できるようにする、という役割がある。LTBP-1, 2, 3, 4 のうち、LTBP-2 は弾性線維と共局在していることが以前から指摘されている。LTBP-2 はその名に反して latent TGFβ を結合することができず、遺伝子欠損マウスが胎生早期致死であるため、弾性線維形成における役割は不明であった。筆者らは最近、細胞培養での弾性線維形成アッセイ系を用いて、LTBP-2 が DANCE のマイクロフィブリル上への沈着をコントロールしているらしい、というデータを得た¹⁵⁾。

また、LTBP-4 遺伝子欠損マウスは肺と腸の弾性線維がばらばらになっており、肺気腫になることが報告された¹⁶⁾。これが TGFβ と関係あるのか、LTBP-4 の未知の機能によるものなのかはまだわかっていない。

5. おわりに

弾性線維は架橋されて不溶化しているため、生化学的研究の材料として扱いにくく、その形成の分子機構の理解が遅れてきた面がある。しかし遺伝子改変マウスや遺伝子ノックダウンによって、ようやく何の分子が必要なのか、というところまではきた。今後は、これらがどのようにしてはたらくのか、もう一度生化学的な手法に立ち返ってその分子機構を明らかにする必要があるであろう。

1) Rosenbloom, J., Abrams, W.R., & Mecham, R. (1993) FASEB

- J.*, 7, 1208–1218.
- 2) Kagan, H.M. & Li, W. (2003) *J. Cell. Biochem.*, 88, 660–672.
 - 3) Hornstra, I.K., Birge, S., Starcher, B., Bailey, A.J., Mecham, R.P., & Shapiro, S.D. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 14387–14393.
 - 4) Maki, J.M., Rasanen, J., Tikkanen, H., Sormunen, R., Makikallio, K., Kivirikko, K.I., & Soininen, R. (2002) *Circulation*, 106, 2503–2509.
 - 5) Ramirez, F., Sakai, L.Y., Dietz, H.C., & Rifkin, D.B. (2004) *Physiol. Genomics*, 19, 151–154.
 - 6) Carta, L., Pereira, L., Arteaga-Solis, E., Lee-Arteaga, S.Y., Lenart, B., Starcher, B., Merkel, C.A., Sukoyan, M., Kerkis, A., Hazeki, N., Keene, D.R., Sakai, L.Y., & Ramirez, F. (2006) *J. Biol. Chem.*, 281, 8016–8023.
 - 7) Nakamura, T., Ruiz-Lozano, P., Lindner, V., Yabe, D., Taniguchi, M., Furukawa, Y., Kobuke, K., Tashiro, K., Lu, Z., Andon, N.L., Schaub, R., Matsumori, A., Sasayama, S., Chien, K.R., & Honjo, T. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 22476–22483.
 - 8) Nakamura, T., Lozano, P.R., Ikeda, Y., Iwanaga, Y., Hinek, A., Minamisawa, S., Cheng, C.F., Kobuke, K., Dalton, N., Takeda, Y., Tashiro, K., Ross Jr., J., Honjo, T., & Chien, K.R. (2002) *Nature*, 415, 171–175.
 - 9) Yanagisawa, H., Davis, E.C., Starcher, B.C., Ouchi, T., Yanagisawa, M., Richardson, J.A., & Olson, E.N. (2002) *Nature*, 415, 168–171.
 - 10) Hirai, M., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Okawa, K., Hagiwara, A., Chien, K.R., Kita, T., & Nakamura, T. (2007) *J. Cell Biol.*, 176, 1061–1071.
 - 11) McLaughlin, P.J., Chen, Q., Horiguchi, M., Starcher, B.C., Stanton, J.B., Broekelmann, T.J., Marmorstein, A.D., McKay, B., Mecham, R., Nakamura, T., & Marmorstein, L.Y. (2006) *Mol. Cell Biol.*, 26, 1700–1709.
 - 12) McLaughlin, P.J., Bakall, B., Choi, J., Liu, Z., Sasaki, T., Davis, E.C., Marmorstein, A.D., & Marmorstein, L.Y. (2007) *Hum. Mol. Genet.*, 16, 3059–3070.
 - 13) Kostka, G., Giltay, R., Bloch, W., Addicks, K., Timpl, R., Fassler, R., & Chu, M.L. (2001) *Mol. Cell Biol.*, 21, 7025–7034.
 - 14) Sicot, F.X., Tsuda, T., Markova, D., Klement, J.F., Arita, M., Zhang, R.Z., Pan, T.C., Mecham, R.P., Birk, D.E., & Chu, M.L. (2008) *Mol. Cell Biol.*, 28, 1061–1067.
 - 15) Hirai, M., Horiguchi, M., Ohbayashi, T., Kita, T., Chien, K.R., & Nakamura, T. (2007) *EMBO J.*, 26, 3283–3295.
 - 16) Sterner-Kock, A., Thorey, I.S., Koli, K., Wempe, F., Otte, J., Bangsow, T., Kuhlmeier, K., Kirchner, T., Jin, S., Keski-Oja, J., & Melchner, H. (2002) *Genes Dev.*, 16, 2264–2273.

中邨 智之
(関西医科大学薬理学講座)

The roles of fibulin family proteins in elastic fiber assembly
Tomoyuki Nakamura (Department of Pharmacology, Kansai
Medical University, 10–15 Fumizonochō, Moriguchi, Osaka
570–8506, Japan)

NOによるタンパク質修飾を介した受容体の制御

1. はじめに (NOの歴史とS-ニトロソ化)

血管内皮細胞より血管平滑筋を弛緩させる内皮細胞由来平滑筋弛緩因子 (EDRF) が分泌されていることが見いだされ、その正体が一酸化窒素 (NO) であることが証明され、NOが生体内の情報伝達に関わっていることが明らかとなった。その後、L-アルギニンをNOに変換する酵素であるNO合成酵素 (NOS) の発見により、生体内における情報伝達物質としてのNOの地位が確立された。ノーベル財団は1998年、NOの機能解明の業績をたたえてファーチゴット、イグナロとムラドの3人にノーベル生理学・医学賞を授与した。

このEDRFとしてのNOの機能は、主にグアニル酸シクラーゼ (GC) のヘム鉄にNOが結合することによりGCを活性化することであるというのが定説である。しかし、その後の研究でNOは非常に多くの生理的、病理的作用があることが示され、GCの阻害剤を使った研究などによりGCを介する経路以外にもNOの作用メカニズムがあることが示された。その後、NOによるタンパク質のシステインチオール基の修飾 (S-ニトロソ化) がNOの生理的活性のメカニズムであることが提唱され、現在ではこのS-ニトロソ化は実際に、様々なタンパク質でそのタンパク質の機能を制御していると考えられている^{1,2)}。

2. GPCRの制御

7回膜貫通型受容体 (GPCR) は、その名の通り7回細胞膜を貫通する構造を持った受容体のグループであり、受容体はGタンパク質と呼ばれるタンパク質と結合して、このGタンパク質を通して細胞内に情報を伝達する。ただ、GPCRの機能はGタンパク質以外にも多くのタンパク質が関与する非常に複雑な機構により制御されている。その代表的な機構が、アゴニストが受容体に結合して受容体が活性化し、Gタンパク質が受容体から解離した後、Gタンパク質による情報伝達が脱感作され、また受容体が細胞膜上から細胞内に移行する現象である。この現象は非常に複雑に制御されているが、今回は簡単な説明にとどめるので、興味があれば文献を参照していただきたい^{3,4)}。Gタンパク質が解離した受容体は、G protein-coupled receptor