

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08500

研究課題名(和文) プロテインホスファターゼ2Aによる平滑筋化学 力学変換調節のメカニズム

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of protein phosphatase 2A on smooth muscle mechano-chemical coupling

研究代表者

渡辺 賢 (WATANABE, MASARU)

首都大学東京・人間健康科学研究科・教授

研究者番号：60191798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：プロテインホスファターゼ2Aによる平滑筋収縮調節のメカニズムを解明するため、細胞膜を破壊した平滑筋標本を用いて、力学測定・微量タンパク質リン酸化測定を実施した。選択的PP2A阻害薬 rubratoxin Aは標本Caイオン活性化張力及びミオシン軽鎖リン酸化を非可逆的に抑制した。ミオシン軽鎖キナーゼ活性見積もりから、ミオシン軽鎖リン酸化抑制にはミオシン軽鎖キナーゼ活性抑制が関与する可能性が示唆された。一方で、ミオシン軽鎖リン酸化に依存しないラッチ収縮モデルであるMgイオン活性化収縮張力も rubratoxin Aは一定程度抑制した。従ってPP2Aは平滑筋収縮系を複数過程で制御する事が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、従来、平滑筋研究において専ら焦点があてられてきたrP(プロテインホスファターゼ)1に比べて情報量が圧倒的に少なかったPP2Aが、平滑筋収縮機構を活性化させることを世界に先駆けて解明した。特に、平滑筋収縮の主調整機構であるミオシン軽鎖リン酸化機構と、収縮反応の最下流であるミオシン-アクチン結合機構の双方を調節することから、PP2Aが平滑筋収縮のアクチベーターとして機能すると結論される。従って、PP2A活性の人為的調節より血管攣縮等の平滑筋異常収縮を効果的に阻害できる可能性が示唆される。本研究の発展により新たな平滑筋異常収縮への治療戦略を構築したい。

研究成果の概要(英文)：To clarify the mechanisms of the PP2A effects on the smooth muscle contractile proteins in vivo, we studied the effects of rubratoxin A, a specific PP2A inhibitor, on contraction of beta eschin skinned (cell membrane permeabilized) taenia cecum from guinea pig. Rubratoxin A, irreversibly inhibited Ca ion induced contraction of skinned preparations with suppression of myosin light chain (MLC) phosphorylation at 100 - 1000 nM. Also, the agent seems to inhibit MLC kinase activity. Similar concentrations of the agent also seemed to slightly inhibit pharmacological concentrations Mg ion induced, MLC-phosphorylation independent, contraction, an experimental model of "Latch" formation. These results suggest that PP2A causes up-regulation of the MLC and direct interference with myosin-actin interaction.

研究分野：生理学

キーワード：平滑筋 プロテインホスファターゼ ミオシン軽鎖リン酸化 アクチン ミオシン相互作用

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

平滑筋における科学・力学返還過程変調は、持続的に収縮を行う平滑筋においては重要な生理的機構であるにもかかわらず、その実態はいまだ不明であった。

一方、プロテインホスファターゼ 2A(PP2A)の平滑筋細胞内機構、特に平滑筋収縮とのかかわりも不明であったが、本研究者らは PP2A が化学・力学返還過程に影響を与える間接的なエビデンスを実験から得た。

2. 研究の目的

細胞内環境を自在に変換・固定できるスキンド平滑筋標本を用いて、生理・生化学・構造生物学的実験を行い、通常収縮(クロスブリッジ回転)及び通常収縮から低エネルギーコストでの収縮応答(ラッチ)への移行機構(化学・力学変換過程の変調)に対する PP2A 機能に焦点を絞り、力学応答・細胞内収縮フィラメント動態・タンパク質リン酸化動態と PP2A 活性の相関を検討し、通常収縮及びラッチ移行機構制御に対する PP2A の作用点と作用メカニズムを明らかにすることを、具体的な最終目的とした。

3. 研究の方法

平滑筋の細胞膜を エスシン処理により破壊したスキンド標本を用いて、I. 生理学実験(力学応答測定)及び、筋収縮フィラメント形態観測、II. X 線回折による構造生物学的実験、III. 高感度タンパク質リン酸化定量(岡山理科大学・竹谷浩介講師が分担)を行い、まず通常収縮時及びラッチ状態移行時の力学応答・筋収縮フィラメント動態・タンパク質リン酸化の相関を、更に PP2A 活性の制御によりその相関がどの様に変調するかを検討した。

I. スキンド筋標本を用いた生理学実験: モルモット盲腸紐、頸動脈の細胞膜を エスシンで化学的に破壊したスキンド平滑筋標本を用いて、Ca イオン活性化収縮及び、ラッチ収縮モデルである高 Mg イオン誘導収縮に対する PP2A 阻害薬の効果を調べた。

II. スキンド標本を用いた X 線回折実験: 高エネルギー加速器研究機構・放射光実験施設で、生理的環境下でラッチ状態移行時の X 線回折像を撮影し、赤道反射強度と力学応答の関係を経時的に記録した。

III. Phos-tag SDS 法によるタンパク質リン酸化定量: 渡辺が首都大学東京(現東京都立大学)で力学応答実験を行った微小平滑筋標本を適切な条件で固定・保存後、竹谷の所属する岡山理科大学(当初2年は旭川医科大学)に送付し、収縮制御タンパク質、及び他のシグナル調節タンパク質のリン酸化動態を解析した。

4. 研究成果

特異的 PP2A 阻害薬 rubratoxin A がスキンド平滑筋標本の Ca イオン活性化収縮を濃度依存性に抑制した(研究 I)。低濃度 Ca イオンでは、rubratoxin A 処理により収縮張力はほぼ焼失した。一方で、高濃度 Ca イオン濃度活性化収縮張力は rubratoxin A により一部のみ抑制された。従ってミオシン軽鎖リン酸化レベルの指標となる収縮の Ca イオン感受性が rubratoxin A によって抑制されることが明らかになり、ミオシン軽鎖リン酸化が rubratoxin A によって抑制されることが示唆された(Eto et al., 2018; Naraki et al., 2019)。実際、収縮時のミオシン軽鎖リン酸化レベル(研究 III)は rubratoxin A 処理時に減少した(Watanabe and Takeya, 第 94 回日本生理学会大会, 2017)。しかし、ミオシン軽鎖リン酸化レベルの抑制に比べて収縮張力の

抑制が強く表れることから、rubratoxin A による Ca 活性化収縮抑制は、ミオシン軽鎖リン酸化レベルの抑制に加えて何らかのミオシン アクチン相互作用抑制がある事が考えられた。実際、ミオシン軽鎖リン酸化レベルが最大であると考えられる最大Caイオン活性化時にも rubratoxin A により若干抑制された(Naraki et al., 2019)。

Rubratoxin A によるミオシン軽鎖リン酸化抑制機構の全容は本研究では明らかにはならなかった。しかしミオシン軽鎖キナーゼ活性の指標である収縮開始までの潜時が rubratoxin A によって延長する事から、rubratoxin A はミオシン軽鎖キナーゼ活性を抑制する事でミオシン軽鎖リン酸化を抑制する事が示唆された (Naraki et al., 2019)。

一方、低エネルギーコストによる収縮機構の実験モデルである高濃度 Mg イオンによる収縮も rubratoxin A によって抑制された (Watanabe and Takeya, 第 94 回日本生理学会大会, 2017) ことから、rubratoxin A はアクチン-ミオシン結合の状態を直接変化させることが示唆された。実際に、X 線回折実験から、同じ PP2A 阻害薬であるオカダ酸が、収縮フィラメント格子状規則配列をかく乱する事が示唆された (実験 II, Watanabe et al., 第 97 回日本生理学会大会, 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasuyuki NARAKI, Masaru WATANABE, Kousuke TAKEYA	4. 巻 55
2. 論文標題 Inhibitory effects of rubratoxin A, a potent inhibitor of protein phosphatase 2, on the Ca ²⁺ -dependent contraction of skinned carotid artery from guinea pig	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Smooth Muscle Research	6. 最初と最後の頁 14-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1540/jsmr.55.14	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takai A, Eto M, Hirano K, Takaya K, Wakimoto T, Watanabe M	4. 巻 68
2. 論文標題 Protein phosphatases 1 and 2A and their naturally occurring inhibitors: current topics in smooth muscle physiology and chemical biology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1007/s12576-017-0577-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 檜木 康之, 渡辺 賢
2. 発表標題 選択的プロテインホスファターゼ2A阻害薬rubratoxinAは エスシンスキンド平滑筋収縮の潜時を延長する
3. 学会等名 第60回日本平滑筋学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaru WATANABE, Naoya NAKAHARA, Yukisato Ishida
2. 発表標題 Regulation of thick and thin filaments organization of smooth muscle contraction
3. 学会等名 FAOPS2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Watanabe M, Naraki Y, Takeya K
2. 発表標題 Rubratoxin A, a specific protein phosphatase 2A inhibitor, suppresses smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation dependent and independent pathways
3. 学会等名 The 3rd Japan-Taiwan Protein Phspatase Symposium (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaru Watanabe, Kousuke Takeya
2. 発表標題 Mechanisms of inhibitory effects of protein phosphatase 2A on smooth muscle contraction
3. 学会等名 第94回日本生理学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹谷 浩介 (TAKEYA KOUSKE) (20586862)	岡山理科大学・獣医学部・講師 (35302)	