

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07108

研究課題名(和文)血管平滑筋における新たなRhoキナーゼ活性化機構を介した収縮機構の解明

研究課題名(英文) Depolarization-induced contraction of vascular smooth muscle via novel RhoA/Rho-kinase activation.

研究代表者

三田 充男 (Mita, Mitsuo)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50211587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脱分極刺激によるCa<sup>2+</sup>依存性proline-rich tyrosine kinase 2(Pyk2)を介したRhoA/Rhoキナーゼ(ROK)活性化において、Pyk2の標的タンパク質はRhoA不活性化を導くRhoGAPの一つであるARHGAP42であることを初めて明らかにした。ARHGAP42はPyk2によりチロシンリン酸化されることにより不活性化され、相対的にRhoA活性化を導くRhoGEFの活性が上昇し、RhoA/ROKの活性化が生じると考えられる。その結果、ミオシンホスファターゼの抑制、ミオシンのリン酸化が生じ、血管平滑筋の持続的収縮が発生するという新しい収縮調節機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管平滑筋の異常収縮は高血圧症、冠動脈疾患など多くの循環器系疾患の病態生理に重要な役割を果たしている。本研究の成果により、既知の受容体を介した血管平滑筋収縮機構とは異なる脱分極刺激におけるCa<sup>2+</sup>依存性proline-rich tyrosine kinase 2活性化によるRhoA/Rhoキナーゼ経路を介した新たな収縮調節機構の詳細が明らかとなった。この結果より、既知の薬物で効果不十分な病態時の血管障害において、従来から用いられている受容体遮断薬やチャネル阻害薬のような膜タンパク質に作用する既知の薬物とは異なった作用点で効果が期待できる新たな循環器系疾患治療薬の創薬につなげることができる。

研究成果の概要(英文)：This study indicated for the first time that the target protein of Pyk2 in the Ca<sup>2+</sup>-dependent proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2)-mediated RhoA/Rho kinase (ROK) activation in depolarization-induced contraction is ARHGAP42, which is one of the RhoGAPs leading to RhoA inactivation. ARHGAP42 may be inactivated by Pyk2-mediated tyrosine phosphorylation, resulting in a relative increase in RhoGEF activity. Therefore, RhoA is activated. Consequently, ROK activation and subsequent myosin phosphatase inhibition increase myosin phosphorylation, resulting in sustained contraction of vascular smooth muscle.

研究分野：薬理学

キーワード：カルシウム感受性亢進機構 低分子量Gタンパク質 RhoA Rhoキナーゼ Pyk2 RhoGEF RhoGAP

### 1. 研究開始当初の背景

血管平滑筋の異常収縮は、高血圧症、冠動脈疾患など多くの循環器系疾患の病態生理に重要な役割を果たしている。血管平滑筋のみならず全ての平滑筋の収縮は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 上昇によって活性化されるミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) によるミオシン軽鎖 ( $\text{LC}_{20}$ ) のリン酸化によって主に制御されている。しかし近年、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  に依存せず、受容体刺激時に平滑筋収縮を調節する  $\text{Ca}^{2+}$  感受性亢進機構が見いだされ、RhoA/Rho キナーゼ (ROK) を介したミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) の抑制によるものであることが報告された。受容体刺激により低分子量 G タンパク質である RhoA が活性化され、その標的タンパク質の1つである ROK が活性化される。活性化された ROK は MLCP のサブユニットである MYPT1 をリン酸化することにより MLCP 活性を阻害する。その結果、MLCK と MLCP の活性のバランスが崩れ、 $\text{LC}_{20}$  のリン酸化量が上昇することで、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の増加の程度に依存せず収縮が増加する。この  $\text{Ca}^{2+}$  感受性亢進機構は世界的なトピックとして取り上げられ、多くの研究がなされてきた<sup>①</sup>。しかし、従来からこの RhoA/ROK 系の活性化には受容体刺激による 3 量体 G タンパク質 ( $\text{G}_{12/13}$  或は  $\text{G}_q$ ) の活性化が必要であることが通説であったが、申請者はラット尾動脈血管平滑筋を用いて、受容体刺激を介さない高  $\text{K}^+$  による脱分極刺激及び  $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォアであるイオノマイシン (IM) 刺激によって生じる収縮の持続相は、細胞外から流入する  $\text{Ca}^{2+}$  による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇によって RhoA/ROK 系が活性化され、それに引き続く MYPT1 のリン酸化を介して発生することを世界に先駆けて明らかにした<sup>②</sup>。さらに、この高  $\text{K}^+$  刺激による  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 RhoA/ROK 系の活性化には、チロシンキナーゼ阻害薬ゲニステイン感受性である約 113 kDa のタンパク質のチロシンリン酸化が関与していることを見出し<sup>③</sup>、このタンパク質は  $\text{Ca}^{2+}$  によって活性化されるチロシンキナーゼである proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) であることを報告した<sup>④</sup>。この知見は、収縮の初期相とは異なり、持続相においては細胞外から流入する  $\text{Ca}^{2+}$  により、MLCK が直接活性化されるばかりではなく、RhoA/ROK 系を介した MLCP の抑制機構が働き、収縮が維持されることを意味している。しかし、現在まで平滑筋収縮における Pyk2 を介した情報伝達機構についての詳細は全く明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

高血圧症、冠動脈疾患など多くの循環器系疾患は、生命にかかわる重篤な疾患であり、血管平滑筋の異常収縮がその原因の一つである。現在使用されている薬剤でも効果が不十分な場合もあり、これらの疾患の予防・治療のためには、血管平滑筋異常収縮の発生機構を解明し、創薬のターゲットとなりうる新たなシグナル分子を明らかにする必要がある。申請者はラット尾動脈平滑筋の高  $\text{K}^+$  刺激による細胞膜の脱分極によって生じる収縮において、持続的収縮は  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇による MLCK の活性化のみによって生じるという従来の考えとは異なり、 $\text{Ca}^{2+}$  によって活性化される RhoA/ROK 系を介した MLCP の抑制機構により生じることを世界で初めて報告した<sup>②</sup>。また、申請者は近年、この  $\text{Ca}^{2+}$  依存性 RhoA/ROK 活性化機構には  $\text{Ca}^{2+}$  依存性チロシンキナーゼの Pyk2 が関与することを初めて見出し、この活性化はチロシンキナーゼ阻害薬ゲニステインや Pyk2 阻害作用をもつサリチル酸ナトリウムによって抑制されることを見出した<sup>③・④</sup>。しかし現在まで、Pyk2 を介した平滑筋収縮機構の詳細は明らかにはなっていない。この収縮にまつわる情報伝達機構を明らかにすることで、受容体刺激のみならず、受容体刺激を介さない血流の変化などの機械的な刺激 (shear stress など) による血管緊張の細胞内情報伝達機構の調節を解明することが可能であり、さらには既知の薬物で効果不十分な病態時の血管機能障害において、従来の薬物とは異なった作用点で効果が期待できる新たな循環器系疾患治療薬の創薬につなげることができる。

そこで、本研究では、ラット尾動脈平滑筋を用いて、RhoA/ROK 活性化における Pyk2 の関与の詳細を検証し、このチロシンキナーゼを介した新たな情報伝達機構において Pyk2 を介した RhoA 活性化に関与するタンパク質本体を明らかにし、新たな治療薬のターゲットとなりうる本体を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 血管平滑筋標本の作成：SD 系ラット (♂、350-550 g) から尾動脈を摘出し、尾動脈をらせん状 (幅 500~600  $\mu\text{m}$ 、長さ 6~7 mm) に切り、内皮細胞と外膜を除去し、血管平滑筋標本とした。

(2) 収縮反応の測定：らせん標本の収縮反応を静止張力 75 mg で等尺的に測定した。収縮反応の測定はすべて室温の条件下、100%酸素を十分に通気した栄養液中で行った。

(3) 尾動脈平滑筋からの DNA 及びタンパク質の抽出と検出：(1)で作成した血管平滑筋らせん標本から DNA あるいはタンパク質を定法に従い抽出し、リアルタイム PCR あるいは電気泳動、免疫沈降法、ウェスタンブロット法を用いて検出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Pyk2 活性化における $\text{Ca}^{2+}$ 及びカルモジュリン (CaM) の関与

Pyk2は $\text{Ca}^{2+}$ 依存性にTyr402の自己チロシンリン酸化により活性化され、リン酸化されたPyk2は他のタンパク質と相互作用する。尾動脈平滑筋において、細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ を除去した条件下、高 $\text{K}^+$  (60 mM  $\text{K}^+$ ) 刺激によるPyk2のTyr402リン酸化は消失した。このことより、Pyk2活性化には $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が不可欠であることが示された。一方で、CaM阻害薬W-7存在下では、60 mM  $\text{K}^+$ 刺激によるPyk2のTyr402リン酸化は抑制されたが、ネガティブコントロールであるW-5によってもPyk2のリン酸化は抑制されたことより、60 mM  $\text{K}^+$ 刺激によるPyk2活性化にはCaMは関与しない可能性が考えられた。一方で、 $\text{Ca}^{2+}$ イオノフォアであるイオノマイシン (IM) 刺激による持続収縮と $\text{LC}_{20}$ リン酸化に対するW-7の効果を検討したところ、収縮及び $\text{LC}_{20}$ リン酸化の初期相のみが抑制されたが持続相にはほとんど影響が見られなかった。以上のことより、収縮の初期相は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇によるMLCKの活性化により生じ、一方、持続相においてはCaMを介さず直接 $\text{Ca}^{2+}$ によりPyk2の活性化を介したRhoA/ROK経路の活性化が生じることが考えられた。

##### (2) IM刺激による持続収縮と $\text{LC}_{20}$ リン酸化に対するROK阻害薬HA-1077、Pyk2阻害薬サリチル酸ナトリウム (SS) 及びPF-431396、MLCK阻害薬ML-9の効果 (図1)

MLCK阻害薬であるML-9の前処理によりIM収縮は初期相(4分後)及び持続相(30分後)ともに抑制された。一方、ROK阻害薬HA-1077、Pyk2阻害薬SS及びPF-431396の前処理によりIM収縮は持続相のみが抑制された。また、IM刺激による $\text{LC}_{20}$ リン酸化増加は各阻害薬とも収縮反応と同様の抑制傾向を示した。以上のことより、IM刺激による収縮の初期相は、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇によるMLCKの活性化により生じ、一方、持続相においては $\text{Ca}^{2+}$ によるPyk2活性化によってPyk2を介したRhoA/ROK経路の活性化により収縮が発生することが示唆された。(1)の結果と合わせて投稿論文作成中)

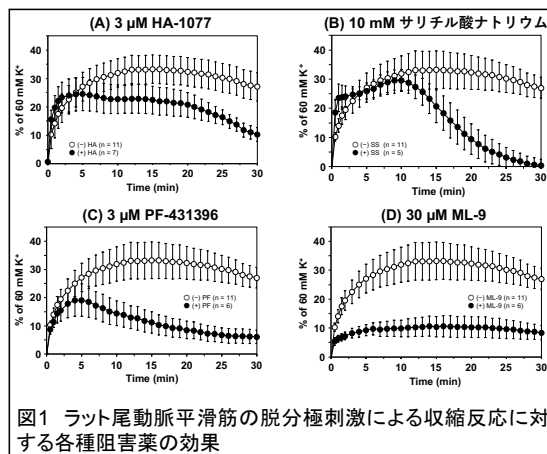


図1 ラット尾動脈平滑筋の脱分極刺激による収縮反応に対する各種阻害薬の効果

##### (3) 60 mM $\text{K}^+$ 刺激による尾動脈平滑筋の収縮における新規Rho阻害物質RhosinおよびY16の効果

RhoAは、グアニンヌクレオチド交換因子 (RhoGEF) の働きによってGTPが結合することにより活性化型に、一方、GTPase活性化因子 (RhoGAP) によってGTPの加水分解反応が促進され不活性化型になることで、細胞内シグナル伝達の分子スイッチとして働いている。活性化されたRhoAは、ROKに作用して、それに引き続く情報伝達機構を活性化する。Rhosinは、細胞内でRhoAのRhoGEF結合ドメインに結合して、RhoAの活性化を抑制する。Y16は、RhoGEFの選択的阻害剤であり、LARGなどのRhoGEFのDH-PHドメインに結合し、比較的選択的にRhoA活性化を用量依存的に抑制することが報告されている。60 mM  $\text{K}^+$ 収縮はRhosinの前処理により濃度依存的に抑制され、その抑制効果は特に持続相において顕著であった。一方、Y16では60 mM  $\text{K}^+$ 収縮の抑制効果は見られなかった。Y16はRhoGEFの中でもLARG、p115-RhoGEF、PDZ-RhoGEFに対して感受性が高いことより、60 mM  $\text{K}^+$ 収縮の持続相においてはLARG、p115-RhoGEF、PDZ-RhoGEF以外のRhoGEFが関与する可能性が考えられる。以上のことより、 $\text{Ca}^{2+}$ 流入による収縮の持続相のみがPyk2リン酸化に引き続くRhoA活性化を介したROK活性化機構によるものであることが示唆され、このRhoA活性化にはPyk2を介したY16非感受性のRhoGEFあるいはRhoGAPが関与していると考えられる。(投稿論文修正中)

##### (4) 尾動脈平滑筋におけるRhoGEF及びRhoGAPの発現

Rho familyを標的とするRhoGEFは80種類以上、RhoGAPは70種類以上が存在する⑤。血管平滑筋においても数種類のRhoGEF及びRhoGAPが報告されている。リアルタイムPCRを用いた解析により、現在まで血管平滑筋で報告があるRhoGEFのARHGEF 1 (p115-RhoGEF)、ARHGEF 2、ARHGEF 11 (PDZ-RhoGEF)、ARHGEF 12 (LARG)、ARHGEF 18 (p114-RhoGEF)、ARHGEF 25 (p63-RhoGEF) の6種類、RhoGAPにおいては、ARHGAP35 (p190-RhoGAP)、ARHGAP42 (RhoGAP42) の2種類の遺伝子の発現を尾動脈平滑筋で確認した。

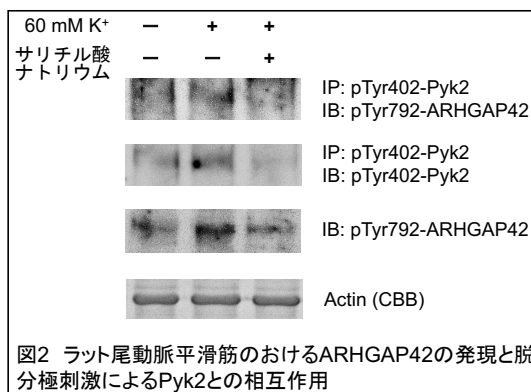
##### (5) Pyk2と相互作用するRhoGEF及びRhoGAPの同定

尾動脈平滑筋で存在を確認した6種のRhoGEF及び2種のRhoGAPについて60 mM  $\text{K}^+$ 刺激時におけるリン酸化Pyk2との相互作用を免疫沈降法により検討したところ、ARHGAP42 (RhoGAP42) が相互作用することが確認され、これはSSにより抑制された (図2)。さらに、RhoGAP42は60 mM  $\text{K}^+$ 刺激によりTyr792チロシンリン酸化の上昇が生じ、SSによって抑制されることを見出し

た(図2)。以上のことより、Ca<sup>2+</sup>によるPyk2活性化を介したRhoA/ROK系活性化機構にはRhoGAP42のチロシンリン酸化が関与することを初めて明らかにした。(4)の結果と合わせて投稿論文作成中)

#### (6) RhoA/ROK経路活性化におけるPI3キナーゼの関与

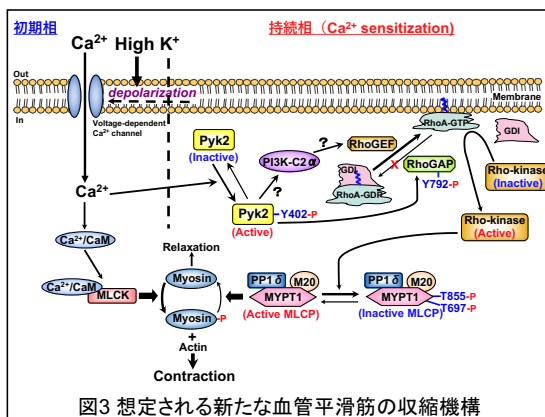
RhoAの活性調節に関与する可能性のあるタンパク質としてPI3キナーゼ(PI3K)が報告されている。尾動脈平滑筋における60 mM K<sup>+</sup>収縮、60 mM K<sup>+</sup>刺激によるLC<sub>20</sub>リン酸化、Pyk2リン酸化及びRhoA活性化は、PI3K阻害薬ウォルトマンニン及びLY294002で抑制された。また、リン酸化Pyk2との免疫沈降により、PI3KのアイソフォームのうちPI3K-C2αがPyk2と相互作用することが確認された。このことより、Ca<sup>2+</sup>依存性Pyk2によるRhoA/ROK活性化にPI3K-C2αの関与の可能性が示されたが、今後さらなる詳細の検討が必要である。(投稿論文準備中)



COVID-19の影響で研究計画通りに進まなかった部分もあったが、今後は本研究で明らかとなったPyk2及びRhoGAP42のsiRNAを導入することによってそれらのタンパク質をノックダウン、あるいは遺伝子導入によりこれらを過剰発現させたヒト冠状動脈平滑筋細胞(Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells)を用いて、高K<sup>+</sup>刺激によるPyk2リン酸化、RhoA活性化、MYPT1リン酸化及びLC<sub>20</sub>リン酸化の一連の情報伝達系の変化について検討し、どのようにCa<sup>2+</sup>依存性Pyk2活性化がRhoA/ROK経路の活性化を導くかを解明する。

以上、補助事業期間全体を通じて実施した研究結果より、血管平滑筋の収縮の持続相においては、刺激により細胞外から流入したCa<sup>2+</sup>がPyk2を活性化し、RhoGAP42をチロシンリン酸化することで、その活性を阻害し、相対的にRhoGEF活性を上昇させる可能性を見出した。結果的にRhoA/ROK系の活性化が生じ収縮が発生するという、Pyk2によるRhoA/ROK系を介した新たな収縮機構を明らかにした(図3)。さらには、このPyk2を介したRhoA/ROK活性化には、PI3K-C2αが関与する可能性が考えられたが、さらなる検討が必要である。

本研究により、血管平滑筋におけるCa<sup>2+</sup>依存性RhoA/ROK活性化を導くPyk2を介した新しい情報伝達機構が解明でき、さらには、血管平滑筋の緊張を調節する従来から用いられている受容体遮断薬やチャネル阻害薬のような膜タンパク質に作用する既知の薬物とは異なる新たな作用点をもつ薬物を探索することに結びつくと考え。



#### <引用文献>

- ① K. Swärd, M. Mita, D.P. Wilson, J.T. Deng, M. Susnjar and M.P. Walsh. The role of RhoA and Rho-associated kinase in vascular smooth muscle contraction. *Curr. Hypertens. Rep.*, **5**(1), 66-72 (2003).
- ② M. Mita, H. Yanagihara, S. Hishinuma, M. Saito and M.P. Walsh. Membrane depolarization-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves Rho-associated kinase. *Biochem. J.*, **364**(Pt 2), 431-440 (2002).
- ③ M. Mita, H. Tanaka, H. Yanagihara, J. Nakagawa, S. Hishinuma, C. Sutherland, M.P. Walsh and M. Shoji. Membrane depolarization-induced RhoA/Rho-associated kinase activation and sustained contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves genistein-sensitive tyrosine phosphorylation. *J. Smooth Muscle Res.*, **49**, 26-45 (2013).
- ④ R.D. Mills, M. Mita, J. Nakagawa, M. Shoji, C. Sutherland and M.P. Walsh. A role for the tyrosine kinase Pyk2 in depolarization-induced contraction of vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, **290**(14), 8677-8692 (2015).
- ⑤ D. Strassheim, E. Gerasimovskaya, D. Irwin D, E.C. Dempsey, K. Stenmark and V. Karoor. RhoGTPase in vascular disease. *Cells*, **98**(6), 551-571 (2019).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 相田和輝、津山夏輝、野島礼史、塚田梨奈、三田充男
2. 発表標題 ラット尾動脈血管平滑筋における高K <sup>+</sup> 収縮に対するRho阻害薬の効果
3. 学会等名 第63回日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相田和輝、三田充男
2. 発表標題 ラット尾動脈平滑筋のイオノマイシン刺激による収縮反応における初期相と持続相の収縮機構の違い
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

明治薬科大学循環薬理学研究室ホームページ <a href="https://www.my-pharm.ac.jp/education/kdb/lab/lab0_90.html">https://www.my-pharm.ac.jp/education/kdb/lab/lab0_90.html</a>
---

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
研究協力者	相田 和輝  (AIDA KAZUKI)	明治薬科大学  (32684)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------