

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：25503

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06129・19K21245

研究課題名（和文）新規発見した血管異常収縮制御分子p63RhoGEFの結合/阻害分子特定と機能解析

研究課題名（英文）Exploration of the coupling partner and the potential inhibitor of a novel smooth muscle contraction regulator, p63RhoGEF

研究代表者

百溪 江 (Momotani, Ko)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：00824848

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血管収縮制御に関わるp63RhoGEFタンパク質の結合タンパク質の探索を行い、その結合を阻害する化合物の特定を目指した。結合タンパク質の特定のための各種タグ付きタンパク質の哺乳類細胞内における人工的過剰発現はほぼ成功した。化合物スクリーニングのツールとして酵母細胞内での過剰発現を目指したが達成できなかった。生体内における当該タンパク質の機能解析は、マウスの微小血管を直接使用した活性化実験に成功した。対象作用機序最下流、ミオシンのリン酸化に至る未知の作用機序の存在が本研究課程において示唆され、RSK2活性化型キナーゼの関与特定し、Science Signaling誌上に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管の異常収縮が高血圧を引き起こすことはよく知られています。本研究は、血管収縮に関わる新たな因子の特定し、その因子の阻害剤の特定による高血圧治療薬の開発につなげていくことを目指しました。現在既にいくつかの高血圧治療薬は存在していますが、いずれも副作用の問題があり、高血圧治療薬の選択肢を増やすことによってそれらの副作用回避の可能性を広げることは喫緊の課題です。本研究では、当初予想していた通りの新たな因子の特定には至りませんでした。研究途上において示唆された、全く新しい別の因子の特定に成功し、これは既存の高血圧治療薬とは全く異なる新たな高血圧治療薬へ道を開く成果と考えます。

研究成果の概要（英文）：This study aims to explore and identify an association partner of a smooth muscle contraction regulatory protein p63RhoGEF. A newly identified partner will eventually be applied for the screening of the inhibitory compound of p63RhoGEF. Overexpression of various versions of tagged p63RhoGEF in mammalian cells resulted mostly in success. However, overexpression of p63RhoGEF in yeast cells for a future project of inhibitory compound screening was not achieved within the given time. The crucial role of p63RhoGEF in vascular smooth muscle contraction regulation was successfully confirmed using ex vivo mouse micro-vessels. During this study, the presence of an unknown regulatory element modifying the most downstream of smooth muscle contraction regulatory pathway, myosin light chain phosphorylation, had been suggested. This unknown element was identified as RSK2 kinase and reported on Science Signaling Journal.

研究分野：血管平滑筋生理学

キーワード：p63RhoGEF GEFT RhoA 平滑筋

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、これまでの研究を通して血管収縮制御への関与を特定した p63RhoGEF タンパク質とともに働く未知のタンパク質を探索し、両タンパク質の結合阻害による化合物の特定用ツールへの応用を目指した。将来的に阻害因子が特定されれば、p63RhoGEF タンパク質の特定の機能阻害による高血圧治療薬の特定・開発への発展が期待できる。

平滑筋収縮制御は、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に依存し活性化されるミオシン軽鎖 (MLC) キナーゼと、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に依存せず、G タンパク質共役受容体 (GPCR) を最上流に置き、その中間過程において低分子量 G タンパク質、RhoA および Rho キナーゼが介在するシグナル経路によって活性度が制御されている、MLC 脱リン酸化酵素 (MLCP) による MLC のリン酸化レベルに深く依存している。そのうち MLCP による MLC 脱リン酸化は  $Ca^{2+}$  濃度に依存せず平滑筋収縮を誘発するため、 $Ca^{2+}$  感受性亢進 ( $Ca^{2+}$ -sensitization) と称され、高血圧への深い関与が指摘されてきた。この  $Ca^{2+}$  感受性亢進シグナル経路において、GPCR と RhoA を介在するシグナル分子はほぼ 20 年間不明であったが、たとえば申請者のこれまでの研究によって p63RhoGEF タンパク質の介在が特定されている。

$Ca^{2+}$  感受性亢進シグナル経路の阻害による血管平滑筋収縮阻害法は、たとえば RhoA・Rho キナーゼ作用機序を阻害する方法も考えられるが、同作用機序は平滑筋収縮に限らず生体内の広範なシグナル経路に関わっていることから非特異性や重度の副作用を発現する問題がある。その他、アンジオテンシン阻害薬も広範な機能をもつ GPCR を阻害標的としているため、同様の問題をかかえている。一方、 $Ca^{2+}$  感受性亢進シグナル経路において、収束点は血管平滑筋の収縮という同一の生理現象であるにもかかわらず p63RhoGEF を含む数種の GEF を介した複数の経路が同時並行的に存在していることが現在は明らかになっているが複数経路の同時存在理由は未解明であった。

個々の GEF はそれぞれ特定の条件、環境下において血管収縮を誘導するために存在するとの可能性が考えられるが、たとえば p63RhoGEF が特定の高血圧病理条件下でのみ血管収縮を誘導しているとするれば、それを標的とする阻害剤の効果は特定病理条件のみを対象とした極めて限定、特異的なものとなり副作用の抑制に大きく寄与すると考えられた。

これらの背景と着想から本研究が計画された。

## 2. 研究の目的

本研究は、上記で述べられているような未知の血管平滑筋収縮制御シグナルシグナル分子、最終的な高血圧治療薬への応用を見据えた p63RhoGEF の機能阻害因子の特定を前提に、p63RhoGEF 機能阻害ペプチドの特定と、その p63RhoGEF の結合分析を行い、また、酵母内における当該タンパク質結合の再現性を確立して、分子標的高血圧治療薬の開発を念頭に、酵母ツーハイブリット法を応用した化合物スクリーニング手法構築を目指した。

### 3 . 研究の方法

p63RhoGEF 機能阻害ペプチドの特定と、その p63RhoGEF との結合分析には免疫沈降法やプルダウン法を含む、各種沈降法が計画された。プルダウン法には、タンパク質相互作用分析における新手法である近位依存性ビオチン標識 (BioID) を応用したタンパク質結合検出法および Halo tag 等を使用したプルダウン法を含む。p63RhoGEF 機能阻害ペプチドの特定においては、BioID を含む、各種タグ付き p63RhoGEF タンパク質を哺乳類細胞内で過剰発現させ、共沈降したタンパク質を回収し、その特定を目指した。また、将来的な p63RhoGEF と特定した結合ペプチドをイースト内で共発現させ、将来的にはそのイーストに候補化合物ライブラリーを添加することによってイースト内で p63RhoGEF と特定された結合タンパク質の結合を阻害する阻害剤を特定するという分子標的阻害剤スクリーニング法を想定し、それらのタンパク質のイースト内での過剰発現も予定された。

### 4 . 研究成果

BioID タグ付きタンパク質を含む p63RhoGEF タンパク質の哺乳類細胞内での過剰発現は、そのほとんどにおいて成功した。当初、最も一般的な N 末端タグ付き p63RhoGEF の過剰発現を模索したが、その課程において、p63RhoGEF N 末端にあるタンデムシステインが、p63RhoGEF の細胞膜への局在化と、それに依存する p63RhoGEF 正常機能において重要な役割を果たしていることが判明し、急遽、より難易度の高い C 末端タグ付き p63RhoGEF の過剰発現に実験手法を切り替えたが、最終的にほとんどのタグ付き p63RhoGEF の哺乳類細胞内での過剰発現に成功した。しかしながら、イースト内における過剰発現は、今回の研究時間内には実現することはできなかった。

一方、これまで平滑筋収縮は、MLC キナーゼと MLCP の活性度のバランスによって排他的に制御される MLC のリン酸化レベルによって制御されると考えられてきたが、p63RhoGEF タンパク質の機能解析の過程において、MLC キナーゼが不存在の状態でも MLC のリン酸化が促進され、平滑筋が収縮することが観察された。これは、これまで平滑筋収縮制御の根幹とされてきた MLC キナーゼと MLCP を経由する作用機序とは別の、未知の作用機序の可能性を示唆するものであった。本研究の重要な目的の一つは未知の血管平滑筋収縮制御シグナル分子の特定であることから、この未知のキナーゼの特定も目標に組み入れ、最終的に RSK2 活性型キナーゼがこのリン酸化を媒介していることを特定し、Science Signaling 誌上に発表した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Mykhaylo V. Artamonov, Swapnil K. Sonkusare, Miranda E. Good, Ko Momotani, Masumi Eto, Brant E. Isakson, Thu H. Le, Eric L. Cope, Zygmunt S. Derewenda, Urszula Derewenda, Avril V. Somlyo	4. 巻 Vol. 11, Issue 554
2. 論文標題 RSK2 contributes to myogenic vasoconstriction of resistance arteries by activating smooth muscle myosin and the Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> exchanger	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eear3924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aar3924	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 1件）

1. 発表者名 坂井久美子 百溪江
2. 発表標題 腸間膜血管内圧上昇に呼応した血管緊張におけるGDP/GTP交換因子p63RhoGEFの活性化
3. 学会等名 日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 坂井久美子 百溪江
2. 発表標題 腸間膜血管内圧上昇に呼応した血管緊張におけるGDP/GTP交換因子p63RhoGEFの活性化
3. 学会等名 日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 百溪江 坂井久美子
2. 発表標題 Ca <sup>2+</sup> 感受性の亢進を通じた平滑筋収縮制御におけるp63RhoGEFの機能解析
3. 学会等名 日本平滑筋学会総会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Kumiko Sakai, Hiroki Kurokawa, Ko Momotani
2. 発表標題 p63RhoGEF: a key regulator in myogenic tone/response
3. 学会等名 The Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019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