

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390059
 研究課題名(和文) 機能的プロテオミクスと1分子シグナル伝達解析法による血管緊張異常の分子機構の解明
 研究課題名(英文) Clarification of molecular mechanisms of abnormal vascular contraction by functional proteomics and a single molecular analysis of signal transduction
 研究代表者
 小林 誠 (KOBAYASHI SEI)
 山口大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：80225515

研究成果の概要(和文)：血管異常収縮の分子機構を明らかにするために、機能的プロテオミクスと分子シグナル伝達解析法を用いて、検討した。新規の候補シグナル分子を複数個、質量分析計にて同定した。血管異常収縮において、カルシウム非依存性のミオシンリン酸化反応が起こることを明らかにすると共に、カルシウム非依存性にリン酸化されたミオシンとアクチンの1分子動態をリアルタイムに観察することに成功した。膜ラフトモデル膜の構築に成功し、SPCとモデル膜との相互作用の動力的解析を行った。

研究成果の概要(英文)：We tried to clarify the molecular mechanisms of abnormal vascular contraction by functional proteomics and a single molecular analysis of signal transduction. We identified some candidates for novel signaling molecules for abnormal vascular contraction. We found that myosin light chain are phosphorylated by Rho-kinase in the absence of Ca²⁺ and can rapid sliding with actin. We observed the interaction between SPC and lipid raft model membrane.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：病態生理、血管病、1分子、シグナル伝達、機能的プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

血管病(心筋梗塞や脳卒中など)は、合計すると我が国死因の第2位となり、また、わが国の突然死の原因の大部分を占めている。血管病の原因として、血管平滑筋のCa²⁺非依存性の異常収縮が注目されている。従って、このCa²⁺非依存性収縮を引き起こすメカニズムとその原因因子を解明することによって、血管病の根本的な予防法や治療法を開発す

ることが、国民衛生上の最重要課題である。

申請者らが開発したスキンド標本は、細胞膜情報伝達機構(受容体やG蛋白等)と収縮能を保持しながら、細胞膜にのみ高分子量物質が通過できる小孔を開けた生体組織標本であり(JBC 1989, 2報)、[Ca²⁺]_iを一定値に固定できるため、Ca²⁺非依存性収縮のみを観察できるのみならず、細胞内情報伝達に影響する因子を細胞内還流することによって、

細胞膜を通過し難い未知のシグナル分子の効果を直接観察する事が可能である。申請者らは、更にこのスキンド法と遺伝子工学を統合化することによって、リコンビナント蛋白を細胞内へ急速導入する実験系を確立し (ProNAS 1996)、世界に先駆けて、血管の Ca²⁺ 非依存性収縮を引き起こす 3 つの原因シグナル分子を次々に同定してきた。すなわち、スフィンゴ脂質のスフィンゴシルホスホリルコリン (SPC) (FEBS Lett 2000、Circ Res 2002) ⇒ Src ファミリーチロシンキナーゼの Fyn (Circ Res 2002) ⇒ Rho キナーゼ (ROK) (JBC 1997、Circ Res 2002) ⇒ 血管異常収縮という経路を明らかにした。さらに、最近、これらの病的シグナル伝達に、コレステロールが必須である事を発見し (Circ Res 2006)、高脂血症と血管病・突然死を直接リンクする初めての報告として注目され、また、ヒトの血管病において SPC が異常高値となる事が報告され、今や、コレステロール⇒SPC/Fyn/ROK 経路は血管病の主因として注目されている (Editorial 総説、Circ Res 2002 及び 2006、Nature 2004 等)。現在、この経路およびそのクロストークについて世界中の多数の研究室から報告がなされているが、しばしば真逆の報告があり、血管異常収縮のシグナル伝達の研究は混乱を極めていた状況にある。その原因は以下の実験手法の 4 つの問題点があるからである。

(1) 異常収縮は時間経過の早い反応であるため、遺伝子発現等の分子生物学的手法や細胞を磨り潰す生化学的手法では、数時間以上を要するため、実際の収縮反応とはかけ離れた結果を生む。

(2) 試験管内での蛋白質レベルの活性測定では、単独の酵素について特定の溶液中の条件で解析されるため、細胞が激しく動くダイナミックな異常収縮の場合のシグナル分子の動態とは異なる場合が多い。また、当然ながら、酵素間の相互作用については不明なままとなる。

(3) 酵素活性を抗体や RI で測定する実験は、間接的所見であるため、用いる抗体・RI や実験条件によって結果が異なっている。例えば、最下流の ROK による基質蛋白のリン酸化ですら、リン酸化部位もリン酸化量も多施設によって真逆の異なる報告が出ている。

(4) 阻害薬実験では、本当に標的分子のみを阻害しているか？という特異性の疑問が常にあり、また、実は実験当時は未知だった分子を阻害していたという事例も多数報告されている。

従って、難病である血管病の治療薬開発のためには、一日も早く、以上の混沌とした問題点を克服し、血管異常収縮の分子機構を確定する事が急務である。

2. 研究の目的

本研究では、前述したような従来の不確かな方法論ではなく、より確実な手法を導入して、確定的な実験結果を得る事を目指す。確実な科学的実証としては、『見えるもの』と『物質の存在』である。本研究では、『見えるもの』として、血管異常収縮の各シグナル分子とその相互作用のリアルタイム可視化を目指し、また、『物質の存在』として質量分析による物質とその修飾の同定を試みる。これらの確実な科学的実証方法により、血管異常収縮の分子機構を解明することを試みる。

3. 研究の方法

(1) 機能的プロテオミクス

血管平滑筋細収縮のシグナル分子を上流から下流に至るまで網羅的に解析する目的で、タンデム飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS/MS) および LC-MS/MS を用いて血管平滑筋収縮に関わる新規のシグナル分子を、既知分子・未知分子を含め同定する事を試みた。方法として、血管組織あるいは培養ヒト血管平滑筋細胞を SPC にて刺激後、蛋白を可溶化して lysate を作成し、抗リン酸化チロシン抗体による免疫沈降法にてチロシンリン酸化蛋白を濃縮した後、SDS-PAGE で展開する。ゲル上の蛋白を PDVF 膜へ転写後染色し、SPC および Fyn 依存性にチロシンリン酸化されている蛋白を切り出して、蛋白分解酵素 *Achromobacter* Protease I にて消化し、飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS) および LC-MS/MS にて消化ペプチドの質量を測定する。タンデム飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF-MS) および LC-MS/MS は現在既に申請者の所属する教室に設置されており、ルーチンに稼働している。このため、ゲノム情報が明らかな既知の分子は、ペプチドマスフィンガープリンティングによってこの時点でわずか 30 分以内に同定可能である。

SDS-PAGE 後に蛋白を PVDF 膜へ転写する事で蛋白分子を安定化させ、プロテアーゼによる蛋白分子の消化効率を高めるのに必要な還元 S アルキル化を効率的に行う事に成功した。また、申請者はプロテアーゼとして、トリプシンではなく *Achromobacter* Protease I を用い、ペプチドマスフィンガープリンティングに有効な、特異性の高い(高質量の)ペプチドを得る事に成功した。更にリン酸化修飾を受ける蛋白分子については、リン酸の付加により、分子量が理論値より 80 kDa 増加する事からリン酸化ペプ

チドを同定し、更にリン酸化部位を同定した。

また、最近では、高感度タンデム型質量分析系において、リン酸化蛋白を高感度に同定するための2つの測定モードを独自に開発した。即ち、①アミノ酸配列情報が全く未知の状態において、リン酸化ペプチドを選択的に検出する事が可能な測定モード(モードAと命名)と、②リン酸化部位周辺の既知のアミノ酸配列の情報に基づき、リン酸化ペプチドを選択的に最高感度で検出する事が可能な測定モード(モードBと命名)を開発し、本研究では、この2つの測定モードを駆使して、血管異常収縮を惹起した血管組織・細胞のlysateを用いて、シグナル分子を同定を試みた。

(2)リアルタイム可視化：リコンビナントのミオシンとアクチンを用いた *in vitro motility assay*

プレート上に固定したミオシン分子群の上を蛍光標識したアクチンが滑る速度を測定する。このシステムによって、各シグナル分子のリコンビナント蛋白が実際に収縮現象(アクチンとミオシンの滑り)にどのような影響を及ぼすか明らかにする。

(3)モデル膜を用いたラフトにおける病的シグナル分子の動力学解析

申請者らは、コレステロールが血管異常収縮のシグナル伝達に必須である事を発見しており、コレステロールは細胞膜の膜ラフトドメインに限局して蓄積する事から、膜ラフトが反応の場になっている可能性が高い。既に予備実験において、世界最高レベルの純度の膜ラフトの調整に成功し、また、これまで不可能とされていた、ラフト構成脂質群(スフィンゴミエリン、コレステロール等)を高濃度混合する事に成功し、機能的に安定したラフトのモデル膜を調製する事に世界で初めて成功したので、これらのシステムを用いて病的シグナル分子の動力学解析を行う。

4. 研究成果

血管異常収縮の病的シグナル分子として、血管平滑筋膜ラフト分画から新規の候補シグナル分子を複数個、抽出し、さらにこれらの分子を質量分析計にて同定した。

血管異常収縮の基盤となるカルシウム非依存性収縮において、カルシウム非依存性のミオシンリン酸化反応が起こることを明らかにすると共に、リン酸化部位として候補部位を複数個絞り込む事ができた。カルシウム非依存性にリン酸化されたミオシンとアクチンの1分子動態をリアルタイムに観察す

ることに成功した。

膜ラフトモデル膜の構築に成功し、電子顕微鏡と原子間力顕微鏡を用いて、膜ラフトモデル膜の表面形状と性状を明らかにした。さらに、本システムと表面プラズモン共鳴測定法を統合することによって、膜ラフトモデル膜における病的シグナル分子相互作用を解析するシステムの構築に成功した。SPCとモデル膜との相互作用の動力学的解析を行い、SPCとモデル膜との相互作用においては、膜コレステロール含量が重要である事を見出した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

①岸 博子ら(5名中5番目) *Focused proteomics* による、血管平滑筋異常収縮の新規病的シグナル分子の探索、日本平滑筋学会雑誌、14巻、J-14、2010年、査読有

②H. Kishi et al. (7名中7番目) *Focused proteomic approach to identify novel signaling molecules for abnormal vascular smooth muscle contraction*. *J Physiol Sci* 60(Supp):S10, 2010、査読有

③T. Kurokawa, Y. Yumiya, H. Fujisawa, S. Shirao, S. Kashiwagi, M. Sato, H. Kishi, S. Miwa, K. Mogami, S. Kato, T. Akimura, M. Soma, K. Ogasawara, A. Ogawa, S. Kobayashi, M. Suzuki *Elevated concentrations of sphingosylphosphorylcholine in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage: A possible role as a spasmogen*. *J Clin Neurosci*, 16, 1064-1068, 2009 査読有

④川道 穂津美ら(4名中4番目) 血管異常収縮の分子機構と分子標的治療薬の探索、日薬理誌、133巻、pp.124-129、2009年、査読無し

⑤加治屋 勝子ら(4名中4番目) スフィンゴ脂質による血管収縮のカルシウム感受性制御の血管病における意義、血管医学、9巻、pp.231-238、2008年、査読無し

[学会発表] (計3件)

①宮成 健司ら(7名中7番目) 血管平滑筋収縮のCa²⁺-sensitizationを特異的に阻害する植物由来成分、筋生理の集い、2010年12月4日、東京(東京慈恵会医科大学)

②S. Kobayashi、Essential roles of Fyn tyrosine kinase and membrane lipid raft in smooth muscle contraction、International Symposium Post-genomic advances in the physiology of smooth muscle、2009年7月23日、名古屋市立大学

③小林 誠、血管平滑筋収縮のCa感受性増強におけるFynチロシンキナーゼの重要性、適応医学会、2008年6月6日、別府ビーコンプラザ

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~lily/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 誠 (KOBAYASHI SEI)

山口大学大学院医学系研究科・教授

研究者番号：80225515

(2) 研究分担者

岸 博子 (KISHI HIROKO)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40359899

加治屋 勝子 (KAJIYA KATSUKO)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00379942

川道 穂津美 (KAWAMICHI HOZUMI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80363042

(H20-H21)

(3) 連携研究者

なし