

自己評価報告書

平成 23 年 3 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2012

課題番号：20390303

研究課題名 (和文) 動脈管酸素感受性機構におけるシグナル伝達のプロテオミクス

研究課題名 (英文) Proteomic analysis of oxygen inducing signal transduction in ductus arteriosus

研究代表者

中西 敏雄 (NAKANISHI TOSHIO)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：90120013

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：プロテオミクス、動脈管、酸素感受性

1. 研究計画の概要

本研究の目的は、動脈管が酸素を感受して収縮する機構のシグナル伝達系を解明することである。酸素は動脈管平滑筋細胞の酸化還元状態や活性酸素濃度を変えて、1) 細胞膜表面のカリウム(K)イオンチャンネルを閉じ、脱分極を起こし、カルシウム(Ca)チャンネルを開き、細胞内Ca濃度を増加させる、2) 細胞内小胞体からのCaイオンの放出を増加させる、3) Rho kinase 活性化を介し筋原線維のCa感受性を増加させる、ことにより動脈管を収縮させる。動脈管におけるこれら3つの酸素の作用は、いずれも、肺動脈における作用とは反対である。本研究では、動脈管における1) Kチャンネル、2) 小胞体、3) 筋原線維のCa感受性、を制御するシグナル伝達系の構成タンパク質群を質量分析計TOF/MSを含めたプロテオミクス手法を用いて解明し、肺動脈と比較する。動脈管の酸素感受機構が明らかになれば、胎児、新生児の動脈管に関わる疾患に対する新しい治療法につながる。

2. 研究の進捗状況

(1) シグナル伝達を担う構成タンパク質群(複合体)を免疫沈降法により心血管組織から捕捉するためにKチャンネル(Kv1.5)とCaチャンネル(Cav1.2)抗体をすでに調製し、現在RhoB抗体を作成中である。

(2) 複合体の免疫沈降法を改善したことにより、非特異的吸着が減少し所用時間も格段に短縮した。

(3) Kv1.5複合体の抽出条件を検討した結果、好適な界面活性剤の種類や濃度が判明した。心血管試料も膜画分調製後、同界面活性剤を含む緩衝液により良好な結果を得られることがわかった。

(4) Blue-native/SDS PAGE および等電点・SDS型2次元電気泳動法を複合体構成タンパク質の分離に併用したことにより、大動脈・肺動脈からKv1.5複合体、心組織からKv1.5およびCav1.2複合体構成タンパク質候補を複数見つけた。

(5) 一連のTOF/MS試料の調製と測定、Mascotによる検索法に習熟した。

(6) ヒトCav1.2(アミノ酸残基数2222)のクローニングに成功した。培養細胞にCav1.2発現させ作製したCav1.2抗体を用いて検出できた。これにより培養細胞を用いてもCav1.2複合体の研究が可能になった。

(7) 小胞体や筋原線維のCa感受性を制御するシグナル伝達系メンバーは多数あり、ターゲットを絞り込む必要がある。未熟動脈管は収縮能が弱いことから、収縮弛緩制御機構のmRNA発現量を家兔未熟成熟胎仔を用いて検討した。Rhoパスイェイは胎仔の発達に伴う変動は少ないが、RhoB、Rho kinase 1が主要な担い手であることがわかった。筋小胞体は、発達段階に伴って血管により発現に大きな違いがあることが判明した。例えばリアノジン受容体2は発達に伴い発現が増加するが、カルセクエ

ストリンの発現はほとんど変化せず、動脈管ではホスホランバンは低いがカルモジュリンが肺動脈に比べて高い、などの特徴が判明した。

3. 現在までの達成度

②おおもね順調に進展している。

(理由)

これまでに本研究の特徴である複合体の免疫沈降に必要な Kv1.5、Cav1.2 抗体が多量に調製できた。培養細胞および心血管組織からチャンネル複合体の抽出・分離に関する手法が確立でき、非特異的吸着についても改善が進んだ。デスチオビオチン標識法、Blue-native/SDS PAGE および等電点/SDS 二次元電気泳動法、質量分析法など主要な手法にも習熟し、順次成果も得られている。加えて、今後計画している小胞体や筋原線維の研究のための予備検討を実施したため、動脈管や肺動脈の収縮弛緩制御機構の発現の特徴を把握でき、RhoB や Rho kinase 1 やカルモジュリンなどのターゲットの選定が進んだことも理由に挙げられる。

4. 今後の研究の推進方策

主に家兔心血管試料を用いて、研究計画書に沿った研究を Kv1.5、Cav1.2、筋小胞体、筋原線維収縮制御について鋭意進める。シグナル伝達系の構成タンパク質群を質量分析計 TOF/MS を含めたプロテオミクスにより、比較・同定していく手法を主に用いる。動脈管と肺動脈の比較や、未熟・成熟の違いなどを探究することにより、動脈管が酸素を感受して収縮する機構のシグナル伝達系の解明を目指す。

5. 代表的な研究成果

(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 3 件)

① Sun F, Hayama E, Katsube Y, Matsuoka R, Nakanishi T., The role of the large-conductance voltage-dependent and calcium-activated potassium (BK(Ca)) channels in the regulation of rat ductus arteriosus tone. Heart & Vessels. 25, 556-564, 2010, 査読有

[学会発表] (計 10 件)

① 羽山恵美子, 中西敏雄, 肺動脈・動脈管

の発達に伴う収縮制御に関する遺伝子群の発現変動, 第16回日本小児肺循環研究会, 2011.2.5, 東京

② 羽山恵美子, 中西敏雄, 蛍光標識二次元電気泳動法を用いた肺動脈・動脈管酸素感受性蛋白質の検討, 第46回日本小児循環器学会, 2010.7.8, 東京

③ 羽山恵美子, 中西敏雄, ブタ新生仔大血管膜電位依存性カリウムチャンネル複合体の分離, 第45回日本小児循環器学会, 2009.7.15-17, 神戸

④ 羽山恵美子, 中西敏雄, 膜電位依存性カリウムチャンネル複合体の分離, 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会合同大会, 2008.12.9, 神戸