

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 1日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790240

研究課題名（和文） ミオシン軽鎖ホスファターゼの活性化を介した、一酸化窒素による血管平滑筋弛緩機構

研究課題名（英文） Identification of Protein Phosphatase that Controls the Activity of Myosin Light Chain Phosphatase.

研究代表者

仙葉 慎吾 (SEMBA SHINGO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40466496

研究成果の概要（和文）：

一酸化窒素(NO)による血管平滑筋弛緩のメカニズムを明らかにするため、MLCPの制御サブユニット(MYPT1)を脱リン酸化しMLCP活性を上昇させる「MYPT1ホスファターゼ」をアフィニティークロマトグラフィーによって分離・同定した。その結果、PP1c δ をそのひとつとして同定した。培養平滑筋細胞にPP1c δ を過剰発現させると、エンドセリン-1刺激によるMYPT-1のリン酸化が抑制された。PP1c δ はMLCPの触媒サブユニットであることから、MLCP自身がMYPT-1を自己脱リン酸化することでMLCPの活性化を引き起こしていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we utilized affinity chromatography technique using MYPT1 fragment that was thiophosphorylated at Thr-696 (tp-MYPT) as ligand for isolation of MYPT1-phosphatases. By peptide mass fingerprinting analysis, we identified PP1c δ as one of the proteins that specifically bound to tp-MYPT but not unphosphorylated (unp) -MYPT Sepharose resin. Furthermore, overexpression of PP1c δ in smooth muscle cell line resulted the inhibition of the MYPT1 phosphorylation at Thr-696 induced by endothelin-1 stimulation. Our results indicate that PP1c δ facilitates the dis-inhibition of MLCP activity by auto-dephosphorylating MYPT1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：シグナル伝達、血管平滑筋、一酸化窒素、ミオシンホスファターゼ、MYPT1

1. 研究開始当初の背景

血管内皮に由来する一酸化窒素(NO)は血管平滑筋の重要な弛緩因子として体内循環の

調節に関わっており、生体内でNOを遊離させる亜硝酸誘導体は虚血性心疾患や高血圧症の治療に用いられている。平滑筋細胞に浸透したNOはグアニル酸シクラーゼを活性化

し、細胞内の cGMP 濃度を上昇させる。cGMP は cGMP 依存性キナーゼ (PKG) の活性化を介して血管平滑筋の弛緩を引き起こすと考えられている。

血管平滑筋の収縮・弛緩は、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) とミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) の活性のバランスで決定される。すなわち、MLCK 活性が優位であれば平滑筋は収縮し、MLCP 活性が優位であれば弛緩する。ここ十年來の研究で、MLCP の活性は様々な機構で調節されており、平滑筋収縮の制御に積極的に関与している重要な酵素であることが明らかとなった。特に、Rho kinase や ZIP kinase によって MLCP の制御サブユニットである MYPT1 がリン酸化されると、MLCP 活性が低下し MLCK 活性が優位になるため、平滑筋の収縮を引き起こされる。

最近、平滑筋細胞内での PKG の活性化が MYPT1 の脱リン酸化を引き起こし、その結果 MLCP 活性が上昇するために平滑筋の弛緩が起こることが明らかとなった。このことは、平滑筋細胞内で PKG が活性化されると MYPT1 の脱リン酸化を促進する「MYPT1 ホスファターゼ」が存在することを示している。

2. 研究の目的

これまでの研究によって、MYPT1 をリン酸化する多くのキナーゼが同定されているが、MYPT1 を脱リン酸化するホスファターゼの研究は全くなされていない。そこで本研究計画では、MYPT1 ホスファターゼを同定し用と試みた。そして、MLCP 活性化を介した NO による血管平滑筋弛緩機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ウシ大動脈平滑筋抽出液中の MYPT1 ホスファターゼを単離するため、非リン酸化 (unpMYPT)、またはリン酸化の安定なアナログであるチオリン酸化をした MYPT1 (tpMYPT) をリガンドとしたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行った。そして、それぞれのカラムに結合したタンパク質を用いて、リン酸化 MYPT を基質としたホスファターゼ活性測定、2次元電気泳動による tpMYPT 特異的結合タンパク質の探索を行った。tpMYPT に特異的に結合したタンパク質を質量分析を用いて同定した。同定した MYPT-1 ホスファターゼを組替えアデノウイルスを用いて平滑筋培養細胞に過剰発現させ、エンドセリン-1 (ET-1) で刺激したときの MYPT-1 のリン酸化状態をウェスタンブロットで解析した。

4. 研究成果

ウシ大動脈平滑筋抽出液中の MYPT1 ホスファターゼ活性のうち、unpMYPT-Sepharose カラムには 0.6%、tpMYPT-Sepharose カラムには 1.8% の活性が結合した。このホスファターゼの活性は $1 \mu\text{M}$ のオカダ酸によって完全に阻害された (図 1) ことから、1型セリン/スレオニンホスファターゼに属するものであるものと推測された。

これらの結合画分を二次元電気泳動したところ、等電点が 5-6.5、分子量が約 35kDa の

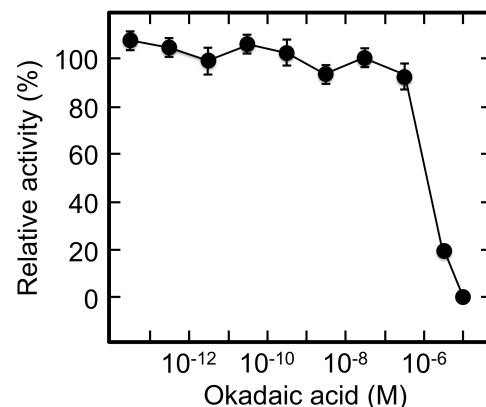


図 1 MYPT-1 ホスファターゼのオカダ酸感受性。

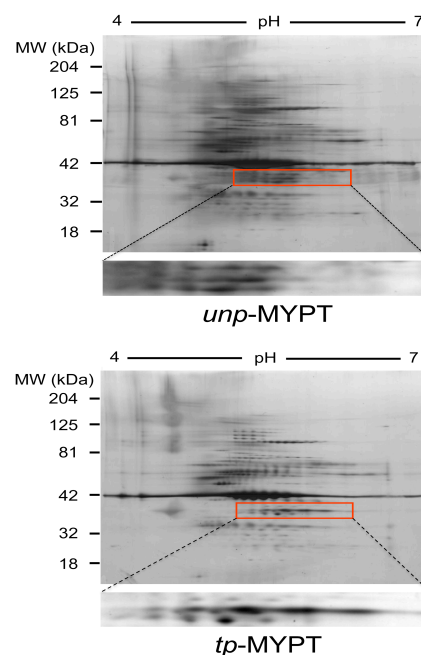


図 2 unp-, tp-MYPT-Sepharose カラムに結合したタンパク質を 2次元電気泳動後、ゲルを銀染色した。

タンパク質が tpMYPT-Sepharose カラムに特異的に結合していることがわかった (図 2)。そこで、質量分析計を用いた同定を試みた結果、1 型セリン/スレオニンホスファターゼの触媒サブユニットである PP1c δ が特異的に結合していることが明らかとなった。また、抗 PP1c δ 抗体を用いたウェスタンブロットの結果、PP1c δ は tpMYPT-Sepharose カラムにだけ結合し、unpMYPT-Sepharose カラムには結合していないことが明らかとなった (図 3)。

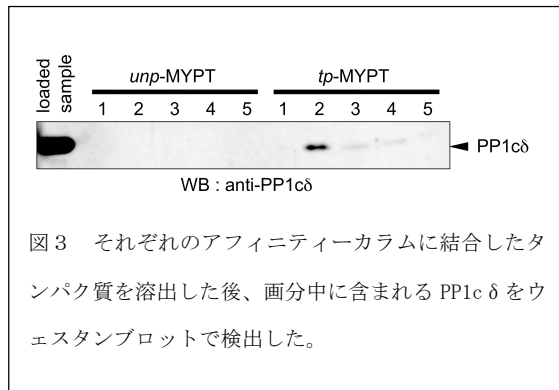


図 3 それぞれのアフィニティーカラムに結合したタンパク質を溶出した後、画分中に含まれる PP1c δ をウェスタンブロットで検出した。

次に、培養平滑筋細胞 (SMC) を用いて、PP1c δ を過剰発現させたときの MYPT1 のリン酸化状態の変化を検討した。SMC を 100 nM の endothelin-1 (ET-1) で刺激すると、MYPT-1 の Ser696 のリン酸化が刺激前に比べて約 4 倍上昇した。組替えアデノウイルスを用いて、EGFP と PP1c δ の融合タンパク質を過剰発現させた SMC を用いて同様の実験を行ったところ、ET-1 刺激による MYPT-1 のリン酸化が抑制されることが明らかとなった (図 2)。また、EGFP-PP1 δ の発現量を増大させるとリン酸化の抑制も強くなった。これらの結果から、ET-1 刺激によってリン酸化された MYPT-1 の Ser696 を、EGFP-PP1c δ が即座に脱リン酸化しているものと考えられた。次に、MYPT-1 の脱リン酸化が MLCP による自己脱リン酸化である可能性を検討するために、チオリン酸化した MYPT-1 を固定化したビーズ (tp-MYPT beads) を用いて pull-down assay を行った。その結果、PP1c δ とともに MYPT-1 が tp-MYPT beads に結合していることが明らかとなった。PP1c δ は MLCP の触媒サブユニットであることから、MLCP が自身の MYPT1 を脱リン酸化、すなわち自己脱リン酸化することによってその抑制を解除している可能性が考えられた。以上の結果から、MLCP 自身が MYPT-1 を脱リン酸化することで MLCP の活性化を引き起こしていることが示唆された。

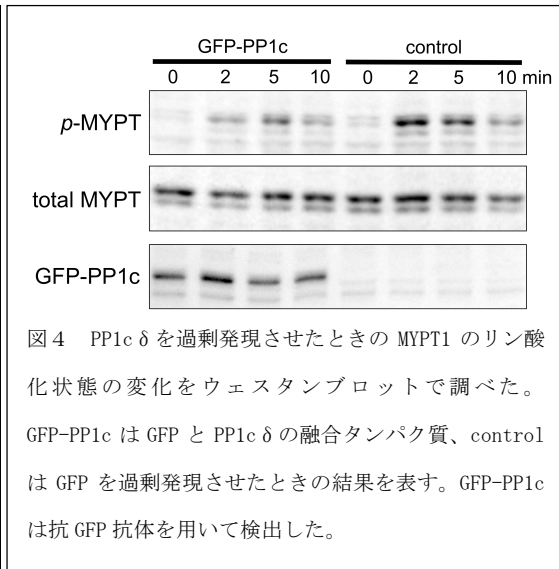


図 4 PP1c δ を過剰発現させたときの MYPT1 のリン酸化状態の変化をウェスタンブロットで調べた。GFP-PP1c は GFP と PP1c δ の融合タンパク質、control は GFP を過剰発現させたときの結果を表す。GFP-PP1c は抗 GFP 抗体を用いて検出した。

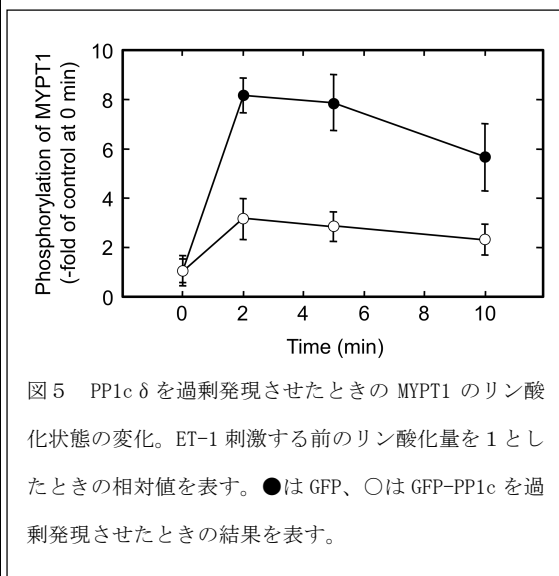


図 5 PP1c δ を過剰発現させたときの MYPT1 のリン酸化状態の変化。ET-1 刺激する前のリン酸化量を 1 としたときの相対値を表す。●は GFP、○は GFP-PP1c を過剰発現させたときの結果を表す。

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 1 件)

Yanju Ma, Shingo Semba, Atsuo Maemoto, Masayuki Takeuchi, Isamu Kameshita, Atsuhiko Ishida, Sanae Kato, Tsuyoshi Katoh, Yunpeng Liu, Takanobu Taniguchi. Oxazolone-induced over-expression of focal adhesion kinase in colonic epithelial cells of colitis mouse model. **FEBS Letters**. 584:3949-3954 (2010) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

①Yanju Ma, Shingo Semba, Mikihiro Fujiya, Yutaka Kohgo and Takanobu Taniguchi. Activation of focal adhesion kinase is

necessary for repairing epithelial barrier in Caco-2 cell monolayer. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、横浜

② Yanju Ma, Shingo Semba, and Takanobu Taniguchi. Oxazolone-induced over-expression of focal adhesion kinase in colonic epithelial cells of colitis mouse model. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸

③ Shingo Semba, Yanju Ma, and Takanobu Taniguchi. Identification of Protein Phosphatase that Controls the Activity of Myosin Light Chain Phosphatase. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仙葉 慎吾 (SEMBA SHINGO)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：40466496

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし