

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 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890011

研究課題名（和文） 微小平滑筋におけるシグナル伝達の高感度定量解析法の開発

研究課題名（英文） Development of highly sensitive methods to analyze signal transduction in a small smooth muscle

研究代表者

竹谷 浩介 (TAKEYA KOSUKE)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：20586862

研究成果の概要（和文）：平滑筋の収縮・弛緩調節の分子機序を明らかにするため、新規の高感度リン酸化解析法の開発を目指した。ウシ毛様体平滑筋のリン酸化 MYPT1 を phos-tag 電気泳動法を用いて分離・定量を試みている。カルバコールで収縮刺激を行った毛様体筋では高いレベルの myosin のリン酸化が観察されたが、予想に反して弛緩状態の myosin のリン酸化レベルも高いままに保たれていた。これらの結果はウシ毛様体筋では myosin リン酸化以外の未同定の Ca^{2+} 依存性収縮調節因子が存在する可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：In order to address the regulatory mechanisms of smooth muscle contraction and relaxation, we aimed to develop a novel highly sensitive method to analyze phosphorylation signals. We are attempting to quantify MYPT1 phosphorylation in bovine ciliary muscle by using phos-tag electrophoresis. High level of myosin phosphorylation was observed in Carbachol-contracted ciliary muscle. Contrary to our expectations, myosin phosphorylation remained at high level even in the resting state. These results suggest that there could be an unknown Ca^{2+} -dependent factor that regulates bovine ciliary muscle contraction rather than myosin phosphorylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,180,000	354,000	1,534,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,280,000	684,000	2,964,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：平滑筋、毛様体筋、ミオシン、リン酸化定量法、キナーゼ、ホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

平滑筋は生物のあらゆる器官に広く分布しており、様々な生命維持活動に重要な役割を果たしている。異なる器官で様々な機能を果たすために、各平滑筋組織は多様に機能分化している。そのため平滑筋の機能・役割を

理解するためには、個々の平滑筋における収縮・弛緩調節機構の解明が必要となる。

“微小平滑筋”はその大きさに反比例して、特に高度に機能分化しており、その多様な機能を反映して収縮・弛緩応答も特異なものとなっている。従って、各微小平滑筋の収縮・

弛緩特性の分子機序を明らかにすることは、その組織に対する生理学・病態生理学的な知見を与えるだけでなく、平滑筋の“多様性の源”を考える上でも重要な示唆をもたらすと期待される。

微小平滑筋の研究はその微小な大きさ故、これまでは主に薬理学的手法に依存せざるをえなかった。しかし、必ずしも選択性・特異性の高い薬剤が使用できるわけではなく、また、複雑に絡み合ったシグナル伝達経路にあっては、得られた結果の解釈は如何様にもなり、議論の元となっていた。この議論の答えを導くためには、“直接的な証拠”、即ちシグナル伝達における生化学的な変化（リン酸化など）を“定量的”に検出することが必要となる。

一般に平滑筋の収縮・弛緩は、第1にモータータンパク質である myosin のリン酸化・脱リン酸化によって制御されている（図1）。従って、平滑筋の収縮・弛緩は myosin をリン酸化する酵素（MLCK: myosin light chain kinase）と脱リン酸化する酵素（MLCP: myosin light chain phosphatase）の活性のバランスによって決まる。

MLCK の活性は Ca^{2+} /calmodulin (CaM) 複合体によって制御される。収縮刺激により細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、 Ca^{2+} は CaM に結合し、 Ca^{2+} /CaM 複合体が MLCK を活性化する。活性化された MLCK は myosin の調節軽鎖 LC20 をリン酸化し、平滑筋は収縮に傾く（図1）。

アゴニスト刺激など一部の収縮刺激は MLCK の活性化と同時に MLCP の調節サブユニットである MYPT1 (myosin targeting subunit 1) のリン酸化を介して MLCP の活性を抑制し、より強い平滑筋収縮を引き起こす。このリン酸化は Rho-kinase などによって行われる（図1）。また、MLCP の活性はリン酸化依存性阻害タンパク質である CPI17 によっても抑制される。最近、Dimopoulos 等によってこれら2つの抑制経路が時空間的に異なる役割を果たしている可能性が示唆された(1)。

環状ヌクレオチド依存型 kinases PKA/PKG の活性化により、平滑筋が弛緩することが知られている。この分子機序の一部に PKA/PKG による MYPT1 のリン酸化が関わっている可能性が示唆されている(2)。PKA/PKG は Rho-kinase による抑制的リン酸化部位 (Thr696, Thr853) に隣接する Ser 残基 (Ser695, Ser852) をリン酸化するので、このリン酸化により Rho-kinase による抑制能が阻害されると考えられている(3)。しかし、その機構の詳細は議論が続いている(4)。

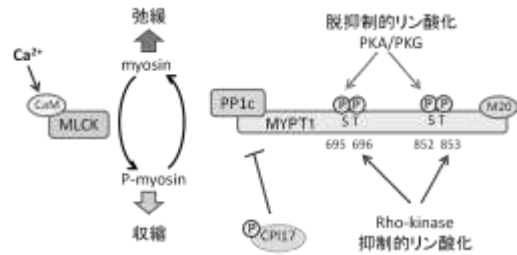


図1. 平滑筋収縮制御モデル

2. 研究の目的

上述のように MLCP の活性は多様な制御を受け、このことが平滑筋の多様な収縮・弛緩特性を生み出していると考えられる。しかし、現在 MYPT1 のリン酸化状態を定量的に検出する方法が無く、異なる試料間での結果の比較が困難になっている。現在、多くの研究ではリン酸化特異的抗体を用いてリン酸化量を“相対的に定量”している。しかし、この方法では「MYPT1 のリン酸化が2倍になった」と言うときに、総量の「1%が2%」になっても、「50%が100%」になっても同じ結果として出てくる。これを1:1で結合する脱リン酸化酵素 PP1c の活性として言い換えると、「1%の活性抑制が2%へ」「50%の活性抑制が100%へ」と両者から導かれる総 PP1c 活性は大きく異なる。従って、異なる実験系での結果を比較するためには、“相対定量”ではなく“絶対定量”が必要となる。

また、現在のリン酸化特異的抗体を用いた方法では単一 MYPT1 分子上で Thr696 と Thr853 が同時にリン酸化されているような二重リン酸化状態と、それぞれの残基が単独でリン酸化されている状態とを区別することができない。そのため、それぞれのリン酸化の機能分担についても議論することができない。従って、これらのリン酸化状態を区別して検出する手法の確立が望まれる。

本研究では、我々がこれまで確立した LC20, CPI17 の超高感度リン酸化定量法(5)を応用して、1) MYPT1 のリン酸化の“絶対定量法”の開発を目指す。更に、2) 開発した方法を使って、これまで生化学的に調べることができなかった毛様体平滑筋の収縮調節タンパク質 (MYPT1, CPI17, LC20) のリン酸化の状態を定量的に調べることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では微小平滑筋であるウシ毛様体筋（眼球の遠近調節に関わる平滑筋）を実験材料として平滑筋収縮制御関連タンパク質のリン酸化定量法の開発とシグナル伝達解析を行った。

4. 研究成果

1) MYPT1 のリン酸化定量法の開発の試み

ウシ毛様体筋における MYPT1 の発現をウェスタンブロッティングで確認したところ、大きさの異なる 2 種類のバンドが検出された。この 2 種類のバンドのリン酸化状態を、MYPT1 のリン酸化特異抗体 (抗 pThr696-MYPT1 抗体、及び抗 pThr850-MYPT1 抗体) を用いて確認したところ、いずれも両リン酸化部位がリン酸化されているものが含まれることが明らかとなった。このことから毛様体平滑筋の収縮・弛緩制御に MYPT1 のリン酸化が何らかの役割を果たしている可能性が示された。

新規 MYPT1 リン酸化定量法を開発するには、生体試料を用いるよりも *in vitro* で任意のキナーゼを用いてリン酸化した試料を用いた方が効率的であることから、ウシ毛様体筋 MYPT1 の大腸菌発現系の構築を行った。この大腸菌発現系から精製した MYPT1 を用いてリン酸化定量法の開発を試みている。MYPT1 は Thr696 と Thr853 がリン酸化され MLCP の活性を抑制している。これらのリン酸化をリン酸化数、並びにリン酸化部位に応じて分離・定量するためリン酸親和性タグ(phos-tag) SDS 電気泳動法による分離条件を検討している。

2) myosin リン酸化シグナル解析

ウシ毛様体筋における myosin の高感度リン酸解析は我々が以前開発した phos-tag SDS 電気泳動による手法(5)により行った。

コリン作動薬であるカルバコール(CCh)で収縮させた毛様体筋の myosin リン酸化レベルを弛緩時 (基底状態、および EGTA により細胞外 Ca^{2+} を除いた状態) と比較した (図 2)。CCh で収縮させた毛様体筋における myosin のリン酸化は約 $54.6 \pm 3.7\%$ (\pm SEM) で、他の平滑筋で収縮が見られるときと同程度の高いリン酸化レベルであった。一方、弛緩状態のリン酸化レベルは基底状態で $42.1 \pm 3.0\%$ 、EGTA 存在下で $46.1 \pm 2.2\%$ であり、他の平滑筋の弛緩時よりも明らかに高いレベルにあった。

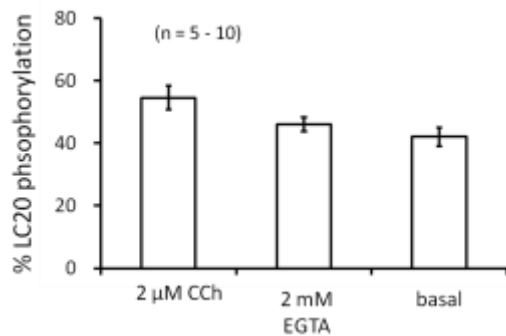


図 2. ウシ毛様体筋における myosin LC20 のリン酸化定量

このような弛緩時でも高いレベルの myosin リン酸化が維持されている例としては、ウサギ尿道括約筋が知られている(6)が、非常に希な事例である。これらの平滑筋では myosin のリン酸化・脱リン酸化とは異なるメカニズムで収縮・弛緩が制御されている可能性が高い。現在開発中の高感度リン酸化定量法を用いることで、このような特異な平滑筋のシグナル伝達機構も詳細に調べることが出来ると期待される。

[参考文献]

- (1) Dimopoulou GJ *et al. Circ Res.* **100**:121-129, 2007
- (2) Wooldridge AA *et al. J Biol Chem.* **279**:34496-34504, 2004
- (3) Nakamura K *et al. Circ Res.* **101**:712-722, 2007
- (4) Khromov A *et al. J Biol Chem.* **284**:21569-21579, 2009
- (5) Takeya K *et al. Am J Physiol Renal Physiol.* **294**:F1487-1492, 2008
- (6) Walsh MP *et al. Am J Physiol Renal Physiol.* **300**:F73-85, 2011

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)

- (1) 竹谷浩介, Phos-tag SDS 電気泳動を用いた平滑筋収縮調節タンパク質のリン酸化シグナル解析. *生物物理化学*, 査読有, **56**, s15-s19.

[学会発表] (計 1 件)

- (1) Kosuke Takeya, Motoi Miyazu, Teppei Akao & Akira Takai. Smooth muscle myosin phosphorylation in bovine ciliary muscle. 第 89 回日本生理学会大会、松本 2012 年 3 月. ポスター

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/phys1/profiles/takeya.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹谷 浩介 (TAKEYA KOSUKE)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：20586862

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：