

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 26 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460290

研究課題名(和文)細胞骨格制御の観点から難病疾患群に共通する病的シグナル伝達系を解明する

研究課題名(英文)Elucidation of the shared signaling pathways for intractable diseases in terms of cytoskeletal rearrangements

研究代表者

岸 博子(KISHI, Hiroko)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40359899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の成果は下記の通りである。細胞骨格関連分子P1の、異常収縮シグナル分子であるFynとの相互作用部位を明らかにした。細胞骨格関連分子V1がSPC刺激によってチロシン脱リン酸化に加え、N末端が切断・除去される限定分解を受ける事を見出した。P1のノックダウンにより、血管平滑筋細胞や腫瘍細胞のストレスファイバー形成や細胞遊走が抑制される事を見出した。P1に存在する複数のチロシン残基について、リン酸化の時間経過が異なる事を明らかにした。P1の平滑筋特異的なノックアウトマウスを作成した。

研究成果の概要(英文)：The results of this research are summarized as follows: 1) We determined the site of P1, a cytoskeleton-related molecule, where interacts with Fyn, a signaling molecule which mediates abnormal contraction of vascular smooth muscle. 2) We found that V1, a cytoskeleton-related molecule, was tyrosine-dephosphorylated and cleaved at the N-terminus by the stimulation of SPC. 3) We found that the knockdown of P1 inhibited the stress-fiber formation and cell migration. 4) We found that P1 has multiple phosphorylation sites and the time course of phosphorylation was different in each site. 5) We generated smooth muscle-specific P1 knockout mice.

研究分野：平滑筋生理学

キーワード：血管平滑筋 血管異常収縮 細胞骨格関連分子 細胞運動・遊走 病的シグナル伝達系 腫瘍細胞浸潤・転移

1. 研究開始当初の背景

血管異常収縮である血管攣縮は、突然死の主因となる難病を引き起こし、治療の突破口を開くためには、そのシグナル伝達機構の解明が必須である。これまでに、細胞質 Ca^{2+} 非依存性の血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達において、Rho キナーゼ(ROK)およびその上流の RhoA が中心的な役割を果たす事が知られていたが、シグナル伝達経路は不明であった。研究代表者らは、血管平滑筋異常収縮に特異的なシグナル伝達経路として スフィンゴシルホスホリルコリン(SPC)/ Src ファミリーチロシンキナーゼ(Src-TK)/ROK 経路 を発見した(FEBS Lett, 482:85, 2000, Circ Res, 91:112, 2002, Circ Res, 91:953, 2002)。更に、研究代表者らは、ヒトで9種類報告されている Src-TK の中でも、Fyn が血管平滑筋異常収縮の新規シグナル分子である直接的な証拠を得た(日本平滑筋学会 2009、IUPS2009 発表)。また、興味深い事に、異常収縮のシグナル分子である Fyn が、線維芽細胞において、ストレスファイバー形成のシグナル分子として機能する事も見出した(FEBS Lett, 581:5227, 2007, Cell Signal 24: 282, 2012)。

更に、研究代表者が独自に考案した focused proteomics と siRNA によるハイスループット機能解析により、Fyn 下流の新規の異常収縮シグナル分子を探索したところ、アクチンフィラメントや中間径フィラメントの構築変化を担う、細胞骨格関連分子群が同定された。(日本生理学会 2012 ポスター賞受賞、日本平滑筋学会 2012 発表)。中でも、P1 は異常収縮と細胞遊走の両者のシグナル伝達を担う事が示唆された。

2. 研究の目的

上記の様に、研究代表者らの見出した血管平滑筋異常収縮の新規シグナル分子が、細胞骨格関連分子であり、細胞骨格の再構成や細胞遊走においても、重要な役割を果たす事が明らかになった。こうした研究結果と学術的背景から、本研究では、血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達系と、細胞運動・細胞遊走のシグナル伝達系の関連について解明し、ひいては、細胞骨格構築制御の観点から、これらの疾患群(血管平滑筋異常収縮、腫瘍細胞浸潤・転移、動脈硬化、新生内膜形成)の病的シグナル伝達系の関連を、解明する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞骨格関連分子群と、既知の血管平滑筋異常収縮シグナル分子との相互作用部位の決定: 細胞骨格関連分子群のフラグメントを、組換えタンパク質として発現させ、既知の異常収縮シグナル分子(Fyn, ROK)の全長の組換えタンパク質との相互作用を、分子間相互作用解析装置(BIACORE, 研究室現有)で解析して、相互作用部位を決定する。

(2) 高感度タンデム型質量分析計による、異常収縮シグナル分子の新規翻訳後修飾の解析: 予備実験において、Fyn 下流の新規異常収縮シグナル分子として同定した細胞骨格関連分子群や、既知の異常収縮シグナル分子が、異常収縮刺激時に従来知られていない新規の翻訳後修飾を受ける可能性が示唆されており、これを、高感度タンデム型質量分析計で解析する。

(3) 異常収縮シグナル分子が、細胞運動・細胞遊走に果たす役割の解析: 申請者らが Fyn 下流の新規異常収縮シグナル分子として同定した細胞骨格関連分子群や、既知の異常収縮シグナル分子の siRNA を、血管平滑筋細胞や腫瘍細胞に導入して当該分子をノックダウンし、ストレスファイバー形成や細胞運動・細胞遊走に対する影響を、免疫染色や、生細胞のタイムラプスで解析する。

(4) 異常収縮シグナル分子の活性制御様式の解析: (1)や(2)で決定した相互作用部位や新規の翻訳後修飾に対する変異体を作成して組換えタンパク質を発現・精製し、既知の異常収縮シグナル分子(Fyn, ROK)の活性化に対する影響を、in vitro キナーゼアッセイで解析する。

(5) 生細胞イメージングによる、細胞形態、および、細胞骨格構築制御の解析: (1)や(2)で決定した相互作用部位や新規の翻訳後修飾に対する変異体を血管平滑筋細胞や腫瘍細胞に導入して、SPC 刺激時の細胞形態および細胞骨格構築の変化を、タイムラプス顕微鏡(研究室現有)による生細胞イメージング、および、自動細胞イメージング装置(研究室現有)による定量的イメージングによって解析する。

(6) 組織レベルでの解析: (1)や(2)で決定した相互作用部位や新規の翻訳後修飾に対する変異体を発現・精製して、研究分担者の小林が開発した、beta-escin スキンド血管平滑筋標本に導入し、血管平滑筋異常収縮に与える影響を検討する。

(7) 生体レベルでの解析: 異常収縮シグナル分子のノックアウト動物において、血管攣縮や腫瘍浸潤・転移に与える影響を、生体レベルで解析する。

4. 研究成果

(1) 細胞骨格関連分子群と、既知の血管平滑筋異常収縮シグナル分子との相互作用部位の決定: 細胞骨格関連分子 P1 は、その N 末端で活性型 Fyn と相互作用する一方、不活性型 Fyn とは相互作用しない。更に、P1 の C 末端は、活性型 Fyn とともに不活性型 Fyn とともに相互作用しない事を明らかにした。

(2) 高感度タンデム型質量分析計による、異常収縮シグナル分子の新規翻訳後修飾の解析: ヒト血管平滑筋細胞に HaloTag-細胞骨格関連分子 V1 融合ベクターを導入し、SPC で刺激後、V1 と結合した Fyn を HaloTag プルダウンアッセイによって精製した。このサン

プルを SDS-PAGE し、翻訳後修飾でシフトしたバンドを還元 S アルキル化後プロテアーゼ消化して質量分析したが、翻訳後修飾部位の決定には至らなかった。しかし、この研究を遂行する中で、細胞骨格関連分子 P1 が SPC 刺激によってチロシン脱リン酸化に加え、N 末端が切断・除去される限定分解を受ける事が判明し、異常収縮シグナル伝達における蛋白分解酵素の関与が示唆された。今後、平成 28 年度に採択された「基盤研究(C) 血管平滑筋異常収縮シグナル伝達においてカルパインと細胞骨格が果たす役割の解明(研究代表者：岸 博子)」の研究計画を実施する事により、詳細を解明していく予定である。

(3) 異常収縮シグナル分子が、細胞運動・細胞遊走に果たす役割の解析:細胞骨格関連分子 P1 の siRNA を血管平滑筋細胞や腫瘍細胞に導入し、P1 のノックダウンによりストレスファイバー形成や細胞遊走が抑制される事を、確認した。更に、P1 の shRNA を発現するレンチウイルスベクターを血管平滑筋細胞や腫瘍細胞に導入したところ、ストレスファイバー形成や細胞遊走・浸潤が抑制された。

(4) 異常収縮シグナル分子の活性制御様式の解析: 活性型 Fyn との相互作用部位である細胞骨格関連分子 P1 の N 末端には、複数のチロシン残基がある。癌細胞においてストレスファイバー形成を引き起こす TGF- β 刺激によって、これらのチロシン残基のリン酸化は、異なる時間経過をとる事を明らかにした。更に、これらのリン酸化部位に対する変異体を作成した。

(5) 生細胞および定量的イメージングによる、細胞形態、および、細胞骨格構築制御の解析:細胞骨格関連分子 P1 の N 末端フラグメントや、リン酸化部位の変異体を腫瘍細胞に強制発現し、ストレスファイバー形成や細胞遊走に対する影響を検討した。

(6) 組織レベルでの解析: 細胞骨格関連分子 P1 の変異体の組換え蛋白質発現用のベクターの構築が進行中である。今後、変異体の組換え蛋白質を発現・精製し、beta-escin スキンド血管平滑筋標本に導入する予定である。

(7) 生体レベルでの解析: 細胞骨格関連分子 P1 の平滑筋特異的ノックアウトマウスの作成が完了し、タモキシフェンによる平滑筋組織特異的な P1 のノックアウト誘導を確認した。今後、これを用いて生体レベルでの解析を進める予定である。

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 3 件)

岸 博子、張 影、小林 誠、質量分析計による蛋白質同定～シグナル伝達研究への応用～、山口医学、査読有、64: 77-181, 2015
ISSN 0513-1731

Yoshiteru Kagawa, Hiroko Kishi (9 番目), Sei

Kobayashi (10 番目), ほか計 17 名

Fatty acid-binding protein 7 regulates function of caveolae in astrocytes through expression of caveolin-1, *Glia*, 査読有, 63: 780-794, 2015
DOI: 1002/glia.22784

Byung Chull An, Tsuyoshi Sakai, Shigeru Komaba, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi, Jin Young Kim, Reiko Ikebe, and Mistuo Ikebe
Phosphorylation of the Kinase Domain Regulates Autophosphorylation of Myosin IIIA and Its Translocation in Microvilli, *Biochemistry*, 査読有, 53: 7835-7845, 2014
DOI: 10.1021/bi501247z

[学会発表](計 21 件)

Hiroko Kishi, The MLC20 monophosphorylation-dependent and -independent Ca^{2+} -sensitization, respectively at the early and late phase of vascular smooth muscle abnormal contraction, 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 22 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

Shoko Iwanaga, Flippase mediates the transmembrane transport of sphingosylphosphorylcholine, a spasmogen of human coronary and cerebral arteries, 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 22 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

張 影, Docosapentaenoic acid (DPA) n-6 不飽和脂肪酸により新たな血管攣縮の抑制作用の発見とその分子機構の解明、2015 年 10 月 24 日、第 67 回日本生理学会中国四国地方会、米子コンベンションセンター小ホール(鳥取県・米子市)

岸 博子, SPC/Fyn/ROK 経路による血管平滑筋収縮 Ca^{2+} 感受性亢進のシグナル伝達における、ミオシン軽鎖リン酸化の検討、2015 年 8 月 27 日、第 57 回日本平滑筋学会総会、山口大学小串キャンパス(医学部)総合研究棟(山口県・宇部市)

張 影, 活性化 Fyn とパキシリン N 末端との相互作用は血管平滑筋細胞のストレスファイバー形成と細胞遊走において重要な役割を担う、2015 年 8 月 27 日、第 57 回日本平滑筋学会総会、山口大学小串キャンパス(医学部)総合研究棟(山口県・宇部市)

吉井 大智, 血管平滑筋異常収縮を特異的に抑制する食用植物由来成分の探索、2015 年 8 月 26 日、第 57 回日本平滑筋学会総会、山口大学小串キャンパス(医学部)総合研究棟(山口県・宇部市)

Hiroko Kishi, The novel role of calpain in SPC/Fyn/ROK pathway which mediates the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction, 第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 3 月 22 日、神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)

Ying Zhang, N-terminus of paxillin regulates actin stress fiber formation by binding to the

active Fyn, 第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 3 月 21 日、神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

Yoshiteru Kagawa, FABP7 is involved in epigenetic modification of mouse caveolin-1 gene promotor, 第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 3 月 21 日、神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

Kenji Miyanari, Discovery of novel Salacia-derived components which specifically inhibit the ROK-mediated Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction, 第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 3 月 22 日、神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

Tomohiko Kimura, Novel fish-derived peptide fragments which induce endothelium-dependent and -independent vasorelaxation, 第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会・第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015 年 3 月 22 日、神戸国際会議場・展示場 (兵庫県・神戸市)

岸 博子、血管平滑筋収縮のカルシウム感受性亢進における、タンパク質分解酵素の関与の可能性、2014 年 12 月 6 日、筋生理の集い、東京慈恵会医科大学 (東京都・港区)

岸 博子、SPC/Fyn/ROK 経路による血管平滑筋収縮 Ca^{2+} 感受性亢進のシグナル伝達における、Fyn および ROK 活性化の経時的変化の検討、2014 年 8 月 7 日、第 56 回日本平滑筋学会総会、新横浜プリンスホテル(神奈川県・横浜市)

張 影、アクチン・ストレスファイバー形成における、新規シグナル分子パキシリンと活性型 Fyn チロシンキナーゼとの相互作用の重要性、2014 年 8 月 7 日、第 56 回日本平滑筋学会総会、新横浜プリンスホテル (神奈川県・横浜市)

Hiroko Kishi, The time course of Fyn and ROK activation in the signal transduction of abnormal vascular smooth muscle contraction, 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市)

Katsuko Kajiya, Important role of cell membrane microdomain for Ca^{2+} -sensitization of vascular smooth muscle contraction, 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 18 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市)

木村友彦、冠血管弛緩作用を有する新規ペプチドの探索: 続報、2013 年 12 月 21 日、筋生理の集い、東京慈恵会医科大学 (東京都・港区)

岸 博子、血管異常収縮の新規シグナル分子として同定された細胞骨格関連分子の、Fyn との相互作用解析、2013 年 8 月 7 日、第 55 回日本平滑筋学会総会、旭川市大雪クリスタルホール (北海道・旭川市)

張 影、血管平滑筋アクチン・ストレスフ

アイバーの形成を担う新規シグナル分子の同定とその機能解析、2013 年 8 月 7 日、第 55 回日本平滑筋学会総会、旭川市大雪クリスタルホール (北海道・旭川市)

加治屋勝子、血管平滑筋異常収縮の病的シグナル伝達における細胞膜上マイクロドメインの新規機能、2013 年 8 月 7 日、第 55 回日本平滑筋学会総会、旭川市大雪クリスタルホール (北海道・旭川市)

②Hiroko Kishi, The interaction of Fyn and a cytoskeleton-related protein which is identified as a novel signaling molecule in SPC/Fyn/ROK pathway to mediate abnormal VSM contraction, 2013 年 7 月 14 日、第 36 回心筋代謝研究会、キャノンマーケティングジャパン株式会社 3 階ホール (東京都・品川区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 4 件)

名称: SPC/Fyn/Rho キナーゼシグナル伝達経路の阻害剤

発明者: 岸 博子、張 影、小林 誠

権利者: 国立大学法人山口大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-094671

出願年月日: 2015 年 5 月 7 日

国内外の別: 国内

名称: 血管攣縮抑制剤

発明者: 小林 誠、高柿了大、岸 博子、張 影、

加治屋勝子、渡邊和晃

権利者: 出願人 国立大学法人山口大学、株式会社ラフィーネインターナショナル

種類: 特許

番号: 特願 2014-210258

出願年月日: 2014 年 10 月 14 日

国内外の別: 国内

名称: 血管攣縮抑制剤

発明者: 高松日出子、小林 誠、宮成健司、岸 博子、加治屋勝子、野地本和孝、高田雄一

権利者: 株式会社タカマ

種類: 特許

番号: 特願 2014-184678

出願年月日: 2014 年 9 月 10 日

国内外の別: 国内

名称: 血管弛緩作用を有するペプチドおよび血管弛緩剤

発明者: 小林 誠、木村友彦、岸 博子、加治屋勝子、高田雄一、白土絵里

権利者: 国立大学法人山口大学、林兼産業株式会社

種類: 特許

番号: 特願 2013-185832

出願年月日: 2013 年 9 月 9 日

国内外の別: 国内

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸 博子 (KISHI, Hiroko)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40359899

(2)研究分担者

加治屋 勝子 (KAJIYA, Katsuko)

鹿児島大学・農学部・講師

研究者番号：00379942

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

張 影 (ZHANG, Ying)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10711260