

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660224

研究課題名(和文)ホスファターゼ活性制御蛋白質CPI-17を介した新規病態生理機能解明

研究課題名(英文)Clarification of new pathophysiological functions of CPI-17, an endogenous myosin phosphatase inhibitory protein.

研究代表者

堀 正敏(Hori, Masatoshi)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70211547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：内臓臓器を構成する平滑筋細胞の運動はミオシンのリン酸化により制御されている。CPI-17はミオシンホスファターゼの内因性抑制蛋白質であり、ミオシンのリン酸化を調節する。CPI-17は血圧調節や消化管などの運動制御や、高血圧や気管支炎、発がんなど様々な病態への関与が示唆されている。本研究では、CRISPR/Cas9ゲノム編集システム技術により、世界で初めてCPI-17KOマウスとCPI-17のリン酸化制御しているアミノ酸の点変異ノックインマウスの作出に成功した。今後、これらの遺伝子改変動物を使ってCPI-17の生理学的および病態生理学的機能解析を行う。

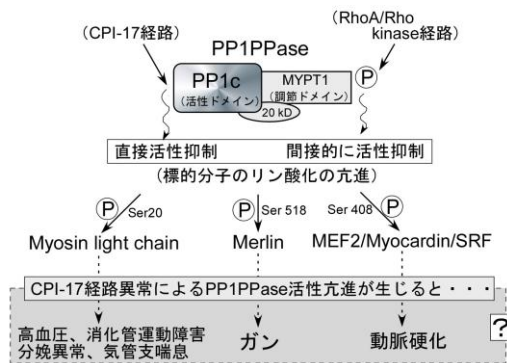
研究成果の概要(英文)：Motility of smooth muscle cell is regulated by phosphorylation of myosin, which is modulated by myosin light chain kinase and myosin phosphatase. CPI-17 is an endogenous inhibitory protein of myosin phosphatase. Phosphorylated CPI-17 at Thr38 inhibits myosin phosphatase activity. The CPI-17 signaling is known to regulate pathophysiological functions such as hypertension, asthma and cancer in addition to regulate physiological functions such as blood pressure and intestinal motility and so on. However, production of mutant mice targeting CPI-17 were not succeeded in the world. In the present study, we approached to make mutant mice targeting CPI-17 by using CRISPR/Cas9 system. We succeeded to establish three mutant mice targeting CPI-17, CPI-17 knock-out, constitutive active CPI-17 (CA[T38E]CPI-17) knock-in and dominant negative CPI-17 (DN[T38A]CPI-17) knock-in mice. We started to clarify physiological and pathophysiological functions of CPI-17 by using these mutant mice.

研究分野：薬理学

キーワード：平滑筋 ミオシン リン酸化 CPI-17 高血圧 収縮蛋白 がん

1. 研究開始当初の背景

内臓平滑筋の収縮はミオシンのリン酸化制御による。RhoA/Rho kinase系とCPI-17系によるミオシンホスファターゼ(PP1 PPase)活性調節が、このミオシンのリン酸化を制御し、様々な疾患の要因となっている。さらに、1) CPI-17はガン抑制蛋白質Merlinのリン酸化を制御してガン化に関与すること(Nature 2006)、2) 血管病変に重要な平滑筋脱分化を制御する転写因子MEF2/Myocardin/SRFのリン酸化制御をすること(JBC 2012)など、全く新しい病態生理機構に関与する可能性が近年提唱され始めた(図1)。しかし、多くの遺伝子改変動物の作出が容易になった現代においても、CPI-17の遺伝子改変動物の作出は成功に至っておらず、CPI-17が担っている生理学的機能や病態生理学的機能をin vivoのレベルで実証できず、関連分野の研究に大きな遅れをもたらしている。



(図1) CPI-17/PP1PPase系の関与が現在想定される疾患

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子同定以来30年近い今まで世界で成功していない、ミオシンの脱リン酸化酵素(ホスファターゼ; PP1 PPase)の内臓抑制タンパク質であるCPI-17KOマウスを作出し、生理的な血圧制御や消化管運動制御、ならびに高血圧、動脈硬化、気管支喘息、消化器運動障害、分娩異常、さらにはガンの病態進行におけるCPI-17/PP1 PPase制御系の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

申請者は、予備研究としてすでに世界に先駆けてCPI-17遺伝子欠損ES細胞の樹立に成功している。そこで、ES細胞を使った通常の

方法によりCPI-17 KOマウスの作出を試みる。

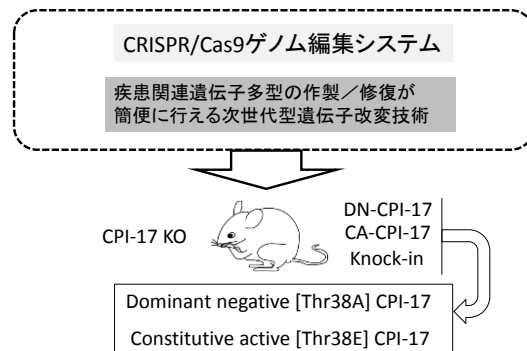
また、得られたKOマウスを用いて、正常血圧の測定や、消化管運動や子宮運動の測定などの生理学的機能解析を実施する。

バルーンカテーテルによる頸動脈内皮障害血管リモデリンモデル、喘息モデルなどを作出し、CPI-17の病態生理学的役割について解析する。

4. 研究成果

初年度は、CPI-17遺伝子欠損ES細胞を用いてキメラマウスの作製を試み、さらにはCPI-17欠損マウスの作製に従事した。しかし、キメラマウスの作出に成功しなかった。その原因について様々な検証を行ったが原因を突き止めるに至らなかった。

そこで、ES細胞を用いることをあきらめ、あらたにCRISPR/Cas9ゲノム編集システム技術を導入し、CPI-17変異マウスの作製に着手した。これまでの研究成果より、CPI-17はThr38のリン酸化により活性化され、標的タンパク質であるミオシンホスファターゼ触媒サブユニットPP1cδと結合し、ホスファターゼ活性を直接抑制することが知られている。そこで、MutagenesisによりThr38をGlutamic acidに置換したConstitutive active CPI-17(以下CA[T38E]CPI-17)と、Thr38をAlanineに置換したDominant negative CPI-17(以下DN[T38A]CPI-17)、CPI-17の全欠損(以下CPI-17 KO)のコンストラクトを作製し、それらを使って3種類のCPI-17ミュータントマウスの作製をデザインした(図2)。



(図2) CRISPR/Cas9ゲノム編集システムを使ったCPI-17遺伝子改変動物

ゲノム編集への手法変更により、当初の研究

計画は大きく遅れ、CPI-17 を標的とした遺伝子改変動物の作出は次年度へ持ち越された。しかし、最終的に CPI-17 KO マウスの作出に成功した。雌雄の出生率や成長曲線をはじめ、野生型と KO マウスとの間に大きな表現形の相違は認められなかった。最終的に、得られた CPI-17KO マウスを SPF 化するために業者へのクリーニングを依頼し、クリーニングを完了したヘテロマウスを得、最終的にホモマウスによる繁殖を軌道に乗せた。

一方、CA[T38E]CPI-17 と DN[T38A]CPI-17 の knock-in マウスについては、オフターゲット効果が出現してしまい、当初、knock-in マウスの作出は困難であった。しかし、その後、酵素活性条件などを修正するなど、細かい実験系の調整を行うことで、最終的に両 knock-in マウスの作出に成功した。得られた knock-in マウスの雌雄の出生率や成長曲線などの表現形は野生型マウスとの間に大きな相違は認められなかった。最終年度末に、両系統の SPF 化の依頼を行い、5 月初旬にヘテロマウスとしてクリーニングを完了して再入手する予定である。

以上、研究期間の 2 年間で、世界で初めて CPI-17 KO マウスと、CA[T38E]CPI-17 と DN[T38A]CPI-17 の 2 系統のミュータント CPI-17 knock-in マウスの作出に成功し、CPI-17 の生理学的、病態生理学的機能を解明する重要なツールを得た。

研究期間は終了してしまうが、今後、これらの CPI-17 遺伝子改変動物を用いて下記の点についてさらに解析を行い、CPI-17 の生理学的ならびに病態生理学的機能について in vivo のレベルで解明していく。

- ・テレメトリーシステムを用いた無拘束下での生理的血压変動における CPI-17 遺伝子改変動物の影響の解析。
- ・生理学的消化管運動機能における CPI-17 遺伝子改変動物の影響の解析。
- ・分娩時の子宮運動における CPI-17 遺伝子改変動物の影響の解析。
- ・高食塩負荷高血圧モデルにおける CPI-17 遺伝子改変動物の影響の解析。
- ・腸炎疾患における CPI-17 遺伝子改変動物の

影響の解析。

- ・頸動脈内皮細胞傷害血管リモデリングモデルにおける CPI-17 遺伝子改変動物の影響の解析。

- ・気管支喘息モデルにおける CPI-17 遺伝子改変動物の影響の解析。

<引用文献>

Jin H et al., Tumorigenic transformation by CPI-17 through inhibition of *amerlin* phosphatase.

Nature (2006) 442:576-579

Pagiatalis C et al., A novel RhoA/ROCK-CPI-17-MEF2C signaling pathway regulates vascular smooth muscle cell gene expression.

Journal of Biological Chemistry

(2012) 287:8361-8370

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)

Mori D, Watanabe N, Kaminuma O, Murata T, Hiroi T, Ozaki H, Hori M.

IL-17A induces hypo-contraction of intestinal smooth muscle via induction of iNOS in muscularis macrophages.

Journal of Pharmacological Sciences

(2014)125:394-405. (査読有り)

DOI: 10.1254/jphs.14060FP

[学会発表] (計 7 件)

① 水野理介、一色政志、西本光宏、藤田敏郎、堀正敏、尾崎博

高食塩食負荷はマウス集合リンパ管の収縮頻度を増強する

第 157 日本獣医学会学術集会

2014.9.9-12 北海道大学(北海道、札幌市)

② M Hori, T. Maehara, Y. Imura, K. Matsumoto, S Horie, K. Horiguchi, S Iino, M. Kondo, S. Shimada, H. Tsubone, T. Murata, H. Ozaki

Ameliorative actions of muscularis inflammation by antiemetic drugs, 5-HT3a receptor antagonists, in post-operative ileus

The 1st Federation of Neurogastroenterology and Motility Meeting

2014.9.5-7 Guangzhou Baiyun International Convention Center (China, Guangzhou)

- ③ N. Kaji, T. Murata, H. Ozaki, M. Hori
 Combined treatment with IFN-c and LPS
 impaired pacemaker activity of interstitial
 cells of Cajal in small intestine.
 The 1st Federation of Neurogastroenterology
 and Motility Meeting
 2014.9.5-7 Guangzhou Baiyun International
 Convention Center (China, Guangzhou)
- ④ 梶典幸、村田幸久、尾崎博、堀正敏
 IFN- γ /LPS シグナルは Interstitial cell of
 Cajal のペースメーカー機能を障害する
 第 56 回日本平滑筋学会総会
 2014.8.6-8 新横浜プリンスホテル (神奈
 川県、横浜市)
- ⑤ 森大祐、渡辺伸昌、神沼修、村田幸久、
 尾崎博、堀正敏
 IL-17A は iNOS 発現を介して消化管平滑
 筋収縮を抑制する
 第 87 回日本薬理学会年会
 2014.3.19-21 仙台国際センター (宮城県、
 仙台市)
- ⑥ 堀正敏
 病態と平滑筋収縮蛋白系の制御異常
 第 55 回日本平滑筋学会総会
 2013.8.6-9 旭川市第節クリスタルホール
 (北海道、旭川市) (招待講演)
- ⑦ 森大祐、村田 幸久、堀正敏、尾崎博
 IL-17A は iNOS 発現を介してラット回腸
 平滑筋の収縮を抑制する
 第 55 回日本平滑筋学会総会
 2013.8.6-9 旭川市第節クリスタルホール
 (北海道、旭川市)

[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

東京大学大学院農学生命科学研究科
 獣医薬理学研究室

<http://www.vm.a.u-tokyo.ac.jp/yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 正敏 (HORI, Masatoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・
 准教授
 研究者番号：70211547

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

角田 茂 (KAKUTA, Shigeru)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・
 准教授

研究者番号：80345032