

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18963

研究課題名(和文)高感度Phos-tag法を応用した毛様体筋の収縮調節機序の解析

研究課題名(英文)Analysis of ciliary muscle contraction by highly sensitive phos-tag method

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：毛様体筋は眼の遠近調節に関わる平滑筋で素早い収縮応答とそれに引き続く持続的な収縮というユニークな収縮特性を持っている。血管や消化管などの平滑筋では分子モーターであるミオシンというタンパク質がリン酸化されることで収縮のスイッチがONになり収縮が起こるが、毛様体筋ではこのスイッチが収縮弛緩の状態にかかわらず常にONであることが判明した。そのため毛様体筋では別のスイッチが働いていると考えられた。この未知のスイッチは細胞内のカルシウム濃度の上昇に反応してONになり、ミオシンリン酸化スイッチよりも素早い収縮応答を可能にしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The ciliary muscle in the eyes controls accommodation for viewing objects with a rapid response and sustained contraction. In general, smooth muscle contraction is regulated by phosphorylation of myosin, a motor protein. When myosin gets phosphorylated, it becomes active and generates contractile force. Interestingly, we found that the phosphorylation level of myosin in ciliary muscle stays high regardless of contractile state, suggesting that an unknown regulator is involved in triggering ciliary muscle contraction. This unknown regulator is activated by increased intracellular calcium, and thus allows quicker response than myosin phosphorylation.

研究分野：生理学

キーワード：毛様体筋 ミオシン リン酸化 カルシウム

1. 研究開始当初の背景

(1) 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。異なる器官で異なる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、統一的な調節モデルの構築ではなく、個々の平滑筋における収縮・弛緩調節機構を解明することが必要となる。

(2) ① 毛様体筋は目の遠近調節を担う平滑筋で、血管や消化管などの一般的な平滑筋とは異なるユニークな収縮特性を持っていることが知られている。即ち、素早い遠近調節を行うための一過的な素早い収縮(消化管型)に引き続き、焦点を維持するための持続的な張力発生(血管型)がセットになった収縮を行う。このようなユニークな毛様体筋の収縮弛緩調節の分子機構は複雑であることが予想され、十分な解明が進んでいない。

② これまでの研究により毛様体筋の収縮には細胞内と細胞外の Ca^{2+} がそれぞれ重要な役割を果たしていることが明らかとなっている(図1)。副交感神経終末からアセチルコリンが分泌されるとアセチルコリン(ACh)は毛様体筋細胞膜上の M_3 ムスカリン受容体に作用して毛様体筋を収縮させる。 M_3 受容体は三量体Gタンパク質の一種である G_q と共役しておりこの G_q の下流で様々な収縮調節シグナル伝達経路が活性化されると考えられている(参考文献①)。

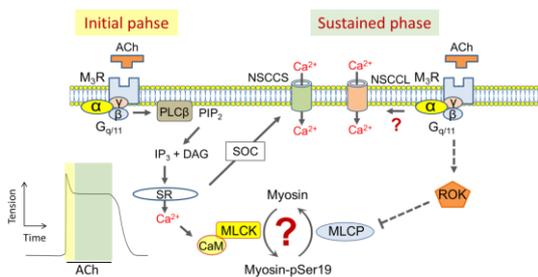


図1 毛様体筋シグナル伝達モデル

③ 収縮初期相(素早い収縮)では G_q の下流で活性化されたホスホリパーゼC (PLC) が IP_3 を産生し、それにより細胞内 Ca^{2+} ストア(SR)からの素早い Ca^{2+} 放出が起こる。これにより細胞内 Ca^{2+} 濃度が一過的に上昇し収縮が惹起される。一方、焦点維持に必要な収縮の持続相では細胞外から非選択性陽イオンチャネル(NSCC)を介して Ca^{2+} が持続的に流入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が高い状態で維持されている(参考文献②)。

④ 一般的に、これまで研究の進んでいる多くの平滑筋では細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると Ca^{2+} /カルモジュリン(CaM)複合体依存的にミ

オシン軽鎖キナーゼ(MLCK)が活性化され、モータータンパク質であるミオシンの調節軽鎖(LC₂₀)のリン酸化が亢進する。平滑筋ミオシンのモーター活性はLC₂₀のリン酸化により劇的に上昇するのでこれにより収縮が惹起される。一方、毛様体筋においては Ca^{2+} の下流の調節経路は未解明であり、どのようにして消化管型と血管型の収縮特性が共存しているかは不明である。

(3) ① これまでの毛様体筋の収縮調節機構の解析における問題点は次の2つが考えられる。1) 毛様体筋はサイズが小さく、また平滑筋含有量が比較的小さいため、生化学的解析(リン酸化解析など)が困難でそれらのデータがほとんどない。2) 毛様体筋は純粋な平滑筋組織ではなく、上皮細胞や線維芽細胞など様々な非筋細胞が不均一に混ざっている。そのため、それらの細胞由来のタンパク質が生化学解析のバックグラウンドノイズとして常に影響を与えている。

② 本研究では我々がこれまで確立してきたPhos-tag 電気泳動を用いた高感度なミオシン軽鎖リン酸化解析を用いることで上記問題を克服し、毛様体筋のユニークな収縮特性の分子機序の解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

(1) 前述したように毛様体筋は他の平滑筋ではあまり見られない素早い一過的な収縮とそれに引き続く持続的な張力維持というユニークな収縮特定を持っているが、その収縮弛緩の調節の分子機序はいまだ不明な点が多い。特に多くの平滑筋の収縮・弛緩調節で重要な役割を担う Ca^{2+} 依存的・非依存的なミオシン軽鎖LC₂₀のリン酸化に関する情報が未解明のままである。

(2) ① そこで本研究では毛様体筋の収縮・弛緩に伴うミオシン軽鎖リン酸化の定量的な解析を行い、その調節機序の解明を目指した。② また、ミオシン軽鎖リン酸化以外に Ca^{2+} 依存性の因子が関与している可能性について検討することとした。

③ 得られた結果に基づき毛様体筋のユニークな収縮特性について考察することとした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では比較的入手が容易であり、かつ測定可能な十分強い張力を発生するウシの毛様体筋を用いて種々の条件下(後述)で等尺性張力の測定を行った。また、張力測定途中の任意の時点で $-80^{\circ}C$ に冷却したTCA/acetoneを用いて、筋試料を急速凍結し、その時点でのミオシン軽鎖LC₂₀のリン酸化状態をPhos-tag 電気泳動法(後述)を用いて定量した。

(2) ① ウシ毛様体筋は幅1 mm x 長さ5 mm程度の切片として両端をレーヨン糸で縛り、一

端を張力トランスデューサーに固定し、他端を水平稼働可能なフックに固定した。自作の非灌流型マイクロチャンバー(340 μ L)中に懸垂し、約 50 mgの休止張力を与えた後、生理的緩衝液中で 30 分以上平衡化した。平衡化後、2 μ M のカルバコール(CCh、アセチルコリンの安定同位体)で刺激を行い、十分な張力を発生するものを用いて解析を行った。

② 毛様体筋切片を Ca^{2+} イオノフォアであるイオノマイシンを用いて Ca^{2+} 選択的な透過処理を行い、 Ca^{2+} 依存性の収縮を誘起し、張力測定、およびリン酸解析を行った。

③ β エシンを用いて細胞膜の透過処理を行ったスキンド標本を用いて収縮の Ca^{2+} 濃度依存性を解析した。栄養液には Ca^{2+} -EGTA 緩衝液を用いて Ca^{2+} 濃度($\text{pCa} = -\log [\text{Ca}^{2+}]$)を調節し、各種濃度における張力測定、およびリン酸解析を行った。また、緩衝液に CaM を添加することで、CaM 依存性の因子の関与を検討した。

④ 界面活性剤である Triton X100 を用いて細胞膜を除去したスキンド標本を用いて、 Ca^{2+} 依存性収縮とそれに伴うリン酸化を測定した。また、ホスファターゼ阻害剤であるマイクロシスチン LR を用いて強制的にミオシン軽鎖 LC₂₀ のリン酸化を亢進させ、収縮に対する作用を検討した。

(3) ① ミオシン軽鎖 LC₂₀ のリン酸化は Phos-tag 電気泳動法と高感度ウェスタンブロットティングを用いて定量した(参考文献③)。Phos-tag 電気泳動はリン酸基に対して親和性を持つ Phos-tag/Mn²⁺複合体を含むゲル中を移動するタンパク質が、そのリン酸化状態に応じて移動度が変化することを利用して分離する方法で、リン酸化 LC₂₀ は非リン酸化 LC₂₀ よりゆっくりと泳動されることで 2 本または 3 本(リン酸化部位が 2 か所の場合)のバンドに分離される。

② ウェスタンブロットティングでは二次抗体にビオチン標識された抗体を用い、これを HRP 標識した NeutrAvidin と結合させることで高感度な検出を行った。

4. 研究成果

(1) ① ウシ毛様体筋の収縮・弛緩調節の分子機序解明の足掛かりとして、ミオシン軽鎖 LC₂₀ のリン酸化を定量解析した。その結果、ウシ毛様体筋においてはカルバコールにより収縮させた状態で約 40%の LC₂₀ がリン酸化リン酸化されていることが明らかとなった(図2)。

② 一方、弛緩状態では予想に反して LC₂₀ のリン酸化に有意な減少は確認されず、リン酸化が高いまま維持されていることが判明した。このことはウシ毛様体筋においてミオシン軽鎖リン酸化・脱リン酸化が主要な調節因子として機能しておらず、その他の調節因子が重要であることを示唆している。また、弛緩時にも高い LC₂₀ のリン酸化が維持されてい

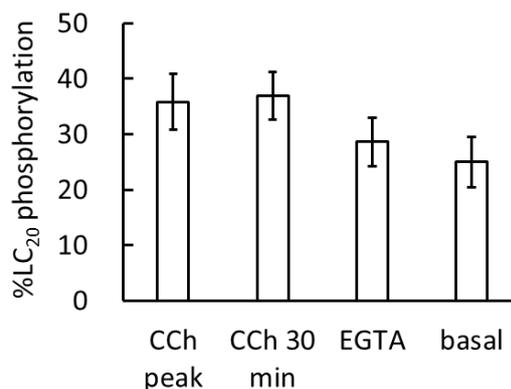


図2 ウシ毛様体筋(生筋)におけるミオシン軽鎖のリン酸化

る例は他の平滑筋ではほとんど知られておらず、毛様体筋のユニークな収縮特性を実現するための新規の調節機序が関わっている可能性を強く支持している。

(2) ウシ毛様体筋は Ca^{2+} 依存的な収縮を示すことから、イオノマイシンを用いて Ca^{2+} 収縮時の LC₂₀ リン酸化を測定したが、カルバコール収縮時と同様の結果が得られ、LC₂₀ リン酸化の優位な変化は観測されなかった。

(3) ① β エシンを用いて細胞膜の透過処理を行ったスキンド毛様体筋標本を用いて収縮の Ca^{2+} 濃度依存性を解析したところ、非透過処理筋とは異なり、 Ca^{2+} 濃度依存的な収縮とそれに伴う LC₂₀ リン酸化の増加が見られた。② また、この収縮張力とリン酸化の増加は CaM の添加により亢進し、より低濃度の Ca^{2+} でリン酸化が増加した。このことは CaM 依存的な LC₂₀ リン酸化機序、すなわち MLCK の関与を強く示唆している。

③ 一方、 Ca^{2+} 濃度を極力低くした状態($\text{pCa} 9$)では LC₂₀ のリン酸化は 10%以下まで低下しており、他の多くの平滑筋と同様のミオシン軽鎖リン酸化依存的な収縮弛緩調節機序が働いていると考えられた。

④ このような結果は、非透過処理筋の結果と一致しておらず、透過処理により重要な調節因子(特に LC₂₀ のリン酸化を高い状態で保つための因子)が失われてしまった可能性を示唆している。

(4) ① ミオシンリン酸化以外の Ca^{2+} 依存性収縮調節因子の関与を検討するため Triton X100 で膜透過処理したウシ毛様体筋でミオシン軽鎖脱リン酸化酵素阻害剤であるマイクロシスチンを用いて、強制的に LC₂₀ のリン酸化を亢進させた。多くの平滑筋では LC₂₀ のリン酸化の増加に伴い Ca^{2+} 非依存的な収縮がみられるが、毛様体筋では LC₂₀ のリン酸化の亢進に伴う収縮は非常に弱いものであった。② このリン酸化が亢進した状態に Ca^{2+} を添加すると強い収縮が見られた。このことから

ウシ毛様体筋ではミオシン軽鎖リン酸化以外に Ca^{2+} 依存性の調節因子が収縮・弛緩制御において重要な役割を果たしていることが示された(図3)。

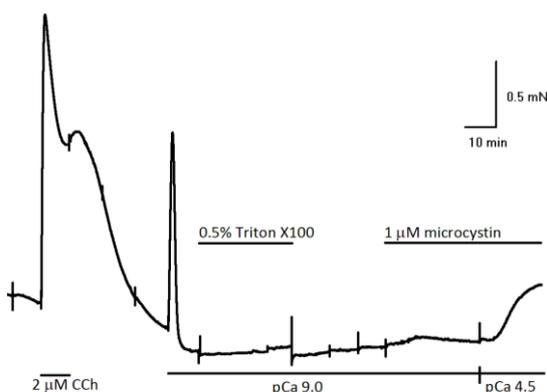


図3 Triton X100 スキンド標本の Ca^{2+} 依存性収縮

③ また、細胞膜を完全に壊す強力な界面活性剤である Triton X100 を用いても、この調節作用が残っていたことから、これに関わる因子は収縮装置、すなわちミオシンフィラメントやアクチンフィラメントに強く結合していることが考えられた。

(5) ① 以上の結果をもとにウシ毛様体筋における収縮調節機序を考えた(図4)。一般に、平滑筋の収縮弛緩はミオシン軽鎖のリン酸化が ON/OFF のスイッチの役割を果たしているが、ウシ毛様体筋では収縮弛緩の状態にかかわらずミオシン軽鎖のリン酸化が高い状態に維持されていた。したがって、ミオシン軽鎖のリン酸化が ON/OFF のスイッチの役割を果たしておらず、別の調節因子(スイッチ)が存在している可能性が示された。この未知のスイッチは細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により ON になると考えられる。

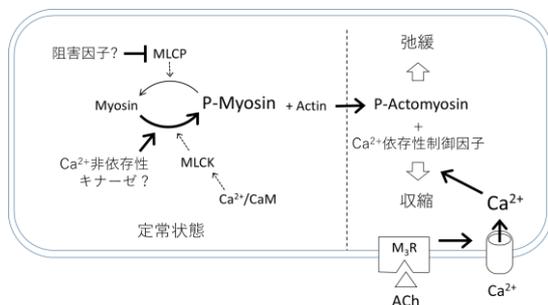


図4 ウシ毛様体筋の新規 Ca^{2+} 依存性収縮調節モデル

② これにより毛様体筋は[キナーゼの活性化→ミオシン軽鎖のリン酸化]のステップを省略して収縮のスイッチを ON にすることが

できるので、素早い収縮、すなわち素早い焦点調節が可能になるのではないかと考えられる。

③ Triton X100 スキンド標本でもこのスイッチの作用が残っていたことから、この調節因子はアクチン・ミオシンからなる収縮装置に強く結合していると考えられる。

④ このような Ca^{2+} 依存性の調節因子としては Calponin や Caldesmon が知られている。今後はこれらの Ca^{2+} 依存性調節因子の関与を検討する必要がある。

<引用文献>

- ① Yasui F, Miyazu M, Yoshida A, Naruse K, Takai A. Examination of signalling pathways involved in muscarinic responses in bovine ciliary muscle using YM-254890, an inhibitor of the $G_{q/11}$ protein. *Br. J. Pharmacol.* 154(4), 2008, 890-900
- ② Takai Y, Sugawara R, Ohinata H, Takai A. Two types of non-selective cation channel opened by muscarinic stimulation with carbachol in bovine ciliary muscle cells. *J Physiol.* 559(3), 2004, 899-922
- ③ Takeya K, Loutzenhiser K, Shiraishi M, Loutzenhiser R, Walsh M.P. A highly sensitive technique to measure myosin regulatory light chain phosphorylation: the first quantification in renal arterioles. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294(6), 2008, F1487-F1492

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

- ① 竹谷浩介、金子智之、宮津基、高井章、Calcium-dependent myosin phosphorylation in bovine ciliary muscle、第94回日本生理学会大会、2017年3月30日、静岡県

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