

平成22年 2月 25日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700359
 研究課題名(和文) 完全ヒト化ナノシステムで時空間的リアルタイム可視化によって血管攣縮を解明する
 研究課題名(英文)
 Clarification of vasospasm by a spatiotemporal nanoscale analysis of signal molecules.
 研究代表者
 川道 穂津美 (KAWAMICHI HOZUMI)
 山口大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：80363042

研究成果の概要(和文)：血管攣縮は Rho キナーゼによるカルシウム非依存性の異常収縮であるが、最終ステップとなる収縮蛋白による異常収縮現象は未だ確定されていない。本研究では、全て質量分析によって検証された高純度の収縮蛋白の滑り運動をリアルタイム・ナノ解析するシステムの構築に成功し、それを用いて、カルシウム非存在下で、Rho キナーゼによって制御鎖がリン酸化された平滑筋ミオシンとアクチンの滑り運動をリアルタイム可視化することに成功した。しかも、その運動速度は正常収縮の最高値に匹敵する著明なものであった。

研究成果の概要(英文)：Vasospasm is a Rho-kinase-mediated Ca^{2+} -independent abnormal contraction. However, its final step (= interaction of contractile proteins) was not determined yet. In this study, we developed a spatiotemporal nanoscale analysis of signal molecules, which were confirmed by mass spectrometry. Using this system, we found that even in the absence of Ca^{2+} smooth muscle myosin, whose regulatory light chains are phosphorylated by Rho-kinase, can show rapid sliding with actin at the maximum high speed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：平滑筋生理、可視化、生体分子、リアルタイム、血管攣縮

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳卒中などの血管病は合計すると日本で第2位の死因である。血管病は心臓

や脳などの臓器自体の病気ではなく、その臓器へ分布する血管の血行障害が原因である。中でも加齢に関らず時と場所を選ばず起こりうる血管攣縮(血管が痙攣)のような異常収縮

は、突然死の主因である。近年メタボリック症候群が先進諸国の重大な関心事の1つであるが、原因物質の1つであると考えられるコレステロールが血管攣縮と密接に関連している (Morikage ら, *Circ. Res.* 2006)。血管異常収縮のメカニズムを精確に解明し、副作用のない分子標的治療薬の発表は、世界人類共通の緊急の悲願である。

血管収縮には2種類ある。1つは血圧調節の正常収縮で、これは Ca^{2+} 濃度依存的であり、 Ca^{2+} -カルモジュリン (CaM) によって、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) が活性化され、ミオシン軽鎖 (MLC20) をリン酸化することで、収縮蛋白質であるミオシンとアクチンの滑り運動により収縮する。この病態は Ca^{2+} 拮抗薬で抑制できる。もう1つは、血管攣縮など Ca^{2+} 濃度に非依存的な異常収縮であるが、発症メカニズムは未解明で、 Ca^{2+} 拮抗薬では治癒せず、分子標的治療薬は未だない。異常収縮のシグナル経路であるコレステロール \Rightarrow SPC \Rightarrow Fyn \Rightarrow Rhoキナーゼ (ROK) (Morikage ら, *Circ. Res.* 2006, Todoroki ら, *FEBS.* 2000, Shirao ら, *Circ. Res.* 2002, Nakao ら, *Circ. Res.* 2002, Kawamichi ら, *Exp. Clin. Cardiol.* 2007) は既に当研究室が報告し、この経路の中心的な分子は ROK だが、様々なクロストークがある分子なので、ROK の生理機構、特に ROK 下流のシグナル経路については、実験方法の違いによって真逆の結果が出たりして、混沌としており、一定の見解が得られていない。

2. 研究の目的

血管異常収縮のシグナル伝達経路で重要な役割を果たしている ROK の下流のシグナル経路に関する研究については、クロストークの関与、実験手法の違いによって、混乱を極めている状況にある。本研究では、これまでの問題点を全てクリアして、全て質量分析で検証した高純度のリコンビナント収縮タンパクを用いた純粹かつ単純な実験システムで、収縮タンパクの動きをリアルタイム・ナノ解析することにより、血管異常収縮の最下流のシグナル伝達機構の直接的証拠を得る研究を行う。

3. 研究の方法

まず昆虫細胞とバキュロウイルスの発現系を用いて、ニワトリ砂肝平滑筋由来リコンビナントミオシンを発現させた。発現は、ミオシンの重鎖、必須軽鎖、制御軽鎖を昆虫細胞

のなかで共発現させ、昆虫細胞中で6量体のリコンビナント平滑筋ミオシンを再構成させる形で発現させた。

次に精製は、ミオシン重鎖へ融合発現させた His タグを利用し、Ni レジンをを用いて、ミオシンの6量体構造を保ったまま、精製した。精製したミオシンは SDS-PAGE 電気泳動で精製度を確認した。

精製したリコンビナント平滑筋ミオシンは、目的のサブユニットがそれぞれ発現されており、さらに昆虫細胞由来のミオシンの各サブユニットが混入していないことを確認するために、SDS-PAGE 電気泳動後、PVDF 膜へブロッティングし、コロイダルゴールド染色を行い、重鎖、制御軽鎖、必須軽鎖のバンドを切り出し、S-アルキル化、脱塩をおこない、MALDI-TOF 質量分析計で、各サブユニットの同定を行った。

また、精製したリコンビナント平滑筋ミオシンの制御軽鎖のリン酸化状態は、リン酸化蛋白質のみを染色する ProQ Diamond 染色液で SDS-PAGE 電気泳動のゲルを染色することで検出した。また、精製したリコンビナント平滑筋ミオシンは SDS-PAGE 電気泳動の後に PVDF 膜へブロッティングし、制御軽鎖のバンドを切り出し、S-アルキル化、脱塩し、タンデム型質量分析計 (LC/LC-MS) で、精製したリコンビナント平滑筋ミオシンの制御軽鎖のリン酸化状態を測定し、確認することも行った。

次に、精製したリコンビナント平滑筋ミオシンをカルシウム存在下でミオシン軽鎖キナーゼを用い、リン酸化反応を行った。さらに、カルシウム非存在下で、Rho キナーゼを用い、リン酸化反応を行った。

リン酸化状態の確認は、SDS-PAGE 電気泳動の ProQ Diamond 染色、および、タンデム型質量分析による測定で確認を行った。

次に、発現、精製したリコンビナント平滑筋ミオシンの制御軽鎖をリン酸化した平滑筋ミオシンによるアクチンフィラメントの滑り運動速度のリアルタイム可視化測定を行うために、*in vitro* motility assay システムを構築した。

この構築したシステムを用いて、まず、ミオシン軽鎖キナーゼによって制御軽鎖をリン酸化させたリコンビナント平滑筋ミオシンを用いて、カルシウム存在下で、血管平滑筋の正常収縮時のアクチンフィラメントの滑り運動速度のリアルタイム可視化測定を行った。次に、Rho キナーゼによって制御軽鎖をリン酸化させたリコンビナント平滑筋ミオシンを用いて、カルシウム非存在下で血管平滑筋の異常収縮時のアクチンフィラメントの滑り運動速度のリアルタイム可視化測定を行った。

4. 研究成果

今回、リコンビナント平滑筋ミオシンは、昆虫細胞の中で6量体を再構成し、Hisタグを利用して高純度に精製された。精製したリコンビナント平滑筋ミオシンは、MALDI-TOF質量分析計によって、各サブユニットが、目的の平滑筋ミオシン由来のものであることが同定された。また、昆虫細胞由来のミオシンのサブユニットの混入はないことも確認された。

精製したリコンビナント平滑筋ミオシンは、ProQ Diamond染色により、制御軽鎖はリン酸化されていないことが確認された。またさらに、タンデム型質量分析による測定により、制御軽鎖が非リン酸化状態であることを確認した。

次に、ミオシン軽鎖キナーゼによって、カルシウム存在下で、制御軽鎖がリン酸化されることを確認した。また、Rhoキナーゼによって、カルシウム非存在下で、制御軽鎖がリン酸化されることをProQ Diamond染色によって、確認した。

次に、*in vitro* motility assayを利用したリコンビナント平滑筋ミオシンによるアクチンフィラメントの滑り運動速度のリアルタイム可視化測定を検出するシステムを使用し、ミオシン制御軽鎖をミオシン軽鎖キナーゼでリン酸化したリコンビナント平滑筋ミオシンを用い、カルシウム存在下で、アクチンフィラメントの滑り運動速度のリアルタイム可視化測定に成功し、血管平滑筋の正常収縮時の測定に成功した。次に、Rhoキナーゼでミオシン制御軽鎖をリン酸化したリコンビナント平滑筋ミオシンを用い、カルシウム非存在下で、アクチンフィラメントの滑り運動速度のリアルタイム可視化測定に成功し、血管平滑筋の異常収縮を測定に成功した。また、この異常収縮時のアクチンフィラメントの滑り運動速度は、正常収縮時の滑り運動時の最高速度に匹敵するものであることが確認された。

以上により、カルシウム非存在下で、ROKによって直接ミオシン制御軽鎖がリン酸化されることによって、生理的な収縮の最高速度に匹敵するような著明な滑り運動が、カルシウム非存在下で引き起こされることが直接証明された。

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 2 件)

- ① 川道徳津美、岸博子、加治屋勝子、高田雄一、小林誠. 日薬理誌, 血管異常収縮の分子機構と分子標的治療薬の探索, 133. 124-129, 2009. 査読無
- ② Hozumi Kawamichi., Time Studies, Watching the motion pictures of signal molecules of the abnormal vascular contraction! Spatiotemporal nanoscale analysis of intracellular abnormality., 2,45-64,2008. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 川道徳津美、第 51 回日本平滑筋学会, 平成 21 年 7 月 21-23 日, 平滑筋ミオシンは ROK によってカルシウム非存在下で、直接リン酸化され、滑り運動を最大速度で引き起こすことができる. 名古屋市立大学
- ② 川道徳津美、日本時間学会第 1 回大会, 平成 21 年 6 月 13-14 日, 血管異常収縮の原因分子の動きを観察する! ~時空間的ナノシステムによるリアルタイム可視化解析~. 山口大学
- ③ 川道徳津美、筋生理の集い, 平成 20 年 12 月 13 日, Rho キナーゼによって軽鎖を直接リン酸化された平滑筋ミオシンの *in vitro* motility 解析. 東京慈恵会医科大学
- ④ 川道徳津美、第46回日本生物物理学会, 平成20年12月3日, RhoキナーゼによってCa²⁺-非依存性に直接リン酸化された平滑筋ミオシンは、アクチンとの滑り運動を最大速度で引き起こすことができる. 福岡国際会議場
- ⑤ 川道徳津美、第 110 回山口大学医学会, 平成 20 年 7 月 19 日, カルシウム非存在下で平滑筋収縮クロスブリッジはサイクリング可能か? ~1 分子リアルタイム可視化解析による検討~. 山口大学
- ⑥ H. Kawamichi、第 31 回心筋代謝研究会, 平成 20 年 7 月 12-13 日, Calcium-independent and direct phosphorylation of smooth muscle myosin light chain by Rho-kinase is alone sufficient to stimulate actomyosin sliding at the maximum velocity leading to calcium-sensitization. 東京慈恵会医科大学

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 1 件）

名称：組換えミオシン

発明者：川道 穂津美

権利者：川道 穂津美

種類：特許

番号：特許第 4367825 号

取得年月日：平成 21 年 9 月 4 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~lily/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川道 穂津美 (KAWAMICHI HOZUMI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80363042

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし