

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25年6月10日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500364

研究課題名（和文） プロテオミクスと機能解析による、血管平滑筋収縮と細胞骨格の関連の解明

研究課題名（英文） The elucidation of the relationship between vascular smooth muscle contraction and cytoskeletal rearrangement by proteomics and functional analysis

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

研究成果の概要（和文）：血管平滑筋異常収縮は、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞などの急性発症で致命的な難病を引き起こす。我々はこれまでに focused proteomics によって未知の異常収縮のシグナル分子を探索し、複数の細胞骨格関連蛋白質を同定した。今回、それらのリン酸化部位を解明し、更に、RNA 干渉と自動細胞イメージングシステムによるハイスループットなスクリーニング系を確立して、真に血管平滑筋異常収縮に関与する細胞骨格関連蛋白質を絞り込み、それらの分子の機能解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Abnormal vascular smooth muscle (VSM) contraction induces acute and fatal diseases such as angina pectoris, myocardial infarction and cerebral infarction. Using focused proteomics, we previously identified several cytoskeleton-related proteins as the candidates for novel signaling molecules mediating abnormal VSM contraction. In the present study, we identified the phosphorylation sites of those proteins. Furthermore, to examine if those cytoskeleton-related proteins were truly involved in abnormal VSM contraction, we developed a high throughput screening system utilizing RNAi and automated cell imaging device, and successfully narrowed down those candidate proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：平滑筋生理、血管平滑筋、平滑筋収縮、プロテオミクス、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

血管平滑筋異常収縮は、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞などの急性発症で致命的な難病を引き起こし、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。血管平滑筋異常収縮のシグナル伝達経路は、正常血圧維持に必要な細胞質 Ca^{2+} 濃度依存性の正常収縮のシグナル伝達経路とは異なり、

Ca²⁺非依存性である事が知られていたが、異常収縮の原因分子は不明であった。これまでに我々は、血管平滑筋異常収縮に特異的なシグナル伝達経路である SPC/Src-TK/ROK 経路を発見し、更に、Src-TK の中で、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。興味深い事に、Fyn はまたストレスファイバー形成を促進する新規分子である事も発見した。更に、focused proteomics により、Fyn 下流のシグナル分子を探索したところ、アクチンフィラメントのみならず、中間径フィラメントや微小管に関連する、多数の細胞骨格関連蛋白質が同定された。

2. 研究の目的

前述の研究成果を背景に、本研究は、血管平滑筋異常収縮における、細胞骨格関連蛋白質や細胞骨格構築変化の役割を、我々が独自に開発し、かつ得意分野である focused proteomics、RNA 干渉と自動細胞イメージングシステムによるハイスループット解析、分子生物学的手法、相互作用解析、生理学的手法を駆使して、分子・細胞レベルから、組織・生体レベルに至るまで、多角的なアプローチにより解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Focused proteomics による、血管平滑筋異常収縮シグナル分子のリン酸化部位の決定

これまでに focused proteomics によって、Fyn 下流の異常収縮シグナル分子として同定した細胞骨格関連蛋白質のリン酸化部位を決定するため、我々が独自に開発した高感度タンデム質量分析計によるリン酸化ペプチドの高感度測定方法を更に改善した。

(2) RNA 干渉と自動細胞イメージングシステムによる、細胞骨格関連蛋白質の血管平滑筋異常収縮に与える影響のハイスループット解析

同定した異常収縮シグナル分子が、真に血管平滑筋収縮および細胞骨格の構築へ関与しているか、自動細胞イメージングシステム(現有)と独自開発の解析アルゴリズムを用いて、ハイスループットで機能解析を行った。すなわち、候補分子の siRNA を固相化したマルチウェルプレートに、血管平滑筋細胞を培養し、siRNA を導入後、細胞を SPC で刺激して、異常収縮を誘発し、自動細胞イメージングシステムを用いて、収縮の様子を自動的・経時的にモニタリングし、画像を取得した。同システムには、蛍光顕微鏡が内蔵されており、細胞体と細胞骨格を多重蛍光標識する事によって、細胞形態と細胞骨格構築の状態を、多チャンネル蛍光画像として、全自動で取

得・解析する事が可能である。さらに、独自開発の解析アルゴリズムを用いて、収縮(細胞形態の変化)および、細胞骨格構築の変化を、多重パラメータを用いて、自動的・定量的に解析した。さらに、これらの多重パラメータの変化を control siRNA を導入した細胞と比較し、有意に影響がある分子を選択した。

(3) 細胞骨格関連蛋白質の、細胞骨格動態および血管平滑筋収縮への関与の *in vitro* 解析

(1)(2) で絞り込んだ細胞骨格関連蛋白質の cDNA を組み込んだ HaloTag 融合発現ベクターを構築し、血管平滑筋細胞に過剰発現させ、HaloTag と結合する蛍光リガンドを用いて、生細胞の細胞骨格関連蛋白質を可視化した。更にこの細胞を用い、異常収縮刺激時における細胞骨格関連蛋白質の局在の変化や細胞骨格構築の変化を、生細胞イメージングで解析した。

(4) 細胞骨格関連蛋白質の、血管異常収縮シグナル分子との相互作用解析

(1)(2) で絞り込んだ細胞骨格関連蛋白質の組換え蛋白質を発現・精製し、Fyn や ROK との相互作用を、分子間相互作用解析装置(BIACORE)を用いて解析した。更に、これらの細胞骨格関連蛋白質の cDNA を組み込んだ HaloTag 融合発現ベクターを、血管平滑筋細胞に発現させ、既知の異常収縮シグナル分子である Fyn や ROK との相互作用を、HaloTag プルダウンアッセイによって解析した。

(5) 組織レベルでの検討

(1)(2) で絞り込んだ細胞骨格関連蛋白質を β -エスシンスキンド血管平滑筋標本に導入するため、これらの細胞骨格関連蛋白質の組換え蛋白質の発現ベクターを構築し、異常収縮に与える影響を組織レベルで検討する事を目指した。

(6) 生体レベルでの検討

(1)(2) で絞り込んだ細胞骨格関連蛋白質が、血管異常収縮に与える影響を、生体レベルで解析するために、血管攣縮モデル動物を作成した。ノックアウト動物の入手のしやすさから、マウスを用い、くも膜下出血モデルを作成して、惹起された脳血管攣縮を評価する実験系を構築した。

4. 研究成果

(1) Focused proteomics による、血管平滑筋異常収縮シグナル分子のリン酸化部位の決定

これまでに我々が開発してきた、タンデム型質量分析計によるリン酸化ペプチドの高感度測定方法を、サンプル調製の段階におい

てリン酸化ペプチドを濃縮するプロトコルの改善や、タンデム型質量分析計の測定モードの改善を行う事によって、更に高感度化した。その結果、Fyn 下流の異常収縮シグナル分子として同定した細胞骨格関連蛋白質群のリン酸化部位を決定できた。この中で、I1 (特許出願準備中のため、名前の公表は控える)は、SPC 刺激 5 分後に、チロシン残基が一過性にリン酸化され、10 分後以降は、刺激前と同じリン酸化レベルに戻る事が判明した。また V1 (特許出願準備中のため、名前の公表は控える)は、SPC 刺激 5 分後に、チロシン残基が脱リン酸化され、それ以降も脱リン酸化が持続する事が明らかになった。

(2) RNA 干渉と自動細胞イメージングシステムによる、細胞骨格関連蛋白質の血管平滑筋異常収縮に与える影響のハイスループット解析

血管平滑筋細胞を SPC で刺激して異常収縮を誘発した時に起こる収縮(細胞形態の変化)、および、細胞骨格構築の変化を、自動細胞イメージングシステムと、独自に開発したアルゴリズムによって、複数のパラメータの変動として、定量解析する事に成功した。96 穴プレートにおいて、1 ウェルあたり 200-450 個の細胞を、自動的に定量解析する事ができた。

細胞形態に関連するパラメータでは、表面積、周径、長径、正円率が SPC 刺激後 20~30 分以降に減少し、収縮に伴う細胞形態の変化を反映していた。また、細胞体を染色する蛍光色素の 1 ピクセルあたりの平均蛍光強度が、SPC 刺激後 20 分以降に増加し、収縮により細胞の厚みが増す事を反映していると考えられた。

細胞骨格のうち、F-アクチンに関連したパラメータでは、1 ピクセルあたりの平均蛍光強度が、SPC 刺激後 3 分で一過性に増加した後、20 分以降で持続的に増加した。また、F-アクチンのファイバー 1 本あたりの面積は、SPC 刺激後 20 分以降で持続的に増加したが、ファイバーの本数は、SPC 刺激後 20 分以降で減少した。これらのパラメータの変動は、SPC 刺激後 3 分で、F-アクチン重合が収縮に先行して増加し、更に、20 分以降に、細胞形態の変化に伴って、細胞辺縁の F-アクチンが太くなる一方で、細胞内部の F-アクチンが不明瞭になる事を反映していると考えられた。

また、細胞骨格のうち、中間径フィラメントに関連したパラメータでは、1 ピクセルあたりの平均蛍光強度、中間径フィラメントのフィラメント 1 本あたりの面積、細胞内の蛍光強度のばらつき具合が、SPC 刺激後 20 分以降で持続的に増加した。これらのパラメータの変動は、刺激前は細胞内に均一に分布していた中間径フィラメントが SPC 刺激後 20

分以降、細胞形態の変化に伴って、局所に凝集し、分布が不均一になる事を反映していると考えられた。

上記の様に、異常収縮時に起こる血管平滑筋細胞の形態および細胞骨格構築変化を、パラメータの変動として定量的に解析する事に成功した。この研究成果は、2012 年第 89 回日本生理学会において、ポスターアワードを受賞した。次に、このシステムを用いて、focused proteomics で同定した候補分子のスクリーニングを行った。候補分子の siRNA を固相化した 96 穴プレートに、血管平滑筋細胞を培養して、候補分子をノックダウン後、SPC による細胞形態と細胞骨格構築の変化を定量的に解析し、control siRNA を導入したコントロールの細胞と比較して、パラメータの変動が抑制された候補分子を選択した。その結果、21 個の候補分子の中から、I1, P1, V1 (特許出願準備中のため、名前の公表は控える)といった細胞骨格関連蛋白質を、新規異常収縮シグナル分子として絞り込む事に成功した。

(3) 細胞骨格関連蛋白質の、細胞骨格動態および血管平滑筋収縮への関与の *in vitro* 解析

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蛋白質 V1 の HaloTag 融合発現ベクターを構築し、血管平滑筋細胞で発現して、生細胞イメージングを行い、異常収縮に伴って、V1 の局在および構築が経時的に変化していく様子を、生きた血管平滑筋細胞で観察する事に成功した。生細胞イメージングで得られた V1 の局在および構築の変化は、免疫染色で得られた結果と一致した。

(4) 細胞骨格関連蛋白質の、血管異常収縮シグナル分子との相互作用解析

分子間相互作用解析装置 (BIACORE) による検討では、細胞骨格関連分子 P1 が、活性型 Fyn と相互作用するが、非活性型 Fyn とは相互作用しない事を確認した。更に、HaloTag プルダウンアッセイによる検討においても、P1 と Fyn の結合量は、Fyn の活性に依存して増加しており、BIACORE による検討結果と一致した。

また、細胞骨格関連蛋白質 V1 は、HaloTag プルダウンアッセイにおいて、SPC 刺激後、野生型 Fyn との結合が増加したが、興味深い事に、V1 と結合した Fyn は、SPC 刺激後、SDS-PAGE において高分子方向へシフトしていた。このシフトしたバンドは、既知の Fyn の翻訳後修飾を認識する抗体とは反応しない事から、Fyn が異常収縮時に未知の翻訳後修飾を受けている可能性が示唆され、今後更なる解明を必要とする。

(5)組織レベルでの検討

細胞骨格関連蛋白質の発現ベクターを構築し、組換え蛋白質を発現・精製した。今後、 β -エスシン平滑筋標本へ導入するために、精製した組換え蛋白質を溶解するバッファーや、濃度などの条件を、最適化していく。

(6)生体レベルでの検討

野生型マウスでも膜下出血モデルを作成し、高い成功率で脳血管攣縮を誘発する技術をほぼ確実なものとした。また、脳血管攣縮による脳血流低下を、2次元レーザー血流計で評価する事に成功した。更に、これらのマウスでは海馬の神経細胞数が減少し、脳血管攣縮による虚血性変化を反映していると考えられた。今後は、細胞骨格関連蛋白質のノックアウトマウス(既に入手済み)を用いても膜下出血モデルを作成し、当該細胞骨格関連蛋白質が、脳血管攣縮の発症に必須であるかを検討する予定である。

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4件)

- ①Dan Xu, Hiroko Kishi, Hozumi Kawamichi, Katsuko Kajiya, Yuichi Takada, Sei Kobayashi
Sphingosylphosphorylcholine induces stress fiber formation via activation of Fyn-RhoA-ROCK signaling pathway in fibroblasts
Cellular Signalling, 査読有 24(1): 282-289, 2012
DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.09.013
- ②Katsuko Kajiya, Hiroko Kishi, Yuichi Takada, Ying Zhang, Tomohiko Kimura, Kenji Miyinari, Hiroshi Hagihara, Sei Kobayashi
New avenues to vascular disease prevention by food components
Foods & Food Ingredients Journal of Japan, 査読有 217(3): 284-289, 2012
[http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/ffij-e217\(3\)](http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME.nsf/pages/ffij-e217(3))
- ③Daisuke Mori, Masatoshi Hori, Takahisa Murata, Takashi Ohama, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi, Hiroshi Ozaki
Synchronous phosphorylation of CPI-17 and MYPT1 is essential for inducing Ca^{2+} sensitization in intestinal smooth muscle
Neurogastroenterology & Motility, 査読有 23(12): 1111-1122, 2011
DOI: 10.1111/j.1365-2982.2011.01799.x
- ④Ryo Hashimoto, Seiji Umemoto, Fengling

Guo, Kyoko Umeji, Shinichi Itoh, Hiroko Kishi, Sei Kobayashi, and Masunori Matsuzaki

Nifedipine activates PPAR γ and exerts an antioxidative action through Cu/ZnSOD independent of blood-pressure lowering in SHRSP

Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 査読有 17(8): 785-795, 2010
https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jat/17/8/_contents

[学会発表] (計39件)

- ①Hiroko Kishi, The characterization of a cytoskeleton-related protein identified as the novel downstream target of Fyn in SPC/Fyn/ROK pathway mediating abnormal vascular smooth muscle contraction, 第90回日本生理学会大会, 2013年3月27-29日、タワーホール船堀(東京)
- ②岸 博子, 自動細胞イメージングシステムを用いた、血管平滑筋異常収縮の新規シグナル分子探索の客観的ハイスループット化, 第53回日本平滑筋学会, 2011年8月3-4日、ゆうぼうと(東京)
- ③Hiroko Kishi, The development of a high-throughput and objective screening system to validate candidate molecules which mediate abnormal vascular smooth muscle contraction, 第35回心筋代謝研究会, 2012年7月7-8日、キャノンマーケティングジャパン株式会社(東京)
- ④Hiroko Kishi, The development of a high-throughput and objective screening system to validate candidate molecules for downstream target of Fyn in SPC/Fyn/ROK pathway which mediates abnormal vascular smooth muscle contraction, 第89回日本生理学会大会, 2012年3月29-31日、長野県松本文化会館(松本) ※ポスターアワード受賞
- ⑤岸 博子, 自動細胞イメージングシステムを用いた、血管平滑筋異常収縮の新規シグナル分子探索の客観的ハイスループット化, 第53回日本平滑筋学会, 2011年8月3-4日、ゆうぼうと(東京)
- ⑥岸 博子, Focused Proteomicsによる、血管平滑筋異常収縮の新規病的シグナル分子の探索, 第52回日本平滑筋学会, 2010年6月30日-7月2日、仙台市情報・産業プラザ(仙台)
- ⑦ Hiroko Kishi, Focused proteomic approach to identify novel signaling molecules for abnormal vascular smooth muscle contraction, 第87回日本生理学会大会, 2010年5月19-21日、盛岡市民

文化ホール等（盛岡）

〔産業財産権〕

○取得状況（計4件）

名称：血管病予防に効果を有する食品組成物

発明者：小林 誠、岸 博子

権利者：国立大学法人山口大学

種類：特許

番号：特許第5186679号

取得年月日：2013年2月1日

国内外の別：国内

名称：平滑筋収縮抑制剤

発明者：扇谷 悟、森田直樹、花田啓子、小林利克、小林 誠、岸 博子、宮下和夫、細川雅史

権利者：国立大学法人山口大学

種類：特許

番号：特許第5158715号

取得年月日：2012年12月21日

国内外の別：国内

名称：平滑筋収縮抑制剤

発明者：小林 誠、岸 博子、横地俊弘、中原東郎

権利者：国立大学法人山口大学

種類：特許

番号：特許第5124776号

取得年月日：2012年11月9日

国内外の別：国内

名称：血管異常収縮の抑制剤

発明者：小林 誠、岸 博子、中島幹夫、前田祥範

権利者：国立大学法人山口大学、国立大学法人佐賀大学

種類：特許

番号：特許第5103618号

取得年月日：2012年10月12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/>

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

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

加治屋 勝子 (KAJIYA KATSUKO)

山口大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00379942

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

(H22→H23)