

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 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890104

研究課題名（和文）急性炎症における血管内皮細胞の細胞骨格ダイナミクス制御機構の解明

研究課題名（英文）The regulation of cytoskeletal dynamics in endothelial cells during acute inflammation

研究代表者

加藤 久和 (KATO HISAKAZU)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：30589312

研究成果の概要（和文）：血管内皮でおこる急性の炎症反応において、サイトカインにより発現誘導される分子として同定したリン酸化酵素 NUAK2 とその基質 MYPT1 の機能解析を行った。NUAK2 をノックダウンした血管内皮細胞ではアクチンストレスファイバーの消失とミオシン軽鎖のリン酸化の減少が認められた。さらに NUAK2 の活性化に関わる自己リン酸化候補部位を数か所同定した。また血管内皮を可視化できるゼブラフィッシュ個体を用いて NUAK2 アンチセンスモルフォリノを投与したところ、致死的な表現型を示し、in vivo における NUAK2-MYPT1 の重要性が示唆された。以上の結果から NUAK2 はサイトカインによって誘導活性化されることにより MYPT1 を介して細胞骨格を制御し炎症時の血管内皮の恒常性維持に関わっていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this research project, I examined the role of cytokine-induced kinase NUAK2 in endothelial cells. When NUAK2 was knocked down in endothelial cells, loss of actin stress fiber and decrease in phosphorylation of myosin light chain were observed. Furthermore, I identified several auto-phosphorylation sites in NUAK2, which involved in activation of its kinase. I injected antisense morpholino against NUAK2 into the zebrafish allowing live imaging of blood vessels, and they showed lethal phenotypes. These data suggest that NUAK2-MYPT1 axis involves in the regulation of cytoskeletal dynamics in vitro and in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011年度	1,130,000	339,000	1,469,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,360,000	708,000	3,068,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード： 組織・細胞、生体分子、循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

血管を構成する細胞群の中でも血液の血管外漏出を防ぐバリアーとなる血管内皮細胞は、急性の炎症反応において、炎症性サイトカインによって活性化され細胞骨格のリモデリングを引き起こすことが知られている。しかしながら、細胞骨格のリモデリングについては、サイトカインによって誘導される既知の接着分子やケモカインのみでは説明することができず、直接的にその役割を担う分子機構は解明されていない。

そこで、血管内皮細胞を用いてサイトカイン $\text{TNF}\alpha$ によって発現誘導される遺伝子をマイクロアレイ法でスクリーニングし、リン酸化酵素 **NUAK2** を同定した。**NUAK2** はリン酸化酵素であることは明らかにされていたが、その基質は未知であったため、これまでに研究代表者らが開発してきた独自のタンパク質精製技術を用いることにより、さらに **NUAK2** の新規基質のスクリーニングを行い、ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素のサブユニット **MYPT1** を同定した。

NUAK2 はこれまでに知られている **MYPT1** リン酸化酵素 Rho キナーゼとは異なる部位をリン酸化することを明らかにした。

2. 研究の目的

NUAK2 が **MYPT1** をリン酸化することによって、細胞運動の制御機構の中心に位置するミオシンがいかにより制御されているかを種々の培養細胞株を用いて明らかにし、炎症性サイトカインによって活性化される血管内皮細胞の機能にどのように関わっているかを、初代培養血管内皮細胞およびゼブラフ

イッシュを用いて検討し、高血圧や動脈硬化などの生活習慣病に対する薬剤や治療法の開発の基盤とする。

3. 研究の方法

(1) **NUAK2-MYPT1** シグナルの細胞骨格ダイナミクスにおける役割の解明

種々の培養細胞株において、RNA 干渉法により **NUAK2** をノックダウンし、**GFP** 融合タンパク質を用いた蛍光顕微鏡のタイムラプス観察を行い、接着斑やアクチンの動態を検討する。また、**MYPT1** リン酸化抗体を作成しそのリン酸化の挙動と細胞骨格タンパク質の挙動との相関についても検討する。

(2) **NUAK2** 活性化機構の解明

多くのリン酸化酵素は、何らかのシグナルによりそのコンフォメーションを変え、「活性化」する。その活性化機構の解明は、リン酸化酵素阻害剤の開発につながる。**NUAK2** は自己リン酸化される性質を利用して、*in vitro* リン酸化反応とタンパク質精製技術を組み合わせ、自己リン酸化部位の同定を試みる。

(3) 炎症反応における **NUAK2-MYPT1** シグナルの細胞骨格ダイナミクス制御機構の解明

単層シートを形成した初代培養血管内皮細胞を用いて、炎症性サイトカインによって刺激されたときの、血管透過性の亢進にかかわる **NUAK2-MYPT1** の役割を明らかにする。

(4) *in vivo* 血管内皮における **NUAK2-MYPT1** の役割の解析

研究代表者らはこれまでにゼブラフィッシュをモデルとした心血管系の機能解析技術を確立してきた。In vivo における血管内皮の挙動を追跡できる GFP を発現するゼブラフィッシュを利用し、アンチセンスモルフォリノや mRNA の受精卵へのインジェクションを行い、その表現型の解析を蛍光顕微鏡のライブイメージングにて解析する。

4. 研究成果

(1) NUAK2-MYPT1 シグナルの細胞骨格のダイナミクスにおける役割の解明

HeLa 細胞を用いて RNA 干渉法により NUAK2 の遺伝子発現を抑制したところ、細胞形態が著明に変化しており、免疫染色やアクチン分子の蛍光タイムラプス観察の結果から、アクチンストレスファイバーの消失とミオシン軽鎖のリン酸化が減弱していることが明らかとなった。NUAK2 はミオシン軽鎖の脱リン酸化酵素である MYPT1 を負に制御して、細胞骨格を制御していることが示唆される。研究代表者らはこれまでに NUAK2 による MYPT1 の新たなリン酸化部位を同定していることから、その MYPT1 リン酸化部位変異体を作成し、上記の細胞に導入しさらに詳細なメカニズムの検討を試みた。しかしながら MYPT1 変異体は細胞への導入がいささか困難であり、今後機能解析可能な MYPT1 変異体の細胞への導入方法を検討していく。

(2) NUAK2 の活性化機構の解明

これまでの検討により明らかとなっている NUAK2 の自己リン酸化が活性化機構に大きく寄与していると考え、NUAK2 の自己リン酸化部位の同定を試みた。大腸菌により作成した NUAK2 タンパク質を精製し in vitro リン酸化反応と HPLC を組み合わせて解析を行い、いくつかの候補部位を同定した。さ

らに候補部位の変異タンパク質を作製し in vitro リン酸化反応を繰り返し行ったところ、数か所の自己リン酸化部位が存在することが明らかとなっている。今後はこの自己リン酸化部位が NUAK2 の活性化にどのように関わっているか、すなわち MYPT1 のリン酸化にどのように影響するかについて自己リン酸化部位変異体を培養細胞に導入して検討していく予定である。

(3) 血管内皮細胞における NUAK2-MYPT1 の役割の解明

NUAK2-MYPT1 のシグナルが、培養血管内皮細胞において果たす役割を明らかにするために、ヒト臍帯血管内皮細胞の初代培養系を使用した。血管内皮細胞において NUAK2 の遺伝子発現を抑制したところ、HeLa 細胞での検討と同様の表現型、すなわち細胞形態の著明な変化を示した。この表現型に対する種々の MYPT1 リン酸化変異体を用いたレスキュー実験を試みた。

(4) in vivo 血管内皮における NUAK2-MYPT1 の役割の解析

ゼブラフィッシュを用いた in vivo 血管内皮細胞の機能アッセイ系を立ち上げ、進化的にゼブラフィッシュでも保存されている NUAK2-MYPT1 の in vivo における機能解析を開始した。NUAK2 アンチセンスモルフォリノの投与は、顕著な致死的表现型を示し、in vivo における NUAK2 の重要性が示唆された。しかしながら、致死的表现型では血管内皮の形態や発生における機能解析を行うことはできない。今後はアンチセンスモルフォリノの投与方法を検討し、胎生期の血管内皮の挙動を追跡していく予定である。

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)

1. Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Shimizu K, **Kato H**, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N, Minamino T. Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. *J Control Release*. (2011), *in press*. 査読有

2. Higo S, Asano Y, **Kato H**, Yamazaki S, Nakano A, Tsukamoto O, Seguchi O, Asai M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Minamino T, Komuro I, Kitakaze M, Takashima S. Isoform-specific intermolecular disulfide bond formation of heterochromatin protein 1 (HP1). *J Biol Chem*. (2010) 285:31337-47. 査読有

3. Nakano A, **Kato H**, Watanabe T, Min KD, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Kaibuchi K, Mochizuki N, Kitakaze M, Takashima S. AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nat Cell Biol*. (2010) 12:583-90. 査読有

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 久和 (Kato Hisakazu)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号 : 30589312