

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700407

研究課題名(和文) 超高感度リン酸化定量法の開発：単離平滑筋細胞の生化学的解析を目指して

研究課題名(英文) Development of highly sensitive methods for phosphorylation analysis

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウシ毛様体筋は素早い応答と持続的な張力維持という収縮特性を持つ平滑筋である。この収縮の調節の分子機序の解明を目指し、我々が開発してきた高感度リン酸化定量法を用いてリン酸化解析を行った。ウシ毛様体筋においてはカルバコール誘導性収縮、並びにイオノマイシンによるCa²⁺誘導性収縮いずれにおいても収縮弛緩に伴うミオシン軽鎖のリン酸化に大きな変化が見られなかった。また、ミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤も収縮を抑制することはできなかった。このことは毛様体筋が他の平滑筋とは異なる収縮弛緩調節機序を持っていることを強く示唆している。

研究成果の概要(英文)：Bovine ciliary muscle has unique contractile properties characterized by rapid response to stimuli and sustained contraction. In this study, to address the molecular mechanisms of contraction, I performed phosphorylation analysis by using highly sensitive quantification methods which we have developed. In bovine ciliary muscle, no significant changes were observed in myosin light chain phosphorylation in carbachol-induced or ionomycin-induced contractions regardless of contraction and relaxation. Furthermore, inhibition of myosin light chain kinase could not attenuate contraction, suggesting that ciliary muscle has a unique regulatory mechanisms.

研究分野：生理学

キーワード：平滑筋 毛様体筋 リン酸化 ミオシン

1. 研究開始当初の背景

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。

“微小平滑筋”はその大きさに反比例して、特に高度に機能分化しており、その多様な機能を反映して収縮・弛緩応答も特異なものとなっている。様々な微小平滑筋の収縮・弛緩特性の分子機序を明らかにすることは、その組織に対する生理学・病態生理学的な知見を与えるだけでなく、平滑筋の“多様な収縮特性の源”を考える上でも重要な知見をもたらすと期待される。

平滑筋の収縮・弛緩はモータータンパク質であるミオシンのリン酸化・脱リン酸化によって制御されているという「ミオシンリン酸化調節モデル」が広く受け入れられている(図1)。

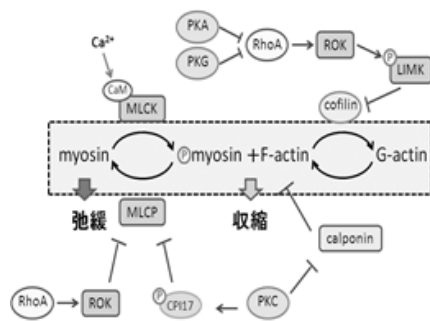


図1 平滑筋収縮調節のシグナル伝達モデル

また、ミオシンのリン酸化状態を決めるミオシン軽鎖キナーゼ MLCK やミオシン軽鎖ホスファターゼ MLCP の活性は収縮刺激の種類に応じて、上流にあるそれぞれの活性調節因子によって調節されている。このような調節因子のいくつかはリン酸化によって制御されている。

一方、最近ミオシンのリン酸化以外の収縮調節系が関与している例が報告されている(1)。

2. 研究の目的

本研究では、筆者が最近開発した超高感度のリン酸化定量法(2-4)を用いて、これまで測定が困難であった“微小平滑筋組織”、特に毛様体平滑筋における収縮調節タンパク質のリン酸化状態を定量的に調べ、平滑筋収縮調節の分子機序を明らかにすることを目的とする。

毛様体筋は目の遠近調節に関わる平滑筋で、素早く、且つスムーズな収縮・弛緩応答と収縮状態を長時間持続するという性質を併せ持っており、他の多くの平滑筋とは異なる収縮特性を持っている。

3. 研究の方法

(1)等尺性張力測定 新鮮なウシ摘出眼球より毛様体筋切片を作成し、等尺性張力を測定した。カルバコール(CCh)やイオノマイシンにより刺激を行い、収縮を誘導した。

(2)リン酸化解析 等尺性張力を測定中の任

意の点で -80°C に冷却した 10% TCA / acetone を用いて急速凍結し、反応を停止した。1xSDS サンプルバッファーを用いて、タンパク質を抽出し、Phos-tag 電気泳動法によりリン酸化タンパク質を分離した。目的とするタンパク質はウェスタンブロッティングにより検出し、画像解析によりリン酸化タンパク質量を定量した。

4. 研究成果

(1) ウシ毛様体筋におけるミオシン軽鎖のリン酸化

①コリン作動薬であるカルバコール($2\ \mu\text{M}$)刺激により収縮させた毛様体筋のミオシンのリン酸化状態を弛緩時(基底状態、および EGTA により細胞外 Ca^{2+} を除いた状態)と比較した(図2)。CCh 収縮時は他の平滑筋で見られるのと同程度の高いリン酸化レベルであった。一方、弛緩状態である基底状態ではリン酸化の若干の減少は見られたが、統計的な有意差はなく、また、そのレベルは他の平滑筋の弛緩時よりも明らかに高いレベルのままであった。EGTA により細胞外 Ca^{2+} を除去した状態でもその傾向は変わらず、ウシ毛様体筋はミオシンのリン酸化以外の収縮弛緩調節機構を持っている可能性が示唆された。

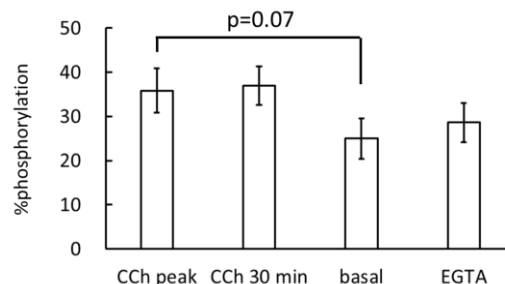


図2 CCh 刺激時のミオシンのリン酸化

②多くの平滑筋ではアゴニスト刺激時には Ca^{2+} -CaM/MLCK 系の活性化以外に Ca^{2+} 感受性亢進機構が活性化されることが知られている。先にみられた特殊なミオシンのリン酸化レベルがこのような複雑な系を介して起こっているのかを検証するため、ウシ毛様体筋の Ca^{2+} 依存性収縮について検討した。

Ca^{2+} イオノフォアであるイオノマイシンで毛様体筋を処理すると緩やかに張力が増加し、持続的な収縮が見られる。この時、外部の Ca^{2+} を EGTA により除去すると毛様体筋は速やかに弛緩し、再び Ca^{2+} を戻すと弛緩前の張力に戻る(図3A)。それぞれの点で反応を停止しミオシンのリン酸化を測定した(図3B)。イオノマイシンで収縮した状態のミオシンのリン酸化レベルは未処理の基底状態のものと同差がなかった。また、イオノマイシン処理中に EGTA により細胞外 Ca^{2+} を除去し、完全に弛緩した状態でもミオシンのリン酸化レベルに変化は見られなかった。

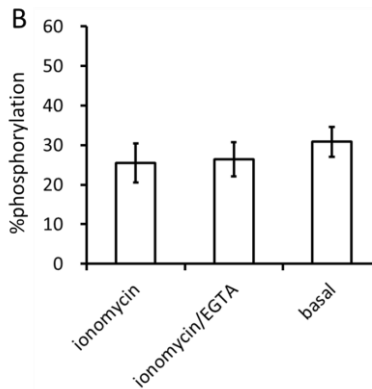
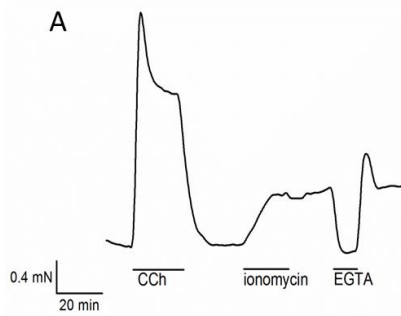


図3 イオノマイシン処理によるCa²⁺依存性ミオシンリン酸化

(2)ウシ毛様体筋収縮に対するキナーゼ阻害剤の作用

①MLCK 阻害剤 ML7 の作用

ウシ毛様体筋の収縮弛緩に伴うミオシンのリン酸化に変化が見られなかったことから、ウシ毛様体筋ではCa²⁺-CaM 依存性のMLCK の活性化が収縮に関与していない可能性が考えられた。そこでMLCK の阻害剤であるML7 の毛様体筋収縮に対する作用を検討した。図4に示す通り、ML7はCCh誘導性収縮に対して全く影響を与えなかった。

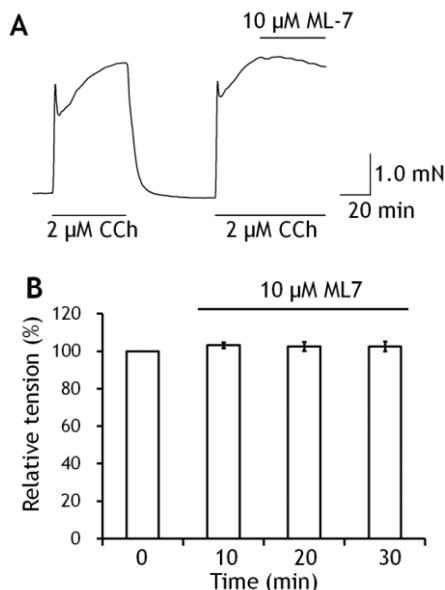


図4 MLCK 阻害剤 ML7 の作用

②Rho キナーゼの阻害剤 Y27632 の作用

ウシ毛様体筋ではミオシンのリン酸化によらない収縮・弛緩調節機構の関与が示唆された。そこで、次にRho キナーゼの阻害剤であるY27632 の作用を調べ、Rho キナーゼの収縮調節への関与を検討した(図5)。Y27632 は濃度依存的に毛様体筋のCCh誘導性収縮を減弱したが、高濃度にしても収縮を完全に抑制することはできず、30 μM でも張力は約50%残っていた。

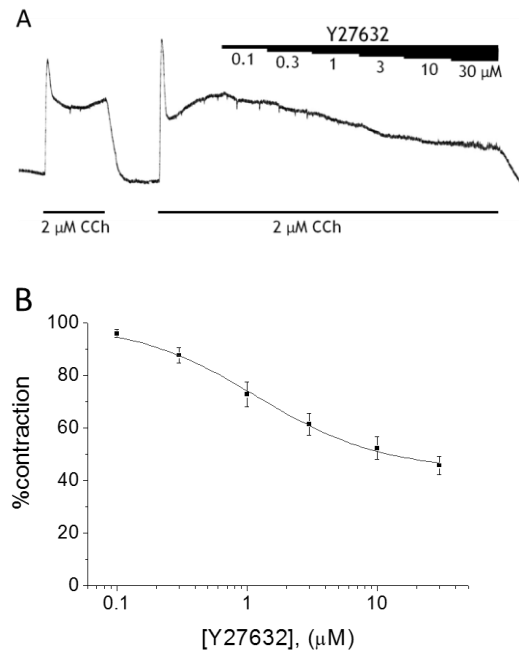


図5 Rho キナーゼ阻害剤 Y27632 の作用

(3)まとめ

多様な機能分化を見せる微小平滑筋の一つであるウシ毛様体筋の収縮・弛緩調節の分子機序を解明するため、高感度リン酸化定量法を用いてミオシンのリン酸化を中心に解析を行った。その結果ウシ毛様体筋では収縮弛緩に伴うミオシンリン酸化量に変化が見られなかった。また、他の平滑筋でミオシンのCa²⁺依存性リン酸化を担っているMLCK に対する阻害剤も収縮に対する抑制作用を示さなかった。これらの結果からウシ毛様体筋においてはミオシンリン酸化非依存的な収縮制御因子の存在が強く示唆されたが、まだその因子の同定には至っていない。

<引用文献>

- (1) Walsh MP *et al. Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **300**:F73-85, 2011
- (2) Takeya K *et al. Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **294**:F1487-1492, 2008
- (3) El-Yazbi AF *et al. J. Physiol.* **588**:1747-1762, 2010
- (4) Johnson RP *et al. J. Physiol.* **587**:2537-2553, 2009

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 竹谷浩介、石田美織、宮津基、高井章、ウシ毛様体平滑筋に対する PP2A 阻害剤の作用、第 57 回日本平滑筋学会総会、2015 年 8 月 25~28 日、山口県
- ② Kosuke Takeya、Akira Takai、Myosin phosphorylation dependent and independent smooth muscle contraction. 第 91 回日本生理学会大会、2014 年 3 月 16~18 日、鹿児島県
- ③ 竹谷浩介、高井章、平滑筋収縮・弛緩制御の分子機序の解明を目指したリン酸化シグナル解析、第 55 回日本平滑筋学会総会、2013 年 8 月 6~8 日、北海道
- ④ 竹谷浩介、ウシ毛様体筋におけるミオシンのリン酸化、第 54 回日本平滑筋学会総会、2012 年 8 月 2~3 日
- ⑤ 竹谷浩介、ウシ毛様体筋におけるミオシンのリン酸化、第 13 回細胞運動系研究交流セミナー、2012 年 7 月 7~8 日

[その他]

ホームページ等

http://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/p_hys1/profiles/takeya.htm

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