

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461656

研究課題名(和文) 筋収縮調節タンパク質のリン酸化を指標とした酸素感受性動脈管の収縮弛緩のメカニズム

研究課題名(英文) Analyses of Contractile Protein Phosphorylation in Ductus Arteriosus and Pulmonary Artery

研究代表者

竹内 大二 (Takeuchi, Daiji)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40328456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：動脈管は酸素感受性であり、胎児の血液を肺動脈から大動脈にバイパスし、生後血液中酸素の上昇などにより収縮する。HSP27は満期胎児動脈管や接続する肺動脈や大動脈に高発現する。動脈管と肺動脈のHSP27のリン酸化は、胎児の成熟につれて漸増した。満期胎児肺動脈では動脈管よりリン酸化が亢進していたが、新生仔ではほぼ消滅した。HSP27のリン酸化と筋収縮の傾向は一致しており、肺動脈の胎児では収縮し、生後の拡張を説明する。HSP27のリン酸化はp38 MAPKパスウェイにより制御にされると考えられる。動脈管と肺動脈におけるHSP27やミオシン制御軽鎖のリン酸化状態は異なり、筋収縮制御の違いを示唆する。

研究成果の概要(英文)：The ductus arteriosus (DA) ejects blood from the right ventricle to bypass the pulmonary artery. At birth, functional closure of the DA is initiated by circulatory increase in pO₂. HSP27 was expressed to a relatively higher extent in the DA than in the adjacent aorta (Ao) and pulmonary arteries (PA).

Phosphorylation level of HSP27 was higher in the fetal PA than in fetal DA. Interestingly, phosphorylation of HSP27 was lesser in newborn PA but not in the DA. Since phosphorylation of HSP27 promotes contraction of smooth muscles, the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, which regulates phosphorylation of HSP27, might regulate constriction/dilation of fetal and newborn PA. In this study, distinct phosphorylation status of HSP27 and myosin regulatory light chain proteins was found in fetal and newborn rabbit DA and PA, suggesting a diverse mechanism regulating the vascular tone of the DA and PA.

研究分野：循環器小児科学

キーワード：動脈管 リン酸化 筋収縮蛋白質

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈管は胎性期の低酸素状態で開き、生後酸素に反応して収縮する。一方、肺動脈は胎生期低酸素状態で収縮しており、生後血中酸素分圧が上昇すると拡張する。また、臍帯動脈は胎盤や胎児の酸素供給需要に合わせて収縮弛緩する。血管平滑筋の収縮弛緩は血管抵抗を制御し、胎児の発育や心機能に大きな影響を与える。しかし、動脈管と肺動脈の酸素に対する反応の違いや臍帯動脈の収縮弛緩の機序には不明な点が多い。

(2) 血管平滑筋の収縮弛緩は Ca^{2+} によって媒介されている。膜が脱分極すると細胞外から細胞内へ流入する Ca^{2+} が増加する。また細胞膜に存在する交感神経や副交感神経受容体が刺激されると刺激伝達系によりシグナルが小胞体に伝達され、小胞体からの Ca^{2+} 放出が増加し、細胞内 Ca^{2+} が増加する。成熟した平滑筋では細胞膜から流入する Ca^{2+} が小胞体に存在するリアノジン受容体を刺激して Ca^{2+} を放出し、イノシトール 3 リン酸が筋小胞体の Ca^{2+} 放出をうながし細胞内 Ca^{2+} が増加する。細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、 Ca^{2+} -カルモジュリン複合体が形成され、ミオシン軽鎖キナーゼを活性化してミオシン調節軽鎖 (LC20) をリン酸化することにより、平滑筋が収縮する。

(3) 血管平滑筋の収縮は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加とは別に、 Ca^{2+} に対する感受性増加によっても制御されている。即ち、GTP 結合蛋白 (GTP-Rho A や GTP-Rho B) は Rho キナーゼを活性化し、Rho キナーゼの活性化はミオシン軽鎖フォスファターゼの調節サブユニットである MYPT1 をリン酸化することにより、不活性化する。すると、みかけのミオシン軽鎖キナーゼの活性が上昇し、ミオシン軽鎖のリン酸化が維持されることにより、収縮がうながされる (Ca^{2+} 感受性亢進)。(表 1)

表1 筋収縮制御タンパク質のリン酸化とその作用

分類	筋収縮制御タンパク質			リン酸化			
	タンパク質の名前	遺伝子	MW (kDa, kD)	リン酸化	リン酸化酵素	リン酸化の役割	リン酸化は平滑筋を?
アクチン結合タンパク質	Caldesmon	CALD1 (variant 1)	93.2	Ser759	PKC, MAP kinases (p38, ERK p42, ERK p44)	ミオシンとアクチンとの結合が減る。平滑筋の ATPase 活性の阻害を解除する。	収縮
				Ser789 (major)			
				Ser735	Casein kinase II		
			Thr83				
	Calponin	CNN1	33.2	ser175	protein kinase C (calcium/calmodulin kinase II (CaMKII))	平滑筋の ATPase 活性の阻害を解除する。	収縮
	Tropomyosin	TPM1-4 (variant 1)	32.7	Ser283 (TPM1)	MAP kinases (ERK p42, ERK p44)	リン酸化トログミオシンの方が、ATPase 活性を活性化する。	収縮
	Myosin light chain, regulatory	MYL12B	19.8	Ser19	Ca^{2+} -calmodulin 活性化した MLC kinase (リン酸化は、MLC phosphatase (による))	ATPase を活性化する	収縮
低分子量ヒートショックタンパク質 (sHSP)	HSP27	HSPB1	22.8	Ser15 Ser78 Ser82	p38 MAP kinase, MAPKAP kinase-2	収縮、遊走を活性化	収縮
	HSP20	HSPB6	17.1	Ser16	cAMP-dependent protein kinase (PKA) cGMP-dependent protein kinase (PKG)	収縮を阻害する。	弛緩

(4) 酸素感受性の動脈管や臍帯動脈の平滑筋細胞の収縮機構の研究は、多くは薬理学 (1980-現在 門間・豊島ら多数)・生理学・分子生物学的なもの (Coceani et al 1970-, RI Clyman et al 1977-, S Archer et al 2002-, EK Weir et al 2006-など) であり、生化学的にタンパク質のリン酸化をターゲットとした詳細な研究はまだない。

(5) 平成 22-23 年度若手研究 (B) を遂行し、臍帯動脈の血管の収縮弛緩に関する遺伝子群の発現を筋小胞体と Rho キナーゼ系について検討した。Rho 系に大きな変動はないが、筋小胞体の Ca^{2+} 貯蔵・放出に関わる複数の遺伝子の発現量は、血管ごとに胎仔の発達に従って変動することが判明した。臍帯動脈の筋小胞体の Ca^{2+} を貯蔵し放出する能力・機能は、未熟・成熟胎児では異なると予想される。

(6) 連携研究者らのこれまでに研究成果から、満期胎仔動脈管には、 β トロポミオシンが高発現することが明らかとなっている。 β トロポミオシンは、アクチンに結合し、h-カルデスモンと相互作用し¹、筋収縮弛緩を制御するタンパク質の一つであり^{1,2}、平滑筋細胞、心筋細胞、骨格筋細胞に高発現する。筋収縮制御タンパク質の多くは、リン酸化によって機能が変化する。低分子量ヒートショックプロテイン (HSP) の一つである HSP27 は、骨格筋や平滑筋に高発現し、アクチンに結合、リン酸化により収縮を調節する。酸化ストレスで生じる活性酸素種などの刺激は、HSP27 をリン酸化し筋収縮を促進する。動脈管における筋収縮制御タンパク質のリン酸化の変動は酸素感受性に連動している可能性がある。臍帯動脈や動脈管などの胎児に特有な血管は、酸素濃度の変化などの外部からの刺激に対し、主にどのパスウェイによって収縮弛緩を行っているのか。リン酸化/脱リン酸化は筋タンパク質の収縮の制御を担うことから、このリン酸化を詳細に検出すれば、刺激によって動くパスウェイが判明する可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、酸素感受性の血管である動脈管が酸素濃度の変化に応じて収縮弛緩する機序を、筋収縮調節タンパク質群のリン酸化を指標にして詳細に検討することである。血管の収縮は血管平滑筋のミオシン-アクチン結合から生まれる。そのミオシンのアクチンとの結合を調節するミオシン調節軽鎖 LC20) やリン酸化により収縮を制御する HSP27 のリン酸化状態を検討することにより、酸素感受性の血管の収縮の機構 (パスウェイ) の一端を生化学的に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 血管試料の採取：ラット妊娠 21 日 (成熟) 胎仔、並びに日本白色家兔妊娠 21 日 (未熟)、27 日、30 日 (満期) 胎仔を、麻酔下の母獣から採取した。子宮からとり出した胎仔並びに生後 1 又は 2 日目の新生仔は、麻酔投与により安楽死させた後、氷冷した。動脈管・主肺動脈・下行大動脈などの大血管を冷生理的食塩液中で実体顕微鏡下速やかに採取し、血液などの付着成分をできる限り除去した。血管試料の一部には、収縮・弛緩を誘導する刺激を与えて、リン酸化蛋白質検出のための試料とした。また、試料の一部は、

RNAlater (Ambion) 中で -20°C に保存し mRNA 及びタンパク質の分析試料とした。一部の主肺動脈、動脈管、大動脈の一連の血管組織を、リン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液で固定し免疫染色用試料とした。タンパク質抽出用試料は液体窒素で急速凍結し -80°C で保存した。

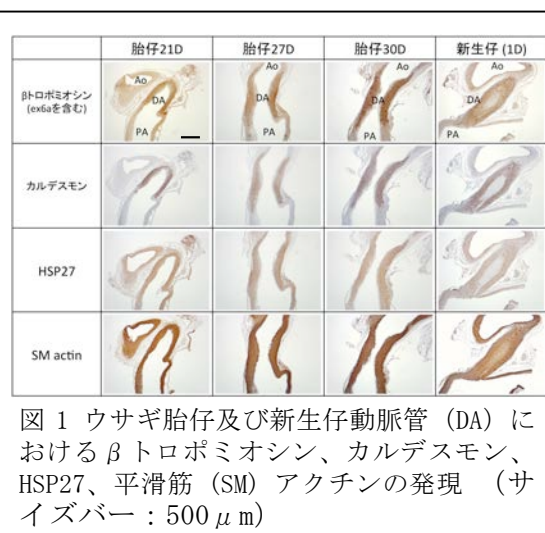
(2) 収縮・弛緩を誘導する刺激として、50 mmol/L 塩化カリウム、200 nmol/L エンドセリン 1 (ET1)、NO を発生させ強力な血管拡張作用を持つニトロプルシド (1 mmol/L) を添加した、 Ca^{2+} を含む Krebs-Henseleit 緩衝液中で 37°C 所定時間、血管試料を培養した。

(3) 蛋白質試料の調製と電気泳動：RNAlater 中に保存した組織試料から total RNA 抽出後、冷アセトン沈殿法によりタンパク質を回収し、タンパク質試料として用いた。タンパク質のみを抽出する組織又は細胞試料の場合は、直接 5-10 倍量の 7M 尿素、4% CHAPS、脱リン酸化阻害剤 (5 mM Sodium fluoride, 1 mM Sodium orthovanadate, 5 mM Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate) を含む HEPES 緩衝液、pH8.6 を用いてホモジナイズし、タンパク質を可溶化した。抽出タンパク質は、タンパク質濃度を測定 (Bradford ultra, Novexin) 後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および phos-tag SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分離した。Phos-tag SDS-PAGE は、phos-tag アクリルアミドとマンガンイオンを含むアクリルアミドゲルを用いた SDS 電気泳動法であり、金属イオンがリン酸基を捕捉することにより、リン酸化タンパク質の泳動が遅延することから、リン酸化タンパク質を非リン酸化タンパク質から分離することができる。泳動分離されたタンパク質バンドをウェスタンブロッティング法により PVDF 膜に転写、3% スキムミルクを含む TBST でブロッキング後、1:100 ~ 1:1000 希釈した各抗体とインキュベートし、TBST 洗浄後 HRP 標識二次抗体を用いた化学発光法により検出した。

(4) 免疫染色：PFA 固定試料をパラフィン包埋し、薄切切片 ($4\mu\text{m}$) を作製した。脱パラフィン後、 98°C 45 分間賦活化 (イムノセイバー) し、内在性のペルオキシダーゼ活性を阻害するために 0.3%過酸化水素液処理を 30 分間行った。3% BSA を含む TBST を用いてブロッキング後、 β トロポミオシンモノクローナル抗体 (M07, clone 3C8, Abnova)、抗カルデスモンモノクローナル抗体 (Sigma)、抗 HSP27 マウス抗血清、抗平滑筋アクチンモノクローナル抗体 (ab18460-1, Abnova) を一次抗体として、VECTASTAIN Elite ABC Mouse IgG Kit を用いてペルオキシダーゼ (DAB) 染色を行い、ヘマトキシリンカウンター染色後、脱水・透徹、封入した。

4. 研究成果

(1) 免疫染色法を用いてウサギ胎仔及び新生仔の動脈管における β トロポミオシン、カルデスモン、HSP27、平滑筋アクチンの発現を検討した (図 1)。胎仔の成熟に伴い動脈管における β トロポミオシンの発現が増え、満期胎仔の動脈管では特に高発現していた。新生仔の動脈管では閉鎖した内腔側中膜部分で発現が減少していたが、外膜側の中膜では高発現していた。トロポミオシンと結合して平滑筋を弛緩させるカルデスモンの分布は、 β トロポミオシンとよく一致し、動脈管において周囲の肺動脈や大動脈に比べて高い発現を示した。 β トロポミオシンとカルデスモンは、動脈管において共発現していると考えられる。HSP27 は動脈管や肺動脈において大動脈よりやや高発現し、未熟胎仔の動脈管に比べて満期胎仔で発現が高く、新生仔で発現はやや低下していた。平滑筋アクチンは、血管中膜のマーカーである。



(2) HSP27 のリン酸化を phos-tag 電気泳動法により検討した。筋収縮制御タンパク質のカルデスモンがリン酸化されると、アクチンとトロポミオシンの結合様式が変わり、アクチンがミオシンと結合し収縮力を生じる。活性酸素などの刺激により、HSP27 はリン酸化されて筋収縮を促す。胎仔及び新生仔の動脈管と肺動脈における HSP27 の発現 (図 2A) とリン酸化 (図 2B) を結果の図に示した。

胎仔の成熟に比例して HSP27 の発現量は、動脈管肺動脈のいずれにおいても増加し、成獣の肺動脈で高発現していた。図 2B は $50\mu\text{M}$ phos-tag を含む 10% SDS-PAGE で分離した結果であり、リン酸化された HSP27 が分離されている。成獣の肺動脈には少なくとも 3 つの異なるリン酸化状態の HSP27 が存在していた。胎仔動脈管と肺動脈のリン酸化 HSP27 バンドを、同日齢試料間で比較すると、肺動脈でよりリン酸化が進んでいた。HSP27 のリン酸化が筋収縮を促すとすれば、胎仔の肺動脈は収縮傾向であり、胎仔の動脈管は拡張傾向であると考えられる。興味深いことに、生後 1 日の新生仔肺動脈の HSP27 のリン酸化は、極め

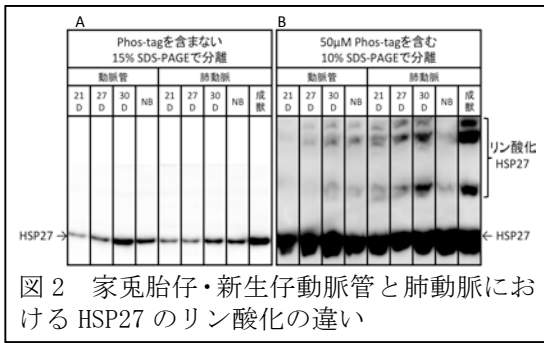


図2 家兎胎仔・新生仔動脈管と肺動脈における HSP27 のリン酸化の違い

て減弱していた。新生仔の肺動脈は肺へ血液を盛んに送っており、その血管平滑筋は拡張していると考えられることから、HSP27 の非リン酸化は肺動脈平滑筋の弛緩の傾向と一致していた。しかし、成獣の肺動脈の HSP27 は、胎仔や新生仔に比べてリン酸化が進んでいたことから、一概に「リン酸化=収縮」と考えるより、収縮弛緩がほぼ一定の状態から急激に拡張に移る際に HSP27 の非リン酸化が生じると考えるべきかもしれない。新生仔の動脈管の HSP27 のリン酸化は、満期胎仔と同レベルであった。これらの結果から、動脈管に比べて肺動脈において、HSP27 のリン酸化による筋収縮制御がより強く寄与するのではないかと考えられる。HSP27 のリン酸化は、p38 mitogen- activated protein kinase (分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ, MAPK) パスウェイによって制御されることが報告されている³。P38 MAPK パスウェイは、サイトカインによる刺激や紫外線照射、酸化・熱・浸透圧ストレスなどによって活性化される。P38 MAPK は、胎仔の動脈管拡張を促すプロスタグランジン E1 によっても活性化されること⁴から、胎仔の肺動脈においては、血中プロスタグランジン濃度の増加に伴って、P38 MAPK パスウェイが活性化し、HSP27 がリン酸化し、平滑筋の収縮状態の維持に役立っているのではないかと考えられる。また、誕生時の血中プロスタグランジン E1 濃度の減衰により、P38 MAPK パスウェイが不活化すると、HSP27 のリン酸化が減弱して、肺動脈の拡張に寄与するのではないかと考えられる。

収縮・弛緩を誘導する刺激として、50 mmol/L 塩化カリウム、200 nmol/L エンドセリン 1、ニトロプルシド (1 mmol/L) を添加した、Ca²⁺を含む Krebs-Henseleit 緩衝液中で 37°C 所定時間、家兎成獣下行大動脈試料を培養した結果を図 3 に示した。エンドセリン 1 との 15 分間の培養により、リン酸化が減衰していた。ニトロプルシド添加の場合もリン

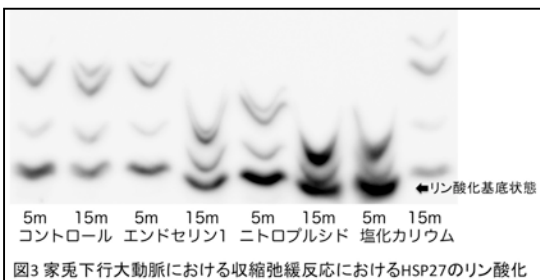


図3 家兎下行大動脈における収縮弛緩反応における HSP27 のリン酸化

酸化は経時的に減衰していたが、エンドセリンの場合にはバンド強弱の割合や位置が異なっていた。塩化カリウム添加の場合、5 分間の培養で強い脱リン酸化の傾向がみられ、15 分間ではコントロールと同等のリン酸化に戻っていた。このように HSP27 のリン酸化は、刺激の種類や期間により極めて敏感に変動することがわかった。(図 3)

(3) 平滑筋の収縮制御タンパク質のリン酸化で最もよく知られているのが、ミオシン制御軽鎖のリン酸化である。細胞外からの Ca²⁺流入や筋小胞体からの Ca²⁺放出により、平滑筋の細胞質内の Ca²⁺レベルが上昇すると、Ca²⁺はカルモジュリンと結合し複合体を形成する。この複合体がミオシン軽鎖キナーゼを活性化し、ミオシン制御軽鎖をリン酸化する。リン酸化ミオシンはアクチンと反応して ATPase 活性を増し ATP を分解する。産生した ATP 由来のエネルギーを利用して平滑筋は収縮する。細胞内の Ca²⁺レベルが低下し、フォスファターゼで脱リン酸化されると収縮が停止し、平滑筋の弛緩が起きる。動脈管と肺動脈のミオシン制御軽鎖のリン酸化を phos-tag 電気泳動法により検討した(図 4)。

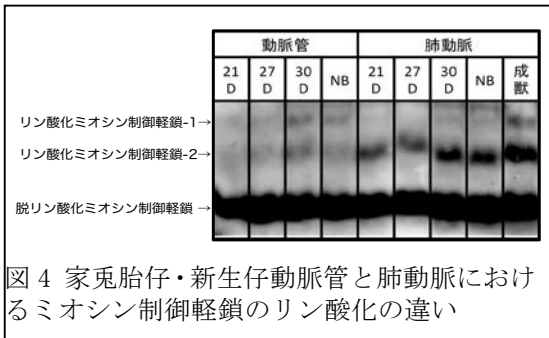


図4 家兎胎仔・新生仔動脈管と肺動脈におけるミオシン制御軽鎖のリン酸化の違い

動脈管においては、リン酸化したミオシン制御軽鎖を示す 2 バンドが低濃度ではあるが観察された。胎仔・新生仔の肺動脈では泳動の速い方のリン酸化ミオシン制御軽鎖バンドが明瞭であり、成獣の肺動脈では 2 バンドが明らかであった。これらの結果から、胎仔の動脈管と肺動脈のミオシン制御軽鎖のリン酸化の状態は、異なっていることが判明した。胎仔肺動脈は、発達レベルの同じ胎仔動脈管に比べて、ミオシン制御軽鎖の 1 種類のリン酸化が進んでおり、これは胎仔の肺動脈平滑筋が収縮傾向にあることを示すと考えられる。しかし、HSP27 のリン酸化とは異なり、新生仔のミオシン制御軽鎖のリン酸化は、満期胎仔と同等であった。ミオシン制御軽鎖のリン酸化と HSP27 のリン酸化は、平滑筋の収縮弛緩の制御に寄与するが、これらの結果は、リン酸化による制御を行うパスウェイが異なっていることを示唆していると思われる。成獣の肺動脈では、2 種類のリン酸化のバンドが明らかでありリン酸化が進んでいる。ミオシン制御軽鎖のリン酸化も、HSP27 と同じく成獣では血管拡張が必要な場合に脱リン酸化により対応するのではないだろう

か。ミオシン制御軽鎖のリン酸化は、ミオシン軽鎖キナーゼに依存するが、Rho キナーゼ系もミオシン軽鎖ホスファターゼの活性を抑制することにより、ミオシン制御軽鎖のリン酸化を亢進する。動脈管と肺動脈におけるミオシン制御軽鎖の2つのリン酸化の割合の違いは、これら2つのパスウェイによるミオシン制御軽鎖のリン酸化（=収縮拡張の制御）の違いを示すのではないだろうか。

結論

満期胎仔動脈管では、 β トロポミオシン及びカルデスモンは、周囲の肺動脈や大動脈に比べて高発現し、その発現部位はよく一致していた。HSP27は、動脈管にやや高発現であるが、肺動脈や大動脈にも高発現していた。

動脈管と肺動脈では、3つの異なるリン酸化HSP27がみつき、胎仔の成熟につれてリン酸化は増加する傾向を示した。満期胎仔の肺動脈では動脈管よりHSP27のリン酸化が亢進していた。新生仔の肺動脈のHSP27のリン酸化はほぼ消滅し、動脈管では満期と同等のリン酸化が検出された。HSP27のリン酸化は主に肺動脈の収縮弛緩の傾向と一致しており、HSP27のリン酸化を制御するp38 MAPKパスウェイがこの収縮制御に関与している可能性が考えられた。胎仔、新生仔の動脈管と肺動脈では、ミオシン制御軽鎖のリン酸化のパターンが異なることが示された。

本研究の結果、胎仔・新生仔の動脈管と肺動脈におけるHSP27とミオシン制御軽鎖のリン酸化が異なっていることが明らかとなった。動脈管と肺動脈における筋収縮制御の状況が異なっていることを示唆すると考えられる。

<引用文献>

- ① Gunning P, O'Neill G, Hardeman E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol Rev.* 2008;88:1-35
- ② Lees-Miller JP, Helfman DM. The molecular basis for tropomyosin isoform diversity. *Bioessays.* 1991;13:429-437

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

- ① 羽山恵美子、中西敏雄、Phos-tag SDS-PAGEを用いた動脈管・肺動脈の筋収縮制御タンパク質のリン酸化の検討、第50回日本小児循環器学会年会、2014年7月3日～5日、岡山コンベンションセンター（岡山県・岡山市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 大二 (TAKEUCHI, Daiji)
東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：40328456

(2) 研究分担者

中西 敏雄 (MAKANISHI, Toshio)
東京女子医科大学・医学部・研究生
研究者番号：90120013

(3) 連携研究者

羽山 恵美子 (HAYAMA, Emiko)
東京女子医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：00349698