

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：32680

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670128

研究課題名(和文)細胞核分裂に関与するミオシン軽鎖キナーゼの役割

研究課題名(英文)Role of the myosin light chain kinase (MLCK) participating in cellular multiplication

研究代表者

小浜 一弘 (Kohama, Kazuhiro)

武蔵野大学・薬学研究所・客員教授

研究者番号：30101116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)の役割を検討するために、PDBu処理で形成されるポドソーム(Pod)等について解析し、1)A7r5細胞のPDBu誘導Pod形成にMLCKの存在が必須、2) PDBu処理によるMatrix Metalloproteinases (MMP)活性の上昇、3)アクチン細胞骨格の崩壊又はMMP活性阻害剤(MMPI)によるPodに共存するアクチンとMMPの消失、4) PDBuによるA7r5細胞の収縮増強とMMPIによる同増強の阻害を観察した。また、5) DNAアレイ解析により、モルモット由来血管平滑筋細胞のMLCKの発現抑制によるmRNAの安定性の増加の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the biological roles of myosin light chain kinase (MLCK), we analyzed events such as the PDBu-induced formation of protruding podosomes (Pod), and observed the followings: 1) MLCK is essential in PDBu-induced Pod formation in rat vascular smooth muscle cell line A7r5 cells ; 2) PDBu increases MMP activity; 3) destruction of actin cytoskeleton or use of Galardin, a broad-spectrum MMP activity inhibitor, prevented the coexistence of actin and MMP in the Pod; 4) PDBu increased contraction of A7r5 cells but Galardin suppressed such an enhancing effect of PDBu in these cells. 5) In addition, from DNA microarray analysis, the possibility that suppression of MLCK expression enhances mRNA stability in guinea pig vascular smooth muscle cells was suggested.

研究分野：循環薬理学

キーワード：細胞骨格 アクトミオシン系 ミオシン軽鎖キナーゼMLCK 血管細胞 細胞内情報伝達 MMPs ポドソーム

1. 研究当初の背景

ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) には、ミオシン結合部位及びミオシン軽鎖をリン酸化する部位以外に、カルモジュリン結合部位及びアクチン結合部位があり、細胞分裂や細胞遊走等にも重要な役割を果たすとされている。血管平滑筋の病態生理ではその増殖は重要な課題であり、この細胞にも MLCK が制御因子として存在するが、増殖における機能は十分には解明されていない。種々の方法で血管平滑筋細胞 (VSMC) の MLCK の発現を阻害したところ、予想に反して、細胞増殖の亢進を観察したり。即ち、MLCK は増殖には阻害因子として作用すると考えられた。

本研究では、平滑筋の細胞増殖等における MLCK やアクチン細胞骨格、Matrix metalloproteinase (MMP) 等の関与について、MLCK の発現を抑制した VSMC 及び動脈硬化等への関与が考えられる平滑筋細胞の podosome 等を対象として検討した。

MMP は Zn^{2+} を酵素活性中心に含む蛋白質分解酵素で不活性型の pro-MMP があり、これの切断により活性化した MMP が作られる。MMP にはいくつかの分子量の isoform があり、細胞外マトリックス (ECM) を溶解し活性化するため、細胞運動と結びつけられている。近年では細胞運動は血管の再構築を変化させるため発癌のメカニズムの1つとして注目を集めている²⁾。

一方、血管平滑筋ではアクチン繊維が細胞内でその骨格として存在し、これと相互作用するアクチン結合蛋白質が多く知られている。MMP と細胞増殖の関係は以前より報告はあるものの、MMP が細胞外に分泌され ECM に作用する酵素であるためか、細胞内にあるアクチンとの相互作用に関する報告は殆どなかった。

血管平滑筋はホルボールエステル (PDBu) によりゆっくりした収縮が引き起こされ、また、細胞膜外に podosome と称される突起 (内部に発達したアクチン骨格が存在) が出現する。podosome を抗 MMP 抗体で染色すると MMP が大量に存在することが、また、抗アクチン抗体で染色した場合は核を横切るアクチン細胞骨格が観察される。さらに、抗アクチン抗体と抗 MMP 抗体の二重染色により、アクチンと MMP が共存していることが示唆されている。

2. 研究の目的

ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) の役割を検討するために、(1) podosome 形成における MLCK の役割をその発現を抑制した VSMC で検討し、さらに、(2) 血管平滑筋細胞に podosome の形成を誘導した場合に、核内 MMP がアクチン細胞骨格をレールにする trafficking により、podosome に移動するとの仮説をたて、これをサポートするデータを収集することとした。また、(3) MLCK のノックアウト (KO) が血管平滑筋細胞の遺伝子発現に与える影響について、DNA マイクロアレイ解析を行って検討した。具体的には、以下のとおりである。

(1) podosome 形成における MLCK の役割の検討

モルモット血管平滑筋細胞 (VSMC) 及びラット由来大動脈平滑筋 (A7r5) 細胞の MLCK の発現を抑制し、PDBu 刺激による podosome 形成への影響を検討した。

(2) 血管平滑筋細胞の podosome の形成への MMP、アクチン細胞骨格の影響の検討

1) 培養 A7r5 細胞を PDBu で刺激した後、MMP-2、-9、-14 蛋白質の発現量、MMP 活性及び mRNA 量の変化等を解析した。

2) 共焦点蛍光顕微鏡により podosome 内のアクチンと MMP の存在量を定量し、2 者に関係づける実験を行った。

3) アクチン細胞骨格を破壊する薬物 (Latrunculine) により、アクチン細胞骨格が podosome 形成に与える影響を調べた。もう1つの細胞骨格であるチューブリン網を破壊し、アクチン細胞骨格を破壊した場合の podosome への影響と比較した。

4) MMP の酵素活性の阻害剤を用い、MMPs の細胞骨格に作用する蛋白質としての機能について検討を加えた。

(3) MLCK の KO が血管平滑筋細胞の遺伝子発現に与える影響の検討

モルモット VSMC の MLCK KO 細胞及び野生株細胞における MLCK の発現、並びに MLCK の KO が遺伝子発現に与える影響を検討するために、以下①及び②の DNA アレイ解析を行った。

① transcriptome (TRC) 解析：全 RNA を対象

② translatoome (TLN) 解析：3 つ以上の ribosome が結合した mRNA を対象

3. 研究の方法

(1) podosome 形成における MLCK の役割の

検討

A7r5 (ラット由来大動脈平滑筋) 細胞の MLCK の発現を検討するため、siRNA をトランスフェクトして抑制した細胞を作製した。この細胞について、PDBu を曝露前後 (podosome 形成誘導前後) の MLCK 及び α -アクチンの局在を、抗 MLCK 抗体及び抗 α -アクチン抗体を用いて蛍光抗体法で観察した。また、MLCK のキナーゼ活性を阻害する ML-9 を添加した場合の podosome 形成への影響を同様に検討した。

(2) 血管平滑筋細胞の podosome の形成への MMP、アクチン細胞骨格の影響の検討

1) A7r5 細胞 (ATCC, Manassas, VA)

を Dulbecco's modified Eagles medium (Invitrogen, Carlsbad, CA)+10%ウシ胎仔血清の条件で培養し、培養 A7r5 細胞のライセートを SDS-PAGE で分離した後、ウエスタン・ブロット法及び gel zymography³⁾により MMP 活性を解析した。

2) 培養 A7r5 細胞の MMP 活性は、FITC でラベルしたゼラチン (MMP 基質) でコートしたガラス板上で培養した A7r5 細胞について MMP 活性により分解される FITC 蛍光を測定する方法でも解析した。

3) MMP-2、-9、及び-14 をコードする mRNA を定量するため、Platinum-RT キット (Invitrogen 社)を用い RT-PCR を行った。

4) podosome が形成されている A7r5 細胞の収縮測定については、A7r5 細胞をコラーゲン・ゲル内で培養し、文献 4)で示した方法により、細胞の収縮能を解析した。

(3) MLCK の KO が VSMC(血管平滑筋細胞) の遺伝子発現に与える影響の検討

レトロウイルス・ベクターにモルモット (GP) の MLCK に対する siRNA をデザインしてそれを組み込んだコンストラクトを GP の VSMC に遺伝子導入し、MLCK KO 細胞を作製した。

TRC (transcriptome) 解析では、常法に従い、KO 細胞及び野生株細胞から総 RNA を抽出し、DNA アレイ解析を行った。TLN (translatome) 解析では、両細胞の細胞質を調製し、ショ糖密度勾配遠心法により 3 個以上の ribosome が結合した mRNA (≒翻訳中の mRNA) を分離し、DNA アレイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) podosome 形成における MLCK の役割の

検討

A7r5 細胞に PDBu で podosome を誘導すると、podosome のアクチンと MLCK の局在がほぼ一致していた。A7r5 細胞の MLCK の発現を siRNA で抑制すると、PDBu 曝露による podosome 形成が抑制された (図 1)。

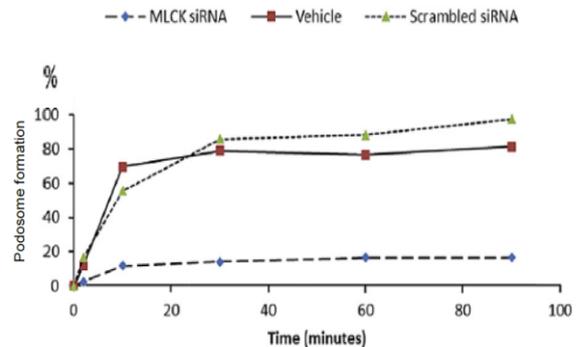


図 1

この podosome 形成は、MLCK によるミオシン軽鎖のリン酸化を ML-9 で阻害しても抑制されなかったため、MLCK のキナーゼ部位は podosome 形成に関与しないことが明らかになった。この結果は、アクチン結合部位を含む MLCK のペプチドの導入が podosome 形成の抑制を回復した結果と共に、MLCK のキナーゼ活性ではなく MLCK のアクチン結合部位が podosome 形成に関与することを支持するものである。

(2) 血管平滑筋細胞の podosome の形成への MMP、アクチン細胞骨格の影響の検討

1) ホルボールエステル (PDBu) 曝露により A7r5 細胞に引き起される変化

培養 A7r5 細胞を $10^{-7}M \sim 10^{-5}M$ の PDBu に曝露すると、podosome が形成されることを確認した。

PDBu 処理の細胞及び無処理細胞 (Control) についてウエスタン・ブロットを行い、MMPs の発現を解析した (図 2-A)。

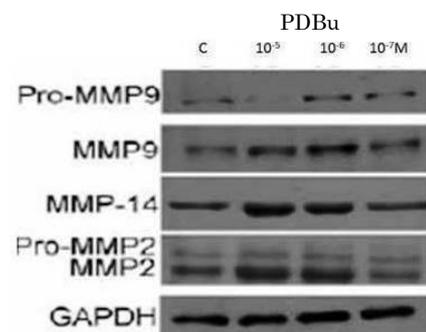


図 2-A

PDBu の存在下では Control に比べ、MMPs

(MMP-2、-9 及び-14) の発現量が増加していた。MMPs の前駆体の Pro MMPs (MMP-2、-9 及び-14) も同様に増加していた。Gel zymography 法により MMPs の MMP 活性を測定し、相対値をグラフに示した (図 2-B)。MMP 活性が PDBu 刺激後に上昇していることが確認された。

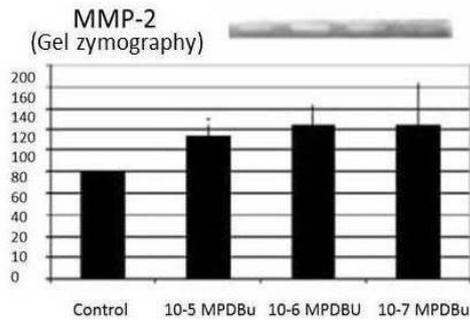


図 2-B

次に、PDBu 刺激による MMPs の発現増加が、コードする mRNA の増加を伴っているかどうかを PCR 法により検討した。MMP-2、MMP-9 及び MMP-14 をコードする mRNA 量を定量したところ、PDBu 刺激の有無による発現量の変化は観察されなかった (図 2-C)。以上により、PDBu 刺激による MMPs 等の量の増加は translation 後におけるタンパク質の安定性等の変化等によると考えられた。

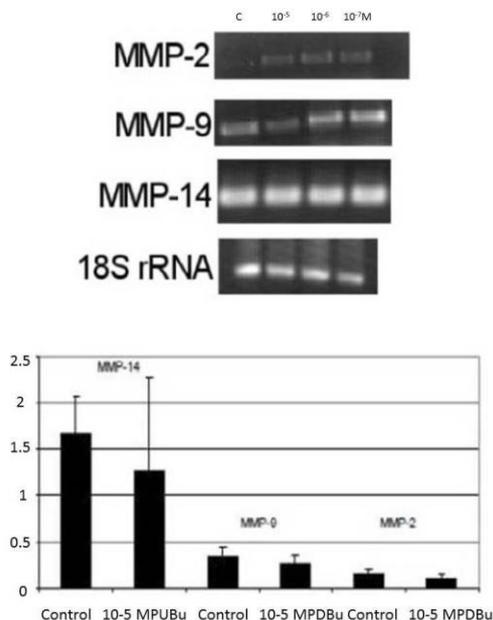


図 2-C

2) MMPs と α -アクチンの局在の解析

PDBu で A7r5 細胞を刺激すると、抗 MMPs 抗体により細胞周辺に形成される podosome

が染色される。同様に抗 α -アクチン抗体で染色し、同抗体と抗 MMP-9 抗体の染色像を Merge させると両者の局在が重なっていた (図 3-A の黄色い染色像)。

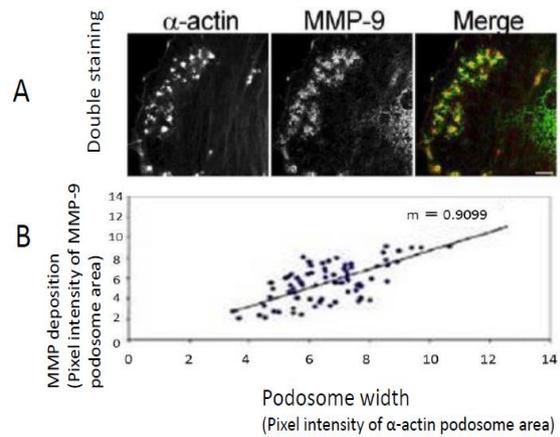


図 3

また、MMP-9 について pixel 当りのそれぞれの蛍光強度を縦軸としてプロットした (図 3-B) と、傾斜 (m) は 0.9099 であり、MMP-9 と α -actin の局在に強い相関があることが明らかになった。この相関は、podosome において MMPs がその先端に向かって移動するという考えをサポートすると考えられた。

3) アクチン細胞骨格の切断と MMPs の局在

細胞内のアクチン細胞骨格を切断した場合の MMP 及び α -アクチンの局在の変化等をそれぞれの抗体を用いて観察した (図 4)。

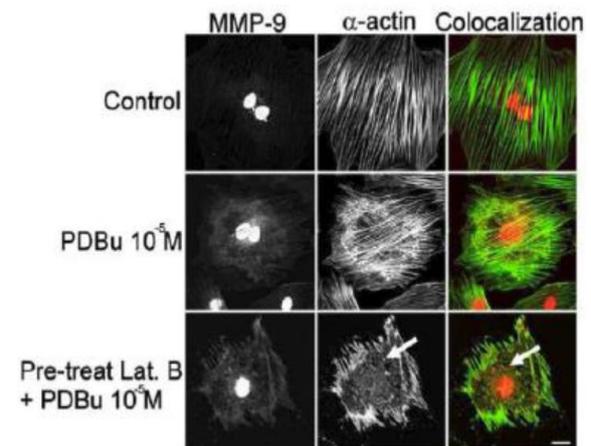


図 4

A7r5 細胞の control では、MMPs (MMP-9 を典型例として用いる) は核に存在しており、繊維状の細胞骨格として α -actin 網がみられた。両者の局在の重なり (黄色) は、核のみ観察された。ここで細胞を PDBu に曝露す

ると細胞周辺部に podosome が形成されるが、その細胞周辺部に MMP-9 と α -actin が存在し、同じ部分に局在（共存）していた（黄色染色部分）。podosome が形成されている細胞にアクチン繊維を切片する薬物（Latrunculin B : Lat.B）を添加すると、細胞内のアクチン網が増え、細胞周辺部の podosome は形成されずに分散していた（矢印）。Merge 写真では、赤色のドットがみられるが、この染色は MMP-9 に対応するものと考えられる。図 2-C では、PDBu 刺激で MMPs の mRNA の増加は観察されなかったため、成果(2)-2) に示した MMPs の podosome への移動をサポートするものと解釈した。

もう一つの細胞骨格として、細胞内チューブリン網がある。PDBu 存在下で培養した A7r5 細胞を PDBu に曝露すると、アクチン網と同様のチューブリン網の形成が確認された。また、podosome も多数形成された。この細胞を Colchicine で処理すると、チューブリン網が切断された。しかし、podosome は細胞内に残り、また抗 MMP 抗体で赤く染色される構造が残っていた（data not shown）。

4) MMP の酵素阻害剤の作用

幅広いスペクトルの MMP 活性の阻害薬である Galardin (Gal) について、podosome 形成に与える影響を解析した。図 5-A は、各種濃度の Gal(0~1000nM) の処理によって PDBu により形成された podosome を有する細胞の割合 (%) を示す。Gal 処理によりこの割合が減少していたことから、podosome 形成と MMP 活性とが関係することが明らかになった。これを確認するために、FITC でラベルしたゲラチン基質上で A7r5 を培養し、PDBu を曝露し podosome を形成させ、MMP 活性を測定した。その結果、斑点状の degradation spot が増加、即ち MMP の活性の上昇が観察され、また、その活性の上昇は、Gal 処理によって斑点の減少 (=MMP 活性の阻害) がみられた（図 5-B）。

5) PDBu 曝露による A7r5 細胞の収縮への影響

コラーゲン・ゲル内で A7r5 細胞を培養し、収縮を測定する方法を用い、PDBu 曝露による A7r5 細胞の収縮を検討したところ、control に比べ 1.4 倍の収縮が観察された（図 5-C）。一方、Gal の存在下では control と同程度となり、収縮の増強はみられなかった。この結果から、MMP 活性の阻害が収縮にも影響することが明らかになった。また、

podosome の形成が収縮にも影響を与えることを、はじめて明らかにした。

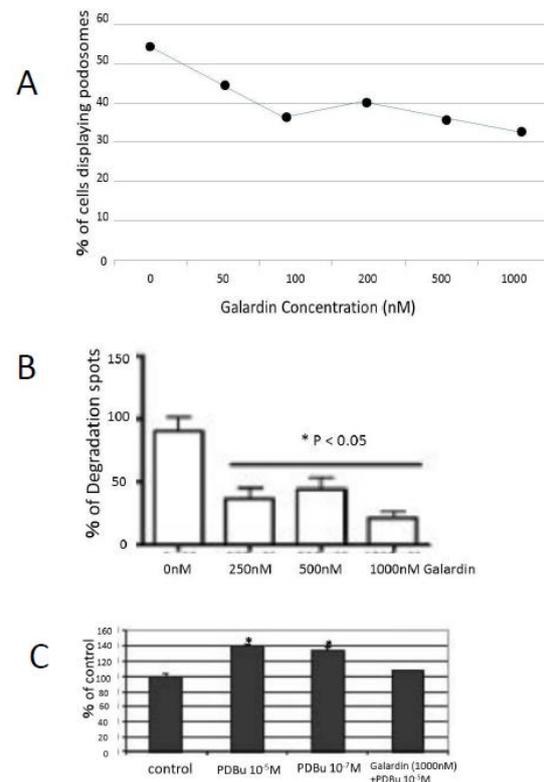


図 5

(3) MLCK の KO が血管平滑筋細胞の遺伝子発現に与える影響の検討

モルモットの VSMC の DNA アレイ解析では、ヒトやマウスに比べ、現時点では遺伝子の情報量が少ないため、MLCK 関連遺伝子としては、以下の 3 種類のみが解析可能であった。

- ① MLCK family member 4-like
- ② MLCK 2, skeletal/cardiac muscle-like
- ③ putative MLCK 3-like

KO 細胞及び野生株細胞における MLCK の発現については、TCR 解析では MLCK ノックアウトにより多少の変動が観察され、TLN 解析では KO 細胞と野生株細胞のいずれもバックグラウンドに比べ 1.5 倍程度の変動であった。しかし、いずれも DNA アレイ解析データのシグナルの値が低いため、これらのデータのみでは、MLCK 発現に関して議論することはできないため、ELISA 法等を用いた確認を行う予定である。

MLCK のノックアウトが遺伝子発現に与える影響を検討したところ、KO 細胞において 2 倍以上の up regulation が観察された遺伝子数は、TRC 解析及び TLN 解析でそれぞれ 1075 及び 2537 であり、TLN 解析で 2 倍

以上多かった (図 6)。一方、down regulation された遺伝子数は、TRC 解析及び TLN 解析でそれぞれ 1299 及び 1567 と大きな差はなかった。



図 6

KO 細胞及び野生株細胞における MLCK の発現については、既にウエスタン・ブロット法で発現がほぼ完全に抑制されていることを確認しているが、今般の DNA アレイ解析ではツール側の限界により、信頼のおけるデータを得ることができなかった。ヒト又はマウスの血管平滑筋細胞で MLCK ノックアウト細胞を作製し、同様の検討を行う必要があると考える。

MLCK のノックアウトが遺伝子発現に与える影響については、up regulation が観察された遺伝子で MLCK の発現抑制により ribosome が 3 つ以上結合した mRNA の遺伝子数が増えたことから、mRNA の安定性が高まっている可能性が考えられた。今後、さらに詳細に検討する予定である。

<引用文献>

- 1) Wang HH, Nakamura A, Yoshiyama S, Ishikawa R, Cai N, Ye LH, Takano-Ohmuro H, Kohama K. Down-regulation of myosin light chain kinase expression in vascular smooth muscle cells accelerates cell proliferation: requirement of its actin-binding domain for reversion to normal rates. *J Pharmacol Sci.* 2012; 119(1):91-6. Epub 2012 Apr 18.
- 2) Galis ZS, Khatry JJ (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res* 90:251-262.
- 3) Zhang HJ, Zhao W, Venkataraman S, Robbins ME, Buettner GR, (2002) Activation of matrix metalloproteinase-2 by overexpression of manganese

superoxide dismutase in human breast cancer MCF-7 cells involves reactive oxygen species. *J Biol Chem* 277:20919-20926.

- 4) Li S, Moon JJ, Miao H, Jin G, Chen BP, (2003) Signal transduction in matrix contraction and the migration of vascular smooth muscle cells in three-dimensional matrix. *J Vasc Res* 40:378-388.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、分担研究者は下線)

[雑誌論文] 計 3 件

- 1) H Tanaka, H H Wang, S E. Thatcher, H Hagiwara, H Takano-Ohmuro, K Kohama. Electron microscopic examination of podosomes induced by phorbol 12,13 dibutyrate on the surface of A7r5 cells. *J.Pharmacol Sci.*128,78-82 (2015) 査読有
- 2) Y Zhao, C Zhang, X Wei, P Li, Y Cui, Y Qin, X Wei, M Jin, K Kohama & Y Gao. Heat shock protein 60 stimulates the migration of vascular smooth muscle cells via Toll-like receptor 4 and ERK MAPK activation. *Sci.Rep.* 5:15352 DOI:10.1038 / srep 15352 (2015) 査読有
- 3) SE Thatcher, JE Black, H Tanaka, K.Kohama, ME Fultz, LA Cassis, and Wright GL. Matrix Metalloproteinases -14, -9 and -2 are localized to the podosome and involved in podosome development in the A7r5 smooth muscle cell. *J of Cardiobiology*, 5(1) 1-10(2017). 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小浜 一弘 (KOHAMA, Kazuhiro)
武蔵野大学・薬学研究所・客員教授
研究者番号: 30101116

(2) 研究分担者

大室 弘美 (TAKANO-OHMURO, Hromi)
武蔵野大学・薬学研究所・教授
研究者番号: 00124470

懸川 友人 (KAKEGAWA, Tomohito)
城西国際大学・薬学部・教授
研究者番号: 8016939