

2) 微小平滑筋におけるシグナル伝達の高感度定量解析法の開発

代表研究者 竹谷 浩介

【背景と目的】

平滑筋は生物のあらゆる器官に広く分布しており、収縮・弛緩を介して様々な生命維持活動に重要な役割を果たしている。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分子のリン酸化によって制御されている。平滑筋ミオシンはリン酸化されるとスイッチがONになり、平滑筋の収縮を引き起こす。逆にミオシンが脱リン酸化されるとスイッチがOFFになり平滑筋は弛緩する。このようなミオシンのスイッチの

ON/OFF は上流にあるミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) とミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) の活性のバランスによって決まる。また、これらの酵素の活性もさらに上流のシグナル伝達によって制御されていることから、これらのシグナル伝達経路の解明が、平滑筋収縮・弛緩の制御メカニズムを明らかにする上で必須となる。

微小平滑筋は高度に機能分化しており、その収縮・弛緩の制御機構も他の平滑筋とは大きく異なっていることが予想される。微小平滑筋の研究はその微小な大きさ故、これまでは主に薬理学的手法に依存せざるをえなかった。しかし、必ずしも選択性・特異性の高い薬剤が使用できるわけではなく、また、複雑に絡み合ったシグナル伝達経路にあつては、得られた結果の解釈は複雑で、議論の元となっている。本研究では、この議論の答えを導くための“直接的な証拠”、即ちシグナル伝達における生化学的な変化（リン酸化など）を“高感度”かつ“定量的”に検出する新規手法の開発を目指した。

#### 【実験方法】

本研究では微小平滑筋であるウシ毛様体筋（眼球の遠近調節に関わる平滑筋）を実験材料として平滑筋収縮制御関連タンパク質のリン酸化定量法の開発とシグナル伝達解析を行った。

#### 【結果と考察】

##### 1. MYPT1 のリン酸化定量法の開発の試み

MLCP の活性調節サブユニットである MYPT1 のリン酸化解析法の開発を目的に、ウシ毛様体筋から MYPT1 の cDNA クローニングを行った。得られた cDNA から MYPT1 の大量発現系を構築し、精製 MYPT1 を用いてリン酸化定量法の開発を試みている。MYPT1 は Thr696 と Thr853 がリン酸化され MLCP の活性を抑制している。これらのリン酸化をリン酸化数、並びにリン酸化部位に応じて分離・定量するためリン酸親和性タグ (phos-tag) SDS 電気泳動法による分離条件を検討している。

##### 2. ミオシンリン酸化シグナル解析

ウシ毛様体筋におけるミオシンの高感度リン酸化解析は筆者が以前開発した phos-tag SDS 電気泳動による手法<sup>1)</sup>により行った。

コリン作動薬であるカルバコール (CCh) で収縮させた毛様体筋のミオシンリン酸化レベルを弛緩時（基底状態、および EGTA により細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を除いた状態）と比較した。CCh で収縮させた毛様体筋におけるミオシンのリン酸化は約  $54.6 \pm 3.7\%$  ( $\pm$  SEM) で、他の平滑筋で収縮が見られるときと同程度の高いリン酸化レベルであった。一方、弛緩状態のリン酸化レベルは基底状態で  $42.1 \pm 3.0\%$ 、EGTA 存在下で  $46.1 \pm 2.2\%$  であり、他の平滑筋の弛緩時よりも明らかに高いレベルにあった。

このような弛緩時でも高いレベルのミオシンリン酸化が維持されている例としては、ウサギ尿道括約筋が知られている<sup>2)</sup>が、非常に希な事例である。これらの平滑筋ではミオシンのリン酸化・脱リン酸化とは異なるメカニズムで収縮・弛緩が制御されている可能性が高い。現在開発中の高感度リン酸化定量法を用いることで、このような特異な平滑筋のシグナル伝達機構も詳細に調べることが出来ると期待される。

#### 【参考文献】

- 1) Takeya K. *et al.* A highly sensitive technique to measure myosin regulatory light chain phosphorylation: the first quantification in renal arterioles. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294: F1487-1492, 2008
- 2) Walsh MP. *et al.* Rho-associated kinase plays a role in rabbit urethral smooth muscle contraction, but not via enhanced myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 300: F73-85, 2011