

学 位 論 文 題 名

Tyrosine phosphorylation as a convergent pathway of heterotrimeric G protein- and *rho* protein-mediated Ca^{2+} sensitization of smooth muscle of rabbit mesenteric artery

(ウサギ腸間膜動脈平滑筋における三量体G蛋白および *rho* 蛋白を介した Ca^{2+} 感受性増強機構におけるチロシンキナーゼの役割に関する研究)

学位論文内容の要旨

血管平滑筋の収縮機構において、myosin light chain (MLC)のリン酸化は中心的役割を果たしている。 Ca^{2+} /calmodulin 依存性 MLC kinase により MLC はリン酸化され、actomyosin ATPase を活性化させることにより収縮が生じ、また MLC phosphatase の活性化により脱リン酸化され弛緩する。細胞内 Ca^{2+} の上昇が MLC kinase / phosphatase 活性比の増加を介して収縮性に重要な働きをしているが、アゴニストによる血管収縮の程度は細胞内 Ca^{2+} レベルの変化とは必ずしも平行せず、血管平滑筋の Ca^{2+} 感受性を調節する機構が考えられている。アゴニストによる Ca^{2+} 感受性増強効果は guanosine 5'-O-(2-thiodiphosphate) (GDP_βS)によって抑制され、また、guanine 5'-triphosphate (GTP) あるいはその非水解性類似物質である guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) ($\text{GTP}_\gamma\text{S}$)によってもアゴニストと同様な Ca^{2+} 感受性増強効果が認められる。このことから、アゴニストによる収縮蛋白の Ca^{2+} 感受性増強には、それぞれの受容体に結合している三量体G蛋白の活性化が重要な役割を果たしていると考えられているが、G 蛋白以下の細胞内情報伝達系に関しては十分な検討がなされていない。

本研究では G 蛋白の Ca^{2+} 感受性増強効果における細胞内情報伝達系に関して、ウサギ上腸間膜動脈平滑筋のスキンドファイバーを用いて薬理学的手法により検討した。

方法は、ニュージーランド白色ウサギをペントバルビタール麻酔後、上腸間膜動脈を摘出し、長さ 1.5 - 2.0mm、幅 0.4 - 0.5mm の筋線維束を β -escin (50 μM)で 30 分間処理することによりスキンドファイバー標本を作成した。標本の一端を張力トランスジューサーに結合し、種々の濃度の Ca^{2+} 溶液や薬物を作用させて、等尺性収縮による張力を測定した。また、*Clostridium botulinum* C3 酵素の ADP リボシル化反応を検討するため、スキンドファイバー標本に対し C3 酵素 (1 μg / ml)存在下あるいは非存在下に NAD (10 μM)を 30 分間、続いて ^{32}P -NAD を 30 分間反応させた。その後、電気泳動を行い、オートラジオグラフィーを施行した。また、抗 *rhoA* 抗体によるウェスタンブロット法もあわせて行った。

スキンドファイバー標本を C3 酵素と ^{32}P -NAD で処理すると、約 23 kDa に相当する部位

に ^{32}P の集積が認められた。抗 *rhoA* 抗体によるウエスタンブロット法にても同部位にバンドが認められたことから、C3 酵素は主に *rho* を ADP リボシル化させるものと考えられた。そして NAD 存在下に C3 酵素で前処置することにより、C3 酵素による [^{32}P]-ADP リボシル化反応はほぼ消失したことから、この条件下では C3 酵素はほぼ全ての *rho* を ADP リボシル化するものと考えられた。

GTP γ S は 0.3 μM Ca^{2+} 溶液における収縮を濃度依存性に増強させ、10 μM にて最大効果を示した。また、張力- $[\text{Ca}^{2+}]$ 反応曲線を有意に左方へ移動させた (pCa_{50} : 対照; 6.14 $\pm$ 0.03, GTP γ S (100 μM); 6.50 $\pm$ 0.05. $P < 0.001$)。これらの効果は GDP β S (1 mM)により可逆性に完全に抑制された。NAD 存在下に C3 酵素で 30 分間前処置すると、0.3 μM Ca^{2+} 溶液における収縮にはほとんど影響を及ぼさなかったが、GTP γ S の収縮増強効果は有意に抑制された。特に GTP γ S 10 μM まではほぼ完全に抑制されたが、高濃度 (30 - 100 μM)においては完全には抑制されなかった。

Phenylephrine, histamine も GTP (10 μM)存在下で、0.3 μM Ca^{2+} 溶液における収縮を濃度依存性に増強させたが、これらの Ca^{2+} 感受性増強効果は C3 酵素前処置にてもほとんど影響を受けなかった。

プロテインキナーゼ C (PKC)の選択的阻害薬である calphostin C (1 μM) および staurosporine (20 nM)は、0.3 μM Ca^{2+} 溶液における収縮には影響を及ぼさずに PKC 活性化薬である phorbol ester 12,13-dibutyrate (PDBu) (100 nM) の Ca^{2+} 感受性増強効果を完全に抑制した。しかし、GTP γ S, phenylephrine および histamine による Ca^{2+} 感受性増強効果にはほとんど影響を及ぼさなかった。

Tyrosine kinase 阻害薬である genistein (100 μM), tyrphostin 25 (100 μM)は 0.3 μM Ca^{2+} 溶液での収縮反応や PDBu の Ca^{2+} 感受性増強効果にはほとんど影響を及ぼさずに GTP γ S (100 μM), phenylephrine (1 μM)および histamine (10 μM)の Ca^{2+} 感受性増強効果を完全に抑制した。Genistein の不活性化体である daidzein (100 μM)は GTP γ S の Ca^{2+} 感受性増強効果に対しほとんど影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、GTP γ S の Ca^{2+} 感受性増強効果には主に低分子量 G 蛋白である *rho* の活性化が関与しているのに対し、三量体 G 蛋白を介したアゴニストの Ca^{2+} 感受性増強効果には *rho* の活性化は関与しておらず、それぞれの Ca^{2+} 感受性増強効果は異なる情報伝達系を介しているものと考えられる。高濃度 GTP γ S の Ca^{2+} 感受性増強効果は C3 酵素で完全には抑制されなかったことから、高濃度のときのみ三量体 G 蛋白を介した経路も活性化させる可能性が示唆された。GTP γ S およびアゴニストによる Ca^{2+} 感受性増強効果は、いずれも PKC 阻害薬では抑制されずに tyrosine kinase 阻害薬で抑制されることから、両者は低分子量 G 蛋白 *rho* と三量体 G 蛋白という異なる情報伝達系を介するものの、最終的には tyrosine kinase の活性化に収束するものと結論される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 哲 男

副 査 教 授 北 畠 顕

副 査 教 授 菅 野 盛 夫

学 位 論 文 題 名

Tyrosine phosphorylation as a convergent pathway of heterotrimeric G protein- and *rho* protein-mediated Ca^{2+} sensitization of smooth muscle of rabbit mesenteric artery

(ウサギ腸間膜動脈平滑筋における三量体G蛋白および *rho* 蛋白を介した Ca^{2+} 感受性増強機構におけるチロシンキナーゼの役割に関する研究)

血管平滑筋の収縮機構において、myosin light chain (MLC)のリン酸化は中心的役割を果たしている。 Ca^{2+} /calmodulin 依存性 MLC kinase により MLC はリン酸化され、actomyosin ATPase を活性化させることにより収縮が生じ、また MLC phosphatase の活性化により脱リン酸化され弛緩する。細胞内 Ca^{2+} の上昇が MLC kinase / phosphatase 活性比の増加を介して収縮性に重要な働きをしているが、アゴニストによる血管収縮の程度は細胞内 Ca^{2+} レベルの変化とは必ずしも平行せず、血管平滑筋の Ca^{2+} 感受性を調節する機構が考えられている。アゴニストによる Ca^{2+} 感受性増強効果はそれぞれの受容体に結合している三量体 G 蛋白の活性化が重要な役割を果たしていると考えられているが、G 蛋白以下の細胞内情報伝達系に関しては十分な検討がなされていない。本研究ではウサギ腸間膜動脈平滑筋を用い、GTP γ S およびアゴニストによる G 蛋白を介した Ca^{2+} 感受性増強効果に關与する細胞内情報伝達系について、小分子量 G 蛋白 *rho*, プロテインキナーゼ C (PKC), チロシンキナーゼの関わりについて薬理学的に検討した。方法はウサギ腸間膜動脈を摘出し、長さ 1.5mm、幅 0.4mm の筋線維束を β -escin で処理することによりスキンドファイバー標本を作成し、等尺性収縮による張力を測定した。また、*Clostridium botulinum* C3 酵素の ADP リボシル化反応を検討するため、スキンドファイバー標本に対し C3 酵素と ^{32}P -NAD を反応させ、電気泳動を行い、オートラジオグラフィーを施行した。また、抗 *rhoA* 抗体によるウエスタンブロット法もあわせて行った。

スキンドファイバー標本を C3 酵素と ^{32}P -NAD で処理すると、約 23 kDa に相当する部位に ^{32}P の集積を認め、抗 *rhoA* 抗体によるウエスタンブロット法にても同部位にバンドが認められたことから、C3 酵素は主に *rho* を ADP リボシル化させるものと考えられた。GTP γ S

は $0.3 \mu\text{M}$ Ca^{2+} 溶液における収縮を増強させ、この効果は GDP_βS により可逆性に完全に抑制された。 C3 酵素前処置により $\text{GTP}_\gamma\text{S}$ の Ca^{2+} 感受性増強効果は有意に抑制された。 Phenylephrine , histamine のアゴニストもまた GTP 存在下で Ca^{2+} 感受性増強効果を示したが、この効果は $\text{GTP}_\gamma\text{S}$ とは対照的に C3 酵素前処置にてもほとんど影響を受けなかった。 PKC の選択的阻害薬である calphostin C , および staurosporine は、 PKC 活性化薬である $\text{phorbol ester 12,13-dibutyrate(PDBu)}$ の Ca^{2+} 感受性増強効果を完全に抑制したが、 $\text{GTP}_\gamma\text{S}$ およびアゴニストによる Ca^{2+} 感受性増強効果にはほとんど影響を及ぼさなかった。 チロシンキナーゼ 阻害薬である genistein および tyrphostin 25 は $0.3 \mu\text{M}$ Ca^{2+} 溶液での収縮反応や PDBu の Ca^{2+} 感受性増強効果にはほとんど影響を及ぼさずに $\text{GTP}_\gamma\text{S}$ およびアゴニストの Ca^{2+} 感受性増強効果を完全に抑制した。 Genistein の不活性化体である daidzein は $\text{GTP}_\gamma\text{S}$ の Ca^{2+} 感受性増強効果に対しほとんど影響を及ぼさなかった。以上の結果から、 $\text{GTP}_\gamma\text{S}$ の Ca^{2+} 感受性増強効果には主に低分子量 G 蛋白である rho の活性化が関与しているのに対し、三量体 G 蛋白を介したアゴニストの Ca^{2+} 感受性増強効果には rho の活性化は関与しておらず、それぞれの Ca^{2+} 感受性増強効果は異なる情報伝達系を介しているものと考えられる。 $\text{GTP}_\gamma\text{S}$ およびアゴニストによる Ca^{2+} 感受性増強効果は、いずれも PKC 阻害薬では抑制されずに チロシンキナーゼ 阻害薬で抑制されることから、両者は低分子量 G 蛋白 rho と三量体 G 蛋白という異なる情報伝達系を介するものの、最終的には チロシンキナーゼ の活性化に収束するものと結論される。

学位論文の公開発表に際して、副査の北畠教授から心筋と平滑筋における Ca^{2+} 感受性の機序の違いについて、血管平滑筋の Ca^{2+} 感受性増強効果における生理的および病的状態における役割について、 PKC の役割における他の文献との結果の相違の理由についての質問があった。次いで副査の菅野教授からは、本研究の結果はすべての血管に普遍的なものかどうか、 チロシンキナーゼ 阻害剤の臨床応用の可能性についての質問があった。主査の上田教授からは、アゴニストにより実際に チロシンキナーゼ の活性化が生じているのか、また チロシンキナーゼ の標的部位について質問があったが、申請者は実験結果に基づいて、また文献的考察を駆使して誠実かつ概ね適切に回答し得た。

血管平滑筋 Ca^{2+} 感受性の情報伝達系を詳細に検討した本研究は、冠攣縮性狭心症、高血圧などの Ca^{2+} 感受性の亢進しているといわれている病態の解明、治療など、臨床応用に向けての展開に重要な寄与をしようるものと評価される。

審査員一同は、申請者の豊富な学識に併せて、この研究が関連領域研究の進展に与える成果を評価し、申請者が博士（医学）を受けるに十分な資格を有するものと判定した。