

The novel regulation of vascular smooth muscle contraction, phosphoinositide 3-kinase Class II α (PI3K-C2 α)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/17250

【要約】

修士課程優秀論文

血管平滑筋収縮の新しい細胞内制御因子
クラスII α ホスホイノシチド3-キナーゼ (PI3K-C2 α)The novel regulator of vascular smooth muscle contraction,
phosphoinositide 3-kinase class II α (PI3K-C2 α)金沢大学大学院医学系研究科
血管分子生理学

宮澤 秀和, 吉岡 和晃, 多久 和陽

血管作動物質受容体は収縮フィラメントのCa²⁺感受性を調節する細胞内カルシウムイオンは平滑筋収縮をトリガーする主要な因子であり、興奮性(収縮性)受容体作動性生理活性物質や伸展による血管収縮にはこれらの刺激によってひきおこされる細胞内遊離カルシウムイオン濃度([Ca²⁺]_i)の上昇が必須の役割をはたしている。カルシウムイオンは平滑筋の収縮装置であるミオシンフィラメントとアクチンフィラメント間相互作用の活性化を引き起こすことにより、収縮を惹起する。カルシウムイオンによる収縮フィラメント活性化の主要な分子機構は、ミオシン分子の20kDミオシン軽鎖(MLC)サブユニットのリン酸化である。[Ca²⁺]_iの上昇はカルモジュリン依存性リン酸化酵素ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)を活性化することにより、MLCのリン酸化をひきおこす¹⁾。

一方、ノルアドレナリン、エンドセリン等の収縮性受容体アゴニストはカルシウムを動員してMLCKを活性化するとともに、MLC脱リン酸化酵素ミオシン軽鎖ホスファターゼ(MLCP)の抑制を引き起こすことが見いだされた²⁾。筆者らはこのMLCPの抑制が低分子量G蛋白Rhoを介することを初めて報告した。その後、Rhoの下流において活性化されるRhoキナーゼがMLCP調節蛋白MYPT1あるいはCPI-17のリン酸化を媒介することによりMLCPを抑制することが明らかにされた。このように、受容体アゴニストは、MLCPを抑制することによりMLCKによるMLCリン酸化を増強する結果、収縮フィラメントをCa²⁺に対して感作する(Ca²⁺-sensitization)。

カルシウムによるRho活性化とMLCP抑制

収縮性アゴニストの受容体のほとんどは、G蛋白質共役型受容体(GPCR)である。GPCRの活性化により、三量体G蛋白質G_{q/11}-ホスホリパーゼC(PLC)-IP₃を介してカルシウムを動員する。また、GPCRは三量体G蛋白質G_{12/13}を介してRhoを活性化する³⁾。GPCRによるG_{12/13}を介したRho活性化は、G_{12/13}とRho活性化分子であるグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)との直接的な相互作用によるものであり、カルシウムの関与はこれまで考えられていなかった。筆者らは、受容体刺激とは無関係に[Ca²⁺]_iの上昇がRhoの活性化をもたらすユニークな機構が血管平滑筋に存在することを見出した⁴⁾。高K⁺脱分極刺激により細胞内へのカルシウム流入を促進して[Ca²⁺]_iを上昇させると、Rhoが活性化された。KClによるRho活性化は細胞外液カルシウム除去やジヒドロピリジン型Ca²⁺チャネルアンタゴニストによ

って抑制されたことから、Ca²⁺が必須であった。また、カルシウムイオンフォアであるイオノマイシンもKClと同様にRhoを活性化したこともカルシウムによるRho活性化をうらづけた。KClはRhoの下流において、Rhoキナーゼを介してMYPT1、CPI-17のリン酸化を引き起こしてMLCPを抑制した。ノルアドレナリンなどの受容体アゴニストによるRho活性化とMLCP抑制も、部分的にはCa²⁺依存的事であることがわかった。

平滑筋収縮におけるCa²⁺の役割の観点からは、このCa²⁺によるMLCP抑制は、Ca²⁺がMLCリン酸化反応を促進すると同時に脱リン酸化を抑制して効率的にMLCのリン酸化レベルを増加させること、すなわち“Ca²⁺によるCa²⁺感受性増強”(Ca²⁺-induced Ca²⁺-sensitization)を誘発すること示している⁵⁾。

カルシウムによるRho活性化はPI3K-C2 α に依存する

筆者らはカルシウムによるRho活性化を研究する過程で、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)阻害薬であるワートマンニン(WMN)やLY294002が、KClによるRho活性化を強く抑制することを見いだした⁶⁾。WMN、LY294002いずれもKClによるCa²⁺依存性Rho活性化及びMYPT1リン酸化を濃度依存的に抑制してMLCP抑制を阻害し、その容量反応関係はMLCリン酸化ならびに収縮抑制のそれと十分に一致した。また、PI3K阻害薬は、KCl脱分極刺激のみならずノルアドレナリンによる収縮、MLCリン酸化及びRho活性化も抑制した。これらの実験成績から、PI3K阻害薬による血管収縮抑制の主要な機序は、Rhoの抑制とそれによるMLCP抑制の解除であることをつきとめた。

PI3Kには3クラス(I, IIおよびIII)、8つのアイソフォームが存在する。クラスIは、PI3K α 、PI3K β 、PI3K γ 、PI3K δ の4つのアイソフォームからなり、これらはチロシンキナーゼ型受容体やG蛋白共役型受容体の刺激によって活性化され、PI-3,4-P₂、PI-3,4,5-P₃を産生し、蛋白リン酸化酵素Aktや低分子量G蛋白RacのGEFの活性化をひきおこして細胞生存、細胞増殖、細胞運動、アクチン骨格の再編成、グルコース輸送などを制御する。クラスII PI3Kには、PI3K-C2 α 、PI3K-C2 β 、PI3K-C2 γ の3つのアイソフォームがあり、これらの活性化機序および生理機能はほとんど不明のままである。クラスII PI3K酵素はクラスIと異なり、PI-3-P、PI-3,4-P₂を産生する。PI3K-C2 α 、PI3K-C2 β は全身に広汎に発現しているのに対し、PI3K-C2 γ の発現は主として肝に局限している。クラスIIIはVps34と呼ばれる単一のアイソフォームからなり、これはPI-3-Pを産生して細

胞内小胞輸送調節に関わっている。

血管平滑筋収縮、MLCリン酸化及びRho活性化の阻害に要したWMN及びLY294002の濃度は、これまでの培養細胞を対象とした細胞運動や細胞生存抑制を指標とした多くの研究から報告されている濃度よりも約10倍高濃度を要することに筆者らは注目した。また、摘出動脈においても、クラスI PI3Kの下流ではたらくAktの活性化はMLCリン酸化や収縮反応とは異なり、培養細胞で報告されているのと同程度の比較的低濃度のWMNで抑制された。これらの事実から、WMN及びLY294002に対して低感受性のPI3Kアイソフォームが血管平滑筋のRho活性化、MLCリン酸化並びに収縮に関与していると考えられた。ウエスタン法で解析したところ、血管平滑筋には、クラスI PI3K α および β の触媒サブユニットp110 α 及びp110 β 、クラスII PI3K-C2 α 、PI3K-C2 β の4種のアイソフォームが発現していた。この中で、唯一クラスII α のPI3K-C2 α のみは他のすべてのPI3Kアイソフォームと異なり、WMN及びLY294002に対して低感受性を示すことが知られている。実際に、血管から各PI3Kアイソフォームを免疫沈降してこのことを確認した³⁾。さらに、興味深いことに、KClやノルアドレナリンはPI3K-C2 α を活性化したが、PI3K α やPI3K β はむしろ逆に抑制した。これらの結果から、WMN、LY294002によるMLCリン酸化及び収縮抑制作用の標的分子は、PI3K低感受性のPI3K-C2 α である可能性が考えられた。そこで、PI3K-C2 α が収縮に関与しているか否かを、PI3K-C2 α を標的としたRNAi法により直接的に検討した。摘出血管平滑筋組織は遺伝子導入に高度に抵抗性のため、ラミニンを塗布したディッシュ上で無血清培養した収縮能を保持した血管平滑筋細胞を用いた。ノルアドレナリンのみならず細胞内にカルシウムを流入させるイオノマイシンは強い収縮を惹起し、この収縮はRho及びRhoキナーゼに依存した。また、イオノマイシン刺激による収縮は、比較的高濃度のWMN、LY294002によってのみ強く抑制された。すなわち、この分化型培養血管平滑筋細胞のイオノマイシン収縮の性質は、血管平滑筋組織のKCl収縮のそれに類似していた。PI3K-C2 α に特異的な塩基配列のsiRNAは、分化型培養血管平滑筋細胞においてPI3K-C2 α 蛋白の発現を抑制し、ノルアドレナリン及びイオノマイシンによる収縮を抑制した。PI3K-C2 α 発現のノックダウンは、MYPT1及びMLCリン酸化も抑制した。さらに、Rhoキナーゼ阻害薬はイオノマイシンによるMYPT1及びMLCリン酸化を抑制した。一方、クラスIのPI3K α に特異的なsiRNAにはこのような阻害効果はなかった。

以上の結果から、血管平滑筋においてKClやノルアドレナリンによるカルシウム依存的なRho活性化及びMLCP抑制を仲介する新しいシグナル分子としてのPI3K-C2 α の役割が明らかになった。カルシウムはPI3K-C2 α を活性化し、これはMLCP活性を制御する情報伝達経路のキーシグナル分子であるRhoの活

性化に関わる。この作用を介して、PI3K-C2 α はMLCP抑制を仲介する。PI3Kファミリーの中では、研究のすすんでいるクラスI酵素とは異なり、クラスII酵素の細胞、器官レベルでの研究は著しく少なく、クラスII酵素の生理機能はほとんど理解されていないかった。筆者らは、クラスII酵素であるPI3K-C2 α が血管平滑筋収縮制御において重要な機能を果たしていることを初めて明らかにした。PI3K-C2 α は生理的な血管平滑筋収縮において重要であるばかりでなく、高血圧、血管攣縮などの病的血管収縮においても重要な役割をはたしている可能性があり、検討中である。

文 献

- 1) S. Sakurada, H. Okamoto, N. Takuwa, N. Sugimoto and Y. Takuwa. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol)* 2001;281: C571-C578.
- 2) S. Sakurada, N. Takuwa, N. Sugimoto, Y. Wang, M. Seto, Y. Sasaki and Y. Takuwa. Ca²⁺-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ. Res.* 2003;93: 548-556.
- 3) Y. Wang, K. Yoshioka, MA. Azam, N. Takuwa, S. Sakurada, Y. Kayaba, N. sugimoto, I. Inoki, T. Kimura, T. Kuwai and Y. Takuwa Class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle. *Biochem. J.* 2006; 394: 581-592.
- 4) MA. Azam, K. Yoshioka, S. Ohkura, N. Takuwa, N. Sugimoto, K. Sato, and Y. Takuwa Ca²⁺-independent, inhibitory effects of cyclic AMP on Ca²⁺ regulation of phosphoinositide 3-kinase C2 α , Rho and myosin phosphatase in vascular smooth muscle *J. Pharm. Exp. Ther.* 2006; 320: 907-916.
- 5) K. Yoshioka, N. Sugimoto, N. Takuwa, Y. Takuwa Essential role for class II phosphoinositide 3-kinase alpha-isoform in Ca²⁺-induced, Rho- and Rho kinase-dependent regulation of myosin phosphatase and contraction in isolated vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 2007;71:912-920.



Profile

2005年 神奈川工科大学工学部応用化学科卒業
 2007年 金沢大学大学院医学系研究科(血管分子生理学講座)修了
 同年4月 東光薬品工業株式会社東京研究所に所属、現在に至る
 趣味：サッカー観戦、サイクリングなど