

# 血管平滑筋収縮におけるホスファチジルイノシトール3-キナーゼクラスII $\alpha$ サブタイプの役割

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: 王, 煜 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4490">http://hdl.handle.net/2297/4490</a>

## 血管平滑筋収縮におけるホスファチジルイノシトール 3-キナーゼクラス II $\alpha$ サブタイプの役割

金沢大学医学系研究科血管分子生理  
(旧講座名：第一生理学)  
(主任：多久和 陽)

王

焯

ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (PI3K) はホスファチジルイノシトール (PI) 及びそのリン酸化体のイノシトール環3位のリン酸化を触媒する酵素であり、産物であるPI 3-リン酸 (PI-3-P)、PI 3,4-2リン酸 (PI-3,4-P<sub>2</sub>) 及びPI 3,4,5-3リン酸 (PI-3,4,5-P<sub>3</sub>) は、細胞運動、細胞骨格調節、細胞形態調節、遺伝子発現制御、細胞増殖、抗アポトーシス、細胞内小胞輸送、血小板凝集など多岐にわたる作用を媒介する。PI3KはクラスI, II, IIIからなり、この内クラスI, III酵素の機能は比較的によく解明されているが、クラスII酵素の働きはほとんど解明されていない。PI3Kの血管機能、特に平滑筋トーン調節における役割は不明である。本研究では、血管平滑筋収縮におけるPI3Kの役割を解明する目的で、PI3K阻害薬ワートマンニン (wortmannin, WMN) 及びLY294002のウサギ大動脈平滑筋標本における収縮反応、MLC<sub>20</sub>リン酸化、Rho活性化、ミオシンホスファターゼ (MLCP) 活性に及ぼす効果を検討し、さらに血管収縮調節に関わっているPI3Kサブタイプの同定を試み、以下の結論を得た。1) WMN及びLY294002は、KCl脱分極による収縮及び20kDaミオシン軽鎖 (MLC<sub>20</sub>) リン酸化を濃度依存的に抑制した。文献に報告されている様々なPI3K阻害薬の効果と比較した場合、この血管平滑筋の応答はWMN、LY294002いずれに対しても少なくとも10倍低感受性であった。2) LY294002は、受容体作動性アゴニストであるノルアドレナリンによる収縮も濃度依存的に抑制した。収縮抑制とともに、LY294002はノルアドレナリンによるMLC<sub>20</sub>リン酸化を抑制した。したがって、PI3K阻害薬による収縮抑制は、MLC<sub>20</sub>リン酸化の抑制によると考えられた。3) LY294002は、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) 阻害薬ML-9によるKCl収縮の弛緩を促進し、これに伴うMLC<sub>20</sub>リン酸化の低下も促進した。一方、MLCP阻害薬カリキュリン-A投与によって引き起こされる収縮及びMLC<sub>20</sub>リン酸化の抑制は軽度であった。すなわち、PI3K阻害薬は主としてMLC<sub>20</sub>脱リン酸化を促進することによって、MLC<sub>20</sub>リン酸化、収縮の抑制を引き起こすことが示唆された。4) これと一致して、LY294002は、MLCPを負に制御する低分子量G蛋白RhoのKCl及びノルアドレナリンによる活性化を抑制した。また、MLCP活性の抑制にはたらく調節サブユニットMYPT1のThr<sup>850</sup>リン酸化も抑制した。5) 血管平滑筋には、PI3KクラスI酵素p110 $\alpha$ とクラスII酵素PI3K-C2 $\alpha$ の発現が検出された。6) 血管平滑筋のPI3K-C2 $\alpha$ はp110 $\alpha$ に比較してWMNに対して10倍以上低感受性であり、収縮及びMLC<sub>20</sub>リン酸化のWMN感受性とほぼ一致していた。7) KCl及びノルアドレナリンはPI3K-C2 $\alpha$ を活性化したが、p110 $\alpha$ をむしろ抑制した。8) 収縮能を保持した培養血管平滑筋細胞におけるRNAi法によるPI3K-C2 $\alpha$ 発現の抑制は、イオノマイシンによるカルシウム依存的な収縮を抑制した。以上の結果から、PI3KクラスII酵素であるPI3K-C2 $\alpha$ はRho活性化に関わっており、この作用を介してMLCP活性を負に制御し、MLCリン酸化の正方向の調節に関与していることが明らかになった。この作用により、PI3K-C2 $\alpha$ は血管トーンの調節に関わると考えられる。

**Key words** phosphoinositide-3-kinase, myosin phosphatase, Rho, Rho-kinase, myosin light chain, myosin light chain kinase

ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ (phosphoinositide-3-kinase, PI3K) は細胞膜リン脂質であるホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol, PI) 及びそのリン酸化体のイノシトール環3位のリン酸化を触媒する酵素であり、産物であるPI-3-P、PI-3,4-P<sub>2</sub>及びPI-3,4,5-P<sub>3</sub>はシグナル伝達機能を発揮し、細胞運動、細胞骨格調節、細胞形態調節、遺伝子発現制御、細胞増殖、

抗アポトーシス、細胞内小胞輸送、血小板凝集など多岐にわたる作用を媒介することが明らかにされている<sup>1)~3)</sup>。哺乳類においてはPI3Kは少なくとも8つのメンバーからなるファミリーを構成しており、これらは一次構造、活性の調節機構、基質特異性等から3つのクラスに分類されている。クラスIは、分子量110kDの触媒サブユニット (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$ , p110 $\gamma$ )

平成16年10月28日受付、平成16年11月30日受理

Abbreviations : DAG, 1, 2-diacylglycerol; DTT, dithiothreitol; GFP, green fluorescent protein; IP<sub>3</sub>, inositol 1, 4, 5-triphosphate; MLC<sub>20</sub>, 20kDa myosin light chain; MLCK, myosin light chain kinase; MLCP, myosin phosphatase; MYPT1, myosin phosphatase target subunit 1; PI, phosphatidylinositol; PI3K, phosphoinositide-3-kinase; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; RNAi, RNA interference; siRNA, short interfering RNA duplex; TLC, thin layer chromatography; WMN, wortmannin

と分子量50~101kDaの調節サブユニットからなるヘテロ二量体を形成し、PI-4,5-2リン酸(PI-4,5-P<sub>2</sub>)、PI-4-1リン酸(PI-4P)、PIのいずれも基質とする。クラスIは血小板由来成長因子、インスリンなどの受容体チロシンキナーゼを介して作用する増殖因子やG蛋白共役型受容体を介して作用するアゴニストによって活性化される。クラスIIは約200kDaの3つのサブタイプ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )からなり、現在までその活性を調節する細胞内結合蛋白は知られていない。また活性化の機構も十分に理解されていない。クラスIIはクラスIと異なり、PI-4-PとPIのみを基質とする。クラスIIIは酵母のVps34pのホモログであり、細胞内小胞輸送に関わっている。クラスIIIは細胞内において構成的に活性型として存在しており、PIのみを基質に利用することが特徴である。PI3Kに対する阻害薬としてワートマンニン(wortmannin, WMN)及びLY294002が広く研究に用いられているが、クラスII $\alpha$ サブタイプ(PI3K-C2 $\alpha$ )のみはこれらの阻害薬に対する感受性が他のメンバーに比して少なくとも10倍低いことが知られている。

血管平滑筋収縮は神経伝達物質、ホルモン、局所で産生される生理活性物質(オータコイド)によって引き起こされる<sup>6)7)</sup>。これらの血管作動物質は細胞膜表面受容体(この多くは細胞膜7回貫通型のG蛋白質共役型受容体である)に結合し、三量体G蛋白質G<sub>q/11</sub>を介してホスホリパーゼC(phospholipase C, PLC)活性化と細胞膜上の電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルを含むCa<sup>2+</sup>チャネルの開口を引き起こし、この情報伝達経路が収縮を媒介する主要な機構としてはたらく。PLCの活性化により、細胞膜に存在するリン脂質、PI-4,5-P<sub>2</sub>が加水分解を受け、イノシトール-1,4,5-3リン酸(inositol 1,4,5-triphosphate, IP<sub>3</sub>)と、1,2-ジアシルグリセロール(diacylglycerol, DAG)が産生される。PLCの基質となるPI-4,5-P<sub>2</sub>は、イノシトール環3位にリン酸基を有さず、上述のPI3Kの産物ではない。従ってG<sub>q/11</sub>-PLC経路はPI3Kとは直接には関連しない。IP<sub>3</sub>は細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵プールよりCa<sup>2+</sup>放出を引き起こし、細胞膜Ca<sup>2+</sup>チャネルを介した細胞外からのCa<sup>2+</sup>流入と相まって、急激な細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)の上昇をもたらされる。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇はカルモジュリンを介してミオシン軽鎖キナーゼ(myosin light chain kinase, MLCK)を活性化し20kDaミオシン軽鎖(myosin light chain, MLC<sub>20</sub>)をリン酸化する。この結果ミオシンフィラメントとアクチンフィラメント間の相互作用が可能になり、収縮が開始する。一方、DAGとCa<sup>2+</sup>によってプロテインキナーゼC(protein kinase C, PKC)が活性化され、これも収縮に寄与する<sup>8)</sup>。PKCによる血管収縮の機序にはMLC<sub>20</sub>リン酸化に依存する部分と非依存的な部分の両者が存在すると考えられている。近年このモデルに加えて、血管作動物質がMLC<sub>20</sub>脱リン酸化のプロセスを抑制することが明らかにされた<sup>9)10)</sup>。すなわち、血管作動物質はMLCKを活性化すると同時に、ミオシン軽鎖フォスファターゼ(myosin phosphatase, MLCP)に抑制を及ぼすことにより、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇によってトリガーされるMLC<sub>20</sub>リン酸化を増強(Ca<sup>2+</sup>感受性の増強)する。我々を含むいくつかの研究グループにより、血管作動物質によるこのMLCP抑制には低分子量G蛋白質Rho及びRhoにより活性化されるRhoキナーゼが関与していることが明らかにされた<sup>11)</sup>。従来は、血管作動物質は三量体G蛋白質G<sub>12/13</sub>を介してRhoを活性化すると考えられてきた<sup>12)13)</sup>。我々は最近、血管平滑筋においてKCl脱分極やイオノマイシンによる[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇がRho活性化をもたらすことを見出した。すなわ

ち、血管作動物質によるRho活性化にはG<sub>12/13</sub>の他に、G<sub>q/11</sub>-Ca<sup>2+</sup>の経路も関与する<sup>14)</sup>。活性化されたRhoは次にRhoキナーゼの活性亢進をもたらす。MLCPの110kDaミオシン結合サブユニット(myosin phosphatase target subunit 1, MYPT1)およびMLCP阻害蛋白CPI-17のリン酸化を引き起こす結果MLCP活性を抑制する<sup>15)17)</sup>。またRhoキナーゼの他にPKCもCPI-17をリン酸化しうる<sup>18)19)</sup>。Rho-Rhoキナーゼ-MLCP系の活性の変動は血管収縮を大きく変化させる作用があり、高血圧や冠動脈攣縮などの病的異常血管収縮におけるこの経路の関与が示唆されている<sup>20)23)</sup>。

以上のように平滑筋収縮におけるPLCを介した膜リン脂質からの情報伝達はよく知られているが、これまで上記血管平滑筋収縮情報伝達におけるPI3Kの役割はほとんど知られていなかった。しかし近年、PI3K阻害薬であるWMNやLY294002が血管平滑筋収縮を抑制することが相次いで報告された。またこの抑制がMLC<sub>20</sub>リン酸化の抑制を伴うことが示された<sup>24)26)</sup>。しかしながら、これらの阻害薬がMLCK、MLCPいずれの活性にどのような機構を介して影響を及ぼすのか、また血管平滑筋におけるどのPI3Kサブタイプが阻害薬の標的となっているのかは不明であった。本研究においてこれらの点について検討し、1) KCl脱分極刺激やノルアドレナリン収縮血管において、PI3K阻害薬は主としてMLC<sub>20</sub>脱リン酸化を促進することによってMLC<sub>20</sub>リン酸化を低下させること、2) この作用はRho活性化およびMLCPのMYPT1サブユニットリン酸化の抑制を伴うこと、3) これらのPI3K阻害薬の血管作用の分子標的は、クラスII酵素PI3K-C2 $\alpha$ であることを明らかにした。

## 材料及び方法

### I. 試薬

本研究に使用した主要試薬の入手先は以下の通りである。ノルアドレナリン及びワートマンニン(Sigma, St. Louis, USA)、U46619(Calbiochem, La Jolla, USA)及びLY294002(Cayman, Ann Arbor, USA)、カリキュリン-A及びML-9(生化学工業, 東京)、抗MYPT1 T850リン酸化抗体(Upstate, Charlottesville, USA)、抗MYPT1抗体(Covance, Berkeley, USA)、抗MLC<sub>20</sub>抗体(Sigma)、抗RhoA(26C4)抗体、抗PI3K p110 $\alpha$ (N-20)抗体、抗PI3K p110 $\beta$ (S-19)抗体(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)、抗リン酸化チロシン抗体(PY20)(ICI, Irvine, USA)、抗PI3K-CII $\alpha$ 抗体及び抗PI3K-CII $\beta$ 抗体(BD Biosciences, San Jose, USA)、抗Ser<sup>473</sup>リン酸化AKT抗体及び抗Akt抗体(Cell Signaling, Beverly, USA)。

### II. 血管平滑筋等尺性張力測定

体重1.9 kgの雄日本白色家兔の耳静脈よりソルノペンチル(102 mg/Kg体重)(共立製薬, 東京)を過量投与して安楽死させ、胸部大動脈を摘出した。大動脈周囲の結合組織を除去し、幅6-8 mmのリング標本を切り出した。爪楊枝を用いて内皮細胞層を擦過除去し、等尺性張力測定装置(UM-203, 岸本医療機械, 京都)に取り付け、37℃下、95% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>の混合ガスを通気したKrebs-Henseleit緩衝液(NaCl 119 mM, KCl 4.7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 25 mM, glucose 11 mM)を満たしたマグナス管中で1グラムの基礎張力負荷下にインキュベートした<sup>13)17)</sup>。1時間後より、60 mM KClによる収縮を収縮ピーク値が最大となるまで繰り返す(通常3-4回)、その後実験を開始した。種々の刺激による発生

張力は60 mM KClによる最大発生張力の%で表示した。

### III. MLC<sub>20</sub>リン酸化及びMBSリン酸化の測定

等尺性収縮下にある血管リング標本を10%トリクロロ酢酸, 20 mM DTT (dithiothreitol) 含有ドライアイス-アセトン中で急速凍結した。約1時間室温に静置した後, 10 mM DTT含有アセトン(室温)中で30分間リング標本をインキュベートした。これを計3回繰り返した後, キムワイプ上で血管リング標本を乾燥させた。MLC<sub>20</sub>リン酸化レベルの測定には血管リング標本をハサミで細かく切断し, 尿素サンプル溶液(20 mM Tris/HCl (pH8.6), 23 mM glycin, 10 mM DTT, 8 M尿素)中で溶解し蛋白質を抽出した。抽出液を遠心濾過(Ultrafree-MCチューブ(Millipore, Bedford, USA))を使用し, 濾液を尿素-グリセロール-ポリアクリルアミド電気泳動で分離し, イモビロン-Pメンブレン(Millipore)に電気的に転写した。MLC<sub>20</sub>抗体を用いてリン酸化及び非リン酸化MLC<sub>20</sub>バンドを検出した。バンドのデンシティーはデンシトメーター(PDI, San Francisco, USA)にて定量し, MLC<sub>20</sub>リン酸化レベルは総MLC<sub>20</sub>当たりのリン酸化MLC<sub>20</sub>の%として表示した。MYPT1リン酸化レベル測定の場合には, 上記の血管リング標本を, 20 mM Tris/HCl (pH7.5), 100 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0.1% SDS, 2 mM EGTA, 0.5% NP-40から成る緩衝液中でホモジェナイズし, 4倍濃度のLaemmli SDSサンプル緩衝液と混和後5分間煮沸し, 15,000回転で5分間遠心後の上清を使用した。試料の一部を用いてLowry法による蛋白定量を行い, 等量の蛋白(110 µg)をSDS-8%ポリアクリルアミド電気泳動にて分離した。イモビロン-Pメンブレンに転写後, 抗T850リン酸化MYPT1抗体および抗非リン酸化MYPT1抗体を用いてバンドを検出し, デンシティーを定量した。MLC<sub>20</sub>リン酸化率は, 総MLC<sub>20</sub>量(リン酸化及び非リン酸化MLC<sub>20</sub>)に対するリン酸化MLC<sub>20</sub>量の割合として表示した。

### IV. 活性型Rhoの定量

等尺性収縮下にある血管リング標本を液体窒素で急速凍結し, 450 µlのRhoアッセイ用緩衝液((Tris/HCl 50 mM (pH7.2), 1% Triton X-100, 0.5% deoxycholic acid, 0.1% SDS, 500 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 各20 µg/mlのleupeptin及びaprotinin, 1 mM PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride))でホモジェナイズ後, 4℃下, 10分間, 15,000回転で遠心し, 上清を採取した。上清の一部をウエスタンブロッティングによる総Rho含量の定量及びLowry法による蛋白濃度測定に使用した。蛋白量270 µgを含むホモジュネートに, glutathione Sepharose ビーズ(Amersham Biosciences, Piscataway, USA)に結合した40 µgの組換えglutathione-s-transferase (GST)-Rotekin蛋白を加え, ゆるやかに振とうしながら4℃下, 30分間インキュベートした。4℃下, 3分間, 12,000回転で遠心し, 沈降物を回収した。沈降物を洗浄緩衝液(50 mM Tris/HCl (pH 7.2), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 各20 µg/mlのleupeptin及びaprotinin, 1 mM PMSF)で懸濁し, 再度上記の条件で遠心し, 沈降物を回収した。これをさらに2回繰り返した後, 沈降物に2倍濃度のLaemmli SDSサンプル緩衝液(2X緩衝液)を加え, 煮沸後, 4℃下, 5分間15,000回転で遠心して上清を得た<sup>13)</sup>。SDS-15%ポリアクリルアミド電気泳動により分離し, イモビロン-Pメンブレンに転写後, 抗RhoA抗体を用いてバンドを検出しデンシティーを定量した。

### V. PI3キナーゼアッセイ

等尺性収縮下にある血管リング標本を液体窒素中で急速凍結し, 800 µlのPI3キナーゼアッセイ用緩衝液(1% NP-40, 20 mM Tris/HCl (pH7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF)でホモジェナイズ後, 4℃下, 10分間15,000回転で遠心し, 上清を取得した。蛋白量400 µgを含む上清に各PI3K抗体もしくは抗ホスホチロシン(anti-phosphotyrosine, PY20)抗体を加え, PI3Kを免疫沈降した<sup>27)</sup>。免疫沈降物を緩衝液(20 mM Tris/HCl (pH7.5), 100 mM NaCl, 0.5 mM EGTA)で洗浄後, キナーゼアッセイ緩衝液(20 mM Tris/HCl (pH7.5), 100 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 10 mCi/ml of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP, 200 µg/ml PI)を加え, 25℃下で30分間インキュベートした。CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>/11N HCl混液(2:1:0.02 (V:V:V))を加え反応を停止した。15,000回転, 1分間遠心後の下層を全量採取し, 薄層クロマトグラフィー(thin layer chromatography, TLC)プレート(Silica gel 60, メルック社)にスポットし, CH<sub>3</sub>OH/CHCl<sub>3</sub>/25% NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O (43:38:5:7)から成る溶媒系で展開した<sup>28)</sup>。TLCプレート上で分離されたリン酸化PIの放射活性をFuji-BASバイオイメージアナライザー2000によって定量した。

### VI. PI3Kウエスタンブロッティング

培養細胞及びウサギ大動脈リング標本を20 mM Tris/HCl (pH7.5), 100 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 2 mM EGTA, 0.1% SDS, 0.5% NP-40から成るホモジュネーション緩衝液中で溶解もしくはホモジェナイズし, 4℃下15,000回転5分間遠心し, 上清を分離回収した。上清の一部をLowry法による蛋白濃度測定に使用し, 残量の上清に対して4X緩衝液を加えて混合後, 煮沸した。各試料の120 µg蛋白量相当をSDS-8%ポリアクリルアミド電気泳動にて分離し, イモビロン-Pメンブレンに電気的に転写し, 各種特異的抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

### VII. 単離培養血管平滑筋細胞を用いた収縮反応の解析

5週齢のウイスター系ラットより摘出した大動脈を細切し, タイプVコラゲナーゼ, タイプIIIエラスターゼ(いずれもSigma)で消化し, 単離血管平滑筋細胞を得た<sup>29)</sup>。ラミニン(20 µg/ml)(イワキガラス社, 船橋)で表面を被覆したガラス製ラプテックチェンバー(Nalge-Nunc, Copenhagen, Denmark)上に播種し, インスリン様成長因子-I(2 ng/ml)及び0.2%脂肪酸不含有ウシアルブミン(Sigma)を含むDulbecco's minimal essential mediumを用いて培養した。培養3日後に, 細胞をトランスフェクション試薬リポフェクトアミン2000(Invitrogen, Carlsbad, USA)を用いて, クラゲGFP(green fluorescent protein)発現プラスミドpEGFP-C1(BD Biosciences)をトランスフェクションした。24時間後に, 共焦点ユニット(CSU21, 横川電機, 横浜)を備えた倒立型蛍光顕微鏡(IX70, オリンプス, 東京)で観察した。平滑筋細胞の収縮は, 1細胞当たりの表面積の刺激前後での減少率(%)で評価した。

### VIII. RNAi

PI3K-C2 $\alpha$ のDNA塩基配列5'-AAGATATTGCTGGATGACAAT-3'に対して2本鎖RNAを, Silencer siRNA(short interfering RNA) construction kit(Ambion, Austin, USA)を使用して, インビトロトランスクリプション法により合成した。コントロールRNA(スクランブルRNA)の配列は, 5'-AATCGACTGTGATACTACAAT-3'であっ

た。細胞への導入は、収縮実験の24時間前にRNA 20 nMの濃度でpEGFP-C1とともにトランスフェクションした。このRNAi (RNA interference) により、PI3K-C2 $\alpha$ の発現蛋白量は約90%減少することをウエスタンブロット法にて確認した。

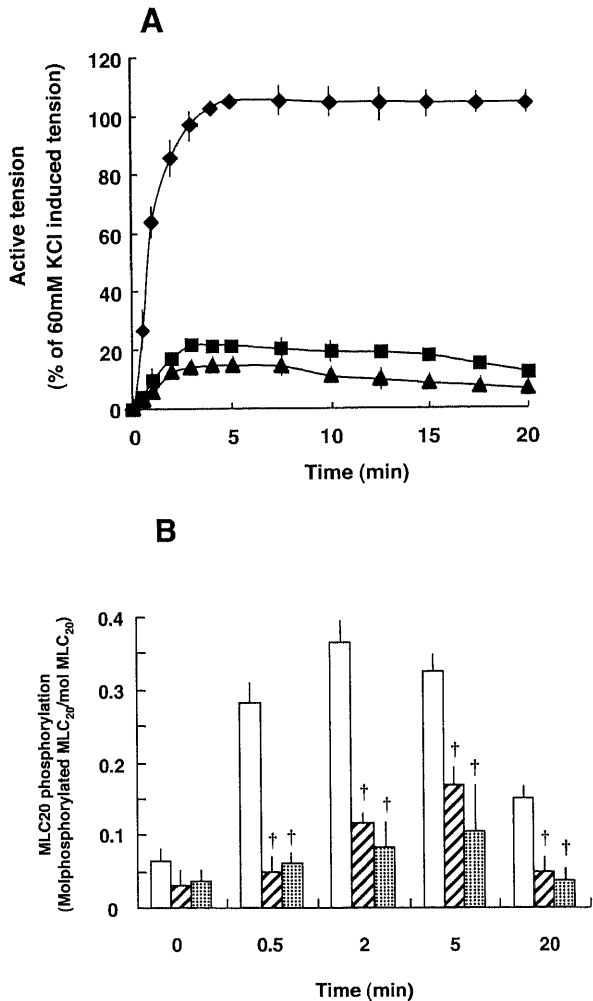


Fig. 1. Time course of KCl-induced active tension generation and MLC<sub>20</sub> phosphorylation in the presence and absence of the PI3-kinase inhibitors. (A) The effects of PI3-kinase inhibitors on KCl-induced active tension generation. The symbols (◆, ■, ▲) denote stimulation with 60 mM KCl alone, KCl in the presence of 100  $\mu$ M LY294002 and KCl in the presence of 1  $\mu$ M WMN, respectively. (B) The effects of the PI3-kinase inhibitors on KCl-induced MLC<sub>20</sub> phosphorylation. Rabbit aortic ring was stimulated with 60 mM KCl in the presence and absence of WMN (1  $\mu$ M) and LY294002 (LY) (100  $\mu$ M), which were added to the bath solution 30 min before KCl stimulation. Isometric tension was measured by using a force-transducer. Contracted aorta rings were rapidly frozen in acetone/TCA with dry ice, followed by analysis of MLC<sub>20</sub> phosphorylation by urea-glycerol PAGE and Western blotting using anti-MLC<sub>20</sub> antibody. The open, shaded, and stippled columns denote stimulation with 60 mM KCl alone, KCl in the presence of 100  $\mu$ M LY294002 and KCl in the presence of 1  $\mu$ M WMN, respectively. The data are  $\bar{X} \pm$  range of duplicate determinations. The symbol † denotes statistical significance at the level of  $p < 0.01$ , compared to respective non-stimulated values.

## IX. 統計処理法

測定値はすべて平均 $\pm$ 標準偏差で表した。二群間の比較はStudent t-検定法、多群間の比較にはまず分散分析を行い有意差が認められたものに対してはScheffeの方法にて検定した。危険率5%未満を統計学的に有意と判定した。

## 結 果

### I. PI3K阻害薬によるKClおよびノルアドレナリン収縮とMLC<sub>20</sub>リン酸化の抑制

ウサギ大動脈リング標本に60 mM KClによる脱分極刺激を与えると持続的な収縮が観察された(図1A)。大動脈リング標本をあらかじめPI3-キナーゼ阻害薬LY294002 (100  $\mu$ M)あるいはWMN (1  $\mu$ M)で前処理すると、KClによる収縮は初期相、持続相のいずれも80-90%抑制された(図1A)。また、LY294002、WMNの両阻害薬は、KCl刺激開始2分、5分、20分の時点でMLC<sub>20</sub>リン酸化を65-90%抑制した(図1B)。LY294002、WMN

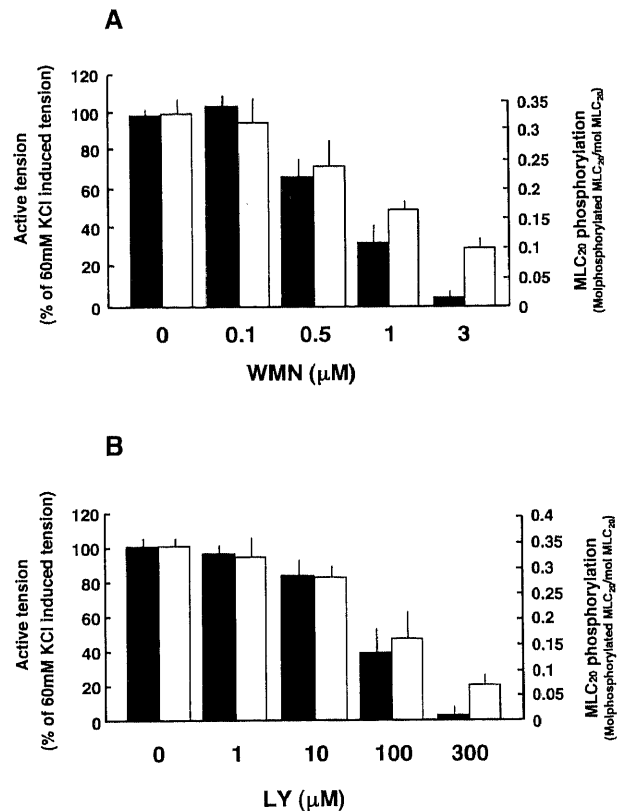


Fig. 2. Dose-dependent inhibition of KCl-induced contraction and MLC<sub>20</sub> phosphorylation by the PI3-kinase inhibitors. (A) inhibition by WMN. (B) inhibition by LY. The PI3-kinase inhibitors, WMN and LY294002 (LY), were added to the bath solution 30 minutes before KCl stimulation. The closed and open bars represent active tension and MLC<sub>20</sub> phosphorylation, respectively. The data are  $\bar{X} \pm$  range of duplicate determinations.

による収縮及びMLC<sub>20</sub>リン酸化の抑制はともに用量依存的であり、LY294002, WMNそれぞれにおいて両作用の間でIC<sub>50</sub>値は近似していた (LY294002では約70  $\mu$ M, WMNでは0.5  $\mu$ M) (図2A及びB)。以上の結果から、両阻害薬による収縮抑制はMLC<sub>20</sub>リン酸化の抑制によることが示唆された。

LY294002は、受容体作動性アゴニストであるノルアドレナリン (3  $\mu$ M) による収縮も用量依存的に抑制した (図3A)。しかし、ノルアドレナリンに比較して、PKCを活性化するフォルボール12,13-ジブチレート (phorbol 12, 13-dibutyrate, PDBu) 収縮の抑制は弱かった。同様の抑制作用はWMNによっても観察された。LY294002 (100  $\mu$ M) はまた、ノルアドレナリン (3  $\mu$ M) によるMLC<sub>20</sub>リン酸化を約70%抑制した (図3B)。ノルアドレナリンに比較してPDBuによるMLC<sub>20</sub>リン酸化の増加は軽度であり、LY294002による抑制は明らかではなかった。

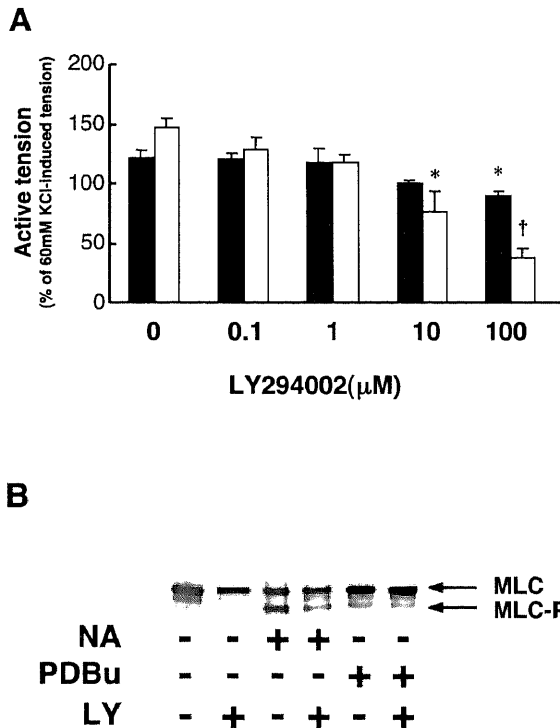


Fig. 3. Different effects of LY294002 on noradrenaline (NA)- and PDBu-induced contraction and MLC<sub>20</sub> phosphorylation. (A) Dose-dependent effects of LY294002 (LY) on NA- and PDBu-induced active tension generation. The data are  $\bar{X} \pm$  range of duplicate determinations. The closed and open bars represent PDBu- and noradrenalin (NA)-stimulation, respectively. Aortic rings were stimulated with NA (3  $\mu$ M) for 5 min or PDBu (1  $\mu$ M) for 1 h in the presence of various concentrations of LY294002. The symbols \* and † denote statistical significance at the level of  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively, compared to respective values in the absence of LY294002.

(B) The effects of LY294002 on PDBu- and NA-induced MLC<sub>20</sub> phosphorylation. Aortic rings were stimulated with NA (3  $\mu$ M) for 5 min or PDBu (1  $\mu$ M) for 1 h in the presence and absence of LY294002 (100  $\mu$ M).

## II. PI3K阻害薬によるMLC<sub>20</sub>脱リン酸化及び弛緩の促進

PI3K阻害薬によるMLC<sub>20</sub>リン酸化レベルの低下は、MLC<sub>20</sub>脱リン酸化の促進 (MLCPの活性亢進) もしくはMLC<sub>20</sub>リン酸化プロセスの抑制 (MLCK活性の抑制) のいずれか、あるいは両者によって引き起こされうる。この点を明らかにする目的で、KCl (60 mM) によって収縮させた大動脈リング標本にMLCK阻害薬ML-9 (100  $\mu$ M) を作用させて弛緩を誘導した。張力は、ML-9投与後25分ではML-9非存在下に比較して60%低下し、MLC<sub>20</sub>リン酸化レベルは約70%低下した (図4A, B)。ML-9とともにLY294002 (100  $\mu$ M) を作用させると張力、MLC<sub>20</sub>リン酸化レベルの低下は顕著に増強された。この結果は、LY294002がMLC<sub>20</sub>脱リン酸化を促進すること、すなわちMLCP活性を促進することを示唆した。

一方、KClやアドレナリンなどの刺激がない場合にMLCP阻害薬カリキュリン-A (0.3  $\mu$ M) のみによって引き起こされる緩徐な収縮に対しては、LY294002 (100  $\mu$ M) はごく軽度 (20%) 収縮を抑制したが、MLC<sub>20</sub>リン酸化レベルは抑制しなかった (図5A, B)。この結果は、MLCPが抑制されている条件下でのMLC<sub>20</sub>リン酸化 (MLC<sub>20</sub>リン酸化酵素活性を反映する) に対してはほとんど抑制を及ぼさないことを示唆した。

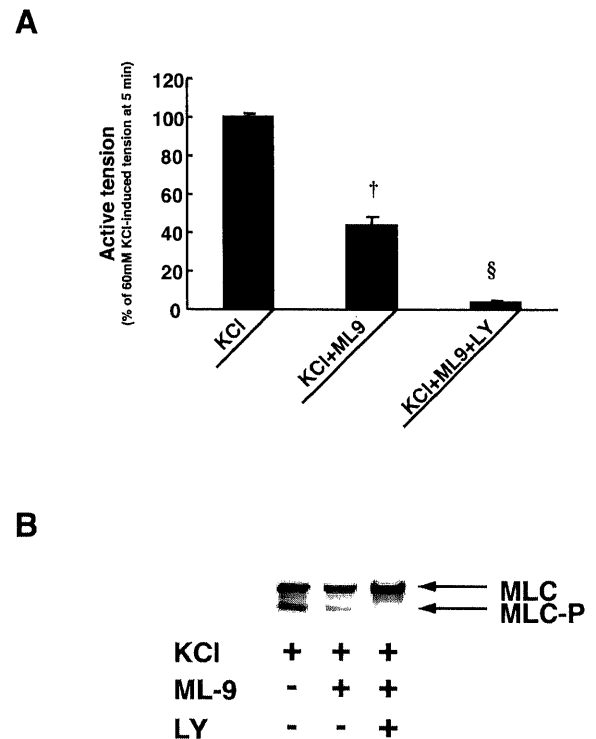


Fig. 4. Stimulation by LY294002 of ML9-induced reductions in tension and MLC<sub>20</sub> phosphorylation in KCl-stimulated aortic rings. (A) Active tension. The symbol † and § denotes statistical significance at the level of  $p < 0.01$ , compared to the KCl-treated and KCl plus ML9-treated groups, respectively. (B) MLC<sub>20</sub> phosphorylation. At 5 min after KCl (60 mM) stimulation, ML9 (50  $\mu$ M) with or without LY294002 (LY) (100  $\mu$ M) was added. 25 min later, the reactions were terminated. The data are  $\bar{X} \pm$  S.E. of triplicate determinations in (A).

III. PI3K阻害薬による Rho 活性化及びMYPT1リン酸化の抑制

KCl, ノルアドレナリンはいずれも Rho を活性化して, MLCPの抑制を引き起こす。そこで, PI3K阻害薬の Rho 活性化に及ぼす効果を検討した。KCl (60 mM) 及びノルアドレナリン (3  $\mu$ M) はいずれも GTP 結合型 Rho の含量を 6-8 倍増加させた (図 6A)。LY294002 (100  $\mu$ M) は KCl, ノルアドレナリンによる GTP 結合型 Rho の増加を 80-90 % 抑制した。Rho を介した MLCP 抑制の機序として調節サブユニット MYPT1 のリン酸化が重要と考えられている。実際, 抗リン酸化 MYPT1 抗体を用いて MYPT1 Thr<sup>850</sup> リン酸化を評価したところ, KCl, ノルアドレナリンはこれを 2-3 倍増加させた (図 6B)。LY294002 は KCl, ノルアドレナリンによるこの MYPT1 リン酸化を抑制した。以上の結果は, PI3K 阻害薬は KCl 及びノルアドレナリンによる Rho 活性化を抑制することにより MLCP 抑制を阻害することを示している。

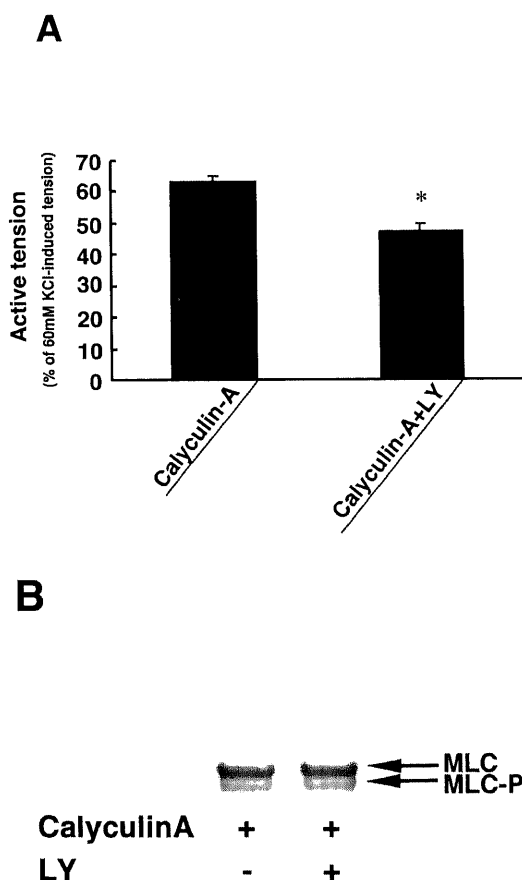


Fig. 5. The effects of LY294002 on calyculin A-induced contraction and MLC<sub>20</sub> phosphorylation. (A) Active tension. The symbol \* denotes statistical significance at the level of  $p < 0.05$  compared to the calyculinA group. (B) MLC<sub>20</sub> phosphorylation. LY294002 (LY) (100  $\mu$ M) was added before the addition of calyculin A (300 nM). The active tension and MLC<sub>20</sub> phosphorylation level at 30 min after the addition of calyculin A are shown. The data are means  $\pm$  S.E. of triplicate determinations in (A).

IV. 血管平滑筋における PI3K-C2 $\alpha$  の発現

PI3K阻害薬 LY294002 及び WMN による収縮, MLC<sub>20</sub>リン酸化の抑制は, 図 2 に明らかなように比較的高濃度の阻害薬が必要であり, この点においてこれまで報告されている多くの PI3K 阻害薬の作用とは異なる。PI3Kファミリーのメンバーの中で, PI3K-C2 $\alpha$  は特徴的に PI3K 阻害薬に対して低感受性を示す。そこで, 血管平滑筋が PI3K-C2 $\alpha$  を発現しているか否かを検討した。図 7A に示すように, ウェスタンブロット解析にてウサギ大動脈には PI3K-C2 $\alpha$  の発現が検出された。また, クラス I 酵素の p110 $\alpha$  も検出された。さらに, 免疫組織染色により血管壁における PI3K-C2 $\alpha$  の発現分布を検討したところ, 血管平滑筋細胞及び内皮細胞の両者において PI3K-C2 $\alpha$  の発現が認められた。非免疫 IgG を用いた場合にはどちらの細胞も染色されなかった (図 7B)。

V. 血管平滑筋 PI3K-C2 $\alpha$  の PI3K 阻害薬に対する低感受性

血管平滑筋の PI3K-C2 $\alpha$  が実際に PI3K 阻害薬に対して低感受性を示すか否かを検討した。そこで, ウサギ大動脈リング標本から特異抗体を用いて PI3K-C2 $\alpha$  及び p110 $\alpha$  を免疫沈降し, 種々の濃度の WMN 存在下で PI3K 活性を測定した。WMN は 10 nM の低濃度から p110 $\alpha$  活性を 90 % 以上抑制した (図 8)。これとは対照的に, WMN は 100 nM まで PI3K-C2 $\alpha$  を抑制せず, 1  $\mu$ M ではじめて約 40 %, PI3K-C2 $\alpha$  活性を抑制した。このように, 血管平滑筋の PI3K-C2 $\alpha$  は p110 $\alpha$  に比較して WMN に対して少なくとも 10 倍の感受性低下を示した。

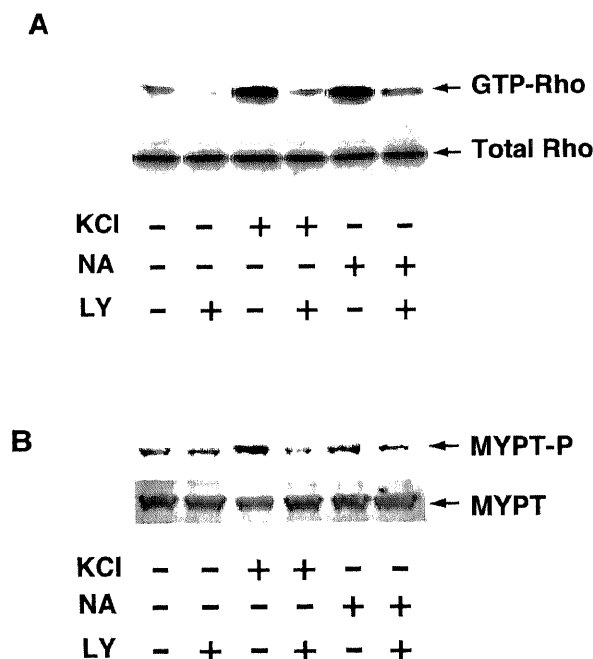


Fig. 6. The effects of LY294002 on KCl-and NA-induced Rho activation and MYPT1 phosphorylation. (A) The amount of GTP-bound RhoA. (B) MYPT1 phosphorylation. Aortic rings were stimulated with 60 mM KCl or NA (3  $\mu$ M) in the presence and absence of LY294002 (LY) (100  $\mu$ M), which were added to the bath solution 30 minutes before KCl stimulation.

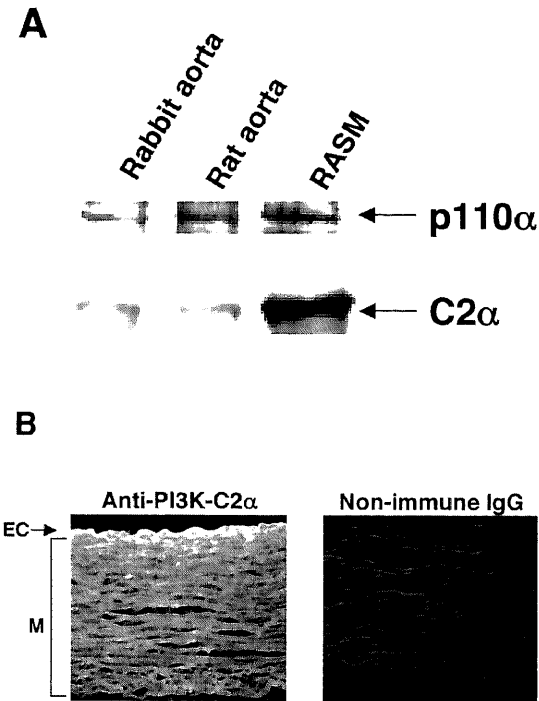


Fig. 7. Expression of PI3K subtypes, p110 $\alpha$  and PI3K-C2 $\alpha$  in aortic smooth muscle. (A) Western blot analysis of PI3K subtypes in rabbit and rat aortic smooth muscle and cultures rat aortic smooth muscle cells. (B) Immunofluorescent staining of PI3K-C2 $\alpha$  in rabbit aortic wall. Rabbit aortic sections were stained with anti-PI3K-C2 $\alpha$  or non-immune IgG. EC and M denote endothelial cells and medial smooth muscle layer, respectively.

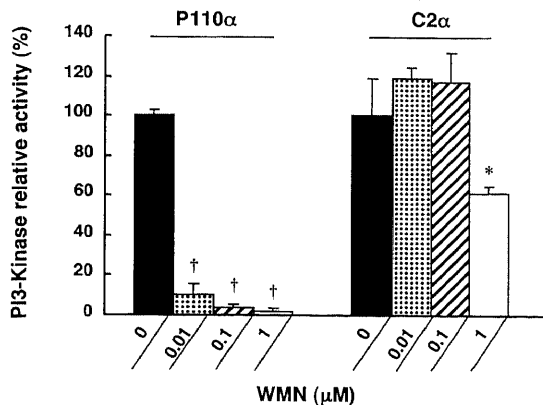


Fig. 8. Different sensitivities of PI3K p110 $\alpha$  and PI3K-C2 $\alpha$ . The PI3K subtypes were immunoprecipitated from rabbit aortae by immunoprecipitation using subtype-specific antibodies, followed by *in vitro* PI3K assay in the presence of indicated concentrations of WMN. The data are  $\bar{X} \pm S E$  of triplicate determinations. The symbols \* and  $\dagger$  denote statistical significance at the level of  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively, compared to the values in the absence of WMN.

#### VI. 血管平滑筋 PI3K-C2 $\alpha$ の KCl 及びノルアドレナリンによる活性化

KCl, ノルアドレナリンが p110 $\alpha$ , PI3K-C2 $\alpha$  活性に及ぼす効果を検討するために, KCl, ノルアドレナリンで刺激した大動脈リング標本からこれらの PI3K 酵素を免疫沈降し, インビトロにおいて PI3K 活性を測定した. 興味深いことに, KCl (60 mM), ノルアドレナリン (3  $\mu$ M) はいずれも p110 $\alpha$  を抑制した (図 9). これとは対照的に, KCl, ノルアドレナリンいずれも PI3K-C2 $\alpha$  活性を 1.6-1.8 倍増加させた.

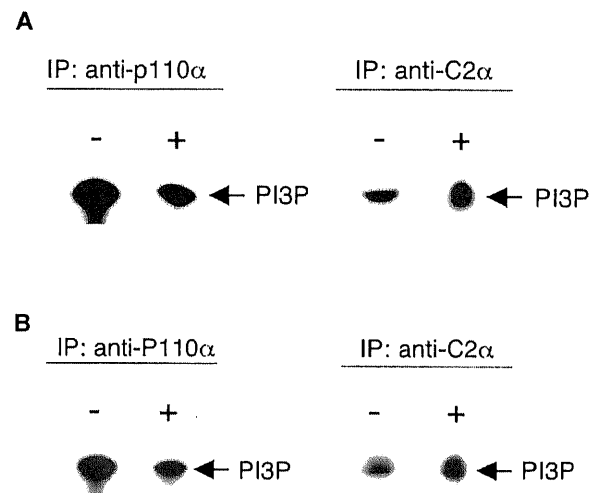


Fig. 9. Stimulation of PI3K-C2 $\alpha$  but not p110 $\alpha$  by KCl and NA. (A) The effects of KCl. (B) The effects of NA. Aortic rings were stimulated by either KCl (60 mM) or NA (3  $\mu$ M) for 5 min, and PI3K subtypes were immunoprecipitated with subtype-specific antibodies followed by *in vitro* PI3K activity using [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP. Autoradiographs are shown.

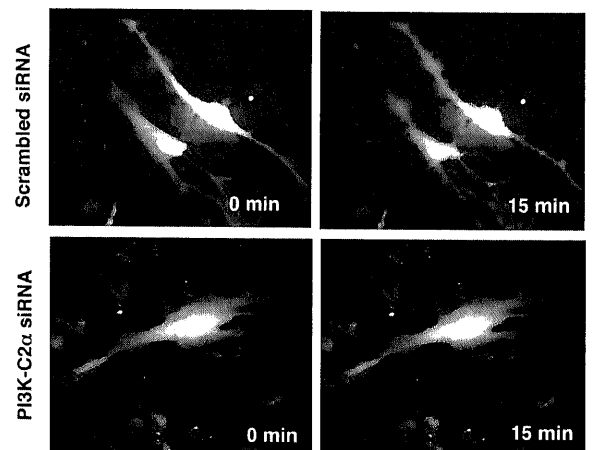


Fig. 10. Inhibition of ionomycin-induced contraction by RNAi-mediated down-regulation of PI3K-C2 $\alpha$  in aortic smooth muscle cells. The cells were transfected with either PI3K-C2 $\alpha$ -specific siRNA or scrambled RNA and analyzed for ionomycin (1  $\mu$ M)-induced contraction 10 min after administration.



## VII. RNAiによるPI3K-C2 $\alpha$ の発現抑制の収縮に及ぼす影響

無血清で培養した単離培養血管平滑筋細胞は、カルシウムイオノフォア、イオノマイシンによる刺激に対して収縮反応を示す。RNAi法を用いてPI3K-C2 $\alpha$ の発現を低下させた時に、収縮応答がどのように影響されるかを検討した。図10に示すように、スクランブル配列のRNA2本鎖をトランスフェクトした細胞では、イオノマイシン(1 $\mu$ M)刺激に対して収縮反応が観察された(細胞表面積の約25%の減少)。一方、PI3K-C2 $\alpha$ を標的とした特異的RNA2本鎖をトランスフェクトした細胞では、イオノマイシン刺激に対する収縮応答は抑制された。

## 考 察

PI3Kは様々な細胞外からのシグナルに応答して活性化され、細胞増殖、細胞運動、細胞形態の調節など多彩な役割を担う。PI3Kは個体レベルでは生命維持に必須の細胞内シグナル伝達分子であり、また癌や糖尿病などの疾患において密接に病態に関わると考えられている<sup>30)-32)</sup>。しかしながら、血管収縮やこれに関連した血管病におけるPI3Kの役割は極めて不十分な理解にとどまっている<sup>33)-36)</sup>。

本研究ではまず、PI3K阻害薬WMN及びLY294002が、KCl脱分極刺激及びノルアドレナリン受容体刺激によって惹起されるMLC<sub>20</sub>リン酸化反応及び収縮反応をともに抑制することを示した(図1-3)。両反応の抑制の間には良い相関が見られ、MLC<sub>20</sub>リン酸化の抑制がこれら阻害薬による収縮抑制の主要な機序であることが示唆された。次に、PI3K阻害薬によるMLC<sub>20</sub>リン酸化レベルの低下がMLC<sub>20</sub>脱リン酸化の促進もしくはMLC<sub>20</sub>リン酸化プロセスの抑制のいずれによるのかを検討し、LY294002はMLC<sub>20</sub>脱リン酸化を促進するがMLC<sub>20</sub>リン酸化活性には大きくは影響しないことを見出した(図4, 5)。WMNはMLC<sub>20</sub>リン酸化酵素MLCKの阻害活性を有することが報告されているが<sup>37)</sup>、細胞膜透過血管平滑筋細胞及び精製MLCK<sup>38)</sup>を用いた検討では、生理的なATP濃度ではWMNはMLCKを阻害しなかった(未発表データ)。これらの結果はKClやノルアドレナリン等の収縮刺激がMLCPを抑制する事実と合わせ、PI3KはKClやノルアドレナリン収縮におけるMLCP阻害に関わっており、LY294002はこの阻害を解除することによってMLC<sub>20</sub>脱リン酸化を促進することを示唆している。

低分子量G蛋白RhoはKCl脱分極刺激や受容体刺激によって活性化される。活性化されたRhoは次にRhoキナーゼを活性化して、MLCPを抑制する。RhoキナーゼによるMLCPの抑制には、MLCPの調節サブユニットであるMYPT1及びMLCP阻害蛋白CPI-17のリン酸化が重要な役割を果たすと考えられている。本研究においてまずPI3K阻害薬がKClやノルアドレナリンによるRho活性化にどのように影響するかを検討し、LY294002がRho活性化を強く抑制することを見出した(図6)。次に、KClやノルアドレナリンによるMYPT1リン酸化がLY294002によってどのように影響されるかを検討し、LY294002がMYPT1リン酸化を抑制することを見出した(図6)。これらの結果は、KClやノルアドレナリンによるRho活性化にPI3Kが必要であり、この作用を介してPI3KはMYPT1リン酸化従ってMLCP抑制に関わっていることを示唆している。PI3K阻害薬はKClやノルアドレナリンによるRho活性化を阻害する結果、MLCP抑制の阻害をもたらすMLC<sub>20</sub>脱リン酸化を促進すると考えられる。

血管平滑筋においては、KCl脱分極がRhoを活性化する事実から明らかなように、Ca<sup>2+</sup>を介したRho活性化機構が存在する<sup>14)</sup>。PI3K阻害薬はKClによるRho活性化を抑制することから、Ca<sup>2+</sup>を介したRho活性化にPI3Kが関与していることが示唆される。受容体作動物質はG<sub>12/13</sub>、G<sub>q/11</sub>-Ca<sup>2+</sup>の両経路を介してRhoを活性化するが<sup>39)</sup>、PI3K阻害薬は後者の経路を抑制すると考えられる。

PI3Kにはいくつかのサブタイプが存在する。本研究で観察されたWMN及びLY294002の抑制作用がどのPI3Kサブタイプの阻害の結果であるかは重要な疑問である。本研究において収縮及びMLC<sub>20</sub>リン酸化の阻害に要したWMN及びLY294002の濃度は、これまでの多くの培養細胞を対象とした研究で報告されている濃度よりも少なくとも10倍高濃度である。また、本研究に使用したウサギ大動脈においても、Akt(PI3Kで活性化される蛋白リン酸化酵素)活性化はMLC<sub>20</sub>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(未発表)。これらの事実から、WMN及びLY294002に対して低感受性のPI3Kサブタイプが血管平滑筋のRho活性化、MLC<sub>20</sub>リン酸化並びに収縮に関与していると考えられる。そこで、血管平滑筋に発現しているPI3Kサブタイプを検討したところ、少なくともクラスIに属するp110 $\alpha$ 、クラスIIに属するPI3K-C2 $\alpha$ の発現が確認できた(図7)。この中で、クラスII $\alpha$ のPI3K-C2 $\alpha$ は他のPI3Kサブタイプとは異なり、WMN及びLY294002に対して低い感受性を示すことが知られている<sup>3)</sup>。実際に、ウサギ血管から免疫沈降したPI3K-C2 $\alpha$ を用いてこのことを確認した(図8)。さらに、興味深いことに、KClやノルアドレナリンはPI3K-C2 $\alpha$ を活性化したが、p110 $\alpha$ はむしろ逆に抑制した(図9)。これらの結果から、WMN、LY294002によるMLC<sub>20</sub>リン酸化及び収縮抑制作用の標的分子は、これらのPI3K阻害薬に対して低感受性のPI3K-C2 $\alpha$ である可能性が考えられた。

そこで、PI3K-C2 $\alpha$ が収縮に関与しているか否かを、PI3K-C2 $\alpha$ を標的としたRNAi法により直接的に検討した。PI3K-C2 $\alpha$ に特異的な塩基配列のsiRNAは、無血清培養した血管平滑筋細胞においてPI3K-C2 $\alpha$ 蛋白の発現を抑制し、イオノマイシンによる収縮を抑制した(図10)。この結果は、PI3K-C2 $\alpha$ の血管平滑筋収縮への関与を示している。

以上の結果から、血管平滑筋収縮の情報伝達における新しいシグナル分子としてのPI3K-C2 $\alpha$ の役割が明らかになった。KClやノルアドレナリンはPI3K-C2 $\alpha$ 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 $\alpha$ はMLCPに抑制を及ぼす。WMNやLY294002に対して低感受性のPI3K-C2 $\alpha$ は比較的低濃度のPI3K阻害薬によっては抑制されず、高濃度の阻害薬によって初めて抑制を受けるので、MLC<sub>20</sub>リン酸化、収縮の抑制には高濃度のPI3K阻害薬を要したと考えられる。

PI3Kファミリーの中では、クラスI酵素の作用に関する研究はすすんでおり、細胞増殖、細胞生存、糖代謝、成長において必須の役割をはたすことが明らかにされている。しかし、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かった<sup>32)</sup>。本研究は、クラスII酵素であるPI3K-C2 $\alpha$ 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明らかにしたものであ

る。PI3K-C2 $\alpha$ 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、今後検討する必要がある。

### 結 論

血管平滑筋収縮の細胞内情報伝達におけるPI3Kの役割を解明する目的で、PI3K阻害薬WMN及びLY294002のウサギ大動脈平滑筋標本における収縮反応、MLC<sub>20</sub>リン酸化、Rho活性化、MLCPに及ぼす効果を検討し、さらに血管収縮調節に関わっているPI3Kサブタイプの同定を試み、以下の結論を得た。

1. WMN及びLY294002は、KCl脱分極による収縮とMLC<sub>20</sub>リン酸化を濃度依存的に抑制した。文献で報告されている様々なPI3K阻害薬の効果と比較して、この血管平滑筋の応答は少なくとも10倍低感受性であった。
2. LY294002は、受容体作動性アゴニストであるノルアドレナリンによる収縮を濃度依存的に抑制した。LY294002は、ノルアドレナリンによるMLC<sub>20</sub>リン酸化を抑制した。
3. LY294002は、MLCK阻害薬ML-9によるKCl収縮の弛緩を促進し、これに伴うMLC<sub>20</sub>リン酸化の低下も促進した。一方、MLCP阻害薬カリキュリン-A投与による収縮及びMLC<sub>20</sub>リン酸化の抑制は軽度ないし認められなかった。
4. LY294002は、MLCPを負に制御する低分子量G蛋白RhoのKCl及びノルアドレナリンによる活性化を抑制した。LY294002はまた、MLCP活性の抑制をきたすその調節サブユニットMYPT1リン酸化を抑制した。
5. 血管平滑筋には、PI3KクラスI酵素p110 $\alpha$ とクラスII酵素PI3K-C2 $\alpha$ の発現が検出された。
6. 血管平滑筋のPI3K-C2 $\alpha$ はp110 $\alpha$ に比較して、WMNに対して10倍以上低感受性であり、収縮及びMLC<sub>20</sub>リン酸化のWMN感受性とほぼ一致していた。
7. KCl及びノルアドレナリンは、PI3K-C2 $\alpha$ を活性化した。一方、p110 $\alpha$ はむしろ抑制した。
8. 培養血管平滑筋細胞におけるRNAiによるPI3K-C2 $\alpha$ 発現の抑制は、イオノマイシンによる収縮を抑制した。
9. 以上の結果から、PI3K-C2 $\alpha$ がRhoの活性化、これに引き続くMLCP活性の抑制を介してMLC<sub>20</sub>リン酸化を増強することにより、血管平滑筋収縮に関与することが示唆された。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました血管分子生理学分野多久和陽教授に深甚なる謝意を捧げます。また研究の遂行にあたり御助言を賜りました血管分子生理学分野桜田惣太郎先生、吉岡和晃先生、多久和典子先生、杉本直俊先生に厚く御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) Vanhaesebroeck B, Leever SJ. Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* 70: 535-612, 2001
- 2) Anderson RA, Boronenkov IV. Phosphatidylinositol phosphate kinases, a multifaceted family of signaling enzymes. *J Biol Chem* 274: 9907-9910, 1999
- 3) Cantrell DA. Phosphoinositide 3-kinase pathways. *J Cell Sci* 114: 1439-1445, 2001
- 4) Coelho CM, Leever SJ. Do growth and cell division rates determine cell size in multicellular organism? *J Cell Sci* 113: 2927-2934, 2000
- 5) Rameh LE, Cantley LC. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274: 8347-8350, 1999
- 6) Kamm KE, Stull JT. The function myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25: 593-620, 1985
- 7) Takuwa Y. Regulation of vascular smooth muscle contraction: the roles of Ca<sup>2+</sup>, protein kinase C and myosin light chain phosphatase. *Jpn Heart J* 37: 793-813, 1998
- 8) Rasmussen H, Takuwa Y. Protein kinase C in the regulation of smooth muscle contraction. *FASEB J* 1: 177-185, 1995
- 9) Kitazawa T, Gaylann BD, Denney GH, Somlyo AP. G-protein-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization of smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* 266: 1708-1715, 1991
- 10) Somlyo AP, Somlyo AV. Ca<sup>2+</sup> sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83: 1325-1358, 2003
- 11) Noda M, Yasuda-Fukazawa C, Moriishi K, Takuwa Y. Involvement of Rho in GTP $\gamma$ S-induced enhancement of phosphorylation of 20kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity. *FEBS Lett* 367: 246-250, 1995
- 12) Gohla A, Schlutz G, Offermanns S. Role for G12/13 in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res* 87: 221-227, 2000
- 13) Sakurada S, Okamoto H, Takuwa Y. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 281: C571-C578, 2001
- 14) Sakurada S, Wang Y, Takuwa Y. Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of Rho and Rho kinase in membrane depolarization-induced and receptor stimulation-induced vascular smooth muscle contraction. *Circ Res* 93: 548-556, 2003
- 15) Kimura K, Ito M, Kaibuchi K. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273: 245-248, 1996
- 16) Koyama M, Ito M, Nakano T. Phosphorylation of CPI-17, an inhibitory phosphoprotein of smooth muscle myosin phosphatase by Rho kinase. *FEBS Lett* 275: 197-200, 2000
- 17) Nagumo H, Sasaki Y, Takuwa Y. Rho kinase inhibitor HA1077 prevents Rho-mediated myosin phosphatase inhibition in smooth muscle cells. *Am J Physiol* 278: C57-C65, 2000
- 18) Eto M, Morita F. A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem* 118: 1104-1107, 1995
- 19) Kitazawa T, Eto M, Brautigan DL. Agonist trigger G protein-mediated activation of the CPI-17 inhibitor phosphoprotein of myosin light phosphatase to enhance vascular smooth muscle contractility. *J Biol Chem* 275: 9897-9900, 2000
- 20) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Inui J, Narumiya S.

Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389: 990-994, 1997

- 21) Mukai Y, Shimokawa H, Takeshita A. Involvement of Rho-kinase in hypertensive vascular disease: a novel therapeutic target in hypertension. *FASEB J* 15: 1062-1064, 2001
- 22) Seasholtz TM, Yang AH, Brown JH. Increased expression and activity of RhoA are associated with increased DNA synthesis and reduced p27<sup>kip1</sup> expression in the vasculature of hypertensive rats. *Circ Res* 89: 488-495, 2001
- 23) Seko T, Ito M, Nakano T. Activation of RhoA and inhibition of myosin phosphatase as important components in hypertension in vascular smooth muscle. *Circ Res* 92: 411-418, 2003
- 24) Zheng X, Renaux B, Hollenberg MD. Parallel contractile signal transduction pathways activated by receptors for thrombin and epidermal growth factor-urogastrone in guinea pig gastric smooth muscle: blockade by inhibitors of mitogen-activated protein kinase-kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 325-334, 1998
- 25) Yang ZW, Wang J, Altura BM. Importance of PKC and PI3Ks in ethanol-induced contraction of cerebral arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 280: H2144-H2152, 2001
- 26) Ibitayo AI, Tsunoda Y, Bitar KN. Src kinase and PI3-kinase as transduction pathway in ceramide-induced contraction of colonic smooth muscle. *Am J Physiol* 275: G705-G711, 1998
- 27) Arcaro A, Zvelebil MJ, Wallasch C, Ullrich A, Waterfield MD, Domin J. Class II phosphoinositide 3-kinase are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol Cell Biol* 20: 3817-3830, 2000
- 28) Walsh JP, Caldwell KK, Majerus PW. Formation of phosphatidylinositol 3-phosphate by isomerization from phosphatidylinositol 4-phosphate. *Proc Natl Acad Sci* 88: 9184-9187, 1991
- 29) Paglin S, Takuwa Y, Kamm KE, Stull JT, Garvas H, Rasmussen H. Atrial natriuretic peptide inhibits the agonist-induced increase in extent of myosin light chain phosphorylation in aortic smooth muscle. *J Biol Chem* 263: 13117-13120, 1988
- 30) Andreelli F, Laville M, Vallier P. Defective regulation of phosphatidylinositol-3-kinase gene expression in skeletal muscle and adipose tissue of non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. *Diabetologia* 42: 358-364, 1999
- 31) Kim YB, Kahn BB. Normal insulin-dependent activation of Akt/protein kinase B, with diminished activation of phosphoinositide 3-kinase, in muscle in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 104: 733-741, 1999
- 32) Katso R, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinase: implication for development, immunity, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 615-675, 2001
- 33) Northcott CA, Poy MN, Watts SW. Phosphoinositide 3-kinase mediates enhanced spontaneous and agonist-induced contraction in aorta of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Circ Res* 91: 360-369, 2002
- 34) Wehrwein EA, Northcott CA, Watts SW. Rho/Rho kinase and phosphoinositide 3-kinase are parallel pathways in the development of spontaneous arterial tone in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 1011-1019, 2004
- 35) Northcott CA, Watts SW. PI3-kinase upregulation and involvement in spontaneous tone in arteries from DOCA-salt rat. *Hypertension* 43: 885-890, 2004
- 36) Komalavilas P, Brophy CM. PI3-kinase/Akt modulates vascular smooth muscle tone via cAMP signaling pathways. *J Appl Physiol* 91: 1819-1829, 2001
- 37) Nakanishi S, Matsuda Y. Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 267: 2157-2163, 1992
- 38) Ngai PK, Carruthers CA, Walsh MP. Isolation of the native form of chicken gizzard myosin light-chain kinase. *Biochem J* 218: 863-870, 1984
- 39) Gohla A, Schultz G, Offermanns S. Role for G12/G13 in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res* 87: 221-227, 2000

**The important role of the class II phosphoinositide 3-kinase C2 $\alpha$  subtype in the regulation of Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle** Yu Wang, Department of Molecular Vascular Biology, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., **113**, 98 — 108 (2004)

**Key words** phosphoinositide-3-kinase, myosin phosphatase, Rho, Rho-kinase, myosin light chain, myosin light chain kinase

#### Abstract

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) is an enzyme which phosphorylates phosphoinositides (PIs) at D3 position of the inositol ring, producing PI-3-P, PI-3,4P<sub>2</sub> and PI-3,4,5-P<sub>3</sub>. These PI3K products mediate diverse activities including cell migration, re-organization of actin cytoskeleton, mitogenesis, cell survival and vesicular trafficking. Cloning of the catalytic subunits of PI3-kinases led to organizing the multi-gene family into three major classes, class I, II and III, based on their substrate specificity, sequence homology, and regulation. Most of the previous reports focused on class I and III. Little is known about regulation and cellular function of class II PI3K enzymes. The role of PI3Ks in the regulation of vascular functions is not fully understood. In order to explore the role of PI3Ks in vascular smooth muscle contraction, we examined the effects of the PI3-kinase inhibitors wortmannin (WMN) and LY294002 on KCl- and noradrenaline-induced tension generation, 20-kDa myosin light chain (MLC<sub>20</sub>) phosphorylation, Rho activation and myosin phosphatase inhibition. We made the following observations: 1) WMN and LY294002 dose-dependently inhibited KCl membrane depolarization-induced contraction and MLC<sub>20</sub> phosphorylation. Both responses were at least one order less sensitive to PI3K inhibitors compared to previously reported effects. 2) PI3K inhibitors also inhibited noradrenaline-induced MLC<sub>20</sub> phosphorylation and contraction. 3) LY294002 accelerated myosin light chain kinase inhibitor ML9-induced relaxation and MLC<sub>20</sub> de-phosphorylation in KCl-stimulated smooth muscle, implying that a PI3K inhibitor stimulates myosin phosphatase (MLCP). 4) In accordance with this notion, LY294002 inhibited KCl and noradrenaline-induced small G protein Rho activation and inhibitory phosphorylation of the myosin targeting regulatory subunit (MYPT1) of MLCP. 5) The expression of Class I PI3K p110 $\alpha$  and Class II PI3K-C2 $\alpha$  was detected in vascular smooth muscle. 6) PI3K-C2 $\alpha$  was found to be at least one order less sensitive to WMN than p110 $\alpha$ . 7) KCl and noradrenaline stimulated PI3K-C2 $\alpha$ , but rather inhibited p110 $\alpha$ . 8) Finally, the selective suppression of PI3K-C2 $\alpha$  expression by RNAi inhibited ionomycin-induced contraction in isolated vascular smooth muscle cells. These observations suggest that PI3K-C2 $\alpha$  is involved in contraction through stimulating Rho which negatively regulate MLCP in membrane depolarization- and receptor agonist-stimulated vascular smooth muscle.