

研究テーマ

平滑筋収縮を制御システムの解明

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

平滑筋は、血管や消化管、気管、子宮などの臓器を構成しており、生体のさまざまな反応において重要な役割を果たしている。このため、平滑筋の異常収縮は重篤な疾患の原因となる。我が国の死因の上位を占める狭心症や心筋梗塞などの虚血性心疾患や脳梗塞の主たる原因の一つは、心臓や脳などに分布する血管の攣縮(血管平滑筋の異常収縮)である。平滑筋の収縮は、リン酸化されたミオシンがアクチンと相互作用することによって、張力を発生し引き起こされる。そこで、本研究ではミオシンのリン酸化制御システムの動作原理を明らかにすることで、平滑筋収縮を制御するシステムメカニズムの解明を目指した。

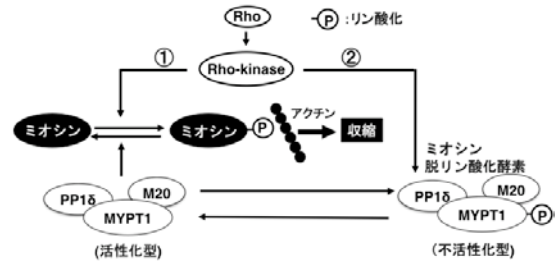


図1 Rho/Rho-kinaseによるミオシンのリン酸化制御機構

細胞外シグナルの下流で、低分子量GTP結合蛋白質Rhoが活性化されると、そのエフェクター分子であるRho-kinaseが活性化される。活性化されたRho-kinaseはミオシンを直接的にリン酸化すると同時にミオシン脱リン酸化酵素の調節サブユニット(MYPT1)をリン酸化し、脱リン酸化酵素活性を抑制する(図1①②)(Kaibuchi *et al.* 1999)。このように、Rho/Rho-kinaseは2つのシグナル伝達経路を介して、ミオシンのリン酸化を亢進させ、平滑筋収縮を引き起こす。血管平滑筋の異常収縮部位では、ミオシンのリン酸化が亢進していることが報告されている(Shimokawa *et al.* 1999)。Rho-kinase阻害剤はミオシンのリン酸化の異常亢進を抑制することから、平滑筋の異常収縮を原因とする疾患の治療薬として注目されている(Shimokawa and Rashid, 2007)。しかしながら、Rho/Rho-kinaseによるミオシンのリン酸化制御システムがどのような原理に基づき制御されているかは明らかではない。本研究では、Rho/Rho-kinaseによるミオシンのリン酸化制御シグナル伝達経路について数理モデルを構築し、平滑筋収縮を制御するシステムの動作原理を理論的手法により解析を行った。

2. 方法

細胞外シグナルであるThrombinは、Rhoを一過的にしか活性化しないにも関わらず、ミオシンの持続的なリン酸化を誘導することが知られている(Maeda *et al.* 2006)。しかしながら、なぜ上流シグナルの一過的な活性化に対し、下流シグナルの持続的な活性化が引き起こされるかは明らかではない。この特徴的なミオシンのリン酸化の挙動に着目し、Rho/Rho-kinaseによるミオシンのリン酸化制御システムの動作原理を解析した。

Rho/Rho-kinaseによるミオシンのリン酸化制御シグナル伝達経路を微分方程式で表現した数理モデルの構築を試みた。しかしながら、ミオシンのリン酸化を制御する既知のシグナル伝達経路をコンピュータシミュレーションモデルとして再現した先行研究により、*in silico*で持続的なミオシンのリン酸化が再現できないことから、未知のシグナル伝達経路の存在が示唆されていた(Maeda *et al.* 2006)。

Rho-kinaseの基質蛋白質の多くがミオシン脱リン酸化酵素の制御を受けることが知られている(Amano *et al.* 2003; Kaibuchi *et al.* 1999)。ミオシン脱リン酸化酵素の調節サブユニット(MYPT1)は、Rho-kinaseの基質蛋白質の一つであり、MYPT1がミオシン脱リン酸化酵素によって脱リン酸化制御を受ける可能性が高いと考えられる。そこで、未知のシグナル伝達経路として、ミオシン脱リン酸化酵素によるMYPT1の脱リン酸化反応を導入し、数理モデルを作成した。本研究で作成した数理モデルでは、細胞内のシグナル分子濃度及びミカエリス定数、分子活性などのパラメータは、文献に報告されている実測値を用いた。作成した数理モデルを用いたコンピュータシミュレーションにより、ミオシンのリン酸化の挙動を予測した。シミュレーション結果と実測されたミオシンのリン酸化の挙動を比較することにより、作成した数理モデルの妥当性を検討した。さらに、作成した数理モデルを用いて、Rho/Rho-kinaseがどのような原理に基づきミオシンのリン酸化を制御しているか解析を行った。

3. 結果 研究成果

Thrombinを作用させた時のRhoの活性が一過的であるにもかかわらず、ミオシンのリン酸化が持続的に起こることから、Rho-kinaseの一過的な活性を入力シグナルとして与え、ミオシンのリン酸化の挙動をコンピュータシミュレーションにより予測した。その結果、Rho-kinaseの一過的な活性化に対して、ミオシンの持続的なリン酸化を再現することができた(図2)。

さらに、構築した数理モデルを用い、Rho-kinaseの活性に対するミオシンのリン酸化の定常状態を理論的に予測した。その結果、ミオシンのリン酸化の定常状態は2つの安定な定常状態と1つの不安定な定常状態を持つことが予測された(図3)。

この結果は、ミオシンのリン酸化はRho-kinaseの活性に対して双安定性を示す。双安定なシステムでは、上流シグナルの連続的な変化に対して、非連続な下流シグナルの出力が得られる。すなわち、上流シグナルが閾値を超えると、下流シグナルが不可逆的に活性化状態へと遷移する。よって、ミオシンのリン酸化制御システムが双安定であれば、上流シグナルのRho/Rho-kinaseの活性化が一過的でも、ミオシンのリン酸化が持続すると考えられ、現在までに報告されているミオシンのリン酸化の動的挙動と良く一致する。

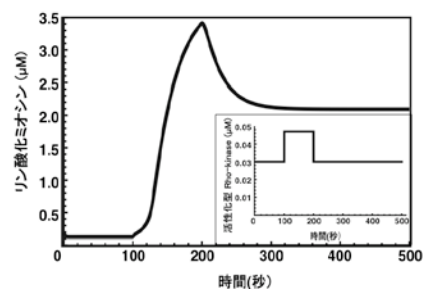


図2 リン酸化ミオシンのシミュレーション結果

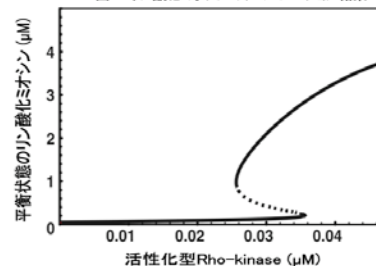


図3 ミオシンのリン酸化は双安定

4. 考察 まとめ

Rho/Rho-kinaseによるミオシンのリン酸化制御シグナル伝達経路には、ミオシンの脱リン酸化酵素によるMYPT1の脱リン酸化反応が存在する可能性が高い。Rho-kinaseによるMYPT1のリン酸化は、ミオシン脱リン酸化酵素の活性を抑制的に制御する。よって、ミオシン脱リン酸化酵素によるMYPT1の脱リン酸化は、ミオシン脱リン酸化酵素活性を亢進させるポジティブフィードバックループの役割を果たすと考えられる。ポジティブフィードバックループやネガティブフィードバックループはパラメータ依存的に双安定性を示す事が知られている。本研究では、文献によって報告されている既知のパラメータ(分子濃度・ミカエリス定数・分子活性など)を用いて作成した微分方程式を用いて、定常状態を予測した。その結果、ミオシンのリン酸化が双安定性を示すことが予測された。

自然界の多くの現象が双安定なシステムによって制御されていることが知られている。しかしながら、双安定性によって制御されている生命機能を実験的に示した研究はほとんどない。そこで、今後は理論から予測されたRho/Rho-kinaseによるミオシンのリン酸化制御システムの動作原理を生化学・細胞生物学実験により実証していきたい。

5. 発表論文、参考文献

- 1) Amano, M., Kaneko, T., Maeda, A., Nakayama, M., Ito, M., Yamauchi, T., Goto, H., Fukata, Y., Oshiro, N., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (2003). Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase. *J Neurochem* 87, 780-790.
- 2) Kaibuchi, K., Kuroda, S. and Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 68, 459-486.
- 3) Maeda, A., Ozaki, Y., Sivakumaran, S., Akiyama, T., Urakubo, H., Usami, A., Sato, M., Kaibuchi, K., and Kurada, S. (2006). Ca²⁺-independent phospholipase A2-dependent sustained Rho-kinase activation exhibits all-or-none response. *Genes Cells* 11, 1071-1083.
- 4) Shimokawa, H., and Rashid, M. (2007). Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. *Trends Pharmacol Sci* 28, 296-302.
- 5) Shimokawa, H., Seto, M., Katsumata, N., Amano, M., Kozai, T., Yamawaki, T., Kuwata, K., Kandabashi, T., Egashira, K., Ikegaki, I., Asano, T., Kaibuchi, K., and Takeshita, A. (1999). Rho-kinase-mediated pathway induces enhanced myosin light chain phosphorylations in a swine model of coronary artery spasm. *Cardiovasc Res* 43, 1029-1039.