

研究課題：血管平滑筋の形質変換時における筋線維の動的変化に關与する
因子の検索

課題番号 17590218

平成17年度～18年度科学研究費補助金(基盤研究(C))研究成果報告書

平成19年 5月

研究代表者 岡垣 壮
(三重大学大学院生物資源学研究科助教授)

<はしがき>

動脈硬化症などの生活習慣病や癌などの疾患においては血管の病変が重要な関与をしている。血管に弾力性を与えている平滑筋細胞は、状況によって性質の異なる細胞へと形質変換する。動脈硬化症病変において血管平滑筋細胞は、正常な収縮をする「収縮型」細胞から筋線維に乏しく細胞外マトリックスを多量に分泌する「合成型」型細胞へと変化する。また胎児期での血管発生や成人での毛細血管の新生においては、平滑筋が未分化の状態から分化した「収縮型」細胞へと変化する。しかし形質変換の分子レベルでの変化については不明の点が多く、それを解明することにより様々な疾患の発症のメカニズムが解明されると期待される。そこで培養平滑筋細胞を用いて形質変換のモデル系を作成し、形質変換において発現量の変化する遺伝子を網羅的にスクリーニングすることにした。さらに特定できた遺伝子の発現レベルを詳細に解析した。

研究組織

研究代表者 岡垣 壮 (三重大学・大学院生物資源学研究科・助教授)
研究分担者 大井敦史 (三重大学・大学院生物資源学研究科・助手)
中村彰男 (群馬大学・大学院医学系研究科・講師)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成17年度	2、500	0	2、500
平成16年度	1、100	0	1、100
総額	3、600	0	3、600

研究発表

(1) 学会誌等

Nakamura A, Hanyuda Y, Okagaki T, Takagi T, Kohama K.

A calmodulin-dependent protein kinase from lower eukaryote *Physarum polycephalum*.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (2005) Mar 25;328(4):838-844.

Okagaki T, Takami M, Hosokawa K, Yano M, Higashi-Fujime S, Ooi A.

Biochemical properties of ordinary and dark muscle myosin from carp skeletal muscle. *J.*

Biochem. (2005);138:255-262.

Katayama T, Yoshiyama S, Tanaka H, Wang HH, Nakamura A, Kohama K.

Blebbistatin inhibits sphingosylphosphorylcholine-induced contraction of collagen-gel fiber populated by vascular smooth-muscle cells.

J. Pharmacol. Sci. (2006);102:339-342.

Li S, Tanaka H, Wang HH, Yoshiyama S, Kumagai H, Nakamura A, Brown DL, Thatcher SE, Wright GL, Kohama.

Intracellular signal transduction for migration and actin remodeling in vascular smooth muscle cells after sphingosylphosphorylcholine stimulation.

Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. (2006);291:H1262-1272.

Kawamichi H, Zhang Y, Hino M, Nakamura A, Tanaka H, Farkas L, Nyitray L, Kohama K.

Calcium inhibition of *Physarum* myosin as examined by the recombinant heavy mero-myosin.

Adv. Exp. Med. Biol. (2007);592:265-272.

Sumiyoshi H, Ooguchi M, Ooi A, Okagaki T, Higashi-Fujime S.

Insight into the mechanism of fast movement of myosin from *Chara corallina*.

Cell Motil. Cytoskel. (2007); 64:131-142.

Okagaki T, Yang L, Ooi A.

Mechanochemical properties of ordinary and dark muscle myosins from seawater fish. *Fish. Sci.*

(2007);73:184-188.

Okagaki T, Suzuki R, Ooi A.

C-protein (MyBP-C) isoforms from carp ordinary and dark muscles and their muscle type specific binding to myosin. *Fish. Sci.* 73: 638-648 (2007)

(2) 口頭発表

岡垣壮、高見将樹、細川喜代、矢野美幸、藤目杉江、大井敦史：コイ普通筋（速筋）および血合筋（遅筋）ミオシンの生化学的性質について、第43回日本生物物理学会年会(2005)

大井敦史、田村陽次郎、岡垣壮：グルコン酸塩の分子間相互作用とミオシンゲルへの強い作用、第43回日本生物物理学会年会(2005)

岡垣壮、中村彰男、小濱一弘、長崎香奈、河合悠希：培養血管平滑筋細胞 AC01 の増殖、形態、性質に及ぼす PDGF と酪酸ナトリウムの効果、第79回日本薬理学会年会(2006)

中村彰男、岡垣壮、小濱一弘：平滑筋培養細胞の分化型、非分化型における miRNA の分布、第79回日本薬理学会年会(2006)

吉山伸司、永田宏次、中村彰男、田之倉優、小浜一弘：下等真核生物粘菌より抽出した平滑筋弛緩物質 (2nd report) 第79回日本薬理学会年会(2006)

河野憲史、中村彰男、Gao Ying、石川良樹、吉山伸司、羽生田友紀、高橋あゆみ、小濱一弘：リコンビナント平滑筋全長ミオシン軽鎖キナーゼの解析、第79回日本薬理学会年会(2006)

田中秀幸、Li Sheng、Thatcher Sean、Brown Dawn、中村彰男、Wright Gray、小濱一弘：スフィンゴ脂質刺激による血管平滑筋細胞内アクチン構築と細胞遊走の形態学的研究、第79回日本薬理学会年会(2006)

張影、川道穂津美、中村彰男、佐溝剛一、日野瑞城、Farkas Laszlo、Nyitray Laszlo、

小濱一弘：真性粘菌フィザルムのヘビーメロミオシンの発現と機能解析、第79回日本薬理学会年会(2006)

Okagaki, Nagahama, Miyamoto, Nakamura, Kohama, Nagasaki, Kawai: Effect of PDGF and sodium butyrate on the properties of cultured vascular smooth muscle cell p53LMAC01, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006)

Tamura, Ooi, Okagaki: Changes in adiabatic compressibility of calmodulin with calcium bound state and unbound state, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006)

Nakamura, Kawano, Gao, Ishikawa, Hanyuda, Takahashi, Kohama: High level expression and characterization of the recombinant smooth muscle myosin light chain kinase, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (2006)

中村彰男、岸博子、松本篤、石川良樹、小林誠、小濱一弘：セリン・スレオニンキナーゼによるリコンビナントミオシン軽鎖キナーゼのリン酸化、第80回日本薬理学会年会(2007)

片山豪、吉山伸司、田中秀幸、王洪輝、中村彰男、小濱一弘：スフィンゴシルホスホリルコリンは人工平滑筋組織を収縮させ、プレビスタチンはこれを弛緩する、第80回日本薬理学会年会(2007)

王洪輝、田中秀幸、石川良樹、秦宵然、趙鉄軍、叶麗虹、岡垣壮、中村彰男、小濱一弘：プレビスタチンによる平滑筋ミオシン・モーター活性阻害と平滑筋遊走阻害について、第80回日本薬理学会年会(2007)

研究成果

研究の目的

血管平滑筋は分化の進んだ筋線維の発達した「収縮型」、および未分化で増殖をする「合成型」の2種類の細胞に形質変換する。平成16年度までの研究で培養血管平滑筋細胞をPDGF処理によって合成型様細胞、酪酸ナトリウム(Na-butyrate, NaB)処理によって収縮型様細胞を作製することができるようになった。そこでそれらの2種類の細胞に特異的な遺伝子を選別するために、サブトラクションライブラリーを作成して、スクリーニングして遺伝子を同定することにした。

以下のような研究計画で実験を遂行した。

- 1) サブトラクションライブラリーの構築
- 2) ライブラリーの塩基配列の決定と相同性検索
- 3) ハイブリダイゼーションによる発現量の差のチェック
- 4) 形質変換後に増減する遺伝子のスクリーニングと発現量の定量
- 5) ミオシンの機能を調節する因子の解析

研究結果

1) サブトラクションライブラリーの構築

平滑筋は状況に応じて分化の進んだ筋線維の発達した収縮型、および未分化で増殖をする合成型の2種類の細胞に形質変換する。この過程を明らかにするため培養血管平滑筋細胞をPDGF処理によって合成型様細胞、酪酸ナトリウム(Na-butyrate, NaB)処理によって収縮型様細胞を作製し、それらの細胞に特異的な遺伝子を検索することにした。それぞれの細胞からmRNAを単離しcDNAを合成し、サブトラクション法(Clontech PCR select differential subtraction kit)によりPDGF処理細胞特異的遺伝子とNaB特異的遺伝子をスクリーニングし、それぞれについてpENT-TEVプラスミドへtopoisomerase反応で挿入してプラスミドライブラリーを構築した。

2) ライブラリーの塩基配列の決定と相同性検索

プラスミドを大腸菌に形質転換し、PCRによって100bp以上のインサートをもつクローンを同定し、シーケンス、BLAST解析をおこなった。PDGF特異的ライブラリーからは2300クローンを単離し、そのうち740クローンについてシーケンスをおこない、230クローンの遺伝子が特定できた。これらの中には分泌系、転写因子等の核内タンパク質、リボソームに関連する遺伝子が多く含まれていた。またNaB特異的ライブラリ

一からは1200クローンを解析し、そのうち440クローンについてシーケンスを行い、160クローンについて遺伝子が特定できた。これらの中には細胞骨格系、プロテオソーム系の遺伝子が多く含まれていた。

3) ハイブリダイゼーションによる発現量の差のチェック

実際に上記の方法で得られたクローンがそれぞれ PDGF 処理細胞、NaB 処理細胞で有意に発現の差が見られるかをハイブリダイゼーションでチェックした(Clontech differential screening kit を利用)。まずスクリーニングしたクローンを PCR で増幅しナイロン膜にドットプロットしたものを4セット用意した。それぞれのナイロン膜に4種類のプローブを反応させて、仮想的 Northern ハイブリダイゼーションをおこないシグナルをイメージャーで定量した。使用したプローブはサブトラクションする前の PDGF 処理細胞、および NaB 処理細胞の cDNA、さらに forward subtraction、および reverse subtraction した cDNA の4種類である。その結果有意に特異性が認められたものが PDGF 処理細胞では15クローン、NaB 処理細胞では19クローンに集約された。PDGF 特異的遺伝子は S100A4, Salvador homologue, gamma-actin, alpha-tubulin, zinc finger protein 289, homer homologue, DnaJ homologue, Hox 1.3 gene, DEAD box polypeptide, ring finger protein 11, rho family GTPase3 等であった。一方 NaB 特異的遺伝子は S100A6, afadin, serum inducible protein kinase, rho GTPase activating protein 2, motofusink, vascular cell adhesion molecule1, vacuolar protein sorting 37A, eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, splicing factor SC-35, metastasis suppressor 1, kinesin-associated protein 3 等であった。

4) 形質変換後に増減する遺伝子のスクリーニングと発現量の定量

上記の集約されたクローンに対してプライマーを作製し、リアルタイム PCR をおこなって PDGF 処理細胞と NaB 処理細胞での発現量に有意に差があるかを確認した。2種類の細胞で発現量の差が2倍以上認められたものは Ca^{2+} 結合蛋白質である S100A4, S100A6、および α -actin などであった。そこで S100A4, S100A6 の全長をクローニングし、大腸菌で発現蛋白質を作成した。さらにこの発現蛋白質と Ca^{2+} 依存的に相互作用する因子3種類を培養平滑筋細胞から単離することができた。これらについては現在アミノ酸シーケンスを決定する準備を行っている。さらに上記の発現蛋白質を抗原としてニワトリに免疫して卵黄抗体の作成した。またアフィニティー精製を行って、特異的抗体を作成した。

5) ミオシンの機能を調節する因子の解析

EF-hand カルシウム結合タンパク質ファミリーの S100A4 は非筋細胞においてミオシンの線維形成を調節することが報告されている。そこで S100A4 の平滑筋ミオシンの線維形成に対する影響を調べた。S100A4 は Ca^{2+} 依存的に非リン酸化ミオシンの重合を阻害することがわかった。しかしリン酸化ミオシンに対しては線維形成を阻害することはなかった。またミオシン線維安定化因子 p32 存在下でもこの S100A4 の阻害効果が観察された。

今後の研究の展開

上記のスクリーニングによって有意に発現量に差のあった残りのクローンについてもリアルタイム PCR によって同様な解析を続けていく予定である。さらに PDGF を添加後、1日後、2日後、3日後の細胞から mRNA を単離して、PDGF 処理細胞特異的な遺伝子の発現量の時間変化を追跡していく予定である。同様に NaB を添加してからの時間変化を追って、NaB 処理細胞特異的な遺伝子の発現量の時間変化を追跡したい。これらの実験により特異的な遺伝子の発現と筋線維の構成要素の発現量の変化との相関を調べたい。またこれらの遺伝子を大腸菌で発現することによって、pull down assay 法によって平滑筋細胞内でこれらの遺伝子と相互作用する因子の単離をおこないたい。

要約

血管平滑筋は分化の進んだ筋線維の発達した「収縮型」、および未分化で増殖をする「合成型」の2種類の細胞に形質変換する。培養血管平滑筋細胞を PDGF 処理によって合成型様細胞、酪酸ナトリウム (Na-butyrate, NaB) 処理によって収縮型様細胞を作製し、それらの細胞に特異的な遺伝子のサブトラクションライブラリーを作成することによりスクリーニングした。PDGF 特異的なライブラリーからは 230 クローンが、NaB 特異的なライブラリーからは 160 クローンの遺伝子が特定できた。これらのクローンをナイロン膜にドットプロットした膜を4枚ずつ用意し、特異性を確認するため仮想的 Northern ハイブリダイゼーションをおこなった。使用したプローブは、サブトラクションした2種類の cDNA、およびサブトラクション前の2種類の cDNA である。その結果有意に特異性が認められたものが PDGF 処理細胞では 15 クローン、NaB 処理細胞では 19 クローンに集約された。そこでこれらのクローンに対してプライマーを作製し、リアルタイム PCR をおこなって PDGF 処理細胞と NaB 処理細胞での発現量に有意に差があるかを確認した。

2種類の細胞で発現量の差が2倍以上認められたものは Ca^{2+} 結合蛋白質である S100A4、S100A6、および α -actin などであった。そこで S100A4、S100A6 の全長をクローニング

し、大腸菌で発現蛋白質を作成した。さらにこの発現蛋白質と Ca^{2+} 依存的に相互作用する因子 3 種類を培養平滑筋細胞から単離することができた。これらについては現在アミノ酸シーケンスを決定する準備を行っている。今後は有意に発現量に差のあった残りのクローンについても同様な解析を続けていく予定である。

SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Vascular smooth muscle cell (VSMC) shows two typical phenotype, contraction-type and synthetic-type upon various situations. We developed model system of phenotypic modulation by using cultured VSMC, P53LMAC01. Upon addition of PDGF, the VSMC changed to synthetic-type phenotype, and it changed to typical contraction-type phenotype in the presence of sodium butyrate (Na-B), which induce growth suppression by inhibiting acetylation of DNA. We isolated mRNA from these typical two types of cell and constructed subtraction cDNA library. We sequenced inserts of the library, and screened 230 clones from PDGF-specific library, and 160 clones from NaB-specific library. Further inserts of each clone were spotted to nylon membrane and examined by putative Northern hybridization to confirm the specificity in each types of cell. Four sets of membrane was hybridized with four sets of probes, two subtracted cDNAs and two original cDNAs from PDGF- and NaB-treated cells. As a result, 15 clones from PDGF-specific library and 19 clones from NaB-specific library were confirmed in the specificity of the expression. To quantify the expression level of these clones in PDGF- and NaB-treated cell, we made primer sets for each clone and examined with real time PCR. Clones showing 2-fold difference of expression among these two types of cell were S100A4, S100A6, α -actin and others. We isolated the full-length cDNA of S100A4 and S100A6 by RT-PCR, and expressed these genes in bacteria. Using these gene products we affinity purified three proteins that interact with S100A4 and S100A6 proteins from the VSMC.