



Involvement of MAP kinase activators in angiotensin II-induced activation of MAP kinases in cultured vascular smooth muscle cells

Ishida, Yoshihiro

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-03-26

(Date of Publication)

2015-09-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2130

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3129893>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002130>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	石田義裕 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博ろ第1575号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成9年3月26日
学位論文題目	Involvement of MAP kinase activators in angiotensin II-induced activation of MAP kinases in cultured vascular smooth muscle cells (培養血管平滑筋細胞のアンギオテンシンIIによるMAPキナーゼ活性化におけるMAPキナーゼ活性化因子の関与)
審査委員	主査 教授 横山光宏 教授 尾原秀史 教授 中村俊一

論文内容の要旨

【序文】

アンギオテンシンII (AII) は血管平滑筋細胞 (VSMC) の収縮のみならず肥大や増殖を引き起こすことが示され、高血圧や動脈硬化の発生、進展機構と関連して注目されている。VSMCにおいて、AIIはCキナーゼ (PKC) 系やCa²⁺系を介して細胞増殖に必須の細胞性癌遺伝子*c-fos*, *c-jun*や*c-myc*の発現を促進するが、PKC系やCa²⁺系がいかなる機構で核内遺伝子の発現を促進するかは明らかでない。

Mitogen-activated-proteinキナーゼ (MAPK) は血小板由来増殖因子 (PDGF) や上皮増殖因子 (EGF) などの細胞増殖因子の作用時に、チロシンとセリン/スレオニン残基がリン酸化され活性化される蛋白質リン酸化酵素である。活性化されたMAPKは種々の酵素蛋白質や細胞骨格蛋白質をリン酸化するとともに、細胞核に移行して、種々の転写因子、中でもP62^{T_{CF}}をリン酸化する。リン酸化されたP62^{T_{CF}}は*c-fos*遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域のシスエレメントSRE (serum response element) に結合する転写因子SRF (serum response factor) と複合体を形成して*c-fos*の発現を促進する。MAPKはまた、核内の細胞性癌遺伝子*c-jun*, *c-myc*の産物をリン酸化すると報告されている。従ってMAPKは細胞膜から核への情報伝達に関与すると考えられる。最近PDGFやEGFなどの細胞増殖因子によるMAPKの活性化にMAPK活性化因子が関与することが明らかになっている。我々は既にVSMCにおいて、AIIが二種類のMAPK (分子量40kDaのキナーゼ1, 45kDaのキナーゼ2) のチロシンとセリン/スレオニン残基をリン酸化し活性化することを明らかにしているが、本研究ではVSMCにおいてAIIによるMAPK活性化機構に、MAPK活性化因子が関与するか否かを検討した。

【実験方法】

1) VSMCの調整 ラット大動脈中膜平滑筋より酵素消化法により調整した。継代数8-16代のconfluentの細胞を48時間無血清で培養した後実験に使用した。

2) MAPK活性の測定

A IIで刺激したVSMCの可溶性画分のMAPK活性はミエリン塩基性蛋白質 (MBP) を基質として用い、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPの存在下で30°C15分間インキュベートし、 ^{32}P でラベルされたリン酸化MBPをトリクロロ酢酸で沈殿させた後、ニトロセルロースフィルターに集め液体シンチレーションカウンターで測定した。

3) 不活性型MAPKの部分調整

無刺激のVSMCの可溶性画分をDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーで溶出後MonoQカラムクロマトグラフィー (MonoQ) で分画し、各分画を抗MAPK抗体を用いたイムノプロット法で解析した。抗MAPK抗体で認識される分子量40kDaと45kDaの蛋白質を有する分画を集め不活性型MAPKとして用いた。

4) MAPK活性化因子活性 (不活性型MAPKを活性化させる活性) の測定

MonoQまたはゲルろ過で分離した各分画を不活性型MAPKと $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPの存在下で30°C15分間インキュベートした後基質としてMBPを加え、さらに30°C15分間インキュベートし、MAPK活性を測定した。

5) MAPK活性化因子の部分調整

A IIで刺激したVSMCの可溶性画分をMonoQで分画し、各分画のMAPK活性化因子活性を測定した。活性のある分画をさらにSuperose 12 HR 10/30カラムクロマトグラフィーでゲルろ過し、各分画のMAPK活性化因子活性を測定し、活性のある分画をMAPK活性化因子として用いた。

6) In vitroにおけるMAPK活性化因子による不活性型MAPKの活性化反応

部分精製したMAPK活性化因子と不活性型MAPKを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPの存在下で30°C15分間インキュベートした後基質のMBPをポリアクリアミドゲル内に含ませたゲル内リン酸化反応で解析した。

7) In vitroにおけるMAPK活性化因子による不活性型MAPKのリン酸化反応

部分精製したMAPK活性化因子と不活性型MAPKを $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATPの存在下で30°C15分間インキュベートした後SDS-ポリアクリアミドゲル電気泳動で分離し、一部をポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜に転写後オートラジオグラフィーで解析した。また一部をPVDF膜に転写後、抗MAPK抗体によるイムノプロット法で解析し、抗体陽性のバンドを溶出し、リン酸化アミノ酸分析に供した。

【結果】

A II刺激前のVSMCの可溶性画分をMonoQで分離すると、いずれの分画にもMAPK活性はほとんど認められなかった。しかし、これらの分画を抗MAPK抗体によるイムノプロット法で解析すると、不活性型のキナーゼ1とキナーゼ2はほぼ同じ分画に溶出された。これらの分画を集め不活性型のMAPKとして以下の実験に用いた。A IIで刺激したVSMCの可溶性画分をMonoQで分離し、各分画に不活性型MAPKを加えてMAPK活性化因子活性を測定すると、内因性MAPKの2峰のピーク (キナーゼ1とキナーゼ2) の直前にMAPK活性化因子活性のピークが3峰認められた。PKCを活性化する12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート (TPA) で刺激した場合も同様のMAPK活性化因子活性の3峰のピークが認められた。非刺激下のVSMCでは、これらのMAPK活性化因子活性は認められなかった。MonoQで分離されたMAPK活性化因子活性の3峰のピークを各々Superose12HR 10/30カラムクロマトグラフィーでゲルろ過したところ、3峰のピークともMAPK活性化因子活性は分子量約60kDaの位置に溶出された。この内2番目のピークをゲルろ過した標品をMAPK活性化因子として以下の*in vitro*の実験に用いた。(1番目、3番目のピークを使用しても同様の結果が得

られた)。

*In vitro*において不活性型MAPKをMAPK活性化因子と共にインキュベートすると、分子量40kDaのキナーゼ1、45kDaのキナーゼ2が活性化された。またこの時40kDa、45kDaの2種類のMAPKがリン酸化された。このリン酸化されたMAPKのリン酸化アミノ酸分析を行ったところ、キナーゼ1、キナーゼ2ともリン酸化チロシン、リン酸化スレオニン、少量のリン酸化セリンを含有していた。

【考察】

本研究の結果から、VSMCにおいてAIIによるMAPKのリン酸化と活性化機構にMAPK活性化因子が関与することが明らかとなった。我々は既にVSMCにおいてAIIは主としてPKC系を介して二種類のMAPK(キナーゼ1、キナーゼ2)を活性化することを明らかにしている。PKCを活性化するTPAもAIIと同様のMAPK活性化因子を活性化することから、AIIはPKC、MAPK活性化因子、MAPKからなるキナーゼカスケードを介して細胞核へシグナルを伝達すると考えられる。

AIIによって活性化されるMAPK活性化因子はMonoQで3峰のピークに分離され、いずれもゲルろ過上ほぼ同じ分子量約60kDaと推定された。EGF刺激による線維芽細胞や、神経成長因子刺激によるPC12細胞においても陰イオン交換クロマトグラフィーでMAPK活性化因子活性のピークが2峰性に認められることが報告されている。これらのMAPK活性化因子相互の関係は明らかではないが、MAPK活性化因子には複数のアイソフォームが存在する可能性が示唆される。

MAPK活性化因子がMAPKのチロシンとセリン/スレオニン残基のリン酸化を促進する機序は明らかではないが、1) MAPK活性化因子がMAPKのチロシンとセリン/スレオニン残基両方の自己リン酸化を促進する、2) MAPK活性化因子がチロシンまたはセリン/スレオニン残基特異的リン酸化酵素で、一方のリン酸化により他方の自己リン酸化が促進される、3) MAPK活性化因子がチロシンとセリン/スレオニン残基両方のリン酸化酵素である

という3つの可能性があるが、今後MAPK活性化因子の精製とクローニングにより解明する必要がある。

論文審査の結果の要旨

アンジオテンシンII(AII)は血管平滑筋細胞(VSMC)の収縮のみならず肥大や増殖を引き起こすことが示され、高血圧や動脈硬化の発生、進展機構と関連して注目されている。VSMCにおいて、AIIはCキナーゼ(PKC)系やCa²⁺系を介して細胞増殖に必須の細胞性癌遺伝子*c-fos*、*c-jun*や*c-myc*の発現を促進するが、PKC系やCa²⁺系がいかなる機構で核内遺伝子の発現を促進するかは明らかでない。

Mitogen-activated-proteinキナーゼ(MAPK)は血小板由来増殖因子(PDGF)や上皮増殖因子(EGF)などの細胞増殖因子の作用時に、チロシンとセリン/スレオニン残基がリン酸化され活性化される蛋白質リン酸化酵素である。活性化されたMAPKは種々の酵素蛋白質や細胞骨格蛋白質をリン酸化するとともに、細胞核に移行して、種々の転写因子、中でもP62^{Tcf}をリン酸化する。リン酸化されたP62^{Tcf}は*c-fos*遺伝子のプロモーター・エンハンサー領域のシスエレメントSRE(serum response element)に結合する転写因子SRF(serum response factor)と複合体を形成して*c-fos*の発現を促進する。従ってMAPKは細胞膜から核への情報伝達に関与すると考えられる。最近PDGFやEGFなどの細胞増殖因子によるMAPKの活性化にMAPK活性化因子が関与することが明らかに

なっている。我々は既にVSMCにおいてA IIが二種類のMAPK（分子量40kDaのキナーゼ1，45kDaのキナーゼ2）のチロシンとセリン/スレオニン残基をリン酸化し活性化することを明らかにしているが、本研究ではVSMCにおいてA IIによるMAPK活性化機構に、MAPK活性化因子が関与するか否かを検討した。

A II非刺激時の培養ラット大動脈平滑筋細胞の可溶性画分をMonoQで分離すると、いずれの分画にもMAPK活性はほとんど認められなかった。しかし、これらの分画を抗MAPK抗体によるイムノブロット法で解析すると、不活性型のキナーゼ1とキナーゼ2はほぼ同じ分画に溶出された。これらの分画を集め不活性型のMAPKとして以下の実験に用いた。A IIで刺激したVSMCの可溶性画分をMonoQで分離し、各分画に不活性型MAPKを加えてMAPK活性化因子を測定すると、内因性MAPKの2峰のピーク（キナーゼ1とキナーゼ2）の直前にMAPK活性化因子活性のピークが3峰認められた。PKCを活性化する12-0-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート（TPA）で刺激した場合も同様のMAPK活性化因子活性の3峰ピークが認められた。非刺激下のVSMCでは、これらのMAPK活性化因子活性は認められなかった。MonoQで分離されたMAPK活性化因子活性の3峰のピークを各々カラムクロマトグラフィーでゲルろ過したところ、3峰のピークともMAPK活性化因子活性は分子量約60kDaの位置に溶出された。次に、*in vitro*において不活性型MAPKをゲルろ過したMAPK活性化因子と共にインキュベートすると、分子量40kDaのキナーゼ1，45kDaキナーゼ2が活性化された。またこの時40kDa，45kDaの2種類のMAPKがリン酸化された。このリン酸化されたMAPKのリン酸化アミノ酸分析を行ったところ、キナーゼ1，キナーゼ2ともリン酸化チロシン，リン酸化スレオニン，少量のリン酸化セリンを含有していた。

本研究はVSMCにおいてA II刺激による細胞内プロテインキナーゼカスケードについて研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったMAPKのリン酸化と活性化機構にMAPK活性化因子が関与することについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。