

28amD-002S

ラット尾動脈平滑筋の高カリウムによる脱分極刺激によって生じる収縮における CPI-17 リン酸化

山田 彩加¹, 文屋 隆之¹, 〇月岡 佑太¹, 木村 江理香¹, Michael P. WALSH², 三田 充男¹, 庄司 優¹(¹明治薬大, ²カルガリー大)

【目的】我々は以前ラット尾動脈血管平滑筋の高 K^+ による脱分極刺激によって生じる収縮の持続相は RhoA/Rho キナーゼ (ROK) の活性化による MYPT1 (myosin targeting subunit of myosin light chain phosphatase (MLCP)) リン酸化を介した MLCP の抑制によって導かれることを見いだした [*Biochem. J.*, **364**, 431-440 (2002)]. 一方、ROK はプロテインキナーゼ C (PKC) とともに MLCP に特異的な活性阻害タンパク質である CPI-17 をリン酸化し、MLCP 活性を阻害することが報告されている。そこで、本研究では高 K^+ 収縮における CPI-17 リン酸化の関与について検討した。

【方法】ラット尾動脈らせん標本を 60 mM K^+ あるいは PKC 活性化薬ホルボール-12, 13 ジブチレート (PDBu) で刺激後、10% TCA 及び 10 mM DTT を含むアセトン/ドライアイス中で反応を止めた。凍結乾燥後、標本からタンパク質を抽出し、Phos-tag[®] SDS-PAGE を用いて非リン酸化とリン酸化 CPI-17 を分離した。定量にはウェスタンブロット法を用い、抗ウサギ CPI-17 抗体により化学発光検出法で定量した。

【結果】PDBu 刺激時、非リン酸化及びリン酸化 CPI-17 を明瞭に分離することができ、PDBu 刺激により CPI-17 リン酸化量は有意に増加した。さらには、リン酸化 CPI-17 抗体を用いた結果より、リン酸化部位は Thr38 であることが示された。一方、60mM K^+ 刺激においては CPI-17 リン酸化量の有意な増加は観察されなかった。

【考察】以上のことより、ラット尾動脈平滑筋の高 K^+ 収縮には、ROK 及び PKC を介した CPI-17 のリン酸化は関与しないことが示された。