Gタンパク質共役型受容体を介した ホスホリパーゼCシグナル伝達系に対する抑制性調節機構

松岡 功, 伊藤 政明

要約: ホスファチジルイノシトールに特異的なホスホリパーゼC (PLC) は、三量体Gタンパク質のエフェクターの一つで、Gタンパク質共役型受容体 (GPCR) で認識されたホルモンや神経伝達物質の情報を、 Ca^{2+} に依存した細胞内情報に変換し、興奮性生理反応を惹起する酵素として重要な役割を果たしている。このPLCシグナル伝達系の過剰な応答は、平滑筋収縮による血圧上昇や気道狭窄、分泌細胞からのケミカルメディエーターの放出亢進、血小板機能亢進など様々な病態と関連した反応を引き起こすことから、これらを抑制的に調節することは疾病の治療戦略として用いられてきた。GPCRの刺激効果は $\text{G}\alpha_q$ と各 $\text{G}\beta\gamma$ でシグナル伝達が行われPLCを活性化する。GPCRの下流で働く代表的なエフェクターであるcAMP合成酵素のアデニル酸シクラーゼが、抑制性Gタンパク質の G_i により負に制御されるのに対し、PLCシグナル伝達系を抑制するGタンパク質は存在しない。しかし、他のGタンパク質共役型受容体の刺激がcAMPやcGMPなどの細胞内情報伝達系を介し間接的にPLCシグナルを抑制することが知られている。最近、cAMPを介した他の受容体のクロストークや、PLC活性化に関わる $\text{G}\alpha_q$ のスイッチを切るタンパク質の役割が解明された。さらに、疾患モデル動物やヒトゲノム解析の結果からPLCシグナル伝達系の負の制御機構の不全が循環器系疾患の発症に関与することが示唆されている。

はじめに

種々のホルモンや神経伝達物質の情報は7回膜貫通構造を持つGタンパク質共役型受容体 (GPCR) で認識され、受容体に共役した三量体Gタンパク質を介

して細胞内情報伝達系へと伝播される。ホスファチジルイノシトール-4,5二リン酸 [$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$] の分解を促進するホスホリパーゼC (PLC) はGPCR刺激の下流でGタンパク質により活性化され、2つの細胞内情報伝達物質、すなわち、イノシトール三リン酸 (IP_3) とジアシルグリセロール (DG) を産生する。 IP_3 は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位から Ca^{2+} 放出を促進し、DGはCキナーゼ (PKC) を活性化する。この結果生じる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とタンパク質リン酸化は、各器官の興奮性の生理機能を惹起し、その過剰反応は多くの病態の原因になっている(1)。例えば、血管平滑筋収縮による血圧上昇、消化管運動の亢進、気管支平滑筋収縮による気道狭窄、内分泌および外分泌の亢進、血小板活性化による血栓形成、白血球やリンパ球、マクロファージなど免疫系細胞のサイトカイン産生亢進など枚挙にいとまがない。このためPLCシグナル伝達系に共役したGPCRの阻害薬は、高血圧における α_1 アドレナリン受容体阻害薬 (α_1 ブロッカー) や、アンジオテンシンII受容体阻害薬 (ARB) のように、優れた治療薬になっている。しかし、原因となる過剰刺激が多様な場合、特定の受容体遮断薬では治療効果が不十分で、実際、高血圧患者の70%は、 α_1 ブロッカーやARBなど受容体遮断薬ではコントロール不十分であると言われている(2)。GPCRによるPLCシグナル伝達系は、入り口の受容体が多様であっても、その下流では G_q の α サブユニットまたは $\text{G}_{i/o}$ に由来する $\beta\gamma$ サブユニットによって媒介される。この $\text{G}\alpha_q$ -PLCまたは $\text{G}\beta\gamma$ -PLCを負に制御できれば、受容体遮断薬より広いスペクトルを持つ治療薬になると考えられる。PLCシグナル伝達系にはアデニル酸シクラーゼ活性の調節における G_i に相当する機構は

キーワード: ホスホリパーゼC, Gタンパク質共役型受容体, RGS, サイクリックAMP

高崎健康福祉大学 薬学部 薬効解析学研究室 (〒370-0033 群馬県高崎市中大類町 60)

E-mail: isao@takasaki-u.ac.jp (松岡), mito@takasaki-u.ac.jp (伊藤), 原稿受領日: 2009年7月28日, 依頼原稿

Title: Negative regulatory mechanism of phospholipase C signaling triggered by G protein-coupled receptor.

Author: Isao Matsuoka, Masaaki Ito

図1 PLC各アイソザイムのドメイン構成の比較

見出されていない。しかし、血管および消化管平滑筋や血小板では、細胞内cAMPやcGMPがPLCシグナル伝達系を阻害し、平滑筋収縮や血小板凝集を抑制することが知られている。今日、PLCには13種類のアイソザイムが同定されて構造の特徴から6種類のクラスに分類されている。本稿では、まず今日までに明らかにされたPLCの分子種と、その活性化機構をPLC- β アイソザイムを中心に述べ、続いて、最近明らかにされたPLCシグナル伝達系の抑制機序について、我々の知見もおりまぜて紹介する。

1. PLCの種類と分子構造

PLCは β , γ , δ , ϵ , ζ および η の6つのクラスに分類され、今日までに4種類の β , 2種類の γ , 3種類の δ , 1種類の ϵ と ζ , 2種類の η のアイソザイムが同定され、各アイソザイムにはいくつかのスプライシングバリエーションが認められている(3)。これまでに同定されている6種類のPLCの構造を図1に示した。PLCは複数の共通したドメイン構造をもつタンパク質で、酵素の触媒部位と考えられているXYボックスのほかに、Pleckstrin homology (PH) ドメイン、EFハンドモチーフ、C2ドメインを有している。触媒部位のXYボックスやその他の共通したドメインを除くとアミノ酸配列や分子サイズには類似性が少なく、それぞれ特異的な活性制御機構が存在すると考えられている。以下に、三量体Gタンパク質により活性制御を受けるPLC- β アイソザイムを例にとり、基本構造とGタンパク質による活性化機構との関係について述べる。

1) PLCの触媒部位

PLCの触媒部位は、バクテリアの酵素から哺乳動物まで最も良く保存されており、2つのドメインのXおよびYボックスで構成され、TIMバレルと呼ばれる α ヘリックスと β シートからなるポケット構造を形成している。この保存されたXとYボックスを結ぶ部分はZ領域と呼ばれ、各PLC- β アイソザイムの間

で最も相同性が低い。陰性に荷電したアミノ酸が多く存在する。最近、PLC- β_2 とその活性化因子、Rac2との複合体のX線解析が行われ、活性触媒部位の構造やその他のドメインとの位置関係は活性化時も非活性化時も大きく変化していないことが示された(4)。このモデルから酵素が細胞膜にリクルートされると触媒部位の中心を塞ぐように配置しているZ領域が細胞膜の陰性荷電と反発して移動し、活性部位が露出され基質と結合できるようになると考えられている(図2)。実際、このZ領域を欠損させると、酵素活性が上昇する(4)。このようなZ領域の性質は、PLC- δ やPLC- ϵ でも認められ、PLC各アイソザイムに共通した性質であると考えられている。また、PLC- γ アイソザイムにはXYドメインの間にSH2やSH3ドメインで区切られたPHドメインが存在するが、チロシン酸化されると活性部位が抑制構造から解除されると考えられている。

2) その他の共通ドメイン (PHドメイン, EFハンド, C2ドメイン)

各PLCアイソザイムは ζ タイプを除いてPHドメインを持つ。PHドメインは、PI(4,5) P_2 に結合する性質が知られているが、 β タイプでは、 $G\beta\gamma$ による活性化に重要なドメインであると考えられている(5)。ただし、この部位に $G\beta\gamma$ が結合しても酵素の全体的な構造は変化せず、細胞膜の上で $G\beta\gamma$ にリクルートされることがPLC- β_2 やPLC- β_3 の活性化に必要であるらしい。PHドメインは低分子量Gタンパク質のRacの作用部位でもあると考えられている(6)。EFハンドモチーフは全てのPLCアイソザイムに認められ、XYボックスの上流に隣接して存在する。EFハンドモチーフはhelix-loop-helix構造を持ち、カルモジュリンやトロポニンで知られるように Ca^{2+} と結合して機能するドメインである。PLCのEFハンドは Ca^{2+} の結合により構造変化が認められないが酵素活性の発現に必須の部分である(7)。もうひとつの共通した構造であるC2ドメインはXYボックスの下流にある。C2ドメインは Ca^{2+} /リン脂質結合ドメインとして知られており、PLC- δ のC2ドメインには、3箇所の Ca^{2+} 結合サイトが存在する。しかし、変異を入れて Ca^{2+} 結合能を無くしてもPLC- δ の Ca^{2+} に依存したイノシールリン脂質の加水分解活性は影響が認められていない(8)。一方、PLC- β のC2ドメインは、活性化した $G\alpha_q$ との結合に必要で、次に述べるC末ドメインと共に $G\alpha_q$ による酵素の活性化に関与すると考えられている(9)。

図2 PLC-βの活性化メカニズム

3) C 末 coiled-coil ドメイン

PLC-βは、他のアイソザイムと異なり、coiled-coil 構造を持つ約 400 アミノ酸の長い C 末を持つ。この部分は $G\alpha_q$ による PLC-β の活性化に必要で、欠損により PLC 自身の触媒活性は保持されるが、 $G\alpha_q$ の活性化作用は失われる (9)。また、PLC-β は $G\alpha_q$ の GTPase 活性を亢進させる作用を持つが、これも C 末ドメインを欠損させると消失する。

2. PLC アイソザイムの活性調節機構

PLC アイソザイムの活性調節機構は、PLC-γ と PLC-β について多くの研究成果が蓄積されているが、不明な点も残されている。PLC は Ca^{2+} に依存した酵素で、進化の過程で早期に登場したと考えられている。PLC-δ タイプは、 $G_{i/o}$ で活性化されるという報告はあるが、細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化することが生理的な制御機構であると考えられている (10)。PLC-γ は他のアイソザイムと異なる構造的をもち、増殖因子や抗原刺激によりチロシンリン酸化酵素が活性化された時に PLC シグナル伝達系を亢進させる酵素で、抗原刺激による肥満細胞からのヒスタミン放出に関与することは良く知られている (11)。PLC アイソザイムの中で、GPCR 刺激の下流で活性が制御されているのは、PLC-β、PLC-ε と PLC-η である。このうち PLC-ε は前述した PLC 各分子に共通したドメイン構造のほかに、Ras ファミリー低分子量 G タンパク質と結合する 2 つの RA (Ras/Rap associating) ドメインと、Ras ファミリーの GTP 交換反応を促進する CDC25 ドメインを持ち (図 1)、三量体 G タンパク質では、 $G\beta\gamma$ に加え、 G_{12} および G_{13} の制御下で Rho-GEF により活性化した Rho で刺激される (12)。さらに、いくつかの細胞では Gs を介して上昇した cAMP が Epac (exchange protein activated by cAMP) を介して

RapGEF を活性化し、最終的に Rap2B が PLC 活性を上昇させることも示されている (13)。このように、PLC-ε は種々の外界のシグナルを PLC シグナル伝達系に集約する非常にユニークな酵素として注目されている。しかし、GPCR の下流で速やかに応答する β タイプと異なり、PLC-ε は経時的には緩徐で持続的な PLC シグナルを亢進し、細胞の増殖や分化に関与することが示唆されている (14)。一方、PLC-η は、 $G\beta\gamma$ により活性化されることが報告された (15) が、発見されてからの歴史が浅く、GPCR の下流で機能する PLC としての役割は不明な点が多い。

GPCR の下流で、細胞の興奮性応答に最も広範に関与しているのは PLC-β アイソザイムである。PLC-β アイソザイムの活性調節機構を図 2 に示した。PLC-β には 4 種類のアイソザイムが存在し、全て G_q ファミリー ($G_{q, 11, 14, 15, 16}$) の G タンパク質 α サブユニットで活性化される。このうち PLC-β₂ は $G\alpha_q$ で活性化される程度が小さい。また、 $G\beta\gamma$ サブユニットも PLC-β アイソザイムを活性化するが、この活性化が最も顕著に見られるのは PLC-β₂ と PLC-β₃ であることが示されている (16)。すなわち、PLC-β₁ と β₄ は $G\alpha_q$ で活性化を受け、PLC-β₂ は主に $G\beta\gamma$ で、そして PLC-β₃ は $G\alpha_q$ と $G\beta\gamma$ の両方で刺激されると考えられている。しかし、各アイソザイムの G タンパク質サブユニットに対する感受性を決定している要因は単純ではなく、PLC-β₃ のみ発現している細胞で $G\beta\gamma$ による活性化が認められなかったり (17)、逆に PLC-β₂ と PLC-β₃ を共発現している細胞で、 $G\beta\gamma$ による PLC 活性化が β₃ の抗体で完全に消失するという矛盾した結果も報告されている (18)。PLC-β の活性調節機構でもう一つ重要な経路は、低分子量 G タンパク質の Rac による制御である。Rac は PLC-β アイソザイムのうち、β₂ と β₃ (β₁ では無効) の PH ドメインに結合して酵素活性を上昇させる (6)。この Rac の作用は、PLC-γ₂ (γ₁ では無効) でも認められる (19)。Rac は GPCR の下流で活性化することから、このメカニズムは PLC シグナル伝達系の多様性を考える上で重要な知見である。

3. PLC 活性の抑制性調節機構

PLC シグナル伝達系は、PLC の分子種や G_q タンパク質が同定される以前から、GPCR 刺激による平滑筋収縮や、血小板凝集で中心的な役割を果たすと考えられていた。この PLC シグナルによる平滑筋収縮や血小板凝集は cAMP や cGMP で抑制されることも良く知られていた (20)。最近、この cAMP や cGMP によ

る PLC シグナル伝達系の制御機構が明らかになってきた。また、G タンパク質の持つ内因性の GTPase 活性を亢進し、シグナルの消灯に関わる GAP (GTPase-activating protein) として同定された RGS (Regulator of G-protein signaling) も PLC シグナルの抑制に重要である。その概要を図 3 に示した。

G_s に共役した GPCR が刺激されると、cAMP 産生が亢進し A キナーゼ (PKA) を介して G_q-PLC シグナル伝達系を抑制する。また、cGMP も G キナーゼ (PKG) を介して PLC シグナル伝達系を抑制する。このような反応は、特に平滑筋細胞や、血小板や白血球など血球系細胞で認められる。cAMP による抑制機序には、PKA による PLC-β のリン酸化が関与する (21)。PKA は PLC-β₂ と PLC-β₃ をリン酸化するが、PLC-β₁ はリン酸化しない。PLC-β₃ の PKA によるリン酸化部位は C 末 1105 番目のセリンと同定されている。このセリンは PKG や PKC でもリン酸化を受け、NO やホルボールエステル (PMA) による PLC-β₃ の活性阻害に関与すると考えられている (図 3 の①) (22, 23)。そして、このリン酸化部位のセリンをアラニンに変換した PLC-β₃ では、Gα_q による活性化は影響されないが PKA による抑制作用が消失した (22)。しかし、Gβγ で PLC-β₃ を活性化した場合、PKA による抑制には 1105 番目のセリンのリン酸化は関係ないという (22)。PLC-β₃ の活性化調節において Gβγ は PH ドメインに作用するのに対して、Gα_q は 1105 番目のセリンが存在する C 末に作用部位があるため、そのリン酸化が PLC-β₃ と Gα_q の相互作用を特異的に阻害すると考えられる。このことから、PKA が Gβγ の活性化を抑制する機構は、PLC-β₃ 自身のリン酸化ではなく、別の因子が関与すると考えられる。

しかし、このような考えは $\text{PLC-}\beta_2$ には当てはまらないようである。 $\text{PLC-}\beta_2$ の場合は PKA により C 末にある 956 番目のセリンがリン酸化されるが、 PKA は $\text{G}\alpha_q$ の活性化作用を抑制せず、 $\text{G}\beta\gamma$ による活性化を選択的に抑制するという (24)。このような一連の実験は、 PLC や $\text{G}\alpha_q$ 、 $\text{G}\beta\gamma$ を過剰発現させた細胞で検討されたもので、実際の細胞内での反応と異なる可能性がある。例えば、内因性に $\text{PLC-}\beta_3$ のみを発現する RBL-2H3 細胞では、 fMLP と血小板活性化因子 (PAF) はそれぞれ $\text{G}\beta\gamma$ と $\text{G}\alpha_q$ を介して PLC を活性化するが、この細胞で cAMP は fMLP の作用 ($\text{G}\beta\gamma$ 誘発作用) のみを阻害し、 PAF の作用 ($\text{G}\alpha_q$ 誘発作用) には影響しない (25)。我々は、 $\text{PLC-}\beta_3$ のみを発現するマクロファージ由来の J774 細胞において、 P2Y_6 受容体を介した $\text{G}\alpha_q$ - $\text{PLC-}\beta_3$ の活性化が、プロスタグランジン (PG) E_2 の EP2 受容体を介して抑制されることを報告した (26)。 EP2 受容体は Gs-cAMP 情報伝達系を活性化することが知られているが、この PGE_2 による $\text{G}\alpha_q$ - $\text{PLC-}\beta_3$ の阻害は PKA が関与していない可能性が示唆されている。さらに、 PC12 や NG108-15 細胞など神経系細胞では、 cAMP は P2Y_2 受容体などの $\text{G}\alpha_q$ 共役型受容体刺激による $\text{PLC-}\beta$ の活性化を全く抑制しない (27, 28)。このことから、 PKA による $\text{PLC-}\beta$ 活性の制御メカニズムの解明には、さらに慎重に解析する必要があると思われる。

RGSはGタンパク質の α サブユニットが持つGTP水解活性を促進させるGAP活性を持つ一連のタンパク質で、シグナル伝達において重要な役割を果たしている。哺乳動物の細胞では、25種類以上のRGSが見出され、その構造から6つのグループに分けられている(29)。このうちRGS4ファミリーに分類されるRGS2, RGS3やRGS4はG α_q のGAPとして重要である。最近、Huangらは腸管平滑筋細胞を用いて、PKAやPKGによるPLC- β_1 の抑制にRGS4が関与することを示した(30)。前述のようにPLC- β_1 はPKAやPKGでリン酸化されない。しかし、PKAやPKGを活性化すると、PLC- β_1 活性が抑制され、同時にRGS4とG α_q の会合が増加してGTPase活性の亢進が認められた(図3の②)。さらに、PKAはRGSドメインを持つGRK2(G protein-coupled receptor kinase 2)もリン酸化し、G α_q との会合を促進してPLC- β_1 の活性化を抑制することが示された(図3の③)(30)。

一方, RGS2 は最も強力な $G\alpha_q$ の GAP として知られているが, RGS2 を欠損させたマウスは, 高血圧を示し, NO-cGMP-PKG による血管の弛緩反応が消失

していることが見出された(31). PKG でリン酸化された RGS2 は細胞膜への移行が促進され, GAP 活性が亢進すると考えられている (図3の④). 実際に, RGS2 を欠損したマウスから取った血管平滑筋細胞は NO-cGMP 刺激に対する反応が消失していた(32). RGS2 は $G\alpha_q$ の主要な GAP で, アンジオテンシン II やノルアドレナリンなど PLC シグナル伝達系を活性化する血管収縮物質の作用を調節し, 病態との関連も指摘されている. 実際に, 高血圧の原因遺伝子として, RGS2 遺伝子の点突然変異が見出だされ注目されている(33).

おわりに

様々な種類の PLC 分子がシグナル伝達に関与して生体反応を推し進めていることが明らかになってきた. その活性制御機構は従来考えられていた $G\alpha_q$ と $G\beta\gamma$ の役割のように単純ではなく, 新しい活性制御機構が次々と見つかっている. さらに, PLC- ϵ のように多くのシグナルとクロストークするアイソザイムの解析も進んできた. 今回, 焦点をあてた PLC シグナル伝達系の負の調節の未解決な問題点に加え, 新しい PLC アイソザイムの抑制制御も興味ある課題である. PLC シグナル伝達の抑制メカニズムの解明は, 循環器系疾患や炎症, 癌などの治療戦略に新たな展開をもたらすことが期待される.

文 献

- 1) Lefkowitz RJ, et al. Nat Biotechnol. 1996;14:283-286.
- 2) Harris DM, et al. Clin Sci. 2008;115:79-87.
- 3) Harden TK, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2006;46:355-379.
- 4) Hicks SN, et al. Mol Cell. 2008;31:383-394.
- 5) Wang T, et al. J Biol Chem. 2000;275:7466-7469.
- 6) Snyder JT, et al. J Biol Chem. 2003;278:21099-21104.
- 7) Nakashima S, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1995;211:365-369.
- 8) Grobler JA, et al. Biochemistry. 1998;37:5020-5028.
- 9) Wang T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:7843-7846.
- 10) Kim YH, et al. J Biol Chem. 1999;274:26127-26134.
- 11) Sada K, et al. Blood. 2002;100:2138-2144.
- 12) Seifert JP, et al. J Biol Chem. 2008;283:29690-29698.
- 13) Evellin S, et al. J Biol Chem. 2002;277:16805-16813.
- 14) Kelley GG, et al. J Biol Chem. 2006;281:2639-2648.
- 15) Zhou Y, et al. Biochemistry. 2008;47:4410-4417.
- 16) Runnels LW, et al. Biochemistry. 1999;38:1488-1496.
- 17) Jiang H, et al. J Biol Chem. 1996;271:13430-13434.
- 18) Murthy KS, et al. Am J Physiol. 1995;269:C969-C978.
- 19) Piechulek T, et al. J Biol Chem. 2005;280:38923-38931.
- 20) Abdel-Latif AA. Proc Soc Exp Biol Med. 1996;211:163-177.
- 21) Yue C, et al. J Biol Chem. 1998;273:18023-18027.
- 22) Xia C, et al. J Biol Chem. 2001;276:19770-19777.
- 23) Yue C, et al. J Biol Chem. 2000;275:30220-30225.
- 24) Liu M, et al. Nature. 1996;382:83-87.
- 25) Ali H, et al. J Biol Chem. 1998;273:11012-11016.
- 26) Ito M, et al. J Pharmacol Sci. 2008;107:443-450.
- 27) Matsuoka I, et al. Mol Pharmacol. 1995;47:855-862.
- 28) Ono T, et al. Jpn J Pharmacol. 1998;78:269-277.
- 29) Hollinger S, et al. Pharmacol Rev. 2002;54:527-559.
- 30) Huang J, et al. Am J Physiol Cell Physiol. 2007;292:C200-C208.
- 31) Tang KM, et al. Nat Med. 2003;9:1506-1512.
- 32) Sun X, et al. Mol Pharmacol. 2005;67:631-639.
- 33) Gu S, et al. Mol Pharmacol. 2008;73:1037-1043.

著者プロフィール

松岡 功 (まつおか いさお)

高崎健康福祉大学薬学部薬学科, 教授, 薬学博士.

◇1981年北海道大学薬学部卒業, 同年 福島県立医科大学医学部薬理学講座助手, '99年同助教授, '06年より現職.
◇研究テーマ: プリン作動性情報伝達機構の生理・病態的意義の解明. ◇趣味: ソフトボール, 映画鑑賞, 食べ歩き.

伊藤 政明 (いとう まさあき)

高崎健康福祉大学薬学部薬学科, 助手.

◇2000年東北大学大学院薬学研究科博士課程前期課程修了, '00-'06年トーアエイヨー株式会社研究部研究員, '06年より現職. ◇研究テーマ: 循環器疾患における炎症反応の役割ならびにその分子機構の解明. ◇趣味: 釣り, ドライブ, 映画鑑賞.