◆総説◆

血小板活性化に関与する蛋白(脱)リン酸化酵素とその抑制剤

西 川 政 勝*

Possible Roles of Protein Ser/Thr Kinases/Phosphatases in Platelet Activation and Their Modulations by Selective Inhibitors

Masakatsu NISHIKAWA*

Key words : protein kinase, protein phosphatase, platelet activation, inhibitors

はじめに

蛋白リン酸化反応は、ほかの真核細胞同様血小板においても細胞内情報伝達機構として重要な役割を演じている。アゴニストによる血小板活性化機構には受容体刺激連関によるイノシトールリン脂質の代謝回転、細胞内 Ca^{2+} 動員、低分子 G 蛋白群の活性化などが関与し、 Ca^{2+} 依存性プロテインキナーゼ、C キナーゼなどのセリン/スレオニンキナーゼ群やチロシンキナーゼ酵素群 (src, lyn, syk 等) に刺激が伝えられ、それぞれの基質蛋白をリン酸化し基質蛋白機能を修飾することにより最終的に血小板反応 (形態変化, 放出, 凝集) が惹起される。血小板活性化のシグナルは膜糖蛋白 GPIIb/IIIa (インテグリン $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$) にも伝えられ GPIIb/IIIa の構造変化が起き (inside-out signal) フィブリノーゲンが結合し凝集が惹起される¹⁾。GPIIb/IIIa とフィブリノーゲンの結合によりさらに細胞内にシグナルが伝えられ (outside-in signal), アクチン系細胞骨格蛋白群の集合化・集中化により凝集が強固になると考えられる。一方, cAMP や cGMP は機能抑制性のシグナルとして働き、

cAMP 依存性および cGMP 依存性 protein kinase (A-キナーゼ, G-キナーゼ) を活性化し基質蛋白をリン酸化することにより血小板機能を抑制すると考えられる。セリン/スレオニンキナーゼ群は、細胞内蛋白リン酸化反応の 90% 以上を担っていると考えられており、今なお数多くの新たなキナーゼが報告されつつあるのが現状である。細胞内での蛋白(セリン/スレオニン)リン酸化レベルはリン酸化/脱リン酸化のバランスにより調節されているため、脱リン酸化反応を調節するセリン/スレオニンホスファターゼもキナーゼ同様血小板反応の調節に関与することが明らかとなった。本項では抑制性シグナル伝達に関与する A-キナーゼや G-キナーゼについては省略し、血小板活性化シグナル伝達に関与するセリン/スレオニンキナーゼおよびホスファターゼ系の役割、キナーゼ系とホスファターゼ系の cross-talk についてミオシンホスファターゼ活性調節を例にとり概説する。

*三重大学医学部第二内科〔〒 514-8507 津市江戸橋二丁目 174 番地〕

The Second Department of Internal Medicine, Mie University School of Medicine [2-174 Edobashi, Tsu, Mie 514-8507, Japan.]

Tel. 059-231-5016 Fax. 059-231-5200 e-mail: nisikawa@clin.medic.mie-u.ac.jp

図 1 血小板機能調節における主要 Ser/Thr キナーゼとホスファターゼによる制御

セリン/スレオニンキナーゼ

(図 1 参照)

1. イノシトールリン脂質代謝とセリン/スレオニンキナーゼ

血小板は、種々の細胞外刺激により phospholipase C (PLC) が活性化され膜成分のイノシトールリン脂質(phosphatidylinositol, phosphoinositide), 特にイノシトール環の 4 位にリン酸が入った phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP₂ または PtdIns (4, 5) P₂) を水解し、2 種のセコンドメッセンジャー、D-myo-inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP₃ または Ins (1, 4, 5) P₃) と diacylglycerol (DG) を産生することが知られている¹⁾。Ins (1, 4, 5) P₃ は、細胞内 Ca²⁺ プール (主に濃染小管系 dense tubular system: DTS) からの Ca²⁺ 遊離を誘導する Ins (1, 4, 5) P₃ 誘導性 Ca²⁺ 放出 (IP₃-induced Ca²⁺ release) を行い細胞内 Ca²⁺ 上昇に重要な役割を演じている。細胞内 Ca²⁺ の増加は Ca²⁺ 依存性酵素たとえば Ca²⁺/calmodulin 依存性キナーゼを活性化する。一方、

DG は C-キナーゼの活性化因子として種々の生理機能を制御すると考えられる。現在でも細胞内 Ca²⁺ の上昇/Ca²⁺ 依存性キナーゼの活性化と C-キナーゼの活性化は血小板活性化の制御の中心であると考えられる。

近年、イノシトールリン脂質の 3 位にリン酸が入った 3-phosphorylated phosphatidylinositides (3-PPI) が細胞増殖, chemotaxis や形質転換において増加することが明らかにされ、新たなシグナル伝達分子として注目されている¹⁾²⁾。代表的は 3-PPI としては phosphatidylinositol 3, 4-bisphosphate (PtdIns (3, 4) P₂) や PtdIns(3, 4, 5) P₃ であり, phosphoinositide 3-kinase (PI 3-K) により PtdIns (4) P や PtdIns (3, 4) P₂ をリン酸化することにより生成される。これら 3-PPI は phospholipase 酵素類の基質とはならない。PtdIns (3, 4, 5) P₃ はホルボールエステル (TPA) や DG では活性化されない C-キナーゼの 1 種 PKC ξ を活性化すること, PtdIns (3, 4) P₂ は akt/PKB を直接活性化することが明らかにされている。現在では 3-PPI はセコンドメッセンジャーとして機能

図2 MLC-キナーゼおよびミオシンホスファターゼの活性修飾によるミオシンIIのリン酸化の制御機構

しており、オルガネラ膜の移動、細胞骨格アクチンの再構成を介した形態変化、および走化性など多くの細胞応答に関与すると考えられている。血小板においてもトロンビン、TRAP (thrombin receptor-activating peptide), U-46619 (TXA₂ アナログ) や TPA で刺激すると PtdIns (3, 4) P₂ や PtdIns (3, 4, 5) P₃ が速やかに産生される。PI 3-K の特異的阻害剤 wortmannin はこれらの細胞応答を阻害することが報告されている。PI 3-K はこれまでに 2 種類、p 85/PI 3-K と PI 3-K γ が報告されている¹³⁾。p 85/PI 3-K は p 85 と p 110 から成るヘテロダイマーで、p 85 は SH 2 ドメインや SH 3 ドメインを有する活性調節サブユニットで、PI 3-K 活性は p 110 に存在する。p 85/PI 3-K は低分子 G 蛋白 Rho により活性化されると報告されており、PI 3-K γ は p 85 はなく、三量体 G 蛋白の $\beta\gamma$ サブユニットにより活性化される。

2. 細胞内 Ca²⁺ 上昇と Ca²⁺ 依存性プロテインキナーゼの活性化

血小板内 Ca²⁺ 上昇のシグナルは Ca²⁺/calmodulin 依存性プロテインキナーゼ、Ca²⁺ 依存性プロテアーゼ (calpain)、C-キナーゼなどの種々の Ca²⁺ 依存性経路に伝達される。トロン

ビン、コラーゲン、TXA₂、PAF などのアゴニストやずり応力などの機械的刺激で血小板を活性化すると 20 k ダルトン (Da) のミオシン軽鎖 (myosin light chain: MLC₂₀) や 47 kDa の pleckstrin (後述) が速やかにリン酸化されることが知られている。血小板にも種々の Ca²⁺/calmodulin (CaM) 依存性キナーゼが存在することが報告されているが、なかでも血小板活性化に重要な役割を演じているのが MLC₂₀ 基質特異的キナーゼ、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLC-キナーゼ、血小板では分子量 105 kDa) である。血小板におけるアクトミオシン収縮制御機構の基本は平滑筋同様 MLC-キナーゼの活性化による MLC リン酸化/脱リン酸化反応である。すなわち、Ca²⁺/calmodulin によって MLC-キナーゼが活性化されるとミオシン分子の MLC₂₀ の Ser 19 がリン酸化されミオシン分子の頭部 (モータードメイン) に存在する MgATPase が活性化されアクチンとミオシンが相互反応 (収縮) し血小板の形態変化や放出反応が引き起こされると考えられる⁴⁾⁻⁶⁾ (図 2)。血小板における MLC₂₀ リン酸化反応の重要性はカルモデュリン阻害剤 W-7 や MLC-キナーゼ特異的阻害剤 ML-9 を用いた薬理学的手法により明らかにさ

れた。MLC-キナーゼの一次構造は触媒ドメイン、ATP 結合ドメイン、調節ドメイン、アクチン結合ドメインより成り、調節ドメインには calmodulin 結合ドメイン、自己阻害ドメイン、リン酸化部位 (A site, B site) が含まれる。MLC-キナーゼは基本的には Ca^{2+} /calmodulin により活性が調節されるが、種々のキナーゼでリン酸化されるとその活性が修飾される。リン酸化部位 A site は calmodulin 結合部位近傍で、calmodulin 結合によりリン酸化が著しく阻害される。B site のリン酸化は MLC-キナーゼ活性に影響を与えないが、A site のリン酸化により MLC-キナーゼの calmodulin に対する親和性が約 1/10 に低下することにより MLC-キナーゼ活性が減弱する^{7)~9)}。この A site のリン酸化は A-キナーゼ、C-キナーゼや calmodulin (CaM) キナーゼ II によりリン酸化されることが報告されているが、intact 血小板において MLC-キナーゼをリン酸化しているかどうかは不明である。

また、phosphorylase kinase も Ca^{2+} /calmodulin 依存性キナーゼであり phosphorylase を活性化し収縮装置を作用させるエネルギーである ATP を供給することにより血小板活性化に寄与すると考えられる。

3. diacylglycerol (DG) の生成と C-キナーゼ

C-キナーゼ (Protein kinase C: PKC) は分子量約 80 k ダルトンのセリン/スレオニンキナーゼファミリーで活性化に phosphatidylserine (PS) を必要とする。現在までに 11 種のアイソフォームが知られており、3 グループ、すなわち¹⁾ diacylglycerol (DG), Ca^{2+} , PS により活性化される conventional PKC (cPKC) と呼ばれている PKC α , β I, β II, γ ²⁾。活性化に DG と PS が必要であるが Ca^{2+} を必要としない novel PKC (nPKC) と呼ばれている PKC δ , ϵ , η (L), θ , μ ³⁾。 Ca^{2+} や DG で活性化されず脂肪酸や polyphosphoinositides (3-PPI) で活性化される atypical PKC (aPKC) と呼ばれている PKC ζ ,

λ に分類されている¹⁰⁾。

血小板には C-キナーゼが豊富に存在し、大部分は PKC α , β I, β II, δ アイソフォームであるが、PKC ϵ , η (L), ζ も少量ながら存在する¹¹⁾¹²⁾。活性化血小板では PLC により *sn*-1, 2-DG が形質膜内に形成され DG kinase により速やかにリン酸化され phosphatidic acid に合成される。この膜結合型の DG が細胞質内に存在する不活性の C-キナーゼを形質膜に translocate させることにより C-キナーゼは Ca^{2+} , PS により活性化されると考えられる。DG は C-キナーゼの Ca^{2+} に対する親和性を増大させることから、アゴニスト刺激血小板では DG と Ca^{2+} は相乗的に C-キナーゼを活性化すると考えられる。cPKC および nPKC は基本的にはアゴニストによる PtdIns (4, 5) P_2 水解産物によって活性化されると考えられる。また、PKC α , β I, β II は不飽和脂肪酸によっても活性化される¹²⁾。アゴニスト刺激で活性化された PI 3-kinase により生成された 3-PPI は nPKC や aPKC を緩徐に活性化し血小板凝集を維持するのに関与しているのではないかと考えられている。補体 C_{5b-9} やエンドトキシン lipopolysaccharide も C-キナーゼを直接活性化することが知られており、播種性血管内凝固症候群 (DIC) の病態に関与しているかもしれない。C-キナーゼは PLC 活性化とは関係なくホルボールエステルや膜透過性の合成 DG によっても活性化され C-キナーゼの役割を解明する種々の研究に用いられている。これらの薬物により直接血小板を刺激すると凝集や放出反応、アラキドン酸の放出や代謝が認められる。C-キナーゼが血小板凝集や放出反応を生ずるメカニズムはまだ完全には解明されていない。H-7, Bisindolylmaleimide I (GF 109203X), Calphostin C, Ro-31-8220 など数多くの C-キナーゼ阻害剤が開発され幾多の論文が報告されている¹³⁾ が、アイソザイム特異的阻害剤は未だ適切な薬剤がないのが現状である。

血小板における C-キナーゼの生理的ないし

薬理学的活性化は 47 kDa の pleckstrin 蛋白のリン酸化を必ず伴うことから、pleckstrin 蛋白のリン酸化は血小板における C-キナーゼ活性化の指標に使われている。Pleckstrin (platelet and leukocyte C kinase substrate から命名) は血液系細胞のみに存在することやクロニングされアミノ酸配列等も判明しているが、生理的機能については依然不明である¹⁴⁾。シグナル伝達に関与し pleckstrin のアミノ酸配列に相同性を有する (PH モチーフという) 蛋白、たとえば PLC, 低分子 G 蛋白 (Ras-GAP, Ras-GRF), β -アドレナリン受容体キナーゼ, β -spectrin やダイニンなど約 100 種の蛋白が報告されており¹⁵⁾、これらの蛋白の多くが酸性リン脂質、特に PtdIns (4, 5) P_2 と結合することが知られている。PH モチーフは三量体 G 蛋白の $\beta\gamma$ サブユニット ($G\beta\gamma$) とも結合することから、アゴニストによる受容体の活性化シグナルを抑制するのではないかと考えられている。また、pleckstrin は Ins(1, 4, 5) P_3 や inositol 1, 3, 4, 5-tetrakisphosphate Ins (1, 3, 4, 5) P_4 を分解する酵素 inositol polyphosphate 5-phosphatase I (5-phosphatase I) と 1:1 の結合をし、C-キナーゼにより pleckstrin がリン酸化されると 5-phosphatase I 活性が増加することが報告され、血小板活性化シグナルを終息させる経路に関与しているのではないかと推測されている。C-キナーゼはミオシン分子の MLC₂₀ を *in vitro* および *in vivo* でリン酸化するがリン酸化部位が MLC-キナーゼとは異なり Ser 1, Ser 2 と Thr 9 である。血小板ミオシンの C-キナーゼ単独によるリン酸化 (Thr 9) はミオシンの MgATPase 活性に影響を及ぼさないものの、MLC-キナーゼと C-キナーゼでミオシンを二重リン酸化 (Ser 19 と Thr 9) した場合のミオシンの MgATPase 活性は MLC-キナーゼ単独によるリン酸化 (Ser 19) ミオシンに比し低下することから、C-キナーゼはアクトミオシン系に抑制的に作用しているのではないかと考えられる¹⁶⁾¹⁷⁾。

4. Akt/PKB (protein kinase B) の活性化

Akt/PKB (分子量約 60 kDa) は C-キナーゼと類似した触媒ドメインを有するセリン/スレオニンキナーゼで、PI 3-K 反応産物である PtdIns (3, 4) P_2 により直接活性化される¹⁸⁾。また、PtdIns (3, 4, 5) P_3 依存性プロテインキナーゼ-1 (phosphatidylinositol-dependent kinase-1: PDK 1) が akt/PKB をリン酸化して活性化することが明らかとなっている。最近、血小板においても akt/PKB が存在し PtdIns (3, 4) P_2 や PtdIns (3, 4, 5) P_3 によりリン酸化を受けることにより akt/PKB 活性が増加することが報告されたが¹⁹⁾、血小板活性化における役割については未だ不明である。Akt/PKB に対する特異的阻害剤はまだ報告されていない。

5. 低分子 G 蛋白によって活性化されるキナーゼ

血小板には、rac, rab, RhoA などの低分子 G 蛋白が存在する。RhoA の阻害物質である C 3 exoenzyme を incubation の後に TRAP を作用させるとフィブリノーゲン粘着血小板の伸展と接着斑の形成が抑制されることから、Rho は細胞骨格の再構成に関与することが示唆された²⁰⁾。Rho はアクチン系細胞骨格の形成に中心的役割を演じていると考えられており、Swiss 3 T 3 細胞では外部刺激による stress fiber の形成のシグナル伝達に関与していることが示されている²¹⁾²²⁾。RhoA によって活性化されるセリン/スレオニンキナーゼとしては分子量 160 kDa の ROK α (Rock-2, Rho-キナーゼ) および ROK β (Rock-1) が知られているが^{23)~25)}、このうちヒト血小板には Rho-キナーゼのみが存在する。また、Rho に結合するほかのセリン/スレオニンキナーゼとして C-キナーゼの触媒ドメインと homology を有する 128 kDa の protein kinase N (PKN, または PRK 1, PAK-1) や PRK-2 (PKC-related kinase 2 または PAK-2) が報告されており²⁶⁾、ヒト血小板にも PKN が存在する。ヒト血小板における Rho-キナーゼの

表 1 セリン/スレオニンホスファターゼの分類と特徴

	PP1	PP2A	Calcineurin (PP2B)	PP2C
Phosphorylase kinase サブユニットに対する基質特異性	β	α	α	α
2 価金属イオン要求性	—	—	+Ca ²⁺ /CaM	+Mg ²⁺
Inhibitor-1 および-2 による抑制	+	—	—	—
阻害剤	Calyculin A Okadaic acid		CsA, FK506+ Immunophillin	—
触媒サブユニットアイソザイム	37kDa $\alpha, \gamma, \delta (\beta)$	36kDa α, β	61kDa CN-A α , CN-A β	43kDa α, β
調節サブユニット	G-subunit, MBS, etc	A (65 kDa) B (various)	CN-B (19kDa) CaM (17.5kDa)	?
リン酸化による調節機構	+	+	?	+
	MBS, C-subunit	B-subunit, C-subunit		C-subunit

MBS; Myosin-binding subunit, CaM; Calmodulin, CN; Calcineurin, C-subunit; 触媒サブユニット, CsA; Cyclosporin A, Da: dalton, G-subunit: Glycogen phosphatase の Glycogen 結合サブユニット

含有量は MLC-キナーゼの約 1/15 である。Rho-キナーゼの基質としては、ミオシンホスファターゼのミオシン結合サブユニット (MBS)、ミオシンの MLC₂₀、アデュシン (adducin) などが報告されており、血小板アクトミオシン収縮反応の Ca²⁺ 感受性の亢進や血小板膜骨格の再構成にも関与していると考えられる。Rho-キナーゼ阻害剤としては Y-27632 や HA-1077 が見い出されており、Rho-キナーゼの細胞における機能の解明に用いられている²⁷⁾。

6. MAP-キナーゼ (mitogen activated protein kinase)

血小板には少なくとも 3 種類の MAP-キナーゼ、すなわち extracellular receptor activated kinase (ERK) 1, ERK 2, p 38 MAP kinase が存在し、いずれもトロンビンなどの種々のアゴニスト刺激により活性化されることが報告されているが³¹⁾、血小板機能と MAP-キナーゼとの関連については不明である。これらのキナーゼはいずれも MAP-キナーゼキナーゼ (MEK 1, MEK 2) により tyrosine および threonine 残基がリン酸化されることにより活性化される。MAP-キナーゼの基質としては細胞質 phospholipase A₂ (cPLA₂) や Na⁺/H⁺ exchanger が想定されたが²⁸⁾²⁹⁾、p 38 MAP キ

ナーゼが cPLA₂ をリン酸化するものの PLA₂ 活性には影響せず血小板におけるこれらの役割については依然不明である。MEK の阻害剤としては PD 98059, p 38 MAP キナーゼの阻害剤としては SB 202190 が代表的である。

セリン/スレオニンホスファターゼ

1. ホスファターゼの分類と機能

ホスファターゼ系は蛋白チロシンリン酸化を脱リン酸化するチロシンホスファターゼ、蛋白セリン/スレオニンリン酸化を脱リン酸化するセリン/スレオニンホスファターゼ、蛋白チロシン/スレオニンリン酸化を脱リン酸化する dual specificity phosphatase が知られている。

セリン/スレオニンホスファターゼは、表 1 に示したように酵素学的性質により type-1 と type-2 に分類 (Cohen の分類) され、type-1 (PP 1) は耐熱性蛋白 inhibitor 1 (I-1) と inhibitor 2 (I-2) により抑制され phosphorylase kinase の β subunit を選択的に脱リン酸化する^{30)~32)}。一方、type-2 ホスファターゼは I-1 や I-2 により抑制されず、phosphorylase kinase の α subunit を基質とし、二価金属イオン要求性により PP 2 A (Ca²⁺/Mg²⁺ 非依存性)、PP 2

図3 Myosin-binding subunit (MBS) の構造と機能ドメイン

B (Ca^{2+} 依存性, calcineurin), PP 2 C (Mg^{2+} 依存性) に細分されている。この分類は現在も広く用いられているが、最近の分子生物学的解析によるこれら酵素群の系統発生的な関連性とは異なっていることが明らかとなっている。系統発生的分類では、PP 1, PP 2 A および PP 2 B は family I, PP 2 C は family II と呼ばれている。最近 Cohen の分類に当てはまらない PPX, PPY, PP 3 など多くのホスファターゼ (novel phosphatase と呼ばれている) が同定されている。

PP 1 の触媒サブユニット (PP 1 c) は分子量 37 kDa でありクローニングの結果より 4 つのアイソザイム PP 1 c α , PP 1 c γ 1, PP 1 c γ 2, PP 1 c δ (=PP 1 c β) が存在していることが明らかとなっている。自然界に存在している PP 1 は PP 1 c 単独では細胞質に存在せず、PP 1 c と種々の調節サブユニットが複合体を形成しており、これらの調節サブユニットが触媒サブユニット PP 1 c の細胞内での局在を既定したり (targeting subunit), 基質特異性を決定している。平滑筋や血小板に存在するミオシン結合性 PP 1 (ミオシンホスファターゼ; PP 1_M) は PP 1 δ と分子量 130 kDa と 20 kDa の 2 つの調節サブユニットから成る heterotrimer であり、130

kDa サブユニットがリン酸化ミオシンへの結合サブユニット (myosin-binding subunit; MBS, 図 3 参照) である³³⁾。20 kDa サブユニット (M 20) の生理的意義については依然不明である。最近、130 kDa MBS がリン酸化されると PP 1 酵素活性が減少することが *in vitro* の系および血小板で明らかにされた (後述)。

PP 2 A ホロ酵素は触媒サブユニット (PP 2 Ac, 分子量 36 kDa) と A サブユニット (65 kDa, PR 65) で structural core を形成しそれに種々の分子量の B サブユニットが結合した heterotrimer で細胞内に存在していると考えられる。B サブユニットは 55 kDa (PR 55, B subunit), 54 kDa (B' subunit), 72 kDa (PR 72), 74 kDa (B'' subunit), 130 kDa (PR 130) である。これらの調節サブユニットの機能は完全には解明されていないが、基質特異性や細胞内における局在を既定していると考えられている。分子クローニングの結果より PP 2 Ac には 2 つのアイソザイム PP 2 Ac α と PP 2 Ac β , A サブユニットには A α と A β , B サブユニットには α , β , γ のアイソザイムが存在することが知られている。sphingomyelinase の活性化により産生される ceramide は *in vitro* の系において PP 2 A dimer は活性化しないものの

PP 2 A heterotrimer を活性化することが知られている。PP 2 Ac は *in vitro* の系では p 60^{src}, p 56^{lck}, epidermal growth factor および insulin receptor などの tyrosine kinase によりリン酸化されるとホスファターゼ活性が減少することが報告されている³⁴⁾。しかしながら、血小板においては PP 2 Ac のチロシンリン酸化は確認されていない。

細胞膜通過性の PP 1 および PP 2 A の特異的阻害剤が発見され、ホスファターゼの細胞レベルでの役割の解明に近年用いられている。もっとも良く検討され広く用いられているのが、黒磯海綿より抽出されたオカダ酸 (OKA) でポリエチル脂肪酸である。ほかの PP 1/PP 2 A 阻害剤 (tautomycin, calyculin, microcystin, nodularin) と異なり、OKA は PP 1 ($K_i=20$ nM) より PP 2 A ($K_i=0.2$ nM) をより低濃度で阻害するが、細胞透過性が弱いいため細胞レベルでの実験には工夫が必要である。

PP 2 B (calcineurin) は、当初脳に存在する calmodulin 結合蛋白として同定されその後 PS/TPase 活性を有することが明らかにされた。PP 2 B は calcineurin A (分子量 60 kDa) と calcineurin B (分子量 19 kDa) の heterodimer である。calcineurin A は触媒サブユニットで calmodulin 結合ドメインを有し、calcineurin B は Ca^{2+} 結合性の調節サブユニットである。calcineurin B は EF hand 構造を有しており、4 個の Ca^{2+} 結合 loop を有しており calmodulin と 35% の相同性を有する。PP 2 B は Ca^{2+} および calmodulin により活性化されるが、 Mn^{2+} , Mg^{2+} または Ni^{2+} によっても活性化される。PP 2 B ($K_d=0.1$ nM) は Ca^{2+} /calmodulin 依存性 protein kinase ($K_d=45$ nM) より低濃度の Ca^{2+} で活性化される。臓器移植時の拒絶反応抑制になくなくてはならない細胞免疫抑制剤 cyclosporin A や FK 506 は、それらの細胞内受容蛋白である cyclophilin や FKBP を介して calcineurin 活性を阻害することが見い出され世の注目を浴びた。cyclophilin や FKBP

は immunophilin と総称され prolin isomerase (rotamase) 活性を有しており、それぞれいくつものアイソザイムが存在していることが明らかにされている。FK 506/FKBP と calcineurin の結合は Ca^{2+} 依存性である。

PP 2 C は Mg^{2+} 依存性の monomeric なホスファターゼ ($ED_{50}=1$ mM) で分子量 43-48 kDa である。PP 2 C α と PP 2 C β の 2 つのアイソザイムが同定されている。PP 2 C は、casein kinase II によるリン酸化部位を有するがリン酸化されても活性は変化しない。また、PP 2 C に対する特異的阻害剤が見つかっておらず本酵素の生理的役割については不明な点が多い。

2. 血小板におけるホスファターゼについて

血小板には、PP 1, PP 2 A, calcineurin, PP 2 C のいずれのタイプのホスファターゼが存在しその量的な比は PP 1=PP 2 A>>calcineurin $\geq$ PP 2 C である。PP 1c については PP 1c α , PP 1c γ , PP 1c δ のいずれの isoform も存在し、細胞質にはそのうち PP 1c α がもっとも多く存在することなどを報告してきた³⁵⁾。PP 2 A 酵素については PP 2 Ac (37 kDa), A サブユニット (65 kDa), B サブユニット (55 kDa) が存在し、ミオシンホスファターゼとしては PP 1 δ と 2 つの調節サブユニット 130 kDa MBS と 20 kDa サブユニットが存在することを最近われわれは明らかにした。PP 1/PP 2 A 阻害剤 OKA および calyculin A は低濃度では血管平滑筋収縮作用を有しており、この作用がホスファターゼ阻害による MLC₂₀ の Ca^{2+} 非依存性リン酸化の亢進によることが報告された。しかしながら、calyculin A や OKA はいずれの条件下においても血小板を活性化する作用は認められず、血小板凝集・放出反応を阻害することから平滑筋とは異なっている事が明らかである³⁵⁾³⁶⁾。これらの薬物は平滑筋同様 MLC₂₀ のリン酸化を促進するばかりでなく数種類 (200 k, 60 k, 50 kDa) の蛋白リン酸化をも増加させることが明らかとなっている。50 kDa 蛋白は Vasodilator stimulated phosphoprotein

図4 Rho/Rho-キナーゼおよびC-キナーゼによるミオシンリン酸化の二重制御

(VASP) と呼ばれ、血小板における A-キナーゼ、G-キナーゼの代表的な基質蛋白であり、 PGE_1 、 PGI_2 、EDRF (内皮由来血管弛緩因子: NO) の抑制作用を伝えるシグナル伝達物質である。このように血小板では PP1/PP2A 阻害剤は促進性および抑制性の両方の蛋白リン酸化反応を促進するが最終的には血小板機能抑制的に作用すると考えられる。

血小板にも calcineurin, FKBP 12, cyclophilin A が存在するが, cyclosporin A や FK 506 は血小板機能を活性化も抑制もしないことから calcineurin の血小板における役割については現在不明である。PP2C についても血小板における役割については現在不明である。

3. 血小板活性化に伴うミオシンホスファターゼ活性のセリン/スレオニンキナーゼによる制御機構 (図4参照)

PP1 に分類されるミオシンホスファターゼは、触媒サブユニットである PP1 δ 、調節サブユニットである 130 kDaMBS と M20 よりなる heterotrimer である (図3)。130 kDaMBS は、ミオシン結合能を有しており PP1 δ の tar-

getting に関与していることが明らかにされている³⁷⁾³⁸⁾。1996 年、鶏砂囊平滑筋を用いた *in vitro* の系で 130 kDaMBS が内在性キナーゼによりリン酸化されるとミオシンホスファターゼ活性が減少することが報告された³⁹⁾。膜透過性を亢進させた平滑筋を $\text{GTP}\gamma\text{S}$ で刺激すると細胞内 Ca^{2+} の上昇が認められないのに MLC₂₀ リン酸化の増加、平滑筋収縮の増強が観察される (Ca^{2+} 感受性の亢進)。この現象が低分子 G 蛋白 Rho の阻害物質である C3 exoenzyme により阻害することから Rho が GTP による平滑筋収縮の Ca^{2+} 感受性の亢進に関与する可能性が指摘されていた⁴⁰⁾⁴¹⁾ が、メカニズムについては不明であった。1996 年貝淵らのグループにより Rho-キナーゼが 130 kDa MBS を *in vitro* でリン酸化するとミオシンホスファターゼ活性が減少することが見い出され、NIH 3T3 細胞に活性型 Rho (RhoA^{v14}) を発現すると MBS および MLC₂₀ のリン酸化が増加することが報告された⁴²⁾⁴³⁾。すなわち、平滑筋細胞における $\text{GTP}\gamma\text{S}$ による MLC₂₀ リン酸化の亢進は、 $\text{GTP}\cdot\text{Rho}$ が Rho-キナーゼを活性化し 130

kDaMBS をリン酸化することによりミオシンホスファターゼ活性が低下することに起因する可能性が考えられる。

私たちは、血小板にも PP1c δ , 130 kDaMBS, M20 サブユニットから成るミオシンホスファターゼが存在することを immunoblot 法を用いて証明し、anti-MBS 抗体を用いた血小板免疫沈降物に RhoA および Rho-キナーゼが共存することを明らかにした⁴⁴⁾⁴⁵⁾。さらに、凝集しない状況（攪拌せず）下で血小板をアゴニスト刺激すると、MBS がリン酸化されるとともにミオシンホスファターゼ活性は減少し刺激後 1 分で約 50% 活性は低下した⁴⁴⁾。すなわち、図 4 示したように血小板をアゴニストで刺激するとレセプター/G 蛋白が PLC を活性化し PtsIns (4, 5) P₂ 代謝の亢進することなどにより細胞内 Ca²⁺ が増加し、Ca²⁺ 依存性酵素 MLC-キナーゼを活性化し MLC₂₀ がリン酸化される。一方、レセプター活性化のシグナルは Rho-GTP を生成し Rho-キナーゼを活性化し 130 kDaMBS のリン酸化を介してミオシンホスファターゼ活性を減少させることにより MLC₂₀ のリン酸化を促進する。このように、アゴニストがレセプターに結合すると、セリン/スレオニンキナーゼ系を作動させるばかりでなくホスファターゼにもシグナルが伝えられ (cross-talk), 血小板活性化が調節されていると考えられる。

Rho-キナーゼは MBS ばかりでなく MLC₂₀ (MLC-キナーゼと同じリン酸化部位) をリン酸化すること⁴⁶⁾、スキンド平滑筋に Rho-キナーゼを作用させると収縮が起こること⁴⁷⁾が報告されている。ミオシンのリン酸化酵素について主に MLC-キナーゼよりのかまたは Rho-キナーゼによるものかは、1. 組織・細胞の種類により両酵素の含量が異なる、2. 外部刺激による細胞反応が細胞内 Ca²⁺ 濃度の増加に依存するかどうか、などによると考えられる。血小板には、Rho-キナーゼより MLC-キナーゼがより豊富（約 15 倍）に存在すること、アゴニスト刺激に

よる細胞内 Ca²⁺ 濃度の増加が急峻であることから血小板における MLC₂₀ のリン酸化に関しては MLC-キナーゼが主体ではないかと考えられる。

ミオシンホスファターゼ活性の阻害による Ca²⁺ 感受性の亢進は、RhoA を介する制御系ばかりでなく C-キナーゼを介する制御系が存在することが最近報告されている。ミオシンホスファターゼの PP1c に結合しその活性を阻害する蛋白 CPI 17 (PKC-potentiated PP1 inhibitory protein of 17 kDa) が主に動脈平滑筋に存在する。CPI-17 は C-キナーゼでリン酸化されるとミオシンホスファターゼ活性を強力に阻害することが *in vitro* の実験系で明らかにされた⁴⁸⁾⁴⁹⁾。さらに、PKN によっても CPI 17 の C-キナーゼリン酸化部位がリン酸化されることが明らかにされている。Electropermeabilized 血小板を用いた研究で放出反応に対する C-キナーゼによる感受性の亢進が報告されており⁵⁰⁾、また血小板においても少量ながら CPI 17 類似蛋白が存在していることから、CPI 17 のリン酸化によるミオシンホスファターゼの調節機構の存在の可能性が示唆される。

おわりに

血小板活性化の情報伝達系をセリン/スレオニンキナーゼおよびホスファターゼに注目して最近の知見を踏まえて概説した。細胞内の複雑な制御系を単純化して紹介記載したため、また拙文のため理解しにくい点もあると思うが読者諸賢のお役に立つことを期待する。

文 献

- 1) Kroll MH, Sullivan R: Mechanisms of platelet activation. Thrombosis and Hemorrhage. (eds. Loscalzo J, Schafer AI) WILLIAMS & WILKINS pp. 261-291, 1998.
- 2) Hartwig JH, Barkalow K: Polyphosphoinositide

- synthesis and platelet shape change. *Curr Opin Hematol* **4**: 351-356, 1997.
- 3) Rittenhouse SE: Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, a potential signaling enzyme in platelets. *Sem Hematol* **32**: 120-125, 1995.
 - 4) Nishikawa M, Tanaka T, Hidaka H: Ca^{2+} -calmodulin-dependent phosphorylation and platelet secretion. *Nature* **287**: 863-865, 1980.
 - 5) Fox JEB, Phillips DR: Role of phosphorylation in mediating the association of myosin with the cytoskeletal structures of human platelets. *J Biol Chem* **257**: 4120-4126, 1982.
 - 6) Daniel JL, Molish IR, Rigmaiden M, Stewart G: Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response. *J Biol Chem* **259**: 9826-9831, 1984.
 - 7) Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG: Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* **76**: 697-1003, 1996.
 - 8) Nishikawa M, de Lanerolle P, Lincoln T, Adelstein RS: Phosphorylation of mammalian myosin light chain kinases by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase and cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **259**: 8429-8436, 1984.
 - 9) Nishikawa M, Shirakawa S, Adelstein RS: Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by protein kinase C: Comparative study of the phosphorylated sites. *J Biol Chem* **260**: 8978-8983, 1985.
 - 10) 大野茂男: プロテインキナーゼCの構造生物学. 蛋白質・核酸・酵素 **44**: 404-411, 1999.
 - 11) Nishikawa M, Komada F, Uemura Y, Hidaka H, Shirakawa S: The signal transduction systems and intracellular Ca^{2+} dynamics in arachidonate-induced platelet activation. *Acta Haematol Jpn* **52**: 1489-1497, 1989.
 - 12) Nishikawa M, Hidaka H, Shirakawa S: Possible involvement of direct stimulation of protein kinase C by unsaturated fatty acids in platelet activation. *Biochem Pharmacol* **37**: 3079-3089, 1988.
 - 13) Hoffmann J: The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J* **11**: 649-669, 1997.
 - 14) Tyers M, Rachubinski RA, Stewart MI, Varriachio AM: Molecular cloning and expression of the major protein kinase C substrate of platelets. *Nature* **333**: 470-473, 1988.
 - 15) Rebecchi MJ, Scarlata S: Pleckstrin homology domains: a common fold with diverse functions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **27**: 503-528, 1998.
 - 16) Naka M, Nishikawa M, Adelstein RS, Hidaka H: Phorbol-ester induced activation of human platelets is associated with protein kinase C phosphorylation of myosin light chain. *Nature* **306**: 490-492, 1983.
 - 17) Nishikawa M, Sellers JR, Adelstein RS, Hidaka H: Protein kinase C modulates the phosphorylation of the smooth muscle heavy meromyosin by myosin light chain kinase. *J Biol Chem* **259**: 8808-8814, 1984.
 - 18) Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR: Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* **335**: 1-13, 1998.
 - 19) Banfic H, Tang X, Batty IH, Downes CP: A novel integrin-activated pathway forms PKB/Akt-stimulatory phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate via phosphatidylinositol 3-phosphate in platelets. *J Biol Chem* **273**: 13-16, 1998.
 - 20) Leng L, Kashiwagi H, Ren X-D, Shattil SJ: RhoA and the function of platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Blood* **91**: 4206-4215, 1998.
 - 21) Hall A: Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol* **10**: 31-54, 1994.
 - 22) Narumiya S: The small GTPase Rho: Cellular functions and signal transduction. *J Biochem* **120**: 215-228, 1996.
 - 23) Leung T, Manser E, Tan L, Lim L: A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem* **270**: 29051-29054, 1995.
 - 24) Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara

- K: Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for the small GTP binding protein Rho. *EMBO J* **15**: 2208-2216, 1996.
- 25) Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K: The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa ser/thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J* **15**: 1885-1893, 1996.
- 26) Amano M, Mukai H, Ono Y, Chihara K: Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N. *Science* **271**: 68-650, 1996.
- 27) Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T: Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**: 990-994, 1997.
- 28) Kramer RM, Roberts EF, Um SL, Börsch-Haubold AG: p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) in thrombin-stimulated platelets. *J Biol Chem* **271**: 27723-27729, 1996.
- 29) Aharonovitz O, Granot Y: Stimulation of mitogen-activated protein kinase and Na⁺/H⁺ exchanger in human platelets. *J Biol Chem* **271**: 16494-16499, 1996.
- 30) Cohen P: The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* **58**: 453-508, 1989.
- 31) Mumby MC, Walter G: Protein serine/threonine phosphatases: Structure, regulation and functions in cell growth. *Physiol Rev* **73**: 673-699, 1993.
- 32) Wera S, Hemmings BA: Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* **311**: 17-29, 1995.
- 33) 暮石泰子, 伊藤正明, 市川和人, 中野 起: 平滑筋収縮とミオシンホスファターゼ. 蛋白質・核酸・酵素 **43**: 977-986, 1998.
- 34) Chen J, Parsons S, Brautigan DL: Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* **269**: 7957-7962, 1994.
- 35) Nishikawa M, Toyoda H, Saito M, Morita K: Calyculin A and okadaic acid inhibit human platelet aggregation by blocking protein phosphatases types 1 and 2A. *Cell Signal* **6**: 59-71, 1994.
- 36) Higashihara M, Takahata K, Kurokawa K, Ikebe M: The inhibitory effects of okadaic acid on platelet function. *FEBS Lett* **307**: 206-210, 1992.
- 37) Alessi D, Macdougall LK, Sola MM, Ikebe M: The control of protein phosphatase-1 by targeting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1. *Eur J Biochem* **210**: 1023-1035, 1992.
- 38) Shimizu H, Ito M, Miyahara M, Ichikawa K: Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J Biol Chem* **269**: 30407-30411, 1994.
- 39) Ichikawa K, Ito M, Hartshorne DJ: Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity. *J Biol Chem* **271**: 4733-4740, 1996.
- 40) Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakanishi H: Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* **20**: 227-231, 1995.
- 41) Noda M, Yasuda-Fukazawa C, Moriishi K, Kato T: Involvement of rho in GTPγS-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain on vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* **367**: 246-250, 1995.
- 42) Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K: Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for the small GTP binding protein Rho. *EMBO J* **15**: 2208-2216, 1996.
- 43) Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K: Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**: 245-248, 1996.
- 44) Nakai K, Suzuki Y, Kihira H, Wada H: Regulation of myosin phosphatase through phosphorylation of the myosin-binding subunit in platelet activation. *Blood* **90**: 3936-3942, 1997.
- 45) Suzuki Y, Yamamoto M, Wada H, Ito M:

- Agonist-induced regulation of myosin phosphatase activity in human platelets through activation of Rho-kinase. *Blood* **93**: 3408-3417, 1999.
- 46) Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y: Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**: 20246-20249, 1996.
- 47) Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K: Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem* **272**: 12257-12260, 1997.
- 48) Eto M, Ohmori T, Suzuki M, Furuya K: A novel protein phosphatase-1 inhibitory protein potentiated by protein kinase C. Isolation from porcine aorta media and characterization. *J Biochem* **118**: 1104-1107, 1995.
- 49) Senba S, Eto M, Yazawa M: Identification of trimeric myosin phosphatase (PP1M) as a target for a novel PKC potentiated protein phosphatase-1 inhibitory protein (CPI17) in porcine aorta smooth muscle. *J Biochem* **125**: 354-362, 1999.
- 50) Coorssen JR, Davidson MML, Haslam RJ: Factors affecting dense and α -granule secretion from electroporated human platelets: Ca^{2+} -independent actions of phorbol ester and $\text{GTP}\gamma\text{S}$. *Cell Regul* **1**: 1027-1041, 1990.