◆ トピックス ◆

血小板のトロンビン受容体

—その構造と機能—

関 屋 富 士 男

Platelet Thrombin Receptor
—Its Structure and Function—

Fujio SEKIYA

Key words: thrombin, receptor, platelets, peptide agonist, structure/function relationship

はじめに

1991年のCoughlinらのグループによる、血小板および血管内皮細胞に存在するトロンビン受容体 cDNA の発現クローニングの成功¹⁾は、その生理的意義の重要性より各方面の大きな注目を浴びた。また、単なるトロンビンの結合ではなく、トロンビンにより切断されて生じた受容体分子の新たな N 末端部分 (SFLLRN.. という配列を持つ) が自身に作用し、活性化させるという特異な受容体活性化の機構も同時に明らかにされた。この最初の報告に関してはこの欄で昨年紹介し²⁾、Coughlin らによる総説³⁾も出ているので、それを参照されたい。本稿ではその後、明らかにされたこの受容体に関する知見を概説する。

受容体の構造と機能

i) 受容体の構造

現在まで、トロンビン受容体の cDNA はヒト¹⁾、ハムスター⁴⁾、ラット⁵⁾より単離されている(図 1)。ヒトの場合、425 アミノ酸残基に相当す

る open reading frame を持ち、26 残基がシグナル配列だと思われる¹⁾。この配列より予想される分子量は 44 kDa だが、実際にイムノブロッティングで検出された血小板膜の受容体は約 70 kDa である⁶⁾⁷⁾。この違いは糖鎖の付加によると思われる。この分子は G-protein 共役型受容体に共通する構造である 7 つの膜貫通部位を持つが、どの部位が G-protein との相互作用に重要であるかは明らかにされていない。現在までのところ詳細に検討されているのは第 1 細胞外ドメイン上のトロンビン結合部位である。受容体分子のトロンビンにより切断される部位の直後に存在する配列は酸性アミノ酸に富み、ヒルジンのトロンビン結合部位と相同性を示す¹⁾⁸⁾。Coughlin らはここがトロンビンの anion binding exosite と相互作用するのではないかと考え、この部分を改変した変異体⁸⁾、合成ペプチド⁸⁾⁹⁾、さらにこの部分に対する抗ペプチド抗体⁶⁾を用いた解析を行い、それが正しいことを証明している。

ii) アゴニストペプチドの構造・機能の相関
Coughlin らは最初の報告でトロンビンによ

図1 トロンビン受容体の一次構造。

cDNA より推定されるヒト¹⁾、ハムスター⁴⁾ およびラット⁵⁾ の受容体のアミノ酸配列を並記する。“-”はヒトと同じ配列を示し、~~~~はシグナル配列、■は膜貫通部位とそれぞれ推定される部分を示す。またトロンビンにより切断される部分を矢印で示す (ヒトの場合 Arg⁴¹/Ser⁴²)。

る切断で露出する部位に相当するテトラデカペプチドにこの受容体に対するアゴニスト活性があることを明らかにしたが¹⁾、その後このペプチドの構造・機能相関を詳細に検討している。合成ペプチドを用いた結果より、ヘキサペプチド SFLLRN が最大活性を示すこと、4残基 SFLL まで短くしてもまだ活性は見られること、最初のセリン残基を他のアミノ酸に置換しても活性はあるが遊離のアミノ基を持つ必要があること、そして2番目のフェニルアラニン残基が必須なことなどを明らかにした (表1)¹⁰⁾。すなわちこの受容体を活性化するのに必要最小限な配列はテトラペプチド XFLL である。同様

の結果が他のいくつかのグループによっても確認されているが、特に Brass らによるものが興味深い。彼らは最初の1残基を欠いたペプチド (FLLRN) にはアゴニスト活性はないが、トロンビンまたはアゴニストペプチドによる血小板凝集を阻害すると報告している¹¹⁾。このペプチドはトロンビンによるフィブリン形成には影響しないとも述べられており、トロンビン自体には作用せず細胞にのみ働き得るはじめての受容体アンタゴニストである。

トロンビンによる細胞活性化の機序

クローニングの結果明らかにされた、7つの

表1 トロンビン受容体アゴニストペプチドの構造・機能相関^a

ペプチド	EC ₅₀ ^b (μM)
⁴² SFLLRNPNDKYE ⁵⁵ PF	18.2
FLLRNPNDKYE ⁵⁵ PF	>1000
SFLLRNPNDKYE	8.2
acetyl-SFLLRNPNDKYE	>1000
SFLLRNPNDK	7.2
SFLLRNPN	4.7
SFLLRNP-amide	3.4
SFLLRN-amide	1.4
SFLLR-amide	6.0
GFLLR-amide	8.7
AFLLR-amide	25.3
SALLR-amide	>1000
SFALR-amide	29.1
SFLAR-amide	143
SFLL-amide	461

^a 文献 10 より抜粋

^b ヒト PRP 中で最大凝集の半分の凝集反応を引き起こすのに必要なペプチド濃度

膜貫通部位を持つ受容体の構造は薬理的検討より予想されていた G-protein との共役を証明するものである。実際、細胞に発現させた受容体を用いてこの共役 (G_i を介する adenylate cyclase の阻害および G_q を介する phospholipase C の活性化) が確認された¹²⁾。

この受容体はトロンビンにより切断されるため一回限りでその役割を終える。では、トロンビンに一度触れた受容体は活性化されたままの状態でとどまるのだろうか? Brass はこの点を HEL 細胞を用いて検討した。トロンビンで刺激された細胞は当然新たな受容体分子が合成されるまでトロンビンに対しては応答しなくなるが、アゴニストペプチドに対してはかなり短時間で応答を回復する。この回復はタンパク質合成を阻害しても起きるが、protein phosphatase 阻害剤により抑制される。また phorbol ester で前処理した細胞はトロンビンおよびペプチドに対して応答しなくなる。これらの観察より、刺激に伴い活性化された protein kinase が受容体を修飾し、リン酸化された受容体分子はアゴニスト部分との親和性を失って解離し、刺激が遮断されるのだらうと考察している¹³⁾。また、Brass らはアゴニストとして働く部分を認識するモノクローナル抗体を作成し、

この抗体が血小板のトロンビン凝集を選択的に阻害すること、さらにこの抗体の結合部位が血小板一個あたり、1,800 個あることも明らかにしている⁷⁾。この数は以前より報告されていたトロンビンの moderate affinity binding site の数とほぼ等しい。

トロンビンは血小板のみならず様々な細胞に対して刺激を与えることが知られる。アゴニストペプチドの種々の細胞に対する影響を観察した報告もすでに多数あるが、その一部を紹介したい。

トロンビンを培養神経細胞に与えると速やかな形態変化 (神経突起が引っ込み細胞が丸くなる) が起きる。この現象は従来、形態維持に必要な細胞外マトリックスがトロンビンにより分解されるためだと説明されていたが、アゴニストペプチドを用いることで受容体を介した細胞に対する直接的なものであることが証明された¹⁴⁾。

血管平滑筋にこのペプチドを作用させるとトロンビンの場合と同様に細胞増殖を引き起こす¹⁵⁾。この結果を受けて、Schwartz はトロンビンが動脈硬化などの病態の原因となる serum-derived growth factor ではないかと議論している¹⁶⁾。一方、cDNA を用いた in situ hybridization および免疫染色により、動脈硬化巣の平滑筋細胞には正常のものに比べはるかに多くの受容体 mRNA とタンパク質が検出されるとの興味深い報告もある¹⁷⁾。

今後の課題

以上述べたように、トロンビンによる細胞活性化のメカニズムは飛躍的に理解が深まりつつある。以前の研究においては、トロンビンのプロテアーゼとしての性質が間接的な影響を及ぼしていた可能性もあったが、アゴニストペプチドという強力な武器が得られたことでより精密な解析が行えるようになったと考えられる。今後、解明されるべき点として、特に次のふたつを挙げたい。

① Coughlin らが同定したもの以外の型の受容体が存在する可能性。Bartha らは血管内皮細胞における刺激時の mRNA 発現レベルの変

動を観察した。トロンビン、ペプチドともに tissue factor の発現は増加させるが、一方 thrombomodulin の場合、ペプチドはトロンビンとは異なり mRNA レベルを上昇させないと報告している¹⁸⁾。この結果は異なる型の受容体の存在を示すものかもしれない。

②この受容体以外の細胞膜上のトロンビン結合タンパク質、特に Bernard-Soulier 症候群 (BSS) 関連タンパク質 (GPIb-IX, GPV) の生理的役割。血小板上の GPIb-IX はトロンビンに対する高親和性結合部位となるが、その生理的意義は不明である。これが血小板上にトロンビンを蓄積させ確実な受容体活性化を保証するとの見解もあるが¹⁹⁾、Leong らは高親和性部位に結合したトロンビンはプロテアーゼとして不活性であると報告し、この意見を否定している²⁰⁾。しかし、BSS 患者の血小板がトロンビンに対して不応であるのは事実であり、今後この矛盾の解決が待たれる。

文 献

- 1) Vu, T.-K.H., Hung, D.T., Wheaton, V.I. & Coughlin, S.R.: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, **64**: 1057~1068, 1991.
- 2) 関屋富士男, 斉藤佑尚: 血小板のトロンビン受容体, 血栓止血, **3**: 198~201, 1992.
- 3) Coughlin, S.R., Vu, T.-K.H., Hung, D.T. & Wheaton, V.I.: Characterization of a functional thrombin receptor: Issues and opportunities. *J Clin Invest*, **89**: 351~355, 1992.
- 4) Rasmussen, U.B., Vouret-Craviari, V., Jallat, S., Schlesinger, Y., Pages, G., Pavirani, A., Lecocq, J.-P., Pouyssegur, J. & van Obberghen-Schilling, E.: cDNA cloning and expression of a hamster α -thrombin receptor coupled to Ca^{2+} mobilization. *FEBS Lett*, **288**: 123~128, 1991.
- 5) Zhong, C., Hayzer, D.J., Corson, M.A. & Runge, M.S.: Molecular cloning of the rat vascular smooth muscle thrombin receptor: Evidence for *in vitro* regulation by basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*, **267**: 16975~16979, 1992.
- 6) Hung, D.T., Vu, T.-K.H., Wheaton, V.I., Ishii, K. & Coughlin, S.R.: Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. *J Clin Invest*, **89**: 1350~1353, 1992.
- 7) Brass, L.F., Vassallo, R.R., Jr., Belmonte, E., Ahuja, M., Cichowski, K. & Hoxie, J.A.: Structure and function of the human platelet thrombin receptor: Studies using monoclonal antibodies directed against a defined domain within the receptor N terminus. *J Biol Chem*, **267**: 13795~13798, 1992.
- 8) Vu, T.-K.H., Wheaton, V.I., Hung, D.T., Charo, I. & Coughlin, S.R.: Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature*, **353**: 674~677, 1991.
- 9) Hung, D.T., Vu, T.-K.H., Wheaton, V.I., Charo, I., Nelken, N.A., Esmon, N., Esmon, C.T. & Coughlin, S.R.: "Mirror image" antagonists of thrombin-induced platelet activation based on thrombin receptor structure. *J Clin Invest*, **89**: 444~450, 1992.
- 10) Scarborough, R.M., Naughton, M., Teng, W., Hung, D.T., Rose, J., Vu, T.-K.H., Wheaton, V.I., Turck, C.W. & Coughlin, S.R.: Tethered ligand agonist peptides: Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem*, **267**: 13146~13149, 1992.
- 11) Vassallo R.R., Jr., Kieber-Emmons, T., Cichowski, K. & Brass, L.F.: Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides. *J Biol Chem*, **267**: 6081~6085, 1992.
- 12) Hung, D.T., Wong, Y.H., Vu, T.-K.H. & Coughlin, S.R.: The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, **267**: 20831~20834, 1992.
- 13) Brass, L.F.: Homologous desensitization of HEL cell thrombin receptors: Distinguishable roles for proteolysis and phosphorylation. *J Biol Chem*, **267**: 6044~6050, 1992.
- 14) Jalink, K. & Moolenaar, W.H.: Thrombin receptor activation causes rapid neural cell rounding and neurite retraction independent of classic second messengers. *J Cell Biol*, **118**: 411~419,

- 1992.
- 15) McNamara, C.A., Sarembock, I.J., Gimple, L.W., Fenton, J.W., II, Coughlin, S.R. & Owens, G.K.: Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. *J Clin Invest*, **91**: 94~98, 1993.
- 16) Schwartz, S.M.: Serum-derived growth factor is thrombin? *J Clin Invest* **91**: 4, 1993.
- 17) Nelken, N.A., Soifer, S.J., O'Keefe, J., Vu, T.-K. H., Charo, I.F. & Coughlin, S.R.: Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest*, **90**: 1614~1621, 1992.
- 18) Bartha, K., Brisson, C., Archipoff, G., de la Salle, C., Lanza, F., Cazenave, J.-P. & Beretz, A.: Thrombin regulates tissue factor and thrombomodulin mRNA levels and activities in human saphenous vein endothelial cells by distinct mechanisms. *J Biol Chem*, **268**: 421~429, 1993.
- 19) De Marco, L., Mazzucato, M., Masott, A., Fenton, J.W., II & Ruggeri, Z.M.: Function of glycoprotein Ib α in platelet activation induced by α -thrombin. *J. Biol. Chem.* **266**: 23776~23783, 1991.
- 20) Leong, L., Henriksen, R.A., Kermode, J.C., Rittenhouse, S.E. & Tracy, P.B.: The thrombin high-affinity binding site on platelets is a negative regulator of thrombin-induced platelet activation: Structure-function studies using mutant thrombins, Quick I and Quick II. *Biochemistry*, **31**: 2567~2576, 1992.
-