ホスファターゼ阻害薬の薬理学

堀 正敏*
唐木英明

細胞の種々の生理機構にとって、蛋白質の磷酸化-脱磷酸化反応は重要な制御機構の1つであり、これを担うのが蛋白質磷酸化酵素と蛋白質脱磷酸化酵素である。これまでは磷酸化酵素側からの研究が圧倒的に多く、脱磷酸化酵素側からの研究は、その特異的阻害薬がなかったこともあり少なかった。しかし、オカダ酸をはじめ、近年次々と脱磷酸化酵素阻害薬が発見され、種々の生理機構の解明にこれらの阻害薬が有用な tool となりつつある。これまでに発見された脱磷酸化酵素阻害薬の脱磷酸化酵素阻害作用と平滑筋に対する作用を中心に紹介する。

細胞の多くの機能は蛋白質の磷酸化-脱磷酸化によって調節されている。これまで、蛋白質脱磷酸化酵素（以下ホスファターゼ）の特異的阻害薬が見いだされていなかったこともあり、その研究は蛋白質磷酸化酵素（以下キナーゼ）側からのものが主体であった。しかし、オカダ酸 (okadaic acid)^(1,2) とカリクリン A (calyculin A)⁽³⁾ が特異的なホスファターゼ阻害薬として発見され、ホスファターゼ側からの研究が可能となり注目を集めている。また、新たにトートマイシン (tautomycin)⁽⁴⁻⁶⁾ とマイクロシスチン-LR (microcystin-LR)^(7,8) が特異的なホスファターゼ阻害薬として見いだされた。本稿では、この4種のホスファターゼ阻害薬のホスファターゼ阻害作用と平滑筋に対する作用を中心に研究の現状を概観する。

ホスファターゼ阻害薬 (図1)

オカダ酸 (okadaic acid)

オカダ酸 (図1) は 1981 年

Pharmacology of Phosphatase Inhibitors

* Masatoshi HORI, Hideaki KARA-KI, 東京大学農学部

橘⁽⁹⁾により日本産クロイソカイメン (*Halichondria okadai*) およびフロリダ産近縁種 *H. melanodocia* から分離された、特異な構造を持つポリエ

図1 ■ 各種ホスファターゼ阻害薬の化学構造

表 1 ■ 各種ホスファターゼの特徴とそれに対する阻害薬の効果

分類	インヒビター類による抑制	ホスホリラーゼキナーゼ α, β	陽イオン要求性	50% 抑制濃度 (IC ₅₀) (nm)			
				オカダ酸	カリクリンA	トートマイシン	ミクロシスチン-LR
1 型	あり	$\beta > \alpha$	なし	60~500 ⁽³⁾	3 ⁽⁶⁾	32 ⁽⁶⁾ , 0.2 ⁽⁵⁾	6 ⁽⁸⁾ , 1.7 ⁽⁷⁾
2 A 型	なし	$\alpha > \beta$	なし	1 ⁽³⁾	5 ⁽⁶⁾	32 ⁽⁶⁾ , 1 ⁽⁵⁾	2 ⁽⁸⁾ , 0.04 ⁽⁷⁾
2 B 型	なし	$\alpha > \beta$	Ca ²⁺ (カルモジュリン)	10,000 ⁽²⁾	400~700	>10,000 ⁽⁵⁾	—
2 C 型	なし	$\alpha > \beta$	Mg ²⁺	抑制なし ⁽²⁾	—	抑制なし ⁽⁵⁾	抑制なし ⁽⁷⁾
筋胃由来 (内因性)	—	—	—	70 ⁽⁸⁾	1 ⁽⁶⁾	6 ⁽⁶⁾	30*

*: 未発表, 肩つき数字は文献番号

ーテル化合物である。マウスに対するその毒性は 0.12 mg/kg (LD₅₀) と低いが, 白血病細胞 P388 および L 1210 に対しては 1.7 ng/ml および 17 ng/ml ときわめて強い細胞毒性を示す。また, 下痢性貝中毒の原因プランクトンである渦鞭毛藻 (*Dinophysis fortii*) からオカダ酸とその誘導体ジノフィジストキシン (dinophysistoxin, 35-メチルオカダ酸) が分離され, 二枚貝による下痢性中毒の原因物質として同定されている。

カリクリン A (calyculin A)

カリクリン A (図 1) は 1986 年に加藤ら⁽¹⁰⁾によって伊豆半島沖で採取されたカイメン *Disco-dermia calyx* より抽出された。その誘導体にカリクリン B, C および D があるが, いずれもウニ受精卵の卵割阻害作用 (IC₅₀: 5~10 ng/ml) を持ち, 白血病細胞 L 1210 に対して強い細胞毒性を示す (IC₅₀: 0.74~1.5 ng/ml)。また, ラット線維芽細胞 3Y1 や, マウス白血病細胞 L 1210 において核酸および蛋白質合成阻害作用を示すことが知られている。

トートマイシン (tautomycin)

オカダ酸およびカリクリン A がいずれもカイメンから単離されたのに対して, トートマイシン (図 1) は Cheng ら⁽¹¹⁾によって中国産の放線菌 *Streptomyces spiroverticillatus* より単離された抗生物質である。その抗菌作用は 50~500 μ g/ml の範囲で種々の菌類に作用し, またヒトの白血病細胞 K 562 の形態変化 (bleb formation) をひき起こすことも知られている (0.1~1 μ g/ml)⁽¹²⁾。

ミクロシスチン-LR (microcystin-LR)

ミクロシスチン-LR (図 1) はラン藻 *Microcystis aeruginosa* より単離され⁽¹³⁾, 他の誘導体

(ミクロシスチン-RR) および *Nodularia spumigena* より単離されるノデュラリン (nodularin) とともに, 強い肝毒性を示すことが知られている。ヨーロッパやオーストラリアでは, これらの藻類 (アオコ) が河川や貯水池に異常繁殖し, この水を飲んだ愛玩動物や家畜が中毒死して問題となっている⁽¹⁴⁾。

ホスファターゼ阻害作用

蛋白質の磷酸化の標的となるアミノ酸は, 水酸基を持つセリン, スレオニンおよびチロシンである。多くのキナーゼはセリン・スレオニン残基を磷酸化するセリン・スレオニンキナーゼであり, したがって, ホスファターゼにおいてもセリン・スレオニンホスファターゼの研究が最も広く行なわれている。Cohen ら^(15,16)の分類によれば, セリン・スレオニンホスファターゼは表 1 に示すように 4 つに分類される。

まず, 耐熱性インヒビター 1 と 2 によって抑制される 1 型と抑制されない 2 型に分けることができる。また, 1 型ホスファターゼはホスホリラーゼキナーゼの β サブユニットをより速く脱磷酸化するのに比べて, 2 型ホスファターゼはホスホリラーゼキナーゼの α サブユニットをより速く脱磷酸化し, その陽イオン依存性によりさらに 2 A 型, 2 B 型および 2 C 型に分類される。2 A 型は 1 型とともに 2 価陽イオン要求性はないが, 2 B 型は Ca²⁺ とカルモジュリン依存性であり, カルシニユリン (calcieneurin) と呼ばれる。また, 2 C 型は Mg²⁺ 依存性である。

オカダ酸のホスファターゼ阻害作用は高井ら^(1,2)によって明らかにされ, 筆者らはカリクリ

ン A⁽⁸⁾, ミクロシスチン-LR⁽⁶⁾ およびトートマイシン⁽⁶⁾の作用を明らかにした. 表 1 に示したように, オカダ酸は 1 型および 2 A 型ホスファターゼに対して強い抑制作用を示すが, その IC₅₀ は 2 A 型のほうが約 60~500 倍強い. また, 2 B 型に対しては高濃度で抑制効果を示し (IC₅₀: 10 μ M), 2 C 型に対しては抑制効果を示さない.

これに対して, カリクリン A は 1 型および 2 A 型ホスファターゼを非選択的に抑制し, その作用はオカダ酸に比べて強い. また, 2 B 型に対する抑制作用は弱く, その IC₅₀ は 400~700 nM である.

トートマイシンはカリクリン A と類似の作用を示し, 1 型, 2 A 型ホスファターゼに対して同程度の抑制作用を示し, 2 B 型ホスファターゼには高濃度でしか抑制作用を示さない (IC₅₀: >10 μ M). また, 2 C 型ホスファターゼに対しては抑制作用を示さない. トートマイシンは 2 A 型ホスファターゼよりも 1 型ホスファターゼを選択的に抑制するとの報告もあるが⁽⁵⁾, その K_i 値は約 2 倍しか異ならないので, カリクリン A タイプのホスファターゼ阻害薬と考えてよいだろう.

ミクロシスチン LR-は, 筆者らのグループでは 1 型および 2 A 型ホスファターゼに対してほぼ同程度の抑制効果 (IC₅₀: 6 nM および 2 nM) を示した⁽⁸⁾が, Honkanen ら⁽⁷⁾は 2 A 型ホスファターゼをより選択的に阻害すると報告している. 彼らの報告によれば, ホスファターゼの濃度を希釈していくと ミクロシスチン-LR のホスファターゼ阻害作用は増強され, その濃度作用曲線は左に移動していくが, その増強作用は 1 型ホスファターゼよりも 2 A 型ホスファターゼにおいて顕著に認められる. すなわち, ホスファターゼ濃度を希釈していけば, ミクロシスチン-LR は 1 型より 2 A 型ホスファターゼをより選択的に抑制するようになる, ということである. MacKintosh と Klumpp ら⁽⁵⁾の K_i 値による比較においても, ミクロシスチン-LR は約 6 倍以上 2 A 型ホスファターゼに対して強い値を示していることから, ミクロシスチン-LR はオカダ酸タイプのホスファターゼ阻害薬であると考えられる. また, その抑

制作用はオカダ酸に比べて約 10 倍強いが, 1 型ホスファターゼに対する 2 A 型ホスファターゼの選択性は, オカダ酸が約 60~500 倍強いに対して ミクロシスチン-LR は約 40 倍であり, オカダ酸のほうがより選択性が高いといえる.

セリン・スレオニンホスファターゼ以外のホスファターゼ (蛋白質ホスファターゼ以外も含む) に関するこれらのホスファターゼ阻害薬の検討は少ないが, オカダ酸およびカリクリン A は酸またはアルカリホスファターゼおよびチロシンホスファターゼには抑制作用を示さず^(2,3), またオカダ酸は イノシトール 1,4,5-三リン酸 ホスファターゼも抑制しないことが報告されている⁽²⁾.

平滑筋に対する作用

橘ら⁽⁹⁾がオカダ酸の構造を明らかにした翌年, 柴田ら⁽¹⁷⁾によりオカダ酸が Ca²⁺ 非依存性に血管および腸管平滑筋を収縮させることが見いだされた. これがきっかけとなり, オカダ酸の作用は平滑筋を用いて詳細に検討され, そのホスファターゼ阻害作用も平滑筋を用いて明らかにされた. また, 後にオカダ酸が平滑筋収縮弛緩作用をも示すことが見いだされた. ここでは, 平滑筋に対する作用をオカダ酸とカリクリン A を中心に説明する.

1. 平滑筋の収縮機構

初めに平滑筋の収縮機構について簡単に触れておく. 現在, 平滑筋の収縮はミオシンの磷酸化説で説明されている (図 2). 収縮薬により, Ca²⁺ チャネルを介した細胞外からの Ca²⁺ 流入や筋小胞体からの Ca²⁺ 遊離により, 細胞質内の遊離 Ca²⁺ 濃度 ([Ca²⁺]_{cyt}) が上昇する. [Ca²⁺]_{cyt} はカルモジュリン (CaM) と結合し, この Ca²⁺-カルモジュリンは不活性型のミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) と複合体を形成し, ミオシン軽鎖キナーゼは活性化される. これによってミオシン軽鎖が磷酸化され, ミオシンの ATPase 活性が上昇しアクチンとの相互作用が起こり, 筋は収縮する. 収縮薬を除去すると, Ca²⁺ チャネルは閉鎖し, 細胞質膜と筋小胞体膜の Ca²⁺ ポンプの働き

図 2 ■ 平滑筋の収縮弛緩機構

詳細は本文を参照。high：高濃度のオカダ酸で抑制される。low：低濃度のオカダ酸で抑制される。CaM：カルモジュリン，MLCK：ミオシン軽鎖キナーゼ

で $[Ca^{2+}]_{cyt}$ は減少する。これによって Ca^{2+} -カルモジュリン-ミオシン軽鎖キナーゼ複合体からミオシン軽鎖キナーゼが離れ、その酵素活性は低下する。その結果、ホスファターゼ活性が相対的に上回り、リン酸化されたミオシン軽鎖は脱リン酸化され筋は弛緩する。

2. 平滑筋収縮作用

1982 年、柴田ら⁽¹⁷⁾はオカダ酸が血管平滑筋と腸管平滑筋において Ca^{2+} 不在下でゆっくりとした立上がりの持続的な収縮を生じることを見だし、この収縮がテトロドトキシンとインドメタシンによっても影響を受けないことから、オカダ酸が神経に作用したりプロスタグランジンの遊離を起こすのではなく、平滑筋に直接作用すると考えた。その後 1987 年になって、筆者らのグループの尾崎ら⁽¹⁸⁾は、腸管平滑筋のサポニン処理脱膜化標本（スキンドファイバー）を用いて、オカダ酸が Ca^{2+} に依存せずに収縮を生じること、収縮蛋白質系の Ca^{2+} 感受性を増加させること、カルモジュリン活性には影響を与えないことを明らかにした。さらに尾崎らは、ニワトリより抽出した天然

アクトミオシンを用いて、オカダ酸が Ca^{2+} 不在下においても超沈殿、ミオシンの ATPase 活性を増加させ、さらにこの際ミオシン軽鎖のリン酸化を伴うことを明らかにした⁽¹⁹⁾。この時彼らは、リン酸化ミオシン軽鎖の脱リン酸化反応を指標としてホスファターゼ活性に対する作用も検討したが、オカダ酸を前処置していなかったためにホスファターゼ阻害作用を検出できなかった。したがって、これらの成績から、 Ca^{2+} とカルモジュリンに依存せずに活性を持ち、 Ca^{2+} によってその活性がさらに増強されるキナーゼを介してオカダ酸が収縮作用を示すと考えた。

しかし、その直後に高井ら^(14,20)

によってオカダ酸がホスファターゼ活性を阻害することが明らかにされた。高井らはサポニンよりも強い細胞膜破壊作用を持つ Triton X-100 を用いた腸管平滑筋スキンドファイバーにおいてオカダ酸が Ca^{2+} 依存性に収縮作用を示し、またその粗抽出液を用いて、オカダ酸がミオシン軽鎖キナーゼ活性には影響を与えずに、ホスファターゼ活性を抑制することを報告した。さらに、スキンドファイバーにおけるオカダ酸の収縮がミオシン軽鎖のリン酸化の増加に依存していることを明らかにした⁽²⁰⁾。

尾崎らの報告と高井らの報告では、オカダ酸の収縮が Ca^{2+} 依存性であるのか Ca^{2+} に依存しなくても生じるのかという点で違いがあった。しかし、その後小原ら⁽²¹⁾は気管平滑筋を用いて、オカダ酸による収縮の一部が Ca^{2+} とカルモジュリンに依存せずにミオシン軽鎖のリン酸化を増加させることを明らかにした。一方、筆者らのグループの石原らは、オカダ酸とは異なるカイメンより単離されたカリクリンAがオカダ酸同様、天然アクトミオシンの超沈殿、ミオシン ATPase 活性ならびにミオシン軽鎖のリン酸化を Ca^{2+} 不在下で増加

図3 ■天然アクトミオシンにおけるミオシン軽鎖の磷酸化に対する各種ホスファターゼ阻害薬の作用

CL-A: カリクリンA, OA: オカダ酸, TM: トートマイシン, Mic-LR: ミクロシスチン-LR. Ca^{2+} 除去下でも各種ホスファターゼ阻害薬はミオシン軽鎖の磷酸化をひき起こした. 反応時間: 15 分間.

させることを明らかにし⁽²²⁾, カリクリンAがホスファターゼ活性を抑制することを見いだした⁽³⁾. その後新しく発見された トートマイシン⁽⁵⁾ とミクロシスチン-LR においても, Ca^{2+} 不在下で平滑筋収縮が生じ, 図3に示したように天然アクトミオシンのミオシン軽鎖を Ca^{2+} 不在下で磷酸化させることを確認している. しかし, 生筋の収縮作用を生じるのに必要な濃度は, ホスファターゼ阻害薬によってはスキンドファイバーや天然アクトミオシンでの有効濃度よりかなり高濃度を要するものがある. これは, 恐らく膜の透過性に起因するものと考えられ, その透過性はカリクリンA > オカダ酸 > トートマイシン > ミクロシスチン-LR の順で高いものと考えられる.

以上のことより, オカダ酸をはじめとするホスファターゼ阻害薬による平滑筋収縮作用は次のように考えられる. Ca^{2+} の存在する場合は, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ がたとえ静止状態であってもミオシン軽鎖キナーゼは弱い活性を持ち, ミオシン軽鎖を磷酸化しているが, ホスファターゼ活性が相対的には強いのですぐに脱磷酸化され収縮は生じないものと考えられる. しかし, ホスファターゼ阻害薬によってホスファターゼ活性が失活してしまうと, わずかなミオシン軽鎖キナーゼ活性によるミオシンの磷酸化も脱磷酸化されないため, 徐々にミオシン軽鎖の磷酸化が増加して収縮作用を示す

ものと考えられる. スキンドファイバーなどでオカダ酸が収縮蛋白系の Ca^{2+} 感受性を上げることもこれによって説明できる.

しかし, Ca^{2+} をまったく除去してしまった場合やカルモジュリン阻害薬の存在する場合は, Ca^{2+} -カルモジュリン依存性のミオシン軽鎖キナーゼの活性はなくなるため, 前述の考えではホスファターゼ阻害薬による収縮の説明はできない. しかもこの収縮がミオシン軽鎖の磷酸化の増加を伴っており, その磷酸化部位はミオシン軽鎖キナーゼによる磷酸化部位と同じであることが見いだされた⁽²³⁾. したがって, Ca^{2+} -カルモジュリンに依存しないミオシン軽鎖キナーゼが存在し, ホスファターゼ阻害薬によってホスファターゼ活性が抑制されると間接的にこのキナーゼ活性が増加し, ミオシンの磷酸化を増加させ, 収縮を生じるものと考えられる (図2参照). 恐らく, このキナーゼの作用は, 正常な状態においてはホスファターゼによって覆い隠されているものと考えられる.

3. 平滑筋弛緩作用

オカダ酸は $3 \sim 10 \mu\text{M}$ の濃度で収縮作用を示すが, 筆者らはそれより低濃度 ($0.3 \sim 1 \mu\text{M}$) のオカダ酸が平滑筋収縮を抑制することを見いだした⁽²⁴⁾. このオカダ酸の平滑筋弛緩作用は, その後いくつかのグループによって報告された^(25,26). この抑制作用は臓器ならびに収縮薬の種類を問わず認められるが, その $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ 動態に対する影響には差が認められる. ウサギ大動脈, ブタ冠動脈およびモルモット輪精管において, 高濃度 K^{+} 収縮に対してオカダ酸は $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ をわずかに抑制するかほとんど抑制せずに収縮張力を抑制する. これに対して, ウシ気管平滑筋のカルバコール収縮⁽²⁷⁾ とモルモット輪精管のノルアドレナリンおよびATP収縮⁽²⁸⁾などの受容体作動薬においては, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の持続的な増加を抑制し収縮を弛緩させる. さらに, ウサギの血小板においてもスロンビンによる $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の増加を伴う凝集反応が, 低濃度のオカダ酸によって $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の減少を伴って阻害される⁽²⁴⁾. これらの反応は

cAMP の作用ときわめてよく類似しており、しかもオカダ酸の平滑筋弛緩作用は cAMP によって増強されたが、cGMP によっては増強されなかった (未発表)。

オカダ酸に対してカリクリンAは、高濃度 K^+ ならびに受容体作動薬の収縮に対して弱い一過性の弛緩作用を示すが、その後すぐに収縮増強作用に転じ、顕著な平滑筋弛緩作用は認められなかった (未発表)。さらにトートマイシン⁽⁶⁾にも平滑筋弛緩作用は認められず、ミクロシチン-LR はオカダ酸に比べて弱いものの、ゆっくりとした平滑筋弛緩作用が認められた (未発表)。前節ですでに述べたように、オカダ酸ならびにミクロシチン-LR は、2A 型ホスファターゼを1型ホスファターゼに比べて低濃度域で選択的に阻害し、カリクリンAならびにトートマイシンは1型、2A 型ホスファターゼに対する選択性はほとんどない。したがって、オカダ酸の平滑筋弛緩作用は2A 型類似のホスファターゼを阻害することによって生じているものと考えられた。

これらのことから、低濃度のオカダ酸による平滑筋弛緩作用は次のように考えることができる。低濃度のオカダ酸は cAMP 依存性キナーゼによる磷酸化反応を脱磷酸化させるホスファターゼ (恐らく上述のようにこのホスファターゼは2A 型類似のホスファターゼと考えられる。次項を参照) を阻害し、見かけ上このキナーゼ活性を増加させることにより弛緩作用を示すものと考えられる。また、高濃度のオカダ酸は、ミオシン軽鎖の磷酸化を制御するホスファターゼ (1型類似のホスファターゼと考えられる。次項参照) をも阻害するため、その弛緩作用は収縮作用に拮抗されて現われないものと思われる (図2, high と low 参照)。カリクリンAの平滑筋弛緩作用が初期の一過性の反応しか示さないのも、同様の理由と考えられる。

他方、ウシの気管平滑筋では、オカダ酸は $[Ca^{2+}]_{cyt}$ の減少を伴ってカルパコール収縮を抑制するが、この時ミオシン軽鎖の磷酸化は減少しないことを筆者らは見いだした⁽²⁷⁾。このミオシンの磷酸化と収縮の乖離は上述の平滑筋のミオシン

その磷酸化説には当てはまらず、平滑筋の収縮機構のものに問題を投げかけるものである。

4. 平滑筋収縮を制御するホスファターゼの同定

これまで、セリン・スレオニンホスファターゼはCohen ら^(15,16)によって4種類に分けられているが (表1)、平滑筋の収縮を制御するホスファターゼがこのうちどれにあたるのかは明らかではなかった。Pato ら⁽²⁹⁻³²⁾のグループはニワトリ筋胃よりI~IVまでのホスファターゼを単離したが、このうちミオシンと結合能を持つのはIIIとIVの2種類のみであり、これらはインヒビター類で抑制されないことを報告した。高井ら⁽³³⁾は、インヒビター類とオカダ酸の作用によってモルモット回腸縦走筋に含まれるホスファターゼの同定を試み、4種のホスファターゼを同定した。その中でインヒビター類で抑制されないCohen らの2A 型に属する2つのホスファターゼのうち、比較的オカダ酸に対する感受性が低いホスファターゼはスキンドファイバー中においても長期間残存していた。また、筆者らはニワトリ筋胃およびウサギ子宮平滑筋由来のホスファターゼを用いてオカダ酸とカリクリンAの作用を検討したところ、その IC_{50} はオカダ酸で10~200 nM、カリクリンAで1 nM となり、1型ホスファターゼに対する抑制効果と類似していることを見いだした^(3,23)。これらの成績から、平滑筋の収縮を制御するホスファターゼはその阻害薬の感受性からは1型ホスファターゼに類似するが、インヒビター類の感受性からは2型に類似するものであり、Cohen らによる従来の分類に当てはまらないものと考えられた。

最近、西脇ら⁽³⁴⁾はミクロシチン-LR によるアフィニティカラムを作製し、それを用いてマウス脳より2A 型ホスファターゼを単離することに成功した。以上のように、ホスファターゼ阻害薬はホスファターゼの単離精製にも応用されている。

5. 平滑筋のイオンチャネルへの作用

ホスファターゼ阻害薬は、イオンチャネルの研究分野でも応用され、オカダ酸が心筋のL型 Ca^{2+}

チャネルを活性化して陽性変力作用を示すこと⁽³⁵⁾、そのL型 Ca^{2+} チャネルの cAMP 依存性プロテインキナーゼによる開口率の増加作用をオカダ酸が著しく増加させること⁽³⁶⁾などが報告された。筆者らは、血管平滑筋においてオカダ酸ならびにカリクリンAが $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ を上昇させることを報告した⁽²²⁾が(この $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ の上昇は収縮に遅れて認められ、 Ca^{2+} チャネルブロッカーで抑制されるが、この時収縮はまったく抑制されないので、収縮には反映されていないものと考えられる)、藪ら⁽³⁷⁾はカリクリンAが平滑筋のL型 Ca^{2+} チャネルを活性化することを見いだした。一方、Ward ら⁽³⁸⁾は、イヌの胃ならびに結腸平滑筋では血管平滑筋と異なり、オカダ酸ならびにカリクリンAが Ca^{2+} チャネルを抑制することを報告した。また、久米ら⁽³⁹⁾はウサギの気管平滑筋において、オカダ酸が cAMP 依存性プロテインキナーゼの存在下においてのみ Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルを活性化することを明らかにした。これらの成績は、ホスファターゼ阻害薬の適用によりホスファターゼが阻害され、その結果間接的にチャネルを構成する蛋白質の磷酸化が生じることによると考えられ、一部のイオンチャネルの開閉がその構成蛋白質の磷酸化により制御される可能性と、その制御が平滑筋の種類により異なる可能性を示している。

6. アクチン-ミオシン相互作用への影響——ホスファターゼ阻害以外の作用の可能性

これまで、オカダ酸はホスファターゼ阻害薬として種々の研究に応用されてきたが、オカダ酸のホスファターゼ阻害以外の作用についてはなんら報告がなかった。しかし最近、早川ら⁽⁴⁰⁾により興味ある知見が報告された。すなわち、ニトロセルロースでコーティングしたカバーガラス上に磷酸化させた平滑筋のミオシン分子を接着させ、この上にファロイジン-ローダミンで蛍光ラベルしたFアクチンをのせ ATP を加えると、アクチン-ミオシンの相互作用が生じミオシン分子上をアクチン線維が動くのを観察できる (motility assay)。したがって、この系にはミオシン軽鎖キナ

ーゼやホスファターゼの関与はない。彼らは、この系においてオカダ酸が濃度依存性にアクチン線維の移動速度を増加させることを明らかにした。さらにこの時、アクチン活性化ミオシン ATPase 活性やミオシン ATPase 活性もオカダ酸によって増強されることから、オカダ酸がホスファターゼ阻害作用を介さずに、直接アクチン-ミオシンの相互作用を活性化する可能性を示唆した。この作用が生筋でのオカダ酸の収縮作用に関係しているかどうかはわからないが、他のホスファターゼ阻害薬においてもホスファターゼ阻害以外の作用が見いだされる可能性がある。

その他の作用

本稿では、ホスファターゼ阻害薬の平滑筋に対する作用を中心に述べたが、これらのホスファターゼ阻害薬の多くが強い発癌プロモーター作用を持つことが明らかにされている⁽⁴¹⁾。この作用は同じ発癌プロモーターであるホルボールエステルと異なり、Cキナーゼとは結合せず、また直接Cキナーゼ活性を増加させない^(42,43)ことから、ホスファターゼ阻害作用による他のキナーゼの活性化が関与するものと考えられている。その詳細は原著ならびに菅沼、藤木の文献⁽⁴⁴⁾を参照されたい。

最近、筆者らは培養平滑筋 A10 細胞⁽⁴⁵⁾、あるいは線維芽 3T3 細胞⁽⁴⁶⁾において、カリクリンAが細胞の種々の形態変化(円形化、bleb 形成、基質との接着解離、細胞の断裂など)をきたし、特にアクチン線維が細胞膜直下より解離し、核周辺部に凝集することを見いだした。これらの現象は、非特異的磷酸化酵素阻害薬によって阻害され、高濃度のカリクリンAでのみ認められることから、1型類似のホスファターゼを阻害することによる間接的な蛋白質の磷酸化が関与しているものと考えられた。

*

オカダ酸がホスファターゼ阻害薬として発見されて以来、カリクリンA、ミクロシスチン-LR、トートマイシンと次々にホスファターゼ阻害薬が発見された。オカダ酸とカリクリンAは和光純薬

から、ミクロシスチン-LR は Calbiochem からすでに販売されており、ホスファターゼ阻害薬を用いた細胞機構の研究は今後さらに進むものと考えられる。しかし、この4種のホスファターゼ阻害薬はいずれもセリン・スレオニンホスファターゼの1型および2A型ホスファターゼに選択性が高く、いまのところ2B型および2C型ホスファターゼさらにはチロシンホスファターゼの選択的阻害薬はない。それらの選択的なホスファターゼ阻害薬が見いだされれば、種々の細胞機能の解明に大いに助けになるのは明らかであり、その発見が期待されるところである。

本文中の未発表の成績は当研究室の石原宏朗(現 第一製薬)、阿部浅樹(現 岡山大学)、穴吹 淳らによる。

文献

- 1) A. Takai, C. Bialojan, M. Troschika & J. C. Ruegg : *FEBS Lett.*, 217, 81 (1987).
- 2) C. Bialojan & A. Takai : *Biochem. J.*, 256, 283 (1988).
- 3) H. Ishihara, B. L. Martin, D. L. Brautigam, H. Karaki, H. Ozaki, Y. Kato, N. Fusetani, S. Watabe, K. Hashimoto, D. Uemura & D. J. Hartshorne : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 871 (1989).
- 4) J. Magae, H. Osada, H. Fujiki, T. Saido, K. Suzuki, K. Nakai, M. Yamasaki & K. Isono : *Proc. Jpn. Acad.*, 66(B), 209 (1990).
- 5) C. MacKintosh & S. Klumpp : *FEBS Lett.*, 277, 137 (1990).
- 6) M. Hori, J. Magae, Y.-G. Han, D. J. Hartshorne & H. Karaki : *FEBS Lett.*, 285, 145 (1991).
- 7) R. E. Honkanen, R. E. Moore, S. L. Daily, B. S. Khatra, M. Dukelow & A. L. Boynton : *J. Biol. Chem.*, 265, 19401 (1990).
- 8) J. E. Eriksson, D. Toivola, J. A. O. Meriluoto, H. Karaki, Y.-G. Han & D. J. Hartshorne : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173, 1347 (1990).
- 9) K. Tachibana, P. J. Scheuer, Y. Tsukitani, H. Kikuchi, D. Van Engen, J. Clardy, Y. Gopichand & F. J. Schmitz : *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 2469 (1981).
- 10) Y. Kato, N. Fusetani, S. Matsunaga & K. Hashimoto : *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 2780 (1986).
- 11) X.-C. Cheng, T. Kihara, J. Magae, Y. Kobayashi, R.-P. Fang, Z.-F. Ni, Y.-C. Shen, K. Ko, I. Yamaguchi & K. Isono : *J. Antibiotics*, 40, 907 (1987).
- 12) J. Magae, C. Watanabe, H. Osada, X.-C. Cheng & K. Isono : *J. Antibiotics*, 41, 932 (1988).
- 13) W. W. Carmichael, V. Beasley, D. L. Bunner, J. N. Eloff, I. Falconer, P. Gorham, K. Harada, T. Kirshnamurthy, M.-J. Yu, R. E. Moore, K. L. Rinehart, M. Runnegar, O. M. Skulberg & M. Watanabe : *Toxicol.*, 26, 971 (1988).
- 14) I. R. Falconer : *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 6, 177 (1991).
- 15) P. Cohen & P. T. W. Cohen : *J. Biol. Chem.*, 264, 21435 (1989).
- 16) P. Cohen : *Ann. Rev. Biochem.*, 58, 453 (1989).
- 17) S. Shibata, Y. Ishida, Y. Ohizumi, J. Habon, Y. Tsukitani & H. Kikuchi : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 223, 135 (1982).
- 18) H. Ozaki, K. Kohama, Y. Nonomura, S. Shibata & H. Karaki : *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 335, 356 (1987).
- 19) H. Ozaki, H. Ishihara, K. Kohama, Y. Nonomura & H. Karaki : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 243, 1167 (1987).
- 20) C. Bialojan, J. C. Ruegg & A. Takai : *J. Physiol.*, 398, 81 (1988).
- 21) K. Obara, A. Takai, J. C. Ruegg & P. Lanerolle : *Pflugers. Arch.*, 414, 134 (1989).
- 22) H. Ishihara, H. Ozaki, K. Sato, M. Hori, H. Karaki, S. Watabe, Y. Kato, N. Fusetani, K. Hashimoto, D. Uemura & D. J. Hartshorne : *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 250, 388 (1989).
- 23) 石原宏明 : '海綿毒カリクリンAとオカダ酸の平滑筋作用に関する研究', 東京大学農学博士学位論文 (1990).
- 24) H. Karaki, M. Mitsui, H. Nagase, H. Ozaki, S. Shibata & D. Uemura : *Br. J. Pharmacol.*, 98, 590 (1989).
- 25) K. Hirano, H. Kanaide & M. Nakamura : *Br. J. Pharmacol.*, 98, 1261 (1989).
- 26) N. Ashizawa, F. Kobayashi, Y. Tanaka & K. Nakayama : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 162, 971 (1989).
- 27) M. G. Tansey, M. Hori, H. Karaki, K. E. Kamm & J. T. Stull : *FEBS Lett.*, 270, 219 (1990).
- 28) S. Shibata, N. Satake, M. Morikawa, S.-C. Kown, H. Karaki, K. Kurahashi, T. Sawada & I. Kodama : *Eur. J. Pharmacol.*, 193, 1 (1991).
- 29) M. D. Pato & R. S. Adelstein : *J. Biol. Chem.*, 255, 6535 (1980).
- 30) M. D. Pato & R. S. Adelstein : *J. Biol. Chem.*, 258, 7047 (1983).
- 31) M. D. Pato & R. S. Adelstein : *J. Biol. Chem.*, 258, 7055 (1983).
- 32) M. D. Pato & E. Kerc : *J. Biol. Chem.*, 260, 12359 (1985).
- 33) A. Takai, M. Troschka, G. Mieskes & A. V. Somlyo : *Biochem. J.*, 262, 617 (1989).
- 34) S. Nishiwaki, H. Fujiki, M. Suganuma, R. Nishiwaki-Matsushima & T. Sugimura : *FEBS Lett.*, 279, 115 (1991).
- 35) I. Kodama, N. Kondo & S. Shibata : *J. Physiol.*, 378, 359 (1986).
- 36) J. Hesheler, G. Mieskes, J. C. Ruegg, A. Takai & W. Trautwein : *Pflugers. Arch.*, 412, 248 (1988).
- 37) H. Yabu, M. Yoshino, T. Usuki, T. Someya, K. Obara, H. Ozaki & H. Karaki : "Frontiers in Smooth Muscle Research", Wiley-Liss, New York, 1990, p. 623.
- 38) S. M. Ward, F. Vogalis, D. P. Blondfield, H. Ozaki, N. Fusetani, D. Uemura, N. G. Publicover & K. M. Sanders : *Am. J. Physiol.*, 262, C 64 (1991).
- 39) H. Kume, A. Takai, H. Tokuno & T. Tomita : *Nature*, 341, 152 (1989).
- 40) K. Hayakawa, T. Okagaki, T. Dobashi, A. Sakanishi, K. Kaneko & K. Kohama : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 177, 1155 (1991).
- 41) M. Suganuma, H. Fujiki, H. Suguri, S. Yoshizawa, M. Hirota, K. Nakayasu, K. Yamada & T. Sugimura :

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1768 (1988).
- 42) T. Sassa, W. W. Werner, N. Uda, M. Suganuma, H. Suguri, S. Yoshizawa, M. Hirota & H. Fujiki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 159, 939 (1989).
- 43) H. Fujiki & M. Suganuma: *Jpn. J. Cancer. Res. (Gann)*, 79, 1089 (1988).
- 44) 菅沼雅美, 藤木博太: '発癌プロモーターとしての okadaic acid クラス化合物', 実験医学, 8, 1232 (1990).
- 45) M. Mitsui, H. Ishihara, H. Ozaki, F. Yazama, T. Nishida, Y. Kato, N. Fusetani & H. Karaki: *Jpn. J. Pharmacol.*, 52 (suppl), 319P (1990).
- 46) L. Chartier, L. L. Rankin, R. E. Allen, Y. Kato, N. Fusetani, H. Karaki, S. Watabe & D. J. Hartshorne: *Cell Motil. Cytoskeleton*, 18, 26 (1991).

ラグタイム ♪♪♪

Time Lag

Fool On The Hill

——丘の上の愚者——

丘の上の愚者は
沈んでいく陽を見る
頭のなかの目が
回っている地球を見る

ビートルズのヒットナンバーの一節で、曲の中で4回繰り返して歌われる。日没の前にして西方浄土を冥想する東洋の賢者のイメージと重っているところが面白い。特に、頭のなかの目が回っている地球を見るというのは普通ではなかなかイメージするのが難しいと思う。

1967年にビートルズはアルバム『マジカルミステリーツアー』を製作しているが、当時彼らはインドの神秘家に共鳴し、ハシシやLSDなどの幻覚剤を使用していた。おそらく、LSDによる幻覚作用は人類共通のイメージパターンを生みだし、ある種の神秘家は薬を使用しなくても類似の体験をするのであろう。

LSD (lysergic acid diethylamide) は 5-hydroxytryptamine (5-HT) の構造類似物質である。5-HT は血清中の血管平滑筋収縮物質として分離された。LSD が幻覚と思考障害をひき起こすことから、5-HT は脳内において神経伝達の役割を担い、精神機能に深く関わるということが予想されていたが、ドーパミンやノルアドレナリンなどの他のモノアミン神経伝達物質の研究に比べ、かなり遅れをとっていた。

体内では、5-HT は消化管のエンテロクロマフィン細胞に約 90% が存在し、血小板には約 8%, 脳にはわずか 1~2% しかない。もし、脳に大量存在すればわれわれの精神の機能は現在とは大分異なったものになってい

るはずである。

消化器と脳とはこのような物質を通じて、相互作用をしていることは納得のいく話である。神秘的体験と断食などはアミノ酸代謝物を通じて相互に関連しているのだろう。

最近、機能性食品という言葉をよく耳にし、研究も活発に行なわれている。食品のもつ新しい機能の開発というプラスの面があることは否定できないが、現在、機能を評価する系としては免疫系がとりあげられることが予想される。しかし、この免疫系と脳とが特にレセプターという点で共通な側面をもつことが明らかになってきている。たとえば、LSD は 5-HT のレセプターサブタイプである 5-HT₂ と結合することが知られている。レセプターのサブグループが微妙に 5-HT の類似物の構造を識別し、ある特定の作用を担当する細胞が反応しているのだらう。

機能性食品の研究のゆくえには充分注意を払わなければならないだろう。

リヴァプール出身の4人の反逆児たちは世界中を駆けめぐり、演奏活動を続け、休む暇もなかった。彼らが出会った「丘の上の愚者」は何者なのか？

この者は馬鹿のような薄笑いをうかべ、動かずにいるという。東洋では似たものを賢者といっている。

(夢遊子)