血小板タンパクチロシンリン酸化の 血小板機能制御における役割

小田 淳・宮川義隆・渡部玲子・池田康夫

慶應義塾大学医学部内科 ㊞ 160 新宿区信濃町 35

Roles of Protein Tyrosine Phosphorylation in The Regulation of Platelet Functions.

Atsushi Oda, Yoshitaka Miyakawa, Reiko Watanabe, Yasuo Ikeda.

Department of Internal Medicine, School of medicine, Keio University.
35 Shinanomachi, Shinjukuku, Tokyo 160, Japan

Protein tyrosine phosphorylation of numerous proteins have been observed by many during platelet activation processes. Especially, the relation between protein tyrosine phosphorylation and platelet aggregation or adhesion has been extensively studied. In view of the recent progresses achieved in many laboratories including ours, we would like to present a comprehensive review on this ever growing field.

Key Words : pp60src, pp72syk, Platelet aggregation, GTP binding proteins. Calcium. Phospholipases.

はじめに

血小板は止血血栓反応において中心的役割を果たしている。血小板の数量の著しい低下や、機能不全があれば生体の止血機能も不全で、生命は維持できない。たとえば、白血病などの血液疾患や抗癌剤投与後の患者では著しい血小板の低下に伴い、全身性の出血傾向が認められる。また、転写因子 NF-E2 の knock out マウスでは血小板が全く形成されずに、胎生期より著しい出血傾向が認められ、出生しても約 90% は生後 10 日前後で

死亡する¹⁾。一方、心筋梗塞、脳梗塞、不安定狭心症もしくは突然死などは血栓症そのものないしはそれに起因するものである。これらの状態で血管内視鏡や冠動脈造影、剖検などにより動脈内血栓の存在が証明されている。この動脈内血栓形成に血小板が主要な役割をはたすことも広く認められている。従って、外界の刺激に応じて血小板機能は不全にも、過剰応答にもならないよう複雑に細胞内情報伝達系により制御されている。血小板はまた生体から比較的容易に、ほぼ単一の集団として純化できる細胞である。このような特徴を有

図1. 三量体GTP結合タンパクに共役した受容体を介した血小板活性化機構とタンパクチロシンリン酸化上昇の模式図

するため、血小板は以前から、細胞機能と情報伝達系を研究するモデルとして、盛んに研究されてきた²⁾。最近では、特に pp60src などのチロシンリン酸化酵素を豊富に発現しているため、血小板細胞内タンパクチロシンリン酸化と細胞機能の関連性に注目が集まっている。本稿では血小板膜受容体を介した活性化のどの部分にチロシンリン酸化が関与しているかについて概説を試みたい。

1. 三量体GTP結合タンパクに共役した受容体を介した血小板活性化機構とタンパクチロシンリン酸化の関連性

血小板膜表面上にはトロンビン、トロンボキサン、血小板刺激因子 (PAF)、バゾプレッシン、セロトニン受容体などが三量体GTP結合タンパクに共役しているものと考えられている。これら

のうち、トロンボキサンそしてトロンビンに関しては、これら受容体に共役する三量体GTP結合タンパクとしてはGq、そしておそらくG₁₂、G₁₃であることが示唆されている。このうちGqはトロンボキサンなどの刺激下における phospholipase Cβ₁の活性化に関与すると思われるが、G₁₂、G₁₃がいかなる情報刺激に関与しているかは明らかではない。phospholipase Cβ₁の活性化により、形質膜の内側に存在する phosphatidyl-inositol 4, 5-bisphosphate (PIP₂)が分解され、Inositol trisphosphate (IP₃)と diacylglycerol (DG)が産生される。前者は細胞内カルシウム貯蔵部位よりのカルシウムイオンの動員を惹起し、さらに、この貯蔵部位の枯渇は形質膜のカルシウムチャンネルを開口に寄与するであろう (capacitative calcium entry)。著者らは flow cytometry を用いて個々の血小板のα顆粒の放出と、細胞内カルシウムイオン濃度の同時測定を行ない、α顆粒の放出が認められる血小板は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を有意に認めるものに限ることを証明しており、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は、少なくともα顆粒の放出に必須であろう³⁾。DGはCキナーゼの活性化に関与するが、最近では11種以上のCキナーゼがあることが判明しており、中にはDGに非感受性のものも存在する。このCキナーゼの活性化も血小板凝集や顆粒放出反応に関与するものと、その他にMAP kinaseの活性化も惹起されるとの報告があり⁴⁾、これはphospholipase A₂の活性化に関与して、アラキドン酸の遊離とそのトロンボキサンへの変換を介してポジティブフィードバック機構を形成することになる²⁾ (図1)。PAF、バゾプレッシン、セロトニンの場合も同様な情報伝達経路を介して血小板の活性化に寄与しているものと考えられているが、Yamamuraらにより、このような三量体GTP結合タンパクに共役している受容体と、血小板活性化物質の結合の下流に、非受容体型チロシンリン酸化酵素sykの自己リン酸化を伴う活性化を認められることが示された^{5, 6)}。この活性化は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇には依存せず、むしろこ

れにより抑制されることも同様に明らかにされた。このため、かれらは syk の活性化が細胞内カルシウムイオン濃度の上昇の上流にある現象であると提唱してきている。また、チロシンリン酸化反応が細胞外液から、細胞内へのカルシウムイオンの流入を制御していることも示唆されている⁷⁾。しかしながら、Daniel ら⁸⁾はトロンビンや PAF などを用いた場合、非特異的リン酸化酵素阻害剤スタウロスポリンにより、血小板タンパクチロシンリン酸化が強く抑制されるものの、カルシウムイオン濃度の上昇はほとんど影響されていないか、むしろ亢進する傾向にあることを報告しており、われわれも同様の成績を得ている。実際、トロンビン刺激 phospholipase C γ のチロシンリン酸化は強くおこらず⁸⁾、他の細胞で提唱されているようにこの isozyme のチロシンリン酸化による活性化が、トロンビン刺激下の早期の細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を惹起しているとは考えがたい。従って、血小板 syk の活性が三量体 GTP 結合タンパクに共役している受容体の関与するカルシウムイオン濃度の上昇に、どの程度関与するかについてはさらに検討が必要であろう。

一方、当初よりカルシウムイオノフォアと C キナーゼ活性化物質 (Phorbol ester など) が相乗的に血小板タンパクチロシンリン酸化を惹起することを報告されてきた^{9, 10)}。このことは、phospholipase C の活性化により惹起される細胞内カルシウムイオン濃度の上昇と、C キナーゼの活性化の下流にタンパクチロシンリン酸化が認められると言う可能性を示唆するものである。われわれも血小板の phospholipase C を抑制する cAMP および cGMP 細胞内濃度を上昇させるプロスタグランディン E₁ や、ニトロプルシドソーダによってトロンビン惹起タンパクチロシンリン酸化と細胞内カルシウムイオン濃度の上昇がともに抑制されることを報告しており¹¹⁾少なくともタンパクチロシンリン酸化一部は phospholipase C の活性化の下流にあるものと思われる。いまのところ、この細胞内カルシウムイオン濃度の上昇と C キナーゼの活性化が、タンパクチロシンリン酸

化を惹起する機序は全く不明である。

さて、このタンパクチロシンリン酸化がどのような生理的役割を果たしているかは明確ではない、唯一、上述のように MAP kinase が恐らく phospholipase A₂ の活性化に関与しているものと思われるが、血小板における詳細な証明はなされていない。他のチロシンリン酸化されるタンパクとしては p125^{FAK12, 13)}, cortactin¹⁴⁾, SHC¹⁵⁾ などが示されているが、他のチロシンリン酸化タンパクの多くは未だ同定されておらず、またこれらのタンパクのチロシンリン酸化の意義も不明である。(図 1)

2. コラーゲンないし IgG 惹起血小板活性化とタンパクチロシンリン酸化の関連性

このような G タンパクを介した血小板活性化機構との関連性は不明な点が多いが、コラーゲンに対する血小板活性化におけるタンパクチロシンリン酸化の意義は次第に明らかになりつつある⁸⁾。すなわち、血小板は膜上のインテグリン $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$ をはじめ複数の膜糖タンパクと、コラーゲンのこれも複数の結合部位を介して結合し、続いてチロシンリン酸化反応が引き金となり、phospholipase C γ の活性化をへて細胞内カルシウムイオン濃度の上昇、C キナーゼの活性化が起こる可能性が示唆されている⁸⁾。また、臙染顆粒から放出される ADP, セロトニン、アラキドン酸より産生されるトロンボキサンは再び上記の機構をへて血小板を活性化するというポジティブフィードバック機構を形成することとなる。

これと、きわめて類似しているのが血小板表面上にある CD9 などに対する抗体による血小板の活性化機構である。既に、抗 CD9 抗体により CD9 と Fc γ 受容体が架橋されることにより、血小板内チロシンリン酸化反応が惹起されることが知られている¹⁶⁾。Fc γ 受容体同士を架橋させても同様のシグナルが入ることが知られている。この際、チロシンリン酸化されるタンパクとして Fc γ 受容体自体が知られている¹⁶⁾。われわれは、

図2. コラーゲン惹起血小板活性化機構とタンパクチロシンリン酸化上昇の模式図

最近血小板の抗 CD9 抗体惹起タンパクチロシンリン酸化タンパクの1つが、チロシンリン酸化酵素 p72 sykであることを認めた¹⁷⁾。様々な阻害剤を用いた実験結果より類推すると、CD9とFcγ受容体が架橋がまず弱い p72 sykの(自己リン酸化とほぼ平行する)活性化を惹起して、2~3の基質がリン酸化される、その後、インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ を介した血小板凝集に依存してより、強力な p72 sykの活性化が起こり、同時に無数のタンパクがチロシンリン酸化されるらしい。これに対して、高濃度のコラーゲンを用いた場合は、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ の協調はチロシンリン酸化には必要ないとされている⁸⁾。この違いは上記のように、コラーゲンには $\alpha_{IIb}\beta_3$ 以外にも複数の受容体が存在し、これらを強固に架橋するのに対して、血小板の Fcγ 受容体はほぼ Fcγ RIIA のみで、IgG Fcγ との親和性が弱く、CD9とFcγ受容体の架橋の程度が弱いためかも知れない。(図2)

3. $\alpha_{IIb}\beta_3$ とタンパクチロシンリン酸化および脱リン酸化の関連

上記の様なトロンビンやコラーゲンなどで血小板が活性化される際にインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ は何らかの構造変化を生じ、フィブリノーゲンに対する親和性を著しく上昇させる²⁾。この $\alpha_{IIb}\beta_3$ の「活性化」機序は現在までのところ不明である。フィブリノーゲンと $\alpha_{IIb}\beta_3$ により血小板凝集が生じる。凝集に応じてチロシンリン酸化反応の一部が惹起されると共に、脱リン酸化反応も促進される^{18, 19)}。凝集依存性にチロシンリン酸化されるタンパクのうち、唯一同定されているのは p125^{FAK} (focal adhesion kinase) である^{12, 13)}。われわれや他のグループは凝集依存性に pp60src およびチロシンリン酸化基質の細胞骨格への移行を認めている^{20, 21)}。従って、凝集依存性のチロシンリン酸化には p125^{FAK} の活性化と、その他 Shatill と Brugge らにより $\alpha_{IIb}\beta_3$ のフィブリノーゲンによる架橋のみによって、p72 sykの活性化と未同定の 140 kDa タンパクなどのチロシンリン酸化が惹起されることが報告されている(この際は、p125^{FAK} のチロシンリン酸化は起こらない)²²⁾。(図1)

また、上記と全く異なる経路で血小板活性化をもたらすのは高ズリ応力惹起凝集 (SIPA)²³⁾であり、高ズリ応力存在下では、von Willebrand 因子 (vWf) と $\alpha_{IIb}\beta_3$ $\alpha_{IIb}\beta$ および GPIb/IX への結合に依存した凝集である。近年、SIPA はズリ応力に抗して血小板血栓 (動脈系で認められるいわゆる白色血栓) が形成、維持されるための生理的、病的に重要な機構と考えられるようになってきているが、われわれは SIPA 下でも凝集依存性にチロシンリン酸化が惹起されていることを認めた²⁴⁾。またわれわれは、局麻剤であるジブカインはトロンビン惹起血小板凝集を乖離させるがこの際 130~100 kDa のチロシンリン酸化タンパクの脱リン酸化が認められる²⁵⁾。以上より血小板タンパクチロシンリン酸化が $\alpha_{IIb}\beta_3$ や GPIb/IX へのリガントの結合や、それに依存する血小板凝集によって1部制御されていることが明

図3. pp60src のカルパインによる切断とその影響

確である。しかしながら、いまのところこれらのチロシンリン酸化の生理的意義は不明である。

4. タンパク分解酵素カルパインによるタンパクチロシンリン酸化の制御の可能性

さて、前項で血小板凝集下で、一部のタンパクのチロシン脱リン酸化反応も促進されるとしたが、この機構は不明であった。血小板では凝集依存性にタンパク分解酵素カルパインが活性化されることが知られているため、われわれはチロシンリン酸化酵素や脱リン酸化酵素がカルパインによって切断され、その機能や局在が変化する可能性について検討した。その結果、最も血小板で豊富なチロシンリン酸化酵素 pp60src²⁶⁾ (図3) とチロシン脱リン酸化酵素 PTP1B¹⁸⁾ (図4) がカルパインの基質であることを見いだした。この切断には、両者とも細胞膜接合部近傍で起こり、切断により膜から遊離されるようになる。同時に pp60src の活性は低下して、PTP1B の活性は上昇した。従って、血小板凝集の結果として起こるカルパイン活性化は、チロシン脱リン酸化に寄与しているかも知れない。

5. 血小板チロシンリン酸化酵素型受容体の存在

血小板にも PDGF (platelet derived growth

図4. PTP1B のカルパインによる切断とその影響

factor) 受容体²⁷⁾ や c-Kit²⁸⁾ などのチロシンリン酸化酵素型受容体が存在し、これらの受容体の惹起する最初のシグナルは、チロシンリン酸化反応であるとされている。PDGF 刺激は血小板凝集に抑制的、c-Kit ligand 刺激は血小板凝集に促進的であることが示唆されている。われわれは最近いくつかのグループがクローニングに成功したトロンボポエチンが血小板のタンパクチロシンリン酸化を惹起することを認めた (未発表データ)。この受容体である c-mpl はチロシンリン酸化酵素ではないが、ほかのサイトカイン同様、トロンボポエチン結合後の情報伝達系にはチロシンリン酸化が中心的役割を果たしているものと思われる。

結 語

血小板はインテグリンとチロシンリン酸化制御を中心に研究が進み、この領域では他の細胞の研究をリードしている。特にコラーゲン惹起血小板活性化機構におけるチロシンリン酸化の役割、インテグリンとチロシンリン酸化の関連性などは次第に明らかになりつつある。しかしながら、トロンビン惹起チロシンリン酸化の生理的意義などはいまだ不明である。非常に active な研究分野であり、この問題についても近い将来解答が得られるものと思われる。

謝 辞

本稿をまとめる機会を賜りました、東京女子医大

生化学講座 高桑雄一教授に深謝いたします。本研究の一部は内藤医学研究振興財団研究助成金の援助を受けた。

文 献

- 1) Shivdasami RA, Rosenblatt MF, Vignali K, Zuker-Franklin D, Okin SH. *Blood*, **84** (Suppl 2), 109a, 1994
- 2) Siess W. *Physiol Rev* **12** : 71-95. 1989
- 3) Oda A, Daley JF, Kang J, Smith M, Ware JA, Salzman EW. *Am J Physiol* **260** : C242-C248. 1991
- 4) Samiel M, Sanghera, JS, Pelech SL. *Biochim Biophys Acta*. **1176** (3) : 287-298. 1993
- 5) Taniguchi T, Kitagawa H, Yasue T, Yanagi S, Sakazai K, Asahi M, Ohta S, Takeuchi F, Yamamura H. *J Biol Chem*. **268** : 2277-2279. 1993
- 6) Maeda T, Taniguchi T, Inazu T, Yang C, Nakagawara G, Yamamura H. *Biochem Biophys Res Commun* **197** : 62-678, 1993
- 7) Vostal JG, Jackson WL, Shuman NR. *J Biol Chem* **266** : 16911-16916. 1991
- 8) Daniel JL, Dangelmaier C, Smith JB. *Biochem J*. **302** : 617-622. 1994
- 9) Ferrel JE Jr., Martin S. *Mol Cell Biol* **8** : 3603-3610. 1988
- 10) Golden A, Brugge JS. *Proc Natl Acad Sci USA* **86** : 901-905. 1989
- 11) Oda A, Druker BJ, Smith M, Salzman EW. *Am J Physiol* **262** : C701-C707 1992
- 12) Lipfert L, Heimovich B, Schaller MD, Cobbs BS, Parsons JT. *J Cell Biol*. **119** : 905-912. 1992
- 13) Shatti SJ, Haimovich B, Cunningham M, Lipfert L, Parsons JT, Ginsberg MH, Brugge JS. *J Biol Chem*. **269** : 14738-14745. 1994
- 14) Wong S, Reynolds AB, Papkoff J. *Oncogene* **7** : 2407-2415. 1992
- 15) Oda A, Watanebe R, Druker BJ, Miyakawa Y, Handa M, Watanabe K, Ikeda Y. *Blood* **84** (Suppl 1) : 534a (Abstract). 1994
- 16) Huang MM, Indik Z, Brass LF, Hoxie JA, Schreiber AD, Brugge JS. *J Biol Chem* **267** : 5467-5473. 1992
- 17) Watanebe R, Oda A, Druker BJ, Miyakawa Y, Handa M, Watanabe K, Ikeda Y. *Blood* **84** (Suppl 1) : 322a (Abstract). 1994
- 18) Golden A, Brugge, JS, Shattil, SJ. *J Cell Biol* **111** : 3117-3127. 1990
- 19) Frangioni JV, Oda A, Smith M, Salzman EW, Neel, BG. *EMBO J* **12** : 4843-4856. 1993
- 20) Oda A, Daley JF, Claudia Cabral, Kang J, Smith M, Salzman EW. *Blood* **79** : 920-927. 1992
- 21) Clark E, Brugge JS. *Mol Cell Biol* **13** : 1863-1871. 1993
- 22) Huang M-M, Lipfert L, Cunningham M, Brugge JS, Ginsberg MH, Shattil SJ. *J Cell Biol* **122** : 473-483. 1993
- 23) Ikeda Y, Handa M, Kamata T, Kawano K, Kawai Y, Watanabe K, Kawakami K, Sakai K, Fukuyama M, Itagaki I, Yoshioka A, Ruggeri ZM. *Thromb Haemostas* **69** : 496-502. 1993
- 24) Oda A, Yokoyama K, Murata M, Tokuhira M, Nakamura K, Handa M, Watanabe K, Ikeda Y. *Thromb Haemostas*. in press.
- 25) Oda A, Druker BJ, Smith M, Salzman EW. *Am. J. Physiol. (Cell Section)* in press.
- 26) Oda A, Druker BJ, Ariyoshi H, Smith M, Salzman EW. *J Biol Chem* **268** : 12603-12606 1993
- 27) Vassboton FS, Havnen OK, Heldin CH, Holmsen H. *J Biol Chem* **269**, 13874-13879 1994
- 28) Gravalek J, Groopman JE, Lyles YR, Jiang S, Bennett L, Zsebo K, Avraham H. *J. Biol Chem*. **269** : 21718-21724. 1994

(受付 1994年1月27日)