

Regulation of the Vascular Smooth Muscle Tone : The Ca^{2+} Signaling and the Ca^{2+} Sensitivity of the Contractile Apparatus

金出, 英夫

九州大学大学院医学研究院分子細胞情報学分野, 九州大学大学院医学研究院附属心臓血管研究施設分子細胞情報学部門 : 教授 : 循環器薬理学, 循環器内科学

<https://doi.org/10.15017/3606>

出版情報 : 福岡醫學雜誌. 98 (1), pp.1-10, 2007-01-25. Fukuoka Medical Association
バージョン :
権利関係 :



総 説

血管平滑筋の緊張調節

—Ca²⁺シグナリングとCa²⁺感受性—

九州大学大学院医学研究院 分子細胞情報学分野

九州大学大学院医学研究院 附属心臓血管研究施設 分子細胞情報学部門

金 出 英 夫

はじめに

横紋筋（骨格筋，心筋）の収縮・弛緩機序については，研究の歴史が長く，今では詳しく解明されている。これに比べて，平滑筋の研究は遅れている。平滑筋の生理学・薬理学的研究にはこれを妨げる次の様な事情があった。(1)平滑筋細胞，中でも血管平滑筋細胞は骨格筋や心筋細胞に比べると著しく小さい。(2)平滑筋は血管，眼毛様体・虹彩，消化管，胆道，呼吸器，泌尿器，生殖器等，多くの主要臓器を構成する。これらの平滑筋の電気生理学的性格や(3)自律神経支配は臓器の種類によって大きく異なり，また同じ臓器でも動物の種類，あるいは部位，さらには状態によって異なる事が多い。(4)同様に，オートコイドやホルモン受容体の存在にも種，臓器，部位特異性がある。(5)平滑筋収縮は骨格筋や心筋に比べて少ないエネルギーで維持されている。収縮の程度とこれに必要なエネルギー量・エネルギー代謝の関係については，ほとんど判っていない。(6)血管平滑筋細胞の特徴として増殖性がある。血管病変部で増殖した平滑筋の収縮・弛緩機序は正常部とは全く異なる。したがって，骨格筋や心筋研究に比べて，平滑筋の生理学・薬理学的研究成果については，しばしば研究者間の意見の一致を得難い事がある，ということになる。

筋細胞の緊張は基本的に専らCa²⁺シグナル，すなわち，Ca²⁺ transient [一過性の細胞質Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)変化]によって制御されている。本稿では血管平滑筋の緊張調節について，Ca²⁺シグナリングと収縮器のCa²⁺感受性という観点から説明する。

1. Ca²⁺シグナリングとCa²⁺感受性

細胞質Ca²⁺濃度は10⁻⁷M，細胞外Ca²⁺濃度は10⁻³M，内外1万倍の較差がある。静止弛緩状態における[Ca²⁺]_iはおおよそ10⁻⁷Mであり，興奮収縮によって10⁻⁶M付近まで上昇する。骨格筋細胞や心筋細胞の張力変化は[Ca²⁺]_i変化のほぼ単純な関数であり，「[Ca²⁺]_i—張力関係」に恒常性があると考えられるので，張力変化から[Ca²⁺]_i変化を推定する事が可能である。

平滑筋細胞の緊張調節の主役を演じるのもまたCa²⁺シグナル系であるが，張力変化を[Ca²⁺]_i変化の単純な関数としては説明できないことが多い。平滑筋細胞では，数多くの蛋白質，特に種々のキナーゼが，張力発生に関わる細胞内シグナル伝達網や収縮器（収縮蛋白質）に，Ca²⁺依存性あるいは非依存性に作用している。すなわち，平滑筋の「[Ca²⁺]_i—張力関係」は複雑で，その制御機序については不明な点が多い。筋細胞において，[Ca²⁺]_i変化量から期待された張力変化量とは異なる量の張力変化が観察された場合，一般に，収縮器の「Ca²⁺感受性」が変化した，と表現する。したがって，特に平滑筋細胞においては，「Ca²⁺シグナル・[Ca²⁺]_i変化」と「Ca²⁺感受性変化」の双方によって緊張調節が行われていることになる。

Ca²⁺シグナリングに関わるCa²⁺輸送系の大略を図1に示す。[Ca²⁺]_iの上昇は主としてCa²⁺チャネル

Hideo KANAIDE

Division of Molecular Cardiology, Research Institute of Angiocardiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Regulation of the Vascular Smooth Muscle Tone

—The Ca²⁺ Signaling and the Ca²⁺ Sensitivity of the Contractile Apparatus—

(VOCC: voltage-operated calcium channel; ROCC: receptor-operated calcium channel) を介する細胞外 Ca^{2+} の流入と、筋小胞体 (SR) からの Ca^{2+} 放出 (inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)-induced Ca^{2+} release: IICR; Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release: CICR) による。血管平滑筋細胞では細胞外の Ca^{2+} 流入による上昇が重要な役割を演じているので、いわゆる「 Ca^{2+} 拮抗薬」は強い血管弛緩作用を引き起こす。 $[Ca^{2+}]_i$ の低下は主として筋小胞体の Ca^{2+} ポンプと細胞膜 (SL) の Ca^{2+} ポンプや Na^+/Ca^{2+} 交換による。

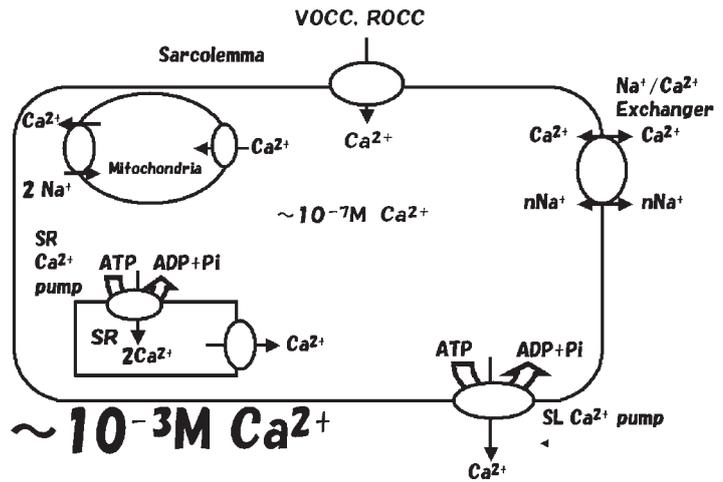
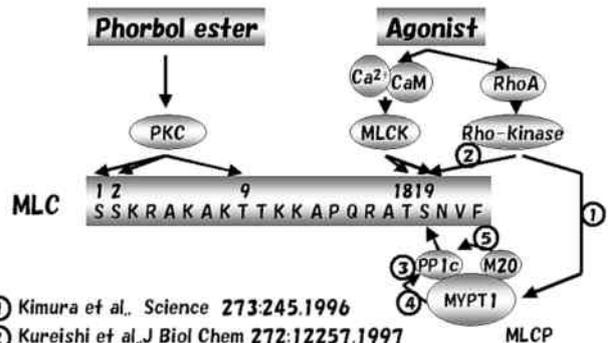


図1 平滑筋細胞のカルシウム輸送系

2. 平滑筋の収縮・弛緩におけるミオシンのリン酸化と脱リン酸化の基本的機序

まず、 Ca^{2+} シグナルによる平滑筋の緊張制御機序の概要を説明する¹⁾。例えば高 K^+ 溶液による脱分極刺激は平滑筋細胞の VOCC を開口し、細胞外 Ca^{2+} を流入させ、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こす。細胞外から流入した Ca^{2+} は CICR によって SR の Ca^{2+} を放出させ、さらに $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を引き起こす。いわゆるアゴニスト刺激は細胞内シグナル伝達系-IICR によって SR の Ca^{2+} を放出させるとともに、細胞外 Ca^{2+} の流入を増加させ、 $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させる。 $[Ca^{2+}]_i$ の上昇によって Ca^{2+} ・カルモジュリン (CaM) 複合体が形成される。 Ca^{2+} ・CaM 複合体はミオシン軽鎖 (myosin light chain: MLC) リン酸化酵素 (MLC キナーゼ: MLCK) と結合してこれを活性化し、その結果、分子量 2 万の MLC がリン酸化される。リン酸化は 19 番のセリン (S19) に生じ、特殊な状況では 18 番のトレオニン (T18) もリン酸化される。リン酸化 MLC を持つミオシン分子はアクチン分子との結合解離の繰り返しによって平滑筋を収縮させる (図 2)。

SR への Ca^{2+} の再取り込みと細胞外への Ca^{2+} の排出によって $[Ca^{2+}]_i$ が低下すると MLCK 活性は低下する。リン酸化 MLC はミオシン脱リン酸化酵素 (MLCP) によって脱リン酸化され、アクチン分子との相互作用が不可能となり、平滑筋の弛緩をもたらす。したがって、 Ca^{2+} シグナル・ $[Ca^{2+}]_i$ 変化と MLC リン酸化の程度は平滑筋の収縮・弛緩や緊張の程度を制御する最も重要な因子である。MLC のリン酸化の程度は MLCK と MLCP の活性のバランスの影響下にある。



- ① Kimura et al., Science 273:245.1996
- ② Kureishi et al., J Biol Chem 272:12257.1997
- ③ Hirano et al., J Biol Chem 272:3683.1997
- ④ Zhou et al., J Physiol 516:55.1999
- ⑤ Zhou et al., Biochem Biophys Res Commun 254:158.1999

図2 ミオシン軽鎖のリン酸化と脱リン酸化
 Ca^{2+} ・ Ca^{2+}/CaM 系による MLCK 活性化は MLC のリン酸化、収縮を引き起こす。最初に 19S、ついで 18T がリン酸化される。C キナーゼ (PKC) による MLC の 1S, 2S, 9T のリン酸化は収縮をむしろ阻害する。Rho-kinase による MLCP の① MYPT1 リン酸化は MLCP 活性阻害によってリン酸化 MLC を増加させ、収縮を増強する。②, ③, ④, ⑤の系路は教室関係者が見出したもの。平滑筋の緊張調節では MLC のリン酸化と脱リン酸化のバランスが重要。

MLCPは1992-1994年にかけて精製され²⁾³⁾,その研究の歴史は新しい。MLCPは、1型脱リン酸化酵素に分類され、3つのサブユニット(分子量38kDの触媒サブユニットと、110-130kDと20kDの調節サブユニット)から成る。110-130kD調節サブユニットのN末端側に38kD触媒サブユニット(PP1c;1型脱リン酸化酵素触媒サブユニット)、C末端側に20kD調節サブユニット(M20)が1:1:1のモル比で結合し、複合体/3量体を形成している。110-130kD調節サブユニットは、MLCとPP1cの双方に結合し、MLCPをミオシン線維上に局在させることから、MYPT1(myosin phosphatase target subunit)、MBS(myosin binding subunit of MLCP)、あるいはM130とも呼ばれている。

「Ca²⁺感受性」調節は基本的に2つの機序、すなわち、「MLCリン酸化に依存する機序」と「依存しない機序」に大別できる。前者は、収縮・弛緩や緊張の程度は基本的にMLCのリン酸化の程度によって制御されている、とする立場である。「[Ca²⁺]_i-張力関係」に変化があっても、「MLCリン酸化-張力関係」は変わらない、と云う考え方を基本にしている。MLCリン酸化の程度は、上述の如く、リン酸化反応と脱リン酸化反応のバランスによって決定されている。したがって、ある一定の[Ca²⁺]_i状態において、もしもリン酸化反応の亢進、あるいは脱リン酸化反応の抑制があったとすると、リン酸化MLCを増やすので、「Ca²⁺感受性の亢進」をもたらすことになる。この際、MLCK活性がCa²⁺非依存性に増強することは無いので、リン酸化反応の増強においては、MLCPの抑制の方が重要な役割を果たしている可能性がある。後者「MLCリン酸化に依存しない機序」については、ほとんど解明されていない。

3. 平滑筋細胞の収縮器 (contractile apparatus) の「Ca²⁺感受性」

(a) 「Ca²⁺感受性変化」の実験法:「[Ca²⁺]_i-張力関係」の測定

「Ca²⁺感受性変化」の定量的評価には、[Ca²⁺]_iを固定した状態で細胞内シグナル伝達系を操作し、「張力」変化を記録する方法と、「[Ca²⁺]_iと「張力」を同時記録する方法がある。前者ではスキンド標本法、後者では[Ca²⁺]_i指示色素法が重要である。

(1) スキンド標本:αトキシン⁴⁾やβエシン⁵⁾を用いることによって細胞膜に小孔を穿ち、スキンド血管組織・細胞標本を作製することができる。このスキンド血管中膜平滑筋微小標本は受容体・細胞内情報伝達系を温存しており、[Ca²⁺]_iのみならず種々の細胞内シグナル伝達関連物質濃度を自由に変えながら発生張力を測定することによって、Ca²⁺感受性の変化を観察可能である。トリトンXによる小孔は、比較的分子量の大きな酵素の触媒サブユニットをはじめ種々のミュータント蛋白質を平滑筋細胞内に導入可能であるが、細胞内の小分子量物質が流出するおそれがある。

(2) 平滑筋への蛋白質導入法の開発:1988年、ヒト免疫不全ウイルスの転写因子、Tat蛋白質(Transactivating protein)が、細胞膜を透過することが見出され、アミノ酸10~16残基からなる領域が膜透過に必須の領域(Protein transduction domain)であることが明らかにされた。さらに、蛋白質や核酸にPTDを結合させれば、細胞膜を保ったままで、これらを細胞内に導入できることが示された。この方法⁶⁾を用いると、細胞膜を温存した生理的条件下にシグナル伝達関連蛋白質や収縮装置関連蛋白質を平滑筋細胞内に導入可能であり、「Ca²⁺感受性」研究の新しい有効な手段となることが期待される⁷⁾。

(3) [Ca²⁺]_i指示色素エクオリン法:エクオリンは、元来、細胞局所[Ca²⁺]_iの迅速かつ大きな変化の測定に適している。平滑筋細胞では、[Ca²⁺]_i変化が小さいこと、[Ca²⁺]_i変化は細胞内で広範かつ遷延性に生じ、色素自体が[Ca²⁺]_i変化によって消耗されてしまうことから、[Ca²⁺]_i測定にエクオリンは適当でない。

(4) [Ca²⁺]_i指示色素フラ-2法:Ca²⁺との解離定数(摂氏37度のKd値:2.24 x 10⁻⁷M)が細胞の生理的な[Ca²⁺]_i変化領域にあること、蛍光量が大きくかつ褪色が少ないこと、2波長蛍光測光法を応用できるので標本の収縮・弛緩が引き起こす光学ノイズを簡単に消去できること、等の長所から、平滑筋条片の[Ca²⁺]_iと「張力」の同時測定」の[Ca²⁺]_i指示色素としてはフラ-2が最も優れている⁸⁾。著者らは光学線維束を用いるフラ-2の「Front-surface Fluorimetry法」を開発し、種々の平滑筋の微小条片標本の「[Ca²⁺]_i-張力同時測定」を行っている(図3)⁹⁾。

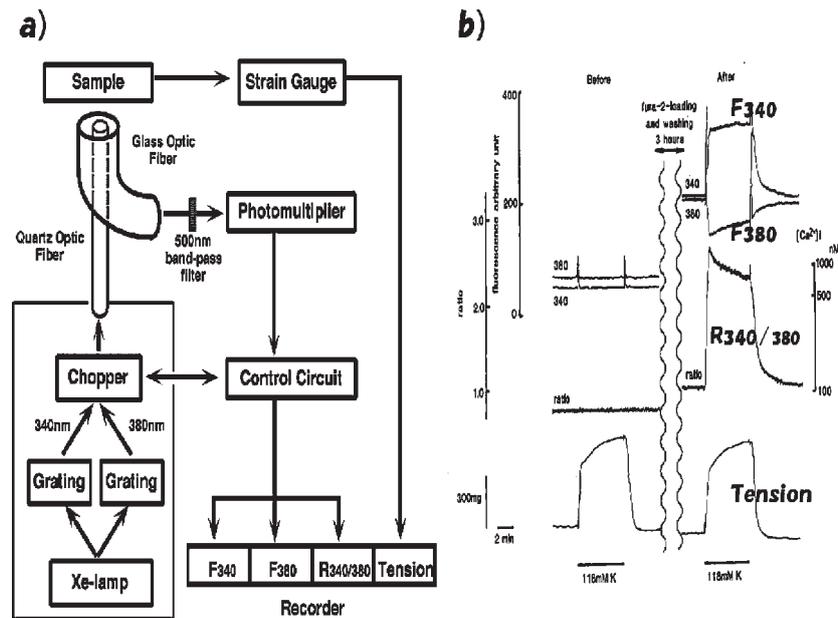


図 3 フラー 2 表面蛍光測光法 ($[Ca^{2+}]_i$ -張力関係の同時直接記録法)
 a) システム図：同心円 (内円：石英繊維；外円：ガラス繊維) 光学繊維束を用いる。内円より 340 nm と 380 nm の励起光を交互 (400 Hz) に照射し、外円によってそれぞれの 500 nm 蛍光強度 (F 340, F 380) を記録する。蛍光比 R 340/380 は $[Ca^{2+}]_i$ を示す。張力を同時記録する。
 b) 実記録例：フラ-2 色素負荷前後の 118 mM K^+ 脱分極刺激による張力発生に差が見られないことから、色素負荷は張力発生に影響しないことがわかる。

(b) 基本的な、すなわち、「 Ca^{2+} シグナル系のみが働いている場合」の「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」について「 Ca^{2+} 感受性の変化」を論じようとする場合、ある「基本的な Ca^{2+} 感受性」状態、すなわち、収縮の程度は $[Ca^{2+}]_i$ の変化のみによって規定され、「収縮器の Ca^{2+} 感受性は基底状態」という基本的な「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」を想定し、この状態との比較という方法を採用することが便利である。この基本的な収縮を、著者らは「 Ca^{2+} 収縮」と呼ぶ。「 Ca^{2+} 収縮」の基本的「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」は以下の如く決定する。(1) フラ-2 を用いる「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力同時測定」において、細胞外 Ca^{2+} 濃度を 1.25 mM に固定し、 K^+ 溶液 (例えば 30, 40, 60, 118 mM 等) で脱分極させると、 $[Ca^{2+}]_i$ と張力は K^+ 濃度に応じて急上昇の後、定常収縮状態に入る (図 4-1)。(2) 血管平滑筋条片標本を 118 mM K^+ 溶液で脱分極させ、細胞膜のイオン透過性を上げたままで細胞外 Ca^{2+} 濃度を階段状 (0-10 mM) に累積投与で上昇させると、これに応じて $[Ca^{2+}]_i$ と発生張力の階段状上昇が見られる (図 4-2)。(1) の定常状態の「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」曲線と、(2) から得られた「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」曲線は同一である (図 4-3)。(3) スキンド標本では細胞膜に小孔を穿つため、「細胞外 Ca^{2+} 濃度 $[Ca^{2+}]_o$ 」は $[Ca^{2+}]_i$ に等しい。スキンド標本の「 $[Ca^{2+}]_o$ -張力関係」曲線を作成し、(1) や (2) と比較したところ同一であった。したがって、これを「 Ca^{2+} 収縮」における基本的な「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」と考えることができる。この概念を用いると、例えばアゴニストの収縮作用の測定において、ある $[Ca^{2+}]_i$ 値における発生張力が「 Ca^{2+} 収縮」の基本的な「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」から予測される張力よりも大きい時、「 Ca^{2+} 感受性の亢進」と呼ぶことが出来る。

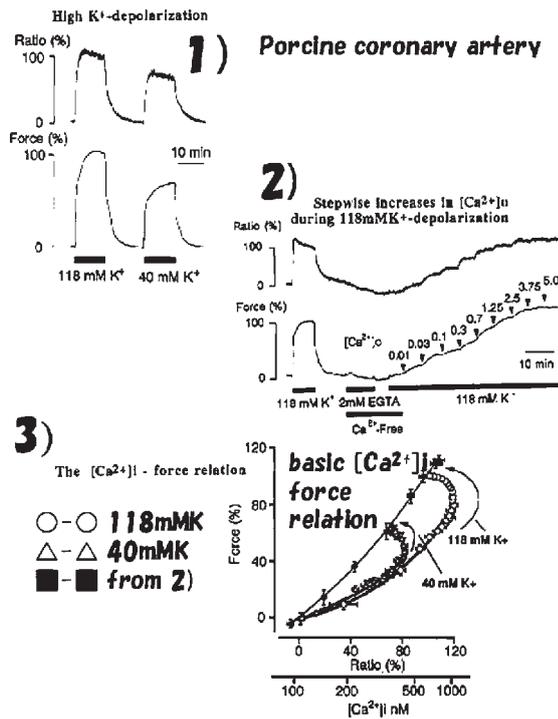


図4 「Ca²⁺収縮」の「[Ca²⁺]_i—張力関係」。すなわち基本的な「[Ca²⁺]_i—張力関係」

基本的「[Ca²⁺]_i—張力関係」は以下の如く決定する。

1) フラー2測定において、細胞外Ca²⁺濃度を1.25 mMに固定し、K⁺溶液(例えば30, 40, 60, 118 mM等)で脱分極させると、[Ca²⁺]_iと張力はK⁺濃度に応じて急上昇の後、定常収縮状態に入る。

2) 118 mM K⁺溶液で脱分極させ、細胞膜のイオン透過性を上げたままで細胞外Ca²⁺濃度を階段状(0-10 mM)に累積投与で上昇させると、これに応じて[Ca²⁺]_iと発生張力の階段状上昇が見られる。

3) 「[Ca²⁺]_i—張力関係」：1)の定常収縮状態の「[Ca²⁺]_i—張力関係」曲線と、2)から得られた「[Ca²⁺]_i—張力関係」曲線は同一である。

これを「Ca²⁺収縮」における基本的な「[Ca²⁺]_i—張力関係」と考える。例えば、ある[Ca²⁺]_i値における発生張力が「Ca²⁺収縮」の基本的な「[Ca²⁺]_i—張力関係」から予測される張力よりも大きい時、「Ca²⁺感受性の亢進」と呼ぶ。

4. 平滑筋収縮における「[Ca²⁺]_i—張力関係」の変化

(a) Ca²⁺感受性 に対する前負荷の影響¹⁰⁾¹¹⁾

牛中脳動脈の微小中膜平滑筋条片を高負荷と低負荷状態の双方で、1.25 mM Ca²⁺を含む118 mM K⁺溶液を用いて脱分極させると、[Ca²⁺]_iの変化程度は等しいが、発生張力は高負荷の方がはるかに大きくなり、「[Ca²⁺]_i—張力関係」は左方移動した。

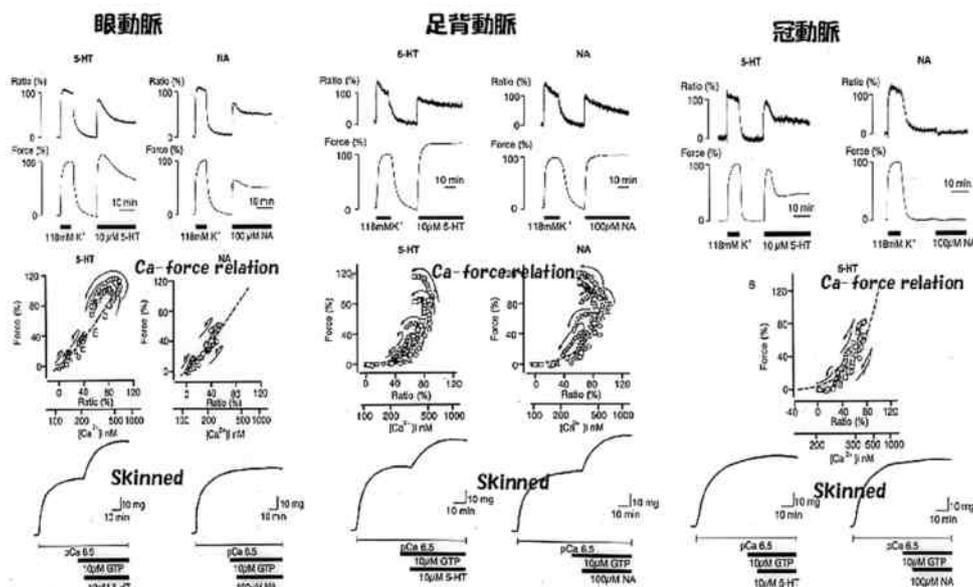


図5 牛の各種動脈中膜標本に対するセロトニン(5HT)、ノルアドレナリン(NA)の効果

フラー2で得られた「[Ca²⁺]_i—張力関係」は、スキンド標本(pCa 6.5≒3 × 10⁻⁷ M)で得られる結果とよく一致する。

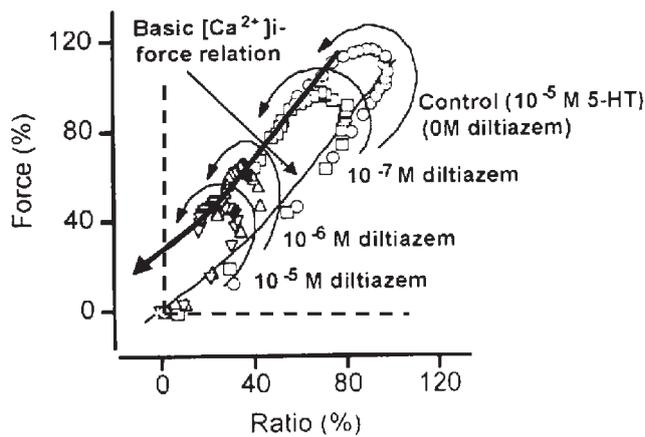


図6 眼動脈のセロトニン収縮時の「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」に対する種々濃度の diltiazem の効果
Diltiazem によって $[Ca^{2+}]_i$ は下がるが、張力の感受性増加分は下がらぬため、「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」曲線は左方平行移動を示す。

性」の変化を伴わない。冠動脈起始部は NE によって収縮しない。足背動脈の 5HT 収縮および NE 収縮は共に GTP 依存性の「 Ca^{2+} 感受性」亢進を伴う。眼動脈・足背動脈の「 Ca^{2+} 感受性」亢進による発生張力増加の程度はアゴニストによって引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の程度に比例する。しかしながら、 Ca^{2+} 拮抗薬 (diltiazem: Dil) によってアゴニスト誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は阻止出来るが、「 Ca^{2+} 感受性」増大を阻止することは出来ない (図6)。

豚冠動脈起始部ヒスタミン収縮の「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」は、収縮開始後の時間経過中、刻々と変化しており、「 Ca^{2+} 感受性」には時間依存性がある¹³⁾。

5. 血管弛緩薬作用と「 Ca^{2+} 感受性」変化

豚冠動脈に Ca^{2+} 拮抗薬 Dil を前投与し、高 K^+ 脱分極刺激あるいはヒスタミン刺激による収縮を起こさせた場合、これらの刺激が引き起こす収縮の「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」の時間経過にはほとんど影響が見られず、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の抑制に見合う程度の張力の抑制が観察された¹⁴⁾。一方、環状ヌクレオチドのサイクリック GMP (cGMP) およびサイクリック AMP (cAMP) をそれぞれ増加させるニトログリセリン (NG)¹⁵⁾ およびイソプロテレノール (Iso)¹⁶⁾ の前投与は、高 K^+ 脱分極刺激あるいはヒスタミン刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を抑制し、この $[Ca^{2+}]_i$ 抑制の程度に見合った以上に張力を低下させた。NG および Iso は Dil とは異なり、SR からの Ca^{2+} 放出量を減らす。NG および Iso は Dil とは異なり強く「 Ca^{2+} 感受性」を低下させるため、高 K^+ 脱分極刺激による「 Ca^{2+} 収縮」の「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」を右方移動させる。NG および Iso はヒスタミン収縮が引き起こす「 $[Ca^{2+}]_i$ -張力関係」の左方移動を阻害する。cGMP, cAMP を介する Ca^{2+} 感受性低下機構の説明は確立しているとは言えないが、代表的な説を図7に示す。

6. MLCP 活性抑制による Ca^{2+} 感受性亢進

MLCP 活性抑制機構は以下の如く大別される (図2)。すなわち、(a) MLCP の3量体構造自体の変化による活性抑制、(b) MYPT1 の T 696 リン酸化による活性抑制、(c) MYPT1 のリン酸化に MLCP の3量体構造変化を伴う活性抑制、(d) インヒビター蛋白質 CPI-17 (17 kDa PKC-potentiated inhibitory protein of phosphatase) による活性抑制である (図7)。

(a) 3量体構造 (PP1c, M20, MYPT1) 自体の変化による MLCP 活性抑制

PP1c は単独でも MLC を脱リン酸化する。しかし、酵素活性は3量体形成によって上昇し、形成障害に

(b) 血管平滑筋「 Ca^{2+} 感受性」の時間依存性と臓器、および刺激特異性について
種々のアゴニストに対する血管平滑筋の反応性や「 Ca^{2+} 感受性」は、種によって、臓器によって、同一臓器においては血管のサイズ(幹か分枝か)によって、また動脈か静脈かによって異なる。反応性の差異は、その支配領域(臓器)の機能と密接に関わり、主として受容体の発現調節によって制御されているようである¹²⁾。例えば、牛の眼動脈、冠動脈起始部、足背動脈はセロトニン (5HT) やノルエピネフリン (NE) に対して、それぞれ特徴的な反応を示す (図5)。眼動脈の 5HT 収縮は GTP 依存性の「 Ca^{2+} 感受性」の亢進を伴うが、NE 収縮には「 Ca^{2+} 感受性」変化を伴わない。冠動脈起始部の 5HT 収縮は「 Ca^{2+} 感受性」

よって低下する。アラキドン酸は MYPT1 と PP1c を解離させること、また、PKC は MYPT1 のアンキリンリピート領域リン酸化によって PP1c やリン酸化 MLC と MYPT1 との結合を阻害することによって、MLCP を阻害し、リン酸化 MLC を増加させ、収縮増大を引き起こす (Ca²⁺感受性亢進)⁷⁾。一方、MYPT1 のアミノ末端領域をスキンド平滑筋標本に導入すると Ca²⁺感受性が亢進する。この作用には、PP1c 結合モチーフは必要とせず、acidic cluster を含む領域を必要とする¹⁷⁾。したがって、外因性に投与した MYPT1 フラグメントは、酵素活性増強に関与するサブユニット間相互作用、特に MYPT1 と PP1c の相互作用の障害によって、Ca²⁺感受性亢進を引き起こす可能性がある。

(b) MYPT1 のリン酸化による MLCP 活性抑制—リン酸化 MLC 増加—収縮増強

MLCP と、その「Ca²⁺感受性」調節作用に関する詳細と最新情報については既報の拙稿を参照されたい⁷⁾。以下に要点を述べる。

1995 年、無 Ca²⁺、MLCK 阻害剤存在下に、スキンド平滑筋標本をあらかじめ ATP_γS で処理すると、MYPT1 のリン酸化によって MLCP 活性は抑制され、Ca²⁺感受性が亢進することが報告された¹⁸⁾。さらに、砂囊平滑筋から精製した MLCP 標品に ATP を添加すると、MYPT1 の T696 がリン酸化され、MLCP 活性が抑制されること、MLCP 標品に含まれているこの内因性キナーゼは chelerythrine によって阻害されることが報告された¹⁹⁾。一方、Rho キナーゼ (Rho-associated kinase, あるいは ROCK) は MYPT1 のリン酸化を介して MLCP 活性を抑制すること、Rho キナーゼは主として MLCP の 2 箇所をリン酸化するが、MLCP 活性抑制に関わるリン酸化部位は、内因性キナーゼと同一部位 (T696) であることが報告された²⁰⁾²¹⁾。

MYPT1 の T696 リン酸化による MLCP 活性抑制の分子メカニズムは未だ明らかではない。内因性キナーゼにより MYPT1 がリン酸化され、MLCP 活性が抑制されている時も MYPT1 と PP1c の結合は保たれており、MLCP 活性低下は 3 量体構造変化を伴わないと考えられている。一方、インヒビター 1、DARPP-32、CPI-17 は、リン酸化されることにより 1 型フォスファターゼ抑制作用を発揮する PP1c 阻害蛋白質である。MYPT1 の場合も、T696 のリン酸化により MLCP 活性が抑制されることから、これらの阻害蛋白質と類似のメカニズムが働いていると想定される。

MYPT1 の T696 をリン酸化するキナーゼとしては、上記の内因性キナーゼや Rho キナーゼ以外に、Zip-like キナーゼ、Zip キナーゼ、myotonic dystrophy protein キナーゼ (DMPK) がある。これらのキナーゼの全てが Ca²⁺感受性亢進において同様に生理的役割を果たしているのか、あるいは、状況に応じてそれぞれ異なるキナーゼが Ca²⁺感受性亢進に関わるのか、についてはよくわかっていない⁷⁾。

ここ数年来、低分子 G 蛋白質 RhoA および、これによって活性化される Rho キナーゼの血管攣縮における重要性が脚光を浴びている。平滑筋収縮制御における RhoA-Rho キナーゼ系の作用は 2 つある。すなわち、Rho キナーゼによる MLC の直接リン酸化とミオシンの活性化作用、および、Rho キナーゼの MYPT1

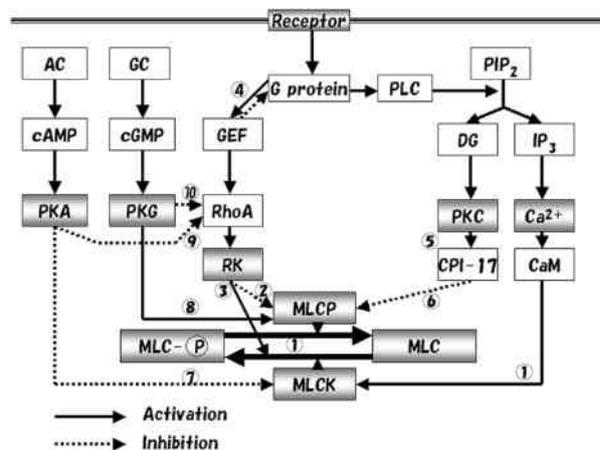


図 7 ミオシン軽鎖のリン酸化・脱リン酸化におよぼす Ca²⁺、PKA、PKG、PKC、Rho キナーゼの影響とその相関

PKC は CPI-17 を介して MLCP 阻害、したがって収縮増加。PKA、PKG は RhoA を抑制し、弛緩へ。また PKA は MLCK を抑え、弛緩。PKG は MLCP を活性化し弛緩。

① Kamm and Stull, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 25: 593, 1985.; ② Kimura et al., *Science* 273: 245, 1996.; ③ Kureishi et al., *J Biol Chem* 272: 12257, 1997.; ④ Kozasa et al., *Science* 280: 2109, 1998.; ⑤ Eto et al., *FEBS Lett* 410: 356, 1997.; ⑥ Li et al., *J Physiol* 508: 871, 1998.; ⑦ Adelstein et al., *J Biol Chem* 253: 8347, 1978.; ⑧ Lee et al., *J Biol Chem* 272: 5063, 1997. ⑨ Dong et al., *J Biol Chem* 273: 22554, 1998. ⑩ Sauzeau et al., *J Biol Chem* 275: 21722, 2000.

リン酸化を介する MLCP の抑制-MLC リン酸化の増加である。いずれの作用においても、MLC リン酸化が増加され、「Ca²⁺感受性」は増大することになる。活性型 Rho キナーゼは、無 Ca²⁺液およびウオルトマニン (wortmannin) によって MLCK を抑制したスキンド平滑筋標本の収縮を確かに引き起こすので、MLC の直接リン酸化によるミオシン活性化作用は in situ でも起こり得る²²⁾。しかしながら、一方、Rho キナーゼは、MYPT1 に対する基質特異性が MLC より 10 倍以上高い (MYPT1 の Km 値は 0.1-0.2 μ M, MLC の Km 値は 2.5-5 μ M)。さらに、活性型 RhoA は MYPT1 の C 末端と結合するので、Rho キナーゼは MYPT1 の近傍で活性化されると考えられる。したがって、Rho キナーゼの生理的役割は MLC の直接リン酸化よりも、むしろ MYPT1 リン酸化-MLCP 抑制-MLC リン酸化増大であろう。

(c) MYPT1 のリン酸化に MLCP の 3 量体構造変化を伴う MLCP 活性抑制

受容体刺激に伴って MYPT1 と PP1c の細胞内局在に解離が生じることが示された²³⁾。フェレット門脈単離平滑筋細胞において、MYPT1 及び PP1c は安静時は細胞質に均一に分布する。PGF2 α で刺激すると、MYPT1, PP1c 共に 5 分後に細胞膜直下に移動した。その後、PP1c は細胞質に戻ったが、MYPT1 は細胞膜に留まった。すなわち、PGF2 α 収縮の持続相では、PP1c と MYPT1 とが解離し、MLC の脱リン酸化反応が抑制される。膜への移行は、MYPT1 のリン酸化を伴っていたこと、また、Rho キナーゼ阻害剤 Y27632 により抑制されたことから、MYPT1 のリン酸化が関与することが示唆された。このメカニズムの詳細は不明である。この MYPT1 と PP1c の解離と MLC リン酸化の亢進は、フェニレフリン刺激では認められない。

(d) インヒビター蛋白質による MLCP 活性抑制機構

1995 年、1 型脱リン酸化酵素阻害蛋白質である CPI-17 が平滑筋細胞に特異的に発現することが報告された²⁴⁾。この蛋白質の T38 が C キナーゼ (PKC) によってリン酸化されると、MLCP を阻害する。現在、T38 をリン酸化するキナーゼとして、PKC 以外に、PKN, Rho キナーゼ, Zip-like キナーゼが報告されている。CPI-17 の活性調節機構は複雑で、Ca²⁺感受性制御機序の詳細は明らかではない (図 7)。

7. Ca²⁺非依存性ミオシン活性化による Ca²⁺感受性調節

MLC の S19 および T18 のリン酸化は、ミオシンを活性化する。長い間ミオシン活性化を引き起こすリン酸化酵素として MLCK 以外には知られていなかった。前述の様に、1997 年、Rho キナーゼが、直接 MLC をリン酸化することにより、平滑筋収縮を引き起こすことが報告された²²⁾。その後、これまでに、種々のキナーゼがミオシン活性化を引き起こす MLC のキナーゼとして追加されている。その中で、平滑筋収縮作用が確認されているのは、Integrin-linked キナーゼ, Zip キナーゼ, PAK3 であり、全て Ca²⁺非依存性酵素である。MLCK は、MLC の S19 を好んでリン酸化するが、Integrin-linked キナーゼ, Zip キナーゼは、S19 も T18 も同じ速度でリン酸化することが特徴である。Rho キナーゼと PAK3 は S19 をリン酸化するが、平滑筋細胞における T18 リン酸化の報告はない。通常の平滑筋収縮では、Ca²⁺シグナルを介した収縮機構が優位と考えられるので、これら Ca²⁺非依存性 MLC リン酸化反応の生理的意義には未だ不明な点がある。Rho kinase の場合には、基質特異性から判断すると、直接の MLC リン酸化作用よりも、MYPT1 リン酸化を介した MLCP 活性抑制作用の方が、Ca²⁺感受性亢進にはより重要な役割を果たしていると考えられる。

おわりに

本稿では、まず、平滑筋収縮装置の「[Ca²⁺]i-張力関係」観察による「Ca²⁺感受性」の評価について説明した。「Ca²⁺感受性」の変化によって、「[Ca²⁺]i-張力関係」は収縮/弛緩中に刻々と変化する。「Ca²⁺感受性」の調節機構については未だに不明な点が多い。RhoA-Rho キナーゼ-MLCP 系の関与が注目を浴びている。Rho キナーゼは、MYPT1 の T696 のリン酸化によって MLCP を抑制し、リン酸化 MLC を

増加させるのみならず、MLCを直接リン酸化し、平滑筋収縮装置の「Ca²⁺感受性」を亢進させている可能性もある。

参 考 文 献

- 1) Hartshorne DJ: Biochemistry of the contractile process in smooth muscle, In Johnson LR (ed): Physiology of the Gastrointestinal Tract. pp 423-482, Raven Press New York, 1987.
- 2) Shimizu H, Ito M, Miyahara M, Ichikawa K, Okubo S, Konishi T, Naka M, Tanaka T, Hirano K and Hartshorne DJ: Characterization of the myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. J. Biol. Chem. 269: 30407-30411, 1994.
- 3) Shirazi A, Iizuka K, Fadden P, Mosse C, Somlyo AP, Somlyo AV and Haystead TA: Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. The differential effects of the holoenzyme and its subunits on smooth muscle. J.Biol.Chem. 269: 31598-31606, 1994.
- 4) Nishimura J, Kolber M and van Breemen C: Norepinephrine and GTP- γ -S increase myofilament calcium sensitivity in α -toxin permeabilized arterial smooth muscle. Biochem. Biophysic. Res. Commun. 157: 677-683, 1988.
- 5) Kobayashi S, Kitazawa T, Somlyo AV and Somlyo AP: Cytosolic heparin inhibits muscarinic and α -adrenergic Ca²⁺ release in smooth muscle: physiological role of inositol 1,4,5-trisphosphate in pharmacomechanical coupling. J. Biol.Chem. 264: 17997-18004, 1989.
- 6) Schwarze SR and Dowdy SF: In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. Trends Pharmacol. Sci. 21: 45-48, 2000.
- 7) 平野勝也, Derkach DN, 平野真弓, 西村淳二, 金出英夫: 平滑筋収縮装置の Ca²⁺感受性調節: ミオシンリン酸化と脱リン酸化機構, 血管 25: 53-61, 2002.
- 8) Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY: A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. J.Biol.Chem. 269: 3440-3450, 1985.
- 9) Kanaide H: Measurement of [Ca²⁺]_i in smooth muscle strips using front-surface fluorimetry, In Lambert DG(ed): Methods in Molecular Biology, Vol 312: Calcium Signaling Protocols. 2nd ed. pp 251-259, Humana Press Inc. Totowa NJ, 2005.
- 10) Miyagi Y, Kobayashi S, Nishimura J, Fukui M and Kanaide H: Resting load regulates cytosolic calcium-force relationship of the contraction of bovine cerebrovascular smooth muscle. J.Physiol.484: 123-137,1995.
- 11) Miyagi Y, Kobayashi S, Nishimura J, Fukui M and Kanaide H: Resting load regulates vascular sensitivity by a cytosolic Ca²⁺-insensitive mechanism. Am.J.Physiol. 268: C 1332-C 1341, 1995.
- 12) Nishimura J, Kanaide H and Nakamura M: Characteristics of adrenoceptors and [3H] nitrendipine receptors of porcine vascular smooth muscle: differences between coronary artery and aorta. Circ.Res. 60: 837-844, 1987.
- 13) Hirano K, Kanaide H, Abe S and Nakamura M: Temporal changes in the calcium-force relation during histamine-induced contractions of strips of the coronary artery of the pig. Br.J.Pharmacol.102: 27-34, 1991.
- 14) Hirano K, Kanaide H, Abe S and Nakamura M: Effects of diltiazem on calcium concentrations in the cytosol and on force of contractions in porcine coronary arterial strips. Br.J.Pharmacol. 101: 283-280, 1990.
- 15) Abe S, Kanaide H and Nakamura M: Front-surface fluorometry with fura-2 and effects of nitroglycerin on cytosolic calcium concentrations and on tension in the coronary artery of the pig. Br.J.Pharmacol. 101: 545-552, 1990.
- 16) Ushio-Fukai M, Abe S, Kobayashi S, Nishimura J and Kanaide H: Effects of isoprenaline on cytosolic calcium concentrations and on tension in the porcine coronary artery. J.Physiol. 462: 679-696, 1993.
- 17) Zhou Y, Hirano K, Sakihara C, Nishimura J and Kanaide H: NH 2-terminal fragments of the 130 kDa subunit of myosin phosphatase increases the Ca²⁺ sensitivity of porcine renal artery. J.Physiol. 516: 55-65, 1999.
- 18) Trinkle-Mulcahy L, Ichikawa K, Hartshorne DJ, Siegman MJ and Butler TM: Thiophosphorylation of the 130-kDa subunit is associated with a decreased activity of myosin light chain phosphatase in alpha-toxin-permeabilized smooth muscle. J.Biol.Chem. 270: 18191-18194, 1995.

- 19) 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.
- 20) Feng J, Ito M, Ichikawa K, Isaka N, Nishikawa M, Hartshorne DJ and Nakano T : Inhibitory phosphorylation site for Rho-associated kinase on smooth muscle myosin phosphatase. *J.Biol.Chem.* 274 : 37385-37390, 1999.
- 21) Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M and Kaibuchi K : Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J. Cell.Biol.* 147 : 1023-1037, 1999.
- 22) Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M, Kimura K, Kanaide H, Nakano T, Kaibuchi K and Ito M : Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J.Biol.Chem.* 272 : 12257-12260, 1997.
- 23) Shin H-M, Je H-D, Gallant C, Tao TC, Hartshorne DJ, Ito M and Morgan KG : Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. *Circ.Res.* 90 : 546-553,2002.
- 24) Eto M, Senba S, Morita F and Yazawa M : Molecular cloning of a novel phosphorylation-dependent inhibitory protein of protein phosphatase-1 (CPI 17) in smooth muscle : its specific localization in smooth muscle. *FEBS Lett.* 410 : 356-360, 1997.

(参考文献のうち、数字がゴシック体で表示されているものについては、著者により重要なものと指定された分です。)

プロフィール

金出 英夫 (かないで ひでお)

九州大学教授 (大学院医学研究院附属心臓血管研究施設分子細胞情報学部門)

◆略歴 1943 年生まれ。1968 年九州大学医学部医学科卒業。1970 年 Cleveland Mt. Sinai 病院インターン、1971 年 Cleveland Clinic 研究員。1974~1988 年九州大学医学部循環器内科助手、講師。1988 年九州大学医学部附属心臓血管研究施設分子細胞情報学部門教授。2005 年九州大学医学研究院長、医学部長。専門は循環器薬理学、循環器内科学。