

学 位 論 文 題 名

大動脈平滑筋ミオシン軽鎖ホスファターゼの活
性調節機構に関する研究

学位論文内容の要旨

血管中膜を構成する平滑筋は、その収縮・弛緩によって、血流量や血圧を調節している。平滑筋収縮の引き金となるのは、ミオシン分子の調節サブユニットである20kDa軽鎖(LC20)におけるりん酸化反応である。この反応を触媒するミオシンLC20キナーゼの活性はカルシウムイオン濃度によって調節されていることが知られているが、LC20のりん酸エステル結合の加水分解反応を触媒するミオシンLC20ホスファターゼ(Myosin LC20 Phosphatase; MLCP)活性の調節機構は解明されていなかった。そこで、本研究ではMLCP活性の調節機構を生化学的に解明することで、豚大動脈平滑筋における収縮制御の分子機構を明らかにすることを目的とした。

第1章では、豚大動脈平滑筋ミオシンLC20ホスファターゼ(Porcine Aorta smooth muscle MLCP; PA-MLCP)の精製、および精製標品の性質について述べた。豚大動脈平滑筋1kg(60-70頭分)から、210 μ gの均一なPA-MLCPが得られた。この酵素は、69kDaと37kDaのサブユニットが1対1のモル比で結合したホロ酵素であり、その37kDaの成分は1型セリン/スレオニンホスファターゼの触媒サブユニット(PP1c)であると推定された。しかし、この酵素の活性は、既に知られているPP1cの特異的阻害蛋白質であるインヒビター1、インヒビター2に対して抵抗性を示したため、新たな活性調節因子の存在が示唆された。

第2章では、PA-MLCPの活性調節因子の発見とその精製、および性質について述べた。豚大動脈平滑筋抽出液にATPのアナログであるadenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)を加えると、内在するMLCP活性が経時的に低下した。この阻害にはチオリン酸化に依存してPA-MLCP活性を阻害する蛋白質(Inhibitory Protein; IP)と、これをりん酸化するキナーゼ(IP-potentiating Kinase; IP-K)の2成分が必要であった。IP-Kを部分精製した後に、IPの精製を行なった。1kgの豚大動脈平滑筋から2つの阻害蛋白質、IP(710 μ g)とIP'(93 μ g)を均一にまで精製した。SDS-PAGE、及び未変性条件でのゲルろ過の結果から、どちらの阻害蛋白質の分子量もそれぞれ20kDa、21kDaと見積もられ、単量体蛋白質であることが明らかとなった。IPとIP'のアミノ酸組成はほぼ一致し、配列は同一であることが推定された。IP

についてアミノ酸配列分析を行ない、全体の75%に相当する137残基分の配列を決定した。これらの配列は、既知の阻害蛋白質を含めてデータベースに登録されているどの蛋白質にも存在しておらず、IPが新規の蛋白質であることが示された。

IPの阻害活性は1mol/molのりん酸化で最大となった。精製PA-MLCP活性を50%阻害するのに必要なりん酸化IPの濃度は1.4nMであった。また、豚大動脈の抽出液のMLCP活性も100%阻害できることが明らかとなった。IPは兎骨格筋から精製したPP1cのMLCP活性も阻害したが、2A型ホスファターゼの触媒サブユニット(PP2Ac)の活性には全く影響を与えなかった。以上の結果から、IPは1型ホスファターゼ特異的阻害蛋白質であること、また、これまでに報告のある阻害蛋白質と異なり、IPの阻害活性にPA-MLCPの69kDaサブユニットは何ら影響を与えないことが示され、IPが性質の面でも新しい阻害蛋白質であると示唆された。

この阻害活性に必須なIPのりん酸化部位のアミノ酸配列は、RHARVT*VK、であった(*印はりん酸化残基を示す)。この配列はミオシンLC20のりん酸化部位の配列と塩基性アミノ酸の位置において類似性が認められた。また、IPのりん酸基を最も良く脱りん酸化するホスファターゼはPP2Acであったが、活性を阻害されるPA-MLCP、PP1cも弱いながらりん酸化IPを脱りん酸化した。以上の結果から、IPのりん酸基がPP1cの活性部位に、基質と競争的に結合する可能性が示された。

第3章ではIPをりん酸化するキナーゼについて述べた。IPの阻害に必須なりん酸化部位の配列は、カルシウム・りん脂質依存性プロテインキナーゼ(Protein Kinase C; PKC)の認識配列であった。そこで豚脳から調製したPKCによるIPのりん酸化を調べたところ、IPは Ca^{2+} /ホスファチジルセリン/ジオレイン(Ca/PS/DO)に依存してりん酸化され、その阻害活性はIP-Kでりん酸化したIPと一致した。さらに、大動脈平滑筋の抽出液にもCa/PS/DOに依存してIPをりん酸化するPKC活性が確認され、この酵素が生理的に働くIPキナーゼであることが示唆された。一方、部分精製したIP-KはCa/PS/DOやトリブシン処理によって活性化されなかった。PKCとIP-Kの他に、大動脈平滑筋にトリブシンで活性化されるIPキナーゼ活性も見い出され、IPの活性化には調節機構の異なる複数のキナーゼが関与することが示された。このように、PA-MLCP活性を複数の経路で調節することによって、血管平滑筋に要求される複雑な収縮制御を行なっていると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 盛 田 フ ミ

副 査 教 授 菊 池 九 二 三

副 査 教 授 矢 澤 道 生

学 位 論 文 題 名

大動脈平滑筋ミオシン軽鎖ホスファターゼの 活性調節機構に関する研究

ミオシンは大動脈平滑筋において、その張力維持に寄与するモータータンパク質である。ミオシンはATPの化学エネルギーを得るために、分子内にATPase活性部位を持ち、必要な時にATPを加水分解して張力発生に寄与する。ATPase活性はミオシン分子のサブユニットの一つであるミオシン制御軽鎖LC20の磷酸化によって制御され、その磷酸化には、細胞内のカルシウムイオン濃度で制御されるミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)が作用する。一方、平滑筋ミオシン内の磷酸化LC20はミオシン軽鎖ホスファターゼ(MLCP)で脱磷酸化されるが、MLCPの制御因子の存在はこれまで報告されていなかった。従って、ミオシンATPase活性制御に関し、一般に認められていた機構では、細胞内のカルシウムイオン濃度が高い間、MLCKとMLCPの両者が作用し続け、ATPが費やされるという難点を含んでいた。

申請者は、ブタ大動脈平滑筋に、磷酸化に依存してMLCP活性を阻害するタンパク質(IP)が存在することを見いだした。申請論文では、IPの発見、単離、キャラクターゼーション、IPを磷酸化する内在性キナーゼの精製と性質、大動脈平滑筋ミオシンの脱磷酸化系路における制御機構、について述べられている。

まず、大動脈平滑筋抽出液のMLCP活性が、ATP γ Sの共存で阻害されることを見だし、組織内に磷酸化に依存したMLCP活性阻害タンパク質の存在が示唆された。そこで、大動脈抽出液をDEAEカラムに供し、吸着しない素通り画分を、更に3種類のカラムクロマトグラフィで精製し、均一な阻害タンパク質IPを得た。IPは未変性および、変性、何れの条件下においても2万の分子量を示し、モノマーの球状タンパク質であると推定された。IPをリシルエンドペプチダーゼ、あるいは、BrCNで分解し、ペプチド断片を精製した。IPの75%のアミノ酸配列を決定し、データベースを用いて解析すると、既存の何れのタンパク質とも有意な相同性を示さず、IPは新しいタンパク質であると判断された。IPは、ほぼ1 mol/molの割合で磷酸化され、阻害活性は磷酸化量に比例した。IPは、タイプ1の

プロテインホスファターゼ活性のみを阻害し、タイプ2Aのホスファターゼ活性を全く阻害しなかった。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて磷酸化したIPから磷酸化ペプチドを単離し、その配列を決定した。RHARVTVKの配列中、6残基目のThrが磷酸化されていた。この配列は、プロテインキナーゼCが認識する磷酸化部位の共通配列の一つである、K/RXS*/T*KK/Rを共有している。ここで、S*/T*は磷酸化部位である。そこで、ブタ脳から精製したプロテインキナーゼCでIPを磷酸化すると、同一のThrが磷酸化され、MLCP活性の阻害も同様に観測された。IPを磷酸化する内在性のキナーゼ(IPキナーゼ)に関しては、部分精製標品を得たが、抗プロテインキナーゼC抗体と反応しなかった。また、プロテインキナーゼCの活性化剤であるカルシウムイオンや、ホスファチジルセリンで活性化されなかった。従って、内在性IPキナーゼは、プロテインキナーゼCのホモログと考えられるが、その同定は今後に残されている。内在性IPキナーゼの制御因子が未だ不明であるが、これらの結果から、*in vivo*におけるMLCP活性は、IPの磷酸化で制御されている可能性が高い。また、大動脈にはプロテインキナーゼCも存在しているので、プロテインキナーゼCでIPが活性化され、MLCP活性が阻害されることも考えられる。最近、透過性にした大動脈平滑筋の張力がプロテインキナーゼCの活性化剤で増強され、それは、MLCP活性阻害に由来することが報告された。IPは、MLCP活性阻害に直接作用するタンパク質として制御に関わっている可能性が高い。

以上の結果は、大動脈平滑筋ミオシンLC20の脱磷酸化経路において、磷酸化を介した制御機構が存在する可能性を初めて示している。これは、大動脈平滑筋の生理機能の解明に大きく貢献すると共に、プロテインホスファターゼ一般の制御機構の解明にも寄与でき、高く評価される。審査員一同は、申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。