

## 蛋白質チロシンリン酸化反応と血小板機能

尾崎 由基男

山梨医科大学臨床検査医学

キーワード 血小板機能, チロシンリン酸化, チロシンキナーゼ, 血小板膜蛋白

### 序 言

チロシンキナーゼと血小板機能の関わりについて我々の教室で研究を始めて7年になる。3年前にある学会誌にチロシンリン酸化の総説を依頼され、それまでの世界における研究の進展にわずかながら我々の教室の結果を交え、血小板活性化とチロシンキナーゼの関係について小論文をまとめた。今回、山梨医大誌にチロシンキナーゼについての総説を書くことになり、3年前の自らの総説を読み返すとこの研究課題の最近の進歩がいかに著しいかが認識できた。本論文ですべての項目について解説することはできないが、最近の血小板活性化信号伝達系におけるチロシンキナーゼの主要な進展を解説したい。最初3分の1程度はチロシンキナーゼの基礎的な解説をし、細胞の信号伝達系における役割を述べる。その後現在までにわかってきた血小板活性化とチロシンリン酸化の関係について説明したい。

### 1. 細胞機能における蛋白質リン酸化及び

#### チロシンキナーゼの発見

細胞活性化の信号伝達系において、蛋白質リン酸化は重要な役割をはたしている。蛋白質リン酸化を起こす protein kinase (タンパク質リン酸化酵

素)は主としてATPからのPiを基質蛋白質に結合させるが、その修飾の結果基質のコンフォメーションの変化が起こり活性が調節されると考えられている。リン酸化による蛋白質の立体構造の変化は、myosin等で確認されており、蛋白質リン酸化は細胞機能のあらゆる調節機構にかかわると言っても過言ではないであろう。基質蛋白質のリン酸化を詳しく解析すると、リン酸化はほとんどが水酸基を持つアミノ酸(セリン、スレオニン)残基に起きる。このため、長い期間、protein kinaseはセリンとスレオニンをリン酸化する酵素すなわちセリン/スレオニンキナーゼと考えられていた。細胞内活性化信号として知られているCa<sup>++</sup>, cAMPによりそれぞれ活性化されるCa<sup>++</sup>-calmodulin依存性protein kinase, cAMP依存性protein kinaseもその範疇に入り、また西塚等により発見されたprotein kinase Cも同様である。ところが1970年代後半より1980年代初めにかけて、ラウス肉腫ウィルスの癌遺伝子産物が蛋白質のセリンやスレオニン残基でなく、チロシン残基をリン酸化することが明らかになった<sup>1)</sup>。チロシンもセリンなどと同様水酸基を持つアミノ酸であるが、チロシン残基のリン酸化は細胞内の全リン酸化アミノ酸のわずか0.02-0.05%にすぎず発見が遅れたわけである。その後チロシン残基をリン酸化する酵素(チロシンキナーゼ)が次々と発見されたが、そのほとんどが、増殖因子の受容体、または癌遺伝子産物であった。チロシンキナーゼの活性を持つ受容体には、PDGF

(血小板由来成長因子), インスリン及びM-CSF (コロニー刺激因子) などに対するものがあり, これら受容体に増殖因子が結合すると, 内在するチロシンキナーゼ活性が増加する。この結果標的蛋白のチロシン残基のリン酸化が起き, 細胞増殖への信号になると考えられている。一方, 細胞膜より外部へ出ていない非受容体型のチロシンキナーゼもあり, 膜受容体の下流で細胞増殖を含め, 種々の細胞機能に関与している<sup>2, 3)</sup>。いくつかの癌遺伝子産物は, チロシンキナーゼと相同なアミノ酸配列を持ち, これらのチロシンキナーゼの活性化状態を模倣して癌化に関与しているらしい。これまで発見されているチロシンキナーゼのほとんどは 自らの活性, または他のチロシンキナーゼによりチロシンリン酸化を受けることでそのチロシンキナーゼ活性が制御されることが知られているが (autophosphorylation), CSKのように自己リン酸化を受けないチロシンキナーゼも発見されている。

## 2. 蛋白チロシンリン酸化と信号伝達

細胞活性化信号伝達系には多数の因子が関わり, cascade を構成してつぎつぎと信号が伝播していくわけだが, チロシンキナーゼとその基質などチロシンリン酸化をめぐる信号伝達系ではどのような機序が働いているのであろうか。チロシンリン酸化蛋白を免疫沈降等で分離すると時々共沈してくる蛋白があり, その物質がチロシンリン酸化蛋白の基質や, 制御物質であることが多いのは以前より知られていた。その結合する機構として提唱されているのが, SH2 と呼ばれる構造である。結晶の X 線解析などにより, SH2 はリン酸化されたチロシンと結合する部位と, その付近の構造を認識する部位をもつことが分かり, ある特定のチロシンリン酸化蛋白と結合することが示唆されている。チロシンキナーゼの多くのものがこの SH2 構造をもち, また現在ではチロシンキナーゼ以外にも多くの信号伝達に関与する蛋白が SH2 構造

をもつことが明らかになってきた<sup>4)</sup>。また, 面白いことにそのような蛋白の多くが SH3 と呼ばれる proline-rich domain と結合する構造をも兼ね備え, 複数の蛋白の会合に寄与しているらしい。一例をあげると, 増殖因子の受容体は細胞内ドメインに自己リン酸化を受けるチロシン部位を持つことが多いが, そのチロシンリン酸化部位に Grb2 が結合する。Grb2 は中心に SH2 構造をもち, その部位でリン酸化されたチロシンに結合するが, 両端には SH3 構造をもち, それにより SOS と呼ばれる蛋白をも結合する<sup>5)</sup>。このようなそれ自身では酵素活性を持たないが, adaptor として働く蛋白の関与により, 多くの蛋白の集合が起き, 活性化信号の伝達が容易になると考えられている。図 1 に SH2 や SH3 を介する信号伝達系の概要を示す。

## 3. 血小板活性化とチロシンリン酸化蛋白の発現

リン酸化チロシンはリン酸化セリン・スレオニンと比較し少量であり, 一般的にリン酸化の検討に使用される <sup>32</sup>Pi 取り込みによる検出ではリン酸化セリン, スレオニンに隠れ認識しがたい。そこで抗リン酸化チロシン抗体を用いた Western blot 法を用いて, チロシンリン酸化蛋白を検出する方法が用いられている。この方法で, トロンピンによるチロシンリン酸化の時間経過を見たのが, 図 2 である。非刺激時において最も強くチロシンリン酸化を受けている蛋白は, 約 60 kDa のものであるが, これはチロシンキナーゼである pp60<sup>src</sup> が autophosphorylation によりチロシンリン酸化をおこなっているものと考えられている。刺激後, 5 - 10 秒で分子量 7 万 5 千のチロシンリン酸化蛋白が出現し, 約 1 分後に脱リン酸化を受ける。このバンドには, 骨核蛋白である cortactin やチロシンキナーゼである p72<sup>src</sup> が含まれている。刺激後 1 - 3 分経ち凝集が起きるとそれに伴い, 64 kDa, 95 - 97 kDa, 125 kDa のバンドが強くチロシンリン酸化されてくる。125 kDa の蛋白は, 凝集に関与する p125<sup>FAK</sup> を含むと思われる。血小板

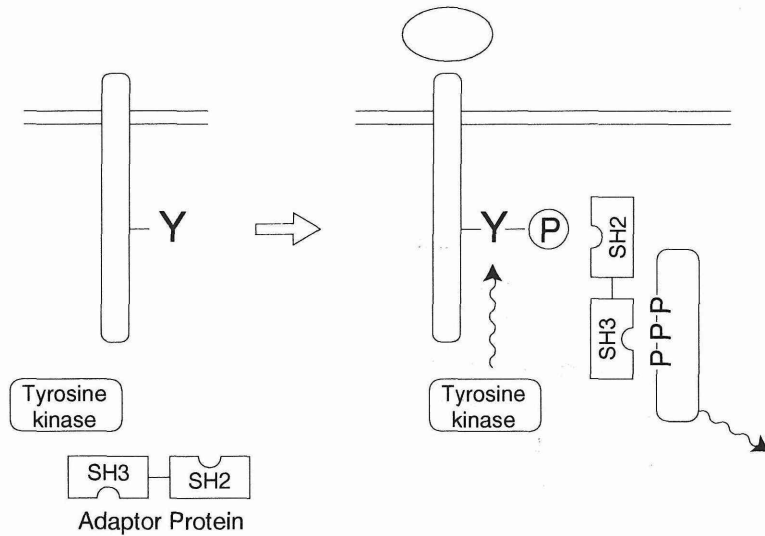


図1. SH2およびSH3を介する信号伝達経路

受容体とリガンドが結合するとチロシンキナーゼが活性化され、受容体、またはその下流の蛋白のチロシン残基が磷酸化される。そのチロシン磷酸化残基は、SH2の構造をもつ蛋白により認識され、複合体を形成する。SH2は磷酸化チロシン残基のみでなく、その近傍の構造も認識するためある特有の蛋白と結合する能力をもつ。アダプター蛋白と呼ばれる一群の蛋白は、SH2のみならず、プロリン残基を多く含む構造を認識するSH3をもち、いくつかの蛋白を含む複合体の形成、またそれによる信号伝達に参与する。

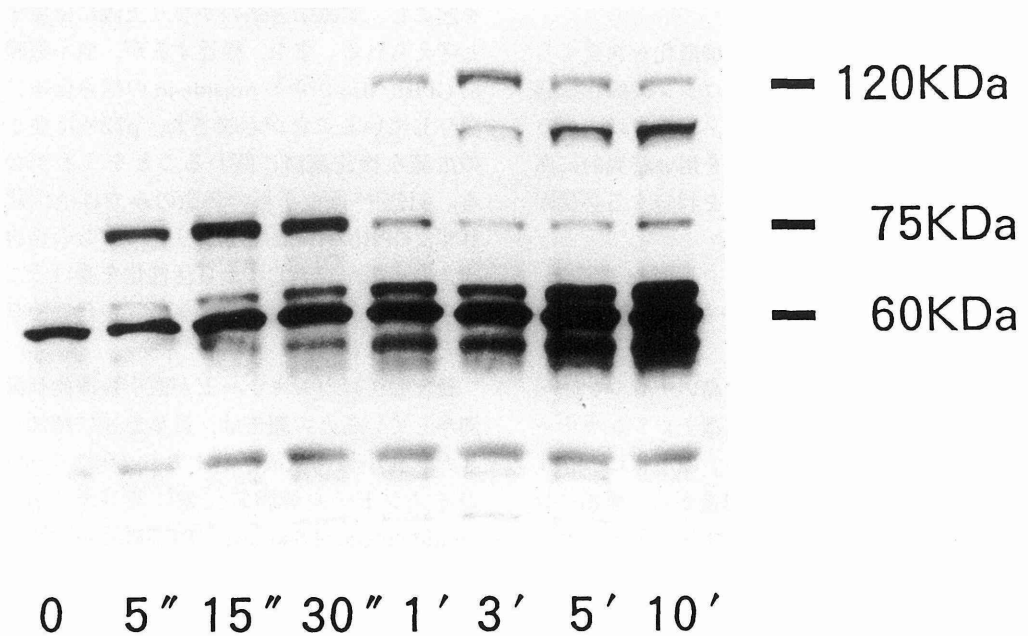


図2. トロンビンによるチロシン磷酸化蛋白の出現

血小板をトロンビンで刺激後、可溶化し抗磷酸化チロシン抗体でWestern blotしたもの。刺激後、分子量70-75 kDaのチロシン磷酸化蛋白が早期に出現し、その後脱磷酸化を受ける。その後、90 kDaや125 kDaのチロシン磷酸化蛋白が出現する。

刺激トロンビンによる血小板チロシン磷酸化蛋白の発現についての報告は、それらの分子量、また時間経過でかなり異なるものもあるが、我々のデータは Ferrel や Rendu のものと類似しているようである。これまでにチロシンリン酸化を起こすことが報告されている物質は、トロンビン、コラーゲン、platelet-activating factor, vasopressin, phorbol myristate acetate, A23187, wheat germ agglutinin, orthovanadate, 各種抗血小板抗体など多岐にわたっている。それぞれの刺激により新たに出現するチロシンリン酸化蛋白の分子量は異なり、活性化物質により誘導されるチロシンキナーゼ活性またはその基質が異なることが示唆される。しかし同一の刺激によるチロシンリン酸化でも報告により異なる蛋白の出現が示されており、刺激によりチロシンリン酸化がどの様に変化するのかについてまだ意見の一致をみていない。リン酸化チロシンを検出するために用いる抗体の特異性が異なることがこのような discrepancy の一因と思われる。

私見では、全体のチロシン磷酸化を判定する方法ではそれぞれの蛋白のチロシン磷酸化状態を把握することは困難であり、現在ではあまり有用性がない。免疫沈降法等を用い特異的にある蛋白のチロシン磷酸化状態を判定する必要があると考える。

#### 4. 血小板のチロシンキナーゼ

血小板は他の細胞と比較し高いチロシンキナーゼ活性が存在するが、受容型チロシンキナーゼの存在は報告されていない。血小板に存在するチロシンキナーゼはその構造から3種類に分類される。src ファミリーチロシンキナーゼに属するものはSH3ドメインおよびSH2ドメインを持ち、その主要なものはラウス肉腫ウイルスの癌遺伝子 pp60<sup>v-src</sup> に相当する細胞に内在する proto-oncogene であり、pp60<sup>c-src</sup> と呼ばれる蛋白である。pp60<sup>c-src</sup> は血小板全蛋白の0.2 - 0.4%を占める程大量に存在する。pp60<sup>c-src</sup> 以外

にも p59<sup>lyn</sup>, p62<sup>yes</sup>, および p54/58<sup>lyn</sup> などの存在が認められているが pp60<sup>c-src</sup> の 1/10 - 1/20 倍の量に過ぎない。p72<sup>syk</sup> は、pp60<sup>c-src</sup> とは異なり、SH3を持たず、代わりにSH2を2カ所有するチロシンキナーゼであり、細胞活性化の初期に重要な役割を果たすことが最近明らかになりつつある。p125<sup>FAK</sup> と呼ばれるチロシンキナーゼはSH2もSH3も無いが、focal adhesion と呼ばれる細胞の接着、凝集に重要な複合体に存在し、細胞の形態変化、細胞同士の接着に関与しているらしい(図3)。

血小板活性化に伴う pp60<sup>c-src</sup> 活性の変化は判定しにくいだが、これは血小板には pp60<sup>c-src</sup> が大量に存在し、一部のみの pp60<sup>c-src</sup> の活性を検出しにくいと思われる<sup>6)</sup>。我々は pp60<sup>c-src</sup> のチロシン磷酸化部位を認識するSH2基のGST融合蛋白を用い、活性化 pp60<sup>c-src</sup> の検出を試みているが、pp60<sup>c-src</sup> の活性化は強い刺激剤による血小板刺激のやや後期に起きるらしい。一方、p72<sup>syk</sup> は、非常に弱い刺激でも早期より活性化を起こし、刺激伝達系のかなり上流に位置すると考えられる。また、後述するが、血小板膜蛋白 GPIIb/IIIa からの outside-in の信号伝達にも関与していることが示唆され、p72<sup>syk</sup> は血小板の広範な機能調節に関わることをうかがわせる。p125<sup>FAK</sup> は血小板の刺激のみでは活性化されず、GPIIb/IIIa とフィブリノーゲンの結合が起き血小板が凝集してから活性化を受けることが示されており、血小板凝集の安定化に関与すると考えられる。

種々のチロシンキナーゼが血小板機能制御に関与しているとの報告は、近年急速に増加してきた。血小板刺激後早期より pp60<sup>c-src</sup> や p59<sup>lyn</sup> がイノシトール磷脂質代謝に関与する phosphatidylinositol-3-kinase (PI 3-kinase) 活性と結合する<sup>7)</sup>。また細胞内信号伝達系として最近注目されている GTP 結合蛋白が他の細胞系で pp60<sup>c-src</sup> と結合することがわかったが、血小板でも GTP 結合蛋白に関連する GTPase activating protein と p59<sup>lyn</sup> などが刺激後比較的早期に結合することが報告されている。また、発現時

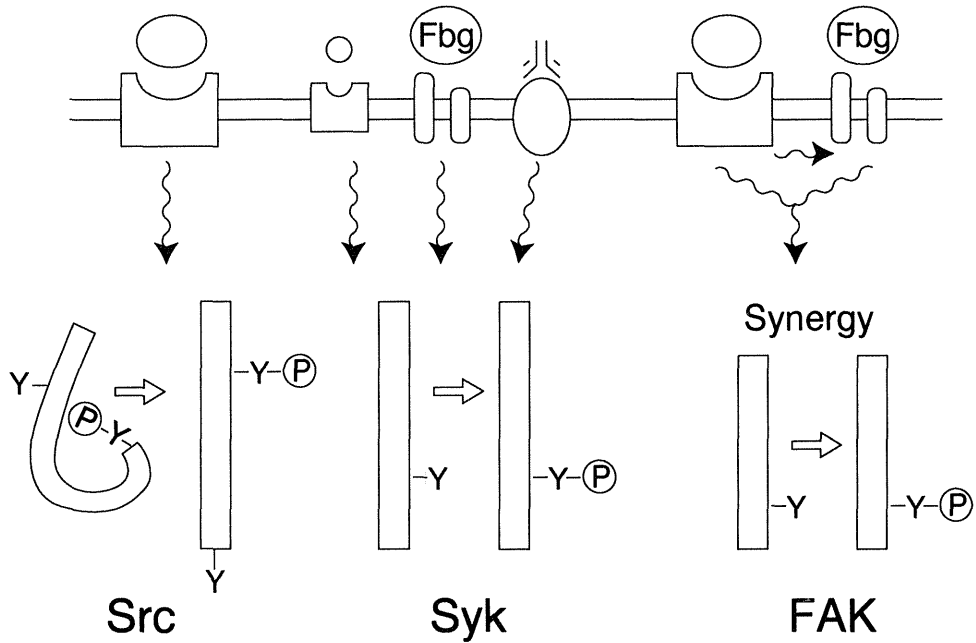


図3. 血小板の各種チロシンキナーゼの活性化機構

pp60<sup>src</sup>は、そのC末端のチロシン残基がリン酸化されている状態では、不活性型である。トロンピンなどの強い刺激が加わると、おそらく脱リン酸化酵素の働きによりSrcのC末端のチロシン残基のリン酸がはずれ、またよりN末端側のチロシン残基がリン酸化されて完全な活性型になる。p72<sup>syk</sup>は、弱い刺激、フィブリノーゲンと血小板糖蛋白 GPIIb/IIIa の結合（つまり凝集であるが）、膜蛋白とその抗体との反応等によっても簡単に活性化される。凝集のみでなく、GPIIb/IIIa 活性化抗体など、outside-in signal によっても活性化を受ける。p125<sup>FAK</sup>は単なる刺激のみでは活性化を受けず、刺激に伴うフィブリノーゲンと GPIIb/IIIa の結合が起き、堅固な凝集が惹起されると、リン酸化を受け活性化される。

期はやや遅いが、細胞活性化にともない pp60<sup>src</sup> や p54/58<sup>lyn</sup> が骨格蛋白に付着する現象も認められている<sup>8)</sup>。このように、非受容体型チロシンキナーゼが血小板活性化に密接に関連していることを示唆する報告は多いが、血小板は核を持たないため他の細胞のように遺伝子操作により特定のチロシンキナーゼの役割を同定することが遅れていた。最近、p72<sup>syk</sup> の knockout mouse が作成されたが、大多数胎内で出血死することが分かった。数パーセントの生存する個体を用いた検討では、p72<sup>syk</sup> 欠損例では、血小板がコラーゲンに反応せず p72<sup>syk</sup> がコラーゲンによる血小板活性化の経路に重要な役割を果たしていることが示唆されている<sup>9)</sup>。

### 5. チロシンフォスファターゼと血小板機能との関連

蛋白をチロシンリン酸化するのはチロシンキナーゼであるが、生体にはチロシン残基を脱リン酸化するチロシンフォスファターゼも存在する。チロシンフォスファターゼの阻害剤である vanadate を加えると、血小板の多数の蛋白のチロシンリン酸化が起き、また凝集、細胞内カルシウム動員等も起きることより、フォスファターゼの活性が蛋白のチロシンリン酸化状態を制御し、細胞機能へ影響を与えているようである。実際、他の細胞系で報告されているチロシンフォスファターゼの基質に対する Kd 値は チロシンキナーゼの値より小さく、チロシンキナー

ゼよりチロシンフォスファターゼ活性の方が生体内での蛋白チロシン磷酸化の平衡状態を強く制御している可能性がある。また、リンパ球活性化において、leukocyte common antigenであるCD45がその内在するチロシンフォスファターゼ活性によりTリンパ球活性化を制御している現象などのように、チロシンフォスファターゼが細胞の分化、機能に密接な関連を持つことが示唆されている細胞系が多い<sup>10)</sup>。一方、血小板においてはPTP-1B, PTP-1C, PTP-1Dの3種のチロシンフォスファターゼの存在が報告されているが、まだ血小板機能とのはっきりとした関連が確認されたものは少ない。血小板の活性化に伴いPTP-1BやPTP-1Cのチロシンフォスファターゼが磷酸化、またカルパインによる分解を受けること、p60<sup>src</sup>や骨核蛋白と結合することなどの報告がこれまでなされている<sup>11, 12)</sup>。我々は、PTP-1D (SYP) がコラーゲン、特にGPVIを介した血小板活性化時にチロシン磷酸化されることを見いだしており、PTP-1Dがコラーゲン刺激に特異的に関与すると推測している。チロシンフォスファターゼの研究は、チロシンキナーゼと比較しかなり遅れているが、これから急速に発展する分野と思われる。

## 6. チロシンリン酸化蛋白、チロシンキナーゼと血小板機能との関連

血小板の活性化にともない種々のチロシン磷酸化蛋白が出現し、これまでに多くの蛋白のチロシン磷酸化が報告されてきた。しかしチロシン磷酸化蛋白と、特定の血小板機能が対応することが示されているものはまだ少ない。最近一部のチロシン磷酸化を欠損する血小板機能異常症などの発見により、チロシンキナーゼと特定の機能との関連が明らかにされつつある。以下に最近解明されてきた膜蛋白、また細胞骨格蛋白の関与する血小板活性化とチロシン磷酸化との関係を解説する。

### 1) コラーゲン受容体

この数年でコラーゲン受容体とチロシンリン酸化の関係の研究が飛躍的に進歩した。コラーゲンは血管壁の障害に伴い露出され、血小板の粘着、凝集を引き起こす最も生理的な血小板活性化物質といえる。コラーゲンはその3次元的な構造が血小板活性化に重要であることが示され、コラーゲンのaffinity gelを用いると複数の蛋白がとれることより血小板上の受容体も複数の種類が存在すると考えられていた。Sixmaのグループは軽い出血傾向を示すコラーゲンに反応しない血小板をもつ患者では、血小板膜上のGPIa/IIaを欠損することを示し、GPIa/IIaがコラーゲン受容体の一つであることを示唆した<sup>13)</sup>。我々は、抗GPIa/IIa抗体を用いた検討によりGPIa/IIaがp72<sup>src</sup>というチロシンキナーゼの活性化に一部関与すること、またcytochalasin Dを用いた検討によりGPIa/IIaとコラーゲンの反応後に血小板の形態変化が起きることがチロシンキナーゼの完全なる活性化に重要であることを見いだした<sup>14)</sup>。また最近我々はRhodocytinという蛇毒がGPIa/IIaに特異的に結合することにより血小板を活性化することを見いだしたが、抗GPIa/IIa抗体、およびこのような蛇毒を用いる検討により、GPIa/IIaを介して伝達する活性化信号のさらなる進歩が期待できると思われる。

一方、大熊等はある特発性血小板減少症に於いて血小板がコラーゲンに反応しないこと、またその血小板がGPVIを欠損していることを発見した。また、その患者のIgGは正常人の血小板を活性化することも明らかになった<sup>15)</sup>。その後3例のGPVI欠損症が報告されたがそれらのすべてがコラーゲン不応性であり、GPVIがコラーゲン受容体であることがつよく示唆された。Barnes等はコラーゲンの一部の構造を用いた合成ペプチドのなかより血小板活性化を起こすcollagen-related peptide (CRP)を見いだしたが、このCRPがGPVI欠損症では血小板凝集を起こさないことよりGPVIがコラーゲン受容体であることが確定された<sup>16)</sup>。コラー

ゲン活性化によりチロシンキナーゼである p72<sup>syk</sup> が活性化されることはすでに報告されていたが、大熊等は GPVI 欠損例では p72<sup>syk</sup> が特異的に活性化されないこと、しかし p60<sup>src</sup> の活性化は正常に起きることを見いだした<sup>17)</sup>。

Watson 等はコラーゲン刺激により phospholipase C- $\gamma$ 2 が特異的に活性化され、それが Fc 受容体の一部である  $\gamma$  chain のチロシン磷酸化と相関すること、またチロシン磷酸化された  $\gamma$  chain が p72<sup>syk</sup> と結合することを見いだしていた<sup>18, 19)</sup>。この発見は、 $\gamma$  chain が抗原抗体反応や免疫系以外の信号伝達系に参与することを初めて示したものである。Watson 等は次に  $\gamma$  chain-knockout mouse および syk-knockout mouse を用いた検討より、GPVI と  $\gamma$  chain が

もともと結合しており、コラーゲンにより GPVI の活性化が起きるとなんらかのチロシンキナーゼにより  $\gamma$  chain がリン酸化され、そこへ p72<sup>syk</sup> がその2つの SH2 基により結合することを発見した。この p72<sup>syk</sup> と  $\gamma$  chain の結合により、p72<sup>syk</sup> が活性化され、その下流に細胞内カルシウムの動員を起こす phospholipase C- $\gamma$ 2 の活性化があるらしい<sup>9)</sup>。図4にこれまでに明らかにされたコラーゲンによる血小板活性化信号の概略を示す。

GPIa/IIa と GPVI はそれぞれコラーゲンにより血小板の活性化に補助的に機能しており、どちらが欠損しても血小板凝集は起きなくなる。今後はこれらの受容体の cross-talk の解明が進むと思われる。

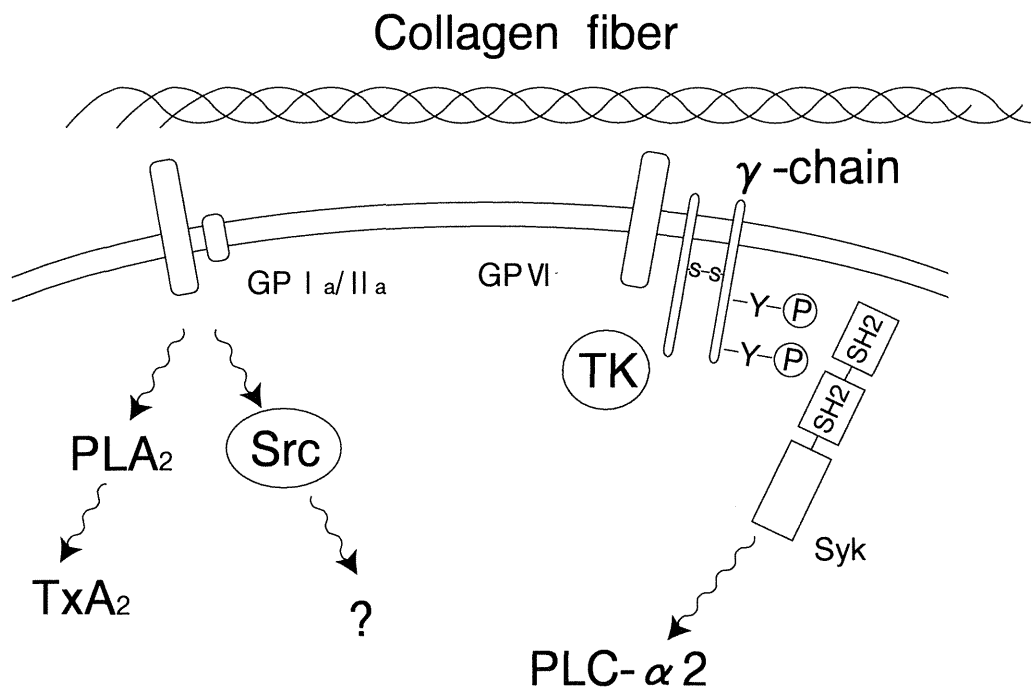


図4. コラーゲン刺激による血小板活性化信号

これまでに確認されているコラーゲン受容体は GPIIb/IIIa と GPVI の2種類である。GPIIb/IIIa からの信号のみでは、Src の活性化は起きるが、Syk は活性化されない。また、我々の検討では GPIIb/IIIa を介する刺激では、thromboxane A2 の産生が重要な役割をはたす。GPVI を介する血小板活性化においては、GPVI とコラーゲンの反応により  $\gamma$  chain が未だ同定されていないチロシンキナーゼによりチロシン磷酸化される。その磷酸化チロシン残基に、Syk は2個の SH2 を用い強固に結合し、それにより活性化を受けられる。Syk の下流に phospholipase C- $\gamma$ 2 が存在し、細胞内カルシウム動員を引き起こす。

## 2) Fc 受容体

IgG の Fc 部分に対する受容体が血小板膜上にあり、抗磷脂質症候群、ヘパリン惹起血小板減少症などで重要な役割をはたすことが明らかにされている。IgG に対する受容体としては血小板には FcγRIIA と命名されている Fcγ 受容体のみが存在するが、この受容体の細胞内ドメインには ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) と呼ばれるチロシン残基を2箇所を持つ構造が存在する。他の細胞系において種々の受容体刺激により ITAM のチロシン残基が src ファミリーチロシンキナーゼによりリン酸化され、そこに ZAP70 や p72<sup>syk</sup> が結合することにより、それより下流の信号伝達系が賦活化されるとの仮説がたてられている。血小板において同様な機序が作用しているのかど

うか、我々は Fc 受容体を介して血小板を活性化する抗 CD9 抗体、及び Fc 受容体クロスリンクの2法を用い検討した。その結果 Fc 受容体クロスリンクでは、まず pp54/58<sup>lyn</sup> が Fc 受容体の ITAM の2箇所のチロシン残基をリン酸化し、その後に p72<sup>syk</sup> がその SH2 を介してチロシンリン酸化された ITAM に結合することが明らかになった<sup>20)</sup>。一方、抗 CD9 抗体による血小板活性化では、Fc 受容体のチロシンリン酸化は起き、また p72<sup>syk</sup> のチロシンリン酸化は起きるものの p72<sup>syk</sup> の結合は認められなかった<sup>21)</sup>。そこで Fc 受容体のチロシンリン酸化を詳細に検討すると、ITAM の N 末端チロシンのみがリン酸化され、C 末端のチロシンは不変であることがわかった。ITAM の2箇所のチロシンがリン酸化されないと p72<sup>syk</sup> との結合力が弱く、細胞

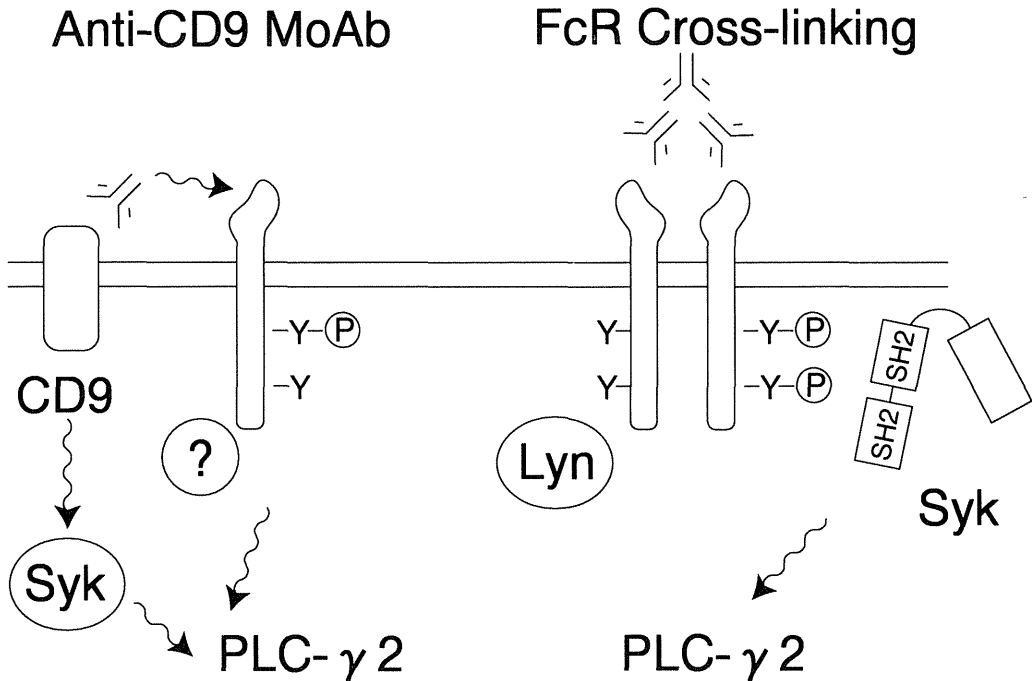


図5. Fc 受容体を介する血小板活性化経路

Fc 受容体のクロスリンク (2 量体形成) では、Fc 受容体とチロシンキナーゼである Lyn が結合し、FcγRII の細胞内ドメインの2個のチロシン残基をリン酸化する。リン酸化された2個のチロシン残基に、Syk がその2個の SH2 により結合し活性化を受ける。一方、抗 CD9 抗体による血小板刺激では Fc 受容体の2量体形成はなく、Fc 受容体のチロシンリン酸化は N 末端のみに起きる。CD9 の活性化により Syk は活性化されるが、Fc 受容体との結合は認められない。



内ではFc受容体とp72<sup>syk</sup>との結合が認められないと推測されている。図5にFcγRIIを介する血小板活性化のモデルを示す。

血小板は、血栓止血のみに関与するばかりでなく、最近ではアレルギー、炎症にも関与することが示唆されつつある。IgEのFc受容体が血小板に存在することはすでに報告されているが、我々は最近IgEのFc受容体を介する血小板活性化の研究を始めており、やはりチロシンキナーゼが関与することを見いだしている。この方面の研究はこれからの重要な課題になると思われる。

### 3) Glycoprotein Ib (GPIb)

GPIbは、von Willebrand factor (vWF) と結合する膜蛋白であり、血小板粘着の初期反応に重要な膜蛋白である。また最近では、GPIbはshear stressによる血小板活性化に関与するものとして注目を集めている。vWFとGPIbを結合させ血小板凝集を起こす刺激剤としては抗生物質として開発されたristocetinがよく用いられる。ristocetin単独、vWF単独ではチロシン磷酸化は起きないが、両者を使用すると64 kDaのチロシンリン酸化蛋白が発現した。藤村等により詳細に検討されているbotrocetinは、vWFに結合しGPIbへの結合性を与える蛇毒であるが、botrocetinを用いても同様な結果を得た<sup>22)</sup>。これらの結果より、GPIbとvWFの結合により64 kDaのチロシンリン酸化が選択的に起きることが示唆され、GPIbを介する血小板活性化にチロシンキナーゼが重要な役割をはたしていると思われた。最近になり、GPIb-vWF刺激によりいくつかのチロシンキナーゼが活性化により骨格蛋白へ移行することも明らかにされている<sup>23)</sup>。また、我々も抗GPIb抗体がp72<sup>syk</sup>を活性化し、血小板機能を促進すること<sup>24)</sup>、botrocetin-vWF刺激によりp72<sup>syk</sup>の活性化、adaptor proteinであるShcのチロシン磷酸化、またp72<sup>syk</sup>とpp60<sup>c-src</sup>の結合などの現象が起きることを確認している<sup>25)</sup>。このように種々のチロシンリン酸化蛋白、チロシンキナーゼがvWF-

GPIbを介した血小板活性化に関与していることが示唆されるが、これらの信号の最も上流にあるものは何であろうか。我々は抗GPIb抗体を用い、in vitro kinase assayを用いることにより、GPIbを介する血小板活性化の早期にGPIbにキナーゼ活性が結合することを見いだした。さらに、phosphoamino acid analysisにより、得られたキナーゼ活性はチロシンキナーゼであることを確認したが、これまでに発見されている血小板のチロシンキナーゼとの異同はまだ不明である<sup>25)</sup>。種々の抗GPIb抗体を用いた検討では、vWFがGPIbに結合することによりGPIbの細胞内ドメインにconformational changeが起き、それによりチロシンキナーゼが結合することが推測されている。図6にこの仮説を示す。

### 4) Glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)

GPIIb/IIIaにfibrinogenが結合することにより、種々の血小板活性化のパラメーターが増強されることが以前よりよく知られており、outside-in signalと呼ばれてきた。しかしこれまでではGPIIb/IIIaがどのような機構で血小板活性化信号伝達系に作用するのか不明であった。最近になり、GPIIb/IIIaのfibrinogen bindingを阻害するペプチドがトロンビンによるチロシンリン酸化の一部を抑制すること、またGPIIb/IIIaの欠損している血小板無力症患者の血小板にこれに相当するチロシンリン酸化蛋白がないことがあげられ、GPIIb/IIIaが少なくとも一部のチロシンキナーゼ活性の調節することが示された<sup>26)</sup>。また、GPIIIaの細胞内ドメインが凝集に伴いチロシン磷酸化され、そこにadaptor proteinであるGrb-2やShcが結合することが報告された<sup>27)</sup>。さらにGPIIb/IIIaに結合しフィブリノーゲンとの結合を促進する抗体や、フィブリノーゲンのpartial agonistであるRGDペプチドによりp72<sup>syk</sup>が活性化されることも示され、outside-in signalにp72<sup>syk</sup>の活性化が関与している可能性が強く示唆されている<sup>28)</sup>。

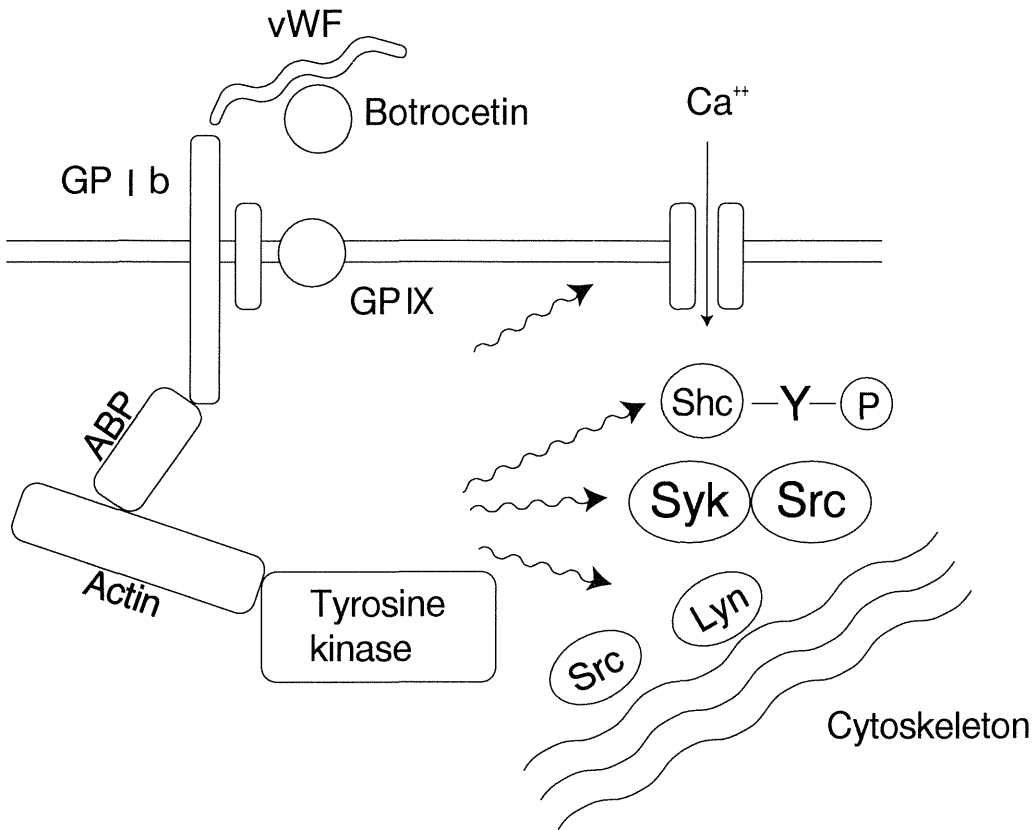


図6. GPIIbを介した血小板活性化信号伝達経路

vWFは流血中に存在するときは血小板膜のGPIIbと結合できない。コラーゲンまたはvWF活性化物質であるbotrocetinと反応すると、vWFはGPIIbと結合する。GPIIbの活性化により、カルシウム動員、アダプター蛋白であるShcのチロシンリン酸化、SykとSrcの結合、チロシンキナーゼの骨格蛋白への移行などが起きる。これらの上流にあり、もっとも早期に起きると思われる反応は、GPIIbとまだ同定されていないチロシンキナーゼの結合である。この結合は、GPIIbとの直接的なものでなく、アクチンを介するものと思われる。

##### 5) Glycoprotein IV (GPIV)

ヒト血小板上の糖蛋白GPIVが、pp59<sup>l<sup>yn</sup></sup>、pp62<sup>src</sup>などと結合していること、またGPIV欠損例ではpp59<sup>l<sup>yn</sup></sup>、pp62<sup>src</sup>は存在するもののそれに対応するチロシンリン酸化蛋白がないことが報告されている<sup>29)</sup>。しかし、今までのところGPIV欠損例における特定の血小板機能異常は報告されておらず、これらのチロシンリン酸化蛋白と機能との関連は不明である。

##### 6) イノシトール磷脂質代謝

イノシトール磷脂質の代謝経路でこれまで最も広く研究されてきたものは、IP<sub>3</sub>、diacylglycerol

を産生する系であろう。phosphatidylinositol (PI)がPI 4-kinaseによりリン酸を付加されphosphatidylinositol (4) phosphate (PI (4) P)となり、次にPIP kinaseが働きPI (4, 5) P<sub>2</sub>となる。このPI (4, 5) P<sub>2</sub>がphospholipase C (PLC)によりIP<sub>3</sub>及びdiacylglycerolに分解される。diacylglycerol (DG)はDG kinaseの働きでphosphatidic acid (PA)となり次にPIを生じるというcycleを形成している。チロシンキナーゼ活性が細胞内でPI kinase活性と物理的に結合していること、またチロシンキナーゼ活性化によりPIPが生成することよりチロシンキナーゼがPI kinase活性を増加させることが

推測された。しかし、チロシンリン酸化が関与することにより生成されたPIPを良く調べてみると、PI (4) PやPI (4, 5) P2でなくイノシトール基の position 3 がリン酸化されたPI (3) PやPI (3, 4) P2であった<sup>30)</sup>。PI (3, 4) P2はPI (4, 5) P2と異なり phospholipase Cの基質とはならず細胞内Ca<sup>++</sup>動員を起こすIP3は産生されない。しかし、PI (3, 4) P2はそれ自身で種々の蛋白に結合することにより、細胞増殖等の細胞機能制御に関わることが示されている。血小板においては、gelsolinによるactin filament cappingをPI (3, 4) P2が抑制することより、PI (3, 4) P2が血小板の形態変化、粘着、凝集を促進することが示唆されている(31)。PI (3, 4) P2が蓄積することは、GPIIb/IIIaを活性化状態に保つために必要らしい。また、同様にイノシトール基の position 3 が磷酸化されたPI (3, 4, 5) P3はある種のprotein kinase C (PKC $\zeta$ )の活性化に関与することも示唆されている<sup>32)</sup>。

PI (3, 4) P2やPI (3, 4, 5) P3の生成に関わるPI-3Kは、チロシン磷酸化蛋白と結合するSH2ドメインを2個有し、またfocal adhesion部位でp60<sup>src</sup>などのチロシンキナーゼと結合することが示されている。このようにPI-3Kはチロシンキナーゼとの関連が強く示唆されているが、その活性化機構はまだ不明な点が多い。これまでにPI-3Kの活性化が、トロンビン等種々の刺激において観察されており、その上流にprotein kinase CやGTP結合蛋白の存在があると考えられる。

## 文 献

- 1) Hunter T, Sefton BM: Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. Proc Natl Acad Sci USA, 77: 1311-1315, 1980.
- 2) Druker BJ, Mamon H, Robert TM: Oncogenes, growth factors, and signal transduction. New Eng J Med, 321: 1383-1391, 1989.
- 3) Ullrich A, Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. Cell, 61: 203-212, 1990.
- 4) Songyang Z, Schoelson SE, Chaudhuri M, Gish G, Pawson T et al.: SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. Cell, 73: 767-778, 1993.
- 5) Sun H, Tonks K: The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. TIBS, 19: 480-485, 1994.
- 6) Wong S, Reynolds AB, Papkoff J: Oncogene, 7: 2407-2415, 1992.
- 7) Gutkind JS, Lacal PM, Robbins KC: Thrombin-dependent association of phosphatidylinositol-3-kinase with p60c-src and p59fyn in human platelets. Mol Cell Biol, 10: 3806-3809, 1990.
- 8) Horvath AR, Kiss ZS, Anand R, Kellie S: Association of pp60c-src with the cytoskeleton upon platelet activation. Biochem Soc Trans, 1991; 19: 1150-1154, 1991.
- 9) Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VLJ, Wason SP: The Fc receptor  $\gamma$ chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. EMBO J, 16: 2333-2341, 1997.
- 10) Charbonneau H, Tonks NK, Walsh KA, Fischer EH: The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. Proc Natl Acad Sci USA, 85: 7182-7186, 1988.
- 11) Faket H, Ramos-Morales F, Bachelot C, Fischer S, Rendu F: Association of the protein tyrosine phosphatase PTP1C with protein tyrosine kinase c-Src in human platelets. FEBS Lett, 383: 165-169, 1996.
- 12) Li RA, Gaits F, Ragab-Thomas JMF, Maclouf J, Caen JP et al.: Protein tyrosine phosphatase SHP-1 fails to associate with cytoskeleton but is normally phosphorylated upon thrombin stimulation of thrombasthenic platelets. Thromb Haemost, 77: 150-154, 1997.
- 13) Nieuwenhuis HK, Akkerman JWN, Houdijk WPM, Sixma JJ: Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. Nature, 318: 470-472, 1985.
- 14) Asazuma N, Yatomi Y, Ozaki Y, Qi R, Kuroda K et al.: Protein tyrosine phosphorylation and p72syk activation in human platelets stimulated by collagen is dependent upon glycoprotein Ia/IIa and actin polymerization. Thromb Haemost, 75: 648-654, 1996.
- 15) Sugiyama T, Okuma M, Ushikubi F, Sensaki S, Kanaji K, Uchino H: A novel platelet-aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia. Blood, 69: 1712-1720, 1987.

- 16) Morton LF, Hargreaves PG, Farndale RW, Young RD, Barnes MJ: Integrin  $\alpha 2 \beta 1$ -independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for  $\alpha 2 \beta 1$ -independent platelet reactivity. *Biochem J*, 306: 337–344, 1995.
- 17) Ichinohe T, Takayama H, Ezumi Y, Arai M, Yamamoto N, Takahashi H, Okuma M: Collagen-simulated activation of Syk but not c-Src is severely compromised in human platelets lacking membrane glycoprotein VI. *J Biol Chem*, 272: 63–68, 1997.
- 18) Blake RA, Schieven GL, Watson SP: Collagen stimulates tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma 2$  but not phospholipase C- $\gamma 1$  in human platelets. *FEBS Lett*, 353: 212–216, 1994.
- 19) Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law C-L, Watson SP: Tyrosine phosphorylation of the Fc receptor  $\gamma$ -chain in collagen-stimulated platelets. *J Biol Chem*, 271: 18095–18099, 1996.
- 20) Qi R, Ozaki Y, Kuroda K, Asazuma N, Yatomi Y, Kume S: Differential activation of human platelets induced by Fc $\gamma$ I cross-linking and by anti-CD9 monoclonal antibody. *J Immunol*, 157: 5638–5645, 1996.
- 21) Ozaki Y, Satoh K, Qi R, Yatomi Y, Yanagi S: Anti-CD9 monoclonal antibody activates p72syk in human platelets. *J Biol Chem*, 270: 15119–15124, 1995.
- 22) Ozaki Y, Satoh K, Yatomi Y, Miura S, Fujimura Y, Kume S: Protein tyrosine phosphorylation in human platelets induced by interaction between glycoprotein Ib and von Willebrand factor. *Biochimica Biophysica Acta*, 1243: 482–488, 1995.
- 23) Jackson SP, Schoenwaelder SM, Yuan Y, Rabinowitz, Salem HH, Mitchell CA: Adhesion receptor activation of phosphatidylinositol 3-kinase. Von Willebrand factor stimulates the cytoskeletal association and activation of phosphatidylinositol 3-kinase and pp60<sup>c-src</sup> in human platelets. *J Biol Chem*, 269: 27093–27099, 1994.
- 24) Yanabu M, Ozaki Y, Nomura S, Miyake T, Miyazaki Y: Tyrosine phosphorylation and p72syk activation by an anti-glycoprotein Ib monoclonal antibody. *Blood*, 89: 1590–1598, 1997.
- 25) Asazuma N, Ozaki Y, Satoh K, Yatomi Y, Handa M et al.: Glycoprotein Ib-von Willebrand factor interactions activate tyrosine kinases in human platelets. *Blood*, 1997 (in press).
- 26) Ferrel JE Jr, Martin GS: Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein Iib-IIIa in platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 2234–2238, 1989.
- 27) Law D, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR: Outside-in integrin signal transduction. *J Biol Chem*, 271: 10811–10815, 1996.
- 28) Hato T, Oda A, Ozaki Y, Minamoto Y, Nakatani S: Outside-in signaling from integrin  $\alpha_{Iib} \beta_3$  into platelets in the absence of agonist-induced signaling. *Int J Hematol*, 65: 385–395, 1997.
- 29) Huang MM, Bolen J, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS: Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein tyrosine kinases in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88: 7844–7848, 1991.
- 30) Whitman M, Downes CP, Keeler M, Keller T, Cantley L: Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature*, 332: 644–646, 1988.
- 31) Hartwig JH, Kung S, Kovacsovics T, Janmey PA, Cantley LC: D $\beta$  phosphoinositides and outside-in integrin signaling by glycoprotein Iib-IIIa mediate platelet actin assembly and filopodial extension induced by phorbol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem*, 271: 32986–32993, 1996.
- 32) Rittenhouse SE: Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase, a potential signaling enzyme in platelets. *Sem Hematol*, 32: 120–125, 1995.