
原著

血管平滑筋に存在するミオシン軽鎖脱リン酸化酵素の
ミオシン結合サブユニットについて：
cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素によるリン酸化と
G₁ リン酸化タンパク質との類似性

新潟大学医学部第一内科学教室（主任：相澤義房教授）

藤 田 聡

Myosin Binding Subunit of Myosin Light Chain Phosphatase of Vascular
Smooth Muscle: Phosphorylation by cGMP-Dependent Protein Kinase
and Close Resemblance to G₁ Phosphoprotein

Satoru FUJITA

*The First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)*

A 138 kDa protein, immunoreactive with an antibody to myosin binding subunit (MBS) of chicken gizzard myosin light chain phosphatase (MLCP), was detected in microsomes as well as myofibrillar fraction from porcine aorta. The 138 kDa protein that was purified by immunoprecipitation with the antibody either from microsomes or myofibrillar fraction was found to be a good substrate for cGMP-dependent protein kinase (PKG). The microsomal protein was tightly associated with membranes and could be solubilized by Triton X-100, a property reminiscent of G₁ phosphoprotein, the unidentified major PKG substrate in the vascular smooth muscle. Both proteins co-migrated on SDS-PAGE and the MBS antibody immunoprecipitated thiophosphorylated G₁. Thus, MBS is a substrate for PKG, and the membrane-bound MBS may be identical to G₁, or at least its constituent. We propose that phosphorylation of MBS by

Reprint requests to: Satoru FUJITA,
The First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
1 Asahimachi-dori,
Niigata City, 951-8122, JAPAN.

別刷請求先：〒951-8122 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部第一内科学教室 藤田 聡

PKG may be responsible for cGMP-induced Ca²⁺-desensitization of contractile machinery in vascular smooth muscle.

Key words: myosin light chain phosphatase; cGMP-dependent protein kinase; thiophosphorylation; Ca²⁺ sensitivity

ミオシン軽鎖脱リン酸化酵素, cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素, チオリン酸化, Ca²⁺ 感受性

はじめに

平滑筋収縮にはミオシン軽鎖のリン酸化が重要な役割を果たしており, そのミオシン軽鎖のリン酸化量は2つの酵素, すなわちミオシン軽鎖リン酸化酵素 (MLCK) とミオシン軽鎖脱リン酸化酵素 (MLCP) の活性のバランスによって決定される. 最近までミオシン軽鎖のリン酸化の調節は主に MLCK によって担われていると考えられてきた¹⁾²⁾. この考え方では, MLCK の活性は Ca²⁺/カルモジュリン複合体の濃度に依存するため, ミオシン軽鎖のリン酸化量は細胞内 Ca²⁺ 濃度に依存することになる. しかし細胞内 Ca²⁺ 濃度の直接測定が可能になると, 細胞内 Ca²⁺ 濃度とミオシン軽鎖のリン酸化量は必ずしも相関しないことが次第に明らかとなってきた³⁾. 例えば, アゴニスト刺激による収縮では, 脱分極刺激による収縮に比べ, 同じ Ca²⁺ 濃度でのミオシン軽鎖リン酸化量は明らかに多くなることが示されており, アゴニストによる収縮ではミオシン軽鎖リン酸化の Ca²⁺ 感受性が高くなることがわかる. このアゴニストによる Ca²⁺ 感受性の増大は, MLCK の活性化ではなく, MLCP の活性低下によって説明されている³⁾. このアゴニスト刺激によって起こる MLCP 活性低下の機序はなお不明な点が多いが, MLCP と結合しているある種のタンパク質リン酸化酵素⁴⁾, あるいは低分子量 GTP 結合タンパク質 (Rho) によって活性化されるタンパク質リン酸化酵素により, MLCP のミオシン結合サブユニット (MBS) がリン酸化され, MLCP 活性が低下することが報告されている⁵⁾⁶⁾.

NO を遊離して作用する種々の血管拡張薬や心房性ナトリウム利尿ペプチド, 血管内皮由来弛緩因子による血管平滑筋弛緩作用が cGMP を介していることは広く認められている⁷⁾⁸⁾. この cGMP による弛緩の分子機構の詳細は未だ不明確な点が多いが, cGMP が cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKG) を活性化し, 活性化された PKG による特定のタンパク質のリン酸化が, cGMP による平滑筋弛緩の主要なメカ

ニズムであると考えられている⁹⁾¹⁰⁾. cGMP を介する血管平滑筋弛緩には複数の機序が想定されており, 主に細胞内 Ca²⁺ 濃度の低下に結びつく機序と⁹⁾¹⁰⁾, 収縮機構の Ca²⁺ 感受性低下を引き起こす機序とに分類することができる^{11)–13)}. cGMP による細胞内 Ca²⁺ 濃度の低下の機序については既に多くの研究がなされているが⁹⁾¹⁰⁾, Ca²⁺ 感受性低下の機序についての研究は限られている. Wu ら¹⁴⁾, また Lee ら¹⁵⁾ は, Ca²⁺ 感受性低下は MLCK 活性の抑制ではなく, MLCP 活性の亢進が原因であると結論している. また最近, cGMP による Ca²⁺ 感受性低下には PKG の活性化が関与していることが報告されている¹³⁾. これらの知見は, MLCP の活性調節サブユニットである MBS が PKG の基質であり, この PKG による MBS のリン酸化が MLCP を活性化することにより, ミオシン軽鎖の脱リン酸化をおこす可能性があることを示唆するものである. 本研究では, 血管平滑筋に存在する MBS が PKG の基質タンパク質であるか否かについて検討した. また, 血管平滑筋に存在し, MBS とほぼ同じ分子量をもつ PKG 基質タンパク質であり, 長い間同定が成功していない G₁ リン酸化タンパク質¹⁶⁾ が MBS と同一のタンパク質である可能性についても検討を加えた.

方 法

1. ブタ大動脈平滑筋の細胞分画

ブタ大動脈平滑筋の細胞分画は以前に報告した方法に従い, マイクロゾーム (本論文では heavy microsomes と呼ぶ), KCl で洗浄したマイクロゾーム (KeMS), KeMS をさらに EGTA で洗浄して calmodulin を除去したマイクロゾーム (CaM (–)-KeMS) を分離した¹⁷⁾¹⁸⁾. 分画に用いた緩衝液には数種のタンパク質分解酵素阻害剤を添加して使用した (0.5 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 1 μg/ml aprotinin, 10 μg/ml leupeptin, 5 μg/ml pepstatin A, 1 mM benzamidine). また, heavy microsomes (70,000×g 沈渣) が得られた際の上清を, さらに遠心し,

(120,000×g, 60分), 沈渣として light microsomes を, 上清として細胞質分画を得た. また, CaM (-)-KeMSを, 0.5% Triton X-100, 0.13 M KCl, 20 mM Hepes-KOH (pH 7.4), 0.5 mM MgCl₂, 0.05 mM CaCl₂, 20% glycerol 中に懸濁し, 4℃で30分間攪拌し, 遠心 (120,000×g, 60分) して不溶成分を取り除いた上清を Triton X-100 可溶性分画として用いた. また, ブタ大動脈の筋原線維分画は Shirazi らの方法に従って分離した¹⁹⁾.

2. MLCP のミオシン結合サブユニット (MBS) の免疫沈降

最近, ニワトリ砂囊平滑筋から MLCP が精製され²⁰⁾²¹⁾, この MLCP のホロ酵素はヘテロ 3 量体であり, 分子量約 38 kDa の触媒サブユニット (PP1 δ) と 130 kDa, 及び 20 kDa の 2 つの調節サブユニット (M130 あるいは MBS, M20) から構成されることが判明しており, この MLCP の 130-kDa-MBS に対する抗体を用いて免疫沈降を行った.

筋原線維分画あるいは CaM (-)-KeMS の Triton X-100 可溶性分画を 0.5 mg/ml になるように免疫沈降用緩衝液 (0.5% Triton X-100, 0.25 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EGTA, 20% glycerol) に上記のタンパク質分解酵素阻害剤を加えたもので懸濁し, 遠心 (8000×g, 15分) して不溶性成分を除去した. 上清を, 1 mg/ml protease-free BSA とタンパク質分解酵素阻害剤を加えた免疫沈降用緩衝液で平衡化した 20 μ l の protein A-Sepharose と氷上で 2 時間混和し, 遠心 (8000×g, 1分) して上清を得た. その上清に精製ウサギ IgG 5 μ g を加えた後, 平衡化した 20 μ l の protein A-Sepharose と氷上で 2 時間混和し, 同様に遠心して上清を得た. この上清に, 130 kDa MBS に対するポリクローナル抗体 (M130N) を 2 μ g, あるいは対照用として精製ウサギ IgG を 5 μ g を加えて, さらに氷上で 2 時間反応させた後, 20 μ l の protein A-Sepharose と 4℃で終夜混和した. その懸濁液を遠心して得られた沈渣をタンパク質分解酵素阻害剤を添加した免疫沈降用緩衝液で 4 回洗浄してから, 得られた免疫沈降物を後述の方法により PKG で直接リン酸化するか, SDS-PAGE 分析あるいはイムノブロット分析を行う場合には, 免疫沈降物を 4% SDS, 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol 中で加温し (65℃, 10分), 溶出したタンパク質を SDS-PAGE で分離した²²⁾.

3. cGMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKG) によるリン酸化

免疫沈降した MBS のリン酸化を行う場合は, 得られた免疫沈降物に, 各 15 μ l の免疫沈降用緩衝液, PKG I α (最終濃度 40 μ g/ml) と cGMP (同 4 μ M) を含む TEM 緩衝液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM EGTA, 25 mM 2-mercaptoethanol), リン酸化緩衝液 (80 mM Tris-HCl (pH 7.5), 40 mM (CH₃COO)₂Mg, 0.2 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine) を加えて, 37℃, 5 分間加温後, 15 μ l の 400 μ M [γ -³²P] ATP (2.5–3.5 Ci/mmol) を加えて, 37℃, 20 分間反応させた. その後反応液の半量の 6% SDS, 0.19 M Tris-HCl (pH 6.8), 6% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol を加えて, 65℃, 10 分加温した後, 遠心し (8000×g, 1分), 上清を 6% SDS-PAGE gel にて分離して, 乾燥させたゲルを X 線フィルムに -80℃で露光した.

血管平滑筋には数種の PKG 基質タンパク質が存在することが従来から知られており, そのうち分子量が 215–240 kDa 及び 120–140 kDa のタンパク質は Casnellie らにより, それぞれ, G₀, G₁ と呼ばれている¹⁶⁾. これらのタンパク質の PKG によるリン酸化は既報により以前に報告されている方法で行った¹⁶⁾²³⁾. マイクロゾーム (50 μ g) を 50 mM Hepes-NaOH (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 1 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine に懸濁し, 20 μ M [γ -³²P] ATP (15 Ci/mmol) と 1 μ M cGMP を加えて, 0℃, 30 秒間反応させた. 対照として用いた反応液には cGMP を添加しなかった. その後反応液の半量の 6% SDS, 0.19 M Tris-HCl (pH 6.8), 6% 2-mercaptoethanol, 30% glycerol を加えて, 95℃で 5 分加温して反応を停止し, 6% SDS-PAGE gel にて分離後, X 線フィルムに -80℃で露光した¹⁶⁾. マイクロゾームの PKG 基質タンパク質をチオリン酸化する場合は, [γ -³²P] ATP を基質に用いるリン酸化と同様の方法で行ったが, 基質として [γ -³⁵S] ATP (12.5 Ci/ml) を用いて, 0℃, 15 分間反応させた. 反応液を遠心後 (100,000×g, 30分), タンパク濃度が 1 mg/ml となるように, タンパク質分解酵素阻害剤を加えた免疫沈降用緩衝液で懸濁し, 不溶性成分を遠心 (15,000×g, 30分) して除去した後, 上述のように M130N 抗体を用いて免疫沈降を行った. 免疫沈降物は 6% SDS-PAGE gel で分離後, Bonner and Laskey の方法に従い, フルオログラフィー法によりチオリン酸化タン

パク質を検出した²⁴⁾。

4. その他の分析法

SDS-PAGE は Laemmli の緩衝液系を用いた¹⁷⁾。ゲルを銀染色する場合には Silver-Stain II Kit (和光純薬) を使用した。またイムノブロット分析に用いる転写膜には polyvinylidene difluoride membrane (Clear membrane-P, Atto) を、結合抗体の検出には Enhanced Chemiluminescence detection system (Amersham Life Science) を用いた¹⁷⁾。タンパク質濃度はウシ血清アルブミン (BSA) を標準物質に用いて Lowry 法で測定した。

5. 材 料

MLCP の MBS に対する抗体は三重大学医学部第一内科学教室伊藤正明博士から供与していただいたものを使用した。いずれもポリクローナル抗体 (ウサギ) であり、そのうち、M130N はニワトリ砂囊平滑筋の 130 kDa MBS (M130) のスプライシングバリエーションである 133 kDa MBS (M133, M133の512から552のアミノ酸残基の間に41個の挿入領域をもつ)²⁰⁾ の N 末端 (1 から 674 までのアミノ酸) を抗原として作成されたものであり、ヒト、ラット、及びウシの MBS と

交叉反応を示すことが確認されている²⁵⁾。HBS, HLC 抗体は、ヒトの脳及び肺の MBS の C 末部分を抗原として作成された。また、M20C 抗体は、ニワトリ砂囊平滑筋の MLCP の 20 kDa サブユニット (M20) の C 末側に存在するロイシンジッパー配列を抗原として作成されたものである。

細胞膜カルシウムポンプ (PMCA) に対する抗体 (P32) はブタ大動脈から精製した PMCA を抗原として作成したモノクローナル抗体を用いた²⁶⁾。Type I α PKG は以前に報告した方法により精製した¹⁷⁾。その他本研究に用いた材料は以下の通りである: protein-A-Sepharose CL-4B (Sigma Chemical Co.); p-rotease-free BSA (生化学工業); 精製ウサギ IgG (Jackson ImmunoResearch Lab.); [γ -³²P] ATP (10-50 Ci/mmol) (Du Pont-NEN); [γ -³⁵S] ATP (600 Ci/mmol) (Amersham International PLC); aprotinin, benzamidin, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine 及び Triton X-100 (和光純薬); pepstatin A 及び leupeptin (ペプチド研究所)。

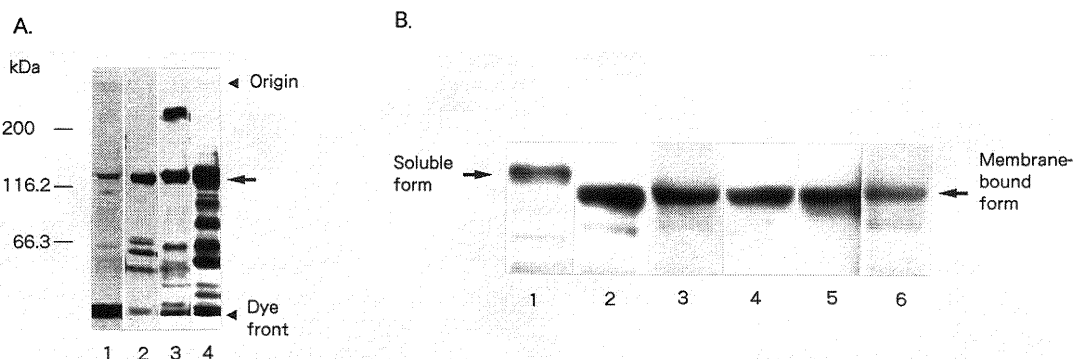


図1 Immunoblotting analyses of proteins present in the myofibrillar fraction of porcine aorta with various antibodies to subunits of myosin light chain phosphatase (MLCP) and subcellular distribution of myosin binding subunit (MBS). (Panel A) Myofibrillar fraction of porcine aorta was analyzed by immunoblotting conducted with four polyclonal antibodies (M20C, HBC, HLC, and M130N) raised against various portions of MBS isoforms or 20kDa subunit (M20). Lanes: 1, M20C; 2, HBC; 3, HLC; 4, M130N. The position of MBS is indicated with an arrow. The positions of molecular size markers (Dai-ichi Pure Chemicals, Tokyo) are indicated on the left of immunoblots. (Panel B) Subcellular distribution of MBS in porcine aorta. A representative immunoblotting analysis using M130N antibody is shown. Thirty μ g of protein was loaded on each lane. Lanes: 1, cytosolic fraction; 2, light microsomes; 3, heavy microsomes; 4, KCl-extracted microsomes (KeMS); 5, calmodulin-depleted, KCl-extracted microsomes (CaM(-)-KeMS); 6, Triton X-100 solubilizate of CaM(-)-KeMS.

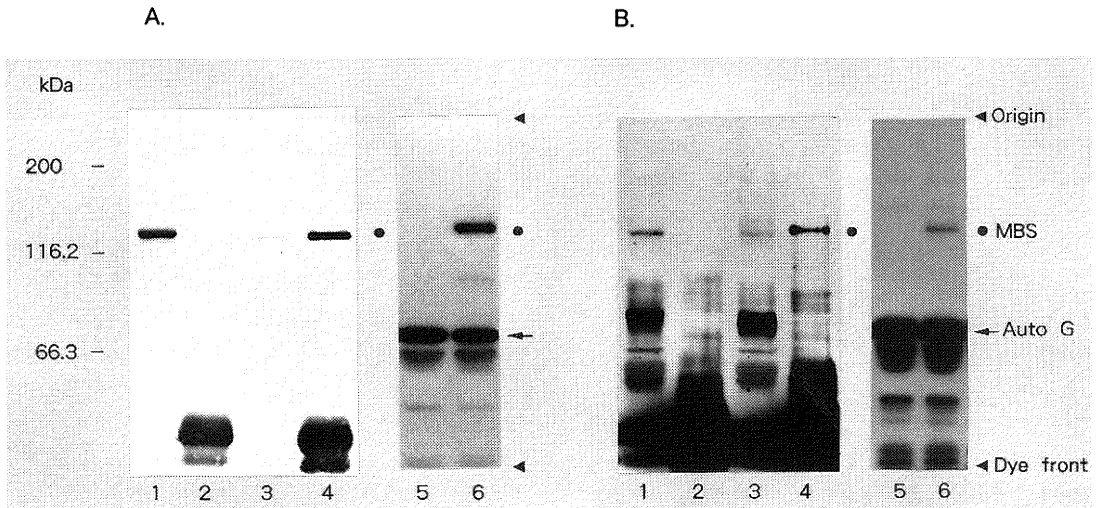


図2 Immunoprecipitation and phosphorylation by PKG of MBS of myofibrillar fraction and microsomal fraction. Myofibrillar fraction (Panel A) and Triton X-100 solubilize of calmodulin-depleted, Triton X-100 solubilized KCl-extracted microsomes (CaM(-)-KeMS) (Panel B) were subjected to immunoprecipitation with M130N antibody. Immunoprecipitates were directly phosphorylated by PKG. Lanes 1-4 are the results of immunoprecipitation in which MBS was detected by immunoblotting with M130N antibody as a probe. Lanes 5 and 6 are the results of phosphorylation of immunoprecipitates by PKG (autoradiogram). Lanes: 1, supernatant of immunoprecipitation with purified rabbit IgG (control); 2, immunoprecipitate with purified rabbit IgG (control); 3, supernatant of immunoprecipitation with M130N; 4, immunoprecipitate with M130N; 5, immunoprecipitate with purified rabbit IgG (control); 6, immunoprecipitate with M130N. Symbols: Auto G, auto-phosphorylated PKG; ●, MBS; ◀, the positions of origin and dye front of SDS-PAGE.

結 果

1. ブタ大動脈平滑筋のミオシン軽鎖脱リン酸化酵素 (MLCP) のミオシン結合サブユニット (MBS) の性質

ブタ大動脈から分離した筋原線維分画を MBS アイソフォームに対する複数の抗体と M20に対する抗体を用いて、イムノブロットング分析を行った結果を図1Aに示した。いくつかのタンパク質が抗体と反応しているが、分子量130-140 kDaのタンパク質はいずれの抗体とも反応していた。このタンパク質は MLCP の M20 調節サブユニットの C 末端にあるロイシンジッパーを認識する抗体 (M20C) とも交叉反応を示し、哺乳動物の MBS C 末端に存在するロイシンジッパー構造が反応しているものと考えられた。次にこれらの抗体の中で分子量130-140 kDaのタンパク質に最も反応性の高かった M130N 抗体をブタ大動脈平滑筋の

MBS 認識抗体として用い、これと反応する分子量130-140 kDa タンパク質の各種細胞分画における分布を調べた (図1B)。このタンパク質は light microsomes や heavy microsomes および 0.6 M KCl で洗浄後のマイクロゾーム (KeMS), さらに EGTA で洗浄して calmodulin を除去したマイクロゾーム (CaM(-)-KeMS) にも存在した。また、このタンパク質は, IP₃ レセプターや PMCA などの膜タンパク質を可溶化する条件下で²⁷⁾, Triton X-100 によって大部分可溶化された。この膜と強固に結合している抗体反応性タンパク質は SDS-PAGE 上分子量138 kDaを示したが、このタンパク質以外に、やや分子量が大きい抗体反応性タンパク質 (145 kDa) が細胞質分画に存在した。以上、ブタ大動脈にも少なくとも2種類の分子量の異なる MBS アイソフォームが存在し、分子量の大きいもの (145 kDa) は細胞質に、分子量の小さいもの (138 kDa) は膜に結合して存在すると考えられた。

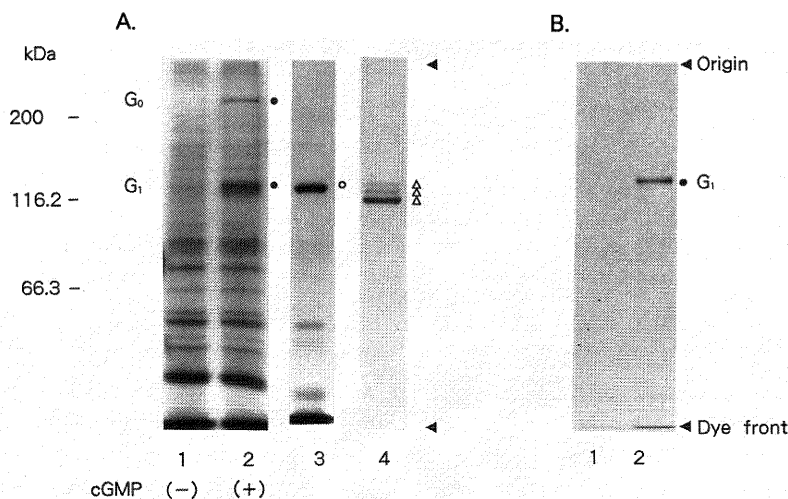


図3 Comparison of electrophoretic mobilities on SDS-PAGE of G₁ phosphoprotein, MBS and plasma membrane Ca²⁺ pump ATPase (PMCA) and immunoprecipitation of thiophosphorylated G₁ with antibody to MB S. (Panel A) Calmodulin-depleted, KCl-extracted microsomes (CaM(-)-KeMS) of porcine aorta was phosphorylated with [γ -³²P] ATP in the presence or absence of cGMP, and processed for autoradiography or immunoblotting with M130N antibody, and a monoclonal antibody (P32) to PMCA. Lanes: 1, phosphorylated proteins in the absence of cGMP (autoradiogram); 2, phosphorylated proteins in the presence of 1 μ M cGMP (autoradiogram); 3, immunoblotting with M130N; 4, immunoblotting with P32. Symbols: ●, PKG substrate; ○, MBS; △, PMCA isoforms. (Panel B) CaM(-)-KeMS was thiophosphorylated with [γ -³⁵S] ATP as a substrate and subjected to immunoprecipitation with M130N antibody. A fluorogram was shown. Lanes: 1, immunoprecipitate with purified rabbit IgG (control); 2, immunoprecipitate with M130N.

2. PKG による MBS タンパク質のリン酸化

次にブタ大動脈に存在する MBS が PKG 基質タンパク質であるかどうかについて検討した。図 2 は、筋原線維分画及び CaM (-)-KeMS の Triton X-100 可溶性分画から、M130N 抗体による免疫沈降により MBS を精製し、PKG によりリン酸化した結果を示すが、いずれの分画からも分子量 138 kDa のタンパク質が特異的に免疫沈降することが確認され、また、その免疫沈降されたタンパク質が PKG によりリン酸化を受けることが示された。以上の結果より、筋原線維に存在する MBS と同様に、膜に結合して存在している MBS も、PKG の基質タンパク質であることが強

く示唆された。

3. MBS と G₁リン酸化タンパク質の比較

上記のように、膜に結合している分子量 138 kDa の MBS タンパク質が血管平滑筋に存在し、そのタンパク質が PKG のよい基質であるということから、この膜結合性の 138 kDa の MBS タンパク質が血管平滑筋に存在する PKG の主要基質の 1 つである分子量 120–140 kDa の G₁ 蛋白に相当するかどうかについて検討した。

図 3A に示すように、本研究で用いた CaM (-)-KeMS 分画においても、分子量 240 kDa の G₀ タンパク質と分子量 138 kDa の G₁ が検出され、いずれも

主要な PKG 基質であることが確認された。M 130 N によるイムノブロッティング分析が示すように、MBS の移動度は G_1 と完全に同じであった。また PMCA に対するモノクローナル抗体 (P32) を用いたイムノブロッティングでは 3 本のバンドが検出され、これらのうち 1 番上のバンドが、 G_1 及び MBS タンパク質と同位置に泳動された。この PMCA の 1 番上のバンドと G_1 は異なった電気泳動条件でも常に同じ位置にくるという結果は、従来からの報告と一致した^{17) 23) 28)}。

次に、 G_1 タンパク質が M 130 N 抗体により免疫沈降されるかどうかを調べた。 G_1 タンパク質は $[\gamma\text{-}^{32}\text{S}]$ ATP を基質としてリン酸化することにより、タンパク質脱リン酸化酵素の作用を受けないチオリン酸化タンパク質としてラベルしてから免疫沈降の試料とした。図 3B に示すように分子量 138 kDa のチオリン酸化タンパク質が M 130 N 抗体により特異的に免疫沈降されることがわかった。

考 察

タンパク質脱リン酸化酵素の多くは Type 1 (PP1) あるいは Type 2 (PP2) に属し、その多くがミオシン軽鎖の脱リン酸化反応を触媒することが報告されている²⁹⁾。生理的なミオシン軽鎖脱リン酸化酵素の本体は不明であったが、最近、リン酸化されたミオシンを基質として有効に利用することができ、ミオシンやアクトミオシンと結合するタンパク質脱リン酸化酵素として、ニワトリ砂嚢平滑筋とブタ膀胱平滑筋から MLCP が精製された¹⁹⁾²⁰⁾。いずれも同様のサブユニット構成をもつヘテロ三量体であり¹⁹⁾、触媒サブユニット (PP1 δ) と二つの調節サブユニット (M 130 あるいは MBS と、M 20) からなる。MBS は触媒サブユニットのミオシンへの結合と活性制御に関与していることが示唆されているが²⁹⁾、M 20 の機能は現在不明である。

本研究により、ブタ大動脈平滑筋の細胞下分画には、ニワトリ砂嚢平滑筋の 130 kDa MBS に対して作成した抗体 (M 130 N) と反応する、138 kDa と 145 kDa の、分子量のわずかに異なる 2 種類のタンパク質が存在することが示された。ニワトリ砂嚢平滑筋においても、スプライシングバリエーションである 2 種類の MBS アイソフォーム (M 130 と M 133) が存在することが cDNA クローニングにより見出されている²⁰⁾。また、ニワトリ砂嚢平滑筋の MBS に対するモノクローナル抗体を用いて、Okubo らは³⁰⁾ ニワトリの多くの組織に分子量の近接した 2 種類の MBS タンパク質が存在

することを報告している。本研究で見出された 2 つの抗体反応性タンパク質のうち、分子量の大きいタンパク質 (145 kDa) は細胞質分画に存在し、分子量の小さいタンパク質 (138 kDa) はマイクロゾーム分画に存在していた。マイクロゾームに存在する 138 kDa MBS は高濃度の塩や EGTA で洗浄しても抽出されなかったが、Triton X-100 で大部分可溶化されたことから、膜結合性タンパク質である可能性が高い。この膜と結合している MBS が存在することは、他の組織や細胞においても、細胞分画による分析あるいは免疫組織化学的方法を用いた分析により示されている⁵⁾³¹⁾。以上のような MBS アイソフォームの細胞内分布の違いは、それぞれのアイソフォームの機能的な差異を示唆するものである。

ブタ大動脈の筋原線維分画を用いた場合と同様に、CaM (-)-KeMS の Triton X-100 可溶性分画から 138 kDa MBS は M 130 N 抗体により特異的に免疫沈降し、さらに、PKG により強くリン酸化されることがわかった。この結果は MBS が PKG 基質タンパク質であることを強く示唆するものである。このリン酸化に伴う機能的変化についてはまだ明らかではないが、MBS にはアンキリンリピートとロイシンジッパーが、 NH_2 末端と COOH 末端にそれぞれ存在し²⁰⁾³²⁾、これらの構造が MBS のミオシン以外のタンパク質との相互作用や、触媒サブユニット (PP1 δ) との結合やその活性調節に関与していると考えられている。Ito らはニワトリ砂嚢平滑筋の MLCP が MBS を介して酸性リン脂質と相互作用することを最近報告している³¹⁾。MLCP 活性は酸性リン脂質との結合により抑制されるが、興味深いことに、cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (PKA) による MBS のリン酸化は、MLCP のリン脂質からの解離を起こし、抑制されていた MLCP 活性の回復を起こすことが示された。また、ニワトリ砂嚢平滑筋 MLCP の MBS が PKG によってもリン酸化され、MLCP のリン脂質からの解離を引き起こすことが最近同じグループによって示されている (Ichikawa, K., Ito, M., Yoshida, Y. and Fujita, S. 投稿中)。これらの結果は、MLCP は、ミオシンに結合しているものとは別に、膜、おそらくは細胞膜と結合しているものがあり、血管平滑筋弛緩を惹起するセカンドメッセンジャーである cAMP や cGMP によって活性化された PKA や PKG によりリン酸化を受け、膜から解離することにより活性化を起こす可能性があることを示唆する。

血管平滑筋に存在する G_0 , G_1 タンパク質はいずれ

も膜タンパク質であり、PKG により顕著なリン酸化を受けるタンパク質であることが以前から知られていた²³⁾³³⁾。最近、G₀ は type 1 IP₃ receptor であることが示されたが²⁷⁾³⁴⁾、G₁ については、PKG により最も強いリン酸化を受けるタンパク質であることからこれまで多くの同定の試みがなされてきたにもかかわらず、その本体は不明なままであった²³⁾²⁷⁾³⁵⁾。G₁ はほぼ同様の分子量をもつ MLCK やカルデスモン、細胞膜カルシウムポンプ (PMCA) とは異なるタンパク質であることはすでに証明されている²⁸⁾³⁶⁾。本研究で明らかにされたように、血管平滑筋で見出された分子量 138 kDa の膜結合性の MBS は PKG のよい基質であり、電気泳動上 G₁ と同位置に泳動されるばかりでなく、M130N抗体はチオリン酸化した G₁ タンパク質を特異的に免疫沈降した。以上の結果は MBS が G₁ タンパク質と同一か、あるいは少なくともその構成タンパク質の一つである可能性を強く示唆するものである。

以上のように、ブタ大動脈平滑筋には分子量が 138 kDa と 145 kDa の少なくとも 2 種類の MBS アイソフォームが存在し、分子量の大きいものは細胞質分画に、分子量の小さいものは膜と結合して存在していることが明らかとなった。138 kDa MBS は PKG のよい基質であり、血管平滑筋の主要な PKG 基質タンパク質の一つである G₁ タンパク質に相当する可能性が示唆された。これらの結果は、cGMP による血管平滑筋の弛緩に関与する収縮機構の Ca²⁺ 感受性低下に、PKG による MLCP の MBS のリン酸化が関与している可能性を示すものであり、今後さらに詳細な検討が必要であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました新潟大学医学部第一内科学教室 相澤義房教授に深謝いたします。また直接御指導、御助言をいただきました、新潟大学医学部薬理学教室の今井昭一名誉教授、樋口宗史教授、吉田 豊講師、ならびに貴重な抗体を提供していただきました、三重大学医学部第一内科学教室の中野 越教授、伊藤正明助手に心より感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Hartshorne, D.J.: Biochemistry of the Contractile Process in Smooth Muscle (Johnson, L.R., ed) pp423~482, Raven Press, New York, 1987.
- 2) Kamm, K.E. and Stull, J.T.: Regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Annu. Rev. Physiol.*, **51**: 299~313, 1989.
- 3) Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V.: Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature*, **372**: 231~236, 1994.
- 4) Ichikawa, K., Ito, M. and Hartshorne, D.J.: Phosphorylation of the large subunit of myosin phosphatase and inhibition of phosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, **271**: 4733~4740, 1996.
- 5) Kimura, K., Ito, M., Amono, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K.: Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, **273**: 245~248, 1996.
- 6) Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M. and Narumiya, S.: Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*, **389**: 990~994, 1997.
- 7) Waldman, S. and Murad, F.: Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.*, **39**: 163~194, 1987.
- 8) Warner, T.D., Mitchell, J.A., Sheng, H. and Murad, F.: *Advances Pharmacol.*, **26**: Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation. 171~194, 1994.
- 9) Lincoln, T.M. and Cornwell, T.L.: Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.*, **7**: 328~338, 1993.
- 10) Lincoln, T.M., Cornwell, T.L., Komalavilas, P., MacMillan - Crow, L.A. and Boerth, N.J.: *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction* (Barany, M., ed) pp257~268, Academic Press, San Diego, CA., 1996.
- 11) Pfitzer, G., Merkel, L., Ruegg, J.C. and Hoffman, F.: Cyclic GMP - dependent protein kinase relaxes skinned fibers from guinea pig taenia coli but not from chicken gizzard. *Pflügers Arch.*, **407**: 87~91, 1986.

- 12) Nishimura, J. and van Breemen, C.: Direct regulation of smooth muscle contractile elements by second messengers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**: 929~935, 1989.
- 13) Kawada, T., Toyosato, A., Islam, M.O., Yoshida, Y. and Imai, S.: cGMP-kinase mediates cGMP- and cAMP-induced Ca^{2+} desensitization of skinned rat artery. *Eur. J. Pharmacol.*, **323**: 75~82, 1997.
- 14) Wu, X., Somlyo, A.V. and Somlyo, A.P.: Cyclic GMP-dependent stimulation reverses G-protein-coupled inhibition of smooth muscle myosin light chain phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **220**: 658~663, 1996.
- 15) Lee, M.R., Li, L. and Kitazawa, T.: Cyclic GMP causes Ca^{2+} desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **272**: 5063~5068, 1997.
- 16) Casnellie, J.E., Ives, H.E., Jamieson, J.D. and Greengard, P.: Cyclic GMP-dependent protein phosphorylation in intact medial tissue and isolated cells from vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, **255**: 3770~3776, 1980.
- 17) Yoshida, Y., Sun, H.-T., Cai, J.-Q. and Imai, S.: Cyclic GMP-dependent protein kinase stimulates the plasma membrane Ca^{2+} pump ATPase of vascular smooth muscle via phosphorylation of a 240-kDa protein. *J. Biol. Chem.*, **266**: 19819~19825, 1991.
- 18) Sun, H.-T., Yoshida, Y. and Imai, S.: A Ca^{2+} -activated, Mg^{2+} -dependent ATPase with high affinities for both Ca^{2+} and Mg^{2+} in vascular smooth muscle microsomes: Comparison with plasma membrane Ca^{2+} pump ATPase. *J. Biochem. (Tokyo)*, **108**: 730~736, 1990.
- 19) Shirazi, A., Iizuka, K., Fadden, P., Mosse, C., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V. and Haystead, T.A.J.: Purification and characterization of the mammalian myosin light chain phosphatase holoenzyme. *J. Biol. Chem.*, **269**: 31598~31606, 1994.
- 20) Shimizu, H., Ito, N., Miyahara, M., Ichikawa, K., Okubo, S., Konishi, T., Naka, M., Tanaka, T., Hirano, K., Hartshorne, D.J. and Nakano, T.: Characterization of the Myosin-binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **269**: 30407~30411, 1994.
- 21) Allesi, D., MacDougall, L.K., Sola, M.M., Ikebe, M. and Cohen, P.: The control of protein phosphatase 1 by targeting subunits. *Eur. J. Biochem.*, **210**: 1023~1035, 1992.
- 22) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680~685, 1970.
- 23) Baltensperger, K., Carafoli, E. and Chiesi, M.: The Ca^{2+} pumping ATPase and the major substrates of the cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle sarcolemma are distinct entities. *Eur. J. Biochem.*, **172**: 7~16, 1988.
- 24) Bonner, W.M. and Laskey, R.A.: A film detection method for Tritium-labelled proteins and nucleic acid in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.*, **46**: 83~88, 1974.
- 25) Inagaki, N., Nishizawa, M., Ito, M., Fujioka, M., Nakano, T., Tsujino, S., Matsuzawa, K., Kimura, K., Kaibuchi, K. and Inagaki, M.: Myosin binding subunit of smooth muscle myosin phosphatase at the cell-cell adhesion sites in MDCK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **230**: 552~556, 1997.
- 26) Yoshida, Y., Toyosato, A., Islam, M.O., Koga, T., Fujita, S. and Imai, S.: Stimulation of plasma membrane Ca^{2+} pump ATPase of vascular smooth muscle by cGMP-dependent protein kinase: Functional reconstitution with purified proteins. *Mol. Cell. Biochem.*, in press, 1997.
- 27) Koga, T., Yoshida, Y., Cai, J.-Q., Islam, M.O. and Imai, S.: Purification and characterization of 240 kDa cGMP-dependent protein kinase substrate of vascular smooth muscle. *J. Biol. Chem.*, **269**: 11640~11647, 1994.
- 28) Yoshida, Y., Cai, J.-Q. and Imai, S.: Plasma membrane Ca^{2+} pump ATPase is not a substrate for cGMP-dependent protein kinase. *J. Biochem.*, **111**: 559~562, 1992.
- 29) Erdödi, F., Ito, M. and Hartshorne, D.J.: Biochemistry of Smooth Muscle Contraction

- (Bàràny, M., ed) pp131~142, Academic Press, San Diego, CA, 1996.
- 30) Okubo, S., Ito, M., Takahashi, Y., Ichikawa, K., Miyahara, M., Shimizu, H., Konishi, T., Shima, H., Nagao, M., Hartshorne, D.J. and Nakano, T.: A regulatory subunit of smooth muscle myosin bound phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**: 429~434, 1994.
 - 31) Ito, M., Feng, J., Tsujino, S., Inagaki, N., Inagaki, M., Tanaka, J., Ichikawa, K., Hartshorne, D.J. and Nakano, T.: Interaction of smooth muscle myosin phosphatase with phospholipids. *Biochemistry*, **36**: 7607~7614, 1997.
 - 32) Chen, Y.H., Chen, M.X., Allesì, D.R., Campbell, D.G., Shanahan, C., Cohen, P. and Cohen P.T.W.: Molecular cloning of cDNA encoding the 110kDa and 21kDa regulatory subunits of smooth muscle protein phosphatase 1M. *FEBS Lett.*, **356**: 51~55, 1994.
 - 33) Baltensperger, K., Chiesi, M. and Carafoli, E.: Substrate of cGMP kinase in vascular smooth muscle and their role in the relaxation process. *Biochemistry*, **29**: 9753~9760, 1990.
 - 34) Islam, M.O., Yoshida, Y., Koga, T., Kojima, M., Kangawa, K. and Imai, S.: Isolation and characterization of vascular smooth muscle inositol 1, 4, 5 - triphosphate receptor. *Biochem. J.*, **316**: 295~302, 1996.
 - 35) Vrolix, M., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Hofmann, F. and Casteels, R.: Cyclic GMP - dependent protein kinase stimulates the plasma-lemmal Ca²⁺ pump of smooth muscle via phosphorylation of phosphatidylinositol. *Biochem. J.*, **255**: 855~863, 1988.
 - 36) Sarcevic, B., Robinson, P.J., Pearson, R.B. and Kemp, B.E.: The smooth muscle 132kDa cyclic GMP-dependnt protein kinase substrate is not myosin light chain kinase or caldesmon. *Biochem. J.*, **271**: 493~499, 1990.
-