

Rho/Rho-キナーゼと血管収縮機構

天野 睦紀 貝淵 弘三

要 旨：血管平滑筋の収縮は，カルシウムシグナルによりミオシン軽鎖キナーゼを介してミオシンのリン酸化レベルを制御することで調節され，血圧の維持に寄与している。一方で，冠動脈攣縮や脳血管攣縮など血管平滑筋の異常収縮には低分子量GTP結合蛋白質Rhoとそのエフェクター分子であるRho-キナーゼが関与していることが示されてきた。本稿ではRho/Rho-キナーゼによる血管収縮の分子機構について概説する。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 337-341)

Key words: Rho, Rho-kinase, myosin light chain phosphatase (MLCP), Ca^{2+} -sensitization

血管平滑筋の Ca^{2+} -sensitizationと Rho/Rho-キナーゼ

血管平滑筋の収縮力は，通常細胞内 Ca^{2+} 濃度に依存している。細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると Ca^{2+} -カルモジュリン(CaM)複合体が形成され，これがミオシン軽鎖(myosin light chain: MLC)キナーゼ(MLCK)を活性化させる。その結果，2型ミオシンのMLCの19番目のセリンがリン酸化されてミオシンのATPase活性が上昇することによりアクチンミオシンの張力が発生する。しかしながら，冠動脈攣縮や脳血管攣縮など異常な血管の収縮や一部の高血圧においては，必ずしも細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が認められず， Ca^{2+} 拮抗薬が無効な場合があることが知られていた。このように一定の Ca^{2+} 濃度においても平滑筋細胞の張力が上昇する現象は Ca^{2+} -感受性の亢進(Ca^{2+} -sensitization)と呼ばれている。10年ほど前にわれわれは，低分子量GTP結合蛋白質Rhoとそのエフェクター分子であるRho-キナーゼが Ca^{2+} -sensitizationにおいて重要な役割を果たしていることを示した^{1,2)}。Rhoは平滑筋細胞において，ノルアドレナリン，エンドセリン，トロンボキサンA2等の血管作動物質刺激によって活性化され，エフェクター分子であるRho-キナーゼを活性化させる。活性化されたRho-キナーゼはミオシン軽鎖ホスファターゼ(MLCP)のミオシン結合サブユニット(myosin phosphatase targeting subunit 1:

MYPT1)をリン酸化することによりMLCPの活性を抑制する。MLCのリン酸化レベルはMLCKとMLCPの活性のバランスにより規定されるため， Ca^{2+} によるMLCKの活性の上昇がなくとも，MLCPの活性抑制によりMLCのリン酸化レベルが上昇し，平滑筋の収縮が起こる(Fig. 1)^{3,4)}。MLCPは触媒サブユニット(PP1C δ)と調節サブユニットであるMYPT1, M20から構成される。Rho-キナーゼはMYPT1の696番目のトレオニンと853番目のトレオニンをリン酸化し，この部位のリン酸化はMLCPの活性に対して抑制的に働く。Rho-キナーゼ以外にもZIP-キナーゼやILKも696番目のトレオニンをリン酸化することが報告されており， Ca^{2+} -sensitizationに関わっていることが示唆されている(Fig. 2)。一方で，PKGやPKAはMYPT1の695番目のセリンをリン酸化するが，695番目のセリンがリン酸化されていると696番目のトレオニンのリン酸化が阻害されることが報告されており，NO/cGMPシグナル系やcAMPシグナル系による平滑筋弛緩の機序の一部を説明するものと考えられる。Rho-キナーゼは，MLCPの抑制因子であるCPI-17の38番目のトレオニンをリン酸化して活性化することによってもMLCPの機能を抑制する。また，Rho-キナーゼがeNOSの発現を抑制することも報告されており，Rho-キナーゼは血管収縮を多面的に調節していると考えられている。

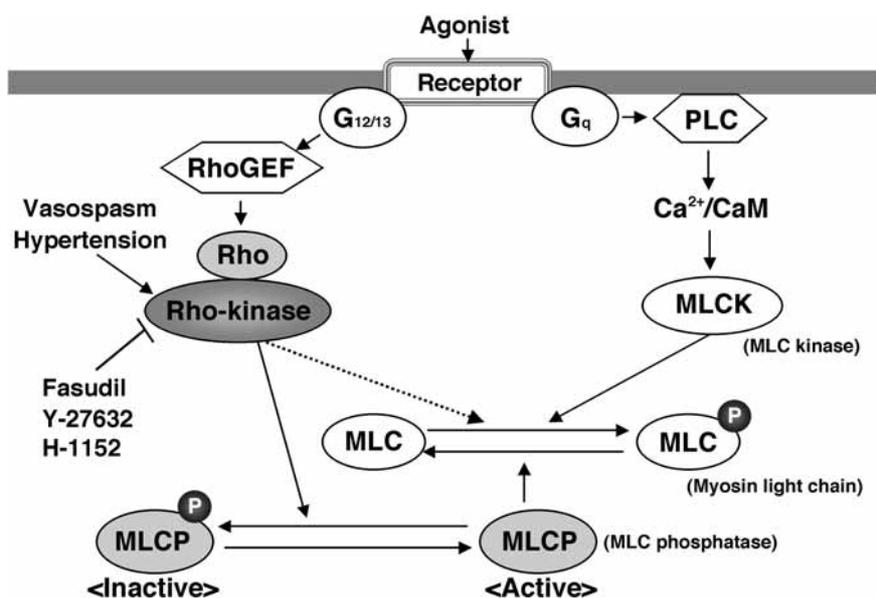


Figure 1 Rho/Rho-kinase signaling pathway.
PLC: phospholipase C

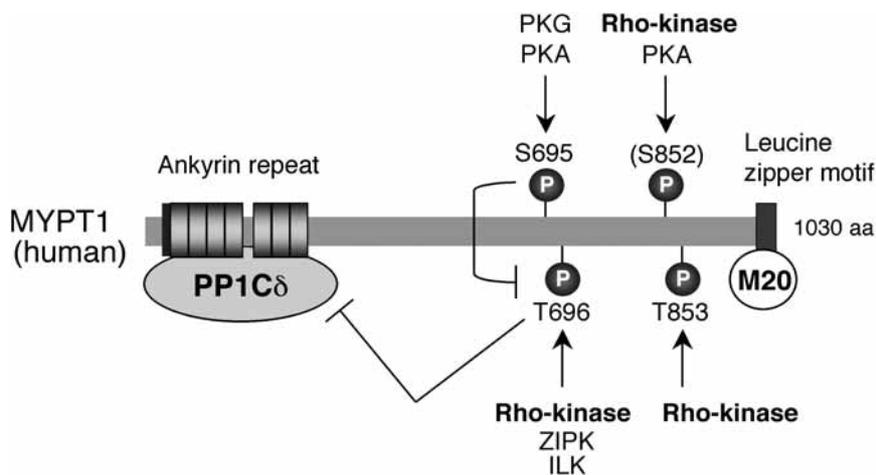


Figure 2 Phosphorylation of MYPT1 by Rho-kinase.

Rho/Rho-キナーゼシグナル経路について

RhoはRasスーパーファミリーに属する低分子量GTP結合蛋白質であり、RacやCdc42等とともにRhoサブファミリーを構成し、分子スイッチとして主に細胞骨格・細胞接着装置の再構築に重要な役割を果たしている。Rho-キナーゼはRhoにより活性化されるRhoのエ

フェクター分子であり、上述のアクチオシンによる張力の調節をはじめ、さまざまな細胞機能に関わっている。RhoにはRhoA、RhoB、RhoCの3種の、Rho-キナーゼにはRho-キナーゼ α /ROCK2/ROK α とRho-キナーゼ β /ROCK1/ROK β の2種類のアイソフォームがそれぞれ存在し、ほとんどすべての組織でいずれか、あるいは複数のアイソフォームが発現している。本稿ではそ

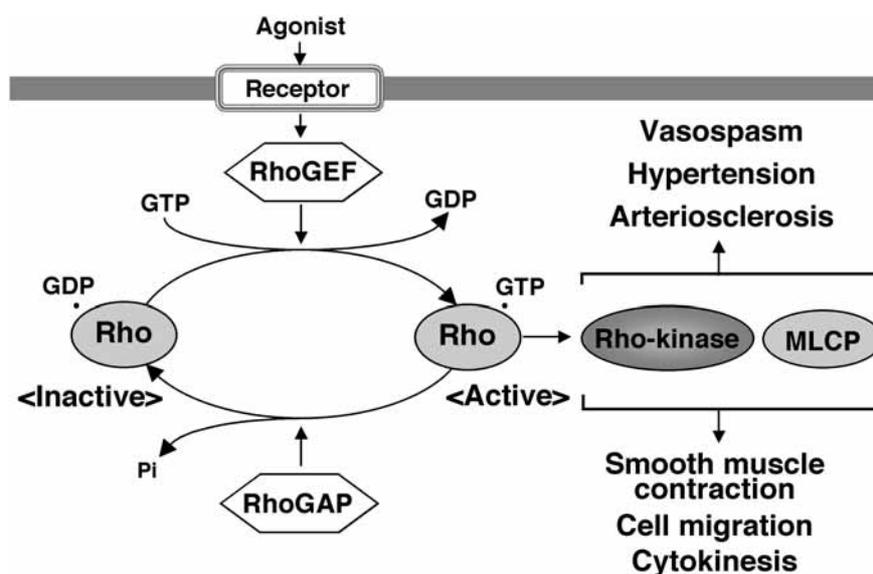


Figure 3 Rho/Rho-kinase and cardiovascular diseases.

それぞれのアイソフォームを総称してRhoとRho-キナーゼと記載する。Rhoはさまざまなアゴニスト刺激によりヘテロ3量体G蛋白質 $G_{12/13}$ を介して活性化されることが示されている。Rhoは活性型であるGTP結合型と不活性型であるGDP結合型をサイクリングすることで分子スイッチとして機能しているが、Rhoの活性化はRhoGEF (guanine nucleotide exchange factor), 不活性化はRhoGAP (GTPase activating protein) と呼ばれる一群の分子が担っている (Fig. 3)。またRhoGDI (guanine nucleotide dissociation inhibitor) はGDP型のRhoに結合し、不活性型のRhoを細胞質にとどめておく役割を持つ。Rho-キナーゼはN末端側にキナーゼドメイン, 中央にコイルドコイルドメイン, C末端側にシステインに富む領域によって分断されたPHドメインを有している。キナーゼドメインの両端には活性に必要な伸長領域が存在する。活性型RhoはコイルドコイルドメインのC末端側のRho結合領域 (Rho-binding domain: RBD) に結合することで、Rho-キナーゼを活性化する⁵⁻⁷。最近、奈良先端科学技術大学院大学の箱嶋敏雄博士らとの共同研究によりRho-キナーゼのキナーゼドメインと阻害剤の複合体の結晶構造を決定し、Rho-キナーゼはキナーゼドメインの両端の伸長領域を介して2量体化していること、この2量体形成がキナーゼ活性に必須であるこ

とを示した⁸。Rho/Rho-キナーゼシグナルは上述の平滑筋収縮の調節以外にも、細胞遊走や細胞質分裂、神経突起の退縮などの細胞現象に関わっていることが報告されている⁵⁻⁷。

Rho/Rho-キナーゼと疾患

Rho-キナーゼ特異的阻害剤がRho-キナーゼの機能を解析するうえで有用なツールとなり、Rho/Rho-キナーゼを介するシグナルが多くの疾患に関わっていることが明らかにされてきた^{3,9-11}。われわれも東北大学の下川宏明博士らとの共同研究により特に循環器疾患にRho/Rho-キナーゼが関与していることを示してきた。これまでに、Fasudil/HA-1077, Y-27632, H-1152等がRho-キナーゼ特異的なATP競合阻害剤として報告されている。この中でFasudilはクモ膜下出血後の脳血管攣縮を緩解する薬剤として既に臨床応用されている。Y-27632はフェニレフリンによる平滑筋収縮を抑制する化合物としてスクリーニングされ、種々の高血圧ラットモデルにおいて降圧作用を示している。臨床研究においてもFasudilが本態性高血圧患者に対して血管拡張反応を示すことが報告されている。FasudilやY-27632はまた、冠動脈攣縮モデルやクモ膜下出血による脳血管攣縮モデルにおいてMLCのリン酸化と血管攣縮を有意に

抑制することが報告されている。狭心症や肺高血圧症モデルにおいてもRho-キナーゼ阻害剤は血管攣縮を抑制することが示されており、これらの病変において血管平滑筋でRho/Rho-キナーゼの異常な活性化が起こっていることが示唆される。さらに、Rho-キナーゼ阻害剤が冠動脈硬化モデルにおいて血管壁肥厚、マクロファージや血管平滑筋細胞の血管内膜への浸潤を抑制することが示され、Rho-キナーゼは炎症反応とそれに伴う細胞遊走にも関わっていると考えられるようになった。細胞レベルでのRho-キナーゼ阻害剤の細胞遊走に及ぼす影響については複数の報告があるものの、必ずしも統一した見解が得られていない。われわれは複数の細胞種を用いてRho-キナーゼ阻害剤が細胞遊走を阻害するかどうか調べたが、その結果、Rho-キナーゼ阻害剤は細胞種特異的にかつ実験系依存的に細胞の遊走を阻害することが分かった¹²⁾。このことは、Rho/Rho-キナーゼはある特定の状況下(おそらく炎症に伴う細胞の遊走など)においてのみ細胞の遊走に必要とされることを示唆している。循環器疾患以外にも脊髄損傷や神経変性疾患にRho-キナーゼが有効であるという報告がある¹⁰⁾。myelin-associated glycoprotein(MAG)やNogo等のミエリン由来の軸索伸長阻害因子はRho/Rho-キナーゼシグナル経路を活性化して損傷した軸索の再生を妨げているとされているが、Rho-キナーゼ阻害剤を作用させることで軸索の再構成を起こすことができる。また作用機序には不明の点が多いものの、アルツハイマー病に対して改善効果があるという報告もある。他にも、腎保護作用や糖尿病合併症の一つである勃起障害にも治療効果があると期待されている。

おわりに

Rho-キナーゼの発見から約10年が経過するが、その間にCa²⁺-sensitizationの分子機序の解明が大きく進み、またRho/Rho-キナーゼシグナル経路の異常が多数の疾患と関わりのあることも明らかとなってきた。その一方で、Rho/Rho-キナーゼシグナル経路をターゲットとした治療を目指す多数の研究開発が進められてはいるが、実際の臨床応用は現時点では限定的なものである。今後、創薬ターゲットとして、また種々の疾患の

リスクファクターとしてRho/Rho-キナーゼシグナル経路を解析することにより、病態解明や治療への足がかりとなることが期待される。

文 献

- 1) Kimura K, Ito M, Amano M et al: Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 1996, **273**: 245–248.
- 2) Kureishi Y, Kobayashi S, Amano M et al: Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 12257–12260.
- 3) Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K: Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*, 2001, **22**: 32–39.
- 4) Somlyo AP, Somlyo AV: Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*, 2003, **83**: 1325–1358.
- 5) Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M: Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem*, 1999, **68**: 459–486.
- 6) Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K: Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res*, 2000, **261**: 44–51.
- 7) Riento K, Ridley AJ: Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**: 446–456.
- 8) Yamaguchi H, Kasa M, Amano M et al: Molecular mechanism for the regulation of rho-kinase by dimerization and its inhibition by fasudil. *Structure*, 2006, **14**: 589–600.
- 9) Shimokawa H, Takeshita A: Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25**: 1767–1775.
- 10) Mueller BK, Mack H, Teusch N: Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, **4**: 387–398.
- 11) Budzyn K, Marley PD, Sobey CG: Targeting Rho and Rho-kinase in the treatment of cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci*, 2006, **27**: 97–104.
- 12) Nakayama M, Amano M, Katsumi A et al: Rho-kinase and myosin II activities are required for cell type and environment specific migration. *Genes Cells*, 2005, **10**: 107–117.

Rho/Rho-kinase in Regulation of Vascular Contraction

Mutsuki Amano and Kozo Kaibuchi

Department of Cell Pharmacology, School of Medicine, Nagoya University, Aichi, Japan

Key words: Rho, Rho-kinase, myosin light chain phosphatase (MLCP), Ca²⁺-sensitization

Contraction of vascular smooth muscle is controlled by intracellular Ca²⁺ concentration and the resultant increase in myosin light chain (MLC) phosphorylation through MLC kinase. In some cardiovascular diseases such as coronary artery vasospasm and cerebral vasospasm, small GTPase Rho and its effector Rho-kinase have been shown to be linked to such abnormal vascular contraction. The review discusses molecular basis in vascular contraction by Rho/Rho-kinase. (J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 337–341)