The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	血小板アクトミオシン系におけるCa2+感受性因子としてのカルモデュリンの同定
Author(s)	森本, 興市
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33523
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【59】

氏名・(本籍)	森本興市（もりもと こういち）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5841 号
学位授与の日付	昭和57年12月4日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**血小板アクトミオシン系におけるCa^{2+}感受性因子としてのカルモデュリンの同定**
論文審査委員	(主査) 教授 垣内 史朗 (副査) 教授 神前 五郎 教授 吉田 博

論文内容の要旨

〔目 的〕

血小板はトロンビン，ADP，コラーゲン等の生理活性物質およびCa^{2+} ionophore等種々の刺激により活性化され，円盤状から球状となり偽足形成へと進む形態変化，凝集およびセロトニン，ADP等の放出に至る一連の反応を示すが，これらの現象には細胞質内Ca^{2+}濃度の上昇と収縮性蛋白質殊にアクトミオシン系の関与が重要な役割を果たしていることが知られている。しかしながら，アクトミオシン系におけるCa^{2+}による制御機構について，その詳細はいまだ明らかになっていない。

今回の研究は，ヒト血小板よりCa^{2+}感受性アクトミオシン（ミオシンB）の調整法を開発し，このCa^{2+}感受性因子の追求を目的とした。

〔方法ならびに結果〕

血小板の，ミオシンおよびアクチンを基本構成成分とする新しいミオシンB調整法は以下の如くである。ヒト洗浄血小板を9倍量の0.32 M蔗糖を含む緩衝液にて抽出し，さらに終濃度10mMのMg ATPとなるように調整し硫安分画を行った。この25%から60%飽和の分画を0.6 MKClを含む緩衝液で溶解し，遠心した上清を低イオン強度の緩衝液で透析しpHを6.3とした。これを遠心した沈査をさらに高イオン強度の緩衝液で溶解して遠心し，上清を再度低イオン強度の緩衝液で透析後pHを6.3に調整し遠心して得られた沈査をミオシンBの標品とした。このミオシンBのSDSディスク電気泳動において，ミオシンとアクチンはミオシンB全蛋白質中にそれぞれ45%および35%を占めた。この調整方法は，血小板以外のいわゆる非筋肉組織にも応用可能であった。

アクチン・ミオシン間の相互作用の指標として超沈澱およびMg^{2+}－ATPase活性を検討した。まず

超沈澱では，ミオシンBはATPとMg^{2+}の存在下でCa^{2+}依存性に超沈澱を起こしμMオーダーのCa^{2+}濃度により活性化された。Mg^{2+}－ATP_{ase}活性についてみれば，同様にμMオーダーのCa^{2+}濃度により活性化され，50%活性化に要するCa^{2+}濃度は3μMであった。

次にこのミオシンBのCa^{2+}感受性因子として，Ca^{2+}受容蛋白質の一つであるカルモデュリンを想定し，カルモデュリン阻害剤の影響を検討した。まずカルモデュリン阻害剤の代表的な薬剤であるトリフルオペラジン(TEP)の添加効果を検討したところ，濃度依存性にミオシンBの超沈澱を抑制し，50%抑制に要するTEPの濃度（I_{50})は18μMであった。同様に他のカルモデュリン阻害剤であるクロールプロマジン(CPZ)，W－7，プロメタジン(PM)についてもI_{50}を検討したところ，CPZ31μM，W－745μM，PM310μMであり，これら各I_{50}はカルモデュリン依存性ホスホジエステラーゼ活性の阻害濃度と近似していた。この結果から血小板ミオシンBのCa^{2+}感受性因子はカルモデュリンである可能性が強く示唆された。

さらにカルモデュリンの関与を直接証明するためにミオシンBよりCa^{2+}感受性因子を分離（脱感作）し，脱感作されたアクトミオシンとCa^{2+}感受性因子との再構成実験を行った。まずミオシンBをEGTAを含む低イオン強度緩衝液で透析した後，遠心した沈査を高イオン強度緩衝液で溶解するという操作を2回繰返し脱感作アクトミオシンを得た。この脱感作アクトミオシンは，0.1 mMCa^{2+}存在下において超沈澱活性を認めなかったが，これに牛脳より精製した標準カルモデュリンを添加すると濃度依存性に活性の回復を認め，50%活性化および最大活性化に要するカルモデュリン量はそれぞれ1.0μgおよび3.0μgであった。EGTA存在下ではカルモデュリン添加効果は認められず，Ca^{2+}－カルモデュリンにより脱感作アクトミオシンは再感作されることが明らかになった。

次に，上記脱感作により得られた上清分画はCa^{2+}感受性因子を含んでおり，この上清をフェノチアジンアフィニティカラムに通すとCa^{2+}依存性にアフィニティカラムに結合した。溶出分画にはカルモデュリン活性を認め，この分画を脱感作アクトミオシンに添加すると同様に濃度依存性に超沈澱活性の回復を示し，50%活性化および最大活性化に必要なCa^{2+}感受性因子は，カルモデュリン活性に換算してそれぞれ0.9μgおよび2.7μgで，標準カルモデュリンにより得られた値とほぼ一致した。さらにフェノチアジンアフィニティカラムでの溶出分画を，Ca^{2+}存在下および非存在下にDavis法により電気泳動すると，標準カルモデュリンと同一の移動度を示す蛋白質以外にはCa^{2+}依存性に移動度の変化を示す蛋白質は認めなかった。

以上の結果から，血小板ミオシンBにおけるCa^{2+}感受性因子は唯一カルモデュリンであることを直接証明することができた。

〔総　括〕

1．ヒト洗浄血小板よりミオシンおよびアクチンを多量に含む新しいミオシンB調整法を開発した。この調整方法は他の非筋肉組織にも応用可能である。

2．このミオシンBは，細胞の活性化に必要な生理的範囲のCa^{2+}濃度（μMオーダー）で超沈澱およびMg^{2+}－ATP_{ase}活性を示した。

3．このミオシンBは，カルモデュリン阻害剤により超沈澱活性を阻害された。これはミオシンB

中の Ca^{2+}感受性因子がカルモデュリンである可能性を示唆した。

4．脱感作アクトミオシンはCa^{2+}感受性を示さず，牛脳より精製した標準カルモデュリンにより濃度依存性に Ca^{2+}感受性の回復を示した。またフェノチアジンアフィニティカラムで部分精製したCa^{2+}感受性因子との再構成によっても同様に感受性の回復を見た。このCa^{2+}感受性因子中にはカルモデュリン活性を認め，回復の程度は標準カルモデュリンの濃度依存性と一致した。

5．部分精製した Ca^{2+}感受性因子中に電気泳動上カルモデュリンの存在を確認し，これ以外にCa^{2+}依存性に移動度の変化する蛋白質を認めなかった。

6．以上の結果から，カルモデュリンが血小板ミオシンBの Ca^{2+}感受性に関与する唯一の因子であることが証明された。

論文の審査結果の要旨

血小板凝集反応に収縮蛋白質（アクトミオシン）が関与することが知られており，またCa^{2+}が必須であることが知られている。このCa^{2+}の作用を仲介する蛋白質としてカルモデュリンが擬せられたまま長らく確証は得られなかった。

本論文は，ヒト血小板より Ca^{2+}感受性アクトミオシンを調整し，この系に Ca^{2+}感受性を与えているものがカルモデュリンに他ならないことを証明したものであって，上記の疑問に答えるものである。医学博士としての論文にふさわしい内容と考えられる。