

Title	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
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	森 本 興 市
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 8 4 1 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〕

血小板はトロンピン, 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 10 mM の Mg ATP となるように調整し硫酸分画を行った。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 $3\mu M$ 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 $18\mu M$ 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、CPZ $31\mu M$ 、W-7 $45\mu M$ 、PM $310\mu M$ 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、 $0.1mM Ca^{2+}$ 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 $1.0\mu g$ および $3.0\mu g$ 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 $0.9\mu g$ および $2.7\mu g$ 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。