



Title	ヒト血小板におけるPOLYPHOSPHOINOSITIDES代謝
Author(s)	中村, 匡輔
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34990">https://hdl.handle.net/11094/34990</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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

氏名・（本籍）	なか 中	むら 村	きよう 匡	すけ 輔
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	6974	号	
学位授与の日付	昭和60年8月2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	ヒト血小板におけるPOLYPHOSPHOINOSITIDES代謝			
論文審査委員	(主査)			
	教授	森	武貞	
	(副査)			
	教授	坂本	幸哉	教授 吉田 博

### 論文内容の要旨

#### (目的)

血小板は膜表面でthrombin (thr)などの刺激受容に引き続いて、viscous metamorphosisと呼ばれる特有の形態変化、顆粒内容の分泌、prostaglandinsの合成などを行い、一次止血栓形成の主役をなす。これらの反応は、他の分泌細胞と同様に、細胞内遊離カルシウム濃度( $Ca^{2+}$ )<sub>i</sub>の上昇により促進されると考えられている。刺激受容に伴う( $Ca^{2+}$ )<sub>i</sub>上昇のメカニズムとして、近年 polyphosphoinositides (PPI) の代謝が注目されている。PPIにはphosphatidylinositol (PI)がさらにリン酸化されたPI 4-monophosphate (DPI), PI 4,5-bisphosphate (TPI)が含まれるが、とりわけTPIは $Ca^{2+}$ と親和性が強く、形質膜脂質二重層の最内側に $Ca^{2+}$ -TPI complexとして存在し、その水解により細胞質内に遊離 $Ca^{2+}$ が放出されると考えられている。このTPI水解は、従来、PI特異的phospholipase Cにより行なわれるものと推測されていた。しかし、当教室で報告したように、少なくともウシ血小板由来のphospholipase Cの活性は完全に $Ca^{2+}$ 依存性であり(文献1)、phospholipase CによるTPI水解反応が $Ca^{2+}$ 依存性であるならば、( $Ca^{2+}$ )<sub>i</sub>上昇機構としての意義は疑問視される。そこで、ヒト血小板からphospholipase Cを部分精製し、その基質特異性と $Ca^{2+}$ 依存性について検討を行い、さらにthr刺激受容に伴う血小板膜脂質の動態と( $Ca^{2+}$ )<sub>i</sub>を検討し、TPI水解の生理的意義について考察を加えた。

#### (方法ならびに成績)

1. ヒト血小板phospholipase Cの部分精製およびその基質特異性、 $Ca^{2+}$ 依存性について  
クエン酸加ヒト新鮮血より、洗浄血小板を調整、これを超音波破壊し、遠沈上清(10,500xg, 60分)を得た。さらに、硫酸分画、Octyl Sepharose 4B, DEAE Sepharose CL-6Bカラムクロマトにより精製を試み、110

倍の比活性を有する酵素標品を得た。phospholipase C 活性の測定は、既報に準じて行った(文献1)。また、 $^{32}\text{P}$ で標識した血小板より抽出した磷脂質分画を基質として、酵素標品の基質特異性および $\text{Ca}^{2+}$ 依存性を一次元薄層クロマト(TLC)を用いて分析した。酵素標品は $\text{DPI} > \text{TPI} > \text{PI}$ (%rate)の順に内因性基質を水解した。この水解反応は、1 mM EGTA存在下では認められず、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性であると考えられた。

## 2. Thr刺激によるTPI水解反応と $(\text{Ca}^{2+})_i$

$\text{Ca}^{2+}$ を含まないbufferに浮遊した $^{32}\text{P}$ 標識ヒト血小板を調整し、生理的刺激物質としてthr(0.5 U/ml)を添加後、経時的に反応を停止させて脂質抽出を行い、TLCにて脂質分析を行った。Thr添加により $^{32}\text{P}$ -TPIの減少と $^{32}\text{P}$ -phosphatidic acid (PA)の増加を認めた。 $(\text{Ca}^{2+})_i$ のindicatorとして開発されたquin 2を高濃度で用いると、細胞内遊離 $\text{Ca}^{2+}$ がキレートされ、血小板反応が阻害されることを当教室において既に明らかにしているが(文献2)、quin 2を用いて細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ をキレートした条件下での脂質の変化を検討した。Thr刺激による $^{32}\text{P}$ -TPIの減少と $^{32}\text{P}$ -PAの増加はquin 2により濃度依存性に阻害された。しかし、反応系にあらかじめ1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ を添加した場合には、quin 2による阻害は全く認められなかった。

以上の結果より、thr刺激によるTPI水解は $(\text{Ca}^{2+})_i$ 依存性であると考えられた。さらに、 $(\text{Ca}^{2+})_i$ とTPI水解の関係を検討するために、thr濃度と $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を変化させて、脂質分析とquin 2による $(\text{Ca}^{2+})_i$ の測定を行った。細胞外 $\text{Ca}^{2+}$  1 mM存在下では、低濃度thr(0.03 U/ml)添加により $(\text{Ca}^{2+})_i$ は320 nMまで上昇したが、TPIの水解は全く認めなかった。また、細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 非存在下において、0.5 U/mlのthr添加による $(\text{Ca}^{2+})_i$ の上昇は245 nMであったにもかかわらず、有意のTPI水解が認められた。この結果よりTPI水解は $(\text{Ca}^{2+})_i$ に無関係であり、agonistの濃度に第一に依存しているように思われた。この相反する結果を考察するために、TPI水解がquin 2により阻害された条件下での $(\text{Ca}^{2+})_i$ の測定を試みた。その結果、quin 2で前処理した血小板の $(\text{Ca}^{2+})_i$ は、静止時の $(\text{Ca}^{2+})_i$ (= 100 nM)よりも低下している事、また、thr添加による $(\text{Ca}^{2+})_i$ の上昇も抑制されている事が判明した。

### (総括)

1) ヒト血小板phospholipase Cは内因性DPI, TPIを $\text{Ca}^{2+}$ 依存性に水解し、刺激受容に伴うTPI水解に本酵素が関与している可能性が示唆された。

2) 刺激受容に伴う血小板TPI水解は第一にagonistの量に依存性であり、 $(\text{Ca}^{2+})_i$ の上昇程度とは無関係であった。しかし、少なくとも静止時レベルの $(\text{Ca}^{2+})_i$ はその水解に必要であった。

3) 生理的刺激受容に関連した、phospholipase CによるTPI水解は100 nMすなわち静止時レベルの $(\text{Ca}^{2+})_i$ で認められることから、刺激受容後の $(\text{Ca}^{2+})_i$ 上昇を惹起する反応である可能性が示された。

### 文 献

1. H. HAKATA, et al. : J. Biochem., 92: 929-935, 1982.
2. K. HATAYAMA, et al. : Thromb. Res., (in press). 1985.

## 論文の審査結果の要旨

本論文は、ヒト血小板のpolyphosphoinositides代謝を細胞内遊離Ca<sup>2+</sup>濃度 ((Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub>) と関連して、検討したもので、以下の新しい知見があり、学位論文としての価値があると考ええる。すなわち、刺激受容後の (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> 上昇はphospholipase Cによるphosphatidylinositol-4,5-bisphosphate(TPI) の水解によることが示され、またこの水解反応は静止時レベルの (Ca<sup>2+</sup>)<sub>i</sub> を必要とするが、主としてagonistの量に依存することが明らかとなった。