The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	血小板活性化に伴う細胞内Ca2+濃度上昇と分泌反応，蛋白質燐酸化反応の相互関係に関する研究
Author(s)	畑山，浩毅
Citation	大阪大学，1986，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35414
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

【29】

氏名・(本籍)	畑山浩毅（はたやま こうき）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 7361 号
学位授与の日付	昭和61年5月30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	**血小板活性化に伴う細胞内Ca^{2+}濃度上昇と分泌反応，蛋白質燐酸化反応の相互関係に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 吉田 博　教授 和田 博

論文内容の要旨

［目　的］

刺激受容に伴う血小板のいくつかの蛋白質の燐酸化は，血小板反応調節の一つの重要な機構であると推測されている。しかしその燐酸化の生理的意義はまだ十分には解明されていない。血小板刺激に伴って燐酸化される蛋白質の中で分子量47,000の蛋白（P47）と分子量20,000の蛋白（P20；ミオシン軽鎖と判明している）はそれぞれC－キナーゼとミオシン軽鎖キナーゼ（MLCK）によって燐酸化されることが判明している。C－キナーゼはCa^{2+}とジグリセライドによって活性化され，MLCKはカルモデュリンとCa^{2+}によって活性化される。一方，刺激受容に伴う細胞内遊離Caイオン濃度（〔Ca^{2+}〕i）の上昇が分泌反応などの重要な細胞反応のセカンドメッセンジャーとして注目されるようになり，血小板のような小さな細胞でもquin 2法を用いることにより〔Ca^{2+}〕iの上昇が確認されるようになった。本研究は血小板刺激時におけるこのquin 2法による〔Ca^{2+}〕iの動態と，蛋白質燐酸化反応，分泌反応の間の相互関係を知ることにより，血小板反応における蛋白質燐酸化反応の生理的な役割を探ることを目的とした。

［方法ならびに成績］

血小板は，健常人よりクエン酸採血を行い遠沈して洗浄血小板を得た。血小板刺激剤として，トロンビンとトロンボキサンA_2アナログであるSTA$_2$を用いた。血小板凝集反応及び濃染顆粒よりのATP分泌反応は，洗浄血小板を用いてルミアグリゴメーターにて測定した。〔Ca^{2+}〕iの測定は，既報（文献1）に基づき，洗浄血小板に2.5μMのquin 2 AMを37℃にて25分間incubateの後再び洗浄を行って得たquin 2加血小板を用いて蛍光分光光度計にて測定した。P20，P47蛋白質燐酸化反応は，洗浄血小板

に^{32}Pを60分間37℃にてincubateの後再び洗浄を行い，得た血小板にトロンビンとＳＴＡ$_2$刺激後最大の燐酸化が起こるそれぞれ30秒後，15秒後に反応を止め，加熱後，Laemmliの方法（文献２）に基づきＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い，染色の後オートラジオグラフィーを行いデンシトメーターにて燐酸化の程度を測定した。細胞外Ca^{2+}イオン濃度（〔Ca^{2+}〕e）の設定には，Ca^{2+}－ＥＧＴＡバッファーを用いた。

1. 〔Ca^{2+}〕i，血小板ＡＴＰ分泌反応，Ｐ20，Ｐ47蛋白質燐酸化反応の，刺激剤濃度依存性を検討したところ，トロンビンでは，0.02U／mlよりそれぞれの反応は開始し0.5～１U／mlを最大とする濃度依存性が認められた。ＳＴＡ$_2$では，50nMよりそれぞれの反応は開始し200～400nMを最大とするが反応の起こる濃度内では濃度依存性は余り認められなかった。
2. 〔Ca^{2+}〕i，血小板ＡＴＰ分泌反応，Ｐ20，Ｐ47蛋白質燐酸化反応の相互関係を検討した。トロンビン刺激においては，高濃度（0.5U／ml）では，〔Ca^{2+}〕eを変化させても分泌反応，Ｐ20，Ｐ47燐酸化反応はほぼ同じ程度であるが〔Ca^{2+}〕iは〔Ca^{2+}〕eに伴って変化増大した。これに対して，トロンビン低濃度では，〔Ca^{2+}〕eを変化させた場合，〔Ca^{2+}〕i，分泌反応，Ｐ20燐酸化反応は相関する（$P<0.05$）のに対し，Ｐ47燐酸化反応は相関せずほぼ一定の程度であった。ＳＴＡ$_2$刺激の場合，その至適濃度である200nMで刺激したところ，〔Ca^{2+}〕eの変化に伴って，〔Ca^{2+}〕i，分泌反応とＰ20燐酸化反応は相関する（$p<0.01$）のに対し，Ｐ47燐酸化は相関しなかった。またこの結果はＳＴＡ$_2$の濃度を変えても同じであった。

［総　括］

血小板活性化に伴う〔Ca^{2+}〕i，ＡＴＰ分泌反応，Ｐ20，Ｐ47燐酸化反応の相互関係について検討した。トロンビン低濃度及びＳＴＡ$_2$刺激においては，〔Ca^{2+}〕eを変化させた場合の〔Ca^{2+}〕i，分泌反応，Ｐ燐酸化反応は相関するのに対し，Ｐ47燐酸化は相関しなかった。トロンビン高濃度の場合は，Ｐ20，Ｐ47共，〔Ca^{2+}〕iと相関しなかった。生理的濃度により近いと考えられる低濃度トロンビンやＳＴＡ$_2$刺激において，〔Ca^{2+}〕i，分泌反応，Ｐ20燐酸化が相関し，Ｐ47燐酸化が相関しなかったことより，Ｐ20燐酸化に伴いミオシンＡＴＰase活性が発現し収縮反応に至る経路が血小板反応に重要であると考えられ，Ｐ47燐酸化は血小板活性化とは無関係であると考えられた。

文　献

1. HATAYAMA, K. et al. : Thromb. Res., 38 : 505－512, 1985
2. LAEMMLI, U. K. : Nature, 227 : 680－685, 1970

論文の審査結果の要旨

最近，in vitroの系において，血小板反応におけるＰ20蛋白燐酸化の重要性が指摘され注目されている。本研究はintact plateletを用いたex vivoの系で，生理的条件下でのagonist刺激に対するＰ20蛋白燐酸化がCa^{2+}依存性に起こることをはじめて明らかにしたものである。また，この条件下でのＰ47蛋

白燐酸化はagonist濃度依存性であり，血小板分泌反応とは無関係であることが初めて明らかにされた。学位に価する論文と考える。