

Title	ヒト血小板ミオシン軽鎖のカルパイン依存性燐酸化反応について
Author(s)	梶原, 勇喜
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36529">https://hdl.handle.net/11094/36529</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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名・(本籍)	梶原勇喜
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8264 号
学位授与の日付	昭和63年6月9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	ヒト血小板ミオシン軽鎖のカルパイン依存性リン酸化反応について
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 岡本 光弘 教授 多田 道彦

### 論文内容の要旨

#### 〔目 的〕

血小板はカルパイン ( $\text{Ca}^{2+}$  依存性中性蛋白分解酵素) を豊富に含む細胞の1つであり, 刺激受容にともなってカルパインの基質であるアクチン結合蛋白 (ABP) およびタリン (P-235) の限定分解が観察されている<sup>1)</sup> が, その生理的意義はまだ解明されていない。一方, 刺激受容にともない分子量47,000の蛋白 (47K) はC-キナーゼにより, また分子量20,000の蛋白 (20K; ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) およびC-キナーゼの両者によってリン酸化され, それらのリン酸化が血小板の分泌反応などを調節するものと考えられている。また, MLCKとC-キナーゼはともにカルパインにより限定分解され, C-キナーゼは  $\text{Ca}^{2+}$  非依存性の活性型へ変換すると報告されている。従って, カルパインはMLCKおよびC-キナーゼを分解することにより蛋白リン酸化反応に影響を与え, 刺激受容後の血小板反応を制御する可能性が考えられる。

そこで私たちは, カルパイン阻害剤としてN-ethylmaleimide (NEM) を用い, 20Kリン酸化におけるカルパインの関与について検討した<sup>2)</sup> が, NEMはカルパインのみならず血小板反応に重要なミオシンの  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase 活性なども阻害するため, 本研究では, より基質特異性の高い合成ペプチドカルパイン阻害剤を用い, 血小板蛋白リン酸化反応におけるカルパインの関与について検討を行った。

#### 〔方法ならびに成績〕

##### 1. 各種カルパイン阻害剤の阻害活性の検定

一定量のヒト血小板より精製したカルパイン-Iと種々の阻害剤とを5分間 incubation した後熱変性カゼインを基質として  $200 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  とともに加え20分間反応させた後, 残存するカルパイン活性を

測定した。0.02  $\mu$ カルパイン-I に対する  $ID_{50}$  値は、用いた阻害剤によりそれぞれ NEM : 120  $\mu$ M, epoxy succinate derivative (E-64) : 240  $\mu$ M, 合成ペプチドカルパイン阻害剤 (N-acetyl-Leu-Leu-Methioninal : L-L-M) : 0.12  $\mu$ M であった。

2. ヒト血小板反応に対する阻害剤の作用 血小板カルパイン-I に対し最も強い阻害を示し、その濃度ではミオシン  $Mg^{2+}$ -ATPase 活性を抑制しない 100  $\mu$ g/ml の L-L-M を用いて血小板反応に対するその効果を検討した。血小板 (intact) に対して L-L-M の膜透過性が低いため、ヒト洗浄血小板を超音波破碎して得た破碎血小板 (Homogenate platelets ; H-P) および Knight and Scrutton の方法<sup>3)</sup>にて調整した高電圧処理膜高透過性血小板 (Electropermeabilized platelets ; E-P) を用意した。H-P, E-P では蛋白分解および磷酸化反応に対する L-L-M の影響を調べ、E-P ではさらに血小板濃染顆粒に特異的にとり込まれるアクリフラビンを用い、阻害剤の分泌反応に対する効果の検討も行った。

H-P, E-P は L-L-M と 37°C で一定時間 incubation した後、 $Ca^{2+}$  1 mM と一定量の r-<sup>32</sup>P-ATP を添加 1 分後に反応を停止し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、ABP, P-235 の分解をデントメーターにて測定した。20K, 47K 磷酸化は、電気泳動後オートラジオグラフィーにより判定した。さらに、20K 蛋白はトリプシン処理後、2次元ペプチドマッピングを行い、オートラジオグラフィーにて、MLCK 依存性ホスホセリン部と C-キナーゼ依存性ホスホスレオニン部への<sup>32</sup>P の取り込みを解析した。

H-P, E-P において、 $Ca^{2+}$  添加後 ABP, P-235 蛋白の限定分解および、20K, 47K 蛋白の磷酸化反応が認められた。L-L-M 存在下では、蛋白分解および磷酸化反応の濃度依存性抑制が認められたが、E-P でのアクリフラビン分泌抑制は観察されなかった。20K ペプチドマッピングでは、H-P において、MLCK および C-キナーゼ依存性にそれぞれのペプチド群の磷酸化が認められ、両群の磷酸化は、L-L-M で抑制された。E-P では MLCK 依存性に磷酸化されるペプチド群のみ認められ、L-L-M はこの磷酸化を抑制した。

#### 〔総括〕

今回使用した L-L-M は従来カルパイン阻害剤として用いられてきた薬剤 (NEM, E-64) に比し約 1,000 倍高い活性を示し、カルパインの生理的役割を解明する上で有用な薬物であると考えられた。しかし、この L-L-M は細胞膜透過性が低かったため、H-P と E-P を用いてカルパイン依存性 20K および 47K 磷酸化反応の解明を行った。

H-P, E-P において  $Ca^{2+}$  添加にともなう蛋白磷酸化反応にカルパイン依存性 20K, 47K 磷酸化経路の存在が示唆された。一方、20K は MLCK, C-キナーゼ両者により磷酸化されるが、生理的条件下では MLCK 依存性磷酸化反応のみが作用し、この磷酸化にカルパインが関与していると考えられた。

#### 〔文献〕

1. Fox, J. B. E. et al : J. Biol. Chem. 260, 1060, 1985
2. Kambayashi, J. et al : Biochem. Int. 13, 571, 1987
3. Knight, D. E. and Scrutton, S. C. : Thrombos. Res. 20, 437, 1980

## 論文の審査結果の要旨

本研究は、種々のカルパイン阻害剤を用いて血小板の活性化機構の一つである蛋白磷酸化反応におけるカルパインの関与を明らかにしたものである。合成ペプチドカルパイン阻害剤は、カルパインに対し強い阻害活性を示し、特異性も高く、この合成阻害剤は破碎血小板、高電圧処理血小板におけるアクチン結合蛋白 (ABP) およびタリン (P-235) の限定分解を抑制すると同時に、ミオシン軽鎖 (20K) および47K蛋白の磷酸化も抑制した。以上より、ミオシン軽鎖キナーゼ、C-キナーゼ活性化にカルパインの関与が示唆された。

一方、破碎血小板におけるミオシン軽鎖はミオシン軽鎖キナーゼ、C-キナーゼ両者により磷酸化されたが、より生理的条件に近い高電圧処理血小板でのミオシン軽鎖は、ミオシン軽鎖キナーゼのみにより磷酸化された。

これらの知見は、カルパインの生理的機能を解明する上で重要であり、学位に値する。