

Title	ヒト血小板イノシトールリン脂質のリン酸化調節機構について
Author(s)	須賀, 一普
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36631">https://hdl.handle.net/11094/36631</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>〉</a> をご参照ください。

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

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

Osaka University

【74】

氏名・(本籍)	須 賀 一 普
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8373 号
学位授与の日付	昭和63年11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	ヒト血小板イノシトールリン脂質のリン酸化調節機構について
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞 (副査) 教授 吉田 博 教授 岡本 光弘

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

血小板は生理的刺激の受容に引き続き、形態変化、分泌反応などを惹起し、一次止血機構の主役を演ずる。この刺激受容後の signal transduction にリン脂質、特にイノシトールリン脂質代謝が重要な役割を果たしていることが近年明らかにされてきた。また血小板内 cAMP 濃度を上昇させると、血小板反応が抑制されることはよく知られているが、血小板内 cAMP 濃度上昇に伴うイノシトールリン脂質代謝の変動については十分な検討がなされていない。当教室の上林らは、細胞内 cAMP 濃度を上昇させる薬剤 prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) を非刺激時の血小板に添加すると、細胞内遊離カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) が低下することを明らかにしているが<sup>(1)</sup>、本研究はこれをふまえて、血小板内 cAMP 濃度と  $[Ca^{2+}]_i$  の血小板イノシトールリン脂質代謝に及ぼす影響を検討したものである。

#### 〔方法ならびに成績〕

①非刺激時の血小板イノシトールリン脂質動態におよぼす血小板内 cAMP 濃度および  $[Ca^{2+}]_i$  の影響

クエン酸加ヒト新鮮血より洗浄血小板を調整し、<sup>32</sup>P-リン酸を prelabel あるいは pulse label することにより血小板を標識した。標識血小板に cAMP 濃度を上昇させる薬剤 (dibutyryl cAMP (dbcAMP), PGI<sub>2</sub>) を添加し、37°C にて一定時間反応させた。この反応液に冷却した chloroform/methanol/HCl = 100/200/2 を添加し、さらに chloroform, KCl をこれに添加することにより脂質抽出を行い、薄層クロマトグラフィー (TLC) にて脂質分析を行なった。dbcAMP 添加または PGI<sub>2</sub> 添加により、phosphatidylinositol (PI) の <sup>32</sup>P-labelling は減少し、phosphatidylinositol-4-

monophosphate (PIP) の<sup>32</sup>P-labelling は増加した。この成績は、pulse label 法でも prelabel 法でも同様に認められた。PIP の<sup>32</sup>P-labelling の増加は、血小板PI-kinase 活性に由来するものと推定された。

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 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 Ca<sup>2+</sup> がキレートされ、血小板反応が阻害される<sup>12)</sup>。Quin-2 を用いて細胞内遊離 Ca<sup>2+</sup> をキレートし、血小板リン脂質のリン酸化を検討したところ、quin-2 の濃度依存性にPIP の<sup>32</sup>P-labelling が増加した。

#### ②超音波破碎血小板におけるPI-kinase 活性の測定

超音波破碎血小板にMg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、cAMP、dbcAMPをそれぞれ添加し、(γ-<sup>32</sup>P)ATP存在下にて37°C、一定時間反応させた。脂質抽出、TLCは①の実験と同様におこない、得られたPIPの放射活性をもってPI-kinase 活性とした。PI-kinase はMg<sup>2+</sup>存在下で上昇し、μMレベルのCa<sup>2+</sup>によりその活性は低下した。1μMのdbcAMP添加は、むしろその活性を抑制した。A-kinase のはcatalytic subunit およびその阻害蛋白質は、超音波破碎血小板PI-kinase 活性には何ら影響を与えなかった。

以上の結果より、非刺激時の血小板において、血小板内cAMP濃度上昇および[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>低下が血小板PI-kinaseの活性化を惹起すると推察された。しかし、超音波破碎した血小板におけるPI-kinase 活性の検討により、その活性はcAMP、A-kinaseには支配されず、Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>の濃度により制御されることが判明した。つまり、非刺激時の血小板におけるcAMP濃度上昇によるPIPの<sup>32</sup>P-labellingの増加は、cAMPによりA-kinaseが活性化され、その結果、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が低下したことによりPI-kinaseが活性化されたと考えられた。

#### 〔総括〕

①非刺激時の血小板において、血小板内cAMPを上昇あるいは[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を低下させることにより、PIPの<sup>32</sup>P-labellingの増加、即ちPI-kinase活性の上昇が認められた。

②超音波破碎した血小板のPI-kinase活性は、Mg<sup>2+</sup>により上昇し、微量のCa<sup>2+</sup>により活性の阻害がみられた。

③生理的刺激受容において、phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)が水解されることで[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>が上昇するといわれているが、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>の上昇によりPIP<sub>2</sub>の前駆体であるPIPの合成酵素PI-kinaseの活性は低下した。したがって、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇はPIP<sub>2</sub>の合成を阻害する方向に働き、このnegative feedback機構の一部をPI-kinaseが担っている可能性が示唆された。

#### 〔文献〕

- (1) J. KAMBAYASHI, et al : Thromb. Res., 44 : 439-444, 1986.
- (2) K. HATAYAMA, et al : Thromb. Res., 41 : 760-770, 1986.

## 論文の審査結果の要旨

本研究は、ヒト血小板においてcAMPがイノシトールリン脂質のリン酸化に及ぼす影響を検討したものである。cAMPを増加させると phosphatidylinositol-4-monophosphate のリン酸化が増加するが、この現象の本体は phosphatidylinositol-kinase が細胞内遊離Ca濃度により制御されているためであることを明らかにした。また同 kinase が negative feedback 機構の一部を担っていることも明らかにしている。

以上の知見は血小板反応の理解に重要であり学位に値するものと考ええる。