



Title	Mechanism of Intracellular Calcium Mobilization in Bovine Platelets
Author(s)	於保, 力
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37062">https://hdl.handle.net/11094/37062</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">大阪大学の博士論文について</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)	お	ほ	ちから
学位の種類	於	保	力
学位記番号	理	学	博
学位授与の日付	第	9 0 4 2	号
学位授与の要件	平成 2 年 3 月 24 日		
学位論文題目	理学研究科生物化学専攻		
	学位規則第 5 条第 1 項該当		
	Mechanism of Intracellular Calcium		
	Mobilization in Bovine Platelets		
	(ウシ血小板における細胞内カルシウム動員機構)		
論文審査委員	(主査)		
	教授 中村 隆雄		
	(副査)		
	教授 福井 俊郎	教授 中川 八郎	

### 論文内容の要旨

血小板は血液中のトロンビン等により止血栓を形成する。トロンビン刺激は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を促し、その結果、血小板機能の発現を引き起こす。一般に、イノシトールリン脂質 ( $\text{PIP}_2$ ) の分解産物の一つである  $\text{IP}_3$  が  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位から  $\text{Ca}^{2+}$  を放出する媒体として考えられている。私は、血小板から調製した細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位と考えられる膜分画に  $\text{IP}_3$  を作用させても貯蔵  $\text{Ca}^{2+}$  の約 20% しか放出されないこと、一方、 $\text{PIP}_2$  を作用させると約 80% の  $\text{Ca}^{2+}$  が放出されることを見いだした。このことは  $\text{IP}_3$  以外の  $\text{Ca}^{2+}$  動員機構が存在する可能性を示唆している。私は膜の透過性を高めた血小板を用いて、トロンビン刺激による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員とイノシトールリン脂質代謝に関与する細胞内因子を検索する系を確立し、GTP 結合蛋白質の関与とそのリン酸化による制御を調べた。

膜の透過性を高めた血小板にトロンビンを加えると濃度依存的に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位から最大約  $700 \text{ pmol}/10^8 \text{ cells}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  が放出された。この  $\text{Ca}^{2+}$  放出は細胞外に加えた GTP により促進され、 $\text{GDP} \beta \text{S}$  により抑制された。GTP 結合蛋白質の活性剤である GTP  $\gamma \text{S}$  はトロンビンと同様な  $\text{Ca}^{2+}$  放出を引き起こした。トロンビン、GTP  $\gamma \text{S}$  は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  動員に並行してホスファチジン酸 (PA) 及び  $\text{PIP}_2$  の形成を促進した。このようなトロンビンの作用は  $\text{GDP} \beta \text{S}$  と cAMP により抑制された。他方、GTP  $\gamma \text{S}$  の作用は cAMP により活性化が遅れた。

細胞内 C キナーゼを活性化すると、4 分で最大の半分量に達する遅い速度で約  $700 \text{ pmol}/10^8 \text{ cells}$  の  $\text{Ca}^{2+}$  が細胞内貯蔵部位から放出された。C キナーゼを活性化してもホスホリパーゼ C、 $\text{PIP}$ -キナーゼの活性化は観察されなかった。

細胞内 A キナーゼあるいは C キナーゼを活性化すると GTP  $\gamma \text{S}$  によるイノシトールリン脂質代謝の促

進が抑制された。血小板でイノシトールリン脂質代謝を制御していると考えられているGTP結合蛋白質Giは百日咳毒素でADP-リボシル化されるが、cAMPはこのリボシル化を促進し、一方、TPAは抑制した。このことは、Aキナーゼ及びCキナーゼによりGiの活性が制御を受け、この結果イノシトールリン脂質の代謝が阻害されたと考えることができる。

以上の実験結果から、(1)トロンビンによる細胞内Ca<sup>2+</sup>動員機構はGTP結合蛋白質が関与していること、(2)そのGTP結合蛋白質にはホスホリパーゼCとPIPKキナーゼが共役していること、(3)その酵素活性はGTP結合蛋白質Giのリン酸化により制御を受けていること、(4)ホスホリパーゼCによるイノシトールリン脂質の分解産物であるジアシルグリセロールはGTP結合蛋白質の機能を抑制する一方で、別の経路により経統的Ca<sup>2+</sup>動員を起こすことが示唆された。

### 論文の審査結果の要旨

血小板細胞は止血反応に際し多様な細胞機能を発現する。この発現には細胞内Ca濃度の上昇(Ca動員)が必須である。これまでの研究から、細胞内Ca動員は細胞膜リン脂質フォスファチジルイノシトール三リン酸の加水分解により生ずるイノシトール三リン酸により起こされると考えられている。しかし細胞内Ca動員には他の機構も考えられており、どのような機構がこの反応において血小板細胞内Ca動員に関与しているか特定されていない。その原因として今迄の研究が無細胞系又は無傷細胞を用いて行われており、Ca動員と細胞内脂質代謝活性を平行測定し比較することが出来なかったことがある。

於保君はこの難点を解決するため細胞膜の透過性を高電場処理により高めた細胞を調製し、これを用いて生理的なトロンビン刺激に応答するCa動員を測定する系を確立した。さらにこの系の利点を生かし、トロンビンによるCa動員にGタンパク質が関与していること、またそのGタンパク質がリン脂質代謝の活性化を仲介することを見出した。またこれらの活性がcAMP依存的なタンパク質のリン酸化により制御されることに基き、そのGタンパク質が百日咳毒素によりADPリボシル化される性質をもつものであることを確認した。これらの発見は止血反応につながる血小板細胞内Ca動員機構を解明する上で大きな寄与となるものである。よって本研究は理学博士の学位論文として充分価値あるものと認める。