

Title	Relationship between Ca <sup>2+</sup> influx and inositol 1, 4, 5-trisphosphate formation in human platelets.
Author(s)	上村, 佳央
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37342">https://hdl.handle.net/11094/37342</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)	うえ 上	むら 村	よし 佳	お 央
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9 2 4 9	号	
学位授与の日付	平成 2 年 6 月 7 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	Relationship between $\text{Ca}^{2+}$ influx and inositol 1, 4, 5-trisphosphate formation in human platelets. (ヒト血小板における $\text{Ca}^{2+}$ 流入とイノシトール 1, 4, 5 三リン酸生成との関連性)			
論文審査委員	(主査)			
	教授	森	武貞	
	(副査)			
	教授	岡本	光弘	教授 祖父江憲治

### 論文内容の要旨

#### 〔目的〕

形質膜表面での刺激受容に伴う血小板内遊離  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) の上昇は血小板反応の重要な促進因子である。この  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の動員と細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  の流入が関与している。 $\text{Ca}^{2+}$  動員はホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸がホスホリパーゼ C によって水解されて生じるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) によって主に調節されることが証明されているが、 $\text{Ca}^{2+}$  流入に関しては、血小板細胞膜に膜電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルが存在しないことは報告されているものの、その機構は依然不明である。

近年、T-リンパ球などにおいて、 $\text{IP}_3$  あるいはその代謝産物であるイノシトール 1, 3, 4, 5-四リン酸 ( $\text{IP}_4$ ) が、膜電位非依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの  $\text{Ca}^{2+}$  流入を調節している可能性が報告された。本研究は、血小板反応における  $\text{Ca}^{2+}$  流入について、 $\text{IP}_3$  の生成との関連性からその機構を検討したものである。

#### 〔方法〕

##### (1) 血小板 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の測定および $\text{Ca}^{2+}$ 流入の評価

ヒト新鮮クエン酸加血より多血小板血漿を作成し、これを蛍光  $\text{Ca}^{2+}$  インジケター ( $\text{fura-2 AM}$ ) と  $37^\circ\text{C}$ 、20 分間インキュベートし、 $\text{fura-2}$  負荷血小板を調製した。血小板刺激は  $1\text{ mM CaCl}_2$  あるいは  $1\text{ mM EGTA}$  存在下にて行った。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の定量は、Pollock らの方法によった。 $\text{Ca}^{2+}$  流入量は、Jy らの方法に従い、 $\text{CaCl}_2$  存在下と  $\text{EGTA}$  存在下の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の差 ( $\Delta$ )

$[Ca^{2+}]_i$  を求め評価した。

#### (2) 血小板 $IP_3$ 生成量 ( $\square IP_3$ ) の測定

fura-2 負荷血小板を刺激後 0.2 容の 2.0% 過塩素酸にて反応を停止し、上清を 1.0 N KOH で中和した。これを凍結乾燥にて濃縮後、 $[^3H] IP_3$ 、 $IP_3$ -binding protein (Amersham) と  $4^\circ C$ 、15 分間インキュベートし、binding assay を行うことによって  $\square IP_3$  を測定した。

#### [成績]

- (1) 血小板を低温 ( $10^\circ C$ ) にてトロンビン ( $0.5 \mu/ml$ ) で刺激することによって、 $\Delta [Ca^{2+}]_i$  と  $\square IP_3$  の経時変化を詳細に検討することができた。 $\Delta [Ca^{2+}]_i$  および  $\square IP_3$  は刺激直後から経時的に一致して上昇し、刺激後 60 秒で最大となった。また、種々の濃度のトロンビン ( $0.05 - 2.0 \mu/ml$ ) 刺激後 60 秒における  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  と  $\square IP_3$  の間に強い相関関係を認めた。
- (2) 次に、種々の濃度のトロンビン、ADP、PAF (血小板活性化因子)、 $STA_2$  (トロンボキサン  $A_2$  アナログ)、イオノマイシン ( $Ca^{2+}$  イオノフォア)、アラキドン酸を用い、 $37^\circ C$  にて血小板を刺激し、 $\Delta [Ca^{2+}]_i$  の最大値とその時点での  $\square IP_3$  の関係を検討した。生理的刺激物質であるトロンビン、ADP、PAF、 $STA_2$  では濃度依存性に両者の上昇が認められたが、 $\square IP_3$  に対する  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  の比 ( $\Delta [Ca^{2+}]_i / \square IP_3$ ) は一致せず、PAF ( $50 \text{ nM}$ )、 $STA_2$  ( $50 \text{ nM}$ ) 刺激では、トロンビン ( $0.1 \mu/ml$ )、ADP ( $5 \mu M$ ) 刺激の場合に比べ約  $1/2$  であった。これは  $IP_3$  が、 $Ca^{2+}$  流入を調節している可能性の低いことを示しており、また、イオノマイシン、アラキドン酸刺激では  $\Delta [Ca^{2+}]_i$  が濃度依存性に上昇するのに対し、 $\square IP_3$  の上昇は軽微であったことから、 $Ca^{2+}$  流入が  $IP_3$  生成を誘導しないことが明らかとなった。以上より、血小板の  $Ca^{2+}$  流入と  $IP_3$  生成には、直接の関連性が存在しないと考えられた。
- (3) 血小板を低温 ( $20^\circ C$ ) において種々の濃度のトロンビンで刺激した場合、 $\Delta [Ca^{2+}]_i$  と  $\square IP_3$  は共に抑制され、 $37^\circ C$  の場合と比べ低値となった。しかしながら、 $\Delta [Ca^{2+}]_i$  に対する抑制は  $\square IP_3$  の抑制に比べ弱く、トロンビン ( $0.5 \mu/ml$ ) 刺激ではそれぞれ、 $37^\circ C$  の場合の  $73.1 \pm 3.5\%$ 、 $17.5 \pm 1.9\%$  であった。つまり、トロンビン刺激による血小板の  $Ca^{2+}$  流入が  $IP_3$  生成と比較して低温による抑制を受けにくいと考えられ、トロンビンの  $Ca^{2+}$  チャンネルに対する直接作用が示唆された。

#### [総括]

- (1) 血小板を種々の条件にて刺激し、 $Ca^{2+}$  流入と  $IP_3$  生成の関連性について検討した。
- (2) トロンビン刺激時における  $Ca^{2+}$  流入は、 $IP_3$  の生成と経時的に一致し、両者間に強い相関関係が認められた。
- (3)  $IP_3$  の生成が  $Ca^{2+}$  流入を調節するという機序は、否定的であると考えられ、また、 $Ca^{2+}$  流入のみでは  $IP_3$  の生成が誘導されないことが明らかとなった。
- (4) トロンビン刺激による  $Ca^{2+}$  流入に、 $Ca^{2+}$  チャンネルに対するトロンビンの直接作用が示唆され

た。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、血小板の  $\text{Ca}^{2+}$  流入について、イノシトール 1, 4, 5 三リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) 生成との関連性からその機構を検討したものである。

その結果、血小板の  $\text{Ca}^{2+}$  流入は、 $\text{IP}_3$  の生成に関連した受容体を介して生じていることが明らかとなった。しかしながら、 $\text{Ca}^{2+}$  流入は  $\text{IP}_3$  の生成とは独立しており、アゴニストにて直接活性化される  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルによって生じるものと考えられた。

これらの知見は、血小板凝集反応の発現に必須である  $\text{Ca}^{2+}$  動態の解析に重要であり、医学博士の学位を授与するに値すると考える。