



Title	Characteristics of various synthetic peptide calpain inhibitors and their application for the analysis of platelet reaction
Author(s)	有吉, 秀男
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37737">https://hdl.handle.net/11094/37737</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"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >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	あり	よし	ひで	お
博士の専攻分野 の 名 称	有	吉	秀	男
学 位 記 番 号	博	士 (医	学)	
学位授与年月日	第	1 0 0 1 0	号	
学位授与の要件	平	成 4 年 2 月 4 日		
学 位 論 文 名	学位規則第 4 条第 2 項該当			
	Characteristics of various synthetic peptide calpain inhibitors and their application for the analysis of platelet reaction (種々の合成ペプチドカルパイン阻害剤の検討と、その血小板反応への応用)			
論文審査委員	(主査)			
	教 授	森	武貞	
	(副査)			
	教 授	松沢	佑次	教 授 三木 直正

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

カルシウム依存性中性プロテアーゼ（カルパイン）は、ヒト血小板を初め種々の哺乳類、鳥類の様々な細胞に分布し、その活性は主として細胞内カルシウムおよび内在性阻害蛋白（カルパスタチン）により調節されている。ヒト血小板においては、カルパインの基質として細胞骨格蛋白、酵素、膜糖蛋白などが報告されているが、その生理的役割は未だ不明である。カルパインの生理的作用を検討するには、特異的で、かつ細胞膜透過性を有する阻害剤が有用であるが、現在まではロイペプチンなどの非特異的で細胞膜透過性の低いセリンプロテアーゼ阻害剤が用いられていたため、その結果の解釈が困難であった。本研究は、カルパインに対しより特異性が高く、細胞膜透過性を有する合成ペプチド阻害剤を開発し、その血小板反応に対する影響を検討したものである。

### 〔方 法〕

#### (1) 合成阻害剤のカルパイン特異性の評価

ペプチダルデヒド-Leu-nLeu-Hを骨格とし、そのN末端を種々の置換基にて修飾した合成品を用いて、それぞれのカルパイン、カテプシン、パパイン、キモトリプシンに対する阻害効果、 $IC_{50}$ を求め、ロイペプチン、E-64d (EST) のそれと比較検討した。カルパイン活性はカルシウム依存性カゼイン分解活性として求めた。

#### (2) 血小板内カルパイン阻害活性の評価

ヒト新鮮クエン酸加血より遠心法にて洗浄血小板を調整した。1 mM  $CaCl_2$  存在下に種々の合成

阻害剤と5分間インキュベートした後、 $A_{23187}$  ( $1\mu\text{M}$ )にて血小板を刺激し、SDS-PAGEにてカルパインの基質蛋白である actin binding protein (ABP) および talin (P235)の分解を観察し、その抑制の程度により血小板内カルパイン阻害活性を評価した。

### (3) 血小板活性化反応に対する影響

血小板凝集反応は Lumi-aggregometer を用いて測定した。血小板内カルシウム濃度の変化 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) は、Rink らの方法により、Quin-2 負荷血小板を用いて測定した。血小板イノシトール 1,4,5-三リン酸 ( $IP_3$ ) 生成量は、Uemura らの方法により  $IP_3$  assay kit (Amersham)を用い測定した。トロンボキサン  $B_2$  生成量は、RIA kit (NEN) を用いて測定した。また、トロンボキサン合成系に対する影響は、 $^{14}\text{C}$  標識アラキドン酸を血小板に加え、その分解産物を薄層クロマトグラフィーにて分離、同定することにより評価した。

### 〔成績〕

- (1) 合成阻害剤の中で Benzyloxycarbonyl-Leu-nLeu-H (カルペプチン) が最も特異性が高く、抗カルパイン活性はロイペプチンの約10倍で、抗ババイン活性は10分の1であった。
- (2) カルペプチンは、 $10-30\mu\text{M}$ の低濃度において、 $A_{23187}$  処理血小板の ABP 及び P235 の分解をほぼ完全に抑制した。これに対し、ロイペプチンは高濃度においても無効であった。
- (3) カルペプチンは、低濃度 ( $50\mu\text{M}$  以下) においてはトロンビンおよびコラーゲン刺激による血小板凝集、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇、 $IP_3$  産生、 $TxB_2$  産生に影響を与えなかったが、高濃度 ( $100\mu\text{M}$  以上) においては各血小板反応を濃度依存性に抑制した。
- (4) カルペプチンは、高濃度においてトロンボキサン合成酵素を非特異的に抑制し、 $TxB_2$  の産生は著名に低下した。

### 〔総括〕

- (1) 合成したペプチド阻害剤の中で、カルペプチンはカルパインに対する特異性、ならびに、細胞膜透過性の点で最も優れ、低濃度 ( $10-30\mu\text{M}$ ) において  $A_{23187}$  刺激血小板での ABP、P235 の分解、すなわち、内在性カルパイン活性を抑制した。
- (2) 低濃度カルペプチンは、トロンビンまたはコラーゲン刺激時の血小板凝集、 $IP_3$  の産生、 $[Ca^{2+}]_i$  の上昇に影響を与えなかった。この結果は、カルパインが血小板活性化反応に必須ではないことを示唆している。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、カルパインに対し特異性が高く、かつ intact cell に応用可能な阻害剤を合成し、血小板活性化反応に対する影響を検討したものである。

その結果、合成ペプチド阻害剤（BOC-Leu-nLeu-H，カルペプチンと命名）が得られた。カルペプチンはカルパイン特異性が高く、また、イオノフォア刺激血小板において基質タンパク質の分解を抑制したことより、細胞膜透過性を有すると考えられた。しかし、カルペプチンは、カルパイン特異的な濃度においては、血小板の凝集、細胞内カルシウム濃度の上昇、 $IP_3$  産生に影響を与えなかった。このデータは、血小板活性化反応にカルパイン活性は必須ではないことを示している。

これらの知見は、血小板におけるカルパインの生理的役割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。