

Title	The possible involvement of protein phosphatase 1 in thrombin-induced Ca <sup>2+</sup> influx of human platelets.
Author(s)	村田, 幸平
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38906">https://hdl.handle.net/11094/38906</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	むら た こう へい 村 田 幸 平
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 3 0 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 6 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	<b>The possible involvement of protein phosphatase 1 in thrombin-induced <math>Ca^{2+}</math> influx of human platelets.</b> (トロンビン刺激ヒト血小板のカルシウム流入における1型蛋白脱リン酸化酵素の関与)
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】

血小板反応において、タンパクのリン酸化ならびにその脱リン酸化が重要な反応調節機構であることが示されている。しかしながら、リン酸化酵素（キナーゼ）に比較して脱リン酸化酵素（フォスファターゼ）に関する研究は少なく、その生理的役割は不明である。近年、オカダ酸（OA）、カリクリンA（CLA）、タウトマイシン（TM）など、細胞膜透過性があり阻害スペクトラムの異なるフォスファターゼ（1型及び2A型）に対する特異的阻害剤が発見され、フォスファターゼの血小板反応への関与についての研究が可能となった。著者は、さきに高濃度トロンビン（0.1U/ml）刺激による血小板の凝集、分泌がOA及びCLAによって制御されることを明らかにしているが、その機序は不明であった。本論文は、フォスファターゼ阻害剤（OA, CLA, TM）の効果を比較検討することにより、1型または2A型のいずれのフォスファターゼがこの抑制に関与しているかを明らかにするとともに、マンガンを用いたカルシウム流入機構の解析により、トロンビン刺激血小板反応におけるフォスファターゼ阻害剤の抑制機序を明かにすることを目的とした。

#### 【方法】

- 1) ヒト静脈血より得られた血小板をEGTA 2 mMを含むglucose-HEPES緩衝液にて洗浄し、洗浄血小板浮遊液を調整し、lumi-aggregometerを用いて凝集及びATP放出を観察した。
- 2) Fura-2 AM標識血小板を用いて、種々の励起波長（340, 360, 380 nm）により誘導される蛍光を経時的に記録し、 $Mn^{2+}$ による蛍光の減弱あるいは $Ca^{2+}$ による蛍光の増強を指標に、細胞内カルシウム動態を解析した。

#### 【成績】

- 1)  $Ca^{2+}$  1 mM存在下で、フォスファターゼ阻害剤はトロンビン刺激による血小板凝集およびATP放出を濃度依存的に抑制し、そのIC<sub>50</sub>はCLA < TM < OAの順であった。精製フォスファターゼに対するIC<sub>50</sub>は、1型に対してはCLA < TM < OAの順であったが、2A型に対しては三者ともほぼ等しかった。また、これらの阻害剤はすべて細胞膜透過性を有するため、ここで見られた血小板抑制作用は血小板の1型フォスファターゼの阻害によって惹起されると考えられた。
- 2) これに対し、EGTA 1 mM存在下では上記の抑制は見られず、また $Ca^{2+}$ イオノフォア（A<sub>23187</sub>）刺激による凝集に対しても抑制が見られないことから、細胞外からのカルシウム流入がこの抑制に関与している可能性が考えられ

た。

3) フォスファターゼ阻害剤は、血小板のトロンビン刺激後に生じる  $Mn^{2+}$  流入による fura-2 の蛍光減弱（励起波長 360nm）を濃度依存的に抑制した。励起波長 380nm においては、細胞内貯蔵部位からの  $Ca^{2+}$  動員にはほとんど影響を与えずに  $Mn^{2+}$  流入を抑制した。 $Mn^{2+}$  は  $Ca^{2+}$  と共通のイオンチャンネルを通じて細胞内に流入するとされているため、 $Ca^{2+}$  流入が抑制されていると考えられた。さらに  $Ca^{2+}$  1 nM 存在下、トロンビン刺激後 3 分の時点で、フォスファターゼ阻害剤を添加すると  $Ca^{2+}$  による蛍光が低下した（励起波長 340 nM）。このことは開いているカルシウムチャンネルもフォスファターゼ阻害剤により抑制されることを示している。

以上から、フォスファターゼ阻害剤が血小板カルシウムチャンネルに関連した蛋白の脱リン酸化を阻害することにより、カルシウム流入を抑制していると考えられた。

#### 【総括】

トロンビン刺激血小板におけるカルシウム流入の維持に、1 型蛋白脱リン酸化酵素が正の調節機構として働いていると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、血小板反応における蛋白脱リン酸化酵素（フォスファターゼ）の関与を研究したものである。

申請者はすでに 1 型及び 2 A 型フォスファターゼ阻害剤（オカダ酸（OA）、カリクリン A（CLA）が血小板反応を抑制することを明かにしているが、本論文はさらに新しい 1 型及び 2 A 型フォスファターゼ阻害剤であるタウトマイシン（TM）を加えてそれらの血小板反応抑制のメカニズムを検討した。

申請者はまずフォスファターゼ阻害剤の血小板反応抑制効果が細胞外液のカルシウムに依存していることに着目し、血小板のカルシウム流入をこれらの阻害剤が抑制しているという仮説をたて、カルシウム流入を解析するために、fura-2 AM 標識血小板のマンガン及びカルシウムに対する反応性の相違点を利用した実験系を確立した。さらにこの実験系においてフォスファターゼ阻害剤がトロンビン刺激によるカルシウム流入を特異的に抑制することを見いだしている。またこの抑制の IC50 は CLA < TM < OA であり従来報告されている精製された 1 型フォスファターゼの IC50 の順序に相当することから、血小板の 1 型フォスファターゼの阻害によってカルシウム流入の抑制が引き起こされると結論づけている。

本論文は従来ほとんど研究がなされていなかった血小板の蛋白脱リン酸化酵素の細胞内情報伝達機構における役割に初めて注目し、トロンビン刺激時におけるカルシウム流入に 1 型の同酵素が関与していることを示した点で高く評価でき、学位に値するものとする。