



Title	Translocation of cortactin (p80/85) to the actin-based cytoskeleton during thrombin receptor-mediated platelet activation
Author(s)	小澤, 健太郎
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39840
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	小 澤 健 太 郎 お ざわ けん た ろう
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 3 7 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Translocation of cortactin (p80/85) to the actin - based cytoskeleton during thrombin receptor - mediated platelet activation. (トロンビンレセプターを介する血小板活性化に伴うコルタクチン (p80/85) のアクチン系細胞骨格への移行)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 祖父江憲治 (副査) 教 授 木谷 照夫 教 授 吉川 邦彦

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

血小板活性化に伴う形態変化、放出反応、凝集反応においてアクチン系細胞骨格の再構成は重要な役割を果たす。最近、種々の情報伝達分子が活性化血小板においてアクチン系細胞骨格と相互作用することが明らかになってきている。一方、血小板活性化過程におけるチロシンリン酸化の役割も注目されている。血小板で最も豊富に発現するチロシンキナーゼである src 遺伝子産物は、活性化に伴ってアクチン系細胞骨格と会合することから、チロシンキナーゼ系とアクチン系細胞骨格の機能的関連性が示唆されている。

コルタクチンは src 遺伝子産物の基質として見い出されたが、その後、細胞辺縁部のアクチン線維に一致して局在するアクチン結合蛋白質であることが明らかとなった。又、コルタクチンはカルボキシル末端に SH 3 ドメインを有し、細胞内情報伝達に関与する可能性が示唆されている。本研究では血小板活性化過程におけるコルタクチンとアクチン系細胞骨格の相互作用について検討した。

[方法ならびに成績]

ヒト洗浄血小板をトロンビンレセプターアゴニストペプチド (SFLLRN) にて活性化し、刺激後種々の時点で終濃度 1 % Triton X-100 を含む塩類溶液処理後、遠心分離による細胞内分画を行った。得られた細胞骨格分画 (10,000xg pellet)、膜骨格分画 (100,000xg pellet)、Triton 可溶性分画 (100,000xg supernatant) を抗リン酸化チロシン抗体によるイムノブロットで解析したところ、血小板活性化に伴って多くの蛋白質がチロシンリン酸化を受けた。このうち、分子量 130KDa, 80/85KDa, 60KDa 蛋白質は活性化血小板細胞骨格分画に特異的集積を示した。抗コルタクチン抗体及び src 抗体を用いた免疫沈降実験から、80/85KDa, 60KDa 蛋白質は各々コルタクチンと src 遺伝子産物であることが同定された。

静止血小板でその殆どが可溶性分画に存在するコルタクチンは、トロンビンレセプター刺激直後から速やかに細胞骨格分画への移行が認められ、刺激後 2 分で約 40 % が細胞骨格分画に回収された。血小板の主要なインテグリンである GPIIb/IIIa の機能を阻害し凝集反応を抑制すると、コルタクチンの移行は著しく抑制され、約 3 % が移行するのみであった。サイトカラシン D によりアクチン重合を阻害するとコルタクチンの移行は完全に抑制された。このことから、細胞骨格に移行するコルタクチンには GPIIb/IIIa 依存性及び非依存性の 2 種類のコンパートメントが存在し、いずれの移行にもアクチンの重合が必須であると思われる。GPIIb/IIIa 依存性に細胞骨格分画に移行するコルタクチン

は全体の約40%を占め、血小板凝集反応に関与すると考えられる。GPIIbIIIa 非依存性コルタクチンは全体の約3-4%であり、活性化初期の形態変化や放出反応に関与する可能性が考えられる。

チロシンキナーゼ阻害剤である2,5-methyl dihydroxycinnamateによりコルタクチンのチロシンリン酸化を抑制しても細胞骨格分画への移行は影響を受けないことから、コルタクチンの移行はチロシンリン酸化非依存性に起こると思われる。

静止血小板の低張抽出物を用いてアクチン線維との結合実験を行ったところ、コルタクチンはアクチンと共沈した。この結果からもコルタクチンの細胞骨格への移行はアクチン線維との相互作用を介すると考えられた。

更に、凝集血小板及びフィブリノーゲン上に伸展付着させた血小板を用いてアクチン線維、コルタクチンの二重染色を行い血小板内における両者の局在を検討した。いずれの場合にもコルタクチンとアクチン線維は局在が一致することから両者がin vivoで相互作用することが強く示唆された。

〔総括〕

血小板活性化過程においてコルタクチンはチロシンリン酸化を受けるとともにアクチン系細胞骨格へ移行する。但し、コルタクチンの細胞骨格との相互作用にチロシンリン酸化は直接関係していない。細胞骨格と相互作用するコルタクチンの大部分はインテグリン GPIIbIIIa の活性化を必要とし、血小板凝集反応に関与と思われる。又、一部のコルタクチンは GPIIbIIIa 非依存性に活性化初期に細胞骨格に移行し、形態変化や放出反応に伴うアクチン系細胞骨格の再構成に関与すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、トロンビンレセプターを介する血小板活性化過程におけるコルタクチンとアクチン系細胞骨格の相互作用を解析したものである。コルタクチンは活性化血小板細胞骨格中の主要なチロシンリン酸化蛋白質であることが同定された。細胞骨格に移行するコルタクチンには2つのプールが存在する。マイナープール（総コルタクチンの約3%）は活性化初期のアクチン重合に伴って細胞骨格に移行し、形態変化や放出反応に関与する。これに対し、メジャープール（総コルタクチンの約40%）は活性化後期にインテグリン GPIIbIIIa 依存性に凝集反応に伴って、細胞骨格に移行することが明らかにされた。コルタクチンの細胞骨格への移行はチロシンリン酸化には存在しないことが確認された。又、コルタクチンは凝集血小板及び、フィブリノーゲン上に付着させた血小板においてアクチンと一致して局在する。以上の結果より、コルタクチンは血小板活性化過程におけるアクチン系細胞骨格の再構築に密接に関与することが明らかとなった。

本研究は血小板の生理機能発現に果たす細胞骨格の役割の解明に寄与するものであり、学位に値すると認める。