



## A role of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation : comparison of thrombin and collagen actions

佐野, 公彦

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1983-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0404

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000404>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍) 佐野ひこ(兵庫県)  
 学位の種類 医学博士  
 学位記番号 医博い第376号  
 学位授与の要件 学位規則第5条第1項該当  
 学位授与の日付 昭和58年3月31日  
 学位論文題目 A ROLE OF CALCIUM-ACTIVATED, PHOSPHOLIPID-DEPENDENT PROTEIN KINASE IN HUMAN PLATELET ACTIVATION; COMPARISON OF THROMBIN AND COLLAGEN ACTIONS  
 (ヒト血小板活性化反応におけるカルシウム, リン脂質依存性蛋白質リン酸化酵素の役割; トロンビンおよびコラーゲンの作用の比較)  
 審査委員 主査教授西塙泰美  
 教授杉山武敏 教授松尾保

### 論文内容の要旨

#### 序文

血小板は生体内における止血反応, 血栓形成に重要な役割を果たしているが, 最近動脈硬化の発生にも密接に関連していることが判明しており, 血小板機能の調節について様々な角度からの解析が行われている。なかでも, アラキドン酸・プロスタグランジン系を中心とする脂質代謝が注目されている。すなわち, 血小板にトロンビンやコラーゲンなどの刺激物質が作用すると血小板膜中のリン脂質が急速に分解され, その時生成するアラキドン酸がプロスタグランジン G<sub>2</sub>・H<sub>2</sub>に変換される。これらのプロスタグランジンは血小板中でさらに強力な血小板活性化物質であるトロンボキサン A<sub>2</sub>に変換されるが, 一方血管内皮細胞によって血小板機能抑制作用をもつプロスタグランジン I<sub>2</sub>にも変換されるという極めて巧妙な調節を受けていることが明らかになっていている。

一方, トロンビンやコラーゲンが血小板に作用すると, 血小板の分子量約40,000の蛋白質(以後40K蛋白質と省略する)が著しくリン酸化を受け, この蛋白質リン酸化反応が血小板の放出反応と極めて密接な関連があると言われている。しかし, この40K蛋白質のリン酸化酵素やそのリン酸化反応の制御機構については不明であった。他方, 血小板にトロンビンが作用すると, イノシトールリン脂質(以後PIと省略する)が加水分解を受け, ジアシルグリセロール(以後DGと省略する)が一過性に蓄積することが報告されている。最近高井らによって, このPIの代謝回転と共に活性化される蛋白質リン酸化酵素(以後Cキナーゼと省略する)が発見され, 本酵素が血小板活性化反応に関与していることが示唆された。本論文ではCキナーゼが実際に血

小板活性化反応に重要な役割を果たしていることを明らかにするとともに、トロンボキサンA<sub>2</sub>やプロスタグランジンI<sub>2</sub>による血小板機能の調節機構について解析した。

### 実験方法

血小板はヒトの血液より、Mustardらの方法によって分離調整した。血小板の刺激後のDGの生成、リン脂質の変化およびトロンボキサンB<sub>2</sub>の生成は、血小板をあらかじめ<sup>3</sup>H-アラキドン酸で標識し、刺激後、薄層クロマトグラフィーにより、脂質を分離して定量した。血小板の蛋白質リン酸化反応は、<sup>32</sup>Pで標識した血小板を刺激後、SDS-スラブゲル電気泳動にかけ、そのオートラジオグラムをデンシトメーターにより定量した。セロトニンの放出反応は、<sup>14</sup>C-セロトニンで標識した血小板を刺激後、放出された放射活性を測定した。無細胞系での40K蛋白質のリン酸化反応は、血小板より部分精製した40K蛋白質をラット大脳より精製したCキナーゼによって〔r-<sup>32</sup>P〕ATPの存在下にリン酸化した。40K蛋白質のリン酸化部位は、トリプシンの限定分解によるフィンガープリント法で解析した。

### 実験結果

血小板をトロンビンで刺激すると、まず、PIの加水分解により、DGが生成する。この反応は15秒で最大に達する。これに続いて40K蛋白質のリン酸化、セロトニンの放出が認められる。血小板をコラーゲンで刺激した時も全く同様の現象が観察されるが、その反応時間はトロンビンに較べると長く、1~2分を要した。これらのことから、DGの生成が、40K蛋白質のリン酸化反応、さらにセロトニン放出反応の引き金となっている可能性が強い。すなわちDGによって活性化される蛋白質リン酸化酵素であるCキナーゼが、この反応に関わっていると推定される。そこで、無細胞系でCキナーゼが40K蛋白質を基質としてリン酸化するかどうかを調べたところ、実際にカルシウム、リン脂質およびDG依存性に、Cキナーゼが40K蛋白質をリン酸化した。さらにこのリン酸化部位は、正常血小板をトロンビンやコラーゲンでリン酸化した時のものとほぼ同一であった。すなわち、実際に生体内でCキナーゼが40K蛋白質のリン酸化を介して血小板の放出反応に重要な役割を果たしている可能性が非常に強い。また、プロスタグランジンE<sub>1</sub>やI<sub>2</sub>は血小板中のサイクリックAMPを上昇させることによって血小板の活性化反応を阻害することがこれまでに明らかにされている。他方、トロンビンやコラーゲンが血小板に作用した際にサイクリックGMPの上昇がみられるが、これはfeedback inhibitorとして働いていると考えられている。これらのサイクリックヌクレオチドを上昇させる薬剤は全て、トロンビンやコラーゲンによるDGの生成、40K蛋白質のリン酸化、セロトニンの放出を同程度に抑制した。次にプロスタグランジン合成の阻害剤であるインドメサシンの作用をみると、インドメサシンはトロンビンやコラーゲンによるトロンボキサンの生成を完全に抑制するが、トロンビンによるDGの生成、40K蛋白質のリン酸化、セロトニンの放出はあまり抑制しない。ところが、インドメサシンはコラーゲンによるこれらの反応を約50%抑制する。これらの解析結果から、コラーゲンによる血小板活性化反応においては、トロンビンの場合よりもトロンボキサンA<sub>2</sub>の関与が大きいと判断される。巨大分子であるコラーゲン線維に血小板が結合すると、結合した血小板よりトロン

ボキサンA<sub>2</sub>が放出され、さらに他の血小板を活性化するという增幅機構になっていると考えられる。そしてまた、トロンボキサンA<sub>2</sub>もDG-Cキナーゼ系を介して働いていることが示唆される。

## 考 察

血小板の機能調節機構は多くの疾患および病態に関連しており、その解明は臨床上においても極めて重要である。本論文では、血小板の刺激応答反応において、リン脂質の代謝と蛋白質リン酸化反応、すなわちDG-Cキナーゼ系が重要な役割を果たしていることを明らかにした。生体内において血小板にトロンビンやコラーゲンが作用するときには、このDG-Cキナーゼ系を中心としてトロンボキサンA<sub>2</sub>による正の増幅機構およびプロスタグランジンI<sub>2</sub>による負の制御機構が互いに関連し合って巧妙な調節を受けているのである。また、血小板由来の成長因子は動脈硬化の発生に重要な役割をしているが、この作用にもDG-Cキナーゼ系が働いていることが示唆されており、今後、さらにこの系が多くの疾患に係わっていることが明らかになると思われる。

## 論文審査の結果の要旨

血小板の機能、ことにトロンビンやコラーゲンによるセロトニン放出反応や凝集反応の機構は、古くから循環器、血液学の領域のメインテーマの一つとして数多くの研究がおこなわれてきた。殊に最近ではトロンボキサンやプロスタサイクリン等のアラキドン酸代謝物質による血小板と血管壁との相互連繋による機能の活性化とその抑制機序の解析が注目されている。本研究者はこの様な状況の中で、特にトロンビンとコラーゲンによる血小板活性化反応の生化学的基盤の解明を目指し、これらの物質が血小板の形質膜受容体に作用して後、これに引きつづいて認められる秒単位の反応を解析し、血小板の刺激がセロトニンの放出へ連るシグナルの伝達機構の基本構築を解明することができた。

トロンビンやコラーゲンが血小板形質膜の受容体に作用すると、形質膜を構成している磷脂質の中でイノシトール磷脂質が急速に分解をうけてアラキドン酸を含有するジグリセリドが一過性に産生される。このジグリセリドが外界シグナルの情報伝達物質の役割を果して、ある種の蛋白質磷酸化酵素（Cキナーゼ）の触媒活性を発揮させ、その働きを介して血小板の機能が現われる仕組みである。換言すればトロンビンやコラーゲンはいづれも血小板の形質膜イノシトール磷脂質のきわめて迅速な分解をひきおこし、Cキナーゼによってその情報が増幅拡大されており、この酵素による血小板の蛋白質、特に40K蛋白質の磷酸化反応がセロトニン放出反応と共に働くとの結論に達した。

ホルモンや神経伝達物質によるイノシトール磷脂質の急速な分解は約30余年前、アセチルコリンについて初めて観察された現象であるが、この現象の受容機構における意義は今日まで莫大な研究にもかかわらず不明であった。本研究は血小板の活性化反応の中で、外界シグナルの伝達増幅機構の解明を通じて、形質膜における磷脂質の分解が、細胞内部の機能調節に連結していることを実験的に証明したものであり、その生理学上の意義は非常に大きい。

トロンビンとコラーゲンの作用機構は基本的には同じであるが、今回、アラキドン酸からトロ

ンボキサン生成反応を阻止する実験をも併せて実施した結果、コラーゲンの作用にはトロンボキサンの関与が強く、血小板活性化の活性化連鎖反応の重要性を指摘している。

このように本研究は生理活性物質による血小板の活性化反応の生化学的基盤を解析し、ことに生体膜の受容機構について新たな概念を提出し、これを実証したものとして価値ある集積と認められる。よって本研究者は、医学博士の学位を得る資格があると認める。