



Synergistic functions of phorbol ester and calcium in serotonin release from human platelets

山西, 淳司

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1985-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0507

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000507>

※ 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)	やまにしじゅんじ 山 西 淳 司 (兵庫県)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第444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60年3月31日
学位論文題目	SYNERGISTIC FUNCTIONS OF PHORBOL ESTER AND CALCIUM IN SEROTONIN RELEASE FROM HUMAN PLATELETS (血小板セロトニン放出反応に対するフォルボールエステル とカルシウムイオンとの相乗的作用)

審査委員	主査 教授 西 塚 泰 美
	教授 福 崎 恒 教授 杉 山 武 敏

論文内容の要旨

序 文

血小板は血栓形成や止血反応のみならず、動脈硬化や血管攣縮の発生等、生体反応に深く関与することが明らかにされており、その活性化機構については多くの研究が行われている。中でも、 Ca^{2+} 濃度の上昇は血小板活性化の引き金の一つとして働いており、血小板にトロンビンやコラーゲンが作用すると急速に Ca^{2+} が細胞質内へ動員される。 Ca^{2+} は種々の Ca^{2+} 受容蛋白質を活性化するが血小板においては特に calmodulin の機能が詳細に解析されている。 Ca^{2+} によって活性化された calmodulin は myosin light chain kinase を介して分子量約20,000の myosin light chain (以後20K蛋白質と省略する)のリン酸化を促進することが知られている。この際、分子量約40,000の蛋白質(以下40K蛋白質と省略する)が著しくリン酸化され、この蛋白質のリン酸化が血小板の放出反応と極めて密接な関連があると考えられている。一方、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、当研究室で見出された Ca^{2+} ・リン脂質依存性の蛋白質リン酸化酵素(Cキナーゼ)はこのPIの代謝回転に共役して活性化され、40K蛋白質のリン酸化を通して血小板の活性化に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。また、発癌プロモーターであるTPAが無細胞系でCキナーゼを直接活性化させることが見出された。そこで本論文ではTPAと Ca^{2+} イオノフォアA23187とが、各々選択的にCキナーゼの活性化と Ca^{2+} 動員を惹き起こすことを明らかにし、血小板の放出反応においてCキナーゼの活性化と Ca^{2+} 動員とが互いに相乗的に作

用することを示した。本研究は生体内における発癌プロモーターの作用点を示し、かつ、その生物学的な意義をはじめて解明したものである。

実験方法

血小板はヒトの血液より Baenzinger and Majerus の方法によって分離調整した。血小板の蛋白質リン酸化反応は ^{32}P で標識した血小板を刺激後、オートラジオグラムをデンストメーターにより定量した。血小板の刺激後の DG の生成、リン脂質の変化は ^3H -アラキドン酸を用いて標識し、刺激後、薄層クロマトグラフィーにより脂質を分離した後定量した。セロトニンの放出反応は、血小板を ^{14}C -セロトニンを用いてあらかじめ標識し、刺激後に放出されたその放射能を測定した。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 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 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により刺激すると PI の加水分解により DG が生成し、続いて 40K 蛋白質のリン酸化、セロトニンの放出反応が認められた。一方、TPA により刺激すると 40K 蛋白質のリン酸化は認められたが PI の代謝回転は促進されず DG は生成されなかった。これらの 40K 蛋白質のリン酸化反応が C キナーゼによるか否かを調べる目的から、リン酸化部位を比較検討した。その結果、トロンビン刺激後に認められる 40K 蛋白質のリン酸化部位は TPA 刺激に際して認められるリン酸化部位と同一であった。このリン酸化部位は無細胞系において C キナーゼによってリン酸化される部位とも一致した。すなわち、実際にトロンビンや TPA による 40K 蛋白質のリン酸化は C キナーゼを介したものと結論される。なお、この際トロンビン刺激により 40K 蛋白質と同様に 20K 蛋白質も著しくリン酸化されるのに対して、TPA 刺激によっては 40K 蛋白質は著しくリン酸化されるにもかかわらず、20K 蛋白質はほとんどリン酸化されなかった。しかし、 Ca^{2+} イオノフォアである A 23187 刺激によっては逆に 40K 蛋白質はほとんどリン酸化されないが 20K 蛋白質は著しくリン酸化された。これらの結果より、TPA と A 23187 とは選択的に C キナーゼの活性化と Ca^{2+} の動員とをそれぞれ惹き起こすものと考えられる。TPA による 40K 蛋白質のリン酸化反応は A 23187 の添加によって影響されないのに対して、TPA によるセロトニン放出反応は A 23187 によって著しく相乗的に促進された。なお、A 23187 のみではセロトニンは放出されない。これらの事実から、血小板の放出反応には C キナーゼ系と Ca^{2+} 受容蛋白質系の両系の活性化が必要であり、両系は互いに協同的に働いていると結論される。次に、血小板抑制作用を有する種々の薬物の効果を調査した。トロンビンによる 40K 蛋白質のリン酸化反応に対して、 PGE_1 、DBc AMP、SNP、8 Bc GMP はすべて抑制的に作用した。しかし、TPA による 40K 蛋白質のリン酸化に対してはこれらの薬物は抑制的に作用しなかった。

考 察

血小板の活性化機構は血栓症や動脈硬化症の成因など種々の疾患に関連しており、その解明は極めて重要である。本論文では、C キナーゼ系と Ca^{2+} 受容蛋白質系の両系の活性化が血小板の放出反応に必要であることを明らかにした。TPA によって C キナーゼを活性化するのみでは血小板の放出反

応は不十分であり、また、A 23187 による Ca^{2+} の動員のみでも血小板は機能を発揮しない。しかし、両者の協同作用によって血小板の活性化反応は促進されることより、これらの二つの情報伝達系は互いに相乗的に働いていると結論される。トロンビン刺激による40K蛋白質のリン酸化が、cAMPやcGMPによって速やかに阻害を受けるが、TPAによる40K蛋白質のリン酸化はcAMPやcGMPによって阻害されない。これはTPAがPIの代謝回転の促進と共役せずに直接Cキナーゼを活性化させて40K蛋白質のリン酸化を惹き起こしている事に一致している。このように、血小板機能はCキナーゼ系および Ca^{2+} 受容蛋白質系による正の制御機構とcAMPによる負の制御機構が互いに関連しており、二つの受容体機構により調節を受けている。TPAが血小板以外の細胞においてもCキナーゼを直接活性化しているか否かは現在結論され得ないが、TPAの受容体がCキナーゼと同一であるとの報告が相ついでおり、発癌プロモーションをはじめとするTPAの多彩な生理作用の多くはCキナーゼを介している可能性が強く示唆される。特に、TPAによるCキナーゼの活性化がcAMPやcGMPによるフィードバック阻害を受けないこと、また、TPAが安定物質であり形質膜に長時間存在してCキナーゼを活性化し続けると考えられること等、TPAの細胞増殖や分化に与える作用がCキナーゼを介している可能性が高い。

論文審査の結果の要旨

フォルボールエステルは、古くから強力な発癌のプロモーターとして知られ、その作用機構が問題とされてきた。種々のトレーサー実験から、フォルボールエステルは、細胞膜にある仮想のレセプターを介して、その多彩な作用を発揮することがあきらかであったが、その作用の本質は解明されていなかった。1982年、当教室において、フォルボールエステルの作用点がprotein kinase cであることが発見され、それを契機としてこの発癌のプロモーターの作用と、その機構が急速に進められるようになったが、本学位申請者の提出した論文は、フォルボールエステルの作用機構解明の初期、その緒をなした研究である。

当初、フォルボールエステルは試験管内でprotein kinase cを直接活性化することが見出されたが、この現象を細胞内において証明し、細胞機能の活性化との関連を確立する必要があった。本研究では、血小板がフォルボールエステルに反応して、セロトニンを放出する事実に着目し、血小板内におけるprotein kinase cのフォルボールエステルによる活性化、つづいてそのセロトニン放出における意義をあきらかにするべく企てている。

血小板を $[^3\text{H}]$ アラキドン酸、 $[^{32}\text{P}i]$ 、 $[^3\text{H}]$ セロトニン等で標識し、形質膜成分の動き、protein kinase cの活性化反応、セロトニンの放出等を多角的に検索し、フォルボールエステルが、通常の生理的なレセプターとは無関係に細胞膜磷脂質の二重層に入り、protein kinase cを活性化している根拠を得た。この際、protein kinase c活性化の結果として血小板内では分子量約4万ダルトンの蛋白質が強くリン酸化される。種々の解析の結果として、フォルボールエステルの作用点は主としてprotein kinase cを介しているとの結果が得られている。しかし、フォルボールエステルのみでは、血小板

の機能の活性化は充分ではなく、カルシウムイオンの動員が必要とされることも解明された。

通常、細胞の機能の活性化や、増殖の促進をもたらす種々の生理活性物質は、ジアシルグリセロール生成による protein kinase c 活性化とカルシウムイオンの動員をもたらすが、本研究では、この2つの外界シグナルの伝達経路の中でフォルボールエステルは、protein kinase c の恒及的な活性化をもたらすことがあきらかとなった。

このように、本研究では、永らく不明であった、フォルボールエステルの作用点を解明するとともに、その細胞応答における役割をあきらかにしたものであり、今日の発癌のプロモーションの研究にインパクトを与えたものとして価値ある業績と認める。

よって、本研究者は、医学博士を得る資格があると判定する。