Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Properties of protein kinase C subspecies in human platelets

佃, 正憲

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1990-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲0881
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000881

※ 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。

〔 83 〕

氏名・（本籍）	佃（つくだ） 政（まさ） 憲（のり） （兵庫県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第670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	平成2年3月31日
学位論文題目	PROPERTIES OF PROTEIN KINASE C SUBSPECIES IN HUMAN PLATELETS （ヒト血小板プロテインキナーゼC亜種の特性に関する研究）
審査委員	主査 教授 西塚泰美 教授 河野通雄 教授 廣畑和志

論文内容の要旨

緒言

細胞内情報伝達の主軸を成す protein kinase C (PKC) には，現在7種（α，β I，β II，γ，δ，ε，ζ）の亜種が存在し，それぞれが酵素化学的性質，組織，細胞内分布の点においても異なった特徴を備えており，それぞれ固有の機能を発現する可能性が生じてきた。ラット脳PKCはハイドロキシアパタイトによるカラムクロマトグラフィにより type I，type II，type IIIの3つの活性ピークに分離され，type I はγ PKCであり，type II は同一遺伝子よる alternative splicingにより生ずるβ I，β II PKCの混合であって，type III はα PKCである事が明らかになっている。Type I PKCは脳神経系でのみ発現され，type II PKCは限られたいくつかの組織内に，type IIIはあらゆる組織，培養細胞系において認められる。

ヒト血小板刺激時の凝集，放出反応に伴なって分子量47,000の蛋白質（P47）のリン酸化が認められる。P47はすでにアミノ酸配列も明らかとなっているが，これまで知られている蛋白質リン酸化反応は，PKCの活性化によることがTPAや膜透過性のジアシルグリセロールを用いた研究によりすでに明らかとなっている。

本研究は血小板PKCの亜種の存在を明らかにし，生理的基質であるP47のリン酸化を指標とし，血小板放出反応惹起時に機能するPKC亜種の決定を目的としている。

実験方法および結果

1. PKC及びP47の精製

Baenziger and Majerusの方法により得られたヒト血小板を，0－4℃下で，homogenate buffer

内で sonication により破壊し，100,000gで60分間遠沈した。その上清を高速液体クロマトグラフィ（FPLC）に接続したTSK DEAE-5PWカラムに流し，buffer Aで平衡化した後，0－400mMのNaClで溶出した。1mlずつの分画に分け，それぞれについてPKCとP47の存在を確かめた。PKCの存在は，H_1ヒストンを基質としたリン酸化活性，P47はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により確かめた。PKCは9から12分画に，P47は14から18分画に溶出された。得られたPKC分画は，FPLCに接続したハイドロキシアパタイト（HA）カラムに流し，buffer Bで平衡化した後，20－215mMのリン酸化カリウムバッファーで溶出した。これによりPKCは2つのピークにわけられ，1番目のピークを peak a，2番目を peak bと呼ぶことにした。peak aとpeak bは，それぞれ，ラット脳PKCの typeⅡ（41－50分画）と typeⅢ（62－70分画）に対応する位置に溶出された。

2. Immunoblot 法による血小板PKC亜種の解析

PKC分画を，SDSポリアクリルアミドゲルに電気泳動し，ニトロセルロース膜に移した。これに特異抗体を反応させ，アビジン－ビオチン－ペルオキシダーゼ法による発色させた。用いた抗体は，PKCのアミノ酸配列の一部と同じ配列の合成ペプチドに対して作った抗体である。Peak aと peak bは，CKpC1 β-a抗体に反応し，しかも，その分子量は約80kDであった。このCKpC1 β-a抗体は，α，βⅠ，βⅡ，γに対して反応するが，δ，ε，ζ-PKCに反応しない。また，peak aは，CKpV1 β-a抗体に反応したが，peak bは反応しなかった。このCKqV1 β-a抗体は，β（βⅠとβⅡ）に対して特異的に反応する抗体である。

3. 血小板PKCの酵素化学的性質

PKCの酵素活性は，［γ-^{32}P］ATPからH1ヒストンへの^{32}Piの取り込みによって測定した。これに，$CaCl_2$，ホスファチジルセリン（PS），ジオレイン（CD），アラキドン酸（AA）の濃度を変えて動力学的性質をみた。ヒト血小板 peak bは，ラット脳typeⅢと殆ど同じ性質を有するが，peak aは，ラット脳typeⅡとは全く異なった性質を示した。この peak aは，Ca^{2+}には依存せず，PS，DOに部分的に反応した。又，peak aの遊離AAに対する反応は，脳固有のtype Ⅰとよく似ていた。このAAによるpeak aの活性化には，Ca^{2+}やPS，DO依存性はみられなかったが，更に高い濃度のAAでは阻害された。一方，peak bは，typeⅡ，typeⅢと同様に，AAの濃度に依存して活性化された。

4. P47蛋白のリン酸化

TSK DEAE-5PWカラムにより部分的に精製されたP47蛋白を，PKCによりリン酸化し，^{32}Piの取り込みをオートラジオグラフィにより測定した。ヒト血小板PKCとラット脳PKCはすべて，P47蛋白をリン酸化することができた。また，その活性化の様式はH1ヒストンを用いたリン酸化反応と同様であった。

考　察

ヒト血小板には，α構造のアミノ酸配列をもつtypeⅢ PKCが多く存在すると考えられる。この

亜種の他にもう一つ別のの亜種が，HAカラムにより，βⅠ，βⅡ構造をもつtypeⅡ PKCと同じ分画に溶出される。この血小板の酵素 peak aは，ラット脳PKCのアミノ末端に対する抗体により認識されるが，typeⅡ PKCとははっきり異なった性質を示す。この酵素とδ，ε，ζ-PKCとの関係は明確になっていない。又，この血小板 peak aが，いくつかのPKC亜種の混合であるという可能性も否定できない。

この新しく見られた血小板酵素によるP47蛋白のリン酸化は，Ca^{2+}の存在なしで認められ，PS，DOに部分的に依存している。しかしながら，一般に，in vitro でのPKCのCa^{2+}や脂質への依存性は，基質によって様々である。例えば，プロタミンを基質とすると，activator は必要としない。又，in vitro では，生理学的な基質以外でもリン酸化の基質となることができる。このため，in vivo での，PKC亜種それぞれの activator や生理学的基質の解析は現在，非常に困難である。また，細胞内での酵素の局在化と同様に，基質の局在化がある可能性も存在する。血小板内で，どのPKC亜種がP47蛋白をリン酸化しているのかは，今後の問題である。

論文審査の結果の要旨

血小板はトロンビン，コラーゲン等の刺激により凝集反応，放出反応等の応答を示し，その分子機作の解明は古くからの問題である。1980年前後に，この機構として血小板の受容体刺激によってイノシトール燐脂質から生成するジグリセリドとイノシトール燐酸，ことにIP 3 の両者がセカンドメッセンジャーとなり，protein kinase C（PKC）経路とカルシウムイオン経路がともに血小板の活性化に必要であることが確立された。その後の数年間に，PKCは単一の酵素ではなく，多数の分子種から構成されていることが，いわゆる分子クローニング，及び酵素化学的手法から解明され，血小板におけるPKCの分子種の解析と，どの分子種のPKCが関与するかが問題となってきた。

本学位申請者は，この課題の解決を目的として，ヒトの血小板内のPKCについて酵素化学，及び免疫化学的解析を行った。その結果，血小板にはα-sequence をもつPKCと共に，他の組織には未だ見出されていない形のPKCがほぼ同量存在していることを見出した。この血小板に存在する新しい形のPKCはカルシウムイオンに対する感受性がなく，δ，ε，ζ型PKCと類似しているが，ジグリセリドのみでなく，アラキドン酸によって強い活性の促進を受ける。血小板内におけるPKCの生理的な作用点はカルモジュリンを結合する47K蛋白質であることが最近証明されているが，上述のα型PKC及びアラキドン酸で活性化されるタイプのPKCはいずれも共に47K蛋白質を強く燐酸化しうる。したがって，血小板の活性化反応にはイノシトール燐脂質の分解によるジグリセリドのみでなく，phospholipase A2や，diglyceride hipase 等によるアラキドン酸，及びその代謝産物もまたセカンドメッセンジャーとして働いている可能性が生まれてきた。

本研究にはこのように血小板の活性化反応という古くからの生理現象の分子機構の理解に，新しい視点を開拓したものとして価値ある業績と認める。よって医学博士の学位をうる資格があると認める。