

氏 名	よし おか あきら 吉 岡 亮
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2433 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学位論文題目	Identification of Protein Kinase Ca as an Essential, but Not Sufficient, Cytosolic Factor for Ca^{2+} induced α - and Dense-core Granule Secretion in Platelets (透過型血小板を使った α 顆粒および濃染顆粒の放出反応解析系の確立と、必須細胞質因子、プロテインキナーゼ Ca の同定)
論文調査委員	(主 査) 教 授 内 山 卓 教 授 淀 井 淳 司 教 授 北 徹

論 文 内 容 の 要 旨

止血や血栓症で必須の働きをする血小板は、細胞外部からの様々な刺激によって活性化され、粘着、凝集等の機能を発揮すると共に、 α 顆粒、濃染顆粒などの分泌顆粒を放出する。ところが、血小板はサイズが小さく、細胞核もないので外部からの蛋白・遺伝子導入等が困難なため、活性化機構とそれに関わる物質はよくわかっていない。そこで我々は形質膜を透過型にした血小板を使って α 顆粒と濃染顆粒の放出を同時に解析する実験方法を確立した。この解析系を用いて顆粒放出に必須の細胞質因子を精製、同定するとプロテインキナーゼ Ca (PKCa) であった。さらにこの蛋白が単独では顆粒放出活性がないことを明らかにした。

形質膜透過型血小板を使った解析系の確立：

ストレプトコッカス属の産生する streptolysin O(SLO) は4℃で細胞膜のコレステロールと結合し、温度を上昇させて初めて膜に孔をあける。洗浄血小板と SLO を4℃でインキュベートしたあと形質膜に結合しなかった SLO を洗浄して取り除き、細胞内部環境条件にしたバッファー中で30℃にすると、細胞内部の膜に障害を与えずに形質膜だけを透過型に出来る。孔は径30nmで小分子や蛋白は自由に行き来するが小胞などの構造物は細胞内にとどまる。顆粒放出反応は細胞内 Ca イオン濃度の上昇を引き金とするが、透過型血小板では細胞内外の Ca イオン濃度が等しくなるので、 Ca 塩を加えることで刺激とした。そのため本研究は細胞内 Ca イオン濃度上昇以後の顆粒放出反応についての解析である。顆粒放出活性は、放出された α 顆粒内の von Willebrand 因子と、濃染顆粒内にあらかじめ取り込ませておいた [^3H] セロトニンを測定することにより解析した。

顆粒放出に必須の蛋白質を精製し同定すると PKCa であった：

透過型血小板は拡散により細胞質が希釈されるため、外部から細胞質を補充しなければ Ca 塩で刺激しても顆粒放出は起きなかった。これは細胞質中の必須因子の存在を意味する。試みた数種類の種や細胞の細胞質もすべて α 、濃染両方の顆粒放出反応を起こせた。そこで手に入れやすいラット脳の細胞質を使って必須因子を精製した。両顆粒の放出活性を指標にして、順に硫酸アンモニウム沈澱、mono-Q, mono-S, ゲル濾過, resource PHE で細胞質を分離してゆき最終的に SDS-PAGE 上で一本のバンドにまで精製した。活性の測定は、複数の必須因子の存在を想定し、少量の細胞質を加えた状態でおこなった。

両方の顆粒分泌を促進する精製蛋白は部分アミノ酸配列決定により PKCa と同定した。PKC 阻害剤 G6805 は両顆粒放出を抑制し、また精製した分画から PKCa を免疫沈降させて除去すると両顆粒の放出活性が失われるので PKCa が両顆粒の放出に必須の因子であると確認できた。活性化血小板で PKC によりリン酸化されることがすでに示されている JAM (junctional adhesion molecule) のリン酸化部位を持つ領域ペプチドをこの系に加えると、精製した分画は効率よく JAM をリン酸化したので、加えた PKCa は活性化していると考えられた。またヒト血小板の細胞質をゲル濾過で分離すると分

画の顆粒放出活性と含まれる PKC α 濃度が並行したので、ヒト血小板でも PKC α は重要な制御因子であることが示唆された。

一方、精製した PKC α を単独で透過型血小板に加え Ca 塩で刺激しても顆粒放出を起こすことはできなかった。すなわち PKC α は十分因子ではなく、第 2、第 3 の必須細胞質因子の存在が示唆された。今後この因子を同定してゆく予定である。

血小板は止血や動脈硬化の最終段階である血栓症の発症に重要な役割を果たし、循環器領域でも注目されている。血小板機能の重要性にも関わらず、核のない血小板には分子生物学が応用し難い制約があり、研究は薬理学的解析が主であった。そのため血小板活性化に伴う凝集や顆粒放出のメカニズムは未解明のことが多い。吉岡らは streptolysin O により形質膜を透過型にした血小板を用いて、Ca 塩を刺激として顆粒を放出させ、 α 顆粒 (von Willebrand factor) と濃染顆粒 (serotonin) の放出を同時に解析するアッセイ系を確立した。

透過型血小板は外から細胞質を加えないと両顆粒とも放出が起きなかったので必須因子の存在が示唆された。ラット脳画分より必須因子を精製し部分アミノ酸シーケンス決定により PKC α と同定した。PKC 阻害剤や、PKC α を抗体で加える細胞質より除去することは顆粒放出を抑制した。しかし PKC α は少量の細胞質の存在下で両方の顆粒放出を促進したが、PKC α 単独では放出を起こさなかったので、PKC α は十分因子ではなく別の必須分子が存在することが示唆された。

以上の研究は、血小板活性化のメカニズムを解明する新たな手法を確立し、さらに血小板顆粒放出に関わる PKC α の役割を解析したもので、血栓症の予防・治療に寄与するところが多い。したがって本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成13年12月6日実施の論文内容とそれに関した試問を受け、合格と認められたものである。