

[別紙1]

トロンビンによる血小板活性化時の細胞内カルシウム濃度の制御機構

指導教官 木村 哲教授

内科学専攻・平成9年入学

学生証番号 77433 学生氏名 東郷 眞子

要旨本文

多くの細胞において、細胞内カルシウム濃度の変化は様々な細胞の生理機能の制御に重要な役割を演じている。ヒト血小板においても、種々の活性物質による、接着、形態変化、凝集あるいは放出などの反応惹起には、細胞内カルシウム濃度の上昇が関与している。アゴニストが受容体に結合すると、細胞外カルシウムの細部内への流入と細胞内カルシウム貯蔵庫からのカルシウムの細胞質への放出によって細胞内カルシウム濃度は上昇する。その後、細胞質内のカルシウムは細胞外へ排出され、あるいは細胞内貯蔵庫に再度取りこまれ、細胞内カルシウム濃度は活性化前の値に戻る。受容体へのアゴニストとの結合が細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こすメカニズムについては、様々な側面が解明されつつあるが、上昇したカルシウム濃度が活性化前の値に戻るメカニズムについて、特にアゴニストの受容体への結合がいかに関与しているかについて

は、研究されていないので、下記の研究を行った。

トロンビンは生体内で最も強力な血小板活性化物質である。細胞外カルシウムを 0.5 mM EGTA でキレートして除去した条件下で、1 U/ml のトロンビンを投与すると、細胞内カルシウム濃度は 35 ± 8 nM (n=5) から 300 ± 18 nM (n=5) に急速に増加し、その後緩徐に減少して 3 分以内に投与前よりやや高いレベルに到達する。この急速な増加と緩徐な減少は、より低濃度のトロンビンでも観察されるが、トロンボキサン A₂ アナログ U46619、ADP、platelet activating factor などの投与時には認められずトロンビンに特徴的である。6 μ M の wortmannin で 37 °C 10 分間前ふ置した後にトロンビンを投与すると、初期の細胞内カルシウム濃度の上昇には影響すること無く、これに引き続く細胞内カルシウム濃度の減少を促進する事ができる。この促進効果は wortmannin が phosphatidylinositol 3-kinase を抑制する濃度では認められず、ミオシン軽鎖リン酸化を抑制する有効濃度で、wortmannin 濃度依存性に認められた。

血小板細胞内 IP₃ 濃度は 1 U/ml のトロンビン投与によって、無投与時の約 2.8 ± 0.6 pmol/10⁸ 個血小板から 5 秒以内に 11.8 ± 2.2 pmol/10⁸ 血小板に増加し、10 秒以内に 4.7 ± 1.4 pmol/10⁸ 血小板に減少する。血小板を wortmannin で 10 分間前ふ置した後にトロンビンを投与すると、IP₃ は前処置しなかった時とほとんど同様の値に増加し、ピーク時の IP₃ 濃度は wortmannin での前処置でほとんど影響を受けないが、トロンビン投与 20 秒以降の IP₃ 濃度のみは wortmannin 濃度依存性に減少する。

トロンビン投与後の PLC 活性は、細胞を細胞骨格画分、膜骨格画分、TritonX-100 可溶性画分に分画して測定すると、トロンビン投与後 5 秒間ふ置によって、いずれの画分でも活性が増加する傾向が認められた。また、膜骨格画分と細胞骨格画分で wortmannin 前ふ置で減少する傾向が認められた。トロンビ

ン投与後 30 秒ふ置した場合には、膜骨格画分と細胞骨格画分でトロンビンふ置で活性が上昇し、さらに膜骨格では wortmannin 前ふ置で活性が低値であった。しかし、30 秒後の膜骨格以外では有意ではなかった。トロンビン投与後の活性の継時的変化を検討すると、EGTA 存在下では Ca 存在下に比較して活性が低値であり、wortmannin 前ふ置によってさらに低下する傾向が、15 秒以後に認められた。

次いで、PLC β の translocation についてウェスタンブロット解析を行った。細胞を Triton X-100 可溶性画分、細胞骨格画分、膜骨格画分に分画して検討した。PLC β 2 の C 末端に対する抗体で反応させると、トロンビン投与後 5 秒および 30 秒間ふ置で 140 kDa 蛋白と 40 kDa 蛋白の細胞骨格画分での増加が認められた。wortmannin 前ふ置でバンドの増加が減弱する傾向が認められらたが、非常に軽度であった。PLC β 3 の C 末端に対する抗体で反応させると、トロンビン投与後に膜画分で 155 kDa 蛋白の減少、50 kDa 蛋白の消失と細胞骨格画分での 50 kDa 蛋白の出現が認められた。この増加は wortmannin 投与により全く変化を示さなかった。以上の結果は、wortmannin の前ふ置により生じる、IP $_3$ 濃度、PLC 活性、PLC β の translocation への影響が、wortmannin による細胞内カルシウム濃度低下に追隨した二次的なものである事を示唆した。

sarco/endoplasmic reticulum Ca $^{2+}$ -ATPase (SERCA) の阻害薬である thapsigargin 0.2 μ M を投与すると、細胞質に存在するカルシウムの濃染小管系への再取り込みが阻害される事により、軽度の細胞内カルシウム濃度の上昇がもたらされる。その後にトロンビンを投与すると、カルシウム濃度上昇のピーク値は増加するが、第 2 相の減少相のカルシウムの緩徐な減少に影響は認められない。wortmannin で前ふ置した血小板に thapsigargin を投与した後にトロンビン投与すると wortmannin の減少促進効果は著しく減弱される。トロンビン投与後にトロ

ンビン受容体阻害薬アルガトロバンを投与すると、カルシウム減少が急速となるが、thapsigargin を前投与しておく、アルガトロバンによる急速化が認められない。thapsigargin を前投与後に U46619 を投与すると、U46619 による急速な減少を緩徐化する。これらは、SERCA の阻害が、受容体へのアゴニストへの結合に引き続く細胞内カルシウムの上昇後の減少にも関与し、トロンビン投与により細胞内に放出されたカルシウムの再取り込みを阻害することにより、減少を緩徐化する作用を有する事を示唆している。このような減少速度の緩徐化は、ごく少量のトロンビンを投与した後に U46619 を投与した場合、トロンビン投与後にアルガトロバンを投与し細胞内カルシウム濃度が低下した後に、U46619 を投与した場合にも認められた。このことから、トロンビンも SERCA を抑制して、細胞内に放出されたカルシウムの再取り込みを阻害するな減少をもたらしている可能性が示唆された。

SERCA 3b は非活性化時には細胞内膜中に存在し plasma membrane とリンクしており、血小板活性化時には細胞骨格と結合する事が報告されている。血小板活性化はミオシンの細胞骨格との結合をもたらす。wortmannin によるミオシン軽鎖リン酸化酵素抑制がトロンビン投与時の細胞骨格変化に影響を及ぼし、トロンビン投与後の SERCA 活性を抑制するメカニズムが想定された。