

氏名（本籍）	鈴木武志（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	甲第 276 号
学位授与日付	平成 6 年 3 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Biochemical studies on phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in human platelets (I) Partial purification and characterization of two forms of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase from human platelet membrane (II) Inhibition of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase by cyclic AMP in human platelets
審査委員	(主査) 教授 野澤 義 則 (副査) 教授 鶴見 介 登 教授 森 秀 樹

論文内容の要旨

細胞内情報伝達においてイノシトールリン脂質代謝は重要な役割を果たしている。すなわち、外来刺激によりホスホリパーゼ C (PLC) が活性化されると、ホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸 (PIP₂) から二種類のセカンドメッセンジャー、イノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) と 1, 2-ジアシルグリセロール (DG) が産生される。IP₃ は細胞内プールより Ca²⁺ を動員し、DG はプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化して細胞応答を誘起する。PIP₂ はホスファチジルイノシトール (PI) からホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ (PI キナーゼ)、ついでホスファチジルイノシトール 4-リン酸 5-キナーゼ (PIP キナーゼ) の段階的リン酸化によって生じる。したがって、PIP キナーゼは IP₃ と DG の供給源となる PIP₂ を生成する重要な酵素であるが、その性状および活性調節機構には不明な点が多い。

血小板は外来刺激にきわめて迅速に反応し、凝集、粘着、分泌といった一連の反応を呈し、止血・血栓形成に中心的な役割を果たしている。また、迅速応答のモデル細胞として、情報伝達経路についての知見が集積しており、血小板活性化機構においても、イノシトールリン脂質代謝は中心的な役割を果たしていることが明らかにされている。しかしながら、血小板イノシトールリン脂質代謝に関する研究は、PIP₂ 分解系を司る PLC が中心であり、合成系、特に PIP キナーゼの生化学的性状および活性調節機構についての報告はきわめて少ない。

そこで本研究では、ヒト血小板の PIP₂ 合成系を明らかにする目的で、PIP キナーゼを精製し生化学的性状を解析するとともに、活性調節機構について検討し以下の結果を得た。

1) ヒト血小板の PIP キナーゼ活性の大部分は膜画分に存在するために、コール酸により可溶化後、陰イオン交換、アフィニティなどの 4 種類のカラムクロマトグラフィーを用いて、分子量 51kDa と 47kDa の 2 種類の PIP キナーゼ (PIP キナーゼ I, PIP キナーゼ II) が部分精製された。ATP に対する Km 値は、PIP キナーゼ I が 20 μM, PIP キナーゼ II が 15.4 μM であった。

2) 2 種類の PIP キナーゼはコール酸、Mg²⁺ 存在下で同様に活性化されたが、Mn²⁺ 存在下では PIP キナーゼ I のみが活性化された。ホスファチジルセリンは、両 PIP キナーゼ活性を促進し、逆にホスファチジルコリンは抑制した。なお、ホスファチジルエタノールアミンは PIP キナーゼ I に対し活性化作用、PIP キナーゼ II には抑制的に作用した。したがって、PIP キナーゼ I, II は別の酵素である可能性が示唆された。

3) 精製した PIP キナーゼにより産生された PIP₂ に精製 PLC を作用させると約90%が分解されたことから、精製した PIP キナーゼは PI 4-P 5-キナーゼと考えられる。

4) ³²P 標識血小板を細胞内 cyclic AMP (cAMP) を上昇させるフォルスコリンとインキュベーションすると、経時のおよび濃度依存的に PIP は増加し、PIP₂ は減少した。さらに、プロスタグランジン I₂ (PGI₂) によって cAMP 濃度を上昇させた場合にも、同様の結果が得られた。一方、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) の阻害剤 (H-89) によって、PGI₂ による PIP の増加と PIP₂ の減少は抑制され、PKA による PIP キナーゼの活性制御が示唆された。

5) サボニン処理により形質膜を透過性にした血小板に PGI₂ を添加すると、PIP₂ の産生量は PGI₂ の濃度依存的に減少した。また cAMP 添加でも同様の結果が得られた。

6) PIP キナーゼ活性の約90%が存在する血小板膜画分を cAMP 処理すると、PIP キナーゼ活性は cAMP 濃度依存的に抑制された。PKA 阻害剤 (H-8) によりこの抑制効果は消失した。

7) Dibutylryl cyclicAMP 処理により内因性 PKA を活性化した血小板から調製した膜画分では、PIP キナーゼ活性の抑制 (約40%) が観察された。

8) サボニン処理血小板を PKA 触媒サブユニットとインキュベーションすると PIP キナーゼ活性は半減した。

9) 部分精製した PIP キナーゼを PKA 触媒サブユニットとインキュベーションすると、活性は約40%にまで低下した。

以上の結果より、血小板の膜画分には2種類の PIP キナーゼが存在する可能性が示唆された。また、血小板活性化を阻害する cAMP が、PKA の活性化を介し PIP キナーゼを抑制することが明らかとなった。すなわち、cAMP による PKA の活性化が PIP キナーゼを抑制し、PIP₂ 量を減少させて、その結果 PLC 活性化によるセカンドメッセンジャーの IP₃ と DG の産生量が低下し血小板機能が抑制されることが推測され、このことが cAMP による血小板機能抑制メカニズムの一つと考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者鈴木武志は、PIP キナーゼをヒト血小板より部分精製し、その生化学的性状を明らかにした。さらに、ヒト血小板 PIP キナーゼが cAMP 依存性プロテインキナーゼ (PKA) を介して抑制されることを示し、cAMP による血小板機能抑制メカニズムの新たな作用機序を示した。これらの知見は、血小板活性化メカニズムの解明、さらには細胞内情報伝達機構の研究進展に関与するものと考えられる。

主論文公表誌

Biochemical studies on phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in human platelets

(I) Partial purification and characterization of two forms of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase from human platelet membrane

平成3年10月発行 Thromb. Res. 64 (1), 45~56

(II) Inhibition of phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase by cyclic AMP in human platelets

平成6年発行予定 Platelets 印刷中