

学 位 論 文 題 名

血液凝固反応における蛋白リン酸化酵素の関与

学位論文内容の要旨

I 緒 言

血液凝固反応のカスケードの過程で Ca^{2+} 、磷脂質を必要とするステップが存在するが、 Ca^{2+} 、磷脂質の作用機作は必ずしも明らかではない。

一方、プロテインキナーゼC（以下 PKC）は細胞内の基質蛋白質を磷酸化することにより細胞の分化、増殖及び分泌機能などに関与しているが、その活性発現には補因子として Ca^{2+} 及び磷脂質、特に phosphatidylserine（以下 PS）を必須とし、一方、細胞外においてはフィブリノーゲン（血液凝固第Ⅰ因子）などの血漿蛋白質を磷酸化するとの報告がある。これらのことは PKC が血液凝固因子を磷酸化することにより血液凝固反応へ関与しうる可能性を示唆している。

本研究においては血液の凝固反応における PKC の関与を検討する目的で Ca^{2+} 及び磷脂質を必要とする血液凝固第Ⅷ、第Ⅱ（プロトロンビン）及び第Ⅰ因子に及ぼす PKC の影響を検索した。

Ⅱ 材料および方法

1. PKC 精製：PKC は西塚らの方法に準じ、ブタ脾臓より DEAE セルロース、セファクリル S-200 及びプロタミン・セファロース 4 B アフィニティークロマトグラフィーにて精製した。
2. PKC 活性測定：Kuo らの方法に準じて施行した。基質として Lysine - Rich Histone (LRH) あるいは試料 $40\mu\text{g}$ を用い、精製 PKC $3\mu\text{g}$ 及び $50\mu\text{M}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP ($0.37\text{Tbq}/\text{mmol}$) を加え、PS $5\mu\text{g}$ 及び 0.5mM CaCl_2 の存在下、或は非存在下で、磷酸化反応を 30°C にて 5 分間行ない、5 %TCA 添加をもって反応終了とした。
3. オートラジオグラフィー：0.333mM ATP 添加で 10 分間反応後、30mM Tris/HCl - buffer (pH7.5), 9 %SDS, 15 %グリセロール及び 0.05 %bromophenol blue よりなる

溶液0.1mlを加え反応を停止せしめた。2-ME 8 μ lを添加後、反応液50 μ lを10%ゲルにてSDS-PAGEを施行した。染色、脱色、乾燥を施した後、X線フィルムに-80℃で7～10日間、暴露した。

4. 磷酸化アミノ酸残基の解析：0℃冷却により磷酸化反応を停止させ、磷酸化第Ⅱ因子（0.24mg）を用いて牧田らの方法に準じて磷酸化アミノ酸残基の解析を施行した。一次元としてセルロース薄層板上にて1,000Vで1時間電気泳動を施行し、次に二次元としてアセンディング・クロマトグラフィーを施行した。乾燥の後、X線フィルムに-80℃で7～10日間暴露した。標準磷酸化アミノ酸はNinhydrinを用いて染色した。
5. 磷酸化第Ⅱ因子の凝固活性測定：磷酸化第Ⅱ因子の凝固活性はQuick一段変法によるプロトロンビン時間（PT）にて凝固時間測定機KC-1Aを用いて測定し、triplicateで施行した。
6. PKCの阻害剤による検討：PKCの阻害剤である、gossypol, palmitoylcarnitine, trifluoperazine及びstaurosporineを用いて、PKCによる第Ⅱ因子の磷酸化に及ぼす影響を検討した。

Ⅲ 結 果

1. オートラジオグラフィー

PKCによる凝固因子の磷酸化をオートラジオグラフィーにて検討した。血液凝固第Ⅰ、第Ⅱ及び第Ⅳ因子がPKCによる磷酸化を受け、基質になりうることが示唆されたが、第Ⅱ因子の活性型であるトロンビンでは磷酸化は認められなかった。

2. 磷酸化アミノ酸残基の検討

PKCにより磷酸化されるアミノ酸残基の二次元展開による検討ではスレオニン残基、セリン残基には磷酸化が認められたが、チロジン残基には認められず、磷酸化の程度はセリン残基で最も著明であった。

3. 第Ⅱ因子の基質としての検討

PKCによる第Ⅱ因子の磷酸化に関する酵素学的検討では、第Ⅱ因子に対するミカエリス定数は0.86 μ Mであり、化学量論的には第Ⅱ因子1モルあたり最大で約0.2モルがPKCにより磷酸化されることが示された。

4. 磷酸化第Ⅱ因子の凝固活性の検討

30℃、5分間で磷酸化された第Ⅱ因子は、20.60秒 $\pm$ 0.17秒（ $\pm$ SE）で凝固し、PKCの補

因子である PS 及び CaCl_2 を添加しないコントロールの 21.27 ± 0.20 秒より短縮する傾向にあり凝固活性亢進の可能性が示唆された。

5. PKC の阻害剤による検討

Gossypol 及び palmitoylcarnitine は $100 \mu\text{M}$ の添加にて PKC の磷酸化を著しく阻害した。Trifluoperazine による阻害活性は $100 \mu\text{M}$ にて認められたが $10 \mu\text{M}$ では認められなかった。Staurosporine は 10nM でも阻害活性を認め、 100nM では磷酸化活性が殆ど検出されなかった。

IV 考 察

本研究では血液の凝固過程における PKC の関与を解析する目的で Ca^{2+} 及び磷脂質を要求する血液凝固因子に対する PKC の影響を検討した。その結果、第 I 因子に加え、第 II 因子及び第 VIII 因子が in vitro で PKC により磷酸化される事が明らかになった。磷酸化された第 II 因子の凝固活性は、PT 測定では、亢進する傾向が示唆された。第 II 因子の磷酸化部位はトロンビンが磷酸化されない事より、トロンビンの存在する C 末端ではなく、N 末端付近であろうと推測された。この N 末端付近の部位には Ca^{2+} 及び磷脂質との結合に必須である γ -carboxyglutamic acid ドメインが含まれている。第 II 因子の磷酸化に対する PKC の阻害剤の検討では、競合阻害剤のなかでは gossypol が最も強く磷酸化を阻害し、trifluoperazine は $100 \mu\text{M}$ では阻害効果は殆ど認められない等、競合阻害剤間における差異が認められたがその原因は明らかではない。更に PKC の基質としての第 II 因子を酵素学的に検討し、ミカエリス定数 ($0.86 \mu\text{M}$) は効率の良い基質として報告のある LRH ($0.6 \mu\text{M}$) などに匹敵する事が認められた。化学量論的検討では磷酸化される第 II 因子量は 1 モルあたり約 0.2 モルと少量であった。しかし、補体成分 C 3 の様に 0.5–0.6 モル程度の磷酸化でも生理活性に影響しているとの報告もあり興味ある知見と考えられる。

V 結 語

- 1) 凝固活性時に Ca^{2+} 及び磷脂質を必要とする血液凝固第 I、第 II 及び第 VIII 因子が PKC により磷酸化された。
- 2) PKC により磷酸化された第 II 因子のアミノ酸二次元展開解析により、磷酸化を受けるアミノ酸残基は主としてセリン残基であることが明らかとなった。
- 3) 酵素学的検討では第 II 因子の PKC による磷酸化反応におけるミカエリス定数は $0.86 \mu\text{M}$

であり、第Ⅱ因子1モルあたり約0.2モルが磷酸化された。

- 4) 第Ⅱ因子の PKC による磷酸化は PKC の競合的阻害剤のうちでは gossypol により強く阻害され、staurosporine では nM オーダーにて阻害活性が認められた。
- 5) プロトロンビン時間の測定では PKC により磷酸化された第Ⅱ因子の凝固活性は亢進する傾向を示した。

以上より血液凝固のカスケードにおいて PKC が血液凝固第Ⅷ、第Ⅱ及び第Ⅰ因子を磷酸化して血液凝固の過程に関与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保

副 査 教 授 牧 田 章

副 査 教 授 石 橋 輝 雄

I 研究目的

血液凝固反応にはプロテインキナーゼC（以下 PKC）の補因子でもある Ca^{2+} 及び磷脂質を必要とするステップが存在するが、これら両者の作用機作は必ずしも明らかではない。一方、PKC は細胞内情報伝達系において主要なる磷酸化酵素であるが、フィブリノーゲン（血液凝固第Ⅰ因子）などの血漿蛋白質を細胞外にて磷酸化するとの報告がある。このことは PKC が血液凝固因子を磷酸化することにより血液凝固反応へ関与しうる可能性を示唆している。そこで血液の凝固反応における PKC の関与を検討する目的で Ca^{2+} 及び磷脂質を必要とする血液凝固第Ⅷ、第Ⅱ（プロトロンビン）及び第Ⅰ因子に及ぼす PKC の影響を検討した。

II 材料および方法

1. PKC 精製：PKC は西塚らの方法に準じ、ブタ脾臓より DEAE セルロース、セファクリル S-200 及びプロタミン・セファロース 4 B アフィニティークロマトグラフィーにて精製した。
2. PKC 活性測定：Kuo らの方法に準じて施行した。基質として Lysine - Rich Histone

(LRH)あるいは凝固因子40 μ gを用いた。精製 PKC 3 μ g及び50 μ M [γ - 32 P] ATPを加え, phosphatidylserine 5 μ g及び0.5mM CaCl₂の存在下, 燐酸化反応を30℃にて5分間行ない, 5 %TCA 添加をもって反応の終了とした。

3. オートラジオグラフィー: 0.333mM [γ - 32 P] ATP 添加で10分間反応後, 30mMTris/HCl (pH7.5), 9 %SDS, 15%グリセロール及び0.05%bromophenol blue よりなる溶液0.1mlを加え反応を停止せしめた。2-ME 8 μ lを添加後, 反応液50 μ lを10%ゲルにてSDS - PAGE を施行した。
4. 燐酸化アミノ酸残基の解析: 0℃冷却により燐酸化反応を停止させ, 燐酸化第Ⅱ因子(0.24mg)を用いて牧田らの方法に準じて燐酸化アミノ酸残基の解析を施行した。セルロース薄層板上にて1,000Vで1時間電気泳動(一次元)を施行後, アセンディング・クロマトグラフィー(二次元)を施行した。標準燐酸化アミノ酸はNinhydrinを用いて染色した。
5. 燐酸化第Ⅱ因子の凝固活性測定: 燐酸化第Ⅱ因子の凝固活性はQuick一段変法によるプロトロンビン時間(PT)にて凝固時間測定機 KC-1 Aを用いて測定し, triplicate で施行した。
6. PKC の阻害剤による検討: PKC の阻害剤である, gossypol, palmitoylcarnitine, trifluoperazine 及び staurosporine を用いて, PKC による第Ⅱ因子の燐酸化に及ぼす影響を検討した。

Ⅲ 結 果

1. オートラジオグラフィー

PKC による凝固因子の燐酸化をオートラジオグラフィーにて検討した。血液凝固第Ⅰ、第Ⅱ及び第Ⅷ因子がPKCによる燐酸化を受け, 基質になりうることが示唆されたが, 第Ⅱ因子の活性型であるトロンビンでは燐酸化は認められなかった。

2. 燐酸化アミノ酸残基の検討

PKC により燐酸化されるアミノ酸残基の三次元展開による検討ではスレオニン残基, セリン残基の燐酸化が認められ, 燐酸化の程度は後者でより著明であった。

3. 燐酸化第Ⅱ因子の凝固活性の検討

30℃, 5分間で燐酸化された第Ⅱ因子は, 20.60秒 $\pm$ 0.17秒($\pm$ SE)で凝固し, コントロールの21.27秒 $\pm$ 0.20秒より短縮する傾向にあり凝固活性亢進の可能性が示唆された。

4. 第Ⅱ因子の基質としての検討

PKC による第Ⅱ因子の磷酸化に関する酵素学的検討では、第Ⅱ因子に対する K_m 値は $0.86 \mu M$ であり、第Ⅱ因子 1 モルあたり最大で約 0.2 モルが磷酸化されることが示された。

5. PKC の阻害剤による検討

第Ⅱ因子のリン酸化は LRH を基質とした場合と同様に阻害された。特に Staurosporine は $10 nM$ で阻害活性を示し、競合阻害剤の中では gossypol が PKC の磷酸化を強く阻害した。

IV 考案および結語

1. 凝固活性時に Ca^{2+} 及び磷脂質を必要とする血液凝固第Ⅰ、第Ⅱ及び第Ⅷ因子が PKC により磷酸化された。
2. PKC により磷酸化された第Ⅱ因子のアミノ酸二次元展開解析により、磷酸化アミノ酸残基は主としてセリン残基であることが強く示唆された。
3. PT 測定では PKC により磷酸化された第Ⅱ因子の凝固活性は亢進する傾向が示唆された。
4. 酵素学的検討では第Ⅱ因子の PKC による磷酸化反応における K_m 値は $0.86 \mu M$ であり、第Ⅱ因子 1 モルあたり約 0.2 モルが磷酸化された。
5. 第Ⅱ因子の PKC による磷酸化は PKC の競合的阻害剤のうちでは gossypol により強く阻害され、staurosporine はさらに強い阻害活性を示した。

これらの検討の結果、血液凝固反応において PKC が血液凝固第Ⅷ、第Ⅱ及び第Ⅰ因子を磷酸化して血液凝固の過程に関与していることが示唆された。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。