血小板 fibronectin の collagen レセプターに 関する検討

鈴木 宏治* 橋本仙一郎*

Further studies on platelet fibronectin as collagen receptor

Koji SUZUKI* and Senichiro HASHIMOTO*

Key words : platelet, fibronectin, CIG, collagen receptor, serotonin

A cell surface and tissue protein, termed fibronectin, is antigenically identical to a major plasma glycoprotein, cold-insoluble globulin (CIG). Fibronectin on fibroblast cell surfaces contributes to cell spreading and adhesion, and its protein diminishes from these surfaces when transformed by oncogenic viruses. Recently, fibronectin has been found in platelets and is known to be released from them under stimulation by collagen or thrombin. Moreover, platelet fibronectin (P-fibronectin) is suggested to contribute the receptor for collagen in the platelet (Bensusan, H.B., et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 : 5864, 1978).

The present study aimed to confirm the findings of Bensusan, et al., and to investigate the influences of P-fibronectin and CIG on the collagen binding to platelets. The results obtained were as follows.

(1) Fibronectin was isolated by affinity chromatography on anti-CIG-IgG-agarose. Its protein, different from CIG, showed a single band SDS-gel electrophoresis after reduction and a molecular weight of approximately 230,000.

(2) The collagen-induced secretion of serotonin from human platelets in plasma was inhibited by the treatment of collagen with both P-fibronectin and CIG. The secretion was stimulated with gelatin and inhibited by CIG.

(3) Purified anti-CIG-IgG stimulated serotonin secretion from the platelets, but the control IgG did not. The secretion from platelets stimulated with anti-CIG-IgG was inhibited by pretreatment of anti-CIG-IgG with both P-fibronectin and CIG.

(4) Collagen preincubated at 37°C for 120 min was found to bind to platelets, but the binding of collagen scarcely saturated with unlabelled collagen. Binding of collagen to platelets was inhibited by pretreatment of collagen with both P-fibronectin and CIG.

* 三重大学医学部付属病院検査部 (〒514 津市江戸橋2-174), Department of Clinical Pathology, Mie University School of Medicine, Mie, Japan.

These evidences imply that fibronectin could constitute the collagen-binding protein of platelets.

はじめに

Collagen による血小板凝集の初期反応は血小板膜上の glucosyltransferase と collagen 分子の糖鎖の結合により開始されるという Jamieson らの酵素-基質説¹⁾²⁾があるが、最近 Bensusan³⁾ らにより血小板 fibronectin (以後 P-fibronectin と称す) の collagen receptor 説が提出され注目されている。本研究は P-fibronectin と血漿中の cold-insoluble globulin (CIG) とを対比させながら、P-fibronectin の collagen receptor としての可能性について検討を行った。

I. 実験材料および方法

Collagen は Sigma 社の Type III (acid soluble from Calf skin) を用いた。CIG はヒト血漿からわれわれの方法⁴⁾で精製した。anti-CIG-IgG は精製 CIG を家兔に免疫して得た抗血清から CIG-agarose カラムを用いて精製した。非特異的 IgG は非免疫性家兔血清から protein A-agarose (Pharmacia Fine Chem.) を用いて調製した。CIG-agarose, anti-CIG-agarose, collagen-agarose, gelatin-agarose は BrCN-agarose (Pharmacia Fine Chem.) を用いて作成した。P-fibronectin は Bensusan ら³⁾の変法で精製した。Buffer A (0.01M sodium phosphate, 0.01M sodium citrate, 0.15M NaCl, 1mM EDTA, 0.01M ϵ -ACA, Trasylol 100U/ml) で洗浄した新鮮ヒト血小板を 0.1 mM PMSF, 8M urea を含む buffer A に浮遊させ、可溶性蛋白質を還元カルボキシル化処理後 buffer A で透析した。透析による析出物を遠心分離で除去し、上清中の P-fibronectin を anti-CIG-IgG-

Fig. 1 Effect of platelet fibronectin or CIG on the secretion of serotonin from platelets induced by collagen. Collagen (final concentration, 50 μ g/ml) preincubated with various amounts of fibronectin or CIG at 37°C for 15 min was added to PRP (2×10^8 platelets) pretreated with ³H-serotonin, and the amount of released serotonin from platelets for 3 min was determined.

Fig. 2 The stimulation of serotonin secretion from platelets by anti-CIG-IgG. Various amounts of anti-CIG-IgG or control IgG were added to PRP (2×10^8 platelets) pretreated with ³H-serotonin, and the amount of serotonin released from platelets for 3 min was determined.

Fig. 3 Effect of platelet fibronectin or CIG on binding of collagen to platelets. ^{125}I -collagen (1 μg) preincubated with various amounts of fibronectin or CIG at 37°C for 120 min was added to PRP (10^8 platelets), and the amount of collagen bound to platelets was determined.

agarose カラムに結合させ、洗浄後 8M urea で溶出した。血小板の serotonin 放出反応は Brass らの方法⁵⁾で ^3H -serotonin およびヒトの PRP 血小板を用いて検討した。 ^{125}I -collagen は chloramine T 法で調製し、ヒト血小板への結合実験は Gordon らの方法⁶⁾に準じて行った。

II. 結 果

1) P-fibronectin

精製した P-fibronectin は SDS-ゲル電気泳動法で分子量約 230,000 の単一バンドを示し、対照として anti-CIG-IgG-agarose カラムで調製した血漿 CIG は還元後分子量 220,000 および 215,000 の 2 本バンドを示した。CIG は collagen-agarose, gelatin-agarose の両方に結合したが、P-fibronectin は collagen-agarose の方に強く結合した。

2) serotonin 放出反応と P-fibronectin

Collagen による血小板の serotonin 放出反応に対する P-fibronectin, CIG の影響について検討した(図 1)。最終濃度 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように調製した一定量の collagen と種々の量の P-fibronectin あるいは CIG を 15 分間反応させた

後、予め $1.0\mu\text{Ci}/\text{ml}$ になるように ^3H -serotonin を添加した PRP $400\mu\text{l}$ を加え、3 分後の血小板残存 serotonin 量を測定した。serotonin 放出反応は collagen を P-fibronectin で前処理することにより阻害され、この阻害は CIG よりも顕著であった。なお serotonin 放出反応は gelatin によっても惹起され、gelatin を CIG で前処理することにより阻害された。

3) anti-CIG-IgG の serotonin 放出作用

図 2 に anti-CIG-IgG の添加による PRP 血小板からの serotonin 放出反応を示した。対照の非特異的 IgG の添加では serotonin 放出反応は認められなかった。CIG 抗体による serotonin 放出反応は抗体を予め P-fibronectin あるいは CIG と反応されることにより阻害され、P-fibronectin/抗体のモル比が 1/2 以上では完全な阻害が認められた。

4) ^{125}I -collagen の血小板への結合と P-fibronectin

Collagen の血小板への結合は反応液中での collagen 存在形態に依存し⁶⁾、 37°C 、120 分間の加温処理で繊維性 collagen にすることにより比較的再現性良く血小板に結合することが認められた。PRP 血小板への結合は添加した ^{125}I -collagen の 4~5%，また formalin 固定化血小板へは 1~2% が結合した。この ^{125}I -collagen の血小板への結合は過剰の unlabeled collagen の添加でも顕著な阻害は認められなかった。図 3 に ^{125}I -collagen の PRP 血小板への結合に対する P-fibronectin, CIG の影響を示した。collagen の血小板への結合は PRP 血漿に含まれている CIG の約 2 倍量の P-fibronectin, CIG の添加で約 1/2 に、4 倍量の添加で約 1/3 に減少した。

III. 考察と結語

Fibronectin (CIG) は fibroblast 等の癌化、脱癌化現象に、また F. XIII の基質として fibrinogen とともに組織の修復反応に関与するなど種々の生物学的現象に重要な役割を担っていると考えられている⁴⁾⁷⁾。最近 Plow ら⁸⁾、Zucker ら⁹⁾により血小板にも fibronectin が約

3 $\mu\text{g}/10^9$ platelets ほど存在し、その一部が serotonin, ADP, PF_4 , β -thrombin などとともに collagen や thrombin により血小板の顆粒から放出されることが明らかにされた。Bensusan ら³⁾による P-fibronectin の collagen receptor としての可能性を示す報告は、既報の fibronectin (CIG) の特徴的性質である collagen (gelatin) との強い親和性から推察し、reasonable な説であろう。P-fibronectin の構成 subunit は CIG のもの⁴⁾とは異なり、同一分子量の2本鎖から成っていることから恐らく蛋白分解を受けておらず、その起原も血漿の CIG に由来するものではないと考えられる。本実験結果の大部分は Bensusan らの結果³⁾を肯定するものであったが、われわれはさらに、collagen の血小板への結合が P-fibronectin, CIG で阻害されることを確認できた。これらの結果は P-fibronectin が、collagen receptor として血小板凝集に関与している可能性を強く示持するものである。しかし ^{125}I -collagen の血小板への結合が unlabelled collagen によって顕著な阻害を受けない事実を考えると P-fibronectin が、はたして collagen の唯一の receptor として血小板表面に存在するのか、また collagen の P-fibronectin への結合が血小板凝集にどのような機構で結びつくのかは、今後の重要な検討課題であろう。

文 献

- 1) Baber, A.J. and Jamieson, G.A.: Platelet collagen adhesion characterization of collagen glucosyltransferase of plasma membranes of human blood platelets. *Biochem. Biophys. Acta*, **252**; 533~545, 1971.
- 2) Brass, L. F. and Bensusan, H. B.: On the role of the collagen carbohydrate residues in the platelet. Collagen interaction. *Biochim. Biophys. Acta*, **444**; 43~52, 1976.
- 3) Bensusan, H.B., Koh, T.L., Henry, K.G., Murray, B. A. and Culp, L. A.: Evidence that fibronectin is the collagen receptor on platelet membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**; 5864~5868, 1978.
- 4) Iwanaga, S., Suzuki, K. and Hashimoto, S.: Bovine plasma cold-insoluble globulin: gross structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **312**; 56~73, 1978.
- 5) Brass, L.F. and Bensusan, H.B.: The role of collagen quarternary structure in the platelet: collagen interaction. *J. Clin. Invest.*, **54**; 1480~1487, 1974.
- 6) Gordon, J.L. and Dingle, J.T.: Binding of radiolabelled collagen to blood platelets. *J. Cell. Sci.*, **16**; 157~166, 1974.
- 7) Yamada, K. M. and Olden, K.: Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*, **275**; 179~184, 1900.
- 8) Plow, E.F., Birdwell, C. and Ginsberg, M. H.: Identification and quantitation of platelet-associated fibronectin antigen. *J. Clin. Invest.*, **63**; 540~543, 1979.
- 9) Zucker, M.B., Mosesson, M.W., Broekman, M.J. and Kaplan, K.I.: Release of platelet fibronectin (cold-insoluble globulin) from alpha granules induced by thrombin or collagen: lack of requirement for plasma fibronectin in ADP-induced platelet aggregation. *Blood*, **54**; 8~12, 1979.
- 10) Engvall, E. and Ruoslahti, E.: Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen. *Int. J. Cancer*, **20**; 1~5, 1977.