血小板膜蛋白の解析 (4)
蛋白分解酵素 (トリプシン, キモトリプシン) による
膜蛋白の変化と機能との関係

前浜 修爾* 藤村 欣吾* 蔵本 淳*

Analysis of platelet plasma membrane proteins (4)
Trypsin or chymotrypsin induced alteration in structure
and function

Shuji MAEHAMA*, Kingo FUJIMURA* and Atsushi KURAMOTO*

Key words: platelet membrane glycoproteins, release reaction, serine protease, heparin

We have demonstrated that thrombin-induced platelet release reaction is closely related to the specific hydrolysis of glycoprotein V (GPV) which is one of the surface membrane glycoproteins and whose molecular weight is approximately 80,000 to 90,000 daltons.

In this study, we have further studied the influence of the other serineproteases on GP V, using trypsin and α -chymotrypsin.

GP V was hydrolyzed not only by thrombin but also by trypsin in a concentration or time-dependent manner, and its disappearance was accompanied with release reaction. Trypsin also hydrolyzed GP I (M.W. 150,000) and high molecular weight glycoproteins as well, chymotrypsin had no effect on the membrane glycoproteins nor the release reaction.

Platelets pretreated with thrombin showed the decreased release reaction after stimulation with trypsin or thrombin, but there was no remarkable change in platelets pretreated with chymotrypsin, which have the functionally affected GP I.

Heparin had specific inhibitory effect against thrombin-induced release reaction in a concentration dependent manner and its effect was remarkably increased by using platelets pretreated with chymotrypsin instead of normal washed platelets.

As the results, the most important glycoprotein for the serineproteases to induce release reaction was GP V, which was hydrolyzed specifically by thrombin or non-specifically by trypsin. On the other hand, it was considered that GP I was the receptors for heparin as well as for thrombin, and heparin exhibited

* 広島大学原医研内科 (〒734 広島市霞町), Department of Internal Medicine, Research Institute for Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University, Hiroshima, Japan.

its inhibitory effect on thrombininduced release reaction by means of competition for these receptors on GP I.

はじめに

Thrombin による血小板放出反応は、分子量約8～9万の糖蛋白 (GP V) の特異的水解により惹起される可能性を報告してきた¹⁾. この thrombin sensitive protein と考えられる GP V に対する他の serine protease の影響を調べるため, trypsin, α -chymotrypsin を用い, 膜蛋白と機能面に及ぼす影響, さらにこれらの酵素作用に対する heparin の抑制効果を観察し, 各膜蛋白分画と血小板機能との関連性について検討した.

I. 実験方法および結果

(1) 血小板膜蛋白の解析

ACD 加血より分離した血小板を neuramidase, galactose oxidase にて連続処理し, 酸化された galactose 残基を $\text{Na}[^3\text{H}]\text{BH}_4$ にて還元標識した²⁾. 標識血小板は各濃度の酵素処理, または一定濃度の酵素にて経時的に処理した後, 超音波破壊し, SDS-polyacrylamide gel にて電気泳動後, fluorography および microdensitometer による解析を行なった. Trypsin 処理では, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では濃度依存性に GP V の消失がみられ, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の処理で完全に消失

Fig. 1 $\text{Na}[^3\text{H}]\text{BH}_4$ labeled platelets (10^9 plts/ml) were treated with various concentrations of trypsin for 10 minutes at 37°C . After sonication, $250\mu\text{g}$ of protein were applied to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and its fluorographic pattern was studied by microdensitometric analysis.

Fig. 2 Released ^{14}C -5HT level from enzyme treated platelets (Mean $\pm$ SD, N=4). ^{14}C -5HT labeled platelets (10^9 plts/ml) were incubated with various concentrations of enzymes for 10 minutes at 37°C in buffer containing 134 mM NaCl, 5 mM glucose, 15 mM Tris (pH 7.4) and 1 mM EDTA. After stopping the reaction and centrifugation, radioactivities of released ^{14}C -5HT and malondialdehyde (MDA) of supernatant were measured.

したが、同時に分子量約15万のGP I, さらに高分子量の糖蛋白の消失が平行して認められた(図1)。さらに trypsin 0.5u/ml で経時的に処理すると、上記の変化は反応開始後60秒ですでに最大となる急激な反応であることが確認された。一方 chymotrypsin では高濃度、長時間処理しても明確な膜蛋白組成上の変化は認められなかった。

(2) 血小板放出反応, MDA 産生能

クエン酸加血より分離し ^{14}C -serotonin 標識した血小板を上記と同様の酵素処理を加えた後、遠心分離して上清中の放射活性とともに、thiobarbiturate 法による血小板 10^9 個あたりのMDA 産生量を測定した。その結果, trypsin に対しては処理濃度的にも処理時間的にも膜蛋白の変化と一致して、放出, MDA 産生反応が認められ, GP V の完全消失とともに plateau に達したが, chymotrypsin では両反応とも観察されなかった(図2)。

(3) Chymotrypsin, thrombin 前処理血小板

に thrombin, trypsin 刺激を行なった場合の血小板機能

Chymotrypsin は前述のごとく明確な膜蛋白組成上の変化を導き得なかったが、同酵素にて処理した血小板では, ristocetin, thrombin による凝集能が低下しており、機能的に GP I を修飾していることが推察された。したがって chymotrypsin にて GP I を, thrombin にて GP V をあらかじめ修飾し (37°C , 10 分間), ^{14}C -serotonine にて標識後、さらに thrombin, trypsin (5u/ml) を作用させ、上清中の放射活性および MDA 産生量を測定した。chymotrypsin 前処理血小板では、その後の thrombin, trypsin 処理にて control とほぼ同様の放出, MDA 産生反応を認めるのに対して、thrombin 前処理血小板では前処理濃度に依存して、両反応とも抑制される結果を得た。

(4) Heparin による thrombin, trypsin 惹起放出反応の抑制効果

Chymotrypsin 処理標識血小板を各濃度の

Fig. 3 Inhibition of thrombin or trypsin-induced ^{14}C -5HT release from chymotrypsin-pretreated platelets by heparin. After incubation with various concentrations of heparin for 10 minutes at room temperature, platelets pretreated with chymotrypsin were stimulated by thrombin or trypsin (1.0u/ml). Radioactivity of ^{14}C -5HT in supernatant of normal washed platelet (—) and of chymotrypsin-pretreated platelets (--- or -.-) was measured.

heparin と室温 10 分間 preincubate した後, thrombin または trypsin 1u/ml にて 37°C 10 分間処理し, 上清中の放射活性を求めた. thrombin 処理に対して heparin は濃度依存的に著明な放出抑制効果を示し, さらに chymotrypsin 前処理血小板に対しては, より低濃度にて抑制効果が認められた. 一方, trypsin に対しては heparin の抑制効果はほとんど認められなかった (図 3).

III. 考察および結論

Thrombin, trypsin 等の serine protease による血小板放出反応には, 活性 serine 残基の存在が必要で³⁾⁴⁾, このことは膜表面上に酵素の基質となるべき蛋白が存在することを示唆する⁵⁾. GP V は thrombin により特異的に¹⁾²⁾,

trypsin により非特異的に水解され, 同糖蛋白の消失が, 放出, MDA 産生反応の開始と極めて深い相関を示す. さらに thrombin 前処理にてあらかじめ GP V の減少した血小板では, その後の thrombin, trypsin での処理に対して, 放出反応の低下を認めたことから, GP V は serine protease 惹起放出反応において必須の基質糖蛋白であろうと思われる. 一方 GP I は, ristocetin 凝集に必要な糖蛋白であるとともに, thrombin 結合部位としても重要で⁶⁾⁷⁾, GP V とは膜表面上で近接して存在する可能性があり, GP I に結合した thrombin はより安定な形で GP V の水解作用を発揮し, その結果一部では脂質代謝を活性化することによって, 放出反応を引き起こすと考えられる. 一方, heparin は thrombin による放出反応を著明に抑制するのに対し, trypsin に対しては抑制効果を示さず, さらに chymotrypsin 前処理血小板では, より低濃度の heparin で強力な抑制効果を示すことから, heparin は serine protease そのものの酵素活性を阻害するよりもむしろ⁸⁾, GP I 上に存在すると考えられる結合部位を thrombin と競合することにより, 放出抑制効果を示すものと考えられた.

文 献

- 1) Fujimura, K., Maehama, S. and Kuramoto, A.: The effect of protease on platelet plasma membranes. The mode of thrombin action on glycoprotein I and V, and on platelet functions. *Acta Haematol. Jpn.*, **43**; 1168~1177, 1980.
- 2) Phillips, D. R. and Agin, P. P.: Platelet plasma membrane glycoproteins. Identification of a proteolytic substrate for thrombin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**; 940~947, 1977.
- 3) Fazal Mohammed, S., Whitworth, C., Chuang, H.Y.K., Lundblad, R.L. and Mason, R.G.: Multiple active forms of thrombin: Binding to platelets and effects on platelet function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **73**; 1660~1663, 1976.
- 4) Tollefsen, D.M., Feagler, J.R. and Majerus, E.W.: Thrombin binding to platelet glycoprotein V. *J. Biol. Chem.*, **253**; 1111~1115, 1978.

- P.W.: The binding of thrombin to the surface of human platelets. J. Biol. Chem., 249; 2646~2651, 1974.
- 5) Phillips, D.R. and Agin, P.P.: Thrombin substrates and the proteolytic site of thrombin action on human-platelet plasma membranes. Biochim. Biophys. Acta, 352; 218~227, 1974.
- 6) Okumura, T. and Jamieson, G.A.: Platelet glyocalicin: A single receptor for platelet aggregation induced by thrombin or ristocetin. Thromb. Res., 8; 701~706, 1976.
- 7) Ganguly, P. and Gould, N.L.: Thrombin receptors of human platelets: Thrombin binding and antithrombin properties of glycoprotein I. Br. J. Haematol., 42; 137~145, 1979.
- 8) Smith, G.F.: The heparin-thrombin complex in the heparin inactivation of thrombin in blood. Chemistry and Biology of Thrombin. (Eds. Lundblad, R. L., Fenton, II, J. W., Mann, K. G., Ann Arbor Science, Ann. Arbor, Michigan,) 1977, p. 413~419.

●わが国唯一の葉酸補酵素研究の完全な集大成!

葉 酸 —基礎と臨床—

編集 京都大学内科教授 内野治人 岐阜歯科大学内科教授 外林秀紀

専門医18氏分担執筆

A 5 判 484頁 図172 表104 定価9,800円(〒200円)

文部省科学総合研究「葉酸補酵素の臨床的应用に関する基礎的研究」の成果をふまえて、さらに最新の葉酸研究を包括して編集した。現時点までの文献をできるだけ集積し、ほぼ完全な集大成ができた。葉酸に関するすべての知識はこの一冊に網羅されている。臨床医のみならず、生化学、栄養学の基礎および応用に携わる方々の常備すべき一冊である。

●内容: 第1章 緒言, 第2章 わが国における葉酸研究の歴史, 第3章 葉酸の基礎, I.概説, II.葉酸の定量法, III.葉酸補酵素の形態, IV.葉酸の含量, V.葉酸補酵素の作用機序, VI.葉酸補酵素の酵素的生成と相互転換, 第4章 葉酸の臨床化学, I.生体内運命, II.食品の葉酸測定と摂取量, III.食品中の葉酸のavailability, IV.放射性同位元素を用いる葉酸測定法, V.正常血液葉酸値, 第5章 葉酸欠乏症, I.欠乏症, II.シロネズミの葉酸欠乏飼料の調製法とその応用, III.無菌動物の葉酸代謝—葉酸代謝に対する腸内細菌の関与面—, IV.核酸代謝からみた葉酸欠乏症, 第6章 葉酸の臨床, I.臨床応用とその展望, II.葉酸代謝異常症, III.わが国における葉酸欠乏症, IV.葉酸利用障害, V.再生不良性貧血における葉酸療法に対する一考察, VI.再生不良性貧血に対する葉酸の効果。