原 著

フェリチン標識 wheat germ agglutinin
による血小板形質膜の動態について

Studies on the distribution and mobility of binding sites
on the surface of platelet plasma membrane by means of
ferritin-conjugated wheat germ agglutinin

千川 就可* 井村 穰二* 四元 正一*
河口 幸博* 白沢健二郎*

Nariyoshi HOSHIKAWA*, Jōji IMURA*, Shōichi YOTSUMOTO*
Yukihiro KAWAGUCHI*, Kenjiro SHIRASAWA*

Key words: platelet glycocalyx, wheat germ agglutinin, sialic acid,
platelet activation, electron microscopy

The distribution and mobility of binding sites on the plasma membrane of platelets were studied by using ferritin-conjugated wheat germ agglutinin (F-WGA).

Washed human platelets were incubated with F-WGA (final ferritin concentration: 0.1 mg/ml) at 37°C after or before glutaraldehyde fixation at room temperature.

In incubation with F-WGA after fixation, the plasma membrane of disk shaped, nonactivated platelets was diffusely studded with the particles.

The binding sites of F-WGA were remarkably decreased in number with pretreatment of neuraminidase (f.c. 10 or 20 IU/ml) after fixation.

When platelets were incubated with F-WGA and followed by fixation, the binding sites on the cell surface became loose and irregular in arrangement showing lateral migration. With the lapse of time, the particles were taken up into the dilated open canalicular system. After further incubation with phosphate buffered saline, such a distribution became looser and the particles increased in number in the open canalicular system. When platelets were reincubated with F-WGA and fixed after washing, the particles were distributed again on surface

* 杏林大学医学部病理〔〒181 三鷹市新川 6-20-2〕, Department of Pathology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo, Japan.

of activated platelets.

The native ferritin used in the respective control experiment was never bound on the membrane of platelets.

These findings suggest that WGA generally binds to N-acetylneuraminic acid (sialic acid) of the cell surface. The results are absolutely compatible with those of the mobility of anionic sites on the cell membrane obtained by utilization of cationized ferritin.

In conclusion, the diffuse distribution of sialic acid may contribute to the unstickness of platelets in association with anionic charge on the cell surface. Under circumstance, however, mobility of binding sites may facilitate activation of platelets due to some kinds of stimulation.

はじめに

血小板形質膜表層の糖衣¹⁾には、種々の刺激に対する receptor が存在すると考えられている²⁻⁶⁾。血小板凝集惹起物質の一つとして知られる wheat germ agglutinin (WGA)⁴⁾は、一般に N-acetyl-glucosamin および N-acetylneuraminic acid と特異的に反応するレクチンとされ^{7,8)}、その receptor は、糖蛋白 Ib に存在するとされている^{4,9)}。われわれは今回 ferritin conjugated WGA (F-WGA) を血小板に用い、その結合状態とそれに伴う活性化した血小板形質膜上の動態について検索した。

I. 実験方法

実験 I-A : 人の多血小板血漿をクエン酸 Na 添加 0.01M PBS (pH 7.4) で2回洗浄した後、2.5% glutaraldehyde で室温にて30分間固定し、その後2回洗浄し、F-WGA (Maruzen Oil I-2101) (最終フェリチン濃度 0.1 mg/ml) と37°C で、5—45分間経時的に incubation し透過型電顕試料を得た。

実験 I-B : 上記同様に固定した血小板を、2回洗浄後 0.2M sodium acetyl-acetic buffer (pH 5.4) に再浮遊し、neuraminidase (Sigma Chem. Co. Type V) 10あるいは20 IU/ml と37°C 1時間 incubation し、さらに F-WGA と5—45分間 incubation し試料を得た。

実験 II : 洗浄血小板を F-WGA と 37°C で incubation し、5—45分まで経時的に固定し試料を得た。

実験 III : 洗浄血小板を F-WGA と 37°C で5分間 incubation し、さらに5—15分クエン酸 Na 添加 PBS で incubation し固定した。

実験 IV : 実験 III で得られた固定前血小板を再度 F-WGA と 37°C で5分間 incubation した。

すべての実験における対照として、血小板を native ferritin (NF) (Pentex-Miles, 6 X crystallized) と同一過程で incubation した試料および F-WGA との incubation の前に 0.5 M N-acetyl-D-glucosamin (Sigma Chem. Co.) と37°C で15分間 pre-incubation した試料を用いた。

II. 実験成績

実験 I-A : F-WGA 粒子は、細胞小器官のよく保存され、胞体内に顆粒成分がびまん性に分布する洗浄血小板 (非活性血小板) 形質膜上に均等で密に付着している (図 1)。

実験 I-B : F-WGA 粒子は、非活性血小板形質膜表層で疎に僅かに付着するのみである (図 2)。

実験 II : F-WGA 粒子は不均等に分布し、一部で集簇化の傾向を示す。Incubation の早期から拡張した管状系へ摂取される粒子がみられ、時間の経過とともに徐々に増加する (図 3)。

実験 III : F-WGA 粒子は、強い管状系の拡張、顆粒成分の著しい減少を示す洗浄血小板 (活性化血小板) の形質膜面上に、さらに疎となりかつ不均等分布し、管状系内には多数の粒子が観察される (図 4)。

実験 IV : F-WGA 粒子は活性化した血小板の

Fig. 1 Washed platelets were incubated with F-WGA at 37°C for 5 min after fixation: Ferritin particles are diffusely distributed on the plasma membrane of a nonactivated platelet. $\times 50,000$

Fig. 2 Washed platelets treated with neuraminidase (20 IU) at 37°C for 1 hour after fixation were followed by further incubation with F-WGA at 37°C for 5 min: Ferritin particles are loosely arranged on the plasma membrane of a nonactivated platelet. $\times 50,000$

形質膜表面にびまん性に再度結合し、管状系内にも出現している (図 5)。

全実験において、いずれの対照群血小板の形質膜面上にも NF または F-WGA 粒子の結合はみられなかった。

III. 総括および考案

固定後の血小板形質膜表面にみられた F-WGA 粒子の連続性分布から、形質膜表面上の WGA receptor は、通常びまん性に分布し、さらにこの結合が neuraminidase 処理により強く抑制されることから、WGA は主として sial 酸に結合していることが推測される。しかし本実験に用いた neuraminidase に含まれる非特異的な反応は完全に否定しえない。種々の条件下において未固定血小板表面で観察される不均等、疎でかつ一部集簇を伴う粒子の分布と、管状系内の粒子の存在は、これらの粒子が膜面上を移動凝集し、さらに管状系内へ移動した可能性

がある。これは、短時間の F-WGA との incubation 後の洗浄および PBS との incubation により、粒子が表面でより疎となり、管状系内に多く観察されたことから示唆される。再度の F-WGA との incubation により付着する粒子の存在は、WGA receptor が洗浄および PBS との incubation の間に redistribution する可能性がある。以上の所見は、以前われわれが報告した cationized ferritin による荷電の変化に伴う血小板形質膜の動態¹⁰⁾と極めて一致する点が多い (図 6, 7)。この動態には microfilaments の関与が示唆される^{11~13)}。膜負荷電の一部が sial 酸に基づく¹⁴⁾¹⁶⁾とされ、また WGA も sial 酸に結合する事実⁷⁾⁸⁾を考慮すると、非活性血小板表面の sial 酸の均等分布が、その負荷電に関与し、非粘着、凝集性に役割を演じていることが示唆される。さらに糖衣の sial 酸部への刺激がこの部の移動凝集を招来し、血小板に活性化を来す要因の一つである可能性を示した。

Fig. 3 Washed platelets were incubated with F-WGA at 37°C for 5min: Ferritin particles are irregularly distributed on the cell surface and on the membrane of dilated open canalicular system (OCS) of an activated platelet. $\times 50,000$

Fig. 4 Washed platelets were incubated with PBS for 1 min after incubation with F-WGA at 37°C for 5 min: Ferritin particles are loosely distributed on the plasma membrane of an activated platelet and also present in the OCS. $\times 60,000$

Fig. 5 Washed platelets were incubated with PBS at 37°C for 1 min after incubation with F-WGA at 37°C for 5 min followed by further incubation with F-WGA at 37°C for 5min: Ferritin particles are diffusely bound again on the plasma membrane of an activated platelet. The OCS is dilated and contains particles as seen in the Fig. 4. $\times 60,000$

Fig. 6 Washed platelets were incubated with CF at 37°C for 1min after fixation: The cell surface is diffusely studded with dense CF particles. $\times 60,000$

Fig. 7 Platelets incubated with CF at 37°C for 1 min: The particles are irregular and continuous in distribution on the cell surface of an activated platelet. The particles also stick on the membrane with infrequent cluster formation in the lumen of the dilated OCS. $\times 60,000$

文 献

- 1) Behnke, O.: Electron microscopic observation on the membrane system of the rat blood platelet. *Anat. Res.*, **158**; 121~138, 1967.
- 2) Jamieson, G.A., Okumura, T. and Hasitz, M.: Structure and function of platelet glycolocalicin. *Throm. Haemostas.*, **42**; 1673~1678, 1979.
- 3) Okumura, T., Hasitz, M. and Jamieson, G.A.: Platelet glycolocalicin. *J. Biol. Chem.*, **253**; 3435~3443, 1978.
- 4) Greenberg, J.H. and Jamieson, G.A.: The effects of various lectins on platelet aggregation and release. *Biochem. Biophys. Acta.*, **345**; 231~242, 1974.
- 5) Tollefsen, D.M., Feagler, J.R. and Majerus, P.W.: Introduction of platelet release reaction by phytohemagglutinin. *J. Clin. Invest.*, **53**; 211~218, 1974.
- 6) Majerus, P.W. and Brodie, G.N.: The binding of phytohemagglutinins to human platelet plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, **247**; 4253~4257, 1972.
- 7) Le Vine, D., Kaplan, M.J. and Greenaway, P.J.: The purification and characterization of wheat-germ agglutinin. *Biochem. J.*, **129**; 847~856, 1972.
- 8) Greenaway, P.J. and Le Vine, D.: Binding of N-acetyl-neuraminic acid by wheat germ agglutinin. *Nature New Biology*, **241**; 191~192, 1973.
- 9) Clemetson, K.J., Pfueller, S.L., Luscher, E.F. and Jenkins, C.S.P.: Isolation of the membrane glycoproteins of human blood platelets by lectin affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta.*, **464**; 493~508, 1977.
- 10) 千川就可, 四元正一, 河口幸博, 白沢健二朗:

- 陽性化フェリチンによる血小板形質膜の陰性荷電の動態とそれに伴う血小板の活性化について. Tr. Soc. Pathol. Jpn., **71**; 91, 1982.
- 11) Nicolson, G.L.: Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells. I. Cytoplasmic influence over cell surface components. Biochim. Biophys. Acta., **457**; 57~108, 1976.
- 12) 四元正一, 河口幸博, 室谷哲弥, 白沢健二朗: Colchicine, Cytochalasin B の血小板の latex 粒子の摂取および ADP 凝集反応に及ぼす影響. 血液と脈管, **10**; 436~444, 1979.
- 13) Hirano, H. and Kawakami, H.: Redistribution of surface-bound ligands in blood platelets as revealed by electron microscopy. Acta Haematol. Jpn., **45**; 1335~1345, 1982.
- 14) Jamieson, G.A. and Smith, D.F.: Characterization of plasma membranes from platelets. (ed. Gordon, J.L.: Platelets in Biology and Pathology), North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1976, p. 89.
- 15) Seaman, G.V.F.: The surface chemistry of the erythrocyte and thrombocyte membrane. J. Supramol. Struct. 437~447, 1973.

●代謝と酵素の異常を総まとめ！

赤血球酵素の基礎と臨床

編集 東京大学内科教授 三輪史朗 専門医38氏分担執筆
A 5 判 411 頁 図147 表97 定価8,800円(千200円)

酵素欠乏症は、最近では構造遺伝子変異により構造が異なり、そのため機能上欠陥のある異常酵素の産生によることがわかって、酵素異常症と呼ぶ方が適切と考えられるようになった。本書は赤血球の代謝や酵素の正常と異常の研究の現状をまとめて、genetic markerとしての赤血球酵素のすべてを解説した。臨床医のみならず、血液学、生化学、栄養学、人類学、遺伝学に携わる方々の恰好の参考書である。

●内容：第1章 赤血球酵素研究の進歩と問題点、第2章 赤血球の解糖調節と解糖に伴う熱発生、第3章 Pyruvate kinase deficiency, 第4章 Glucosephosphate isomerase deficiency, 第5章 Glucosephosphate isomerase deficiency, 第6章 赤血球ホスホフルクトキナーゼとその異常症、第7章 先天性phosphoglycerate kinase欠乏症、第8章 PGK Matsue, 第9章 PGK欠乏症の筋病変、第10章 先天性2,3-ジホスホグリセロムターゼ異常症、第11章 赤血球酵素異常と2,3-DPG およびヘモグロビンの酸素運搬能、第12章 2,3-DPGとHbとの結合、第13章 H型乳酸脱水素酵素欠損症、第14章 新しく発見された6種のG6PD variantについて、第15章 Erythrocyte glutathione peroxidase deficiency, 第16章 赤血球のピリミジン特異性5'-ヌクレオチダーゼ、第17章 Glutathione reductase, 第18章 二次性赤血球酵素欠乏症、第19章 鉄芽球性貧血における酵素異常、第20章 赤血球酵素の遺伝的多型、第21章 先天性メトヘモグロビン血症とチトクロームb₅還元酵素、第22章 Lesch-Nyhan症候群とHypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, 第23章 東洋における無カタラーゼ血液症と低カタラーゼ血液症、第24章 赤血球膜ATP ase, 第25章 Protein kinase, 総括。