ヒト血小板の PMA (phorbol myristate acetate) 前処理による刺激応答の変化

服部 浩明* 中島 茂* 東松 豊彦*
岡野 幸雄* 野沢 義則*

Effects of PMA on responses and membrane phospholipid metabolism in human platelets

Hiroaki HATTORI*, Shigeru NAKASHIMA, Toyohiko TOHMATSU*,
Yukio OKANO* and Yoshinori NOZAWA*

Key words: human platelet, membrane phospholipid metabolism,
inositol phosphates, PMA, Ca^{2+} mobilization

The effects of tumor promoter (PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate) on thrombin-stimulated human platelet responses and membrane phospholipid metabolism were investigated. Thrombin (0.1 U/ml)-induced serotonin release was inhibited by pretreatment with PMA (50 $\mu\text{g/ml}$) for 5 min. This inhibition was associated with a suppression of polyphosphoinositide breakdown and increase of cytoplasmic free Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). PMA was observed to increase the incorporation of [^{32}P]phosphate into phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2) and phosphatidylinositol 4-phosphate (PIP). This indicates that treatment with PMA suppresses the hydrolysis of PIP_2 by phospholipase C, resulting in the insufficient supply of a Ca^{2+} releaser, IP_3 . A considerably high radioactivity in PIP would be due to the enhanced conversion of phosphatidylinositol (PI) to PIP via PI kinase rather than the inhibited PIP breakdown, since there was no indication of PIP hydrolysis during stimulation with thrombin alone. These observations provide evidence that protein kinase C subserves a negative feedback role in a receptor-mediated cell activation.

* 岐阜大学医学部生化学〔〒500 岐阜市司町 40〕, Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan.

はじめに

血小板活性化反応はイノシトールリン脂質の代謝亢進と密接に関連している¹⁾²⁾。つまり、トロンビンなどのアゴニストにより、ホスホリパーゼCを介するポリホスホイノシチド (PPI) の加水分解が起こり、1, 2-ジアシルグリセロール (DG) とイノシトール三リン酸 (IP_3) が産生される。この 1, 2-DG はCキナーゼを活性化し³⁾, IP_3 は細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 動員を促し細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる⁴⁾ との報告もあり、膜リン脂質代謝が血小板活性化機構の初発現象として注目されている。ところで、PMA は 1, 2-DG を産生することなくキナーゼに直接作用し細胞活性化に促進的に作用する⁵⁾ ことが知られているが、最近分泌反応や Ca^{2+} 動員などに対して抑制的に作用する⁶⁾⁷⁾ ことも報告されている。そこで本報では、PMA 前処理におけるヒト血小板活性化反応について検討した。

I. 材料と方法

放出反応は [^{14}C] 5-HT 標識血小板を用いて測定した⁸⁾。膜リン脂質代謝は [3H] アラキドン酸あるいは [^{32}P] リン酸標識血小板から脂質抽出後、薄層クロマトグラフィーで各リン脂質を分離し、それぞれの画分の放射活性を測定した⁹⁾。 [3H] イノシトール標識血小板からは脂質抽出時の水層をイオン交換樹脂 AG-1 ($\times 8$ 酸型)によりイノシトールリン酸を分画した¹⁰⁾。細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) は quin 2 の蛍光変化により検討した¹¹⁾。

II. 結 果

放出反応はトロンビン (0.1 U/ml) 刺激69.0 %に対し、PMA (50 ng/ml) 前処理 (5分間) トロンビン刺激44.9%であった。イノシトールリン酸の産生では、 IP_3 , IP_2 はトロンビン刺激後1分間でコントロールに比して250, 199%, PMA 前処理トロンビン刺激では 133, 115%であった (表1)。また、 PIP_2 および PIP の分解、ホスファチジン酸産生も PMA 前処理により抑制された。一方、PMA 前処理により [^{32}P]

Table 1 Effects of PMA on thrombin-induced inositol phosphate formation in human platelets.

	Percent of control		
	IP_3	IP_2	IP
Control	100	100	100
PMA (50 ng/ml)	113	105	102
Thrombin (0.1 U/ml)	250	199	124
PMA+Thrombin	133	115	106

Samples (0.5 ml) of [3H]inositol-labeled platelet suspension were preincubated with PMA (50 ng/ml) for 5 min before addition of thrombin (0.1 U/ml) for 60 sec. Results are expressed as percentage of control. Each value is the mean of duplicate determinations from two experiments.

Fig. 1 Time course of incorporation of [^{32}P]phosphate into polyphosphoinositides by PMA.

Samples of [^{32}P]phosphate-labeled platelet suspension were incubated with PMA (50 ng/ml) for indicated time at 37°C . Each points represents the mean of duplicate determination from two experiment. $\circ$, Δ , $\square$, without PMA. $\bullet$, $\blacktriangle$, $\blacksquare$, with PMA. PI, phosphatidylinositol; PIP, phosphatidylinositol 4-phosphate; PIP_2 , phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate.

リン酸の PIP および PIP_2 への取り込み増加も観察された (図1)。 $[Ca^{2+}]_i$ 動態については、PMA 前処理によりトロンビンによる quin 2 螢

光の増加が抑えられた。また、ホスホリパーゼ A₂ 活性においても PMA 前処理によりアラキドン酸遊離が低下した。

III. 考 察

ヒト血小板において PMA を前処理することにより、分泌反応が抑制され、さらにホスホリパーゼ C による PIP₂ の分解が抑えられ、その代謝産物である IP₃ の産生低下のため貯蔵部位からの [Ca²⁺]_i 動員が阻害されたことが示唆された。一方、PI キナーゼ系の活性化により PI → PIP → PIP₂ のリン酸化系は促進されている。すなわち、これらの PMA の効果は、PMA が C キナーゼを活性化する³⁾⁵⁾により、C キナーゼが抑制的に作用しているものと推測される¹²⁾。つまり、ホスホリパーゼ系に対しては抑制的に、PI キナーゼ系に対しては促進的に作用している。かくして、PIP₂ を蓄積し、次の刺激応答に備えるものと考えられる。

文 献

- 1) Rittenhouse-Simmons, S.: Production of diglyceride from phosphatidylinositol in activated human platelets. *J. Clin. Invest.*, **63**; 580~587, 1979.
- 2) Holub, R.J.: Altered phospholipid metabolism in thrombin-stimulated human platelets. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*, **62**; 341~351, 1984.
- 3) Nishizuka, Y.: The role of protein Kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, **308**; 693~697, 1984.
- 4) Berridge, M.J. and Irvine, R.F.: Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312**; 315~321, 1984.
- 5) Yamanishi, J., Takai, Y., Kaibuchi, K., Castagna, M. and Nishizuka, Y.: Synergistic functions of phorbol ester and calcium in serotonin release from human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**; 778~786, 1983.
- 6) Zavoico, G.B., Halenda, S.P., Sha'afi, R.I. and Feinstein, M.B.: Phorbol myristate inhibits thrombin-stimulated Ca²⁺ mobilization and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate hydrolysis in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**; 3859~3862, 1985.
- 7) de Chaffoy de Courecelles, D., Roevens, P. and van Belle, H.: 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate stimulates inositol lipid phosphorylation in intact human platelets. *FEBS Lett.*, **173**; 389~395, 1984.
- 8) Imai, A., Hattori, H., Takahashi, M. and Nozawa, Y.: Evidence that cyclic AMP may regulate Ca²⁺-mobilization and phospholipases in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**; 693~700, 1985.
- 9) Imai, A., Yano, K., Kameyama, Y. and Nozawa, Y.: Evidence for predominance of phospholipase A₂ in release of arachidonic acid in thrombin-activated platelets: Phosphatidylinositol-specific phospholipase C may play minor role in arachidonate liberation. *Jpn. J. Exp. Med.*, **52**; 99~105, 1982.
- 10) Yano, K., Higashida, H., Hattori, H. and Nozawa, Y.: Bradykinin-induced transient accumulation of inositol trisphosphate in neuron-like cell line NG108-15 cells. *FEBS Lett.*, **181**; 403~406, 1985.
- 11) Tsien, R.Y., Pozzan, T. and Rink, T.J.: Calcium homeostasis in intact lymphocytes: Cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell. Biol.*, **94**; 325~334, 1982.
- 12) Watson, S.P. and Lapetina, E.G.: 1, 2-Diacylglycerol and phorbol ester inhibit agonist-induced formation of inositol phosphates in human platelets: Possible implications for negative feedback regulation of inositol phospholipid hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **82**; 2623~2626, 1985.
- 13) Halenda, S.P. and Feinstein, M.B.: Phorbol myristate acetate stimulates formation of phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**; 507~513, 1984.