活性化ヒト血小板におけるイノシトールリン酸 産生と Ca^{2+} 動態

東松 豊彦* 中島 茂* 服部 浩明*
岡野 幸雄* 野沢 義則*

Formation of inositol phosphates and Ca^{2+} mobilization in thrombin-activated human platelets

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

Key words: human platelets, inositol phosphates, Ca^{2+}
mobilization, phosphoinositide, thrombin

In human platelets both membrane phospholipid metabolism and Ca^{2+} mobilization are known to be closely associated with signal transduction. Phosphoinositide metabolism and changes in cytoplasmic Ca^{2+} level were investigated in [^3H]inositol-labeled and quin 2-loaded platelets respectively.

In the presence of 1 mM CaCl_2 thrombin (0.1–1.0 U/ml) caused a transient decrease in [^3H]phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PIP_2) and the rapid formation of [^3H]inositol trisphosphate (IP_3) within 10 seconds. [^3H]Inositol bisphosphate was also accumulated in the early phase but [^3H] inositol monophosphate was accumulated later. The formation of [^3H]inositol phosphates was not affected by 1 mM EGTA. PIP_2 was resynthesized above the initial level and [^3H]phosphatidylinositol 4-phosphate (PIP) increased. [^3H]Phosphatidylinositol was found to be a lipid pool for PIP and PIP_2 . Cytoplasmic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) increased rapidly coinciding with the process of IP_3 formation and thereafter declined gradually toward the resting value. Under conditions that IP_3 formation was inhibited a small increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed. Moreover IP_3 was observed to be a Ca^{2+} releaser from Ca^{2+} -accumulating human platelet membranes.

These results indicate that a series of phosphoinositides metabolism may regulate the formation of second messengers to be contributory to human platelet 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

ヒト血小板活性化に伴い、ホスファチジルイノシトール 4, 5 ニリン酸 (PIP_2) を含むイノシトールリン脂質 (IPL) 代謝が亢進する¹⁾。IPL の分解産物であるジアシルグリセロール (DG) は C キナーゼを活性化し²⁾、 PIP_2 の分解産物であるイノシトール三リン酸 (IP_3) については、細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離を促すとの報告がなされている³⁾。本報告では、ヒト血小板における IPL の役割を解明するためにイノシトールリン酸 (IPs) 産生と Ca^{2+} 動態との相関について検討を加えた。

I. 材料と方法

既報¹⁾に従い洗浄血小板を調整し、 $[^3\text{H}]$ イノシトールで標識した後に⁴⁾、10 mM LiCl 存在下でトロンビン (0.1~1.0 U/ml) 刺激を加えた。ついで Bligh-Dyer 法⁵⁾に準じ(塩酸添加)⁶⁾脂質抽出を行い、その水層はイオン交換クロマトグラフィー (AG 1×8 ギ酸型樹脂)⁷⁾、脂質層は薄層クロマトグラフィーにより¹⁾、おのおの、 IP_3 、IPL を分画した。細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) は quin 2 の蛍光変化により測定した⁸⁾。血小板凝集はアグリゴメーターにより、セロトニン放出は $[\text{C}^{14}]$ セロトニン標識血小板を用いて測定した。また血小板膜小胞は超音波処理を施し遠心分画により調整した⁹⁾。

II. 結 果

1.0 U/ml トロンビン刺激後早期にセロトニン放出が誘起され20~30秒では完了するが、凝集は1分以後よりプラトーに達した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は刺激後5~10秒から急激に増加し、その後漸減する傾向を示した (図1)。 IPs については (図2)、刺激後10秒以内に IP_3 が産生され30秒以後ではほぼプラトーに達した。イノシトールニリン酸もまた早期に増加するのに対して、イノシトール一リン酸は30秒より増加を示した。このような IPs 産生は外液 Ca^{2+} に影響されなかった。同一試料の IPL 代謝については、刺激後10秒以内に PIP_2 が一過性に減少したのに対し

Fig. 1 Time courses of thrombin-stimulated aggregation, release of $[\text{C}^{14}]$ serotonin (5-HT) and a change in cytoplasmic free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in the presence of 1 mM CaCl_2 . Human platelets were incubated with 1 U/ml thrombin for indicated time at 37°C.

Fig. 2 Time courses thrombin-stimulated changes in inositol monophosphate (IP), inositol bisphosphate (IP_2) and inositol trisphosphate (IP_3) in the presence of 1 mM CaCl_2 . $[\text{C}^{3}\text{H}]$ Inositol-labeled human platelets were incubated with 1 U/ml thrombin for indicated time at 37°C. thrombin ●—●, control ○—○.

ホスファチジルイノシトール 4 リン酸 (PIP) は増加を示した。またホスファチジルイノシトール (PI) は経時的に減少した。血小板を 1 mM ジブチリル cAMP, 1 mM 8 ブロモ cGMP, あるいは 50 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA) で 5 分間インキュベートした後トロンビンを加えると IP_3 産生が抑えられ、また $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇の程度も減少した。また、分離した血小板膜小胞に 10 μM IP_3 を添加すると Ca^{2+} 遊離が観察された。

III. 考 察

ヒト血小板をトロンビンで刺激すると、早期に PIP_2 分解および IP_3 産生がおこるが、これは細胞外 Ca^{2+} には非依存性である¹⁰⁾。サイクリックヌクレオチドあるいは PMA 存在下では IP_3 産生、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇がともに抑えられること、および IP_3 添加により血小板膜小胞から Ca^{2+} が遊離することより、 IP_3 は細胞内において Ca^{2+} releaser として作用することが示唆された。PI はすべてが分解するのではなく、一部はさらにリン酸化され、PIP や PIP_2 に対する脂質プールとして機能していると考えられる。これら一連の IPL 代謝がセカンドメッセンジャーである IP_3 や DG の産生を調節しヒト血小板の機能発現に関与しているものと考えられた。

文 献

- 1) Imai, A., Nakashima, S. and Nozawa, Y.: The rapid polyphosphoinositide metabolism may be a triggering event for thrombin-mediated stimulation on platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**; 693~697, 1984.
- 2) Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, **308**; 693~697, 1984.
- 3) Berridge, M.J.: Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312**; 315~321, 1984.
- 4) Watson, S.P., McConnell, R.T. and Lapetina,

E.G.: The rapid formation of inositol phosphate in human platelets by thrombin is inhibited by prostacyclin. *J. Biol. Chem.*, **259**; 13199~13203, 1984.

- 5) Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**; 911~917, 1959.
- 6) Marche, P., Koutouzov, S. and Myer, P.: Metabolism of phosphoinositides in the rat erythrocyte membrane: A reappraisal of the effect of magnesium on the ^{32}P incorporation into polyphospho-inositides. *Biochim. Biophys. Acta*, **710**; 332~340, 1982.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Dean, W.L. and Sullivan, D.M.: Structural and functional properties of a Ca^{2+} -ATPase from human platelets. *J. Biol. Chem.*, **257**; 14390~14394, 1982.
- 10) 岡野幸雄, 中島 茂, 今井篤志, 東松豊彦, 服部浩明, 高木 肇, 野沢義則: ヒト血小板における Ca^{2+} 動態の再検討—細胞外 Ca^{2+} の役割—。血液と脈管, **16**; 183~186, 1985.

● 疾病の免疫遺伝学的アプローチ!

HLA と 疾病

月刊「臨床免疫」第14巻冬季特別増刊号

編集 慶応大学教授 渡辺 格、東海大学教授 辻 公美、専門医22氏分担執筆

B5判 144頁 定価3,500円(〒300円)

〒101 東京都千代田区神田多町2-11

科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768