アクチン修飾剤の活性化血小板蛋白質 リン酸化反応に及ぼす影響について

橋本 孝二* 瓦林 佳子** 朴 勤植** 橋本 幸蔵**
任 太性** 巽 典之** 奥田 清**

Effects of actin modification reagents on protein phosphorylation of activated platelets

Koji HASHIMOTO*, Keiko KAWARABAYASHI**, Keunsik PARK**,
Kozo HASHIMOTO**, Taesung IM**, Noriyuki TATSUMI**
and Kiyoshi OKUDA

Key words: phosphorylation, platelet secretion,
cytochalasin B, phalloidin, actin

We studied the effects of cytochalasin B and phalloidin on platelet secretion and protein phosphorylation induced by ionophore A23187.

(1) Preincubation of platelets with cytochalasin B or phalloidin suppressed the ATP release induced by A23187 in a dose dependent manner.

(2) In the absence of these reagents, exposure of ^{32}P -labelled platelets to A23187 resulted in increased phosphorylation of the 20,000-dalton protein (P20) and the 47,000-dalton protein (P47).

(3) Treatment of ^{32}P -labelled platelets with cytochalasin B or phalloidin suppressed the increased phosphorylation of both P20 and P47 caused by A23187.

In conclusion, it was considered that intact network configuration of actin filaments would support full phosphorylation of P20 and P47 during platelet activation.

* 大阪市立大学医学部第二生化学〔〒545 大阪市阿倍野区旭町 1-5-7〕, Department of Biochemistry, Osaka City University, Osaka, Japan.

** 同 臨床検査医学, Department of Laboratory Medicine, Osaka, City University, Osaka, Japan.

はじめに

血小板の活性化反応、特に放出反応にともなう分子量20Kダルトンの蛋白質(P20)と47Kダルトンの蛋白質(P47)がリン酸化を受けることが知られている¹⁻³⁾。P20はミオシン軽鎖であり⁴⁾、ミオシン軽鎖キナーゼにより、リン酸化を受けアクチオミオシンの相互作用に重要な調節作用を果たしていることが知られているのに対し、P47はCキナーゼによりリン酸化を受けることは判明している⁵⁾が、まだその生理的役割は不明である。今回われわれはアクチン修飾剤であるサイトカラシンBおよびファロイジンの蛋白質リン酸化反応に及ぼす影響を調べ、血小板放出反応における収縮蛋白とリン酸化反応の関連性について検討したので報告する。

I. 方法

ヒト洗浄血小板浮遊液をFoxらの方法⁶⁾に準じて作製し、 $[^{32}\text{P}]$ 正リン酸で標識した後、サイトカラシンB ($40\text{ }\mu\text{M}$) もしくはファロイジン ($100\text{ }\mu\text{M}$) を添加し、 37°C で30分間インキュベーションを行った後、イオノフォアA23187 ($4\text{ }\mu\text{M}$) にて刺激を加えた。SDS-PAGE、オートラジオグラフィーを行い、リン酸化反応の時間的経過を追跡した。血小板放出反応はLumi-Aggregometerを用いてATP放出を観察した。

II. 結果

1) サイトカラシンBは $5\text{ }\mu\text{M}\sim 40\text{ }\mu\text{M}$ の範囲で、ファロイジンは $0\sim 200\text{ }\mu\text{M}$ の範囲で濃度依存性にA23187刺激によるATP放出を抑制した。 IC_{50} はそれぞれ $20\text{ }\mu\text{M}$ 、 $40\text{ }\mu\text{M}$ であった。

2) P20のリン酸化は刺激後15秒がピークで刺激前の約3倍に達し、その後脱リン酸化を受け5分後にはほぼ刺激前のレベルに復した。一方P47のリン酸化は刺激後1分がピークで刺激前の約4倍に達し、その後徐々に脱リン酸化され、10分後に刺激前のレベルに復した。

3) サイトカラシンB、ファロイジンで前処理した血小板ではともにA23187刺激によるP

Fig. 1 Effects of cytochalasin B on phosphorylation of P20 (A) and P47 (B)
●—●; control, ■—■; cytochalasin B ($40\text{ }\mu\text{M}$) Each point indicates the mean $\pm$ S.E. of 3 experiments.

20およびP47のリン酸化は明らかに抑制を受けたが、P47においてより抑制は強くみられた。両薬剤による差は明らかではなかった(図1, 2)。

III. 考察

以上の結果より、サイトカラシンBおよびファロイジンの血小板放出反応に対する阻害効果は主にアクチンに対する作用によるものと考えられるため、*in vivo*での血小板活性化の過程でP20とP47が十分にリン酸化反応を受けるためには、細胞骨格としてのアクチンの規則的な配列状態が必要である可能性が示唆された。

Fig. 2 Effects of phalloidin on phosphorylation of P20 (A) and P47 (B)
 ●—●; control, ■—■; phalloidin (100 μ M) Each point indicates the mean $\pm$ S.E. of 3 experiments.

文 献

1) Lyons, R.M., Standford, N., Majerus,

P.W.: Thrombin-induced protein phosphorylation in human platelets. *J. Clin. Invest.*, **56**; 924~936, 1975.

2) Haslam, R.J., Lynham, J.A.: Relationship between phosphorylation of blood platelet proteins and secretion of platelet granule constituents. I. Effect of different aggregating agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**; 714~722, 1977.

3) Haslam, R.J., Lynham, J.A., Fox, J.E.B.: Effects of collagen, ionophore A23187 and prostaglandin E_1 on the phosphorylation of specific proteins in blood platelets. *Biochem. J.*, **178**; 397~406, 1979.

4) Adelstein, R.S., Conti, M.A., Anderson, W. Jr.: Phosphorylation of human platelet myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **70**; 3115~3119, 1973.

5) Sano, K., Takai, Y., Yamanishi, J., Nishizuka, Y.: A role of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in human platelet activation. *J. Biol. Chem.*, **258**; 2010~2013, 1983.

6) Fox, J.E.B., Phillips, D.R.: Role of phosphorylation in mediating the association of myosin with the cytoskeletal structures of human platelets. *J. Biol. Chem.*, **257**; 4120~4126, 1982.