アクチン重合化反応における血小板膜脂質分画の関与

橋本 幸藏* 橋本 孝二* 三宮 祐一*
吉川 岳男* 任 太性* 巽 典之*

Effect of platelet membrane lipid fraction on actin polymerization

Kohzo HASHIMOTO*, Kohji HASHIMOTO*, Yuichi SANNOMIYA*,
Takeo YOSHIKAWA*, Taesong IM* and Noriyuki TATSUMI*

Key words: platelet membrane, lipid, actin polymerization

Effects of membrane fraction of human platelets on polymerization of actin have been examined. Freshly prepared membrane fraction inhibited the polymerization, whereas the membrane fraction which was once frozen after preparing fresh membrane fraction accelerated the polymerization. Liposomes which were composed of lipids obtained from the platelet membrane showed higher acceleration of the polymerization. When the membrane fraction was pretreated with thrombin or phospholipase A₂, acceleration of actin polymerization was observed by the fraction. Pretreatment with phospholipase C, however, showed no effect on the polymerization. Liposomes formed by PtdIns (4, 5) P₂ showed highest acceleration. From these findings we concluded that not only changes in free calcium ion level, but also some conformational change or electric charge of the membrane would be responsible to the induction of actin polymerization.

目 的

血小板の活性化による細胞内 Ca⁺⁺ 濃度の上昇が、プロフィリンのようなアクチン重合化阻止蛋白の解離を可能にしアクチンの重合を開始すると考えられている¹⁾。しかし、EDTA 存在

下の血小板を刺激する事においても、血小板アクチンが容易に重合しうる事より²⁾、他のトリガーの存在が示唆される。

我々は、刺激のきわめて初期の段階で何らかのシグナルがアクチンの重合化に関与していると考え血小板膜との反応を試み、興味あるデー

* 大阪市立大学医学部臨床検査医学教室〔〒545 大阪市阿倍野区旭町 1-5-7〕, Department of Clinical and Laboratory Medicine, Osaka City University Medical School, Osaka, Japan.

Fig. 1 Effects of platelet membrane fraction on actin polymerization.

G-actin (final concentration 0.94 mg/ml) and a platelet membrane fraction which was suspended in a solution containing 40 mM KCl, 1 mM EGTA, 10 mM PIPES (pH 6.8) were mixed. (A) Utilization of intact membrane fraction, (B) addition of thrombin after mixing actin and intact membrane fraction, (C) addition of actin after treatment of intact membrane with thrombin, (D) utilization of frozen membrane fraction, and (E) utilization of liposomes made of membrane lipids. The mixture was incubated for 30 min at 25°C and its viscosity was measured.

タを得たので報告する。

I. 材料と方法

アクチンは Spudich と Watt の方法³⁾ で抽出した。血小板膜は Barber と Jamieson の方法⁴⁾ で抽出した。血小板アクチンの抽出と DNase I での測定は橋本らの方法⁵⁾ で行った。egg lecithin, Ptds, PtdIns, Ptp Ins (4, 5) P₂ Phospholipase C, Phospholipase A₂ は、シグマ社を使用した。粘度は増原の方法⁶⁾ で測定した。リボソームは、血小板膜をクロロフォルムで抽出後橋本らの方法⁷⁾ で作製した。

II. 成績

①分離血小板膜に G-アクチンを作用させた

Fig. 2 Effects of enzyme-treated membrane fraction on actin polymerization.

Membrane fraction was treated with 5 units PL-A₂ (closed column) or 3 units PL-C (open-column) for 1-10 min at 25°C and the viscosity of actin solution mixed with membrane fraction was measured, V1, viscosity of actin solution mixed with enzyme-treated membrane fraction; V2, viscosity of actin solution mixed with enzyme-untreated membrane fraction.

場合、重合化は、コントロールよりも抑制されている結果を得た。②分離血小板膜を 4°C で一夜放置または、-70°C で保存後のものを作用した場合、G-アクチンの重合化は、コントロールよりも促進されている結果を得た。すなわち温度変化による物理的な膜への影響が、アクチン重合化に関与すると考えられた。また、③分離血小板膜をトロンビンで処理した後 G-アクチンを作用させた場合、トロンビン未処理血小板膜に比し若干重合化が促進された。これらの結果より、シグナルを介しての生化学的な作用と物理的直接作用が、アクチンの重合化に影響を与えていると考え、Phospholipase (PL) による処理を試みた。また、同時に、血小板膜より脂質を抽出後、リボソームを作成し、G-アクチンを作用させた。PL 処理において ④ PL-C は、重合化に影響を与えなかった。⑤ PL-A₂

は、1分処理で重合化を促進した。また、リボソームとの反応では、最もアクチンは重合した。その結果、各リン脂質成分との反応を試みた。リン脂質成分との反応PtdIns (4, 5) P_2 が最も重合化を促進した。

III. 結 論

アクチンの重合化は、分離血小板膜において、リン脂質が関与しており、このリン脂質に対しての PL- A_2 の作用が重合化を開始させるトリガーとなりえることが示唆された。

文 献

- 1) Markey, J., Persson, T. and Linberg, U.: Characterization of platelet extracts before and after stimulation with respect to the possible role of profilactin as microfilament precursor. *Cell.*, **23**; 145~153, 1985.
- 2) Pribluda, J., Laub, F. and Rotman, A.: The state of actin in activated human platelets. *Eur. J. Biochem.*, **116**; 293~296, 1981.
- 3) Spudich, J.A. and Watt, S.: The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. *J. Biol. Chem.*, **246**; 4866~4871, 1971.
- 4) Barber, A.J. and Jamieson, G.A.: Isolation and characterization of plasma membrane from human blood platelets. *J. Biol. Chem.*, **245**; 6357~6365, 1970.
- 5) Hashimoto, K. and Tatsumi, N.: N-ethylmaleimide cannot inhibit actin polymerization in platelets. *Biochem. International*, **12**; 653~660, 1986.
- 6) Masuhara, M., Yokoyama, J. and Tatsumi, N.: Theoretical studies on capillary microviscometry of skeletal muscle actin. *Biosci. Rep.*, **3**; 195~206, 1983.
- 7) 橋本幸藏, 巽 典之: *In vitro* モデルとしての人工膜と actin との反応. 医学と生物学, **110**; 303~306, 1985.

●わが国唯一のビタミンB₁₂研究の完全な集大成!

ビタミンB₁₂ —基礎と臨床—

編集 京都大学内科教授 内野治人 専門医24氏分担執筆

A 5判 367頁 図157 表73 定価7,800円(〒300円)

ビタミンB₁₂は最も新しく発見されたものであるが、その構造の特異性や作用の独自性から、その研究の進歩は著しいものがある。最近では、その同族体の臨床応用が広がってきたものの、生化学、酵素学などの基盤にたった合理的な使用法はまだほど遠い所にある。本書はわが国でのB₁₂研究を現時点で集大成し、関係各方面の研究者に便ならしめた。

●内容: 第1章 ビタミンB₁₂研究の進歩と問題点, 第2章 ビタミンB₁₂の吸収, 第3章 ビタミンB₁₂の腸管吸収機構, 第4章 Whole body counterのビタミンB₁₂吸収試験ならびにB₁₂代謝への応用, 第5章 悪性貧血と胃の自己免疫, 第6章 悪性貧血の成因に関する自己免疫の考察, 第7章 ビタミンB₁₂の生体内転換利用, 第8章 ビタミンB₁₂結合蛋白, 第9章 Acid-resistant binding capacity と "granulocyte related" binding proteinについて, 第10章 トランスコバラミンII欠乏症, 第11章 ビタミンB₁₂のradioassay, 第12章 ビタミンB₁₂と葉酸代謝, 第13章 ビタミンB₁₂と中毒, 第14章 巨赤芽球性貧血, 第15章 尿中メチルマロン酸排泄とビタミンB₁₂代謝, 第16章 高ビタミンB₁₂血症, 第17章 ビタミンB₁₂代謝と神経系, 第18章 ビタミンB₁₂と神経疾患。