Serine protease inhibitor の血小板凝集 抑制機序に関する検討

程原 佳子* 藤山 佳秀* 細田 四郎* 安永幸二郎**

Mechanism of inhibitory effects of serine protease inhibitors of platelet aggregation

Keiko HODOHARA*, Yoshihide FUJIYAMA*, Shiro HOSODA*
and Kohjiro YASUNAGA**

Key words: human platelet aggregation, cytoskeleton, serine protease
inhibitors, cytosomal protease, nafamostat mesilate

We reported the effects of serine protease inhibitors on the interaction of platelet cytoskeletal proteins. Serine protease inhibitors such as PMSF, FOY-007 or FUT-175 and aspirin inhibited the incorporation of myosin heavy chain into the 1% Triton X-100 insoluble residue during the aggregation induced by ADP. FUT-175 also suppressed the incorporation of actin binding protein and fibrinogen into the cytoskeletons. This may result in the inhibition of not only the second aggregation but also the primary wave of aggregation. Anti-hydrolytic activity of FUT-175 against trypsin was recovered in cytosol fraction at least 2×10^{-6} M, when platelets were incubated with this agent, 10^{-4} M. This seems to indicate that FUT-175 has unique site(s) of action in cytosol which is related to the inhibition of integration of cytoskeletons during the process of platelet aggregation besides its action on arachidonate metabolism. In fact, zymogram of platelet cytosol fraction with Tosyl-L-lysine α -naphthyl ester as substrate, demonstrated 5 active bands (pl. 9.2, 8.1, 6.25, 5.9, 5.3, 4.4). Some of these cytosomal serine proteases might act as an important role in the formation of cytoskeletons during the process of platelet reaction.

* 滋賀医科大学第二内科 [〒520-21 大津市瀬田月輪町], The 2nd Department of Internal Medicine, Shiga University of Medical Science, Shiga, Japan.

** 関西医科大学第一内科, The First Department of Internal Medicine, Kansai Medical School, Osaka, Japan.

はじめに

われわれは、serine protease 阻害剤の血小板凝集抑制作用の機序を検討するうち、強力な阻害剤である FUT-175 がアラキドン酸代謝に対する作用を介さず、細胞骨格蛋白の動員を抑制することを見いだした¹⁾。今回、各細胞骨格蛋白の動態への serine protease 阻害剤の影響を検討すると共に、血小板における protease 活性を高感度基質 Tosyl-L-lysine α -naphthyl ester (TLNE)²⁾を用いて検討したので報告する。

I. 方法

1. 正常人 PRP を用いて Phillips ら³⁾の方法に準じ、惹起物質添加後、各時点で 1% Triton X-100 にて抽出し、不溶性蛋白を SDS-PAGE で解析した。

2. Mustard の方法⁴⁾によって作製した洗浄血小板より、超音波処理、超遠心にて cytosol fraction を得た。8 M urea, 2% ampholine (pH 3-10) を含む rod gel で等電点電気泳動を行った後、0.5 μ M TLNE, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ を含む 0.25 M phosphate buffer (pH 7.4) で incubate し、0.1% Fast violet にて発色させ、zymogram を得た。

3. 同じく cytosol fraction を Benzamidine Sepharose 6 B に apply し、0.1 M 酢酸 0.4 M NaCl で protease 分画を溶出した。一部は、TLNE を用いて活性を測定し、他は凍結乾燥後、等電点電気泳動を行ない、蛋白染色した。

II. 結果および考察

1. Triton 不溶性蛋白の動態をみると、ADP による完全な凝集反応では、不可逆的な ABP、

Fig. 1-a SDS-PAGE of Triton X-100 insoluble proteins of platelets stimulated with 5 μ M ADP.

1-b Time-dependent changes in the platelet cytoskeletal protein composition.

Platelet rich plasma was incubated with 5 μ M of ADP in the absence (1-a A) or the presence (1-a B) of FUT-175, for various periods of time indicated in the figure 1-b. Then the platelets were extracted with 1% Triton X-100, and the insoluble residue was separated by centrifugation. The residue thus obtained was treated with 2% SDS 2% β -mercapto ethanol, and applied to 5-20% gradient gel. (Fig. 1-a) The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue and the area of individual peak was measured on densitometry scan. The amount of proteins increased in the insoluble residue were expressed as a ratio to those of intact platelets. (Fig. 1-b)

MHC, fibrinogen 及び actin の動員が必要である。これに対して, PMSF, FOY, aspirin は MHC の動員を抑制して二次凝集及び ATP 放出を抑制し, FUT-175 は shape change に伴う一過性の MHC の増加は抑えないものの, ABP, MHC, fibrinogen の動員を抑制することにより一次凝集をも抑制した (図 1)。一次凝集のみを惹起する低濃度 ADP による凝集に対しては, FUT-175 は主に fibrinogen の動員を抑制した。これらのことから, 放出反応を伴う二次凝集には MHC の動員が必要であり, これにアラキドン酸代謝物が促進的に働くと考えられた。しかし, FUT-175 の一次凝集抑制作用は, さらに fibrinogen の Triton 不溶性蛋白への動員抑制にあると考えられた。TLNE の trypsin による hydrolysis に対する抑制活性で見ると, FUT-175 10^{-4} M 添加血小板では cytosol fraction に 2×10^{-6} M 程度の FUT-175 活性が認められ, 高濃度では, 細胞内の serine protease を抑制する可能性があると考えられた。

2. 血小板 cytosol fraction の zymogram では, pI 9.2, 8.1, 6.25, 5.9, 5.3, 4.4 に活性帯を認めた (図 2)。pI 4.4 の band は esterase の zymogram と一致し, esterase 活性と考えられた。Benzamidine Sepharose 6 B による affinity chromatography で得られた蛋白は, pI 6.2 及び 5.0 の等電点を持ち, 活性においても二峰性のピークを認めた。しかし, 溶出蛋白による zymogram は得られなかった。今後, この血小板内 serine protease(s) の特性を検討することにより, 血小板反応における serine protease の役割を明らかにしたい。

文 献

- 1) 程原佳子, 他: 第 8 回日本止血血栓学会発表
- 2) Niinabe, M., Hitomi, Y. and Fujii, S.: A sensitive colorimetric assay for various protease using naphthyl ester derivatives as substrate. *J. Biochem.*, **87**; 779~783, 1980.
- 3) Phillips, D.R., Jennings, L.K. and Edwards, H.M.: Identification of mem-

Fig. 2 Zymogram of platelet cytosomal proteins with TLNE as substrate.

For the preparation of zymogram of platelet cytosomal proteins, polyacrylamide disc gel electrophoresis was carried out in the presence of 8 M urea and 2 % ampholine (pH 3-10). After electrophoresis, the gel was incubated with substrate buffer solution containing 0.5 μ M of TLNE, 1 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2 . Then 1/10 volume of 1 % Fast Violet B solution was added and the gel was left to stand at the room temperature.

- brane proteins mediating the interaction of human platelets. *J. Cell Biol.*, **86**; 77~86, 1980.
- 4) Mustard, J.F., Perry, D.W., Ardlie, N.G. and Packham, M.A.: Preparation of suspension of washed platelets from humans. *Br. J. Haematol.*, **22**; 193~204, 1972.