血小板 lipoxygenase 活性の subcellular localization

——正常人と活性低下症例との比較——

金地 研二* 牛首 文隆* 大熊 稔* 内野 治人*

Subcellular localization of platelet lipoxygenase activity

——comparison between normal and lipoxygenase-deficient platelets——

Kenji KANAJI*, Fumitaka USHIKUBI*, Minoru OKUMA*
and Haruto UCHINO*

Key words: platelet lipoxygenase, subcellular localization, 12-hydroxyeicosatetraenoic acid, calcium chloride

Lipoxygenase activities were estimated in platelet subcellular fractions as well as in intact platelets obtained from normal subjects and 7 patients with platelet-lipoxygenase deficiency. From a washed platelet suspension (intact platelets), 12,000 g supernatant of sonicated platelets (F-I), cytosol fractions (F-II) and microsomal fractions (F-III) were prepared by differential centrifugation. 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) produced by the incubation of arachidonic acid with platelets or each fraction from them was measured by reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis.

In normal subjects, 12-HETE production by subcellular fractions was 87.1% (F-I), 31.4% (F-II) and 17.2% (F-III) of that by intact platelets, and was not significantly affected by the addition of CaCl_2 . Of the 7 patients, one patient showed no detectable lipoxygenase activity in any subcellular fractions and in intact platelets; the other patients showed reduced activities in all subcellular fractions as well as in intact platelets. In some of these patients, it appeared that lipoxygenase activities were not fully expressed in intact platelets because much more amounts of 12-HETE was produced by their subcellular fractions than by intact platelets especially in the presence of CaCl_2 .

* 京都大学医学部第一内科 [〒606 京都市左京区聖護院川原町 54], The First Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan.

はじめに

血小板 lipoxxygenase (PLO) 系アラキドン酸 (AA) 代謝の最終産物である 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE)^{1,2)} を逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を用いて測定することによって, 正常人および PLO 低下症例 (骨髓増殖性疾患)^{3,4)} の血小板とそれらの subcellular fraction における LO 活性を比較・検討した。

I. 対象および方法

TBA 法⁵⁾により PLO 低下症例と判定した骨髓増殖性疾患患者 7 名と健康成人 9 名を対象とした。血小板を分離・洗浄し³⁾ 300 mM 蔗糖溶液に再浮遊 (2×10^6 個/ μ l) し, 超音波処理⁶⁾ 後, 12,000 g で 12 分間遠沈して上清を得た (F-I)。これをさらに 105,000 g で 60 分間遠沈し, 上清 (F-II) を分離し, 沈渣を F-II と等量の蔗糖溶液に再浮遊した (F-III)。こうして得られた血小板浮遊液あるいは分画 (100 μ l) に 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 25 mM NaCl, 還元型グルタチオン (F-I・III には 1 mM, F-II には 0.1 mM⁷⁾) を加え, 100 μ M AA と 37°C で 5 分間反応させた (総量 200 μ l)。また反応系

に 2.5 mM CaCl_2 を加えて, その影響をみた。反応産物の抽出・RP-HPLC による 12-HETE の測定は, 既報⁸⁾ に準じて行った。

II. 結 果

結果をまとめて表 1 に示す。正常人においては, 1162.4 ± 203.3 ng/ 10^8 platelets の 12-HETE が血小板浮遊液によって生成され, 各分画における産生量はそれの $87.1 \pm 25.2\%$ (F-I), $31.4 \pm 11.5\%$ (F-II), $17.2 \pm 7.3\%$ (F-III) であった (Mean $\pm$ SD, n=9)。また, これらの 12-HETE 産生に対し, CaCl_2 の添加は有意の影響を及ぼさなかった。表 1 に示すように, PLO 低下症例のうち症例 1 においては, いかなる条件下でも 12-HETE 産生を検出し得なかったのに対し, 他の 6 例では, 血小板浮遊液および各分画において 12-HETE の産生が認められた。しかしその産生量は正常人に比し低下していた。この 6 例のいずれも, CaCl_2 によって F-I の 12-HETE 産生量が増加したが, F-II・III に対しては, 明らかな効果を認めなかった。このうち症例 2~6 では, F-I による 12-HETE 産生量が血小板浮遊液による産生量を上まわり, 特に CaCl_2 の添加時に著明となった。また血小板浮遊液を上まわる 12-HETE 産生は,

Table 1 12-HETE production by intact platelets and their subcellular fractions

Patient No.	Diagnosis	12-HETE (ng/ 10^8 platelets or their fractions)					
		Intact platelets	12,000 g supernatant (F-I)	Cytosol (F-II)		Microsome (F-III)	
1	CML	0	0 (0)*	0	(0)	0	(0)
2	CML	4.6	8.3 (16.1)	10.2	(12.0)	5.1	(5.3)
3	ET	31.5	50.8 (102.0)	51.4	(56.7)	10.9	(13.2)
4	ET	42.5	52.0 (73.0)	32.4	(23.7)	19.5	(25.3)
5	PV	32.3	43.2 (61.6)	30.0	(29.9)	4.3	(5.0)
6	PV	56.4	88.4 (131.4)	61.6	(62.9)	19.1	(16.4)
7	PV	305.4	111.8 (163.1)	36.4	(35.6)	47.0	(62.2)
Normal subjects	M $\pm$ SD (n=9)	1162.4	1029.7(1027.4)	368.8 (387.0)		194.4 (204.1)	
		$\pm$ 203.3	$\pm$ 403.8 (319.2)	$\pm$ 175.8 (173.7)		$\pm$ 73.4 (73.7)	

Intact platelets (10^8 cells/ 100μ l) or their subcellular fraction was incubated with 100 μ M AA for 5 min at 37°C in the presence or absence of 2.5 mM CaCl_2 . Extracted AA metabolites were analysed by RP-HPLC⁸⁾.

* (), 12-HETE produced in the presence of CaCl_2 .

CML, chronic myeloid leukemia; ET, essential thrombocythemia; PV, polycythemia vera.

F-II (症例 2, 3, 6) や F-III (症例 2) においても認められた。

III. 考 察

ヒトの PLO 活性は F-II だけでなく F-III にも存在すること^{7,9)} が確認された。今回検討した PLO 低下症例には、完全欠損と考えられる症例と活性の部分欠損 (欠乏) しているものがあり、後者の場合には、すべての分画に LO 活性が検出された。また PLO 低下症例には、単に酵素活性が低下しているだけでなく、intact な血小板と AA との反応では、その低下した LO 活性がさらに発現されにくい状態となっているものがあることが示唆された。

文 献

- 1) Hamberg, M. and Samuelsson, B.: Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**; 3400~3404, 1974.
- 2) Bryant, R.W., Simon, T.C. and Bailey, J.M.: Role of glutathion peroxidase and hexose monophosphate shunt in the platelet lipoxygenase pathway. *J. Biol. Chem.*, **257**; 14937~14943, 1982.
- 3) Okuma, M. and Uchino, H.: Altered arachidonate metabolism by platelets in patients with myeloproliferative disorders. *Blood*, **54**; 1258~1271, 1979.
- 4) Schafer, A.I.: Deficiency of platelet lipoxygenase activity in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.*, **306**; 381~386, 1982.
- 5) Takayama, H., Okuma, M. and Uchino, H.: A simple method for estimation of lipoxygenase and cyclo-oxygenase pathways in human platelets—the use of thiobarbituric acid reaction. *Thromb. Haemost.*, **44**; 111~114, 1980.
- 6) Okuma, M., Yamashita, S. and Numa, S.: Enzymic studies on phosphatidic acid synthesis in human platelets. *Blood*, **41**; 379~389, 1973.
- 7) Lagarde, M., Croset, M., Authi, K.S. and Crawford, N.: Subcellular localization and some properties of lipoxygenase activity in human blood platelets. *Biochem. J.*, **222**; 495~500, 1984.
- 8) Kanaji, K., Okuma, M. and Uchino, H.: Deficient induction of leukotriene synthesis in human neutrophils by lipoxygenase-deficient platelets. *Blood*, **67**; 903~908, 1986.
- 9) 大熊 稔: 血小板の脂質代謝と血小板機能. *日血会誌*, **39**; 682~693, 1976.

●内科と眼科の統合による成果！

糖尿病性網膜症

編集 東北大学内科教授 後藤由夫

琉球大学眼科教授 福田雅俊 専門医37氏分担執筆

A 5 判 355頁 図92 表86 原色10 定価7,800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