A 23187 による血小板細胞内カルシウムイオン
上昇におよぼす taurine の影響
——aequorin 負荷血小板による検討——

八木 高秀* 香取 瞭*

Inhibitory effect of taurine on cytoplasmic Ca^{2+} change
in platelets activated with A 23187

Takahide YAGI*, Ryo KATORI*

Key words: taurine, calcium ion, aequorin,
aspirin dibutyl cAMP

The purpose of the present study is to clarify the inhibitory effect of taurine on the elevation of cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]$) in activated platelets. Using aequorin-loaded platelets activated with $1\ \mu\text{M}$ A 23187 in normal subjects, $[\text{Ca}^{2+}]$ was measured by a Platelet Ionized Calcium Aggregometer (Chrono-log). The elevation of $[\text{Ca}^{2+}]$ in platelets activated with A 23187 was significantly inhibited by the incubation with $1\ \text{mM}$ taurine for 10 min. In order to elucidate the mechanism of this inhibitory effect of taurine, the aequorin-loaded platelets were pretreated with $5 \times 10^{-5}\text{M}$ aspirin (ASA) and 10^{-4}M dibutyl cAMP (dbcAMP) before the incubation with $1\ \text{mM}$ taurine. The pretreatment with both of ASA and dbcAMP significantly inhibited $[\text{Ca}^{2+}]$ in platelet activated with A 23187. The elevation of $[\text{Ca}^{2+}]$ in ASA-pretreated platelet activated with A 23187 was further inhibited by the incubation with taurine, but in dbcAMP-pretreated platelet was not. These results suggest the possibility that the inhibitory mechanism of taurine on the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]$ in platelets activated with A 23187 is not related to arachidonic metabolism. But it remains to be investigated whether the inhibition of taurine to platelet activation with A 23187 is due to cAMP-related mechanism or no related one.

* 近畿大学医学部第一内科 [〒589 大阪狭山市大野東 377-2], First Department of Internal Medicine, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan. 受付: 1988. 1. 10. 受理: 1988. 6. 15.

緒 言

Taurine は血小板に 特異的に 高い 含量を 示す¹⁾。われわれは、この taurine が thrombin による活性化血小板の quin 2/AM 蛍光強度の変化を指標とした細胞内カルシウムイオンの上昇を抑制することを認めた²⁾。しかし quin 2/AM は細胞内でカルシウムイオンとの緩衝作用をもつとの報告があり³⁾、本研究では aequorin 負荷血小板⁴⁾を用い細胞内カルシウムイオン濃度の変動に対する taurine の影響を検討した。

I. 対象と方法

対象は健康ボランティア (30±6 歳) 9 例で、Johnson ら⁴⁾の方法で aequorin 負荷血小板を作製した。細胞内カルシウムイオンの測定は Chrono-log 社製 Platelet Ionized Calcium Aggregometer を用いた。Taurine の影響は aequorin 負荷血小板に 1 mM taurine を加え 10 分間 incubation した後 1 μ M A 23187 を加え対照と比較した。また、taurine の作用機序を明らかにするため、 5×10^{-5} M Aspirin (ASA)、 10^{-4} M dibutyryl c-AMP (dbcAMP) との 1 分間 incubation の前処理をおこない、同様に

1 mM taurine を加え 1 μ M A 23187 による細胞内カルシウムイオン濃度の変化を測定した。

有意差検定は Wilcoxon 検定によりおこない $p < 0.05$ をもって有意とした。

II. 成 績

1. 1 μ M A 23187 活性化血小板の細胞内カルシウムイオン濃度および taurine の影響

図 1 に示すように活性化血小板細胞内カルシウムイオン濃度は taurine 未処理では $41.4 \pm 8.9 \mu\text{M}$ ($n=8$) であるが、1 mM taurine 前処理により $32.9 \pm 7.5 \mu\text{M}$ へと有意に抑制した ($p < 0.05$)。

2. ASA, dbcAMP 前処理血小板の細胞内カルシウムイオン濃度におよぼす taurine の影響

図 2 左に示すように 1 μ M A 23187 により細胞内カルシウムイオン濃度は対照では $42.3 \pm 8.5 \mu\text{M}$ ($n=7$) であるが、ASA 前処理により $34.7 \pm 4.0 \mu\text{M}$ へと有意に低下し ($p < 0.05$)、また ASA 前処理に加え 1 mM taurine を添加すると $27.7 \pm 5.8 \mu\text{M}$ へと、さらに有意の低下を示した ($p < 0.05$)。また、dbcAMP によ

Fig. 1 Effect of 1 mM taurine on peak $[\text{Ca}^{2+}]$ in platelets activated with 1 μM A 23187.

Fig. 2 Effect of 5×10^{-5} M aspirin (left panel), 10^{-4} M dibutyryl cAMP (right panel) and 1 mM taurine on peak $[\text{Ca}^{2+}]$ in platelets activated with 1 μM A 23187.

る検討では図2右に示すように対照は $42.7 \pm 8.7 \mu\text{M}$ ($n=7$) であり, dbcAMP 前処理により $30.4 \pm 8.0 \mu\text{M}$ へと有意に低下するが ($p < 0.05$), dbcAMP 前処理に加え 1 mM taurine を添加しても $27.6 \pm 6.5 \mu\text{M}$ と, 有意の変動を示さなかった.

III. 考 察

in vitro で taurine は $1 \mu\text{M}$ A 23187 による血小板細胞内カルシウムイオン上昇を有意に抑制した. さらに, ASA 前処理 aequorin 負荷血小板に $1 \mu\text{M}$ A 23187 を加えた時の細胞内カルシウムイオンの上昇を taurine は抑制し, これは taurine が血小板の malondialdehyde 合成能に影響しないことより taurine の抗血小板作用がプロスタグランディン系と独立したものであるとした既報の成績²⁾⁵⁾ を支持する. 一方, taurine は dbcAMP で前処理した条件下では A 23187 による細胞内カルシウムイオンの上昇に taurine は有意な影響をおよぼさず, これは血小板の細胞内カルシウムイオン変動を調節するうえで taurine と c-AMP の関連を示

唆するが, これらの相互作用については今後さらに詳細な検討を要すると思われる.

文 献

- 1) Awapara, J., Landua, A.J., Fuerst, R.: Distribution of free amino acids and related substances in organs of the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **5**: 457~562, 1950.
- 2) 八木高秀, 小橋紀之, 香取 瞭: 陳旧性心筋梗塞におけるタウリンの血小板凝集能抑制機序の検討. 血液と脈管, **18**: 250~253, 1987.
- 3) Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y.: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**: 3440~3450, 1985.
- 4) Johnson, P.C., Ware, J.A., Cliveden, P.B., Smith, M., Dvorak, A.M., Salzman, E.W.: Measurement of ionized calcium in blood platelets with the photoprote in Aequorin; Comparison with quin 2. *J. Biol. Chem.*, **260**: 2069~2076, 1985.
- 5) 八木高秀, 小橋紀之, 浜 純吉, 岡林孝直, 香取 瞭: Taurine の血小板放出能に及ぼす影響—とくに ATP 代謝と関連して—, 含硫アミノ酸, **8**: 467~474, 1985.