培養肝細胞におけるプロトロンビン分泌の制御

伴野 雅洋* 上山 護* 浦山 功* 浅田 敏雄*

The control of prothrombin secretion in culture liver cells

Masahiro TOMONO*, Mamoru UHEYAMA*,
Tsutomu URAYAMA* and Toshio ASADA*

Key words: vitamin k, calcium, prothrombin, liver cell

Vitamin K brings calcium flux as well as γ -carboxylation in liver cells. Prothrombin increased in the medium of the guinea pig liver cell culture along with the rise of intracellular Ca^{++} by vitamin K stimulation. This result indicates a secretion mechanism linked to some chemical stimulations. Pregnane-diol and oleic acid had no effect on the Ca^{2+} flux but suppressed the prothrombin secretion induced by vitamin K stimulation, although the inhibition mechanism unknown.

はじめに

ビタミンKは肝細胞におけるプロトロンビンなどの血液凝固因子産生において γ -カルボキシレーションに関与する以外に、細胞質内 Ca^{++} 濃度変化を介して生理作用を有していると考えられる^{1)~4)}。著者らはビタミンK刺激を培養細胞に加えた時の細胞質内 Ca^{++} 濃度変化と培地中へのプロトロンビン分泌が連動しているかどうか調べた。また分泌機構に対する影響物質の

検討も行なった。

I. 材料と方法

1) 肝細胞懸濁液の作製と細胞質内 Ca^{++} 濃度測定：モルモット肝細胞に Ca^{++} 蛍光指示薬 quin-2 を $40 \mu\text{M}$ 取り込ませ、emission 339 nm, excitation 492 nm でいろいろな濃度のビタミン K_1 刺激を加えた時の蛍光変化を測定した⁶⁾⁷⁾。

2) 培地中プロトロンビン測定のための

* 東邦大学医学部生化学 [〒143 東京都大田区大森西 6-11-1], Department of Biochemistry, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan.

** 同 産婦人科, The First Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan. 受付: 1988. 1. 10. 受理: 1988. 8. 23.

Fig. 1 Intracellular Ca^{2+} Response

ELISA 法の確立: 抗ヒトプロトロンビン を 96 穴プレートの各 well に入れ, PBST で洗って から, モルモット肝細胞懸濁液にビタミン K_1 などを添加した後の培地液を抗原として加えた. また前もって第 1 抗体として抗ヒトプロトロンビン, 第 2 抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ヤギ IgG を 1:1 で混ぜたものを加え, 最後に 1 mg/ml の p-nitrophenylphosphate を加えて, 405 nm で吸光度を測定した. この時ヒト正常血漿のプロトロンビン値を 1 と して standarization を行なった.

II. 結 果

1) ビタミン K_1 40 μM 以上の刺激でモルモット肝細胞質内 Ca^{2+} 濃度上昇がみられた. またオレイン酸および pregnane-diol はこれに対し全く影響をおよぼさなかった (図 1).

2) ビタミン K_1 無添加ではモルモット肝細胞培地中に平均 0.73×10^{-4} のプロトロンビンしか検出されなかったが, ビタミン K_1 100 μM 刺激では 9.85×10^{-4} のプロトロンビンが検出

Fig. 2 Prothrombin secretion in guinea pig liver cells

された. pregnane-diol 0.25 mM, オレイン酸 10 μM , アラキドン酸 10 μM で 37°C, 30 分間前処置した場合はビタミン K_1 単独の時を 100 % としてのおおの 23 %, 21 %, 23 % と培地中へのプロトロンビン分泌阻害がみられた. しかしパルミチン酸ではほとんど阻害はみられず, ステアリン酸, リノール酸でも多少の阻害はみられたがその割合は小さかった (図 2).

III. 考 察

モルモット肝細胞質内 Ca^{2+} 濃度上昇に連動してプロトロンビンが培地中に増量することはビタミン K による外来刺激応答性の分泌機構が肝細胞内で働いている可能性を示している. ビタミン K_1 40 μM という濃度は生理的にはかなり高いものであり, これがそのまま主体内での現象を反映しているとは限らないが少なくとも分泌応答性が存在することは言える. オレイン酸や pregnane-diol が肝細胞質内 Ca^{2+} 濃度上昇は阻害しないが, プロトロンビンの培地中への放出は抑制するという結果からこれらの物

質が分泌反応のいずれかの過程に対して阻害的に働いていると考えられる。しかしその機構解析は今後の検討課題である。

文 献

- 1) Dimonte D., Bellomo, G., Thor, H., Nicotera, P., Orrenius, S.: Menadione-induced cytotoxicity is associated with thiol oxidation and alteration in intracellular Ca^{2+} homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**: 343~350, 1984.
- 2) Gallin, J.I., Seligmann, B.E., Cramer, E.B., Schiffman, E., Fletcher, M.P.: Effects of vitamin K on human neutrophil function. *J. Immunol.*, **128**: 1399~1408, 1982.
- 3) Bellomo, G., Mirabelli, F., Richelmi, P., Orrenius, S.: Critical role of sulfhydryl groups in ATP-dependent Ca^{2+} sequestration by the plasma membrane fraction from rat liver. *FEBS Letter*, **163**: 136~139, 1983.
- 4) Nicotera, P., Moore, M., Mirabelli, F., Bellomo, G., Orrenius, S.: Inhibition of hepatocyte plasma membrane Ca^{2+} -ATPase activity by menadione metabolism and its restoration by thiols. *FEBS Letter*, **181**: 149~153, 1985.
- 5) Bevan, B.R., Holton, J.B.: Inhibition of bilirubin conjugation in the rat liver slices by free fatty acids with relevance to the problem of breast milk jaundice. *Clin. Chim. Acta*, **41**: 101~107, 1972.
- 6) Tsien, R.Y.: A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, **290**: 527~528, 1981.
- 7) Moolenaar, W.H., Tertoolen, L.G.J., DeLaat, S.W.: Growth factors immediately raise cytoplasmic free Ca^{2+} in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **259**: 8066~9069, 1984.