

血小板凝集抑制機構に関する研究 —calmodulin 阻害剤によるリン脂質代謝動態への影響—

京都大学医学部第二外科（指導：日笠頼則教授）

森 敬 一 郎

〔原稿受付：昭和58年6月8日〕

Effects of Calmodulin Antagonists on Platelet Aggregation and Phospholipid Metabolism

KEIICHIRO MORI

Second Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

Recent studies have suggested that many of the effects of ionic calcium on enzymes and other calcium-dependent proteins are mediated through an intracellular calcium-binding protein, calmodulin. Chlorpromazine and other phenothiazines are potent inhibitors of calmodulin-sensitive enzymes. These calmodulin antagonists have been reported to inhibit platelet aggregation induced by ADP, collagen, thrombin or adrenaline. The exact mechanism by which inhibition of calmodulin function results in failure of platelet aggregation is unknown. In view of these findings, I have examined the possibility that calmodulin antagonists modify the components of membrane phospholipids. Washed rabbit platelets were incubated with radioactive choline, methionine, ethanolamine, serine and inositol; the platelets were able to synthesize radioactive phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine(PS) and phosphatidylinositol. When platelets were incubated with calmodulin antagonists, i.e. chlorpromazine, trifluoperazine and N-[6-aminohexyl]-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, there was about 30-fold increase in ^3H -serine incorporation into PS within 10 min. By contrast, no significant inhibition or stimulation of ^3H -choline, -methionine, -ethanolamine and -inositol incorporation into phospholipids were observed. However, when glycerol was used as the radioactive substrate, there was a little increase in the total incorporation into lipids, without a significant increase into PS. In mammals phosphatidylserine is formed by an exchange reaction. Calmodulin antagonists activated calcium-dependent base-exchange reaction in microsomal fraction, and this calcium-dependent reaction was inhibited in the presence of calmodulin. These results suggest that

Key words: Platelet, Calmodulin, Calmodulin antagonist, Chlorpromazine, Phosphatidylserine.

索引語：血小板，カルモジュリン，カルモジュリン阻害剤，クロルプロマジン，フォスファチジルセリン。

Present address: The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.

calcium-dependent base-exchange reaction is operative in rabbit platelet and is regulated, at least in part, by membrane-bound calmodulin, and the stimulation of ^3H -serine incorporation into PS by these drugs results from the inhibition of calmodulin function.

緒 言

血小板は、血栓形成による止血機構に果す重要な役割以外にも、炎症反応、免疫反応、あるいはセロトニン、カテコールアミンなどの活性物質の運搬、放出など多岐にわたる dynamic な機能を担っている血球である。したがって、血小板機能を抑制する抗血小板療法は、臨床的に大きな意義をもち、最近の抗血小板薬物の研究はめざましいものがある。

血小板凝集反応を抑制する薬物は数多く知られているが、その作用機序の相異によって薬物を分類すると以下の4群に大別しうる。1) 環状ヌクレオチドの代謝系に作用する薬物、2) プロスタグランディンの代謝系に作用する薬物、3) カルシウムイオンの輸送系に作用する薬物、4) 血小板の膜安定性などに作用する薬物の4つである。しかし、この第4群に属する薬物(クロロプロマジン、トリフルオペラジンなど²⁷⁾)は、血小板膜の構成成分である蛋白、あるいは脂質に作用し、膜を安定化することによって血小板の凝集を抑制するのであらうと考えられているが、その作用機序には不明点が多い。

ところで、カルシウムイオンが種々の細胞においてその機能の発現に重要な役割を演じていることが近年明らかにされてきている。カルシウムの作用発現には、直接カルシウムが作用する場合と、カルシウムと特異的に結合するカルシウム結合蛋白を必要とする場合のある事が知られているが、特にこのカルシウム結合蛋白の重要性が注目されている^{9,23,26)}。

血小板において、カルシウムの結合蛋白の一つであるカルモジュリンの大部分は細胞中に存在し、種々の酵素の活性発現に重要な cofactor として働いていると考えられている。しかし、血小板の膜にもかなりの量のカルモジュリンが存在していることから³⁷⁾、細胞膜においてもカルモジュリンは、細胞質内と同様に何らかの生理的役割を担っているものと考えられているが、現在のところその生理的意義はほとんど明らかではない。

一方、クロロプロマジン、トリフルオペラジンなどのフェノチアジン系の薬物は、カルモジュリンに特異

的に結合し、その作用発現を阻害することが種々の酵素において証明されている^{5,7,8,10,11,16,20,42)}。したがって、これらの薬物は、いわゆる膜安定化作用により血小板の凝集を抑制するのか、あるいは血小板に存在するカルモジュリンを阻害することにより凝集を抑制するのかは、興味ある問題点である。

またこれらフェノチアジン系の薬物は膜に親和性を有することが知られているが^{13,21)} 著者はその作用部位は血小板膜に存在するカルモジュリンではないかと考えた。そこで、種々のカルモジュリン阻害剤およびウシ脳より精製したカルモジュリンを併せ用いることにより、血小板膜のリン脂質の代謝動態に与えるカルシウム、カルモジュリンおよびその阻害剤の影響を明らかにした。このことは、従来あいまいな概念で理解されてきた膜安定化作用による凝集抑制機構の一端の解明に通じるものである。

研究材料および研究方法

1) 家兔洗浄血小板

家兔(体重 2~3 kg)頸動脈よりカニューレーションを行ない、3.8%クエン酸ナトリウム1,10容加え、プラスチックシリンジにて1羽より 80~100 ml の採血を行なった。これを 250×g 10分間遠沈し、PRP (platelet rich plasma) を作成したのち、2000×g 20分間遠沈し、血小板を分離後、この血小板を Tris buffered saline (140 mM NaCl, 5 mM ブドウ糖, 1 mM EDTA, 15 mM Tris-HCl, pH 7.4) を用いて遠沈操作を繰り返す、2回洗浄を行なった。上記洗浄操作は 4°C で行なった。

血小板を用いる実験では、洗浄血小板を Buffer (A) (134 mM NaCl, 5 mM ブドウ糖, 1 mM MgCl_2 , 0.25 % Albumin, 15 mM Tris-HCl, pH 7.4) に浮遊させ、37°C にて反応を行なった。血小板数は位相差顕微鏡にて算定した。

血小板膜標品を用いる実験では、洗浄血小板を 0.1 mM EGTA 加、0.25 M Sucrose に浮遊させ、Tomy Seiko 社製 VR 200P 型、Ultrasonic disruptor で 25 W 15秒、超音波処理を行なった。これを 14,000×g 10分間遠沈した上清を 105,000×g 60分遠沈し、沈

渣を再度 0.1 mM EGTA, 0.25 M Sucrose で洗浄の
 のち、最終は、0.25 M Sucrose で浮遊し、酵素標品と
 した。反応液の組成は、血小板膜標品 100 μ g, HEPES
 緩衝液 (100 mM, 特に断わらぬ限り pH 7.4), 0.1 mM
 EGTA, 適当量のカルシウム (10 μ M ~ 10 mM) と混
 じ、ここに 3 H-セリン, 3 H-エタノールアミン, ある
 いは 3 H-コリン (各々 10 μ M, 1 μ Ci) を加え、全量
 200 μ l とした。反応は 37°C, 10分間保温することによ
 って行なった。タンパク量は、Lowry²⁵⁾ らの方法によ
 り測定した。

2) 試 薬

クロルプロマジン, トリフルオペラジン (TFP) は吉
 富製薬のものを使用し, N-(6-aminohexyl)-5-chloro
 -1-naphthalenesulfonamide (W-7), およびその類縁体
 W-5 は、三重大学医学部日高教授の御好意により頂
 戴した。トロンピンは Park-Davis 社製を用い、カル
 モジュリンはウシ脳より Teo ら³⁸⁾ の方法により精製
 し単一標品を得た。

L-[3- 3 H]Serine 28 Ci/mmol. [methyl- 3 H]Choline
 chloride 60 Ci/mmol. [1- 3 H]Ethanol-1-ol-2-amine
 HCl 23 Ci/mmol. myo-[2- 3 H]Inositol 3.2 Ci/mmol.
 L-[methyl- 3 H]Methionine 71 Ci/mmol. [14 C]gly-

cerol 171 mCi/mmol. (Amersham 社製)

3) リン脂質の抽出、分離および定量

0.2 N 塩酸性で反応終了後、Bligh and Dyer³⁹⁾ 法
 の Gibson⁴⁰⁾ らの変法により、リン脂質を抽出した。
 リン脂質の分離は、薄層クロマトグラフィー (メルク
 社製, シリカゲルプレート) で行なった。展開溶媒は、
 クロロホルム/n-プロピルアルコール/プロピオン酸/
 水 (2:3:2:1) を用いた。各々のリン脂質を I_2 ガスで
 染め、その位置を確認し、その部分のシリカゲルをか
 き取り、放射能を Packard 社 3225 型液体シンチレー
 ションカウンターにて測定した。

4) 血小板凝集能

トロンピンによる血小板凝集能は、RIKADENKI
 社製 RAM-21 型, アグリゴメーターにて測定した。

5) アミノ酸分析

滋賀医科大学実験実習機器センターの御好意により、
 日本電子社製 JLC6AHS 型アミノ酸自動分析装置に
 よりニンヒドリン法にて測定した。

結 果

1) 血小板凝集に対するクロルプロマジンの阻害効果

ウサギ洗浄血小板浮遊液を調製し、アグリゴメータ

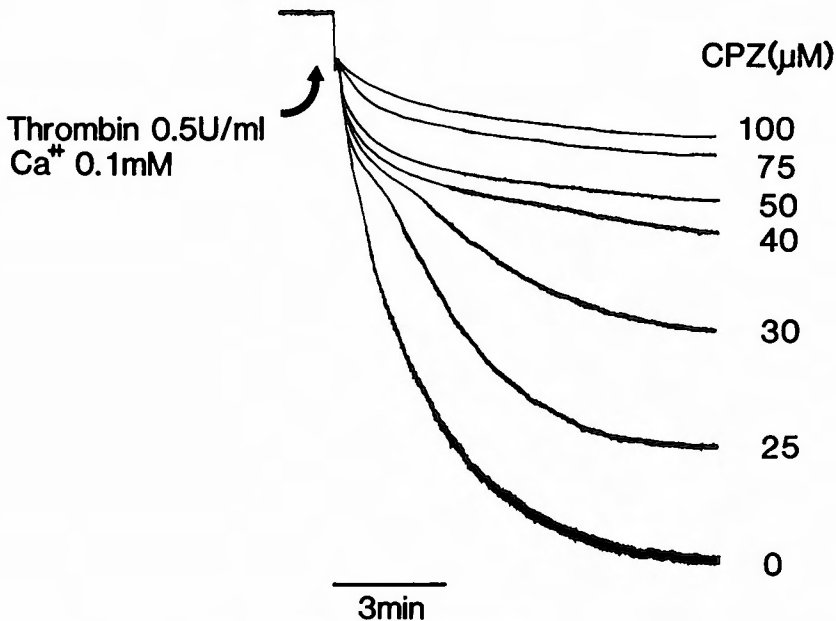


図1 トロンピン凝集に対するクロルプロマジンの阻害効果

ウサギ洗浄血小板 (2×10^8 個/0.5 ml) を10分間クロルプロマジン (0~100 μ M) 処
 理後、トロンピン 0.5 U/ml, Ca^{2+} 0.1 mM を添加した。

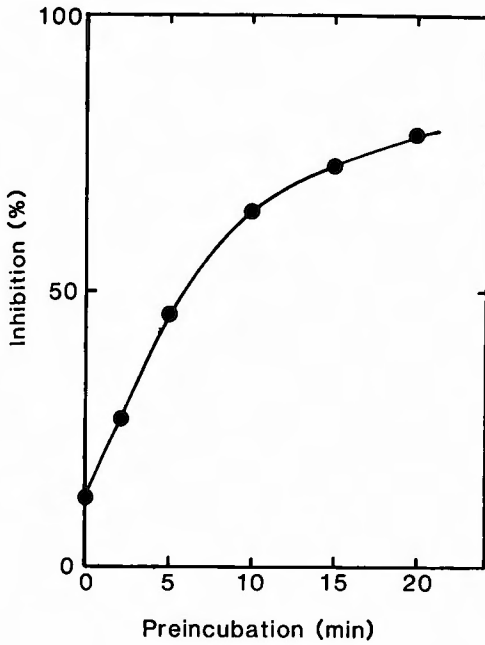


図2 クロルプロマジン処理時間による阻害効果の増強
ウサギ 洗浄血小板 (2×10^8 個/0.5 ml) とクロルプロマジン $50 \mu\text{M}$ とを 37°C で各々の時間インキュベートした後、トロンビン 0.5 U/ml Ca^{2+} 0.1 mM を添加し、凝集阻害効果をみた。

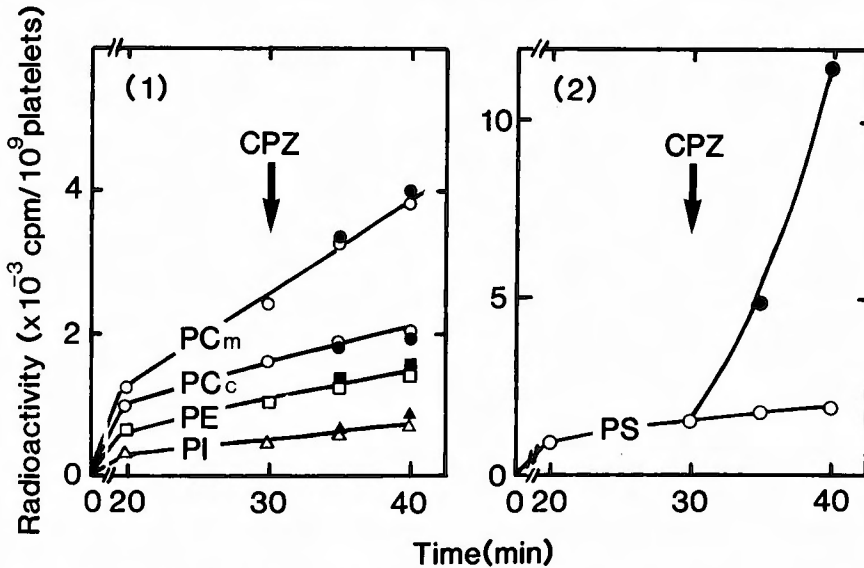


図3 リン脂質合成に対するクロルプロマジンの影響

^3H ラベルのコリン、メチオニン、エタノールアミン、イノシトール、セリン ($2 \mu\text{Ci}$, $0.2 \mu\text{M}$) をウサギ 洗浄血小板 (10^8 個 0.5 ml) と30分間インキュベートしたのち、 $50 \mu\text{M}$ クロルプロマジンを添加し、各リン脂質合成への影響をみた。

黒：クロルプロマジン添加，白：対照

(1) ^3H コリン→フォスファチジルコリン PCc

^3H メチオニン→フォスファチジルコリン PCm

^3H エタノールアミン→フォスファチジルエタノールアミン PE

^3H イノシトール→フォスファチジルイノシトール PI

(2) ^3H セリン→フォスファチジルセリン PS

ーを使用してトロンビンによる血小板凝集反応に対するクロルプロマジンの効果を検討した。図1に示すように、凝集反応はクロルプロマジン添加10分後にトロンビン (0.5 U/ml) を添加すると、クロルプロマジンに対して用量依存的に抑制を受け、100 μ M にてほぼ完全に阻害された。また、トロンビン添加前におけるクロルプロマジンと血小板の前処理時間の影響を調べてみると、図2に示したように、最大の凝集阻害効果の発現には15分前後が必要であることが判明した。

2) 血小板リン脂質代謝に与えるクロルプロマジンの影響

洗浄血小板をリン脂質の塩基部分、あるいはその前駆体であるコリン、メチオニン、エタノールアミン、セリン、イノシトールの ^3H ラベルしたものと30分間前処理して、これらを細胞内へ取り込ませたあと、クロルプロマジンを加え、それぞれのリン脂質分画への取り込みに対する効果を検討した。

図3に示したように、コリン、メチオニンから生成するフォスファチジルコリン (PC)、イノシトールからのフォスファチジルイノシトール (PI)、エタノールアミンからのフォスファチジルエタノールアミン (PE) については、アイソトープラベルされたリン脂質の量は、クロルプロマジンを加えても対照との間に有意の差を認めなかった。一方、 ^3H -セリンを取り込ませておいた血小板では、 ^3H ラベルされたフォスファチジ

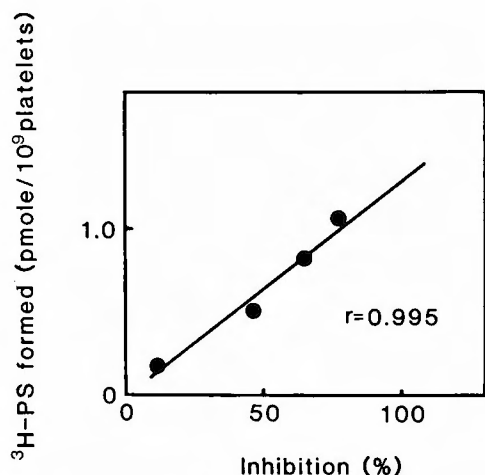


図4 凝集阻害効果と PS 合成量との関係

クロルプロマジン (50 μ M) 添加後の各時間における ^3H -PS の合成量を縦軸に、トロンビン凝集の阻害率を横軸に表わし、両者間の相関係数を算定した。

ルセリン (PS) の量は、クロルプロマジン処理により著明に増大した。

3) 凝集阻害効果と PS 合成量との関係

クロルプロマジンにより合成が促進された PS 量と血小板凝集阻害率との関係をみると、図4に示すごとく、相関係数は 0.995 ときわめて良好な正相関を示した。このことは血小板中 PS 量と血小板凝集機能が、何らかの関係を有していることを示唆している。

そこで、クロルプロマジンによるこの PS 合成促進効果の機序を検討した。

4) 血小板へのセリン取り込みに対する影響

PS 生成の増加は、 ^3H -セリン $\rightarrow$ ^3H -PS の反応が促進したのか、それとも単にクロルプロマジンにより ^3H -セリンの血小板内への取り込みが増大したことによる二次的なものかはこれからだけでは明らかでなく、これらを検討するために血小板への ^3H -セリンの総取り込みを測定した。

図5に示したように、血小板への ^3H -セリン総取り込み量は、クロルプロマジン処理の有無にかかわらず

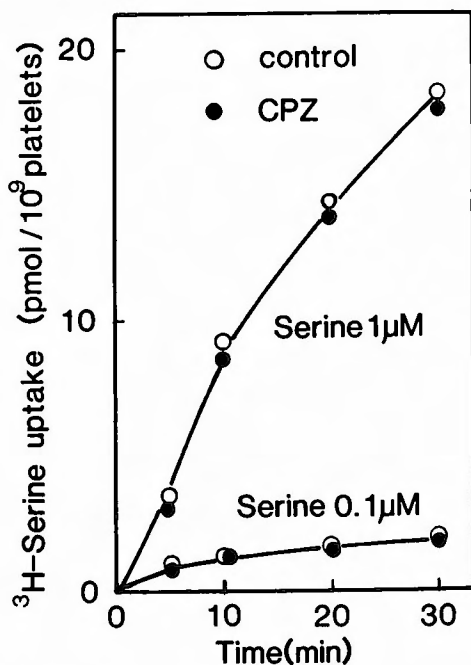


図5 ^3H -セリンの血小板への取り込み

^3H -セリン (1 μ Ci, 0.1 μ M および 1 μ M) を血小板 (10^9 個, 0.5 ml) とインキュベートし、各時間に血小板をグラスフィルター (GFB) 上に取り出し、0°C の生理的食塩水 (4 ml) で洗浄後、放射能を測定した。

不変であった。

5) PS 合成に及ぼすカルモジュリン阻害剤の影響

洗浄血小板を ^3H -セリンと30分間インキュベートしたあとに再度血小板を洗浄し、血小板内に取り込まれた ^3H -セリンから合成される ^3H -PS の量を検討したところ、クロルプロマジン添加により生成量は用量依存的に促進し、 $50\ \mu\text{M}$ にて最大となったが、 $50\ \mu\text{M}$ 以上ではその効果は減弱した (図6)。そこで、他のカルモジュリン阻害剤であるトリフルオペラジン、W-7 についてその効果を検討してみると、クロルプロマジン同様、PS の生成は著明に増大した。一方、W-7 に類似のナフタレンスルフォアミド系化合物で抗カルモジュリン作用の弱い W-5 を加えてみると、PS の生成は増加したがその効果は弱く、最大効果の発現には $100\sim 150\ \mu\text{M}$ が必要であった。

6) ^{14}C グリセロールと ^3H セリンからの PS 合成の比較

^3H -セリンを取り込ませた血小板における PS 生成

促進は、単にリン脂質の塩基部分が置換して生じるのか、あるいはグリセロール骨格へ ^3H -セリンが取り込まれたのち PS が生成するのかを明らかにするために ^{14}C -グリセロールを用いて同様の実験を行ない、 ^{14}C -PS の増加の有無を調べた。図7に示すように、 ^{14}C ラベルされたリン脂質を薄層クロマトグラフィーにより分離し、クロルプロマジンの効果をみると、その有無にかかわらず PS の位置にはほとんど放射能を認めなかった。しかし、 ^3H -セリンを用いると、PS の位置にのみ放射能が認められ、クロルプロマジン添加により著明に増加した。しかも、この時 PE、PC あるいはスフィンゴミエリン (SM) の位置にはほとんど放射能を認めなかった。

7) 血小板内のアミノ酸に対するクロルプロマジンの影響

クロルプロマジンにより PS 生成が促進したときの血小板内の遊離セリンの動向を調べたところ、図8に示すように、アスパラギン酸、スレオニン、アスパラギ

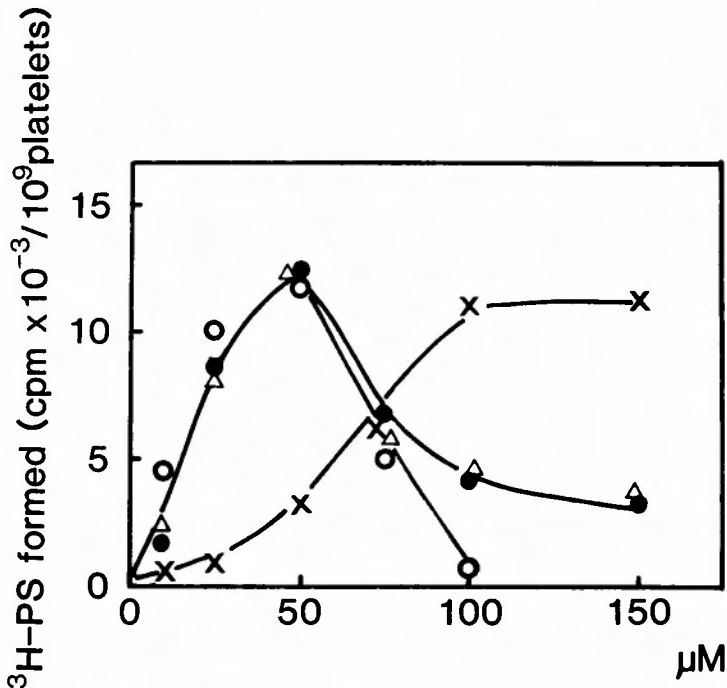


図6 カルモジュリン阻害剤の用量依存性

^3H -セリン ($10\ \mu\text{Ci}$, $1\ \mu\text{M}$) を洗浄血小板 (5×10^9 個/5 ml) と 37°C でインキュベートした。20分後血小板を 4°C の Buffer A で洗浄し、 ^3H -セリンを取り込ませた血小板を作製した。この血小板 (10^9 個, $0.5\ \text{ml}$) にクロルプロマジン (●-●)、トリフルオペラジン (○-○)、W-7 (△-△)、W-5 (×-×) を各濃度添加し、30分後の ^3H -PS 量を測定した。

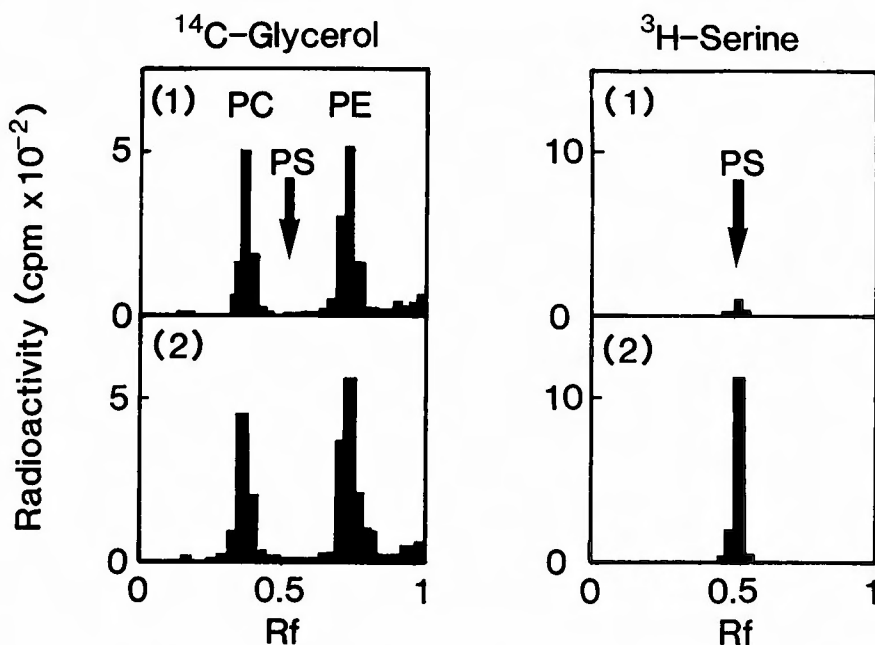


図7 ^{14}C -グリセロール, ^3H -セリンからのリン脂質合成

^{14}C -グリセロール ($1\mu\text{Ci}$) (左図) または ^3H -セリン ($4\mu\text{Ci}$) (右図) を血小板 10^8 個と30分間インキュベートし、リン脂質を抽出し、薄層クロマトグラフィーを行なった。展開溶媒はクロロホルム/*n*-プロピルアルコール/プロピオン酸/水 (2:3:2:1) を用いた。

PC: フォスファチジルコリン, PS: フォスファチジルセリン, PE: フォスファチジルエタノールアミン

上段は対照

下段はクロルプロマジン ($50\mu\text{M}$) 処理

ン、グルタミン酸などのアミノ酸には影響がなく、セリンのみが減少した。また、クロルプロマジン添加後時間経過とともにセリン量は減少し $1.4\text{nmol}/10^8$ 血小板から 0.7nmol となった (図9)。

8) 血小板膜における PS 合成酵素の性質

PS は、細胞内においては Ca^{2+} 要求性のいわゆるリン脂質塩基交換反応によって生成するとされている²²⁾。そこで、血小板の膜標品を調製し、カルモジュリン阻害剤および Ca^{2+} の効果を *in vitro* で検討した。 Ca^{2+} を反応系から除くと、交換反応による PS の生成は殆んど認められなかったが、図10に示したように、 $25\mu\text{M}$ Ca^{2+} を添加すると、至適 pH 9.0~9.5 とする交換反応活性が認められた。ここにクロルプロマジンを添加すると、至適 pH は 8.2~8.5 へ移動し、さらに高い反応活性がみられた。次に、 Ca^{2+} の効果を調べてみると、交換反応は $20\mu\text{M}$ 程度の Ca^{2+} 添加により活性化され、以後用量依存的に増強した (図11)。

一方、クロルプロマジンを添加すると、 $20\mu\text{M}$ 程度の Ca^{2+} 存在下でもクロルプロマジン無添加の場合にみられる最大活性とほぼ等しい極めて強い活性化が観察された (図11)。次に、ウシ脳より精製したカルモジュリンを反応系に加えてみると、図12に示すように交換反応は用量依存的に抑制を受け、 $4\mu\text{M}$ のカルモジュリンによりほぼ半分の活性となった。

考 察

血小板が機能するにあたって、カルシウムイオンは最も重要な情報伝達物質であり、細胞質内のカルシウム濃度の増加が血小板の放出および凝集反応を引き起こすと考えられている。

血小板内での酵素レベルにおけるカルシウムの主たる役割は次第に明らかにされ、現在では少なくとも次の3点を挙げることができよう。

1. 膜リン脂質の代謝系の調節 (フォスファチジル

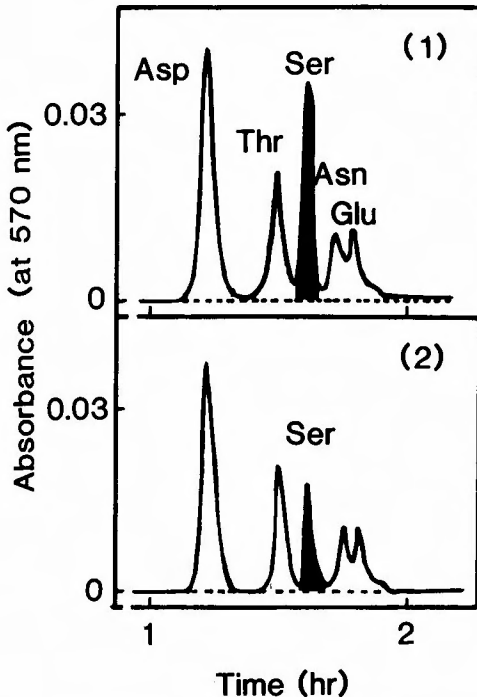


図8 ウサギ洗浄血小板内のアミノ酸の分析
ウサギ洗浄血小板 (5×10^9 個/5 ml) を30分間インキュベートしたのち、50% TCA 0.5 ml を加え除蛋白し、濃縮後アミノ酸分析を行なった。上段は対照
下段はクロルプロマジン ($50 \mu\text{M}$) 処理
Asp : アスパラギン酸
Thr : スレオニン
Ser : セリン
Asn : アスパラギン
Glu : グルタミン酸

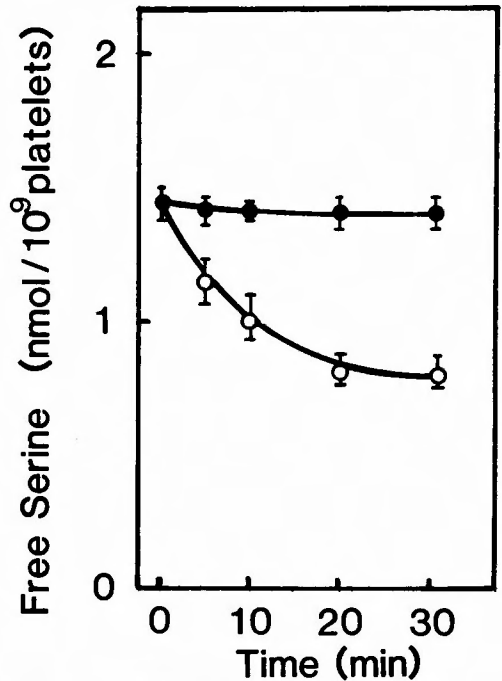


図9 ウサギ洗浄血小板内セリン量の時間経過
ウサギ洗浄血小板をクロルプロマジン $50 \mu\text{M}$ で0~30分間処理し、図8の方法で各時間のセリン量を測定した。
●-● : 対照
○-○ : クロルプロマジン ($50 \mu\text{M}$) 処理

イノシトールの分解に関与する phospholipase $\text{C}^{2)}$ 、アラキドン酸の遊離を引き起こす phospholipase A_2 の活性化⁴²⁾)

2. 蛋白のリン酸化反応系の調節 (actomyosin の収縮に関与する myosin light chain kinase¹¹⁾、protein kinase $\text{C}^{6)}$ などの活性化)

3. 環状ヌクレオチドの代謝 (分解系に関与する phosphodiesterase³²⁾ の活性化)

最近、このカルシウムの機能発現に際して、酵素レベルでの解析が進み、カルシウム単独ではなく、カルシウムとカルモジュリンの両者を必要とする種々の酵素の存在が示され、血小板においても、myosin light chain kinase, phosphodiesterase などの重要な酵素がカルシウム、カルモジュリンの両者を cofactor とし

ていることが明らかにされた。血小板細胞質中に多量に存在するカルモジュリンは、これらの酵素の重要な cofactor として働いていることが推察される。

一方、血小板の膜にもかなりの量のカルモジュリンが存在しているにもかかわらず、その役割は不明な点が多いが、細胞質内に存在するカルモジュリンと同様、膜内カルモジュリンも種々の機能を果しているものと推定される。

カルモジュリンに作用し、その機能を抑制する代表的な薬物であるクロルプロマジンは、すでに報告されているように血小板に作用させると用量依存的にトロンビンによる凝集を抑制した(図1)。しかし、詳細に検討を加えたところクロルプロマジンの血小板への取り込みは3~5分内で平衡に達するのに対し(未発表)、クロルプロマジンと血小板の処理時間を調べてみると、図2に示すごとく最大効果を得るには15~20分とかなりの時間を必要とすることが判明した。この15~20分間に血小板内ではどのような変化が起こっているのだろうか。はたしてクロルプロマジンが細胞

質内に入り込み、細胞質内でカルモジュリン依存性の種々の酵素を阻害するのにこれだけの時間を要するのであろうか、あるいは赤血球において報告されている、クロムプロマジンが赤血球細胞質内にはほとんど存在せず、膜分画のみに大部分局在するという事実^{13,21)}が

血小板にも当てはまるのであろうか。

一方、細胞膜におけるリン脂質代謝系はカルシウムにより活性化あるいは阻害を受け、カルシウムにより調節されていることはよく知られている。例えば、phospholipase $A_2^{(14)}$, phospholipase $C^{(2)}$, phospholi-

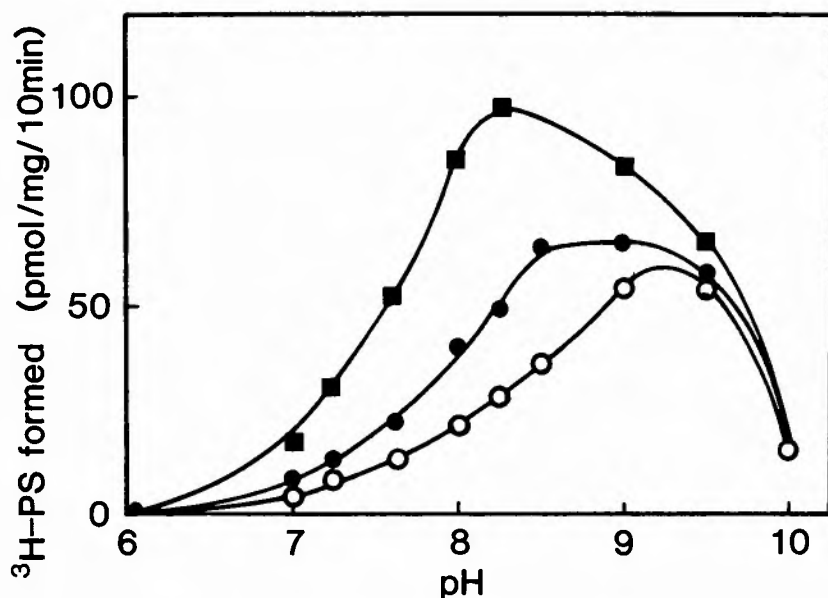


図 10

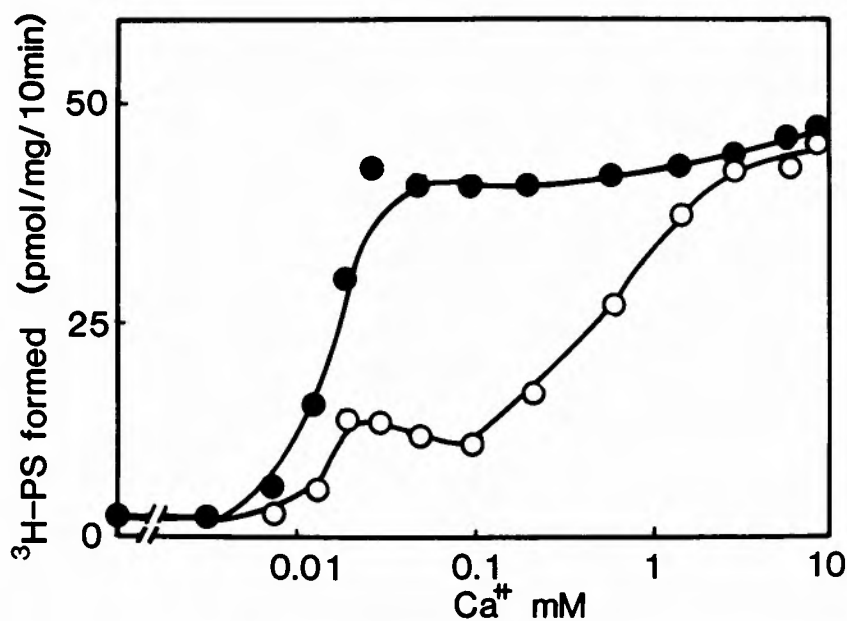


図 11

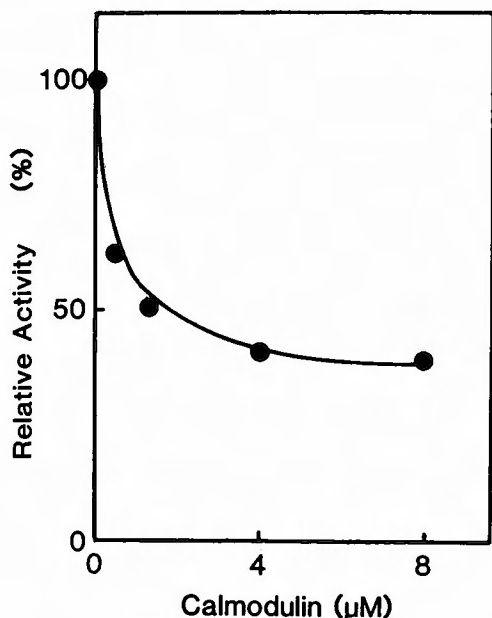


図12 血小板膜におけるセリン塩基交換反応に及ぼすカルシウム-カルモジュリンの効果

血小板膜標品 100 μg を 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4), 0.1 mM EGTA, 0.2 mM Ca^{2+} 存在下にて ^3H -セリン (0.01 mM, 1 μCi) およびカルモジュリンと全量 400 μl にて 37°C 10分間反応させた。

pase D³⁶⁾, phosphocholine transferase⁴¹⁾, phospholipid methylation⁴²⁸⁾, phospholipid base exchange reaction⁴¹⁸⁻¹⁹⁾, などである。そこで著者は、クロルプロマジンの作用部位が血小板においても赤血球と同様に膜に存在するのではないかと考え、クロルプロマジン処理により膜に存在するリン脂質にどのような変化が起こっているのかを検討した。

PC, PE, PS, PI の base の部分になりうる ^3H ラベルのコリン, メチオニン, エタノールアミン, セリン, イノシトールを取り込ませたウサギ洗浄血小板を作成し、クロルプロマジンを加えて、それぞれのリン脂質への影響をみた。

リン脂質の中で、 ^3H -セリンから ^3H -PS への取り込みが対照に比べ、クロルプロマジン処理により数十倍増加した。さらに、この効果は、他のカルモジュリン阻害剤である TFP, W-7 によっても同様に認められ、それぞれの薬物の ED_{50} は、カルモジュリンに対する阻害効果を示す濃度 (20~30 μM) とよく一致していた^{17,40)}。また、W-5 (カルモジュリンに対する阻害力は弱い W-7 の類似体) は、 ^3H -PS 合成促進効果は弱く、その ED_{50} は 80 μM であった。

次に、血小板中には遊離のセリンが内因性にどの程度存在しているのか、またクロルプロマジンにより内因性のセリンはどのような影響を受けるのかを検討した。

内因性のセリンは、血小板 10^9 個あたり約 1.4 nmol 存在するが、クロルプロマジン添加により 0.7 nmol にまで減少した。この減少時間経過は、 ^3H -PS の増加経過とミラーイメージになり、セリンの減少はおそらく PS 合成に使用されたものと推定された。

PS の合成は、動物細胞においては一般的に、エネルギー非依存性のいわゆるリン脂質塩基交換反応つまり PE あるいは PC の塩基部分とセリンの交換反応によって合成される²²⁾。

そこで、このクロルプロマジンによる PS 合成の促進は、塩基交換反応によるものか否かを確認するため ^{14}C -グリセロールを用いて同様の実験を行なったが、

図10 セリン塩基交換反応に対する pH の効果

「実験方法」に述べたようにして調製した血小板膜標品 100 μg を種々の pH の HEPES 緩衝液 EGTA (0.1 mM) 存在下にて、 ^3H -セリン (1 μCi, 10 μM) と全量 200 μl にて 37°C, 10分間反応させ、生成した ^3H -PS を Bligh-Dyer 法により抽出し、放射能を測定することにより定量した。

○-○: 25 μM, Ca^{2+}

●-●: 25 μM, Ca^{2+} , 10 μM クロルプロマジン

■-■: 25 μM, Ca^{2+} , 30 μM クロルプロマジン

図11 血小板膜におけるセリン塩基交換反応におよぼすカルシウムイオン、およびクロルプロマジンの効果

血小板膜標品 100 μg を 100 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 0.1 mM EGTA 存在下にて ^3H -セリン (1 μCi, 10 μM) と全量 200 μl にて 37°C, 10分間反応させ、生成した ^3H -PS を抽出、定量した。

○-○: クロルプロマジン無添加

●-●: 30 μM クロルプロマジン添加

図7に示すごとく、 ^{14}C -グリセロールを用いた場合は、 ^{14}C -PSの合成にはほとんど影響を示さなかった。この事実は、PSの合成促進がやはり塩基交換反応の促進効果によるものであることを示唆している。

そこで、血小板膜標品を用いてクロルプロマジンによるPS合成の促進効果における作用機構に検討を加えた。

この塩基交換反応の至適pHは9.0~9.5と非常に高いが、クロルプロマジンを添加することにより至適pHを8.2付近にまで下げた。また、カルシウムイオンに対するクロルプロマジンの効果は、 10^{-6} ~ 10^{-5} Mの低濃度のカルシウム存在で顕著なPS合成促進効果を示した。

このPS合成系に、ウシ脳より精製したカルモジュリンを数 μM 添加すると顕著な阻害を示した。したがって、血小板におけるセリン塩基交換反応はカルシウムによって活性化を受けるが、カルモジュリンは逆に、抑制的に作用するという特異な調節機構を有しているものと考えられ、クロルプロマジンはこの抑制を解除することによってPS合成を促進しているのではないと思われる。文献的には、膜に強固に組み込まれたカルモジュリンの機能は、ラット脳のカルシウム要求性 adenylate cyclase において抑制的に作用しているのではないかと考えられており、またこの場合、外来性にカルモジュリンを添加すると逆に活性化をもたらすと報告されている³¹⁾。さらに、赤血球膜の Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase は、外来性にカルモジュリンを与えた場合活性化が認められる。また、外来性にカルモジュリンを与えることにより塩基交換反応は影響を受けることから、膜に存在するカルモジュリン以外に細胞質に存在するカルモジュリンもこの反応系に関与している可能性を否定できるものではない。

血小板において、PSはPIとともに、膜の内側に分布し外側にはほとんど存在しない非対称性に分布する特徴あるリン脂質である^{33,43)}。酸性リン脂質であるPSの物理化学的性質はカルシウムイオンに対して鋭敏に応答し、相分離を引き起こす²⁹⁾ことがよく知られているが、生体膜において同様の現象が認められるか否かは明らかではない。

「PSは、glucagon sensitive adenylate cyclaseの再構成に必要である²⁴⁾、 Na^{+} - K^{+} ATPaseの再構成にやはり有用である¹²⁾、protein kinase Cの重要な cofactorである³⁵⁾、 Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPaseの再活性化に必要である³⁰⁾、あるいは多核白血球の貧食時にPS合成は抑

制される³⁹⁾、PSを外来性に mast cell に投与すると histamine の遊離反応を増強する³⁴⁾」など、PSの関与していると思われる生理、酵素反応が報告されているが、塩基交換反応によるPS合成促進、あるいは抑制といった調節機構との関連性についての報告はない。

PS合成において、セリンの交換する相手はPEのエタノールアミンなのか、あるいはPCのコリンなのであろうか、またクロルプロマジンによるPSの合成促進時間経過は、クロルプロマジンの血小板凝集抑制に必要な時間経過との間により相関が認められ(図4)、PSの増加は何らかの凝集機構に関与していることが示唆されるが、PS増加は具体的にどのような役割を担っているのであろうか。これらいくつかの重要な問題点は今後の課題と考えている。

結 語

抗血小板療法は、外科領域とりわけ血管外科の分野では、重要な補助療法の1つとなっている。抗血小板薬物のうち、これまで漠然と「膜安定化作用」とされ、その作用機序の詳細が明らかでなかったフェノチアジン系薬物について、膜の重要な構成成分であるリン脂質の代謝に与える影響を検討した。

フェノチアジン系薬物、あるいはカルモジュリン阻害剤とされている薬物は、膜リン脂質のうちフォスファチジルセリンのみの合成を著明に促進した。これは、細胞内セリンと膜リン脂質のフォスファチジルコリンあるいはフォスファチジルエタノールアミンの塩基部分との交換反応が促進されることにより起ることが明らかとなった。また、膜標品を用いた実験から、カルシウム-カルモジュリンは、フォスファチジルセリン合成反応を阻害することが判明し、フェノチアジン系薬物は、このカルモジュリンの阻害効果を解除することにより、フォスファチジルセリンの合成を促進することが推察された。

血小板におけるフォスファチジルセリンの合成促進か、生理的にいかなる意味を持つのかという問題は、今後の興味ある課題であり、これらの解明は、血小板の機能発現の機序を理解するのに寄与するものと考えている。

稿を終るにあたり、寛く御指導、御鞭撻を賜り、御校閲をいただいた恩師日笠朝則教授に心より感謝する。また、薬理学教室、藤原始教授には、実験の御指導をいただき、その他数えきれない御厚情を賜った。心からの感謝を捧げる。直接御指導いただいた、熊田 馨講師、藤原元博士に深謝するとともに、研究に御協力いただいた谷口信吉学兄、森川茂広学兄に感謝の意を表する。

また、測定の一部に御指導、御協力をいただいた滋賀医科大学、野崎光洋教授、山崎暁山氏、須崎雅史氏、山口周宏氏に厚く御礼申し上げる。

参 考 文 献

- 1) Alemany S, Varela I, et al: Calmodulin regulation of phospholipid and fatty acid methylation by rat liver microsomes. *J Biol Chem* **275**: 9249-9251, 1982.
- 2) Allan D and Michell RH: Phosphatidylinositol cleavage in lymphocytes: Requirement for calcium ions at a low concentration and effects of other cations. *Biochem J* **142**: 599-604, 1974.
- 3) Bligh EG and Dyer WJ: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**: 911-917, 1959.
- 4) Borkenhagen LF, Kennedy EP, et al: Enzymatic formation and decarboxylation of phosphatidylserine. *J Biol Chem* **236**: PC28-30, 1961.
- 5) Brostrom CO, Huang YC, et al: Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase. *Proc Nat Acad Sci USA* **72**: 64-68, 1975.
- 6) Castagna M, Takai Y, et al: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **257**: 7847-7851, 1982.
- 7) Cheung WY: Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase: Demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Commun* **38**: 533-538, 1970.
- 8) Cheung WY, Bradham LS, et al: Protein activator of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase of bovine or rat brain also activates its adenylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* **66**: 1055-1062, 1975.
- 9) Cheung WY: Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* **207**: 19-27, 1980.
- 10) Cohen P, Burchell A, et al: Identification of the Ca^{2+} -dependent modulator protein as the fourth subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase. *FEBS Lett* **92**: 287-293, 1973.
- 11) Dabrowska R and Hartshorne DJ: A Ca^{2+} and modulator-dependent myosin light chain kinase from non-muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **85**: 1352-1359, 1978.
- 12) De Pont JJHMM and Eeden AVPV: Role of negatively charged phospholipids in highly purified $(\text{Na}^+-\text{K}^+)\text{-ATPase}$ from rabbit kidney outer medulla. *Biochem Biophys Acta* **508**: 464-477, 1978.
- 13) Elferink JGR: The asymmetric distribution of chlorpromazine and its quaternary analogue over the erythrocyte membrane. *Biochem Pharmacol* **26**: 2411-2416, 1977.
- 14) Franson R and Waite M: Relation between calcium requirement, substrate charge, and rabbit polymorphonuclear leukocyte phospholipase A_2 activity. *Biochemistry* **17**: 4029-4033, 1978.
- 15) Gibson KD, Wilson JD, et al: The enzymatic conversion of phospholipid ethanolamine to phospholipid choline in rat liver. *J Biol Chem* **236**: 673-679, 1961.
- 16) Gopinath RM and Vincenzi FF: Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of $(\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+})\text{-ATPase}$. *Biochem Biophys Res Commun* **77**: 1203-1209, 1977.
- 17) Hidaka H, Asano M, et al: Activity-structure relationship of calmodulin antagonists. Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol* **20**: 571-578, 1981.
- 18) Hübscher G, Dils RR, et al: Studies on the biosynthesis of phosphatidyl serine. *Biochem Biophys Acta* **36**: 518-528, 1959.
- 19) Hübscher G: Metabolism of phospholipids. VI. The effect of metal ions on the incorporation of L-serine into phosphatidylserine. *Biochem Biophys Acta* **57**: 555-561, 1962.
- 20) Kakiuchi S, Yamazaki R, et al: Properties of a heat-stable phosphodiesterase activity factor isolated from brain extract. *Proc Jpn Acad* **46**: 587-592, 1970.
- 21) Kanaho Y, Sato T, et al: The activity of various phenothiazine drugs for membranes of intact human erythrocytes and their membrane-transforming activity. *Mol Pharmacol* **20**: 704-708, 1981.
- 22) Kanfer JN: Base exchange reactions of the phospholipids in rat brain particles. *J Lipid Res* **13**: 468-476, 1972.
- 23) Klee CB, Crouch TH, et al: Calmodulin. *Ann Rev Biochem* **49**: 489-515, 1980.
- 24) Levey GS: Restoration of guinea pig myocardial adenyl cyclase by phosphatidylserine. *Biochem Biophys Res Commun* **43**: 108-113, 1971.
- 25) Lowry OH, Rosebrough NJ, et al: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951.
- 26) Means AR and Dedman JR: Calmodulin—an intracellular calcium receptor. *Nature* **285**: 73-77, 1980.
- 27) Mills DCB and Roberts GCK: Membrane active drugs and the aggregation of human blood platelets. *Nature* **213**: 35-38, 1967.
- 28) Mori K, Taniguchi S, et al: Enzymatic properties of phospholipid methylation in rabbit platelets.

- Thromb Res **29**: 215-224, 1983.
- 29) Ohnishi S: A spin-label study of biological membranes with special emphasis on calcium-induced lateral phase separation. *Adv Biophys* **8**: 35-82, 1975.
 - 30) Peterson SW, Ronner P: Partial purification and reconstitution of the $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase of erythrocyte membranes. *Arch Biochem Biophys* **186**: 202-210, 1978.
 - 31) Piascik MT, Wisler PL, et al: Ca^{2+} -dependent regulation of guinea pig brain adenylate cyclase. *J Biol Chem* **255**: 4176-4181, 1980.
 - 32) Pichard AL, Hanoune J, et al: Human brain and platelet cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase: Different response to drugs. *Biochem Biophys Acta* **279**: 217-220, 1972.
 - 33) Schick PK, Kurica KB, et al: Location of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in the human platelet plasma membrane. *J Clin Invest* **57**: 1221-1226, 1976.
 - 34) Stechschulte DJ and Austen KF: Phosphatidylserine enhancement of antigeninduced mediator release from rat mast cells. *J Immunol* **112**: 970-978, 1974.
 - 35) Takai Y, Kishimoto A, et al: Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent, 1979.
 - 36) Taki T and Kanfer JN: Partial purification and properties of a rat brain phospholipase D. *J Biol Chem* **254**: 9761-9765, 1979.
 - 37) Taniguchi S, Mori K, et al: Calcium-dependent regulation of phospholipid methylation in rabbit platelets. (in print, *Thromb Res*)
 - 38) Teo TS, Wang TH, et al: Purification and properties of the protein activator of bovine heart cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. *J Biol Chem* **248**: 588-595, 1973.
 - 39) Tou JS: Decreased incorporation of L-(U- ^{14}C) serine into phosphatidylserine by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. *Biochem Biophys Acta* **575**: 384-388, 1979.
 - 40) Weiss B, Prozialeck W, et al: Pharmacological regulation of calmodulin. *Ann N Y Acad Sci* **356**: 319-345, 1980.
 - 41) Weiss SB, Smith SW, et al: The enzymatic formation of lecithine from cytidine diphosphate choline and D-1,2-diglyceride. *J Biol Chem* **231**: 53-64, 1958.
 - 42) Wong PYK and Cheung WY: Calmodulin stimulates human platelet phospholipase A_2 . *Biochem Biophys Res Commun* **90**: 473-480, 1979.
 - 43) Zwaal RFA and Hemker HC: Blood cell membranes and haemostasis. *Haemostasis* **11**: 12-39, 1982.