ヘパラン硫酸の抗トロンビン, 抗 Xa 活性に関する研究

吉田 圭一* 越智 教道* 多和田 明* 布施 暁子*
松本嘉代子* 奥山 隆*

Studies on antithrombin III-potentiating activity of heparan sulfates

Kei-ichi YOSHIDA*, Norimichi OCHI*, Akira TAWADA*, Akiko FUSE*,
Kayoko MATSUMOTO* and Takashi OKUYAMA*

Key words: heparan sulfate, heparin, antithrombin III,
thrombin, factor Xa

The relationships between the chemical and physicochemical properties and the antithrombin III (AT III)-potentiating activities of heparan sulfates (HS) from various origins were investigated.

HS of bovine kidney or bovine lung showed higher activity than those of pig skin or pig gastric mucin.

These activities increased with the intensities of anionic charges of HS.

Unlike heparin, all HS preferentially potentiated AT III activities for Xa rather than for thrombin.

These tendencies were pronounced in lower molecular weight of HS.

The oligosaccharides obtained by enzymatic degradation of HS showed only anti-Xa activities and these active fragments were entirely adsorbed to AT III-Sepharose column.

Similar oligosaccharides were also obtained from heparin by heparinase digestion.

These results suggest that HS and heparin are carrying similar oligosaccharides which are capable of potentiating AT III activity.

はじめに

ヘパリンの血管壁における存在が確認されて

いないのに対し、ヘパラン硫酸 (HS) は多量に存在していることが確認されている。また、HS にはアンチトロンビンⅢ (ATⅢ) を介して抗

* 生化学工業株式会社東京研究所 [〒189 東京都東大和市立野 3-1253], Tokyo Research Institute, Seikagaku Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan.

ロンビン (抗Ⅱa), 抗 Xa 活性を発現するという報告^{1,2,3)}もあり, 血管壁における抗血栓作用の役割を考える上で興味深い. しかし, HS は著しく Heterogenous なムコ多糖であるため, 全ての HS がこのような活性を有しているか否か不明である. この点を調べるため諸起源より HS を調製してその活性を比較し, かつ物性との関連について検討した.

I. 実験材料と方法

材料; HS は牛腎, 鶏冠, 豚皮より脱脂後, プロナーゼ消化, またはアルカリ処理で抽出し, エタノール分画, 樹脂分画により精製した. 豚胃粘膜と牛肺の HS は市販脱脂粉末原料より調製した. いずれの HS もイオン交換クロマトによる分画では, 0.75M, 1M, 1.25M NaCl 溶出画分に分布した. 牛肺 HS は 1.25 M が主画分であったが, 他は全て 1M が主画分であった. 以下の実験ではこれら主画分のみを分析対象とした. ヘパリンは Willson 社製品を精製した. 精製 HS は, 構成糖, 硫黄含量, IR スペクトル, 旋光度, 電気泳動, ムコ多糖分解酵素処理等の分析により同定した.

ATⅢとXaは牛血漿より精製し, トロンビンは市販品を用いた. ATⅢ-Sepharose は精製兎 ATⅢを用いて Höök ら⁴⁾の方法で調製した.

活性測定; 抗凝固活性はヒトクエン酸加血漿に HS を負荷して APTT を測定し, 活性既知のヘパリンを負荷したときの検量曲線に外挿してユニットを算出した.

抗Ⅱa, 抗 Xa 活性は蛍光基質 BOC-Val-Pro-Arg-MCA (Ⅱa), BOC-Ile-Glu-Gly-Arg-MCA (Xa) を用い Morita ら⁵⁾の方法に準じて測定した. すなわち, この系に試料を終濃度 $7 \mu\text{g/ml}$ 加え ATⅢを加えて3分間孵置した後, Ⅱa または Xa を加えて 37°C 3分間反応させ, 遊離したアミノメチルクマリン量 $\cdots F_S$ と対照として試料の代りに生理食塩を加えたときの値 $\cdots F_B$

Fig. 1 ATⅢ-potentiating activities of various heparan sulfates.

Fig. 2 Relationships between molecular weight and specific activities of heparan sulfates.

を求め $\frac{F_B - F_S}{F_B} \times 100$ を阻害率として表した.

II. 結 果

HS の抗Ⅱa, 抗 Xa 活性は一定の対数濃度に対し直線的に増加した. ヘパリンと HS (牛腎, 1.25M画分) の活性を50%阻害値で比べると抗Ⅱa で約100:1 (重量比) 抗 Xa で約40:

Fig. 3 AT III-Sepharose affinity chromatography of the oligosaccharides of heparin and heparan sulfate obtained by enzymatic degradation.

1 とヘパリンの方がはるかに強く、抗 IIa でその差が著しかった。図 1 に示すごとく HS の活性は腎や肺由来のものが強く、皮や胃粘膜由来のものは弱かった。腎では S 含量の高いものほど活性が強く、いずれの HS も抗 Xa > 抗 IIa であった。ATIII 増強活性と抗凝固活性はほぼ似た動きを示した。

牛腎 1 M...HS と 1.25 M...HS のゲル濾過法による分子量分布と比活性の関係を図 2 に示した。両 HS は Fr. No. 40 附近より高分子領域ではほぼ一定の抗 Xa/抗 IIa 活性を示しているが、それ以下の領域に分布する 1 MHS は急速に抗 IIa 活性が消失し、抗 Xa 活性のみが残った。

この性質は 1 MHS 特有であるのか、低分子 HS 共通の性質であるのかを調べるため、牛腎 1.25 MHS を HS 分解酵素で低分子化し、Sephadex G-50 で分画して活性分布を調べた。

その結果、低分子化に伴い分子量約 6,000 で抗 IIa 活性が、ついで約 1,400 で抗 Xa 活性が消失した。同様の実験をヘパリンをヘパリン分解酵素で分解して調べたところ、ほぼ同じ分子量で同様の阻害活性の変化がみられた。そこで抗 Xa 活性のみを有するこれらオリゴ糖画分を AT III-Sepharose に apply し、Affinity chromatography によりその結合能を調べた。図 3 のごとく、ヘパリンオリゴ糖は約 1/8、HS オリゴ

糖は約 1/10 がカラムに吸着され、活性はこの吸着画分からのみ回収された。また、クロマト前にはなかった抗トロンビン活性がこの処理により ATIII-Sepharose 吸着画分に見出された。

III. 考察と総括

以上の結果より、ATIII 増強活性は HS の起原により差があり、同一組織起原では荷電の高い方が強い。Xa と IIa に対する阻害力はヘパリンでは抗 IIa > 抗 Xa であるが HS はいずれも抗 IIa < 抗 Xa であり、特に低分子 HS でその傾向は著明であった。低分子ヘパリンは抗 Xa 活性が強いという報告^{6,7)}があるが、HS は高分子領域でも抗 Xa 活性の方が抗 IIa 活性を上回った。両ムコ多糖を酵素分解して得られたオリゴ糖は分子量と活性の関係や ATIII 結合能などの点で非常に類似していることを示した。しかし、分解前後では活性の強さに大きな差のあること、活性スペクトルが変化することを考慮すると、これら多糖体の ATIII 活性増強の機能は単に ATIII に結合する糖鎖部分のみならず、他の糖鎖部分の機能をも考慮する必要があることが示唆された。

文 献

- 1) Teien, A.N., et al.: The anticoagulant effect of heparan sulfate and dermatan sulfate. *Thromb. Res.*, **8**; 859~867, 1976.
- 2) Thomas, D.P., et al.: Anti-factor Xa activity of heparan sulfate. *Thromb. Res.*, **14**; 501~506, 1979.
- 3) Kindness, G., et al.: Effect of glycosaminoglycans on thrombin-induced clotting of normal and antithrombin III-deficient plasmas. *Thromb. Res.*, **17**; 5395~44, 1980.
- 4) Höök, M., et al.: Anticoagulant activity of heparin: Separation of high-activity and low-activity heparin species by affinity chromatography on immobilized antithrombin. *FEBS Lett.*, **66**; 90~93, 1976.
- 5) Morita, T., et al.: New fluorogenic substrate for α -thrombin, factor Xa, kallikreins, and

- urokinase. J. Biochem., **82**; 1495~1498, 1977.
- 6) Lane, D.A., et al.: Molecular weight dependence of the anticoagulant properties of heparin: Intravenous and subcutaneous administration of fractionated heparins to man. Thromb. Res., **16**; 651~662, 1979.
- 7) Oosta, G.M., et al.: Multiple functional domains of the heparin molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **78**; 829~833, 1981.

●内科疾患のカルシウム代謝とその異常

カルシウムの臨床

編集 神戸大学内科教授 藤田拓男 専門医15氏分担執筆
B5判 365頁 図129 表78 定価9,800円(〒240円)

カルシウムは人体のあらゆるところに存在し、あらゆる機能に関与する。したがって、内科疾患のすべてに密接に関連しており、内科学を理解するためにカルシウム代謝とその異常をまず知らなければならない。本書は内科疾患のあらゆる部分にわたってカルシウムの影を探し求め、カルシウムの臨床を通して内科学を再構成しようとしたユニークかつ野心的な試みの産物である。

●内容: 総論, 第1章 神経系疾患とカルシウム代謝異常, 第2章 心血管疾患とカルシウム, 第3章 腎疾患とカルシウム, 第4章 呼吸器疾患とカルシウム, 第5章 消化器疾患とカルシウム, 第6章 血液疾患とカルシウム, 第7章 内分泌疾患とカルシウム, 第8章 リウマチ様関節炎とカルシウム代謝, 第9章 膠原病および免疫アレルギー疾患とカルシウム, 第10章 物理的原因による疾患とカルシウム, 第11章 薬剤とカルシウム代謝異常, 第12章 老年病とカルシウム, 第13章 悪性腫瘍とカルシウム, 第14章 カルシウム代謝検査法, 索引