フィブリノーゲン-トロンビン系における ヘパリンおよびヘパリノイドの効果

佐 藤 弘 子*

Effect of heparin and heparinoids on the reaction of fibrinogen and thrombin

Hiroko SATO*

Key words: heparin, fibrinogen, thrombin, turbidimetry,
inhibition constants

Inhibition constants of heparin and heparinoids, which formed soluble complexes with fibrinogen, for the fibrinogen and thrombin system were determined by the turbidimetric method, derived from a kinetic study^{1,2)} on the initial stage of the fibrinogen-fibrin conversion. A commercial heparin (molecular weight, 9,000; 152 units/mg) and dextran sulfate (DSC), low molecular weight dextran sulfate (DSA), carboxy methyl cellulose (CMC), chondroitin sulfate (CHS), and sulfated methyl cellulose (SMC) were investigated. Among heparinoids, DSC inhibited more effectively the reaction of fibrinogen and thrombin than heparin. At high concentrations (> 0.08 mg/ml), heparin and heparinoids acted as noncompetitive inhibitors, and inhibition constants for those substances were smaller in the following order of $DSV < \text{heparin} < DSA < CMC < CHS < SMC$.

The apparent inhibition of heparin and DSC for the reaction of fibrinogen and thrombin increased with decreasing concentrations. At low concentrations ($< 10^{-4}$ mg/ml), both heparin and DSC acted as hyperbolic competitive inhibitors of thrombin. The inhibition constant of heparin was 1.07×10^{-8} M, which agrees with values estimated from a thrombin and synthetic substrate system.⁷⁻¹⁰⁾ The scarce inhibition effect of DSC in the presence of anti-thrombin III for the fibrinogen-thrombin system suggests that DSC can not induce the conformational change of antithrombin III¹¹⁻¹³⁾, different from heparin.

* 京都大学医用高分子研究センター [〒606 京都市左京区聖護院川原町], Research Center for Medical Polymers and Biomaterials, Kyoto University, Kyoto, Japan.

緒 論

ヘパリンおよびヘパリン様分子は血液凝固阻害剤としてだけでなく、動脈硬化症、内皮細胞、血小板凝集、抗血栓性医用材料に関連して研究が行なわれている。一方、私達は *in vitro* におけるフィブリノーゲン-フィブリン転換の反応溶液の初期濁度変化を速度論的に研究した¹⁾²⁾。すなわち、低塩濃度、中性 pH における濁度-時間曲線から求められる誘導時間を I_p 、添加時のフィブリノーゲン濃度を $[F_0]$ とすると、本濁度法で検出可能な最小のフィブリン・モノマー重合体生成速度項 $v' (= [F_0] + K_{m_p}/I_p)$ を半経験的に誘導した。ここで K_{m_p} はミカエリス・メンテン定数に相当する定数である。種々のトロンビン拮抗阻害剤の阻害定数決定に引続き¹⁾、フィブリノーゲン-トロンビン系に対するヘパリンやヘパリノイドの阻害効果および阻害様式について研究した。特にヘパリンは見掛けの阻害定数が濃度に対し変化することが知られており³⁾⁴⁾、本濁度法を用いて阻害定数 ($= K_{i_p}$) を得ることは興味あることと思われる。

I. 材料と方法

実験には市販ヘパリン (半井化学(株) そしてヘパリノイドとして種々の分子量のデキストラン硫酸 (DSA および DS2, 名糖産業(株) 社

製; DSC, Sigma 社; DS4, 半井化学(株) 社), コンドロイチン硫酸 (半井化学(株) 社), カルボキシメチルセルロース (第一工業製薬(株) 社製), 硫酸化メチルセルロース (松本油脂(株) 社製メチルセルロースを硫酸化) を使用した。表 1 にこれらの記号および性質を示す。牛フィブリノーゲン (95% clottable, Lot. 24, Miles 社) とヘパリンあるいはヘパリノイドを含む 3 ml の反応溶液に、微量の牛トロンビン (比活性 487, 587 units/mg, Sigma 社) を添加すると同時に、350 nm で反応液のフィブリノーゲン溶液に対する相対濁度変化を測定し、速度論的解析²⁾ を行なった。牛アンチトロンビン III (AT, Sigma 社) はヘパリンおよび DSC 量よりも過剰量を用いた。

II. 結果と考察

1. フィブリノーゲンとヘパリンおよびヘパリノイドとの複合体形成と抗凝固活性

フィブリノーゲンは pH 7.0 では分子全体として負に荷電しているが、部分的に正荷電を有し、ヘパリンおよびヘパリノイドのような多負荷電重合体 (= polyanion) と複合体を形成する。表 1 の第 6 項目に示すように可溶性複合体 (soluble complex) あるいは沈殿性の、したがって濁度として検出できる高分子電解質複合体を形成する (図 1)。 n_{PA} を反応溶液中のポリ

Table 1 Heparin and heparinoids used

Polyanions	Abbreviation	Molecular weight	Number of ionizable groups/pyranose r.	Ionoizable groups	Polyion complex with fibrinogen
Heparin (152 units/mg)	Hep, H	9,000	1.5	$-\text{COO}^-$, $-\text{OSO}_3^-$ $-\text{NH}_2\text{SO}_3^-$	soluble complex (s.c.)
Chondroitin sulfate	CHS	45,000	1.0	$-\text{OSO}_3^-$	s.c.
Carboxy methyl cellulose	CMC	50,000	0.91	$-\text{COO}^-$	s.c.
Sulfated methyl cellulose	SMC	50,000	0.855	$-\text{OSO}_3^-$	s.c.
Sulfated cellulose	SCS	160,000	1.03	$-\text{OSO}_3$	(ppt.)
Dextran sulfate-1	DSA	1,100	2.13	$-\text{OSO}_3^-$	s.c.
Dextran sulfate-2	DS2	13,000	2.40	$-\text{OSO}_3^-$	(ppt.)
Dextran sulfate-3	DSC	30,000	1.59	$-\text{OSO}_3^-$	s.c.
Dextran sulfate-4	DS4	500,000	1.64	$-\text{OSO}_3^-$	(ppt.)
Polyvinyl sulfate	PVS	—	—	$-\text{OSO}_3^-$	(ppt.)
Hyaluronic acid-Na	HA	850,000	1.0	$-\text{COO}^-$	s.c.

Fig. 1 Turbidity (at 400 nm) as a function of mixing ratio R_{PA} after 3 min upon the addition of heparin and heparinoids to 0.4 mg/ml fibrinogen in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0; A, Hep; B, CHS; D, SMC; E, DSA; F, HA.

アニオンの負の解離性基数, n_{PC} をフィブリノーゲンの正の解離性基数 ($=124.7/10^5 g$) とすると混合比 $R_{PA} = n_{PA}/(n_{PA} + n_{PC})$ で表すことができる. 図1で PVS とフィブリノーゲンの高分子電解質複合体は形成後, 速かに凝集し濁度減少が見られたが, SCS, DS4, PVS は共に $R_{PA} = 0.1 \sim 0.2$ において高分子電解質複合体形成が最大になった.

図2にフィブリノーゲンと種々の混合比のヘパリンおよびヘパリノイドにトロンビンを添加し, 反応2時間後に汙液の未反応フィブリノーゲン量 ($E_{1cm}^{1mg/ml} = 1.506$) を測定した結果を示す. $R_{PA} = 0.1 \sim 0.2$ で抗凝固活性の極小値が PVS, SCS, DS2, DS4 において観察でき, それは図1の高分子電解質複合体形成の最大に相当している. 結局これらのポリアニオンはその電荷密度, 分子量, 主鎖の可撓性および親水性と関係していると考えられるが, フィブリノーゲンとある混合領域で沈殿を形成するので抗凝固剤として用いるべきではない.

2. トロンビンに対するヘパリンおよびヘパリノイドの阻害定数の決定

Fig. 2 Anticlotting effect of heparin and heparinoids in a reaction mixture of 6 ml containing 0.4 mg/ml fibrinogen and 0.33 units/ml thrombin for 2 h in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0 and ca. 20°C.

Fig. 3 Formation rate (v) in the absence of inhibitors divided by formation rate (v_i) in the presence of inhibitors is plotted against concentration, $[I]$, of heparin or heparinoids in 0.55 M phosphate buffer at pH 7.0; $[F_0]=0.3$ mg/ml and $[T_0]=0.33$ NIH units/ml.

Fig. 4 The reciprocal of the formation rate term ($1/v_i$) is plotted against low concentration of heparin in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0; $[F_0]=0.3$ (●) and 0.5 (○) mg/ml. $[T_0]=0.33$ NIH units/ml. Broken line shows for DSC.

フィブリノーゲンと可溶性複合体を形成するヘパリンおよびヘパリノイドの場合、図3に示すように見掛けの阻害効果は低濃度になるほど大きい。ここで $[F_0]$ および $[T_0]$ は添加フィブリノーゲンおよびトロンビン濃度を示す。約 0.08 mg/ml 以上の高濃度領域では反応速度の逆数は濃度0において1に収束するので、非拮抗阻害剤として作用することがわかり、その直線部分の勾配から阻害定数を得る(表2)。フィブリノーゲン-トロンビン反応に対する重量濃

Table 2 Inhibition constants K_{ip} of heparin and heparinoids in high concentration (>0.08 mg/ml) for fibrinogen and thrombin systems in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0, 25°C.

Acidic polysaccharides	K_{ip}	
	mg/ml	(pyranose) M (rings/l)
DSC	0.0229	6.26×10^{-5}
Hep	0.0352	6.41×10^{-5}
DSA	0.0775	1.80×10^{-4}
CMC	0.164	6.98×10^{-4}
CHS	0.345	6.87×10^{-4}
SMC	0.714	2.22×10^{-3}

度当りの阻害作用は $DSC > Hep > DSA > CMC > CHS > SMC$ の順に大きい。しかしピラノース環当りの濃度に換算して分子として考えると、DSC と Hep および CMC と CHS はほぼ同一阻害作用を持っている。

図4に 10^{-4} mg/ml 以下の低濃度域のヘパリンおよび DSC によるフィブリノーゲン-トロンビン反応阻害の Dixon プロット⁵⁾を示す。この濃度域では高濃度領域と異なって拮抗阻害剤のように作用している。図中の直線の勾配はいずれも小さく、ヘパリンおよび DSC は真の拮抗阻害剤として作用しているわけではない⁶⁾。

図4の2直線の交点から、ヘパリンの低濃度域

Fig. 5 $1/v_i'$ plotted to concentration of Hep or DSC in the presence of AT of 4.18×10^{-3} mg/ml in 0.05 M phosphate buffer at pH 7.0. $[F_0] = 0.3$ mg/ml and $[T_0] = 0.33$ NIH units/ml. Incubation time of (T+Hep or DSC+AT) is 1 min.

Fig. 6 Various constants of inhibition K_{ip} , dissociation K_d , the Michaelis-Menten (K_m, K_{mp}) in the interaction of heparin, AT, thrombin, and fibrinogen.

の阻害定数は $1.07 \times 10^{-8} \text{ M}$ と見積ることができる。この値はトロンビン-合成基質系等で得られた文献値とよく一致している⁷⁻¹⁰⁾。

過剰の AT 存在下でヘパリン (H) あるいは DSC とトロンビン (T) を 1 分間インキュベートしてフィブリノーゲンを添加した結果を図 5 に示す。ヘパリンが顕著な阻害効果を示すのに、DSC の効果はほとんど検出されない。それは恐らく DSC がヘパリンのように AT と結合できても、ヘパリンのように AT の分子形態変化を惹起させないためと思われる¹¹⁻¹³⁾。AT によるトロンビン失活のためにヘパリンは本研究で使ったヘパリノイドの持たない特異な分子構造を持っていると思われる。Casu 等

¹⁴⁾, Lindahl 等¹⁵⁾, Rosenberg 等¹⁶⁾, Yoshizawa 等¹⁷⁾, はヘパリン由来のオリゴ糖中、AT 結合に高親和性を示し、かつ抗 Xa 活性が高い配列としてほぼ類似の分子構造を提唱している。それらは低トロンビン活性であったが、AT-Hep が阻害効果を持つ XIIa, XIa, Xa, IXa, VIIa, トロンビンはいずれもセリンプロテアーゼであり、それらの活性部位に相応する AT 上の反応部位は共に類似して (少なくとも IIa, IXa, Xa では同じであることが示されている。¹⁹⁾、特にトロンビンに対する失活効果には、AT とトロンビンに対する結合部位が必要なためにヘパリンは数千以上の分子量を持つ必要があるであろう。図 6 にヘパリン (H),

AT, トロンビン, フィブリノーゲン(F)に関する種々の相互作用に関する定数をまとめた. 右側に矢印があるほど結合はゆるやかで, ATとヘパリンが極めて強力にトロンビンを失活させることがわかる.

III. 結 論

ヘパリノイド中, 特に DSC はフィブリノーゲンと可溶性複合体を形成し, フィブリノーゲン-トロンビン反応に対する阻害効果はすぐれていた. しかし DSC は AT 存在下で, ヘパリンのような強力な失活効果は示さなかった. 0.08 mg/ml 以上のヘパリン濃度域の阻害定数として $3.91 \times 10^{-6} \text{ M}$, 又低濃度域では $1.07 \times 10^{-8} \text{ M}$ をフィブリノーゲン-フィブリン転換初期反応を利用した濁度法から得た. 後者の値はトロンビン-合成基質系で測定した文献値とよく一致した⁷⁻¹⁰⁾.

謝辞: 京都大学, 中島章夫名誉教授に深謝いたします.

文 献

- 1) 佐藤弘子, 中島章夫: トロンビン拮抗阻害剤の阻害定数の新決定法. 血液と脈管, **15**; 175~177, 1984.
- 2) Sato, H. and Nakajima, A.: Kinetic study on the initial stage of the fibrinogen-fibrin conversion by thrombin. (II) Application of enzyme kinetics to turbidimetric method. Thromb. Res., **33**; 133~139, 1984.
- 3) Abildgaard, U.: Inhibition of the thrombin-fibrinogen reaction by heparin in the absence of cofactor. Scand. J. Haemat., **5**; 432-439, 1968.
- 4) Li, E.H.H., Orton, C. and Feinman, R.D.: The interaction of thrombin and heparin. Proflavine dye binding studies. Biochemistry, **13**; 5012~5017, 1974.
- 5) Dixon, M.: The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J., **55**; 170~171, 1953.
- 6) Sato, H. and Nakajima, A.: Kinetic

study on the initial stage of the fibrinogen-fibrin conversion by thrombin. (III) Effects of competitive inhibitors. Thromb. Res., **37**; 327~335, 1985; (IV) Effects of heparin and its analogues. ibid. **39**; 549~557, 1985.

- 7) Li, E.H.H., Orton, C. and Feinman, R.D.: The interaction of thrombin and heparin. Proflavine dye binding studies. Biochemistry, **13**; 5012~5017, 1974.
- 8) Smith, G.F.: The heparin-thrombin complex in the mechanism of thrombin inactivation by heparin. Biochem. Biophys. Res. Commun., **77**; 111~117, 1977.
- 9) Griffith, M.J., Kingdon, H.S. and Lundblad, R.L.: The interaction of heparin with human α -thrombin: Effect on the hydrolysis of anilide tripeptide substrate. Arch. Biochem. Biophys., **195**; 378~384, 1979.
- 10) Rosenberg, R.D., Jordan, R., Oosta, G.M. and Gardner, W.: The molecular interactions responsible for heparin's anticoagulant effect. (Ed. by Man, K.G. and Taylor, F.B., Jr.: The regulation of coagulation), Amsterdam, Elsevier/North-Holland, 1980 607~619.
- 11) Nordenman, B. and Björk, I.: Binding low-affinity and high-affinity heparin to antithrombin. Ultraviolet difference spectroscopy and circular dichroism studies. Biochemistry, **17**; 3339~3344, 1978.
- 12) Villanueva, G. and Danishefsky, I.: Conformational change accompanying the binding of antithrombin III to thrombin. Biochemistry, **18**; 810~817, 1979.
- 13) Olson, S.T. and Shore, J.D.: Binding of high affinity heparin to antithrombin III. Characterization of the protein fluorescence enhancement. J. Biol. Chem., **256**; 11065~11072, 1981.
- 14) Casu, B., Oreste, P., Torri, G., Zop-

- petti, G., Choay, J., Lormeau, J.-C., Petitou, M. and Sinaÿ, P.: The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor X_a) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. *Biochem. J.*, **197**; 599~609, 1981.
- 15) Lindahl, U., Bäckström, G. and Thunberg, L.: The antithrombin-binding sequence in heparin. *J. Biol. Chem.*, **258**; 9826~9830, 1983.
- 16) Atha, D.H., Stephens, A.W. and Rosenberg, R.D.: Evaluation of critical groups required for the binding of heparin to antithrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**; 1030~1034, 1984.
- 17) Ototani, N., Kikuchi, M. and Yoshizawa, Z.: Structure and biological activity of finback-whale (*Balaenoptera physalus* L.) heparin octasaccharide. *Biochem. J.*, **205** 23~30, 1982.
- 18) Nakanishi, E., Sato H. and Nakajima, A.: Electrophoresis study on the interaction of fibrinogen with heparin. submitted to *Polymer J.*
- 19) Jordan, R.E., Oosta, G.M., Gardner, W.T. and Rosenberg, R.D.: The kinetics of hemostatic enzyme-antithrombin interactions in the presence of low molecular weight heparin. *J. Biol. Chem.*, **255**; 10081~10090, 1980.

血小板刺激応答時の情報伝達物質の代謝・機能を徹底解明!

血小板1985 -血小板刺激応答-

血小 板 芦ノ湖カンファレンス
編 集 日 高 弘 義
大 熊 稔
風 間 睦 美
藏 本 淳
山 崎 博 男

専門医33氏分担執筆

血小板の刺激に対する応答機序は、現段階で一体どれだけ判明しているのだろうか。また、どのように理解したらよいのだろうか。これらの問の答えを得るために、細胞膜や酵素蛋白からCaなどの情報伝達物質にいたるまで、血小板の刺激応答時のシグナルメディエーターと考えられる物質に焦点をあて、その代謝や機能に関して、各分野の第一線のエキスパートに解説していただいた。とくに血小板のCa依存性ミオシン軽鎖リン酸化反応の第一人者である米国 NIH の R.S. Adelstein 博士の最近の研究概説も特別原稿としていただいた。この方面の世界の動きを知るためにも大変有意義であると考えられる。

●内容: 1. トランスメンブレンコントロール, 2. 分泌細胞における膜応答様式, 3. 受容体としての血小板糖蛋白, 4. 細胞膜受容体-アデニレートシクラーゼ連関の分子機構, 5. 血小板における cyclic AMP と TXA₂ 合成の関係について, 6. カルパイン-カルパスタチン系の役割, 7. カルシウム依存性中性プロテアーゼの分子生物学, 8. Cキナーゼとは, 9. 血小板放出反応の Ca²⁺ 調節, 10. 血小板活性化反応におけるCキナーゼの役割, 11. 血小板アクトマイオシン, 12. 刺激応答異常による血小板病態, 13. Regulation of Contractile Proteins in Human Blood Platelets

●B5判 頁210 図122 表16
¥5,800(配送料弊社負担)

科学評論社

〒101 東京都千代田区神田多町2-11

振替口座 東京 7-102026
電話 03-252-7768