特集・第 XIII 因子

フィブリン重合体にとり込まれて 不溶化した L-アスパラギナーゼ*

稲田 祐二** 広瀬 茂久** 岡田 政久**

Key words : factor XIII, L-asparaginase, fibrin polymer.

目 的

白血病寛解剤として治療に使用されている L-アスパラギナーゼを水に対して不溶化し、不溶化アスパラギナーゼ (Immobilized asparaginase) を調製することを目的とする。不溶化の方法は血液凝固系の重要な一過程である酵素トロンビンによるフィブリノゲン-フィブリン変換を利用し、生成するフィブリン重合体にアスパラギナーゼを埋め込み、アスパラギナーゼを不溶化すると共に安定化させる。この際、血液凝固第 XIII 因子はフィブリン分子間、あるいはフィブリン-アスパラギナーゼ分子間の架橋反応を触媒し、不溶化、安定化に寄与する可能性がある。このように調製された不溶化アスパラギナーゼは白血病患者の血液透析の際、透析管中に存在させることによって、従来のアスパラギナーゼ投与により生ずる副作用を除き、さらに連続投与による抗体の産生を防ぐ可能性がある。

ある種の白血病はその腫瘍細胞がアスパラギンを必須の栄養源としているので、アスパラギナーゼの酵素作用によってアスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに分解し、栄養源を断つために治療効果があると考えられている。患者へのアスパラギナーゼの投与は血液中へアンモニアの放出をきたし、頭痛、吐気等の副作用

図 1

を起す。さらに大腸菌より単離、結晶化された同酵素の連続投与は人体にとって非自己のため抗体を産生し過敏症を起す。以上二つの欠点は、透析管に不溶化アスパラギナーゼを存在させた人工腎臓を用いて患者の血液を透析することにより補うことができる。すなわち、透析管内に取りつけた不溶化アスパラギナーゼにより上述の酵素反応が進行し、この時遊離するアンモニアは透析により速かに除去される。また大

* Immobilized L-asparaginase embedded in fibrin polymer. (The 3rd Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis)

** 東京工業大学理学部化学科生物化学〔〒152 東京都目黒区大岡山2-12-1〕 Yuji INADA, Shigehisa HIROSE and Masahisa OKADA : Laboratory of Biological chemistry, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan.

腸菌由来のアスパラギナーゼは大部分フィブリン膜内にうめ込まれて不溶化されているため抗体産生系とは接触しにくく、抗体の産生はみられないものと思われる。さらにアスパラギナーゼを不溶化する担体に人フィブリン重合体を用いれば、血液凝固系、免疫系に影響を及ぼすことが少ないという点においても、他の合成高分子を担体とするよりも優れている(図1)。

ここで固定化酵素についての研究の概略を述べる。近年、種々の化学反応を常温中性という緩和な条件下で、しかも高効率で進行させる能力を有する酵素を工業的に利用しようとする試みが内外において盛んに行われており、将来、酵素工業として発展する可能性がある¹⁾²⁾。そのためには、酵素を水に対して不溶性にし、さらに酵素の有する機能を長時間持続させるための安定化が必要である。不溶性となった固定化酵素は固体触媒と同様の取扱いが可能であり、例えばカラムに固定化酵素を充填して基質を流せば反応生成物が得られる。更に反応系から酵素を取り出し再使用することも可能である。固定化酵素を作る方法は三つに大別される。(1)水に溶けない担体、例えば樹脂、セルロース誘導体、ガラス等に共有結合、イオン結合あるいは物理的吸着により酵素を不溶化し固定する方法、(2)グルタルアルデヒドのような一つの分子内に二つの官能基を有する試薬を用いて酵素蛋白質間を架橋し、凝集させて不溶化する方法、(3)ゲルの微細な格子の中へ酵素を閉じ込めたり、マイクロカプセル中に封入する方法が、主なものである。いずれの方法も一長一短があり、例えば物理的吸着は担体より離れ易い欠点がある。また化学的に共有結合をつくらせることは、蛋白質の微妙な高次構造の破壊をきたし、酵素機能の消失が起りやすい。現在固定化酵素を工業的に利用しているのはアミノアシラーゼを DEAE-セファデックスに結合させ、アセチル-D, L-アミノ酸から L-アミノ酸をつくる工業的方法が日本で、固定化ペニシリンアミダーゼを用いペニシリン G を 6-アミノペニシラン酸にする工業的方法がヨーロッパ、アメリカで行われている。

図 2

工業界での固定化酵素の利用と相まって医学界でも、この固定化酵素を治療に、また診断に利用するのも可能であると著者は考えている。その一つとして本稿ではフィブリン膜に固定化された L-アスパラギナーゼについて述べる³⁾。アスパラギナーゼによる癌細胞の増殖抑制については本庶、早石の総説⁴⁾があり、臨床医学的研究については山田、三浦、日比野の総説⁵⁾があり、アスパラギナーゼの構造と機能については著者の総説⁶⁾がある。

II. 方 法

不溶化アスパラギナーゼの調製法を図2に示す。本研究では人フィブリンゲンの入手が困難

図 3

であった為、牛フィブリノゲンを用いた。牛血漿より Blombach の方法で単離した牛フィブリノゲン 200 mg を 20 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.2) 8 ml に溶解し、1 mg アスパラギナーゼ (220 IU/mg) および少量の Ca^{2+} を添加溶解する。混合液を合成樹脂性の箱 (2×4.5×1 cm) に入れ、市販の牛トロンビン 1.2mg を 0.3ml のクエン酸に溶解した液を箱に添加、攪拌し室温に放置する。12 時間後凝集した寒天状ゲルをロ紙上に出し、静かに圧力を加え浸出する液をロ紙で除去し、フィルム状フィブリン重合体を得る。水道水でこれを充分洗滌しフィブリン重合体に埋め込まれなかった遊離のアスパラギナーゼを除く。不溶化されたアスパラギナーゼの有する酵素活性は、基質アスパラギンより、酵素作用によって遊離するアンモニア量をネスラー試薬で発色させ、分光学的に定量した。

III. 成 績

上述の方法で調製された不溶化アスパラギナーゼは二日間蒸留水中に放置してもほとんど酵素活性の減少は観察されない。アスパラギナーゼを埋め込んだ膜状フィブリン重合体を 50mm² と 100mm² の面積に切り取り、基質アスパラギ

ンを含む溶液中に浸し、一定時間ごとに基質溶液の一部を取り出し、分解生成物であるアンモニアを定量した結果を図 3 に示した。時間に対してアンモニアの生成量は直線的に増加し、またフィブリン膜の面積に比例してアンモニア量は増加する。一方反応系よりフィブリン膜を取り除くとアンモニアの生成は認められない。以上の結果はアスパラギナーゼが膜状フィブリン重合体中に埋め込まれ不溶化されたことを示している。

このフィブリン重合体は 6 M 尿素によって可溶化されないことより、血液凝固第 XIII 因子がフィブリン分子間を共有結合によって架橋していると思われる。第 XIII 因子はフィブリン分子中に存在するグルタミン残基の酸アミドと、リジン残基の ϵ -アミノ基との間で酸アミド結合を生成する反応を触媒するトランスグルタミナーゼに属する酵素であるが、フィブリンの他にグルカゴンおよびインシュリンの B 鎖についても架橋反応が行われ、基質特異性はかなり低いと考えられる⁷⁾。アスパラギナーゼは分子量 13.6 万で 1 分子中に 56 個のグルタミン残基と、88 個のリジン残基が存在する。第 XIII 因子はアスパラギナーゼ分子内あるいは分子間で架橋され、その結果、酵素の構造の安定化、および不溶化が起こる可能性がある。また第 XIII 因子がフィブリン分子とアスパラギナーゼ分子間での架橋はアスパラギナーゼの固定化に役立つであろう (図 4)。本研究で調製されたフィブリン膜に固定化されたアスパラギナーゼは 6 M 尿素に溶解しない事実より、第 XIII 因子がフィブリン分子間で架橋していることは明らかであるが、アスパラギナーゼ分子間、分子内およびアスパラギナーゼ-フィブリン間の架橋は証明されていない。しかし不溶化アスパラギナーゼの長時間の洗滌によっても膜より酵素が遊離しないこと、また酵素活性が消失しないことより上述の第 XIII 因子による反応の進行が示唆される、このように止血に重要な役割を演ずる第 XIII 因子は酵素分子内の架橋による安定化、あるいは酵素の不溶化に利用できる可能性がある。従来、酵素の安定化、不溶化に二官能

図 4

基を有するグルタルアルデヒドが使用されていたが、この試薬の架橋に比べ第 XIII 因子による反応はさらに緩和な条件下で進行し、酵素の有する特定の立体構造を破壊することなく架橋できる点が優れている。

人工透析管中に不溶化酵素を存在させ、血液中に存在する物質を酵素反応によって変換させ治療する試みは、不溶化アスパラギナーゼによって腫瘍細胞に必要なアスパラギンを分解するとか、あるいは不溶化フェニルアラニンヒドロゲナーゼによってフェニルケトン尿症の患者の治療に利用できる可能性がある。この際に、酵素を固定化する担体に人由来のフィブリン重合体を用いることは酵素の構造を破壊しない緩和な条件下で固定化されること、血液凝固系、免疫系の活性化が他の合成高分子を用いた場合に比べ起こりにくい点において最適の材料と考えられる⁸⁾⁹⁾。

結 論

白血病寛解剤として臨床治療に使用されている L-アスパラギナーゼを水に対して不溶化し

不溶化アスパラギナーゼ (Immobilized asparaginase) を調製した。不溶化の方法は血液凝固系の重要な一過程である酵素トロンビンによるフィブリノゲン-フィブリン変換を利用し、生成するフィブリン重合体にアスパラギナーゼを埋め込み、アスパラギナーゼを不溶化するとともに安定化させる。この際血液凝固第 XIII 因子はフィブリン分子間、あるいはフィブリン-アスパラギナーゼ分子間の架橋反応を触媒し、不溶化、安定化に寄与している可能性がある。この不溶化アスパラギナーゼは、白血病患者への投与によって副作用の少ない、また抗体を産生しない薬剤として利用されることを最終目的としている。

文 献

- 1) Goldman, R., Foldstein, L. and Katchalski, E.: "Biochemical Aspects of Reaction on Solid Supports" p. 1, Ed. by G. R. Stark, Academic Press, New York, 1971.
- 2) Vieth, W. R. and Venkatasubramanian, K.: Chemtech. Jan., 47 (1974).

- 3) Inada, Y., Hirose, S., Okada, M. and Mihama, H. : Enzyme, **20**; 188, 1975.
- 4) 本庶 祐, 早石 修: 蛋白質, 核酸, 酸素, **15**; 195, 1970.
- 5) 山田一正, 三浦守司, 日比野進: 内科, **22**, 448, 1968.
- 6) 稲田祐二: 医学のあゆみ, **88**, 453, 1974.
- 7) Folk, J. E. and Chung, S. I. : Advances in Enzymology, p. 100, Vol. **38**; 1973.
- 8) Inada, Y., Yamazaki, S., Miyake, S., Hirose, S., Okada, M. and Mihama, H. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **67**; 1275, 1975.
- 9) Inada, Y., Hirose, S., Matsushima, A. and Hiramoto, Y. : Exptl. Cell Res., in press.

<Abstract>

Immobilized L-asparaginase embedded

in fibrin polymer

by

Yuji INADA, Shigehisa HIROSE and Masahisa OKADA

from

Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan.

Immobilized asparaginase was prepared by embedding asparaginase (which is effective for remission children with leukemia) into fibrin polymer formed by fibrinogen-fibrin conversion in the presence of thrombin. The immobilized asparaginase film did not dissolve in 6 M urea, suggesting that blood coagulation factor XIII participates in the cross-linking between fibrins and between fibrin and asparaginase.