コラゲン構造と血小板凝集*

児 玉 亮** 津 田 圭四郎** 山 中 学***

Key words : Platelet, Collagen, Aggregation, Collagenase

緒 言

血小板とコラゲン反応は止血および血栓形成機構に重要であるが、まだその反応機作は明確になっていない。コラゲンに血小板結合部位があるとする説もいくつかでており、たとえば、Wilner 等¹⁾はコラゲンのリジン、またはヒドロキシリジンのε-アミノ基が血小板凝集に必須であるとしており、Jamieson 等²⁾は血小板膜上のグルコシルトランスフェラーゼをコラゲン分子中のヒドロキシリジンの不完全な糖鎖との複合体形成が重要であるとした。また一方では Jaffe 等³⁾のようにコラゲンの高次構造が重要であるとする説もあり、彼等は一定の規則正しい重合をしたコラゲンのみが血小板を凝集させるとした。

血小板凝集におけるコラゲンと血小板の反応機作について、われわれはコラゲンの構造と部位との関係に注目し研究を続けてきた⁴⁾。今回、コラゲナーゼで部分加水分解したコラゲンを用いて、コラゲンによる血小板凝集および結合部位について検討を行った。

I. 実験材料と実験方法

1. 実験材料

i) コラゲン溶液と部分加水分解コラゲンの調整

用いたコラゲンはニッピ研究所から提供され

たもので、牛皮膚コラゲンをプロクターゼ処理して、末端のテロペプチドを除去等して、可溶化してある。等電点附近 (pH 8 附近) で沈殿させたものを希酢酸(0.05%)に溶かし (pH 3) 脱イオン蒸留水に対して透析して、pH 5 ~ 6 にした。0.2%希酢酸に溶解させた場合は (pH 2.5)、一旦、希アルカリで中和 (pH 5 ~ 6) してから同様に透析した。コラゲン濃度は 0.2 ~ 0.3%で、長期間安定で、会合体は析出しない。溶液のイオン強度を下げたことによりコラゲン分子がたがいに反発し、会合しにくくなったのであろう。このコラゲンを *Clostridium histolyticum* 由来のコラゲナーゼで部分加水分解して、硫酸分画またはヒドロキシアパタイトカラムで分別して各フラクションを得た。

ii) コラゲンの部分加水分解と分別

プロクターゼ処理コラゲンをコラゲナーゼで部分加水分解した。分解経過は比旋光度($[\alpha]_{405}$)の変化により判定した。用いたコラゲナーゼはペプチダーゼ活性をある程度有するため、切断した短いコラゲンフラグメントを直ちにペプチドに分解するので比旋光度は減少する。これはおたまじゃくしのコラゲナーゼによる分解の場合にはペプチダーゼ活性はないので比旋光度は変化しない⁵⁾のとは異なる。比旋光度が 900°, 700°および 590°になった時、硫酸分画したのをそれぞれ A-Fraction, B-Fraction, C-Fraction とした。この分画方法は Stark Kühn との方

* Collagen structure and platelet aggregation. (The 4th Congress of the Japanese Society on Thrombosis and Hemostasis, Nov. 29, 1975).

** 繊維高分子材料研究所 (〒221 横浜市神奈川区沢渡4-1), Makoto KODAMA & Keishiro TSUDA: Research Institute for Polymers and Textiles, Yokohama, Japan 221.

*** 東京大学医学部中央検査部, Manabu YAMANAKA: Department of Central Clinical Laboratory, The University of Tokyo Hospital, The University of Tokyo School of Medicine, Tokyo, Japan 113.

Fig. 1 Chromatography of Collagen on Hydroxyapatite column.

法⁶⁾と基本的には同じであるが pH を 5.5 にして分解を緩和した。また pH を 5.0 に変えて比旋光度が 800° になった時、ハイドロキシアパタイトカラムにかけて分別したものを D-Fraction とした。

iii) ハイドロキシアパタイトカラムによるコラーゲンの分別⁷⁾

用いたハイドロキシアパタイトカラム (φ2cm × 4.5cm) は 0.001N のリン酸緩衝液で最初に平衡になっている。流速は 34ml/hr であった。図 1 にこのカラムの elution パターンを示したが、図中の矢印を示す C は sample charge を示す。最初のピークはハイドロキシアパタイトカラムに未吸着分であり、加水分解された短いペプチドはこの分画に入るので、容易にコラーゲンから取り除くことができる。リン酸緩衝液の linear gradient (gradient は点線で示した) により吸着分を溶出させると、(A) の未変性コラーゲンとの (B) 熱変性コラーゲンとは明らかに異なる elution パターンを示し、分別が可能である。また、(C) には部分熱変性したコラーゲンの elution

Fig. 2 Effect of Concentration of Collagen partially digested by Collagenase (D-Fraction) on Platelet aggregation.

パターンを示したが、2つのピークが認められ、それぞれが(A)と(B)のピークに対応している。これにより用いるコラーゲン溶液が変性しているか否かを知ることができる。

熱変性をおこさないように 4°C コールド・ルーム中で、このカラムによりコラーゲナーゼで部分加水分解したコラーゲンの分別をして、(D) に示されるように D-Fraction を得た。血小板凝集能測定のためには、脱イオン蒸留水に対して透析した後、ダイアフローで濃縮したものをを用いた。

iv) 熱変性コラーゲン

プロクターゼ処理コラーゲンを 60°C、20 分間温水浴槽中で加熱したものをを用いた。

v) 血小板浮遊血漿 (PRP)

3.13% クエン酸ナトリウム 1 容と血液 9 容の割合で正常人肘静脈より採血し、直ちに、これを室温にて 1,000rpm、10 分間、遠沈分離して得た。検査に際し、室温保存で採血後 6 時間以内に測定に供した。

2. 実験方法

血小板凝集測定には Bryston 社の Aggrometer を用い、0.5ml の PRP に試料のコラーゲン溶液を加えて 37°C (低温の場合は 22°C)、

Fig. 3 Inhibitory effects of D- and A-Fractions on Platelet aggregation.

Fig. 4 Temperature and Chain length dependence of Collagen partially digested (A- and C-Fraction) on Platelet aggregation.

スターラー回転数は 1,100rpm である。

II. 実験成績

1. コラゲン溶液の経時変化

さきにわれわれは⁴⁾、プロクターゼ処理によりテロペプチドをはずされたコラゲンは血小板を凝集させることを報告した。以上の方法でイオン強度を極端に下げて調整したコラゲン溶液は一般に安定であるが、4°C、5 か月間貯蔵し

たものでは、新たに調整されたものと比較して、凝集の lag time は短縮した。また新たに調整されたものでは 40μg 以下の量では血小板凝集はおこさないのに対し、貯蔵したものでは 4μg でも血小板凝集能を示し、これは native コラゲンと同程度である。この貯蔵コラゲン溶液の超遠心沈降パターンは、ゲル状の会合体が含まれていることを示すことから、テロペプチドは血小板凝集に直接は関与せず、コラゲン分

Fig. 5 Inhibitory effect of Heat denatured Collagen on Platelet aggregation.

子の会合を助ける役割を持ち、この会合体が血小板を凝集させると思われ、ゲル状の会合体が存在するコラゲン溶液においても、みかけ上、native コラゲンと同様な血小板凝集能の亢進をもたらしたと考えられる。

2. 部分加水分解コラゲンによる血小板凝集

D-Fraction を用いて血小板凝集能を測定した結果を図2に示した。コラゲナーゼ未処理のコラゲンに比べ、明らかに lag time が延長し、かつ凝集を起させるのに必要な濃度も高くなっている。コラゲナーゼ処理により分子鎖が短くなると血小板凝集は起しにくくあることから、コラゲン分子鎖の長さが関与することは明らかであるが、これは絶対的な要因でなく、コラゲン量が多くなれば、血小板凝集能は増強される。いずれにせよ、この部分加水分解コラゲンのある部位に血小板凝集活性があると考えられる。

硫酸分画の A, B, C Fraction は血小板凝集を 37° では起さない。図3の下段の時間軸に平行な直線は A-Fraction の場合を示している。いま、血小板凝集を起さない低濃度の D-Fraction をあらかじめ加えておき、次に高濃度の D-Fraction を加えると、凝集は阻止される。

(図3上) しかし、血小板凝集を示さない A-Fraction に添加した場合は (図3下)、D-Fr-

action により凝集が起る。すなわち、A-Fraction をあらかじめ加えても、D-Fraction の凝集効果は阻害されない。これは A, B, C の各 Fraction は 37°C では熱変性して、三本鎖のらせん構造をとっていないため、血小板に結合せず、後から加えた D-Fraction は血小板と結合して、これを凝集させ、他方、低濃度の D-Fraction は一過性の吸光度の増大が示すように、血小板と結合して次にくるコラゲン分子の結合を阻止するため、2回目の D-Fraction による凝集が阻害されたものと思われる。この違いは D-Fraction は 37° で三本鎖のらせん構造をとっているためであろう。これを確認するために、測定温度を 37°C から 22°C に下げて各 Fraction の血小板凝集を測定すると図4のように A-Fraction では凝集がみられた。低温度のために3本鎖らせん構造を保っているためと思われる。しかし、より短い分子鎖を持つと考えられる C-Fraction では凝集はみられなかった。

鎖長は長いが三本鎖らせん構造は失われている熱変性コラゲンでは、既報⁴⁾のように一過性の吸光度の増大、すなわち血小板との反応を示すが、凝集は起さない(図5)。しかし、D-Fraction の低濃度の場合と異なり、後から添加されたコラゲンによる凝集は阻止しない。

III. 考 按

分子鎖の短くなったコラーゲンの血小板凝集能の温度依存性は三本鎖らせん構造が凝集に必須であることを示唆している。コラーゲンに血小板粘着、凝集の活性部位の存在が推定されているが、これはコラーゲンが三本鎖らせん構造をとり、規則正しい配列をした時はじめて血小板を粘着、凝集させることができると考えられる。一本鎖の熱変性コラーゲンでも血小板の変形をおこすことから、血小板とコラーゲンとの反応の存在を示唆するが、あとから添加したコラーゲンによる凝集を阻止しなかった点は、三本鎖らせん構造をとる D-Fraction とは異なる反応態度を示すと考えられる。

4°C では A, C, D のいずれの Fraction も ATP により SLS 繊維を形成することが電顕より示されているので、3本鎖らせん構造をとっていることは明らかである。試料溶液中でも、この構造をとっていて、しかも血小板凝集を起こさないことは活性部位がなくなったことを示唆する。

ゲル状会合体のあるコラーゲン溶液から FLS 繊維を形成させると、電顕では縞模様のない無定形に近い繊維が見られたが、これより、かならずしも Jaffe and Deykin³⁾ の主張する一定の規則正しい重合は血小板凝集に必須でないと考えられる。現在、コラーゲンの鎖長と血小板凝集の関係を電顕等により検討中である。

おわりに、コラーゲンを提供された株式会社ニッピ研究所に深謝し、東京大学理学部生化学の西貝正明氏、川崎 力博士の協力で感謝します。

文 献

- 1) Wilner, G. C., Noddell, H. L., and Prosspez, T.L. : Aggregation of platelets by collagen : Polar active sites of insoluble human collagen. *Am. J. Physiol.*, **220** ; 1074, 1971.
- 2) Jamieson, G. A., Urban, L. and Barker, A.J. : Enzymatic basis for platelet: Collagen adhesion as the primary step in haemostasis. *Nature New Biol.*, **234** ; 5, 1971.
- 3) Jaffe, R. and Deykin, D. : Evidence for a structural requirement for the aggregation

of platelets by collagen. *J. Clin. Invest.*, **53** ; 875, 1974.

- 4) 山中 学, 永井 裕, 松田道生, 磯部淳一 : 血小板の機能—特にコラーゲンと血小板反応について, *臨床血液*, **16** ; 4, 387, 1975.
- 5) Gross, J. and Nagai, Y. : Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54** ; 1197, 1965.
- 6) Stark, M. and Kühn, K. : The properties of molecular fragments obtained on treating colfskin collagen with collagenase from *Clostridium histolyticum*. *European J. Biochem.* **6** ; 534, 1968.
- 7) Kawasaki, T. and Bernardi, G. : Investigation on the resolving power of hydroxyapatite columns. *Biopolymers*, **9** ; 257, 1970.

<ABSTRACT>

The Effects of Collagen Structure on Platelet Aggregation

by

Makoto KODAMA, Keishiro TSUDA and Manabu YAMANAKA*

from

Research Institute for Polymers and Textiles, Yokohama, and *Department of Central Clinical Laboratory, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan.

The effects of structural changes of collagen-platelet reaction were investigated. The collagen used was derived from bovine skin collagen, of which telopeptide was removed with proctase. It was dissolved in 0.05% solution of acetic acid and then dialyzed against deionized water to adjust to about pH 5.5. This collagen solution was very stable compared with one containing salt. The digestion with collagenase from *Clostridium histolyticum* was followed as a decrease in the specific optical rotation at 405 nm. A, B and C-fractions were isolated by fractional ammonium sulphate precipitation when the values of $[\alpha]_{405}$ dropped from -1000° to -900° , -700° and -590° , respectively. D-fraction was prepared by fractionation using hydroxyapatite column when it

dropped to -800° . Each fraction was dialyzed against deionized water and especially the solution of D-fraction was concentrated with Diaflo of 0.2~0.3%. Platelet aggregation was measured with Aggregometer.

The collagen stored at 4°C for 5 months showed increased ability of platelet aggregation compared with the freshly prepared one and the same effects on it with native collagen. The sedimentation pattern of ultracentrifugation of stored collagen showed the presence of gel-like aggregates in the solution. These results suggest that telopeptide of native collagen is not essential to platelet aggregation, but accelerates the association of collagen which induces platelet aggregation. Although D-fraction showed dose dependence for induction of platelet aggregation in both lag time and maximum aggregation rate, increased lag time and platelet aggregation ability at only higher concentration were observed compared with the collagen untreated with collagenase. It suggests that the length of collagen molecules plays a part but is not a critical factor in platelet aggregation. A, B and C-fractions did not aggregate platelet at 37°C . D-fraction of low concentration altered platelet shape as shown in the transient increase of optical density of the mixture of D-fraction and PRP. D-fraction of low concentration added previously to PRP showed inhibitory effect on the aggregation ability of D-fraction of higher concentration which was added successively, while the addition of A-fraction showed no inhibitory effect on it. It could be considered that the molecule chain of A-fraction could not adhere to platelet because it was denatured at 37°C and lost its triple helical structure, but higher dose of D-fraction could adhere to and aggregate platelet because the molecule chain of it held the triple helical structure. A-fraction showed the

baility of platelet aggregation when it was measured at 22°C , because its triple helical structure was well preserved at this low temperature. The collagen denatured by heating at 60°C for 20 min. showed also transient increase of optical density in the pattern of platelet aggregation which indicated shape change platelets in PRP, but no inhibitory effect on the ability of platelet aggregation of the collagen. These results suggest that there are different mechanisms in platelet-collagen reaction and the heat denatured collagen.

<DISCUSSION>

神前五郎(大阪大学第二外科) 1) 熱変性コラゲンを作用させたときの血小板の形態変化とはどのようなものか。 2) 熱変性コラゲンを作用させたとき血小板の放出反応が起るか。

児玉 亮(工技院織高研) 熱変性したコラゲンと血小板とは結合していないと、その後の未変性コラゲン添加による血小板凝集から考えられるが一過性の透過率の増大はなんらかの血小板とコラゲンの作用を意味しており、血小板がある配列をとったと考えられるが、溶液中の存在様式についてはわからない。

山中 学(東京大学中検) ^{14}C -セロトニンをを用いた放出反応では、熱変性コラゲンを加えたときには全く放出は見られない。

中川雅夫(京都医科大学第二内科) 血小板の Collagen 凝集をみる場合に、現在種々の Collagen および種々の処理をした Collagen の液を使用しており、これらによって血小板の異なった凝集パターンを示すが、血小板の Collagen 凝集能をみる場合に最も適当と思われる Collagen sol. の標準液としては如何なるものを、おすすめるか。

児玉 コラゲン溶液の経時変化は中性付近では避けられない。われわれの溶液調整法でも認められるので、測定の前にコラゲン溶液を調整し、lag time または超遠心沈降パターンから分子分散していることを確かめてから実験に供すればこの溶液が基準溶液になると考えている。