

薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
115 (7) 537-542 (1995)

トロンビンによるフィブリノゲン-フィブリン変換反応に及ぼす シアル酸残基の関与について

秋浜澄行,* 松田兆史, 深瀬 徹, 山中愛子, 奥出政義
明治薬科大学

Participation of Sialic Acid Residue in the Fibrinogen-Fibrin Conversion by Thrombin

Sumiyuki AKIHAMA,* Yosifumi MATSUDA, Tohru FUKASE,
Aiko YAMANAKA, and Masayoshi OKUDE

Department of Biochemistry, Meiji College of Pharmacy, 1-35-23,
Nozawa, Setagaya-ku Tokyo 154, Japan

(Received January 25, 1995)

In order to estimate the effects of sialic acid residues in fibrinogen on the fibrinogen-fibrin conversion by bovine thrombin the Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) were determined. The K_m value obtained by the use of intact-fibrinogen was smaller than that of asialo-fibrinogen. This fact suggests that the sialic acid residues affected the formation of the enzyme-substrate complex.

It was also found that in comparison with the asialo-fibrinogen, the intact-fibrinogen was significantly influenced in the gel formation time by the ionic strength in the reaction solution.

Key words—fibrinogen; asialofibrinogen; thrombin; Michaelis constant; maximum velocity; sialic acid

フィブリノゲンは血液凝固過程で最も中心的役割を担っている主要血漿糖タンパク成分の1つである。ヒトのフィブリノゲンは血漿中に約170—400 mg/100 ml含まれ、分子質量は約340000 Daの球状糖タンパク質で3種類のポリペプチド鎖A α , B β と γ 鎖より構成されているプロトマーのダイマーである。そしてB β と γ 鎖には2分岐アンテナ様構造をもつオリゴ糖が1分子ずつ結合している。オリゴ糖を構成している糖はガラクトース, マンノース, N-アセチルグルコサミンとシアル酸で、シアル酸は通常、フィブリノゲン1分子に6分子結合している。¹⁻⁴⁾

Martinez⁴⁾らは肝疾患に伴うクロット形成時間の延長を引き起こすフィブリノゲン異常症を調べ、それらの異常フィブリノゲン分子は多くのシアル酸を含有していることを明らかにした。さらにクロット形成時間の延長とシアル酸の含量との間にある種の相関がみられることや、また正常及び異常フィブリノゲン分子からノイラミニダーゼ(シアリダーゼ)処理して得たアシアロフィブリノゲンのクロット形成時間は、いずれの場合でも短くなり、そしてほぼ等しくなることを報告している。しかし、一方Gentry⁵⁾やMartine⁶⁾らは、正常フィブリノゲンをノイラミニダーゼ処理して得たアシアロフィブリノゲンのクロット形成時間は未処理のものとの間には差が認められないと報告している。またアシアロ体にすることによってフィブリン

ゲル形成に関連して 350 nm の吸光度は増加し、その増加はシアル酸含量に反比例することも良く知られている。⁷⁾

これらのことからフィブリノゲン・フィブリン変換に及ぼすシアル酸残基の干与が示唆されたので、本研究はヒトのフィブリノゲンとアシアロフィブリノゲンを用いて、トロンビンに対するミカエリス定数 (K_m) や最大速度 (V_{max}) 及びイオン強度の影響について検討し、さらに、ヒト以外の動物の場合、どのような結果が得られるか、ウシのフィブリノゲンとアシアロフィブリノゲンを用いて比較検討を行った。

実験の部

フィブリノゲン ヒトフィブリノゲンは凝固性 95% の製品を、ウシフィブリノゲンは凝固性 99% の製品をシグマ社から購入した。ノイラミダーゼ (*Clostridium perfringens* 由来) もシグマ社の製品を使用した。

アシアロフィブリノゲンは前報⁸⁾と同様な条件でノイラミダーゼ処理を行った後、セルロファイン GCL-2000 (生化学工業) カラム (3×45 cm) でゲルろ過して精製した。

フィブリノゲンの濃度は 280 nm の吸光度を測定し、ヒトフィブリノゲンは $A_{280} 1.00 = 0.64$ mg/ml, ウシフィブリノゲンは $A_{280} 1.00 = 0.66$ mg/ml の係数を用いて求めた。この係数はフィブリノゲンを pH 7.2 のリン酸緩衝生理食塩水に溶かし、280 nm の吸光度を測定するとともに、ウシ血清アルブミンを標準物質としてビシンコニン酸法⁹⁾を用いてタンパクの定量を行って求めたものである。

シアル酸の定量 フィブリノゲン結合シアル酸は前報^{3,8)}と同様に処理してシアル酸を遊離させた後、チオバルビツル酸法¹⁰⁾で測定した。

フィブリンクロット形成に伴って起こる濁度の測定 フィブリノゲンの 0.15 M 食塩含有 0.01 M イミダゾール緩衝液 pH 7.2 (IBS) 溶液 0.5 ml に 0.02 M CaCl_2 水溶液 0.25 ml を加え、あ

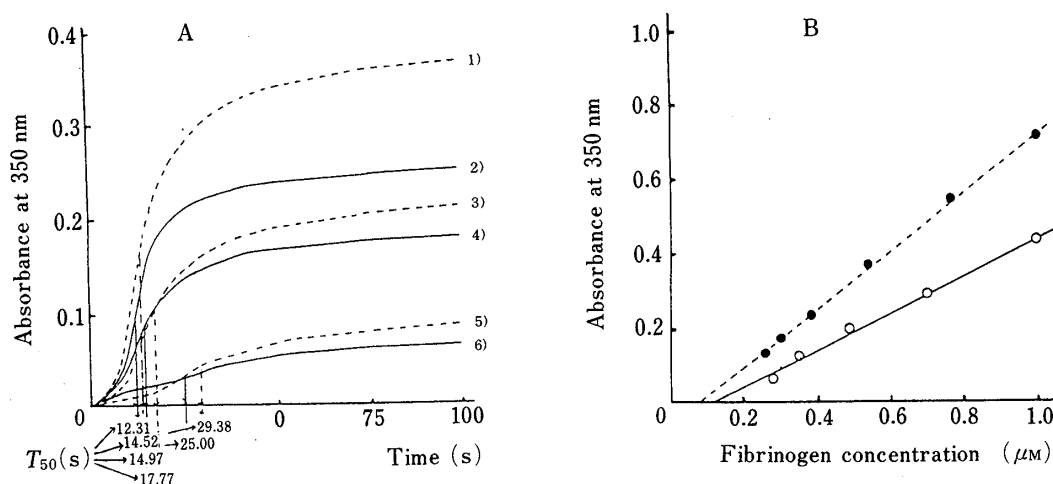


Fig. 1. Turbidity in Fibrin Clot Formation

A: 50% turbidity formation time (T_{50}) and continuous change of turbidity in human intact-fibrin (—) and asialo-fibrin (-----) clot formations by bovine thrombin. Fibrinogen concentration and T_{50} : 1) $0.89 \mu\text{M}$, 14.52 s; 2) $0.98 \mu\text{M}$, 2.31 s; 3) $0.64 \mu\text{M}$, 17.77 s; 4) $0.68 \mu\text{M}$, 14.97 s; 5) $0.28 \mu\text{M}$, 29.38 s; 6) $0.25 \mu\text{M}$, 25.00 s. B: Fibrinogen concentration and absorbance change at 350 nm of 100 s after reaction in bovine intact-fibrinogen (—) or asialo-fibrinogen (-----) and bovine thrombin.

らかじめ 37°C で 5 分加温後 50 U/ml ウシトロンビン (持田製薬) 0.05 ml を加えて反応させ、直ちに 350 nm の吸光度を連続測定した。

50% 濁度形成時間 (T_{50}) の測定 フィブリンクロット形成に伴って起こる濁度 (350 nm の吸光度) と反応時間との関係グラフ (Fig. 1A) を作製して求めた。

フィブリンクロット形成時間の測定 フィブリノゲンの IBS 溶液 0.2 ml に 0.02 M CaCl_2 水溶液 0.1 ml を加えてあらかじめ 37°C に加温した後 50 U/ml ウシトロンビン IBS 溶液 0.1 ml を加え Sysmex Blood Coagulation Analyzer CA-100 (東亜医用電子) を用いて測定した。

電導度測定 デジタル電導度計 CM-15A (東亜電波) を用いて測定した。

結 果

ヒトのフィブリノゲン 1 分子に結合しているシアル酸残基は 6 分子と報告されている。^{3,4)} ウシのフィブリノゲンについて 0.79, 1.26, 1.59, 及び 2.52 mg/ml の 4 種の異なる濃度のフィブリノゲン溶液を調整して、それぞれについてシアル酸を測定してフィブリノゲン 1 分子当りのシアル酸残基数を求めたところ、 5.14 ± 0.26 ($n=4$) 分子の値が得られた。

前報⁸⁾や Fig. 1 に示すようにアシアロフィブリノゲンから生成するクロットゲルによる濁度は正常フィブリノゲンよりも常に大きくまた初速時の吸光度の増加の差も高かった。

Shinowara¹¹⁾はヒトのフィブリノゲンを基質として用い、クロット形成時間を利用してヒトトロンビンの K_m 値を求めている。そこで本研究では反応速度の値として反応開始後 15 秒から 45 秒間の吸光度の増加 ΔA_{350}^{15-45} 及び最大濁度の半分の濁度が得られる時間 T_{50} 値を用いて K_m 値の測定を行った。

3 種の反応速度の値を用いて行った Lineweaver-Burk のプロットの結果と K_m 値及び V_{max} 値を Fig. 2 や Table 1 に示した。 K_m 値はヒトやウシいずれの場合でも、またいずれの反応速度の

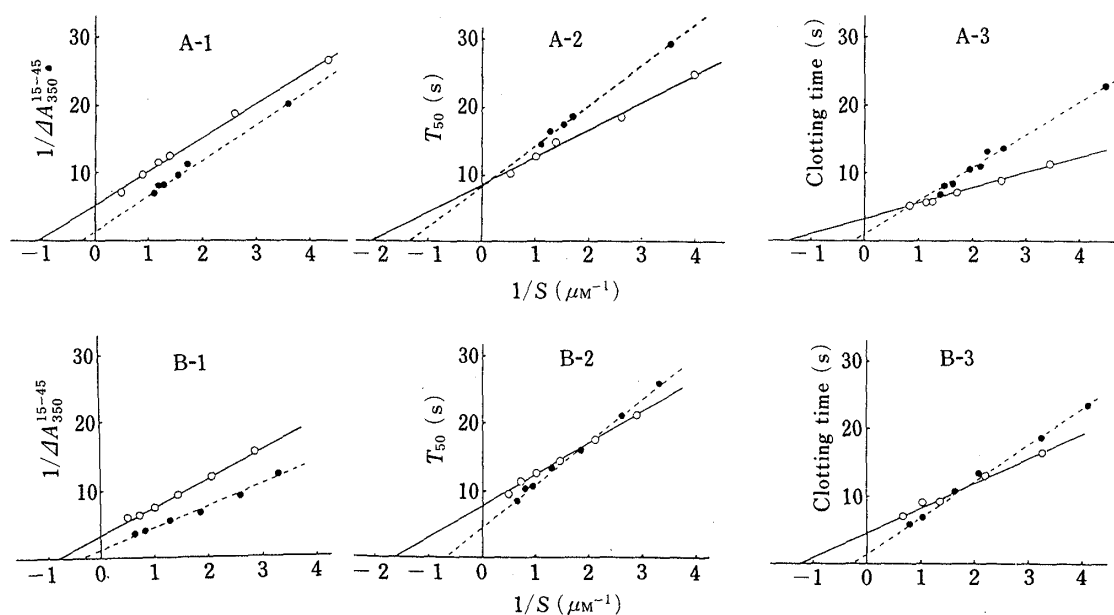


Fig. 2. Lineweaver-Burk Plots for Human or Bovine Intact-fibrinogen and Asialo-fibrinogen toward Bovine Thrombin Using ΔA_{350}^{15-45} Value, T_{50} Value and Clotting Time as Coagulation Velocity

Fibrinogen: A, human; B, bovine. Coaguration verocities: 1) ΔA_{350}^{15-45} , 2) ΔT_{50} , 3) clotting time. Intact-fibrinogen, —○—; asialo-fibrinogen, —●—.

値を用いても正常フィブリノゲンに比べてアシアロフィブリノゲンの方が大きな値を示した。

反応速度の値として ΔA_{350}^{15-45} の値を用いた時の V_{\max} 値はヒト及びウシフィブリノゲンに比べて、それらのアシアロフィブリノゲンの方が高い値を示した。クロット形成時間を反応速度の

Table 1. Michaelis Constants (K_m) and Maximum Velocities (V_{\max}) for Human or Bovine Intact-fibrinogen and Asialo-fibrinogen toward Bovine Thrombin

Substrate	Coagulation velocities					
	ΔA_{350}^{15-45}		T_{50}		Clotting time	
	K_m ($\times 10^{-7}$ M)	V_{\max} ($\Delta A_{350}^{15-45}/U$)	K_m ($\times 10^{-7}$ M)	V_{\max} (s/U)	K_m ($\times 10^{-7}$ M)	V_{\max} (s/U)
Human						
Intact-fibrinogen	8.86	0.072	4.97	20.9	7.98	14.7
Asialo-fibrinogen	34.8	0.264	7.18	20.6	53.3	4.62
Bovine						
Intact-fibrinogen	11.1	0.110	6.20	19.2	7.80	23.3
Asialo-fibrinogen	22.9	0.296	13.2	12.0	32.7	8.23

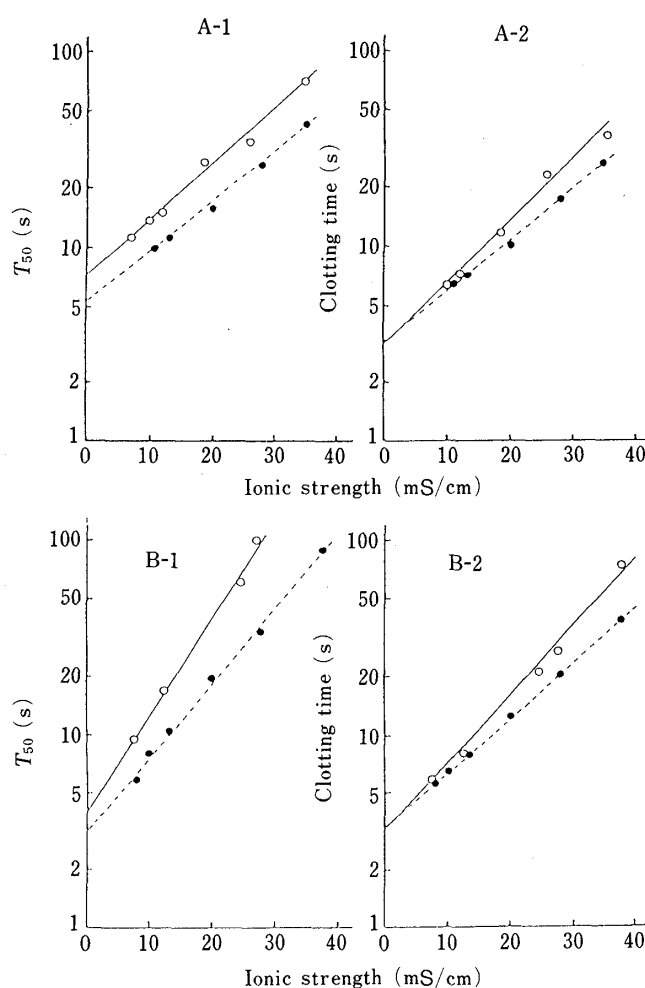


Fig. 3. Influence of Ionic Strength on the Fibrin Clot Formation

Fibrinogen: A, human; B, bovine. Coagulation velocities: 1) ΔT_{50} , 2) clotting time.
Intact-fibrinogen, —○—; asialo-fibrinogen, —●—.

値として利用した時ヒト、ウシいずれの場合においても基質濃度が高い時は正常フィブリノゲンに比べてアシアロフィブリノゲンの方がクロット形成時間は短い、基質濃度を低くするとヒトでは $1.27 \mu\text{M}$ 、ウシでは $0.576 \mu\text{M}$ 濃度を境にしてアシアロフィブリノゲンの方が延長する。 T_{50} の値においては、ヒトの場合 $17.5 \mu\text{M}$ 、ウシでは $0.544 \mu\text{M}$ 濃度を境にして基質濃度と反応速度の関係は逆転した。

イオン強度はトロンビン時間に影響を及ぼすことが知られている。食塩の濃度を 0.075 — 0.50 M に変化させて T_{50} やクロット形成時間に及ぼすイオン強度の影響を調べたところ、Fig. 3 に示すようにヒト及びウシフィブリノゲンともにアシアロフィブリノゲンの方が影響を受けにくかった。

考 察

ウシフィブリノゲンに含まれているシアル酸残基は5分子と計算されヒトより1分子少なかったが、ウシのフィブリノゲンもヒトと同様シアロ糖タンパク質であることを確認した。

反応速度の値としてクロット形成時間を利用した場合、ヒトのトロンビンとヒトのフィブリノゲンを用いる系での K_m 値は、 $4.38 \times 10^{-7} \text{ M}$ と報告されている。¹¹⁾ しかしウシのトロンビンとヒトのフィブリノゲンを用いる系での K_m 値は反応速度の値としてクロット形成時間を利用した時では $7.98 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $4.43 \times 10^{-7} \text{ M}$ を用いた時は $8.86 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 T_{50} では $4.97 \times 10^{-7} \text{ M}$ の値が得られた。アシアロフィブリノゲン系ではそれぞれ $53.3 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $11.1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $7.18 \times 10^{-7} \text{ M}$ と正常のシアロ体のフィブリノゲンよりも大きい値が得られた。同様な結果がウシのフィブリノゲンとアシアロフィブリノゲンの場合でも得られ、シアル酸残基が酵素-基質複合体形成に直接関与していることを推論させる。

また、クロット形成時間や T_{50} 値、特にクロット形成時間は基質の濃度により正常のシアロ体のフィブリノゲンとアシアロフィブリノゲンの関係が逆転する。すなわち基質の濃度が高いときはシアロ体のフィブリノゲンの方がアシアロフィブリノゲンよりもクロット形成時間が延長するが、基質の濃度が低いときはアシアロフィブリノゲンの方がシアロ体よりも延長する。Martinez ら⁶⁾ は1977年にはシアロ体のフィブリノゲンとアシアロフィブリノゲンの間にクロット形成時間に差がみられないことを、そして1978年には⁹⁾ 主として肝疾患の患者からのフィブリノゲンではあるがシアロ体のフィブリノゲンのクロット形成時間はアシアロフィブリノゲンよりも延長すると異なる結果を報告している。実験に使用した基質濃度は前報では $0.96 \mu\text{M}$ で、Fig. 2 の結果から推察するとクロット形成時間に差がみられないか、むしろアシアロフィブリノゲンの方が短い値が得られる基質濃度で、後報では $1.47 \mu\text{M}$ とアシアロフィブリノゲンの方が延長する値が得られる基質濃度での実験結果のためと理解できる。しかし Gentry ら⁹⁾ の実験では $8.40 \mu\text{M}$ の基質濃度を使用しているにもかかわらずほぼ同じクロット形成時間が得られている。今後この点について詳細な検討を行いたい。

イオン強度がクロット形成時間に強い影響を与えることは既に報告されている。^{12,13)} 本研究でのイオン強度の変化によるフィブリンゲル形成時間に及ぼす影響は、アシアロフィブリノゲンの方がシアロ体のフィブリノゲンよりも受けにくかった。このことはシアル酸残基がフィブリンゲルの形成に影響を与えているものと推測させる。

引用文献

- 1) Doolittle R. F., Bouma H., Cottrell B. A., Strong D., Watt K. W. K., "Chemistry and Physiology of the Human Plasma Proteins," Pergamon Press, New York, 1979, p. 77.
- 2) Mizuochi T., Taniguchi T., Asami Y., Takamatsu J., Okude M., Iwanaga S., Kobata A., *J. Biochem.*, **92**, 283 (1982).
- 3) Okude M., Morimoto Y., Akihama S., *Jpn. J. Clin. Chem.*, **20**, 51 (1991).
- 4) Martinez J., Palascak J. E., Kwasniak D., *J. Clin. Invest.*, **61**, 535 (1978).
- 5) Gentry P. A., Alexander B., *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 50 (1976).
- 6) Martinez J., Palascak J., Peters C., *J. Lab. Clin. Med.*, **89**, 367 (1977).
- 7) Diaz-Maurino T., Castro C., Albert A., *Tromb. Res.*, **27**, 397 (1982).
- 8) Okude M., Yamanaka A., Morimoto Y., Akihama S., *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 448 (1993).
- 9) Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Kienk D. C., *Anal. Biochem.*, **150**, 76 (1985);
志村清仁, 笠井献一, "新生化学実験講座 1 タンパク質 I," 東京化学同人, 東京, 1990, p. 93.
- 10) Warren L., *J. Biol. Chem.*, **234**, 1971 (1959); Warren L., "Methods in Enzymology," Vol. 6, Academic Press, New York, 1963, p. 463; 大熊誠一, "生化学実験講座 4 複合糖質研究法 I," 東京化学同人, 東京, 1976, p. 383.
- 11) Shinowara G. Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **113**, 359 (1966).
- 12) Latallo Z. S., Fletcher A. P., Alkjaersing N., Sherry S., *Am. J. Physiol.*, **202**, 675 (1962).
- 13) Abildgaard U., *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **16**, 521 (1964).