



Importance of GlcUA β 1-3GalNAc (4S,6S) in chondroitin sulfate E for t-PA-and u-PA-mediated Glu-plasminogen activation

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 坂井, 登紀子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1609

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 332号	学位授与年月日	平成13年 2月14日
氏名	坂井 登紀子		
論文題目	<p>Importance of GlcUAβ1-3GalNAc(4S, 6S) in chondroitin sulfate E for t-PA-and u-PA-mediated Glu-plasminogen activation (組織プラスミノゲンアクチベーター及びウロキナーゼを介する Glu プラスミノゲン活性化におけるコンドロイチン硫酸 E 中のグルクロン酸 β1-3N アセチルガラクトサミン(4S,6S)の重要性)</p>		

博士(医学) 坂井 登紀子

論文題目

Importance of GlcUA β 1-3GalNAc(4S, 6S) in chondroitin sulfate E for t-PA- and u-PA-mediated Glu-plasminogen activation

(組織プラスミノゲンアクチベーター及びウロキナーゼを介するGluプラスミノゲン活性化におけるコンドロイチン硫酸E中のグルクロン酸 β 1-3Nアセチルガラクトサミン(4S, 6S)の重要性)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

ヘパリン、ヘパラン硫酸などの硫酸化多糖(Glycosaminoglycan, GAG)は組織プラスミノゲンアクチベーター(t-PA)あるいはウロキナーゼ(u-PA)存在下でプラスミノゲン(plg)の活性化を促進する作用を持つことが報告されている。

本研究では、グルクロン酸(GlcUA) β 1-3Nアセチルガラクトサミン(GalNAc) (4S, 6S)の基本骨格をもつイカ由来のコンドロイチン硫酸E(CSE)と、同様の基本骨格に硫酸化されたフコース側鎖を持つナマコ由来のGAG(SC-GAG)を実験材料とし、in vitroにおけるplg活性促進作用を比較し、GAGの構造となんらかの相関が見られるかを検討した。

〔方法〕

プラスミン特異的なpNA合成基質を利用してGlu-プラスミノゲン(Glu-plg)の活性化量、すなわちプラスミン産生量を吸光度として測定した。反応初期における産生量を時間の二乗に対してプロットし、直線の傾きを求めた。GAGを添加しない場合の傾きを1とし、各GAGのGlu-plg活性化力を相対値(potential factor)として比較した。

また、t-PA, u-PAの酵素活性をそれぞれに特異的なpNA合成基質により上記と同様に測定し、potential factorとして相対比較した。

CSEの低分子化はGAG分解酵素の一種であるコンドロイチナーゼABCにより段階的に実施し、分子量分布を高速液体クロマトグラフィーによって調べた。

〔結果〕

CSEの一本鎖t-PA, 二本鎖t-PA, u-PAを介したGlu-plg活性化力すなわちPotential factorは、それぞれ最大で400, 140, 130であった。同時に測定した未分画ヘパリンは20~50程度であり、CSEは顕著なGlu-plg活性化力を有するGAGであることが示された。一方、側鎖を有するSC-GAGでは最大でも15程度とCSEと比してはるかに低値を示した。

次にCSEが直接PAを活性化するかを調べた。CSEは一本鎖あるいは二本鎖t-PAを2倍程度活性化させるに留まり、u-PAに対しては無作用であることが示された。

さらに分子量約8万のCSEを分解酵素で3段階に低分化した場合におけるPA存在下のGlu-plg活性化力を調べた。低分子化につれてpotential factorは低下したが、約500にまで分解しても、20~100程度であった。

硫酸化パターンの異なる二糖精製品、7種各100 μ g/mlを添加した際の、PA存在下におけるGlu-plg活性

化力を比較した。GlcUA/イズロン酸(DoUA)-GalNAc(4S, 6S)由来の二糖(略称 Δ Di-diS_E)は、7種のうちもっとも高いpotentiation factorを示した。ほんのわずかの構造差異しかない二糖、例えば Δ Di-diS_D[GlcUA/DoUA(2S)-GalNAc(6S)由来]や、 Δ Di-triS[(GlcUA/DoUA(2S)-GalNAc(4S, 6S)由来]はGlu-plgをほとんど活性化しなかった。 Δ Di-diS_B[GlcUA/DoUA(2S)-GalNAc(4S)由来]はu-PAを介するGlu-plg活性化には寄与したがその効果は Δ Di-diS_Eには匹敵しなかった。

[考察]

CSEがPA存在下で顕著に高いGlu-plg活性化力を示すこと、また、CSEは直接PAを活性化する作用はほとんどないこと、側鎖をもつSC-GAGはGlu-plg活性化力がCSEより格段に弱いことが確認された。ところが分子量約18000のSC-GAGよりもCSEは8万と長鎖であるため一概に比較できない。そこで分解酵素によるCSEの低分子化を行い、SC-GAGと同程度の分子量にし、それでもCSEはSC-GAGよりはるかに高い活性化力を示すことを確認した。

以上のことからPA存在下でのGlu-plg活性化にはCSEに特徴的な[GlcUA β 1-3GalNAc(4S, 6S)]_nの繰り返し構造が重要であり、側鎖構造は活性化を阻害することが示唆された。これはおそらくGAGとPA、GAGとGlu-plgとの結合をGAG側鎖が阻害することによると考えた。また、GAGの分子量は長い方がPA存在下でのGlu-plg活性化により効果的であるが、二糖でもPAを介したGlu-plg活性化がおこることが強く示唆された。これは他のコンドロイチン硫酸類やヘパリンにはない極めて珍しい特徴であった。

そこで、硫酸化パターン別に精製されたGAG二糖7種類について、100 μ g/ml濃度におけるPA存在下でのGlu-plg活性化作用を比較した。予測どおり[GlcUA β 1-3GalNAc(4S, 6S)]由来の二糖である Δ Di-diS_Eが他に比べ顕著に高い活性化力を示した。硫酸化サイトの異なる Δ Di-diS_Bはu-PAを介するGlu-plg活性化には比較的良く効果を示し、PAの構造に相関して活性化が起こっているものと推測された。また Δ Di-diS_Eに硫酸基が一つ付加した構造はほとんど活性化能を示さなかった。このことから、PAを介するGlu-plg活性化には[GlcUA β 1-3GalNAc(4S, 6S)]の構造が重要であり、硫酸基の欠失、さらなる付加、置換はその作用を減弱させることが確認された。

[結論]

in vitroにおけるGAGによる線溶酵素活性化には[GlcUA β 1-3GalNAc(4S, 6S)]の構造が強く関与している。本構造への硫酸基の欠失あるいは、さらなる硫酸基の付加、糖側鎖の付加は上記構造のもつ線溶酵素活性化能力を減弱させることが観察された。

論文審査の結果の要旨

硫酸化多糖(Glycosaminoglycan, GAG)は組織プラスミノゲンアクチベータ(t-PA)あるいはウロキナーゼ(u-PA)存在下でプラスミノゲン(plg)の活性化を促進する作用を持つことが報告されている。ヘパリン、ヘパラン硫酸については研究されているがその他のGAGについての検討はほとんどなされていない。

申請者は、グルクロン酸(GlcUA) β 1-3Nアセチルガラクトサミン(GalNAc)(4S, 6S)の基本骨格をもつイカ由来のコンドロイチン硫酸E(CSE)と、同様の基本骨格に硫酸化されたフコース側鎖を持つナマコ由来のGAG(SC-GAG)を実験材料とし、in vitroにおけるplg活性促進作用を比較し、GAGの構造とplg活性化との関連を検討している。プラスミン特異的なpNA合成基質を利用してGlu-プラスミノゲン(Glu-plg)の

活性化量を吸光度として測定している。また酵素処理によりCSEの低分子化を行い、低分子CSEのGlu-plgの活性化量も測定している。

CSEの一本鎖t-PA、二本鎖t-PA、u-PAを介したGlu-plg活性化力はヘパリンに比し3から8倍あることが見出された。またこの活性化は側鎖を有するSC-GAGでは見られなかった。分子量約8万のCSEを分解酵素で3段階に低分子化した場合におけるPA存在下のGlu-plg活性化力は分子量約500にまで分解しても活性化は見られた。さらに硫酸化パターンの異なる二糖精製品を用いた検討ではGlcUA/イズロン酸(DoUA)-GalNAc(4S, 6S)由来の二糖(略称 Δ Di-diSE)がもっとも高い活性化を示し、硫酸基の付加が1つあるいは3つのものはほとんど活性化しなかった。

以上の結果よりCSEはPA存在下でヘパリンより高いGlu-plg活性化力を示すこと、この機序としてCSEに特徴的な[GlcUA β 1-3GalNAc(4S, 6S)]_nの繰り返し構造が重要であること、その2糖体でも活性化作用が存在することを見出した。GlcUA β 1-3GalNAc(4S, 6S)がGlu-plgに結合し、Glu-plgの構造変化を惹起しplasminに変換しやすくなっていると推測される。2糖体でも線溶促進効果があることは静脈投与可能であり血栓症での臨床応用が可能になる。血栓症が増加している昨今、CSEは新規血栓溶解促進剤として有望であり、本研究はきわめて重要な新知見を示したものと考えられた。

審査の過程において、申請者に次のような質問がなされた。

- 1) 2糖体と高分子型CSEのGlu-plg活性化機構の差異について
- 2) フィブリン溶解能法でも合成基質法と同じ結果になるか
- 3) 2価陽イオンの測定に及ぼす影響について
- 4) 静脈投与した時のCSEの循環動態について
- 5) CSEの血液凝固活性に対する効果について
- 6) GlcUA β 1-3GalNAc(4S, 6S)の2糖体とGlu-plg結合様式および結合が予想されるアミノ酸について
- 7) CSEの側鎖の役割について
- 8) 2糖体精製の純度について
- 9) イオン交換のクロマトグラフィーでのGAG溶出順序とGAGの構造について
- 10) PAにt-PAとu-PAを用いたときのGlu-plg活性化の違いについて

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査委員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 金山 尚 裕
副査 梅 村 和 夫 副査 渡 邊 裕 司