

〔シンポジウム〕 血液凝固関連物質の電気泳動的解析

1. 血液凝固線溶系のメカニズム*

—とくに凝固と線溶の相関について—

高田 明和**・高田由美子**

凝固と線溶とは密接な関係にあることは長い間知られていた。Astrup¹⁾ や Fearnley²⁾ は線溶は凝固の結果形成されたフィブリンを血管壁より放出された“溶解物質 (lytic materials)” が除去する役割をもつと提唱した。凝固と線溶は個々別々の過程として研究され、さらに各因子が純化されるとその反応は他の因子と切り離されてしらべられて来た。しかし実際には凝固系と線溶系は最終段階のみでなく、反応の多くの段階で相互に関係していることが判って来た。本稿では凝固と線溶の現在迄受け入れられているメカニズムを述べ、凝固と線溶の相関を内因系凝固開始機構の場合とフィブリン形成の場合について述べることにする。

I. 凝固系

現在の凝固系は MacFarlane³⁾ や Davie & Ratnoff⁴⁾ の cascade 説に基づいている。これによれば血中の凝固因子は不活性の型で存在し、これが凝固の過程で活性型に変わるというものである。この活性化は主として因子である蛋白の限定分解である。因子のうちのあるものはセリン酵素の前駆体 (precursor) である。これには XII, XI やビタミン K 依存性の X, IX, VII, II などがある。またあるものは酵素反応を促進させる補助因子 (V, VIII 等) である。最近の研究では V も VIII もそのままでは不活性であり、若干のトロンピンが生成され、これにより活性化されて V_a, VIII_a となり、完全な活性をうという。一方 IX_a, X_a が作用する際にはリン脂質を必要とする。このリン脂質 (phospholipid: PL) は血小板が凝集等活性化されないと供給されない。また組織因子 (tissue factor: TF) もリン脂質が結合している (Fig. 1)。

凝固系とそれに関連する系のセリン酵素を Fig. 2 に示す。この特徴は一般に前駆体が不活性であること、蛋白のある特定の箇所が分解されて活性型になるということである。これをトリプシノーゲンと比較すると次のことがわかる。まず活性化されたものは C 末端側の 250 残基は強い相同性があり、その大きさは大体トリプシノーゲンの大きさである。ビタミン K 依存性蛋白では N 末端

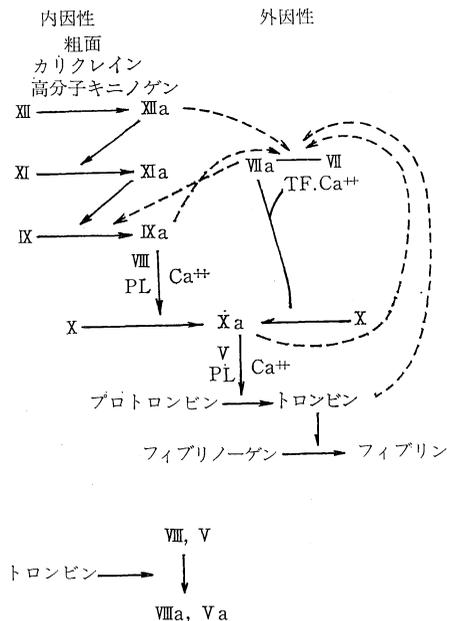


Fig. 1. 凝固の内因系と外因系

点線は内因系と外因系の相互関係、フィードバックのシステムを示す。また下部にトロンピンによる V, VIII の活性化を示す。

* Mechanism of coagulation and fibrinolysis system —Relationship between coagulation and fibrinolysis—

** Akikazu Takada, Yumiko Takada, 浜松医科大学第2生理学教室.

Key words: blood coagulation, fibrinolysis.

(8) 生物物理化学

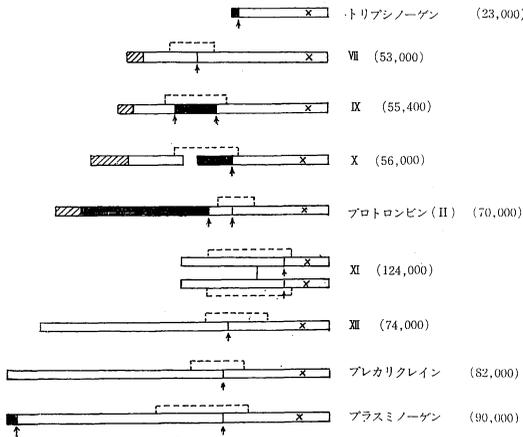


Fig. 2. 凝固線溶系酵素の類似性

凝固，線溶系の酵素はよく似ている。まず，C末端側に active site があり，この部分はトリプシノーゲンと高い相同性を有する。ビタミンK依存性蛋白はII，VII，IX，XであるがこれらはN末端側にγカルボキシングルタミン酸 (Gla) を有し，やはり相互に高い相同性を有する。Gla を有する部分を斜線で示してある。矢印の部分は活性化の際に切断される部分であるが S-S 結合で結ばれているので2本にはならない。プラスミノノーゲンのN末端は真の意味で activation peptide とはいえない。ほかの黒く塗りつぶしてある部分は activation の際に放出される。×印は活性中心。

側に Ca⁺⁺ を介して PL と結合する場所がある。以上から凝固系のセリン酵素はトリプシノーゲンの gene duplication により進化したと考えられる。

凝固系には内因系と外因系があり，まず内因系から説明する。

II. 凝固の内因系

凝固の内因系は接触系 (contact phase) ではじまるが，これは血液がガラス管の中ではパラフィンで内面を

coat した管の中より早く凝固するという観察から見出された。さらにこれに関係する因子として Hageman 因子 (XII因子)，plasma thromboplastin antecedent (PTA=XI因子) が発見されて内因系の開始機構が解明されて来た。さらに最近 prekallikrein (PK)⁵⁾ high-molecular-weight kininogen (HMW-K)⁶⁾ が関与していることが見出された。これらの因子の物理化学的性質を Table 1 に示し，活性化の過程を Fig. 3 に示す。まず血漿中にある XII 因子は陰性荷電をもつ異物面に接触すると立体構造に変化をおこす。ここに kallikrein が作用すると 52,000 dalton の heavy chain と 28,000 の light chain に限定分解される。活性中心は light chain にある。牛の XII 因子の場合 Arg-Val bond が切断される。活性化 XII (α-XIIa) はさらに kallikrein により C 末端が切断され β-XIIa となる。この過程を Fig. 4 に示す。一方 prekallikrein は XIIa (主として β-XIIa，若干 α-XIIa) により kallikrein になる。このように XIIa と kallikrein は相互に相手を活性化する (reciprocal activation) が血液中には free な XIIa や kallikrein は存在しないと考えられるので最初の活性化は何によりおこるかが問題となる。現在では XII が粗面と結合すると構造が変って prekallikrein, XI を活性化するという考えと，

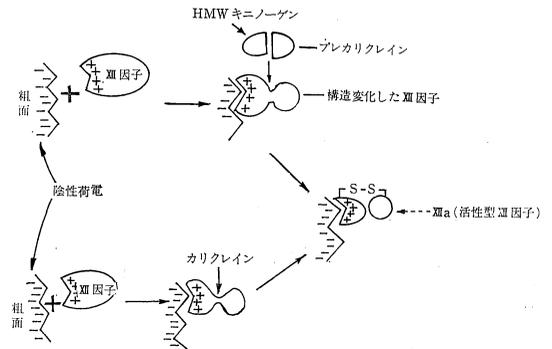


Fig. 3. 粗面による XII 因子の活性化

Table 1. Contact phase の蛋白の性質

蛋白質	分子量	鎖	電気泳動度	血漿中濃度
XII 因子	80,000	1	β	30 μg/ml (0.4 μM)
α-XIIa	80,000	2		
β-XIIa	28,000	2		
XI 因子	160,000	2	γ	6 μg/ml (0.07 μM)
HMW kininogen	110,000	2	α	70 μg/ml (0.7 μM)
prekallikrein	85,000	1	γ	50 μg/ml (0.6 μM)

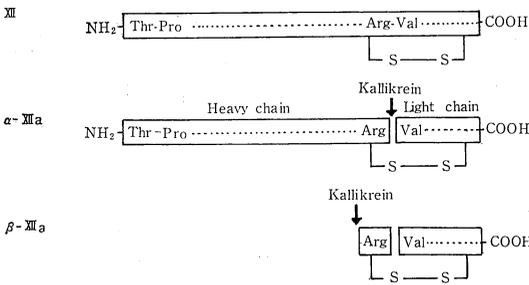


Fig. 4. XII因子の kallikrein による活性化

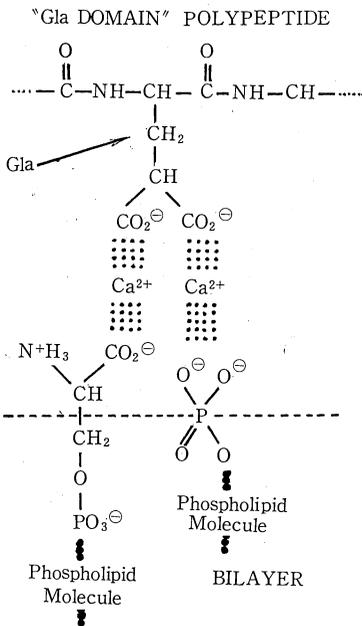


Fig. 5. ビタミンK依存性蛋白の Gla とリン脂質の結合

prekallikrein が zymogen でありながら弱い活性もち XII を XIIa にするという考えが出されている⁷⁾。

このようにして開始された内因系により, XI→XIa, さらに IX→IXa と活性化されてゆくが (Fig. 1), XIa による X の活性化, さらに Xa による II (プロトロンビン) の活性化には二つの補助因子の存在が必要となる。一つは血小板由来のリン脂質 (PL=血小板第3因子) でもう一つはVIII (Xの活性化に必要) またはV因子 (IIの活性化に必要) である。

ビタミンK依存性の因子であるII, VII, IX, Xは肝で合成の過程でビタミンK依存性の carboxylation により Glu (glutamic acid) が γ -carboxyglutamic acid (Gla)

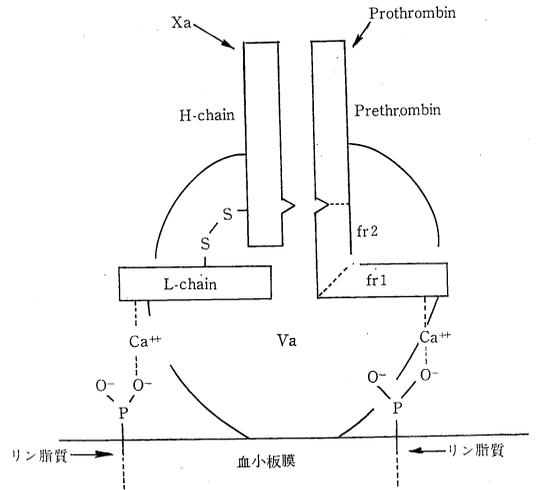


Fig. 6. リン脂質上における Xa による prothrombin の活性化

↳: この部で prothrombin の fr. 2 と prothrombin の間を切断する,

なる。これは因子のN末端側に存在し Fig. 5 に示すように Ca^{++} を介して血小板膜のリン脂質と結合するのに用いられている。リン脂質には血小板膜の外側は zwitterion として phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine 等があるが, これは Ca^{++} を介して Gla と結合することがほとんどない。一方膜の内側には陰性荷電をもった phosphatidylserine 等があり, これは Gla と結合する。このことは血小板が障害されないことと凝固促進をおこさないことをよく説明する。

さてこのようにして血小板膜のリン脂質の上に IXa と X が $Gla-Ca^{++}$ を介して結合するが IXa による II の活性化は VIIIa の存在で非常に促進する。この相互関係は Xa による II の活性化, さらに tissue factor 存在下における X の活性化においても似たようなものなので Fig. 6 に II (prothrombin) の活性化を例にして図示する。

このようにして Va と PL 上で活性化された II から thrombin が出来て, さらにこれが fibrinogen を fibrin にするがこの詳細は最近の総説を参照されたい⁹⁾。

III. 凝固の外因系

凝固の外因系は組織が傷害され tissue factor が放出されることで始まる。血中にはK依存性蛋白のVIIが存在するが, VIIは zymogen でありながら DFP をとりこみ活性をもっていると考えられる⁹⁾。VIIまたは VIIa は

(10) 生物物理化学

tissue factor と complex を作り、これが $X \rightarrow X_a$ の反応をおこす。Tissue factor はリン脂質をもつ巨大蛋白で VII や VII_a と X は Gla を介して結合している。Tissue factor からリン脂質を除去すると活性を失う。

IV. 線 溶 系

線溶系は fibrin の plasmin による分解の系をいう。線溶系にも内因系と外因系があり、内因系は XII 因子の活性化と共に始まる。XII は活性化されると XII_a となりさらに prekallikrein を kallikrein にする。この kallikrein は plasminogen (plg) を plasmin (pl) にする activator の作用をもつ¹⁰⁾。さらに XII_a, XI_a 自体も

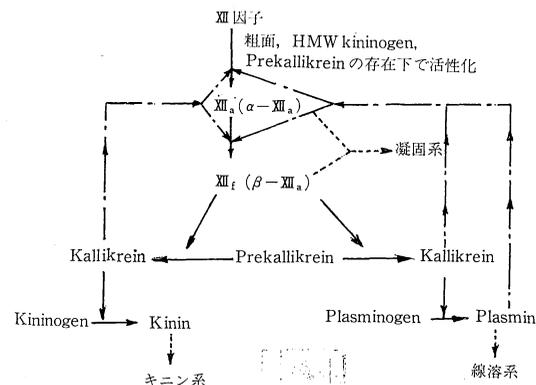


Fig. 7. XII因子依存性線溶系

Kallikrein と plasmin は XII をさらに活性化する

Table 2. アクチベーターの分類

生 理 的
外因系アクチベーター
血管壁アクチベーター
組 織アクチベーター
白血球 (マクロファージ) 性アクチベーター
腫瘍細胞性アクチベーター
内因性アクチベーター
XII因子依存性アクチベーター
XII因子非依存性アクチベーター
ウロキナーゼ
非生理的
細菌性
ストレプトキナーゼ
スタフィロキナーゼ
化学的
クロフォオルム
グリセリン

activator の作用をもつという。Kallikrein は HMW-kininogen に作用しキニン (bradykinin) を生成させキニン系が開始する。これを Fig. 7 に示した。しかし内因系線溶は外因系線溶にくらべると作用がよわい。

これに対し血管壁、組織、細胞等から放出された activator による線溶を外因系線溶という。Activator の分類を Table 2 に示した。

血中には正常状態では N 末端に Glu をもつ分子量 90,000 位の plg が存在する¹¹⁾。これには 2 種の isozyme がある。Asn₂₈₈ に glucosamine を含む糖鎖と Thr₃₄₅ に galactosamine を含む糖鎖をもつものを plg-I といい後者のみをもつものを plg-II という。Glu-plg に pl が作用すると主として Lys₇₇₇-Lys₇₈ の間で切断され N 末端に Lys (1 部は Arg₆₈-Met₆₉ の間で切断される) をもつ Lys-plg が生成される。次に plg の構造でもう一つの特徴は五つのお互いに似た構造をもつ kringle があるということである。Fig. 8 に Glu-plg の構造のシエマを示すが N 末端から五つの kringle が示されている。さてこの kringle は plg の五つの間に互いに相同性 (homology) があるのみでなく prothrombin の fragment 1, 2 とも相同性がある。Kringle のアミノ酸の内 20 は五つの plg の kringle, 二つの prothrombin のすべての kringle に共通である (Fig. 9)。

Kringle 構造は plg の作用を最も特徴づけている。Kringle にはリジンまたはその類似物質と結合するリジン結合部位 (lysine binding-site=LBS) というものが

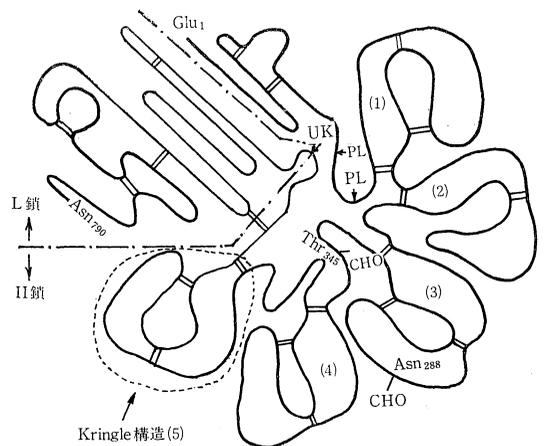


Fig. 8. Glu-plg の構造

H鎖に五つの kringle 構造がある。L鎖に活性中心がある。Kringle 3 の Asn₂₈₈ に glucosamine についた糖鎖がある。Kringle 3 と 4 の間の Thr₃₄₅ に galactosamine についた糖鎖がある。

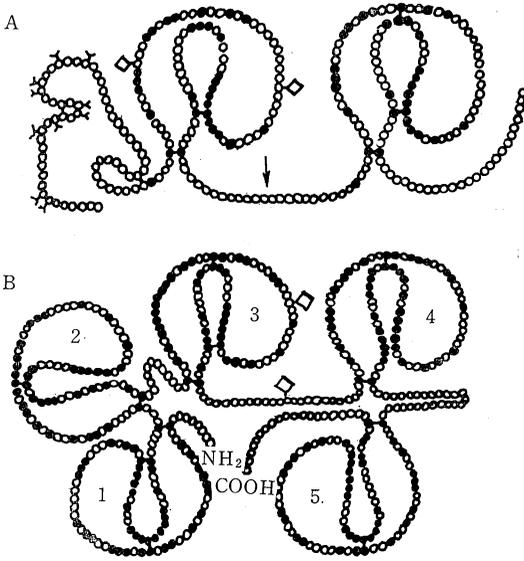


Fig. 9. プロトロンビンとプラスミノゲンの kringle 間の相同性

各○印は一つのアミノ酸残基を示す。A：プロトロンビンの Fragment 1-2 の部。Y印は γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla), 矢印はトロンビンで切断される個所 (156—157)。◇印は糖鎖。黒印は kringle 間で相同性のある場所。B：プラスミノゲンの五つの kringle とプロトロンビンに相同性のある個所を黒印にしてある。N末端は、Lys をもつ Lys-plg の H-chain のみを示す。

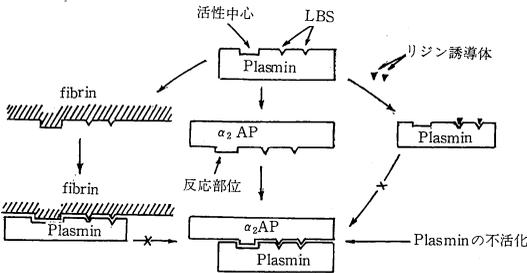


Fig. 10. α_2 AP による plasmin の不活化

フィブリンやリジン誘導体 (EACA や tranexamic acid) 存在下では plasmin は不活化されにくい。一×→の印は、plasmin が α_2 AP と complex を作りにくいことを示す。LBS は一つは high affinity LBS, 一つは low affinity LBS を代表させている。

ある。LBS は K_1 に二つあり、一つは high affinity であり他は low affinity である。さらに K_2, K_3, K_4 には一つづつの low affinity の LBS が存在する¹²⁾。一方 K_{1+2+3}, K_4, K_5 には各々 fibrin と結合する部位があり、

これは LBS 自体またはそれと非常に密接に関係している。リジン等が LBS と結合していると fibrin は plg と結合出来ない。さらに α_2 antiplasmin (α_2 AP) は K_{1+2+3} の部位で plasmin と結合し、これもリジン等があると pl と結合出来ない (Fig. 10)。このことで LBS が plg または pl の機能の発現 (線溶) と制御 (失活) に中心的役割を示していることがわかる。

V. Plg の立体構造

Plg は Glu 型と Lys 型とでは立体構造を異にすることが知られている。超遠心, 円二色性 (CD), 蛍光分光, 蛍光偏光等の測定の結果により Glu-plg の方が Lys-plg より tight な構造をしていること, Glu-plg がリジン類似物質の 6 AHA (=EACA) や tranexamic acid と結合すると立体構造が Lys-plg と同じように loose になることが示された¹¹⁾。Fig. 11 は我々の仕事であるが, Glu-plg も II も tranexamic acid や EACA の存在下で立体構造 (2 次構造) に変化をおこすことがわかる¹³⁾。Computer simulation では Glu-plg は大体 5% の α -helix, 30% の β -構造, 40% の random coil 構造, 25% の β -turn 構造をとっている。一方構造変化は蛍光分光光度計を用いても示される¹⁴⁾。Fig. 12 に示すように Glu-plg に tranexamic acid や EACA を加えると 290 nm の紫外線で励起した際, 340 nm の蛍光の emission が增大する。

この蛍光は Trp 残基に特徴的なので Trp 残基周辺の microenvironment に変化をきたしたことを示す。さら

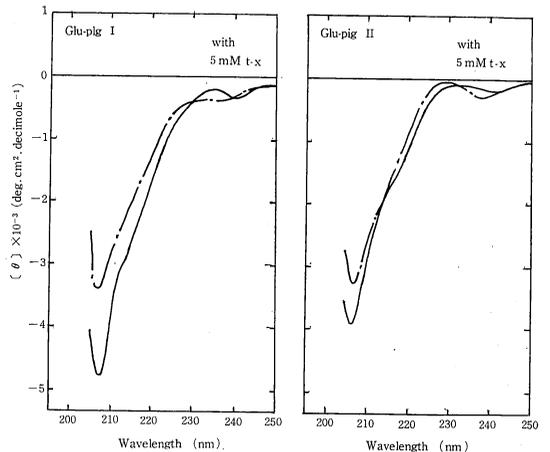


Fig. 11. CD スペクトルの変化

鎖線は tranexamic acid (t-x) の存在下における Glu-plg I と II の CD スペクトル。

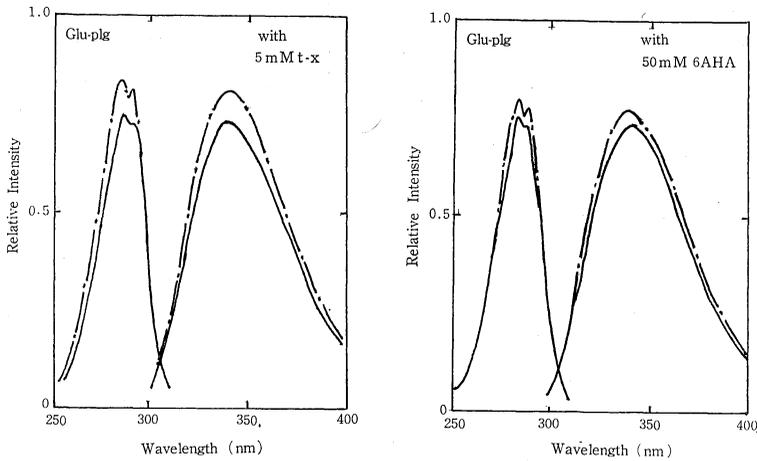


Fig. 12. 蛍光スペクトルの変化

鎖線は 5 mM の tranexamic acid (t-x), または 50 mM の EACA (6AHA) の存在下における plg の紫外吸収スペクトルと蛍光スペクトルを示す。

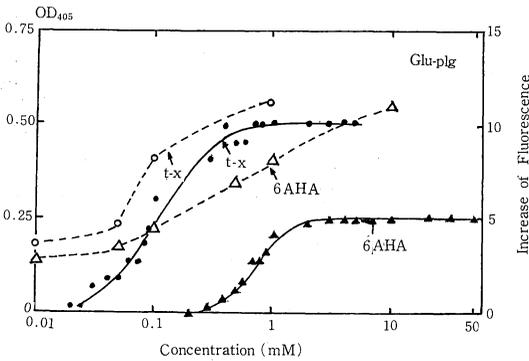


Fig. 13. Glu-plg に tranexamic acid や EACA (6AHA) を加えた時の蛍光強度と活性の変化。

○印, △印は活性を示す. Glu-plg に UK を加えて生成した plg を S-2251 の10分間の水解でしらべた。

に注目すべきことはこれらのリジン類似物質が LBS と結合し, Glu-plg の立体構造が変化すると Glu-plg は activators により活性化され易くなるということである¹⁴⁾. Fig. 13 は Glu-plg に tranexamic acid を加えた場合 urokinase (UK) による活性化が促進することを示している. また Glu-plg の N末端 peptide が切断され Lys-plg になると activators による活性化がよくなる^{11, 15)}.

これらのことは Glu-plg の立体構造と活性化の間には密接な関係のあることを示す。

VI. 凝固と線溶の相関

Camiolo ら¹⁶⁾は血漿を凝固させる時 tissue activator を加えると線溶は凝固のない時より促進することを見出した. さらに Wallen¹⁷⁾は tissue activator による plg の活性化は fibrin の存在下で促進されるが UK による活性化は影響をうけないことを示した. ここでは凝固と線溶の相関を血漿を用いた場合, 純化した plg を UK または SK で活性化した場合にわけて記述する.

a) 血漿中の Glu-plg の UK または SK (streptokinase) による活性化。

血漿に UK を加えると UK により Glu-plg が活性化されプラスミン (pl) が出る. この pl 量を合成基質 S-2251 の水解により測定することが出来る. 一方この血漿に UK と共に thrombin または Ca^{++} を加えて凝固をおこさせ, その際の pl の生成を測定した. 結果は Fig. 14 に示すように血漿中に UK を加えても Glu-plg はほとんど活性化されないか活性化されてもすぐ不活化されてしまう. これに対し thrombin を加えたり Ca^{++} を加えて fibrin を形成させると S-2251 水解活性, 即ち pl 量は増大する. これは SK を加えた際にも観察される.

b) 純化した fibrinogen (fbg) の存在下における plg の UK による活性化

前述の実験では clot 形成過程があると Glu-plg よりの pl の生成が促進されることを示すのみでこれが fibrin の存在のためか, fibrin 形成以前の反応のためかは不明である. そこで純化した fbg を用い fbg の存在下,

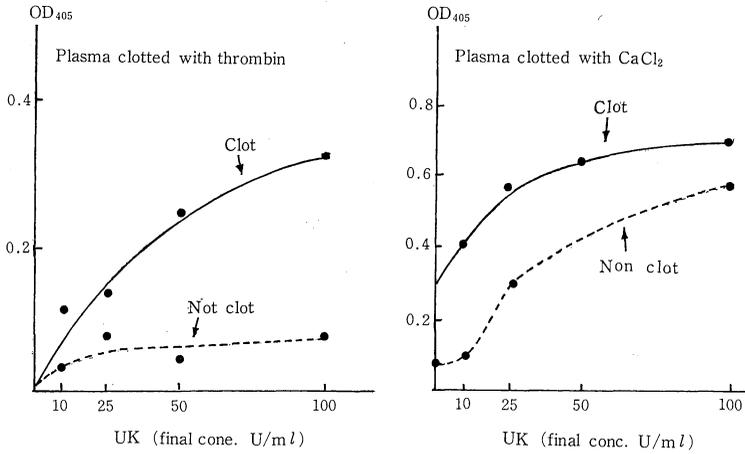


Fig. 14. 血漿を凝固させた際の血漿中 plg の UK による活性化
 左図: 0.3 ml のヒト血漿に 0.5 U のヒトトロンピン, 100 μg の S-2251 を加えた (全量 1 ml). 37°C で 10 分間 incubate 後生成されたプラスミン量を S-2251 水解で調べた。
 右図: 上実験のトロンピンの代わりに CaCl₂ を加え凝固させた。

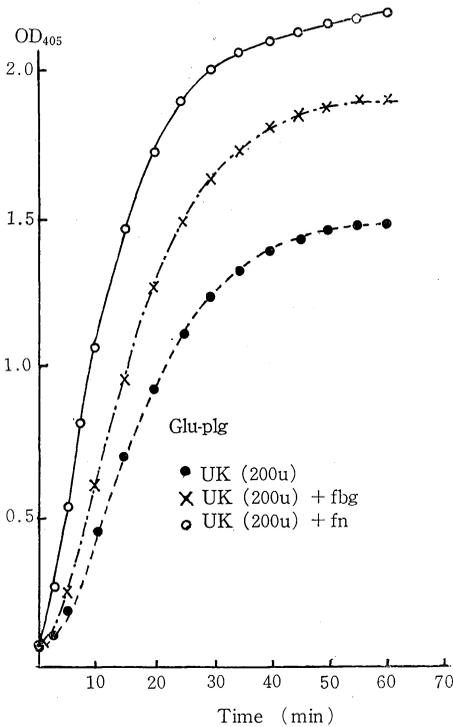


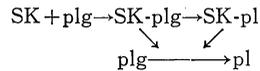
Fig. 15. Glu-plg を UK で活性化した場合の fbg, fibrin の影響。

(fbg+thrombin) の存在下における Glu-plg, Lys-plg の UK による活性化をしらべた。Fig. 15 に示すよう

に Glu-plg は fibrin 存在下で最も活性化され、fbg の存在下でも活性化が促進される。これが活性化の促進であることは SDS-PAGE により確認された¹⁸⁾。一方 Lys-plg の活性化に対しては fibrin, fbg ともにあまり大きな作用をもたなかった。このことは Glu-plg の LBS が fbg, fibrin と結合することにより立体構造を変化させ活性化され易くなったと考えさせる。

c) plg の SK による活性化

SK による plg の活性化は長い間論議的であった。現在では次のような過程がうけ入れられている。



即ち SK は plg とモル・モルの complex を作る。これは plg を活性化する能力、即ち activator 作用をもつ。SK-plg complex は autocatalytic に SK-pl complex になり、これも activator の作用をもつ。一方古くから SK の作用を高める因子の存在がいわれていたが¹⁹⁾最近我々はこれが fbg に関連した物質、特に α 鎖の degrade した early FgDP であることを見出した²⁰⁾。さらに fibrin, fragment D, E の作用を検討すると Fig. 16 に示すような結果が得られた。これは UK の活性化の場合と異なり Lys-plg でも見られる現象である。しかし Lys-plg を用いた場合は促進の程度が少ない。このことは SK による plg の活性化が Glu-plg の立体構造によるのみでないことを示す。SK は plg の light

(14) 生物物理化学

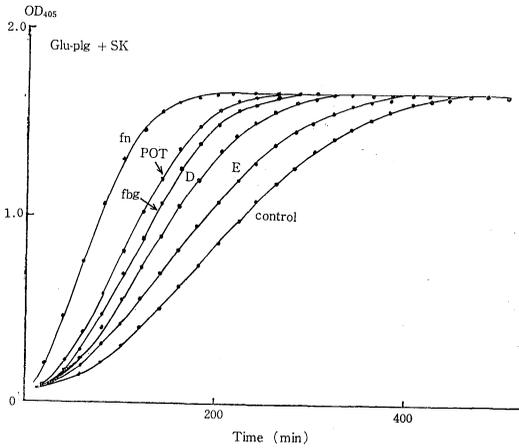


Fig. 16. Glu-plg を SK で活性化した際の fibrin, fbg, 分解産物の影響.
0.1 μ M の Glu-plg に fbg 等 0.1 μ M を加え 0.5 U の SK で活性化した。

chain と結合するので、恐らく fbg 等は heavy chain の LBS と結合するであろう。従って SK-plg-fbg または SK-plg-POT (potentiator) の trimolecular complex がよりよい activator として作用すると考えられる。

d) Tissue activator の作用におよぼす fibrin の影響

UK による Glu-plg の活性化は fibrin の存在下で促進されるが、tissue activator も fibrin の存在下で著しく作用を亢進する¹⁷⁾。さらに tissue activator は fibrin に対する親和性が UK よりも高く²¹⁾、精製の過程で fibrin-Sepharose 等を用いる²²⁾。Kinetics の検討は activator が fibrin に結合し、さらに activator-fibrin complex に plg が結合し、3者の complex が形成される。その結果 plg \rightarrow pl おこり pl は release され新しい plg が activator-fibrin-plg の trimolecular complex を作ってゆくという²³⁾。

血液中に存在する tissue activator と同様の作用をもつものは vascular activator であり、これも fibrin に対して親和性がつよいので血管内の fibrin 形成に際し溶解的に作用し生体には有利に働く。また tissue activator が UK 療法にかわる有効な線溶療法剤として注目を集めていることは周知のことである。

e) α_2 Antiplasmin の作用

前述したように α_2 AP はまず即時的に pl の LBS と結合する。ついで α_2 AP の反応中心の Arg-Met が pl の活性中心の serine と acyl 結合をする。pl の LBS

がリジン類似物質や fibrin と結合していると α_2 AP との即時的反応がおこらない、従って生成された pl が不活性化されにくくなる。このことも clot が出来ると fibrinolysis がおこり易いことの一つの原因となる。

VII. ま と め

凝固過程は生体の防衛反応と考えられる。出血がおこった時これをとめて体液、血液の喪失を防ぐことは生体の恒常性維持と生命現象維持のために重要な現象である。また凝塊は組織の修復過程で溶解吸収される。線溶はこの段階に作用する。一方免疫において anaphylaxis があるように凝固が生体にとり不利に作用することがある。これが血管内凝固であり、血栓症である。この際は線溶により凝塊が溶解することが生体に有利に作用することになる。実際に凝塊を早く溶解するために外部から血栓溶解物質を加え線溶を促進させる場合もある。このようなことから凝固がおこった際すぐに線溶がおこることが多くの場合生体に有利に作用する。勿論線溶が非常に亢進して生成された凝血塊が早期に溶解してしまうと出血がとまらないことになる。

このような条件を満たすため fibrin 形成と fibrin 溶解は一定の間隔をおいて相続いておこるようになっていく。その重要な過程の一つが fibrin 形成による線溶の促進である。これには fibrin への activator の吸着、LBS による plg (特に Glu-plg) の結合、Glu-plg の場合は立体構造の変化と活性化促進、tissue activator による場合は activator-plg-fibrin の complex 形成とそれによる plg の活性化促進がおこる。それ以外にも内因系の XII 因子が活性化されると凝固と線溶がはじまるという過程も凝固と線溶の相関を示す。

凝固、線溶系には多くの因子が関与し、また多くの抑制物質が活性化や活性自体を制御している。これは凝固も線溶も必要とされる時に必要とされる場所でも必要とされる順序でおこる必要があるからである。Fibrin 形成という立場で見れば fbg \rightarrow fibrin 変換は早くおこった方がよいし、血管内の血液の流動性、流通ということを考えればこの変換はおこりにくい方がよいと云うことになる。この論文では fibrin 形成と線溶の活性化の相関のみを重点的にとり上げたがそれ以外にも多くの因子が関与し生体の生命現象維持のために作用していることは間違いない。

文 献

- 1) Astrup, T.: Thrombos. Diathes. Haemorrh.,

- 2 : 347, 1958.
- 2) Fearnley, G.R. : Lancet, **i** : 992, 1961.
 - 3) MacFarlane, R.G. : Nature, **202** : 498, 1964.
 - 4) Davie, E.W. and Ratnoff, O.D. : Science, **145** : 1310, 1964.
 - 5) Wuepper, K.D. : J. Exp. Med., **138** : 1345, 1973.
 - 6) Saito, H. et al. : J. Clin. Invest., **55** : 1082, 1975.
 - 7) Heimark, R.L. et al. : Nature, **286** : 456, 1980.
 - 8) 高田明和他編 : 炎症の化学伝達(1)-血漿, 血小板性因子一, MRC メディカルリサーチセンター, 東京, 1983, p.43.
 - 9) Zur, M. and Nemerson, Y. : J. Biol. Chem., **255** : 5703, 1978.
 - 10) Colman, R. : Biochem. Biophys. Res. Commun., **35** : 273, 1969.
 - 11) Wallen, P. and Wiman, B. : In Proteases and Biological Control, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, 1975, p.291.
 - 12) Markus, G. et al. : J. Biol. Chem., **254** : 1211, 1979.
 - 13) Sugawara, Y. et al. : Thrombos. Res., **33** : 269, 1984.
 - 14) Takada, A. et al. : Thrombos. Res., in press.
 - 15) Takada, A. and Takada, Y. : Thrombos. Res., **23** : 411, 1981.
 - 16) Camiolo, S.M. et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **138** : 277, 1971.
 - 17) Wallen, P. : In "Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis," Raven Press, New York, 1978, p.167.
 - 18) Takada, A. and Takada, Y. : Thrombos. Res., **22** : 497, 1981.
 - 19) Takada, A. et al. : J. Biol. Chem., **245** : 6389, 1970.
 - 20) Takada, A. et al. : Thrombos. Res., **22** : 623, 1981.
 - 21) Thorsen, S. et al. : Thrombos. Diathes. Haemorrh., **28** : 65, 1972.
 - 22) Gurewich, V. et al. : Blood, **46** : 555, 1975.
 - 23) Hoylaerts, M. et al. : J. Biol. Chem., **257** : 2912, 1982.