

氏名・(本籍)	と 後	とう 藤	とし 寿	お 夫
学位の種類	理	学	博	士
学位記番号	理	第	3	1
			0	号
学位授与年月日	昭和46年1月27日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
最終学歴	昭和40年3月 東北大学大学院理学研究科修士課程生物学専攻修了			
学位論文題目	Preparation of highly purified Fibrin Stabilizing Factor (高純度フィブリン安定化因子の調製)			
論文審査委員	(主査) 教授	青木	廉	教授
				樋渡 宏一
				助教授 小西 和彦

論 文 目 次

第 1 章	序 論
第 2 章	ウシ・フィブリン安定化因子の精製
第 3 章	ヒト・フィブリン安定化因子の精製
第 4 章	トロンビンによるフィブリン安定化因子の分解
第 5 章	考 察
第 6 章	要 約
	文 献

論文内容要旨

第1章 序 論

血液凝固の最終段階に酵素として働くフィブリン安定化因子(FSF)は、古く1940年代にRobins及びLorand and Laki等により「 Ca^{++} 存在下で酸又はurea可溶フィブリンを不溶フィブリンに転化させる因子」として発見された。以来酸不溶フィブリン形成の機構について分子レベルでの解析が進められ、種々の説が提唱されたが、1960年代に入ってLarand and Konishiにより酸不溶フィブリン形成はtransamidationによることが示唆され、その後、 NH_3 の遊離、 γ -glutamylと ϵ -lysine間のisopeptide結合の形成等が確認されて、transamidation説は確立された。現在ではフィブリン分子上のisopeptideの結合座も決定されている。このような機能をもつFSFは生体中では不活性な前駆体として存在しており、血液凝固の際に Ca^{++} 存在下でトロンビンにより酵素活性を持つ活性フィブリン安定化因子(FSF*)となる。著者はFSFの活性化の機構を解明する為の基礎としてFSFの精製を行なった。次いで、精製したFSFを用いて、FSFの活性化及びその失活に関して初歩的研究を行った。

第2章 ウシ・フィブリン安定化因子の精製

1. 材料及び実験方法

フィブリンノーゲン、フィブリン及びトロンビンは夫々Laki(1951)、Donnelly(1955)の方法に従って調製した。粗FSFは、凍結血漿(Pentex)を触解後遠心により沈澱を除き、熱処理を主とするLoewy et al.(1957)の方法により調整し、これをstarting materialとしてDEAE-セルロース・カラム・クロマトグラフィー及び蔗糖密度公配超遠心により、FSFの精製を進めた。最終産物の純度検定は主としてディスク電気泳動(7.5%ポリアクリルアミド、トリス・グリシン緩衝液pH8.6, 3mA × 2hrs, 酢酸固定, アミド・ブラック染色)により行なった。

Ca^{++} 及びシステイン存在下(pH7.5, 室温)でFSFをトロンビン(2 NIH 単位)により10分間活性化し、これにフィブリン溶液(4.5 mg)を加え、30分後にモノクロロ酢酸で反応を止め、酸不溶フィブリンが約2 mg形成されるに必要な酵素量を1単位とした。蛋白はLowry et al.(1951)の方法で定量し、比活性(蛋白1mg当りの単位数)を求めた。

2. 結 果

A) DEAE-セルロース・カラム・クロマトグラフィー

1 mM EDTAを含む50 mM トリス塩酸緩衝液(pH7.5)で平衡化したDEAE-セルロース・カラム(3 × 24 cm)に粗FSFをかけ、平衡液で洗ってから、NaClのリニア濃度公配(0から0.3 M, 流出液1.2 ℓ)をかけながら流出分面を行った。流出パターンは、粗FSFによって必ずしも一定しないが、多くの場合4つのピークが現れ、比較的低い第3番目のピークにFSF活性が検出された。

ステップワイズ法による流出も検討した。この場合FSFは0.06 M NaClで流出された。しかし、

再現性に於てリニア濃度公配法がより確実であった。FSF分画を硫酸で濃縮後、蔗糖密度公配超遠心により更に精製を進めた。

B) 蔗糖密度公配超遠心

約5%から40%(W/V)の連続蔗糖密度公配層(4.5 ml)にFSF溶液(0.5 ml)を載せ、スウィング・ヘッドを用いて遠心(44,000 r. p. m. \times 12 $\frac{1}{2}$ hrs, 又は 64,000 r. p. m. \times 8 $\frac{3}{4}$ hrs)後、遠心管の底に穴をあけて滴下しながら分画した。遠心のパターンは、多くの場合、4つのピークを示し、そのうち最も高いピークにFSF活性が検出された。

粗FSFから始まる精製の balance sheet も合せ完成した。比活性の上昇率は粗FSFの純度に左右されるが最終産物の比活性はほぼ 2,000 単位/mg 蛋白に落ち着く。

最終産物は非常に安定であり、薄い濃度で一晩以上放置されない限り、少くとも1カ月間は比活性の低下は認められなかった(4°C 保存)。

C) ディスク電気泳動による純度検定

DEAE-セルロース・カラム・クロマトグラフィーのみによってもほぼ単一のバンドを示す試料も得られたが、多くの場合、蔗糖密度公配超遠心後も二本のバンドを示した。そこで、トロンビンによる活性化なしに酵素活性を調べてみたところ酸不溶フィブリンの形成が認められた。これまで区別なしに述べてきたが、以後トロンビンの添加なしに活性測定した場合をFSF活性、添加した場合を total 活性(FSF + FSF^{*})、total 活性からFSF^{*}活性を差引いた値をFSF活性と区別して呼ぶことにする。前記条件下でディスク電気泳動を行なった場合現れる二本のバンドのうち、わずかながら遅く動くバンドの太さとFSF^{*}活性は比例していることが観察された。最終産物の total 活性のうち、FSF^{*}活性が占める割合が80%に及ぶ場合もあった。

D) 分子量の決定

最終産物のうちFSF^{*}活性が微量しか認められない試料を用いYphantis(1964)の方法による沈降平衡法によりウシFSFの分子量を決定した。偏比容のみはLoewy et al. (1961)に倣って0.725と仮定して算出した。得られた値は270,000であった。FSFはシステイン存在下で分子量130,000に解離するとの報告があるが、システイン存在下でもFSFの分子量は270,000であった。

遠心の場におけるFSFの沈降の挙動を、カタラーゼ(分子量250,000)とLDH(120,000)をマーカーとして、蔗糖密度公配法により前記条件下で調べた結果FSFはそれらマーカーの中間に沈降した。またフィブリノーゲン(330,000)はFSFと全く同じ分画に沈降した。このこととYphantisの方法によって決定されたFSFの分子量270,000とを併せ考慮すると、FSFの形態は棒状と思われる。

E) 等電点の決定

pH範囲4-6のampholite(5%)を用い、エレクトロフォカシング(700 volts 34 hrs, 4°C)により、最終産物中のFSFとFSF^{*}の等電点を決定した。FSFとFSF^{*}は分析的スケールながら分離され、その等電点は夫々6.0及び5.6であった。FSF^{*}分画は、前記ディスク電気泳動における二本のバンドのうち、より遅く動くバンドに相当し、FSF分画はより早く動くバンドに相当する

ことが解った。

第3章 ヒト・フィブリン安定化因子の精製

素材としてヒトの凍結血漿 (Chicago Blood Donor Service) を用いた以外は、ウシ・FSFの精製と全く同様の方法で精製を行なった。得られた最終産物は、ディスク電気泳動による純度検定の結果、ウシの場合とは対照的にほとんどの場合単一バンドを示し、FSF^{*}含量も極めて少なかった。収量は血漿 2 l から 14.8 mg, 比活性は 340単位/mg蛋白であった。FSFの等電点は 5.4 (4℃) と決定された。

第4章 トロンビンによるフィブリン安定化因子の分解

Lorand and Konishi (1964) は、トロンビンによって活性化されたFSF^{*}は不安定であり、このFSF^{*}の不活性化は酸素分圧を低下させることにより抑えられることを示した。しかし、トロンビンは蛋白分解酵素の1つであることから推して、FSF^{*}がトロンビンによって overdigest されることも、トロンビン共存下でのFSF^{*}の不安定性の一因と考えられる。著者はこの点をディスク電気泳動を用いて検討した。

1. 材料及び実験方法

ヒト・FSF及びウシ・FSFは前記の方法により精製した。ウシの試料はFSFとFSF^{*}をほぼ1:1の比で含むものを用いた。Ca⁺⁺及びシステイン(又はグルタチオン)存在下でFSFをトロンビン処理し、反応をEDTA及びTAMeによって停止し、その変化の過程をディスク電気泳動により追跡した。

2. 結果

ウシの場合、トロンビンはFSFとFSF^{*}の双方をアタックし、ポリアクリルアミド上のこれら二本のバンドは次第に消えて行きそれに伴って新たに影状に染色されるもの(シャドー)が現れた。双方のバンドが消える頃には酵素活性は検出されなかった。活性化に伴ってFSFのバンドが薄くなりFSF^{*}のバンドが濃くなっていくことが予想されたが、採用した条件下では捕えることが出来なかった。ヒト試料の場合もシャドーが現れた。

第5章 考 察

精製最終産物は、ウシの場合特に、FSF^{*}の混在が顕著であった。FSF→FSF^{*}の機構を解明するためにはFSFの純品をとることが望ましい。FSF^{*}含量は既に粗FSFに於て決定されていた。粗FSF調製の過程でFSFが活性化される要因として、ガラス壁との接触、トロンビンは勿論のこととしてその他の蛋白分解酵素 (Konishi and Takagi 1969) などが考えられる。そこで、粗FSFの調製から活性検定に至るまで全ての容器をプラスチックに替えるか或いはガラス器をシリコン・コーティングして用いた。前以ってプロトロンビンをBaSO₄で吸着除去後、EDTA, STI, ヘパリン, ε-アミノカプロン酸存在下で粗FSFの調製を行なった。しかし、このようにして調製した粗FSFのFSF^{*}含量はコントロールとほとんど変りなかった。

イオン交換樹脂、分子篩、超遠心などによってもFSFとFSF^{*}の分離が出来なかったことから推して、

これら二つの蛋白は性質が極めて類似しているものと思われる。しかし、ディスク電気泳動及びエレクトロフォカシングの結果から、表面電荷に差異のあることが明らかにされた。

FSF*を含む最終産物は4℃に於て少なくとも1カ月間比活性の減少は認められなかった。Koniishi and Lorandの方法に従ってトロンビンから分離したFSF*は少なくとも数日間安定である。ディスク電気泳動によってポリアクリルアミド上に同定されたFSFとFSF*のバンドが、トロンビン処理により消失することが明らかにされた。これらのことを併せ考察すると、トロンビン共存下に於けるFSF*の失活はトロンビンによる *overdigestion* が主な要因と思われる。我々の実験条件では明瞭な結論を得るには至らなかったがディスク電気泳動はFSF→FSF*の機構解明の有効な手段であろう。

後 記

この論文は第2章に述べた部分を中心にして、*Biochem. Biophys. Res. Comm.* 31, 222-230 (1968)及び*Methods in Enzymology XIX* ed. by Colowick and Kaplan, Academic Press (1970)に発表した。

論文審査結果の要旨

哺乳動物の血液は体外に流出すると不溶性フィブリンが形成され凝固する。このフィブリンは初めは尿素溶液などに可溶性であるが、酵素の働きにより不溶性に変化するものであり、現在この酵素はフィブリン安定化因子(FSF)として認められ、その不溶性化の機構は transamidation なることも確認されている。然しFSFの前駆体及びそれが活性化される機構は現在不明のまま残されている。これらの点を研究するためにはまづ純粹のFSFを得ることが不可欠の条件であり、既に多くの試みが行われているが未だに成功していない。このFSF精製を試みた研究が本論文である。

ウシのフィブリン安定化因子の精製：Laki(1951) Donnelly(1955) 及び Locwy (1957) 等の方法で調製した粗FSFをDEAEセルローズカラム、クロマトグラフィー及び蔗糖密度勾配遠心法を利用して精製した結果、比活性 2,000/mg蛋白質を有する安定なFSFを得ることができた。然しこの標品をディスク電気泳動法で調べたところ活性FSFが種々の割合に混在していることが明らかになった。活性FSFの混在は粗FSF調製過程中FSFが活性化される可能性があり、その原因となると考えられる。ガラス容器面との直接接触を断ち、プロソロンビンの吸着除去、さらにEDTA, STI, ヘパリン、 ϵ -アミノカプロン酸存在の下での調製を行なったが混在してくる活性FSFの除去はできなかった。また調製後、イオン交換樹脂、分子篩、超遠心を試みたがFSFと活性FSFの分離は不可能に終わった。

また得られた標品中、活性FSFを微量しか含まない試料について沈降平衡法で測定したFSFの分子量は270,000、また沈降の挙動からその形は fibrous に近いと思われる。等電点はFSFでは6.0、活性FSFでは5.6である。

ヒトのフィブリン安定化因子の精製：同様の方法で精製して得られた標品の比活性は340単位/mg蛋白質、等電点は5.4であったが、標品中の活性FSFの含量が非常に少ない点がウシの場合と異なる点である。

上記の方法では完全にFSFのみを分離することはできなかった。種々試みた方法のうちディスク電気泳動法のみが分離にある程度有効であり、今後FSF→活性FSF機構解明にこの方法は有力な手段となり得るであろう。

以上後藤寿夫の研究は完全とはいえないが、今までのうち最も純度の高いFSF標品調製に成功したものであり、今後この方面の研究の進歩に資するところは大きいと考える。

よって後藤寿夫提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。