

バチルス由来の血栓溶解促進酵素の研究

**The study on the thrombolytic enzyme subtilisin NAT from *Bacillus subtilis***

2020. 9

東京農工大学大学院  
連合農学研究科  
応用生命科学専攻  
高垣 聡一郎

## 目次

第 1 章	緒論	1
第 1 節	血液の凝固と線溶	1
第 2 節	Subtilisin NAT (ナットウキナーゼ) の作用	3
第 3 節	研究の目的	5
第 2 章	STN のフィブリン分解活性を促進する物質の探索	6
第 1 節	緒言	6
第 2 節	材料と方法	6
第 3 節	結果	11
第 4 節	考察	19
第 3 章	STN の血栓溶解メカニズムの検証	21
第 1 節	緒言	21
第 2 節	方法	21
第 3 節	結果	26
第 4 節	考察	37
謝辞		40
参考文献		41

## 略語一覽

$\alpha_2M$  :  $\alpha_2$  macroglobulin

BSB : Borate saline buffered

DMSO : Dimethyl sulfoxide

FU : fibrin degradation units

PA : plasminogen activator

PAI-1 : type 1 plasminogen activator inhibitor

PBS(-) : Phosphate buffered saline

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

scu-PA : single-chain u-PA

STN : Subtilisin NAT

TBS-T : Tris buffered saline with Tween 80

t-PA : tissue-type plasminogen activator

tcu-PA : two-chain u-PA

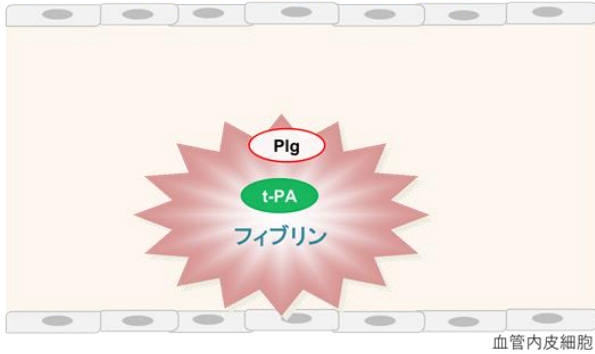
u-PA : urokinase-type plasminogen activator

## 第 1 章 緒論

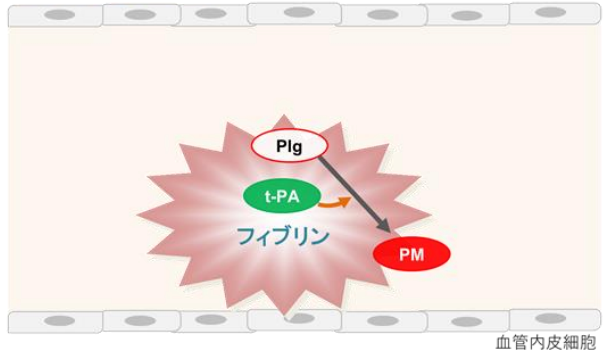
### 第 1 節 血液の凝固と線溶

血液凝固線溶系は止血機構の中心であり、血液の流出を防止するとともに、組織修復および創傷治癒の基礎となる<sup>1, 2)</sup>。凝固系では、出血が生じると速やかに血液が凝固し、不溶性タンパク質であるフィブリンを主要構成成分とする止血血栓が形成される<sup>3)</sup>。一方で、血栓が過剰に形成されることで血管閉塞や循環障害が生じるため、その対応策として線溶系が不要な血栓を溶解除去する役割を担っている。このメカニズムは、さまざまな調節因子によって高度に調整されており、凝固系、線溶系のバランスにより正常な血液循環が維持される。一方で、本邦ではガンに次いで虚血性心疾患や脳血管疾患も主要な死因となっている<sup>4)</sup>。これら疾患の原因の 1 つが、凝固線溶制御機構の破綻により血流が途絶えることである。血栓の溶解においてはプラスミノゲン・プラスミン系が中心的な役割を果たす(図 1)。1 本鎖不活性型のプラスミノゲンはプラスミノゲンアクチベーター(plasminogen activator: PA)によって重鎖と軽鎖の 2 本鎖に限定分解され、フィブリン分解活性を有するプラスミンとなる。また、主要な PA として、組織型(tissue-type plasminogen activator: t-PA)とウロキナーゼ型(urokinase-type plasminogen activator: u-PA)が存在する。t-PA はフィブリンに対して高い親和性を有し、フィブリン上でプラスミノゲンと共に複合体を形成することで、局在的なプラスミン産生およびフィブリン分解を行う<sup>5, 6)</sup>。一方で u-PA はフィブリンに対する親和性は低い、不活性型の 1 本鎖 u-PA(single-chain u-PA: scu-PA)がプラスミンにより 2 本鎖(two-chain u-PA: tcu-PA)に限定分解されることでプラスミノゲン活性能を獲得し、プラスミン産生が生じる<sup>7)</sup>。一方で PA 阻害因子 1 (type 1 plasminogen activator inhibitor: PAI-1) は線溶系における主要な阻害因子であり、PA との均衡を保つことで凝固線溶のバランスを取っている<sup>8)</sup>。このような血栓溶解に重要な PA は、静脈投与による心筋梗塞や脳梗塞での血栓溶解療法として利用されている。しかし、出血など重篤な副作用を引き起こし、t-PA については脳梗塞発症から 4.5 時間以内に治療が必要であるなど、その使用は制限されている<sup>9)</sup>。そのため、PA に代わる安全な血栓溶解療法の開発が模索されている。

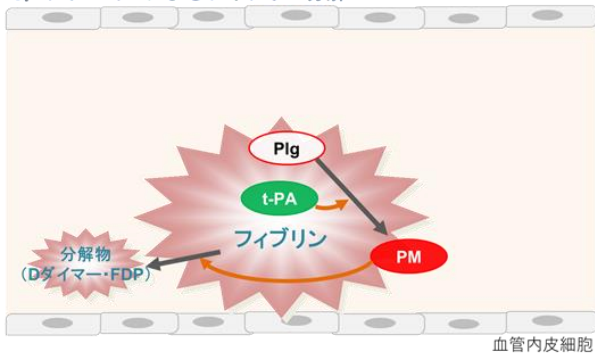
1. フィブリンへのプラスミノゲンとt-PAの結合



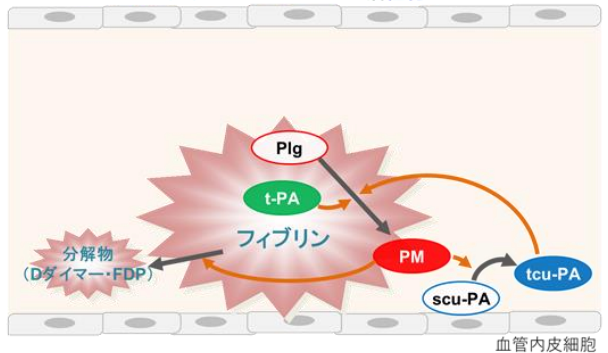
2. プラスミンの産生



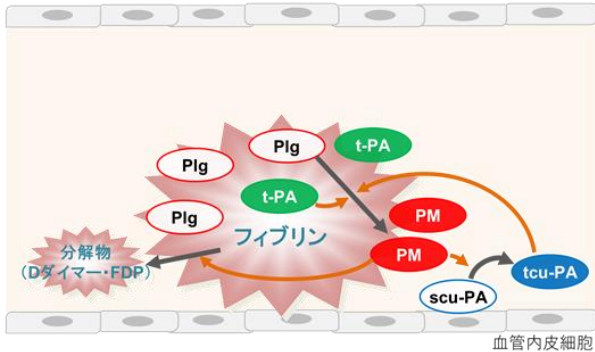
3. プラスミンによるフィブリン分解



4. プラスミンによるscu-PA活性化  
⇒tcu-PAによるプラスミノゲン活性化



5. 更なるプラスミノゲン・t-PAの集積



6. 指数関数的なプラスミン産生  
⇒フィブリン分解促進

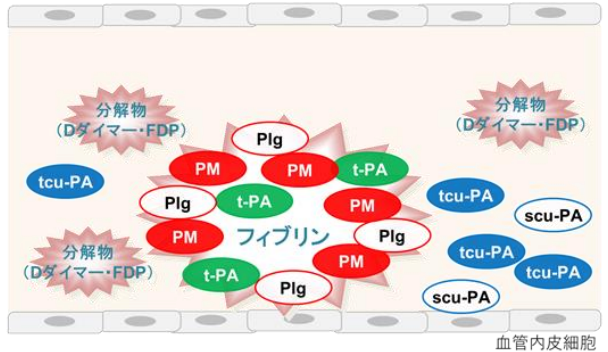


図 1 フィブリン分解の局在化と加速

(1) フィブリンにプラスミノゲンと t-PA が結合し、(2) プラスミノゲンを活性化しプラスミンを産生する。(3) プラスミンはフィブリンを分解すると共に (4) scu-PA を活性化し tcu-PA を産生する。tcu-PA もプラスミノゲンを活性化、プラスミン産生する。(5) さらにプラスミノゲンおよび t-PA が集積し、(6) フィブリン局在的なプラスミン産生、フィブリン分解が促進する。

(Plg : プラミノゲン、PM : プラスミン)

## 第 2 節 Subtilisin NAT (ナットウキナーゼ) の作用

Subtilisin NAT (STN) はセリンプロテアーゼの 1 種である。発酵食品である納豆の製造過程において、蒸し大豆を発酵するために納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) が利用されるが、STN は納豆菌により産生される。これは納豆にも含まれる特徴的な酵素であり、ナットウキナーゼとも呼ばれる。初めて STN が着目されたのはフィブリン分解能であった<sup>10)</sup>。須見らは納豆中にフィブリン分解酵素を見出し、さらにプラスミンに対する合成アミド基質を分解することを明らかにし、この酵素をナットウキナーゼと命名した。その後の解析により、この物質は 275 残基のアミノ酸から成るプロテアーゼであり、STN と同一であることが確認された<sup>11, 12, 13)</sup>。その酵素活性は、プラスミンと比べ凝血塊の溶解は 4 から 5 倍、フィブリンの分解については 6 倍以上と高活性である<sup>14)</sup>。また、フィブリン分解以外の線溶に関する作用として scu-PA を活性型の tcu-PA に変換すること<sup>15)</sup>、熱失活した STN を培地に添加することで培養血管内皮細胞の t-PA 産生が増進することが報告されている<sup>16)</sup>。さらに、PAI-1 を分解することにより不活化し、結果的に PA 作用を向上することで凝血塊の分解が促進する<sup>17)</sup> (図 2)。一方で、STN はプラスミノーゲンを活性型のプラスミンには変換できず、PA 様作用は有していない<sup>14)</sup>。

このような作用が報告されている一方で、プロテアーゼである STN が、その活性を保持したまま生体内で役割を果たすことについて懐疑的な見方もある。一般に経口摂取したタンパク質は、消化吸收の過程でアミノ酸、ペプチドなどの低分子に分解されると理解されるためである。この点に関しては、ラット十二指腸への STN 投与試験 (80 mg/kg) において、投与後 5 時間までに血中のフィブリンノーゲンの分解および血漿凝固時間の延長が確認され、腸管吸収の可能性が示唆された<sup>18)</sup>。また、11 人の健常者を対象とした STN (2000 FU/人) 経口投与試験において、投与 13 時間程度で STN の最高血中濃度に達することが報告された<sup>19)</sup>。一方で、血中に代謝されたプロテアーゼは、阻害因子である  $\alpha_2$  マクログロブリン ( $\alpha_2$ M) に取り込まれ不活化する<sup>20)</sup>。STN も同様であり、1 分子の  $\alpha_2$ M に 2 分子の STN が取り込まれ、フィブリンに対する分解の活性は消失する<sup>21)</sup>。しかし、 $\alpha_2$ M に取り込まれたプロテアーゼは活性を保持することが報告されており<sup>22)</sup>、STN- $\alpha_2$ M 複合体においても低分子への感受性は変化しながらも活性は維持している<sup>21)</sup>。一方で、実験動物を用いた血液凝固線溶系に及ぼす影響が検証されており、血栓症モデルラットの大腿静脈へ血栓溶解剤を投与したところ、STN、プラスミンで血栓が溶解し、それぞれの血流回復率は 62%、16%であり、STN に強い効果

が認められた<sup>23)</sup>。また、人工血栓を作製したラット<sup>24)</sup>やイヌ<sup>25)</sup>への経口投与においても血栓溶解による血流回復が示された。さらに STN を 1 週間経口投与したラットに人工血栓を作製したところ、STN の投与量に依存して血流閉塞が遅延し、STN を添加したウサギ血漿においても抗凝固作用が確認された<sup>26)</sup>。また、自然発症高血圧ラットへの経口投与において、STN 投与では血漿フィブリノーゲンを分解し、一方で STN 分解物の投与ではアンジオテンシン II レベルを低下させることで降圧作用を示した<sup>27)</sup>。さらにヒトへの経口投与においても、血液凝固因子の低下による抗凝固作用<sup>28)</sup>、血中 t-PA やフィブリン分解物の上昇などが示す線溶系の促進<sup>25,29)</sup>、血圧の正常化<sup>30)</sup>、心血管疾患への応用<sup>31, 32, 33, 34)</sup>などの報告がされており、STN は日本のみならず中国、韓国を含むアジア諸国、欧米などで広く健康食品として利用されている。(主にナットウキナーゼと呼ばれて流通している。)

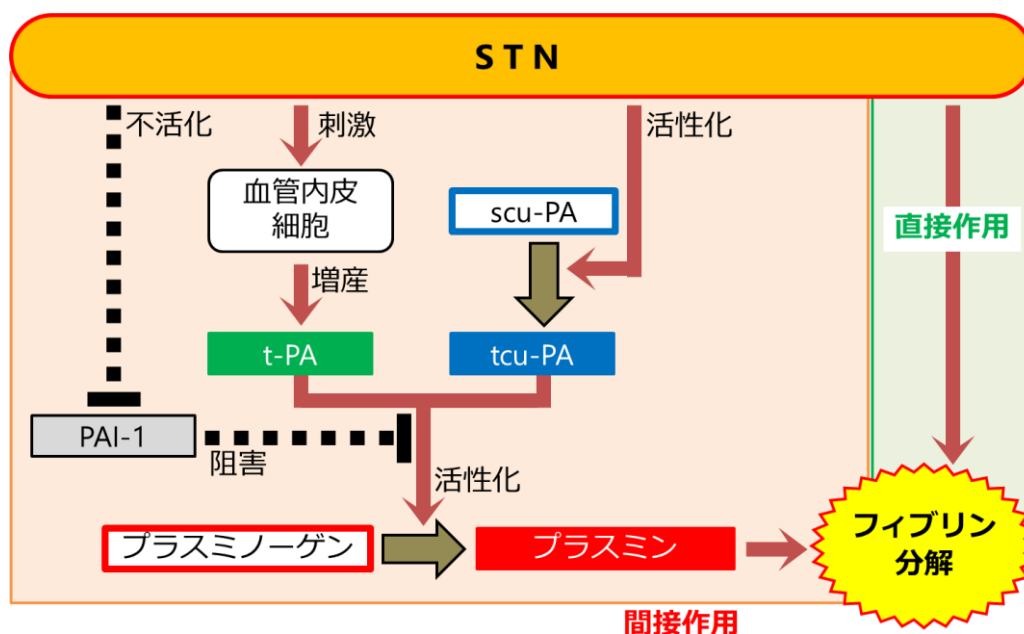


図 2 フィブリン分解における STN の作用機序

STN の作用機序を模式図で示した。これまでに直接的なフィブリン分解活性とともにプラスミンを介する間接的な線溶活性が報告されている。

### 第 3 節 研究の目的

このように STN はさまざまな研究が行われており、実用化されているにもかかわらず未解明な部分も残っている。まず、現在 STN はフィブリン分解能が注目され、健康食品として利用されている。ここで STN の活性を高めることができれば、効率良く、安価に利用することが可能となるが、その手段に関する研究は乏しい。そこで食品としての利用を前提に、活性を高める方法として、他の食品素材との併用を検討する。一方で、フィブリン分解をはじめとする線溶に関する作用が示唆されており、実際にヒト試験においても影響が報告されている。しかし、生体内における STN の詳細な作用メカニズムについては未だ明らかとなっていない。そこで、本研究では、STN の活性を高める食品素材の探索、活性成分の同定と作用の解析（第 2 章）および STN の *in vivo* 血栓溶解作用の解析（第 3 章）を目的とした。

なお、本論文の第 2 章は既報論文に基づいて作成したものである。



## 第 2 章 STN のフィブリン分解活性を促進する物質の探索

### 第 1 節 緒言

STN は納豆に含まれるフィブリン分解酵素として注目され、納豆が持つ健康的な食品イメージもあり、健康食品として世界中で利用されている。STN は納豆菌が産生する酵素であることから、これまでに STN を効率的に得る方法として菌の改良や培養条件に関する研究が進められてきた<sup>35, 36)</sup>。一方で、STN のフィブリン分解活性を高める手段に関する研究は乏しい。そこで、食品として利用することを前提として、STN のフィブリン分解活性を促進する添加物を食品中から探索する。納豆は香辛料や薬味と共に喫食することが多いため、本研究では香辛料を候補食品として検討を行う。

### 第 2 節 材料と方法

#### 2-2-1 材料

STN はオルガノフードテック社にて食品原料として販売している製品を用いた（ナットウキナーゼ HTNK-J<sup>®</sup>）。これは納豆菌（*B. subtilis* var. *natto*）培養液を濃縮、濾過の後に粉末加工した製品であり、健康食品の原料として流通している。本研究ではフィブリン分解単位（fibrin degradation units: FU）として 25000 FU/g（ロット番号；HTN7E2801）のものを使用した。フィブリン分解単位は財団法人日本健康・栄養食品協会が定めるナットウ菌培養エキス食品品質規格基準に準拠した方法で測定しており、1 FU はフィブリンに STN を加えて得られたフィブリン分解物を波長 275 nm における吸光度で測定した際、吸光度を 1 分間に 0.01 増加させる酵素量である。

香辛料は粉末の製品として赤トウガラシ、青トウガラシ、マスタード、山椒、カレー粉、ヤラピノペッパー、ガラムマサラ、ホワイトペッパー（ヤスマ社製）、豆板醤（日研フード社製）、ワサビ（日本デイリーヘルス社製）を用いた。

その他、本実験で用いた緩衝液を以下に示す。

ホウ酸緩衝液 (Borate saline buffered : BSB)

: 0.16 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、0.01 M  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 、0.1 M NaCl、pH 7.8

トリス緩衝生理食塩水 (Tris buffered saline with Tween 80 : TBS-T)

: 50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、0.01% (w/v) Tween 80、pH 7.4

リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline : PBS(-))

: 137 mM NaCl、8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、2.68 mM KCl、1.47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、pH 7.4

SDS-PAGE 用 非還元サンプルバッファー

: 205 mM Tris-HCl、8% (w/v) SDS、40% (w/v) スクロース、0.008% (w/v) ブロモフェノールブルー

SDS-PAGE 用 還元サンプルバッファー

: 非還元サンプルバッファーに 20% (w/v) 2-メルカプトエタノール添加

SDS-PAGE 用 染色液

: 1.25 L 超純水、1.25 L メタノール、0.5 L 酢酸、1.5 g クマシーブリリアントブルー R250

SDS-PAGE 用 染色液

: 1.8 L 超純水、0.9 L メタノール、0.3 L 酢酸

## 2-2-2 フィブリン溶解試験

目的に応じて 3 種類の試験方法を実施した。

### 2-2-2-1 フィブリンプレート法

BSB に溶解した 10 mL ウシ血漿由来フィブリノーゲン (5 mg/mL) (製品番号: F8630、Sigma-Aldrich 社製) と 500  $\mu$ L のトロンビン (50 units/mL) を混合し、90 mm ディッシュ内にて 30 分以上、室温 (25°C 程度) で静置した。作製したフィブリンプレートに STN (0.94 FU) とサンプルを溶解した BSB 30  $\mu$ L を滴下し、37°C で 4 時間静置した。その後、白濁したフィブリンゲルが透明に変化した領域 (長径×短径) をフィブリン溶解領域として評価した。また、各濃度に調整した STN 溶液を用いて標準曲線を作成した。

### 2-2-2-2 96 ウェルマイクロプレート法

試験効率および精度の向上のため 96 ウェルマイクロプレートを用いた。ここでは透明、丸底タイプの 96 ウェルマイクロプレート内に 1 ウェルあたり 50  $\mu$ L ずつ、フィブリンプレート法と同様にフィブリンゲルを作製した。作製したフィブリンウェルの端に STN (0.125 FU) とサンプルを溶解した BSB 5  $\mu$ L を滴下した。これを 37°C で保温し、ウェル中央部の波長 405 nm における吸光度変化をフィブリン溶解度として評価した。なお、測定はいずれも 3 回以上実施した。

### 2-2-2-3 384 ウェルマイクロプレート法

さらなる試験の効率化のため、384 ウェルマイクロプレートを用いた。ここでは透明、平底タイプの 384 ウェルマイクロプレート内に 1 ウェルあたり 50  $\mu$ L ずつ、フィブリンプレート法と同様にフィブリンゲルを作製した。作製したフィブリンウェルに STN (0.125 FU) とサンプルを溶解した BSB 5  $\mu$ L を滴下した。37°C で保温し、波長 405 nm における吸光度変化をフィブリン溶解度として評価した。この試験では、保温 40 分から 150 分の時間範囲において直線的に吸光度が減少する 30 分間の近似直線を算出し、フィブリン溶解活性とした。なお、測定はいずれも 3 回以上実施し、統計検定は一元配置分散分析および Dunnett 法を用いた。

## 2-2-3 フィブリノーゲン分解試験

SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にてフィブリノーゲン分解を検証した。SDS-PAGE は Laemmli<sup>37)</sup>の方法に従った。リノール酸 (200  $\mu$ g/mL) を添加または非添加の条件で、ウシ血漿由来フィブリノーゲン (1

mg/mL) と STN (0.025 FU/mL) を BSB に溶解した。37°C で 5 分から 60 分間処理し、処理液 10  $\mu$ L に還元サンプルバッファ 3.5  $\mu$ L を加え、95°C、5 分間の熱処理を行い電気泳動に供する検体とした。検体 10  $\mu$ L を 12.5% アクリルアミドゲルにて電気泳動し、染色液で染色後、脱色液で脱色した。

#### 2-2-4 フィブリンノーゲン分解物の解析

SNT に分解されたフィブリンノーゲン断片を SDS-PAGE により分離回収し、トリプシン消化後にアミノ酸配列解析を行った。解析は nano-LC-MS/MS を構成するイオントラップ型質量分析計 (LTQ Orbitrap Velos ETD、Thermo Fisher Scientific 社製) を用いた。なお、本解析は大学連携研究設備ネットワークを通して東京医科歯科大学リサーチコアセンターの細谷祥一先生に協力いただいた。

#### 2-2-5 合成アミド基質分解試験

STN はフィブリンと同様に合成アミド基質を分解する。H-D Hexahydrotyrosol-Ala-Arg-*p*-nitroaniride (Spectrozyme<sup>®</sup> TH、Sekisui Diagnostics 社製) は高感度発色基質であり、酵素分解により *p*-nitroaniline を放出する。そのため、波長 405 nm における吸光度を測定することでアミド分解を評価できる。この試験法を用いて、リノール酸が直接的に STN の酵素活性を向上させることを検証した。2.5  $\mu$ g/mL から 40  $\mu$ g/mL のリノール酸を添加し、STN (25 FU/mL)、Spectrozyme<sup>®</sup> TH (0.1 mM) を含む BSB 100  $\mu$ L を反応液とし、37°C での波長 405 nm における吸光度の経時変化を測定した。なお、測定はいずれも 3 回以上実施した。

#### 2-2-6 赤トウガラシ中の促進物質の精製

100 g の赤トウガラシ粉末を 1 L のアセトンで抽出し、残渣をさらに 0.5 L のアセトンで抽出した。両アセトン抽出物を合わせ、エバポレーターで濃縮することで約 11 g の油状残渣を得た。このうち 5 g を *n*-ヘキサンで平衡化したシリカゲル 90 g から成るカラムに供した。*n*-ヘキサンとアセトンの混合液 (90:10、80:20、60:40、0:100) を展開溶媒として各 3 L ずつ連続してカラムを通過させ、それぞれ分取した液について 96 ウェルマイクロプレート法により STN のフィブリン分解促進効果を検証した。最も促進効率が良かった分画について、さらに *n*-ヘキサンと酢酸エチル混合液 (98:2、95:5、90:10、80:20、60:40) を用いて同様に 2 度目の展開、フィブリン分解促進効果の検証を行い、*n*-ヘキサンと酢酸エチル混合液 (99:1、98:2、95:5) を用いて 3 度目の展開を行った。

#### 2-2-7 NMRによる物質の同定

70 mg/mL となるよう赤トウガラシ抽出物を重水素化クロロホルムに溶解し、核磁気共鳴装置 (JNM-Alpha-600 spectrometer、JEOL 社製) を用いて 150 MHz で  $^{13}\text{C}$ 、600 MHz で  $^1\text{H}$  の NMR スペクトルを測定した。測定結果は ALICE2 ver. 2.05 (JEOL 社製) を用いて処理、解析を行った。

### 第 3 節 結果

#### 2-3-1 STN のフィブリン分解活性を促進する香辛料のスクリーニング

香辛料粉末を水に添加し、得られた上清を香辛料抽出液として回収した。その結果、フィブリンプレート法において、STN 溶液 30  $\mu$ L あたり 2.63 mg のマスタードから得られた抽出物を添加することで、フィブリン分解活性を 3.3 倍 (図 3d) に促進することが明らかとなった。さらに 9 種類の香辛料を検証したところ、赤トウガラシが最も高活性であった。先と同様に、赤トウガラシを添加することで、フィブリン溶解は濃度依存的に著しく上昇した (図 3a)。加えて、豆板醤 (図 3b)、青トウガラシ (図 3c)、カレー粉 (図 3g)、ヤラピノペッパー (図 3h) においても促進効果が見られた。このことより、STN のフィブリン分解促進物質は幅広い香辛料に分布していることが示唆された。

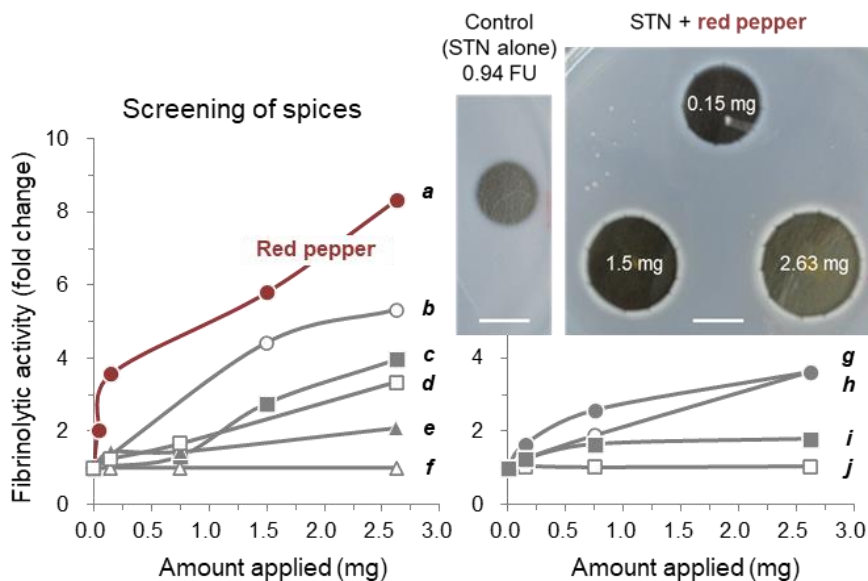


図 3 香辛料のスクリーニング

香辛料の水抽出物と STN を混合し 30  $\mu$ L (0.94 FU/30  $\mu$ L) をフィブリン平板に滴下し、フィブリン溶解活性を測定した。図中 a, 赤トウガラシ ; b, 豆板醤 ; c, 青トウガラシ ; d, マスタード ; e, 山椒 ; f, ワサビ ; g, カレー粉 ; h, ヤラピノペッパー ; i, ガラムマサラ ; j, ホワイトペッパーを示す。香辛料の重量は、抽出に用いた香辛料の量を示す。右上挿絵に実際例を示し、左側は香辛料を含まない (STN のみ) 対照区であり、右側は表示量の赤トウガラシ添加区である。フィブリンが溶解することで透明な溶解窓が確認できる。

### 2-3-2 赤トウガラシに含まれる促進物質の精製と同定

最も高活性であった赤トウガラシをアセトンまたは水を溶媒として抽出した。各抽出物について、96 ウェルマイクロプレート法により STN のフィブリン分解促進効果を検証したところ、アセトン抽出物は水抽出物の 10 倍以上の高効率であることが明らかとなった (図 4A、B)。そこで、赤トウガラシ粉末のアセトンで抽出物をエバポレーターで濃縮物をカラムに供し、比率の異なる *n*-ヘキサンとアセトンの混合液を展開溶媒として 3 L ずつ連続してカラムを通過させ、それぞれ分取した。これにより、*n*-ヘキサンとアセトンの混合液 (90:10) 画分において促進効果を確認し、さらに比率の異なる *n*-ヘキサンと酢酸エチル混合液を用いて同様に 2 度目の展開を行った。ここで *n*-ヘキサンと酢酸エチル混合液 (98:2) 画分において促進を回収し、再度 *n*-ヘキサンと酢酸エチル混合液を用いて 3 度目の展開を行った。その結果、*n*-ヘキサンと酢酸エチル混合液 (99:1) 画分において促進物質を回収した。これら 3 度のカラム精製により、最終的に 100 g の赤トウガラシ粉末から 2.4 g の物質を精製し、本精製物質 24  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上で STN のフィブリン分解が促進された (図 4C)。

この精製物について測定した NMR スペクトルを図 5 に示す。この解析の結果、シグナルは脂肪酸の特徴を有しており、赤トウガラシにも豊富に含まれるリノール酸が主要な物質であると同定した。

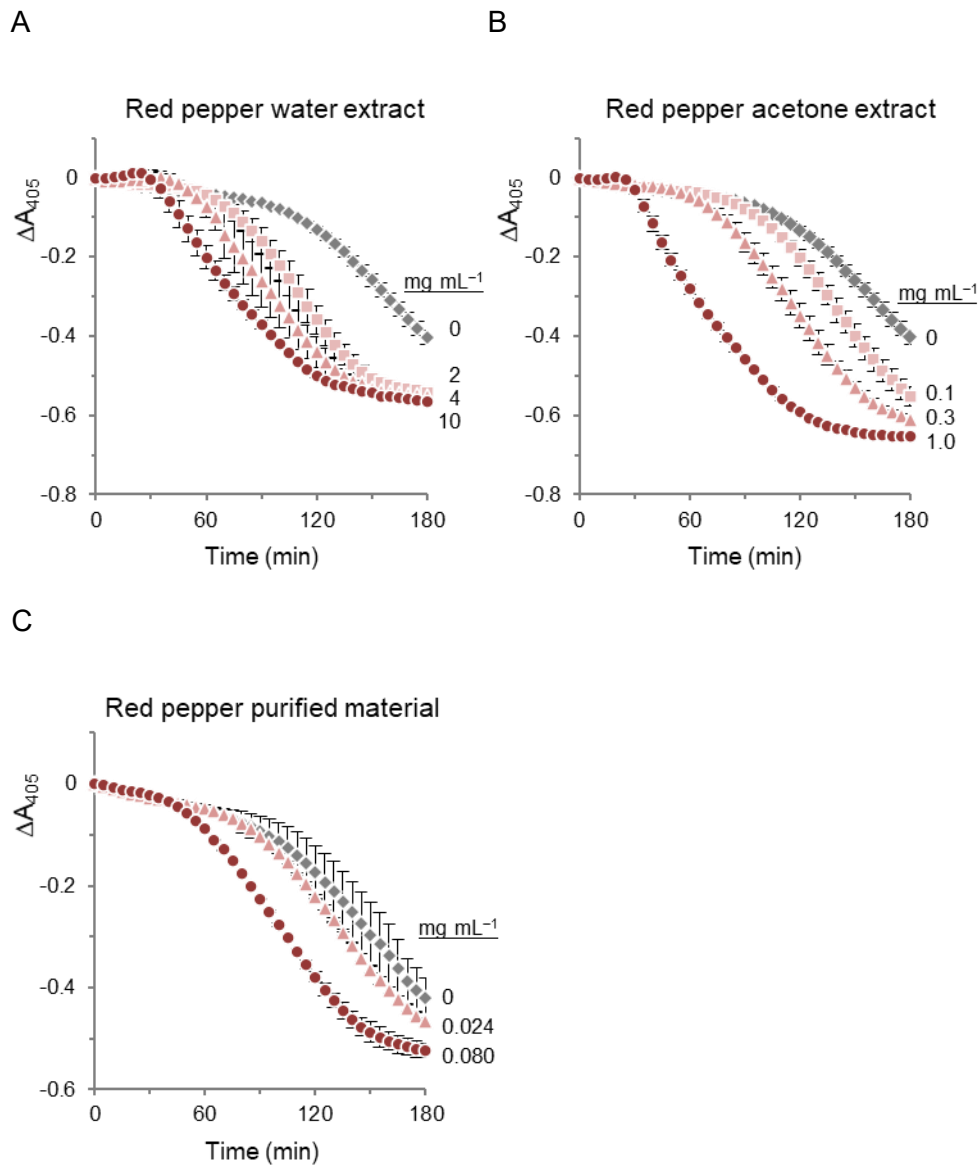


図 4 赤トウガラシ抽出物のフィブリン溶解活性

96 ウェルマイクロプレート法により経時的な吸光度変化をフィブリン溶解として評価した。赤トウガラシの水抽出物 (A), 赤トウガラシのアセトン抽出物 (B), 赤トウガラシの精製物 (C) を示す (n = 3、mean ± SD)。水抽出に比べアセトン抽出物は 10 倍以上の高い活性を有し、カラム精製によりさらに 10 倍以上の高活性物質を精製した。



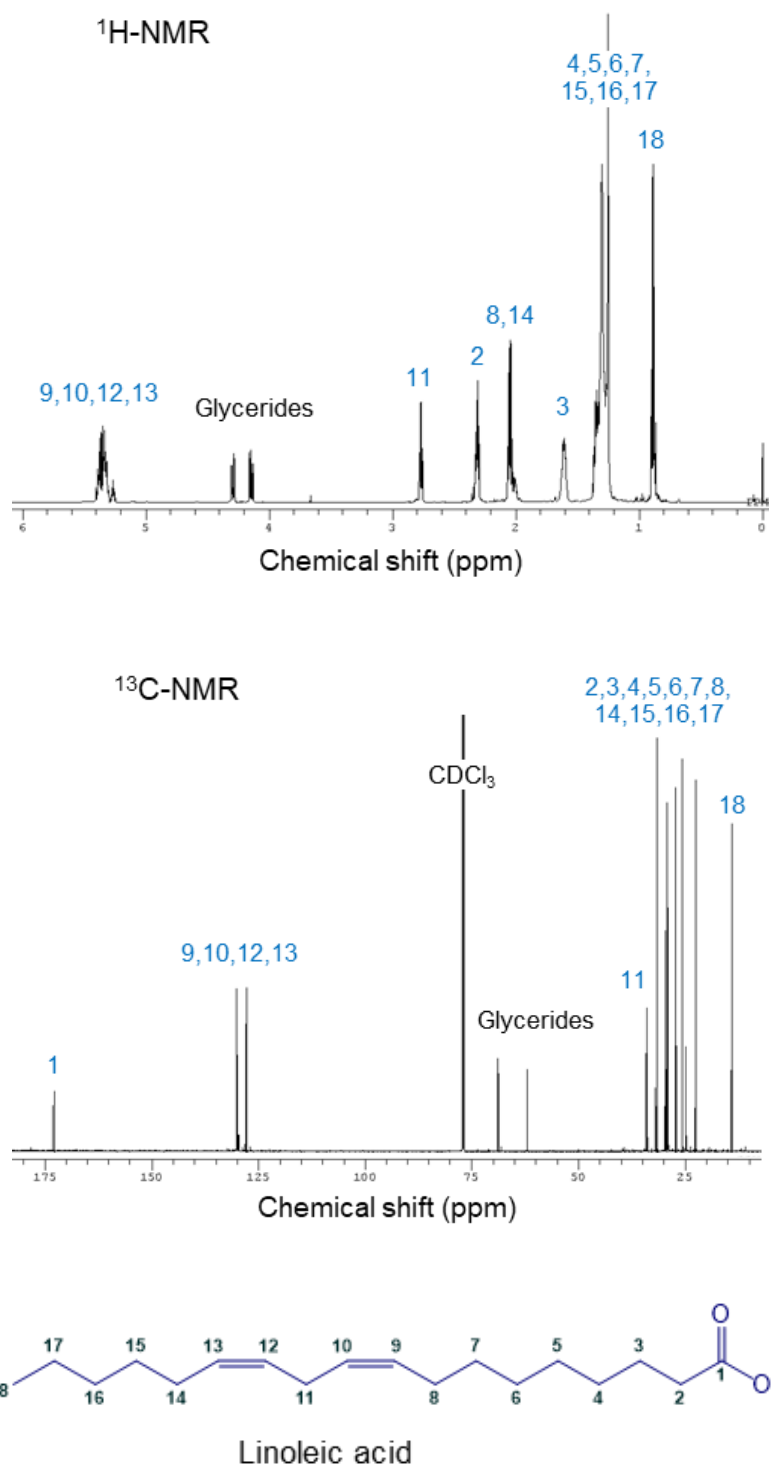


図 5 赤トウガラシ精製物の NMR スペクトル

カラム精製で得られた赤トウガラシ由来の精製物の NMR で測定した。上段に <sup>1</sup>H-NMR、中段に <sup>13</sup>C-NMR のスペクトルを示す。解析の結果、精製物の主成分はリノール酸（下段に構造式を示す）であると推定した。これは、赤トウガラシにも豊富に含まれる成分でもある。

### 2-3-3 リノール酸による基質分解活性の検証

20  $\mu\text{g/mL}$  以上のリノール酸を加えることで STN のフィブリン分解活性が促進することが、96 ウェルマイクロプレート試験によって示された(図 6A)。さらにリノール酸が STN の酵素活性に与える直接的な影響を、合成アミド基質 (Spectrozyme<sup>®</sup> TH) を用いて検証した。しかし、最大 40  $\mu\text{g/mL}$  のリノール酸を添加したにもかかわらず、合成アミド基質の分解には影響を及ぼさなかった(図 6B)。したがって、リノール酸が STN 本体の酵素活性を促進しないことが明らかとなった。すなわち、リノール酸による STN のフィブリン分解活性促進は、フィブリン(およびフィブリノーゲン)の構造変化により、酵素基質間の相互作用が変化することに起因することが示唆された。

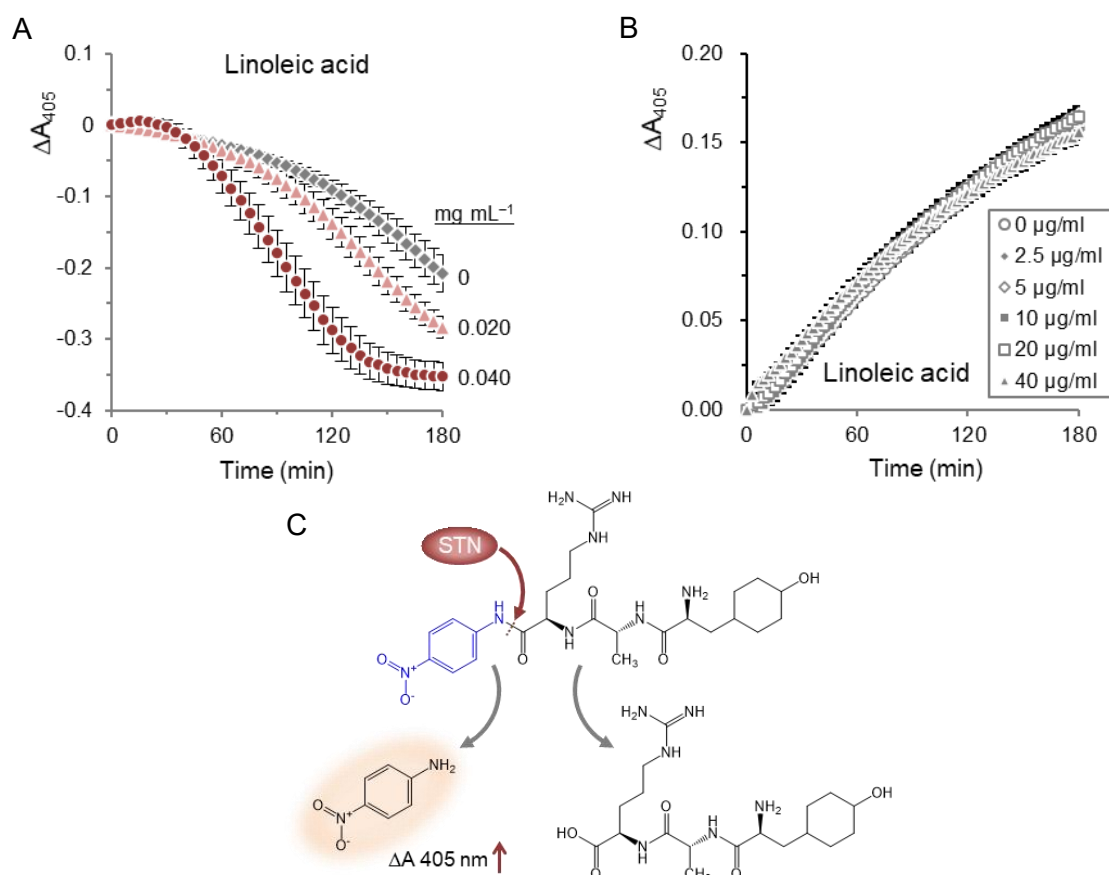


図 6 合成アミド基質を用いた酵素活性測定

(A) 96 ウェルマイクロプレート法にて STN (0.125 FU) へのリノール酸添加効果を評価し、0.02 mg/mL 以上の添加でフィブリン溶解が促進した。(n = 3、mean  $\pm$  SD)

(B) リノール酸を STN (25 FU/mL) に添加し、酵素活性について合成アミド基質を用いて測定した。このときの経時的な吸光度変化を示したが、リノール酸添加の影響は認められなかった。(n = 3、mean  $\pm$  SD)

(C) Spectrozyme<sup>®</sup> TH は、酵素により切断された *p*-nitroaniline を波長 405 nm で検出することができる。

#### 2-3-4 リノール酸によるフィブリンノーゲン分解活性の促進

さらに、フィブリンの前駆物質であるフィブリンノーゲンの分解も同様に促進する。フィブリンノーゲンは A $\alpha$  鎖、B $\beta$  鎖、 $\gamma$  鎖がそれぞれ 2 個ずつの計 6 個のサブユニットで構成される。STN は A $\alpha$  鎖に対して高感度であり、STN 処理により速やかに分解された。さらに 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のリノール酸を添加した際、A $\alpha$  鎖の分解速度に影響はなかったが、38.3、29.4、26.5 kDa の  $\alpha$  鎖断片の分解が遅くなった（図 7）。一方で、B $\beta$  鎖および  $\gamma$  鎖においては、53.4、50.7 kDa の両断片共に分解が促進することが明らかとなった。このことからリノール酸による STN のフィブリン分解活性の促進は、B $\beta$  鎖および  $\gamma$  鎖の分解が促進することに依存していると考えられる。

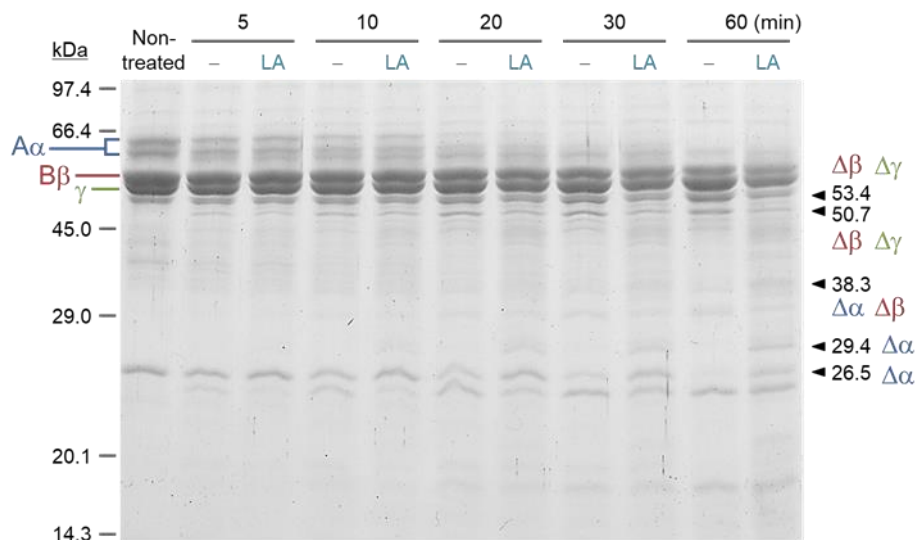


図 7 リノール酸のフィブリン溶解試験

リノール酸 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を STN に添加して得られたウシ由来フィブリンノーゲン分解物の経時変化を SDS-PAGE にて検証した。フィブリンノーゲンの構成タンパクとして、糖鎖付加の違いによる 2 型の A $\alpha$  鎖、B $\beta$  鎖、 $\gamma$  鎖を左端に示す。

右端の矢印はアミノ酸配列を解析した断片であり、大まかな分子量と断片の由来を  $\Delta\alpha$ 、 $\alpha$  鎖断片； $\Delta\beta$ 、 $\beta$  鎖断片； $\Delta\gamma$ 、 $\gamma$  鎖断片と示す。

### 2-3-5 脂肪酸と STN フィブリン分解活性の評価

脂肪酸の構造が STN のフィブリン分解活性促進に与える影響を、384 ウェルプレート法にて検証した (図 8)。まず、さまざまな不飽和脂肪酸は STN のフィブリン分解活性を上昇させた。ここではオレイン酸 [18:1( $\Delta$ 9)]、リシノール酸 [18:1( $\Delta$ 9)-12-OH]、リノール酸 [18:2( $\Delta$ 9,12)]、アラキドン酸 [20:4( $\Delta$ 5,8,11,14)]、エイコサペンタエン酸 [20:5( $\Delta$ 5,8,11,14,17)]、ドコサヘキサエン酸 [22:6[( $\Delta$ 4,7,10,13,16,19)]]において、その作用が明らかとなった。一方で炭素数 6 から 20 の飽和脂肪酸においては、影響が無いもしくは阻害的な作用を確認した。

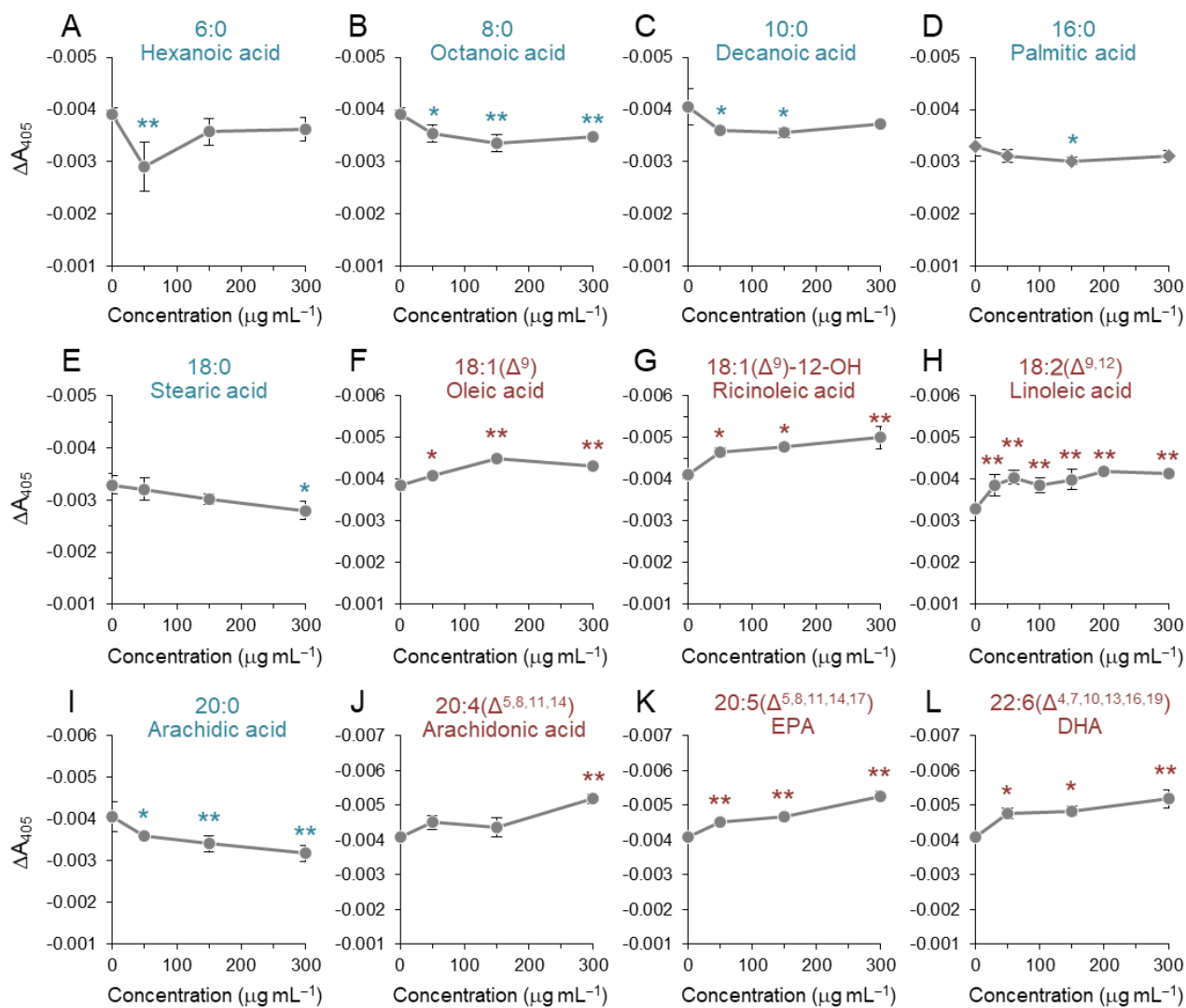


図 8 各種脂肪酸が STN のフィブリン溶解活性に与える影響

384 ウェルマイクロプレート法にて、さまざまな脂肪酸添加による STN のフィブリン溶解を測定した。不飽和脂肪酸 (F、G、H、J、K、L) は STN 活性の促進を示した。一方で、飽和脂肪酸 (A、B、C、D、E、I) では阻害効果が示された。

( $n = 3$ 、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 、\*  $p < 0.03$ 、\*\* $p < 0.01$ 、統計処理は Dunnett 法で行った)

(EPA, eicosapentaenoic acid ; DHA, docosahexaenoic acid)

## 第 4 節 考察

STN は血栓の主要成分であるフィブリンを分解することが知られており、これまでに STN の抗凝固能について報告されている<sup>31, 33, 34)</sup>。本研究において、リノール酸を含めさまざまな不飽和脂肪酸が STN のフィブリン分解活性を促進することを見出した (図 8)。さらに  $\omega$ -3 多価不飽和脂肪酸 (EPA、DHA) において  $\omega$ -9 一価不飽和脂肪酸 (オレイン酸)、 $\omega$ -3 二価不飽和脂肪酸 (リノール酸) と同等の促進効果であったことから、不飽和脂肪酸における不飽和度や不飽和結合の位置は影響しないことが示された。さらに、この促進効果は不飽和脂肪酸に限定され、鎖長の影響を受けず、さまざまな飽和脂肪酸において STN を介するフィブリン分解を抑制した。

不飽和脂肪酸が STN のフィブリン分解を促進するメカニズムは、フィブリンの構造的な変化が関与していると推察する。これまでに、脂肪酸がフィブリンの構造や、フィブリン分解における感受性に影響を及ぼすことが報告されている<sup>38, 39)</sup>。さらにオレイン酸やリノール酸などの長鎖不飽和脂肪酸が、プラスミンによるフィブリン分解を阻害する報告は、STN を用いた今回の結果と異なる<sup>38)</sup>。この違いは、プラスミン・プラスミノーゲンはリジン結合部位を有しており、フィブリン・フィブリンノーゲンの C 末端リジンに結合することで、コンホーメーション変化が起こり、効率的にプラスミノーゲンアクチベーターによる活性化を受ける。そのためリジン結合部位の結合阻害がフィブリン分解抑制に繋がる。これまでにオレイン酸によるプラスミンのフィブリン分解の低下、自己消化の促進が認められ、その要因としてリジン結合部位を含むクリングル 5 領域への脂肪酸の結合によるリジン結合部位の結合阻害が示唆されている<sup>40, 41, 42)</sup>。しかし STN はリジン結合部位を持たないため、オレイン酸によるリジン結合部位の結合阻害の影響を受けないためと考える。したがって、脂肪酸によるフィブリンの構造変化を伴う調節機構は、プロテアーゼの種類に依存して効果が異なる。加えて、プラスミンのフィブリン分解における飽和脂肪酸の影響はごくわずかである<sup>38)</sup>。

また、不飽和脂肪酸は STN のフィブリン・フィブリンノーゲンの分解を促進し、一方で飽和脂肪酸は阻害作用を示すことを明らかにした。これはフィブリン・フィブリンノーゲンの構造変化に伴い、STN による切断感受性が変化したものと考えられる。飽和脂肪酸が直線状の分子構造を持つのに対して、不飽和脂肪酸は二重結合の幾何学的性質により折れ曲がり構造をとる。そのため、この違いがフィブリン・フィブリンノーゲンに対する親和性や結合により生ずる構造変化に異なる影響を与え、STN による切断 (分子認識) に差異が生じたものと推察する。

不飽和脂肪酸を STN と併用して経口摂取することは可能であり、特に  $\omega$ -3 多価不飽和脂肪酸である EPA、DHA は、すでに血清脂質の改善作用または動脈硬化病変の進展を抑制する医薬品や、健康食品で利用されている<sup>43)</sup>。ほかの不飽和脂肪酸も食品中に広く含まれている成分であるため経口摂取における安全性も高いと考える。そのため、STN のフィブリン溶解活性を高めるため、不飽和脂肪酸との併用は健康食品に適した方法である。この知見を利用して、よりよい健康食品などの製品化への応用を期待する。

## 第 3 章 STN の血栓溶解メカニズムの検証

### 第 1 節 緒言

STN はヒトへの経口投与においても凝固線溶系への作用、降圧作用が示唆され、心血管疾患への応用も検討されている。これまでに *in vitro* 研究により STN のプロテアーゼ活性が一因であると考えられている。しかし、生体内における作用機序の詳細は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、マウスを用いた *in vivo* 血栓溶解作用の解析を行った。

### 第 2 節 方法

#### 3-2-1 肺塞栓モデルマウスの作製

ヒト血漿 360 mL、トロンビン水溶液 (500 U/mL) 720  $\mu$ L、CaCl<sub>2</sub> 水溶液 (440 mM) 40 mL を混合し、37°C で 1 時間静置した。血漿がゲル化したことを確認し、10 mL の生理食塩水で 3 回洗浄した。-80°C で 1 時間凍結した後、乳鉢と乳棒で粗粉碎し、生理食塩水を加えてホモジナイザーで 100  $\mu$ m 程度まで粉碎した。その後、遠心沈殿物を 40 mL の生理食塩水に懸濁し、ヒト血漿由来微小凝血塊懸濁液とした。7 週齢の雄マウス (Slc: ICR、三協ラボサービス社) に凝血塊懸濁液を 4 mL/kg となるよう尾静脈内投与し、30 分間開放して肺塞栓モデルマウスとした。なお、本章における動物実験は東京農工大学動物実験小委員会および同学学長の審査、承認を受けて実施した (承認番号: 第 29-75 号)。

#### 3-2-2 *in vivo* 塞栓溶解試験

肺塞栓モデルマウスの尾静脈内に検体を急速投与した。検体は生理食塩水 1 mL あたり 30 mg の STN を溶解した STN 溶液 (750 FU/mL : 30 mg/mL)、これに PMSF (1 mM) を加えプロテアーゼ活性を不活化したのちに、透析膜で余剰な PMSF を透析除去した不活化 STN、PMSF を添加しない対照試験とした透析処理 STN を事前に調製した。STN 溶液は 7500 FU/kg (300 mg/mL)、各透析処理検体は STN として 300 mg/mL を投与量とした。なお、透析処理により溶液体積がわずかに増加したため、処理後の溶液体積増加率から STN 濃度を算出した。また陽性対照として、t-PA (1 mg/mL) を 15 mg/kg で用いた。さらにプラスミン阻害剤であるアプロチニン (10000 KIU/mL) を添加した STN (750 FU/mL) 及び t-PA (1 mg/mL) も用い、それぞれ 7500 FU/kg、15 mg/kg を投与量とした。t-PA を 15 mg/kg (アプロチニン添加および非添加) 投与する際のみ、45 分間の間隔で半量ずつ 2 回に分けて投与し、他はす



べて1回で投与した。なお、t-PA およびアプロチニンの添加量は過去の報告例を参考とした<sup>44, 45)</sup>。1回目の投与から90分後に下大静脈より採血し、全血に対して1/9量の3.8%クエン酸緩衝液、1/100量のアプロチニン(100000 KIU/mL)を添加し、遠心上清(830×g、10分、4°C)を血漿として回収した。塞栓溶解の指標として、得られた血漿よりヒト特異的抗体を用いた免疫学的測定法(AlphaLISA<sup>®</sup> Human D-dimer Immunoassay kit、ロット:2470974、PerkinElmer社製)を用いてDダイマー量を定量した。Dダイマーはフィブリノゲンの分解産物である<sup>46)</sup>。フィブリノーゲンはA $\alpha$ 鎖、B $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖の3本鎖で構成されるポリペプチド鎖のN末端同士が結合したホモダイマーであり、N末端で構成される中央部(Eドメイン)とC末端側となる両端(Dドメイン)から成る。フィブリノーゲンはトロンビンおよび活性化凝固第XIII因子により架橋された多量体の安定化フィブリンを形成する。安定化フィブリンはプラスミンにより分解され、2つのDドメインを持つフィブリン分解産物であるD分画、Dダイマーとなる(図9)。

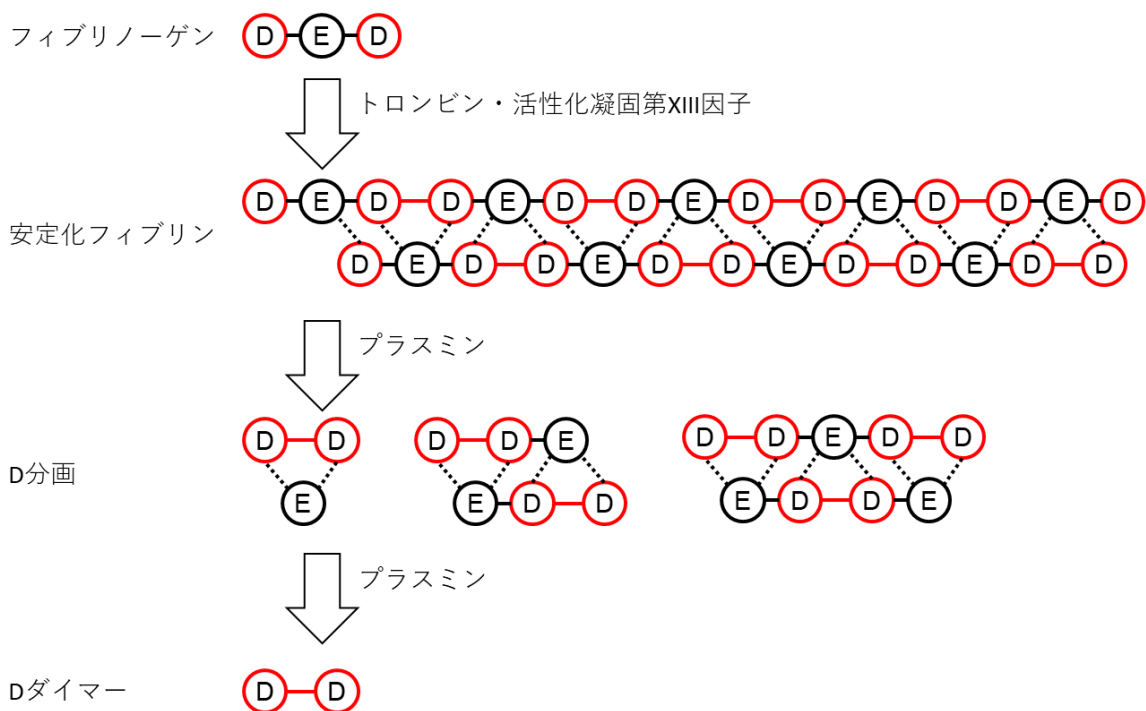


図9 Dダイマーの構造模式図

トロンビンおよび活性化凝固第XIII因子により、フィブリノーゲンから安定化フィブリンが形成される。安定化フィブリンをプラスミンが分解することで、さまざまなフィブリン分解物(D分画)が産生され、最終的に2個のDドメインで構成されるDダイマーとなる。

#### 3-2-4 タンパク質の分解様式評価

血漿およびプラスミノゲン溶液を検体として、先と同様に SDS-PAGE にてタンパク質の分離を行った。

#### 3-2-5 合成アミド基質分解試験

先と同様に合成アミド基質 Spectrozyme<sup>®</sup> TH を用いて酵素活性を測定した。すなわち、検体溶液に Spectrozyme<sup>®</sup> TH (0.1 mM) を加え、37°C での波長 405 nm における吸光度の経時変化を測定した。その変化量を酵素活性として評価した。なお、測定はいずれも 3 回以上実施した。

#### 3-2-6 フィブリンコートプレート試験

Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 で蛍光標識したヒト血漿由来フィブリンノーゲン (Invitrogen 社製) を 3.33 mg/mL になるよう炭酸水素ナトリウム溶液 (0.1 M、pH 8.3) に溶解し、未標識ヒト血漿由来フィブリンノーゲン (製品番号: 341578、Millipore 社製) は PBS(-) に 200 µg/mL となるよう溶解した。Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 標識フィブリンノーゲン溶液 50 µL、未標識フィブリンノーゲン溶液 10 mL を混合し、黒色、平底タイプの 96 ウェルマイクロプレートに 100 µL/well ずつ分注し、遮光して 37°C で 3 日間乾燥することでウェル内に固着させた。作製したプレートに PBS(-) に溶解したトロンビン (0.765 U/mL) を 75 µL/well 加え、遮光して 37°C で 3 時間静置した。0.01% tween 80<sup>®</sup> 含有 PBS(-) を 100 µL/well 加えて 2 回洗浄し、PBS(-) を 100 µL/well 加えて 1 回洗浄した。PBS(-) (アジ化ナトリウム 0.02% 添加) に 5 mg/mL となるよう溶解したブタ皮膚由来 1 型ゼラチン (ゲル強度約 300 Bloom、Sigma-Aldrich 社製) を 200 µL/well 加え、遮光して 37°C で 1 時間静置した。ゼラチン溶液を除去し、試験内容に応じて検体を 150 または 200 µL/well 加え、37°C での Alexa Fluor 647 蛍光強度 (励起波長 650 nm、蛍光波長 676 nm) の経時変化を測定した。ここではフィブリン分解とともに蛍光強度が上昇するが、これが横ばいになった時点を最大値として、測定開始から蛍光強度が最大値の半分に達するまでに要した時間 (50% 分解時間) をフィブリン分解活性とした。なお、測定はいずれも 3 回以上実施し、統計検定は Student's t-test 法を用いた。

### 3-2-7 フィブリンカラム試験

血液が絶えず流れる血管を簡易的に模倣し、*in vitro* 塞栓血管モデルとしてフィブリンを充填したカラムに送液する試験系を構築した。目的に応じて2種類の試験方法を実施した（図10）。

#### 3-2-7-1 第1法

HiTrap NHS-activated HP Columns（内容量1 mL、GE Healthcare社製）を使用し、平均粒子径34  $\mu\text{m}$ のビーズ状のアガロース担体に対してフィブリノーゲンをアミド結合によりカップリングした。まず、炭酸水素ナトリウム溶液（0.1 M、pH 8.3）に溶解したAlexa Fluor<sup>®</sup> 647 標識ヒト血漿由来フィブリノーゲン溶液（3.33 mg/mL）100  $\mu\text{L}$ と、生理食塩水に溶解した未標識ヒト血漿由来フィブリノーゲン溶液（1 mg/mL）900  $\mu\text{L}$ を混合し、製品マニュアルに従ってカップリングを行った。その後、カラムを解体し3 mLのTBS-T（アジ化ナトリウム0.02%添加）でビーズを回収し、フィブリノーゲンカップリングビーズとした。このビーズ20  $\mu\text{L}$ を、先端をピペットチップおよび脱脂綿を詰めたガラスキャピラリー（内径1 mm、外径1.5 mm、全長75 mm）に充填した。作製したフィブリノーゲンカラムをシリンジポンプおよびインジェクターに接続し、カラム部分はウォータージャケットで37°Cに保温した。TBS-Tを灌流しながらトロンビン（1 U/mL）を300  $\mu\text{L}$ インジェクションし、流速20  $\mu\text{L}/\text{min}$ で30分間、100  $\mu\text{L}/\text{min}$ で10分間灌流することでフィブリンを形成した。その後、試験溶液を送液した。このとき、カラム通過液を黒色、平底タイプの96ウェルマイクロプレートへ200  $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ回収し、含まれるフィブリン分解産物をAlexa Fluor<sup>®</sup> 647 蛍光強度として測定した。なお、測定はいずれも3回以上実施し、統計検定はStudent's t-test法を用いた。

#### 3-2-7-2 第2法

第1法を改変し、あらかじめトロンビン処理を行ったフィブリンカップリングビーズをキャピラリーに充填するものとした。すなわち第1法と同様にHiTrap NHS-activated HP Columns（内容量1 mL、GE Healthcare社製）を使用し、ビーズ状のアガロース担体に対してフィブリノーゲンをカップリングした。その後、カラムをシリンジポンプに接続し、TBS-Tに溶解したトロンビン（1 U/mL）15 mL、さらに6 mLのTBS-Tをいずれも流速500  $\mu\text{L}/\text{min}$ で通過させた。トロンビン処理によりフィブリンに変換した後、カラムを解体し3 mLのTBS-T（アジ化ナトリウム0.02%添加）でビーズを回収し、フィブリンカップリングビーズとした。このビーズ10  $\mu\text{L}$ とビーズ状デキストラン担体（Sephadex<sup>®</sup> G-50、GE Healthcare社製）20  $\mu\text{L}$ を混合し、先端にピペット

チップおよび脱脂綿を詰めたキャピラリー（内径 1.5 mm、外径 2.5 mm、全長 110 mm）に充填した。作製したフィブリンカラムをシリンジポンプおよびインジェクターに接続し、カラム部分にヒータを接触させて試験装置とした。ウェルの面積、容積が通常の 1/2 に設計された白色、平底タイプの 96 ウェルマイクロプレート（PerkinElmer 社製）へ、シリンジポンプにより送液したカラムの通過液を 50  $\mu$ L/well ずつ回収した。そして、通過液に含まれるフィブリン分解産物を Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 蛍光強度として測定した。なお、測定はいずれも 3 回以上実施し、統計検定は Student's t-test 法を用いた。

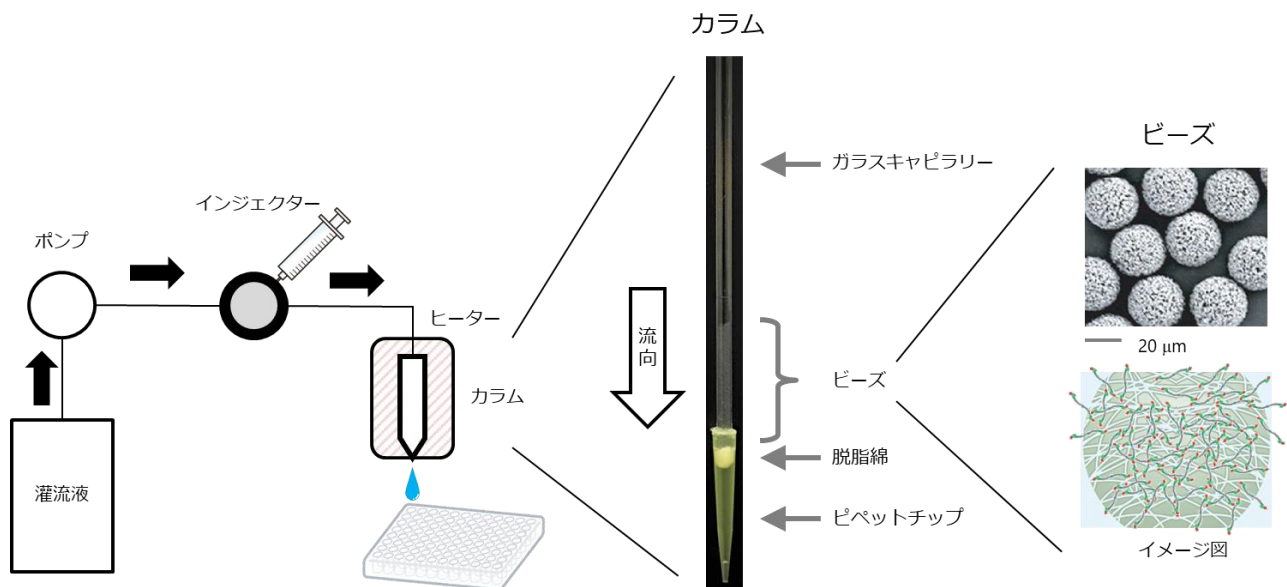


図 10 フィブリンカラム試験の概要図

(A) フィブリンカラム試験の全体概要。ポンプで送液された灌流液が、カラムを通過して流出する。この流出液を 96 ウェルマイクロプレートで回収し、フィブリンの溶出を Alexa fluor<sup>®</sup> 647 として検出した。

(B) 第 2 法で用いるフィブリンカラム画像。ピペットチップおよび脱脂綿で栓をしたガラスキャピラリーにフィブリンカップリングビーズを充填している。第 1 法においてもキャピラリーのサイズやビーズの量などが異なるが、同構造のカラムを使用した。

### 第 3 節 結果

#### 3-3-1 プロテアーゼ阻害剤による STN 活性の阻害

BSB に溶解した STN (25 FU/mL) に対して 1/99 量のプロテアーゼ阻害剤溶液を添加した。阻害剤はアプロチニン (最終濃度 100 KIU/mL)、フッ化フェニルメチルスルホニル (Phenylmethylsulfonyl fluoride : PMSF、同 1 mM)、対照としてジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide : DMSO) を用いた。その結果、PMSF は STN のプロテアーゼ活性を阻害したが (図 11)、アプロチニンは阻害効果を示さなかった。一方で *Bacillus licheniformis* が産生するセリンプロテアーゼである Subtilisin Carlsberg においては、PMSF およびアプロチニンによりプロテアーゼ活性が阻害される<sup>47, 48)</sup>。これらは、共に *Bacillus* 属由来のセリンプロテアーゼであるが、阻害剤により受ける影響の違いが明らかとなった。また、STN に対するアプロチニンと PMSF の阻害効果の違いを踏まえて、以降の *in vivo* 試験を実施した。

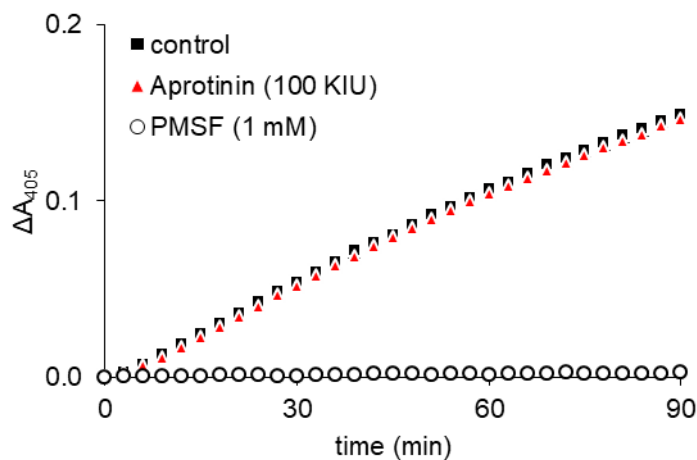


図 11 STN の活性阻害

各種阻害剤を添加した STN の酵素活性を、合成アミド基質 (Spectrozyme<sup>®</sup> TH) を用いて測定した。PMSF を添加により吸光度の変化が消失し、STN の不活化を示した。(n = 3、mean ± SD)

### 3-3-2 STN がマウス塞栓溶解に与える影響

肺塞栓モデルマウスに t-PA (15 mg/kg) を投与することで、塞栓が溶解したことを示す D ダイマーレベルが有意に上昇し、アプロチニン (100000 KIU/kg) を同時投与することで作用が打ち消された (図 12A)。これにより、線溶活性因子である t-PA、線溶阻害因子であるアプロチニンにおいて、いずれも期待する結果が得られたことから、塞栓溶解を評価する本試験系が妥当であることを確認した。次に STN を投与したところ、有意に D ダイマーレベルが上昇したことから、STN の塞栓溶解作用が示された。一方で、t-PA と同様にアプロチニンによってその作用は消失した。アプロチニンは STN の活性阻害作用は無いが (図 11)、プラスミンを中心とする内因性の線溶システムを阻害する。したがって、STN がフィブリンを直接的に分解する作用ではなく、プラスミンなどの内因性システムを介する間接的な作用が重要であることが示唆された (図 12C)。一方で PMSF 添加および透析により不活化処理した STN においても血栓溶解作用は示さなかった。したがって、SNT による塞栓溶解作用にはプロテアーゼ活性が必須であり、t-PA と同様に内因性システムに依存することが明らかとなった。なお、透析処理のみ実施した STN では有意な作用を確認した。なお、無処理の STN に比べて作用が小さくなったが、これは質量濃度を同一にしているものの、透析処理過程による部分的な STN 失活が生じた影響と推測する。

また、このときの血漿タンパクを SDS-PAGE により分離した (図 12B)。マウス血漿を TBS-T で 10 倍希釈し、1/3 量の非還元サンプルバッファーを加え、15  $\mu$ L/lane となるよう 7.5%ポリアクリルアミドゲルに供し、電気泳動、染色、脱色を行った。その結果、STN および STN とアプロチニンを同時投与したもので血漿タンパク、特に高分子画分が大きく分解されていることを確認した。これは、血中に豊富に含まれる 750 kDa の高分子タンパクである  $\alpha_2$ M<sup>49)</sup>であると推察する。一方で t-PA 投与群においては、わずかに分解されている程度であり、影響は限定的であった。

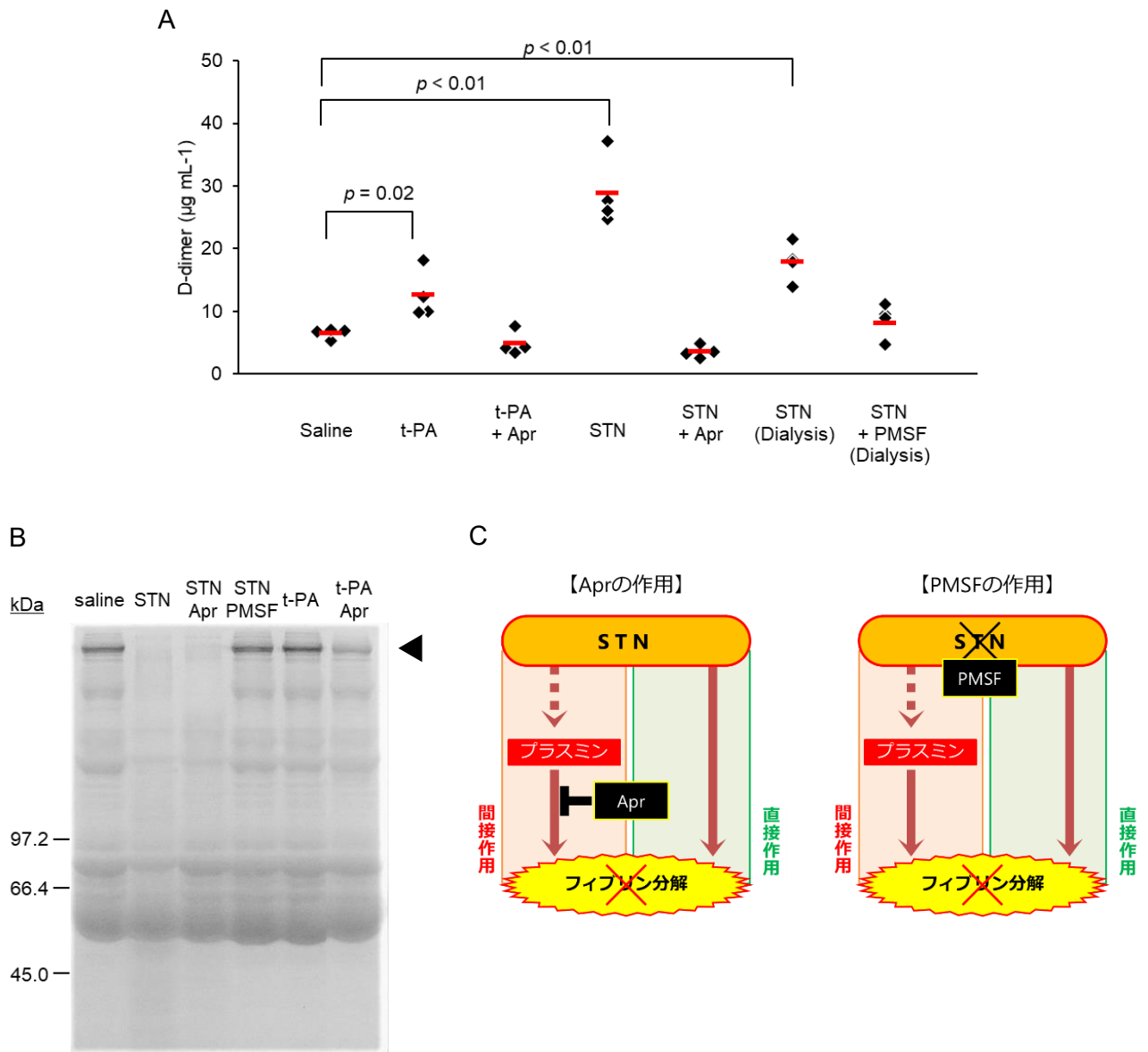


図 12 塞栓モデルマウスへ STN 投与試験

塞栓モデルマウスに対して Saline、t-PA (t-PA 15 mg/kg)、t-PA + Apr (t-PA 15 mg/kg とアプロチニン 100000 KIU/kg)、STN (STN 7500 FU/kg)、STN + Apr (STN 7500 FU/kg とアプロチニン 100000 KIU/kg)、STN (Dialysis) (透析処理 STN)、STN + PMSF (Dialysis) (PMSF 処理後に透析処理した STN) を投与した。

(A) 塞栓モデルマウスの血漿中の D ダイマーレベルであり、t-PA、STN、STN (Dialysis) において、有意な増加を示した。(◆, 個々の数値; —, 平均値、統計処理は Dunnett 法で行った。)

(B) 塞栓モデルマウスの血漿タンパク質を SDS-PAGE により分離した。STN、STN Apr において高分子タンパクが分解された (◀)。

(C) 各阻害因子の作用模式図

### 3-3-3 STN 処理血漿のフィブリン分解作用の変化

STN をヒト血漿に添加した際の、タンパク分解およびプロテアーゼ活性を評価した。まず TBS-T で 10 倍希釈したヒト血漿に任意濃度の STN を添加し、37°C で 30 分間処理した。SDS-PAGE によるタンパク質分離のため、処理液の 1/3 量の非還元サンプルバッファーを加え、15  $\mu\text{L}/\text{lane}$  となるよう 7.5% ポリアクリルアミドに供し、電気泳動、染色および脱色を行った。その結果、STN 0.25 FU/mL でも僅かに高分子画分の分解が認められ、0.50 FU/mL、1.0 FU/mL と高濃度になるにつれ分解が進む様子であった (図 13A)。高分子タンパクの分解が進む点においては、STN を投与したマウス血漿と同様の傾向である。一方で 1.5 FU/mL は 1.0 FU/mL と比べて大きな差は認められなかった。

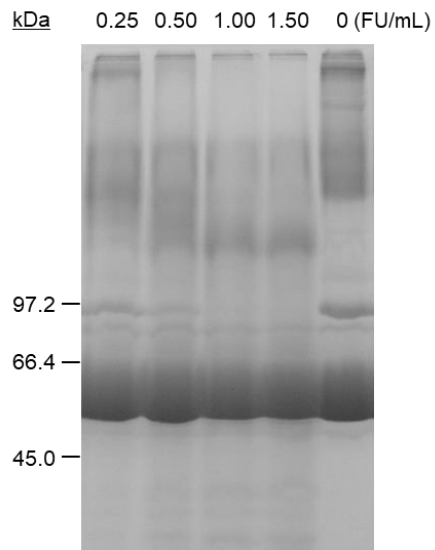
次に、処理液を用いて Spectrozyme<sup>®</sup> TH による合成アミド基質分解試験を行い、直線的に吸光度が上昇する測定開始から 7 分間までの近似直線の傾きを算出し、酵素活性とした。これにより活性中和点は 0.5 FU/mL から 1.0 FU/mL の間と推定した (図 13B)。

そこで血漿タンパクの一部分解が生じ、かつ酵素活性中和濃度である STN 0.375 FU/mL を加え、37°C で 30 分間処理した 10 倍希釈ヒト血漿を用意した。この血漿に scu-PA または t-PA を添加してフィブリンコートプレート試験を行い、プラスミノゲンアクチベーターに及ぼす影響を評価した。ここでは、蛍光強度の上昇が横ばいとなる測定 240 分時点の蛍光強度を基準 (100%) として、その 50% 蛍光強度に到達するまでに時間をフィブリン溶解活性とした。その結果、scu-PA、t-PA のいずれにおいても添加濃度に依存してフィブリン溶解が促進した (図 14A)。しかし、t-PA 0.03 nM および 0.06 nM 添加時に STN 処理による有意な時間の延長、すなわち活性低下が生じたが、全体としては STN 処理による影響は認められない傾向であった。

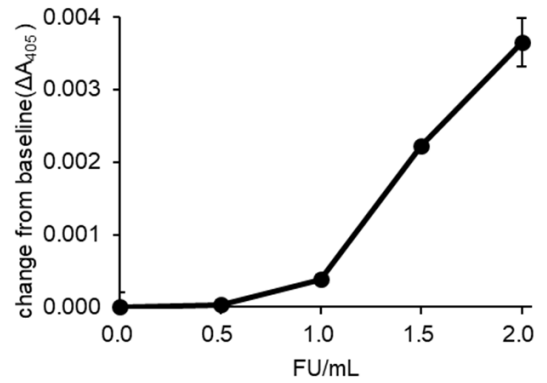
ここで、STN を投与したマウス血漿のフィブリン分解能を検討した。リタイヤ雄マウス (Slc: ICR、三協ラボサービス社) に STN (7500 FU/10 mL/kg) または生理食塩水 (10 mL/kg) を尾静脈内投与し、60 分後に下大静脈より採血し、全血に対して 1/9 量の 3.8% クエン酸緩衝液を添加し、遠心上清 (830  $\times$ g、10 分、4°C) を血漿として回収した。得られたマウス血漿を TBS-T にて 10 倍希釈し、t-PA (最終濃度 0.1 nM) または scu-PA (同 1 nM) を添加してフィブリンコートプレート試験を行った。上昇が横ばいとなる測定 240 分時点の蛍光強度を基準として、その 50% 蛍光強度に到達するまでに時間をフィブリン溶解活性とした。その結果、t-PA (図 14B)、scu-PA (図 14C) とともに溶解活性が低下しており、血漿中のフィブリン溶解活性と体内で生じている活性の相違があることが示唆された。



A



B



### 図 13 ヒト血漿の STN 処理

(A) 各濃度の STN を添加した 10 倍希釈ヒト血漿タンパクを SDS-PAGE にて分離した。0.25 FU/mL 以上で高分子を中心とした分解が生じた。

(B) 各濃度の STN を添加した 10 倍希釈ヒト血漿の酵素活性を合成アミド基質 (Spectrozyme<sup>®</sup> TH) にて測定した。STN 1.0 FU/mL より酵素活性が残存していることが示唆された。

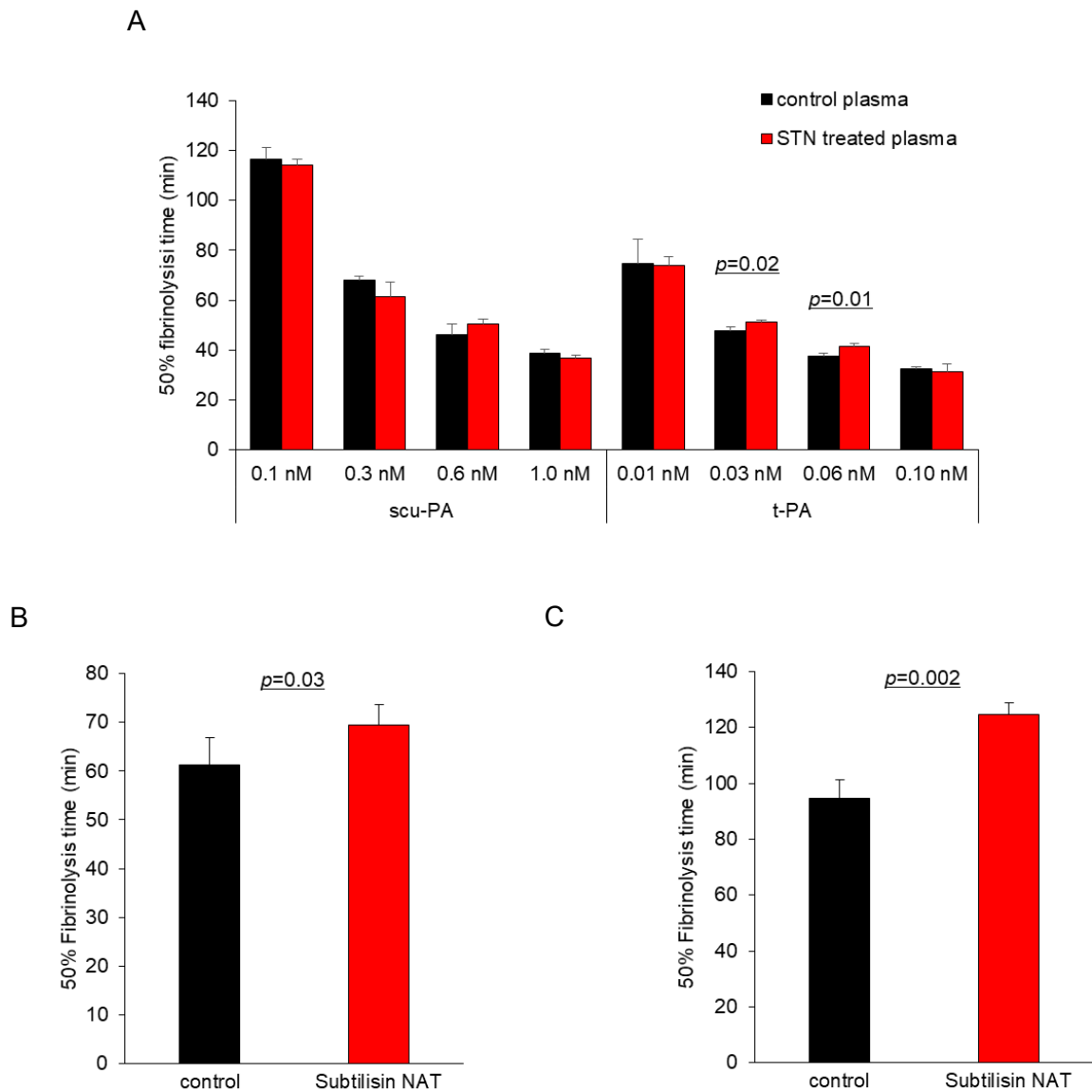


図 14 血漿の線溶活性効果

フィブリンコートプレート法にてフィブリン分解活性を評価した。

(A) STN 処理したヒト血漿に scu-PA または t-PA を添加した時のフィブリン分解活性を評価した。いずれにおいても、STN 処理による促進効果は見出せなかった。

(n = 3、mean ± SD、統計処理は Student's t-test 法で行った)

(B、C) PA を添加した STN 投与マウス血漿のフィブリン分解活性を評価した。(B) t-PA を添加し、各群 5 匹ずつをそれぞれ分析した。(n = 5、mean ± SD、統計処理は Student's t-test 法で行った。) (C) scu-PA を添加し、各群 5 匹の混合血漿を分析した。(n = 3、mean ± SD、統計処理は Student's t-test 法で行った)

### 3-3-4 STN における高感受性型プラスミノーゲンへの変換の検証

プラスミノーゲンは N 末端を部分分解することで、PA による活性化を受けやすい Lys 型プラスミノーゲンとなり、線溶系が促進する<sup>50)</sup>。そこで STN によるプラスミノーゲン分解産物の検証を行った。プラスミノーゲン（最終濃度：0.3 mg/mL）と STN（最終濃度：0.75、1.5 FU/mL）を 37°C で最大 120 分間処理した。処理液の 1/3 量の還元サンプルバッファーを加え、10  $\mu$ L/lane となるよう 7.5%ポリアクリルアミドに供し、電気泳動および染色、脱色を行った。その結果、STN の活性および処理時間に依存してプラスミノーゲンの分解が生じた（図 15）。しかし、85 kDa である Lys 型プラスミノーゲンは確認できず、45 kDa 以下まで分解された。また、STN は PA としてプラスミノーゲンを活性化しないことも報告されている<sup>14)</sup>。したがって、STN はプラスミノーゲンの活性に影響を与えないと考える。

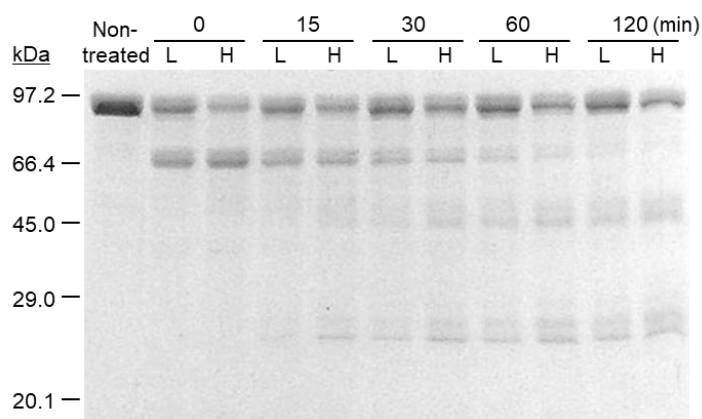


図 15 STN によるプラスミノーゲン分解試験

STN により分解したプラスミノーゲン断片を SDS-PAGE にて分離した。プラスミノーゲン（0.3 mg/mL）に STN（L, 0.75 FU/mL ; H, 1.5 FU/mL）を加え 120 分までの経時的な断片変化を評価した。

### 3-3-5 STNによるフィブリン部分分解とPA反応性の検証

プラスミノーゲンはリジン結合部位を介して部分分解によって露出したフィブリンのC末端リジンに結合することで、フィブリンとの親和性が高まり、局在的に線溶が活性化する<sup>51)</sup>。また、生体内の血管では、常に血液が灌流している。そこで、STNによるフィブリンの部分分解が線溶系に与える影響を、より生体を模倣した条件で検証するため、灌流が可能なフィブリンカラム試験（第1法）を行った。まずTBS-Tで10倍希釈したヒト血漿（あらかじめ15500×g、20分、4°Cで不溶物を遠心分離した）を流速100 μL/minで6分間送液した後にSTN（0.75 FU/mL）を100 μLインジェクションし、10分間送液することでフィブリンを部分分解した。その後、t-PA（600 nM）またはscu-PA（100 nM）を100 μLインジェクションし、流速20 μL/minで40分間送液した。ここでは200 μL/wellを1フラクションとして回収し、STNインジェクション前の3フラクションの平均値を基準とし、各フラクションの変化量を示した。その結果、フィブリン分解はSTNのインジェクション後に一時的に上昇し（フラクション5）、t-PAおよびscu-PAにより再度上昇した（フラクション9から12）（図16A、C）。各PAによるフィブリン分解量をフラクション9から12の合計としたとき、STNによってt-PA活性は有意に低下した（図16B）。一方で、scu-PAではSTNによる影響は見られなかった（図16D）。このことより、STNのフィブリン部分分解によるPAを介した線溶活性は生じず、予想に反してt-PAにおいては活性が下がることが明らかとなった。

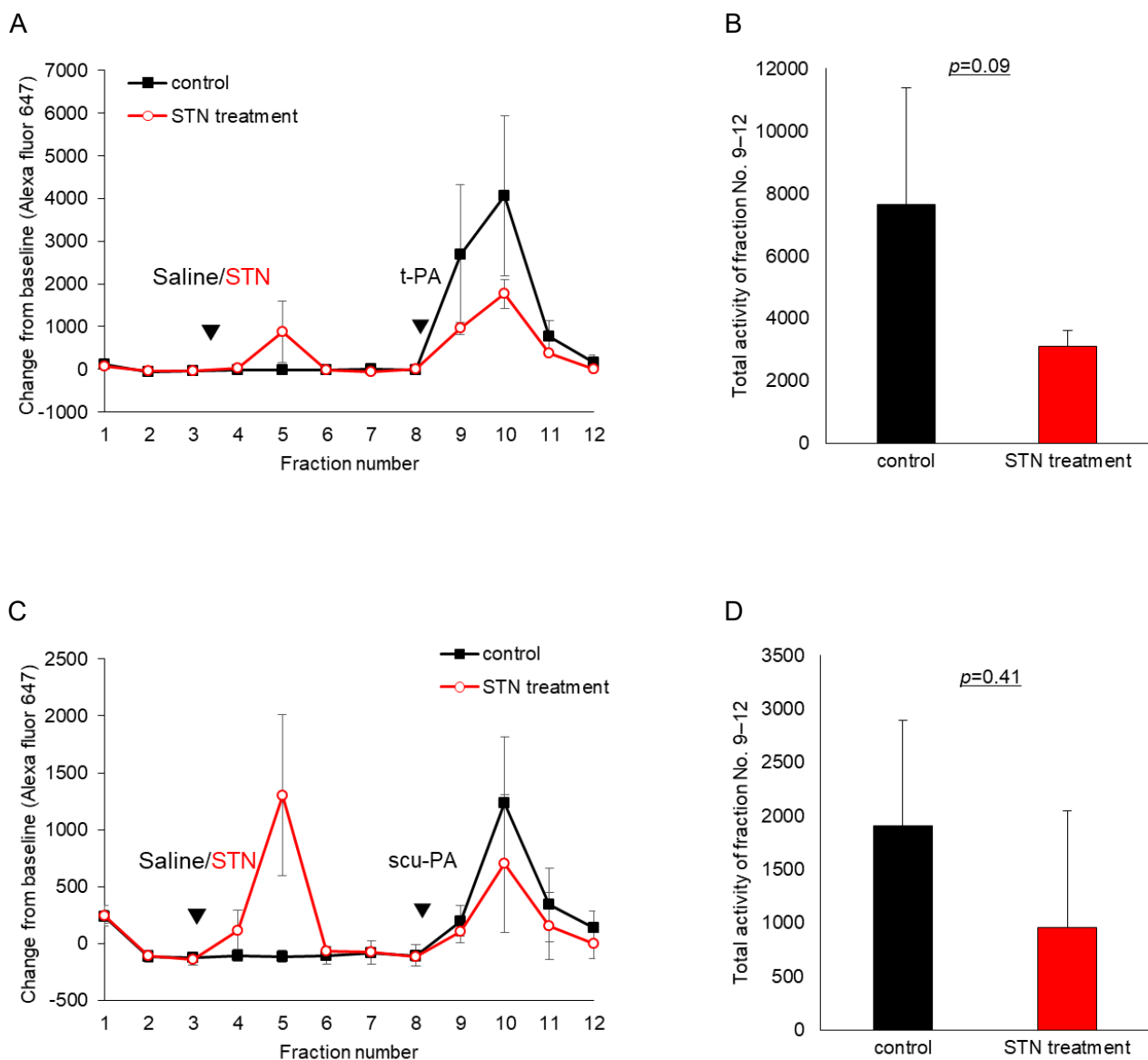


図 16 STN によるフィブリン部分分解試験

STN によりフィブリンを一部分解した後に、PA を添加したときのフィブリン分解をフィブリンカラム試験（第 1 法）にて評価した。（A、C）フラクシオン 3 の回収直後に STN をインジェクションし、フラクシオン 8 の回収直後に（A）t-PA および（C）scu-PA をインジェクションした。いずれもインジェクション直後にフィブリン分解の指標となる Alexa fluor 647 蛍光強度が上昇した。（B）t-PA または（D）scu-PA インジェクションの影響をフラクシオン 9 から 12 の合計で評価した。（n = 3、mean ± SD、統計処理は Student's t-test 法で行った。）

### 3-3-6 STN 処理血漿における PA のフィブリン分解

STN を静脈投与したマウスにおいて、血漿タンパクの分解が生じる。これを再現するため、STN により分解した血漿を用いて、灌流可能なフィブリンカラム試験（第 2 法）を行った。まず TBS-T で 10 倍希釈したヒト血漿（あらかじめ 15500 ×g、20 分、4°C で不溶物を遠心分離した）に STN を添加し（最終濃度 0.5 FU/mL）、37°C で 30 分間処理した。ここで STN により血漿タンパクが分解され、なおかつ STN 活性が血漿由来のプロテアーゼ阻害因子により中和された STN 処理血漿を得た。この STN 処理血漿を流速 25 μL/min で 6 分間送液した後、t-PA (600 nM) を 100 μL インジェクションし、40 分間送液した。ここでは 50 μL/well を 1 フラクションとして回収し、t-PA インジェクション前の 3 フラクションの平均値を基準として、各フラクションの変化量を示した。その結果、フィブリン分解は t-PA のインジェクション後に上昇した（フラクション 8 から 19）（図 17A、B）。しかし、STN 処理による影響は確認できなかった。

同様に、10 倍希釈ヒト血漿を STN 処理（最終濃度 0.5 FU/mL）した血漿を灌流させて、scu-PA (100 nM) を 100 μL インジェクションした。このときフラクション 2 から 9 の近似曲線を基準として、各フラクションの変化量を示した。このとき、t-PA と同様に scu-PA インジェクション後にフィブリン分解が上昇した（フラクション 10 から 20）（図 17C）。フィブリン分解量をフラクション 10 から 20 の合計としたとき、STN 処理によってフィブリン分解が有意に上昇した（図 17D）。したがって、灌流試験において、STN で処理した血漿により scu-PA を介したフィブリン分解が促進することが明らかとなった。一方で t-PA の作用には影響を及ぼさなかった。このことから、STN を含む血漿が灌流している条件において、scu-PA のフィブリン分解作用を高めることが示された。このとき STN は血漿の一部タンパク分解するが、活性は中和される濃度であった。

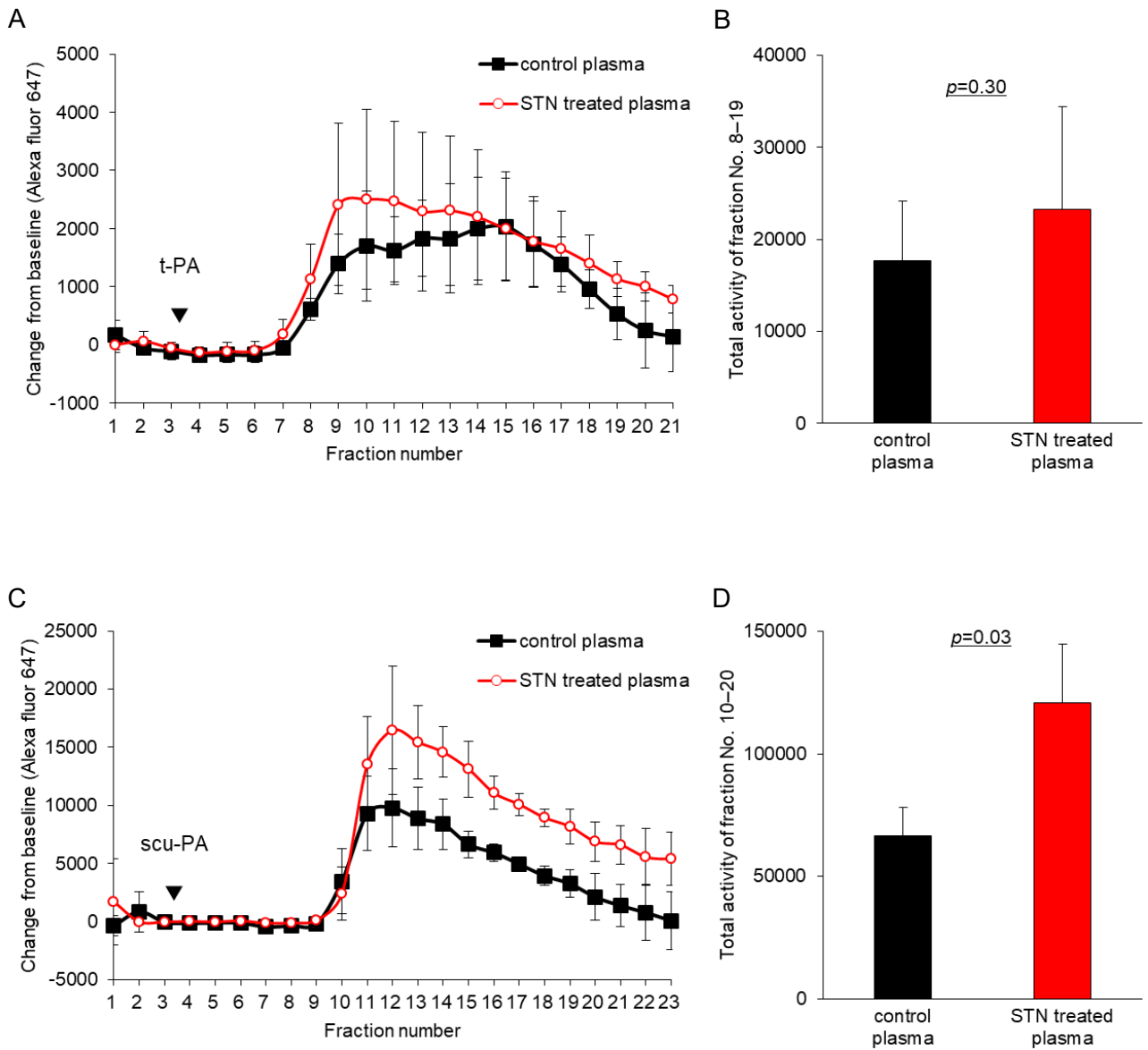


図 17 STN 処理した血漿によるフィブリン分解試験

STN 処理した血漿に PA を添加したときのフィブリン分解についてフィブリンカラム試験（第 2 法）にて評価した。（A、C）フラクシオン 3 の回収直後に（A）t-PA および（C）scu-PA をインジェクションした。いずれもインジェクション後にフィブリン分解の指標となる Alexa fluor 647 蛍光強度が上昇した。（B）t-PA または（D）scu-PA インジェクションの影響をそれぞれフラクシオン 8 から 19、10 から 20 の合計で評価した。（ $n = 3$ 、 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 、統計処理は Student's t-test 法で行った。）

#### 第 4 節 考察

塞栓モデルマウスへの尾静脈投与により血中 D ダイマーレベルが上昇し、STN の塞栓溶解作用が示された。さらにアプロチニンとの併用、または不活化した STN ではこの作用が消失した。したがって、塞栓溶解において STN のプロテアーゼ活性および内因性の線溶系が必須であることが明らかとなった。これまで、さまざまな塞栓モデル動物への投与試験により STN の塞栓溶解効果が示されてきた<sup>23, 24)</sup>。そして、これらはフィブリン分解酵素である STN の酵素活性により、直接的に塞栓 (フィブリン) が分解されることに起因すると考えられてきた。しかし、この結果は、プロテアーゼ活性を介して内因性の線溶系に依存することを示唆する。

そこで塞栓の周辺環境である血液中に STN が与える影響を検証した。まず STN 投与マウスの血漿タンパクの一部が分解されており、STN 添加ヒト血漿においても同様の分解が確認できた。しかし、フィブリンコートプレート試験において、STN 処理ヒト血漿ではフィブリン分解が概ね変化がないが、一部で低下する場合があった。さらに、STN 投与マウス血漿においては有意にフィブリン分解が遅延した。ここで、血漿中に存在する PAI-1 は、STN により分解され不活化する PA の重要な阻害因子である<sup>17)</sup>。また、広くプロテアーゼを阻害する  $\alpha_2$ M は STN との複合体を形成する<sup>21)</sup>。血中には  $\alpha_2$ M が多量に存在する (血清中 2~3 mg/mL 程度<sup>52)</sup>)。血中に取り込まれた STN は速やかに  $\alpha_2$ M により不活化すると推測する。このとき  $\alpha_2$ M は STN と 1:2 の非共有結合複合体を形成して  $\alpha_2$ M 自身も不活化するため、血中の活性型  $\alpha_2$ M が減少することになる。 $\alpha_2$ M の特異性は広く、プラスミンを含む凝固線溶系プロテアーゼも不活化するため<sup>53)</sup>、活性型  $\alpha_2$ M の減少により結果的に線溶が促進される可能性がある。すなわち、STN 自身が  $\alpha_2$ M により不活化されることで、これが身代わりとなりプラスミンなどの線溶活性が促進すると考える。そのため STN 処理した血漿においては PA やプラスミンの活性に影響を及ぼし、プロテアーゼ阻害抑制による線溶活性化を期待したが、これと異なる結果であった。一方で、このように多くの血漿タンパクが分解されているにもかかわらず、大きくとも 30% 程度のフィブリン分解能の減少であり凝固線溶の均衡が一定水準で維持されている点は意外であった。ここで、フィブリン分解能の低下原因の 1 つとしては、STN のプラスミノゲン分解が関与している可能性がある。プラスミノゲンは N 末端の Lys76-Lys77 が切断されることで PA による活性化作用を受けやすくなる。しかし、STN はプラスミノゲンの線溶活性に繋がる構造変化は生じず、低分子にまで分解するため本来の機能を喪失させることが想定できる。すなわち、STN 処理または STN



投与血漿中のプラスミノーゲンは STN 活性により低分子化され、線溶活性が低下した可能性がある。しかし、これらはいずれも線溶活性とは異なる内容であり、塞栓モデルマウスを用いた生体試験の結果と全く異なる。

ここで、フィブリンコートプレート試験と生体血管の大きな違いの 1 つとして、前者は閉鎖系であるのに対し、後者は常に新しい血液が供給排出されることに着目した。この血液循環を再現するため、閉塞血管を模したフィブリンカラムに血漿を通過させる実験系を用いた。t-PA やプラスミノーゲンはリジン結合部位を介して、部分分解を受けたフィブリンの C 末端リジン残基に結合する<sup>5, 6, 51)</sup>。そこで、STN によりフィブリンを部分分解した後に t-PA または scu-PA をインジェクションしたが、有意差は認められなかった。次に、STN 処理ヒト血漿による t-PA の影響を検証したが、影響は見られなかった。一方で、scu-PA をインジェクションした際、血漿の STN 処理によりフィブリン分解が有意に増加することが確認できた。これは、閉鎖系の試験や t-PA においては見られない作用である。したがって、血栓灌流下に STN 処理血漿が供給される条件において scu-PA を介した線溶（プラスミノーゲンとのレシプロカル活性化）が増加すると解釈できる。

血漿が灌流することによる影響としてプラスミノーゲンや  $\alpha_2M$ 、 $\alpha_2$ -antiplasmin といった線溶因子、抗線溶因子が常に供給される環境で、フィブリンへのプラスミノーゲンの結合と scu-PA によるレシプロカル活性化に影響する因子の活性が STN により修飾を受けるものと推測する。本研究では、STN の酵素活性が内因性の線溶活性に大きな影響を及ぼしていることを新たに発見し、特に scu-PA が重要な役割を担っていることが示唆された。

一般に、血中に取り込まれたプロテアーゼは生体防御機構 ( $\alpha_2M$  など) により速やかに不活化するため、血中に入った瞬間が STN 活性の働くタイミングと場所であると考えられる。したがって、STN の生理的作用は血中移行した際に局所的に血漿タンパクを部分分解することにより生ずるものと考えられる。そこで部分分解を受けた因子が循環して生理作用を及ぼすものと推測する。このため、これまでに知られている抗凝固や血圧降下などの STN の生理作用においても、血中フィブリンノーゲンやキニノーゲンなどが短時間で局所的に STN により部分分解されることに起因する可能性もある。詳細な機序は明らかではないが、STN の腸管吸収に関する証拠もあることから<sup>19, 23)</sup>、STN と同時に摂取した不飽和脂肪酸も共に血中に移行する可能性がある。その場においては STN と同時に存在する不飽和脂肪酸によりフィブリンノーゲンを効率よく部分分解することが可能となる (第 2 章)。部分分解を受けたフィブリンノーゲンは凝固に必須な N 末端配列を失い、これが結果的に凝固塊の成長 (線溶抵抗性となる) を抑えるため、間接的に生理的線溶を促進できるも

のと推測する。

今後の STN の効果的利用法の開発につながることを期待する。

## 謝辞

本研究の機会を与えていただき、ご多忙の中、多大なるご指導を賜りました東京農工大学大学院 連合農学研究科 応用生命科学専攻 蓮見恵司教授に深く感謝いたします。また、多くのご助言を賜りました東京農工大学 鈴木絵里子 講師、茨城大学 上妻由章 教授に心より感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、タンパク質同定のご指導を賜りました東京医科歯科大学リサーチコアセンター 細谷祥一先生に御礼申し上げます。また、赤トウガラシに含まれる STN 活性促進物質の抽出、同定など、多くの実験において、多大な協力をいただきました卒業生の鈴木麻衣子氏に感謝いたします。また、研究活動および学生生活を行う上で、さまざまなご協力をいただきました同研究室の卒業生、在校生の皆様に感謝いたします。

また、在職中にもかかわらず、社会人博士課程への挑戦の機会をいただき、多くのご支援、ご協力を賜りましたオルガノフードテック株式会社代表取締役社長 阿部直人氏、山口良一氏、また業務面でご配慮いただきました営業部並びに同社の皆様に心より御礼申し上げます。

最後に、大学院生活に理解を示し、3年間支えてくれた妻に感謝いたします。

## 参考文献

1. Chapin, J. C., & Hajjar, K. A. (2015). Fibrinolysis and the Control of Blood Coagulation. *Blood Reviews*, 29(1), 17–24.
2. Collen, D., & Lijnen, H. R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood*, 78(12), 3114–3124.
3. Göbel, K., Eichler, S., Wiendl, H., Chavakis, T., Kleinschnitz, C., & Meuth, S. G. (2018). The coagulation factors fibrinogen, thrombin, and factor XII in Inflammatory Disorders-A Systematic review. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–14.
- 4 平成 30 年 人口動態調査 死因順位別にみた年次別死亡率（人口 10 万対）
- 5 Hoylaerts, M., Rijken, D. C., Lijnen, H. R., & Collen, D. (1982). Kinetics of the Activation of Plasminogen by Human Tissue Plasminogen Activator. Role of Fibrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(6), 2912–2919.
- 6 Stewart, R. J., Fredenburgh, J. C., Leslie, B. A., Keyt, B. A., Rischke, J. A. & Weitz, J. I. (2000). Identification of the Mechanism Responsible for the Increased Fibrin Specificity of TNK-Tissue Plasminogen Activator Relative to Tissue Plasminogen Activator. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(14), 10112–10120.
- 7 Kasai, S., Arimura, H., Nishida, M., & Suyama, T. (1985). Proteolytic Cleavage of Single-Chain Pro-Urokinase Induces Conformational Change Which Follows Activation of the Zymogen and Reduction of Its High Affinity for Fibrin. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(22), 12377–12381.
- 8 Keijer, J., Linders, M., van Zonneveld, A. J., Ehrlich, H. J., de Boer, J. P., & Pannekoek, H. (1991). The interaction of plasminogen activator inhibitor 1 with plasminogen activators (tissue-type and urokinase-type) and fibrin: localization of interaction sites and physiologic relevance *Blood*, 78(2), 401–409.
- 9 日本脳卒中学会（2019）. 静注血栓溶解（rt-PA）療法適正治療方針第三版
- 10 Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., & Muraki, H. (1987). A

- novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia*, 43, 1110–1111.
- 11 須見洋行 (1990). 納豆の機能性. *日本醸造協会誌*, 85 (8), 518–524.
  - 12 Nakamura, T., Yamagata, Y., & Ichishima, E. (1992). Nucleotide Sequence of the Subtilisin NAT Gene, *aprN*, of *Bacillus subtilis* (natto). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(11), 1869–1871.
  - 13 Fujita, M. Nomura, K. Hong, K., Ito, Y., Asada, A., & Nishimuro, S. (1993). Purification and Characterization of a Strong Fibrinolytic Enzyme (Nattokinase) in the Vegetable Cheese Natto, a Popular Soybean Fermented Food in Japan. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 197(3), 1340–1347.
  - 14 Fujita, M., Ito, Y., Hong, K., & Nishimuro, S. (1995). Characterization of Nattokinase-degraded Products from Human Fibrinogen or Cross-linked Fibrin. *Fibrinolysis*, 9, 157–164.
  - 15 須見 洋行, 馬場 健史, 岸本 憲明 (1996). 納豆中のプロウロキナーゼ活性化酵素と血栓溶解能. *日本食品科学工学会誌*, 43 (10), 1124–1127
  - 16 Yatagai, C., Maruyama, M., Kawahara, T., & Sumi, H. (2009). Nattokinase-Promoted Tissue Plasminogen Activator Release from Human Cells. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 36, 227–232
  - 17 Urano, T., Ihara, H., Umemura, K., Suzuki, Y., Oike, M., Akita, S., Tsukumoto, Y., Suzuki, I., & Takada, A. (2001). The Profibrinolytic Enzyme Subtilisin NAT Purified from *Bacillus subtilis* Cleaves and Inactivates Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), 24690–24696.
  - 18 Fujita, M., Hong, K., Ito, Y., Misawa, S., Takeuchi, N., Kariya, K., & Nishimuro, S. (1995). Transport of Nattokinase across the Rat Intestinal Tract. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(9), 1194–1196
  - 19 Ero, M., Ng, C., Mihailovski, T., Harvey, N., & Lewis, B. (2013). A pilot study on the serum pharmacokinetics of Nattokinase in humans following a single, oral, daily dose. *Alternative Therapies in Health and Medicine*, 19, 16–19.
  - 20 Rehman, A. A., Ahsan, H., & Khan F. H. (2013). Alpha-2-Macroglobulin: A

- Physiological Guardian. *Journal of Cellular Physiology*, 228, 1665–1675.
- 21 Kamata, H., Yamagata, Y., Nakamura, T., Nakajima, T., Oda, K., Murao, S. (1989). Characterization of the Complex between  $\alpha$ 2-Macroglobulin and a Serine Protease from *Bacillus natto*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(10), 2695–2702.
- 22 Feldman, S. R., Gonias, S. L., & Pizzo, S. V. (1985). Model of  $\alpha$ 2-macroglobulin structure and function. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 82, 5700–5704.
- 23 Fujita, M., Hong, K., Ito, Y., Fujii, R., Kariya, K., & Nishimuro, S. (1995). Thrombolytic Effect of Nattokinase on a Chemically Induced Thrombosis Model in Rat. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 18(10), 1387–1391.
- 24 Xu, J., Du, M., Yang, X., Chen, Q., Chen, H., & Lin D. H. (2014). Thrombolytic Effects in vivo of Nattokinase in a Carrageenan-Induced Rat Model of Thrombosis. *Acta Haematologica*, 132, 247–253
- 25 Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K., & Hiratani H. (1990). Enhancement of the Fibrinolytic Activity in Plasma by Oral Administration of Nattokinase. *Acta Haematologica*, 84, 139–143
- 26 Jang, J. Y., Kim, T. S., Cai, J., Kim, J., Kim, Y., Shin, K., Kim, K. S., Park, S. K., Lee, S. P., Choi, E. K., Rhee, M. H., Kim, Y. B. (2013). Nattokinase improves blood flow by inhibiting platelet aggregation and thrombus formation. *Laboratory Animal Research*, 29(4), 221–225.
- 27 Fujita, M., Ohnishi, K., Takaoka, S., Ogasawara, K., Fukuyama, R., & Nakamura, H. (2011). Antihypertensive Effects of Continuous Oral Administration of Nattokinase and Its Fragments in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 34(11), 1696–1701.
- 28 Hsia, C. H., Shen, M. C., Lin, J. S., Wen, Y. K., Hwang, K. L., Cham, T. M., & Yang, N. C. (2009). Nattokinase decreases plasma levels of fibrinogen, factor VII, and factor VIII in human subjects. *Nutrition Research*, 29, 190–196.
- 29 Kurosawa, Y., Nirengi, S., Homma, T., Esaki, K., Ohta, M., Clark J. F., & Hamaoka, T. (2015). A single-dose of oral nattokinase potentiates thrombolysis and anti-coagulation profiles. *Scientific Reports*, 5, 11601
- 30 Kim, J. Y., Gum, S. N., Paik, J. K., Lim, H. H., Kim, K. C., Ogasawara, K.,

- Inoue, K., Park, S., Jang, Y., & Lee, J. H. (2008). Effect of Nattokinase on Blood Pressure: A Randomized, Controlled Trial. *Hypertension Research*, 31, 1583–1588.
- 31 Weng, Y., Yao, J., Sparks, S., & Wang, K. Y. (2017). Nattokinase: An oral antithrombotic agent for the prevention of cardiovascular disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 523.
- 32 Jensen, G. S., Lenninger, M., Ero, M. P., & Benson, K. F. (2016). Consumption of nattokinase is associated with reduced blood pressure and von willebrand factor, a cardiovascular risk marker: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter North American clinical trial. *Integrated Blood Pressure Control*, 9, 95–104.
- 33 Chen, H., McGowan, E. M., Ren, N., Lal, S., Nassif, N., Shad-Kaneez, F., Qu, X., & Lin, Y. (2018). Nattokinase: A Promising Alternative in Prevention and Treatment of Cardiovascular Diseases. *Biomarker Insights*, 13, 1–8.
- 34 Peng, Y., Yang X., & Zhang Y. (2005). Microbial Fibrinolytic Enzymes: An Overview of Source, Production, Properties, and Thrombolytic Activity in Vivo. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(2), 126–132.
- 35 Liu, Z., Zheng, W., Ge, C., Cui, W., Zhou, L., & Zhou Z. (2019). High-level extracellular production of recombinant nattokinase in *Bacillus subtilis* WB800 by multiple tandem promoters. *BMC Microbiology*, 19(1), 89.
- 36 Deepak, V., Kalishwaralal, K., Ramkumarpandian, S., Babu, S. V., Senthilkumar, S. R., & Sangiliyandi, G. (2008). Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 99(17), 8170–8174.
- 37 Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- 38 Muraoka, T., & Okuda, H. (1977). Effects of Free Fatty Acids on Fibrinolytic Activity. *The Journal of Biochemistry*, 82(2), 529–533.
- 39 Tanka-Salamon, A., Komorowicz, E., Szabó, L., Tenekedjiev, K., & Kolev, K. (2016). Free Fatty Acids Modulate Thrombin Mediated Fibrin Generation Resulting in Less Stable Clots. *Plos One*, 11(12), e0167806.
- 40 Higazi, A. A., Aziza, R., Samara, A. A., & Mayer, M. (1994). Regulation of

- fibrinolysis by non-esterified fatty acids. *Biochemical Journal*, 300, 251–255.
- 41 Huet, E., Cauchard, J. H., Berton, A., Robinet, A., Decarme, M., Hornebeck, W., & Bellon. G. (2004). Inhibition of Plasmin-Mediated prostromelysin-1 Activation by Interaction of Long Chain Unsaturated Fatty Acids With Kringle 5. *Biochemical Pharmacology*, 67(4), 643–654.
- 42 Tanka-Salamon, A., Tenekedjiev, K., Machovich, R., & Kolev, K. (2008). Suppressed Catalytic Efficiency of Plasmin in the Presence of Long-Chain Fatty Acids. Identification of Kinetic Parameters From Continuous Enzymatic Assay With Monte Carlo Simulation. *The FEBS Journal*, 275(6), 1274–1282.
- 43 Swanson, D., Block, R., & Mousa, S. A. (2012). Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in Nutrition*, 3(1), 1–7.
- 44 Amki, M. El., Lerouet, D., Coqueran, B., Curis, E., Orset, C., Vivien, D., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., & Margail, I. (2012). Experimental modeling of recombinant tissue plasminogen activator effects after ischemic stroke. *Experimental Neurology*, 238(2), 138–144.
- 45 Garabedian, H. D., Gold, H. K., Leinbach, R. C., Svizzero, T. A., Finkelstein, D. M., Guerrero, J.L., & Collen, Désiré. (1991). Bleeding time prolongation and bleeding during infusion of recombinant tissue-type plasminogen activator in dogs: Potentiation by aspirin and reversal with aprotinin. *Journal of the American College of Cardiology*, 17(5), 1213–1222.
- 46 Haapaniemi, E., & Tatlisumak, T. (2009). Is D-dimer helpful in evaluating stroke patients? A systematic review. *Acta Neurologica Scandinavica*, 119, 141–150.
- 47 Sharma, A., & Radha Kishan, K. V. (2011). Serine protease inhibitor mediated peptide bond re-synthesis in diverse protein molecules. *FEBS Letters*, 585, 3465–3470.
- 48 Hirata, J., Chung, L. P., Ariese, F., Irth, H., & Gooijer, C. (2005). Coupling



- of size-exclusion chromatography to a continuous assay for Subtilisin using a fluorescence resonance energy transfer peptide substrate: Testing of two standard inhibitors. *Journal of Chromatography A*, 1081(2), 140–144.
- 49 Hudson, N. W., Kehoe, J. M., & Koo, P. H. (1987). Mouse  $\alpha$ -macroglobulin structure, function and a molecular model. *Biochemical Journal*, 248(3), 837–845.
- 50 Fredenburgh, J. C., & Nesheim, M. E. (1992). Lys-plasminogen Is a Significant Intermediate in the Activation of Glu-plasminogen During Fibrinolysis in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(36), 26150–26156.
- 51 Christensen, U. (1985). C-terminal lysine residues of fibrinogen fragments essential for binding to plasminogen. *FEBS Letters*, 182(1), 43–46.
- 52 Yoshino, S., Fujimoto, K., Takada, T., Kawamura, S., Ogawa, J., Kamata, Y., Koderu, Y., & Shichiri M. (2019). Molecular form and concentration of serum  $\alpha$ 2-macroglobulin in diabetes. *Scientific Reports*, 9, 12927.
- 53 Aoki, N., Moroi, M., & Tachiya, K. (1978). Effects of alpha2-plasmin Inhibitor on Fibrin Clot Lysis. Its Comparison With alpha2-macroglobulin. *Thrombosis and Haemostasis*, 39(1), 22–31.