

## 学 位 論 文 要 旨

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*

応用生命科学専攻 応用生物化学大講座

高垣 聡一郎

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。凝固系においては、出血が生じると速やかに血液が凝固し、止血血栓が形成される。一方で、過剰な血栓は血管閉塞や循環障害を引き起こすため、不要な血栓を溶解除去する線溶系が役割を果たし凝固線溶のバランスを取っている。虚血性心疾患や脳血管疾患は世界的に主要な死因であり、血栓塞栓により血流が途絶えることが原因である。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。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によって、フィブリン分解活性を有するプラスミンとなる。また、主要なプラスミノゲンアクチベーターとして、組織型 (t-PA) とウロキナーゼ型 (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することで局在的なフィブリン分解を行う。一方で u-PA は組織における細胞外プロテオリシスに中心的な役割を果たす。組換え t-PA の静脈投与は心筋梗塞や脳梗塞における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す可能性があり、その使用は厳格に制限されている。そのため、より安全な血栓溶解療法の開発が模索されている。

Subtilisin NAT (STN) は納豆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*) により産生されるセリンプロテアーゼであり、ナットウキナーゼとも呼ばれる。STN は血栓の主要タンパク質であるフィブリンを効率よく分解するため、STN を含む食品の摂取により線溶を活性化する試みがなされている。また、フィブリン分解以外の線溶に関する作用としては不活性一本鎖型 u-PA (scu-PA) の活性化、培養血

管内皮細胞の t-PA 産生向上、プラスミノーゲンアクチベーター阻害因子の不活化などが報告されている。さらに、STN のヒトへの経口投与においても、抗凝固作用、線溶促進、血圧の低下などが報告されており、健康食品としての STN の利用に対する期待は高まっている。

このように STN に関する様々な研究が行われ、健康食品として利用されているにもかかわらず、STN の血栓溶解作用の本質は十分には明らかとされていない。本研究では STN の効果的な利用方法を見いだすことを目的として、STN の線溶活性を促進する食品素材の探索、ならびに STN による *in vivo* での血栓溶解の機序の解析を行った。

STN 活性を促進する食品素材の探索においては、香辛料抽出物を候補物質として検討を行い、赤トウガラシに活性を見出した。活性に基づく関与成分の精製により、赤トウガラシに豊富に含まれるリノール酸が関与成分であり、さらに様々な不飽和脂肪酸も同様の作用をもつことを明らかにした。不飽和脂肪酸は炭素数や不飽和度、不飽和結合の位置に関わらず活性を示すが、飽和脂肪酸は STN によるフィブリン分解を阻害した。不飽和脂肪酸の作用は STN の酵素活性自体に対する影響ではなく、フィブリンおよびフィブリノーゲンの立体構造変化の誘導に基づくものと推定される。

STN の *in vivo* 血栓溶解作用の解析においては、ヒト血漿から作成した凝固塊をマウスへ投与し、その分解により生ずるヒト型フィブリン分解物（D ダイマー）を定量するモデルを構築した。これに対する STN 投与によりヒト型 D ダイマーの増加が確認され、血栓溶解作用が示された。本活性はプラスミン阻害剤（STN への作用をもたない）との併用、または STN の不活化により消失した。これまで、*in vivo* においても STN は直接フィブリンを分解すると考えられてきたが、この結果は、STN の血栓溶解作用は、その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。その機序を明らかにするため、STN 処理した血漿のフィブリン分解活性を検証した。マイクロプレートを用いたフィブリン分解試験では、t-PA、scu-PA による線溶は血漿の STN 処理により増加しなかった。そこで、生体内の血管を模したフィブリン充填カラムを作製し、血漿が灌流する試験系を用いた。この系では、STN 処理血漿において、scu-PA による線溶が増加することが明らかとなった。すなわち、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。この作用の本質としては、絶えず新たな線溶因子・抗線溶因子が供給される環境で、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される。

本研究で得られた知見が、STN の効果的利用法の開発につながることを期待する。