

講座

ヘパリンの作用機序

吉澤善作*

1. はじめに

ヘパリン(以下 Hep と略記する)は抗凝固活性(血液凝固阻止活性)(anticoagulant activity)や脂血清澄活性(lipolytic activity; lipemia clearing activity), その他多彩な生物活性をもつ¹⁾ため, 発見(1916年)以来興味ある研究対象となり, 研究報告も枚挙にいとまがない。筆者らはさきに, 1978年初期ころまでの研究成果をまとめ, 単行本として出版した²⁾。その後の Hep 研究の進歩はめざましく, 特に抗凝固活性と構造との関係の研究は核心に迫りつつあり, 1982年初期までの研究成果のうち, Hep の生合成と抗凝固活性の機能領域に関するおもな知見を“みにれびう”の形で紹介した³⁾。本講座では, Hep の作用機序として, 抗凝固活性発現に関する最近の知見の概要を紹介する。

2. Hep のアンチトロンビン III に対する結合領域

凝固因子であるセリンプロテアーゼ類(XIIa, XIa, IXa, Xa, VIIa などの各因子, 以下因子の記載を省略する)は血液中のそれらに対する生理的阻害物質であるアンチトロンビン III (別名 heparin cofactor I) (以下 AT と略記する)によって阻害されるが, この阻害反応は Hep によって飛躍的に促進される⁴⁾。この促進作用を発現するためには, Hep はその分子中に AT と結合する特異な結合領域を必要とする。市販 Hep を AT との親和性に基づいて分画すると, その約 1/3 は AT と強く結合するが, 残りの約 2/3 は AT に対する親和性が弱いか, またはまったくな

い^{5,6)}。

Hopwood ら⁵⁾は, AT との親和性の高い Hep を AT に結合させ, それをヘパリナーゼで消化して, AT に結合した部分のオリゴ糖を調べ, 得られた分子量 $4 \sim 5 \times 10^3$ (十二~十六糖に相当)のオリゴ糖には AT と特異的に結合する領域が存在すると報告した。

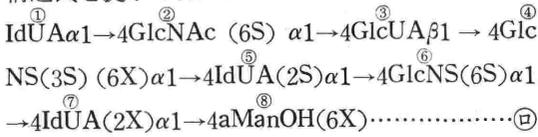
Rosenberg と Lam⁷⁾は, 市販のブタ Hep (以下 Phep と略記する)の低分子画分(分子量 $6 \sim 8 \times 10^3$)のものを AT と混ぜ, Sephadex G-100 によるゲル濾過法で AT に対する親和性の高い高活性のもの(HA) (360単位/mg)と親和性の低い比較的不活性のもの(LA) (12単位/mg) (単位は U. S. P. で表示)に分け, 両者を亜硝酸で脱アミノ化分解し, 分解産物を還元してから分画・精製し, 四糖画分 IdUA α 1 \rightarrow 4GlcNAc (6S) α 1 \rightarrow 4GlcUA β 1 \rightarrow 4aManOH (6S) (略号は末尾に示す)を得, その収率が HA : LA = 100 : 2.6 であったことから, この四糖を生ずる Hep 中の下記の部位が AT との結合に必須な構造領域であると報告した。

IdUA α 1 \rightarrow 4GlcNAc (6S) α 1 \rightarrow 4GlcUA β 1 \rightarrow 4GlcNS (6S)①

一方, Lindahl の研究グループは^{8,9)}市販の Phep の亜硝酸による部分脱アミノ化分解産物を還元してから, AT-Sepharose によるアフィニティクロマトグラフィーを行い, AT に対して親和性の高いもの(HA), 中等度のもの(MA), および低いもの(LA)に分けた。そのうち HA を Sephadex G-50 でゲル濾過を行い, AT と強く結合する八, 十, 十二糖画分を得, 最小の八糖に対して構造式を提示した⁸⁾。更に Lindahl ら¹⁰⁾はこの八糖を NaB³H₄ で還元してから, 過ヨウ素酸

* 東北大学医学部第二医化学教室

で酸化し、次いでアルカリ分解を行って五糖を得た。これをヒトの尿から分離した GlcN 3-O-硫酸スルファターゼで分解したところ、その非還元末端から硫酸基が遊離することを確かめ、この GlcNS (6X) には 3-O-硫酸基が結合していることを明らかにした¹⁰⁾。この 3-O-硫酸基の存在は ¹³C-NMR スペクトル分析でも確かめられた¹¹⁾。また、上記の過ヨウ素酸化—アルカリ分解結果、 α -L-イゾロニダーゼや血小板由来のエンド- β -グルクロニダーゼによる消化結果、脱アミノ化分解-NaB³H₄還元結果、その他の手段による構造研究の結果に基づき、この八糖に対して次の構造式を提示した¹²⁾。



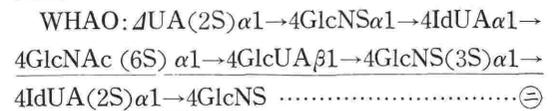
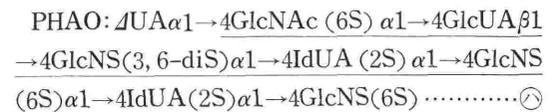
このうち^⑦は GlcUA に変わりうると述べている¹²⁾。更に、上記の各種の反応産物や、部分脱N-硫酸化物、ヒドラジン分解産物とそのN-アセチル化産物などのATに対する親和性をしらべ、^②~^⑥の五糖がATとの結合に必須な構造領域であること¹²⁾、とくに^④と^⑥のN-硫酸基^{8,9,12,13)}、^②の6-O-硫酸基^{12,14)}はATとの結合に不可欠であるが、^②のN-アセチル基は必須でないことなどを明らかにした¹²⁾。なお、^⑤の2-O-硫酸基と^⑥の6-O-硫酸基の寄与については今後の検討課題とした¹²⁾。しかし、抗凝固活性の発現には他の研究者の報告を引用し、Hep分子中の他の部分の関与を伴うことも述べている¹²⁾。

前述の Rosenberg と Lam⁷⁾の四糖は Lindahl らの八糖の^④の3-O-硫酸基を除けば^①~^④の四糖に相当する。その後 Rosenberg のグループ¹⁵⁾もATとの結合部位に3-O-硫酸基の存在を容認している。

Casu ら¹⁶⁾は市販の PHep を溶媒で分画して低分子画分を得、それをゲル濾過の後、AT-agarose を用いて分画し、AT に対し親和性の高い(以下 HA と略記する)十糖を主成分とするオリゴ糖(a)を得た。また、同じ Hep を脱アミノ化分解してから AT-Sepharose で分画し、更に Sephadex G-25 でゲル濾過をして HA 八糖 (b) を得た。一方、同じ Hep をへパリナーゼで30℃、36時間消化してから消化産物を上述と同様に処理して

HA 八糖 (c) を得た。これらの a, b, c はいずれも AT と強く結合し、AT 存在下(以下中和活性に関する記載のさいはこの記述を略す) Xa 中和(不活化)活性をもっていたが、APTT 法での抗凝固活性はほとんどなかった。これらの ¹³C-NMR スペクトル分析その他の検索結果に基づき、それぞれの構造式を提示した。三者はいずれも AT との結合に必須な六糖単位(Lindahl らの構造式^④の^①~^⑥)をもっていた。そのうちの b は Lindahl らの八糖^④に相当していた。一方 c は非還元末端に Δ UA をもち、還元末端に GlcNS(6S)をもっていた。

筆者ら^{17,18)}は、PHep およびクジラ Hep (以下 WHep と略記する)を精製へパリナーゼで30℃、14分間消化し、その消化産物を Sephadex G-50 でゲル濾過を行って八糖画分を得た。この画分を AT-Sepharose を用いて分画し、HA 八糖 (PHep および WHep からの HA 八糖をそれぞれ PHAO および WHAO と命名)を得た。AT に対する親和性は PHAO が WHAO より高かったが、両者の化学組成は硫酸基の含量以外は同じであった。PHAO はトロンビン(以下 T と略記する)と Xa を強く中和し、その50%中和活性はもとの Hep の2倍と6.5倍であった。また APTT 法でも、もとの Hep の1.6倍の抗凝固活性を示した。一方 WHAO の Xa 中和活性はもとの Hep の1/3に過ぎず、T 中和活性も APTT 法による抗凝固活性もきわめて弱かった。両者の化学分析や ¹³C-NMR スペクトル分析、酵素による構造研究などの結果に基づき、両者に対し次の構造式を提示した^{17,18)}。



両者共 AT との結合に必須な五糖単位(アンダーラインの部分)を含んでいた。

以上の代表的4つのグループの研究結果から、Hep 分子中の AT との結合に必須な領域は上述の五糖であることが明らかとなり、また、その結合により Xa 中和活性が発現することも明らかと

なった。最近 Sinay¹⁹⁾はこの五糖を化学的手段で合成することに成功し、それがATと強く結合し、高いXa中和活性を示すがAPTT法による抗凝固活性はほとんどないことを述べている。

3. ATのHepに対する結合部位

ATは分子量62,000の α_2 -グロブリンに属する糖タンパク質のひとつである。このATのLys残基をO-methylisoureaでブロックするとATはTと結合するが、Hepによって影響されなくなるので、ATのHepに対する結合部位はLys残基であることが明らかとなった²⁰⁾。その後いくつかの研究報告があるが、最近 Finlay のグループ^{21,22)}は、ATの3つの-S-S結合(disulfide bonds)のうちの一つ(Cys-239とCys-422間)を温和な条件下で還元すると、HepによるAT-T反応の促進効果がなくなるが、HepなしのAT-T反応には影響を与えないことを確かめ、この-S-S結合がHep-AT結合に重要であると述べている。更に、このCys-239はATのLysの多い領域に存在しているので、その近傍のLysがHepと結合するものと推定している。そのほか、ATに含まれる6つのTrp残基のうちHepとATとの結合部位付近に存在するひとつが両者の結合に不可欠であることも報告されている^{23,24)}。

4. Heparin cofactor II (HC II) と Hep との結合

血液中にHepのかなり高い濃度(≥ 5 単位/ml)で、ATよりも速やかにTを中和する heparin cofactor II (HC II)が見出されている²⁵⁾。これは正常ヒト血液中に $\geq 90\mu\text{g/ml}$ 存在する分子量65,600のタンパク質で、Xa中和活性はない。HC IIはHep以外のムコ多糖ではデルマトン硫酸によっても活性化される²⁶⁾。HepのHC IIとの結合領域はATとの結合領域とは異なる²⁷⁾。

5. Hepの分子サイズと凝固因子の中和活性

Laurentら²⁸⁾は、Hepの抗凝固活性はATとの結合に必要な構造領域の分布との関連から、その分子量に関係すると述べている。また、Thunbergら²⁹⁾もTおよびXa中和活性はHep多糖鎖の長さが長くなるほど強くなると報告している。

Holmerら³⁰⁾は、PHepの脱アミノ化分解産物のうちHA十～十六糖画分について調べ、これらのオリゴ糖はいずれもATと強く結合してXa中和活性を示すが、T中和活性はほとんどないことを報告している。次いで、Holmerら³¹⁾は、分子量の異なる種々のHA Hep標品について、各種の凝固因子に対する中和活性を調べた結果、Xa, XIIaおよびカリクレエンの中和には分子サイズはあまり関係しないが、IXa, XIaおよびTの中和には分子サイズが関係し、低分子化するにつれて中和活性が低下することを述べている。したがって、凝固因子のうち前者のグループの中和にはATとの結合領域のみが不可欠とみられるし、後者のグループの中和には、そのほかにも必要な構造領域が必要とみなされる。Longら³²⁾も、分子量 $36.3\sim 6.1\times 10^3$ のHep標品の各種凝固因子に対する中和活性を調べ、Xa(恐らくXIIaやカリクレエンも)やプラスミンの中和にはHepの分子量はあまり関係しないが、T(恐らくIXaやXIaも)の中和にはHep標品の分子量が大きくなるほど活性も高くなることを報告している。

Oostaら³³⁾は、PHepのHA画分を部分的に脱アミノ化分解し、その分解産物をゲル濾過法で分画して、六～十六糖画分を得た。それらの凝固因子に対する中和活性を調べた結果、六、八、十糖ではT中和活性を認められなかったが、十四、十六糖では高い活性を示した。一方、Xa中和活性はすべての画分に認められたが、六糖および十糖では十六糖の活性の6.9%と60.9%であった。また、十四糖のT中和活性およびXaの中和活性は、それぞれ140単位/ μmol および460単位/ μmol 、十六糖のそれらはそれぞれ500単位/ μmol および560単位/ μmol を示した。反応のkineticsを調べた結果から、十四糖と十六糖はTの中和に関して、同程度にATを直接活性化することが出来ること、さらに、大きい方(十六糖)はTをATに近づけることも可能と見なされると述べている。つまり、大きい方のオリゴ糖はTとATとを近づけるか、あるいはTを速やかに中和出来るようにATを活性化するに不可欠な部位をもっと述べている。そして、Hepにはこのような異なる機能(function)に関与する複数構造領域(multiple structural domains)が存在するものと推定した。

更に、十四糖以上では AT との結合に必須な構造領域 (前述の Rosenberg と Lam⁷⁾ の四糖—構造式 ④) のほかに、その非還元末端からやや離れたところに位置する T 中和活性に必須な構造単位 (活性化部位) が存在するものと推定し、この両者の存在によって T のみならず、IXa, XIa も中和されるものと推定した³³⁾。

更に Jordan ら¹⁵⁾ は、高分子 (分子量 18~22 × 10³) で高活性 (731 単位/mg) の Hep には AT に対する結合領域と活性化部位がそれぞれ 2 つずつ存在するが、低分子 (分子量 6~8 × 10³) で高活性 (350 単位/mg) の Hep にはそれらがひとつずつしか存在しないと述べている。Danielsson と Björk³⁴⁾ は分子量 6~34.7 × 10³ の HA Hep 標品で抗凝固活性の高い Hep では AT とより強く結合するものほど AT との結合領域を 2 つもった多糖鎖の割合が多くなると報告し、分子量の異なる HA Hep 標品の AT との結合性によって抗凝固活性の増加をある程度説明することが出来ると述べている。また、Piepkorn ら³⁵⁾ および Takahashi ら³⁶⁾ は、AT には Hep と結合する部位が 2 個所存在し、低分子で抗凝固活性の低い Hep はその 2 分子が AT の 2 つの結合部位に別々に結合するが、高分子で抗凝固活性の高い Hep はその 1 分子が AT の 2 つの結合部位に結合すると述べている。そのほか、Radoff と Danishefsky³⁷⁾ は、HA Hep の分子量の増加に伴って、AT との親和性が増大することを報告し、更に、Hep には AT との結合領域のほかに、イオン結合で結合する多くの補助的作用部位が存在し、それは分子量が大きくなるほど多くなると述べている。

6. Hep と AT および凝固因子との結合

Hep が抗凝固活性を発現するためには、その分子中に存在する AT との結合領域で AT と結合することが不可欠であることは前述した。その上、各種の凝固因子 (セリンプロテアーゼ類) を中和する場合、Xa, XIIIa およびカリクレインの系と IXa, XIa および T の系とでは異なり³¹⁾、前者の場合基本的には Hep 分子中の AT 結合領域と AT との結合によって中和活性が発現されるものと見なされることも前述した。(活性の強弱には Hep のアニオン密度その他も関係するとみなされるが、

それについては後述する。) 一方、後者の場合に關しては主として下記の報告がある。

Jordan ら³⁸⁾ は、凝固系のセリンプロテアーゼ類 (IXa, XIa, T) に対する AT の阻害活性を、低分子の HA Hep 存在下、その Hep の濃度変化に関する Kinetics を調べ、Hep と AT との直接的結合によって AT-酵素複合体形成が 10³ のオーダーで促進されると述べている。更に Stone ら³⁹⁾ は、Hep 由来の HA 八~十四糖および HA 十八糖や低分子 (分子量 6,500) と高分子 (分子量 22,000) の HA Hep と AT との結合物の CD (circular dichroism) スペクトルを測定したところ、前者では Xa を中和することが可能な AT の形状 (conformation) 変化に基づく CD スペクトルを観察し、後者では前者に加えて、T 系の凝固因子を迅速に中和することが可能なように第 2 の決定的な (critical) 領域でも結合したために、AT の別な形状変化をもたらしたと見なされる CD スペクトルも観察された。すなわち、Hep の 2 つの領域がそれぞれ AT の別々の部位で結合すると異なる形状変化を誘導し、第 1 領域での結合で Xa 系の凝固因子の中和を可能にし、第 1 と第 2 の両領域での結合によって T 系の凝固因子の中和を可能にすると見なした。

一方、Wong ら⁴⁰⁾ は、Hep は AT と T との反応を促進するが、他方 T とも結合し、Hep-T の結合が Hep-AT との結合より強いことを述べている。しかし、この Hep-T 複合体は活性な形ではなく、むしろ AT と T との反応を阻害すると述べている。同様なことは Petersen と Jørgensen⁴¹⁾ によっても報告されている。

Hep-T 結合が Hep-AT 結合より強いことは以前 Griffith⁴²⁾ も報告し、Hep による AT-T 反応の促進には、まず Hep と T とが結合することで AT-T 反応を促進すると述べたが、最近では後述のごとく、三者が結合する三元複合体 (ternary complex) の "templete" モデル⁴³⁾ を提唱している。

Danielsson と Björk⁴⁴⁾ は、Hep の有無にかかわらず、形成された AT-T 複合体は同じであることから、Hep は AT-T 形成に触媒的 (catalytic) に働くと述べている。Pletcher と Nelsestuen⁴⁵⁾ は、Hep 依存性の AT-P (プロテアーゼ) (凝固因子) 反応の kinetics を調べ、Hep

は触媒として働き、AT は第1の基質、プロテアーゼは第2の基質で、第1段階で Hep-AT が形成され、第2の段階で Hep-AT-P が形成されるが、第2段階の反応は速やかに進行し、続いて AT-P 複合体より Hep が離れると述べている。Olson ら⁴⁶⁾は、HA Hep と AT との結合を調べ、AT と Hep はまず弱いイオン結合で結合し、それが AT の形状変化を伴った強い結合に変わり、続いてプロテアーゼと結合する。そして、プロテアーゼにより AT が分解を受けると Hep が離れ、触媒的に働くとして述べている。Olson と Shore⁴⁷⁾は、AT と T との反応は2段階の反応で、第1段階は弱い結合、第2段階は安定な結合であるが、Hep は第1段階の反応を3桁のオーダーで促進すると述べている。Holmer ら⁴⁸⁾は、Hep を AT との親和性によって高活性と低活性の画分に分けると、両画分とも T には同様に結合することを見ている。そして、高活性 Hep の抗凝固作用の機序として、少量の高活性 Hep と AT が結合すると AT の形状が変化し、AT の T との結合部位をより反応しやすくする。その結果、AT と T とが速やかに結合するが、そのさい Hep の別の部位が T とも結合する。次いで、AT と T との結合が共有結合に変わると、AT-T 複合体の形状が変化するので Hep が離れて触媒的に働くとして推定した。Griffith⁴³⁾は、種々の条件下で HA Hep によって促進される AT-T 反応の kinetics を調べ、Hep は AT と T の双方に結合して三元複合体 (ternary complex) (Hep-AT-T) を形成するものと見なされると述べ、この“template”モデルが Hep の AT-T 反応促進の作用機序としてよく当てはまると報告している。次いで、Griffith⁴⁹⁾は、Hep の触媒する AT と T および Xa との反応ならびに HC II (heparin cofactor II) と T との反応の kinetics を調べ、これらの系で Hep が触媒反応を発揮するためには、Hep が両プロテアーゼ (T と Xa) および両阻害剤 (AT と HC II) のいずれとも結合することが必要であると述べている。すなわち、その反応は任意次の二成分基質に対する酵素の触媒反応に匹敵するもので、それは Hep の作用機序に対する“template”モデルと一致すると述べている⁵⁰⁾。そのほか、その他の機構も全体の反応速度を決定する上で重要なようであると述べて

いる。Lahiri と Danishefsky⁵¹⁾は、AT より Hep が多い条件下で、Hep, AT, T 混合物を高速液体クロマトグラフィーで調べると、Hep-AT-T 複合体が検出されたが、AT が Hep より多い条件下では、Hep-AT 結合が Hep-AT-T 結合より強いので、Hep-AT-T が形成されたとしても、その Hep ははずれて AT と結合するので、Hep-AT-T 複合体は検出されないこと、また、Hep-T 複合体が形成されたとしてもその結合は低い塩濃度で容易に解離するので、用いた実験条件下では検出されなかったと述べている。

Speight と Griffith⁵²⁾は、カルシウム (Ca) が Hep の触媒する AT-T 反応を阻害することから、その kinetics を調べた結果、Ca は Hep 分子中の T と結合する機能基 (functional group) に結合するために阻害するものと見なされた。その機能基として Hep のカルボキシル基が上げられている。また、Hep の T に対する結合性は Hep の硫酸化の程度にも関係する。すなわち、Hep のアニオン密度 (anionic density) に影響されること、そして、Hep と AT との結合を“on-off”スイッチとすれば、Hep のアニオン密度は抵抗器 (rheostat) に相当すると述べている。Liang と Chakrabarti⁵³⁾は Ca は Hep のカルボキシル基と強く結合するが、その隣りの硫酸化グルコサミン残基のスルファミノ基も Ca との結合に必須で、前者の結合を安定化させると述べている。これらの報告は Hep が AT と T の双方に結合し、いわゆる三元複合体を形成するとする Griffith の説⁴³⁾の裏付けともなる。

7. クジラ Hep の構造と抗凝固活性

筆者らは WHep が市販の Hep に比し、N-アセチル基の含量が高く、硫酸基の含量が低いにもかかわらず、抗凝固活性が高いので⁵⁴⁾、その高い活性発現の構造的基盤を明らかにするため PHep を対照として、主として化学的、酵素的手段や NMR スペクトル分析法などによって比較検討を行ってきた。これまでの報告のうち、両者を精製ヘパリナーゼで部分消化して得られた AT に親和性の高い八糖 (WHAO と PHAO)^{17,18)} については既述したが、ここではまず PHAO の高い抗凝固活性発現の構造的基盤について述べる。

PHAO の構造式 (2の⊙) を Lindahl ら¹²⁾ の八糖のそれ (2の⊕) と比較すると, ⊕では⊙の還元末端の GlcNS (6S) が脱アミノ化分解で aMan (6X) 《それを還元したので aManOH (6X)》に変わっている. この⊕は Casu ら¹⁶⁾ によっても分離され, Xa 中和活性は高いが APTT 法による抗凝固活性はほとんどないことが確かめられている. 一方, Xa 中和活性を持つが, T中和活性も APTT 法による抗凝固活性もほとんどない WHAO の構造式 (2の⊖) と比較すると, ⊙の還元末端には⊖の還元末端にないトリ硫酸化二糖 (IdUA (2S)α1→4GlcNS (6S)) が存在する. これらのことから, Hep 分子中でもっともアニオン密度の高いトリ硫酸化二糖の存在が PHAO の T中和活性や APTT 法による抗凝固活性の発現に必須な構造単位と見なされた¹⁸⁾. これに関連して, AT との結合に不可欠な構造領域に隣接して Tとの結合部位の存在する可能性が Laurent ら²⁸⁾ によって提示されている.

筆者ら⁵⁵⁾ はその後, WHep と PHep のデアミ化分解産物のオリゴ糖を高速液体クロマトグラフィーで調べたところ, WHep と PHep からの AT 結合領域由来の四糖の比は 3.7 : 1 で, WHep には PHep に比し AT 結合領域が著しく多く存在することが分かった. これに対して, WHep と PHep 中の上記トリ硫酸化二糖の比は約 5 : 1 であった. また, WHep の AT 結合領域とトリ硫酸化二糖の比は約 1 : 2 であった. 次いで筆者ら⁵⁶⁾ は, WHep と PHep を直接 AT-Sepharose で分画したところ, WHep からは 74~88%, PHep からは 37.5% の収率で HA Hep 画分が得られた. ま

た, WHep と PHep をヘパリチナーゼ 1 またはヘパリナーゼで部分消化して, 消化産物をゲル濾過法で八~二十糖に分け, 更にそれぞれのオリゴ糖を AT-Sepharose で分画して HA オリゴ糖を得た. その収率からも WHep は PHep に比し, AT 結合領域を著しく多く含むことが再確認された⁵⁶⁾. これらのオリゴ糖はいずれも高い Xa 中和活性を示したが, T中和活性は十六糖以下では弱く, 十八糖と二十糖では強い活性が認められた⁵⁶⁾. 両者は APTT 法でも強い抗凝固活性を示した⁵⁷⁾. また, 十六, 十八, 二十糖の構成二糖組成を調べたところ, いずれも AT 結合領域を 1 モル相当含んでいたが, トリ硫酸化二糖の含量は 0.6 : 1.0 : 1.6 の割合であった⁵⁷⁾. これらのことから, WHep では T中和活性および APTT 法における抗凝固活性発現の構造的基盤として, 多数の AT 結合領域と, それから約 8 糖はなれたところに, T中和活性や APTT 法での抗凝固活性発現に関与する少なくとも等モルのトリ硫酸化二糖が存在しているものと見なされた⁵⁷⁾. 結果として, WHep のこのような特異な構造的基盤によって高い抗凝固活性が発現されているものと見なされた.

8. おわりに

Hep 研究の最近の進歩のうちから, 抗凝固活性発現に関する知見の概要を紹介した. 概括的な記述に終始したが, 本講座を通じて Hep の抗凝固作用機序に関する研究の現状を把握していただければ幸いである.

略号: Hep: heparin PHep: porcine heparin WHep: whale heparin AT: antithrombin III T: thrombin
AT-Sepharose: Sepharose coupled with AT HA: high-affinity for AT IdUA: L-iduronic acid GlcN: glu-
cosamine GlcNS: N-sulfoglucosamine GlcNAc: N-acetylglucosamine GlcUA: D-glucuronic acid aMan:
2,5-anhydromannose aManOH: 2,5-anhydromannitol 4UA: 4,5 hexuronic acid (2S): 2-O-sulfated (6S):
6-O-sulfated (3S): 3-O-sulfated (X): sulfated or non-sulfated APTT: activated partial thromboplastin
time PHAO: porcine high-affinity octasaccharide for AT WHAO: whale high-affinity octasaccharide for AT
Lys: lysine Cys: cysteine Trp: tryptophan

文 献

- 1) Jaques, L. B. : Heparin-anionic polyelectrolyte drugs. *Pharmacol. Rev.* **31** : 99~166, 1980.
- 2) 奥山 隆, 音谷 登, 佐々木 勲, 村田克己 : ヘパリン. 吉沢善作監修. 講談社, 東京, 1979.
- 3) 吉沢善作, 音谷 登 : Heparinの生合成と抗凝血活性の機能領域. *生化学* **54** : 397~385, 1982.
- 4) Rosenberg, R. D. : Chemistry of the hemostatic mechanism and its relationship to the action of heparin. *Fed. Proc.* **36** : 10~18, 1977.
- 5) Hopwood, J., Höök, M., Linker, A., Lindahl, U. : Anticoagulant activity of heparin: Isolation of antithrombin-binding sites. *FEBS Letters* **69** : 51~54, 1976.
- 6) Lam, L. H., Silbert, J. E., Rosenberg, R. D. : The separation of active and inactive forms of heparin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **69** : 570~577, 1976.
- 7) Rosenberg, R. D., Lam, L. : Correlation between structure and function of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76** : 1218~1222, 1979.
- 8) Thunberg, L., Bäckström, G., Grundberg, H., Riesenfeld, J., Lindahl, U. : The molecular size of the antithrombin-binding sequence in heparin. *FEBS Letters* **117** : 203~206, 1980.
- 9) Höök, M., Thunberg, L., Riesenfeld, J., Bäckström, G., Petterson, I., Lindahl, U. : Structure of the antithrombin-binding sequence in heparin. Lundblad, R. L., Brown, W. V., Mann, K. G., Roberts, H. R., eds. : *Chemistry and Biology of Heparin*. Elsevier, North-Holland, 271~279, 1981.
- 10) Lindahl, U., Bäckström, G., Thunberg, L., Leder, I. G. : Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77** : 6551~6555, 1980.
- 11) Meyer, B., Thunberg, L., Lindahl, U., Larm, O., Leder, I. G. : The antithrombin-binding sequence of heparin studied by n. m. r. spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **88** : C1~C4, 1981.
- 12) Lindahl, U., Thunberg, L., Bäckström, G., Riesenfeld, J. : The antithrombin-binding sequence of heparin. *Biochem. Soc. Trans.* **9** : 499~501, 1981.
- 13) Riesenfeld, J., Thunberg, L., Höök, M., Lindahl, U. : The antithrombin-binding sequence of heparin. Location of essential N-sulfate groups. *J. Biol. Chem.* **256** : 2389~2394, 1981.
- 14) Lindahl, U., Bäckström, G., Thunberg, L. : The antithrombin-binding sequence in heparin. Identification of an essential 9-O-sulfate group. *J. Biol. Chem.* **258** : 9826~9830, 1983.
- 15) Jordan, R. E., Favreau, L. V., Braswell, E. H., Rosenberg, R. D. : Heparin with two binding sites for antithrombin or platelet factor 4. *J. Biol. Chem.* **257** : 400~406, 1982.
- 16) Casu, B., Oreste, P., Torri, G., Zoppetti, G. Choay, J., Lormeau, J.-C., Petitou, M. : The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and ¹³C nuclear-magnetic-resonance studies. *Biochem. J.* **197** : 599~609, 1981.
- 17) Ototani, N., Yosizawa, Z. : Anticoagulant activity of heparin octasaccharide. *J. Biochem.* **90** : 1553~1556, 1981.
- 18) Ototani, N., Kikuchi, M., Yosizawa, Z. : Structure and biological activity of finback-whale (*Balaenoptera physalus L.*) heparin octasaccharides. Chemical carbon-13 nuclear-magnetic-resonance, enzymic and biological studies. *Biochem. J.* **205** : 23~30, 1982.
- 19) Sinay, P. : The chemical synthesis of heparin oligosaccharide fragments with anti-(factor Xa) activity. 第6回糖質シンポジウム講演要旨集. (Aug. 25~27, Sendai), 2~4, 1983.
- 20) Rosenberg, R. D., Damus, P. S. : The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* **248** : 6490~6505, 1973.
- 21) Ferguson, W. S., Finlay, T. H. : Localization of the disulfide bond in human antithrombin III required for heparin-accelerated thrombin inactivation. *Arch. Biochem. Biophys.* **221** : 304~307, 1983.
- 22) Longas, M. O., Ferguson, W. S., Finlay, T. H. : A disulfide bond in antithrombin is required for heparin-accelerated thrombin inactivation. *J. Biol. Chem.* **255** : 3436~3441, 1980.
- 23) Villanueva, G. B., Perret, V., Danishefsky, I. : Tryptophan residue at the heparin binding site in antithrombin III. *Arch. Biochem. Biophys.* **203** : 453~457, 1980.
- 24) Blackburn, M. N., Sibley, C. C. : The heparin binding site of antithrombin III. Evidence for a critical tryptophan residue. *J. Biol. Chem.* **255** : 824~826, 1980.
- 25) Tollefsen, D. M., Majerus, D. W., Blank, M. K. : Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J. Biol. Chem.* **257** : 2162~2169, 1982.
- 26) Tollefsen, D. A., Pestka, C. A., Monafu, W. J. : Activation of heparin cofactor II by dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.* **258** : 6713~6716, 1983.
- 27) Griffith, M. J., Marbet, G. A. : Dermatan sulfate and heparin can be fractionated by affinity for heparin cofactor II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **112** : 663~670, 1983.
- 28) Laurent, T. C., Tengblad, A., Thunberg, L., Höök, M., Lindahl, U. : The molecular-weight-dependence of anti-coagulant activity of heparin. *Biochem. J.* **175** : 691~701, 1978.
- 29) Thunberg, L., Lindahl, U., Tengblad, A., Laurent, T. C., Jackson, C. M. : On the molecular-weight-dependence of the anticoagulant activity of heparin. *Biochem. J.* **181** : 241~243, 1979.

- 30) Holmer, E., Lindahl, U., Bäckström, G., Thunberg, L., Sandberg, H., Söderström, G., Anderson, L. O. : Anticoagulant activities and effects on platelets of a heparin fragment with high affinity for binantithrombin. *Thromb. Res.* **18** : 861~869, 1980.
- 31) Holmer, E., Kurachi, K., Söderström, G. : The molecular-weight dependence of the rate-enhancing effects of heparin on the inhibition of thrombin, factor Xa, factor IXa, factor XIIa and kallikrein by antithrombin. *Biochem. J.* **193** : 395~400, 1981.
- 32) Long, W. F., Williamson, F. B., Woodhead, N. E. : Effect of heparin molecular-size fractions on the inhibition of proteinases by antithrombin III. *Biochem. Soc. Trans.* **11** : 97~98, 1983.
- 33) Oosta, G. M., Gardner, W. T., Beeler, D. L., Rosenberg, R. D. : Multiple functional domains of the heparin molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78** : 829~833, 1981.
- 34) Danielsson, Å., Björk, I. : Binding to antithrombin of heparin fractions with different molecular weights. *Biochem. J.* **193** : 427~433, 1981.
- 35) Piepkorn, M. W., Lagunoff, D., Schmer, G. : Binding of heparin to antithrombin III: The use of dansyl and rhodamine labels. *Arch. Biochem. Biophys.* **205** : 315~322, 1980.
- 36) Takahashi, H. K., Nader, H. B., Dietrich, C. P. : A method for rapid quantitation and preparation of antithrombin III-high-affinity heparin fractions. *Anal. Biochem.* **116** : 456~461, 1981.
- 37) Radoff, S., Danishefsky, I. : High-activity heparin: Chain length, affinity for antithrombin and anticoagulant activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **215** : 163~170, 1982.
- 38) Jordan, R. E., Oosta, G. M., Gardner, W. T., Rosenberg, R. D. : The kinetics of hemostatic enzyme-antithrombin interactions in the presence of low molecular weight heparin. *J. Biol. Chem.* **255** : 10081~10090, 1980.
- 39) Stone, A. L., Beeler, D., Oosta, G., Rosenberg, R. D. : Circular dichroism spectroscopy of heparin-antithrombin interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79** : 7190~7198, 1982.
- 40) Wong, R. F., Windwer, S. R., Feinman, R. D. : Interaction of thrombin and antithrombin. Reaction observed by intrinsic fluorescence measurements. *Biochemistry* **22** : 3994~3999, 1983.
- 41) Petersen, L. C., Jørgensen, M. : Electrostatic interactions in the heparin-enhanced reaction between human thrombin and antithrombin. *Biochem. J.* **211** : 91~97, 1983.
- 42) Griffith, M. J. : The significance of the interaction of heparin with thrombin pertaining to the heparin enhanced-antithrombin III/thrombin reaction rate. Lundblad, R. L., Brown, W. V., Mann K. G., Roberts, H. R., eds. : *Chemistry and Biology of heparin*. Elsevier, North-Holland, 237~248, 1981.
- 43) Griffith, M. J. : Kinetics of the heparin-enhanced antithrombin III/thrombin reaction. Evidence for a template model for the mechanism of action of heparin. *J. Biol. Chem.* **257** : 7360~7365, 1982.
- 44) Danielsson, Å., Björk, I. : Properties of antithrombin-thrombin complex formed in the presence and in the absence of heparin. *Biochem. J.* **213** : 345~353, 1983.
- 45) Pletcher, C. H., Nelsestuen, G. L. : The rate-determining step of the heparin-catalyzed antithrombin /thrombin reaction is independent of thrombin. *J. Biol. Chem.* **257** : 5342~5345, 1982. Two substrate reaction model for heparin-catalyzed bovine antithrombin/protease reaction. *J. Biol. Chem.* **258** : 1086~1091, 1983.
- 46) Olson, S. T., Srinivasan, K. R., Björk, I., Shore, J. D. : Binding of high affinity heparin to antithrombin III. Stopped flow kinetic studies of the binding interaction. *J. Biol. Chem.* **256** : 11073~11079, 1981.
- 47) Olson, S. T., Shore, J. D. : Demonstration of a two-step reaction mechanism for inhibition of α -thrombin by antithrombin III and identification of the step affected by heparin. *J. Biol. Chem.* **257** : 14891~14895, 1982.
- 48) Holmer, E., Söderström, G., Anderson, L.-O. : Studies on the mechanism of the rate-enhancing effect of heparin on the thrombin-antithrombin III reaction. *Eur. J. Biochem.* **93** : 1~5, 1979.
- 49) Griffith, M. J. : Heparin-catalyzed inhibitor/protease reactions: Kinetic evidence for a common mechanism of action of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80** : 5460~5464, 1983.
- 50) Griffith, M. J. : The heparin-enhanced antithrombin III/thrombin reaction is saturable with respect to both thrombin and antithrombin III. *J. Biol. Chem.* **257** : 13899~13902, 1982.
- 51) Lahiri, B., Danishefsky, I. : Application of high-performance liquid chromatography to the characterization of the interaction of heparin with antithrombin III and thrombin. *Anal. Biochem.* **129** : 46~50, 1983.
- 52) Speight, M. O., Griffith, M. J. : Calcium inhibits the heparin-catalyzed antithrombin III/thrombin reaction by decreasing the apparent binding activity of heparin for thrombin. *Arch. Biochem. Biophys.* **225** : 958~963, 1983.
- 53) Liang, J. N., Chakrabarti, B. : An essential role for the 2-sulfoamino group in the interaction of calcium ion with heparin. *Carbohydr. Res.* **106** : 101~109, 1982.
- 54) Yosizawa, Z. : A new type heparin " ω -heparin" isolated from whale organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16** : 336~341, 1964.
- 55) Kosakai, M., Yosizawa, Z. : High performance liquid chromatography of pyridylamino derivatives of sulfated oligosaccharides in the deamination products of porcine and whale heparin. *J. Biochem.* **92** : 295

