フィブリン重合過程へのカルシウム添加効果

小島瑠美，土橋敏明，外山吉治
群馬大学　理工学府　物質・生命理工学専攻 [〒376-8515　群馬県桐生市天神町 1 丁目 5-1]

１．緒言

フィブリノゲンは血液凝固因子の 1 つであり中央に E 領域，その両端に D 領域をもつ血漿糖タンパク質である．血液凝固カスケード反応の最終段階において，フィブリノゲンに酵素トロンビンが作用すると，フィブリノゲンの E 領域にある FpA と FpB が切断されフィブリンとなる．フィブリンは半分子ごとに重合することによりプロトフィブリルを形成し，その後ラテラル方向への集合によってゲルネットワークを形成する．一方，フィブリノゲンの D 領域には 4 つのカルシウムイオン結合サイトが存在する．フィブリン重合におけるこれらの結合サイトの役割については，いくつかの研究報告があるが完全に理解されていない 1)．本研究は，カルシウムイオンがフィブリン重合過程，フィブリンゲルの力学特性およびトロンビン活性に与える影響について，濁度測定，動的粘弾性測定および蛍光測定により検討した．

２．実験方法

試料：フィブリノゲンはウシ由来フィブリノゲン(SIGMA-Aldrich, Type1-s)をトリス緩衝生理食塩水（TBS）に溶解し，透析を行ったもの用いた．トロンビンは牛由来トロンビン(和光純薬)を用いた．カルシウム溶液は，塩化カルシウム二水和物を TBS に目的の濃度に溶解した．

濁度測定：測定は分光光度計(V-630, Jasco)を使用した．5mg/ml フィブリノゲン水溶液に 0.25U/ml トロンビンおよび塩化カルシウム溶液を 0mM，10mM，25mM,，50mM，75mM，100mM と濃度を変えて添加した試料を用いて，波長 350nm における濁度の波長依存性を測定した．

動的粘弾性測定：動的粘弾性の測定には平行板型動的粘弾性装置(東洋精機　レオログラフ・ゾル)を使用した．測定は温度 25℃，加振周波数 3Hz，変位量±50μm で行った．5mg/ml フィブリノゲン水溶液に 0.25U/ml トロンビンおよび塩化カルシウム溶液を 0mM，50mM，100mM と濃度を変えて添加した試料の貯蔵弾性率(G’)および損失弾性率(G’’)を測定した．

蛍光測定：蛍光強度の測定は蛍光分光光度計(FP-8200, Jasco)を使用した．0.03mM MCA 蛍光試薬溶液に 0.1U/ml トロンビンおよび塩化カルシウム溶液を 0mM～1000mM と濃度を変えて添加した試料の蛍光強度の経時変化よりトロンビンの酵素活性を測定した．

３．実験結果

濁度測定：カルシウム濃度 10mM，25mM，50mM では濁度の立ち上がりまでの時間が短くなり，飽和値が 0mM よりやや上昇したことからゲル化の促進が観察された．一方 75mM，100mM では，濁度の立ち上がりまでの時間が長くなり，飽和値が 0mM より低下したことからゲル化の抑制が観測された．

動的粘弾性測定：G’の経時変化を図に示す．カルシウム濃度 0mM に対して 50mM では G’の値の著しい上昇が観測された．一方，100mM では G’の増加の遅延が観測された．

蛍光測定： カルシウム濃度 25mM 程度でやや活性が上昇した後，さらに濃度を上げると活性は抑制された．

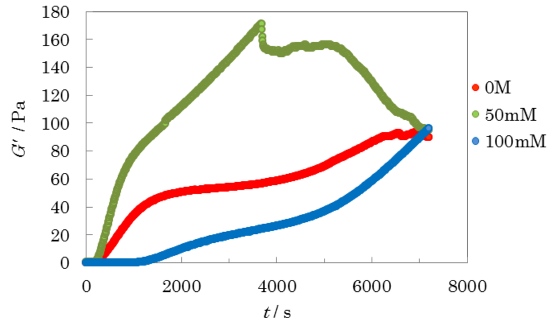

図　各カルシウム濃度における動的粘弾性測定で得られた G’の経時変化

文献

1) J. W. Weisel et al., Blood, 121, 1712-1719 (2013).