鼻副鼻腔粘膜における線維素溶解現象

第 4 報 ヒトおよび動物の鼻副鼻腔粘膜の Tissue Plasminogen Activator の作用様式

おかにし のり ひこ
岡 西 紀 彦

緒 言

第 1 項 実験材料ならびに実験方法

A) 実験材料

B) 実験方法

第 2 項 実験成績

- 1) urokinase に対する諸阻害剤による抑制効果
- 2) ヒト上顎洞粘膜 T.A. 液に対する諸阻

害剤による抑制効果

- 3) ブタ鼻副鼻腔粘膜 T.A. 液に対する諸阻害剤による抑制効果
- 4) イヌ鼻副鼻腔粘膜 T.A. 液に対する諸阻害剤による抑制効果

考 按

結 論

参考文献

諸 言

ヒトおよび種々の動物の鼻副鼻腔粘膜中には多量の tissue plasminogen activator (以下, T.A.) が含まれており¹⁾, この activator は主として, ヒトでは lysosomal fraction に, イヌでは microsomal fraction に含まれていることを著者は既述の論文²⁾において報告した.

本論文の研究は, これらの activator に種々の酵素阻害物質を作用させ, その作用をヒト, ブタおよびイヌの鼻副鼻腔粘膜について比較し, それらの間の作用様式の差異, および urokinase (UK) の作用様式との間の異同を知ろうとして企図されたものである.

第 1 項 実験材料ならびに実験方法

A) 実験材料

1) 被検試料: ヒトの上顎洞粘膜, ブタ, イヌの鼻副鼻腔粘膜は採取後, 直ちに dry ice 又は -20°C の冷凍庫内に保存し, 一週間以内に使用した. ヒトの上顎洞粘膜は Astrup の方法に準じて acetone 未³⁾にしたものを使用した.

2) 抽出溶剤: 0.15M NaCl-0.02 M tris buffer, pH 7.4 を使用した.

3) urokinase (UK): 持田製薬株式会社の Uronase を 0.15M NaCl-0.02M tris buffer (pH 7.4) にて 16 u/ml (Ploug unit) に溶解し

た.

4) フィブリノーゲン (Fg): 第一化学薬品株式会社のウシのフィブリノーゲン (Cohn Fract. I) を 0.2M 硼酸緩衝液 (pH 7.75) にて 0.4% に溶解したものを Fg 液として使用した (0.4% Fg 液).

5) トロンビン (Th): 持田製薬株式会社のウシのトロンビンを 0.2 M 硼酸緩衝液, pH 7.75 にて 10 u/ml に溶解した (10 u/ml Th 液).

6) 化学修飾試薬 (阻害剤)

Fibrinolytic Activity of Nasal and Paranasal Mucous Membrane. IV. Active Sites of Tissue Plasminogen Activator and Urokinase.
Norihiro Okanishi.

*広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 黒住静之教授)

a) diisopropylphosphofluoridate (DFP) : Sigma chemical co のものを 80% buthanol にて 2% に溶解したものを, 0.02M tris buffer (pH 7.4) にて 11 倍, 110 倍, 1,100 倍に希釈し, 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M 液を作製した.

b) iodoacetamide : 和光純薬工業株式会社のものを 0.02M tris buffer (pH 7.4) にて溶解した.

c) N-ethylmaleimide (NEM) : 和光純薬工業株式会社のものを, 0.02M tris buffer (pH 7.4) にて溶解した.

d) N-tosyl-L-lysylchloromethane (TLCK) : ドイツメルクのを 0.2M tris buffer (pH 7.4) にて溶解した.

7) 対照

iodoacetamide, NEM, TLCK に対しては, 0.02M tris buffer (pH 7.4) を DFP に対しては, 80% buthanol を 0.02M tris buffer (pH 7.4) にて DFP の希釈度に対応させて希釈した.

8) 緩衝液: 0.2M 硼酸緩衝液 (pH 7.75) は Norman⁸⁾ の方法により作製. 0.02M tris buffer (pH 7.4) は tris- (hydroxymethyl) -aminomethane および塩酸を用いて作製.

B) 実験方法

図 1 の如く, 被検試料に 10 倍量の抽出溶剤を加え, acetone 未を用いる場合は, (湿重量/乾燥重量) $\times$ 5 倍量の抽出溶剤を加えたものをホモジェナイズ後, 0°C に 2 時間放置後, 3000 r.p.m. にて 15 分間遠沈を行ない, 上清を T.A. 液とした. 本研究は Kaplan and Austen⁵⁾ の方法を参考とし, 図 1 の如き手順で実験を行なった. T.A. 液 1.8ml に諸阻害剤 0.2ml を加え全量を 2.0ml とし, 終濃度を iodoacetamide, NEM では 10^{-2} M, TLCK では 10^{-2} M, 10^{-3} M, DFP では 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M とした. 対照としては, iodoacetamide, NEM および TLCK に対しては T.A. 液 1.8ml に 0.02M tris buffer (pH 7.4) の 0.2ml を加えたものおよび DFP に対する対照として

図 1 Tissue Activator の線溶作用に対する諸 Inhibitor による抑制試験

T.A. 液 1.8ml に 80% buthanol を 0.02M tris buffer (pH 7.4) にて 11 倍, 110 倍, 1,100 倍に希釈したものを各 0.2ml づつ加え, DFP 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M 液に対する対照とした. 上記の T.A. 液と阻害剤の混液および対照液を 37°C にて 90 分間 incubation を行なったものを, 4°C にて 1 晩 (7~10 時間) 透析を行なった. 透析外液としては, 抽出溶剤と同じく, 0.15M NaCl-0.02M tris buffer (pH 7.4) を使用した. このものの 0.03ml を各検体につき 3 点づつ標準フィブリン平板上⁹⁾に滴下し, 13 時間乃至 18 時間後にフィブリン膜溶解環の面積 (長径 $\times$ 短径 mm²) を測定し, 各検体毎に 3 点の平均値を求め活性度とした.

各動物によって対照群の活性度が異なるが, UK (16u/ml) も含めて, 対照による溶解面積は 13 時間後で, イヌ以外では略 100 乃至 200 mm² の範囲内に入った. この為, ヒト, ブタ, UK (16u/ml) では 13 時間後に, 犬では 18 時間後に測定した. なお, 標準フィブリン平板は内径 8.5cm のペトリシャーレに 0.4% Fg 液 8 ml および 10u/ml Th 液 4 ml を混入し作成した.

第2項 実験成績

1) urokinase に対する諸阻害剤による抑制効果

図2に見られる如く、DFP では、終濃度 10^{-3}M の場合、対照液では 200mm^2 を示すのに対し、全く活性が認められず、100%の抑制度が認められた。終濃度 10^{-4}M の場合には、対照液では 164mm^2 を示したのに対し、 8mm^2 しか活性を示さず、95%の抑制度が認められた。次に終濃度が 10^{-5}M では、対照液にて 167mm^2 を示したのに対し、 113mm^2 の活性値を示し、32%の抑制度が認められた。

iodoacetamide では、終濃度が 10^{-2}M の場合、対照液が 193mm^2 の活性値を示したのに対し、 185mm^2 の活性値を示し、殆んど抑制は認められなかった。

NEM では終濃度が 10^{-2}M で対照液にて 193mm^2 の活性値を示したのに対し、 203mm^2 の活性値を示し、抑制は全く認められなかった (-5%)。

TLCK では終濃度が 10^{-2}M で対照液で 193mm^2 の活性値を示したのに対し、 129mm^2 の

活性値を示し33%の抑制度が認められた。

終濃度が 10^{-3}M の場合、対照液では 193mm^2 の活性値を示したのに対し、 221mm^2 の活性値を示し、TLCK 混合液ではかえって活性が促進される傾向(-15%)さえ窺えた。

2) ヒト上顎洞粘膜T.A.液に対する諸阻害剤による抑制効果

図3に見られる如く、DFP では終濃度が 10^{-3}M の場合、対照液にて 104mm^2 を示すのに対し、DFP 混合液では全く活性は認められず、100%の抑制度が認められた。終濃度が 10^{-4}M の場合には、対照液にて 97mm^2 の活性値を示したのに対し、 44mm^2 の活性値を示し、55%の抑制度が認められた。終濃度が 10^{-5}M では、対照液にて 92mm^2 の活性値を示したのに対し、DFP 混合液では 132mm^2 の活性値を示し、かえって促進される傾向さえ窺えた(-43%)。

iodoacetamide では、終濃度が 10^{-2}M の場合に対照液にて 120mm^2 の活性値を示したの

図2 Urokinase に対する諸 Inhibitor の抑制効果

図3 ヒト上顎洞粘膜T.A.に対する諸 Inhibitor の抑制効果

に対し、 98mm^2 の活性値を示し、僅かな抑制効果が窺われた (18%)。

NEM では、終濃度が 10^{-2}M の場合に、対照液にて 120mm^2 の活性値を示したのに対し、 85mm^2 の活性値を示し軽度の抑制度が窺われた (29%)。

TLCK では終濃度が 10^{-2}M の場合に、対照液にて 120mm^2 の活性値が認められたのに対し、 89mm^2 と軽度の抑制度が窺われた (26%)。終濃度が 10^{-3}M の場合には、対照液にて 120mm^2 の活性値を示したのに対し、 108mm^2 を示し殆んど抑制は認められなかった (10%)。

3) ブタ鼻副鼻腔粘膜 T.A. 液に対する諸阻害剤による抑制効果

図 4 に見られるように DFP では、終濃度が 10^{-3}M の場合に、対照液にて 124mm^2 の活性値を示したのに対し、DFP の混合液では全く活性を示さず、100% の抑制度が認められた。終濃度が 10^{-4}M の場合には、対照液にて 113mm^2 の活性値を示したのに対し、 90mm^2 の活性値を示し、軽度の抑制度が窺われた (20%)。終濃度が 10^{-5}M の場合には、対照液にて 105

mm^2 の活性値を示したのに対し、DFP 混合液ではやや促進される傾向さえ窺えた (-11%)。

iodoacetamide では、終濃度が 10^{-2}M の場合に、対照液にて 121mm^2 の活性値を示したのに対し、 121mm^2 の活性値を示し抑制は全く認められなかった (0%)。

NEM では、終濃度が 10^{-2}M の場合に、対照液にて 121mm^2 の活性値を示したのに対し、 117mm^2 の活性値を示し、抑制は全く認められなかった (3%)。

TLCK では、終濃度が 10^{-2}M の場合に、対照液にて 121mm^2 の活性値を示したのに対し、 124mm^2 の活性値を示し全く抑制は認められなかった (-2%)。終濃度が 10^{-3}M の場合にも、対照液にて 121mm^2 の活性値を示したのに対し、 130mm^2 と全く抑制は認められなかった (-7%)。

4) イヌ鼻副鼻腔粘膜 T.A. 液に対する諸阻害剤による抑制効果

図 5 に示す如く、DFP では、終濃度が 10^{-3}M の場合でも、対照液にて 76mm^2 の活性値を示したのに対し、 63mm^2 の活性値を示し、僅かな抑制傾向しか窺われなかった (17%)。

図 4 ブタ鼻副鼻腔粘膜 T.A. に対する諸 Inhibitor の抑制効果

図 5 イヌ鼻副鼻腔粘膜 T.A. に対する諸 Inhibitor の抑制効果

iodoacetamide では終濃度が 10^{-2}M の場合に、対照液にて 91mm^2 の活性値を示したのに対し、 39mm^2 の活性値を示し、57% の抑制度を認めた。

NEM では、終濃度が 10^{-2}M の場合に対照液にて 91mm^2 の活性値を示したのに対し、全く活性値を示さず、100% の抑制度が認められた。

考 按

DFP (diisopropylphosphorofluoridate) は酵素活性中心の異常に高い反応により serine 残基に選択的に結合し、その活性を完全に失活させると考えられており、活性中心 serine 残基の探索に用いられる^{7)~9)}。

TLCK (N-tosyl-L-lysylchloromethane) は酵素基質に類似の構造を有することにより、活性中心の histidine 残基に選択的に結合し失活を来す。TLCK はトリプシンの活性中心の一つである His-46 を修飾することが知られているが、同じく histidine 残基を活性中心に有するキモトリプシンでは、TPCK (N-tosyl-L-phenylalanylchloromethane) により His-57 が修飾され、失活する。この際、TLCK はキモトリプシンには、TPCK はトリプシンには、それぞれ作用し得ない^{7)~9)}。この点に関して、加藤、成田⁹⁾らは、トリプシン、キモトリプシンの一次構造を比較し、「化学修飾の結果より推定される活性中心である His 周辺と active serine 周辺の構造は同一であるが、両者共に有するエステラーゼ作用およびプロテアーゼ作用は基質特異性という点では異っていることを考えると、これら共通部分はペプチド結合ならびにエステル結合の水解触媒にとって必要な構造であり、基質特異性は他の要素に支配されているといえよう」と述べている。要するに TLCK により失活を受ける場合、histidine 残基を含む活性中心は、一次構造以外の面においても、例えば活性中心の地勢などに関しても、トリプシンのそれに類似していることが推測されよ

う。TLCK では、終濃度が 10^{-2}M の場合に、対照液にて 91mm^2 の活性値を示したのに対し、 11mm^2 の活性値を示し、88% の抑制度が認められた。終濃度が 10^{-3}M の場合には、対照液にて 91mm^2 の活性値を示したのに対し、 36mm^2 の活性値を示し、60% の抑制度が認められた。

う。又、TLCK により失活を受けない場合に活性中心に histidine 残基が関与しないとは断定出来ないであろう。

iodoacetamide, NEM (N-ethylmaleimide) は DFP, TLCK などとやや趣を異にし、SH 基の反応性識別試薬であるが、酵素活性発現のために SH 基を必要とする所謂、SH 酵素であるパパイン、ステムブロメラインなどいくつかの蛋白分解酵素がこれらにより、活性中心の修飾を受け失活することが知られている^{7)~9)}。しかし、これ等の試薬により失活を受けない場合に、活性中心の SH 基の関与を否定することは出来ないであろう。

UK, ヒト上顎洞粘膜 T.A., ブタ鼻副鼻腔粘膜 T.A. はいずれも DFP にて著明に抑制されるところより、活性中心に serine 残基をもつ所謂、serine protease に属すると推定される。UK では更に histidine 残基の関与もある程度窺われる。ヒト上顎洞粘膜では SH 基および histidine 残基の関与も幾分推定される。これらと対照的にイヌ鼻副鼻腔粘膜 T.A. は NEM 10^{-2}M で 100%, iodoacetamide 10^{-2}M で 57% 抑制されるところより、SH 基が活性中心の一つとして重要な位置を占めていると考えられる。また TLCK によっても著明な抑制が認められる処より histidine 残基も活性中心の一つとして重要な位置を占めていると考えられる。

動物の種類により鼻副鼻腔粘膜 T.A. の活性度にも差があるため、各 T.A. および UK の活性度を同程度に統一したのについて、実験

を行なうことが望ましいと考えられたが、犬鼻粘膜T.A.液以外では13時間 incubate 後の対照群フィブリン膜溶解環が100乃至 200mm² 範囲内に入った為、特に各T.A.液の活性度を調整しなかった。イヌ鼻副鼻腔粘膜T.A.では活性度が他に比して可成り、低かったがT.A.液の活性度を他のもののレベルにすることは困難であると考えられたのでそのまま使用した。

Kaplan and Austen⁵⁾ はヒト血液中の plasminogen proactivator に Hageman factor を加えることにより生じた plasminogen activator について、DFP および TLCK を用いてその plasminogen 活性化作用に対する抑制効果をフィブリン平板法にて検討している。それによると DFP 10⁻³M で90%の抑制度を TLCK 10⁻³M で20%の抑制度を認めたと報告している。これは著者の行なったUKおよびヒト上顎洞粘膜T.A.に関する実験成績にほぼ類似したものである。

Herbert et al.⁸⁾ は Hageman factor cofactor, plasmin および urokinase についてそれ等の esterase 作用に対する iodoacetamide, NEM の抑制効果につき報告している。彼らは合成基質として acetyllysine methylester (Ac-Lys-OMe) を用い、基質中に直接阻害剤を加え、iodoacetamide, NEM が終濃度で各々 10⁻²M となるようにした。その結果、Hageman

factor cofactor は iodoacetamide にて 72%, NEM にて 43%, plasmin は iodoacetamide にて 59%, NEM にて 37%, urokinase では iodoacetamide にて 70%, NEM にて 49% の抑制度を認めたという。

著者の実験成績ではUKに対して iodoacetamide, NEM では抑制効果が認められず、彼らのものとは異った成績を得た。この差違をどのように解釈すべきかは実験条件が全く異なるので軽卒には結論を下せないが、このことより、UKが esterase として作用する場合とウシの plasminogen activator として作用する場合では、活性中心の関与する態度が異なるのではないだろうかという疑問が持たれる。しかし、Buck et al.¹¹⁾ は human plasminogen および plasmin と streptokinase の同モル混合液についてその TAME esterase activity および bovine plasminogen activator activity に対する DFP および TLCK による抑制試験を行なった結果、両活性は同一の活性部位によるものであると述べており、更に、藤井¹²⁾ らは「ε-ACA の plasmin に対する阻害効果についてもし、ε-ACA が活性中心に結合するならば、基質のいかにかわらず、阻害効果がみられるはずである。」と述べているように、この点に関しては、更に慎重な検討が必要であろう。

結 論

ヒト、ブタ、イヌの鼻副鼻腔粘膜 tissue plasminogen activator および urokinase の活性中心について、諸修飾試薬を用い、フィブリン溶解抑制度を測定し次の結果を得た。

1) UK, ヒト上顎洞粘膜T.A.、ブタ鼻副鼻腔粘膜T.A.は、活性中心の一つに serine 残基をもつ所謂 serine protease と考えられる。

2) UKでは histidine 残基も活性中心に関与していることが窺われる。

3) ヒト上顎洞粘膜T.A.では、histidine 残基、SH基の関与も窺われる。

4) イヌ鼻副鼻腔粘膜T.A.は、以上3者と対照的にSH基および histidine 残基が活性中心に重要な位置を占めていると考えられる。

稿を終るにあたり、御懇切なる御指導および御校閲を賜った恩師黒住静之教授ならびに終始御指導、御鞭撻を頂いた原田康夫助教授に衷心より謝意を捧げます。

本実験に直接、御指導および御協力を頂いた神戸学院大学栄養学部岡本歌子教授ならびに御協力を頂いた同教

室員諸兄に深甚なる感謝の意を表します。

最後に本研究を行うにあたり多大な便宜をお計り頂いた 三菱 三原病院長小園昇博士に 厚く感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第12回日本鼻副鼻腔学会において発表した。

参 考 文 献

- 1) 岡西紀彦：鼻副鼻腔粘膜における線維素溶解現象：第1報，鼻副鼻腔粘膜における局所線溶能の生理的意義。耳鼻臨床 68 : 増3 ; 427, 1975.
- 2) 岡西紀彦：鼻副鼻腔粘膜における線維素溶解現象：第3報，ヒトおよびイス鼻副鼻腔粘膜線溶能の細胞内局在。耳鼻臨床 68 : 増3 ; 463, 1975.
- 3) Astrup, T. : Fibrinokinase. Acta. Physiol. Scand., 24 : 267, 1951.
- 4) Norman, P.S. : Studies on the plasmin system. J. Exp. Med., 106 : 423, 1957.
- 5) Kaplan, A.P. and Austen, K.F. : The fibrinolytic pathway of human plasma, isolation and characterization of the plasminogen proactivator. J. Exp. Med., 136 : 1378, 1972.
- 6) Astrup, T. and Müllertz, S. : The fibrinplate method for estimating fibrinolytic activity. Arch. Biochem. Biophys., 40 : 346, 1952.
- 7) 柴田和雄：高次構造の化学的研究法。東京大学出版会 1971.
- 8) 西沢一俊，志村憲助 編：酵素の分子生物学。南江堂 1973.
- 9) 西沢一俊，志村憲助 編：入門酵素化学。【南江堂 1973.
- 10) Herbert, R. J., Ogston, D. and Douglas, A.S. : Further purification and properties of Hageman factor cofactor. Biochim. Biophys. Acta., 271 : 371, 1972.
- 11) Buck, B.C., Hummel, B.C.W. and DeRenzo, E.C. : Interaction of streptokinase and human plasminogen ; V. studies on the nature and mechanism of formation of the enzymatic site of the activator complex. J. Biol. Chem., 243 : 3648, 1968.
- 12) 藤井節郎，村松 睦：プラスミンの生化学。蛋白質，核酸，酵素 12 : 226, 1967.

(原稿到着：昭和49年12月26日
別刷請求先：岡西 紀彦
〒734 広島市霞町 1-2-3
広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室)