組織ウロキナーゼの分子構造と線溶活性

須見 洋行* Kenneth C. Robbins** 小杉 忠誠*
松尾 理* 美原 恒*

Some properties of a high molecular form kidney
cultured urokinase

Hiroyuki SUMI*, Kenneth C. Robbins**, Tadayoshi KOSUGI*
Osamu MATSUO* and Hisashi MIHARA*

Key words : tissue cultured urokinase, urinary urokinase,
molecular structure, affinity chromatography,
plasminogen activator

A high molecular form of human kidney cultured urokinase (T HMW-UK) was highly purified by affinity chromatography on [N^α-(ε-aminocaproyl)-DL-homoarginine hexylester]-Sephadex, followed by isoelectric focusing and Sephadex G-100 gel filtration. The molecular weight (53,400 by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis), amino acid composition, and kinetic parameters for Glu-plasminogen activation ($K_m=0.92 \mu\text{M}$, $k^{\text{cat}}=28.7 \text{ min}^{-1}$) of the enzyme resembled those of the high molecular form of urinary urokinase (U HMW-UK). However, some differences were found as follows. 1) T HMW-UK was more resistant to reduction, and the molecule did not completely dissociate into two protein bands (heavy and light chains) on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. 2) The isoelectric point of T HMW-UK ($pI=9.3$) by isoelectric focusing was more alkali than that of U HMW-UK ($pI=8.9$). 3) The specific activity of T HMW-UK (63,500 IU/mg protein) was approximately half of that of U HMW-UK (100,000—120,000 IU/mg protein).

The results indicate certain difference in physicochemical properties between T HMW-UK and U HMW-UK, and that some T HMW-UK is composed of single polypeptide chain or that some differences exist in the sugar composition of T HMW-UK and U HMW-UK.

* 宮崎医科大学第二生理 (〒889-16 宮崎県宮崎郡清武町大字木原5200), Second Department of Physiology, Miyazaki Medical College, Miyazaki, Japan.

** Biochemistry Section, Michael Reese Research Foundation, Chicago, U.S.A.

緒 言

ウロキナーゼ(UK) による線溶療法がさかんとなっている一方、酵素としての UK の性質、とくにヒト腎の組織培養で得た高分子 UK (T HMW-UK) に関する報告は少ない。

著者らは最近 affinity chromatography にて T HMW-UK を純化しその性質を検討したので報告する。

I. 材料および方法

T HMW-UK の粗標品 (SA 6,500 IU/mg 蛋白) は Robbins 博士 (シカゴ大学) より提供された。純化した尿由来の U HMW-UK [SA 124,000 IU/mg 蛋白, p-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate (NPGB) タイトレーションで94.1% active], 同 UK に対する家兎抗血清の調整, [N^x-(ε-aminocaproyl-DL-homoarginine hexylester)-Sepharose による affinity chromatography, およびゲル透過の操作はすでに報告した方法^{1,4)}に順じた。蛋白は Lowry 法で, UK 活性は pyro-Glu-Gly-Arg-pNA (S-2444) を基質とした比色法で, また Glu-plasminogen の活性化 kinetics は Whol らの方法²⁾で行なった。等電点電気泳動は LKB 8101, 110cmカラムを用い操作した。sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide ゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Weber & Osborn の方法で, また試料の還元には 6M 尿素入り 1.0% β-mercaptoethanol で, 37°C 1 時間行った。

II. 成 績

1. UK 分子の還元による影響

各種 UK 標品を SDS-PAGE にかけた結果を図1に示す。尿由来の U-UK 標品 (No. 1~4, 6, 7) では全て還元処理で HMW-UK 分子の有する MW 53,000 の蛋白帯が完全に消失し, 31,000 (H鎖) および18,000 (L鎖) の2つの蛋白帯に変化するのに対し、腎培養で得られた T-UK 標品 (No. 5) は同条件で完全な解離を起こさず還元処理後も MW 53,000 の蛋白帯が残ることがわかった。

2. T HMW-UK の精製と性質

Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of unreduced and reduced urokinase preparations.

Samples No. 1~4, 6 and 7 contained commercially obtained urinary urokinase, No. 5 contained human kidney cultured urokinase, and S contained standard proteins (bovine serum albumin, egg albumin, chymotrypsinogen A, and cytochrome c). A) Unreduced samples: the sample diluent consisted of 6 M urea, 1.0% sodium dodecyl sulfate and 0.01M phosphate buffer, pH 7.4. B) Reduced samples: Urokinase reduction was achieved with 1.0% β-mercaptoethanol for 1 hr at 37°C. The numbers on the right indicate molecular weight in thousands.

60万 IU の粗 T HMW-UK 標品を [N^a-(ε-aminocaproyl)-DL-homoarginine hexylester-Sepharose にかけた結果を図2に示す。吸着された酵素は 6M 尿素を含む緩衝液で溶出される。これをさらに等電点電気泳動(pH 3.5~

Fig. 2 Elution profile of T HMW-UK applied to a column of [N-(ϵ -aminocaproyl)-DL-homoarginine hexyl ester]-Sephacrose. Six $\times 10^6$ IU of crude T HMW-UK was applied to the column. The buffer was 0.1M phosphate containing 2M NaCl, pH 7.4. The flow rate was 21 ml/hr. The arrow indicates the point of buffer change.

Table 1 Physicochemical properties of purified kidney cultured urokinase

Molecular weight			
Gel filtration			54,000
SDS-polyacrylamide			53,400
gel electrophoresis			
Specific activity			
(S-2444) (IU/mg protein)			63,500
Active site (NPGP) (%)			54.1
Disc gel electrophoresis			1 band
with β -mercaptoethanol			3 bands
			(H and L chains)
<hr/>			
Amino acid analysis (Trp not determined, values not corrected)			
Lys	32.4	Ala	22.5
His	19.7	1/2 Cys	21.5
Arg	25.9	Val	23.8
Asp	42.4	Met	3.3
Thr	28.6	Ile	20.5
Ser	32.8	Leu	37.9
Glu	46.7	Tyr	20.0
Pro	25.7	Phe	13.9
Gly	44.9	Total	(462)

10.5), および Sephadex G-100 ($1.0 \times 149\text{cm}$) によるゲル濾過で精製した。最終標品(約 180,500 IU)は PAGE で単一であった。

純化した T HMW-UK の物理化学的性質を表 1 にまとめた。Ouchterlony 法で T HMW-UK と U HMW-UK は単一の沈降線を示し、抗原性が一致した。Glu-plasminogen の活性化能を比較した結果（酵素量は NPGB タイトレーションによる）、U HMW-UK が K_m $0.63 \mu M$, k_{cat} 28.1 min^{-1} ($k_{cat}/K_m = 44.6 \mu M^{-1} \text{ min}^{-1}$) であるのに対し、T HMW-UK は K_m $0.92 \mu M$, k_{cat} 28.7 min^{-1} ($k_{cat}/K_m = 31.2 \mu M^{-1} \text{ min}^{-1}$) を示した。また、等電点電気泳動では U HMW-UK が pI 8.9 に対し T HMW-UK は pI 9.3 に活性ピークを示した。

III. 考 察

UK は分子量の上から高分子タイプ (HMW-UK) とその酵素的分解産物と考えられている低分子タイプ (LMW-UK) に分けられる。UH MW-UK に関しては最近 Holmberg, Soberano ら³⁾, および著者ら⁴⁾ が二本のポリペプチド鎖

構造を有すること、また著者ら⁴⁾が active site はH鎖上にあることを証明しているが、一方 T HMW-UK の性質に関しては今までほとんど報告がない。

本著では純化した T HMW-UK の分子量、アミノ酸組成(表1)、および Glu-plasminogen の活性化能がすでに報告されている U HMW-UK の結果³⁾⁴⁾と非常によく似ていることを明らかにした。また T HMW-UK は U HMW-UK と異なり、還元処理で分子の完全な H 鎖、L 鎖への解離が起りにくいこと(図1)、また U HMW-UK (100,000~120,000 IU/mg 蛋白)³⁾⁴⁾にくらべ分子当りの活性が低いこと、さらに等電点電気泳動で T HMW-UK はより塩基性であることがわかった。

1977年 Bernik & Oller⁵⁾らは腎中に preurokinase の存在を予想しているが、著者らの得た T HMW-UK 中にも一本鎖ポリペプチド構造を有する proenzyme の存在が考えられる。また U HMW-UK と T HMW-UK の糖成分の違いについても今後検討しなければならない。

文 献

- 1) Sumi, H., Sasaki, K. and Muramatsu, M.: A simple and rapid purification method of urokinase using a [N^α-(ε-aminocaproyl)-D L-homoarginine hexylester]-Sephadex column. *Acta Haem. Jap.*, **41**; 766~770, 1978.
- 2) Whol, R. C., Summaria, L., Arzadon, L. and Robbins, K.C.: Steady state kinetics of activation of human and bovine plasminogen by streptokinase and its equimolar complexes with various activated forms of human plasminogen. *J. Biol. Chem.*, **253**; 1402~1407, 1978.
- 3) Soberano, M. E., Ong, E. B., Johnson, A. J., Levy, M. and Schoellmann, G.: Purification and characterization of two forms of urokinase. *Biochem. Biophys. Acta*, **445**; 763~773, 1976.
- 4) Sumi, H. and Robbins, K.C.: The preparation and characterization of a functionally-active urokinase heavy chain prepared from high molecular weight urinary urokinase. Abstract of 5th International Conference on Synthetic Thrombolytic Agents, p. 4, Malmö, Sweden, 1980.
- 5) Bernik, M.B. and Oller, E.P.: Regulation of fibrinolysis through activation and inhibition of activation of plasminogen proactivator (preurokinase). *Thromb. Haemostas.*, **38**; 136, 1977.

●血小板研究のすべてを網羅して体系化!

血 小 板 — 基礎と臨床 —

編集 東京大学教授 山中 學 専門医44氏分担執筆
A 4 判 447頁 図159 表74 定価8,800円(〒240円)

101 東京都千代田区神田多町2-11 科学評論社

振替口座東京 7-102026
電話 03-252-7768