Glu-プラスミノゲン (plg) と Lys-plg の 立体構造の分光学的測定

高田 明和* 高田由美子* 牧野 安博*
浦野 哲盟* 白浜 茂穂**

Spectrophotometric measurement of the conformations of Glu-and Lys-plasminogen

Akikazu TAKADA*, Yumiko TAKADA*, Yasuhiro MAKINO*
Tetsumei URANO** and Shigeho SHIRAHAMA***

Key words: Glu-plasminogen, Lys-plasminogen, acidified plasminogen,
conformation of plasminogen, circular dichroism

Glu-and Lys-plasminogen (plg) were subjected to low pH (pH 2.0). Their conformation and activation rates were measured. The activation rates of Glu-plg enhanced after acidified. The increase was irreversible even after a short interval of acidification. The activation rate of acidified Glu-plg did not increase in the presence of fibrin or fibrinogen. The activation rate of acidified Lys-plg rather decreased and was not influenced in the presence of fibrin or fibrinogen. The fluorescence intensity at 340 nm of plasminogen decreased after acidification. The negative molar ellipticity, $[\theta]$, of Glu-plg decreased after acidification but that of Lys-plg did not change.

These results indicate that the conformational change corresponded to the increased activation rate of Glu-plg after the acidification. Although the tertiary conformation of Lys-plg changed after the acidification, its activation rate did not change.

* 浜松医科大学第二生理 [〒431-31 浜松市半田町 3600], Department of Physiology, Hamamatsu University, School of Medicine, Hamamatsu, Japan.

** 同 第二外科, Department of Surgery, Hamamatsu University, School of Medicine, Hamamatsu, Japan.

*** 同 皮膚科, Department of Dermatology, Hamamatsu University, School of Medicine, Hamamatsu, Japan.

はじめに

Glu-plg より Lys-plg の方がアクチベーターにより活性化され易いことは知られている¹⁾. われわれは Glu-plg の UK による活性化がフィブリン (fn) の存在下で促進するが, Lys-plg は影響をうけないことを示した²⁾. しかし Glu-plg の活性化への fn の影響には否定的な発表もある³⁾. われわれはこれは plg 純化過程の影響もあるのではないかと考え, 一例としての酸処理時の構造および活性化の変化を検討した.

I. 方 法

plg の活性化は S-2251 の水解で測定し⁴⁾, 構造は蛍光⁵⁾, 円二色性分散⁵⁾により測定した.

II. 結 果

1. Glu-, Lys-plg の蛍光, 円二色性分散測定

Glu-, Lys-plg は CD により β 構造を主とし

て α ヘリックスの少ない構造をし, Lys-plg の方が谷の分子橢円率が小さくよりランダムな構造をしていた. また 340 nm 前後のトリプトファン残基に由来する蛍光も Lys-plg の方が弱く, 高次構造にも疎水性残基がタンパク表面に露出していることを推察させる.

2. 酸処理 plg の UK による活性化 (図 1)

Glu-plg を酸処理すると UK による活性化は著しく高まったが Lys-plg の活性化は若干低下した.

Glu-plg の活性化は酸処理後には fn, fbg の影響をうけなくなった. この際 Glu-, Lys-plg 共に 340 nm 付近の蛍光強度を減少させ 3 次構造に変化が起きていることを示す. さらにこのような構造と活性化の変化は Glu-plg を pH 2 にし, すぐに pH 7.0 にもどしても見られ, そのまま 24 時間放置してももとにもどらなかった. plg のタンパク表面の疎水域を fluorescent probe である 1-anilino-8-naphthalene sulfon-

Fig. 1 Effects of acidification of plasminogen on its activation by UK. In the left side of the figure, Glu-plg ($1 \mu\text{M}$) was kept at pH 2 for 0 min, 10 min or 24 hrs, and then pH was adjusted to 7.0 which was used as acidified Glu-plg. In the right side of the figure, pH of Glu-plg ($1 \mu\text{M}$) was changed to pH 2 and immediately adjusted to pH 7 then kept for 0, 1 or 24 hrs which was used as acidified Glu-plg. In both figures, 0.2 ml of acidified Glu-plg ($1 \mu\text{M}$) was mixed with 0.2 ml of UK (100 u/ml), 1.0 ml of S-2251 ($200 \mu\text{g/ml}$) and 0.6 ml of buffer. The mixture was put into a cuvette to measure spectrophotometric changes at 405 nm at 37°C using Beckman DU8B spectrophotometer.

Fig. 2 CD spectra of native and acidified Glu-plg (left) or Lys-plg (right). Acidified plasminogen was made by keeping Glu- or Lys-plg at pH 2 for 3 hrs at room temperature.

ate (ANS) を用いて測定すると pH 2 にして 3 時間迄の室温放置ではタンパク表面は著しく親水性で ANS と結合せず、24 時間以上放置すると ANS との結合性をまし表面に疎水域が出現することが判かった。しかしこのような plg も変性しているのではないことは UK による活性化が亢進していることから示された。

3. Glu-, Lys-plg の酸処理による CD スペクトルの変化 (図 2)

Glu-plg を酸処理 (3 時間) すると分子橢円率が減少し 2 次構造がランダムになった。この時の $[\theta]$ の大きさは Lys-plg の $[\theta]$ と同じ程度になった。一方 Lys-plg の $[\theta]$ は酸処理によって変化しない。このことは Lys-plg の活性化が酸処理の影響をうけないことと関係するようにも推察される。

III. 結 論

Glu-plg は酸処理によりまず高次構造の変化をうけ活性化も亢進したがこれは不可逆的で pH をもどして放置してももどらなかった。

文 献

- 1) Claeyss, H. and Vermeylen, J.: Physicochemical and proenzyme properties of NH_2 -terminal glutamic acid and NH_2 -terminal lysine human plasminogen. Influence of 6-aminohexanoic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, **342**; 351~359, 1974.
- 2) Takada, A. and Takada, Y.: Effects of ω -aminoacids and clot formation on the activation by urokinase of various plasminogen preparations. *Thrombos. Res.*, **18**; 167~176, 1980.
- 3) Verheijen, J.H., Nieuwenhuizen, W. and Wijngaards, G.: Activation of plasminogen by tissue activator is increased specifically in the presence of certain soluble fibrin (ogen) fragments. *Thrombos. Res.*, **27**; 377~385, 1982.
- 4) Takada, A., Takada, Y. and Sugawara, Y.: Effects of fibrinogen and fibrin on the activation of Glu- and Lys-plasminogen by urokinase. *Thrombos. Res.*, **33**; 561~569, 1984.
- 5) Sugawara, Y., Takada, Y. and Takada, A.: Fluorescence polarization and spectropolarimetric studies on the conformational changes induced by ω -aminoacids in two isozymes of Glu-plasminogen (I and II). *Thrombos. Res.*, **33**; 269~275, 1984.