2種類の表皮 PA inhibitor ; UK との相互作用の解析

日比野利彦* 伊崎 誠一* 伊崎 正勝*

Two distinct forms of plasminogen activator inhibitor in human epidermis and their interaction with urokinase

Toshihiko HIBINO*, Seiichi IZAKI* and Masakatsu IZAKI*

Key words: plasminogen activator, plasminogen activator
inhibitor, anhydro-enzyme, DIP-enzyme

Two species of plasminogen activator (PA) inhibitors (PA-I₁ and PA-I₂) were purified from human cornified cell extract by use of Fast Protein Liquid Chromatographic columns, Mono Q (high performance anion-exchanger) and Mono P (high resolution chromatofocusing). Both PA-I₁ with a molecular weight (MW) of 66,000 and PA-I₂ with MW 45,000 showed inhibition against urokinase (UK). However, different inhibition mechanisms were demonstrated for these inhibitors. E-I complex between PA-I₁ and UK was found to be dissociable by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Whereas, PA-I₂ formed undissociated complex with UK. Using affinity column technique with immobilized active site modified UK, involvement of active site serine for E-I complex formation was investigated. PA-I₁ demonstrated binding affinity with native UK, but it was not adsorbed either to anhydro-UK whose active site serine was converted to dehydroalanine, or DIP-UK whose active site was covered with diisopropylphosphate group. PA-I₂ was found to bind with anhydro-UK in addition to native UK, but PA-I₂ did not show binding affinity with DIP-UK.

はじめに

以前にわれわれは、ヒト表皮角質には Plasminogen Activator (PA) inhibitor が存在する

ことを報告した¹⁾。今回、表皮 PA inhibitor が性質のよく似た2種類の物質 (PA-I₁ および PA-I₂) より成ること、さらに、精製した PA-I₁ および PA-I₂ と Urokinase (UK) との反応性の

* 岩手医科大学皮膚科 [〒020 盛岡市内丸 19-1], Department of Dermatology, Iwate Medical University School of Medicine, Morioka, Japan.

違いについて明らかにした。

I. 方 法

ヒト表皮角質を0.1 M Tris HCl (pH 8.0) + 0.14 M NaClで抽出後, Sephacryl S-200, DEAE Sepharose, hydroxylapatite chromatography で部分精製したサンプルを得た。さらに, FPLC (Pharmacia 社製) の Mono Q (高分離イオン交換体) column, そして Mono P (高分解能 chromatofocusing) column を用いて, PA-I₁ と PA-I₂ を純化した。Inhibitor 活性の測定には Glu-Gly-Arg-pNA (s-2444) を用いた。精製した inhibitor と UK との complex 形成を SDS 電気泳動で調べた。UK は還元後, アルキル化して精製した active heavy chain UK を用いた^{2,3)}。さらに, PA-I₁ 及び PA-I₂ と UK との相互作用における UK の活性中心の関与について調べるため, DFP を活性 serine に作用させた DIP-UK と PMSF との反応後アルカリ処理して anhydro-UK を調整し⁴⁾、これらを native UK と共に Sepharose に固定化した

affinity column を得た。

II. 結 果

部分精製したサンプルを Mono Q column で分画したところ, inhibitor 活性が明瞭な2つの peak に分離して認められた(図1)。

PA-I₁ と PA-I₂ は chromatofocusing column Mono P により精製することができた。SDS 電気泳動で PA-I₁ は分子量 66,000, PA-I₂ は 45,000 にそれぞれ単一の band を示した。

PA-I₁ と UK を反応させた後, SDS 電気泳動像を調べてみたところ, 分子量 66,000 (PA-I₁) および 33,000 (active heavy chain UK) の2本の band のみ認められ, PA-I₁ と UK との結合は SDS で解離することが示された。しかし, PA-I₂ (45,000) と UK (33,000) との反応では, 新たに分子量 65,000 に band が認められ, PA-I₂ と UK は不可逆的に結合し, その際分子量 12,000 の reaction peptide を放出することが示唆された。また PA-I₁ は native UK column に結合したが anhydro-UK および

Fig. 1 Partially purified PA inhibitor fraction was applied on Mono Q column. Elution was performed by NaCl gradient up to 0.4 M in 20 mM phosphate buffer, pH 7.5. Solid line shows absorbance at 280 nm. Inhibitor activity for urokinase (●.....●) was measured in each fraction. (T. Hibino et al).

Table 1 Binding Affinity of PA-I₁ and PA-I₂ with Immobilized Native UK, Anhydro-UK and DIP-UK

	Native UK	Anhydro-UK	DIP-UK
PA-I ₁	+	—	—
PA-I ₂	+	+	—

Footnote:

PA-I₁ or PA-I₂ fractions separated from Mono Q column were applied to native UK, anhydro-UK and DIP-UK affinity columns, respectively, in order to investigate binding affinity of PA-I₁ and PA-I₂ to active site modified UK.

DIP-UK には結合せず, PA-I₁ と UK との結合には活性 serine が必須であることが明らかとなった。(表1) PA-I₂ は native UK に加えて anhydro-UK にも結合し, serine に加えて, 活性中心近傍との反応の重要性が示唆された。

III. 考 案

Hashimoto ら⁵⁾は培養表皮細胞が PA を分泌することを, また, Hausteint⁶⁾,あるいはFräki & Hopsu-Havu⁷⁾は炎症性異常角化症の表皮で強い PA 活性が出現することを報告している。今回われわれが見い出した2種類の PA inhibitor は, その反応様式の違いを通して, 表皮の PA 活性の微妙な control に関与しているものと推察される。

文 献

- 1) Hibino, T., Izaki, S., and Izaki, M.: Detection of serine proteinase inhibitors in human cornified cells. *Biocem. Biophys. Res. Commun.*, **101**; 948~955, 1981.
- 2) Sumi, H. and Robbins, K.: A functionally active heavy chain derived from human high molecular weight urokinase. *J. Biol. Chem.*, **258**; 8014~8019, 1983.
- 3) Holmberg, L., Bladh, B. and Astedt, B.: Purification of urokinase by affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, **445**; 215~222, 1976.
- 4) Ako, H., Foster, R.J. and Ryan, C.A.: The preparation of anhydro-trypsin and its reactivity with naturally occurring proteinase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **47**; 1402~1407, 1972.
- 5) Hashimoto, K., Singer, K.H., Lide, W.B., Shafran, K., Webber, P., Morioka, S. and Lazarus, G.S.: Plasminogen activator in cultured human epidermal cells. *J. Invest. Dermatol.*, **81**; 424~429, 1983.
- 6) Hausteint, U.-F. Quantitative estimation of the tissue activator of fibrinolysis in normal and pathologically changed skin. *Arch. Klin. Exp. Derm.*, **232**; 245~259, 1968.
- 7) Fräki, J.E. and Hopsu-Havu, V.K. Human skin proteinases. *Arch. Dermatol. Res.*, **256**; 113~126, 1976.

血液細胞の分化と増殖—基礎と臨床

編集 自治医科大学学長 中尾喜久 東京大学内科教授 高久史磨
専門医21氏分担執筆

A5判 251頁 図126 表47 定価4,800円(〒300円)