Granuloma-Associated Plasminogen Activator (PA) の性質, および Macrophage PA の性質との比較

伊崎 誠一* 日比野利彦* 許 培圻*
東海林真司* 大熊 眞治* 松尾 理**

Properties of granuloma associated plasminogen activator (PA) and its relation to macrophage PA

Seiichi IZAKI*, Toshihiko HIBINO*, P.S. Hsu*,
Shinji TOKAIRIN*, Masaharu OHKUMA* and Osamu MATSUO**

Key words: plasminogen activator, macrophages, granulomatous
inflammation, hypersensitivity, murine leprosy

Partially purified plasminogen activator (gPA) extracted from hypersensitivity-type murine lepromas in C57BL/6N mice after Sephacryl S-200 and DEAE Sepharose columns showed a unique substrate specificity for chromogenic substrates, distinct from that of urokinase-type PA (uPA), and tissue-type PA (tPA). It was revealed that gPA was with the highest substrate specificity for Ile-Pro-Arg-pNA (s-2288) ($K_m=1.4 \times 10^{-4}$), second highest for Val-Leu-Lys-pNA (s-2251) ($K_m=5.2 \times 10^{-4}$), and a fairly high affinity for Glu-Gly-Arg-pNA (s-2444) ($K_m=9.3 \times 10^{-4}$), whereas it was found compatible with the substrate specificity of macrophage PA (mPA) secreted by thioglycollate stimulated mouse peritoneal macrophages in culture. An electrophoretic enzymography demonstrated that gPA consists of two molecular forms (subspecies) with $M_r=45,000$ and $24,000$, distinct from uPA ($M_r=55,000$ and $33,000$) and tPA ($M_r=72,000$), whereas identical with the enzymographic pattern of mPA ($M_r=45,000$ and $24,000$). An immunoblotting technique further revealed that gPA is antigenically not related to uPA and tPA.

A PA with a characteristics identical to macrophage PA was found in inflammatory tissue during the development of hypersensitivity-type of murine lepromas, suggesting its possible immuno-modulatory role in the inflammation.

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

** 近畿大学医学部生理, Department of Physiology, Kinki University, School of Medicine, Osaka, Japan.

はじめに

鼠らいをモデルとした慢性肉芽腫性炎の研究によりわれわれは C75BL/6N マウスの Hyper-sensitivity 型鼠らい腫の抽出液中に特徴のある Plasminogen activator (gPA) が出現することを報告した^{1,2)}。本研究では観察された PA の部分的精製と性質決定をさらに進め、得られたデータを既知の Urokinase 型 (uPA), Tissue 型 (tPA), および Macrophage 由来型 (mPA) の各 PA の性質と比較検討しようとした。

I. 方 法

C57BL/6N マウスに *Mycobacterium leprae-murium* 菌を皮下接種し、接種部位に形成される鼠らい腫を採取し、トリス緩衝生食液で gPA を抽出した。抽出液を Sephacryl S-200, および DEAE-Sepharose の両カラムで分画した。市販の uPA を還元し、Active Heavy Chain (以下単に uPA) を作製した。Bowes Melanoma Cells を培養し、tPA を得た。また C57BL/6N マウスの腹腔内に Thioglycollate Medium を注射して得た腹腔 Macrophage の培養上清から mPA を採取し部分精製を行なった。PA 活性の測定には、¹²⁵I-Fibrin-Micro-Plate, および Ile-Pro-Arg-pNA (s-2288), Val-Leu-Lys-

pNA (s-2251), Glu-Gly-Arg-pNA (s-2444) を用いた。SDS ポリアクリルアミドゲル上で PA の酵素活性を検出する Heussen and Dowdle (1980)³⁾の開発した Enzymography を応用して各 PA の分子量を比較した。抗 uPA 抗体²⁾ および抗 tPA モノクローナル抗体⁴⁾ を作製し、Immunoblotting^{5,6)}に用い、gPA の抗原性の交叉反応の検討を行なった。

II. 成 績

部分精製を行なった gPA を用いて性質決定を行なったところ、gPA は分子量 45,000 および 23,000 の Subspecies からなり²⁾、いずれも熱に比較的安定な弱アルカリ性に至適 pH をもつ、DFP と PMSF に感受性の Serine 酵素であることが明かとなった。gPA は、TLCK, aprotinin, SBTI, antipain などによって阻害されるトリプシン様の酵素であり、Ile-Pro-Arg-pNA に対して最も高い親和性を示し ($K_m = 1.4 \times 10^{-4}$ M), ついで Val-Leu-Lys-pNA に対して高い親和性を示し ($K_m = 5.2 \times 10^{-4}$ M), および Glu-Gly-Arg-pNA に比較的高い親和性をしめす ($K_m = 9.3 \times 10^{-4}$ M), uPA や gPA と異なる、かなり特徴的な性質を有する事が明かとなった (表 1)。しかしながら gPA は、mPA とほとんど同じ基質特異性を示した。

Table 1 Relative hydrolytic rate for peptide substrates by PAs

	Ile-Pro-Arg-pNA (s-2288)	Val-Leu-Lys-pNA (s-2251)	Glu-Gly-Arg-pNA (s-2444)
gPA	100%* ($K_m = 1.4 \times 10^{-4}$)**	35% ($K_m = 5.2 \times 10^{-4}$)	4.5% ($K_m = 9.3 \times 10^{-4}$)
mPA	100% (n. d.)***	36% (n. d.)	19% (n. d.)
tPA	100% ($K_m = 2.3 \times 10^{-4}$)	1.6% ($K_m = 6.6 \times 10^{-5}$)	17% ($K_m = 1.2 \times 10^{-3}$)
uPA	100% ($K_m = 3.0 \times 10^{-4}$)	0.6% ($K_m = 2.5 \times 10^{-3}$)	230% ($K_m = 5.0 \times 10^{-5}$)

* Constant concentration of various PAs were reacted with 0.2 mM (final concentration) of each peptide substrates. Hydrolytic activity (initial velocity) of every PA for s-2288 was expressed as 100%. The initial velocity for s-2251 and s-2444 was expressed as percent hydrolytic rate.

** Constant concentration of various PAs were mixed with 0.75, 1, 1.5, 3, 5, and 10×10^{-4} M of each peptide substrate to determine apparent K_m values.

*** Not determined.

Enzymography による分子量の比較の結果も、gPA は、tPA (Mr=72,000) や uPA (Mr=55,000と33,000) と異なり mPA (Mr=45,000と24,000) と同一のパターンを示した(図1)。また gPA は、Immunoblotting の実験で抗 uPA および 抗 tPA のいずれとも交叉反応を示さなかった²⁾。

まとめ

活性化 macrophage の分泌する PA の性質の一端が明らかにされ、これと同じ性質を有する PA が Hypersensitivity 型の鼠らの炎症組織中に見出された。

文 献

- 1) Izaki, S., Isozaki, Y., Satoh, M., Hibino, T., Kon, S., and Izaki, M.: Comparative study with two polar types of murine leprosy: An involvement of plasminogen activator and its possible regulating factor in the granulomatous tissue reaction. *J. Invest. Dermatol.*, **80**; 81~85, 1983.
- 2) Izaki, S., Hibino, T., Isozaki, Y., Hsu, P.S., Izaki, M. and Matsuo, O.: Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor associated with granulomatous inflammation: A study with murine leprosy. *Thromb. Haemostas.*, **52**: 243~249, 1984.
- 3) Heussen, C., and Dowdle, E.B.: Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulphate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.*, **102**; 196~202, 1980.
- 4) Matsuo, O., Tanbara, Y., Okada, K., Bando, H., and Nagoya, T.: Monoclonal antibody to human tissue plasminogen activator. *Thrombos. Res.*, **36**; 517~526, 1984.
- 5) Burnette, W.N.: "Western blotting": electrophoretic transfer from sodium dodecyl sul-

Fig. 1 Electrophoretic enzymographic pattern of gPA, mPA, tPA, and uPA. After electrophoresis in a SDS-10% polyacrylamide slab gel copolymerized with 1% casein with purified dog plasminogen, the gel was washed with 2.5% Triton X to remove SDS. The gel without plasminogen was treated in parallel (not shown). The gels were incubated in 0.1 M Glycine-NaOH buffer, pH 8.3 for 18 hours at 37°C for enzyme reaction. The cleared bands indicated that the protein sample activated plasminogen that was followed by caseinolysis in the gel.

fate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, **112**; 195~203, 1981.

- 6) Hsu, S.-M., Raine, L., and Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, **29**; 577~580, 1981.