尿中に認められるフィブリン 親和性 UK について

林 滋* 山田 兼雄**

Fibrin-affinity urokinase found in human urine

Shigeru HAYASHI* and Kaneo YAMADA**

Key words: Fib-UK, UK, fibrin affinity,
UK antigen, zymogram

Fibrin high-affinity urokinase (UK) differed from single chain UK was purified with fibrin-Sepharose chromatography and gel filtration. The molecular weight of the purified fibrin high affinity UK (Fib-UK) was 95-100 K. This Fib-UK was similar in immunological nature to UK but was different from it by molecular weight, its binding affinity for fibrin and lower specific activity (1865 IU/mg). The plasminogen activator activity of Fib-UK was quenched by anti Fib-UK serum and anti UK serum. Zymogram after SDS-PAGE revealed that Fib-UK lyzed plasminogen rich fibrin plate at the molecular weight of 95-100 K. Immuno-electrophoresis of Fib-UK and UK revealed that Fib-UK had an antigenicity against UK, while UK had not an antigenicity against Fib-UK.

It was concluded that Fib-UK was a protein having an activator activity, UK antigen and fibrin high affinity, and its molecular weight was 95-100 K.

はじめに

組織アクチベータ (t-PA)¹⁾や single chain UK (SC-UK)²⁾は、フィブリン親和性を有するため選択的なフィブリン溶解が可能であり、新しい血栓溶解剤として注目されている。われわれは、SC-UK 純化の際認められ、分子量約 10

万でかつフィブリン親和性のある UK 様蛋白 (Fib-UK) に着目し、その酵素学的および免疫学的な検討を行い、その本態の解明を試みた。

I. 方法

Fibrin-Sepharose : ヒト fibrinogen を CNBr-Sepharose 4B にカップリングし、牛トロロンビ

* 荻窪病院内科 [〒167 東京都杉並区今川 3-1-24], Internal Medicine, Ogikubo Hospital, Tokyo, Japan.

** 聖マリアンナ医科大学小児科, Department of Pediatrics, St. Marianna University School of Medicine, Kanagawa, Japan.

Fig. 1 Fibrin-Sepharose chromatography of Fib-UK.

The lysine-Sepharose passed urine was applied to fibrin-Sepharose (bed volume, 30 ml) and the column was washed with 0.01 M phosphate, 0.5 M NaCl, pH 7.6 buffer. The adsorbed protein was eluted with 0.01 M phosphate, 0.2 M arginine, pH 7.6 buffer. Fractions of No. 16-40 were collected.

ンを加えて作製. UK 抗血清: 純化した HMW-UK (55,000), および LMW-UK (33,000) を Freund's のアジュバントと共にウサギに免疫して作製. Fib-UK 抗血清: 純化 Fib-UK (Sephadex G-100 分画) を Freund's のアジュバントと共にウサギに免疫して作製. Zymography: Granelli-Piperno らの方法³⁾.

II. 成績

1. Fib-UK の純化: 尿4 l を出発材料とし, lysine-Sepharose を通過後, fibrin-Sepharose に吸着させ, バッファーで十分洗滌し, 0.2 M arginine で溶出させた (図1). 溶出分画を, ポリエチレングリコールで濃縮し, Sephadex G-100 (1.0×90 cm, 0.01 M リン酸バッファー, pH 7.6) でゲル濾過し, 単一ピークを得た.

2. Fib-UK の SDS-PAGE: 9.5~10 万の領域に単一バンドとして泳動され, 還元系 (β -ME) でも単一バンドであった (図2-a).

3. Fib-UK の性状: Fib-UK は, plasminogen 含有フィブリン平板を分解し (1865 IU/mg), フィブリン平板は溶解しなかった. 同様に, S-2444 (Kabi 社) を僅かに水解し OD_{405}/min : 0.002, S-2251 は水解しなかった. UK を control とし kinetics を検討した結果, K_m :

74 μM (Fib-UK), 41 μM (UK), V_{max} : 0.57 $\times 10^{-9}$ mol/min (Fib-UK), 2×10^{-9} mol/min (UK); K_{cat} : 3.8 sec^{-1} (Fib-UK), 11 sec^{-1} (UK); K_{cat}/K_m : 0.051 $\mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ (Fib-UK), 0.268 $\mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ (UK) であった.

4. 免疫電気泳動: Fib-UK と UK を泳動した結果, Fib-UK は anti Fib-UK および anti UK とそれぞれ α region および γ - β region に沈降線を形成した. 一方 UK は, anti UK とのみ沈降線を形成し, anti Fib-UK とは反応しなかった (図2-b, c).

5. Zymography: Fib-UK と UK を Zymography で検討した. Fib-UK は 9.5~10 万の位置に大きな溶解を示し, UK は, 5.5万と3.3万の位置に溶解を認めた (図2-d).

III. 考案

Fib-UK は, 分子量 9.5~10 万の UK 抗原を有するアクチベータの一種であり, SC-UK とほぼ同等のフィブリン親和性を有する. 比活性は, 1865 IU/mg で UK (75,000~180,000 IU/mg) よりも低値であるが, SC-UK²⁾ (2,300 IU/mg) と近い値であった. Fib-UK の臨床的意義や, 血中での存在, さらに SC-UK との関係についてさらに検討が必要である.

Fig. 2-a SDS-PAGE of the purified Fib-UK with or without reduction. SDS-PAGE was performed with 5 % acrylamide gel and reduction was carried out by 5 % β -mercaptoethanol. N-R means without reduction and R means with reduction.

2-b Immunoelectrophoresis of Fib-UK and UK. Anode is to the right. In well A, B and C, 5 μ l of human plasma 10 μ l (about 1.5 μ g) of Fib-UK and 10 μ l (about 10 μ g) of UK were placed, respectively. After electrophoresis, troughs a, b and c were filled with antiserum against human serum, Fib-UK and UK.

2-c Immunoelectrophoresis of Fib-UK and UK. Anode is to the right. In well A and B, 5 μ l of human plasma and 10 μ l of Fib-UK were placed. Troughs a and b were filled with antiserum against human serum and UK.

2-d Zymogram of Fib-UK and UK after SDS-PAGE. UK was diluted and electrophoresed in No. 1 (12 IU), No. 2 (6 IU), No. 3 (3 IU) and No. 4 (1.5 IU). Fib-UK (7.5 μ g) was electrophoresed in No. 5. In No. 1-4, the lytic bands correspond to HMW-UK (55,000) and LMW-UK (33,000). The molecular weight of the lytic band (No. 5) corresponds to 95,000-100,000.

文 献

- 1) Rijken, D.C. and Collen, D.: Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. J. Biol. Chem., **256**; 7035~7041, 1981.
- 2) Husain, S.S., Gurewich, V. and Lipinski, B.: Purification and partial characterization of a

single chain high molecular weight form of urokinase human urine. Arch. Biochem. Biophys., **220**; 31~38, 1983.

- 3) Granelli-Piperno, A. and Reich, E.: A study of protease and protease inhibitor complex in biological fluids. J. Exp. Med., **148**; 223~243, 1978.

●わが国唯一の葉酸補酵素研究の完全な集大成！

葉 酸 —基礎と臨床—

編集 京都大学内科教授 内野治人 岐阜歯科大学内科教授 外林秀紀
専門医18氏分担執筆

A 5 判 484頁 図172 表104 定価9,800円(〒300円)

葉酸というものを通じての造血機能の研究は、臨床医のみでなく、また、医学部の基礎のみにとどまらず、生化学領域の基礎学者から、栄養学の領域まで拡大される。そして、この時点でのわが国の研究は、このような範囲にわたる広範な領域で行なわれてきており、そこで葉酸研究史をみるときに、わが国での研究の広がりと深さを感じる。(序より)

【主要内容】

●わが国における葉酸研究の歴史 ●葉酸の基礎 (葉酸の定量法／葉酸補酵素の形態／葉酸の含量／葉酸補酵素の作用機序／葉酸補酵素の酵素の生成と相互転換) ●葉酸の臨床化学 (生体内運命／食品の葉酸測定と摂取量／食品中の葉酸のavailability／放射性同位元素を用いる葉酸測定法／正常血液葉酸値) 葉酸欠乏症 (欠乏症／シロネズミの葉酸欠乏飼料の調製法とその応用「血液学的所見」／無菌動物の葉酸代謝—葉酸代謝に対する腸内細菌の関与面—／核酸代謝からみた葉酸欠乏症) ●葉酸の臨床 (臨床応用とその展望／葉酸代謝異常症／わが国における葉酸欠乏症／葉酸利用障害／再生不良性貧血における葉酸療法に対する一考察／再生不良性貧血に対する葉酸の効果)