プラスミンの活性中心の立体地勢の特徴
——合成基質ならびに三脚型の合成阻害物質等の特性からみた——

岡本 彰祐¹⁾ 佐々木邦子¹⁾ 和中 敬子¹⁾ 岡田 芳男²⁾
津田 裕子²⁾ 手納 直規²⁾ 土方 明子³⁾ 池沢 且子⁴⁾
岡本 歌子⁵⁾

The characteristics of stereogeometry at the active center
of plasmin ——with reference to kinetics of highly selective
synthetic substrates and inhibitors——

Shosuke OKAMOTA¹⁾, Kuniko SASAKI¹⁾, Keiko WANAKA¹⁾
Yoshio OKADA²⁾, Yuko TSUDA²⁾, Naoki TENO²⁾, Akiko HIJIKATA³⁾,
Katsuko IKEZAWA⁴⁾ and Utako OKAMOTO⁵⁾

Key words: plasmin, active center, kinetics, synthetic
substrates, synthetic inhibitors

Despite of accumulated information of the LBS (lysine binding site) of the plasmin¹⁾, little is known of characteristic stereogeometry at the active center. The present studies were kinetically made by using selective synthetic substrates or inhibitors, with expectations that tri-pod structure of highly selective substrates and inhibitors would indicate the replica structure of the active center. From the results obtained, we conclude that the plasmin active center assumes the following three pockets; (1) the first pocket is characterized just to fit the positively charged head of the lysine residue, (2) the second is equipped with very fine structure just to fit (2R, 4R) structure of 4-metyle-2-piperidine-carboxylic acid, but not other stereoisomers of the above mentioned radical (Table 1), and (3) when

- 1) 済生会兵庫県病院血栓止血研究神戸プロジェクト〔〒651 神戸市中央区日暮通5-5-17〕, Kobe Research Projects on Thrombosis and Haemostasis, Saiseikai-Hospital, Kobe, Japan.
- 2) 神戸学院大学薬学部薬化学, Department of Medical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Kobe-Gakuin University, Kobe, Japan.
- 3) 神戸大学医療短期大学, Kobe University School of Allied Medical Sciences, Kobe, Japan.
- 4) 兵庫医科大学中央臨床検査部, Department of Clinical Pathology and Clinical Laboratory, Hyogo Medical College, Nishinomiya, Japan.
- 5) 神戸学院大学栄養学部生理, Department of Physiology, Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University, Kobe, Japan.

examined by D-Ile-L-Phe-L-Lys-pNA, 3-methyl-valeric acid-L-Phe-L-Lys-pNA and L-Ile-L-Phe-L-Lys-pNA, the third pocket is to fit (a) D-Ile-, (b) 3-methyl-valeric acid-, and (c) L-Ile-, with different K_m values (a) 20 μM , (b) 180 μM , and (c) 330 μM respectively, the highest affinity of the third pocket for the terminal D-Ile derivative being indicated (Table 2).

目 的

プラスミン分子のH鎖クリングルにあるLBS (lysine binding site) の特性が注目され、いわゆる LBS 指向型の t-AMCHA 等のプラスミン阻害物質の知見は集められつつある¹⁾。しかるに、プラスミンのL鎖に位置する「活性中心」の特性については知るところが極めてすくない。すでにトロンビンに関しては、多数の選択的阻害物質が研究され^{2~4)}、高度の特異性を持ち、 K_i が 10^{-8}M に達する三脚型の Arg 誘導体が得られ⁵⁾、トロンビンの活性中心は、そのレプリカ構造をとるものと想定された⁶⁾。

本研究は、第1にプラスミンの選択的合成基質⁷⁾ならびに阻害物質の構造と作用の関係を追求し、さらにすすんで、プラスミンの活性中心が特に有効な阻害物質および基質のレプリカ構造をとるとする推定のもとに、その立体地勢の

特徴を検討しようとしたものである。

I. 実験材料および実験方法

(1) 合成基質または阻害物質としては、私共が合成した L-Arg および L-Lys を一脚とする三脚構造をもつものを多用した。特に L-Lys をC末にもつペプチドでは、そのN末の Ile あるいは Pro に種々の化学修飾を加え、その影響を検討した。

(2) Arg のC末に 4-methyl-2-piperidine-carboxylic acid (MPCA) が結合した化合物においては、その立体構造とプラスミン抑制作用の関係を検討した。

(3) プラスミンは KABI 社提供の lyophilized powder (for laboratory use) を用い、活性中心に対する阻害活性には、注記した場合以外は主として S-2251 を用いて測定した。

Table 1 Stereochemical structures of MD 805 and their inhibition constants for plasmin and thrombin

Structures of R		KI (μM)	
		Plasmin	Thrombin
(2R,4R)	800	0.019
(2R,4S)	> 500	0.24
(2S,4R)	> 1500	1.9
(2S,4S)	> 500	280

Table 2 Synthetic substrates and inhibitors to plasmin

Substrates	K _m (mM)	I ₅₀ (mM)*
D-Ile-L-Phe-L-Lys-pNA	0.02	0.03
$ \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \quad \text{C}_2\text{H}_5 \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH} \\ \\ \text{CH}_2-\text{CO-L-Phe-L-Lys-pNA} \end{array} $	0.18	0.10
L-Ile-L-Phe-L-Lys-pNA	0.33	0.19
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>		
D-Pro-L-Phe-L-Lys-pNA	0.05	0.04
$ \begin{array}{c} \text{H}_2\text{C} - \text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \diagdown \quad / \\ \text{CH}-\text{CO-L-Phe-L-Lys-pNA} \end{array} $	0.14	0.09
L-Pro-L-Phe-L-Lys-pNA	0.18	0.10

* Boc-L-Val-L-Leu-L-Lys-MCA(f.c. 0.1mM) was used as substrate.

II. 成 績

(1) プラスミンにおいても, Arg または Lys をもつ三脚構造が基質または阻害物質として有効であるが, 一般に Lys 誘導体は Arg のそれよりも明かに小さな K_m および K_i を示した.

(2) Arg の C 末に MPCA が結合した化合物では事実上 (2R-4R) 構造のみに阻害作用がみられた (表 1).

(3) Lys の N 末に関しては, 新しく合成された D-Ile-L-Phe-L-Lys-pNA が K_m 20 μM kcat (s⁻¹) 10 を示し, 在来の D-Val-L-Leu-L-Lys-pNA の K_m 300 μM, kcat (s⁻¹) 11 に比較して, はるかにすぐれた値を示した. しかし, D-Ile を 3-methyl-valeric acid あるいは L-Ile に置換した場合には, M_m がそれぞれ 180 μM および 330 μM を示した (表 2).

III. 考察および結論

プラスミンの『限定分解』には, その活性中心の『特性』も深く関与する. 活性中心には三脚構造のレプリカ構造をとる立体地勢が存在し, Arg および Lys のオメガアミノ基に対応する第一ポケットの他に, Lys 等の C 末に相当

して, MPCA の微細な立体構造を読み取る第二ポケットがあり, さらに Lys 等の α 位の N 末より, 数オングストロングの距離に D 型アミノ酸の「遊離アミノ基」に対応する第三ポケットの特性 (おそらくはマイナス荷電) の存在が推論された.

文 献

- 1) Okamoto, S. and Hijikata, A.: Rational approach to proteinase inhibitors. Drug Design, **VI**; 143~199, 1975.
- 2) Okamoto, S., Kinjo, K., Hijikata, A., Kikumoto, R., Tamao, Y., Ohkubo, K. and Tonomura, S.: Thrombin inhibitors. 1. Ester derivatives of N^α-(arylsulfonyl)-L-arginine. J. Med. Chem., **23**; 827~350, 1980.
- 3) Kikumoto, R., Tamao, Y., Ohkubo, K., Tezuka, T., Tonomura, S., Okamoto, S., Funahara, Y. and Hijikata, A.: Thrombin inhibitors. 2. Amide derivatives of N^α-substituted L-arginine. J. Med. Chem., **23**; 830~836, 1980.
- 4) Kikumoto, R., Tamao, Y., Ohkubo, K., Tezuka, T., Tonomura, S., Okamoto, S. and Hijikata, A.: Thrombin inhibitors. 3. Car-

- boxyl-containing amide derivatives of N^{α} -substituted L-arginine. J. Med. Chem., **23**; 1293~1299, 1980,
- 5) Kikumoto, R., Tamao, Y., Tezuka, T., Tonomura, S., Hara, H., Ninomiya, K., Hijikata, A. and Okamoto, S.: Selective inhibition of thrombin by (2R, 4R)-4-methyl-1-[N²-(3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolin-yl) sulfonyl] L-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid. Biochemistry, **23**; 85~90, 1984.
 - 6) Hijikata, A., Okamoto, S., Kikumoto, R. and Tamao, Y.: Kinetic studies on the selectivity of a synthetic thrombin-inhibitor using synthetic peptide substrates. Thrombos. Haemostas., **42**; 1039~1045, 1979.
 - 7) Cs.-Szabó, G., Pozsgay, M. and Elödi, P.: Investigation of the substrate-binding site of human plasmin using tripeptidyl-p-nitroanilide substrates. Thromb. Res., **20**; 199~206, 1980.
 - 8) Okamoto, S., Hijikata, A., Sasaki, K., Kikumoto, R. and Tamao, Y.: Similarity and dissimilarity of stereogeometry of active center of plasmin and thrombin. Progress in Fibrinolysis, **VI**; 315~317, 1983.

●白血病患者の理論と実際！

白血病の化学療法—基礎と臨床—

編集 滋賀医科大学学長 脇坂行一 専門医28名分担執筆

A 5 判 292頁 図60 表42 定価5,800円(〒300円)

白血病、とくに急性白血病といえは、輸血以外になすすべもなく手をこまねて見ているのが実情であった。しかし近年、白血病の化学療法が進歩し、白血病の治癒についても一縷の光明が覗われてきた。本書は白血病の化学療法の理論と実際に焦点をしぼり、第一線の研究者による熱心な討議をまとめたものである。我国の白血病の治療指針書である。

●内容：〔白血病細胞の増殖異常と核酸代謝〕1. Leukemogenesisと白血病細胞のRNA dependent DNA polymerase 活性, 2. 白血病細胞のDNA合成系酵素活性と代謝調節, 3. ヒトリンパ球におけるpyrimidine合成の調節, 4. 急性白血病経過中の芽球動態とDNA合成能, 5. ヒトリンパ性白血病細胞のgenetic transcription, 6. 白血病細胞におけるRNA合成, 7. Radioautographyによる白血病細胞増殖異常の解析, 8. Non-dividing compartmentに属する白血病細胞の意義, [抗白血病剤の作用機序と臨床効果] 1. 抗白血病剤の投与経路による効果の差異とその機序, 2. 白血病細胞におけるcytosine arabinosideとcycloctidineの作用機序, 3. 抗白血病剤の殺細胞作用に及ぼす濃度因子と作用時間, 4. 急性白血病の寛解導入, 維持ならびに寛解強化療法について, 5. 骨髄内白血病細胞の動態の解析による白血病化学療法, 6. 慢性骨髄性白血病の治療と予後, 7. 白血病治療中の白血病細胞減少曲線について。