UK, Pro-UK, UK-UK inhibitor complex の 血中での安定性について

前場 良太* 林 滋** 山田 兼雄***

Stabilities of UK, Pro-UK and UK-UK inhibitor complex in human plasma

Ryota MAEBA*, Shigeru HAYASHI** and Kaneo YAMADA***

Key words: UK, pro-UK, UK-UK inhibitor complex, zymography

Recently, we reported that fibrin high-affinity urokinase (Fib-UK) of which molecular weight was about 100 K was present in human urine and was very similar to UK-UK inhibitor complex in immunological and enzymatic nature (3). In the present paper, stabilities of UK, pro-UK and UK-UK inhibitor complex in plasma were examined with zymography. UK-UK inhibitor complex which was formed by incubating UK and plasma was more stable in plasma than UK, and resistant to DFP. Similarly, pro-UK was most stable in plasma and resistant to DFP. These results suggest that when UK is bound to UK inhibitor, UK changes its conformation and its stability in plasma increases like pro-UK.

はじめに

尿中には、高分子 UK (MW, 55,000)、低分子 UK (MW, 33,000) 以外にも、高分子の UK complex が存在することが知られている^{1,2)}。著者らは、免疫学的手法により、高分子の UK complex のうち、分子量 95~100 K のものは、UK と UK inhibitor が結合した

UK complex (fibrin high-affinity UK : Fib-UK) であることを明らかにした^{3,4)}。さらに、UK を血中に投与した時に出現する、分子量 95~100 K の UK complex も UK と UK inhibitor との complex であることを明らかにした⁴⁾。今回、この UK-UK inhibitor complex の血中での安定性を、UK や pro-UK と比較検討した。

* 荻窪病院中検〔〒167 東京都杉並区今川3-1-24〕, Central Laboratory, Ogikubo Hospital, Tokyo, Japan.

** 同 内科, 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.

I. 方 法

Plasminogen activator (PA) 活性測定 : plasminogen (Plg) 含有 fibrin 平板法. Zymography (Zymo) : Graneli-piperno らの方法⁵⁾. UK 抗体 Sepharose : UK 1 mg を免疫して得たウサギ抗血清より, IgG 分画を精製し, CNBr-Sepharose 4B にカップリングして作製⁴⁾. Pro-UK : ヒト腎細胞培養上清より, UK 抗体 Sepharose で精製して得た.

II. 成 績

1) UK, Pro-UK, UK-UK inhibitor complex の血中での安定性 : ヒト血漿に UK を添加し, UK の血中動態を zymo で観察した. UK の血中濃度 3 IU/ml の時, 添加 UK の大部分が血中の UK inhibitor と complex を形成した. それ以上の濃度では, 過剰の UK は free な状態で存在した. UK 等の血中動態の経時変化を zymo で検討したところ, free の UK が経時的に失活していくのに対し, UK-UK inhibitor complex は, 長時間活性を維持していた (図 1-a). また Pro-UK は, 大部分が血

中で free な状態で存在しているにもかかわらず, 長時間活性を維持していた (図 1-b).

2) UK, Pro-UK, UK-UK inhibitor complex の血中での安定性 (*in vitro* の検討) : 血中の UK 残存活性を, fibrin 平板で測定した. UK の血中残存活性は, 100分後 67%, 8時間後 46%であったのに対し, Pro-UK のそれは, 100分後 97%, 8時間後 93%と, きわめて安定であった. また, UK-UK inhibitor complex は 100分後 83%, 8時間後に 73%であった (図 2-a).

3) UK, Pro-UK, 尿中および血中 UK-UK inhibitor complex の DFP に対する反応態度 : Free の UK が DFP で阻害を受けるのに対し, Pro-UK および UK-UK inhibitor complex は DFP に耐性であった (図 2-b).

III. 考 案

UK は, 血中の UK inhibitor と complex を形成することにより, DFP に耐性となり, かつ血中での安定性が著しく増加することが明らかとなった. また Pro-UK は, 血中の UK inhibitor とは容易に complex を形成せず, free

Fig. 1 Zymographic analysis of the stabilities of UK, por-UK and UK-UK inhibitor complex in human plasma. SDS-PAGE was performed with 7.5% acrylamide gel at 10 mA for 16 h. UK (Fig. 1-a) or pro-UK (Fig. 1-b) was added to human plasma at a concentration of 40 IU/mL, incubated at 37°C for 20 min, 100 min, 8 h and 40 h. At each incubation point, samples were applied to anti UK-Sepharose column and the eluates were electrophoresed, followed by zymography. Band of UK-UK inhibitor complex was shown in 100 K region.

Fig. 2-a Residual activities of UK, pro-UK and UK-UK inhibitor complex in human plasma.
UK, pro-UK or UK-UK inhibitor complex which was obtained from urine by fibrin-Sepharose (3) was added to plasma at a concentration of 40 IU/mL.

Fig. 2-b Zymographic analysis of the effect of DFP on the activities of UK, pro-UK and UK-UK inhibitor complex in human plasma.
(left panel) : Freshly voided urine was dialyzed against water and concentrated to about $\times 100$ fold, purified with anti UK-Sepharose. The eluate was treated with DFP (25 mM) and electrophoresed, followed by zymography.
(center panel) : UK (18 IU/mL) was added to plasma and incubated at 37°C for 20 min. The resultant mixture was purified with anti UK-Sepharose. The eluate was treated with DFP (10 mM) and electrophoresed, followed by zymography.
(right panel) : Pro-UK (5 IU) was treated with DFP (25 mM) and electrophoresed, followed by zymography.

な状態で血中で安定であり、かつ DFP にも耐性であった。以上の結果より、UK は、UK inhibitor と結合し complex を形成すると、Pro-UK の様に活性基が保護されるような立体構造の変化を起こすのではないかと考えられる

文 献

- 1) Hart, D.A., Kramer, M. and Chieplak, W.: Identification of subpopulation of human urinary plasminogen activators. Thromb. Haemostas., **51**; 212~216, 1984.
- 2) Cieplak, W. and Hart, D.A.: Formation of stable complex between urokinase and a human urinary component. Thromb. Haemostas., **53**; 36~41, 1985.
- 3) Hayashi, S. and Yamada, K.: Purification and properties of fibrin high-affinity urokinase from human urine. Acta Haematol. Jpn., **49**; 1244~1254, 1986.
- 4) Hayashi, S. and Yamada, K.: Purification and properties of fibrin high-affinity urokinase from human urine. Thromb. Haemostas., **54**; 102, 1985 (Abstract).
- 5) Granelli-Piperno, A. and Reich, E.: A study of protease and protease inhibitor complex in biological fluids. J. Exp. Med., **148**; 223~243, 1978.

●現在のB₁₂研究の進歩と問題点！

ビタミンB₁₂の体内動態と活性

編集 京都大学内科教授 内野治人 専門医50氏分担執筆
A 4 判 216頁 図76 表38 定価6,800円(千300円)

近年ビタミンB₁₂に関する研究は、笑気ガスによるモデル実験の開発や先天代謝異常症の発見、B₁₂結合蛋白に関する知見の集積など、著しい進歩をみた。本書はB₁₂の世界的権威Cooper教授を中心にB₁₂の生体内動態および生体内活性の研究成果をまとめたものである。現在のB₁₂研究の最先端の進歩と問題点が浮きばりにされている。

●内容：【生体内動態】第1章 最近生体内に認められたビタミンB₁₂類縁体について、第2章 各種ビタミンB₁₂同族体の生体内動態—大量経口投与時の血清、各種臓器および尿中各種ビタミンB₁₂の分布—、第3章 肝cobalamin代謝に及ぼす加齢の影響、第4章 胃手術とビタミンB₁₂吸収、第5章 Blind loop症候群におけるビタミンB₁₂吸収障害、第6章 ビタミンB₁₂吸収に及ぼす腸酵素の影響。【生体内活性】第1章 ビタミンB₁₂依存症、第2章 巨赤芽性貧血におけるメチルコバリン代謝異常とN₂Oを用いた培養系代謝モデルの作製、第3章 笑気の一ヒト骨髓細胞のmethionine-synthetase活性とビタミンB₁₂、葉酸代謝に及ぼす影響、第4章 メチルB₁₂のヒト調節T細胞機能に対する増強効果、第5章 メチルB₁₂の造血調節作用、第6章 脂質代謝とビタミンB₁₂、第7章 磷脂質代謝とビタミンB₁₂、第8章 糖尿病性末梢神経障害とメチルコバラミンの治療効果。
【特別講演】The utilization and metabolism of vitamin B₁₂.