尿中トリプシンインヒビター (UTI) および関連 インヒビターの化学修飾と抗線溶能

須見 洋行* 浜田 博喜** 吉田 悦男*
津島 弘文*** 丸山 真杉* 美原 恒*

Chemical modification and anti-fibrinolysis of urinary trypsin inhibitor (UTI)

Hiroyuki SUMI*, Hiroki HAMADA**, Etsuo YOSHIDA*,
Hirofumi TSUSHIMA***, Masugi MARUYAMA* and Hisashi MIHARA*

Key words: urinary trypsin inhibitor, chemical modification, antifibrinolysis,
leukocyte protease, Arg-type inhibitor

The NH₂-terminal amino acid sequences (H₂N-Ala¹~Met³⁶) of highly purified urinary trypsin inhibitor (UTI) and plasma UTI related acid-stable trypsin inhibitor (ASTI) were found to be completely identical. Neither of the inhibitors was not completely inactivated even under acidic conditions with 70% HCOOH at 60°C for 17hr. In particularly, a much higher stability of antiplasmin activity was confirmed in contrast to the antitrypsin activity which gradually decreased.

The reagent 1,2-cyclohexanedione was used to modify the guanidino group of Arg residues in the UTI molecule. This resulted in complete disappearance of both activities, possibly indicating that UTI and related inhibitors belong to the "Arg-type inhibitor" previously defined by Laskowsky and Sealock. On the other hand, for modification of the ε-amino group of Lys residue in the UTI molecule, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid was used. The resultant trinitrophenyl derivative of the inhibitor (TNP-UTI) was found to demonstrate approximately 50 times stronger antiplasmin fibrinolysis than the intact inhibitor. Almost no

* 宮崎医科大学第二生理 [〒889-16 宮崎郡清武町木原 5200], Department of Physiology, Miyazaki Medical College, Miyazaki, Japan.

** 岡山理科大学基礎理学科, Department of Fundamental Natural Science, Okayama University of Science, Okayama, Japan.

*** ツルク大学医学部皮膚科, Department of Dermatology, School of Medicine, Turk University, Turk, Finland. 受付: 1988. 1. 10. 受理: 1988. 7. 30.

change in antitrypsin or antichymotrypsin activity occurred as a result of the inhibitor modification. The modified inhibitor was also shown to be a potent inhibitor of non-plasmin mediated fibrinolysis with human leukocyte protease.

はじめに

われわれはこれまで約15カ年にわたって UTI 活性と各種病態との関係、SH-酵素¹⁾あるいは BrCN²⁾による低分子化と生じた活性 fragment の性質等を報告してきたが、最近 ELISA 法の開発³⁾で UTI と同じ抗原性を持つ一連の酸安定性インヒビターがヒト体液及び組織中に広く分布することもわかってきた。今回、このようなインヒビターの化学修飾を試み、分子構造と抗線溶能の関係を調べた。

I. 材料と方法

UTI, およびヒト血漿の 6% HClO₄ 可溶分画からの酸安定性トリプシンインヒビター (ASTI) の精製、測定方法は既に報告した如く行なった⁴⁾。抗プラスミン活性の測定はミドリ十字社製のヒト血漿プラスミン (25 CU/バイアル) を用い、インヒビターと酵素を 37°C, 5 分間ブレインキュベーションした後の残存活性より算出した。また両分子の Arg および Lys 残基の修飾を Haynes⁵⁾ および Patty と Smith⁶⁾ の方法で行なった。

II. 成績

UTI と血中の ASTI の N 末満 36 残基 (H₂ N-Ala-Val-Leu-Pro-Gln-Glu-Glu-Gly-X-Gly-Gly-Gly-Gln-Leu-Val-Thr-Glu-Val-Thr-Lys-Lys-Glu-Asp-Ser-X-Gln-Leu-Gly-Tyr-Ser-Ala-Gly-Pro-X-Met-...) は完全に一致することがわかった。いずれもきわめて酸性 (pI=約 2.0), かつ酸性条件下で安定であり、例えば、図 1 に示すように 70% 蟻酸中で 60°C, 17 時間の加熱でも完全失活することなく、特に抗プラスミン能は全く変化しなかった。しかし、1, 2-cyclohexanedione で分子内の Arg 残基を修飾 (DHCH 化) した場合、抗トリプシ

ンおよび抗プラスミンの両活性は消失した。一方、2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid で分子内の主に Lys 残基を修飾 (TNP 化) した場合、表 1 に示すように抗トリプシン能は変わらなかったが、抗プラスミン能 (標準フィブリン平板法) が著しく亢進することがわかった (UTI では約 50 倍; 25 CU 阻害/mg TNP-UTI)。なお、UTI および TNP-UTI のプラスミンに対する阻害反応は即時性と考えられ、37°C, 5 分間のブレインキュベーション後に両者の complex 形成がポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認できた。このような化学修飾による阻害能の増強効果は非プラスミン性の線溶酵素 (ヒト白血球 lysate 使用) に対しても起こることがわかった (表 1 右)。その他、UTI, ASTI, およびそれらの TNP 誘導体は凝固系にも作用し、ラットおよびヒト血漿の APTT および PT を延長することが確認された。

III. 考察と結論

UTI および関連インヒビターの化学修飾を行ない、それらが Laskowski によって分類⁷⁾された "Arg-type inhibitor" に属することがわかった。さらに今回初めて、分子内の Lys 残基を TNP 化することにより抗線溶能のみが著しく亢進することが明らかとなったが、これらの成績はこれまでの UTI 分子の酵素処理¹⁾あるいは BrCN 処理²⁾の実験成績とも考え合わせて、両インヒビター分子内には抗トリプシンと抗プラスミンとの異なる reactive site (double headed) のあることを示唆するものと思われる。また UTI あるいは TNP-UTI はプラスミンのみならず非プラスミン性 (細胞性) の線溶酵素に対しても強く作用することが確認され、最近のわれわれが行っている犬の実験的急性肺炎での UTI の投与効果の成績 (未発表) とも考え合わせて、一連の酸安定性インヒビターが線溶系の統御因

Fig. 1 Formic acid treatment of UTI

UTI dissolved in 70% HCOOH (7.5 mg/ml) was heat treated at 60°C for 0 min (○), 5 min (□), 30 min (×), 2.5 hr (+), and 17 hr (●). After dilution and dialysis with distilled water, the residual antitrypsin and antiplasmin activities were determined with each amido substrate (Bz-L-Arg-pNA and H-D-Val-Leu-Lys-pNA, respectively).

Table 1 Chemical modification and anti-fibrinolysis of UTI

	ASTI activity ¹⁾ (U/mg)	Anti-fibrinolysis ²⁾ (U/mg)	
		Plasmin inhibition	Leukocyte protease inhibition
Control	1,210	0.5	3.1
Arg-modification ³⁾	0	0	0
Lys-modification ⁴⁾	1,092 ± 107	24.6 ± 5.5	32.6 ± 6.2

¹⁾ Antitrypsin determined by caseinolysis; 1 U = 1 µg trypsin inhibition.

²⁾ Determined by the standard fibrin plate method (Incubation time was 2 hr for plasmin or 18 hr for leukocyte protease, at 37°C); 1 U = inhibition for 1 CU of plasmin or equivalent anti-fibrinolytic activity for leukocyte protease.

³⁾ Modified by Haines's method with 1,2-cyclohexanedione.

⁴⁾ Modified by Patty and Smith's method with 2, 4, 6 trinitrobenzenesulfonic acid. Values are the mean ± SD of 5 determinations.

子として生理的にも重要な役割を果たしていることが推測された。

文 献

- 1) Sumi, H., Toki, N., Takasugi, S., Machara, S., Maruyama, M., Akazawa, K., Matsuo, O. and Mihara, H.: Low molecular weight trypsin-plasmin inhibitors isolated from papain treated urinary trypsin inhibitor. *Thrombos. Haemostas.*, **47**: 14~18, 1982.
- 2) Sumi, H., Toki, N., Takasugi, S., Machara, S., Tsushima, H., Akazawa, K. and Mihara, H.: Multiple molecular forms of acid-stable plasmin inhibitor derived from human urinary trypsin inhibitor. *Enzyme*, **30**: 252~258, 1983.
- 3) Yoshida, E., Sumi, H., Maruyama, M., Mihara, H. and Sakai, R.: Development and application of an enzyme-linked immunosorbent assay for acid stable trypsin inhibitor (ASTI) in human plasma. *Clin. Chim. Acta*, **167**: 155~164, 1987.
- 4) Maruyama, M., Yamamoto, T., Sumi, H., Tsushima, H., Mihara, H. and Minamino, N.: Purification and amino acid analysis of plasma acid stable trypsin inhibitor. *Enzyme*, **35**: 225~231, 1986.
- 5) Haynes, R., Osuga, D.T. and Feeney, R.E.: Modification of amino acid groups in inhibitors of proteolytic enzymes. *Biochemistry*, **6**: 541~547, 1967.
- 6) Patthy, L. and Smith, E.L.: Identification of functional arginine residues in ribonuclease A and lysozyme. *J. Biol. Chem.*, **250**: 565-569, 1975.
- 7) Laskowsky, M. and Sealock, R.W.: Protein proteinase inhibitors-molecular aspects; in Boyer, P.D., *The Enzymes*, Vol. III, pp. 376~463 (Academic Press, New York 1971).