限定分解した Streptokinase の活性について

中島 昭* 真田 進* 森下 尚*
若松 伸治* 中村 吉宏* 塩野 裕之*
酒井 淳一* 岡田 忠* 梶江 勇*

The fibrinolytic activity of proteolytic
digests of streptokinase

Akira NAKASHIMA*, Susumu SANADA*, Takashi MORISHITA*,
Shinji WAKAMATSU*, Yoshihiro NAKAMURA*, Hiroyuki SHIONO*,
Jun-ichi SAKAI*, Tadashi OKADA* and Isamu SUGIE*

Key words : streptokinase, fibrin formation, activation of
plasminogen, streptokinase digest

Streptokinase (SK) reacts stoichiometrically with human plasminogen and plasmin to generate plasminogen activator activity by making complex. In order to clarify the reaction of SK and plasminogen, enzymatic properties of SK were studied. Digested SK with molecular weight of 29K (SK₂₉) was prepared by tryptic digestion of native SK (nSK) with molecular weight of 47K and separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. SK₂₉ was extracted from the electrophoretic gel, and its fibrinolytic and amidolytic activity was compared with that of nSK. A mixture of SK₂₉ and human plasminogen hydrolyzed only human fibrin, while a mixture of nSK and human plasminogen hydrolyzed human and bovine fibrin (Fig.2). SK₂₉ showed the ability to activate human plasminogen in the presence of human fibrin (Fig.3). However, different from nSK, it did not show the ability in the presence of human fibrinogen, bovine fibrin or fibrinogen. These results suggest that human fibrin formation induces conformational changes in the human plasminogen which results in the generation of an active site by SK₂₉.

* 愛知医科大学第一生理学教室 (〒480-11 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21); Department of Physiology, Aichi Medical University, Aichi, Japan. 受付: 1988.12.21. 受理: 1989. 2.27.

はじめに

Streptokinase (SK) の活性化機序, ことに Plasminogen (Plg) との complex 形成の機序を調査する目的で, SK を種々の蛋白分解酵素で低分子量化し, 活性化機能を有する低分子 SK の性質について検討した. SK を Trypsin で分解した分子量 29K の SK₂₉ はヒト Fibrin (Fibn) の存在下のみでヒト Plg を活性化する興味ある性質に変換することを明らかにした.

I. 材料と方法

(1) SK₂₉ の分離: SK (Boeringer) と Trypsin (Sigma) を mol 比 110:1 に加え SK を分解した後 DFP で反応を停止した. SDS-PAGE で分離後, Gel をスライスして 2.5% TritonX-100 処理した. この Gel を pH 7.5, 50 mM Tris-HCl buffer, 0.15 M NaCl 中で 4°C, 12時間振盪して蛋白を抽出した. 蛋白量の定量は Protein Assay kit (Bio Rad) を用いた.

(2) Fibrinolytic Activity の測定: ウシ Plg-rich 及び Plg free Fibrin Plate (BSP, BfP) とヒト Plg rich 及び Plg free Fibrin Plate

(HSP, HfP) の4種類の平板を用いた.

(3) Amidolytic Activity の測定: Plasmin 活性を S-2251 による End point 法で測定した.

II. 結果

(1) Zymogram: Trypsin, Endoproteinase Lys-C, Endoproteinase Glu-C で SK を分解すると 47K (native SK) から 29K にかけて数本の band がみられるが溶解は主に 47K と 29K に観察された. また Chymotrypsin による分解においても 47K から低分子量側に数本の band がみられたが溶解は主に 47K と 37K 付近に観察された.

(2) SK₂₉ の分離: Trypsin 分解した SK を SDS-PAGE により分離, 抽出して蛋白量と Fibrinolytic Activity を測定した. 47K の native SK (nSK) は 29K (SK₂₉) と 18K に主に分解された (図 1 上段). この抽出蛋白にヒト Plg を加え4種類の Fibrin Plate で溶解を測定した (図 1 下段). nSK では BSP, BfP および HSP, HfP の溶解がみられ, nSK ヒト Plg complex はウシおよびヒト Fibn を分解した. しかし SK₂₉ では HSP, HfP のみ

Fig. 1 Separation of SK digests and its fibrinolytic activity.

Top: protein concentration of tryptic digests of SK.

Bottom: fibrinolytic activity of nSK and SK₂₉.

Fig. 2 Activation of human plasminogen by SK₂₉ or nSK.
nSK and SK₂₉ were applied on human or bovine fibrin plates which contained human plasminogen at various concentrations.

Fig. 3 Effect of human fibrin on the activation of human plasminogen by SK₂₉.
The activation of human plasminogen by SK₂₉ was detected only in the presence of human fibrin.

溶解がみられた。SK₂₉・ヒト Plg complex はヒト Fibn を分解したが、ウシ Fibn は分解しなかった。

(3) SK₂₉ の線溶活性の検討: nSK および SK₂₉ の性質をヒト Plg の濃度を変えて検討し

た(図 2)。nSK に加えるヒト Plg の量を増加させると、BfP、HfP とも溶解は増加した。しかし SK₂₉ は HfP で Plg 量に依存して溶解が増加したが、BfP では溶解が観察できなかった。SK₂₉ によるヒト Plg の活性発現はヒト

Fibn 中でのみ起こりウシ Fibn 中では起こらなかった。

次いで SK₂₉ によるヒト Plg 活性化がヒト Fibn または Fibrinogen(Fibg) 存在下で増強されるかどうかを検討するため S-2251 を用いて Amidase 活性を測定した(図 3)。Fibn 存在下では時間経過に伴ない S-2251 の分解が認められたが、Fibg 存在下では分解は認められなかった。SK₂₉ によるヒト Plg の活性化はヒト Fibn の形成により増強された。同様の実験をヒト Fibg の代わりにウシ Fibg を用いて行なったが、ウシ Fibg と Fibn は SK₂₉ によるヒト Plg 活性化を増強しなかった。

III. 考 察

Castellino らはヒト Plg・SK complex から派生する nSK の N 末端 59 残基が欠損した SK 及びウサギ Plg・SK complex から派生する nSK の C 末端が欠損した SK を分離して、この両者とも nSK と同様にヒト Plg を Pl に活性化すると報告した^{1,2)}。また Jackson と Tang は nSK と同じ性質を有する C 末端 32 残基が欠損した SK を分離した³⁾。われわれが分離した SK₂₉ は N 末端が切断されたかもしくは、C 末端が切断されたか、アミノ酸配列を決定していないので明確ではないが、少なくとも両者の報告より低分子量の SK で活性を有するものがあることは明白である。またヒト、ウシの Fibg や Fibn は nSK の Plg 活性化を増強することが報告されている⁴⁾。SK₂₉ によるヒト Plg 活性化はヒト Fibn のみで増強

されて、ウシ Fibn およびヒト Fibg で増強されない点においてこれまでの報告とは異なっている。SK₂₉ による活性化も、ヒト Plg の C 末端側 (Pl の B chain に相当) と complex を形成することにより生じると考えられるが、SK が低分子量化しているため Plg の十分な conformational change が惹起されず活性は出現しない。しかしヒト Plg がヒト Fibn と補助的に結合すると、ヒト Plg の活性部位が十分に露出して活性が出現すると考えられる。このようなヒト Fibn 存在下のみでヒト Plg を活性化する SK₂₉ の特性は、今後血栓症治療薬の進展に重大な示唆を与えるものと考えられる。

文 献

- 1) Brockway, W., and Castellino, F.J.: A characterization of native streptokinase and altered streptokinase isolated from a human plasminogen activator complex. *Biochemistry*, **13**; 2063~2070, 1974.
- 2) Siefring, G.E. and Castellino, F.J.: Interaction of streptokinase with plasminogen. *J. Biol. Chem.*, **251**; 3913~3920, 1976.
- 3) Jackson, K.W., Malke, H., Tang, J.: Active streptokinase from the cloned gene in streptococcus sanguis is without the carboxyl-Terminal 32 residues. *Biochemistry*, **25**; 108~114, 1986.
- 4) Comiolo, S.M., Markus, G., Hobika, G.H.: Augmentation of streptokinase activator activity by fibrinogen or fibrin. *Thomb. Res.*, **17**; 697~706, 1980.