特集：血栓溶解療法の進歩

<基礎篇>

Type 1 plasminogen activator inhibitor

三 室 淳*

Jun MIMURO*

Key words: PAI-1, cDNA, fibrinolysis, PAI-1 binding protein

I. 緒 言

Fibrinolytic system (線溶系) は, plasminogen がその特異的な activator により活性型の broad spectrum な serine protease である plasmin となり, 血栓の fibrin を溶解することから名付けられている. 線溶系はただ単に血管内において血栓溶解に働くばかりでなく, 炎症, 組織破壊, 細胞の移動, 腫瘍細胞の転移, 血管新生, など種々の生物反応において重要な役割を果たしている (Fig. 1)^{1,2)}. 線溶系の作動は tissue type plasminogen activator (tPA) と urokinase type plasminogen activator (uPA) によって plasminogen が活性化されることで開始される. これら両 PA の活性は, それらの特異的 inhibitor である Type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1), および cell receptor, cell matrix, cofactor 等により制御されている¹⁾. 特に PA と PAI-1 の balance により線溶開始活性が決ってくるので, PAI-1 の細胞での産生の増減や, PAI-1 分子自体の活性の変動は前述した生物反応に大きく影響する¹⁾. PAI-1 の生理学的重要性は数々の臨床例からも確かめられている. 例えば PAI-1 が減少するような病態では出血傾向が認められ, 一方, 血栓症の患者において血中 PAI-1 の上昇を認める例がある. 本論文では PAI-1 の生化学, 分子生物学的側面について

述べてゆく.

II. PAI-1 の一次構造

Human^{3~5)}, bovine⁶⁾, rat⁷⁾, mouse⁸⁾ の PAI-1 cDNA が cloning されており, それらの cDNA sequence からアミノ酸配列が決定されている. PAI-1 は signal peptide (23 アミノ

Fibrinolytic System

Fig. 1 線溶系の模式図

線溶系の開始は plasminogen (Plg) を tPA あるいは uPA が活性化することで行われる. plasmin (Plm) は血栓溶解に働くばかりでなく, 組織破壊にも働く. PAI-1 は plasmin generation の段階で, α_2 plasmin inhibitor (α_2 PI) は生じた plasmin を抑制することにより線溶系を制御している. このように, 線溶系は SERPIN により 2 段階で制御されている.

* 自治医科大学医学部 血液研究所 止血血栓部門 講師 [〒329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1]; Division of Hemostasis and Thrombosis, Institute of Hematology, Jichi Medical School, Tochigi-ken 329-04

Fig. 2 各種 PAI-1 のアミノ酸配列の比較

部位にある。Rat PAI-1 はこの他にもう 1 つ glycosylation site があるがこれが糖鎖をもっているかは明かではない。これら PAI-1 分子のアミノ酸配列の比較検討からは、PA と反応する reactive center はいずれもが Arg-Met であり、reactive center 付近のアミノ酸配列は類似性が高いことが分かる (**Fig. 2**)。その一方で、N-末端付近は類似性が低い。PAI-1 は serine protease inhibitor (SERPIN) superfamily に属し、 α_1 -antitrypsin や antithrombin III と類似の構造を持つ³⁾⁴⁾。すなわち、reactive center は、C 末端付近の exposed loop 上にあり、PA との反応に際しては、reactive center の Arg (P_1) と Met (P_1') の間

Table 1. Plasminogen activator (PA) と Plasminogen activator inhibitor (PAI) の反応定数 (Second-order rate constant ; K assoc)

PA	PAI	K assoc ($M^{-1}s^{-1}$)	Reference
tPA, one chain	bovine PAI-1	3.7×10^7	41
	Rat PAI-1	3.7×10^7	42
	human PAI-1	7×10^6	43
	PAI-2	9×10^2	44
	Protease Nexin-1	1.5×10^3	45
tPA, two chain	bovine PAI-1	1.5×10^8	41
	plasma PAI-1	3×10^7	46
	human PAI-1	1.5×10^7	43
	PAI-2	2.5×10^5	44
	protease Nexin-1	3×10^4	45
Urokinase, high molecular weight	bovine PAI-1	1.6×10^8	41
	Rat PAI-1	5×10^7	42
	PAI-2	9×10^5	44
	Protease Nexin-1	1.5×10^5	45

にて解裂が起こり P₁ の Arg 残基は PA の活性 serine 残基との間に covalent bond を作る。この反応は極めて速く、second order rate constant は tPA と PAI-1 の間で $10^{6-7}/M/s$ 以上、UK と PAI-1 の間で $10^{7-8}/M/s$ 以上であり、他の PA inhibitor 活性を持つ蛋白 (PAI-2, protease nexin-1) と比較し second order rate constant において 1000~10000 以上の開きがある (Table 1)。このことから、PAI-1 が tPA や uPA の生理的 inhibitor であることが分かる。

III. PAI-1 の分子生物学

前述のように、4 種の PAI-1 cDNA が cloning されている³⁻⁸⁾。これら cDNA から推定される mRNA は基本的には同様の構造をしており、約 120~140 bp の 5'-untranslated region, 12.06 bp の coding region (23 アミノ酸からなる signal peptide を含む 402 アミノ酸を code する) そして約 1.7 kb の 3'-untranslated region からなる。3'-untranslated region には AU rich sequence が在る³⁻⁷⁾。AU rich sequence は ribonuclease に sensitive ではないかと考えられている³⁻⁷⁾。ただし、ribonuclease に sensitive な consensus sequence として知られている反復する AUUU sequence は bovine PAI-1 mRNA にのみ在る⁹⁾。cDNA

を probe としておこなった Northern blot からは human cell においては 3.2 kb と 2.3 kb^{3,5)}、bovine cell において、3 kb と 1.6 kb の 2 種類の mRNA¹⁰⁾ がみとめられている。human system では alternative polyadenylation, bovine system では ribonuclease による 3 kb mRNA の AUUU sequence での分解と、それぞれ異なった機序が、2 種の mRNA の成因と考えられている^{3-6,10)}。

PAI-1 gene は第 7 染色体上 q 21.3-q 22 にあり^{5,11)}、cystic fibrosis gene の近傍にある¹¹⁾。PAI-1 の gene structure^{12,13)} と全 DNA sequence¹³⁾ が決められている。これによると、PAI-1 gene は 9 exon と 8 intron からなり、promoter を含む 5' flanking region は 6 kb 以上ある。PAI-1 gene は制御が強くかかることが知られている。Transforming growth factor β , Tumor necrosis factor α , Interleukin-1 また endotoxin は血管内皮細胞で PAI-1 mRNA レベル^{10,14)} および PAI-1 分子の産生¹⁴⁻¹⁷⁾ を増加させることが知られている。この他 steroid hormone は fibrosarcoma cell line^{18,19)} や hepatoma cell line²⁰⁾ で PAI-1 の生産を増加する。また、PAI-1 gene の promoter region の解析からは dexamethasone に反応する sequence が決められている²¹⁾。

IV. PAI-1 の活性の制御

PAI-1 の活性を制御するものは PAI-1 を失活させるもの、安定化させるもの、そして非活性型の PAI-1 を活性化するものに大別される。

PAI-1 を失活させるものには、oxidant と protease が知られている。PAI-1 の active center は Arg-Met であり、P₁ の Met が oxidation を受け失活すると考えられている²²⁾。PAI-1 は SERPIN であり、その target protease である PA あるいは、その他の protease と反応し複合体を形成するに際しその活性を失う。その一方、ある protease は PAI-1 を bait region において限定分解する。前者に属するものに PA, activated protein C²³⁾ そして contact phase protease²⁴⁾ があり、後者には thrombin^{25,26)} そして elastase²⁷⁾ がある。activated protein C は PAI-1 を失活させ線溶活性を上昇させると報告されてきた^{23,24)}。この反応は protease と protease inhibitor の反応であり、複合体を形成した PAI-1, activated protein C とともに失活している。すなわち、activated protein C が PAI-1 を限定分解して PAI-1 を失活させるのではない。この反応は極めて遅い反応であり、大過剰の activated protein C を投与したときにおこると考えられる¹⁾。

PAI-1 には少なくとも二つの型（活性型 PAI-1 および latent PAI-1）が存在することが知られている^{1,28)}。精製された活性型 PAI-1 はきわめて不安定であり、例えば 37°C にてさえも容易に生物学的活性のない（すなわち PA と反応しない）latent PAI-1 へ変化する^{1,29)}。latent PAI-1 は化学的安定性が高く、また蛋白変性剤（SDS, グアニジン塩酸, 尿素）²⁸⁾ や Negatively-charged phospholipids³⁰⁾ と反応させることにより、活性型 PAI-1 にすることができる。PAI-1 は活性型 PAI-1 として細胞から産生され、PAI-1 分子に構造変化が起こり latent PAI-1 へと変化すると考えられる。これらのことは、PAI-1 が cysteine 残基をもたず、分子内 S-S 架橋結合をもたない為、その分子構造が環境により容易に変化することによ

るためと考えられる¹⁾。以上のことから、活性型 PAI-1 を安定化する protein, あるいは latent PAI-1 を活性化する因子が存在すれば、それら因子は、PAI-1 分子の活性に影響することで線溶活性を制御し得る。活性型 PAI-1 を安定化する可能性がある protein (PAI-1 binding protein, PAI-1 結合蛋白) の存在は種々の報告から示唆されている（後述）¹⁾。その一方、latent PAI-1 を活性化する生理的因子は未だ明かにされていず、latent PAI-1 の活性化反応が生体内で起こるか否か、論議のあるところである。

V. PAI-1 Binding Protein

1. PAI-1 と Extracellular Matrix

血管壁内皮細胞などより分泌され培養上清に集積した PAI-1 は、そのほとんどが活性のない latent PAI-1 であるが、培養血管壁内皮細胞の細胞外基質 (Extracellular Matrix, ECM) に存在する PAI-1 は活性型である³¹⁾。また、活性型 PAI-1 は ECM と結合することにより安定化される³²⁾。この ECM に存在する PAI-1 は tPA と反応し複合体をつくと ECM より遊離する。このことは複合体の形成により PAI-1 の分子構造が大きく変わるためと考えられる。精製し isotope 標識した PAI-1 を ECM に加えると活性型 PAI-1 が特異的に ECM に結合する³²⁾。一方、latent PAI-1 の ECM への親和性は活性型 PAI-1 の 1/15 以下である³²⁾。活性型 PAI-1 の ECM への結合は $k_d = 60 \text{ nM}$ と強いが、37°C で緩衝液中で incubation すると ECM に結合していた PAI-1 は緩衝液中に放出される。これは、液相中の PAI-1 は latent PAI-1 へ変化するため、平衡反応が PAI-1 を ECM から遊離する方向に傾いているためと考えられる³²⁾。isotope 標識 PAI-1 は ECM と結合することで安定化する。また ECM を種々の protease で処理すると PAI-1 結合能が失われる。これらの data からは、ECM 中に存在する何等かの蛋白が PAI-1 の結合と安定化に関与していると推測された³²⁾。

2. PAI-1 と血漿蛋白

PAI-1 は血漿中には極低濃度 (20 ng/ml) 存在する³³⁾。PAI-1 はまた血小板に存在し血小板の凝集反応にともない放出される³⁴⁾。ところで、血漿³⁵⁾あるいは血清³⁶⁾を gel filtration column chromatography により分画すると、活性型 PAI-1 は予想される分子量よりも高分子領域に認められる。このことより、活性型 PAI-1 は血液中では他の血漿蛋白と結合していると考えられ、血漿中にも PAI-1 binding protein が存在するとされた^{35,36)}。

3. PAI-1 binding protein の精製

近年、二つの group により^{37,38)} PAI-1 binding protein (PAI-1 BP) が血漿中より精製された。結論的には、両者ともに同じ protein を精製した。精製された PAI-1 BP の N 末端アミノ酸解析と免疫学的検索により血漿 PAI-1 BP は、既知の血漿蛋白の一つである vitronectin と同じであることが明らかになった^{37,38)}。vitronectin は ECM protein のひとつであり、培養血管内皮細胞の ECM にも認められるので、ECM に存在する PAI-1 BP の一つと考えられる³⁷⁾。

4. PAI-1 と vitronectin

vitronectin は serum spreading factor とも呼ばれ、また、補体系の S-protein と同一の蛋白である。多くの細胞は vitronectin receptor を持っており、vitronectin は細胞の接着に重要な役割を果たしている。vitronectin に結合した PAI-1 は、tPA また uPA と反応しこれらを失活させる^{38,39)}。またその反応速度も変化しない³⁵⁾。PAI-1 と vitronectin の結合は可逆的であり^{37,38)}、vitronectin に結合していた PAI-1 は、PA と反応し PAI-1/PA 複合体をつくると vitronectin から遊離する³⁸⁾。vitronectin を plastic microtiter plates に固相化させ、isotope 標識した PAI-1 を加えると、PAI-1 は plastic plates に結合する³⁹⁾。この binding curve からは kd は 200 nM とされる。PAI-1 の活性化の有無は PAI-1 の vitronectin に対する結合に影響しないとする報告もあるが、多くの報告^{32,37,38,40)}からは、活性型 PAI-1 が vitronectin に強く結合するのにに対し、latent PAI-1 は極弱くのみ結合すると考えられる。

vitronectin に結合した活性型 PAI-1 は遊離型 PAI-1 より安定である (活性半減期 $t_{1/2}$ が約 2 倍に延長する)³⁸⁾。また、vitronectin の latent PAI-1 に対する影響をみた報告⁴⁰⁾からは、4°C で PAI-1 と vitronectin を長時間 (5~10 日) incubation すると latent PAI-1 が活性型に変化する。

vitronectin の PAI-1 binding site また PAI-1 の vitronectin binding site はまだ明かにされていない。PAI-1 は vitronectin への細胞の接着を阻害しないので³⁶⁾、vitronectin の N 末端近くに存在する cell attachment site には PAI-1 は結合しないと考えられる。

Declerck ら¹³⁾は PAI-1 は multimer おそらくは dimer の vitronectin とのみ結合するとしているが、両者の結合は 1 対 1 とする報告もある。ligand blotting を用いた検討からは monomer の vitronectin も PAI-1 を結合しえる (Mimuro, Seiffert & Loskutoff, 未発表 data)。

5. PAI-1 と vitronectin の結合の生理的意義

PAI-1 は血中に 20 ng/ml と低濃度で存在するのにに対し vitronectin は 200~400 $\mu\text{g/ml}$ と PAI-1 の約 10,000 倍の濃度で存在する。血中の vitronectin のすべてが PAI-1 を結合できるか否かは明かではないが、仮に血中の全 vitronectin が PAI-1 を結合しえるとすると、血中の PAI-1 はほとんど vitronectin との複合体として存在すると考えられる。vitronectin は不安定な活性型 PAI-1 に対し安定化作用があるが、PAI-1 の流血中からの clearance は極めて速く ($t_{1/2}=7\text{ min}$)¹⁾、この安定化作用が血液中で生理的意味があるか否かは明かではない。また、4°C で起こる vitronectin による latent PAI-1 の活性化反応は極めて遅く、37°C の生体内での生理的意義は少ないと考えられる。むしろ、vitronectin は生体内では血中ばかりでなく組織にも存在するので、PAI-1 を組織に局在化し組織内濃度を高めることで、線溶系が関与する生物学的反応を制御しているかも知れない。

文 献

- 1) Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J: Type 1 plasminogen activator inhibitor in "Progress in Hemostasis and Thrombosis", (Coller BS ed.) vol 9: 1989, pp 87~115. WB Saunders, Philadelphia.
- 2) Dano K, Anderasen PA, Grondahl-Hanses J, Kristenses P, Nielsen LS, Skriver L: Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv Cancer Res* 44: 139~266, 1985.
- 3) Ny T, Sawdey M, Lawrence DA, Millan JL, Loskutoff DJ: Cloning and sequence of a cDNA coding for the human β -migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 6776~6780, 1986.
- 4) Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, Diergaarde P, Verweih CL, van Zonneveld AJ, van Mourik JA: Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): A new member of serpin gene family. *EMBO J.* 5: 2539~2544, 1986.
- 5) Ginsburg D, Zeheb R, Yang AY, Raferrty UM, Andreasen PA, Nielsen L, Dano K, Lebo RV, Gelehrter TD: cDNA cloning of human plasminogen activator inhibitor from endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 78: 1673~1680, 1986.
- 6) Mimuro J, Sawdey M, Hattori M, Loskutoff DJ: cDNA for bovine type 1 plasminogen activator inhibitor. *Nucl. Acid Res.* 17: 8872, 1989.
- 7) Zeheb R, Gelehrter TD: Cloning and sequencing of cDNA for the rat plasminogen activator inhibitor-1. *Gene* 73: 45~468, 1988.
- 8) Prendergast G, Cole MD: Posttranscriptional regulation of cellular gene expression by the c-myc oncogene. *Mol Cell. Biol.* 9: 124~134, 1989.
- 9) Mimuro J, Loskutoff DJ: Characterization of the immature form of plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) present in cultured bovine aortic endothelial cells (BAEs). *Fibrinolysis* 2, (suppl 1) 120, 1988.
- 10) Sawdey M, Podor T, Loskutoff DJ: Regulation of type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in cultured bovine aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 264: 10396~10401, 1989.
- 11) Klinger KW, Winqvist R, Riccio A, Andreasen PA, Sartorio R, Nielsen LS, Stuart, Stanislovits P, Watkins P, Douglas R, Grzeschik KH, Alitalo K, Blasi F, Dano K: Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- 12) Loskutoff DJ, Linders M, Keijer J, Veerman H, van Heerikhizen H, Pannekoek H: Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: Nonrandom distribution of introns, *Biochemistry* 26: 3763~3768, 1987.
- 13) Bosma PJ, van den Berg E, Kooistra T, Siemieniak DR, Slightom JL: Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Biol Chem* 263: 9129~9141, 1988.
- 14) Schleef RR, Bevilacqua MP, Sawdey M, Gimbrone RA Jr, Loskutoff DJ: Cytokine activation of vascular endothelium: Effects on tissue plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor. *J. Biol. Chem.* 263: 5797~5803, 1988.
- 15) Bevilacqua MP, Schleef RR, Gimbrone MA Jr, Loskutoff KJ: Regulation of the fibrinolytic system of cultured human vascular endothelium by interleukin 1. *J Clin Invest* 78: 587~591, 1986.
- 16) Mimuro J, Loskutoff DJ: Effect of transforming growth factor β (TGF β) on the fibrinolytic system of cultured bovine aortic endothelial cells (BAEs). *Thromb Hemostas* 58: 1647, 1987.
- 17) Colucci M, Paramo JA, Collen D: Generation in plasma of a fast acting inhibitor of plasminogen activator in response to endotoxin stimulation: *J Clin Invest* 75: 818~824, 1985.
- 18) Andreasen PA, Puke C, Riccio A, Kristensen P, Nielsen LS, Lund LR, Blasi F, Dano K: Plasminogen activator inhibitor type 1 biosynthesis and mRNA level are increased by dexamethasone in human fibrosarcoma cells. *Mol Cell Biol* 7: 3021~3025, 1987.
- 19) Medcalf R, Van den Berg E, Schleuning W-S: Glucocorticoid modulated gene expression of tissue- and urinary type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor 1 and 2. *J Cell Biol* 106: 971~978, 1978.
- 20) Loskutoff DJ, Roegner K, Erickson LA, Schleef

- RR, Huttenlocher A, Coleman PL, Gelehrter TD.: The dexamethasone-induced inhibitor of plasminogen activator in hepatoma cells is antigenically related to an inhibitor produced by bovine aortic endothelial cells. *Thromb Haemostas* **55**: 8~11, 1986.
- 21) van Zonneveld AJ, Curriden S, Loskutoff DJ: Type 1 plasminogen activator inhibitor gene: Functional analysis and glucocorticoid regulation of its promoter. *Proc. Natl Acad Sci USA* **85**: 5525~5529, 1988.
 - 22) Lawrence DA, Loskutoff DJ: Inactivation of plasminogen activator inhibitor by oxidants. *Biochemistry* **25**: 6351~6355, 1986.
 - 23) Sakata Y, Curriden SA, Lawrence DA, Griffin JH, Loskutoff DJ: Activated protein C stimulates the fibrinolytic activity of cultured endothelial cells and decreases antiactivator activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 1121~1125, 1985.
 - 24) Berrittini M, Schleef RR, Espana F, Loskutoff DJ, Griffin JH: Interaction of type 1 plasminogen activator inhibitor with the enzymes of the contact activation system. *J. Biol. Chem* **264**: 11738~11743, 1989.
 - 25) de Fouw NJ, van Hinsgergh VWM, de Jong YF, Haverkate F, Bertina RM: The interaction of activated protein C and thrombin with the plasminogen activator inhibitor released from endothelial cells, *Thromb Haemost* **57**: 176~182, 1987.
 - 26) Knudsen BS, Hapel PC, Nachman RL: Plasminogen activator inhibitor is associated with the extracellular matrix of cultured bovine smooth muscle cells. *J Clin Invest* **80**: 1082~1089, 1987.
 - 27) Levin EG, Santell L: Association of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with the growth substratum and membrane of human endothelial cells. *J Cell Biol* **105**: 2543~2549, 1987.
 - 28) Hekman CM, Loskutoff DJ: Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants. *J Biol Chem* **260**: 11581~19
 - 29) Hekman CM, Loskutoff DJ: Bovine Plasminogen activator inhibitor 1: Specificity determinations and comparison of the active latent and guanidine-activated forms. *Biochemistry* **27**: 2911~2918, 1988.
 - 30) Lambers JWJ, Cammenga M, Konig B, Pannekoek H, van Mourik JA: Activation of human endothelial cell type plasminogen activator inhibitor (PAI-1) by negatively charged phospholipids. *J Biol Chem* **262**: 17492~17496, 1987.
 - 31) Mimuro J, Schleef RR, Loskutoff DJ: Extracellular matrix of cultured bovine aortic endothelial cells contains functionally active type 1 plasminogen activator inhibitor. *Blood* **70**: 721~728, 1987.
 - 32) Mimuro J, Loskutoff DJ: Binding of type 1 plasminogen activator inhibitor to the extracellular matrix of cultured bovine endothelial cells. *J Biol Chem* **264**: 5058~5063, 1989.
 - 33) Kruithof EKO, Tran-Thang C, Gudinchet A, Hauert J, Nicoloso G, Genton C, Welte H, Bachmann F: Fibrinolysis in pregnancy. A study of plasminogen activator inhibitors. *Blood* **69**: 460~466, 1987.
 - 34) Erickson LA, Ginsberg MH, Loskutoff DJ: Detection and partial characterization of an inhibitor of plasminogen activator in human platelets. *J Clin Invest* **74**: 1465~1472, 1984.
 - 35) Wiman B, Lindahl T, Almquist A: Evidence for a discrete plasminogen activator inhibitor binding protein in plasma. *Thromb Haemost* **59**: 392~395, 1988.
 - 36) Erickson LA, Hekman CM, Loskutoff DJ: Denaturant-induced stimulation of the β -migrating plasminogen activator inhibitor in endothelial cells and serum. *Blood* **68**: 1298~1305, 1986.
 - 37) Mimuro J, Loskutoff DJ: Purification of a protein from bovine plasma that binds to type 1 plasminogen activator inhibitor and prevents its interaction with extracellular matrix. *J. Biol Chem* **264**: 936~939, 1989.
 - 38) Decklerck PJ, DeMol M, Alessi M, Baudner S, Plaques E, Preissner KT, Muller-Berghaus G, Collen D: Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor-1 from human plasma. *J Biol Chem* **263**: 15454~15461, 1988.
 - 39) Salonen E-M, Vaheri A, Pollanen J, Stephens R, Andreassen P, Mayer M, Dane K, Bailit J, Rous-

- lahti E: Interaction of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with vitronectin. *J Biol Chem* **264**: 6339~6343, 1989.
- 40) Wun TC, Palmier MO, Siegel SM, Smith CE: Affinity purification of active plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) using immobilized anhydrourokinase. *J Biol Chem* **264**: 7862~2868, 1989.
- 41) Hekman CM, Loskutoff DJ: Kinetic analysis of the interactions between plasminogen activator inhibitor 1 and both urokinase and tissue plasminogen activator. *Arch Biochem. Biophys* **262**: 199~210, 1988.
- 42) Coleman PL, Patel PD, Cwikel BH, Rafferty UM, Szyner-Laszuk R, Gelehrter TD: Characterization of the dexamethasone-induced inhibitor of plasminogen activator in HTC hepatoma cells. *J Biol Chem* **261**: 4352~4357, 1986.
- 43) Roder M, Philips M, Suenson E, Thorsen S: The influence of fibrin formation and degradation on the kinetics of inhibition of tissue type plasminogen activator (tPA) by plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1). *Fibrinolysis* **2**, (suppl 1) 96, 1988.
- 44) Kruithof EKO, Vassalli JD: Schleuning WD, Mattaliano RJ, Bachmann F: Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor from the histiocytic lymphoma cell line U-937. *J Biol Chem* **261**: 11207~11213, 1986.
- 45) Scott RW, Bergman BL, Bajpai A, Hersh PT, Podriquer H, Jones BN, Barreda C, Watts S, Baker JB: Protease Nexin. Properties and a modified purification procedure. *J Biol Chem* **260**: 7029~7034, 1985.
- 46) Colucci M, Paramo JA, Collen D: Inhibition of one-chain and two-chain forms of human tissue-type plasminogen activator by the fast-acting inhibitor of plasminogen activator in vitro and in vivo. *J Lab Clin Med* **108**: 53~59, 1986.
-