◆原 著◆

インビトロにおける非酵素的糖化現象の α_2 -プラスミン インヒビターにおよぼす影響

山下 勉, 藤井 誠治, 井上 かおり
畠田 典子, 小林 恵美, 松岡 瑛

The Effects of Nonenzymatic Glycation on Human α_2 -Plasmin Inhibitor *in Vitro*

Tsutomu YAMASHITA, Seiji FUJII, Kaori INOUE, Noriko HATAKEDA,
Emi KOBAYASHI and Akira MATSUOKA

Key words: α_2 -Plasmin inhibitor, nonenzymatic glycation, lysine binding site I (LBS I), kringle binding site (KBS), active site binding site (ABS)

We studied the effects of nonenzymatic glycation on human α_2 -plasmin inhibitor (α_2 -PI) *in vitro*. Purified human α_2 -PI (14.9 $\mu\text{M}/l$) was incubated with glucose (55.5 mM/l) at 37°C for 4 days. α_2 -PI was significantly glycosylated, and then the activity of glycosylated α_2 -PI decreased, while the levels of α_2 -PI antigen did not change. The amount of complexes which were formed between glycosylated α_2 -PI and plasmin (5.0 U/ml) were less than that of control (control: 167.0~354.8 nM/l, glycosylated α_2 -PI: 25.2~105.4 nM/l, $p < 0.01$). α_2 -PI formed a complex of molecular weight in the region of 170 KD with plasmin revealed by SDS-PAGE analysis. However, glycosylated α_2 -PI did not form a complex with plasmin. On crossed immunoelectrophoresis containing anti α_2 -PI antiserum in the second dimension, plasmin- α_2 -PI complex showed a major peak. On the contrary, glycosylated α_2 -PI demonstrated two major peaks including the slow moving one. The results are indicating that a glycosylated α_2 -PI is a form of non-binding for plasmin. Furthermore, when plasmin was added to the mixture of α_2 -PI and LBS I (500 $\mu\text{g}/\text{m}l$), the residual plasmin activity increased as the concentration of LBS I was increased. However, in case of glycosylated α_2 -PI, LBS I had no effect on the residual plasmin activity. In addition, α_2 -PI was similarly glycosylated by incubating with glucose and LBS I.

From these observations, it is suggested that nonenzymatic glycation causes a chemical modification of KBS (Kringle Binding Site) and ABS (Active Binding Site) of α_2 -PI, and it is caused by poor formation of complex with plasmin and makes activity of α_2 -PI decrease.

緒 言

血液中の種々タンパク質にグルコースが結合する現象 (以下, 糖化*と呼ぶ) は, 非酵素的に起こりこの非酵素的糖化現象により糖化されたタンパク質の機能異常が報告されている¹⁾²⁾³⁾. 多くのタンパク質は主にその構成アミノ酸である Lysine 残基のフリーの ϵ アミノグループとグルコースが非酵素的に結合する⁴⁾⁵⁾ 結果, その構成に変化を受ける. 凝固線溶系にかかわる種々酵素, 阻害物質において, この Lysine 残基は非常に重要なアミノ酸である. 従って, 非酵素的な糖化現象が凝固線溶因子に影響をおよぼす可能性が考えられる. プラスミンならびに α_2 プラスミンインヒビター (以下 α_2 -PI) においても Lysine 残基は非常に重要な機能を担うアミノ酸である. プラスミンの生理的阻害物質である α_2 -PI は血液の線溶機構に対する特異的な制御調節を有し, 止血栓の維持およびその溶解の調節に重要な役割を担っている⁶⁾⁷⁾. その先天的欠損症患者に出血傾向が認められることが知られている⁸⁾. しかし, α_2 -PI に対する非酵素的糖化現象による影響についての報告はない. 今回, われわれは非酵素的に糖化された α_2 -PI のプラスミン阻害への影響を検索した.

材料と方法

α_2 -PI は純化ヒト α_2 -PI (ATHENS RESEACH ANDT ECHNOLOGY, INC.) 14.9 μ M を用いた. プラスミンはヒト Glu-プラスミノゲン (SIGMA) 10 U/ml をウロキナーゼ (ヒト高分子量ウロキナーゼ, ミドリ十字) 3,000 IU/ml にて活性化して用いた. プラスミノゲンリジン²バインディングサイト I (LBS I) はヒトプラスミノゲン由来リジンバインディングサイト I (SIGMA) を用いた.

α_2 -PI 活性: 健康人プール血漿を 100% としてプラスミン阻害度を合成基質 (S-2251, KABI) を用いて⁹⁾ 測定した.

糖化蛋白量: 糖化蛋白のもつケトアミンの還

元能を利用した塩化ニトロブルーテトラゾリウム塩の還元発色反応を用いた Johnson らの方法¹⁰⁾ にて定量した. 糖化蛋白量は安定な糖化ヒト血清 (プレチマット, フルクトサミン, BMY) を標準物質とした.

α_2 -PI のプラスミン阻害に対する LBSI の影響: α_2 -PI (14.9 μ M) と合成基質 (3 mM) の混液に種々の濃度 (0~500 μ g/ml) の LBS I を添加したのちプラスミン (5 U/ml) を加えた直後 (0.5 秒後) から 10 秒間の吸光度の変化をとらえ比較した. 測定は遠式方式汎用自動分析装置 (COBAS FARA, BAXTER) を用いた. 本分析装置は反応系の種々条件が自由に設定可能で, 測光セル内の別べつの反応液を遠心方式で混和することから反応開始直後の測定が可能である.

複合体形成過程の分析, 並びに形成量の定量: α_2 -PI (14.9 μ M) にプラスミン (5 U/ml) を添加し, 各種時間のインキュベーション後, 一定量を取り出し, 0.2 M 溶液の DFP (Diisopropylfluorophosphate, SIGMA) にて反応を停止させた試料について行った.

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE): Laemmli らの方法¹¹⁾ に従い, 4~20% のグラジエントスラブゲル (第一化学薬品) を用いて, 7 μ l のサンプル量で 40 mA, 1 時間泳動を行った. 銀染色は Sammons らの方法¹²⁾ に従って行った. 分子量マーカーは高分子量, 低分子量用電気泳動用キャリブレーションキット (ファルマシア) を用い, 同様に泳動した.

二次元免疫電気泳動 (CIE): 1% アガロース (和光純薬) を用いて第二相に 1% 抗ヒト α_2 -PI 抗血清 (持田) を含ませてそれぞれ 2 mA/cm で 3 時間泳動した.

プラスミン- α_2 -PI 複合体 (PIC) 量およびフリー α_2 -PI 量: サンドイッチ EIA 法¹³⁾ (PIC 「テイジン」, α_2 -PI 「テイジン」 帝人) を用いて定量した.

結 果

1) α_2 -PI の非酵素的糖化

α_2 -PI (14.9 μ M/l) 溶液にグルコースを

*: 本論文で用いる糖化とは血漿中のタンパク質がグルコースと結合してアマドリ転位により安定なケトアミンになることを指す.

Table 1 The effects upon α_2 -PI of nonenzymatic glycation. Purified human α_2 -PI (14.9 μ M/l) was incubated with glucose (55.5mM/l) for 4 days at 37°C and activity, antigen and glycated protein was determined.

		Control α_2 PI	α_2 PI at glucose concentration of 55 mM/l
Activity	(%)	64.3 $\pm$ 2.57	9.1 $\pm$ 2.6*
Antigen	(%)	77.7 $\pm$ 5.8	69.8 $\pm$ 6.8
Glycated protein	(μ M/l)	3.9 $\pm$ 0.52	76.0 $\pm$ 0.1*

*: P<0.01

Fig. 1 Sodiumdodecyl sulfate gel electrophoretic analysis of the interaction of α_2 -PI and plasmin.

Control α_2 -PI was incubated with plasmin (5 U/ml) for various times and the reaction was stopped by adding 0.2 M DFP. Prior to electrophoretic analysis samples were added in 0.0625 M tris-HCl (pH 6.8) containing, 2% sodium dodecyl sulfate, and 10% glycerol, 0.01% BPB. Samples of 7 μ l were then applied to gel (4~20% Polyacrylamide gradient gel, 84 $\times$ 90 $\times$ 1.0 mm) and were run for 1 hour at 40 mA. and silver staining was done. Lane1: Plasmin, Lane2: α_2 -PI, Lane3~8: Plasmin+ α_2 -PI, Lane9~10: Molecular markers.

55.5 mM/l になるように添加して、4 日間のインキュベートを行った。その活性はインキュベーション前を 100%とした時、コントロールが 64.3 $\pm$ 2.5%に対してグルコースとインキュベートした α_2 -PI は 9.1 $\pm$ 2.6%と著明な活性低下が認められた。それに対して α_2 -PI 抗原量は

インキュベーション前を 100%とした時、コントロールが 77.7 $\pm$ 5.8%に対してグルコースとインキュベートした α_2 -PI は 69.8 $\pm$ 6.8%と有意な差を認めなかった。糖化タンパク量はコントロールが 3.9 $\pm$ 0.52 μ M/l に対してグルコースとインキュベートした α_2 -PI は 7.60 $\pm$ 0.13

Fig. 2 Sodiumdodecyl sulfate gel electrophoretic analysis of the interaction of glycated α_2 -PI and plasmin.

glycated α_2 -PI was incubated with plasmin (5 U/ml) for various times and the reaction was stopped by adding 0.2 M DFP. Electrophoretic analysis was done similarly. See Fig. 1 legend. Lane1: Plasmin, Lane2: Glycated α_2 -PI, Lane3~10: Plasmin+Glycated α_2 -PI, Lane11~12: Molecular markers

Fig. 3 Time course of the formation of plasmin-glycated α_2 -PI complex. 450 μ l of α_2 -PI was mixed with 100 μ l of saline or LBS I (500 μ g/ml) and 450 μ l of plasmin (5 U/ml) was added and incubated for various times at 37°C and the reaction was stopped by 0.2 M DFP. The amounts of complexes were determined.

Control α_2 -PI+Plasmin: (○), Glycated α_2 -PI+Plasmin: (●), Control α_2 -PI+LBS I+Plasmin: (□)

μ M/l と著しく増加した (Table 1).

2) 糖化 α_2 -PI とプラスミンの相互反応

① SDS-PAGE による分析: 糖化 α_2 -PI に

ウロキナーゼで活性化したプラスミンを作用させ、経時的な変化を SDS-PAGE にて分析した。実験に用いた α_2 -PI および、プラスミンはわれ

Fig. 4 Crossed immunoelectrophoresis of glycosylated α_2 -PI and plasmin. Anti human α_2 -PI serum was contained in the second dimension agarose. Control α_2 -PI or glycosylated α_2 -PI was incubated with plasmin and an aliquote of mixture was applied after 10 minutes of incubation and were run 3 hours at 20 mA. A: Control α_2 -PI+Plasmin, B: Control α_2 -PI+Plasmin

Fig. 5 The effects of LBS I on the interaction of α_2 -PI and Plasmin. 100 μ l of α_2 -PI (14.9 μ M/l) was mixed with 100 μ l of S-2251 (3 mM), and 100 μ l of LBS I (0~500 μ g/ml) was added, and the mixture was incubated at 37°C. 50 μ l of plasmin (5 U/ml) was added to the mixture, and the residual plasmin activity was measured. Control α_2 -PI+LBS I+Plasmin: (○), Glycosylated α_2 -PI+LBS I+Plasmin: (●)

われが用いた泳動条件ではそれぞれ分子量 67 KD, 89 KD の位置に単一のバンドとして認められた (Fig. 1 レーン 1, 2). コントロールが α_2 -PI ではプラスミン添加直後 10 秒で既に分子量 170 KD の位置に複合体のバンドを確認した (Fig. 1 レーン 3) のに対して糖化 α_2 -PI ではプラスミン添加後 30 分まで明らかな複合体形成が認められなかった (Fig. 2 レーン 3~10).

② 複合体形成量の変化: α_2 -PI とプラスミンの複合体形成量は、コントロール α_2 -PI ではプラスミン添加後、ほぼ二峰性の複合体形成パターンを示し、プラスミン添加直後 10~20 秒で 313 nM/l の形成量を示した (Fig. 3 ○). α_2 -PI とプラスミンの反応系に LBS I (0.5 mg/ml)

を介在させた場合、その複合体形成過程はコントロールの第一の形成ピークを欠いた形成過程を示した (Fig. 3 □). 一方、糖化 α_2 -PI ではプラスミン添加直後 10~20 秒で 38 nM/l と著明な形成低下を認め (Fig. 3 ●) SDS-PAGE の成績に一致した.

③ CIE による分析: α_2 -PI とプラスミンの反応を CIE にて分析した. コントロールおよび糖化 α_2 -PI にプラスミンを作用させて、その CIE 泳動パターンを比較するとコントロールでは複合体形成により一峰性である (Fig. 4 B) のに対して糖化 α_2 -PI では一元目の陰極側に複合体を形成しないフリーの α_2 -PI のピークとコントロールと同じく複合体を形成したピー

クの二峰性の泳動パターンを示した (Fig. 4 A).

3) 糖化 α_2 -PI に対する LBS I の影響

糖化 α_2 -PI のプラスミン阻害活性に対する LBS I の影響を検討した. 糖化 α_2 -PI と合成基質の混液に LBS I を添加してプラスミンを加えた直後 (0.5 秒後) から 10 秒間の吸光度の変化を比較した. コントロール α_2 -PI では LBS I が介在すると α_2 -PI のプラスミン阻害活性が低下して残存プラスミン活性が高くなった (Fig. 5 ○). しかし, 糖化 α_2 -PI では LBS I の影響を受けず LBS I の濃度に関係なく残存プラスミン活性は変化が認められなかった (Fig. 5 ●).

考 察

非酵素的な糖化現象は種々の血中タンパク質がその対象になるものと考えられる. フルクトサミン, ヘモグロビン A_{1c} のように糖化蛋白を血糖コントロールの指標に用いる場合¹⁴⁾¹⁵⁾ は別として, 臨床的に問題となるのは糖化されることによるそのタンパク質の機能異常である. 特に高血糖状態を呈する糖尿病などでは大きな問題になると考えられる. タンパク質の非酵素的糖化現象はその構成アミノ酸である Lysine 残基のフリーの ϵ アミノグループとグルコースの非酵素的結合⁴⁾⁵⁾ による Lysine 残基の変化に起因する機能障害が問題となる. 特に, 凝固線溶系にかかわる種々酵素, 阻害物質において, Lysine 残基は非常に重要なアミノ酸である. われわれは以前インビトロにおいて非酵素的に糖化されたアンチトロンビン III についてそのヘパリン結合部位近傍の Lysine 残基の変化がアンチトロンビン III の構造変化をもたらすその複合体形成に障害をもたらす可能性を報告した³⁾. α_2 -PI にはプラスミノゲンの LBS と強い親和性を有するクリングル結合部位 (KBS) にその結合に重要な Lysine 残基が存在¹⁶⁾ することから, 非酵素的糖化現象による機能障害の可能性が想像された. α_2 -PI はグルコース 55.5 mM/l (1 g/dl) の 4 日間のインキュベートで非酵素的に糖化された. この時, 糖化 α_2 -PI はプラスミン阻害活性が著明に低下した. しかし,

抗原性に変化は認められなかった. SDS-PAGE による分析からコントロール α_2 -PI ではプラスミン添加直後 10 秒で分子量 170 KD の位置に複合体のバンドを認めた (Fig. 1 レーン 3). このバンドはプラスミノゲン抗体を用いたウェスタンブロットによる検討から, α_2 -PI とプラスミンの複合体であることを確認した (成績未表示). 一方, 糖化 α_2 -PI ではプラスミン添加後 30 分まで明らかな複合体形成が認められなかった (Fig. 2 レーン 3~10). α_2 -PI とプラスミンの複合体形成量はコントロール α_2 -PI ではほぼ二峰性の形成過程を示した (Fig. 3 ○). α_2 -PI がプラスミンを阻害する場合, 両者はモル比で 1 対 1 で複合体を形成する⁶⁾. α_2 -PI とプラスミンとの反応は α_2 -PI の KBS とプラスミンの LBS が結合する可逆的な非常に早い反応と, その後に続く α_2 -PI の活性部位 (ABS) とプラスミンの活性部位との不可逆的反応の 2 段階で進行する¹⁷⁾¹⁸⁾. プラスミン, α_2 -PI の反応系にプラスミノゲンの LBS I を介在させた場合, コントロール α_2 -PI でみられた二峰性の複合体形成ピークの最初のピークを欠いた複合体形成過程を示したことから, この形成過程の最初のピークは α_2 -PI の KBS とプラスミンの LBS I の反応が大きく関与していると考えられた (Fig. 3 □). 糖化 α_2 -PI の場合はコントロールの二峰性の形成ピークの最初のピークは同様に欠いており, 第 2 のピークも著明に低い形成過程を示し, KBS のみならず ABS の変化が示唆された (Fig. 3 ●). 二次元免疫電気泳動による分析ではコントロール α_2 -PI ではプラスミンとの複合体形成により一次元目の陽極側に一峰性の沈降線のピークを認めたのに対して糖化 α_2 -PI ではプラスミンと複合体を形成したピークと陰極側のフリーの α_2 -PI のピークと 2 つの沈降線のピークを認め, プラスミンと複合体を形成しない α_2 -PI を認めた (Fig. 4 A). また α_2 -PI のプラスミン阻害反応における LBS I の影響を調べた成績では, コントロール α_2 -PI では添加する LBSI の量に依存して残存プラスミン活性が高くなり α_2 -PI の KBS に対してプラスミンの LBS と添加した LBS I が競合した. これに対して糖化 α_2

-PI では LBS I の量に関係なく残存プラスミン活性はほぼ一定であり糖化 α_2 -PI の KBS の変化が示唆された。血漿中に存在する α_2 -PI は二つの異なった分子量を示し、血漿中約 35% の低分子量 α_2 -PI はプラスミノゲンと親和性を示さない¹⁹⁾²⁰⁾ が、糖化 α_2 -PI はプラスミノゲンとの親和性の低下のみならず、プラスミンの活性阻害部位の変化も認めた。さらに α_2 -PI をグルコースおよび LBS I とインキュベートした場合、 α_2 -PI は同様に糖化された (成績未表示)。

これらの成績より非酵素的糖化現象が α_2 -PI に及ぼす影響は α_2 -PI の KBS および ABS 近傍双方の Lysine 残基にグルコースが結合することにより、その機能上の変化を引き起こし、プラスミンとの複合体形成が阻害されることによりプラスミン阻害活性の低下が起こることが示唆された。

結 語

1) α_2 -PI はグルコース (55.5 mM/l) との 4 日間のインキュベートで非酵素的に糖化され、プラスミン阻害活性は著明に低下した。

2) SDS-PAGE による分析から糖化 α_2 -PI はプラスミンと明らかな複合体を形成しなかった。

3) α_2 -PI とプラスミンの複合体形成量過程に二峰性を示し、LBS I を介在させると第一のピークを欠いた形成過程を示した。糖化 α_2 -PI は両方のピークが著明に低い形成過程を示した。

4) 糖化 α_2 -PI の二次元免疫電気泳動による分析から、プラスミンと複合体を形成しない α_2 -PI を認めた。

5) α_2 -PI とプラスミンとの反応系に LBS I を添加した場合、その量に依存して残存プラスミン活性が高くなったのに対して、糖化 α_2 -PI では LBS I の量に関係なく残存プラスミン活性はほぼ一定であった。

6) 非酵素的糖化現象が α_2 -PI に及ぼす影響は α_2 -PI の KBS および ABS 近傍双方にグルコースが結合することによりその機能上の変化を引き起こしプラスミンとの複合体形成が障害

されることによりプラスミン阻害活性の低下が起こるものと思われた。

文 献

- 1) Eble, A.S., Thorpe, S.R. and Baynes, J.W.: Nonenzymatic glucosylation and glucose-dependent cross-linking of proteins. *J. Biol.Chem.* **258**: 9406~9412, 1983.
- 2) Brownlee, M., Vlassara, H. and Cerami, A.: Nonenzymatic Glycosylation Reduces the Susceptibility of Fibrin to Degradation by Plasmin. *Diabetes* **32**: 680~684, 1983.
- 3) 山下 勉, 井上典子, ほか: インビトロにおける非酵素的糖化現象のアンチトロンビン III におよぼす影響. *日本血栓止血学会誌* **1**: 112~122, 1989.
- 4) Brownlee, M. and Cerami, A.: The biochemistry of complications of diabetes mellitus. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 385~432, 1981.
- 5) Sensi, M., Pricci, F., Rossi, M.G., Morano, S. and Mario, U.: D-lysine Effectively Decreases the None-Enzymic Glycation of Proteins *in Vitro*. *Clin. Chem.* **35**: 384~387, 1989.
- 6) Moroi, M., and Aoki, N.: Isolation and Characterization of α_2 -Plasmininhibitor from Human Plasma. *J. Biol. Chem.* **251**: 5956~5965, 1976.
- 7) Collen, D.: Identification and Some Properties of New Fast Reacting Plasmin Inhibitor in Human Plasma. *J. Bio. Chem.* **69**: 209~216, 1976.
- 8) Aoki, N., Saito, H., Kamiya, T., Koie, K., Sakata, Y. and Kobakura, M.: Congenital deficiency of α_2 -Plasmin inhibitor associated with severe hemorrhagic tendency, *J. Clin. Invest.*, **63**: 877~884, 1977.
- 9) Naito, K. and Aoki, N.: Assay of α_2 -Plasmin inhibitor activity by means of a plasmin specific tripeptide substrate. *Thromb. Res.* **12**: 1147~1156, 1978.
- 10) Johnson, R.N. and Baker, J.R.: The Alkaline reducing activity of glycated serum proteins and its relevance to diabetes mellitus. *Cin. Chem.* **32**: 368~370, 1986.
- 11) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680~685, 1970.
- 12) Sammons, D.W., Adams, L.D. and Nishizawa, E.

- E.: Ultrasensitive silverbased color staining of polypeptide in polyacrylamide gel. *Electrophoresis* **2**: 135~141, 1981.
- 13) 青木延雄, 武永 強, 長谷川 淳, ほか: EIA 法による α_2 -PI (TD-80) および α_2 -PI・プラスミン複合体 (TD-80C) 測定キットの基礎的検討. *臨床病理* **35**: 111~117, 1987.
- 14) Johnson, R.N., Metcalf, P.A., Baker, J.R.: Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin. Chim. Acta.* **127**: 87~95, 1982.
- 15) Jovanovic, L., Peterson, C.M.: The clinical utility of glycosylated hemoglobin. *Am. J. Med.* **70**: 331~338, 1981.
- 16) Sugiyama, N., Sasaki, T., Iwamoto, M. and Abiko, Y.: Binding site of α_2 -Plasmin inhibitor to plasminogen. *Biochem. Biophys. Acta.* **952**: 1~7, 1988.
- 17) Wiman, B. and Collen, D.: On the Kinetics of the Reaction between Human Antiplasmin and Plasmin. *Eur. J. Biochem.* **84**: 573~578, 1978.
- 18) Wiman, B., Lijnen H.R. and Collen, D.: ON the specific interaction between the lysine-binding sites in plasmin and complementary sites in α_2 -antiplasmin and in fibrinogen. *Biochem. Biophys. Acta.* **579**: 142~154, 1979.
- 19) Christen, U., Clemmesen, I.: Purification and reaction mechanisms of the primary inhibitor of plasma from human plasma. *Biochem. J.* **175**: 635~641, 1978.
- 20) Bagge, L., Saldeen, T.: The primary fibrinolysis inhibitor and trauma. *Thromb. Res.* **13**: 1131~1136, 1978.
-