

氏名・(本籍)	え ぐち ゆたか 江 口 豊 (京都府)
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博第48号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与年月日	昭和63年3月24日
学位論文題目	Characterization of Thrombin-resistant Recombinant Human Single Chain Urokinase-type Plasminogen Activator Mutants (トロンビンの失活をうけない修飾一本鎖ウロキナーゼによる 血栓溶解反応の解析)
	審 査 委 員 主査 教授 細 田 四 郎 副査 教授 小 玉 正 智 副査 教授 越 智 幸 男

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔研究の目的〕

一本鎖ウロキナーゼ(UK)はfibrinogenolysisをおこさずFibrin(Fbn)に特異的に作用する新しい血栓溶解剤として注目されている。一本鎖UKは発色合成基質S2444に対するアミド水解活性をほとんど有しない。しかしplasmin(Plm)等により、<sup>158</sup>Lys-<sup>159</sup>Ile結合が水解されHigh Molecular Weight-UKに、また<sup>135</sup>Lys-<sup>136</sup>Lys結合も水解されるとLow Molecular Weight-UKになり、両者とも二本鎖UKとして高いアミド水解活性を示す。一方一本鎖UKはthrombin(IIa)によっても<sup>156</sup>Arg-<sup>157</sup>Phe結合が水解される。しかしこのものはアミド水解活性を示さず、もはやPlmによる活性化もうけないことが知られており、血栓周囲のIIaの影響が問題となってくる。ところで一本鎖UKにも生理的基質であるplasminogen(Plg)を活性化するPlg活性化能は十分認められるとの実験報告もある。しかしそれは混在するPlmを介して生じた二本鎖UKによる可能性もあり、実験条件についての議論が多い。我々は遺伝子工学的手法によりIIaで限定分解をうけず、同時にPlmでも切れにくいように<sup>157</sup>PheをAspに置換した修飾組換え一本鎖UK(SM3)、さらに<sup>135</sup>LysをGlnに置換した修飾組換え一本鎖UK(SM4)を作成し、その有効性を検討するとともに、一本鎖UK自身による血栓溶解反応を解析した。

### 〔方法〕

①材料: SM3、SM4および非修飾組換え一本鎖UK(SMO)は、それぞれ修飾、非修飾のヒトUKのcDNAを組み込んだ大腸菌で発現させ、その精製標品を用いた。②アミド水

解活性：各種一本鎖UKをPlmで処理した後、発色合成基質S2444に対するアミド水解活性を測定した。またIIaで前処理後同様の実験を行った。③Plg活性化能：多量のアプロチニン(Plmのインヒビター)存在下に、放射性ヨードで標識したPlgに各種UKを加え、生じるPlm量を還元SDS-PAGE後のautoradiographyより測定した。④Plasma clot溶解能：放射性ヨードで標識したFbnを含むplasma clotを作成し、これを各種UKを含むPlasma中へ浮遊させ、上清中に遊離してくるFbn分解産物の放射活性を経時的に測定した。また同様の実験をIIa存在下でも行った。

#### 〔結果〕

①SM3、SM4およびSM0は分子量約46,000の一本鎖蛋白質で、家兎ポリクローナル抗体に対する抗原性は、天然型と同じであった。②SM3、SM4およびSM0をPlmで二本鎖とした場合、これらのS2444に対する親和性( $K_m : 1.5 \sim 1.7 \times 10^{-4} M$ )、および最大反応速度( $V_{max} : 30 \sim 46 \mu M / \text{min} / \text{mg}$ )はほぼ同じ値を示し、またPlgに対する $K_m : 10 \sim 11 \mu M$ 、および触媒速度定数( $k_2 : 1.8 \sim 2.6 S^{-1}$ )にも有意差はなかった。③SM3、SM4およびSM0は多量のアプロチニン存在下でもPlgをPlmに活性化し、これらの活性化速度は二本鎖UKの約1/2以下であった。Plgに対する $K_m$ はそれぞれ $0.85 \mu M$ 、 $0.38 \mu M$ 、 $0.27 \mu M$ であり、一本鎖UKの特徴であるPlgとの高い親和性は十分に保持されていた。④SM3とSM4はSM0に比しPlmによる二本鎖UKへの変換は極めて遅かった。⑤SM3とSM4はSM0と異なりIIaで前処理後もPlmによる活性化は保持された。⑥Plasma clot溶解反応ではSM4とSM0はほぼ同じ高い溶解能を示した。SM3はそれらより低かったが、いずれも二本鎖UKの活性をうまわった。さらにplasma clotが90%溶解している時点でSM0は20%が二本鎖となっていたが、SM4は一本鎖のままであった。⑦IIa存在下でのplasma clot溶解反応では、SMOはほとんど溶解能を示さなかったが、SM4は高い溶解能を示した。またSM3はSM4の約1/2の溶解能であった。

#### 〔考察〕

Plg活性化反応では、生じたPlmにより一本鎖UKの一部が二本鎖UKになりPlgを活性化する。しかしPlmの阻害剤が多量に存在する二本鎖UKの生じない条件下で、PlgがPlmに活性化されたことから、この活性化能は一本鎖UKのみによるものと考えられる。一本鎖UKのPlg活性化能は、精製系においては二本鎖UKの半分以下であったにもかかわらず、plasma clot溶解反応ではSM3とSM4は二本鎖UKよりはるかに高い溶解能を示した。またIIa存在下でも高い溶解能を示した。これは $^{157}Phe$ 置換により、二本鎖への変換が極めて遅く一本鎖のままであることによりFbnへの特異性を有しかつ血中のProtease inhibitorより守られ、またIIaによる水解をうけないためであると考えられる。なおSM4はSM3よりも高い溶解能を示した。このことは $^{135}Lys$ のみをGlnに置換した修飾一本鎖UKの諸性質がSM0と大差はなかったことにより、135位および157位の二か所でのアミノ酸置換がひきおこした立体構造の変化が有利に働いたためではないかと考えられる。

#### 〔結論〕

①SM3とSM4はthrombinによる水解をうけず、二本鎖UKへの変換が極めて遅かった。

②SM 0、SM 3 およびSM 4 は一本鎖でPlasminogen活性化能を有していた。③特にSM 4 はplasma clot溶解反応において一本鎖のままに優れた血栓溶解能を示した。またthrombin存在下でも血栓溶解能を示したことより、SM 4 はthrombinが存在する血栓成長時にも活性を有するものと考えられる。

#### 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、一本鎖ウロキナーゼ(UK)による血栓溶解反応を解析し、天然の二本鎖UKと比較して、一本鎖UKの優れた点を明らかにしたものである。

このため、組換えDNA実験により作成した非修飾組換え一本鎖UK(SM0)及び修飾組換え一本鎖UK(SM3、SM4)を用いて一本鎖UKの作用機序を検討した。SM3とSM4はthrombinによる水解をうけず、二本鎖UKへの変換が極めて遅かった。

これによって、(1)一本鎖UKの作用機序を明確にすることができた、と同時に(2)修飾組換え一本鎖UK、特にSM4の血栓溶解作用における優秀性、すなわちthrombinによる水解をうけないため、thrombinが存在する血栓成長時にも活性を有し、血栓溶解剤として一段と優れたUKであることを明かとした。

以上の研究は年々増加の一途を辿るわが国の脳血栓症の治療に、極めて多くの知見を加え、また新しい強力な一本鎖UK(SM4)を修飾組換えDNA操作により産み出させたものである。

本研究は、医学博士の学位論文として、価値あるものと認める。