

## 基質を含むポリアクリルアミド・ゲル電気泳動法による ヒト血漿中の中性セリンプロテイナーゼの検出の試み

堀 江 登

(武庫川女子大学生生活環境学部食物栄養学科)

### Studies on detection of neutral serine proteinase in human plasma by electrophoresis using substrate-containing polyacrylamide gel

Noboru Horie

*Department of Food Science and Nutrition,  
School of Human Environmental Sciences,  
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663, Japan*

In order to examine the existence of proteinase in the human plasma, the electrophoretic method by using polyacrylamide-gel containing SDS and substrate was adopted in this study.

The proteinase-like substance in the human plasma hydrolyzed fibrinogen, gelatin and  $\alpha$ -casein, but did not the serum albumin, the hemoglobin and  $\gamma$ -globulin. The fibrinolytic activity in the human plasma was detected in all of six healthy subjects. The activity was disappeared at 50°C for 30 min, and inhibited by  $10^{-3}$ M DFP or anti-human plasminogen IgG. The proteinase-like substance was bound on lysine-Sepharose CL-4B and eluted with 0.2M  $\epsilon$ -aminocaprylic acid. The examination by gel filtration induced that the fibrinolytic activity existed in the fraction corresponding to the molecular weight of 90 kDa. By the immunoblotting method, a mobility of the substance was shown to be similar to that of human plasminogen.

The data demonstrated that the plasmin-like proteinase activity in the human plasma was artifact something made from plasminogen.

#### 緒 言

血液中には複数でしかも多量のプロテイナーゼ・インヒビターが存在するにもかかわらず、血管内で形成された血栓は線維素溶解系の亢進とともに溶解する。このことは、血管内に生じたフィブリンにプラスミノゲン<sup>1)2)</sup>やプラスミノゲン・アクチベーター<sup>3)</sup>が特異的に結合し、インヒビター過多の血中でも血栓上で局所的に線維素溶解系が亢進し、血栓を溶解するとされている。また、血中で生じたプラスミンはプラスミン・インヒビターと複合体を形成するが、フィブリンが生じるとそれらは解離し、離れ

たプラスミンがフィブリンを分解するとの説<sup>4)</sup>もある。また、正常なヒトの血漿中にはプロテイナーゼにより部分的に分解されたと考えられるプラスミノゲン<sup>5)6)</sup>やフィブリノゲン<sup>7)</sup>の存在が報告され、活性型プロテイナーゼまたはプロテイナーゼ・インヒビター複合体が正常なヒトの血液中に存在することを暗示する。

本報は、血液中に存在する活性型プロテイナーゼまたはプロテイナーゼ・インヒビター複合体の検出と同定を、極微量のプロテイナーゼの検出とその分子量を概算することが可能な基質をあらかじめ含む SDS-PAGE 法<sup>8)</sup>によって試みたものである。

## 材料と方法

血漿中のフィブリノゲン濃度は Quick のチロジン法<sup>9)</sup>によって測定した。

ヒト・プラスミノゲンは、ヒトの保存血漿から Deutsch and Mertz の方法<sup>10)</sup>で作製したリジン・セファローズ CL-4B を使用して、Brockway and Castellino の方法<sup>11)</sup>で精製した。本精製品を使用してヒト・プラスミノゲンに対する家兎の抗血清を作製し、プロテイン A・セファローズ CL-4B (Pharmacia LKB Biotechnology AB) を使用して抗ヒト・プラスミノゲン家兎 IgG を単離した。

SDS-PAGE 法は、Laemmli の方法<sup>12)</sup>に準拠して、10% ポリアクリルアミドゲルを支持体として使用した SDS-PAGE 法によった。あらかじめ基質を含むポリアクリルアミドゲルを使用した SDS-PAGE 法は、Heussen and Dowdle の方法<sup>8)</sup>に準拠して、0.1% SDS を含む 3% ポリアクリルアミドゲル (pH 6.8) の濃縮ゲル (5mA) と 0.1% 基質、0.1% SDS を含む 11% ポリアクリルアミドゲル (pH 8.8) の分離ゲル (10mA) を使用したミニスラブゲル電気泳動法 (50x85x1mm) で行った。試料として血漿を使用する場合は生理食塩水で 5 倍希釈したものを、また、プラスミノゲン等の精製品を使用する場合にはタンパク量として 2 $\mu$ g を等量の 2% SDS 溶液と混和して熱処理せずにそれぞれのレーンに 10 $\mu$ l を泳動した。泳動には Laemmli<sup>12)</sup>のトリス・グリシン緩衝液 (pH 8.3) を使用した。泳動後、ゲルを 2.5% トリトン X-100 溶液中に浸してゆっくりと 1 時間攪拌する操作を 2 回繰り返した。その後、0.1M グリシン・水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 8.3)、0.1M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.4) または 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.0) の中で、37 $^{\circ}$ C で 18 時間インキュベートした。ゲル中のプロテイナーゼ活性を 50% トリクロロ酢酸溶液に浸して停止させ、7% 酢酸液でトリクロロ酢酸を除去した後、アミドブラックでゲルを染色した。7% 酢酸で脱色後、プロテイナーゼ活性の存在する部位が溶解窓として出現した。本研究では、分離用ゲル内に封じ込める基質としてウシ・フィブリノゲン (第一化学)、 $\alpha$ -カゼイン (Sigma)、ウシ・ゼラチン (Sigma)、ウシ・血清アルブミン (Sigma)、ウシ・ヘモグロビン (Sigma)、ウシ・ $\gamma$ -グロブリン (Sigma) を使った。

プロット法は電気泳動後のポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース膜にウエスタン・ブ

ロット法で行い、ヒト・プラスミノゲンの同定は 1 次抗体として抗ヒト・プラスミノゲン家兎 IgG、2 次抗体としてホースラディッシュペーパーオキソダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG (Bio-Lad) を使用して行った。

## 結果および考察

表 1 の上の値は採血直後に作製した正常な男女 5 人の血漿中のフィブリノゲン量をチロジン法で測定したものである。下の値は上と同じ血漿をそれぞれ 37 $^{\circ}$ C、20 時間インキュベートした後に測定したフィブリノゲン量を示すが、両者の間にほとんど差は認められなかった。このことは、正常なヒトの血漿中には、プロテイナーゼが活性を持たない前駆体として存在するか、または、活性化されたとしてもそれぞれのインヒビターによって阻害されるために、極めて線維素溶解系が亢進し難い条件であると推察する。しかし、正常なヒトの血漿中にはプロテイナーゼにより部分的に分解されたと考えられるプラスミノゲン<sup>5)6)</sup>やフィブリノゲン<sup>7)</sup>の存在が報告されている。このことは、正常なヒトの血液中に活性型のプロテイナーゼまたはプロテイナーゼ・インヒビター複合体が存在することを暗示する。

Table 1. Plasma fibrinogenolysis

Incubation time (hr)	Fibrinogen concentration (mg/dl)
0 (n=5)	379 $\pm$ 57.6
20 (n=5)	390 $\pm$ 58.6

そこで、ヒトの血漿中のプロテイナーゼを感度よく検出することが可能な基質をあらかじめ含む SDS-PAGE 法によって検出することを試みた。本研究で使用した方法は、プラスミノゲン・アクチベーターの検出のために基質としてゼラチンとプラスミノゲンをあらかじめポリアクリルアミドのゲル内に封入した Heussen & Dowdle の方法<sup>8)</sup>を一部修飾したものである。本実験ではゲル内にあらかじめ封じ込める基質として、フィブリノゲン、 $\alpha$ -カゼイン、ゼラチン、血清アルブミン、ヘモグロビン、 $\gamma$ -グロブリンを使い、その成績を表 2 にまとめた。ゲル内に基質として封じ込めるタンパク質を替えた場合、さらに、インキュベートする緩衝液の pH を

替えた場合に現れた溶解窓の出現の度合いを3段階で示した。血漿中にフィブリノゲン、カゼイン、ゼラチンを分解する活性が現れたが、他のタンパク質に対するものは認められなかった。これらの溶解窓はいずれも中性付近で著しく出現した。また、カゼインを基質にしたものでは2種類の移動度の異なる溶解窓が現れた。カゼインとゼラチンは、血液中のプロテイナーゼの生理的な基質とは考え難いことから、以後使用する基質としてフィブリノゲンを、また分解のために0.1M トリス・塩酸緩衝液(pH 7.4)を使用した。

Table 2. Substrate specificity and optimal pH

Substrate	pH 6.0	pH 7.4	pH 8.3
Fibrinogen	+	+	++
$\alpha$ -casein			
High mobility	++	++	++
Low mobility	+	+	-
Gelatin	+	++	+
Serum albumin	-	-	-
Hemoglobin	-	-	-
$\gamma$ -globulin	-	-	-

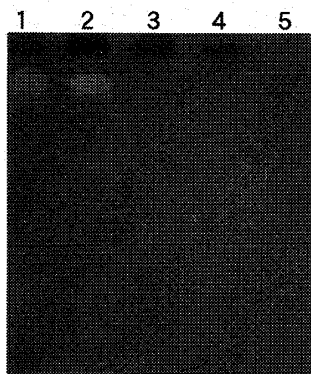


Fig.1. Fibrinogenolytic activity of SDS-PAGE containing fibrinogen by heat-treated plasma for 30min at various temperatures. Lane 1 : 20°C, lane 2 : 37°C, lane 3 : 50°C, lane 4 : 60°C, lane 5 : 80°C.

次に、6人の健康な男女の血漿についてフィブリノゲンを含むSDS-PAGEを行ったが、いずれも同じ泳動距離に溶解窓が1本のみ現れ、これは特定の被検者にだけ出現するものではなかった。また、こ

の溶解窓は50°C、30分以上の熱処理で消失した(図1)。このことは、この溶解窓は熱に弱いタンパク質すなわちプロテイナーゼによるものであったと推察した。

リジン・セファローズ CL-4B に対する親和性とジイソプロピルフルオロホスフェイト(DFP)の影響を検討した成績を図2に示す。フィブリノゲンを分解する成分は、リジン・セファローズ CL-4B カラムに吸着し、0.2M イプシロンアミノカプロン酸(EACA)溶液で溶出し、明らかな溶解窓が認められた。また、電気泳動後のゲルを $10^{-3}$ M DFPを含むトリス・塩酸緩衝液(pH 7.4)中に浸して、37°Cで18時間インキュベーション後の活性を測定したが、フィブリノゲンを分解する活性はすべて消失した。これらのことから、このフィブリノゲンを分解する活性は、リジン・セファローズ CL-4B に対して親和性(リジン結合部位)を有する成分に由来し、しかも DFP で阻害されるセリン・プロテイナーゼによるものであり、分子量がおおよそ90kDaであることから、プラスミンの可能性が示唆された。

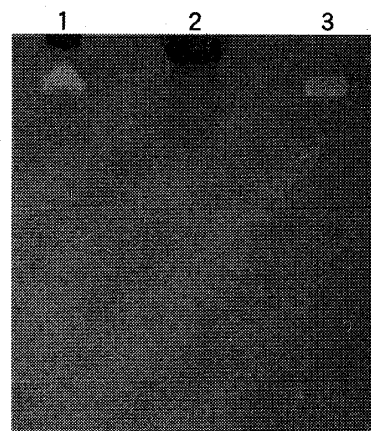


Fig.2. Effects of diisopropylfluorophosphate (DFP) on fibrinogenolytic activity of SDS-PAGE containing fibrinogen. Lane 1 : plasma, lane 2 : passing fraction of plasma on lysine-Sepharose CL-4B, lane 3 : binding fraction of plasma on lysine Sepharose CL-4B.

次に、ヒト・プラスミノゲンに対する家兎抗体の影響を検討した成績を図3に示す。図3-Aのゲルは、血漿、リジン・セファローズ CL-4B 非吸着画分、吸着画分について、フィブリノゲンを含むSDS-PAGEを行ったものである。図3-Bは、3-A

のゲルと同様に泳動したものをニトロセルロース膜にウエスタン・プロットイング後、1次抗体として抗ヒト・プラスミノゲン家兎 IgG を、さらに2次抗体としてホースラディッシュペーパーオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG を使って活性染色したものである。ゲルの溶解窓(図 3-A)に相当するニトロセルロース膜の部位(図 3-B)に染色バンドが認められた。また、抗ヒト・プラスミノゲン家兎 IgG とヒト血漿を 37℃, 30 分間インキュベートした後にフィブリノゲンを含む SDS-PAGE を行ったが、溶解窓は検出されなかった。これらのことから、フィブリノゲンを分解した活性が免疫的にヒト・プラスミノゲンと同一のものであったと推察する。

図4は、種々の濃度のウロキナーゼで血漿を 37℃, 1 時間インキュベートした時に新たに生じたプラスミンと基質をゲル内に封じ込めた SDS-PAGE 法によって常時検出されるプロテイナーゼ活性を比較したものである。活性化に使用したウロキナーゼ濃度に対して dose dependent に、血漿のみで生じた溶解窓と同位置にプラスミンの溶解窓が現れ、さらに新たなプロテイナーゼ活性が大分子量の泳動位置にも出現した。これらは $\alpha_2$ -マクログロブリンまたは $\alpha_1$ -プラスミンインヒビターと結合したものであり、基質をゲル内に封じ込めた SDS-PAGE 法ではプラスミン・インヒビター複合体は大分子量の状態を維持したまま泳動したものと推察する。また、結果は示さないが、新鮮血漿をセファクリル S-200 でゲルを過した各画分を凍結乾燥し、フィブリノゲンを含む SDS-PAGE を行ったが、本来のプラスミノゲンが溶出される位置にのみ著しい溶解窓が現れ、高分子量画分には溶解窓は見られなかった。

これらのことから、プラスミノゲンは、インヒビターが過剰に存在する血漿中では活性化され難く、活性化型のプラスミンとインヒビターの複合体でなく前駆体で存在し、フィブリンが形成された時のみ活性化され、生体内に生じたフィブリンを除去するものと推察する。

血漿中のプロテイナーゼの検出のために使用した基質をあらかじめ含む SDS-PAGE 法は、ゼラチンとプラスミノゲンをあらかじめ含むゲルとゼラチンのみを含むゲルを支持体を使用して、両ゲルの溶解窓の差から極く微量のプラスミノゲン・アクチベーターを検出するために開発されたものである<sup>13)</sup>。この原理を使用して、著者は種々の検体中のプラスミノゲン・アクチベーターを同定した<sup>14)15)16)17)18)</sup>。

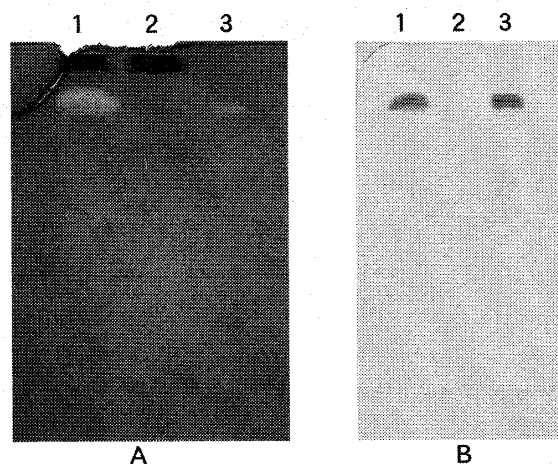


Fig. 3. Effects of anti-human plasminogen rabbit IgG on fractions of lysine-Sepharose CL-4B. Gel A was fibrinogenolytic activity of SDS-PAGE containing fibrinogen. Gel B was human plasminogen on a nitrocellulose membrane after western blotting from the gel. Lane 1 : plasma, lane 2 : passing fraction of plasma on lysine-Sepharose CL-4B, lane 3 : binding fraction of plasma on lysine Sepharose CL-4B.

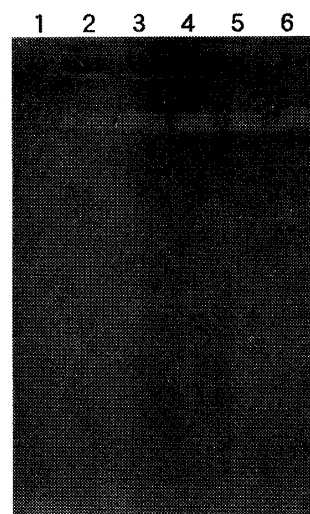


Fig. 4. Patterns of fibrinogenolytic activity of SDS-PAGE containing fibrinogen by plasma activated with urokinase at 37°C for 30min. Lane 1 : urokinase (3,000mIU) alone, lane 2 : urokinase (3,000mIU) + plasma (1 $\mu$ l), lane 3 : urokinase (600mIU) + plasma (1 $\mu$ l), lane 4 : urokinase (120mIU) + plasma (1 $\mu$ l), lane 5 : urokinase (24mIU) + plasma (1 $\mu$ l), lane 6 : plasma (1 $\mu$ l) alone.

しかし、今回の研究では、血漿中のプロテイナーゼの検出のために SDS という界面活性剤を使用したためにタンパク質の立体構造に変化が生じ、プラスミノゲン・アクチベーターによってプラスミノゲンのアルギニンとバリンの結合が限定分解されてプロテイナーゼの活性部位が出現してプラスミンが生成する過程<sup>19)</sup>と同様の活性部位の出現が人工的に生じたものと推察する。

## 結 論

以上の成績をまとめると、本実験の系で血漿中のプロテイナーゼによる溶解窓は、フィブリノゲン、 $\alpha$ -カゼイン、ゼラチンを基質に使用した場合に認められたが、血清アルブミン、ヘモグロビン、 $\gamma$ -グロブリンでは出現しなかった。

これらの活性は、正常な男女6人すべての血漿に認められ、50℃、30分間以上の熱処理で消失した。また、これらの活性成分はリジン・セファローズ CL-4B カラムに結合し、0.2M イプシロンアミノカプロン酸溶液で溶出した。さらに、この活性は $10^{-3}$  M DFP および抗ヒト・プラスミノゲン家兎 IgG で阻害された。また、この活性は、電気泳動法とゲルろ過法とともに本来のプラスミノゲンの位置に分離した。

以上のことから、本実験で検出されたプロテイナーゼ様活性は、プラスミン様の性質を示し、プラスミノゲンに由来した人工産物であると結論した。

## 文 献

- 1) Alkjaersig, N., Fletcher, N. P. and Sherry, S., *J. Clin. Invest.* 38, 1086-1095 (1959)
- 2) Throsen, S., *Biochim. Biophys. Acta*, 393, 55-65 (1975)
- 3) Lassen, M., *Acta Chem. Scand.*, 12, 1825-1829 (1958)
- 4) Amburus, J. L. and Markus, G., *Am. J. Physiol.*, 199, 491-494 (1960)
- 5) Yamamoto, J., Okamoto, U., Kojima, S., Morita, S. and Fujii, K., *Clin. Lab. Haemat.* 4, 117-130 (1982)
- 6) Yamamoto, J., Okamoto, U., Asada, N. and Yamaoka, M., *Jpn. J. Physiol.* 35, 1013-1021 (1985)
- 7) Connaghan, D. G., Francis, C. W., Lane, D. A. and Marder, V. J., *Blood* 65, 589-597 (1985)
- 8) Heussen, C. and Dowdle, E. B., *Analytical. Biochem.* 102, 196-202 (1980)
- 9) Quick, A., Hemorrhagic disease, Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 436-439 (1957)
- 10) Deutsch, D. G. and Mertz, E. T., *Science*, 170, 1095-1096 (1970)
- 11) Brockway, W. J. and Castellino, F. J., *Arch. Biochem. Biophys.* 151, 194-199 (1972)
- 12) Laemmli, U. K., *Nature*, 227, 680-685 (1970)
- 13) Granelli-Piperno, A. and Reich, E., *J. Exp. Med.*, 148, 223-234 (1978)
- 14) Horie, N., Fukuyama, K., Itoh, Y. and Epstein, W.L., *Comp. Biochem. Physiol.*, 77; 349-353 (1984)
- 15) Horie, N., Yokozeki, H. and Sato K., *Am. J. Physiol.* 250, R691-R697 (1986)
- 16) 堀江 登, 岡本歌子, 清水はじめ, 太田直登, *医学のあゆみ*, 136, 997-998 (1986)
- 17) Horie, N., Okamoto, U. and Wijngaards, G., *Thrombos. Res.* 45, 703-707 (1987)
- 18) 木下明美, 堀江 登, *武庫川女子大学紀要*, 43, 11-15 (1995)
- 19) Summaria, L., Arzadon, L., Bernabe, P. and Robbins, K. C., *J. Biol. Chem.* 250, 3988-3995 (1975)