

限外濾過法による人尿ウロキナーゼの精製

小 山 憲 治
大 野 省 太 郎
木 原 啓 一

Purification of Urokinase from Human Urine by a Ultrafiltration Method

Kenji KOYAMA
Shotaro OHNO
Keichi KIHARA

Purification of urokinase from human urine was investigated by a combination of ultrafiltration and ion-exchange chromatographic methods. Fresh urine from healthy males was first concentrated by ultrafiltration using TS-10 membrane. Then, the proteins of higher and lower molecular weights were removed by ultrafiltration using TS-300 and TS-50 membranes respectively. Activity yield of urokinase was about 90% and its specific activity was 2 times as high as that of a feed solution. With a combined use of ultrafiltration and ionexchange chromatography, specific activity of urokinase could be easily increased further.

1. はじめに

限外濾過法で人尿中に存在するウロキナーゼの精製を検討した。

ウロキナーゼは人尿中に存在する酵素で、血液中で線溶賦活化作用を示し血栓症の治療剤として最近脚光を浴びている。血漿蛋白である繊維素（フィブリン）を溶解する蛋白分解酵素をプラスミンと呼ぶ。また血漿中でプラスミンは不活性化プラスミノゲンとして存在するが、これを活性化する酵素をプラスミノゲン・アクチベーターと呼んでいる。ウロキナーゼの作用はこれに該当する。この酵素が人尿中に存在することは、1952年 Sobel¹⁾ らによって発表されている。

人尿中には分子量数百万から数千の約30種類以上の蛋白質及び酵素が混在している。ウロキナーゼは人尿1ℓ当り0.1mgと非常に微量にしか存在しない。この人尿から分子量 5.4×10^4 のウロキナーゼを分離精製することは極めて難かしく、その手法は生産者達のノウハウとして隠された部分が多い。

近年では腎細胞の組織培養法、遺伝子組み換え技術²⁾によりウロキナーゼ様酵素が得られている。

さて、限外濾過は分子オーダーで篩分けをする方法であり、原理的に分子量の接近した蛋白分子同志でさえも分離可能なものである。しかし、分離操作の粗さ、膜への吸着等により、分子量の接近した蛋白分子の分離例は少なく極端にサイズの異なる分子同志を分離しているのが現状である。我々は限外濾過膜の精密化及び、膜性能を最大限に発揮させることのできる装置とその運転法の開発について検討を重ね、比較的分離性能の良いシステムを得ることができた。SC-60モデルとして発表し、現在までに膜面積数 m^2 の装置の試作を終了している。このシステムは分子量の接近した蛋白分子同志でさえも分離可能なものとし、多くの蛋白質及び、合成高分子の分離例がある³⁾。

こゝの報告は人尿中のウロキナーゼを粗精製する目的で、TSK-限外濾過システムを用い、人尿をあらかじめ限外濾過法で濃縮し、その後、限外濾過膜を組み合わせ分子重量分画を試みた。又、イオン交換ゲルに吸着させ

た画分を同様に限外濾過膜を組み合わせて分子量分画を試みウロキナーゼの比活性を増加させる方法を検討した。

2. 方法

〔1〕 試料

健康な男子人尿を 60ℓ 採取し以下の実験に 30ℓ づつ使用した。

〔2〕 限外濾過膜及び装置

限外濾過膜、装置は東洋曹達製、UF 膜システム、モデル SC-60、膜面積約 60 cm² を分子量分画用に、SC-02M、膜面積 0.2 m² を人尿の濃縮用に用いた。

〔3〕 濃縮及び分子量分画操作

人尿 30ℓ に 1 M NaCl 及び 0.2 m M の EDTA を添加し pH を 10 に調整し、TS-10 膜 (公称分画分子量 1×10^4) を装着した SC-02M システムで 150 ml まで濃縮した。濃縮操作中に生じたコロイド様物質は、0.45 μm のマイクロフィルターにて濾過しその濾液を原液とした。

膜分子量分画は Fig. 1 に示した方法に従った。ここで TS-300, TS-50, TS-10 は、それぞれ公称分画分子量 3×10^5 , 5×10^4 , 1×10^4 である。

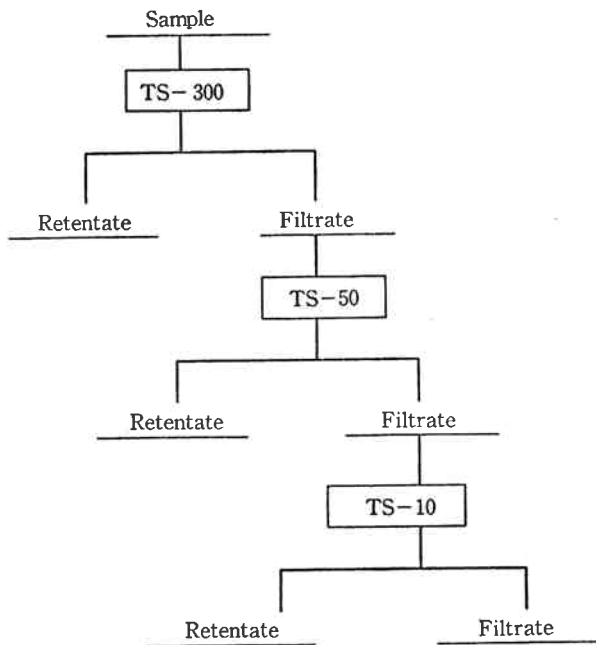


Fig. 1 Schematic diagram of membrane fractionation method

分画方法は原液の容量が2分の1になるまで濃縮し (この実験では 150 ml を 75 ml まで濃縮) その時点で pH 10 の緩衝液でもとの容積に希釈し、再濃縮、希釈を繰り返す回分法で行った。この場合、膜の目詰まり、

濃度分極現象を極力避けるために、膜透過速度を約 $10 \sim 15 \ell/m^2 \cdot hr$ にコントロールした。

〔4〕 イオン交換ゲルによるウロキナーゼの吸着⁵⁾

人尿 30ℓ を pH 3.15 に調整し、同緩衝液で平衡化した CM-セルロースゲル 60 g を人尿に分散して 1 時間攪拌した。その後、ガラスフィルターにて CM-セルロースゲルを濾別し、pH 5.7 の緩衝液で不純蛋白質を洗浄する。その後、pH 4.0 (0.075 M NaCl 含) 緩衝液で吸着したウロキナーゼ画分を溶出させた。そして 1 M の NaCl 及び 0.2 mM の EDTA を加えて pH 10 に調整しこれを原液とした。膜分子量分画は Fig. 1 に示した方法に従った。

〔5〕 ウロキナーゼの活性測定⁶⁾

ウロキナーゼの活性測定は合成基質として N α -アセチル-L-リジン-メチルエステル塩酸塩を用いた。ウロキナーゼの作用で生じたメタノールを KMnO₄ でギ酸に酸化し、クロモトロブ酸で着色し 580 nm の吸光度より活性を求めた。ウロキナーゼの検量線作成のため活性既知の市販のウロキナーゼを用いた。求めたウロキナーゼ活性の検量線を Fig. 2 に示した。

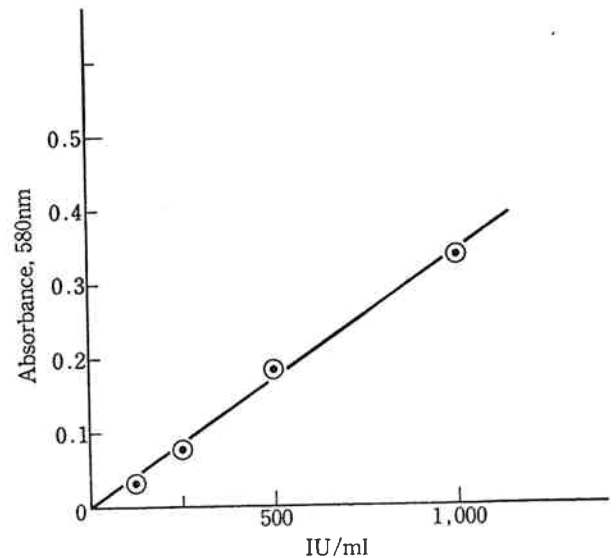


Fig. 2 Calibration curve for the determination of the urokinase activity

〔6〕 液体クロマトグラフィー測定

測定条件

装置 HLC 802UR

カラム G30000SW (0.75 × 60 cm) 1本

溶離液 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.8)

検出 UV 280 nm

標準蛋白質として、牛血清 γ -グロブリン (分子量 1.6×10^5)、牛血清アルブミン (6.8×10^4)、ミオグロビン

(1.8×10^4), ビタミン B-12 (1.3×10^8) を用いた。

3. 結果と考察

pH 調整, 塩添加, EDTA 添加なしに, 採取した人尿をそのまま膜濃縮及び, 膜分子量分画した結果, ウロキナーゼ活性の収率は非常に低く20%以下であった。他の酵素, DNaseI, ウロペプシンの収率はほぼ100%であり, ウロキナーゼの収率のみ低かった。この原因としてウロキナーゼの不安定性による変性失活, ウロキナーゼのプロテアーゼによる失活及び, ウロキナーゼの膜への吸着等が考えられる。そこでウロキナーゼは酸性側では変性し易くアルカリ側では安定である事と, ogawa らにより⁷⁾高分子吸着剤 (たとえばアクリロニトリル) に吸着させたウロキナーゼを脱着させるのに pH をアルカリ側, 高塩濃度の条件で行った。よってここでは脱着させる溶液で膜分離を行えば吸着はある程度おさえられると考えた。又, プロテアーゼの影響は EDTA を添加することで防げると考えられる。人尿を pH 10 に調整し NaCl 1M 添加及び, 0.2mM の EDTA の添加はその原因を防ぐ目的であり以下の実験の膜分離は同条件で行っている。

(2) 人尿の膜濃縮及び膜分子量分画

人尿 30l を TS-10 膜で 150 ml に濃縮した原液の HLC クロマトグラムを Fig. 3 に示した。Fig 中の溶出曲線の下に数字は標準蛋白質の溶出位置を示し,

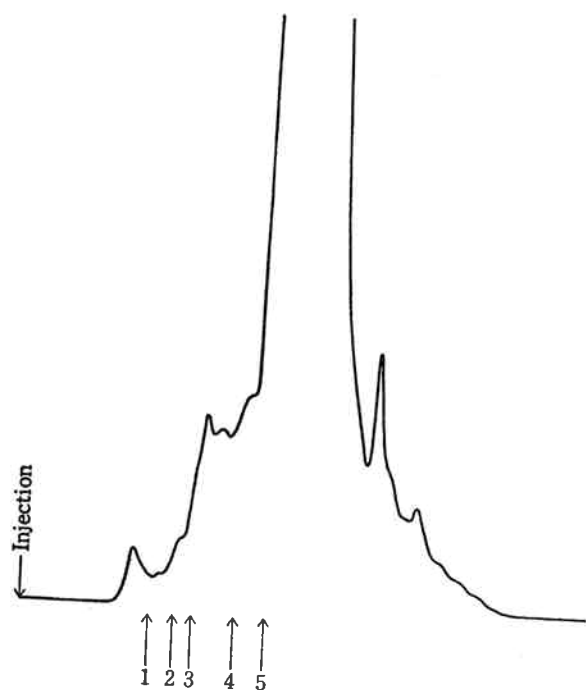


Fig. 3 Chromatogram of urine concentrated by TS-10 membrane

1~5までそれぞれ牛血清 γ -グロブリンダイマー (分子量 3.2×10^5), γ -グロブリンモノマー (1.6×10^5), 牛血清アルブミン (6.8×10^4), ミオグロビン (1.8×10^4), ビタミンB-12 (1.3×10^8) である。Fig. 3 より溶出ピークは HLC クロマトの排除限界からあり, 高範囲な分子量を持つ蛋白質が混在しているのが明白である。ウロキナーゼの分子量は 5.4×10^4 であり低分子量の 3.3×10^4 も存在する。

このクロマトグラムのそれぞれのピークの帰属は不可能であり又, 各蛋白成分に分離するのは現状の限外濾過膜では不可能に近いので限外濾過膜を組み合わせて分子

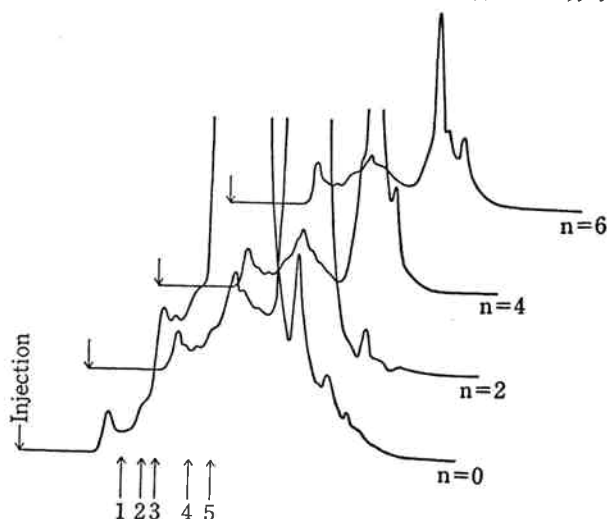


Fig. 4 Chromatogram of the retained solution on TS-300 membrane at the nth batch

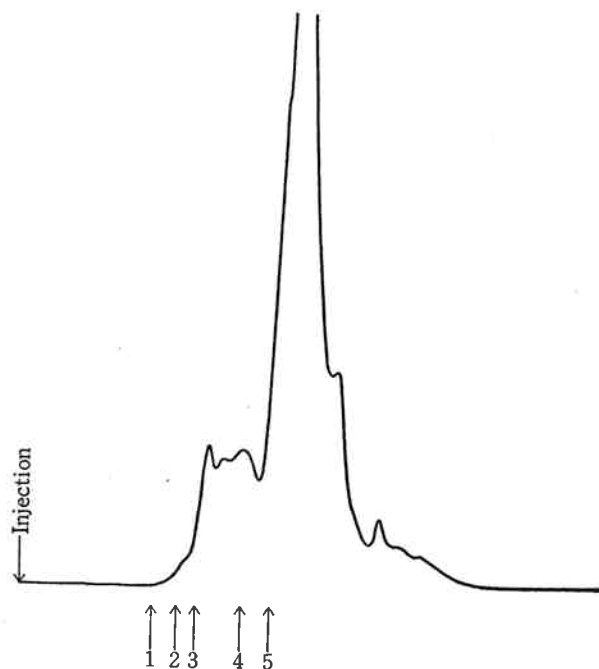


Fig. 5 Chromatogram of the filtrate through TS-300 membrane

量 3×10^5 以上, $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^4$, $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$, 1×10^4 以下の4成分におおまかに分子量分画した。最初に HLC クロマトグラムの排除限界の溶出位置にある高分子量蛋白の除去を TS-300 膜で作った。Fig. 4 に2倍濃縮回数と原液のクロマトグラムの経時変化を示した。回分回数6回で分子量 3×10^5 以下の蛋白質が80%程度回収されていることがわかる。Fig. 5 は TS-300 膜透過液の HLC クロマトグラムを示した。高分子量蛋白の除去はほぼ完全である。次にこの透過液を TS-50 膜で液量 450 ml から 150 ml に濃縮しその時点から2倍濃縮回分法で分画を行った。Fig. 6 に回分回数と HLC クロマトグラムの経時変化を示す。回分回数6回で分子量 5×10^4 以下の蛋白質の除去はほぼ完全である。この画分は分子量では 3×10^5 から 5×10^4 の画分でありウロキナーゼの分子量 5.4×10^4 を考慮すればこの画分にウロキナーゼは存在するはずである。Fig. 7 は TS-50 膜透過液を TS-10 膜で濃縮した溶液の HLC クロマト

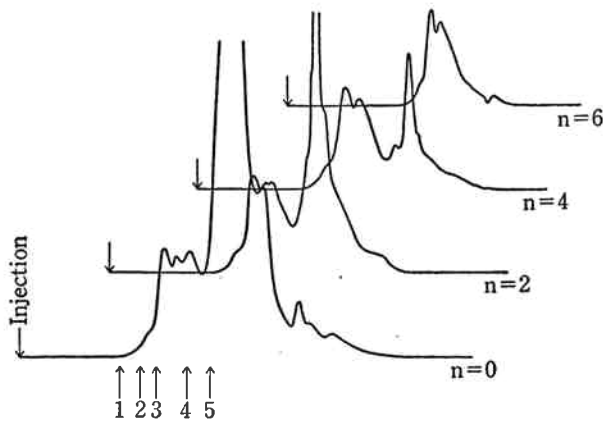


Fig. 6 Chromatogram of the retained solution on TS-300 membrane

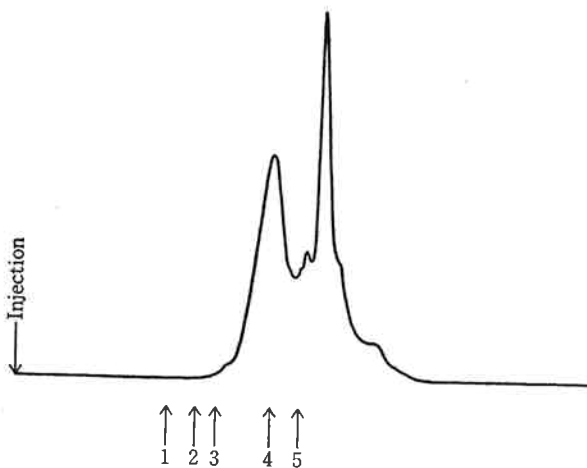


Fig. 7 Chromatogram of the filtrate through TS-50 membrane. The filtrate was concentrated by using TS-10 membrane

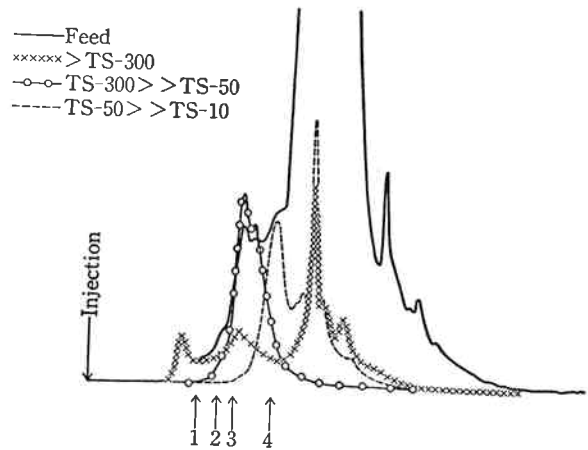


Fig. 8 Chromatograms of the three fractions

Table 1 Urokinase activity in the fractions.

	Total activity of urokinase IU	Activity recovery %
Feed (urine concentrated by TS-10)	2.77×10^5	100
>TS-300	5.08×10^4	18
TS-300>>TS-50	1.01×10^5	37
TS-50>>TS-10	9.92×10^4	36
TS-10>	0	0

グラムである。HLC クロマト的には分子量 2×10^4 の単一ピークが得られていてが帰属は不明である。上述の分子量分画した4つの画分の HLC クロマトグラムを Fig. 8 に示した。各画分は分離はかなりシャープであり TSK-限外濾過システムの有効性を示している。

各画分のウロキナーゼ活性を Table 1 に示した。人尿 1 l 当りウロキナーゼ活性は 1×10^4 IU であり 30 l を膜濃縮しているので 3×10^5 IU と考えてよく、濃縮した原液は、ほぼ回収されている。原液のウロキナーゼ活性に対する各画分全体の収率は約90%であり高い。ウロキナーゼの失活及び膜への吸着は前述条件ではほぼ解消できたと思われる。

ウロキナーゼの分子量は 5.4×10^4 であり TS-300>>TS-50 の画分にあると考えられるが TS-50>>TS-10 の画分にもウロキナーゼ活性がある。これは低分子量ウロキナーゼ 3.2×10^4 の存在によるものかもしれない。ゲル濾過で分取し各フラクションのウロキナーゼの活性測定をすれば確認可能と思われるが現状では不明である。比活性すなわち単位蛋白質当りの活性を考えると TS-300>>TS-50 の画分は原液と比較すると HLC クロマトグラムのピーク面積が4分の1になっており、ク

クロマトグラムのピーク面積が単純に蛋白量に比例するとすれば比活性は約2倍に増加している。分子量 3×10^5 以上の画分に若干活性は残っているが分画回分操作を繰り返すことにより減少し TS-300 > > TS-50 の画分のウロキナーゼ活性が増加するはずである。

このようにウロキナーゼの比活性は限外濾過法で容易に増加できるのがわかる。しかし人尿を直接濃縮するのはウロキナーゼが人尿 1ℓ 当り 0.1 mg しかなくそのために大量に処理する必要がある。そこで人尿濃縮工程にかなりの膜面積が必要となり経済的な面に問題がある。又、人尿は腐敗しやすく実際的ではない。そこでウロキナーゼの精製に多く取り入れられているイオン交換法と限外濾過法を組み合わせるウロキナーゼの精製を検討した。

(2) イオン交換ゲルとの組み合わせ⁵⁾

イオン交換ゲルとして CM-セルロースを選び公知の方法で人尿よりウロキナーゼを吸着、脱着させた。その溶液に 1 M NaCl, 0.2 mM EDTA 添加し pH を 10 に

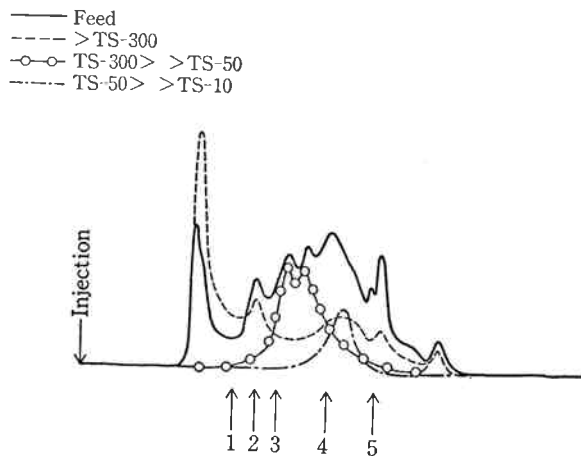


Fig. 9 Chromatograms of the raw solution adsorbed to the CM-sepharose gel and the three fractions separated by the use of TSK-UF membrane

Table 2 Activity of urokinase and activity recovery obtained by ultrafiltration

	activity of urokinase IU	Activity recovery %
Feed (CM-Separose)	9.0×10^4	100 %
>TS-300	5.0×10^3	5.6%
TS-300 > >TS-50	6.0×10^4	67.2%
TS-50 > >TS-10	6.5×10^3	7.2%
TS-10 >	0	0

調整したものの HLC クロマトグラムを Fig. 9 に示した。Fig. 3 の人尿濃縮液と比較して単純なクロマトグラムを示しているが各ピークの帰属は不明である。この原液を Fig. 1 に示した方法に従い 4 つの画分に分子量分画した。その HLC クロマトグラムを Fig. 9 に示した。比較的シャープな画分が得られており、TSK-限外濾過システム有効性を示している。

各画分のウロキナーゼ活性を Table 2 に示した。CM-セルロースゲル吸着画分のウロキナーゼ活性は 9.0×10^4 IU でありこの工程の収率は約 30% と低い。これは操作上ウロキナーゼの損失が多かったのか又は、CM-セルロースゲル吸着条件が悪いのかもしれない。

原体と比較して全工程のウロキナーゼ活性は 80% であり高い。ウロキナーゼ活性は TS-300 > > TS-50 の画分にほぼ集中している。前述の人尿濃縮物から膜分離の場合、TS-50 > > TS-10 の画分にもかなりのウロキナーゼ活性はあった。これは CM-セルロースゲルに分子量 5.4×10^4 のウロキナーゼのみ吸着し 3.3×10^4 のウロキナーゼは吸着しにくいのかかもしれないが現状では不明である。

TS-300 > > TS-50 の画分のウロキナーゼ比活性は、原体と比較し HLC クロマトグラムのピーク面積が 1/3 になっているので約 2 倍に増加していると考えられる。

このようにイオン交換法と組み合わせることでより実工程に近い操作で比活性を容易に増加させることが可能である。又、膜法の利点は溶液に混在するパイロジェン(発熱物質)が除けることにもある。我々の TSK-限外濾過でパイロジェンの 1 種であるエンドトキシンを分離した結果⁸⁾、TS-300 膜以下の分画分子量を持つ膜がエンドトキシンを阻止することがわかった。本研究ではウロキナーゼ活性が TS-300 以下の画分にあり人尿がパイロジェンで汚染されていてもその膜透過液はパイロジェンフリーな溶液が得られているはずである。

4. おわりに

ウロキナーゼは血栓治療剤のみならず制ガン剤との併用で効果があり、近年急速に普及してきた酵素製剤である。人尿蛋白は 30 種類程度はあり、その中から工業的にウロキナーゼのみ単離精製するには非常に多くの操作工程がありかなり複雑な様子である。

この報文では限外濾過法のみ及び、イオン交換法と限外濾過法を組み合わせたが当然この操作だけではウロキナーゼを十分に精製するのは困難である。

既存のウロキナーゼ業界では各生産者が独自の吸着剤を開発しウロキナーゼを吸着させその後、多くの分離精製工程でウロキナーゼを精製している。膜法を使用する

ことでこの分離精製工程が少しでも省略できれば利点が大きいと思われる。又、その他の利用法として生産者は海外でも人尿を採取しているが、採取現場に膜装置を備え濃縮分画してウロキナーゼ画分のみを日本に輸送する方式も考えられる。本研究では実施していないが高分子量ウロキナーゼと低分量ウロキナーゼを限外濾過法で分離可能であれば極めて有効な分画手段と考えられる。近い将来検討してみたいと考えている。

文 献

- 1) J. R. B. Williams; *Brit. J. Pathol.*, **32**, 530 (1951).
G. W. Sobel, S. R. Mohler, M. W. Tones, A. B. C. Dowdy and M. M. Guest; *Amer. J. Physiol.*, **171** 768 (1952).
- 2) G. H. Barlow, L. Lazer and I. Tribby; "Thrombosis and Urokinase", ed. by R. Paoletti and S. Sherry, p. 75 (1977) Academic Press.
- 3) B. Ratzkin, et al; *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **78** (6), 3313 (1981). "特許公報" 昭56-158799, アポトラボラトリーズ.
- 4) 大野他; "東洋曹達研究報告", **26**, (1)67 (1982).
- 5) 吉田他; "特許公報" 昭40-27830.
- 6) W. F. White and G. H. Barlow; *Biochemistry*, **5**, 2160 (1966).
- 7) Nobuhisa Ogawa, et al, *Thrombos. Diathes. haemorrh* (Stuttg), **34**, 194 (1975).
- 8) 小山, 大野 投稿中.