

# イソペプチド結合をもつ変異型ヒトプロウロキナーゼの酵素化学的諸性質の検討

飯 田 寛  
本 間 信 幸  
竹 本 久 雄

## Characterization of Recombinant Modified Human Pro-urokinase Which Has an Isopeptide Bond

Hiroshi IIDA  
Nobuyuki HONMA  
Hisao TAKEMOTO

Recombinant modified pro-urokinase (IPM4), which has two amino acid substitutions (Lys<sup>135</sup> → Gln and Phe<sup>157</sup> → Asp) and an isopeptide bond (isoAsp<sup>407</sup> — Gly<sup>408</sup>), has been characterized for its substrate selectivity and thermostability. IPM4 has an optimum pH at 8.0–8.5 for L-pyroglutamyl-glycyl-L-arginine p-nitroanilide, and the *K<sub>m</sub>* value for this substrate is 0.04 mM (37°C, pH 8.3, ion strength=0.15). More than 50% of the potential enzymatic activity of IPM4 has remained after the incubation of one hour at 80°C (pH 6.0). The character of IPM4 is similar to that of the recombinant pro-urokinase (IPM0) which has the same isopeptide bond.

### 1. はじめに

プロウロキナーゼは、プラスミノゲンをプラスミンに変換する活性をもつウロキナーゼの前駆体である。プロウロキナーゼはプラスミンにより活性化されるまで活性をもたないため、血漿中ではプラスミンの局在する血栓部位で特異的に作用し血栓を溶解する。

ヒト尿由来プロウロキナーゼの一次構造を遺伝子工学的に様々に置換した変異型プロウロキナーゼの研究がこれまでにいくつか報告されている<sup>1) 2) 3)</sup>。ヒト尿由来プロウロキナーゼの135残基目のリジン残基をグルタミンに、157残基目のフェニルアラニン残基をアスパラギン酸に置換したプロウロキナーゼ (Lys<sup>135</sup> → Gln, Phe<sup>157</sup> → Asp pro-urokinase, 以下 TM-164 という) も、変異型プロウロキナーゼのひとつである<sup>4) 5)</sup>。大腸菌に発

現させた TM-164 については、プラスミンによる活性化、プラスミノゲンの活性化やフィブリン溶解性等の性質が、天然型のアミノ酸配列をもつプロウロキナーゼの性質と比較検討された。その結果、1本鎖ポリペプチドである TM-164 は、1本鎖から2本鎖への転換に関して、血液凝固因子であるトロンピンには抵抗性を示した。一方、線溶因子であるプラスミンによる1本鎖から2本鎖への転換でウロキナーゼ活性を示した。またプラスミンによる1本鎖から2本鎖への転換反応速度は、TM-164 のほうが天然型に比べ緩やかなことが示された<sup>5)</sup>。

TM-164 には等電点の異なる異性体が存在した。異性体の一次構造については、407残基目の本来のアスパラギン残基に脱アミドが起こり、側鎖カルボニル基に408残基目から411残基目(末端)までのフラグメントが

転位していた<sup>6)</sup>。すなわち、407残基目と408残基目の結合はイソペプチド結合となっていた。イソペプチド結合についてはカルモジュリン<sup>7)</sup>やヒト成長ホルモン<sup>8)</sup>に関する報告がある。その後の研究で、イソペプチド結合はプロウロキナーゼがアルカリ性の溶液にさらされることで生じることが明らかにされた<sup>9)</sup>。

本研究は、135残基目と157残基目を変異させた一次構造およびイソペプチド結合をもつプロウロキナーゼが、その変異により酵素機能に変化がないことを示すことを目的として行われた。以下、TM-164の407残基目と408残基目の間がイソペプチド結合である異性体をIPM4、天然型アミノ酸配列をもち407残基目と408残基目の間がイソペプチド結合である異性体をIPM0という。また、IPM4、IPM0、TM-164のそれぞれを活性化したものを、順にIPM4a、IPM0a、TM-164aという。

## 2. 実験 および 結果

### (1) IPM0, IPM4 および TM-164 の調製

ヒト・プロウロキナーゼをコードするプラスミドあるいはTM-164をコードするプラスミド<sup>4)</sup>を大腸菌に発現させたのち、大腸菌を高圧ホモゲナイザーで破碎した。破碎して得られた inclusion body を可溶化させ、リフォールディングさせた。その後、それぞれのプロウロキナーゼは硫酸塩析、疎水クロマトグラフィー、亜鉛キレートカラムクロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィーにより精製された。イソペプチド結合をもつプロウロキナーゼと、それをもたないプロウロキナーゼとは、陽イオン交換クロマトグラフィー (TSKgel SP-5PW カラム) で分画された。

### (2) 活性の最適 pH

#### (1) プロウロキナーゼの活性化処理

IPM4, TM-164 あるいは(株)ミドリ十字のナサルプラーゼ (以下、ナサルプラーゼを NAS, 活性化されたナサルプラーゼを NASa という) を0.1Mトリス緩衝液 (pH 7.4)/0.05 M 塩化ナトリウム/0.1%トリトンX-100 中でプラスミンと37°C, 10分間反応させたのち、大豆トリプシンインヒビター (STI) を添加し37°C, 5分間インキュベートした。STI はプラスミン 1 unit あたり 2 mg の割合になるように添加した。

なおナサルプラーゼは、ヒト腎臓に由来する線維芽細胞より生産される分子内2ヶ所に糖鎖をもつプロウロキナーゼである。

#### (2) 活性の最適 pH

活性化処理されたプロウロキナーゼ 31 IU/ml と初

濃度 0.5 mM の pyroglutamyl-glycyl-arginine p-nitroanilide (S-2444) をリン酸二水素一カリウム, クエン酸, トリス, ホウ酸 (各0.1M) からなる広域緩衝液 (pH 6.0 ~ pH 10) 中で37°C, 5分間反応させた。反応停止は酢酸を添加して行い、遊離した p-nitroaniline (pNA) の 405 nm の吸光度を測定して活性を求めた。Fig. 1 に pH と活性の関係を示した。IPM4a, TM-164a および NASa のいずれも、S-2444に対して同様に作用した。活性の最適 pH は8.0~8.5であった。

次に、IPM4a と TM-164a とで pH と活性の関係が一致したことが、分析中にイソペプチド結合を生じたためでないことを確認した。

### (3) 溶液中での TM-164 から IPM4 への変化

TM-164 をリン酸二水素一カリウム, クエン酸, トリス, ホウ酸 (各0.1M) からなる広域緩衝液中にて37°Cでインキュベートした後、陽イオン交換クロマトグラフィー (TSKgel SP-NPR カラム) による分析を行った。SP-NPR カラムでの分析は、20分間で 20 mM グリシン-NaOH 緩衝液 (pH 9.4) から0.133M塩化ナトリウムを含む同緩衝液のリニアグラジエント溶出を行い、検出は波長 280 nm の吸光度で行った。分析は室温で行った。

分析の結果を Fig. 2 に示した。37°Cにおいては pH 7 以上では TM-164 から IPM4 の変化が顕著であった。とくに pH 8 では、24時間後に TM-164 が IPM4

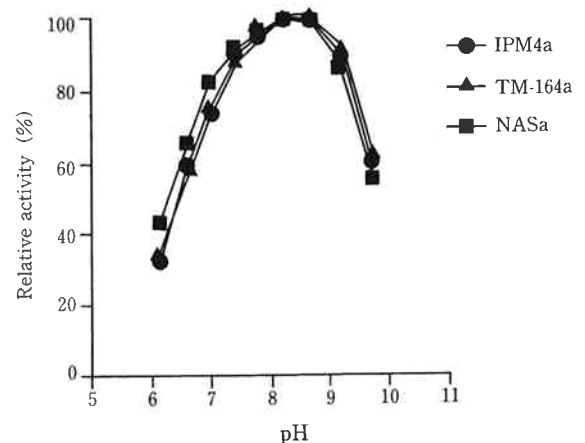


Fig. 1 pH profiles on the hydrolysis of S-2444.

Each proenzyme (IPM4, TM-164, and NAS (nasaruplase)) was converted to the active form (IPMa, TM-164a, and NASa) by plasmin-treatment. The assay was performed with 0.5 mM S-2444 as a chromogenic substrate.

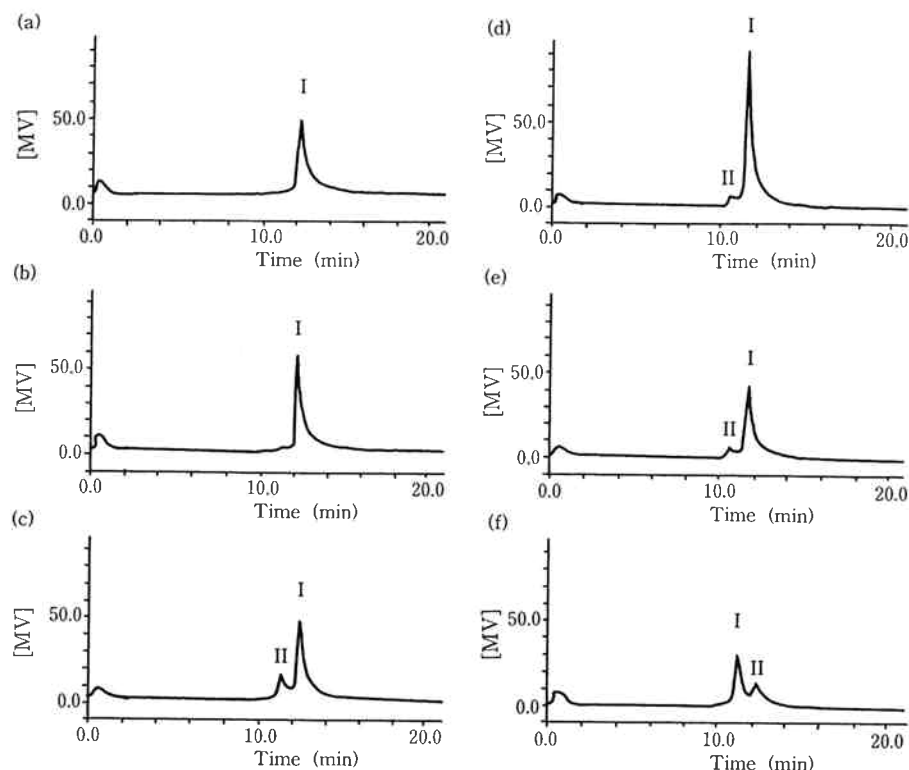


Fig. 2 Influence of pH on the conversion of TM-164 (I) to IPM (II).

TM-164 was incubated at each pH (indicated below), followed by analysis using HPLC (TSKgel SP-NPR). (a) pH 5.0, 24 h, (b) pH 6.0, 24 h, (c) pH 7.0, 24 h, (d) pH 8.0, 1 h, (e) pH 8.0, 3 h, (f) pH 8.0, 24 h.

より少なくなっていた。しかし、1時間の処理では TM-164 が大部分を占めていた。したがって、Fig. 1 の結果は TM-164 と IPM4 のそれぞれの性質を反映したものと考えられる。

なお、SP-NPR カラムに供した試料と同様の試料を ODS-120T カラムで分析したところ、24時間処理でも pH 5.0 ~ pH 8.0 の試料に変化は認められず、すべてシングルなピークとして検出された。

#### (4) 基質選択性

##### (1) IPM4a あるいは IPM0a の調製

IPM4 あるいは IPM0 を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.0) / 2M 塩化ナトリウム中、室温で4時間プラスミン処理した後、STI を添加した。その反応液を疎水クロマトグラフィー (TSKgel Phenyl-5PW カラム) にかけた。Phenyl-5PW カラムからの溶出は、20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) / 2 M 塩化ナトリウムから 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) へのリニアグラジエントで行い、IPM4a あるいは IPM0a を得た。操作は室温でおこなった。

##### (2) TM-164 の活性化

TM-164 は、50 mM トリス緩衝液 (pH 8.3) / 0.1 M 塩化ナトリウム中で 37°C、30分間プラスミン処理した後、

STI を添加した。その反応液を MCA 基質との反応に用いた。

##### (3) 蛍光基質 (MCA 基質) との反応

各種 MCA 基質は(株)ペプチド研究所より購入した。

MCA 基質は初濃度 0.1 mM になるように 50 mM トリス緩衝液 (pH 8.3) / 0.1 M 塩化ナトリウムに溶解した。酵素反応は、酵素濃度 100 IU/ml, 37°Cで行い、遊離した7-アミノ-4-メチルクマリン (AMC) を励起波長 380 nm, 蛍光波長 440 nm で検出した。活性は酵素反応1分間あたりの AMC 遊離量を、pyrog-lutamyl-glycyl-arginine MCA (PyrGR-MCA) を基質としたときの値を100として相対値で示した。

また、基質初濃度 1 mM で同様の実験を TM-164a と NASa について行った。

Table 1 に MCA 基質に対する IPM0a, IPM4a, TM-164a, NASa の作用を示した。MCA 基質分子の amino 残基はアルファベット 1 文字で示した。

PyrGR-MCA はプラスミノゲン分子の558残基目から560残基目の Pro-Gly-Arg のアナログであるので、IPM0a, IPM4a, TM-164a, NASa はいずれも PyrGR-MCA に対して最も良く作用した。ところがアミノ基側

Table 1 Substrate selectivity

Substrate	Relative activity (%)				
	IPM0a*1	IPM4a*1	TM-164a*1	TM-164a*2	NASa*2
PyrGR-MCA	100	100	100	100	100
CbzPyrGR-MCA	2	2	4	14	14
GltGR-MCA	43	42	47	74	67
BocE(OBzl)GR-MCA	15	15	14	28	29
BocE(OBzl)AR-MCA	10	10	11	20	19
BocD(OBzl)PR-MCA	1	1	1	3	3
BocFSR-MCA	n.d.	n.d.	n.d.	20	20
BocLGR-MCA	8	7	7	19	18
BocLTR-MCA	n.d.	n.d.	n.d.	2	2
BocQGR-MCA	3	3	3	9	9
BocQAR-MCA	n.d.	n.d.	n.d.	16	15
BocLSTR-MCA	2	2	2	6	6
BocIEGR-MCA	1	1	1	3	3
BocVPR-MCA	1	1	1	4	4
BocPFR-MCA	n.d.	n.d.	n.d.	0.6	0.6
BocVLK-MCA	0.1	0.1	0.1	0.4	0.4
BocEKK-MCA	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2

Concentration of the MCA-substrates: \*10.1 mM, \*21.0 mM

n.d.: not determined

に保護基をもつ CbzPyrGR-MCA に対してはあまり作用しなかった。これは保護基がウロキナーゼの基質認識の障害になっているためと考えられる。そのことは、プラスミノゲンの557残基目はジスルフィド結合を形成している Cys 残基であり、Cys 残基の側鎖がウロキナーゼの基質認識に関与していないこと、および、557残基目から560残基目までの構造がウロキナーゼの基質認識に重要であることを示唆している。他の基質に対する相対的な作用は、IPM0a, IPM4a, TM-164a, NASa のそれぞれが互いに同様の傾向を示した。NASa は分子内の2ヶ所に糖鎖をもっているが、本実験の結果からは糖鎖は酵素反応に影響していないと考えられる。

以上の結果から、基質選択性に関しては、プロウロキナーゼの135残基目と157残基目を変異させたことが影響を及ぼすことはないと考えられる。

#### (5) 発色基質 S-2444 に対する IPM4a の反応速度論的解析

反応は IPM4a (0.44  $\mu\text{g}$ ) を 0.022 ~ 0.35 mM の S-2444を含む0.05Mトリス塩酸-0.1M塩化ナトリウム (pH 8.3) 0.8 ml 中、37°Cで行った。反応30秒~2分間における pNA 遊離量を波長 405 nm の吸光度で検出し、1秒間あたりの pNA 遊離量を求めた。pNA 量は、 $\epsilon_{405} = 9950 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  から算出した。反応速度論的パラ

Table 2 Kinetic parameters of UK4 toward S-2444

plot	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $\text{s}^{-1}/\text{mM}$ )	$\gamma^a$
1/v vs 1/[S]	0.041 $\pm$ 0.001	10.9 $\pm$ 0.2	2.6 $\times 10^2$	0.999
v vs v/[S]	0.041 $\pm$ 0.002	10.8 $\pm$ 0.2	2.7 $\times 10^2$	-0.997
[S]/v vs [S]	0.039 $\pm$ 0.002	10.7 $\pm$ 0.1	2.8 $\times 10^2$	0.999
	0.035	10.3	2.9 $\times 10^2$ <sup>bc</sup>	
	0.054	17	3.2 $\times 10^2$ <sup>bd</sup>	

<sup>a</sup> Correlation coefficient determined by linear regression analysis. <sup>b</sup> Urinary urokinase, 0.05 M Tris-HCl-0.1 M NaCl (pH 8.0)<sup>10)</sup>. <sup>c</sup> 25°C. <sup>d</sup> 37°C.

メーターは、pNA の遊離速度 (v) と S-2444 濃度 ([S]) の関係を3通りの方法でプロットして求め、その結果を Table 2 に示した。

若干測定条件に差はあるが、S-2444 に対する反応速度論的パラメーターには IPM4a とヒト尿由来ウロキナーゼとで差がないと推定される。

#### (6) 温度安定性の比較

##### (i) プロウロキナーゼの温度安定性

濃度  $1.0 \times 10^4$  IU/ml の IPM4 あるいは IPM0 を 0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.0) 中にて 4 ~ 95°C で 30分間処理したのち、直ちに氷冷した。その液を希釈してからプラスミンによる活性化処理をしたのち、0.175 mM S-

2444 を基質として pH 8.5 で測定した。

(2) ウロキナーゼの温度安定性

濃度  $1.0 \times 10^4$  IU/ml の IPM4a あるいは IPM0a を 0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.0) 中にて 4~90°Cで30分間処理したのち、直ちに氷冷した。その液を希釈して、0.175 mM S-2444 を基質として pH 8.5 で測定した。

(3) IPM4 の温度安定性の経時変化

IPM4 について(1)と同様の実験を pH 6.0 と pH 7.5 で行い、活性経時変化を調べた。

Fig. 3 に IPM4 と IPM0, IPM4a と IPM0a のそれぞれの温度安定性の比較を, Fig. 4 に IPM4 の温度安定性の経時変化をそれぞれ示した。

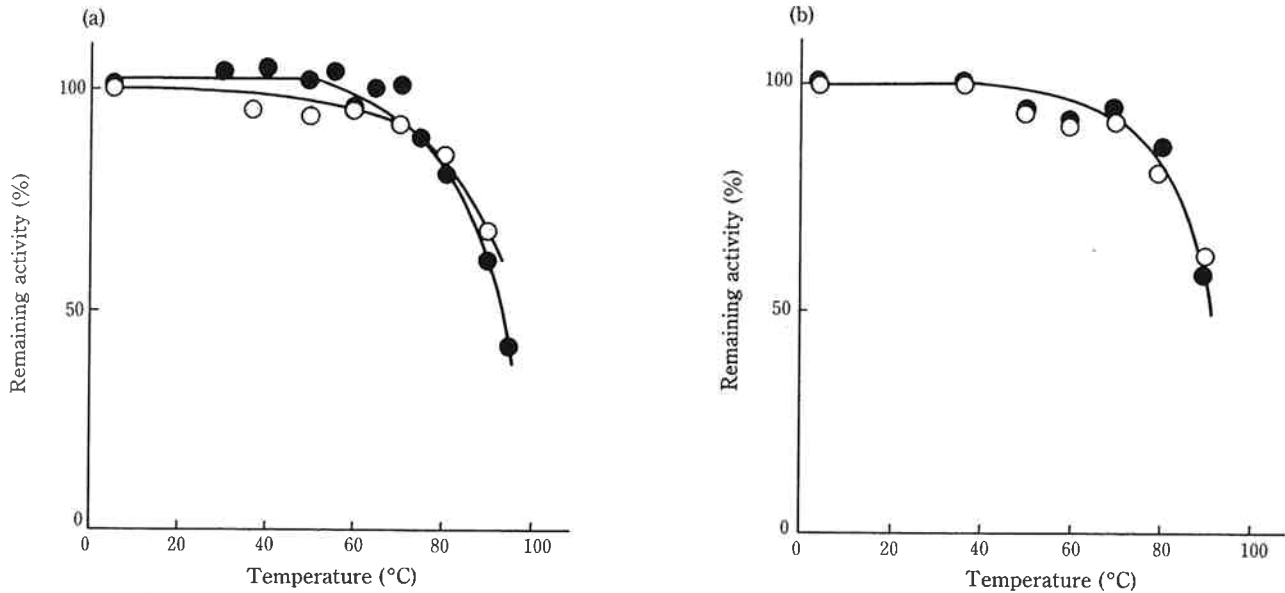


Fig. 3 Thermostability of IPM4, IPM0, IPM4a, and IPM0a at pH 6.0.

(a) IPM4 (●) or IPM0 (○) was incubated for 30 min at each temperature, followed by chilling on ice-water, and was assayed with S-2444 as a substrate after activation with plasmin.

(b) IPM4a (●) or IPM0a (○) was treated as described in (a) except for directly assayed without plasmin-treatment.

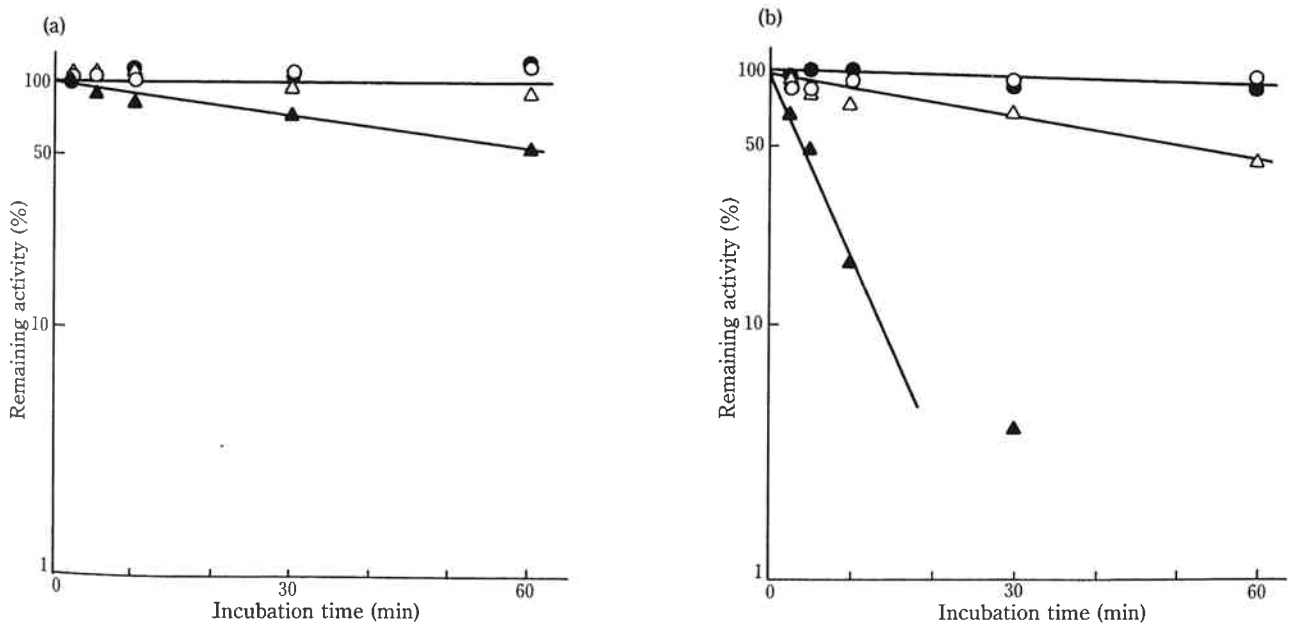


Fig. 4 The time course of the irreversible inactivation by heat-treatment of IPM4 at (a) pH 6.0, or (b) pH 7.5.

IPM4 was incubated at 50°C (○), 60°C (●), 70°C (△), and 80°C (▲), followed by chilling on ice-water, and was assayed with S-2444 as a substrate after activation with plasmin.

Fig. 3 に示されたように、活性前駆体 IPM4 にも活性体 IPM4a にも一次構造の変異による温度安定性への影響はなかった。また、プラスミンにより IPM4 から IPM4a に変換されても温度安定性に影響がでていないことが明らかになった。さらに温度安定性は pH により影響されることが明らかになった。(Fig. 4)。pH 7.5 と pH 6.0 とでは後者のほうが温度安定性が高く、80°C、1 時間の処理でも 50% 以上の活性が残存していた。より高い pH での不可逆的な熱変性の起こりやすさは、リゾチームについての研究で脱アミドによる不可逆的な構造変化が原因であることが報告されている<sup>11)</sup>。IPM4 や IPM0 で温度安定性が高いことは、活性ドメインの構造の安定性が高いことを示している。構造の安定性は、分子内にジスルフィド結合が 12ヶ所も存在すること、および活性前駆体であることにより自己消化がないことに起因していると推定される。また、IPM4a や IPM0a においては、ジスルフィド結合の存在以外に、基質選択性が厳密であるために自己消化がないことも起因していると考えられる。そのために Fig. 3 に示されたように、活性化の前後で温度安定性が変化しなかったと考えられる。

### 3. ま と め

TM-164 の 407 残基目のアスパラギン残基に脱アミドを起こし、側鎖カルボニル基に 408 残基目から 411 残基目(末端)までのフラグメントが転位して生じた IPM4 と、IPM0 との基質選択性と温度安定性に関する性質が比較された。IPM4 を活性化して生じる IPM4a と、IPM0 を活性化して生じる IPM0a は、TM-164 やナサルプラーゼと同様の基質選択性を有していた。また、IPM4、IPM0、IPM4a および IPM0a はすべて同様の温度安定性を示した。以上から、プロウロキナーゼの 135 残基目と 157 残基目の 2ヶ所をアミノ酸置換され、イソ

ペプチド結合 (isoAsp<sup>407</sup>-Gly<sup>408</sup>) をもつ IPM4 は、アミノ酸置換による本来の酵素機能への影響はないことが明らかにされた。

### 参 考 文 献

- 1) Lijunen, H. R. Nelles, L. Hoef, B. V. Demasin, E. and Collen, D. (1988) *Eur. J. Biochem.* 177, 575-582.
- 2) Lijunen, H. R. Hoef, B. V. Nelles, L. and Collen, D. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 5232-5236.
- 3) Davidow, L. S. Dumais, D. R. Smyth, A. P. Greer, J. and Moir, D. T. (1991) *Protein Engineering*, 4, 923-928.
- 4) Miyake, T. Hibino, Y. Kobayashi, Y. Yokoyama, M. Watanabe, K. and Ohmori, M. (1988) *J. Biochem.* 104, 643-647.
- 5) Eguchi, Y. Sakata, Y. Matsuda, M. Osada, H. Numao, N. Ohmori, M. and Kondo, K. (1990) *J. Biochem.* 108, 72-79.
- 6) 近藤 淑; 平成元年 GE 第 2 四半期報告 (1989).
- 7) Johnson, B. A. Langmack, E. L. and Aswad, D. W. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12283-12287.
- 8) Johnson, B. A. Shirokawa, J. M. Hancock, W. S. Spellman, M. W. Basa, L. J. and Aswad, D. W. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 14262-14271.
- 9) 本間信幸, 新谷晃司, 竹本久雄 (1992) 東ソー研究報告, 第 36 卷, 第 2 号, 179-188.
- 10) Lottenberg, R. Christensen, U. Jacson, C. M. and Coleman, P. L. "Methods in ENZYMOLOGY", ed. by Laszlo Lorand, ACADEMIC PRESS, New York, Vol. 80, p. 341-361 (1981).
- 11) Ahern, T. J. and Klivanov, A. M. (1985) *Science*, 228, 1280-1284.



著 者  
氏名 飯 田 寛  
Hiroshi IIDA  
入社 昭和63年 4月 1日  
所属 研究本部  
          生物学研究所  
          AIA 開発室  
          副主任研究員



著 者  
氏名 本 間 信 幸  
Nobuyuki HONMA  
入社 昭和62年 4月 1日  
所属 研究本部  
          生物学研究所  
          バイオテクノロジー研究室  
          副主任研究員



著 者  
氏名 竹 本 久 雄  
Hisao TAKEMOTO  
入社 昭和46年 4月 16日  
所属 研究本部  
          生物学研究所  
          生物学研究所所長付