

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590222

研究課題名(和文) 新規ペプチドによるプラスミノゲン活性化促進機構の解析とその応用

研究課題名(英文) New synthetic peptide enhances plasminogen activation and thrombolysis

研究代表者

岡田 清孝 (OKADA KIYOTAKA)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：20185432

研究成果の概要(和文)：スタフィロキナーゼのアミノ酸配列中の一部の配列に相当する合成ペプチド(SP)は、プラスミノゲン(P1g)に結合してP1g activator(PA)による活性化を促進させた。この結合はP1g B鎖のC末端側の一部を構成する合成ペプチドで阻害された。SPのGlu-P1gへの結合は、Glu-P1gの構造変化を誘導した。SPはマウス血栓モデルに対して、血流の再開通を促進させた。よって、SPはP1g活性化を促進することにより血栓溶解促進作用を示す。

研究成果の概要(英文)：A new synthetic nonadecapeptide (SP) corresponding to Glu22-Leu40 of staphylokinase molecule bound to plasminogen (Plg) and enhanced the activation of Plg by Plg activator (PA). This binding was completely inhibited by synthetic peptide corresponding to C-terminal region of plasmin B-chain. SP binds to Glu-Plg, and induces structural changes of Glu-Plg. When SP was administrated in mouse thrombosis model, earlier recanalization was observed than in mice with vehicle administration. Thus, SP enhanced Plg activation and induced effective thrombolysis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2010年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：血液凝固・血液レオロジー

1. 研究開始当初の背景

線溶系は血漿中に存在し酵素前駆体である plasminogen (Plg)がその活性化因子である Plg activator (PA)により plasmin に変換され、この plasmin がフィブリンを分解し血栓を溶解する系である。この PA には、組織性 PA (t-PA)とウロキナーゼ型 PA (u-PA)の二種類が存在する。また、線溶系には抑制系として PA に対し PA inhibitor (PAI)が、plasmin に対して α_2 -antiplasmin

(α_2 -AP または α_2 -plasmin inhibitor; α_2 -PI)がそれぞれ存在する。このように、線溶系は血栓溶解に対して活性化系と阻害系のバランスで制御されている。このバランスが崩れると血栓症や出血傾向を引き起こす。急性心筋梗塞などの血栓症の治療には t-PA などの PAs が血栓溶解薬として使用されている。

Plg は N 末端ペプチド領域、5 個のクリングル領域 (K1-K5)、および酵素活性領域

(B鎖)から構成されている。NativeなPlg (Glu¹-Plg)は血漿中でそのN末端ペプチド領域が、自身のクリングル領域に存在するリジン結合部位(LBS)に結合している。このためGlu¹-Plgの構造は”closed-form”で、PAによる活性化を受けにくい。これに対し、plasminにより限定分解されたLys⁷⁸-PlgはN末端ペプチド領域が除去され、構造が”open form”となりPAによる活性化を受けやすい。また、フィブリン上ではリジン側鎖にGlu¹-PlgのLBSが結合し、Lys⁷⁸-Plgと類似の”open form”構造を誘導し、Plg活性化促進作用を示す。

また、t-PAはその構造中に存在するフィンガー領域とクリングル領域を介して高いフィブリン親和性を示す。よって、Plgとt-PAはフィブリン上に集約され、効率のよいplasmin産生が引き起こされる。さらに、plasminはフィブリンを限定分解によりリジンを露出させ、Plgやt-PA分子中のLBSに対する結合部位を増加させる。よってさらに線溶活性化反応が促進されることになる。このようにフィブリン上のC末端リジンは線溶活性の増強反応において重要な役割を果す。

一方、血栓症に対してPAが血栓溶解薬として使用されている。当教室ではPro-urokinase (Pro-UK) (Fibrinolysis, 1987)やt-PA (FEBS Letter, 1985)などのPAsの血栓溶解機序について勢力的に研究を進めてきた。その中で、黄色ぶどう球菌が産生するstaphylokinase (SAK)については、世界に先駆けて研究を進め、SAKがplasminと複合体を形成しPlg活性化能を発現させ、 α_2 -APとの相互作用によりユニークなfibrin特異性を示すことを明らかにした(Blood, 1990)。このSAKの作用機序をさらに詳細に解明する目的で、そのアミノ酸配列の一部に即したペプチドを合成し、Plgとの反応性を検討した。

その結果、合成ペプチドの中にPAによるGlu¹-Plg活性化を促進する物質を見出した(Thromb Haemost 2007)。このペプチドはSAKアミノ酸配列の22番目から40番目に相当する配列(SAK22-40; SP)で、Glu¹-PlgのB鎖側のSAK結合部位とは異なる場所に結合し、Plg活性化促進作用を発現することを明らかにした。また、SPはPlg A鎖が持つLBSを介したフィブリンへの結合機能を保持したまま、Plg活性化促進作用を発現することを明らかにした。このことから、フィブリン上のPlg活性化促進反応はSPによりさらに増強することを見出した。このような点から、SPは今までに全く報告のない新たなPlg活性化促進機序を発揮すると推測される。

さらに、SPは血管内皮細胞およびフィ

ブリン上でもPlg活性化促進を示し、マウス血栓モデルでの血栓溶解を促進することが予測されることから、血栓溶解促進薬として臨床応用が期待される。

2. 研究の目的

新規ペプチドのプラスミノゲン活性化促進機構を解明し、さらに血栓溶解促進作用としての応用性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ペプチドの合成

SPとPlgのB鎖のアミノ酸配列に対応する10-20残基含有のペプチドおよびその変異体はペプチド合成機(PSSM-8, Simazu, Japan)で作成した。

(2) Plg活性化促進作用の解析

①. SPのPlg活性化促進作用: PAs (t-PAまたはu-PA)によるGlu¹-Plg活性化はplasminの発色性合成基質(S-2251)を用いてマイクロプレートリーダー(Thermomax™, Molecular Devices, USA)で測定し、酵素反応速度論的解析を行った。また、PAによるPlg活性化はSDS-PAGE法を用いたplasmin産生の検出で、同様にSPの作用を解析した。

②. SPとPlgの結合阻害Plgペプチドの影響: 上記1)で得られたPlgペプチドのSPによるGlu-Plg活性化促進作用への影響は、上記の発色性合成基質法とSDS-PAGE法で解析した。

(3) 結合能の解析

①. SPとPlgとの結合能: 結合能は生体分子間相互作用解析装置IASys (Affinity Sensors, UK)を用いて解析した。Plgをキュベットに固相化後、SPを加え、その結合能を解析した。

②. SPのPlgの結合部位の同定: SPのGlu¹-Plgへの結合部位はPlg B鎖のアミノ酸配列に対応する種々の合成ペプチドを用いた競合阻害実験で同定した。

(4) 血管内皮細胞上における反応

①. 血管内皮細胞: 細胞は当教室で既に樹立化しているヒト臍帯静脈血管内皮細胞TKM-33を用いた。

②. Plg結合能: TKM-33上のPlgに対するSPの結合能はIASysを用いて解析した。

③. Plg活性化: TKM-33上におけるPlg活性化に対するSPの影響は合成基質(S-2251)を用いて測定した。

(5) SPによるPlgの構造変化の解析

Plgの構造変化は、SPを反応させた前

後の Glu¹-Plg または Lys⁷⁸-Plg の円偏光二色性 (CD; JASCO J-720, Nihon Bunko, Japan) スペクトルで解析した。また、Lys 誘導体である EACA の存在下の Plg と比較した。

(6) マウス血栓モデルにおける解析

- ①. マウス:線溶系因子遺伝子欠損マウス (KO)とそれに対応する対照マウス (WT)を用いた。 α_2 -APKO は我々がベルギールーバン大学と共同で開発したものである。また、t-PAKO と PAI-1KO はベルギールーバン大学より導入し、長年に渡り継代維持している。これらの動物は我が国で定められた指針に従って作成された近畿大学の実験動物取り扱い規定に従って行った。
- ②. マウス血栓モデルは rose bengal / 光照射により頸動脈に血栓を作成させ、血流を測定することにより血栓形成・溶解を解析した。

4. 研究成果

(1) Plg 活性化促進作用の解析

①. SP の Plg 活性化促進作用

SP は t-PA による Plg 活性化を濃度依存性に促進した。その Plg 活性化促進作用の酵素反応論的解析をし、その結果を図 1 に示す。

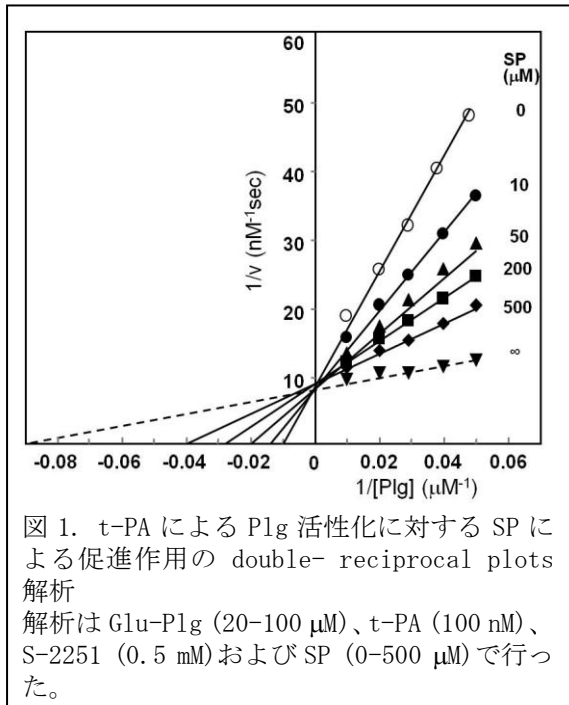


図 1. t-PA による Plg 活性化に対する SP による促進作用の double-reciprocal plots 解析
解析は Glu-Plg (20-100 μM)、t-PA (100 nM)、S-2251 (0.5 mM) および SP (0-500 μM) で行った。

酵素反応定数 Km は、SP 存在下で 105 ±

7.0 μM から 8.5 ± 1.0 μM に低下した。また、kcat は、SAK22-40 の非存在下 (0.115 ± 0.021 s⁻¹) と存在下 (0.105 ± 0.012 s⁻¹) で有意な差はなかった。kcat/Km は、SP の存在下 (0.0124 ± 0.0035 μM⁻¹ · s⁻¹) で非存在下 (0.00109 ± 0.00045 μM⁻¹ · s⁻¹) に比べ、約 11.4 倍増加した。

また、plasmin 活性に対する SP の影響について、合成基質 S-2251 を用いて検討したが、有意な差はなかった。

②. 血管内皮細胞上での Plg 活性化能

血管内皮細胞は、t-PA による Plg 活性化を促進した。また、SP は、血管内皮細胞存在下で t-PA による Plg 活性化を濃度依存性に促進した (図 2)。

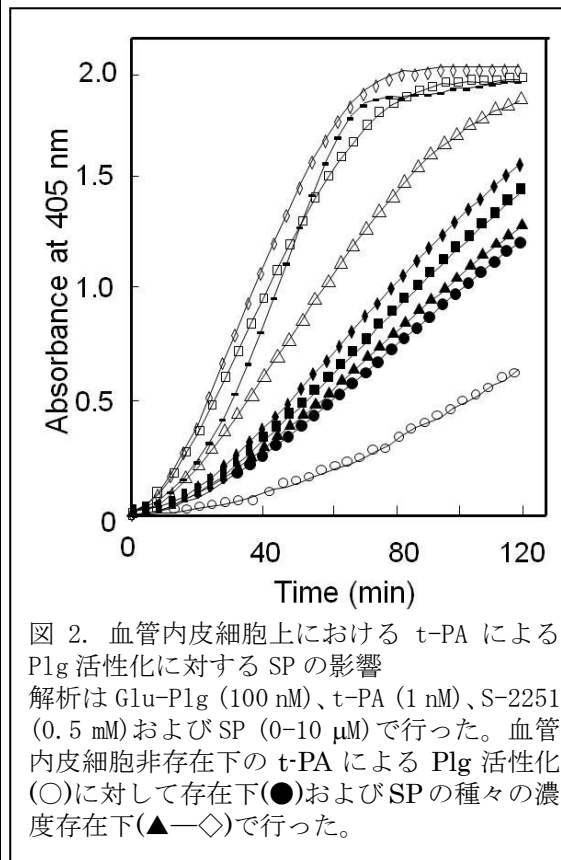


図 2. 血管内皮細胞上における t-PA による Plg 活性化に対する SP の影響
解析は Glu-Plg (100 nM)、t-PA (1 nM)、S-2251 (0.5 mM) および SP (0-10 μM) で行った。血管内皮細胞非存在下の t-PA による Plg 活性化 (○) に対して存在下 (●) および SP の種々の濃度存在下 (▲—◇) で行った。

(2) 結合能の解析

- ①. SP と Plg との結合能: SP は、ヒトおよびマウス Plg に対して濃度依存性に結合した。
- ②. 血管内皮細胞上における結合能: ヒト臍帯静脈血管内皮細胞は、固相化 SP に結合しなかった。また、固相化 Plg に対して血管内皮細胞は、細胞数依存性に結合した。さらに、血管内皮細胞は、固相化 SP に対して Plg を結合させ後、Plg の濃度依存性に結合した (図 3)。

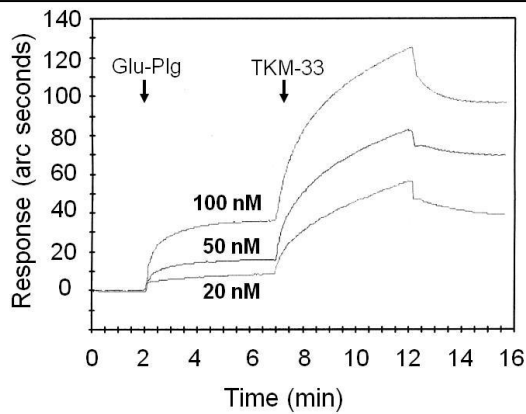


図3. 血管内皮細胞上におけるSPのP1g結合能

B11とSPの結合実験はIASysを用いて行った。固相化SPに対してGlu-P1g(20, 50, 100 nM)反応させた後、血管内皮細胞TKM-33 (1×10^4)を反応させた。結合実験は、生体高分子間相互解析装置IASysを用いた。

(3). SPのP1gの結合部位の同定

①. SPのP1g活性化促進効果に対するP1g B鎖ペプチドの影響: SPのP1g活性化促進効果は、P1g B鎖のC末端側の合成ペプチドB11 (Phe747-Gly763)、B7 (Phe680-Val708)およびB9 (Ala726-Ser735)で阻害された(図4)。そのうちB11は、最も強い濃度依存性の阻害効果を示した。それ以外のP1g B鎖のアミノ酸配列に対応するペプチドはSPのP1g活性化促進効果に影響しなかった。

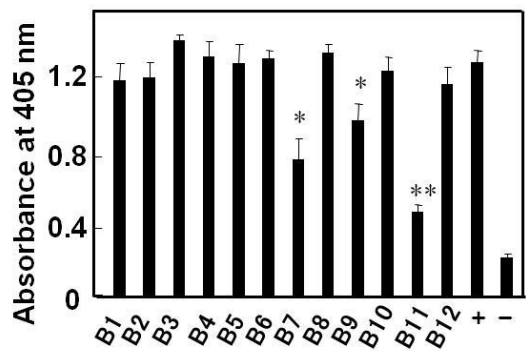


図4. SPのP1g活性化促進効果に対するP1g B鎖ペプチドの影響。

解析はGlu-P1g (100 nM)、t-PA (1 nM)、S-2251 (0.5 mM)およびSP (5 μ M)の反応系に対してP1g B鎖ペプチド (5 μ M)を加えて行った。t-PAによるP1g活性化(-)に対してSP存在下(+), さらにP1g B鎖ペプチド(B1-B11)を加えた場合を示す。*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ 。

また、B11ペプチドのアミノ酸置換変異体では、750番目のAspをAla (D750A、E748A/D750A)またはLys (D750K)に置換した変異によりSPのP1g活性化促進作用に対する阻害活性を消失した。さらに、750番目のAspを除去したB11ペプチド (Δ D750)も阻害作用を消失した(表1)。しかし、Glu748、Lys749、Lys751のアミノ酸の変異体は、B11と同等のSPのP1g活性化促進作用に対する阻害活性を示した。

表1. SPのP1g活性化促進作用に対するB11ペプチド変異体の阻害効果

| ペプチド | 阻害活性(%) |
|-------------------------|-------------------|
| B11 | 100 |
| E748A | 88.9 \pm 10.7 |
| E748K | 95.7 \pm 3.3 |
| K749A | 85.4 \pm 12.6 |
| K749D | 90.9 \pm 8.1 |
| D750A | 10.8 \pm 6.3 ** |
| D750K | 15.3 \pm 7.8 ** |
| K751A | 83.9 \pm 15.3 |
| K751D | 87.6 \pm 11.0 |
| E748A/D750A | 10.1 \pm 4.7 ** |
| K749A/K751A | 82.9 \pm 16.8 |
| E748K/K749E/D750K/K751D | 25.7 \pm 11.6 * |
| Δ D750 | 8.3 \pm 5.6 ** |

解析はGlu-P1g (100 nM)、t-PA (1 nM)、S-2251 (0.5 mM)およびSP (5 μ M)の反応系に対してB11またはB11変異体 (5 μ M)を加えて行った。*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$ 。

②. SPとB11の結合能: B11は、固相化SPに対して濃度依存性に結合した(図5A)。SPに対するB11の結合定数は、 k_a が $2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 k_d が $6.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ および K_a が $3.49 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ をそれぞれ示した。また、その結合は、B11の750番目のAspの変異により消失した(図5B)。

③. SPのP1g結合能に対するB11の影響: B11は、固相化P1gに対するSPの結合に対して、濃度依存性に阻害した。

(4) SPによるP1gの構造変化の解析

Glu¹-P1gの近紫外部(250-310 nm)のCDスペクトルは、SPの存在下で下方にシフトした(図6A)。また、そのスペクトルは、EACAの存在下での変化と異なっていた。さらに、Lys⁷⁸-P1gのCDスペクトルにおいても下方にシフトした(図6B)。しかし、EACAの存在下のLys⁷⁸-P1gでは、変化がなかった。また、Glu¹-P1gまたはLys⁷⁸-P1gの遠紫外部(200-250 nm)のCDスペクトルは、SPの存在と非存在下での大きな差はなかった。

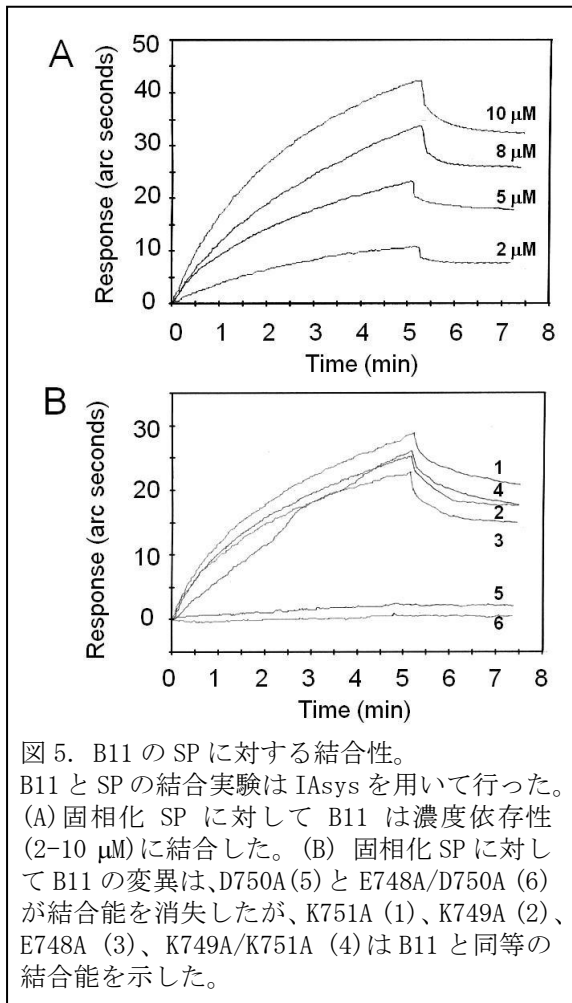


図5. B11のSPに対する結合性。
B11とSPの結合実験はIASysを用いて行った。(A)固相化SPに対してB11は濃度依存性(2-10 μM)に結合した。(B)固相化SPに対してB11の変異は、D750A(5)とE748A/D750A(6)が結合能を消失したが、K751A(1)、K749A(2)、E748A(3)、K749A/K751A(4)はB11と同等の結合能を示した。

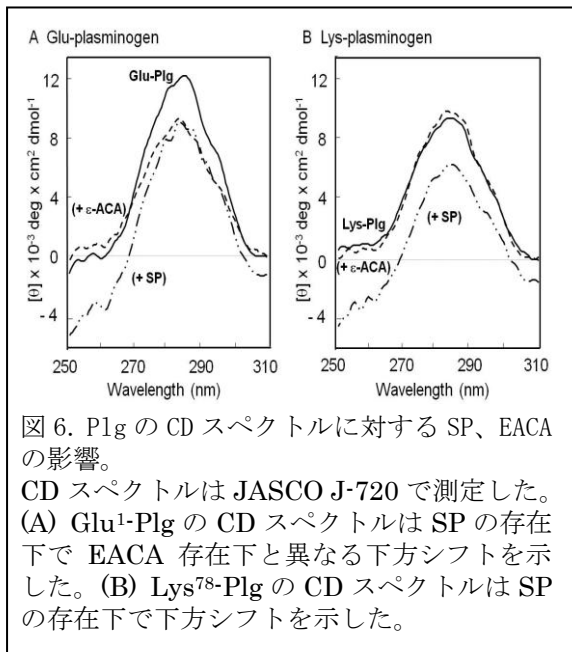


図6. PlgのCDスペクトルに対するSP、EACAの影響。
CDスペクトルはJASCO J-720で測定した。(A)Glu¹-PlgのCDスペクトルはSPの存在下でEACA存在下と異なる下方シフトを示した。(B)Lys⁷⁸-PlgのCDスペクトルはSPの存在下で下方シフトを示した。

(5) マウス血栓モデルにおける解析

①. SPの血栓溶解促進効果: SPは、マウス血栓モデルにおいて血流の再開通率

を濃度依存性に増加させた(図7A-D)。
②. 遺伝子欠損マウスの血栓モデルにおけるSPの効果: t-PAKOマウスの血栓モデルでは、SP非投与群(図7E)または投与群(図7F)において血流の再開通が見られなかった。PAI-1KOマウスの血栓モデルでは、WT(図7A)の血流の再開通率より亢進し(図7G)、さらにSP投与によりその亢進は増強した(図7H)。

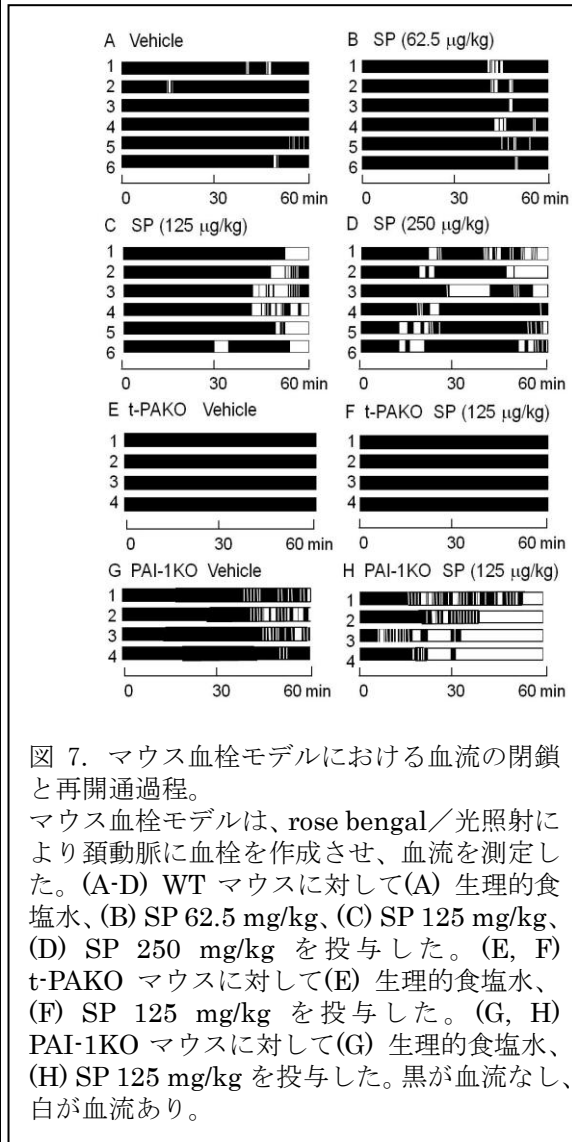


図7. マウス血栓モデルにおける血流の開鎖と再開通過程。
マウス血栓モデルは、rose bengal/光照射により頸動脈に血栓を作成させ、血流を測定した。(A-D) WTマウスに対して(A)生理的食塩水、(B)SP 62.5 mg/kg、(C)SP 125 mg/kg、(D)SP 250 mg/kgを投与した。(E, F) t-PAKOマウスに対して(E)生理的食塩水、(F)SP 125 mg/kgを投与した。(G, H) PAI-1KOマウスに対して(G)生理的食塩水、(H)SP 125 mg/kgを投与した。黒が血流なし、白が血流あり。

以上の結果より、SPはPlgのB鎖側のPhe747-Gly763領域に結合し、Plgの部分的構造変化を誘導することで、t-PAによる活性化を亢進すると考えられる。このSPが結合するPlgの部位は、今までに報告されているLys類縁物質やフィブリンが結合するPlg A鎖側のクリグル領域にあるLBSとは全く異なる。さらに、以前報告した(Thromb Haemost 2007)ようにPlg B鎖側に結合するSAKの結合部位とも異なる。このようなこと

から、SP は Plg に対して今までに報告の全くない新規な結合様式をとると考えられる。また、Plg は、フィブリンや種々の細胞の膜上に存在する Plg の受容体や結合部位にクリンゲル領域の LBS を介して結合することが知られている。SP は、その LBS とは異なる部位で Plg と結合することから、フィブリン上や細胞膜上でも Plg に結合し、その活性化を促進出来ると考えられる。このことから、SP と Plg の血管内皮細胞上での反応が説明できる。さらに、マウスの血栓モデルにおける SP の血栓溶解促進結果も裏付けられる。

よって、SP は新規のメカニズムによる血栓溶解促進物質として、臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Okada K, Ueshima S, Matsuno H, Nagai N, Kawao N, Tanaka M, Matsuo O, A synthetic peptide derived from staphylokinase enhances plasminogen activator by tissue-type plasminogen activator. J Thromb Haemost 査読有, 2011, Epub ahead of print.
- ② Kanno Y, Ishisaki A, Kawashita E, Chosa, N, Nakajima K, Nishihara T, Toyoshima K, Okada K, Ueshima S, Matsushita K, Matsuo O, Matsuno H, Plasminogen/plasmin modulates bone metabolism by regulating the osteoblast and osteoclast function. J Biol Chem, 査読有, 2011, Epub ahead of print.
- ③ Kawao N, Nagai N, Tamura Y, Okada K, Yano M, Suzuki Y, Uemura K, Ueshima S, Matsuo O, Urokinase-type plasminogen activator contributes to heterogeneity of macrophages at the border of damaged site during liver repair in mice. Thromb Haemost 査読有, 2011, Epub ahead of print.
- ④ Taniguchi Y, Inoue N, Morita S, Nikaido Y, Nakashima T, Nagai N, Okada K, Matsuo O, Miyata S, Localization of plasminogen in mouse hippocampus, cerebral cortex, and hypothalamus. Cell Tissue Res, 査読有 343, 2011. 303-317.
- ⑤ Kawao N, Nagai N, Okada K, Okumoto K, Ueshima S, Matsuo O, Role of plasminogen in macrophage accumulation during liver repair. Thromb Res 査読有 125, 2010, e214-e221.
- ⑥ Kawao N, Nagai N, Ishida C, Okada K, Okumoto K, Suzuki Y, Uemura K, Ueshima

S, Matsuo O, Plasminogen is essential for granulation tissue formation during the recovery process after liver injury in mice. J Thromb Haemost 査読有 8, 2010, 1555-1566.

- ⑦ Nishiya K, Nogami R, Okada K, Matsuo O, Take M, Ogi K, Shima M, Determination of factor VIII-interactive region within plasmin responsible for plasmin-catalyzed activation and inactivation of factor VIII(a). Thromb Haemost 査読有 104, 2010, 105-117.
- ⑧ Okada K, Ueshima S, Kawao N, Okamoto C, Matsuo K, Akao M, Seki T, Ariga T, Tanaka M, Matsuo O. Binding of plasminogen to hepatocytes isolated from injured mice liver and nonparenchymal cell-dependent proliferation of hepatocytes. Blood Coagul Fibrin 査読有 19, 2008, 503-511.

[学会発表] (計 3 件)

- ① Okada K, Synthetic nonadecapeptide (SAK22-40) enhances plasminogen activation and thrombolysis. 20th International Congress on Fibrinolysis and Proteolysis. 2010, 8, 24 Amsterdam, The Netherlands.
- ② 岡田清孝、新規ペプチドの線溶系活性化促進作用の解析、第 33 回日本血栓止血学会学術集、2010, 4, 24、鹿児島。
- ③ 岡田清孝、新規ペプチドのプラスミノゲン活性化促進機序の解析。第 31 回日本血栓止血学会学術集会 2008, 11, 22、大阪。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 清孝 (OKADA KIYOTAKA)
近畿大学・医学部・講師
研究者番号：20185432

(2) 研究分担者

松尾 理 (MATSUO OSAMU)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：40030879
河尾 直之 (KAWAO NAOYUKI)
近畿大学・医学部・助教
研究者番号：70388510
上嶋 繁 (UESHIMA SHIGERU)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号：30193791
永井 信夫 (NAGAI NOBUO)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授
研究者番号：90260281
(H22：連携研究者)