

アネキシンVを利用した新しい血栓溶解剤の開発 ア ネキシンVとウロキナーゼB鎖複合体の作製と性状

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9243

アネキシンVを利用した新しい血栓溶解剤の開発

—アネキシンVとウロキナーゼB鎖複合体の作製と性状—

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

田 中 憲 次

アネキシンV変異体とウロキナーゼB鎖の複合体を作製し、試験管内フィブリンクロット溶解試験およびラット肺塞栓溶解試験でその線溶学的性状を検討した。野生型アネキシンVのN末端アミノ酸を6個伸長させ (Met-Ala-Cys-Asp-His-Ser)、さらに Cys316 を Ser に置換させたアネキシンV変異体が大腸菌で発現させた。ウロキナーゼB鎖はウロキナーゼ分子の AB鎖をつなぐジスルフィド結合を限定的に還元させて得た。このように得られた二種類の蛋白質をジスルフィド結合で架橋後精製し、化学量論的に両蛋白質が1:1で結合した複合体を得た。本複合体は合成基質に対してウロキナーゼと同等の触媒活性を有し、またプラスミノゲン活性化作用でもウロキナーゼと同等の活性を示した。さらに本複合体はフォスファチジルセリンを含有する細胞膜に対してアネキシンVと同様の結合能を示した。これらの結果から複合体を形成する両蛋白質はジスルフィド結合による架橋後もそれぞれの生理活性を保持していることが明らかになった。試験管内フィブリンクロット溶解試験を用いて複合体の線溶活性をウロキナーゼと比較した結果、両者で差は認められなかった。他方、ラット肺塞栓溶解試験で両者の線溶活性を比較した結果、血中半減期には差がないにもかかわらず、線溶活性は複合体の方がウロキナーゼの3倍から4倍強かった。これらの結果からアネキシンVがリン脂質含有血栓へのプラスミノゲンアクチベーターの標的化に有用であり、得られた複合体は次世代の新しい線溶剤に発展する可能性が示唆された。

Key words fibrinolysis, annexin V, urokinase, phosphatidyl serine

現在、血栓溶解療法にウロキナーゼ (urokinase, UK) や組織プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator, t-PA) が広く使用されているが、血栓に対する親和性が低く、血中半減期が短いため大量投与を余儀なくされ、全身性の出血が問題となっている。これらの問題を解決するために血栓に対する親和性を高めたり、血中半減期を延長させた線溶剤の改良が行われている。新しい線溶剤としてウロキナーゼの前駆体である一本鎖ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (single chain urokinase-type plasminogen activator, scuPA)、別名プロウロキナーゼ (pro-urokinase, pro-UK) やプラスミノゲンとストレプトキナーゼの活性型複合体であるAPSAC (anisoylated plasminogen streptokinase activator complex) が臨床使用されている。t-PA や scuPA の変異体やハイブリッド蛋白質が数多く作られ、それらの線溶活性が検討されている²⁾。さらにフィブリンや血小板の膜蛋白質に対する抗体を scuPA に化学的に結合させたキメラ蛋白質は血栓に対して高い親和性を持ち、線溶活性を増強したと報告されている²⁰⁾。

アネキシンVは多くの細胞に存在するアネキシンファミリーの中で最も多量に存在し、かつリン脂質への親和性が最も強いCa²⁺依存性のリン脂質結合蛋白質である。アネキシンの生理作用としては抗凝固作用、細胞膜融合作用、細胞内骨格と細胞膜

相互作用の媒介作用等が報告されているが、その真の生理作用についてはなお明らかではない⁴⁵⁾。アネキシンVは陰性電荷を帯びたりポソーム⁶⁷⁾や活性化血小板⁶⁸⁾に強く結合する。本分子はN末端アミノ酸 (Ala) がブロックされた319のアミノ酸からなり、分子量36kDa、糖鎖も分子内ジスルフィド結合も含まない単純蛋白質である。アネキシンVは70-80のアミノ酸を含む四つのくり返し構造とN末端ランダム構造を持つ¹⁰⁾。X線構造解析から、各くり返し構造は五つの α ヘリックスからなる詰まったドメイン構造を有することがわかった。アネキシンVはCa²⁺結合部位が存在する凸な分子表面でCa²⁺を介してリン脂質膜と結合し¹¹⁾、N末端ランダム構造 (~16残基) は細胞膜結合部位の外側に存在する。アネキシンVはリン脂質に対して強い親和性を有するヒト由来蛋白質であり、蛋白質分解酵素に抵抗性の比較的小さな分子であるなどの利点から、リン脂質への標識化に最適な分子かもしれない。これらの予測を裏付けるように、最近、大動脈内および環状動脈内に血栓を作成した動物にアネキシンVを静脈内投与すると、いずれの場合にも血栓に選択的に集積することが報告された¹²⁻¹⁴⁾。

ウロキナーゼは一本鎖で不活性型の scuPA として分泌されるトリプシン型のセリンプロテアーゼで、血漿カリクレインやプラスミンによって不活性型から活性型に転換される¹⁵⁾¹⁶⁾。活性型は二本鎖からなり、A鎖はN末端から始まるユニット (24kDa)

平成8年9月26日受付, 平成8年10月29日受理

Abbreviations: α_2 -PI, α_2 -plasmin inhibitor; BSA, bovine serum albumin; DEAE, diethylaminoethyl; DFP, diisopropyl fluorophosphate; DTT, dithiothreitol; HSA, human serum albumin; IU, international unit; scuPA, single

で、B鎖はC末側の触媒活性を有するユニット(30kDa)である。これら二本のペプチドはA鎖の Cys148 とB鎖の Cys279 間で分子内ジスルフィド結合によって架橋されている¹⁷⁾¹⁸⁾。ウロキナーゼはプラスミノゲンをプラスミンに転換する酵素で¹⁹⁾、生成したプラスミンによりフィブリンの溶解が始まる。scuPAは弱いながらもフィブリンに親和性があるといわれているが²⁰⁾、ウロキナーゼはフィブリンにほとんど結合しない。

本報ではリン脂質を含む血栓に指向性を持つアネキシンVとウロキナーゼB鎖を結合させた新しい線溶剤の作製方法及その性質について報告する。この分子の構造を図1に模式化した。

材料および方法

I. 材 料

ウロキナーゼ (150,000 国際単位 (international unit, IU)/mg), Glu-プラスミノゲン (25.1 カゼイン単位 (casein unit, cu)/mg), トロンピン (1,000 NIHユニット (unit, U)/mg), フィブリノゲン, ヒト血清アルブミン (human serum albumin, HSA) はミドリ十字社製 (大阪) を使用した。アネキシンVは新鮮ヒト胎盤より既報の方法で精製した¹⁰⁾。DNase (10U/ml) は Boehringer Mannheim 社製 (Mannheim, Germany) を, ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT), トリトンX-100, ツイーン80, カナマイシン, アンピシリン, ペプスタチン, ロイペプチン, フルオロリン酸ジイソプロピル (diisopropyl fluorophosphate, DFP) は Sigma 社製 (St. Louis, USA) を用いた。ベンザミジン-セファローズ 6B は Pharmacia 社製 (Uppsala, Sweden) を用いた。発色基質 Glu-Gly-Arg-pNA (L-glutamyl-glycyl-L-arginine p-nitroanilide, S-2444), D-Val-Leu-Lys-pNA (D-valyl-L-leucyl-L-lysine p-nitroanilide, S-2251) は Chromogenix 社製 (Molndal, Sweden) を, 蛍光基質 Glt-Gly-Arg-MCA (glutaryl-glycyl-L-arginine 4-methyl-coumaryl-7-amide, 3097-v) はペプチド研究所製 (大阪) を用いた。蛋白質の標識法は既報¹³⁾に従った。各標識蛋白質の比放射活性は、フィブリノゲン (10cpm/ng), ウロキナーゼ (7,505cpm/ng), ウロキナーゼB鎖 (9,428cpm/ng), 複合体 (3,780cpm/ng) であった。蛋白質測定キット (BCA) とウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) は Pierce 社製 (Rockford, USA) を, L-ブロスは Gibco/BRL 社製

(Gaithersburg, USA) を用いた。リン脂質は Sigma 社より購入し、フォスファチジルセリン (phosphatidyl serine, PS) : フォスファチジルコリン : フォスファチジルエタノールアミン (2 : 2 : 1) のリボソームを Meersらの方法²¹⁾で作製し、常法に従い臭化シアン活性化セファローズ 6B (Pharmacia) にカップリングさせた。

II. ウロキナーゼB鎖の単離

ウロキナーゼ (36.9mg) を 90ml の 1mM DTT, 20mM ベンザミジン含有 100mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解後、37℃で90分間緩やかに震盪した。反応混合液を0.4M NaCl, 0.05% NaN₃ 含有 20mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) で平衡化したスーパーデクス G-25 スーパーファインカラム (径5×高さ12cm) で素早く脱塩した。蛋白質画分を 1N NaOH で中和した後、ベンザミジン-セファローズ 6B カラム (径1.6×高さ5cm) に添加した。未吸着のウロキナーゼA鎖を 50mM NaCl, 0.05% NaN₃ 含有 50mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) で除去後、吸着したウロキナーゼB鎖を 0.4M NaCl, 0.05% NaN₃ 含有 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) でカラムから溶出した。得られたウロキナーゼB鎖は使用時まで-20℃で凍結保存した。収量, 収率はそれぞれ 10.8mg, 52% であった。

III. N末端伸長アネキシンV変異体 (アネキシンV-N6) の作製

まずアネキシンVの Cys316 のコドン Serに置換したアネキシンV変異体の cDNA (pANXVC-S) を作製した。ATG コドンの直前に NdeI 認識部位を導入し、終止コドンの直後に BamHI 認識部位を導入した。天然型アネキシンVの cDNA (pPAP-I-1.6)⁹⁾ を鋳型として、作製した二つのオリゴヌクレオチド (5' -g. gaa. ttc. cat. atg. gca. cag. gtt. ctc. aga. ggc. act. gtg-3', 5' -cgc. gga. tcc. tta. gtc. atc. ttc. tcc. gga. gag. cag-3') を用いて cDNA (pANXVC-S) を PCR 反応により増幅した。得られた cDNA を pET12a (Novagen, Madison, USA) の T7 プロモーター支配下の NdeI と BamHI のクローニング部位に挿入した。次に、Met-Ala-Cys-Asp-His-Ser をコードするオリゴヌクレオチド (5' -t. atg. gca. tgt. gac. cat. tc-3') とその相補配列 (5' -t. aga. atg. gtc. aca. tgc. ca-3') を作製した (NdeI 切断末端が両末端に出る)。両オリゴヌクレオチドをアニールし、得られた二量体をあらかじめ NdeI で消化した pANXVC-S に挿入して pANXVC-S-N6 を得た。DNA 配列分析で、本プラスミドに目的の変異が正しく挿入されていることを確認した。

温度ショック (42℃) により活性化される λ P_L プロモーターの支配下に T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を持つ pGP1-1 プラスミドで形質転換した大腸菌 K-38 をワシントン大学医学部生化学教室 (Seattle, USA) の Dominic Chung 博士より供与された。作製したプラスミド (pANXVC-S-N6) でこの大腸菌 K-38 を形質転換した。得られた形質転換体 (二種類のプラスミドを保持する) を 30℃で 2% L-ブロス, 25 μM アンピシリン, 25 μM カナマイシンを含む 50mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 3,000ml で培養した。4時間後 (OD₆₀₀=0.4), 培養フラスコを 42℃の温浴に20分浸して温度ショックを与え、さらに 37℃で 2時間培養を続けた後、菌体を回収し-20℃で凍結保存した。

融解した菌体を 10mM CaCl₂, 1mg/ml ロイペプチン, 1

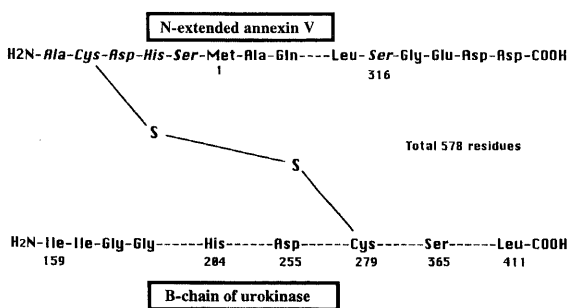


Fig. 1. The structure of the annexin V - urokinase conjugate. Selected amino acid residues are numbered according to the sequences of the native proteins. The residues in the extension and mutated in annexin V are indicated in italics.

chain urokinase-type plasminogen activator; PRP, platelet-rich plasma; PS, phosphatidyl serine; t-PA, tissue-type plasminogen activator

mg/ml ペプスタチン, 0.1mM DFP を含む 50mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) 100ml に懸濁し, 氷冷下で 5 分間超音波処理した. 溶菌液に 5 μ l の DNase (10U/ml) を加え, 室温で 10 分間処理した. 遠心により沈殿を回収し, 8M 尿素, 0.1M NH₄Cl, 10mM EDTA, 1mg/ml ペプスタチン, 1mg/ml ロイペプチン, 0.1mM DFP を含む 50mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) 70ml でアネキシン V-N6 を抽出した. 遠心により上清を回収し, 0.1mM DTT 含有 50mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) で 2 倍希釈後, 4 $^{\circ}$ C で 2 日間放置した. その後, 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) 150ml, 500ml, 2,000ml で順次透析を行った. 透析後液をジエチルアミノエチル (diethylaminoethyl, DEAE) -セファローズカラム (径 1.4 \times 高さ 18cm) に吸着させ, 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) で洗浄後, 0 から 0.5M の NaCl による直線勾配で溶出した. 各分画の抗凝固活性を測定し活性画分を回収した. 80% 飽和硫酸で活性画分を沈殿させ, 沈殿を少量の 150mM NaCl, 10mM DTT 含有 50mM 酢酸緩衝液 (pH 5.6) に溶解し, セファデクス G-75 カラム (径 2.5 \times 高さ 90cm) を用いて DTT を含まない同緩衝液でゲル濾過を行った. アネキシン V-N6 はゲル濾過上で単一ピークとして溶出され, SDS-PAGE 上で 36kDa の均一なバンドとして泳動された. 3,000ml の培養液からの最終収量は 35mg であった.

IV. アネキシン V-N6/ウロキナーゼ B 鎖複合体の作製

アネキシン V-N6 を 0.1mM DTT で 1 時間処理後, セファデクス G-25 スーパーファインカラム (径 5 \times 高さ 12cm) を用いて 50mM NaCl 含有 50mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) で脱塩した. ウロキナーゼ B 鎖の保存液を溶解後, 微量の不溶物を遠心で除去した. ウロキナーゼ B 鎖 (0.69mg) とアネキシン V-N6 (4.5mg) を 20mM ベンザミジン, mM CaCl₂, 50mM NaCl 含有 50mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) 4ml に溶解し, 緩やかに攪拌しながら 37 $^{\circ}$ C で一晩反応させた. 反応混合液をリボソームゲルカラム (径 1.6 \times 高さ 2.7cm) にかけて, 2.5mM CaCl₂, 0.5M NaCl 含有 50mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し, 2.5mM CaCl₂ を 3mM EDTA に置換した同緩衝液で溶出した. 得られた溶出画分をベンザミジン-セファローズカラム (径 1 \times 高さ 2.8cm) にかけて, 50mM NaCl 含有 50mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) で洗浄し, 20mM ベンザミジン含有の同緩衝液で溶出した. 精製した複合体の収量は 0.47mg で, 合成基質の水解活性による収率は 32% であった.

V. アネキシン V-N6/ウロキナーゼ B 鎖複合体の性状分析

1. 合成基質の水解活性

複合体, ウロキナーゼ B 鎖およびウロキナーゼの水解活性を合成基質 Glt-Gly-Arg-MCA で検討した. 各サンプルを 0.4% HSA, 50mM NaCl, 0.05% NaN₃ 含有 50mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) で 30-1,000IU/ml になるように希釈した後, 50 μ l をマイクロタイタープレートに添加し, 同緩衝液で 0.5mM 濃度に調製した基質 50 μ l と室温で 5 分間反応させた. 50% 酢酸 50 μ l で反応を止めた後, フルオロロスカン II (大日本製薬株式会社, 大阪) を用いて励起波長 355nm, 蛍光波長 460nm で測定した. また他の測定では, ウロキナーゼとウロキナーゼ B 鎖の活性を S-2444 で測定した. サンプル (3-5 μ l) に 80 μ l の 0.1M Tris 緩衝液 (pH 7.8) を加えた後, さらに 20 μ l の S-2444 (10mM) を加えて, 室温で 5 分間反応させた. 0.2M のクエン酸 1ml を添加して反応を止めた後, Thermo max microplate reader (Molecular Devices, Menlo Park, USA) を用いて 405nm の吸光度を測定し

た.

2. プラスミノゲンの活性化

複合体の水解活性を S-2251 で定量した後, 1.85nM に調製した. 100mM NaCl, 0.1% ツイーン 80 含有 50mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) 中でプラスミノゲン (終濃度; 0-30 μ M) と反応させた. プラスミンの生成速度と Michaelis-Menten の速度定数は Tait らの方法²⁹⁾により求めた.

3. 細胞膜結合能および抗凝固活性

複合体の細胞膜に対する親和性を, 保存赤血球 (5 \times 10⁶ cells/ml) を用いて, ¹²⁵I-アネキシン V (5nM) との競合反応で測定した³⁰⁾. 反応は 136mM NaCl, 2.7mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 2mM MgCl₂, 1mM NaH₂PO₄, 5mM ブドウ糖, 5mg/ml BSA 含有 10mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) 中で 37 $^{\circ}$ C, 15 分間保温して行った.

複合体の抗凝固活性はヒト胎盤由来アネキシン V を標準品として, Funakoshi らの方法¹⁰⁾を用いて凝固時間で測定した.

4. 試験管内フィブリンクロット溶解試験

Tait らの方法²⁹⁾により, ヒト多血小板血漿 (platelet-rich plasma, PRP) と ¹²⁵I-フィブリノゲンを混合して作製したフィブリンクロットを用いて測定した. 検査試料は 18.5nM に調製した. 結果は反応溶液中に遊離した放射活性の割合で示した.

5. ラット肺塞栓モデルを用いた線溶活性

Wistar 系雄性ラットから採血を行い, 1,000g で 3 分間遠心することにより PRP を調製した. 2ml の PRP に ¹²⁵I-フィブリノゲン (終濃度; 1.4mCi/ml), CaCl₂ (同; 25mM), およびトロンビン (同; 10U/ml) を加え, 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた. クロットを生食で洗浄し, ハサミで小片に刻んだ後, 液体窒素下で凍結させ, 5ml の生食を加えホモジナイザーで懸濁させた. 得られたフィブリン懸濁液をラット尾静脈より投与し, 5 分後に検査試料を同様に尾静脈より投与した. 1 時間後, 腹部大静脈より採血し, 動物を屠殺後すばやく肺を摘出し, 全放射活性を測定した. サンプル投与直前の肺中の放射活性は 145,161 \pm 3,375cpm であった. 線溶活性は以下の式より算出した.

線溶活性 (%) = 100 \times { 1 - (1 時間後の肺の放射活性/サンプル投与直前の放射活性) }

フィブリノゲンと α_2 -プラスミンインヒビター (α_2 -plasmin inhibitor, α_2 -PI) の血中濃度はフィブリノゲン測定用試薬・B (国際試薬, 神戸), テストチーム APL・2 キット (第一化学薬品, 東京) を用いて測定した.

6. 血中半減期

放射性ヨードで標識した複合体 (520ng), ウロキナーゼ (350ng), ウロキナーゼ B 鎖 (430ng) を Wistar 系雄性ラットの尾静脈から投与し, 0.1ml ずつ経時的に採血して放射活性を測定した. 投与直後の血中放射活性 (cpm/ml) は, 投与した全放射活性をラットの体重に 0.06 を乗じた値で除して算定した. 結果は各経過時での血中放射活性の残存率 (%) で示した.

7. その他の分析

SDS-PAGE は 10% あるいは 8-16% ポリアクリルアミドゲルを用いた標準的な Laemmli の方法に従った. 染色にはクマシーブルーあるいは銀染色を用いた. 蛋白質濃度はアミノ酸分析あるいは BSA を標品に用いた蛋白質測定キット (BCA) を用いた.

成 績

I. ウロキナーゼの限定還元とウロキナーゼB鎖の単離

ベンザミジンはトリプシン型セリンプロテアーゼの可逆的阻害剤で、F. XIa²⁹や血漿カリクレイン²⁰の分子内鎖間ジスルフィド結合の還元反応中に触媒活性を阻害することが報告されている。van der Graaf らの方法^{23,24}に準じて、ウロキナーゼを20mM ベンザミジンの存在下に1mM DTT 含有50mM Tris 緩衝液 (pH 8.0) で還元処理を行った。経時的に過剰量のヨード酢酸アミドを添加して還元反応を止めた。反応生成物の水解活性の測定には Glu-Gly-Arg-pNA を用いた。ベンザミジン存在下の還元反応では生成物の水解活性に変化は見られなかったが、非存在下では反応の進行とともに酵素活性が低下し、反応終了時には活性が消失した (図2)。非還元下の SDS-PAGE では、反応の進行にしたがってウロキナーゼのバンドが徐々に減少し140分後には消失したが、他方ウロキナーゼA鎖およびB鎖のバンドは増加した (図3)。ベンザミジンは還元反応中にウロキナーゼB鎖の酵素活性のみならず、その構造をも保護することが明らかとなった。それに反してウロキナーゼA鎖は一部がさらに分解を受け二つのフラグメントが観察された。

ウロキナーゼ (3.2mg) を還元し、反応液中のベンザミジンをセファデックス G25 で除去後、ウロキナーゼA鎖およびB鎖をベンザミジン-セファロースで分離した。カラムに吸着しないA鎖を洗浄操作で除去した後、吸着したB鎖を0.1%の酢酸で溶出した。単離したB鎖は SDS-PAGE で単一のバンドであった (図5のレーン4)。B鎖の収量は1.7mg で収率94%であった。B鎖のスルフィドリル基 (SH 基) を Ellman 法²⁵で定量した結果、1モルのB鎖当り SH 基は1.04モルであった。これらの結果は、上述の還元条件下での還元反応はA鎖の Cys148 とB鎖の Cys279 を結合している鎖間ジスルフィド結合に限定されて起こったこ

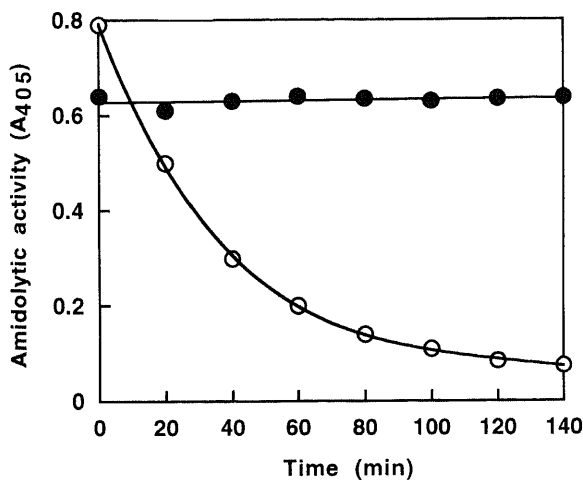


Fig. 2. Limited reduction of urokinase. Urokinase (3.2mg) was incubated at room temperature with 1mM DTT in 0.4ml of 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mM EDTA in the presence or absence of 20mM benzamidine. At desired times, the reduction was terminated by the addition of monoiodoacetamide and the amidolytic activity against S-2444 was assayed as described in Methods. Reactions with (●) and without (○) benzamidine.

とを示している。B鎖の大規模調製では方法に述べたように少し変更した方法を用いた。

II. アネキシン V-N6 の調製と性状

アネキシンVはC末端領域の316位に半シスチンを持つが²⁹、分子内部に埋もれているためジスルフィド形成に関与できないと推察された。またC末端近傍に Ca²⁺ 結合部位が存在するため複合体形成による立体障害の起る可能性が考えられた。以上の考察から、元来の316位の Cys を Ser に置換し、さらにN末端から2番目の位置に Cys を導入した6残基のペプチドをアネキシンVのN末端に付加した変異型アネキシン V-N6 の構築をめざした (図1)。この蛋白質を大腸菌を用いて大量に発現させた。アネキシン V-N6 の細胞膜結合能に着目して、菌体を超音波処理により破砕後、Ca²⁺ 存在下で不溶性の膜画分に結合させ回収した。その後、膜画分から8M尿素とEDTAによって可溶化した。抽出液を2倍希釈し尿素濃度を4Mまで急激に下げ、その後透析を数回繰り返すことにより尿素をゆっくりと除去して再構成処理を行った。得られたアネキシン V-N6 をイオン交換 (DEAE-セファロース) とゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。精製されたアネキシン V-N6 は SDS-PAGE 上で野生型のアネキシンVよりも少し遅れた位置に単一のバンドとして観察された (図5のレーン5)。N末端アミノ酸配列分析で、Ala-Cys-Asp-His-Ser-Met 配列が観測されたことから、N末端のホルミル Met 残基は菌体内で翻訳後にアミノペプチダーゼにより切断除去されたことが示された。予備検討の結果、中性あるいは弱アルカリ性領域でこの分子は二量体を形成した。このことはN末端伸長領域に導入された Cys 残基が分子表面に位置し、ジスルフィド結合を形成する可能性を示唆した。凝固時間の測定により、アネキシン V-N6 はヒト胎盤由来の野生型アネキシンVと同等の比活性を持つことがわかった。1,000ml の培養液から10mg以上のアネキシン V-N6 が得られた。

III. アネキシン V-N6/ウロキナーゼB鎖複合体の作製と単離

まずアネキシン V-N6 とウロキナーゼB鎖それぞれ単独でのホモ二量体の生成反応を検討し、アネキシン V-N6 の方がウロキナーゼB鎖よりもホモ二量体の生成速度が速いことを確認した。両構成分子を pH 7.4 の緩衝液中で別々に反応させた時、6時間後にアネキシン V-N6 の60%が、またウロキナーゼB鎖

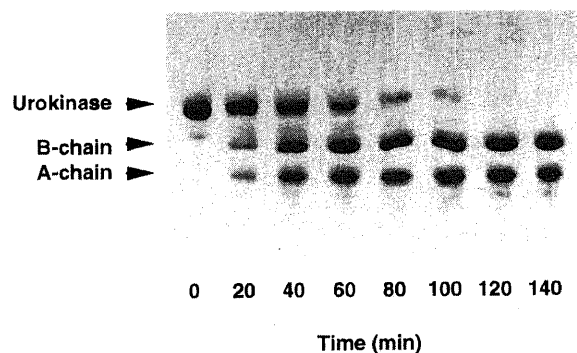


Fig. 3. SDS-PAGE pattern for the reduction of urokinase. The samples (20μl) obtained in the presence of benzamidine as above were applied to a 10% Laemmli gel under the reducing conditions. The gel was stained with Coomassie brilliant blue.

の20%がホモ二量体を生成した。したがって、ホモ二量体生成によるアネキシン V-N6 の消失を代償するために過剰量のアネキシン V-N6 (アネキシン V-N6 とウロキナーゼB鎖のモル比=15:1) を用いて複合体生成の検討を行った。両蛋白質を混合し一晚空酸化させると、SDS-PAGE 上で分子量が約 65kDa の複数のバンドが観察された。これらのバンドは複合体とそれぞれのホモ二量体から成っていた。これら三つのバンドはゲル上では明瞭に分離されなかった。この時、分子量が 65kDa 以上の高分子は見られなかったことから、先のウロキナーゼの還元反応では、ウロキナーゼのA鎖とB鎖の鎖間ジスルフィド結合だけが限定的に還元され、B鎖内の他のジスルフィド結合は還元されなかったことが示された。

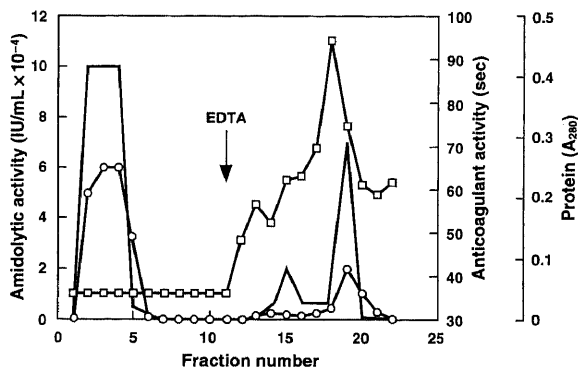


Fig. 4. Separation of the conjugate on a liposome-gel column. The conjugate prepared as described in Methods was applied to a liposome-gel column (1.6×2.7cm) that was equilibrated with 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.5M NaCl, 2.5mM CaCl₂. The conjugate was eluted with the same buffer but containing 3 mM EDTA instead of CaCl₂. The fractions from 17 to 20 were pooled and applied to a benzamidine-Sepharose column for further purification. Anticoagulant activity (□) and amidolytic activity (○) were measured as described in Methods. Protein concentration (—).

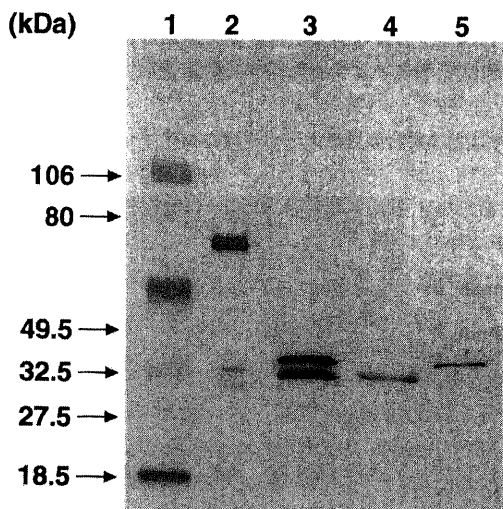


Fig. 5. SDS-PAGE pattern of the conjugate. Samples were applied to a Laemmli gradient gel (8-16%). Lane 1, molecular weight standard; lane 2, non-reduced conjugate; lane 3, reduced conjugate; lane 4, B-chain; lane 5, annexin V-N6. The bands were visualized by silver staining.

複合体を精製するために、酸化生成物を Ca²⁺ 存在下でリボソームゲルに添加し、洗浄後ゲルに吸着された蛋白質をEDTAを含む緩衝液で溶出した(図4)。溶出液には複合体とアネキシン V-N6 の単量体および、ホモ二量体が含まれることがSDS-PAGE から示された。得られた溶出液を次にベンザミジン-セファローズに添加し、ベンザミジンを含む緩衝液で溶出した。アネキシン V-N6 の単量体およびホモ二量体は非吸着画分に見られ、複合体のみがカラムに吸着され、単一なピークとして溶出された。精製された複合体は SDS-PAGE 上で分子量 69kDa の単一なバンドとして泳動され(図5のレーン2)、アネキシン V-N6 (37kDa) とウロキナーゼB鎖 (30kDa) の分子量の和と一致した。複合体を還元すると、アネキシン V-N6 とウロキナーゼB鎖に相当する二つの同じ濃さのバンドに泳動された。この電気

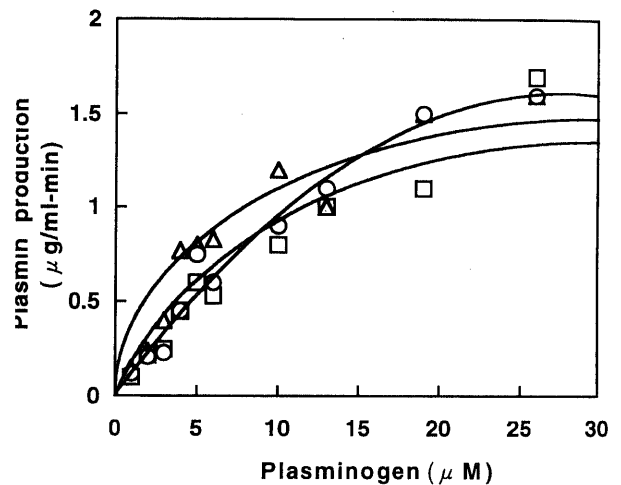


Fig. 6. Plasminogen activation by the conjugate, urokinase and B-chain. Plasminogen at the indicated concentration was added to urokinase (Δ), conjugate (○), or B-chain (□), and the rate of plasmin production was measured as described under Methods. The lines are the fitted functions used to determine the kinetic parameters.

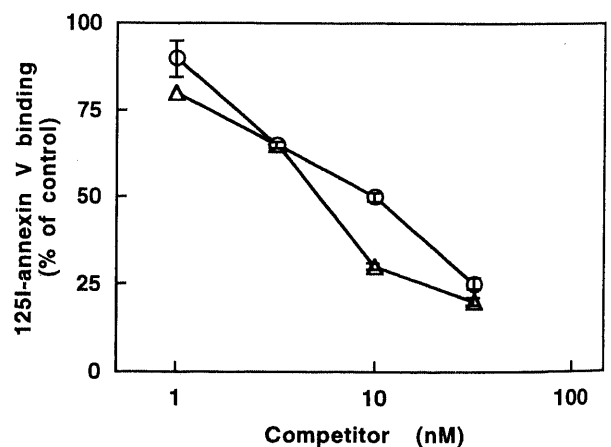


Fig. 7. Competitive binding of the conjugate and annexin V to PS-containing membranes. Conjugate (○) or annexin V (Δ) was added at the indicated concentrations and binding activity was measured as described under Methods. Error bars are given where larger than the size of symbols.

泳動図から、アネキシン V-N6 とウロキナーゼB鎖がモル比 1 : 1 でジスルフィド結合により架橋されたことが明らかとなった。複合体 (63pmol) のN末端配列分析の結果、次の二つの配列が得られた。アネキシン V-N6 に由来する Ala (30.9)-X-Asp (9.1)-His (4.0)-Ser (17.5)-Met (5.9)-Ala (25.2)-Gln (11.4) とウロキナーゼB鎖に由来する Ile (21.8)-Ile (22.6)-Gly (26.9)-Gly (28.7)-Glu (16.0)-Phe (24.0)-Thr (16.4)-Thr (17.3) であった (括弧内の値は検出されたフェニルチオヒダントイン (phenylthiohydantoin, PTH)-アミノ酸の pmol を示す)。両配列のモル比はほぼ 1 : 1 であった。アネキシン V-N6 の第二サイクルのブランク (X) はこの位置に Cys 残基の存在を示す。

IV. アネキシン V-N6/ウロキナーゼB鎖複合体の性状

1. 複合体, ウロキナーゼB鎖, ウロキナーゼの酵素活性

上述のように、還元反応中でウロキナーゼの加水分解活性は変化せず、B鎖はA鎖から離れても完全な酵素活性を保持することがわかった。Glt-Gly-Arg-MCA を用いた測定での比活性は、複合体が11.8, ウロキナーゼB鎖が11.0, ウロキナーゼが8.4 (IU/pmol) で、ウロキナーゼB鎖はアネキシン V-N6 と架橋されても完全な酵素活性を維持していることが示された。

次に複合体, ウロキナーゼB鎖, ウロキナーゼのプラスミノゲンのプラスミンへの転換活性を調べた (図6)。プラスミノゲン活性化速度は三者間で差が見られなかった。回帰曲線から算出した熱力学的パラメーターは、ウロキナーゼが $K_m=8.0 \pm 1.8\text{mM}$, $V_{max}=2.1 \pm 0.2\text{mg}/(\text{ml} \cdot \text{min})$, B鎖が $K_m=26.4 \pm 9.7\text{mM}$, $V_{max}=3.2 \pm 0.7\text{mg}/(\text{ml} \cdot \text{min})$, 複合体が $K_m=18.6 \pm 3.5\text{mM}$, $V_{max}=2.8 \pm 0.3\text{mg}/(\text{ml} \cdot \text{min})$ であった。これらの値は複合体がウロキナーゼとほぼ同様のプラスミノゲン活性化能を有することを示している。

2. リン脂質への親和性

アネキシンVのN末端領域はリン脂質への結合に関与しないことが既に報告されているので¹¹⁾, アネキシンVのN末端を伸長した変異体アネキシン V-N6 をデザインした。予期されたように、アネキシン V-N6 は野生型アネキシンVと同様のリン脂質

結合能および抗凝固活性を持っていた。細胞表面に PS が露出した細胞に対する複合体の結合能を ¹²⁵I-アネキシンVを用いた競合反応で定量した。¹²⁵I アネキシンVの結合を50%阻害する濃度は、複合体で 8nM, 野生型で 6nMとほぼ一致した値であった (図7)。これらの結果から、複合体中のアネキシン V-N6 部分のリン脂質結合能は、ウロキナーゼB鎖の付加によって影響を受けないことが示された。

3. 線溶活性と血中半減期

試験管内フィブリンクロット溶解試験の検討で、複合体は PRP から作製したフィブリンクロットを溶解した。本条件下での完全なクロット溶解は90分後に見られ、対照に用いたウロキナーゼと同等であった (図8)。次にラット肺塞栓モデルで複合体の線溶活性を、検討した。複合体とウロキナーゼの線溶活性は試験管内フィブリンクロット溶解試験では同等であったが、ラット肺塞栓溶解試験では大きな差が見られた。複合体は 25,000, 50,000IU/kg の投与量でそれぞれ47.1±3.5%, 66.1±0.5%のフィブリン塞栓の溶解が見られたが、ウロキナーゼは 100,000, 200,000IU/kg の投与量で45.2±7.2%, 77.1±1.3%の溶解であった (図9)。これらの数字は複合体の線溶活性がウロキナーゼの3倍から4倍高いことを示している。複合体投与1時間後のフィブリノゲンおよび α_2 -PI の血中レベルは変化しなかった。フィブリノゲン量は 25,000IU/kg 投与で1.40±0.04 mg/ml, 50,000IU/kg 投与で 1.33±0.02mg/ml (非投与群で 1.39±0.08mg/ml) であった。 α_2 -PI 量はそれぞれ非投与群の 103.2±2.7%, 98.4±2.8%であった。ウロキナーゼ投与群ではフィブリノゲン量の変化は観察されなかったが、 α_2 -PI量は 100,000IU/kg 投与で 87.8±5.0%, 200,000IU/kg 投与で85.9±2.4%と低下が見られた。

ラットで三種類の蛋白質の血中半減期を検討した (図10)。 α 相の半減期は複合体が2.3±0.3分, ウロキナーゼが2.0±0.4分, B鎖が1.9±0.3分, さらにアネキシンVが2.5±0.3分であった。この結果は、いずれの蛋白質も血中からの消失速度がほぼ同等

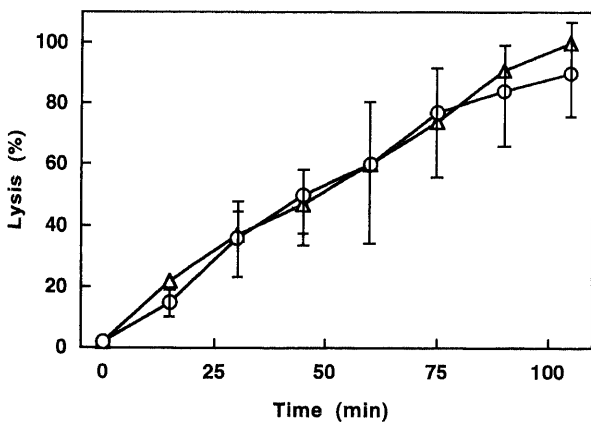


Fig. 8. *In vitro* fibrinolytic activity of the conjugate and urokinase. Lysis of a clot prepared from human PRP was determined as described under Methods. Lysis with urokinase (△) or conjugate (○), both added at 18.5nM. Lysis was minimal (<5%) in the absence of activator.

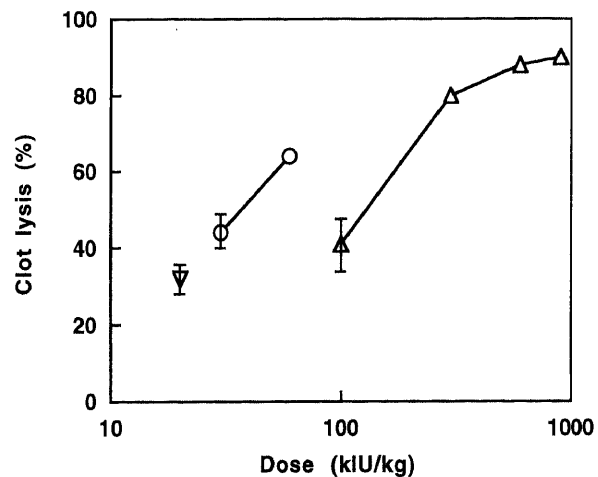


Fig. 9. *In vivo* fibrinolytic activity of the conjugate and urokinase. Lysis of a clot prepared from rat PRP was determined in a rat pulmonary embolism model as described under Methods. The results are shown as the average of five experiments, with error bars given where larger than the size of symbol. Lysis with urokinase (△), conjugate (○), or control with injection vehicle alone (▽).

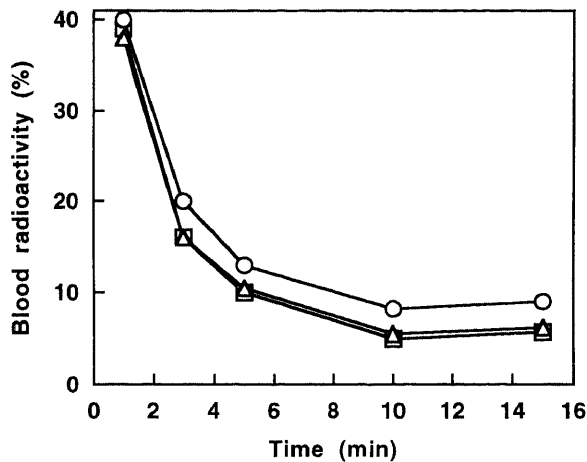


Fig.10. Plasma clearance of the conjugate, urokinase and B-chain. The radiolabeled conjugate, urokinase or B-chain was injected into the tail vein of a rat. Blood samples were drawn at the indicated times and radioactivity was measured. Results shown are mean values for three rats for each protein tested. Conjugate (○), urokinase (△), and B-chain (□).

であることを示した。

考 察

蛋白質学的に改変された線溶剤は大きく二つのタイプに分けることができる。第一のタイプは活性化血小板に対する親和性を持たせたものであり、第二のタイプはフィブリンを標的にするものである。第一のタイプは活性化血小板を主成分とする動脈血栓²⁶⁾の溶解に優れている。血小板膜糖蛋白質IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) に対する抗体にウロキナーゼを化学的に架橋した複合体はウロキナーゼ単独に比べて線溶活性が上昇した^{27,28)}。またトロンボスポンジン抗体にウロキナーゼを化学的に結合させた複合体も動物モデルで高い線溶活性を發揮した²⁹⁾。アネキシン V-N6/ウロキナーゼB鎖複合体は第一のタイプに属する新しい血栓溶解剤であり、その作用機序は複合体を構成するアネキシンVが血栓中の活性化血小板膜に特異的且つ大量に集積し、その結果血栓でのウロキナーゼ濃度が上昇してより効果的に血栓を溶解するものと考えられる。

今回ラット肺塞栓モデルの検討では複合体にウロキナーゼと比べ3倍から4倍高い線溶活性を認めた。両蛋白質の血中半減期が同じであることを考えると、この効果は複合体の効力の持続によるのではなく、先に述べたように複合体の血栓への集積性が向上したためと推察される。ラット肺塞栓溶解試験の効力の差が試験管内フィブリンクロット溶解試験に反映されなかったが、これは他の例でも認められる。BodeらはscuPAとGPIIb/IIIa抗体の複合体が動物試験では試験管内試験よりも数倍高い線溶能を發揮したと報告している²⁹⁾。ウロキナーゼ投与時に見られる全身線溶³⁰⁾が複合体投与で観察されなかったのは、本剤の血栓特異的な線溶作用を示唆しており、本複合体の安全性が期待される。

線溶剤の第二のタイプはt-PAのクリングルドメインやフィブリンに対する特異抗体によるフィブリンへの集積性を利用している。数多くの変異型t-PAが検討された中で、フィブリン親和性を有するt-PAのA鎖に酵素活性を担うscuPAのB鎖を連

結させたキメラ分子や³¹⁾、t-PAのA鎖中のフィンガードメインと上皮細胞成長因子(epidermal growth factor, EGF)ドメインを欠失させたペプチドにscuPAのB鎖を連結させたキメラ分子³²⁾、あるいはt-PAのA鎖中のクリングルドメイン1と2の連続したペプチドにscuPAのB鎖を連結させたキメラ分子³³⁾などが検討され、いずれもscuPA単独の投与に比較して高い線溶能が報告された。Cys84をSerに置換した変異型t-PA³⁴⁾などは血中半減期を延ばすことにより線溶効果の持続を期待している。フィブリン特異抗体を用いる線溶剤はHaber³⁵⁾やRunge³⁶⁾により開発され、ウサギモデルで高い線溶能が報告されている。scuPAとフィブリンDダイマーに対する抗体を化学的に結合させた複合体³⁰⁾や、scuPAのAla132-Leu411ペプチド³⁷⁾あるいは同Leu144-Leu411ペプチド³⁸⁾と抗フィブリン抗体のハイブリッド蛋白質も高い線溶活性が報告されている。

近年アネキシンV/scuPAハイブリッド蛋白質を原核細胞で発現させ、試験管内フィブリンクロット溶解試験でscuPAと同等のプラスミノゲン活性化作用を示すことが報告された²⁷⁾。さらに同じハイブリッド蛋白質を真核細胞で大量に発現させ臨床応用に適応しようとする試みもなされている。今後ヒト由来蛋白質で血栓に強い結合能を有するアネキシンVをキャリアー蛋白質とする新しい線溶剤の臨床開発が期待される³⁸⁾。

結 論

アネキシンV変異体とウロキナーゼB鎖の複合体を作製、精製し、複合体の物理化学的性状を検討した。さらにその線溶学的性状を試験管内フィブリンクロット溶解試験およびラット肺塞栓溶解試験で検討し、以下の結論を得た。

1. 野生型アネキシンVのN末端アミノ酸を6個伸長させ(Met-Ala-Cys-Asp-His-Ser)、さらにCys316をSerに置換させたアネキシンV変異体を大腸菌で発現させた。1,000mlの培養液から最終精製品の収量は約12mgであった。

2. ウロキナーゼ分子のAB鎖をつなぐジスルフィド結合を限定的に還元してウロキナーゼB鎖を得た。最終精製品収率は52%であった。

3. アネキシンV変異体とウロキナーゼB鎖をジスルフィド結合で架橋後精製し、化学量論的に両蛋白質が1:1で結合した複合体を得た。最終精製品収率は32%であった。

4. 本複合体は合成基質水解活性およびプラスミノゲン活性化作用ともにウロキナーゼと同等の活性を示した。さらに本複合体は細胞膜に対してアネキシンVと同様の結合能を示した。これらの結果から複合体を形成する両蛋白質はジスルフィド結合による架橋後もそれぞれの生理活性をほぼ100%保持していることが明らかになった。

5. 試験管内フィブリンクロット溶解試験を用いて複合体の線溶活性をウロキナーゼと比較した結果、両者で差は認められなかった。他方、ラット肺塞栓溶解試験で両者の線溶活性を比較した結果、血中半減期には差がないにもかかわらず、線溶活性は複合体の方がウロキナーゼの3倍から4倍強かった。これは複合体がラットの循環血液中でリン脂質含有血栓に対して高い親和性を發揮した結果と推察される。以上のことからアネキシンVはリン脂質含有血栓へのプラスミノゲンアクチベーターの標的化に有用であり、得られた複合体は次世代の新しい線溶剤に発展する可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師松田保教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接の御指導を賜りましたワシントン大学医学部藤川和雄教授に深謝致します。
なお本論文の内容の一部は The 10th International Conference on Methods in Protein Structure Analysis (1994, Snowbird, Utah) において発表した。

文 献

- 1) de Bono D. Therapeutic uses of thrombolytic drugs. *In* AL Bloom, CD Forbes, DP Thomas, EGD Tuddenham (eds), *Haemostasis and Thrombosis*, 3rd ed, p1459-1472, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1994
- 2) Lijnen HR, Collen D. Remaining perspectives of mutant and chimeric plasminogen activators. *Ann N Y Acad Sci* 667: 357-364, 1992
- 3) Runge MS, Bode C, Haber E, Quertermous T. Hybrid molecules: insights into plasminogen activator function. *Mol Biol Med* 8: 245-255, 1991
- 4) Walker JH, Boustead CM, Koster JJ, Bewley M, Waller DA. Annexin V, a calcium-dependent phospholipid-binding protein. *Biochem Soc Trans* 20: 828-833, 1992
- 5) Huber R, Berendes R, Burger A, Luecke H, Karshikov A. Annexin V-crystal structure and its implications on function. *Behring Inst Mitt* 107: 25, 1992
- 6) Tait JF, Gibson D, Fujikawa K. Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J Biol Chem* 264: 7944-7949, 1989
- 7) Tait JF, Gibson D. Phospholipid binding of annexin V: effects of calcium and membrane phosphatidyl serine content. *Arch Biochem Biophys* 298: 187-191, 1992
- 8) Thiagarajan P, Tait JF. Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidyl serine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *J Biol Chem* 265: 17420-17423, 1990
- 9) Funakoshi T, Hendrickson LE, McMullen BA, Fujikawa K. Primary structure of human placental anticoagulant protein. *Biochemistry* 26: 8087-8092, 1987
- 10) Funakoshi T, Heimark RL, Hendrickson LE, McMullen BA, Fujikawa K. Human placental anticoagulant protein: isolation and characterization. *Biochemistry* 26: 5572-5578, 1987
- 11) Huber R, Romisch J, Paques EP. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. *EMBO J* 9: 3867-3874, 1990
- 12) Tait JF, Cerqueira MD, Dewhurst TA, Fujikawa K, Ritchie JL, Stratton JR. Evaluation of annexin V as a platelet-directed thrombus targeting agent. *Thrombosis Res* 75: 491-501, 1994
- 13) Tait JF, Gibson D. Measurement of membrane phospholipid asymmetry in normal and sickle-cell erythrocytes by means of annexin V binding. *J Lab Clin Med* 123: 741-748, 1994
- 14) Stratton JR, Dewhurst TA, Kasina S, Reno JM, Cerqueira MD, Baskin DG, Tait JF. Selective uptake of radiolabeled annexin V on acute porcine left atrial thrombi. *Circulation* 92: 3113-3121, 1995
- 15) Ichinose A, Fujikawa K, Suyama T. The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. *J Biol Chem* 261: 3486-3489, 1986
- 16) Nielsen LS, Hansen, JG, Skriver L, Wilson EL, Kaltoft K, Zeuthen J, Dano K. Purification of zymogen to plasminogen activator from human glioblastoma cells by affinity chromatography with monoclonal antibody. *Biochemistry* 21: 6410-6415, 1982
- 17) Gunzler WA, Steffens GJ, Otting F, Kim SM, Frankus E, Floh'e L. The primary structure of high molecular mass urokinase from human urine. The complete amino acid sequence of the A chain. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 363: 1155-1165, 1982
- 18) Gunzler WA, Steffens GJ, Otting F, Buse G, Floh'e L. Structural relationship between human high and low molecular mass urokinase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 363: 133-141, 1982
- 19) Summari L, Arzadon L, Bernabe P, Robbins KC. The activation of plasminogen to plasmin by urokinase in the presence of the plasmin inhibitor trasylol. *J Biol Chem* 250: 3988-3995, 1975
- 20) Kasai S, Arimura H, Nishida M, Suyama T. Proteolytic cleavage of single-chain pro-urokinase induces conformational change which follows activation of the zymogen and reduction of its high affinity for fibrin. *J Biol Chem* 260: 12377-12381, 1985
- 21) Meers P, Hong K, Papahadjopoulos D. Synexin-like proteins from human polymorphonuclear leukocytes. Identification and characterization of granule-aggregating and membrane-fusing activities. *J Biol Chem* 262: 7850-7858, 1987
- 22) Tait JF, Engelhardt S, Smith C, Fujikawa K. Prourokinase-annexin V chimeras. Construction, expression, and characterization of recombinant proteins. *J Biol Chem* 270: 21594-21599, 1995
- 23) van der Graaf F, Greengard JS, Bouma BN, Kerbiriou DM, Griffin JH. Isolation and functional characterization of the active light chain of activated human blood coagulation factor XI. *J Biol Chem* 258: 9669-9675, 1983
- 24) van der Graaf F, Tans G, Bouma BN, Griffin JH. Isolation and functional properties of the heavy and light chains of human plasma kallikrein. *J Biol Chem* 257: 14300-14305, 1982
- 25) Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77, 1959
- 26) Cahill MR, Newland AC. Platelet activation in coronary artery disease. *Br J Biomed Sci* 50:221-234, 1993
- 27) Bode C, Meinhardt G, Runge MS, Freitag M, Nordt T, Arens M, Newell JB, Kubler W, Haber E. Platelet-targeted fibrinolysis enhances clot lysis and inhibits platelet aggregation. *Circulation* 84: 805-813, 1991
- 28) Dewerchin M, Lijnen HR, Strassen JM, De Cock F, Quertermous T, Ginsberg MH, Plow ER, Collen D. Effect of chemical conjugation of recombinant single-chain urokinase-type plasminogen activator with monoclonal antiplatelet antibodies on platelet aggregation and on plasma clot lysis in vitro and in vivo.

Blood 78: 1005-1018, 1991

29) Bode C, Runge MS, Schonermar S, Eberle T, Newell JB, Kubler W, Haber E. Conjugation to antifibrin Fab' enhances fibrinolytic potency of single-chain urokinase plasminogen activator. *Circulation* 81:1974-1980, 1990

30) Gurewich V, Pannell R, Louis S, Kelley P, Suddith RL. Effective and fibrin-specific clot lysis by a zymogen precursor form of urokinase (pro-urokinase). A study in vitro and in two animal species. *J Clin Invest* 73: 1731-1739, 1984

31) Collen D, Lu HR, Lijnen HR, Nelles L, Stassen JM. Thrombolytic and pharmacokinetic properties of chimeric tissue-type and urokinase-type plasminogen activators. *Circulation* 84:1216-1234, 1991

32) Lu HR, Wu Z, Pquwels P, Lijnen HR, Collen D. Comparative thrombolytic properties of tissue-type plasminogen activator (t-PA), single-chain urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and K1K2Pu (a t-PA/u-PA chimera) in a combined arterial and venous thrombosis model in the dog. *J Am Coll Cardiol* 19: 1350-1359, 1992

33) Suzuki S, Saito M, Suzuki N, Kato H, Nagaoka N, Yoshitake S, Yui Y, Kawai C. Intracoronary infusion of E6010 has more potent thrombolytic activity than tissue plasminogen activator (t-PA) in dogs: a higher plasma level of E6010 than t-PA causes

potent thrombolytic activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 22: 834-840, 1993

34) Haber E, Quertermous T, Matsueda GR, Runge MS. Innovative approaches to plasminogen activator therapy. *Science* 243: 51-56, 1989

35) Runge MS, Bode C, Matsueda GR, Haber E. Antibody-enhanced thrombolysis: targeting of tissue plasminogen activator in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 84: 7659-7662, 1987

36) Dewerchin M, Lijnen HR, van Hoef B, De Cock F, Collen D. Biochemical properties of conjugates of urokinase-type plasminogen activator with a monoclonal antibody specific for cross-linked fibrin. *Eur J Biochem* 185: 141-149, 1989

37) Holvoet P, Laroche Y, Lijnen HR, van Cauwenberge R, Demarsin E, Brouwers E, Matthyssens G, Collen D. Characterization of a chimeric plasminogen activator consisting of a single-chain Fv fragment derived from a fibrin fragment D-dimer-specific antibody and a truncated single-chain urokinase. *J Biol Chem* 266: 19717-19724, 1991

38) Tanaka K, Einaga K, Tsuchiyama H, Tait JF, Fujikawa K. Preparation and characterization of a disulfide-linked bioconjugate of annexin V with the B-chain of urokinase: An improved fibrinolytic agent targeted to phospholipid-containing thrombi. *Biochemistry* 35: 922-929, 1996

The Study of an Improved Fibrinolytic Agent connected to Annexin V: Preparation and Characterization of a Disulfide-Linked Bioconjugate of Annexin V with the B-Chain of Urokinase Kenji Tanaka, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **105**, 684—692 (1996)

Key words fibrinolysis, annexin V, urokinase, phosphatidyl serine

Abstract

A conjugate of annexin V and the B-chain of urokinase was prepared and its fibrinolytic properties were studied. First, a mutant of annexin V was constructed carrying an N-terminal extension of six amino acids (Met-Ala-Cys-Asp-His-Ser) and Cys316 mutated to Ser, and expressed in *E. coli* cells. The urokinase B-chain was prepared by limited reduction of the inter-chain disulfide bond between the A- and B-chains of urokinase. The mutated annexin V and the urokinase B-chain were then connected by a disulfide bond and purified to yield a 1:1 stoichiometric conjugate. The conjugate exhibited the same catalytic activity as urokinase in the amidolysis of a synthetic substrate and in the activation of plasminogen. The conjugate showed the same binding affinity for phosphatidyl serine-containing membranes as annexin V. The *in vitro* fibrinolytic activity of the conjugate on clots prepared from platelet-rich plasma was comparable to that of urokinase. However, the conjugate showed an *in vivo* thrombolytic activity 3 to 4 fold stronger than urokinase in a rat pulmonary embolism model, while having essentially the same plasma clearance rate as urokinase or B-chain. These results indicated that annexin V was a useful agent for targeting plasminogen activators to phospholipid-containing thrombi.