◆原 著◆

白血球プロテアーゼおよびその放出におよぼす poly-L-lysine の影響

永松陽子^{*1}, 山本順一郎^{*1}, 浅田圭一^{*2}, 岡田芳男^{*2}

Effects of Poly-L-lysine on Activities of Leukocyte Proteinases and on Release of Proteinases from Leukocytes

Yoko NAGAMATSU^{*1}, Junichiro YAMAMOTO^{*1}, Keiichi ASADA^{*2}
and Yoshio OKADA^{*2}

Key words: polycation, poly-L-lysine, leukocyte elastase, cathepsin G, fibrinolysis

Recently, polycations have been reported to activate the erythrocyte multicatalytic proteinase and release lactate dehydrogenase from endothelial cells. Furthermore, polycations seem to affect vascular permeability and prostaglandin synthesis in cultured glomerular mesangial cells. We previously reported the application of poly-L-lysine for the purification of leukocyte cathepsin G (CLP) by affinity chromatography and the effect of polycations on the amidolytic activities of leukocyte elastase (ELP) and CLP.

In this study, we also found that at a low concentration, poly-L-lysine stimulated the release of ELP and CLP from leukocytes.

1) At a concentration of 1.5 μ M, poly-L-lysine (mw. 290,000) stimulated the release of ELP and CLP from separated leukocytes in the same extent as 2 M NaCl.

2) Poly-L-lysine (mw. 290,000) stimulated the release of CLP and ELP from leukocytes in diluted blood at a concentration of 5 and 10 nM, respectively. On the other hand, a several times higher concentration of poly-L-lysine was required for release of both enzymes from leukocytes in non-diluted blood.

3) In proportion to molecular weight, poly-L-lysine enhanced amidolytic activities of ELP and CLP and the fibrinolytic activity of ELP. Thus, poly-L-lysine enhanced the activity of ELP at a lower concentration than activity of CLP.

結 言

ポリカチオンを血管内皮細胞や糸球体メサン

ギウム細胞に作用させると血管の透過性が増し、プロスタサイクリン生成が誘導される¹⁾²⁾³⁾。また、ポリカチオンが赤血球多機能プロテアー

^{*1} 神戸学院大学栄養学部生理学研究室:〔〒 651-21 神戸市西区伊川谷町有瀬神戸学院大学〕: Laboratory of Physiology, Faculty of Nutrition, Kobe-Gakuin University, Ikawadani, Nishi-ku, Kobe 651-21, Japan.

^{*2} 同 薬学部薬品化学研究室 (Laboratory of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe-Gakuin University, Ikawadani, Nishi-ku 651-21, Japan.) 受付: 1993. 3. 4, 受理: 1993. 5. 31.

Fig. 1 Synthetic scheme for Boc-[Lys(Z)]₅-N₂H₃.

ゼのカゼイン分解活性を増強することも報告されている⁴⁾。

われわれは、プロテアーゼ活性に対するポリカチオンの活性増強作用が特異的であるか否かに興味をもち、白血球プロテアーゼ活性への影響について検討した。その結果、ポリカチオンが白血球エラスターゼおよびカテプシン G の合成基質分解活性を増大させるが、他のセリンプロテアーゼ活性に対しては同様の作用を示さないこと⁵⁾、また、ポリ-L-リジン (mw. 290,000) を溶出剤として用いることにより、アフィニティーセファロース (Suc-L-Tyr-D-Leu-D-Val-pNA-sepharose) に吸着したカテプシン G を一段階で速やかに精製できることを報告した⁵⁾。

本研究は、ポリカチオンが白血球よりエラスターゼやカテプシン G の放出を促進するか否かを検討すること、また、われわれの研究室で合成された低分子量ポリ-L-リジンと高分子量ポリ-L-リジンの作用を比較することを目的として企図された。

材料および方法

1. 材料

ポリ-L-リジンの両酵素活性におよぼす影響を調べるため、エラスターゼ (ELP) およびカテプシン G (CLP) が精製された。精製は、アフィニティーセファロースを用いて既報にしたがって行った⁶⁾⁷⁾。白血球は健康成人より採血し

た血液より分離した⁸⁾。血液はすべて健康成人より採血したものを使用した。

糜エラスターゼ、 α -キモトリプシンは Sigma 社 (Type III および Type II)、プラスミンは KABI 社、トロンビン (牛トロンビン) は持田製薬のものを使用し、それぞれの合成基質分解活性測定には Suc-Ala₃-pNA (ペプチド研)、Suc-Ile-Pro-Phe-pNA⁹⁾、s-2251, s-2238 (KABI) を使用した。アミノ酸はナカライテスク (京都) のものを使用した。

ポリ-L-リジンは Sigma 社 (St. Louis, USA) と、一部当研究室で合成したものを 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5:CLP, pH 8.0:ELP) に溶解して使用した。Lys (5), Lys (10), Lys (15) は以下の方法で合成された。

2. 酵素活性の測定

CLP および ELP の合成基質分解活性は、おののくに特異的な合成基質、Suc-Ile-Pro-Phe-pNA および Suc-Ala-Tyr-Leu-Val-pNA⁹⁾¹⁰⁾ を用いて 37°C で 5 分間に放出されてくる pNA 量を 410 nm で測定して求めた。その他の酵素についても同様に測定した。合成基質の終濃度は 0.5 mM であった。

フィブリン分解活性は、lysine-sepharose によりプラスミノゲンを除去したフィブリノーゲン (Poiet 社、牛フィブリノーゲン) と牛トロンビンにより作成したフィブリン平板¹¹⁾に酵素液とポリ-L-リジンまたはアミノ酸の等量混液を 0.03 ml 滴下し、37°C, 24 時間インキュベ

Fig. 2 Effect of the concentration of poly-L-lysine (mw. 290,000) on amidolysis by CLP (○—○) and ELP (●—●). Amidolytic activities of CLP and ELP were measured using Suc-Ile-Pro-Phe-pNA and Suc-Ala-Tyr-Leu-Val-pNA, respectively.

Table 1 Effects of lysine chain length for amidolytic activity of CLP

	Final con. (μg/ml) of poly-L-lysine			
	400	40	4	0.4
Control	100%	100%	100%	100%
Lys(5)	130	130	115	—
Lys(10)	150	130	115	—
Lys(15)	160	130	115	—
Lys(mw. 3800)	175	135	115	—
Lys(20)	185	150	115	—
Lys(mw. 10,200)	200	175	150	—
Lys(mw. 26,600)	200	200	180	—
Lys(mw. 290,000)	200	200	185	110

Numbers in parentheses indicate lysine chain length.

ートした後, 溶解面積を測定して求めた。

3. Lys (5), Lys (10), Lys (15) の合成

H-Lys(Z)-OBzl¹²⁾と Boc-Lys(Z)-ONp¹³⁾を用いて, 図 1に示すような経路で Boc-[Lys(Z)]₅-OBzl を合成した。この化合物の Boc 基をトリフルオロ酢酸で除去した後, 化合物 Boc-[Lys(Z)]₅-N₂H₃とアジド法にて縮合し, Boc-[Lys(Z)]₁₀-OBzlを得た。同様にこの化合物の Boc 基を除去し, Boc-[Lys(Z)]₅-N₂H₃と縮合し Boc-[Lys(Z)]₁₅-OBzlを得た。これらを接

触還元に付し, すべての保護基を除去し, 酢酸塩として H-(Lys)₅-OH, H-(Lys)₁₀-OH, H-(Lys)₁₅-OHを得た。

結 果

種々のポリカチオンが CLP および ELP の合成基質分解活性を増大させることは既に報告した⁵⁾。図 2は, 分子量 290,000 のポリ-L-リジンを用いて, CLP および ELP 活性に影響をおよぼす濃度の限界を調べた。CLP と ELP の反応液中の終濃度は 4 nM であった。ポリ-L-リジンは CLP に対しては 1 nM (0.27 μg/ml) 以上で活性増強作用を示すのに対し, 一方, ELP に対しては 0.2 nM (0.056 μg/ml) においても作用を示した。すなわち反応液中の酵素濃度より低い濃度で, ポリ-L-リジンは ELP, CLP の分子構造に影響を及ぼした。

Table 1 は, 低分子量のポリ-L-リジンを合成し, その CLP 活性に対する作用を高分子量ポリ-L-リジンと比較したものである。ポリ-L-リジンを含まない 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中での CLP 活性を 100 とした時ののおのの相対値を Table 1 に示した。低分子量のポリ-L-リジンでは, 反応液中の終濃度が高

Table 2 Effects of lysine chain length for amidolytic activity of ELP

	Final con.($\mu\text{g/ml}$) of poly-L-lysine				
	400	40	4	0.4	0.04
Control	100%	100%	100%	100%	100%
Lys(5)	180	170	165	150	—
Lys(10)	240	210	190	170	—
Lys(15)	250	215	190	165	—
Lys(mw. 3800)	285	240	195	160	—
Lys(20)	270	235	215	170	—
Lys(mw. 10,200)	360	340	280	210	—
Lys(mw. 26,600)	370	345	290	230	—
Lys(mw. 290,000)	390	375	315	250	120

Numbers in parentheses indicate lysine chain length.

Table 3 Effects of amino acid and poly-L-lysine for fibrinolytic activity of ELP

	fibrinolytic activity (mm^2)
Control	170 $\pm$ 27
arginine	146 $\pm$ 29
arginine-HCl	138 $\pm$ 15
Isoleucin	142 $\pm$ 21
Alanine	165 $\pm$ 35
Asparagine	137 $\pm$ 30
lysine-HCl	139 $\pm$ 28
Poly-L-lysine(5)	240 $\pm$ 26
Poly-L-lysine(10)	284 $\pm$ 30
Poly-L-lysine(3800)	290 $\pm$ 25
Poly-L-lysine(290,000)	330 $\pm$ 32
Poly-D-lysine(290,000)	324 $\pm$ 22
NaCl (2 M)	263 $\pm$ 48

The final concentration of amino acid (L form) and poly-L-lysine in ELP solution was 120 $\mu\text{g/ml}$. mean $\pm$ SD (n=6).

い時, CLP 活性増強作用はリジン鎖の長さに比例した。しかし, L-リジンや L-アルギニンにおいては 3 mM の終濃度を用いても, CLP 活性に影響しなかった。一方, 分子量 290,000 のポリ-L-リジンは, 4 $\mu\text{g/ml}$ (15 nM) の終濃度で CLP 活性増強作用を示した。

Table 2 は, 種々のポリ-L-リジンを pH 8.0 のトリス塩酸緩衝液に溶解して, **Table 1** と同様に ELP 活性増強作用について測定した結果である。分子量の大きいポリ-L-リジンは CLP (**Table 1**) よりも ELP に対して, より低い終濃度, 0.4 $\mu\text{g/ml}$ (1.5 nM) で, 活性増強作用を示した。

Table 4 Effects of poly-L-lysine for release of proteinases from separated leukocytes

Extracts	ELP	CLP
Tris buffer (0.1 M, pH 8.0)	<5%	<5%
2 M NaCl	60	80
Poly-L-lysine	80	100
Freezing & thawing in 2 M NaCl	100	100

Poly-L-lysine and NaCl were dissolved in Tris buffer (0.1 M, pH 8.0). Final concentration of poly-L-lysine (mw. 290,000) was 400 $\mu\text{g/ml}$ (1.5 μM).

このようなポリ-L-リジンの CLP や ELP の合成基質分解に対する活性増強作用は, 高濃度の塩類溶液が両酵素活性におよぼす効果と一致している。そこで, 塩濃度に影響される ELP のフィブリン分解活性に対しても, ポリ-L-リジンが増強作用を示すか否か検討した (**Table 3**)。ポリ-L-リジンは, その分子量に比例して, 2 M NaCl と同様, ELP のフィブリン分解活性を増強した。L-リジンあるいは他のアミノ酸は ELP フィブリン分解活性に影響しなかった。一方, CLP はフィブリンを分解しない。そこで, CLP のカゼイン分解におよぼすポリ-L-リジンの影響を調べたが, 増強作用は認められなかった。

現在, 分離した白血球から ELP と CLP を抽出するためには, 高濃度塩類溶液の使用と凍結融解操作を行っている¹⁴⁾。Table 4 は低濃度のポリ-L-リジン溶液によって白血球から放出

されてくる両酵素の活性を, 凍結融解 (10 回) を繰り返した時放出されてくる活性 (100%) と比較したものである。ポリ-L-リジンの低い濃度にもかかわらず, 2 M NaCl 溶液と同等以上の結果を示した。反応時間は 30 分であった。なお, 合成基質分解活性測定に際しては, 白血球浮遊液に加えられたポリ-L-リジンと 2 M NaCl, あるいはいずれかを添加することにより, 同一条件で活性の比較を行った。

次に, 採血直後のクエン酸血およびその 10 倍希釈クエン酸血を用いて, **Table 5** の実験を行った。分離した白血球浮遊液を用いた **Table 4** の実験と同様に, 赤血球, 血小板, 血漿インヒビターなどの存在下でも, 白血球がポリ-L-リジンの作用を受けるか否かを検討した。血液中には両酵素に対するインヒビターが多量存在し, その大半は α_1 -AT またはキモトリプシンインヒビターと, また一部は α_2 -マクログロブリンと結合しているので, **Table 5** では既知の方法¹⁵⁾により, α_2 -マクログロブリンと結合した両酵素活性を測定した (37°C, 24 時間)。また, **Table 4** と同様にポリ-L-リジンを添加し, 同一条件下で合成基質分解活性を比較したが, 血漿存在下での本実験においては, 両酵素活性はポリ-L-リジンの影響を受けなかった。

Table 5 の結果は, ポリ-L-リジンの影響が希釈血液において, より大きいことを示す。また, ELP より CLP に対して強い作用を示し, ポリ-L-リジン (20~100 nM) により白血球から放出されてくる CLP 量は, 血清中 (Thrombin 付加) に, あるいは 1 M NaCl により放出されてくる CLP 量の数倍であった。

考 察

白血球中性プロテアーゼである CLP および ELP の基質分解活性が, 高濃度の塩の存在下で亢進することは, すでに知られている⁸⁾¹⁰⁾。このことは, 他のセリンプロテアーゼと異なり, 両酵素の特徴でもある。

また, 本実験結果は, 両酵素の基質分解活性がポリカチオンによって亢進することを明らかにした前の報告⁵⁾に加え, 低分子量のポリ-L-リジンや, 酵素濃度と等しい濃度の高分子量ポリ

Table 5 Comparative amidolytic activities of leukocyte proteinases released by various concentrations of poly-L-lysine

Final conc. of poly-L-lysine	Diluted blood*		Non-diluted blood	
	ELP	CLP	ELP	CLP
0 nM	100%	100%	100%	100%
5	100	250	—	—
10	120	550	100	130
20	150	750	100	170
100	140	600	150	300
500	100	250	150	450
1000	100	250	100	450
Thrombin (10 u)	110	140	120	160
NaCl (1 M)	100	200	—	—

* Blood was diluted with various concentrations of poly-L-lysine (mw. 290,000) dissolved in Tris buffer (0.1 M, pH 8.0) containing 0.15 M NaCl.

-L-リジンが, 両酵素の基質に対するアフィニティを増大することを示した。さらに, ポリ-L-リジンは ELP のフィブリン分解活性をも亢進した。フィブリン分解活性増強作用は, Lys (5) にも認められ, ポリ-D-リジン (mw. 290,000) もその L-体と同様の作用を示した。

他のセリンプロテアーゼである糜エラスターゼ, α -キモトリプシン, プラスミン, トロンビンの合成基質分解活性および糜エラスターゼ, プラスミンのフィブリン分解活性に対して, 結果には示さなかったが, 種々のポリ-L-リジンは影響しなかった。高濃度の塩の存在下で, プラスミンのフィブリン分解活性が亢進するにもかかわらず, ポリ-L-リジンにより影響されないこと, また ELP, CLP の活性亢進が, それらの酵素濃度と同程度のポリ-L-リジンの存在下で認められることは, 両酵素とポリカチオンの特異的な結合を示唆する。ポリカチオンのプラスチャージが, プロテアーゼのマイナスチャージと結合する化学反応の結果としても, ELP および CLP の活性部位は基質とのアフィニティを増し, かつ立体障害を起こしていない。なぜなら, フィブリンのような大分子量の基質分解に対しても, ポリ-L-リジンは ELP の活性を増強した。合成基質やフィブリンと酵素が結合する部位ではない他の部位にポリ-L-リジンが結合し, 活性部位に影響するという本実験結果が, 他のセリンプロテアーゼでは認められな

い特異性を示すことは、生体内においても、同様な現象を示す可能性が示唆される。なお、ポリ-L-リジン (mw. 290,000) 存在下で ELP, CLP 活性はトリス塩酸緩衝液, あるいは 2 M NaCl を含むトリス塩酸緩衝液中よりも安定であった。

ポリ-L-リジン (mw. 290,000) が血管内皮細胞や赤血球膜に作用することを考慮すれば、白血球膜に作用する可能性は大きい。本実験においてもポリ-L-リジンは低い濃度で速やかに ELP, CLP を放出してくる。しかし、低分子量のポリ-L-リジンではその作用は弱く、ELP, CLP 放出のために要する時間と濃度について、今後さらに検討する予定である。一方、分離していない血液中の白血球にポリ-L-リジンを作作用させると、血液の状態によって異なる結果が得られた。Table 5 に示すように、希釈血液ではポリ-L-リジンはより低い濃度で放出効果を示した。この結果は、共存する他の血球がポリ-L-リジンと結合することによりポリ-L-リジンの白血球への結合を妨げていることを示唆している。

ある種の炎症局所では、好中球とともに好酸球が動員される。好酸球には好酸球カチオンックプロテイン (eosinophil cationic protein, ECP) が含まれており、放出された ECP は細胞傷害を引き起こす¹⁶⁾¹⁷⁾。近年、ECP はラジオイムノアッセイで容易に測定されるようになっているが¹⁸⁾¹⁹⁾、病態における好酸球の役割は明らかにされていない。われわれは好酸球より放出される ECP が、白血球に作用し、ポリ-L-リジンと同様、ELP, CLP の放出に関与しているか否か、検討する方法と疾患について考慮中である。

血管内皮細胞や赤血球で報告されているポリカチオンの細胞膜や酵素活性への作用が、白血球および ELP 活性, CLP 活性に対しても同様に認められ、また、これらの結果を酵素の抽出および精製に利用できることを前の報告⁵⁾で明らかにしたが、ポリ-L-リジンの使用を一層容易にするため、低分子ポリ-L-リジンを合成した。その結果、Lys (5) にいたるまで活性増強作用を認めたが、白血球膜に対する作用に関し

ては合成物質の量的な問題があり、低い濃度においての検討では、十分な結果が得られなかった。さらに検討を重ねる予定である。

文 献

- 1) Needham, L., Hellewell, P.G., Williams, T.J., Gordon, J.L.: Endothelial functional responses and increased vascular permeability induced by polycations. *Lab. Invest.*, **59**: 538-548, 1988.
- 2) Alabi, N.: Effect of polycations on prostaglandin synthesis in cultured glomerular mesangial cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1042**: 221-226, 1990.
- 3) Vehaskari, V.M., Chang, C.T.C., Stevens, J.K., Robson, A.M.: The effects of polycations on vascular permeability in the rat. A proposed role for charge sites. *J. Clin. Invest.*, **73**: 1053-1061, 1984.
- 4) Mellgren, R.L.: Interaction of human erythrocyte multicatalytic proteinase with polycations. *Biochim. Biophys. Acta*, **1040**: 28-34, 1990.
- 5) Nagamatsu, Y., Yamamoto, J., Kanamoto, A., Tsuda, Y., Okada, Y.: Application of poly-L-lysine to purification of leukocyte cathepsin G by affinity chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**: 1634-1636, 1992.
- 6) Okada, Y., Tsuda, Y., Nagamatsu, Y., Okamoto, U.: Convenient purification of human spleen fibrinolytic proteinase (SFP) and human leukocyte elastase by affinity chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**: 1528-1530, 1982.
- 7) 永松陽子, 岡本歌子, 雨宮武彦, 白川雅秀, 中田美智子: 少量血液で可能な白血球エラスターゼ測定法とヒト白血球エラスターゼ活性. *医学のあゆみ*, **123**: 268-270, 1982.
- 8) Nagamatsu, Y., Okamoto, U., Tsuda, Y., Okada, Y.: Human leukocyte elastase-like proteinase purified by affinity chromatography with Suc-L-Tyr-D-Leu-D-Val-pNA, and its identification with human spleen fibrinolytic proteinase. *Thromb. Haemostas.*, **51**: 243-247, 1984.
- 9) 永松陽子, 岡本歌子, 岡田芳男, 津田裕子: ヒト脾のセリン・プロテアーゼに対する -Val-pNA 型新規合成基質について. *血液と脈管*, **13**: 382-385, 1982.
- 10) 永松陽子, 仲矢由起子, 岡本歌子, 津田裕子, 岡田芳男: 人白血球カテプシン G およびその α_2 -マクログ

- ロブリン複合体の酵素学的研究. 血液と脈管, **18**: 257-260, 1987.
- 11) 永松陽子: ヒト脾から抽出されるフィブリン分解作用を持つ因子の部分純化, ならびに若干の性質について. 日本生理誌, **40**: 463-471, 1978.
- 12) Abe, O., Takiguchi, H., Makisumi, S., Izumiya, N.: Synthesis of cyclo-diglycyl-L-lysyl-diglycyl-L-lysyl and hydrolysis by trypsin. Bull. Chem. Soc. Japan, **40**: 1945-1951, 1967.
- 13) Wunsch, E., Zwick, A.: Zur Synthese des Glucagons, IV Darstellung der Sequenz 12-13. Chem. Ber., **97**: 3305-3311, 1964.
- 14) 永松陽子, 坪井諭志, 中林和則, 津田裕子, 岡田芳男, 山本順一郎: アフィニティーカラムによる白血球カテプシン G の部分純化と合成阻害物質について. 血栓止血誌, **1**: 203-211, 1990.
- 15) 永松陽子, 山本順一郎, 石崎誠司, 堀江 登, 岡本歌子, 飯泉久子, 津田裕子, 岡田芳男: 白血球エラスターゼおよびカテプシン G の血漿, 血清, 白血球濃度. 血液と脈管, **20**: 13-21, 1989.
- 16) Frigas, E., Gleich, G.J.: The eosinophil and the pathophysiology of asthma. **77**: 527-537, 1986.
- 17) Young, J.D.-E., Peterson, C.G.B., Venge, P. Cohn, Z.A.: Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. Nature, **321**: 613-616, 1986.
- 18) Venge, P., Roxin, L.-E., Olsson, I.: Radioimmunoassay of human eosinophil cationic protein. British J. Haematol., **37**: 331-335, 1977.
- 19) 栗原和幸, 山田 節, 斎藤博久, 飯倉洋治: 血液中の Eosinophil cationic protein (ECP) 測定に関する基礎的条件の検討. **41**: 512-518, 1992.
-