白血球による tuftsin 分解機構

長岡 功・山下辰久*

Mechanism of tuftsin inactivation by polymorphonuclear neutrophils The subcellular localization of the tuftsin-inactivating activity was studied using guinea pig polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and the following results were obtained. Tuftsin-inactivating activity was present in the membrane fraction. When PMNs were modified chemically by a poorly permeant reagent, diazotized sulfanilic acid (DSA), to inhibit ecto-enzymes selectively, PMNs lost the tuftsin-inactivating activity, suggesting that the tuftsin-inactivating activity is localized on the cell surface as an ecto-enzyme. When PMNs were modified by DSA at different concentrations, the degree of inhibition by DSA of the tuftsin-inactivating activity was proportional to the degree of inhibition of the activity of leucine aminopeptidase (LAP), an ecto-enzyme. These results suggest the possibility that LAP may be identical with the tuftsin-inactivating enzyme or at least may act as one of the tuftsin-inactivating enzymes.

Isao Nagaoka・Tatsuhisa Yamashita

Laboratory of Physiological Chemistry, School of Medicine Juntendo University

白血球の食作用を促進する tuftsin (Thr-Lys-Pro-Arg) は、炎症応答の mediator として重要であり、好中球の細胞膜に存在するロイコキナーゼによりロイコキニンから産生される一方、好中球との接触によりその効果が消失することが知られている^{1,2)}。また、tuftsin がロイシンアミノペプチダーゼ (LAP)、プロナーゼ、カルボキシペプチダーゼにより分解されることも報告されている²⁾。しかし白血球における tuftsin の不活化機構についての報告はほとんどない。

最近、われわれは、LAP がモルモット、ヒト、ウサギの好中球にその活性中心を細胞表面に露出した ecto-enzyme として細胞膜に存在することを見出した³⁾。そこで、tuftsin 不活化酵素の細胞内局在性をモルモット腹腔浸出好中球を用いて調べるとともに、tuftsin 不活化酵素と LAP との関連性を検討したところ、ecto-enzyme である LAP が tuftsin を不活化し、食作用の調節を行う可能性があるという知見を得た。

材料と方法

(1) 白血球

モルモット腹腔にグリコーゲン溶液を注射し、得られた浸出液より好中球を調製した⁴⁾。

(2) 食作用

Fridkin らの方法⁵⁾に従い、白血球モノレイヤーを用いた、オプソニン化したチモザンと tuftsin 存在下で 37°C・45 分間 インキュベーションしたモノレイヤーをライト・ギムザ染色し、鏡顕してチモザン顆粒を一つ以

上含む白血球の百分率を求めた。tuftsin の食作用促進効果は、phagocytic index としてあらわした (図 1)。

(3) 細胞成分画分

Cohn & Hirsch の方法⁶⁾により顆粒、細胞質、膜画分を調製した。

(4) 白血球の化学修飾

10⁷/ml の好中球をスルファニル酸のジアゾニウム塩 (DSA)³⁾と 37°C・5 分間反応させ、白血球を洗った後 phosphate buffered saline に懸濁した。白血球懸濁液の一部は sonication した後、酵素の測定に用いた。

(5) 酵素活性

leucine aminopeptidase (LAP)、5'-nucleotidase, lactate dehydrogenase (LDH) は以前に報告した方法³⁾で測定した。

結果と考察

(1) tuftsin による食作用促進効果

tuftsin の食作用促進効果の濃度依存性を調べたところ、0.16 µg/ml までは tuftsin の濃度の増加とともに食作用促進効果も増加し、0.24 µg/ml でプラトーに達し、そのときの phagocytic index は 2 前後であった。そこで以後の tuftsin の食作用促進の実験は 0.16 µg/ml の濃度で行った。

(2) tuftsin 不活化酵素の細胞内局在性

tuftsin の食作用促進効果は、白血球との接触により消失することが知られている。しかし、tuftsin 不活化酵素の白血球細胞内局在性についての報告はほとんどない。そこでわれわれは Cohn らの方法によって得た細胞成分画分を用いてその局在性を調べた。

* 順天堂大学医学部生理化学教室

incubation mixture	ratio
PMN monolayer (5.4×10^5)	1
opsonized zymosan particles	4
with or without tuftsin	

↓
incubation 37°C 45min
↓

PMNs containing zymosan particles were counted

$$\text{phagocytic index} = \frac{\% \text{ of PMNs containing zymosan particles with tuftsin}}{\% \text{ of PMNs containing zymosan particles without tuftsin}}$$

図 1 tuftsin-induced phagocytosis assay

表 1 subcellular localization of tuftsin-inactivating activity

subcellular fraction	phagocytic index	
	before treatment	after treatment
membrane	2.08	0.97
granule	1.93	1.56
cytosol	1.92	1.59

Tuftsin (0.6 ml of 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated with 0.15 ml of subcellular fractions (corresponding to $8 \times 10^7/\text{ml}$) at 37°C for 120 min. The reaction mixture was heated at 100°C for 5 min and then the supernatant was used for the phagocytosis assay.

表 2 localization of tuftsin-inactivating activity on the plasma membrane

	phagocytic index	
	before treatment	after treatment
control PMNs	1.85	1.07
1mM DSA-modified PMNs	1.85	1.67

Tuftsin (0.6 ml of 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated with 0.15 ml of PMNs suspension (corresponding to $8 \times 10^7/\text{ml}$) at 37°C for 120 min. After centrifugation, the resultant supernatant was used for the phagocytosis assay.

表 1 には tuftsin を細胞成分画分と 37°C・120 分間反応させた後の phagocytic index が示されている。tuftsin の効果は膜画分によって完全に消失したが、細胞質および顆粒画分によってはほとんど不活化されなかった。この結果から tuftsin 不活化酵素が膜画分に存在することが示唆された。

つぎに細胞膜透過性が低く従って ecto-enzyme を選択的に修飾するといわれているスルフェニル酸のジアゾニウム塩 (DSA)²⁾ によって好中球を修飾 (1mM・37°C・5 分) し、tuftsin 不活化酵素に対する影響を調べた。

図 2 effects of 1 mM DSA on marker enzymes of the plasma membrane

PMNs ($10^7/\text{ml}$) were modified chemically with DSA at 37°C. At indicated intervals, PMNs were washed twice with 0.9% NaCl and homogenized completely and assayed for enzyme activity.

The key to the figure is as follows: ●—●, LAP: ○—○, 5'-nucleotidase: △—△, LDH

図 3 correlation of tuftsin-inactivating activity with LAP activity

After the modification by DSA at 1 mM, 0.25 mM, 0.125 mM and 0 mM, the tuftsin-inactivating assay was carried out by incubation of modified PMNs with tuftsin at 37°C for 10 min as described in the legend to table 2.

表 2 から明らかなように、コントロール白血球では、37°C・120 分の処理によって tuftsin の効果は完全に消失したが、修飾した白血球では、tuftsin の不活化はほとんど認められなかった。このことから tuftsin 不活化酵素が細胞膜上に ecto-enzyme として存在する可能性が示唆された。

先にわれわれは、DSA による白血球の化学修飾によ

って LAP が ecto-enzyme として細胞膜に存在することを報告した³⁾が、1 mM の DSA で5分間修飾すると細胞膜のマーカーエンザイム、特に LAP の活性はいちじるしく阻害されたが、細胞質酵素の LDH の活性はほとんど影響されなかった (図2)。

一方、Najjar らは tuftsin がブタの腎臓より調製した LAP によって分解されることを報告している²⁾。これらのことから、白血球 LAP が tuftsin 不活化酵素と同一かもしれないという可能性が示唆される。

(3) tuftsin 不活化能と LAP 活性との関連性

tuftsin 不活化酵素と LAP との同一性を調べるために種々の DSA (0, 0.125, 0.25, 1 mM) 濃度で修飾した白血球の tuftsin 不活化能と LAP 活性との相関関係を調べてみた。図3の横軸には LAP 活性が、たて軸にはそのときの tuftsin を不活化する割合が示されている。この図からわかるように LAP 活性と tuftsin 不活化能の間には比例関係が見られた。

以上、tuftsin 不活化酵素の細胞内局在性、および tuftsin 不活化能と LAP 活性との関連性から、白血球 LAP が tuftsin 不活化酵素と同一あるいは少なくとも

その一つとして作用しているという可能性が得られた。これらのことから細胞膜上に ecto-enzyme として存在する LAP が tuftsin の食作用促進効果を抑制することによって白血球の炎症応答の調節に関与しているものと思われる。

文 献

- 1) Najjar, V.A., Nishioka, K.: Nature 228: 672-673, 1970.
- 2) Nishioka, K., Constantopoulos, A., Satoh, P.S., Mitchell, W.M., Najjar, V.A.: Biochim. Biophys. Acta. 310: 217-229, 1973.
- 3) Nagaoka, I., Yamashita, T.: Biochim. Biophys. Acta 598: 169-172, 1980.
- 4) Yamashita, T., Imaizumi, N., Yuasa, S.: Cryobiology 16: 112-117, 1979.
- 5) Fridkin, M., Stabinsky, Y., Zakuth, V., Spirer, Z.: Biochim. Biophys. Acta. 496: 203-211, 1977.
- 6) Cohn, Z.A., Hirsch, J.G.: J. Exp. Med. 112: 983-1004, 1960.
- 7) DePierre, J.W., Karnovsky, M.L.: J. Biol. Chem. 249: 7111-7120, 1974.