ヒト顆粒球および単球のスーパーオキシド産生におけるセリンプロテアーゼの役割

北川誠一・高久史磨*

Role of serine proteases in superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes and monocytes The possible participation of proteases in superoxide (O_2^-) production by human polymorphonuclear leukocytes (PMN) and monocytes was explored using various protease inhibitors and substrates. Protease inhibitors used included naturally occurring inhibitors of serine proteases and synthetic inhibitors that modify the active site of serine proteases. Substrates used were synthetic substrates of the chymotrypsin type as well as trypsin type of protease. All these inhibitors and substrates inhibited O_2^- production by human PMN and monocytes induced by cytochalasin E and concanavalin A, though PMN were more sensitive to these inhibitors and substrates than monocytes. Inhibition appeared rapidly even when the inhibitors were added at the same time as the stimulants, during the induction time of O_2^- production or at the time of maximum O_2^- production, whereas much greater inhibition was observed when the cells were preincubated with the inhibitors. These observations suggest that enzymatically active serine proteases are essential for these phagocytic cells to initiate and maintain the O_2^- production in response to the stimuli. The inhibitory effect of the inhibitor and substrate for chymotrypsin type protease was greater than that of those substances for trypsin type protease. Macromolecular inhibitors also inhibited the O_2^- production. These findings suggest that the serine proteases involved in the O_2^- production by human PMN and monocytes are similar to chymotrypsin rather than trypsin, and are possibly located at the cell surface membrane.

Seiichi Kitagawa・Fumimaro Takaku

Department of Medicine, Jichi Medical School

顆粒球および単球から放出されるスーパーオキシド (O_2^-) は、きわめて反応性に富み、殺菌過程および炎症局所における組織損傷のうえできわめて重要な役割を果たしている¹⁾。これらの細胞による O_2^- 産生は、必ずしも食作用を必要とせず、種々の膜作用物質によって誘導される²⁾。

今回、われわれは concanavalin A (Con A) と cytochalasin E (Cyt E) によって誘導されるヒト顆粒球および単球の O_2^- 産生の過程にセリンプロテアーゼが関与している可能性を見いだしたので報告する。

方 法

(1) 細胞調整

健康成人より得たヘパリン加静脈血に等量の3%デキストラン生食を加え、室温に約30分静置して大部分の赤血球を沈降させて除いた。白血球を多く含む上清を Ficoll-Conray に重層し、比重遠沈法によって顆粒球分画(顆粒球99%以上)と単核球分画(単球15~25%, リンパ球75~85%, 顆粒球1%以下)に分離した。顆粒球分

画に含まれている赤血球は溶血操作によって除去した。一方, McCoy's 5A に浮遊させた単核球 ($5 \times 10^5/\text{ml}$) に carbonyl iron を加え, 37°C 30分孵置後, 食細胞を magnet で除去して, リンパ球分画 (リンパ球99%以上) を調整した。これらの細胞は, すべて Hepes-生食 (0.9% NaCl, 5 mM N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid, pH 7.4) に浮遊させた。

(2) O_2^- の測定

分光光度計用の 1 ml cuvette に 2 mM glucose, 1 mM CaCl_2 , 66 μM ferricytochrome C, 細胞浮遊液 ($2-4 \times 10^5$ 顆粒球/ml または $1.2-2 \times 10^6$ 単核球/ml) およびセリンプロテアーゼの阻害剤または人工基質を加え, 総量 0.99 ml とした。これらの反応液を $37^\circ\text{C} \cdot 3$ 分 (セリンプロテアーゼの阻害剤) または10分 (セリンプロテアーゼの人工基質) 孵置後, Con A (5 μl , 最終濃度 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と Cyt E (5 μl , 最終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を同時に加え, 産生された O_2^- を ferricytochrome C の還元 (550~540 nm) によって測定した^{3,4)}。これらの反応は, 2波長分光光度計 (日立 557) に取り付けた恒温セルホルダー中 (37°C) で行わせ, レコーダを用いて反応の time course を描かせた。Con A および Cyt E の添加

* 自治医科大学第一内科学教室

図1 顆粒球 (A) および単球 (B) の O_2^- 産生反応
 顆粒球 $5 \times 10^6/ml$. 単核球 $1.2 \times 10^6/ml$ (単球25%). 左: Con A $50 \mu g/ml$ 単独添加, 中央: Cyt E $5 \mu g/ml$ 単独添加, 右: Con A $50 \mu g/ml$ と Cyt E $5 \mu g/ml$ を同時に添加.

図2 Con A と Cyt E の同時添加による O_2^- 産生促進効果
 (A) Con A ($50 \mu g/ml$) と種々の濃度の Cyt E を同時に添加
 (B) Cyt E ($5 \mu g/ml$) と種々の濃度の Con A を同時に添加
 ○: 顆粒球 $2 \times 10^5/ml$. ●: 単核球 $2 \times 10^6/ml$

図3 種々のセリンプロテアーゼ阻害剤による顆粒球 (A) および単球 (B) の O_2^- 産生の阻害
 細胞浮遊液に種々のセリンプロテアーゼ阻害剤を加え, $37^\circ C \cdot 3$ 分孵置後, Con A ($50 \mu g/ml$) と Cyt E ($5 \mu g/ml$) を同時に添加. ●: TPCK, ○: aprotinin, ▲: TLCK, △: SBTI, ■: PMSF

によって誘導される cytochrome C の還元は, superoxide dismutase ($20 \mu g/ml$) によって完全に阻害され, O_2^- に特異的な反応であると考えられた. O_2^- の産生速度は time course の直線部分より算出した. これらの実験において, エリスロシン B で調べた細胞の viability

は95%以上であった.

結果

(1) Con A および Cyt E によって誘導される顆粒球および単球の O_2^- 産生反応

図4 TPCK による顆粒球および単球の O_2^- 産生の阻害

- (A) 顆粒球 ($2 \times 10^5/ml$)
 (B) 単核球 ($2 \times 10^6/ml$) に TPCK を加え、 $37^\circ C$ ・3 分分解置後、Con A ($50 \mu g/ml$) と Cyt E ($5 \mu g/ml$) を同時に添加
 (C) Con A ($50 \mu g/ml$) および Cyt E ($5 \mu g/ml$) 添加 (a) 1 分後、(b) 同時、(c) 5 分前に TPCK ($10 \mu M$) を顆粒球 ($2 \times 10^5/ml$) 浮遊液に添加
 (D) 単球 (単核球 $1.75 \times 10^6/ml$) の O_2^- 産生が最大に達したときに TPCK ($50 \mu M$) を途中添加
 Con A ($50 \mu g/ml$) および Cyt E ($5 \mu g/ml$) を同時に添加

Con A および Cyt E は顆粒球ばかりでなく、単球にも作用して O_2^- 産生を誘導した⁵⁻⁸⁾。これらの細胞による O_2^- 産生は、Con A と Cyt E を同時に添加することにより、著明に増強された (図1)。

しかし、Con A および Cyt E に対する反応には両細胞間で相異が認められ、顆粒球は Con A よりも Cyt E

に対してよく反応し、単球は Cyt E よりも Con A に対してよく反応した。さらに、Con A によって誘導された顆粒球の O_2^- 産生は持続的で、直線的に増加する一方、単球の O_2^- 産生は一過性で4～5分後にはいちじるしく減弱した。これらの細胞による O_2^- 産生は、Cyt E および Con A の濃度に依存して増加した (図

図5 顆粒球(A), 単球(B)の O_2^- 産生に及ぼすTPCKおよびPMSFの影響

細胞浮遊液にTPCKまたはPMSFを加え、37°Cで5分・15分または30分孵置後、Con A (50 $\mu g/ml$)とCyt E (5 $\mu g/ml$)を同時に添加
(A) ●: 100 μM PMSF. ○: 250 μM PMSF. ■: 0.2 μM TPCK.
□: 0.5 μM TPCK
(B) ●: 250 μM PMSF. ○: 500 μM PMSF. ■: 2.5 μM TPCK.
□: 5 μM TPCK

2). また、細胞数にも比例して増加した。リンパ球分画(リンパ球99%以上)にCon AとCyt Eを同時に添加しても O_2^- 産生はほとんど認められなかった。したがって、単核球分画における O_2^- の産生は単球によって行なわれると考えられた。

(2) セリンプロテアーゼ阻害剤による顆粒球および単球の O_2^- 産生の阻害

図3に示すように、顆粒球および単球の O_2^- 産生はともに種々のセリンプロテアーゼ阻害剤によって濃度依存性に抑制された。L-1-tosylamido-2-phenylethyl-chloromethyl ketone (TPCK)による典型的な阻害作用を図4に示した。種々の時点でTPCKを添加すると、添加後すみやかに阻害作用が認められ、特に細胞をTPCKで前処置すると阻害作用は一層強くなった。さらに、 O_2^- 産生速度が最大に達したときに、TPCKを途中添加しても、すみやかに阻害作用が認められた。同様な結果は、その他の阻害剤でも認められた。

図5に示すように、TPCKおよびphenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)による阻害作用は、細胞との孵置時間をながくするとさらに強くなった。一般に顆粒球は、単球に比し、セリンプロテアーゼ阻害剤に対して感受性が高い傾向にあった。顆粒球に対する阻害作用の強さはTPCK>N- α -p-tosyl-L-lysine-chloromethyl ketone (TLCK)>aprotinin>soybean trypsin inhibitor (SBTI)>PMSFであり、単球に対する阻害作用の強さはTPCK>aprotinin>TLCK=SBTI>PMSFであった(図3)。

顆粒球とPMSFを37°C・5分孵置後、細胞を洗浄して反応液からPMSFを除去すると、 O_2^- 産生は著明

図6 セリンプロテアーゼ阻害剤除去による顆粒球(A)および単球(B)の O_2^- 産生の回復
細胞浮遊液にプロテアーゼ阻害剤を加え、37°C・5分または20分孵置後、細胞を2回洗浄して、阻害剤を反応液から除去した。open symbolsは洗浄した細胞の O_2^- 産生を示し、solid symbolsは洗浄しなかった細胞の O_2^- 産生を示す。 O_2^- の産生は、Con A (50 $\mu g/ml$)とCyt E (5 $\mu g/ml$)を同時に添加することによって誘導した。
(A) ○, ●: 1 mM PMSF. □, ■: 10 μM TPCK, △, ▲: 500 μM TLCK
(B) ○, ●: 1 mM PMSF. □, ■: 50 μM TPCK. △, ▲: 500 μM TLCK

に回復した(図6A)。同様な結果は軽度であるが、TLCKおよびTPCKによる阻害作用でも認められたが、孵置時間をながくすると回復は認められなくなった。PMSFによる阻害も、顆粒球を1 mM PMSFで37°C・40分、前処置すると O_2^- 産生の回復は消失した。同様な結果は単球でも認められた(図6B)。

図7 セリンプロテアーゼの人工基質による顆粒球および単球の O_2^- 産生の阻害
細胞浮遊液に (A) BTEE または (B) TAME を加え、 37°C 10分孵置後、Con A ($50 \mu\text{g/ml}$) と Cyt E ($5 \mu\text{g/ml}$) を同時に添加
○：顆粒球，●：単球

(3) セリンプロテアーゼの人工基質による顆粒球および単球の O_2^- 産生の阻害

顆粒球および単球の O_2^- 産生は、N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) および *p*-tosyl-L-arginine methyl ester (TAME) によって濃度依存性に抑制された(図7)。阻害作用の強さは $\text{BTEE} > \text{TAME}$ であった。また、阻害剤に対すると同様、単球に比し、顆粒球は人工基質に対して感受性が高い傾向にあった。

考 察

顆粒球および単球の O_2^- 産生は、種々のセリンプロテアーゼ阻害剤および人工基質によって抑制された。これらの事実、顆粒球および単球の O_2^- 産生にセリンプロテアーゼが関与している可能性を示唆している。顆粒球および単球の O_2^- 産生に対する阻害作用は、キモトリプシン阻害剤である TPCK がトリプシン阻害剤である TLCK よりもきわめて強く、一方、人工基質を用いた実験でも、キモトリプシンの人工基質である BTEE が、トリプシンの人工基質である TAME よりもきわめて強かった⁹⁻¹²⁾。

これらの事実、本プロテアーゼがトリプシンよりも、むしろキモトリプシンに類似していることを示唆している。さらに、細胞膜を透過することは困難と思われる高分子の阻害剤 (aprotinin および SBTI) によってもすみやかに O_2^- の産生が抑制されることより、本プロテアーゼは顆粒球および単球の表面細胞膜に局在するものと考えられる^{13,14)}。顆粒球と単球との間に、セリンプロテアーゼ阻害剤および人工基質に対する感受性に相異が認められる。この相異の原因としてつぎの2点が考えられる。

① O_2^- 産生に関与するプロテアーゼは顆粒球と単球とで異なっている。

② 顆粒球と単球とで、その O_2^- 産生機構に相異が存在する。

最近のわれわれの研究は、顆粒球と単球とでその O_2^- 産生機構に相異が存在することを示している¹⁵⁾。

PMSF, TPCK, および TLCK は、セリンプロテアーゼの活性中心に存在するセリンまたはヒスチジン残基と不可逆的に結合し、プロテアーゼ活性を失活させる^{9,16)}。しかし、次式に示すように、その反応の中間体として可逆的な複合体を形成することが認められている^{9,16)}。

これらの反応が、膜表面に存在するプロテアーゼと阻害剤との間で行われていると考えるならば、阻害剤を除去した際に認められる O_2^- 産生の軽度の回復は、可逆的な酵素—阻害剤複合体の存在で説明することができる。さらに、この O_2^- 産生の回復は、細胞と阻害剤を十分に孵置した場合には消失し、また、阻害剤による抑制は時間依存性であることより、本プロテアーゼは膜表面に活性型で存在していると考えられる。

本プロテアーゼが、 O_2^- 産生酵素である NAD(P)H oxidase の活性化にどのような形で関与しているのか、また、本プロテアーゼの基質がなんであるか、今後に残された問題である。

文 献

- 1) 北川誠一, 高久史磨: 臨床免疫 10 : 522-538, 1978.
- 2) 中川原章, 竹重公一朗: 代謝 14 : 985-995, 1977.
- 3) Nakagawara, A., Nabi, B.Z.F., Minakami, S.: Clin. Chim. Acta. 74 : 173-176, 1977.
- 4) Kitagawa, S., Takaku, F., Sakamoto, S.: J. Clin. Invest. 65 : 74-81, 1980.
- 5) Romeo, D., Zabucchi, G., Rossi, F.: Nature New Biol. 243 : 111-112, 1973.
- 6) Nakagawara, A., Minakami, S.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 64 : 760-767, 1975.
- 7) Goldstein, I.M., Cerqueira, M., Lind, S., Kaplan, H.B.: J. Clin. Invest. 59 : 249-254, 1977.
- 8) Kitagawa, S., Takaku, F., Sakamoto, S.: FEBS Lett. 107 : 331-334, 1979.
- 9) Shaw, E.: The Enzymes. P.D. Boyer, ed. Academic Press. Inc., New York, 1: 91-146, 1970.
- 10) Schoellman, G., Shaw, E.: Biochemistry 2 : 252-255, 1963.
- 11) Shaw, E., Mares-Guia, M., Cohen, W.: Biochemistry 4 : 2219-2224, 1965.
- 12) Hummel, B.C.W.: Can. J. Biochem. Physiol. 37: 1393-1399, 1959.
- 13) Trautschold, I., Werle, E., Zickgraf-Rüdel, G.: Biochem. Pharmacol. 16 : 59-72, 1967.
- 14) Kowalski, D., Leary, T.R., McKee, R.E., Sealock, R.W., Wang, D., Laskowski, M., Jr.: Protease Inhibitors. Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., Truscheit, E. ed. Springer-Verlag, Berlin. 311-324, 1974.
- 15) Kitagawa, S., Takaku, F., Sakamoto, S.: J. Immunol. 125 : 359-364, 1980.
- 16) Fahrney, D.E., Gold, A.M.: J. Am. Chem. Soc. 85 : 997-1000, 1963.