酵素-酵素インヒビター complex の炎症における役割

竹内明輝・荏原忠夫・橋本 明*

The role of the protease-protease-inhibitor complexes It is well known that at the site of inflammation neutrophils release proteolytic enzymes which cause tissue damage.

These proteases combine with protease inhibitors such as α_1 -antitrypsin and α_2 -macroglobulins and lose their biological activity. We examined the fate of these protease-protease inhibitor complexes. α_1 -antitrypsin was used as a protease inhibitor and purified by passing through the blue sepharose and sephadex columns. Trypsin was used as a proteolytic enzyme and mixed with purified α_1 -antitrypsin at 37°C to make a protease-protease inhibitor complex. This complex was separated from native α_1 -antitrypsin by isoelectric focusing and then incubated with normal human neutrophils.

Significant lysosomal enzyme release was seen when neutrophils were incubated with this protease-protease inhibitor complex, but such enzyme release was not observed when neutrophils were incubated with native α_1 -antitrypsin or trypsin.

The amount of lysosomal enzyme release was proportional to the amount of complex added. From these result we presume that this complex can promote the further protease release from the cells and worsen the inflammation.

Akiteru Takeuchi・Tadao Chihara, Akira Hashimoto

Department of Medicine and Physical Therapy, Faculty of Medicine, University of Tokyo

急性炎症に際し、好中球はその部位に集積し、各種の蛋白分解酵素を放出して炎症をさらに増悪させると考えられている。生体内では放出された蛋白分解活性をもつこれらの酵素は、 α_1 -antitrypsin, α_2 -macroglobulin などのプロテアーゼインヒビターと結びついてその活性を失い、その役割を終えると考えられてきたが、われわれはこの蛋白分解酵素とプロテアーゼインヒビターの複合物がさらになんらかの役割を果たしているのではないかと考え、人工的に蛋白分解酵素とそのインヒビターの complex を作製し、その生物学的活性について調べた。

方 法

(1) 好中球

正常ヒト血液 20 ml をヘパリン採血し、hypaque-ficoll 比重遠心法によりリンパ球を除去後、その沈殿物に 3% dextran 液を加えて、赤血球を除いた。除去しきれなかった赤血球は、0.2% 食塩水を加えることにより溶血させた。このようにして得られた好中球を Hanks' buffer で洗浄し、好中球の濃度を調整したのち、buffer に suspend した。細胞の viability は trypan blue dye exclusion 法によりチェックし、95%以上の細胞が viable であることを確認した。

(2) プロテアーゼ、プロテアーゼインヒビターの精製

プロテアーゼ酵素としては、市販の trypsin (Miles Lab. USA) を用い、プロテアーゼインヒビターとしては、 α_1 -antitrypsin (Worthington Biochemical Corp USA) を用いた。市販の α_1 -antitrypsin は純度が低いため、さらに purification を行った。まず Sephadex G 100 (column size 5×100 cm) に、0.5 M NaCl 5 ml に溶解した 300 mg の α_1 -antitrypsin を apply し、溶出した solution 中の α_1 -antitrypsin の量を M partigen (Behring, W. Germany) により測定し、peak を集めたのち Diaflo ultrafiltration membrane (Amicon Com. USA) により濃縮、さらに 0.1 M KCl 0.05 M Tris HCl pH 7.0 に対し透析したのち、blue sephrose CL-6B カラム (Pharmacia Sweden) を通して混入したアルブミンを除去した¹⁾。

(3) プロテアーゼ-プロテアーゼインヒビター complex の精製

trypsin 10 μ g に、種々の量の α_1 -antitrypsin 液を加え、5分間 incubate した後、 α -N-Benzoyl-DL-Arginine-P-nitroanilide HCl (Sigma, USA) を加えて、さらに 37°C 30分間 incubate し、氷酢酸で反応をストップさせ、OD 410 nm で比色して trypsin の活性を調べ、trypsin と α_1 -antitrypsin の最適比を決めたのち、trypsin と α_1 -antitrypsin を 37°C において15分間 incubate した。つぎにこの溶液に carrier ampholine (pH 3.5~10) を加え、等電点電気泳動装置に apply し、3 KW 48時間放置した後、fractionation を行った。

* 東京大学医学部内科物理療法学教室

(4) 酵素測定, 蛋白測定

蛋白濃度は, OD 280 nm における吸光度を測定することにより決定した. β -glucuronidase の測定は, phenolphthalein glucuronic acid を基質として用い, OD 550 nm で比色した²⁾. peroxidase の測定は, H_2O_2 を基質として用い, OD 470 nm にて比色を行った⁴⁾. lactic dehydrogenase (LDH) の測定は, 焦性ブドウ酸を基質として用い, OD 500 nm で測定した⁵⁾.

(5) ライソゾーム酵素の放出

ヒト好中球を $5 \times 10^6/ml$ に調整し, 各種テスト液とともに $37^\circ C$ において 15 分間 incubate した後, 400 g 10分間遠心し, その上清を集めて酵素活性を測定した.

(6) 好中球遊走能

Boyden chamber を用いて測定を行った⁶⁾. Boyden chamber の下の部分には, lipopolysaccharide (Difco Com. USA) により活性化した10%のブール血清を加えて, 標準遊走因子として用いた. フィルターは, 孔径 3μ の micropore filter (Milipore Corp. USA) を用いた. $5 \times 10^6/ml$ に調整したヒト好中球を cytocentrifuge を用いて, filter の上に蓄積させた. Chamber の上の部分には, Hanks buffer を加えた. この chamber を 3 時間 $37^\circ C$ において incubate したのち, フィルターをとりだして固定染色し, 顕微鏡下 (400 倍) で最下層まで達した好中球の数を, grid を用いて測定した.

(7) O_2^- 発生の測定

ferricytochrome C (Sigma Co. USA) は, 4 mg/ml, テスト液は蛋白濃度 6 mg/ml に, ヒト好中球濃度は $5000/mm^3$ に調整する. 各試験管に cytochrome C 液 0.25 ml, 好中球液 0.5 ml, テスト液 0.15 ml, Gey's buffer 0.1 ml 加えたのち, $37^\circ C$ において 15 分間 incubate した後, $4^\circ C$ において 800 g・10分間遠心し, その上清 0.7 ml に蒸留水 2.0 ml 加えて OD nm で比色を行った.

結 果

(1) α_1 -antitrypsin の purification

まず市販のヒト α_1 -antitrypsin 300 mg を 0.5 M NaCl に溶解し, Sephadex G 100 column に apply した. 図1に示すようにこの sample は二つの peak にわかれ, α_1 antitrypsin 活性は2番目の peak にみられた. この peak を Diaflo membrane (Amicon Co. USA) により濃縮, さらに混入しているアルブミンを除去するため, Blue Sepharose column を通したのち, 再度濃縮を Diaflo membrane を用いて行った.

(2) プロテアーゼ-プロテアーゼインヒビター complex の作製

10 μg の trypsin と種々の量の精製した α_1 -antitrypsin を $37^\circ C$ において 5 分間 incubate した後, trypsin の

図1 Sephadex G 100 column に 0.5 M NaCl に溶解した α_1 -antitrypsin を apply し, 0.5 M NaCl で elute
——: 蛋白濃度,線: α_1 -antitrypsin の濃度を示す.

図2 10 μg の trypsin と種々の量の α_1 -antitrypsin を加えて trypsin と α_1 -antitrypsin complex の最適比を求めたもの
横軸に α_1 -antitrypsin の量, 縦軸に α_1 -antitrypsin で阻止されたあとの trypsin の活性を元の trypsin 活性に対する パーセントで示した.

activity のチェックを行った. 図2に示すように 50 μl の α_1 -antitrypsin が, 10 μg の trypsin 活性を完全に抑えた. そこでこの割合に基いて trypsin と α_1 -antitrypsin の complex の作製を行った. この complex は変性して α_1 -antitrypsin と反応しなかった trypsin, および過剰に加えられている α_1 -antitrypsin と混在するため, 等電電気泳動装置により, complex を分離した. 図3にその結果を示す. 蛋白のピークは四つみられたが, α_1 -antitrypsin の定量を行った結果, 2番目のピークと3番目のピークに α_1 -antitrypsin が存在していることが判明した. native な α_1 -antitrypsin は酸性に charge しており, また trypsin はアルカリ性に charge している

図3 isoelectric focusing により, 変性した trypsin, native α_1 -antitrypsin と, trypsin- α_1 -antitrypsin complex を分離
—: OD 280 nm での測定,: α_1 antitrypsin 量, - · - · -: pH.

図4 ポリアクリルアミドによる蛋白純度の測定
右側は native α_1 -antitrypsin, 左側が trypsin- α_1 antitrypsin complex である.

ので, この両者の complex はほぼ中性に charge しているものと推定された. そのため α_1 antitrypsin の二つのピークのうち, 最初のピークは native な α_1 antitrypsin によるものであり, 後の peak は complex により成り

図5 各種テスト液と好中球を incubate した後上清中に放出された β -glucuronidase 量の測定

図6 各種テスト液と好中球を incubate した後上清中に放出された peroxidase 量の測定

立っていると考えられた. これらの fraction の purity を確認するため, ポリアクリルアミドの gel electrophoresis を行った.

図4の右側が, native な α_1 antitrypsin, 左側が complex の electrophoresis の結果である. complex の fraction にもわずかに native α_1 antitrypsin の混入がみられ, また native α_1 antitrypsin で上の部分にみられる層は, 精製過程において変性を起こしてしまった α_1 antitrypsin であり, 下の層が native α_1 antitrypsin である.

(3) 好中球よりの lysosomal enzyme の放出

正常ヒト血液より, dextran 法, hypaque-ficoll 法により好中球を分離, 濃度を $5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し, 同じ蛋白量の albumin, trypsin, α_1 -antitrypsin, または trypsin- α_1 -antitrypsin complex とともに 37°C 15分間遠心して, 上清中の各種酵素の測定を行った. 図5にその結果を示している. trypsin- α_1 -antitrypsin complex を好中球とともに incubate すると, 好中球よりの β -glu-

図7 加えた trypsin- α_1 antitrypsin complex の量と、好中球より放出された β -glucuronidase の量との関係
横軸は complex の量、縦軸内は enzyme の量

図8 各種テスト液の好中球遊走能に与える影響

curonidase の放出は大幅に増加している。 α_1 -antitrypsin のみと incubate したときも、わずかに enzyme, release の増加がみられたが、これは好中球が変性した α_1 -antitrypsin を貪食したためと思われる。

つぎに specific granule に属する peroxidase の release を測定したが (図6)、やはり同様に enzyme-enzyme inhibitor complex とともに incubate することにより、peroxidase の放出は大幅に増加した。

つぎにこの trypsin- α_1 -antitrypsin complex 量を色々かえてみて、好中球よりの β -glucuronidase の放出量を測定してみた。

図7にその結果を示す。少量の complex を加えても、

図9 各種テスト液の好中球による O_2^- 発生に与える影響

β -glucuronidase の放出量は増加しており、好中球とともに incubate する complex の量に一致して上清中のライソゾーム酵素の放出量は増加していた。

(4) 好中球遊走能に与える影響

各種テスト液を蛋白濃度 100 μ g/ml に調節して、ヒト好中球と preincubate したのち、Boyden chamber を用いて好中球の遊走能を調べた。trypsin と preincubate すると遊走能はいちじるしく低下したが、trypsin- α_1 -antitrypsin, complex との preincubation では、buffer と preincubate した場合にくらべ、わずかに遊走能が低下したのみで統計学的に有意の差は認められなかった (図8)。

(5) O_2^- 発生に与える影響

各種テスト液を好中球とともに incubate し O_2^- 発生を調べたが、complex を加えても特に O_2^- 発生はみられなかった (図9)。

考 察

急性炎症の際、好中球は炎症部位に集積して、各種蛋白分解酵素を放出し、さらに炎症を進行させる。これらの酵素は生体内の酵素インヒビターと結合して、酵素活性をもたない complex を形成する。従来この complex に対しては、あまり関心が払われていなかった。一方、抗原-抗体 complex は補体を活性化したり、好中球に貪食され、ライソゾーム酵素の放出を促したりして、炎症に関与している。酵素インヒビターは抗体と違い、種類の酵素と結合するがその結合機構はなかなか複雑であり、まだ解明されていない点も多い。われわれはこの酵素-酵素インヒビター complex に注目し、人工的にこの complex を作製してその生物学的活性について調べた。酵素インヒビターとしては、 α_1 -antitrypsin を用い、まずこれの精製を行い、プロテアーゼとして用いた trypsin と結合させ、カラムを用いてこの complex を分離した。この complex とヒト好中球を incubate すると、好中球よりのライソゾーム酵素の放出が大幅に増加する

ことを見いだした。生体内において自然に存在し、好中球に貪食されることのないプロテアーゼと、酵素インヒビターの両者が結合すると、好中球に貪食され、さらに好中球よりのプロテアーゼ放出を促すという作用を有することを見いだした。

同じく炎症に際して、重要な機能である好中球の遊走能や、 O_2^- 発生に関しては、目下の実験の結果ではこの complex は特に影響を与えていないが、このプロテアーゼ—プロテアーゼインヒビター complex の炎症に対する役割に関しては、今後さらに検索の予定である。

本論文の一部は厚生省特定疾患パーチェット病調査研究費によった。

文 献

- 1) Pannel R., et al.: Isolation and properties of human plasma α_1 -protease inhibitor. Biochemistry 13 : 5439-5445, 1974.
- 2) Fishman, W.H., et al.: Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood β -glucuronidase. J. Biol. Chem. 173 : 449-456, 1948.
- 3) George, P.: Intermediate compound formation with peroxidase and strong oxidizing agents. J. Biol. Chem. 201 : 413-426, 1953.
- 4) Margenstern, S.: Automated determination of NAD-coupled enzymes. Determination of lactic dehydrogenase. Anal Biochem. 13 : 149-161, 1965.