好中球の食作用促進因子 (PSF) の分離, 精製

石橋芳雄・山下辰久*

Isolation and purification of phagocytosis-stimulating factor from neutrophils

Yoshio Ishibashi・Tatsuhisa Yamashita*

貪食白血球により産生される食作用促進因子 (phagocytosis-stimulating factor, PSF) は, 好中球の C_3b receptor を介した食作用を特異的に促進する因子であり, 炎症応答の調節に重要な役割を演じていると考えられている^{1,2)}. これまでにわれわれは, PSF が塩基性蛋白であることを見だし, 好中球顆粒分画に含まれる既知の塩基性蛋白との異同について検討を加えた結果, 食作用促進作用および殺菌作用において, 顆粒分画中の塩基性蛋白とは異なる活性を示すことを明らかにしている. 今回, PSF と顆粒分画中の塩基性蛋白との異同をさらに詳細に検討するため, 銅キレートクロマトグラフを用いて PSF の精製を試み, PSF の分子量, 等電点, アミノ酸組成などの物理化学的性質を調べた.

材料と方法

(1) 好中球の調製

グリコゲン刺激により得られたモルモット腹腔滲出液から好中球を調製した³⁾.

(2) PSF の調製

PMNs (1×10^7 cells/ml) にモルモット新鮮血清でオプソニン化した zymosan (1 mg/ml) を加え, 37°C 1 時間インキュベートしたのち, 貪食好中球を超音波破碎し, その上清を 80°C 30 分間処理したのち, Sephadex G-100 のゲル濾過により部分精製した²⁾.

(3) 顆粒抽出液の調製

顆粒抽出液は Lehrer らの方法⁴⁾により調製した. すなわち, 未処理および貪食好中球から得られた顆粒分画を 0.01M citrate で 2.5×10^8 cells/ml に相当する濃度に懸濁し, 0°C 1 時間攪拌することにより抽出した.

(4) 銅キレートクロマトグラフ

銅キレートクロマトグラフは Torres らの方法⁵⁾に従った. すなわち, 顆粒抽出液に 40 mM Tris-5mM phosphate-0.5 M NaCl buffer (pH 8.2) を 2:1 の割合

図1 copper chelate chromatography of granule extract from intact PMNs

で加え, pH 8.2 に合わせ, これを銅キレートカラムに apply し, 5 ml/hr の流速で pH 7.7 から pH 2.8 のグラジエントをかけて溶出させた.

(5) 貪食能の測定

好中球 monolayer を用い, オプソニン化 zymosan を 37°C 10 分間貪食させたのち, メタノール固定, Wright-Giemsa 染色し, 鏡検により好中球の貪食率を求めた²⁾.

結果と考察

(1) 好中球顆粒抽出液の銅キレートクロマトグラフ

まず, 未処理好中球から得られた顆粒成分抽出液の銅キレートクロマトグラフにおける溶出パターンを図1に示す. その結果 pH 5.1 付近に cationic protein, pH 4.6 に lysozyme, pH 4.0 に lactoferrin がそれぞれ溶出された. また, これらの塩基性蛋白によって, 好中球貪食能はあまり促進されなかった. これに対し, 貪食好中球から得られた顆粒成分抽出液について, 同様の方法で銅キレートクロマトグラフを行った場合 (図2), 未処理好中球顆粒成分抽出液と比較して, cationic protein, lysozyme, lactoferrin が貪食によって顆粒分画からほと

* Department of Physiological Chemistry, Jun-tendo University, School of Medicine 順天堂大学医学部生理化学教室

図2 copper chelate chromatography of granule extract from phagocytosing PMNs

んど消失していた。pH 3.7 付近に新たなピークが認められ、この fraction に強い PSF 活性が認められた。さらに、従来の方法²⁾にしたがって貪食好中球から得られた PSF 粗抽出液を、80°C 30 分間熱処理したのち、Sephadex G-100 により部分精製した PSF を、さらに銅キレートクロマトにより精製したところ、同様に pH 3.7 付近に強い PSF 活性をもつピークが得られた。このような銅キレートクロマトグラフにおける PSF と顆粒成分中の cationic protein, lysozyme および lactoferrin との溶出パターンの違いから、PSF は顆粒分画中のこれら塩基性蛋白とは異なる物質であることが示唆された。

(2) 精製 PSF の分子性状

上記のように PSF 粗抽出液を熱処理、ゲル濾過および銅キレートクロマトグラフによって精製した PSF の分子性状を調べた。

① SDS 電気泳動：PSF は MW 16,000 の位置に単一バンドとして認められた。これに対し、cationic protein, lysozyme, lactoferrin は MW 36,000, MW 14,500, MW 70,000 の位置にそれぞれ泳動された。

② 等電点電気泳動：PSF は等電点電気泳動において pI 8.7 の位置に泳動された。

③ アミノ酸組成：PSF のアミノ酸組成を表 1 に示す。一般に顆粒分画中の cationic protein は、Arg 含量が多く、16% 前後であるのに対し、PSF の Arg 含量は 4% 程度であった。

以上の結果より、PSF は分子量、等電点およびアミノ酸組成から考えて、顆粒分画中の既知の塩基性蛋白で

表 1 amino acid composition of PSF

amino acid	% of total	residues/molecule of PSF*	
		actual value	nearest integer
aspartic acid	13.1	18.6	19
threonine	5.2	7.3	7
serine	7.1	10.1	10
glutamic acid	15.8	22.4	22
proline	2.3	3.3	3
glycine	8.1	11.4	11
alanine	5.3	7.6	8
half-cystine	1.0	1.4	1
valine	2.0	2.8	3
methionine	2.0	3.2	3
isoleucine	4.3	6.2	6
leucine	9.9	14.0	14
tyrosine	1.1	1.6	2
phenylalanine	4.1	5.8	6
histidine	7.7	10.9	11
lysine	7.2	10.3	10
arginine	4.0	5.7	6

(total) 142

* based on a MW of 16,000 obtained on SDS-PAGE

ある cationic protein, lysozyme, lactoferrin とは明らかに異なることがわかった。

文 献

- 1) Ishibashi, Y., Yamashita, T.: Generation of a phagocytosis-stimulating factor by polymorphonuclear neutrophils during phagocytosis. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 64:181-189, 1981.
- 2) Ishibashi, Y., Yamashita, T.: Effects of a phagocytosis-stimulating factor on the phagocytic process of polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 38: 825-833, 1982.
- 3) Yamashita, T., Imaizumi, N., Yuasa, S.: Effect of endocellular cryoprotectant upon polymorphonuclear neutrophil function during storage at low temperature. *Cryobiology* 16: 112-117, 1979.
- 4) Lehrer, R.I., Ladra, K.M., Hake, R.B.: Non-oxidative fungicidal mechanisms of mammalian granulocytes; demonstration of components with candidal activity in human, rabbit and guinea pig leukocytes. *Infect. Immun.* 11: 1226-1234, 1975.
- 5) Torres, A.R., Peterson, E.A., Evans, W.H., Mage, M.G., Wilson, S.M.: Fractionation of granule proteins of granulocytes by copper chelate chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 576: 385-392, 1979.