白血球細胞膜の transmethylation, phospholipase A₂ 活性以外の major および third pathway の磷脂質酵素活性

——炎症反応との関与についての検討——

丹羽鞆負^{*1)}, 尾崎由基男^{*2)}, 谷口信吉^{*3)}

Phospholipid enzyme activities of major pathway and the third pathway in the inflammatory states
The biosynthesis of phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), and phosphatidylserine (PS) by base-exchange reactions, and of PC and PE by the major pathway (ethanolaminephosphotransferase (EPT) and cholinephosphotransferase (CPT)), was assessed in the membranes of human leukocyte subsets. Among the three base-exchange activities, ethanolamine-exchange was the highest, and choline-exchange the lowest. In major pathway, EPT and CPT had comparable activities. Among leukocyte subpopulations, T lymphocytes showed the highest levels of each enzyme activity, and neutrophils showed the least. Base-exchange activities were increased by addition of Ca²⁺ but inhibited by Mg²⁺ while EPT and CPT were inhibited by Ca²⁺ but enhanced by Mg²⁺. However, each base-exchange was also enhanced by calmodulin inhibitors and inhibited by calmodulin, suggesting that base-exchange reaction is dependent on Ca²⁺ but inhibited by Ca-calmodulin complex. Among the enzyme activities tested, PE formation alone was increased by the presence of low concentrations of bioactive stimulants. Our recent reports showed increased ethanolamine-exchange activity in the patients with various inflammatory disorders. These postulate that although its biological significance is unknown, base-exchange activities may be related to cell activation and that PE formation in base-exchange is a precursor of N-transmethylation of PE, leading to the production of arachidonic acid cascade through PC by phospholipase A₂ activity.

Yukie Niwa^{*1)}, Yukio Ozaki^{*2)}, Shinkichi Taniguchi^{*3)}

^{*1)} Tosashimizu Hospital, ^{*2)} Department of Internal Medicine, Tokyo University
^{*3)} Department of Pharmacology, Kyoto University

key words: *membrane phospholipid, base-exchange activity, ethanolaminephosphotransferase, cholinephosphotransferase, cell activation*

筆者らは、本誌(既報)¹⁾で、炎症患者白血球膜の methyltransferase, phospholipase A₂, base-exchange activities, CPT, EPT などの細胞膜磷脂質酵素活性を測定し、炎症細胞の活性化機構について、新しい仮説を報告したが、今回は、その生理学的、生化学的意義の明らかにされていない base-exchange activity と、細胞膜 phospholipids の constituent である PE(内膜)、および PC(外膜)の形成を mediate する EPT, CPT の生化学的意義を知るための新しい実験を試み、base-exchange activity, および major pathway の EPT, CPT の methylation や phospholipase A₂ の minor pathway の炎症反応を惹起す経路への関連性について、考察を加えることにした。

base-exchange activity とは、Ca²⁺ 依存性で、エネル

ギー非依存性の反応で、多くの細胞や組織の膜で、それぞれの phospholipids の C₃ 位に結合している base が ethanolamine, choline あるいは serine と交換することにより、PE, PC および PS が産生されることが知られている。しかしながら、既述のように、その生物学的な意義は、ほとんど不明で、しかもこれら3種の base-exchange activity は共通して動くだけでなく、それぞれ独立して反応する場合もあり、その詳細なメカニズムについては不明である。

すなわち、哺乳動物では、phospholipids 中、PS のみがこの base-exchange reaction で主として合成されるものであり、PE, PC を産生する ethanolamine-exchange や choline-exchange activity は、補足的なものにすぎないとの報告²⁾もあり、また、ウサギの好中球が貪食作用を行う際には、serine-exchange activity のみが低下を示すという報告もみられる³⁾。

phospholipids (PE, PC) の大部分(99.9%以上)は、細胞膜の骨格形成を示す phospholipids であり、これら

*1) 土佐清水病院

*2) 東京大学医学部第一内科学教室

*3) 京都大学医学部薬理学教室

表 1 ヒト好中球, 単球, リンパ球, Tリンパ球, non T リンパ球の磷脂質酵素活性

		好中球	単球	リンパ球	Tリンパ球	non T リンパ球
major pathway	cholinephosphotransferase(CPT)	19.8±3.8	63.9±12.1	53.9±12.1	70.8±15.7	39.8±8.2
	ethanolaminephosphotransferase (EPT)	17.1±2.2	56.7±6.3	48.0±5.4	63.6±7.7	32.1±4.3
base- exchange	[³ H]-choline incorporation	0.7±0.08	1.6±0.1	1.1±0.3	1.6±0.1	0.7±0.2
	[³ H]-serine incorporation	3.9±0.5	9.6±1.2	7.5±0.9	11.2±1.3	5.1±0.7
	[³ H]-ethanolamine incorporation	7.1±0.6	17.9±1.6	16.0±1.3	19.8±1.7	12.2±1.1

各酵素活性は各同位元素標識 substrate の磷脂質の取り込み量の mean±SEM pmol/min/mg protein であらわした。

phospholipid constituent の PE, PC の形成を mediate する⁴⁻⁷酵素(EPT, CPT)の経路は, major の pathway とよばれ, 一方, cell activation に関係する, すなわち, 膜の内外転, transmethylation に関係する PE, PC はごく微量で⁶⁻¹⁰, methyltransferase (および phospholipase A₂)によって mediate され, minor の pathway とよばれている。しかしながら, 本誌既報¹ 図1で示すとおり, PE, PC, PS の合成には, ethanolamine, choline, serine などの phospholipids の base との間に複雑な相互関係があり, major pathway の反応や base-exchange reaction が PE→PC→arachidonic acid→arachidonic acid cascade の cell activation の流れに, なんらかの影響を与える可能性も推測される。

そこで今回, 筆者らは, Ca²⁺, Mg²⁺, calmodulin, calmodulin inhibitor, および bioactive stimulants の影響などを調べながら, この両反応系の cell activation を惹起さす minor の pathway への関連性を検索してみた。

対象と方法

種々の炎症性疾患患者の base-exchange activity と EPT, CPT 値の測定については, 本誌既報¹と重複するので, 結果のみを簡単に略記することにする。

まず, 健康人の白血球を Ficoll-Hypaque centrifugation により, polymorphonuclear leucocytes(好中球)と, mononuclear cell fraction にわけ, さらに, mononuclear fraction より adherent cell として, 単球, non-adherent cell としてリンパ球を Reiss and Roos¹³の方法で petri dishes に incubate することにより, 分離集獲した。さらに, リンパ球は sheep erythrocyte rosetting technique¹⁴により T lymphocyte と non-T-lymphocyte (B lymphocyte とよぶ)に分離し, OKM1 monoclonal antibody (Ortho pharmaceutical Raritan. NJ, USA)を用いて, 混入単球の計算をした (Tリンパ球中: 1%以下, Bリンパ球: 7%前後)。

これら, 健康人好中球, リンパ球, 単球, Tリンパ球,

表 2 calmodulin の好中球膜 base-exchange activity への影響

濃度(M)	0	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
base-exchange				
[³ H]-ethanolamine	7.13	2.91	2.92	2.89
[³ H]-serine	3.92	1.00	0.92	0.69
[³ H]-choline	0.69	0.42	2.01	0.09

3 mM CaCl₂ 存在下に“方法”に記載された(standard assay mixture の)条件で calmodulin の影響を測定した。

Bリンパ球のそれぞれの細胞膜を, 丹羽らの方法^{11,12}で集獲し, それぞれの細胞膜の3種の base-exchange activity (ethanolamine, serine and choline-exchange), および2種の major pathway の酵素(EPT および CPT)活性を測定した。細胞膜の集獲法と, 各酵素活性の測定法については, 既報^{1,11,12}に詳述してあるので省略する。

つぎに, おおのの図1, 表2に指示された種々の濃度の CaCl₂, MgCl₂, calmodulin inhibitor である chlorpromazine(CPZ), および trifluoperazine(TFP)あるいは calmodulin を, 細胞を sonication した後の assay mixture 中に加え, 3種の base-exchange activity と EPT, CPT activity への影響を調べた。

つぎに bioactive stimulants の影響であるが, 好中球は, opsonized zymosan および phorbormyristate acetate (PMA)で, リンパ球は PHA, Con A で, 細胞を sonicate する前に 10 分間 incubate した後, おおのの enzyme activity への影響を調べた。

なお, 各薬剤の入手先については, 別誌¹⁵に記載されてあるため, 省略する ([³H]-CDP-ethanolamine と calmodulin は当研究所で合成)。

結 果

(1) ヒト白血球膜の磷脂質酵素活性

本誌既報¹にみられるように, 好中球膜では, active

図1 Ca^{2+} および calmodulin inhibitors (CPZ, TFP) の好中球・リンパ球膜各 base-exchange activity への影響

●: 好中球, ○: リンパ球

— Ca^{2+} , CPZ, TFP

standard assay mixture については, “方法” の項に記載されているが, CPZ, TFP の添加時には, CPZ, TFP の影響を知るためには, CaCl_2 の影響に強力に左右されるので, CaCl_2 は 3 mM を使用せず, 0.1 mM の少量の存在下に実験を行った。

stage の Behçet 病, 重症細菌感染症, SLE, RA 患者の順で ethanolamine-exchange activity が亢進し, また, リンパ球では, 同じく active stage の RA, SLE, Behçet の順で, やはり ethanolamine-exchange の上昇が認められた(図表省略)。

一方, 健康人の好中球, リンパ球, Tリンパ球, Bリンパ球, 単球の5種の白血球 subsets の base-exchange activity は, 表1にみられるように, それぞれ PE 形成 (ethanolamine-exchange activity) がもっとも高く, serine-exchange が, それにつづき, PC 形成 (choline-exchange activity) が最低値を示し, 最高の ethanolamine-exchange activity と最低の choline-exchange activity の差は10倍近い差がみられた。

一方, major pathway の PE 形成 (EPT activity) は, PC 形成 (CPT activity) と, ほぼ同値かあるいは若干低値を示した。また, 今回測定した5種類の酵素活性も, また, すでに筆者らの報告¹¹⁾している transmethylation

を惹起さす methyltransferase や phospholipase A_2 など膜 phospholipids 酵素活性は, すべて T リンパ球がもっとも高く, ついで単球が高く, リンパ球, B リンパ球, 好中球という順位であり, この傾向は細胞膜の superoxide dismutase (SOD) 活性にも同様のことが報告されている¹⁶⁾。

(2) Ca^{2+} および Mg^{2+} の各酵素活性への影響

base-exchange activity, 特に ethanolamine と serine-exchange activity は, pH 7.5 で free の Ca^{2+} の濃度に並行して亢進し, Ca^{2+} が 3 mM を超すと低下しはじめ, maximal activity は, 3 mM で認められた。

一方, Mg^{2+} は, 3 mM Ca^{2+} の存在下でも 0.2 mM Mg^{2+} の添加により, 強力に3種の base-exchange reaction を抑制した(図1)。

major pathway では, base-exchange activity と逆で, Mg^{2+} の添加で濃度依存性に上昇し, maximal velocity は 5~10 mM でみられた(図表省略)が, 5 mM Mg^{2+} の存在下でも, わずか 0.1 mM の Ca^{2+} の添加により, basal level の 1/10~1/15 の値まで著明に低下した。

(3) calmodulin inhibitor および calmodulin の各酵素活性への影響

上述のように, 各 base-exchange activity は, Ca^{2+} 依存性に反応したにもかかわらず, 予測に反し, CPZ および TFP の添加により上昇し, maximal stimulation は, 100 μM のあたりで認められた(図1)。

一方, calmodulin の添加は, base-exchange reaction 中, PS 形成と PC 形成を有意に抑制し, PE 形成には, 顕著な影響を与えなかった(表2)。

一方, EPT, CPT に関しては, CPZ や TFP の calmodulin inhibitor の添加により若干低下傾向を示したが, 有意の減少は認められず, また, calmodulin の添加では, 全然影響が認められなかった(図表省略)。

(4) bioactive stimulants の各酵素活性への影響

base-exchange activity 中, ethanolamine-exchange activity は, 好中球では 0.2 mg/ml 以下の opsonized zymosan, また 10 ng/ml 以下の PMA の濃度範囲で濃度依存性に刺激亢進を示した(表3a), リンパ球でも 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の Con A また, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PHA の範囲で上昇を示した(表3b)。

この base-exchange の PE 形成を刺激上昇させた濃度は, 一般に whole の好中球やリンパ球を刺激した至適濃度(好中球の場合は, 活性酸素産生やライソゾーム酵素分泌刺激濃度, リンパ球では, Con A や PHA に対する blastogenesis 刺激濃度)の 1/5~2/5 の低濃度であり^{11,15)}, この低濃度は筆者らが同じく好中球, リンパ球膜の methyltransferase 活性を刺激亢進させた至適濃度と同じ濃度¹¹⁾のものであり, 一般に, 白血球膜 phospholipids 酵素活性を刺激する至適濃度は, whole cell を

表3 bioactive stimulants 各 base-exchange activity への影響

a. 好中球膜 base-exchange reaction

base-exchange \ zymosan (mg/ml)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	1	2
ethanolamine-exchange	7.3	7.7	9.1	9.8	8.2	7.0	6.3
serine-exchange	3.9	3.7	3.9	4.4	3.7	3.4	3.2
choline-exchange	0.6	0.5	0.7	1.1	0.5	0.4	0.5

base-exchange \ PMA (ng/ml)	0	4	6	10	15	20	40
ethanolamine-exchange	7.3	7.0	7.8	8.6	8.0	7.7	8.0
serine-exchange	3.9	4.0	4.2	4.1	4.1	3.9	3.7
choline-exchange	0.6	1.0	1.1	1.5	1.1	1.0	0.9

b. リンパ球膜 base-exchange reaction

base-exchange \ Con A (μ g/ml)	0	0.5	1	2	4	10	20
ethanolamine-exchange	16.0	20.9	22.7	24.5	20.1	18.8	17.2
serine-exchange	7.5	10.0	9.9	12.5	11.2	9.3	9.0
choline-exchange	1.1	1.2	1.4	1.6	1.9	0.9	0.8

base-exchange \ PHA (μ g/ml)	0	0.05	0.1	0.2	0.4	1	2
ethanolamine-exchange	16.0	19.9	22.9	24.2	24.9	22.4	20.9
serine-exchange	7.5	10.8	12.2	12.9	12.8	11.9	10.8
choline-exchange	1.1	1.7	1.8	1.9	1.6	1.4	1.3

刺激する濃度よりはるかに低いということがいえる。

一方、好中球、リンパ球膜の serine-exchange と choline-exchange activity, および major pathway の EPT, CPT は、これら bioactive stimulants によって有意の変化を示さず、今回検索した酵素活性中、base-exchange reaction の ethanolamine-exchange activity のみが、cell activation を惹起す炎症反応の過程と関連を有している可能性が示唆された。

考 察

今回の実験で、既報の臨床報告にもみられたような急性の炎症患者好中球、リンパ球膜の ethanolamine-exchange activity の亢進が証明されたのみならず、opsonized zymosan や PHA, Con A などの bioactive stimulants の添加で有意な活性の亢進がみられ、一方、EPT, CPT の major pathway の酵素活性は、炎症患者でも変化を示さず、かつ、bioactive stimulants で刺激されなかった。

このことは、従来、major pathway(EPT, CPT)は、Hirata ら⁷⁾が、chemoattractant の添加で、EPT, CPT の活性の上昇が得られなかったと報告しているように、cell activation に関係せず、膜の骨格形成に関与するとする考え^{4,7)}を支持するものであり、一方、その生化学的意義の不明であった base-exchange reaction のうち

で、ethanolamine-exchange activity が cell activation の惹起に、なんらかの関連性を有している可能性を示唆する。

さらに、base-exchange reaction の詳細な意義の解明のために行った種々の実験結果より、 Ca^{2+} の添加では、すべての base-exchange activity は亢進したが、calmodulin inhibitor の添加によっても刺激され、かつ calmodulin 自身の添加で抑制を受けた。

このことは、base-exchange reaction は、 Ca^{2+} には依存性であるが、calcium-calmodulin complex には、非依存性であることを示唆する。

また、 Mg^{2+} で base-exchange activity が抑制され major pathway の EPT, CPT が刺激亢進されたことは、methylation や phospholipase A_2 が Mg^{2+} によって (Ca^{2+} とは逆に)抑制を受けることが知られていることから、base-exchange reaction の cell activation との関与を暗示さすものである。

筆者らが、すでに報告¹⁵⁾しているように、家兎の血小板の base-exchange activity と比較すると、ほぼ類似の結果がみられ、3種の activity の活性値の順位も、PE 形成>PS 形成>PC 形成であったが、今回のヒト白血球の ethanolamine-exchange と choline-exchange の差は、家兎血小板においてみられた差よりはるかに大きい。このことは、既報で筆者らが示唆しているように、base-exchange activity 中、ethanolamine-exchange activity の生化学的意義の解明に一層有力な手掛かりを与えるものと思われる。

すなわち、今回の実験結果から、base-exchange activity, 特に ethanolamine-exchange activity の意義として、methylation や phospholipase A_2 の minor pathway に⁶⁻⁹⁾類似した細胞活性化機構への関与を支持するデータを連挙してみると、

① Ca^{2+} 依存性で Mg^{2+} 非依存性である……methylation, phospholipase A_2 と類似

② bioactive stimulants で ethanolamine-exchange が刺激される。

③ bioactive stimulants で刺激亢進される濃度が methylation を増加させたと同様の低濃度である。

④ 筆者らの研究室の実験結果であるが、膜成分の作成の際に base-exchange の測定時に用いた EGTA/ CaCl_2 system^{1,11)}の方法を methylation の測定に使用すると、一層高い活性と compact な(標準偏差値の小さい)データが得られた。

base-exchange reaction は、(calmodulin inhibitor で亢進し、calmodulin で抑制されるという問題点を残しているが……)、以上のように minor pathway の methyltransferase や phospholipase A_2 ときわめて類似の反応態度をとっている。

また、さらに示唆に富む所見として、正常人の major の pathway では、PE 形成の EPT activity のほうが若干 PC 形成の CPT activity より低下を示しているが(表1), base-exchange reaction における PE 形成(ethanolamine-exchange activity)は、健康人(表1), および炎症患者も含め、PC 形成(choline-exchange activity) よりはるかに高い値を示している。そして、炎症患者の base-exchange reaction では、ethanolamine-exchange activity が亢進し、逆に choline-exchange activity は低下傾向を示すため、さらに両者の差はいちじるしく大きくなっている。このことは、本誌既報¹⁾図1からも推測されるように、base-exchange reaction のうちで、ethanolamine-exchange activity の ethanolamine が cell activation の発生源の一つと考えられている minor pathway⁶⁻⁹⁾ の precursor であり、すなわち、base-exchange reaction の ethanolamine は、transmethylation の PE の供給源である可能性が考えられる。

したがって、base-exchange reaction で、仮に PC 形成のほうが PE 形成より大きいと minor pathway での

の流れが逆流することになる。base-exchange の ethanolamine-exchange が choline-exchange により高値で、しかも炎症時に、その両者の差が大きくなるということとは、炎症反応の mediator や process を惹起さす原動力となっている minor pathway の流れを一層促進させることが考えられる。

base-exchange reaction (の ethanolamine-exchange activity)が、このようなメカニズムで cell activation の機構と関連を有しているであろうという筆者らの仮説は、今後多くの検討を要する問題を残しているが、生理学的、生化学的意義の不明であった base-exchange activity の研究を進めるうえで一つの手掛かりを提供するものと考ええる。

文 献

- 1) 丹羽鞆負：細胞膜の動態と炎症性疾患。炎症 7: 57-62, 1987.
- 2) Kanfer, J.N.: The base-exchange enzymes and phospholipase D of mammalian tissue. *Can. J. Biochem.* 58: 1370-1380, 1980.
- 3) Tou, J.-S.: Decreased incorporation of L-[U-¹⁴C] serine into phosphatidylserine by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis. *Biochim.*

Biophys. Acta 575: 384-388, 1979.

- 4) Kennedy, E.P., Weiss, S.B.: The function of cytidine coenzymes in the biosynthesis of phospholipids. *J. Biol. Chem.* 222: 193-214, 1956.
- 5) Weiss, S.B., Smith, S.W., Kennedy, E.P.: The enzymatic formation of lecithin from cytidine diphosphate choline and d-1, 2-diglyceride. *J. Biol. Chem.* 231: 53-64, 1958.
- 6) Hirata, F., Axelrod, J.: Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Sci.* 209: 1082-1090, 1980.
- 7) Hirata, F., Corcoran, B.A., Venkatasubramanian, K., Sciffmann, E., Axelrod, J.: Chemoattractants stimulate degradation of methylated phospholipids and release of arachidonic acid in rabbit leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 2640-2643, 1979.
- 8) Fisher, D.B., Mueller, G.C.: Studies on the mechanism by which phytohemagglutinin rapidly stimulates phospholipid metabolism of human lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 248: 434-448, 1971.
- 9) 豊島 聡：リンパ球の分裂とメチル基転移。代謝 18: 1499-1505, 1981.
- 10) Vance, D.E., Kruijff, B.: The possible functional significance of phosphatidylethanolamine methylation. *Nature* 288: 277-279, 1980.
- 11) Niwa, Y., Sakane, T., Taniguchi, S.: Phospholipid transmethylation in the membrane of human neutrophils and lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 234: 7-14, 1984.
- 12) Niwa, Y., Sakane, T., Yamamoto, S., Kano, T., Taniguchi, S.: Methyltransferase and phospholipase A₂ activity in the membrane of neutrophils and lymphocytes from patients with bacterial and viral infections. *Inflammation* 9: 53-65, 1985.
- 13) Reiss, M., Roos, D.: Differences in oxygen metabolism of phagocytosing monocytes and neutrophils. *J. Clin. Invest.* 61: 480-488, 1978.
- 14) Lohrmann, H.P., Novikovs, L., Graw, R.G.: Stimulatory capacity of human T and B lymphocytes in the mixed leukocyte culture. *Nature (London)* 250: 144-149, 1974.
- 15) Niwa, Y., Taniguchi, S.: Phospholipid base-exchange in human leukocyte membranes: Quantitation and correlation with other phospholipid biosynthetic pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* 250: 345-357 1986.
- 16) Kobayashi, Y., Okahata, S., Sakano, T., Tanabe, K., Usui, T.: Superoxide dismutase activity of T lymphocytes and non-T lymphocytes. *FEBS Letters* 98: 391-393, 1979.