好中球のロイコトリエン D₄ 分解作用

長岡 功・山下辰久*

Leukotriene D₄-metabolizing activity of human neutrophils Leukotriene D₄-metabolizing activity was studied using human neutrophils. Leukotriene D₄ was rapidly converted to leukotriene E₄ during incubation with intact neutrophils. The subcellular localization of leukotriene D₄-metabolizing enzyme was examined, and leukotriene D₄-metabolizing activity was found to be present in the particulate fraction which consists of cell surface membrane and granules, but not in the nuclear and cytosol fractions. When neutrophils were modified chemically with diazotized sulfanilic acid, a poorly permeant reagent which inactivates cell surface enzymes selectively, the leukotriene D₄-metabolizing activity of intact neutrophils was significantly inhibited. When neutrophils were stimulated with phorbol myristate acetate, a secretagogue, leukotriene D₄-metabolizing activity was found to be released extracellularly. Among enzyme inhibitors examined, o-phenanthroline, a metal chelator strongly inhibited both the leukotriene D₄-metabolizing activities of intact neutrophils and extracellularly released enzyme. These results would suggest that leukotriene D₄-metabolizing metalloenzymes which convert leukotriene D₄ to leukotriene E₄, are located on the cell surface membrane and in the granules of human neutrophils.

Isao Nagaoka・Tatsuhisa Yamashita*

*Department of Physiological Chemistry, Juntendo University, School of Medicine

key words: leukotriene D₄, leukotriene D₄-metabolizing activity, diazotized sulfanilic acid, o-phenanthroline, human neutrophil

炎症の際に、白血球によってロイコトリエン (LT) C₄, D₄ および E₄ などの slow reacting substances of anaphylaxis (SRS-A) が産生されるが、SRS-A のなかで、LTD₄ は、強力な血管透過性亢進作用をもつことから、炎症反応において重要な働きをしていると考えられている¹⁾。現在までに、LTD₄ の産生機構については、詳細な研究がなされているが²⁾、産生された LTD₄ が、炎症部位においてどのような機序によって分解されるかについては、ほとんど検討されていない。筆者らは、すでに、急性炎症の際に出現するブラジキニンなどのケミカルメディエーターが、炎症部位に集積する好中球によって分解されることを報告している³⁾。そこで、本研究では、好中球が、ケミカルメディエーターである LTD₄ の分解にどのように関与しているかを検討してみた。

材料と方法

(1) 好中球の調製⁴⁾

ヘパリン採血した健康成人静脈血に、5%デキストランを含む生理食塩水を4:1の割合で加え、よく混和した後に30~40分間室温で静置し、赤血球を沈降させた。得られた上清部分を Ficoll-Conray 液(比重1.078)に重層し、これを室温で1,000×g、20分間遠心し、沈殿部分に好中球を回収した。好中球に混在している赤血球を

低張処理によって溶血させた後に、好中球を PBS [phosphate-buffered saline, 137 mM NaCl/2.7 mM KCl/8.1 mM Na₂HPO₄/1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4] で2回洗浄し、最終的に PBS に懸濁した。得られた細胞を Wright-Giemsa 染色すると、95%以上が好中球であった。

(2) 好中球の細胞成分画分の調製

PBS に懸濁した好中球 (2×10⁷ 細胞/ml) を、4°C 74 W 30秒間超音波処理し、細胞を破碎した。この破碎細胞液を 400×g、15分間遠心し、沈殿部分に核画分を得た。さらに、上清部分を10⁵×g、1時間遠心し、沈殿部分に particulate、上清部分に細胞質の各画分を得た。

(3) スルファニル酸のジアゾニウム塩(DSA)による好中球の化学修飾^{3,4)}

好中球(10⁷ 細胞/ml)を2 mMDSA と PBS 中で37°C 5分間インキュベーションすることによって、好中球の細胞膜表面を化学修飾した。インキュベーション後、細胞を PBS で2回洗浄することによって反応を停止し、細胞を再び PBS に懸濁した。好中球を化学修飾したあとに、細胞の生存率をトリパンブルー色素排除試験で調べたところ、生存率は95%以上であった。

DSA は、DePierre と Karnovsky の方法に従って調製し⁵⁾、PBS に溶解した。

(4) 顆粒酵素の細胞外放出

好中球 (2×10⁷ 細胞/ml) を 100 ng/ml phorbol myristate acetate (PMA) と PBS 中で37°C 30分間インキュ

* 順天堂大学医学部生理化学教室

図1 RP-HPLC analysis of the metabolism of leukotriene D_4 by human neutrophils
Leukotriene D_4 ($1 \mu\text{g/ml}$) was incubated with neutrophils (10^7 cells/ml) for 0 min (a) or 40 min (b) at 37°C . After the termination of the reaction and subsequent centrifugation, an aliquot of the resultant supernatant was subjected to chromatography. (c) authentic leukotriene E_4

ペーシェンした後に、細胞浮遊液を $1850\times\text{g}$, 10分間遠心し、得られた上清中に含まれる酵素活性を測定することによって、顆粒酵素の細胞外放出を判定した。

(5) 好中球のロイコトリエン D_4 分解作用の測定

$1 \mu\text{g/ml}$ のロイコトリエン(LT) D_4 を好中球あるいは好中球の細胞成分画分(10^7 細胞/ml)と PBS 中で、 37°C 一定時間インキュベーションし、 LTD_4 を分解した。反応を酸性のメタノール(メタノール: 酢酸=1000:1)を加えて停止した後に、反応液を遠心($8300\times\text{g}$, 10分間)し、上清中に含まれる LTD_4 量をモルモット回腸を用いて定量した³⁾。また、反応上清の一部を逆相の高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)で分析し、 LTD_4 が、どのような物質に分解されているかを調べてみた。RP-HPLC は、Finepak SIL C_{18} ($5 \mu\text{m}$, $4\times 260 \text{ mm}$, 日本分光)を使い、0.05% EDTA を含むメタノール/水/酢酸(65:35:0.1, pH 5.6)を、 1 ml/分 の速度で流し、280 nm の紫外部吸収で検出を行った。

(6) 酵素活性の測定

Mg^{2+} -ATPase は、ATP を基質として測定した⁶⁾。乳酸脱水素酵素は、Bergmeyer の方法⁷⁾により測定した。リゾチームは、micrococcus lysodeikticus を基質として、また、 β -グルクロニダーゼは、フェノールフタレイニングルクロン酸を基質として、それぞれ酵素活性を測定した³⁾。

酵素活性は、1分間に $1 \mu\text{mol}$ の基質を分解する酵素量を 1 unit(U)としてあらわした。

結果と考察

(1) ヒト好中球の LTD_4 分解作用

LTD_4 ($1 \mu\text{g/ml}$)をヒト好中球(10^7 細胞/ml)と 37°C でインキュベーションすると、 LTD_4 のモルモット回腸収縮作用が、時間とともに低下し、40分後には、未処理 LTD_4 の $11.5\pm 2.1\%$ ($n=3$)にまで低下した。そこで、

この LTD_4 と好中球の反応上清を RP-HPLC で分析し、 LTD_4 がどのような物質に代謝されているかを調べてみた(図1)。retention time が 17.73 ± 0.24 分のあるところにある LTD_4 のピークは、好中球と40分間インキュベーションすることによって完全に消失し、それにかわって、 LTE_4 の retention time に一致したところに新たなピーク(retention time 19.55 ± 0.41 分)が出現し、 LTD_4 は、この新たなピークに定量的に変換されていた。この新たに出現した物質の紫外吸収スペクトルを調べてみると、280 nm に最大吸収をもち、270 nm と 290 nm に二つの肩をもつことから、 LTE_4 と同じ吸収スペクトルを示すことがわかった。

また、 LTE_4 のモルモット回腸収縮作用を調べてみると、 LTD_4 の $8.4\pm 2.3\%$ ($n=3$)であり、この値は、さきの LTD_4 と好中球の反応上清の回腸収縮作用(LTD_4 の11.5%)と類似していた。これらの結果から、 LTD_4 は、ヒト好中球によって LTE_4 に分解されることがわかった。

(2) LTD_4 分解酵素の細胞内局在性

ヒト好中球に、 LTD_4 を LTE_4 に分解する作用が存在することがわかったので、つぎに、 LTD_4 分解酵素の細胞内局在性について検討してみた。まず、好中球を、核、細胞質および particulate の各画分に分離し、 LTD_4 分解酵素が、これらのどの画分に存在するか調べた。得られた各細胞成分画分におけるマーカー酵素の分布をみると(表1)、細胞質酵素の乳酸脱水素酵素は細胞質画分に、また、細胞膜酵素の Mg^{2+} -ATPase⁸⁾、顆粒酵素のリゾチームおよび β -グルクロニダーゼは、particulate 画分に、それぞれ80~90%存在していたが、これらマーカー酵素は、核画分にはほとんど存在しなかった(5%以下)。 LTD_4 にこれらの細胞成分画分を作用させたところ(表2)、核および細胞質画分は、 LTD_4 をまったく分解しなかったが、particulate 画分は、 LTD_4 をすみやかに

表 1 distribution of marker enzymes in subcellular fractions of neutrophils

	relative enzyme activity (%)		
	nucleus	cytosol	particulate
Mg ²⁺ -ATPase	3.3±0.8	17.8±3.4	78.5±0.3
lysozyme	5.3±2.2	16.7±0.1	78.9±2.7
β-glucuronidase	4.5±1.9	23.3±3.0	72.3±1.1
lactate dehydrogenase	1.2±0.8	94.3±1.1	4.4±0.3

Relative enzyme activities in subcellular fractions are expressed as a percentage of the total activities recovered. Total recoveries of the enzymes were 90~110%. Total enzyme activities were 4.75±1.83 mU/10⁷ cells for Mg²⁺-ATPase, 21.69±2.47 μg egg-white lysozyme/10⁷ cells for lysozyme, 2.45±0.27 mU/10⁷ cells for β-glucuronidase and 741.1±203.5 mU/10⁷ cells for lactate dehydrogenase. Values represent the mean±SD of three experiments.

表 2 degradation of leukotriene D₄ by neutrophil subcellular fractions

incubation time	residual leukotriene D ₄ (% of initial)		
	nucleus	cytosol	particulate
5 min	—	—	68.0±5.2
10 min	—	—	36.3±3.7
20 min	—	—	16.3±0.5
40 min	97.5±4.3	95.0±4.6	8.5±0.5

After leukotriene D₄ (1 μg/ml) was incubated with each subcellular fraction (10⁷ cell equivalents/ml) for the indicated time periods, the residual leukotriene D₄ was quantitated using the isolated guinea-pig ileum. Values are the mean±SD of three experiments.

表 3 degradation of leukotriene D₄ by intact or diazotized sulfanilic acid (DSA)-modified neutrophils

incubation time	residual leukotriene D ₄ (% of initial)	
	control neutrophils	DSA-modified neutrophils
5 min	78.0±9.0	—
10 min	56.3±9.2	92.5±3.0
20 min	30.0±7.1	83.2±2.0
40 min	11.5±2.1	70.0±5.0

After leukotriene D₄ (1 μg/ml) was incubated with control unmodified or 2 mM DSA-modified neutrophils (10⁷ cells/ml) for the indicated time periods, the residual leukotriene D₄ was quantitated. Values represent the mean±SD of three experiments.

LTE₄ に分解した。この結果から、LTD₄ 分解酵素は、好中球の particulate 画分に存在することがわかった。

particulate 画分は、細胞膜および顆粒成分によって構成されているので、つぎに、LTD₄ 分解酵素が、これ

らのどちらの成分に存在するかを調べた。まず、好中球を、膜透過性が低く、したがって細胞膜表面に存在する酵素のみを特異的に阻害するスルファニル酸のジアゾニウム塩(DSA)⁵⁾で修飾してみた。DSA 修飾した好中球のマーカー酵素の活性を調べてみると、細胞質酵素の乳酸脱水素酵素、顆粒酵素のリゾチームおよび β-グルクロニダーゼは、まったく阻害されていなかったが、細胞膜表面酵素の Mg²⁺-ATPase は、約 80% 阻害されており、DSA 修飾によって好中球の細胞膜表面酵素が、選択的に阻害されていることがわかった。そこで、この DSA 修飾した好中球の LTD₄ 分解作用を調べてみた(表 3)。修飾していないコントロールの好中球は、LTD₄ を時間とともにすみやかに LTE₄ に分解した。しかし、DSA 修飾した好中球は、LTD₄ をほとんど分解せず、DSA 修飾によって、好中球の LTD₄ 分解作用が、約 80% 阻害されていることがわかった。

この結果から、LTD₄ 分解酵素が、好中球の細胞膜表面に存在することが推測された。

つぎに、LTD₄ 分解酵素が、好中球の顆粒内にも存在するかどうか調べてみた。好中球を、100 ng/ml PMA で 30 分間刺激すると、リゾチームの 50% が、細胞外に放

表4 degradation of leukotriene D₄ by extracellularly released granular enzyme from neutrophils

incubation time	residual leukotriene D ₄ (% of initial)	
	supernatant from unstimulated cells	supernatant from PMA-stimulated cells
5 min	—	85.0±5.0
10 min	87.8±3.6	70.0±4.7
20 min	—	43.0±3.3
40 min	80.5±3.3	17.0±2.8

Leukotriene D₄ (1 µg/ml) was incubated with supernatants from unstimulated or 100 ng/ml PMA-stimulated neutrophils (10⁷ cell equivalents/ml) for the indicated time periods, and then the residual leukotriene D₄ was assayed. Values are the mean±SD of three experiments.

表5 effect of enzyme inhibitors on the leukotriene D₄-metabolizing activities of intact neutrophils and extracellularly released granular enzyme

inhibitors	relative leukotriene D ₄ -metabolizing activity (%)	
	intact neutrophils	granular enzyme released ^a
bestatin (100 µg/ml)	98.5±2.6	95.9±3.7
leucine chloromethyl ketone (100 µM)	92.6±5.5	96.7±4.3
serine (5 mM), borate (10 mM)	94.1±3.0	95.2±1.5
ε-amino-n-caproic acid (3 mM)	99.3±3.2	98.3±1.6
diisopropylfluorophosphate (1 mM)	93.0±7.6	95.9±5.9
N-ethylmaleimide (5 mM)	96.4±5.5	97.9±3.0
dithiothreitol (1 mM)	3.2±3.7	6.7±2.3
o-phenanthroline (1 mM)	3.2±4.5	4.2±1.0

Leukotriene D₄ (1 µg/ml) was incubated with intact neutrophils (10⁷ cells/ml) or extracellularly released granular enzyme (10⁷ cell equivalents/ml) in the absence or presence of enzyme inhibitors at indicated concentrations, and then the residual leukotriene D₄ was assayed. Relative leukotriene D₄-metabolizing activity is expressed as a percentage of that measured in the absence of inhibitors. Values are the mean±SD of three experiments.

a: Extracellularly released granular enzyme was prepared from neutrophils which were stimulated with 100 ng/ml PMA for 30 min at 37°C.

出された。また、好中球を PMA 非存在下で30分間インキュベーションすると、10%のリゾチームが細胞外に放出された。一方、細胞質乳酸脱水素酵素の細胞外放出は、いずれの場合も4%以下であった。これらの反応上清を LTD₄ に作用させると(表4)、PMA 刺激していない好中球の反応上清は、LTD₄ をほとんど分解しなかったが、PMA 刺激した好中球の反応上清は、LTD₄ をすみやかに LTE₄ に分解することがわかった。これらの結果から、LTD₄ 分解酵素は、好中球の顆粒内にも存在すると考えられた。

(3) LTD₄ 分解酵素の性質

好中球の細胞膜表面および顆粒中に存在する LTD₄

分解酵素の性質を調べるために、intact 好中球および PMA 刺激によって細胞外に放出された顆粒酵素に及ぼす種々の阻害剤の効果を検討してみた(表5)。アミノペプチダーゼ阻害剤の leucine chloromethyl ketone⁹⁾および bestatin¹⁰⁾、γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ阻害剤のセリン・ホウ酸複合体¹¹⁾、カルボキシペプチダーゼ阻害剤の ε-amino-n-caproic acid¹²⁾、セリンプロテアーゼ阻害剤の diisopropyl fluorophosphate、および SH 基修飾試薬の N-ethylmaleimide は、両酵素活性にまったく影響しなかったが、SH 化合物の dithiothreitol および金属キレート剤の o-phenanthroline は、両酵素活性を著明に阻害した。また、o-phenanthroline による阻害

は、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} などの金属イオンの添加によって完全に回復することが、両酵素で観察された。さらに、dithiothreitolは、金属キレート作用を有することが知られているが¹³⁾、dithiothreitolによる阻害も、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} の添加によって回復することが、両酵素で観察された。これらの結果から、好中球の細胞膜表面および顆粒中に存在する LTD_4 分解酵素は、金属酵素であると考えられた。

急性炎症の炎症組織では、血管透過性の亢進や好中球などの白血球の浸潤が認められる。血管透過性の亢進には、ブラジキニンや SRS-A などのケミカルメディエーターが関与しているが、炎症部位における SRS-A の主要成分である LTD_4 は^{14,15)}、強力な血管透過性亢進作用をもつことから、急性炎症において重要な働きをしていると考えられている。

今回の結果は、炎症部位において、 LTD_4 が好中球によって分解されることを示唆しており、ブラジキニンが好中球によって分解されるという以前の報告³⁾を考えあわせると、好中球は、炎症部位においてケミカルメディエーターを代謝することによって、炎症反応の調節に関与しているという可能性が考えられる。

最後にロイコトリエン D_4 を提供していただいた小野薬品工業㈱に感謝いたします。

文 献

- 1) Piper, P.J.: Formation and actions of leukotrienes. *Physiol. Rev.* 64: 744-761, 1984.
- 2) Örning, L., Hammarström, S.: Inhibition of leukotriene C and leukotriene D biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 255: 8023-8026, 1980.
- 3) Nagaoka, I., Yamashita, T.: Possible involvement of aminopeptidase, an ecto-enzyme in the inactivation of bradykinin by intact neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta.* 847: 67-76, 1985.
- 4) Nagaoka, I., Yamashita, T.: Comparative studies on the leucine aminopeptidase activity of different types of leukocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B: 147-151, 1984.
- 5) DePierre, J.W., Karnovsky, M.L.: Ecto-enzymes of the guinea pig polymorphonuclear leukocytes. I Evidence for an ecto-adenosine monophosphatase, -adenosine triphosphatase, and -p-nitrophenyl phosphatase. *J. Biol. Chem.* 249: 7111-7120, 1974.
- 6) Yamashita, T., Tanaka, Y., Matsuzawa, H.: Cytoplasmic and plasma membrane adenosine triphosphatase of polymorphonuclear neutrophils. Comparison of their enzymatic properties and attempt for a direct determination of myosin ATPase activity using polymorphonuclear neutrophil extract. *Biochim. Biophys. Acta* 599: 246-253, 1980.
- 7) Bergmeyer, H.U., Bernt, E.: Lactate dehydrogenase. UV-assay with pyruvate and NADH. *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer, H.U., ed., Academic Press, New York, 1974, p 574-579.
- 8) Smolen, J.E., Weissmann, G.: Mg^{2+} -ATPase as a membrane ecto-enzyme of human granulocytes. Inhibitors, activators and response to phagocytosis. *Biochim. Biophys. Acta* 512: 525-538, 1978.
- 9) Birch, P.L., El-Obeid, H.A., Akhtar, M.: The preparation of chloromethylketone analogues of amino acids. Inhibition of leucine aminopeptidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 148: 447-4451, 1972.
- 10) Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, H., Hamada, H., Takeuchi, T.: Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by actinomycetes. *J. Antibiotics* 23: 425-427, 1970.
- 11) Tate, S.S., Meister, A.: Serine-borate complex as a transition-state inhibitor of γ -glutamyl transpeptidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 4806-4809, 1978.
- 12) Erdős, E.G., Yang, H.Y.T.: Kinases. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. XXV. Erdős, E.G., ed., Springer-Verlag, Berlin, 1970, p 516-530.
- 13) Gracy, R.W., Noltmann, E.A.: Studies on phosphomannose isomerase. II Characterization as a zinc metalloenzyme. *J. Biol. Chem.* 243: 4109-4116, 1968.
- 14) Lewis, R.A., Austen, K.F., Drazen, J.M., Clark, D.A., Marfat, A., Corey, E.J.: Slow reacting substances of anaphylaxis: Identification of leukotriene C-1 and D from human and rat sources. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3710-3714, 1980.
- 15) Goetzl, E.J., Payan, D.G., Goldman, D.W.: Immunopathogenetic roles of leukotrienes in human diseases. *J. Clin. Immunol.* 4: 79-84, 1984.