白血球の研究を顧みて

Reminiscences of my research on the leukocyte functions

山下 辰久*
TATSUHISA YAMASHITA, M.D.

細菌・寄生虫などの異物が生体内に侵入すると、好中球や好酸球などの白血球が血管から異物侵入部位に遊出し、そこで異物を捕らえ排除しようとする。白血球のこれら機能の発現には、細胞膜の接着受容体、活性酸素および顆粒内の殺菌・殺虫タンパクが重要な働きをすると考えられている。本講演では、われわれがいままで研究してきた白血球の接着機構、活性酸素生成機構、顆粒内殺菌・殺虫タンパク質の作用機構および遺伝子発現機構についての結果を紹介しながら白血球機能を概説した。

キーワード：生体防御、白血球、細胞接着、活性酸素、抗微生物タンパク、遺伝子発現

Key words : host defense, leukocyte, cell adhesion, reactive oxygen, antimicrobial protein, gene expression

研究の流れ

ただ今は、丁寧なご紹介を頂き有難うございます。また、本日の記念講演の機会を与えて頂きました順天堂医学会の皆様へ御礼申し上げます。

さて、私は、昭和30年、当時有山 登先生が教授をされ、関根隆光先生が助教授をされていた生化学講座に入り、以来、約40年間順天堂大学において研究・教育に携わってまいりました。この40年を振り返って見ますと、生化学講座で過ごしたはじめの20年と、生化学講座から独立して生理化学研究室・生化学第二講座で過ごしたあとの20年に分けられます(表-1)。生化学講座時代は、筋収縮機構について研究してまいりましたが、昭和50年に独立し、生理化学研究室を開設したと

きに、より臨床に近いテーマをと考え、感染症や炎症に関与する白血球、とくに好中球・好酸球などの顆粒球について研究することにしました。

生理化学研究室開設当時は、低温保存の白血球機能におよぼす影響や、化学修飾による白血球機能の解析、あるいは動物炎症モデルを使った炎症機構の解明などのテーマについて、細胞レベルで研究しておりましたが、その後、接着機構、活性酸素生成機構、白血球の顆粒内殺菌・殺虫タンパク質の作用機構および遺伝子発現などのテーマについて、分子レベルあるいは遺伝子レベルで研究を進めるようになりました。本講演では、時間の関係上これらの中から2、3の仕事を白血球機能について概説しながら紹介して見ようと思います。

白血球機能の概説

図-1は、好中球が細菌などの異物を排除する過程を示しています。まず、血液中の好中球は、接着分子を介して血管内皮細胞や血管基底膜に接着し、血管外に遊出し、異物侵入部位に向かって遊

* 順天堂大学医学部生化学第二講座教授
Department of Biochemistry (II), Juntendo
University School of Medicine, Tokyo, Japan
** 第268回順天堂医学会学術集会〔Mar. 23, 1994 開催〕
〔Apr. 25, 1994 原稿受領〕

表-1 研究の流れ

年代	研究テーマ
昭和30年 生化学講座	筋収縮機構 ミオシンATPaseの活性中心の構造解析 アクチン-ミオシンの相互作用に關与するSH基の同定
昭和50年 生理化学研究室 昭和62年 生化学第二講座	白血球の生化学的研究 低温保存の好中球機能におよぼす影響（今泉，平井） 化学修飾による好中球機能の解析（高森，田中，津沢） 動物炎症モデルを使った炎症機構の解明（長岡，石橋） 白血球によるケミカルメディエーターの代謝機構（長岡，小谷野） 食作用促進因子に関する研究（石橋） 好酸球の活性酸素生成機構（染谷，原） 肥満細胞の顆粒放出反応（斎藤） 接着機構（岩淵） 活性酸素生成機構（染谷） 顆粒内殺菌・殺虫タンパクの作用機構（斎藤，蓬田，橋本） および遺伝子発現（長岡） 抗レトロウイルス活性をもつ顆粒タンパクの研究（蓬田） 細胞増殖因子の遺伝子発現機構（長岡） 骨髓細胞の分化・成熟（宮本，長岡） スポーツの生体防御におよぼす影響（橋本）
現在に至る	

す。好中球の接着・遊走・殺菌などの作用が障害されると重症の感染症を引き起こすことから、これらの作用は好中球の機能発現に重要であると考えられます。

図-2は、好中球の殺菌作用を詳しく示したものです。好中球が異物を貪食すると細胞膜が異物を包み食胞が形成されますが、この時に細胞膜のスーパーオキシド生成酵素が活性化されます。さらに、食胞はリソゾーム顆粒と融合しファゴリソゾームを形成します。スーパーオキシド生成酵素は、NADPHを基質として酸素を一電子還元してスーパーオキシド O_2^- を生成します。生成されたスーパーオキシドはさらに過酸化水素・次亜塩素酸などの活性酸素に変化します。

これらの活性酸素およびリソゾーム顆粒から放出された殺菌タンパクの作用によって殺菌が行われます。一般に、活性酸素による殺菌を酸素依存性の殺菌といい、顆粒内の殺菌タンパクによるものを酸素非依存性の殺菌といいます。

走っていきます。そこで好中球は異物を貪食し、活性酸素や顆粒内殺菌タンパクや種々の酸性加水分解酵素の作用によって異物を処理します。しかし、この時に活性酸素や顆粒タンパクが過度に細胞外に放出されると組織障害をおこしてしまいま

図-2 好中球の殺菌作用

顆粒の殺菌タンパクとしては、カチオンックペプチド・リゾチーム・ラクトフェリンなどの塩基性タンパクが知られていますが、カチオンックペプチドは、顆粒内での含有量が多く、また、グラム陽性菌・陰性菌・真菌・ウイルスに対して広い抗微生物作用を示すことから、酸素非依存性の殺菌において特に重要であると考えられています。

接着機構について

異物が体内に侵入しますと、好中球は接着分子を介して血管内皮細胞や血管基底膜に接着し血管外に遊出しますが、われわれは血小板の成分が好中球の接着を阻害することを見出し、この因子を接着阻害因子、即ち adherence inhibiting factor ; AIF と名付けました (図-3)。AIF は血小板のリソゾーム画分に存在し、血小板をトロンビンで刺激すると、細胞外に放出されることがわかりました。この因子は、基底膜の主要成分であるⅣ型コラーゲンに対する好中球の接着を強く阻害すると共に内皮細胞に対する接着をも阻害します。精製された AIF を SDS 電気泳動にかけますと 340, 190,

165 kDa のバンドに分かれることから、AIF はこれらのサブユニットから成ることがわかりました。

次に、AIF の作用機構を明らかにするために、AIF と受容体との親和性や AIF 受容体数を推定することができる Scatchard プロット解析法を用いて、AIF の好中球への結合の様子を調べてみました。図-4 からわかりますように好中球には、高親和性と低親和性の 2 種類の AIF 受容体が存在することがわかりました。さらに、Ⅳ型コラーゲン存在下で Scatchard 解析を行うと、高親和性受容体の解離定数は変化せず、低親和性受容体の解離定数のみが変化することがわかりました。これらの結果から、高親和性 AIF 受容体は AIF のみを認識し、一方、低親和性受容体は AIF のみならずⅣ型コラーゲンも認識することがわかりました。

さらに、AIF 受容体の本体を探るために、アフィニティークロマトグラフィーを用いて AIF 受容体の分離を試みました (図-5)。その結果、AIF のみを認識する受容体と、AIF とⅣ型コラーゲンの両者を認識する受容体が異なるタンパクとして分離することができました。これらの受容体を

図-3 血小板由来の好中球接着能阻害因子 (Adherence-inhibiting Factor ; AIF)

図-4 Scatchard プロットによる AIF 受容体の解析

SDS 存在下の電気泳動で解析しますと、両者に共通のサブユニットも存在することがわかりました。さらに、AIF と IV 型コラーゲンの両者を認識する受容体は、いわゆる IV 型コラーゲン受容体と同じサブユニットによって構成されることが示され、この受容体が、IV 型コラーゲン受容体そのものであることがわかりました。

これらの結果から、血小板から放出される AIF は、IV 型コラーゲン受容体に作用し、IV 型コラーゲンへの結合を阻害することによって、好中球の基底膜への接着を阻害し、好中球の炎症部位への

過度の遊出を抑制する可能性が考えられました。なお、AIF のみを認識する受容体の働きについては、現在さらに検討を進めております。

スーパーオキシド生成酵素の活性化機構について

次に、スーパーオキシド生成酵素の活性化機構についてお話します。好中球が異物を貪食したり、遊走因子などの可溶性刺激剤で刺激されますと細胞膜に存在するスーパーオキシド生成酵素が活性化され、酸素を一電子還元してスーパーオキシド

図-5 アフィニティークロマトグラフィーによる AIF 受容体の分離

図-6 スーパーオキシド生成酵素の活性化機構

を生成します。この酵素の活性化は、生きた細胞を刺激したときにみられますが、破碎した細胞では見られないことから、活性化機構の解明はこれまであまりなされていませんでした (図-6)。しかし、最近、破碎した細胞に SDS やアラキドン酸を作用させると、この酵素が活性化されることがわかり、しかも、その活性化は細胞膜だけではおこらずに、細胞質共存下ではじめておこることがわかり、この酵素の活性化に細胞質に存在する何

らかの因子が必須であることが示されました。

そこで、私たちは、スーパーオキシド生成酵素の活性化に関わる細胞質因子について検討してみました。

好中球の細胞質を陽イオン交換クロマトグラフィーで分離すると、細胞膜のスーパーオキシド生成酵素を活性化する単一のフラクションが得られ、これを SP-1 と呼ぶことにしました (図-7)。さらに、陽イオン交換クロマトグラフィーの未吸着

図-7 細胞質因子の精製

図-8 細胞質因子の相互作用

フラクションを陰イオン交換クロマトグラフィーにかけると、SP-1 存在下でスーパーオキシド生成酵素を活性化する大きなフラクションが得られ、これを QA-1 としました。これらのフラクションを精製したところ、SP-1 は、すでに報告されている 67 kDa、47 kDa の細胞質因子のほかに 39 kDa の新たなタンパクを含むことがわかりました。SP-1 を界面活性剤などで処理すると、47 kDa タンパクは分離されましたが、39 kDa タンパクと 67 kDa タンパクは分離されず両者が強固にインターアクションしていることがわかり、このことから 39

kDa タンパクは 67 kDa タンパクの機能に影響を与えている因子ではないかと思われました。一方、QA-1 は、精製の結果、28.5 kDa タンパクを含み、このタンパク質はアミノ酸配列分析の結果から、シグナル伝達に参与する G タンパク質の一つであることがわかりました。

これらの細胞質因子の作用を再構成系で調べてみますと、SP-1 は単独でいくぶん細胞膜のスーパーオキシド生成酵素を活性化しますが、QA-1 は単独でほとんど活性化をおこしませんでした（図-8）。しかし、両者を組み合わせると相乗的にスーパーオキシド生成酵素を活性化することがわかりま

した。スーパーオキシド生成酵素の活性化には、47 kDa、67 kDa などの細胞質因子が細胞膜へ移行し、細胞膜チトクローム b とインターアクションすることが必要であると考えられています。したがって、私たちが見出した 28.5 kDa タンパクは、47 kDa、67 kDa の細胞質因子の細胞膜への移行や、チトクローム b とのインターアクションに影響することによってスーパーオキシド生成酵素の活性化に強く関与するものと思われました。

図-9 顆粒内殺菌活性物質カチオニックペプチド (CP)

顆粒内殺菌・殺虫タンパクの作用機構について

最後に、好中球の顆粒内殺菌タンパクの仕事についてお話したいと思います。

好中球の顆粒内にはいくつかの殺菌作用を示すタンパク質がありますが、そのなかで、抗微生物作用のスペクトラムが広く、かつ、含有量の多いカチオニックペプチドの精製を行い、その殺菌活性のメカニズムを調べてみました。好中球顆粒タンパク質を酸性電気泳動した後、高速液体クロマトグラフィーで精製したところ、2つのピークが得られ、これらをカチオニックペプチド CP-1、CP-2 と命名しました (図-9)。これらペプチドは、それぞれ31個のアミノ酸から成り、塩基性アミノ酸であるアルギニンを多く含み、21番目のアミノ酸残基がイソロイシン、あるいはロイシンと異なる以外は同じアミノ酸配列であることが分かりました。

次に、カチオニックペプチドの生物活性を調べてみますと、CP-1、CP-2ともに、従来知られている殺菌作用のほかに、肥満細胞からのヒスタミ

ン放出作用をもつことがわかり、カチオニックペプチドが、組織の肥満細胞に作用することによって、急性の炎症反応に関与する可能性のあることが示唆されました (図-10)。

カチオニックペプチドは、トリプシン消化すると活性が消失しますが、キモトリプシン消化では活性が保持されていることから、キモトリプシン消化液を高速液体クロマトグラフィーにかけることによって活性フラグメントの分離を試みました。得られた4つのフラグメントのうち、2つが活性を持っており、1つは Arg¹-Tyr¹⁴、もう1つは Arg¹⁵-Tyr²⁷ であり、両ペプチドは Arg-Arg という共通構造をもつことから、活性に Arg-Arg が必要であることが推定されました (図-11)。N末端の Arg を1つ除去すると活性が1/10に減少し、2つ除去すると活性が完全に消失することから、両ペプチドの活性の発現に、Arg-Arg という構造が必要であることがわかりました。

最近、好酸球の顆粒内の殺虫タンパク質である Major Basic Protein についても、活性断片を得ることを試みたところ、Ile⁵⁴ から Phe⁶⁷ を含むペプ

図-10 カチオンニックペプチド (CP) の生物活性

図-11 カチオンニックペプチド (CP) の生物活性の発現における Arg 残基の役割

チド断片に活性が存在し、しかも、多くのアルギニン残基を含むことがわかりました (図-12)。このフラグメントをアルギニン残基を特異的にシトルリン残基に換えるペプチジルアルギニンデアミナーゼで処理すると、活性が著明に低下することがわかりました。

以上の結果から、顆粒内の塩基性タンパクの生物活性の発現にはアルギニン残基が重要であることがわかりました。

Major Basic Protein

図-12 好酸球の Major Basic Protein の活性フラグメントとその作用発現における Arg 残基の役割

cDNAの塩基配列から推測されるカチオンিকペプチドの前駆体のアミノ酸配列

図-13 カチオンিকペプチドの cDNA

顆粒内殺菌タンパクの遺伝子発現機構について

次に、カチオンিকペプチドの遺伝子発現について調べてみました。まず、カチオンিকペプチドの cDNA について検索したところ、3種類の cDNA が得られました (図-13)。これらの塩基配列からアミノ酸配列を推定したところ、カチオンিকペプチドは、シグナルペプチド・プロペプチド・成熟ペプチドからなるアミノ酸93個の前駆体から生成されることが示唆されました。そして、3種の cDNA のうち、2つは Ile²¹ をコードすること

から CP-1 の、また、もう1つは Leu²¹ をコードすることから CP-2 の cDNA であることがわかりました。CP-1 の cDNA をそれぞれ CP-1A と CP-1B とすると、両者は、プロペプチド領域において Glu⁻⁸, Gln⁻⁸ をコードするという違いがあり、CP-2 のプロペプチド領域は、CP-1B と同じ配列を示していました。このようにカチオンিকペプチドは相同性の高い3種類の cDNA によってコードされることがわかりました。

そこで、カチオンিকペプチドの遺伝子について検索しました。ゲノミックライブラリーをスク

図-14 カチオンペプチド (CP) の遺伝子

図-15 好中球の分化・成熟に伴うカチオンペプチド (CP) の発現の変化

リーニングしたところ、4つの遺伝子クローンが得られました(図-14)。これらクローンの塩基配列を解析したところ、カチオニックペプチド遺伝子は、3個のエキソンから成ることがわかりました。また、4つのクローンのうち、1つは Gln⁸ と Ile²¹ をコードすることから CP-1 A の、また、もう1つは Gln⁸ と Ile²¹ をコードすることから CP-1 B の、さらに、残りの2つは Gln⁸ と Leu²¹ をコードすることから CP-2 の遺伝子クローンであることがわかりました。塩基配列の相同性は、CP-1 のクローン間および CP-2 のクローン間でそれぞれ99%以上であり、また、CP-1 と CP-2 の間でも96%でした。さらに、ゲノミック DNA を制限酵素で分解しサザンブロットで解析したところ、種々の大きさの DNA 断片がカチオニックペプチドの cDNA とハイブリダイズしましたが、それらの大きさは得られたクローンの制限酵素認識部位から予想されるものでした。これらの結果から、カチオニックペプチドは相同性が高い2つの異なる遺伝子によってコードされ、また、得られたクローンは、それぞれ CP-1 および CP-2 遺伝子の対立遺伝子であることがわかりました。

次に、カチオニックペプチドが好中球の分化・成熟過程のどの段階で発現するかを調べてみました(図-15)。in situ hybridization によってカチオニックペプチドの mRNA 発現細胞を検索したところ、骨髓芽球・前骨髓球・骨髓球・後骨髓球がカチオニックペプチドの mRNA を発現しており、その発現の程度は、骨髓芽球ではわずかだけでしたが、前骨髓球・骨髓球ではほとんどの細胞が mRNA を発現するようになり、その後、発現細胞は減少し、成熟好中球では mRNA がほとんどなくなることがわかりました。また、カチオニックペプチドに対する抗体を用いて、カチオニックペプチドの存在の有無を免疫組織化学的に調べたところ、mRNA と同様に、骨髓芽球ではカチオニックペプチドはわずかししか認められませんでした。前骨髓球、骨髓球ではほとんどの細胞がカチオニックペプチドを有するようになり、その後、mRNA が減少しても、その含有レベルが維持されることがわかりました。なお、データは示しませんが、好中球系以外の細胞はカチオニックペプチドとその mRNA を発現していませんでした。

これらの結果から、カチオニックペプチドは、骨髓の成熟過程の好中球によって合成され、その後、顆粒内に蓄えられることがわかりました。

ま と め

以上、私の仕事を紹介しながら、好中球機能に

図-16 好中球の機能とその異常

ついて概説してまいりました。現在までに、感染症をともし好中球の機能異常として、接着能異常による leukocyte adhesion deficiency ; LAD, 遊走能異常の Lazy leukocyte 症候群, 活性酸素生成異常による慢性肉芽腫症, 顆粒タンパク異常による特殊顆粒欠損症やミエロペルオキシダーゼ欠損症などが知られています (図-16)。そして, LAD では接着分子の CD18 の欠損が, また, 慢性肉芽腫症では細胞膜のチトクロームや 47 kDa, 67 kDa の細胞質因子の欠損が報告されています。さらに, 特殊顆粒欠損症ではカチオニックペプチドの欠損が報告されています。今後, 私どもが見出した AIF やその受容体, ならびに 39 kDa, 28.5 kDa の細胞質因子が, これら好中球の機能異常とどのように関わっているかについて検討する必要があります。また, カチオニックペプチドについては, 好中球の分化にともなう遺伝子発現のメカニズムを明らかにし, それが欠損症においてどのように障害されているかを検討すると

もに, その異常がどのような方法によって回復するか, 例えば, 遺伝子治療の対象になるのかといった問題をも検討する必要があると思われます。さらに, 私たちは最近, 好中球の顆粒内に抗レトロウイルス活性をもつタンパク質を見出し, また, 骨髄細胞の好酸球への分化メカニズムの解明に努めておりますので, 今後, これらの問題についても検討しなければならないと思います。

おわりに

私は, 本学で長い間研究してまいりましたが, この間に明らかにできたことは生物現象のほんの一部であります。教室の諸君が今後ともこれらの研究をさらに発展させることを期待し, また順天堂大学がますます発展することを願い, 私の記念講演を終わらせていただきます。どうも, ご静聴ありがとうございました。

勤務医はどこへ行く

日本全国80大学の医学部から約8,000名の医師が育ち, 大部分の医師は大学病院およびその他の関連病院で臨床研修を数年間継続する。開業医のメリットがなくなり, その平均年齢が60才となり, 若い医師はむしろ気楽な勤務医に留まるようになった。

日本医師会のある地区では勤務医の入会を余り歓迎しないが, ある地区では猛烈に勧誘している。全国の医師の約40%が開業医であり, 約60%が勤務医であるという。さらに勤務医が増加しつつある。日本医師会会員の多くが勤務医であるが, 役員になっているのは

約10%である。

全国の病院協会では国民医療費の約70%を使い, 病院の医療費は開業医に比して圧倒的に高額である反面, 支払われる医療費が少ないので, 病院の勤務医は薄給である。勤務医は病院協会に協力して, 病院の経営を改善すべきであるか, やがて開業する可能性が大きいから日本医師会に加入して協力した方がよいのか, しばし思案にくれている。

(国際親善総合病院院長 加藤 英夫)