Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-03

白血球のNADPH酸化酵素に関する生化学的研究

山口，照英

(Degree)
博士（理学）
(Date of Degree)
1992-04-24
(Date of Publication)
2015-03-27
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙1641
(JaLCDOI)
https://doi.org/10.11501/3090176
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001641

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

神戸大学博士論文

白血球のNADPH酸化酵素に関する生化学的研究

平成　4 年　3 月

山口照英

目次

序章 1

第１章　NADPH酸化酵素の細胞内局在とその性質について 6
材料及び方法 7
結果 １０
考察 ３５

第２章　NADPH酸化酵素の可溶化とその部分精製 ４０
材料及び方法 ４１
結果 ４４
考察 ４７

第３章　チトクロームb558の精製とその性質について ５３
材料及び方法 ５４
結果 ５９
考察 ６２

第４章　総合討論 ７１

要旨 ７４
謝辞 ７７
引用文献 ７８

略語表

O_2^-：スーパーオキサイドラジカル

PMN：多形核白血球

NADPH：dihydronicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NADP：nicotinamide adenosine dinucleotide phosphate

NADH：dihydronicotinamide adenosine dinucleotide

HEPES：4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

PMA：phorbol myristate acetate

MA：ミリスチン酸

OA：オレイン酸

EA：エライジン酸

FMLP：formylmethionyl-leucyl-phenylalanine

CGD：慢性肉芽腫症（chronic granulomatous disease）

SOD：スーパーオキサイドディスムターゼ

$OH^{\cdot}$：ヒドロキシラジカル

CCP：cytochrome c peroxidase

KRP：Krebs Ringer phosphate buffer

EGTA：ethylene glycol bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

EDTA：ethylene diaminetetraacetic acid

CO：一酸化炭素

SDS-PAGE：sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

CB-F3GA：Cibacron Blue F3GA

PMSF：phenylmethylsulfonyl fluoride

OG：octylglucoside

DOC：deoxycholic acid

TLCK：N-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone

DFP：diisopropylfluorophosphate

HTP：hydroxylapatite

HMPD : hexamethylphosphoramide

CD : 円二色性(circular dichroism)

ESR : electron spin resonance

Ki : 阻害定数

Km : ミカエリス定数

FAD : flavin adenine dinucleotide

FMN : flavin mononucleotide

OD : 吸光度(optical density)

cmc : 臨界ミセル濃度

$\Delta\varepsilon$: モル吸光係数差

序章

好中球やマクロファージは、外界から進入した細菌等を貪食し殺菌する生体防御上重要な役割を担っている。この食細胞の生体防御機能に最初に注目したのはMetchnikoff(1)で、1883年に彼は海綿の中胚葉性のアメーバ様細胞が異物を取り込む様子を観察し、この貪食機能を持つ遊走性の細胞が生体防御に関連するのではないかと考えた。彼は、この異物を貪食する細胞を食細胞（phagocytes）と命名した。この食細胞の殺菌系として、ライソゾームに含まれる加水分解酵素やカチオニック蛋白等が古くから知られており，その作用について詳細な検討がなされてきた。

一方、これらの食細胞は、食菌というダイナミックな変化と同時に様々な代謝変化を示すことが古くから知られていた。1933年に、BaldridgeとGerardはイヌの白血球にSarcina luteaを加えたとき白血球の呼吸が著しく上昇したと報告した(2)。彼らは、この白血球の呼吸上昇はSarcina luteaの食菌作用に伴いミトコンドリアの呼吸が上昇したと考えた。一方、1959年にSbarraとKarnovskyは、食作用に伴って現れるモルモット腹腔好中球の呼吸上昇がシアン耐性であることを報告しミトコンドリアの呼吸上昇によるものでないこと明らかにした(3)。また、彼らは解糖系の阻害剤であるモノヨード酢酸や2-デオキシグルコースがこのシアン耐性呼吸の上昇を阻害することも報告した。さらに、ヘキソースモノリン酸経路による糖代謝が著しく昂進することも明らかにした。従って、この発表以降、食作用に伴う呼吸の上昇が白血球のどのような代謝変化と結び付いているのかについて新しい研究が展開されていった。

1961年にQuastelらのグループは、^{14}C-蟻酸を食菌中の白血球に添加したところ^{14}C-蟻酸が脱炭酸されて$^{14}CO_2$産生が顕著に起こることを報告し、細胞内のカタラーゼやペルオキシダーゼが白血球の生成したH_2O_2を用いて蟻酸を脱炭酸したものと考えた(4)。彼らは白血球の食作用時に見られるシアン耐性呼吸の上昇の少なくとも一部は、このH_2O_2生成と共役しているものと推定した。その後、Rootらも、蛍光色素であるスコポレチン-ペルオキシダーゼ系を用いた検討によ

り白血球がH_2O_2を生成することを報告した(5)。一方 1969年に、McCord と Fridovichによって、スーパーオキサイドラジカル（O_2^-）をH_2O_2とO_2へ不均化する酵素であるスーパーオキサイドディスムターゼ（SOD）が発見された(6)。このSODを用いることにより、Babiorらは白血球が食菌にともなってO_2^-を生成することを明らかにした(7)。さらに、このO_2^-生成がシアン耐性呼吸の上昇そのものであることが明らかにされた。すなわち、以下のように酸素が1電子還元され

$$O_2 \xrightarrow{e} O_2^- \xrightarrow[\text{不均化反応}]{2H^+} H_2O_2$$

てO_2^-が生成され、引き続いて起こるO_2^-の不均化反応によりH_2O_2が生成される一連の反応であることが明らかにされた。言い換えれば、白血球のシアン耐性呼吸は、O_2^-やH_2O_2などの活性酸素生成に他ならないことが明らかにされた。この発見により、白血球のO_2^-生成酵素の本体についての研究が大きな広がりを見せることになった。当初、このO_2^-生成のための電子供与体は何かについて、また細胞内局在部位についても複数の意見があった。1つは、Karnovskyらのグループにより提唱されたNADH酸化酵素説であり(8,9)、白血球のシアン耐性呼吸が解糖系の阻害剤で阻害されること、さらに細胞外に添加したNADHが酸化されH_2O_2が生成される電子顕微鏡の観察に基づいており、活性酸素生成の電子供与体はNADHであると考えた。すなわち、彼らは解糖系で生成されるNADHがO_2の還元に用いられると考えていた。また彼らは、このO_2^-生成酵素は細胞質に存在する可溶性酵素ないしは細胞膜に弱く結合している酵素と考えていた。一方、Rossiらのグループは、ヘキソースモノリン酸経路においてグルコース6リン酸がグルコース6リン酸脱水素酵素により代謝されるときに生成するNADPHがその電子供与体であるとするNADPH酸化酵素説を提唱していた(10)。彼らはまた、活性化した白血球より核を除いた上清をショ糖密度勾配遠心法により分画し、顆粒分画（リソゾーム）にそのNADPH酸化活性があり、O_2^-生成酵素は顆粒画分（リソゾーム）に存在すると考えていた(11)。また、Babiorらのグループは、電子供与体はRossiらと同様にヘキソースモノリン酸経路で生成されるNADPHであるとするも

のの、そのO_2^-生成酵素は細胞膜に存在すると考えていた(12,13)。このように、O_2^-生成酵素について、その細胞内局在、電子供与体についても諸説があった。これらの説の大きな違いは好中球の活性酸素の基質がNADPHであるのかNADHであるのか、言い換えれば活性酸素生成は解糖系と共役しているのかあるいはヘキソースモノリン酸経路の代謝経路と共役しているのかという問題であった。また、その細胞内局在ばかりでなく本酵素が膜酵素であるのか非膜酵素であるのかも論議の重要な点であった。すなわち、Rossiら及びBabiorらは、局在はともかくNADPH酸化酵素は内在性の膜酵素と考えており、Karnovskyらとは大きく異なっていた。これらの不一致は、本酵素系が非常に不安定なため、細胞下レベルでの活性酸素の測定が非常に困難なため、さらには分画方法等に問題があったためとも考えられる。その後、その電子供与体については、遺伝的疾患であるグルコース6リン酸脱水素酵素の欠損患者では活性酸素生成能が欠損していることなどよりNADPHがその電子供与体であることが明らかとなり、活性酸素生成酵素はNADPH酸化酵素と呼ばれるようになった。一方、その細胞内局在については、筆者らの発表も含めO_2^-生成酵素は、白血球の細胞膜に存在することが明らかにされた(14-16)。

食作用時に白血球が生成するこの活性酸素の役割については、慢性肉芽腫症(Chronic granulomatous disease, CGD)患者の白血球が活性酸素生成能を欠損していることが発見されて非常に注目されるようになった(17,18)。古くからCGD患者は細菌感染を繰り返し、重篤な感染症を起こすことが知られていた。これは、CGD患者白血球は正常な貪食能を持つものの貪食した細菌の殺菌機能の低下が認められており、その易感染性は白血球の機能異常によると考えられていた。このCGD患者の白血球が活性酸素生成能を欠損していることが明らかになることによって、逆に白血球の生成する活性酸素が生体防御上非常に重要な役割を担っていることが明らかになった。さらに、CGD患者白血球の生化学的研究がその後の白血球のO_2^-生成酵素の研究に大きな進歩をもたらした。すなわち、CGD患者白血球に欠損している分子がNADPH酸化酵素の構成分子ないしはその活性化機構に関与する分子である考えられ、多くの検討がなされてきた。最初に発見された欠損は、b型チトクロームの欠損である(19,20)。このb型チトクロームは、Shinagawaらによって白血球のミクロゾーム分画に存在する白血球特有の

ヘム蛋白であることが報告され、チトクロームb558と命名されていた(21)。その後、多くのCGD患者白血球においてチトクロームb558の欠損が報告され、本ヘム蛋白がNADPH酸化酵素の活性基の1つと考えられるようになった(22)。

1984年に、Pickらのグループにより(23)、無細胞系でNADPH酸化酵素を活性化できることが報告された。すなわち、活性化していない膜分画と細胞質分画の共存下に不飽和脂肪酸を添加することによりNADPH酸化酵素を活性化できることが明らかにされ、その活性化に関与する、あるいはNADPH酸化酵素そのものを構成する分子の解明が進んだ。無細胞系でのNADPH酸化酵素の活性化は、不飽和脂肪酸ばかりでなく飽和脂肪酸やドデシル硫酸ナトリウムを用いても引き起こすことができる(24-26)。この無細胞系におけるNADPH酸化酵素の活性化系を用いて、細胞質因子の解析が進み、複数の細胞質因子の関与が報告されている(27,28)。特に、CGD患者白血球を用いて、患者白血球の細胞質分画と健常人の膜分画、あるいはその逆の組合せによりCGD患者白血球の欠損要因の検討がなされ、CGD患者は細胞質因子の欠損と膜分画の欠損に分類されるようになった。膜画分の欠損は現在までのところチトクロームb558の欠損のみが知られている。この細胞質因子が欠損しているCGD患者白血球の詳細な解析より、分子量47kDaおよび67kDaの細胞質蛋白の欠損が見いだされた(29-31)。特に、47kDa蛋白質は、チトクロームb558を持つCGD患者においてリン酸化蛋白質の欠損として報告されていた分子と同一であることが明らかにされ、NADPH酸化酵素の活性化機構にリン酸化が密接に関与することが明らかにされた。しかし、この無細胞系では47kDa蛋白質がリン酸化されないとの報告もあり、無細胞系におけるNADPH酸化酵素の活性化は細胞そのものの活性化とは多少異なっている可能性もある。

白血球の活性酸素生成は、食作用時ばかりでなく種々の物質によって引き起こされることが知られている。Caイオノフォア(32,33)、プロモーターであるPhorbol myristate acetate(PMA)(34)、Concanavalin Aやphytohemagglutininなどのレクチン(35,36)、ミリスチン酸やアラキドン酸などの脂肪酸(37,38)、走化因子であるC5a(39)やformyl methionylleucylphenylalanine (FMLP)(40), digitonine(41)、ミクロフィラメントの重合阻害剤であるcytochalasin EやD(42,43)等と非常に多岐にわたっている。また、細胞内情報伝達機構に関連すると思われる細胞内Ca^{2+}イオンの上昇(44)、膜電位の変化(45)、膜リン脂質代謝

の昂進(46)、蛋白質リン酸化の変化(47,48)が活性化にともなって起こることも知られている。上記したように、活性化にともなうリン酸化蛋白質の変化を解析することにより、活性化に伴う47kDa蛋白質のリン酸化が認められないCGD患者が見いだされNADPH酸化酵素の活性化に関与する蛋白質として注目されはじめた(49)。一方、白血球の活性化に関連して、その活性基の1つと考えられているチトクロームb558が休止期の白血球では細胞膜と顆粒分画の2相性の分布を示し、活性化に伴って顆粒から細胞膜へと移行し、この移行によりNADPH酸化酵素が細胞膜で再構築され活性化が引き起こされるとする説が複数のグループより提唱された(50-53)。

活性酸素生成酵素であるNADPH酸化酵素の性質については未だ活性を持った状態での精製に成功した例はなく不明の点が多い(55,56)。その活性基としてはチトクロームb558やフラビン蛋白質が想定されているが、特にフラビン蛋白質については異論が多い。また、膜酵素としての、性質についても不明な点が多い。例えば、NADPHに対するKmについては30～50μM程度と報告されているが、酸素に対するKmについては約30μM程度とする報告から、数μMとする報告もあり異論が多い。また、2価イオンの要求性等についても不明な点が多い。

本論文において、上記のNADPH酸化酵素について以下のような点について考察する。すなわち、(1) NADPH酸化酵素の細胞内局在について、(2) NADPH酸化酵素の細胞膜酵素としての諸性質について、(3) NADPH酸化酵素の活性化とチトクロームb558の細胞内局在との関連について、特にチトクロームb558の細胞膜移行説との関連について、(4) NADPH酸化酵素の可溶化とその部分精製について、(5) チトクロームb558の精製とその諸性質の解析について述べると共に、NADPH酸化酵素の本体について考察する。

第１章　NADPH酸化酵素の細胞内局在とその性質について

好中球やマクロファージなどの食細胞（以下白血球と略）は、食菌時にスーパーオキサイドラジカル（O_2^-）や H_2O_2 あるいはヒドロキシラジカル（OH·）を生成することが知られている。近年，この活性酸素生成が殺菌に重要な役割を担っていることが明らかにされてきた(54-59)。また、この活性酸素生成は、食菌時ばかりでなく、種々の活性化物質（脂肪酸(37,38,60)、PMA(34)、ionophore (32,33)等）によっても引き起こされる。この一連の活性酸素生成は、白血球のNADPH酸化酵素が何等かの機作によって活性化され、NADPHを基質として酸素を一電子還元することによって引き起こされる一連の反応と考えられている。その細胞内局在については、当初、顆粒分画、細胞膜、あるいは細胞質に存在するとする諸説が提唱されていた。

特に、NADPH酸化酵素の細胞内局在に関して相反する説が提唱された理由としては、活性酸素は種々の細胞内小器官（ミトコンドリアやミクロゾーム等）からも生成されることより(61,62)、殺菌酵素系としてのNADPH酸化酵素を特異的に検出することが困難な場合が多いためと考えられる。また、活性酸素の測定法も重要な問題点であった。多くの活性酸素測定法が、電子の授受を測定するために細胞内器官からの測定には、細胞内電子伝達系やその電子供与体が測定の妨害となっていた。

現在まで、このNADPH酸化酵素の本体の詳細について、あるいはその活性化機構については不明な点が多いが、その活性基としてフラビン(63)とb型チトクローム(19)(チトクローム b_{558})が考えられており、これらの分子が膜を貫通し電子伝達系を構成していると考えられている。しかし、これらの活性基の細胞内分布やその存在量等についてもいくつかの説があり、不明の点が多い。

本研究においては、一定の浸透圧を保持しながら密度勾配を形成することができるPercollを用いて活性化白血球の細胞内オルガネラの分画を行い、このNADPH酸化酵素が細胞膜に局在することを明らかにした(14,65)。特に、マクロファージの分画においては、他の電子伝達系や電子供与体の影響を受けにくい

cytochrome c peroxidaseを用いて、H_2O_2生成を測定することによりNADPH酸化酵素の局在部位の同定を行った(15)。また、分画した細胞膜を用いて膜酵素としてのNADPH酸化酵素の酵素学的性質について検討してきた(65、66)。さらに、細胞膜分画ではO_2^-生成酵素の活性基の1つと考えられているチトクロームb558の純度が上昇することを見いだした。さらに、NADPH酸化酵素のもう1つの活性基の候補であるフラビンの細胞膜中の存在量を測定し、チトクロームb558の比が1:9と大きく離れていることを明らかにした。さらに、チトクロームb558の細胞内分布について検討したところ、チトクロームb558は2相性の分布を示すものの短時間の活性化では活性化前後でその分布は大きく変動しないことを明らかにした。

本章においては、このNADPH酸化酵素の細胞内分布及びその諸性質について考察する。

材料及び方法

1) 試薬

Cytochrome c、Phenyl-methylsulfonylfluoride（以上 Sigma）、NADPH、NADH、ATP、AMP（以上Boehringer）、Percoll（Pharmacia）、Cibacron Blue F3GA（Pierce）は各々の会社より購入した。^{57}Co-cyanocobalaminは、Amershamより購入した。cytochrome c peroxidase（CCP）は、Yonetani等の方法（67）に従ってイースト菌より抽出精製し結晶化して用いた。アセチル化cytochrome cは、既報に従って調製した(37)。得られたアセチル化cytochromecは63-69%のアセチル化率であった。

2) 好中球の調製

モルモット(68)好中球は、既報にしたがい2%カゼインを腹腔内に投与し、14～16時間後0.9%NaCl溶液を用いて腹腔内より採集した。残存している赤血球は、0.2%NaCl溶液の低張溶液を用いて溶血させて除いた。ブタ末梢血好中球

(69)調製には、ブタ血液を10分の1量の3%polyvinylpyrrolidone溶液と混和し、1時間ほど静置したのち上清の画分を遠心して白血球を集めた。残存している赤血球は0.2%NaClにより溶血させて除いた。また、白血球分画中のリンパ球は比重1.077のLymphoprep™を用いて除いた。得られた白血球分画中の好中球の純度は、いずれも95-98%であり、HEPES-緩衝生理食塩水（17 mM HEPES緩衝液(pH 7.4), 5 mM KCl 1.2 mM $MgCl_2$を含む）に懸濁した。

3)モルモット肺マクロファージの調整

モルモット肺マクロファージは、Myrvikらの方法(70)にしたがい、肺胞内を0.9%NaCl溶液にて洗浄することにより採集した。残存している赤血球は、他の白血球の場合と同様0.2%NaCl溶液にて溶血させて除いた。得られた分画のマクロファージの純度は約95%であった。

4) 白血球のオルガネラの分画

白血球のオルガネラの分画は、Percoll密度勾配遠心法により行った。白血球を10^7細胞／mlになるように5mMグルコースを含むHEPES-緩衝生理食塩水に懸濁し、37℃にてpreincubateした。10分後に、ミリスチン酸（110nmol/10^7細胞）を添加し、30秒間(71)、37℃で白血球を活性化した。活性化後直ちに、冷却した0.34 Mショ糖溶液とシリコンオイル（比重1.02）の2重層に細胞懸濁液を重層し、1000 x gで3分間遠心し反応液と細胞を素早く分離した。沈澱した細胞を冷却したプロテアーゼ阻害剤を含むTris-（あるいはHEPES-）緩衝ショ糖液（10mM Tris-HCl(pH7.4)あるいは10mM HEPES-NaOH(pH 7.4)、0.25M ショ糖, 20 μg/ml TLCK, 2μg/ml leupeptin）に懸濁し、Potter型テフロンホモジナイザーを用い、1000rpm、40往復して細胞を破砕した。細胞破砕液に1／100量の0.1 M PMSFを添加した後、450 x g、10分間遠心して上清を得た。上清に1／100量の0.1M EGTA加えた後、0-50%Percollの密度勾配を含むTris-緩衝ショ糖液に重層しBeckman SW27 rotorあるいはBeckman Ti14 Zonal rotorにて分画を行った。遠心後、一定量づつ分取し、各分画の細胞内指標酵素の活性を測定した。また、細胞膜の調製には、膜指標酵素のピークの分画を165,000 x g、60分間遠心して集めた。得られた沈澱を、再びTris-緩衝ショ糖液にて洗浄後、適量のTris-緩

衝ショ糖液に懸濁して-80℃に保存した。

5) 細胞からのO_2^-生成活性の測定

細胞からのO_2^-生成活性は、cytochrome cの還元を経時的に測定して求めた(60)。2 x 10^6細胞を1.6mlのHEPES-緩衝生理食塩水に懸濁し、50 μM cytochrome c, 5 μg/ml catalaseを添加して、37℃で5分間インキュベートした後、活性化剤を加え550-540nmの吸光度変化を経時的に測定した。測定は、日立557二波長分光光度計を用いて行った。

6) 細胞膜分画からのO_2^-及びH_2O_2生成活性の測定

細胞膜分画のO_2^-生成活性はアセチル化cytochrome cを用いて行った(37)。基本的な反応溶液は、0.1 mM NADPH, 5 μg/ml catalase、15 μM アセチル化cytochrome c、0.17 M ショ糖を含む65 mM Na-K-リン酸緩衝液（pH 7.0）を用いた。反応は、一定量の細胞膜分画を添加して開始した。H_2O_2生成活性は、cytochrome c peroxidase（CCP）を用いて測定した(72)。基本的な反応液は、0.1 mM NADPH、5μM CCP、0.17 M ショ糖液を含む65 mM Na-K-リン酸緩衝液を用いた。活性は、H_2O_2-CCP複合体形成量を419-408 nmの吸光度差を経時的に測定して求めた。

7) 他の酵素活性及び指標蛋白の測定

glucose-6-phosphatase(73)、5'-nucleotidase(74)、Na-K-ATPase(75)活性は既報に従い測定した。また遊離した無機リンはYoungburgとYoungburgの方法に従って測定した(76)。Lactate dehydrogenase活性は、NADHの酸化を経時的に測定して求めた(77)。NADPH cytochrome c reductase活性は、OmuraとTakesueの方法(78)によって測定した。アズール顆粒の指標酵素であるMyeloperoxidase活性はGuaiacolの酸化反応より求めた(79)。特殊顆粒の指標酵素であるVitamine B_{12}-binding proteinは^{57}Co-Cyanocobalaminを用いて測定した(80)。lysozyme活性は、Micrococcus lysodeikticusの溶菌反応による450nmの吸光度の低下を測定することにより求めた(81)。

8) チトクローム b_{558}およびフラビン量の測定

チトクローム b_{558}量はdithioniteによる酸化還元差スペクトルより求めた。ミリモル吸光係数は$E_{mM558-540nm}$=21.6を用いた(82)。酸化状態の絶対スペクトルをdata processorに記憶後、少量のdithionite粉末を添加してチトクロームb_{558}を還元した。data processorのsubtraction modeを用いて酸化還元差スペクトルを記録した。フラビン量は、pH法にてそのFAD、FMN量を求めた(83,84)。

9) 蛋白定量

蛋白は、Lowryの方法にしたがってウシ血清アルブミンをstandardとして定量した(85)。

結果

1) 白血球の活性酸素生成

好中球やマクロファージなどの食細胞 - 白血球は、貪食時あるいは種々の刺激によりO_2^-やH_2O_2などの活性酸素を生成する。図1は種々の脂肪酸によるモルモット好中球からのO_2^-生成のトレースを示している。好中球は、脂肪酸添加後、ほとんどlag time無しに（ミリスチン酸）あるいは数十秒のlag timeの後に急激なO_2^-生成を起こす。一方、マクロファージも同様に脂肪酸の添加により、活性酸素を生成する(84)。図2は、モルモット肺マクロファージにミリスチン酸を添加したときのO_2^-生成を示している。肺マクロファージの場合もミリスチン酸添加によりほとんどlag time無しにO_2^-の生成が起こる。

以上のように、好中球やマクロファージは種々の刺激に応じて活性酸素を生成するようになるが、重要な点は刺激を受けていない白血球では活性酸素生成系は不活性であると言うことである。従って、細胞下分画において活性化した細胞と活性化していない細胞の比較を行うことによりその活性酸素生成酵素の局在を推定することができる。

2)好中球のNADPH酸化酵素の細胞内局在

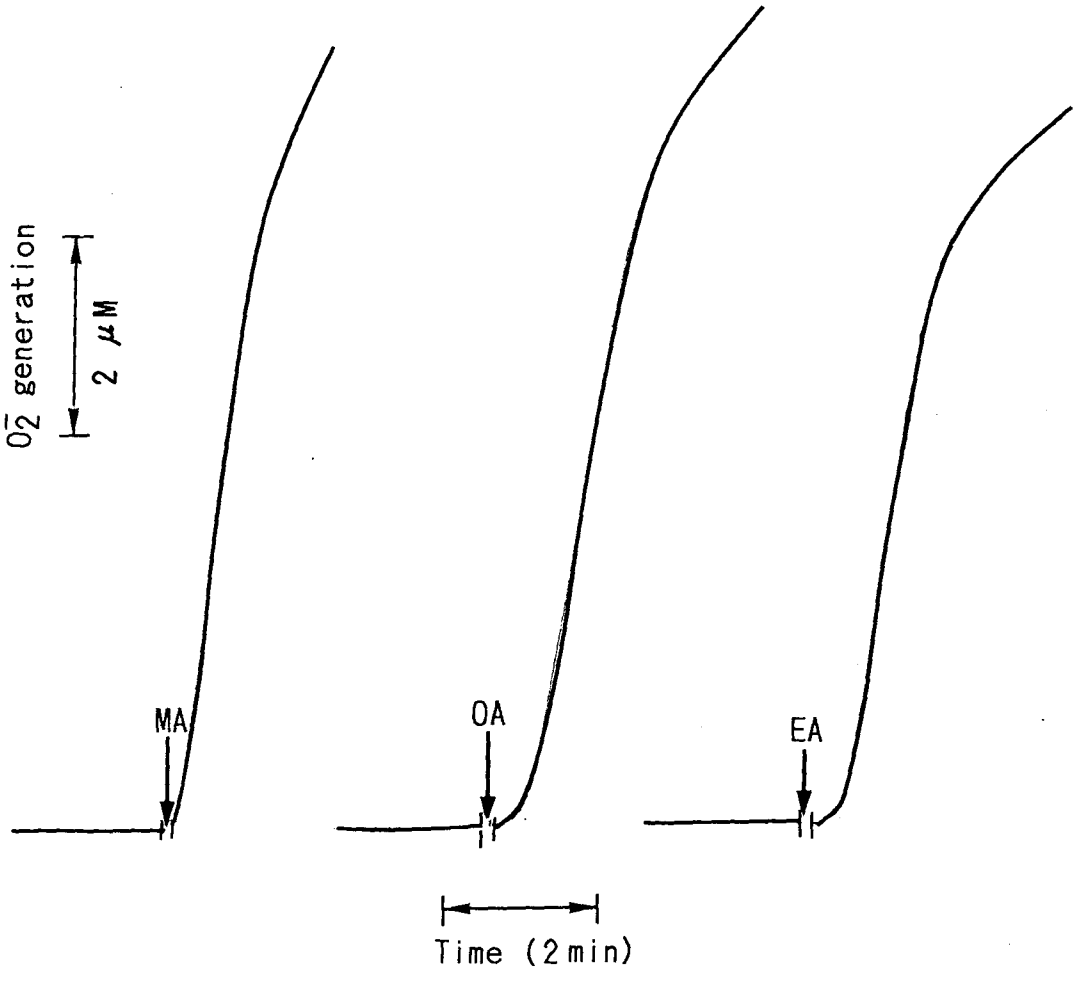


Figure 1. O_2^- release from guinea pig PMN upon addition of fatty acid. MA, 110 μM myristic acid; OA, 25 μM oleic acid; EA, 50 μM elaidic acid. The assay method is described in "MATERIALS AND METHODS".

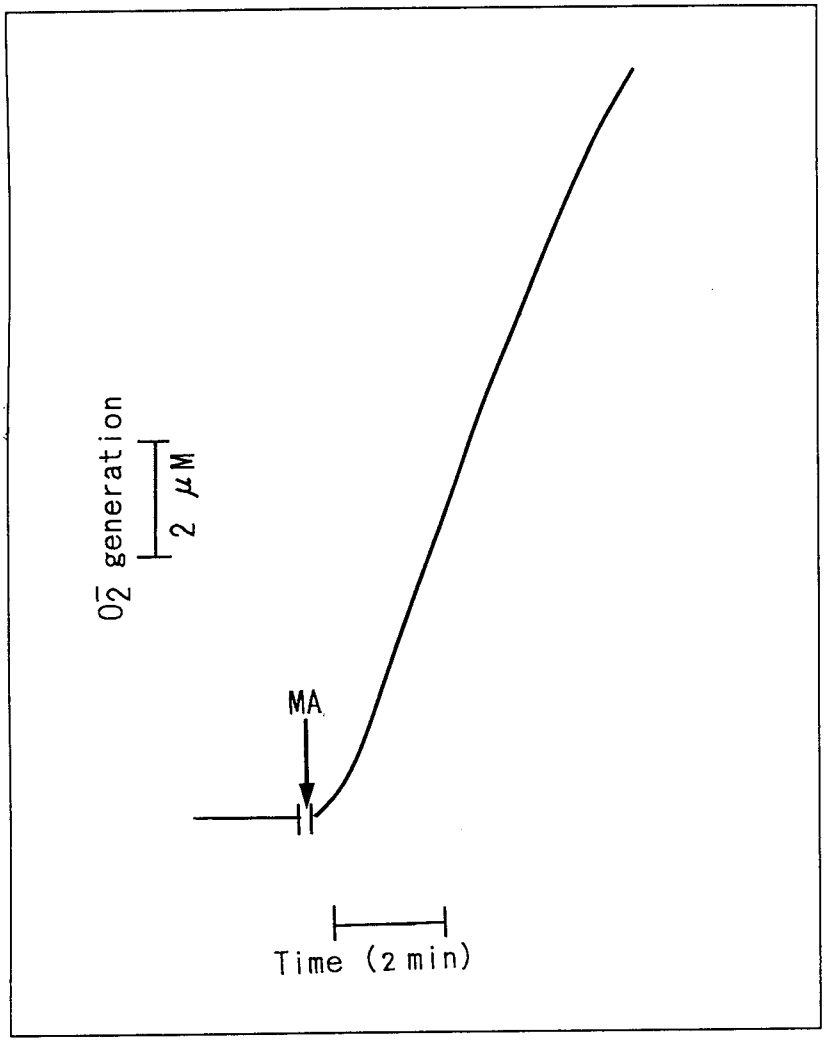


Figure 2. O_2^- release from alveolar macrophages upon addition of myristate. Reaction mixture contained 3 x 10^6 cells, 5 mM glucose, and 50 μM cytochrome c in 1.6 ml of Ca^{2+}-free KRP.

好中球の活性酸素生成系であるNADPH酸化酵素の局在について、古くからいくつかの説が唱えられてきた(9,11,12)。この細胞内局在に関する諸説の不一致は、上記した細胞下レベルでの活性酸素測定の問題ばかりでなく、本酵素が非常に不安定であることと、好中球が他の細胞に比べて壊しにくくまたその細胞内オルガネラが凝集しやすい細胞(87)であるためと考えられる。この細胞内オルガネラの凝集は、種々のイオンによって引き起こされると考えられるので、好中球を活性化後素早く反応液と分離する必要がある。このために、活性化した好中球懸濁液をシリコンオイルに重層して遠心を行い反応液とすばやく分離することとし、さらに媒体としてPercollを用いた等浸透圧密度勾配(88)にて細胞内オルガネラを分画した。

図3は、モルモット腹腔好中球をHEPES緩衝液系を用いたPercoll密度勾配遠心法により分画した結果を示している。ミリスチン酸で活性化した好中球のO_2^-生成活性は比重約1.05付近に単一ピークとして認められた。このピークと、細胞膜指標酵素の5'-nucleotidaseのマーカーのピークはよく一致していた。一方、ミクロゾームの指標酵素であるglucose-6-phosphataseは二相性のピークを示し重い方のピークはNADPH酸化酵素と一致した。アズール顆粒や特殊顆粒の指標酵素であるmyeloperoxidaseやlysozyme活性は、密度勾配の最も重い分画に見いだされた。ヒト好中球の細胞膜指標酵素として用いられている alkaline phosphataseは、2相性の分布を示した。軽い方のalkaline phosphataseのピークは細胞膜指標酵素のピークと一致したが、比重の重いalkaline phosphataseのピークは顆粒分画の指標酵素のピークと一致していた。一方、活性化していない細胞からの分画では、O_2^-生成活性は全分画に渡って非常に低い活性しか認められなかったが、それ以外の指標酵素については活性化した場合と同様の分画パターンを示した。

図4は、図3と同様にモルモット腹腔好中球を、Tris緩衝液系のPercoll密度勾配遠心法にて分画した結果を示している。ミリスチン酸で活性化した好中球も、対照の活性化していない好中球も図3と同様のパターンを示すが、alkaline phosphataseの分画パターンのみがHEPES緩衝液を用いた場合と異なっていた。すなわち、alkaline phosphataseの重い方のピークは顆粒分画と一致していたが、軽いピークは細胞膜指標酵素のピークよりさらに重い比重の分画に回

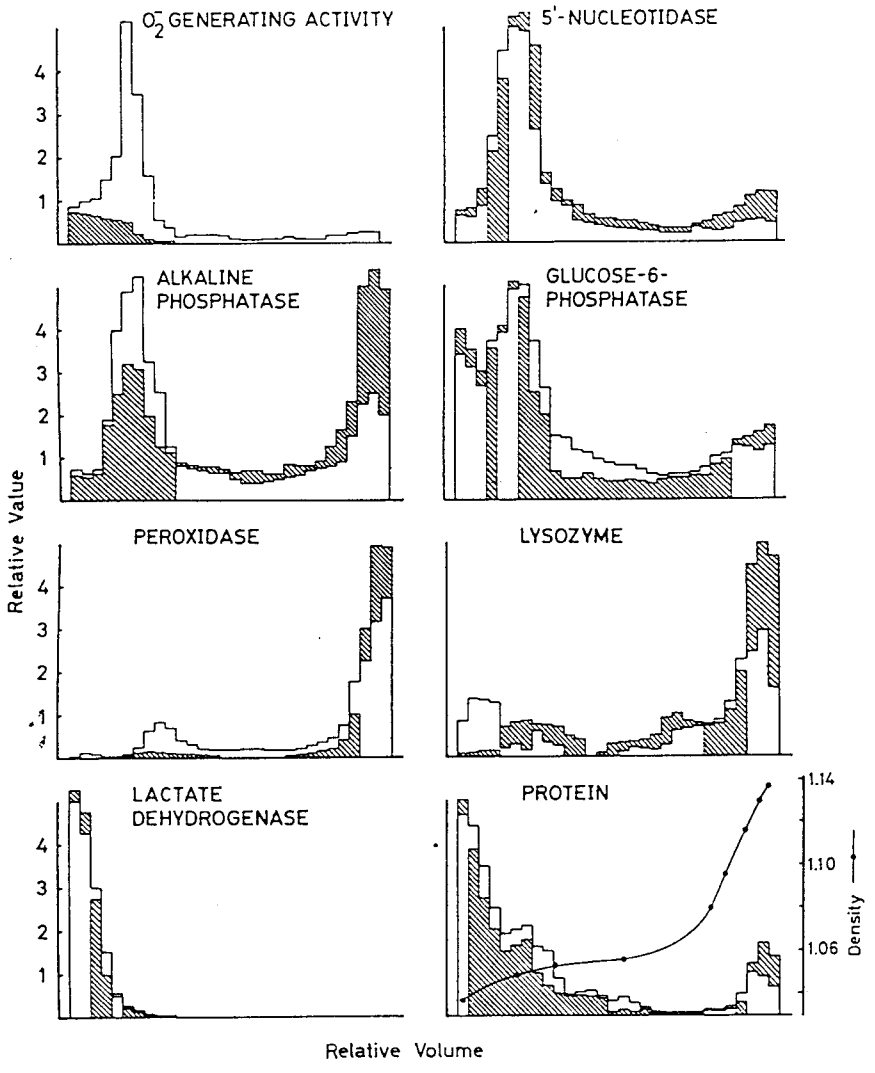


Figure 3. Distribution of enzyme activities in guinea pig PMN fractionated by Percoll density gradient centrifugation using HEPES buffer. Postnuclear supernatant of PMN homogenate was applied to Percoll density gradient (0 to 50% Percoll) containing 0.34M sucrose and 10 mM HEPES buffer (pH 7.4) and centrifuged at 12,000 rpm for 60 min (Beckman SW27 rotor). Histograms show the relative values of each fraction from either myristate-activated (open area) or resting (hatched area) PMN. The fractions from the top to the bottom are represented from left to right in the figure. Enzymatic activity assays are described in "MATERIALS AND METHODS". This figure shows one of four experiments. Density was determined by using marker beads purchased from Pharmacia Fine Chem. Co., London.

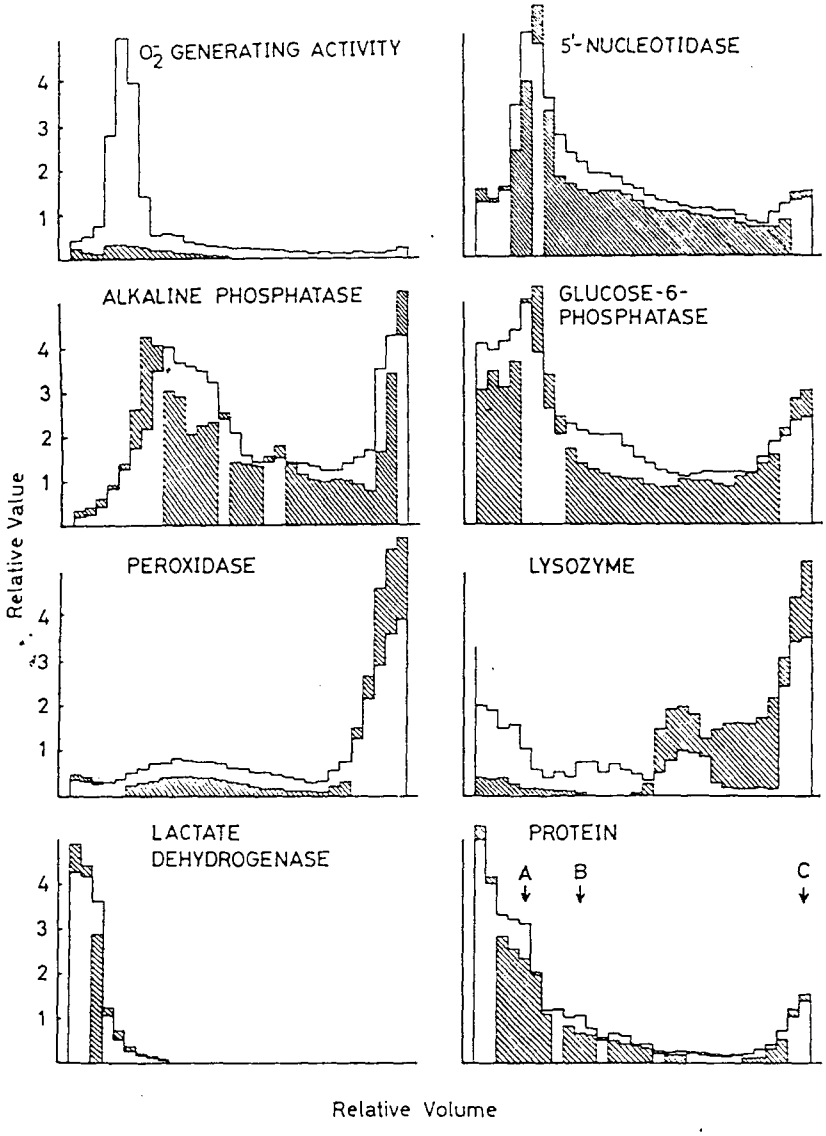


Figure 4. Distribution of enzyme activities in guinea pig PMN fractionated by Percoll density gradient centrifugation using Tris-HCl buffer. Postnuclear supernatant of PMN homogenate was applied to Percoll density gradient (0 to 50% Percoll) containing 0.34M sucrose and 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and centrifuged at 12,000 rpm for 60 min (Beckman SW27 rotor). Other experimental procedures were as in Fig. 3. The graph shows one of seven experiments.

収された。したがって、モルモット好中球の場合は、alkaline phosphataseは細胞膜指標酵素としては不適当であることが示唆された。

図5は、図4のA，B，Cの各分画を集め、その超薄切片を電子顕微鏡で観察した結果である。分画Aは、ほとんど小胞状の膜構造のみが観察され生化学的な結果とよく一致していた。分画Cには、濃染される顆粒と薄く染色される2種類の顆粒が含まれていた。これらの、2種類の顆粒は、それぞれアズール顆粒および特殊顆粒と考えられる。一方、分画Bは膜と顆粒が混在しており、おそらく膜と顆粒の凝集した分画と考えられる。

これらの結果より、NADPH酸化酵素は細胞膜に局在することが示唆されたので、このO_2^-生成活性のピークを集め各々の指標酵素の比活性を比較した。表1はミリスチン酸で活性化した好中球の膜分画と細胞での各指標酵素の比活性をまとめた結果であるが、O_2^-生成活性と5'-nucleotidase活性はそれぞれ5.8倍と3.9倍に比活性が増加していた。一方、ミクロゾームの指標酵素であるGlucose-6-phosphatase活性は、2.5倍増加していた。lysozymeおよびmyeloperoxidsaeの比活性は、それぞれ約5分の1および約20分の1に低下していた。

一方、同様の分画をBeckman Ti14 Zonal rotorを用いて分画を行い、得られた膜分画と細胞との指標酵素の比活性を比較した結果を表2に示す。Zonal rotorを用いた場合も分画パターンに大きな変化はないが、膜分画の比活性は水平rotorを用いた場合より高くなった。すなわち、5'-nucleotidaseの比活性は約12倍上昇しており、またO_2^-生成活性も12倍に上昇していた。一方、ミクロゾームの指標酵素であるNADPH-cytochrome c reductase活性はわずかに2.5倍上昇していただけであった。lysozymeの比活性は、約10分の1にまで低下していた。

以上の結果より、NADPH酸化酵素は好中球の細胞膜に局在していると結論した。

3)マクロファージのNADPH酸化酵素の細胞内局在について

マクロファージは、好中球と同じく活性酸素生成能を持つが、その細胞内構造は大きく異なっていることが知られている。すなわち、好中球はミトコンドリアやミクロゾーム含量が非常に少なく、むしろ複数の顆粒が発達した細胞であるが、マクロファージは他の細胞同様ミトコンドリアやミクロゾームの発達した細胞である。そこで、モルモット肺マクロファージのNADPH酸化酵素の細胞

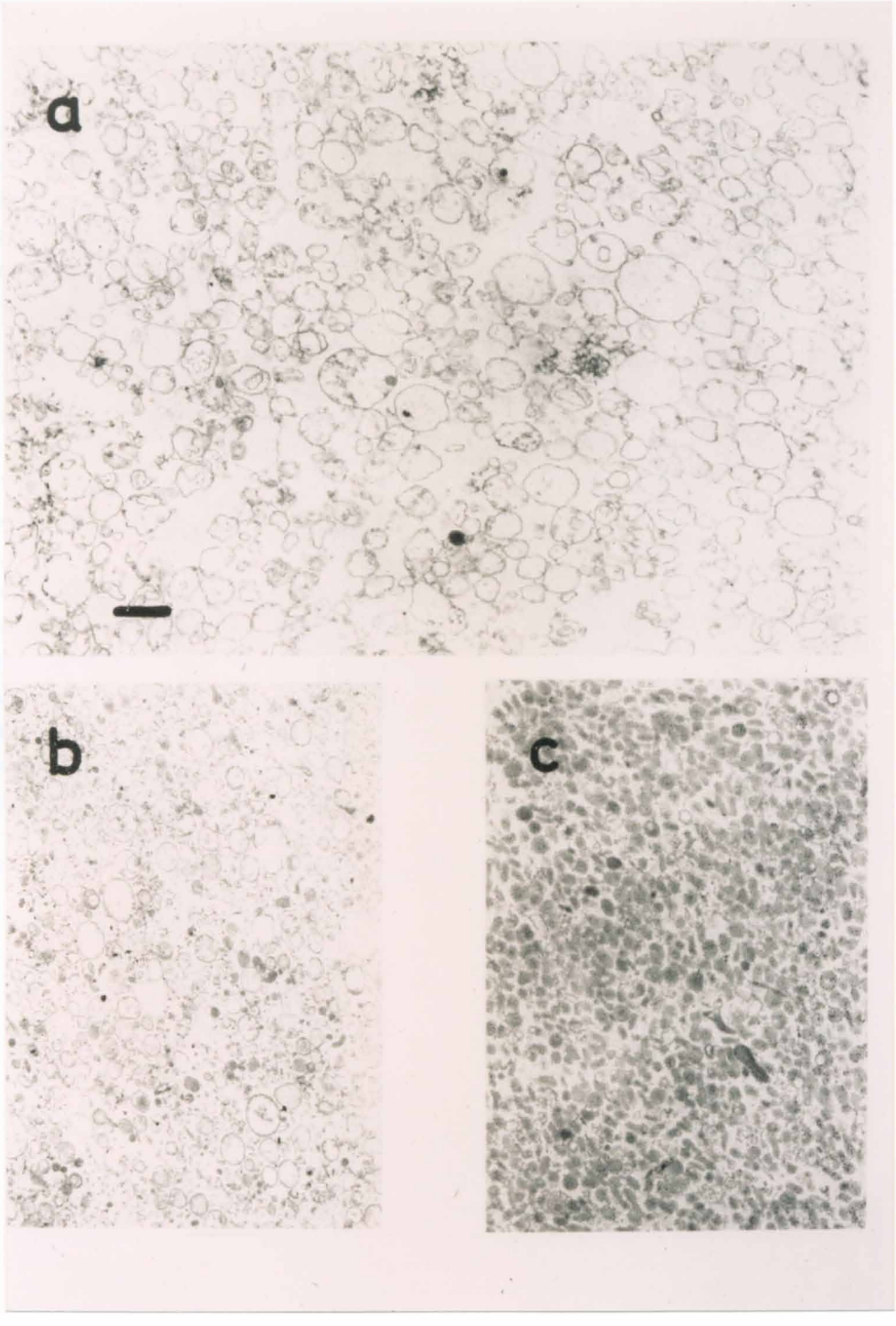


Figure 5. Electron microscopic studies of the fractions isolated by Percoll density gradient centrifugation using Tris-HCl buffer (pH 7.4). Figures a, b, c are of fractions A, B, C in Fig. 4.

Table 1. Specific activities of marker enzymes in fraction A and in whole cells. Cells were activated with myristate and fractionated by Percoll density gradient centrifugation using Tris-HCl buffer, pH 7.4. For the enzyme assays see "Materials and Methods". Results are expressed as means ± S.E.

	Fraction A[a]	Whole cells
O_2^- generation (nmol/min/mg protein)	19.9 ± 0.5	3.38 ± 0.82
5'-Nucleotidase (μmol/15min/mg protein)	3.35 ± 0.45	0.90 ± 0.16
Peroxidase (μmol/min/mg protein)	0.052 ± 0.015	0.97 ± 0.09
Glucose-6-phosphatase (μmol/30min/mg protein)	1.50 ± 0.30	0.59 ± 0.18
Alkaline phosphatase (μmol/h/mg protein)	17.2 ± 8.9	18.6 ± 2.9
Lysozyme (unit/mg protein)	6.98 ± 3.40	31.9 ± 2.9

a: Fraction A: the peak fraction of O_2^- generating activity in Fig. 4.

Tabel 2. Specific activities of marker enzymes in the plasma membrane fraction and in whole cells.

	O_2^- generation (nmol/min/mg protein)	5'-nucleotidase (μmol/15min/mg protein	NADPH-cytochrome c reductase (nmol/min/mg protein)	lysozyme (unit/mg protein)
Whole cells	2.45	0.9	1.07	31.9
Plasma membranes	30.2	11.2	2.50	3.49

Cells were activated with myristate and fractionated by Percoll density-gradient centrifugation. For the assay of O_2^- generating activity, the assay mixture contained 15 μM acetylated cytochrome c, 5 μg/ml catalase, 0.1 mM NADPH and an aliquot of sample in 0.17 M sucrose/65 mM Na-K-phosphate buffer (pH 7.0). For the other enzyme assays see "Materials and Methods".

内局在について検討してみた。

図6は、モルモット肺マクロファージをミリスチン酸で活性化したのち、Percoll密度勾配遠心で分画を行った結果を示している。NADPH酸化酵素活性は、CCPを用いたH_2O_2生成活性にて測定した。ミリスチン酸で活性化したマクロファージでは、H_2O_2生成活性は、比重1.04付近の非常に軽い分画に単一ピークとして認められ、膜指標酵素の5'-nucleotidase活性のピークと一致していた。一方、ミクロゾーム指標酵素であるNADPH-cytochrome c reductase活性のピークは、膜指標酵素のピークよりわずかに軽い分画に回収されるものの、ほぼ膜指標酵素と同一比重位置に回収された。NADPH酸化酵素の活性基の1つと考えられているチトクロームb558はH_2O_2生成活性と同一ピークに回収された。ライソゾームの指標酵素であるlysozymeは最も重い分画に回収された。一方、ミトコンドリアの指標酵素であるcytochrome c oxidaseは2つのピークに分画されたが、軽い比重のピークも膜指標酵素のピークとは明らかに異なっていた。

活性化していないマクロファージの分画では、H_2O_2生成活性がほとんど認められないこと、cytochrome c oxidase活性が比較的重い分画に単一ピークとして回収されることを除いて、他の指標酵素については活性化した場合とほぼ同様の分画パターンを示した。ミリスチン酸で活性化したマクロファージ分画ではcytochrome c oxidaseが2相性の分画パターンを示したが、おそらくミリスチン酸がミトコンドリアに結合しその比重を変化させたためと考えられる。

表3は、ミリスチン酸で活性化した細胞と活性化していない細胞の細胞膜分画の各指標酵素の比活性を細胞での値と比較した結果である。ミリスチン酸で活性化した場合、細胞膜分画のH_2O_2生成活性および5'-nucleotidase活性は細胞レベルに比較して約10倍ほど上昇していた。これに比べミクロゾーム指標酵素の比活性の上昇は、約4倍とH_2O_2生成活性の上昇に比較してわずかな値であった。一方、cytochrome c oxidaseの比活性は約11分の1に減少していた。この表には示さなかったが、lysozymeの比活性も約20分の1に減少していた。活性化していない場合も、H_2O_2生成活性を除いて細胞膜での各指標酵素の比活性の上昇は非常に近い値を示していた。

図7は、活性化および非活性化マクロファージの細胞膜分画でのH_2O_2生成活性のNADPHに対するLineweaver-Burkプロットを求めた結果である。活性化した

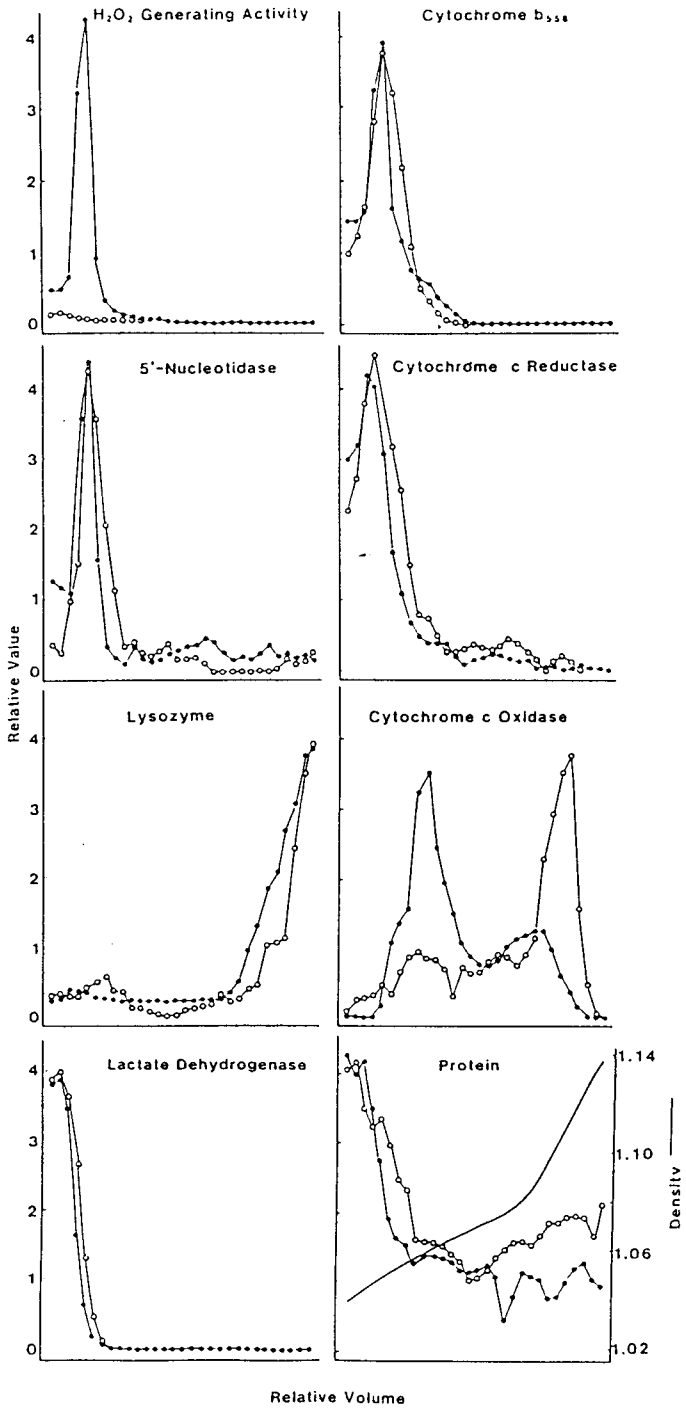


Figure 6. Distribution of enzyme activities in guinea pig alveolar macrophages. Graphs are the normalized distribution patterns of alveolar macrophages as a function of the volume collected. Radial distance increases from left to right. The ordinate is the concentration in the fraction relative to the concentration corresponding to a uniform distribution throughout the gradient. Closed and open circles show the distribution of enzymes from myristic acid-activated and unactivated alveolar macrophages, respectively.

Table 3. Specific contents of markers in plasma membranes from guinea pig alveolar macrophages.

	H_2O_2-generating activity (μmol/min/mg protein)	5'-Nucleotidase activity (μmol/min/mg protein)	Cytochrome b (pmol/mg protein)	NADPH-cytochrome c reductase (nmol/min/mg protein)	Cytochrome c oxidase (nmol/min/mg protein)
Myristic acid-activated					
Cell homogenates	0.11 ± 0.03	0.81 ± 0.11	0.079 ± 0.014	33 ± 8	31.2 ± 8.4
Plasma membranes	1.2 ± 0.34	8.3 ± 1.8	0.78 ± 0.12	134 ± 28	2.8 ± 0.7
Resting cells					
Cell homogenates	0.005 ± 0.002	0.77 ± 0.06	0.076 ± 0.011	38 ± 6	28.0 ± 3.2
Plasma membranes	0.021 ± 0.01	7.9 ± 0.32	0.77 ± 0.15	145 ± 15	1.4 ± 0.6

Numbers are means ± S.D. from three experiments.

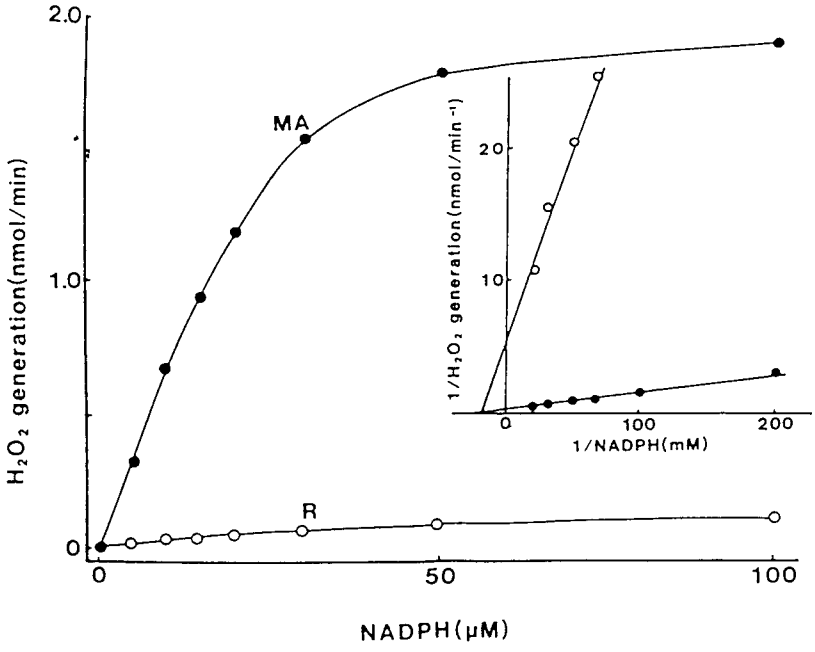


Figure 7. The rate of H_2O_2 production by plasma membranes of both activated and unactivated alveolar macrophages plotted against the NADPH concentration added. The reaction mixture is as in "MATERIALS AND METHODS" by using plasma membranes of myristic acid-activated (MA) and unactivated (R) alveolar macrophages contained 2.0 μg protein. Inset shows the Lineweaver-Burk plot of H_2O_2-producing activity in both plasma membranes.

場合そのH_2O_2生成の最大活性は、0.42から0.93μmol/min/mg蛋白に対して活性化していない場合 0.012 から 0.023 μmol/min/mg蛋白であった。また、そのNADPHに対するKmはそれぞれ35.0±5.3μM（平均値±S.D., n=4）および50.5±7.8（n=4）であり、好中球の報告(16,58)と非常に近い値が得られた。

4) NADPH酸化酵素のNADPH結合部位について

Briggs等は、好中球のO_2^-生成酵素はNADHを基質とし、また細胞外より与えたNADHを酸化し得ると報告している(9)。これが事実であるとすると、好中球の活性酸素生成系の基質結合部位は細胞膜の外にも局在すると考えられる。そこで白血球の基質結合部位の局在について、NADHやATPなどの立体構造類似体であるCibacron Blue F3GA を用いて検討してみた。図８は、ミリスチン酸で活性化したモルモット好中球の細胞膜分画の NADPH酸化酵素に対する Cibacron Blue F3GAの影響をみた結果である。この色素は、非常に低濃度でO_2^-生成活性を阻害し、約10μMでは90%程阻害した。この阻害形式について明らかにするために、Lineweaver-Burkプロットを取ってみた。図９に示すように Cibacron Blue F3GAは典型的な拮抗阻害を示し、Kiは約0.8μMと非常に低いことが明らかとなった。従って、この色素はNADPH酸化酵素のNADPHとの反応部位に強固に結合することが明らかとなった。次に、本色素の細胞レベルでのO_2^-生成活性に及ぼす影響について検討した。図１０に示すように、Cibacron Blue F3GAはミリスチン酸やPMAなどによって引き起こされる細胞レベルでのO_2^-生成活性に対しては全く阻害を示さなかった。以上の結果より、好中球NADPH酸化酵素のNADPH結合部位は細胞膜裏側に位置すると結論した(65)。

5) NADPH酸化酵素の２価イオン要求性について

複数の研究者によりNADPH酸化酵素の２価イオン要求性について報告されており、Mgイオン、Caイオン等の要求性が論議されてきたが、非常にcrudeな分画を用いており相反する結果が得られている(89-91)。そこで、Percoll密度勾配遠心法で分離した細胞膜分画を用いてNADPH酸化酵素の２価イオン要求性について検討した。ミリスチン酸で活性化したモルモット好中球から細胞膜を分離しTris-ショ糖液で十分に洗浄し、種々の２価イオンあるいはそのキレーター存在

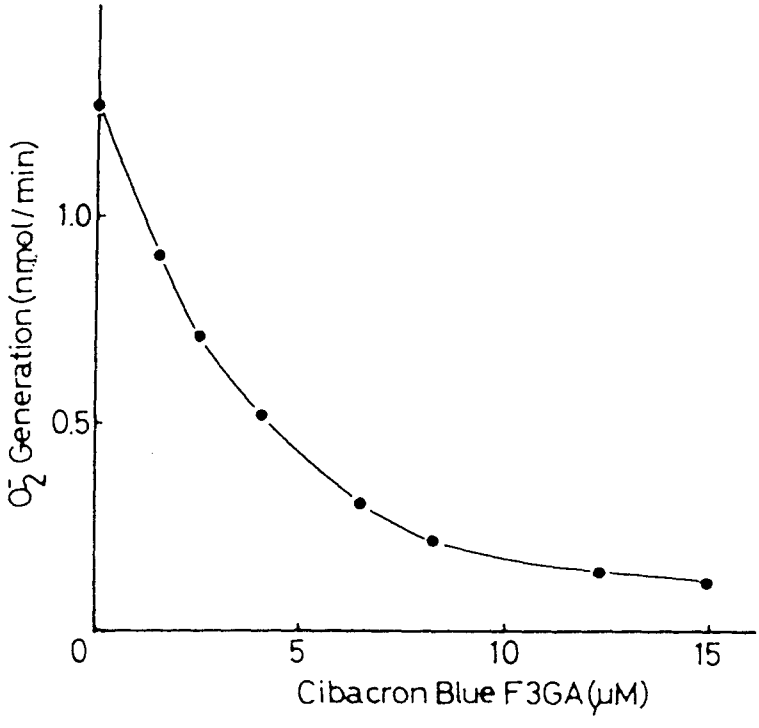


Figure 8. Effect of Cibacron Blue F3GA (CB-F3GA) on O_2^- generation by plasma membrane-bound NADPH oxidase. Plasma membranes were isolated from MA-activated PMN by Percoll density gradient centrifugation. The assay mixture contained 41 μg/ml protein of plasma membranes, 15 μM acetylated cytochrome c, 5 μg/ml catalase, 0.1 mM NADPH, 0.17 M sucrose and various concentrations of CB-F3GA in 65 mM sodium potassium phosphate buffer, pH 7.0. The reaction was started by addition of NADPH.

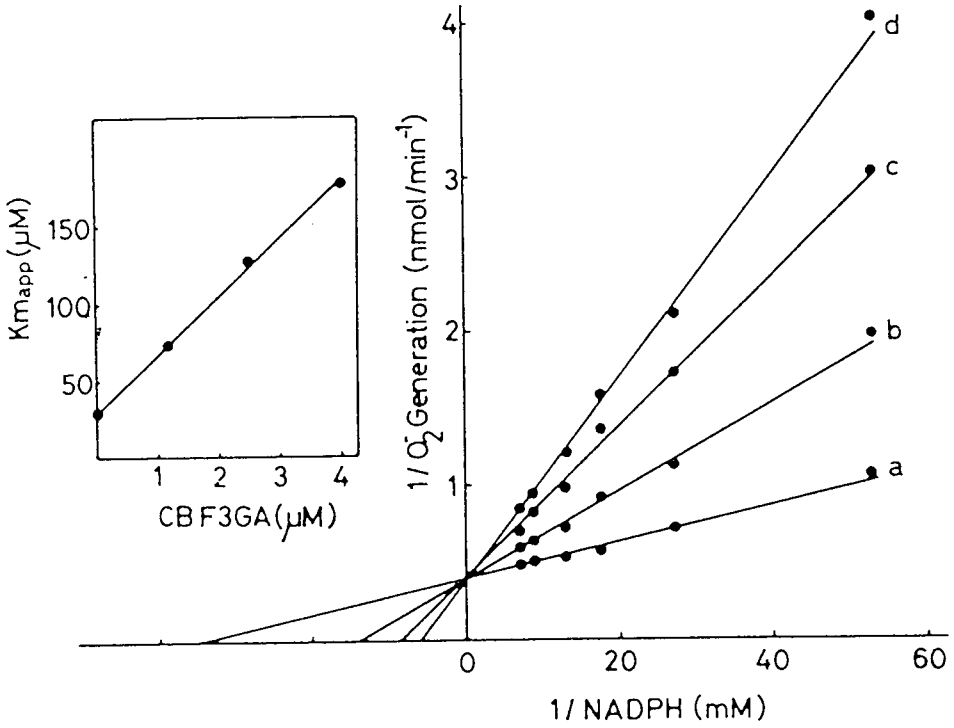


Figure 9. Inhibition by CB-F3GA of O_2^- generation by plasma membrane-bound NADPH oxidase. The assay mixture was as for Fig. 8, except that 69 μg/ml protein of plasma membranes was used. The concentrations of CB-F3GA used were as follows: a, 0; b, 1.2 μM; c, 2.5 μM; d, 4.0 μM. The inset is a replot of the apparent Km at various CB-F3GA concentrations.

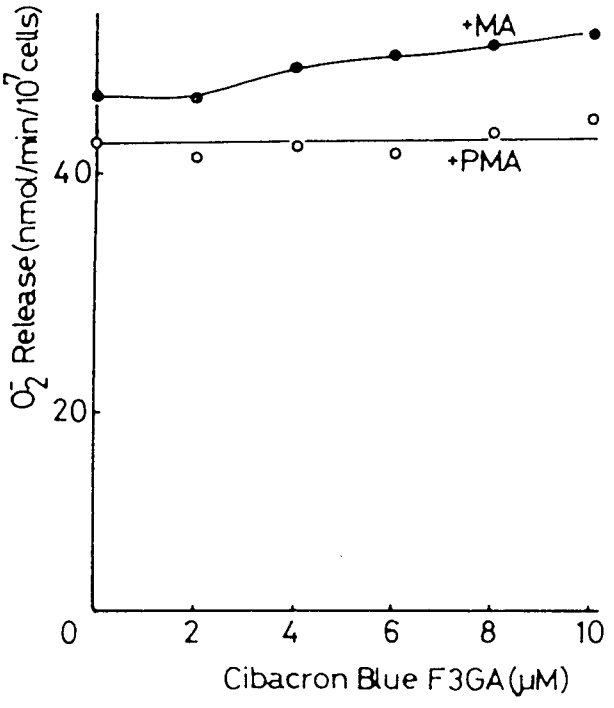


Figure 10. Effect of CB-F3GA on the O_2^- generation by activated cells. The assay mixture contained 4 x 10^6 cells, 15 μM cytochrome c, 5 μg/ml catalase, 5 mM glucose and various amounts of CB-F3GA in 1.6 ml of HEPES buffer saline. PMN were activated by myristate (MA) (110nmol/10^7 cells) or phorbol myristate acetate (PMA)(0.1 μg/1.6 ml)

下でのNADPH酸化酵素活性をH_2O_2生成活性で調べた。表４に示すように、Mgイオンはその活性を73％も増加させた。しかし、Caイオンの添加によってはその活性は殆ど変化しなかった。一方、Znイオンの添加は、H_2O_2生成活性を顕著に低下させた。比較的Mgイオンに特異性の高いキレーターであるEDTAは、NADPH酸化酵素活性を顕著に低下させた。興味あることに、ZnやCaイオンに特異性の高いEGTAはむしろH_2O_2生成活性を上昇させた。また結果としては示さなかったが、cytochrome cを用いてO_2^-生成活性で測定した場合も同様の結果が得られた。以上の結果は、NADPH酸化酵素がその至適な活性にMgイオンを要求することを示唆している。そこで、Mgイオン濃度を変化させたときのO_2^-生成活性を調べてみた。図１１に示すように、O_2^-生成活性は低濃度のMgイオンの添加により上昇し 40-50 μMのMgイオン添加によりその活性の上昇はプラトーに達した。このMgイオンの活性上昇作用を詳しく検討するために、Mgイオン存在下或は非存在下でのNADPH酸化酵素活性をH_2O_2生成活性で比較してみた。図１２に示すように、Mgイオンの添加によりNADPHに対する Kmは40から25μMに低下し、Vmaxは1.5倍増加した。したがって、Mgイオンは NADPH酸化酵素の基質結合及び代謝活性の両方を活性化するものと考えらる。一方、ZnイオンによるNADPH酸化酵素の阻害とEGTAによる活性化の機構については不明であるが、Na,K-ATPase活性がEGTAによって活性化されその活性化はZnイオンをキレートするためとの報告(75,92)もあり膜酵素に特有な現象である可能性が考えられる。

6) チトクローム b_{558}の細胞内局在

NADPH酸化酵素の活性基としてフラビンやチトクロームb_{558}が提唱されている。このヘム蛋白が活性化にともない顆粒から細胞膜に移行することにより、NADPH酸化酵素が活性化されると言う移行説が唱えられている(50-53)。このチトクロームb_{558}移行説は、好中球破砕液の核を除いた上清を密度勾配遠心で分画した結果から導かれたものであるが、先にも述べたように、好中球は非常に壊れにくくまたその細胞内オルガネラは種々の塩の存在で凝集を起こしやすい。そこで、チトクロームb_{558}の細胞内局在について上記のPercoll密度勾配遠心法を用いて検討した。

図１３は、ブタ好中球をミリスチン酸で活性化し、活性化していない細胞を

Table 4. The effect of divalent cations and its chelators on the NADPH oxidase in the plasma membrane fraction.

		H_2O_2 generating activity (nmol/min)	Percent of control
Control		1.42	100
$MgCl_2$	0.15 mM	2.45	173
	1.50 mM	2.45	173
$CaCl_2$	0.15 mM	1.38	97
	1.50 mM	1.34	95
$ZnCl_2$	0.15 mM	0.82	58
	1.50 mM	0.67	47
EDTA	0.15 mM	0.32	23
	1.50 mM	0.40	28
EGTA	0.15 mM	2.15	151
	1.50 mM	1.96	138

The reaction mixture contained 51 μg/ml protein of plasma membranes, 5 μM CCP and 0.1 mM NADPH in the same sucrose buffer as described for the O_2^- assay.

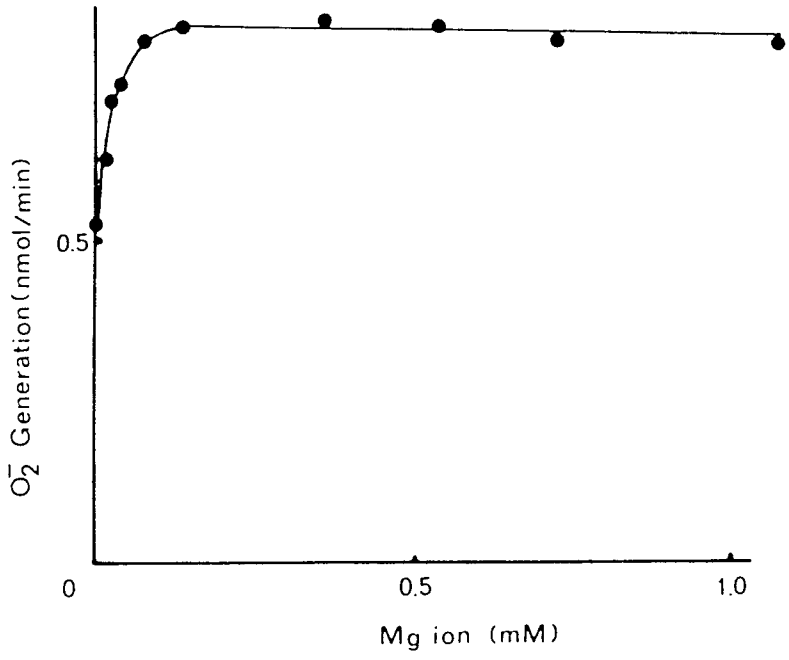


Figure 11. The NADPH-dependent O_2^- generation by the plasma membrane-bound oxidase under various Mg^{2+} concentrations. The assay mixture is as for Table 4, except that 28.8 μg/ml protein of plasma membranes was used.

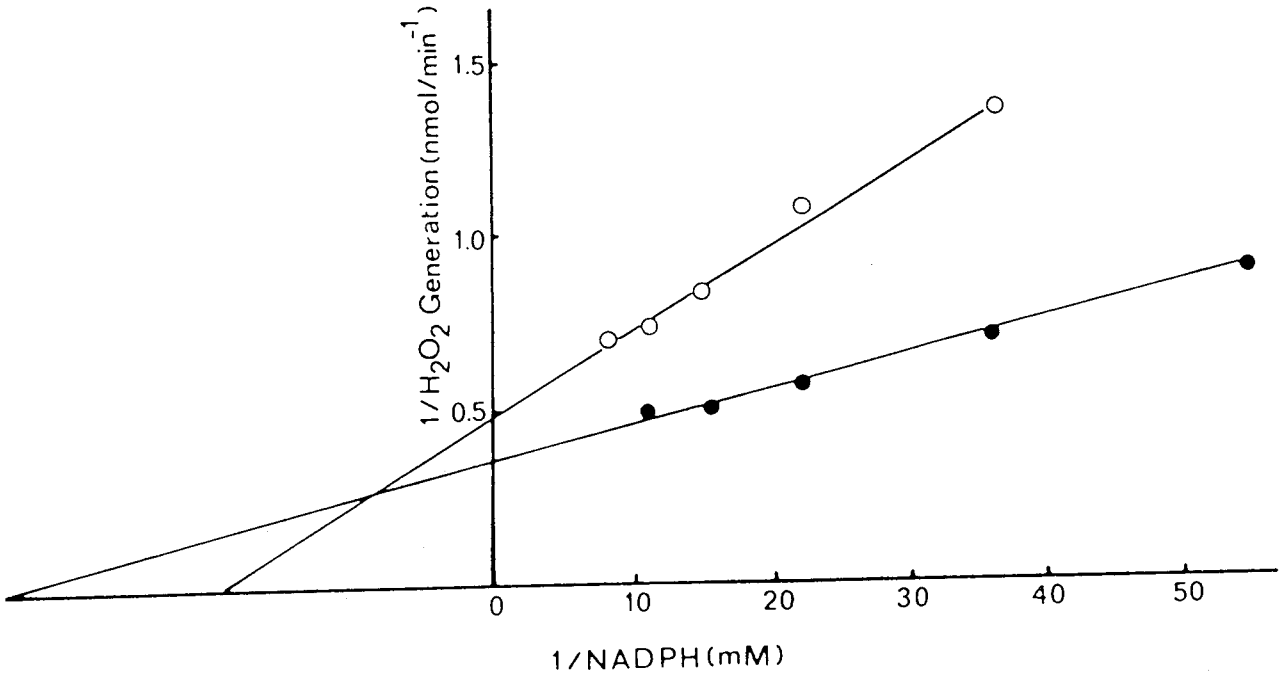


Figure 12. Lineweaver-Burk plots of H_2O_2 generation by the plasma membrane-bound oxidase as a function of NADPH concentration in the presence (closed circle) and absence (open circle) of Mg^{2+}. The assay mixture contained 51 μg/ml protein of plasma membranes, 5 μM CCP and various amounts of NADPH in sucrose buffer with of without 0.25 mM Mg^{2+}.

対照としてZonal rotorを用いたPercoll密度勾配遠心法による分画を行った結果である。ミリスチン酸で活性化したブタ好中球のO_2^-生成活性は、比重1.05-1.06付近に単一ピークとして認められた。それに対して、活性化していない好中球から得た分画では殆ど活性は認められなかった。細胞膜指標酵素であるNa,K-ATPase活性のピークは、ミリスチン酸で活性化した細胞のO_2^-生成活性のピークと一致していた。さらに、チトクローム b_{558}は活性化した場合も活性化しない場合も、主ピークはこの細胞膜指標酵素のピークと一致し、密度勾配の最も重い比重の分画に小さなピークが認められた。ミクロゾームの指標酵素であるNADPH-cytochrome c reductaseは、2相性のピークを示したが両ピークとも細胞膜指標酵素のピークとは異なっていた。特殊顆粒の指標蛋白であるvitamine B_{12}-結合蛋白やアズール顆粒の指標酵素であるmyeloperoxidaseは、密度勾配のもっとも重い部分に局在していた。以上の結果より、チトクロームb_{558}は細胞内顆粒と細胞膜の両オルガネラに存在するものの好中球の活性化前後でその分布に大きな変化はないと考えられる。そこで、この細胞膜指標酵素のピークの分画を集め細胞の比活性と比較してみた。表5に示すように、O_2^-生成活性はミリスチン酸で活性化した細胞から得た細胞膜では比活性が約20倍ほど増加していた。Na,K-ATPaseは、活性化及び比活性化細胞より得た両細胞膜とも顕著な比活性の増加を示し、その増加率はそれぞれ29.2及び32.2倍であった。一方、チトクローム b_{558}の比活性の増加は両細胞膜とも10倍ほどであり、特に強調しておかなければならないことは、活性化及び非活性化細胞ともその細胞膜での比含量に大きな変化はなく、むしろ非活性化細胞の方がわずかに高い比含量を示した。そして、2つの顆粒蛋白は顕著な低下を示した。興味あることに、白血球の細胞膜分画のフラビンは殆どが非共有型であり、かつその90%以上がFAD蛋白であったが、細胞膜におけるこのFAD／チトクロームb_{558}比は 1/8.9 と非常に離れていた。このことは、もしNADPH酸化酵素の活性基がフラビンとチトクローム b_{558}から構成されるとすると重要な意味を持つと考えられる（このチトクロームb_{558}とフラビン量の比率については次章で考察する）。

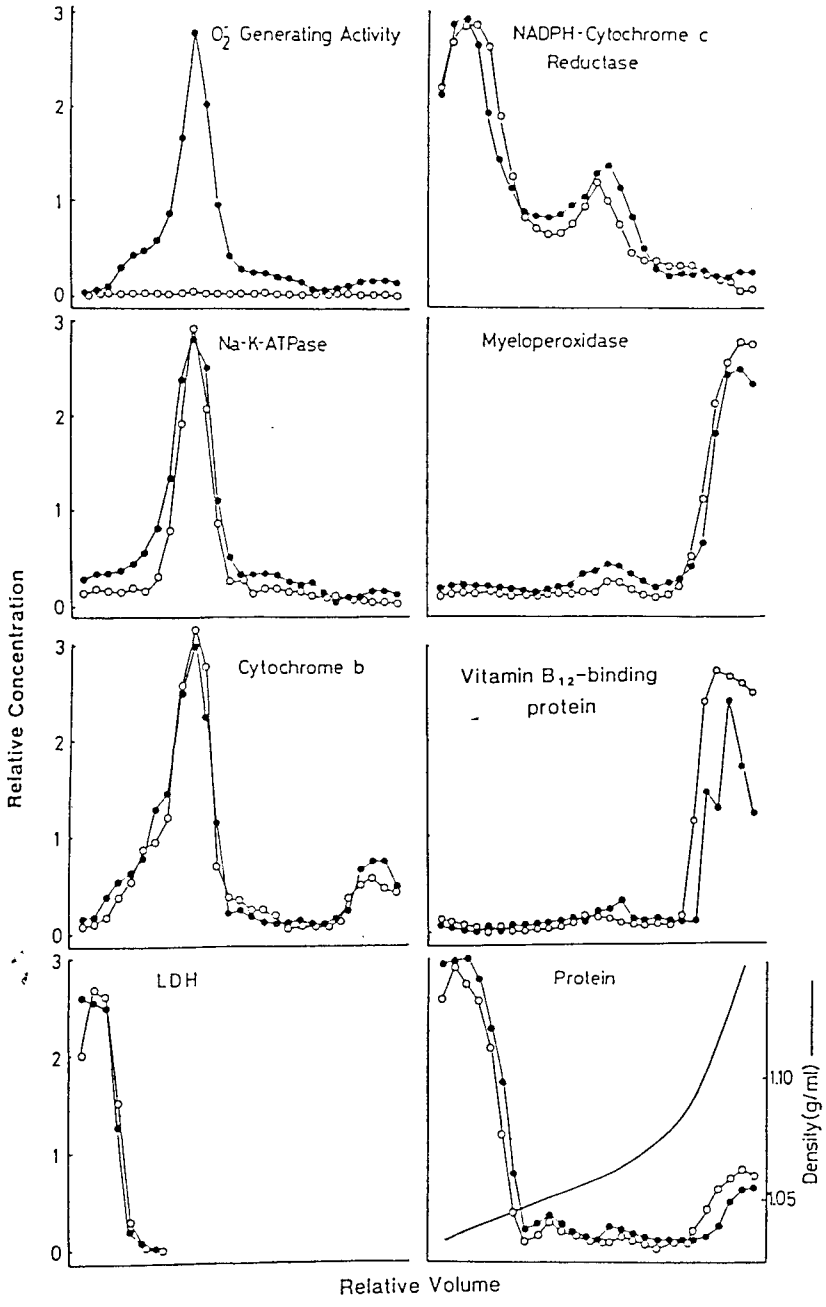


Figure 13. Distribution of enzyme activities in porcine neutrophils fractionated by Percoll density gradient centrifugation. Graphs are normalized distribution patterns of neutrophils as a function of the volume collected. Radial distance increases from left to right. The ordinate is the concentration in the fraction relative to the concentration corresponding to a uniform distribution throughout the gradient. Postnuclear supernatants of neutrophil homogenate were applied to a Percoll density gradient (0 to 50%) containing 0.34 M sucrose/10 mM Tris-HCl (pH 7.4)/1 mM HMPD/0.1 mM TLCK, and 1 mM EGTA cushioned by 50% sucrose, and centrifuged at 20,000 rpm for 60 min (Beckman Ti-14 Zonal rotor). Closed and open circles show the distribution of enzymes from MA-activated and resting neutrophils, respectively. Enzyme assays are described in "MATERIALS AND METHODS". Density was determined pycnometrically.

Table 5. Specific contents of markers in plasma membranes from neutrophils.

	O_2^- generating activity (nmol/min/mg protein)	Na,K-ATPase (μmol/15min/mg protein)	Myeloperoxidase (μmol/min/mg protein)	Cytochrome b (pmol/mg protein)	FAD (pmol/mg protein)	Vitamin B_{12}-binding protein (ng bound/mg protein)
MA-activated						
Cell homogenate	37 ± 2.0	0.06 ± 0.002	6.6 ± 0.33	71 ± 2.0	71 ± 1.0	16.3 ± 3.7
Plasma membranes	790 ± 71	1.77 ± 0.35	0.29 ± 0.04	760 ± 90	95 ± 4.0	0.84 ± 0.22
Resting						
Cell homogenates	0.2	0.063 ± 0.003	6.8 ± 0.37	76 ± 4.0	65 ± 4.0	24.7 ± 2.3
Plasma membranes	3.4	2.03 ± 0.3	0.22 ± 0.016	810 ± 85	89 ± 10	0.40 ± 0.02

Numbers are means ± S.D. from three experiments.

考察

1) NADPH酸化酵素の細胞内局在

古くからNADPH酸化酵素の細胞内局在について、細胞質説、顆粒説（ライソゾーム説）、細胞膜説等が提唱されていた(9,11,13)。これらの報告では、密度勾配遠心の媒体としてはショ糖が用いられていた。しかし、高密度のショ糖は粘性が高いばかりでなく、その高い浸透圧のために各オルガネラの水分が失われ退縮し本来の比重と異なる分画に回収されることなどより、各オルガネラの分離が不十分なこともある。また、好中球の細胞内オルガネラは凝集しやすいことが知られており、特にNaClやKClなどの1価イオンがオルガネラの凝集を引き起こすことが報告されている(87)。そこで本研究では、密度勾配遠心の媒体としてシリカゲル粒子をポリビニールピロリドンで皮膜したPercollを用いて分画を行った。Percollは、ほとんど浸透圧をもたず幅広い範囲にわたって等浸透圧の密度勾配を形成することができ、かつ粘性も非常に低い。また、シリコンオイルを用いて白血球を浮遊液からすばやく分離し、浮遊液中のイオンや活性化剤を除き、細胞内オルガネラの凝集を防いだ。

ブタおよびモルモットの活性化した好中球をPercoll密度勾配遠心にて分画すると、そのO_2^-生成活性は細胞膜指標酵素と同一の挙動を示した。一方、活性化していない細胞をPercoll密度勾配で分画した場合は全分画に渡って非常に低いO_2^-生成活性しか認められなかった。さらに、活性化した好中球から得た細胞膜分画のO_2^-生成活性と細胞膜指標酵素の比活性は、顕著に上昇していた。一方、ミクロゾームの指標酵素であるGlucose-6-phosphataseやNADPH cytochrome c reductaseの比活性も細胞膜分画で上昇しているが、分画パターンは2相性のピークを示した。また、アズール顆粒や特殊顆粒の指標酵素の比活性はむしろ顕著に低下していた。したがって、好中球のNADPH酸化酵素は細胞膜に局在するものと結論した。

一方、ミリスチン酸で活性化したモルモット肺マクロファージをPercoll密度勾配遠心法にて分画した場合、そのH_2O_2生成活性で測定したNADPH酸化酵素活性は好中球同様軽い比重の分画に単一ピークとして回収された。また、細胞膜指

標酵素である5'-nucleotidaseのピークはこのH_2O_2生成活性のピークと一致していた。ミクロゾームの指標酵素のピークはH_2O_2生成ピークとほぼ同一ピークを示し、好中球のような2相性にはならなかった。一方、ミトコンドリアやリソゾームの指標酵素のピークはH_2O_2生成活性のピークとは大きく異なり、また細胞膜分画での比活性もむしろ低下していた。一方、膜分画のミクロゾームの比活性の上昇は4倍ほどであるのに対して、H_2O_2生成活性および5'-nucleotidase活性は約 10倍ほど上昇しており、マクロファージのNADPH酸化酵素も細胞膜に局在するものと考えられる。

マクロファージのNADPH酸化酵素について報告されているNAPDHに対するKmの値は非常に異なっている(93-95)。これらの不一致の要因としては、ミクロゾームやミトコンドリアなどが混在した分画を用いて測定しているためにこれらの電子伝達系からの活性酸素生成も測定してしまうこと(61,62)、さらに多くの場合NADPH酸化酵素活性をcytochrome cを用いたO_2^-生成活性にて測定しているが、これらの電子伝達系が酵素的に cytochrome cを酸化・還元し(96)測定が妨げられるためと考えられる。本研究では、Percoll密度勾配遠心法により調製した細胞膜分画を用いて、CCP法によりH_2O_2生成活性を測定しNADPH酸化酵素のNADPHに対するKmを求めたところ、約35μMと好中球での報告に非常に近い値が得られた。従って、マクロファージのNADPH酸化酵素の酵素的な性質は好中球と変わらないものと考えられる。

2)<u>チトクロームb_{558}の細胞内局在について</u>

NADPH酸化酵素の活性基の1つと考えられているチトクロームb_{558}は、細胞膜ばかりでなく顆粒分画にも局在することが報告されているが、この顆粒分画に存在するチトクロームb_{558}が活性化の過程で細胞膜に移行することが複数のグループより報告されている(50-53)。さらに、Schneiderらはこのチトクロームb_{558}の移行そのものが活性化に関与すると考えている。本研究では、ブタ好中球のチトクローム b_{558}の局在をZonal rotorを用いてPercoll密度勾配遠心法にて検討したが、活性化した細胞もしていない細胞も2相性の分布を示し、主ピークは細胞膜指標酵素のピークと一致した。また、細胞膜分画へのチトクローム b_{558}の回収率も活性化した細胞としない細胞で有意差は認められなかった。

従って、少なくとも３０秒間の活性化では、チトクロームb558の細胞膜への移行は起こらないと考えられ、Schneiderらが提唱しているチトクロームb558の細胞膜への移行がNADPH酸化酵素の活性化に必須であるとする説とは矛盾する。一方、結果としては示さなかったがより長時間ミリスチン酸で活性化した場合（３分間と１０分間）、比重1.05の細胞膜分画のピークは非常に小さくなり、より重い比重の細胞膜と顆粒の混在している分画に主ピークが認められるようになる。このことは、長時間の活性化した細胞からの分画では、細胞内オルガネラの凝集が起こりやすくなることを示唆している。一方、活性化にともなってチトクローム b558が細胞膜に移行するとの説を提唱しているBorregaard等(50)は、高濃度のKClやNaCl存在下で密度勾配遠心を行っている。しかし、Cohn等はこの様な塩の存在下では好中球の細胞内器官が凝集を起こしやすいことを報告している(87)。従って、Borregaard等の報告においてチトクローム b558の密度勾配遠心法で分布が活性化した細胞としていない細胞で異なっていたのは、上記の塩の存在が大きく影響している可能性もある。

3) 好中球細胞膜のNADPH酸化酵素の諸性質について

2価イオンのNADPH酸化酵素活性に及ぼす影響について、細胞膜分画を用いて検討した。細胞膜分画のO_2^-やH_2O_2生成活性は、比較的低濃度のMgイオンによって昂進し、しかも EDTA の添加により顕著に阻害された。また、Lineweaver-Burkプロットによる解析よりMgイオンはNADPH酸化酵素の基質結合性及びその反応性の両方を促進していると考えられる。しかし、この細胞膜分画のO_2^-やH_2O_2生成活性に対してCaイオンの促進効果は認められなかった。Green等(97)は、粗膜分画のTriton-X100可溶化分画を用いて、O_2^-生成活性がCaイオンにより促進されると報告しているが、このCaイオンの促進効果はCaイオンとdetergentの相互作用による可能性がある。なぜならば、洗浄した細胞膜分画でもCaイオンの効果が認められないばかりでなく高濃度のEGTAを添加した場合むしろO_2^-やH_2O_2生成活性を顕著に増加させたことから、細胞膜分画の NADPH酸化酵素はCaイオン非要求性であると考えられる。したがって、NADPH酸化酵素はその至適活性にMgイオンを要求しCaイオンは要求しないものと結論された。一方、EGTAの促進作用はおそらくZnイオンをキレートするためと考えられるが、その機構につい

ては不明である。このことは、白血球が他の細胞に比較して非常に大量のZnイオンを含むことと考え合わせると興味深い(98)。

好中球のNADPH酸化酵素は、細胞膜に存在すると考えられるが、その細胞膜でのtopologyについてはいくつかの仮説がある。Karnovskyのグループ(9)は ― 彼らはNADH酸化酵素説を取っていたが ― その基質結合部位が細胞膜外側にも存在すると考えられるデータを報告していた。しかし、Cibacron Blue F3GA はNADPH酸化酵素に対して拮抗阻害を示すにもかかわらず、細胞レベルでのO_2^-生成活性は全く阻害しなかった。従って、NADPH酸化酵素の基質結合部位は細胞膜裏側に位置していると考えられる。一方、Kakinuma等(99)によってNADPH酸化酵素によって生成される活性酸素は細胞膜の外側にのみ生成されることが明らかにされており、NADPHからの電子の流れは細胞の中から外へ一方向に流れると考えられる（図１４）。また、WilsonらはCibacron Blue F3GAにより阻害されるヌクレオチド要求酵素を分類し、そのKiが～0.1 - 1.0μMの酵素はdinucleotide foldを持つが10μM以上のKiの酵素はdinucleotide foldを持たないとしている(100)。彼らの分類に従えば白血球のNADPH酸化酵素もdinucleotide foldを持つものと考えられる。

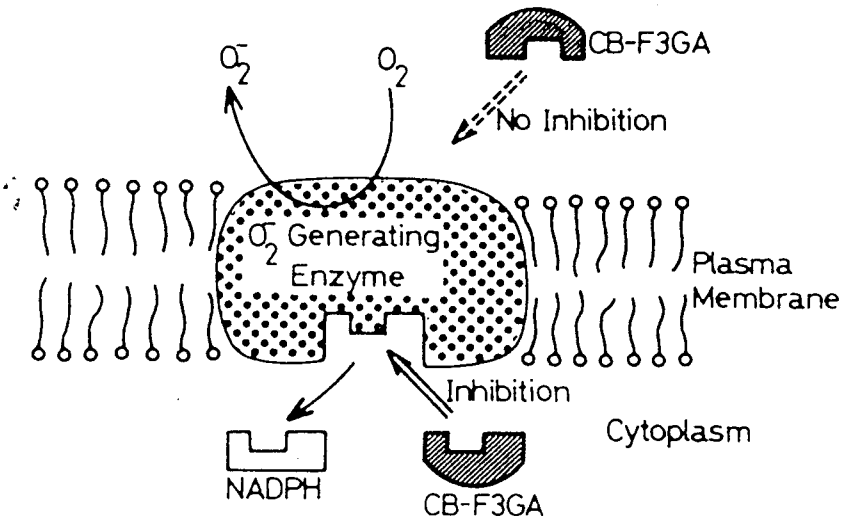
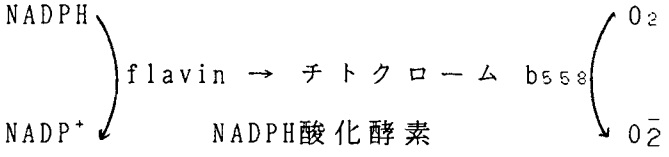


Figure 14. A model of the NADPH binding site of the O_2^- generating enzyme on the PMN plasma membrane. CB-F3GA, which does not penetrate the plasma membranes, cannot inhibit O_2^- generation by intact PMN, but it competitively inhibited O_2^- generation by the NADPH oxidase, probably because it bound to the NADPH binding site on inside-out vesicles of plasma membrane. Therefore, the NADPH binding site of this enzyme is probably located on the inner surface of the plasma membrane.

第2章　NADPH酸化酵素の可溶化とその部分精製

白血球のNADPH酸化酵素は、複数の活性基より構成される電子伝達系と考えられており、以下のようにNADPHを基質として酸素を一電子還元しスーパーオキサイドラジカル（O_2^-）を生成する膜酵素系であり、その活性基としてはフラビ



ン蛋白(63)とチトクロームb558(19,20)などが想定されている。1980年代に入ってから、種々の界面活性剤等を用いて、NADPH酸化酵素の可溶化、あるいは可溶化したNADPH酸化酵素の部分精製が試みられるようになった(63,101-104)。しかし、NADPH酸化酵素は非常に不安定であり、未だ本酵素の完全な精製の報告例はない。可溶化標品あるいは部分精製標品を用いて、その酵素化学的性質等の検討が行われてきた。特に、その活性基と想定されているフラビン含量とチトクロームb558含量比についても種々の異なる値が報告されている。フラビン蛋白質とチトクロームb558が NADPH酸化酵素を構成しているとすると、その比はNADPH酸化酵素の電子の流れあるいは細胞膜上におけるフラビン蛋白質とチトクロームb558の立体配位を考察する上で非常に重要な意味を持つ。一方Schneiderらは、NADPH酸化酵素はフラビン蛋白質やチトクロームb558の他にユビキノンを活性基として持つと報告している(51,52)。しかし、チトクロームb558以外のフラビン蛋白質やユビキノンについてはその存否も含めて不明な点が多い。

本章では、ブタ白血球からのNADPH酸化酵素の可溶化とその部分精製を試みた結果について述べる。また、部分精製標品のチトクロームb558とフラビンの量比について検討した結果について考察する。

材料及び方法

1) 試薬

Cytochrome c、Phenyl-methylsulfonylfluoride（以上 Sigma）、NADPH、NADH、ATP、AMP、FAD、FMN （以上Boehringer）、Percoll、Sepharose 2B、Blue Dextran（以上Pharmacia）、otylglucoside（同仁化学）は各々の会社より購入した。Blue DextranはRyanとVestlingの方法(105)にしたがいSepharose 2Bに結合させた。Cytochrome c peroxidase（CCP）は、Yonetani等の方法(65)に従ってイースト菌より抽出精製し結晶化した。アセチル化cytochrome c は、既報に従って調製した(37)。得られたアセチル化cytochrome cは63-69%のアセチル化率であった。Deoxycholic acid（DOC）は、既報に従い再結晶して用いた。Asolectinは、自治医科大学香川教授より供与された。

2) 好中球の調製

ブタ末梢血好中球は、ブタ血液を10分の1量の3%polyvinylpyrrolidone溶液と混和し、1時間ほど静置したのち上清の画分を遠心して得た(69)。残存している赤血球は0.2%NaClにより溶血させて除いた。また、白血球分画中のリンパ球は比重1.077のLymphoprep™を用いて除いた。得られた白血球分画中の好中球の純度は、95-98%であり、HEPES-緩衝生理食塩水（17 mM HEPES緩衝液(pH7.4), 5 mM KCl 1.2 mM $MgCl_2$を含む）に懸濁した。

3) 白血球のオルガネラの分画

白血球のオルガネラの分画は、Percoll密度勾配遠心法により行った。白血球を10^7細胞／mlになるように5mMグルコースを含むHEPES-緩衝生理食塩水に懸濁し、37℃にてpreincubateした。10分後にミリスチン酸を添加し、30秒間、37℃で好中球を活性化した。活性化後直ちに、冷却した0.34 Mショ糖溶液とシリコンオイル（比重1.02）の二重層に細胞懸濁液を重層し、1000 x gで3分間遠心して反応液と細胞を素早く分離した。沈澱した細胞を冷却したプロテアーゼ阻害剤を含むTris-緩衝ショ糖液（10mM Tris-HCl(pH7.4)、0.25M ショ糖, 20μg/

ml TLCK, 2μg／ml leupeptin：細胞破砕液）に懸濁し、Potter型テフロンホモジナイザーを用い、1,000 rpm、40往復して細胞を破砕した。細胞破砕液に1／100量の0.1M PMSFを添加した後、450 x g、10分間遠心して上清を得た。上清に1／100量の0.1M EGTAを加えた後、0から50％のPercollの密度勾配を含むTris-緩衝ショ糖液に重層しBeckman Ti14 Zonal rotorにて分画を行った。遠心後、一定量づつ分取し、各指標酵素の活性を測定した。細胞膜は、膜指標酵素のピークの分画を 165,000 x g、60分間遠心して集めた。得られた沈澱を、再びTris-緩衝ショ糖液にて洗った後、適量のTris-緩衝ショ糖液に懸濁して-80℃に保存した。

4)NADPH酸化酵素の可溶化

Percoll密度勾配遠心法により調製した細胞膜分画よりNADPH酸化酵素を可溶化した。可溶化は、非イオン性界面活性剤であるoctylglucosideを用いて行った。細胞膜分画を30％グリセリンを含む細胞破砕液に懸濁し、種々の濃度のoctylglucosideを添加し、氷浴中で20分間攪拌した。この溶液を、165,000 x gで1時間遠心して、上清と沈澱を得た。沈澱は、上清と同容量の細胞破砕液に再懸濁した。

5)NADPH酸化酵素のBlue Dextran Sepharoseによる精製

上記可溶化の結果に基づき、細胞膜30％グリセリンを含む細胞破砕液に懸濁し（1.0～1.5mg/mlの膜蛋白を含む）、終濃度1％あるいは1.5％のoctylglucosideを添加し、0℃で20分間攪拌してNADPH酸化酵素を可溶化した。この懸濁液を、165,000 x g、1時間遠心して不溶性分画を除き、上清を集めた。得られた上清を、2倍量の15％グリセリン、0.1mM EGTA、20μg/ml asolectinを含む細胞破砕液にて希釈し、0.1％ octylglucosideを含むこの希釈溶液で平衡化したBlue Dextran-Sepharose 2Bカラムに重層する。重層後、カラムを平衡化緩衝液で洗浄した後、0.3％DOCを含む上記希釈液を用いて吸着したNADPH酸化酵素を溶出した。

6) O_2^-及びH_2O_2生成活性の測定

細胞膜分画のO_2^-生成活性はアセチル化cytochrome cを用いて行った(37)。基本的な反応溶液は、0.1 mM NADPH, 5 μg/ml catalase、15 μM アセチル化cytochrome c、1 mM $MgCl_2$、0.1 mM EGTA、0.17 M ショ糖を含む65 mM Na-K-リン酸緩衝液（pH 7.0）を用いた。反応は、一定量の細胞膜分画を添加して開始した。H_2O_2生成活性は、cytochrome c peroxidase（CCP）を用いて測定した(72)。反応液は、種々の濃度のNADPH、5μM CCP、1 mM $MgCl_2$、0.1 mM EGTA、0.17 M ショ糖液を含む65 mM Na-K-リン酸緩衝液を用いた。活性は、H_2O_2-CCP複合体形成量を419-408 nmの吸光度差を経時的に測定することにより求めた。

7) 他の酵素活性及び指標蛋白の測定

Na-K-ATPase(75)活性は既報に従い測定した。遊離した無機リンはYoungburgとYoungburgの方法にしたがって測定した。lactate dehydrogenase活性は、NADHの酸化を経時的に測定して求めた(77)。NADPH cytochrome c reductase活性はOmura and Takesueの方法(78)によって測定した。Myeloperoxidase活性はGuaiacolの酸化反応より求めた(79)。Vitamine B_{12}-binding protein は ^{57}Co-Cyanocobalaminを用いて測定した(80)。

8) チトクローム b_{558}およびフラビン量の測定

チトクローム b_{558}量はdithioniteによる酸化還元差スペクトルより求めた。ミリモル吸光係数は$E_{mM558-540nm}$=21.6を用いた(82)。酸化状態の絶対スペクトルをdata processorに記憶後、少量のdithionite粉末を添加してチトクロームb_{558}を還元した。data processorのsubtraction modeを用いて酸化還元差スペクトルを記録した。フラビン量は、pH法にてそのFAD、FMN量を求めた(83,84)。

9) 蛋白定量

蛋白は、Lowryの方法にしたがってウシ血清アルブミンを標準蛋白質として定量した(85)。

結果

1) NADPH酸化酵素のoctylglucosideによる可溶化

好中球細胞膜より種々の濃度のoctylglucoside(OG)を用いてNADPH酸化酵素の可溶化を試みた。図１５は、ミリスチン酸で活性化したブタ好中球の細胞膜分画を種々の濃度のoctylglucosideで可溶化したパターンである。可溶化分画と不溶性分画とをあわせた全O_2^-生成活性は、1%octylglucosideでもっとも高くなり、かつ82%のO_2^-生成活性が可溶化された。1%octylglucosideにより、90%のチトクロームb558と64%のFADが可溶化された。チトクロームb558とFADの可溶化は、1.5%octylglucosideでほぼ最高になったが、O_2^-生成活性はむしろ1.5%octylglucosideでは低下していた。これは、NADPH酸化酵素の複合体の解離あるいは脂質等の除去により失活した可能性が考えられる。

2) NADPH酸化酵素の部分精製

先に述べたようにCibacron Blue F3GAは、NADPH酸化酵素の拮抗阻害剤であると考えられるのでこの色素をリガンドとしたアフィニティクロマトグラフィが考えられる。そこで、Blue Dextran をSepharose 2Bに結合させてNADPH酸化酵素の精製に用いることにした。

予備試験として、DOCを用いて NADPH酸化酵素を可溶化し、Blue Dextran-Sepharose 2Bによる精製を試みた。しかし、DOCで可溶化したNADPH酸化酵素活性はカラムに吸着されず全て素通り分画に回収された。おそらく、DOCで可溶化されたNADPH酸化酵素はそのDOCミセルのイオン反発力がカラムへの吸着を妨げているものと考えられた。図１６は、1% octylglucosideおよび1.5% octyl-glucoside可溶化分画のBlue Dextran Sepharose 2Bのaffinityクロマトグラフィの結果である。カラム溶出分画中のO_2^-生成活性およびチトクローム b558の含量は、1%octylglucosideで可溶化した分画が1.5%octylglucosideで可溶化した分画に比べ3倍ほど活性および含量が高かった。素通り分画のO_2^-生成活性は両可溶化試料とも大きな差異は認められなかったが、チトクローム b558の含量はむしろ1.5%octylglucoside可溶化試料の方が高い値を示した。これらの結果は、高濃度のoctylglucosideによるNADPH酸化酵素の複合体の解離等を反映している

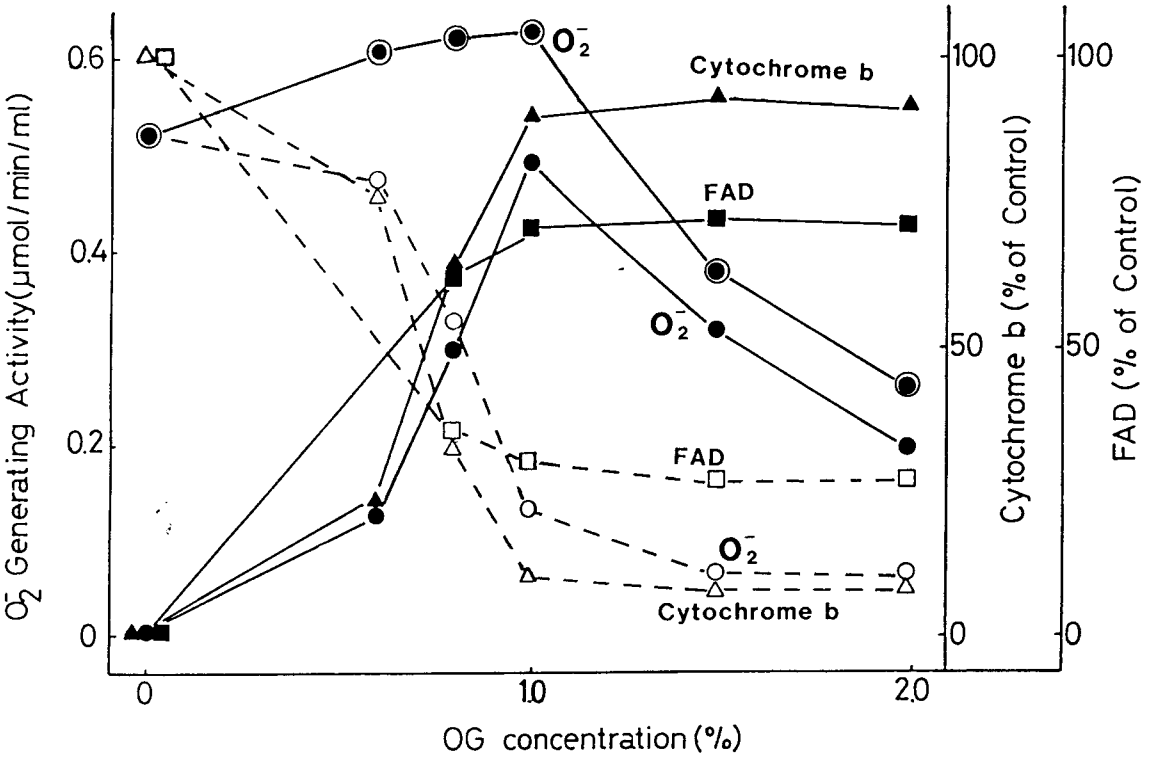


Figure 15. Solubilization profile of the NADPH oxidase. The O_2^- generating enzyme was solubilized from the plasma membranes prepared from MA activated PMN as in Fig. 1. The plasma membranes were solubilized with various concentration of octylglucoside at 0℃ for 15 min. Then, the membrane-suspension was centrifuged at 165,000 x g for 60 min. The precipitate was suspended in the same buffer except of the absence of octylglucoside. Solubilized (closed symbol and solid line) and precipitated (open symbol and dashed line) O_2^- generating activity (circles), cytochrome b_{558}(triangles), and FAD (squares) were determined as described in "MATERIALS AND METHODS". Total O_2^- generating activity (—◉—) is plotted as a function of solubilized plus precipitated activity.

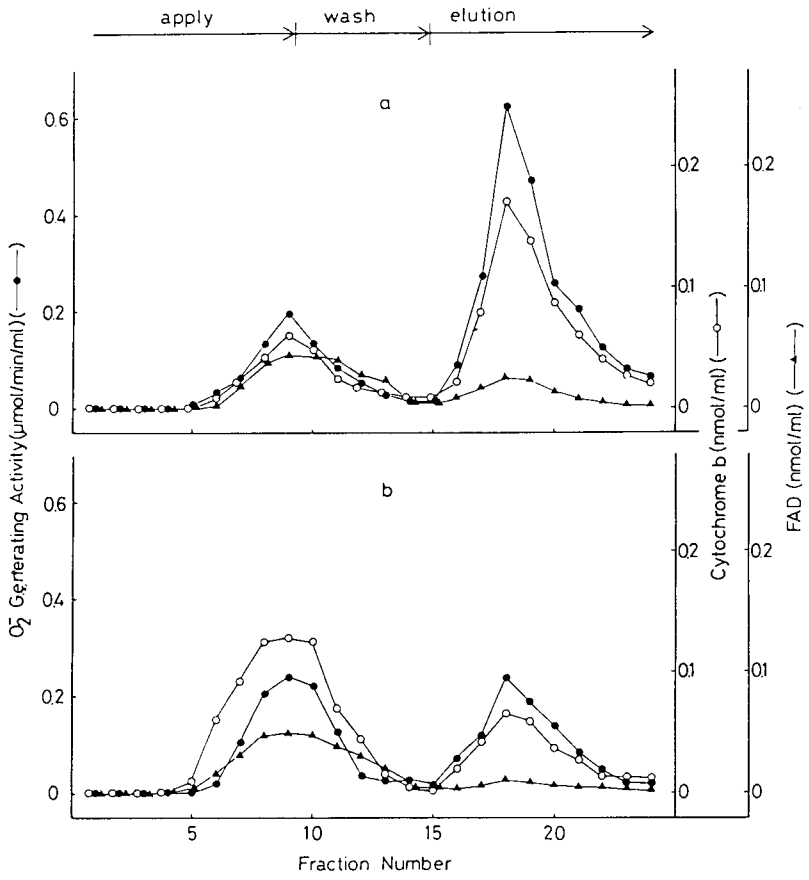


Figure 16. Affinity chromatography on Blue Dextran Sepharose 2B of NADPH oxidase solubilized with octylglucoside. Five ml of both 1.0%(a)- and 1.5% octylglucoside(b)-solubilized fraction was diluted to 15 ml and applied to the column of Blue Dextran Sepharose 2B, which was equilibrated with 0.1% octylglucoside in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) buffer contained 0.25 M sucrose, 15% glycerol, 0.1 mM EGTA and 20 μg/ml asolectin. After washing with the equilibrated buffer, the NADPH oxidase was eluted with the equilibration buffer contained 0.3% DOC instead of octylglucoside.

とも考えられる。図１７は、活性化した細胞及び非活性化細胞より得た膜分画を1%octylglucosideで可溶化し、Blue Dextran Sepharoseにより精製を試みた結果である。非活性化細胞からの分画では、チトクロームb558及びFADは活性化した場合とほぼ同様ののクロマトグラフィーパターンを示すにもかかわらず、O_2^-生成活性は全分画にわたって殆ど認められなかった。図１８は、溶出分画の酸化・還元スペクトルである。酸化型の絶対スペクトルは、413nmに吸収極大が、酸化-還元差スペクトルでは、426、529、558nmに吸収極大があった。表６は、Blue Dextran Sepharoseの精製結果をまとめたものである。この分画は、SDS-PAGEによる解析から6本の主バンドの他多くのバンドが認められcrudeな精製標品ではあるが、O_2^-生成活性は細胞膜分画より7.6倍上昇しており、これは細胞レベルより約150倍ほど増加していたことになる。チトクローム b558は細胞膜分画より2.4倍増加していたが、FAD含量は細胞膜分画に比べて殆どその含量の増加が認められなかった。興味あることに、FADとチトクローム b558の含量比は約15倍ほど離れていた。また、結果には示さなかったが、可溶化分画、各カラムクロマトグラフィーのいずれの分画においてもFMNの含量はFAD含量の多くとも20分の1以下であった。また、共有結合をしているフラビンは検出されなかった。

考察

1) NADPH酸化酵素の可溶化

ブタ好中球細胞膜からのNADPH酸化酵素の可溶化は、1%octylglucosideを用いたとき、最も高い可溶化率が得られ（82%）、その条件下で90%のチトクロームb558が可溶化された。しかし、1.5% octylglucosideではチトクローム b558の可溶化率はわずかに上昇するものの、NADPH酸化酵素の可溶化分画と沈澱を合わせた総活性はむしろ60%に低下した。これらの結果は、高濃度octyl-glucosideによりNADPH酸化酵素の複合体の解離ないしは脂質の除去がその活性の低下をもたらしたのではないかと考えられる。一方、前章で述べたようにこの細胞膜分画に含まれるフラビンは殆ど共有結合型は見いだせず、かつ非共有

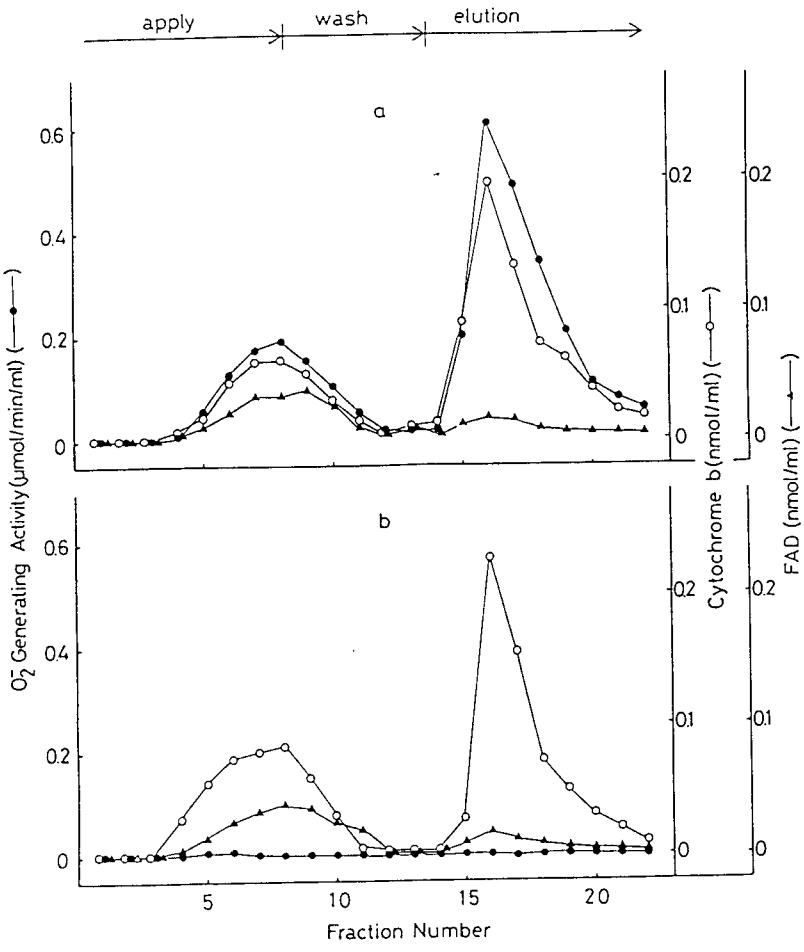


Figure 17. Affinity chromatography on the Blue Dextran Sepharose 2B of NADPH oxidase. The plasma membranes prepared from MA-activated (a) and resting (b) PMN were solubilized with 1.0% octylglucoside. Solubilized samples were fractionated as same as in Fig. 16.

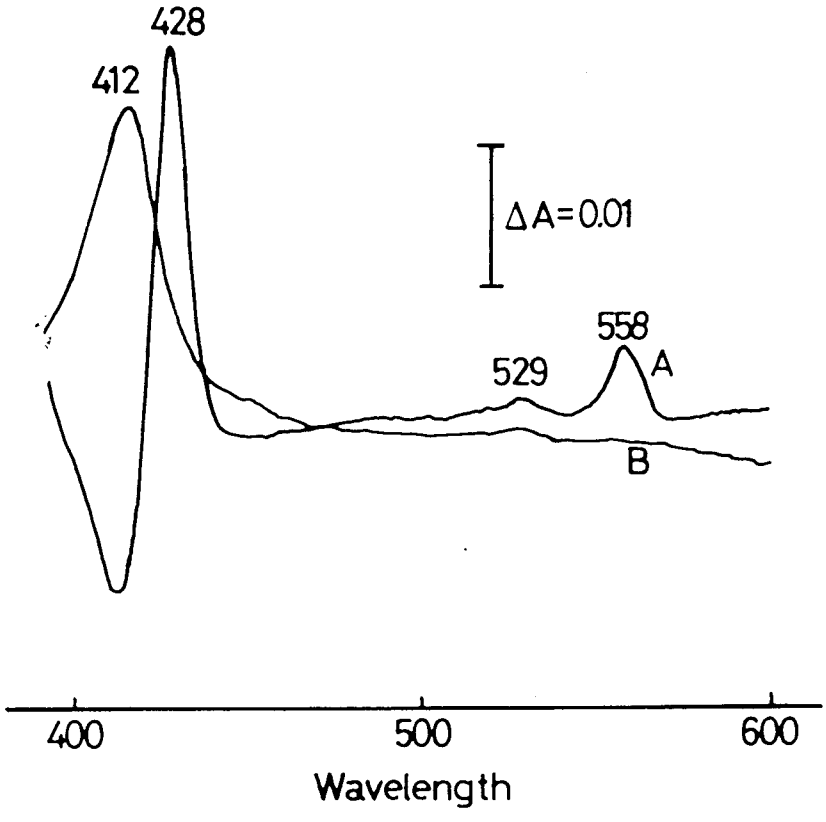


Figure 18. Absolute oxidized spectrum (B) and reduced minus oxidized spectrum (A) of eluate fraction, which contained 0.13 mg protein/ml. After the measurement of absolute spectrum, a few grains of dithionite were added. After the addition of dithionite, reduced minus oxidized spectrum was recorded.

Table 6. Purification of NADPH oxidase from myristate-activated PMN.

	O_2^- generating activity (μmol/min/mg protein)	Cytochrome b (nmol/mg protein)	FAD (nmol/mg protein)
Plasma membranes	0.74	0.71	0.10
DOC eluate	5.60 (7.6x)	1.70 (2.4x)	0.11(1.1x)

結合型フラビンの大部分はFADであった。このFADを持つフラビン蛋白質の種々の濃度のoctylglucosideによる可溶化パターンは、チトクロームb558とよく一致していた。このことは、チトクロームb558とフラビン蛋白質の複合体がNADPH酸化酵素を構成しているとする考えに矛盾しない結果と思われる。

2) NADPH酸化酵素の部分精製

ブタ好中球よりNADPH酸化酵素を、Cibacron Blue F3GAをリガンドとして精製することを試みた。Blue Dextran Sepharoseに吸着したNADPH酸化酵素あるいはチトクロームb558は、DOCを用いることにより効率よく溶出することができた。部分精製したNADPH酸化酵素の比活性は5.6μmol/min/mg蛋白と顕著に上昇していた。このBlue Dextran Sepharoseによる部分精製標品のNADPH oxidsae活性は、他の報告に比べて最も高い値であった。しかし、それ以上の精製はむしろ活性を低下させてしまった。これは可溶化後NADPH酸化酵素は急速に失活するためと考えられる。さらに、チトクロームb558も顕著な上昇を示したが、フラビン含量（FAD）は、ほとんど増加していなかった。以上の結果は、チトクロームb558がNADPH酸化酵素の活性基であることを示唆している一方、フラビンの関与については否定的な結果に思われる。しかし、Kakinuma等による好中球細胞膜分画のフラビンのESRを用いた研究よりフラビンがNADPH結合部位である可能性が示唆されており(105)、かつヘム蛋白は1電子還元しか行わないことよりチトクロームb558はNADPH結合部位を持つとは考えにくい。

NADPH酸化酵素の活性基としてフラビンとチトクローム b558が考えられているが、その細胞膜においてフラビンとチトクローム b558が1:1あるいは1:2で構成されているとする説がある(50,106,107)。この白血球のフラビンは細胞膜分画や可溶化分画等の大部分のフラビンが非共有結合型のFADであったことより、NADPH酸化酵素のフラビン蛋白質はFADを補酵素として持つと考えられている。本研究では、Percoll密度勾配で分画したブタ好中球細胞膜分画のフラビン（FAD）とチトクローム b558の比率は1:9であり、またBlue Dextran Sepharoseを用いて部分精製したNADPH酸化酵素では、その比活性の増大にもかかわらず比は1:15とさらに離れた値が得られた。一方、ミクロゾームのP-450とP450-reductaseの比率も約20:1との値が報告されており、P-450がreductaseを取り囲むよう

な膜内配置が考えられている(108)。NADPH酸化酵素も細胞膜内において同様の立体配置をしている可能性が考えらる。

第3章 チトクロームb558の精製とその性質について

前章で述べたように、白血球のNADPH酸化酵素がどのような活性基から構成されているかについては不明の点が多いが、少なくともその1つはチトクロームb558であるとする点については現在まで異論はない。チトクロームb558は白血球特有のヘム蛋白質であり、その吸収スペクトルは酸化型で413nm付近に吸収極大があり、還元型ではSoret領域は426nm付近に、またα、βのそれぞれの吸収領域で558、529nm付近に吸収極大を持っている(19,21)。また、細胞膜分画での酸化還元電位は、-245mVと他のb-型チトクロームに比べ非常に低い値を示し、真核生物では最も低いEmである(109)。一方、その酸素との結合力に関しては相異なる説が報告されている。一般に、酸素との結合は一酸化炭素との結合性を測定することにより論議されているが、複数のグループはCO差スペクトルを測定し、チトクロームb558はCOと結合すること、すなわち酸素との結合性を有するterminal hemeであると考えている(110,111)。一方、Iizukaらは、チトクロームb558はCOとの結合力はなくむしろ酸素とは直接結合せず電子をheme edgeより酸素に渡すterminal hemeであると考えている(112)。

Royer-Pokaraらにより、チトクロームb558の欠損した伴性劣性遺伝CGD患者白血球より原因遺伝子がXp21領域よりクローニングされ、そのcDNAの塩基配列より54kDaの蛋白質をコードすることが明らかにされた(113)。さらに、このcDNAのコードする蛋白質は約90kDaの糖蛋白として発現されていることも明らかにされた。一方、SegalらおよびParkosらによりチトクロームb558の精製が行われ、90kDa付近および22kDa付近の2つのsubunitから構成されていることが報告された(114-116)。さらに、この90kDa蛋白がRoyer-PokaraのクローニングしたcDNAのコードする蛋白と同一であることが明らかにされた。しかし、チトクロームb558のヘムがそのどちらに存在するのか、またチトクロームb558からどのようにして酸素に電子が渡されるのか、あるいは直接酸素にわたるのではなくさらに不明の分子が関与するのか等については不明のままである。

本章においては、このチトクロームb558のヘムをもつ分子の精製と、その性

質について検討した結果について述べる。

材料及び方法

1) 試薬

hydroxylapatite Ultro Gel、DEAE-Sephacel、Mono-Q FPLCカラム、Dextran T500、heparin-Sepharose 6B（以上はPharmacia LKB Biotechnology Inc.）；octylglucoside（Bio-RadあるいはDojindo Laboratories）；leupeptin、antipain、diisopropylfluorophosphate、N-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)、phenylmethylsulfonyl fluoride（以上Sigma）はそれぞれの会社より購入した。他の試薬は、特級を用いた。

2) チトクロームb558の可溶化

ヒト好中球は、既報(60)にしたがいDextran T500により赤血球を沈澱させ、得られた上清を遠心により集めた。残存している赤血球は0.2% NaClの低張液を用いて溶血させた。得られた好中球は、10mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM TLCK, 2 μg/ml leupeptin, 2μg/ml antipain, 0.5 mM dithiothreitol及び0.015% hexamethylphosphoramide（HMPD）を含む0.25Mショ糖液（Tris-ショ糖液）に懸濁し－80℃に保存した。冷凍保存してあった200mlの細胞懸濁液（6 x 10^{10}細胞を含む）を解凍し、終濃度1mMのdiisopropylfluorophosphateを加えた。0℃で、40ワット、10秒間の超音波処理により細胞を破砕し、その破砕液に100分の1量のphenylmethylsulfonyl fluorideを添加した。以降の操作はすべて0 - 4℃で行った。この細胞破砕液を、450 x g、10分間遠心して上清を得る。この上清に、100分の1量の0.1M EGTA溶液を添加し、165,000 x g、60分間遠心して粗膜分画を得る。得られた膜分画を、60mlのTris-ショ糖液に懸濁し、さらに120mlの1.5 Mリン酸緩衝液を加えて0℃、40ワット、5秒間超音波処理を行う。これを、165,000 x g、60分間遠心して薄褐色の沈澱を得る。この沈澱を、60mlのTris-ショ糖液に懸濁したのち、終濃度1.0%のoctylglucosideを添加し0℃で15分間攪拌する。この懸濁液を、165,000 x g、60分間遠心して沈澱を得る。

得られた沈澱を、60mlの5%グリセリン、0.1mM TLCK, 2μg/ml leupeptin, 2μg/ml antipain, 0.5mM dithiothreitol及び0.015% hexamethylphosphoramideを含む100mMリン酸緩衝液(pH 7.3)(可溶化溶液)に懸濁する。この懸濁液に、終濃度1.6%のoctylglucosideを添加し、0℃で15分間攪拌してチトクロームb558を可溶化した。15分後に、240,000 x g、60分間、遠心して不溶性物質を除いた。上清には、1.1から1.74nmol/mg蛋白のチトクロームb558が含まれていた。

3)チトクロームb558の精製

可溶化したチトクロームb558は、0.5%octylglucosideを含む可溶化溶液で平衡化したhydroxylapatiteカラムに重層した。以降のカラム操作には可溶化溶液に含まれている蛋白分解酵素阻害剤を添加して行った。カラムを平衡化緩衝液で洗浄したのち、0.1から1.0 Mのリン酸緩衝液(pH 7.3)の濃度勾配(緩衝液以外は平衡化緩衝液と組成は同じ)を用いて溶出した(図１９)。チトクロームb558のピーク分画を集め、100 mM リン酸緩衝液(pH 7.3)に対して透析した。透析後、終濃度1%のoctylglucosideを添加した。これを、再びhydroxylapatiteカラムに重層し、再クロマトグラフィーを行った。得られたチトクロームb558のピーク分画を集め、50mMリン酸緩衝液(pH 7.3)に対して透析した。透析後、終濃度1%のoctylglucosideを添加し、これを0.5%octylglucosideを含む50mMリン酸緩衝液にて平衡化したDEAE-Sephacelに重層した。素通り分画を集め、10mMリン酸緩衝液(pH 7.3)に対して透析した。透析後、終濃度1.5%のoctyl-glucosideを添加したのち、0.5%octylglucosideを含む10mMリン酸緩衝液にて平衡化したMono Q FPLCに重層した。チトクロームb558を、0.01から1.5Mリン酸緩衝液(pH 7.3)の不連続勾配にて溶出した(図２０)。

4)チトクロームb558のheparin-Sepharoseへの結合

精製過程におけるチトクロームb558のheparin-Sepharoseへの結合性について検討した。各精製段階におけるチトクロームb558を、25mMリン酸緩衝液に対して透析した。透析後、終濃度1.5%のoctylglucosideを添加したのち、0.5% octylglucosideおよび可溶化溶液に含まれている蛋白分解酵素阻害剤を含む25mMリン酸緩衝液(pH 7.3)にて平衡化したheparin-Sepharoseに重層した。結合し

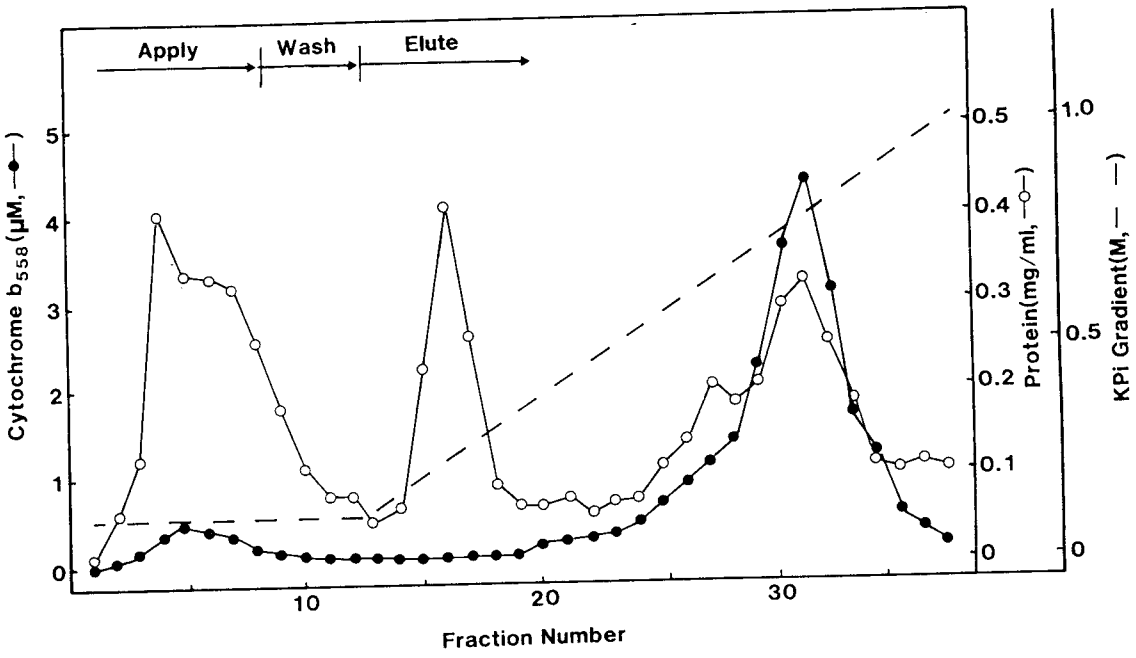


Figure 19. Column chromatography of cytochrome b_{558} on hydroxylapatite Ultro Gel. ●, cytochrome b_{558} concentration as calculated from the absorbance of the reduced spectra at 558 nm;○, protein concentration; ---, concentration of potassium phosphate buffer (pH 7.3).

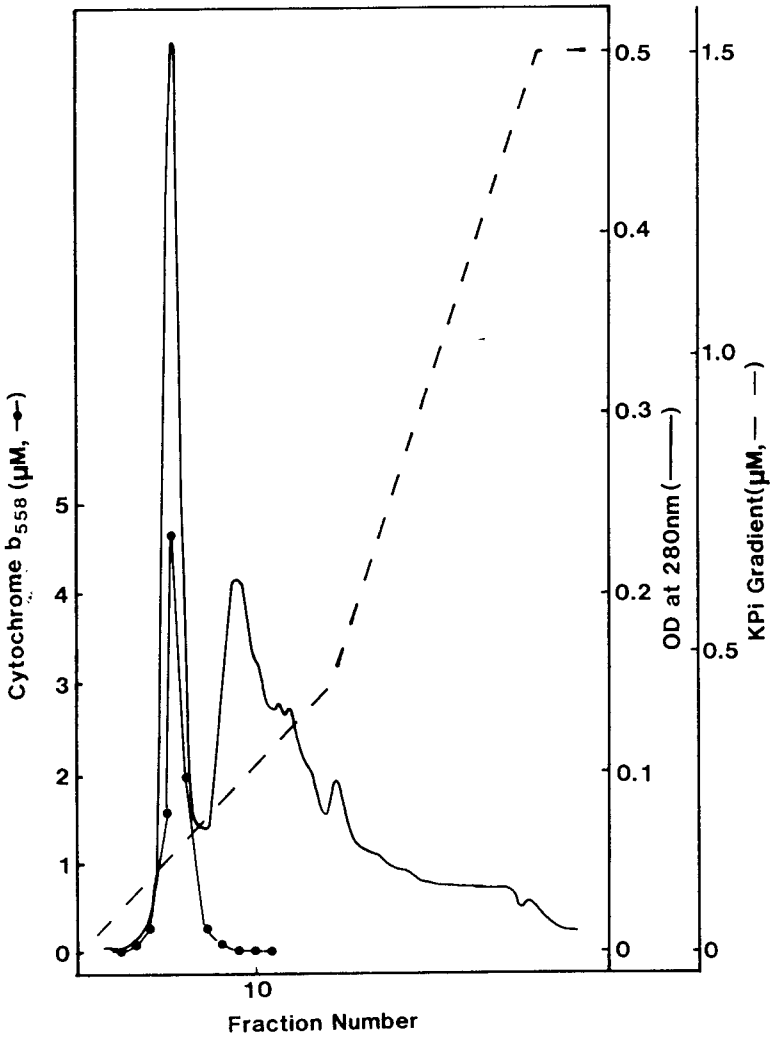


Figure 20. Column chromatography of cytochrome b_{558} on Mono Q FPLC. ●, cytochrome b_{558}; — —, absorbance at 280 nm; ---, gradient of 0.01 - 1.5 M potassium phosphate buffer (pH 7.3).

たチトクロームb558は、0.5%octylglucosideを含む0.75 Mリン酸緩衝液(pH 7.3)にて溶出した。

5) チトクロームb558およびフラビン量の測定

チトクロームb558量はdithioniteによる酸化還元差スペクトルより求めた。ミリモル吸光係数は$E_{mM558-540nm}$=21.6をもちいた(82)。酸化状態の絶対スペクトルをdata processorに記憶後、少量のdithionite粉末を添加してチトクロームb558を還元した。data processorのsubtraction modeを用いて酸化還元差スペクトルを記録した。また、COスペクトルの測定には、チトクロームb558を少量のdithionite粉末で還元後、試料中にCOガスを還流したのち、subtraction modeにてCO差スペクトルを記録した。フラビン量は、pH法にてそのFAD、FMN量を求めた(83,84)。

6) CDスペクトル解析

CDスペクトル解析のために15mMリン酸緩衝液に対して透析した部分精製標品を、DEAE-Sephacelに吸着させ濃縮した。この分画を、50mMリン酸緩衝液に対して透析した。透析後、14-18μMチトクロームb558を含むこの分画に終濃度2.0%のoctylglucosideを添加し、CDスペクトル解析に用いた。CDスペクトルは、日本分光Jasco J-500を用いて、20℃で行った。また、Δεは分光学的に測定したチトクロームb558の濃度より計算した。

7)SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

各分画の、SDS-PAGEによる解析はLaemmliの方法(117)にしたがって行った。また、分離用のゲルは、15%のアクリルアミドゲルを用いた。

8) 蛋白定量　蛋白は、Lowryの方法(85)にしたがってウシ血清アルブミンを標準蛋白質として定量した。

結果

1)ヒト好中球チトクロームb558の精製

ヒト好中球チトクロームb558精製の典型的な結果を表7に示す。粗膜分画のチトクロームb558の比含量は0.154nmol/mg蛋白であり、これは細胞当りの含量の約2倍である。高イオン強度処理及び低イオン強度下でのoctylglucoside前処理の後、100mMリン酸緩衝液下で、1.6%octylglucosideにより87-95%のチトクロームb558が可溶化された。1回目のhydroxylapatiteカラム操作により7倍ほどチトクロームb558の比含量が増加した。また、大部分のフラビン（主としてFADであるが）は1回目のhydroxylapatiteカラムの素通り分画に回収された。Mono Q FPLCの溶出分画のチトクロームb558の比含量は、37nmol/mg蛋白という値が得られた。これは現在まで報告されているチトクロームb558の比含量のなかでも最も高い値である。また、その精製効率3.9と低い値であったが、粗膜分画からの精製度は255倍であった（これは細胞レベルからは約500倍であった）。

図21は、各精製段階のSDS-PAGEを示してある。Mono Q FPLCのピーク分画では約20kDa付近に単一バンドが得られた。しかし、Segal(114)あるいはParkos(115)らが報告している90kDa付近の高分子subunitと考えられているバンドは認められなかった。

一方、Parkosらによってチトクロームb558は、heparin-Sepharose あるいはwheat germ agglutinin-Sepharoseに結合することが報告されている(115)。これは、糖蛋白質であるチトクロームb558の高分子subunitを介して、糖鎖に親和性のあるheparinあるいはレクチンカラムに結合するものと考えられている。そこで、各精製段階のチトクロームb558のheparin-Sepharoseへの結合性について検討してみた。図22は、1回目の hydroxylapatiteカラムの溶出分画およびMono Q FPLCの溶出分画のHeparin-Sepharoseカラムクロマトグラフィパターンを示してある。1回目のhydroxylapatiteカラムの溶出分画では、大部分のチトクロームb558がカラムに吸着されるのに対して、Mono Q FPLCからの溶出分画では、カラムに全く吸着されなかった。この結果は、SDS-PAGEの泳動結果とよく一致していた。一方、1回目のhydroxylapatiteカラムの溶出分画のheparin-

Table 7. Purification of human neutrophil cytochrome b_{558}

Fraction	Specific content	Total amount	Yield
	nmol/mg protein	nmol	%
Particulate	0.154	475[a]	100
KPi-washed	0.310	360	76
OG-solubilized	1.74	228	48
1st HTP[b] eluate	12.3	100	21
2nd HTP eluate	20.3	73.3	15.4
50mM DEAE effluent	30.1	58.9	12.4
Mono Q FPLC eluate	37.0	18.9	3.9 (x189)

a: Total amount of cytochrome b_{558} was obtained from $\sim 6 \times 10^{10}$ neutrophils.

b: HTP, hydroxylapatite.

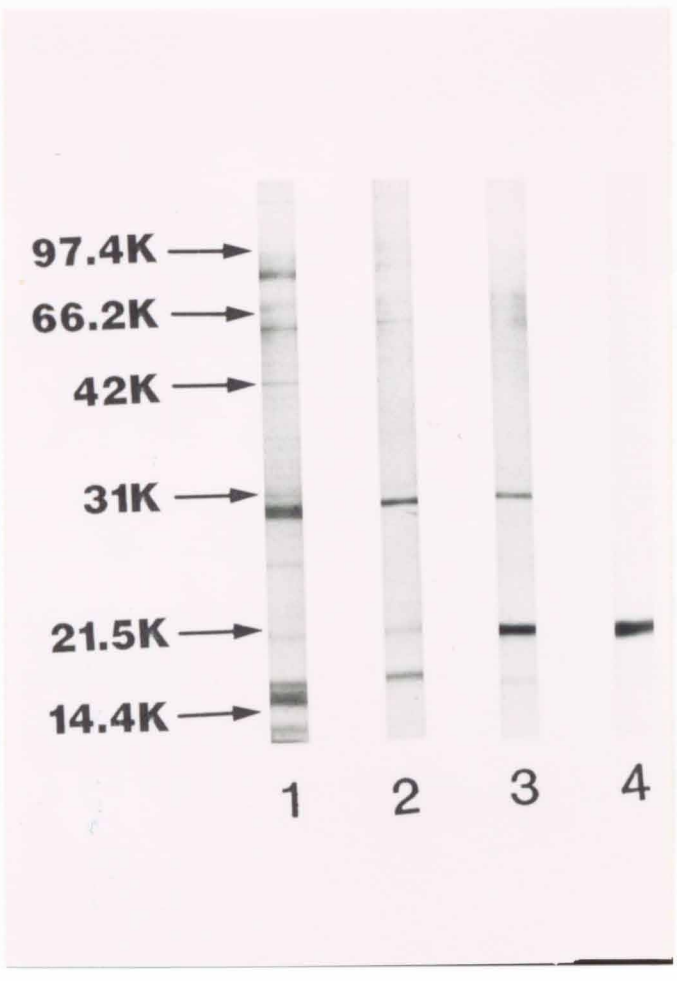


Figure 21. SDS-PAGE pattern of purified and crude cytochrome b_{558}. Lane 1, 1.0 M potassium phosphate buffer-washed particulate fraction; lane 2, 1.6% octylglucoside-solubilized fraction; lane 3, DEAE-Sepharose effluent fraction; lane 4, Mono Q FPLC eluate fraction. Each lane contained about 0.5 μg protein. The gel was stained with Coomassie Blue R-250. Numbers indicate the molecular masses of marker protein.

Sepharose吸着分画およびMono Q FPLCの溶出分画のSDS-PAGEでの解析結果を図２３に示す。粗精製分画では、90kDa付近にlarge subunitと考えられる幅広いバンドが認められるのに対して、精製標品では銀染色によっても20kDa付近のバンドのみが認められた。

2) 精製チトクロームb558の性質

図２４は、Mono Q FPLC溶出分画の酸化・還元の絶対スペクトルを示している。酸化型では、413.5nmに吸収ピークが、還元型では426nm、529nm、558nmに吸収極大があり、すでに報告されている値と一致していた。

図２５-上図は、COおよびKCN差スペクトルを示している。精製したチトクロームb558は、KCNとは結合しないもののCOとの結合に基づくと思われるCO差スペクトルが得られた。図２５-下図は、CO存在下の絶対スペクトルを示している。そのCOスペクトルは、420 nmに吸収極大が認められた。しかし、結果には示さなかったが膜分画ではCOとの結合性は全く認められなかった。

次に、ヘム近傍の情報を得るためにCDスペクトルの測定を行った。この場合は、測定に大量のチトクロームb558を必要とするために部分精製標品を用いて行った。図２６に示すように、チトクロームb558のSoret領域のCDスペクトルは酸化型及び還元型とも上下にsplitしたS-型のCDスペクトルパターンを示した。また、その交点の波長はそれぞれその吸収波長のピークとほぼ一致していた（表８）。

考察

1) チトクロームb558のsmall subunitの精製

本研究では、非イオン性のCMCの高い界面活性剤であるoctylglucosideを用いて、チトクロームb558の精製を行い、ほぼ単一バンドにまで精製刷ることができいた。現在のところ、チトクロームb558は 20kDa付近と90kDa付近の２つのsubunitから構成されると考えられている(114-116)。本研究で精製したチトクロームb558は、20kDa付近に単一バンドを示すものの90kDa付近のバンドは精製

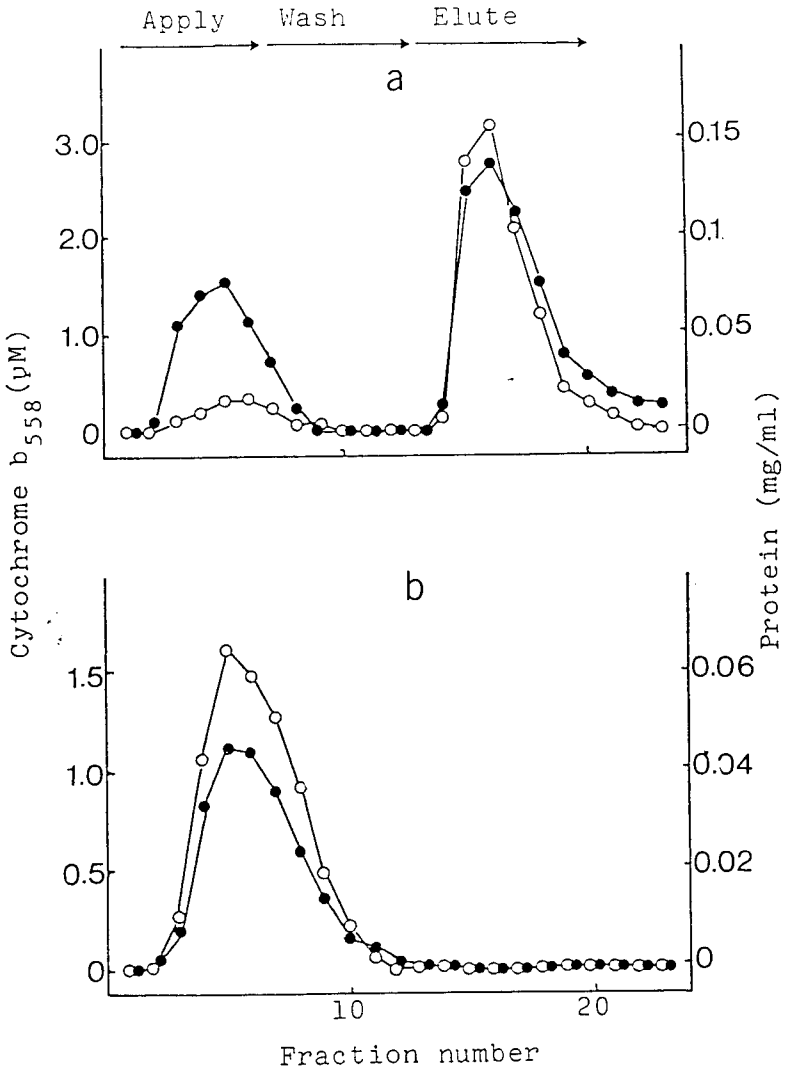


Figure 22. Heparin-Sepharose column chromatography of crude and purified cytochrome b_{558}. a, chromatography pattern of the sample from the first hydroxylapatite eluate fraction; b, chromatography pattern of a sample from the Mono Q FPLC eluate fraction. ○, cytochrome b_{558} concentration; ●, protein concentration.

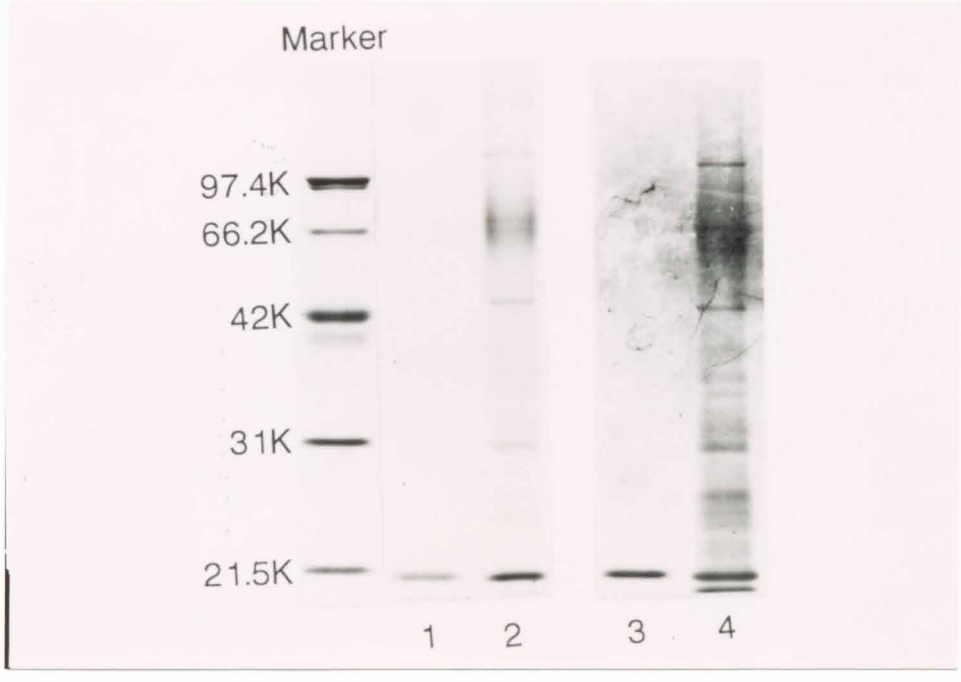


Figure 23. SDS-PAGE pattern of purified and heparin-Sepharose eluate fractions. Lanes 1 and 3, Mono Q FPLC eluate fraction; lanes 2 and 4, heparin-Sepharose eluate fraction described for Fig. 22a; lanes 1 and 2, Coomassie Blue staining pattern; lanes 3 and 4, silver staining pattern.

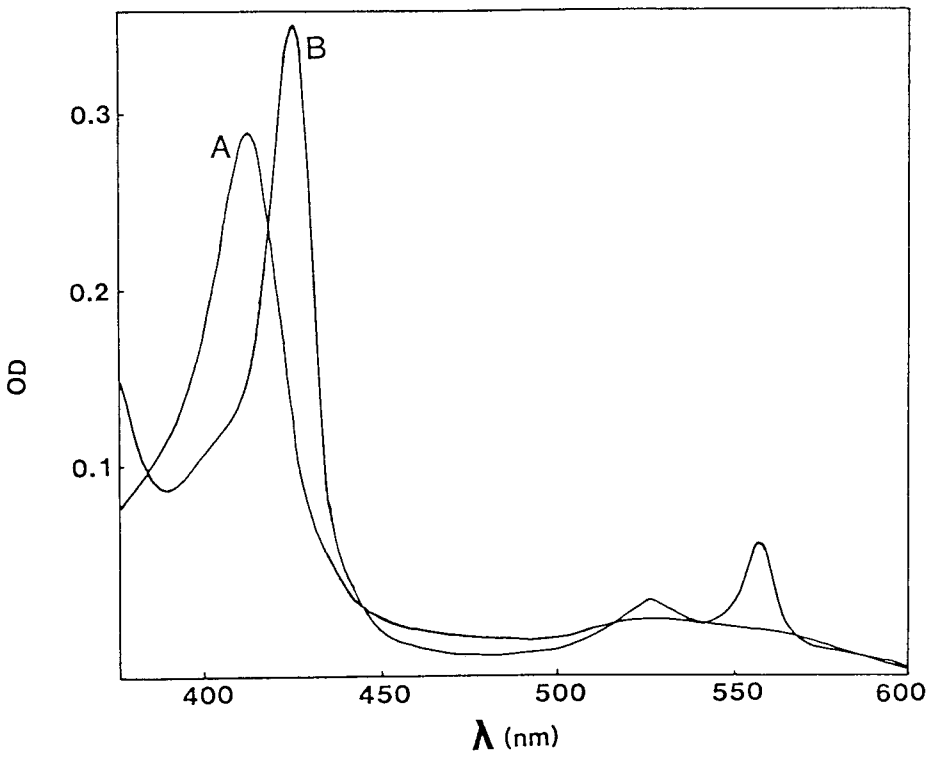
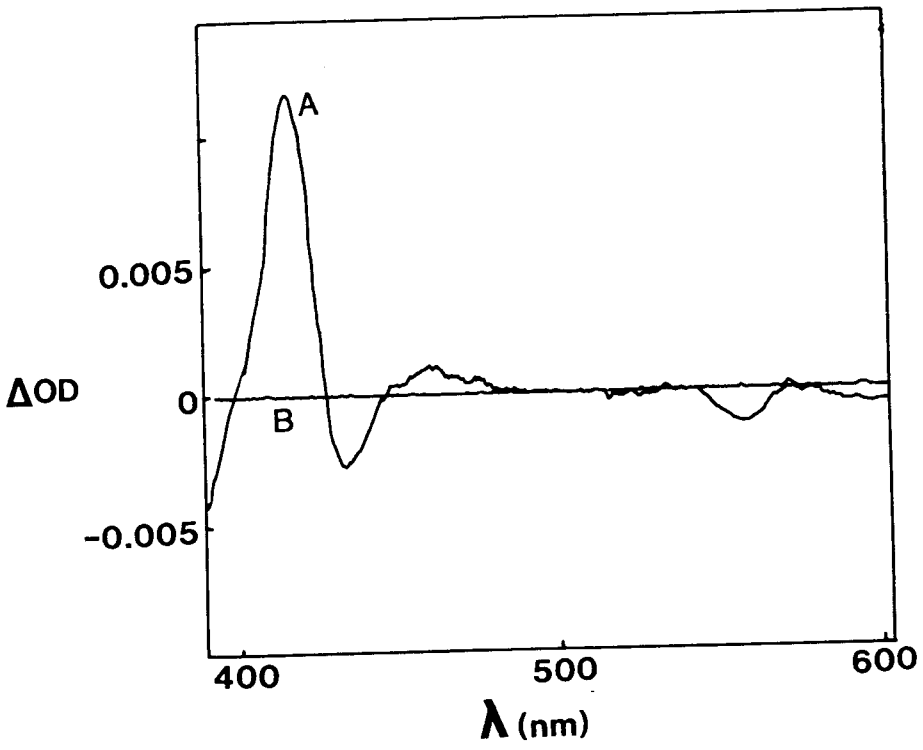


Figure 24. Absolute spectra of reduced and oxidized purified cytochrome b_{558}. Absolute oxidized (spectrum A) and reduced (Spectrum B) spectra of purified cytochrome b_{558} (Mono Q eluate fraction) were measured at 20 ℃.



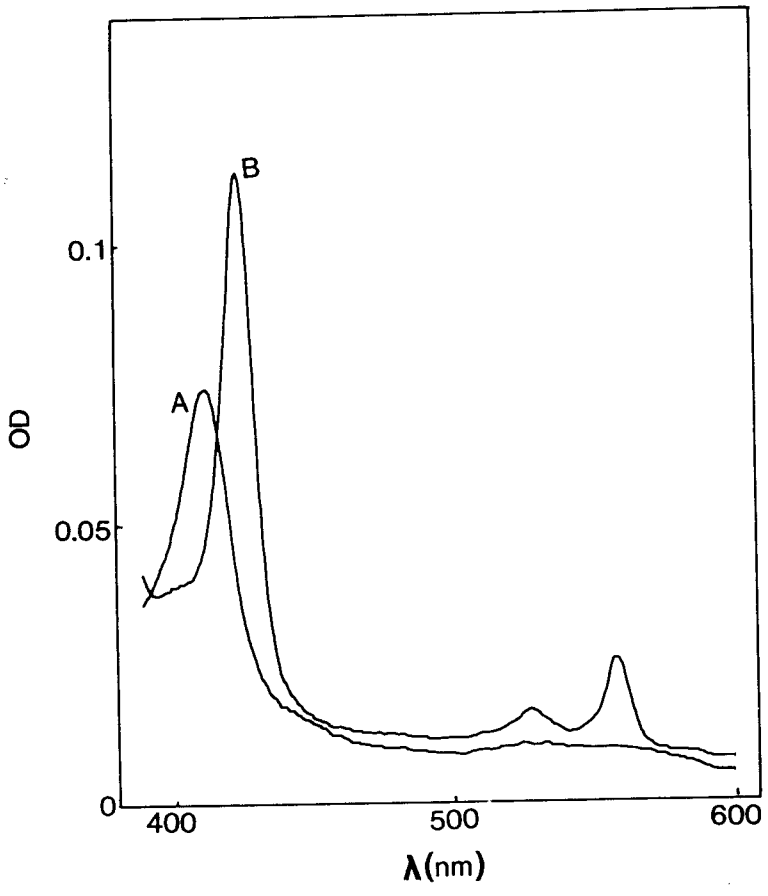


Figure 25. Upper, CO and KCN difference spectra of purified cytochrome b_{558}. The CO (spectrum A) and KCN (spectrum B) difference spectra were measured at 20°C by using the subtraction mode of a data processor. Carbon monoxide was bubbled through the dithionite-reduced solution. Lower, absolute spectrum of CO-cytochrome b_{558} (spectrum A) was recorded as described (upper). Spectrum B indicated the dithionite-reduced spectrum of cytochrome b_{558}.

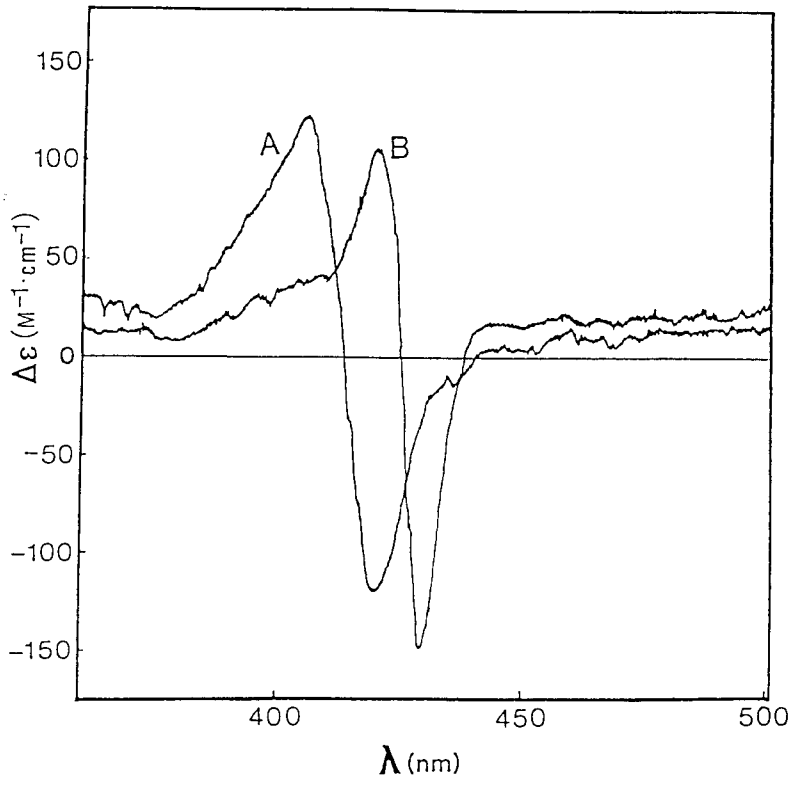


Figure 26. Circular dichroism spectra of human cytochrome b_{558}. The CD spectra of cytochrome b_{558} in the DEAE-Sephacel-cencentrated fraction were measured at 20°C. Spectrum A, CD spectrum of oxidized cytochrome b_{558}; spectrum of dithionite-reduced cytochrome b_{558}.

Table 8. Circular dichroism characterization of cytochrome b_{558}. Data were derived from Fig. 26. The $\Delta\varepsilon$ values are calculated on the basis of the concentration of cytochrome b_{558} as determined from optical absorbance.

	λ max	$\Delta\varepsilon$	λ crossover
	nm	$M^{-1}cm^{-1}$	nm
Oxidized cytochrome b_{558}	406	121	413
	426	-119	
Reduced cytochrome b_{558}	420	102	424.5
	429	-150	

分画に含まれていなかった。このことは、Mono Q FPLCの溶出分画が、heparin-Sepharoseカラムに吸着されなかったことからも、この分画にlarge subunitが含まれていないことを示している。従って、チトクロームb558のヘムはsmall subunitに存在するものと考えられる。

2) チトクロームb558のCOとの結合性

Mono Q FPLCの溶出分画は、還元条件下、COを還流することによりその吸収波長は426nmから420nmに移行した。一般に、COとの結合性を有するb-型チトクロームのCO吸収ピーク波長は420nm付近であると言われている。従って、精製したチトクロームb558は、COとの結合性を持つことは精製したチトクロームb558が酸素との結合性を有していることを示すものと考えられる。一方、膜分画のチトクロームb558はCOとの結合性を示す吸収スペクトル変化は全く示さなかった。従って、精製チトクロームb558は酸素と結合する性質を持つものの、細胞膜では酸素との結合性を持たないように構築されているものと考えられる。

3) チトクロームb558のCDスペクトル

b-型チトクロームであるproto IXヘムタイプのSoret領域のCDスペクトルは、主として正のcotton効果を持つ場合と負のcotton効果を持つ場合に分類される。正のcotton効果を持つproto IXヘムは、酸素との結合性を有するperoxidaseやヘモグロビンが挙げられる(118,119)。一方、電子伝達系の中間型チトクロムbは負のcotton効果を持つケースが多い(120、121)。一方、特殊な例としてミトコンドリアのbc複合体のチトクロームbは吸収波長を中心にsplitしたS-型CDスペクトルを示すことが知られている(122)。これは、このチトクロームbの2つのヘムが、15Å以内に存在しヘム-ヘム相互作用をするためと結論されている。チトクロームb558も、ミトコンドリアのbc複合体と同じく、その吸収波長を中心としてsplitしたCDスペクトルを示していた。これは、おそらくチトクロームb558のヘムが分子内あるいは分子間でヘム-ヘム相互作用をしているものと考えられる。このことは、フラビン蛋白質からチトクロームb558への電子の授受を考えるとき重要な意味を持つ。すなわち、NADPHからフラビンへは2電子が渡されるはずであるが、このフラビンの2電子がどの様にチトクロームb558を1電

子還元するのか不明である。もし、チトクロームb558は分子内あるいは分子間でヘム-ヘム相互作用をするほどの位置に2つのヘムが存在すればこの2つのヘムに同時に電子が渡される機構が想定される。

本研究でチトクロームb558最終標品の比含量は37nmol/mg蛋白であったが、Segalら(116)はsmall subunitとlarge subunitから構成されるチトクロームb558の比含量が約30nmol/mg蛋白であったと報告している。彼らの結果が正しく、チトクロームb558のsubunitが1：1で構成されているとすると、その最終比含量は20nmol/mg蛋白と計算される。すなわち、Segalらの結果および本研究の結果を総合すると、チトクロームb558は1分子に2つ以上のヘムを持つ可能性が高いと思われる、従って、チトクロームb558はおそらく分子内ヘム-ヘム相互作用を持つと考えられる。

第４章　　総合討論

好中球の活性酸素生成系(NADPH酸化酵素)の諸性質を、細胞膜および部分精製標品を用いて検討した。また、NADPH酸化酵素の活性基と考えられているチトクロームb558の精製を行いその性質を明らかにした。

Percoll密度勾配遠心法を用いて、ブタおよびモルモット好中球および肺マクロファージの分画を行った。活性化した白血球からの分画では、NADPH酸化酵素活性は細胞膜指標酵素のピークと一致し、その比活性の上昇も細胞膜酵素の比活性の上昇と最も良く相関していた。一方、活性化していない白血球では、全分画にわたってNADPH酸化酵素活性はほとんど認められなかった。従って、白血球NADPH酸化酵素はその細胞膜に局在するものと考えられる。一方、NADPH酸化酵素の活性基と考えられているチトクロームb558の主ピークは、活性化前および短時間の活性化を行った細胞とも細胞膜に主ピークが見いだされた。また、長時間の活性化した細胞では細胞膜と顆粒分画の凝集が見られ、チトクロームb558の局在を明らかにすることはできなった。従って、少なくとも短時間の活性化ではチトクロームb558の細胞膜への移行は起こらないと考えられる。このことはチトクロームb558の細胞膜への移行がNADPH酸化酵素の活性化につながるとする説を否定するものである。また、活性化および非活性化肺マクロファージをPercoll密度勾配遠心法にて分画したが、チトクロームb558は細胞膜にのみ見いだされた。この結果も、チトクロームb558の細胞膜への移行がNADPH酸化酵素の活性化と結び付くとする説を否定している。

細胞膜分画でのNADPH酸化酵素活性はCibacron Blue F3GAによって拮抗阻害を受けるが、細胞レベルでのO_2^-生成活性は阻害されないことより、NADPH酸化酵素のNADPH結合部位は細胞膜内側に存在すると考えられる。また、Cibacron Blue F3GAのNADPH酸化酵素の阻害Kiは、0.8μMと非常に低く、これはWilsonによる分類に従えば、白血球NADPH酸化酵素はdinucleotide foldを持つことを示唆している。

細胞膜でのNADPH酸化酵素活性は、40-50μMのMgイオンによって昂進しCaイオンは全く影響を与えなかった。さらに、EDTAがNADPH酸化酵素活性を顕著に阻害

することより、NADPH酸化酵素はその至適活性にMgイオンを要求すると考えられる。また、EGTAがむしろ活性を増加させることよりNADPH酸化酵素はCaイオン非要求性の酵素であると考えられる。このEGTAによる活性の促進作用は、Znイオンが阻害作用を持つことと関連するものと考えられ、好中球が非常に高濃度のZnイオンを持つことと考え合わせると興味深い。

細胞膜よりNADPH酸化酵素を可溶化し、Blue Dextran Sepharoseにて精製を試みた。得られた部分精製標品は、細胞レベルより150倍ほど比活性が上昇しており、チトクロームb558含量も顕著な増加を示した。以上の結果は、このヘム蛋白がNADPH酸化酵素の活性基の1つであること示唆するものと考えられる。細胞膜分画およびこの部分精製標品のフラビン（FAD）とチトクロームb558の比率は、それぞれ約1:9および1:15と大きく差があった。従って、NADPH酸化酵素はミクロゾームのP-450とP-450 reductaseのようにチトクロームb558がフラビンを取り囲むような立体配置している可能性がある。

ヒト好中球よりチトクロームb558の精製を行った。得られたチトクロームb558の比含量は37nmol/mg蛋白であった。この値は、現在報告されているなかで最も高い値であった。SDS-PAGEによる解析より精製したチトクロームb558は、20kDa付近に単一バンドを示した。また、精製標品はheparin-Sepharoseに吸着されなっかたことより本研究で精製されたチトクロームb558はlarge subunitを含まずsmall subunitのみを含むと考えられる。従って、チトクロームb558のヘムはsmall subunitに存在するものと結論された。一方、精製したチトクロームb558はCOとの結合性を示すものの膜分画では全くCOと結合しなかった。従って、精製したチトクロームb558は酸素との結合性は有するが、チトクロームb558は細胞膜上においてCOとは結合しないような、言い換えれば酸素とは直接結合しない様に構築されていると考えられる。

Soret領域のCDスペクトル解析より、チトクロームb558はミトコンドリアのbc複合体チトクロームbと同様のsplitとしたS-型のCDスペクトルを示した。この結果は、チトクロームb558の分子内あるいは分子間の2つのヘムがヘム-ヘム相互作用をしていること示唆している。またチトクロームb558がヘム-ヘム相互作用を持つとするとフラビンからの電子の流れを考える上で非常に重要である。すなわち、フラビンは2電子還元を行う補酵素であるが、基質NADPHから渡され

た2電子がヘム-ヘム相互作用をしている2分子のヘムに同時に渡される機構が想定される。

要旨

好中球やマクロファージなどの食細胞は、食菌時あるいは種々の膜活性化物質の刺激に応じスーパーオキサイド（O_2^-）やH_2O_2などの活性酸素を生成する。これは食細胞の活性酸素生成酵素(NADPH酸化酵素)がなんらかの機作により活性化されNADPHを基質として酸素を1電子還元することによりO_2^-を生成する一連の反応である。食細胞はこれらの活性酸素を用いて殺菌を行うことが知られており、本酵素は食細胞の生体防御能を担う重要な酵素である。本研究ではこの活性酸素生成酵素であるNADPH酸化酵素の細胞内局在について明らかにするとともに、その諸性質について細胞膜および部分精製標品を用いて検討した。また、NADPH酸化酵素の活性基と考えられているチトクロームb558の精製を行いその性質を明らかにした。

NADPH酸化酵素の細胞内局在を明らかにするためPercoll密度勾配遠心法を用いて、ブタおよびモルモット好中球およびモルモット肺マクロファージの分画を行った。活性化した細胞からの分画では、NADPH酸化酵素活性は単一ピークとして得られ、またそのピークは細胞膜指標酵素のピークと一致していた。膜分画における細胞レベルからのNADPH酸化酵素活性の比活性の上昇は、細胞膜酵素の比活性の上昇と最も良く相関していた。従って、好中球NADPH酸化酵素はその細胞膜に局在するものと結論された。一方、NADPH酸化酵素の活性基と考えられているチトクロームb558は2相性のピークを示し、その主ピークは、活性化前および短時間の活性化を行った細胞とも細胞膜に見いだされた。また、活性化および非活性化肺マクロファージをPercoll密度勾配遠心法にて分画したが、チトクローム b558は細胞膜にのみ見いだされた。以上の結果より、チトクローム b558の細胞膜への移行がNADPH酸化酵素の活性化と結び付くとする説を否定した。

細胞膜分画でのNADPH酸化酵素活性はNADPHの立体構造の類似した色素であるCibacron Blue F3GAによって拮抗阻害を受けるが、細胞レベルでのO_2^-生成活性は阻害されないことより、NADPH酸化酵素のNADPH結合部位は細胞膜内側に存在すると考えられる。また、Cibacron Blue F3GAのNADPH酸化酵素の阻害定数Kiは、0.8μMと非常に低く、好中球NADPH酸化酵素の活性部位はdinucleotide foldを持つことが示唆された。

細胞膜でのNADPH酸化酵素活性は、40-50μMのMgイオンによって昂進しCaイオンは全く影響を与えなかった。さらに、EDTAがNADPH酸化酵素活性を顕著に阻害することより、NADPH酸化酵素はその至適活性にMgイオンを要求すると考えられる。また、MgイオンによりNADPH酸化酵素のNADPH対するKmが小さくなると共に最大活性が上昇することより、Mgイオンはその基質親和性および活性の両方に影響するものと考えられる。一方、EGTA がむしろ活性を増加させることよりNADPH酸化酵素はCaイオン非要求性の酵素であると考えられる。このEGTAによる活性の促進作用は、Znイオンが阻害作用を持つことと関連するものと考えられ、白血球が非常に高濃度のZnイオンを持つことと考え合わせると興味深い。

細胞膜よりNADPH酸化酵素を可溶化し、Blue Dextran Sepharoseを用いて精製を試みた。得られた部分精製標品は、細胞レベルより150倍ほど比活性が上昇しており、cytochrome b_{558}含量も顕著な増加を示した。以上の結果は、このヘム蛋白がNADPH酸化酵素の活性基の1つであること示唆するものと考えられる。細胞膜分画およびこの部分精製標品のフラビン（FAD）とチトクロームb_{558}の比率は、それぞれ約1:9および1:15と大きく差があり、複数のチトクロームb_{558}がフラビン蛋白を取り囲むような立体配置している可能性が考えられる。

NADPH酸化酵素の活性基と考えられているチトクロームb_{558}の諸性質を明らかにするために、ヒト好中球よりチトクロームb_{558}の精製を試みた。得られたチトクロームb_{558}の比含量は37 nmol/mg蛋白と現在報告されているなかで最も高い値であった。SDS-PAGEによる解析より精製したチトクロームb_{558}は、20kDa付近に単一バンドを示した。また、チトクロームb_{558}は large subunit および small subunitより構成されると考えられているが、この精製標品はheparin-Sepharoseに吸着されなっかたことおよびそのSDS-PAGEパターンより、精製チトクロームb_{558}はlarge subunitを含まずsmall subunitのみを含むと考えられる。従って、チトクロームb_{558}のヘムはsmall subunitに存在するものと考えられる。一方、精製したチトクロームb_{558}はCOとの結合性を示すものの膜分画では全くCOと結合しなかったことよりチトクロームb_{558}は細胞膜上において COとは結合しないような、言い換えれば酸素とは直接結合しないように構築されていると考えられる。

Soret領域のCDスペクトル解析より、チトクロームb_{558}はミトコンドリアのb

c複合体チトクロームbと同様のsplitとしたS-型のCDスペクトルを示した。この結果は、チトクロームb$_{558}$の分子内あるいは分子間の2つのヘムがヘム-ヘム相互作用をしていること示唆している。またチトクロームb$_{558}$がヘム-ヘム相互作用を持つとするとフラビン蛋白からの電子の流れを考える上で非常に重要である。すなわち、フラビンは2電子還元を行う補酵素であるが、この2電子がヘム-ヘム相互作用をしている2分子のヘムに同時に渡される機構が想定される。

謝辞

本論文を早するに当たり、終始研究の御指導を賜りました東京都臨床医学総合研究所柿沼カツ子部長に深く感謝致します。また、御助言と御指導を賜りました国立衛生試験所の早川堯夫部長に深く感謝致します。

本研究の共同研究者である兼田瑞穂博士、吉川昭博士、佐藤功栄博士、嶋田孝吉博士に感謝致します。また、終始適切な御助言を頂いた千葉司博士、福原幸子博士、山本行男博士、新見伸吾博士、内田恵理子博士に感謝致します。

引用文献

1. Metchnikoff,E.(1883) Arb'Zoologischen Inst. Univ. (Wien), 5, 141-168

2. Baldridge,C.W. and Gerard.R.W. (1933) Am. J. Physiol., 103, 235-236

3. Sbarra,A.J. and Karnovsky,M.L. (1959) J. Biol. Chem., 234, 1355-1362

4. Iyer,G.Y.N., Islam,M.F. and Quastel,J.H. (1961) Nature, 912, 535-541

5. Root,R.K., Metcalf,J., Oshino,N. and Chance,B.(1975) J. Clin. Invest., 55, 945-955

6. McCord,J.M.and Fridovich,I., (1969) J. Biol. Chem., 244, 6049-6055

7. Babior,B.M., Kipnes,R.S. and Curnutte,J.T., (1973) J. Clin. Invest., 52, 741-744

8. Baehner,R.L. and Karnovsky,M.L.(1968) Science, 162, 1277-1279

9. Briggs,R.T., Karnovsky,M.L. and Karnovksy,M.J. (1977) J. Clin. Invest., 59, 1088-1098

10. Patriarca,P., Cramer,R., Moncalvo,S. Rossi,F. and Romeo,D. (1971) Arch. Biochem. Biophys., 145, 255-262

11. Patriarca,P., Cramer,R., Dri,P., Fant,L., Basford,R.E. and Rossi,F. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun., 53, 830-837

12. Babior,B.M., Curnutte,J.T. and McMurrich,B.J.(1976) J. Clin. Invest., 58, 989-996

13. Dewald,B., Baggiolini,M., Curnutte,J.T. and Babior,B.M., (1979) J. Clin. Invest., 63, 21-29

14. Yamaguchi,T., Sato,K., Shimada,K. and Kakinuma,K.(1982)J. Biochem., 91, 31-40

15. Yamaguchi,T. and Kaneda,M. (1988) Biochim. Biophys. Acta, 933, 450-459

16. Rossi,F. (1986) Biochim. Biophys. Acta, 853, 65-89

17. Holmes,B., Page,A.R. and Good,R.A. (1967) J. Clin. Invest., 46, 1422-1432

18. Curnutte,J.T., Whitten,D.M. and Babior,B.M. (1975) N. Engl. Clin. Invest., 290, 593-601

19. Segal,A.W., and Jones,O.T.G. (1978) Nature, 276, 515-517

20. Segal,A.W. Cross,A.R., Garcia,R., Borregaard,N., Valerius,N., Soothill,J.F. and Jones,O.T.G. (1983) N.Engl. J. Med., 308, 245-250

21. Shinagawa,Y., Tanaka,C., Teraoka,A. and Shinagawa,Y. (1966) J. Biochem., 59, 622-624

22. Smith,R.M. and Curnutte,J.T., (1991) Blood, 77, 673-686

23. Bromberg,Y. and Pick,E. (1984) Cell Immunol., 88, 213-221

24. Curnutte,J.T. (1985) J. Clin. Invest., 75, 1740-1743

25. McPhail,L.C., Shirley,P.S., Clayton,C.C. and Snyderman,R. (1985) J. Clin. Invest., 75, 1735-1742

26. Heyneman,R.A. and Vercauteren,R.E. (1984) J. Leuko. Biol., 36, 751-759

27. Bromberg,Y. and Pick,E. (1985) J. Biol. Chem., 260, 13539-13545

28. Tanaka,T., Kanegasaki,S., Makino,R., Iizuka,T. and Ishimura,Y. (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 144, 606-612

29. Curnutte,J.T., Scott,P.J. and Mayo,L.A. (1989) Proc. Nat.

Acad. Sci., USA 86, 825-833

30. Nunoi,H. Rotrosen,D. Gallin.J.I. and Malech,H.L. (1988) Science, 242, 1298-1300

31. Clark,R.A., Malech,H.L., Gallin,J.I., Nunoi,H., Volpp,b.D., Pearson,D.W., Nauseef,W.M. and Curnutte,J.T. (1989) N. Engl. J. Med., 321, 647-651

32. Romeo,D., Zabucchi,G., Miani,N. and Rossi,F. (1975) Nature, 253, 542-544

33. Schell-Fredrich,E. (1974) FEBS Lett., 48, 37-41

34. Repine,J.E., White,J.G., Clawson,C.C. and Holmes,B.M. (1974) J. Lab. Clin. Med., 83, 911-915

35. Romeo,D., Jug.D., Zabucchi,G. and Rossi,F. (1974) FEBS Lett., 42, 90-94

36. Tsuń,M.F., Newman,B., Chusid,M.J., Wolff,S.M. and McInfyre,P.A. (1976) J. Haematol., 33, 205-209

37. Kakinuma,K. and Minakami,S. (1978) Biochim. Biophys. Acta, 538, 50-59

38. Badwey,J.A., Curnutte,J.T. and Karnovsky,M.L. (1981) J. Biol. Chem., 256, 12640-12643

39. Goetzl,E.J. and Austen,K.F. (1974) J. Clin. Invest., 53, 591-598

40. English,D., Roloff,J.S. and Lukens,J.N. (1981) J. Immunol., 126, 165-171

41. Graham,R.C., Karnovsky,M.J., Shafer,A.W., Glass,E.A. and Karnovsky,M.L. (1967) J. Biol. Chem., 32, 629-634

42. Nakagawara,A., Takeshige,K. and Minakami,S. (1974) Exp. Cell Res., 87, 392-396

43. 中川原章、竹重公一郎 (1977) 代謝（特集 白血球），14, 27-31

44. Nakagawara,M., Takeshige,K., Sumimoto,H., Yoshitake,J. and Minakami,S. (1984) Biochim. Biophys. Acta, 805, 97-103

45. Whitin,J.C., Chapman,C.E., Simons,E.R., Chovaniec,M.E. and Cohen,H.J. (1980) J. Biol. Chem., 255, 1874-1878

46. 竹縄忠臣 (1985) 生化学、57, 1-19

47. Schneider,C., Zanetti,M. and Romeo,D. (1981) FEBS Lett., 127, 4-7

48. Andrews,P.C. and Babior,B.M. (1983) Blood, 61, 333-340

49. Hayakawa,T., Suzuki,K., Suzuki,S., Andrews,P.C. and Babior,B.M. (1986) J. Biol. Chem., 261, 9109-9115

50. Borregaard,N. and Tauber,A.I. (1984) J. Biol. Chem., 259, 47-52

51. Crawford,D.R. and Schneider,D.L. (1983) J. Biol. Chem., 258, 5363-5367

52. Mollinedo,F. and Schneider,D.L. (1984) J. Biol. Chem., 259, 7143-7150

53. Ohno,Y., Seligmann,B.E. and Gallin,J.I. (1985) J. Biol. Chem., 260, 2409-2414

54. 柿沼カツ子 (1979) 食作用に伴う代謝変化『白血球と食作用』（水上茂樹、柿沼カツ子編），pp. 93-124, 講談社 (1979)

55. Babior,B.M. (1978) New Engl. J. Med., 298, 659-668

56. Babior,B.M. (1984) Blood, 64, 959-966

57. Babior,B.M. (1984) J. Clin. Invest., 73, 599-601

58. Babior,B.M. (1987) Tends in Biochem. Sci., 12, 241-243

59. Tauber,A.I. (1987) Blood, 69, 711-720

60. Yamaguchi,T., Kaneda,M. and Kakinuma,K. (1986) Biochim. Biophys. Acta, 861, 440-446

61. Boveris,A. and Cadenas,E. (1975) FEBS Lett., 54, 311-314

62. Boveris,A., Oshino,N. and Chance,B. (1972) Biochem. J., 128, 617-630

63. Babior,B.M. and Kipnes,R.S. (1977) Blood, 50, 517-524

64. Yamaguchi,T., Kaneda,M. and Kakinuma,K. (1986) J. Biochem., 99, 953-959

65. Yamaguchi,T. and Kakinuma,K. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun., 104, 200-206

66. Yamaguchi,T., Kaneda,M. and Kakinuma,K. (1983) Biochem. Biophys, Res. Commun., 115, 261-267

67. Yonetani,T. (1965) J. Biol. Chem., 240, 4509-4514

68. Kakinuma,K. (1968) Jpn. J. Exp. Med., 38, 165-169

69. Wakeyama,H., Takeshige,K., Takayanagi,R. and Minakami,S. (1982) Biochem. J., 205, 593-601

70. Myrvik,Q.N., Leake,E.S. and Fariss,B. (1961)J. Immunol., 86, 128-132

71. Kakinuma,K. (1974) Biochim. Biophys. Acta, 348, 76-85

72. Kakinuma,K. and Kaneda,M. (1980) FEBS Lett., 111, 90-94

73. Swanson,M.A. (1955) in Methods in Enzymology (Colowick,S.P. and Kaplan,N.O., eds.) vol.2, pp541-543, Academic Press, New York

74. Michell,R.H. and Hawthorne,J.N. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun., 21, 333-338

75. Segel,G.B., Simon,W., Lichtman,A.H. and Lichtman,M.A. (1981) J. Biol. Chem., 256, 6629-6632

76. Youngburg,G.E. and Youngburg,M.W. (1930) J. Lab. Clin. Med., 16, 158-168

77. Bergmeyer,H.U., Bernt,E. and Hess,B. (1965) in Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer,H.U., ed.), pp. 736-741, Academic Press, New York

78. Omura,T. and Takesue,S. (1970) J. Biochem., 67, 249-257

79. Chance,B. and Maehly,A.C. (1955) in Method in Enzymolgy (Colowick,S.P. and Kaplan,N.O., eds.) vol.2, pp.764-741, Academic press, New York

80. Kane,S.P., Hoffbrand,A.V. and Neale,G. (1974) Gut, 15, 953-959

81. Litwack,G. (1955) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 89, 401-403

82. Cross,A.R., Higson,F.K., Jones,O.T.G., Harper,A.M. and Segal,A.W. (1982) Biochem. J., 204, 479-485

83. Singer,T.P.. Salach,J., Hemmerrich,P., and Ehrenberg,A. (1971) in Methods in Enzymolgy (McCormick,D.B. and Wright,L.D., eds.), vol.18B, pp.416-427, Academic Press, New York

84. Faeder,E.J. and Siegel,L.M. (1973) Anal. Biochem., 53, 332-336

85. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. and Randall,R.J. (1951) J. Biol. Chem., 193, 265-275

86. Kaneda,K., Kakinuma,K., Yamaguchi,T. and Shimada,K. (1980) J. Biochem., 88, 1159-1165

87. Cohn,Z.A. and Hirsch,J.G. (1960) J. Exp. Med., 112, 983-1005

88. Pertoft,H., Laurent,T.C., Laas,T. and Kagedal,L. (1978) Anal. Biochem., 88, 271-282

89. Takeshige,K., Nabi,Z.F., Tatschek,B. and Minakami,S. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun., 95, 410-415

90. Mottola,C. and Romeo,D. (1980) J. Cell Biol., 93, 129-134

91. Cohen,H.J., Chovaniec,M.E. and Davis,W.A. (1980) Blood, 55, 355-363

92. Segel,G.B., Kovach,G. and Lichtman,M.A. (1979) J. Cell. Physiol., 100, 109-118

93. Segal,G.B., Simon,W., Lichtman,A.H. and Lichtman,M.A. (1981) J. Biol. Chem., 256, 6629-6632

94. Tunawaki,S. and Nathan,C.F. (1984) J. Biol.Chem., 259, 4305-4312

94. Bellavitte,P., Berton,G., Dri,P. and Soranzo,M.R. (1981) J. Reticuloendothel. Soc., 29, 47-60

95. Gerberick,G.F., Willoughby,J.B. and Willoughby,W.F. (1985) J. Exp. Med., 161, 392-408

96. Azzi,A. Montecucco,C. and Richter,C. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 597-603

97. Green,T.R., Wu,D.E. and Wirtz,M.K. (1983) Biochem. Biopys. Res. Commun., 110, 973-978

98. Fredrick,R.E., Tanaka,R.K. Valentine,W.N. (1964) J. Clin. Invest., 43, 304

99. Kakinuma,K. and Kaneda,M. (1982) in Biochemistry and Function of Phagocytes (Rossi,F. and Patriarca,P., eds.) pp. 351-360, Plenum Pub. Co., New York

100. Wilson,J.E. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun., 72, 816-823

101. Bellavite,P., Cross,A.R., Serra,M.C., Davoli,A., Jones,O.T.G. and Rossi,F. (1983) Biochim. Biophys. Acta, 746, 40-47

102. Tauber,A.I. and Goetzl,E.J. (1979) Biochemistry, 18, 5576-5584

103. Serra,M.C., Bellavite,P., Davoli,A., Bannister,J.V. and Rossi,F. (1984) Biochim. Biophys. Acta, 788, 138-146

104. Vellavite,P., dellaBianca,V., Serra,C., Papini,E. and Rossi,F. (1984) FEBS Lett., 170, 157-161

105. Kakinuma,K., Kaneda,M., Chiba,T. and Ohnishi,T. (1986) J. Biol. Chem., 261, 9426-9432

106. Cross,A.R., Jones,O.T.G., Garcia,R. and Segal,A.W. (1982) Biochem. J., 208, 759-763

107. Gabig,T.G. (1983) J. Biol. Chem., 258, 6352-6356

108. Peterson,J.A., Ebel,R.E., O'Keaffee,D.H., Matsubara,T. and Estabrook,R.E. (1976) J. Biol. Chem., 251, 4010-4016

109. Cross,A.R., Higson,F.K., Jones,O.T.G., Harper,A.M. and Segal,A.W. (1982) Biochem. J., 204, 479-485

110. Pember,S.O., Heyl,B.L., Kinkado,J.M.Jr. and Lambeth,J.D. (1984) J. Biol. Chem., 259, 10590-10595

111. Bellavitte,P., Papini,E., Zani,L., DellaBianca,V. and Rossi,F. (1985) Free Radical Res. Commun., 1, 11-29

112. Iizuka,T., Kanegasaki,S., Makino,R., Tanaka,T. and Ishimura,Y. (1985) J. Biol. Chem., 260, 12049-12053

113. Royer-Pokora,B., Kunkel,L.H., Monaco,A.P., Goff,S.C., Newburgewr,P.E., Baehner,R.L., Cole,F.S., Curnutte,J.T. and Orkin,S.H. (1986) Nature, 204, 793-794

114. Segal,A.W. (1987) Nature, 336, 88-91

115. Parkos,C.A., Allen,R.A., Cochrane,C.G. and Jersaitis,A.J. (1987) J. Clin. Invest., 80, 732-742

116. Teahan,C., Rowe,P., Parker,P., Totty,N. and Segal,A.W. (1987) Nature, 327, 720-721

117. Laemmli,U.K. (1970) Nature, 227, 680-685

118. Okada,Y. and Okunuki,K. (1970) J. Biochem., 67, 487-496

119. Hsu,M.C. and Woody,R.D. (1971) J. Am. Chem. Soc., 93, 3515-3525

120. Okada,T. and Okunuki,K. (1970) J. Biochem., 67, 603-605

121. Huntley,T.E. and Strittmatter,P. (1972) J. Biol. Chem., 247, 4641-4647

122. Esposti,M.D., Crimi,M., Samworth,C.M., Solaini,G. and Lenaz,G. (1987) Biochim. Biophys. Acta, 892, 245-252