



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

(JaLCD0I)

<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。



氏名・(本籍)	やま ぐち てる ひで 山 口 照 英 (東京都)
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)
学位記番号	博ろ第25号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成4年4月24日
学位論文題目	白血球のNADPH酸化酵素に関する生化学的研究
審査委員	主査 教授 氷上雄三 教授 橋本徹 教授 豊澤敬一郎

論文内容の要旨

好中球やマクロファージなどの食細胞(白血球)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シド(O_2^-)や H_2O_2 などの活性酸素を生成する。これは白血球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。白血球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、本酵素は白血球の生体防御能を担う重要な酵素である。本論文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 b_{558} 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、白血球NADPH酸化酵素は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 b_{558} 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。従って、少なくとも短時間の活性化ではチトクローム b_{558} の細胞膜への移行は起こらないと考えられた。このことはチトクローム b_{558} 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 b_{558} は細胞膜にのみ見いだされた。この結果も、チトクローム b_{558} 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、NADPHなどのヌクレオチドと立体構造の類似した色素である Cibacron Blue F3GA によって顕著な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 K_i は、 $0.8 \mu M$ と非常に低く、これは Wilson による分類に従えば、白血球NADPH酸化酵素の活性部位は 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、 $40-50 \mu M$ 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に対する k_m 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、チトクローム 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つであることを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を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、 20 kDa 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 より構成されることが考えられているが、この精製標品は heparin-Sepharose に吸着されなかったことおよびその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 に存在するものと結論された。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に、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 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を示唆している。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。

論文審査の結果の要旨

本論文は、好中球やマクロファージなどの食細胞（白血球）の活性酸素生成酵素について一連の研究をまとめたものである。白血球の活性酸素生成酵素（NADPH酸化酵素）は、貧食時あるいは種々の刺激物質により活性化される膜酵素で、NADPHを基質としスーパーオキシド (O_2^-)、 H_2O_2 や $OH\cdot$ を生成する。白血球は、これらの毒性の強い活性酸素種を用いて殺菌を行うことが知られている。従って、本酵素は食細胞の生体防御能と密接に関連する重要な酵素である。本研究は、このNADPH酸化酵素の生化学的研究の集成でありこれらの結果が5章に渡り述べられている。

序章では、食細胞（白血球）の活性酸素生成酵素の発見の由来、その細胞内局在、その酵素的性質、活性化機構等現在まで得られている知見について概説している。

第1章では、NADPH酸化酵素の細胞内局在とその性質について述べている。脂肪酸で活性化した好中球やマクロファージを Percoll 密度勾配遠心法にて分画し、本酵素が細胞膜に局在することを明らかにした。この細胞膜分画を用いて、本酵素がMgイオン要求性であり、Mgイオンは本酵素の基質であるNADPHとの結合性及びその反応性の両方に影響を与えることを明らかにした。さらに、Znイオンにより本酵素が顕著に阻害されることを明らかにし、これは膜構造と関連する可能性を示唆した。またNADPHと立体構造の類似した色素である Cibacron Blue F3GA により本酵素が顕著に阻害されることを明らかにし、本酵素の活性基が dinucleotide fold を持つことなどを示唆している。さらに、本酵素の活性基と考えられているチトクローム b_{558} が、好中球では2相性の分布、すなわち細胞膜と顆粒分画の両オルガネラに存在し、活性化によってもその分布に変化の認められないことを明らかにしている。一方、マクロファージでは本ヘム蛋白質は細胞膜にのみ局在することを明らかにし、チトクローム b_{558} の移行が活性酸素生成酵素の活性化につながるとする説を否定している。

第2章では、白血球のNADPH酸化酵素の可溶化とその部分精製について述べている。活性化した好中球より細胞膜を分離し、この細胞膜より octylglucoside を用いてこの活性酸素生成酵素を効率よく可溶化できることを明らかにした。また可溶化標品より、Blue Dextran Sepharose を用いてきわめて高い比活性の部分精製標品が得られることを報告している。この部分精製標品中のチトクローム b_{558} の純度が、細胞あるいは膜分画に比べ非常に上昇することより本ヘム蛋白が活性基であることが示唆されたと報告している。また、この部分精製された標品中のフラビン (FAD) とチトクローム b_{558} の比が1:15と大きくはなれており、ミクロゾームのP450とP450reductase のようにチトクローム b_{558} がフラビン蛋白を取り囲むような細胞膜配置を提唱している。

第3章では、チトクローム b_{558} の精製とその性質について述べている。チトクローム b_{558} は、hydroxylapatite Ultro Gel, DEAE-Sephacel, Mono Q FPLC を用いて、細胞レベルより約500倍精製され、SDS-PAGE にて約20kDaに単一バンドの標品が得られたと報告されている。これらの結果より、チトクローム b_{558} を構成する2つの subunit のうち分子量の小さい subunit にヘムが存在すると結論している。また、酸素との結合性の指標である、COとの結合性が精製標品で認められるものの、細胞膜分画ではその結合性が全く認められないことを報告し、チトクローム b_{558} は細胞膜において酸素とは直接反応しないように構築されていることを示唆した。さらに、チトクローム b_{558} の Soret 領域における酸化及び還元状態でのCDスペクトルを測定し、両CDスペクトルとも各吸収波長を中心として split したS型のパターンを示すことを明らかにした。これらの結果より、本ヘム蛋白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可能性が示唆されており、このことより本酵素の活性基と考えられているフラビン蛋白からチトクローム b_{558} への電子の流れについて、1分子のFAD中の2電子がチトクローム b_{558} のヘム2分子に同時に渡されるとする仮説を提唱している。

第4章は総合討論で、第1章から第3章において得られた結果およびこれらの結果より導かれた結論および仮説について総合的に考察している。

以上のように、本論文では、白血球のNADPH酸化酵素の細胞内局在やその諸性質を明らかにするとともに、その活性基の一つであるチトクローム b_{558} を精製しその諸性質を明らかにしている。本研究で得られた成果は白血球の活性酸素生成酵素の研究において基礎的な面より高く評価される。

よって、学位申請者山口照英は、博士（理学）の学位を得る資格があると認める。