

学位論文題名

食細胞による活性酸素産生の機構

— 海綿由来生理活性物質 keramamide B を用いた解析 —

学位論文内容の要旨

人をはじめとする様々な動物は体内への異物の侵襲から身を守らなければならない。多核白血球の好中球は外来異物に対し、遊走、貪食、活性酸素 ( $O_2^-$  等) 産生 (殺菌効果による異物の排除)、酵素放出といった反応を示す。この活性酸素産生は生体防御に必須であり、この反応を導く酵素を欠損した遺伝性疾患の慢性肉芽腫症患者は感染症を繰り返し死に至る。細菌由来の走化性因子である formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP) による好中球の刺激は、百日咳毒素感受性 GTP 結合タンパク質 ( $G_i$ ) を介した経路によって  $O_2^-$  を産生し、白血球の活性化機構を研究するモデルとなっている。

本研究ではまず、1991年に生薬学講座の小林淳一教授らによって発見された keramamide B (KER-B) を含むいくつかの海綿由来の環状ペプチドがモルモット好中球を fMLP で刺激した際の  $O_2^-$  産生を抑制することを見出し、その作用点を明らかにした。また、fMLP 以外の刺激による炎症反応に対する KER-B の効果を検討した。

はじめにKER-Bによる活性酸素産生の阻害を検討した。KER-Bは濃度依存的に  $O_2^-$  産生を阻害し、50%阻害濃度は  $5\mu\text{M}$  であった。また、KER-B存在下においては  $O_2^-$  産生の fMLP 用量依存曲線が高濃度側にシフトしており、競合阻害の様式を示した。一方、fMLPと同様の経路で活性酸素産生を導くとされる補体成分の C5a による活性酸素産生を KER-B は阻害することはなかった。以上の結果から fMLP 刺激による  $O_2^-$  産生におけるKER-Bの作用点は受容体レベルであると考えられた。そこで [ $^3\text{H}$ ] で標識した fMLP を使用して結合実験を行ったところ、KER-Bは fMLP 受容体の競合阻害薬であることが明らかとなった。また、その KI は fMLP のアンタゴニストとして一般的によく用いられている t-BocMLP と同程度であったことから KER-B の fMLP 阻害薬としての有用性が示唆された。

つぎに著者は fMLP 競合阻害薬の KER-B が、タチナタマメ由来のレクチンであるコンカナバリン A (Con A) による  $O_2^-$  産生を抑制することを見出した。しかし、Con A は fMLP の結合を阻害しなかった。つまり、Con A は fMLP 受容体にアゴニスト様の結合を示さないにも関わらず fMLP のアンタゴニストである KER-B によってその最終応答が阻害されるということが明らかになった。Con A は細胞表面の糖タンパク質を架橋することによって様々な細胞応答を引き起こすとされていることを考慮すると、KER-B は fMLP 受容体に対して競合的に作用するのみでなく、受容体刺激から活性酸素産生応答までのカスケードの途中をも阻害している可能性が示唆された。そこで細胞内情報伝達因子に対する KER-B の作用を検討した。

G タンパク質共役型受容体を刺激すると、受容体に会合している G タンパク質が解離し、

これがホスホリパーゼC (PLC) およびイノシトールリン脂質 3-キナーゼ (PI 3-キナーゼ) を活性化する。活性化した PLC により産生されるイノシトール三リン酸 ( $IP_3$ ) は細胞内のカルシウム動員を導く。その結果カルシウムに依存して活性化されるタンパク質リン酸化酵素 (PKC) によって活性酸素産生が増大する。一方、PI 3-キナーゼの細胞内反応生成物である  $PI(3,4,5)P_3$  に依存して活性化される PKC のサブタイプの存在が知られている。 $O_2^-$  産生にはカルシウム動員系と PI 3-キナーゼ系の両方が必須であると考えられている。

まず、カルシウム動員系について検討したところ、KER-B は fMLP 刺激および Con A 刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を阻害した。しかし、Con A 刺激によるカルシウム動員は KER-B によっても、百日咳毒素 (IAP) による前処理による  $G_i$  を介する経路の遮断によっても部分的にしか抑制されなかった。このことから Con A によるカルシウム動員は  $G_i$  を介した経路と共にチロシンキナーゼを介した経路の少なくとも二つによって活性化されている可能性が考えられた。また、 $IP_3$  に対する細胞内カルシウム貯蔵部位からのカルシウムの放出は KER-B の存在によって変化することはなかった。そこで PLC 活性に対する KER-B の影響を検討したところ、PLC 活性にも KER-B は影響しないことがわかった。

そこでさらに、カルシウム動員系の他に受容体刺激によって活性化する PI 3-キナーゼ系に対する KER-B の影響を検討した。fMLP および Con A 刺激による PI 3-キナーゼの活性は、細胞内生成物である  $PI(3,4,5)P_3$  の産生量により評価した。これらの活性はいずれも KER-B によって抑制された。また、IAP 処理によって fMLP および Con A による  $PI(3,4,5)P_3$  の産生は阻害された。さらに Con A による  $PI(3,4,5)P_3$  の産生はマンノースによって抑制されることから、この応答は Con A のレクチン作用によるものであると考えられた。また、fMLP および Con A 刺激による  $PI(3,4,5)P_3$  の産生と  $O_2^-$  産生はいずれも PI 3-キナーゼの阻害剤であるワートマニン処理によって阻害された。

上述した  $PI(3,4,5)P_3$  産生は G タンパク質の  $\beta\gamma$  サブユニットによって活性化される PI 3-キナーゼである  $p110\gamma$  によるものと考えられるが、PI 3-キナーゼはこの他に 85 kDa の活性調節サブユニット (p85) と 110 kDa の触媒サブユニット (p110) からなるタイプ (p85/p110 ヘテロダイマー型) の存在が示されている。このヘテロダイマー型の PI 3-キナーゼはその p85 に存在する Src homology 2 (SH2) 領域を介してチロシンリン酸化タンパク質と結合し、活性化すると言われている。好中球を Con A で刺激するとタンパク質のチロシンリン酸化が増大し、これは IAP によっても KER-B によっても影響をうけなかった。このリン酸化チロシンにより p85/p110 ヘテロダイマー型 PI 3-キナーゼが活性化されると考えられたので Con A で刺激した細胞の抗ホスホチロシン抗体 (PY20) 免疫沈降画分中の PI 3-キナーゼ活性を PI を基質にした  $PI(3)P$  産生量によって測定した。Con A 刺激により PY20 免疫沈降画分中の PI 3-キナーゼ活性が増大したが、この活性は KER-B および IAP によって抑制されなかった。また PY20 免疫沈降画分中の PI 3-キナーゼの p85 の量は Con A の刺激により増大し、KER-B と IAP の影響を受けなかった。一方、fMLP は抗ホスホチロシン抗体免疫沈降画分中の PI 3-キナーゼ活性を増加させることはなかった。

以上の結果から次のような情報伝達経路が示された。Con A 刺激は  $G_i$  に依存する PI 3-キナーゼ及びチロシンリン酸化タンパク質に依存する PI 3-キナーゼの両者を同時に活性化するのに対し、fMLP は  $G_i$  に依存する PI 3-キナーゼのみを活性化することが示唆された。同様の見解がカルシウム動員系においても得られた。IAP、KER-B は Con A による  $PI(3,4,5)P_3$  の産生と  $O_2^-$  産生をいずれも抑制しながら、チロシンキナーゼに依存する PI 3-キナーゼには無効であった。この事実は KER-B が Con A 刺激に含まれる fMLP 様の作用のみを抑制していることを意味する。さらにこの結果から、Con A によるチロシンキナーゼの活性化は、PI 3-キ

ナーゼの活性化を導きながら PI (3,4,5)P<sub>3</sub> の産生及び O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生を引き起こさないことが示唆される。このConA 刺激による PI (3,4,5)P<sub>3</sub> を産生しない PI 3-キナーゼの細胞内生成物の同定は今後の課題である。本研究は KER-B が好中球の機能の解明に有用であることを示した。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 栗 原 堅 三  
副 査 教 授 徳 光 幸 子  
副 査 教 授 野 村 靖 幸  
副 査 助 教 授 三 宅 教 尚

学 位 論 文 題 名

## 食細胞による活性酸素産生の機構

－海綿由来生理活性物質 keramamide B を用いた解析－

人をはじめとする様々な動物は体内への異物の侵襲から身を守らなければならない。多核白血球の好中球は外来異物に対し、遊走、貪食、活性酸素( $O_2^-$  等)産生(殺菌効果による異物の排除)、酵素放出といった反応を示す。この活性酸素産生は生体防御に必須であり、この反応を導く酵素を欠損した遺伝性疾患の慢性肉芽腫症患者は感染症を繰り返し死に至る。細菌由来の走化性因子である formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) による好中球の刺激は、百日咳毒素感受性 GTP 結合タンパク質(Gi)を介した経路によって  $O_2^-$  を産生し、白血球の活性化機構を研究するモデルとなっている。

申請者はまず、1991 年に生薬学講座の小林淳一教授らによって発見された keramamide B (KER-B) を含むいくつかの海綿由来の環状ペプチドがモルモット好中球を fMLP で刺激した際の  $O_2^-$  産生を抑制することを見出し、その作用点を明らかにした。また、fMLP 以外の刺激による炎症反応に対する KER-B の効果を検討した。はじめに KER-B による活性酸素産生の阻害を検討した。KER-B は濃度依存的に  $O_2^-$  産生を阻害し、50 % 阻害濃度は  $5 \mu M$  であった。また、KER-B 存在下においては  $O_2^-$  産生の fMLP 用量依存曲線が高濃度側にシフトしており、競合阻害の様式を示した。一方、fMLP と同様の経路で活性酸素産生を導くとされる補体成分の C5a による活性酸素産生を KER-B は阻害することはなかった。以上の結果から fMLP 刺激による  $O_2^-$  産生における KER-B の作用点は受容体レベルである

と考えられた。そこで  $[^3\text{H}]$  で標識した fMLP を使用して結合実験を行ったところ、KER-B は fMLP 受容体の競合阻害薬であることが明らかとなった。また、その KI は fMLP のアンタゴニストとして一般的によく用いられている t-BocMLP と同程度であったことから KER-B の fMLP 阻害薬としての有用性が示唆された。

つぎに申請者は fMLP 競合阻害薬の KER-B が、タチナタマメ由来のレクチンであるコンカナバリン A (Con A) による  $\text{O}_2^-$  産生を抑制することを見出した。しかし、ConA は fMLP の結合を阻害しなかった。つまり、Con A は fMLP 受容体にアゴニスト様の結合を示さないにも関わらず fMLP のアンタゴニストである KER-B によってその最終応答が阻害されるということが明らかになった。Con A は細胞表面の糖タンパク質を架橋することによって様々な細胞応答を引き起こすとされていることを考慮すると、KER-B は fMLP 受容体に対して競合的に作用するのみでなく、受容体刺激から活性酸素産生応答までのカスケードの途中をも阻害している可能性が示唆された。

そこで細胞内情報伝達因子に対する KER-B の作用を検討した。この結果から次のような情報伝達経路が示された。Con A 刺激は  $G_i$  に依存する  $\text{PI}_3$ -キナーゼ及びチロシンリン酸化タンパク質に依存する  $\text{PI}_3$ -キナーゼの両者を同時に活性化することに対し、fMLP は  $G_i$  に依存する  $\text{PI}_3$ -キナーゼのみを活性化することが示唆された。同様の見解がカルシウム動員系においても得られた。百日咳毒素 (IAP)、KER-B は Con A による  $\text{PI} (3,4,5)\text{P}_3$  の産生と  $\text{O}_2^-$  産生をいずれも抑制しながら、チロシンキナーゼに依存する  $\text{PI} 3$ -キナーゼには無効であった。この事実は KER-B が Con A 刺激に含まれる fMLP 様の作用のみを抑制していることを意味する。さらにこの結果から、Con A によるチロシンキナーゼの活性化は、 $\text{PI} 3$ -キナーゼの活性化を導きながら  $\text{PI} (3,4,5)\text{P}_3$  の産生及び  $\text{O}_2^-$  産生を引き起こさないことが示唆される。この ConA 刺激による  $\text{PI} (3,4,5)\text{P}_3$  を産生しない  $\text{PI}_3$ -キナーゼの細胞内生成物の同定は今後の課題である。本研究は KER-B が好中球の機能の解明に有用であることを示した。

以上のように、本論文は食細胞による活性酸素の産生機構に関する新しい知見を多く含んでおり、審査員一同は、本論文は博士 (薬学) の称号を与えるのにふさわしい論文であると判断した。