

● 総 説

生体防御における酸素の役割

竹重公一朗*

ヒト好中球はその食作用時あるいは合成走化性ペプチドやカルシウムイオノファア A23187 などの可溶性刺激物質によって刺激された時、分子状酸素を還元してスーパーオキシド、過酸化水素、水酸ラジカルを生成する。この“呼吸の爆発”は殺菌に必須な反応であり、またある炎症疾患の病因として重要であると考えられているが、好中球の細胞膜に局在する NADPH oxidase によって触媒されている。NADPH oxidase はフラビン蛋白質と b 型チトクロムからなると考えられつつあるが、遺伝性疾患である慢性肉芽腫症の患者好中球は本活性を欠損している。休止期にみられない NADPH oxidase がどのような機構で活性化されるのか現在のところ明らかではないが、最近得られた知見は次のような活性化機構を示唆している：リガンドが細胞膜上の受容体に結合すると GTP 結合蛋白質を活性化する。活性化 GTP 結合蛋白質はホスホリパーゼ C を活性化するのでホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸は蛋白リン酸化酵素 C を活性化するジアシルグセロールと細胞内貯蔵部位からのカルシウムの遊離を促すイノシトール三リン酸に水解される。細胞内遊離カルシウム濃度が上昇するとカルシウム-カルモジュリン依存性蛋白リン酸化酵素が活性化される。このように、NADPH oxidase の活性化には蛋白リン酸化反応が関わっていると考えられている。好中球における NADPH oxidase の活性化機構の研究は、細胞の刺激一応答連関の 1 つのモデルとして注目されている。

キーワード：好中球、スーパーオキシド、NADPH oxidase、カルシウム、蛋白質リン酸化酵素、GTP 結合蛋白質

The role for molecular oxygen in host defense

Koichiro Takeshige, M.D., Ph.D., Associate Professor

Department of Biochemistry, Kyushu University School of Medicine

Human neutrophils phagocytosing or stimulated by soluble stimuli such as a synthetic chemotactic peptide and the calcium ionophore A23187, reduce molecular oxygen to reactive metabolites, such as superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. This respiratory burst, essential to the cell's bactericidal activity and significant in the pathogenesis of some inflammatory diseases, is catalyzed by NADPH Oxidase and results from oxidation of NADPH generated via the hexosemonophosphate shunt. The oxidase is considered to be composed of a flavoprotein and a b-type cytochrome and its activity is defective in

chronic granulomatous disease. The biochemical mechanisms underlying the activation of the NADPH oxidase which is dormant in the resting cells are not well understood, but recent evidence has implicated a model as follows: Occupancy of receptors leads to activation of a GTP-binding protein (G protein) and the activated G protein then stimulates phospholipase C to cleave phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate into two intracellular messengers 1,2-diacylglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate, which activate protein kinase C and release calcium from intracellular storage sites, respectively. Increases in cytosolic calcium levels may activate calcium calmodulin-dependent protein kinase. The activation of NADPH oxidase could thus result from protein phosphorylation mediated by the protein kinases. The regulatory model proposed herein may be relevant to the stimulus-response coupling of other cells.

*九州大学医学部第 2 生化学

Keywords : _____

Neutrophils
 Superoxide
 NADPH oxidase
 Calcium
 Protein kinase C
 GTP-binding protein

1. はじめに

生体は微生物の侵入に対して種々の防御機構を備えている。表1は生体防御機構を分類したものである。特異抗体や補体による特異的防御機構と皮膚・粘膜による機械的防御および食細胞（好中球、単球、マクロファージ）による殺菌が含まれる非特異的防御機構とに分けられる。本小稿で述べようとするのは食細胞による殺菌についてである。

酸素は地球表面に存在する元素の約半数を、また人体構成々分の約66%を占めており人間を含め好気性生物にとって不可欠な物質である。生体は酸素を利用してエネルギー獲得や有用な生体物質の生合成などを行っているが、その一方では生体

表1 生体防御機構の分類

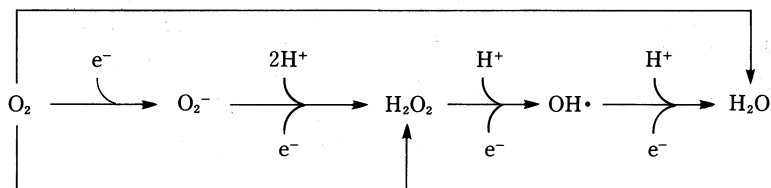
- | |
|-----------------------------|
| 1. 特異的防御機構 |
| a. 液性免疫 |
| b. 細胞性免疫 |
| c. 補体 |
| 2. 非特異的防御機構 |
| a. 機械的防御 |
| 皮膚・粘膜 |
| b. 食細胞（好中球、単球、マクロファージ）による殺菌 |

は常に酸素の毒性にさらされている。すなわち、通常には生体は酸素分子を4電子還元することにより H_2O に変えながら利用している。この代表的な例はミトコンドリアの電子伝達系とATP合成である。しかし特殊な場合には、酸素分子は部分還元され酸化力（毒性）の強い活性酸素（ O_2^- , H_2O_2 , $\text{OH}\cdot$, $^1\text{O}_2$ ）が生成する（図1）。生体は生成した活性酸素をsuperoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidaseなどによって消去しているが、活性酸素の細胞内濃度が防御能力を超えると、炎症、発癌などの障害が起こる。このように生成した活性酸素は“悪玉”として働くが、生体はこの“悪玉”をうまく利用する場合もある。その代表例が食細胞による殺菌である（図2）。

以下に、食細胞の中で最もよく研究が進んでいる好中球の殺菌について述べる。なお、他の総説¹⁾²⁾、著書³⁾も併せて参照されたい。

2. 好中球の食作用時における代謝変化

好中球が微生物を取りこみ殺すまでの過程は非常に複雑な反応が順序どおりに行われるものであるが、次の3つの段階に分けて考えることができる。まず好中球は侵入した微生物を見つけ出し、その方向へ動く（ケモタキシス）。これまでに多くの走化性因子が見出されている。次に好中球は微生物に接触、吸着し、ついで取り込み食胞を形成する。接触、吸着の機構はよくわかっていないが、微生物表面の荷電や疎水性、また好中球細胞膜上のレセプターに吸着できるかどうかにか依存している。後者の例としてオプソニン（抗体と補体）による食作用の促進がある。形成された食胞は好中球内顆粒と融合しファゴリソゾームとなる。取り込まれた微生物はファゴリソゾームの中で後述する殺菌機構によって殺され、ついで消化される。

**図1 活性酸素の生成**

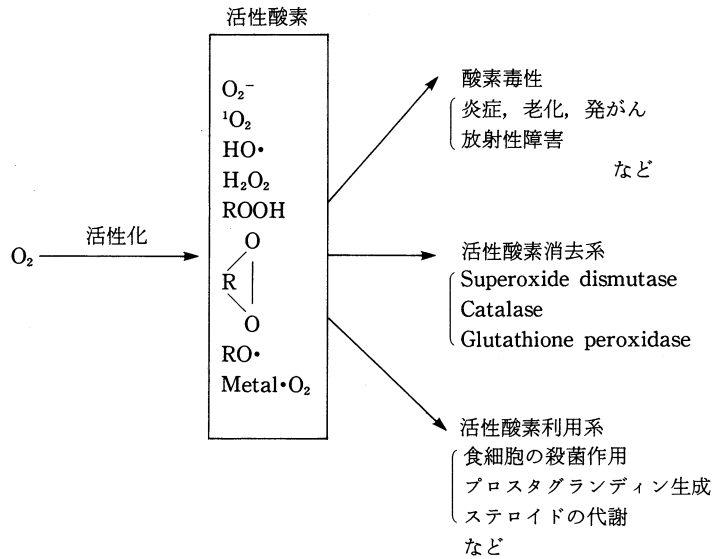


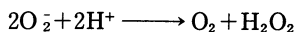
図2 活性酸素の生成とその作用

好中球の顆粒にはミエロペルオキシダーゼやβ-グルクロニダーゼなどの加水分解酵素を多く含むアズール顆粒とラクトフェリン, リゾチーム, 数種の塩基性蛋白質を含む特殊顆粒とがある。

さて, 好中球は微生物と接触すると同時に次に述べるような劇的な代謝変化を起こす(図3)。これらは全て殺菌のためのものである。

1) シアン耐性呼吸の増加と活性酸素生成

食作用時に酸素消費が上昇することは約半世紀前に見出されていたが, その後長い間その意義については不明であった。この酸素消費の上昇はミトコンドリアでのATP合成の上昇によるものではなく, すべて活性酸素生成によるものである。また, 殺菌を行うためのものであることがわかってきた。まず好中球はスーパーオキシド(O₂⁻)を生成するが, O₂⁻は自発的にあるいはスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の働きで次の反応によってH₂O₂となる。



生成したH₂O₂はO₂⁻と反応して強力な酸化剤であるOH[·]ができる。この時金属イオン(特にFe)の共存が必要であると考えられている(金属イオン媒介によるHarber-Weiss反応)。

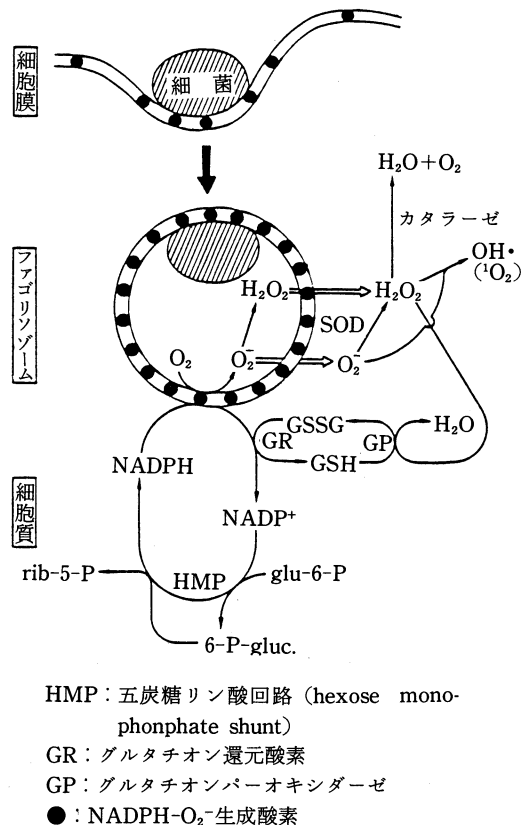
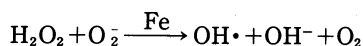


図3 食作用時の代謝変化

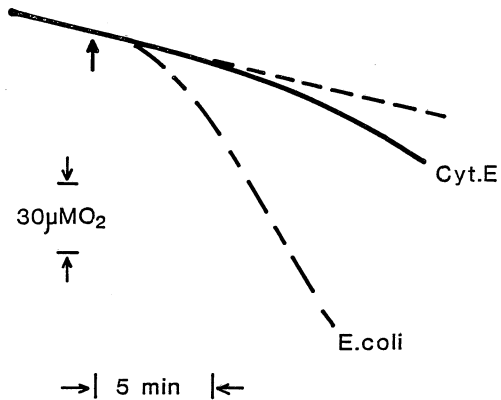


図4 好中球の食作用時における酸素消費(上)とO₂生成(下)
Cyt.E; サイトカラシン E

食作用時に一重項酸素(¹O₂)ができるかどうかは、その測定方法(化学発光)が¹O₂に特異的でないためにまだ明らかになっていない。

図4は好中球にE.coliを食べさせた時、および可溶性刺激物質の1つであるサイトカラシンE(Cyt.E)で刺激した時の酸素消費とO₂生成を示している。酸素消費は酸素電極を用いて、またO₂生成はチトクロムCのO₂による還元を2波長分光光度計を用いて(550-540nm)測定している。図5は蛍光プローブのホモワニリン酸を用いてH₂O₂生成を示したものである。ホモワニリン酸は生成したH₂O₂と添加したペルオキシダーゼによって酸化され、蛍光を出すようになる。NaN₃は生成したH₂O₂を分解するカタラーゼを阻害するために反応液中に入れてある。ところで、遺伝性疾患である慢性肉芽腫症(chronic granulomatous disease, CGD)の患者の好中球は

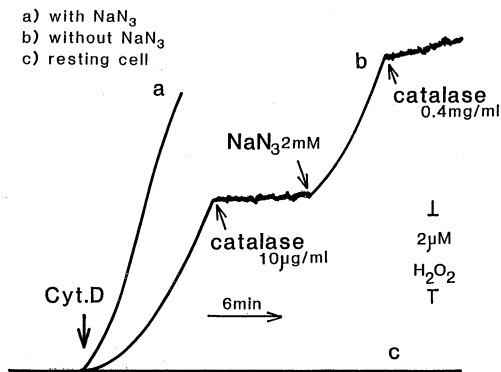


図5 好中球のサイトカラシンD(Cyt.D)刺激によるH₂O₂生成

刺激を受けても活性酸素を生成することはできない。この患者は乳幼児より重篤な感染症をくり返すが、このことから好中球の活性酸素生成が殺菌において重要な役割を果たしていることが理解できる。図6にCGD患者および正常人の全血10μlを用いたO₂とH₂O₂の生成を示している。CGD患者血液ではO₂もH₂O₂も生成していないことがわかる。

2) 解糖および五炭糖リン酸回路(hexose monophosphate shunt)

食作用時の解糖の促進は一時的であり、またその促進の程度は酸素代謝(活性酸素生成)程著しくない。五炭糖リン酸回路(HMP shunt)は、グルコース-6-リン酸が脱炭酸されて五炭糖が、そしてNADP⁺が還元されてNADPHができる経路である。この回路の促進は、生成したH₂O₂が次に述べるグルタチオンサイクルによって代謝されるときに、また後述するようにO₂を生成するNADPH oxidaseが食作用時に活性化されるため、細胞内のNADP⁺濃度が上昇し、その結果HMPshuntの律速酵素であるグルコース-6-リン酸脱水素酵素が活性化されるためである。

3) グルタチオン代謝の促進

生成したH₂O₂はグルタチオンペルオキシダーゼの働きにより還元型グルタチオン(GSH)を酸化し、生成した酸化型グルタチオン(GSSG)はグルタチオン還元酵素によりNADPHの酸化を伴って還元される。このように食作用時にはグルタチオン代謝が促進している。

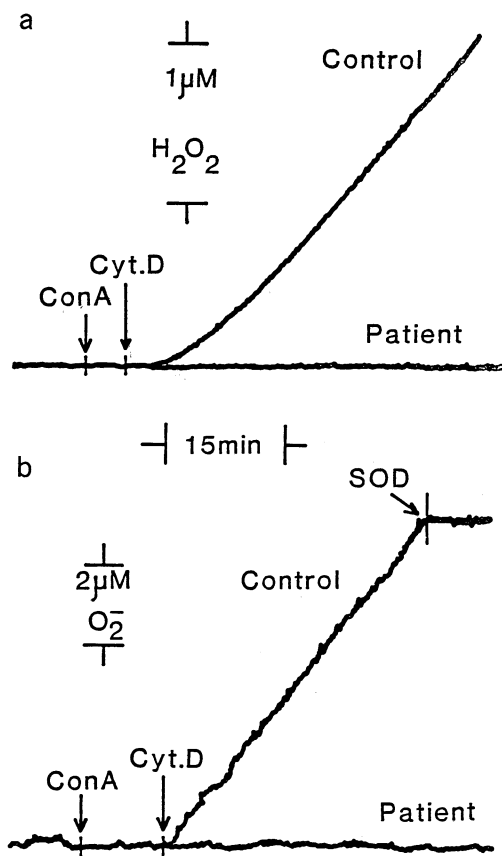


図6 正常人および慢性肉芽腫症患者の好中球による H_2O_2 (a)および O_2^- (b)生成
ConA: コンカナバリン A, Cyt.D: サイトカラシン D

以上述べた五炭糖リン酸回路とグルタチオン代謝の促進は H_2O_2 の生成, したがって O_2^- の生成に依存している。食作用時に O_2^- や H_2O_2 の生成がみられない CGD の好中球では, 2つの代謝とも促進されない。

4) リン脂質代謝の促進

好中球は食作用時あるいは可溶性刺激物質で刺激を受けた時, 膜に存在するリン脂質からアラキドン酸を遊離する。遊離したアラキドン酸はリポオキシゲナーゼとシクロオキシゲナーゼによって代謝され, 生理活性物質であるロイコトリエン B_4 , C_4 , D_4 , E_4 , リボキシニン A, B, プロスタグランジン E_2 などを生成する。この中ロイコトリエン B_4 とリボキシニン A は好中球に作用して O_2^- 生成を誘導することが知られている。また, 好中球

表2 ヒト好中球の O_2^- 生成を誘導する物質

- (1)細胞膜受容体を介して作用する物質
 - ①オプソニン化ゼイモザン (OZ), 等
..... (C3b 受容体)
 - ②抗原抗体複合物, 凝集 IgG, 等
..... (Fc 受容体)
 - ③ C5a, 走化性ペプチド (FMLP 等),
ロイコトリエン B_4 (LTB $_4$), 血小板活性化因子 (PAF)
- (2)レクチン
コンカナバリン A (Con-A), WGA, PHA
- (3) NaF
- (4)ホスホリパーゼ (PLase-C)
- (5) Ca^{2+} -イオノフォア
A213187, ionomycin, 等
- (6) protein kinase C (PK-C) を直接活性化する物質
 - ①ジアシルグリセロール (OAG 等)
 - ②フォルボルエステル (PMA 等)
 - ③ teleocidin
- (7)その他
 - ①不飽和脂肪酸 (アラキドン酸, オレイン酸, 等)
 - ②サイトカラシン D, E
 - ③ジギトニン
 - ④ tumor necrosis factor (TNF)
 - ⑤ hexachlorocyclohexane

は血小板を凝集させる血小板活性化因子 (PAF) をリン脂質からつくり出す。PAF も好中球の O_2^- 生成を誘導する。好中球 (他の細胞でも証明されているが) のリン脂質代謝の中で重要なものは, 最近特に研究が進んでいるイノシトールリン脂質の代謝である⁴⁾。この代謝は細胞の刺激伝達機構において重要な役割を果たしていることが明らかとなってきており後で詳しく論じる。

ところで, 上述の代謝変化は異物を取り込む時ばかりでなく可溶性の種々の刺激物質によって刺激された時にも起こる。表2にこれまで知られている代謝誘導物質を列挙している。

3. スーパーオキシド生成酵素

上述したように, 殺菌に関わる活性酸素の生成, 特に O_2^- の生成は他の活性酸素の生成や種々の代謝変化をひき起こす。このように代謝変化の中心的役割を果たしている O_2^- 生成は, 好中球の細胞

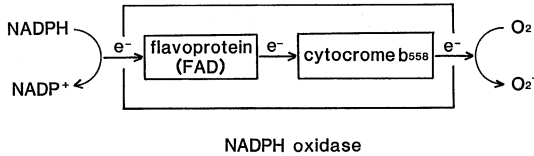


図7 O₂生成酵素(NADPH oxidase)の電子伝達系(仮説)

膜に存在する NADPH-O₂生成酵素 (NADPH oxidase) によって解媒されている⁵⁾。すなわち、酸素分子 (O₂) を一電子還元して O₂⁻ とする細胞内電子供与体は NADPH である。反応は次のように進むと考えられる。

$2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^- + NADP^+ + H^+$
NADPH oxidase は非常に不安定であるためにまだ完全には精製されておらず、その本態については不明な部分が多い。しかし、次に述べるような酵素学的知見が得られている⁶⁾。(1) NADPH および O₂ に対する km はそれぞれ 25~50μM と約 30μM である。(2) 至適 pH は中性付近 (pH7.0~7.5) である。(3) KCN, アンチマイシン A では阻害されないが、SH 基阻害剤やフラビンのアナログによって阻害される。現在、本酵素はミトコンドリアやマイクロソームにみられるようないくつかの構成成分から成る電子伝達系であると考えられつつある。構成成分としてフラビン蛋白質とチトクロム b₅₅₈ が考えられている(図7)。以下にこれらの構成成分について述べる。

細胞膜画分から可溶化した NADPH oxidase 標品は flavin adenine dinucleotide (FAD) によって活性が上昇し、FAD のアナログによって NADPH oxidase 活性が抑制されるという事実は⁶⁾、FAD を補欠分子族としてもつフラビン蛋白質が関与することを示唆している。また、CGD 好中球の細胞膜画分は FAD をほとんど含まないという報告もフラビン蛋白質の関与を支持する。しかし、フラビン蛋白質の実体については全くわかっていない。

チトクロム b₅₅₈ は食細胞だけに存在するチトクロムであり、好中球では細胞膜と特殊顆粒に局在する⁸⁾⁹⁾。その物理化学的性質としては、酸化還元スペクトルでのピークとして 419nm, 529nm, 558nm をもち、酸化還元電位(E_{m, 7.0})は -245mV

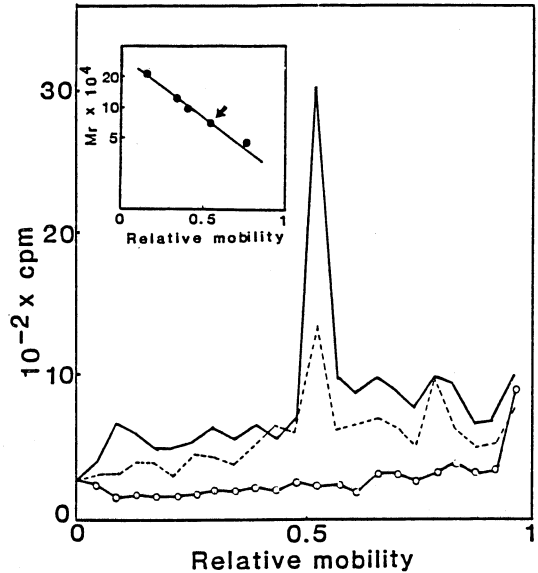


図8 2',3'-dialdehyde NADPH でラベルした NADPH oxidase 標品を SDS-ゲル電気泳動した時の放射活性の分布(文献10)
(-)2',3'-dialdehyde NADPH+NaB[³H]₃CN; (---)2',3'-dialdehyde NADPH+NADPH+NaB[³H]₃CN; (-○-)NaB[³H]₃CNのみ。

である。このチトクロムはすでに精製されているが、研究グループによってその分子量が異っている。CGD の好中球はチトクロム b₅₅₈ を欠くか、存在しても異常なスペクトルを示す。高い NADPH oxidase 活性をもつ細胞膜画分に NADPH を加えるとチトクロム b₅₅₈ は還元され、O₂ 生成活性とよく相関する。

このように NADPH oxidase はフラビン蛋白質とチトクロム b₅₅₈ からなる電子伝達系である可能性はあるが、まだ確かな実験事実はない。実際高度に精製された NADPH oxidase には FAD あるいはチトクロム b₅₅₈ はほとんどないという報告もあり今後明らかにしなくてはならない重要な問題の1つである。最近、筆者らは NADPH oxidase の NADPH 結合部位について NADPH アナログ (2', 3'-ジアルデヒド NADPH) を用いて検討し、分子量 66,000 蛋白質が NADPH 結合部位をもつことを明らかにした(図8)¹⁰⁾。この蛋白質は好中球の他単球には存在するが、リンパ球、

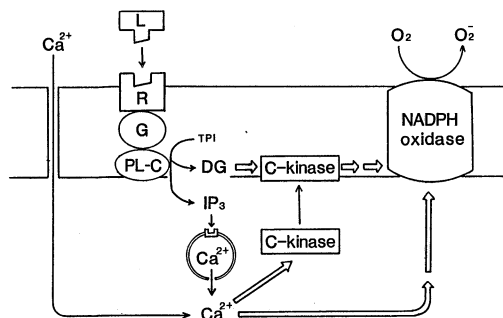


図9 NADPH oxidase の活性化経路(仮説)

赤血球, 血小板には存在せず食細胞に特異的な蛋白質のようである¹¹⁾。この蛋白質が FAD を含むかどうかは今のところ明らかでない。

4. NADPH oxidase の活性化機構

好中球は刺激を受けない時(休止時)には全く O_2^- を生成せず, 刺激を受けて初めて O_2^- を生成する。このことは何らかの活性化機構の存在を示唆するが, この刺激一応答に関する研究は血小板とともに好中球において大いに進展している。

図9に現在考えられている好中球 NADPH oxidase の活性化機構を模式的に図示している。

1) GTP 結合蛋白質とホスホリパーゼ C

好中球の O_2^- 生成を誘導する刺激剤が受容体と結合すると膜結合性ホスホリパーゼ C (PL-C) が活性化するが, 受容体と PL-C とは GTP 結合蛋白質(G 蛋白質)により媒介されている¹²⁾。すなわち, 刺激剤—受容体複合体の情報は G 蛋白質を経て PL-C に伝えられる。受容体に刺激剤が結合すると G 蛋白質が活性化され, GTP ase 活性が上昇する。百日咳菌毒素は G 蛋白質を化学修飾(ADP—リボシル化)することによりその機能を阻害するので, 刺激の伝達は止まってしまう。今のところ G 蛋白質がどのような機構で活性化されているのか明らかではない。

PL-C は細胞膜に存在し, Ca^{2+} 要求性にホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸 (TPI) を加水分解し, イノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP_3) とジアシルグリセロール (DG) を生成する(図10)⁴⁾。PL-C の活性化には $100\mu M$ 以上の Ca^{2+} 濃度が必要であるが, G 蛋白質が活性化され PL-C に作用

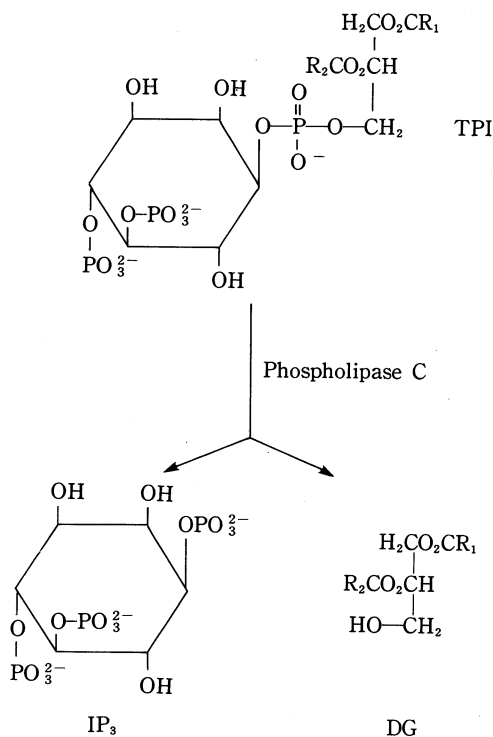


図10 TPI はホスホリパーゼ C によって IP_3 と DG に加水分解される。TPI: ホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸, IP_3 : イノシトール 1, 4, 5-三リン酸, DG: ジアシルグリセロール

すると必要な Ca^{2+} 濃度は $0.1\mu M$ (これは休止時好中球の細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度に等しい)に低下する¹³⁾。このように活性化した G 蛋白質は PL-C の Ca^{2+} 要求濃度を低下させることによって PL-C を活性化していると考えられている。なお, PL-C の作用によって生成した IP_3 と DG は, 後述するようにそれぞれ細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} の放出と蛋白質リン酸化酵素 C の活性化を誘導する second messenger である。

2) 細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の上昇

好中球の O_2^- には Ca^{2+} が必須であり細胞内 Ca^{2+} を涸渇した好中球は受容体に刺激剤が結合しても O_2^- 生成は起こらない¹⁴⁾。 O_2^- 生成の活性化には $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が重要な働きをしていると考えられている。休止時好中球の $[Ca^{2+}]_i$ は細胞外液のおよそ $1/2 \times 10^4$ で, 約 $100nM$ である。この濃度勾配を維持しているのは主に細胞膜上の

Ca^{2+} -ATPaseである。刺激を受けると好中球の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は急激に上昇することが、最近開発された蛍光プローブのQuin 2やFra 2を用いて示されている。刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇は細胞外からの Ca^{2+} の流入と細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位からの Ca^{2+} の放出によるものである。細胞外からの Ca^{2+} の流入は電位依存性チャネルではなく受容体介在性チャネルによるのではないかと考えられているが、詳しいことは不明である。一方、細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+} の放出は、前述した IP_3 による。 IP_3 は貯蔵部位(おそらく小胞体)に存在する IP_3 受容体に結合することによって Ca^{2+} の放出を誘導する。刺激時の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は O_2 生成の誘導に必要ではあるが十分ではない。たとえば、 Ca^{2+} 潤渴好中球にフォルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン(FMLP)を加えて2分後に Ca^{2+} を加えても $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇はみられるのにもかかわらず O_2 生成は起こらない¹⁴⁾。逆に Ca^{2+} を加えてからFMLPで刺激すると O_2 生成はみられる。

3) 蛋白質リン酸化酵素C

さて、 Ca^{2+} が O_2 生成の誘導、すなわちNADPH oxidaseの活性化に重要な働きをしていることを述べてきたが、それでは Ca^{2+} はどのような機構でNADPH oxidaseを活性化しているのであろうか。この研究の初期には、カルモジュリンの阻害剤であるW-7によって好中球の O_2 生成が阻害されたため、カルモジュリンの関与が示唆されたが¹⁵⁾、その後W-7は蛋白質リン酸化酵素C(Protein Kinase C:PK-C)をも阻害すること、また刺激剤の1つであるホルボルミスチレートアセテート(PMA)は直接PK-Cを活性化することなどがわかって O_2 生成におけるPK-Cの関与が注目されてきた¹⁶⁾。PK-Cは細胞膜にあるホスファチジルセリンと Ca^{2+} とDGによって活性化される¹⁷⁾。 Ca^{2+} とDGとは協同的に作用して、十分な濃度のDGがあれば休止時好中球内の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (約100nM)で活性化される。DGはすでに述べたようにTPIがPL-Cによって加水分解されてできる。PMAはDGと同様の作用機構でPK-Cを活性化する。好中球に細胞膜をよく透過するDGの1-オレオイル2-アセチルグリセロール(OAG)を加えると、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を伴わずに O_2 生成がみられ、この O_2 生成はPK-Cの阻害剤H-7によって阻

害される¹⁸⁾。また、OAGやPMAとカルシウムイオノフォアとは協同的に作用して O_2 生成を誘導する。これらの知見は好中球の O_2 生成の誘導にPK-Cが関与していることを強く示唆している。実際、FMLP、PMA、OAGなどで刺激された時、数種の蛋白質のリン酸化がみられ、これらのリン酸化はH-7で抑制される。しかしながら、現在NADPH oxidaseそのものがリン酸化されるのかどうかまだ明らかではない。CGD好中球では、正常好中球が刺激された時みられる分子量47,000蛋白質のリン酸化がみられない。

ところで、OAGやPMAは直接PK-Cを活性化して、またカルシウムイオノフォア(A23187)は Ca^{2+} 依存性にPL-Cを活性化し、生成したDGは Ca^{2+} と協同的にPK-Cを活性化することによりNADPH oxidaseの活性化を誘導するので、受容体を介した活性化の場合とは異なり百日咳菌毒素によって阻害されない。

NADPH oxidaseの活性化機構をさらに詳しく解明するためには、無細胞系においてNADPH oxidaseを活性化する条件を確立する必要がある。最近、好中球ホモジネートに不飽和脂肪酸(アラキドン酸、オレイン酸)やドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を加えるとNADPH oxidaseが活性化されるという報告がなされた¹⁹⁾。この系においては、ATPと Ca^{2+} は必要なく蛋白質リン酸化反応は関わっていないようである²⁰⁾。また細胞膜画分とともに細胞質成分が必要である。今後、この系を用いて活性化機構の解明が進展するものと期待される。

5. 殺菌機構

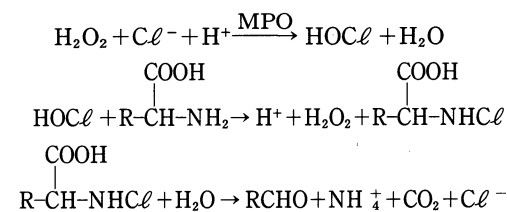
好中球の活性酸素生成について述べてきたが、それでは生成した活性酸素はどのようなメカニズムで取り込んだ微生物を殺しているのであろうか。

殺菌への O_2 自身の関与は否定的である。 H_2O_2 は高濃度(~1mM)になると殺菌作用を示すが、アズール顆粒中に存在するミエロペルオキシダーゼ(MPO)とハロゲンイオンによって殺菌作用は著しく増強される。ハロゲンイオンとしてはその細胞内濃度からして Cl^- が生理的に働いているものと考えられている。このMPO- H_2O_2 - Cl^- 系は、微生物の表面の構成物質(チロニンなど)を

表3 好中球の殺菌機構

1. 酸素に依存した殺菌
a. ミエロペルオキシダーゼ依存の殺菌 (MPO-H ₂ O ₂ -Cl ⁻ 系)
b. エミロペルオキシダーゼに依存しない殺菌
i) H ₂ O ₂
ii) OH [•]
2. 酸素に依存しない殺菌
a. 酸 (H ⁺ , 有機酸)
b. リゾチーム
c. ラクトフェリン
d. 塩基性蛋白質

ハロゲン化することにより破壊したり、また下記の反応でアミノ酸を脱炭酸して殺すものと考えられている。



MPOの重要性は、重症MPO欠損症の好中球において殺菌能低下がみられることから、またH₂O₂が役立っていることは、CGD好中球はH₂O₂を生成する菌(乳酸菌など)を殺すがカタラーゼをもつ菌は殺せないことから理解できる。活性酸素の中で最も酸化力の強いOH[•]の殺菌への関与は、OH[•]の消去剤として知られているマンニトールやヒスチジンを投与すると殺菌が阻害される事実から支持されている。

好中球は以上述べた酸素に依存する系他に、酸素に依存しない殺菌系をもっている(表3)。したがって、嫌氣的条件下においてもある種の細菌は殺される。この系には、H⁺や有機酸の他に顆粒中のリゾチーム、ラクトフェリン、そして数種の塩基性蛋白質がある。食作用時に食胞と顆粒が融合すると、これらの殺菌性蛋白質は細菌を攻撃し始める。食胞と顆粒との融合が減少しているChediak-Higashi症候群の好中球では殺菌能の低下がみられる。

このように好中球は多くの殺菌機構をもっているが、どの機構が最もよく働いているかは、好中球の酸素の利用度や取り込んだ細菌の違い(カタ

ラーゼをもっているか、H₂O₂を生成できるかどうかなど)に依存していると思われる。実際にはいくつかの機構が同時に働いているのであろう。

6. おわりに

酸素が生体防御機構の1つである食細胞の殺菌にどのように関わっているかを好中球を中心に概説した。他の食細胞の単球やマクロファージ、それに好酸球においてもほぼ同じ系で活性酸素が生成されている。この分野での最大の関心は、O₂⁻を生成するNADPH oxidaseの本態とこの酵素(系)の活性化機構を明らかにすることに集まっている。もしNADPH oxidaseが電子伝達系であるなら、その構成成分として考えられているフラビン蛋白質とチトクロムb₅₅₈はどのような性質をもっており、また細胞膜上での相互作用はどのようなものなのであろうか。一方、NADPH oxidaseの活性化もすでに無細胞系で行うことができるようになっているが、細胞膜上の不活性型NADPH oxidaseを活性化するのに必要な細胞質成分とはどんな物質なのだろうか。また、蛋白質リン酸化酵素Cによる蛋白質リン酸化反応と細胞質成分との関係はどのようなものなのであろうか。これらの問題点は、現在多くの研究者の興味の対象となっており、今後の成果が楽しみである。

(本稿は、第21回日本高気圧環境医学会総会における特別講演を基に加筆されたものである。)

【参 考 文 献】

- 1) 住本英樹, 竹重公一朗, 水上茂樹: 顆粒球の機能と代謝—スーパーオキシドアニオンの生成およびその調節機構について—, 炎症5: 89-100, 1985
- 2) Rossi, F.: The O₂⁻-forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. Biochim. Biophys. Acta 853: 65-89, 1986
- 3) 水上茂樹: 白血球の生化学. 東京, 東京大学出版会, 1986
- 4) 竹縄忠臣: 情報受容伝達におけるイノシトールリン脂質代謝の役割. 宇井理生編, 現代化学増刊4, 東京, 東京化学同人, 1985
- 5) Babior, B.M.: Oxidants from phagocytes: Agents of defence and destruction. Blood 64: 959-966, 1984
- 6) Wakeyama, H., Takeshige, K., Takayanagi, R. and Minakami, S.: Superoxide-forming NADPH oxidase preparation of pig polymor-

- phonuclear leucocytes. *Biochem. J.* 205 : 593-601, 1982
- 7) Gabig, T.G.: The NADPH-dependent O_2^- generating oxidase from human neutrophils. Identification of a flavoprotein component that is deficient in a patient with chronic granulomatous disease. *J. Biol. Chem.* 258 : 6352-6356, 1983
 - 8) Garcia, R.C. and Segal, A.W.: Changes in the subcellular distribution of the cytochrome b_{-245} on stimulation of human neutrophils. *Biochem. J.* 219 : 233-242, 1984
 - 9) Cross, A.R., Parkinson, J.F. and Jones, O.T. G.: Mechanism of the superoxide-producing oxidase of neutrophils. *Biochem. J.* 226 : 881-884, 1985
 - 10) Umei, T., Takeshige, K. and Minakami, S.: NADPH binding component of neutrophil superoxide-generating oxidase. *J. Biol. Chem.* 261 : 5229-5232, 1986
 - 11) Umei, T., Takeshige, K. and Minakami, S.: NADPH-binding component of the superoxide-generating oxidase in unstimulated neutrophils and the neutrophils from the patients with chronic granulomatous disease. *Biochem. J.* in press.
 - 12) 堅田利男, 宇井理生: アデニレートシクラーゼ系, 宇井理生編, 受容体と情報伝達, 28-47, 東京, 東京化学同人, 1985
 - 13) Smith, C.D., Cox, C.C. and Snyderman, R.: Receptor-coupled activation of phosphoinositide-specific phospholipase C by an N protein. *Science* 232 : 97-100, 1986
 - 14) Nakagawara, M., Takeshige, K., Sumimoto, H., Yoshitake, J. and Minakami, S.: Superoxide release and intracellular free calcium-depleted human neutrophils stimulated by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Biochim. Biophys. Acta* 805 : 97-103, 1984
 - 15) Takeshige, K. and Minakami, S.: Involvement of calmodulin in phagocytotic respiratory burst of leukocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99 : 484-490, 1981
 - 16) Fujita, I., Irita, K. and Takeshige, K. and Minakami, S.: Diacylglycerol, 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol, stimulates superoxide-generation from human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 : 318-324, 1984
 - 17) Nishizuka, Y.: The role of protein kinase C in the cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308 : 693-698, 1984
 - 18) Fujita, I., Takeshige, K. and Minakami, S.: Inhibition of neutrophil superoxide formation by 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7), an inhibitor of protein kinase C. *Biochem. Pharmacol.* 35 : 4555-4562, 1986
 - 19) Bromberg, Y. and Pick, E.: Activation of NADPH-dependent superoxide production in a cell-free system by sodium dodecyl sulfate. *J. Biol. Chem.* 260 : 13539-13545, 1985
 - 20) 竹重公一朗, 藤田一郎, 梅井利彦, 水上茂樹: 好中球のスーパオキシド生成機構について. *生化学*, 58 : 523, 1986