

論文内容の要旨

論文題目 好酸球におけるタウリンの生理的機能に関する研究

氏名 徳永彩未

【序論】

タウリンは、ヒトをはじめとする動物の多くの組織において、最も多量に存在する遊離型アミノ酸の一つである。タウリンが炎症を抑制するという報告が今まで数多くなされてきたが、そのメカニズムは不明であった。タウリンが好中球に多く存在することから、私は、免疫系細胞自身の働きに何らかの重要な影響を及ぼすと考え、好中球におけるタウリンの生理的機能に着目して研究を始めた。これまでの研究から、タウリンと好中球に特徴的に発現する酵素ミエロペルオキシダーゼ (Myeloperoxidase, MPO) から細菌貪食後に生成されるタウリンクロラミン (Taurine Chloramine, TauCl) は、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の Met45 をメチオニンスルフォキシド ($\text{MetS}=\text{O}$) へと酸化することで、貪食刺激にตอบสนองした $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の分解を阻害し、 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 活性化を遮断し、炎症と組織障害を抑制することが明らかになってきた (図 1)。従来、生体内に存在する酸化剤は $\text{NF}\kappa\text{B}$ の活性化を促進するといわれてきたが、酸化剤である TauCl が $\text{NF}\kappa\text{B}$ の活性化を遮断することは大変興味深い。このアミノ酸の酸化という従来とは異なるシグナル伝達は、大変独創性の高い研究対象である。

近年、様々なアレルギー反応を原因とする疾患が急増し、しかもその病状は悪化・難治化する傾向にあることから、その優れた治療薬の開発が強く望まれている。白血球には好中球の他に好酸球が存在するが、好酸球は気管支喘息や他のアレルギー炎症疾患において生じる炎症による組織障害に大きく関わっている。例えば、喘息患者の気管支では、気道の好酸球レベルが過剰に増加し、好酸球に特徴的に発現するエオシノフィルペルオキシダーゼ (Eosinophil Peroxidase, EPO) が産生する次亜臭素酸 (HOBr) や $\text{NF}\kappa\text{B}$ に依存した炎症性サイトカインが放出され炎症を引き起こしている。そして、放出された炎症性サイトカインの過剰産生によって、さらに好酸球が増加するという悪循環に陥る。喘息のしくみが解明されるにつれ、喘息は気管支の慢性的な炎症が主な原因であることがわかってきた。タウリンは、好酸球にも高濃度で存在し、刺激で生じる HOBr と反応してタウリンブロマミン (Taurine Bromamine, TauBr) が生成されると考えられる。しかし、生体内の Br 量は Cl に比較すると極微量であることから EPO のこのような触媒反応にはほとんど着目されてこなかった。実際に生体内において、この反応により TauBr が生成されているならば、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ が酸化されて $\text{NF}\kappa\text{B}$ の活性化が遮断され、アレルギー反応において炎症が抑制される

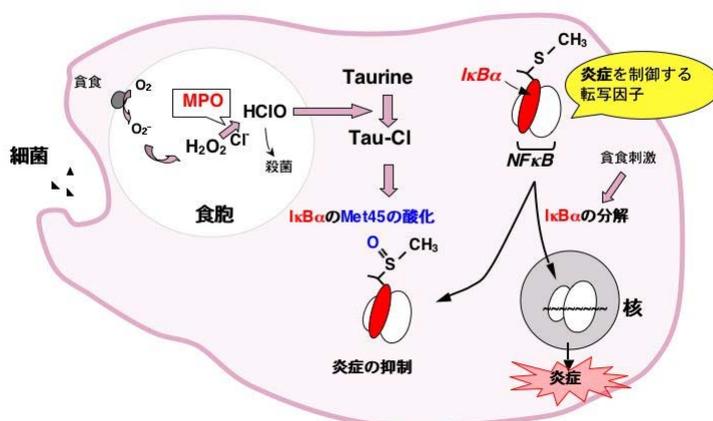


図1 好中球におけるタウリンの抗炎症メカニズム
(After Kanayama et al., 2002)

近年、様々なアレルギー反応を原因とする疾患が急増し、しかもその病状は悪化・難治化する傾向にあることから、その優れた治療薬の開発が強く望まれている。白血球には好中球の他に好酸球が存在するが、好酸球は気管支喘息や他のアレルギー炎症疾患において生じる炎症による組織障害に大きく関わっている。例えば、喘息患者の気管支では、気道の好酸球レベルが過剰に増加し、好酸球に特徴的に発現するエオシノフィルペルオキシダーゼ (Eosinophil Peroxidase, EPO) が産生する次亜臭素酸 (HOBr) や $\text{NF}\kappa\text{B}$ に依存した炎症性サイトカインが放出され炎症を引き起こしている。そして、放出された炎症性サイトカインの過剰産生によって、さらに好酸球が増加するという悪循環に陥る。喘息のしくみが解明されるにつれ、喘息は気管支の慢性的な炎症が主な原因であることがわかってきた。タウリンは、好酸球にも高濃度で存在し、刺激で生じる HOBr と反応してタウリンブロマミン (Taurine Bromamine, TauBr) が生成されると考えられる。しかし、生体内の Br 量は Cl に比較すると極微量であることから EPO のこのような触媒反応にはほとんど着目されてこなかった。実際に生体内において、この反応により TauBr が生成されているならば、 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ が酸化されて $\text{NF}\kappa\text{B}$ の活性化が遮断され、アレルギー反応において炎症が抑制される

可能性が考えられる。本研究では、生体内において IκBα が酸化されて NFκB の活性化が遮断されているのかどうかを様々な実験手法により確認した。さらに TauCl と比較してその性質がほとんど知られていない TauBr の生物学的特性を検証した。

【結果と考察】

1. TauBr による IκBα 分解抑制と NFκB 活性化阻害

SDS-PAGE では、TauCl が IκBα を酸化すると、IκBα のバンドが上にシフトすることがわかっている (Kanayama et al., 2002)。NFκB に対する TauBr の影響を知るために、IκBα の酸化と分解に対する TauBr の効果を TauCl と比較しながらウェスタンブロットで調べた (図 2)。TauBr は、TauCl とほぼ同じ濃度で、IκBα のバンドを上シフトすることがわかった。Cl と Br のハロゲンとしての性質は類似しており、TauCl も TauBr もともに酸化剤としてはたらくため、IκBα の Met に対する酸化という反応機構は同様であると考えられる。細胞膜破壊前後 (図 2A, B) で、TauCl と TauBr の効果を比較することにより、TauCl のほうがやや細胞膜透過性が低いことが示唆された。

刺激に反応して分解される IκBα に対する TauBr の効果を TauCl と比較しながら調べた (図 3)。IκBα は TNFα 刺激後にリン酸化され分解される。しかし TauBr で前処理することによって TauCl の場合と同様に抑制された。この IκBα の分解抑制が、NFκB の活性化を阻害しているかどうか、ゲルシフトアッセイによって観察した (図 4)。TNFα 刺激時間依存的に増加した核内の NFκB は、TauCl, TauBr で前処理することによって減少した。そして、TauCl よりも TauBr の方が NFκB の核内移行阻害力がより強力であることがわかった。

NFκB の核内移行阻害にともなって、NFκB の転写活性が実際に抑制されているのかどうかをルシフェラーゼアッセイを用いて調べた。その結果、TNFα 刺激前の TauBr 処理によって TauBr 濃度依存的にルシフェラーゼ活性が低下した。これは TauBr が NFκB の転写活性を実際に抑制することを示唆している。

2. プロタミンの細胞膜透過性

白血球は高濃度のタウリンを含有しているため、TauCl と同様、TauBr の形成とその反応性にも非常に興味をもたれる。これまでは TauCl が直接細胞内のターゲットである IκBα を酸化すると考えられてきた。しかし、最近の研究によって TauCl は細胞膜をほとんど透過しないことが報告されている。TauCl による IκBα の酸化は、培地中に存在する他のアミノ酸と塩置換することによって生成された細胞膜透過性のグリシクロラミン (GlyCl) を通して、間接的に起こっているということが報告されている。クロラミンは様々な細胞内制御経路と関わっていることが報告されているが、クロラミンの種類によって細胞膜透過性が異なるため、細胞への影響は細胞内サイトへ到達できるかどうかによって

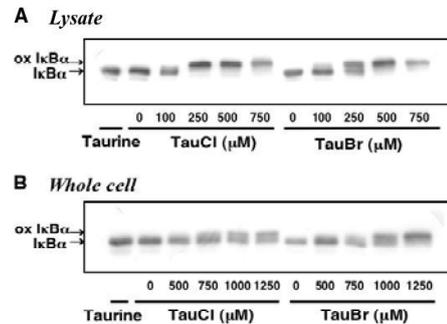


図2 Jurkat 細胞における IκBα の酸化に対する TauCl と TauBr の効果の比較

(A) Jurkat 細胞を TNE buffer で溶解させた後、TauCl, TauBr で処理 (ウェスタンブロット解析)
(B) 培地中において Jurkat 細胞を TauCl, TauBr で処理 (ウェスタンブロット解析)

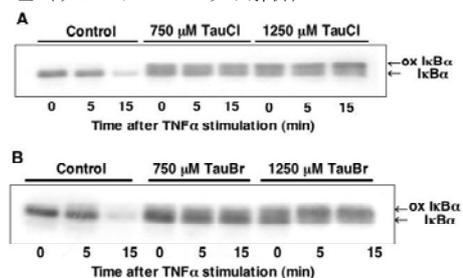


図3 Jurkat 細胞における IκBα の分解に対する TauCl と TauBr の効果の比較

Jurkat 細胞を (A) 750μM, 1.250μM TauCl (B) 750μM, 1.250μM TauBr で処理 (ウェスタンブロット解析)

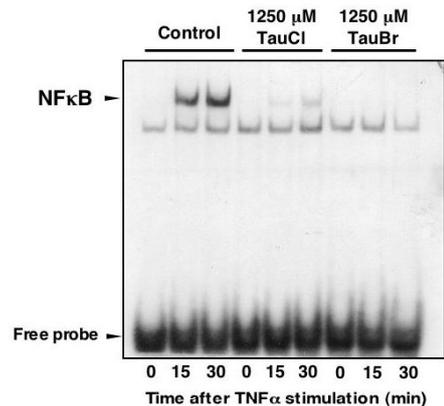


図4 TNFαに誘導されるNFκBの核移行性に対する TauCl と TauBr の効果の比較 (ゲルシフトアッセイ)

ている。このように、細胞膜透過性は非常に重要な要素であるが、ブロミンの細胞膜透過性や細胞反応性についてはわかっていない。そこで、実際の白血球内外のアミノ酸組成に着目し検証した。

Jurkat 細胞における NF κ B システムへの TauCl と TauBr の効果を種々のアミノ酸が含まれている培地ではなく PBS 中で比較した (図 5A)。その結果、TauCl は 250 μ M に至っても I κ B α を酸化しないのに対し、TauBr は 50 μ M というきわめて低濃度で I κ B α の酸化を引き起こした。タウリン以外の生体内濃度が高い上位 4 つのアミノ酸 (Gly, Ala, Gln, Glu) のブロミンについても同様に検証を行ったところ、TauBr よりも細胞膜透過性の高いものは見出されなかった。TauCl は細胞膜をほとんど透過しない。一方、TauBr は、それ自身がクロラミンの中でも透過性が高いといわれている GlyCl よりも、高い透過性を示すことが明らかになった。脂溶性のリン脂質細胞膜と親和性が高い方がより細胞膜透過性が高い。Cl と Br の溶媒結合半径・電気陰性度の両面から、TauBr は TauCl よりも脂溶性が高いと考えられる。さらに、細胞膜透過速度について検証を行ったところ、TauBr は 5 分以内という速いタイムスケールで I κ B α を酸化していることがわかった (図 5B)。同じハロゲン族であっても、Cl と Br の違いにより細胞膜透過性への影響が大きく異なることは興味深い。

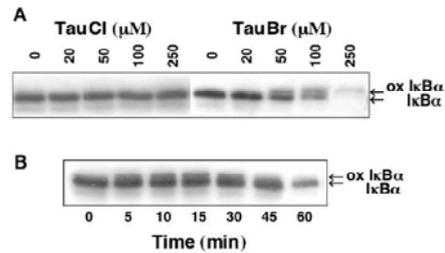


図5 TauClとTauBrの細胞膜透過性

(A) I κ B α の酸化に対するTauCl・TauBr濃度依存性 (B) 50 μ M TauBrによるI κ B α の酸化タイムコース

3. 好酸球におけるタウリンの生理的機能

TauBr のはたらきが *in vivo* で観察できるのかという疑問を解決するため、好酸球の培養細胞を用いて検討した。細胞内に EPO が存在すれば、序論で述べたように TauBr が生成されることが考えられる。TauBr が生合成されることによって I κ B α の分解が抑制されるが、タウリン、Br は生体内に存在するので、残りの条件である EPO 活性をもち、かつ MPO 活性をほとんどもたない細胞モデルの探索から始めた。

①好酸球におけるMPOとEPO活性の選択的測定

MPO は好中球、EPO は好酸球にそれぞれ特徴的に発現する酵素であるが、細胞によっては両酵素が発現している可能性がある。MPO と EPO は生化学・免疫学的に全く異なる性質をもつ酵素であるが、構造が類似しているためそれらの活性を選択的に測定することは困難である。今までにヒト白血球における MPO と EPO の測定の報告はなかった。私は、分光学的手法による選択的測定法を開発し、それぞれを測定することができた。この方法により、いくつかの好酸球について測定を行い、EPO 活性が高く MPO 活性がほとんどないものを選んだ。その結果、EPO 活性があると報告されている慢性骨髄性白血病細胞 (YJ 細胞) が EPO 活性が高く、MPO 活性がほとんどないことが確認されたので (図 6A)、この好酸球を用いて以降の検証を行うことに決定した。

②YJ細胞におけるタウリンの機能解析

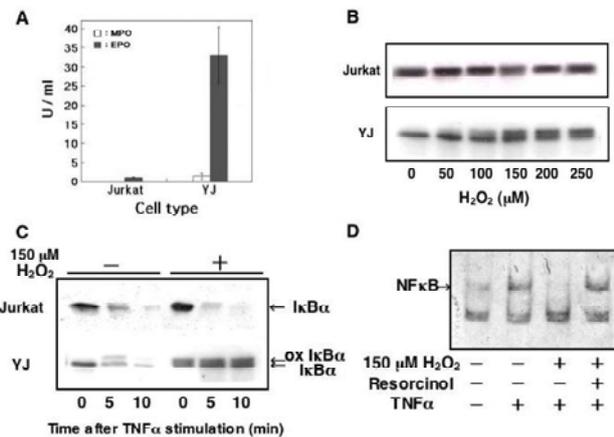


図6 好酸球(YJ細胞)のH₂O₂処理

(A) Jurkat細胞(Control)とYJ細胞のMPO・EPO活性
(B) 細胞をH₂O₂で15分間処理(ウェスタンブロット解析)
(C) 細胞を150 μ M H₂O₂で15分間処理し引き続きTNF α で0, 5, 10分間刺激(ウェスタンブロット解析)
(D) 細胞を150 μ M H₂O₂, EPOの阻害剤で処理し引き続きTNF α で30分間刺激(ゲルシフトアッセイ)

YJ細胞を過酸化水素 (H_2O_2) で処理したとき、細胞内で TauBr が合成され IkB α が酸化されるかどうかをウェスタンブロットで観察した。その結果、両酵素の活性がほとんどない Jurkat 細胞では IkB α のバンドは変化しなかったが、YJ 細胞では H_2O_2 濃度依存的に IkB α が酸化された (図 6B)。それぞれの細胞を H_2O_2 で前処理したとき、TNF α 刺激による IkB α の分解が抑制されるかどうかを解析した。その結果、Jurkat では H_2O_2 前処理に関わらず IkB α は分解されたが、YJ では H_2O_2 前処理により分解が抑制された (図 6C)。次に、NF κ B の核移行に対する効果をゲルシフトアッセイで観察した (図 6D)。TNF α 刺激によって現れた NF κ B のバンドは、 H_2O_2 で前処理することで消失し、酵素の阻害剤 (Resorcinol) で処理することにより再び現れた。以上のことより実際に刺激を受けた好酸球において TauBr が IkB α の分解を抑制し、NF κ B の核移行を阻害するというメカニズムが示唆された。

生理的ハロゲン濃度下における EPO による主な酸化生成物としては、HOBr の他に HOSCN が近年になって様々に報告されている。HOSCN は HOBr のようにタウリンと化合物を作るかは全く報告がない。そこで、今回新たに EPO/ H_2O_2 /SCN 系列による IkB α 酸化への影響を調べた。まず、HOSCN を合成しタウリンと反応させたが、反応は起こらなかった。そこで、HOSCN 自体が IkB α 酸化能をもつかどうかをウェスタンブロットで解析した。その結果、HOSCN は $750\mu\text{M}$ に至っても IkB α のバンドをシフトさせることはなかった。

血漿中の Br⁻ 濃度は $20\text{-}100\mu\text{M}$ であることが知られているが、細胞内の濃度は報告されていない。どの程度の TauBr が細胞内で生成されているかは明確ではないが、好酸球によって生合成された TauBr が IkB α を酸化することにより NF κ B の活性化を抑制していることが示唆された。TauBr は非常に高い細胞膜透過性を有しているため、細胞外で生成されたとき、周囲の細胞内に直ちに入り NF κ B 活性化を抑制することが可能である。

【結論】

TauBr の生物学的性質はこれまでにほとんど知られていない。本研究により、TauBr は IkB α の分解を抑制することにより、NF κ B の核移行と転写を抑制し、抗炎症効果を発揮するという抗炎症機構が初めて示された。これは TauCl と同様のプロセスであるが、TauCl が細胞膜をほとんど透過しないのに対し、TauBr は細胞膜透過性が高く、極めて低濃度で細胞内サイトへ到達できることが初めて明らかになった。MPO は好中球から自身の細胞内に放出される一方で、EPO は好酸球から自身の細胞内だけでなく細胞外にも放出される。喘息を含む様々なアレルギー疾患の炎症サイトにおいて、好酸球により細胞内外で生成された TauBr は、アレルギー反応に関わる NF κ B 依存性の様々なサイトカインの放出抑制を行うことが示唆された。さらに、細胞膜透過性の高い TauBr は、他の様々な細胞シグナル伝達経路をも制御している可能性がある。

【発表論文】

1) Saimi Tokunaga, Hideki Kato, Akihiko Kudo (2001)

Selective preparation of Monoclinic and Tetragonal BiVO_4 with Scheelite structure and their photocatalytic properties. *Chem. Mater.*, 13(12), 4624-4628.

2) Saimi Tokunaga, Atsuhiko Kanayama, Yusei Miyamoto (2007)

Modification of IkB α by taurine bromamine inhibits tumor necrosis factor α -induced NF- κ B activation. *Inflammation Research*, in press.