

## Original Article

# FMLPで誘導されるラット好中球の活性酸素産生 および細胞遊走におけるカルシウム-カルモジュ リンの役割

東 幸雄\*, 柏俣正典

朝日大学歯学部歯科薬理学講座

\*連絡先: 東 幸雄, 〒501-0296 岐阜県瑞穂市穂積 1851-1

Tel: 058-329-1432, Fax: 058-329-1432, e-mail: azuma@dent.asahi-u.ac.jp

*Roles of calcium-calmodulin in superoxide production and chemotaxis in FMLP-stimulated rat neutrophils*

In neutrophils, an intracellular calcium ion plays an important role in regulating cellular functions induced by chemoattractants. In this study, we have investigated the role of intracellular calcium and its effector molecule, calmodulin, in superoxide anion production and chemotaxis of rat neutrophils. N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP), one of the chemoattractants, is known to activate phospholipase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt via activation of its G protein-coupled membrane receptors. Inositol trisphosphate produced by both enzymes increases a release of calcium ion from the store. By inhibition of calcium release, the production of superoxide anion in neutrophils was abrogated, whereas the chemotaxis was unaffected. In contrast, both the superoxide anion production and the chemotaxis of neutrophils were suppressed by inhibition of influx of extracellular calcium ion. Inhibition of calmodulin using a calmodulin antagonist, W-7, attenuated FMLP-induced superoxide anion production and chemotaxis of neutrophils. W-7 also inhibited FMLP-induced Akt phosphorylation. Taken together, our data indicate that a critical role of calcium ion and calmodulin in superoxide anion production and chemotaxis of neutrophils, and suggested that FMLP-induced Akt activation may be mediated by calcium-calmodulin pathway in rat neutrophils.

Rec.3/29/2006, Acc.5/25/2006, pp460-466

Yukio Azuma\*, Masanori Kashimata

Department of Pharmacology, Asahi University School of Dentistry, Gifu, Japan

**Key words** calcium-calmodulin, neutrophils, signal transduction, superoxide production, chemotaxis

### はじめに

好中球は生体防御機構の最前線で、遊走、貪食、活性酸素産生、脱顆粒など状況に応じて様々な機能を発現する。通常、血流中に存在する好中球は感染や炎症によって生成する遊走因子 (chemoattractant) を感知し、因子に向かって遊走することで感染や炎症の局所に集積する。集積した好中球は微生物やその他の侵害因子に対して活性

酸素を産生し、顆粒中に存在する酵素を放出 (脱顆粒) して攻撃する。これらの攻撃因子が過剰に存在すると、宿主に対しても障害をもたらす。したがって、産生される活性酸素の量は厳密に調節されなければならない。遊走因子などの刺激は好中球内で生じる種々の細胞内情報伝達系 (シグナル) を介して調節されていると考えられている<sup>1)</sup>。

細菌由来の遊走因子N-formyl-methionyl-leucyl-phenylala-

nine (FMLP) が好中球のGタンパク質共役型受容体に結合すると、三量体Gタンパク質が活性化され、G $\beta\gamma$ 二量体サブユニットが遊離して phospholipase C (PLC) および phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の活性化が起こる<sup>2,4)</sup>。両酵素の活性化によって生成する inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>) は細胞内に貯蔵されている小胞体からのカルシウムの遊離と、細胞膜のカルシウムチャネルの活性化による細胞外カルシウムの流入を促す。その結果、細胞内遊離カルシウムイオン濃度が上昇して<sup>5,6)</sup>カルモジュリン (CaM) などのカルシウム結合タンパク質が活性化されることが知られている。CaMの活性化に伴ってCaM依存性リン酸化酵素の活性化も惹起される<sup>7)</sup>。主要なCaM依存性タンパク質リン酸化酵素には4種のアイソザイム (Ca-CaM dependent kinase I, II, III および IV) が存在し、さらにそれらの酵素をリン酸化して活性を増強するCa-CaM dependent kinase kinase (CaMKK) およびミオシン軽鎖リン酸化酵素が存在することも知られている。好中球にはCaMK I, CaMK II, CaMKK およびミオシン軽鎖リン酸化酵素が発現しており、中でもCaMKKの発現量が多いことが報告されている<sup>8)</sup>。近年、CaM拮抗薬のW-7の前処置によって、好中球の活性酸素産生、遊走などの機能発現が抑制されることが報告された<sup>8)</sup>。また、PI3Kによって生成するPI-3, 4, 5 P<sub>3</sub>に結合して膜に転移したAktがCaMKKによってリン酸化される。活性化したAktがNADPHoxidaseの細胞質サブユニットであるp47<sup>phox</sup>をリン酸化して膜に転移させる。p47<sup>phox</sup>は膜上のNADPHoxidaseサブユニットと結合して、活性型のNADPHoxidaseとなり活性酸素を生成するという報告もある<sup>9,10)</sup>。しかし、好中球の活性酸素産生と遊走に参与するシグナル伝達経路やCaM拮抗薬による機能抑制メカニズムについては明らかではない。今回、好中球の活性酸素産生および遊走能発現におけるCa-CaMを介するシグナル経路について検討を行った。

## 材料と方法

### 1) 実験材料

RPMI1640培地, Hank's balanced salt solution (HBSS) および Gey's balanced salt solution (Gey's BSS) はGibco Life Technologies社 (Grand Island, NY, USA) から購入した。LY294002, U73122, W-7はSigma社 (St. Louis, MO, USA), ML-7はCalbiochem社 (San Diego, CA, USA) のものを使用した。抗PI3Kp85抗体はUpstate Biotechnology社 (Lake Placid, NY, USA), 抗リン酸化PI3K p85抗体はSanta Cruz Biotechnology社 (Santa Cruz, CA, USA), 抗Akt抗体, 抗リン酸化Akt抗体はCell Signaling Biotechnology社 (Beverly, MA, USA) から購入した。これらの一次抗体はすべてラッ

ト抗原を認識するものを用いた。二次抗体の抗マウスIgG抗体と抗ウサギIgG抗体はVector社 (Burlingame, CA, USA) のものを用いた。

### 2) ラット好中球の調製

実験には体重250~300gのWistar系雄性ラットを用いた。ラットの腹腔内に6%カゼイン水溶液を体重100gあたり10ml投与して18時間放置した。クロロホルム麻酔下で腹腔液を採取し、腹腔液に混入した赤血球を取り除くため氷冷低張緩衝液 (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>3</sub> および 1 mM EDTA) に懸濁させて10秒間処理した後、遠心分離 (800×g, 10分) し、沈査をさらにphosphate buffered saline (PBS) で2回洗浄した。試料中の好中球を確認するため、浮遊液中に含まれる細胞をメイ・ギムザ染色法とトリパンブルー染色法にて染色し、その95%以上が好中球であること、また95%以上が生細胞であることをそれぞれ確認した。

### 3) 活性酸素産生の測定

好中球が産生するスーパーオキシドは、シトクロムC還元法で測定した<sup>11)</sup>。好中球浮遊液 (5×10<sup>6</sup> cells/ml, 10 mM HEPES および 4 mM NaHCO<sub>3</sub> 含有 HBSS に懸濁) にシトクロムC (最終濃度 1.2 mg/ml) と FMLP (最終濃度 1 μM) を加えて37°Cで5分間、インキュベーションを行った。反応を遠心分離 (250×g, 20秒) により停止し、上清中に含まれる還元シトクロムCの濃度を540 nm および 550 nm の吸光度を測定することで求めた。スーパーオキシドによって生成された還元シトクロムC量を正確に求めるため、反応液に45 unitsのスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を添加して同様に測定した陰性対照値を差し引いた値をシトクロムC産生量とした。活性酸素産生量の変動は対照群に対する%で表示した。一部の実験では、細胞浮遊液中のカルシウムの影響を検討するため、カルシウムを含まないHBSSに2mM EGTAを加えて同様の実験を行った。

### 4) 遊走能の測定

好中球の遊走能は、96穴マイクロケモタキシスチャンバー (Neuro Probe, Cabin John, MD, USA) を用いて、Boyden法<sup>12)</sup>の変法により測定した。チャンバー下室にはFMLPと各種阻害薬を含有したGey's BSSを、ポリカーボネート膜 (Neuro Probe, Cabin John, MD, USA) で仕切られた上室には1%BSAと阻害薬含有のGey's BSSに浮遊した好中球 (2×10<sup>6</sup> cells/ml) を満たして37°Cで60分間のインキュベーションを行った。反応後、膜を取り外し、膜表面の細胞を剥がして取り除いた後、膜裏側まで遊走した細胞をDiff-Quic (国際試薬, 神戸) で固定染色した。遊走した細胞数は染色された膜の吸光度 (655 nm) をマイクロプレートリー

ダーで測定することにより求めた。好中球遊走能は、チャンパー下室にFMLPのみを加えた陽性対照からチャンパー下室に緩衝液のみを加えた陰性対照を差し引いた値を100 (最大遊走量) とし、この値に対する%で表示した。一部の実験では、細胞浮遊液中のカルシウムの影響を検討するため、カルシウムを含まない Gey's BSS に 2 mM EGTA を加えて同様の実験を行った。

### 5) 好中球の活性化と細胞成分分析法

好中球浮遊液 ( $5 \times 10^7$  cells/ml, RPMI 1640 に懸濁) に、各種阻害薬を加えて 37°C で 30 分間プレインキュベーションした後、FMLP (1  $\mu$ M または 10 nM) を加えて、さらに反応を行った。一定時間の後、好中球浮遊液を氷冷して反応を停止し、遠心分離 (800  $\times$  g, 10 分) によって細胞を集めた。好中球に 100  $\mu$ l の 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.0), 0.34 M ショ糖, 1 mM PMSF, 1 mM EGTA, 10 mM benzamidine, 10  $\mu$ g/ml leupeptin および 10  $\mu$ g/ml antipain 含有を加えてポリトロンホモジナイザーによりホモジネートを作製した。ホモジネートを 12,000  $\times$  g, 10 分間遠心分離し、上清をさらに 105,000  $\times$  g, 60 分間遠心分離した。得られた上清を細胞質画分として実験に使用した。また、沈殿に 50  $\mu$ l の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5), 1% Triton X-100, 1mM PMSF, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 25mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0.2 mM sodium orthovanadate, 10  $\mu$ g/ml leupeptin および 1  $\mu$ g/ml aprotinin 含有を加えて溶解し、さらに 12,000  $\times$  g, 30 分の遠心分離を行って上清を細胞膜画分とした。それぞれの画分のタンパク質量はプロテインアッセイキット (BioRad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。

### 6) ウェスタンブロット法

一定量のタンパク質 (50  $\mu$ g) を含む細胞質画分と細胞膜画分に等量の 2 $\times$ SDS-sample buffer (1.0 M Tris-HCl pH 6.8, 4% 2-mercaptoethanol, 2% SDS, 20% glycerol および 0.05% bromophenol blue) を加え、100°C で 5 分間処理した。処理後、各試料を 10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。泳動されたタンパク質はポリビニルピロリデンジフルオリド (PVDF) 膜に転写後、特異的抗体を用いたペルオキシダーゼ/NBT/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いて発色した。

### 7) 統計処理

統計処理は Student's *t*-test を用いて行った。p 値が 0.05 以下を有意差ありとした。実験結果は平均  $\pm$  標準誤差で表示した。

## 結果

ラット腹腔好中球を FMLP で刺激すると活性酸素産生と遊走が誘導される。図 1 には、種々濃度の FMLP でラットの好中球を刺激した場合の遊走能の変化を示した。好中

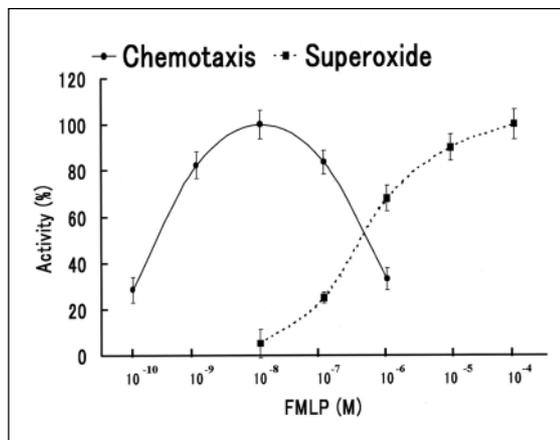


図1 FMLP刺激によるラット好中球の遊走および活性酸素産生の用量反応曲線

遊走能は、Boyden 法の変法で測定した。活性酸素は、チトクロム C 還元法で測定した。遊走能は至適濃度である 10 nM の値を 100% とし、活性酸素産生は、今回実験に用いた濃度範囲で最大の産生量を示した 100  $\mu$ M の値を 100% として表示した。平均  $\pm$  標準誤差 (n=5)

球の遊走は 0.1 nM 以上の FMLP 濃度で見られ、10 nM で最大となることが分かった。また、10 nM FMLP 以上濃度ではむしろ遊走能は低下した (図 1)。一方、FMLP で刺激したラット好中球の活性酸素産生量における用量-反応曲線を図 1 に示した。100 nM 以上の FMLP で有意な活性酸素の増加が認められ、1  $\mu$ M まで用量に依存して増加することが分かった。したがって、以下の実験では遊走活性の至適濃度である 10 nM FMLP で刺激した場合と活性酸素産生の増加が認められる 1  $\mu$ M FMLP で刺激した場合の細胞内情報伝達経路について検討した。

図 2A にはカルシウムを含まない HBSS あるいは Gey's BSS に浮遊させた好中球液に、EGTA を添加した場合の FMLP 刺激による活性酸素産生と遊走活性について調べた結果を示した。細胞外液中のカルシウムを除去すると、FMLP による活性酸素産生および遊走はともに有意に抑制した (図 2A)。また、小胞体からの貯蔵カルシウムの遊離を特異的に阻害することが知られている TMB-8 を反応系に添加した場合、FMLP で誘導される活性酸素産生量は有意に抑制された。しかし、遊走活性にはほとんど影響を及ぼさなかった (図 2A)。細胞外液中のカルシウムを除去した好中球に TMB-8 を処置して FMLP で刺激すると活性酸素産生はほとんど認められなくなった。遊走は、同条件で TMB-8 の処置と未処置の場合で違いは認められなかった (図 2A)。

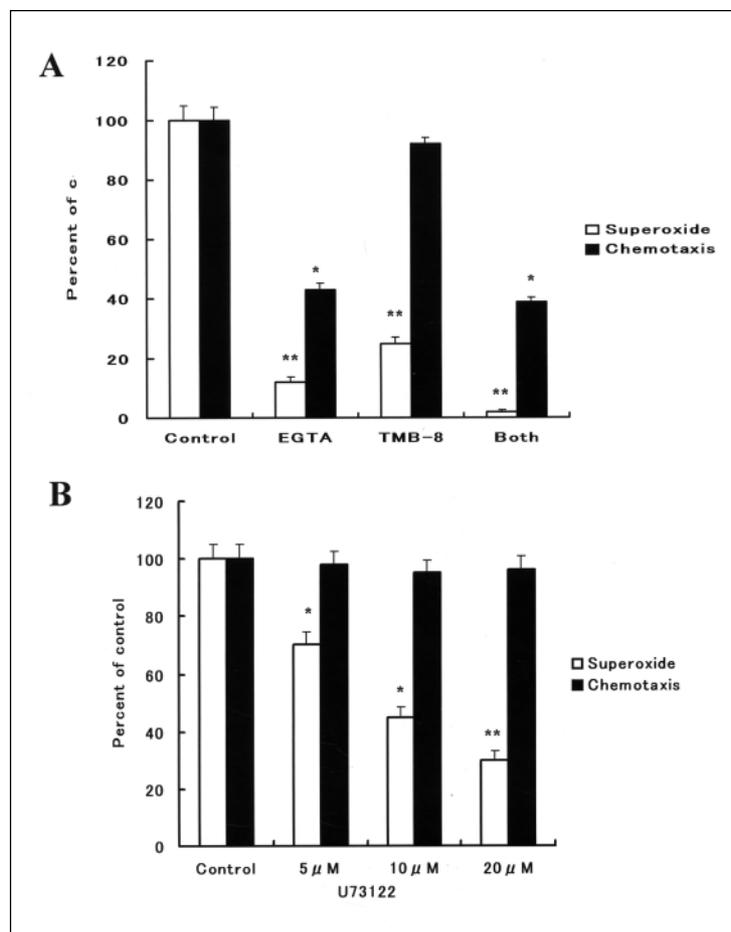


図2 FMLP刺激によるラット好中球の遊走および活性酸素産生に及ぼすカルシウムイオンおよびホスホリパーゼCの影響

10 nM FMLP 刺激による遊走および 1 μM FMLP 刺激による活性酸素産生に及ぼす各種薬剤の影響を検討した。

A: 外液中のカルシウムを除き、2 mM の EGTA を添加した培養液を使用 (EGTA) 細胞内カルシウム拮抗薬 TMB-8 (100 μM) および両者を併用 (Both)。

B: ホスホリパーゼ C 阻害薬 U73122 の影響。

平均土標準誤差 (n = 5)

\*p < 0.05 および \*\*p < 0.01 はそれぞれの対照群 (control) に対する危険率を示す。

また、結果としては示さないが、細胞内カルシウムキレート剤である BAPTA/AM を取り込ませた好中球を FMLP で刺激すると、TMB-8 の場合と同様、活性酸素産生は有意に抑制されたが遊走には影響を及ぼさないことが分かった。さらに細胞外液中のカルシウムを除いて EGTA を添加した条件下で、BAPTA/AM で前処置した場合、活性酸素産生はほぼ完全に抑制されたが、遊走は、同条件で BAPTA/AM の処置と未処置の場合で違いは認められなかった。

細胞内の PLC の活性化によって IP<sub>3</sub> が産生されると、小胞体からのカルシウムの遊離が起こることが知られてい

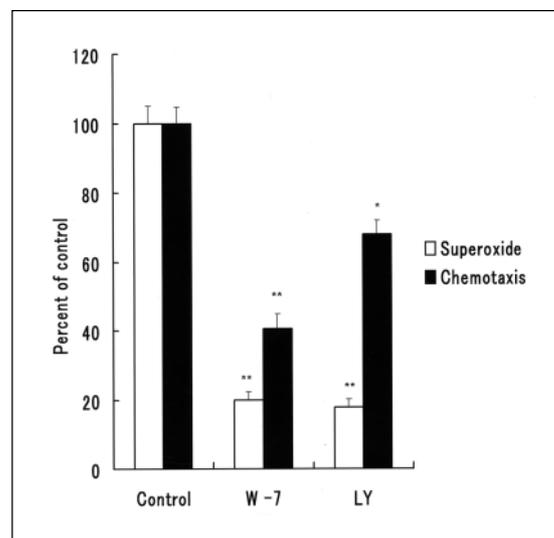


図3 FMLP刺激によるラット好中球の遊走および活性酸素産生に及ぼす W-7 および LY294002 の影響

カルモジュリン拮抗薬 W-7 (50 μM)、PI3K 阻害薬 LY294002 (20 μM)、平均土標準誤差 (n = 5)

\*p < 0.05 および \*\*p < 0.01 はそれぞれの対照群 (control) に対する危険率を示す。

る。そこで好中球の活性酸素の産生と遊走に及ぼす PLC 阻害薬 U73122 の影響について検討した。その結果、U73122 の前処置によって好中球の活性酸素産生は有意に抑制されたが遊走は影響を受けないことが分かった (図 2B)。したがって、FMLP 刺激直後に見られる細胞内貯蔵カルシウム遊離による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は活性酸素産生には関与するが遊走には関与しないと考えられた。また、細胞外からのカルシウムの細胞内への流入に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は活性酸素産生および遊走に関与することが示唆された。

細胞内カルシウムイオン濃度上昇に伴って活性化される

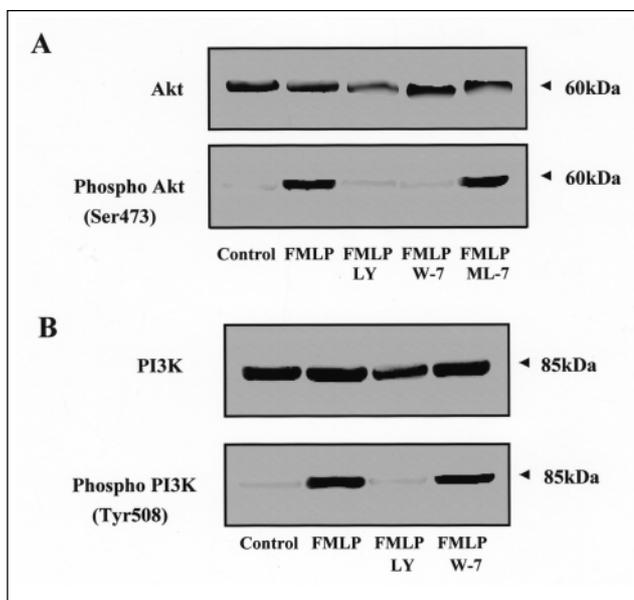


図4 FMLP刺激によるラット好中球のAktおよびPI3Kのリン酸化に及ぼす阻害薬の影響

ウエスタンブロット法とAkt, リン酸化Akt, PI3kおよびリン酸化PI3Kに対する特異抗体を用いて検討した。

A: カルモジュリン拮抗薬W-7(50  $\mu$ M), PI3K阻害薬LY294002(20  $\mu$ M), ミオシン軽鎖リン酸化酵素阻害薬ML-7(50  $\mu$ M). B: カルモジュリン拮抗薬W-7(50  $\mu$ M), PI3K阻害薬LY294002(20  $\mu$ M).

カルシウム結合タンパク質CaMの役割を阻害薬W-7を用いて検討した。図3にはW-7の存在下でFMLP刺激した好中球の活性酸素産生と遊走活性を示した。その結果、W-7はFMLPによる活性酸素産生と遊走を有意に抑制することが分かった。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇により、CaMが活性化すると、さらに種々のCaM依存性タンパク質リン酸化酵素の活性化が起こる。CaMKKは好中球に多量に発現しており、CaMKだけでなくprotein kinase B (Akt)のリン酸化を促進させることが報告されている<sup>13)</sup>。Aktの活性化の機構にCaMKKが如何なる関与をしているかを検討するため、PI3Kの阻害薬であるLY294002の影響についても検討を行った(図3)。LY294002の添加により、FMLPによる活性酸素の産生と遊走はともに抑制された。したがって、好中球の活性酸素の産生と遊走を制御するシグナルには少なくともCa-CaMを介する経路とPI3K-Aktを介する経路が関与していると考えられた。

LY294002, W-7あるいはML-7を前処置後、FMLPで刺激した好中球のタンパク質抽出液をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロット法を用いて解析

した。図4Aには、その結果を示した。FMLPは好中球のAktリン酸化を促進することが分かった。また、Aktのリン酸化は、W-7およびPI3K阻害薬LY294002で抑制されたが、ミオシン軽鎖リン酸化酵素阻害薬であるML-7では影響を受けなかった(図4A)。したがって、Aktのリン酸化(活性化)には、PI3K-PI-3, 4, 5 P<sub>3</sub>によるAktの膜への移行とCaMKKによるリン酸化の2つの反応が必要であることが示唆された。図4Bには、リン酸化PI3Kの検出を行った結果を示した。FMLP刺激により、PI3Kリン酸化の増加が認められた。LY294002は明らかにPI3Kリン酸化を抑制したが、W-7はほとんど影響を及ぼさないことが分かった。これらの結果から、PI3Kの下流にCa-CaMが存在し、Aktの活性化を介して活性酸素の産生を制御していることが示唆された。

## 考 察

FMLP, IL-8, LTB4およびC5aなどの遊走因子が好中球細胞膜のGタンパク質共役型の受容体に結合すると、様々なシグナルを活性化し、生物活性を発現することが知られている。受容体が活性化すると、Gタンパク質から遊離したG $\beta\gamma$ サブユニットと結合してPLC $\beta$ が活性化し<sup>2)</sup>、同様に、G $\beta\gamma$ サブユニットとの結合を介してPI3K $\gamma$ が活性化することが知られている<sup>3,4)</sup>。活性化したPLC $\beta$ とPI3K $\gamma$ はともにIP<sub>3</sub>の生成を亢進させ、その結果、細胞内貯蔵部位からカルシウムの遊離を促し細胞内遊離カルシウムイオン濃度を上昇させる<sup>5,6)</sup>。受容体活性化に伴い細胞膜のカルシウムチャンネルを介して細胞外のカルシウムの流入による細胞内カルシウムイオン濃度の持続的な上昇が生じることが知られている<sup>5,6)</sup>。細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を抑制すると遊走因子によって誘導される好中球の活性酸素産生や遊走などの好中球の機能が阻害される。したがって、カルシウムは好中球機能発現のセカンドメッセンジャーの一つと考えられているが、このシグナル伝達経路の詳細については不明な点が多い。

本実験では、カゼインで誘導したラット腹腔好中球を用いて、FMLPで誘導される活性酸素産生と遊走におけるカルシウムを介するシグナル経路について検討した。細胞内貯蔵カルシウムの遊離を阻害するTMB-8で前処置すると、活性酸素産生は有意に抑制されたが遊走は影響を受けなかった。また、結果には示さないがBAPTA/AM(細胞内カルシウムキレート剤)で処置した場合も同様に活性酸素産生は有意に抑制されたが遊走は影響を受けなかった。これらの結果から、細胞内貯蔵カルシウムの遊離に伴う細胞内遊離カルシウムイオン濃度の上昇は、活性酸素の産生には関与するが、遊走の発現には関与しないことが示

唆された。さらに、PLC活性化によって増加するIP<sub>3</sub>の産生をPLC阻害薬U73122で抑制すると好中球の活性酸素産生は有意に抑制されたが遊走には影響を及ぼさなかった。この結果から、FMLP刺激によって生じる細胞内貯蔵部位からのカルシウムの遊離は、IP<sub>3</sub>の作用によるものであることが示唆された。したがって、細胞内貯蔵部位からのカルシウムの遊離に伴う細胞内遊離カルシウムイオン濃度の上昇は活性酸素産生系には関与するが、遊走活性には関与していないものと考えられた。

一方、細胞外液中のカルシウムを除去してFMLPで刺激した場合、活性酸素産生および遊走がともに抑制された。細胞外液中のカルシウムを除去した好中球にTMB-8を処置してFMLPで刺激すると活性酸素産生はほとんど認められなくなった。遊走は、同条件でTMB-8の処置と未処置の場合で違いは認められなかった。これらの結果から、FMLP刺激によるIP<sub>3</sub>の産生亢進と細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は活性酸素産生には関与するが遊走には関与しないこと、細胞外からのカルシウムの細胞内への流入に伴う細胞内カルシウムイオン濃度の上昇は活性酸素産生と遊走の両方に関与することが示唆された。

細胞内カルシウムイオン濃度上昇に伴って活性化されるカルシウム結合タンパク質CaMの機能について検討した。CaMは不活性の状態で細胞質に存在し、カルシウムイオン濃度の上昇に伴ってその4カ所の結合部位にカルシウムが結合して活性化する。活性化したCaMはCaM依存性のタンパク質リン酸化酵素に結合してその酵素を活性化させる<sup>7)</sup>。CaMの特異的阻害薬であるW-7で前処理した好中球をFMLPで刺激したところ、ラット好中球の活性酸素産生および遊走をともに抑制した。したがって、CaM依存性タンパク質リン酸化酵素が活性酸素産生および遊走の発現に関与していることが示唆された。

FMLPが受容体と結合すると種々のシグナル分子の活性化を介して、PI3Kが活性化してPI-3, 4, 5 P<sub>3</sub>の産生が亢進する。PI-3, 4, 5 P<sub>3</sub>はAktの膜への転移を誘導し<sup>14)</sup>、好中球に多量に発現しているCaMKKがAktをリン酸化する<sup>15)</sup>。リン酸化Aktは、NADPHoxidaseのサブユニットであるp47phoxをリン酸化し、NADPHoxidaseを活性化を介して活性酸素の産生を促進することが報告されている<sup>9,10)</sup>。

ウエスタンブロット解析により、ラット好中球のAktリン酸化はFMLPの刺激によって促進するが、リン酸化反応はW-7 (CaM拮抗薬)あるいはLY294002 (PI3K阻害薬)によって抑制されることが分かった。また、PI3Kリン酸化は、LY294002で抑制されたが、W-7では影響を受けなかった。したがって、CaMKKはPI3Kの下流に存在しており、PI-3, 4, 5 P<sub>3</sub>によって転移したAktをリン酸化 (活性化)

すること、さらに、Aktが活性酸素産生系のシグナル分子として機能している可能性が示唆された。しかし、好中球の活性酸素産生におけるシグナル伝達系では、PI3K-Aktの関与する割合は少なく、PI3K-PKCが主要な役割を果たしているという報告<sup>16)</sup>もあることから、さらに詳細な検討が必要であると考えられる。

また、CaM依存性タンパク質リン酸化酵素の一つであるミオシン軽鎖リン酸化酵素によるミオシンII軽鎖のリン酸化が好中球の遊走能発現に必要であることが知られており<sup>16)</sup>、本実験でのW-7による遊走抑制作用はミオシン軽鎖リン酸化酵素の活性化阻害を介して発現している可能性が示唆された。ミオシン軽鎖リン酸化酵素阻害薬ML-7 (50 μM)の前処置で、FMLP刺激によるラット好中球の遊走を62%、活性酸素産生を82%抑制することを確認している (未発表データ)。一方、多核白血球に特異的に発現するCaM依存性のタンパク質リン酸化酵素としてCaMK I-like kinase (CKLiK)が発見され<sup>17)</sup>、好中球の機能発現に関与することも報告されている<sup>18)</sup>。今後、CaMKKおよびMLCKとCKLiKとの関連について検討が必要であると考えられる。

## 文 献

- 1) Bokoch GM: Chemoattractant Signaling and Leukocyte Activation. *Blood*, 86: 1649-1660, 1995.
- 2) Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D: Roles of PLC-β2 and β3 and PI3K γ in Chemoattractant-Mediated Signal Transduction. *Science*, 287: 1046-1049, 2000.
- 3) Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Piroola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann M: Central Role for G Protein-Coupled Phosphoinositide 3-Kinase γ in Inflammation. *Science*, 287: 1049-1053, 2000.
- 4) Bae YS, Cantley LG, Chen C-S, Kim S-R, Kwon K-S, Rhee SG: Activation of Phospholipase C-γ by Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate. *J Biol Chem*, 273: 4465-4469, 1998.
- 5) Korchak HM, Rutherford LE, Weissmann G: Stimulus Response Coupling in the Human Neutrophil. I. Kinetic analysis of changes in calcium permeability. *J Biol Chem*, 259: 4070-4075, 1984.
- 6) Korchak HM, Vienne K, Rutherford LE, Wilkenfeld C, Finkelstein MC, Weissmann G: Stimulus Response Coupling in the Human Neutrophil. II. Temporal analysis of changes in cytosolic calcium and calcium efflux. *J Biol Chem*, 259: 4076-4082, 1984.

- 7) Hook SS, Means AR: Ca<sup>2+</sup>/CaM-Dependent Kinases: From Activation to Function. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 41: 471-505, 2001.
- 8) Verploegen S, van Leeuwen CM, van Deutekom HWM, Lammers J-WJ, Koenderman L, Coffe PJ: Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin regulated signaling pathways in chemoattractant induced neutrophil effector functions. Comparison with the role of phosphatidylinositol-3 kinase. *Eur J Biochem*, 269: 4625-4634, 2002.
- 9) Chen Q, Powell DW, Rane MJ, Singh S, Butt W, Klirin JB, McLeish KR: Akt Phosphorylates p47<sup>phox</sup> and Mediates Respiratory Burst Activity in Human Neutrophils. *J Immunol*, 170: 5302-5308, 2003.
- 10) Hoyal CR, Gutierrez A, Young BM, Catz SD, Lin J-H, Tschlis PN, Babior BM: Modulation of p47<sup>phox</sup> activity by site-specific phosphorylation: Akt-dependent activation of the NADPH oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 5130-5135, 2003.
- 11) McCord JM, Fridovich I: Superoxide Dismutase. *J Biol Chem*, 244: 6049-6055, 1969.
- 12) Boyden S: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*, 115, 453-466, 1962.
- 13) Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR: Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature*, 396: 584-587, 1998.
- 14) James SR, Downes CP, Gigg R, Grove SJA, Holmes AB, Alessi DR: Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J*, 315: 709-713, 1996.
- 15) Yamamori T, Inanami O, Nagahata H, Kuwabara M: Phosphoinositide 3-kinase regulates the phosphorylation of NADPH oxidase component p47<sup>phox</sup> by controlling cPKC/PKC  $\delta$  but not Akt. *Biochem Biophys Res Commun*, 316: 720-730, 2004.
- 16) Eddy RJ, Pierini LM, Matsumura F, Maxfield FR: Ca<sup>2+</sup>-dependent myosin II activation is required for uropod retraction during neutrophil migration. *J Cell Sci*, 113: 1287-1298, 2000.
- 17) Verploegen S, Lammers JW, Koenderman L, Coffe PJ: Identification and characterization of CKLiK, a novel granulocyte Ca<sup>++</sup>/calmodulin-dependent kinase. *Blood*, 96: 3215-3223, 2000.
- 18) Verploegen S, Ulfman L, van Deutekom HW, van Aalst C, Honing H, Lammers JW, Koenderman L, Coffe PJ: Characterization of the role of CaMK I-like kinase (CKLiK) in human granulocyte function. *Blood*, 106: 1076-1083, 2005.