

ヒト末梢血好中球のスーパーオキサイド生成機構： そのプライミング，刺激物，リン酸化酵素特異性

秋丸 国広*・秋丸 陽子*・佐藤 英介*・枝重 圭祐**・高橋 正彦***
谷村 昌信****・小渕 浩嗣*・小林 純郎*****・吉岡 保*****・内海 耕隼*

(高知医科大学医学部 *生物学教室, **附属動物実験施設, ***神経精神医学教室,
****泌尿器科学教室・*****新居浜基礎医学研究所・*****倉敷成人病センター)

Mechanism of Superoxide Generation in Human Peripheral Neutrophils : Its Priming, Stimulation, and Protein Kinase Specificities

Kunihiro AKIMARU*, Yoko AKIMARU*, Eisuke F. SATO*, Keisuke EDASHIGE**,
Masahiko TAKAHASHI***, Masanobu TANIMURA****, Hirotsugu KOBUCHI*,
Sumio KOBAYASHI*****, Tamotsu YOSHIOKA*****, and Kozo UTSUMI*

*Department of Medical Biology, **Institute for Laboratory Animals, ***Department of Neuropsychiatry, and ****
Department of Urology, Kochi Medical School, Nankoku-shi, Kochi 783, Japan ; *****Niihama Medical Institute,
Niihama-shi, Ehime 792, Japan ; and *****Center for Adult Diseases, Kurashiki, Kurashiki-shi, Okayama 710, Japan

Abstract. Healthy human peripheral neutrophils (HPPMN) are not primed, and have weak responses to stimuli which activate HPPMN through their membrane receptors. Recombinant human tumor necrosis factor- α (rHuTNF) and recombinant granulocyte colony stimulation factor (rG-CSF) primed HPPMN. Superoxide (O_2^-) generation by formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) or opsonized zymosan (OZ) was enhanced by these primers. However, O_2^- generation induced by phorbol myristate acetate (PMA) or dioctanoylglycerol (DOG) was not enhanced by the primers. Receptor mediated O_2^- generation in rHuTNF primed neutrophils was inhibited by the genistein or alpha-cyano-3-ethoxy-4-hydroxy-5-phenylthiomethylcin-namamide (ST 638), inhibitors of tyrosine kinase (TK). But it was enhanced by 1-(5-isoquinoline sulfonyl)-3-methyl-piperazine (H-7) or staurosporine, inhibitors of Ca^{++} - and phospholipid-dependent protein kinase (PKC), in their concentration dependent manner. On the contrary, O_2^- generation of HPPMN at higher concentration of PMA or DOG was rather stimulated by genistein or ST 638 and was inhibited by H-7 or staurosporine.

These results suggest that protein kinases participates in the NADPH-oxidase activation of neutrophils and that two pathways exist in the NADPH-oxidase activation: one in PMA- or

DOG-stimulated PKC-dependent pathway and the other in FMLP-stimulated TK-dependent pathway. Moreover, it suggests that TK might be involved in the reaction of neutrophil priming with various ligands.

緒言

好中球は、微生物などの外的侵入物に対し防衛反応の最前線に立ち、免疫反応において極めて重要な機能を担っている。一般に、生体内の末梢血に存在する好中球は種々の刺激物、特に受容体を介した刺激に対する応答反応は弱く、生体内で生成される tumor necrosis factor- α (TNF- α) や granulocyte colony stimulation factor (G-CSF), バクテリアの lipopolysaccharide (LPS) などによって応答反応が促進される。この現象は priming と呼ばれ¹⁻³⁾, 末梢血の好中球は言わば「眠っている」状態で, primer と呼ばれる物質によって「目を覚まされた」状態になると考えられる。この priming 反応は現在多くの研究者によって解析されているが, その機構はなお明らかでない。一度 priming を受けた好中球は, 刺激物に応答した様々な反応の促進が示される。例えば, スーパーオキシド (O_2^-) 生成⁴⁾, 血管内皮細胞への吸着⁵⁾ (この反応は, 生体内においては好中球が血管から作用部位へ移動するための最も初期の反応として要求される), 細胞運動⁶⁾, 細胞内リソソーム酵素の遊出⁷⁾, 殺細胞作用⁸⁾等々, 化学的反應のみならず, 形態的变化も伴う激しい変化が誘導される。これらの応答反応の中で, O_2^- 生成反応は O_2 burst と呼ばれ, 急激な O_2 消費の促進が示される。これは急激な hexose monophosphate shunt 活性の増大で生成される NADPH を NADPH-oxidase (flavin, cytochrome b_{558} , C_oQ などよりなる酵素複合体) と呼ばれる細胞膜結合酵素系の活性化により酸化し, それによって酸素が 1 電子還元され, O_2^- を生成する反応であり, 従ってこの反応は, O_2^- 生成に続く殺菌作用をはじめ酸素毒性の原因となる種々の活性酸素形成の初期反応である⁹⁾。このようなことから好中球の機能の中でも NADPH-oxidase の活性化が最も注目され, その活性化機構の解析のため多くの研究が行われて来た。そして, C-キナーゼに特異的に結合してその酵素の活性化をするホルボールエステル的一种 phorbol myristate acetate (PMA) が好中球 O_2^- 生成を促進する作用のあることから, この反応系への C-キナーゼの関与が考えられた¹⁰⁾。事実, PMA 刺激による O_2^- 生成は C-キナーゼの阻害剤である 1-(5-iso-quinolinesulfonyl)-3-methyl-piperazine (H-7)¹¹⁾ や staurosporine¹²⁾ により阻害され, C-キナーゼ活性化の O_2^- 生成への関与は極めて高いと考えられている。また慢性多発性肉芽腫 (CGD) 患者の好中球の研究から, この NADPH-oxidase 反応には細胞質の 47kDa タンパク質 (p47 phox) が関与し, このタンパク質の欠損が O_2^- 生成機能欠損の原因となり, また疾患の原因と成っている事が明らかにされた¹³⁾。そして, このタンパクの全アミノ酸配列も決定され¹⁴⁾, 最近の研究で, このタンパク質が O_2^- 生成に関与するためには細胞膜結合酵素の NADPH-oxidase に会合しなければならないことも明らかに

された¹⁵⁾。さらにそのためにはこのタンパク質のリン酸化(6ヶのリン酸化部位を持つ)が必要で、C-キナーゼはそのリン酸化に関与すると示唆されている¹⁶⁾。しかし、formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) 等の受容体を介するシグナル伝達反応による NADPH-oxidase の活性化は、C-キナーゼ阻害剤での反応阻害が弱く、C-キナーゼの関与しない他のキナーゼに依存した活性化機構の存在も示唆されている。中でも近年注目されているのが tyrosine kinase (TK) の関与である。TK は発癌ウイルス遺伝子の産物にしばしば見られるのをはじめ¹⁷⁾、細胞増殖とも深く関わり¹⁸⁾、その研究の発展は著しい。好中球の受容体刺激に依存した O₂ 生成はこの TK を特異的に阻害する genistein や alpha-cyano-3-ethoxy-4-hydroxy-5-phenylthiomethylcinnamamide (ST 638) によって強く阻害され¹⁹⁾、この反応機構への TK の関与が強く示唆されている。

このような観点から、本研究ではヒト末梢血好中球 (HPPMN) の recombinant TNF- α (rHuTNF) や recombinant G-CSF (rG-CSF) による priming 作用と、刺激応答性 O₂ 生成機構におけるタンパク質リン酸化の関与について解析し、この活性化機構には少なくとも二つのリン酸化反応、すなわち C-キナーゼと TK が関与し、それぞれ C-キナーゼ活性化に依存した反応と刺激物受容体に依存した反応に関与していることについて報告する。

材料と方法

試薬：Ferricytochrome c (Cyt. c), FMLP, PMA, Zymosan はシグマ社の、H-7 は生化学工業の、dioctanoylglycerol (DOG) はフナコシ社のものを使用した。rHuTNF は林原生化学研究所により恵与された物を、rG-CSF は中外製薬より恵与されたものを、ST 638 は鐘ヶ淵化学工業白石忠義博士より恵与されたものを、それぞれ使用した。その他の試薬はナカライテスク社の特級を使用した。なお genistein²⁰⁾ と ST 638¹⁹⁾ は dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解して使用し、添加 DMSO の終末濃度が 0.5% を越えないようにした。rHuTNF と rG-CSF は 0.5 mg/ml BSA を含む 2 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した標品を使用した。

好中球：好中球は HPPMN とモルモット腹腔内好中球 (GPtPMN) を使用した²¹⁾。HPPMN は健康な成人男性より採取し、Flow Laboratories 社の Mono-poly resolving medium を用いた Ficoll-Hypaque 密度勾配遠心法を行った後、Ca⁺⁺-free Krebs-Ringer-phosphate (KRP) にて 2 回洗浄して実験に供した²²⁾。GPtPMN は 2% の nutrose (0.9% NaCl を含むトリス緩衝液, pH 7.4 水溶液) を、モルモット腹腔内に体重の約 1/10 量注入し、16 時間後に腹腔液を採取して Ca⁺⁺-free KRP にて洗浄し、実験に供した⁹⁾。

刺激物：好中球の刺激物は、受容体を介する物質として FMLP とオプソニン化チモーザン (OZ) を使用し、C-キナーゼ活性化を介する物質として PMA と DOG を使用した。

好中球の priming：HPPMN の priming は、種々の濃度の rHuTNF と rG-CSF を 37°C にて種々の時間 preincubate し行った。

O_2^- の測定： O_2^- の測定は、Cyt. cの還元による $A_{550-540}$ の吸光度変化を $37^\circ C$ にて反応液を攪拌しながら、島津二波長分光光度計 (UV-300) により連続的に測定した^{9,23)}。

結果と考察

1. HPPMNにおける種々刺激物による O_2^- 生成のrHuTNFによる促進と刺激物特異性ならびに濃度依存性：rHuTNFはHPPMNの刺激物依存性 O_2^- を濃度依存的に促進する。勿論このときrHuTNFの処理時間に依存し、20分間処理までは時間依存的に促進し30分で最高促進値を示すが、それ以上の処理では反って低下する傾向にあった。今、種々の濃度のrHuTNFで10分間処理した後、低濃度FMLP刺激(1.25×10^{-8} M)による O_2^- 生成を測定し、rHuTNFの

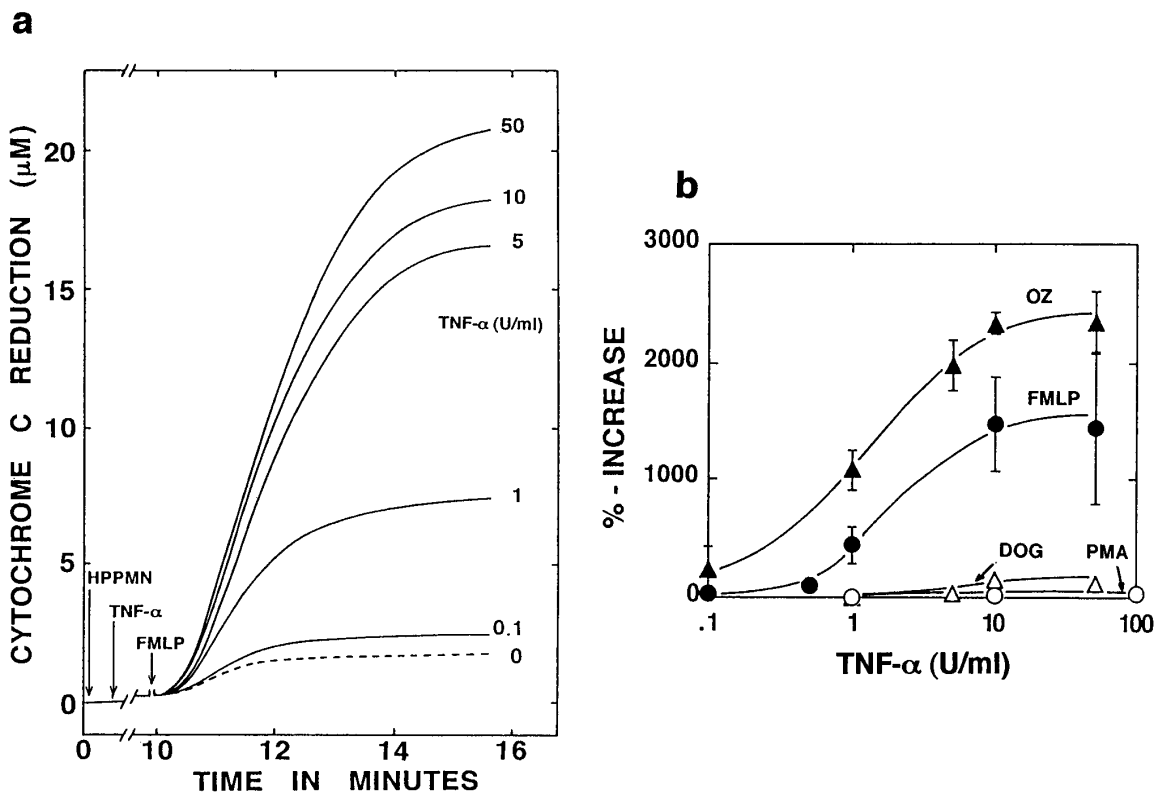


Fig.1. Effect of rHuTNF on the stimulus-dependent O_2^- generation in HPPMN
 HPPMN (1×10^6 cells/ml) were incubated in the KRP (pH 7.4) containing 1 mM $CaCl_2$, 20 μ M Cyt. c, and 10 mM glucose at $37^\circ C$. The reaction was started in the presence or absence of various reagents, and changes in absorbance at 550–540 nm were monitored by a dual beam spectrophotometer (Shimadzu UV-300). O_2^- generation was calculated from Cyt. c reduction using extinction coefficient of 21.0 mM^{-1} . Concentrations of FMLP, OZ, PMA, and DOG were 1.25×10^{-8} M, 200 μ g/ml, 1×10^{-9} M, and 5×10^{-7} M, respectively.

a, shows the enhancement by rHuTNF of FMLP-stimulated O_2^- generation

b, shows the dose dependent curves of rHuTNF

濃度依存性を求めてみると Fig. 1a のようであり、10 U/ml rHuTNF ではほぼ最高の促進が観察された。このような rHuTNF の促進作用を他の刺激物について測定してみると Fig. 1b のように、受容体を介する NADPH-oxidase の活性化に対しては強い促進作用が認められるが、C-キナーゼ活性化作用のある PMA や DOG 刺激に対してはその促進作用は極めて小さかった。すなわち、rHuTNF の priming 作用は刺激物特異的で、特に受容体を介した O_2^- 生成に対して強いことが明らかである。高濃度 (100 U/ml) あるいは長時間 (1 時間以上) の rHuTNF 処理によって、HPPMN では他の刺激物による処理なしに O_2^- 生成がみられるが、生体内ではそのような高濃度条件は存在せず、rHuTNF の好中球への作用としては priming 作用が重要と考えられる。

2. 種々刺激物による HPPMN の O_2^- 生成に対する rG-CSF による priming 効果 : rG-CSF も rHuTNF 同様、HPPMN に対して priming 作用のあることは良く知られた事実で、Fig. 2a に示すように HPPMN の FMLP 刺激による O_2^- 生成は rG-CSF の濃度に依存した促進を示し、50 ng/ml でほぼ最高値に達した。勿論この rG-CSF による priming も処理時間に依存し、

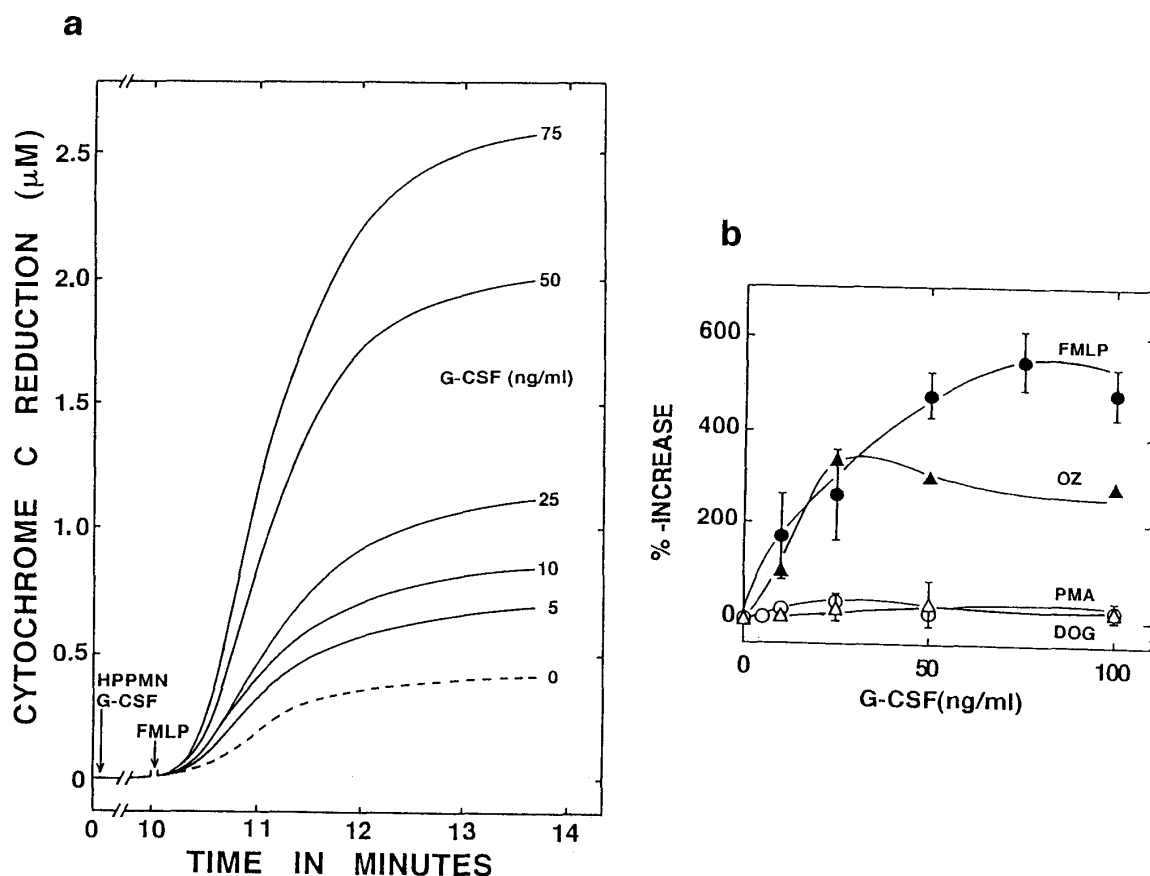


Fig.2. Enhancement by rG-CSF of stimulation-dependent O_2^- generation in HPPMN
Experimental conditions were the same as described in Fig. 1. rG-CSF was dissolved in phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.5 mg/ml BSA.

10分間の処理で最高値が示された。

またこの rG-CSF の priming 効果も好中球の刺激物によって著しく異なり, rHuTNF と同様に FMLP や OZ 等の受容体を介した O_2^- 生成に対し強い促進作用を示し, C-キナーゼ活性化作用のある PMA や DOG 刺激による O_2^- 生成に対してはほとんど促進作用が認められなかった (Fig. 2b)。

3. タンパク質リン酸化酵素阻害剤による rHuTNF で priming を受けた HPPMN の FMLP による O_2^- 生成の変化：先にも述べたように, NADPH-oxidase の活性化は, 細胞質の p47 phox が要求され^{15,24)}, その細胞質からの膜への移行にリン酸化反応が関与していることが明らかにされている¹⁶⁾。従って, タンパク質リン酸化酵素によるリン酸化が要求されるが, 近年この酵素に関しては, C-キナーゼ以外のリン酸化酵素の関与を示唆する研究成果が報告され, その機構は極めて複雑な問題となり解決されていない¹⁹⁾。事実, rHuTNF で priming され, FMLP 刺激で生成される O_2^- に対する種々のリン酸化酵素阻害剤の影響を検討してみると, Fig. 3a の

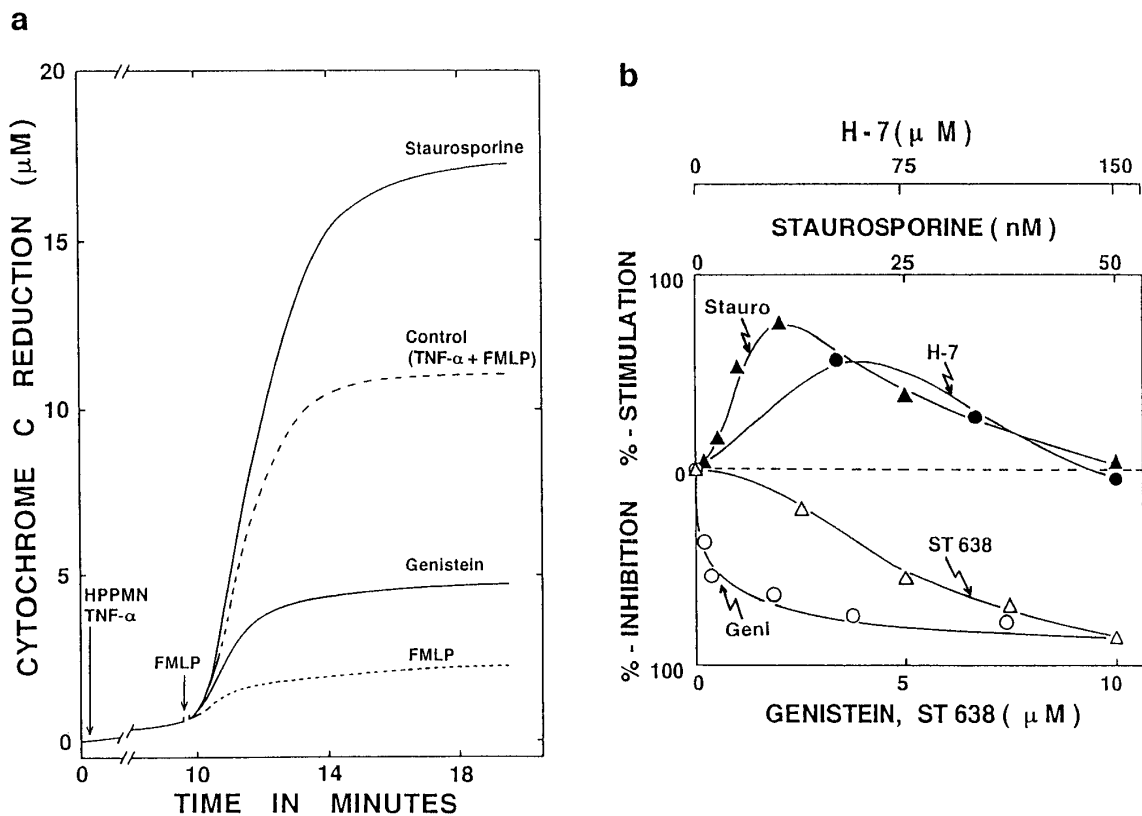


Fig.3. Effect of protein kinase inhibitors on FMLP-induced O_2^- generation in rHuTNF-primed HPPMN

Experimental conditions were the same as described in Fig. 1. Concentration of rHuTNF and FMLP were 10 U/ml and 1.25×10^{-8} M, respectively. Inhibitors were added just after the addition of rHuTNF and preincubated for 10 min before addition of FMLP.

a, shows the traces of O_2^- generation.

b, shows the dose dependent curves for various inhibitors.

ように特徴ある阻害パターンが示された。すなわち、rHuTNFで priming した HPPMN の FMLP 刺激による O_2^- 生成は、TK 阻害剤である genistein²⁰や ST 638¹⁹)によって濃度依存的に強く阻害され、それに反して H-7や staurosporine のような C-キナーゼ阻害物質によって反って促進された(Fig. 3b)。このような阻害物質の作用は OZ による刺激の場合にも観察されたが、その作用の度合は FMLP の場合に比較して小さく、現在その理由について検討中である。

4. rG-CSFで priming を受けた HPPMN の FMLP 刺激による O_2^- 生成のタンパク質リン酸化酵素阻害剤による変化: rG-CSF による priming についても、種々のタンパク質リン酸化酵素阻害剤が rHuTNF の場合に示したと同様な作用パターンを示すか否かについて検討した。Fig. 4a, b はその結果を示す。すなわち rG-CSF による priming においても、FMLP による O_2^- 生成は TK 阻害剤により強く阻害され、C-キナーゼ阻害剤ではかなり高濃度でもほとんど阻害されなかった。これらの阻害剤の高濃度での反応には特異性が少なく、信頼性がない。

これらの結果は FMLP や OZ のような受容体を介した刺激のみが rHuTNF や rG-CSF な

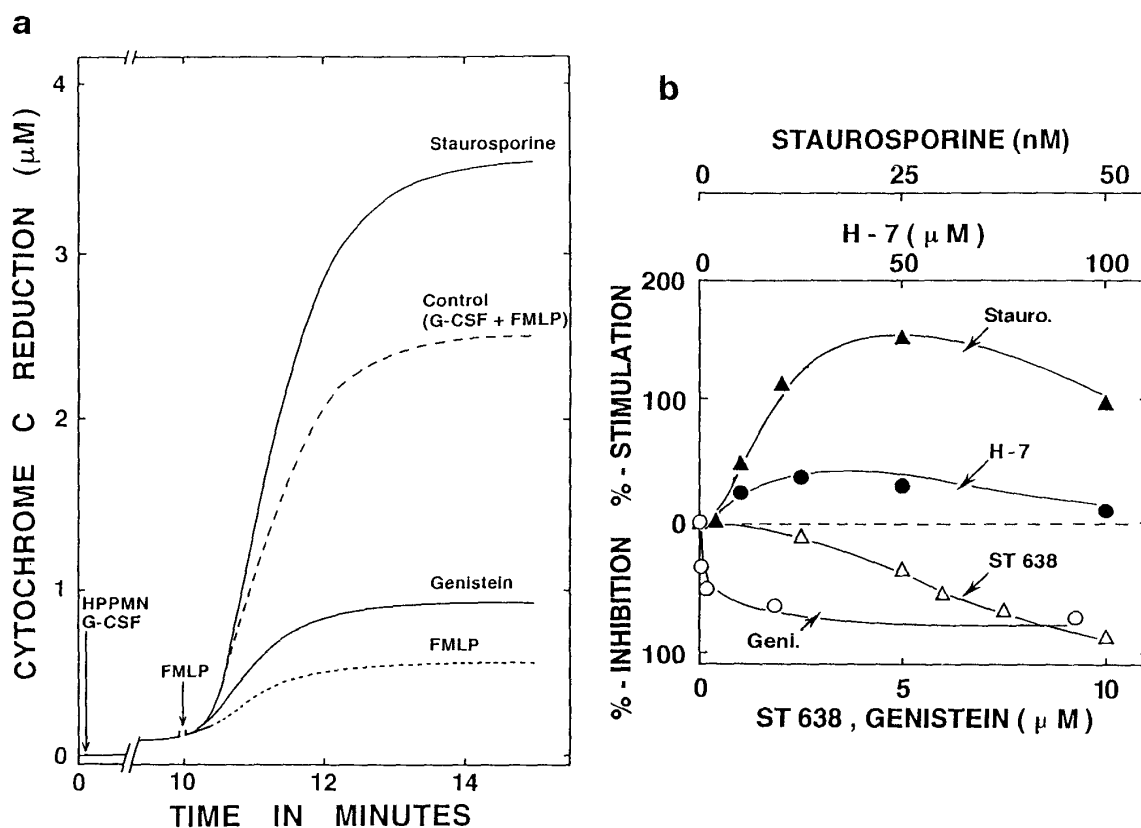


Fig.4. Effect of protein kinase inhibitors on FMLP-induced O_2^- generation in rG-CSF-primed HPPMN

Experimental conditions were the same as described in Fig. 3 except that rG-CSF was used as primer instead of rHuTNF. Concentration of rG-CSF was 50 ng/ml, and preincubated for 10 min before addition of FMLP.

どによる priming 作用を受け，かつそれらは C-キナーゼ活性よりは TK 活性に依存していることを示唆する。

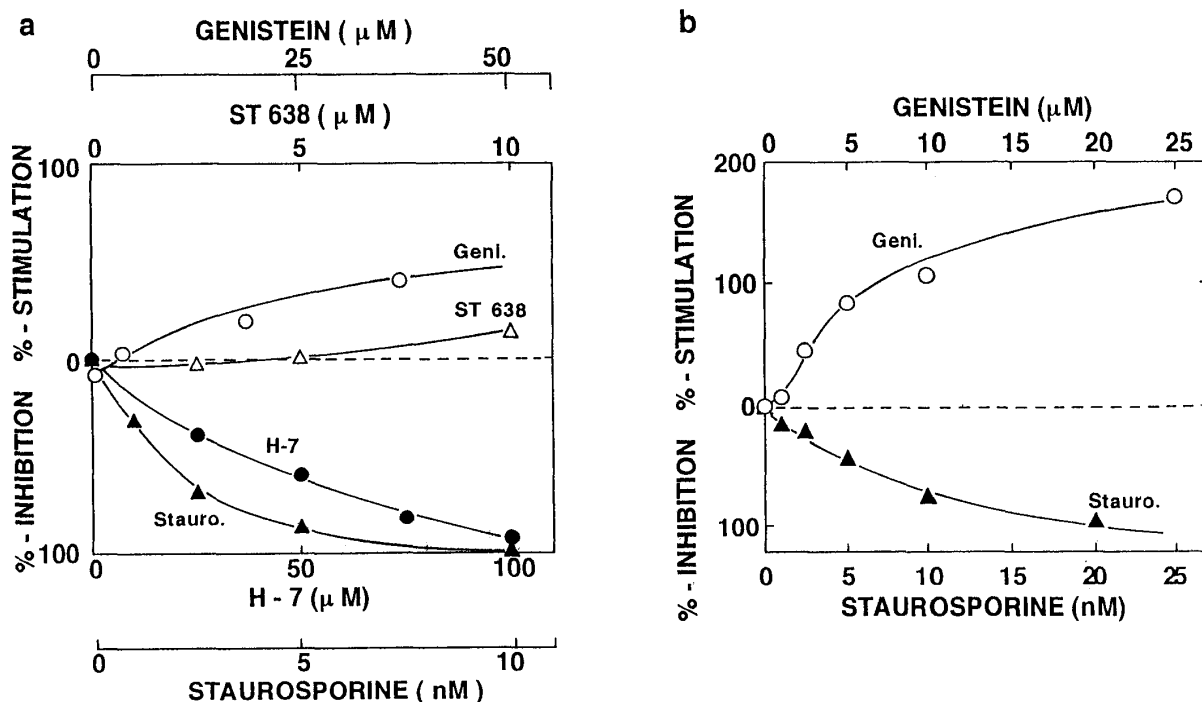


Fig.5. Effect of protein kinase inhibitors on the PMA or DOG induced O_2^- generation in HPPMN

Experimental conditions were the same as described in Fig. 1. Concentration of PMA or DOG was 1×10^{-9} M or 5×10^{-7} M, respectively. HPPMN were preincubated with protein kinase inhibitions for 10 min (H-7 and staurosporin) or 1 min (genistein and ST 638) before addition of FMLP.

- shows the dose dependent curves of various inhibitors on PMA-stimulated O_2^- generation of HPPMN.
- shows the dose dependent curves of various inhibitors on DOG-stimulated O_2^- generation of HPPMN.

5. HPPMN の PMA 刺激による O_2^- 生成のタンパク質リン酸化酵素阻害剤による変化：前述したように，PMA 刺激による HPPMN の O_2^- 生成は rHuTNF や rG-CSF の影響を受けにくく，priming 作用を受けることなく NADPH-oxidase を活性化し，強い O_2^- 生成促進作用を示す。そこで，この O_2^- 生成に対する種々のタンパク質リン酸化酵素阻害剤の影響を検討し，Fig. 5a に示すような結果を得た。すなわち，HPPMN の PMA 刺激による O_2^- 生成は C-キナーゼ阻害剤である staurosporine や H-7 によって濃度依存的に阻害され，TK 阻害剤である genistein や ST 638 によっては反って促進された。同様なリン酸化酵素阻害剤の作用は，C-キナーゼ活性化作用のある DOG 刺激による O_2^- 生成においても観察された (Fig. 5b)。この結果は，C-キナーゼ活性化作用のある PMA や DOG による NADPH-oxidase の活性化や，それに伴う O_2^- 生成は C-キナーゼに依存していることを示唆する。

これらの結果より、HPPMN の priming と刺激物による活性化には少なくとも二つ以上のタンパク質リン酸化酵素依存性の経路があり、その1つはC-キナーゼ依存性で、もう1つはTK 活性依存性であると結論される。またC-キナーゼやTK によるリン酸化タンパク質の解析については、すでに報告されているC-キナーゼによる p47 phox の存在は勿論のこと、現在、我々の研究室でTK による細胞内タンパク質のチロシンのリン酸化についてその解析を試み、rHuTNF による priming に伴い細胞質の特定のタンパク質のチロシン残基のリン酸化が亢進し、TK 阻害剤で阻止されることを見出したので、その性質の解析を進めている²⁵⁾。

6. HPPMN と GPtPMN の FMLP による O_2^- 生成の TK 阻害剤に対する感受性：GPtPMN は以上のような HPPMN に比べ、TK や C-キナーゼ阻害剤に対しかなり異なった反応を示す。すなわち、GPtPMN は rHuTNF や rG-CSF の priming 作用なしに、FMLP や OZ によるかなり強い O_2^- 生成が観察され、これらに対する TK 阻害剤の効果は極めて低かった。rHuTNF で priming を受けた HPPMN と GPtPMN の同一濃度の FMLP による O_2^- 生成に対する TK 阻害剤の作用について検討した結果を示すと、Fig. 6 のようであった。すなわち、HPPMN の O_2^-

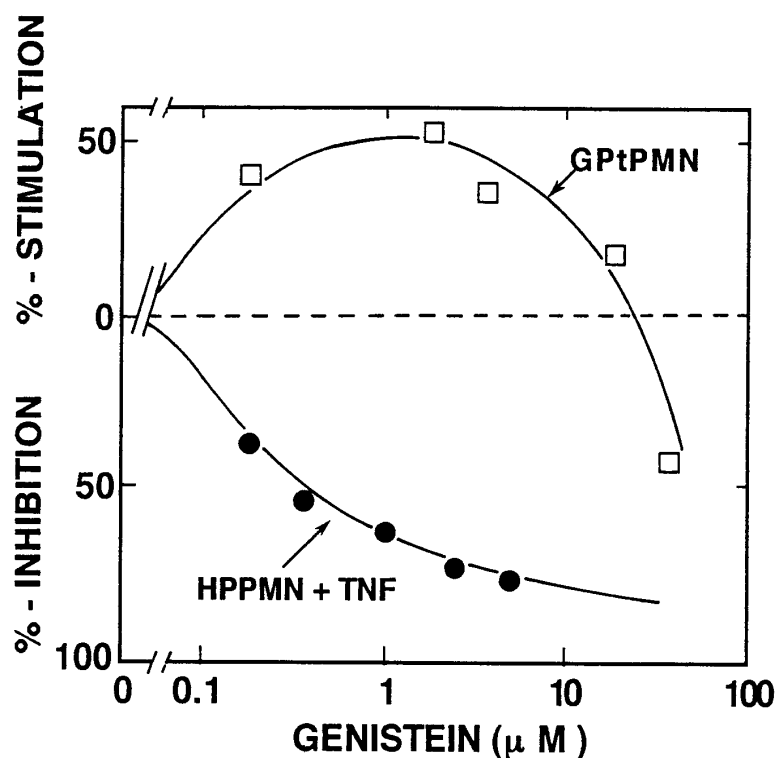


Fig.6. Sensitivity of FMLP-induced O_2^- generation to genistein

Experimental conditions were the same as described in Fig. 3. Neutrophils density was 1×10^6 cells/ml. HPPMN were incubated 10 min with 10 U/ml rHuTNF. Various concentrations of genistein were added 1 min before adding 1.25×10^{-8} M FMLP.

●—●, HPPMN were pretreated with rHuTNF and then stimulated by FMLP.

□—□, GPtPMN were stimulated by FMLP after incubation without rHuTNF.

生成は genistein によって強く阻害されることは前述した通りであるが，GPTPMN の O_2^- 生成は低濃度の genistein で反って促進された。このことは，rHuTNF や rG-CSF による priming 機構も TK に依存していることをさらに支持するものと考えられる。

結 論

以上の実験結果を総合すると，HPPMN は rHuTNF や rG-CSF により強く priming 作用を受け，刺激による NADPH-oxidase の活性化が促進され， O_2^- 生成が増大する。この rHuTNF や rG-CSF の priming 作用は受容体を介した刺激物において特に強く観察され，PMA や DOG による刺激に対しては極めて弱い。しかも priming を受けた HPPMN の刺激物による O_2^- 生成は，FMLP や OZ 刺激においては TK 阻害剤で強く阻害され，C-キナーゼ阻害剤では反って促進され，TK 依存性が強い。さらにこの TK 依存性は特に priming 機構において強いことがモルモット腹腔内好中球との比較実験から示唆される。また，PMA や DOG 刺激による

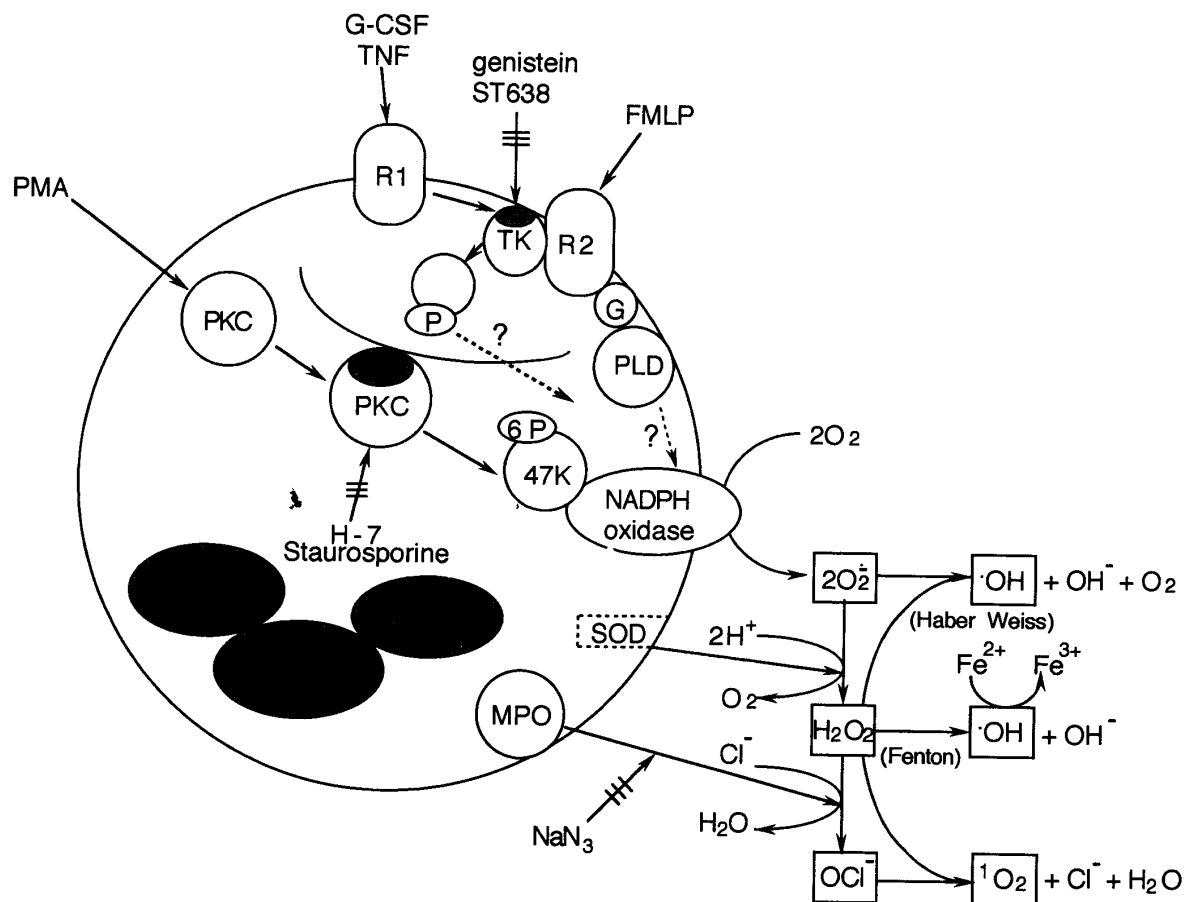


Fig.7. Schematic representation of the mechanism of O_2^- generation in human peripheral polymorphonuclear leukocytes.

O₂⁻生成はC-キナーゼ阻害剤で強く阻害され、TK阻害剤では反って促進され、C-キナーゼ依存性が強い。従って、HPPMNのprimingには強いリン酸化酵素特異性があると結論される。いまこれらを総合して図に示すとFig.7のようになる。HPPMNのprimingにおける刺激物特異性、受容体を介した刺激応答性のO₂⁻生成、PMAやDOGに依存したO₂⁻生成などは、それぞれTK及びC-キナーゼの活性に依存した二つ以上の経路があり、各反応には特異性のあることが結論される。

謝 辞

本論文の作成に当たり、種々御協力を頂いた岡西妙子さんに感謝する。また、本研究の遂行にあたり、ST 638の恵与を受けた鐘ヶ淵化学工業株式会社高砂工業所の白石忠義博士、rHu-TNFの恵与を受けた林原生物化学研究所の栗本雅司博士に深く感謝します。

文 献

- 1) Atkinson, Y.H., Marasco, W.A., Lopez, A.F., and Vadas, M.A., Recombinant human tumor necrosis factor- α . Regulation of N-formylmethionylleucylphenylalanine receptor affinity and function on human neutrophils. *J. Clin. Invest.*, **81**, 759-765 (1988)
- 2) McColl, S.R., Beauseigle, D., Gilbert, C., and Naccache, P.H., Priming of the human neutrophil respiratory burst by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor- α involves regulation at a postcell surface receptor level. Enhancement of the effect of agents which directly activate G proteins. *J. Immunol.*, **145**, 3047-3053 (1990)
- 3) Worthen, G.S., Seccombe, J.F., Clay, K.L., Guthrie, L.A., and Johnston, Jr. R.B., The priming of neutrophils by lipopolysaccharide for production of intracellular platelet activating factor: Potential role in mediation of enhanced superoxide secretion. *J. Immunol.*, **140**, 3553-3559 (1988)
- 4) Klebanoff, S.J., Vadas, M.A., Harlan, J.M., Sparks, L.H., Gamble, J.R., Agosti, J.M., and Waltersdorff, A.M., Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, **136**, 4220-4225 (1986)
- 5) Gamble, J.R., Harlan, J.M., Klebanoff, S.J., and Vadas, M.A., Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 8667-8671 (1985)
- 6) Figari, I.S., Mori, N.A., and Palladino, Jr. M.A., Regulation of neutrophil migration and superoxide production by recombinant tumor necrosis factors- α and - β : Comparison to recombinant interferon- γ and interleukin-1 α . *Blood*, **70**, 979-984 (1987)
- 7) Nathan, C.F., Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, **80**, 1550-1560 (1987)
- 8) Ferrante, A., Tumor necrosis factor alpha potentiates neutrophil antimicrobial activity: Increased fungicidal activity against *Torulopsis glabrata* and *Candida albicans* and associated increases in oxygen radical production and lysosomal enzyme release. *Infect. Immunity*, **57**, 2115-2122 (1989)

- 9) Takahashi, R., Edashige, K., Sato, E.F., Inoue, M., Matsuno, T., and Utsumi, K., Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.*, **285**, 325-330 (1991)
- 10) Tauber, A.I., Protein kinase C and the activation of the human neutrophil NADPH-oxidase. *Blood*, **69**, 711-720 (1987)
- 11) Kawamoto, S., and Hidaka, H., 1-(5-Isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7) is a selective inhibitor of protein kinase C in rabbit platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **125**, 258-264 (1984)
- 12) Tomaoka, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M., and Tomita, F., Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{2+} -dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **135**, 397-402 (1986)
- 13) Caldwell, S.E., McCall, C.E., Hendricks, C.L., Leone, P.A., Basa, D.A., and McPhall, L.C., Coregulation of NADPH-oxidase activation and phosphorylation of a 48 kDa protein(s) by a cytosolic factor defective in autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J. Clin. Invest.*, **81**, 1485-1496 (1988)
- 14) Lomax, K.J., Leto, T.L., Nunoi, H., Gallin, J.I., and Malech, H.L., Recombinant 47-kilodalton cytosol factor restores NADPH oxidase in chronic granulomatous disease. *Science*, **245**, 409-412 (1989)
- 15) Nauseef, W.M., Volpp, D.B., McCormick, S., Leidal, K.G., and Clark, R.A., Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 5911-5917 (1991)
- 16) Rotrosen, D., and Thomas, L.L., Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation of membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19910-19915 (1990)
- 17) Jove, R., and Hanafusa, H., Cell transformation by the viral src oncogene. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **3**, 31-56 (1987)
- 18) Ullrich, A., and Schlessinger, J., Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, **61**, 203-212 (1990)
- 19) Berkow, R.L., Dodson, R.W., and Kraft, A.S., Human neutrophils contain distinct cytosolic and particulate tyrosine kinase activities: possible role in neutrophil activation. *Biochim. Biophys. Acta*, **997**, 292-301 (1989)
- 20) Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y., Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.*, **262**, 5592-5595 (1987)
- 21) Matsuno, T., Orita, K., Sato, E., Nobori, K., Inoue, B., and Utsumi, K., Inhibition of metabolic response of polymorphonuclear leukocyte by bisoclaurine alkaloids. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 1613-1616 (1987)
- 22) Yamamoto, M., Saeki, K., and Utsumi, K., Isolation of human salivary polymorphonuclear leukocytes and their stimulation-coupled responses. *Arch. Biochem. Biophys.*, **289**, 76-81 (1991)
- 23) Nakagawara, A., Shibata, Y., Takeshige, K., and Minakami, S., Action of cytochalasin E on polymorphonuclear leukocytes of guinea pig peritoneal exudates. *Exp. Cell Res.*, **101**, 225-234 (1976)
- 24) Heyworth, P.G., Curnutte, J.T., Nauseef, W.M., Volpp, B.D., Pearson, D.W., Rosen, H., and Clark, R.A., Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47-phox and p67-phox requires interaction between p47-phox and cyto-

chrome b₅₅₈. *J. Clin. Invest.*, **87**, 352-356 (1991)

- 25) Akimaru, K., Utsumi, T., Sato, E.F., Klostergaard, J., and Utsumi, K., Tumor necrosis factor and granulocyte colony stimulation factor modulate agonist-dependent superoxide generation of human peripheral neutrophils by enhancing the tyrosin kinase dependent phosphorylation of cytoplasmic proteins. (unpublished paper)

(1991年8月21日受理)