

氏名	ふるたかずゆき 古田和幸
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第594号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	Regulation of histamine synthesis through post-translational processing of histidine decarboxylase (ヒスチジン脱炭酸酵素の翻訳後プロセッシングを介するヒスタミン合成の調節機構に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 中山和久 教授 伊藤信行 教授 根岸 学

### 論文内容の要旨

ヒスタミンは、炎症、アレルギー、胃酸分泌、神経伝達といった多彩な応答に関与する生理活性アミンであり、生体内ではL-ヒスチジンを特異的な基質とするヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)により合成される。細胞内で合成されたヒスタミンは、通常は顆粒内に貯留され、刺激に応じて細胞外へと放出される。放出されたヒスタミンは、特異的な受容体に結合することによりその生理作用を発揮する。このような一連のプロセスのうちで、ヒスタミンの顆粒からの放出や受容体への結合に関する研究は特に進んでおり、アレルギーや消化性潰瘍の治療薬が生み出されている。

一方、活性化したマクロファージや好中球のような細胞では、合成されたヒスタミンが細胞外へ直ちに放出されることが近年の研究により見いだされており、ヒスタミンの顆粒からの放出機構に加えて生合成の調節機構にも注目が集まっている。しかしながら、HDCに関する知見は限られており、ヒスタミンが細胞内のどこで合成されるのかや、その合成がどのように制御されているのかはこれまで不明であった。

著者の所属する研究室でのこれまでの研究により、HDCは分子量74kDaの前駆体として合成された後に、53kDaのフォームへと翻訳後プロセッシングされることが明らかになっている。また、74kDaの分子種は細胞質で合成された後に小胞体へと移行することも示唆されている。そこで本研究では、HDCの小胞体局在化と翻訳後プロセッシングのメカニズムを明らかにすることを目的として以下の検討を行った。

#### 第一章 ヒスチジン脱炭酸酵素の小胞体膜への局在化機構の解析

*in vitro* 翻訳系を用いた実験の結果から、HDCはサイトゾルで合成された後に小胞体膜へとターゲティングされることが明らかになっている。しかしながら、アミノ末端の典型的なシグナル配列や膜貫通ドメインを持たないHDCが、どのようなメカニズムで小胞体へと輸送されるのかは不明である。この点を明らかにするために、小胞体膜に局在するHDCの配向性について検討した。

まず、HDCを発現するCOS-7細胞をストレプトリジン-Oあるいはジギトニンで処理することにより細胞膜を選択的に透過性にし、細胞質側から小胞体膜へのアクセスが可能でかつ小胞体内腔成分の漏出のない条件を決定した。74kDa分子種は主として小胞体に分布し、サイトゾルにはほとんど検出されなかった。また、74kDa分子種はアルカリ抽出操作に対して耐性を示すことから、膜を貫通しているかあるいは強固に結合している可能性が示唆された。細胞膜を透過性にした細胞をプロテイナーゼKで処理した場合には、HDCのアミノ末端側50kDaの領域が保護された。また蛍光抗体法による解析では、カルボキシル末端側は抗体により認識されるのに対して、アミノ末端側は認識されなかった。これらのことから、74kDaのHDCはアミノ末端を小胞体内腔側あるいは膜内に、カルボキシル末端を細胞質側に持つ配向性をとると予想された。

次に、HDCのカルボキシル末端側約20kDaの領域をGFPのカルボキシル末端に付加したGFP融合HDC(GFP/HDC)の局在についても解析を行った。その結果、GFP/HDCはCOS-7細胞において小胞体様の局在を示すとともに、

野生型 HDC と同様の膜配向性を示すことが明らかになった。これらのことから、カルボキシル末端側20kDa の領域は、HDC の小胞体への局在を決定するだけでなく、アミノ末端側が小胞体内腔あるいは膜内、カルボキシル末端側が細胞質側という膜配向性の決定にも寄与することが明らかになった。

## 第二章 マスト細胞におけるヒスチジン脱炭酸酵素の翻訳後プロセッシングと活性化機構の解析

翻訳後プロセッシングは HDC の細胞内局在や酵素活性に影響を与える可能性があることから、プロセッシング反応に関するプロテアーゼはヒスタミン合成の調節を考える上で重要である。しかしこれまで、そのプロセッシング部位やプロセッシングに関するプロテアーゼの実体は不明であった。

これらを解明するために、著者は HDC を内在性に発現するマウス癌化マスト細胞株 P-815 に、エピトープタグを付加した HDC cDNA をレンチウイルスベクターを用いて導入した。この P-815 細胞では、HDC のプロセッシング反応が酪酸処理により顕著に促進され、55kDa と 60kDa の二種類のプロセッシング産物が検出された。そこで、アラニン点変異スクリーニング法を用いてプロセッシング部位を検索したところ、60kDa 分子種への変換には550番目と551番目の、55kDa への変換には517番目と518番目の連続するアスパラギン酸残基がそれぞれ重要であることが明らかになった。この結果に基づいてプロセッシングを受けない変異体を作製して野生型と比較したところ、野生型を発現する細胞では酪酸処理による HDC 活性の上昇が起こるのに対して、変異体を発現する細胞での活性化は見られなかった。

次にプロセッシング部位の特徴に着目し、*in vitro* 翻訳系で合成した 74kDa HDC の精製した種々のカスパーゼやグランザイムによるプロセッシングを検討した。その結果、HDC はカスパーゼ-8 およびカスパーゼ-9 により選択的に切断されることが判明した。そこで、P-815 におけるプロセッシングに対するカスパーゼ特異的阻害薬の影響を調べたところ、HDC のプロセッシングは非特異的カスパーゼ阻害薬で完全に、カスパーゼ-8 あるいはカスパーゼ-9 に特異的な阻害薬により部分的に阻害された。またこれらの阻害薬は、酪酸処理による酵素活性の上昇に対しても同様の傾向の阻害効果を示した。

これらのことから、P-815 細胞においては、HDC は翻訳後プロセッシングにより活性化され、このプロセッシングにはカスパーゼ-8 およびカスパーゼ-9 が関与する可能性が強く示唆された。

著者は本研究を通じて、HDC の前駆体が小胞体膜にカルボキシル末端を細胞質側に配向した状態で存在すること、P-815 癌化マスト細胞ではサイトゾルのカスパーゼ-8 およびカスパーゼ-9 による翻訳後プロセッシングを介して HDC が活性化されることを明らかにした。これらの有用な基礎的知見をもとにして、新たな作用機序の抗ヒスタミン薬の開発が可能になると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

ヒスタミンは、炎症、アレルギー、胃酸分泌、神経伝達といった多彩な応答に関与する生理活性アミンである。ヒスタミンの顆粒からの放出やヒスタミンの受容体に関する研究は比較的進んでおり、それらを標的とした治療薬は既に臨床応用されている。その一方で、ヒスタミン産生の調節機構については不明な点が多い。生体内でのヒスタミンの産生は L-ヒスチジンを特異的な基質とするヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) により行われる。これまでに、HDC は翻訳後にそのカルボキシル末端 20kDa の領域がプロセッシングを受けること、その領域は HDC の小胞体への移行に必要であることが報告されている。しかし、ヒスタミン産生における翻訳後プロセッシングの役割は明らかではなかった。また、このプロセッシングを行うプロテアーゼも同定されていなかった。そこで著者は HDC のカルボキシル末端領域の機能および翻訳後プロセッシングの役割を明らかとすることを目的として解析を行い、以下の成果を得た。

著者はまず、COS-7 細胞を用いて、HDC の細胞内局在の決定機構について解析を行った。その結果、① HDC はそのアミノ末端側を小胞体内腔側に配向するようにして存在することが示された。さらに、② HDC のカルボキシル末端側 20kDa の領域は小胞体への局在化および小胞体での配向性を決定する機能を有することが示唆された。

次いで著者は、各種 HDC 変異体をマウスマスト細胞株 P-815 に導入し、HDC の翻訳後プロセッシングの活性に及ぼす影響、HDC 内のプロセッシングを受ける部位の決定、およびプロセッシングプロテアーゼの同定を行った。その結果、① プロセッシングに重要なアミノ酸残基を同定し、② 翻訳後プロセッシングを受けない変異体 HDC の作製に成功した。その変異体を用いて、HDC はプロセッシングにより高活性型へと変換されることを示した。さらに、③ 細胞内における HDC の翻訳後プロ

セシングが、カスパーゼ-8およびカスパーゼ-9によって行われることを発見した。これは、細胞内における HDC のプロセシングプロテアーゼを同定した初めての例である。

以上の成果は、HDC の細胞内局在がそのカルボキシル末端領域によって制御されていること、その領域がプロセシングされることが HDC の活性化に必要であることを示したこと、プロセシングプロテアーゼを同定したことにおいて、学問的価値は極めて高い。本研究によって示されたヒスタミンの産生調節機構は、ヒスタミンの関与する疾患の治療薬の新たな標的として有用な作用点と考えられ、新たな作用機序の抗ヒスタミン薬の開発の基礎的知見となるものである。

よって本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成18年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。