

氏名	田中智之
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	論薬博第607号
学位授与の日付	平成11年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	ヒスタジン脱炭酸酵素の活性発現調節機構に関する研究

(主査)

論文調査委員 教授 市川 厚 教授 川寄敏祐 教授 佐藤公道

## 論文内容の要旨

ヒスタミンは炎症、即時型アレルギー、胃酸分泌、神経伝達、癌細胞の増殖、血球系細胞の分化など多彩な反応に関わる生体内アミンである。抗ヒスタミン薬の観点からはこれまでにその受容体への結合、あるいは肥満細胞、好塩基球からの脱顆粒に着目した研究が行われ、アレルギーや消化性胃潰瘍といった臨床事例において成果を収めている。しかしながらヒスタミンの生合成が細胞内のどこで行われ、また貯留・産生はどのように制御されているのかといった点は未だ明らかではない。ヒスタミンは生体内においてヒスタジン脱炭酸酵素(HDC)によって合成されるが、近年その精製・cDNAクローニングの結果、74kDaの分子量を持つ前駆体として翻訳された後、53kDaの成熟体へと変換されることが示唆された。そこで著者はHDCに特異的な抗体を調製し、肥満細胞における本酵素の細胞内局在性および代謝回転を解明することにより、ヒスタミンの合成・貯留の調節機構について考察した。

## 第一章 ラット好塩基球細胞株におけるHDCの細胞内局在性の解析

抗HDC抗体を調製し、ラット好塩基球細胞株(RBL-2H3)の免疫沈降を行ったところ、74kDaの分子量を持つ前駆体から53kDaの成熟体への翻訳後プロセッシングが確認された。また74kDa分子種は速い代謝回転を行うのに対して53kDa分子種は比較的安定であることが判明した。形質膜の選択的な破壊、あるいは透過処理を行ったところ、サイトゾルには前駆体のみが存在し酵素活性を有することが明らかとなった。さらに密度勾配遠心分離によって分布を検討したところ、前駆体は主としてサイトゾル、一部が小胞体を含む画分に検出され、成熟体は小胞体、ゴルジを含む画分および一部がヒスタミン顆粒を含む画分に検出された。このとき酵素活性はサイトゾルと顆粒画分に検出された。サイトゾルを漏出させた細胞に対してトリプシン処理を行ったところ、成熟体のみが抵抗性を示し、内腔側に存在することが示唆された。蛍光抗体法による検討ではHDCの小胞体への集積が認められ、形質膜を透過させて得られたシグナルからそれは主として内腔側と推定された。

## 第二章 前駆体HDC分子種のユビキチン-プロテアソームを介した分解

前章の検討から肥満細胞における前駆体分子種の速い代謝回転は、成熟体への変換によるものだけではなく前駆体分子種自体が非常に速い分解を受けている可能性が示唆された。そこでサイトゾルに存在する前駆体分解活性について阻害剤を培地中に添加し検索したところ、プロテアソーム阻害剤が選択的に分解を抑制した。抗HDC抗体による免疫沈降物を抗ユビキチン抗体でイムノプロットしたところ前駆体に対するユビキチンの重合が生じていることが明らかとなった。またその分解はATP依存的であった。

## 第三章 前駆体HDC分子種の小胞体移行、プロセッシングの解析

前駆体分子種はサイトゾルで翻訳された後小胞体へと移行するが、HDCは一次構造の上でN-末端にシグナル配列を持たないことから、哺乳類では稀な細胞内輸送を行うと考えられた。そこでCOS細胞発現系を用いて欠変異体の発現を調べ、小胞体移行に関わる配列を検索したところ、C-末端10kDaの領域が必要と考えられた。またこの領域を異種サイトゾルタンパクに融合させ発現実験を行ったところ、小胞体への局在が認められた。インビトロ翻訳系を用いて解析したところ、HD

Cの小胞体移行は翻訳と共役しない特殊な様式であることが判明した。またインビトロのモデルでプロセッシングについて検討したところ、前駆体分子種はブタ膵臓エラスターゼによりプロセッシングを受け精製酵素と同様の二量体を形成することから、エラスターゼ様のプロテアーゼが翻訳後プロセッシングに関与することが推定された。

以上著者は肥満細胞においてHDCがサイトゾルで活性を有する前駆体として翻訳された後、小胞体内腔へと輸送され成熟体へと変換されることを明らかにした。また前駆体分子種はプロテアソームの基質でもあることから、その活性は厳密に調節されていると考えられる。本研究はHDCの活性調節がタンパクレベルにおいても行われることを示唆しており、その代謝回転を制御する新たな作用機作の抗ヒスタミン薬の可能性を提起するものとする。

## 論文審査の結果の要旨

本論文はヒスタミン合成酵素であるhistidine decarboxylase (HDC) について、肥満細胞における細胞内局在性および代謝回転を解析し、これまで不明であったヒスタミンの合成・貯留の調節機構を考察したものである。抗ヒスタミン薬の観点から見ると、これまでにヒスタミン受容体拮抗剤と肥満細胞からのヒスタミン含有顆粒の放出阻害剤はあるが、ヒスタミン合成を調節する薬物は開発されていないことから、この成果は、この方面の研究進展に大きく貢献する基礎的知見として評価されるものである。著者は研究内容を三章に分けて発表しているが、各章の要点と新事実は以下の通りである。

第一章では、まず、HDCの細胞内局在性を解析するために必要な特異性の高い抗HDC抗体を調製し、それをを用いて免疫沈降法によりラット好塩基球細胞株 (RBL-2H3) におけるHDC分子の細胞内代謝を検討し、HDC分子においては、翻訳された前駆体74kDa分子種と翻訳後プロセッシングで生成される成熟体53kDa分子種の2つのサブタイプを見出した。次いで、代謝回転実験から74kDa分子種は速い代謝を受けるが、53kDa分子種は比較的安定であることを明らかにした。さらに、蛍光抗体を用いた実験等から74kDa分子種は主にサイトゾル分画に、また、53kDa分子種は小胞体・ゴルジ・ヒスタミン含有顆粒に存在することを明らかにした。

第二章では、サイトゾルに存在する74kDa分子種の速い代謝回転に着目して、その代謝を行うプロテアーゼの同定を行うために、サイトゾルの<sup>35</sup>Sメチオニン標識74kDa HDCの分解を阻止するプロテアーゼ阻害剤の検索を行い、プロテアソーム阻害剤のみが選択的に74kDa分子種の分解を抑制することを発見した。さらに、プロテアソームはユビキチン-ATP依存的に74kDa分子種を分解することを明らかにした。

第三章では、74kDa分子種はサイトゾルで翻訳されたのち小胞体内腔へと移行するが、HDCには一次構造上N-末端にシグナル配列を持たないこと、およびC-末端のプロセッシングが小胞体移行において起こることから、哺乳類では稀なC-末端認識による細胞内輸送を受けているタンパクと考え、COS細胞発現系を用いて欠変異体の発現から解析を行い、20アミノ酸残基からなる小胞体移行シグナルを同定した。このシグナルはこれまで知られていない新規配列であった。さらに、インビトロのモデルで74kDa分子種の53kDa分子種へのプロセッシングに関与するプロテアーゼとして、ブタ膵臓エラスターゼ様の酵素であることを明らかにした。

以上、本研究はHDCの活性調節がタンパクレベルにおいても行われていることを明らかにしたものであり、その代謝回転を制御する新たな作用機作の抗ヒスタミン薬の可能性を提起したものである。

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。更に平成11年2月16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。