

ヒスチジン脱炭酸酵素の活性調節機構に関する研究

1999

田 中 智 之

# 目次

緒言	-1-
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	-4-
(結果)	-5-
(考察)	-12-
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	-15-
(結果)	-16-
(考察)	-22-
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	-25-
(結果)	-26-
(考察)	-35-
結語	-39-
実験方法の部	-40-
謝辞	-48-
発表論文目録	-49-
引用文献	-50-

## 緒言

ヒスタミンは炎症 [1, 2]、アレルギー [3, 4]、胃酸分泌 [5] 等の生体反応における主要なメディエーターとして良く知られる生体アミンである。また、中枢では神経伝達物質としても機能し [6]、近年の報告では血球系細胞の増殖・分化 [7, 8] あるいは血小板凝集における作用 [9]、一部の癌細胞の増殖 [10, 11] においても重要な働きをしていることが明らかにされている。ヒスタミンは細胞内においてヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC: EC 4.1.1.22) により L-ヒスチジンを基質として合成され、細胞内に貯留もしくは細胞外に放出される。肥満細胞や好塩基球に代表されるヒスタミン産生細胞においては、ヒスタミンは顆粒内に貯留されており、細胞が免疫刺激や非免疫刺激を受けると、脱顆粒反応を起こして細胞外へ放出され、周辺の標的細胞膜上に存在する特異的な受容体に結合しその作用を発現する。ヒスタミンの作用に関する従来の研究では、脱顆粒および受容体への結合に関するものが特に進展しており、受容体特異的なアンタゴニスト [12] や脱顆粒を抑制する化合物 [13] が開発され、消化性潰瘍、アレルギーなどの疾患に適用されている。ヒスタミン関連医薬品の開発という観点からは、上記のものに加えて、ヒスタミンの合成段階を制御する薬物も重要なポイントである。しかしながら、HDC に関する酵素化学的な研究が遅れていたため、これまでヒスタミンの合成段階を標的とした薬物の開発はなされていない。

ところで、ヒスタミン産生の様式としては大きく分類して二つのタイプがあることが知られている。一つは比較的低い HDC 活性を有する細胞が構成的にヒスタミンを産生し、顆粒に貯留し刺激に応じて放出するという場合で、腹腔内や皮膚に存在する肥満細胞や好塩基球においてみられる [14]。もう一つは高い HDC 活性を有する、あるいは転写レベルで HDC が誘導される細胞におけるヒスタミン産生で、この場合は合成後ただちに細胞外へと放出されることが特徴であり、胃の enterochromaffin-like cells (ECL 細胞)、血球系前駆細胞、一部の癌細胞においてみられる [7, 15-17]。特に後者においては放出

されるヒスタミン量の制御は HDC 活性のレベルで行われることから、HDC 活性発現のメカニズムを解明することの意義は大きいと考えられる。

著者の所属する研究室では、これまでにマウス癌化肥満細胞 P-815 から HDC の精製 [18] 及び cDNA のクローニング [19] が行われ、HDC の分子レベルにおける解析が可能となった。また、ゲノムレベルでの解析からは、HDC が dexamethasone、TPA、カルシウムイオノフォア、cAMP といった刺激に応じて転写レベルで誘導される [20, 21] ことが明らかにされた。タンパクレベルでは cDNA によりコードされる HDC が 74 kDa の分子量を有する [19] のに対して、精製酵素は 53 kDa の分子量のサブユニットからなる二量体である [18] ことから、HDC は翻訳後プロセッシングを受けることが予測された。翻訳後プロセッシングについては、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いた組み換え HDC の性状が検討され、74 kDa 分子種は発現系細胞では不溶性画分に存在し、低活性体であることが示された [22]。しかしながら、これまでの報告では、精製酵素はすべて可溶性画分から得られていることから、ヒスタミン産生細胞における HDC の分子修飾と細胞内局在性について解明することが必要となった。

そこで、著者はまず組み換え HDC タンパクを大腸菌を用いて調製し、特異的な抗 HDC 抗体を作製した [23]。この抗 HDC 抗体を用いてラット好塩基球細胞株の HDC の翻訳後プロセッシングおよび二つの分子種の細胞内局在性に関し検討を行った。その結果について三章に分けて記述する。各章の要点は；第一章では、74 kDa 分子種及び 53 kDa 分子種は細胞内において異なる局在を示し、それぞれサイトゾル、顆粒という二つのヒスタミンプールを形成することを明らかにした。第二章では、74 kDa 分子種が非常に早い代謝を受けることを見出し、それは 74 kDa 分子種がユビキチン-プロテアソーム系により分解されるためであることを明らかにした。第三章では 74 kDa 分子種の小胞体への移行が翻訳後プロセッシングで失われる C-末領域を介して起こることを明らかにした。

なお本文中あるいは図表中で使用した略号は以下の通りである。

ALLN:	<i>n</i> -acetyl leucyl leucyl norleucinal
ALLM:	<i>n</i> -acetyl leucyl leucyl methional
ATP:	adenosine triphosphate
ATP $\gamma$ S:	adenosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)
cDNA	complementary DNA
DDC:	aromatic L-amino acid decarboxylase
ER:	endoplasmic reticulum
FP2:	NADPH-cytochrome P450 reductase
FITC:	fluorescein isothiocyanate
GFP:	green fluorescent protein
GST:	glutathione <i>S</i> -transferase
LDH:	lactate dehydrogenase
mRNA;	messenger RNA
ODC:	ornithine decarboxylase
PBS:	phosphate-buffered saline
PCR:	polymerase chain reaction
PDI:	protein disulfide isomerase
PIPES:	1,4-piperazine diethanesulfonic acid
PMSF:	phenylmethylsulfonyl fluoride
PPE:	porcine pancreatic elastase
RIPA:	radioimmune precipitation assay
SDS-PAGE:	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SLO:	streptolysin-O
TBS:	Tris-buffered saline
ZL2H:	carboxybenzyl leucyl leucinal
ZL3H:	carboxybenzyl leucyl leucyl leucinal

## 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

#### 【要約】

ヒスタミンの生理的な役割を考える上で、その産生酵素である HDC の活性調節機構を解明することは重要である。

これまでの研究で、精製、cDNA クローニングの結果から、HDC は 74 kDa の分子量を持つ前駆体として翻訳された後、53 kDa の成熟体へと変換されることが予想された。そこで、この HDC の分子サイズ変換とその細胞内局在性を検討するために、本章ではまず、特異的な抗 HDC 抗体を作製し、それをを用いてラット好塩基球細胞株 (RBL-2H3 細胞) の HDC について解析した。その結果、免疫沈降による解析から、HDC は 74 kDa の前駆体から 53 kDa の成熟体へと変換されることがわかった。次いで、形質膜を選択的に透過させる薬物処理を行うと、それにより漏出するサイトゾルの HDC 活性は 74 kDa 分子種に由来することが判明した。Percoll 密度勾配遠心分画法で細胞成分を分離すると、74 kDa 分子種は主にサイトゾル、一部が小胞体を含む画分に存在し、53 kDa 分子種は小胞体・ゴルジを含む画分に、一部はヒスタミン顆粒を含む画分に存在していた。このとき酵素活性はサイトゾルと、ヒスタミン顆粒画分に存在していた。蛍光抗体法による解析では HDC のシグナルは主として小胞体に観察され、それは内腔側に存在することが示唆された。さらに形質膜の破壊後、trypsin 処理を行うと 74 kDa 分子種は分解されるのに対して 53 kDa 分子種は抵抗性を示した。

以上の結果は、肥満細胞あるいは好塩基球において HDC は翻訳後プロセッシングを介して生じる二種の分子種として存在し、それぞれサイトゾル、ヒスタミン顆粒内におけるヒスタミン産生に関わることを示唆するものである。

#### 【結果】

##### (1) HDC の翻訳後プロセッシングの解析

すでにクローニングされたマウス HDC cDNA をもとに、そのアミノ酸残基 1-210 に相当するペプチドを GST 融合タンパクとして *E. coli* で発現させた組み換えタンパクを抗原として用いて、抗 HDC 抗体を作製した [23]。ラット好塩基球細胞株 (RBL-2H3 細胞) を [<sup>35</sup>S]メチオニンで標識し、抗 HDC 抗体で免疫沈降し、沈降物を SDS-PAGE により解析した。Fig. 1A にみられるように 74 kDa 分子種は主として可溶性画分に、53 kDa 分子種は沈殿画分にそれぞれ検出された。また非標識メチオニンによるパルス-チェイス実験の結果、Fig. 1B に見られるように、74 kDa から 53 kDa への変換はチェイス 5 分ですでに検出された。また 74 kDa 分子種の半減期は 30 分以内と推定され、代謝回転の速い分子であるのに比して、53 kDa 分子種は比較的安定であった。

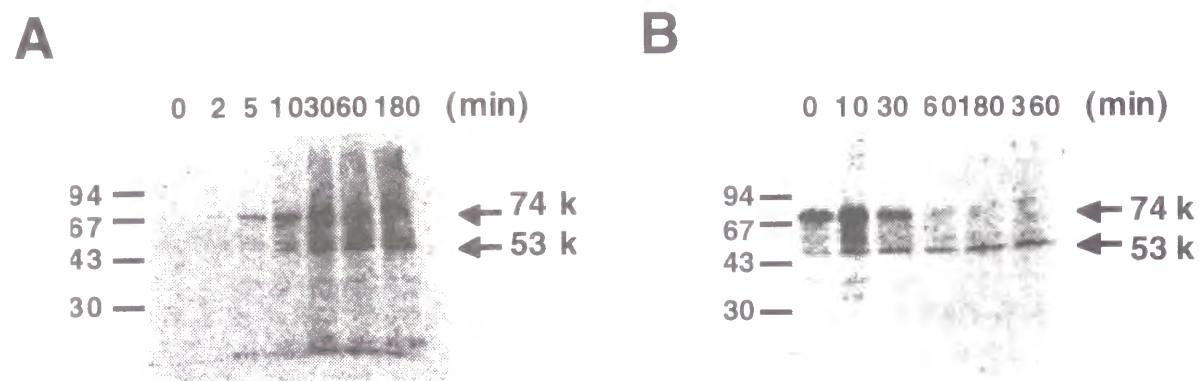
##### (2) サイトゾルに局在する HDC 分子種の解析

サイトゾルに存在する分子種について解析をするために、形質膜を選択的に破壊することが知られている溶血素である streptolysin-O で RBL-2H3 細胞を処理し、細胞外に漏出する画分と残査の細胞成分とに分離した。Table I にみられるようにサイトゾルのマーカー酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性の約 90 % が漏出する条件下、HDC 活性は約 40 % が漏出した。また同じ条件下、免疫沈降により漏出画分に存在する HDC 分子種を調べたところ、74 kDa 分子種が一部漏出するのに対して 53 kDa 分子種はすべて細胞成分側に残存した (Fig. 2)。

##### (3) HDC の細胞内分布

HDC の細胞内分布について、RBL-2H3 細胞を [<sup>35</sup>S]メチオニンで 30 分 (Fig. 3A) あるいは 90 分 (Fig. 3B) 間標識し、細胞破碎後、Percoll 密度勾配遠心分画法を用いて細胞成分を分画し、各画分の HDC 分子種を免疫沈降法により解析した。Fig. 3A にみられるように、74 kDa 分子種はサイトゾルのマーカーである LDH 活性 (Fig. 3D) の約 90 % が回収





**Fig. 1 Distinct distribution of the 74 kDa and 53 kDa forms of HDC.**

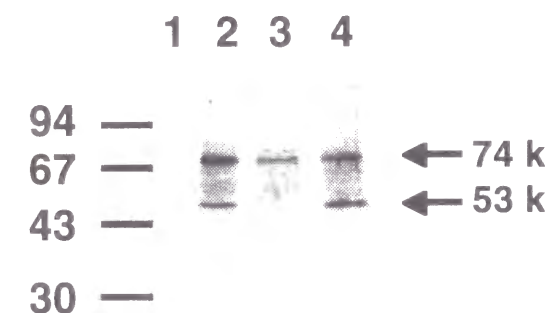
(A) RBL-2H3 cells ( $1 \times 10^7$  cells/lane) labeled with [ $^{35}\text{S}$ ]methionine for 30 min were fractionated as described under 'Experimental Procedures' and immunoprecipitated with anti-GST-fusion HDC antiserum. Lane 1, 100,000 x g supernatant (S1); lane 2, high salt-extracted 100,000 x g precipitate (S2); lane 3, 100,000 x g precipitate (P1); lane 4, high salt-extracted 1,000 x g supernatant (S3); lane 5, 1,000 x g precipitate (P2). (B) Cells were pulsed for 10 min with [ $^{35}\text{S}$ ]methionine and then chased for the time periods indicated before the lysis in RIPA buffer. The lysate of the cells was immunoprecipitated with anti-GST-fusion HDC antiserum as described under 'Experimental Procedures'. The immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE. The 74 kDa and 53 kDa HDC are indicated by arrows.

	HDC activity		LDH activity	
	None	SLO	None	SLO
	<i>pmol/min/10<sup>7</sup> cells</i>		<i>μmol/min/10<sup>7</sup> cells</i>	
Total	64.3±0.376	61.5±1.08	1.25±0.0808	1.50±0.0917
Leakage	4.29±0.105	25.1±1.39	0.111±0.00666	1.31±0.0520
Percentage of total	6.67±0.149 %	40.8±1.56 %	8.88±0.382 %	87.3±2.51 %

**Table I Leakage of enzymatic activity of HDC on Streptolysin-O treatment**

Cells were treated with 1,000 U/ml SLO (preactivated by incubation for 15 min on ice with 10 mM dithiothreitol) in PBS at 4°C for 10 min. After this SLO-binding step, the cells were rinsed in PBS twice and then incubated at 37°C for 3 min to effect the permeabilization. The leaked fraction was assayed for HDC and LDH activity as described under 'Experimental Procedures'. Values represent means of S.E. of three samples.

される fraction 7 および 8 に検出され、53 kDa 分子種は ミクロソームのマーカである NADPH-cytochrome c reductase 活性、protein disulfide isomerase (PDI)、ゴルジのマーカである mannosidase II (Man II) が主として回収される fraction 6 に検出された。Fig. 3B はパルス時間をさらに延長した細胞を分画したものであるが、ここではヒスタミン顆粒が含まれる (Fig. 3C) fraction 1 にも 53 kDa 分子種が検出された。また、酵素活性およびヒスタミン量を測定したところ、fraction 1、fraction 7、8 にそれぞれピークが見られた (Fig. 3C)。

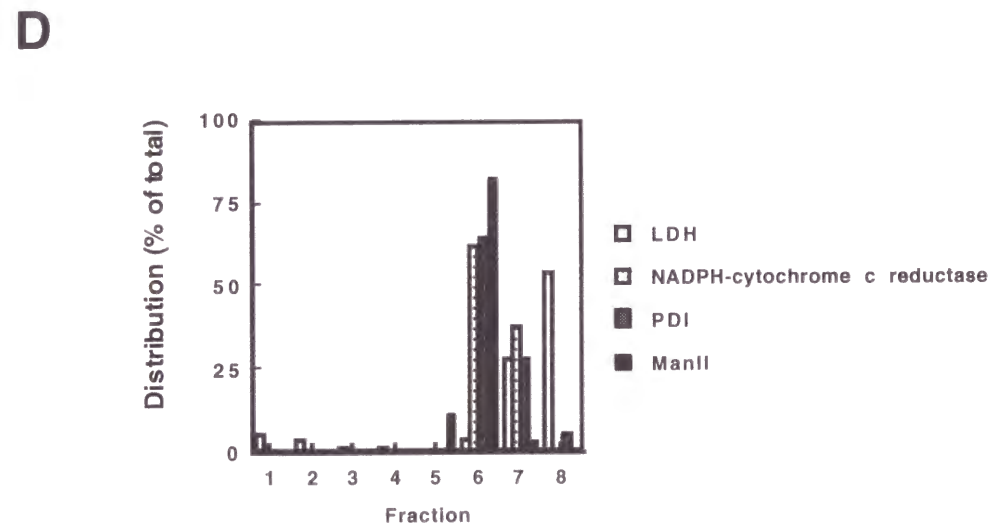
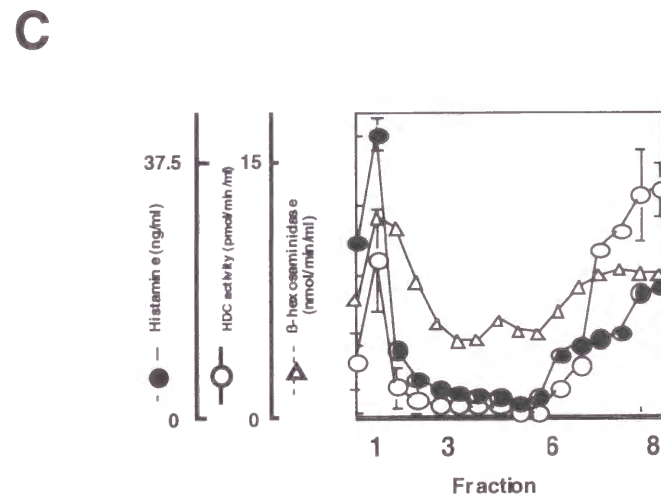
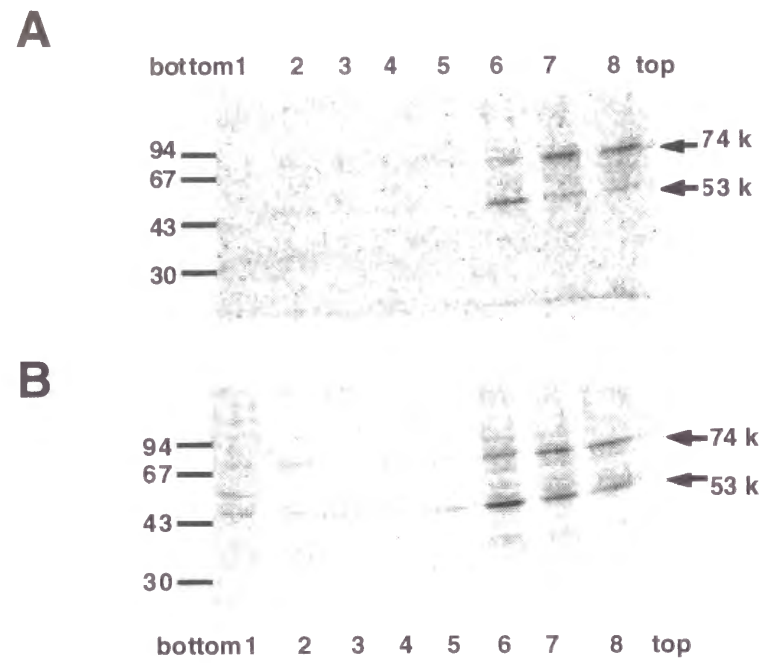


**Fig. 2 Leakage of the 74 kDa form of HDC on selective permeabilization of plasma membrane with streptolysin-O treatment.**

Cells ( $1 \times 10^7$  cells/lane) were pulsed for 30 min with [ $^{35}\text{S}$ ]methionine and treated with (lanes 3 and 4) or without (lanes 1 and 2) streptolysin-O (1,000 U/ml) as described under 'Experimental Procedures'. The leaked fraction (lane 1 and 3) and the cells which were washed once time after the treatment (lane 2 and 4) were then immunoprecipitated with anti-GST-fusion HDC antiserum respectively. The 74 kDa and 53 kDa HDC are indicated by arrows.

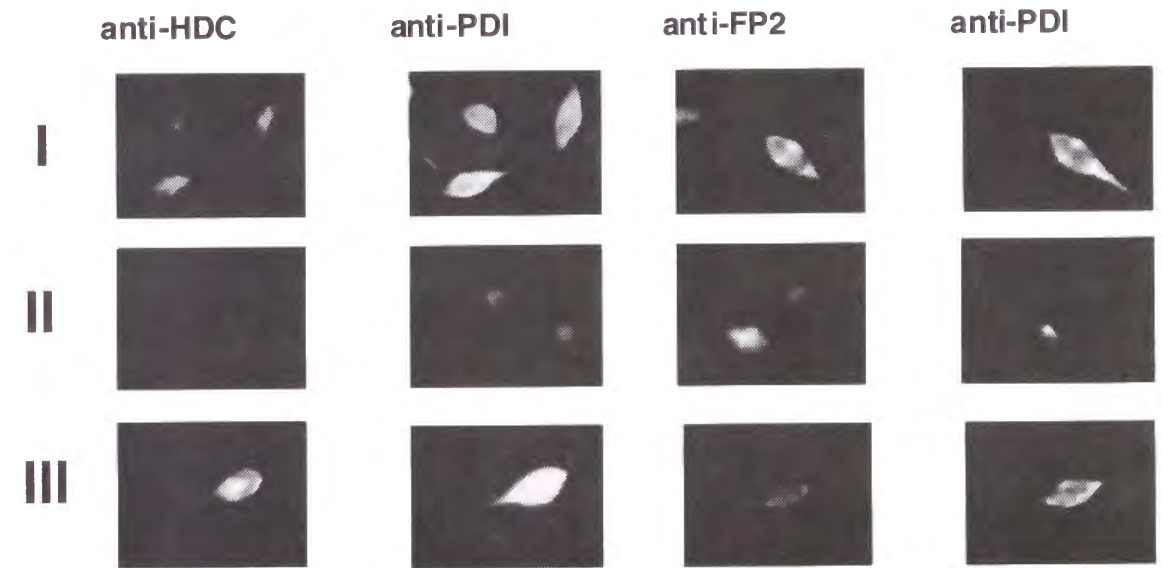
#### (4) 蛍光抗体法による HDC の細胞内局在性の解析

これまでに得られた HDC の細胞内局在性に関する解析を蛍光抗体法を用いて確認した。小胞体のマーカとして PDI と NADPH-cytochrome P-450 reductase (FP2) を用いた。FP2 はサイトゾル側にその大部分を露出させる膜貫通型の小胞体タンパクであるのに対して、PDI は小胞体内腔側に存在することが知られている。Fig. 4 の Lane I は細胞を固定後、Triton X-100 を用いて膜を可溶化して HDC、PDI あるいは FP2、PDI に対する特



**Fig. 3 Subcellular distribution of the 74 kDa and 53 kDa forms of HDC**

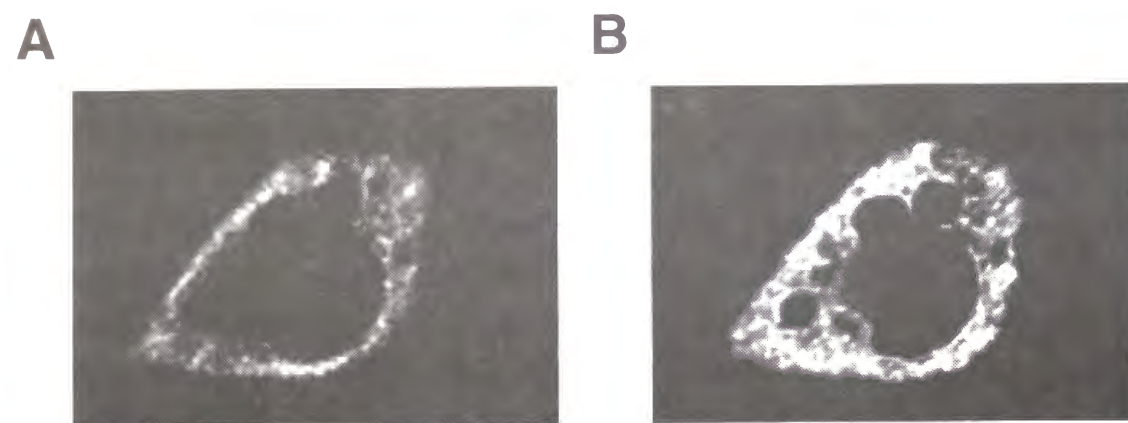
Intracellular localization of HDC was determined by Percoll density gradient fractionation and immunoprecipitation with anti-GST-fusion HDC antiserum as described under 'Experimental Procedures'. Cells ( $5 \times 10^7$  cells) were pulsed with [ $^{35}$ S]methionine for 30 min (A) and for 90 min (B) and fractionated before immunoprecipitation. The 74 kDa and 53 kDa forms of HDC are indicated by arrows. (C) The HDC activities (open circle) and histamine content (closed circle) of each fraction (collected by 16 fractions) were measured.  $\beta$ -hexosaminidase (open triangle) as a granule marker was measured in each fraction. (D) The distribution of marker proteins was investigated. On each fraction, LDH and NADPH-cytochrome c reductase activities were measured. The amount of PDI and mannosidase II (Man II) were evaluated respectively by immunoblot analysis using their specific antibodies and determined densitometrically.



**Fig. 4 Immunofluorescence study of HDC**

An immunofluorescence study was carried out with anti-GST-fusion HDC antiserum (1:500) (A), anti-FP2 antiserum (1:500) (B), and anti-PDI antibody (1:500), and stained with second antibody, anti-rabbit IgG antibody conjugated with FITC (1:200, anti-GST-fusion HDC and anti-FP2 antiserum) and anti-mouse IgG antibody conjugated with rhodamine (1:150, anti-PDI antibody). Cells were treated with (II and III) or without (I) streptolysin-O (1,500 U/ml). After fixation with 100 mM sodium phosphate, pH 7.4 containing 2 % paraformaldehyde, 0.1 % glutaraldehyde and 3 % sucrose, cells were permeabilized with (I and III) or without (II) 0.1 % of Triton X-100. Thereafter cells were stained.





**Fig. 5 Confocal microscopic observation of co-existence of HDC and PDI in the ER**

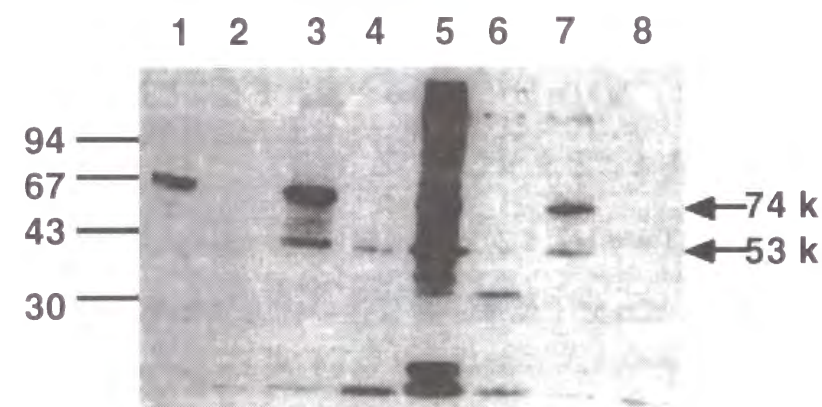
Cells were double-stained with anti-GST-fusion HDC antiserum (A) and with anti-PDI antibody (B) as described in the legend to Fig. 4. The fluorescent images were observed with a confocal microscope.

異なる抗体でそれぞれ二重染色した結果で、いずれも小胞体への局在を示す網目状のシグナルが得られた。Lane II は細胞を streptolysin-O 処理して形質膜のみを透過させることにより得られたシグナルを示し、ここでは FP2 のみでシグナルが得られ、HDC、PDI ではシグナルは観察されなかった。しかし streptolysin-O 処理後細胞を固定し、さらに Triton X-100 で膜構造を可溶化する (Lane III) と再び三者のシグナルが観察された。HDC と PDI の二重染色の結果を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、Fig. 5 に見られるように広い範囲にわたってその局在が一致していた。

(5) 53 kDa 分子種の内腔側への局在

(4) の結果は小胞体に集積した HDC が PDI と同様に内腔側に存在することを示唆するものである。そこで Macri と Adeli の方法 [24] に従い、digitonin で形質膜を透過させた細胞に trypsin 処理を行うことによって内腔側に存在する HDC 分子種の同定を行った。Fig. 6 に見られるように digitonin 処理により、一部の 74 kDa 分子種のみが漏出し (lane 1)、53 kDa 分子種および残りの 74 kDa 分子種は細胞成分側に残存する (lane 3)。この二つの

画分に対して trypsin 消化を行ったところ、74 kDa 分子種はどちらの画分においても完全に分解される (lane 2、4) のに対して、53 kDa 分子種は抵抗性を示した (lane 4)。また Triton X-100 で膜透過を行った場合は両分子種が漏出し、ともに trypsin によって完全に消化された (lane 5、6)。



**Fig. 6 Trypsinization of permeabilized cells**

Cells labeled with [<sup>35</sup>S]methionine were washed and incubated in 10 mM PIPES, pH 6.8 containing 0.3 M sucrose, 0.1 M KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM sodium-free EDTA (CSK buffer) with 100 μg/ml digitonin (lane 1-4) for 10 min at room temperature or with 0.1 % Triton X-100 (lane 5-8) for 30 min at 4°C. Permeabilized cells washed once in CSK buffer (lane 3, 4, 7 and 8) and the soluble fractions (lanes 1, 2, 5 and 6) were incubated in the presence (lanes 2, 4, 6 and 8) and absence (lanes 1, 3, 5 and 7) of trypsin (200 μg/ml) prepared in CSK buffer for 10 min at room temperature. The reaction was stopped by adding 5 x RIPA buffer containing the mixture of protease inhibitors and then aliquots were subjected to immunoprecipitation with anti-GST-fusion HDC antiserum as described under 'Experimental Procedures'.



## 【考察】

本章において HDC はラット好塩基球細胞株、RBL-2H3 において 74 kDa の分子量をもつ前駆体として翻訳された後、53 kDa の成熟体へとプロセッシングを受けることが明らかとなった (Fig. 1)。また両分子種は細胞内において異なる局在性を示すことも明らかとなった (Figs. 2-6)。内在性の HDC のプロセッシングについての解析は本研究が最初のものである。

Streptolysin-O 処理により、74 kDa 分子種のみが漏出することはサイトゾルに存在する分子種が 74 kDa 分子種であることを示している (Fig. 2)。また、同時に細胞全体の約 40% の酵素活性が漏出する (Table I) ことから、前駆体分子種は活性体であると結論することができる。さらに、74 kDa 分子種は非常に速い代謝回転をしていると考えられる (Fig. 1)。

サイトゾルを漏出後の細胞にも 74 kDa 分子種は検出されるが、digitonin 処理した細胞を trypsin で消化すると 74 kDa 分子種が完全に消失されること (Fig. 6)、および 74 kDa 分子種はミクロソーム画分にも検出される (Fig. 3) ことから、この 74 kDa 分子種は小胞体膜のサイトゾル側に存在することが推測される。53 kDa 分子種が内腔側に存在すること (Fig. 6) およびサイトゾルには検出されないこと (Figs. 2, 3) を考慮すると、74 kDa 分子種は小胞体内腔側へと輸送された後速やかに 53 kDa 分子種へと変換されることが考えられる。HDC において一次構造上、N-末端にシグナル配列は存在しないことから、サイトゾルから小胞体への移行がどのような機構であるかは大変興味深い点である。この点については第三章において解析を行った。膜画分に存在する HDC 活性に関しては Snyder [25] らが、ラット脳下垂体に大部分は可溶性画分に存在するものの膜結合性の活性が有意に検出されることを報告している。さらに Martres [26]、Braudry [27]、Toledo [28] らもやはりラット脳における膜結合性の活性を報告している。Toledo らは膜結合性の活性が調製時のカルシウム濃度を上昇させることにより可溶化されること [29] を報告している。

しかしながら、これらの報告のいずれにおいても HDC の分子量については言及されていない。今回得られた知見からは、こうした脳における膜結合性の酵素活性は小胞体膜に存在する 74 kDa 分子種に由来すると推測される。

これまでに著者の所属する研究室において、バキュウロウイルス-昆虫細胞発現系を用いた検討から 74 kDa 分子種は不溶性画分に存在することが明らかにされている。これは小胞体への移行を一部において反映するものと考えられるが、発現系細胞の 74 kDa は 6 M グアニジンと 10 mM dithiothreitol という条件下で可溶化される凝集体由来という性状 [22] を考慮すると、バキュウロウイルス発現系で大量発現の際に観察されることがある封入体 [30] に近い性質のものであると考えられる。

53 kDa 分子種は Percoll 密度勾配遠心分画 (Fig. 3)、digitonin 処理細胞の trypsin 消化 (Fig. 6) といった検討から、小胞体内腔側に局在することが示唆された。また蛍光抗体法による検討から、抗 HDC 抗体により得られるシグナルは小胞体内腔タンパクである protein disulfide isomerase (PDI) [31] のものとほぼ一致した。これらのことから蛍光抗体法によって得られるシグナルは主として 53 kDa 分子種に由来するものと考えられる。また、Percoll 密度勾配遠心分画の結果においても、53 kDa 分子種のミクロソーム画分への集積が観察される (Fig. 3) こともこの推論を支持するものである。HDC の精製に関する報告 [18] からは、本酵素は可溶性画分に存在する 53 kDa 分子種の二量体であると推測されていたが、これらは細胞内腔側の 53 kDa 分子種が細胞破碎や遠心分画といった操作により漏出した結果である可能性がある。今回の検討においても、細胞を破碎、遠心分画することにより可溶性画分に 53 kDa 分子種が顆粒酵素である  $\beta$ -hexosaminidase と共に一部回収されている (Fig. 3)。

また 53 kDa 分子種はヒスタミン顆粒を含む画分に検出された (Fig. 3) が、これは 53 kDa 分子種が顆粒内においてヒスタミン合成を行っていることを示唆している。ヒスタミンの顆粒への蓄積に関してはまだ不明な点が多く残されている。他のアミンにおいてはサイトゾルから顆粒への取り込みをする機構として、Vesicular monoamine transporter (VMAT)-1、-2 が知られており [32]、この活性はレゼルピンにより阻害される。ヒスタ

ミンに関しては、ヒスタミン産生細胞における発現および組織特異的な発現の HDC との類似性から VMAT-2 がヒスタミンを顆粒へ取り込む transporter であるという説がある [33]。しかしながら、他のアミン類に対する  $K_m$  値と比較してヒスタミンに対する親和性が 10 倍程度低いこと、レゼルヒンの結合をヒスタミンが阻害しないこと [34] が知られており、他に未知のヒスタミン特異的な transporter が存在する可能性は否定できない。また、著者の得た結果はヒスタミン顆粒内におけるヒスタミン合成を示唆しており、どのような機構でヒスタミンが顆粒内に蓄積されるかを明らかにするためには、今後顆粒画分におけるヒスタミン合成について更なる検討が必要である。

今回得られた知見から、肥満細胞、好塩基球において 74 kDa 分子種はサイトゾルにおいて、53 kDa 分子種はヒスタミン顆粒内においてヒスタミンを産生することが示唆された。ヒスタミン産生の様式としては大別して二種が知られている。結合組織型肥満細胞や好塩基球においては通常 HDC 活性は低く、顆粒内にヒスタミンが貯留され、刺激に応じて脱顆粒によりヒスタミンが産生される。それに対して胃の enterochromaffin-like cell (ECL 細胞)、粘膜型肥満細胞、ヒスタミンニューロンにおいては高い HDC 活性が検出され、顆粒への蓄積は少ない。こうしたヒスタミン産生様式の相違が何に起因するかは現段階では不明であるが、今回得られた知見からは細胞内の HDC 分子種の相違がヒスタミン産生様式を決定する因子の一つであることが予想される。特に 74 kDa 分子種の小胞体への移行、53 kDa 分子種への変換といったステップは、ヒスタミン合成の調節機構として重要な役割をもつことが予想され、今後更なる検討が必要である。

## 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

#### 【要約】

第一章ではラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 において HDC が翻訳後プロセッシングを受け、細胞内局在性の異なる二種の活性体（74 kDa、53 kDa 分子種）として存在することを明らかにした。またサイトゾルに存在する 74 kDa 分子種は非常に速い代謝回転を行うタンパクであることが示唆された。HDC は転写レベルでも調節を受けることが知られているが、刺激により転写量が増加あるいは減少する際に直接の影響を受けるのは前駆体である 74 kDa 分子種であると考えられる。そこで 74 kDa 分子種の分解系に関わる因子について検討を行った。74 kDa 分子種はパルス-チェイス実験の結果から半減期が 30 分未満の短寿命のタンパクであった。培地中に各種のプロテアーゼ阻害剤を添加し 74 kDa 分子種の代謝回転を調べたところ、プロテアソーム阻害剤 (ZL3H、lactacystin、ALLN) により分解が抑制された。また抗 HDC 抗体で免疫沈降を行い、沈降物の抗ユビキチン抗体によるイムノブロットを行ったところ、ユビキチンにより修飾された分子種が検出された。また、その量はプロテアソーム阻害剤の前処理により増加した。さらにインビトロの系において 74 kDa 分子種の分解を検討したところ、反応は ATP 依存的であった。

以上の結果は 74 kDa 分子種がユビキチン-プロテアソーム経路の基質であることを示しており、そのサイトゾルにおける酵素活性は厳密に調節されていることを示唆するものである。



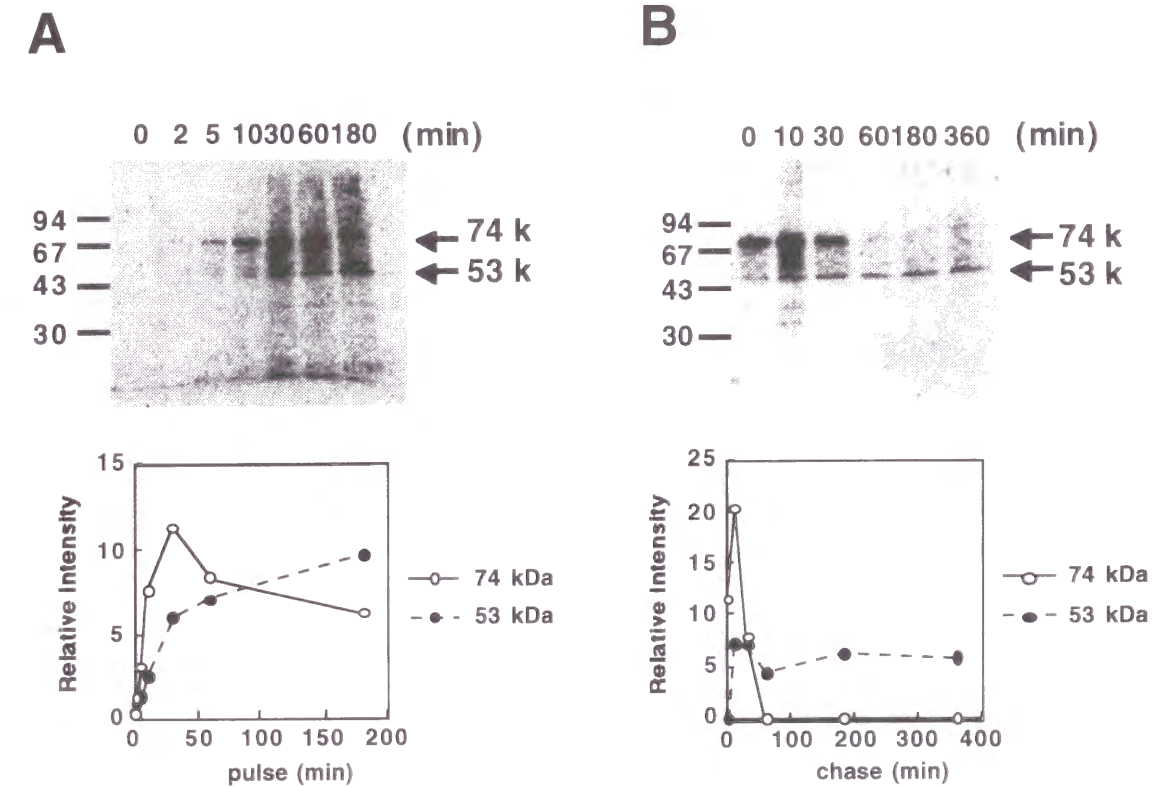
## 【結果】

### (1) HDC 分子種の代謝回転の検討

第一章ですでに示唆されているが、HDC 分子種の代謝回転について [<sup>35</sup>S]メチオニンを用いてパルス-チェイス実験を行い免疫沈降によりその詳細を解析した。Fig. 7A はパルス標識の経時変化を調べたものであるが、74 kDa 分子種は標識 2 分後から検出され、一方 53 kDa 分子種は 5 分後から検出された。53 kDa 分子種は標識時間に応じてその量が増加した。また 10 分間標識後、非標識メチオニンを加えてチェイス実験の経時変化を調べたところ、74 kDa 分子種は半減期 30 分未満の速い代謝回転を示すのに対し (Fig. 7B)、53 kDa 分子種はチェイス 6 時間後でも検出された。またグラフに示すように 74 kDa 分子種の減少は 53 kDa 分子種の増加と対応関係が見られなかった。

### (2) 74 kDa 分子種の分解に対するプロテアーゼ阻害剤の効果

(1) で観察された 74 kDa 分子種の急激な分解に関わるプロテアーゼを同定するために、様々なプロテアーゼ阻害剤を培地中に添加しその効果を検討した (Fig. 8A)。セリンプロテアーゼ阻害剤である aprotinin (lane 3、4)、leupeptin (lane 5、6)、benzamidine (lane 7、8)、PMSF (lane 9、10)、システインプロテアーゼ阻害剤である E-64 (lane 11、12)、酸性プロテアーゼである pepstatin A (lane 13、14) をそれぞれ培地に前処理し、(1) と同様に 10 分間パルス標識し 90 分間チェイスを行ったところいずれも 74 kDa 分子種の分解を阻害しなかった。次にプロテアソーム阻害剤として知られる ZL3H (lane 3、4)、lactacystin (lane 5、6)、ALLN (lane 7、8)、ZL2H (lane 9、10) を前処理した場合 (Fig. 8B) には、分解の抑制が見られた。ZL3H および ZL2H はプロテアソームおよびカルパインを阻害することが知られているが、同濃度では ZL3H の方がプロテアソーム選択的であることが報告されている [35]。そこで ZL3H と ZL2H 処理を比較したところ、ZL3H 処理でより強い阻害効果が観察された (Fig. 8C)。



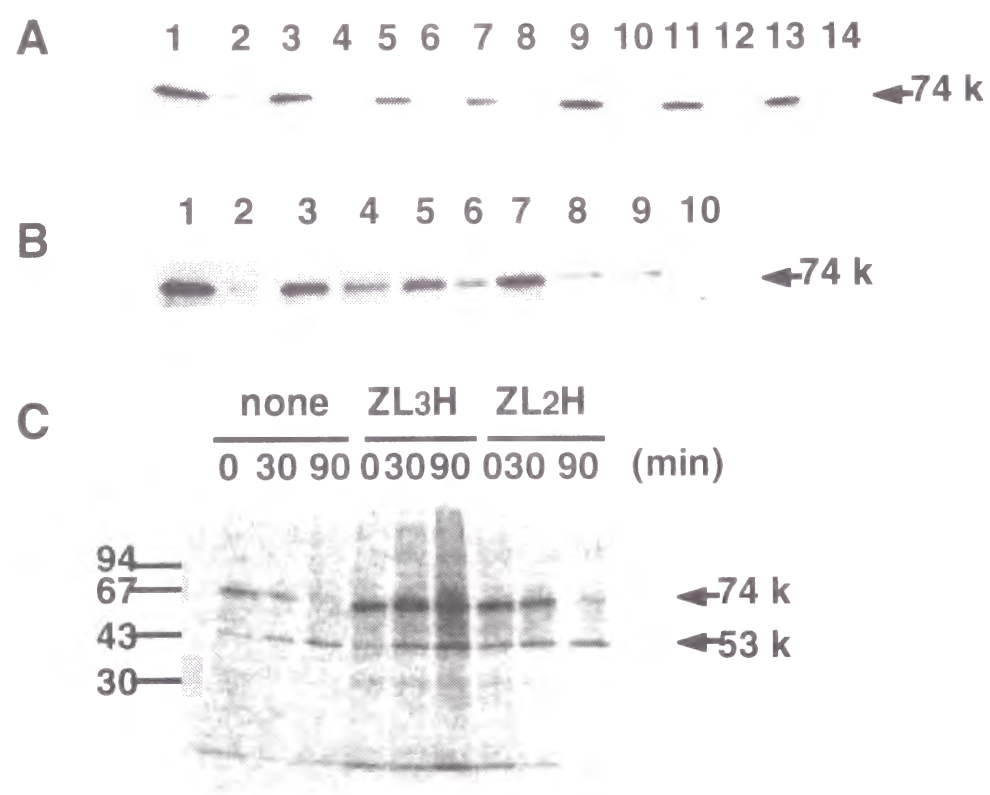
**Fig. 7 Time-dependent formation of the 74 kDa and 53 kDa forms of HDC**

RBL-2H3 cells ( $1 \times 10^7$  cells/lane) were pulsed with [<sup>35</sup>S] methionine for the time periods indicated (A), and chased (pulse for 10 min) for the times indicated in the presence of an excess amount of cold methionine (B) before lysis in RIPA buffer and immunoprecipitation with anti-GST-fusion HDC antiserum. The immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE and with a Fujix BAS 2000 Bio-imaging Analyzer. The 74 kDa HDC and 53 kDa HDC are indicated by the arrows.

### (3) 74 kDa 分子種のユビキチン化

HDC のユビキチン化について検討を行った。細胞を 30 分間標識し抗 HDC 抗体で免疫沈降後、沈降物を SDS-PAGE で分離、抗ユビキチン抗体によりイムノブロットを行った (Fig. 9A)。その結果、150 kDa 前後の分子量を持つスメアーなバンドが検出された。また培地中に ZL3H を前処理することによりその量は増加し、さらに高分子側にもバンドが見られた。またオートラジオグラフィーによる検出によっても、ZL3H 前処理のものでは 74 kDa 分子種の高分子側にスメアーな像が得られた。





**Fig. 8 Effect of protease inhibitors on the degradation of 74 kDa HDC**

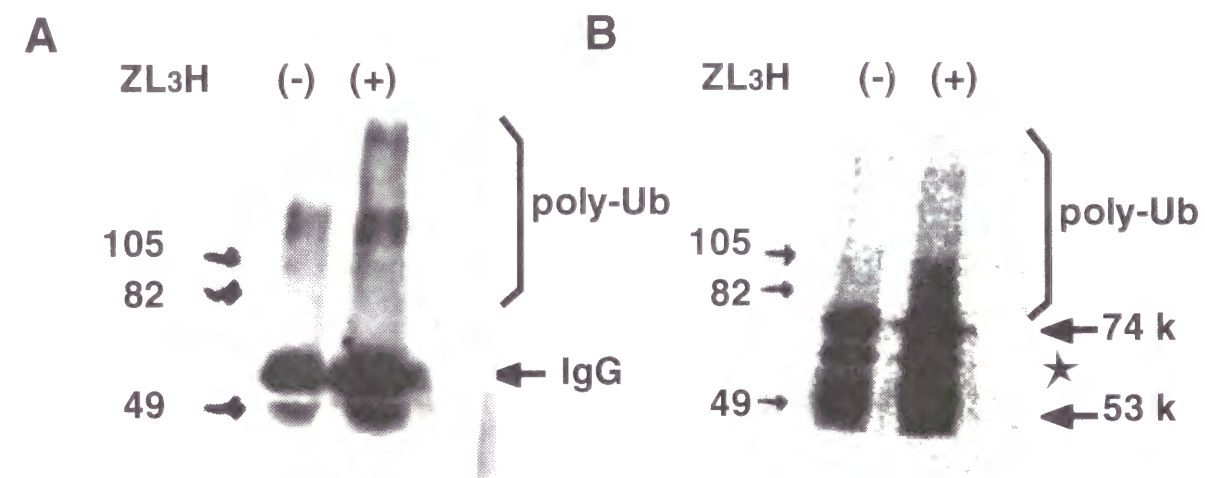
RBL-2H3 cells ( $1 \times 10^7$  cells) were incubated with or without various protease inhibitors for 3 h, and pulsed with [ $^{35}$ S] methionine for 10 min (lane 1, 3, 5, 7, 9, 11 and 13) followed by a chase for 90 min (lane 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14). The immunoprecipitated HDCs were analyzed by SDS-PAGE and a Fujix BAS 2000 Bio-imaging Analyzer. Column A shows the effects of various protease inhibitors; Lane 1 and 2, no treatment; 3 and 4, aprotinin (5  $\mu$ g/ml); 5 and 6, leupeptin (5  $\mu$ g/ml); 7 and 8, benzamidine (10  $\mu$ M); 9 and 10, PMSF (2  $\mu$ M); 11 and 12, E-64 (5  $\mu$ g/ml); 13 and 14, pepstatin A (1  $\mu$ g/ml). Column B shows the effects of proteasome inhibitors; Lane 1 and 2, no treatment; 3 and 4, ZL3H (20  $\mu$ M, pretreated for 30 min); 5 and 6, lactacystin (10  $\mu$ M, pretreated for 3 hr); 7 and 8, ALLN (100  $\mu$ M, pretreated for 30 min); 9 and 10, ZL2H (20  $\mu$ M, pretreated for 30 min). Column C shows the effects of ZL3H and ZL2H by pulse-chase study. Cells ( $1 \times 10^7$  cells/lane) were pulsed for 10 min and chased for the time periods indicated. Thirty minutes before pulse labeling, 20  $\mu$ M ZL3H and 20  $\mu$ M ZL2H and dimethylsulfonyloxide (solvent alone) were added to the culture medium. Immunoprecipitated HDCs were analyzed.

(4) 74 kDa 分子種の分解の ATP 依存性

74 kDa 分子種の分解のエネルギー依存性についてインビトロの系を用いて検討した。30 分間標識した細胞を 10,000 x g 60 分間で遠心分離し、上清画分と沈殿画分に分離した。免疫沈降により上清画分には 74 kDa 分子種、沈殿画分には 53 kDa 分子種が主として回収される (Fig. 10A) ことから、この上清画分を用いてインビトロの分解反応を調べた。脱塩カラムを用いて上清画分から低分子を除いた後 37  $^{\circ}$ C、10 分間インキュベートすることにより、ATP の非水解性アナログである ATP $\gamma$ S 存在下ではほとんど分解が見られない (lane 2) のに対して、ATP および ATP 再生系をとともに加えた場合は明らかに 74 kDa 分子種の減少が認められた (lane 3)。またその分解は ZL3H を反応系に添加することにより阻害された (lane 4、5)。

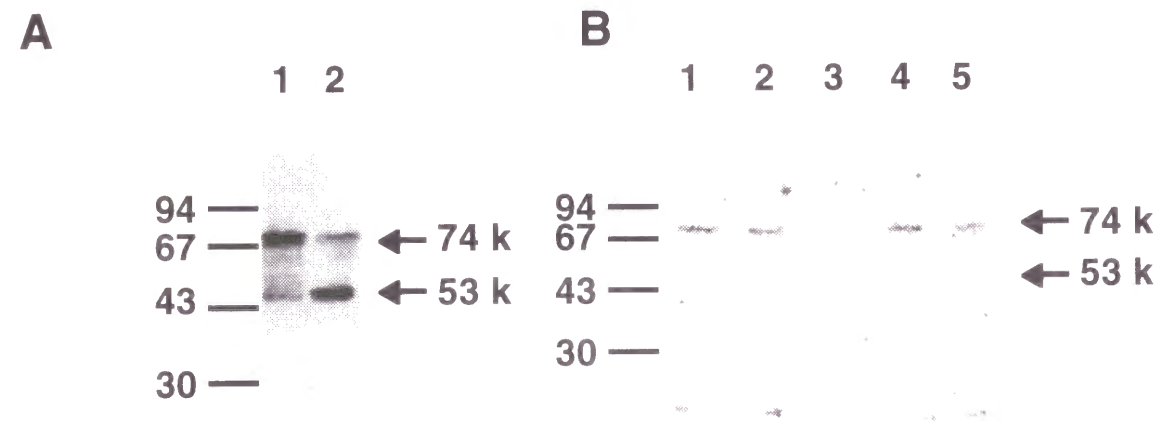
(5) RBL-2H3 細胞におけるプロテアソーム活性

本細胞中のプロテアソーム活性を特異的基質である z-leu-leu-leu-MCA を用いて測定した。(4) で得られた 10,000 x g 上清画分には  $148 \pm 24.0$  nmol/min/ $10^7$  cells の活性が検出され、これは 20  $\mu$ M ZL3H を添加することにより検出限界以下のレベルまで阻害された。



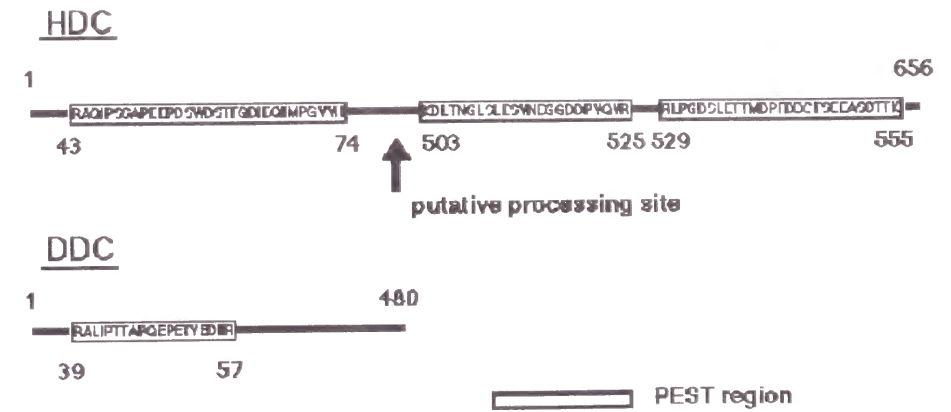
**Fig. 9 Ubiquitination of 74 kDa HDC**

RBL-2H3 cells ( $5 \times 10^7$  cells) were pretreated with (+) or without (-) 20  $\mu$ M ZL3H for 30 min, and pulse labeled with [ $^{35}$ S] methionine for 30 min and immunoprecipitated with anti-GST-fusion HDC antiserum. Immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE (7 % slab gel), and separated proteins were transferred to PVDF membrane, and immunoblotted with anti-ubiquitin antibody (1:1000) as described in "Experimental procedures". (A) Immunoblot analysis with anti-ubiquitin antibody. 'IgG' indicates antibody used in immunoprecipitation (anti-GST-fusion HDC antiserum). (B) Autoradiography of the same blot as in (A). The blot was analyzed using a Fujix BAS 2000 Bio-Imaging Analyzer. The arrows indicate the 74 kDa and 53 kDa forms of HDC. The star indicates a non-specific band. 'poly-Ub' indicates poly-ubiquitinated 74 kDa HDC.



**Fig. 10 ATP dependency of the degradation of 74 kDa HDC *in vitro***

RBL-2H3 cells ( $1 \times 10^7$  cells/lane) labeled with [ $^{35}$ S] methionine for 30 min were homogenized and fractionated by centrifugation as described in 'Experimental procedures'. (A) Radioactive 74 kDa and 53 kDa HDC in the 10,000 x g supernatant (lane 1) and precipitate fraction (lane 2) after immunoprecipitation with anti-GST-fusion HDC antiserum. (B) Changes in radioactive 74 kDa HDC in aliquots of the 10,000 x g supernatant which were incubated for 10 min at 37°C with (lane 4 and 5) or without (lane 2 and 3) 20  $\mu$ M ZL3H. The supernatant was incubated in the (-) ATP buffer (the lysis buffer containing 2 mM ATP $\gamma$ S) (lane 2 and 4) and in the (+) ATP buffer (the lysis buffer containing 2 mM ATP, 1 mM creatine phosphate and 37.5  $\mu$ g/ml creatine phosphokinase) (lane 3 and 5). Lane 1 is the control without incubation. The arrows indicate the 74 kDa and 53 kDa forms of HDC.



**Fig. 11 PEST region of HDC and DDC**

Amino acid sequences of HDC and DDC are represented by a one-letter code. Number indicates the position of the amino acid in HDC or DDC. The putative processing site of HDC is indicated by an arrow. PEST regions in HDC and DDC are boxed.

## 【考察】

細胞内におけるタンパク分解には大きく分けて二つの経路が知られている。一つはリソゾーム内における加水分解であり、もう一つは今回着目したサイトゾルにおけるユビキチン-プロテアソーム経路である。プロテアソーム経路は、筋細胞におけるタンパク分解や細胞周期を調節するタンパク、あるいは転写因子など、細胞機能の維持に重要なタンパクの分解を司ることが知られている [36]。また近年、一部の酵素が基質となる例も報告されており、tyrosine aminotransferase [37]、ornithine decarboxylase (ODC) [38]などはプロテアソーム経路により分解される。著者は HDC もまたユビキチンによる修飾を受けた後にプロテアソーム経路によって ATP 依存的に分解されることを明らかにした。

第一章および Fig. 10 の検討からサイトゾルには 74 kDa 分子種のみが存在することが明らかとなった。また免疫沈降を用いた代謝回転に関する検討から、74 kDa 分子種は短寿命のタンパクであるのに対して、53 kDa 分子種は比較的安定なタンパクである (Fig. 7)。さらに 74 kDa 分子種の減少に応じた 53 kDa 分子種の増加が見られないことから、74 kDa 分子種のサイトゾルにおける代謝経路は二種あると考えられる。すなわち一つは第一章でもふれた小胞体への移行、内腔側でのプロセッシングであり、これについては第三章で考察する。もう一つはこの章で検討したプロテアソームによる分解である。プロテアソームによって分解されるタンパクでこれまでに報告されているものは、いずれも細胞の機能維持に重要なタンパクであり、転写・翻訳とプロテアソームによる分解のバランスによって細胞内でその量は厳密に調節されている。このことを考慮すると、サイトゾルの 74 kDa 分子種がプロテアソームによって分解されることには何らかの生理的に重要な機能があることが予想される。ヒスタミンはいくつかの癌細胞 [10, 17]、あるいは未分化な血球系細胞 [7] において増殖因子としてはたらくことが知られている。前者の作用は  $H_{1C}$  と呼称される細胞内のヒスタミン結合サイトを介して、後者は  $H_2$  受容体を介して作用するものと考えられている。これらの例のいずれにおいても細胞内の

HDC の酵素活性が上昇することが知られており、増殖に関わるヒスタミンは新生ヒスタミンであると考えられる。このような知見と著者の得た結果を考慮すると、新生ヒスタミンの供給源はサイトゾルに存在する 74 kDa 分子種であり、その機能が細胞増殖という重要なものであるためにプロテアソームにより速やかに分解される可能性も考えられる。この点については、癌細胞、血球系前駆細胞を用いた HDC の代謝回転の検討、ヒスタミンの細胞からの放出についてさらに検討を加える必要がある。

ODC は細胞増殖に重要なポリアミン合成の律速酵素である [39, 40]が、これはユビキチン化されず ODC 特異的な antizyme と呼ばれる結合タンパクによりプロテアソーム経路で分解される [41]。最近、ODC と HDC の間に PEST 領域と呼ばれる共通した構造上の特徴があることが指摘されている [42]。PEST 領域とはリジンやアルギニンといった正電荷を持つアミノ酸に挟まれたプロリン (P)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、セリン (S)、スレオニン (T) に富む親水性の配列であり、細胞内において短寿命のタンパクの多くに見いだされる配列である [43]。現段階ではプロテアソームあるいはユビキチン化とどのように関わるかについては確定した報告はされていないが、PEST 領域を有するタンパクの多くはプロテアソームの基質でもある。ラット HDC には PEST 領域は三カ所存在し、N-末側の一カ所 (43-74) は ODC あるいは dopa decarboxylase (DDC) のものと対応している。また C-末側の二カ所 (503-525、529-555) は 74 kDa 分子種に特有の配列であり [42]、74 kDa 分子種の分解に何らかの寄与をするものであると考えられる (Fig. 11)。

肥満細胞において HDC に翻訳後プロセッシングを介した二つの分子種が存在する生理的な意義は未だ明らかではない。また 74 kDa 分子種によって作り出されるサイトゾルのヒスタミンプールがどのような反応に関わるかも不明である。しかしながらプロテアソーム経路を介してその量が厳密に調節されていることから、74 kDa 分子種は HDC の転写促進に対応した一過性の速やかなヒスタミン合成の誘導に関わるものが予想される。今後はそのようなタイプのヒスタミン合成が行われると推定される系である一部の癌細胞、未分化な血球系細胞、胃の enterochromaffin-like cell (ECL 細胞) などにおける



### 第三章

#### 前駆体 HDC 分子種の小胞体移行、プロセシングの解析

##### 【要約】

第一章ではラット好塩基球細胞株において、サイトゾル、顆粒という二つのヒスタミンプールが HDC の二つの分子種によりそれぞれ形成されることが明らかとなった。また第二章の検討により 74 kDa 分子種はプロテアソーム経路により速やかに分解されることが判明した。74 kDa 分子種の小胞体移行は、プロテアソームによる分解から免れるために、あるいは 53 kDa 分子種への変換量を調節する上で重要なステップであると考えられる。すなわちこの小胞体移行と翻訳後プロセシングが細胞内のヒスタミンプールの調節に重要な役割を有することが予想される。そこでそのメカニズムに関してそれぞれ検討を行った。COS 細胞発現系を用いてマウス HDC の前駆体、C-末欠失変異体の細胞内局在性について検討したところ、小胞体への局在に必要な領域は C-末 10 kDa の範囲に存在することが判明した。またこの領域をサイトゾルに発現する green fluorescent protein (GFP) の C-末に融合させた組み換えタンパクは小胞体に局在することから、HDC の C-末 10 kDa の領域に小胞体移行を引き起こす配列が存在すると考えられた。HDC は N-末端に典型的なシグナル配列を持たないことから、翻訳と小胞体移行は共役しないことが予想されたが、インビトロ翻訳系を用いたマイクロソームへの移行実験から HDC の小胞体移行は翻訳後起こることが確認された。また翻訳後プロセシングの機構について、バキュウロウイルス-昆虫細胞系を用いて 74 kDa 分子種を調製し検討を行った。既知のプロテアーゼではブタ膵臓エラスターゼ特異的に、74 kDa 分子種は 53 kDa 分子種に変換された。変換された 53 kDa 分子種は精製酵素と同様の性質を有し、生体内においてもエラスターゼ様のプロテアーゼが HDC の翻訳後プロセシングに関わることが示唆された。

【結果】

(1) 74 kDa 分子種の C-末領域を介した膜画分への移行

HDC の小胞体移行に関わる配列を同定するために、COS 細胞発現系を用いて 74 kDa 分子種、およびその C-末欠失変異体の細胞内局在性に関する検討を行った。これまでの知見 [22] から、翻訳後プロセシングにより C-末 20 kDa の領域が失われると考えられるのでまず 74 kDa 分子種と C-末欠失変異体 54 kDa 分子種の細胞内局在性を蛍光抗体法により調べた。Fig. 12 は抗 HDC 抗体および抗 PDI 抗体により発現細胞を二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察したものである。74 kDa 分子種のシグナルは PDI のシグナルとほぼ一致 (Fig. 12A) し、小胞体への集積が確認された。一方 54 kDa 分子種は PDI

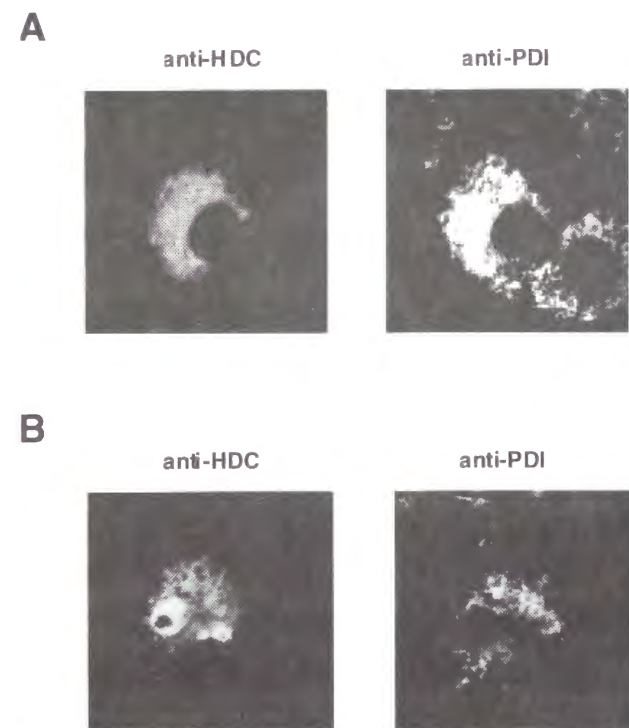


Fig. 12 Confocal microscopic observation of HDC and PDI

Cells expressing the 74 kDa HDC (A) or 54 kDa HDC (B) were double-stained with anti-GST fusion HDC antiserum (left) and with anti-PDI antibody (right) as described in the legend to Fig. 3. The fluorescent images were observed with a confocal microscope.

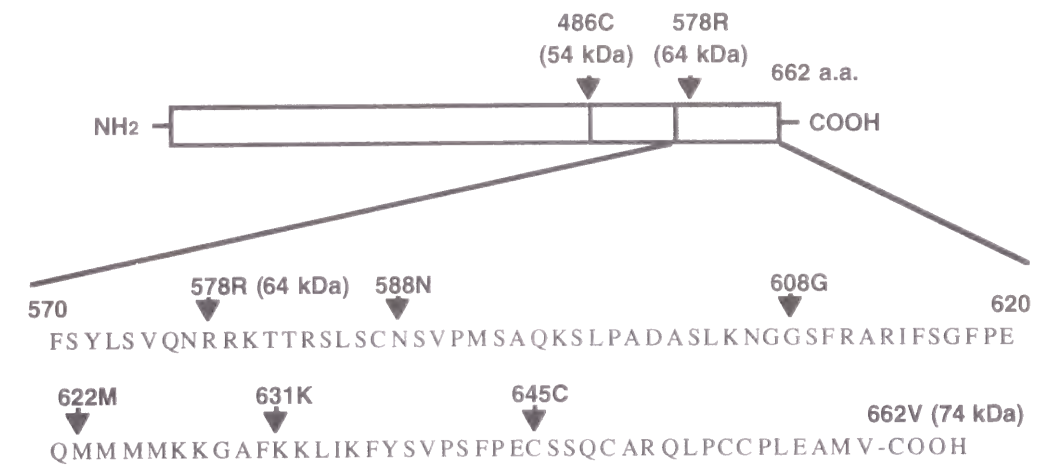


Fig. 13 Carboxyl-terminal sequence of HDC

The carboxyl-terminal region of HDC is represented with one-letter codes for amino acids. The mutated amino acid residues in the mutant HDCs numbered relative to the stop codon are indicated by arrows.

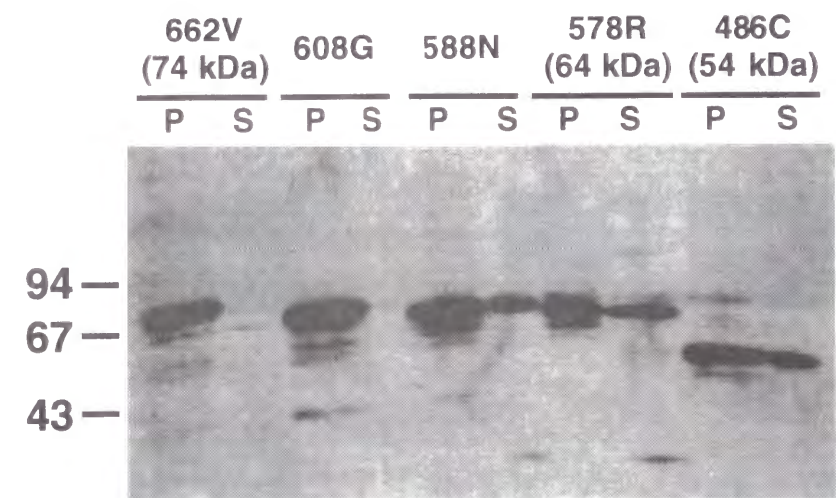


Fig. 14 Immunoblot analyses of the various carboxyl-terminal deletion mutants expressed in COS-7 cells

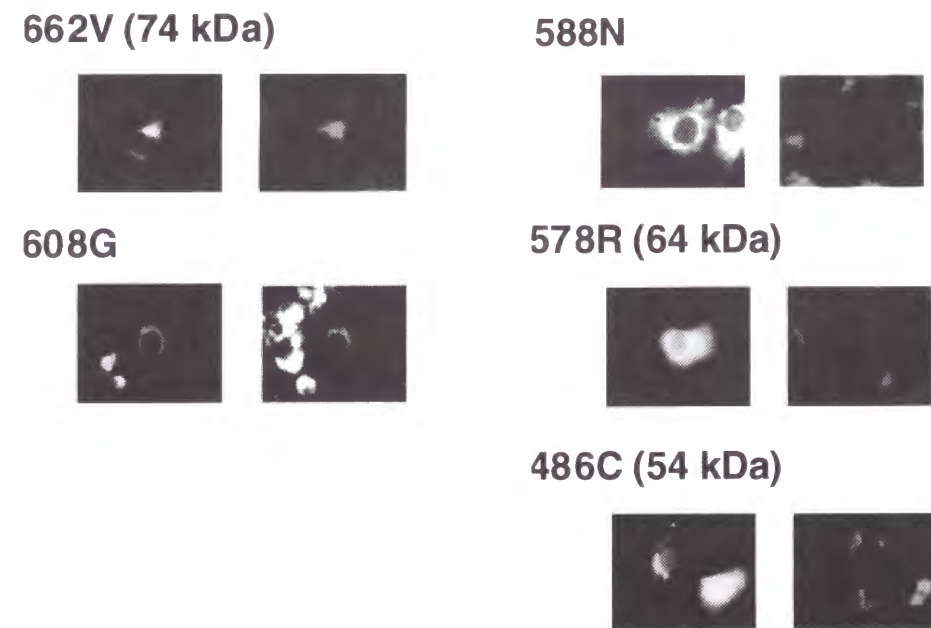
Cells transfected with the vectors indicated were fractionated into particulate (P) and supernatant (S) fractions as described under 'Experimental Procedures'. Each fraction was subjected to SDS-PAGE and immunoblot analysis with anti-GST-fusion HDC antibody. The molecular weight marker is indicated on the left.

とは異なる分布を示し、細胞内全体にシグナルが観察された (Fig. 12B)。そこで Fig. 13



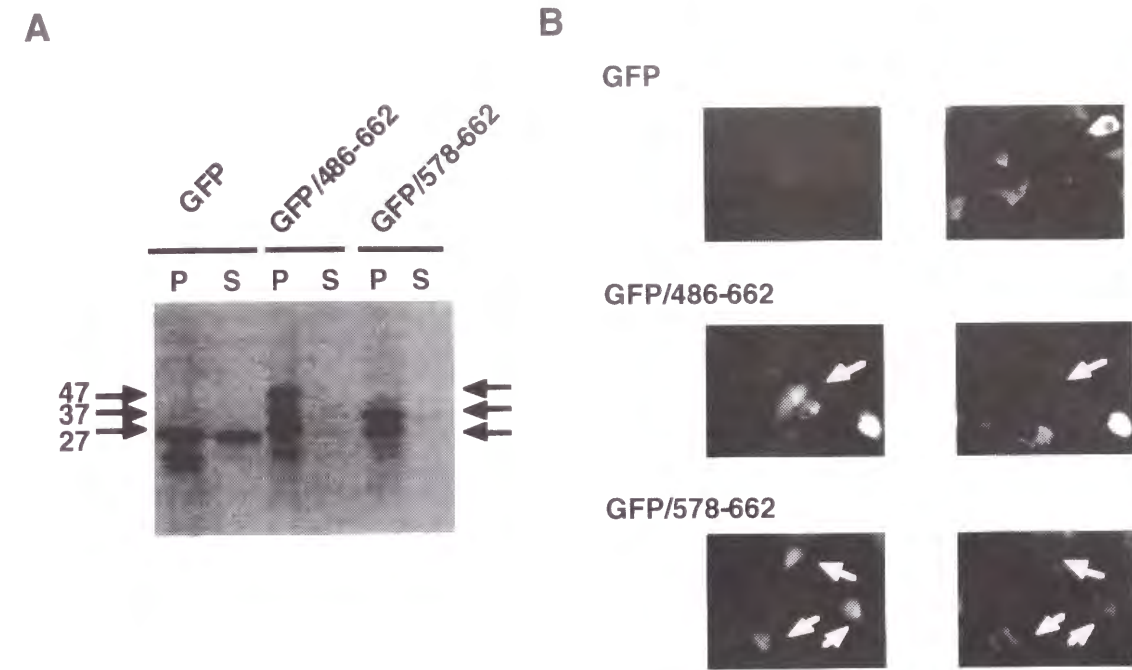
に模式的に示すようにこの領域に関してさらに詳細に C-末欠失変異体を作製した。

まず各欠失変異体について発現細胞のイムノブロットを抗 HDC 抗体を用いて行った。細胞を 100,000 x g 1 時間の遠心分画により上清画分と沈殿画分に分離し、それぞれについて検討したところ、74 kDa 分子種および 608 番目のグリシンを終止コドンに置換した 608G 分子種までは上清画分には発現が認められないのに対して、588 番目のアスパラギンを終止コドンに置換した 588N 分子種およびそれより小さい分子量の変異体は上清画分にバンドが検出された (Fig. 14)。次に蛍光抗体法を用いて細胞内局在性に関して検討した。小胞体のマーカーとしては PDI を用い二重染色により局在性を判定した。その結果、74 kDa 分子種、608G 分子種は小胞体に局在が見られるのに対して、588N 分子種、



**Fig. 15. Immunofluorescence study of HDC and its carboxyl-terminal deletion mutants**

An immunofluorescence study was performed with anti-GST-fusion HDC antibody (1:500) (left) and anti-PDI antiserum (1:500) (right) and stained with secondary antibody, anti-rabbit IgG antibody conjugated with FITC (1:200) and anti-mouse IgG antibody conjugated with rhodamine (1:150). Cells were transfected with the vectors indicated. After fixation with 100 mM sodium phosphate, pH 7.4, containing 2 % paraformaldehyde, 0.1 % glutaraldehyde and 3 % sucrose, cells were permeabilized with 0.1 % of Triton X-100. Thereafter cells were stained.



**Fig. 16 Translocation of GFP by the carboxyl-terminal sequence of HDC**

(A) Cells transfected with pEGEP-C1, pEGFP-C1/HDC486-662, or pEGFP-C1/HDC578-662 were fractionated into particulate and supernatant fractions as described under 'Experimental Procedures'. Each fraction was subjected to SDS-PAGE and immunoblot analysis with anti-GFP antibody (1:1000). The molecular weights of GFP, GFP-fusion HDC578-662 and GFP-fusion HDC486-662 are indicated as 27, 37, and 47 kDa with the arrows, respectively. (B) GFP and GFP-fusion HDC proteins were detected by their intrinsic fluorescence (left). The counter-staining of PDI was performed (right) as described in the legend to Fig. 3. The transfection and fixation of the cells was performed as described in the legend to Fig. 3. The cells expressing GFP-fusion HDC were indicated by white arrows.

578R 分子種は 486C 分子種 (54 kDa C-末欠失変異体) と同様に細胞内に広く分布し PDI と異なる局在性を示した (Fig. 15)。

## (2) GFP-HDC 融合タンパクの小胞体への局在

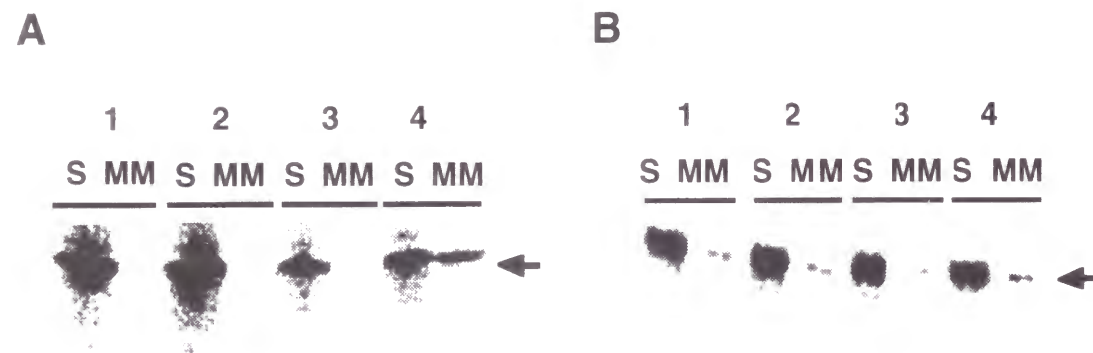
(1) で得られた結果をもとに HDC の C-末断片と紫外線照射により蛍光を発することから細胞内局在性の検討において用いられる green fluorescent protein (GFP) の融合タンパクの組み換え体を COS 細胞で発現させ、局在性を検討した。GFP は COS 細胞で発現させるとサイトゾルに局在し、遠心分画では 100,000 x g 上清画分にも抗 GFP 抗体によ



るイムノプロットによりバンドが検出される (Fig. 16)。一方 GFP の C-末に HDC の C-末配列 (486-662、578-662) を結合させた組み換え体とともに PDI と同様の細胞内局在性を示し、100,000 x g の上清画分にバンドは検出されなかった。

### (3) インビトロ翻訳系を用いた小胞体移行の解析

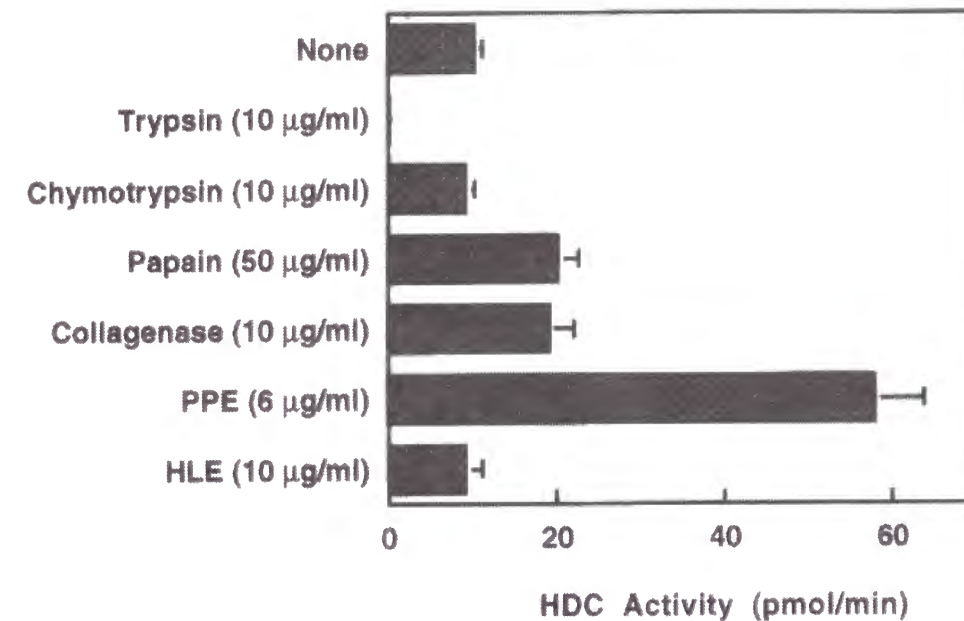
小胞体移行の解析に用いられる、ウサギ網状赤血球ライセートによるインビトロ翻訳系により HDC の小胞体移行を解析した。インビトロで作製した HDC mRNA をウサギ網状赤血球ライセートとともに [<sup>35</sup>S]メチオニン存在下インキュベートし、標識 HDC を調製した。また小胞体移行はイヌ膵臓ミクロソームを反応系に添加することにより、ミクロソーム画分へ移行する標識 HDC を検出することにより評価した。74 kDa 分子種は翻訳をシクロヘキシミドで停止した後にミクロソーム膜とインキュベートすることによ



**Fig. 17 Post-translational targeting of HDC**

[<sup>35</sup>S]methionine-labeled 74 kDa (A) and 54 kDa (B) HDC were synthesized respectively using an in vitro translation system with rabbit reticulocyte lysates. The microsomal membrane fraction (MM) and supernatant fraction (S) was isolated by the alkaline floatation method described under 'Experimental Procedures'. To perform the co-floatation, rat microsomal membranes were added to the translation mixtures (lane 2, 3 and 4). Control was performed with no microsomal membranes (lane 1). The canine pancreatic microsomal membranes were added to the translation mixtures during the translation reaction (lane 3), or after the addition of cycloheximide and incubated for 90 min at 30°C (lane 4).

て膜画分へと移行した (Fig. 17A、lane 4)。しかしながら翻訳反応中にミクロソーム膜を添加したのに関しては移行は検出されなかった (lane 3)。一方、54 kDa C-末欠失変異体はいかなる条件においてもミクロソーム膜画分への移行を起こさなかった。



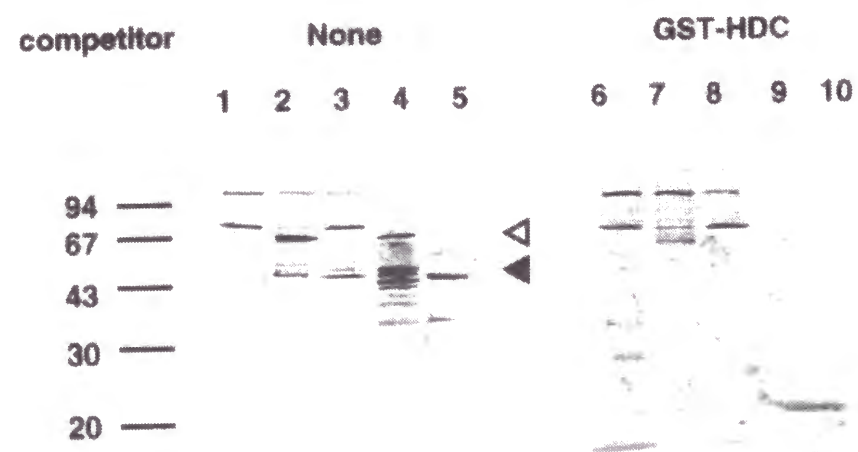
**Fig. 18 Effect of various proteinase on HDC activity in the particulate recombinant mouse mastocytoma HDC (74K-rHDC)**

After Sf9 cells infected with recombinant virus were harvested, they were washed and suspended in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8), containing 0.2 mM dithiothreitol, 0.01 mM pyridoxal 5'-phosphate, 2 % polyethyleneglycol #300, and disrupted by freezing in liquid nitrogen and thawing at 37°C. The suspension was then centrifuged at 100,000 x g for 20 min at 4°C, and the particulate fraction was washed and resuspended in the same buffer. An aliquot of the particulate fraction (2.3 mg protein/ml) was incubated for 10 min at 37°C with the indicated concentrations of trypsin, chymotrypsin, papain, collagenase, porcine pancreatic elastase (PPE), human leukocyte elastase (HLE). An aliquot of each reaction mixture was assayed for enzymatic activity. Values represent the mean±S.E. (n=6)

### (4) 翻訳後プロセシングのインビトロにおける解析

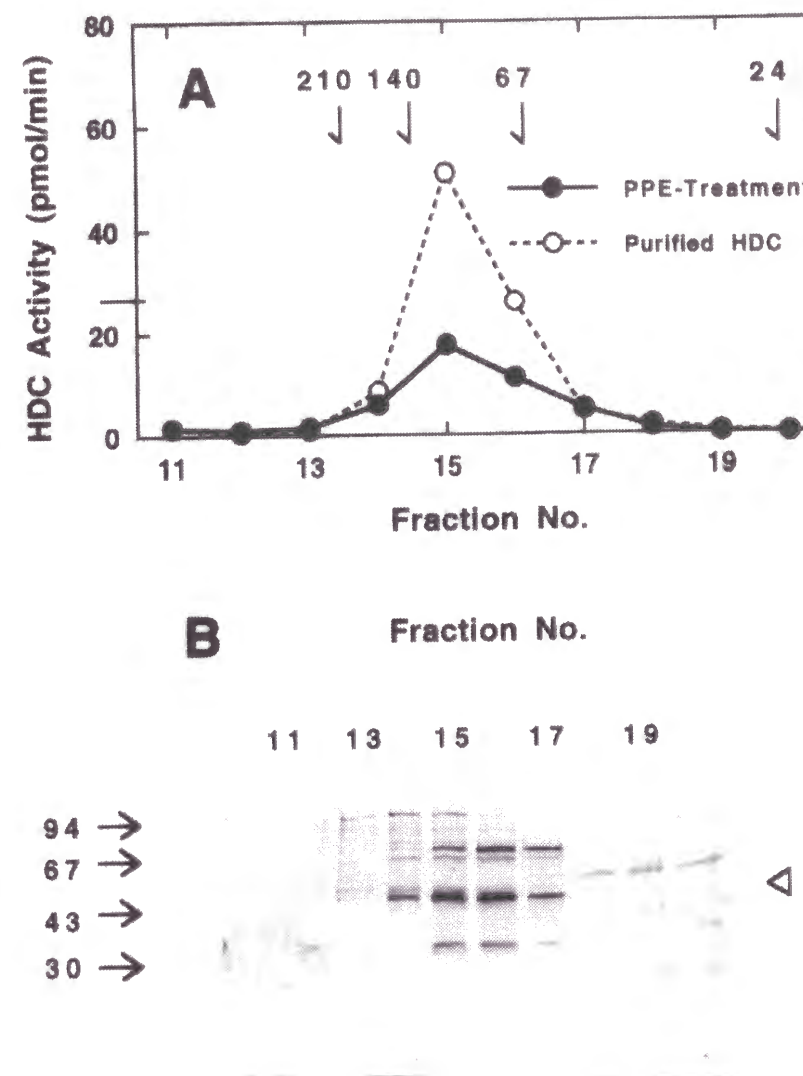
74 kDa 分子種の翻訳後プロセシングに関わるプロテアーゼの性状を明らかにするため、

まずインビトロの系におけるプロセッシング反応のモデル系を作製した。基質としてバキューロウイルス-昆虫細胞発現系で調製した 74 kDa 分子種を用い、既知のいくつかのプロテアーゼによる処理を行った。発現系において 74 kDa 分子種は沈殿画分に存在する [22] が、その沈殿画分にプロテアーゼを加え、酵素活性の変化およびイムノプロットにより 53 kDa 分子種の生成を検出した。Fig. 18 は酵素活性の変化を調べたものであるが、種々のプロテアーゼの中でブタ膵臓エラスターゼにより酵素活性の上昇が認められた。そこでこの処理により生成する分子種を抗 HDC 抗体を用いたイムノプロットにより同定したところ、可溶性の 53 kDa 分子種が生成していることが明らかとなった (Fig. 19)。



**Fig. 19 Conversion of the particulate 74K-rHDC into soluble 53K-rHDC species by PPE**

The PPE-treated particulate fraction prepared by the procedure described in the legend of Fig. 17 was centrifuged at 100,000 x g for 20 min. Aliquots of the obtained supernatant and particulate fractions from PPE-treated 74K-rHDC species were immunoblotted using affinity-purified anti-HDC antibody (1:1000), with (right) or without (left) GST-fusion HDC (5 µg/ml). Lanes 1 and 6; the supernatant without PPE, Lanes 2 and 7; the precipitate without PPE, Lanes 3 and 8; the supernatant with PPE, Lanes 4 and 9; the precipitate with PPE, Lanes 5 and 10; purified mouse mastocytoma HDC (15 ng). 74K-rHDC and 53K-rHDC were indicated by the white and black arrow heads, respectively.



**Fig. 20 Molecular masses of PPE-released HDC species**

The supernatant from PPE-treated 74K-rHDC or the purified mouse mastocytoma HDC was separately applied to a Superose 12 HR 10/30 column equilibrated with 50 mM potassium phosphate (pH 6.8) containing 0.2 M NaCl, 0.2 mM dithiothreitol, 0.01 mM pyridoxal 5'-phosphate, 2 % polyethylene glycol #300. Aliquots of the fractions were assayed for the enzyme activity (A) or immunoblotted on SDS-PAGE (B) to determine the size of the size of the HDC peptide. The molecular mass markers were catalase (210 kDa), lactate dehydrogenase (140 kDa), malate dehydrogenase (67 kDa), and α-chymotrypsinogen (24 kDa). 53K-rHDC was indicated by the arrow head.

また、処理後の可溶性画分をゲルろ過クロマトグラフィーにより解析したところ、およそ 110 kDa の溶出画分に酵素活性が検出され、その画分に存在する分子種は 53 kDa 分子

種であり精製酵素と同様に二量体形成をしていることが明らかとなった (Fig.20)。

## 【考察】

第一章の結果から肥満細胞において 74 kDa HDC はサイトゾルで翻訳された後、小胞体へ移行することが明らかとなったが、その機構に関しては不明であった。新生タンパクの小胞体への移行には二つの経路があることが知られている。一つはタンパクの N-末側にシグナル配列が存在する場合で、これは signal recognition particle (SRP) およびその受容体 (SRPR) を介して移行する [44-46]。またこの経路では小胞体移行と翻訳は共役しており、翻訳中のタンパクが小胞体内へ輸送される。もう一つは N-末にシグナル配列が存在しないタンパクの小胞体移行で、これは SRP/SRPR 非依存的であり翻訳終了後、完全長のタンパクが遊離リボソームから解離した後に輸送される [47]。近年、後者の例として C-末側に挿入配列 (insertion sequence) と呼ばれる疎水的な領域を有する一群のタンパクが報告されている [48]。HDC においては、N-末のシグナル配列、あるいは C-末の挿入配列といった疎水的な一次構造は認められないことから、小胞体移行に関わる C-末領域は新規の移行配列を含んでいると考えられる。さらにこの領域は他のタンパクと相同性を持たないが、異種の HDC 間では比較的高い相同性を有する保存された領域であることから、HDC 特異的な小胞体移行のメカニズムが想定される。C-末欠失変異体を用いた発現系での検討は C-末 10 kDa の領域のうち特に 588 番目のアスパラギンから 607 番目のグリシンが重要であることを示唆する (Fig. 14、15) が、この領域のみを GFP に融合させた組み換え体は小胞体移行を示さなかった (未発表データ) ことから小胞体移行に必要な十分な配列の同定は今後の課題である。

翻訳後 targeting を受けることが報告されている哺乳類のタンパク [49-52] は極めて稀で、そのメカニズムは依然として不明な点が数多く残されている。酵母の系においては、SRP/SRPR 経路を欠損させた株も生存可能でありいくつかのシグナル配列を有する分泌タンパクも正常に分泌される [53]。酵母においては Sec62/63 complex と呼ばれる膜タンパクが SRP/SRPR 非依存的な小胞体輸送において重要な機能を果たすことが知られてい



る [54] が、逆にこれらを欠損させた株も生存可能である。酵母においては両者の経路を用いることができる分泌タンパクと、それぞれの系に特異的な分泌タンパクがあることが知られている [54, 55]。Sec62/63 complex の哺乳類における対応遺伝子は同定されているがその機能は現段階では不明であり、HDC の翻訳後 targeting (Fig. 17) にどのように関わるかは非常に興味深い点である。また酵母の系では、サイトゾルと小胞体内に存在する heat shock protein (HSP) 70 family のタンパクが小胞体内へのタンパクの輸送に関与していることが報告されている [56]。しかしながらそれらは細胞内に大量に存在するタンパクであり小胞体特異的な輸送を説明するには至っていない。著者は HDC ではその C-末領域に Hsp70 が結合することを示唆する結果を得ているが (未発表データ)、今後 HDC の C-末領域に結合するタンパクについて解析を行うことにより翻訳後 targeting のメカニズムがさらに詳細に明らかになることが予想される。HDC の小胞体移行に関しては、COS 細胞発現系、インビトロ翻訳系で再現されることから肥満細胞特異的な機構ではないことが予想されるが、これらの系において HDC が内腔側へと輸送されているかどうかについては明らかではない。今後ヒスタミン合成の調節という観点からも、この点について検討を加える必要がある。しかしながら COS 細胞、インビトロ翻訳系におけるミクロソームではプロセッシングは行われぬ (Fig. 14、17) ことから、翻訳後プロセッシングはおそらく HDC 発現細胞特異的な機構であることが予想される。

翻訳後プロセッシングに関わるプロテアーゼの性質について、大量調製が可能な Sf9 昆虫細胞発現系を用いてインビトロの検討を行ったところ、ブタ膵臓エラスターゼにより 74 kDa 分子種から 53 kDa 分子種への変換が認められた (Fig. 18、19)。Sf9 細胞において 74 kDa 分子種は不溶性画分に発現するが、その性質は大腸菌発現系などでしばしば観察される封入体 (inclusion body) に近いものである [30]。しかしながら生成した 53 kDa 分子種は高活性型の二量体であり (Fig. 20)、その酵素学的性質はマウス癌化肥満細胞 P-815 から得られた精製酵素とよく一致している。近年、著者の所属する研究室において、癌化肥満細胞由来のプロセッシング酵素の精製が試みられ、それはセリンプロテアーゼ阻害剤である benzamidine 感受性であることが判明した [57]。このプロテアーゼがエラスター

ゼ様の基質特異性を持つかどうかは不明であるが、ブタ膵臓エラスターゼは benzamidine により阻害を受けることから、今回検討したモデルは生体内のプロセッシング反応を反映していると考えられる。エラスターゼはセリンプロテアーゼであるが、遺伝子間の相同性から進化的にグループ分けするとその superfamily には mast cell protease (MCP) や granzyme B といった酵素群が含まれている [58]。MCP はマウスでこれまでに 8 種類が同定されており肥満細胞の分化指標として用いられている [59]。MCP は肥満細胞において顆粒内に局在し、顆粒タンパクの中で占める比率も高いことが知られているが、これらの酵素学的性質に関しては不明の点が多い。HDC は小胞体内腔側でプロセッシングを受けることが第一章で示唆されていることから、この MCP family がプロセッシングに関わる可能性も考えられる。

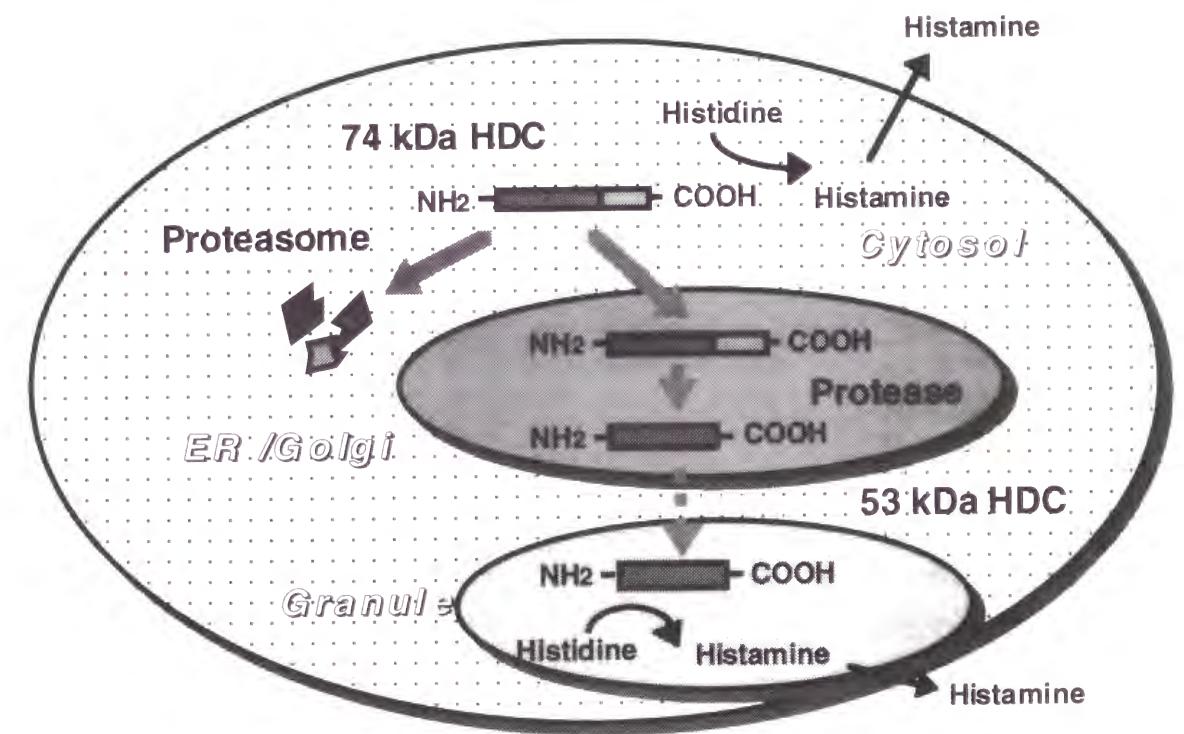


Fig. 21 The regulation of histamine synthesis by the 74- and 53-kDa HDC

第一章、第二章において明らかにされた知見から、サイトゾルのヒスタミンプールおよび顆粒内のヒスタミン量を調節する機構として、74 kDa 分子種の小胞体移行あるいは翻訳後プロセッシングは重要な岐路であると考えられる (Fig. 21)。今後この両者の調節機構の詳細をさらに明らかにすることにより、生体内におけるヒスタミン合成調節のメカニズムが解明されることが期待できる。

## 結語

著者はヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) の活性発現調節機構に関する研究を行い、次の成果を得た。

1. ラット好塩基球細胞株 (RBL-2H3) において HDC は 74 kDa の分子量を持つ前駆体としてサイトゾルで翻訳された後小胞体へと輸送され、その内腔側で 53 kDa の成熟体へと変換される。また細胞内にはそれぞれの分子種に由来する、サイトゾル、顆粒という二種のヒスタミンプールが存在する。
2. 同細胞株において 74 kDa 分子種はユビキチン-プロテアソーム経路を介した速い代謝回転を行うのに対して、53 kDa 分子種は安定である。
3. 74 kDa 分子種の小胞体移行はその C-末 10 kDa の領域を介しており、シグナル配列非依存的な翻訳後移行である。

これらの基礎的研究成果は、従来不明であったヒスタミン生合成の調節機構の解明に寄与するのみならず、ヒスタミン生合成を制御する新たなヒスタミン関連医薬品の開発を可能とするものである。

## 実験方法の部

### 第一章に関する実験

#### (1) 細胞培養

ラット好塩基球細胞株 (RBL-2H3) は 10 % ウシ胎児血清 (FCS) を含む RPMI-1640 培地中で 5 % CO<sub>2</sub> 存在下培養した。実験には対数増殖期の細胞を用いた。

#### (2) [<sup>35</sup>S]メチオニン標識

細胞を 10 % 透析ウシ胎児血清を含むメチオニン不含 RPMI-1640 培地で 30 分間培養後、[<sup>35</sup>S]メチオニン (10 μCi/ml) を添加した。チェイス実験では標識後、通常のメディアウムで一回洗浄後培養を継続した。

#### (3) 免疫沈降

抗 HDC 抗体は、大腸菌を用いて GST 融合タンパクとして HDC の N-末 210 アミノ酸残基相当を調製し、ウサギ (日本白色種) に免疫して調製した [23]。実験には硫酸沈殿後、透析を行ったものを用いた。

標識した細胞を PBS で二回洗浄し、沈殿を 1 ml の RIPA buffer (30 mM HEPES-NaOH, pH 7.3, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % deoxycholate, 0.1 % SDS, protease inhibitor mix [0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM benzamidine, 0.01 mg/ml leupeptin, 0.01 mg/ml aprotinin, 0.01 mg/ml E-64, 0.001 mg/ml pepstatin A]) に懸濁し氷上で 1 時間静置した。その後 10,000 x g で 10 分間 4 °C で遠心し、上清に 0.05 ml の Proten A-Sepharose CL-4B (1:1 slurry) を加えた。4 °C で 1 時間混和し、8,000 x g 5 分間遠心を行った。その上清に抗 HDC 抗体を加え (1:200) 1 時間 4 °C で静置し、さらに Protein A-Sepharose CL-4B (1:1

slurry) を 0.05 ml 加え 1 時間 4 °C で混和した。これを 8,000 x g 5 分間 4 °C で遠心し、免疫沈降物を分離した。沈降物は 5 回 RIPA buffer で洗浄し、沈殿に等量の 2 x SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4 % SDS, 10 % 2-mercaptoethanol, 20 % glycerol, 0.1 % bromophenol blue) を加え 15 分間煮沸した。これをさらに 8,000 x g 5 分間遠心し、その上清を SDS-PAGE (10 % slab gel) [60] で分離した。ゲルは乾燥後 Fujix BAS 2000 Bio-Imaging Analyzer によって解析した。

#### (4) 細胞分画

30 分間標識した細胞 (1.5 x 10<sup>7</sup> cells) を回収後、homogenize (H1) buffer (10 mM HEPES-NaOH, pH 7.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, protease inhibitor mix) で懸濁、破碎した。破碎液は 1,000 x g 10 分間、100,000 x g 1 時間で順次遠心分画し、それぞれの沈殿画分は high-salt buffer (20 mM HEPES-NaOH, pH 7.3, 25 % glycerol, 0.5 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, protease inhibitor mix) で懸濁し、再度遠心したものを salt-extracted fraction とした。

#### (5) Streptolysin-O 処理

Streptolysin-O (SLO) は氷上 15 分間 10 mM dithiothreitol を含む PBS 中で静置し活性化した。細胞懸濁液に対して 1,000 units/ml の濃度で添加し、4 °C、10 分間結合反応を行った。PBS による洗浄を 2 回行い遊離した SLO を除き、37 °C、3 分間の反応により膜破壊を行った。

#### (6) Percoll 密度勾配遠心分画

RBL-2H3 細胞の Percoll 密度勾配遠心分画は Gullberg らの方法 [61] をもとに、若干の改変を加えた。標識した細胞 (5 x 10<sup>7</sup> cells) を回収後、1.5 ml の homogenize (H2) buffer (0.34 M sucrose, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.3, 0.3 mM EDTA, protease inhibitor mix) に懸濁



し Dounce glass homogenizer で 40 ストローク破碎を行った。残存する未破碎細胞および核は 500 x g 10 分間で遠心することにより除いた。1 ml の飽和 sucrose 上に 6 ml の Percoll layer (20 % Percoll, 15 mM HEPES-NaOH, pH 7.3, 0.25 M sucrose, protease inhibitor mix) を重層し、さらにその上に上清画分を重層後、32,000 x g 60 分間の遠心により密度勾配遠心を形成した。各画分はペリスタポンプを用いて下層から 1 ml ずつ (あるいは 0.5 ml) 回収した。酵素活性の測定には各画分を等量の Triton buffer (15 mM HEPES-NaOH, pH 7.3, 0.2 % Triton X-100) で希釈し 1 時間 4 度で静置した。その後 K buffer (10 mM K-P, pH 7.3, 0.01 mM pyridoxal 5'-phosphate, 0.2 mM dithiothreitol, 2 % polyethylene glycol #300, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM benzamide) を透析外液として 4 °C、15 時間透析を行い活性測定用に用いた。

#### (7) ヒスチジン脱炭酸酵素活性の測定

HDC 活性の測定は大森らの方法 [18] に従った。1 ml の系において基質である L-histidine 濃度は 0.8 mM とし、HDC buffer (100 mM K-P, pH 6.8, 0.01 mM pyridoxal 5'-phosphate, 0.2 mM dithiothreitol, 2 % polyethylene glycol #300, 0.2 mM aminoguanidine) 中で 37 °C 4 時間反応を行った。生成したヒスタミンは *o*-phthalaldehyde と反応させ蛍光測定により定量した [62]。

#### (8) タンパク定量

タンパク定量は Lowry らの方法 [63] に従い、ウシ血清アルブミンを標準として測定した。

#### (9) マーカー酵素活性の測定

乳酸脱水素酵素活性は Joellsson らの方法 [64]、NADPH-cytochrome c 還元酵素活性は大村らの方法 [65]、 $\beta$ -hexosaminidase 活性は Hultberg らの方法 [66] に従いそれぞれ測定し

た。

#### (10) イムノプロット

SDS-PAGE (10 % slab gel) を行った後、ゲルを電氣的に polyvinylidene difluoride 膜に転写した。転写 buffer (25 mM Tris-base, 40 mM 6-aminohexanoic acid, 0.02 % SDS, 20 % methanol) 中で 15 V 定圧下、90 分間転写を行った。膜は転写後、TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) で洗浄し、5 % スキムミルク中で 4 °C、15 時間ブロッキング反応を行った。さらにスキムミルク存在下一次抗体 (anti-PDI, anti-mannosidase II) と 37 °C、1 時間反応を行い、TTBS (TBS plus 0.05 % Tween 20) で洗浄後、抗 IgG 二次抗体と反応させ染色した。

#### (11) 蛍光抗体法

細胞を低密度で円形カバーガラス上で培養し、SLO 処理あるいは無処理のものを固定液 (100 mM Na-P, pH 7.5, 2 % paraformaldehyde, 0.1 % glutaraldehyde, 3 % sucrose) で氷上 30 分間固定後、透過液 (10 mM Na-P, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.1 % Tween 20, 0.1 % Triton X-100) で室温 10 分間 3 回の処理を行い、形質膜、内膜を透過させた。その後室温で 2 % ヤギ正常血清を含む TPBS (0.05 % Tween 20 を含む PBS) 中で 30 分間静置しブロッキング反応を行った。一次抗体 (抗 HDC 抗体; 1:500、抗 FP2 抗体; 1:500、抗 PDI 抗体; 1:500) は TPBS 中で反応を 4 °C 一晩行った。さらに High salt TPBS (10 mM Na-P, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.1 % Tween 20) で 5 分間室温で洗浄し、二次抗体 (FITC 結合抗ウサギ IgG; 1:200、Rhodamine 結合抗マウス IgG; 1:150) と TPBS 中で室温一時間の反応を行った。なお SLO による選択的な形質膜破壊の実験においては Tween 20-free の buffer を用いた。

#### (12) Digitonin 処理および trypsin 消化実験

メチオニン標識細胞の digitonin 処理および trypsin 消化は Macri と Adeli の方法 [24] に

従った。PBS で洗浄した細胞を 0.1 mg/ml の digitonin を含む CSK buffer (0.3 M Sucrose, 0.1 M KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM sodium-free EDTA, 10 mM PIPES, pH 6.8) 中で室温 10 分間処理し 800 x g の遠心分画により可溶化画分と細胞残渣とに分離した。残渣は CSK buffer で一度洗浄した。この両画分に終濃度 0.2 mg/ml の trypsin を添加し 10 分間室温で反応させた。反応停止は RIPA buffer の添加により行った。以下 (3) の免疫沈降法に従い各画分の HDC 分子種を同定した。Digitonin の選択性は LDH と PDI の漏出で判定し、90 % 以上の LDH 活性の漏出と PDI が漏出していないことをイムノプロットにより確認した。またコントロールとしては digitonin 処理をせず、1 % Triton X-100 を含む CSK buffer で氷上 30 分間処理したものをを用いて同じ実験を行った。

## 第二章に関する実験

### (1) 細胞培養

第一章に関する実験の部を参照。

### (2) [<sup>35</sup>S]メチオニン標識

第一章に関する実験の部を参照。

### (3) 免疫沈降

第一章に関する実験の部を参照。

### (4) ユビキチン化 HDC 分子種の検出

[<sup>35</sup>S]メチオニン標識細胞 (5 x 10<sup>7</sup> cells) を回収後、抗 HDC 抗体を用いて免疫沈降を行い沈降物を SDS-PAGE (7 %) で分離後、抗ユビキチン抗体 (1:1000) でイムノプロットを行った。イムノプロットに関しては第一章に関する実験の部 (10) を参照。

### (5) 74 kDa 分子種の ATP 依存的な分解

30 分間標識した細胞をテフロン-ガラスホモジナイザーで HEPES-buffre (10 mM HEPES-NaOH, pH 7.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, protease inhibitor mix) 中で破碎し、1,000 x g 10 分間で遠心した上清画分をさらに 10,000 x g 30 分間で遠心分離した。この上清画分を NAP-5 column を用いて脱塩し、低分子を除いた。その後 (-) ATP buffer (HEPES -buffer plus 2 mM ATP  $\gamma$  S) あるいは (+) ATP buffer (HEPES-buffer plus 2 mM ATP, 1mM creatine phosphate, 0.0375 mg/ml creatine phosphokinase) 中で 37 °C 10 分間反応させた。反応は RIPA buffer を添加することにより停止させ、抗 HDC 抗体を用いた免疫沈降により解析を行った。

## 第三章に関する実験

### (1) 発現ベクターの構築

山本によって構築された HDC cDNA の部分配列を含むベクター pVLHDC1, vHDC5, vHDC6 [22] の EcoRI 断片を pcDNA3 の EcoRI site にサブクローニングし、74 kDa、64 kDa、54 kDa 相当の HDC の発現プラスミドを作製した。さらに詳細な C-末欠変異体は、Vent DNA polymerase を用いて PCR により EcoRI 断片を作製することにより調製した。ベクターの名称は終止コドンに置換したアミノ酸残基の番号にならって呼称した。ただし 662V (74 kDa) のみは全長の HDC である。GFP 融合タンパクをコードするベクターは pEGFP-C1 に PCR により得られた EcoRI 断片をサブクローニングすることにより作製した。

### (2) 細胞培養

COS-7 細胞は 10 % ウシ胎児血清 (FCS) を含む Dulbecco の改変イーグル培地中で 5 % CO<sub>2</sub> 存在下培養した。実験には対数増殖期の細胞を用いた。

### (3) トランスフェクション

COS-7細胞へのトランスフェクションは CellPfect Transfection kit を用い、添付書類の指示に沿って行った。細胞はトランスフェクション後 48 時間のものを用いた。

### (4) 細胞分画

発現細胞を回収後 K-P buffer (10 mM K-P, pH 6.8, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.2 mM dithiothreitol, 0.01 mM pyridoxal 5'-phosphate, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, protease inhibitor mix) 中でテフロン-ガラスホモジナイザーを用いて破碎し、100,000 x g 1 時間 4 °C で遠心分画し沈殿、上清画分を得た。各画分に関して抗 HDC 抗体を用いたイムノプロットを行った。

### (5) インビトロ翻訳系

山本によって構築された [22] HDC cDNA 部分配列を含むプラスミド pBSHDC5 および pBSHDC7 をそれぞれ *Sal*I で直鎖上にし、T7 RNA polymerase を用いて mRNA に相当する配列を有する RNA を調製した。インビトロ翻訳系はウサギ網状赤血球ライセートを用いて行った。0.02 ml の系に対して 1 μg RNA を添加し、<sup>35</sup>S]メチオニン存在下翻訳反応を 30 °C 80 分間行った。翻訳は反応系に終濃度 0.05 mM のシクロヘキシミドを加えることにより停止させた。

### (6) 小胞体への移行実験

(5) で調製した [<sup>35</sup>S]メチオニン標識 HDC に対してイヌ膵臓ミクロソーム膜を添加し、30 °C 90 分間反応させた。イヌ膵臓ミクロソームは翻訳反応前に添加するもの (0.5 μl) と翻訳停止後添加するもの (4 μl) との比較を行った。ミクロソーム膜画分の分離はアルカリフローテーション法を用いた。移行反応終了後、共沈用のラットミクロソーム膜 (10 μl, 5 mg/ml) を加え、終濃度 0.1 M となるように Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を添加し 4 °C 30 分間静

置した。さらに終濃度 1.69 M となるように飽和 sucrose 溶液を添加し、その上に 1.25 M sucrose/0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液、0.25 M sucrose/0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液を順に重層し、120,000 x g 1.5 時間 4 °C で遠心し密度勾配を作製した。上層にはミクロソーム膜が含まれるが、上層、下層共に終濃度 10 % のトリクロロ酢酸を加え、沈殿物をそれぞれ SDS-PAGE (10 %) で分離し、オートラジオグラフィにより解析した。

### (7) 74 kDa 分子種のプロテアーゼによる活性化

バキュウロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて Sf9 細胞で組み換え 74 kDa 分子種を調製した [22]。発現細胞を 100,000 x g、20 分間遠心することによって得られる沈殿画分を 2.3 mg protein/ml に調製し、各種プロテアーゼと 37 °C 10 分間反応させ酵素活性を測定した。また反応後 100,000 x g の遠心分画により二つの画分に分け、それぞれ SDS-PAGE (10 %) で分離後、抗 HDC 抗体によるイムノプロットを行った。

### (8) ゲルろ過による分子量測定

ブタ膵臓エラスターゼ処理により可溶性画分として得られた試料を Superose 12 HR 10/30 カラムを用いてゲルろ過し分子量を求めた。カラムは buffer (50 mM K-P, pH 6.8, 0.2 M NaCl, 0.2 mM dithiothreitol, 0.01 mM pyridoxal 5'-phosphate, 2 % polyethylene glycol #300) で平衡化し、各画分について酵素活性の測定および抗 HDC 抗体によるイムノプロットを行った。



## 謝辞

本研究の終わりに臨み、本研究の機会を賜り、また終始有益な御助言ならびに御指導を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 市川 厚 教授に謹んで感謝の意を表します。

また本研究の始まりにおいて直接の御指導を賜りました、星薬科大学 福井 哲也 教授に深く感謝いたします。本研究の全般にわたり貴重な御助言を賜りました、京都大学大学院薬学研究科 根岸 学 教授、千葉大学薬学部 五十嵐 一衛 教授、東北大学大学院医学研究科 渡邊 建彦 教授に深く感謝いたします。さらに、本研究の遂行に当たり終始的確な御助言をいただいた、京都大学大学院薬学研究科 杉本 幸彦 助教授、日本たばこ産業医薬基礎研究所 八浪 公夫 博士、東北大学大学院医学研究科 大津 浩 講師に深く感謝いたします。

また本研究において直接御指導いただいた、日本たばこ産業医薬基礎研究所 山本 純 博士、エーザイ株式会社研究所 大郷 真 博士、小野薬品株式会社研究所 中川 論 博士、国立予防衛生研究所 鈴木 敏和 博士に深く感謝いたします。

第一章および第二章にご協力いただいた、三菱化学横浜総合研究所 根本 憲一 修士、京都大学大学院薬学研究科 山村 英梨子 学士、第三章にご協力いただいた、協和発酵株式会社研究所 鈴木 佐和子 修士、論文作成にご協力いただいた、根岸 美保子 学士、寺西 幸子 学士、寺井 佐智子 学士、そして本研究の一部にご協力いただいた、京都大学大学院薬学研究科 久米 利明 助手、味の素株式会社研究所 島 洋一郎 修士、摂南大学薬学部 船越 英資 助手、また常に励まし、協力していただいた、京都大学大学院薬学研究科生体情報薬学（旧衛生化学講座）教室の諸氏に深く感謝いたします。

最後に、研究に専心できる自由を与えてくださり、著者の良き理解者でもある、父 義男、母 敬子に心から感謝いたします。

## 発表論文目録

本研究の一部は以下の論文に公表した。

Processing and activation of recombinant mouse mastocytoma histidine decarboxylase in the particulate fraction of Sf9 cells by porcine pancreatic elastase  
*Biochimica et Biophysica Acta*, **1253**; 9-12, 1995

Degradation of the 74 kDa form of mouse L-histidine decarboxylase via the ubiquitin-proteasome pathway in a rat basophilic/mast cell line (RBL-2H3)  
*FEBS Letters*, **417**; 203-207, 1997

Intracellular localization of the 74- and 53-kDa forms of L-histidine decarboxylase in a rat basophilic/mast cell line, RBL-2H3  
*The Journal of Biological Chemistry*, **273**; 8177-8182, 1998

Membrane targeting and binding of the 74-kDa form of mouse L-histidine decarboxylase via its carboxyl-terminal sequence  
*FEBS Letters*, **437**; 44-48, 1998

## 引用文献

1. Mitsuhashi, M. and Payan, D. G. (1988) *J. Cell. Physiol.* **134**, 367-375
2. Beer, D. J., Matloff, S. M. and Rocklin, R. E. (1984) *Adv. Immunol.* **35**, 209-268
3. Beaven, M. A. (1978) Histamine: Its role in physiological and pathological processes. Basel:Karger
4. Beaven, M. A. (1976) *N. Eng. J. Med.* **294**, 320-325
5. Code, C. F. (1965) *Federation Proc.* **24**, 1311-1321
6. Schwartz, J. C., Pollard, H., and Quach, T. T. (1980) *J. Neurochem.* **35**, 26-33
7. Schneider, E., Piquet-Pellorce, C. and Dy, M. (1990) *J. Cell. Physiol.* **143**, 337-343
8. Corbel, S., Schneider, E., Lemoine, F. M. and Dy, M. (1995) *Blood* **86**, 531-539
9. Saxena, S. P., Brandes, L. J., Becker, A. B., Simons, K. J., LaBella, F. S. and Gerrard, J. M. (1989) *Science* **243**, 1596-1599
10. Bartholeyns, J. and Fozard, J. R. (1985) *Trends Pharmacol. Sci.* **6**, 123-125
11. Bartholeyns, J. and Bouclier, M. (1984) *Cancer Res.* **44**, 639-645
12. Hill, S. J., Ganellin, C. R., Timmerman, J. C., Schwartz, J. C., Shankley, N. P., Young, J. M., Schunack, W., Levi, R. and Haas, H. L. (1997)

*Pharmacol. Rev.* **49**, 253-278

13. Mazurek, N., Berger, G. and Pecht, I. (1980) *Nature* **286**, 722-723
14. Schleimer, R. P., MacGlashan, D. W. Jr., Schuluman, E. S., Peters, S. P., Adams, G. K., Adkinson, N. F. Jr. and Lichtenstein L. M. (1983) *Clin. Rev. Allergy* **1**, 327-341
15. Printz, C., Kajimura, M., Scott, D. R., Mercier, F., Helender, H. F. and Sachs, G. (1993) *Gastroenterology* **105**, 449-461
16. Hosoda, S., Nakamura, W., Snell, K. C. and Stewart, H. L. (1970) *Science* **170**, 454-455
17. Cricco, G. P., Davio, C. A., Martin, G., Engel, N., Fitzsimons, C. P., Bergoc, R. M. and Rivera, E. S. (1994) *Agents Actions* **43**, 17-20
18. Ohmori, E., Fukui, T., Imanishi, N., Yatsunami, K. and Ichikawa, A. (1990) *J. Biochem.* **107**, 834-839
19. Yamamoto, J., Yatsunami, K., Ohmori, E., Sugimoto, Y., Fukui, T., Katayama, T. and Ichikawa, A. (1990) *FEBS lett* **276**, 214-218
20. Kawai, H., Ohgoh, M., Emoto, S., Ohmori, E., Imanishi, N., Yatsunami, K. and Ichikawa, A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1133**, 172-178
21. Miyazaki, T., Ohgoh, M., Ohmori, E., Yamamoto, J., Emoto, S., Yatsunami, K. and Ichikawa, A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1133**, 179-186
22. Yamamoto, J., Fukui, T., Suzuki, K., Tanaka, S., Yatsunami, K. and Ichikawa, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta.* **1216**, 431-440
23. Asahara, M., Mushiake, S., Shimada, S., Fukui, H., Kinoshita, Y.,

- Kawanami, C., Watanabe, T., Tanaka, S., Ichikawa, A., Uchiyama, Y., Narushima, Y., Takasawa, S., Okamoto, H., Tohyama, M. and Chiba, T. (1996) *Gastroenterology* **111**, 45-55
24. Macri, J. and Adeli, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 7328-7337
25. Snyder, S. H., Brown, B. and Kuhar, M. J. (1974) *J. Neurochem.* **23**, 37-45
26. Martres, M.P., Braudry, M. and Schwartz, J.C. (1975) *Brain Res.* **83**, 261-275.
27. Braudry, M., Martres, M.P. and Schwartz, J.C. (1973) *Agents Actions* **3**, 175-176
28. Toledo, A., Sabria, J., Rodriguez, R., Brandner, R., Rodriguez, J., Palacios, J. M. and Blanco, I. (1988) *J. Neurochem.* **51**, 1400-1406
29. Toledo, A., Rodriguez, R., Sabria, J., Rodriguez, J. and Blanco, I. (1988) *J. Neurochem.* **56**, 380-384
30. Landford, R.E., Kennedy, R.C., Dreesman, G.R., Eichberg, J.W., Notnal, L. Luckow, V.A. and Summers, M.D. (1987) in *Viral Hepatitis and Liver diseases* (Zuckerman, A., ed.), pp.372-378, Alan R. Liss, New York.
31. Quemeneur, E., Guthapfel, R. and Gueguen, P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5485-5488
32. Schuldiner, S., Shirvan, A. and Linial, M. (1995) *Physiol. Rev.* **75**, 369-392
33. Merickel, A. and Edwards, R. H. (1995) *Neuropharmacology* **34**, 1543-1547
34. Peter, D., Jimenez, J., Liu, Y., Kim, J. and Edwards, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 7231-7237
35. Tsubuki, S., Kawasaki, H., Saito, Y., Miyashita, N., Inomata, M. and Kawashima, S. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 1195-1201
36. Goldberg, A. L. (1995) *Science* **268**, 522-523
37. Hershko A. and Ciechanover A. (1992) *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 761-807
38. Gross-Mesilaty S., Hargrove J. L. and Ciechanover A. (1997) *FEBS lett.* **405**, 175-180
39. Hayashi S. and Canellakis E. S., in *Ornithine Decarboxylase: Biology, Enzymology and Molecular Genetics* (Hayashi S., ed) pp.47-58, Pergamon Press, New York
40. Auvinen M., Paasinen A., Andersson L. C. and Holtta E. (1992) *Nature* **360**, 355-358
41. Murakami Y., Tanaka K., Matsufuji S., Miyazaki Y. and Hayashi S. (1992) *Biochem. J.* **283**, 661-664
42. Viguera E., Trelles O., Urdiales J. L., Mates J. M. and Sanchez-Jimenez F. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 318-319
43. Rechsteiner M. and Rogers S. W. (1996) *Trends Biochem. Sci.* **21**, 267-271
44. Enoch, H. G., Fleming, P. J., and Strittmatter, P. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 6483-6488
45. Rachubinski, R. A., Verma, D., and Bergeron, J. J. (1980) *J. Cell Biol.* **84**, 705-716
46. Sabatini, D. D., Kreibich, G., Morimoto, T., and Adesnik, M. (1982) *J. Cell.*



*Biol.* **92**, 1-22

47. Kalies, K. and Hartmann E. (1998) *Eur. J. Biochem.* **254**, 1-5
48. Walter, P., and Johnson, A. (1994) *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 87-119
49. Anderson, D. J., Mostov, K. E., and Blobel, G. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 7249-7253
50. Bendzko, P., Prehn, S., and Rapoport, T.A. (1982) *Eur. J. Biochem.* **123**, 121-126
51. Okada, Y., Frey, A.BN, Gruentner, T.M., Oesch, F., Sabatini, D.D., and Kreibich, G. (1982) *Eur. J. Biochem.* **122**, 393-402
52. Mitoma, J-Y. and Ito, A. (1992) *EMBO J.* **11**, 4197-4203
53. Hann, B. C. and Walter, P. (1991) *Cell* **67**, 131-144
54. Rothblatt, J. A., Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Daum, G. and Schekman, R. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 2641-2652
55. Ng, D. T. W., Brown, J. D. and Walter, P. (1996) *J. Cell Biol.* **134**, 269-278
56. Chirico, W. J., Waters, M. G. and Blobel, G.(1988) *Nature* **332**, 805-810
57. Ichikawa, A., Funakoshi, E., Tanaka, S., Nemoto, K. and Fukui, T. (1998) *Inflamm. Res.* **47**, suppl 1, S46-S47
58. Lützelshwab, C., Pejler, G., Aveskogh, M. and Hellman, L. (1997) *J. Exp. Med.* **185**, 13-29
59. Lützelshwab, C., Huang, M., Kullberg, M C., Aveskogh, M. and Hellman, L. (1998) *Eur. J. Immunol.* **28**, 1022-1033

60. Laemmli U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
61. Gullberg, U., Lindmark, A., Nilsson, E., Persson, A. and Olsson, I. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 25219-25225
62. Shore, P. A., Burkhalter, A. and Cohn, V. H. (1959) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **127**, 182-186
63. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
64. Joelsson, M. and Tjerneld, F. (1994) *Methods Enzymol.* **228**, 136-143
65. Omura, T. and Takesue, S. (1970) *J. Biochem.* **67**, 249-257
66. Hultberg, B., Lindsten, J. and Sjöblad, S. (1976) *Biochem.J.* **155**, 599-605