

氏 名	ふな 船 越 英 資
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 391 号
学位授与の日付	平成 9 年 3 月 24 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	薬学研究科薬学専攻
学位論文題目	ヒスタミン生合成酵素の翻訳後修飾による活性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、胃酸分泌の制御、即時型アレルギー、炎症においてはオータコイドとしての、中枢神経系においては神経伝達物質としての機能を有し、薬理的・生理的に重要な生体内アミンとして知られている。最近では、細胞増殖や血小板凝集を促進する細胞内メッセンジャーとしての機能も見出されている。ヒスチジン脱炭酸酵素 (histidine decarboxylase; HDC と略) は、L-ヒスチジンを特異的基質として一段階の脱炭酸反応でヒスタミンを合成する酵素であり、生体内のヒスタミンの作用発現に重要な役割を果たしている。近年、所属研究室ではマウス HDC の精製とその遺伝子クローニングが行われ、HDC が 74kDa 分子量の前駆体として翻訳され、その後、翻訳後修飾により 53kDa 分子量の成熟活性体へと変換される可能性を示唆している。しかし、生体内における 74kDa 前駆体の存在およびその翻訳後修飾の機構については全く不明である。そこで著者は、HDC の翻訳後修飾による活性調節機構を明らかにすることを目的とし、以下の研究を行った。

第一章 マウス癌化肥満細胞の前駆体 HDC のプロセッシングによる成熟体 HDC への変換

マウス細胞における 74kDa 分子種の存在およびその性質を明らかにするため、培養マウス癌化肥満細胞を ^{35}S -メチオニンラベルし、生成する標識 HDC 分子種を、作製した抗マウス HDC (N 末端) 抗体を用いた免疫沈降法により検索した。その結果、マウス癌化肥満細胞には、74kDa と 53kDa の両分子種が、それぞれ 10 万 xg 沈殿画分と上清画分に存在すること、また、量的には 53kDa 分子が 74kDa 分子に比して非常に多いことが分かった。次いで、 ^{35}S -メチオニンでのパルス-チェイスの実験により、74kDa 分子が 53kDa 分子に変換することが明らかになった。

このマウス HDC の変換 (翻訳後プロセッシング) に関与するプロテアーゼについては今まで報告がない。そこで著者は、関与するプロテアーゼを推測するため、種々のプロテアーゼインヒビターをマウス癌化肥満細胞に作用させ、HDC 活性の局在性変化を測定した。測定は、HDC の de novo 合成により、沈殿画

分の HDC 活性は変化しないが、上清画分の HDC 活性が約30倍増加するデキサメサゾンおよびホルボールエステル処理細胞を用いて行った。その結果、基質特異性を異にする種々のタイプのプロテアーゼインヒビターのうちで、セリンプロテアーゼインヒビターに属するベンザミジンが、特異的に上清画分の HDC 活性を減少させ、沈殿画分の HDC 活性を増加させた。この際、阻害剤は HDC の酵素活性あるいは mRNA の生成に影響を与えなかった。これらの結果から、マウス癌化肥満細胞における HDC の翻訳後プロセッシングにはベンザミジン感受性のプロテアーゼの関与が示唆された。

さらに、このプロセッシング酵素がヒスタミンの胃酸分泌反応に関与するかについて検討した。その結果、マウスを絶食後、低温暴露によるストレス負荷を与えると、胃ホモジェネート中の 74kDa 分子を 53kDa 分子に変換する *in vitro* でのプロセッシング活性が増大したことから、ヒスタミンの生理作用発現に関与することが示唆された。

第二章 マウス癌化肥満細胞の HDC プロセッシング酵素の精製とその性質

マウス癌化肥満細胞を出発材料として用い、細胞の10万 xg 上清画分からベンザミジンアフィニティーゲルを含む4段階のカラムクロマトグラフィーにより HDC プロセッシング酵素を約4,000倍に精製し、最終的に SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のゲル上で銀染色により単一と判定される精製標品を得た。精製酵素は、分子量約 40kDa であり、ゲル濾過クロマトグラフィーでの推定分子量の結果と一致する。酵素はセリンプロテアーゼインヒビターのうち、ベンザミジンとジイソプロピルフルオロリン酸により顕著に阻害されるが、その他のタイプのプロテアーゼインヒビターでは阻害を受けなかった。酵素活性は HDC を発現していない HeLa 細胞には存在しなかった。また、酵素は肥満細胞に特異的かつ多量に存在していることが知られる Mast Cell Proteases の諸性質とは異なり、新規のプロテアーゼである可能性が示唆された。

著者は、マウスを用い生体内における HDC の 74kDa 分子種の存在を初めて明らかにするとともに、前駆体 74kDa 分子が翻訳後プロセッシングにより、成熟体 53kDa 分子に変換されること、この変換には新規のセリン型プロテアーゼが関与していることを見出した。また、本実験で成熟体 53kDa 分子の速い代謝が示唆されているので、このプロセッシング酵素の働きは、ヒスタミン生成の鍵となる可能性が考えられる。以上、本研究は、従来不明であった HDC の翻訳後修飾による活性調節機構を分子レベルで解析したものである。従来、ヒスタミン受容体拮抗薬、肥満細胞の分泌抑制剤しかなかったヒスタミン関連医薬品の開発においての基礎的知見として寄与するものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

様々な生理作用を発揮するヒスタミンは、ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC と略) により生成する。近年、この酵素の精製とその遺伝子 cDNA のクローニングが行われた。その結果、HDC は 74kDa 分子量の前駆体として翻訳され、翻訳後修飾により 53kDa 分子量の成熟活性体に変換する可能性が種々の遺伝子研究から示唆された。しかし、マスト細胞レベルで HDC 分子の存在とその変換、および関与する酵素の性

質を解明することが望まれていた。本論文は、まず、74kDa HDC 分子がマスト細胞に存在し、それがプロテアーゼによる特異的な修飾を受けて 53kDa HDC 分子に変換することを、免疫生化学的手法を駆使して初めて明らかにした。この研究において、マスト細胞中での 74kDa HDC 分子の 53kDa HDC 分子への変換が、数分間のオーダーでベンザミジン感受性のプロテアーゼの関与で起こること、また、53kDa HDC 分子も数時間のオーダーで免疫学的には検出されない代謝産物に変換することがわかった。著者はこの分子変換を行う酵素活性が、絶食後、低温暴露によるストレス負荷したマウス胃粘膜で増加することから、ヒスタミンの生理作用の発現と密接に関連していることを示唆した。次いで、マウスマスト細胞の抽出液から、ベンザミジン・アフィニティーカラムを含む 4 段階の過程で、SDS ゲル電気泳動上単一のベンザミジン感受性のセリン型プロテアーゼを精製することに成功した。これら HDC 酵素の活性発現と制御に関する知見は、ヒスタミン代謝をその生成反応において制御する薬物の開発において寄与するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値有るものと認める。

更に、平成 9 年 2 月 24 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。