



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | ラット胎児肝臓ヒスチジン脱炭酸酵素の翻訳後プロセッシング部位に関する研究                                                                                                                                                                                                                                 |
| Author(s)    | 水口, 博之                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 1992, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/37949">https://hdl.handle.net/11094/37949</a>                                                                                                                                                                                  |
| rights       |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|            |                                                 |
|------------|-------------------------------------------------|
| 氏 名        | みず ぐち ひろ ゆき<br>水 口 博 之                          |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 ( 医 学 )                                     |
| 学位記番号      | 第 1 0 1 5 5 号                                   |
| 学位授与年月日    | 平成 4 年 3 月 25 日                                 |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>医学研究科 生理系専攻                 |
| 学 位 論 文 名  | ラット胎児肝臓ヒスチジン脱炭酸酵素の翻訳後プロセッシング部位<br>に関する研究        |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教 授 和田 博<br>(副査)<br>教 授 田川 邦夫 教 授 三木 直正 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### (目 的)

ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) はヒスタミンの唯一の生合成酵素であり本酵素の性質を明らかにすることはヒスタミンの生理的役割を解明する上で重要であると考えられる。本酵素は酵素含量が少ないことや非常に不安定なことから精製が困難であったが、これまでラット胎児肝臓、マウス腎臓およびマウス・マストサイトーマP-815細胞より精製され分子量54Kのサブユニットからなるダイマー酵素であることがわかっている。また最近になりラット、マウスおよびヒトの HDC をコードする cDNA が相次いでクローニングされ、cDNA から推定される HDC の分子量はいずれも74Kであった。この分子量における不一致は本酵素が翻訳後にプロセッシングを受けている可能性を示唆する。本研究では、以下に示す手法によりラット胎児肝臓 HDC の翻訳後プロセッシング部位について検討した。

### (方法並びに結果)

#### 1) ラット胎児肝臓 HDC の精製

ラット胎児肝臓より硫酸分画の後、DEAE Toyopearl, Phenyl Toyopearl, Sephacryl S300 HR, TSK gel HA-1000, TSKgel G 3000 SW<sub>XL</sub>, TSKgel phenyl-5 PW のカラムクロマトグラフィーにより0.22 %の収率で3,500倍精製した。精製酵素は SDS-PAGE で54K の単一タンパクバンドを示した。

#### 2) 部分アミノ酸配列解析

精製酵素を還元カルボキシメチル化後トリプシン消化し、得られたペプチドを逆相クロマトグラフィーにより精製した後その部分アミノ酸配列を決定した。その結果最も C 末端側のペプチドとしてアミノ酸残基465-470のペプチド (Asp-Trp-Asn-Leu-Ile-Arg) が得られこの部分が精製酵素中に存在する

ことがわかった。

### 3) 抗 HDC 部分ペプチド抗体を用いたイムノブロッティング

ラット胎児肝臓 HDC cDNA の情報をもとに 3 種類の部分ペプチド (HP41:41-54位, HP212:212-230位, HP485:485-499位) を合成し, これらのペプチドに対する特異抗体を得た。抗ペプチド抗体を用いたイムノブロッティングの結果, 抗 HP 41抗体および抗 HP 212 抗体は精製 HDCタンパクを認識したが, 抗 HP 485 抗体は HDC タンパクを認識しなかった。この結果は精製ラット胎児肝臓HDCタンパク中に HP 41 (41-54位), HP 212 (212-230位) は存在するが, HP 485 (485-499位) の全部もしくは大部分は存在しないことを示す。

### 4) カルボキシペプチダーゼ Y による C 末端アミノ酸配列解析

精製酵素をカルボキシペプチダーゼ Y で酵素消化し経時的に遊離アミノ酸を定量した。その結果グルタミン, ロイシン, バリン, アスパラギン, アラニン, グルタミン酸, アルギニン, およびイソロイシンがおおよそ 1 : 3 : 1 : 1 : 2 : 1 : 1 : 1 の割合で回収された。この結果は479位のグルタミンを C 末端アミノ酸と仮定した時のアミノ酸の回収比とよく一致していた。

#### (総括)

ラット胎児肝臓 HDC の翻訳後プロセッシング部位を明らかにするため上述の研究を行った結果, 精製酵素の分子量が54Kであったこと, 精製酵素のトリプシン消化ペプチドとしてアミノ酸残基465-470位のペプチドが得られたこと, および本酵素の部分ペプチドに対する抗体を用いたイムノブロッティングにより, アミノ酸残基41位から230位は精製酵素中に存在するが485-499位の部分は存在しないことが明らかとなった。これらの結果は本酵素がアミノ酸残基470位から485位の間でプロセッシングを受けることを示唆した。また本酵素の C 末端アミノ酸を直接解析した結果, 断定はできなかったが479位のグルタミン残基が C 末端アミノ酸であることを示唆する結果が得られた。以上を総合すると, 本酵素はおそらくアミノ酸残基479位のグルタミン残基の C 末端側で切断されると考えられ, この結果は本酵素の分子量の矛盾を説明できることが分かった。

## 論文審査の結果の要旨

ヒスチジン脱炭酸酵素 (HDC) は生体内における唯一のヒスタミン生合成酵素であることから, HDC の性質を明らかにすることはヒスタミンの生理的役割を理解する上で非常に重要である。近年 HDC の cDNA から推定されたタンパクとの間に約 2 万分子量に差があることが明らかとなり, このことは HDC が翻訳後にプロセッシングをうける可能性を強く示唆した。本研究は, ラット胎児肝臓 HDC を用いてそのプロセッシング部位を明らかにしたものであり, 酵素化学的にも興味深い本酵素の翻訳後プロセッシング機構およびその生理的役割を研究する上で意義深いものであり, よって本研究は学位論文としてふさわしいものであると考えられる。