The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification and characterization of a mouse dipeptidase that hydrolyzes L-carnosine
Author(s)	大谷, 寛人
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45488
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【23】

氏　　名	大谷寛人（おおたにひろと）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学位記番号	第　19256　号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Identification and characterization of a mouse dipeptidase that hydrolyzes L-carnosine （カルノシン分解活性を持つマウスジペプチド分解酵素の同定及び機能解析）
論文審査委員	（主査） 教　授　永井　克也 （副査） 教　授　三木　直正　　教　授　津本　忠治

論文内容の要旨

〔　目　　的　〕

カルノシン（β-Alanyl-L-histidine）は脊椎動物の脳や神経、肝臓をはじめとした生体内の様々な組織に高濃度（1-20 mM）で分布する生理活性を持つジペプドであり、類似物質としてホモカルノシン（GABA-hisitidine）やアンセリン（β-Alanyl-N-methylhistidine）が存在する。

カルノシンの作用としては神経伝達やZn^{2+}、Cu^{2+} などの金属イオンとの複合体形成能に起因する抗酸化作用が考えられているが実際に生体で果たしている役割は未だ明らかではない。

最近、我々の研究室において、2-deoxy-D-glucose の脳室内投与による糖欠乏状態が引き起こす血糖上昇がカルノシンによって抑制されることが示され、カルノシンが中枢神経による自律神経系のエネルギー代謝調節に関わる因子である可能性が示唆されている。カルノシンは生体内においてカルノシン合成酵素（carnosine synthetase）とカルノシン分解酵素（carnosinase）により代謝されており、これらの酵素が発現している組織では carnosine が何らかの生理作用を担っていることが期待される。しかし、カルノシンの生体内での合成及び分解のメカニズムは未だ明らかにはなっていない。そこで私は、*Lactobacilus* のカルノシン分解酵素である PepV と相同性を持つ哺乳類の蛋白質について検討をおこなった。

〔　方法ならびに成績　〕

今回私は、マウスの cDNA データーベース上において PepV と高い相同性を持つ約 53 KDa の蛋白質（mCN2）をコードする配列を見出した。この蛋白はメタロプロテアーゼファミリーの中の一つ、glutamate-carboxypeptidase を含む M20A サブファミリーに属すると推測された、生体内で分解酵素として活性を持っていることが期待された。そこで、mCN2 の GST 融合蛋白質を精製し、HPLC によって基質及び分解産物を定量したところ、カルノシンに対して高い分解活性を示したが、ホモカルノシンに対しては分解活性を持たなかった。また、アミノプロテアーゼの阻害剤であるベスタチンによってカルノシンの分解活性は著しく抑制された。さらに TLC を用いて種々のジペプチドに対する分解活性を検討した結果、カルノシンのみならずジペプチド全般に対して幅広い基質認識性を持っている事

が示唆された。

更に、mCN2 が生体内で実際に発現しているかを検討するために、大腸菌で大量発現させた mCN2 を抗原としたポリクローナル抗体を作成し、各組織に対するウェスタンブロットによって局在を検討したところ、mCN2 は骨格筋及び心筋を除くほとんどの組織に発現していることが示唆された。次に、先に我々の研究室で示唆されていた中枢神経系における自律神経制御の可能性を確かめるため、ラット脳の各組織における発現パターンを組織染色を行って検討した。結果、mCN2 は視床束傍核、視床下部の乳頭結節核、嗅球の僧帽細胞層の細胞体に強く発現していた。線条体や小脳プルキンエ細胞においては、神経線維のみの発現が認められた。更に脳全体において、小型の陽性細胞が散見されたが、全体これらの全ての部位においてグリア細胞のマーカーである glial fibrilary acidic protein（GFAP）との共局在は認められなかった。

乳頭結節核は、ヒスタミンの合成酵素である Histidine-decarboxylase（HDC）の脳における唯一の発現部位でありヒスタミン神経系の中核としてエネルギー代謝調節に重要な役割を果たしている。そこで、HDC と mCN2 の２重染色を行ったところ、背側及び腹側の乳頭結節核においてヒスチジン合成酵素との共局在が認められた。

〔　総　　括　〕

カルノシン分解酵素には基質認識性及び組織分布が異なる２種類の carnosinase が存在することが知られていたが、mCN2 は幅広い基質認識性やベスタチンに対する感受性、さらには最適 pH や細胞内局在の予測から tissue carnosinase（cytosolic non-specific dipeptidase）である可能性が高いと考えられる。mCN2 は筋肉以外のほとんどの組織に発現していることが示唆されたが、これは筋肉組織がカルノシンを多量に含有する組織であり、カルノシン合成活性が存在するためと考えられる。この結果から mCN2 がカルノシンの濃度の調節に機能的な役割を果たしていることが推測される。

更に、ラット脳の乳頭結節核において mCN2 が HDC と共局在していることから、カルノシンの分解によるヒスチヂンの供給が間接的にヒスタミンを介したエネルギー代謝調節に関与している可能性が推測される。

論文審査の結果の要旨

カルノシンは、東南アジアの伝統的抗ストレス剤であるチキンエキスの有効成分であることが知られているが、その生理的な作用についてはほとんど分かっていなかった。しかし、近年カルノシンが運動によって筋肉から血液中に放出されること、及び自律神経を制御して高血糖や高血圧を抑制する因子である可能性が明らかになり、更なる報告が待たれていた。本研究はカルノシンの代謝酵素の一つであるカルノシン分解酵素に着目し、cDNA データベース上からマウスのカルノシン分解酵素を同定、機能解析を試みたものであるが、同定された mCN2 が tissue carnosinase として筋肉組織を除く幅広い組織に偏在していること、更に中枢神経系のヒスタミン神経系において、ヒスタミンの基質を供給することによって間接的に制御していることを示唆する結果を得た。これは、カルノシンが中枢への運動シグナルとして作用していると言う仮説を支持するものであり、この研究は学位の授与に値すると思われる。