

氏名(本籍)	くのりゆういち (愛知県) 九里裕一		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博乙第2203号		
学位授与年月日	平成18年3月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Species Difference in Enzymatic Property of Mast Cell Chymases (肥満細胞キマーゼの酵素化学的性質の種差に関する研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	深水昭吉
副査	筑波大学教授	農学博士	小林達彦
副査	筑波大学教授	博士(薬学)	柳澤純
副査	筑波大学助教授	博士(農学)	谷本啓司

論文の内容の要旨

キマーゼは肥満細胞特異的に発現しているセリンプロテアーゼであり、抗原などの刺激により、ヒスタミンなどの炎症性メディエーターとともに肥満細胞から放出される。その生理的役割は明確ではないが、アレルギー炎症、心血管系組織の増殖・リモデリング等への関与が示唆されている。本論文では、キマーゼの生理的役割についてより詳細な知見を得ることを目的に、酵素化学的性質の種差について検討を行なった。

キマーゼには、塩基配列の系統解析から α キマーゼと β キマーゼの2つのグループが存在する。霊長類とイヌは1つの α キマーゼのみを持つが、マウスとラットはそれぞれ1つの α キマーゼ(MMCP-5, RMCP-5)と複数の β キマーゼ(MMCP-1, 2, 4, RMCP-1, 2, 4)を持つ。これまでの研究から、ほとんどのキマーゼはキモトリプシン様の基質特異性を持つことが明らかとなっている。一方、アミノ酸配列の相同性から、げっ歯類 α キマーゼも他の α キマーゼと同様にキモトリプシン様であることが推測されていたが、具体的な報告はなかった。そこでMMCP-5とRMCP-5の組換え蛋白を調製し、それらの基質特異性を検討した結果、いずれもアラニンやバリン等の小さな疎水性側鎖のアミノ酸をPI部位に持つペプチド性基質を分解したことから、エラスターゼ様酵素であることが判明した。MMCP-5の変異体(V216G)は、ヒトキマーゼ同様にキモトリプシン様の活性を示したことから、基質結合ポケットに位置する216番目のバリンがMMCP-5の基質特異性を規定していることが明らかとなった。

アンジオテンシンII(Ang II)は、血圧の制御や組織リモデリング等、心血管系のホメオスタシスに重要な役割をもつペプチドである。近年、組織レニン・アンジオテンシン系において、アンジオテンシン変換酵素(ACE)非依存性のAng II産生が、主にキマーゼによるものであることが報告されている。一方、キマーゼのAng Iに対する基質特異性には種差が存在することが知られている。例えば、ヒト、サル及びイヌの α キマーゼと一部の β キマーゼはAng IからAng IIを変換するが、ラットキマーゼ(RMCP-1)はAng Iを分解することが報告されている。しかしながら、これらは同一の条件で定量的に比較されたものではない。そこで、哺乳類5種(ヒト、イヌ、ハムスター、ラット、マウス)のキマーゼを用いて、Ang II産生と分解活性の速度論解析を行った。すべてのキマーゼは、Ang IからAng IIを産生し、その活性強度の順番は、イヌ>ヒト>ハムスター>マウス>ラットであった。また、ヒト以外のキマーゼはAng II分解活性を示し、そ

の活性強度の順番は、ハムスター>ラット>マウス>イヌであった。

キマーゼは、様々な疾患に関与する生理活性ペプチドやサイトカインの活性化に関与することが示唆されている。例えば、ヒトやイヌのキマーゼは高い Ang II 産生活性を示し、Ang II を介して、心筋症、心筋梗塞、動脈硬化等の疾患に関与していることが示唆されている。このことは、キマーゼがこれら心血管系疾患の治療薬のターゲット分子として注目されると同時に、基礎及び臨床研究におけるキマーゼの検出法の重要性を高めている。現在、ウエスタンブロッティング (WB) や免疫組織染色に有用ないくつかの抗ヒトキマーゼ抗体が入手可能であるが、エピトープや他種のキマーゼに対する交差性等については検証されていない。そこで、新たにヒトキマーゼに対するモノクローナル抗体を作成し、それらの免疫学的解析における有用性を検討した。2つの異なる抗原 (ヒトキマーゼ蛋白, ヒトキマーゼ・ヘパリン混合物) を用いることにより、ヒトキマーゼの様々なエピトープに結合する7種類のモノクローナル抗体を作成することに成功した。これらはすべて WB と免疫組織染色に有用であった。ドットプロット解析から、これらはヒトキマーゼのみならずイヌキマーゼにも反応し、うち2つはげっ歯類キマーゼにも反応した。

審 査 の 結 果 の 要 旨

キマーゼは、肥満細胞で発現するセリンプロテアーゼであり、アレルギー制御や心血管系機能を持つとされてきたが、酵素活性の機能的種差の存在や高感度な検出系が無かったことから、創薬ターゲットとしての開発が遅れていた。特に、活性種差は阻害剤スクリーニング後の化合物の薬効評価に大きな障害となる。そこで本研究では、先ずキマーゼの進化的側面から種差解明の第一歩となる活性機能相関を解明した。端的な例として、マウスキマーゼはエラスターゼ活性を持つが、活性中心のアミノ酸 (Val) をヒトキマーゼ型の Gly に置換したところ、驚くことにキモトリプシン用活性を獲得することを発見した。この結果は、げっ歯類キマーゼが、ヒトキマーゼと異なる生理的役割を持っていることを示唆している。このような機能種差の分子基盤をもとに、さらに基質特異性を組織 Ang II 産生系を用いて測定したところ、Ang II が関与する疾患におけるキマーゼの病態生理学的役割に種差が存在することを見出した。最後に、キマーゼの検出系としてモノクローナル抗体の作製・解析を行い、今後のキマーゼ研究において有用な抗体を得ることに成功した。

以上のように、本研究の成果は、酵素科学領域のみならず創薬科学の領域においても大きく貢献するものと判断される。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。