



Human Skin Chymotrypsin-like Proteinase Chymase SUBCELLULAR LOCALIZATION TO MAST CELL GRANULES AND INTERACTION WITH HEPARIN AND OTHER GLYCOSAMINOGLYCANS

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐山, 重敏 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1334

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 57号	学位授与年月日	平成 元年 1月20日
氏 名	佐 山 重 敏		
論文題目	Human Skin Chymotrypsin-like Proteinase Chymase (ヒト皮膚キモトリプシン様酵素 キマーゼ) SUBCELLULAR LOCALIZATION TO MAST CELL GRANULES AND INTERACTION WITH HEPARIN AND OTHER GLYCOSAMINOGLYCANS (肥満細胞顆粒内局在およびヘパリンその他のグリコサミノグリカンとの相互作用)		

Human Skin Chymotrypsin-like Proteinase Chymase

(ヒト皮膚キモトリプシン様酵素キマーゼ)

SUBCELLULAR LOCALIZATION TO MAST CELL GRANULES
AND INTERACTION WITH HEPARIN AND OTHER
GLYCOSAMINOGLYCANS

(肥満細胞顆粒内局在およびヘパリンその他のグリコサミノグリカンとの相互作用)

論文の内容の要旨

Human skin chymotrypsin-like proteinase (HSC) はヒト皮膚より精製されたキモトリプシン様蛋白分解酵素であり、免疫電顕の手法を用いてヒト皮膚の肥満細胞の顆粒中に存在することが示された。肥満細胞の顆粒中にはヘパリンが存在し、近年ヘパリンは肥満細胞内メディエーターの貯蔵物質としての機能が提唱されているため、HSCとヘパリンとの相互作用がセファクリルS-200のゲル濾過を用いて検討された。HSCの溶出位置はHSCをヘパリンとブレインキューベートすることにより高分子側へ移動し、両者の結合することが示された。この結合は食塩濃度0.4 M以下で強く認められ、0.75 M以上では認められなかった。過剰量のヘパリン分解産物が共存しても両者の結合は阻害されず、結合には高分子量のヘパリンが必要であることが示された。塩濃度を高めることにより結合が阻害されるという事実は両者の結合がイオン結合であることを示唆するが、それを更に明らかにするため、HSCとヘパリンの化学修飾が行われた。ヘパリンはN-硫酸基を選択的に除去し、N-desulfated heparin (N-d-H) と命名した。この標品の一部は更にアミノ基の部分にアセチル基を導入し、この標品をN-desulfated acetylated-heparin (N-d, s-H) と命名した。HSCはリジン残基のアミノ基にアセチル基が導入された。HSCはN-d-Hと結合せず、N-d, s-Hとは結合を示したが、その強さは無処理ヘパリンとの結合より弱かった。またアセチル化されたHSCはヘパリンと非常に弱く結合したにすぎなかった。上記の事実はHSCとヘパリンとの結合がイオン結合であることを示す。更に、ヘパリンと糖鎖の構造は異なるが陰電荷密度はほぼ等しいデキストラン硫酸もHSCと強く結合し、HSCとヘパリンとの結合は構造特異性に基づくのではなく、荷電密度に基づくことが示された。HSCとヘパリンの結合の結合定数は $[^{35}\text{S}]$ -ヘパリン、抗HSC家兎血清を用いた結合平衡の実験により、約 $7 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ と算出された。HSCはヘパリンと結合してもその酵素活性部位は阻害されず、このことは合成基質であるN-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilideを用いて示された。しかるに分子量の大きい $[^3\text{H}]$ カゼインを基質として用いた場合には立体阻害が生じ、0.15 M食塩濃度で酵素活性が低下した。ヘパリンセファロースを用いた結合実験により、HSC以外にも、ヒト皮膚トリプターゼ、ヒト白血球カテプシンG、ヒト白血球エラスターゼもヘパリンと結合することが示された。結合の相対的強度はHSC、トリプターゼ、カテプシンGでほぼ同様、エラスターゼでは弱かった。また、脾臓の酵素であるキモトリプシンはヘパリンと結合しなかった。次にヘパリン以外のグリコサミノグリカンであるヘパラン硫酸、デルマトン硫酸、コンドロイチン-4-硫酸、コンドロイチン-6-硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸とHSCとの結合をゲル濾過で調べたところ、生理的塩濃度で有意な結合を示したものはヘパラン硫酸のみであった。免疫蛍光抗体法を用いることにより、HSCは表皮・真皮接合部に結合することが示され、更にこの結合はポリ-L-リジンのブレインキューベーションにより阻害されることから、HSCは表皮・真皮接合部の陰荷電を持つ物質に結合することが示された。ヘパラン硫酸は基底膜の主要構成成分として知られており、ヘパリン同様強く陰性に荷電した物質であるので、HSCは肥満細胞から放出された後、イオン結合によりヘパラン硫酸を介して表皮・真皮接合部に結合する機序が想定される。HSCは表皮・真皮接合部を消化して同部の分離をきたすことが知られており、上記の一連の実験結果は、HSCがヘパラン硫酸との結合を介して、ある種の表皮下水泡をきたす疾患の発生に関与している可能性を示すものである。

論文審査の結果の要旨

表皮下水疱性疾患の一つである類天疱瘡では形態学的に肥満細胞が局所で脱顆粒を起こしていることが知られている。また、顆粒中に存在するヘパリンには肥満細胞内メディエータの貯蔵物質としての機能が提唱されている。しかし、肥満細胞と水疱性疾患の関連性は明らかではない。

そこで、申請者は、ヒト皮膚肥満細胞顆粒中に存在するHuman Skin Chymotrypsin-like Proteinase, Chymase (ヒト皮膚キモトリプシン様蛋白分解酵素、キマーゼ、以下HSCと略)が水疱形成になんらかの役割を持つことを想定し、ヘパリン、基底膜の主要構成成分として知られているヘパラン硫酸およびヘパリン関連物質とHSCの相互作用を精製したHSCを用いて解析した。そこでえられた結果は、

- 1) 0.75 M以上の食塩水でHSCとヘパリンの結合が阻止されることや化学修飾をしたヘパリン誘導体の結合力の解析から、HSCとヘパリンの結合はイオン結合であることが示された。
- 2) ヘパリン以外に陰性荷電密度のほぼ等しいデキストラン硫酸がHSCと強く結合することから、この結合は構造特異性によるよりも陰性荷電の密度に基づくことが示された。
- 3) ヘパリンとHSCの結合定数は 7×10^{-7} Mと求められた。
- 4) 他の蛋白分解酵素、すなわちヒト皮膚トリプターゼ、ヒト白血球カテプシンG、ヒト白血球エラスターゼなどもヘパリンと結合することが認められた。HSC、トリプターゼ、カテプシンGのヘパリンとの結合力はほぼ同じ程度であったが、エラスターゼの結合力は弱いものであった。脾キモトリプシンはヘパリンとの結合を示さなかった。
- 5) ヘパリン以外のグリコサミノグリカン(GAG)であるヘパラン硫酸、デルマトン硫酸、コンドロイチン-4-硫酸、コンドロイチン-6-硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸とHSCの結合を解析した結果、これらのGAGのうちヘパラン硫酸とデルマトン硫酸に結合が認められた。しかし、生理的な条件ではヘパラン硫酸のみに結合すると考えられた。
- 6) 免疫蛍光抗体法でHSCは表皮・真皮接合部に結合することが示され、この結合はポリ-L-リジンの前処理で阻害された。基底膜の主要構成成分であり、かつ陰荷電をもつヘパラン硫酸と結合するという知見と併せて、表皮・真皮接合部に見いだされたHSCはヘパラン硫酸に対して結合しているものと推定された。

申請者は以上の結果から肥満細胞から放出されたHSCがイオン結合により表皮・真皮接合部に結合し、その部分を消化することが表皮下水疱性疾患の生ずる機序である可能性を示した。

以上の結果に対して、HSCの精製法、ヘパリンとの結合による酵素活性の変化、HSCの局在、肺、腸管粘膜、皮膚などの肥満細胞のサブタイプと機能の差異、類天疱瘡抗原について討論がなされた。

以上の審査の結果、本論文は、表皮下水疱性疾患の成因について新しい知見を示したものと評価し、全員一致でこの研究が学位授与にふさわしいものと判定した。

論文審査担当者 主査 教授 菅 野 剛 史

副査 教授 市 山 新 副査 教授 藤 田 道 也

副査 助教授 瀧 川 雅 浩 副査 助教授 寺 尾 俊 彦