

論文の内容の要旨

論文題目 マスト細胞に発現するヘパラーゼの生物学的な役割

氏名 脇 紀彦

第 1 章 序論

ヘパリンはイズロン酸あるいはグルクロン酸とグルコサミンの 2 糖繰り返し構造で構成され高度に硫酸化修飾された多糖であり、結合組織型マスト細胞 (CTMC) のみによって産生され、分泌顆粒中に分布する。ヘパリンは分泌顆粒の成熟およびヘパリン結合性を有するいくつかの顆粒内酵素の蓄積に必須であることがヘパリン生合成の一段階に必須な遺伝子を欠損するマウスを用いた遺伝学的検討により示された。CTMC における生合成の最終段階でヘパリンは低分子化されるが、その機構と生物学的な意義は不明であった。

ヘパラーゼは哺乳類では唯一のヘパラン硫酸およびヘパリンに特異的なエンド型 β -グルクロニダーゼである。ヘパラーゼ組換え型蛋白質は *in vitro* でヘパリンを分解すること、および骨髓細胞誘導マスト細胞にヘパラーゼ活性が検出されることからヘパラーゼがマスト細胞内におけるヘパリンの低分子化に関与することが推測されてきた。

以上より本研究において私はヘパラーゼが細胞中でヘパリンを低分子化し顆粒中のヘパリン結合性分子の機能を間接的に制御すると仮説を設定した。当研究室において樹立されたヘパラーゼに対するモノクローナル抗体 (mAb) RIO の特異性を明らかにし、この抗体と細胞モデルを用いて仮説を検証した。

第 2 章 抗ヘパラーゼモノクローナル抗体の特異性解析

ヘパラーゼはプレ前駆体として生合成されシグナル配列の切断を受け前駆体となった後、細胞内における N 末端付近の配列の酵素的な除去に伴い成熟体へ変換される。一方ヘパラーゼの C 末端配

列もまた酵素的に除去され、これによりヘパラーゼは C 末端欠損体へ変換される。mAb RIO のクローンに由来する抗体がこれらのプロセシング体を識別するかどうかを確かめるため、各プロセシング体のヘパラーゼ組換え型蛋白質を作製し、これらの蛋白質に対する mAb RIO の結合を検出した。

ヘパラーゼのプロセシング体に対する mAb RIO の特異性

ELISA 法により前駆体、成熟体、および C 末端を欠損する前駆体ヘパラーゼ組換え型蛋白質に対する mAb RIO の結合を検出した。mAb RIO-6 および 7 はいずれの組換え型蛋白質に対しても高い結合を示した。一方 C 末欠損体に対する mAb RIO-1 および 3 の結合は前駆体に対する結合に比べ著しく低いものであった。すなわち mAb RIO-1 および 3 はヘパラーゼ C 末端配列を認識した。

第 3 章 マスト細胞に発現するヘパラーゼの生物学的役割

生体内の CTMC におけるヘパラーゼの細胞内局在を調べた。さらに CTMC 様細胞株である MST 細胞にヘパラーゼを導入することで顆粒内のヘパラーゼを再構成し、この系を用いて CTMC におけるヘパラーゼの機能を検証した。

CTMC におけるヘパラーゼの細胞内局在

皮膚および腹腔の CTMC におけるヘパラーゼの細胞内局在を mAb RIO-1 免疫組織化学染色および免疫細胞化学染色により調べた。細胞内顆粒に抗体の結合が検出され、この結合は脱顆粒に伴い失われたことから、ヘパラーゼは CTMC の機能的な分泌顆粒に局在することが示された。

CTMC へのヘパラーゼの導入

MST 細胞の培養上清に前駆体ヘパラーゼ組換え型蛋白質を添加し培養した後、mAb RIO-1 を用いた細胞染色によりヘパラーゼを検出した。培養 2 時間後にヘパラーゼは細胞内に取り込まれ細胞内顆粒に集積した。

導入されたヘパラーゼの分泌顆粒への集積

ヘパリンと相互作用するためにヘパラーゼは分泌顆粒に局在する必要がある。取り込まれたヘパラーゼが分泌顆粒に集積することを確認するため、脱顆粒に伴い細胞内のヘパラーゼが分泌されるか否かを調べた。コンカナバリン A による細胞表面受容体架橋の脱顆粒刺激を加えた後、細胞染色および Western blotting 法によりヘパラーゼを検出した。ヘパラーゼは脱顆粒後の MST 細胞中には検出されなかった。マスト細胞内に集積したヘパラーゼは機能的な分泌顆粒に局在することが判明した。

CTMC に導入されたヘパラーゼの成熟体への変換

効率よくヘパリンを低分子化するために、取り込まれた前駆体ヘパラーゼは成熟体に変換されることが推測されたため、蓄積されたヘパラーゼが成熟型かどうかを調べた。取り込まれた前駆体ヘパラーゼの分子量の経時変化を Western blotting 法により解析した。培養上清中の前駆体ヘパラーゼは経時的に減少した一方で、細胞ライセート中に検出されたヘパラーゼは成熟体であり、これは経時的に増加した。前駆体ヘパラーゼは取り込まれた後に成熟体に変換され細胞内に集積することが明らかになった。

ヘパラーゼによる CTMC 内ヘパリンの低分子化

ヘパラーゼが細胞内でヘパリンを低分子化することを確認するため、ヘパラーゼ導入に伴いヘパリン分子量が低下するか否かを調べた。MST 細胞内のヘパリンを $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ によりパルス標識した後ヘパラーゼを細胞内に導入し 24 時間培養し、細胞可溶化物をゲル濾過カラムクロマトグラフィーに供す

ることへパリンの分子量を調べた。未処理の MST 細胞に由来するへパリンは約 60 kDa のピークとして検出されたのに対し、へパラナーゼを導入した細胞のへパリンは 25 kDa よりも小さい分子量の単一のピークとして検出された。すなわちへパラナーゼ依存的にへパリンが低分子化されることが判明した。

へパラナーゼによる CTMC 内トリプターゼの活性化

トリプターゼ (mouse mast cell protease-6, 7) はマスト細胞特異的に発現し、分泌顆粒内蛋白質の 25% を構成する主要な顆粒内プロテアーゼである。へパリンはトリプターゼの主要な活性調節因子であり、トリプターゼと結合することでトリプターゼ活性の顕著な上昇を引き起こす。しかしながらへパリンの分子量変化がトリプターゼ活性を調節するのかわかりなかつた。そこでへパリンを低分子化するへパラナーゼの導入によりマスト細胞内のトリプターゼ活性が変化するか否かを調べた。MST 細胞にへパラナーゼを導入し 24 時間培養した後、細胞可溶化物中のトリプターゼ活性を比較した。MST 細胞由来の細胞ライセートをトリプターゼのモデル基質であるフィブロネクチンと反応し、フィブロネクチンホモ二量体の単量体への分子量変化を Western blotting 法により検出しトリプターゼ活性の指標とした。へパラナーゼを導入した細胞由来の細胞可溶化物によるフィブロネクチン分解は未処理の細胞由来の細胞可溶化物による分解に比べ著しいものであつた。Western blotting 法により細胞可溶化物中の蛋白質に対する抗トリプターゼ抗体の結合を検出したところ、未処理およびへパラナーゼ導入時の細胞可溶化物の間に顕著な違いは認められなかつた。へパラナーゼによりマスト細胞内のトリプターゼ活性は正に調節されることが示唆された。

第 4 章 マスト細胞様細胞株 MST によるへパラナーゼの取り込み機構

第 3 章で見出された MST 細胞への細胞外へパラナーゼの取り込みがどのような分子機構によるものであるか調べた。

へパラナーゼ取り込みを担う細胞表面分子の同定

へパリン硫酸プロテオグリカンが取り込みを担うのかを明らかにするため、競合的に作用する物質を反応させることもしくは薬剤処理により細胞の性状を変化させることが取り込みを阻害するか否かを調べた。硫酸化分子とへパラナーゼの結合を競合的に阻害するへパリン、硫酸化阻害剤である過塩素酸、細胞内輸送阻害剤である Brefeldin A ないしはへパリン硫酸分解酵素であるへパリチナーゼにより MST 細胞を処理し取り込みを行った。いずれの処理によっても生細胞率は変化せず、へパラナーゼを細胞内顆粒に蓄積した細胞の割合は顕著に減少した。へパラナーゼは細胞表面のへパリン硫酸プロテオグリカンを受容体とし細胞内輸送依存的に細胞内に取り込まれることが示唆された。

へパラナーゼ取り込みを担うへパリン硫酸プロテオグリカンの推定

へパリン硫酸プロテオグリカンであるシンデカンファミリーは PDZ 領域を持つアダプター蛋白質に細胞内領域を介して結合し、へパリン硫酸結合性分子の細胞内局在を制御することから、MST 細胞においてシンデカンが発現するかどうかを調べた。MST 細胞におけるシンデカンファミリーの発現を mRNA および蛋白質レベルで検証したところ、シンデカン-1 のみの発現が確認された。取り込まれたへパラナーゼとシンデカン-1 の細胞内分布を蛍光二重染色により比較したところ、両分子は細胞内において部分的に共局在した。へパラナーゼはシンデカン-1 により細胞内へ取り込まれることが推測された。

第 5 章 総括

本研究において私は、mAb RIO-1 および 3 がヘパラーゼ C 末端配列を認識する抗体であることを明らかにした。ヘパラーゼがマスト細胞の分泌顆粒中でヘパリンを低分子化すること、およびヘパラーゼがマスト細胞内のトリプターゼ活性を正に制御することを発見した。また MST 細胞へのヘパラーゼの取り込みは細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンに依存するものであった。

トリプターゼの活性亢進はヘパラーゼの作用によって細胞内で形成された低分子量ヘパリンがトリプターゼに結合したことにより、あるいはトリプターゼと高分子量ヘパリンの複合体にヘパラーゼが作用したことによるものであると考えられる。トリプターゼ阻害剤は炎症性腸疾患および呼吸器疾患動物モデルにおける症状を抑制し、トリプターゼの基質の一つである protease-activated receptor (PAR) -2 を欠損するマウスは関節炎モデルにおいて関節の腫脹を生じない。すなわちトリプターゼは炎症における主要なエフェクター分子であり、ヘパラーゼは炎症抑制の標的因子となりうることが示唆された。

ヘパラーゼが多糖基質を切断する際は 2 糖単位への完全分解ではなくおおよそ 10 糖から 20 糖の断片を生じる限定分解を行うことが知られていたが、このことの生物学的意義は不明であった。低分子量ヘパリンの結合がトリプターゼ活性を上昇させるという考えは、その意義を考察する上でマスト細胞の分泌顆粒中分子の活性制御という観点を新たに提起するものである。

MST 細胞が細胞外のヘパラーゼを取り込み分泌顆粒に蓄積するという事実は、この分子機構がヘパラーゼの細胞内局在を制御する因子として機能することを推測させる。生体内のマスト細胞においてもこの機構が存在するかどうかを確かめることが今後の課題である。