

氏名	緒方 憲一郎		
学位の種類	歯学博士		
学位授与番号	博甲第914号		
学位授与の日付	平成3年3月28日		
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻 (学位規則第5条第1項該当)		
学位論文題目	ヒト唾液中のヒスタチンに関する研究 第1編 分離, 精製とヒスタミン遊離 第2編 ヒスタミン遊離に必要なアミノ酸配列		
論文審査委員	教授 古田裕昭	教授 西嶋克巳	教授 谷口茂彦

### 学位論文内容の要旨

#### 【研究目的】

唾液中には種々の蛋白質やペプチド類が分泌されている。近年, その中にユニークなアミノ酸組成を持つペプチド群が発見されてきた。これらはプロリン, チロシンおよびヒスタチンなどのアミノ酸を分子中に多く含むことが特徴的である。ヒスタチン類 (Hs) もその一つであり, 一連の低分子, 高ヒスタチン含有のポリペプチドである。現在 Hs として一次構造の互いに類似した12種が分離されているが, そのうちヒスタチン1, 3および5 (H1, 3, 5) が全体の90%以上を占めている。これら Hs は現在までに *Candida albicans* や *Streptococcus mutans* に対する抗菌作用, およびラット肥満細胞からのヒスタミン (Hi) 遊離作用を有することが知られている。このうち Hs の Hi 遊離作用に関してはその生理的な役割が明らかでないため, 遊離の機構など詳細な研究が必要である。しかし Hs は塩基性の強いものが多く, 従来の方法では分離精製が非常に困難であった。そこで本研究ではまず Hs を迅速かつ高収量に分離精製する方法を検討し, 次いで Hs の Hi 遊離の機構および Hi 遊離に必要なアミノ酸配列について研究した。

#### 【研究方法】

##### 1. Hs の分離, 精製

唾液はクエン酸刺激により同一人から得た混合唾液を用いた。唾液試料は pH3.0 で5分間加熱処理した後, heparin-Ultrogel カラムを用いて, NaCl の濃度勾配により Hi 遊離活性を指標として分画した。得られた分画は逆相高速液体クロマトグラフィー (逆相 HPLC) によって精製した。精製した Hs はそれぞれアミノ酸分析および一次構造の解析を行った。

##### 2. Hs によるラット肥満細胞からの Hi 遊離

雄性 Wistar 系ラット (300-350 g) を使用し, 肥満細胞はラット腹腔内細胞から Per-

coll を用いた重層遠心法により分離した。Hi 遊離活性の測定は、肥満細胞の浮遊液 ( $10^5$  細胞/ml) 0.5ml を  $37^\circ\text{C}$  で 5 分間保温したのち、試料を加えてさらに 10 分間反応させた。遠心後、上清と沈査の Hi を蛍光法によって定量した。乳酸脱水素酵素 (LDH) の定量は蛍光法によって行った。

### 3. Hs の Hi 遊離活性に必要なアミノ酸配列

H1 と H5 をそれぞれトリプシン、*S. aureus* V8 プロテアーゼおよびペプシンで分解した。Hi 遊離活性のあるフラグメントを逆相 HPLC によって分離し、これらのアミノ酸分析および配列を解析した。さらに H5 の 5-13 位の配列であるペプチド (M9: KRHHGYKRK) を合成し、その Hi 遊離活性を測定した。

#### 【研究結果】

##### 1. 唾液からの Hs の分離と精製

ヘパリンカラムから溶出した 3 分画のうち Hi 遊離活性を認める 2 つの分画から、それぞれ逆相 HPLC によって、H1, 3 および 5 を分離精製できた。収量は唾液 100ml 当り H1, 3 および 5 の総量約 8-10mg であった。

##### 2. Hs による Hi 遊離

H1, 3 および 5 は分離ラット肥満細胞から用量依存的に Hi を遊離した。H3 と H5 の  $\text{ED}_{50}$  は  $15\ \mu\text{M}$  で、H1 のそれは  $100\ \mu\text{M}$  であった。H5 による Hi 遊離は  $37^\circ\text{C}$  では 10 秒以内に最大に達した。この反応は温度依存性であり、至適温度は  $37^\circ\text{C}$  付近であった。また至適 pH は 7.0 付近であり、細胞外のカルシウムは必要ではなかった。この Hi 遊離の際に細胞質内の LDH の漏出は認められなかった。

##### 3. Hi 遊離に必要なアミノ酸配列

H1 と H5 の酵素分解によって得た種々のフラグメントについて、Hi 遊離活性を測定した。その結果、H1 の V8 プロテアーゼ分解によるフラグメント: E12 (KRHHGYRRKFHE) が最も多い Hi 遊離活性を示した。次いで、H5 の V8 プロテアーゼ分解によるフラグメント: N16 (DSHAKRHHGYKRRKFHE) および C8 (KHSHRGY) を分離した。合成ペプチド M9 の Hi 遊離活性は E12 のそれとほぼ同程度であった。これらのフラグメントおよび Hs の Hi 遊離活性の強さを比較すると、 $\text{E12} = \text{M9} > \text{H5} = \text{H3} > \text{N16} = \text{C8} > \text{H1}$  の順であった。

#### 【考察と結論】

1. 加熱前処理をした唾液試料から、ヘパリンカラムと逆相 HPLC の併用によって迅速かつ高収量に Hs を分離、精製できた。
2. Hs によるラット肥満細胞からの Hi 遊離は、温度、pH に依存した開口分泌様式によって起こるものと考えられる。
3. E12 の配列は、H1 の N 末端 5 から 16 位の配列に相当し、この配列は 11 位の Arg が Lys に置換した配列 (KRHHGYKRRKFHE) として H3 および H5 の分子中にも存在している。さらに H5 の 5 から 13 位の配列である M9 の Hi 遊離活性は E12 と同程度であった。この

ことからE12もしくはM9の全部または一部のアミノ酸配列は、H1、H3およびH5に共通したHi遊離活性に必要な一次構造であることが推測された。

### 論文審査の結果の要旨

本論文はヒト唾液中に分泌されている一連の高ヒスチジン含有ペプチドであるヒスタチン類、とくにそのH1、H3およびH5について、その生物活性の一つであるラット肥満細胞からのヒスタミン(Hi)遊離作用をその指標として、その唾液からの分離・精製法の確立、ヒスタチンのHi遊離機構およびHi遊離活性に不可欠なアミノ酸配列について研究したものである。本研究において、①：加熱前処理、ヘパリンカラムと逆相HPLCの併用により迅速かつ高収量のヒスタチン分離・精製法が確立できた。②：ヒスタチンによるラット肥満細胞からのHi遊離は細胞外液のカルシウムに依存しない開口分泌様式による。③：HIのN末端5から16位のアミノ酸配列が、第11位のアミノ酸残基を別とすればH3およびH5にも共通した領域であり、その領域にHi遊離活性を担う必須な一次構造が含まれると推定されるなど、新たな知見が得られ価値ある研究と認められた。よって、審査委員は本論文を歯学博士の学位論文として価値あるものと認めた。