

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07320

研究課題名（和文）新しい翻訳後修飾「ヒスタミン化」の分子機構と機能的意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism and functional significance of histaminylation, a novel post-translational modification

研究代表者

倉増 敦朗（KURAMASU, Atsuo）

昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・教授

研究者番号：90302091

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒスタミン化反応は、トランスグルタミナーゼによってヒスタミンが蛋白質に架橋される翻訳後修飾の一つである。本研究では、トランスグルタミナーゼ阻害または内因性ヒスタミン欠如が、マスト細胞のヒスタミンに対する走化性を低下させることを明らかにし、ヒスタミン化反応が細胞走化性という生理現象に關与している可能性を示した。また、内因性ヒスタミン欠如は、細胞の動きに關わる遺伝子群の発現を低下させることから、ヒスタミン化反応による転写制御の可能性も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒスタミンは細胞外情報伝達物質であると同時に、マスト細胞においては、細胞内においても翻訳後修飾により細胞機能を調節している可能性を示した点において、学術的な意義がある。ヒスタミンに対する走化性は、マスト細胞の局所集積および炎症遷延化の一因であることから、ヒスタミン化の阻害はアレルギー炎症の増悪を防ぐ手段となりうる。

研究成果の概要（英文）：The histaminylation is one of the post-translational modifications in which histamine is cross-linked to proteins by transglutaminase. We found that inhibition of transglutaminase or lack of endogenous histamine reduced the chemotaxis of mast cells to histamine, suggesting that the histaminylation was involved in the process of cell migration. Endogenous histamine deficiency also decreased the expression of a group of genes involved in cell motility, indicating the possibility of transcriptional regulation by histaminylation.

研究分野：薬理学

キーワード：ヒスタミン マスト細胞 ヒスタミン化 トランスグルタミナーゼ 走化性 翻訳後修飾

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

トランスグルタミナーゼは、様々な組織や細胞に広く発現する酵素である。その機能は(1)蛋白質間の架橋反応や、(2)蛋白質と一級アミンの架橋反応の触媒である (Walther 2011)。皮膚の角化肥厚膜 (コーニファイドエンベロープ) 形成や血液凝固因子 XIII によるフィブリン多量体化反応は、前者の反応が関与する例である。一方でヒスタミンなどの一級アミンが蛋白質に架橋される、後者の反応の意義については、ほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

ヒスタミンは細胞外情報伝達物質として広く認識されているが、一級アミンであることからトランスグルタミナーゼの基質となり細胞内において翻訳後修飾物質として機能している可能性がある。本研究は、「トランスグルタミナーゼによるヒスタミン化修飾反応が、細胞の生理機能に重要である」という仮説を検証しようとするものである。

マスト細胞は、自身が産生する炎症メディエーターのヒスタミンに対して走化性を示す。この現象は、炎症組織局所にマスト細胞が集積する一因であると考えられている。本研究は、この生理現象における、ヒスタミン化反応の関与を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨髄由来マスト細胞培養 (BMMC)

6-8 週齢の Balb/c マウスあるいはヒスチジン脱炭酸酵素欠損 (HDCKO) マウスの大腿骨より骨髄細胞を採取し、インターロイキン 3 存在下で 4 週間以上培養した。高親和性 IgE 受容体陽性かつ CD117 陽性細胞が 95%以上となったものを BMMC とし、本研究に使用した。

(2) 走化性試験

孔径 $5\mu\text{m}$ のフィルター膜を底面にもつトランスウェルに BMMC を播種し、 $10\mu\text{M}$ ヒスタミンに対する走化性を測定した。遊走した BMMC に一定数の蛍光ビーズを添加し、フローサイトメーターを用いて、細胞数を計数した。

(3) トランスグルタミナーゼ活性測定

ELISA プレートにトランスグルタミナーゼの基質としてジメチルカゼインを固相化したのち、細胞ライセート試料およびビオチン化ペンチルアミンを添加し、反応させた。洗浄後、トランスグルタミナーゼ反応によりジメチルカゼインに架橋したビオチン化ペンチルアミンを HRP 標識アビジンで検出した。

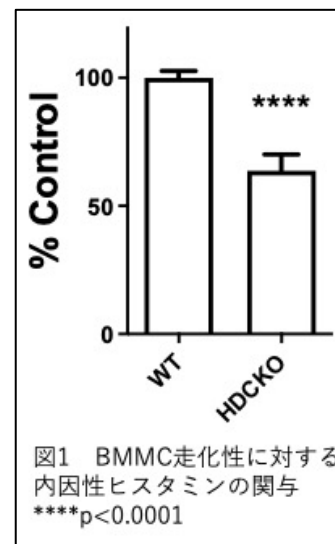
(4) RNA シーケンス

野生型および HDCKO BMMC から QIAGEN RNaseasy MINI を用いて RNA を抽出した。RNA シーケンス解析は BGI 社の RNA シーケンス解析サービスを利用した。

4. 研究成果

(1) 内因性ヒスタミンの BMMC 走化性に対する効果

マスト細胞の走化性におけるヒスタミン化反応の意義を知るために、内因性ヒスタミンの関与を調べた。ヒスタミンを欠如するマスト細胞では、ヒスタミン化反応が起きないと想定される。まず、野生型マウスまたはヒスタミン合成能を欠如した HDCKO マウスから、BMMC を培養し、 $10\mu\text{M}$ ヒスタミンに対する走化性を比較した (図 1)。野生型の BMMC に比べて、HDCKO BMMC は、約 60%にまでヒスタミンに対する走化性が有意に低下した。この結果は、マスト細胞のヒスタミンに対する走化性が、ヒスタミン合成能、即ち内因性ヒスタミンに依存することを示唆する。



(2) トランスグルタミナーゼ阻害薬のBMMC走化性に対する効果

次に、阻害薬を用いてトランスグルタミナーゼの関与を調べた。トランスグルタミナーゼはヒスタミン化を触媒する酵素であり、この酵素を阻害すると、ヒスタミン化反応が阻害されると想定される。不可逆的トランスグルタミナーゼ阻害薬であるZ-DON (50 μM) でBMMCを前処理し、ヒスタミンに対する走化性を調べた。阻害薬で30分間処理したBMMCの走化性は、対照に比較して変化がなかったが、16時間処理したBMMCの走化性は、有意に低下した(図2)。BMMCのトランスグルタミナーゼ活性は、Z-DON (50 μM) 添加後10分ではほぼ消失する(図3)ことから、Z-DON添加後30分でも、十分にトランスグルタミナーゼ阻害効果は得られているはずである。したがって、トランスグルタミナーゼは、例えば遺伝子転写や蛋白質の分解など、長い時間を要する細胞事象を介して、マスト細胞の走化性に関与していることが予想される。

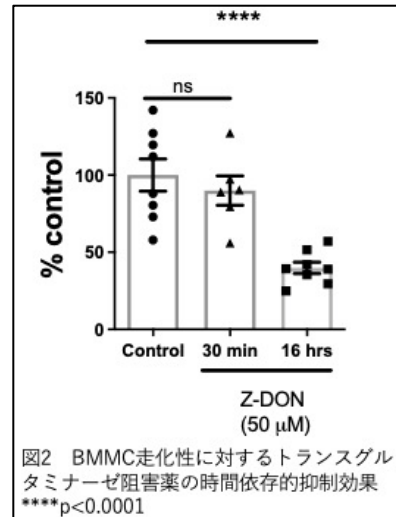


図2 BMMC走化性に対するトランスグルタミナーゼ阻害薬の時間依存的抑制効果 ****p<0.0001

(3) 走化性関連細胞内シグナルに対するトランスグルタミナーゼ活性の関与

BMMCのヒスタミンに対する走化性はヒスタミンH4受容体(HRH4)を介することがわかっている。また、HRH4の下流では、低分子量G蛋白質のRac1やRac2の活性化を介して、AktやERKがリン酸化される(Kuramasu 2018, Honda 2021)。トランスグルタミナーゼはin vitroで、Rac1やRac2と相同性の高いcdc42をヒスタミン化し活性化すると報告があり(Vowinckel 2012)、Rac1やRac2もトランスグルタミナーゼにより活性化される可能性がある。そこで、その下流のAktやERKのリン酸化に対するトランスグルタミナーゼの関与を検討した。10 μMヒスタミンによるAktやERKのリン酸化は、トランスグルタミナーゼ阻害薬のZ-DON (50 μM) 存在下でも、非存在下と同様に認められた(図4)。この結果は、HRH4下流の走化性関連細胞内シグナルには、トランスグルタミナーゼが関与していないことを示唆し、Rac1やRac2がヒスタミン化によって活性化される可能性は低いと考えられる。

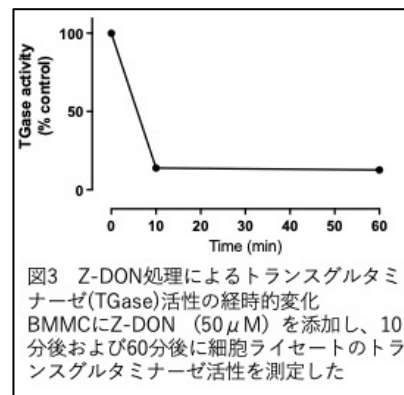


図3 Z-DON処理によるトランスグルタミナーゼ(TGase)活性の経時的変化 BMMCにZ-DON (50 μM) を添加し、10分後および60分後に細胞ライセートのトランスグルタミナーゼ活性を測定した

(4) 内因性ヒスタミンによる転写制御

上述の結果から、ヒスタミン化による走化性制御は、転写などの長い時間を要する細胞事象が関与している可能性がある。ヒスタミンと同じ一級アミンであるセロトニンがヒストンに架橋されるセロトニン化反応によって転写が調節されるという報告もある(Farrelly 2019)。そこで、ヒスタミン化による転写調節の可能性を検討するために、内因性ヒスタミンの有無によるトランスクリプトーム比較を行った。野生型およびHDCKO BMMCからRNAを抽出し、RNAシーケンスによりトランスクリプトームを比較した。変動遺伝子の内、細胞の動きに関わる遺伝子群のみを抽出した(表1)。インテグリン遺伝子群(Itgb21, Itgal, Itgam, Itga6, Itgal, Itgb5, Itgax, Itga4, Itgae)、グアニンヌクレオチド交換因子(Vav3, Dock1)、等の発現量が野生型に比べてHDCKOマスト細胞で低下していることがわかる。これらの遺伝子群は、ヒスタミン化によって発現が制御されている可能性がある。マスト細胞のヒスタミンに対する走化性は、インテグリンに依存していることから、インテグリン遺伝子の発現低下により走化性が低下した可能性がある。また、上述の通り、低分子G蛋白質Rac1およびRac2が走化性に重要であることもわかっているが、Vav3やDock1はRacのグアニンヌクレオチド交換因子として働くことがわかっているため、これらの遺伝子転写の低下がRac1およびRac2の活性化を抑制し、走化性が低下した可能性もある。

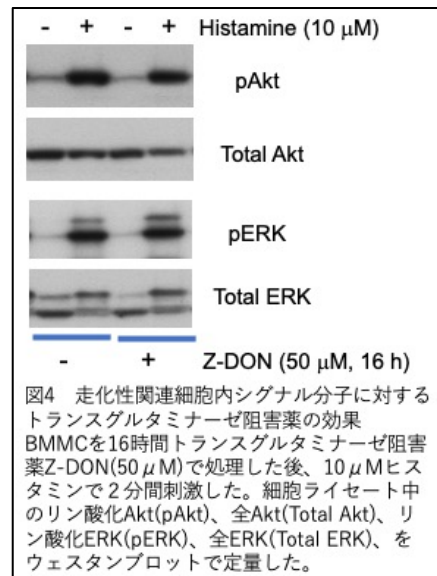


図4 走化性関連細胞内シグナル分子に対するトランスグルタミナーゼ阻害薬の効果 BMMCを16時間トランスグルタミナーゼ阻害薬Z-DON(50 μM)で処理した後、10 μMヒスタミンで2分間刺激した。細胞ライセート中のリン酸化Akt(pAkt)、全Akt(Total Akt)、リン酸化ERK(pERK)、全ERK(Total ERK)、をウェスタンブロットで定量した。

本研究により、内因性ヒスタミンとトランスグルタミナーゼ活性のどちらが欠けても、マスト細胞の走化性が抑制されることが明らかになった。この結果から、ヒスタミン化反応がマ

ト細胞の走化性という生理現象に関与している可能性がある。また、その機序として、ヒスタミン化による蛋白質修飾が、細胞遊走に関連する遺伝子群の転写を調節している可能性がある。

<引用文献>

- ①Walther et al., FEBS Journal 278:4740-4755 (2011)
- ②Kuramasu et al., J Pharmacol Exp Ther 367:9-19 (2018)
- ③Honda et al., Cell Signal. 83:109973 (2021)
- ④Vowinckel et al., FEBS Lett. 586: 3819-3824 (2012)
- ⑤Farrelly et al., Nature 567:535-539 (2019)

Gene ID	Gene Symbol	WT (TPM)	HDCKO (TPM)	ratio (HDCKO/WT)
16415	'Itgb2'	1.02	0.04	0.04
57257	'Vav3'	2.28	0.25	0.11
14268	'Fn1'	30.35	4.33	0.14
109700	'Itga1'	3.17	0.47	0.15
16409	'Itgam'	44.23	6.98	0.16
109711	'Actn1'	12.86	2.6	0.20
330662	'Dock1'	2.43	0.5	0.21
16403	'Itga6'	2.29	0.55	0.24
18479	'Pak1'	7.69	1.86	0.24
12767	'Cxcr4'	21.66	6.46	0.30
16408	'Itgal'	14.68	4.94	0.34
16419	'Itgb5'	4.92	1.7	0.35
16411	'Itgax'	5.69	2.42	0.43
16401	'Itga4'	11.37	5.07	0.45
16407	'Itgae'	3.37	1.63	0.48
18710	'Pik3r3'	1.2	3.22	2.68
434233	'Ppp1ccb'	26.31	70.85	2.69

表1 野生型 (WT) およびHDCKO BMMCのRNAシーケンス解析による遺伝子発現比較
KEGGパスウェイ分類の細胞運動性関連遺伝子群のうち、有意に変動した遺伝子のみ抽出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Honda Takeshi, Nishio Yusuke, Sakai Hiroki, Asagiri Masataka, Yoshimura Kiyoshi, Inui Makoto, Kuramasu Atsuo	4. 巻 83
2. 論文標題 Calcium/calmodulin-dependent regulation of Rac GTPases and Akt in histamine-induced chemotaxis of mast cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Signalling	6. 最初と最後の頁 109973 ~ 109973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2021.109973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉増敦朗、本田健、酒井大樹、朝霧成学、乾誠、吉村清
2. 発表標題 マスト細胞のヒスタミンに対する走化性におけるトランスグルタミナーゼの関与
3. 学会等名 第23回日本ヒスタミン学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西尾侑祐、乾誠、倉増敦朗
2. 発表標題 マスト細胞におけるヒスタミンによる低分子量G蛋白質Rac1及びRac2の活性化はカルシウム/カルモジュリンに依存する
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	吉村 清 (YOSHIMURA Kiyoshi) (30346564)	昭和大学・大学共同利用機関等の部局等・教授 (32622)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	本田 健 (HONDA Takeshi) (30457311)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関