

氏名	竹島 大貴
授与した学位	博士
専攻分野の名称	栄養学
学位授与番号	博甲第145号
学位授与の日付	令和4年3月24日
学位論文の題目	ヒスタミン合成酵素の触媒機構と天然由来阻害物質の阻害機構に関する研究
学位審査委員会	主査 伊東 秀之 副査 山下 広美 副査 川上 祐生 副査 荻野 哲也 副査 中村 光

## 学位論文内容の要旨

本学位論文は、生理活性アミンであり、またアレルギー食中毒の原因物質であるヒスタミンを合成するヒスチジン脱炭酸酵素(Histidine decarboxylase, HDC)の触媒機構及び、天然由来化合物による HDC の阻害機構に関する研究をまとめたものである。

私たち哺乳類の生体内では、HDC により生成されたヒスタミンは、胃酸分泌や平滑筋収縮、血管透過性亢進の三大薬理作用を有する生理活性物質として存在し、また、アレルギー疾患を引き起こすケミカルメディエーターとしても知られている。一方で、ヒスタミン生成菌由来 HDC により蓄積されたヒスタミンを食品中から多量に摂取した場合、アレルギー様食中毒を引き起こすことが知られている。アレルギー疾患やアレルギー様食中毒に用いられる抗ヒスタミン薬には、第一世代と第二世代がある。第一世代は、ヒスタミンの受容体への結合阻害を目的として開発されたが、脳内での受容体結合阻害により強い眠気などの副作用をもたらす。第二世代は、ヒスタミン産生細胞からのヒスタミン遊離抑制を目的としており、第一世代に比べ副作用が少ない。例えば、受容体を阻害せず、HDC 酵素活性を直接制御できるような阻害剤を、天然化合物として植物や果実から抽出し、HDC を含む食品中に添加すれば、加工や保存段階でのヒスタミン蓄積を抑制でき、アレルギー様食中毒の予防に貢献できる。本研究では、有用な HDC 阻害物質を豊富な天然資源から効率的に得るために、HDC の触媒機構と、HDC 阻害作用を持った天然由来化合物の HDC 阻害機構に関する新たな知見を得ることを目的とした。

本論文の内容は以下の通りである。

第一章では、この学位論文に関するイントロダクションについて記述する。

第二章では、HDC を含む PLP 依存性アミノ酸脱炭酸酵素の活性中心に共通して保存されるチロシン残基に着目し、その変異体酵素の機能解析を行った。チロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体は、HDC 本来の脱炭酸反応(ヒスタミン合成反応)を触媒

せず、ヒスタミンが合成されなかった。しかしながら、基質であるヒスチジンを消費し、イミダゾールアセトアルデヒドや過酸化水素、アンモニアを生成する脱炭酸依存酸化的脱アミノ化反応(アルデヒド合成反応)を触媒していた。この結果から、チロシン残基が脱炭酸反応に重要な役割を果たすことが明らかとなった。HDC を含む PLP 依存型アミノ酸脱炭酸酵素の触媒機構の未解明な部分のひとつが、基質 C $\alpha$  位のカルボキシル基離脱(脱炭酸)後に生じる同 C $\alpha$  位へのプロトン付与の仕組みである。アミン合成反応とアルデヒド合成反応は、基質結合から脱炭酸までは同様に進行するが、チロシン残基の有無によって、別々の経路へと進行すると考えられた。したがって、チロシン残基は、触媒機構におけるプロトン付与に関与する重要な残基であると考えられた。

第三章では、これまでの研究で HDC 阻害剤としての有用性を見出した天然由来化合物エラジタンニンの HDC 阻害に関する知見を深めるために、エラジタンニンが持つ多様な構造に着目し、様々なエラジタンニンを用いてヒト由来 HDC 活性の阻害を調べた。その結果、rugosin G が最も強力な HDC 阻害化合物であり、三量体 > 二量体 > 単量体の順に、HDC を強く阻害(非競合阻害)した。しかしながら、環状に二量体化した oenothien B の HDC 阻害作用は単量体よりも弱く、その他の二量体や rugosin G などの三量体エラジタンニンは直鎖状であったことから、直鎖状にオリゴマー化することが HDC 阻害に重要な要因であると考えられた。最も強力に HDC を阻害した直鎖状三量体の rugosin G は、HDC の基質であるヒスチジンに比べると、はるかに大きな分子構造を持つことから、タンパク質表面との相互作用により HDC 活性を阻害していると考えられた。また、HDC 阻害時の rugosin G 濃度では、HDC タンパク質表面を覆いきれないことから、特定の位置で相互作用することで HDC を阻害していると考えられた。

第四章は、この学位論文の総括である。第二章において、HDC の活性中心のチロシン残基が、触媒機構に重要なアミノ酸残基であることが明らかとなった。このチロシン残基は、タンパク質表面に曝されたフレキシブルループという構造を構成するアミノ酸残基である。第三章において、天然由来化合物である rugosin G が、HDC のタンパク質表面の特定の位置で相互作用し活性を阻害する可能性が示唆されたことから、rugosin G は HDC のフレキシブルループの動きを制限するようにタンパク質表面に相互作用しているのではないかと考えられた。しかしながら、チロシン残基の動きを阻害することで、アルデヒド合成反応を触媒する可能性も考えられた。本研究結果は、PLP 依存型アミノ酸脱炭酸酵素の触媒機構におけるプロトン付与の仕組みの解明と、HDC 阻害剤探索によるアレルギー様食中毒の対策に、学術的かつ社会的に寄与するものである。

主業績

No.	論文題目	著者名	発表誌名
1	A single amino acid substitution converts a histidine decarboxylase to an imidazole acetaldehyde synthase	Daiki Takeshima Ayaka Mori Hideyuki Ito Hirofumi Komori Hiroshi Ueno Yoko Nitta	Archives of Biochemistry and Biophysics 2020 Oct 30;693:108551

副業績

No.	論文題目	著者名	発表誌名
1	The Ellagitannin trimer rugosin G inhibits recombinant human histidine decarboxylase	Yoko Nitta Hideyuki Ito Hirohumi Komori Hiroshi Ueno Daiki Takeshima Mikiko Ito Motoyoshi Sakaue Hiroe Kikuzaki	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2019 Jul;83(7):1315-1318

その他の業績 なし

## 論文審査結果の要旨

ヒスタミン合成酵素 (Histidine decarboxylase, HDC) は、アレルギー様食中毒やアレルギー疾患に関与するヒスタミンを合成する。HDCの酵素活性を阻害することで、食品中や体内のヒスタミン量を制御できると考えられるので、本論文では、より効率的な阻害剤探索のために、HDCの触媒機構を解明し、天然由来阻害物質の阻害機構を検討した。

HDCを含むピリドキサルリン酸依存性アミノ酸脱炭酸酵素の活性中心に共通して保存されるチロシン残基に着目し、その変異体酵素の機能解析を行った。その結果、HDCの活性中心に位置するチロシン残基の変異体酵素は、ヒスタミンを合成せず、アルデヒドやアンモニア、過酸化水素を合成していた。このことはチロシン残基が脱炭酸反応に重要な役割を果たし、触媒機構におけるプロトン付与に関与する重要な残基であると考えられた。

次に天然物由来HDC阻害物質探索の一環として、エラジタンニンが持つ多様な構造に着目し、様々なエラジタンニンを用いてヒト由来HDC活性の阻害を調べた結果、エラジタンニンオリゴマーにHDC酵素活性阻害活性が見いだされ、特にRugosin Gなどの直鎖状オリゴマー化した構造のエラジタンニンが、より高い阻害能力を発揮した。さらにヒト由来HDCに最も高い阻害能力を示したRugosin G (直鎖状三量体エラジタンニン) は、アレルギー様食中毒の原因菌であるモルガン菌由来HDCも阻害することを見出した。

本研究より、HDCのヒスタミン合成反応に活性中心のチロシン残基が重要であることを明らかにし、Rugosin Gなどエラジタンニンの直鎖状オリゴマーに顕著なHDC活性阻害を有することを見出し、ヒスタミンを原因とするアレルギー様食中毒の予防に寄与する既存添加物の開発に資する科学的データを提供することができた。

なお、論文発表会における質疑応答では、いずれの質問に対しても的確に真摯な態度で応答していた。以上の結果より、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (栄養学) の学位論文として価値あるものと認める。