

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
月山 芙蓉	主査 教授 勝間田 敬弘 主査 教授 林 秀行 副査 教授 古谷 榮助 副査 教授 北浦 泰裕 副査 教授 窪田 隆裕
主論文題名 Gallate, the component of HIF-inducing catechins, inhibits HIF prolyl hydroxylase (HIF 誘導カテキンの部分構造である没食子酸による HIF プロリン水酸化酵素の阻害)	
学位論文内容の要旨	
<p>【目的】 HIF (hypoxia-inducible factor) は低酸素状態で誘導される転写因子であり、VEGF 等血管新生因子の発現を促進する。最近、種々のカテキン類が HIF を誘導することが発見され、心血管疾患の新たな治療に結びつくことが期待されている。カテキン類やその類縁物質等を利用した治療法を新たに展開するにあたってはこれらカテキン類が HIF を誘導する機構の理解が不可欠であるが、現在のところその機構はほとんど解明されていない。申請者はこの点を明らかにするため、HIF を誘導するカテキンと共通の部分構造を持つ没食子酸プロピルについて、HIF-1α 誘導の現象とその機構についての解析を行った。</p> <p>【方法】 ラット心筋由来 H9c2 培養細胞を用いた。細胞浮遊液に没食子酸プロピル (<i>n</i>-propyl gallate, nPG) を添加し、一定時間後の細胞中 HIF-1α 蛋白質を免疫ブロッティング法により、また HIF-1α mRNA を RT-PCR 法により検出した。HIF プロリン水酸化酵素 (prolyl hydroxylase, PHD) 活性に対する nPG と没食子酸の効果は、H9c2 細胞抽出液中の PHD を用いて調べた。PHD 活性は [5-¹⁴C]-2-オキソグルタル酸から生成する [1-¹⁴C]-コハク酸の放射活性を測定することにより求めた。H9c2 細胞内の nPG および没食子酸の量は細胞抽出液の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離のち電気化学検出により測定した。分子モデル構築はヒト PHD 2 の結晶構造の座標 (PDB エントリー 2G19) を用い、MOE (カナダ CCG 社, ver. 2005.6) のプログラムによって行った。</p> <p>【結果】 H9c2 細胞を 200 μ M の nPG の存在下インキュベートすると、HIF-1α 蛋白質量が上昇し、2 ~ 4 h で最大となり、以後減少した。nPG 添加後 2 h の HIF-1α 蛋白質量は nPG 濃度の上昇とともに上昇した。このことより、nPG が没食子酸を含むカテキン類と同じく HIF-1α を誘導することが確かめられた。一方、nPG は HIF-1α mRNA 量を変化させなかったことから、nPG の HIF-1α 誘導効果は翻訳前ではなく翻訳後のものであることが考えられた。</p> <p>この結果を受け、HIF-1α をプロテアソーム分解系に導く PHD に対する nPG の作用を調べたところ、nPG は 1.2 mM の濃度においても PHD を阻害しなかったが、nPG が脱エステル化したものである</p>	

没食子酸は濃度依存的に PHD を阻害し、0.8 mM の濃度において PHD 活性を完全に消失させた。

実際に nPG 投与により没食子酸が細胞内で生成しているかどうかを確かめるため、400 μ M の nPG で 2 h インキュベートした H9c2 細胞の細胞抽出液を HPLC にて分析した。その結果、細胞に取り込まれた nPG の 4 ~11% が没食子酸に変化していることが判明した。

【考察】

近年の研究により、HIF-1 α は Pro402 および Pro564 が PHD によって分子状酸素を基質とする水酸化を受けると、これら水酸化プロリン残基を認識する von Hippel-Lindau 因子によるユビキチンの付加を受け、プロテアソームによる分解へと導かれることが明らかになっている。

申請者の得た結果をこの知見と併せて考察すると、nPG は細胞に取り込まれたのちに加水分解を受け、生じた没食子酸が PHD を阻害することにより、HIF-1 α プロリン残基の水酸化とそれによる HIF-1 α 蛋白質の分解が抑えられ、HIF-1 α 蛋白質量が增大するという機構が考えられる。

さらに、nPG と没食子酸が類似の構造を持つにもかかわらず、PHD の阻害に関して対照的な挙動をとることの理由を探るため、ヒト PHD 2 の活性部位における分子モデル構築を行った。その結果、基質 2-オキシグルタル酸の結合部位に過不足なく没食子酸が結合すること、すなわち、2-オキシグルタル酸の γ -カルボキシル基が結合する Arg386 に没食子酸のカルボキシル基が、また 2-オキシグルタル酸の α -カルボキシル基と α -ケト基が Fe²⁺ をキレートするのと同じ様式で没食子酸の 2 個のフェノール性水酸基が Fe²⁺ をキレートするモデルが得られた。したがって、没食子酸は PHD への結合において基質 2-オキシグルタル酸と競合することで PHD を阻害し、没食子酸のカルボキシル基がエステル化されている nPG は Arg386 との結合が不可能になるために PHD へ結合せず、PHD を阻害しないものと説明された。

以上より、カテキン類の共通部分構造である没食子酸が PHD を阻害することにより HIF を誘導することが明らかになり、今後没食子酸エステルのエステル部分の改変を中心とした誘導體作成により、さらに HIF 誘導能の高い薬剤の開発につながることを期待される。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	月山 芙蓉
論文審査担当者		主 査 教授 勝 間 田 敬 弘 主 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 古 谷 榮 助 副 査 教授 北 浦 泰 副 査 教授 窪 田 隆 裕	
主論文題名 Gallate, the component of HIF-inducing catechins, inhibits HIF prolyl hydroxylase (HIF 誘導カテキンの部分構造である没食子酸による HIF プロリン水酸化酵素の阻害)			
論文審査結果の要旨			
<p>本研究は、カテキン類が HIF を誘導する機構を明らかにするため、HIF を誘導するカテキンと共通の部分構造を持つ没食子酸プロピルについて、HIF-1α 誘導の現象とその機構についての解析を行ったものである。</p> <p>申請者はラット心筋由来 H9c2 培養細胞を用いて、没食子酸プロピル (<i>n</i>-propyl gallate, nPG) 添加の細胞中 HIF-1α 蛋白質量と HIF-1α mRNA 量に及ぼす影響、HIF プロリン水酸化酵素 (prolyl hydroxylase, PHD) 活性に対する nPG と没食子酸の効果、細胞内における nPG からの没食子酸の生成、および没食子酸の PHD 阻害機構の分子モデルを検討している。</p> <p>その結果、nPG が没食子酸を含むカテキン類と同じく HIF-1α を誘導することが確かめられた。一方、nPG は HIF-1α mRNA 量を変化させなかったことから、nPG の HIF-1α 誘導効果は翻訳前ではなく翻訳後のものであることが考えられた。この結果を受け、HIF-1α をプロテアソーム分解系に導く PHD に対する nPG の作用を調べたところ、nPG は 1.2 mM の濃度においても PHD を阻害しなかったが、nPG が脱エステル化したものである没食子酸は濃度依存的に PHD を阻害し、0.8 mM の濃度において PHD 活性を完全に消失させた。実際に nPG 投与により没食子酸が細胞内で生成しているかどうかを確かめたところ、細胞に取り込まれた nPG の 4 ~11% が没食子酸に変化していることが判明した。さらに、ヒト PHD2 の立体構造を用いてモデル構築を行うことにより、没食子酸が PHD を阻害する機構を構造論的に明らかにした。</p> <p>本研究は、カテキン類の共通部分構造である没食子酸が PHD を阻害することにより HIF を誘導することを明らかにしたものであり、今後没食子酸誘導体を中心とした薬剤の開発に寄与するものと考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Biochemical and Biophysical Research Communications 351(1): 234-239, 2006</p>			