

学位論文題名

ヒト血漿グルタチオンペルオキシダーゼの
構造と機能に関する研究

学位論文内容の要旨

生体が分子状酸素を代謝や呼吸に利用する過程において副産物として、スーパーオキシドや過酸化水素等の反応性の高い活性酸素が生成する。これらの活性酸素は、核酸やタンパク質の修飾、脂質の過酸化等をひきおこし、生体に傷害をあたえ、老化や発癌などの原因とも考えられている。その活性酸素を除去する抗酸化酵素群の一つにグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)がある。

GPxの研究は、血球細胞や各種臓器の細胞質に広く分布するcytosolic GPx (cGPx)を中心に、一次構造の決定やX線回折による3次構造の推定などが行なわれてきた。GPx活性は細胞質だけでなく血漿にも認められる。この血漿に存在するplasma GPx (pGPx)は生化学的、免疫学的にcGPxとは異なることが示唆されていたが、一次構造の報告はなく詳細は不明であった。筆者はこのpGPxの構造と機能について研究を行ない、以下のことを明らかにし、学位論文にまとめた。

(1) ヒトpGPxの一次構造の解析およびその生合成部位についての研究

pGPxのlysyl endopeptidase消化物を逆相クロマトグラフィーで分離し、得られたペプチドをプロテインシーケンサーで分析した。その結果、8つのペプチドの111残基分のアミノ酸配列を決定した。このうちcGPxと比較的相同性の低いアミノ酸配列(13残基)に対するオリゴヌクレオチドを合成し、これをプローブとしてヒト胎盤cDNAライブラリーをスクリーニングし、得られたクローンのシーケンスを決定した。この配列は226個のアミノ酸をコードするオープンリーディングフレームを有し、推定されるアミノ酸配列には先に蛋白レベルで決定した配列と同一の配列が全て含まれていた。pGPxの活性部位セレノシステインは、cGPxの場合と同様に、終止コドンの一つTGAでコードされていた。またアミノ末端近傍の配列は疎水性アミノ酸に富んでおり、分泌タンパク質に特有のシグナルペプチド配列であると考えられた。ヒトcGPxとのアミノ酸配列レベルでの相同性は約44%であり、一次構造の異なるアイソザイムであることが示された。

pGPxの生合成部位を明らかにするために、ラットの臓器からmRNAを調製し、得られたcDNAをプローブとしてNorthern blot解析を行なった。その結果、腎にのみpGPxのmRNAが認められた。また抗pGPx抗体を用いる免疫組織染色により、腎尿細管の基底膜

にpGPxの存在が認められた。以上より、pGPxは主に腎臓の尿細管で生合成され、血漿に分泌されると考えられた。

また筆者は、これまで特異的に測定することが困難であった血中pGPx濃度測定を、抗pGPx抗体を用いた酵素抗体法を開発することで可能にした。この測定法を用いて腎炎患者の血漿中のpGPx濃度を測定したところ、腎炎の初期に、pGPx濃度が上昇することを明らかにし、pGPxが腎炎の診断マーカーになりえる可能性が示唆された。

(2) pGPxの基質特異性についての研究

cGPxはGSH存在下、過酸化水素、有機過酸化物を2電子還元する酵素であるが、細胞膜の過酸化物の主要成分であるphospholipid hydroperoxide(PH) に対しては直接作用しない。一方、PHを還元する細胞質酵素として見いだされたPH-GPxが、細胞内で生成したPHを還元すると考えられる。しかし細胞外に存在するpGPxのPHに対する作用については明らかではなかった。そこで筆者はpGPxの生理的役割を明らかにするために、pGPxのPHに対する作用を検討した。

Phosphatidylcholine hydroperoxide (PC-OOH) に対するpGPxの作用を調べたところ、pGPxはPH-GPx同様にPC-OOHを還元する活性を示した。また生体膜モデルとして、赤血球ゴースト過酸化物に対する作用を検討した。その結果、pGPxはphosphatidylcholineの他に、phosphatidylserine, phosphatidylethanolamineの過酸化物も還元することが明らかになった。これらの結果より、cGPxやPH-GPxが細胞内で生じた過酸化物処理するのに対し、pGPxは血漿中や細胞膜の外側で生成した過酸化物処理に重要な働きを果たしていると考えられた。

(3) pGPxの細胞への取り込みと細胞増殖作用についての研究

無血清培地を用いた細胞培養においてはインスリン、トランスフェリン等と共に、亜セレン酸ナトリウム(Na_2SeO_3)の添加が必須とされてきた。この Na_2SeO_3 の添加の理由として、GPxにセレンが含まれることより、培養中に生成する活性酸素の除去が考えられているがこれを示す実験的証拠はない。また血清培地の場合、血清中のセレン含有因子がセレン供給源であると考えられるが、これを証明した報告もない。そこで筆者はまず、pGPxがセレン供給源になり得る可能性について検討した。

前骨髄腫細胞 HL-60 をセレン不含の無血清培地 (IT-RPMI) で培養した時の細胞内セレン量の変化をcGPx活性を指標として測定した。セレンを培地から除いて培養すると、培養時間に依存したcGPx活性の低下が認められ、培養2日目でcGPx活性は約22%にまで減少し、細胞内のセレン量を低下状態にすることができた。この低セレン状態の細胞を30 nM Na_2SeO_3 、あるいは血漿中濃度に相当する430 nM pGPxを含む培地で3日間培養したところ、cGPx活性の回復が認められた。

次にpGPxの細胞への取り込みを調べるために、 $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_3$ の存在下、pGPx遺伝子を導入したCHO細胞を培養し、上清から ^{75}Se 標識pGPxを調製し、トレーサー実験を行なった。

この⁷⁵Se標識pGPx存在下で培養したHL-60の細胞質画分をSDS-PAGE後、イメージアナライザーで解析したところ、3種類のpGPx以外の⁷⁵Seを含むタンパク質が認められた。これより培養液に添加した⁷⁵Se標識pGPxが細胞に取り込まれ、セレン含有タンパク質が新たに生合成されることが明らかになった。

次にNa₂SeO₃およびpGPxの細胞増殖に及ぼす作用をMTT法、および³H-チミジンの取り込み量で検討した。低セレン状態のHL-60を可変量のNa₂SeO₃存在下に3日間培養すると、用量依存的に細胞増殖がみられ、10-60 nMで最大の増殖活性を示した。一方、Na₂SeO₃を添加しないと細胞は死滅した。Na₂SeO₃の代わりにpGPxを培地に添加したところ、pGPx濃度に依存した細胞増殖が認められ、pGPx 100 nM添加により最大の増殖活性を示した。この細胞増殖活性は、リコンビナントpGPxでも見られたが、セレノシステインを含まないpGPx変異体には認められず、pGPx中のセレンが細胞増殖に関与することが示された。

以上の結果より、pGPxはNa₂SeO₃同様に細胞に取り込まれ、新たに生合成されるセレン含有タンパク質のセレン供給源になり得、何らかの形で細胞増殖に関与することが示された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 長 沢 滋 治
副査 教授 横 沢 英 良
副査 教授 高 橋 和 彦
副査 助教授 澤 田 均

学位論文題名

ヒト血漿グルタチオンペルオキシダーゼの 構造と機能に関する研究

グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)はグルタチオンの存在下、過酸化水素や過酸化脂質を2電子還元して無毒化する酵素で、SOD、カタラーゼとともに酸化ストレスに対する生体防御系の一翼を担っている。これまでに我々の研究室では、既知のGPx(細胞質型GPx, classical GPxとも呼ばれる。cGPxと略す)とは異なるタイプのGPxを血漿中に発見し、これを分離精製し、その生化学的性質を明らかにしてきた。その結果、この細胞外型GPx(pGPx)はcGPxとは異なる構造をもつことが示唆された。申請者は、ヒト血漿からpGPxを精製する方法を改良しこれを得ることに成功した。更に申請者は研究を推し進め、cDNAクローニングによる一次構造の決定、合成部位の決定、免疫測定法の開発、基質特異性の解明の研究を行うと共に、本酵素の細胞へのセレン運搬蛋白質としての可能性を示唆する研究を行った。その結果、下記のような本酵素の構造と機能に関する価値ある研究成果を得た。

1) pGPxのcDNAクローニング

pGPxのエンドペプチダーゼ消化物を逆相クロマトグラフィで分取して得られる複数のペプチドのアミノ酸配列を合計111残基決定したところ、既知のcGPxの配列と部分的にしか一致しなかった。そこで相同性の低い配列

に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとしてヒト胎盤cDNAライブラリをスクリーニングし、pGPxに相当するクローンを得た。このクローンは226残基のアミノ酸をコードするopen reading frameを有しており、推定されるアミノ酸配列は前述のアミノ酸配列分析から決定された111残基全てを含み、pGPxの遺伝子であることが確認された。酵素活性部位のセレノシステインは、cGPxの場合と同様に、open reading frame中に存在するTGAでコードされていた。アミノ末端は疎水性アミノ酸に富むシグナルペプチド配列と考えられ、分泌タンパク質であることが確認された。cGPxとアミノ酸配列を比較すると、相同性は44%であった。ウシcGPxの構造解析から推定される β_1 , β_2 , β_3 -sheet構造や四量体形成に関わる α_2 -helix構造に相当する部分で相同性が高く、cGPxの基本構造がpGPxでも保持されていると考えられた。

2) pGPxの生合成部位の研究

血漿タンパク質の多くは肝で合成されるが、ノーザンブロット法ではヒト正常肝にpGPx mRNAが認められなかった。なお、ヒト胎児肝、肝癌細胞HepG2では発現が見られた。ラット肝、腎、心、肺のmRNAを調べたところ、腎でのみ発現が認められた。金コロイド結合抗pGPx抗体を用いる免疫組織染色で解析したところ、ヒト腎尿細管の基底膜へ沈着が認められた。尿細管で合成され、毛細血管に移行する途中で一部が基底膜に結合したと考えられる。なお、本酵素は血管など他の基底膜には存在せず、尿細管の基底膜に特異的に認められた。本酵素が腎尿細管で生合成されると考えられたので、腎不全による透析患者の血中GPxを酵素抗体法で測定した。全ての透析患者において正常値より低い値が得られ、平均すると30%程度にまで低下していた。

3) pGPxの基質特異性の研究

cGPxはphospholipid hydroperoxide (PH)に作用しないが、最近、PHを基質とするタイプ(PH-GPx)が細胞質に見いだされた。そこでpGPxの生理的役割を明らかにするため、pGPxのPHに対する作用について検討した。dilinolenoyl-phosphatidylcholine hydroperoxide (PC-OOH)への作用を

GSH reductase couple法, HPLC法で測定したところ, pGPxはPH-GPxと同様にPC-OOHを還元した。また, 光増感酸化法で調製した赤血球ゴースト過酸化物に対する作用をTLC法で解析したところ, pGPxはcholesterolを除くphosphatidyl ethanolamine, phosphatidylserineの過酸化物にも作用することが明らかになった。これらの結果から, pGPxはPH-GPxと同様にPHを還元する活性を有しており, 血漿中や細胞膜で生成した過酸化物の処理に重要な働きをしていると考えられる。

4) pGPxのセレン運搬作用の研究

細胞内のセレンを低下した細胞に対するpGPxの作用を調べ, pGPxが細胞に取り込まれ, 新たに合成されるセレン含有蛋白質のセレン源になりえることを放射標識pGPxを用いて証明した。またpGPxがこの細胞の生存維持作用あるいは増殖作用を示すことを明らかにした。

以上, 申請者はヒトGPxの構造と機能について, 蛋白質化学, 遺伝子工学, 酵素学, 免疫学, 細胞生物学の手法を駆使して広範囲な研究を行い, 本酵素の基本的性質を明らかにすると共に, その生理的重要性を明らかにした。この研究成果は, 基礎研究の点で価値があるだけでなく, 本酵素の未知の機能に関する手掛かりが得られた点でも大いに意義のあるものである。以上, 本研究の業績は博士(薬学)の学位に相応しい業績と評価できる。