

学 位 論 文 題 名

ヒト血漿セレン含有タンパク質の機能に関する研究

学位論文内容の要旨

【序論】

酸素を利用してエネルギーを得る反応過程などの副産物としてスーパーオキシドアニオン、過酸化水素 (H_2O_2) などの活性酸素種 (ROS) が生じる。ROS はタンパク質に作用して変性、失活を引き起こすと共に脂質の過酸化反応を引き起こす。ROS を消去する抗酸化酵素の一つ、glutathione peroxidase (GPx) は glutathione (GSH) を電子供与体として H_2O_2 や過酸化脂質を還元・消去する。ROS 産生と消去のバランスが崩れると、様々な疾病を引き起こすと考えられている。動脈硬化症は低密度リポタンパク質 (LDL) 中の脂質の過酸化を引き金として発症することが知られている。

GPx は必須微量元素セレンをセレノシステインの形で活性部位に含み、細胞内型として cellular GPx (cGPx), phospholipid hydroperoxide GPx (PHGPx) が知られている。一方、当研究室で GPx 活性をもつ血漿セレン含有タンパク質として発見された extracellular GPx (eGPx), selenoprotein P (SeP) は、細胞外で抗酸化作用を担っていると考えられる。

今回、これら2種類の血漿セレン含有タンパク質の生理的意義を明らかにする目的で、過酸化物還元活性の速度論的解析を行い、他の GPx family と比較した。さらに動脈硬化症の発症に関わる酸化 LDL の生成及び生じた酸化 LDL 中の過酸化脂質の還元に関与する eGPx, SeP がどのような影響を及ぼすか検討した。

【結果および考察】

1. GPx family の過酸化物還元活性の速度論的解析

ヒト赤血球、血漿、胎盤から cGPx, eGPx, PHGPx, SeP を精製した。得られた標品は全て SDS-PAGE で単一のバンドを示した。

GSH 濃度を 2 mM, 過酸化物濃度を 60 μM , pH 7.4, 37°C とした測定条件における各酵素の H_2O_2 , phosphatidylcholine hydroperoxide (PC-OOH) 還元活性を測定した。水溶性過酸化物の H_2O_2 に対して、cGPx, eGPx がそれぞれ 1.8×10^5 , 8.6×10^4 (nmol/min/nmol) の高い比活性を示した。一方、脂溶性の PC-OOH に対しては、界面活性剤の添加条件で各酵素の活性が異なり、0.1% Triton X-100, 0.24 mM deoxycholate (DOC) で PHGPx が最も高い比活性を示した (1.3×10^3 nmol/min/nmol)。eGPx は 7 mM DOC で比活性が最も高く (1.2×10^3 nmol/min/nmol)、SeP はその至適条件下においても eGPx, PHGPx に比べ 1/10 以下であった。PC-OOH の還元に関与する各酵素が異なる至適界面活性剤濃度を示すことから、ミセルの形態や脂質の配向性の違いが活性に影響を及ぼしていると考えられる。

さらに GPx family の過酸化物還元反応について速度論的解析を行った。過酸化物との速度定数を

比較すると、cGPx, eGPx では H_2O_2 に対し 10^7 オーダー、PHGPx は PC-OOH に対し 10^7 オーダーの高い反応性を示した。それに比べ eGPx, SeP の PC-OOH に対する値はそれぞれ 10^5 , 10^4 オーダーであり、これらの酵素の過酸化脂質に対する特異性が低いことがわかった。また GSH との反応定数は、cGPx, eGPx, PHGPx が $10^4 \sim 10^5$ オーダーの範囲であるのに対し、SeP では 10^2 オーダーと低い。

SeP の GSH に対する特異性が低いことから、GSH に代わるチオール源の存在が示唆された。GSH と同じ生体内チオールの thioredoxin (TRX) が SeP チオール源となりうるか検討したところ、GSH の約 1/400 の TRX 濃度で同等の酵素活性を示した。SeP の TRX に対する k_2' 値は $2.1 \times 10^5 \text{ (M}^{-1}\text{sec}^{-1}\text{)}$ で、cGPx の GSH に対する k_2' 値の $2.1 \times 10^5 \text{ (M}^{-1}\text{sec}^{-1}\text{)}$ に近いことから、SeP は TRX に特異的な酵素であることが示唆された。

2. 血漿中 GPx family の酸化 LDL 産生に及ぼす影響

動脈硬化症の発症に酸化 LDL の関与が示唆されている。LDL の主要脂質成分であるリン脂質 (PC) とコレステロールエステル (CE) が酸化されると PC-OOH, CE-OOH を含む酸化 LDL となる。酸化 LDL に対する eGPx, SeP の反応性を検討したところ、eGPx は PC-OOH を、SeP は PC-OOH, CE-OOH を還元した。

一方、酸化 LDL の産生機構に 15-lipoxygenase (15-LOX) がその初期因子として注目されている。そこで 15-LOX が LDL を過酸化化する反応に及ぼす eGPx と SeP の添加効果について検討した。LDL に 15-LOX を添加し生じた PC-OOH を化学発光 HPLC により測定したところ、15 分でその産生量はプラトーに達した。一方、この反応に GSH と eGPx を共存させると PC-OOH の産生は検出されなかった。また GSH と SeP 共存下には、そのような効果はみられなかった。同様に LDL 中の CE においても GSH と eGPx 共存下で、CE-OOH の産生が検出されなかった。また A_{235} の測定より、GSH, eGPx 共存下で CE-OH の産生は認められなかった。すなわち CE-OOH の還元は起こっていない。15-LOX が脂質を過酸化する際には微量の過酸化物の存在が必須である。eGPx は LDL 中のこの過酸化物を還元することで、15-LOX 活性を抑制していると考えられた。

以上の結果より、血漿中で生じた酸化 LDL を eGPx, SeP が還元・除去し、また酸化 LDL の産生を eGPx が抑制する働きを示すことから、eGPx, SeP が動脈硬化症の進展を抑制する活性を示すことが明らかとなった。

3. 血漿中 GPx family と 4-hydroxy-2-nonenal との反応性

生体内で ROS により脂質が過酸化を受けると、過酸化脂質が産生されるが、さらに酸化が進むとより反応性の高いアルデヒド類が産生される。4-hydroxy-2-nonenal (HNE) は LDL の過酸化に伴って産生され、マクロファージの酸化 LDL 取り込みと泡沫化に促進的に働くと考えられている。動脈硬化症の進展因子である HNE に対する eGPx, SeP の反応性について検討した。

はじめに HNE 添加による活性変化について検討した。eGPx, SeP に HNE を添加し、 37°C , 30 分後の酵素活性を測定したところ、SeP のみ HNE の濃度依存的に活性が低下した。次に全長 SeP (1-381 残基)、N 末端 (1-254 残基)、C 末端 (262-381 残基) フラグメントに HNE を添加し、anti-HNE 抗体を用いた western blotting 解析を行った。その結果、全長及び N 末端フラグメントで速やかな HNE の結合が認められた。SeP の活性には N 末端側のセレノシステインが必須であり、このセレノシステイン残基に HNE が結合していることが示唆された。これより SeP は HNE の毒性を消去することが示された。

以上の結果から eGPx, SeP は動脈硬化症の進展を抑制する機能をもつことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査	助教授	高 橋 和 彦
副 査	教 授	松 田 正
副 査	教 授	横 沢 英 良
副 査	助教授	川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

ヒト血漿セレン含有タンパク質の機能に関する研究

glutathione peroxidase (GPx) は glutathione (GSH) 存在下に H_2O_2 や過酸化脂質を還元・消去する酵素であり、必須微量元素セレンをセレノシステインの形で活性部位に含み、アイソザイムの存在が知られている。GPx には細胞内型として cellular GPx (cGPx), phospholipid hydroperoxide GPx (PHGPx) が知られている。一方、GPx 活性をもつ血漿セレン含有タンパク質 extracellular GPx (eGPx) と selenoprotein P (SeP) は、細胞外で抗酸化作用を担っていると考えられる。本論文では、これら 2 種類の血漿セレン含有タンパク質の生理的意義を明らかにするため、過酸化物還元活性の速度論的解析を行い、他の GPx と比較した。さらに動脈硬化症の発症に関わる低密度リポタンパク質 (LDL) の酸化反応に及ぼす eGPx, SeP の影響を検討し、以下の成果を挙げた。

1. GPx family の過酸化物還元活性の速度論的解析

ヒト試料から精製した cGPx, eGPx, PHGPx, SeP を用い、2 mM GSH, 60 μM 過酸化物濃度、pH 7.4, 37°C の条件で各酵素の H_2O_2 , phosphatidylcholine hydroperoxide (PC-OOH) 還元活性を測定した。 H_2O_2 に対して、cGPx, eGPx が高い比活性を示した。一方、PC-OOH に対しては、界面活性剤の添加条件で各酵素の活性が異なり、0.1% Triton X-100, 0.24 mM deoxycholate (DOC) で PHGPx が最も高い比活性を示した。eGPx は 7 mM DOC で比活性が最も高く、SeP はその至適条件下においても、eGPx PHGPx に比べ 1/10 以下であった。次にこれらの酵素反応の速度論的解析を行った。過酸化物の速度定数を比較すると、cGPx, eGPx では H_2O_2 に対し 10^7 オーダー、PHGPx は PC-OOH に対し 10^7 オーダーの高い反応性を示した。一方、eGPx, SeP の PC-OOH に対する値はそれぞれ 10^5 , 10^4 オーダーであり、過酸化脂質に対する特異性は低かった。また GSH との反応定数は、cGPx, eGPx, PHGPx が $10^4 \sim 10^5$ オーダーの範囲であり、SeP では 10^2 オーダーと低い。生体内チオール thioredoxin (TRX) が SeP のチオール源になるか検討したところ、GSH の約 1/400 の TRX 濃度で

同等の酵素活性を示した。SeP の TRX に対する反応定数 k_2' は、cGPx の GSH に対する k_2' に匹敵し、SeP は TRX に特異的な酵素であることが示唆された。

2. 血漿中 GPx family の酸化 LDL 産生に及ぼす影響

LDL の主要脂質成分である PC とコレステロールエステル (CE) が酸化されると PC-OOH, CE-OOH を含む酸化 LDL となる。酸化 LDL に対する eGPx, SeP の反応性を検討したところ、eGPx は PC-OOH を、SeP は PC-OOH, CE-OOH を還元した。次に 15-lipoxygenase (15-LOX) が LDL を過酸化する反応に及ぼす eGPx と SeP の効果について検討した。LDL に 15-LOX を添加したところ、15 分で PC-OOH の産生量はプラトーに達した。一方、この反応に GSH と eGPx を共存させると PC-OOH は産生されなかった。また SeP にはこのような効果はなかった。更に GSH と eGPx 共存下で、CE-OOH だけでなく、CE-OH の産生も認められなかった。15-LOX が脂質を過酸化する際には微量の過酸化物の存在が必須であり、eGPx は LDL 中のこの過酸化物を還元し、15-LOX 活性を抑制していると考えられた。

3. 血漿中 GPx family と 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) との反応性

LDL の過酸化に伴って産生され、動脈硬化症の進展因子であるアルデヒド HNE に対する eGPx, SeP の反応性について検討した。eGPx, SeP と HNE を反応したところ、SeP の場合のみ HNE の濃度依存的にその酵素活性が低下した。SeP の活性には N 末端側のセレノシステインが必須であり、このセレノシステイン残基に HNE が結合し HNE の毒性を消去することが示唆された。

以上の研究成果から、eGPx, SeP が動脈硬化症の進展を抑制する機能をもつことが示唆された。本研究はセレンにより制御される疾患の予防・診断法の開発に有力な手懸りを与えるものであり、博士（薬学）の学位に値する業績と評価した。