

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月25日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(c)

研究期間：2010～1012

課題番号：22590262

研究課題名（和文） 小胞体ストレスと活性酸素シグナルのレドックス制御

研究課題名（英文） Redox regulation of endoplasmic reticulum stress and signals by reactive oxygen species

研究代表者

藤井順逸 (FUJII JUNICHI)

山形大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00222258

研究成果の概要（和文）：

Prx4 遺伝子欠損マウスの解析により次の結果が得られた。(1) 精巣特異的 Prx4 転写産物が発現することが明らかになり、精子形成との関連が示唆された。(2) B 細胞では Prx4 が IgM の酸化的重合に重要なことが分かった。(3) Prx4 は顆粒球コロニー刺激因子による細胞増殖を抑制的に制御することが分かった。(4) Ero1 と Prx4 の多重欠損マウスはビタミン C が欠乏し壊血病の症状を示した。このように、Prx4 のもつ細胞内外での機能が次第に明らかになってきた。

研究成果の概要（英文）：

We have analyzed roles of Prx4 by using Prx4-knockout mice and obtained following results. (1) Testes-specific Prx4 transcript was present, which suggests potential role of the variant in spermatogenesis. (2) Analyses of Prx4-deficient B cells indicated a significant role of Prx4 in oxidative folding of IgM. (3) Prx4 was found to suppress the cell growth stimulated by granulocyte-colony stimulating factor. (4) Mice that lack Ero1 and Prx4 became scurvy due to vitamin C deficiency. Thus we are gradually unveiling intra- and extra-cellular functions of Prx4.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 基礎医学 医化学一般

 キーワード： (1) 小胞体ストレス (2) レドックス調節 (3) 活性酸素シグナル
 (4) アポトーシス (5) シャペロン

1. 研究開始当初の背景

ペルオキシレドキシシン(Prx)はチオレドキシシン依存性に過酸化水素を還元無毒化する抗酸化酵素として見いだされ、哺乳類では6種類の遺伝子(Prx1~Prx6)によってコードされている。同様に過酸化水素の消去活性を

有し、古くから知られるグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)と比較すると、Prxのペルオキシダーゼ活性は10分の1以下と低いため、発見後しばらくの間はその生理的重要性に疑問がもたれてきた。活性酸素シグナルの制御といったPrxの新たな機能が見いだされて

からのこの十数年間に機能解明が著しく進んだ。

しかしながら同ファミリーの他の分子には無い分泌型といった性質を有する Prx4 については、細胞外や小胞体内は細胞質に比べてもともと酸化的な環境で活性酸素を消去する意義が明確でないこともあり、研究が遅れていた。申請者らは、世界に先駆けて *Prx4* 欠損マウスの作成に成功し、特に精巣の萎縮といった表現型を示す事を報告した (Iuchiら, *Biochem J*, 2009)。Prx4 の一部は分泌されるが、細胞によってはほとんどの分子は小胞体/ゴルジ体に局在する。その機能については明確な結果は示されていなかった。

2. 研究の目的

Prx は過酸化水素を消去する事で受容体刺激時に生じる活性酸素シグナルを抑制的に調節しているが、ファミリーの中で唯一分泌シグナルを有する Prx4 の機能はほとんど知られていなかった。本研究では、*Prx4* 欠損マウスと、それより樹立した B 細胞と線維芽細胞を用いて、小胞体における Prx4 の役割を解明する。

3. 研究の方法

精巣には高分子型 Prx4 が存在することから、データベース検索と生化学的解析により、精巣型 Prx4 の同定と機能解明を行う。

Prx4 欠損マウスより単離した B 細胞と胎児線維芽細胞を用いて細胞生物学的検討を行うことで、細胞増殖や分化過程における Prx4 の役割を明らかにする。

Prx4 欠損マウスと *Ero1* 欠損マウスを交配することで多重欠損マウスを作製し、小胞体内で新規合成蛋白質の酸化的折り畳みに関わる両分子の欠損による影響を検討する。

4. 研究成果 (図参照)

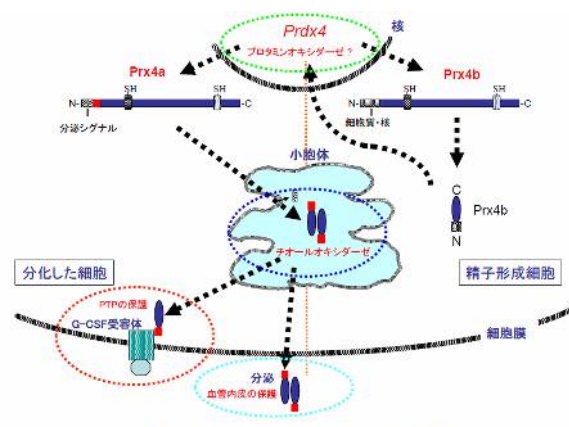
(1) Prx4 は分泌型としてほぼ全身に存在するが、精巣では高分子型を示す。これは精巣では分泌シグナルをコードする第 1 エキソン (1a) に代わって、上流のエキソン (1b) から転写されて *Prx4b* が発現することによることを明らかにした。この精巣型 Prx4 は性成熟に伴って発現し、*Prx4* 欠損マウスでは精子形成の遅れを認めることから、精巣型 Prx4 は精子形成において何らかの役割を果たすことが示唆された。分泌シグナル配列を有する従来の転写産物 *Prx4a* と、シグナル配列の代わりに親水性 N 末ドメインをコードする *Prx4b* の産物は機能的に異なると思われるため、遺伝子導入した細胞を用いた解明を進めている。

(2) *Prx4* 欠損マウスから B 細胞を単離し、分化誘導した際に Prx4 がどのような役割を果たすか検討した。その結果、B 細胞が形質細

胞に分化する過程で、小胞体における IgM の酸化的 folding に Prx4a が重要なことを見出した。

(3) 顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の作用とその受容体の解析を研究対象としている Touw のグループとの共同研究により、Prx4 が G-CSF の増殖シグナルを抑制的に制御していることを明らかにした。*Prx4a* 欠損マウスとそれから樹立した線維芽細胞を用いて解析を行い、Prx4a に特異的な N 末ドメインで G-CSF 受容体の細胞内ドメインに結合し、そのシグナルを抑制的に制御することで、顆粒球の増殖・分化にかかわっていることを明らかにした。

(4) Prx4a は、*Ero1* と連携して小胞体内で新規合成蛋白質の酸化的折り畳みに関わることが知られている。*Ero1* 遺伝子欠損マウスを有する Ronらとの共同研究で *Prdx4* との多重欠損マウスを作製して表現型を解析した。その結果両遺伝子を欠くマウスではアスコルビン酸 (ビタミン C) の欠乏が起こり、コラーゲンの成熟・分泌異常による壊血病となることが分かった。*Ero1* は酸素分子の酸化力により新規合成蛋白質にジスルフィド結合を導入するがその際に過酸化水素を生成する。一方 Prx4 は過酸化水素の酸化力により新規合成蛋白質にジスルフィド結合を導入し過酸化水素を水に還元するため同時に抗酸化作用を発揮する。したがって Prx4 の欠損により小胞体に過酸化水素が蓄積し、それが酸化ストレスをもたらす。*Ero1* の欠損によりシステイン (Cys) の SH 基に酸化的架橋が起こらずそのままの状態が存在することになり、そこに酸化ストレスが負荷されると Cys-SH はスルフェン (Cys-SOH) に酸化される。Cys-SOH はアスコルビン酸により還元されて元の Cys-SH に戻るが、Prx4 と *Ero1* がともに欠損すると極めて大量のアスコルビン酸が消費される。その結果、プロコラーゲンの成熟に必要なアスコルビン酸が枯渇してコラーゲンの形成障害を特徴とする壊血病となると考えられる。



図、明らかになりつつある Prx4 の多様な機能

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 22 件)

1. Ester Zito, Henning Gram Hansen, Giles S. H. Yeo, Junichi Fujii, and David Ron.
Endoplasmic reticulum thiol oxidase deficiency leads to ascorbic acid depletion and noncanonical scurvy in mice.
Mol Cell, 48:39-51(2012) (DOI: 10.1016/j.molcel.2012.08.010.) (査読有)
2. Toshihiro Kurahashi, Tasuku Konno, Noriyuki Otsuki, Myoungsu Kwon, Satoshi Tsunoda, Junitsu Ito, and Junichi Fujii.
A malfunction in the triglyceride transfer from the intracellular lipid pool to the apoB in the enterocytes of SOD1-deficient mice.
FEBS Lett, 586:4289-4295 (2012) (DOI: 10.1016/j.febslet.2012.09.047.) (査読有)
3. Satoshi Tsunoda, Natsuko Kawano, Kenji Miyado, Naoko Kimura, and Junichi Fujii.
Impaired fertilizing ability of Sod1-deficient mouse sperm during in-vitro fertilization.
Biol Reprod, 87:1-6 (2012) (DOI: 10.1095/biolreprod.112.102129.) (査読有)
4. Sun Hee Yim, Yoo-Jin Kim, Sue Young Oh, Junichi Fujii, Yan Zhang, Vadim N. Gladyshev, and Sue Goo Rhee.
Identification and characterization of an alternatively transcribed form of peroxiredoxin IV that is specifically expressed in spermatids of the postpubertal mouse testis
J Biol Chem, 286:39002-39012(2011) (DOI: 10.1074/jbc.M111.257220.) (査読有)
5. Karishma Palande, Onno Roovers, Judith Gits, Carola Verwijmeren, Yoshihito Iuchi, Junichi Fujii, Benjamin G Neel, Robert Karisch, Jan Tavernier, and Ivo P Touw.
Peroxiredoxin-controlled G-CSF signalling at the endoplasmic reticulum-early endosome interface.
J Cell Sci, 124:3695-3705 (2011) (DOI: 10.1242/jcs.089656.) (査読有)
6. Milena Bertolotti, Sun Hee Yim, Jose M. Garcia-Manteiga, Silvia Masciarelli,

- Yoo-Jin Kim, Min-Hee Kang, Yoshihito Iuchi, Junichi Fujii, Roberta Vene, Anna Rubartelli, Sue Goo Rhee, Roberto Sitia. B to plasma cell terminal differentiation entails oxidative stress and profound reshaping of the antioxidant responses. Antioxid Redox Signal, 1133-1144 (2010) (DOI: 10.1089/ars.2009.3079.) (査読有)
7. Yoshihito Iuchi, Noriko Kibe, Satoshi Tsunoda, Saori Suzuki, Takeshi Mikami, Futoshi Okada, Koji Uchida, and Junichi Fujii.
Implication of oxidative stress as a cause of autoimmune hemolytic anemia in the NZB mice.
Free. Radic. Biol. Med. 48:935-944 (2010) (DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2010.01.012.) (査読有)
 8. Naoko Kimura, Satoshi Tsunoda, Yoshihito Iuchi, Hiroyuki Abe, Kiyoshi Totsukawa, and Junichi Fujii.
Intrinsic oxidativestress causes either two-cell arrest or cell death depending on developmental stage of the embryo from SOD1-deficient mice.
Mol. Hum. Reprod. 16:441-451 (2010) (DOI: 10.1093/molehr/gaq007.) (査読有)
 9. Natsuki Otaki, Miho Chikazawa, Ritsuko Nagae, Yuki Shimozu, Takahiro Shibata, Sohei Ito, Yoshinari Takasaki, Junichi Fujii, and Koji Uchida.
Identification of a lipid peroxidation product as the source of oxidation-specific epitopes recognized by anti-DNA autoantibodies.
J Biol Chem. 285:33834-33842 (2010) (DOI: 10.1074/jbc.M110.165175.) (査読有)

[学会発表] (計 43 件)

- ① Junichi Fujii (invited speaker) Roles of Peroxiredoxin 4 in ROS Signaling, Oxidative Protein Folding in ER, and Spermatogenesis. UK-Japan Research Symposium: Molecular Mechanisms of Stress Response in Disease, 6-7 Apr, 2012, Tsukuba University, Ibaraki.
- ② Junichi Fujii (poster), Yoshihito Iuchi, Xuhong Zhang, Satoshi Tsunoda, and Yoshitaka Ikeda.
Peroxiredoxin 4 is a multifunctional redox protein working in endoplasmic reticulum and cytoplasm.
International Symposium on Free Radical Research: Contribution to

Medicine (FRCM2011), Jan 20-22, 2011, Iburikawa, Kyoto.

- ③ 藤井順逸 (シンポジスト) .
赤血球を酸化ストレスによるレドックスバランスの破綻から護る抗酸化機構
第 64 回日本酸化ストレス学会、2011 年 7 月ルスツ、北海道.
- ④ 藤井順逸 (ワークショップ) .
Prx4 の抗酸化活性による活性酸素シグナルの制御.
第 33 回日本分子生物学会第 83 回日本生化学合同年会. 2010 年 12 月、神戸国際会議場、兵庫.

[図書] (計 3 件)

- ① Junichi Fujii, Satoshi Tsunoda, and Naoko Kimura.
Antithetical Roles of Reactive Oxygen Species in Mammalian Reproduction r In Handbook of System Biology of Free Radicals and Anti-oxidants. (I. Larher ed), Springer-Verlag, Germany, in press, 2013.
- ② Junichi Fuji, Yoshihito Iuchi.
Requirement of Multiple Antioxidative/Redox Systems to Support Male Fertility.
In "Male and Female Infertility: Genetic Causes, Hormonal Treatments and Health Effects. " (Bjorn Glantz and Klas Edquist eds), Nova Science Publishers, Inc, p33-54, 2010.

[その他]

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/BiochemI/b2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 順逸 (JUNICHI FUJII)
山形大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00222258

(2) 研究分担者

井内 良仁 (YOSHIHITO IUCHI)
山口大学農学部・准教授
研究者番号：60272069