

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870075

研究課題名(和文)新規レドックス因子Prx4による蛋白質の酸化的折畳みとその生理的役割の解明

研究課題名(英文)Studies on the physiological role of Prx4 in oxidative protein folding

研究代表者

倉橋 敏裕 (Kurahashi, Toshihiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00596570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Prx4の生理的役割を解明するために、培養細胞およびPrx4欠損マウスを用いた解析を行い次の結果を得た。(1) Prx4と相互作用する蛋白質を同定した。(2) Prx4が血小板の膜上に局在することを確認した。(3) Prx4とSOD1の二重欠損マウスを作製した。その二重欠損マウスでは若齢期から著しい肝障害を認めた。(4) Prx4tと相互作用する蛋白質を同定した。Prx4tを培養細胞で過剰発現させると主に細胞質に局在し、抗酸化機能の亢進が認められた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the physiological roles of Prx4, we have analyzed the cultured cells overexpressed Prx4 and Prx4-knockout mice, and obtained following results. (1) We have identified some proteins which might interact with Prx4 or Prx4t. (2) Prx4 might localize to platelet membrane, which suggests Prx4 might be involved in redox remodeling of membrane proteins. (3) We have established Prx4;SOD1 double knockout mice to elucidate roles of Prx4 under oxidative stress in vivo. The double knockout mice had serious hepatic disorder from infant, suggesting pivotal roles of Prx4 in protection against oxidative injury. (4) Overexpressed Prx4t localized in cytoplasm mainly and expressed antioxidant activity in cultured cells.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：ペルオキシレドキシン Prx4 小胞体 蛋白質の酸化的折畳み 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

レドックス (酸化還元) 因子である Peroxiredoxin (Prx) ファミリー蛋白質は過酸化水素を除去する抗酸化酵素の1つであるが、抗酸化機能に加えて、細胞内シグナルとして機能する過酸化水素の量を調節することにより細胞内シグナル伝達の制御にも関わる。哺乳類では Prx1 から Prx6 までの6つのファミリーメンバーが存在するが、申請者が所属する研究室ではこれまでに Prx4 に着目して研究を行ってきた。その結果、Prx4 は Prx ファミリー内で唯一小胞体に局在することや、その一部は細胞外に分泌されることなどを明らかにした (Fujii and Ikeda, Redox Report, review, 2002)。また、Prx4 欠損マウスを作製・解析し、精巣の萎縮といった表現型を示すことを報告した (Iuchi, Fujii et al, Biochem J, 2009)。近年、Prx4 は顆粒球増殖因子受容体のシグナルを調節することが示されたが、小胞体における Prx4 の機能については不明であった。

分泌蛋白質の多くは小胞体で適正な酸化的折り畳みを受けることにより細胞外で機能することが可能となる。小胞体における蛋白質ジスルフィド結合の形成では ER oxidoreductin-1 (Ero1) による Protein disulfide isomerase (PDI) の酸化が重要である。そのため、酵母では Ero1 が生存に必須であるが、マウスでは Ero1 を欠損させても正常に発生・生育することから、他の PDI 酸化酵素の存在が示唆されていた。実際に Ron らは Prx4 が小胞体において蛋白質の酸化的折り畳みに重要な役割を果たしていることを明らかにした (図1) (Zito et al & Ron, Mol. Cell, 2010)。その後、Ron と当研究室との共同研究により、Ero1; Prx4 多重欠損マウスがビタミンCの枯渇により壊血病様の表現型を示すことを明らかにし (Zito, Fujii et al & Ron, Mol. Cell, 2012) 解析が進んだ。しかしながら、その制御機構の詳細や個体レベルでの Prx4 の生理的役割に関してはほとんどわかっていない。

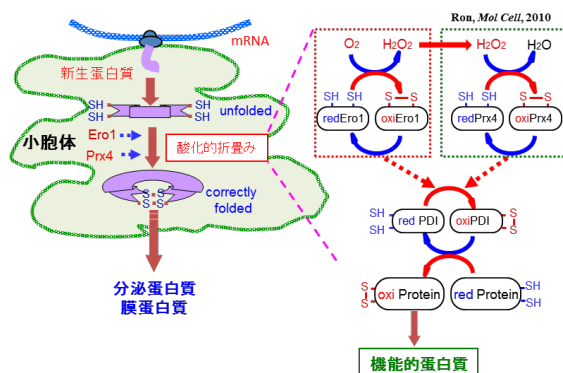


図1 小胞体における合成過程蛋白質の酸化的折り畳みのレドックス調節

2. 研究の目的

Prx4 が小胞体においてタンパク質の酸化的折り畳みに関与することが示され、かつ細胞外へ分泌もされることがこれまでに示されている。しかしながら、それらの詳細な制御機構や生体における生理的役割はほとんどわかっていない。そこで、本研究では培養細胞および Prx4 欠損マウスを用いた解析を行い、Prx4 の分子レベル・個体レベルでの生理的役割解明を目的とした。

3. 研究の方法

・培養細胞を用いた解析

Prx4 と協調して蛋白質の酸化的折り畳みに関わる因子を同定する目的で、Halo-tag を付加した Prx4 を HEK293T 細胞に発現させ、pull-downにより Prx4 に相互作用する因子の検索を行った。

また、Prx4 には転写開始点異なる2種の転写バリエーションが存在する。これまでに解析している全身性で発現しているフォームとは別に、精巣特異的に発現しているフォーム (Prx4t) についても相互作用している因子の検索を行った。さらに、Prx4t に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を付加した発現プラスミドを作製し、培養細胞内での細胞内局在および抗酸化機能を調べた。

・マウス個体を用いた解析

これまでの解析から、通常飼育下において Prx4 欠損マウスは精巣以外に著しい異常を認めない。そこで、蛋白質の酸化的折り畳みは酸化ストレスに脆弱であるとの考えから、全身性で酸化ストレスが亢進している SOD1 欠損マウスを Prx4 欠損マウスと交配し、Prx4; SOD1 二重欠損マウスを作製した。この二重欠損マウスを解析することにより、通常条件下では検出できない Prx4 の生理的機能の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) Prx4 に相互作用する因子の検索

Prx4 を bait にした Pull-down により得られた蛋白質複合体を、質量分析計を用いて解析した。その結果、Prx4 と相互作用することが示唆される複数の蛋白質を同定することができた。それらには PDI ファミリーメンバーが含まれていた。また、それら因子のいくつかの関するは質量分析のデータをイムノプロット解析により確認することができた。

(2) 血小板における Prx4 の発現

PDI ファミリーメンバーの幾つかの因子に関しては、細胞膜蛋白質のジスルフィド結合の架け替えによる構造変化 (レドックスリモ

デリング)に関わっていることが知られている。そこで、同様に Prx4 が細胞膜上でのレドックスリモデリングに関わるかどうかを確かめる目的で、上記、相互作用因子の検索結果をもとに血小板に着目した。予備の実験として、核や一般的な小胞体をもたない血小板に Prx4 が局在しているか否かをイムノブロットおよび免疫染色法により調べた。その結果、野生型マウス由来の血小板では Prx4 の局在が確認できた。一方で、そのシグナルは *Prx4* 欠損マウス由来の血小板では消失していることを確認した。さらに、Prx4 が血小板膜上に局在するか否かを確認する目的で、EZ link sulfo LC-NHS biotin を用いて血小板膜上蛋白質を回収し、Prx4 特異的抗体を用いたイムノブロットにより解析した。その結果、Prx4 が血小板膜上に局在することが確認できた。

(3) *Prx4*; *SOD1* 二重欠損マウスの解析

新規に作製した *Prx4*; *SOD1* 二重欠損マウスに関して、Prx4 の発現が高く、かつ多くの分泌蛋白質を産生している肝臓を中心に解析した。その結果、*Prx4*; *SOD1* 二重欠損マウスでは若齢から肝障害が顕著であり、肝障害マーカーの上昇や小胞体ストレスマーカーの増加が認められた。また、HE 染色や免疫染色等による組織評価においても著しい障害を認め、電子顕微鏡観察によりミトコンドリアの異常を認めた。これらの結果から、Prx4 は肝細胞において酸化傷害からの保護作用を有していることが示唆された。

(4) Prx4t の解析

Prx4t を bait にした Pull-down により得られた蛋白質複合体を、質量分析計を用いて解析した。その結果、Prx4t と相互作用することが示唆される複数の蛋白質を同定した。GFP を付加して哺乳類培養細胞で発現させた Prx4t は、以前に報告された精巣における細胞内局在の結果と一致して、主に細胞質に局在した。また、Prx4t を過剰発現させた細胞において抗酸化機能の亢進がみられたことから、Prx4t も全身性で発現しているフォームと同様に抗酸化機能を有することが示唆された。

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 17 件)

- 1) Tasaki E, Matsumoto S, Tada H, Kurahashi T, Zhang X, Fujii J, Utsumi T, Iuchi Y. Protective role of

testis-specific peroxiredoxin 4 against cellular oxidative stress. *J. Clin. Biochem.Nutr.* 60(3):156-161. doi:10.3164/jcbrn.16-96. (2017) 査読有

- 2) Ito J, Ishii N, Akihara R, Lee J, Kurahashi T, Homma T, Kawasaki R, Fujii J. A high fat diet temporarily renders Sod1-deficient mice resistant to an oxidative insult. *J Nutr Biochem*, 40:44-52. doi:10.1016/j.jnutbio.2016.10.018. (2017) 査読有
- 3) Shirato T, Homma T, Lee J, Kurahashi T, Fujii J. Oxidative stress caused by a SOD1 deficiency ameliorates thioacetamide-triggered cell death via CYP2E1 inhibition but stimulates liver steatosis. *Arch Toxicol.* 91(3):1319-1333. doi:10.1007/s00204-016-1785-9. (2017) 査読有
- 4) Kurahashi T, Lee J, Nabeshima A, Homma T, Kang ES, Saito Y, Yamada S, Nakayama T, Yamada K, Miyata S, Fujii J. Ascorbic acid prevents acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice by ameliorating glutathione recovery and autophagy. *Arch Biochem Biophys.* 15;604:36-46. doi:10.1016/j.abb.2016.06.004. (2016) 査読有
- 5) Otsuki N, Homma T, Fujiwara H, Kaneko K, Hozumi Y, Shichiri M, Takashima M, Ito J, Konno T, Kurahashi T, Yoshida Y, Goto K, Fujii S, Fujii J. Trichloroethylene exposure aggravates behavioral abnormalities in mice that are deficient in superoxide dismutase. *Regul Toxicol Pharmacol.* 79:83-90. doi:10.1016/j.yrtph.2016.05.007. (2016) 査読有
- 6) Nawata A, Noguchi H, Mazaki Y, Kurahashi T, Izumi H, Wang KY, Guo X, Uramoto H, Kohno K, Taniguchi H, Tanaka Y, Fujii J, Sasaguri Y, Tanimoto A, Nakayama T, Yamada S. Overexpression of Peroxiredoxin 4 Affects Intestinal Function in a Dietary Mouse Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease.

PLoS One. 11(4):e0152549.
doi:10.1371/journal.pone.0152549.
(2016) 査読有

- 7) Kurahashi T, Hamashima S, Shirato T, Lee J, Homma T, Kang ES, Fujii J. An SOD1 deficiency enhances lipid droplet accumulation in the fasted mouse liver by aborting lipophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. 467(4):866-71.
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.052.
(2015) 査読有
- 8) Homma T, Kurahashi T, Lee J, Kang ES, and Fujii J. SOD1 deficiency decreases proteasomal function, leading to the accumulation of ubiquitinated proteins in erythrocytes. *Arch Biochem Biophys*. 583:65-72.
doi:10.1016/j.abb.2015.07.023.
(2015) 査読有
- 9) Lee J, Homma T, Kurahashi T, Kang ES, Fujii J. Oxidative stress triggers lipid droplet accumulation in primary cultured hepatocytes by activating fatty acid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 464(1):229-35.
doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.121.
(2015) 査読有
- 10) Homma T, Okano S, Lee J, Ito J, Otsuki N, Kurahashi T, Kang ES, Nakajima O, Fujii J. SOD1 deficiency induces the systemic hyperoxidation of peroxiredoxin in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun*, 463(4):1040-6.
doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.055.
(2015) 査読有
- 11) Tsunoda S, Kibe N, Kurahashi T, and Fujii J. Differential responses of SOD1-deficient mouse embryonic fibroblasts to oxygen concentrations. *Arch. Biochem. Biophys*. 537(1):5-11.
doi:10.1016/j.abb.2013.06.008.
(2013) 査読有

〔学会発表〕(計 12 件)

- 1) 倉橋敏裕ら、臓器線維化における細胞外基質蛋白質の酸化的折畳みに働く小胞体チオールオキシダーゼとアスコルビン酸に関する研究、第 66 回日本酸化ストレス学会、京都市(同志社大学) 2014

年 9 月 4 日.

- 2) 倉橋敏裕ら、臓器の線維化における細胞外基質タンパク質の酸化的折畳み機構に関する研究、第 80 回日本生化学会東北支部例会・シンポジウム、秋田市(アキタパークホテル) 2014 年 5 月 10 日.
- 3) Kurahashi T et al, The potential roles of PRDX4 as a thiol oxidase in endoplasmic reticulum. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International, Kyoto (Kyoto International Conference Center), JAPAN, Mar 24, 2014.
- 4) 倉橋敏裕ら、SOD1 欠損による酸化的ストレスは Prdx4 欠損マウスに肝障害を惹起する、第 36 回日本分子生物学会、神戸市(神戸ポートアイランド) 2013 年 12 月 4 日.
- 5) Kurahashi T et al, Pleiotropic roles of Peroxiredoxin 4 in Antioxidation, Signal Regulation and Oxidative Protein Folding. 6th Joint Meeting of the SFRR Australasia and Japan, Sydney (Mercure Sydney Hotel), Australia, Sep 14, 2013.
- 6) 倉橋敏裕ら、アスコルビン酸合成とカルボニル化合物還元の二面性を有する AKR1A の機能解明、第 66 回日本酸化ストレス学会、名古屋市(ウインク愛知) 2013 年 6 月 14 日.
- 7) 倉橋敏裕ら、Peroxiredoxin 4 欠損マウスの肝臓は酸化的障害に対して脆弱である、第 79 回日本生化学会東北支部例会、仙台市(東北大学) 2013 年 5 月 11 日.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/Biochem1/b2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉橋 敏裕 (KURAHASHI, Toshihiro)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号: 00596570

(4) 研究協力者

藤井 順逸 (FUJII, Junichi)
山形大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 00222258

高尾 敏文 (TAKAO, Toshifumi)
大阪大学・蛋白質研究所・教授
研究者番号: 10197048