

Title	Peroxiredoxin IV Is a Secretable Protein with Heparin-Binding Properties under Reduced Conditions
Author(s)	松本, 紋子
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41786">https://hdl.handle.net/11094/41786</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	まつもとあやこ 松本 紋子
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 15246 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Peroxiredoxin IV Is a Secretable Protein with Heparin-Binding Properties under Reduced Conditions (ペルオキシレドキシシンIVは還元状態でヘパリン結合能を有する分泌タンパク質である)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之  (副査) 教授 中村 敏一 教授 米田 悦啓

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

Peroxiredoxin (PRx) は、バクテリアから哺乳動物にまで広く分布し thioredoxin 依存性の peroxidase 活性を有する23~27kDのタンパクである。現在5種類のPRxファミリーが報告されておりI、II、Vは細胞質に存在し、IIIはミトコンドリアに存在すると報告されている。PRx IVは細胞質に存在し thioredoxin 依存性の peroxidase 活性を持つタンパク質という報告と、分泌されサイトカイン様な働きをし、NF- $\kappa$ B や nitric oxide synthase を誘導するという二つの相反する報告がなされているがその詳細は不明である。ラットより4種類のPRx cDNA をクローニングし、そのうちPRx IVの性質について検討した。

#### 【方法ならびに成績】

PRx ファミリーで保存されている2か所のCys近傍の配列をもとに、degenerative RT-PCR法を行い4種類のPRx産物を得た。これをプローブとし、ラット腎臓cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。PRx I~PRx IIIについては全長が得られたが、PRx IVクローンは5'領域を欠いていたので、5' RACEにより増幅し、全長cDNAとした。大腸菌にマルトース結合タンパクとの融合タンパクとして発現させ、精製タンパクを家兎に免疫してポリクローナル抗体を得た。バキュロウイルスベクターに組み込んで昆虫細胞で発現させ、精製タンパクを用いて諸性質を検討した。

ラットPRx IV cDNAは全長774bpからなり、31kDのタンパクをコードしていた。N末端には分泌タンパクに特徴的なシグナルペプチドを有し、31kDの前駆体として合成された後、27kDの成熟タンパクとして分泌されることが示唆された。バキュロウイルスを用いて昆虫細胞に発現させたタンパクのN末端分析から、シグナルペプチドはAla<sup>6</sup>とLeu<sup>37</sup>の間で切断されることがわかった。PRx IVをトランスフェクトしたCOS-1細胞を用いてパルスチェイス法にて解析したところ、PRx IVは細胞内で合成され分泌されることが明らかとされた。

ラットの組織におけるPRx IVの分布をNorthern blottingとWestern blottingにて解析したところ、膵臓、肝臓、精巣に高発現していた。ラット血漿を硫酸アンモニウムによる塩析にて粗精製したのち免疫沈降したところ、PRx IVの存在が確認できた。

還元型のPRx IVはヘパリンカラムに結合し、酸化型では結合力を失い、このレドックス感受性の結合は可逆的であることが示唆された。還元型PRx IVは、ヒト臍帯静脈内皮細胞の細胞表面に結合し、細胞をヘパリチナーゼ処理

することによって結合が阻害されることが Western blotting にて明らかとされた。また還元型 PRx IV がヒト臍帯静脈内皮細胞表面に結合することは、免疫染色法にて細胞表面に局在する CD54 と二重染色することによっても明らかにされた。ヒト臍帯静脈内皮細胞をサポニン処理し細胞内を免疫染色し、ER に局在する calreticulin と二重染色すると、PRx IV は分泌タンパク特有の細胞内局在を示した。表面プラズモン共鳴法によりヘパリン、ヘパラン硫酸と PRx IV の結合を BIAcore2000 で測定し解離定数 KD を計算した結果、それぞれ 19nM と 870nM となった。

PRx IV は thioredoxin 依存性の peroxidase 活性に加えて glutathione 依存性の peroxidase 活性も示した。PRx IV をヒト臍帯静脈内皮細胞の培地に添加すると、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理による細胞死を部分的に抑制した。

#### 【総括】

PRx IV は細胞内に存在する他の PRx ファミリーと異なり、前駆体として合成された後切断され、分泌型として機能する。血漿中に存在しレドックス感受性にヘパリンに結合することより、酸化的ストレス下において生じる peroxide から血管内皮を保護する作用があると考えられる。また血管内皮に結合することによって内皮表面の濃度を部分的に高め、より効果的な保護作用を発揮することができると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

ペルオキシレドキシシン (PRx) は、バクテリアから哺乳動物にまで広く分布しチオレドキシシン依存性のペルオキシダーゼ活性を有する 23~27kDa のタンパクである。現在 5 種類の PRx ファミリーが報告されており、I、II、V は細胞質に存在し、III はミトコンドリアに存在すると報告されている。

申請者はラットより 4 種類の PRx cDNA をクローニングし、そのうち PRx IV の性質について検討した結果、PRx IV は分泌タンパクに特徴的なシグナルペプチドを有し、31kDa の前駆体として合成された後、27kDa の成熟タンパクとして分泌されることを明かした。また免疫染色法により、PRx IV は細胞質ではなく ER に存在し、分泌タンパク特有の細胞内局在を示すことを明かした。さらに PRx IV はチオレドキシシン依存性のペルオキシダーゼ活性だけでなく、グルタチオン依存性のペルオキシダーゼ活性を持つことを見出した。

ラットの組織における PRx IV の分布を解析したところ、脾臓、肝臓、精巣に高発現し、血漿中の存在も確認した。還元型 PRx IV がヘパリン結合能を有し、ヒト臍帯静脈内皮細胞表面に結合することを見出した。このことにより PRx IV は酸化的ストレス下において生じる過酸化物質から血管内皮を保護する作用があり、血管内皮に結合することによって内皮表面の濃度を部分的に高め、より効果的な保護作用を発揮することができると考えられた。

ラット PRx IV を初めてクローニングし、分泌タンパク質であることを明らかにし、PRx IV が血漿中に存在しレドックス感受性に血管内皮細胞に結合することや、チオレドキシシンとグルタチオンの両方を電子供与体としペルオキシダーゼ活性を有することを解明したことは、本酵素の解析に寄与するもので、本研究は学位の授与に値すると考えられる。