

# 酸化ストレスにより生体膜に生成する 酸化型リン脂質の代謝機構の解明

北里大学 薬学部

中 川 靖 一

Phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) is the unique antioxidant which is able to reduce the phospholipid hydroperoxides produced in biomembrane. PHGPx is preferentially localized in mitochondria as compared with another type of glutathione peroxidase such as classical GPx (cGPx). The cDNA for PHGPx included two site for initiation of translation. One deduced product was 20 kDa PHGPx (non-mitochondrial type) and another was 23 kDa PHGPx (mitochondria type) which possessed a signal peptide for the targeting to mitochondria. Cells that overexpressed the 23 kDa PHGPx were more resistance than control cells to the oxidative damage of mitochondria caused by the treatment with KCN, while the protective effect for the mitochondria damage were not observed in the 20 kDa PHGPx-overexpressed cells. The 23 kDa PHGPx could prevent cell death due to the damage of mitochondria with oxidative stress and would be a key antioxidant enzyme to protect a damage of the skin which is exposed to oxidative damage.

## 1 緒 言

皮膚は生体の最外層にあり、さまざまな物質による化学的、物理的な障害の最前線にある。特に紫外線などによる最大の標的となるのは高度不飽和脂肪酸をもつリン脂質であり、過酸化反応の結果生ずる過酸化脂質は皮膚の炎症、老化を引き起こす原因物質として注目を集めている。過酸化脂質研究の歴史は古いが、生体膜中に生ずる脂質の過酸化物の除去に係わる防御機構を検討した報告は少ない。リン脂質が過酸化されることより生ずる一次生成物はリン脂質ヒドロペルオキシドであり、この生成を抑制することは生体膜の酸化的な障害の防御につながる。特に、細胞内の活性酸素の主要な産生場であるミトコンドリアでの過酸化脂質の蓄積は細胞の老化、さらには細胞の死に至ることから、ミトコンドリア内の防御因子の役割を明らかにすることは重要と考えられている<sup>1)</sup>。



The enzymatic regulation of production of oxidative phospholipids in biomembrane suffered with oxidative stress

Yasuhito Nakagawa

Faculty of pharmaceutical Sciences Kitasato University

リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) はリン脂質やコレステロールヒドロペルオキシドなど生体膜中に生ずる脂質ヒドロペルオキシドを消去できる細胞内の唯一の抗酸化酵素であり、広く組織、細胞に存在している<sup>2, 3)</sup>。我々は生体膜に生ずる酸化型リン脂質であるリン脂質ヒドロペルオキシドの代謝機構を考える上で、PHGPxはカギとなる酵素であると考え、本研究では細胞の老化と深く係わるミトコンドリアにおける本酵素の生理的な役割について検討を行った。

## 2 実 験

### 2.1 PHGPxの細胞内分布の測定

ヒト血管内皮系ガン細胞株 ECV304 細胞、ラット好塩基球系細胞 RBL2H3 細胞の PHGPx を放射性セレンで標識した後、オルガネラに分画した。遠心分離により、核、ミトコンドリア、ミクロソーム、細胞質に分画した。可溶化したミクロソーム、ミトコンドリア画分および細胞質画分を抗PHGPxモノクローナル抗体で免疫沈降を行い、得られた試料について SDS-PAGE を行った。ゲルを乾燥後、イメージングアナライザーにより放射活性のあるスポットを検出した。

## 2.2 in vitro 翻訳系によるリコンビナント PHGPx の作成

PHGPxcDNA を用いて、T7 RNA polymerase により調製した mRNA に [<sup>35</sup>S] メチオニン、ウサギ網状赤血球ライゼートを加え、リコンビナント蛋白質の作成を行った。

## 2.3 PHGPx のミトコンドリアへの輸送

### 2.3.1 in vitro でのミトコンドリアへの輸送

ラット肝臓ミトコンドリアにリコンビナント PHGPx を添加し、反応を開始させた。一定時間に 2,4-ジニトロフェノールを添加して反応を停止させた後、遠心し、ミトコンドリアと上清に分離した。ミトコンドリアは Proteinase K によりミトコンドリア表面に結合したリコンビナント PHGPx を消化した。遠心により得られたミトコンドリアを可溶化して SDS-PAGE を行った。泳動後、イメージアナライザーにより放射活性を測定し、定量した。

### 2.3.2 Green Fluorescent Protein (GFP)

#### 融合タンパク質の細胞内分布の測定

PHGPx の第 1 開始コドンから第 2 開始コドンを含むアミノ酸配列の 1 番から 32 番までをコードする遺伝子、および第 2 開始コドンからのアミノ酸 28 番から 70 番までをコードする遺伝子を GFP 遺伝子にライゲーションしたキメラ cDNA (L-GFP、S-GFP) を構築した。第 1 開始コドンを含まない S-GFP、第 1 開始コドンを含む L-GFP をエレクトロポレーションを用いて、RBL-2H3 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入した細胞をカバーガラスに細胞を付着させ、ホルムアルデヒドに 20 分間浸し、細胞を固定した。カバーガラスを洗浄後、GFP の蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。

## 2.4 ミトコンドリア型、細胞質型 PHGPx 高発現細胞株の樹立

第 1 開始コドンを含むミトコンドリア型 PHGPx をコードしている pRPHGPx4 と、第 2

開始コドンを含む細胞質型 PHGPx をコードしている pRPHGPx2 を哺乳動物の発現ベクターをベクターに組み込み、エレクトロポレーション法により RBL-2H3 細胞へ遺伝子導入した。またコントロール細胞として、PHGPx インサートを含まない発現ベクター SR- $\alpha$  と pSV2-neo を導入した細胞も同時に作成した。遺伝子導入した細胞をゲネチシンにより耐性株を選択し、高発現細胞のスクリーニングを行った。

## 3 結果

### 3.1 PHGPx の細胞内分布

ヒト血管内皮細胞株である ECV304 細胞について細胞を放射性セレンで 4 日間標識し、PHGPx の放射活性の細胞内分布について調べた。対象として、GPx として一般的によく知られている cytosolic GPx (cGPx) についても、同様に調べ、比較検討した。Fig. 1 に示すように ECV304

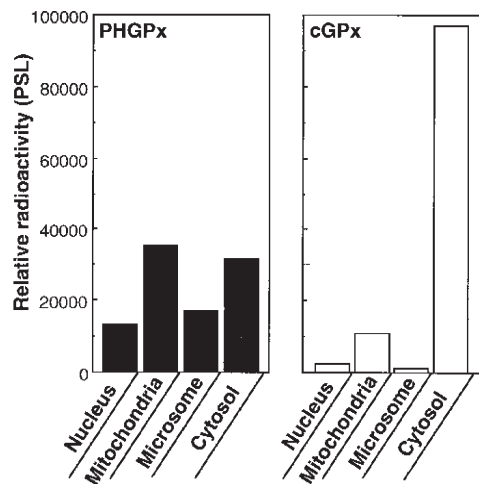


Fig. 1 Subcellular localizations of PHGPx and cGPx in the ECV304 cells.

ECV304 cells were metabolically labeled with <sup>75</sup>Se (0.14 mCi/mL) for 4 days. The <sup>75</sup>Se-labeled cells were fractionated by differential centrifugation into nuclear fraction, mitochondrial fraction, microsomal fraction and cytosolic fraction. Distribution of PHGPx and cGPx was determined by immunoprecipitation analysis with anti-PHGPx and anti-cGPx. Relative radioactivities of PHGPx and cGPx were calculated from scanning densitometry by a Bio-Imaging Analyzer.

細胞では、cGPx の総発現量の 86% が細胞質画分に存在していた。PHGPx は核画分に 13%、ミトコンドリア画分に 34%、ミクロソーム画分に 18%、細胞質画分に 33% の割合で存在しており、いずれのオルガネラにおいても発現が見られたが、ミトコンドリア画分と細胞質画分に多く分布していた。ラット好塩基球系細胞である RBL-2H3 細胞においても ECV304 細胞と同様に cGPx は主に細胞質に存在しており、PHGPx はミトコンドリア画分に多く存在していた。

ミトコンドリア画分および細胞質画分における PHGPx と cGPx の存在量比について見ると、細胞質画分では cGPx 量は PHGPx の約 3.5 倍であるのに対して、ミトコンドリア画分では cGPx は PHGPx の約 1/3 であり、ミトコンドリアにおいて PHGPx の存在比が高いことが明らかになった。このことは細胞質に存在する主な GPx のアイソザイムは cGPx であり、ミトコンドリアでは PHGPx であることを示している。

### 3.2 分子量の異なる 2 種の PHGPx の発現

ラット脳 cDNA ライブラリーより PHGPx の cDNA をクローニングを行った結果、PHGPx には翻訳開始点が 2 つ存在していた (Fig. 2)<sup>3)</sup>。それぞれの開始コドンを含む cDNA を鋳型として *in vitro* の蛋白質合成系を用いて、リコンビナント PHGPx の合成を行った。第 1 開始コド

ンを有する cDNA からは 197 アミノ酸からなる分子量約 23kDa の PHGPx (L-form) が、第 2 開始コドンからは 170 アミノ酸からなる分子量約 20kDa の PHGPx (S-form) が翻訳された<sup>4)</sup>。第 1 開始コドンと第 2 開始コドンの間のリーダー配列がオルガネラへの輸送シグナルとなっている蛋白質が存在することから、PHGPx のこのリーダー配列がミトコンドリアへの輸送シグナルであるか否かについて検討した。

### 3.3 PHGPx のミトコンドリアへの輸送機構

放射性メチオニンで標識されたリコンビナント PHGPx をミトコンドリアとともに反応させ、ミトコンドリア内へ輸送された PHGPx 量を SDS-PAGE で調べた (Fig. 3)。反応 30 分後においても、リーダー配列を持たない 20kDa の S-form の PHGPx は輸送されず、ミトコンドリア内に放射性 PHGPx は検出されなかった。一方、リーダー配列を持つ 23kDa の L-form と反応したミトコンドリア内では輸送された PHGPx が検出された。ミトコンドリア内に輸送された L-form の分子量は 20kDa に変化していることが明らかとなった。ミトコンドリア内に輸送された 20kDa PHGPx はリーダー配列を認識するポリクローナル抗体 (抗 P-1 抗体) で沈降されないことから、ミトコンドリア内に輸送された 23kDa L-form のリーダー配列はプロセッシングにより切断され、20kDa の

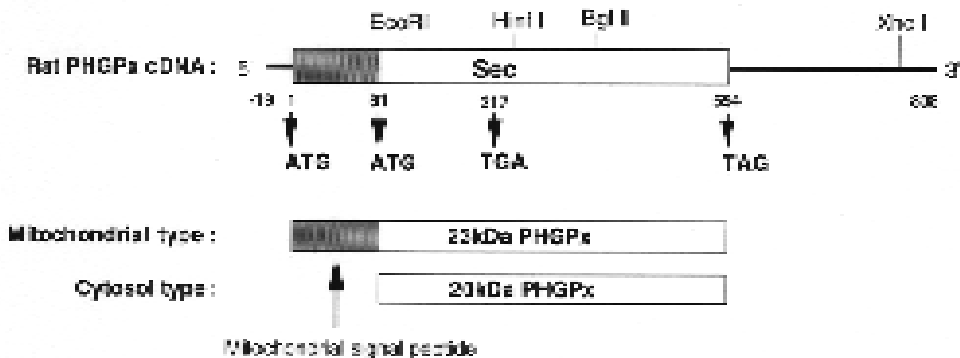


Fig. 2 The structure of cDNA for rat PHGPx.

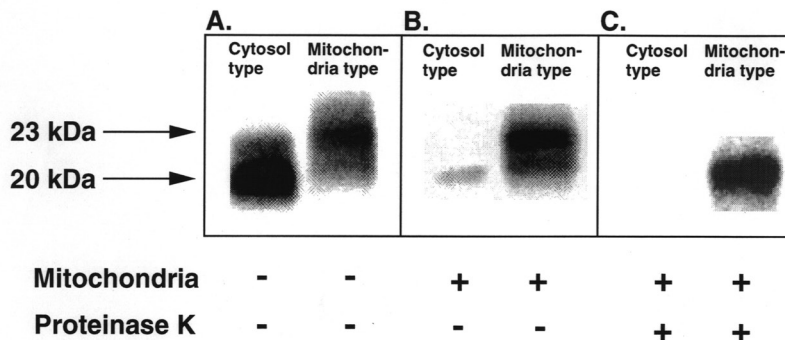


Fig. 3 Import of mitochondria type PHGPx into mitochondria

The cytosol type and the mitochondria type of [<sup>35</sup>S] PHGPx, synthesized in the in vitro translation system (A), was incubated with rat liver mitochondria at 25°C for 30 min (B). After import, the mitochondria were treated with proteinase K for 30 min at 0 °C (C). After the incubation, the mitochondria were further incubated with proteinase K, reisolated and analyzed by 12.5% SDS-PAGE, with subsequent autoradiography and quantitative analysis with the Bio-imaging analyzer.

PHGPxに変化したものと考えられた。これらの結果より、リーダー配列を有する 23kDa L-form の PHGPx がミトコンドリア内へ輸送されることが明かとなった。

L-form のリーダー配列が細胞内でミトコンドリアへの標的化シグナル（ターゲティングシグナル）として機能するのかについて細胞レベルで明らかにするため、シグナルペプチド-GFP の融合タンパク質を細胞内に発現させることにより検討した。リーダー配列を含む 32 アミノ酸をコードする配列をクラゲ蛍光蛋白質である GFP の N 末側に融合させた L-GFP、第 2 開始コドン以降の 42 アミノ酸をコードする配列を同様に融合させた S-GFP の 2 種類の発現ベクターを RBL-2H3 細胞に導入し、発現した GFP 融合タンパク質の細胞内分布を蛍光顕微鏡で調べた。その結果、S-GFP を発現させた細胞は細胞全体に蛍光が見られ、S-GFP は主に細胞質に分布していることが示された。L-GFP は S-GFP の細胞内分布とは明かに異なり、蛍光の分布はミトコンドリア特異的蛍光色素であるローダミン 123 (Rh123) の蛍光パターンと良く一致した。このことはリーダー配列を融合させた GFP タンパク質 (L-GFP) は

ミトコンドリアへ選択的に輸送されることを示している。以上のことから、第 1 開始コドンから翻訳される 23kDa PHGPx がミトコンドリアに輸送されるミトコンドリア型 PHGPx であり、第 2 開始コドンから翻訳されている 20kDaPHGPx がミトコンドリア以外に存在する細胞質型 PHGPx であることが明かになった。

### 3.4 ミトコンドリアの選択的な酸化的障害に対する PHGPx の役割

PHGPx のミトコンドリアにおける役割を明らかにするために、ミトコンドリア型 PHGPx を高発現した M15 細胞、細胞質型 PHGPx を高発現した L 9 細胞を作成し、ミトコンドリアの酸化的障害に対する応答を調べた (Fig. 4)。電子伝達系複合体 IV の阻害剤であるシアン化カリウム (KCN) で各細胞を処理し、生存率を調べた。コントロール細胞株の S 1、細胞質型 PHGPx 高発現細胞株の L 9 細胞では KCN 処理後、2 時間後に強い細胞障害が見られ、処理後 4 時間での生存率は 35%であった。しかし、ミトコンドリア型 PHGPx を高発現した細胞株である M15 細胞では同時間の処理においても 69%の生存率を示し、

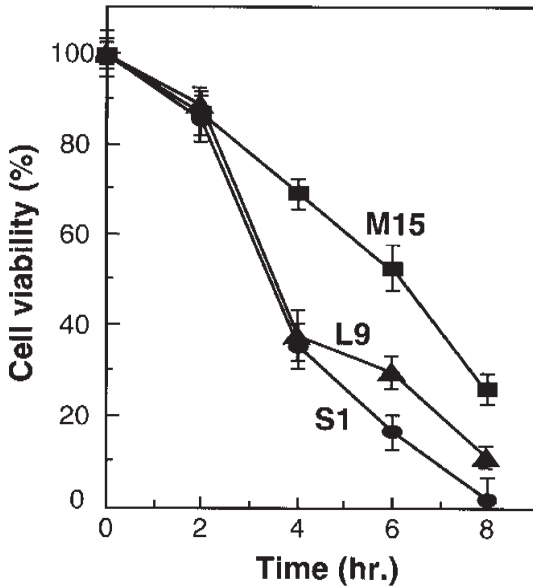


Fig. 4 Effects of KCN on the cell viability of the PHGPx overexpressed cells.

Mitochondrial type PHGPx overexpressed cells (closed squares, M15), cytosolic type PHGPx overexpressed cells (closed triangles, L9) and control cells transfected with the empty vector (closed circles, S1) were plated in  $0.5 \times 10^5$  cells/well in 5%FCS/DMEM. After 24h, these clones were exposed for the indicated time with 25mM KCN. After the treatment of KCN, cell viability was examined with the release of lactate dehydrogenase (LDH). Viability is expressed as a percentage, relative to the total LDH in the cells that were lysed with 0.2% Tween20. Data are expressed as the means of triplicate results.

処理後6時間においても56%の生存率を保っており、S1、L9細胞と比較して約2倍の耐性を獲得していた。これらの結果より、ミトコンドリアの酸化障害に対し、細胞質型PHGPxは関与することはないが、ミトコンドリア型PHGPxは防御因子として機能していることが明らかとなった。

#### 4 考察

活性酸素の主要な産生場であるミトコンドリアに存在する抗酸化酵素はミトコンドリアの酸化障害に起因する老化、アポトーシスの細胞死を抑制する上で極めて重要な役割を果

たしていると考えられている。絶えず酸化的ストレスの環境下にある表皮細胞のミトコンドリア機能を維持するために、PHGPxは主要な役割を果たしているものと推測される。ミトコンドリア抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)の発現はストレスに応じて変動することから、SODに連動して活性酸素を消去するPHGPxの発現も変動するものと考えられるが、PHGPxの発現制御に関しては細胞質型、ミトコンドリア型の転写調節を含めほとんど明らかにされていない。生体膜の酸化型リン脂質の産生調節機構を明らかにするためにはPHGPxの発現調節機構の解明はこれからの検討されるべき課題である。こうした問題を明らかにすることにより、ミトコンドリアの酸化的障害が介在するさまざまな疾病の発症、老化、アポトーシスの細胞死の機構の解明につながるものと期待される。

#### 引用文献

- 1) Quillet MA, Jaffrezou JP, Mansat V, et al. : Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 272, 21388-21395, 1997.
- 2) Roveri A, Maiorino M, Ursini F. : Enzymatic and immunological measurements of soluble and membrane-bound phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, *Method in Enzymology*, 233, 202-212, 1994.
- 3) Imai H, Sumi D, Hanamoto A, et al. : Molecular cloning and functional expression of a cDNA for rat phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase : 3'-untranslated region of the gene is necessary for functional expression, *J. Biochem.*, 118, 1061-1067, 1995.
- 4) Arai M, Imai H, Sumi D, et al. : Import into mitochondria of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase requires a leader sequence, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 227, 433-439, 1996.