

筑波大学

博士（医学）学位論文

Peroxiredoxin I plays a protective role against UVA irradiation through reduction of oxidative stress.

(ペルオキシレドキシン I は酸化ストレスを減少させることにより UVA 照射に対する防御的役割を果たす)

2 0 1 7

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

伊藤 孝明

内容表

抄録	3
略語	5
第 1 章 序論	7
第 2 章 材料と方法	15
2. 1. 細胞培養	15
2. 2. UVA 照射	15
2. 3. 細胞活性に対する MTT 分析	15
2. 4. フローサイトメトリーを用いたアポトーシス分析	16
2. 5. ROS 産生とミトコンドリア障害の検出	16
2. 6. ウェスタンブロット分析	17
2. 7. 定量的リアルタイム PCR 分析	17
2. 8. 統計分析	17
第 3 章 結果	18
3. 1. Prx I-欠損 MEF における UVA 感受性の増加	18
3. 2. Prx I-欠損 MEF における UVA 誘導アポトーシスは p53 により仲介される	18

3.3.	Prx I 欠損 MEF における ROS 蓄積の制御	19
3.4.	Prx I 欠損 MEF における UVA 照射による Nrf2 防御系の変化	19
3.5.	Prx I-欠損 MEF 中の UVA 照射による炎症反応の増加	20
第4章	考察	22
第5章	結論	25
謝辞		26
参考文献		27
図の説明		34
図		39

抄録

背景：皮膚に長波長の紫外線（UVA）を照射した際には DNA 障害のみならず細胞内の活性酸素（ROS）レベルが増加し、脂質やたんぱく質、核酸に障害を与え、アポトーシスが誘導される。ペルオキシレドキシニン I（Prx I）は酸化ストレスに防御的役割を果たす抗酸化タンパク質ファミリーの一つである。しかし Prx I の UVA 刺激に対する役割は不明である。

目的：我々はペルオキシレドキシニン I ノックアウトマウスから得られたマウス胚線維芽細胞（MEF）を用いて UVA 刺激による変化に対するペルオキシレドキシニン I の防御的役割について検討した。

方法：ペルオキシレドキシニン I 欠損（Prx I (-/-)）MEFs と野生型（Prx I (+/+)) の MEF に UVA を照射し、生じたアポトーシスをフローサイトメトリー、定量的リアルタイム PCR、ウェスタンブロットを用いて分析した。

結果：Prx I (-/-) MEF では Prx I (+/+)MEFs と比較してアポトーシスや ROS 産生の増加がみられ、UVA 処理に対する感受性の増加がみられた。また Prx I (-/-) MEF では Prx I (+/+)MEF と比較してアポトーシスの増加と同様に p53 の発現も著明に増加した。一方、Bcl-2, Bcl-xL, と Nrf2 の発現は Prx I (-/-) MEF においてすべて低下していた。

UVA により誘導された炎症反応は Prx I (-/-)MEF で上昇しており、IkB, TNF α , IL-6 の発現の増加もみられた。

この結果により Prx I は、p53, IkB, Nrf2 を含むシグナル伝達を修飾することによりこれらの経路に影響を与えることが示唆された。

結論：我々の実験結果により Prx I は ROS の集積を制御することで UVA によって引き起こされる酸化傷害に対して防御的な役割を果たしていることが示唆された。UVA によって誘導されるアポトーシスや炎症のシグナルは Prx I によって修飾されていると考えられた。

略語

ROS, reactive oxygen species

Prx, Peroxiredoxin

MEF, mouse embryo fibroblast

Bcl-2, B-cell lymphoma 2

Bcl-xL, B-cell lymphoma-extra large

Nrf2, NF-E2-related factor 2

I κ B, inhibitor of nuclear factor-kappa B

TNF α , tumor necrosis factor alpha

IL-6, Interleukin 6

UV, ultraviolet

PCR, polymerase chain reaction;

Cys, cysteine

GCLM, glutamate-cysteine ligase modifier subunit

cisplatin, cdiamedichloroplatinum(II)

MSP23, macrophage stress protein 23kDa

MTT, 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl) -2,5- diphenyltetrazolium bromide

Keap1, Kelch-like ECH-associated protein 1

HO-1, hemeoxygenase-1

DCFH-DA, 2' 7' - dichlorofluoresceindiacetate

RIPA buffer, Radioimmunoprecipitation assay buffer

PVDF, polyvinylidene difluoride

PI, propidium iodide

NF κ B, nuclear factor-kappa B

Bax, Bcl-2-associated X protein

PUMA, p53 up-regulated modulator of apoptosis

第1章. 序論

およそ 38 億年前、地球上で初めての生命が誕生したとき、大気中には酸素がなかったが、その後、20 億年以上前にシアノバクテリアのような光合成を行う生物が現れ、大気中に酸素が蓄積されていった。その後、酸素を利用することで大きなエネルギーを得ることができるため、生物は酸素を取り込むよう進化した[1]。しかし一方、酸素を使うために、活性酸素という大きな問題を背負うことになった。活性酸素は、好中球による殺菌や細胞内のシグナル伝達といった重要な生命現象に関与するとともに、一方では細胞や組織に損傷を与えることにより老化や発がんなど様々な疾患を引き起こすことが知られている[2]。

生物が地表近くに活動圏を広げていくにつれ活性酸素による細胞障害にさらされるのと同時に太陽光中の紫外線による細胞障害にもさらされる可能性が高まった。紫外線は既知のヒト発がん物質である[3]。その波長により、短波長 (UVC:190-280 nm)、中波長 (UVB:280-320 nm)、長波長 (UVA:320-400nm)に分類される。紫外線のうち、290nm 以下の光(UVB の一部と UVC)は、オゾン層や大気に吸収され地上には到達しない。しかし、UVA は、ほとんどのエネルギーが地表に到達している。また、波長により皮膚に対する透過性も異なり、そのうち UVA は透過力が大きく、ほとんどが表皮を通過し、真皮もしくは皮下組織にまで達する。このように、紫外線のうち我々が日常さらされている主なものは UVA であり、ヒトに対する生物学的影響が大きいと考えられる[3]。

人間における紫外線の影響や活性酸素の影響の研究は進んでいるが、まだ解明されていないこともたくさんある。現存する原始生命に最も近い「古細菌」についての研究において新しい活性酸素の制御メカニズムが発見された。活性酸素は正常な細胞代謝において産生されるだけでなく、過度の紫外線が当たるなどの外来刺激の要因によって、酸素は活性酸素へと変化する。細胞内における主

たる活性酸素の産生部位はミトコンドリア、小胞体、ペルオキシソーム及び細胞質である[4]。細胞内で活性酸素が増えすぎると、それはタンパク質や DNA などを傷つけてしまい、有害な物質となる。これを防ぐため、生物は「抗酸化タンパク質」を使って、体内の過剰な活性酸素を処理する抗酸化システムを発展させてきた。特に酸素消費量の高い組織を構成している細胞は活性酸素から身を守る消去酵素を持つことが必須で、食細胞、赤血球、血管内皮細胞、心筋、肝臓、腎臓、脳細胞は高い活性酸素消去能を有している[5]。

古細菌が持つ抗酸化タンパク質のペルオキシレドキシシン（以下 Prx）は活性酸素の一つである過酸化水素を無害な水分子に変える働きを持っている。Prx は哺乳動物では少なくとも 6 種類のアイソフォームとして存在することが分かっている。このような抗酸化酵素の存在が確認されるきっかけとなったのは、Stadtman らにより行われた glutamine synthetase に関する研究である。精製された酵母の glutamine synthetase は非常に失活しやすく、特にジチオトレイトール（dithiothreitol : DTT）と鉄イオンが共存すると、それによって発生する OH-ラジカル的作用によって酸化的に分解を受けることがわかった[6]。しかしこの酵素は酵母の粗抽出液中では非常に安定なので、酸化分解を防ぐ未知の抗酸化物質が存在するのではないかと考えられ、25kDa の protector protein が得られた。これがのちの Prx である[7]。1990 年代に入ると哺乳動物の脳組織などから遺伝子が次々にクローニングされ、6 種類のアイソフォームとして存在することが明らかとなった。この抗酸化タンパク質のファミリーである Prx は種々の活性酸素（ROS）を除去する可能性が報告されている。一般的に、カタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼは過酸化水素及び過酸化物を除去する酵素として知られているが、近年、チオレドキシシンファミリーの過酸化水素除去酵素が発見され、チオレドキシシンペルオキシダーゼと呼ばれている。近年このファ

ミリーに属すると考えられているこれらの分子が次々と発見され、ペルオキシレドキシシンファミリーと呼ばれている [8]。

抗酸化酵素の主要構成メンバーである Prx は、生体外及び生体内における様々な刺激により触媒として活性化したシステイン残基により容易に過酸化状態になりえる [9, 10]。最近の研究によるとペルオキシレドキシシンファミリーには I から VI までの 6 個のアイソフォームが存在し、これらは分子構造の違いから次の 3 つのグループに分けられる [11] (Fig. 1 A)。

① グループ 1 : Typical 2-Cys Prx;

基本的な活性単位は二量体であり、一方の鎖上のシステインと他方の鎖の C 末端付近のシステインとの間に触媒的にジスルフィド結合が形成される。

② グループ 2 : Atypical 2-Cys Prx;

触媒的ジスルフィド結合が分子内であり、そして還元システインが C 末端の「典型的な」位置にない。

③ グループ 3 : 1-Cys Prx;

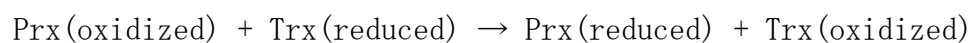
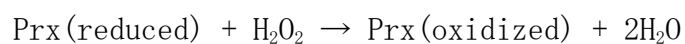
N 末端のみにシステイン残基をもち、このシステイン残基のみが活性の発現のために必要となる。

哺乳動物の Prx I から IV は Typical 2-Cys Prx に属し、それらのアミノ酸配列は N-末端と C-末端のシステイン残基の周りを中心に相同性が高い。Prx V は atypical 2-Cys Prx に属する。Prx I から IV のアミノ酸配列とは相同性が低い、N 末端のシステイン残基 (Cys 47) の周りは相同性が高い。Prx VI は 1-Cys Prx に属する。Prx の局在は以下の通りである [12] :

表 1. ペルオキシレドキシンの種類と局在

Prx	局 在	組織特異性
I	細胞質	肝臓、小腸、腎臓
II	細胞質	心臓、脳、脾臓
III	ミトコンドリア	心臓、筋肉、腎臓
IV	リソソーム/細胞外 (分泌型)	心臓、膵臓、肝臓、精巣
V	ペルオキシソーム/ミトコンドリア	
VI	細胞質/ミトコンドリア	

全ての Prx は同じ触媒機構を共有している。活性システイン（ペルオキシシステイン）は過酸化水素によりスルフェン酸に酸化される。Prx は過酸化水素を還元して水にする過酸化水素除去酵素である。過酸化水素を還元することにより、自身のシステイン残基は酸化されてその活性を失うが、チオレドキシンのによって再還元される触媒サイクルを形成している[12]。Prx は下記の反応により過酸化水素 (H₂O₂) の還元後にチオレドキシシン (Trx) を活用して再還元している (Fig.1 B):



過酸化水素は細胞内で種々のタンパク質のシステイン残基を酸化することによりそのタンパク質の機能を制御し（レドックス制御）、細胞内メッセンジャーとして働いている[13]。しかし一方で、ヒドロキシルラジカルなど毒性の強

い活性酸素を生成し、細胞に酸化障害を与えるという二面性を持っている。このため細胞内の過酸化水素濃度を制御することは細胞機能を維持するために非常に重要である。Prx は細胞質に非常に豊富にあり (特に Prx I 及び II)、過酸化水素に対する親和性が高い。Prx は細胞内の過酸化水素濃度を制御する重要な酵素の一つである [14]。

以下、各 Prx の特性について概略を説明する。

Prx I は脂肪食の経路に重要な役割を果たす。Prx I 欠損マクロファージは野生型と比較し細胞内に多くのコレステロールを蓄積し流出が少ない。Prx I は脂肪食の経路の調節と、酸化ストレスに対してマクロファージによるコレステロールの恒常性の維持に重要な役割を果たす [15]。また Prx I は血管内皮細胞の過剰な活性化と早期の動脈硬化を予防する [16]。Prx I 欠損マウス を用いた実験からは Prx I は赤血球における抗酸化防御をつかさどり、又、悪性腫瘍発生を抑制していることが示されている [17]。

Prx II は ROS/JNK 経路の阻害を通じて黄体退行の進行を防止するのに重要な役割を果たしている [18]。Prx II 欠損マウス を用いた実験より Prx II 欠損は、vascular adhesion molecule-1、intercellular adhesion molecule-1 および monocyte chemotactic protein-1 の発現が増加し、大動脈内膜への免疫細胞の接着および浸潤を増加したことが観察された。 よって Prx II 欠損症は、アテローム性動脈硬化症を発症する重篤な一因であることより、Prx II は血管および炎症細胞におけるアテローム発生反応を阻害する特異的ペルオキシダーゼであり、Prx II の特異的活性化は、アテローム発生に対する有効な予防手段であることが導き出されている [19]。

PrxIIIは、抗酸化機能を有するタンパク質をコードし、ミトコンドリアに局在している[20]。またPrxIIIはMAP3K13と相互作用することが示されている[21]。PrxIIIは、活性酸素種のみトコンドリアレベルの制御において主要な役割を果たす。PrxIII欠損マウスは加齢とともに活動性が低下する。10ヵ月齢で、PrxIII欠損マウスの体力は、野生型よりもはるかに低く、酸化損傷の増加および骨格筋のみトコンドリアDNAコピー数の減少が観察された。さらに、PrxIII欠損マウスの脳においてアポトーシス細胞の増加が見られた。これらの結果によりPrxIIIの欠乏が、酸化ストレスおよびみトコンドリア障害を促進し、エネルギー供給および細胞活性を低下させることよりPrxIIIが老化プロセスの阻害に関与している可能性が示唆された[22]。

PrxIVはほとんどの組織において分泌タンパク質として存在し細胞質に局在する。PrxIVは、転写因子NF- κ Bの活性化において調節的役割を果たすことが見出されている[23-25]。PrxIVはPrxIと相互作用することが示されている[23]。PrxIVは疾患重症度バイオマーカーとして役立つ可能性が報告されている[26]。PrxIVは性的に成熟した精巣では、uncleaved N-terminal hydrophobic peptideを介して精子形成細胞のER（小胞体）膜に固定される。PrxIV欠損マウスを作り、*in vivo*でPrxIVの機能を調べた実験においては、PrxIVを欠く精子形成細胞が、野生型よりも酸化傷害による細胞死の影響を受けやすいことよりPrxIVの存在が絶対必要条件ではないにしても精子形成にとって重要であることが示唆されている[27]。

PrxVはヒト細胞ではミトコンドリア、ペルオキシソーム、細胞基質、および核に局在し、内因性または外因性の過酸化物質蓄積を阻害する細胞保護性抗

酸化酵素であることが示されている[28]。PrxV欠損マウスに関する既報がないため今後の研究が待たれる。

PrxVIは、哺乳動物において唯一の1-Cys Prxであるが[29]、2つの異なる活性部位を有する二官能性酵素であり、細胞の酸化還元調節に関与する[30]。PrxVIは過酸化水素、短鎖有機脂肪酸、およびリン脂質ヒドロペルオキシドを減少させることができ、PrxVIはリン脂質代謝の調節ならびに酸化傷害に対する保護において重要な役割を果たす可能性が示唆されている[31]。PrxVI欠損マウスが、グルコース依存性インスリン分泌の低下およびインスリン抵抗性の増加の両方によって引き起こされる2型糖尿病の初期と同様の表現型を示したことよりPrxVIが2型糖尿病のグルコース代謝における重要な調節因子であることが示唆された[32]。

近年2-Cys Prxに分子シャペロンとしての新たな機能が発見された。酸化ストレスや熱ストレスにより、通常の低分子量タイプのペルオキシレドキシシンが構造変化を起こし、高分子複合体を形成する。この高分子複合体は分子シャペロンとしての機能を持ち、ストレスによって障害を受けたタンパク質の排除、修復に関与する[13, 33]。

MSP23 (マクロファージストレスタンパク質 23kDa) と命名されたマウス Prx I は我々のグループにより腹腔マクロファージから酸化ストレス誘導性タンパク質としてクローン化された[34]。これまでの研究によりペルオキシレドキシシン(Prx)は H_2O_2 のような過酸化物を除去することにより細胞を酸化障害から保護したり、ラジカル反応を停止するような抗酸化物の重要なファミリータンパク質であることが判明した[35-37]。Prx I は主要な細胞質 Prx であり、かつ様々な組織において広く発現されている[38]。 H_2O_2 は細胞内のシグナル伝達分

子であることから、Prx ペルオキシダーゼの活性は可逆的であり、効果的に不活性化され、H₂O₂ 導入と細胞内のシグナルの伝達を可能にする [39, 40]。

最近、ROS に関連する種々のシグナルが報告され、Prx 酵素のシグナル伝達を調節する役割が解明されている。抗がん剤のシス-ジアミンジクロロ白金

(II) (シスプラチン) (cis-diamminedichloro-platinum(II) (cisplatin)) の細胞毒性は急性腎不全を引き起こす細胞酸化性ストレスである [24, 25]。

Prx I 欠損マウスを使用した研究によれば、Prx I はシスプラチン誘導アポトーシスに対して保護的役割を演じることが明らかにされた [41, 42]。しかしながら、UVA により誘導された障害に対する Prx I の役割に関する研究の報告はない。

皮膚障害を引き起こす主要な環境要因は紫外線 (UV) の過剰放射であり、それは紅斑や日焼けなどの急性反応を引き起こすが、更に長期間にわたり紫外線にさらされると早期の皮膚老化及び皮膚癌を惹起する可能性がある。太陽光線中の UV 放射は長波長の UVA (320 - 400 nm) と短波長の UVB (280 - 320 nm) より構成される。UVA は UVB の約 20 倍以上豊富に存在し、皮膚基底層まで浸透する [43, 44]。皮膚の UVA 曝露は細胞レベルでの活性酸素種 (ROS) を増やし、脂質やタンパク質及び核酸を傷つけてアポトーシスに導いている [45]。最近のある研究によれば、UVA 曝露が ROS を生み出し、結果として細胞内の酸化還元バランスの変化及び p 53 のミトコンドリアへの移行を生じることが示された [46]。

今回我々はこれらの点より UVA と Prx I との関連に着目し、Prx I 欠損マウスからの胚線維芽細胞 (MEFs) を用いて UVA による損傷から細胞を守る Prx I の役割を検討した。

第2章 材料及び方法

2.1. 細胞培養

Prx I ホモ欠損マウス (Prx I (-/-)) (OmniBank, Lexicon Pharmaceuticals, Inc.) 及び野生型 (Prx I (+/+)) マウスは既報に記載された通り、ジーントラッピング法を用いて製作した [38]。MEF は 13.5 日 Prx I (-/-) 及び Prx I (+/+) 胎児より既報通り製作した [39]。脳及び暗赤色 (内部) 臓器を胎児より取り除き、残余の組織を最終的に細かく切り刻んだ。細胞は 0.25% トリプシン処理し、遠心分離法により取り出した。次にこれらの MEF をストレプトマイシン (100 U/mL)、ペニシリン (0.1 mg/mL) 及び加熱により不活性化された 10% FBS を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。細胞は 37°C で 5% CO₂ の加湿されたインキュベーターで培養した。MEF の継代培養を含めて全ての実験は独立した 3 回の実験により測定した。全ての動物実験は、筑波大学動物実験委員会の承認 (No. 11-171) を得て行われた。

2.2. UVA 照射

MEF を PBS で洗浄し、培地は 5% FBS 及び 30 mM HEPES を含むフェノールレッドを含有しない DMEM に置き換えた。次にその細胞にピーク 325nm 発光波長の FL20SBLB ランプ (Toshiba, Tokyo, Japan) を用いて UVA を照射した。320 nm 以下の波長は ATG フィルター UV-35 (Asahi Technoglass, Japan) にて遮蔽した。UVA 照射線量はラジオメーター (UVR-305 / 365; Toshiba, Tokyo, Japan) を用いて測定した。

2.3. 細胞活性に対する MTT 分析

細胞活性は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

(MTT) assay 分析で測定した。細胞は6ウェルプレートで各ウェル当たり 1×10^5 cells の細胞をまき、37°Cで一晩培養した。UVA 処理のあと、MTT を添加し、細胞をさらに37°Cで5時間培養した。540 nm の吸光度はVarioskan プレートリーダー(Thermo Fisher Scientific. Co, Yokohama, Japan)を使用して測定した。細胞の死滅はUVA 照射細胞の吸光度と未照射コントロール群細胞との比により評価した。

2.4. フローサイトメトリーを使用したアポトーシス分析

Prx I (+/+) 及び Prx I (-/-) MEF の UVA 誘導アポトーシスは Annexin V-FLUOS Staining Kit (Roche Diagnostic. Co, Tokyo) で処理した後、フローサイトメトリーで評価した。35mm ディッシュ当たり 1×10^5 cell の細胞をまき、10% FBS 添加 DMEM 中で一晩培養し、次いで 15 J/cm^2 の UVA 照射を行い、更に5時間培養した。洗浄して再懸濁された細胞はマニュアルに従って fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Annexin V antibody 及び propidium iodide (PI) を用いて染色した。細胞 (試料当たり 2×10^4 個) は 488nm アルゴンレーザーを備えた流動細胞計測計 (FACSCalibur; Becton Dickinson Co, Tokyo) 及び CellQuest Pro ソフトウェアにて分析した。

2.5. ROS 産生及びミトコンドリア損傷の検出

Prx I (-/-) 及び (+/+) MEF に UVA を照射した。次に $20 \mu\text{M}$ 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate (DCFH-DA) 及び $150 \mu\text{M}$ MitoTracker Deep Red を培地に添加し、細胞を30分培養した。次いで細胞を培地と共に5回洗浄し、共焦点レーザー走査顕微鏡 (TSC SP2, Leica Microsystems, Tokyo, Japan) により蛍光像を得た。

2.6. ウェスタンブロット分析

全細胞抽出物は、RIPA バッファー中の溶解細胞を 10 分間 12,000 g で遠心分離した上清から得た。試料は 12.5%の SDS 含有 ポリアクリルアミドゲル上で分離した後、80V、2 時間で PVDF 膜上に移動した。膜はブロッキングバッファー (5% スキムミルク Yukijirushi, Tokyo, Japan) を含むトリス緩衝生理食塩水-Tween20 (TBS-T) 中 4°C で一晩培養した。次に膜を新しいブロッキングバッファー中で、1:1000 に希釈した 1 次抗体と共に 1 時間、室温で培養した。p53、Bcl-2、及び Bcl-xL 抗体は Cell Signaling Technology (Cell Signaling Technology Japan, Co, Tokyo, Japan) より購入した。Prx I 及び Nrf2 ポリクロナール抗体については以前記載したとおりである [38, 47]。ペルオキシダーゼ結合抗マウス IgG 抗体 (Sigma) または 抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) で室温 1 時間処理後洗浄したのち、ブロット中にラベル化されたバンドは ECL Plus キット (GE Healthcare Bio-Sciences Co., Tokyo, Japan) で検出した。膜は室温において Fuji Medical X-ray Film (Fuji Photo Film Co. Ltd., Tokyo, Japan) で露光した。

2.7. 定量的リアルタイム PCR 分析

定量的リアルタイム PCR は既報記載通り実施した [45, 48]。mRNA 発現レベルは GAPDH をコントロールとして算出した。

2.8. 統計分析

全てのデータは平均±SD として表示した。データ間の差異は Student's - t 検定 (StatView, version 5.0, Abacus Concepts, Berkeley, USA) を使用して統計処理を行った。

第3章. 結果

3.1. Prx I 欠損 MEF における UVA 感受性の増大

Prx I (+/+) 及び Prx I (-/-) MEF に 10 J/cm^2 , 12.5 J/cm^2 , 15 J/cm^2 , 17.5 J/cm^2 の各線量の UVA を照射し、MTT 分析を使用して細胞の生存率を評価した。細胞の生存能力の結果は図 2A に示した。Prx I (-/-) MEF では全ての線量 (10 J/cm^2 ($P<0.05$)、 12.5 J/cm^2 ($P<0.01$)、及び 15 J/cm^2 ($P<0.001$)) に対してより感受性が高かった。

次に、我々は UVA 照射をした MEF を Annexin V 抗体と PI で染色し、Prx I 欠損 MEF の UVA 感受性の増加はアポトーシスによるものかどうかを検討するために、フローサイトメトリーにより分析した。Prx I (-/-) 及び (+/+) MEF の代表的な散布図を Fig. 2B に示した。右上及び右下の四分区間(後期及び初期アポトーシス)に存在する細胞の割合をアポトーシスインデックスとした。この解析により UVA 照射 Prx I (-/-) MEF は、同様に処理された Prx I (+/+) MEF と比較して Annexin V 陽性細胞の割合が増加していることがわかった。Fig. 2C は二つの細胞のタイプのアポトーシスインデックスを示す。 15 J/cm^2 UVA 処理後、Prx I (-/-) 細胞のアポトーシスインデックスは 85.6%であり、Prx I (+/+) 細胞のアポトーシスは 16.7%と有意差がみられ ($P<0.001$)、Prx I (-/-) 細胞が UVA 誘導アポトーシスに対してより感受性が高いことが示唆された。

3.2. Prx I 欠損 MEF における UVA 誘導アポトーシスは p53 により仲介される

Prx I (-/-) MEF 中でアポトーシスが増加した機序を調べるために、細胞を UVA 照射したのちに p53、Bcl-2、及び Bcl-xL に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングで分析した (Fig. 3A, B)。p53 の発現は UVA 照射した Prx

I (-/-) 及び (+/+) MEF の両者でみられ、更に p 53 のベースレベルは Prx I (+/+) MEF に比べ Prx I (-/-) で大幅に高値であった (Fig. 3A, B)。一方で、Bcl-2 及び Bcl-xL の発現は UVA-処理 Prx I (+/+) MEF に比較して UVA 処理 Prx I (-/-) MEF で大幅に減少した。

次に、我々は p53 制御下の遺伝子の発現を検証した。定量的リアルタイム PCR では p21、Noxa、PUMA、及び Bax の mRNA 発現量は Prx I (-/-) においては Prx (+/+) MEF に比べて全て増加することが明らかになった (Fig. 3C)。これらの結果により p53 依存のアポトーシスのシグナル経路は Prx I (-/-) MEF において UVA 照射により変化することが示唆された。

3.3. Prx I 欠損 MEF における ROS 蓄積の制御

UVA 照射による ROS 産生を可視化するために細胞を DCFH-DA で処理した Prx I (+/+) 及び Prx I (-/-) MEF 中の ROS の蓄積量を比べた。Fig. 4A に示されるように活性化された DCFH-DA による蛍光シグナルは、UVA の 5 J/cm² 照射を受けた Prx I (-/-) MEF において強く検出された。これに対して、DCFH-DA シグナルは UVA を照射した Prx I (+/+) MEF または未照射細胞においてはほとんど観測されなかった。細胞内の ROS 生成をフローサイトメトリーにより定量化した。この分析により、Prx I (-/-) MEF 中の ROS 生成は、Prx I (+/+) MEF (P<0.01) と比較して大幅に増加することがわかった (Fig. 4B)。

3.4. PrxI 欠損 MEF における UVA 照射による Nrf2 防御系の変化

UVA 照射は転写因子 Nrf2 が核に蓄積することを誘導し、また UVA 誘導アポトーシスから皮膚細胞を守るための重要な役割を果たしていることが報告されており [49]、また Nrf2 は Prx I を含めて様々なストレス誘導性タンパク質の

遺伝子発現を調整している[47]ことから我々は Prx I (-/-) 及び (+/+) MEF 中の Nrf2 及び Nrf2 制御下にある酸化ストレス誘導タンパク質の発現に対する UVA 照射の影響を検討した。

Nrf2、Prx I、及び代表的な Nrf2 の下流遺伝子産物であるヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) の発現レベルを図 5A 及び B に示す。Prx I (+/+) MEF 中において Nrf2、Prx I、HO-1 の 3 つのタンパク質は全て UVA 照射により有意に増加した。一方で Prx I (-/-) MEF においては、Nrf2 及び HO-1 の UVA-誘導による発現は有意に低かった。予想されたように Prx I タンパク質は Prx I (-/-) 細胞中では検出されなかった。これらの結果により酸化ストレス誘導タンパク質の UVA 誘導による発現は Prx I (-/-) MEF において減少していることがわかった。次に我々は HO-1 及び他の Nrf2-制御下遺伝子である HO-1 および glutamate-cysteine ligase modifier subunit (GCLM) の mRNA 発現レベルの分析のために定量的リアルタイム PCR を行った。HO-1 及び GCLM 遺伝子は Nrf2 の下流に位置しており、それらの増加は Nrf2 の転写活性が増強されていることを意味する。UVA 照射は Prx I (+/+) 及び(-/-) MEF 両者中の HO-1 及び GCLM mRNA 発現を増大させるが、GCLM 上昇の程度は Prx I (+/+) MEF と比較して Prx I (-/-)MEF において有意に小さい (Fig. 5C)。以上の結果より、Nrf2-制御下遺伝子の発現は Prx I-欠損 MEF 中において減少することが示された。

3.5. Prx I 欠損 MEF 中の UVA 照射による炎症反応の増加

Nrf2 のシグナル伝達は NF κ B により転写して抑制されることが報告されているため[50]、我々は次に NF κ B の関連性に注目した。UVA 照射に伴う NF κ B シグナル伝達を調べるために、先ず、NF κ B に結合する抑制タンパク質である

I κ B のタンパク質発現レベルをウエスタンブロッティングにより調べた。Fig. 6A 及び B に示すように、Prx I (+/+) MEF における I κ B の発現が UVA 処理後に有意に減少した。これに対して、Prx I (-/-) MEF における I κ B タンパク質発現はコントロールでも UV 処理細胞においてもほとんど検出されなかった。定量的リアルタイム PCR 分析では UVA 照射は Prx I (-/-) 及び (+/+) MEF の両者において TNF α 及び IL-6 mRNA 発現を引き起こすことが明らかになった。しかしながら、UVA で誘導された TNF α 及び IL-6 の値は Prx I (-/-) 細胞中で大幅に上昇していた (Fig. 6C)。これらの所見において Prx I の欠損は I κ B 発現の低下をもたらしており、そのことが UVA 処理に対する炎症反応の増加につながったと思われた。

第4章. 考察

以上の研究により、我々は Prx I (-/-) MEF は Prx I (+/) MEF と比較して UVA に対して顕著に感受性が高く、その結果アポトーシスの誘導が増加することを発見した。Bruls らによると UVA に誘導されたアポトーシスは p53 が制御するミトコンドリアから放出されたチトクローム c とカスパーゼ活性化をもたらす広範囲な酸化障害によって生じることが報告されている[44]。そのため我々はそのメカニズムにおける p53 の役割を検討した。p53 及び Bax、Noxa、PUMA、及び p21 などの p53 調節アポトーシス促進遺伝子(G1 の細胞サイクル調節物)、並びに抗アポトーシスタンパク質の Bcl-2 及び Bcl-xL の発現を調べた。その結果、Prx I (-/-) MEF において UVA 処理後の p53 及び 4 つの p53-制御遺伝子の発現の増加がみられた。一方、Bcl-2 及び Bcl-xL の発現は UVA-照射された Prx I (-/-) MEF では抑制されていた。これらの結果は Prx I (-/-) MEF におけるアポトーシスの増加は p53 シグナルに関連していることを示唆する。

次に我々は Prx I (-/-) MEF 中の UVA 誘導アポトーシスは過剰な酸化ストレスにより生ずると仮定した。これを検討するために、Prx (-/-) 及び (+/) MEF 中における ROS レベルを DCFH-DA を使用して調べた。5 J/cm² UVA 照射後に、ROS は Prx I (-/-) MEF 中では豊富に検出されたが、Prx I (+/) MEF 中には同じ線量の照射をしたにもかかわらず検出されなかった。この結果により抗酸化能が Prx (-/-) MEF 中では減少することがわかり、ROS が除去できずに過剰な酸化ストレスの蓄積に至り、アポトーシスが誘導されることがわかった。これらの所見は Prx I はサイトカインに誘導された過酸化物のレベルを制御する抗酸化酵素のファミリーの一つであるとする前報[11]と整合性がある。UVA が誘因のアポトーシスにおける ROS の役割もいくつかの研究において

種々の抗酸化物質を使用して検討され[52-54]、これらの報告もまた我々の仮説を支持している。さらに Nrf2-Keap1 システムは細胞における抗酸化反応の中心的な調節因子[54]であることから、我々は Nrf2 及び Nrf2-制御遺伝子の UVA による誘導を調べた。Nrf2 並びにその下流遺伝子がエンコードしている HO-1 及び GCLM の発現レベルは Prx I (+/+) MEF と比較して Prx I (-/-) において減少していることを見出した。これは、ROS は Nrf2 を活性化し、結果として抗酸化ストレス酵素や酸化ストレスタンパク質をコードする一連の遺伝子の発現につながることを示した前報[54]からすると予期し得ない結果であった。しかしながら、別の論文では p53 及び Nrf2 は相互に作用し、p53 は Nrf2 標的遺伝子の転写を抑制することが示されている[55]。以上から、Prx I (-/-) 細胞において増加した p53 は Nrf2 と相互作用して Nrf2 の標的遺伝子の抑制へと導くという仮説も考えられる。一方、ある最近の論文では p53 調節 p21 と Nrf2 間の相互作用が示された。p21 は Nrf2 内の DLG 及び ETGE モチーフと相互作用し、それによりユビチキンは減少し、Nrf2 のプロテアソームによる分解を起こすことが示された[56]。従って、酸化ストレスに対する反応において p53、p21、及び Nrf2 間の細胞保護的なフィードバックループの様なメカニズムが存在する可能性も考えられる。我々の結果は Prx I が存在しない場合、p21 のレベルは増加する一方で、Nrf2 及び Nrf2 のシグナル伝達が抑制されることを示した。従って、Prx I が存在しないことは細胞保護的なフィードバックループに変化をもたらす可能性があり、結果的に UVA 曝露後のアポトーシスを誘導するという結果につながるということも考えられる。しかしながら、Nrf2 と相互作用する標的遺伝子が他にも多く存在することから、今後更なる検討が必要である。

前述の矛盾を説明できる他の仮説として NF κ B シグナルが関与があげられ

る。近年の論文において、NF κ Bは転写レベルでNrf2シグナル伝達を直接抑制することが示された。NF κ Bはコ・アクティベーターであるCREB結合タンパク質(CBP)に対してNrf2と競合すること、更にhistone deacetylase 3(HDAC3)を動員することが見出され、結果的に局所的な低アセチル化及びNrf2シグナル伝達の抑制につながることが発見された [57]。NF κ BファミリーはRelファミリータンパク質p65、c-Rel、Rel B、p50、及びp52を含む。炎症亢進性シグナル、または酸化ストレスのような種々の刺激はI κ Bキナーゼシグナロソームの活性化に導き、結果としてI κ Bの分解及びNF κ B二量体の核への移行を導き、そこで標的遺伝子の転写を誘導するのではなかろうか？ 今回の研究においてPrx I (+/+) MEF中のUVA照射後のI κ Bタンパク質レベルは大幅に減少した。しかしながら、Prx I (-/-) MEF中のI κ Bタンパク質はUV照射前後ともほとんど検出されなかった。従って、酸化ストレスのような刺激により、Prx I (-/-) MEFのベース状態においてはNF κ Bシグナル伝達がすでに惹起されている可能性が考えられる。UVA照射に続いて、NF κ B-制御下遺伝子、すなわちTNF α 及びIL-6のPrx I (-/-) MEF中における発現は増強された。そのため、Prx I (-/-) MEFは炎症反応をおこしやすい素因をもっているか、またはPrx I欠損による炎症反応に関連する他のメカニズムに影響されている可能性がある。

本報告において、我々はPrx IがROSの集積を制御することでUVA誘導のアポトーシスに対して保護的役割を果たすことを明らかにした。しかしながら、これらの機序の根拠は十分に解明されていない。Prx Iは、ペルオキシダーゼ活性に加えて多くのメカニズムを通して細胞及び組織を酸化損傷から保護している。またPrx Iは細胞の種類や刺激に応じておこる細胞の死またはアポトーシスの調節において主な役割を演じる異なる種類の分子との直接もしくは間接

的な相互作用を通して、酸化ストレスに誘導された細胞死を抑制することが考えられる。例えば Prx I は ASK1-JNK シグナル伝達を抑制し、p66shc 及び c-Abl の活性化を抑制することで酸化ストレスによるアポトーシスを抑制することが示されており、更に Prx I は c-Myc、NF κ B、及びアンドロゲン受容体のようないくつかの転写因子に作用して、それらの作用を調節することもわかっている [58]。UVA 照射を原因とするアポトーシスのシグナル伝達の抑制において PrxI が機能する特定の機序は十分には解明されていない。UVA シグナル伝達経路における Prx I の役割を解明するためには、さらなる研究が必要である。

第 5 章. 結論

本論文において我々は、Prx I (-/-) MEF は Prx I (+/+) MEF と比較して UVA に対する感受性が顕著に高く、その結果アポトーシスの誘導が増加することを発見した。この結果は p53 依存のアポトーシスシグナル伝達経路は Prx I (-/-) MEF において変化し、Prx I (-/-) MEF 中の ROS 生産が Prx I (+/+) MEFs 中に比べて有意に上昇したことを示している。Nrf2 調節遺伝子の発現は Prx I (-/-) MEF 中で低下し、I κ B 発現の減少につながり、これは UVA 処理に対する炎症反応の増強につながった。これらの結果から我々は、細胞死またはアポトーシスの調節において重要な役割を果たす異なるタイプの分子との直接及び間接的な相互作用を通じて、酸化性ストレス誘導による細胞死を Prx I が抑制することが可能と考えられる。しかしながら、UVA 照射が原因のアポトーシスのシグナル伝達を抑制するのに Prx I が作用している機序は明らかでない。UVA シグナル伝達経路における Prx I の役割を解明するためにはさらなる研究が必要である。

謝辞

丁寧に御指導いただいた武川寛樹 教授に謝意を表します。柳川 徹 病院教授及び木村伸太郎 博士の実験上の援助と本論文に対する入念な査読に感謝いたします。

参考文献

- [1] 野田春彦『生命の起源』「第二章」培風館、1996年
- [2] 及川伸二、古川絢子、村田真理子、酸化ストレスによるDNAやタンパク質の損傷を介した老化促進機構 基礎老化研究 33巻1号 9-16頁 2009.
- [3] Cadet J, Douki T, Ravanat JL. Oxidatively generated damage to cellular DNA by UVB and UVA radiation. *Photochem Photobiol.* 91(1):140-55, 2015.
- [4] Lismont C, Nordgren M, Van Veldhoven PP. Redox interplay between mitochondria and peroxisomes. *Front Cell Dev Biol.* 27:35, 2015.
- [5] 山本 哲也 , 活性酸素 –その生成, 消去および作用– オーラルサイエンスレポート Vol . 2 : 1 – 1 1 頁 , 2011.
- [6] Kim K, Rhee SG, Stadtman ER. Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxygen species generated by dithiothreitol and iron. *J Biol Chem.* 260: 15394-15397, 1985.
- [7] Kim K, Kim IH, Lee KY, et al. The isolation and purification of a specific protector protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. *J Biol Chem.* 263:4704-11, 1988.
- [8] Park J, Lee S, Lee S, Kang SW: 2-cys peroxiredoxins: emerging hubs determining redox dependency of Mammalian signaling networks. *Int J Cell Biol* 2014: 715867, 2014.
- [9] Ding C, Fan X, Wu G: Peroxiredoxin 1 – an antioxidant enzyme in cancer. *J Cell Mol Med.* 21: 193-202, 2017.

- [10] Wood ZA, Poole LB, Karplus PA: Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300: 650–653, 2003.
- [11] Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB: Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 28: 32–40, 2003.
- [12] Matsumoto A, Okada A, Fujii T. Cloning of the peroxiredoxin gene family in rats and characterization of the fourth member. *FEBS Letters* :246–250, 1999.
- [13] Brinkmann C, Brixius K: Peroxiredoxins and sports: new insights on the antioxidative defense. *J Physiol Sci* 63: 1–5, 2013.
- [14] Rhee SG: Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells* 39: 1–5, 2016.
- [15] Jeong SJ, Kim S, Park JG: Prdx1 (peroxiredoxin 1) deficiency reduces cholesterol efflux via impaired macrophage lipophagic flux. *Autophagy*, 2017.
- [16] Kisucka J, Chauhan AK: Peroxiredoxin1 prevents excessive endothelial activation and early atherosclerosis. *Circ Res* 103:598–605, 2008.
- [17] Carola A, Neumann, Daniela S, Kurause, Christopher V: Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumor suppression. *Nature* 424 : 561–565, 2003.
- [18] Park SJ, Kim JH, Kim TS: Peroxiredoxin 2 regulates PGF2 α -induced corpus luteum regression in mice by inhibiting ROS-dependent JNK activation. *Free Radic Biol Med.* 108:44–55, 2017
- [19] Park JG, Yoo JY, Jeong SJ: Peroxiredoxin 2 deficiency

- exacerbates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ Res.* 109:739-749, 2011.
- [20] Lee S, Wi SM, Min Y, Lee KY: Peroxiredoxin-3 Is Involved in Bactericidal Activity through the Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Immune Netw.* 16:373-380, 2016.
- [21] Masaki M, Ikeda A, Shiraki E: Mixed lineage kinase LZK and antioxidant protein-1 activate NF-kappaB synergistically . *Eur J Biochem.* 270: 76-83, 2003.
- [22] Yong-Gang Zhang, Li Wang, Tomonori Kaifu: Accelerated decline of physical strength in peroxiredoxin-3 knockout mice. *Experimental Biology and Medicine* 241: 1395-1400, 2016
- [23] Haridas V, Ni J, Meager A: TRANK, a novel cytokine that activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase. *J Immunol.* 161:1-6, 1998.
- [24] Jin D-Y, Chae HZ, Rhee SG: Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kB activation. *J Biol Chem.* 272:30952-30961, 1997.
- [25] Yu S, Mu Y, Ao J, Chen X: Peroxiredoxin IV regulates pro-inflammatory responses in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) and protects against bacterial challenge. *J Proteome Res.* 9:1424-1436, 2010.
- [26] Janin Schulte: Peroxiredoxin 4: a multifunctional biomarker worthy of further exploration. *BMC Med.* 137, 2011.
- [27] Iuchi Y, Okada F, Tsunoda S: Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem J.*

419:149–158, 2009.

- [28]Knoops B, Goemaere J, Van der Eecken V: Peroxiredoxin 5: structure, mechanism, and function of the mammalian atypical 2-Cys peroxiredoxin. *Antioxidants & Redox Signaling*. 15: 817-829, 2011.
- [29]Pacifici F, Arriga R, Sorice GP: Peroxiredoxin 6, a novel player in the pathogenesis of diabetes. *Diabetes*.63:3210–3220 ,2014
- [30] L.B. Poole, K.J. Nelson: Distribution and features of the six classes of peroxiredoxins. *Mol. Cells* .39, 2016.
- [31] Y. Manevich, K.S. Reddy, T: Structure and phospholipase function of peroxiredoxin 6: identification of the catalytic triad and its role in phospholipid substrate binding. *J. Lipid Res*. 48, 2007.
- [32] Pacifici F, Arriga R, Sorice GP: Peroxiredoxin 6, a novel player in the pathogenesis of diabetes. *Diabetes*.63:3210–3220, 2014.
- [33]Toledano MB, Huang B: Microbial 2-Cys Peroxiredoxins: Insights into Their Complex Physiological Roles. *Mol Cells* 39: 31–39, 2016.
- [34] Ishii T, Yamada M, Sato H, Matsue M, Taketani S, Nakayama K, et al.: Cloning and characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein. *J Biol Chem*.268: 18633–18636, 1993.
- [35] Rhee SG, Chae HZ, Kim K: Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 38: 1543–1552, 2005.
- [36] Flohe L, Harris JR: Introduction. History of the peroxiredoxins and topical perspectives. *Subcell Biochem*. 44: 1–25, 2007.
- [37] Fujii J, Ikeda Y: Advances in our understanding of

peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep* 7: 123-130, 2002.

[38] Uwayama J, Hirayama A, Yanagawa T, Warabi E, Sugimoto R, Itoh K, et al.: Tissue Prx I in the protection against Fe-NTA and the reduction of nitroxyl radicals. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 226-231, 2006.

[39] Rhee SG: Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*.312: 1882-1883, 2006.

[40] Woo HA, Yim SH, Shin DH, Kang D, Yu DY, Rhee SG: Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H₂O₂ accumulation for cell signaling. *Cell* 140: 517-528, 2010.

[41] Ma D, Warabi E, Yanagawa T, Kimura S, Harada H, Yamagata K, et al.: Peroxiredoxin I plays a protective role against cisplatin cytotoxicity through mitogen activated kinase signals. *Oral Oncol*.45: 1037-1043, 2009.

[42] Okada K, Ma D, Warabi E, Morito N, Akiyama K, Murata Y, et al.: Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity in peroxiredoxin I-deficient mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 503-509, 2013.

[43] Bruls WA, Slaper H, van der Leun JC, Berrens L: Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem Photobiol* 40: 485-494, 1984.

[44] Bruls WA, van Weelden H, van der Leun JC: Transmission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the

- minimal erythema dose. *Photochem Photobiol.*39: 63-67, 1984.
- [45] Kimura S, Warabi E, Yanagawa T, Ma D, Itoh K, Ishii Y, et al.: Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun.*387: 109-114, 2009.
- [46] Waster PK, Ollinger KM: Redox-dependent translocation of p53 to mitochondria or nucleus in human melanocytes after UVA- and UVB-induced apoptosis. *J Invest Dermatol.*129: 1769-1781, 2009.
- [47] Ishii T, Itoh K, Takahashi S, Sato H, Yanagawa T, Katoh Y, et al.: Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages. *J Biol Chem.*275: 16023-16029, 2000.
- [48] Warabi E, Takabe W, Minami T, Inoue K, Itoh K, Yamamoto M, et al.: Shear stress stabilizes NF-E2-related factor 2 and induces antioxidant genes in endothelial cells: role of reactive oxygen/nitrogen species. *Free Radic Biol Med.*42: 260-269, 2007.
- [49] Hirota A, Kawachi Y, Itoh K, Nakamura Y, Xu X, Banno T, et al.: Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis. *J Invest Dermatol.*124: 825-832, 2005.
- [50] Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, et al.: Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol* 76: 1485-1489, 2008.
- [51] Chung YM, Bae YS, Lee SY: Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during sodium

- salicylate-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 34: 434-442, 2003.
- [52] Dou M, Han Y, Han Z, Chen X, Wang Y, Tan J, et al.: Inhibitory effect of polypeptide from *Chlamys farreri* on UVA-induced apoptosis in human keratinocytes. *Invest New Drugs* 22: 391-398, 2004.
- [53] Schneider EM, Vorlaender K, Ma X, Du W, Weiss M: Role of ATP in trauma-associated cytokine release and apoptosis by P2X7 ion channel stimulation. *Ann N Y Acad Sci* 1090: 245-252, 2006.
- [54] Itoh K, Tong KI, Yamamoto M: Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36: 1208-1213, 2004.
- [55] Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D, Pierantoni MG, Napolitano M, Russo T, et al.: p53 suppresses the Nrf2-dependent transcription of antioxidant response genes. *J Biol Chem* 281: 39776-39784, 2006.
- [56] Chen W, Sun Z, Wang XJ, Jiang T, Huang Z, Fang D, et al.: Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response. *Mol Cell* 34: 663-673, 2009.
- [57] Liu GH, Qu J, Shen X: NF-kappaB/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim Biophys Acta* 1783: 713-727, 2008.
- [58] Ishii T, Warabi E, Yanagawa T: Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity. *J Clin Biochem Nutr* 50: 91-105, 2012.

図の説明

Fig. 1. ペルオキシレドキシンの機能

A. 3種類に分類される Prx

- 1) Typical 2-Cys Prx : Typical 2-Cys Prx はペルオキシレドキシンのなかで最も一般的である。それらは、ペルオキシレドキシんに一般的な活性部位および還元化システインを含有する。典型的な 2-Cys Prx は、2つの同一の活性部位を含むホモ二量体として存在する。酸化還元活性部位システインは酸化物を還元してスルフェン酸を形成し、他方のサブユニットのC末端に位置する還元システインを攻撃し電子が最初に相手方（求電子的な部）に動いて反応が始まることとする。この反応は、安定したサブユニット間ジスルフィド結合の形成をもたらす、次いで、チオレドキシンのようなチオレドキシンのようなタンパク質によって還元される。
- 2) Atypical 2-Cys Prx : このカテゴリーの Prx は、Typical 2-Cys Prx と同じメカニズムを持つが、2-Cys Prx は構造的に単量体である。これらの Prx では、活性部位システインおよび還元化システインは同じポリペプチド内に位置する。過酸化物との反応により、縮合反応が生じ、活性部位システイン上にスルフェン酸が形成され、その後分子内ジスルフィド結合が形成される。非定型 2-Cys Prxs は、チオレドキシンの触媒作用のサイクルのための電子供与体として利用する。
- 3) 1-Cys Prxs : 1-Cys Prx は活性部位システインを共有し、還元化システインを含まない。過酸化物との反応で生成されるそれらのシステインスルフェン酸は、チオレドキシンのようなチオール含有電子供与体によって直接還元される。

略語説明

Sp: peroxidatic cysteine 過酸化システイン

SR: resolving cysteine 還元化システイン

SpOH: the cysteine sulfenic acid intermediate
システインスルフェン酸中間体システインスルフェン酸

RSH: thiols チオール

RSSR: disulfide ジスルフィド

R: アルキル基

図参考引用元

Nebraska Redox Biology Center Educational Portal
(http://genomics.unl.edu/RBC_EDU/pr.html)

B. ペルオキシレドキシシン (Prx) とチオレドキシシン (Trx) からなる触媒サイクル

Prx は H_2O_2 を H_2O に還元する過酸化水素消去酵素として機能する。 H_2O_2 を還元することにより自身の持つシステイン残基は酸化され活性を失うが、Trx によって再還元される触媒サイクルを形成している。

略語説明

Prx: ペルオキシレドキシシン

TRX: チオレドキシシン

SH, SOH などはシステイン残基の酸化還元状態を示す。

図参考引用元

老化ゲノム 300 三浦ゆり、遠藤玉夫 20111130

Copyright (C) 2012 Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology. All rights reserved.

(http://www.tmig.or.jp/J_TMIG/genome300/PRDX%20family.html)

Fig. 2. Prx I-欠損 MEF における増強された UVA 感受性

A. UVA の様々な線量で照射された Prx I ホモ接合性ノックアウト (Prx I (-/-)) 及び野生種 (Prx I (+/+)) MEF MTT 細胞の生存能力分析

Prx I (-/-) MEF は全ての UVA 照射線量 (10, 12.5, 及び 15 J/cm²)

(*P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001) (n=3) の試験においてより感受性が高い。

B. Prx I (+/+) 及び Prx I (-/-) MEF の流動細胞計測法ではヨウ化プロピジウム及び蛍光標識化された Annexin V 抗体により染色している。アポトーシス細胞は右上部及び右下部四分画において Annexin V-陽性細胞と定義されている。

垂直軸: ヨウ化プロピジウム (PI), 水平軸: Annexin V.

C. フローサイトメトリの定量化

右上部及び右下部四分画中の細胞の割合はアポトーシス指標として定義された。15J/cm² UVA 照射後、Prx I (-/-) MEF のアポトーシス指標は Prx I (+/+) 細胞に比較して大幅に増加している。数値は三つの独立した実験の平均値 ± SD (**P<0.001) (n=3) である。

Fig. 3. Prx I (+/+) 及び Prx I (-/-) MEF 中のアポトーシスシグナル伝達

A. Prx I (+/+) 及び (-/-) MEF 中における 5 J/cm² UVA 照射前後の p53, Bcl-2, 及び Bcl-xL のウエスタンブロット分析

B. ウエスタンブロットによる p53, Bcl-2, 及び Bcl-xL の定量化。 p53 の発現は増大するが、一方 Bcl-2 及び Bcl-xL 発現レベルは Prx I (-/-) MEF 中において大幅に低下している (*P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001) (n =3)。

C. p21, Noxa, PUMA, 及び Bax mRNA の定量リアルタイム PCR 分析。

発現レベルは GAPDH のそれに規格化している。全ての 4 つの p53-調節 mRNAs は Prx I (-/-) MEF において UVA 照射後に著明に増加している (*P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001) (n =3)。

Fig. 4. Prx I (-/-) 及び Prx I (+/+) MEF 中における UVA に誘導による ROS 生成.

A. MEF 中の ROS 産生分析

細胞は 5 J/cm² UVA 照射され、次いで DCFH-DA で染色している。蛍光標識化された ROS シグナルは共焦点レーザー走査顕微鏡で可視化されている。

B. フローサイトメトリーによる ROS シグナルの定量化

UVA 誘導 ROS 生成は Prx I (+/+) MEF に比べ Prx I (-/-) MEF 中で著明に多い (***) P<0.001) (n =3)。

Fig. 5. UVA 誘導による Nrf2 及び Nrf2-調節遺伝子.

A. Prx I (+/+) 及び (-/-) MEF 中の Nrf2, Prx I, 及び HO-1 の UVA 照射後のウエスタンブロット分析

B. Nrf2, HO-1, 及び Prx I のウエスタンブロットによる定量化

Prx (-/-) 及び (+/+) MEF 中の Nrf-2 及び HO-1 の UVA-誘導増加発現を示している。Prx I は UVA-処理 Prx I (+/+) MEF 中では増加し、そして予想通り Prx I (-/-) MEF 中では未検出である。

C. Nrf2-調節遺伝子 HO-1 及び GCLM の定量リアルタイム PCR

mRNA 発現 レベルは GAPDH のそれに標準化している (*P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001) (n =3)。

Fig. 6. Prx (-/-) MEF 中の UVA-誘導による炎症反応の増強

A. Prx I (-/-) 及び (+/+) MEF 中における I κ B の 5 J/cm² UVA 照射前後のウエスタンブロット分析

B. I κ B ウエスタンブロットの定量化

I κ B は Prx I (+/+) MEF 中で強く発現し、UVA 照射により抑制される。I κ B 発現は Prx I (-/-) MEF 中において著明に低下しており、UVA 照射後も低いままである。(*P<0.05) (n =3)。

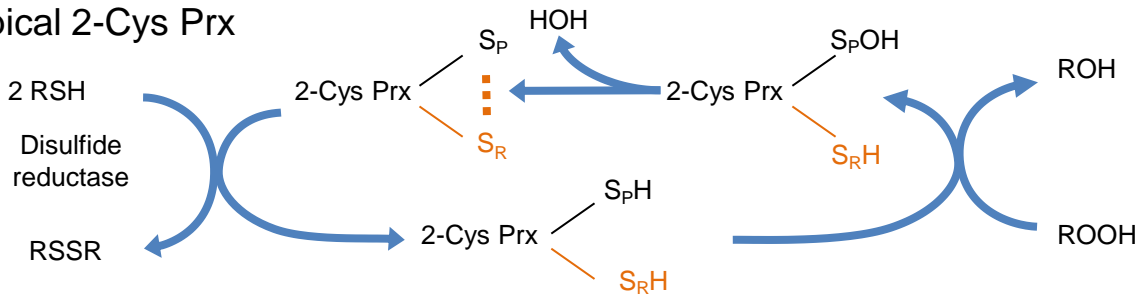
C. TNF α 及び IL-6 mRNA の定量リアルタイム PCR 分析。

UVA-誘導 TNF α 及び IL-6 mRNA レベルは Prx I (+/+) MEF に比べ Prx I (-/-) において著明に高い(*P<0.05, ** P<0.01)。

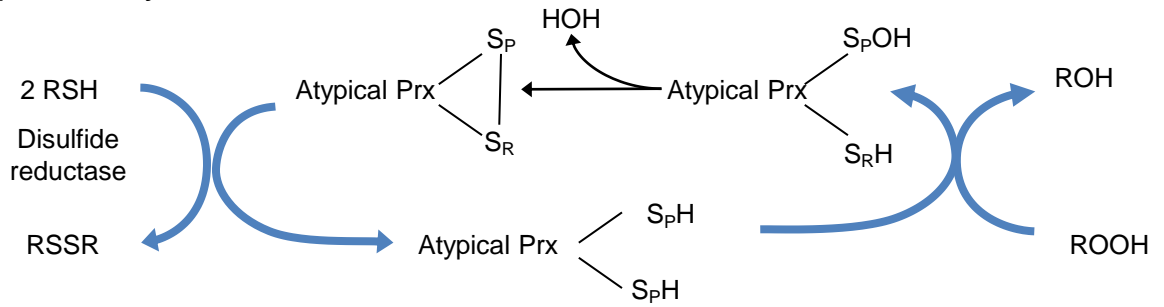


A

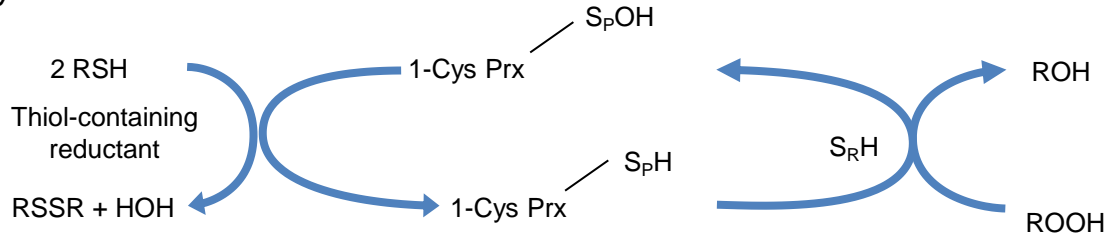
① Typical 2-Cys Prx



② Atypical 2-Cys Prx



③ 1-Cys Prx



B

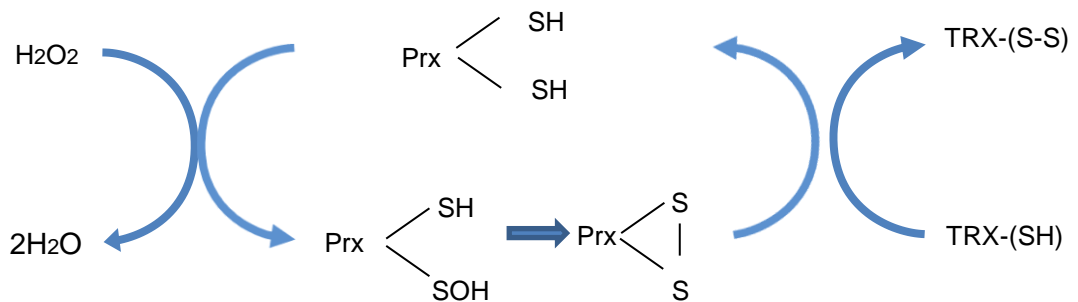
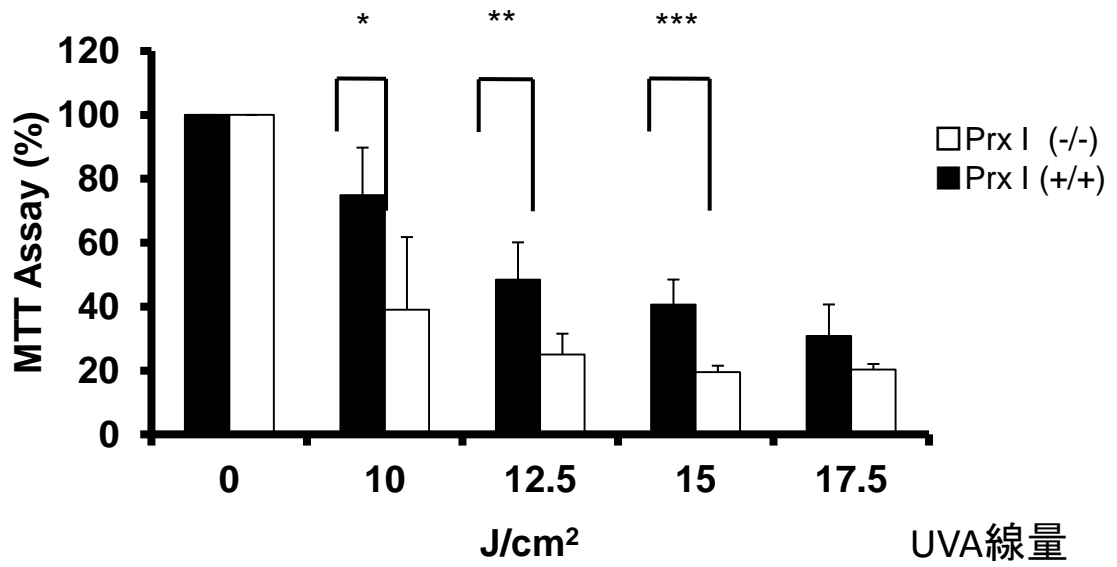
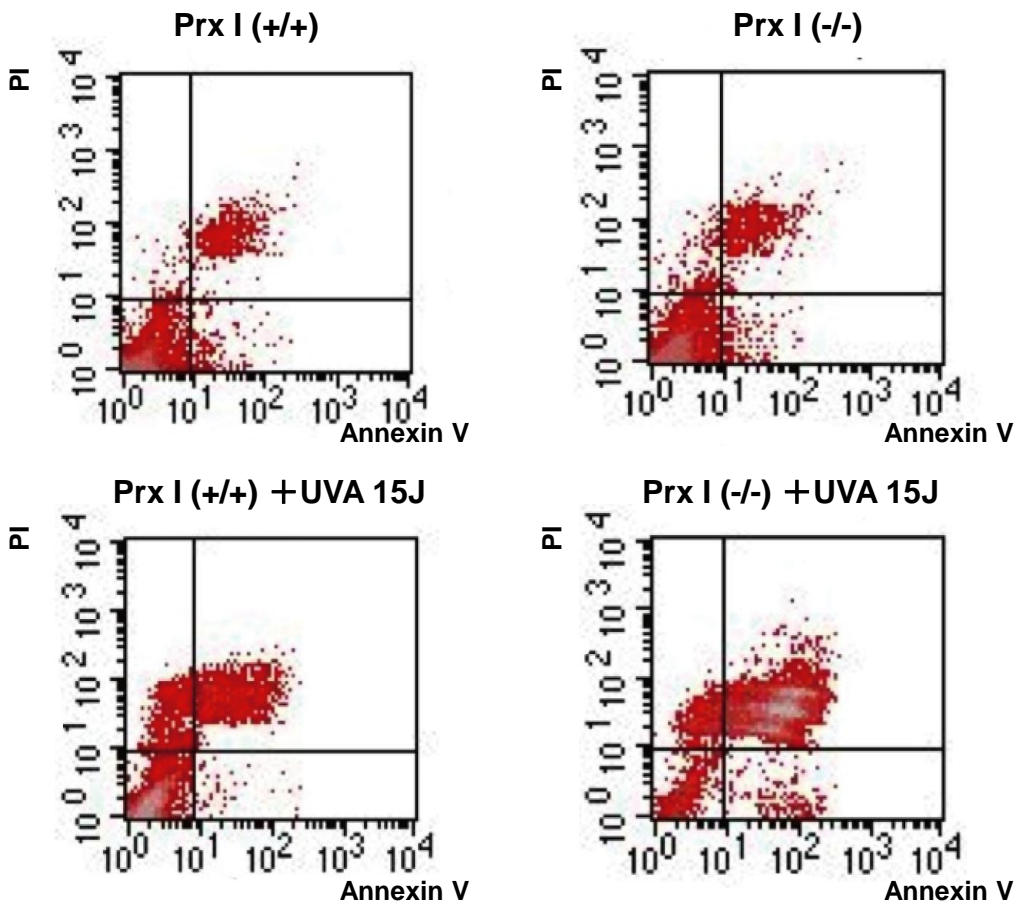


Fig. 1.

A**B****Fig. 2.**

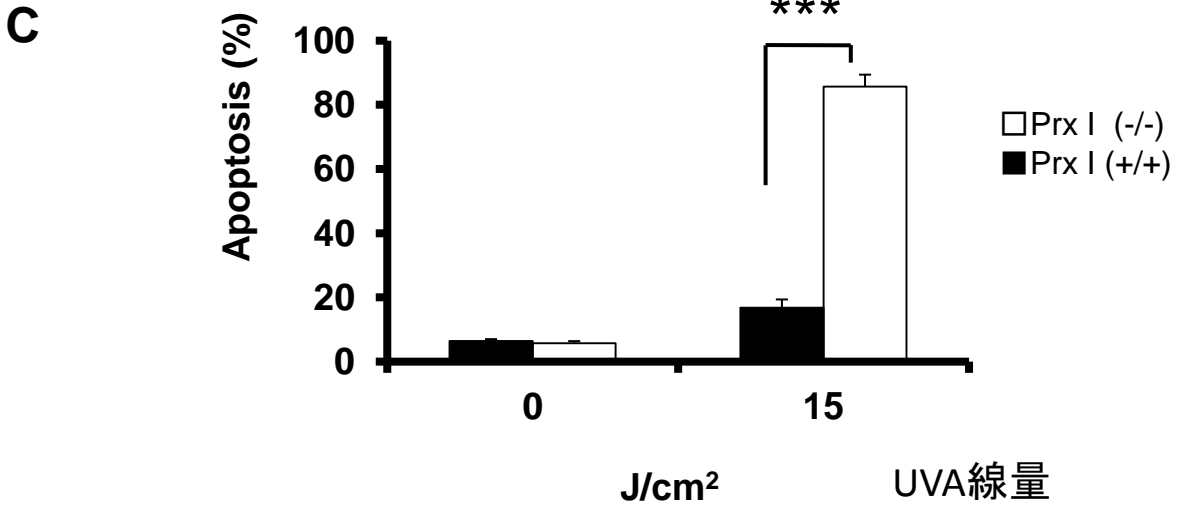


Fig. 2.

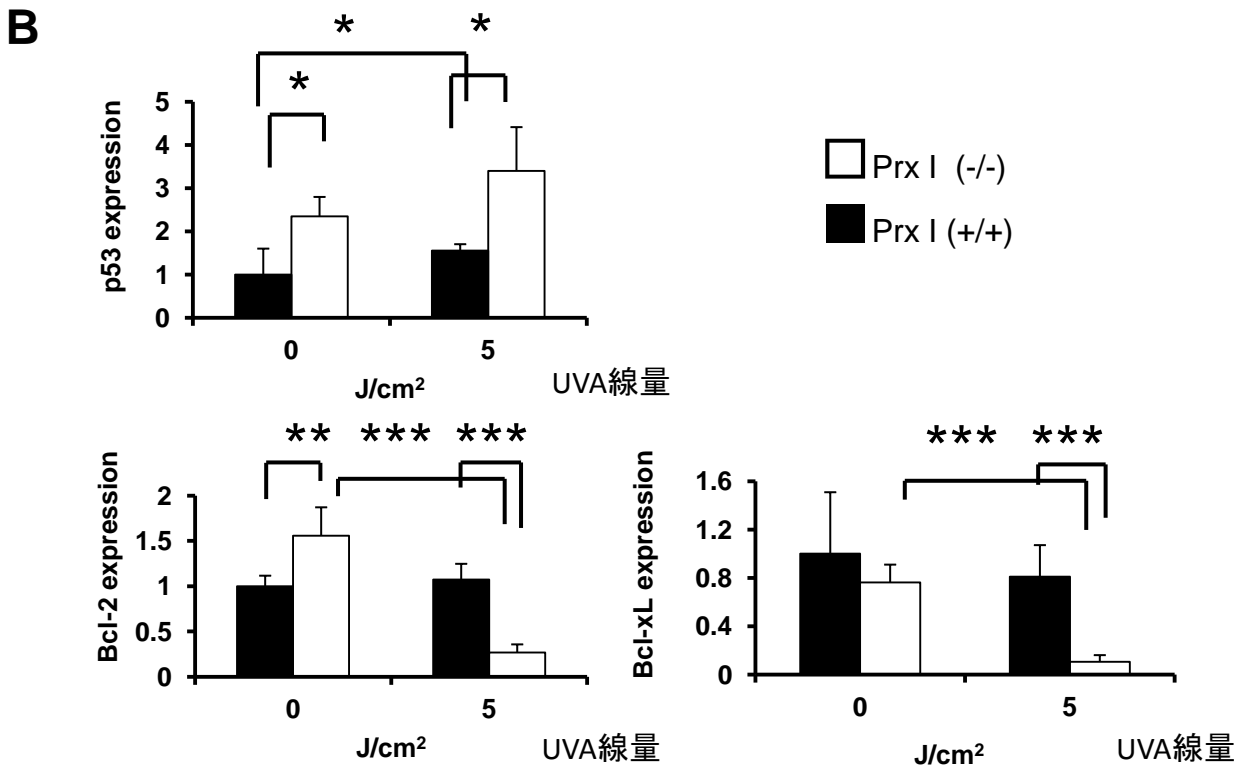
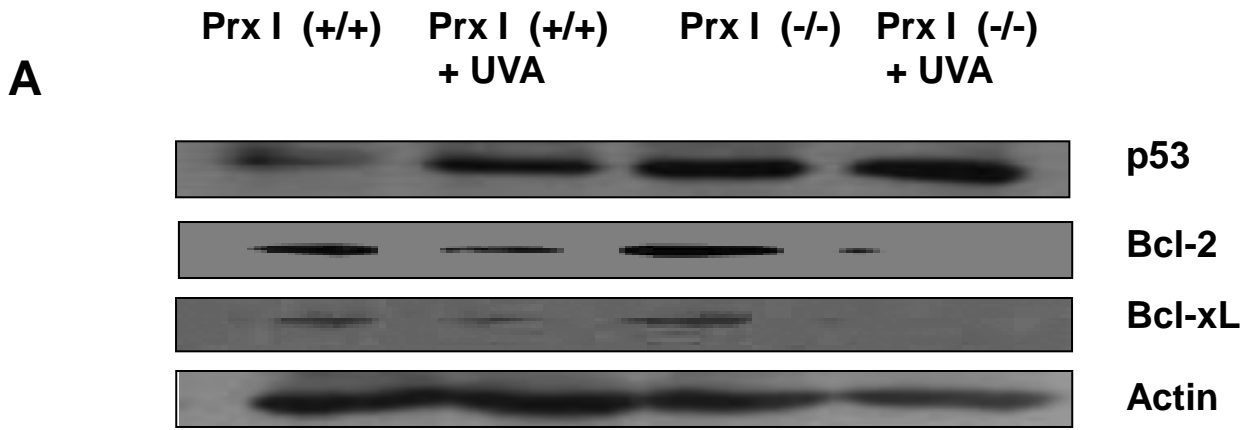


Fig. 3.

C

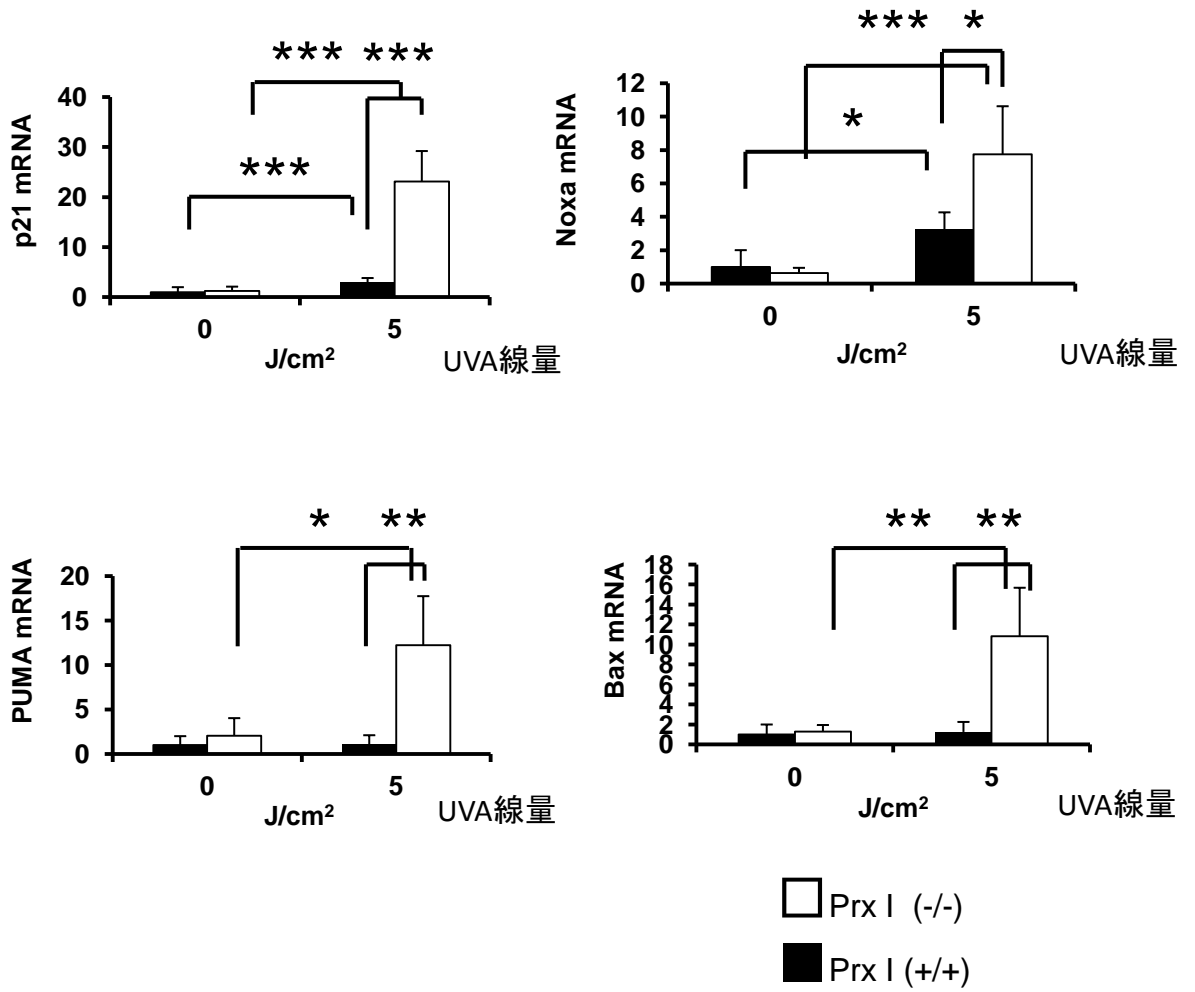


Fig. 3.

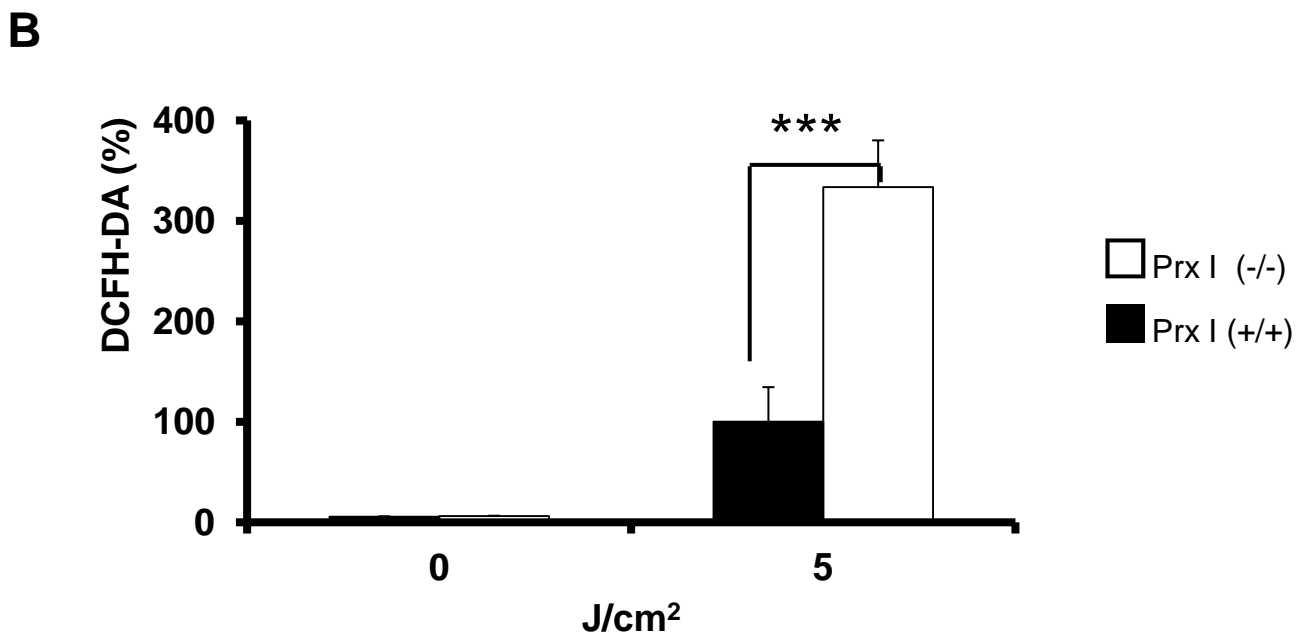
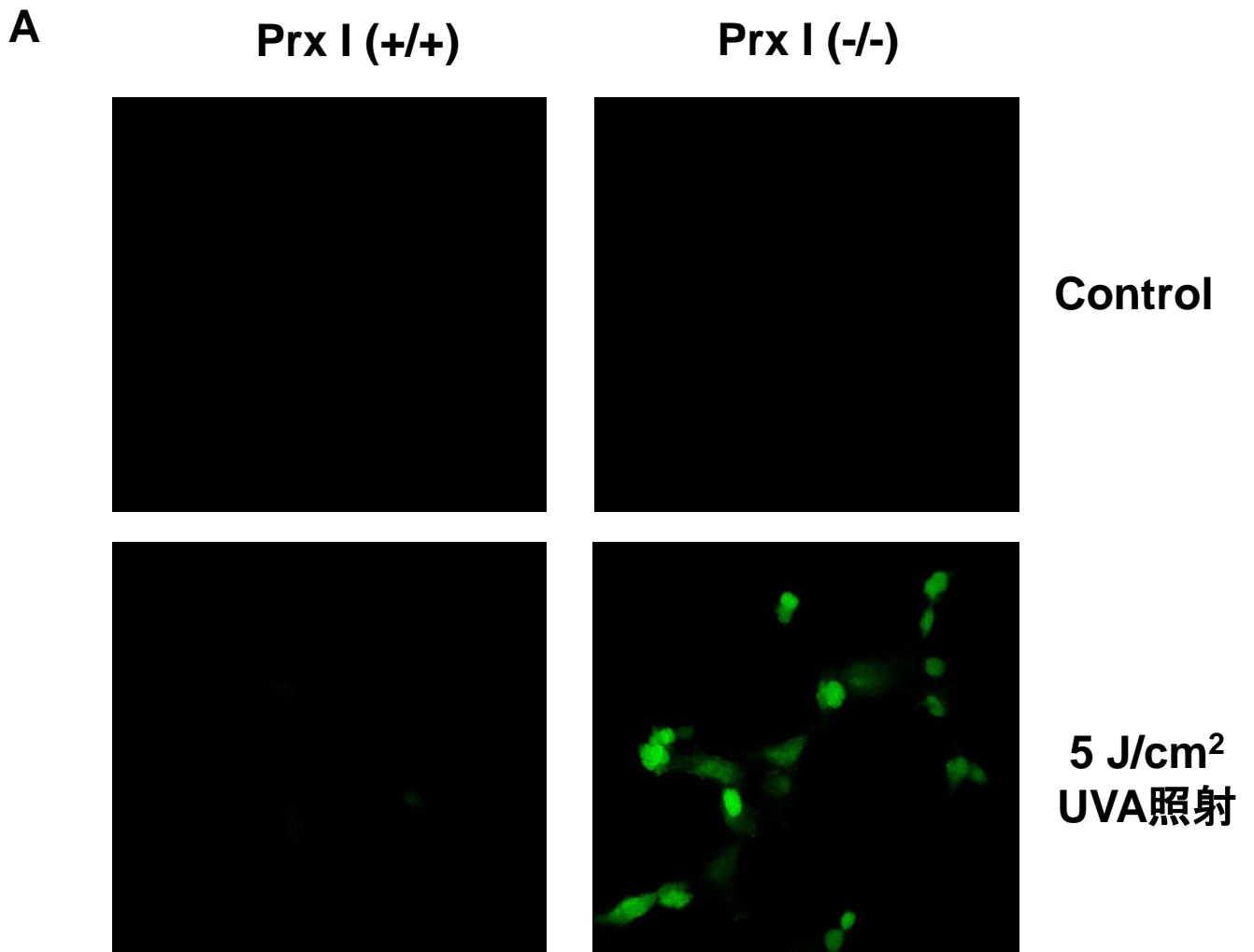


Fig. 4.

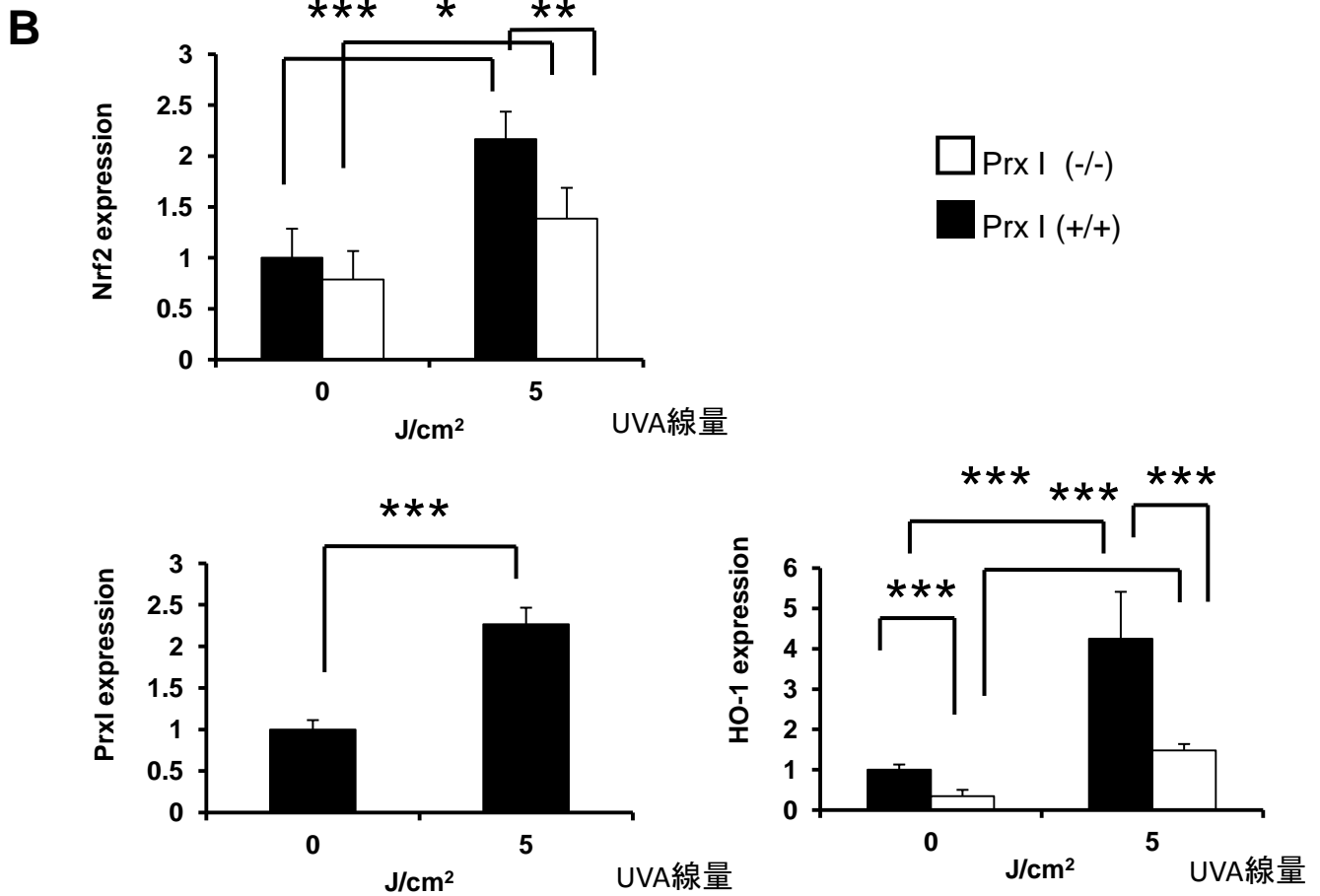
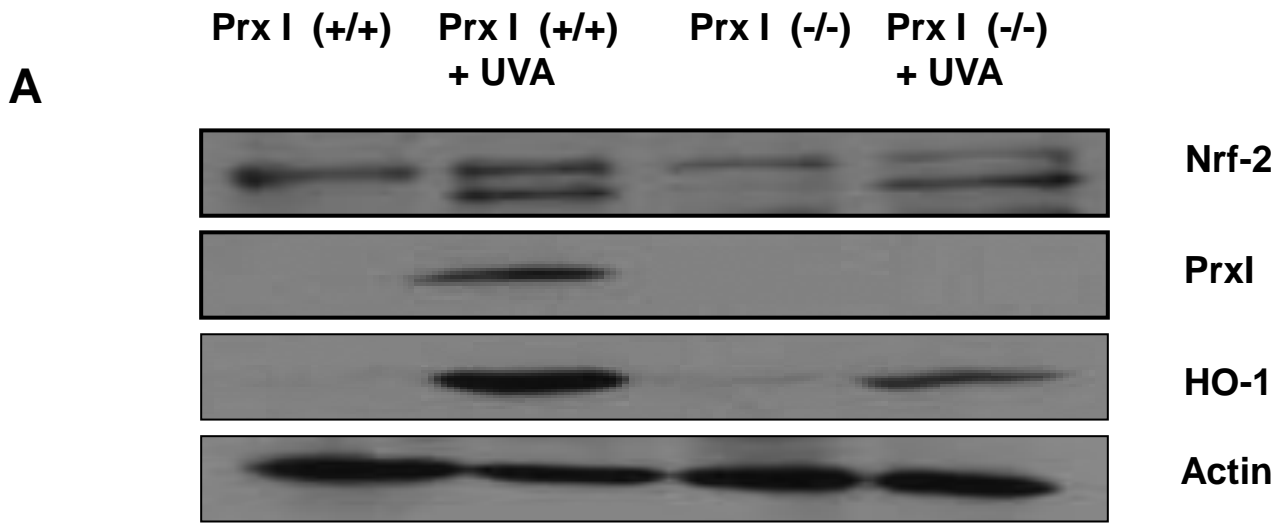


Fig. 5.

C

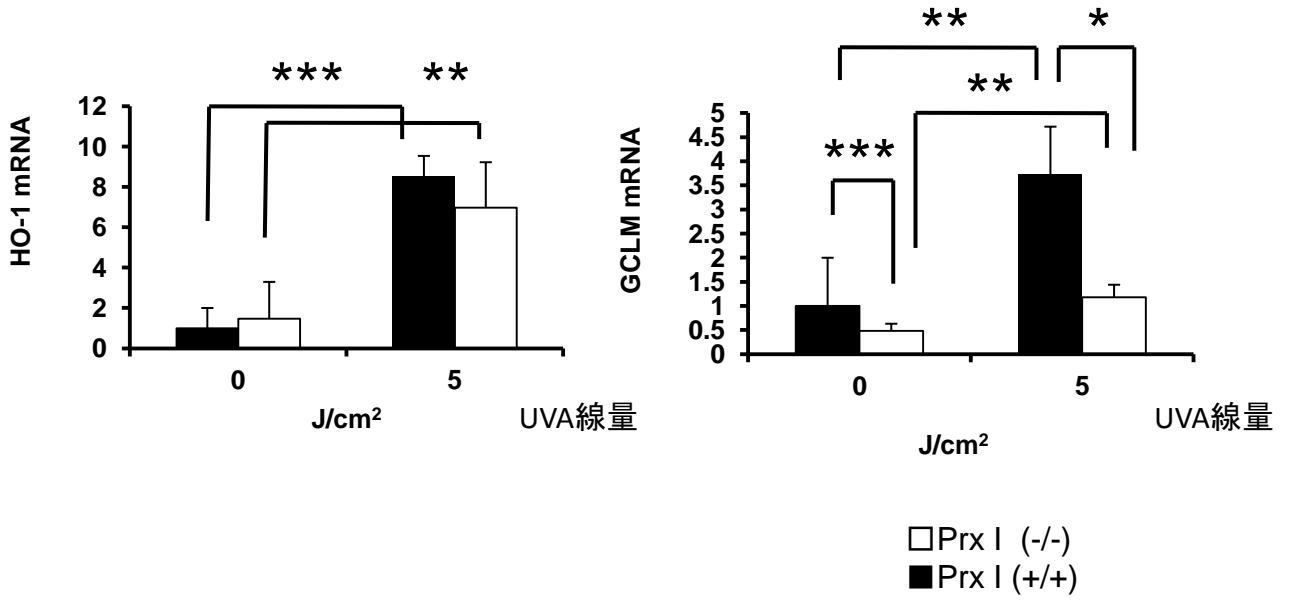
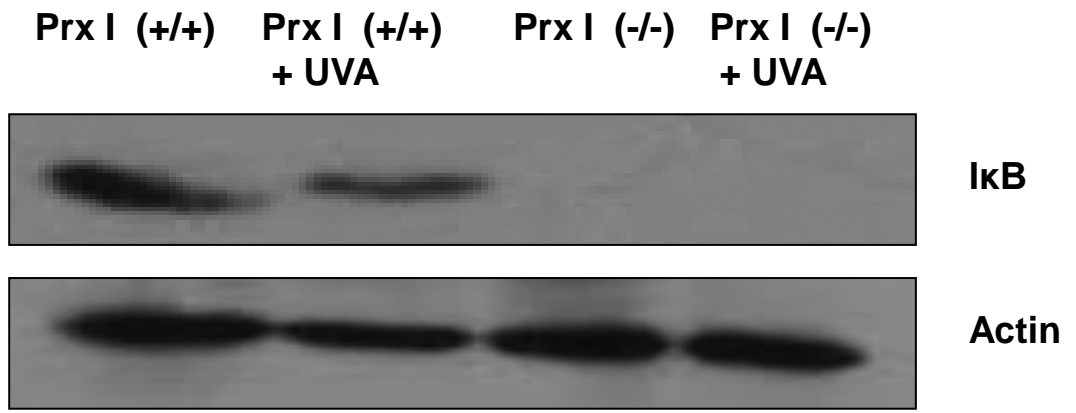
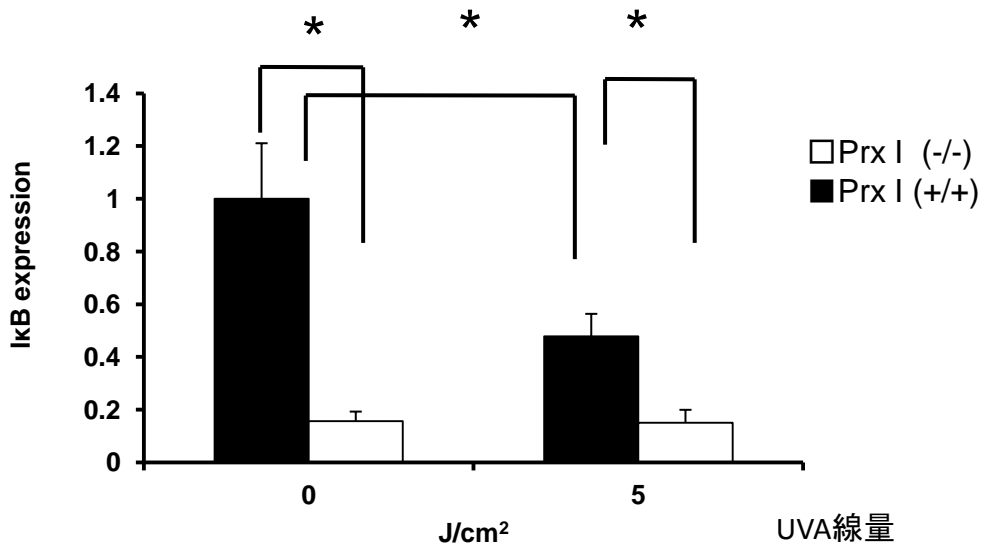
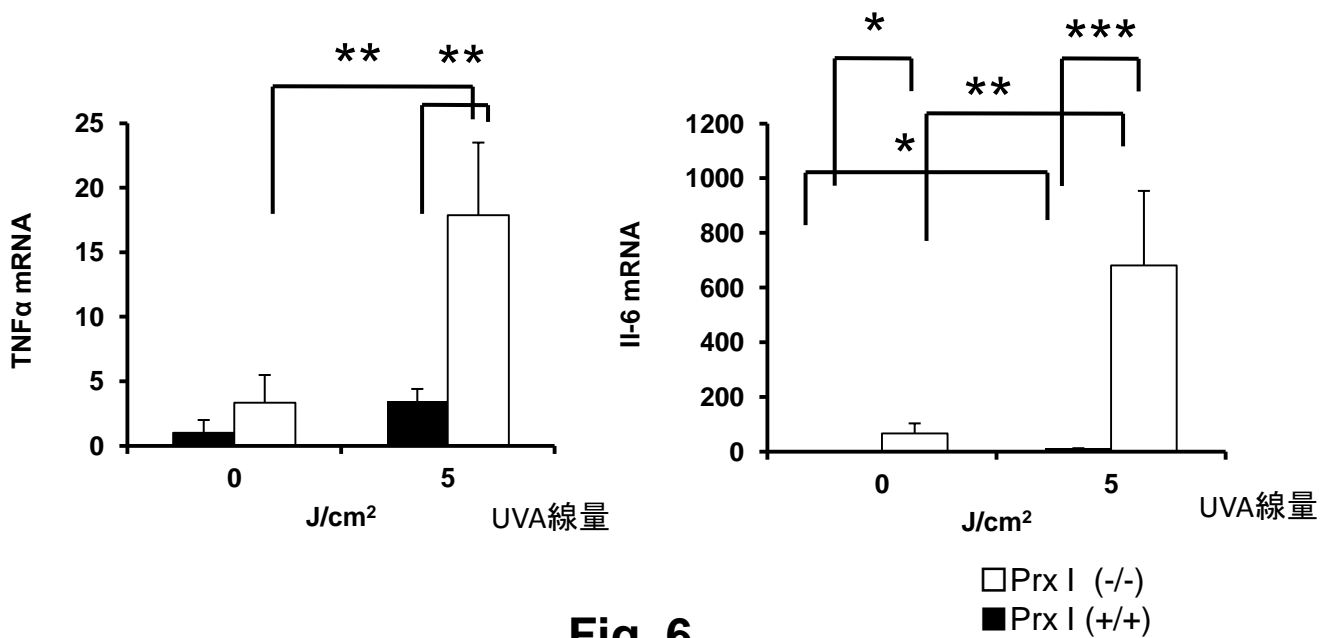


Fig. 5.

A**B****C****Fig. 6.**