

総 説

副腎皮質ミトコンドリアにおける チオレドキシシ・ペルオキシダーゼ酵素系

渡部省二

山口大学医学部保健学科基礎検査学講座 山口県宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8554)

Key words : チオレドキシシ, 活性酸素, ミトコンドリア, 副腎皮質, 電子伝達系

はじめに

ミトコンドリアは酸素呼吸によりATPを産生するオルガネラであり, 大量の酸素を消費している。酸素を使う酵素反応あるいは電子伝達系のような酸化還元反応では一部の酸素が部分的に還元された, いわゆる活性酸素を生じる。活性酸素は反応性が高く, さまざまの分子(核酸, タンパク質等)と反応しこれを破壊(不活性化)する。生物はこれらの活性酸素から身を守るさまさまの工夫をこらしている。生物がもつ活性酸素防御系には, アスコルビン酸, ビタミンE, グルタチオン等の低分子化合物とカタラーゼ等の酵素がある。活性酸素防御系の酵素としては, これまで, カタラーゼの他グルタチオン・ペルオキシダーゼ, スーパーオキシド・ディスムターゼ, チオレドキシシ還元酵素(以下TR)およびアスコルビン酸ペルオキシダーゼ等が知られていたが, 最近, チオレドキシシ(以下Trx)を電子供与体として過酸化物を還元する新しい酵素, チオレドキシシ・ペルオキシダーゼが見い出された。この一群の酵素は新しい遺伝子ファミリーを構成しており, ペルオキシレドキシシ(Peroxiredoxin, Prxと略記)と総称されている¹⁾。このファミリーに属する酵素はほとんどすべての生物に見い出され, また細胞内外の多くのコンパートメント(細胞質, ミトコンドリア, ペルオキシソーム, クロロプラスト, 血清)に存在している。我々はミトコンドリアのプロテアーゼを研究する過程でミトコンドリア型のペ

ルオキシレドキシシを見い出した。

ミトコンドリア・ペルオキシレドキシシ

SP-22発見の経緯 : 副腎皮質ミトコンドリアには他の臓器に比較して大量のATP依存性プロテアーゼが存在する^{2,3)}。このプロテアーゼの副腎皮質における生理的役割を調べる目的で, このプロテアーゼがどのようなタンパクを分解しているかを調べた。精製プロテアーゼを副腎皮質ミトコンドリア・ライセートとATP存在下にインキュベートすることによりいくつかのタンパクが分解されることがわかった。このうち一つはステロイドホルモン合成の最初のステップであるチトクロームP450_{scc}, また他のバンドはチトクロームに電子を渡す酵素系であるアドレノドキシシ還元酵素であった⁴⁾。

この他SP-22と名づけた分子量22,000の未知のタンパクがよく分解されていることがわかったのでこのタンパクを精製して, その全アミノ酸配列を決定した⁵⁾。また, SP-22・cDNAをクローニングし, 塩基配列を決定したところ, 精製タンパクのN末端側に62アミノ酸からなるミトコンドリア移行シグナルの特徴をそなえたプレ配列をもち, SP-22がミトコンドリア・タンパクであることが配列からも示された⁶⁾。

活性中心Cys : プロテイン・シーケンサによる全アミノ酸配列決定により精製SP-22は195アミノ酸より成っていることがわかったが, 47番目のアミノ酸のみはプロテイン・シーケンサで決定できなかった。このアミノ酸を含むペプチドの質量分析により,

平成14年3月4日受理

preSP-22	1	MAADAGRLPR	ASDTRHVSAT	PWGISASAAL	RFVASRRVCL	DNALWSGSDQ
MER5	1	MAAADAGRLW	SSVARHASAI	SRSISASIVL	RFVASRRVCL	DDILWSASAO
preSP-22	51	AKPAPSTSSS	YHAPAVTQHA	PYFKGTAVVS	GEFREISLDD	FKGKYLVLFF
MER5	51	GAAPSTSSS	YHAPAVTQHA	PYFKGTAVVN	SEPKREISLDD	FKGKYLVLFF
MSP23	51	MSS	GHKIGHFPF	NFKATAVMD	QTFHDSISE	YKGYVDFP
TSA	51		MVAQIKQKA	DFYKGVAVD	QYFQVSLDK	YKGYVDFP
AHPRC22	51		MGLNTRKI	KPFKNOAFKN	SEFVETTERD	TEGKWSVDFP
preSP-22	101	YPLDFTFVCP	TEIIAFSDKA	SFFHDVNCQV	VAVSVDSHFS	HLAWINTPRK
MER5	101	YPLDFTFVCP	TEIIAFSDKA	NFFHDVNCQV	VAVSVDSHFS	HLAWINTPRK
MSP23	101	YPLDFTFVCP	TEIIAFSDRA	DEFKRLNCQV	YGAQVDSHFC	HLAWINTPRK
TSA	101	YPLDFTFVCP	TEIIAFSDAA	KNFEEGGAQV	LFASVDSHFS	HLAWINTPRK
AHPRC22	101	YPLDFTFVCP	TEIAGDVADHY	EFKQKQGVV	YSVFDTHFF	DFAWSSSET
preSP-22	151	NGGLGHMNA	LSDLTKQIS	RDYGVLLSP	QIALRGLFII	DPNGVWRKLS
MER5	151	NGGLGHMNI	LSDLTKQIS	RDYGVLLSA	QIALRGLFII	DPNGVWRKLS
MSP23	151	QGGLGVNIP	LSDPKRIFA	QDYGVKADP	GISFRGLFII	DPNGVWRKLS
TSA	151	EGGLGVNIP	LSDLNHSLS	RDYGVLESP	QIALRGLFII	DPNGVWRKLS
AHPRC22	151	IAKIKYAMIS	DPTGALTRNF	DNMR--EDD	QIAPRATVIV	DPNGVWRKLS
preSP-22	201	VNDLPVGRSV	EFTLRVKAFA	QVFAH-GEV	CPANWTPESP	TIKPIPTASK
MER5	201	VNDLPVGRSV	EFTLRVKAFA	QVFAH-GEV	CPANWTPESP	TIKPIPTASK
MSP23	201	VNDLPVGRSV	DEITRVLQAF	QVFAH-GEV	CPASTRPESD	TIKPIPTASK
TSA	201	VNDLPVGRSV	DEITRVLQAF	QVFAH-GEV	CPANWTPESP	TIKPIPTASK
AHPRC22	201	VFAEGTSDA	SDLRXIKAF	QVFAH-GEV	CPAKWKEGA	TIKPIPTASK
preSP-22	251	YVFEKVNQ				
MER5	251	YVFEKVPD				
MSP23	251	YVFEKPK				
TSA	251	YVFEKANK				
AHPRC22	251	KI				

図1. SP-22とその類似タンパク質との比較。SP-22のアミノ酸配列と他のペルオキシレドキシシンとを比較した。TSA, Thiol-specific antioxidant; AHPRC22, Alkylhydroperoxide reductase C22 component. ▼成熟タンパクのN末端位置。

47番アミノ酸はCys-SO₂Hであることが強く示唆された(塩基配列からの翻訳ではCysである)。Cys-SO₂Hがタンパク質に存在して何かの機能をもっていることは考えにくく、また一方Cysは66番と168番にも存在し、これらはピリジルエチル化によりプロテイン・シーケンサで同定されているのでCysが酸化されたものとも考えられなかった。47番アミノ酸はCysそのものではなく、Cys-SOHではないかと推定された。Cys-SOHは不安定な化合物であるが、*Streptococcus*のNADHペルオキダーゼ中に安定に存在することが報告されており、SH ↔ SOHという酸化還元反応により酵素の酸化還元中心として機能している⁷⁾。これらのことからSP-22は47番アミノ酸を活性中心とする酸化還元酵素であろうと推定された。47番アミノ酸近傍の約15アミノ酸はSP-22と相同性をもつタンパクにおいてきわめてよく保存されている(図1)。

SP-22類似タンパク質: SP-22のアミノ酸配列はマウスのMER5というタンパクと92%、酵母のThiol specific antioxidant (TSA) と呼ばれるタンパクと60%の相同性をもっていた(図1)。MER5は赤白血病の細胞を種々の刺激で分化誘導したときに一過性に発現が増大するhousekeeping gene⁸⁾であり、この遺伝子のアンチセンスを発現させると分化誘導が抑えられることが報告されている⁹⁾。MER5もそ

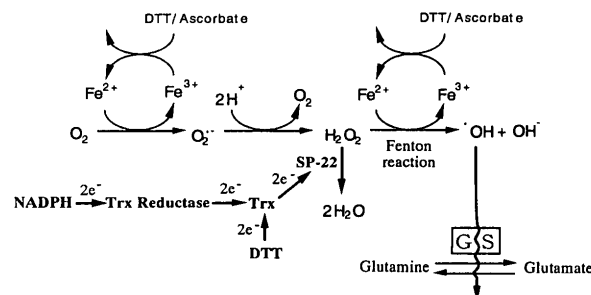


図2. 活性酸素によるグルタミン合成酵素の失活。鉄/DTTによる活性酸素の発生機序を示した。グルタミン合成酵素はヒドロキシラジカルにより失活すると考えられる。SP-22はNADPHよりチオレドキシシン還元酵素、チオレドキシシンを経由して電子を受け取り、過酸化水素を還元する。チオレドキシシンはDTTから電子を受け取ることもできる。DTT, ジチオスレイトール; Trx, チオレドキシシン; GS, グルタミン合成酵素。

のN末端側にSP-22のプレ配列と相同性をもつ配列をもっており、SP-22のマウスにおけるホモログと考えられる。また、TSAはグルタミン合成酵素(以下GS)の鉄/ジチオスレイトール(以下DTT)による失活を抑えるタンパクとして見出された¹⁰⁾もので、鉄/アスコルビン酸による失活に対しては効果がないことからこの名がある。

鉄/DTTまたは鉄/アスコルビン酸は図に示すように酸素を還元し活性酸素を発生させる(図2)。まず、DTT(またはアスコルビン酸)は鉄を還元し2価鉄とし、2価鉄は溶存酸素を還元しスーパーオキシドを発生させる。スーパーオキシドは不均化反応により過酸化水素を生じる。過酸化水素は再び鉄/DTTにより還元され極めて反応性の高いヒドロキシラジカルを発生する(Fenton反応)。このヒドロキシラジカルがGSを始めとして多くの生体高分子に傷害を与えると考えられている。この時TSAが存在するとどこかのステップで活性酸素がトラップされ、GSの失活が阻止される。TSAは、その活性にDTTのようなチオールが必要であることから、DTTは電子供与体として作用していること、即ち、TSAはDTTから電子を受け取り、活性酸素を還元している可能性が示唆された。Chaeら¹¹⁾は酵母においてTrxがTSAの電子供与体として機能していることを突き止め、Trxを再還元する酵素としてチオレドキシシン還元酵素(TR)を精製し、そのcDNAをクローニング・配列決定した。そしてTSAはチオレドキシシン依存性パーオキシド還元

mt-Trx	1	MAQRLLLRRF	10	LTSIISGKPS	20	QSRWAPVAGR	30	ALKTPOYSFG	40	YLTVTFSQAR
mt-Trx	51	SIYTRVCST	60	TFNIQDGPDF	70	QDRVNSETP	80	VVDFPACWC	90	GPCRILGERL
Human Trx	51	RV	60	RRESKAFRC	70	BALDAAGDRL	80	VVDFPACWC	90	GPCRILGERL
Rat Trx	51	RV	60	RRESKAFRC	70	BALDAAGDRL	80	VVDFPACWC	90	GPCRILGERL
E.coli Trx	51	MSD	60	RHSLLTDDSF	70	DTDVAKRAGGA	80	IVDFPACWC	90	GPCRILGERL
mt-Trx	101	EKVVAQKQCK	110	VVAKAVDIDD	120	HDLAAPSEV	130	SAVPTVLAMK	140	NGQVWDRVGC
Human Trx	101	FHSLSEKYSN	110	VVPEVDVDD	120	CQDVASECEV	130	KCMPTFOFFK	140	KGQKVGEPFG
Rat Trx	101	FHSLCDKYSN	110	VVPEVDVDD	120	CQDVADCEV	130	KCMPTFOFFK	140	KGQKVGEPFG
E.coli Trx	101	DEIADKQCK	110	LTVAKLNIDQ	120	NPQTAPRYGI	130	RGIPTELLPK	140	NGEVAATRVG
mt-Trx	151	IKDFQOLEAR	160	LKKKIG						
Human Trx	151	ANKKLEAT	160	INELV						
Rat Trx	151	ANKKLEAT	160	IT						
E.coli Trx	151	LSKGLKCF	160	LDANLA						

図3. ミトコンドリア・チオレドキシソ (mt-Trx) と他のチオレドキシソとの比較。

mt-Trxのアミノ酸配列をヒトとラット細胞質のTrxおよび大腸菌のTrxと比較した。▼成熟タンパクのN末端位置。

酵素 (チオレドキシソ・ペルオキシダーゼ) であることが明らかになった。

SP-22とその補助因子mt-TrxによるTSA活性：一方、我々はSP-22がGS失活阻止活性をもっているかどうか調べたところ、精製SP-22では活性は検出されなかったが、精製の最初のステップであるDEAE-イオン交換カラムからのSP-22を含む溶出液では活性が認められた¹²⁾。我々は、SP-22の活性発現にはもうひとつ別の因子が必要で、この因子が精製の過程で除かれたため精製SP-22で活性が検出されなかったのではないかと考え、ミトコンドリア粗抽出液をゲル濾過で分画し、その各フラクションについて精製SP-22存在下にGS失活阻止活性を測定した。その結果、分子量1~2万付近に精製SP-22に依存したGS失活阻止活性が検出された。この活性物質を精製し、そのアミノ酸配列およびcDNAのヌクレオチド配列を決定したところ、この因子は-Cys-Gly-Pro-Cys-というTrxに共通の配列をもっていることがわかった。ヒト細胞質Trxとラット細胞質Trxは90%のホモロジーをもっているが、我々が見出した新しいTrxはヒトおよびラット細胞質Trxと約30%しかアミノ酸配列の相同性がなく、まったく新しいタイプのTrx (ミトコンドリア・チオレドキシソ=mt-Trx) であった¹³⁾。大腸菌Trxとの相同性は約27%であった。精製mt-Trxアミノ酸配列とcDNAからの翻訳アミノ酸配列を比較するとSP-22の場合と同様にN末端に59アミノ酸から成るミトコンドリア移行シグナルと思われるプレ配列をもっていた (図3)。

mt-TrxあるいはSP-22単独では全くGSの保護活性はなかった。Trxは活性部位に二つのシステインを

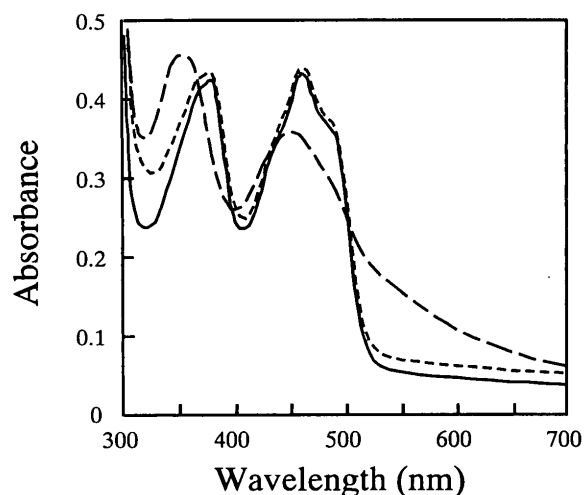


図4. ミトコンドリア・チオレドキシソ還元酵素 (mt-TR) のUV/Vis吸収スペクトル。

精製mt-TRのUV/Vis吸収スペクトルを実線で示した。破線は、酵素濃度の2倍のNADPHを加えた後の、また、点線はさらにNADPH濃度の3倍のアロキサンを加えた後のスペクトルを示す。

もち酸化還元中心として働いている。酸化型のTrxはDTTなどのSH化合物で還元され得るので、SP-22はDTTにより還元されたTrxから電子を受け取り、活性酸素種を還元する還元酵素であろうと考えられた。SP-22はDTTでは還元されないので、SP-22単独では活性をもたないものと思われる (図2)。一方、TSAはTrxが存在しなくてもDTTが存在すれば活性をもつので、DTTにより直接還元されるものと思われる。

ミトコンドリア・チオレドキシソ還元酵素

細胞質のTrxはNADPHからTRにより還元されるので、ミトコンドリア内でもTRがTrxを還元していると考えられる。そこで次にミトコンドリアからTRを精製することを試みた。細胞質のTRは5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) を電子受容体とすることができるので、この活性を指標にしてウシ副腎皮質ミトコンドリア分画よりTR (DTNB還元酵素) を精製した¹³⁾。精製の最後のステップはNADP (H) 依存性の酵素を吸着するアフィニティカラムである2',5'-ADPアガロースを用い、NADPHで溶出した。溶出直後の精製酵素は黄土色を呈していたが、透析あるいは濃縮の間に徐々にあざやかな黄色に変化した。このことはこの酵素がフラビン酵

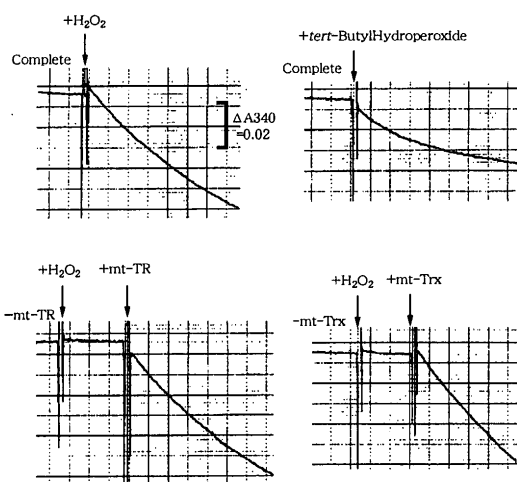


図5. SP-22/mt-Trx/mt-TR/NADPHによる過酸化水素水素の還元。

三つの精製タンパク (SP-22, mt-Trx, mt-TR) および NADPH存在下に過酸化水素によるNADPHの酸化 (340nmの吸光度変化) を測定した。

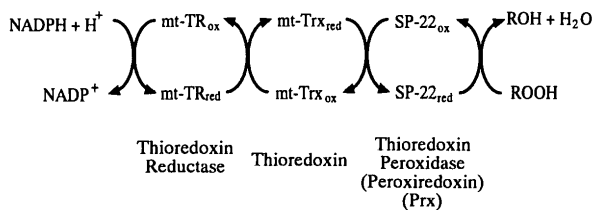


図6. チオレドキシンのペルオキシダーゼ反応系スキーム。

素であり、精製の最後のステップで用いたNADPHにより還元型となり、その後徐々に酸素により自動酸化したことを示唆している。図4に精製酵素の吸収スペクトルを示す。実線は黄色に変化した酵素(酸化型)、点線はNADPHを加えて還元した後のスペクトルである。還元後さらに過剰量のアロキサンを加えると再び酸化型のスペクトルに戻った。これらのスペクトルは細胞質のTR、グルタチオン還元酵素(以下GR)、リポアミド・デヒドロゲナーゼ等のジスルフィド還元酵素のスペクトルと一致する。最も変化の大きい463nmと540nm吸光度変化を測定することによりNADPHによる酸化還元滴定を行い、酵素の濃度を求めた。その結果から463nmにおける分子吸光係数を計算すると11,500という値が得られた。この値は他のフラボプロテインの酸化型の分子吸光係数とほぼ一致する。精製酵素のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動による分子量は約56,000、ゲル濾過では約100,000であったので、ホモ

mt-TR	1	MAALRGAAAR	20	FRGRAPGGAR	30	GAAGRCQYDL	40	LVIGGSGGL	50	AAAKEAAQLG
human TR	1	MAALRGAAAR	20	FRGRAPGGAR	30	GAAGRCQYDL	40	LVIGGSGGL	50	AAAKEAAQLG
human GR	1	MAALRGAAAR	20	FRGRAPGGAR	30	GAAGRCQYDL	40	LVIGGSGGL	50	AAAKEAAQLG
mt-TR	51	KKAVLDYDE	60	PSQGTTRNGI	70	GGTCVNVGCI	80	PKKLMHOAAL	90	LGGMTRDAPH
human TR	51	KKAVLDYDE	60	PSQGTTRNGI	70	GGTCVNVGCI	80	PKKLMHOAAL	90	LGGMTRDAPH
human GR	51	ARAAVVE---	60	-----SHKI	70	GGTCVNVGCV	80	PKKVMNTAV	90	HSEFMHHDAD
mt-TR	101	YGVGVAOAPH	110	SWATLADAV	120	QNHVKSLLNG	130	HRITLQDRKV	140	KIENVKASAV
human TR	101	YGVGVAOAPH	110	SWATLADAV	120	QNHVKSLLNG	130	HRITLQDRKV	140	KIENVKASAV
human GR	101	YGVGVAOAPH	110	SWATLADAV	120	QNHVKSLLNG	130	HRITLQDRKV	140	KIENVKASAV
mt-TR	151	QHTVVCQYK	160	CGEETLLSAR	170	NIHIAITGGRP	180	RYPT--HTEG	190	ALVYGTISDD
human TR	151	QHTVVCQYK	160	CGEETLLSAR	170	NIHIAITGGRP	180	RYPT--HTEG	190	ALVYGTISDD
human GR	151	DKPTIEVSG	160	KK---VFAP	170	NIHIAITGGRP	180	STPHESSIQG	190	ASL-GTISDG
mt-TR	201	LPVLEKSPGK	210	TLVVGASVVA	220	LECAGLITGL	230	GLDTVMVRS	240	VPLEAFDQDM
human TR	201	LPVLEKSPGK	210	TLVVGASVVA	220	LECAGLITGL	230	GLDTVMVRS	240	VPLEAFDQDM
human GR	201	FPVLEKSPGK	210	SVLVGAGVTA	220	VEVAGLISAL	230	GSKLSLMEH	240	DKVLRSPDSS
mt-TR	251	ASLVTHWAG	260	HTTRILRGCA	270	GRVKEVLPQ	280	Q---RVTWV	290	DLTSDRDKAG
human TR	251	ASLVTHWAG	260	HTTRILRGCA	270	GRVKEVLPQ	280	Q---RVTWV	290	DLTSDRDKAG
human GR	251	ISTNCTEEL	260	NAGVEVLKES	270	QVLEVKLTL	280	GLVEMVAV	290	PGRLPVMTMI
mt-TR	301	TFDVLVATG	310	RVPEIASLNI	320	SKAGVHTNPV	330	TGKLVVDAGE	340	TISVPHIYAT
human TR	301	EYNTVLAIG	310	RDACTRIKGL	320	BTVGVKINEK	330	TGKLVVDAGE	340	QINVPYIYAT
human GR	301	PDVDCILWAI	310	GRVPNTKOLS	320	LNKLGQTDD	330	RGHIVDFEQ	340	NINWKGVIYAV
mt-TR	351	GVVLEGRPEL	360	TPDIAI	370	SGRTS	380	DLW-DYSSVP	390	ITVFTPLEVQ
human TR	351	GVVLEGRPEL	360	TPDIAI	370	SGRTS	380	DLW-DYSSVP	390	ITVFTPLEVQ
human GR	351	GVVLEGRPEL	360	TPDIAI	370	SGRTS	380	DLW-DYSSVP	390	ITVFTPLEVQ
mt-TR	401	CVGLSEBAV	410	ARHGEEVEV	420	WHAFYKPLEF	430	IVPORDASCG	440	VHKNVCLREP
human TR	401	CVGLSEBAV	410	ARHGEEVEV	420	WHAFYKPLEF	430	IVPORDASCG	440	VHKNVCLREP
human GR	401	TVGLTEDEAT	410	HYVTEENKXT	420	YTSYFPMYH	430	AVTKRKT-CK	440	VKMKVGNKE
mt-TR	451	PQLVLRHPT	460	GNVAGEVPSQ	470	FALCIKCGAS	480	YQQLNRVYGI	490	HPTCAEYVAK
human TR	451	NRVNGEIVB	460	GNVAGEVPSQ	470	FALCIKCGAS	480	YQQLNRVYGI	490	HPTCAEYVAK
human GR	451	NRVNGEIVB	460	GNVAGEVPSQ	470	FALCIKCGAS	480	YQQLNRVYGI	490	HPTCAEYVAK
mt-TR	501	LRISKRSGLD	510	PTVTGCGU						
human TR	501	LRISKRSGLD	510	PTVTGCGU						
human GR	501	LRISKRSGLD	510	PTVTGCGU						

図7. チオレドキシ還元酵素(ミトコンドリアおよび細胞質)とグルタチオン還元酵素とのアミノ酸比較。

mt-TRのアミノ酸配列とヒト・チオレドキシ還元酵素(TR)およびヒト・グルタチオン還元酵素(GR)と比較した。▼成熟タンパクのN末端位置。

ダイマーであると思われる。この酵素は以下に示すように細胞質のTRとは異なるタンパクであるのでmt-TRと呼ぶ。

SP-22/mt-Trxとmt-TR/NADPHの反応のカップリング: mt-TRの精製ではもっぱらDTNBを電子受容体として用いたが、次にmt-TRがmt-Trxを還元し、SP-22の電子供与系として機能し得るかどうかを調べた。精製した三つのタンパク (SP-22, mt-Trx, mt-TR) にNADPHと基質として過酸化水素(またはtert-butylhydroperoxide)を加えて、NADPHの酸化(340nmの吸光度変化)を測定した。図5に見られるように過酸化水素(またはtert-butylhydroperoxide)を加えるとNADPHが酸化されたが、この反応は三つのタンパクのうちの一つを除いても見られなかった。またNADPHのかわりにNADHを加えても見られなかった。この結果およびこれまでの結果を総合し、図6に示す電子伝達系が副腎皮質ミトコンドリアに存在することが証明された。細胞質TRとの比較: 図7にmt-TR・cDNA塩基配

Human, cytosolic

```
AGCATCCTCCAGGCTGGCTGCTGAGGTTAAGCCCCAGTG
S I L Q A G C Sec G *
491                               499
```

Bovine, mitochondrial

```
GACCCACAGTAACCGGCTGCTGAGGCTAGGCGGCATC
D P T V T G C Sec G *
503                               511
```

図8. mt-TRとヒト細胞質TRのC末端アミノ酸配列と塩基配列。

セレノシステイン近傍のアミノ酸配列と対応するmRNA塩基配列を示す。Sec, セレノシステイン; * 終止コドン。

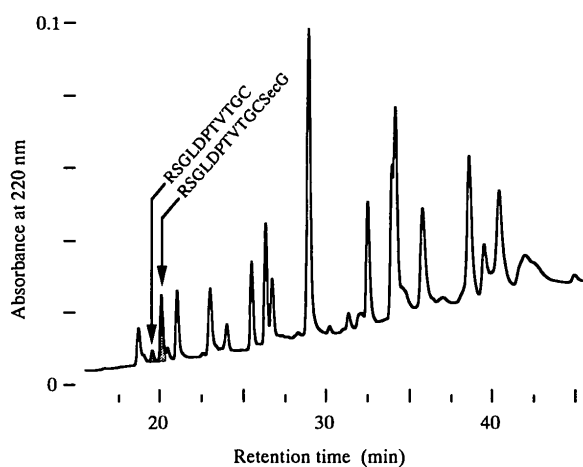


図9. mt-TRの分解産物(ペプチド)のHPLCによる分離。精製mt-TRをエンドロテイナーゼLys-Cで切断後, そのフラグメントをHPLCで分離した。

列から翻訳したアミノ酸配列とヒト細胞質TRおよびヒトGRのアミノ酸配列との比較を示す。ウシmt-TRとヒト細胞質TRとの相同性は54%, ウシmt-TRとヒトGRとの相同性は34%, またヒト細胞質TRとヒトGRとの相同性は34%であった。一方ヒト細胞質TRとウシ細胞質TRは93%の相同性をもっており, mt-TRは細胞質TRとは異なる新しいタイプのTRであることがわかった。FADおよびNADPH結合部位また酸化還元中心として機能している二つのシステインを含む領域の配列が三つのタンパクで保存されている。

セレノシステインの同定: 1996年, Tamura and Stadtman¹⁴⁾ はヒト肺adenocarcinoma細胞においてセレンを含むタンパクを精製し, これがTRであることを見出した。セレノシステインは通常は終止コドンとして用いられるTGAにコードされている¹⁵⁾。ヒトのTR(細胞質)ではセレノシステインはC末

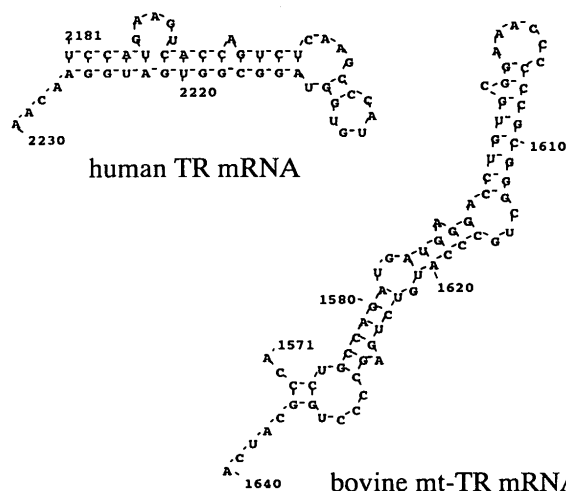


図10. mt-TR mRNAのSelenocysteine Insetion Sequence (SECIS)。

mt-TRとヒト細胞質チオレドキシソ還元酵素mRNAの3'非翻訳領域に見い出されるSECISと考えられる配列とその二次構造を示す。

端から2番目に存在し, そのmRNAではTGAに続きグリシンのコドンがあり, 次にもう一つの終止コドンであるTAAが存在する(図8)。ウシmt-TRのmRNAでも同様であったのでmt-TRもセレノシステインを含むであろうと考えられた。そこでセレノシステインの存在を確認するために, 精製mt-TRをリジン特異的に切断するプロテアーゼで消化し, フラグメントをHPLCで分画後(図9), そのピークをTOF-MSで分析した。その結果20.3minのピークが配列から予想されるセレノシステインを含むC末端ペプチドの分子量と一致した。このペプチドをプロテイン・シーケンサで配列決定したところ, セレノシステインを含めて期待通りの配列が得られた。

さらに19.5minのピークは末端の二つのアミノ酸Sec-Glyを欠くペプチドであることがTOF-MSおよびプロテイン・シーケンサにより証明された。すなわちTGAがセレノシステインに翻訳されず, その本来の役割である終止コドンとして機能し, C末端が2残基欠けている酵素分子が一部(約20%)存在することがわかった。

TGAが終止コドンとして機能するか, セレノシステインに翻訳されるかは, Selenocysteine Insertion Sequence (SECIS) と呼ばれる配列がそのmRNAの3'非翻訳領域に存在するかどうかで決定される。SECISは一般にステム-ループ構造をとり,

	Small TR	Large TR
分布	原核生物 (古細菌を含む) および酵母	一部の高等真核生物 (酵母等) を除く真核生物 (ミトコンドリアを含む)
分子量	~35K	~55K
酸化還元中心	FAD CXXC	FAD CXXXXC CysSec
Redox active Cysの位置	NADPHドメイン内	FADドメイン内

表1. 二つのタイプのチオレドキシ還元酵素

その根元部分にAUGA, ループ部分にAAAという配列をもっていることが知られている¹⁶⁾. ウシmt-TRおよびヒト細胞質のTR・mRNAの3'非翻訳領域には図に示すような配列が存在し, これがSECISであると考えられる (図10).

進化的考察: TRはバクテリアからヒトまでほとんどすべての生物に存在するが, これらは二つのタイプに分けられる (表1). 古細菌を含む原核生物のすべておよび酵母など一部の高等真核生物のTR (small TR, 分子量35K位) とその他の真核生物のTR (large TR, 分子量50K~60K位) である. 共にNADPHを電子供与体とし, Trxを還元するフラビン酵素で, 接近した二つのシステインが活性部位 (酸化還元中心) を形成している. しかしこの二つのタイプのTRはドメイン構造が異なっており, アミノ酸配列の相同性もほとんどない. 活性部位の二つのシステインはsmall TRでは二つのアミノ酸をはさんでNADPHドメインに存在するのに対して, large TRでは4つのアミノ酸をはさんでFADドメインに存在する. 最も大きな違いはlarge TRは第三の酸化還元中心としてセレノシステインをもつことである. これら二つのタイプの酵素は独自の過程を経て同じ活性をもつ酵素に進化したものと考えられている (収斂進化)¹⁷⁾.

一方large TRとホモロジーをもつGRは, バクテリアからヒトまですべて同じファミリーに属しており, large TRは真核生物が分岐した後, 比較的早い時期にGRから分岐し, 進化してきたものと思われる.

ミトコンドリアは, 古細菌由来の真核生物の祖先となった細胞に原核生物が細胞内共生した進化してきたものと考えられている. ミトコンドリアのTRが細菌型のsmall TRではなくlarge TRであったということは, large TRがGRから分岐, 進化した後,

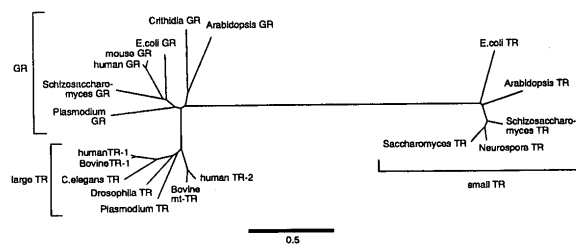


図11. チオレドキシ還元酵素およびグルタチオン還元酵素遺伝子の系統樹.

種々の生物のチオレドキシ還元酵素 (TR) およびグルタチオン還元酵素 (GR) アミノ酸配列をClustal Wにより解析し, 系統樹を作成した. スケールバーは1サイト当りのアミノ酸置換数を表す. TR-1およびTR-2はそれぞれ細胞質およびミトコンドリアのTRである.

細胞内共生した細菌がもっていたTR遺伝子はlarge TR遺伝子に置き換えられたことを示している. ミトコンドリアTRと細胞質TRは, TRとGRが分岐した後, 比較的早い時期に分岐したという結果が系統樹分析により得られている (図11).

ペルオキシレドキシ・ファミリー

SP-22と相同性をもつタンパクはバクテリアからヒトまでさまざまな生物から精製, またはそのcDNAがクローニングされており, それらはアミノ酸配列から6つのグループに分類されている (表2). Prx I, II, VIは細胞質に, Prx IIIはミトコンドリア・マトリックスに局在している. Prx IVはN末端に分泌シグナルをもち, 血清中に見い出される. また, Prx Vはミトコンドリア移行シグナルをもっているものとペルオキシゾーム移行シグナルをもっているものがあり, これらのオルガネラに局在するものと思われる. このうちPrx I~VはTrxを電子供与体している. Prx VはTrxの他にGSHも電子供与体になりうる. Prx VIはin vitroではDTTが電子供与体になることがわかっているが, in vivoにおけ

タイプ	局在	電子供与体	ペルオキシレドキシ
Prx I	細胞質	Trx	PAG, NKEFA, MSP23, OSF3, HBP23
Prx II	細胞質	Trx	TSA, NKEFB
Prx III	ミトコンドリア	Trx	SP-22, MER5
Prx IV	分泌タンパク	Trx, GSH	AOE372
Prx V	ペルオキシゾーム ミトコンドリア	Trx	PMP20, AOEB166
Prx VI	細胞質	(DTT)	1-Cys Prx

表2. ペルオキシレドキシ (Prx) ファミリー

る電子供与体は不明である。

Prx I~Vでは酸化還元活性に関与している二つのシステイン (SP-22ではCys-47とCys-168) があり、その周辺のアミノ酸配列がよく保存されている。Prx VIではC末端側のCys共通配列が存在せず、1-Cys ペルオキシレドキシシンと呼ばれている¹⁸⁾。C末端側のCysはTrxから電子を受け取るために必須であるためPrx VIはTrxを電子供与体とすることができない。なお、最近、他のPrxのC末端側Cys配列との相同性はないが、活性に関与したCysがC末端側に見い出されており、Prx VIでも二つのCysが反応に必要なようである。

SP-22の生体内における役割

我々は副腎皮質においてSP-22 (Prx III) を見出したが、副腎皮質には他の臓器に比べてこのPrxが圧倒的に大量に存在している。その量はウシ副腎皮質では全細胞タンパクの約0.3%、ミトコンドリア・タンパクの約1%、またミトコンドリア・マトリックスあたりでは5%近くにも達する⁵⁾。SP-22だけでなく、SP-22の電子供与系酵素であるTrx/TRが最も多く存在する臓器も副腎皮質である。

副腎皮質はステロイド・ホルモン産生臓器であり、ステロイド合成系の水酸化酵素はミトコンドリアとERに局在している。これらは酸素を基質とする一原子酸素添加酵素である。また、これらの水酸化酵素に電子を渡すアドレノドキシシン還元酵素もミトコンドリアに存在する。これらの酵素は大量の活性酸素を発生するため、副腎皮質は脂質過酸化活性の高い臓器として知られている¹⁹⁻²¹⁾。チオレドキシシン・ペルオキシダーゼ酵素系は副腎皮質ミトコンドリアで発生する活性酸素を処理するために大量に存在しているものと考えられる。またもう一つのステロイド・ホルモン産生臓器である睾丸ではその組織切片においてステロイド合成細胞であるライディッヒ細胞が周辺の細胞に比べて抗SP-22抗血清で強く染色され、ステロイド・ホルモンとSP-22との関係が示唆されている。

Prxはさまざまな細胞からさまざまな経緯で発見されている。例えば、SP-22のマウス・ホモログであるMER5⁸⁾は赤白血球細胞を分化誘導した時に一過性に発現が増加するmRNAとして、PAG (Prx I)²²⁾

は細胞増殖と関係した因子として、NKEF²³⁾はナチュラルキラー細胞の活性化因子として、また、MSP23²⁴⁾は酸化ストレスにより誘導されるタンパク質として発見されている。大量の活性酸素はDNA、タンパク質等に重大な傷害を与えるが、少量の活性酸素は、シグナル伝達に関与しており、むしろ必要不可欠な生理活性物質であることが最近明らかになってきている²⁵⁻²⁷⁾。細胞内の活性酸素(過酸化水素)の濃度調節にPrxはきわめて重要な役割をもっている。種々のPrx発見の経緯からもわかるように、チオレドキシシン・ペルオキシダーゼ系は、細胞増殖、アポトーシス、がん等に関与していることがわかってきている。チオレドキシシン・ペルオキシダーゼ酵素系の過剰発現はアポトーシスを抑制し²⁸⁻³⁰⁾、がん細胞で増加している³¹⁻³³⁾ことが報告されている。過酸化水素は生体膜を通過できるのでミトコンドリアに局在する酵素であっても細胞増殖・分化あるいはアポトーシスに関与していることは十分に考えられる。

参考文献

- 1) Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* 2001; 52: 35-41.
- 2) Watabe S, Kimura T. ATP-dependent protease in bovine adrenal cortex. Tissue specificity, subcellular localization, and partial characterization. *J Biol Chem* 1985; 260: 5511-5517.
- 3) Watabe S, Kimura T. Adrenal cortex mitochondrial enzyme with ATP-dependent protease and protein-dependent ATPase activities. Purification and properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 14498-14504.
- 4) Watabe S, Hara T, Kohno H, Hiroi T, Yago N, Nakazawa T. In vitro degradation of mitochondrial proteins by ATP-dependent protease in bovine adrenal cortex. *J Biochem* 1993; 113: 672-676.
- 5) Watabe S, Kohno K, Kouyama H, Hiroi T, Yago N, Nakazawa T. Purification and characterization of a substrate protein for

- mitochondrial ATP-dependent protease in bovine adrenal cortex. *J Biochem* 1994; **115**: 648-654.
- 6) Hiroi T, Watabe S, Takimoto K, Yago N, Yamamoto Y, Takahashi SY. The cDNA sequence encoding bovine SP-22, a new defence system against reactive oxygen species in mitochondria. *DNA Seq* 1996; **6**: 239-242.
 - 7) Claiborne A, Miller H, Parsonage D, Ross RP. Protein-sulfenic acid stabilization and function in enzyme catalysis and gene regulation. *Faseb J* 1993; **7**: 1483-1490.
 - 8) Yamamoto T, Matsui Y, Natori S, Obinata M. Cloning of a housekeeping-type gene (MER5) preferentially expressed in murine erythroleukemia cells. *Gene* 1989; **80**: 337-343.
 - 9) Nemoto Y, Yamamoto T, Takada S, Matsui Y, Obinata M. Antisense RNA of the latent period gene (MER5) inhibits the differentiation of murine erythroleukemia cells. *Gene* 1990; **91**: 261-265.
 - 10) Kim K, Kim IH, Lee KY, Rhee SG, Stadtman ER. 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* 1988; **263**: 4704-4711.
 - 11) Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 1994; **269**: 27670-27678.
 - 12) Watabe S, Hasegawa H, Takimoto K, Yamamoto Y, Takahashi SY. Possible function of SP-22, a substrate of mitochondrial ATP-dependent protease, as a radical scavenger. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; **213**: 1010-1016.
 - 13) Watabe S, Hiroi T, Yamamoto Y, Fujioka Y, Hasegawa H, Yago N, Takahashi SY. SP-22 is a thioredoxin-dependent peroxide reductase in mitochondria. *Eur J Biochem* 1997; **249**: 52-60.
 - 14) Tamura T, Stadtman TC. A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; **93**: 1006-1011.
 - 15) Stadtman TC. Selenocysteine. *Ann Rev Biochem* 1996; **65**: 83-100.
 - 16) Low SC, Berry MJ. Knowing when not to stop: Selenocysteine incorporation in eukaryote. *Trends Biochem Sci* 1996; **21**: 203-208.
 - 17) Kuriyan J, Krishna TS, Wong L, Guenther B, Pahler A, Williams CH, Jr., Model P. Convergent evolution of similar function in two structurally divergent enzymes. *Nature* 1991; **352**: 172-174.
 - 18) Kang SW, Baines IC, Rhee SG. Characterization of a mammalian peroxidase that contains one conserved cysteine. *J Biol Chem* 1998; **273**: 6303-6311.
 - 19) Hornsby PJ, Crivello JF. The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 1: A background review. *Mol Cell Endocrinol* 1983; **30**: 1-20.
 - 20) Hornsby PJ, Crivello JF. The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. Part 2. *Mol Cell Endocrinol* 1983; **30**: 123-147.
 - 21) Hanukoglu I, Rapoport R, Weiner L, Sklan D. Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage) system. *Arch Biochem Biophys* 1993; **305**: 489-498.
 - 22) Prosperi MT, Ferbus D, Karczinski I, Goubin G. A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins. *J Biol Chem* 1993; **268**: 11050-11056.
 - 23) Shau H, Huang ACJ, Faris M, Nazari R, de Vellis J, W. C. Thioredoxin peroxidase (Natural killer enhancing factor) regulation of activator protein-1 function in endothelial

- cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; **249**: 683-686.
- 24) Ishii T, Yamada M, Sato H, Matsue M, Taketani S, Nakayama K, Sugita Y, Bannai S. Cloning and Characterization of a 23-kDa Stress-Induced Mouse Peritoneal Macrophage Protein. *J Biol Chem* 1993; **268**: 18633-18636.
- 25) Lo YYC, Wong JMS, Cruz TF. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* 1996; **271**: 15703-15707.
- 26) Monteiro HP, Stern A. Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free Radic Biol Med* 1996; **21**: 323-333.
- 27) Ginn-Pease ME, Whisler RL. Redox signals and NF-kappaB activation in T cells. *Free Radic Biol Med* 1998; **25**: 346-361.
- 28) Baker A, Payne CM, Briehl MM, Powis G. Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1997; **57**: 5162-5167.
- 29) Ichimiya S, Davis J, G., O'Rourke DM, Katsumata M, Greene MI. Murine thioredoxin peroxidase delays neuronal apoptosis and is expressed in areas of the brain most susceptible to hypoxic and ischemic injury. *DNA Cell Biol* 1997; **16**: 311-321.
- 30) Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30615-30618.
- 31) Yanagawa T, Ishikawa T, Ishii T, Tabuchi K, Iwasa S, Bannai S, Omura K, Suzuki H, Yoshida H. Peroxiredoxin I expression in human thyroid tumors. *Cancer Lett* 1999; **145**: 127-132.
- 32) Chang JW, Jeon HB, Lee JH, Yoo JS, Chun JS, Kim JH, Yoo YJ. Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **289**: 507-512.
- 33) Noh DY, Ahn SJ, Lee RA, Kim SW, Park IA, Chae HZ. Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer. *Anticancer Res* 2001; **21**: 2085-2090.

Thioredoxin Peroxidase System in Adrenocortical Mitochondria

Shoji WATABE

*Basic Laboratory Sciences, Faculty of Health Sciences,
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami-Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8554, Japan*

SUMMARY

We identified SP-22 that had been found as a substrate protein for mitochondrial ATP-dependent protease to be a thioredoxin peroxidase in adrenocortical mitochondria. It catalyzes thioredoxin dependent reduction of peroxides including hydrogen peroxide. Adrenocortical mitochondria also contain thioredoxin and its reductase different from the cytosolic counterparts. We purified these three mitochondrial proteins and determined nucleotide sequences of their cDNA. These three proteins constructed a new electron transport system in mitochondria to reduce peroxides, protecting mitochondrial components such as enzymes and nucleic acids from damage by reactive oxygen species. Adrenocortical mitochondria contain several hydroxylases for steroids and an electron-donating system for them (adrenodoxin and adrenodoxin reductase). These oxidoreductases along with the mitochondrial respiratory chain vigorously generate reactive oxygen species and the adrenal cortex is known to be active in lipid peroxidation. Therefore, the thioredoxin peroxidase system may play a crucial role in maintaining mitochondrial function.