

# 生体膜を活性酸素から守るペルオキシレドキシン: 生理生化学と応用開発

阪井 康能

(京都大学大学院 農学研究科応用生命科学専攻)

ペルオキシソーム(Ps) は、過酸化水素を発生するオキシダーゼを持っていて、極めて酸化ストレスの高いオルガネラであり、Ps からの活性酸素種の生成・Ps 増殖・発ガン性の密接な相互関係も指摘されている。本研究により、Ps には、従来、古くから知られているカタラーゼ以外に活性酸素種を消去する独自のシステム、すなわち生体膜を防御しているペルオキシレドキシン(Prx) Pmp20 を持っていることが明らかになった。

メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* の Ps 膜に、新しい酸化ストレス消去タンパク群であるペルオキシレドキシン (Prx)に属する Pmp20 を見出した。Prx は、近年、特に注目を集めている抗酸化タンパク質ファミリーであり、細胞内情報伝達・NO 産生などにも関与していることがわかってきた(広津ら、蛋白質・核酸・酵素, 45, 2463, (2000))。 *C. boidinii* Pmp20 は、歴史的には、Ps に見出された最初の Prx であるが、Prx ファミリーが認知されるまでの長い間、Ps 膜に局在する機能未知のタンパク質とされていた。近年になって、出芽酵母やヒト・マウスにおいて、Pmp20 ホモログの存在が報告され、これらの抗酸化活性が認められているものの、生理的意義や生化学反応系については明確ではない。また、出芽酵母遺伝子破壊株では、Ps が発達する生育条件においても生育阻害は認められなかったことや、Ps における局在も曖昧なことから、その生理的意義の解析について難航していた。

本研究では、Pmp20 の生理的役割及び生化学反応の解明をめざし、本申請者により確立された *C. boidinii* 分子育種・遺伝子発現系とタンパク質の Ps 局在化を操作することにより行いたい。特に、1) Ps 膜に局在する Prx が、どのような活性酸素種を基質にし、2) Ps 内で、どのような還元再生系を用いているのか？ 3) カタラーゼとの機能分担はどうなっているか？について着目し、研究を行った。

## (a) Pmp20 の細胞内輸送制御と遺伝子破壊株の生育特性を用いた Pmp20 の生理機能解析

Pmp20 は、Prx ファミリーに属し、抗酸化活性を示すことが示唆されているが、Ps における局在機能性についての明確な知見はなかった。本研究により *C. boidinii* PMP20 遺伝子破壊株が、メタノールを単一の炭素源として生育できないことを発見した。さらに、その生育阻害の程度は、同じ抗酸化酵素であるカ

タラーゼ以上に大きく、Pmp20 が生理的に抗酸化酵素として重要な生理的意義を担っていることがわかった。また、Ps 内における Pmp20 の機能発現が、必須であるかどうかを検討するために、本遺伝子破壊株に、Pmp20 の Ps 輸送シグナルを除いたり、付加したりすることで Pmp20 の局在化を改変し、遺伝子破壊株の生育能を相補するかどうかを検定した。その結果、Pmp20 が本当に Ps 内膜上で、抗酸化活性により機能している分子であることが明らかとなった。

一方、Pmp20 及びカタラーゼの細胞内局在性と Ps への輸送効率に違いがあり、Pmp20 がカタラーゼに比べて優先的に Ps に輸送されているということを見出した。この違いは、2つのタンパク質のける Ps 輸送シグナルのレセプターへの結合力の差によることに起因する。

#### (b) Pmp20 精製標品を用いた生化学反応：基質特異性とペルオキシソーム内リサイクリングシステムを用いた過酸化脂質定量法への展望

Pmp20 を過剰発現させた大腸菌から組み替えタンパクを精製し、SH 依存性の酸化ストレス除去因子であること、さらに還元型グルタチオン還元力として生体膜に局在するような過酸化脂質を解毒するグルタチオンペルオキシダーゼ活性を有することを生化学的につきとめた。実際に、精製した Ps 画分に生理的レベルの GSH を見出し、Ps 内における GSH の生理的機能を初めて見出した。チオレドキシンでなく、より産業的供給の簡便な GSH を還元力とし、かつ、過酸化脂質を基質とすることから、従来、測定の困難であった過酸化脂質の酵素的定量法の開発に応用利用できるものと考えられる。

(発表論文)

Hirofumi Horiguchi, Hiroya Yurimoto, Nobuo Kato and Yasuyoshi Sakai.

Antioxidant System within Yeast Peroxisome: Biochemical and Physiological Characterization of CbPmp20 in the Methylophilic Yeast *Candida boidinii*.

*J. Biol. Chem.*, **276** (17) 14279-14288 (2001).

Hirofumi Horiguchi, Hiroya Yurimoto, Toh-Kheng Goh, Tomoyuki Nakagawa, Nobuo Kato and Yasuyoshi Sakai.

Peroxisomal Catalase in the Methylophilic Yeast *Candida boidinii*: Transport Efficiency and Metabolic Significance.

*J. Bacteriol.*, **183** (21) 6372-6383 (2001). [cover story].