

小胞体における蛋白質の酸化折畳み異常による コラーゲン形成障害機構の解明

山形大学大学院医学系研究科生化学・分子生物学

藤井 順逸

Vitamin C (ascorbic acid; AsA) is an essential nutritional factor and required for collagen production as well as antioxidation in human. We have analyzed genetically modified mice regarding Akr1a, which catalyzes a step in the AsA biosynthesis, and the embryonic fibroblasts derived from the mice (MEFs). The body weight of the knockout (KO) mice was the same as the wild-type (WT) mice up to ~20 weeks. The KO mice started dying around 10 weeks of age and all had died within one year under the AsA-deficient diet. However, supplementation of AsA contributed to maintaining body weight and extended the life-span of the KO mice. We then used MEFs from WT and human Akr1a-transgenic (Tg) mice to investigate the potential roles of Akr1a under culture conditions. Tg MEFs showed higher acrolein-reducing activities than WT MEFs and were more resistant to cytotoxicity. While the administration of ascorbic acid to the cells increased the intracellular levels of ascorbic acid, it had no effect on the resistance to acrolein. Thus, one of the principle roles of Akr1a in primates is the reductive detoxification of aldehydes, notably acrolein, and protection from its detrimental effects. We also examined the impact of a deficiency of Akr1a on fibrotic damage caused by unilateral ureteric obstruction in the mice. Even though Akr1a-deficient mice could produce only about 10% of the AsA produced by WT mice, no difference was observed in collagen I synthesis under pathological conditions. The data implied either a low demand for AsA or the presence of another electron donor for collagen I production in the mouse kidney. Application of the genetically modified mice would give us an advantage in elucidation of in vivo-roles of AsA such as collagen synthesis and anti-oxidation.

1. 緒言

皮膚は、外気や光その他の有害な外的環境に常にさらされているため、様々な影響を受けている。皮膚の創傷により、護られていた内部組織に障害が及び感染などの危険が増すため、すみやかな治癒が進行する(図1)。創傷治癒は複雑な過程を経るが、その際にコラーゲンなどをはじめとする細胞外基質タンパク質が大量に合成され、創傷部位の保護とその後のリモデリングなどに働く。

コラーゲンは身体で最も多いタンパク質であり、その保水性や弾力性によって皮膚を若く健康に保つ作用に加え、多様な生理機能を担っている。例えば心臓や肝臓などの臓器は虚血などによって細胞死が起り失われると、筋線維芽細胞が増殖してコラーゲンをはじめとする基質タンパク質を大量に分泌し、その間隙を埋める(図2)。このような臓器の線維化が緊急対応として機能し、その間に本来の細胞数が回復すれば臓器機能が維持されるが、線維化が進行すると臓器不全に陥る。こうした細胞外基質の形成は、細胞によるタンパク質の合成と分泌反応とも密接に関係する。

ビタミンC(アスコルビン酸; AsA)はその抗酸化能に加えて、いくつかの酵素系で電子供与体として作用する。中で

も Prolyl 4-hydroxylase によるプロリンのヒドロキシル化反応では、AsAが電子供与体となってコラーゲン形成に関わると考えられている。そのためAsAが不足するとコラーゲンなどの形成が障害され、壊血病や骨形成異常を来す。

霊長類は進化の過程でAsA合成の最終段階を触媒するGulo遺伝子に変異を生じたため、ヒトはその合成能を欠くが、げっ歯類をはじめとする多くの実験動物はグルコースやグリコーゲンを出発材料としてAsAを合成できる。Aldehyde Reductase(遺伝子名; Akr1a)はアスコルビン酸合成反応のうちGuloとは異なる段階を触媒し、その遺伝子欠損(Akr1a-KO)によりアスコルビン酸合成能が10%程度にまで低下する¹⁾(図3)。マウスは遺伝子改変技術が確立しているため病態モデル動物として頻用されるが、AsA欠乏の病態を示さないことから、AsAに関する生理機能の解明を目的とする研究材料には適さない。

一般に分泌タンパク質は、粗面小胞体で合成された後に小胞体内でシステイン-SH基が酸化されてジスルフィド結合を形成することで、機能を発揮できる立体構造をとる(図4)。PRDX4はERO1とともに新生タンパク質のシステイン-SH基を酸化してジスルフィド結合を導入し、タンパク質の酸化折畳みを行う²⁾。ERO1欠損マウスと我々が樹立したPRDX4欠損マウス³⁾を交配して得たERO1^{-/-};PRDX4二重欠損マウスは、タンパク質の酸化折畳みが正常に進行しないことが原因となってAsAが消費され、その結果コラーゲン形成障害が起って壊血病になる⁴⁾。一方、非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の際に起こる線維化は、PRDX4欠損により増悪し過剰発現により改善される⁵⁾。このように、コラーゲンについては、小胞体における酸化



Elucidation of malfunction of collagen synthesis caused by defected oxidative protein folding in endoplasmic reticulum

Junichi Fujii

Yamagata University, Graduate School of Medical Sciences, Department of Biochemistry and Molecular Biology

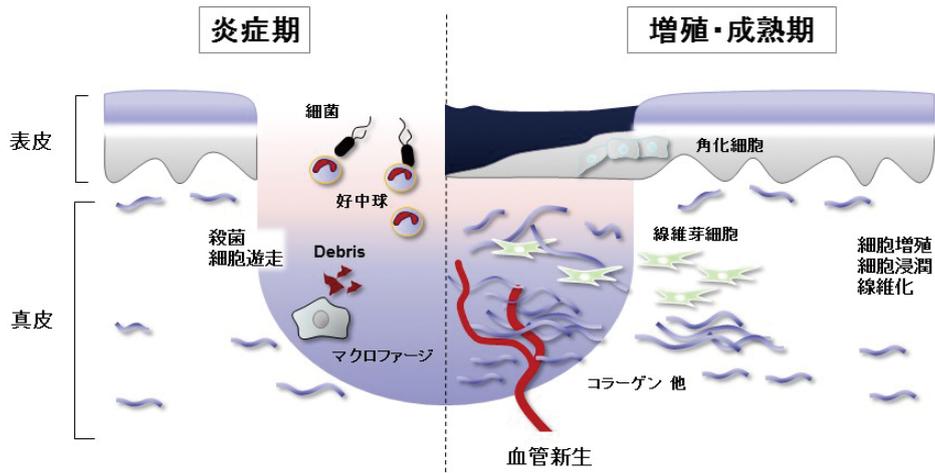


図1 皮膚の創傷治癒過程とコラーゲンをはじめとする基質タンパク質の役割¹¹⁾

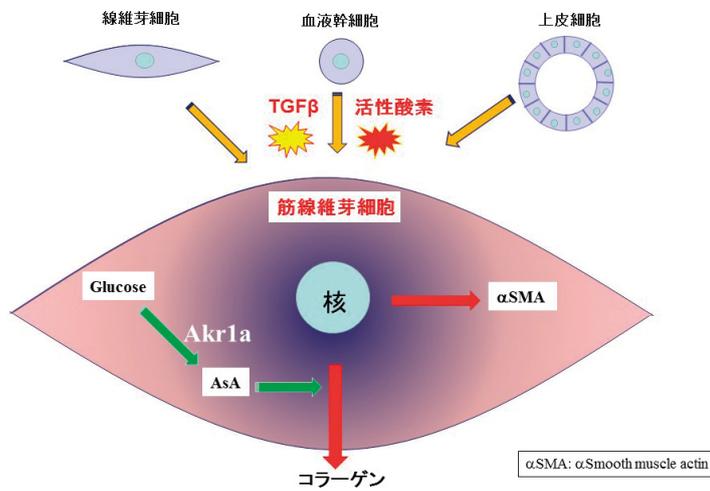


図2 臓器線維化の過程で筋線維芽細胞が分化・増殖し、コラーゲンなどの基質タンパク質を生成する

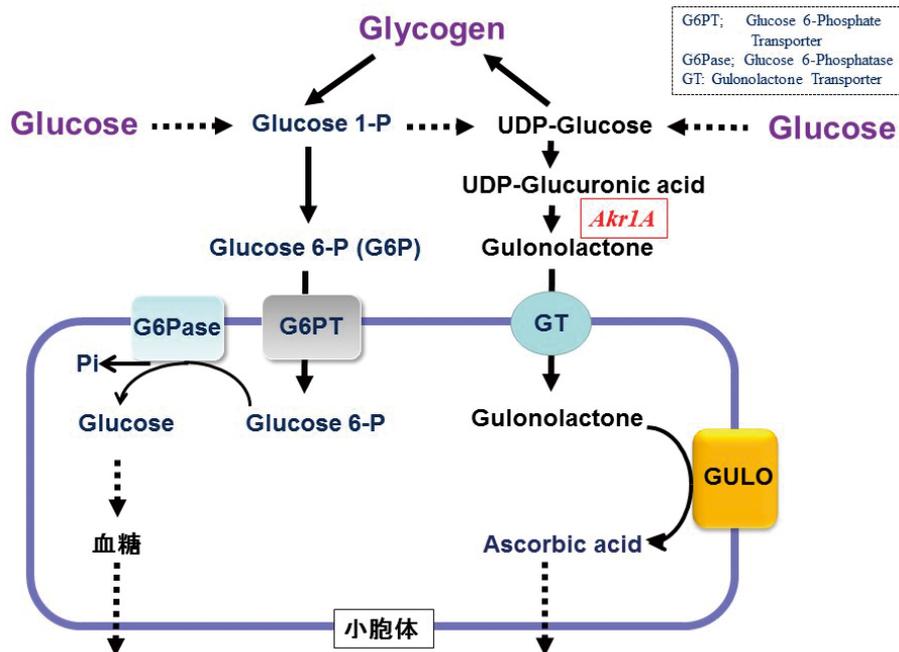


図3 グルコース・グリコーゲンからの血糖供給とAsAの合成経路

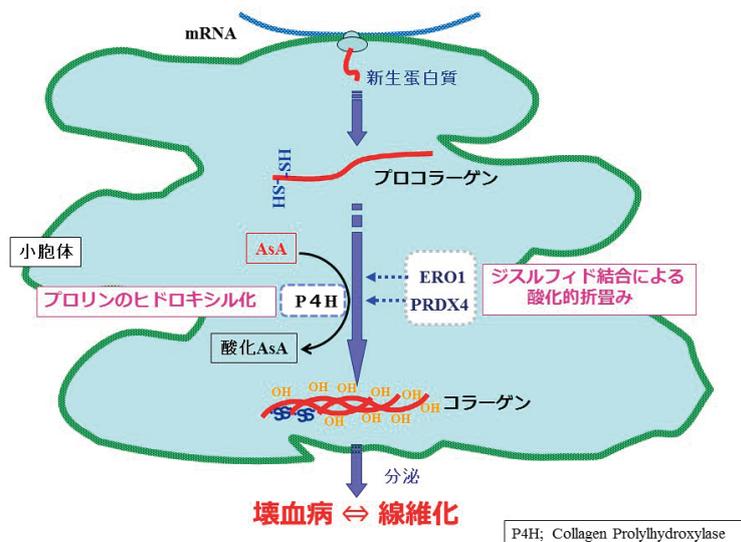


図4 コラーゲンの生成には小胞体におけるタンパク質の酸化的折畳みとプロリンのヒドロキシル化が必要

的折畳みに加えて、プロリンがヒドロキシル化された後に分泌され、細胞外基質としての機能を発揮するようになる。

本研究では、主に Akr1a 欠損マウスを用いて、コラーゲンの合成と機能発現における AsA の役割について解明するとともに、AsA 合成以外の Akr1a の役割について検討した。

2. 実験

2.1. Akr1a KO マウスの表現型と個体における AsA の作用

野生型 (WT)・Akr1a 欠損 (Akr1a-KO)・ヒト Akr1a トランスジェニック (hAkr1a-Tg) マウスを AsA 欠乏餌で飼育し、AsA 欠乏がマウスの生存に与える影響を調べた。また Akr1a-KO マウスに AsA 含有水 (1.5 g/L) を与えることで AsA 欠乏症状への効果を調べ、肝臓・腎臓ならびに血漿中の AsA を測定した。

2.2. マウス胚性線維芽細胞 (MEF) を用いた解析

WT・Akr1a-KO・hAkr1a-Tg の妊娠雌マウスの胎仔から MEF を単離し、SV40 large T 抗原を用いて不死化させて、それぞれの遺伝子型の MEF を樹立した。その MEF を用いて、AsA 含有量の測定と AsA の合成中間体である D-glucuronate の還元活性を測定し、さらに各種アルデヒド化合物に対する感受性を調べて、MEF における Akr1a の役割について検討した。特に脂質過酸化の最終産物や環境毒素として知られるアクロレインの解毒作用に焦点を当てて検討した。

2.3. AsA のコラーゲン形成に果たす役割の検討

WT マウス、Akr1a-KO マウス、ならびに AsA を投与

した Akr1a-KO マウス (9-10 週齢) 群を用いて一側尿管結紮モデルを作製し、5 日目に腎臓を摘出して腎線維化に伴うコラーゲン形成と腎障害に及ぼす効果について検討した。腎臓組織切片を Elastica-Masson 染色して、線維化の程度を評価した。また、核酸の酸化体である 8-hydroxyguanine (8OH-dG) の抗体を用いた免疫染色を行い、酸化ストレスの病態への関与について検討した。さらに、線維化に関わる筋線維芽細胞のマーカータンパク質である α -smooth muscle actin (α SMA)、主要な基質タンパク質であるコラーゲン I、抗酸化酵素、小胞体関連タンパク質、オートファジー関連タンパク質、ミトコンドリア電子伝達複合体 (I~V) ならびにシトクローム-c の発現について、免疫プロット解析を行った。

3. 結果

3.1. Akr1a-KO マウスの表現型と個体における AsA の作用

Akr1a-KO 雌マウスについては、出生率の著しい低下が認められ、生まれた仔についてもその多くが出生後すぐに死亡した。また、生き残ったマウスも、通常餌での飼育では、1 年以内にすべて死亡した。そこで AsA (1.5g/L) を飲水に加えて投与したところ出生率が著しく改善し、死亡することもほとんどなくなった (図5)。

Akr1a-KO 雌マウスにペントバルビタール麻酔を施すと覚醒が遅れたが、AsA を投与することで改善された。この時ペントバルビタールの代謝を行う肝臓の P450 系は AsA 欠乏の影響を受けておらず、神経系への作用が関係する可能性がある⁶⁾。

マウスの肝臓・腎臓ならびに血漿中の AsA 含有量を測定したところ、Akr1a-KO マウスでは AsA 含有量は血漿中

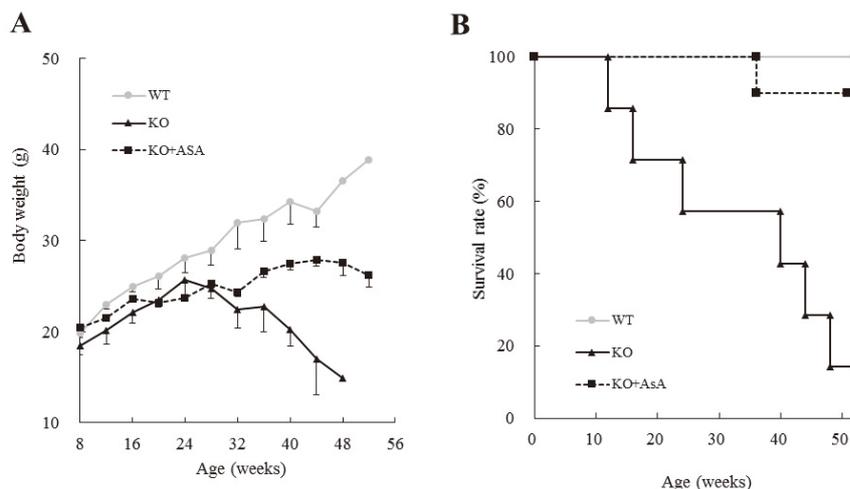


図5 Akrla欠損マウスはAsA欠乏により早期に死亡しAsA摂取により改善する

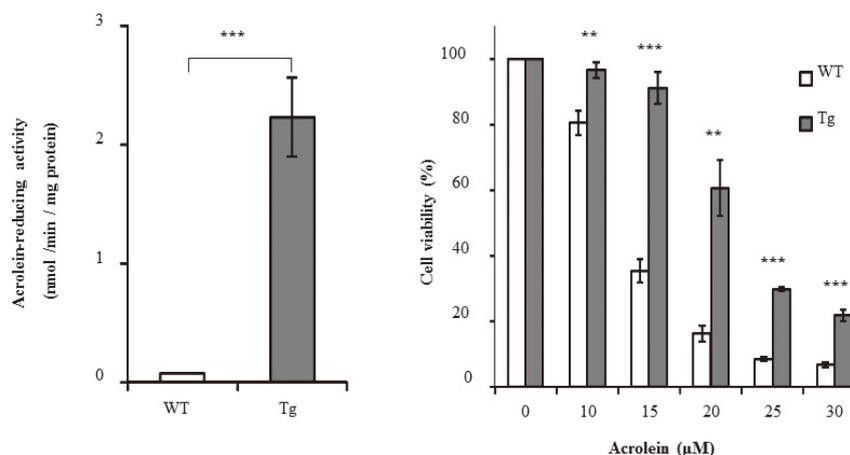


図6 Akrla-Tgマウスの線維芽細胞はアクロレインに対して耐性を示す⁷⁾

で数%にまで低下し、肝臓および腎臓でも約1割程度まで低下していた。Akrla-KOマウスにAsAを投与することでAsA含有量が回復し、Akrla欠損による影響は救済された。しかし、AsA水を給水し成獣にまで達したAkrla-KOマウスについてAsAの投与を中止してもその後死亡率が高くなることはなかった。

3.2. マウス線維芽細胞 (MEF) を用いた解析

WT・Akrla-KO・hAkrla-Tgの各マウスからMEFを単離して形態を観察したが、大きな違いを認めなかった。AsAを含まない通常培地で不死化させたMEFを培養したところ、遺伝子型に関係なく正常に増殖した。それぞれの細胞抽出液を用いてNADPH依存性のD-glucuronate還元活性を測定したところ、WTとAkrla-KO MEFの活性に比べてhAkrla-Tg MEFは高い活性を示した。

この結果は、AkrlaがD-glucuronate還元に関わっていることを示している。しかしAsA含有量はどの細胞でも

極めて低く遺伝子型による違いが認められないことから、MEFはAsAをほとんど合成していないことが分かった。AsA合成過程でAkrlaの基質となるD-glucuronateの添加によりAsA合成量はわずかに増加したが、その量は肝臓などに比べて極めて僅かであった。一方、培地にAsAを添加した場合には、いずれの細胞でもAsAの顕著な増加が認められ、取り込み量には違いは見られなかった。

Akrlaの基質特異性は低く、様々なアルデヒド化合物を還元することで広く解毒反応に関わると考えられている。そこで各種アルデヒド化合物をMEFに添加してその細胞毒性について調べたところ、hAkrla-Tg MEFでは脂質過酸化によって生じるアクロレインの細胞毒性に対する耐性が増していた(図6)。AsAを添加し細胞内のAsA含有量を増加させた細胞でもこの傾向は変わらなかったことから、アクロレインに対する耐性の獲得にはAsAではなく、Akrlaによるアルデヒド還元活性が関わっていることが分かった⁷⁾。

3. 3. AsAのコラーゲン形成に果たす役割の検討

9-10週齢では、Akr1a-KOとWTマウスの腎臓の機能に違いは認められなかった。そこで一側尿管結紮モデル(UUO)を作製して5日後に摘出した腎臓の組織学的検討を行なったところ、炎症細胞の浸潤と線維化が認められたが、遺伝子型による顕著な違いはなかった。発現タンパク質の解析では、筋線維芽細胞への分化を誘導する線維化促進因子であるTGFβの発現が亢進していた(図7)。またαSMA、コラーゲンI、PRDX4の発現についても亢進が認められた。その一方で、抗酸化酵素の発現については、SOD1とCATがわずかに低下したのに対して、ミトコンドリアに局在するSOD2とGPX1については顕著な低下が認められた。尿管結紮による腎障害に小胞体ストレスが関与する可能性が示唆されているが、BipやPDIの発現量は僅かに変動しただけであった。また、LC3抗体を用いた検討でも顕著な増加は認められず、オートファジーの関与を示す結果は得られなかった。以上、いずれの検討でも遺伝子型による違いはなく、AsA欠乏の影響を認めなかった。

尿管結紮5日後の腎臓について、ミトコンドリア電子伝達複合体I~Vおよびシトクローム-cの発現量について調べたところ、尿管結紮により著しく低下していた。そこで腎線維化にミトコンドリア障害がどのように関わるかを明らかにするために、尿管結紮後の異なる時点でこうしたタンパク質の発現について評価した。その結果、ミトコンドリア電子伝達複合体I~Vやシトクローム-cの発現低下がαSMAやコラーゲンIの発現に先行して起っていることが分かった⁸⁾。

4. 考 察

当教室は平成16年度に本財団より「SOD1ノックアウトマウスに発症する皮膚炎への活性酸素の関与の解明」の課題で第14回研究助成を受けた。その成果として、SOD1-

KOマウスでは顔面皮膚に炎症が自然発症し、それは抗酸化剤のN-アセチルシステインにより著しく遅延されるなど、抗酸化物質投与の有効性を明らかにした⁹⁾。創傷治癒モデルではSOD1欠損により治癒速度が遅延し、加齢の進んだマウスでは顕著になる。その機構を解明するために、初代培養MEFによる検討を行ったところ、通常培養(20%酸素)下ではSOD1-KO MEFは死ぬが、体内の酸素(1-2%)では増殖が停止した。こうした細胞分裂異常に細胞周期関連タンパク質の酸化傷害が関わると思われる¹⁰⁾。このように、in vivoとin vitroでは細胞の性質に大きな違いが認められた。こうした結果を踏まえ、コラーゲンの形成に密接に関わり、抗酸化力を有するAsAの役割を明らかにするために本研究を行った。

4. 1. Akr1a KOマウスの表現型と個体におけるAsAの作用

Akr1a-KOマウスにAsAを投与することで出生率が著しく回復し、生存率も著しく改善したことから、Akr1a-KOマウスに見られた表現型の多くはAkr1a欠損によるAsA合成能の低下を反映しているものと考えられた⁸⁾。AsAなどの水溶性ビタミンについては、腎臓から尿中に排泄されるため、過剰症とはならないことが知られており、今回の検討でも血漿中のAsAは数日で消失した。AsA-KO雌マウスでは出生率が著しく低下することから、胚発生過程での重要性が確認された。それが胎児に対する効果なのか、それとも母胎に作用して妊娠の維持に必要なのかといった点については引き続き検討を行っている。

4. 2. マウス線維芽細胞(MEF)を用いた解析

hAkr1a-TgマウスのMEFではAkr1aを過剰発現してもAsAの含有量に変化がなかったことは、AsA合成に関わる他の遺伝子の発現が十分でないことを示してお

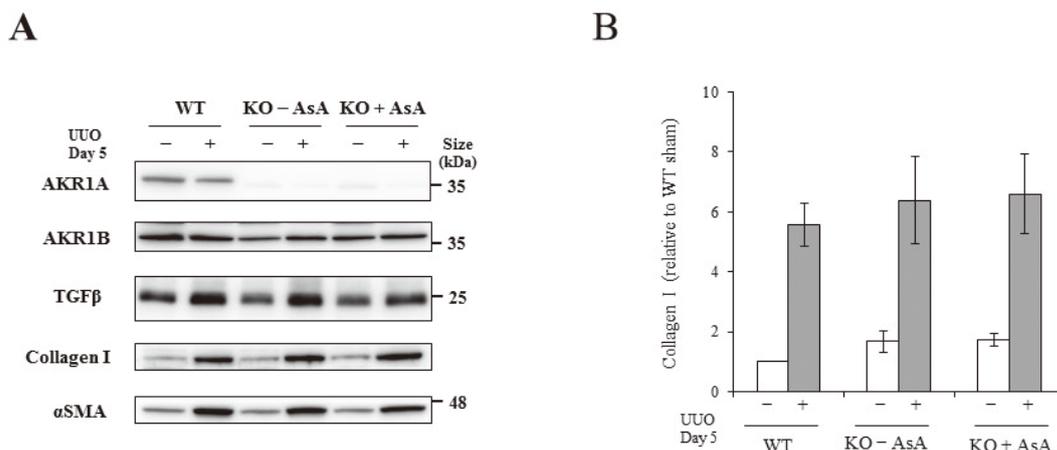


図7 Akr1a-KOによるAsA欠乏は線維化に伴うコラーゲン形成に大きな影響を与えない⁸⁾

り、体内でのAsA合成は肝臓などの限られた臓器で行われるとするこれまでの知見に一致する。肝臓は様々な有害化合物の解毒に働く臓器であり、Akr1aが肝臓で特に高い発現を示すことから、AsA合成の他にアルデヒド化合物の解毒に働くと考えられている。実際にMEFを用いた検討では、hAkr1a-Tg MEFがアルデヒドの中でも毒性が高いアクロレインに対する耐性を示し、高い解毒作用を有することが示唆された⁷⁾。hAkr1a-Tg MEFでは、アクロレインを基質としてNADPHによる還元活性が高いこともこの結果と一致する。MEFにAsAを添加して取り込ませておいてもアクロレインに対する感受性が変わらないことから、AsAはこの解毒作用には寄与しないことが分かった。このことは、hAkr1a-Tg MEFのアクロレイン耐性にはAkr1aによるNADPH依存性還元活性が直接関係することを示す。

4. 3. AsAのコラーゲン形成に果たす役割の検討

コラーゲンは身体を構成するタンパク質として最も多く、皮膚の保湿性や弾力性の保持など、抗老化にとっても重要である。AsAはコラーゲンの生成に必要であり、不足すると壊血病や骨形成異常を来す¹¹⁾。一方で、Gulo欠損によりAsA合成能を欠くマウスを用いた検討では、骨の発育不全を来し20週齢頃から死にはじめるが、皮膚のコラーゲンは正常に形成されるといった、これまでの認識を覆す結果が報告されている。このようにAsAの作用に関する分子機構については、従来の理解とは異なる現象も報告されている。

Akr1a-KOマウスにおいては、野生型マウスの10%程度しかAsAを合成することができないにもかかわらず、WTマウスと比較して、尿管結紮によって生じるコラーゲンIの合成量に差を認めなかった⁸⁾。この結果より、マウスの腎障害時におけるコラーゲンI合成には微量のAsAしか必要としない、もしくは、プロリルヒドロキシラーゼへの別の電子供給体が存在する、可能性が示唆された。ヒト由来の細胞を培養する際の培地にはAsAは含まれていない場合がほとんどであるが、こうした細胞でもコラーゲンの形成が起こることから、後者の可能性が高いと考えられる。プロリルヒドロキシラーゼへの電子の供給に働くレドックス分子としては、細胞内含有量の多いグルタチオンが有力な候補であるため、MEFなどを用いた検討により明らかにしたい。

5. 総括

AsA合成障害のあるAkr1a-KOマウスを用いて、コラーゲン合成におけるAsAの関与について、培養細胞系とマウスを用いて検討を行った。AsAはコラーゲン形成の過程でプロリンヒドロキシ化に必要とされているが、欠損

してもコラーゲン量に影響を与えないことから、他の分子からの電子供与の可能性が示唆された。コラーゲンの形成には、小胞体の中での酸化的折畳みも関係することから、今後はPRDX4-KOとの二重欠損マウスについても併せて解析することで、コラーゲン形成に関わる因子の相互作用についての解明を目指したい。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、Akr1a-KOならびにhAkr1a-Tgマウスを提供くださいました宮田哲博士と、研究を助成してくださいましたコスメトロジー研究振興財団に心から感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Takahashi M, Miyata S, Fujii J, Inai Y, Ueyama S, Araki M, Soga T, Fujinawa R, Nishitani C, Ariki S, Shimizu T, Abe T, Ihara Y, Nishikimi M, Kozutsumi Y, Taniguchi N, and Kuroki Y. In vivo role of aldehyde reductase. *Biochim Biophys Acta*, 1820:1787-1796 (2012)
- 2) Fujii J, Ikeda Y, Kurahashi T, Homma T. Physiological and Pathological Views of Prdx4. *Free Radic Biol Med*, in press (2015)
- 3) Iuchi Y, Okada F, Tsunoda S, Kibe N, Shirasawa N, Ikawa M, Okabe M, Ikeda Y, and Fujii J. Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem J*, 419:149-58 (2009)
- 4) Zito E, Hansen HG, Yeo GSH, Fujii J, and Ron D. Endoplasmic reticulum thiol oxidase deficiency leads to ascorbic acid depletion and noncanonical scurvy in mice. *Mol Cell*, 48:39-51 (2012)
- 5) Nabeshima A, Yamada S, Guo X, Tanimoto A, Wang KY, Shimajiri S, Kimura S, Tasaki T, Noguchi H, Kitada S, Watanabe T, Fujii J, Kohno K, and Sasaguri Y. Peroxiredoxin 4 Protects Against Nonalcoholic Steatohepatitis and Type 2 Diabetes in a Nongenetic Mouse Model. *Antioxid Redox Signal*, 19:1983-1998 (2013)
- 6) Ito J, Otsuki N, Zhang X, Konno K, Kurahashi T, Takahashi M, Yamato M, Matsuoka Y, Yamada K, Miyata S, and Fujii J. Ascorbic acid reverses the prolonged anesthetic action of pentobarbital in Akr1a-knockout mice. *Life Sciences*, 98:1-8 (2014)
- 7) Kurahashi T, Kwon M, Homma T, Saito Y, Lee J, Takahashi T, Yamada K, Miyata S, and Fujii J. Reductive detoxification of acrolein as a potential role for aldehyde reductase (AKR1A) in mammals. *Biochim Biophys Res Commun*, 452:136-141 (2014)

- 8) Nishida H, Kurahashi T, Saito Y, Otsuki N, Kwon M, Ohtake H, Yamakawa M, Yamada K, Miyata S, Tomita Y, and Fujii J. Kidney fibrosis is independent of the amount of ascorbic acid in mice with unilateral ureteral obstruction. *Free Radic Res*, 48:1115-1124 (2014)
- 9) Iuchi Y, Roy D, Okada F, Kibe N, Tsunoda S, Suzuki S, Takahashi M, Yokoyama H, Yoshitake J, Kondo S, and Fujii J. Spontaneous skin damage and delayed wound healing in SOD1-deficient mice. *Mol Cell Biochem*, 341:181-194 (2010)
- 10) Tsunoda S, Kibe N, Kurahashi T, and Fujii J. Differential responses of SOD1-deficient mouse embryonic fibroblasts to oxygen concentrations. *Arch Biochem Biophys* 537:5-11 (2013)
- 11) Kurahashi T, and Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *J Dev Biol*, 3: 57-70 (2015)