



Alterations in the enzyme activity and protein contents of protein disulfide isomerase in rat tissues during fasting and refeeding

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 三上, ともこ メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1572

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 295号	学位授与年月日	平成11年 2月19日
氏名	三上 ともこ		
論文題目	Alterations in the enzyme activity and protein contents of protein disulfide isomerase in rat tissues during fasting and refeeding (絶食と再摂食時におけるラット組織中の protein disulfide isomerase の酵素活性と蛋白量の変化について)		

博士(医学) 三上 ともこ

論文題目

Alterations in the enzyme activity and protein contents of protein disulfide isomerase in rat tissues during fasting and refeeding

(絶食と再摂食時におけるラット組織中のprotein disulfide isomeraseの酵素活性と蛋白量の変化について)

論文内容の要旨

[はじめに]

Protein disulfide isomerase (PDI)は小胞体内に局在する多機能性蛋白であり、新生蛋白の高次構造形成、特にジスルフィド結合の形成に重要な役割を果たすといわれている。約55Kdの蛋白の二量体として存在するが、prolyl-4-hydroxylase や、microsomal triglyceride transfer protein のような蛋白複合体の一つのサブユニットとしても機能している。1987年、堀内らにより、特異的な triiodothyronine (T3) に対する結合能を有すると報告されたが、その生理的意義は未だ不明である。また、PDIの組織分布については、酵素活性、Northern blot、免疫組織染色による検討の報告はあるが、PDI蛋白の定量的検討はまだされておらず、PDI蛋白量とisomerase活性との関係も明らかにされていない。今回、精製PDIに対するポリクローナル抗体を用いたWestern blot法でPDI蛋白の組織分布を検討した。さらに絶食時および再摂食時のラット肝、腎のPDI蛋白量の変化をWestern blot法で調べ、同時にPDI-isomerase活性の変化をscrambled ribonuclease (RNase)法で測定した。また、T3、propylthiouracil (PTU)投与により甲状腺機能亢進および低下ラットを作製し、甲状腺機能とPDI発現との関連も検討した。

[方法]

SDラット(雄、生後6~7週)を用いて、次のようなモデルを作製した。

Fasting/refeeding studyでは、

Control group	対照群 (n=16)
F1 group	絶食1日間群 (n=6)
F3 group	絶食3日間群 (n=11)
R3 group	絶食3日間後再摂食3日間群 (n=11)
R6 group	絶食3日間後再摂食6日間群 (n=6)

Hyper/hypothyroidism studyでは

Control group	対照群 (n=4)
T3 group	2.5 μ g T3皮下注7日間群 (n=4)
PTU group	0.05% PTU 2週間投与群 (n=4)

それぞれのラットから肝、腎(一部コントロールからは心臓、骨格筋、脳、脂肪)を摘出し、ホモジネートを作製し、牛肝臓から精製したPDIに対するポリクローナル抗体を用いたWestern blot法でPDI蛋白量を比較した。酵素活性については、scrambled RNase法を用いて検討した。これは、9M urea、130 mM dithiothreitol存在下で還元させたRNaseを、18M urea、0.188M sarcosine存在下でゆっくり再酸化させ不適切なジスルフィド結合をもつRNase (scrambled RNase)を作製し、これをPDIの触媒する異性化反応で再活性化させることにより、PDIのisomerase活性を測定する方法である。

〔結果〕

1. 臓器分布

ラットの肝、腎、心筋、骨格筋、脂肪組織については Western blot 法にて55Kdの単一なバンドを認めた。各組織での PDI 蛋白の発現量を肝を100%として比較すると、腎36%、脂肪26%、骨格筋11%、心筋9%であった。脳では、55Kdのバンドは検出されなかった。PDI 蛋白の豊富な肝臓と腎臓を用いて、次の実験を行った。

2. Fasting/refeeding study

3日間の絶食でラット肝、腎のPDI蛋白量はコントロールの約60%に減少した。ただし、肝臓では、24時間の絶食でも蛋白量が減少傾向を示したのに対し、腎臓では24時間では対照群に比べ変化は認められなかった。PDI-isomerase 活性も、蛋白量の減少に平行して、3日間の絶食でコントロールの約50%に減少した。しかし、3日間の再摂食で、PDI蛋白量はコントロールレベルまで回復するのに対し、PDI 活性は6日間の再摂食でも低下したままで、PDI 蛋白量と活性の間に解離がみられた。この結果は、肝、腎とも同様の結果であった。

3. Hyper/hypothyroidism study

甲状腺機能亢進および低下ラットでは、肝臓、腎臓の両臓器とも、PDI 蛋白量、活性いずれにおいてもコントロールに対し有意の変化を認めなかった。

〔考察および結語〕

1. PDI 蛋白は、肝臓、腎臓、脂肪組織に多く認められたが、脳には発現が認められなかった。この結果は、既知のPDI酵素活性の組織分布とほぼ合致するものであった。
2. 3日間の絶食で、PDI蛋白量は肝臓、腎臓ともに有意に減少し、3日間の再摂食で回復した。
3. 肝、腎のPDI活性は、絶食時、蛋白量の変化に伴って減少したが、再摂食時にはPDI蛋白量の変化と異なり、回復が見られなかった。PDI 蛋白が回復しているにも関わらず、PDI 活性の回復が伴わない機序は未解決であるが、PDIは、他の蛋白、たとえば prolyl-4-hydroxylase の他のサブユニットと結合するとイソメラーゼ活性が約半分に抑制されることが報告されており、このような他の蛋白との結合による酵素活性への修飾がこのPDI蛋白量と活性の解離に関与している可能性がある。
4. 個体の甲状腺機能の変化は、肝、腎のPDI蛋白、酵素活性どちらにも影響を及ぼさなかった。絶食、再摂食時のPDIの変化に、甲状腺ホルモンが関与する可能性は少ないと考えられる。

論文審査の結果の要旨

Protein disulfide isomerase (PDI) は多くの組織の小胞体内に約55kDaのサブユニットからなるホモ二量体として存在する多機能性蛋白質である。新生蛋白質の高次構造形成の際にチオール・ジスルフィド交換反応を触媒し、正しいジスルフィド結合を形成するという作用がその主な機能とされているが、prolyl 4-hydroxylase (proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase) や microsomal triglyceride transfer protein のような蛋白複合体に一つのサブユニットとして存在し、これらの蛋白質の凝集を防ぐという役割も果たしている。更にPDIはtriiodothyronine (T3)と特異的に結合することが1987年に報告された。T3の細胞内への取り込みや核への輸送等に何らかのT3結合蛋白質が関与することを示唆する実験結果がいくつか報告されているが、PDIとT3の結合の生理的意味は不明である。また、PDIの組織分布は酵素活性、Northern blot、および免疫組織染色により検討されているが、それぞれの方法で得られた結果は

必ずしも一致していない。今回、申請者はこの様な現状を踏まえて、抗ウシPDIポリクローナル抗体を用いた Western blot 法でラットにおける PDI 蛋白質の組織分布を調べ、更に甲状腺機能亢進、低下、および絶食時、再摂食時の肝臓と腎臓の PDI の蛋白量と酵素活性の変化を検討した。絶食-再摂食時の PDI の変動を調べた理由は、絶食による血清 T3 濃度の低下が知られているからである。

実験の結果、Western blot 法で抗 PDI 抗体と反応する 55kDa のバンドが肝臓、腎臓、心筋、骨格筋、および白色脂肪組織で顕著に観察された。デンストメーターで定量化した肝臓の PDI 発現量を 100 とすると、腎、脂肪、骨格筋、心筋の発現量はそれぞれ 36、26、11、9 であった。脳では 55kDa のバンドは検出されず、抗 PDI 抗体と反応する 52kDa の蛋白質が骨格筋や心筋の 55kDa PDI とほぼ同程度発現していた。しかし、この 52kDa バンドが非特異的なものか、あるいは何らかの PDI 関連蛋白質の存在を意味するのかについての検索は行わなかった。

絶食-再摂食実験では、3 日間の絶食で肝臓と腎臓の両方で PDI 蛋白質もその活性も対照の 50-60% に低下した。しかし、再摂食で PDI 蛋白量は対照レベルまで回復するのに対して、PDI 活性は低下したままという PDI 蛋白量と活性の解離が肝臓でも腎臓でも観察された。甲状腺機能亢進および低下は肝臓と腎臓の PDI 蛋白量とその活性のいずれにも有意の影響をもたらさなかったため、絶食、再摂食時の PDI の変化に甲状腺ホルモンが関与する可能性は少ないと考えられた。

本研究に関して次のような質疑、試問を行った。

- 1) ER での PDI の存在様式
- 2) PDI は *in vivo* でもインスリン分解に GSH:insulin transhydrogenase として関与しているか否か
- 3) 熱産生という点で T3 と関係がある褐色脂肪ではなく白色脂肪を実験対象として選択した理由
- 4) 脳の 52kDa PDI 様蛋白質について申請者はどのように考えているのか、PDI-mRNA は脳でも検出されるということであるが、その存在部位は neuron か glia か
- 5) 分泌作用の盛んな組織で PDI の存在量が大という結論の実験的根拠
- 6) PDI のアッセイに用いている 3 μ M という DTT の濃度は PDI 活性測定のに至適濃度か、反応終了後残っている DTT の濃度を測定したことがあるか (10 μ g / 200 μ l = 3.65 μ M の scrambled RNase を基質として反応を行っている。bovine pancreas RNase A は 8 個の Cys 残基を持つから、PDI による S-S 架橋の還元と生じた SH の酸化を正しいジスルフィド結合が生じるまで繰り返すことで scrambled RNase が native form に変わるとすれば 3 μ M DTT では不足という可能性はないのか)
- 7) Scrambled RNase 調製のための反応液に加えている sarcosine の作用
- 8) 甲状腺機能亢進ラット、低下ラット作成のために用いた T3 と propylthiouracil (PTU) の投与量をどのような根拠に基づいて決めたのか、実際に機能が亢進あるいは低下していることをどのような指標により確認したのか

これらの質問に対する申請者の答えは概ね適切であり、問題点をよく把握していることを示した。研究面ではラットにおける PDI の組織分布、および絶食、再摂食時の肝臓と腎臓の PDI の変動を丹念に解析し、再摂食時における PDI の蛋白量と活性の解離という興味ある現象を見い出していることと併せて、本論文は博士 (医学) の学位授与に値すると論文審査委員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 市山 新

副査 教授 大関 武彦 副査 助教授 上里 忠良