The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	サイトグロビンの多量体形成による活性酸素種との反応性制御
Author(s)	辻野, 博文
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/54709
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【6】

氏　　名	辻　野　博　文（つじ の ひろ ふみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬学）
学　位　記　番　号	第　２５９５８　号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学　位　論　文　名	**サイトグロビンの多量体形成による活性酸素種との反応性制御**
論文審査委員	（主査） 教　授　宇野　公之 （副査） 教　授　高木　達也　　教　授　大久保　忠恭　　教　授　小比賀　聡

論　文　内　容　の　要　旨

サイトグロビン（Cgb）は2001年に発見されたグロビンタンパク質である。補欠分子団としてヘムを含み、典型的なグロビンフォールドをとっていることからヘモグロビン（Hb）やミオグロビン（Mb）と同様のグロビンファミリーの一種とされている。しかしながら、ヘムの配位状態は5配位構造をとるHbやMbとは大きく異なっており、ヘムの上下からHisが配位した6配位構造をとっている。このヘム鉄は三価（ferric）と二価（ferrous）の二つの状態をとり、それぞれ結合可能な配位子が異なる。さらに、Cgbは構造内に2つのCys残基を有しており、発表されているX線結晶構造として、Cysが還元されているmonomerのものと、Cys同士がジスルフィド結合を形成したdimerのものが報告されている。また、ジスルフィド結合の還元剤であるDTTの有無によって酸素の結合親和性が変化することが報告されているが、その詳細についてはわかっていない。

また、Cgb の生理的機能については様々な仮説が立てられているが、未だに確定していない。Cgbは人の全身の細胞で発現しており、通常は低レベルに抑えられているCgb濃度が、虚血に応答して高レベルになることが報告されており、虚血再灌流に伴う細胞障害からの保護作用を持っているのではないかと考えられているがその詳細はわかっていない。また、ある種のがん細胞では非常に高いレベルでCgb遺伝子がメチル化されていることが確認されている。さらには、Cgbをノックダウンしたマウスではがん原性物質に対する感受性が上昇し、がん化が促進されることがわかっている。がん化に伴い、炎症系カスケードが上昇していたことからCgbは活性酸素種（ROS）の消去系に関わっているのではないかと考えられている。実際にCgbを発現させた細胞ではROSによる細胞障害が低く抑えられているという報告がされている。ROS発生時における生体内の酸化還元環境の変化はジスルフィド結合にも影響をおよぼすため、本研究ではまずジスルフィドの有無による親和性の変化について詳細を明らかとすることにした。さらに、多くの機能仮説と関連性を持つROSとの反応性に着目し、得られたCgbとジスルフィド結合の関係を踏まえたうえで、CgbとROSとの関わりについての研究を行うこととした。

まず、ジスルフィド結合の還元剤となる2-メルカプトエタノール(2-ME)を加えずにSDS-PAGEを行い、ジスルフィド結合の確認を行ったところ、多くの多量体成分の混在が確認された。そこでこれら複数の成分をゲルろ過クロマトグラフィーにより分離し、多量体ごとの親和性を測定した。Ferric状態のCgbに対して、シアン化物イオン（CN^-）の親和性を測定することにより、Cgbはtetramer、dimer、monomerの各fractionで全く異なる親和性を示すことを明らかとした。さらにCys残基を持たない変異体2CSとの比較により、monomerに存在するSS型、およびSH型の配位子親和性の異なる二つの成分の同定を行った。ここでmonomer SS型とはCys残基を介して分子内ジスルフィド結合を形成しているものであり、monomer SH型とはジスルフィド結合を形成していないものである。この中で最も親和性が高いものはmonomer SS型であり、最も親和性が低いtetramerとは約1000倍も親和性が異なっていた。

Cgbが配位子親和性の異なる多量体形成能（monomer SS型、monomer SH型、dimer、tetramer）を持つことを明らかとしたため、次に多量体形成能をふまえてROSとの関係を探った。スーパーオキサイドプローブであるBESSoを用いた測定により、Cgbのすべての多量体がスーパーオキサイドの消去能を有していることを見出した。その中で、monomer SS型のみの特徴として、ferric状態でスーパーオキサイドと反応することでヘム鉄が還元され、そこに酸素が結合したoxy型を生成することが紫外可視吸光スペクトルの測定により確認された。また、monomer SS型はスーパーオキサイドとの反応で生成したoxy状態とNOが反応することでCgbがferric状態に戻るところが観察された。さらに、monomer SS型は本反応に伴い基質であるスーパーオキサイドとNOを用いてペルオキシナイトライト($ONOO^-$)の産生を促進していることを、DCDHFを用いた実験により明らかとした。

以上の知見から、Cgbの生体内反応を考察する。はじめに示したように、Cgbは虚血再灌流に伴う障害からの細胞保護機能を担っていることが報告されている。Cgbはすべての多量体がスーパーオキサイドの消去能を持っており、通常は細胞障害を抑えるためにROS消去を行っていると予想される。一方でCgbのmonomer SS型のみ$ONOO^-$産生促進能も有していた。$ONOO^-$はPI-3-K/Aktシグナルを活性化することで虚血再灌流時の細胞生存率を上昇させるが、高濃度の$ONOO^-$はONOOHなどへの変化を経て高い細胞障害性を示す。そこで$ONOO^-$の産生量を厳しく制御する必要があるが、Cgbは多量体の形成によってそれを行っていると予想される。通常状態でスーパーオキサイド消去を担っていたCgbは虚血再灌流が起こると、虚血に伴う細胞の還元的環境下ではジスルフィド結合が開裂、再灌流に伴う酸化的環境下ではジスルフィド結合が再形成され、多量体群が再編成されることで適切な量の$ONOO^-$を産生し、シグナル活性化により細胞生存に寄与していると考えられた。

このように、CgbはCysを介して細胞内の酸化還元状態を感知し、SS結合の組換えを行うことによるスーパーオキサイドや$ONOO^-$の消去・産生の制御を通して細胞保護機能を発現しているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

サイトグロビン（Cgb）は2001年に発見された新規グロビンタンパク質であり、全身の細胞で発現している。コラーゲン合成系への酸素供給や、虚血状態に応答した発現誘導による活性酸素からの細胞保護機能を担うと提案されているものの、発見から10年以上が経過した今もなお、Cgbの生理的な役割や反応機構については不明である。本論文では、分子レベルからCgbの機能を探るべく、特に2つのCys残基の役割に注目して検証した結果が述べられている。

上述の通り、Cgbは2つのCys残基を有しており、X線結晶構造解析により単量体と二量体を形成することが報告されている。前者では38位と83位のCysがともに還元されている一方で、後者では両Cys残基がサブユニット間で相互にジスルフィド結合を形成している。ジスルフィド結合の還元剤であるDTTの添加により酸素の結合親和性が変化することが報告されているため、ジスルフィド結合の形成がCgbの機能と密接に関わると考えられる。そこでまず、本論文ではCys残基を介した多量体の形成について検討した。ジスルフィド結合が形成される酸化的条件下ではCgbは鉄Ⅲ価のヘムを含むため、これに高い親和性を持つシアン化物イオンを用いて結合平衡反応を調べた結果、野生型Cgbでは多段階の結合過程が観測された。電気泳動で確認したところ、ジスルフィド結合の組み方によって野生型Cgbには単量体、二量体、四量体がそれぞれ2種類ずつ含まれることが判明した。これらを分離してさらに検討した結果、単量体には分子内でジスルフィド結合を形成したSS型とジスルフィド結合が還元されたSH型が含まれ、前者がシアン化物イオンに対して100倍程度高い親和性を持つことが明らかになった。また、速度論的解析を行った結果、SS型ではシアン化物イオンの結合速度が大きく上昇していることが判明した。これらの結果より、Cgbはジスルフィド結合の形成によって外来性配位子に対する反応性を制御している可能性が示唆された。

このジスルフィド結合形成がCgbの生理的機能とどのように関わるかを明らかにするため、活性酸素とCgbの反応性について検討した。Cgbが担う細胞保護機能は活性酸素カスケードの最上流に位置するスーパーオキサイドの消去によるものと考え、スーパーオキサイド特異的蛍光プローブBESSoを用いて評価した。代表的な抗酸化物質であるアスコルビン酸と比較した結果、Cgbはいずれの多量体もアスコルビン酸より高いスーパーオキサイド消去能を持つことがわかった。そこで、この消去機構を解明するため、キサンチンオキシダーゼ/プテリンを用いたスーパーオキサイド発生系の共存下でCgbのUV-visスペクトル変化を追跡した。その結果、単量体SS型でのみ有意なスペクトル変化が観測され、別途調製した酸素結合型Cgbのスペクトルと一致した。このことから、酸化型Cgbはスーパーオキサイドと直接結合して酸素化型へと変化することが明らかとなった。

一方、酸素結合型Cgbは一酸化窒素（NO）と反応し、ペルオキシナイトライト（$ONOO^-$）へと変換して自身は酸化型へと戻ることが報告されている。本論文のここまでの結果を踏まえると、スーパーオキサイドとNOが共存する環境下ではCgbが酸化型と酸素化型を経過することで触媒サイクルを回すことができると考えられる。このことを検証するため、$ONOO^-$特異的吸光プローブDCDHFを用いて評価した結果、Cgb濃度依存的に$ONOO^-$が生成し、その活性は単量体SS型でもっとも高いことがわかった。この結果は、SS型がスーパーオキサイドと反応して酸素化型をもっとも形成しやすいという前述の結果と対応した。

以上の知見から、Cgbの生理的役割として以下の機構が考えられた。まず、Cgbのすべての多量体がスーパーオキサイドの消去能を持っていたことから、細胞障害を抑えるためにCgbは恒常的にROS消去を行っていると考えられる。一方で、単量体SS型のCgbが産生する$ONOO^-$はおそらくPI-3-K/Aktシグナルを活性化することで虚血再灌流時の細胞生存率を上昇させる。すなわち、通常状態でスーパーオキサイド消去を担っていたCgbは、虚血再灌流に伴う細胞内酸化還元状態の変化に応じてジスルフィド結合を再形成し、多量体群の再編成により適切な量の$ONOO^-$を産生することで細胞生存に寄与していると考えられた。このように、CgbはCysを介して細胞内の酸化還元状態を感知し、ジスルフィド結合の組換えを行うことによるスーパーオキサイドや$ONOO^-$の消去・産生の制御を通して細胞保護機能を発現しているものと考えられた。

以上の結果は活性酸素から細胞を保護する医薬品の開発に対してきわめて有用な知見を与えるものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいと判断した。