



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

氏 名		つじ	の	ひろ	ふみ
氏 名		辻	野	博	文
博士の専攻分野の名称	博 士（薬学）				
学 位 記 番 号	第 2 5 9 5 8 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にすることにした。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、シアニ化物イオン（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にした。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にしたため、次に多量体形成能をふまえてROSとの関係を探った。スーパーオキシドプローブである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シ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シ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収スペクトルの測定により確認された。また、monomer SS型はスーパーオキシ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シドと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シ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考えられる。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考えられる。通常状態でスーパーオキシ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シドや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タンパク質であり、全身の細胞で発現している。カ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シドの消去によるものと考え、スーパーオキシ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シ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シ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 はスーパーオキシ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、スーパーオキシドと 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 型がスーパーオキシ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シ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シ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シドや 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。