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

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

2012 年度

辻野　博文

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

2012 年度

辻野　博文

目次

緒論 1

本論

第一章　サイトグロビンの多量体形成能 4

　第一節　ジスルフィド結合によるサイトグロビンの多量体形成 5

　第二節　ferric 状態のサイトグロビン多量体の外来性配位子 6

　第三節　多量体の外来性配位子制御機構 7

　第四節　ferrous 状態のサイトグロビン多量体の外来性配位子 9

　第五節　考察 10

第二章　サイトグロビンと活性酸素種（ROS）との反応 13

　第一節　サイトグロビンのスーパーオキサイド消去能 14

　第二節　スーパーオキサイドとの反応によるサイトグロビンの oxy 化 15

　第三節　oxy 型サイトグロビンと NO の反応 16

　第四節　サイトグロビンの $ONOO^-$ の産生促進能 17

　第五節　考察 18

結論 21

謝辞 22

実験の部 25

参考文献 29

緒論

生体は非常に複雑で多くの反応や機能の組み合わせによって、その生命活動を維持している。そのために重要な働きを果たしているのがタンパク質であり、非常に多くの種類のタンパク質が生体内に存在し、それぞれの役割を果たしている。医学や薬学の分野において、生命活動の詳細を解明することは、より上質な生命活動を提供することにつながるため、これまで盛んにタンパク質に関する研究が行われてきた。

タンパク質研究の非常に初期から研究対象になっていたミオグロビン(Mb)は、さまざまな研究によって筋肉中での酸素貯蔵に関わっていることが明らかとなったが[1]、現在でもその機能についての研究は未だに続けられている。最新の研究により、Mb の新たな機能として通常時の NO 消去による解毒作用[2]、虚血時における NO 産生によるミトコンドリア呼吸抑制作用[3]などの新規機能の提案が行われている。

一方で、新規タンパク質も多く発見され、その機能解明も盛んに行われている。近年、Mb と同様にグロビンファミリーに属するタンパク質であるサイトグロビン(Cgb)が発見された[4,5]。Cgb は 2001 年に発見されたタンパク質であり、10 年以上にわたって生体内での機能を含め検討されてきている。多くのデータが発表され、疾患との関係が明らかになりつつあるが、Cgb の機能についてその詳細は未知のままである。そこで本研究では、細胞生物学的な研究では解明できていない Cgb の機能を、分子論的な研究から探ることとした。

1. サイトグロビンについて

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[4]。マウス肝臓の星細胞で初めて発見されたため、STAP (stellate cell activation-associated protein)、あるいは、全身の細胞で発現していることから、ヒストグロビンとも呼ばれている[5-11]。Cgbの分子量は約 22,000 であり、構成アミノ酸残基の数は 190 である。その構造は典型的なグロビンフォールドをとっており、ヘム周辺のアミノ酸残基の保存性は高い。Mb と比較するとアミノ酸配列の相同性は約 25 % であり、Mb から派生

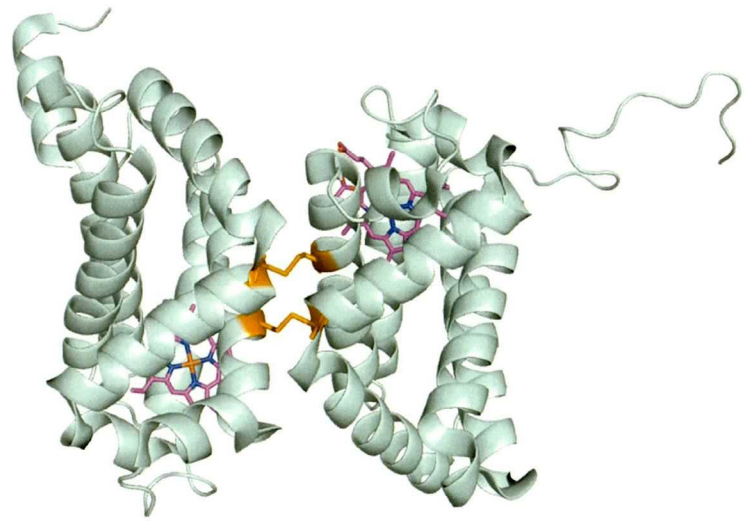

Fig. 1. Cgb の結晶構造(PDB:2dc3)
ヘムをマゼンタ、Cys 残基をオレンジで示した。

し進化したと考えられている[6,8,12]。一方で、Cgbのヘムは上下からHisが配位した6配位構造をとっており、5配位構造をとるMbとは大きく異なっている。また、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[13]と、Cys同士がジスルフィド結合を形成したdimerのもの[14]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[15]が、その詳細についてはわかっていない。しかしながら、Cgbの機能解明には詳細な外来性配位子親和性データの測定が必要不可欠であるため、著者は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。本論文第一章ではジスルフィド結合の影響によるCgbの多量体形成能と親和性変化について論じる。

2. サイトグロビンと活性酸素種（ROS）との関わり

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。しかし、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も考えられている [16]。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 [17]。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 [18,19]。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 [19]。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 [20]。その他、、ROS を介したシグナル伝達や、酸化ストレスからの肝細胞の修復 [21]、センサータンパク質としての役割 [7] といった多くの ROS との関連性が考えられる機能仮説が提案されている一方で、コラーゲン合成に関わるプロリン水酸化酵素と結合可能であることから、コラーゲン合成の際に酸素供給を担っている可能性が示されている [12,22-24] が、Cgb の機能に関しての詳細は解明されていない。

その多岐にわたる機能仮説からCgbは複数の役割を持っていることが考えられるが、著者は多くの機能仮説と関連性を持つCgbとROSとの反応性に着目した。狭義のROSには一重項酸素($^1O_2$)、スーパーオキサイド($O_2^{\cdot -}$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル($HO^{\cdot}$)が含まれ、細胞に対する障害性を持っているとされて

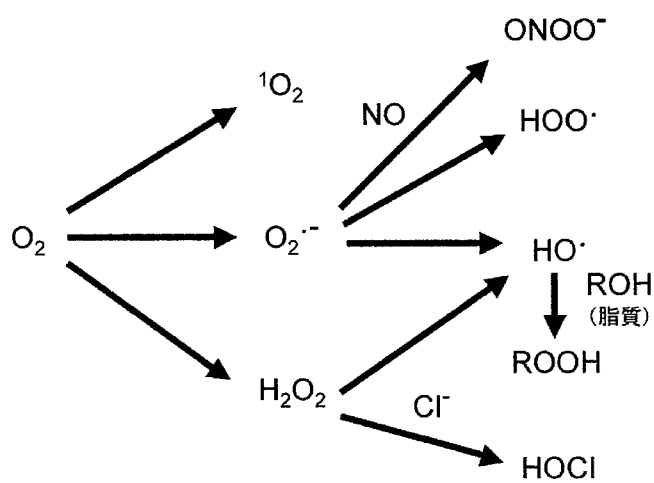

Fig. 2. O_2 を起点とする広義の ROS カスケード

いる。また、スーパーオキサイドとNOとの反応によって生成するペルオキシナイトライト($ONOO^-$)なども広義にはROSの一種とされる。そこで、ROSによる障害を抑えるために、活性酸素カスケードの上流に位置するスーパーオキサイドに注目した。また、ペルオキシナイトライトは細胞障害性を持つと同時に、虚血再灌流時にPI-3-K/Aktシグナルを活性化することで細胞生存率を上昇させるという報告もある[25]。以上の性質はすでに*in vivo*での研究で報告されているCgbの性質と関連性が見られるためペルオキシナイトライトにも注目した。また、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。そこで、本論文第二章では第一章で得られた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述べる。

本論

第一章 サイトグロビンの多量体形成能

Cgb は外来性配位子と結合する場としてヘムを持っている。これは他のグロビンタンパク質と同様の特徴であるが、ヘモグロビン(Hb)や Mb はヘムに対して His がひとつ結合した 5 配位構造をとっているのに対して、Cgb は上下から His が配位した 6 配位構造をとっている。

Fig. 3. 5 配位構造ヘム(左)、6 配位構造ヘム(右)

このヘム鉄は ferric (3 価)、ferrous (2 価)の二つの状態をとり、それぞれの状態で結合可能な外来性配位子が異なる。Ferric 状態ではスーパーオキサイド ($O_2^{\cdot -}$) や CN^- が、ferrous 状態に対しては O_2 や CO といった分子が結合可能である。緒論で示した多くの機能仮説では ROS との関わりが強く示唆されている。また、Cgb が大量発現する虚血再灌流時は細胞環境が酸化状態に傾いており、ferric 状態で存在することが考えられる。そこで ROS の一種であるスーパーオキサイドとの結合状態の詳細を明らかとするため ferric 状態での親和性測定を行うこととした。しかしながらスーパーオキサイドは非常に不安定であり親和性測定には適さないため、代替としてスーパーオキサイドと同様に二原子分子であり負電荷を持つ CN^- をモデルとして親和性を測定することとした。

Ferric Cgb に各濃度の CN^-を添加して紫外可視吸光スペクトルを測定すると Fig. 4. (A)のように等吸収点を通ってスペクトルの変化が観察された。この結果から CN^- 結合型 Cgb のモル分率を算出し、CN^- 濃度に対してプロットすると

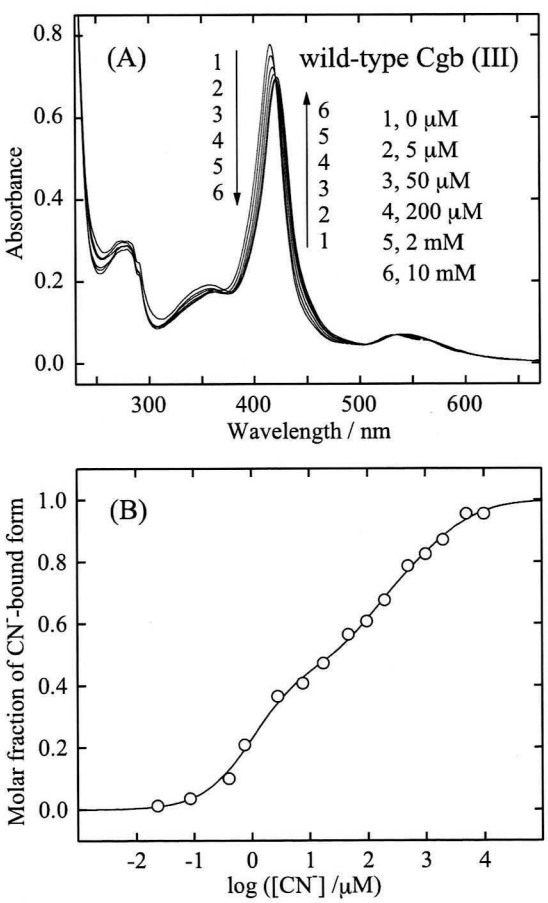

Fig. 4. (A) CN^-添加による Cgb のスペクトル変化、(B)Cgb WT の CN^-滴定曲線

Fig. 4. (B)のような複雑な曲線が得られた。他の論文[15]でもCgbWTの外来性配位子結合の様子は比較的複雑であり、還元剤DTTの添加によってシンプルになるものが多い。またCgbの結晶構造にはCysが関与するdimer型のものとmonomer型のものが両方発表されていることから、配位子結合の複雑性はCys同士のジスルフィド結合によるものであると考えた。

1. ジスルフィド結合によるサイトグロビンの多量体形成

そこで、Cgb WTに対するジスルフィド結合の影響を調べた。マススペクトル測定による確認を試みたが、Cgbが補欠分子団としてヘムを有していること、及びジスルフィド結合によって非常に複雑な構造を有していたことなどから、この方法では解析ができなかった。

そこで、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) +/-の条件でSDS-PAGE によるジスルフィド結合の確認を行った（Fig. 5左）。2-ME(-)条件では非常に多くのバンドが見られ、多くの成分の混在が確認された。一方、2-ME (+)の条件ではシングルバンドが見られた。その分子量は22 kDaでありCgb WTのものと一致した。このことから、Cgbはジスルフィド結合によりいくつかの状態をとっていることが明らかになった。

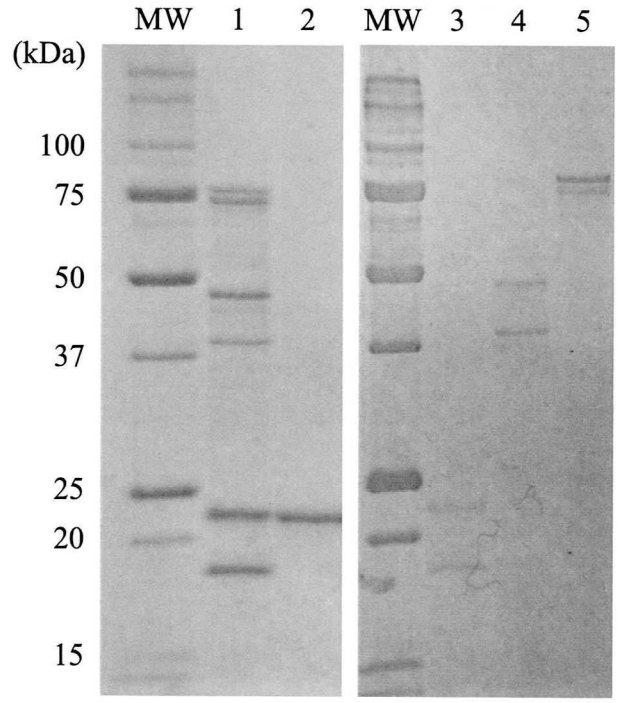

Fig. 5. Cgb の SDS-PAGE. (lane 1) 2-ME(-) mixture. (lane 2) 2-ME(+) mixture. (lane 3) 2-ME(-) monomer fraction. (lane 4) 2-ME(-) dimer fraction. (lane 5) 2-ME(-) tetramer fraction.

続いて、ゲルろ過クロマトグラフィーによりCgb WTの複数成分の分離を試みたところ、Fig. 5右のように三つのfractionに分離できた。その分子量からそれぞれ、monomer fraction、dimer fraction、tetramer fraction とした。Monomer fractionは約22 kDaと18 kDaに、dimer fractionは約38 kDaと48 kDaの二ヶ所に、tetramer fractionでは約75 kDa付近の二ヶ所にそれぞれバンドが見られた。Monomer fractionはPAGEによって二つのバンドが見られたが、22 kDaは2-ME(+)でもバンドが見られた位置であるため、Cys残基がSH型をとっているmonomerであると考えられる。一方、18kDaのバンドはmonomerよりも小さな位置に出ているため、分子内ジスルフィド結合を形成したもの（SS型）であると考えられる。

2. ferric 状態のサイトグロビン多量体の外来性配位子

各 fraction では Cys 残基によるジスルフィド結合によって Cgb が多量化しているため、一般的な還元剤を添加した ferrous の状態では配位子の結合性を測定するのが困難である。そこで、還元剤を必要としない ferric の配位子である CN^-を用いて親和性を測定した。その結果、すべての fraction で 2 段階の結合過程として解析できたが、tetramer と dimer の結果では 2 段階目は非常に小さく、他の fraction が少し混在しているためであると考えられた。一方、monomer fraction では 2 成分目が 3 割を占め、比較的寄与が大きかった。主成分で比較すると、それぞれの fraction では K_d が大きく異なっており、monomer で最も親和性が高く、tetramer で低いという結果であった。

一方、monomer fraction において 3 割を占める成分については、SS 型と SH 型の混在が PAGE で確認されているため、それぞれが異なる親和性を持っている可能性が考えられる。そこで、変異体を用いて二種類の K_d の同定を行った。Cgb の持つ二つの Cys 残基を Ser に置換した変異体 2CS を作製し、PAGE で確認したところ monomer SH 型と同様の状態であることが確認された。そこで 2CS の CN^- に対する K_d を測定したところ、63.0 μM という結果が得られた。これより、この値により近い 324 μM を monomer SH 型の K_d、遠い 2.75 μM を monomer SS 型の K_d とした。以降、monomer fraction は SS 型、SH 型の混在状態の結果が得られるため、SH 型のモデルとして 2CS の結果を用いてそれぞれの SS 型と SH 型の特徴の判断を行った。

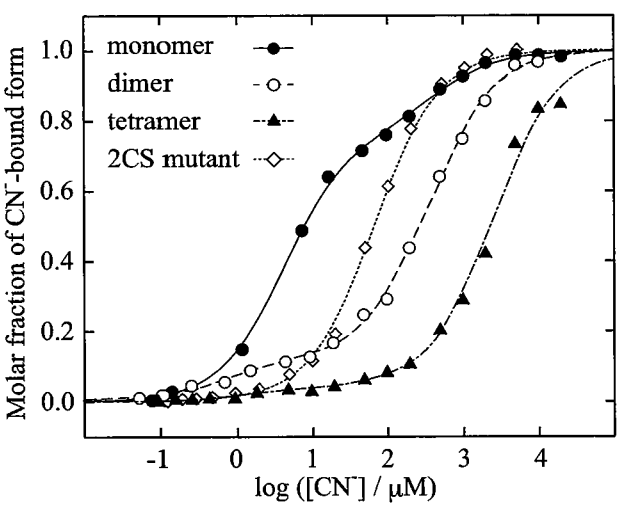

Fig. 6. Cgb の各多量体及び変異体 2CS の CN^-滴定曲線

Table 1. Cgb WT 及び 2CS の CN^-に対する K_d

	K_d (μM)
Tetramer	1.47±2.46 (4%), 2520±296 (96%)
Dimer	0.646±0.211 (16%), 354±19.8 (84%)
Monomer	2.75±0.7 (72%), 324±273 (28%)
2CS	63.0±1.97

3. 多量体の外来性配位子制御機構

親和性の違いの原因を探るため、Cgb WT の各 fraction と変異体 2CS の ferric 状態の共鳴ラマンスペクトルを測定し、活性中心であるヘムの評価を行った。Cgb WT の monomer fraction において酸化還元状態のマーカーバンドであるν_4が 1377 cm^{-1}であり、スピン状態、配位子数を示すν_3、ν_2はそれぞれ 1508 cm^{-1}、1581 cm^{-1}であった。この波数から Cgb WT は 6 配位低スピン状態をとっていることがわかる。一方、dimer fraction では 1377 cm^{-1}、1509 cm^{-1}、1581 cm^{-1}、tetramer fraction では 1377 cm^{-1}、1508 cm^{-1}、1580 cm^{-1}であり、同様に 6 配位低スピン状態をとっていることがわかる。また変異体 2CS では 1375 cm^{-1}、1508 cm^{-1}、1579 cm^{-1}と、やはり大きな違いは見られなかった。以上のことから、Cgb は多量化状態によるヘムの構造的変化は小さいと考えられる。

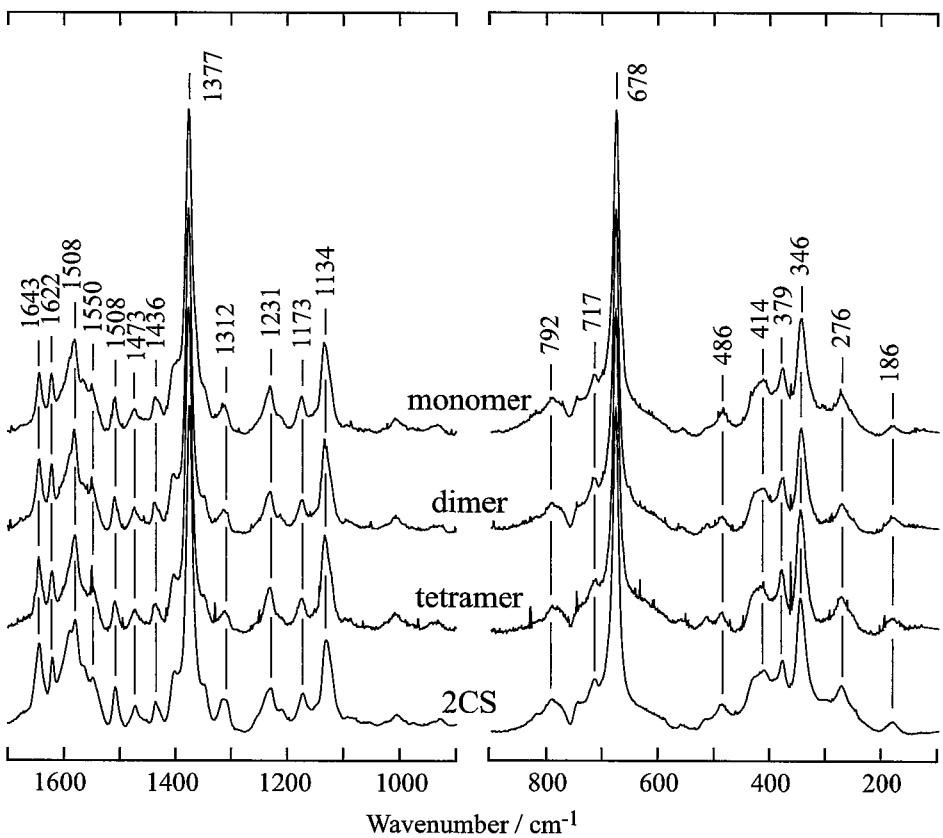

Fig. 7. Cgb WT の各多量体及び変異体 2CS の共鳴ラマンスペクトル

一方で、ferric 状態の Cgb に対して CN^-を配位子として結合速度定数を測定した。得られた結果はすべて 1 段階での解析は不可能であった。これは、前に示したように他の fraction の成分が混在しているためと考えられる。dimer fraction と tetramer fraction では 2

成分として結果が得られ、主成分の k_{on} としてその値を得ることができた。一方、monomer fraction では三段階の結果が得られた。この結果はゲルろ過分離を行う前の mixture での結果と非常に類似したものになった(data not shown)。これは、monomer SS 型、SH 型に加え他の fraction の成分が混在していたためだと考えられる。

結合速度定数の主成分を比較すると、monomer fraction では大きな速度定数が得られ、tetramer fraction になると速度定数は小さくなった。この結果と共鳴ラマンスペクトルの結果を合わせて考えると、多量化による解離定数 K_d の低下はヘムの構造変化によるものではなく、配位子のヘムへのアクセスが制限されたため結合速度定数が低下したことによるものと考えられる。

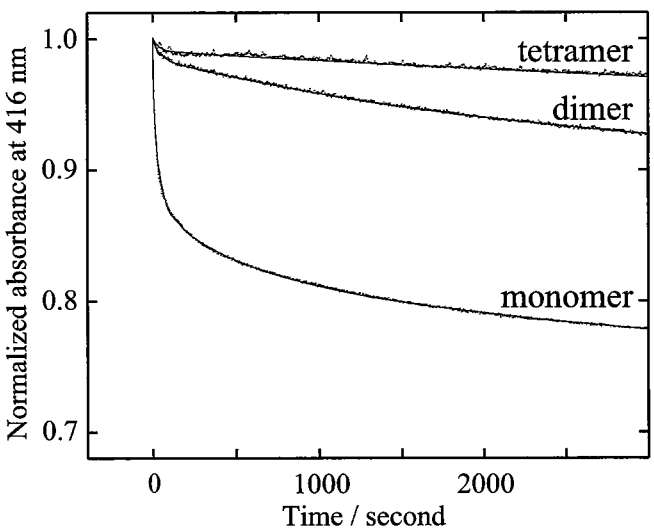

Fig. 8. Cgb WT の各多量体の CN^- に対する結合速度定数測定

Table 2. Cgb WT の CN^- に対する結合速度定数

Fraction	k_{on} (s^{-1})
Tetramer	$3.0 \times 10^{-2} \pm 3.2 \times 10^{-3}$ (11%), $1.8 \times 10^{-4} \pm 1.5 \times 10^{-5}$ (89%)
Dimer	$3.1 \times 10^{-2} \pm 9.6 \times 10^{-4}$ (16%), $3.9 \times 10^{-4} \pm 3.5 \times 10^{-6}$ (84%)
Monomer	$5.6 \times 10^{-2} \pm 4.6 \times 10^{-4}$ (43%), $6.6 \times 10^{-3} \pm 9.1 \times 10^{-5}$ (19%), $6.2 \times 10^{-4} \pm 4.5 \times 10^{-6}$ (38%)

4. ferrous 状態のサイトグロビン多量体の外来性配位子

ここまでの実験から、ferric 状態において多量化状態を変化させると、結合親和性が変化することが明らかとなった。このことから、Cgb の性質は酸化還元環境に関係するものであることが予想された。すなわち、酸化還元環境の変化が Cys 残基の酸化状態に影響し多量化を制御している可能性が考えられた。一方で、Cgb が持つヘム鉄も酸化還元環境の変化に鋭敏な部位であるため、ヘム鉄の酸化還元環境変化と多量化状態の変化についての知見を得るため、ヘム鉄の酸化状態の異なる ferrous 型に対してモデルとして最も測定されている CO の K_d の測定を行った。しかし、従来法であるジチオナイトによる還元ではヘム鉄のみならず Cys 残基まで還元される。そこで、今回は NADH / FMN を用いた光還元によって実験を行った[26]。これは光を当てることで NADH から FMN を介してヘム鉄へ電子を輸送する方法であり、ジスルフィド結合には影響を与えずにヘム鉄だけを還元し、ferrous 型を作製することができる。

結果は ferric のときと同様、tetramer fraction の K_d が 2.4 μM と最も高く、monomer fraction で 0.068 μM と最も低い値が得られ、その差は約 35 倍にもなった。また、変異体である 2CS の K_d は 0.17 μM と monomer fraction と dimer fraction との間の値をとり、こちらも ferric の時と同様の傾向が見られた。しかしながら、こちらの結果では完全に 1 段階として fitting が得られ、複数成分の混在は見られなかった。この理由としては得られた K_d の値が非常に近く、主成分に隠れてしまっている可能性が考えられる。

得られた主成分で比較すると Cgb は多量化が進むほど親和性は下がっていることがわかった。また monomer 間では、完全 SH 型モデルの 2CS は WT monomer fraction よりも親和性が低かった。ferric 状態と同様の結果が得られたことから、Cgb の外来性配位子に対する親和性はヘムの状態によらず、やはり多量化によってヘムへのアクセスが制限されていると考えられた。

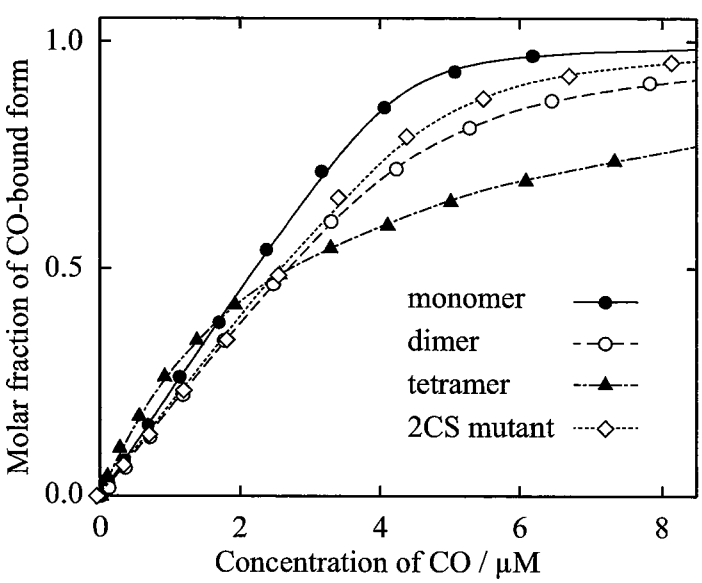

Fig. 9. Cgb の各多量体及び変異体 2CS の CO 滴定曲線

Table 3. Cgb WT 及び 2CS の CO に対する K_d

	K_d (μM)
Tetramer	2.4±0.082
Dimer	0.29±0.0085
Monomer	0.068±0.0022
2CS	0.17±0.0047

5. 考察

以上の結果から、Cgbが持つ複数の多量化体の存在を明らかにすることができた。SDS-PAGEでは各fractionにおいて複数のバンドが観察されたが、これに関しては以下のように考えられる。CgbWTはCys38とCys83という二つのCys残基を持っており、例えば二量体を組むときはCys38とCys83がお互いにジスルフィド結合を形成したtrans-dimerを形成する場合と、Cys38同士がジスルフィド結合を形成したcis-dimerのように、ジスルフィド結合の組み方の違いであると考えられる。一方、monomer fractionのSDS-PAGEで2つのバンドはそれぞれ分子内ジスルフィド結合型（SS型）と非結合型（SH型）が考えられる。このmonomer fractionについてSS型とSH型の混在が同一の酸化還元状態で起こることは通常は考えにくいことだが、他のタンパク質でも同様の状態がいくつか見られている。例えばパパインは5個のCys残基を持っており、1分子中に分子内ジスルフィド結合(SS型)とチオール基(SH型)を共に持っている[27]。その結晶構造を見ると存在位置が近いものは分子内ジスルフィド結合を形成しており、孤立して存在しているものはジスルフィド結合を形成せずCys残基単独で存在している。つまり、同じ酸化還元状態でも立体的な距離が離れていればジスルフィド結合とチオール基が共存できる。そこで、CgbのCys残基に注目してみた。CgbWTのdimer型とmonomer型の結晶構造を比較してみると(Fig. 10)、Cys38が大きく動いていることがわかる。Cys38はA-helixとB-helixの境目に存在しており、dimer型結晶構造では前後がhelixを形成して堅く固定されているが、monomer型のものでは、前後の数残基と共にloopを形成し、Cys83から大きく離れている。このことから、CgbのCys38は前後の残基と共にある程度その位置を変化させることができ、それによりCys残基の酸化還元状態が異なる多量体の混在が可能であると考えられる。またmonomerの分子内ジスルフィド結合形成型（SS型）の存在は今まで明らかにされてはいないが、その存在は過去の論文で示唆されている[15]。Cys38とCys83間の距離は、dimer型の結晶構造でCys残基の持つ硫黄原子間の距離が5.46 Åと近く、可動性をふまえると分子内ジスルフィド結合形成が可能であると考えられる。しかしなが

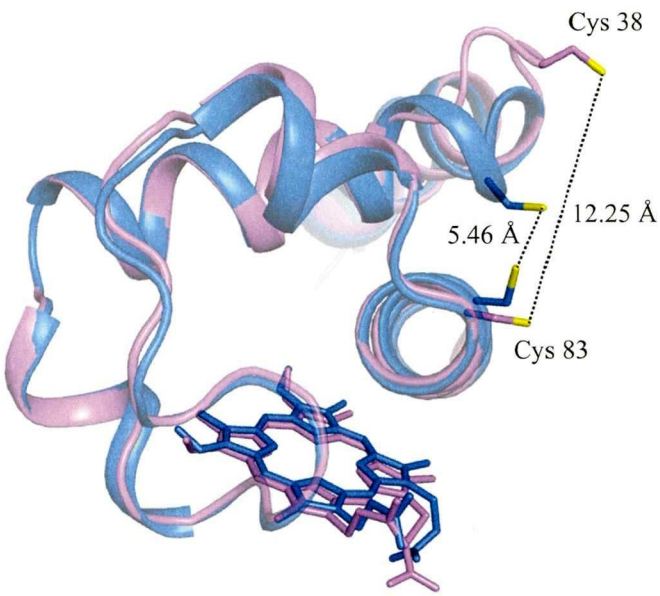

Fig. 10. Cgb monomer(シアン.PDB:1v5h) と Cgb dimer(マゼンタ.PDB:2dc3)の X 線結晶構造での Cys 残基の動き

ら、monomerはSS型とSH型が常に一定の割合で混在しており、様々な条件でこの二つの成分分離を試みたが（pH、塩濃度、Cgb濃度変化など）、単一成分として分離することはできなかった。また、ジチオナイトによって還元後、酸素中に放置することで一時的にmonomer fractionからSS型を増加させることはできたが、その後混在型へと戻ったため、完全にSS型として分離することは不可能であった。

多量体間での親和性に話を移すと、tetramer及びdimerでは各fractionにいくつかの状態を含んでいたが、例えばdimerのtrans型とcis型の親和性に関しては大きな差がないと考えられる。なぜなら、それぞれの滴定で得られた結果より求められた他成分の割合はtetramerで4%、dimerで16%と非常に少量であったが、SDS-PAGEのバンドの濃さから考えてどちらかが滴定の他成分に相当するとは考えにくいからである。つまり、滴定の他成分は分離後平衡により形成した他の多量化形態であり、二つのdimerの形態は非常に近いK_d値を取り主成分を構成していると考えるのが妥当である。これはtetramerについても言えることであり、複数成分が類似のK_d値を取っていると考えられる。一方、monomer fractionでは先に述べたように、SS型は非常に低いK_dをとり、一方、Cys残基がSH型の約100倍の値をとった。このことから、Cgbはmonomer間でも分子内ジスルフィド結合の有無でその親和性が大きく変化することがわかり、親和性制御に関してジスルフィド結合の重要性が示された。

また、鉄の酸化状態を変化させferrous状態に対するCOのK_dを測定した結果でも同様の傾向が見られた。つまり、monomerで最も小さなK_dが、tetramerで最も大きなK_dが得られた。Ferric状態に対するK_dとferrous状態に対するK_dの値の相関関係を見たものがFig. 11である。この結果を見ると値はほぼ正の相関を示しており、Cgbの親和性制御が鉄の酸化状態やリガンドの種類によらず、多量化状態によって同様の制御を受けていることがわかる。

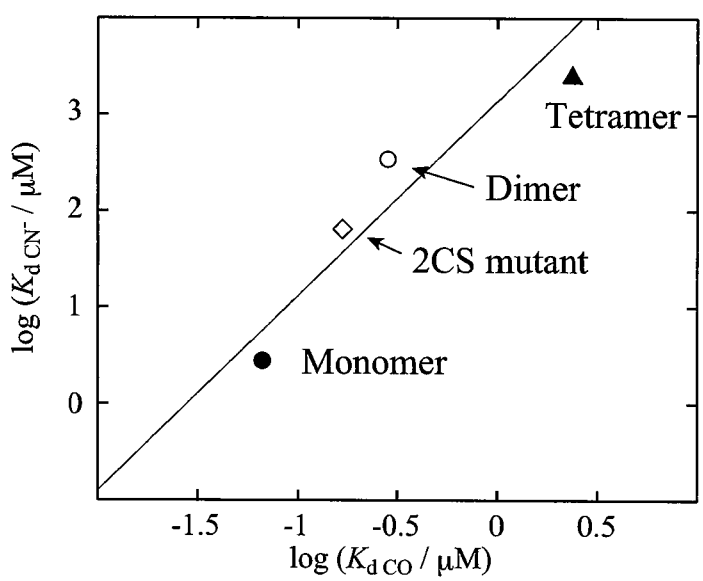

Fig. 11. ferric 状態と ferrous 状態の Cgb の外来性配位子に対する親和性の相関

その原因として kinetics を測定した結果、fraction ごとに大きな違いが観察されたことから、多量化体の親和性の制御方法はヘムの状態変化によらず、リガンドの進入制御によるものであると考えられる。つまり dimer や tetramer はジスルフィド結合の形成によって多量化することにより、サブユニット同士が互いにリガンド進入を邪魔してい

るが、monomer では邪魔な構造がないためよりスムーズにリガンドが進入できると考えられる（Fig.12）。一方、monomer では SH 型と SS 型で大きく K_d が異なっていることからジスルフィド結合の有無によりリガンド進入経路をふさぐような構造変化がおこっていると考えられる。

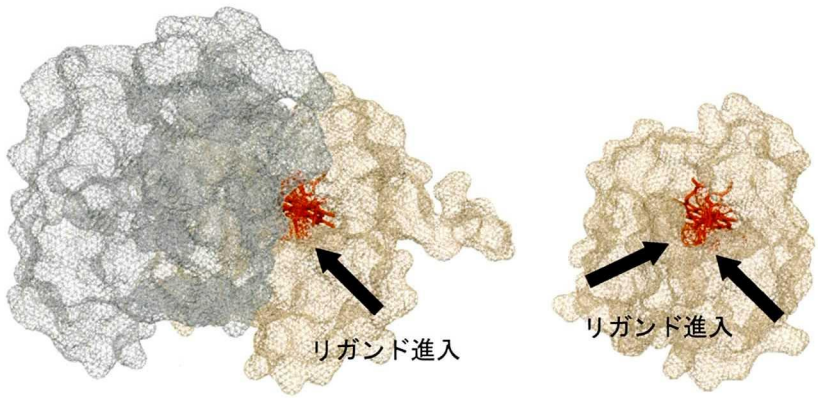

Fig. 12. 予想されるリガンド進入経路
右：monomer（PDB:1v5h）、タンパク質をマゼンタ、ヘム周辺を赤で示した。左：dimer（PDB:2dc3）、サブユニットの一方を茶色、他方をグレーで示した。また、ヘム周辺を赤で示した。

以上の結果から、Cgb は多量体を形成することによってリガンド進入を大きく制御していることを明らかにすることができた。このことは Cgb の機能と密接に結びついていることが予想され、生体内の酸化還元状態を鋭敏に感知してリガンド結合性を変化させることで生体内機能を発現していると考えられたため、多量体形成能と Cgb の機能の一つと考えられている ROS との関わりを調べることとした。

第二章 サイトグロビンと活性酸素種（ROS）との反応

Cgb の生理的機能として抗がん作用や虚血時の細胞保護作用など様々な生体防御作用を持っていると考えられている。この中でCgbの抗がん作用について、マウスのCgb遺伝子をノックアウトしがん原物質を投与したところ、ノックアウトマウスのがん化が著しく増加したことが報告されている[19]。また、このノックアウトマウスでは炎症性サイトカイン(IL-6、IL-1 βなど)が上昇していることから、Cgbの抗がん作用は炎症を抑えることによって発揮されていると考えられ、炎症の原因であるROSを消去しているのではないかと考察されている。また、虚血再灌流が起こると細胞内では非常に多くのROSが産生し、細胞障害を起こすことが知られている[28]。Cgbが虚血に応答して発現量が上昇して細胞保護作用を示すことが発表されているが、これは虚血再灌流に伴って産生するROSを消去することによるのではないかと考えられている。実際にROSの一種である過酸化水素処理した細胞でCgbが存在すると生存率が上昇したという報告もある[20]。

そこで著者はCgbの各多量体とROSとの反応性について評価を行った。ROSの中でもスーパーオキサイドと過酸化水素について反応性を調べたところ、Cgbとスーパーオキサイドとの反応が確認されたため、以下に詳細を示す。

1. サイトグロビンのスーパーオキサイド消去能

Cgbのスーパーオキサイド消去能を蛍光プローブであるBESSo[29,30]を用いて評価した。キサンチンオキシダーゼ/ヒポキサンチン系から発生したスーパーオキサイドの一部に対して抗酸化能を持った物質が消去を行い、残りのスーパーオキサイドがBESSoと反応して蛍光を発する。この蛍光強度を測定し、抗酸化物質添加による蛍光強度の減弱を測定することでスーパーオキサイド消去能を評価した。

その結果、Cgb WT monomerのスーパーオキサイドに対する50%阻害濃度 (IC_{50})は1.53 μMとなった。Dimer、tetramer及び2CSのIC_{50}はそれぞれ3.71 μM、5.58 μM、2.36 μMであり、多少の違いはあるものの、Cgb多量体はすべて同等のスーパーオキサイド消去能を有していた。また、代表的な抗酸化物質であるアスコルビン酸のIC_{50}を測定したところ、12.5 μMであった。アスコルビン酸は10 μM程度で細胞保護作用作用を持つことが報告されていることから[31]、Cgbの細胞内濃度を考慮すると、すべての多量体は十分なスーパーオキサイド消去能を有しており、細胞保護的に働いている可能性があることがわかった。

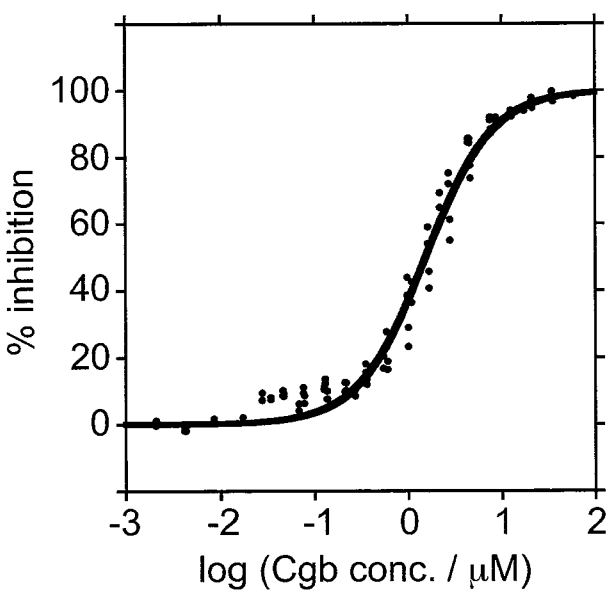

Fig. 13. Cgb WT monomer のスーパーオキサイドに対する阻害曲線

Table 4. Cgb WT 及び2CS のスーパーオキサイドに対する IC_{50}

	IC_{50} (μM)
Monomer	1.53
2CS	2.36
Dimer	3.71
Tetramer	5.58

2. スーパーオキサイドとの反応によるサイトグロビンのoxy化

Cgbのすべての多量体がスーパーオキサイド消去能を有していることが明らかとなったため、その機構の解明を目的に、次にスーパーオキサイドとの反応中のCgbの変化について調べた。キサンチンオキシダーゼ/プテリン系によりスーパーオキサイドを発生させ、Cgbとの反応を経時的にUV-visスペクトルにより測定した。その結果、Cgb WT monomerにおいて、500~600 nm付近に観測されるヘム由来の特徴的な吸収帯（Q帯）でピークのシフトが観察された（Fig. 14 左）。スーパーオキサイド反応後のピークは酸素結合型（oxy型）Cgbのピーク位置と一致した。すなわち、ヘム鉄が3価状態であるferric Cgb WT monomerとスーパーオキサイドがO反応し、ヘム鉄が2価に還元され、そこに酸素が結合したoxy型が生成したことがわかった。

しかしながら、monomer SH型のモデルである変異体2CSではWTのmonomerのような顕著なピークシフトは観察されなかった（Fig. 14 右）。さらに、その他の多量体（dimer、tetramer）でも顕著なピークシフトは観察されなかったことから、同様のスーパーオキサイド消去能を持つにも関わらず、Cgb多量体間で挙動が異なることが示された。また、WT monomerではoxy型が確認され、変異体2CSでは確認されなかったことから、スーパーオキサイドとの反応によるoxy型の生成はmonomer SS型の特徴であると考えられた。

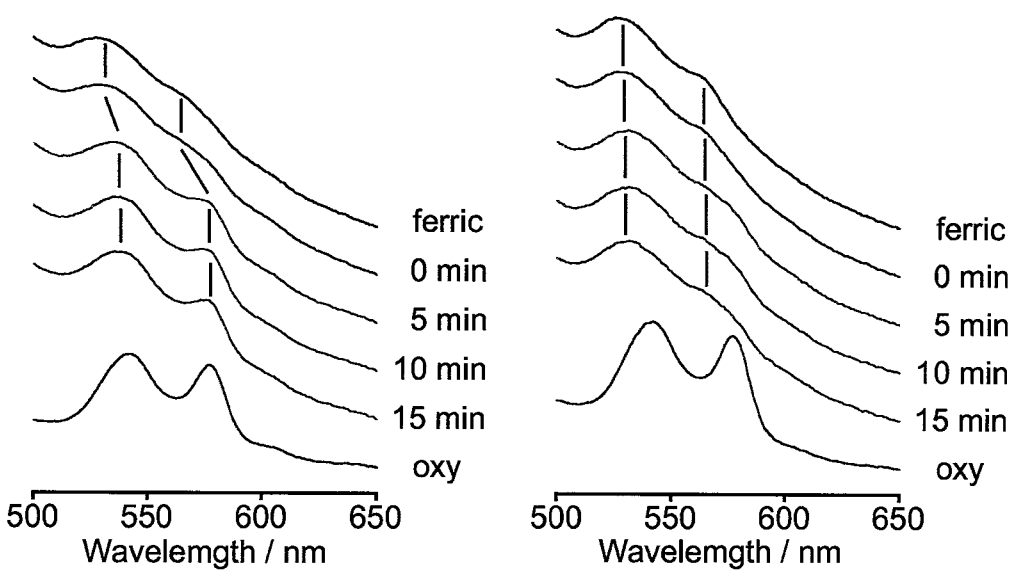

Fig. 14. スーパーオキサイドとの反応による Cgb WT monomer(左)、2CS(右)の紫外可視吸光スペクトル変化

3. oxy型サイトグロビンとNOの反応

次に著者は、スーパーオキサイドとの反応によって生成したoxy型Cgbに注目した。グロビンタンパク質共通の特徴としてoxy型タンパク質はNOとの反応性を持っており、Cgbも同様にoxy型がNOと反応してferric型を生成するという性質を持っている[32]。

また、スーパーオキサイドとNOとの組み合わせもCgbにとって重要な意味を持っていると思われる。スーパーオキサイドはNOの反応により$ONOO^-$を産生する。$ONOO^-$は広義のROSの一種で、H^+やCO_2と反応することで反応性の高いONOOHや$ONOOCO_2$を産生して細胞障害性を示す。一方で虚血再灌流時にPI-3-K/Aktシグナルを活性化することで細胞生存率を上昇させるという報告もある[25]。以上の性質はすでに*in vivo*の実験により報告されているCgbの性質と関連すると思われるため、スーパーオキサイド及びNOとCgbとの反応性を評価した。

はじめに紫外可視吸光スペクトルにより、Cgbの変化を調べた。2節と同様にferric Cgbにスーパーオキサイドを加えスペクトル変化を確認した。十分に時間が経ち、スペクトルがそれ以上変化しなくなったところで終濃度が10~15 μMになるようNO溶液を加え、同様にスペクトルの変化を測定した。Cgb WT monomerはスーパーオキサイドとの反応によりoxy化し、NO添加によってferric状態へ戻ることが確認された。一方で、スーパーオキサイドとの反応でoxy化が確認されなかった成分（dimer、tetramer、2CS）では、やはりNOの添加による変化は見られなかった。

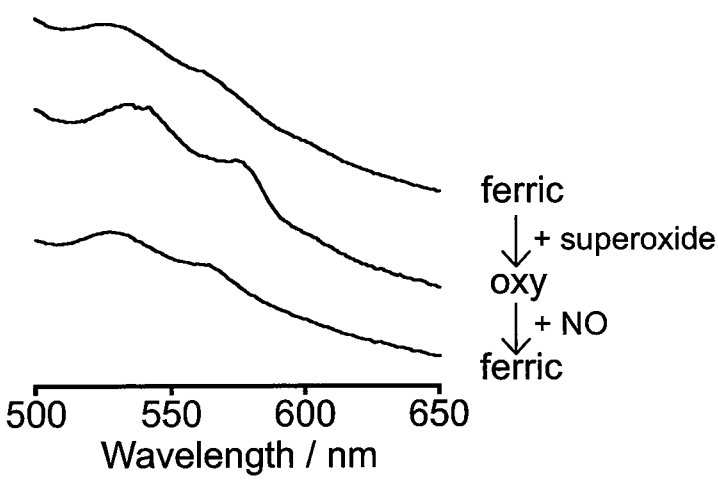

Fig. 15. スーパーオキサイドおよびNOとの反応による
Cgb WT monomerのUV-visスペクトル変化

4. サイトグロビンの$ONOO^-$の産生促進能

次に、Cgbとスーパーオキサイド及びNOとの反応による生成物についての評価を行った。先にも述べたがスーパーオキサイドとNOが反応すると$ONOO^-$が産生するため、Cgbによる$ONOO^-$産生量に対する影響についてDCDHFを用いて評価した。DCDHFは$ONOO^-$と反応し、500 nmに大きな吸収を持つDHFへと変化する。Cgbを加えず、スーパーオキサイドとNOをDCDHFと反応させると、DHF特有の吸光度が上昇し、$ONOO^-$の産生が確認された。次にスーパーオキサイドとNOの反応系にCgb WT monomerを添加しDHFの産生量を算出したところ、Cgb WT monomerの濃度依存的に産生量が上昇していることが確認された（Fig. 16 左）。その他の成分（dimer、tetramer、2CS）についても同様に測定しグラフにしたものがFig. 15の右である。oxy型の形成状況に対応して、WT monomerでDHFの産生量がCgb濃度依存的に大きく増加していることが確認された一方で、その他の成分では、DHF産生量の増加は小さなものであった。

以上の結果より、Cgb WT monomerはスーパーオキサイドとNOとの反応によって$ONOO^-$の産生を促進する働きを持っていると考えられた。また、この産生促進能は他の多量体（dimer、tetramer）及び変異体2CSでは確認されなかったことから、monomer SS型固有の特徴であると考えられた。

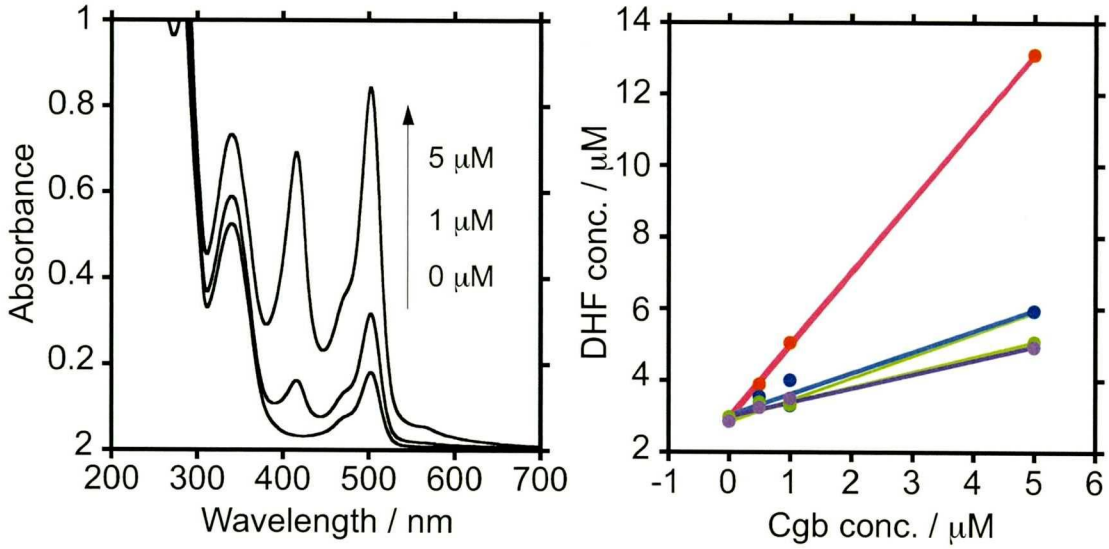

Fig. 16. 左：Cgb WT monomer 濃度による DHF 産生量の紫外可視吸収スペクトル、右：Cgb WT の濃度依存的 DHF 産生量（赤: monomer、青: dimer、紫: tetramer の各 fraction、緑: 2CS）

5. 考察

本研究により、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。しかしながら、スーパーオキサイドとの反応によって起こるCgbの変化は多量体間で異なっていた。Cgb WT monomerは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。しかしながら、それ以外の成分（WT dimer、WT tetramer、変異体2CS）では顕著なスペクトル変化が観察されずoxy型をとらえることはできなかった。Monomer SH型のモデルである2CSでも観察されなかったことから、oxy型生成はWT monomerの中でも特にSS型の特徴であると言える。しかしながら、WT monomer SS型以外の多量体でスーパーオキサイドとの反応でoxy型が形成していないとは言い切れない。Cgbと同様に6配位構造のヘムを持つグロビンタンパク質であるニューログロビン（Ngb）はoxy型の構造が非常に不安定であり、oxy型が生成すると速やかに自動酸化によってferric状態へと変化することが報告されている[33]。また、Ngbも同様にジスルフィド結合による親和性制御を受けており[34]、ジスルフィド結合を還元するとoxy型の自動酸化が速まることが本研究室で観察されている。すなわち、WT monomer SS型以外の成分ではoxy型が生成すると速やかに自動酸化が起こり、ferric状態に戻ることで次のスーパーオキサイドと反応していると考えられた。

一方、WT monomer SS型は生成したoxy型が安定であるため、次の反応を起こすことが可能であった。すなわちWT monomer SS型を含むWT monomer fractionでのみ、oxy型と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(Fig. 17)。さらに、Cgb WT monomer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。

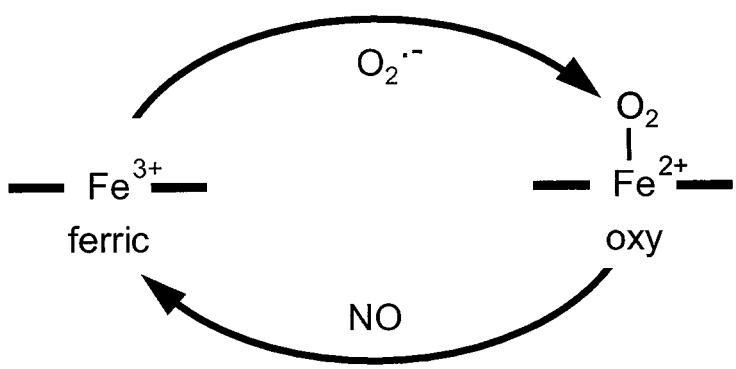

Fig. 17. Cgb WT monomer SS 型の反応サイクル

さらに１章の結果を踏まえて、Cgb の生理的機能について考察する。Cgb の機能仮説については緒論で述べたように、虚血再灌流に伴う細胞保護作用、炎症系カスケード抑制による抗がん作用、ROS によるシグナル伝達など非常に多くのが提案されている[7,16~21]。ところで１章での結果から、Cgbは数多くの多量体を有しており、それぞれが異なる性質を有していることが明らかとなった。すなわちCgbは性質の異なる多量体により、上記に示した複数の機能を同時に担っていることも十分に予想される。そこで本研究の結果から考えられるCgbの機能仮説を以下に示す。

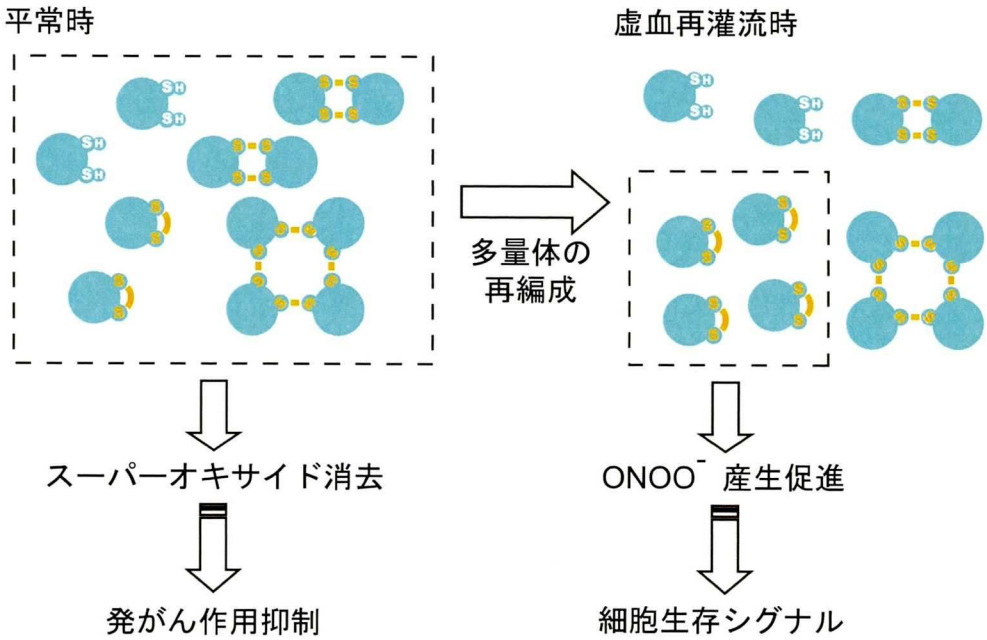

Fig. 18. 本研究結果から予想される Cgb の生体内機能

Cgb は数多くの多量化状態を持つが、そのすべての状態でスーパーオキサイドとの反応性が確認された。すなわちCgbはどのような状態においてもスーパーオキサイドの消去能を有していることがわかる。このことからCgbは多量体の混合状態にかかわらず恒常的にスーパーオキサイドを消去することで、細胞を炎症などの障害から保護していると考えられる。さらに、Thuyらの論文によるとCgbのもつ抗がん作用は抗炎症作用によると考察されていることから[19]、Cgbの持つスーパーオキサイド消去能は抗がん作用を発揮していると考えられる。

一方で、Cgbの多量体はジスルフィド結合によって形成されている。このジスルフィド結合は周りの酸化還元状態に対応して開裂・再形成を起こすことが他のタンパク質について報告されている[35,36]。また、虚血再灌流時には細胞内の酸化還元状態は大きく変化し虚血時は還元的状況になるためジスルフィド結合は開裂し、その後の再灌流が起こると細胞は酸化的状況になりジスルフィド結合が再形成されることも他のタンパク質に

ついて報告されている。すなわちCgbも同様に虚血再灌流時にはジスルフィド結合の開裂・再形成が起こり、多量体の再編成が行われることが予想される。これにより適切な量のCgb monomer SS型が形成され、これが$ONOO^-$の産生を促進する。産生された$ONOO^-$はPI-3-K/Aktシグナルを活性化することで、虚血再灌流に伴う細胞死から細胞を保護する役割がある。しかしながら、多量の$ONOO^-$はONOOHや$ONOOCO_2$を産生して細胞障害性を示すため、Cgbにはジスルフィド結合を介した複雑な多量体の制御機構を有していると考えられる。

以上の結果を創薬の観点からとらえると、Cgbの持つ性質を活用して虚血再灌流に伴う障害から細胞を保護する薬剤を開発できる可能性がある。このような薬剤として現在、日本国内ではラジカットのみが上市されている。これは発生したラジカルを消去することによって細胞障害を抑えている。一方でCgbも同様に虚血再灌流時の細胞障害からの細胞保護作用を持っている。本研究結果から、細胞の生存シグナルを上昇させる$ONOO^-$の産生にCgbのmonomer SS型が大きく関わっていることを明らかとした。すなわち、Cgbのジスルフィド結合を制御してmonomer SS型の割合を増加させるような薬剤、もしくはmonomer SS型の$ONOO^-$産生促進能をより高めることができる薬剤は、現在上市されている薬剤とは異なる作用機序で虚血再灌流に伴う細胞障害を抑える薬になりうる。以上のことから、Cgb研究は創薬に関しても大きく貢献できると期待される。

結論

本研究により、Cgbはジスルフィド結合の結合様式によってmonomer SS型、monomer SH型、dimer、tetramerの複数の多量化状態を形成し得る事が明らかとなった。また、それぞれの多量体で外来性配位子親和性は大きく異なっており、性質が多様であることを見出した。また、共鳴ラマンスペクトルの測定により、多量体の外来性配位子に対する親和性の違いはヘム環境の変化によるものではないことがわかった。一方で結合速度定数はmonomerが最も大きく、tetramerが最も小さいということが明らかとなった。これは親和性の大小と相関しており、ジスルフィド結合の形成によって外来性配位子のヘム部分へのアクセスがしづらくなったことが親和性の違いに影響を与えているものであると考えられた。

また、Cgbのすべての多量体はROSの一種であるスーパーオキサイドの消去能を持っていることを明らかとした。その中で、monomer SS型のみがスーパーオキサイドとの反応によりヘムがferricからoxyへと変化していた。Monomer SS型Cgbはoxy状態でNOと反応し$ONOO^-$の産生を促進する能力を有することを見出した。

以上の知見から、Cgbの生体内反応を考察する。*In vivo* の研究により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[20]。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$ONOO^-$産生能も有している。$ONOO^-$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。

謝辞

本研究を行うに際し、始終御懇意なる御指導、御鞭撻および御校閲を賜りました 大阪大学大学院薬学研究科 宇野 公之 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文作成に際し、御指導ならびに御校閲を賜りました 大阪大学大学院薬学研究科 高木 達也 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文作成に際し、御指導ならびに御校閲を賜りました 大阪大学大学院薬学研究科 小比賀 聡 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本論文作成に際し、御指導ならびに御校閲を賜りました 大阪大学大学院薬学研究科 大久保　忠恭 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を進める上で、始終有益なる御指導と御助言をいただきました 大阪大学大学院薬学研究科 青山 浩 准教授、山下 沢 助教に心より感謝申し上げます。

本研究を行うに際し、共同研究者として御助言、御協力を賜りました 大阪市立大学大学院医学研究科 河田 則文 教授、吉里 勝利 教授に深く感謝申し上げます。

本研究を行うに際し、試料の提供及び数々の御助言、御協力を賜りました 理化学研究所播磨研究所城生体金属科学研究室 主任 城 宜嗣 先生、並びに同研究室 澤井 仁美 博士（現・分子科学研究所）に深く感謝申し上げます。

本研究を進める上で御助言をいただきました 大阪大学大学院工学研究科 大洞　光司 助教に深く感謝いたします。

本研究を進める上で多大なる御協力をいただき、研究室生活を有意義なものとしてくださいました 大阪大学大学院薬学研究科 ハフシ レイラ 博士に深く感謝いたします。

日々御討論とともに、研究室生活を有意義なものにしてくださいました 大阪大学大学院薬学研究科分子反応解析学分野の皆様に感謝いたします。

また、研究の機会を与え、支えてくれた家族に感謝いたします。

実験の部

試薬一覧

測定試薬は、特に指定のない場合以下のものを用いた。

tryptone: BD

yeast extract: BD

NaCl: Nacalai Tesque

NaOH: Wako

ampicillin sodium salt: Wako

5-ALA (5-amino levulinic acid): Cosmo Bio

IPTG (Isopropyl-b-D(-)-thiogalactopyranoside): Wako

Tris-HCl (Trizma base): Sigma

EDTA (EDTA2Na): Dojindo

dithionite (Sodium Hydrosulfite): Wako

DEAE Sepharose Fast Flow: Amersham Biosciences

Sephacryl S-200: GE Healthcare

NaH_2PO_4: Wako

pyridine: Aldrich

Dialysis Membrane Size 36: Wako

KCN: Wako

DTT (dithiothreitol): Wako

BESSo: Wako

L-ascorbic acid: Wako

HEPES: Wako

Hypoxanthine (HPX): SIGMA

xanthine oxidase (XO): nacalai tesque

pterin: SIGMA

2',7'-dichlorofluorescein asetate: SIGMA

カタラーゼ (catalase from bovine liver): SIGMA

グルコースオキシダーゼ: Wako

グルコース: Wako

水は全て Milli-Q 水を用いた。

測定機器一覧

測定機器は、特に指定のない場合以下のものを用いた。

DNAシークエンサー　Gene ReadIR 4200, LiCor
超音波発生装置　Sonifier 450: Branson
超遠心機　7930: Kubota
フラクションコレクター　Model 2110: Bio-Rad
蛋白質濃縮チューブ　Amicon Ultra-15 10,000 MWCO: Millipore
紫外可視分光光度計　UV-2450: Shimadzu
マイクロプレート蛍光計　FP-6500: JASCO
pH メーター　pH meter M-12: Horiba
ラマン分光器　NR-1800: Jasco
Kr Laser　INNOVA 300C: Coherent
遠心機　Centrifuge 5415D: Eppendorf
　　MX-300: Tomy
　　3700: Kubota
恒温振盪培養器　Personal-11: Taitec
超純粋製造装置　MQ synthesis: Millipore
オートクレーブ　SX-500: Tomy

DNA の調整

クローニング用ベクターpBluescript II KS(+)組み込まれたWT遺伝子を鋳型とし、QuikChange 変異導入キット(Stratagene)を用いて変異を導入した。変異導入用プライマー(北海道システムサイエンス)を用いてPCR後Dpn Iで処理し、ベクターを大腸菌 XL-1 Blue MRF' (Stratagene)に形質転換した。LB寒天培地にて培養・選別したコロニーをLB液体培地で培養し、Minipreps purification kit(Promega)によりプラスミドを抽出した。塩基配列をDNAシークエンサーにて読み取り、変異導入を確認した。確認済みプラスミドを制限酵素Bam HI/Nde Iで処理し、同様の制限酵素処理を行っていた発現用ベクターpET 15bに組み替えた。その後大腸菌BL21-Gold(DE3)に形質転換した後LB寒天培地にて選別を行い、大量培養に用いるグリセロールストックを作製した。

大量培養及び精製

0.1mg/mLアンピシリンを含む2LのLB培地を2Lマイヤーに作製し、グリセロールストックを植菌してラップで二重に密栓した後、37℃で12時間振盪培養して、前培養液とした。

0.1mg/mLアンピシリンを含む4L LB培地を5Lマイヤーに作製し、前培養液500mLを加えラップで二重に密栓した後37 ℃、振盪速度80 rpmの条件で培養した。OD_{600} が0.4~0.6において、IPTG及び5-ALAを最終濃度が0.5 mMになるように加えタンパク質の発現を誘導した。その後 15 時間培養した後、遠心分離 (5500g、15min) により菌体を回収し、-80 ℃ で一時冷凍した。

冷凍した菌体を、Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH=8.0)、100 mM NaCl、10 mM Imidazole)で懸濁し、超音波を用いて完全に破砕した。得られた溶液を超遠心(37000rpm、1hr)により沈殿と Cgb を含む上清に分離した。その後、Ni-NTA Agarose カラムにより Cgb を精製した。上清をカラムに吸着させ Lysis buffer と同じ Wash buffer で洗浄後、250 mM Imidazole を含む溶出用緩衝液で His-tag のついた Cgb のみを溶出した。溶出した試料に 0.1 μL/mg cell の thrombin を加え Dialysis buffer 1(50 mM Tris-HCl (pH=8.0)、100 mM NaCl、10mM Imidazole、2.5 mM $CaCl_2$)で 4℃、二晩透析し His tag を切断した。透析後の試料に 1.6 μL/mg cell の Streptavidin Agarose を加えて 4℃で 2 時間反応させた後、13000 rpm で 15 分間遠心して His tag を除去した。再び上清を Ni-NTA Agarose カラムに通し、カラムに吸着しない試料を回収し、His-tag の除去された Cgb 溶液とした。Dialysis buffer 2 (50 mM Tris-HCl (pH=8.0)、100 mM NaCl、10 % Glycerol)で 4℃、一晩透析した後、濃縮用チューブを用いて濃縮し、緩衝液をリン酸 buffer(10mM リン酸、100mM NaCl、pH=7)置換した後最終標品とした。

SDS-PAGE

Sample buufer 10μLにCgb溶液(~20μM)を5μL加えこれを2-ME(-)サンプルとした。一方、sample buufer : 2-メルカプトエタノール(2-ME) = 10 : 1で混合したもの10μLにCgb溶液(~20μM)を5μL加えたサンプルを2-ME(+)サンプルとした。これらサンプルを95℃で5min反応させてサンプルを準備した。準備したサンプルを電気泳動槽(ATTO)にセットした12.5%のゲルにアプライして電気泳動した。その後ゲルを固定液(メタノール 20mL、酢酸 7.5mL、MilliQ 72.5mL)に5min、染色液(CBB R-250 2.5g、酢酸 50mL、メタノール 500mL)に5min浸け、脱色液(メタノール 50mL、酢酸 70mL、MilliQ 800mL)で一晩脱色した、撮影した。

成分分離

Sephacryl S-200を1mのカラムにつめ、そこに濃縮したCgbを添加しリン酸buffer(pH=7)で溶出させた。溶出液を1~2mLずつfraction collectorで回収し、SDS-PAGE(2-ME(-))で各フラクションをSDS-PAGEで確認した。確認された各フラクションの中で、monomer、dimer、tetramerを純粋に含むものを選別しそれぞれのフラクションとし、必要であれば濃縮して測定に用いた。

CN^- 滴定(親和性測定及び結合速度測定)

リン酸buffer(10mM リン酸、100mM NaCl、pH=7)で希釈した濃度一定の試料溶液を複数用意し、そこへ各濃度のKCNを加えたものを調製した。調製した溶液を冷暗所で一晩放置し、十分に反応させた。各KCN濃度の溶液の紫外可視吸収スペクトルからCN^-の解離定数(K_d)を求めた。

また、リン酸bufferでCgbが5μMになるように希釈した。そこに終濃度が100μMになるようにKCNを添加し、ferric状態のSoret帯のピーク(415~418nm)での紫外可視吸光スペクトルの減少を2秒ごとに3000秒間、結合速度を測定した。

共鳴ラマンスペクトル

共鳴ラマンスペクトルの測定には、トリプル分光器(NR-1800)とCCD検出器(BUD-420)を使用した。試料濃度が約100μMとなるようにリン酸buffer(10mM リン酸、100mM NaCl、pH=7)で希釈した。ラマン用回転セルに移し、セルを回転させながら、Kr^+ Laser(励波長 406.7 nm)を用いて、レーザー出力を 100 mW として測定を行った。

CO 滴定（親和性測定）

以下の組成で嫌気 buffer を作製し、これを実験に用いた。

・嫌気 buffer

0.5 M リン酸 buffer (pH7)	2 mL
2 mM EDTA (Wako)	20 μL
Glucose (Wako)	7.2 mg
480 units/mL Glucose oxidase (Wako)	334 μL
20,000 units/mL Catalase (Wako)	260 μL
MilliQ	20 mL

嫌気 buffer に窒素ガスを通し酸素の置換を行ったものに 十分に CO ガスを吹き付けたものを CO ストックとした。

十分に窒素ガスで酸素の置換を行った嫌気 buffer をスクリューキャップ付きのセルに満たし、Cgbを加えた。さらに、セルに200 mM NADH 16 μL と2 mM リボフラビン4μLを加え、445 nm の光を照射することで Cgb を還元した。ここに調整した CO ストックから CO を少量ずつ加えて滴定し、紫外可視吸収スペクトルを測定した。さらにウマミオグロビンをジチオナイトにて還元し、調製したCOストックで滴定を行い、CO ストック中の溶存 CO 濃度を規定し、Cgb の紫外可視吸収スペクトルの変化とあわせて CO の解離定数 (K_d) を求めた。

スーパーオキサイド消去能測定

HEPES(11.92 g, 50 mmol)、NaOH(828 mg, 29.7 mmol)および NaCl(4.63 g, 79 mmol)を水に溶解し、全量1LとしたのちpH7.4に調整して、50mM HEPES bufferを調製した。この50mM HEPES buffer(200 mL)を水で希釈し、全量1LにしてpH7.4に調整し、10mM HEPES bufferを調製した。

測定はマイクロプレート蛍光計(JASCO)を用いて行いった。96穴マイクロプレートに10mM HEPES bufferにCgbを約0.01~400μMになるように分注し、BESSo 20μM、ヒポキサンチン(HPX) 50μM、キサンチンオキシダーゼ(XO) 6.25 munits/mLの終濃度になるように加えた。すべて加えた後にプレートを傾け、ゆすって液面を平らにし、10分間37℃乾燥機でインキュベートし、その後、検出波長λ_{ex} = 505 nm; λ_{em} = 544 nm （cut off = 530 nm）で二回測定し、平均値を結果とした。

スーパーオキサイドとの反応及び NO との反応による Cgb の変化

110 units/mL のカタラーゼを含むリン酸 buffer(10mM リン酸、100mM NaCl、pH=7)に Cgb が 5μM になるように加え、紫外可視吸収スペクトルを測定して ferric 状態のものとした。そこに、終濃度がそれぞれ 10 munits/mL、50 μM になるように XO と pterin を加え経時的に変化がなくなるまでスペクトルを測定した。

さらに、上記の方法でスーパーオキサイドと反応した Cgb 溶液に、NO(300~500μM)を 20μL 加え、経時的に変化がなくなるまでスペクトルを測定した。

ペルオキシナイトライト産生促進能測定

2',7'-dichlorofluorescein asetate を 7.07mg 測りとり、2mL の 20mM NaOH に溶解し、ボルテックス後 10min 室温で放置し、その後冷蔵庫に保存したものを 7.25 mM 2',7'-dichlorofluorescein (DCDHF)ストックとした。また、1.63mg pterin を 40mL の MilliQ 水に溶解したものを 250μM pterin ストックとした。また本実験では buffer として 100mM リン酸 buffer に 0.3mM の EDTA を加えたものを使用した。

エッペンドルフチューブに終濃度 0.1μM DCDHF、50 μM pterin、10 munits/mL XO、110 units/mL カタラーゼになるように加え、さらに各濃度の Cgb を加えて計 500μL になるように buffer で調製した。さらに濃度 300~500μM NO を 5μL 加えパラフィルムでチューブの口を密閉した。さらに 37℃の湯浴で 10 min 反応させた後、氷浴で 5 min 静置した。その後、200~700nm の紫外可視吸収スペクトルを測定し、500nm の吸光度を用いて産生した DHF の濃度を算出した。

参考文献

1. Wyman J. (1966) *J Biol Chem*, **241,** 115-21.
2. Flögel U, Merx MW, Godecke A, Decking UK, Schrader J. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98,** 735-40.
3. Shiva S, Huang Z, Grubina R, Sun J, Ringwood LA, MacArthur PH, Xu X, Murphy E, Darley-Usmar VM, Gladwin MT. (2007) *Circ Res*, **100,** 654-61.
4. Trent JT III, Watts RA, Hargove MS. (2001) *J Biol Chem*, **277**, 19538-19545.
5. Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, Yoshizato K. (2001) *J Biol Chem*, **276**, 25318-25323.
6. Pesce A, Bolognesi M, Bocedi A, Ascenzi P, Dewilde S, Moens L, Hankeln T, Burmester T. (2002) *EMBO Rep,* **3**, 1146-1151.
7. Geuens E, Brouns I, Flamez D, Dewilde S, Timmermans JP, Moens L. (2003) *J Biol Chem*, **278,** 30417-30420.
8. Burmester T, Ebner B, Weich B, Hankeln T. (2002) *Mol Biol Evol,* **19**, 416-421.
9. Gillemans N, McMorrow T, Tewari R, Wai AW, Burgtorf C, Drabek D, Ventress N, Langeveld A, Higgs D, Tan-Un K, Grosveld F, Philipsen S. (2003) *Blood*, **101**, 2842-2849.
10. Sawai H, Kawada N, Yoshizato K, Nakajima Y, Aono S, Shiro Y. (2003) *Biochemistry*, **42,** 5133-5142.
11. Nakatani K, Okuyama H, Shimahara Y, Saeki S, Kim DH, Nakajima Y, Seki S, Kawada N, Yoshizato K. (2004) *Lab Invest*, **84**, 91-101.
12. Hankeln T, Ebner B, Fuchs C, Gerlach F, Haberkamp M, Laufs TL, Roesner A, Schmidt M, Weich B, Wystub S, Reuss S, Bolognesi M, de Sanctis D, Marden MC, Kiger L, Moens L, Dewilde S, Nevo E, Avivi A, Webwe RE, Fago A, Burmester T. (2005) *J Inorg Biochem,* **99**, 110-119.
13. Sugimoto H, Makino M, Sawai H, Kawada N, Yoshizato K, Shiro Y. (2004) *J Mol Biol*, **339,** 873-885.
14. Makino M, Sugimoto H, Sawai H, Kawada N, Yoshizato K, Shiro Y. (2006) *Acta Crystallogr, Sect D,* **62,** 671-677.
15. Lechauve C, Chauvierre C, Dewilde S, Moens L, Green BN, Marden MC, Célier C, Kiger L. (2010) *FEBS J*, **277,** 2696-704.
16. Stagner JI, Parthasarathy SN, Wyler K, Parthasarathy RN. (2005) *Transplant Proc,* **37**, 3452-3.
17. Shaw RJ, Omar MM, Rokadiya S, Kogera FA, Lowe D, Hall GL, Woolgar JA, Homer J, Liloglou T, Field JK, Risk JM. (2009) *Br J Cancer,* **101**, 139-44.
18. Fang J, Ma I, Allalunis-Turner J. (2011) *Radiat Res,* **176**, 198-207.

19. Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, Wakasa K, Iizuka M, Ogawa T, Mori M, Sekiya Y, Momen S, Motoyama H, Ikeda K, Yoshizato K, Kawada N. (2011) *Am J Pathol,* **179**, 1050-60.
20. Nishi H, Inagi R, Kawada N, Yoshizato K, Mimura I, Fujita T, Nangaku M. (2011) *Am J Pathol,* **178,** 128-39.
21. Xu R, Harrison PM, Chen M, Li L, Tsui TY, Fung PC, Cheung PT, Wang G, Li H, Diao Y, Krissansen GW, Xu S, Farzaneh F. (2006) *Mol Ther*, **13**, 1093-1100.
22. Hankeln T, Wystub S, Laufs T, Schmidt M, Gerlach F, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Burmester T. (2004) *IUBMB Life.,* **56,** 671-9.
23. Fago A, Hundahl C, Malte H, Weber RE. (2004) *IUBMB Life.,* **56,** 689-96.
24. Schmidt M, Gerlach F, Avivi A, Laufs T, Wystub S, Simpson JC, Nevo E, Saaler-Reinhardt S, Reuss S, Hankeln T, Burmester T. (2004) *J Biol Chem.,* **279,** 8063-9.
25. Bolanos JP, García-Nogales P, Almeida A. (2004) *Curr Pharm Des*, **10**, 867-77.
26. Brunori M, Giuffrè A, Nienhaus K, Nienhaus GU, Scandurra FM, Vallone B. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A.,* **102,** 8483-8.
27. Bühling F, Fengler A, Brandt W, Welte T, Ansorge S, Nägler DK. (2000) *Adv Exp Med Biol.,* **477,** 241-54.
28. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. (1983) *Surgery,* **94,** 428-32
29. Maeda, H., Yamamoto, K., Nomura, Y., Kohno, I., Hafsi, L., Ueda, N., Yoshida, S., Fukuda, M., Fukuasu, Y., Yamauchi, Y., and Itoh, N. (2005) *J. Am. Chem. Soc.*, **13**, 1946-1954.
30. Maeda, H., Yamamoto, K., Kohno, I., Hafsi, L., Itoh, N., Nakagawa, S., Kanagawa, N., Suzuki, K., and Uno, T. (2007) *Chem. Eur. J.*, **13**, 1946-1954.
31. Messmer K, Reynolds GP. (2005) *Neurosci Lett,* **388**, 39-44.
32. Gardner AM, Cook MR, Gardner PR. (2010) *J Biol Chem,* **285,** 23850-7.
33. Nadra AD, Martí MA, Pesce A, Bolognesi M, Estrin DA. (2008) *Proteins.,* **71,** 695-705.
34. Hamdane D, Kiger L, Dewilde S, Green BN, Pesce A, Uzan J, Burmester T, Hankeln T, Bolognesi M, Moens L, Marden MC.(2004) *Micron.,* **35,** 59-62.
35. Hoshino T, Okamoto M, Takei S, Sakazaki Y, Iwanaga T, Aizawa H. (2008) *Antioxid Redox Signal.,* **10,** 769-83.
36. Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. (2006) *Am J Physiol Heart Circ Physiol.,* **292,** H1227-36.