OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ニューログロビンの酸化還元環境応答性機能に関する研究
Author(s)	ハフシ, レイラ
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58579
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【9】

氏名	ハフシ　レイラ（はふし　れいら）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　２４５１６　号
学位授与年月日	平成 23 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	ニューログロビンの酸化還元環境応答性機能に関する研究
論文審査委員	（主査） 教　授　宇野　公之 （副査） 教　授　高木　達也　　教　授　小比賀　聡　　准教授　大久保忠恭

論文内容の要旨

Ngb は脊椎動物の脳神経細胞や網膜において発現しており、ヘモグロビンやミオグロビンに続く、第三のグロビンタンパク質である。これまでの研究から、Ngb は虚血時に発現が誘導されること、過剰発現させることで梗塞が緩和されることがわかっている。他にも多様な知見がもたらされ、それらを元に様々な機能に関する仮説が提唱されているものの、そのどれもが決定的ではなく、発見から10 年経過した今もなお、その機能は同定されていない。そこで著者は、分子レベルからその機能を探るべく、各種機器分析を駆使し検証を行った。

筆者は Ngb の抗酸化能に着目した。Ngb は上述のように、マウスにおいて過剰発現することで脳梗塞を緩和した。脳梗塞は虚血再灌流障害の一種であり、再灌流時に発生する活性酸素によって細胞が障害され、死滅する。この活性酸素カスケードの最上流に位置するのがスーパーオキサイドである。著者は、Ngb の脳保護作用は、このスーパーオキサイドの消去によるものではないかと考えた。

まず、Ngb のスーパーオキサイド消去能をスーパーオキサイド特異的傾向プローブ BESSo を用いて評価した。その結果、Ngb のスーパーオキサイドに対する 50 % 阻害濃度 (IC_{50}) は 7.4 μM となった。比較として同様に測定したアスコルビン酸の IC_{50} は 8.3 μM であり、両者は同程度のスーパーオキサイド消去能を持つことが明らかとなった。アスコルビン酸はこの濃度で脳保護作用を持つことがすでに報告されていること、Ngb の IC_{50} は Ngb の脳における濃度と同程度であることから、Ngb が生体内において十分にスーパーオキサイド消去能を発揮できることが示唆された。

Ngb の活性中心であるヘムは2つの状態をとることができる。酸化型であるⅢ価、還元型であるⅡ価である。Ⅲ価の状態の Ngb を Ngb^{3+}、Ⅱ価の Ngb を Ngb^{2+} と表記する。先ほどのスーパーオキサイド消去能の実験では、Ngb はⅢ価であったので、以降 Ngb^{3+} について実験を行った。

Ngb はどのようにスーパーオキサイドを消去しているのかについても検討を行った。Ngb^{3+} とスーパーオキサイドとの反応の様子を、紫外可視吸光スペクトルを用いて調べた。スーパーオキサイド発生試薬である KO_2 を Ngb^{3+} に添加すると、Ngb は Ngb^{2+} に酸素が結合した状態 (Ngb^{2+}-O_2) のスペクトルを示した。その後、時間と共に等吸収点を持ちながら Ngb^{3+} のスペクトルに戻った。このことから、Ngb はスーパーオキサイドと反応して、Ngb^{2+}-O_2 となり、一段階で Ngb^{3+} になることがわかった。つまり、Ngb^{3+} はスーパーオキサイドを酸素に変換して消去していると考えられた。

今回の実験により得られた Ngb^{2+}-O_2 の半減期は、他の研究グループから報告されている酸素結合型 Ngb^{2+} の半減期よりが長いことがわかった。他の報告では還元剤等を用いてNgb^{2+} を調製したのちに酸素を結合させているのに対し、今回の実験ではNgb^{3+} とKO_2 との反応により Ngb^{2+}-O_2 が生成している。このような生成過程の違

いが Ngb の分子内ジスルフィド結合に影響を与え、半減期に大きな差が現れたと考察し、分子内ジスルフィド結合の状態について検討した。

Ngbの発現が誘導される虚血再灌流時には、酸素不足や、スーパーオキサイドの発生により細胞内の酸化還元環境が大きく変化すると考えられる。この酸化還元環境変化に対して敏感に応答し、分子内ジスルフィド結合は開裂、再結合を行うと考えられる。また、分子内ジスルフィド結合の形成されている場所は、Ngb のヘムに配位子が結合する際の通り道と考えられている。よって、この分子内ジスルフィド結合が変化することで、配位子結合性も変化する可能性がある。

そこで、生体内における酸化還元環境変化に対応したNgb の挙動に関する仮説を立てた。Ngb は通常ヘム鉄がⅢ価で、分子内ジスルフィド結合が開いた状態であるとする。虚血が起こり、周囲の酸化還元状態が還元的雰囲気に傾くと、ヘム鉄は還元されⅡ価となる。このとき、酸素と結合して虚血部に供給する可能性がある。そして、最灌流が起こって細胞内が酸化的雰囲気に傾くと、ヘム鉄、分子内ジスルフィド結合ともに酸化される。このときスーパーオキサイドと結合し、これを酸素に変換することで消去し、脳を梗塞から保護する。そして、細胞内が元の酸化還元状態に戻ると、ヘム鉄はⅢ価、分子内ジスルフィド結合は開いた状態に戻り、スーパーオキサイドとの親和性が下がる。このような一連のサイクルで、Ngb は脳保護機能を発揮すると著者は考えた。このことを証明するため、Ngb の分子内ジスルフィド結合の有無と、ヘムや、配位子結合性への影響を調べた。

マススペクトルおよび共鳴ラマンスペクトルを用いて評価した結果、Ngb^{3+} には分子内ジスルフィド結合があり、DTT を用いることで、ヘム鉄を還元することなく分子内ジスルフィド結合を開裂させられることがわかった。また、その結果である分子内ジスルフィド結合の開裂自体もヘム鉄に影響を与えないことが明らかとなった。

この結果を受け、DTT を用いて分子内ジスルフィド結合を開裂させた Ngbにおいて配位子親和性が変化するかを、配位子の解離定数 K_d を算出することで評価した。結果、Ngb^{2+}, Ngb^{3+} どちらにおいても、分子内ジスルフィド結合を切断することで配位子親和性は低下することがわかった。さらに、Cys 変異体を用いて、分子内ジスルフィド結合の影響を検討したところ、分子内ジスルフィド結合を形成できない変異体では配位子親和性は低下した。また、スーパーオキサイドとの反応性も低下した。これらのことから、分子内ジスルフィド結合は配位子との結合に大きく影響することがわかった。

仮説の最後の部分、すなわち、元の状態に戻ると分子内ジスルフィド結合が開裂するという部分は、スーパーオキサイドと反応した後の Ngb においてマススペクトルを測定することで検証したその結果、1 Da 程度の分子量の増加が見られた。よって、Ngb はスーパーオキサイドと反応した後分子内ジスルフィド結合を開裂させ、スーパーオキサイドとの反応性を低下させるということが言えた。

以上の実験から、筆者の立てた仮説は証明され、Ngb は脳梗塞を引き起こす虚血再灌流時など、周囲の酸化還元状態の変化に応じてその状態を変え、再灌流で発生するスーパーオキサイドを酸素に変換する事で消去し、脳を保護していると結論づけられた。

論文審査の結果の要旨

Ngb は脊椎動物の脳神経細胞や網膜において発現しており、ヘモグロビンやミオグロビンに続く、第三のグロビンタンパク質である。これまでに、Ngb は虚血時に発現が誘導されること、過剰発現させることで脳梗塞が緩和されること等が報告されている。これらの知見に基づき、Ngb の生理的機能に関する様々な仮説が提唱されているものの、そのどれもが決定的ではなく、発見から 10 年経過した今もなおその機能は不明である。本論文では、分子レベルから Ngb の機能を探るべく、各種機器分析を駆使して検証した結果が述べられている。

上述のように、Ngb はマウスにおいて過剰発現することで脳梗塞を緩和する。脳梗塞は虚血再灌流障害の一種であり、再灌流時に発生する活性酸素によって細胞が障害を受け、死滅する。本論文では、Ngb の脳保護作用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 Ngb のスーパーオキサイド消去能を評価した。その結果、Ngb のスーパーオキサイドに対する 50% 阻害濃度（IC_{50}）は 7.4 μM となり、比較として測定したアスコルビン酸の IC_{50} 値（8.3 μM）と同程度であることを明らかにした。アスコルビン酸はこの濃度で脳保護作用を持つこと、Ngb の IC_{50} は Ngb の脳における濃度と同程度であることから、Ngb が生体内において十分にスーパーオキサイド消去能を発揮できることを示唆した。

次に、Ngb のスーパーオキサイド消去機構を紫外可視吸光スペクトルを用いて検討した。Ngb の活性中心であるヘム鉄は、Ⅲ価（酸化型）、Ⅱ価（還元型）という２つの状態をとることができる（Ⅲ価の状態の Ngb を Ngb^{3+}、Ⅱ価の Ngb を Ngb^{2+} と表記する）。スーパーオキサイド発生試薬である KO_2 を Ngb^{3+} に添加すると、Ngb は Ngb^{2+} に酸素が結合した状態（Ngb^{2+}-O_2）のスペクトルを示し、時間と共に等吸収点を持ちながら Ngb^{3+} のスペクトルに戻ることが明らかとなった。このことから、Ngb はスーパーオキサイドと反応して Ngb^{2+}-O_2 となった後に一段階で Ngb^{3+} に戻る過程を経て、スーパーオキサイドを酸素に変換・消去するという機構を提唱した。

本実験により得られた Ngb^{2+}-O_2 の半減期は他の研究グループから報告されている酸素結合型 Ngb^{2+} の半減期より長く、この原因として Ngb^{2+}-O_2 の調製法の違いが考えられた。すなわち、他の報告では還元剤等を用いて Ngb^{2+} を調製したのちに酸素を結合させているのに対し、本論文では Ngb^{3+} と KO_2 との反応により Ngb^{2+}-O_2 を生成している。このような生成過程の違いが Ngb の分子内ジスルフィド結合の状態を変化させ、半減期に大きな差を与えたと考察し、分子内ジスルフィド結合が配位子の親和性に与える影響について検討した。DTT を用いて Ngb の分子内ジスルフィド結合を開裂させたところ、Ngb^{2+}、Ngb^{3+} どちらにおいても配位子親和性は低下することがわかった。さらに、Cys 変異体を用いて分子内ジスルフィド結合の影響を検討したところ、分子内ジスルフィド結合を形成できない変異体では配位子親和性が低下するとともに、スーパーオキサイドとの反応性も低下することがわかった。これらのことから、分子内ジスルフィド結合の形成は配位子との結合性に大きく影響することを明らかにできた。

以上の結果から、生体内における酸化還元環境変化に対応した Ngb の挙動に関する仮説を提唱した。Ngb のヘム鉄は通常Ⅲ価であるが、虚血により周囲の酸化還元状態が還元的雰囲気に傾くと、ヘム鉄は還元されⅡ価となる。このとき、酸素と結合して虚血部に供給する可能性がある。最灌流が起こって細胞内が酸化的雰囲気に傾くと、ヘム鉄、分子内ジスルフィド結合ともに酸化される。このときスーパーオキサイドと結合し、これを酸素に変換することで消去し、脳を梗塞から保護する。そして、細胞内が元の酸化還元状態に戻ると、ヘム鉄はⅢ価、分子内ジスルフィド結合は開いた状態に戻り、スーパーオキサイドとの親和性が下がる。すなわち、このような脳内酸化還元状態の変化に応じて Ngb はその状態を変え、脳梗塞を引き起こす虚血再灌流時などに発生するスーパーオキサイドを消去することによって脳を保護していると結論した。

以上の結果は脳機能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。