The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	サイトグロビンの特異的構造と配位子結合性
Author(s)	花井, 舜平
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69519
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　花井舜平　）	
論文題名	サイトグロビンの特異的構造と配位子結合性

論文内容の要旨

組織線維化は臓器不全に共通の病態である。肝臓が線維化する病態は肝線維症と呼ばれており、病態の進行にしたがって肝硬変、肝がんへと悪化する。線維化メカニズムは明らかになっておらず、線維化関与タンパク質を見出すため線維化前後の繊維芽細胞におけるプロテオーム解析が行われた。その結果、2001年に肝星細胞で新しいタンパク質が発見され、グロビンフォールドを持つことからサイトグロビン（以後、Cygb）と呼ばれるようになった。

サイトグロビンは全身の細胞に遍在しており、肝臓では前述のように主に線維芽細胞である肝星細胞に存在しているグロビンタンパク質である。分子量は約21kDaで、活性中心にヘムを含み、配位子としてO_2、CO、NOなどのガス分子が結合することが知られている。また近年ではヘム周辺に脂質が侵入することが提唱され、ガス分子のみならず脂質との相互作用も有していることが報告されている。生体内でのCygbの役割として線維化抑制や細胞保護に関わると考えられており、具体的には線維化に関わると考えられるシグナル伝達やコラーゲン合成への関与、ヘモグロビンやミオグロビン、ニューログロビン（Ngb）といった他のグロビンタンパク質と同様に酸素運搬・貯蔵や、一酸化窒素酸素添加、そして当研究室が最近報告したNgbの機能と同様にスーパーオキサイド消去などが示唆されている。しかし、Cygbに関する分子レベルでの研究がほとんどなされていないため、Cygbの機能発現機構に関する知見はほぼ皆無である。

分子レベルから見た、従来のグロビンタンパク質と大きく異なるCygbの構造的特徴として、ジスルフィド結合と長い両末端領域を有するという２点が挙げられる。これまで当研究室では分子レベルの研究として、１つ目の構造的特徴であるジスルフィド結合に着目し、分子内ジスルフィド結合の有無によって配位子結合性が異なり、分子内ジスルフィド結合を有するSS型では、分子内ジスルフィド結合が開裂しているSH型と比べてシアン化物イオン（CN^-）に対する配位子結合性が100倍以上強いことが報告されてきた。一方で、２つ目の構造的特徴である両末端領域については国内外問わず*in vivo*および*in vitro*の双方において詳細な研究は皆無であった。N末端領域、C末端領域共に20残基ほどの長さであり、自由度が高く構造に関する情報が乏しいが、両末端領域は他のグロビンタンパク質にはないCygb独自の特徴であることから、この領域もCygb特異的な機能発現メカニズムの一端を担っていることが予想されてきた。これまで活性酸素消去への関与やタンパク質間相互作用への関与が示唆されてきたが、詳細な研究は行われてこなかった。そこで、本研究ではCygbの長い両末端領域の役割に着目し、CygbのN末端、C末端領域、両末端領域を除去した変異体３種を作製し、野生型（WT）と比較することにより両末端領域の役割について検討した。

まず、末端領域の関与が示唆された活性酸素消去能に関して調査するため、WTと変異体間で、活性酸素の一つであるスーパーオキサイドの消去能について蛍光を用いた測定を行い、末端領域の影響を評価した。その結果、C末端領域によるスーパーオキサイド消去能への関与が明らかになった。次に、ヘムへの配位子結合性への影響を調べるために一般的なプローブであるCOを用いて、紫外可視吸収スペクトルの変化を用いた吸収滴定法によりCOとの結合親和性、さらにフラッシュフォトリシス法によりCOの結合速度、そして共鳴ラマン分光法によりヘム周辺環境における影響を評価した。その結果、COに関する配位子結合性においてWTと変異体間で大きな変化は見られず、末端領域の影響は少ないことが明らかとなった。さらに、ヘムへの酸素の結合安定性の影響を調べるため、ヘム鉄が経時的に酸化する自動酸化と呼ばれる現象における自動酸化速度を紫外可視吸収スペクトルの変化を用いて評価した。その結果も、WTと変異体間で大きな変化は見られず、末端領域の影響は少ないことが明らかとなった。これらの結果から、C末端領域はヘムへの配位子結合性において重要であることが明らかになった。

次に、末端領域のタンパク質の構造安定性への影響を調べるためにグアニジン塩酸塩による変性実験を行い、変性のしやすさを評価した。その結果、C末端領域は構造安定性においても重要な働きをしていることが明らかになり、構造安定性への影響からスーパーオキサイドのヘムへの侵入しやすさが変化し、スーパーオキサイド消去能が変化した

ことが考えられた。

最後に、末端領域の関与が提唱されていたタンパク質間相互作用に関して調査するため、まずCygb WTと相互作用するタンパク質の検討を行った。その結果、コラーゲン合成に関するタンパク質であるProlyl-4-hydroxylase（P4H）と相互作用することが明らかになった。そして、P4Hとの相互作用における末端領域の影響を調査した結果、N末端領域が相互作用に影響を与えることが明らかになった。さらに、N末端領域はジスルフィド結合の有無における影響においても重要な役割を担っていることが考えられた。また、WTのSH型とSS型におけるP4Hとの相互作用のしやすさの違いから、コラーゲン合成調節メカニズムのモデルを示した。Cygbは酸素供給能が提唱されているため、通常酸素環境時ではP4Hと相互作用して酸素を供給しコラーゲン合成に寄与すると考えられた。一方で、低酸素などの酸化ストレス環境時ではジスルフィド結合の形成が促されSS型割合が増加し、全体として相互作用しにくくなり酸素の供給量が減り、コラーゲン合成において抑制的に寄与すると考えられ、酸化還元環境変化に応じたコラーゲン合成調節メカニズムのモデルを提案することができた。

以上より、本研究によりCygbの末端領域が機能及び機能発現メカニズムにおいて重要な役割を有することを示すことができた。C末端領域はスーパーオキサイド消去能、構造安定性に寄与しており、N末端領域はタンパク質間相互作用、ジスルフィド結合による構造変化に寄与していることを明らかにした。提案したコラーゲン合成調節メカニズムのモデルにおいてはN末端領域が重要な働きを持っていることが予想された。本研究の成果は、生体内でのCygbの機能発現メカニズムを明らかにする上でも、Cygbが関わる線維化のメカニズムの解明においても重要な知見になると考えている。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　花井舜平　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	堤　康央
	副 査　教授	大久保忠恭
	副 査　教授	小比賀　聡

論文審査の結果の要旨

本学位論文では、Cytoglobin（Cygb）の両末端領域の役割について明らかにするため、分光学的手法によってCygbの機能及び末端領域欠損における影響について検討した。Cygbの酵素反応としてのスーパーオキサイド消去能、活性中心ヘムに対する配位子の結合性、タンパク質としての構造の安定性、さらには外部のタンパク質との相互作用などCygbにおける内部、全体そして外部との関わりについて測定を行い末端領域の影響を追究し、以下の貴重な知見等を得たものである。

① Cygbは高いスーパーオキサイド消去能を有することを示し、C末端領域がスーパーオキサイド消去能にわずかに影響することを明らかにした。
② 末端領域は結合親和性・結合速度・ヘム周辺環境・自動酸化にほとんど影響を与えないことを明らかにした。一方で末端領域の影響が分子内ジスルフィド結合形成型（SS型）に見られる傾向を示した。
③ C末端領域はタンパク質の構造安定性に貢献していることを明らかにした。
④ Cygbがコレステロール合成に重要なタンパク質の一種であるprolyl-4-hydroxylase（P4H）と相互作用することを明らかにし、分子内ジスルフィド結合形成型（SS型）と非形成型（SH型）で相互作用のしやすさに大きな違いがあることを示した。さらに、各末端領域が結合速度・解離速度に影響していることを明らかにした。

本学位論文では、生体内でのCygbの機能発現メカニズムを明らかにする上でも、Cygbが関わる線維化のメカニズムの解明においても重要な知見である。今後、Cygb研究が進み、Cygbをターゲットにした線維化治療薬、がん治療薬が開発されることを期待したい。

以上、今後の画期的新薬の創成など、創薬領域で、新たな知見・概念を提示・発見したことにより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認めるものである。