



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	<a href="https://doi.org/10.18910/69519">https://doi.org/10.18910/69519</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

平成 29 年度 博士論文

サイトグロビンの特異的構造と配位子結合性

大阪大学大学院 薬学研究科

創成薬学専攻 分子反応解析学分野

花井 舜平



## 目次

緒論 .....	1
1. はじめに .....	1
2. サイトグロビン .....	1
2.1. サイトグロビンの発見 .....	1
2.2. サイトグロビンの構造的特徴 .....	2
3. 本研究の目的 .....	4
本論 .....	5
第一章 結果 .....	5
1. 末端領域欠損変異体 .....	5
1.1. 末端領域欠損変異体の作製 .....	5
1.2. 紫外可視吸光スペクトル測定 .....	6
2. ヘムへの配位子結合性への影響 .....	7
2.1. スーパーオキサイド消去能 .....	7
2.2. CO 結合親和性 .....	9
2.3. 自動酸化速度 .....	11
2.4. CO 結合速度 .....	13
2.5. ヘム周辺環境 .....	16
3. 構造安定性への影響 .....	18
3.1. グアニジン塩酸塩によるタンパク質構造変性 .....	18
4. タンパク質間相互作用への影響 .....	20
4.1. Cygb と P4H のタンパク質間相互作用 .....	20
4.2. 両末端領域のタンパク質間相互作用への影響 .....	22
5. まとめ .....	24
5.1. 末端領域欠損の影響 .....	24
第二章 考察 .....	25
1. Cygb の両末端領域 .....	25
1.1. 末端領域欠損変異体 .....	25
1.2. 末端領域の役割 .....	25
2. Cygb の機能 .....	26
2.1. 自動酸化 .....	26

2.2. スーパーオキサイド消去 .....	26
2.3. タンパク質間相互作用 .....	27
2.4. ジスルフィド結合による Cygb 機能の制御.....	27
2.5. コラーゲン合成調節メカニズム .....	28
結論 .....	30
実験の部 .....	32
試薬 .....	32
実験機器 .....	36
実験操作 .....	37
参考文献 .....	43
謝辞 .....	47

## 緒論

### 1. はじめに

生物は様々なグロビンタンパク質を有しており、それぞれが生命活動の維持に関与している。ヒトにおいては、古くからグロビンタンパク質についての研究がなされており、赤血球に存在するヘモグロビン(Hb)が酸素運搬を、筋細胞に存在するミオグロビン(Mb)が酸素貯蔵を、担うことが明らかとされてきた。Hb、Mbについて、さらなる詳細な構造情報調査の結果、一酸化窒素(NO)の代謝・合成、シグナル伝達、活性酸素種(ROS)の消去などの様々な酵素活性メカニズムについて提案されてきた(1,2)。近年になり、6配位型ヘムを持つヒトグロビンタンパク質が幾つか発見され、系統学的には5配位型グロビンタンパク質と共通の祖先を持ち、5配位型グロビンタンパクは6配位型グロビンタンパク質から進化したと考えられた(3)。6配位型ヘムでは遠位と近位に内在性配位子が結合しており、酸素などの外在性配位子は遠位の配位子と競合して配位する。そのため、6配位型グロビンタンパク質では、酸素運搬や酸素貯蔵には適さず、NO代謝やROS消去などの酵素としての働きや、さらには分子間シグナル伝達に適しているのではと考えられた(4)。

### 2. サイトグロビン

#### 2.1. サイトグロビンの発見

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纖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)と名付けられた(5,6)。

Cygbは、全身の細胞に遍在しており、肝臓では、先に述べたように主に線維芽細胞である肝星細胞に存在している(7)。分子量は約21kDaで、活性中心にヘムを含み、6配位構造をとり、外在性配位子としてO<sub>2</sub>、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(8,9)。生体内でのCygbの役割としては、線維化抑制や細胞保護に関わると考えられている。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、2000年に発見されたニューログロビン(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、NO代謝・合成、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の働きが示唆されている(1,4,10-12)。しかしながら、このCygbの機能発現メカニズムは明らか

になっておらず、さらなる分子レベルでの研究が求められている。

## 2.2. サイトグロビンの構造的特徴

分子レベルから見ると、従来のグロビンタンパク質と共通する構造的特徴は、その名が示すようにグロビンフォールドを持ち活性中心にヘムを持つという点である。一方で、他のグロビンタンパク質と大きく異なる Cygb 独自の構造的特徴としては、ジスルフィド結合と長い両末端領域を有するという 2 つが挙げられる(Fig 1)(13)。

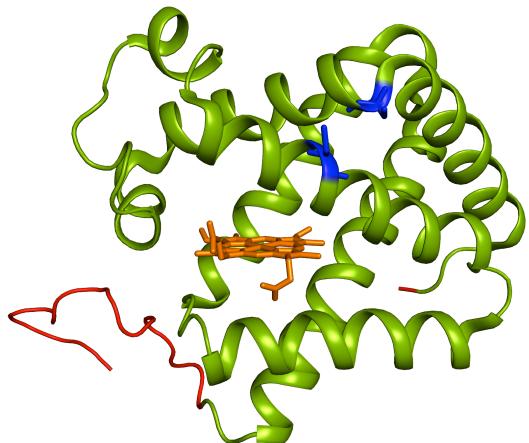


Fig 1. Cygb の結晶構造(PDB : 2DC3)  
ヘム(オレンジ色)、システイン残基  
(青色)、末端領域(赤色)を示す

これまで当研究室では 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により二量体を形成することに加え、単量体においても分子内ジスルフィド結合を有する SS 型と、分子内ジスルフィド結合が開裂している SH 型という異なる状態を取ることを明らかにしてきた(14)。さらにこれらは全て配位子結合性が異なり、例えば SS 型では、SH 型と比べてシアノ化物イオン ( $CN^-$ ) に対する配位子結合性が 100 倍以上強いことを報告した(14)。また、SS 型と SH 型では酸素などの配位子との結合親和性や NO 添加活性などが異なることなども報告されている(15-17)。脂質との結合性においても SS 型のみが脂質と結合し、SH 型では結合しないことが報告され、ジスルフィド結合は Cygb の機能に大きく関わることが考えられた(8,18)。これまで報告された結晶構造は二量体や SH 型のものであり SS 型の構造は依然明らかになっていないものの、シミュレーションによる検討からジスルフィド結合形成により全体構造が大きく変化し、ヘム周辺環境やヘムへの配位子侵入経路が変化すると考えられてきた(14,19)。この SH 型と SS 型は平衡状態であり、生体内での酸化還元環境の変化により平衡がどちらかに傾くと考えられ、Cygb の機能発現メカニズムにおいて重要な役割を担っていることが予想される。

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。他のヒトグロビンタンパク質とアミノ酸配列を比較すると、グロビンフォールドに関わる中心構造では多くのアミノ酸配列が保存されているが、長い末端領域を有しているのは Cygb のみであった(Fig 2)。この Cygb の末端領域はヒトのみならずマウスなどの哺乳類間でアミノ酸配列がほとんど保存されており、N 末端領域・C 末端領域共に 20 残基ほどの長さである。これまで報告された結晶構造では両末端領域の構造が明らかにされておらず、自由度が高い柔軟な構造をしていることが予想された(13,20)。この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してきた。

これまで両末端領域は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(13,21,22)。例えば、Trandafir らは両末端領域を除いた変異体”mini-CYGB”とシステイン残基をセリンに変異した変異体”CYGB\*”を用いて活性酸素消去能への影響を調査し、mini-CYGB が CYGB\* の 500 倍以上となる活性酸素消去能を示したが(23)、この活性酸素消去能の変化は N、C の両末端領域の有無による影響、もしくはシステイン残基の変異による影響だと考えられ、活性酸素消去能に対する末端領域の影響は不明であった。また、Hankeln らは Cygb の末端領域はタンパク質外部で柔軟な構造をしているためにタンパク質間相互作用に関与しているだろうと予想したが、具体的な検証は行われなかつた(22)。

hCgb	MEKVPGE MEIERRERSEELSEAERKAQAMW ARLYAN CEDVG VAILV RFF FVNFP PSAK QYFSQ F K	65
hNgb	-----MERPEPELIRQS WRAV SRSPLHGTVL FARLF ALEP DLLPLFQYNC	46
hMb	-----MGISDGEWQLV LNVWGKV EADIPG H GQEV LIRLFKGHPETULEKFDKF K	48
hHba	-----MVLSPADK TNVKA A WGKVGA HAG EYGA EA LERMFLS EPTT KTYFPHF-	47
hHbb	-----MVHL TPEEK SAVT ALWGKV--NVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFESFG	47
hCgb	-HMEDIPLEMERSPQLRKHACRVMGAINTVWENLHD PDKVSSVLAIVGKAHALKKV EPVVF KIL	127
hNgb	RQFSSPEDCLSSP EFLDHIRKVMVTDAAATVNVEDLSSLE EYLASLGRKHRAVG-VKLSSFSTV	109
hMb	-HLKSEDEMKA SEDLKKHGATVLT A GGI LKKKGH---HEAETKPLAQSHATKHKIPVKYLFFI	108
hHba	-----DL SHGSAQVKG HGKKVADATNAVAHVDD---MPNAISALSDLHAKL RVD P VNFKL	102
hHbb	-DLSTPD AVMGNP KVKA HGKKV LGAFSDGLAHLDN---LK GTFATLSELHCDKLHVDP ENFRLL	107
hCgb	SGVILEVVAEEFASDFPPPETQRWAKLRGLIYSHVTAAVKEVGVWQQVPNATT PPA TLPS SG P	190
hNgb	GESI LYMEK CLGP AFTPATRAWSOL YGA VQAMS RG WDGE-----	151
hMb	DECITIQV LQSKH PGDFGADACQ GAMNKA LEI FRKDM ASNYKELGFQG-----	154
hHba	SHC LVTAAHLPAEFTPAVHASLDKFLASVSTVLT SKY R-----	142
hHbb	GNV LVCV LAHHFGKEFTPPVQAAYQKVVVAGVANALAHKVH-----	147

Fig 2. ヒトグロビンタンパク質のアミノ酸配列

共通するアミノ酸配列を黒塗りで示す

### 3. 本研究の目的

Cygb の機能発現メカニズムを明らかにするためには分子レベルの研究が求められており、他のグロビンタンパク質にはない Cygb 独自の特徴である両末端領域の役割を明らかにすることが Cygb の機能発現メカニズムを詳細に解明することにつながると考えた。そこで、本研究では Cygb の N、C それぞれの末端領域を除去した変異体を用いて、N 末端領域、C 末端領域それぞれの欠損による影響について、末端領域の関与が提唱されていた活性酸素消去とタンパク質間相互作用への影響を含めて評価し、各末端領域それぞれの役割を解明することを目的とした。さらに、そこから Cygb の機能発現メカニズムの解明を目指した。

第一章では実験結果を示している。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、活性酸素の一つであるスーパーオキサイド消去能への影響について蛍光を用いた測定により明らかにし、その後紫外可視吸収スペクトルの変化から CO との結合親和性、さらにフラッシュフオトリシス法による CO の結合速度、そして共鳴ラマン分光法によるヘム周辺環境における影響を調査した。その後、両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った。次に、末端領域の関与が提唱されたタンパク質間相互作用に関して、まず Cygb WT と相互作用するタンパク質を明らかにした後に、タンパク質間相互作用における両末端領域の影響を調査した。

第二章では、第一章で見られた実験結果について考察している。C 末端領域の役割、N 末端領域の役割を挙げ、それぞれの末端領域の関係をまとめた。さらに、研究を通して得られた知見から Cygb の機能発現メカニズムを提唱した。

# 本論

## 第一章 結果

### 1. 末端領域欠損変異体

#### 1.1. 末端領域欠損変異体の作製

Cygb の末端領域の役割を調査するため N 末端領域を除いた  $\Delta N$  ( $\Delta 1-17$ )、C 末端領域を除いた  $\Delta C$  ( $\Delta 171-190$ )、そして N、C 両末端領域を除去した変異体  $\Delta NC$  ( $\Delta 1-17, \Delta 171-190$ )を作製した。WT と変異体の単量体における純度を確認するため SDS-PAGE を行った結果、全ての変異体にて分子量の減少によるバンド位置の低下した单一のバンドが確認でき(Fig 3 lane 2, 4, 6, 8)、純度の高い Cygb を得ることが出来たことが確認された。

一方で緒論にも示した通り、Cygb はジスルフィド結合を介した SS 型と SH 型が平衡反応によって混在している。WTにおいて通常の PAGE 条件(還元剤 2-ME 添加時)では単一のバンドが見られた(Fig 3 lane 2)が、還元剤非添加時には二本のバンドが見られた(Fig 3 lane 1)。還元剤の有無によって変化するこれら二本はそれぞれ SS 型と SH 型であると考えられ(14)、末端領域欠損変異体でも WT と同様に還元剤添加時には単一のバンド(Fig 3 lane 4, 6, 8)であったものが、還元剤非添加時には二本のバンド(Fig 3 lane 3, 5, 7)になることから Cygb 変異体の単量体にも SS 型と SH 型が混在することが明らかになった。

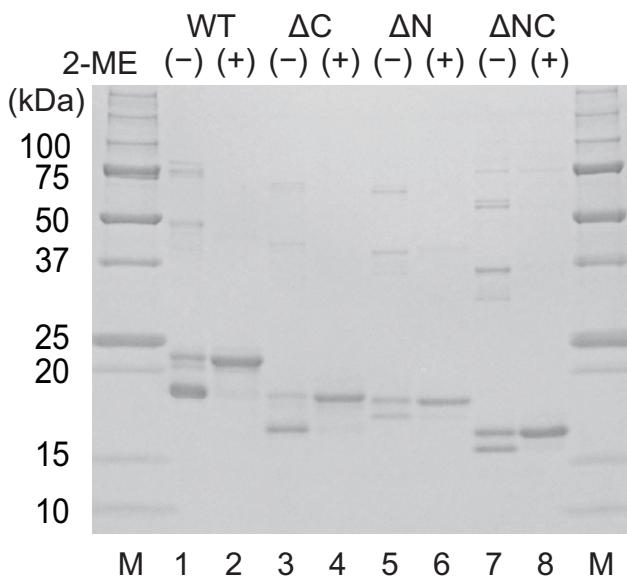


Fig 3. Cygb 単量体の SDS-PAGE

M : マーカー

lane 1 : 2-ME を含まない WT

lane 2 : 2-ME を含む WT

lane 3 : 2-ME を含まない  $\Delta C$

lane 4 : 2-ME を含む  $\Delta C$

lane 5 : 2-ME を含まない  $\Delta N$

lane 6 : 2-ME を含む  $\Delta N$

lane 7 : 2-ME を含まない  $\Delta NC$

lane 8 : 2-ME を含む  $\Delta NC$

## 1.2. 紫外可視吸光スペクトル測定

得られた末端領域欠損変異体において、Cygb の生理学的機能に必要である活性中心へムの保持が行われているかを確認するため、紫外可視吸光スペクトルを測定した。その結果、変異体では WT では ferric 型（3 値型）で Soret 帯では 415.0 nm、Q 帯では 533.0 nm と 561.0 nm にピークが見られ、還元剤の添加によって ferrous 型（2 値型）へ変化させると 428.0 nm、531.0 nm、560.0 nm へとピークが移動した。 $\Delta NC$  では ferric 型では Soret 帯が 415.0 nm、Q 帯が 533.5 nm、559.5 nm にピークが見られ、ferrous 型では Soret 帯が 428.0 nm、Q 帯が 531.5 nm、560.5 nm でピークが見られ、 $\Delta C$ 、 $\Delta N$  でも同様に大きな影響はみられず、WT とほぼ同様の波長にてピークが見られたことから末端領域の欠損はへムの保持に影響を与えないことがわかった(Fig 4)。

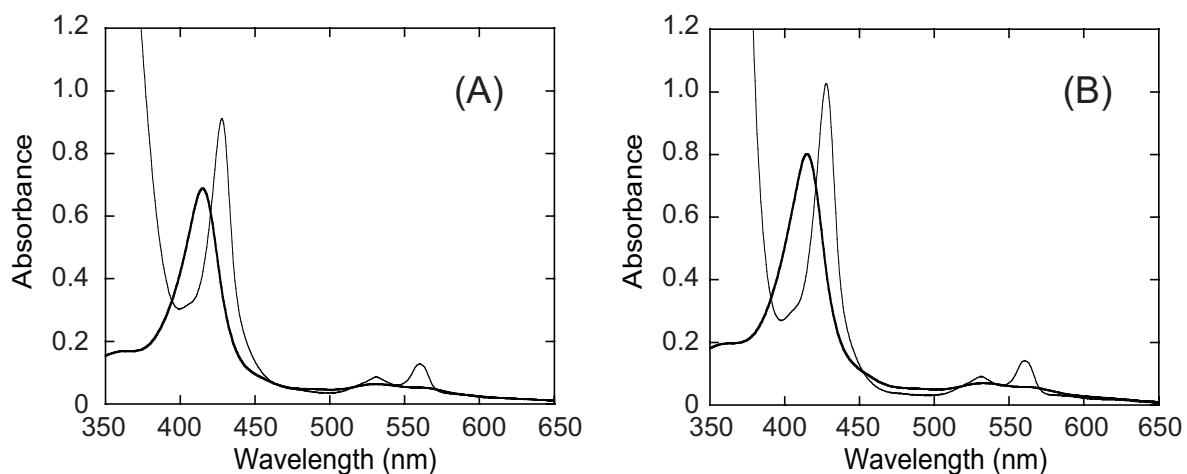


Fig 4. Cygb の紫外可視吸収スペクトル

(A) WT、(B)  $\Delta NC$  (濃線：ferric 型、薄線：ferrous 型)

## 2. ヘムへの配位子結合性への影響

### 2.1. スーパーオキサイド消去能

先行研究にて Cygb は酸化ストレスからの細胞保護に関与することが提唱されてきた(24,25)。さらに、近年 Ngb がスーパーオキサイド消去活性を有することが報告され、消去メカニズムとしてスーパーオキサイドがヘムに結合し酸素化型になることが提唱された(10)。Cygb は Ngb と同じ 6 配位構造のヘムを持つため、Cygbにおいても同様の反応の進行が予想され、蛍光試薬 BESSo を用いた同様の方法で Cygb のスーパーオキサイド消去能を測定した。まず Cygb WT について測定したところ、Cygb 濃度依存的にスーパーオキサイド消去能を示し、そこから 50% のスーパーオキサイド消去能を示すタンパク質濃度である IC<sub>50</sub> を算出した(Fig 5A)。その結果、Cygb WT の IC<sub>50</sub> は 1.5 μM となり、super oxide dismutase (SOD) (IC<sub>50</sub> =  $1.8 \times 10^{-4}$  μM) よりは低いものの、これまでスーパーオキサイド消去能が報告されていた Ngb (IC<sub>50</sub> = 7.4 μM)、抗酸化物質として知られるアスコルビン酸 (IC<sub>50</sub> = 8.3 μM) より高い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(Fig 5B)。

次に両末端領域によるスーパーオキサイド消去能への影響を調べるために、Cygb ΔC、ΔN、ΔNC についても同様の測定を行なった。その結果、ΔC、ΔN、ΔNC における IC<sub>50</sub> 値は 0.95 μM、1.5 μM、0.85 μM となり、末端領域欠損変異体でも WT と同様にスーパーオキサイド消去活性を示すことが分かった(Table 1)。さらに、ΔC、ΔNC では WT よりわずかではあるが低い値を示し、C 末端領域欠損によりスーパーオキサイド消去能が増加することが明らかになった(Fig 5B)。

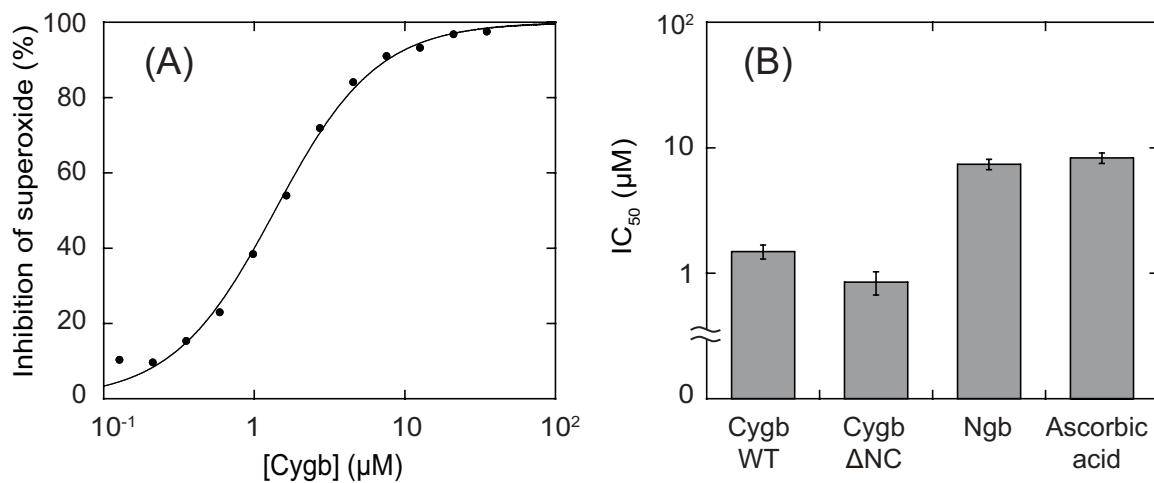


Fig 5. スーパーオキサイド消去能測定

(A) Cygb WT によるスーパーオキサイド消去、(B) 各タンパク質・化合物での IC<sub>50</sub> 値

Table 1. スーパーオキサイド消去能

		<b>IC50 (μM)</b>
<b>Cygb</b>	<b>WT</b>	$1.5 \pm 0.2$
	<b>Δ C</b>	$0.95 \pm 0.10$
	<b>Δ N</b>	$1.5 \pm 0.1$
	<b>Δ NC</b>	$0.85 \pm 0.18$
<b>Ngb*</b>		$7.4 \pm 0.7$
<b>Ascorbic Acid*</b>		$8.3 \pm 0.8$
<b>Bovine SOD*</b>		$(1.8 \pm 0.2) \times 10^{-4}$

\*(10)

## 2.2. CO 結合親和性

末端領域の欠損が Cygb のスーパーオキサイド消去能にわずかに影響を与えたことから末端領域が外来性配位子との結合性へ影響している可能性が考えられた。そこで、配位子結合性への影響を調べるために、ヘムタンパク質における外来性配位子として一般的に用いられる一酸化炭素 (CO) を用いて、結合親和性の指標である解離定数  $K_d$  を求めた(Fig 6)。この際、SS 型と SH 型への影響を区別するため還元剤である DTT を加えた実験も行った。その結果、DTT 非添加時には、Cygb WT の解離定数  $K_d$  は 80 nM であり、 $\Delta C$ 、 $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  の  $K_d$  は 197 nM、91 nM、108 nM であった(Table 2)。DTT 添加時には Cygb WT、 $\Delta C$ 、 $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  の順に  $K_d$  は 63 nM、112 nM、121 nM、71 nM であった(Table 2)。DTT 非添加時に  $\Delta C$  の  $K_d$  は WT の 2 倍以上の値を示したが、 $\Delta NC$  では大きな変化は見られなかった。他の値に関しても相関がみられなかったことから末端領域は外来性配位子との結合に関与していないことが示された。

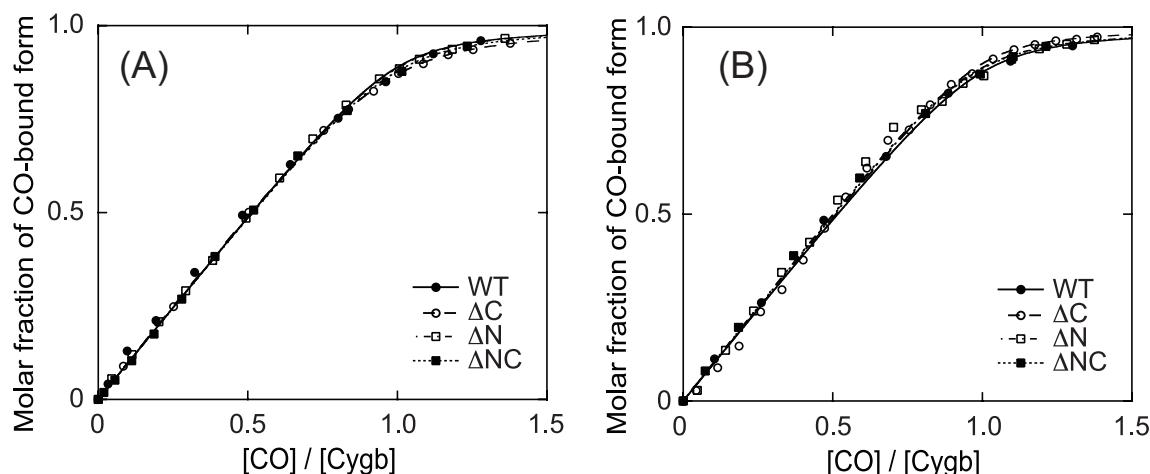


Fig 6. Cygb 比における CO 結合割合

(A) DTT 非添加時、(B) DTT 添加時のプロット及びフィッティング

それぞれ WT(●・実線)、 $\Delta C$ (○・破線)、 $\Delta N$ (□・一点鎖線)、 $\Delta NC$ (■・点線)を示す

Table 2. DTT 非添加、添加時における CO の解離定数

$K_d$ (nM)		
-DTT	<b>WT</b>	$80 \pm 22$
	<b>ΔC</b>	$197 \pm 60$
	<b>ΔN</b>	$91 \pm 1$
	<b>ΔNC</b>	$108 \pm 32$
+ DTT	<b>WT</b>	$63 \pm 15$
	<b>ΔC</b>	$112 \pm 16$
	<b>ΔN</b>	$121 \pm 14$
	<b>ΔNC</b>	$71 \pm 10$

### 2.3. 自動酸化速度

近年、シミュレーションによって Mb ではスーパーオキサイドがヘムに結合して oxy 型(酸素化型)に変化した後に、自動酸化という現象によって結合した酸素がスーパーオキサイド又は過酸化水素として放出されると報告された(26)。さらに、Ngb 研究において、自動酸化を介したスーパーオキサイド消去サイクルが提唱されてきた(10)。このことから Cygb におけるスーパーオキサイド消去反応においても自動酸化が関与していることが考えられ、スーパーオキサイド消去能に対して末端領域の影響がみられたことから自動酸化への末端領域の関与も考えられた。そこで、WT と変異体において自動酸化速度の測定を行った。自動酸化では oxy 型から ferric 型へ変化する際に吸収スペクトルの変化が見られ(Fig 7A)、最初のスペクトルとの差をとった差スペクトルを確認したことと、518 nm で増加変化、579 nm で減少変化が見られた(Fig 7A inset)。この変化が大きい 518 nm と 579 nm でのスペクトル変化から自動酸化速度を求めた(Fig 7B)。その結果、二成分による自動酸化反応が見られ、WT では自動酸化速度  $k_{auto}$  は速い成分が  $7.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  と遅い成分が  $7.2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  と算出され、 $\Delta C$ 、 $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  では速い成分はそれぞれ、 $6.7 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ 、 $6.2 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ 、 $7.6 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  であり遅い成分はそれぞれ  $8.9 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ 、 $7.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ 、 $6.8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  と算出された(Table 3)。

次にジスルフィド結合の影響を調べる実験を行うこととしたが、これまでのように還元剤を加えると自動酸化測定に影響が出るため、ジスルフィド結合を形成する 38 位と 83 位のシステイン残基をセリン残基に変異した変異体 Cygb 2CS を SH 型のモデルとして用いて、同様の測定を行った。2CS では一成分の変化が見られ(Fig 7E)、 $k_{auto}$  は  $9.1 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  であったため WT の結果との比較から、WT で見られた速度の速い成分が SH 型であり、速度の遅い成分が SS 型であると決定できた。さらに、WT と末端領域欠損変異体間の  $k_{auto}$  の比較から SS 型でも SH 型それぞれにおいて自動酸化速度に大きな影響は見られないことが明らかとなった。

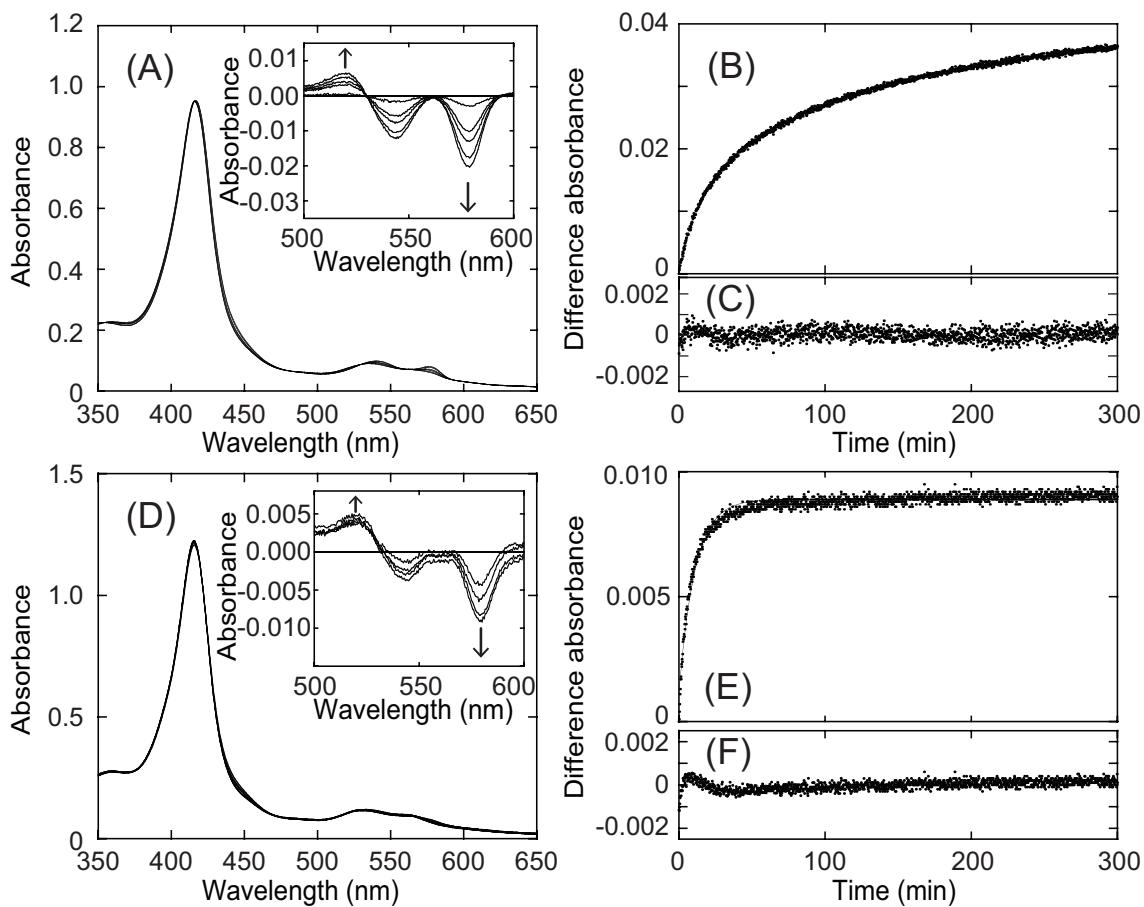


Fig 7. Cygb WT、2CS での自動酸化反応

WT : (A) 紫外可視吸収スペクトルの経時変化と、その差スペクトル(insert)

(B) Absorbance 差( $A_{518\text{nm}}-A_{579\text{nm}}$ )のプロット及びフィッティング、(C) 解析での残差

2CS : (D) 紫外可視吸収スペクトルの経時変化と、その差スペクトル(insert)

(E) Absorbance 差( $A_{518\text{nm}}-A_{579\text{nm}}$ )のプロット及びフィッティング、(F) 解析での残差

Table 3. Cygb の自動酸化速度

	$k_{\text{auto}} (\text{min}^{-1})$	
	Fast phase (SH 型)	Slow phase (SS 型)
WT	$(7.5 \pm 1.1) \times 10^{-2}$	$(7.2 \pm 0.1) \times 10^{-3}$
$\Delta C$	$(6.7 \pm 0.5) \times 10^{-2}$	$(8.9 \pm 0.2) \times 10^{-3}$
$\Delta N$	$(6.2 \pm 0.7) \times 10^{-2}$	$(7.8 \pm 0.6) \times 10^{-3}$
$\Delta NC$	$(7.6 \pm 0.7) \times 10^{-2}$	$(6.8 \pm 0.4) \times 10^{-3}$

## 2.4. CO 結合速度

Cygb の末端欠損変異体間にて配位子の結合速度の変化を調べるためにフラッシュフォトトリシスを用いて CO の結合速度を測定した。フラッシュフォトトリシスとは、パルス光によって誘起されたナノ秒～秒の様々な高速反応を紫外可視光の吸収などから追跡する方法であり、本実験では CO 結合型 Cygb にパルス光を当て CO を解離させ、そこから CO が再結合する様子を CO 結合型 Cygb のピーク波長である 421 nm の吸収光を追跡することで評価した。CO 一気圧下で測定を行ったところ二段階の結合過程が観察された。これについては、速い段階が CO 再結合過程を反映する段階であり、遅い段階が遠位の His 残基が解離する過程を反映する段階であると知られている(17,27)。本測定でも、SS 型と SH 型への影響を区別するため還元剤である DTT を加えた実験も行った。

$k_{\text{obs}}$  の速い段階は CO の再結合を反映する過程であり、CO 結合速度を示す(Fig 8)。DTT 非添加時には WT では  $k_{\text{obs}} = 6.4 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  であり、 $\Delta C$ 、 $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  での  $k_{\text{obs}}$  はそれぞれ  $4.8 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 、 $8.6 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 、 $14 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  であった(Table 4)。DTT 添加時には、WT では  $k_{\text{obs}} = 5.4 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  であり、 $\Delta C$ 、 $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  での  $k_{\text{obs}}$  はそれぞれ  $5.6 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 、 $4.1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ 、 $6.3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$  であった(Table 4)。DTT 非添加時に  $\Delta C$  と  $\Delta N$  では WT と変わらない値を示し、 $\Delta NC$  にて 2 倍ほどの値を示したが、大きな変化とはいえないかった。また、DTT 添加時には WT と末端領域欠損変異体間で変化はほとんど見られなかった。このことから、末端領域は外来性配位子の結合過程にはほとんど影響しないことが示唆された。さらに、DTT 非添加時と DTT 添加時においても大きな変化はみられなかった。

$k_{\text{obs}}$  の遅い段階は His 残基が解離する過程を示し、DTT 非添加時には、WT では  $k_{\text{obs}} = 23 \text{ s}^{-1}$ 、 $\Delta C$ 、 $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  では  $k_{\text{obs}}$  はそれぞれ  $12 \text{ s}^{-1}$ 、 $15 \text{ s}^{-1}$ 、 $24 \text{ s}^{-1}$  であった(Table 4)。 $\Delta C$  と  $\Delta N$  では WT より低い値を示したが、 $\Delta NC$  は WT と変わらない値を示した。DTT 添加時には  $k_{\text{obs}}$  は減少し、WT では  $7 \text{ s}^{-1}$  となり、 $\Delta C$ 、 $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  ではそれぞれ  $7 \text{ s}^{-1}$ 、 $8 \text{ s}^{-1}$ 、 $11 \text{ s}^{-1}$  となった。このとき、WT と末端領域欠損変異体間で大きな変化は見られなかった。ただし、DTT 非添加時と DTT 添加時を比較すると、DTT 添加時にて全体的な値の減少が見られたことから SS 型と SH 型の構造間で遠位の His 残基の性質が異なることが示唆された。

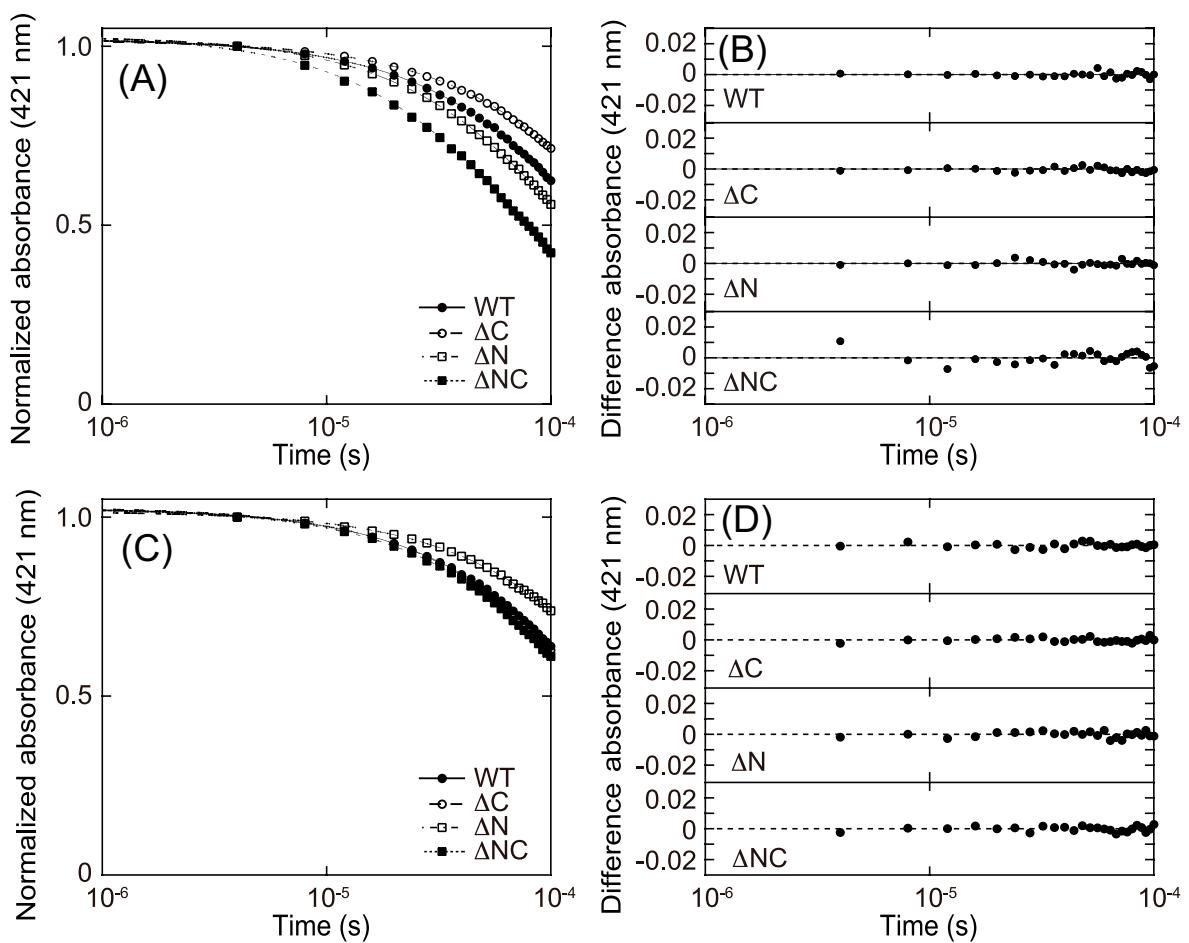


Fig 8. フラッシュフォトリシスによる CO 結合速度の測定

- (A) DTT 非添加時の CO 結合過程における  $A_{421\text{nm}}$  の標準経時的変化及びフィッティング
- (B) A における実測値とフィッティング式との残差
- (C) DTT 添加時の CO 結合過程における  $A_{421\text{nm}}$  の標準経時的変化及びフィッティング
- (D) C における実測値とフィッティング式との残差

それぞれ WT(●・実線)、 $\Delta C$ (○・破線)、 $\Delta N$ (□・一点鎖線)、 $\Delta NC$ (■・点線)を示す

Table 4. DTT 非添加、添加時における速い段階・遅い段階の速度

		$k_{\text{obs}} (\text{s}^{-1})$	
		Fast phase	slow phase
-DTT	WT	$(6.4 \pm 0.2) \times 10^3$	$23 \pm 0.1$
	ΔC	$(4.8 \pm 0.6) \times 10^3$	$12 \pm 0.4$
	ΔN	$(8.6 \pm 0.2) \times 10^3$	$15 \pm 0.3$
	ΔNC	$(14 \pm 0.4) \times 10^3$	$24 \pm 0.1$
+ DTT	WT	$(5.4 \pm 0.2) \times 10^3$	$7 \pm 1$
	ΔC	$(5.6 \pm 0.2) \times 10^3$	$7 \pm 4$
	ΔN	$(4.1 \pm 0.4) \times 10^3$	$8 \pm 3$
	ΔNC	$(6.3 \pm 0.2) \times 10^3$	$11 \pm 0.7$

## 2.5. ヘム周辺環境

これまでの結果から、末端領域の欠損は配位子の結合親和性や結合速度にあまり影響が見られなかつたが、ヘム周辺環境に対する末端領域欠損の影響の確認のため、共鳴ラマン分光法により CO 結合時の共鳴ラマンスペクトルの測定を行つた(Fig 9)。共鳴ラマン分光法では、レーザー光を分子に照射し得られた散乱光を分光することで、分子構造や電子状態に関する情報を得ることができ、本測定では Cygb の活性中心であるヘムの吸収帯で励起し、選択的にヘム由来の振動モードのみの観測を行うことでヘム周辺環境を調査した。本測定でも、SS 型と SH 型への影響を区別するため還元剤である DTT を加えた実験も行つた。その結果、DTT の添加、非添加に関わらず、鉄と CO の伸縮振動を示す  $\nu(\text{Fe-CO})$  と呼ばれるピーク位置に着目すると、WT と全ての変異体にて  $518 \text{ cm}^{-1}$  と  $489 \text{ cm}^{-1}$  の位置に同様にピークが見られ、WT と変異体間でピーク位置に変化は見られなかつた。このことから末端領域の欠損はヘム周辺環境にはほとんど影響しないことが示され、これまでの結果と矛盾しない結果となつた。

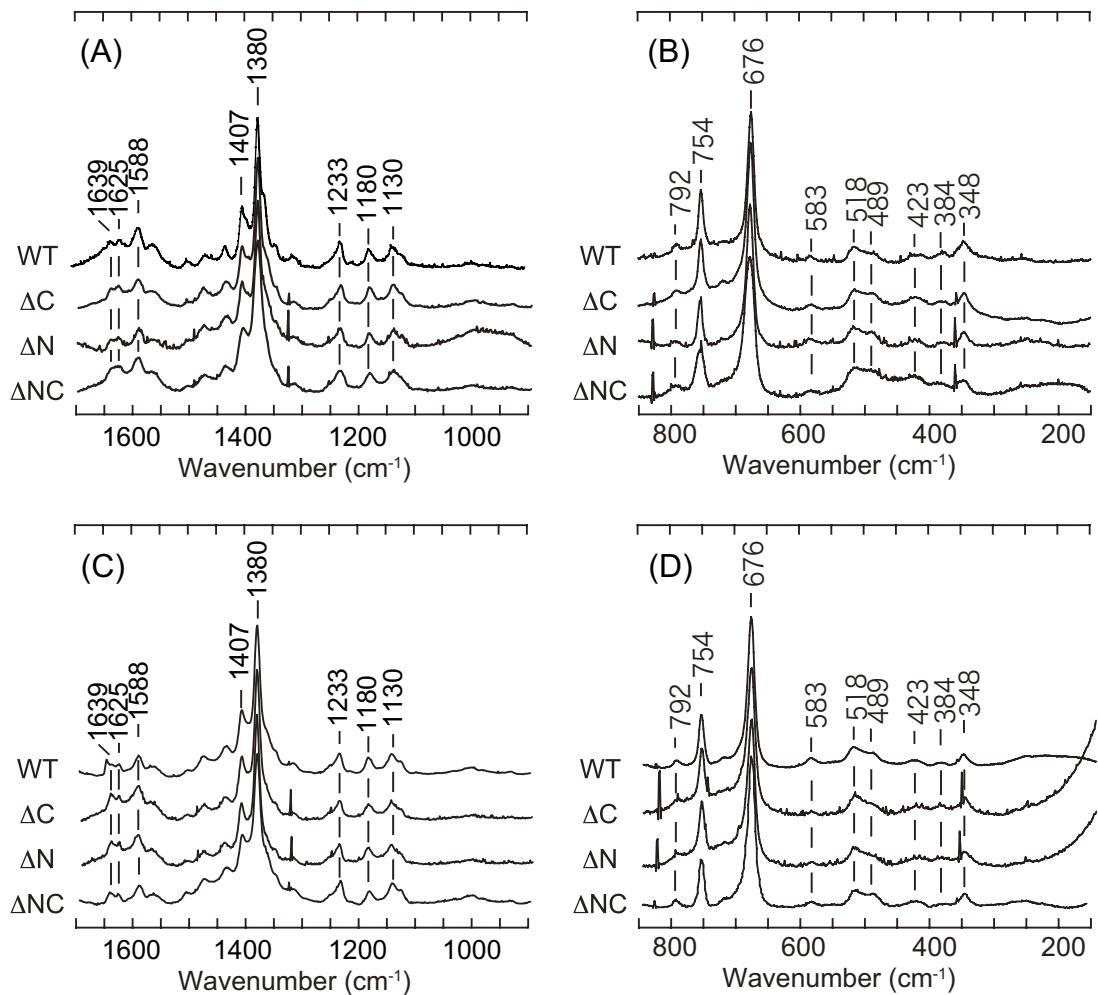


Fig 9. DTT 非添加及び添加時の CO 結合型 Cygb の共鳴ラマンスペクトル

DTT 非添加時の(A) 高波数側、(B) 低波数側の共鳴ラマンスペクトル

DTT 添加時の(C) 高波数側、(D) 低波数側の共鳴ラマンスペクトル

### 3. 構造安定性への影響

#### 3.1. グアニジン塩酸塩によるタンパク質構造変性

末端領域の欠損は配位子の結合性や結合速度、ヘム周辺環境にほとんど影響がみられなかったがスーパーオキサイド消去能にわずかな影響が見られたことから、末端領域は配位子の侵入経路ではなく全体構造に貢献しているのではと考えられた。そこで、グアニジン塩酸塩を用いたタンパク質の変性試験によるタンパク質の構造安定性の測定を行った(Fig 10A)。50%のタンパク質が変性する時のグアニジン塩酸塩濃度  $D_{50}$  を算出したところ、Table 5 に示すように、WT での  $D_{50}$  は 3.1 M であり、 $\Delta C$ 、 $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  の  $D_{50}$  はそれぞれ 2.8 M、3.2 M、2.8 M であった。 $\Delta C$  と  $\Delta NC$  にて WT より 10%程度低い値であったことから(Fig 10B)、C 末端領域の欠損によりタンパク質の安定性が WT と比べて低下することが明らかになった。

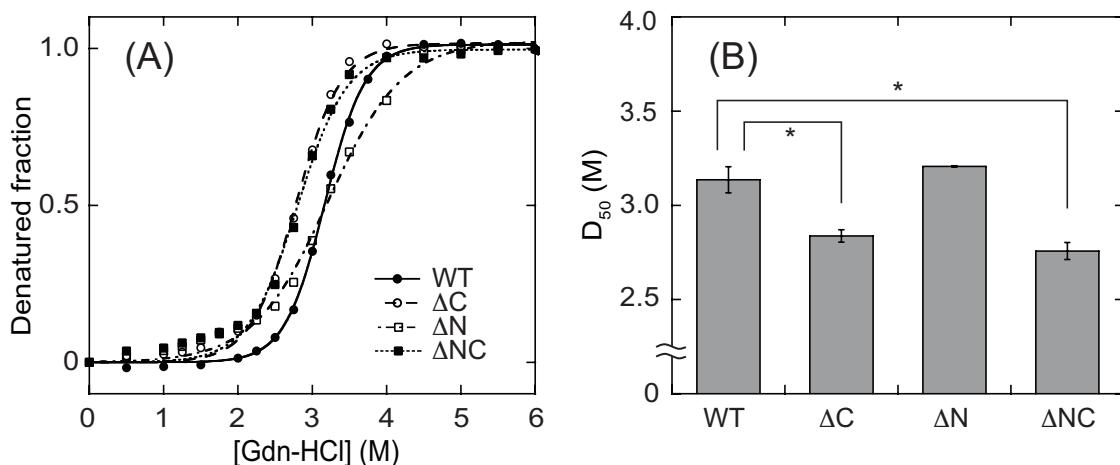


Fig 10. グアニジン塩酸塩による構造安定性の測定

(A) グアニジン塩酸塩によるタンパク質の変性

それぞれ WT(●・実線)、 $\Delta C$ (○・破線)、 $\Delta N$ (□・一点鎖線)、 $\Delta NC$ (■・点線)を示す

(B) WT と各変異体における  $D_{50}$  値の比較 (\*p<0.05, Dunnett's test)

ギブスエネルギーを算出する際に得られる傾き  $m$  は、構造転移の協同性を示すパラメータであり、天然状態と変性状態の表面積に差に比例すると考えられ、WT では  $2.0 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、 $\Delta C$ 、 $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  の  $m$  はそれぞれ  $1.9 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、 $1.3 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、 $1.7 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  であった(Table 5)。WT と比べて  $\Delta N$  だけ低い値となった。このことから N 末端領域を除くと WT と比べて構造が変化し溶媒接触可能表面積が減少したことが考えられた。それぞれの天然状態と変性状態との安定性の差を反映するギブス自由エネルギー  $\Delta G_0$  を算出すると、WT では  $6.2 \text{ kcal mol}^{-1}$  であったのに対して、 $\Delta C$ 、 $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  の  $D_{50}$  はそれぞれ  $5.4 \text{ kcal mol}^{-1}$

$^{-1}$ 、4.2 kcal mol $^{-1}$ 、5.7 kcal mol $^{-1}$ であった(Table 5)。 $\Delta G_0$ では $\Delta C$ 、 $\Delta NC$ にてWTよりわずかに低く、 $\Delta N$ で低い値となった。 $\Delta G_0$ は $D_{50}$ とmの積からも算出できるため、C末端領域欠損による構造安定性の変化、N末端領域欠損による構造の変化の影響が見られたと考えられた。

Table 5. グアニジン塩酸塩による変性実験で得られたパラメータ

	$D_{50}$ (M)	m (kcal mol $^{-1}$ M $^{-1}$ )	$\Delta G_0$ (kcal mol $^{-1}$ )
WT	3.1 ± 0.1	2.0 ± 0.2	6.2 ± 0.7
$\Delta C$	2.8 ± 0.03	1.9 ± 0.1	5.4 ± 0.2
$\Delta N$	3.2 ± 0.003	1.3 ± 0.1	4.2 ± 0.2
$\Delta NC$	2.8 ± 0.04	1.7 ± 0.03	5.7 ± 0.2

## 4. タンパク質間相互作用への影響

### 4.1. Cygb と P4H のタンパク質間相互作用

Cygb はヘムへの配位子の結合のみでなく、様々なタンパク質との相互作用も提唱されているが、その詳細は全く明らかとなっていない。そこで、末端領域が Cygb のタンパク質間相互作用に関与しているかを調査することとした。

これまで *in vivo* での実験から Cygb はコラーゲン合成に関わっていると考えられてきた(7)。コラーゲンは、酸素及びプロコラーゲン、プロリル水酸化酵素(P4H, prolyl-4-hydroxylase)の三者によって合成されるため、Cygb は P4H と相互作用することで酸素を効率よく運搬することでコラーゲン合成に関与しているのでは、と提唱された(28)。しかしながら、これまで Cygb は P4H の相互作用を実際に測定した報告は今までされてこなかった。そこで、物理化学的相互作用を検出できる Biacore T-200 を用いて、まずは Cygb WT が P4H とタンパク質間相互作用しうるかどうかについて検討を行った。P4H をリガンドとしてチップに固定化し、Cygb WT をアナライトとして測定を行った結果、Fig 11A に示すセンサーグラムが観察された。コントロールとして用いた BSA ではこのようなセンサーグラム変化は観察されなかつたことから、Cygb と P4H は相互作用することを世界で初めて明らかにすることができた。

センサーグラムから結合解離・解離速度の解析を行った結果、1成分同士では解析ができず、リガンド (P4H) 1成分に対してアナライト (Cygb WT) が 2成分存在していることが解析から予想された。前述のように SH 型、SS 型は性質が大きく異なることから、この 2成分はそれぞれ SH 型、SS 型であることが考えられたため、SH 型モデルである変異体 Cygb 2CS について測定を行い、ジスルフィド結合の影響を検討した。その結果、2CS では一成分の結合解離が見られたため(Fig 11B)、WT と 2CS 間でパラメータの比較を行った。Table 6 に示すように、WTにおいて一つ目の成分では結合速度定数  $k_a$  が  $136 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、解離速度定数  $k_d$  が  $3.4 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、解離定数  $K_d$  は  $25 \mu\text{M}$  であり、二つ目の成分では  $k_a$  が  $548 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_d$  が  $70 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $K_d$  は  $128 \mu\text{M}$  と算出された。それに対して 2CS では一つ目の成分では  $k_a$  が  $135 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_d$  が  $1.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $K_d$  は  $11 \mu\text{M}$  と算出された。これらの値の比較から、成分 1 が SH 型、成分 2 が SS 型だと帰属することが出来た。このことから SS 型と SH 型にて結合のしやすさが約 6 倍異なることがわかり、SH 型が P4H と相互作用しやすい構造であることが明らかになった。

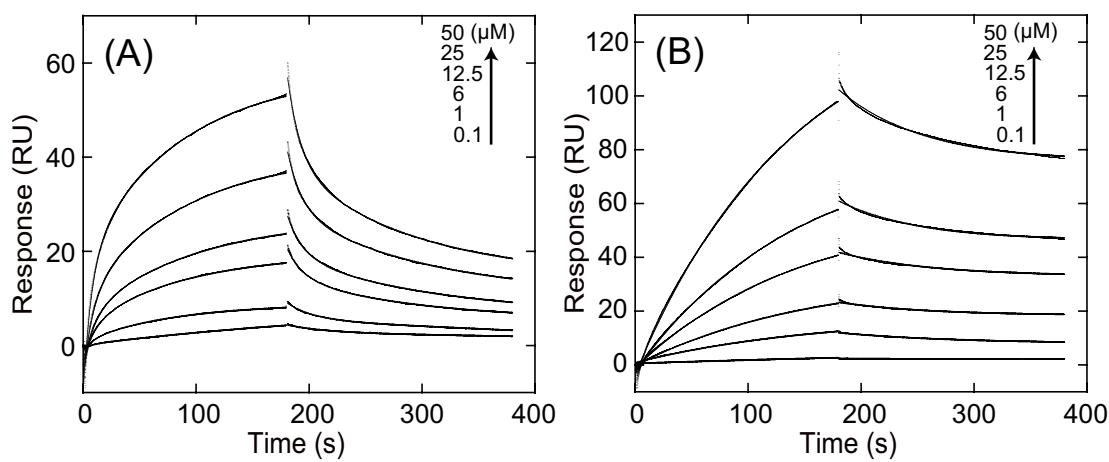


Fig 11. Cygb と P4H との相互作用測定

(A) WT、(B) 2CS でのセンサーグラム

それぞれ下から順に Cygb 濃度 0.1、1、6、12.5、25、50  $\mu\text{M}$  を示す

Table 6. Cygb と P4H のタンパク質間相互作用で得られたパラメータ

Cygb	成分 1			成分 2		
	$k_a$	$k_d$	$K_d$	$k_a$	$k_d$	$K_d$
	( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	( $10^3 \text{s}^{-1}$ )	( $\mu\text{M}$ )	( $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	( $10^3 \text{s}^{-1}$ )	( $\mu\text{M}$ )
WT	136 ± 1	3.4 ± 0.001	25	548 ± 9	70 ± 0.3	128
2CS	135 ± 1	1.5 ± 0.002	11			

## 4.2. 両末端領域のタンパク質間相互作用への影響

Cygb と P4H のタンパク質間相互作用における両末端領域の影響を調べるために、P4H に対して Cygb 変異体  $\Delta C$ 、 $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  にて同様の検討を行った(Fig 12)。その結果、Table 7 に示したように、 $\Delta C$  において SH 型では  $k_a$  が  $137 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_d$  が  $2.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $K_d$  は  $15 \mu\text{M}$  であり、SS 型では  $k_a$  が  $445 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_d$  が  $57 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $K_d$  は  $128 \mu\text{M}$  と算出された。 $\Delta N$  において SH 型では  $k_a$  が  $65 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_d$  が  $0.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $K_d$  は  $13 \mu\text{M}$  であり、SS 型では  $k_a$  が  $1420 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_d$  が  $30 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $K_d$  は  $21 \mu\text{M}$  と、 $\Delta NC$  において、SH 型では  $k_a$  が  $96 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_d$  が  $3.0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $K_d$  は  $32 \mu\text{M}$  であり、SS 型では  $k_a$  が  $818 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $k_d$  が  $80 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、 $K_d$  は  $97 \mu\text{M}$  と算出された。

算出された結合速度定数・解離速度定数・解離定数の値を WT と比べると、 $\Delta C$  では SH 型においては  $k_d$  と  $K_d$  のわずかな低下が見られた。一方で、 $\Delta N$  では SH 型において  $k_a$  が約 2 倍、 $k_d$  が約 4 倍低下、 $K_d$  値が約 2 倍低下しており、SS 型において  $k_a$  が約 3 倍増加し、 $k_d$  が約 2 倍低下し、 $K_d$  が約 6 倍と大きく低下していた。このことから N 末端領域はタンパク質間相互作用において結合・解離速度を調節していることが明らかになった。一方で、 $\Delta NC$  では SH 型において  $k_a$  と  $k_d$  がわずかに低下し  $K_d$  はわずかな増加、SS 型において  $k_a$ 、 $k_d$  共にわずかに増加し  $K_d$  はわずかな低下、と両末端領域欠損変異体では N 末端領域欠損変異体で見られた大きな影響は両末端領域欠損では見られなかった。この理由として、末端領域同士がお互いに影響を及ぼしあっていると考えられた。すなわち、WT では末端同士がそれぞれの動きを制御しあっていたのに対して、片末端欠損では制御を受けることができず大きく相互作用パラメータに影響を与えていると考えられた。さらに、両末端領域が欠損すると、結果として WT と近い挙動を示すことから、P4H との相互作用は末端ではなく、タンパク質の中心構造部分で起こっていることも予想された。さらに、SH 型と SS 型の  $K_d$  を比較すると、WT では  $K_d$  の値が 6 倍程異なっていた。一方で、 $\Delta C$  では 8.5 倍程、 $\Delta N$  では 1.6 倍程、 $\Delta NC$  では 3 倍程と変化していた。このことから、N 末端領域の欠損により SH 型と SS 型での結合親和性の差が小さくなっており、N 末端領域は SH 型と SS 型の構造変化による結合親和性の変化においても重要であることが示された。

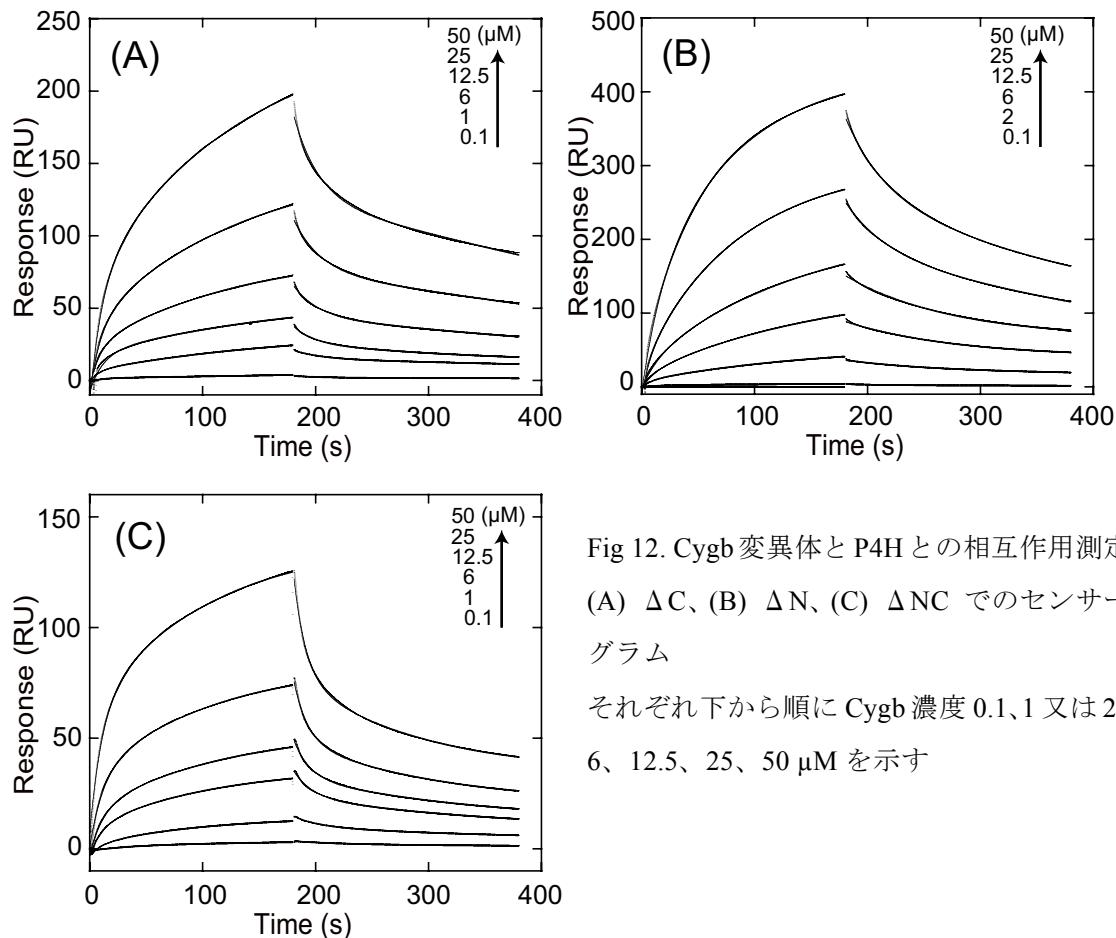


Fig 12. Cygb 変異体と P4H との相互作用測定  
(A)  $\Delta C$ 、(B)  $\Delta N$ 、(C)  $\Delta NC$  でのセンサー  
グラム  
それぞれ下から順に Cygb 濃度 0.1、1 又は 2、  
6、12.5、25、50  $\mu M$  を示す

Table 7. Cygb と P4H のタンパク質間相互作用で得られたパラメータ

Cygb	SH 型			SS 型		
	$k_a$	$k_d$	$K_d$	$k_a$	$k_d$	$K_d$
	( $M^{-1} s^{-1}$ )	( $10^3 s^{-1}$ )	( $\mu M$ )	( $M^{-1} s^{-1}$ )	( $10^3 s^{-1}$ )	( $\mu M$ )
WT	136 $\pm$ 1	3.4 $\pm$ 0.001	25	548 $\pm$ 9	70 $\pm$ 0.3	128
$\Delta C$	137 $\pm$ 1	2.1 $\pm$ 0.006	15	445 $\pm$ 7	57 $\pm$ 0.2	128
$\Delta N$	65 $\pm$ 1	0.9 $\pm$ 0.02	13	1420 $\pm$ 20	30 $\pm$ 0.4	21
$\Delta NC$	96 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.007	32	818 $\pm$ 13	80 $\pm$ 0.3	97

## 5. まとめ

### 5.1. 末端領域欠損の影響

末端領域欠損の変異体に関して、紫外可視吸収スペクトルに変化はなかったことから、ヘムの保持が確認された。そこで、Cygb のスーパーオキサイド消去能への影響の調査を行った。その結果、C 末端領域欠損変異体  $\Delta C$  及び  $\Delta NC$  にてスーパーオキサイド消去能がわずかに増加していた。このことから C 末端領域は活性酸素消去能に影響を与えることが考えられ、Cygb の生体内における活性酸素消去において重要な役割を担っていると考えられた。

次に Cygb の酸素運搬・貯蔵能に対する影響の調査を行った。酸素運搬・貯蔵においては酸素との結合親和性や自動酸化速度が関与してくると考えられるが、CO との結合親和性、結合速度、CO 結合時のヘム周辺環境及び自動酸化に大きな変化は見られなかった。これらの結果から、末端領域は Cygb の生体内における酸素運搬・貯蔵にあまり影響していないことが考えられた。

さらに、末端領域による Cygb のタンパク質の構造安定性への影響の調査を行った。その結果、C 末端領域欠損変異体  $\Delta C$  及び  $\Delta NC$  にて構造安定性が減少していた。このことより C 末端領域はスーパーオキサイド消去能に加え、構造安定性にも影響していることが明らかになった。一方で、ギブスエネルギーの変化傾向から N 末端領域欠損による溶媒接触可能表面積の減少が考えられた。

最後に、末端領域は構造の外側に影響していることが考えられるため、Cygb のタンパク質間相互作用への影響についての調査を行った。まず、Cygb は P4H と相互作用することが明らかになり、SH 型と SS 型で異なることが示された。さらに、末端領域欠損の影響を調査した結果、タンパク質間相互作用において、C 末端領域欠損では解離速度定数にわずかに減少が見られ、N 末端領域欠損では結合速度定数・解離速度定数のどちらにも比較的大きな影響が見られた。このことから、タンパク質間相互作用において両末端領域、特に N 末端領域が重要であり結合及び解離速度を調整することで関与していることが明らかになった。また SS 型と SH 型の  $K_d$  比較から N 末端領域は SH 型と SS 型の構造変化による結合親和性の変移においても重要であることが示された。

## 第二章 考察

### 1. Cygb の両末端領域

#### 1.1. 末端領域欠損変異体

これまで Cygb の両末端領域の役割について様々な議論がなされ、タンパク質間相互作用への関与やヘム 6 配位構造の形成、配位子侵入を促すヘムポケットの形成、又は脂質結合などの Cygb 特有の機能への関与など様々な役割が提唱されてきたが、その詳細は全く明らかにされてこなかった。

Trandafir らは  $\Delta 1-17 \Delta 165-190$  Cygb 変異体”mini-CYGB”とシステイン残基をセリンに変異した変異体”CYGB\*”を用いて活性酸素消去能への影響を調査した(23)。その結果、CYGB\* では bovine SOD の 0.01% の活性酸素消去能を示したのに対して、mini-CYGB では CYGB\* の 500 倍以上となる SOD 比 5.71% の活性酸素消去能を示した。この活性酸素消去能の変化は N、C の両末端領域の有無による影響、もしくはシステイン残基の変異による影響だと考えられたが、活性酸素消去能に対する末端領域の影響は不明であった。近年、Tejero らは  $\Delta 1-15 \Delta 174-190$  Cygb 変異体を用いて脂質結合における末端領域の影響を調査した(8)。その結果、WT ではオレイン酸ナトリウムとの  $K_d$  が  $2.3 \mu\text{M}$  だったのに対して、 $\Delta 1-15 \Delta 174-190$  Cygb では  $3.0 \mu\text{M}$  となり WT と変わらない値を示した。そのため末端領域は脂質結合にはほとんど影響していないことが明らかになったが、他の役割に関しては更なる研究が必要であると述べられた。

本研究では、N、C 末端領域欠損変異体( $\Delta 1-17$  Cygb,  $\Delta 171-190$  Cygb,  $\Delta 1-17 \Delta 171-190$  Cygb)を作製し、N、C 末端領域欠損の影響を調査した。作製した変異体は ferric 型、ferrous 型で WT と同様の吸収スペクトルを示したことからヘムの保持が確認されたが、いくつかの性質が WT と異なっており、末端の役割の一部を明らかとすることができた。

#### 1.2. 末端領域の役割

C 末端領域欠損により、スーパーオキサイド消去能がわずかに増加し、構造安定性を低下していた。このことから C 末端領域はスーパーオキサイド消去能を抑制し、構造安定性を向上させていることが分かった。これは C 末端領域があることで構造安定性が増加し、構造の自由度が減少したことでスーパーオキサイドがヘムへ侵入しにくくなり、その結果スーパーオキサイド消去能が抑制されたと考えられる。一方で、C 末端領域欠損では P4H とのタンパク質間相互作用において解離速度定数のわずかな変化しか見られなかった。以上より C 末端領域は構造安定性・ヘムへの配位子結合性において重要な役割を担っていることと考えられる。

N 末端領域欠損では、ヘムへの配位子結合性に影響はみられず、構造安定性において表面積の減少が見られた。一方で、P4H とのタンパク質間相互作用において SH 型、SS 型共に結合速度定数・解離速度定数・解離定数の大きな変化が見られた。このことから N 末端領域がタンパク質間相互作用において重要な役割を担っていることが明らかになった。また、SH 型、SS 型の  $K_d$  に着目すると、WT で 6 倍程の差があったものが  $\Delta N$  では 1.6 倍と差が減少していた。このことから N 末端領域は SH 型と SS 型の構造変化を補助していることが考えられた。

N、C 末端領域の関係について検討すると、ヘムへの配位子結合性、構造安定性において N、C 両末端領域欠損では、C 末端領域欠損と同じ傾向の変化を示し、スーパーオキサイド消去能が増加し、構造安定性が低下していた。このことから C 末端領域欠損の影響がそのまま N、C 両末端領域欠損でも見られたと考えられる。それに対して、タンパク質間相互作用においては N、C 両末端領域欠損では、C 末端領域欠損で見られた解離速度定数への影響よりは様々な影響があったが、N 末端領域欠損で見られていた結合速度定数・解離速度定数・解離定数の影響が小さくなっていた。このことから、C 末端領域、N 末端領域はそれぞれが影響し合っていることが考えられた。つまり、N 末端領域は C 末端領域の動きを制限していると予想され、C 末端領域が欠損しても影響は少ないが N 末端領域が欠損すると C 末端領域が制御できなくなることで影響が大きくみられるようになつたのだと思われ、両末端領域が欠損していると C 末端領域の影響なくなり WT に近づいたのだと思われた。

## 2. Cygb の機能

### 2.1. 自動酸化

Cygb の自動酸化は 2 段階で見られた。WT の自動酸化速度 [ $k_{auto} = 7.5 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  and  $7.2 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$  (pH 7.4)] は、Physeter macrocephalus Mb [ $k_{auto} = 1.1 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$  (pH 7.2)] (29)よりも高い値となつたが、Ngb [ $k_{auto} = 0.17 \text{ min}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$  (pH 7.5)] よりも低い値となつた(30,31)。これらのことから Cygb は自動酸化が比較的遅く、oxy 型で比較的安定であることが示され、zebrafish Cygb-1 [ $k_{auto} = 0.0165 \text{ min}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$  (pH 7.4)] と Cygb-2 [ $k_{auto} = 0.55 \text{ min}^{-1}$  at  $25^\circ\text{C}$  (pH 7.4)] を除いて、Cygb は自動酸化がみられないほど安定であったという他の研究による報告とは大きく矛盾しない結果となつた(32,33)。先行研究にて自動酸化が見られなかつた原因として Cygb の多量体化による影響が考えられるが、これに関してはさらなる研究が必要である。

### 2.2. スーパーオキサイド消去

Cygb は濃度依存的なスーパーオキサイド消去能を示した。他と比較すると、Cygb ( $IC_{50} =$

1.5 μM)は、SOD ( $IC_{50} = 1.8 \times 10^{-4}$  μM)より 8000 倍以上低いものの、これまでスーパーオキサイド消去能が報告されていた Ngb ( $IC_{50} = 7.4$  μM)、抗酸化物質として知られるアスコルビン酸 ( $IC_{50} = 8.3$  μM)より高い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。このことから Cygb は生体内でスーパーオキサイドを消去していることが考えられ、スーパーオキサイド消去による細胞障害からの細胞保護機能が予想された。

### 2.3. タンパク質間相互作用

これまで Cygb は生体内における様々なタンパク質との相互作用が提唱されてきた。例えば、生体内の酸化還元において Cytochrome P450 reductase (CPR)や Cytochrome b5 との相互作用が提唱され、実際に還元速度が求めてられてきた(16,34)。さらに、酸化ストレス応答では aldo keto reductase family 7 member 2 (AKR7A2)との相互作用が提唱されており、共免疫沈降で相互作用が確認された(35)。しかし、相互作用における結合速度や解離速度、解離定数といったパラメータはこれまで報告されてこなかった。今回、本研究では、Cygb との相互作用が提唱されてきたが実際に確認されてこなかった P4H を用いて、Cygb と P4H との相互作用を明らかにし、結合速度や解離速度、解離定数を求めることができた。さらに、SH 型と SS 型で結合親和性が異なるという興味深い結果を得た上、N 末端領域が相互作用に重要であるということを示すことができた。本研究により Cygb と P4H とのタンパク質間相互作用がみられたことからコラーゲン合成調節において Cygb が重要な役割を果たしていることが予想された。コラーゲン合成調節メカニズムについては後述する。生体内での Cygb の動向を明らかにするためには、CPR や AKR7A2 との相互作用に関しても本研究と同様に各種パラメータを求めるだけでなく、ジスルフィド結合による構造変化の影響、そして末端領域の影響について調査することが期待される。

### 2.4. ジスルフィド結合による Cygb 機能の制御

SH 型と SS 型の違いについて考察を行う。WT 単量体での SH 型、SS 型混合体と 2CS との比較から SH 型は SS 型の 10 倍ほど自動酸化速度が高かったことが示唆された。自動酸化はヘム遠位の配位子結合領域や溶媒の侵入経路の水素結合の相互作用、バッファー、pH によって影響を受けることが知られている。CO 結合時の共鳴ラマンスペクトルにおける  $\nu(\text{Fe-CO})$  では、DTT 有無に関わらずピーク位置が一致しており、DTT 非存在時の単量体では SH 型と SS 型が含まれ DTT 存在時には SH 型しか存在しないことからヘム周辺環境は SH 型と SS 型間で変化しないことが示された。一方で、フラッシュフオトリシス測定で見られた遅い段階における速度において、DTT 非存在時には DTT 存在時の 2、3 倍程  $k_{\text{obs}}$  が高かつたことから、His 解離速度に関して SS 型は SH 型より高いことが考えられた。このことか

ら SS 型では遠位の His 解離した形に平衡が傾いていると考えられ、5 配位になりやすい構造をしていると考えられる。これは先行研究の考察と一致している(36)。つまり、SS 型では 5 配位になりやすい構造をしているために SS 型は oxy 型でより安定になり SH 型より 10 倍程自動酸化速度が低くなつたのだと考えられた。先行研究でも SH 型と SS 型は役割が異なり、Cygb は低酸素のような細胞内の酸化還元環境によって特定の構造をとり、細胞保護作用のために機能を変更していると報告してきた。以上より、ジスルフィド結合は酸素運搬能の調節を行つていることが考えられた。

次に、末端領域による SH 型と SS 型間の構造変化による影響の違いについて考察を行う。フラッシュフオトリシス測定で見られた遅い段階における速度において、DTT 非存在時には  $\Delta C$  と  $\Delta N$  ではわずかに WT より値が低くなつてゐた。しかしながら、DTT 存在時には  $\Delta C$  と  $\Delta N$ 、 $\Delta NC$  は WT とほとんど同じであった。DTT 非存在時の単量体では SH 型と SS 型が含まれ DTT 存在時には SH 型しか存在しないため、末端領域は SS 型と SH 型で影響が異なり、SS 型に対する影響が強いと考えられた。また、P4H とのタンパク質間相互作用において SH 型、SS 型の  $K_d$  において、 $\Delta N$  において SH 型では  $K_d$  が WT と比べて 2 倍の変化があつたのに対して SS 型では 6 倍の変化があつたことからも SS 型への影響が強いことが考えられた。さらにその結果、SH 型と SS 型間の  $K_d$  について WT で 6 倍程の変化があつたものが、 $\Delta N$  では 1.6 倍と差が減少していたことから N 末端領域が SH 型と SS 型の構造変化を補助していることが考えられた。以上より、末端領域は主に SS 型で影響していることが考えられ、N 末端領域が特に構造変化において重要であると示唆された。これまで Cygb 単量体の結晶構造はいくつか報告されてきたが、全て SH 型であり両末端領域の構造は特定されていなかつたため、構造から末端領域の役割を推察することができなかつた。今後 SS 型の結晶構造解析が行われるがあれば、末端領域の役割についてより詳細な検討が行われることが期待できる。

## 2.5. コラーゲン合成調節メカニズム

これまでの知見をもとに構築した Cygb のコラーゲン合成調節作用におけるメカニズムのモデルを Fig. 13 に示した。本研究によって Cygb と P4H のタンパク質間相互作用が明らかになり、SH 型( $K_d : 25 \mu\text{M}$ )と SS 型( $K_d : 128 \mu\text{M}$ )で異なる結合親和性を有し、SH 型は比較的結合しやすく、SS 型は結合しにくくなつてゐることが示された。これら SH 型と SS 型は平衡状態になつてゐると考えられ、それぞれが P4H と相互作用していると考えられる。コラーゲンは、プロコラーゲンと 2-オキソグルタル酸、鉄原子、酸素を用いて P4H により合成されることが知られている(37-39)。Cygb は細胞内での酸素運搬能が提唱されてきたため(25)、通常酸素条件時は細胞内において Cygb がコラーゲン合成に用いる酸素を P4H に運搬し、コ

ラーゲン合成を促進していると考えられた。しかし、酸化ストレスによる酸化的環境では、Cygb の平衡が SS 型に傾くことで P4H と相互作用しにくくなると考えられた。その結果、酸素の供給がへり、コラーゲン量がへり、線維化が抑制されるのでは考えられた。このような酸化還元環境に応じた SH 型・SS 型割合の変化によるコラーゲン合成調節・線維化抑制メカニズムのモデルが示された。ここで、N 末端領域が欠損すると、この調節機構が上手く機能しなくなるため N 末端領域は特に P4H との相互作用を介した本機構において重要な予想される。

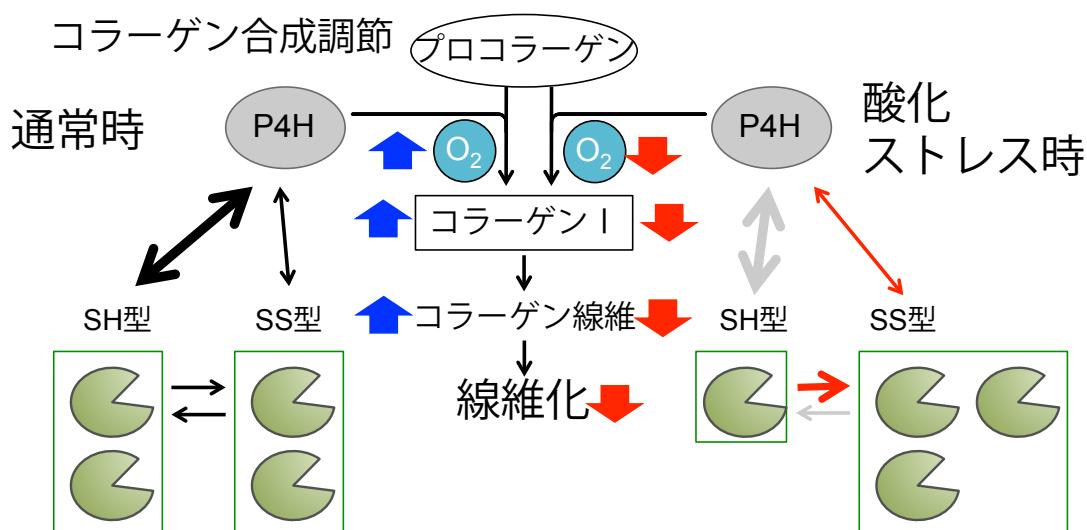


Fig 13. Cygb のコラーゲン合成調節メカニズムのモデル図

Cygb は緑色物体で示す。コラーゲンはプロコラーゲンと P4H と酸素から合成され、コラーゲン線維を形成し、過剰に発現すると線維化を引き起す。Cygb は SH 型で P4H に比較的相互作用しやすく、SS 型で相互作用しにくい。通常時は、P4H と相互作用し、コラーゲン合成に必要な酸素を供給していると考えられ、コラーゲン合成を促進する。酸化ストレス時には線維化がおこりやすくなるが、酸化ストレスによる酸化的環境では SS 型に平衡が傾くことによって P4H と相互作用しにくくなり、酸素供給量が減り、コラーゲン合成を抑えることによって線維化に対して抑制的に働くと考えられる。

## 結論

本研究では、**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調べ、以下の成果を挙げた。

1. C 末端領域は構造安定性の向上、スーパーオキサイド消去能の抑制に寄与していることを示した
2. 両末端領域、特に N 末端領域はタンパク質間相互作用における結合及び解離速度の調節、ジスルフィド結合による構造変化の補助に寄与していることを明らかにした
3. **Cygb** のコラーゲン合成調節メカニズムを提唱することができた

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。

## 略語一覧

Abbreviation	Definition
Cygb	cytoglobin
Ngb	neuroglobin
Hb	hemoglobin
Mb	myoglobin
WT	wild-type
ΔN	a cytoglobin mutant truncated 17 amino acids at the N-terminal domain
ΔC	a cytoglobin mutant truncated 20 amino acids at the C-terminal domain
ΔNC	a cytoglobin mutant truncated 17 amino acids at the N-terminal and 20 amino acids at the C-terminal domains
CO	carbon monoxide
NO	nitric oxide
ROS	reactive oxygen species
SOD	super oxide dismutase
2-ME	β-mercaptoethanol
DTT	dithiothreitol
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

## 実験の部

### 試薬

#### (1)DNA work

##### 【DNA の精製、遺伝子組み換えおよび変異体の調製】

- ・ 変異導入プライマー 北海道システムサイエンス

normal forward primer

5'-AAACTCGAGCATATGGAGAAAGTGCCAGGCGAG-3'

Δ N forward primer

5'-AAACTCGAGCATATGGAGCTGTCCGAGGCAGGAGGAAGG-3'

Δ C reverse primer

5'-AGAGGATCCCTACGGCCCCAAGAGGGCAG-3'

normal reverse primer

5'-AGAGGATCCCTACGGCCCCAAGAGGGCAG-3'

- ・ Minipreps DNA purification system Promega
- ・ PCRpreps DNA purification system Promega
- ・ 制限酵素 : *Xba*I、*Nde*I、*Bam*HI、#4 buffer、×10 BSA N.E.Biolabs
- ・ DNA Ligation Kit Ver 2.0 TAKARA
- ・ KOD plus DNA polymerase Stratagene
- ・ pet15b 本研究室で作製
- ・ pBluescript II SK(+) Stratagene
- ・ Cygb WT 全合成遺伝子 本研究室で作製
- ・ XL-1 Blue MRF' Stratagene
- ・ BL-21 GOLD (DE3) Stratagene

### 【アガロースゲル電気泳動】

- 50×AE buffer

TRIZMA BASE (Sigma-Aldrich)	242 g
Acetic Acis (Wako)	57.1 mL
EDTA Na <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O (DOJINDO)	18.6 g
Milli-Q	1.0 L

- 1.0% Agarose gel

Agarose NA (GE Healthcare)	1 g
50×TAE buffer	100 mL

- Loading dye

Bromophenol Blue (KATAYAMA CHEM)	25 mL
Xylate Cyanole FF (KATAYAMA CHEM)	25 mL
Glycerol (Wako)	3 mg
Milli-Q	10 mL

- molecular weight marker

1kb DNA Ladder (GIBCO BRL)	10 μL
Milli-Q	10 μL
Loading dye	5 L

### 【DNA 配列の確認】

• Urea ALF Grade	Wako
• Long Ranger 50% Gel Solution	TAKARA
• Ammonium persulphate (APS)	Pharmasia biotech
• N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	GE Healthcare
• Thermo Sequenase Primer Cycle Sequence Kit	GE Healthcare
• M13 Forward (-29) / IRD700	ALOKA
• M13 Reverse / IRD700	ALOKA
• Stop Solution	GE Healthcare

### (2)タンパク質の獲得

#### 【大腸菌の大量培養】

• Ampicillin Sodium		Wako
• 5-Aminolevulinic Acid hydrochloride (5-ALA)		COSMO BIO
• Isopropyl β-D(-)-thiogalactopyranoside (IPTG)		Wako
• LB 培地		
Bacto <sup>TM</sup> Tryptone (BD)	10 g	
Bacto <sup>TM</sup> Yeast Extract (BD)	5 g	
NaCl (Wako)	5 g	
5 M NaOH (Wako)	200 μL	
EliX	1 L	
• LB 寒天培地		
Agar powder (Wako)	3 g	
LB 培地	200 mL	

### 【タンパク質精製】

• NaCl	Nacalai Tesque
• NaOH	Wako
• Trisza (Trizma base)	Sigma-Aldrich
• EDTA (EDTA · 2Na)	Dojindo
• NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Wako
• Imidazole	Wako
• CaCl <sub>2</sub>	Wako
• Thrombin	Novagen
• Streptavidin Agarose	Novagen
• Glycerol	Wako
• Ni-NTA Agarose	QIAGEN
• Amicon Ultra-15 10,000 MWCO	Millipore
• Sephacryl S-200	GE Healthcare

### 【SDS-PAGE】

• 10×Tris / Glycine / SDS buffer	BIO RAD
• 2-Mercaptethanol	Wako
• Protein Standard	BIO RAD

• Laemmli Sample buffer	BIO RAD
• PAGEL - c15L	ATTO
• Sigma Dalton Mark VII-L	Sigma-Aldrich
• ワンステップ CBB 染色液	BIO CRAFT

### (3) 実験測定

#### 【各種測定】

• Sodium dithionite (Sodium Hydrosulfite)	Wako
• Sephadex <sup>TM</sup> G-25 Medium	GE Healthcare
• Pyridine	Aldrich
• KCN	Wako
• CO ガス	住友精化
• N <sub>2</sub> ガス	ネリキガス
• BES-So	Wako
• HEPES	Wako
• Hypoxanthine (HPX)	Sigma-Aldrich
• Xanthine oxidase (XO)	Nacalai Tesque
• Pterin	Sigma-Aldrich
• Catalase from bovine liver	Sigma-Aldrich
• Glucose oxidase	Wako
• Glucose	Wako
• Dithiothreitol (DTT)	Wako

## 実験機器

純水製造装置 Elix-5	Millipore
超純水製造装置 Milli-Q integral 5 (A10)	Millipore
DNA シークエンサー DNA Analyzer GENE READ IR 4200	LiCor
DNA 電気泳動装置用 Mupid ミニゲル電気泳動装置	ADVANCE
DNA 電気泳動装置用クーラー COSMO BIO Mupid-2	PROGENE
冷却遠心機 7930	KUBOTA
冷却遠心機 3700	KUBOTA
遠心機 centrifuge 5417C	Eppendorf
サーマルサイクラー TECHINE TC-3000	Barloworld Scientific
超音波発生装置 SONIFIER 450	BRANSON
フラクションコレクター MODEL 2110	BIO-RAD
紫外可視分光光度計 DU-800	BECKMAN
UV-2450	SHIMADZU
マイクロプレート蛍光計 FP-6500	JASCO
pH メーター pH METER F-52	HORIBA
タンパク質電気泳動装置 Compact PAGE Model AE-7350	ATTO
ラマン分光器 NR-1800	日本分光
Kr <sup>+</sup> レーザー Innova 300C	Coherent
超高感度冷却 CCD 検出器 BU-120	ANDOR
恒温槽 THERMO MINDER SDmini	TAITEC
卓上型恒温振盪槽 PERSONAL-11	TAITEC
恒温振盪培養器 Innova 4330	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
アスピレーター ASP-13	IWAKI
オートクレーブ SX-500	TOMY
反応速度解析装置 Continuum Surelite I	ユニソク
攪拌機 STIRRER B9-46N	IWAKI
極微量分光光度計 Nano Drop 2000	Thermo
物理化学的相互作用検出器 Biacore T-200	GE-Healthcare

## 実験操作

### (1) DNA work に関して

#### 【DNA 調製】

当研究室の先行研究で、遺伝子クローニング用ベクターpBluescript II SK(+)に Cygb WT 遺伝子が組み込まれたプラスミドで形質転換された大腸菌 XL-1 Blue MRF'のグリセロールストックが作製されている。それを 10 mL の LB 培地で培養し、Minipreps purification kit によりプラスミドを抽出した。そのプラスミドに対して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 をを行い、変異がかかった Cygb 遺伝子を制限酵素 Bam HI / Xho I で処理し、同様の制限酵素処理を行っていた遺伝子クローニング用ベクターpBluescript II SK(+)に結合させた。そして、そのプラスミドを大腸菌 XL-1 Blue MRF'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 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。次に、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 BL-21 GOLD (DE3) に形質転換した後、LB 寒天培地にて培養・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。

### (2) タンパク質獲得に関して

#### 【大量培養及び精製】

0.1 mg / mL Ampicillin sodium を含む 2L の LB 培地を 2L マイラーに作製し、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 °C、振盪速度 80 rpm の条件で 12 時間振盪させ、前培養を行った。0.1 mg / mL Ampicillin sodium を含む 4L の LB 培地を 5L マイラーに作製し、前培養液 500 mL を加えラップで二重に密栓した後 37 °C、振盪速度 80 rpm の条件で振盪させ、培養を行った。OD<sub>600</sub> が 0.4~0.6 において、Isopropyl β-D(-)-thiogalactopyranoside (IPTG) 及び 5-Aminolevulinic Acid Hydrochloride (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(4,800 g、15 min、4 °C)を行うことで菌体を回収し、-80 °C 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、pH 8.0) で懸濁し、超音波を用いて完全に破碎した。得られた溶液を超遠心(37,000 rpm、1 hr、4 °C)により沈殿と上清に分離し、上清のタンパク質溶液を回収した。その後、Ni-NTA Agarose カラムにより Cygb を精製した。上清をカラムに吸着させ Wash buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、10 mM Imidazole) で洗浄後、溶出用緩衝液(50 mM Tris-HCl

(pH 8.0)、100 mM NaCl、250 mM Imidazole)で His-tag のついた Cygb のみを溶出した。溶出した試料に 0.1  $\mu$ L / mg protein の thrombin を加え Dialysis buffer 1 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、10mM Imidazole、2.5 mM CaCl<sub>2</sub>)で 4 °C、二晩透析し His tag を切断した。透析後の試料に 0.16  $\mu$ L / mg protein の Streptavidin Agarose を加えて 4 °Cで 2 時間反応させた後、超遠心(13,000 rpm、15 min、4 °C)後の上清を回収することにより His tag を除去した。その上清を再度 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 Cygb 溶液とした。Dialysis buffer 2 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、10 % Glycerol)で 4 °C、一晩透析した後、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter 10,000 MWCO を用いて濃縮およびリン酸 buffer (10 mM リン酸、100 mM NaCl, pH 7.4)で buffer 交換を行い、最終標品とした。

#### 【濃度測定】

濃度の決定は、ヘムタンパク質固有の方法であるピリジンヘモクロム法を用いて算出した。ピリジン (最終濃度 10 %) を加えて、NaOH を加えたアルカリ性条件(pH 11~12)にてジチオナイトで還元すると、プロトヘムに特有な吸収スペクトルを示す。プロトヘムのミリモル吸光係数  $\epsilon_{556\text{ nm}} = 34.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を用いて、Lambert-Beer の法則によりタンパク質に含まれるヘムの濃度を算出した。

#### 【SDS-PAGE】

Sample buffer 10  $\mu$ L に Cygb 溶液(~20  $\mu$ M)を 5  $\mu$ L 加え、これを 2-ME(-)サンプルとした。一方、sample buffer : 2-メルカプトエタノール(2-ME) = 10 : 1 で混合したもの 10  $\mu$ L に Cygb 溶液(~20  $\mu$ M)を 5  $\mu$ L 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 °Cで 5 分間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にセットした 15%のゲルにマーカーを 3  $\mu$ L、サンプルを 5  $\mu$ L アプライして電気泳動した。その後ゲルをワンステップ CBB 染色液(BIO CRAFT)に 60 分間浸けた後、精製水に 10 分間浸ける事で染色・脱色し、撮影した。

#### 【単量体分離】

Sephacryl S-200 を内径 2.5 cm×長さ 1 m のカラムにつめ、そこに濃縮した Cygb を添加しリン酸ナトリウム buffer (pH 7.4)で溶出させた。溶出液を 1~2 mL ずつ fraction collector で回収し、各フラクションを 2-ME(-)の条件にて SDS-PAGE で確認した。確認された各フラクションの中で、単量体を純粋に含むものを選別し濃縮して測定に用いた。

### (3) 実験に関して

#### 【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 1 L としたのち pH 7.4 に調整して、50 mM HEPES buffer を調製した。この 50 mM HEPES buffer (200 mL)を水で希釈し、全量 1 L にして pH 7.4 に調整し、10 mM HEPES buffer を調製した。

測定はマイクロプレート蛍光分光計(JASCO)を用いて行った。96 穴マイクロプレートに 10 mM HEPES buffer を用いて Cygb を終濃度約 0.01~60 μM になるように分注し、BESSo 20 μM、Hypoxanthine (HPX) 50 μM、xanthine oxidase (XO) 6.25 m units / mL の終濃度になるよう加えた。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 °C 乾燥機でインキュベートし、その後、検出波長  $\lambda_{\text{ex}} = 505 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 544 \text{ nm}$  (cut off = 530 nm)で一回測定し、その 10 分後にもう一度測定し、それら二回の平均値を結果とした。

解析では、Cygb の濃度 0.1~100 μM それぞれに対してスーパーオキサイド消去能をプロットし、以下の式でフィッティングを行った。

$$y = 100 * X^B / (A^B + X^B)$$

(A は IC<sub>50</sub> 値、B はスーパーオキサイド一分子と反応する Cygb 分子量を示す。)

#### 【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 (pH7.4)	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 ストック溶液とした。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、Cygb を終濃度 6 μM になるように加えた。さらに、セルに 200 mM NADH 16 μL と 2 mM Riboflavin 4 μL を加え、445.5 nm の光を 30 分間照射することで Cygb を還元した。ここに CO ストック溶液を少量ずつ加えて滴定し、紫外可視吸

吸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 ストック溶液で滴定を行い、CO ストック中の溶存 CO 濃度を測定し、Cygb 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。

+DTT の時は、DTT を終濃度 100 mM になるように加えた上記の嫌気 buffer を作製し、窒素ガスを十分にバージして、そこに Cygb を終濃度 6 μM になるように加え密封状態で冷所に 3 時間放置した。この溶液をスクリューキャップ付きのセルに満たし、上記と同様にヘムを還元した後、測定を行った。

解析では、Y 軸に CO 濃度、X 軸に CO 結合割合をプロットし、以下の式を用いてフィッティングを行った。

$$Y = A \cdot X / (1 - X) + B \cdot X$$

(A は  $K_d$  値、B は Cygb の初濃度を示す。)

### 【フラッシュフォトリシス】

CO の結合速度を求める際にフラッシュフォトリシス法を用いた。リン酸 buffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、100 mM NaCl、pH 7.4)に十分に CO ガスを吹き付けてから密封状態で 6 μM となるようサンプルを注入した。測定前にジチオナイトを少量添加して還元し、2 ms あるいは 400 ms の間測定した。得られたデータは、それぞれ出発点の吸光度を 100 % として変化をプロットし、フィッティングすることで  $k_{\text{fast}}$ 、 $k_{\text{slow}}$  を求めた。

+DTT の時は測定の前に、先に DTT を終濃度 100 mM になるように加えたリン酸 buffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、100 mM NaCl、pH 7.4)希釈溶液を作製し、Cygb を終濃度 6 μM になるように加え、密封状態で冷所に 3 時間放置した。その後、測定に用いた。

解析では、時間に対して Absorbance 変化割合をプロットし、以下の式を用いてフィッティングを行った。

$$Y = A + B \cdot \exp(-C \cdot X)$$

(A は標準 Absorbance の最終値、B は標準 Absorbance の変化幅、C は  $k_{\text{fast}}$  又は  $k_{\text{slow}}$  を示す。)

### 【自動酸化】

ブラックセルにリン酸 buffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、100 mM NaCl、pH 7.4)に 7 μM 1mL となるようサンプルを調整した。そこに飽和溶液を 14 倍に薄めたジチオナイト溶液(100 μM)を 10 μL 加え、スペクトルを確認することで還元を確認した。その後、セル内の溶液にピペットイングを適度に行い 280 nm のジチオナイトの減少を確認することでジチオナイトを破壊した。その後、4 分ごとに吸収スペクトルを測定し、自動酸化が起きることを確認した。解析を行い、500 nm から 600 nm の中で変化が大きい 2 波長を設定した。その後、同様の手法

により自動酸化が起きる前に、kinetics モードに切り替え、設定した 2 波長で 0.2 min ごとに 300 min 測定した。

解析では、2 波長のスペクトルの変化幅と測定した時間でプロットしたグラフに対してフィッティングを行った。WT と三種の末端領域欠損変異体に関しては以下のフィッティング式でフィッティングを行った。

$$Y = A * \exp(-B * X) + C * \exp(-D * X)$$

(A は一成分目の変化幅、B は  $k_{auto1}$ 、C は二成分目の変化幅、D は  $k_{auto2}$  を示す。)

一方、2CS 体に関しては以下のフィッティング式でフィッティングを行った。

$$Y = A * \exp(-B * X)$$

(A は一成分目の変化幅、B は  $k_{auto}$  を示す。)

WT で得られた 2 つの値と 2CS の値を比較することでそれを SH 型と SS 型の値だと帰属した。

### 【共鳴ラマンスペクトル測定】

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(BU-420)を使用した。Cygb の終濃度が 100 μM となるようにリン酸 buffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、100 mM NaCl、pH 7.4)で希釈した。ラマン測定用回転セルに移し、セルを回転させながら Kr<sup>+</sup> Laser (励起波長 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。Ferrous-CO 型は、Cygb 溶液に先に CO を吹きつけてから、その溶液をラマン測定用回転セルに入れ、さらにそこにジチオナイトを加えヘムを還元してから測定した。ラマン散乱の励起には He-Cd Laser (励起波長 441.6 nm)を用い、レーザー出力が高いと CO が解離するため、レーザー出力を 20 mW として測定を行った。

Ferrous-CO 型の+DTT の時は、先にリン酸 buffer (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、100 mM NaCl、pH 7.4) 希釈溶液を作製し、CO を十分に吹き付けてから DTT を終濃度 100 mM になるように加え、そこに Cygb を終濃度 100 μM になるように加えた後、密封状態で冷所に 3 時間放置した。その後、その溶液をラマン測定用回転セルに入れ、測定の前にジチオナイトを加えてヘムを還元してから測定に用いた。

### 【タンパク質間相互作用】

タンパク質間相互作用に関しては、BiacoreT200 を用いて測定を行った。NTA チップを用いて、Ligand として His タグ付き P4H (abcam 社で購入, ab115719)を固定化し、Analyte として測定サンプルを流した。アナライトは 0, 0.1, 0.4, 0.7, 1, 2, 3, 6, 12.5, 25, 50 μM の濃度で測定を行った。測定前には、ランニングバッファー(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 50 μM EDTA,

0.05 % tween20), ニッケル溶液(500  $\mu$ M NiCl<sub>2</sub>, 0.05 % tween20), 再生バッファーとして EDTA 溶液(350 mM EDTA, 0.05 % tween20)と NaOH 溶液(50 mM NaOH, 0.05 % tween20)の調整を行った。測定条件として、Ligand の contact time は 180 s, flow 速度は 5  $\mu$ L / min, stabilization time は 240 s で行い、Analyte の contact time は 180 s, flow 速度は 5  $\mu$ L / min, stabilization time は 200 s で行った。First regeneration の contact time は 30 s, flow 速度は 30  $\mu$ L / min, stabilization time は 0 s で行い、Second regeneration の contact time も 30 s, flow 速度は 30  $\mu$ L / min, stabilization time は 0 s で行った。また、Conditioning の contact time は 60 s で 1 回行い、startup は 3 回行った。

得られたセンサーグラムに対して BiacoreT200 Analysis Software を用いて解析を行い、WT と三種の末端領域欠損変異体に関しては、”Heterogeneous Analytes”モデルでフィッティングを行い、2CS に関しては”1:1 binding”モデルでフィッティングを行った。SH 型と SS 型の割合に関しては SDS-PAGE の結果から ImageJ によって割り出した値を用いた。

### 【有意差検定】

有意差を検定する際に、多群間の検定に関して Dunnett 検定を行った。95 %信頼区間の外側に来る確率を p とするとき、その値が  $p < 0.05$  の場合、その 2つにおいて有意差があると判断した。

## 参考文献

1. Straub, A. C., Lohman, A. W., Billaud, M., Johnstone, S. R., Dwyer, S. T., Lee, M. Y., Bortz, P. S., Best, A. K., Columbus, L., Gaston, B., and Isakson, B. E. (2012) Endothelial cell expression of haemoglobin alpha regulates nitric oxide signalling. *Nature* **491**, 473-477
2. Flogel, U., Merx, M. W., Godecke, A., Decking, U. K., and Schrader, J. (2001) Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 735-740
3. Pesce, A., Bolognesi, M., Bocedi, A., Ascenzi, P., Dewilde, S., Moens, L., Hankeln, T., and Burmester, T. (2002) Neuroglobin and cytoglobin. Fresh blood for the vertebrate globin family. *EMBO reports* **3**, 1146-1151
4. Burmester, T., and Hankeln, T. (2014) Function and evolution of vertebrate globins. *Acta Physiol. (Oxf)* **211**, 501-514
5. Kawada, N., Kristensen, D. B., Asahina, K., Nakatani, K., Minamiyama, Y., Seki, S., and Yoshizato, K. (2001) Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 25318-25323
6. Burmester, T., Ebner, B., Weich, B., and Hankeln, T. (2002) Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 416-421
7. Nakatani, K., Okuyama, H., Shimahara, Y., Saeki, S., Kim, D. H., Nakajima, Y., Seki, S., Kawada, N., and Yoshizato, K. (2004) Cytoglobin/STAP, its unique localization in splanchnic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **84**, 91-101
8. Tejero, J., Kapralov, A. A., Baumgartner, M. P., Sparacino-Watkins, C. E., Anthonymutu, T. S., Vlasova, II, Camacho, C. J., Gladwin, M. T., Bayir, H., and Kagan, V. E. (2016) Peroxidase activation of cytoglobin by anionic phospholipids: Mechanisms and consequences. *Biochim. Biophys. Acta* **1861**, 391-401
9. Reeder, B. J., Svistunenko, D. A., and Wilson, M. T. (2011) Lipid binding to cytoglobin leads to a change in haem co-ordination: a role for cytoglobin in lipid signalling of oxidative stress. *Biochem. J.* **434**, 483-492
10. Yamashita, T., Hafsi, L., Masuda, E., Tsujino, H., and Uno, T. (2014) Ferric human neuroglobin scavenges superoxide to form oxy adduct. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **62**, 613-615
11. Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S., and Hankeln, T. (2000) A vertebrate globin

- expressed in the brain. *Nature* **407**, 520-523
- 12. Burmester, T., Haberkamp, M., Mitz, S., Roesner, A., Schmidt, M., Ebner, B., Gerlach, F., Fuchs, C., and Hankeln, T. (2004) Neuroglobin and cytoglobin: genes, proteins and evolution. *IUBMB Life* **56**, 703-707
  - 13. Makino, M., Sugimoto, H., Sawai, H., Kawada, N., Yoshizato, K., and Shiro, Y. (2006) High-resolution structure of human cytoglobin: identification of extra N- and C-termini and a new dimerization mode. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 671-677
  - 14. Tsujino, H., Yamashita, T., Nose, A., Kukino, K., Sawai, H., Shiro, Y., and Uno, T. (2014) Disulfide bonds regulate binding of exogenous ligand to human cytoglobin. *J. Inorg. Biochem.* **135**, 20-27
  - 15. Reeder, B. J., and Ukeri, J. (2017) Strong modulation of nitrite reductase activity of cytoglobin by disulfide bond oxidation: Implications for nitric oxide homeostasis. *Nitric oxide : biology and chemistry* **72**, 16-23
  - 16. Zhou, D., Hemann, C., Boslett, J., Luo, A., Zweier, J. L., and Liu, X. (2017) Oxygen binding and nitric oxide dioxygenase activity of cytoglobin are altered to different extents by cysteine modification. *FEBS open bio* **7**, 845-853
  - 17. Lechauve, C., Chauvierre, C., Dewilde, S., Moens, L., Green, B. N., Marden, M. C., Celier, C., and Kiger, L. (2010) Cytoglobin conformations and disulfide bond formation. *FEBS J.* **277**, 2696-2704
  - 18. Beckerson, P., Wilson, M. T., Svistunenko, D. A., and Reeder, B. J. (2015) Cytoglobin ligand binding regulated by changing haem-co-ordination in response to intramolecular disulfide bond formation and lipid interaction. *Biochem. J.* **465**, 127-137
  - 19. Astudillo, L., Bernad, S., Derrien, V., Sebban, P., and Miksovska, J. (2013) Reduction of the internal disulfide bond between Cys 38 and 83 switches the ligand migration pathway in cytoglobin. *Journal of inorganic biochemistry* **129**, 23-29
  - 20. de Sanctis, D., Dewilde, S., Pesce, A., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T., and Bolognesi, M. (2004) Crystal structure of cytoglobin: the fourth globin type discovered in man displays heme hexa-coordination. *Journal of molecular biology* **336**, 917-927
  - 21. Sugimoto, H., Makino, M., Sawai, H., Kawada, N., Yoshizato, K., and Shiro, Y. (2004) Structural basis of human cytoglobin for ligand binding. *J. Mol. Biol.* **339**, 873-885
  - 22. Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T. L., Roesner, A.,

- Schmidt, M., Weich, B., Wystub, S., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Bolognesi, M., De Sanctis, D., Marden, M. C., Kiger, L., Moens, L., Dewilde, S., Nevo, E., Avivi, A., Weber, R. E., Fago, A., and Burmester, T. (2005) Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 110-119
23. Trandafir, F., Hoogewijs, D., Altieri, F., Rivetti di Val Cervo, P., Ramser, K., Van Doorslaer, S., Vanfleteren, J. R., Moens, L., and Dewilde, S. (2007) Neuroglobin and cytoglobin as potential enzyme or substrate. *Gene* **398**, 103-113
24. Wen, J., Wu, Y., Wei, W., Li, Z., Wang, P., Zhu, S., and Dong, W. (2017) Protective effects of recombinant human cytoglobin against chronic alcohol-induced liver disease in vivo and in vitro. *Scientific reports* **7**, 41647
25. McDonald, F. E., Risk, J. M., and Hodges, N. J. (2012) Protection from intracellular oxidative stress by cytoglobin in normal and cancerous oesophageal cells. *PloS one* **7**, e30587
26. Arcon, J. P., Rosi, P., Petruk, A. A., Marti, M. A., and Estrin, D. A. (2015) Molecular mechanism of myoglobin autoxidation: insights from computer simulations. *J. Phys. Chem. B* **119**, 1802-1813
27. Smagghe, B. J., Sarath, G., Ross, E., Hilbert, J. L., and Hargrove, M. S. (2006) Slow ligand binding kinetics dominate ferrous hexacoordinate hemoglobin reactivities and reveal differences between plants and other species. *Biochemistry* **45**, 561-570
28. Schmidt, M., Gerlach, F., Avivi, A., Laufs, T., Wystub, S., Simpson, J. C., Nevo, E., Saaler-Reinhardt, S., Reuss, S., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) Cytoglobin is a respiratory protein in connective tissue and neurons, which is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* **279**, 8063-8069
29. Suzuki, T., Watanabe, Y. H., Nagasawa, M., Matsuoka, A., and Shikama, K. (2000) Dual nature of the distal histidine residue in the autoxidation reaction of myoglobin and hemoglobin comparison of the H64 mutants. *Eur J Biochem* **267**, 6166-6174
30. Fago, A., Hundahl, C., Dewilde, S., Gilany, K., Moens, L., and Weber, R. E. (2004) Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin. Molecular mechanisms and physiological significance. *J. Biol. Chem.* **279**, 44417-44426
31. Tejero, J., Sparacino-Watkins, C. E., Ragireddy, V., Frizzell, S., and Gladwin, M. T. (2015) Exploring the mechanisms of the reductase activity of neuroglobin by site-directed

- mutagenesis of the heme distal pocket. *Biochemistry* **54**, 722-733
32. Sawai, H., Kawada, N., Yoshizato, K., Nakajima, H., Aono, S., and Shiro, Y. (2003) Characterization of the heme environmental structure of cytoglobin, a fourth globin in humans. *Biochemistry* **42**, 5133-5142
33. Corti, P., Ieraci, M., and Tejero, J. (2016) Characterization of zebrafish neuroglobin and cytoglobins 1 and 2: Zebrafish cytoglobins provide insights into the transition from six-coordinate to five-coordinate globins. *Nitric oxide : biology and chemistry* **53**, 22-34
34. Amdahl, M. B., Sparacino-Watkins, C. E., Corti, P., Gladwin, M. T., and Tejero, J. (2017) Efficient Reduction of Vertebrate Cytoglobins by the Cytochrome b5/Cytochrome b5 Reductase/NADH System. *Biochemistry* **56**, 3993-4004
35. Li, X., Zou, S., Li, Z., Cai, G., Chen, B., Wang, P., and Dong, W. (2016) The identification of human aldo-keto reductase AKR7A2 as a novel cytoglobin-binding partner. *Cellular & molecular biology letters* **21**, 25
36. Beckerson, P., Reeder, B. J., and Wilson, M. T. (2015) Coupling of disulfide bond and distal histidine dissociation in human ferrous cytoglobin regulates ligand binding. *FEBS Lett* **589**, 507-512
37. Price, J. C., Barr, E. W., Tirupati, B., Bollinger, J. M., Jr., and Krebs, C. (2003) The first direct characterization of a high-valent iron intermediate in the reaction of an alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase: a high-spin FeIV complex in taurine/alpha-ketoglutarate dioxygenase (TauD) from Escherichia coli. *Biochemistry* **42**, 7497-7508
38. Timmins, A., Saint-Andre, M., and de Visser, S. P. (2017) Understanding How Prolyl-4-hydroxylase Structure Steers a Ferryl Oxidant toward Scission of a Strong C-H Bond. *Journal of the American Chemical Society* **139**, 9855-9866
39. Vasta, J. D., and Raines, R. T. (2016) Human Collagen Prolyl 4-Hydroxylase Is Activated by Ligands for Its Iron Center. *Biochemistry* **55**, 3224-3233

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、終始格別なるご指導ご鞭撻をいただきました大阪大学大学院薬学研究科分子反応解析学分野 宇野 公之 教授に深謝いたします。そして、ひとかたならぬご厚情いただきました毒性学分野 堤 康央 教授に深謝いたします。

また、本論文の副査を担当していただき、貴重なご意見をいただきました大阪大学薬学研究科生物有機化学分野 小比賀 聰 教授、高分子化学分野 大久保 忠恭 教授に深く感謝の意を表します。

さらに、本研究を進める上で、実験の指導や日常の議論を通じて有益なるご指導とご助言をいただきました武庫川女子大学薬学部衛生化学研究室 山下 沢 准教授、大阪大学大学院薬学研究科分子反応解析学分野 辻野 博文 特任助教に心より感謝の意を表します。

フラッシュフォトリシスの実験の実施に関して、御協力を頂きました大阪大学大学院工学研究科応用化学専攻物質機能化学講座構造有機化学領域林研究室 林 高史 教授、同研究室 大洞 光司 助教に感謝いたします。

そして、研究について教えていただいた分子反応解析学分野の先輩方、共に切磋琢磨してきた同期の皆、研究を手伝ってくれた後輩達に心より感謝いたします。

また、互いに鼓舞し合った大阪大学リーディングプログラム超域イノベーション博士課程プログラムの同期の皆様に感謝いたします。

最後に、研究の機会を与えてくれた家族に感謝いたします。

2018年3月

花井 舜平