

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860022

研究課題名(和文)創薬を指向したNgb/Cgbの反応機構と構造の相関

研究課題名(英文)For discovery of new drugs; elucidation of correlation between reaction mechanisms and structural features in Ngb/Cgb

研究代表者

辻野 博文 (tsujino, hirofumi)

大阪大学・薬学研究科・助教

研究者番号：10707144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：6配位型グロビタンパク質であるニューログロビン(Ngb)及びサイトグロビン(Cgb)は様々な障害からの細胞保護作用を有している。申請者は『新たな創薬ターゲットとなり得るNgb・Cgbの機能発現メカニズム』を明らかにすることを目的に種々アプローチを試みた。その結果、Cgbが $O_2\cdot^-$ 消去活性、ONOO⁻産生抑制活性を有していることを世界で初めて明らかにした。さらに、Ngbの第6配位子である遠位Hisの存在が $O_2\cdot^-$ 消去活性を減弱させていること、ある種の低分子の存在下では配位状態が変化して活性が上昇することを見出した。以上、Ngb及びCgbの機能発現メカニズムの一端を解明することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Newly discovered 6-coordinated globins, neuroglobin (Ngb) and cytoglobin (Cgb), have been reported to protect tissues from various damages. In this work, we aimed to clarify the reaction mechanisms of Ngb and Cgb which can be novel targets for newly produced drugs. First, we have studied on several reactive oxygen and nitrogen species for Ngb and Cgb, and Cgb showed inhibition on a production of peroxynitrite. Since there was no scavenging activity for peroxynitrite in Cgb directly, we identified that Cgb could have an inhibitory effect on a production of peroxynitrite. Second, we also investigated on a correlation of enzymatic activities and structural features in Ngb. Although Ngb WT showed less scavenging activity for superoxide than 5-coordination mutant, we found that binding of a certain lipid increased a scavenging activity for superoxide with a slight formation of 5-coordination. As a consequence, we elucidated some parts of functional mechanisms in Ngb and Cgb.

研究分野：物理系薬学

キーワード：ヘムタンパク質 分光学的測定 活性酸素種 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

2000年以降、ヒト由来の新規グロビンタンパク質が相次いで発見され、それぞれニューログロビン(Ngb)、サイトグロビン(Cgb)と命名された(Burmester, *et al.*, 2000; Trent, *et al.*, 2002)。Ngb及びCgbはヘモグロビン(Hb)やミオグロビン(Mb)と同様にグロビンフォールドという立体構造を持ち、酸素などのガス分子と結合可能であることが明らかとなった。また、マウスを用いた*in vivo*研究によって、NgbとCgbは共に虚血に应答して発現が上昇することや、虚血時の細胞障害からの保護作用を示すことが報告されている。二つのタンパク質で共通する機能が報告される一方で、Ngbのみの特徴としてアルツハイマー病との関連性が、Cgbのみの特徴として癌や線維症の抑制作用がそれぞれ報告されている。特に近年ではCgbを標的とする治療法開発を目指した研究が盛んに行われ、Cgbの強制的な発現による肝繊維症の抑制が確認されたことから(Cui, *et al.*, 2012)、Cgbが新たな創薬ターゲットになり得るとして非常に注目されている。しかしながら*in vivo*実験の発展に比べて、NgbやCgbが生体内でどのような分子をターゲットとし、どのように作用することで前述した現象を引き起こしているか、といった分子レベルでの研究がほとんどなされておらず、Ngb及びCgbが機能を発現する詳細な機構に関する知見はほぼ皆無である。

2. 研究の目的

上記の背景の下、申請者は『新たな創薬ターゲットとなり得るNgb及びCgbの機能発現メカニズム』を明らかとすることを目的とし、以下の2つの目標を掲げた。

反応メカニズム解明 Ngb及びCgbは活性酸素種との関連性が予想されているが、詳細は未だに不明であった。そのような中、申請者は種々の活性酸素種を用いた検討から、Cgbがペルオキシナイトレート(ONOO⁻)との反応性を有する可能性を見出した。そこで、ONOO⁻を中心に活性酸素・窒素種とNgb及びCgbとの詳細な反応メカニズムを明らかにすることで、これらタンパク質による細胞保護作用の一端を明らかにすることを二つ目の目標とした。

酵素活性と構造の相関関係 NgbやCgbをターゲットとした創薬を行う際、酵素反応に関与する残基の知見は非常に有用である。そこで、申請者はスーパーオキシド消去能、ONOO⁻産生促進能に重要な残基の探索を行うこととした。中でも、HbやMbなどの他のグロビンタンパク質で外来性配位子の最も近くに存在する遠位ヒスチジン(His)は、外来性配位子の結合に最も重要とされているが、対応する遠位HisはNgbやCgbでは直接ヘム鉄へ配

位していることからその重要性が伺われる。そこで申請者は、種々のヘム周辺残基変異体を用いて残基の変化による酵素活性、共鳴ラマンスペクトルによる遠位His環境の変化を調べることにより、酵素活性と構造の相関関係に関する知見を得ることを二つ目の目標とした。

3. 研究の方法

前項の研究目的で掲げた二つの目標に従い、研究を遂行した。以下にその研究方法について示す。

反応メカニズム解明 まず、大腸菌を用いて獲得したNgb及びCgbと活性酸素種(O₂^{•-})及び活性窒素種(ONOO⁻)との反応性について、それぞれの活性種と反応する色素を用いて測定した。当初申請者は活性酸素種(O₂^{•-})については消去能を、活性窒素種(ONOO⁻)については産生能を有すると予想していた。O₂^{•-}については予想通りであったが、興味深いことにONOO⁻についても産生抑制能を有するという結果が得られたため、物理パラメータであるIC₅₀を算出して評価した。また、反応途中のCgbやNgbの状態を吸収スペクトルによって同定することで、これらタンパク質において考えられる活性種との反応機構を提案した。さらに、ONOO⁻は生体内ではタンパク質のチロシン残基をニトロ化することで有害性を発揮することが知られていることから、実際にニトロ化を抑制するかをLC/MSを用いた測定系を新たに構築することで定量的に評価した。

酵素活性と構造の相関関係 構造との相関についてはNgbを主な標的として、ヘム周辺の各アミノ酸残基に対する変異体を数種作成し、ヘム鉄の酸化状態に応じた配位子に対する親和性について、紫外可視吸光度計を用いた滴定実験によりK_dとして算出した。また、NgbWTが有していたO₂^{•-}消去活性についても、変異体ごとに測定・評価を行った。さらに、共鳴ラマンスペクトルを測定することで変異による遠位Hisへの構造上の影響を評価した。一方で、遠位Hisについて直接的に影響を調べるために、遠位Hisを変異した変異体H64Vを作成し、周辺残基の変異体と同様の各種測定を行った結果、申請者の当初の予想に反し、WTと比べて親和性および活性の上昇が観察された。このことから申請者は、WTで通常観察される6配位型は不活性化型であり、活性化型へと切り替えるためのon/offスイッチがあると考え、その探索とスイッチ分子が存在している状態での各種活性測定を行った。

4. 研究成果

反応メカニズム解明 Ngb及びCgbの活性酸素種に対する酵素活性の詳細を明らかと

することで、反応メカニズムの解明を試みた。始めに、より研究が進んでいる Cgb を用いてチロシンをニトロ化する実験を試みたが、興味深いことに、ターゲットのニトロ化は観察されなかった。さらに、対象として用いた BSA と比べ、Cgb はターゲットのニトロ化を抑制し、ニトロ化から保護するという逆の役割を示した。そこで、Cgb によるニトロ化において重要となる ONOO⁻の産生量を測定し、詳細に検討することとした。発生源である O₂^{•-}と NO から ONOO⁻産生抑制実験を行ったところ、大変興味深いことに Ngb や Mb などの他のグロビンタンパク質では全く行われなかった ONOO⁻の産生抑制が、Cgb のみで顕著に見られることを明らかとした。一方で、Cgb が ONOO⁻を直接消去することは出来ないことも明らかし、これらの結果を踏まえ、活性酸素・窒素種に対する Cgb の反応メカニズムの一端を解明することができた。さらに、申請者が発見した Cgb の反応と実際に報告されている Cgb の細胞保護活性の関係を明らかとするために、LC-MS を用いて Cgb の Tyr ニトロ化抑制能に関する物理的パラメータの算出を試みた。その結果、Cgb が Tyr のニトロ化を低濃度で抑制しており、本反応性が細胞保護活性の一因であることが強く示唆された。さらに Cgb と類似の構造を有する Mb や Ngb では Cgb ほどの Tyr ニトロ化抑制能を見出せなかったことから、本反応性が Cgb 独自のものであることを明らかとした。

酵素活性と構造の相関関係 Ngb について、種々の変異体 (V101L、F106V、F106L、F106W、V109L、V141F、Y44F、N45F、K67T) を作成し、基質親和性および酵素活性と、共鳴ラマンスペクトルから観察される活性中心であるヘムにおける微細な構造変化との関連性を調査した。これまでに報告されていた基質親和性への影響のみでなく、酵素活性についても相関関係が見られており、多くのヘムポケット構成残基が同様の機序に則って、基質親和性と酵素活性に寄与していることが考えられた。また、V101L では特に大きな親和性と活性の上昇が見られたことから、V101 は疎水性残基であり、水素結合などは形成できないにも関わらず、重要な働きをしていることが示唆された。一方、遠位 His をバリンに変異させて 5 配位型にした場合では、Ngb の重要な活性の一つである O₂^{•-}消去活性が WT よりも高くなることを見出した。さらに、WT においてもある種の脂質を加えることで、少ないながらも 5 配位型 WT を作製することに成功し、さらにこの状態では O₂^{•-}消去活性が上昇することを初めて明らかにした。以上の結果から、Ngb は遠位 His によって自身の活性を制御しており、生体においても低分子によって on/off のスイッチを切り替えている可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

村上剛将, 辻野博文, 榊田恵理, 日高あかね, 山下沢, 宇野公之

Relationship between heme mobility and ligand binding in neuroglobin (ポスター賞受賞)

第24回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 京都, 2014年6月, P-14

柳坂亮太, 辻野博文, 花井舜平, 山下沢, 宇野公之

The effect of cytoglobin on peroxynitrite generation and tyrosine nitration

第24回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 京都, 2014年6月, P-15

花井舜平, 辻野博文, 柳坂亮太, 山下沢, 宇野公之

Roles of N- and C-Terminal Domains in the Ligand Binding Properties of Cytoglobin

第25回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 長崎, 2015年5月, P-08

山本隆裕, 村上剛将, 榊田恵理, 辻野博文, 宇野公之

Spectroscopic analyses of auto-oxidation reaction in neuroglobin.

第25回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 長崎, 2015年5月, P-09

山本隆裕, 榊田恵理, 辻野博文, 山下沢, 宇野公之

ニューログロビンの自動酸化に関する分光学的研究

第14回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム, 大阪, 2016年8月, B2-4

辻野博文, 花井舜平, 柳坂亮太, 山下沢, 宇野公之

生体保護タンパク質サイトグロビンと活性酸素種との反応機構に関する研究

第 66 回日本薬学会 近畿支部大会, 大阪, 2016 年 10 月, E-15-1

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻野 博文 (TSUJINO, Hirofumi)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：10707144

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()