

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350962

研究課題名(和文) 亜鉛フィンゲータンパク質の細胞内活性酸素種に対するセンサー分子としての機能解明

研究課題名(英文) Investigation of new zinc finger protein function as a redox sensor for reactive oxygen in the cells

研究代表者

根木 滋 (NEGI, SHIGERU)

同志社女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：50378866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト転写因子由来のSp1 ZFPを用い、各フィンガードメイン(Sp1-F1, F2およびF3)および3フィンゲータンパク質(Sp1-F123)の構造および酸化反応性や安定性、DNA結合能について検討を行った。過酸化水素を用いた酸化反応の結果、反応性がF1>>F2>F3となり、各フィンガーの酸化反応に対する非等価性が示された。また、酸化によりDNA結合能が失われることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to investigate the oxidation reactivity, stability of the folding structure, DNA-binding property using Sp1 zinc finger protein. As a result of an oxidation reaction with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reactivity became the following order, F1>>F2>F3, indicating that each three finger has a non-equivalence reactivity for the oxidation reaction. In DNA-binding assay using the gel shift method, oxidized Sp1 zinc finger protein lost the DNA-binding ability due to Zn(II) ion release following S-S bond formation.

研究分野：複合新領域 生物分子化学

キーワード：亜鉛フィンゲータンパク質 レドックス反応 レドックスセンサー DAN結合

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム解析が終了した現在、タンパク質に関する研究はポストゲノムの重要課題と考えられ、その位置づけは極めて重要なものとなってきている。タンパク質の精巧な構造と機能との関係の理解が生命現象の理解において極めて重要であることは言うまでもないが、近年、リン酸化をはじめ様々なタンパク質の翻訳後修飾に関しても益々関心が集まりつつある。そのような中で、今回我々は亜鉛フィンガータンパク質 (ZFP) をターゲットタンパク質とし、そのレドックス反応およびレドックスセンサー機能に注目した。ZFP の酸化反応に関する研究は 1998 年に Wilcox らにより Sp1 の F3 の酸化反応について初めて報告されているが、その詳細なメカニズムについては検討がなされていない。また最近、Sénèque らにより Cys<sub>4</sub>型フィンガードメインのモデルペプチドと過酸化水素および一重項酸素との反応について検討がなされており(2011 および 2015 年)、Cys 残基と ROS が多様な反応性を示すことを明らかにしている。これらの先行研究は主に化学的側面から酸化反応を捉えて研究しているが、本研究においては基本的な化学的分析に基づく反応機構の解析はもちろんのこと、それらが実際に生体内でどのような役割を果たしているのか、さらにレドックス反応に基づく翻訳後修飾とレドックスセンサー機能との関わりなどについて注目した。

## 2. 研究の目的

当研究室では、これまでに亜鉛フィンガータンパク質(ZFP)のレドックス挙動について検討を行ってきている。これまでに我々は、亜鉛フィンガーとしてヒト転写因子由来 Sp1 (Fig. 1)、酸化剤として SH 基選択的酸化剤であるジアミドを用いて、個々のフィンガー (Sp1-F1、F2 および F3)の酸化反応およびタンデム化した場合の酸化反応性を検討してきた (Fig. 1A)。その結果、その反応性が Sp1-F1>>F2>F3 の順となった。Sp1 の各ドメインでは、Zn(II)配位部位はすべて C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>型であるにも関わらず、それらの酸化反応性は等価でなく、F1 部分が選択的に酸化されやすいことが分かり、タンデム構造を有する亜鉛フィンガーの酸化反応において、フィンガードメイン間の非等価な酸化反応性を初めて示すことができた。この非等価性の原因について詳細に検討を行ったところ、金属配位結合の安定性およびドメイン構造全体の安定性が酸化反応の反応性に影響を与えていることが明らかとなった。そこで本研究では、酸化剤として生体内に存在する活性酸素種の 1 つである過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を用い、Sp1 ZFP

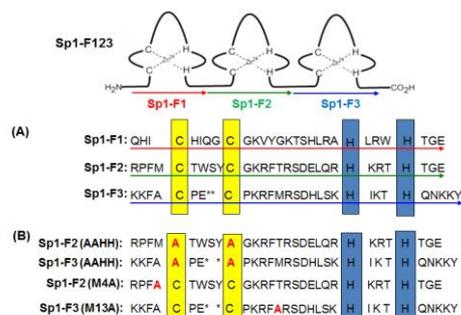


Figure 1. Sp1 zinc finger protein (Sp1-F123) with 3 zinc finger domains. Each domain has a typical Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>-type zinc finger motif as a DNA-binding domain. (A) Primary sequence of each Sp1 finger domain (Sp1-F1 (red), Sp1-F2 (green), and Sp1-F3 (blue)). (B) Primary sequence of mutant peptides of Sp1-F2 and F3 (Sp1-F2(AAHH), F3(AAHH), F2(M4A), and F3(M13A)). Mutated amino acid residue is highlighted by red color. Cys and His residues participating the Zn(II) coordination are yellow and blue boxed, respectively.

の酸化反応について検討を行った。Sp1 の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いた酸化反応については、これまでに Wilcox らにより Sp1-F3 を用いた研究が唯一報告されている。彼らは Sp1-F3 と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を反応させると、ジスルフィド型酸化体以外に thiol-sulfonate (S-S=O)型酸化体を生成すると報告している。そこで本研究では、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と Sp1 ZFP の各フィンガードメインとの酸化反応について検討を行った。詳細に酸素付加生成物について検討を行うために、Sp1 の各フィンガードメインおよび Sp1-F2 および F3 の Cys 残基を Ala 残基に置換した変異体、および Sp1-F2 および F3 にそれぞれ 1 つ含まれている Met 残基をそれぞれ Ala 残基に置換した変異体を作製し (Fig. 1B)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による酸化反応についてゲルシフトアッセイ法により検討を行った。

## 3. 研究の方法

各フィンガードメインは、Fmoc 固相合成法により島津 PSSM-8 ペプチド合成機にて合成した。HPLC で精製し凍結乾燥させたペプチドを用いて、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による各フィンガードメインの酸化反応性および酸化反応の反応速度の検討を TOF-MASS および HPLC を用いて行った。DNA 結合能についてゲルシフトアッセイ法により検討を行った。

## 4. 研究成果

### 1.各フィンガードメインにおける酸化還元反応

初めに Sp1 の各フィンガードメインである Sp1-F1、F2 および F3 と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との酸化実験を行い、HPLC により反応の追跡を行った。HPLC および MALDI-TOF MASS の結果を Fig. 2 および Table 1 に示す。その結果、Sp1-F1 ではジスルフィド酸化体のみが生成したが、Sp1-F2 および F3 ではジスルフィド体およびジスルフィド体に酸素が付加した酸化物が生成することが分かった (Fig. 2A, B および Table 1)。

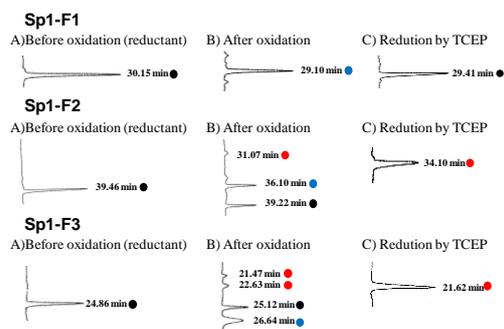


Figure 2. HPLC chromatograms monitoring of the oxidation reaction of Sp1-F1, F2 and F3. Oxidation reaction was conducted for 1 hours using 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The fully reduced, disulfide (S-S) and oxygen adduct forms are labelled as ●, ● and ●, respectively.

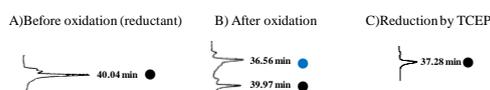
Table 1. Measured molecular weight of Sp1 zinc finger domains (Sp1-F1, F2, and F3) before and after the oxidation and re-reduction by TCEP by MALDI-TOF MS; reductant peptides, oxidation products after oxidation reaction, and reduction products after reduction of oxidation product by TCEP.

Peptide	Reductant	Disulfide(S-S)	Oxygen adduct	Reduction
Sp1-F1	3480.250	3478.270	—	3480.547
Sp1-F2	3712.980	3711.518	3727.251	3729.121
Sp1-F3	3685.069	3683.107	3699.075	3701.028

次に、それぞれ生成した酸化体を HPLC により単離し、TCEP を用いて再還元反応を行った。それらを HPLC により単離精製し、MALDI-TOF MASS 測定を行った (Fig. 2C および Table 1)。Sp1-F1 の再還元反応においては、HPLC で元の還元体と同じところにピークが認められ、MALDI-TOF MASS でも、還元体の分子量と一致したため、Sp1-F1 のジスルフィド酸化体は可逆的に SH 基を持つ還元体に戻ったと考えられる。一方、Sp1-F2 および F3 の場合、どちらも HPLC において還元体および酸化体とは異なった保持時間にピークを示し、それらの質量を MALDI-TOF MASS で確認したところ、還元体から 16 マスずつ、酸化体から 2 マスずつの分子量の生成物が確認された。この結果から、ジスルフィド結合が TCEP により還元され SH 基に戻ったが、酸素はまだ付加された状態をとっていると考えられる。次にこれらの再還元体のジスルフィド結合が SH 基に還元されていることを確認するために、フリーの SH 基を検出できるエルマン反応を行った。その結果、いずれの場合もフリーの SH 基が配列中に 2 つ存在していることが明らかとなった。上述したように、Wilcox らは Sp1-F3 と H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> との酸化においては、ジスルフィド体以外に thioisulfonate (S-S=O) 型酸化体を生成し、これが酸素付加体であると結論を出している。しかしながら、本実験のデータから判断すると thioisulfonate 型酸化体を生成していると考えすることは考えにくい。そこで我々は Sp1-F2 および F3 の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による酸化反応において、酸素付加はジスルフィド部分に起こるのではなく、配列中の他のアミノ酸に起こっているのではないかと考えた。一般的に、タンパク質の酸化的翻訳後修飾において Met 残基が最も酸化されやすく、細胞内の酸化ストレスが上昇すると容易にスルホキシ型構造に変換されて質量が 16 増加することが知られている。そこで、Sp1-F2 および F3 のドメ

イン内に存在する Met 残基を Ala 残基に置換した Sp1-F2 (M4A) および F3 (M13A) を作製し、上述と同条件で、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による酸化実験および TCEP による再還元反応を行い、HPLC および MALDI-TOF MASS を用いて反応生成物の解析を行った。それら結果を Fig. 3 および Table 2 に示す。その結果、いずれの場合も酸化生成物は HPLC では 1 つで、それらは還元体の理論値に比べて約 2 マス分子量が減少しており、ジスルフィド酸化体のみが生成したことが明らかとなった。次に、TCEP 還元反応を行い、それぞれそれぞれのサンプルに対し MALDI-TOF-MASS で分子量を測定したところ、分子量が +2 マス増加し、TCEP 反応後の生成物は還元体の分子量と一致していることから、TCEP によりジスルフィド酸化体

#### Sp1-F2 M4A



#### Sp1-F3 M13A

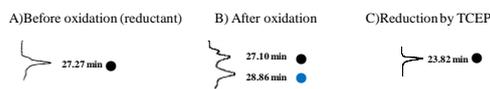


Figure 3. HPLC chromatograms monitoring of the oxidation reaction of Sp1 F2 M4A and F3 M13A. Oxidation reaction was conducted for 1 hour using 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The fully reduced and disulfide (S-S) are labelled as ● and ●, respectively.

Table 2. Measured molecular weight of mutated zinc finger domains (Sp1-F2(M4A), and F3(M13A)) by MALDI-TOF MS; reductant peptides, oxidation products after oxidation reaction, and reduction products after reduction of oxidation product by TCEP.

Peptide	Reductant	Oxidation product	Reduction product
Sp1-F2 M4A	3653.216	3651.256	3653.253
Sp1-F3 M13A	3625.339	3623.398	3625.076

から元の還元体に還元されたと考えられる。この結果から、Sp1-F2 および F3 のドメイン内に存在する Met 残基を Ala 残基に置換した Sp1-F2 (M4A) および F3 (M13A) では、ジスルフィド体酸化体のみが生成し、酸素付加体の生成は認められなかった。さらに、Sp1-F2 および F3 の 2 つのシステインをアラニンに置換させた Sp1-F2(AAHH) および F3(AAHH) を作製し、同様に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による酸化実験および TCEP による還元反応を行った。その結果を Fig. 4 および Table 3 に示す。その結果、いずれの場合においても、酸化反応後の生成物は還元体の理論値に比べて約 16 分子量が増加していることが分かり、1 つ酸素原子が付加した酸化物を生成することが明らかとなった。この結果から、配列中の Cys 残基以外のアミノ酸残基が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と反応することを示唆している。次に、HPLC にて分取された酸化生成物それぞれに対して TCEP 還元反応を行い、HPLC 分取および MALDI-TOF-MASS 測定を行った。その結果、還元反応後の HPLC 保持時間および分子量の値が反応前の酸素付加体と同じであり、酸素付加体は TCEP により還元されないことが分かった。この結果

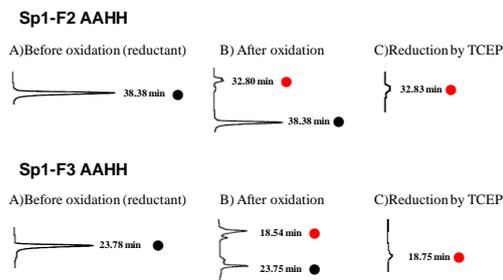


Figure 4. HPLC chromatograms monitoring of the oxidation reaction of Sp1-F2 AAHH and F3 AAHH. Oxidation reaction was conducted for 1 hours using 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The fully reduced and oxygen adduct forms are labelled as ● and ●, respectively.

から、システイン以外の他のアミノ酸が酸化されていることが示唆された。

以上の結果より、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を用いた酸化反応では、Sp1-F1 の場合はジスルフィド体のみが生成するが、Sp1-F2 および F3 では、Wilcox らにより報告されている S-S=O 型酸化体は生成せず、ジスルフィド部位およびフィンガー内の Met 残基が酸化されスルホキシ型 (S=O)酸化体が生成することが分かった。さらに、スルホキシ型 (S=O)酸化体は TCEP に

Table 3. Measured molecular weight of mutated zinc finger domains (Sp1-F2 (AAHH) and F3(AAHH) by MALDI-TOF MS; reductant peptides, oxidation products after oxidation reaction, and reduction products after reduction of oxidation product by TCEP.

Peptide	Reductant	Oxidation product	Reduction product
Sp1-F2 (AAHH)	3650.252	3665.136	3664.995
Sp1-F3 (AAHH)	3621.454	3637.513	3637.260

よって還元されないことがわかり、Sp1-F2 および F3 では不可逆的な酸化反応が進行することが明らかにになった。

## 2. 各フィンガードメインの酸化体・還元体の CD スペクトルによる二次構造解析

各フィンガードメインの酸化型の CD スペクトル結果を Fig. 5 に示す。いずれの場合で

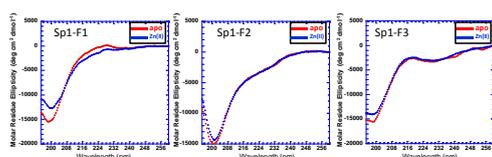


Figure 5. CD spectra of 20 mM oxidized Sp1-F1, F2 and F3 peptides in the absence and presence of 1.3 e.q. Zn(II) in 10 mM Tris-HCl buffer, 50 mM NaCl and 100 mM TCEP at 20 °C.

も酸化型のアポ体では 200 nm 付近に極小値を示すことから、ランダム構造をとっていると考えられる。次に 1.3 当量の Zn(II)を各酸化体に添加したところ、Sp1-F2 および F3 ではほとんど CD スペクトルに変化がなく、アポ体のスペクトルとほぼ一致した。一方、Sp1-F1 の酸化体においては弱いながらも明らかな CD スペクトルに変化が認められた。Sp1-F1 は他のフィンガードメインより多くの His 残基を含むため、His などの金属配位能を有するアミノ酸残基を通して Zn(II)と非特異的に相互作用でき、酸化型においても Zn(II)と強く相互作用を行ったと考えられる。還元型の場合のようなββα構造のようなはっきりとした二次構造誘起とは異なる CD スペクトルを与え

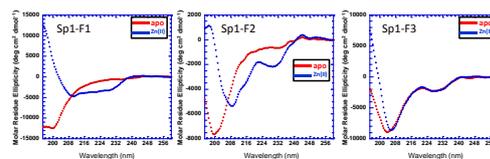


Figure 6. CD spectra of 20 mM reduced Sp1-F1, F2 and F3 peptides in the absence and presence of 1.3 e.q. Zn(II) in 10 mM Tris-HCl buffer, 50 mM NaCl and 100 mM TCEP at 20 °C.

た。

次に、Fig. 6 に各フィンガーの再還元のアポ体および Zn(II)添加の CD スペクトルを示す。アポ体では、いずれの CD スペクトルにおいても 200 nm 付近に極小値を示すことから、再還元体もランダム構造をとっていると考えられる。次に 1.3 当量の Zn(II)を添加したところ、Sp1-F1 および F2 おいては Zn(II)添加に伴い 208 nm および 222 nm 付近のピークが負に増加し、還元体と同様のスペクトル変化が認められたが、Sp1-F3 では顕著なスペクトル変化が見られなかった。Sp1-F1 では、MALDI-TOF MASS 測定から再還元により酸化体が元の還元体になっていることが分かっており、その結果、Sp1-F1 の再還元体の CD スペクトルは還元体の CD スペクトルとほぼ一致したと考えられる。一方、Sp1-F2 および F3 では、再還元によりジスルフィド部分は SH 基に還元されているが、Met 残基の酸素付加体部分は還元されないことが MALDI-TOF MASS 測定から明らかとなっている。この結果をもとに Sp1-F2 および F3 の再還元体の CD スペクトルを考えてみる。Sp1-F2 においては、Zn(II)添加に伴い ZFP に典型的なββα構造が誘起されているので、Met 残基に O 原子が付加した状態でも二次構造を形成できることが明らかとなった。一方、Sp1-F3 では、Zn(II)添加に伴うスペクトル変化が認められなかったことから、Met 残基の O 原子付加により二次構造誘起能が失われた可能性が考えられる。以上の結果から、Met 残基の酸化による O 原子付加の位置により、フィンガードメインの二次構造誘起のされ方が異なることが明らかとなった。

## 3.各フィンガードメインの H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による酸化反応の反応速度

次に各フィンガードメインを用いて 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の条件下で酸化反応の反応速度の検討を行った。その結果を Table 4 に示す。その

Table 4. Rate constant  $k$  for the initial step in the oxidation reaction (5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of Sp1 zinc finger peptides measured at 298 K and pH 7.5.

Peptide	$k_1$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_2$ [s <sup>-1</sup> ]
Sp1-F1	0.053506	—
Sp1-F2	0.01683	0.0037559
Sp1-F3	0.019655	0.0049581

結果、還元体からジスルフィドの生成速度( $k_1$ )を見てみると F1 は 0.053506、F2 は 0.010683、F3 は 0.019655 となった。F1 の場合、他のフィンガーと比べて酸化されやすく、F2 および F3 の場合では、反応速度はほぼ同じであ

ることが分かった。ジスルフィドから酸素付加体の生成速度( $k_2$ )を見てみると F2 は 0.0037559、F3 は 0.0049581 となった。結果から、F1 は F2 および F3 よりも約 5 倍の速さで酸化反応が起こり、タンデム構造を有する亜鉛フィンガーの酸化反応において、フィンガードメイン間の非等価な酸化反応性を確認することができ、F2 および F3 の酸素付加体の生成は逐次反動的に進行していることが明らかとなった。

### 3.Sp1-F123 酸化還元挙動および DNA 結合能

#### 評価

これまでの実験では個々のフィンガードメインに対して酸化実験を行ってきた。ここでは 3 つのフィンガーの連結体である Sp1-F123 に対して酸化実験を行った。はじめに、上述の各フィンガードメインの酸化実験で得られた結果を踏まえて、酸化剤である  $H_2O_2$  の濃度 5 mM の条件下、Sp1-F123 と酸化反応を行った。その結果を Fig. 7 および Table 5 に示す。HPLC 分析により、主要な 6 つの

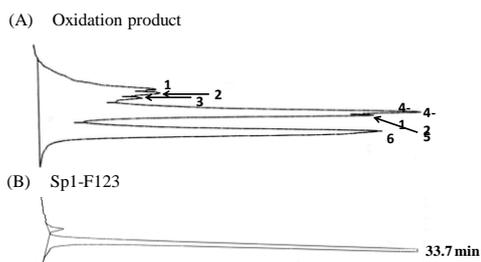


Figure 7. (A) HPLC chromatograms monitoring of the products obtained by oxidation reaction of Sp1-F123. Oxidation reaction was conducted for 1 hours using 5 mM  $H_2O_2$ . (B) HPLC chromatograms monitoring of Sp1-F123.

Table 5. Measured molecular weight of mutated zinc finger domains (Sp1) by MALDI-TOF MS; reductant peptides, oxidation products after oxidation reaction, and reduction products after reduction of oxidation product by TCEP.

Fraction number	RT (min)	Detected mass
1	28.792	11338/11353
2	29.292	11337/11353/11369
3	29.917	11352
4-1	31.608	11339/11354
4-2	31.608	11340
5	32.021	11339
6	34.042	n.d.

n.d.:not detectable

ピークが認められ、7 つの区分で分取した (Fig. 7A)。それぞれのピークを単離し、MALDI-TOF-MASS で分子量を測定した (Table 6)。ピーク 1、3、および 4-1 では還元体を基準に+10 マスの変化が認められた。この結果からこれらの酸化生成物は、3 つのフィンガードメインすべての SH 基が酸化されてジスルフィド結合が形成され、さらに配列中に含まれる 3 つの Met 残基のいずれか 1 つに酸素が付加した生成物であると考えられる。次に、ピーク 2 では還元体から+26 マスの変化が認められたことから、それは 3 つのジスルフィド結合および 2 つの Met 残基に

それぞれ酸素が付加した生成物であると考えられる。また、ピーク 4-2 およびピーク 5 では、還元体から-2 マス変化していることから、3 つのフィンガードメインの中の 1 つの SH 基部分が酸化されてジスルフィド体が生成していると考えられる。ピーク 6 に関しては、MALDI-TOF-MASS で分子量測定を行ったが、明確なピークは得られなかった。還元体を同条件で HPLC 分析を行うと、33.7 min にピークが観察され (Fig. 7B)、ピーク 6 の保持時間とは異なることから、ピーク 6 は還元体でないことは確認できたが、この生成物の同定をすることが出来なかった。

次に、酸素付加体の生成物であるピーク 1、2、および 3 の酸化体、およびそれらの TCEP による再還元した還元体に対してゲルシフトアッセイ法を行い、酸化還元反応の DNA 結合能に対する影響について検討を行った。その結果を Fig. 8 に示す。まず、いずれの酸

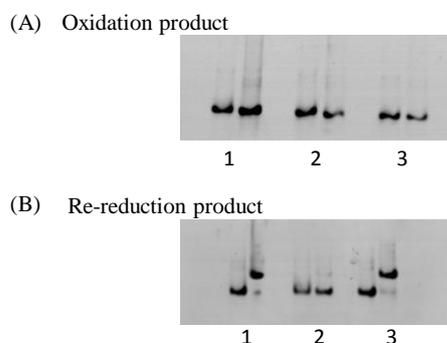


Figure 8. Electrophoretic mobility shift assay of oxidation and re-reduction products of Sp1-F123 incubated with a 5' FAM labeled DNA. Sp1-DNA complexes were resolved by electrophoresis on 8 % poly-acrylamide gels. The numbers are correspond to fractions from HPLC analysis in Fig. 7.

化体においても、ターゲット配列 DNA に対して結合しないことが明らかとなった (Fig. 8A)。これらの酸化体は全てのフィンガードメインの SH 基が酸化されてジスルフィド結合が形成され、結果として Zn(II) が配位できず二次構造形成ができないために DNA 結合能が失われたと考えられる。次に TCEP を用いた再還元体に対し、ゲルシフトアッセイ法を行った (Fig. 8B)。3 つ配列中にある Met 残基のいずれか 1 つに酸素が付加した生成物であると考えられるピーク 1 および 3 の再還元体においては、明確なシフトバンドが認められたことから、再還元による DNA 結合能が回復したことが明らかとなった。一方、2 つの Met 残基にそれぞれ酸素が付加した生成物であると考えられたピーク 2 の再還元体では、明確なシフトバンドが認められないことから、DNA 結合能は再還元により回復しないことが明らかとなった。いずれの酸化体においても TCEP による還元によりジスルフィド部位は全てフリーの SH 基に変換されることが MALDI-TOF MASS で分かっている。そのため、すべての再還元体において Zn(II) に対する配位結合能が回復し、再還元体の各フィン

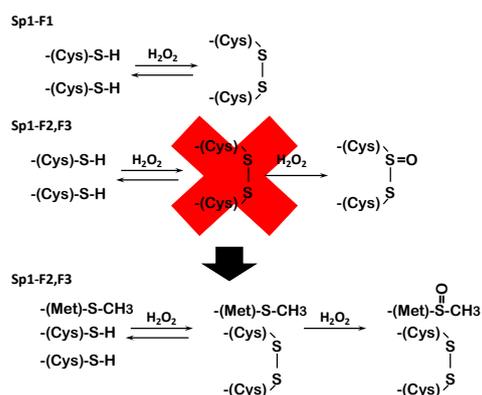
ガードメインの CD スペクトルの結果から判断しても、それらは二次構造を形成できたと考えられる。それにも関わらず、2つの酸素原子が付加した再還元体では DNA に結合することができないという新たな知見が得られた。

今回は Sp1 を用いて酸化剤 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた酸化実験を行った。その応機構を Scheme 1 に示す。F1 ではジスルフィド型酸化体のみ生成するが、F2 および F3 ではジスルフィド体が生成し、さらに Met 残基の S が酸化されスルホキシ型酸化体も生成することが明らかとなった。また、酸化反応後の生成物を TCEP による還元反応を行ったところ、F1 ではジスルフィド部分は還元されたが、F2 および F3 の場合、ジスルフィド部分は F1 同様に TCEP により還元され SH 基に戻ったが、Met 残基のスルホキシ部分は TCEP により還元されず、不可逆的な酸化反応が起こっていることが明らかとなった。

また、CD 測定より、酸化型の各フィンガードメインは、Cys の SH 基が S-S 結合を形成しているために Zn(II) と配位できず、適切な二次構造が形成できないことが分かった。また、再還元型の各フィンガードメインは、Met 残基の酸化による O 原子付加の位置により、フィンガードメインの二次構造誘起のされ方が異なることが明らかとなった。また、3 フィンガー体である Sp1-F123 の酸化還元挙動および DNA 結合への影響を検討した。酸化反応後は、1 および 2 つのジスルフィド結合を含む酸化体、さらにすべての SH 基が酸化されて 3 つのジスルフィド結合をもちかつ 1 あるいは 2 つの酸素を Met 残基の部分に有する酸化体が生成していることが明らかとなった。さらに、酸素付加体の酸化体に対してゲルシフトアッセイを行ったところ、すべての酸化体では DNA 結合能は失われており、TCEP 還元反応により得られた再還元体では 1 酸素付加体では DNA 結合能が回復したが、2 酸素付加体では DNA 結合能が回復しないことが明らかとなった。

今回の結果から、恐らく細胞に酸化的ストレスが生じると、Sp1 亜鉛フィンガータンパク質はまず F1 部分がいわゆる「レドックス応答フィンガー」として選択的に酸化反応を受けてジスルフィド型に変化するが、この酸化反応は可逆的であるので恐らく細胞内のグルタチオンなどの還元剤が作用することで可逆的に元の還元体の形に戻ることができ、DNA 結合機能も回復できると考えられる。もし、それ以上に酸化ストレスが加わると F2 さらに F3 が酸化されてジスルフィドを形成し、同時にドメイン内の Met 残基も酸化を受けてスルホキシ型 (S=O) 酸化体が生成してくると考えられる。この場合は、F2 および F3 のジスルフィド部分は F1 同様可逆的に還元されるが、スルホキシの部分は生体の還元酵素などの助けがない限り元の形には戻れないと考えられる。もしかすると、Met 残基

Scheme 1



部分の酸化はフィンガードメイン内のジスルフィド部分の更なる酸化を防いでいる可能性が考えられる。さらに、酸化による Met 残基への酸素の付加の数によって、不可逆的に DNA 結合能が失われる可能性も本研究結果から明らかとなった。今後はトリプシン消化によるマス測定を行うなどして酸素付加の位置の特定を行うと共に、NMR による構造解析を行う必要があると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. "Efficient cleavage of DNA oligonucleotides by a non-FokI-type zinc finger nuclease containing one His<sub>4</sub>-type finger domain derived from the first finger domain of Sp1"  
**S. Negi**, M. Yoshioka, H. Mima, M. Mastumoto, M. Suzuki, M. Yokoyama, K. Kano, Y. Sugiura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, Vol. 25, pp. 4074-4077, (2015).
2. "Intrinsic cell permeability of the GAGA zinc finger protein into HeLa cells"  
**S. Negi**, Y. Terada, M. Suzuyama, H. Matsumoto, A. Honbo, Y. Amagase, Y. Mizukawa, A. Kiriya, K. Iga, T. Urushidani, Y. Sugiura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, Vol. 464, pp. 1034-1039, (2015).

[学会発表] (計 7 件)

1. "Reversible control of DNA binding of GAL4 transcription factor by a cyclodextrin-porphyrin supramolecular complex" 34th European Symposium 2016 and International peptide Symposium, (Leipzig University, Germany Leipzig), 2016/09/08.

[その他]

[http://research-bd.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchersHtml/2718/2718\\_Researcher.html](http://research-bd.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchersHtml/2718/2718_Researcher.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

根木 滋 (NEGI SHIGERU)

同志社女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：50378866