

## 論文の内容の要旨

論文題目 Heme binding domain in soluble guanylyl cyclase  $\beta 1$  subunit and its use in the development of fluorescent indicator for nitric oxide

和訳 可溶性グアニル酸シクラーゼヘム結合領域の同定及び一酸化窒素蛍光指示薬への応用

指導教官 飯野正光教授

東京大学医学系研究科

平成10年4月入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 並木繁行

一酸化窒素 (NO) は生体内情報伝達物質として多様な生理現象の制御に関与している。循環系では、血管内皮細胞由来の NO が近傍の血管平滑筋細胞に作用し、弛緩させる事で血管トーンスの制御を行っている。また、中枢神経系では、シナプス間においてシナプス前膜からの刺激に応じてシナプス後膜で産生された NO が、逆行性の情報伝達物質としてシナプス前膜に作用し、長期増強 (LTP) に関与すると考えられている。その他、免疫系などでも多くの生理作用を担っていると提唱されているが、NO 自体の化学的な不安定性からその挙動を正確に把握するには至っていない。

現在までに知られている NO の生理的な受容体は、種々のチオール化合物と可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) である。細胞内のチオール基は、NO と反応する事でニトロソチオールを生成し、必要に応じて NO を供給する NO ストアとして働いていると考えられている。また、sGC は内包するヘムによって NO を選択的に認識し、酵素活性を生じ GTP から cGMP を産生する。従来から *in vitro* での NO の様々な検出・定量法が開発されてきているが、その特異性などには問題が多い。本論文では、可溶性グアニル酸シクラーゼ内のヘム結合領域を明らかにし、それを NO センサーとして用い得ることの可能性を示し、蛍光可視化プローブへの応用を目的とした。

### 1、sGC のヘム結合領域の同定

#### <背景>

sGC は、 $\alpha 1$  (82kDa) および  $\beta 1$  (70kDa) サブユニットからなるヘテロダイマーとしてク

ローニンクされている。sGC は、 $\beta 1$  サブユニットに内包されているヘムが NO と結合する事によって活性化され、GTP から cGMP を産生する。それゆえ、ヘム近傍の環境を明らかにすることは、その酵素活性の発現の機構を理解する上で必要不可欠である。 $\beta 1$  サブユニット内のヘムは、中心金属が Fe(II)であり、不活性化状態では 105 番目のヒスチジン (His105) を Fe(II)の軸配位子とする 5 配位型の錯体構造を取る。NO 付加に伴う活性化状態では、ヒスチジンの配位がはずれ、NO を Fe(II)の軸配位子とする 5 配位型の錯体構造を取ることが、分光学的な研究から明らかになっている。ただし、His105 はアポタンパク質へのヘムの結合には絶対必要不可欠なものではない。現在までの研究で、 $\beta 1$  サブユニットの 1-385 番目のアミノ酸残基が存在すれば、ネイティブな sGC と一致するスペクトル特性を示す事が明らかになっている。本論文では、sGC の欠失タンパク質をチオレドキシンの融合タンパク質として作製し、それぞれのヘム結合能及びヘムの状態を評価した。

C 末端の欠失タンパク質では、1-120 番目のアミノ酸部位 [ $\beta 1(1-120)$ ] がヘム結合能を示す最短のものであった。N 末端の欠失タンパク質では $\beta 1(100-385)$ 、 $\beta 1(120-385)$ および $\beta 1(160-385)$ はヘム結合を示さなかったものの、 $\beta 1(80-385)$ はヘム結合能を示した。したがって、 $\beta 1(1-120)$ と $\beta 1(80-385)$ に共通の部位である 80-120 アミノ酸部位は、ヘムを認識・結合する際の「essential domain」と言える。この領域にはヘム鉄の軸配位子である His105 も存在しており、ヘム結合に関与する領域は非常にコンパクトにまとまっている。essential domain の他にヘム結合に影響のある2つのドメイン、「auxiliary heme-binding domain」(341-385 アミノ酸部位)と「inhibitory domain」(196-341 アミノ酸部位)を見出した(図)。auxiliary heme-binding domain には、sGC 同様に Fe(II)の高スピン・5 配位型錯体のヘムを有する Axcyt c'のヘム近傍のアミノ酸残基と高いホモロジーを有する領域 (LVLLGEQF) を持っており、この領域がヘムポケットの一部としての構造を有している事を示唆している。また、essential domain を含んだ N 末端・C 末端を共に欠失させた変異体 $\beta 1(80-195)$ と $\beta 1(60-195)$ でも大きなヘム結合能を示した。

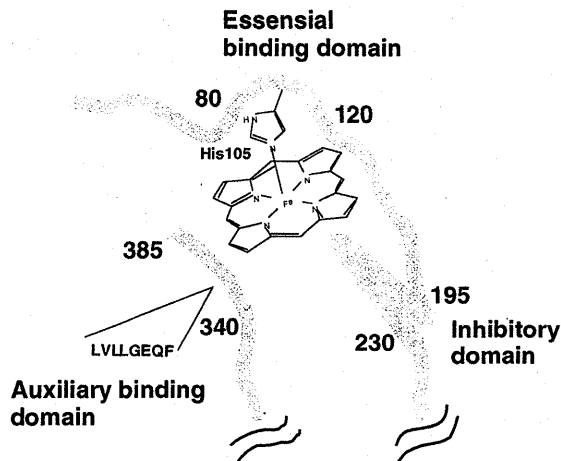


図 sGC のヘム結合に関与する残基のドメイン構造

続いて、このようにして得られた最小に近い sGC のヘム結合骨格が NO を選択的に結合できるか否かについて解析を行った。NO 存在下で生じる $\beta 1(80-195)$ と $\beta 1(60-195)$ のニトロシル錯体は、吸収スペクトル測定の結果、399nm に強い吸収 (Soret 吸収) を示し、485nm には肩吸収を示した。これらの吸収スペクトル特性はネイティブな sGC のニトロシル錯体と同様に、Fe(II)の高スピン・5 配位型錯体タイプのものであった。したがって、これら欠失変異体もニトロシル錯体形成の際のヘム近傍の環境は正常に保持されていた。以上の結果より、今後、 $\beta 1(80-195)$ と $\beta 1(60-195)$ はさらに三次構造変化の解析を行う際に有用なモデルを提供すると期待できる。

## 2、sGC を基本骨格とする NO 蛍光指示薬の開発

### <背景>

現在まで、生体内の NO の動態を研究するためのツールがいくつか開発されており、実用に堪えるものとしては、NO の酸化代謝物の動態を蛍光指示薬で観察する方法や sGC の活性化によって生じる cGMP の定量などが挙げられる。しかしながらいずれの方法も極めて短寿命な分子である NO の動態を直接測定しているとは言い難い。電極法は直接 NO を測定しているが、その使い易さという点で難がある。そこで、本研究では NO 動態の直接的な観察を可能とする蛍光指示薬の開発を目指した。

生体内での NO 分子を選択的に認識し、蛍光強度変化をそのシグナルとして捕らえるためには、以下のような条件が満たされなければならない。1) NO 分子を選択的に認識すること。2) センサー部位で検出した NO 濃度の変化を、効率良く蛍光強度変化に変換

## し出力する事。

それぞれの問題点を以下のようなストラテジーで解決する事を狙った。1) sGC の NO 認識に關与する骨格を用いる。前項で明らかにしたように、sGC の $\beta 1$  サブユニットの欠失変異体 $\beta 1(80-195)$ と $\beta 1(60-195)$ は酸素存在下でも選択的に NO を認識する事ができる。また、一般にヘムタンパク質と NO の反応は極めて速く、NO 動態の観測に有利である。2) センサー部位 (sGC 骨格) での NO 認識の結果生じる高次構造変化を、センサー部位の N 末端側と C 末端側に融合させた緑色蛍光タンパク質 (GFP) の変異体間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率の変化として観測する。以上のようなストラテジーに基づき種々の分子設計を行い、その性能評価を行った。

$\beta 1(80-195)$ 骨格を NO センサーとして含む、様々な長さの $\beta 1$  サブユニット欠失変異体の N 末端と C 末端に GFP のシアン色変異体 (CFP) と GFP をそれぞれ融合させた融合タンパク質を大腸菌を用いて発現させた。NO 濃度の変化に伴う、3種類の融合タンパク質内の2つの GFP 変異体間の FRET 効率の変化を評価した所、期待に反し、FRET 効率の変化以外の何らかの機序による GFP の蛍光強度変化が観察された。そこで、GFP のみを $\beta 1$  サブユニットの 1-260 アミノ酸領域の C 末端に融合させた構造のものを発現・精製し調べた所、NO 濃度依存的に GFP の蛍光変化が生じた。吸収スペクトル測定により、この変化は NO 濃度の上昇に伴う GFP の蛍光量子収率の増加に起因する事が明らかになった。これは、NO がセンサー部位 (ヘム) に結合した際のヘム近傍のアミノ酸残基の高次構造変化が、C 末端の GFP の発色団の環境に影響を及ぼしたことが原因となっていると考えられる。今後、センサー部分と蛍光タンパク質部分との間のリンカー部を調節する事などでより効率良く NO 濃度変化を GFP の蛍光変化として捕らえる事が可能になると予想される。

## 結語

本論文では、sGC のヘムの結合に關与する3つのドメインの同定を行った。この結果を基に NO の生体内での可視化を目指し、遺伝子でコードされたタンパク質ベースの NO 蛍光指示薬の開発を行った。NO の選択的センサー部として sGC のヘム結合領域が有用である事を示し、センサー部と蛍光タンパク質との融合タンパク質を用いる事で周辺の NO 濃度の変化を蛍光強度変化として捕らえる方法を確立した。この方法論は将来的に生体内での NO 動態の直接的可視化に応用可能である。