

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 並 木 繁 行

本研究では、生理的な一酸化窒素 (NO) の受容体である可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 内のヘム結合領域を sGC の欠失タンパク質とチオレドキシンとの融合タンパク質として作製し、それぞれのヘム結合能より同定した。また、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試み、下記の結果を得ている。

1. 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。
2. 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」(196-230 アミノ酸部位) を見出した。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。
3. 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。

4. $\beta 1(80-195)$ 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。
5. 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。

以上、本論文では、sGC のヘムの結合に関与する 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を可能にし、生体内での NO のダイナミクスの解明に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。