

4P060

分子構造の不安定化に伴う野生型 SOD1 の変性と酸化促進性の獲得
(東北大院・薬) ○高橋 旭、藤巻 暢宏、三浦 隆史、中林 孝和

Acquisition of pro-oxidant activity in wild-type SOD1 by the destabilization of the molecular structure

(Grad. Sch. Pharm. Sci., Tohoku Univ.) Asahi Takahashi, Nobuhiro Fujimaki, Takashi Miura, Takakazu Nakabayashi

【序】家族性筋萎縮性硬化症 (fALS) において、Cu,Zn- superoxide dismutase (SOD1) の変異体が ALS の発症に関わっている可能性が指摘されている。また、SOD1 変異体において、配位金属である Cu と Zn を除いた (apo 化した) SOD1 変異体が、37 °C の生理的条件下で不規則構造に富んだ変性体に構造変化すること、さらに Cu を再結合させると酸化促進性を獲得することを示している¹。これらの性質は複数の異なる変異体で確認されており^{2,3}、変異導入による分子構造の不安定化という共通点が、変性体への構造変化を引き起こしているという仮説が立てられる。そこで本研究では、37 °C では変性を示さない野生型 SOD1 の apo 体 (apo-WT) について、分子構造の安定性が下がる 45 °C で恒温放置して仮説を検証した。

【実験】20 μM, pH 7.4 に調製した apo-WT を 45 °C 条件下で 0~120 h 恒温放置した。各放置時間のサンプルについて円偏光二色性 (CD) スペクトルを利用した変性の確認および蛍光分子を利用した酸化促進性の測定を行なった。

また、ローズベンガル (RB) を用いた光増感酸化によって His 残基の酸化促進性への関与を確認後、His 残基のバンドを選択的に検出できる 229 nm 励起紫外共鳴ラマンスペクトルを測定し、His 残基と Cu との結合について調べた。

【結果】45 °C で恒温放置した apo-WT の CD スペクトルを測定したところ、不規則構造に由来する 200 nm 付近の負の強度が放置時間の増加に伴って大きく増加し、24 h で一定値に達した (Fig. 1)。また、この 24 h 放置後のサンプルについて、Cu を添加して酸化促進性を測定したところ、放置前に比べて酸化促進性が増大していた。これらの結果より、apo-WT は 45 °C で 24 h 恒温放置することで不規則構造に富んだ変性体に構造変化し、Cu を再結合することで酸化促進性を獲得することがわかった。

RB を増感剤として用いた光増感酸化は、His 残基に特異的な化学修飾の手段として利用されている。変

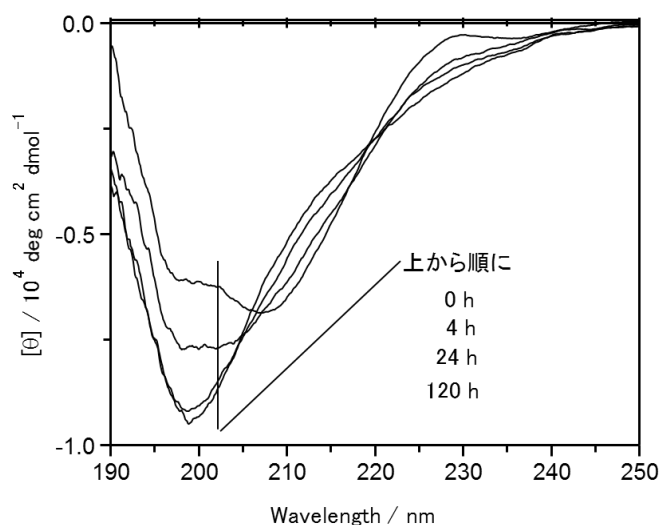


Fig.1 45 °C で各時間恒温放置後の apo-WT の CD スペクトル

性した apo-WT の His 残基を化学修飾して酸化促進性を測定したところ、修飾反応の進行に伴って酸化促進性が低下した。このことから、His 残基が酸化促進性獲得に関与していることがわかった。その結果を受けて、His 残基の情報が得られる 229 nm 紫外共鳴ラマンスペクトルを測定した (Fig. 2)。変性 apo-WT に Cu を添加することで、新たに Cu が結合した His に由来するバンドが観察された。酸化促進性の活性中心となる Cu 結合部位を His 残基が構成していることがわかった。

【考察】 45 °C で 24 h 恒温放置することで得た変性 apo-WT の CD スペクトルは、過去に我々が測定した変性 apo-SOD1 変異体の CD スペクトルと同様の特徴を示していた²。この結果は、45 °C における apo-WT の変性と apo-SOD1 変異体の変性は、同様の構造変化であるといえる。

変性した apo-WT の紫外共鳴ラマンスペクトルにおいて、Cu が結合した His 残基に由来するバンドのパターンについても、我々が測定した変性 apo-SOD1 変異体のものと類似していた^{2,3}。この結果は、変性により再構成される Cu 結合部位の構造についても、apo-WT と apo-SOD1 変異体間において一致していると考えられる。

以上より、分子の構造安定性を低下させることで、apo-WT も apo-SOD1 変異体と同一の変性体に構造変化することがわかった。この結果は冒頭で設定した仮説を否定するものであり、apo-SOD1 は変異導入がなくとも熱により不安定化を受けることで、酸化促進性獲得を伴う構造変化をするということを示している。生理的条件では 45 °C にはならないが、塩濃度の変化といった 45 °C と同等の分子不安定化を受けることで、WT も変性体に構造変化し、酸化促進性を獲得することが考えられる。

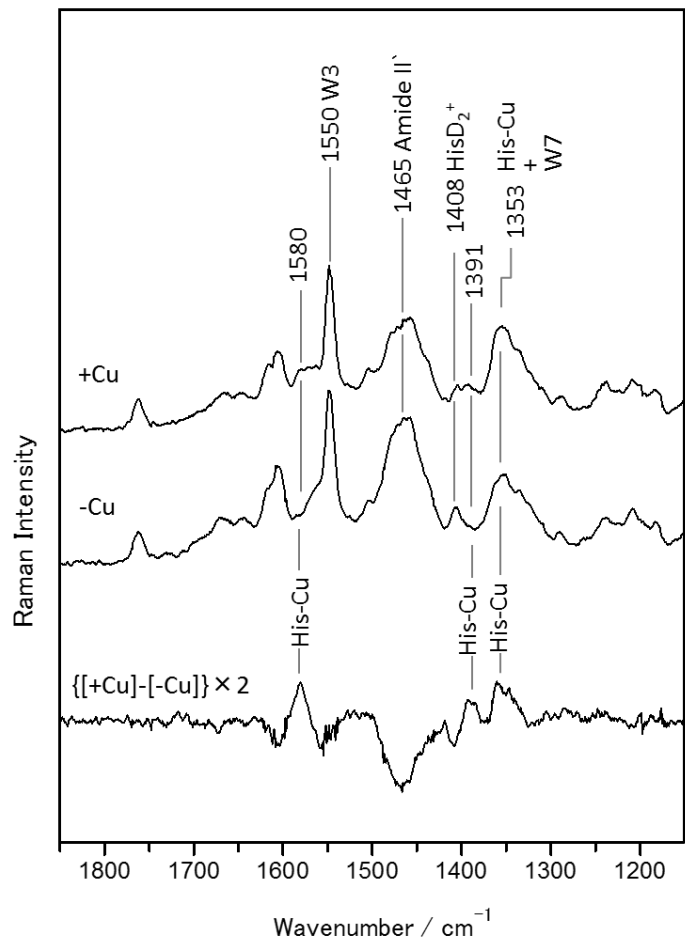


Fig.2 変性 apo-WT の紫外共鳴ラマンスペクトル および Cu 添加の有無から得た差スペクトル

1. Kitamura, F., et al., *Biochemistry*, **50**, 4242-4250 (2011)
2. 西屋健他 第 52 回日本生物物理学会年会 1P047 (2014)
3. 藤巻暢宏他 第 9 回分子科学討論会 4C01 (2015)