

4P061

NO の光解離を用いた糖結合タンパク質の 細胞凝集制御の試み

(東北大院薬) ○佐藤一平・平松弘嗣・中林孝和

The attempt to control the ability of cell agglutination by the NO
photodissociation in the carbohydrate-binding protein
(Tohoku Univ.) I. Satoh, H. Hiramatsu, T. Nakabayashi

【序】 我々はタンパク質構造の光制御を行い、タンパク質および細胞の機能を制御することを目指している。本研究では、光解離過程の基本的な系である SNO 基からの NO の光解離を用いて、タンパク質内にある分子内ジスルフィド結合(S-S 結合)の光による制御・細胞凝集の光制御を目指す。S-S 結合はタンパク質の構造や機能に重要な役割を果たしており、S-S 結合形成の光制御は、多くのタンパク質に適用できると考えられる。光制御の過程を Fig. 1 に示す。タンパク質内にあるシステイン(Cys)側鎖のチオール基(S-H 基)を NO 基に置換させ、S-NO 結合を形成する。次に、NO が吸収する光を照射し、NO を光解離させる。生成した C-S ラジカルはすみやかに S-S 結合を形成し、光によって S-S 結合の生成を行うことができる^{1,2}。

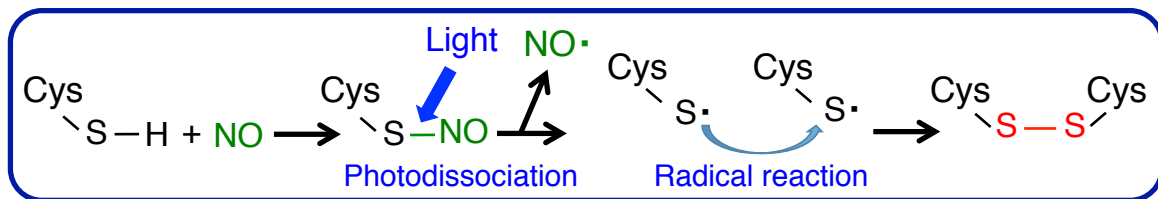


Fig. 1. NO の光解離を用いた S-S 結合の生成機構

本研究では NO 基を修飾するタンパク質として、糖結合タンパク質であるヒトガレクチン 1(Wt-hGal-1)を用いる。Wt-hGal-1 は分子内に 6 つの Cys 側鎖を持ち、Cys 側鎖が還元状態の S-H 基のときには、Fig. 2 のように二量体を形成し、細胞を凝集させることができる。しかし酸化状態となり、Cys 側鎖が分子内 S-S 結合を形成すると、Wt-hGal-1 は単量体となり、細胞の凝集機能を失う³。この Wt-hGal-1 を用いて以下の実験を行うことを目指す。(i) Wt-hGal-1 の S-H 基を NO 基に置換し、S-NO 基を形成させる(以下、NO 基で置換されたガレクチン 1 を、SNO-hGal-1 と呼ぶ)。(ii) NO 基のみが吸収する約 350 nm の光を照射し、NO の光解離が生じることを確認する。(iii) SNO-hGal-1 を用いて赤血球などの細胞試料を凝集させる。(iv) 約 350 nm の光を照射し、凝集した細胞を光によって単量体へと変化させる。本研究によって、NO の光解離を用いたタンパク質および細胞の機能制御の基礎的知見を得ることができる。

【結果】 Wt-hGal-1 は、大腸菌を用いて発現させ、複数のカラムを用いて精製した⁴。得られた Wt-hGal-1 の細胞凝集能を調べた結果を Fig. 3 に示す。2-メルカプトエタノール(2-ME)によって S-H 基に還元された Wt-hGal-1 について、希釈されたウサギ保存血液に加え、約 1 時間の培養を行った。加える前は単量体(Fig. 3 上)であった赤血球が、大

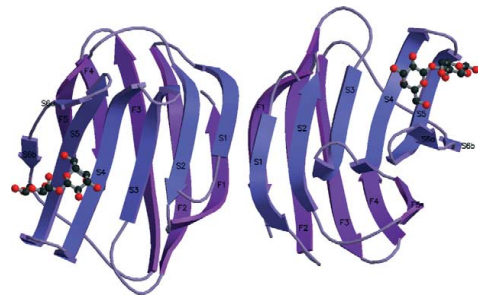


Fig. 2. ヒトガレクチン 1 の二量体構造

きな凝集構造(Fig. 3 下)を示した. 調整した Wt-hGal-1 は細胞凝集能があることがわかる. 還元状態の二量体 Wt-hGal-1 は, 細胞膜上にある β -ガラクトシドと結合することによって, 細胞凝集させることができる.

S-H 基の置換反応による S-NO 基の生成は, NO 置換されたアミノ酸システイン(Cys-NO)と Wt-hGal-1 の混合による置換反応を用いた⁵. しかし, Wt-hGal-1 が分子内 S-S 結合を形成すると, NO の置換を行うことができない. そこで反応前に, Wt-hGal-1 に還元剤を加え, Wt-hGal-1 の Cys 残基を S-H 基に還元した. Fig. 4 に調製した SNO-hGal-1 の吸収スペクトルを示す. ガレクチン内のトリプトファンに由来する約 280 nm の吸収の他に, NO に由来する約 335 nm の吸収も観測されており, SNO-hGal-1 が生成していることがわかる. また反応前に用いる還元剤(2-ME とトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP))を比べると, ガレクチンの吸収に対する NO の吸収が TCEP の使用時において大きくなっている. TCEP の還元力は強く, Wt-hGal-1 内の Cys の多くを S-H 基に還元したことが原因であると考えられる. タンパク質の Cys 濃度に対する NO の濃度は, β -ME は 37%, TCEP の場合は 102%と計算された. TCEP によってほぼすべての Cys が S-H 基に還元され, NO 置換されたと考えられる.

Fig. 5 に S-NO hGal-1 に対して紫外光を照射した結果を示す. 紫外光の照射によって, NO に由来する約 335 nm の吸収強度が減少することがわかる. この結果は, SNO-hGal-1 から NO が光解離していることを示している. さらに, エルマン試薬を用いて S-H 基の検出を行ったが, SNO-hGal-1 は紫外光の照射, 非照射にかかわらず S-H 基は検出されなかった.

S-NO hGal-1 についても赤血球の凝集能を確認した. 現在, 光照射による赤血球の単量体への解離を検討している.

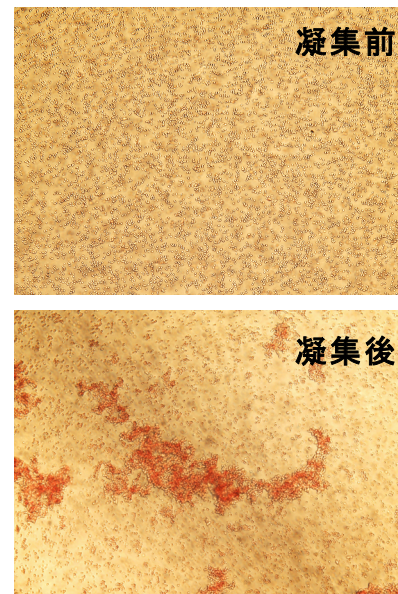


Fig. 3. 赤血球の凝集構造. 赤血球含む水溶液(上図)に Wt-hGal-1 を加えると, 赤血球が凝集するようになる(下図).

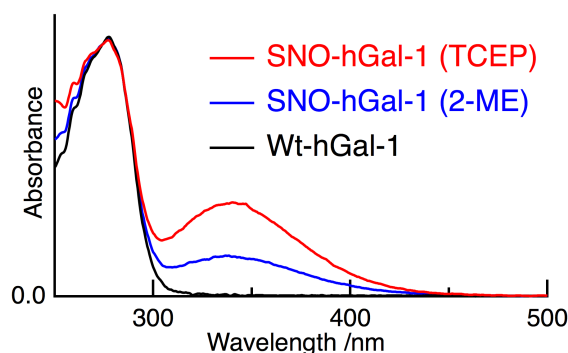


Fig. 4. Wt-hGal-1(黒)と SNO-hGal-1(赤, 青)の吸収スペクトル. 縦軸は規格化している.

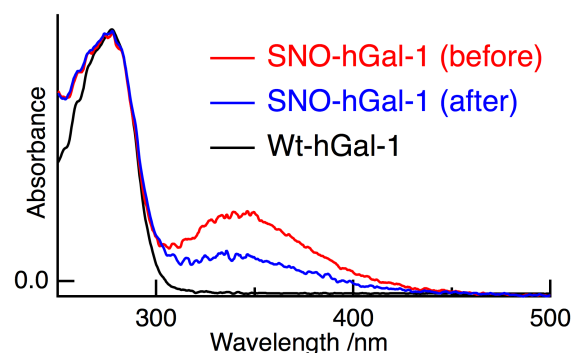


Fig. 5. 紫外光非照射時(青)と照射時(赤) SNO-hGal-1の吸収スペクトル. Wt-hGal-1 の吸収スペクトル(黒)も併せて示す.

1. P. D. Wood, et al. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 518. 2. R. J. Singh, et al. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18596. 3. Y. Inagaki, et al. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 2955. 4. H. Hiramatsu, et al., *Biochemistry* **2013**, *52*, 2371. 5. D. Giustarini, et al. *Antioxid. Redox Signal.* **2005**, *7*, 930.