

ヘムタンパク質の新規触媒活性の発見と機能解析

2017年 12月

永久保 利紀

ヘムタンパク質の新規触媒活性の発見と機能解析

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士（農学）学位論文

永久保 利紀

目次

<u>序論</u>	4
<u>第 1 章 ブタ肝臓の 7,8-DHF 変換活性の発見と酵素精製</u>	
----- 材料と方法	8
----- 結果と考察	11
<u>第 2 章 7,8-DHF 由来代謝産物の構造決定および Hb の活性部位の推定</u>	
----- 材料と方法	23
----- 結果と考察	25
<u>第 3 章 ヘモグロビンの酵素学的諸性質の解析</u>	
----- 材料と方法	39
----- 結果と考察	41
<u>総括</u>	50
<u>参考文献・業績</u>	51
<u>謝辞</u>	56

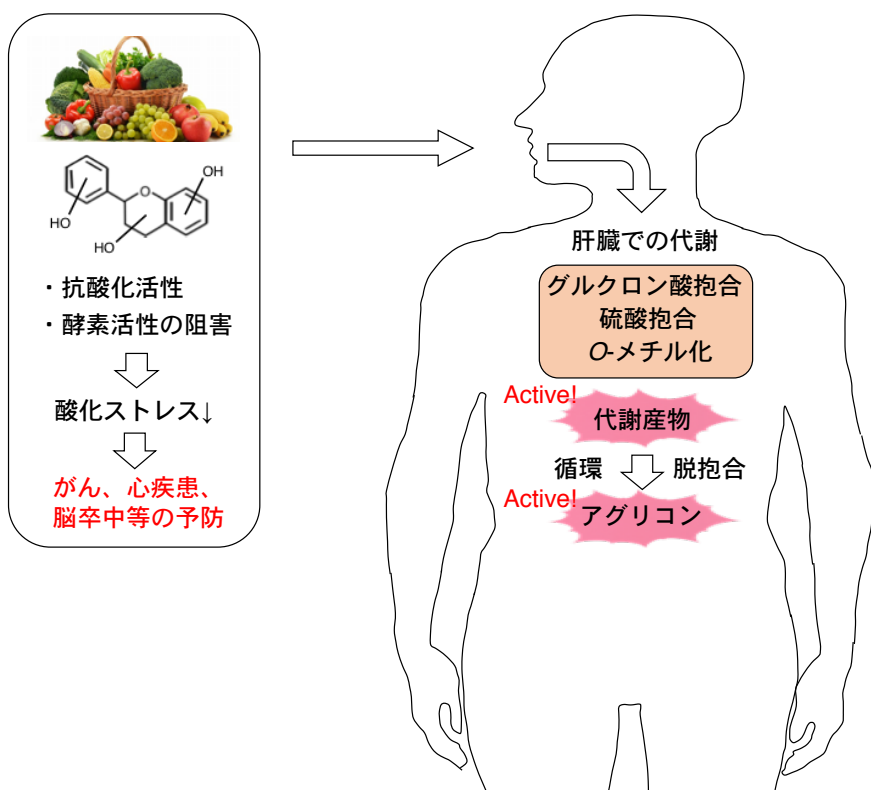
序 論

長きにわたって、天然由来化合物は薬剤開発における重要なリソースとみなされ、抗生物質をはじめとする種々の天然由来生理活性物質が発見されてきた(1)。一方、フラボノイド等の天然由来生理活性物質を含む植物をベースとした食生活が、世界的な健康問題となっているがん、心疾患、脳卒中等の慢性疾患の予防につながることも、経験的に知られている。フラボノイドは、紫外線等の照射によって生じる酸化ストレスを防ぐ為に植物が生産する抗酸化物質であり、これまでに、数千種類ものフラボノイドが植物より発見されてきた(2)。

一方、フラボノイドはヒトに対して有用な生理活性を示すことも知られている。数多くの疫学的研究により、野菜や果物に含まれるフラボノイドが、ヒトの慢性疾患の予防に効果的であることが示されてきた(3)。そのメカニズムとして、「フラボノイドによる生体内の酸化ストレスの低減」が提唱されている。生体内では活性酸素種(ROS)が絶えず生じているが、フラボノイドはその抗酸化活性によりROSを除去する(4)。それだけでなく、ROSと同様に酸化ストレスの原因となるラジカル類を生じる酸化酵素の活性を阻害する作用もある(4)。生体内の酸化ストレスは慢性疾患の引き金となるが、上記のフラボノイドの「抗酸化活性」および「特定の酵素に対する阻害活性」の2つの機能が生体内の酸化ストレスを低減するため、フラボノイドの摂取が結果的に慢性疾患の予防につながると考えられている。

ヒトが摂取したフラボノイドは、以下の経路にしたがって代謝されると考えられている。①小腸や肝臓で、UDP-glucuronosyltransferase、sulfotransferase、catechol-O-methyltransferase等の酵素によって、グルクロン酸抱合、硫酸抱合、O-メチル化を受ける(5)。また、②腸内細菌によってフェニルカルボン酸類へと分解される(6)。小腸で吸収されたフラボノイドは、肝臓へと運ばれる間に上記の抱合体に変換され、それらは循環系へと入る(6)。そして、それらの抱合体はたどり着いた組織で脱抱合反応を受け、元の構造のフラボノイドすなわちアグリコンとなる。一般に、このアグリコンが細胞に対して種々の生理活性を与えていると考えられている(8)。しかしながら、抱合体そのものが抗酸化作用や種々の酵素に対する阻害作用を示し、生理活性を発揮する例も報告されている。例えば、ケルセチンとそのグルクロン酸抱合体は、低密度リポタンパク質の酸化反応を触媒するmyeloperoxidaseを阻害する(9)。また、O-メチル化されたフラボノイドが、炎症の過程で活性酸素種の生成に関わるNADPH oxidaseを阻害することが知られている(10)。そして、フラボノ

イドのグルクロン酸および硫酸抱合体が内皮機能不全に対して保護作用を示すことも報告されている (11)。これらのユニークな生理活性は、摂取したフラボノイドの生理活性の一部である。したがって、新規なフラボノイド代謝産物および代謝酵素の同定は、フラボノイドのヒトに対する生理活性を理解する上で、必要不可欠であるといえる (フラボノイド代謝経路とフラボノイドの生理活性に関する概念の模式図を、以下に示した)。



以上の背景のもと、著者は新規フラボノイド代謝産物と、それをつくる未知の代謝酵素を発見し、ヒトのフラボノイド代謝経路に関する知見を拡張することを目的として、研究を開始した。その過程で、予想外の結果ながら、著者はヘモグロビンが **CoA** あるいは **pantetheine**、**glutathione**、**cysteine** などの生体チオールを基質としてフラボノイドに付加する酵素としての機能を持つことを発見した。本博士論文では、上記のヘモグロビンのフラボノイド変換活性について解析を行った結果を報告する。本研究の成果は、**hemoglobin** の新たな機能の提唱につながる可能性がある。

第 1 章 ブタ肝臓の 7,8-dihydroxyflavone
変換活性の発見と酵素精製

材料と方法

ブタ肝臓の 7,8-DHF 変換活性の検出

畜産草地研究所（つくば市）にて、ブタ肝臓を採取し、ただちに 4°C で冷蔵したリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄した後、液体窒素で急速冷凍した。その後、ドライアイスで冷却を続けながら移送し、-80°C で冷凍保存した。ブタ肝臓を氷上で解凍した後、50 g あたり 1 mL プロテアーゼ阻害剤カクテル（ナカライテスク）を加えた PBS 中で、POLYTRON ホモジナイザーを用いて破碎した。さらに、この破碎液を INSONATOR 201M（KUBOTA）を用いて超音波破碎した。以上の操作は、すべて氷水で冷却しながら行った。上記の破碎液を himac CR21G（日立工機）を用いて遠心分離（15,000 rpm、60 min）し、沈殿を取り除き、上清を無細胞抽出液（CFE）とした。

5 mg/mL CFE、50 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、1 mM 7,8-DHF を含む反応液（200 μ L）を調製し、7 hr インキュベートした。補酵素を添加して反応を試みた際は、上記の反応液に終濃度 2 mM となる様各補酵素を加えた。インキュベート後、等量のアセトニトリルを加えて反応を停止し、高速液体クロマトグラフィー/質量分析器（LC/MS）を用いて分析した。使用機器は Nexera X2 system（島津製作所）であり、カラムは Cosmosil π NAP 4.6 \times 150 mm（ナカライテスク）を用いた。移動相は 0.05% ギ酸とアセトニトリルを用い、流速 1.0 mL/min で、0min から 10.5 min にかけてアセトニトリル濃度を 0% から 100% まで直線的に上昇させた。質量分析は、エレクトロスプレーイオン化法（ESI）で行った。さらに、高分解能質量分析器（HRMS）を用いて、組成式の推定を行った。

酵素活性の測定

全ての酵素反応は、酵素濃度および反応時間が活性と直線的に比例する条件で行った。標準反応液は、100 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、1 mM 7,8-DHF (in DMSO)、2 mM CoA、適当な量の酵素を含む 200 μ L の溶液である。以降の基質特異性に実験に関してのみ、溶解度に応じてフラボノイドの濃度を 1 mM から 0.2 mM まで変化させた。標準反応液のインキュベートは 37°C で行い、200 μ L のアセトニトリルを加えることで反応を停止した。酵素活性は、LC/MS における m/z 529.2 [M-H]⁻ のマ

スクロマトグラムから反応産物のピーク面積を算出し、精製した反応産物を用いて作成した検量線に上記の値を代入することで算出した。また、1 unit を 1 min あたり 1 μ mol の反応産物を生成する活性として定義した。特に断りがない限り、酵素活性は 3 回の独立試行の平均値を記載している。

7,8-DHF 変換酵素の精製

全ての精製過程は、0°C から 4°C の条件下で行った。ブタ肝臓から調製した CFE を硫酸アンモニウム分画 (40%-60%) し、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で透析処理した。透析後のタンパク質溶液を、上記のバッファーで置換した Resource Q 6 mL (GE Healthcare) にアプライした。次に、バッファー中の NaCl 濃度を 0 M から 1 M まで直線的に上昇させることで、タンパク質を溶出した。7,8-DHF 変換活性を示したフラクションを 1 mM リン酸カリウム緩衝液で透析処理し、上記のバッファーで置換した CHT Type I 5 mL (Bio-Rad) にアプライした。次に、バッファーの濃度を 1 mM から 500 mM まで直線的に上昇させることで、タンパク質を溶出した。7,8-DHF 変換活性を示したフラクションを 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で透析処理し、上記のバッファーで置換した Resource Q 6 mL にアプライした。次に、バッファー中の NaCl の濃度を 0 M から 1 M まで直線的に上昇させることで、タンパク質を溶出した。7,8-DHF 変換活性を示したフラクションを、10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4) で透析処理した。精製したタンパク質の純度は、ポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS-PAGE) で確認した。タンパク質サブユニットの分子量は、マーカータンパク質 phosphorylase b (97 kDa)、bovine serum albumin (66 kDa)、ovalbumin (45 kDa)、carbonic anhydrase (30 kDa)、soybean trypsin inhibitor (20.1 kDa)、alpha-lactalbumin (14.4 kDa) に対する相対的な移動度をもとに推定した。タンパク質濃度は、Bradford 法で行った (12)。

ブタ血液由来 hemoglobin (Hb) の精製

ブタ血液から下記の手順で Hb を精製した。ブタ血液は「ブタ肝臓の 7,8-DHF 変換活性の検出」において用いたブタから採取し、heparin を添加して冷蔵保存した。遠心分離 (1,000 g \times 10 min) によりブタ血液から赤血球を回収し、3 倍量の水を加えて溶血させた。溶血後、細胞片を遠心により除去し、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で

透析処理した。このタンパク質溶液を、上記のバッファーで置換した HiprepDEAE FF 16/10 (GE Healthcare) にアプライした。バッファー中の NaCl 濃度を 0 M から 1 M まで直線的に上昇させることで、タンパク質を溶出させた。Hb の純度は、SDS-PAGE で確認した。精製した Hb は、10 mM Hepes-NaOH (pH 7.4) で透析処理した。

ヘムの抽出と質量分析

下記の 2-butanone 法 (13) により、Hb からヘムを抽出した。100 μ L の 2 mg/mL Hb あるいは精製酵素溶液に 0.1 M HCl を加えて pH 2.5 に調整し、氷冷した 2-butanone を加えた。2-Butanone 層を分離し、エバポレーターを用いて 2-butanone を除去した後、50 μ L の MeOH で残存物を溶解した。この溶液を、LC/MS で分析した。カラムは TSK-gel ODS-100V 4.6 \times 150 mm (東ソー) を使用し、移動相として 0.05%ギ酸とアセトニトリルを用いた。流速は 1 mL/min であり、0 min から 10 min にかけてアセトニトリルの濃度を 30%から 80%まで直線的に上昇させた。

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS)

MALDI-TOF/MS には Ultraflextreme-ETA MALDI-TOF/TOF (Bruker) を使用した。1 μ L の 3 mg/mL Hb 溶液をサンプルプレートにスポットして乾燥させた。次に、1 μ L のマトリックス溶液 (sinapic acid の 0.1% trifluoroacetic acid/acetonitrile 飽和溶液) をその上にスポットし、乾燥させた。乾燥後、MALDI-TOF/MS 装置にプレートを挿入して分析した。

結果と考察

本研究を進めるにあたり、著者は、代謝酵素を含む臓器を破碎して無細胞抽出液を調製し、それらとフラボノイドを反応させて新規フラボノイド代謝産物の検出を試みる、という方針をとった。

酵素源とする臓器は、ブタから採取した。ブタは、その臓器、食性、代謝酵素がヒトとよく似ており、ブタから見出した代謝酵素がヒトにも同様に存在する可能性が高いと考えた。また、ブタはすでに全ゲノム配列が決定されており、遺伝子の同定が容易であるという利点もある。ブタは、サルなどに比べて、飼育が容易で臓器を入手しやすい実験動物でもある。

一方、基質とするフラボノイドとしては、7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF) を選択した。7,8-DHF は、様々な野菜や果物に含まれているフラボノイドの一種であり、神経保護作用、記憶力の向上、うつ症状の改善、血圧降下作用などのユニークな生理活性が注目を集めている (14-17)。しかしながら、その代謝経路に関する報告は皆無である。したがって、7,8-DHF の代謝経路を調べることで、新規フラボノイド代謝産物および代謝酵素を発見できる可能性があると考えた。

動物において、食物から摂取したフラボノイドは小腸から吸収される間に上皮細胞で抱合反応を受ける。その抱合体とアグリコンは、消化管に排出されたり、特定のトランスポーターを介して門脈へ流れ込んだりする。一方、小腸から吸収されたフラボノイドの一部は肝臓へ運ばれ、代謝を受ける。そこで生成された代謝産物は血流に乗るものもあれば、胆汁と混ざり腸管循環により再び小腸へと戻る (18)。

新規のフラボノイド代謝産物を探索するために、著者はブタ肝臓由来 CFE と 7,8-DHF との反応を試み、反応産物の検出を試みた。しかしながら、7,8-DHF に由来する反応産物は検出できなかった。その原因として、CFE 中に存在する 7,8-DHF 変換酵素が反応にある補酵素を要求する酵素であり、かつ CFE 中のその補酵素の濃度が低いために、7,8-DHF 変換酵素の活性が微弱となり反応産物を検出できないものと推測した。そこで、補酵素 AMP、ADP、ATP、NADH、NADPH、NAD⁺、NADP⁺、FAD、FMN、inositol、thiamine、pantothenic acid、vitamin B6、CoA (Fig. 1) をそ

れぞれ反応液に加えた条件で再度反応を試みた。その結果、CoA を加えた際に、7,8-DHF に由来すると思われる反応産物の検出に成功した (Fig. 2)。HRMS を用いた分析の結果、反応産物のイオンの m/z 値は 529.1631[M-H] であり、この値から反応産物の組成式を $C_{26}H_{29}N_2O_8S$ と推定した。この組成式から、反応産物は CoA の部分構造である pantetheine と 7,8-DHF が結合した構造を有する化合物であると推測した。この結果は、CoA が補酵素ではなく基質として分解され、さらに、その分解産物である pantetheine を 7,8-DHF と結合する反応が起こったことを示唆した。

上記の反応を触媒する 7,8-DHF 変換酵素を、SDS-PAGE のゲル上で単一になるまで精製した (Fig. 3、Table 1)。この酵素は、およそ 15 kDa および 16 kDa の 2 つのサブユニットからなるタンパク質だった。精製酵素、7,8-DHF、CoA を含む反応液をインキュベートして LC/MS で分析したところ、 m/z 529.1631[M-H] を示す上記の化合物と同一の m/z 値およびリテンションタイムを示す反応産物の生成を確認できた (Fig. 4)。

7,8-DHF 変換酵素を同定するため、上記の精製酵素の N 末端部分アミノ酸配列を決定した。そして、小サブユニット (VLSAADKANVKAAWGIVGGQ) と大サブユニット (VHLSAEEKEAVLGLWGKVVV) の N 末端アミノ酸配列を BLAST 検索したところ、両者はそれぞれ 95% および 100% の割合で、ブタ由来 Hb の α サブユニットと β サブユニットの N 末端アミノ酸配列と一致した。この結果は、ブタ肝臓から精製した 7,8-DHF 変換酵素が Hb であることを強く示唆するものであった。

ブタ肝臓から精製した 7,8-DHF 変換酵素が Hb であることを確認する実験を行った。まず、ブタ血液より Hb を精製したところ、SDS-PAGE 上で精製酵素とほぼ同じ位置に大小 2 種類のサブユニットを確認できた (Fig. 5、Table 2)。次に、MALDI-TOF/MS を用いて精製酵素と Hb の質量を分析したところ、それぞれの小サブユニットの質量 (15065.991 と 15065.619) および大サブユニットの質量 (16064.434 と 16064.710) はほぼ一致した。これは、精製酵素と Hb が同じアミノ酸配列のポリペプチド鎖を有することを示す結果である。さらに、精製酵素および Hb から抽出したヘムを LC/MS で分析したところ、その m/z 値はいずれも 616.2 であり、この値は過去に報告されている protoporphyrin IX と Fe イオンからなるヘムのものと一致した (19)。以上の結果から、精製酵素は血液由来 Hb と同じアミノ酸配列からなるポリペプチド鎖とヘムを有する Hb であると結論づけた。一般的に Hb は酸素運搬タンパク質であると認識されており、Hb がフラボノイド変換酵素として機能するという

報告は皆無である。

CoA、7,8-DHF、血液由来 Hb を含む反応液をインキュベートしたところ、肝臓由来 Hb と同様の 7,8-DHF 変換活性を示した (Table 3)。また、ヒト血液由来 Hb (Sigma-aldrich) も上記の 7,8-DHF 変換活性を有していた。

Table 1 ブタ肝臓由来 7,8-DHF 変換酵素の精製

Step	Total protein (mg)	Total activity (units $\times 10^3$)	Specific activity (units/mg $\times 10^3$)	Yield (%)
Cell-free extract	6100	714	0.112	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	238	112	0.485	16.0
Resource Q	61.7	11.1	0.187	1.62
CHT Type I	5.31	4.79	0.885	0.655
Resource Q	1.85	1.63	0.884	0.230

Table 2 ブタ血液由来 Hb の精製

Step	Total protein (mg)	Total activity ($\mu\text{mol}/\text{min} \times 10^3$)	Specific activity (units/mg $\times 10^3$)	Yield (%)
Hemolysate	1142	140	0.122	100
HiPrep DEAE FF 16/10	121	21.9	0.178	15.5

Table 3 種々の Hb の 7,8-DHF 変換活性

Source of Hb	Relative activity (%)
Porcine liver	100±1
Porcine blood	48.9±3.5
Human blood	25.1±0.6

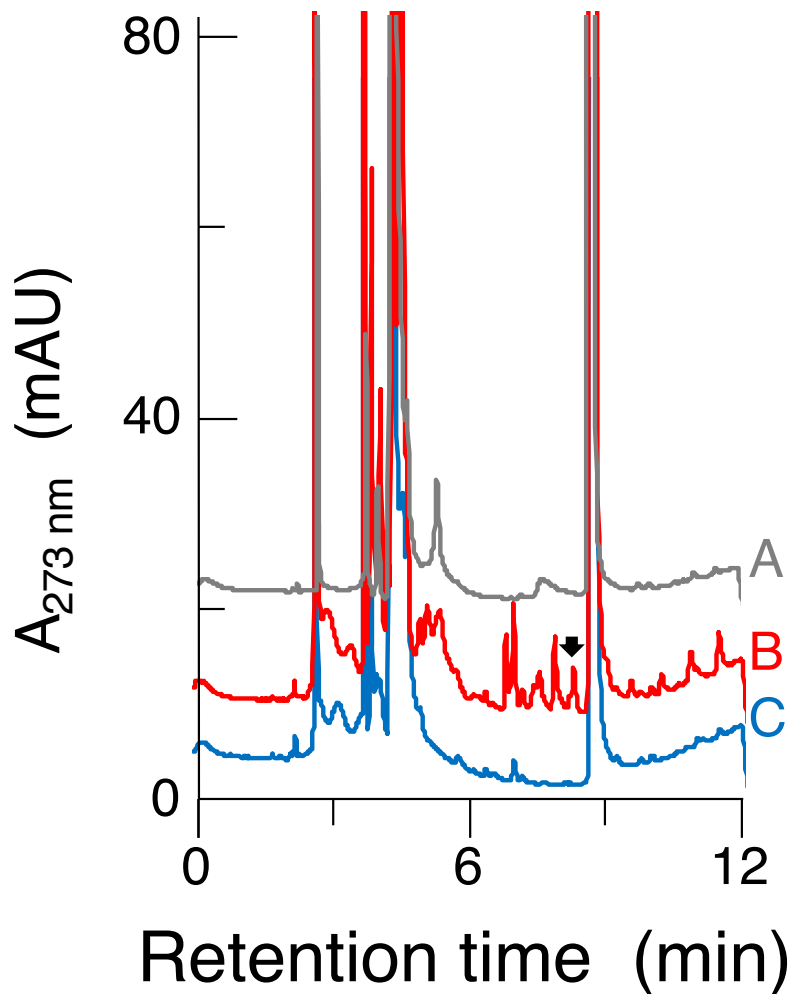


Figure 2. ブタ肝臓の 7,8-DHF 変換活性

ブタ肝臓由来 CFE と 7,8-DHF を CoA の存在下でインキュベートした後、7,8-DHF に由来する反応産物を検出した。7,8-DHF と CoA のみをインキュベートしたサンプル (A)、7,8-DHF、CFE、CoA をインキュベートしたサンプル (B)、7,8-DHF、CFE、CoA を含むがインキュベートしていないサンプル (C) を LC/MS で分析した結果を示している。全てのインキュベートは 37°C で 7 h 行った。黒矢印は、質量分析により m/z 値 529.2 [M-H]⁻ を示した反応産物のピークを表している。

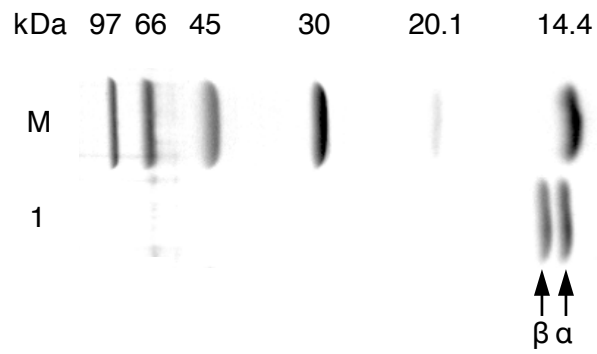


Figure 3. Hb の精製

精製した Hb の純度を SDS-PAGE で確認した。レーン M はマーカートンパク質、1 は精製した Hb をそれぞれ示している。 α サブユニット、 β サブユニットは、それぞれ黒矢印と α 、 β で示している。

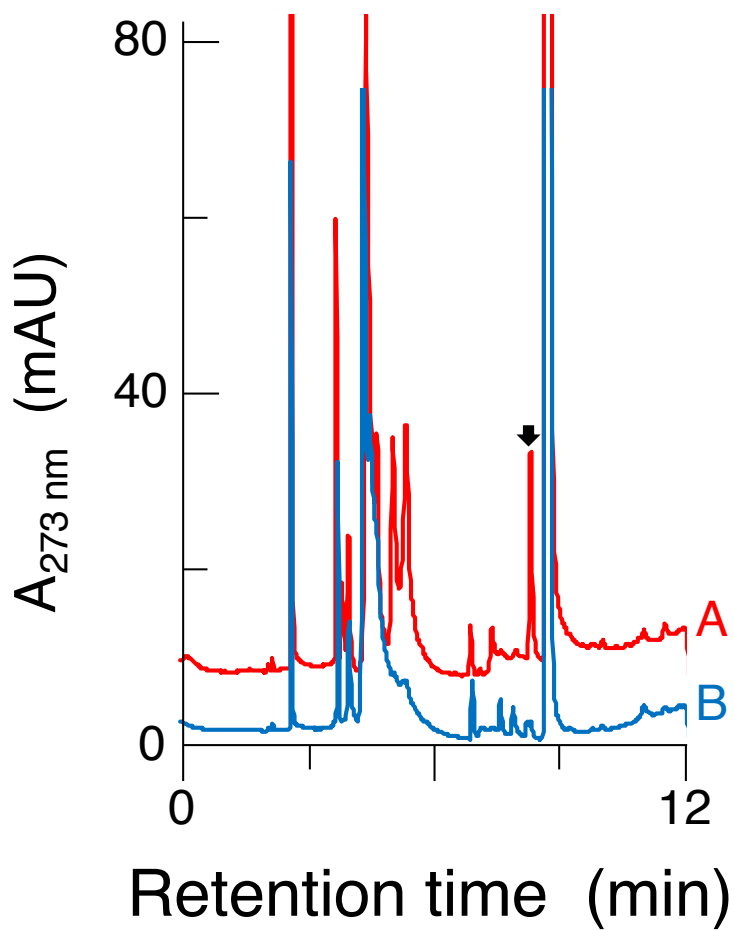


Figure 4. ブタ肝臓由来 Hb の 7,8-DHF 変換活性

ブタ肝臓由来 Hb と 7,8-DHF を CoA の存在下でインキュベートした後、7,8-DHF に由来する反応産物を検出した。7,8-DHF、CFE、CoA、Hb を含む反応液をインキュベートしたサンプル (A)、7,8-DHF、CFE、CoA、Hb を含むがインキュベートしていないサンプル (B) を LC/MS で分析した結果を示している。全てのインキュベーションは 37°C で 7 h 行った。黒矢印は、質量分析により m/z 値 529.2 [M-H]⁻ を示した反応産物のピークを表している。

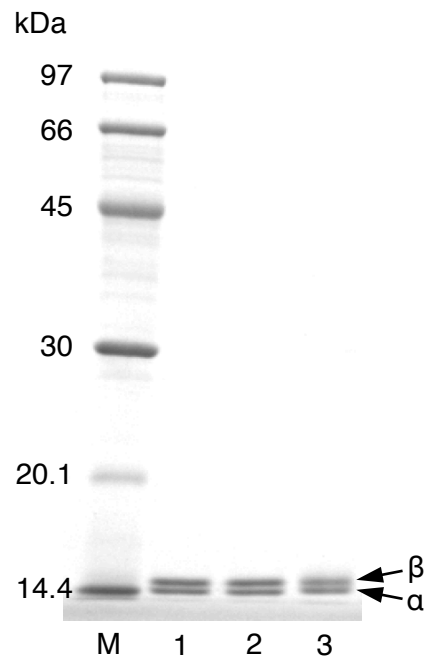


Figure 5. ブタ肝臓、ブタ血液、ヒト血液由来 Hb の SDS-PAGE

レーン 1 はブタ肝臓由来 Hb、レーン 2 はブタ血液由来 Hb、レーン 3 はヒト血液由来 Hb を示している。 α サブユニット、 β サブユニットは、それぞれ黒矢印と α 、 β で示している。

第 2 章 7,8-DHF 由来反応産物の構造決定 および Hb の活性部位の推定

材料と方法

Pantetheine の調製

Pantetheine は、2 分子の pantetheine が S-S 結合を介して結合した pantethine を用いて、下記の手順で調製した。まず、Sigma 社より購入した pantethine を MilliQ 水に終濃度 100 mM となる様に溶解し、この溶液に dithiothreitol (DTT) を終濃度 400 mM となる様に加えた。これを室温で 1 h 静置した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製した。精製した pantetheine の濃度は、5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) を用いた下記の手法で定量した。MilliQ 水に溶解した DTNB (10 mM) と pantetheine 溶液を 1:9 の比率で混合し、常温で 1 hr 静置した (この際、チオールと DTNB は速やかに反応し、黄色色素が生成する)。その後、412 nm における反応溶液の吸光度を測定し、この波長における黄色色素のモル吸光定数 ($\epsilon = 1.55 \times 10^4$) から pantetheine の濃度を算出した。

ヘムの酸化還元状態が Hb の活性に与える影響の測定

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (dithionite) と potassium ferricyanide ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) を用いて Hb のヘムの酸化還元状態 (Fe^{2+} および Fe^{3+}) を変化させ、potassium cyanide (KCN) や carbon monoxide (CO) などの O_2 に代わるリガンドをヘムに結合させることで、7,8-DHF 変換活性にヘムが関与するか否かを確認した。酸化状態のヘム (Fe^{3+}) は、以下の手順で調製した。 $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を終濃度 2 mM となる様に Hb 溶液に加えた後、限外濾過によるバッファー交換で $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を除いた。この Hb 溶液に、終濃度 10 mM となる様に KCN を加え、ヘムに CN を結合させた。還元状態のヘム (Fe^{2+}) は、以下の手順で調製した。まず、嫌気バイアルに Hb 溶液を入れ、液相および気相を Ar ガスで十分に置換した。ここに、嫌氣的に調製した dithionite 溶液を終濃度 2 mM となる様に加えた。この Hb 溶液の気相と液相を CO ガスで十分に置換することにより、ヘムに CO を結合させた。酸化状態および還元状態の Hb の活性測定は、それぞれ好気条件および嫌気条件で、基質である 7,8-DHF と CoA を加えることで行った。

反応産物の構造決定

まず、以下の手順で、構造決定を行うにあたって十分な量の反応産物を調製した。0.3 mg/mL Hb、1 mM 7,8-DHF、1 mM pantethine、4 mM DTT、50 mM Hepes-NaOH (pH 7.4)を含む反応液 300 mL を調製し、37°C で 20 hr インキュベートした。インキュベート後、300 mL の ethyl acetate と 3 mL の acetate を加えて混和し、ethyl acetate 層を抽出した。そして、エバポレーターを用いて ethyl acetate を除き、残存物を 2 mL の methanol に溶解した。この溶液から、HPLC を用いて反応産物を精製した。カラムは Cosmosil π NAP 20 \times 150 mm (ナカライテスク) を使用した。移動相は 60% methanol を使用し、化合物の分離は 7 mL/min の isocratic mode で行った。分離した反応産物は、274 nm での吸光度をモニタリングすることで検出した。反応産物に該当するピークの出現後すみやかに分取した溶液から、エバポレーターを用いて溶媒を除き、十分に乾燥させた後 dimethylsulfoxide- d_6 に残存物を溶解した。

上記の手法で大量精製した反応産物の構造を、AVANCE-600 NMR spectrometer (Bruker) を用いて分析した。 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、heteronuclear multiple bond coherence (HMBC)、Nuclear overhauser effect (NOE) により、反応産物の構造を決定した。

結果と考察

第 1 章で著者が発見した新規 7,8-DHF 代謝産物は、その質量分析の結果から、CoA の部分構造である pantetheine と 7,8-DHF が結合した構造を有する化合物である可能性が高いと考えられた。これは、Hb が触媒する反応が①CoA を pantetheine へと分解する反応と②pantetheine を 7,8-DHF に結合する反応の 2 段階からなることを示唆している (Fig. 6)。そこで、Hb が CoA ではなく pantetheine を直接の基質として反応に用いた際に、CoA の場合と同様の反応産物を生成できるか否か (すなわち Hb が②の反応のみを触媒できるか否か) を検討した。Pantetheine と 7,8-DHF を基質として反応を行い LC/MS で分析した結果、CoA を基質とした際の反応産物と同じ m/z 値 (529.2[M-H]⁻)、およびリテンションタイム (8.4 min) を示す反応産物が生成した。この際の活性は 1.01 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であり、この値は CoA を基質とした場合 ($0.403 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) に比べてはるかに高いものであった。

また、7,8-DHF と pantetheine が結合した構造を有する化合物はこれまでに報告が無く、新規化合物である可能性が高いと考えられた。そこで、pantetheine を基質として用いて反応産物を大量精製し、核磁気共鳴分光法 (NMR) を用いた構造解析を行った結果、上記の反応産物は 7,8-DHF の 6 位の炭素に pantetheine が-SH 基を介して結合した構造を有することが分かった (Fig. 7、Table 4)。本化合物はこれまでに報告の無い新規化合物であり、フラボノイドが生体内で pantetheinylation を受けることを示す初めての例である。したがって、摂取した 7,8-DHF が本化合物に変換された後、どのような生理活性を発揮するのか、という点に関しては未知であり、今後の解明が期待される。

また、ブタ肝臓から精製した Hb を用いて、Hb による CoA の分解活性を調べたところ、LC/MS を用いた分析において基質である CoA の減少を確認できた (Fig. 8)。また、2 つの反応産物 ($m/z = 506$ [M-H]⁻ および 277 [M-H]⁻) の出現も確認できた。上記の 2 つの反応産物の m/z 値は、CoA の部分構造である pantetheine と 3'-phospho-adenosine-5'-diphosphate (ADP) のものに一致した。本反応における CoA の分解速度は $0.657 \pm 0.105 \times 10^{-3} \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。次に、嫌気的条件下で Hb に carbon monoxide (CO) を加えた条件で、再度 CoA 分解活性を測定した。その結果、CO 処理後も Hb の CoA 分解活性を有しており、その活性は $0.311 \pm 0.016 \times 10^{-3}$

$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった (Fig. 8)。CO は O_2 に比べて 200 倍以上の親和性で Hb のヘムと結合することが知られており (20)、一般的に、CO との結合によりヘムは不活性化する。したがって、CO 処理後の Hb にも CoA 分解活性が存在したことは、CoA の分解がヘムとは異なる部位 (ポリペプチド鎖部位) で行われる可能性を示す結果である。また、CoA の加水分解の速度は、pantetheine を 7,8-DHF に付加する反応の速度よりも著しく低いため、Hb が触媒する 2 段階の反応において、1 段階目の CoA の加水分解が律速段階になっていると推測できる。

通常、生体内における CoA の分解経路では、CoA はまず脱リン酸化され、次に 4'-phosphopantetheine と adenosine moiety に分解される (31)。しかし、Hb が触媒する CoA の加水分解では、pantetheine とリン酸の間が切断される。この反応は従来の CoA 分解経路には存在しない (Fig. 1)。したがって、Hb が触媒する CoA の分解反応は、既知の CoA 分解酵素とは切断位置が全く異なるユニークな反応であるといえる。

Hb は $\alpha_2\beta_2$ のヘテロ 4 量体であり、各サブユニットに 1 つずつヘムが結合している。通常、Hb の酸素運搬タンパク質としての機能は、それぞれのヘムの中央に配位した Fe^{2+} に O_2 が結合・解離することで発揮される。そこで、このヘムが 7,8-DHF 変換活性において活性中心として機能しているか否かを明らかにするため、Hb のヘムの酸化還元状態が CoA を基質とした際の 7,8-DHF 変換活性に与える影響を調べた。酸化剤 (dithionite)、還元剤 ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)、2 種類の Fe リガンド (CN^- 、CO) を用いることで、通常の $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ に加えて Fe^{3+} 、 $\text{Fe}^{3+}\text{-CN}$ 、 Fe^{2+} 、 $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ の 4 種類の状態を作り出した (Fig. 9)。この際の UV-vis スペクトルの変化は、過去の報告に一致するものであった (21)。Hb は、dithionite による脱酸素化および CO との結合によって失活することが分かった (Table 5)。また、 CN^- との結合によっても大きく活性が低下した。したがって、Hb はヘムに配位した Fe が $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ および Fe^{3+} の状態をとる時のみ、7,8-DHF 変換活性を発揮することが分かった。これらの結果から、Hb は①CoA を pantetheine と 3',5'-diphospho-ADP に分解し②pantetheine を 7,8-DHF に付加する 2 段階の反応を触媒するが、それらの反応が進行する活性部位はそれぞれ非ヘムのポリペプチド鎖部位とヘム ($\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ および Fe^{3+}) であることが示唆された。一般的に、ヘム酵素においてヘムは活性中心として機能する。実際に、過去に報告されている Hb の酵素的な活性 (aniline の hydroxylation と anthracene の peroxidation) では、いずれもヘムが活性に関わることが示されている (22, 23)。

それらの報告は、Hb のヘムポケットが複数のベンゼン環からなる芳香族化合物を収容できることを示しており、フラボノイドもそれらの基質と同様にヘムポケットに取り込まれ、ヘムによる **pantetheine** の付加を受けると考えられる。しかしながら、フラボノイドよりもはるかに嵩高い **CoA** がヘムポケットに取り込まれるとは考えにくい。したがって、上述の実験結果と併せると、**CoA** の分解がヘムポケット内ではなく非ヘム部位で進行する可能性は高いといえる。

ヘム酵素が触媒する反応の中には、 H_2O_2 などの活性酸素種 (ROS) が mediator となって進行するものがある (24)。そこで、Hb が触媒する 7,8-DHF 変換活性においても、ROS が関与しているか否かを調べた。7,8-DHF のみを含む溶液中で、自発的な H_2O_2 の生成が確認された (Fig. 10)。また、過去の報告において、Hb が H_2O_2 により分解されてヘムから遊離した Fe イオンが Fenton 反応により H_2O_2 を OH^\bullet へと変化させることが示されている (25)。したがって、7,8-DHF の存在下で生じた H_2O_2 や、上記のメカニズムで生じた OH^\bullet などの ROS が mediator として Hb の 7,8-DHF に関与している可能性が考えられた。そこで、種々の ROS (H_2O_2 、 O_2^\cdot 、 OH^\bullet 、 1O_2) に対するスカベンジャーを添加して、**CoA** を基質とした際の Hb の 7,8-DHF 変換活性を測定したところ、スカベンジャーの有無は Hb の活性に大きな影響を与えなかった (Table 6)。したがって、Hb の 7,8-DHF 変換活性は、ROS を mediator とする間接的なものではなく、基質と Hb の直接の相互作用を介したものであると考えられる。

Hb 以外の主なヘムタンパク質として、**peroxidase** や **catalase** が知られている。ヘム酵素においては一般的にヘムが活性中心として機能し、それらの触媒活性はヘム酵素の間で共有されていることがある。そこで、**peroxidase** や **catalase** が Hb と同様に 7,8-DHF 変換活性を有するかを調べた。その結果、これらの酵素が **pantetheine** を 7,8-DHF に付加する反応のみを触媒することが分かった (Table 7)。この結果は、ヘムポケットにおいて 7,8-DHF へ **pantetheine** を付加する活性がヘム酵素に広く存在するのに対して、非ヘム部位の **CoA** 分解活性が Hb に特有のものである可能性を示唆している。また、上述の反応産物は、**pantetheine** が -SH 基を介して 7,8-DHF と結合した構造を有していたことから、**pantetheine** 以外のチオール化合物 (**glutathione** と **cysteine**) も Hb の基質になり得るか検討したところ、それらのチオール化合物が 7,8-DHF に付加した反応産物の生成を確認できた (Table 7)。また、

上記の peroxidase や catalase も、 glutathione や cysteine を 7,8-DHF に付加する活性を有していた。

Table 4 7,8-DHF の pantetheine 付加体の NMR スペクトル

No.	¹ H	<i>J</i> _H (Hz)		¹³ C
1				
2				161.5
3	6.80	s	1H	106.3
4				176.5
4a				114.4
5	7.36	s	1H	115.1
6				121.8
7				165.2
8				134.1
8a				145.3
1'				132.3
2'	8.12	m	1H	126.7
3'	7.57	m	1H	129.4
4'	7.57	m	1H	131.7
5'	7.57	m	1H	129.4
6'	8.12	m	1H	126.7
1''				
2''	2.94	dd 7.6	2H	31.9
3''	3.26	dd 11.5, 6.8	2H	38.6
4''	8.43	br	1H	
5''				171.0
6''	2.30	dd 7.5	2H	35.6
7''	3.33	ddd 13.3, 7.0, 6.3	2H	35.3
8''	7.74	dd 5.6	1H	
9''				173.3
10''	3.71	s	1H	75.5
11''				39.5
12''	3.17, 3.30	d 10.3	2H	68.5
13''	0.79		3H	20.8
14''	0.81		3H	21.4

Table 5 ヘムの酸化還元状態が Hb の 7,8-DHF 変換活性に与える影響
 N.D.は活性を検出できなかったことを示している。

Condition	Oxidant or Reductant	Exogenous ligand	Relative activity (%)
			100±4
Aerobic	K ₃ [Fe(CN) ₆]		143±11
	K ₃ [Fe(CN) ₆]	KCN	29.4±5.4
		KCN	42.1±0.9
			83.9±0.2
Anaerobic	Na ₂ S ₂ O ₄		N.D.
	Na ₂ S ₂ O ₄	CO	N.D.
		CO	N.D.

Table 6 種々の ROS スカベンジャーが Hb の 7,8-DHF 変換活性に与える影響

ROS scavenger	Relative activity (%)
None	100±7.83
Superoxide dismutase	98.3±1.37
Peroxidase	103±5.59
Catalase	105±2.10
Riboflavin	199±4.83
Mannitol	111±4.54
Salicylate	102±3.25
Urea	128±1.0
Phenylalanine	105±2.82

Table 7 ヘム含有タンパク質の 7,8-DHF 変換活性
 N.D.は活性を検出できなかったことを示している。

Heme protein	Specific activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\mu\text{mol heme}$)			
	Glutathione	Cysteine	Pantetheine	CoA
Hb (Porcine blood)	104 \pm 11	97.1 \pm 4.3	86.1 \pm 7.4	0.035 \pm 0.01
Peroxidase (Horseradish)	78.4 \pm 4.6	58.6 \pm 3.9	76.3 \pm 2.8	N.D.
Catalase (Bovine liver)	8.77 \pm 5.5	12.4 \pm 4.8	153 \pm 85	N.D.

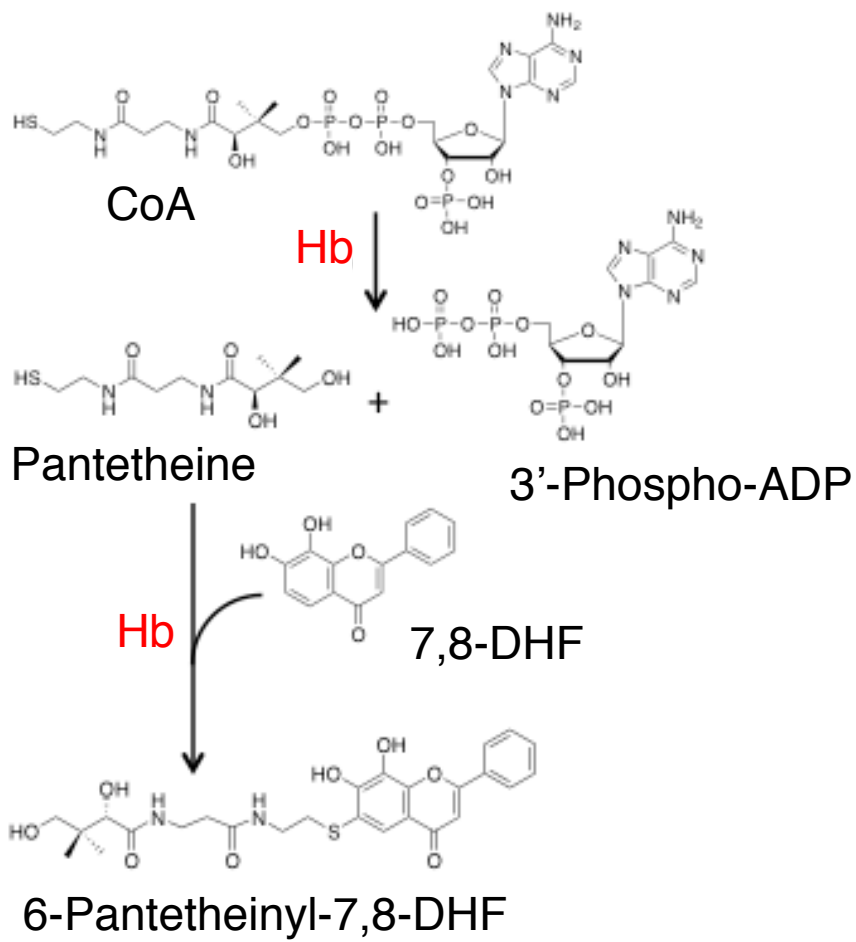


Figure 6. Hb が触媒する 7,8-DHF 変換活性の模式図

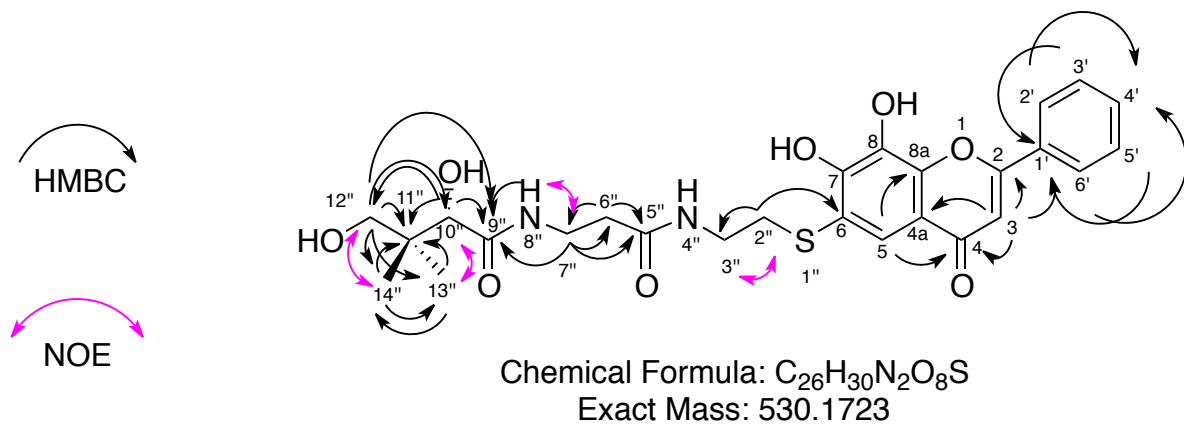


Figure 7. 各種分析により決定した 7,8-DHF の pantetheine 付加体の構造

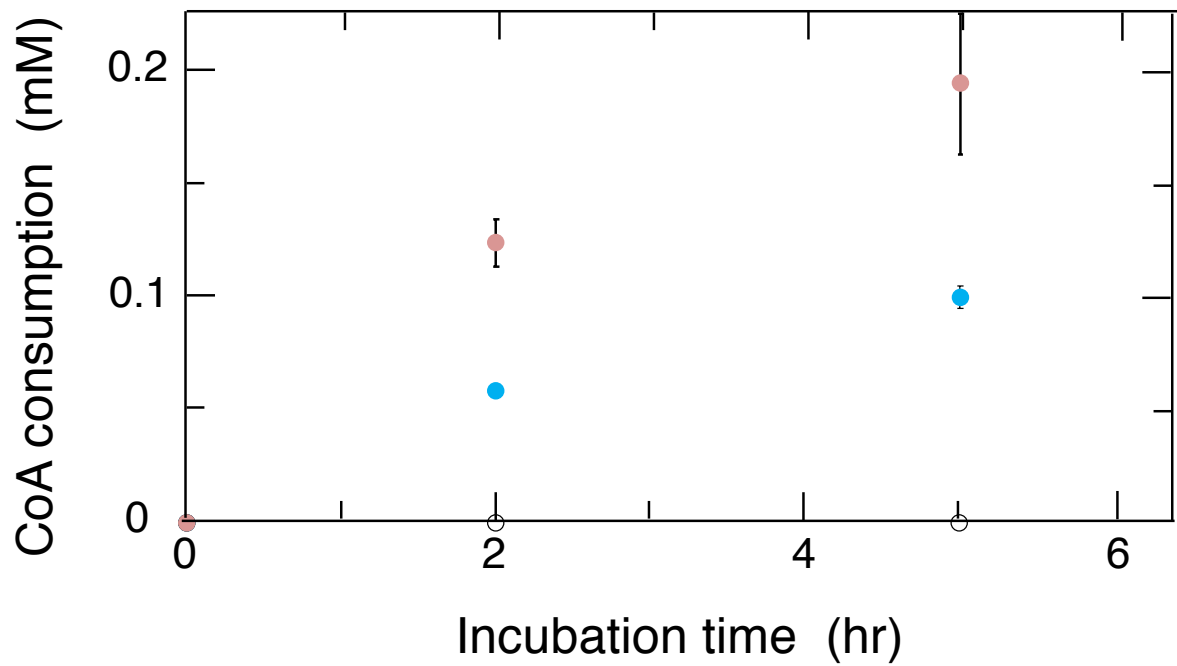


Figure 8. Hb および CO 結合型 Hb による CoA 分解

好気条件 (赤) および Ar 置換後に CO を添加した条件 (青) での Hb の CoA 分解活性を示した。コントロールとして、Hb を加えていない好気条件における CoA 量の増減も示した (白)。

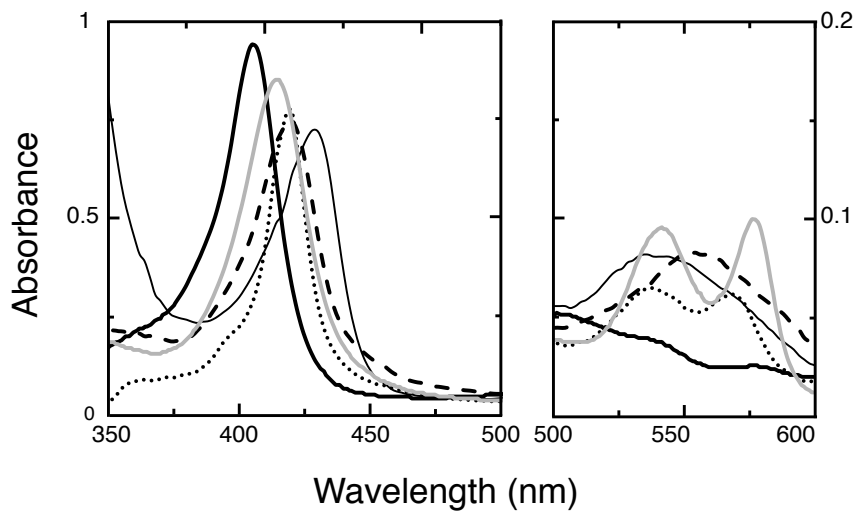


Figure 9. 種々の化合物を加えた時の Hb の UV-vis スペクトル

$K_3[Fe(CN)_6]$ で酸化したサンプル（黒太線）、無処理サンプル（灰色太線）、 $K_3[Fe(CN)_6]$ で酸化した後に KCN を加えたサンプル（点線）を好気条件で分析した。また、 $Na_2S_2O_4$ で還元したサンプル（細線）、 $Na_2S_2O_4$ で還元した後に CO を加えたサンプル（ダッシュ線）を嫌気条件で分析した。

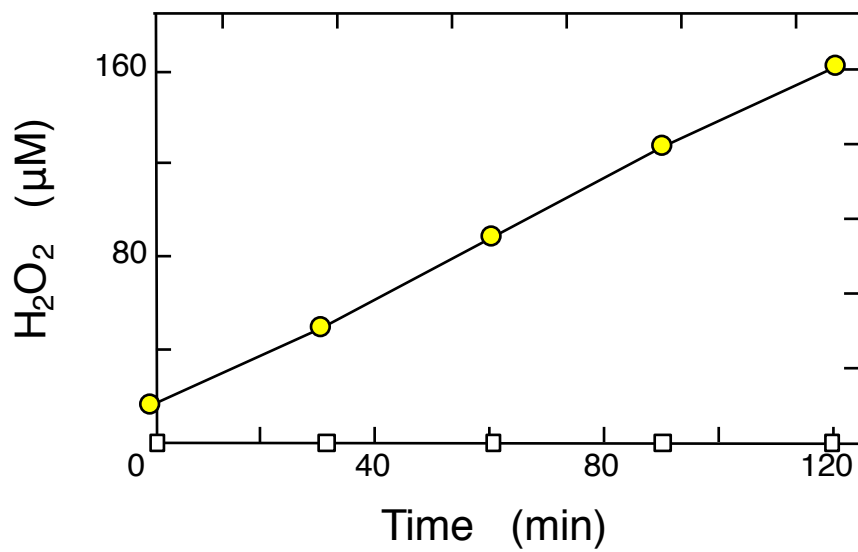


Figure 10. 7,8-DHF 存在下での非酵素的な H₂O₂ 生成

Hb を含まない標準反応液を 37°C でインキュベートした。7,8-DHF を含む条件 (●) と含まない条件 (□) での H₂O₂ の生成量を示している。

第 3 章 Hb の酵素学的諸性質の解明

材料と方法

温度と pH が Hb の活性と安定性に与える影響の測定

Hb の全ての活性測定に、7,8-DHF と CoA を基質として用いた。反応液の pH の調整には、citrate/sodium citrate buffer (pH 5.0 - 6.5)、Hepes-NaOH buffer (pH 6.5 - 8.0)、Tris-HCl buffer (pH 8.0 - 9.0)、NH₄Cl/NH₄OH buffer (pH 9.0 - 10.0)の各種バッファーを使用した。Hb の pH 依存性に関しては、上記のバッファーをそれぞれ終濃度 100 mM となる様に反応液に加え、37°C で 4 hr インキュベートした。pH 安定性に関しては、まず上記のバッファーをそれぞれ終濃度 100 mM となる様に加えた反応液中で Hb を 25°C、30 min インキュベートした。その後、反応液を一定量取り、100 mM Hepes-NaOH (pH 7.4)で 10 倍に希釈して基質を加え、反応を開始した。Hb の温度依存性に関しては、Hb と基質を加えた反応液をインキュベートする際に、恒温槽の温度を 10 - 60°C まで変化させた際の活性を測定した。また、温度安定性に関しては、10 - 70°C で 30 min インキュベートした Hb 溶液に基質を加え、37°C で反応を開始した。

Hb が触媒する 7,8-DHF 変換反応の反応速度論的解析

4 mg/mL Hb、2 mM CoA、100 mM Hepes-NaOH (pH 7.4)を含む反応液に終濃度 0.2 - 1.8 mM となる様に 7,8-DHF を加え、各 7,8-DHF 濃度における Hb の 7,8-DHF 変換活性を測定した。

Hb の基質特異性の解析

1 mg/mL Hb、2 mM CoA、100 mM Hepes-NaOH (pH 7.4)を含む反応液に終濃度 0.2 - 1 mM の各フラボノイドを加え、反応を開始した。各フラボノイドに対する Hb の活性は、各フラボノイドの減少量から算出した。

酵素阻害剤の検討

標準反応液に、種々の化合物をそれぞれ加え、Hb の 7,8-DHF 変換活性を測定した。金属塩は 5 mM、他の化合物は 2 mM となる様に加えた。

結果と考察

pH に関して、Hb は pH 5.0 から pH 11.0 まで安定であり、7,8-DHF 変換活性の至適 pH は pH 8.5 - 9.0 であった (Fig. 11)。Hb が高 pH 条件に対して比較的安定であることは、過去の報告と一致する (26)。また、温度に関して、Hb は 50°C まで安定であり、至適温度は 45°C であった。過去の報告では、Hb は 60°C 以上で急激に失活するとされており、これは本実験の結果と一致した (27)。

CoA を基質として、種々の 7,8-DHF 濃度における Hb の 7,8-DHF 変換活性を測定したところ、それらの値をプロットした曲線は典型的な **Micaelis-Menten-type kinetics** を示した (Fig. 12)。反応速度論的解析の結果、各パラメータは $K_m = 0.404 \pm 0.081$ mM、 $V_{max} = 0.466 \pm 0.161 \times 10^{-3}$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 、 $k_{cat} = 1.24 \times 10^{-3}$ s^{-1} であった。過去に、Hb の酵素様活性についてはいくつか報告がある。それらは、**hydroxylase** (22)、**hydrolase** (28)、**oxygenase**、**peroxidase**、**catalase** (29,30) 活性である。しかし、上記の活性のうち、**Michaelis-Menten type kinetics** にしたがうことが分かっているものは **hydroxylase** 活性のみである。

種々のフラボノイドに対する Hb の基質特異性を調べたところ、CoA を **thiol donor** とした際には、**quercetin**、**catechin**、**naringenin** などの食用植物に広く含まれるフラボノイドが Hb の基質になり得た (Fig. 13)。しかし、7,8-DHF と構造に近い **7-hydroxyflavone** や **apigenin**、**catechin** のジアステレオマーである (-)-**epicatechin**、**quercetin** と構造に近い **4',5-dihydroxyflavone** は Hb の基質にならなかった。これらの結果は、ヒドロキシ基の位置や数が Hb のフラボノイド変換活性に大きな影響を与えないことを示唆している。また、CoA ではなく **pantetheine**、**glutathione**、**cysteine** をチオール側の基質とした際には、イソフラボン類 (**daidzein**、**genistein**) を含む、より幅広いフラボノイドが Hb の基質となった (Table 8)。イソフラボン類のチオール抱合体はこれまでに知られておらず、本研究が初めての報告例である。また、一般的にポリフェノール化合物は **glutathione** が付加することで、抗酸化活性が向上したり、多様な細胞活性を発揮したりすることが知られている (31)。**Pantetheine** が付加したフラボノイドは本研究で初めて見出されたものであり、それらの生理活性の解明が期待される。

Glutathione を基質に付加する抱合反応は重要な代謝反応であるが、この反応を触媒する酵素は **glutathione S-transferase** のみが知られている (32)。この酵素は芳香族化合物や **isothiocyanate** など、この酵素が触媒する抱合反応の基質となる化合物によってその発現が誘導されることが示されている。フラボノイドも、同様に **glutathione S-transferase** の発現を誘導することが示唆されているが (33)、フラボノイドはこの酵素の基質とはならない。フラボノイドは **glutathione S-transferase** の活性中心付近の **cys** 残基に結合することで、この酵素の活性を阻害すると考えられている (34)。ヒトの血液中から **quercetin** の **glutathione** 抱合体は検出されているが (35)、上記の阻害活性ゆえに **glutathione S-transferase** はその抱合体の合成酵素とは考えられていない。一方で、本研究で著者は、**Hb** がフラボノイドに対する **glutathione** 抱合活性を持つことを明らかにした。**Hb** が肝臓に大量に存在することを考慮すれば、小腸から吸収されたフラボノイドに対して、**Hb** が **glutathione** 抱合反応を触媒する **alternative metabolic enzyme** として機能しているかもしれない。換言すれば、フラボノイドに対する抱合反応を触媒できないという **glutathione S-transferase** の欠点を、**Hb** が補っている可能性があるともいえる。

阻害剤検討の結果、一部のキレート剤 (**Diethyldithiocarbamate**)、ヘムに対して作用する阻害剤 (**Hydroxylamine**、**Phenylhydrazine**)、還元剤 (**Dithiothreitol**) によって、**Hb** の活性は著しく阻害された (**Table 9**)。また、**-SH** 基阻害剤 (**5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoate**、**N-Ethylmaleimide**、**p-Chloromercuribenzoate**) による阻害効果は、それらの化合物が**-SH** 基をもつ **CoA** に対して作用した為であると推測できる。上記の化合物とは逆に、**MgCl₂** は **Hb** の活性を増大する効果を示したが、これは **CoA** のリン酸結合が **Mg²⁺** によって活性化され、切断が促進された為であると考えられる。一方、**EDTA** による活性化のメカニズムは不明である。

また、**H₂O₂** によって **Hb** の活性が増大したことは、示唆に富む結果である。著者は、**Hb** が触媒する反応において **CoA** の切断の後に起こる **7,8-DHF** への **pantetheine** 付加反応のメカニズムは、**Compound I** (**Fe⁴⁺=O** のヘム) が関与するものであると推測している。これは、**cytochrome P450** が触媒する **hydroxylation** のメカニズム (36) から類推したものであり、具体的には以下の流れで進行すると考えられる。
①まず、通常の **Hb** のヘム (**Fe²⁺**) が **pantetheine** により還元される (**Fe³⁺** のヘムの場合、まず **pantetheine** の**-SH** 基により **Fe²⁺** に還元され、さらに **O₂** が結合して **Fe²⁺-O₂** となり、上記の流れでさらなる還元を受けると思われる)。
②還元された **Fe²⁺-O-**

O⁻はプロトン化を受け、O-O 結合の開裂とともに **Compound I (Fe^{4+=O})**が生成する。③**Compound I**は **7,8-DHF** の **6**位の炭素からプロトンを引き抜いて活性化し、④**pantetheine** の-SH 基が活性化された炭素に求核攻撃することで **7,8-DHF** に **pantetheine** が付加する。過去に、**Hb** は **H₂O₂** と反応し、ポルフィリン環あるいはタンパク質領域にラジカル部位を持つ **Compound I-like** な状態のヘム (**Fe^{4+=O}**) を形成することが報告されていることから (37)、**H₂O₂**により **7,8-DHF** 変換活性が増大したことは、上記の **Compound I** が関与するメカニズムを支持する結果であると考えられる。さらに、O-O 結合を含む化合物が関与する **Compound I** の形成のメカニズムは、**peroxidase** や **catalase** などのヘム酵素に広く存在するとされているため (38)、それらの酵素も **Hb** と同様に上記のメカニズムで **7,8-DHF** への **pantetheine** 付加反応を触媒する可能性がある。

近年、**tyrosinase** や **catechol oxidase** などの2核銅を活性中心に有する酸化酵素が、上記の構造を共有する **hemocyanin** から進化したタンパク質であるとする仮説が提案されている (39)。しかしながら、活性部位へ基質が結合する際の距離や配向によっては、酸素運搬タンパク質である **hemocyanin** が、**tyrosinase** や **catechol oxidase** と似た芳香族化合物の酸化反応を触媒しうることも発見されている (40)。したがって、**hemocyanin** と同じ金属含有酸素運搬タンパク質である **Hb** が、酸化的に **pantetheine** を **7,8-DHF** に付加する反応を触媒できることも、あり得ないことではない。一方で、**Hb** の非ヘム部位に **CoA** を **pantetheine** と **3'-phospho-CoA** に分解する活性が存在したことは予想外の発見であり、**Hb** の新規機能といえる。

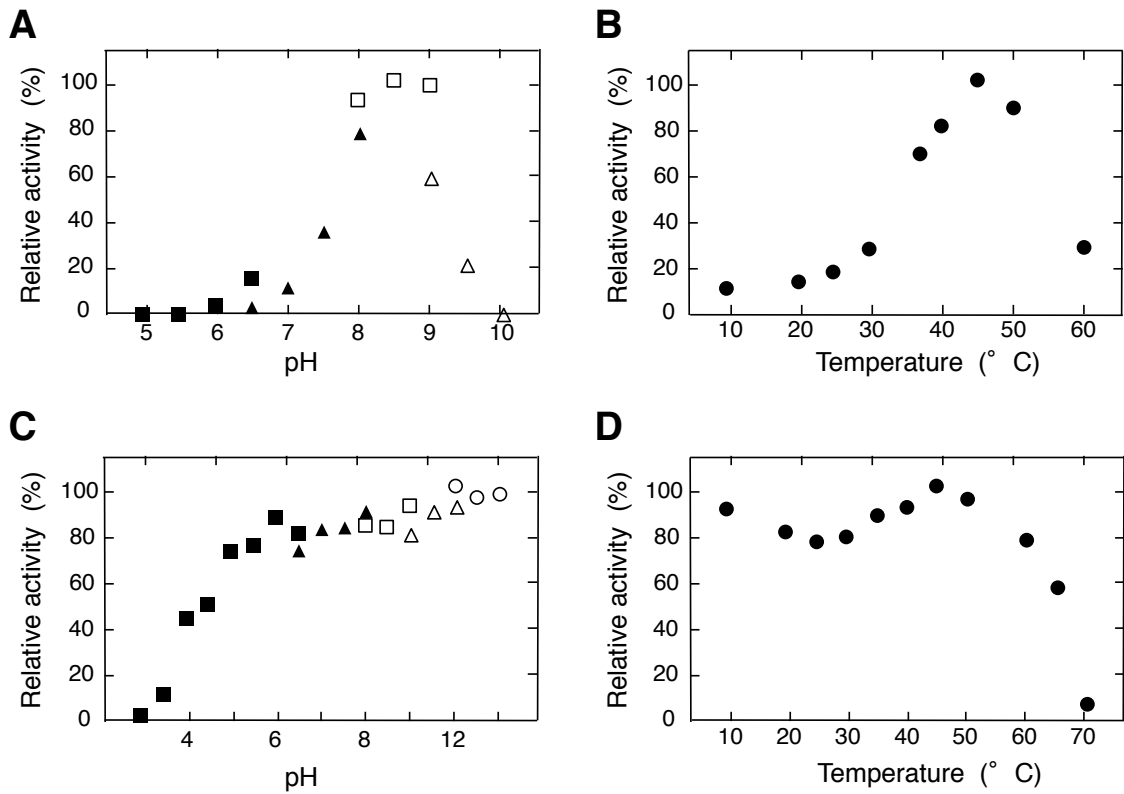


Figure 11. 温度と pH が Hb の 7,8-DHF 変換活性に与える影響

pH に関して、各記号はそれぞれ citrate/sodium citrate (■)、 Hepes-NaOH (▲)、 Tris-HCl (□)、 NH₄Cl/NH₄OH (△)、 NaHCO₃/NaOH (○)を示している。

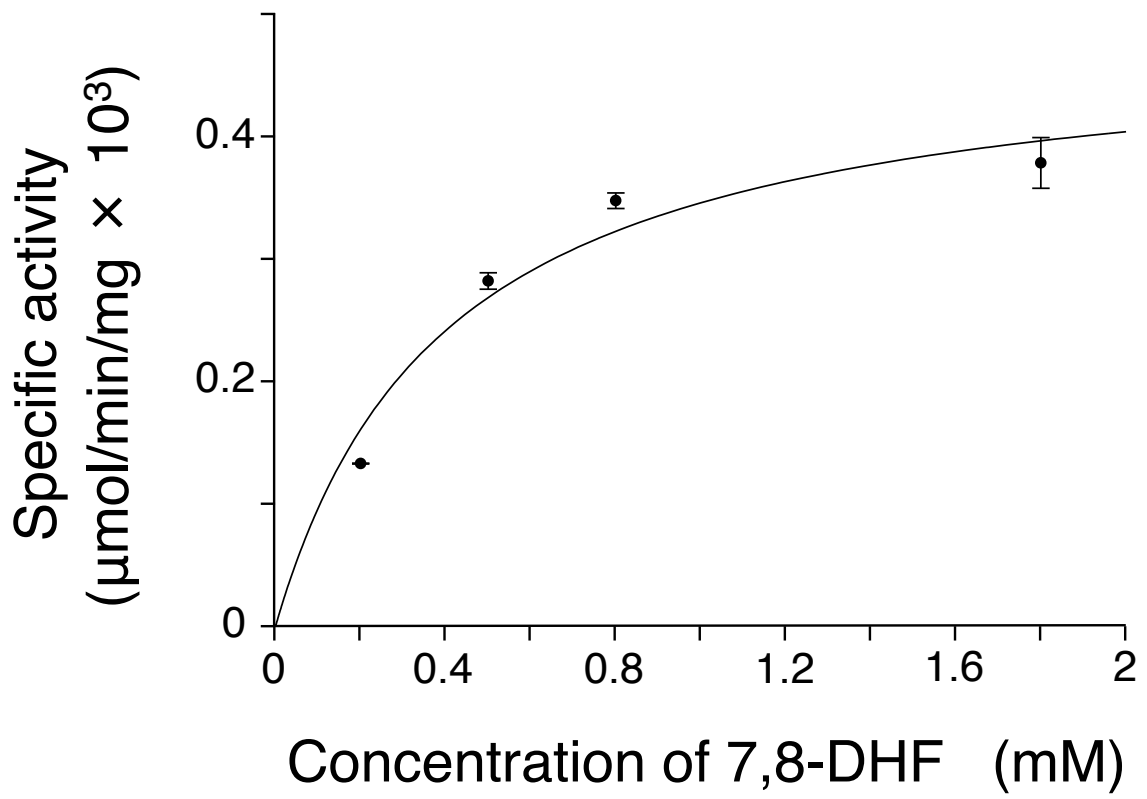


Figure 12. Hb が触媒する 7,8-DHF 変換活性の反応速度論的解析

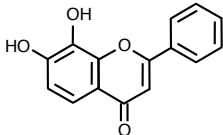
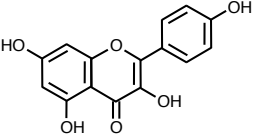
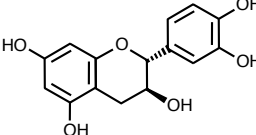
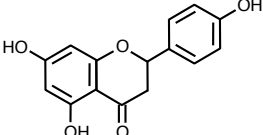
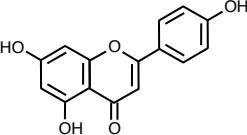
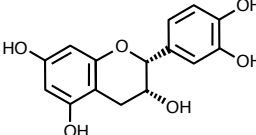
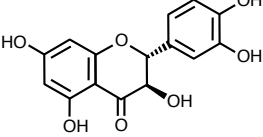
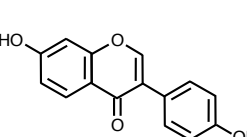
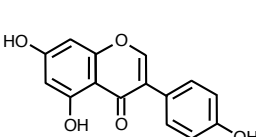
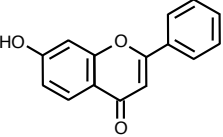
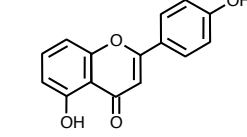
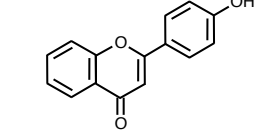
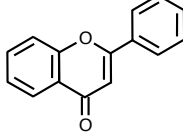
Structure	Name	Relative activity (%)
	7,8-Dihydroxyflavone	100
	Quercetin	310
	(+)-Catechin	49.5
	Naringenin	***
	Apigenin	ND
	(-)-Epicatechin	ND
	(+)-Taxifolin	ND
	Daidzein	ND
	Genistein	ND
	7-Hydroxyflavone	ND
	4',5-Dihydroxyflavone	ND
	4'-Hydroxyflavone	ND
	Flavone	ND

Figure 13. CoA を基質とした際のフラボノイドに対する Hb の基質特異性
 ***は、反応産物が検出できたが比活性を算出できなかったものを表している。

Table 8 チオールを基質とした際のフラボノイドに対する Hb の基質特異性

Flavonoid	Specific activity (units/mg)		
	Pantetheine	Glutathione	Cysteine
7,8-DHF	0.953	0.43	0.443
Quercetin	2.55	0.619	2.90
Apigenin	1.13	*	N.D.
7-Hydroxyflavone	*	N.D.	N.D.
4',5-Dihydroxyflavone	N.D.	N.D.	N.D.
4'-Hydroxyflavone	N.D.	N.D.	N.D.
Flavone	N.D.	N.D.	N.D.
Naringenin	1.87	*	N.D.
(+)-Catechin	2.36	0.0939	0.304
(-)-Epicatechin	2.54	0.281	0.685
(+)-Taxifolin	0.731	*	0.102
Daidzein	*	N.D.	N.D.
Genistein	*	N.D.	N.D.

*は反応産物を検出できたが活性を算出できなかったものを表している。

Table 9 様々な化合物が Hb の 7,8-DHF 変換活性に与える影響

Compound	Relative activity (%)
None	100±2
MgCl ₂	163±1
NaCl	121±2
LiCl	119±5
RbCl ₂	119±2
CaCl ₂	114±3
KCl	91.9±2.8
ZnCl ₂	63.5±2.3
CdCl ₂	59.7±4.7
AlCl ₃	42.0±1.4
FeCl ₂	40.8±1.1
FeCl ₃	35.1±0.7
HgCl ₂	25.8±0.5
MnCl ₂	N.D.
CoCl ₂	N.D.
NiCl ₂	N.D.
CuCl ₂	N.D.
SrCl ₄	N.D.
AgNO ₃	N.D.

(次のページに続く)

(前ページの続き)

Compound	Relative activity (%)
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoate	12.2±1.3
Iodoacetate	56.4±3.4
<i>N</i> -Ethylmaleimide	2.57±0.82
<i>p</i> -Chloromercuribenzoate	3.67±0.49
Hydroxylamine	18.9±1.7
Phenylhydrazine	N.D.
Semicarbazide	111±8
Aminoguanidine	126±4
α, α -Dipyridyl	92.6±12.6
<i>o</i> -Phenanthroline	90.2±5.8
8-Hydroxyquinoline	99.1±6.2
EDTA	148±3
Diethyldithiocarbamate	7.26±0.60
NaN ₃	99.2±5.9
Dithiothreitol	97.4±2.8
Dithiothreitol (10 mM)	26.6±1.8
Dithiothreitol (20 mM)	N.D.
2-Mercaptoethanol	21.1±4.8
H ₂ O ₂	226±21
Ammonium persulfate	42.6±3.7
Phenylmethanesulfonyl fluoride	51.4±2.8
Diisopropyl fluorophosphate	63.8±0.4

総括

本研究で著者は、ブタ肝臓から調製した CFE が CoA の存在下で 7,8-DHF を新規化合物である **pantetheine** 付加体へと変換することを発見した。ブタ肝臓に含まれる 7,8-DHF 変換酵素を精製したところ、この酵素が **Hb** であることが分かった。精製した **Hb** は、①非ヘム部位で CoA を **pantetheine** と 3'-phospho-ADP へと加水分解し、②ヘム部位で **pantetheine** (あるいは **glutathione** や **cysteine** などのチオール) を C-S 結合を介して 7,8-DHF に付加する、2 段階の反応を触媒した。ヒト血液由来の **Hb** も、上記の 2 段階反応を触媒する活性を有していた。**Hb** は、7,8-DHF 以外のフラボノイド (**quercetin**、**catechin**、**naringenin** など) に対しても同様の活性を示した。また、**peroxidase** や **catalase** といった他のヘム酵素は、②の反応のみを触媒した。これは、チオールをフラボノイドに付加する活性が、ヘムタンパク質に広く存在していることを示唆している。一方で、①と②の両方の反応を触媒できるのは **Hb** のみである。

著者の知る限り、本論文は、**Hb** が CoA を分解しながら、その分解産物である **pantetheine** を天然由来生理活性物質であるフラボノイドに付加する触媒活性を持つことを報告する、初めての例である。本研究で用いた **Hb** の基質が生理的基質であるか否かに関わらず、**Hb** に上記の触媒活性が見出されたことには重要な意義がある。**Hb** が血液や肝臓に大量に存在するタンパク質であることもあり、その比活性の低さを根拠に **Hb** の活性に生理学的意義が無いと断定することはできない。また、フラボノイドのチオール抱合体のヒトに対する生理活性等はまだ深く調べられておらず、それらの解明は今後の課題である。本博士論文で報告する成果は、将来的に **Hb** の新しい生理学的役割の発見へとつながることが期待される。

参考文献

1. Vaishnav, P. & Demain, A. L. Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **29**, 223-229 (2011).
2. Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, M. & Tattini, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science* **196**, 67-76 (2012).
3. Del Rio, D. *et al.* Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal* **18**, 1818-1892 (2013).
4. Middleton, E. Jr., Kandaswami, C. & Theoharides, T. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.* **52**, 673-751 (2000).
5. Hollman, P. C. H. Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharm. Biol.* **42**, 74-83 (2004).
6. Day, A. J. *et al.* Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic. Res.* **35**, 941-952 (2001).
7. Perez-Vizcaino, F., Duarte, J. & Santos-Buelga, C. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *J. Sci. Food Agric.* **92**, 1822-1825 (2012).
8. Terao, J., Murota, K. & Kawai, Y. Conjugated quercetin glucuronides as bioactive metabolites and precursors of aglycone *in vivo*. *Food Funct.* **2**, 11-17 (2011).
9. Loke, W. M. *et al.* Quercetin and its *in vivo* metabolites inhibit neutrophil-mediated low-density lipoprotein oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 3609-3615 (2008).
10. Steffen, Y., Gruber, C., Schewe, T. & Sies, H. Mono-*O*-methylated flavonols and other flavonoids as inhibitors of endothelial NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* **469**, 209-219 (2008).
11. Lodi, F. *et al.* Glucuronidated and sulfated metabolites of the flavonoid quercetin prevent endothelial dysfunction but lack direct vasorelaxant effects in rat aorta. *Atherosclerosis* **204**,

34-39 (2009).

12. Bradford, M. M. B. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).

13. Fuhrop, J. H. & Smith, K. M. Porphyrins and Metalloporphyrins. 755-869 (Elsevier, 1975).

14. Jang, S. *et al.* A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 2687-2692 (2010).

15. Spencer, J. P. E. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. *Br. J. Nutr.* **104**, S40-S47 (2010).

16. Cazorla, M. *et al.* Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 1846-1857 (2011).

17. Huai, R. *et al.* Vasorelaxing and antihypertensive effects of 7,8-dihydroxyflavone. *Am. J. Hypertens.* **27**, 750-760 (2014).

18. Santos-Buelga, C., Escribano-Bailon, M. T. & Lattanzio, V. Recent advances in polyphenol research, Vol. 2. 305-306 (Wiley-Blackwell, 2010).

19. Huang, L., Colas, C. & Ortiz de Montellano, P. R. Oxidation of carboxylic acids by horseradish peroxidase results in prosthetic heme modification and inactivation. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 12865-12873 (2004).

20. Blumenthal, I. Carbon monoxide poisoning. *J. R. Soc. Med.* **94**, 270-272 (2001).

21. Sowole, M. A., Vuong, S. & Konermann, L. Interactions of hemoglobin and myoglobin with their ligands CN⁻, CO, and O₂ monitored by electrospray ionization-mass spectrometry. *Anal. Chem.* **87**, 9538-9545 (2015).

22. Elbaum, D. & Nagel, R. L. Esterase activity of hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **256**, 2280-2283 (1981).

23. Smith, M. J. & Beck, W. S. Peroxidase activity of hemoglobin and its subunits: Effects thereupon of haptoglobin. *Biochem. Biophys. Acta* **147**, 324-333 (1967).

24. McCue, J. M., Driscoll, W. J. & Mueller, G. P. Cytochrome c catalyzes the in vitro synthesis of arachidonoyl glycine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **365**, 322-327 (2008).

25. Puppo, A. & Halliwell, B. Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. *Biochem. J.* **249**, 185-190 (1988).

26. Rieder, R. F. Hemoglobin stability: observations on the denaturation of normal and abnormal hemoglobins by oxidant dyes, heat, and alkali. *J. Clin. Invest.* **12**, 2369-2376 (1970).
27. Di Domenico, R. & Lavecchia, R. Thermal stability of human haemoglobin in the presence of sarcosine and sorbitol. *Biotechnol. Lett.* **22**, 335-339 (2000).
28. Mieyal, J. J., Ackerman, R. S., Blumer, J. L. & Freeman, L. S. Characterization of enzyme-like activity of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **251**, 3436-3441 (1976).
29. Paco, L. *et al.* Catalase-like activity of bovine met-hemoglobin: interaction with the pseudo-catalytic peroxidation of anthracene trace in aqueous medium. *Biotechnol. J.* **4**, 1460-1470 (2009).
30. Smith, M. J. & Beck, W. S. Peroxidase activity of hemoglobin and its subunits: Effects thereupon of haptoglobin. *Biochem. Biophys. Acta* **147**, 324-333 (1967).
31. Monks, T. J. & Lau, S. S. The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 229-255 (1998).
32. Strange, R. C., Spiteri, M. A., Ramachandran, S. & Fryer, A. A. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat. Res.* **482**, 21-26 (2001).
33. Boušová, I. & Skálová, L. Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metab. Rev.* **44**, 267-286 (2012).
34. van Zanden, J. J. *et al.* Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin. *Chem. Biol. Interact.* **145**, 139-148 (2003).
35. Hong, Y. & Mitchell, A. E. Identification of glutathione-related quercetin metabolites in humans. *Chem. Res. Toxicol.* **19**, 1525-1532 (2006).
36. Bell, S. R. & Groves, J. T. A highly reactive P450 model compound I. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9640-9641 (2009).
37. Gebicka, L. & Banasiak, E. Flavonoids as reductants of ferryl hemoglobin. *Acta Biochim. Pol.* **56**, 509-513 (2009).
38. Gebicka, L. & Banasiak, E. Flavonoids as reductants of ferryl hemoglobin. *Acta Biochim. Pol.* **56**, 509-513 (2009).
39. Ginsbach, J. W., Kieber-Emmons, M. T., Nomoto, R., Noguchi, A., Ohnishi, Y & Solomon, E. I. Structure/function correlations among coupled binuclear copper proteins through spectroscopic and reactivity studies of NspF. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 10793-10797

(2012).

40. Decker, H. & Tuzcek, F. Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 392-397 (2000).

業績

Toshiki Nagakubo, Takuto Kumano, Yoshiteru Hashimoto and Michihiko Kobayashi
Hemoglobin catalyzes CoA degradation and thiol addition to flavonoids.
Scientific Reports, 8: 1282 (2018)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導を賜り、また日頃より科学に対し真摯かつ自由に取り組む姿勢をご教授下さった、筑波大学生命環境系教授 小林達彦博士に心より御礼申し上げます。

実験のご指導、および研究方針等に関する数々のご助言を賜った筑波大学生命環境系准教授 橋本義輝博士、筑波大学生命環境系助教 熊野匠人博士に心より感謝致します。

公私にわたる多くのご支援を賜った東筑紫短期大学食物栄養学科助教 松本雅子博士、日本大学生物資源科学部助手 西山辰也博士、慶應義塾大学法学部助教 土居志織博士、山田優駿博士、齋藤結希様、栗田周哉様に厚く御礼申し上げます。

ブタ臓器をご提供下さった麻布大学獣医学部教授 勝俣昌也博士に厚く御礼申し上げます。

大学院生活の中で充実した時間を共有させて頂いた微生物育種工学研究室の皆様 に深く感謝致します。

実験環境を整えて下さったことはもちろん、様々な面で多大なサポートを賜った飯村紀代美様、木澤祥恵様、大崎留美子様に、心より感謝申し上げます。

そして、ここまで著者を育て、長い学生生活を支え、叱咤激励して下さった家族に、感謝いたします。

