

博士論文

ニューログロビンがもつ細胞保護能および  
神経突起伸長能の作用機序の解明

高橋 望

# 目次

略語一覧.....	4
1. 序論.....	6
1.1. ニューログロビン (Ngb) とは.....	6
1.2. Ngb の細胞保護能 .....	7
1.3. ヒト Ngb のグアニンヌクレオチド解離阻害因子 (GDI) としての活性と細胞保護能 .....	10
1.4. GDI 活性および細胞保護に重要なアミノ酸残基 .....	10
1.5. ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ の相互作用.....	11
1.6. 魚類 Ngb の細胞膜透過 .....	15
1.7. 細胞膜を透過し細胞死を抑制するキメラ Ngb .....	15
1.8. Ngb の神経突起の伸長作用 .....	16
1.9. 研究目的 .....	16
2. ヒト Ngb の細胞保護能における Glu60 の重要性.....	20
2.1. 要旨.....	20
2.2. 実験方法 .....	21
2.2.1. 発現ベクターの作製 .....	21
2.2.2. 発現ベクターの精製 .....	22
2.2.3. 蛋白質の発現および精製.....	22
2.2.4. 円二色性 (CD) スペクトル.....	24
2.2.5. GDP 解離アッセイ .....	24
2.2.6. 細胞培養 .....	24
2.2.7. 細胞へのプラスミドの導入 .....	25
2.2.8. SH-SY5Y 細胞の過酸化水素処理.....	25
2.2.9. ウェスタンブロット解析 .....	25
2.2.10. 細胞生存率の測定 .....	26
2.2.11. 活性酸素種の除去能の測定 .....	26
2.3. 実験結果 .....	28

2.3.1.	E60Q ヒト Ngb 変異体の構造 .....	28
2.3.2.	E60Q ヒト Ngb の GDI 活性 .....	30
2.3.3.	E60Q ヒト Ngb の細胞保護能 .....	30
2.3.4.	GDI 活性のないヒト Ngb 変異体の活性酸素種の除去能 .....	31
2.4.	考察 .....	35
3.	ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ との相互作用部位の解析 .....	37
3.1.	要旨 .....	37
3.2.	実験方法 .....	38
3.2.1.	発現ベクターの作製 .....	38
3.2.2.	発現ベクターの精製 .....	41
3.2.3.	蛋白質の発現および精製 .....	41
3.2.4.	細胞培養 .....	41
3.2.5.	細胞へのプラスミドの導入 .....	42
3.2.6.	SH-SY5Y 細胞の過酸化水素処理 .....	42
3.2.7.	細胞生存率の測定 .....	42
3.2.8.	$G\alpha_{i1}$ を用いた GST プルダウンアッセイ .....	42
3.2.9.	CD スペクトル .....	43
3.2.10.	GDP 解離アッセイ .....	43
3.2.11.	ウェスタンブロット解析 .....	43
3.3.	実験結果 .....	44
3.3.1.	GDI 活性のないヒト Ngb 変異体の細胞保護能と $G\alpha_{i1}$ との相互作用 .....	44
3.3.2.	ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ のドッキングモデル 1 に基づく $G\alpha_{i1}$ 側の重要残基の特定 .....	45
3.3.3.	様々な生物種における Ngb の配列比較に基づく重要残基の絞り込み .....	50
3.3.4.	ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ のドッキングモデル 2 に基づく $G\alpha_{i1}$ 側の重要残基の特定 .....	58
3.4.	考察 .....	61
3.4.1.	$G\alpha_{i1}$ の重要な残基について .....	61
3.4.2.	ヒト Ngb の重要な残基について .....	62
4.	Ngb の神経突起伸長能の作用機序の解明 .....	66

4.1. 要旨.....	66
4.2. 実験方法 .....	68
4.2.1. 発現ベクターの作製 .....	68
4.2.2. 発現ベクターの精製 .....	68
4.2.3. Ngb の発現および精製 .....	68
4.2.4. 細胞培養 .....	69
4.2.5. 神経突起の伸長の評価.....	69
4.2.6. Ngb のフルオレセインイソチシアネート (FITC) 標識 .....	69
4.2.7. Ngb の細胞内導入の観察 .....	70
4.2.8. PC12 細胞の過酸化水素処理.....	70
4.2.9. 細胞生存率の測定 .....	70
4.3. 実験結果 .....	71
4.3.1. キメラ Ngb の神経突起の伸長能.....	71
4.3.2. キメラ Ngb の細胞膜透過能.....	74
4.3.3. キメラ Ngb の構造変化と神経突起の伸長能.....	76
4.3.4. キメラ Ngb の神経突起の伸長能に重要なアミノ酸残基の特定 .....	76
4.3.5. キメラ Ngb の細胞保護能.....	77
4.4. 考察.....	83
5. 結論.....	87
6. 参考文献 .....	92
7. 発表論文 .....	99
謝辞.....	100

## 略語一覧

ATP	adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)
cAMP	cyclic adenosine monophosphate (環状アデノシン一リン酸)
CD	circular dichroism (円偏光二色性)
CNgb	chimeric neuroglobin (キメラニューログロビン)
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium (ダルベッコ改変イーグル培地)
DMSO	dimethyl sulfoxide (ジメチルスルホキシド)
DTT	dithiothreitol (ジチオスレイトール)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (大腸菌)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
FBS	fetal bovine serum (胎児ウシ血清)
FITC	fluorescein isothiocyanate (フルオレッセインイソチオシアネート)
FM4-64	N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino)phenyl)hexatrienyl)pyridinium dibromide (N-(3-トリエチルアンモニウムプロピル)-4-(6-(4-(ジエチルアミノ)フェニル)ヘキサトリエニル)ピリミジウムジブロマイド)
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor (グアニンヌクレオチド解離阻害因子)
GdnHCl	guanidine hydrochloride (グアニジン塩酸塩)
GDP	guanosine diphosphate (グアノシン二リン酸)
GST	glutathione S-transferase (グルタチオンS-トランスフェラーゼ)
GST-HNgb	GST-fused human neuroglobin (GST融合ヒトニューログロビン)
GTP	guanosine triphosphate (グアノシン三リン酸)
Hb	hemoglobin (ヘモグロビン)
HNgb	human neuroglobin (ヒトニューログロビン)
HRP	horse radish peroxidase (西洋わさびペルオキシダーゼ)
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (イソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド)
Mb	myoglobin (ミオグロビン)
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-

	(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩)
NAC	N-acetylcystein (N-アセチルシステイン)
Ngb	neuroglobin (ニューログロビン)
NGF	nerve growth factor (神経成長因子)
NP-40	Nonidet P-40
one-way ANOVA	one-way analysis of variance (一元配置分散分析)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis (ポリアクリルアミドゲル電気泳動)
PBS	phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PCR	polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride (フッ化フェニルメチルスルホニル)
PVDF	polyvinylidene difluoride (ポリフッ化ビニリデン)
SDS	sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
SEM	standard error of mean (標準誤差)
ZNgb	zebrafish neuroglobin (ゼブラフィッシュニューログロビン)

# 1. 序論

## 1.1. ニューログロビン (Ngb) とは

ニューログロビン (Ngb) は、2000 年にヒトとマウスの脳から発見されたグロビン蛋白質である[1] (図 1)。グロビン蛋白質はバクテリア、原生生物、菌類、植物、動物など様々な生物種に存在しているが、ヒトの生体内には赤血球に存在するヘモグロビン (Hb) と筋細胞に存在するミオグロビン (Mb) のみであると考えられていた。Ngb は約 17 kDa、約 150 アミノ酸残基の単量体のグロビン蛋白質であり、主に脊椎動物の中樞神経系[2,3,4,5]や網膜[5,6]などに特異的に発現している。2000 年に初めて報告された際はヒトとマウスのみのものであったが[1]、その後の研究からゼブラフィッシュをはじめとする魚類[7]や鳥類[8]、両生類[9]の脳でも Ngb の発現が確認され、現在では広く脊椎動物一般に発現している蛋白質であると考えられている。ヒト[10,11]やマウス[12]では X 線結晶構造が明らかになっており、また Ngb は Hb や Mb などと同様に 8 本の  $\alpha$ -ヘリックスからなるグロビンフォールドを構成し、ヘムを含み酸素と可逆的に結合することが確認されている[10,13]。しかしながら、そのアミノ酸配列の相同性は、Ngb-Hb 間で 25%未満、Ngb-Mb 間で 21%未満と低く、また分子系統樹によれば、Ngb は Hb や Mb の祖先のグロビンから約 760 万年前に分岐したと推定されており、Hb と Mb とが分岐した約 550 万年前よりも以前に分岐した蛋白質であることが示唆されている[1]。一方で、ヒト Ngb とマウス Ngb の間でのアミノ酸配列の相同性は、約 94%程度と非常に高く、種を超えて非常に高く保存されていることがわかっている[1]。

Ngb はその立体構造の変化に特徴がある[10,14]。グロビン蛋白質のヘムの中心に位置する鉄原子は通常、鉄二価 (ferrous ;  $\text{Fe}^{2+}$ ) 型と鉄三価 (ferric ;  $\text{Fe}^{3+}$ ) 型のいずれかの状態を取る。Hb や Mb の場合、ヘムの片側から近位のヒスチジン (His) が配位し、もう一方からは、鉄二価においては酸素が、鉄三価においては水が配位する。一方で Ngb の場合、鉄二価および鉄三価 Ngb のヘムに対して近位の His と遠位の His が両側から配位する。これを bis-His 型 Ngb と呼ぶ。また、遠位の His が酸素と置き換わると、片側からのみ近位の His が配位し、もう一方から酸素が配位した状態となる。これを mono-His 型 Ngb と呼ぶ。通常酸素環境下においては、Ngb は二価鉄に酸素が配位 (ferrous -O<sub>2</sub> ;  $\text{Fe}^{2+}$  -O<sub>2</sub>) しているが、酸化ストレス環境下では鉄が酸化され

て三価鉄 (ferric ; Fe<sup>3+</sup>) になり、酸素が外れて His が配位する。このヘム近傍構造の変化に伴って立体構造が大きく変化する (図 2)。このような立体構造の変化は一部の他のグロビン蛋白質、例えば 2001 年に発見された脊椎動物の繊維芽細胞や肝星細胞で発現するサイトグロビン [15,16,17]などでもみられるが、立体構造が変化する事の生理的な意義については未だ明らかになっていない点が多い。

## 1.2. Ngb の細胞保護能

Ngb は発見された当初、主に脳や神経細胞に酸素を供給していると考えられていたが、翌年の 2001 年には、低酸素や虚血再灌流に伴う酸化ストレスから神経細胞を保護する機能があることが報告された[18]。低酸素環境下においたマウスの初代培養の神経細胞や、局所的な脳虚血状態にしたマウスの脳内において Ngb の発現量が上昇することや、マウスの神経細胞にアンチセンスオリゴを導入することで酸化ストレスに伴う細胞死が増大し、一方で Ngb の過剰発現により神経細胞の生存率が上昇することが報告された[18]。加えて、Ngb を過剰発現させたマウスにおいては脳の虚血傷害が減少することも報告された[19]。これらの報告により、Ngb が酸化ストレスに応答して発現量を上昇させ、神経細胞死を抑制する細胞保護能に注目が集まり、現在に至るまで Ngb の細胞保護に関する様々な研究がなされるようになった。2006 年には、Ngb を組み込んだトランスジェニックマウスにおいて、Ngb が虚血に伴う酸化ストレスから心筋細胞を保護することが報告され、神経細胞以外の細胞においても細胞死を抑制することが判明した[20]。これまでに Ngb の細胞保護に関する作用機序については様々な仮説が存在している。具体的には、細胞内において活性酸素種の除去を行っているという説[21,22]や、細胞内の NO を除去するという説[21,22]、ミトコンドリアから放出されたシトクロム c と直接相互作用し、アポトーシスを抑制するという説などが存在している[23]。しかしながら、いずれの仮説においても未解明な部分が多く、Ngb の細胞保護に関する作用機序が解明できたとは言い難い。その一方で、当研究室において Ngb がヘテロ三量体 G 蛋白質 G $\alpha_{i0}$  に対するグアニンヌクレオチド解離阻害因子 (GDI) として機能することが明らかになった。



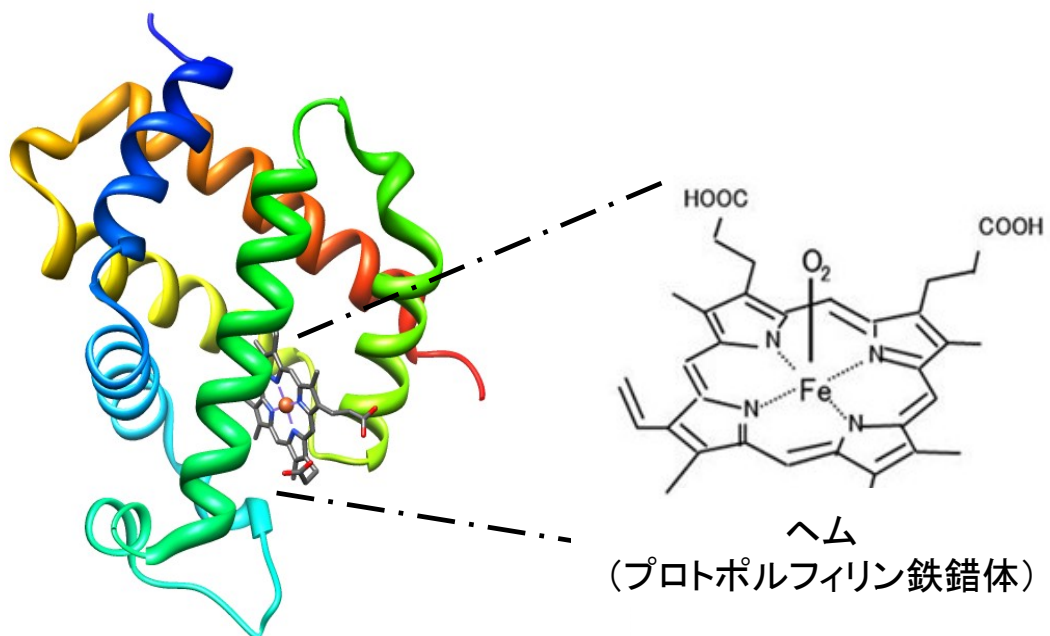
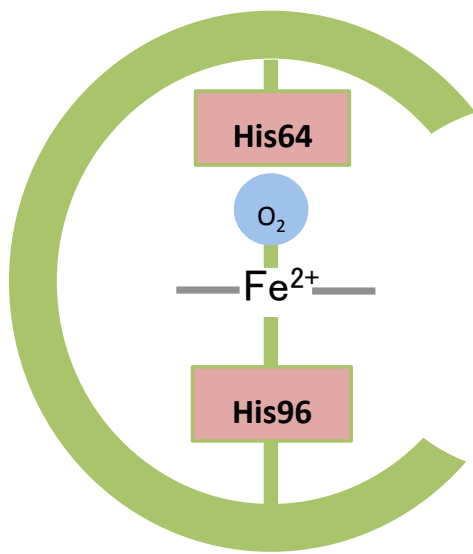


図 1. ヒト Ngb の立体構造

ヒト Ngb の立体構造 (Protein Data Bank code : 4MPM) を示した。ヒト Ngb 内のへムを拡大して右に示した。

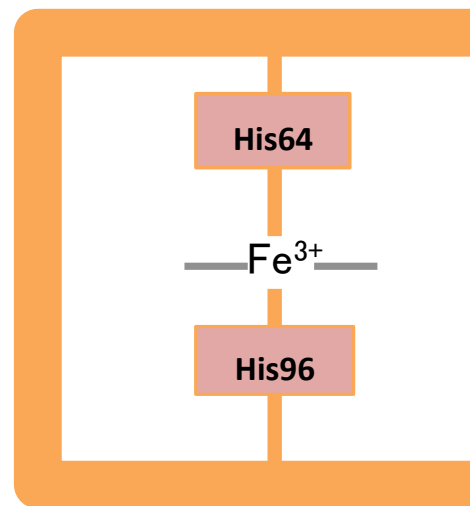
通常酸素環境下



**mono-His型**

(近位のHisと酸素がへむに配位)

酸化ストレス環境下



**bis-His型**

(近位と遠位のHisがへむに配位)

図2. ヒト Ngb の構造変化

ヒト Ngb の構造変化についての模式図を示した。通常酸素環境下（図左側）では、へむに対して近位の His と酸素が配位する（mono-His 型）。酸化ストレス環境下（図右側）になると、鉄が酸化され、酸素が外れ遠位のヒスチジン（His64）がへむに配位する（bis-His 型）。へむ近傍構造の変化に伴い、蛋白質の立体構造が変化する。

### 1.3. ヒト Ngb のグアニンヌクレオチド解離阻害因子 (GDI) としての活性と細胞保護能

当研究室の先行研究により 2003 年に、鉄三価ヒト Ngb が GDP 結合型のヘテロ三量体 G 蛋白質  $G\alpha_{i0}$ [24,25] と相互作用し、グアニンヌクレオチド解離阻害因子 (GDI) として GDP/GTP の交換を阻害することが判明した (図 3) [26]。このことから、通常酸素環境下では酸素を配位しているヒト Ngb が、酸化ストレス環境下では鉄が酸化されて酸素が外れ、bis-His 型 Ngb に構造変化することで、 $G\alpha_{i0}$  と相互作用し、GDI 活性によって細胞保護に関わるシグナル伝達経路を活性化する可能性が考えられた。2008 年には当研究室の先行研究により、GDI 活性のないヒト Ngb 変異体は細胞死を抑制できないことから、細胞保護能にはヒト Ngb の GDI 活性が重要であることが判明した[27]。さらに 2012 年には、ヒト Ngb の GDI 活性が酸化ストレスに伴う cAMP 濃度の減少を抑制することで、細胞死を抑制することが判明した (図 3) [28]。これらのことから、ヒト Ngb は酸化ストレスセンサーとして機能し、 $G\alpha_{i0}$  の下流のシグナル伝達経路を制御することで神経細胞を酸化ストレスから保護する働きがあることが明らかになった。加えて、鉄三価ヒト Ngb は脂質ラフトに局在する膜蛋白質フロチリン[29]と相互作用し[30]、また密度シヨ糖勾配遠心による解析をすると、ヒト Ngb とフロチリンの局在が一致することから[28]、酸化ストレス環境下において、ヒト Ngb がフロチリンと相互作用し、細胞質から脂質ラフトへと移行することが判明した。このようにして、ヒト Ngb は脂質ラフトへと移行し、 $G\alpha_{i1}$  の制御因子として機能することで、細胞死を抑制することが明らかになった。

### 1.4. GDI 活性および細胞保護に重要なアミノ酸残基

現在までにヒト Ngb の GDI 活性に重要なヒト Ngb のアミノ酸残基がいくつか特定されている。先行研究から、ヒト Ngb は GDI 活性をもつ一方で、ゼブラフィッシュ Ngb (魚類 Ngb) は GDI 活性をもたないことが判明した[31]。さらに、ヒト Ngb の極性残基を、魚類 Ngb の極性をもたない残基に置換した変異体では、GDI 活性がなくなることが判明した (図 4) [31]。具体的には、ヒト Ngb の 53 番目のグルタミン酸 (Glu) をグルタミン (Gln) に (E53Q)、97 番目のアルギ

ニン (Arg) を Gln に (R97Q)、118 番目の Glu を Gln に (E118Q) および 151 番目の Glu を アスパラギン (Asn) に (E151N) に部位特異的に置換したヒト Ngb は GDI 活性をもたないことが示された[31]。加えて、これらの変異体は細胞保護能をもたないことも判明した[27]。したがって、ヒト Ngb の GDI 活性および細胞保護には Glu53、Arg97、Glu118、Glu151 が重要であることが判明した。また、これらのアミノ酸残基が保存されている Ngb は、細胞保護能をもつ可能性が高いと考えられ、興味深いことに、これらのアミノ酸残基がすべて保存されているのは北方真獣類と呼ばれる一部の哺乳動物においてのみであり、したがって Ngb の細胞保護能は進化的に比較的新しい段階で獲得されたものであると考えられる (図 4) [32]。

## 1.5. ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ の相互作用

先に述べたように、E53Q ヒト Ngb 変異体、R97Q ヒト Ngb 変異体、E118Q ヒト Ngb 変異体および E151N ヒト Ngb 変異体は GDI 活性をもたないことは判明しているが、これらの変異体が  $G\alpha_{i0}$  と相互作用しないのかどうか、つまり、GDI 活性に重要なアミノ酸残基 (Glu53、Arg97、Glu118 および Glu151) が、 $G\alpha_{i0}$  との相互作用にも重要であるかどうかは依然として不明のままである。しかしながら 2007 年には、ヒト Ngb の Glu53 と  $G\alpha_{i1}$  の Ser44 が相互作用し、ヒト Ngb の Glu60 と  $G\alpha_{i1}$  の Ser206 が相互作用することを示唆する報告がなされた (図 5) [33]。これは、ヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  を混合したものを架橋し、トリプシンにより切断した後、質量分析をすることで、ヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  とが相互作用する領域を特定しようとしたものである。このことから、GDI 活性に重要であるヒト Ngb の Glu53 は  $G\alpha_{i1}$  との相互作用にも重要であり、また新たに、ヒト Ngb の Glu60 が  $G\alpha_{i1}$  との相互作用および GDI 活性に重要であることが示唆された。また、Glu53 と Glu60 は、ヘム近傍構造の変化に伴って構造が変化することが知られている CD-D 領域およびその近傍に位置しており [12]、これらの残基は  $G\alpha_{i1}$  との相互作用に重要な残基である可能性が高いと考えられる。

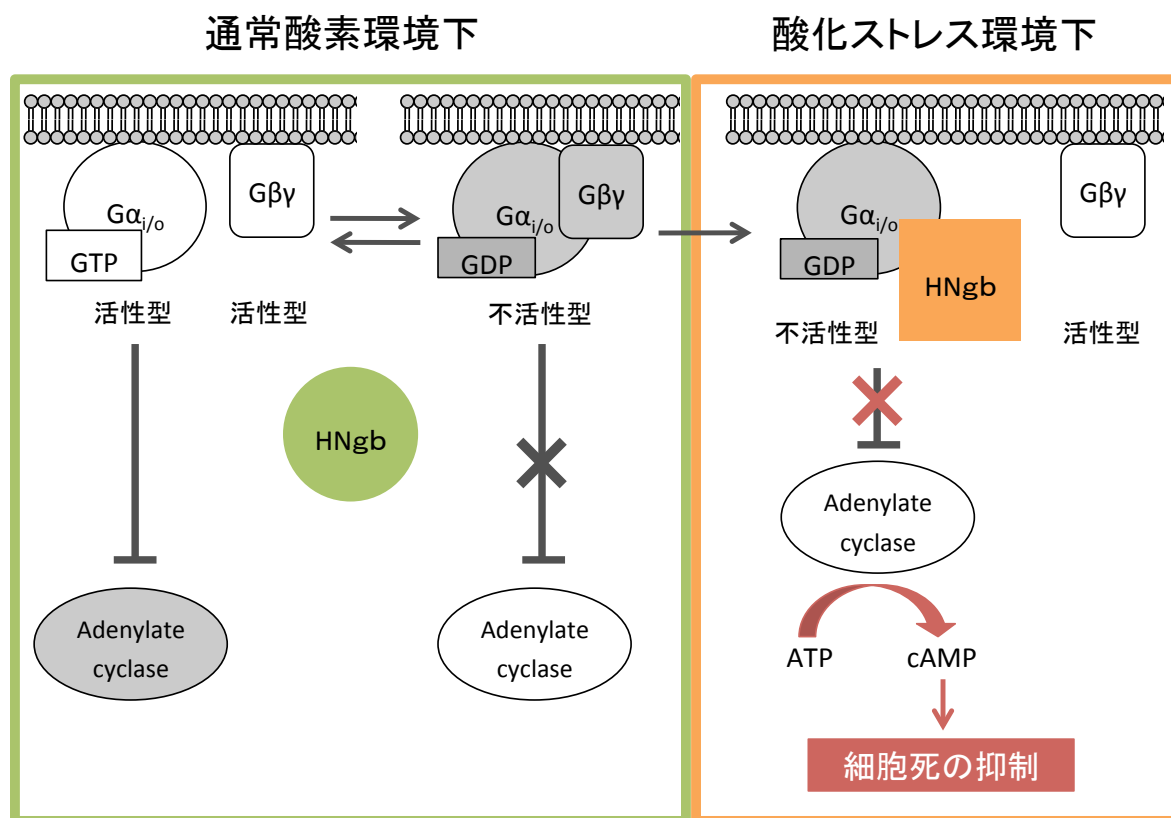


図 3. ヒト Ngb (HNgb) の GDI 活性と細胞保護能

HNgb は、通常酸素環境下ではヘテロ三量体 G 蛋白質  $G\alpha_{i/o}$  と相互作用しないが、酸化ストレス環境下では HNgb の立体構造が変化し、GDP 結合型  $G\alpha_{i/o}$  と相互作用して GDP と GTP の交換を阻害する (GDI 活性) [26]。  $G\alpha_{i/o}$  が不活性型になると、アデニル酸シクラーゼ活性の抑制が解除され、ATP から cAMP が産生される。HNgb は酸化ストレス環境下における cAMP 濃度の低下を抑制することで細胞死を抑制する [28]。

			53	60	97	118	151		
Mammalia	Eutheria	Boreotheria	Human	E	E	R	E	E	
			Monkey	E	E	R	E	E	
			Mouse	E	E	R	E	E	
			Rat	E	E	R	E	E	
			Dolphin	E	E	R	E	D	
			Cow	E	E	R	E	E	
			Pig	E	E	R	E	E	
			Horse	E	E	R	E	E	
	Rabbit	E	E	R	E	E			
			Afrotheria	Elephant	N	E	R	E	E
		Metatheria	Opossum	Q	E	K	E	E	
		Prototheria	Platypus	R	E	K	E	E	
	Aves		Chicken	Q	E	Q	E	L	
	Reptillia		Anole Lizard	Q	E	Q	E	P	
Amphibia		Frog	Q	E	R	E	D		
Osteichtyes		Zebrafish	P	E	Q	Q	N		
		Fugu	Q	E	Q	Q	N		

図 4. ヒト Ngb の GDI 活性に重要なアミノ酸残基 (Glu53、Arg97、Glu118 および Glu151) と  $G\alpha_{11}$  との相互作用部位であることが示唆されたアミノ酸残基 (Glu60) の生物種間の配列比較

Wakasugi et al. (2011) [32]より改変して引用した。図上部の数字はヒト Ngb における残基番号を示す。保存性の高い酸性アミノ酸または塩基性アミノ酸を黄色で示した。

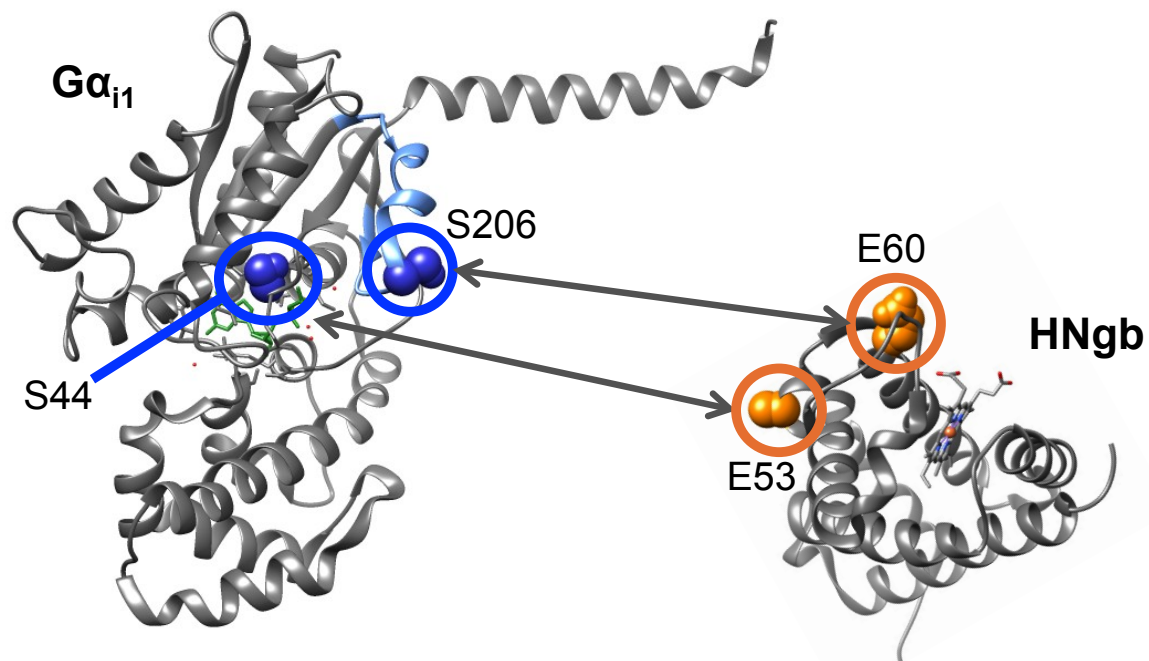


図 5. 質量分析の結果に基づくヒト Ngb (HNgb) と  $G\alpha_{i1}$  の相互作用部位の予測

HNgb の立体構造 (Protein Data Bank code : 4MPM) と  $G\alpha_{i1}$  の立体構造 (Protein Data Bank code : 1KJY) を示した。HNgb と  $G\alpha_{i1}$  を混合したものを架橋し、トリプシンにより切断した後、質量分析した解析から示唆された相互作用に重要な残基を示した[33]。

## 1.6. 魚類 Ngb の細胞膜透過

魚類 Ngb はヒト Ngb と約 50%の相同性をもち、ヒト Ngb と同様にヘム鉄に対して酸素と遠位のヒスチジン残基が競合的に結合する[34]。先に述べたように、ヒト Ngb は GDI 活性をもち、細胞保護能を有するが、魚類 Ngb は GDI 活性をもたず、細胞保護能もないことが判明している[26,27,31]。その一方で当研究室の先行研究から、魚類 Ngb は細胞外から細胞内へ移行する細胞膜透過能をもち、ヒト Ngb はもたないことが明らかになった[35]。さらに、魚類 Ngb 特有の N 末端のリシン残基 (Lys) の極性をなくした変異体、K7A/K9Q 魚類 Ngb 変異体および K21Q/K23Q 魚類 Ngb 変異体には細胞膜透過能がないこともわかった[36]。したがって、魚類 Ngb の細胞膜透過には魚類 Ngb の Lys7、Lys9、Lys21 および Lys23 が重要であることが判明した。これらの残基は魚類 Ngb においてのみ保存されており、細胞膜透過能は魚類の Ngb に共通する機能であると考えられる (図 6)。加えて、細胞表面のグリコサミノグリカンを欠いた細胞に対して、魚類 Ngb は細胞膜透過しなかったことから、魚類 Ngb の細胞膜透過には細胞表面のグリコサミノグリカンが重要であることが判明した[37]。これらのことから、細胞膜透過には、魚類 Ngb 特有の N 末端の正電荷を帯びたリシン残基が、細胞表面の負電荷を帯びたグリコサミノグリカンと相互作用することが重要であると考えられる (図 7)。

## 1.7. 細胞膜を透過し細胞死を抑制するキメラ Ngb

Ngb は 4 つのエクソンから構成されており、蛋白質レベルでは 4 つの構造単位モジュール M1 ~M4 で構成されている。モジュールとは、各アミノ酸残基における  $\alpha$  炭素間の距離が近く、コンパクトにまとまった領域を指し、それぞれのモジュールはエクソンに対応していることが報告されている[38]。当研究室の先行研究において、この Ngb のモジュール構造を利用してキメラ Ngb が作製された (図 8) [39]。これは、細胞膜透過に重要なアミノ酸残基を含む魚類 Ngb の M1 と細胞保護に重要なヒト Ngb の M2~M4 を融合したものである。このキメラ Ngb は GDI 活性を有し、培地に添加しただけで、細胞内に導入され、酸化ストレスに伴う細胞死を抑制することが報告された[35]。



## 1.8. Ngb の神経突起の伸長作用

2013年にヒト Ngb の過剰発現が神経突起の伸長を促進することが初めて報告された[40]。その後、2016年にはマウス Ngb も神経突起の伸長能をもつことが報告された[41]。しかしながら、これまでに Ngb の細胞保護に関する報告は数多く存在しているものの、Ngb が神経突起の伸長に関連する直接の報告はこの2報のみであり、未だその作用機序は明らかになっていない。

## 1.9. 研究目的

このような背景を受けて本研究では、Ngb の細胞保護能に関して、第2章においてはヒト Ngb の Glu60 が GDI 活性や細胞保護能に重要であることを明らかにすることを目的とし、第3章においてはヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  との相互作用に重要なアミノ酸残基を特定することを目的とした。また第4章においては、キメラ Ngb の神経突起の伸長能を検証し、神経突起を伸長させる作用機序を解明することを目的とした。

Mammalia	Eutheria	Boreotheria	Human	1	MER-----PEPELIRQSWRAVSRSPLEHGTVLFAR	30
			Monkey	1	MER-----PEPELIRQSWRAVSRSPLEHGTVLFAR	30
			Mouse	1	MER-----PESELIRQSWRVVSRSPLEHGTVLFAR	30
			Rat	1	MER-----LESELIRQSWRAVSRSPLEHGTVLFAR	30
			Dolphin	1	MER-----PEPELIRQSWREVSRSPLEHGTVLFAR	30
			Cow	1	MER-----PGPELIRQSWRAVSRSPLEHGTVLFAR	30
			Pig	1	MER-----PEPELIRQSWRAVSRSPLEHGTVLFAR	30
			Horse	1	MER-----PEPELIRQSWRVVSRSPLEHGTVLFAR	30
			Rabbit	1	MER-----PEQELIRQSWRAVSRSPLEHGTVLFAR	30
					Afrotheria	Elephant
		Metatheria	Opossum	1	METRRLSGPEQELIRESWQKVNNSNPLQHGMILFTR	35
		Prototheria	Platypus	1	MENGRLSGPEQELIRESWRSVNSNPLEHGMLFTR	35
Aves			Chicken	1	MESGMLSRTQQALIRESWRRVSGSPVQHGVVLFSS	35
Reptillia			Anole Lizard	1	MESGALSSAQQQLIRASWQKVSANPLEHGMVLFSS	35
Amphibia			Frog	1	MEKDQLSGPQKELIRESWQTVSQDQLHHGTVLFSS	35
Osteichthyes			Zebrafish	1	MEK--LSEKDKGLIRDSQESLGK <sup>7</sup> NKVPHGIVLFTR	33
			Godfish	1	MEK--LSVKDKGLIRVSWESLGK <sup>9</sup> NKVPHGIVMFTR	33
			Fugu	1	MEK--LSSKDKELIRGSWDSL <sup>21</sup> GK <sup>23</sup> NKVPHGIVMFSR	33
			Medaka	1	MEK--LSGKDKELIRGSWESLGK <sup>9</sup> NKVPHGIVMFSR	33
			Stickleback	1	MEK--LSGKDKELIRGSWESLGK <sup>9</sup> NKIPHGIVMFSR	33
			Rainbow Trout	1	MEK--LTEKEKELIRVSWESLGK <sup>9</sup> DKVPHGIVMFSR	33
			Icelfish	1	MEK--LSGKDKELIRGSWESLGK <sup>9</sup> NKVPHGIVMFSR	33
			Fugu	1	MEK--LSSKDKELIRGSWDSL <sup>21</sup> GK <sup>23</sup> NKVPHGIVMFSR	33

図 6. 魚類 Ngb の細胞膜透過能に重要なアミノ酸残基(Lys7、Lys9、Lys21 および Lys23)

Wakasugi et al. (2011) [32]より改変して引用した。図中の左右の数字は、それぞれの生物種の Ngb における残基番号を示す。魚類 Ngb の細胞膜透過能に重要なアミノ酸残基(Lys7、Lys9、Lys21 および Lys23) を赤色で示した。

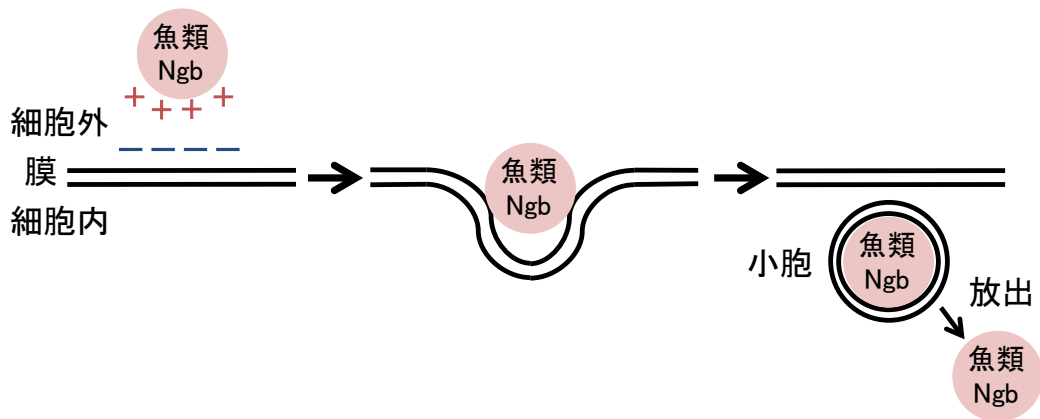


図 7. 魚類 Ngb の細胞膜透過

魚類 Ngb が細胞外から細胞内へ導入される機序を模式図で示した。細胞膜透過には魚類 Ngb の正電荷を帯びたリジン残基が、細胞表面の負電荷を帯びたグリコサミノグリカンと相互作用することが重要である[37]。また、エンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスにより細胞内へと導入されると考えられる[37]。

	N末端				C末端				膜透過能	細胞保護能
魚類Ngb	魚類 M1	魚類 M2	魚類 M3	魚類 M4	+	-				
ヒトNgb	ヒト M1	ヒト M2	ヒト M3	ヒト M4	-	+				
キメラNgb	魚類 M1	ヒト M2	ヒト M3	ヒト M4	+	+				

図 8. 魚類 Ngb、ヒト Ngb およびキメラ Ngb のモジュール構造

魚類 Ngb を桃色、ヒト Ngb を水色で示した。また、細胞外から細胞内へと導入される細胞膜透過能の有無および細胞死を抑制する細胞保護能の有無を示した[35,39]。

## 2. ヒト Ngb の細胞保護能における Glu60 の重要性

### 2.1. 要旨

当研究室の先行研究において、ヒト Ngb が酸化ストレス環境下で、立体構造を変化させ、ヘテロ三量体 G 蛋白質  $G\alpha_{i0}$  と特異的に結合し、GDP 解離阻害因子 (GDI) として働くことを明らかにした。さらに、GDI 活性のない E53Q、R97Q、E118Q および E151N ヒト Ngb 変異体それぞれが、細胞死を抑制できないことも明らかにした。このことから、ヒト Ngb の Glu53、Arg97、Glu118 および Glu151 が GDI 活性および細胞保護能に重要であることを示した。また、ヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  を架橋し、トリプシン処理した後に質量分析を行った解析から、Glu60 がヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  の相互作用に重要な残基であることが示唆された。加えて、Glu60 は酸化ストレス環境において立体構造が大きく変化する CD-D 領域の近傍に位置する残基である。これらのことから本研究では、Ngb の細胞保護能に重要な新たなアミノ酸残基を明らかにするため、ヒト Ngb の Glu60 に着目し、その重要性を検証した。Glu60 の極性をなくした E60Q ヒト Ngb 変異体を作製し実験を行ったところ、E60Q ヒト Ngb 変異体は、野生型ヒト Ngb と同様のヘム近傍構造をとるものの、GDI としての活性がないことが判明した。さらに、分化させた SH-SY5Y 細胞にヒト Ngb を過剰発現し、過酸化水素を加えて酸化ストレスを与えたところ、野生型ヒト Ngb は細胞死を抑制したのに対して、E60Q ヒト Ngb 変異体は細胞死を抑制できないことがわかった。以上のことから Glu60 は、GDI 活性および細胞保護能に重要であることが新たに判明した。また以前から Ngb の細胞保護能は Ngb の活性酸素種の除去能によるという仮説が提唱されていたため、野生型および上記の変異体間の活性酸素種の除去能の解析を行った。その結果、これらのヒト Ngb 間での活性酸素種の除去能には違いがないことが判明した。したがって Ngb の細胞保護能には、Ngb の活性酸素種の除去能ではなく、GDI 活性が重要であることが明らかになった。

## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. 発現ベクターの作製

#### 2.2.1.1. Ngb の発現ベクターと部位特異的変異体の作製

Ngb を大腸菌に発現させるベクターは当研究室において以前作製された pET20b-ヒト Ngb、pET20b-E53Q ヒト Ngb、pET20b-R97Q ヒト Ngb、pET20b-E118Q ヒト Ngb および pET20b-E151N ヒト Ngb[26]を用いた。また哺乳動物細胞に発現させるベクターは、pcDNA3.1-ヒト Ngb[28]を用いた。加えて pET20b-ヒト Ngb あるいは pcDNA3.1-ヒト Ngb を鋳型として部位特異的変異を導入し、pET20b-E60Q ヒト Ngb および pcDNA3.1-E60Q ヒト Ngb を作製した。部位特異的変異の導入は、QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) のプロトコルに従い行った。具体的には、変異を含むプライマーを用意し、pET20b-ヒト Ngb あるいは pcDNA3.1-ヒト Ngb のプラスミド全長を PCR 反応により増幅した。この PCR 産物に *DpnI* を加え、37°C で 1 時間処理し、鋳型プラスミドを選択的に分解した。これを *E.coli* DH5 $\alpha$  株に形質転換して、50  $\mu$ g/mL のアンピシリンを含む TYE 寒天培地上に 37°C で一晩培養後、形質転換体を含むコロニーを得た。変異が導入されたことは、DNA シークエンスの解析 (FASMAC) により確認した。導入した部位特異的変異と使用したプライマーは以下の通りである。

E60Q forward primer : 5'- GGACTGTCTCTCCTCGCCTCAGTTCCTGGACCACATGAGG -3'

E60Q reverse primer : 5'- CCTCATGTGGTCCAGGAACTGAGGCGAGGAGAGACAGTCC -3'

#### 2.2.1.2. G $\alpha_{i1}$ の大腸菌発現ベクターの作製

G $\alpha_{i1}$  の cDNA は Ultimate ORF Clones Human (HORF01, Invitrogen) より入手した。発現プラスミドは N 末端に 6 $\times$ His タグを有する融合蛋白質として発現させる pET151/D-TOPO プラスミドを用いた。pET Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen) のプロトコルに従い、G $\alpha_{i1}$  のプライマーを用意し、目的の配列を PCR 反応により増幅し、発現プラスミドを作製した。使用したプライマーは以下の通りである。

G $\alpha_{i1}$  forward primer : 5'- GCTGTAACAGATGTCATCATAAAAAATAATCTAAAAGATTGTGGTCTCTTTTAA  
-3'

G $\alpha_{11}$  reverse primer : 5'- TTAAAAGAGACCACAATCTTTTAGATTATTTTTATGATGACATCTGTTACAC -3'

## 2.2.2. 発現ベクターの精製

大腸菌に蛋白質を発現させるベクターは *E.coli* DH5 $\alpha$  株に形質転換し、TYE 寒天培地上に 37°C で一晩培養後、形質転換体を含むコロニーを得た後に、QIAprep SPIN Miniprep kit (QIAGEN) 用いて精製した。哺乳動物細胞に蛋白質を発現させるベクターは *E.coli* DH5 $\alpha$  株に形質転換し、TYE 寒天培地上に 37°C で一晩培養後、形質転換体を含むコロニーを得た後に、EndoFree Plasmid Maxi Kit(QIAGEN)を用いて精製した。精製後、フィルター滅菌(Millex-GV、0.22  $\mu$ M、Merck Millipore)をした。

## 2.2.3. 蛋白質の発現および精製

### 2.2.3.1. Ngb の発現および精製

Ngb の発現および精製は、当研究室の先行研究[26,28,31]に従って以下のように行った。はじめに、当研究室において以前作製された pET20b-ヒト Ngb[26]および pET20b-E60Q ヒト Ngb を *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) 株に塩化カルシウム法によって形質転換し、50  $\mu$ g/mL のアンピシリンを含む TYE 寒天培地上に 37°C で一晩培養した。得られた菌体を 50  $\mu$ g/mL のアンピシリンを含む 2 $\times$ TY 培地に移し、37°C で 6 時間振盪培養した後、イソプロピル- $\beta$ -D チオガラクトピラノシド (IPTG) を 0.4 mM になるように添加し、Ngb の発現を 37°C で 4 時間誘導した。菌体は 4,000 rpm、室温で 7 分間遠心し、回収した。

回収した菌体は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、0.4% (v/v) イソプロピルアルコール飽和フッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF)、プロテアーゼインヒビターカクテル (Complete EDTA-free、Roche Diagnostics) で懸濁した。懸濁した菌体は氷上で超音波破碎し、10,000 rpm、4°C で 30 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清は 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で平衡化した DEAE Sephacel (GE Healthcare) を充填したカラムにかけ、20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で洗浄後、20 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl を流して Ngb を溶出した。回収した Ngb は Amicon Ultra (Millipore) を用いて 4,000 rpm、4°C で遠心し濃縮した。濃縮した Ngb は 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl で平衡化した Sephacryl S-200 (GE Healthcare) を充填したカラムにかけて、赤色画分を回収した。さらに、

得られた画分は 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) に置換した後、HiTrap Q HP (GE Healthcare) を用いた FPLC にかけて精製した。精製した Ngb は Amicon Ultra を用いてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に置換した。精製した Ngb は -80°C に保存した。

紫外可視分光光度計 UV-2450 (Shimadzu) を用いて紫外可視吸収スペクトルを測定し、Ngb の濃度を求めた。具体的には精製した Ngb (鉄三価 Ngb) の 413 nm に存在するソーレー帯の吸光度から  $\epsilon_{\text{solet}} = 122 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [33]を用いて計算した。

### 2.2.3.2. $G\alpha_{i1}$ の発現および精製

pET151/D-TOPO- $G\alpha_{i1}$  を *E.coli* BL21 (DE3) 株に形質転換し、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む TYE 寒天培地上に 37°C で一晩培養した。得られた菌体を 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む 2 $\times$ TY 培地に 37°C で 6 時間振盪培養した後、IPTG を 30  $\mu\text{M}$  になるように添加し、 $G\alpha_{i1}$  の発現を 25°C で 18 時間誘導した。菌体は 4,000 rpm、室温で 7 分間遠心し、回収した。

$G\alpha_{i1}$  の精製は、先行研究[44]に従って以下のように行った。回収した菌体は Binding Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、300 mM NaCl、10 mM イミダゾール、20 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、0.4% (v/v) PMSF、プロテアーゼインヒビターカクテル 1 錠) 中に菌体を懸濁した。懸濁した菌体は氷上で超音波破碎し、10,000 rpm、4°C で 30 分間遠心し、上清を回収した。回収した上清は Binding Buffer で平衡化した Ni-NTA His Bind Resin (Novagen) を充填したカラムにかけ、Binding Buffer で洗浄し、さらに Wash Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、300 mM NaCl、20 mM イミダゾール、20 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、0.4% (v/v) PMSF) で洗浄した。Elute Buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、300 mM NaCl、250 mM イミダゾール、20 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、0.4% (v/v) PMSF) を流して、6 $\times$ His タグ付きの目的蛋白質を溶出した。回収した蛋白質は Amicon Ultra を用いて TEV Reaction Buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、150 mM NaCl、50  $\mu\text{M}$  GDP、20 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール、0.4% PMSF (v/v)) に置換した。

N 末端に付加された 6 $\times$ His タグを除くため、TEV turbo protease (MoBiTec) を  $G\alpha_{i1}$  に対して重量比 100 分の 1 量で添加し、4°C で 24 時間処理した。TEV turbo protease は Binding Buffer で平衡化した Ni-NTA His Bind Resin (Novagen) を充填したカラムにかけて除去し、素通り画分を回収することで目的の蛋白質を得た。得られた蛋白質は Amicon Ultra を用いて Store Buffer



(50 mM HEPES (pH 8.0)、1 mM EDTA、2 mM DTT、200  $\mu$ M GDP) に置換し、-80°Cに保存した。

#### 2.2.4. 円二色性 (CD) スペクトル

紫外領域における CD スペクトルは、当研究室の先行研究[39]に従って以下のように行った。分光偏光計 J-805 (Nihon Bunko) を用いて 20°Cで 200 nm から 250 nm の範囲で測定した。試料は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中に希釈し、光路長 1 mm のものを用いて測定を行った。1 残基あたりの平均楕円率 ( $[\theta]$ ; deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>) は、実測値 ( $\theta_{obs}$ ; deg)、蛋白質の濃度および試料のアミノ酸残基数をもとにして、以下の式により求めた。

$$[\theta] = \theta_{obs} / 0.01 \times (\text{蛋白質の濃度}) \times (\text{アミノ酸残基数})$$

また、 $\alpha$ -ヘリックスの含有率 ( $f_H$ ) は、先行研究[45]に基づき以下の式によって計算した。

$$f_H = -([\theta]_{222\text{ nm}} + 2340) / 30300$$

#### 2.2.5. GDP 解離アッセイ

GDP 解離アッセイは、当研究室の先行研究[26]に従って以下のように行った。Buffer A (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、100 mM NaCl、10mM MgSO<sub>4</sub>) 中で 300 nM G $\alpha_{i1}$  と 2  $\mu$ M [<sup>3</sup>H] GDP ([8,5'-<sup>3</sup>H]GDP (20-50 Ci/mmol)、PerkinElmer Life Sciences) を 25°Cで 1.5 時間反応させた。その後、10  $\mu$ M Ngb 存在下または非存在下において 2 mM GTP を添加した。氷冷した Buffer A 1 mL に希釈し反応を停止させ、ニトロセルロースフィルター (0.45  $\mu$ m) (ADVANTEC) に通した。ニトロセルロースフィルターは氷冷 Buffer A を用いて 3 回洗浄し、風乾させ、液体シンチレーションカウンター LS 6500 (Beckman Coulter) により測定した。

#### 2.2.6. 細胞培養

SH-SY5Y 細胞 (CRL-2266) は、10 % (v/v) 胎児ウシ血清 (FBS)、100 unit/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) と F-12 の 1:1 混合培地 (DMEM/F-12、GIBCO) 中で、通常酸素環境 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を維持したインキュベータ (Astec) 内で培養した。培地は 3 日または 4 日に 1 回の頻度で交換し、週に 1 度

の頻度で 1:20 の割合で継代した。培養した細胞は 10  $\mu$ M レチノイン酸 (Sigma-Aldrich) を含む培地で、3 日毎に交換しながら計 6 日間培養して分化させた。細胞の分化は、位相差顕微鏡 (Olympus IX71, Olympus) により形態の変化を観察して確認した。

### 2.2.7. 細胞へのプラスミドの導入

分化させた SH-SY5Y 細胞に対するプラスミドの導入は Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) を用いて行った。具体的には、96 ウェルプレートでは 100  $\mu$ L/ウェルの培地あたり、DNA 0.2  $\mu$ g および OPTI-MEM (GIBCO) 25  $\mu$ L の割合で混合した溶液と、Lipofectamine 2000 0.5  $\mu$ L および OPTI-MEM 25  $\mu$ L の割合で混合した溶液をそれぞれ作製し、室温で 5 分間静置した。さらにこれらの溶液を混合し、室温で 30 分間静置した。混合液の全量を 96 ウェルに加えて、通常酸素環境 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を維持したインキュベータ内で 24 時間培養した。35 mm ディッシュでは 2 mL/ウェルの培地あたり、DNA 4.0  $\mu$ g および OPTI-MEM 250  $\mu$ L の割合で混合した溶液と、Lipofectamine 2000 10  $\mu$ L および OPTI-MEM 250  $\mu$ L の割合で混合した溶液をそれぞれ作製し、96 ウェルプレートの場合と同様の方法で導入した。

### 2.2.8. SH-SY5Y 細胞の過酸化水素処理

分化させた SH-SY5Y 細胞をポリ-D-リシンコートされた 96 ウェルプレート (BioCoat) に  $5.0 \times 10^5$  /mL の密度で播種し、24 時間培養した。その後 2.2.7 の通りに Lipofectamine 2000 を用いてプラスミドを細胞内へ導入した。その後、培地を新たにし、100  $\mu$ M の過酸化水素を加えて 24 時間培養した。

### 2.2.9. ウェスタンブロット解析

細胞は 35 mm ディッシュにおいて培養して回収した後、蛋白質を調製して、ウェスタンブロット解析を行った。具体的には、まず培地を取り除き、細胞を PBS で 2 回洗浄した。Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0、150 mM NaCl、2 mM EDTA、1% NP-40、0.4% (v/v) PMSF、プロテアーゼインヒビターカクテル 1/4 錠) をサンプルあたり 100  $\mu$ L ずつ加えて、懸濁し、スクレーパーにより細胞を掻き取り回収した。その後、氷上において超音波破碎を行い、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心した後、上清のみを回収した。

蛋白質の濃度は Bradford 法により測定した。蛋白質を 98°C で 5 分間熱処理をした後、ポリアクリルアミドゲルを用いて、25 mA の電流の下、電気泳動を行った。セミドライ方式の転写装置 TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD) を用いて蛋白質をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜に転写後、Blocking Buffer (0.1% Tween, 5% (w/v) スキムミルクを加えた 10 mM Tris-HCl pH8.0 溶液) に浸し、一晩 4°C で振盪した。Wash Buffer (0.1 % Tween を添加した 10 mM Tris-HCl pH8.0 溶液) で洗浄した後、一次抗体で 1 時間処理し、再び洗浄した。同様に二次抗体で 1 時間処理し、洗浄した。Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) で処理した後、LAS 4000 mini (GE Healthcare) によって発光を検出した。

使用した抗体については以下の通りである。ヒト Ngb に対するウサギポリクローナル抗体 (1:500, Santa Cruz) に対しては、西洋ワサビペルオキシダーゼが結合した抗ウサギ抗体 (1:5000, GE Healthcare) を二次抗体として用いた。Actin モノクローナル抗体 (1:500, Sigma-Aldrich) に対しては、西洋ワサビペルオキシダーゼが結合した抗マウス抗体 (1:4000, GE Healthcare) を二次抗体として用いた。

### 2.2.10. 細胞生存率の測定

細胞生存率は MTS 法により 96 ウェルプレートにおいて測定した。MTS 反応は、100  $\mu$ L の培地に対し 20  $\mu$ L の Celltiter 96 Aqueous One Solution (Promega) を添加し、通常酸素環境 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を維持したインキュベータ内で 3 時間培養した後、Beckman Coulter DTX880 plate reader (Beckman Coulter) で 490 nm の吸光度を測定した。

### 2.2.11. 活性酸素種の除去能の測定

活性酸素種の除去能は、先行研究[46,47]に従い、フェントン反応により活性酸素種を発生させ、フェナントロリン(1,10-phenanthroline)を用いて比色定量を行うことで測定した。具体的には、100  $\mu$ L の 0.75 mM フェナントロリン、200  $\mu$ L の 5 mM PBS (pH 7.2)、100  $\mu$ L の 0.75 mM FeSO<sub>4</sub>、50  $\mu$ L の超純水 (Milli-Q 水) を混合し、最後に 50  $\mu$ L の 0.01% の過酸化水素を加えて、反応を開始し、37°C で 1 時間静置した。フェナントロリンは二価鉄と錯体を形成し赤色を呈する一方、酸化されると無色になることから、536 nm の吸光を測定し A<sub>f</sub> とした。活性酸素種の除去能を求

める計算式は以下の通りである。

$$\text{scavenging rate} = \left(1 - \frac{A_s - A_x}{A_0 - A_f}\right) \times 100\%$$

過酸化水素の代わりに超純水を加えた時の吸光度を  $A_0$ 、過酸化水素の代わりにサンプルを含む溶液 (100  $\mu\text{g/mL}$ ) を加えた時の吸光度を  $A_s$ 、超純水の代わりにサンプルを含む溶液 (100  $\mu\text{g/mL}$ ) を加えた時の吸光度を  $A_x$  とした。活性酸素除去のポジティブコントロールとして N-アセチルシステイン (NAC、Sigma-Aldrich)、ネガティブコントロールとしてミオグロビン (Mb、Wako) を用いた。

## 2.3. 実験結果

### 2.3.1. E60Q ヒト Ngb 変異体の構造

60 番目のグルタミン酸 (Glu60) が GDI 活性や細胞保護能に重要であることを調べるために、極性をなくした E60Q ヒト Ngb 変異体を作製した。はじめに、E60Q ヒト Ngb 変異体が野生型ヒト Ngb と同様のヘム近傍構造をとるかを調べるために、紫外可視吸収スペクトルを測定した。図 9A には、鉄三価型 (ferric ;  $\text{Fe}^{3+}$ )、鉄二価型 (ferrous ;  $\text{Fe}^{2+}$ ) および鉄二価 CO 結合型 (ferrous-CO ;  $\text{Fe}^{2+}\text{-CO}$ ) ヒト Ngb のそれぞれのスペクトルを示した。鉄二価  $\text{O}_2$  結合型ヒト Ngb は自動酸化されて直ちに鉄三価型ヒト Ngb に変化するため[10]、鉄二価  $\text{O}_2$  結合型ヒト Ngb のモデルとして鉄二価 CO 型ヒト Ngb を用いた。すると、E60Q ヒト Ngb 変異体は、野生型ヒト Ngb と同様のソーレー帯 (Soret band) (鉄三価型 : 413 nm、鉄二価型 : 425 nm、鉄二価 CO 結合型 : 418 nm) および Q 帯のピークが観察された (表 1)。このことから、E60Q ヒト Ngb 変異体は野生型ヒト Ngb と同様のヘム近傍構造をもつことが判明した。

次に E60Q ヒト Ngb 変異体の二次構造を調べるために、E60Q ヒト Ngb 変異体と野生型ヒト Ngb の CD スペクトルを測定した。すると、どちらの蛋白質についても  $\alpha$ -ヘリックスの存在を示す 208、222 nm にピークが観察された (図 9B)。このピークの値から  $\alpha$ -ヘリックス含量を求めたところ、E60Q ヒト Ngb 変異体は、野生型ヒト Ngb と同様の  $\alpha$ -ヘリックス含量を示した (E60Q ヒト Ngb 変異体 : 68.2%、野生型ヒト Ngb : 69.2%) (表 1)。このことから、E60Q ヒト Ngb 変異体は野生型ヒト Ngb と同様の二次構造をもつことが判明した。また、GDI 活性のない他の変異体についても、野生型ヒト Ngb と同様の二次構造をもつことを確認した (表 1)。

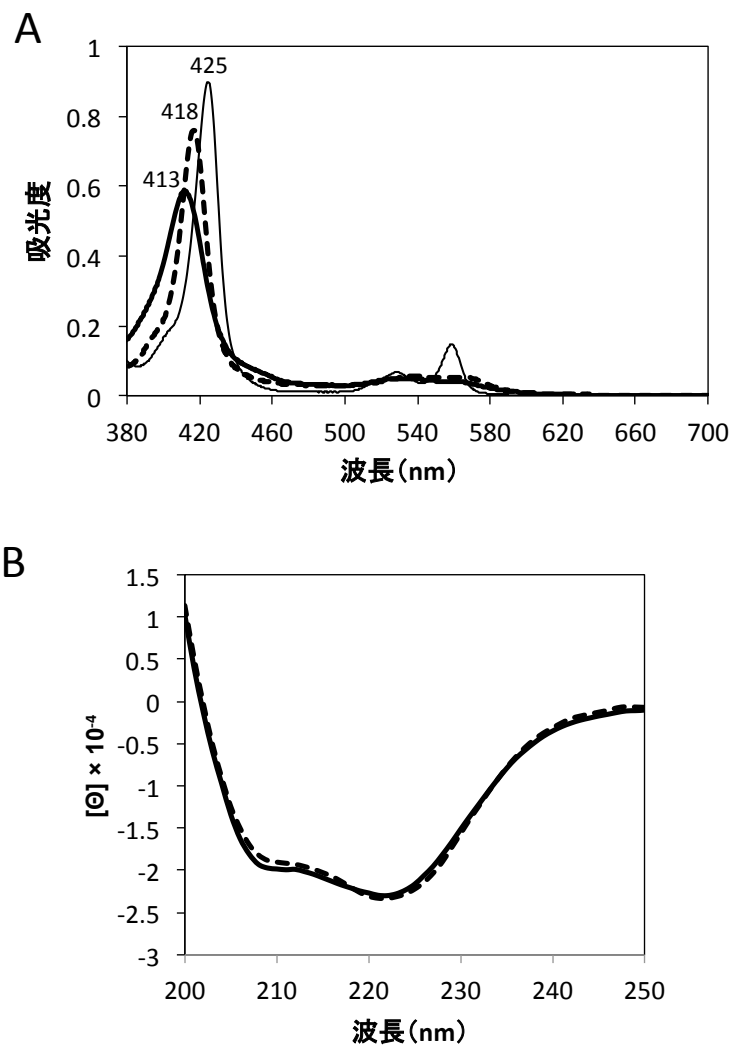


図 9. E60Q ヒト Ngb 変異体の構造解析

(A) E60Q ヒト Ngb 変異体の紫外可視吸収スペクトル 鉄三価 (太線)、鉄二価 (実線)および鉄二価 CO (点線)の E60Q ヒト Ngb 変異体の紫外可視吸収スペクトルを示した。測定は PBS (pH 7.4)、20°Cで行った。(B) 紫外領域における鉄三価の野生型ヒト Ngb (実線)および E60Q ヒト Ngb 変異体 (点線)の CD スペクトルを示した。Ngb の濃度はヘムの含有量をもとに 5  $\mu\text{M}$  に調製した。測定は 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)、20°Cで行った。

表1. 野生型ヒトNgbおよびGDI活性に重要な残基のヒトNgb変異体の構造に関するデータ

	WT	E53Q	E60Q	R97Q	E118Q	E151N
紫外可視吸収スペクトル						
Soret (nm)	413	413	413	413	413	413
visible (nm)	533	532	534	532	532	532
CDスペクトル						
$[\theta]_{222\text{nm}} \times (10^{-4})$ (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )	-2.32	-2.4	-2.29	-2.26	-2.34	-2.36
$\alpha$ -ヘリックス含量 (%)	69.2	71.5	68.2	66.9	69.5	70.2

### 2.3.2. E60Q ヒト Ngb の GDI 活性

ヒト Ngb の Glu60 が、G $\alpha_{i1}$ からの GDP の解離を抑制するのに重要であるかを調べるため、E60Q ヒト Ngb 変異体を用いて GDP 解離アッセイを行った。過剰量の GTP を添加したときを 0 分として、G $\alpha_{i1}$ に対する<sup>3</sup>H]GDP の結合率を経時的に観察したところ、ヒト Ngb の非存在下 (PBS) においては 10 分で 30%程度まで解離が進んだのに対して、野生型ヒト Ngb の存在下においては 60%程度にまで解離が抑制されていた (図 10)。一方で、E60Q ヒト Ngb 変異体は、PBS の場合と同様に GDP の解離が起こっていた (図 10)。このことから、E60Q ヒト Ngb 変異体には GDI 活性がなく、したがって、Glu60 がヒト Ngb の GDI 活性に重要であることが判明した。

### 2.3.3. E60Q ヒト Ngb の細胞保護能

次に、Glu60 がヒト Ngb の細胞保護能に重要であるかを調べるために、分化させた SH-SY5Y 細胞に哺乳動物細胞発現ベクター (pcDNA3.1) を用いて E60Q ヒト Ngb 変異体を導入し、酸化ストレスを与えて細胞の生存について評価した。酸化ストレスとして過酸化水素を用いた。

はじめに、pcDNA3.1-WT ヒト Ngb および pcDNA3.1-E60Q ヒト Ngb によりヒト Ngb が細胞に発現したことをウェスタンブロット解析により確認した (図 11A)。次に、過酸化水素を与えて MTS 法により細胞の生存について評価したところ、野生型ヒト Ngb は細胞死を抑制したのに対して、GDI 活性のない E60Q ヒト Ngb 変異体は細胞死を抑制できないことがわかった (図 11B)。したがって GDI 活性のない E60Q ヒト Ngb 変異体は、酸化ストレスに伴う細胞死を抑制できないことから、ヒト Ngb の GDI 活性がヒト Ngb の細胞保護能に重要であることが確認され[27]、さらにヒト Ngb の細胞保護能には Glu60 が重要であることが判明した。

#### 2.3.4. GDI 活性のないヒト Ngb 変異体の活性酸素種の除去能

ヒト Ngb の細胞保護に関する作用機序として、活性酸素種の除去能によるものであるという仮説が提唱されている[22]。そこで、活性酸素種の除去能がヒト Ngb の細胞保護能の重要であるかを調べるため、細胞保護能のない E53Q、E60Q、R97Q、E118Q および E151N ヒト Ngb 変異体それぞれの活性酸素種の除去能を調べた。するとヒト Ngb は、ミオグロビン (Mb) に比べて高い除去能を示すものの、野生型ヒト Ngb とヒト Ngb 変異体との間には、活性酸素種の除去能に違いがないことがわかった (図 12)。したがって、ヒト Ngb の細胞保護能は、活性酸素種の除去能によるものではないことが判明した。



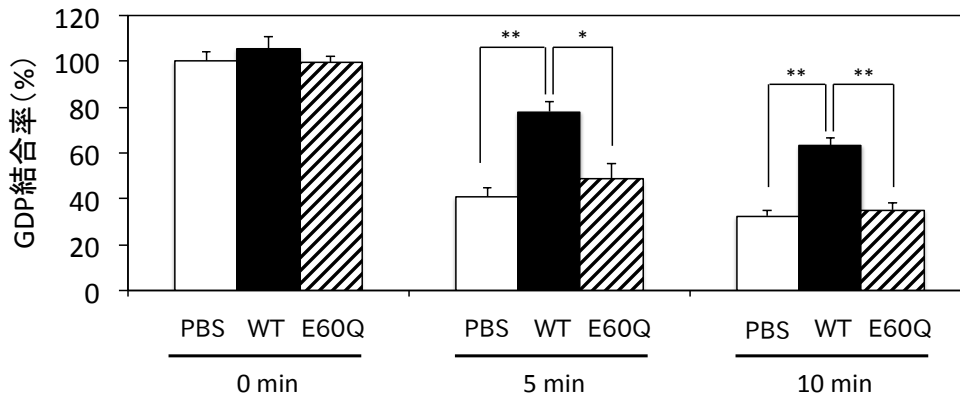


図 10. E60Q ヒト Ngb 変異体の GDI 活性

0.3  $\mu\text{M}$  の $^3\text{H}$ GDP を結合させた  $G\alpha_{11}$  に対して、過剰量 (2 mM) の無標識 GTP を 10  $\mu\text{M}$  Ngb (野生型ヒト Ngb (WT) または E60Q ヒト Ngb (E60Q)) 存在下または非存在下で添加した。0、5、10 分後にそれぞれ分取し、ニトロセルロース膜 (0.45  $\mu\text{m}$ ) に通した。GDP 結合率は、0 分後の Ngb 非存在下 (PBS) における値を 100% として計算した。値は独立した 4 回の実験における平均値であり、エラーバーは SEM を示す。有意差は one-way ANOVA で解析した後、Turkey-Kramer post hoc tests により解析した。(\*;  $p < 0.05$ 、\*\* ;  $p < 0.01$ )

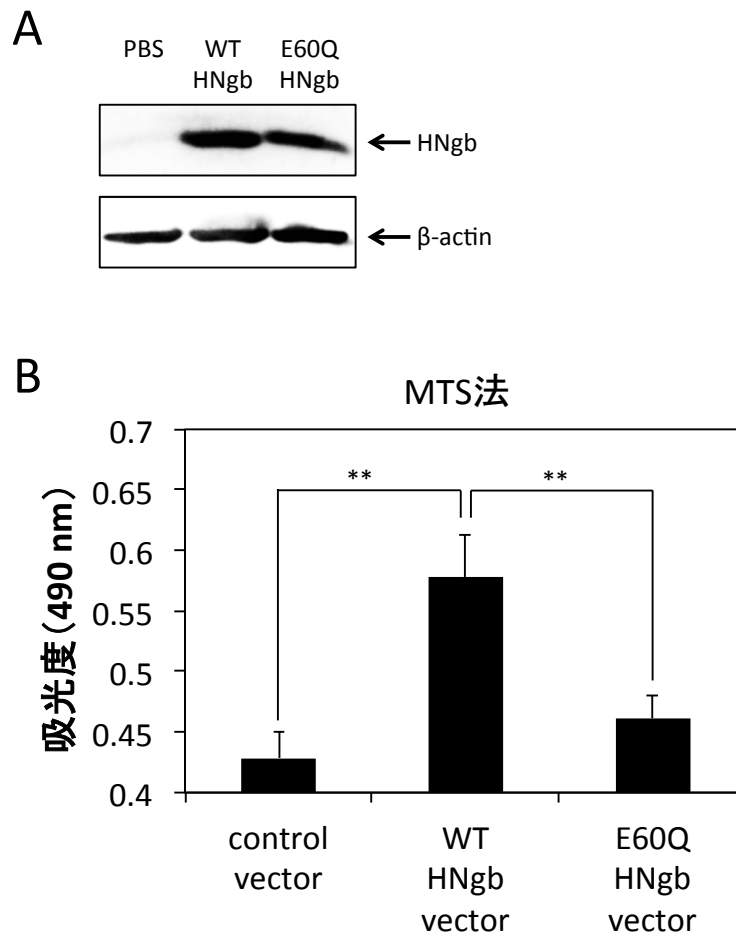


図 11. 野生型ヒト Ngf (HNgb) および E60Q HNgb 変異体の細胞保護能

(A) 空ベクター、野生型 HNgb (WT HNgb) または E60Q HNgb 変異体発現ベクターを分化させた SH-SY5Y に導入し、24 時間培養した。細胞破碎液は SDS-PAGE を行い、HNgb および  $\beta$ -actin の抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。矢印は HNgb および  $\beta$ -actin の想定される位置を示した。(B) 分化させた SH-SY5Y 細胞は HNgb を過剰発現し、過酸化水素を添加して 24 時間培養後した。細胞の生存については MTS 法によって評価した。値は独立した 6 回 (triplicate) の実験における平均値であり、エラーバーは SEM を示す。有意差は one-way ANOVA で解析した後、Turkey-Kramer post hoc tests により解析した。(\*\*;  $p < 0.01$ )

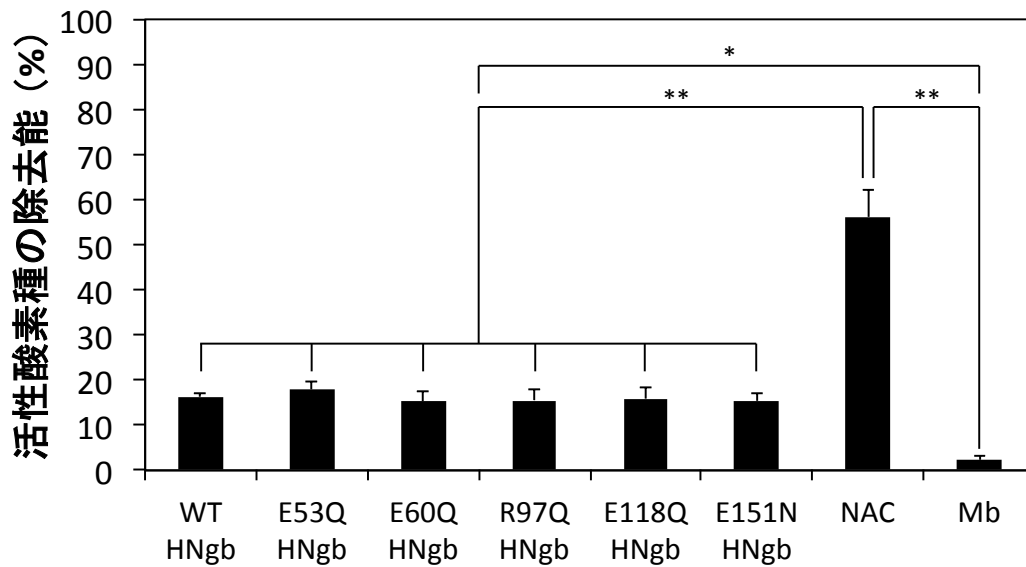


図 12. 野生型 ヒト Ngb (WT HNgb)、E53Q、E60Q、R97Q、E118Q、E151N HNgb 変異体、N-アセチルシステイン (NAC) およびミオグロビン (Mb) の活性酸素種の除去能

過酸化水素を添加して反応を開始させ、37°Cで1時間静置し、536 nmの吸光度を測定した。値は独立した3回の実験における平均値であり、エラーバーはSEMを示す。有意差はone-way ANOVAで解析した後、Turkey-Kramer post hoc testsにより解析した。(\*; p<0.05、\*\* ; p<0.01)

## 2.4. 考察

本研究では、ヒト Ngb の Glu60 が GDI 活性や細胞保護能に重要であること明らかにした。本研究でその重要性を明らかにした Glu60 は、GDP 結合型  $G\alpha$  に結合するいくつかのペプチドにおいても保存されている (図 13)。加えて 61 番目のフェニルアラニンおよび 62 番目のロイシンを含む EFL の保存性も高く (図 13)、Ngb の EFL モチーフが GDP 結合型  $G\alpha$  と相互作用に重要であることが示唆される。

ファージディスプレイ法により発見された KB-752 は 16 アミノ酸残基からなるペプチドであり、GDP 結合型  $G\alpha_{i1}$  と相互作用することが報告された[48]。加えて KB-752 と  $G\alpha_{i1}$  の複合体の X 線構造解析から、KB-752 は  $G\alpha_{i1}$  の switch II 領域 (a.a. 199-219) に相互作用することが明らかになった[48]。 $G\alpha$  の switch 領域とは、GDP 結合時と GTP 結合時に構造が変化し、 $G\beta$   $\gamma$  との相互作用に重要な領域である[49]。また、RNA ディスプレイ法 (In vitro virus 法) により発見された R6A も GDP 結合型  $G\alpha_{i1}$  と相互作用する 17 アミノ酸残基からなるペプチドであり[50]、この相互作用には R6A の 17 アミノ酸残基のうち 9 アミノ酸残基 (R6A-1) が重要であることも明らかになった[50]。その後、R6A-1 と KB752 が競合的に  $G\alpha_{i1}$  と相互作用することから、R6A-1 もまた、 $G\alpha_{i1}$  の switch II 領域と相互作用することが示唆された[51,52]。また、R6A-1 は  $G\alpha_{i1}$  以外の他の  $G\alpha$  ( $G\alpha_o$ 、 $G\alpha_s$ 、 $G\alpha_{q/11}$  および  $G\alpha_{12/13}$ ) とも相互作用することが明らかになった[51,52]。さらに R6A-1 を鋳型として R6A-1-like ペプチドが合成された[53]。一方で、RNA ディスプレイ法により、 $G\alpha_{i1}$  とは相互作用せずに  $G\alpha_s$  と特異的に相互作用する mGSP-1 も発見された[53]。

これらのペプチドの配列とヒト Ngb のアミノ酸配列を比較すると、ヒト Ngb の Glu60 から Leu62 にわたる EFL のモチーフの保存性が高いことが判明した (図 13)。このことから上記のペプチドと同様にヒト Ngb は  $G\alpha_{i1}$  の switch II 領域を介して相互作用することが示唆される。

	G $\alpha_{i1}$ の残基		G $\alpha_{i1}$ G $\alpha_s$	
	S44	S206		
	↕	↕		
	53	60		
HNgb	CRQFSSP <b>E</b> —DCLSSP <b>E</b> FLDHIRKVM		+	-
R6A	MSQTKRLD—DQLYWWEYL-----		+	-
R6A-1	-----DQLYWWEYL-----		+	+
R6A-1-like (8.1.08)	--MKRRLDSDQLSLWEFLDDMDAS--		+	+
mGSP-1	--MAMSDQNKRM TVREFLALPSSL--		-	+
KB-752	-----SRVT <b>W</b> YD <b>E</b> L <b>M</b> DTKSR		+	+

G $\alpha_{i1}$ の残基		
F215	F215	R208
L249	W211	
I253	F215	

図 13. ヒト Ngb (HNgb)、R6A、R6A-1、R6A-1-like (8.1.08)、mGSP-1 および KB-752 ペプチドの配列比較

HNgb と G $\alpha$  と相互作用するペプチドの配列を比較した。HNgb と相同性の高いアミノ酸残基を黄色で示した。HNgb の配列の上に HNgb のアミノ酸番号を示した。表の上部には質量分析から判明した HNgb との相互作用に重要な G $\alpha_{i1}$  の残基を示し、表の下部には X 線結晶構造解析から判明した KB-752 との相互作用に重要な G $\alpha_{i1}$  の残基を示した。G $\alpha_{i1}$  の switch II 領域 (a.a. 199-219) は青色の四角で示した。加えて、特に保存性の高い EFL のモチーフを青い四角で示した。また、G $\alpha_{i1}$  または G $\alpha_s$  と相互作用する蛋白質は+、相互作用しない蛋白質は-として表の右側に示した。

### 3. ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ との相互作用部位の解析

#### 3.1. 要旨

当研究室の先行研究において、ヒト Ngb が酸化ストレス環境下で、立体構造を変化させ、ヘテロ三量体 G 蛋白質  $G\alpha_{i0}$  と特異的に結合し、GDP 解離阻害因子 (GDI) として働くことを明らかにした。さらに、ヒト Ngb の Glu53、Glu60、Arg97、Glu118 および Glu151 が GDI 活性および細胞保護能に重要であることを明らかにした。しかしながら、Ngb が  $G\alpha_{i0}$  と相互作用し、 $G\alpha_{i0}$  に対する GDI として機能することは明らかになっていたが、どのアミノ酸残基を介して相互作用するかは判明していなかった。そこで本研究では、Ngb の制御機構の解明を進めるため、ヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  との相互作用部位の特定を試みた。はじめに、GDI 活性のないヒト Ngb を組み込んだ哺乳動物細胞発現ベクターを用いて、細胞保護能における GDI 活性の重要性を確認した。次に GDI 活性に重要なアミノ酸残基を置換した Ngb 変異体を作製し、 $G\alpha_{i1}$  との相互作用解析を行ったところ、これらの変異体は  $G\alpha_{i1}$  と相互作用ができなくなることが判明した。さらに、 $G\alpha_{i1}$  側の相互作用部位を特定するため、X 線結晶構造解析の結果をもとに Ngb と  $G\alpha_{i1}$  の複合体構造を予測し、相互作用に重要と考えられるアミノ酸残基を推定した。これらの残基を部位特異的に置換した  $G\alpha_{i1}$  変異体を作製し、野生型 Ngb との相互作用解析を行ったところ、ヒト Ngb の Glu53、Glu60、Glu118 と  $G\alpha_{i1}$  の Lys46、Lys70、Arg208、Lys209、Lys210 が相互作用に重要であることが判明した。この結果を受けてヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  の複合体のドッキングモデルを提唱した。

## 3.2. 実験方法

### 3.2.1. 発現ベクターの作製

#### 3.2.1.1. Ngb の発現ベクターと部位特異的変異体の作製

Ngb を大腸菌に発現させるベクターは当研究室において以前作製された pET20b-ヒト Ngb[26] を用いた。また哺乳動物細胞に発現させるベクターは、pcDNA3.1-ヒト Ngb[28] および 2.2.1.1 において作製した pcDNA3.1-E60Q ヒト Ngb を用いた。加えて 2.2.1.1 に記載した通りに pET20b-ヒト Ngb あるいは pcDNA3.1-ヒト Ngb を鋳型として部位特異的変異を導入し、pET20b-R97C ヒト Ngb、pET20b-E151Q ヒト Ngb、pcDNA3.1-E53Q ヒト Ngb、pcDNA3.1-R97Q ヒト Ngb、pcDNA3.1-R97C ヒト Ngb、pcDNA3.1-E118Q ヒト Ngb、pcDNA3.1-E151N ヒト Ngb および pcDNA3.1-E151Q ヒト Ngb を作製した。導入した部位特異的変異と使用したプライマーは以下の通りである。

E53Q forward primer : 5'- GCCGCCAGTTCTCCAGCCCAGAGGACTGTCTCTCCTCGCC -3'

E53Q reverse primer : 5'- GGCGAGGAGAGACAGTCCTGTGGGCTGGAGAACTGGCGGC -3'

E60Q forward primer : 5'- GGACTGTCTCTCCTCGCCTCAGTTCCTGGACCACATGAGG -3'

E60Q reverse primer : 5'- CCTCATGTGGTCCAGGAACTGAGGCGAGGAGAGACAGTCC -3'

R97Q forward primer : 5'- AGCCTGGGCAGGAAGCACCAGGCAGTGGGTGTGAAGCTC -3'

R97Q reverse primer : 5'- GAGCTTCACACCCACTGCCTGGTGCTTCCTGCCCAGGCT -3'

R97C forward primer : 5'- CCTGGGCAGGAAGCACTGTGCAGTGGGTGTGAAGC -3'

R97C reverse primer : 5'- GCTTCACACCCACTGCACAGTGCTTCCTGCCCAGG -3'

E118Q forward primer : 5'- GGTGAGTCTCTGCTCTACATGCTGCAGAAAGTGTCTGCGCCCTGCC -3'

E118Q reverse primer : 5'- GGCAGGGCCCAGACACTTCTGCAGCATGTAGAGCAGAGACTCACC -3'

E151N (pET20b) forward primer : 5'- GGCTGGGATGGCAACTAATCTAGAGGGC -3'

E151N (pET20b) reverse primer : 5'- GCCCTCTAGATTAGTTGCCATCCCAGCC -3'

E151Q (pET20b) forward primer : 5'- GAGTCGAGGCTGGGATGGCCAGTAACTCGAGCACCACCACCA  
CCAC -3'

E151Q (pET20b) reverse primer : 5'- GTGGTGGTGGTGGTGCTCGAGTACTGGCCATCCCAGCCTCG

ACTC -3'

E151Q (pcDNA3.1) forward primer : 5'- GAGTCGAGGCTGGGATGGCCAGTAATCTAGAGGGCCCGTT  
TAAACC -3'

E151Q (pcDNA3.1) reverse primer : 5'- GGTTTAAACGGGCCCTCTAGATTACTGGCCATCCCAGCCTCG  
ACTC -3'

### 3.2.1.2. グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合ヒト Ngb (GST-ヒト Ngb) 発現ベクターの作製

GST-ヒト Ngb を大腸菌に発現させるベクター当研究室において以前作製された pGEX4T-1-ヒト Ngb[28,39]を用いた。これを鋳型として 2.2.1.1 に記載した通りに部位特異的変異を導入し、pGEX4T-1-E53Q ヒト Ngb、pGEX4T-1-E60Q ヒト Ngb、pGEX4T-1-R97Q ヒト Ngb、pGEX4T-1-R97C ヒト Ngb、pGEX4T-1-E118Q ヒト Ngb、pGEX4T-1-E151N ヒト Ngb および pGEX4T-1-E151Q ヒト Ngb を作製した。導入した部位特異的変異と使用した E151N および E151Q 以外のプライマーは 3.2.1.1 の通りであり、E151N および E151Q のプライマーは以下の通りである。

E151N forward primer : 5'- GGCTGGGATGGCAACTAACTCGAGCG -3'

E151N reverse primer : 5'- CGCTCGAGTTAGTTGCCATCCCAGCC -3'

E151Q forward primer : 5'- GAGTCGAGGCTGGGATGGCCAGTAACTCGAGCGCCGCATCG -3'

E151Q reverse primer : 5'- CGATGCGGCCGCTCGAGTTACTGGCCATCCCAGCCTCGACTC -3'

### 3.2.1.3. N 末端を除いた $G\alpha_{i1}$ の大腸菌発現ベクターの作製

2.2.1.2 において作製した pET151 D-TOPO- $G\alpha_{i1}$  を鋳型として短縮型  $G\alpha_{i1}$  (a.a. 26-354) のプライマーを用意し、目的の配列を PCR 反応により増幅した。pET Directional TOPO Expression Kit (Invitrogen) のプロトコルに従い、発現ベクターを作成した。使用したプライマーは以下の通りである。

短縮型  $G\alpha_{i1}$  forward primer : 5'- CACCGACGGCGAGAAGGCGGCGCGAGGTCAAGCTGCTGC -3'



短縮型  $G\alpha_{i1}$  reverse primer : 5'- GCAGCAGCTTGACCTCGCGCGCCGCTTCTCGCCGTCGGTG -3'

### 3.2.1.4. $G\alpha_{i1}$ の部位特異的変異体の作製

3.2.1.3 で作製した短縮型  $G\alpha_{i1}$  を鋳型として、2.2.1.1 に記載した通りに部位特異的変異を導入し、pET151 D-TOPO-R86A  $G\alpha_{i1}$ 、pET151 D-TOPO-K180L  $G\alpha_{i1}$ 、pET151 D-TOPO-R208A/K209A/K210  $G\alpha_{i1}$ 、pET151 D-TOPO-E236Q  $G\alpha_{i1}$ 、pET151 D-TOPO-E238N/E239Q  $G\alpha_{i1}$ 、pET151 D-TOPO-K46A  $G\alpha_{i1}$ 、pET151 D-TOPO-K67A  $G\alpha_{i1}$  および pET151 D-TOPO-K70A  $G\alpha_{i1}$  を作製した。導入した部位特異的変異と使用したプライマーは以下の通りである。

R86A forward primer : 5'- CCAGTCAATTATTGCTATCATTGCGGCTATGGGGAGGTTGAAG -3'

R86A reverse primer : 5'- CTTCAACCTCCCCATAGCCGCAATGATAGCAATAATTGACTGG -3'

K180L forward primer : 5'- GTTCTCAGAACTAGAGTGCTAACTACAGGAATTGTTGAAACC -3'

K180L reverse primer : 5'- GGTTTCAACAATTCCTGTAGTTAGCACTCTAGTTCTGAGAAC -3'

R208A/K209A/K210A forward primer : 5'- GGAGGTCAGAGATCTGAGGCGGCGGCGTGGATTCATTGCTTCGAAGG -3'

R208A/K209A/K210A reverse primer : 5'- CCTTCGAAGCAATGAATCCACGCCGCGCCTCAGATCTCTGACCTCC -3'

E236Q forward primer : 5'- CGACCTGGTTCTAGCTCAAGATGAAGAAATGAACCG -3'

E236Q reverse primer : 5'- CGGTTCAATTTCTTCATCTTGAGCTAGAACCAGGTCG -3'

E238N/E239Q forward primer : 5'- CGACCTGGTTCTAGCTGAAGATAACCAAATGAACCGAATGCATG -3'

E238N/E239Q reverse primer : 5'- CATGCATTCGGTTCATTTGGTTATCTTCAGCTAGAACCAGGTCG -3'

K46A forward primer : 5'- GCTGGTGAATCTGGTGCAAGTACAATTGTGAAGC -3'

K46A reverse primer : 5'- GCTTCACAATTGTACTTGCACCAGATTCACCAGC -3'

K67A forward primer : 5'- GGTTATTCAGAAGAGGAGTGTGCACAATACAAAGCAGTGG -3'

K67A reverse primer : 5'- CCACTGCTTTGTATTGTGCACACTCCTCTTCTGAATAACC -3'

K70A forward primer : 5'- GGAGTGTAACAATACGCAGCAGTGGTCTACAGTAACACC -3'

K70A reverse primer : 5'- GGTGTTACTGTAGACCACTGCTGCGTATTGTTTACTACTCC -3'

### 3.2.2. 発現ベクターの精製

2.2.2 に記載した通りに精製を行った。

### 3.2.3. 蛋白質の発現および精製

#### 3.2.3.1. Ngb の発現および精製

2.2.3.1 に記載した通りに発現および精製を行った。

#### 3.2.3.2. GST および GST-ヒト Ngb の発現および精製

pGEX4T-1 またはヒト Ngb が挿入された pGEX4T-1-ヒト Ngb を *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 (DE3) 株に塩化カルシウム法によって形質転換し、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む TYE 寒天培地上に 37°C で一晩培養した。得られた菌体を 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンを含む 2 $\times$ TY 培地に移し、37°C で 6 時間振盪培養した後、IPTG を 0.4 mM になるように添加し、Ngb の発現を 30°C で 18 時間誘導した。菌体は 4,000 rpm、室温で 7 分間遠心し、回収した。回収した菌体は 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、1 mM DTT、0.4 % (v/v) PMSF、プロテアーゼインヒビターカクテル 1 錠で懸濁した。これを氷上で超音波破碎し、10,000 rpm、4°C で 30 分間遠心して上清を回収した。回収した上清は PBS、1 mM DTT で平衡化したグルタチオンセファロース 4B (GE Healthcare) を充填したカラムにかけ、PBS、1 mM DTT で洗浄後、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM 還元型グルタチオンで溶出した。溶出した GST または GST-ヒト Ngb は Amicon Ultra を用いて PBS に置換して -80°C で保存した。

#### 3.2.3.3. G $\alpha_{i1}$ の発現および精製

2.2.3.2 に記載した通りに発現および精製を行った。

### 3.2.4. 細胞培養

SH-SY5Y 細胞は、10 % (v/v) FBS、100 unit/mL ペニシリンと 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ストレプトマイシンを含む DMEM/F-12 中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> (通常酸素環境下) を維持したインキュベータ

内で培養した。培地は 3 または 4 日に 1 回の頻度で交換し、週に 1 度の頻度で 1:20 の割合で継代した。培養した細胞は 10  $\mu$ M レチノイン酸を含む培地で、3 日毎に交換しながら計 6 日間培養して分化させた。細胞の分化は、位相差顕微鏡 (Olympus IX71、Olympus) により形態の変化を観察して確認した。

### 3.2.5. 細胞へのプラスミドの導入

分化させた SH-SY5Y 細胞に対するプラスミドの導入は Lipofectamine 2000 を用いて行った。具体的には、96 ウェルプレートでは 100  $\mu$ L/ウェルの培地あたり、DNA 0.2  $\mu$ g および OPTI-MEM 25  $\mu$ L の割合で混合した溶液と、Lipofectamine 2000 0.5  $\mu$ L および OPTI-MEM 25  $\mu$ L の割合で混合した溶液をそれぞれ作製し、室温で 5 分間静置した。さらにこれらの溶液を混合し、室温で 30 分間静置した。混合液の全量を 96 ウェルに加えて、通常酸素環境 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を維持したインキュベータ内で 24 時間培養した。

### 3.2.6. SH-SY5Y 細胞の過酸化水素処理

分化させた SH-SY5Y 細胞をポリ-D-リシンコートされた 96 ウェルプレートに  $5.0 \times 10^5$  /mL の密度で播種し、24 時間培養した。その後 3.2.5 の通りに Lipofectamine 2000 を用いてプラスミドを細胞内へ導入した。その後、培地を新たにし 100  $\mu$ M の過酸化水素を加えて 24 時間培養した。

### 3.2.7. 細胞生存率の測定

細胞生存率は MTS 法により、96 ウェルプレートにおいて確認した。MTS 反応は、100  $\mu$ L の培地に対し 20  $\mu$ L の Celltiter 96 Aqueous One Solution を添加し、通常酸素環境 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を維持したインキュベータ内で 3 時間培養した後、Beckman Coulter DTX880 plate reader で 490 nm の吸光度を測定した。

### 3.2.8. G $\alpha_{i1}$ を用いた GST プルダウンアッセイ

グルタチオンセファロース 4 B 懸濁液 50  $\mu$ L を Buffer A (10 mM HEPES (pH 7.4)、150 mM NaCl、10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 % Tween-20) で懸濁し、15,000 rpm で 10 秒間遠心して上清を除い

た。Buffer A に希釈した GST 融合蛋白質 12.5  $\mu\text{g}$  をグルタチオンセファロース 4 B に添加し、4  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間攪拌した。Buffer A で洗浄したグルタチオンセファロース 4 B に 10  $\mu\text{M}$  GDP 含む Buffer A に希釈した 50 nM 短縮型  $\text{G}\alpha_{i1}$  を添加し、さらに 4 $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間攪拌した。Buffer A で洗浄した後、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM 還元型グルタチオンを加えて溶出した。

### 3.2.9. CD スペクトル

2.2.4 に記載した通りに測定を行った。

### 3.2.10. GDP 解離アッセイ

2.2.5 に記載した通りに測定を行った。

### 3.2.11. ウェスタンブロット解析

2.2.9 に記載した通りにウェスタンブロット解析を行った。使用した抗体については以下の通りである。ヒト Ngb に対するウサギポリクローナル抗体 (1:500、Santa Cruz) に対しては、西洋ワサビペルオキシダーゼが結合した抗ウサギ抗体 (1:5000、GE Healthcare) を二次抗体として用いた。Actin モノクローナル抗体 (1:500、Sigma-Aldrich)、 $\text{G}\alpha_i$  マウスモノクローナル抗体 (1:1000、Cell Signaling) に対しては、西洋ワサビペルオキシダーゼが結合した抗マウス抗体 (1:4000、GE Healthcare) を二次抗体として用いた。

### 3.3. 実験結果

#### 3.3.1. GDI 活性のないヒト Ngb 変異体の細胞保護能と $G\alpha_{i1}$ との相互作用

##### 3.3.1.1. ヒト Ngb の発現確認と細胞保護能の検証

当研究室の先行研究において、蛋白質導入試薬 Chariot を用いて GDI 活性のない E53Q、R97Q、E118Q および E151N ヒト Ngb 変異体それぞれが細胞保護能をもたないことを明らかにした [27]。本研究では、はじめに哺乳動物細胞発現ベクター (pcDNA3.1) を用いたときに同様の結果が得られるかを確認するため、分化させた SH-SY5Y 細胞に野生型ヒト Ngb または GDI 活性のないヒト Ngb 変異体を過剰発現し、過酸化水素を与えて細胞の生存について評価した。ウェスタンブロット解析によりヒト Ngb の発現を確認し (図 14A)、MTS 法により細胞の生存について評価したところ、Chariot を用いた結果と同様に、野生型ヒト Ngb は細胞死を抑制できるが、GDI 活性のないヒト Ngb 変異体は細胞死を抑制しなかった (図 14B)。しがたって、過剰発現系を用いて GDI 活性がヒト Ngb の細胞保護能に重要であることを確認した。

##### 3.3.1.2. ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ の相互作用の検証

次に、GDI 活性に重要な Glu53、Glu60、Arg97、Glu118 および Glu151 のそれぞれが  $G\alpha_{i1}$  と相互作用に重要であることを検証するために、GST プルダウンアッセイによりヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  の相互作用を調べた。当研究室の先行研究において、表面プラズモン共鳴を用いて鉄三価型ヒト Ngb が GDP 結合型  $G\alpha_{i1}$  と相互作用することを発見し [26]、さらに GST を融合した鉄三価型ヒト Ngb (GST-ヒト Ngb) もまた、GDP 結合型  $G\alpha_{i1}$  と相互作用することを明らかにした [28]。このことから GST タグがヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  の相互作用に影響を及ぼさないということが判明したため、本研究でも GST-ヒト Ngb を作製して相互作用の検証を行った。

また、 $G\alpha_{i1}$  の N 末端は  $\alpha$ -ヘリックスで、外に突出したような構造をとり、 $G\alpha_{i1}$  単独の結晶においては結晶化できないことや [54]、 $G\alpha_{i1}$  の複合体の X 線結晶構造解析においては N 末端の 25 アミノ酸残基を欠失させて結晶化していることが報告されている [55]。これらの先行研究を参考にし、本研究では N 末端の 25 アミノ酸残基を欠いた  $G\alpha_{i1}$  (短縮型  $G\alpha_{i1}$ ) を作製して相互作用の検証を行った。

GST プルダウンアッセイにより GST-ヒト Ngb と GDP 結合型の  $G\alpha_{i1}$  との相互作用を検証し

たところ、野生型ヒト Ngb は相互作用が確認されたのに対して、GDI 活性のないヒト Ngb 変異体はすべて相互作用しなかった(図 15)。このことから、GST を融合した鉄三価型ヒト Ngb (GST-ヒト Ngb) が GDP 結合型  $G\alpha_{i1}$  と相互作用することを確認した。加えて Glu53、Glu60、Arg97、Glu118 および Glu151 のそれぞれが  $G\alpha_{i1}$  との相互作用に重要であることが判明した。

### 3.3.2. ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ のドッキングモデル 1 に基づく $G\alpha_{i1}$ 側の重要残基の特定

3.3.1 において、 $G\alpha_{i1}$  との相互作用に重要なヒト Ngb のアミノ酸残基を特定した。これを受けて次に  $G\alpha_{i1}$  側の重要なアミノ酸残基の特定を行った。 $G\alpha_{i1}$  の重要なアミノ酸残基を特定するにあたり、はじめに図 16 に示すドッキングモデルを作製した。このドッキングモデルは 1)  $G\alpha_{i1}$  との相互作用にはヒト Ngb の Glu53、Glu60、Arg97、Glu118 および Glu151 が重要であること、2) 架橋したヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  を質量分析した実験から、ヒト Ngb の Glu53 と  $G\alpha_{i1}$  の Ser44、および Glu60 と Ser206 が近接した位置に存在すること [33]、の 2 点を考慮して作製した。ヒト Ngb の重要なアミノ酸残基に近接する  $G\alpha_{i1}$  側の極性残基を青色で示した。

このドッキングモデルが適切であるかを検証するために、青色で示した極性残基の極性をなくした変異体 (R86A  $G\alpha_{i1}$  変異体、K180L  $G\alpha_{i1}$  変異体、R208A/K209A/K210A  $G\alpha_{i1}$  三重変異体 (triple mutant)、E236Q  $G\alpha_{i1}$  変異体および E238N/E239Q  $G\alpha_{i1}$  二重変異体 (double mutant)) を作製し、GST プルダウンアッセイにより GST-ヒト Ngb との相互作用を検証した。K180L、E238N および E239Q の変異は、ヒト Ngb と相互作用しない  $G\alpha_s$  のもつアミノ酸残基に置換したものである。すると、R208A/K209A/K210A  $G\alpha_{i1}$  三重変異体はヒト Ngb と相互作用しない一方で、R86A  $G\alpha_{i1}$  変異体、K180L  $G\alpha_{i1}$  変異体、E236Q  $G\alpha_{i1}$  変異体および E238N/E239Q  $G\alpha_{i1}$  二重変異体はヒト Ngb と相互作用した (図 17AB)。このことから、ヒト Ngb との相互作用には、 $G\alpha_{i1}$  の Arg86、Lys180、Glu236、Glu238 および Glu239 は重要ではなく、Arg208、Lys209 および Lys210 が重要であることが判明した。加えて、図 16 に示すドッキングモデルは適切ではないことがわかった。

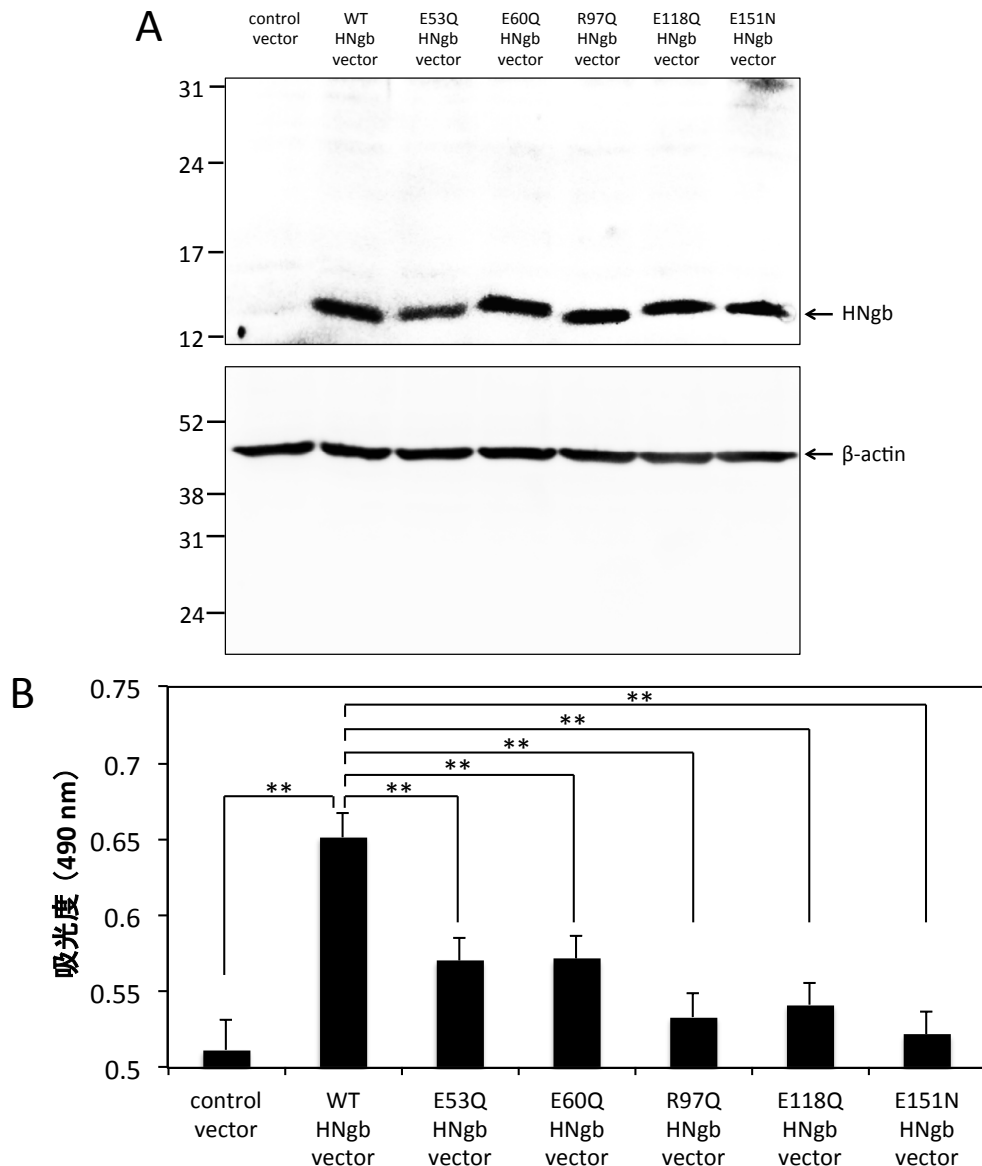


図 14. 野生型ヒト Ngb (HNgb)、E53Q、E60Q、R97Q、E118Q および E151N HNgb 変異体の細胞保護能

(A) 空ベクター、野生型 HNgb (WT HNgb) または GDI 活性のない HNgb 変異体発現ベクターを分化させた SH-SY5Y に導入し、24 時間培養した。細胞破碎液は SDS-PAGE を行い、HNgb および  $\beta$ -actin の抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。矢印は HNgb および  $\beta$ -actin の想定される位置を示し、分子量は kDa として左側に示した。(B) 分化させた SH-SY5Y 細胞は HNgb を過剰発現し、過酸化水素を添加して 24 時間培養した。細胞の生存については MTS 法によって評価した。値は独立した 6 回 (triplicate) の実験における平均値であり、エラーバーは SEM を示す。有意差は one-way ANOVA で解析した後、Turkey-Kramer post hoc tests により解析した。(\*\*;  $p < 0.01$ )

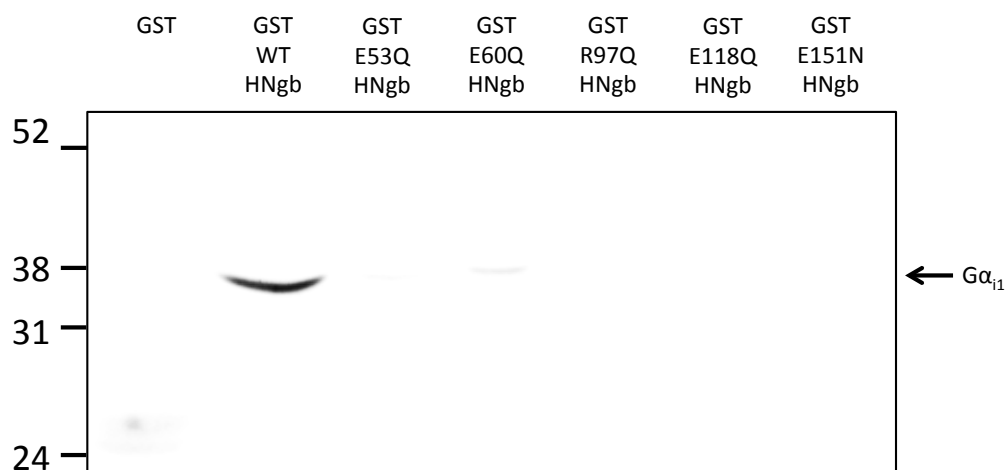


図 15. 野生型ヒト Ngb (HNgb)、E53Q、E60Q、R97Q、E118Q および E151Q HNgb 変異体の  $G\alpha_{i1}$  との GST プルダウンアッセイ

GST、GST 融合野生型鉄三価 HNgb (GST WT HNgb) または GDI 活性のない GST 融合鉄三価 HNgb 変異体を GDP 結合型  $G\alpha_{i1}$  と混合し、グルタチオンセファロース 4B を添加して攪拌、洗浄した後、10 mM 還元型グルタチオンを加えて溶出した。溶出液は SDS-PAGE を行い、 $G\alpha_{i1}$  の抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。矢印は  $G\alpha_{i1}$  の想定される位置を示し、分子量は kDa として左側に示した。



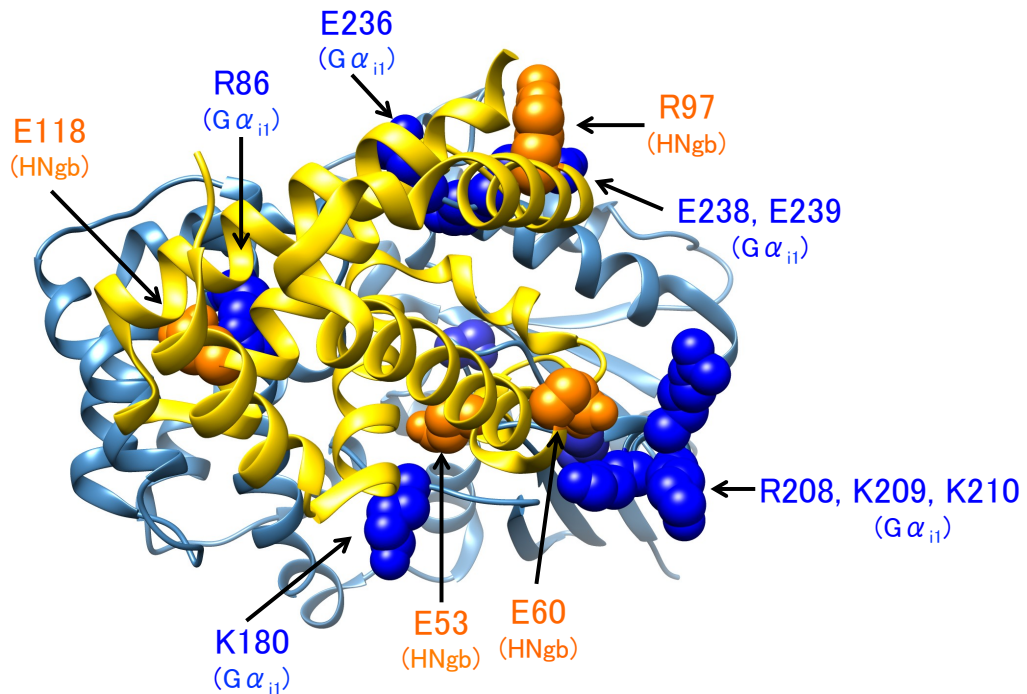


図 16. ヒト NgB (HNgb) と Gα<sub>i1</sub> の複合体のドッキングモデル 1

HNgb の立体構造を黄色で示し (Protein Data Bank code : 4MPM)、細胞保護能に重要な残基を橙色で示した。Gα<sub>i1</sub> の立体構造を水色で示し (Protein Data Bank code : 1KJY)、HNgb との相互作用に重要であると考えられる残基を青色で示した。

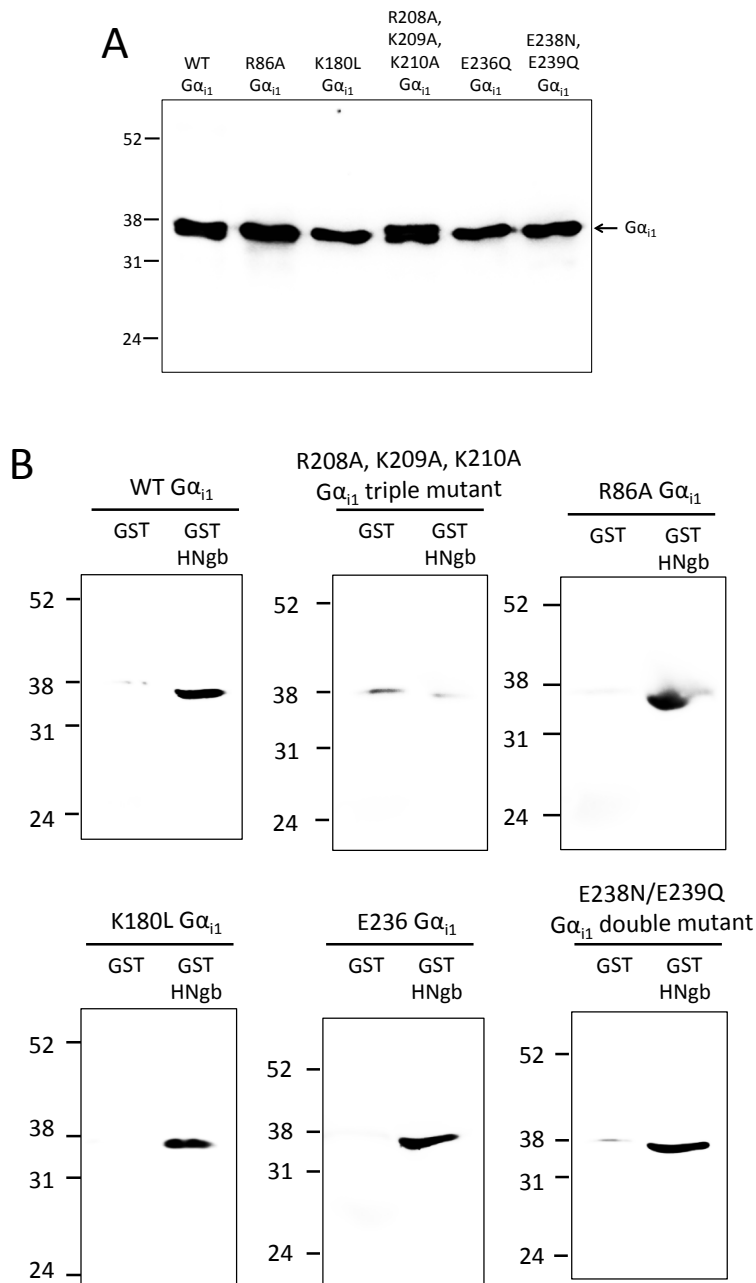


図 17. R86A、K180L、R208A/K209A/K210A、E236Q または E238N/E239Q  $G\alpha_{i1}$  変異体の野生型ヒト Ngb (HNgb) との GST プルダウンアッセイ

GST または GST 融合野生型鉄三価 HNgb (GST HNgb) を GDP 結合型の各  $G\alpha_{i1}$  変異体と混合し、グルタチオンセファロース 4B を添加して攪拌、洗浄した後、10 mM 還元型グルタチオンを加えて溶出した。用いた  $G\alpha_{i1}$  (A) および溶出液 (B) は SDS-PAGE を行い、 $G\alpha_{i1}$  の抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。矢印は  $G\alpha_{i1}$  の想定される位置を示し、分子量は kDa として左側に示した。

### 3.3.3. 様々な生物種における Ngb の配列比較に基づく重要残基の絞り込み

#### 3.3.3.1. 様々な生物種における Ngb の配列比較

当研究室の先行研究により GDI 活性に重要なヒト Ngb の Glu53、Arg97、Glu118 および Glu151 は、北方真獣類と呼ばれる哺乳動物においてのみ、そのすべてが保存されていることが明らかになった[32]。これは GDI 活性をもつヒトの Ngb の極性残基を、GDI 活性をもたない魚類の Ngb の極性をもたない残基に置換した変異体を用いた実験に基づくものである。このことから北方真獣類のもつ Ngb が GDI 活性や細胞保護能をもつことが示唆された。

本研究では、新たなドッキングモデルを作成するために、以前に比べてより広範な生物種の Ngb の配列を用いて配列比較を行い、Ngb 側の重要なアミノ酸残基について再考した (図 18)。すると同じ北方真獣類の中でも、ヒト Ngb の Arg97 に対応する残基がオオコウモリ (Megabat) の Ngb ではシステイン (Cys) になっており、ヒト Ngb の Glu151 に対応する残基がガラゴ (Bush baby) ではグルタミン (Gln) になっていた。そこでこれらの残基が重要であるかを検証するために、R97C ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体を作製し、それぞれの構造、細胞保護能、 $G\alpha_{i1}$  との相互作用および GDI 活性について検証した。

		53	60	97	118	151
Mammalia (Boreotheria)	Human	E	E	R	E	E
	Bush baby	E	E	R	E	Q
	Mouse	E	E	R	E	E
	Megabat	E	E	C	E	E
Osteichtyes	Zebrafish	P	E	Q	Q	N
	Fugu	Q	E	Q	Q	N

図 18. Ngb の GDI 活性に重要なアミノ酸残基の生物種間の配列比較

ヒトの Ngb の GDI 活性に重要なアミノ酸残基に対応するガラゴ、マウス、オオコウモリ、ゼブラフィッシュおよびフグの Ngb の配列を示した。図上部の数字はヒト Ngb における残基番号を示す。ヒト Ngb と相同なアミノ酸残基を黄色で示した。

表2. 野生型ヒトNgbおよびGDI活性に重要な残基のヒトNgb変異体の構造に関するデータ

	WT	WT	E53Q	E60Q	R97Q	R97C	E118Q	E151N	E151Q
紫外可視吸収スペクトル									
Soret (nm)	413	413	413	413	413	413	413	413	413
CDスペクトル									
$[\theta]_{222\text{nm}} \times (10^{-4})$ (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )	-2.32	-2.4	-2.4	-2.29	-2.26	-2.32	-2.34	-2.36	-2.46
$\alpha$ -ヘリックス含量 (%)	68.9	71.4	71.5	67.9	66.9	68.9	69.5	70.2	73.4
references	表1	今回測定	表1	表1	表1	今回測定	表1	表1	今回測定

### 3.3.3.2. R97C ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体の構造

はじめに、R97C ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体が野生型ヒト Ngb と同様のヘム近傍構造をとるかを調べるために、鉄三価型ヒト Ngb の紫外可視吸収スペクトルを測定した (図 19A)。すると、これらの変異体は、野生型ヒト Ngb と同様の吸収スペクトルを示し、ソーレー帯 (soret) のピークも野生型ヒト Ngb と同様の 413 nm にピークが観察された (表 2)。このことから、R97C ヒト Ngb および E151Q ヒト Ngb 変異体は野生型ヒト Ngb と同様のヘム近傍構造をもつことが判明した。

次に、これらの変異体の二次構造を調べるために、CD スペクトルを測定した。すると、どちらの蛋白質についても  $\alpha$ -ヘリックスの存在を示す 208 nm および 222 nm にピークが観察され、野生型と同様の CD スペクトルを示した (図 19B)。また、このピークの値から  $\alpha$ -ヘリックス含量を求めたところ、野生型ヒト Ngb と同様の  $\alpha$ -ヘリックス含量を示した (R97C ヒト Ngb 変異体 : 68.9%、E151Q ヒト Ngb : 73.4%、野生型ヒト Ngb : 71.4%) (表 2)。このことから、R97C ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体は野生型ヒト Ngb と同様の二次構造をもつことが判明した。

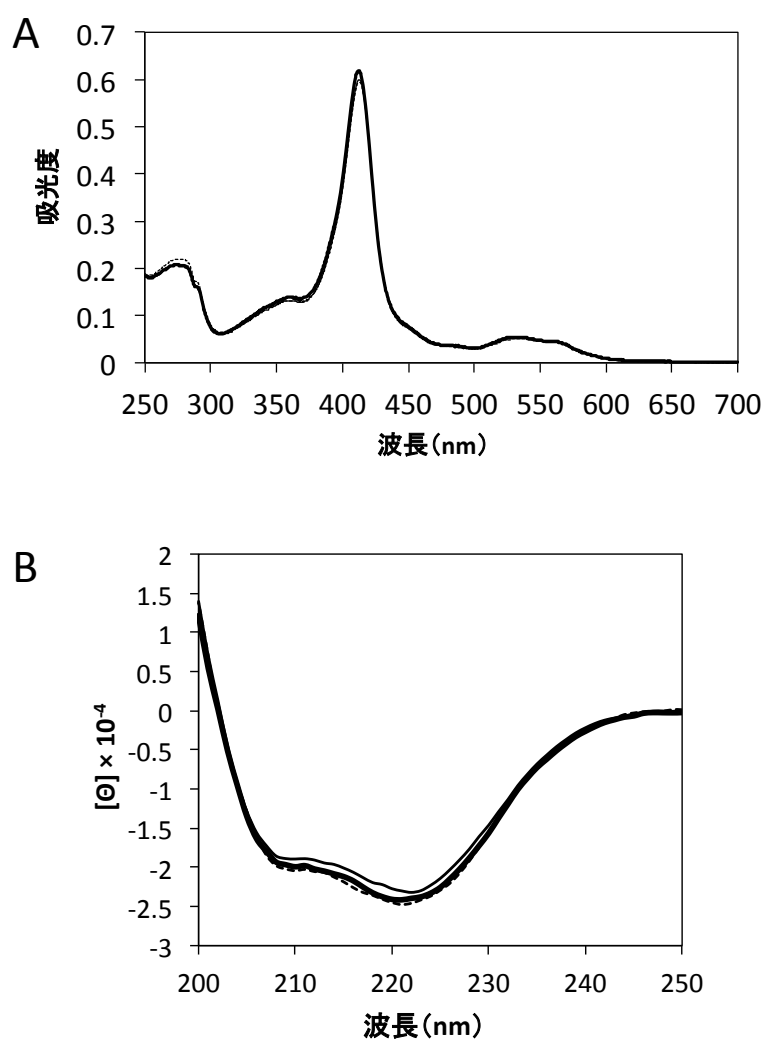


図 19. R97C ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体の構造解析

(A) 野生型ヒト Ngb、R97C ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体の紫外可視吸収スペクトルを示した。鉄三価型の野生型ヒト Ngb (太線)、R97C ヒト Ngb 変異体 (実線)および E151Q ヒト Ngb 変異体(点線)の紫外可視吸収スペクトルを示した。測定は PBS (pH 7.4)、20°Cで行った。(B) 紫外領域における鉄三価の野生型ヒト Ngb (太線)、R97C ヒト Ngb 変異体 (実線)および E151Q ヒト Ngb 変異体(点線)の CD スペクトルを示した。Ngb の濃度はヘムの含有量をもとに 5  $\mu$ M に調製した。測定は 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4)、20°Cで行った。

### 3.3.3.3. R97C ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体は、野生型ヒト Ngb と同様に細胞保護能をもつ

次に、Arg97 および Glu151 がヒト Ngb の細胞保護能に重要であるかを調べるために、分化させた SH-SY5Y 細胞に哺乳動物細胞発現ベクター (pcDNA3.1) を用いて R97C ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体を導入し、過酸化水素を与えて細胞の生存について評価した。はじめにヒト Ngb の発現をウェスタンブロット解析により確認した (図 20A)。次に、過酸化水素を与えて MTS 法により細胞の生存について評価したところ、これらの変異体は野生型ヒト Ngb と同様に細胞死を抑制した (図 20B)。このことから、Arg97 および Glu151 はヒト Ngb の細胞保護能に重要ではないことが判明した。

さらに、GST プルダウンアッセイにより GST-R97C ヒト Ngb および GST-E151Q ヒト Ngb と GDP 結合型の  $G\alpha_{i1}$  との相互作用を検証したところ、これらの変異体は野生型ヒト Ngb と同様に  $G\alpha_{i1}$  と相互作用した (図 21)。このことから、Arg97 および Glu151 は  $G\alpha_{i1}$  との相互作用に重要でないことが判明した。3.3.1.2 (図 15) では、R97Q ヒト Ngb 変異体および E151N ヒト Ngb 変異体は  $G\alpha_{i1}$  と相互作用しなかったが、これは 97 番目の Arg を Gln に置換した変異や 151 番目の Glu を Asn に置換した変異、それ自体によって蛋白質の立体構造に摂動が生じ、結果として  $G\alpha_{i1}$  と相互作用できなくなっていたのではないかと考えられる。

また、これらの残基が GDI 活性に重要であるかを調べるため、R97C ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体を用いて GDP 解離アッセイを行った。過剰量の GTP を添加したときを 0 分として、 $G\alpha_{i1}$  に対する  $[^3H]GDP$  の結合率を経時的に観察したところ、これらの変異体は野生型ヒト Ngb と同様に GDP の解離を抑制した (図 22)。したがって、これらの変異体は野生型ヒト Ngb と同様に GDI 活性をもつことから、Arg97 および Glu151 はヒト Ngb の GDI 活性に重要ではないことが判明した。

これらの結果から Arg97 および Glu151 は Ngb の細胞保護能、 $G\alpha_{i1}$  との相互作用および GDI 活性に重要な残基ではないことが明らかになった。

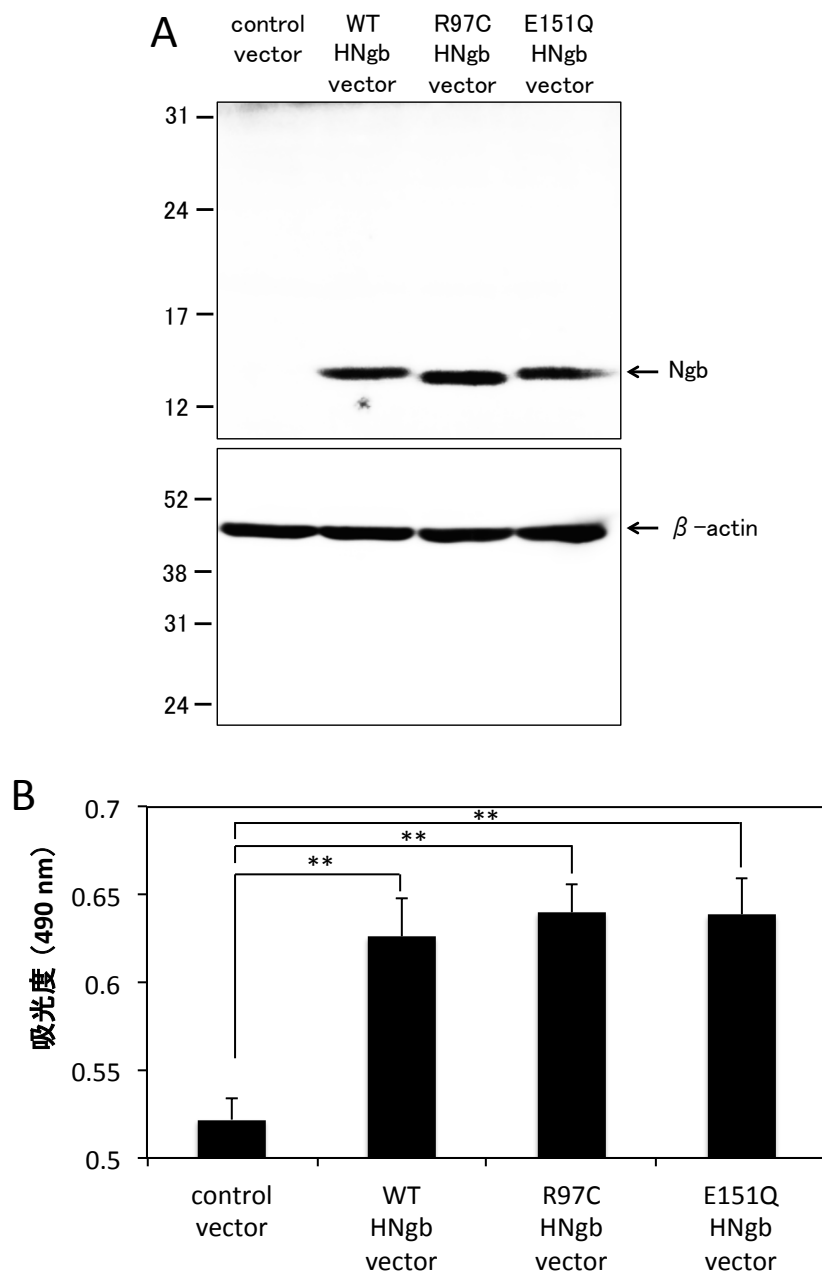


図 20. 野生型ヒト NgB (HNgb)、R97C および E151Q HNgb 変異体の細胞保護能

(A) 空ベクター、野生型 HNgb、R97C HNgb または E151Q HNgb 変異体発現ベクターを分化させた SH-SY5Y に導入し、24 時間培養した。細胞破碎液は SDS-PAGE を行い、HNgb および  $\beta$ -actin の抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。(B) 分化させた SH-SY5Y 細胞は HNgb を過剰発現し、過酸化水素を添加して 24 時間培養した。細胞の生存については MTS 法によって評価した。値は独立した 4 回 (triplicate) の実験における平均値であり、エラーバーは SEM を示す。有意差は one-way ANOVA で解析した後、Turkey-Kramer post hoc tests により解析した。(\*\* ;  $p < 0.01$ )



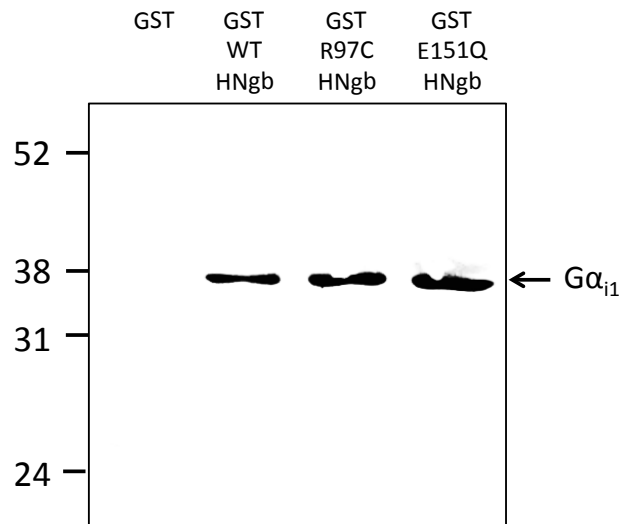


図 21. 野生型ヒト Ngb (HNgb)、R97C および E151Q HNgb 変異体の  $G\alpha_{i1}$  との GST プルダウンアッセイ

GST、GST 融合野生型鉄三価 HNgb (GST WT HNgb)、GST 融合 R97C 鉄三価 HNgb 変異体 (GST R97C HNgb) または GST 融合 E151Q 鉄三価 HNgb 変異体 (GST E151Q HNgb) を GDP 結合型  $G\alpha_{i1}$  と混合し、グルタチオンセファロース 4B を添加して攪拌、洗浄した後、10 mM 還元型グルタチオンを加えて溶出した。溶出液は SDS-PAGE を行い、 $G\alpha_{i1}$  の抗体を用いてウェスタンブロットにより解析した。矢印は  $G\alpha_{i1}$  の想定される位置を示し、分子量は kDa として左側に示した。

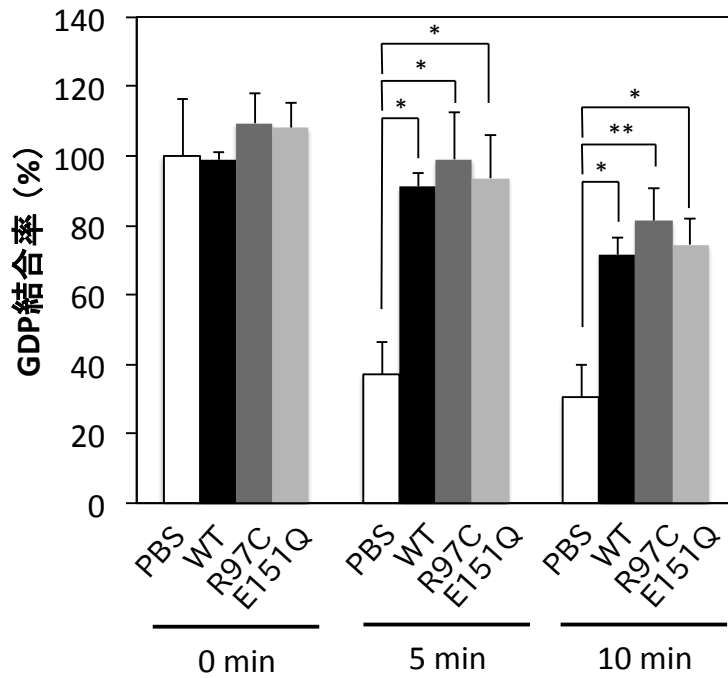


図 22. R97C および E151Q ヒト Ngb 変異体の GDI 活性

0.3  $\mu\text{M}$  の $^3\text{H}$ GDP を結合させた  $G\alpha_{i1}$  に対して、過剰量 (2 mM) の無標識 GTP を 10  $\mu\text{M}$  Ngb 存在下または非存在下で添加した。0、5、10 分後にそれぞれ分取し、ニトロセルロース膜 (0.45  $\mu\text{m}$ ) に通した。GDP 結合率は、0 分後の Ngb 非存在下 (PBS) の試料における値を 100%として計算した。値は独立した 4 回の実験における平均値であり、エラーバーは SEM を示す。有意差は one-way ANOVA で解析した後、Turkey-Kramer post hoc tests により解析した。(\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ )

### 3.3.4. ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ のドッキングモデル 2 に基づく $G\alpha_{i1}$ 側の重要残基の特定

これまでの実験結果から、ヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  の相互作用にはヒト Ngb の Glu53、Glu60 および Glu118 のみが重要であることを明らかにした。そこで、これらの残基に着目して新たなドッキングモデルを作製した (図 23)。ヒト Ngb の Glu53、Glu60 および Glu118 に近接する  $G\alpha_{i1}$  側の極性残基を青色で示した。

このドッキングモデルが適切であるかを検証するために、青色で示した極性残基 (Lys46、Lys67 および Lys70) の極性をなくした変異体 (K46A  $G\alpha_{i1}$  変異体、K67A  $G\alpha_{i1}$  変異体および K70A  $G\alpha_{i1}$  変異体) を作製し、GST プルダウンアッセイにより GST-ヒト Ngb との相互作用を検証した。すると、K46A  $G\alpha_{i1}$  変異体と K70A  $G\alpha_{i1}$  変異体はヒト Ngb と相互作用しない一方で、K67A  $G\alpha_{i1}$  変異体は野生型  $G\alpha_{i1}$  と同様にヒト Ngb と相互作用した (図 24AB)。このことから、ヒト Ngb との相互作用には  $G\alpha_{i1}$  の Lys67 は重要ではなく、Lys46 と Lys70 が重要であることが判明した。

3.3.2 (図 17) で重要であることを明らかにした  $G\alpha_{i1}$  の Arg208、Lys209 および Lys210 と合わせて、ヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  の相互作用には、 $G\alpha_{i1}$  の Lys46、Lys70、Arg208、Lys209 および Lys210 が重要であることが明らかになった。加えて、図 23 に示したドッキングモデルは適切であると考えられる。

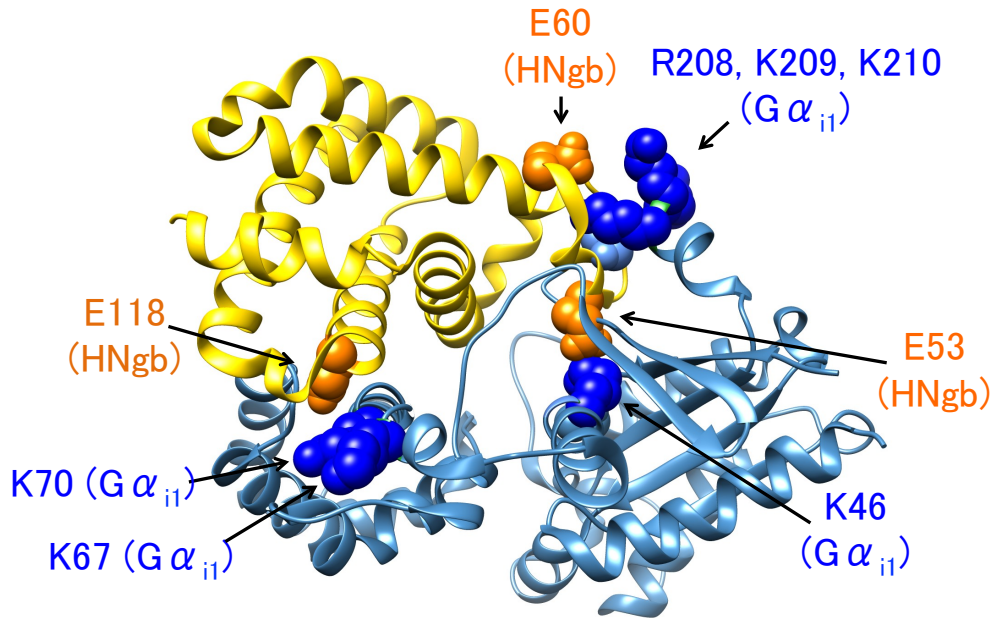


図 23. ヒト Ngb (HNgb) と  $G\alpha_{i1}$  の複合体のドッキングモデル 2

HNgb の立体構造を黄色で示し (Protein Data Bank code : 4MPM)、細胞保護能に重要な残基を橙色で示した。  $G\alpha_{i1}$  の立体構造を水色で示し (Protein Data Bank code : 1KJY)、HNgb との相互作用に重要であると考えられる残基を青色で示した。

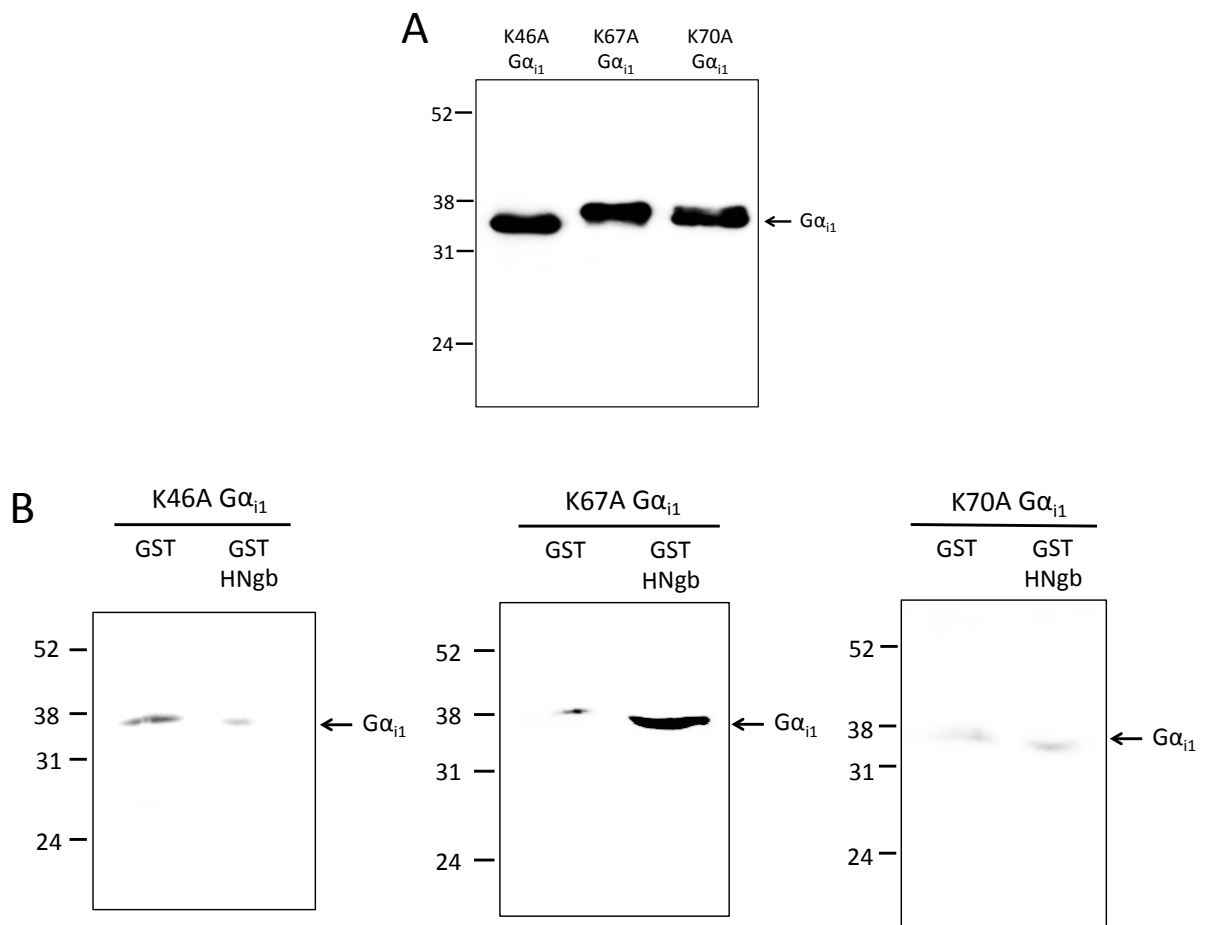


図 24. K46A、K67A および K70A  $G\alpha_{i1}$  変異体の野生型ヒト Ngb (HNgb) との GST プルダウンアッセイ

GST または GST 融合野生型鉄三価 HNgb (GST HNgb) を GDP 結合型の各  $G\alpha_{i1}$  変異体と混合し、グルタチオンセファロース 4B を添加して攪拌、洗浄した後、10 mM 還元型グルタチオンを加えて溶出した。用いた  $G\alpha_{i1}$  (A) および溶出液 (B) は SDS-PAGE を行い、 $G\alpha_{i1}$  の抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。矢印は  $G\alpha_{i1}$  の想定される位置を示し、分子量は kDa として左側に示した。

## 3.4. 考察

### 3.4.1. $G\alpha_{i1}$ の重要な残基について

本研究では、まず哺乳動物細胞発現ベクターを用いてヒト Ngb の細胞保護能には、ヒト Ngb の GDI 活性が重要であることを確認した。さらに GST-ヒト Ngb を用いた GST プルダウンアッセイから、ヒト Ngb の Glu53、Glu60、Arg97、Glu118 および Glu151 が  $G\alpha_{i1}$  との相互作用に重要であることも明らかにした。しかしながら、様々な生物種の Ngb の配列比較に基づき、R97C ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体を作製して解析を行うと、ヒト Ngb の Arg97 および Glu151 はヒト Ngb の GDI 活性、細胞保護能および  $G\alpha_{i1}$  との相互作用のいずれにも重要ではないことが明らかになった。R97Q ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体がいずれも GDI 活性や細胞保護能をもたなかったのは、導入した変異それ自体により、ヒト Ngb の立体構造に摂動が生じ、その結果  $G\alpha_{i1}$  と相互作用できなくなったためであると考えられる。このことから、ヒト Ngb の重要な残基は Glu53、Glu60 および Glu118 の 3 つのアミノ酸残基のみであることを明らかにした。加えて、ヒト Ngb との相互作用に重要な  $G\alpha_{i1}$  のアミノ酸残基が Lys46、Lys70、Lys208、Lys209 および Lys210 であることを明らかにした。これらのことから、ヒト Ngb の負電荷をもつアミノ酸残基と  $G\alpha_{i1}$  の正電荷をもつアミノ酸残基の静電的な相互作用によって複合体を形成することが示唆された。このことは、 $G\alpha$  と  $G\alpha$  の制御因子の静電的な相補性が相互作用に重要であるという報告に矛盾しない結果である[56]。また本研究では、ヒト Ngb の Glu53 と  $G\alpha_{i1}$  の Lys46、ヒト Ngb の Glu60 と  $G\alpha_{i1}$  の Arg208、Lys209、Lys210 およびヒト Ngb の Glu118 と  $G\alpha_{i1}$  の Lys70 がそれぞれ相互作用する複合体のドッキングモデルを提唱した (図 25)。

先行研究においてヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  を架橋し、トリプシン処理した後、質量分析した実験から、ヒト Ngb の Glu53 と Glu60 が  $G\alpha_{i1}$  の Ser44 と Ser206 とそれぞれ近接した位置に存在することが示唆された[33]。本研究で明らかにした Lys46、Arg208、Lys209 および Lys210 は質量分析に基づいて示唆されたアミノ酸残基 Ser44 と Ser206 に非常に近接した位置に存在し、先行研究に矛盾しない結果であるといえる。また X 線結晶構造を調べると、 $G\alpha_{i1}$  の Lys46 は  $G\alpha_{i1}$  の GDP と近接した位置に存在していることから、ヒト Ngb が  $G\alpha_{i1}$  の Lys46 を介して相互作用することで、 $G\alpha_{i1}$  から GDP が解離するのを抑制していると考えられる。さらに、 $G\alpha_{i1}$  の Arg208、

Lys209 および Lys210 は、switch II 領域 (a.a. 199-219) と呼ばれる  $G\beta\gamma$  や  $G\alpha$  の制御因子の相互作用に重要な領域に位置している[49]。このことからヒト Ngb もまた、 $G\alpha$  の他の制御因子などと同様に switch II 領域を介して相互作用すると考えられる。

一方で、ヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  を架橋し、トリプシン処理した後、質量分析を行った先行研究において、ヒト Ngb の 103 番目から 119 番目に対応するペプチドのピークが消失していることが観察された[33]。これはヒト Ngb の 103~119 の領域が、 $G\alpha_{i1}$  との相互作用に重要であることを示唆するものである。本研究では、ヒト Ngb の 103~119 の領域に含まれる Glu118 が、 $G\alpha_{i1}$  の Lys70 と相互作用する複合体のドッキングモデルを提唱し、これも先行研究に矛盾しない結果を得たと考えられる。また、 $G\alpha_{i1}$  に対する GDI として機能する LGN 蛋白質の GoLoco モチーフは、 $G\alpha_{i1}$  の  $\alpha$  ヘリカルドメイン (a.a. 45-176) の Tyr69 および Val72 と相互作用することが判明している[57]。Lys70 はこの近傍に位置しており、ヒト Ngb は  $G\alpha_{i1}$  の Ras-like ドメインだけでなく、 $\alpha$  ヘリカルドメインを介して相互作用するものと考えられる。

さらに  $G\alpha_{i1}$  の Lys46、Arg208、Lys209 および Lys210 はその前後のアミノ酸残基も含めて、 $G\alpha_{i0}$ 、 $G\alpha_s$  などの多くの G 蛋白質で保存されている一方で、Lys70 は  $G\alpha_{i0}$  では保存されているものの、 $G\alpha_s$  では Val になっている (図 26)。したがって、 $G\alpha_{i0}$  の Lys70 のもつ正電荷が、 $G\alpha_{i0}$  とヒト Ngb との特異的な相互作用に重要であると考えられる。

### 3.4.2. ヒト Ngb の重要な残基について

本研究により、ヒト Ngb の Glu53、Glu60 および Glu118 が、 $G\alpha_{i1}$  との相互作用、GDI 活性および細胞保護能に重要であることを明らかにした。

Glu118 は魚類を除く多くの生物種において保存されており、Glu60 はすべて生物種で保存されている一方で、Glu53 は北方真獣類と呼ばれる一部の哺乳動物においてのみ保存されている。したがって、Ngb の GDI 活性や細胞保護能は北方真獣類のみが有する機能であり、Ngb の細胞保護能が進化的に獲得されたことを示唆している。ただ、一部のアザラシの Ngb はヒト Ngb の Glu53 に対応する残基がリシン (Lys) になっており、加えて他の生物種とは異なり神経細胞ではなくアストロサイトにおいて発現が高いことが報告されている[58,59]。このアミノ酸残基および局在の違いは、アザラシの Ngb が他の哺乳動物の Ngb とは異なる機能をもつ可能性を示唆している。

またヒト Ngb の Glu60 およびその前後の配列は、他の  $G\alpha_{i1}$  の結合蛋白質である R6A-1 や KB-752 と非常に高い相同性を有し、ヒト Ngb はこれらの蛋白質と同様に  $G\alpha_{i1}$  の switch II 領域と相互作用する可能性を第 2 章の 2.4 の考察において述べた。本研究において提唱したドッキングモデルは、ヒト Ngb の Glu60 が、 $G\alpha_{i1}$  の switch II 領域に位置する Arg208、Lys209、Lys210 と相互作用するというものであり、2.4 に述べた考察に矛盾しないものである。また Glu60 およびその前後の配列はすべての生物種の Ngb で保存されていることから、ヒト Ngb の Glu60 およびその前後の配列は、 $G\alpha_{i1}$  との相互作用における核となる領域であると考えられる。



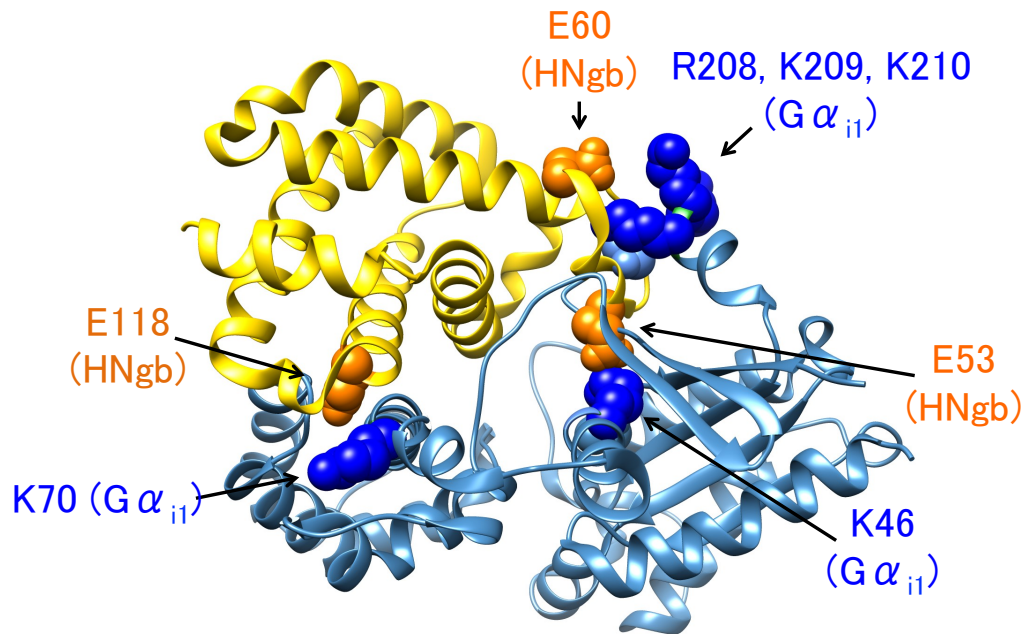


図 25. 想定されるヒト Ngb (HNgb) と  $G\alpha_{i1}$  の複合体のドッキングモデル

HNgb の立体構造を黄色で示し (Protein Data Bank code : 4MPM)、細胞保護能に重要な残基を橙色で示した。  $G\alpha_{i1}$  の立体構造を水色で示し (Protein Data Bank code : 1KJY)、HNgb との相互作用に重要な残基を青色で示した。

	46		70		208~210
$G\alpha_{i1}$	GAGESG <b>K</b> STIVKQ		EECKQ <b>Y</b> KAVVYSN		GQRSE <b>R</b> KKWIHCF
$G\alpha_o$	GAGESG <b>K</b> STIVKQ	~	EDVKQ <b>Y</b> KPVVYSN	~	GQRSE <b>R</b> KKWIHCG
$G\alpha_s$	GAGESG <b>K</b> STIVKQ		EGGEEDPQAARSN		GQRDE <b>R</b> KKWIQCF
	*****		*	**	*** ** ** *

図 26. ヘテロ三量体 G 蛋白質  $G\alpha$  の配列比較

ヒト Ngb との相互作用に重要な  $G\alpha_{i1}$  のアミノ酸残基 (Lys46、Lys70、Arg208、Lys209 および Lys210) およびその前後の配列を、 $G\alpha_o$  および  $G\alpha_s$  と比較した。図上部の数字は  $G\alpha_{i1}$  の残基番号を示す。図下部のアスタリスクはこれらの G 蛋白質において、アミノ酸残基が相同であることを示す。ヒト Ngb との相互作用に重要な  $G\alpha_{i1}$  のアミノ酸残基 (Lys46、Lys70、Arg208、Lys209 および Lys210) と相同性の高い残基を青色で示した。

## 4. Ngb の神経突起伸長能の作用機序の解明

### 4.1. 要旨

当研究室の先行研究において、ヒト Ngb が酸化ストレス下において GDP 結合型  $G\alpha_{i/o}$  と結合し、GDP 解離阻害因子 (GDI) として働き、cAMP 濃度の低下を抑えることで細胞を保護していることを明らかにした。加えてゼブラフィッシュ Ngb (魚類 Ngb) には細胞保護能がないが、細胞外から細胞質内に移行する細胞膜透過能があり、他方ヒト Ngb には細胞膜透過能がないことを見出した。また Ngb は 4 つのエクソンにコードされ、蛋白質においてはモジュール M1~M4 に分割できることを利用して、魚類 Ngb の細胞膜透過能に重要なモジュール M1 とヒト Ngb の細胞保護能に重要なモジュール M2~M4 を融合し、培地に加えるだけで細胞内に導入され、酸化ストレスから細胞を保護するキメラ Ngb の作製にも成功した。近年ヒト Ngb の過剰発現により神経突起の伸長が促進させることが報告されたため、本研究ではキメラ Ngb を培地に添加しただけで神経突起を伸長させるかどうかを解析した。その結果キメラ Ngb は培地への添加により神経突起を伸長させたが、ヒト Ngb や魚類 Ngb は伸長させなかった。加えて細胞膜透過に重要なリジン置換した K7A/K9Q キメラ Ngb 変異体は神経突起を伸長させなかった。このことからキメラ Ngb は細胞質内に導入された後、神経突起を伸長させることが判明した。さらに、神経突起の伸長における立体構造変化の重要性を調べるため、遠位のヒスチジン (His) をバリンに置換した H67V キメラ Ngb 変異体 (ヒト Ngb の H64V に相当) を作製し培地に添加した。すると H67V キメラ Ngb 変異体においても神経突起の伸長が観察され、片側からのみ His が配位した mono-His 型 Ngb にも神経突起の伸長能があることが明らかになった。mono-His 型 Ngb は  $G\alpha_{i/o}$  とは相互作用しないことから、神経突起の伸長には  $G\alpha_{i/o}$  とは異なる分子が関与していることが示唆された。また、神経突起の伸長が Ngb の GDI 活性によるものかを調べるため、GDI 活性をなくした E56Q、E63Q および E121Q キメラ Ngb 変異体を作製し培地に添加した (ヒト Ngb の E53Q、E60Q および E118Q に相当)。すると E56Q キメラ Ngb 変異体は神経突起を伸長させる一方で、E63Q キメラ Ngb 変異体と E121Q キメラ Ngb 変異体は伸長させなかった。したがって、神経突起の伸長には Glu63 および Glu121 のみが重要であることが判明した。Glu63 と Glu121 は多くの生物種で保存されている一方で、Glu56 は北方真獣類と呼ばれる一部の哺乳動

物においてのみ保存されていることから、神経突起の伸長能は細胞保護能よりも進化的に古い段階で獲得されたことが示唆された。

## 4.2. 実験方法

### 4.2.1. 発現ベクターの作製

Ngb を大腸菌に発現させるベクターは、当研究室において以前作製された pET20b-ヒト Ngb[26]、pET20b-キメラ Ngb[39]、pET20b-魚類 Ngb[39]および pET20b-K7A/K9Q キメラ Ngb[36]を用いた。また pET20b-キメラ Ngb を鋳型として 2.2.1.1 に記載した通りに部位特異的変異を導入し、pET20b-E56Q キメラ Ngb、pET20b-E63Q キメラ Ngb、pET20b-H67V キメラ Ngb および pET20b-E121Q キメラ Ngb を作製した。導入した部位特異的変異と使用したプライマーは以下の通りである。

E56Q forward primer : 5'- GCCGCCAGTTCTCCAGCCCAGAGGACTGTCTCTCCTCGCC -3'

E56Q reverse primer : 5'- GGCGAGGAGAGACAGTCCTGTGGGCTGGAGAACTGGCGGC -3'

E63Q forward primer : 5'- GGACTGTCTCTCCTCGCCTCAGTTCCTGGACCACATGAGG -3'

E63Q reverse primer : 5'- CCTCATGTGGTCCAGGAACTGAGGCGAGGAGAGACAGTCC -3'

H67V forward primer : 5'- CGCCTGAGTTCCTGGACGTCATCAGGAAGGTGATGC -3'

H67V reverse primer : 5'- GCATCACCTTCCTGATGACGTCCAGGAACTCAGGCG -3'

E121Q forward primer : 5'- GGTGAGTCTCTGCTCTACATGCTGCAGAAGTGTCTGCGCCCTGCC -3'

E121Q reverse primer : 5'- GGCAGGGCCCAGACACTTCTGCAGCATGTAGAGCAGAGACTCACC -3'

### 4.2.2. 発現ベクターの精製

大腸菌に蛋白質を発現させるベクターは *E.coli* DH5  $\alpha$  株に形質転換し、TYE 寒天培地上に 37°Cで一晩培養後、形質転換体を含むコロニーを得た後、QIAprep SPIN Miniprep kit (QIAGEN) 用いて精製した。

### 4.2.3. Ngb の発現および精製

Ngb は 2.2.3.1 に記載した通りに発現および精製を行った。

#### 4.2.4. 細胞培養

PC12 細胞 (RCB0009、RIKEN Cell Bank) は、10% (v/v) FBS、10% (v/v) ウマ血清、2 mM L-グルタミン、100 unit/mL ペニシリンと 100 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM (GIBCO) 培地中で、通常酸素環境 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を維持したインキュベータ内で、3 日または 4 日に 1 回の頻度で 1:8 の割合で継代した。

#### 4.2.5. 神経突起の伸長の評価

PC12 細胞に Ngf を 2 日間作用させる実験は以下のようにして行った。PC12 細胞をポリ-D-リシン (Sigma-Aldrich) でコートした 35 mm ガラスボトムディッシュ (Iwaki)、またはポリ-D-リシンコートされた 96 ウェルプレートに  $2.0 \times 10^4$  /mL の密度で播種し、通常酸素環境 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を維持したインキュベータ内で、24 時間培養した。その後 10 µM Ngf、PBS または 100 ng/mL NGF (mouse NGF 2.5S (Grade II、Alomone Labs Ltd.)) を培地に添加し、48 時間培養した。細胞の観察は微分干渉顕微鏡 (Nikon C2 plus、Nikon)、または位相差顕微鏡 (Olympus IX71、Olympus) を用いた。1 ウェル当たり 3 つの視野を観察し、合計約 300 個の細胞を計数した。10 µm 以上の神経突起をもつ細胞を神経突起が伸長した細胞として計数した。

PC12 細胞に Ngf を 5 日間作用させる実験は以下のようにして行った。PC12 細胞をポリ-D-リシンでコートした 35 mm ガラスボトムディッシュ、またはポリ-D-リシンコートされた 96 ウェルプレートに  $5.0 \times 10^3$  /mL の密度で播種し、通常酸素環境 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を維持したインキュベータ内で、24 時間培養した。その後 10 µM Ngf、PBS または 100 ng/mL NGF (mouse NGF 2.5S (Grade II、Alomone Labs Ltd.)) を培地に添加し、48 時間培養した。さらに 24 時間毎に、培地の半量を 10 µM Ngf、PBS または 100 ng/mL NGF を含む培地に交換し、合計 72 時間培養した。細胞の観察は微分干渉顕微鏡または位相差顕微鏡を用いた。1 ウェル当たり 3 つの視野を観察し、合計約 200 個の細胞を計数した。細胞体の直径以上の神経突起をもつ細胞を神経突起が伸長した細胞として計数した。

#### 4.2.6. Ngf のフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識

Ngf は Fluoreporter FITC protein labeling kit (Molecular Probes) の 製品プロトコルに従い、フルオレセインイソチオシアネート (FITC、Dojindo) で標識した。具体的には、500 µL

の 2.0 mg/mL Ngb にジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した 1.0 mg/mL FITC 50  $\mu$ L を添加し、遮光した状態で室温、1 時間攪拌した。結合していない FITC は Sephadex G-25 Medium (GE Healthcare) を充填したカラムにかけて除いた。FITC 標識した Ngb の濃度はソーレー帯の吸光度から求め、FITC の濃度は  $A_{494\text{nm}}$  から  $\epsilon_{494\text{nm}} = 68 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  を用いて求めた。実験には FITC に対する蛋白質のモル比が 0.9-1.3 のものを用いた。

#### 4.2.7. Ngb の細胞内導入の観察

PC12 細胞をポリ-D-リシンでコートした 35 mm ガラスボトムディッシュに  $2.0 \times 10^4$  /mL の密度で播種し、通常酸素環境 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を維持したインキュベータ内で、24 時間培養した。その後、無血清培地 (DMEM、2 mM グルタミン) で洗浄し、3  $\mu$ M の FITC 標識した Ngb を含む無血清培地に交換して 1 時間培養した。さらに、FBS を最終 2%、FM4-64 (Molecular Probes) を 1  $\mu$ M になるように添加して、24 時間培養した。細胞は氷冷した PBS で 2 回洗浄し、1 mL の PBS を加えて、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C2 plus、Nikon) で 488 nm の波長のレーザーを用いて観察した。

#### 4.2.8. PC12 細胞の過酸化水素処理

PC12 細胞をポリ-D-リシンコートされた 96 ウェルプレートに  $1.0 \times 10^5$  /mL の密度で播種し、通常酸素環境 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を維持したインキュベータ内で、24 時間培養した。その後、無血清培地 (DMEM、2 mM グルタミン) で洗浄し、Ngb を含む無血清培地に交換して 1 時間培養した。さらに、FBS を最終 2% になるように添加して、24 時間培養した。その後、培地を 10% (v/v) FBS、10% (v/v) ウマ血清、2 mM L-グルタミンを含む DMEM に交換し、200  $\mu$ M の過酸化水素を加えて、通常酸素環境を維持したインキュベータ内で 24 時間培養した。

#### 4.2.9. 細胞生存率の測定

細胞生存率は MTS 法により、96 ウェルプレートにおいて確認した。MTS 反応は、100  $\mu$ L の培地に対し 20  $\mu$ L の Celltiter 96 Aqueous One Solution を添加し、通常酸素環境 (37°C、5% CO<sub>2</sub>) を維持したインキュベータ内で 3 時間培養した後、Beckman Coulter DTX880 plate reader で 490 nm の吸光度を測定した。

## 4.3. 実験結果

### 4.3.1. キメラ Ngb の神経突起の伸長能

神経突起の伸長を観察するために、未分化の PC12 細胞を微分干渉顕微鏡、または位相差顕微鏡により観察した。未分化の PC12 細胞は神経突起をもたない円形の細胞として観察された (図 27A)。また神経突起の伸長を促進する神経成長因子 (Nerve growth factor ; NGF) を培地に添加すると細胞体が細長くなり、神経突起の伸長が観察された (図 27A)。10  $\mu\text{m}$  以上の神経突起をもつ細胞を神経突起が伸長した細胞として計数し、その割合を計算した。NGF 作用させた場合は、神経突起が伸長した細胞の割合が大きく上昇した (図 27B)。

キメラ Ngb の神経突起の伸長能を明らかにするため、キメラ Ngb、ヒト Ngb および魚類 Ngb を精製し、培地に添加して神経突起の伸長能を比較した。蛋白質の精製度は SDS-PAGE により確認した (図 28)。キメラ Ngb を培地に添加すると、PBS を添加した場合に比べて、神経突起が伸長した細胞の割合が大きく上昇した (図 27AB)。加えて、この神経突起の伸長は、培地に添加したキメラ Ngb の濃度依存的に上昇した (図 27C)。一方で、ヒト Ngb や魚類 Ngb を培地に添加しても、神経突起の伸長は観察されなかった (図 27AB)。このことから、キメラ Ngb は培地に添加するだけで、神経突起を伸長させることが判明した。



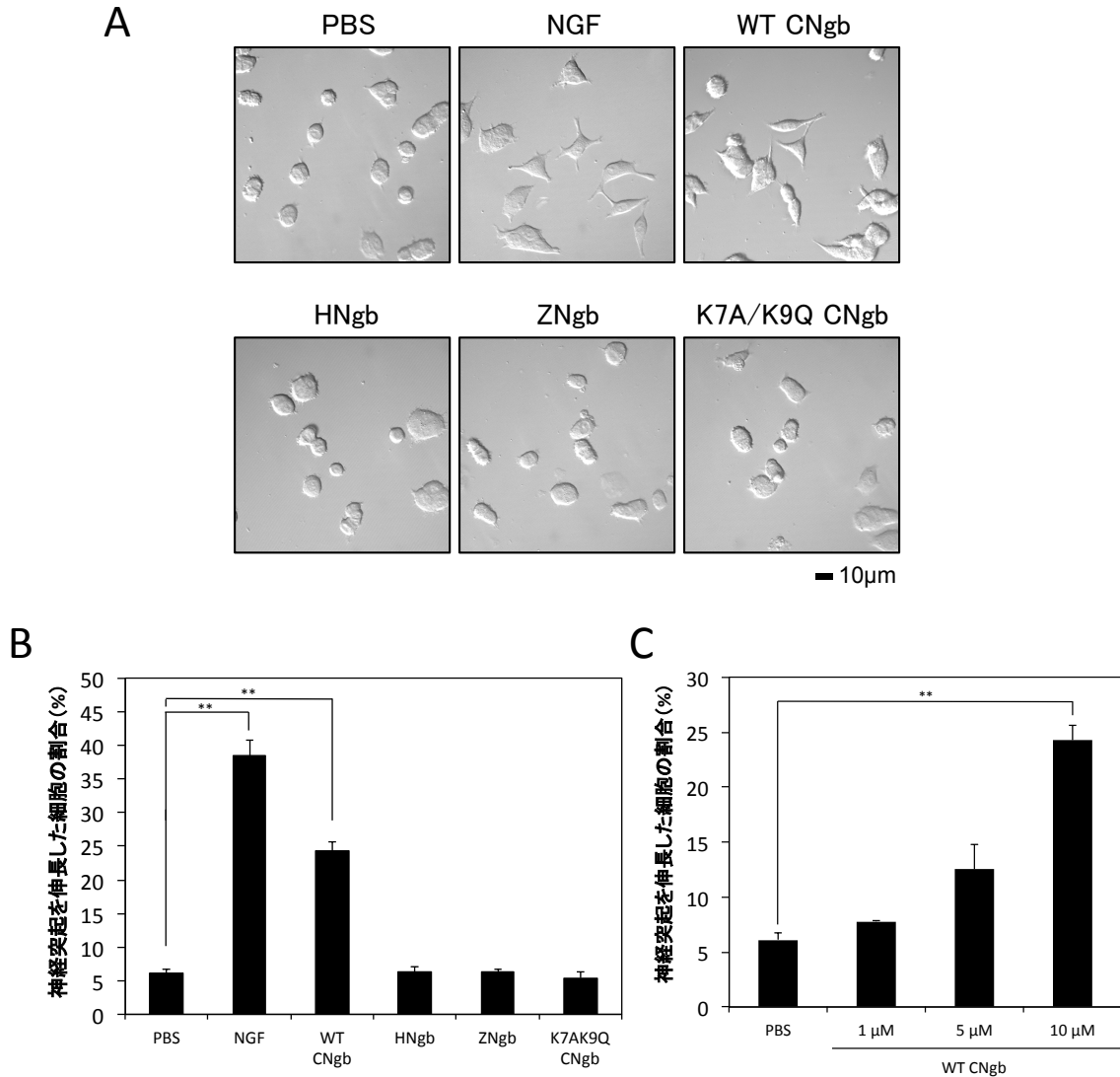


図 27. NGF、野生型キメラ Ngb (WT CNgb)、ヒト Ngb (HNgb)、魚類 Ngb (ZNgb) および K7A/K9Q CNgb 変異体を添加し、2 日間培養した時の PC12 細胞の神経突起の伸長

(A) PC12 細胞は PBS、NGF (100 ng/mL) または Ngb (10 µM) と共に、通常酸素環境下で 2 日間培養した。その後微分干渉顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 µm を示す。(B) 10 µm 以上の神経突起をもつ細胞を神経突起が伸長した細胞として計数し、神経突起を伸長した細胞の割合を示した。値は独立した 3 回以上 (triplicate) の実験における平均値であり、エラーバーは SEM を示す。有意差は one-way ANOVA で解析した後、Turkey-Kramer post hoc tests により解析した。(\*\*; p<0.01) (C) 神経突起の伸長における CNgb の濃度依存性を調べた。値は独立した 3 回の実験における平均値であり、エラーバーは SEM を示す。有意差は one-way ANOVA で解析した後、Turkey-Kramer post hoc tests により解析した。(\*\*; p<0.01)

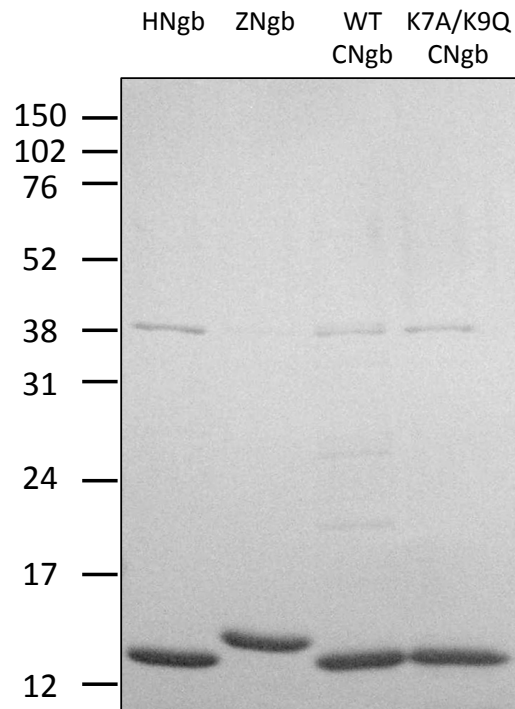


図 28. SDS-PAGE による Ngb の精製度の確認

精製した Ngb は 15% SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、クマシーブリアントブルーで染色した。分子量は kDa として左側に示した。

#### 4.3.2. キメラ Ngb の細胞膜透過能

次に FITC 標識した Ngb を培地に添加し、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行うことで、魚類 Ngb およびキメラ Ngb は細胞内に導入され、ヒト Ngb は導入されないことを確認した (図 29) [35]。さらに、キメラ Ngb の神経突起の伸長能が細胞内に導入されることで発揮されるかどうかを調べるため、細胞膜を透過しない変異体を作製して、神経突起の伸長を観察した。当研究室の先行研究により、K7A/K9Q 魚類 Ngb 変異体は細胞膜透過能をもたないことから [36]、細胞膜透過に重要であると考えられるリシン残基を置換した K7A/K9Q キメラ Ngb を作製し (図 30) [36]、細胞内に導入されるかを調べた。すると K7A/K9Q キメラ Ngb は細胞内に導入されないことが判明した (図 29)。さらに、この変異体を培地に添加しても神経突起の伸長は観察されなかった (図 27AB)。これらのことから、キメラ Ngb が細胞内に導入されることにより神経突起を伸長させることが判明した。

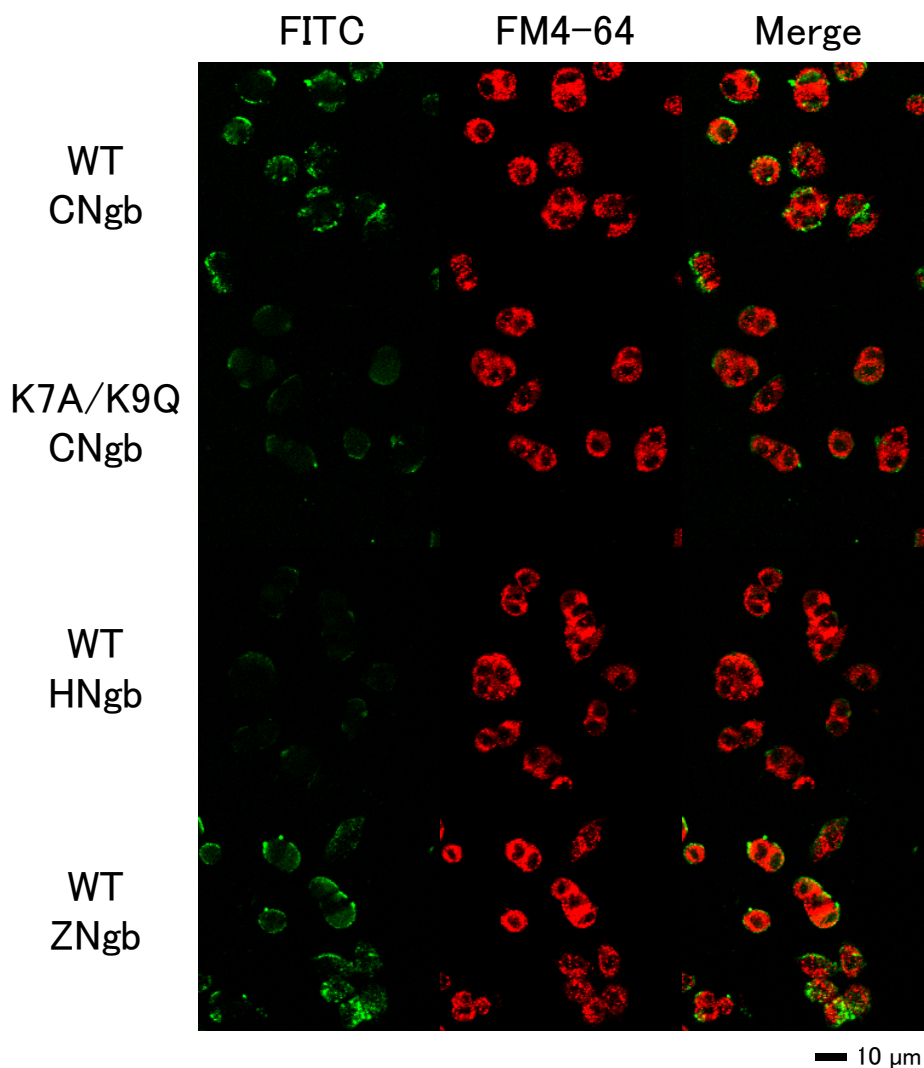


図 29. FITC ラベルした野生型キメラ Ngb (CNgb)、K7A/K9Q CNgb 変異体、ヒト Ngb (HNgb) および魚類 Ngb (ZNgb) の PC12 細胞への導入

PC12 細胞は、3 μM の FITC (緑色) ラベルした野生型キメラ Ngb (WT CNgb)、K7A/K9Q CNgb 変異体、HNgb または ZNgb と共に 1 μM FM4-64 (赤色、エンドサイトーシスマーカー) 存在下で、通常酸素環境下、24 時間培養した。その後共焦点レーザー顕微鏡により観察した。スケールバーは 10 μm を示す。

#### 4.3.3. キメラ Ngb の構造変化と神経突起の伸長能

次にキメラ Ngb の神経突起の伸長能における構造変化の影響を調べるために、ヘムの配位する遠位のヒスチジン (His) をバリン (Val) に置換し、His の配位に伴う構造の変化が起こらない H67V キメラ Ngb 変異体を作製して、神経突起の伸長を観察した。蛋白質の精製度は SDS-PAGE により確認した (図 31)。H67V キメラ Ngb 変異体を培地に添加すると、野生型キメラ Ngb と同様に神経突起の伸長が観察された (図 32AB)。このことからヘム近傍の構造の変化は、Ngb の神経突起の伸長に影響を与えないことが判明した。

さらに Ngb を作用させる時間を伸ばして、PC12 細胞の神経突起の伸長を微分干渉顕微鏡で観察した (図 33A)。PC12 細胞に野生型キメラ Ngb を培地に添加し、5 日間作用させて神経突起の伸長を観察すると、PBS を添加した場合に比べて、細胞体の直径以上の神経突起をもつ細胞の割合が増加した (図 33B)。加えて、H67V キメラ Ngb 変異体も野生型と同様に伸長が観察された (図 33AB)。このことから、片側からのみ His が配位した Ngb (mono-His 型 Ngb) も神経突起の伸長能をもつことが判明した。

#### 4.3.4. キメラ Ngb の神経突起の伸長能に重要なアミノ酸残基の特定

これまでの実験から、魚類 Ngb およびキメラ Ngb は共に細胞内に導入される一方で、魚類 Ngb は神経突起の伸長能がなく、キメラ Ngb は伸長能をもつことが判明した (図 27AB、図 29)。したがってヒト Ngb のモジュール M2~M4 の間にあり、かつ魚類 Ngb とは異なるアミノ酸残基が神経突起の伸長能に重要であることが示唆された (図 30)。また、本論文の第 3 章の研究から、ヒト Ngb の Glu53、Glu60 および Glu118 が GDI 活性や細胞保護能に重要であることを明らかにした。そこで、本研究では、これらのアミノ酸残基が神経突起の伸長能にも重要であるかを調べるため、E56Q キメラ Ngb 変異体、E63Q キメラ Ngb 変異体および E121Q キメラ Ngb 変異体を作製し、神経突起の伸長を観察した。キメラ Ngb の Glu56、Glu63 および Glu121 はそれぞれヒト Ngb の Glu53、Glu60 および Glu118 に対応するアミノ酸残基である (図 30)。これらの蛋白質の精製度は SDS-PAGE により確認した (図 31)。これらの変異体を培地に添加して観察すると、E56Q キメラ Ngb は野生型キメラ Ngb と同様に神経突起の伸長が観察されたのに対して、E63Q キメラ Ngb 変異体および E121Q キメラ Ngb 変異体は神経突起の伸長は観察されなかった (図 32A)。また、これらの Ngb を 5 日間作用させて神経突起の伸長を観察すると、E56Q

キメラ Ngb 変異体は細胞体の直径以上の神経突起をもつ細胞の割合が増加したのに対して、E63Q キメラ Ngb 変異体および E121Q キメラ Ngb 変異体は増加しなかった (図 33AB)。このことから、キメラ Ngb の神経突起の伸長には Glu63 および Glu121 が重要である一方で、Glu56 は重要でないことが判明した。

#### 4.3.5. キメラ Ngb の細胞保護能

当研究室の先行研究において、ヘムの配位する遠位の His を Val に置換し、His の配位に伴う構造の変化が起こらない H64V ヒト Ngb 変異体は  $G\alpha_{ii}$  に対する GDI 活性がなく、酸化ストレスに伴う細胞死を抑制できないことを明らかにした[28]。加えて、当研究室の先行研究[27]および本研究の第 2 章において、E53Q、E60Q および E118Q ヒト Ngb 変異体には GDI 活性がなく、細胞保護能をもたないことを明らかにした。そこで本研究では、ヒト Ngb の His64、Glu53、Glu60 および Glu118 に対応するアミノ酸残基である、キメラ Ngb の His67、Glu56、Glu63 および Glu121 (図 30) のそれぞれが、キメラ Ngb の細胞保護能に重要であるかどうかを検証した。

PC12 細胞を培養している培地に、野生型キメラ Ngb、H67V、E56Q、E63Q または E121Q キメラ Ngb 変異体を添加した後、過酸化水素を与えて細胞の生存について評価した。MTS 法により細胞の生存について評価したところ、野生型キメラ Ngb は細胞死を抑制できるが、H67V キメラ Ngb 変異体は細胞死を抑制しなかった (図 34)。したがって、キメラ Ngb の細胞保護能には、ヒト Ngb と同様に酸化ストレスに伴う mono-His 型から bis-His 型への構造変化が重要であることが明らかになった。また、E56Q、E63Q および E121Q キメラ Ngb 変異体もまた細胞死を抑制しなかった (図 34)。したがって、ヒト Ngb の GDI 活性に重要な Glu53、Glu60 および Glu118 に対応するアミノ酸残基である、キメラ Ngb の Glu56、Glu63 および Glu121 のそれぞれが、キメラ Ngb の細胞保護能に重要であることが判明した。

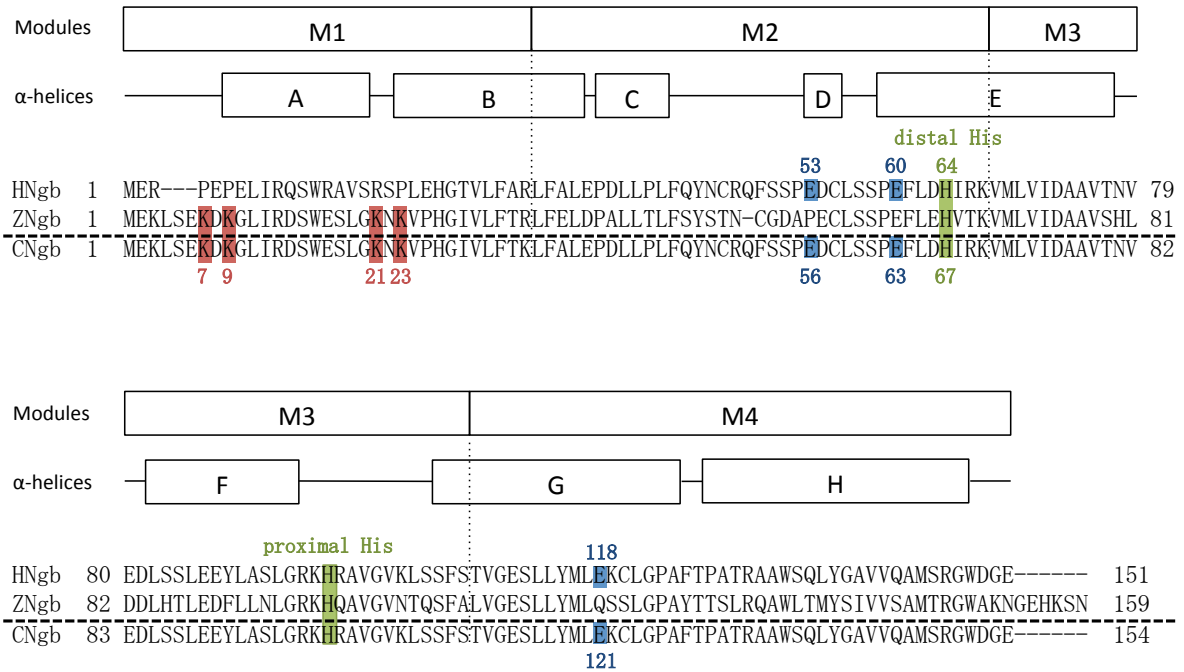
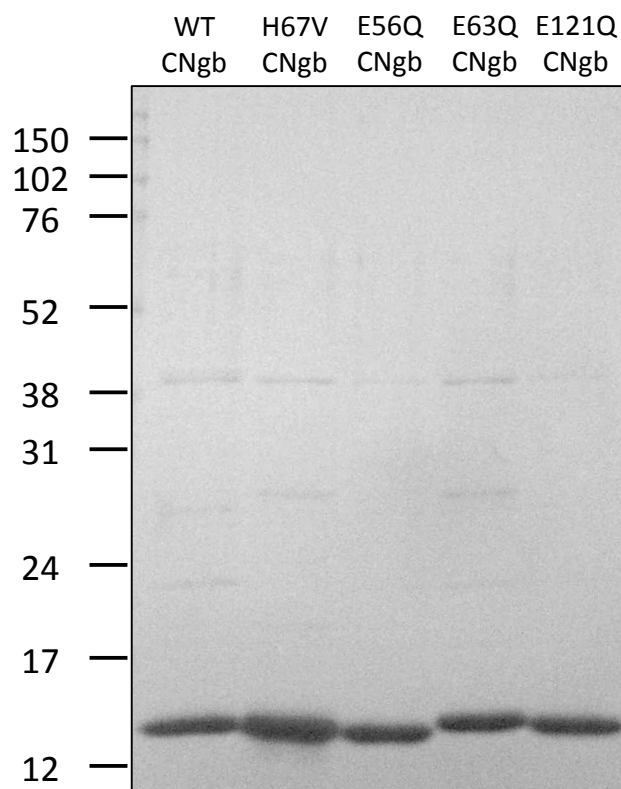


図 30. ヒト Ngb (HNgb)、魚類 Ngb (ZNgb) およびキメラ Ngb (CNgb) の配列比較  
 Clustal W を用いて HNgb、ZNgb および CNgb の配列比較を行った。HNgb のモジュール M1 から M4 および  $\alpha$ -ヘリックスの位置 (Protein Data Bank code : 1OJ6) を配列の上部に示した。GDI 活性に重要な残基を水色、細胞膜透過に重要な残基を赤色、遠位 (distal) および近位 (proximal) のヒスチジン (His) を黄緑色でそれぞれ示し、HNgb の残基番号を上、CNgb の残基番号を下に示した。また、配列の左右には、配列の初めまたは終わりの残基番号を示した。



**図 31. SDS-PAGE による Ngb の精製度の確認**

精製した Ngb は 15% SDS ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE を行い、クマシーブリアントブルーで染色した。分子量は kDa として左側に示した。図中の CNgb はキメラ Ngb を示す。



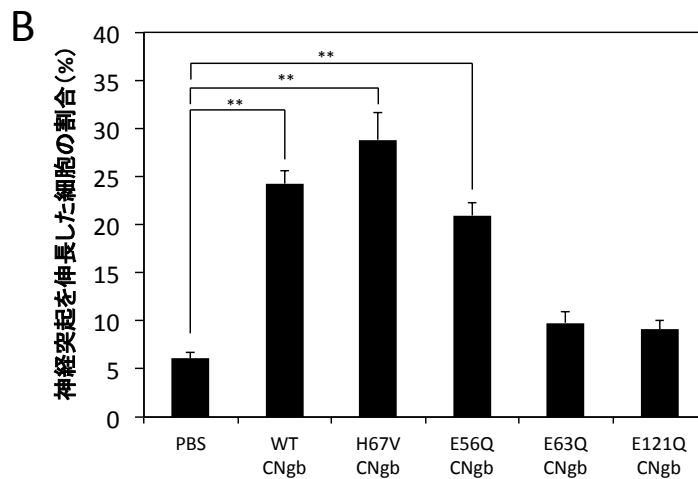
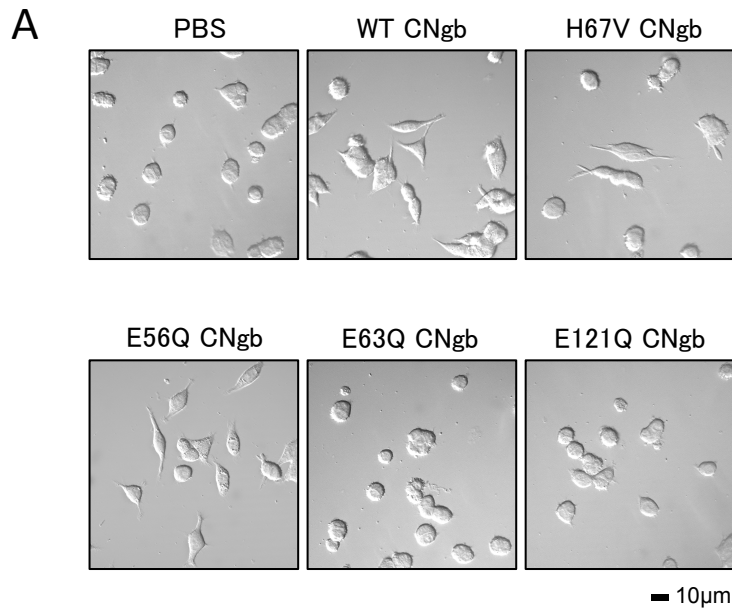


図 32. 野生型キメラ Ngf (WT CNgb)、H67V CNgb 変異体、E56Q CNgb 変異体、E63Q CNgb 変異体および E121Q CNgb 変異体を添加し、2 日間培養した時の PC12 細胞の神経突起の伸長

(A) PC12 細胞は PBS または Ngf (10 μM) と共に、通常酸素環境下で 2 日間培養した。その後、微分干渉顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 μm を示す。(B) 10 μm 以上の神経突起をもつ細胞を神経突起が伸長した細胞として計数し、神経突起を伸長した細胞の割合を示した。値は独立した 4 回以上 (triplicate) の実験における平均値であり、エラーバーは SEM を示す。有意差は one-way ANOVA で解析した後、Turkey-Kramer post hoc tests により解析した。(\*\* ; p<0.01)

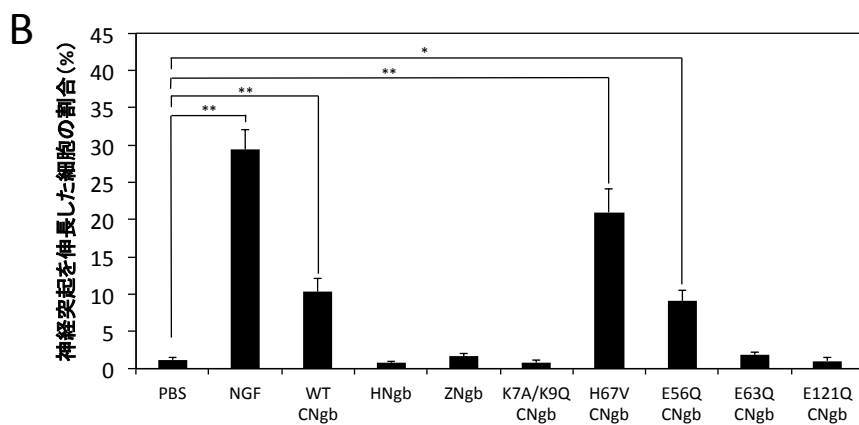
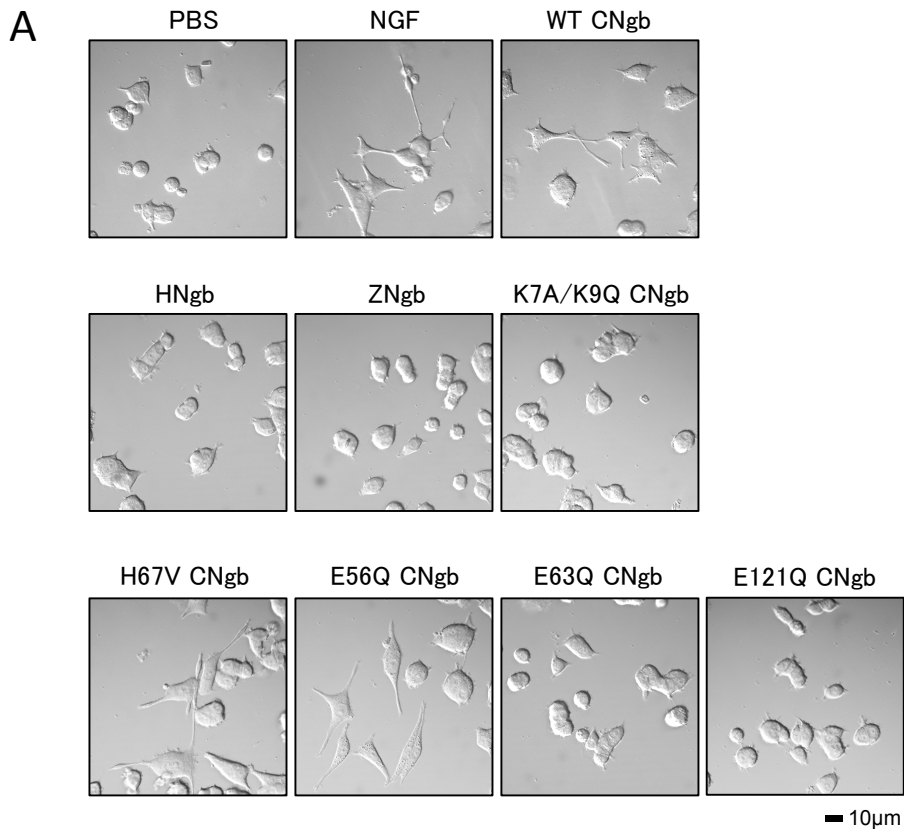


図 33. Ngf および NGF を添加し、5 日間培養した時の PC12 細胞の神経突起の伸長

(A) PC12 細胞は PBS または Ngf (10 µM) と共に、通常酸素環境下で 5 日間培養した。その後、微分干渉顕微鏡で観察した。スケールバーは 10 µm を示す。(B) 細胞体の直径以上の神経突起をもつ細胞を神経突起が伸長した細胞として計数し、神経突起を伸長した細胞の割合を示した。値は独立した 3 回以上 (triplicate) の実験における平均値であり、エラーバーは SEM を示す。有意差は one-way ANOVA で解析した後、Turkey-Kramer post hoc tests により解析した。

(\* ; p<0.05、\*\* ; p<0.01)

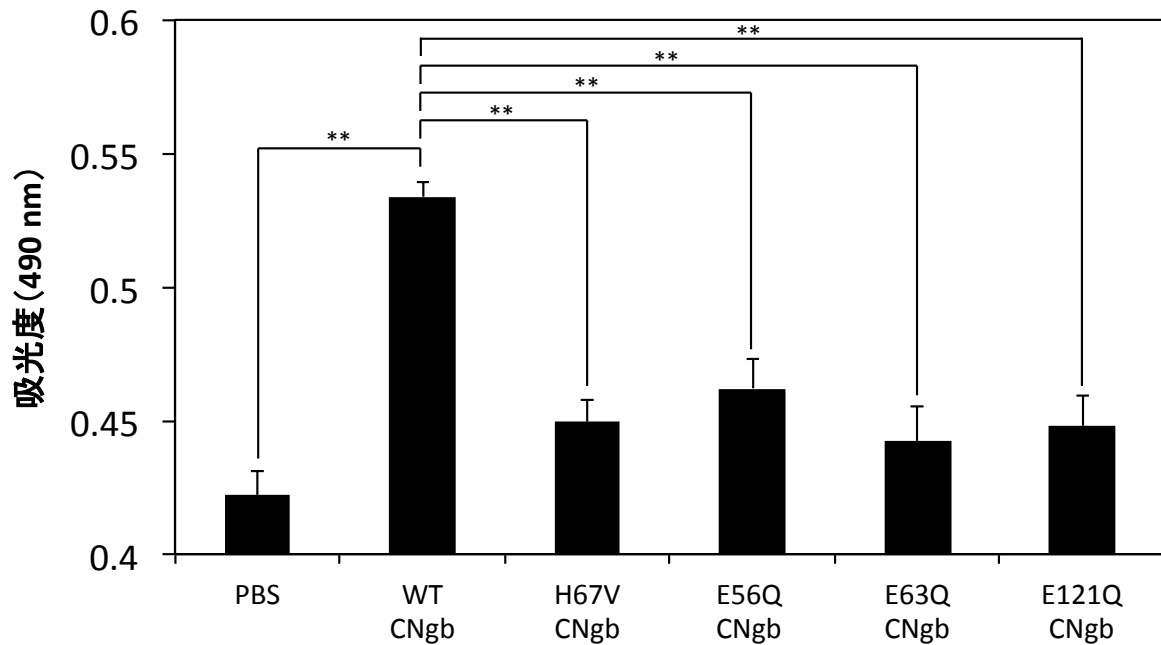


図 34. キメラ Ngb (CNgb) の細胞保護能

PC12 細胞は PBS、野生型 CNgb (WT CNgb)、H67V CNgb、E56Q CNgb、E63Q CNgb または E121Q CNgb を培地に加えて培養した後、過酸化水素を添加して 24 時間培養した。細胞の生存については MTS 法によって評価した。値は独立した 4 回 (triplicate) の実験における平均値であり、エラーバーは SEM を示す。有意差は one-way ANOVA で解析した後、Turkey-Kramer post hoc tests により解析した。(\*\*;  $p < 0.01$ )

## 4.4. 考察

本研究から、細胞膜透過に重要な魚類 Ngb のモジュール M1[35,36]とヒト Ngb のモジュール M2~M4 を融合したキメラ Ngb は、培地に添加しただけで PC12 細胞の神経突起を伸長させた。このことからゼブラフィッシュのモジュール M1 が細胞膜透過に重要であり、ヒトのモジュール M2~M4 が神経突起の伸長に重要であることを明らかにした。したがって、キメラ Ngb は魚類 Ngb 特有の細胞膜透過能により細胞内に導入され[35,36]、ヒト Ngb 特有の神経突起の伸長能により神経突起を伸長させることが判明した (図 35)。NGF は神経突起を伸長させるという点でキメラ Ngb と類似しているが、NGF は細胞膜表面の受容体と相互作用し、細胞内にシグナルを伝達する一方で、キメラ Ngb は細胞膜表面のグルコサミノグリカンと相互作用しエンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシスにより細胞内に導入されて機能する点で、その作用機序が異なると考えられる (図 35)。このことから、新たな神経突起の伸長誘導物質の作製に成功したといえる。

また、2013 年にヒト Ngb の過剰発現がマウスの神経芽細胞種 Neuro 2a やラットの初代培養皮質ニューロンの神経突起の伸長を促進することが報告された[40]。さらに 2016 年にはヒト Ngb の過剰発現がマウスの網膜神経節細胞 (RGC-5 細胞) の神経突起の長さを伸ばすことも報告された[41]。加えて、ヒトの幹細胞から神経幹細胞への分化の過程において、Ngb の発現量が大きく上昇することや、神経細胞の産生が行われるラットの脳室下帯において Ngb が発現していることが報告された[60]。したがって本研究とこれらの先行研究から、哺乳動物の Ngb は神経細胞の分化や産生に重要な役割を果たすことが示唆される。

本研究では、mono-His 型 Ngb (H67V キメラ Ngb 変異体) が神経突起の伸長能もつことから、ヘム近傍構造の変化によらず Ngb は神経突起の伸長能をもつことを明らかにした。一方で、当研究室の先行研究において、mono-His 型ヒト Ngb (H64V ヒト Ngb 変異体) は  $G\alpha_{i/o}$  と相互作用せず、GDI 活性もなく、結果として細胞保護能もなく、また bis-His 型ヒト Ngb は  $G\alpha_{i/o}$  と相互作用し、GDI 活性により細胞死を抑制することを明らかにした[28]。これらのことは、Ngb の細胞保護能には酸化ストレスに伴う bis-His 型への構造変化が重要である一方で、Ngb の神経突起の伸長能にはヘム近傍構造の変化が重要ではないことを意味する。したがって、酸化ストレス環境下で存在する鉄三価 Ngb (bis-His 型 Ngb) は細胞保護能もつ一方で、通常酸素環境下で存在

する鉄二価酸素結合型 Ngb (mono-His 型 Ngb) は神経突起の伸長能をもつ可能性が考えられる。本研究により、神経突起の伸長を起こす作用機序は細胞保護を起こす作用機序とは異なることが明らかになり、Ngb の構造と機能の新たな関係が示唆されたといえる。

加えて、本研究から  $G\alpha_{i/o}$  との相互作用、GDI 活性および細胞保護能に重要なヒト Ngb の Glu53、Glu60 および Glu118 のうち、神経突起の伸長能には Glu60、Glu118 のみが重要であり、Glu53 は重要ではないことが示唆された。これらの重要な残基の違いも、細胞保護能と神経突起の伸長能の作用機序が異なること示唆している。また、それぞれのアミノ酸残基を生物種間で比較すると、Glu60 はすべての生物種において保存されており、Glu118 は両生類、爬虫類、鳥類および哺乳類において広く保存されている一方で、Glu53 は北方真獣類においてのみ保存されていた(図 36)。したがって、神経突起の伸長に重要な Glu60 および Glu118 は両生類より高等なすべての生物種の Ngb において保存されていることから、神経突起の伸長能は両生類より高等なすべての生物種の Ngb が有している一方で、細胞保護能は北方真獣類の Ngb のみが有していることが示唆された。このことから神経突起の伸長能は、細胞保護能よりも進化的に古い段階で獲得されたものであることが示唆された。

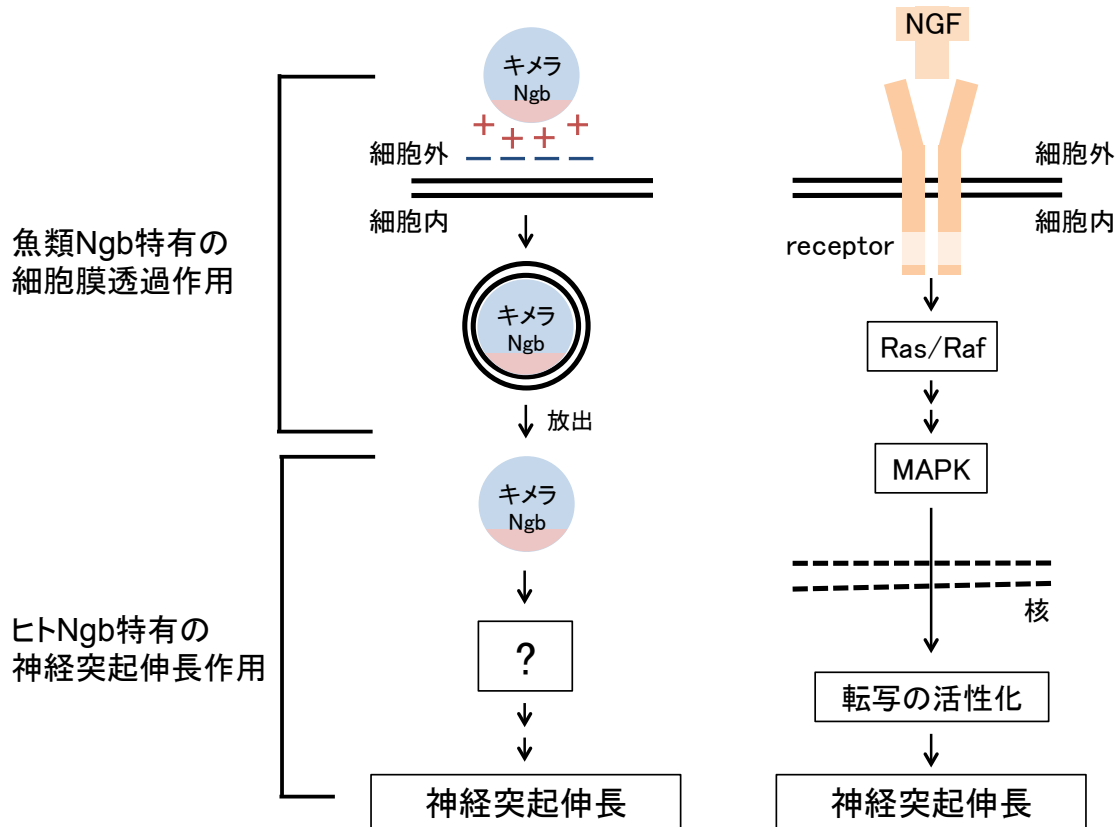


図 35. キメラ Ngb の神経突起の伸長

キメラ Ngb および NGF が神経突起の伸長を促進する模式図を示した。キメラ Ngb はマクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれた後、何らかの方法で細胞質に放出され、神経突起の伸長を起こすシグナル伝達経路を活性化すると考えられる。

			53	60	118	
Mammalia	Eutheria	Boreotheria	Human	E	E	E
			Monkey	E	E	E
			Mouse	E	E	E
			Rat	E	E	E
			Dolphin	E	E	E
			Cow	E	E	E
			Pig	E	E	E
			Horse	E	E	E
	Rabbit	E	E	E		
		Afrotheria	Elephant	N	E	E
		Metatheria	Opossum	Q	E	E
	Prototheria	Platypus	R	E	E	
Aves		Chicken	Q	E	E	
Reptillia		Anole Lizard	Q	E	E	
Amphibia		Frog	Q	E	E	
Osteichtyes		Zebrafish	P	E	Q	
		Fugu	Q	E	Q	

図 36. 細胞保護に重要な残基（Glu53、Glu60 および Glu118）と神経突起の伸長に重要な残基（Glu60 および Glu118）の生物種間の配列比較

図上部の数字はヒト Ngb における残基番号を示す。ヒト Ngb のアミノ酸残基と相同なアミノ酸残基を黄色で示した。

## 5. 結論

本研究により 1) ヒト Ngb の GDI 活性および細胞保護能にヒト Ngb の Glu60 が重要であることを明らかにし (第 2 章)、2) ヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  との相互作用に重要なアミノ酸残基を特定し (第 3 章)、3) キメラ Ngb は培地に添加するだけで、細胞内に導入され神経突起を伸長させることを明らかにした (第 4 章)。

第 2 章では、質量分析による解析からヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  の相互作用部位として示唆されていたヒト Ngb の Glu60 が GDI 活性や細胞保護能に重要であるかを調べるために、E60Q ヒト Ngb 変異体を作製して検証した。すると、E60Q ヒト Ngb 変異体は GDI 活性もなく、細胞死を抑制できなかったことから、ヒト Ngb の GDI 活性および細胞保護能にはヒト Ngb の Glu60 が重要であることが新たに判明した。本研究とこれまでの報告から、GDI 活性および細胞保護能に重要なヒト Ngb のアミノ酸残基は Glu53、Glu60、Arg97、Glu118 および Glu151 であることが判明した。さらにこれらの残基がすべて保存されているのは、北方真獣類と呼ばれる一部の哺乳動物においてのみであることから、北方真獣類の Ngb は細胞保護能をもつことが示唆された。

この結果を受けて第 3 章では、これらのヒト Ngb の残基が  $G\alpha_{i1}$  との相互作用に重要であるかを検証し、加えて  $G\alpha_{i1}$  側の重要残基の特定を試みた。はじめに GST 融合 E53Q、E60Q、R97Q、E118Q および E151N ヒト Ngb 変異体を作製し、野生型  $G\alpha_{i1}$  との GST プルダウンアッセイを行った。すると、これらの変異体は野生型  $G\alpha_{i1}$  と相互作用しなかったことから、GDI 活性や細胞保護能に重要なこれらの残基は、 $G\alpha_{i1}$  との相互作用にも重要であることが判明した。次にヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  の相互作用に重要な  $G\alpha_{i1}$  側の部位を明らかにするために、それぞれの単独の X 線結晶構造を用いて複合体のドッキングモデルを作成し、このドッキングモデルに基づき  $G\alpha_{i1}$  の部位特異的置換変異体を作製して、GST 融合野生型ヒト Ngb との GST プルダウンアッセイを行った。すると、R208A/K209A/K210A  $G\alpha_{i1}$  三重変異体は相互作用しなかったのに対して、他の 4 つの変異体は野生型  $G\alpha_{i1}$  と同様の相互作用を示した。したがって Arg208、Lys209 および Lys210 は相互作用に重要であることが判明したものの、他の 4 つの残基は重要ではないことから、作成した複合体のドッキングモデルは適切でないことが判明した。そこで、新たなドッキングモデルを作成するために、以前に比べてより広範な生物種の Ngb の配列を用いて配列比較を行い、Ngb 側の重要なアミノ酸残基について再考した。すると北方真獣類の Ngb の中でも、ヒト



Ngb の Arg97 に対応する残基がオオコウモリの Ngb では Cys になっており、ヒト Ngb の Glu151 に対応する残基がガラゴでは Gln になっていた。そこでこれらの残基が重要であるかを検証するために、R97C ヒト Ngb 変異体および E151Q ヒト Ngb 変異体を作製して検証したところ、これらの変異体は細胞死を抑制せず、GDI 活性もなく、さらに  $G\alpha_{i1}$  と相互作用しないことがわかった。このことから、ヒト Ngb の Arg97 と Glu151 は、ヒト Ngb の  $G\alpha_{i1}$  との相互作用に重要ではないことが判明した。このことを受けて、ヒト Ngb の Glu53、Glu60 および Glu118 のみに着目し、新たな複合体のドッキングモデルを作成し検証を行ったところ、K46A  $G\alpha_{i1}$  変異体および K70A  $G\alpha_{i1}$  変異体が GST 融合野生型ヒト Ngb と相互作用しないことがわかった。したがって、 $G\alpha_{i1}$  の Arg208、Lys209 および Lys210 に加えて Lys46 と Lys70 もヒト Ngb との相互作用に重要であることが判明した。第 3 章では、 $G\alpha_{i1}$  との相互作用、GDI 活性および細胞保護能に重要なヒト Ngb のアミノ酸残基が Glu53、Glu60 および Glu118 のみであることを明らかにした。さらに、ヒト Ngb との相互作用に重要な  $G\alpha_{i1}$  のアミノ酸残基が Lys46、Lys70、Arg208、Lys209 および Lys210 であることを新たに明らかにした。これらのことから、ヒト Ngb の酸性アミノ酸と  $G\alpha_{i1}$  の塩基性アミノ酸との静電的な相互作用が重要であることが示唆された。また、これらの結果を受けて、ヒト Ngb と  $G\alpha_{i1}$  の複合体のドッキングモデルを提唱した。

第 4 章では、魚類 Ngb のモジュール M1 とヒト Ngb のモジュール M2~M4 を融合したキメラ Ngb が、培地に添加するだけで神経突起を伸長させることを発見した。加えて魚類 Ngb、ヒト Ngb および細胞膜透過しない K7A/K9Q キメラ Ngb 変異体を培地に添加しても神経突起の伸長が観察されなかったことから、キメラ Ngb は魚類 Ngb のモジュール M1 特有の細胞膜透過能により細胞内に導入され、ヒト Ngb のモジュール M2~M4 特有の神経突起の伸長能により神経突起を伸長させることが判明した。さらに、ヒト Ngb の神経突起伸長の作用機序を明らかにするために、遠位のヒスチジン (His) をバリンに置換することで mono-His 型のみをとる H67V キメラ Ngb 変異体を用いて実験を行ったところ、H67V キメラ Ngb 変異体を培地に添加したときにも神経突起の伸長が観察された。したがって、神経突起の伸長には Ngb の構造変化は重要ではないことが判明した。先行研究から mono-His 型ヒト Ngb は  $G\alpha_{i1}$  と相互作用せず細胞保護能もないことが示されていることから、神経突起を引き起こす作用機序は、酸化ストレスから細胞を保護する機序とは異なることが示唆された。また、神経突起の伸長における重要なアミノ酸を特定するために、細胞保護能に重要な残基に着目し、E56Q キメラ Ngb 変異体、E63Q キメラ Ngb

変異体および E121Q キメラ Ngb 変異体を作製して神経突起の伸長を観察した。キメラ Ngb の Glu56、Glu63 および Glu121 はそれぞれ、ヒト Ngb の Glu53、Glu60 および Glu118 に対応するアミノ酸残基である。すると、E56Q キメラ Ngb 変異体は神経突起を伸長が観察されたのに対して、E63Q キメラ Ngb 変異体および E121Q キメラ Ngb 変異体は観察されなかった。このことから、キメラ Ngb の神経突起の伸長には Glu63 および Glu121 が重要である一方で、Glu56 は重要でないことが判明した。このことも、神経突起の伸長能が細胞保護能とは異なる作用機序によるものであることを示唆する結果である。

本研究では、ヒト Ngb の細胞保護能には Arg97 および Glu151 は重要ではなく、Glu53、Glu60 および Glu118 が重要であることを明らかにし、ヒト Ngb の神経突起の伸長能には Glu60 と Glu118 が重要であることが示唆された。3.4.2 および 4.4 の考察でも述べた通り、Glu53 は北方真獣類、Glu60 はすべて生物種、そして Glu118 は両生類よりも高等な生物種で保存されていることから、両生類よりも高等な生物種の Ngb には神経突起の伸長能があり、北方真獣類の Ngb には細胞保護能があると推定された。このことから、Ngb の機能は生物の進化に伴って獲得されてきたと考えられた。様々な生物種間の Ngb の配列アライメントを作成し、先行研究に基づき生物種を分類して示す (図 37) [61]。

ヒトの Glu53 に対応する残基は、北方真獣類 (Boreotheria) の多くの生物種で保存されている一方で、それ以外の生物種では保存されていないことがわかる。特にアフリカ獣類 (Afrotheria) に属するゾウの Ngb は、ヒト Ngb と 92.7% の高い相同性を示すものの、ヒト Ngb の Glu53 に対応する残基が Asn であることから、細胞保護能はもたないと考えられる。また 3.4.2 において、ヒトの Glu53 に対応する残基がアザラシでは Lys になっており細胞保護能はもたない一方で、Ngb の局在が神経細胞ではなくアストロサイトにあり、ヒトとは異なる機能をもつ可能性について言及した。加えて図 37 に示すように、同じ食肉目 (Carnivora) に属し、アザラシと同様に水中での生活に適応しているセイウチの Ngb では、他の多くの北方真獣類と同様に Glu になっており、アザラシの Ngb は特異的な変異を起こしていることが考えられる。

また、ヒトの Glu118 に対応する残基は、ゼブラフィッシュにおいては Gln になっている一方で、カエルよりも高等な Ngb においては、ヒトと同様に Glu になっている。ヒト Ngb、魚類 Ngb およびカエル Ngb のアミノ酸残基の相同性を比較すると、ヒト Ngb と魚類 Ngb 間では 52.3%、ヒト Ngb とカエル Ngb 間では 66.9%、そして魚類 Ngb とカエル Ngb 間では 48.4% となってお

り、カエル Ngb は魚類 Ngb よりもヒト Ngb との相同性が高いことがわかる。このことから、魚類から両生類に進化する過程で、Ngb をコードしている DNA に非常に多くの非同義置換が起こり、アミノ酸配列が大きく変化したことが推定される。このアミノ酸配列の変化に伴い膜透過能が失われ、同時に神経突起の伸長能を獲得したものと考えられる。本研究によって示唆されたように、Ngb の神経突起の伸長能は両生類よりも高等な生物種で広く保存されている可能性があり、神経系における普遍的な意義をもっている可能性が高い。Ngb は 2000 年に発見されて以来、酸化ストレスに伴う細胞保護効果については様々な研究がなされてきたが、神経突起の伸長能については 2013 年の報告以来、直接的な研究は本研究以外に 2 報のみであり[40,41]、今後の研究が期待される。

Mammalia	Eutheria	Boreotheria	Euarchontoglires	Primates	Human	----MERPEPELIRQSWRAVRSRPLEHGTVLFRARLFALEPDLLPLFYQNCRQFS
					Chimpanzee	----MERPEPELIRQSWRAVRSRPLEHGTVLFRARLFALEPDLLPLFYQNCRQFS
					Rhesus macaque	----MERPEPELIRQSWRAVRSRPLEHGTVLFRARLFALEPDLLPLFYQNCRQFS
					Galago	----MERPEPELIRQSWRAVRSRPLEHGTVLFRARLFALEPDLLPLFYQNCRQFS
				Rodentia	Rat	----MERLESELIRQSWRAVRSRPLEHGTVLFRARLFALEPDLLPLFYQNCRQFS
					Mouse	----MERPESELIRQSWRVRSRPLEHGTVLFRARLFALEPSLLPLFYQNCRQFS
			Laurasiatheria	Cetartiodactyla	Cow	----MELPEPELIRQSWREVSRSRPLEHGTVLFRARLFALEPDLLPLFYQNCRQFS
					Whale	----MERPEPELIRQSWREVSRSRPLEHGTVLFRARLFALEPDLLPLFYQNCRQFS
				Carnivora	Harp seal	----MERPEPELIRQSWREVSRSRPLEHGTVLFRARLFALEPDLLPLFYQNCRQFS
					Hooded seal	----MERPEPELIRQSWRAVRSRPLEHGTVLFRARLFALEPDLLPLFYQNCRQFS
					Walrus	----MERPEPELIRQSWRAVRSRPLEHGTVLFRARLFALEPDLLPLFYQNCRQFS
				Chiroptera	Megabat	----MERPEP---SRWSWTVSRKPLEHGGRSAG-LFDLEPDLLPLFYQKSRQFS
			Afrotheria		Elephant	----MQRPEHELIRQSWRVRSRPLEHGTVLFRARLFALEPDLLPLFYQNCRQFS
			Metatheria		Opossum	METRRLSGPEQELIRESWQKVNSNPLQHGIMLFRDLFDLEPDLLPLFYQNCRQFS
			Prototheria		Platypus	MENGRLSGPEQELIRESWRSVNSNPLEHGIMLFRDLFDLEPDLLPLFYQNCRQFS
Aves					Chicken	MESGMLSRITQQALIRSWRRVSGSPVQHGIVLFRSRLFDLFDLPLFYQNCRRFA
Reptillia					Anole	MESGALSSAQQLIRASWQKVSANPLEHGMVLFRLFDLFDLPLFYQNCCKFS
					Turtle	MESGRLSSTQQALIRESWQKVSNNLQHGIVLFRDLFDLFDLPLFYQNCCKFS
Amphibia					Frog	MEKQDLSGPELIRSWQTVSQDQLHHGTVLFRSRLFELEPELVFLFYQNSSHFS
Osteichthyes					Zebrafish	--MEKLSKDKGLIRDSWESLGRVPHGIVLFRDLFDLFDLPLFYQNSYSTN-CG
					Fugu	--MEKLSKDKGLIRGSWDSLGRVPHGIVLFRDLFDLFDLFDLPLFYQNSYSTN-CG
						7 9 2123

	53	60	97	118	151
Human	SPEDCLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	ASLGRKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPATRAAWSQ
Chimpanzee	SPEDCLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	ASLGRKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPATRAAWSQ
Rhesus macaque	SPEDCLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	ASLGRKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPATRAAWSQ
Galago	SPEDCLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	ASLGRKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPATRAAWSQ
Rat	SPEDCLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	ATLGRKHRAVGVRL	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPDFTPATRTAWSQ
Mouse	SPEDCLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	ASLGRKHRAVGVRL	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPDFTPATRTAWSR
Cow	SPEDCLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	ASLGRKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPATRAAWSQ
Whale	SSDCLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	ASLGRKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPAMRAAWSQ
Harp seal	SPKDCSSPEFLDHIRKVMV	IDAVTNVEDLSSLEEYL	AGLGGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPAVRAAWSQ
Hooded seal	SPKDCSSPEFLDHIRKVMV	IDAVTNVEDLSSLEEYL	AGLGGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPAVRAAWSQ
Walrus	SPEDCLSSPEFLDHIRKVMV	IDAVTNVEDLSSLEEYL	AGLGGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPAVRAAWSQ
Megabat	SHEDCLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	AGLGGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCPGPFVTPAVRAAWSQ
Elephant	SVNDCSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	AGLGGKHRLVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPATKAAWSQ
Opossum	SPQDCSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	TNKGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPATRAAWSQ
Platypus	SPRDCLASPEFLDHIRKVMV	IDAAVTNVEDLSSLEEYL	TNKGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPATRAAWSQ
Chicken	SPQECLAAPFLDHIRKVMV	IDAAVSHLEDLPCLEEYL	CNKGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGAAFPDREAWIELY
Anole	TPQECLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTHMENLHCLAEYL	ANLGGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPAVRAAWSQ
Turtle	SPQECLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVTHLENLSSLEEYL	SNLGGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPAVRAAWSQ
Frog	KVQDCSSAPEFLDHIRKVMV	IDAAVSSLDLSSLEEYL	TSNKGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EKCLGPAFTPATRAAWSQ
Zebrafish	DAPECLSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVSHLDDLHLEDFLL	LNKGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EQSLGPAFTPATRAAWSQ
Fugu	STQDCSSPEFLDHIRKVMV	IDAAVSHLDDLHLEDFLL	LNKGKHRAVGVKLS	SSFSTVGSLLYML	EQSLGPAFTPATRAAWSQ

図 37. Ngb の配列アライメント

Clustal W を用いて様々な生物種の Ngb の配列比較を行った。配列の上部の数字はヒト Ngb における残基番号を示し、下部の数字は魚類 Ngb における残基番号を示す。ヒト Ngb の Glu53、Glu60 および Glu118 と相同な残基を黄色で示した。ヒト Ngb の Arg97 に対応するオオコウモリの Cys と Glu151 に対応するガラゴの Gln を青色で示した。魚類 Ngb の Lys7、Lys9、Lys21 および Lys23 と相同な残基を赤色で示した。

## 6. 参考文献

- 1 Burmester, T., Weich, B., Reinhardt, S., and Hankeln, T. (2000) A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* **407**, 520–523
- 2 Zhang, C., Wang, C., Deng, M., Li, L., Wang, H., Fan, M., Xu, W., Meng, F., Qian, L., and He, F. (2002) Full-Length cDNA Cloning of Human Neuroglobin and Tissue Expression of Rat Neuroglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 1411–1419
- 3 Reuss, S., Saaler-Reinhardt, S., Weich, B., Wystub, S., Reuss, M. H., Burmester, T., and Hankeln, T. (2002) Expression analysis of neuroglobin mRNA in rodent tissues. *Neuroscience* **115**, 645–656
- 4 Wystub, S., Laufs, T., Schmidt, M., Burmester, T., Maas, U., Saaler-Reinhardt, S., Hankeln, T., and Reuss, S. (2003) Localization of neuroglobin protein in the mouse brain. *Neurosci. Lett.* **346**, 114–116
- 5 Fabrizius, A., Andre, D., Laufs, T., Bicker, A., Reuss, S., Porto, E., Burmester, T., and Hankeln, T. (2016) Critical re-evaluation of neuroglobin expression reveals conserved patterns among mammals. *Neuroscience* **337**, 339–354
- 6 Schmidt, M., Giessler, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., and Burmester, T., (2003) How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J. Biol. Chem.* **278**, 1932–1935
- 7 Awenius, C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2001) Neuroglobins from the Zebrafish *Danio rerio* and the Pufferfish *Tetraodon nigroviridis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 418–421
- 8 Kugelstadt, D., Haberkamp, M., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) Neuroglobin, cytoglobin, and a novel, eye-specific globin from chicken. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 719–725
- 9 Fuchs, C., Burmester, T., and Hankeln, T. (2006) The amphibian globin gene repertoire as revealed by the *Xenopus* genome. *Cytogenet. Genome Res.* **112**, 296–306
- 10 Pesce, A., Dewilde, S., Nardini, M., Moens, L., Ascenzi, P., Hankeln, T., Burmester, T., and

- Bolognesi, M. (2003) Human Brain Neuroglobin Structure Reveals a Distinct Mode of Controlling Oxygen Affinity. *Structure* **11**, 1087–1095
- 11 Guimarães, B. G., Hamdane, D., Lechauve, C., Marden, M. C., and Golinelli-Pimpaneau, B. (2014) The crystal structure of wild-type human brain neuroglobin reveals flexibility of the disulfide bond that regulates oxygen affinity. *Acta Crystallogr. Sect. D* **70**, 1005–1014
- 12 Vallone, B., Nienhaus, K., Brunori, M., and Nienhaus, G. U. (2004) The structure of murine neuroglobin: Novel pathways for ligand migration and binding. *Proteins* **56**, 85–92
- 13 Dewilde, S., Kiger, L., Burmester, T., Hankeln, T., Baudin-Creuzza, V., Aerts, T., Marden, M. C., Caubergs, R., and Moens, L. (2001) Biochemical characterization and ligand binding properties of neuroglobin, a novel member of the globin family. *J. Biol. Chem.* **276**, 38949–38955
- 14 Hankeln, T., Ebner, B., Fuchs, C., Gerlach, F., Haberkamp, M., Laufs, T., Roesner, A., Schmidt, M., Weich, B., and Wystub, S. (2005) Neuroglobin and cytoglobin in search of their role in the vertebrate globin family. *J. Inorg. Biochem.* **99**, 110–119
- 15 Kawada, N., Kristensen, D. B., Asahina, K., Nakatani, K., Minamiyama, Y., Seki, S., and Yoshizato, K. (2001) Characterization of a Stellate Cell Activation-associated Protein (STAP) with Peroxidase Activity Found in Rat Hepatic Stellate Cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 25318–25323
- 16 Trent, J. T., 3rd, and Hargrove, M. S. (2002) A Ubiquitously Expressed Human Hexacoordinate Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **277**, 19538–19545
- 17 Burmester, T., Ebner, B., Weich, B., and Hankeln, T. (2002) Cytoglobin: A Novel Globin Type Ubiquitously Expressed in Vertebrate Tissues. *Mol. Biol. Evol.* **19**, 416–421
- 18 Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y., and Greenberg, D. A. (2001) Neuroglobin is upregulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 15306–15311
- 19 Sun, Y., Jin, K., Peel, A., Mao, X. O., Xie, L., and Greenberg, D. A. (2003) Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3497–3500

- 20 Khan, A. A., Wang, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L., Miles, E., Graboski, J., Chen, S., Ellerby, L. M., Jin, K., and Greenberg, D. A. (2006) Neuroglobin-overexpressing transgenic mice are resistant to cerebral and myocardial ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 17944–17948
- 21 Garry, D. J., and Mammen, P. P. (2003) Neuroprotection and the role of neuroglobin. *Lancet* **362**, 342–343
- 22 Herold, S., Fago, A., Weber, R. E., Dewilde, S., and Moens, L. (2004) Reactivity studies of the Fe(III) and Fe(II)NO forms of human neuroglobin reveal a potential role against oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **279**, 22841–22847
- 23 Fago, A., Mathews, A. J., Moens, L., Dewilde, S., and Brittain, T. (2006) The reaction of neuroglobin with potential redox protein partners cytochrome b<sub>5</sub> and cytochrome c. *FEBS Lett.* **580**, 4884–4888
- 24 Gilman, A. G. (1987) G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 615–649
- 25 Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature.* **379**, 311–319
- 26 Wakasugi, K., Nakano, T., and Morishima, I. (2003) Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric G $\alpha$  protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J. Biol. Chem.* **278**, 36505–36512
- 27 Watanabe, S., and Wakasugi, K. (2008) Neuroprotective function of human neuroglobin is correlated with its guanine nucleotide dissociation inhibitor activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 695–700
- 28 Watanabe, S., Takahashi, N., Uchida, H., and Wakasugi, K. (2012) Human neuroglobin functions as an oxidative stress-responsive sensor for neuroprotection. *J. Biol. Chem.* **287**, 30128–30138
- 29 Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O., and Málaga-Trillo, E. (2006) Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 343–357

- 30 Wakasugi, K., Nakano, T., Kitatsuji, C., and Morishima, I. (2004) Human neuroglobin interacts with flotillin-1, a lipid raft microdomain-associated protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 453–460
- 31 Wakasugi, K., and Morishima, I. (2005) Identification of Residues in Human Neuroglobin Crucial for Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor Activity. *Biochemistry* **44**, 2943–2948
- 32 Wakasugi, K., Takahashi, N., Uchida, H., and Watanabe, S. (2011) Species-specific functional evolution of neuroglobin. *Mar. Genomics* **4**, 137–142
- 33 Kitatsuji, C., Kuroguchi, M., Nishimura, S., Ishimori, K., and Wakasugi, K. (2007) Molecular Basis of Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor Activity of Human Neuroglobin by Chemical Cross-linking and Mass Spectrometry. *J. Mol. Biol.* **368**, 150–160
- 34 Fuchs, C., Heib, V., Kiger, L., Haberkamp, M., Roesner, A., Schmidt, M., Hamdane, D., Marden, M. C., Hankeln, T., and Burmester, T. (2004) Zebrafish reveals different and conserved features of vertebrate neuroglobin gene structure, expression pattern, and ligand binding. *J. Biol. Chem.* **279**, 24116–24122
- 35 Watanabe, S., and Wakasugi, K. (2008) Zebrafish Neuroglobin Is a Cell-Membrane-Penetrating Globin. *Biochemistry* **47**, 5266–5270
- 36 Watanabe, S., and Wakasugi, K. (2010) Identification of residues critical for the cell - membrane - penetrating activity of zebrafish neuroglobin. *FEBS Lett.* **584**, 2467–2472
- 37 Watanabe, S., and Wakasugi, K. (2011) Module M1 of Zebrafish Neuroglobin Acts as a Structural and Functional Protein Building Block for a Cell-Membrane-Penetrating Activity. *PLOS ONE* **6**, e16808
- 38 Go, M. (1981) Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. *Nature* **291**, 90–92
- 39 Wakasugi, K., and Morishima, I. (2005) Preparation and characterization of a chimeric zebrafish-human neuroglobin engineered by module substitution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 591–597
- 40 Li, L., Liu, Q. R., Xiong, X. X., Liu, J. M., Lai, X. J., Cheng, C., Pan, F., Chen, Y., Bin Yu, S., Yu, A. C. H., and Chen, X. Q. (2013) Neuroglobin Promotes Neurite Outgrowth via



- Differential Binding to PTEN and Akt. *Mol. Neurobiol.* **49**, 149–162
- 41 Sugitani, K., Koriyama, Y., Ogai, K., Wakasugi, K., and Kato, S. (2016) A Possible Role of Neuroglobin in the Retina After Optic Nerve Injury: a comparative study of zebrafish and mouse retina. *Adv. Exp. Med. Res.* **854**, 671–675
- 42 Aida, Y., and Pabst, M. J. (1990) Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. *J. Immunol. Methods.* **132**, 191–195
- 43 Liu, S., Tobias, R., McClure, S., Styba, G., Shi, Q., and Jackowski, G. (1997) Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin. Biochem.* **30**, 455–463
- 44 Lee, E., Linder, M. E., and Gilman, A. G. (1994) Expression of G-protein  $\alpha$  subunits in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **237**, 146–164
- 45 Chen, Y.-H., Yang, J. T., and Martinez, H. M. (1972) Determination of the secondary structures of proteins by circular dichroism and optical rotatory dispersion. *Biochemistry* **11**, 4120–4131
- 46 Li, W., Wu, Y., Ren, C., Lu, Y., Gao, Y., Zheng, X., and Zhang, C. (2011) The activity of recombinant human neuroglobin as an antioxidant and free radical scavenger. *Proteins* **79**, 115–125
- 47 Kamioka, Y., Fujikawa, C., Ogai, K., Sugitani, K., Watanabe, S., Kato, S., and Wakasugi, K. (2013) Functional characterization of fish neuroglobin: zebrafish neuroglobin is highly expressed in amacrine cells after optic nerve injury and can translocate into ZF4 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **1834**, 1779–1788
- 48 Johnston, C. A., Willard, F. S., Jezyk, M. R., Fredericks, Z., Bodor, E. T., Jones, M. B., Blaesius, R., Watts, V. J., Harden, T. K., Sondek, J., Ramer, J. K., and Siderovski, D. P. (2005) Structure of G $\alpha$ 1 bound to a GDP-selective peptide provides insight into guanine nucleotide exchange. *Structure* **13**, 1069–1080
- 49 Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* **379**, 311–319
- 50 Ja, W. W., and Roberts, R. W. (2004) In Vitro Selection of State-Specific Peptide Modulators of G Protein Signaling Using mRNA Display. *Biochemistry* **43**, 9265–9275

- 51 Ja, W. W., Adhikari, A., Austin, R. J., Sprang, S. R., and Roberts, R. W. (2005) A peptide core motif for binding to heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunits. *J. Biol. Chem.* **280**, 32057–32060
- 52 Willard, F. S., and Siderovski, D. P. (2006) The R6A-1 peptide binds to switch II of G  $\alpha_{i1}$  but is not a GDP-dissociation inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **339**, 1107–1112
- 53 Austin, R. J., Ja, W. W., and Roberts, R. W. (2008) Evolution of Class-Specific Peptides Targeting a Hot Spot of the G  $\alpha_s$  Subunit. *J. Mol. Biol.* **377**, 1406–1418
- 54 Coleman, D., E., Berghuis, A., M., Lee, E., Linder, M., E., Gilman, A., G., and Sprang, S. (1994) R. Structures of active conformations of G  $\alpha_1$  and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* **265**, 1405-1412.
- 55 Kimple, R., J., Kimple, M., E., Betts, L., Sondek, J., and Siderovski, D., P. (2002) Structural determinants for GoLoco-induced inhibition of nucleotide release by G  $\alpha$  subunits. *Nature* **416**, 878-81.
- 56 Baltoumas, F. A., Theodoropoulou, M. C., and Hamodrakas, S. J. (2013) Interactions of the  $\alpha$ -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: A critical review and analysis of interacting surfaces, conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J. Struct. Biol.* **182**, 209–218
- 57 Jia, M., Li, J., Zhu, J., Wen, W., Zhang, M., and Wang, W. (2012) Crystal structures of the scaffolding protein LGN reveal the general mechanism by which GoLoco binding motifs inhibit the release of GDP from G  $\alpha_i$ . *J. Biol. Chem.* **287**, 36766–36776
- 58 Mitz, S. A., Reuss, S., Folkow, L. P., Blix, A. S., Ramirez, J. M., Hankeln, T., and Burmester, T. (2009) When the brain goes diving: glial oxidative metabolism may confer hypoxia tolerance to the seal brain. *Neuroscience* **163**, 552–560
- 59 Schneuer, M., Flachsbarth, S., Czech-Damal, N. U., Folkow, L. P., Siebert, U., and Burmester, T. (2012) Neuroglobin of seals and whales: Evidence for a divergent role in the diving brain. *Neuroscience* **223**, 35–44
- 60 Haines, B., Mao, X., Xie, L., Spusta, S., Zeng, X., Jin, K., and Greenberg, D. A. (2013) Neuroglobin expression in neurogenesis. *Neurosci. Lett.* **549**, 3–6
- 61 Springer, M. S., Murphy, W. J., Eizirik, E., and O'Brien, S. J. (2003) Placental mammal

diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**,  
1056–1061

## 7. 発表論文

本研究の成果は以下の論文において発表した。

Takahashi, N., Watanabe, S., and Wakasugi, K. (2013) Crucial roles of Glu60 in human neuroglobin as a guanine nucleotide dissociation inhibitor and neuroprotective agent. *PLOS ONE* **8**, e83698. (本論文の第 2 章に対応)

Takahashi, N., and Wakasugi, K. (2016) Identification of residues crucial for the interaction between human neuroglobin and the  $\alpha$ -subunit of heterotrimeric  $G_i$  protein. *Sci. Rep.* **6**, 24948. (本論文の第 3 章に対応)

Takahashi, N., Onozuka, W., Watanabe, S. and Wakasugi, K. (2017) Chimeric ZHHH neuroglobin acts as a cell membrane-penetrating inducer of neurite outgrowth. *FEBS Open Bio.* **7**, 1338-1349. (本論文の第 4 章に対応)

## 謝辞

本研究を実施する機会や環境を与えて戴き、その遂行にあたって終始ご指導頂いた若杉桂輔准教授に深謝の意を表す。本研究の遂行にあたり貴重なご助言ご討論を戴いた、名古屋大学 環境医学研究所 病態神経科学分野 渡邊征爾 助教に深謝の意を表す。研究生活全般においてご助言ご討論を戴いた、若杉研究室の内田裕之氏、勝又理恵氏、田中智章氏、岩城健氏、上岡勇輝氏、早川友世氏、中村かな葉氏、宮ノ腰美希氏、森田真人氏、小野塚涉氏、窪田融氏、中本晃正氏、加藤麻紗実氏、高金くらら氏、前島克徳氏、櫻井まりあ氏、陳立峻氏、広域科学専攻の諸先生方、生命環境科学系の同期、そして家族に感謝の意を表す。