

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 高橋 望

【背景と目的】

ニューログロビン (Ngb) は、2000 年に発見された約 17 kDa のグロビン蛋白質である。ヘモグロビンやミオグロビンなどと同様に 8 本の α -ヘリックスからなり、ヘムを含み酸素と可逆的に結合する。また、脊椎動物の中枢神経系に特異的に発現しており、酸化ストレス環境下において発現量が増加し、神経細胞死を抑制することが示されている。Ngb はその立体構造の変化に特徴があり、通常酸素環境下においては、Ngb は二価鉄に酸素が配位しているが (mono-His 型)、

酸化ストレス環境下では鉄が酸化されて三価鉄になり、酸素が外れて His が配位する (bis-His 型)。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。当研究室の

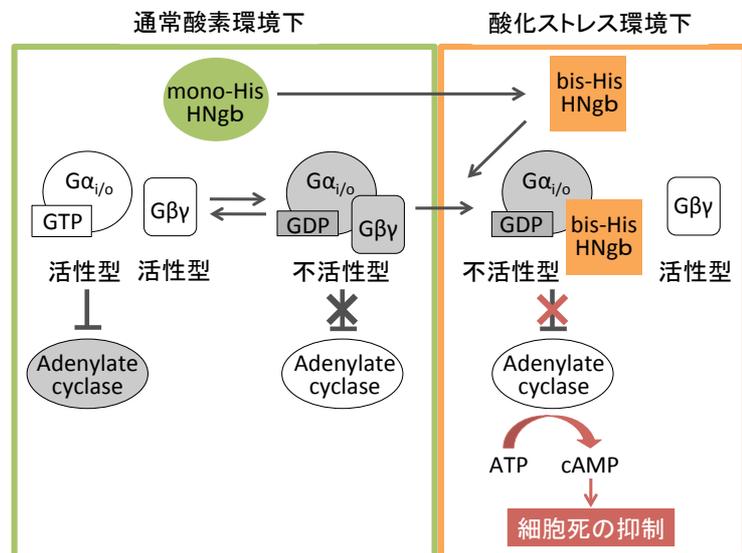


図 1. ヒト Ngb (HNgb) の GDI 活性と細胞保護能

先行研究において、bis-His 型ヒト Ngb がヘテロ三量体 G 蛋白質 α サブユニット ($G\alpha_{i0}$) と特異的に結合し、GDP 解離阻害因子 (GDI) として働き、この GDI 活性により cAMP 濃度の低下を抑えることで、酸化ストレスに伴う細胞死を抑制していることを明らかにした (図 1)。

ヒト Ngb の GDI 活性に重要な残基として、ヒト Ngb の Glu53、Arg97、Glu118 および Glu151 が既に特定されていたが、これらの残基が $G\alpha_{i0}$ との相互作用に重要であるかどうかは依然として不明だった。また、ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ の架橋タンパク質相互作用解析から、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。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、加えて新たに、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、当研究室の先行研究において、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。さらに 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。

近年になり、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、その後、マウス Ngb も神経突起の伸長能をもつことが報告された。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。

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、まずヒト Ngb の Glu60 が GDI 活性や細胞保護能に重要であるかを明らかにすることを目的とし、次にヒト 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。加えて、Ngb の神経突起の伸長能が報告されたことを受けて、キメラ Ngb が神経突起を伸長能させるかどうかを検証し、Ngb が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。

【結果と考察】

1. Ngb の細胞保護能における Glu60 の重要性

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、先行研究に基づいてヒト 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。

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

Ngb の細胞保護の制御機構の解明を進めるため、ヒト Ngb と $G\alpha_{ii}$ との相互作用部位の特定を試みた。初めに、GDI 活性のないヒト Ngb を組み込んだ哺乳動物細胞発現用ベクターを用いて、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、 $G\alpha_{ii}$ との相互作用解析を行ったところ、これらの変異体は $G\alpha_{ii}$ と相互作用ができなくなることが判明した。さらに、 $G\alpha_{ii}$ 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 $G\alpha_{ii}$ 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 $G\alpha_{ii}$ 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 $G\alpha_{ii}$ 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 $G\alpha_{ii}$ の複合体のドッキングモデルを提唱した (図 2)。

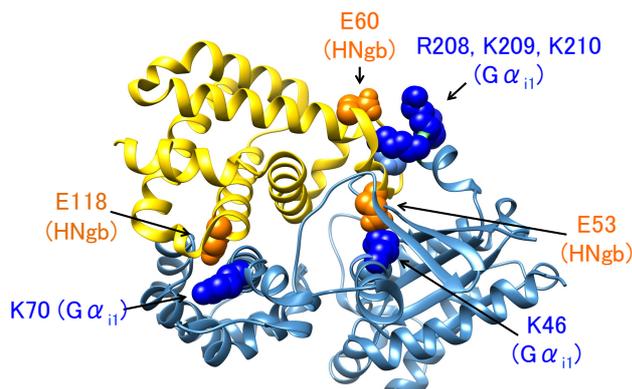


図 2. ヒト Ngb (HNgb, 黄色) と $G\alpha_{ii}$ (水色) の複合体のドッキングモデル

3. Ngb の神経突起伸長能の作用機序の解明

ヒト Ngb の過剰発現が神経突起の伸長を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、その作用機序の解明を試みた。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 (図 3)。加えて細胞膜透過に重要なリジンを置換した 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 His を Val に置換した H67V キメラ Ngb 変異体を作製し培地に添加したところ、この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 $G\alpha_{i0}$ とは相互作用しないことから、神経突起の伸長には $G\alpha_{i0}$ とは異なる分子が関与していることが示唆された。さらに、神経突起の伸長に重要な残基が、細胞保護と同様の残基であるかを調べるために、複数のキメラ Ngb 変異体を作製し

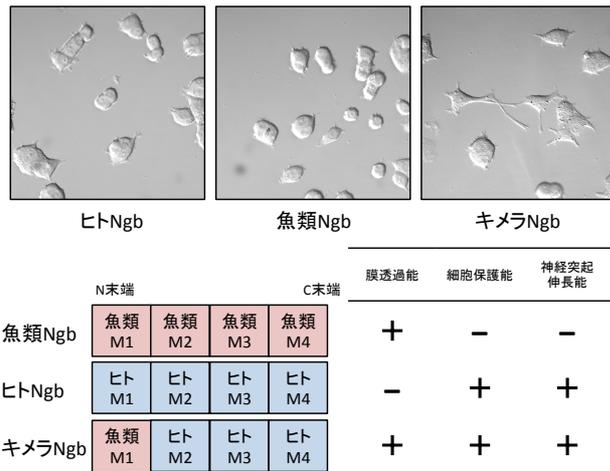


図3. キメラ Ngb は細胞膜を透過し神経突起を伸長させる

解析を行ったところ、神経突起の伸長には細胞保護と異なる残基が重要であることが判明した。加えて、これらの残基について様々な生物種間で比較したところ、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。

【結論】

本研究により、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した。加えてヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ の相互作用に重要なアミノ酸残基を特定し、複合体のドッキングモデルを提唱した。また、キメラ Ngb が細胞外から細胞内へと移行し、神経突起を伸長させることを見出し、さらにこの Ngb の神経突起伸長には、ヘム近傍構造の変化は重要ではなく、 $G\alpha_{i0}$ とは異なる分子が関与していることが示唆された。

【発表論文】

本研究に関する成果は以下の論文において発表した。

1. 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.
2. Takahashi, N., and Wakasugi, K. (2016) Identification of residues crucial for the interaction between human neuroglobin and the α -subunit of heterotrimeric G_i protein. *Sci. Rep.* **6**, 24948.
3. 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*. doi:10.1002/2211-5463.12271