

審査結果の要旨

論文提出者氏名 高橋 望

ニューログロビン (Ngb) は脊椎動物の中枢神経系に特異的に発現しているグロビン蛋白質であり、哺乳類の Ngb には虚血・再灌流に伴う酸化ストレスから神経細胞を保護する働きがある。また、Ngb は通常酸素環境下では、ヘム鉄に酸素が配位した mono-His 型の構造をとる一方で、酸化ストレス環境下になると、遠位側のヒスチジンが配位した bis-His 型の構造に大きく構造変化することが知られている。先行研究から、酸化ストレス下、構造変化した bis-His 型のヒト Ngb がヘテロ三量体 G 蛋白質 α サブユニット ($G\alpha_{i/o}$) と特異的に相互作用し、GDP 解離阻害因子 (GDI) として機能することで、細胞死を抑制することが判明している。本論文は 3 つの研究から構成されており、研究 1 ではヒト Ngb の細胞保護に関する作用機序を詳細に解明するために、ヒト Ngb の細胞保護能に重要な新たなアミノ酸残基の特定を行った。研究 2 では $G\alpha_{i/o}$ のサブタイプの一つである $G\alpha_{i1}$ を用いて、ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ の相互作用部位の解析を行った。また、ヒト Ngb が神経突起の伸長を促進するという最近の研究報告をもとに、研究 3 では Ngb の神経突起伸長能の作用機序の解明も試みた。

研究 1 では、ヒト Ngb の細胞保護能に重要な新たな残基を特定するために、酸化ストレス環境に伴い大きく立体構造が変化する領域 (CD-D 領域) に位置する酸性アミノ酸残基 Glu60 に着目した。初めに E60Q ヒト Ngb 変異体を作製し、野生型ヒト Ngb と同様のヘム近傍構造および二次構造をとることを確認した。次に、 $G\alpha_{i1}$ に対する GDI としての活性を測定したところ、E60Q ヒト Ngb 変異体は GDI としての活性がないことが判明した。さらに、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も明らかになった。以上のことから、ヒト Ngb の Glu60 残基が GDI としての活性および細胞保護能に重要な残基であることを明らかにした。

研究 2 では、ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ との相互作用部位の特定を行った。ヒト Ngb と $G\alpha_{i1}$ のそれぞれ単独の X 線結晶構造から複合体の構造を予測し、Ngb と $G\alpha_{i1}$ の相互作用に重要な残基を推定した。その上で、様々な部位特異的アミノ酸置換体を作製し相互作用を解析することによって、ヒト Ngb では Glu53、Glu60、Glu118 の酸性アミノ酸が、ヒト $G\alpha_{i1}$ では Lys46、Lys70、Arg208、Lys209、Lys210 の塩基性アミノ酸が相互作用に重要であることを明らかにした。

研究 3 では、Ngb の神経突起伸長能の作用機序の解明を試みた。まず、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 に細胞外から細胞質内へ移行する細胞膜透過能があることに着目し、キメラ Ngb の神経突起伸長能を解析した結果、キメラ Ngb に培地に添加するだけで神経突起を伸長させる働きがあることを発見した。また、細胞膜を透過できない変異体を用いた解析から、キメラ Ngb は細胞膜を透過し細胞質内に移行後に神経突起を伸長させることを明らかにした。さらに、bis-His 型への構造変化が起こらない Ngb 変異体も神経突起の伸長を促進したことから、Ngb の立体構造の変化は神経突起の伸長に重要ではないことを明らかにした。さらなる部位特異的アミノ酸置換体を用いた解析から、Ngb の神経突起の伸長作用には、細胞保護作用に重要な残基とは異なる残基が重要であり、Ngb の神経突起伸長能の作用機序は細胞保護能とは異なることが示唆された。

以上、本論文における研究は、ヒト Ngb の酸化ストレスに伴う神経細胞死抑制の作用機序をアミノ酸残基のレベルで詳細に明らかにしたという点で評価できる。さらに、キメラ Ngb は酸化ストレスに伴う細胞死を抑制するだけでなく、神経突起の伸長を促進する働きがあることを実証し、その作用機序についても重要な知見を与えたと判断する。

したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。