

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440047

研究課題名(和文) 蛋白質工学的手法による酸化ストレス下で働く新規グロビン蛋白質の機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation on functional mechanisms of novel globin proteins under oxidative stress conditions by protein engineering

研究代表者

若杉 桂輔 (WAKASUGI, Keisuke)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：20322167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニューログロビン(Ngb)は酸化ストレスから神経細胞を保護する働きを持つ。以前、我々は、ヒトNgbが酸化ストレス下にヘテロ三量体G蛋白質サブユニット(G β i1)と特異的に結合しGDP解離阻害因子として働くことを明らかにした。本研究では、ヒトNgbのGlu53, Glu60, Glu118が、Ngbの細胞保護能及びG β i1との結合に重要であることを明らかにした。さらに、ヒトG β i1のLys46, Lys70, Arg208, Lys209, Lys210がヒトNgbとの相互作用に重要であることを明らかにした。以上の結果をもとに、ヒトNgbとG β i1との複合体の構造モデルを提唱することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Human neuroglobin (Ngb) protects neuronal cells under conditions of oxidative stress. We previously showed that human Ngb acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI) for the β -subunits of heterotrimeric G β /o proteins and inhibits the decrease in cAMP concentration, leading to protection against cell death. In the present study, we used an eukaryotic expression vector driving high-level expression of human wild-type Ngb or Ngb mutants that either exhibit or lack GDI activities in human cells. We demonstrated that the GDI activity of human Ngb is tightly correlated with its neuroprotective activity. We further demonstrated that Glu53, Glu60, and Glu118 of human Ngb are crucial for both the neuroprotective activity and interaction with G β i1. Moreover, we showed that Lys46, Lys70, Arg208, Lys209, and Lys210 residues of G β i1 are important for binding to human Ngb. We propose a molecular docking model of the complex between human Ngb and G β i1.

研究分野：生物学

キーワード：蛋白質 ストレス シグナル伝達 生理活性

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトのニューログロビン(Ngb)の酸化ストレスに伴う神経細胞死抑制機構の解明

2000年に、脊椎動物の脳神経細胞内に可逆的な酸素結合が可能な蛋白質「ニューログロビン(Ngb)」が存在することが報告された。ヒトの脳神経細胞に発現し低酸素・酸化ストレスに応答して発現量が増加する Ngb は、酸化ストレスに伴う神経細胞死を防ぐ。我々は、ヒト Ngb が酸化ストレス応答性のセンサー蛋白質として働き、酸化ストレスを受けた時、ヘテロ三量体 G 蛋白質の サブユニット ($G_{i/o}$) と特異的に結合し、GDP 解離阻害因子 (GDI) として機能することにより、神経細胞死を抑制することを発見した (Wakasugi et al. *J. Biol. Chem.* **278**, 36505-36512 (2003); Watanabe and Wakasugi *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 695-700 (2008))。さらに、Yeast two hybrid screening 法により、 $G_{i/o}$ の他に脂質ラフトに存在しシグナル伝達物質の運搬に重要な働きをする「フロチリン-1」と特異的に結合することを明らかにし、酸化ストレス下で酸化型 Ngb をフロチリン-1 が脂質ラフトに運び、酸化型 Ngb が $G_{i/o}$ と結合し GDI として働くことにより $G_{i/o}$ の活性を抑え、cAMP 量の減少を抑制し、細胞死を防いでいることを明らかにした (Wakasugi et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **318**, 453-460 (2004); Watanabe et al. and Wakasugi *J. Biol. Chem.* **287**, 30128-30138 (2012))。

(2) 魚類 Ngb が持つ「細胞膜透過能」の発見

Ngb を発現している脊椎動物の中で進化的にヒトから最も離れているのは魚類である。我々は魚類 Ngb に、細胞の外から細胞質内に自ら移行する働き「細胞膜透過能」があることを明らかにした (Watanabe and Wakasugi *Biochemistry* **47**, 5266-5270 (2008); Watanabe and Wakasugi *FEBS Lett.* **584**, 2467-2472 (2010); Watanabe and Wakasugi *PLoS ONE* **6**, e16808 (2011); Kamioka et al. and Wakasugi *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 1779-1788 (2013))。また、魚類 Ngb の細胞膜透過能には N 末端領域の 4 つの正電荷を帯びたリジン残基が重要であること、さらに、魚類 Ngb は細胞表面に存在する負電荷を帯びたグリコサミノグリカンと静電的に相互作用し細胞膜透過することを明らかにした (Watanabe and Wakasugi *FEBS Lett.* **584**, 2467-2472 (2010); Watanabe and Wakasugi *PLoS ONE* **6**, e16808 (2011))。

(3) 酸化ストレスに対し細胞保護効果のある新規細胞膜透過蛋白質の創製

ヒトと魚類 Ngb はともに 4 つのエクソンから

なり、蛋白質レベルで 4 つのモジュール M1 ~ M4 で構成されている。魚類 Ngb には GDI 活性がなく細胞を保護できないが、細胞膜透過能がある。他方、ヒトの Ngb には GDI 活性があり細胞を保護できるが、細胞膜透過能はない。そこで、魚類 Ngb の細胞膜透過能に重要なモジュール M1 とヒト Ngb の細胞保護活性に重要なモジュール M2 ~ M4 からなる融合蛋白質であるモジュール置換 Ngb を作製した。このキメラ Ngb は、ヒト Ngb 特有の GDI 活性を持ちかつ魚類 Ngb 特有な細胞膜透過能を兼ね備え、細胞の外の培養液に加えておくだけで細胞質内に入っていき酸化ストレスに伴う神経細胞を保護する働きがあることを明らかにした (Watanabe and Wakasugi *Biochemistry* **47**, 5266-5270 (2008))。さらに、魚類 Ngb のモジュール M1 を完全長のミオグロビン (Mb) の N 末端に融合したモジュール置換蛋白質を作製したところ、Mb に魚類 Ngb 同様の細胞膜透過能を付与することにも成功した (Watanabe and Wakasugi *PLoS ONE* **6**, e16808 (2011))。

2. 研究の目的

- 1) 酸化ストレスから神経細胞を保護するヒトのニューログロビン(Ngb)と三量体 G 蛋白質サブユニット ($G_{i/o}$) の相互作用部位の特定を目指した。
- (2) ヒト Ngb と cystatin C 間の相互作用に重要なアミノ酸残基の解析を行った。
- (3) 細胞膜透過能を持ち、なおかつ、ヒト Ngb 同様の機能を有するキメラ Ngb を用いて、ヒト Ngb による神経突起伸長作用に重要なアミノ酸残基の解明に挑んだ。
- (4) 特異な構造を有するヒトのアンドログロビン (Adgb) の大腸菌、酵母菌、ヒト培養細胞による発現を行った。

3. 研究の方法

ヒト Ngb、キメラ Ngb、GST 融合ヒト Ngb、 G_{i1} 、cystatin C、Adgb などは、大腸菌を用いて蛋白質の大量発現を行った後、精製した。また、ヒト培養細胞で蛋白質を過剰発現させるため、発現ベクターを Lipofectamine を用いて培養細胞に遺伝子導入した。100 μ M H_2O_2 で 24 時間処理することにより、酸化ストレスを誘導した後、MTS アッセイ法を用いて細胞の生存率を解析した。さらに、GST プルダウン法により、GST 融合 Ngb と G_{i1} 間の蛋白質-蛋白質間相互作用の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 酸化ストレスから神経細胞を保護するヒトの Ngb と $G_{i/o}$ の相互作用部位の特定

ヒト Ngb は神経細胞に特異的に発現しているグロビン蛋白質であり、酸化ストレスから神経細胞

胞を保護する働きを持っている。以前、我々は、ヒト Ngb が酸化ストレス下に $G_{i/o}$ と特異的に結合し GDI として働くことにより $G_{i/o}$ の活性を抑え、cAMP 量の減少を抑制することにより細胞死を防いでいることを明らかにした。

本研究では、まず、 $G_{i/o}$ に対する GDI として機能できなくさせたヒト Ngb 変異体を SH-SY5Y 細胞に過剰発現させた後、酸化ストレスを誘導し、細胞の生存率を解析した。その結果、ヒト Ngb の Glu53, Glu60, Glu118 残基が、ヒト Ngb の酸化ストレスに対する細胞保護能に重要であることが明らかになった (図 1)

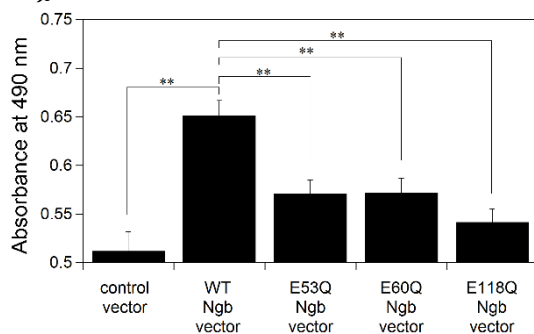


図 1 . ヒト Ngb の酸化ストレスに対する細胞保護活性

野生型(WT) Ngb あるいは E53Q, E60Q, E118Q Ngb 発現ベクターを遺伝子導入した SH-SY5Y 細胞を 100 μ M H_2O_2 で 24 時間処理した。図の縦軸は、MTS アッセイの結果であり、吸光度の値が大きいほど、細胞の生存率が高いことを意味する。 ** $P < 0.01$

また、GST 融合ヒト野生型 Ngb 及び Ngb 変異体を用いた野生型 G_{i1} に対する GST プルダウンアッセイの結果、ヒト Ngb の Glu53, Glu60, Glu118 を一つでも変異させるとヒト Ngb は野生型 G_{i1} と相互作用できなくなることが明らかになった (図 2)

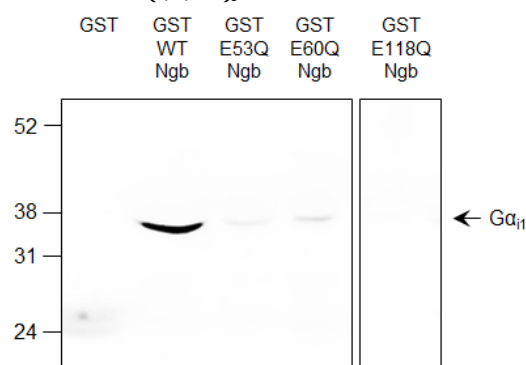


図 2 . GST 融合ヒト野生型 Ngb 及び E53Q, E60Q, E118Q Ngb 変異体を用いた野生型 G_{i1} に対する GST プルダウンアッセイ後のウェスタン・プロット解析結果

次に、Ngb と G_{i1} との蛋白質-蛋白質間相互作用部位の特定を試みた。Ngb と G_{i1} それぞれ単

独での X 線結晶構造解析の結果をもとに Ngb と G_{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後、候補のアミノ酸を部位特異的に置換した変異体を作製し、相互作用の解析を行った。GST 融合ヒト野生型 Ngb を用いた野生型 G_{i1} 及び G_{i1} 変異体に対する GST プルダウンアッセイの結果、ヒト G_{i1} の Lys46, Lys70, Arg208, Lys209, Lys210 がヒト Ngb との相互作用に重要であることが明らかになった (図 3)

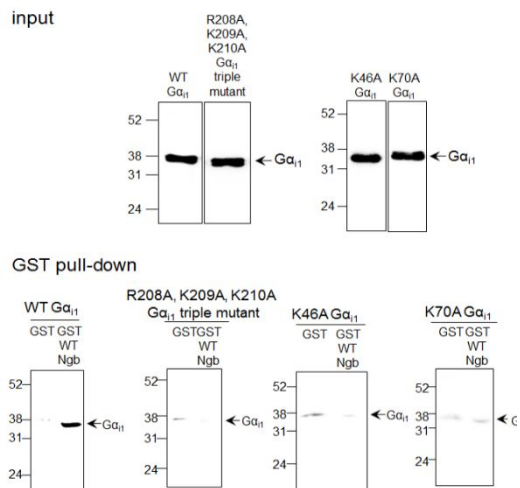


図 3 . GST 融合ヒト野生型(WT) Ngb を用いた野生型 (WT) G_{i1} 及び R208A, K209A, K210A G_{i1} 三重変異体、K46A G_{i1} 変異体、K70A G_{i1} 変異体に対する GST プルダウンアッセイ後のウェスタン・プロット解析結果

Input 時の各 G_{i1} のウェスタン・プロット解析結果を上部に示した。

以上の結果をもとに、ヒト Ngb とヒト G_{i1} との複合体モデルを構築した。その結果、ヒト Ngb の Glu53 がヒト G_{i1} の Lys46 と、ヒト Ngb の Glu60 がヒト G_{i1} の Arg208, Lys209, Lys210 と、ヒト Ngb の Glu118 がヒト G_{i1} の Lys70 と結合することが示唆された。このように、ヒト Ngb とヒト G_{i1} との相互作用には、静電的相互作用が重要であると考えられる。

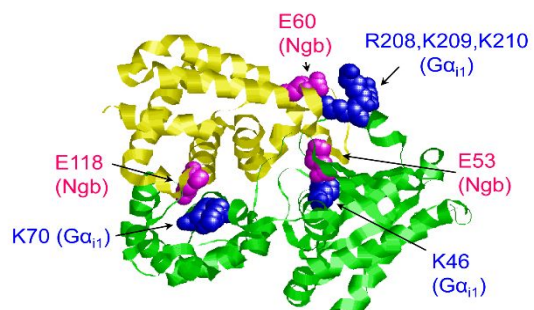


図 4 . ヒト Ngb と G_{i1} の複合体モデル

ヒト Ngb の構造を黄色で、 G_{i1} の構造を緑色で示した。ヒト Ngb、 G_{i1} の相互作用に重要な残基をそれぞれ赤、青で記した。

これらの結果は、*Scientific Reports (Nature Publishing Group)*に投稿論文(Takahashi, N., and Wakasugi, K. Identification of residues crucial for the interaction between human neuroglobin and the β -subunit of heterotrimeric G_i protein. *Scientific Reports (Nature Publishing Group)* **6**, 24948 (2016). (Wakasugi, K. is a corresponding author))として発表した。

(2) ヒト Ngb と cystatin C 間の相互作用に重要なアミノ酸残基の解析

本研究では、cystatin C の大腸菌を用いた大量発現系を構築し、さらに、蛋白質の精製方法も確立することに成功した。さらに、ヒト Ngb が持つ酸化ストレスに伴う神経細胞死を抑制する働き の作用機序を明らかにするために、Ngb が結合する相手である cystatin C と Ngb との蛋白質間相互作用に着目した解析も行い、相互作用部位の候補を絞ることができた。

(3) ヒト Ngb による神経突起伸長作用に重要なアミノ酸残基の解明

ヒトの Ngb には酸化ストレスから神経細胞を保護する働きがある。我々はヘムの両側から His が配位した bis-His 型ヒト Ngb が、 $G_{i/o}$ と結合し GDI として働き cAMP 濃度の低下を抑えることで、細胞死を抑制することを明らかにした。また、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ること、他方、ヒト Ngb には細胞膜透過能がないことも見出した。さらに、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膜を透過し酸化ストレスから細胞を保護するキメラ Ngb の作製に成功した。そこで、本研究では、ヒト Ngb を過剰発現させると神経突起伸長が促進されるという最近の報告に着目し解析をした結果、キメラ Ngb の場合には、培地に添加しただけで神経突起の伸長が起こることが観察された。他方、ヒト Ngb や魚類 Ngb では神経突起伸長の誘導は観察されず、また、細胞膜透過に重要な Lys を変異させた K7A/K9Q キメラ Ngb 変異体においても観察されなかった。以上ことから、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が判明した。さらに、遠位の His を Val に置換した 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たことから、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 $G_{i/o}$ とは結合しないことから、神経突起の伸長には $G_{i/o}$ とは異なる分子

が関与していることが示唆された。また、キメラ Ngb の神経突起の伸長に重要な残基を解析した結果、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。

この研究成果については、現在、論文 (Takahashi, N., Onozuka, W., Watanabe, S. and Wakasugi, K. Chimeric ZHHH neuroglobin acts as a cell membrane-penetrating inducer of neurite outgrowth. Submitted for publication. (Wakasugi, K. is a corresponding author)) を投稿中である。

(4) 特異な構造を有するヒトのアンドログロビン (Adgb) の大腸菌、酵母菌、ヒト培養細胞による発現

ヒトの Adgb は 2012 年に発見された精巣特異的に発現しているグロビン蛋白質であり、グロビンドメインとカルパイン類似ドメインとからなる融合蛋白質である。驚いたことに、グロビンドメインが circular permuted 型であり、しかもその間にカルモジュリン結合モチーフが挿入されている。Adgb の研究はこれまで遺伝子レベルでの研究が少なされているだけで、蛋白質レベルでの研究はこれまで全く行われていない。そこで、本研究では、Adgb 蛋白質の構造と機能を解析することを目指した。Adgb は巨大な蛋白質であることから、ドメインごとに分割した Adgb 切断片を大腸菌を用いて発現させ、精製方法の確立に挑んだ。大腸菌発現系では、様々な条件で発現を試み、Adgb 切断片の発現の条件を決定し、その精製に成功した。特に、ヒト Adgb isoform を大腸菌を用いて発現し精製を行うことに成功した。この精製 Adgb isoform を抗原として rabbit ポリクローナル抗体を作製した。さらに、各種 Adgb 切断片を HeLa 細胞で発現させることにも成功した。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Takahashi, N., and Wakasugi, K. Identification of residues crucial for the interaction between human neuroglobin and the β -subunit of heterotrimeric G_i protein. *Scientific Reports (Nature Publishing Group)* (査読有り) **6**, 24948 (2016). (Wakasugi, K. is a corresponding author)

Sugitani, K., Koriyama, Y., Ogai, K., Wakasugi, K., and Kato, S. A possible role

of neuroglobin in the retina after optic nerve injury: a comparative study of zebrafish and mouse retina. *Adv. Exp. Med. Res.* (査読有り) **854**, 671-675 (2016).

Nakamoto, T., Miyanokoshi, M., Tanaka, T., and Wakasugi, K. Identification of a residue crucial for the angiostatic activity of human mini tryptophanyl-tRNA synthetase by focusing on its molecular evolution. *Scientific Reports (Nature Publishing Group)* (査読有り) **6**, 24750 (2016). (Wakasugi, K. is a corresponding author)

Watanabe, S., Hayakawa, T., Wakasugi, K., and Yamanaka, K. Cystatin C protects neuronal cells against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *Cell Death & Disease (Nature Publishing Group)* (査読有り) **5**, e1497 (2014).

[学会発表](計 16 件)

若杉 桂輔、小野塚 涉、高橋 望 「ニューログロビンの機能解析と蛋白質工学」第 17 回蛋白質科学学会年会、仙台国際センター(宮城県仙台市) 2017 年 6 月 20 日(火)~22 日(木)

高橋 望、小野塚 涉、渡邊 征爾、若杉 桂輔 「細胞膜透過能をもつキメラニューログロビンは神経突起の伸長を促進する」第 17 回蛋白質科学学会年会、仙台国際センター(宮城県仙台市) 2017 年 6 月 20 日(火)~22 日(木)

小野塚 涉、上岡 勇輝、若杉 桂輔 「結核菌ヘモグロビン N の細胞膜透過能の発見」第 17 回蛋白質科学学会年会、仙台国際センター(宮城県仙台市) 2017 年 6 月 20 日(火)~22 日(木)

高橋 望、小野塚 涉、渡邊 征爾、若杉 桂輔 「キメラ ZHHH ニューログロビンは細胞膜を透過し神経突起を伸長させる」第 17 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学本郷キャンパス(東京都文京区) 2017 年 4 月 15 日(土)

高橋望、若杉桂輔 「神経保護作用を持つヒトニューログロビンとヘテロ三量体 G_i 蛋白質サブユニットとの相互作用に重要なアミノ酸残基の特定」第 54 回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場(茨城県つくば市) 2016 年 11 月 25 日(金)~27 日(日)

小野塚 涉、若杉 桂輔 「魚類ニューログロビンの細胞膜透過におけるヘムの配位状態の影響」第 38 回 日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同年会(BMB2015)、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市) 2015 年 12 月 1 日(火)~4 日(金)

高橋 望、若杉 桂輔 「細胞膜を透過し神経突起を伸長させる人工蛋白質キメラニューログロビンの機能解析」第 38 回 日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同年会(BMB2015)、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市) 2015 年 12 月 1 日(火)~4 日(金)

宮ノ腰 美希、若杉 桂輔 「ヒトのトリプトファン tRNA 合成酵素による細胞内へのトリプトファン取り込みの調節」第 38 回 日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同年会(BMB2015)、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市) 2015 年 12 月 1 日(火)~4 日(金)

中本 晃正、田中 智章、宮ノ腰 美希、若杉 桂輔 「分子進化過程に着目したヒト・ミニ・トリプトファン tRNA 合成酵素の血管新生抑制能に重要なアミノ酸残基の特定」第 38 回 日本分子生物学会年会 第 88 回 日本生化学会大会 合同年会(BMB2015)、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市) 2015 年 12 月 1 日(火)~4 日(金)

Nakamoto, T., Tanaka, T., Miyanokoshi, M., and Wakasugi, K. "Identification of crucial residues for the angiostatic activity of human mini tryptophanyl-tRNA synthetase", 10th International symposium on aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS2015), Barcelona, Spain, October 18-22, 2015.

高橋望、若杉桂輔 「酸化ストレスから細胞を守るニューログロビンのヘテロ三量体 G 蛋白質 サブユニットとの相互作用部位の特定」第 15 回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学本郷キャンパス(東京都文京区) 2015 年 6 月 27 日(土)

若杉 桂輔、高橋 望、小野塚 涉、森田 真人、早川 友世、上岡 勇輝、内田 裕之、渡邊 征爾 「生物進化に伴うニューログロビン蛋白質の機能変化」第 40 回 生命の起源および進化学会 学術講演会、東京理科大学葛飾キャンパス(東京都葛飾区) 2015 年 3 月 17 日(火)

Watanabe, S., Wakasugi, K., and Yamanaka, K. "Coordinated activation of autophagy and proteolysis inhibition is essential for neuroprotection by cystatin C against mutant SOD-1-mediated toxicity.", 25th International symposium on ALS/MND, Brussels, Belgium, December 5-7, 2014.

高橋望、若杉桂輔「神経細胞保護作用を持つニューログロビンのヘテロ三量体 G 蛋白質サブユニットとの相互作用解析」, 第 87 回日本生化学会大会、国立京都国際会館（京都府京都市）2014 年 10 月 15 日（水）～18 日（土）

渡邊征爾、若杉桂輔、山中宏二「変異 SOD1 由来の毒性に対するシスタチン C の神経細胞保護機構の解明」, 第 37 回 日本神経科学大会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2014 年 9 月 13 日（土）

高橋望、渡邊征爾、若杉桂輔「ヒトのニューログロビンが持つ酸化ストレスに対する神経細胞保護作用の分子制御機構の解明」, 第 14 回 日本蛋白質科学会年会、ワークピア横浜 / 横浜産貿易ホール（神奈川県横浜市）2014 年 6 月 25 日（水）～27 日（金）

〔その他〕

ホームページ等

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻
生命環境科学系 若杉桂輔研究室

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/wakasugila>
b/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若杉 桂輔 (WAKASUGI, Keisuke)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号: 20322167

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し