

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570121

研究課題名（和文）ニューログロビンの細胞死抑制機構の解明と蛋白質工学的改変

研究課題名（英文）Neuroprotective mechanism of neuroglobin

研究代表者

若杉 桂輔 (Keisuke Wakasugi)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：20322167

研究成果の概要：

ニューログロビン(Ngb)は酸化ストレスに応答しシグナル伝達過程を制御することにより、神経細胞死を防いでいる可能性が高い。本研究では、この仮説を検証することを目的とした。その結果、神経細胞死抑制活性にヒト Ngb の「GDP 解離抑制蛋白質」としての活性が極めて重要であることを実証した。また、魚の Ngb が「細胞膜貫通特性」を持つことを発見し、さらに、蛋白質工学的手法を駆使することにより、培地に加えるだけで細胞内に導入され細胞を保護する新規人工蛋白質の創製にも成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：蛋白質、酵素、ストレス、脳・神経、シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

2000年、神経細胞に特異的に発現し可逆的な酸素結合が可能な蛋白質「ニューログロビン(Ngb)」が報告された。この Ngb を過剰に発現させると脳虚血・再灌流に伴う細胞死が減少し、逆に、Ngb の発現量を低下させると細胞死が増加することから、酸化ストレスに伴う細胞死を抑制する働きが Ngb にあることが示唆された。しかし、その神経細胞死の抑制メカニズムはまだ明らかになっていなかった。我々は、ヒト Ngb の神経細胞死の抑制メカニズムの解明を目指し

た結果、酸化ストレスにより生じる酸化型 Ngb が、ヘテロ三量体 G タンパク質のサブユニット(G)と特異的に結合し、「GDP/GTP 交換反応抑制タンパク質(GDI)」として機能することが明らかになった。一方、通常の酸素結合型 Ngb は G と結合できないことも明らかになった。以上のことから、Ngb は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のみ G と結合し、G の GDI として機能することにより、神経細胞死を抑制している可能性が高まった。

## 2. 研究の目的

従来、グロビン蛋白質は酸素結合蛋白質としてだけ働くものと考えられてきたが、我々の今までの研究から、脳神経細胞に存在するニューログロビン(Ngb)は酸化ストレスに応答し立体構造を大きく変化させ、細胞の生死をつかさどる細胞内シグナル伝達過程を制御することにより、神経細胞死を防いでいる可能性が高いことが示唆された。本研究では、従来の *in vitro* のみではなく *in vivo* の系でこの仮説を検証することを目的とした。さらに、Ngb が関与する神経細胞死抑制機構の全体像を分子レベルで解明することを目指し、Ngb の生理機能の解明に挑んだ。

## 3. 研究の方法

Ngb は、大腸菌を用いて大量発現後、精製した。精製した蛋白質を蛋白質導入試薬 Chariot を用いて培養細胞内に導入した。そのうえで、まず低酸素環境(1% O<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>)で24時間、続いて通常酸素濃度環境下で24時間培養して酸化ストレスを誘導し、細胞死の割合を解析した。また、Ngb を FITC で蛍光標識し、培養細胞に添加後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

## 4. 研究成果

(1) ヒト Ngb の神経細胞死抑制機構の解明  
我々はヒト Ngb が持つ GDI 活性の重要性について明らかにするために、ヒト Ngb 変異体を PC12 細胞に導入し、酸化ストレス下での細胞死抑制能について検討した。具体的には、GDI 活性を持たないヒトの Ngb 変異体 (E53Q, R97Q, E118Q, E151N)、及び、GDI 活性を持つヒト Ngb 変異体 (R47A,

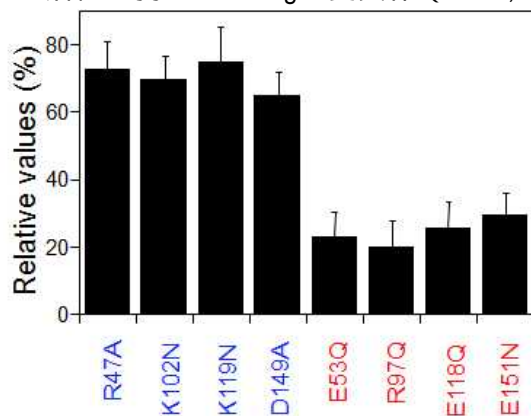


図 1. ヒト Ngb 変異体の細胞死抑制活性

ヒトの野生型 Ngb の細胞保護活性を 100%、緩衝液のみの場合を 0% とし、相対的な割合として細胞保護活性をプロットしている。GDI 活性のある Ngb を青色で、GDI 活性のない Ngb を赤色で示した。細胞死抑制活性に、ヒト Ngb の GDI 活性が極めて重要であることがわかる。

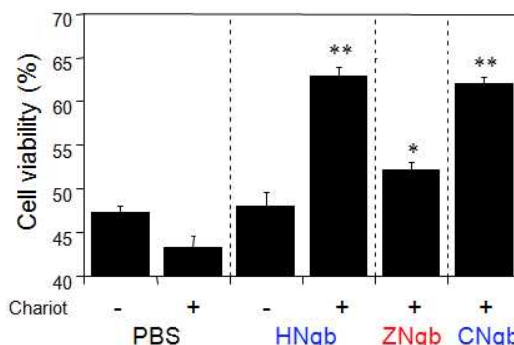


図 2. Ngb の細胞死抑制活性

PBS, 緩衝液; HNgb, ヒト Ngb; ZNgb, ゼブラフィッシュ Ngb; CNgb, キメラ Ngb. 図中の -, + は、それぞれ蛋白質導入試薬 Chariot を含まない場合、含む場合を示す。GDI 活性のある Ngb は青色で、GDI 活性のない Ngb は赤色で示した。Ngb の GDI 活性は、細胞死抑制活性に極めて重要であることがわかる。

K102N, K119N, D149A) を精製し、細胞内への蛋白質導入試薬 Chariot を用いてそれぞれ PC12 細胞内に導入した。その後、酸化ストレスを誘導し、細胞死の割合を解析した。その結果、GDI 活性を持つ変異体は全てヒト野生型 Ngb と同様に細胞死を大きく抑制した一方、GDI 活性を持たない変異体ではいずれも細胞死抑制の程度が著しく低下することが明らかになった(図 1)。以上の結果は Ngb による細胞死の抑制と GDI 活性の間に密接な関係があることを示しており、ヒト Ngb の神経細胞死抑制活性に GDI 活性が極めて重要であることが明らかになった。

(2) ゼブラフィッシュ Ngb、ヒト及びゼブラフィッシュ間でのキメラ Ngb の神経細胞死抑制能の解析

蛋白質細胞内導入試薬 Chariot を用いて、GDI 活性のあるヒト Ngb (HNgb) を導入すると細胞死が抑制される一方、GDI 活性のないゼブラフィッシュ Ngb (ZNgb) を導入しても細胞死は殆ど抑制されないことが明らかになった(図 2)。

ヒト Ngb 及びゼブラフィッシュ Ngb はともに構造単位「モジュール」M1 から M4 で構成されている。Ngb を構成する 4 個のモジュール M1 ~ M4 のうち、ZNgb のモジュール M1 と HNgb のモジュール M2 ~ M4 からなる融合タンパク質であるキメラ Ngb (CNgb) を作製し、構造及び機能の解析を行った。分光装置などを用いた物理化学的な解析により、このキメラ蛋白質は天然の蛋白質同様の安定な構造を形成していることが明らかになった。また、ゼブラフィッシュ Ngb は GDI 活性を持たないが、このキメラ Ngb は、ヒト Ngb 同様の GDI 活性を持ち、Chariot 存在下で細胞死を抑制することが明らかになった(図 2)。

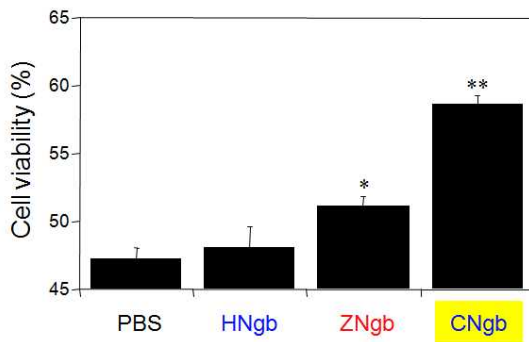


図 3. 蛋白質導入試薬 Chariot 非添加時の Ngb の細胞死抑制活性

さらに、驚いたことに、このキメラ Ngb が Chariot の非存在下でも細胞死を抑制することが明らかとなった(図 3)。これはキメラ Ngb が単独で細胞内に導入されることを示唆している。

### (3) ゼブラフィッシュ Ngb の「細胞膜貫通特性」の発見

そこでヒト Ngb(HNgB), ゼブラフィッシュ Ngb(ZNgB), キメラ Ngb(CNgB)を各々 FITC で蛍光標識し、Chariot 非存在下で培地に添加して一定時間培養後、蛍光顕微鏡により観察した。その結果、ヒト Ngb には細胞膜貫通特性はないが、ゼブラフィッシュ Ngb 及びキメラ Ngb には細胞の外から細胞内に自ら移行する働き「細胞膜貫通特性」があることが明らかになった(図 4)。この発見により、今回はじめて細胞膜貫通特性を持つグロビン蛋白質の存在が明らかになった。ゼブラフィッシュ Ngb とキメラ Ngb はゼブラフィッシュ Ngb 由来のモジュール M1 を共通して含むことから、ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 が細胞膜貫通特性に重要なはたらきをしていることが考えられる。ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 には細胞膜貫通特性を持つ代表的な蛋白質である HIV TAT 蛋白質同様に Arg, Lys に富むアミノ酸配列を有することから、ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 の塩基性アミノ酸残基が細胞膜貫通特性に重要であると考えられる。細胞膜貫通特性のないヒト Ngb ではこれらに対応する残基は Pro となっている。

### (4) 細胞の外から細胞質内へ移行し神経保護作用のある新規モジュール置換蛋白質の創出に成功

ヒト Ngb には GDI 活性があり PC12 細胞に対し細胞死抑制する働きがあるが、ゼブラフィッシュ Ngb にはそのような働きはない。また、ゼブラフィッシュ Ngb には細胞の外から細胞内に自ら移行する細胞膜貫通特性

があるが、ヒト Ngb にはない。今回、蛋白質工学的手法を駆使し、細胞膜貫通特性に重要なゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 と GDI 活性(神経細胞保護作用)に重要なヒト Ngb 由来のモジュール M2 ~ M4 とのキメラ蛋白質を作製(モジュール置換)により、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死を保護する働きがある新規機能性蛋白質の創製に成功した(図 3、図 4)。この実験結果は、新規機能性蛋白質を創出するうえでモジュール置換法が有効な手法となりうることを示している。

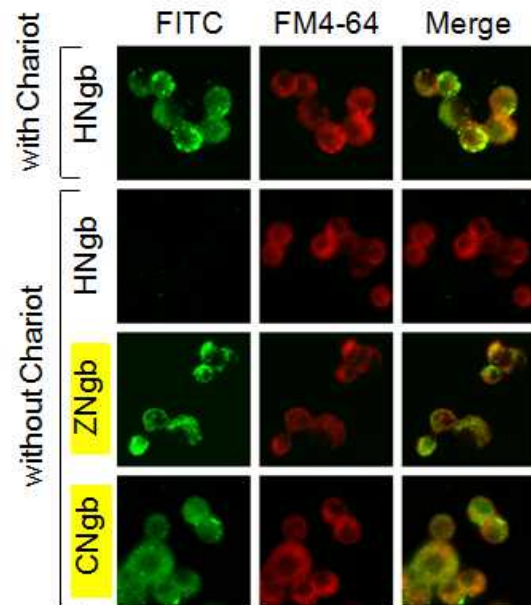


図 4. PC12 細胞への Ngb の細胞膜貫通活性

Ngb を FITC でラベル後、PC12 細胞に添加した。FM4-64 はエンドサイトーシスのマーカーである。ゼブラフィッシュ Ngb(ZNgB)とキメラ Ngb(CNgB)は細胞膜貫通蛋白質として機能している。

### 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)

Watanabe, S., and Wakasugi, K. "Zebrafish neuroglobin is a cell membrane penetrating globin", *Biochemistry* (査読有り) **47**, 5266-5270 (2008).

Watanabe, S., and Wakasugi, K. "Neuroprotective function of human

neuroglobin is correlated with its guanine nucleotide dissociation inhibitor activity”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有り) **369**, 695-700 (2008).

Ishikawa, H., Kim, S., Kwak, K., Wakasugi, K., and Fayer, M. D. “Disulfide bond influence on protein structural dynamics probed with 2D-IR vibrational echo spectroscopy”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (査読有り) **104**, 19309-19314 (2007).

Ishikawa, H., Finkelstein, I. J., Kim, S., Kwak, K., Chung, J. K., Wakasugi, K., Massari, A. M., and Fayer, M. D. “Neuroglobin dynamics observed with ultrafast 2D-IR vibrational echo spectroscopy”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (査読有り) **104**, 16116-16121 (2007).

〔学会発表〕(計2件)

渡邊征爾、若杉桂輔 「ゼブラフィッシュのニューログロビンは細胞膜貫通特性をもつ」、BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会 合同大会)、2008年12月11日、神戸ポートアイランド

渡邊征爾、若杉桂輔 「ニューログロビンの酸化ストレス下での神経細胞死抑制機構の解明」、BMB2007(第30回日本分子生物学会年会及び第80回日本生化学会大会の合同年会)、2007年12月14日、パシフィコ横浜

## 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