

論文の内容の要旨

論文題目 ニューログロビンの細胞死抑制機構および細胞膜貫通特性の解析
Analysis of Neuroprotective Mechanism and Cell-membrane-penetrating
Activity of Neuroglobin.

氏 名 渡邊 征爾

最近、神経細胞に特異的に発現し、酸素と可逆的に結合するニューログロビン(Ngb)が発見された。Ngb は酸化ストレスから神経細胞を保護し、神経細胞死を抑制する働きがあることが報告されているが、その機構は明らかにはなっていなかった。ヒト Ngb がヘテロ三量体タンパク質の α サブユニット($G\alpha_{i/o}$)と特異的に結合して GDP の解離を抑制する、グアニンヌクレオチド解離阻害因子(GDI)としての活性に着目し、私は修士課程における研究で GDI 活性がヒト Ngb の細胞死抑制能に重要であることを明らかにした。また、私は同じく修士課程における研究で、ゼブラフィッシュ Ngb の新規機能として細胞外から細胞内へと自ら移行する、細胞膜貫通特性を発見し、その細胞膜貫通特性にはゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 が重要であることも併せて報告した。そこで、本研究では Ngb の細胞死抑制機構および細胞膜貫通機構の詳細を明らかにすることを目的として研究を行った。

酸化ストレス下において Ngb は他のグロビンと異なり、ヘムの両側からヒスチジンが配位する六配位構造へと立体構造を変化させることが知られている。この六配位型への立体構造変化が細胞死抑制に重要かどうか、配位するヒスチジンを変異させた H64V 変異体およびヘムを亜鉛-プロトポルフィリン IX に置換した Zn 変異体を作製し、これら六配位型をとれないヒト Ngb 変異体の細胞

死抑制能を調べることによって検証した。その結果、これらの変異体はいずれもほとんど細胞死を抑制できず、ヒト Ngb による神経細胞死抑制には酸化ストレスに伴う立体構造変化が重要であることが明らかとなった。次に $G\alpha_{i/o}$ が酸化ストレス下において修飾されて活性化する事実に着目し、ヒト Ngb が修飾された $G\alpha_{i/o}$ に結合して不活性型に維持することで神経細胞死を抑制しているという仮説を立て、その検証を行った。その結果、ヒト Ngb は修飾された $G\alpha_{i/o}$ にも特異的に結合し、GDI としても機能することが明らかとなった。ヒト Ngb は脂質ラフトの構成因子であるフロチリン-1 と相互作用することが報告されていたため、ヒト Ngb は脂質ラフトにおいて $G\alpha_{i/o}$ と相互作用して、その活性を制御していることが推測された。そこで、PC12 細胞から脂質ラフトを単離したところ、ヒト Ngb は酸化ストレス依存的に脂質ラフトへと局在することが判明した。更に、脂質ラフトをメチル- β -シクロデキストリンを用いて解離させたところ、ヒト Ngb による細胞死抑制効果が全く見られなくなった。従って、ヒト Ngb による細胞死抑制に脂質ラフトは重要であり、ヒト Ngb が酸化ストレス依存的に脂質ラフトへと輸送され、 $G\alpha_{i/o}$ の活性を制御することが示唆された。 $G\alpha_{i/o}$ は細胞内でアデニル酸シクラーゼの活性を制御し、細胞内 cAMP 量を減少させることが知られている。従って、ヒト Ngb は $G\alpha_{i/o}$ の活性化を抑制し、細胞内 cAMP 量を維持することによって神経細胞死を抑制している可能性が考えられた。そこで、cAMP の活性型アナログである Sp-cAMPS および不活性型アナログである Rp-cAMPS を細胞に与えて検討したところ、Sp-cAMPS により神経細胞死が顕著に抑制されることが判明した。また、ヒト Ngb による細胞死抑制能は Rp-cAMPS を添加することで完全に失われた。これらの結果から、酸化ストレス下において細胞内 cAMP 量は神経細胞の保護に重要であり、ヒト Ngb は細胞内 cAMP 量の減少を抑制することによって神経細胞を保護していることが示唆された。

また、本研究では細胞膜貫通特性をタンパク質工学的に応用し、新規の細胞膜貫通特性を持った機能性タンパク質として、ヒト・ミオグロビン (Mb) の N 末端側にゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 を付加したキメラ Mb を作製した。このキメラ Mb の二次構造やヘムの結合状態はヒト Mb とほとんど変化しなかったが、キメラ Mb はゼブラフィッシュ Ngb と同様に細胞膜貫通特性を示した。このことはゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 は、もとのタンパク質の立体構造に影響を与えることなく、細胞膜貫通特性を付加できることを示しており、今後、他のタンパク質に対しても同様に細胞膜貫通特性を付加できることが示唆された。

ゼブラフィッシュ Ngb の細胞膜貫通機構の詳細を明らかにするため、本研究では、まず細胞膜貫通特性に必須の残基を部位特異的変異の導入によって特定した。その結果、重要なのは魚類 Ngb のモジュール M1 内で保存された各々 7, 9, 21, 23 番目のリジン残基であると判明した。一方、同じ魚類 Ngb のモジュール M1 内で保存された塩基性アミノ酸残基にも関わらず、3 番目のリ

ジン残基と13番目のアルギニン残基は細胞膜貫通特性に全く影響しなかった。これらのことから、細胞膜貫通特性には単に塩基性アミノ酸の数が重要なのではなく、その立体構造上の配置が重要であることが示唆された。リジン残基は生理条件下において正に帯電しているため、細胞表面で負に強く帯電しているグリコサミノグリカン(GAGs)との相互作用を考え、その検証を行った。その結果、ゼブラフィッシュ Ngb は野生型 CHO 細胞に対しては効率よく導入されたのに対し、GAGs を合成できない D-677 および A-745 の両 CHO 変異株に対してはほとんど導入されなかった。また、GAGs との相互作用をキメラ Mb でも検討した結果、キメラ Mb もゼブラフィッシュ Ngb 同様に GAGs を合成できない細胞には導入されなかった。以上のことから、細胞膜貫通特性にはゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 と細胞表面の GAGs との相互作用が必須であることが明らかとなった。

今までヒト Ngb の細胞死抑制機構には活性酸素の除去など、様々な仮説が提唱されてきたが、本研究によりヒト Ngb が GDI 活性を介して $G\alpha_{i/o}$ に関係するシグナル伝達経路を制御する、細胞の酸化ストレスセンサーとして機能していることが明らかとなった。ヒト Ngb の神経細胞死に関して、そのシグナル伝達経路を明らかにしたのは本研究が初めてである。また、ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 が持つ細胞膜貫通機構においては、モジュール M1 内のリジン残基と GAGs との相互作用が重要であることを明らかにし、更に細胞膜貫通特性をモジュール M1 の付加によって他のタンパク質に付与できることを示した。これらの結果は単にタンパク質を細胞内へ導入するのに有用というだけでなく、モジュールがタンパク質工学的に応用可能であることを実証した点で画期的である。今後、タンパク質のモジュール構造を利用して新規の機能性タンパク質をより容易に作成できるようになることが期待される。