

別紙 2

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 渡邊 征爾

ニューログロビン (Ngb) は 2000 年に発見された酸素結合ヘム蛋白質であり、脊椎動物の神経細胞に発現している。哺乳類 Ngb は、虚血・再灌流などに伴う酸化ストレスから神経細胞を保護する役割があることが明らかになっていたが、その作用機序については不明であった。そこで、本論文では、ヒト Ngb の神経細胞死抑制メカニズムの解明を行った。また、本論文提出者は修士課程において、ヒトから最も進化的に離れた魚類 Ngb が、細胞外から細胞質へと自ら移行できる「細胞膜貫通特性」を持っていることを発見しており、本論文では、魚類 Ngb 特有な細胞膜貫通特性の分子機構の解明も目指した。本論文は、以下の 3 つの研究からなる。

研究 1 では、哺乳類 Ngb の細胞死抑制機構の解明に挑んだ。まず、Ngb 特有の酸化ストレス時の構造変化に着目し、ヒト Ngb の酸化ストレス下における立体構造変化が細胞死の抑制に重要であるか検討した。その結果、酸化ストレス下で立体構造を変化できないヒト Ngb 変異体は細胞死を全く抑制できず、酸化ストレス下でのヒト Ngb の立体構造変化が神経細胞の保護に重要であることが判明した。次に、ヒト Ngb がヘテロ三量体 G 蛋白質 α サブユニット ($G\alpha_{i/o}$) に対し GDP 解離阻害因子として働くことに着目し、部位特異的アミノ酸置換体を用いた解析により、ヒト Ngb の GDP 解離阻害因子としての活性が細胞死抑制能に極めて重要であることを実証した。また、ヒト Ngb の細胞死抑制に脂質ラフトが重要であることを発見し、ヒト Ngb が酸化ストレス時に脂質ラフト構成蛋白質 flotillin-1 により脂質ラフトへ輸送され、 $G\alpha_{i/o}$ の活性を抑制することによって細胞内の cAMP 量の低下を抑え、神経細胞を保護していることを明らかにした。

研究 2 では、魚類ゼブラフィッシュ Ngb が持つ細胞外から細胞質へと自ら移

行できる「細胞膜貫通特性」の分子機構の解明を行った。まず、様々な部位特異的アミノ酸置換体を用いた解析により、ゼブラフィッシュ Ngb の N 末端モジュール M1 内の 4 つのリシン残基が細胞膜貫通特性に重要であることを明らかにした。さらに、ゼブラフィッシュ Ngb の細胞膜貫通特性には細胞膜表面のグリコサミノグリカンが必須であることを示した。つまり、ゼブラフィッシュ Ngb はモジュール M1 内の正電荷を帯びたリシン残基と細胞表面の負電荷を帯びたグリコサミノグリカンとの静電的相互作用を介して細胞膜表面に結合した後、マクロピノサイトーシスによって細胞内へ導入されることを明らかにした。

研究 3 では、ゼブラフィッシュ Ngb の細胞膜貫通特性を利用した蛋白質工学的応用に挑んだ。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 をヒトのミオグロビン (Mb) の N 末端に融合したキメラ Mb を蛋白質工学の手法を用いて作製した。キメラ Mb はゼブラフィッシュ Ngb に匹敵するほど高い効率で細胞内へ導入され、細胞膜貫通特性を持った新規の機能性蛋白質を作製することに成功した。この結果は、モジュールが蛋白質工学における機能的、構造的な単位として利用できることをも示唆しており、モジュールを利用した新規の蛋白質作製法の有効性を示したという点でも評価できる。

以上、本論文における研究は、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細胞内シグナル伝達系の制御を行うことにより神経細胞を保護するというヒト Ngb の作用機序を初めて明らかにしたという点で評価できる。さらに、魚類 Ngb が持つ細胞膜貫通特性の制御機構についても重要な知見を与え、今後の研究の突破口を切り開いたと判断する。

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。