

研 究 報 告 書

「蛋白質工学的的手法による細胞内環境の計測」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：若杉 桂輔

1. 研究のねらい

本プロジェクトでは、これまで研究を行ってきた蛋白質工学、生化学、分子生物学、生物物理学の領域と、新たに細胞生物学とを融合させ、分子進化に着目した「天然蛋白質の新規機能の探索」及び「新規機能性蛋白質の創製」を目指した。特に、非凡な機能を有する蛋白質(従来の蛋白質の機能分類とは異なる機能を持った蛋白質)である脊椎動物の脳内グロビン蛋白質「ニューログロビン(Ngb)」と「アミノアシル tRNA 合成酵素」をターゲットに選び、「非凡な機能を有する蛋白質の生理機能、制御機構、分子進化過程の解明」に挑んだ。また、蛋白質の構造・機能単位である「モジュール」に着目し、「新たな機能性蛋白質の創製を目指したモジュール工学的分子設計戦略」の可能性についても検証した。

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、私のこれまでの研究から、脳神経細胞に存在する Ngb は酸化ストレスに応答し蛋白質の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。本プロジェクトでは、実際の細胞を使ってこの仮説を検証し、さらに、Ngb の生理機能を明らかに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 が持つ「GDP/GTP 交換反応抑制蛋白質(GDI)」としての活性が極めて重要であることを実証でき、ヒト Ngb の細胞保護機構を明らかにできた。また、魚類の Ngb が「細胞膜貫通特性」を持つことを発見し、その活性に重要な残基を特定し、さらに魚類 Ngb と結合する細胞表面の分子も特定できた。さらに、モジュール構造に基づく蛋白質工学的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しかも神経細胞を保護する新規人工蛋白質の創製にも成功した。

2. 研究成果

1) ヒトのニューログロビン(Ngb)の細胞保護機構の解明

1-1) ヒト Ngb の神経細胞死抑制活性に Ngb が持つ GDI 活性が極めて重要であることを実証

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。そこで、以前、私はヒト Ngb の神経細胞死の抑制メカニズムの解明を目指し、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 α サブユニット($G\alpha_{i/o}$) と特異的に結合し、「GDP/GTP 交換反応抑制蛋白質(GDI)」として機能することを明らかにした。また、通常の酸素結合型 Ngb は $G\alpha_{i/o}$ 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

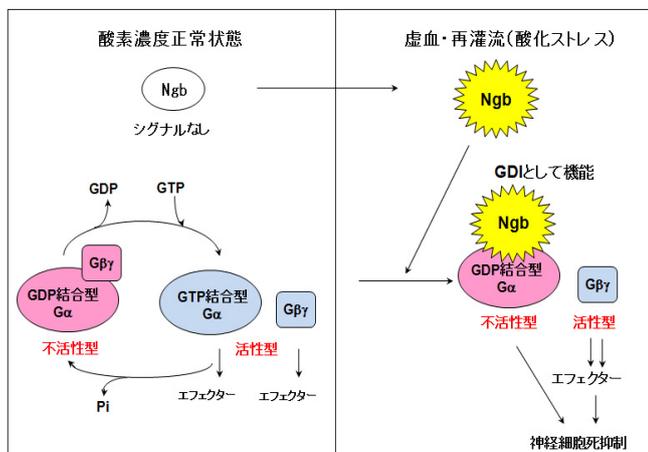


図1. Ngb の神経細胞死抑制機構

蛋白質として働き、酸化ストレスを受けた時のみ $G\alpha_{i/o}$ と結合し、 $G\alpha_{i/o}$ 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(図1)。

本プロジェクトでは、ヒトの Ngb が持つ GDI としての活性の重要性について検証するために、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, K102N, K119N, D149A) を作製し、精製後、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、酸化ストレスを誘導することにより、酸化ストレス下での細胞死抑制能について検討した。その結果、GDI 活性を持たないヒトの Ngb 変異体はいずれも全く細胞死を防がなかったのに対し、GDI 活性を持つヒト Ngb 変異体はすべて野生型ヒト Ngb 同様、細胞死を抑制することが明らかになった(図2)。これら実験結果は 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。

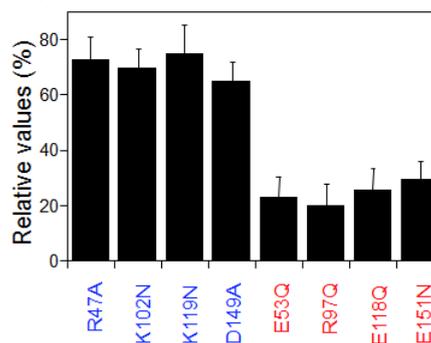


図2. ヒト Ngb 変異体の細胞死抑制能

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表した。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。

1-2) ヒト Ngb の細胞保護能に、酸化ストレスに伴う Ngb の構造変化が重要であることを実証

ヒトの Ngb は、通常の酸素濃度正常状態と虚血・再灌流(酸化ストレス)状態とは異なる構造をとる。酸素濃度正常状態では、ヘム鉄に近位側のヒスチジン(His)のみ結合しており、遠位側の His はヘム鉄から離れ、遠位側の空間には酸素が結合している(図3)。他方、虚血・再灌流(酸化ストレス)状態では、ヘム鉄の近位側、遠位側ともに His が配位している(図3)。

今回、酸化ストレス下におけるヒト Ngb の構造変化が細胞死抑制に重要であることを検証するため、酸化ストレス下でヘムに配位する 64 番目の遠位ヒスチジン(His64)が離れている酸素正常状態のモデルとして、ヘムを亜鉛ポルフィリンで

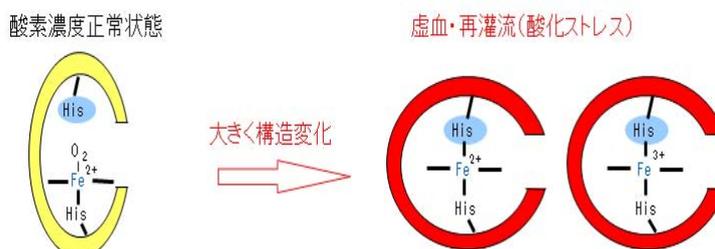


図3. Ngb のヘム近傍構造変化

置換することにより酸化ストレス下で His64 が配位できないようにした亜鉛ポルフィリン置換 Ngb、及び、His64 をヘムに配位できないバリンに置換したヒト H64V Ngb 変異体を作製し、これらが PC12 細胞の酸化ストレスに伴う細胞死を抑制するかを調べた。その結果、亜鉛ポルフィリン置換ヒト Ngb とヒト H64V Ngb 変異体はいずれも細胞死保護しないことが明らかになった。つまり、通常の酸素濃度正常状態型のヒト Ngb は神経細胞を保護せず、ヘム鉄への遠位側ヒスチジンの配位に伴う大きな構造変化が Ngb の細胞保護活性に必須であることが明らかになった。

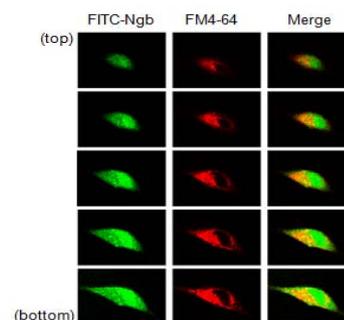


図4. ゼブラフィッシュ Ngb の細胞膜貫通特性(共焦点顕微鏡画像) FM4-64 はエンドサイトーシスのマーカーである。

2) 魚類 Ngb の新規機能の探索

—ゼブラフィッシュ Ngb の「細胞膜貫通特性」の発見—

ヒト Ngb、ゼブラフィッシュ Ngb 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 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 の N 末端領域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 N 末端領域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。そこで、N 末端領域の Arg, Lys の重要性について検証するために部位特異的アミノ酸置換体を作製し、細胞膜貫通特性について解析した。その結果、ゼブラフィッシュ Ngb の Lys7, Lys9, Lys21, Lys23 が細胞膜貫通能に重要であることが明らかになった。また、各種生物由来の Ngb のアミノ酸配列比較をした結果、これら塩基性アミノ酸に富む配列は、魚類にのみ保存されており、両生類、鳥類、哺乳類の Ngb には存在しないことが明らかになった。

3) 蛋白質のモジュール構造に基づく新規機能性蛋白質の創製

3-1) 細胞膜貫通能がありしかも神経保護作用のある新規モジュール置換蛋白質「キメラ ZHHH Ngb」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。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(図5)。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との融合蛋白質であるキメラ ZHHH Ngb(CNgb)を作製した(図5)。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、「キメラ ZHHH Ngb」はゼブラフィッシュ Ngb 同様の細胞膜貫通特性を有し(図6)、しかもヒト Ngb 同様の GDI 活性を持つため、Chariot 存在下でも、非存在下でも、細胞死を抑制できることが明らかになった(図7)。つまり、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く酸化ストレスに伴う神経細胞死を抑制する働きがある新規機能性蛋白質の創製に成功したことが明らかになった。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。

3-2) ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 を使った蛋白質工学による「細胞膜貫通特性を有する新規ミオグロビン(Mb)」の創製

Mb を土台にした蛋白質工学により、ゼブラフィッシュ Ngb 由来のモジュール M1 の融合による細胞膜貫通能の付与の可能性について検証した。ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 を完全長の Mb の N 末端に融合したキメラ蛋白質を作製したところ、このキメラ蛋白質は天然蛋白質同様ヘムを取り込み安定な構造を形成し、さらに、ゼブラフィッシュ Ngb 同様の細胞膜貫通特性を持つことが明らかになっ

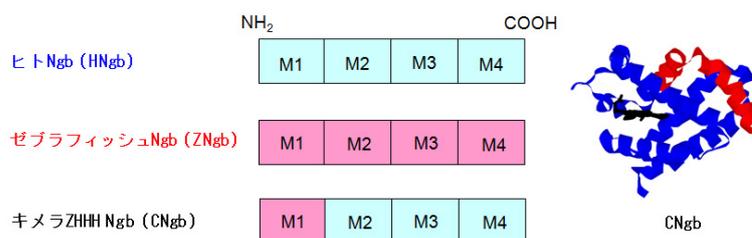


図5. キメラ ZHHH Ngb の作製

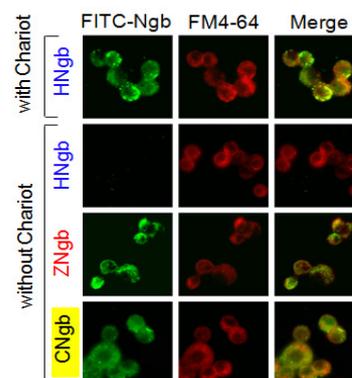


図6. PC12 細胞への Ngb の細胞膜貫通活性

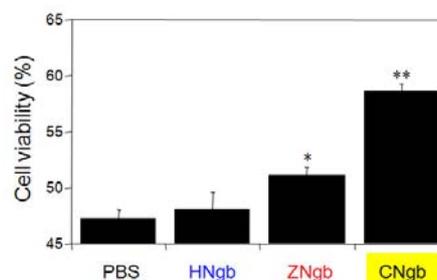


図7. 蛋白質導入試薬 Chariot 非添加時の Ngb の細胞死抑制能

た。この実験から、ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 は、細胞膜貫通能を付与できる”取り付け可能な”「構造及び機能単位」として機能することが実証できた。

4) トリプトファン tRNA 合成酵素(TrpRS)の新規機能の探索

TrpRS は、tRNA にトリプトファンを結合させる反応(アミノアシル化反応)を触媒する酵素であり、細胞質内で蛋白質合成において重要な役割を担っている。以前私は、ヒト TrpRS の余分な付加ドメインが alternative splicing またはプロテアーゼで切断された後、TrpRS 触媒活性ドメインが血管新生抑制因子として働くことを発見した。本プロジェクトでは、多機能性蛋白質である TrpRS の機能の分子進化の解明、及び、新たな生理機能の発見を目指した。具体的には、ヒト以外のウシ、マウス、ゼブラフィッシュの TrpRS のアミノアシル化活性は、ヘムあるいは亜鉛イオンの存在には依存せず、常に活性が高いことを初めて明らかにした。これらの特性は、ヘムあるいは亜鉛イオンと結合した時のみアミノアシル化活性があらわれるヒトの TrpRS の特性と大きく異なる。さらに、蛋白質工学を駆使し、ヒト TrpRS を常時活性型に、ウシ TrpRS をヘムあるいは亜鉛イオン依存型に相互に改変することにも成功した。現在、ヒト TrpRS にのみ存在するアミノアシル活性の不活性型(ヘム、亜鉛イオン非結合時)の存在理由、その生理学的意義の解明を目指している。特に、ヒトの TrpRS の場合のみインターフェロンにより高発現誘導されることがわかっており、このことと関連があるかどうか現在解析を推し進めている。

3. 今後の展開

現在進行中のテーマを以下に記す。

1) ヒト Ngb の細胞保護機構のさらなる解明

ヒト Ngb と $G\alpha_{i/o}$ との複合体の構造解析を目指している。また、Ngb が関わる $G\alpha_{i/o}$ 以降の下流シグナル伝達経路の特定にも挑んでいる。

2) 魚類 Ngb の細胞内での生理機能の解明

魚類 Ngb と相互作用する蛋白質の特定に挑み、その分子を手掛かりにして、生理機能の解明を目指している。

3) モジュール単位での改変によるさらなる新規機能性蛋白質の創製

細胞膜貫通特性を有するゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 を他の蛋白質にも融合し、モジュール置換法の有効性についてさらに検証を行っている。

4. 自己評価

本さがけは2度目のさがけプロジェクトである。一度目のさがけ(「タイムシグナルと制御」領域)において、私は、酸化ストレスによる神経細胞死を抑制する働きのある Ngb が非凡な機能性蛋白質であることを見出した。具体的には、精製蛋白質を用いた生化学的解析により、酸化ストレス条件下のヒト Ngb が三量体 G 蛋白質 α サブユニット($G\alpha_{i/o}$)に結合し、GDP/GTP 交換反応抑制蛋白質(GDI)として働く活性があることを発見した。また、ヒト Ngb が酸化ストレスに対するセンサー蛋白質として機能していることを見出した。二度目のさがけである本プロジェクトでは、実際の細胞を使って、一度目のさがけで提唱したヒト Ngb の細胞保護機構の作用機序に関する仮説を検証し、さらに、Ngb の生理機能、分子進化過程などを解明することを目的とした。その結果、以下のことが明らかになった。

1) ヒト Ngb の細胞保護には、ヒト Ngb が持つ $G\alpha_{i/o}$ に対する GDI 活性が必須であることを実証した。また、ヒト Ngb の細胞保護には酸化ストレスに伴う Ngb の構造変化が重要であることも明らかにした。このように、以前のさがけプロジェクトで発見した Ngb の機能が実際細胞内で重要な働きをしていることを自ら実証することができた。

2) 魚類 Ngb が細胞膜貫通することを発見した。蛋白質工学的手法を駆使することにより、魚類 Ngb の細胞膜貫通特性には、モジュール M1 内の4つの Lys 残基が重要であることを明らかにした。さらに、魚類 Ngb のモジュール M1 の立体構造を明らかにし、魚類 Ngb と結合する細胞表面分

子の特定にも成功した。

3) 培地に加えるだけで細胞保護効果のある新規機能性蛋白質を創製することに成功した。つまり、細胞保護能に重要なゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 と細胞保護能 (GDI 活性) に重要なヒト Ngb のモジュール M2-M4 を融合することにより、細胞膜貫通能と細胞保護能を合わせ持つ新規蛋白質の創製に成功した。さらに、ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 を完全長ミオグロビンの N 末端側に融合することにより、構造的に安定な細胞膜貫通能を有する蛋白質が得られることを示し、魚類 Ngb のモジュール M1 が細胞膜貫通特性を付与できる“取り付け可能な”「構造及び機能単位」として利用できることを実証した。

以上のように、独自のアイデアで研究を行い、オリジナリティーの高い研究成果が得られたと確信している。また、さがけの期間中に共同研究も積極的に行い、新たな分野を開拓できた。今後、これまでの知見を基に、さらに研究を発展させていきたい。

5. 研究総括の見解

ヒト脳内で見出されたニューログロビンがミオグロビン、ヘモグロビンサブユニットとヘム近傍構造が似ているにもかかわらず虚血・再還流による酸化ストレスによる細胞死を防ぐ機能を持つことをキメラタンパク質・変異タンパク質を用いて細胞内で実証したことは評価に値する。着実な研究の成果である。機能発現部位 (G タンパク質との相互作用部位) もモジュール (遺伝子上のエクソンに対応) 置換と部位特異的アミノ酸置換によって同定している。基礎的な研究で重要な成果を挙げているが、課題に掲げている細胞内環境の計測との結びつきが希薄と思われる。今後はこの人工蛋白質を細胞内可視化技術と結びつけて酸化ストレスを計測出来るように期待したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- Watanabe, S., and Wakasugi, K.* Neuroprotective function of human neuroglobin is correlated with its guanine nucleotide dissociation inhibitor activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 695-700 (2008). (*corresponding author)
- Watanabe, S., and Wakasugi, K.* Zebrafish neuroglobin is a cell-membrane-penetrating globin. *Biochemistry* **47**, 5266-5270 (2008).
- Wakasugi, K.* Species-specific differences in the regulation of the aminoacylation activity of mammalian tryptophanyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* **584**, 229-232 (2010).
- Watanabe, S., and Wakasugi, K.* Identification of residues critical for the cell-membrane-penetrating activity of zebrafish neuroglobin. *FEBS Lett.* **584**, 2467-2472 (2010).
- Watanabe, S., and Wakasugi, K.* Module M1 of zebrafish neuroglobin acts as a structural and functional protein building block for a cell-membrane-penetrating activity. *PLoS ONE*, 6(2):e16808 (2011)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) 著書

- 若杉桂輔 「酸素結合タンパク質(ニューログロビン、サイトグロビン): 酸化ストレスに対し細胞を保護するタンパク質」、からだと酸素の事典(酸素ダイナミクス研究会編集)、朝倉書店、253-255 ページ (2009).

- ・若杉桂輔 「モジュール構造に着目した新規酵素の分子設計」、酵素利用技術大系—基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで—、株式会社エヌ・ティー・エス、493-496 ページ (2010).

(4) 学会発表

学会発表(国際)

- ・ Wakasugi, K. “Oxidative stress-responsive intracellular regulation for human tryptophanyl-tRNA synthetase”, The 1st international conference on ARS network and signaling. Hoam Convention Center, Seoul, Korea, November 12-13, 2007.
- ・ Wakasugi, K. “Regulation of human tryptophanyl-tRNA synthetase activity by heme”, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Nagoya, July 25-30, 2009.
- ・ Watanabe, S., and Wakasugi, K. “Functional characterization of neuroglobin, a novel member of the vertebrate globin family”, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Nagoya, July 25-30, 2009.
- ・ Watanabe, S., and Wakasugi, K. “Chimeric ZHHH neuroglobin as a cell-membrane-penetrating neuroprotective globin”, 10th International Conference on Neuroprotective Agents, Asilomar, CA, September 19-22, 2010.
- ・ Wakasugi, K., Takahashi, N., and Watanabe, S. “Investigation of a neuroprotective mechanism of human neuroglobin”, 10th International Conference on Neuroprotective Agents, Asilomar, CA, September 19-22, 2010.

学会発表(国内)

- ・若杉桂輔、渡邊征爾 「ニューログロビンの新規機能の探索」、第36回生体分子科学討論会、北海道大学学術交流会館、2009年6月19日
- ・渡邊征爾、若杉桂輔 「ヒトのニューログロビンによる神経細胞死の抑制には酸化ストレスに伴う構造変化が重要である」、第82回 日本生化学大会、神戸ポートアイランド、2009年10月23日
- ・勝又理恵、若杉桂輔 「培養細胞におけるヒトのトリプトファンtRNA合成酵素の発現解析」、BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学大会 合同大会)、神戸ポートアイランド、2010年12月10日
- ・高橋 望、渡邊征爾、若杉桂輔 「過剰発現系を用いたヒトのニューログロビンの細胞死抑制メカニズムの解明」、BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学大会 合同大会)、神戸ポートアイランド、2010年12月8日
- ・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が持つ細胞膜貫通特性に必須の残基の特定」、BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学大会 合同大会)、神戸ポートアイランド、2010年12月10日

(5) 招待講演

招待講演(国際)

- ・ Wakasugi, K. “Oxidative stress-responsive intracellular regulation for human

tryptophanyl-tRNA synthetase”, The 1st international conference on ARS network and signaling. Hoam Convention Center, Seoul, Korea, November 12–13, 2007.

•Wakasugi, K., Takahashi, N., and Watanabe, S. “Investigation of a neuroprotective mechanism of human neuroglobin”, 10th International Conference on Neuroprotective Agents, Asilomar, CA, September 19–22, 2010.