

研究課題別評価

1.研究課題名 :蛋白質工学的手法によるタイムシグナルの人工制御系の構築

2.研究者名 :若杉 桂輔

グループメンバー :中野 智美 (研究期間 H.13.2.1. ~ H.15.9.30.)

3.研究の狙い:

本研究では、ニューログロビン及びアミノアシル tRNA 合成酵素に焦点をしばり、虚血・再灌流時のシグナル伝達系などにおける新規機能を解明し、さらにその知見をもとにシグナル伝達を制御可能にする新規機能性蛋白質をデザイン創製することにより、酸化ストレス下でのシグナル伝達系の新規な制御機構を分子レベルで明らかにすることを目指した。

4.研究結果:

4-1. ヒトの脳内グロビン蛋白質ニューログロビン(Ngb)の酸化ストレス下での新規機能の解明

4-1-1. Ngb が、酸化ストレス下、三量体 G 蛋白質の サブユニット(G)に対する GDP/GTP 交換反応抑制蛋白質(Guanine nucleotide dissociation inhibitor: GDI)として機能することを発見。

Ngb は、二つの大きく異なる構造をとりうる。一つは、通常の酸素正常状態の構造であり、この状態では、ヘム鉄は 2価であり、酸素などの配位子が結合できる。もう一つの構造は、虚血・再灌流時などの酸化ストレス下で生成する構造であり、ヘム鉄は 3価に酸化され、蛋白質由来のヒスチジンが直接ヘム鉄に配位することにより、酸素正常状態の構造と比べ大きな構造変化を生じる。本研究では、この酸化ストレス下での大きな構造変化に着目し、Ngb に結合する蛋白質の解析を行った結果、酸化ストレス下で生成する鉄 3価 Ngb が脳神経系細胞内シグナル伝達蛋白質である G と特異的に結合すること、他方、通常の酸素正常状態の鉄 2価 Ngb は G とは相互作用しないことを発見した。さらに、Ngb との結合に伴い、G の酵素活性がどう変化するのか解析を行った結果、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 GDP/GTP 交換反応抑制蛋白質 GDI として機能することにより、神経細胞死を抑制し、さらに、神経再生を促進していることを明らかにした。

4-1-2. Ngb が制御する脳神経シグナル伝達系の全体像の解明

脳神経シグナル伝達系における Ngb の役割をさらに検討するために、ヒトNgb を bait とし、Yeast two hybrid system を用いて、Ngb と相互作用する相手分子を human brain cDNA library から探索した。次に、Yeast two hybrid 法で陽性となったクローンに対し、遺伝子を精製し、再度酵母菌に形質転換することによりfalse positive を除外する実験を行った。その後、その DNA 塩基配列の解析を行い、Ngb と相互作用する蛋白質を特定した。さらに、免疫沈降法によってもこの相互作用を確認でき、Ngb と特異的に結合する新たな脳内蛋白質を明らかにすることに成功した。

4-1-3. 新規機能性蛋白質の創製、及び、Ngb 複合体の構造解析による Ngb 制御メカニズムの解明。

Ngb に関し、モジュール置換した種々のキメラ蛋白質を作製した結果、安定な活性型 Ngb の創製に成功した。また、Ngb と脳内蛋白質がどのように複合体を形成するのか分子レベルで明らかにすることを目指した。具体的には、Ngb 及び脳内蛋白質の相互作用部位と推測されるアミノ酸残基の変異体を作製し、精製蛋白質を用いた表面プラズモン共鳴装置 (BIAcore)による in vitro で

の蛋白質間相互作用の解析、及び Yeast two hybrid system による in vivo の系での蛋白質間相互作用の解析を行った。また、Ngb 及び脳内蛋白質との会合体の構造解析を核磁気共鳴装置 (NMR)を用いて行い、会合に伴う構造変化をアミノ酸レベルで解析し、機能の制御と対応づけることに挑んだ。また、円二色性 (CD)、蛍光スペクトルなどの物理化学的解析も駆使した。さらに、Ngb が脳内のどこで発現しているか、Ngb と相互作用する脳内蛋白質が細胞内で Ngb の局在場所と同じであるかどうか、さらに、酸化ストレスにより Ngb の局在箇所がどう変化するか 経時変化を追跡可能なタイムラプス機能を有する蛍光顕微鏡」を用いて解析した。

4-2. アミノアシル tRNA 合成酵素の酸化ストレス下での新規機能の解明

4-2-1. アミノアシル tRNA 合成酵素が血管新生の制御因子として働くことを発見

チロシル tRNA 合成酵素 (TyrRS)とトリプトファン tRNA 合成酵素 (TrpRS)は、tRNA にそれぞれチロシン及びトリプトファンを付加 (アミノアシル化)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。ヒトの TyrRS 及び TrpRS は、触媒活性ドメインのそれぞれ C 末端、N 末端側に、触媒活性には不要な余分な付加ドメインを融合している。そこで、この余分な付加ドメインに着目し実験を進めた結果、ヒト TyrRS 及び TrpRS がアポトーシスの初期段階でヒト細胞から分泌され、余分な付加ドメインがプロテアーゼにより切断された後、触媒活性ドメインがそれぞれ血管新生促進因子、血管新生抑制因子として働くことをはじめて明らかにすることに成功した。

4-2-2. 新規機能性蛋白質の創製に成功

ヒトの TrpRS と相互作用する蛋白質を探索したところ、解糖系の酵素であるグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GapDH)が TrpRS と結合することが明らかになった。TrpRS と結合する GapDH の結合部位の特定を試みるために、様々なキメラ蛋白質を作製した。ミオグロビン (Mb)の N 末端側に GapDH のモジュールを融合したキメラ蛋白質は、Mb 同様、酸素を可逆的に配位でき、また GAPDH 同様に TrpRS と会合する安定な新規蛋白質であることが明らかになった。

5. 自己評価：

本プロジェクトでは、ニューログロビン (Ngb)及びアミノアシル-tRNA 合成酵素が虚血、低酸素時にシグナル蛋白質として機能するということを明らかにした。特に、Ngb が虚血時に立体構造を大きくかえ、シグナル伝達系に関与する蛋白質と相互作用することにより、神経細胞死を防ぎ神経再生のためのシグナルを伝達するという大きな発見をすることができた。この研究成果は、グロビン蛋白質は酸素結合蛋白質としてだけ働くという従来の固定観念をくつがえし、酸化ストレス応答性のシグナル伝達センサー蛋白質としても機能するという全く新たな概念を打ち立てた。また、アミノ酸を tRNA に結合させる反応 (アミノアシル化)を触媒する酵素であり蛋白質合成において重要な役割を担っているヒトのアミノアシル tRNA 合成酵素が血管新生の制御因子として働くことを発見した。さらに、トリプトファン tRNA 合成酵素のアミノアシル活性を制御する新規機能性蛋白質を創製することにも成功した。

これら Ngb 及び TyrRS, TrpRS の酸化ストレス下でのシグナル伝達過程における新規機能の解明に関する研究は、私自身が斬新な仮説をたて検証を行い築いた全くオリジナルな研究であり、国内外ともに類似の研究はない。酸化ストレスは、多くの病気と密接に関わっており、本研究成果は、虚血性疾患、再生医療などに大きなインパクトを与えることができたと考えている。

今後は、Ngb 及び TrpRS と相互作用するシグナル伝達蛋白質の複合体の構造解析、変異体を用いた構造及び機能解析をさらに押し進め、複合体の界面 (結合部位)の特定を目指し、どのよう

な蛋白質? 蛋白質間相互作用の違いで神経再生へのシグナルの on/off がされているかアミノ酸レベルで分子メカニズムを詳細に解明し、さらに、相互作用に重要なモジュールを使ってコンピューター・モデリングを駆使し神経再生を誘導あるいは抑制するペプチド(蛋白質)をデザインし、神経再生の人工制御系の構築を目指したい。この研究は、脳神経系の医学、医療、血管新生関連の再生医療に多大な貢献をもたらすだけでなく、再生、分化を誘導、制御できる人工蛋白質の創製のための革新的な概念を与えるものと期待できる。

6.研究総括の見解：

本領域でただ一人の工学畑出身。シグナル伝達の制御を人工分子の創出によって可能にすることを旨とする。今回国内に於いて他の生物学・医学分野出身者との直接的交流が実現したことは、人脈の拡大、発想の転換をもたらす多様な影響を与えた。そのプラス効果は研究対象範囲を拡大させるとともに今後の成長に役立つものと期待してよい。すでにその現実化が始まっていることに注目したい。

7.主な論文等：

主な論文

1. Wakasugi, K., Slike, B. M., Hood, J., Otani, A., Ewalt, K. L., Friedlander, M., Cheresch, D. A., and Schimmel, P. (2002) A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 173-177.
2. Wakasugi, K., Slike, B. M., Hood, J., Ewalt, K. L., Cheresch, D. A., and Schimmel, P. (2002) Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* 277, 20124-20126.
3. Wakasugi, K., Nakano, T., and Morishima, I. (2003) Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric α protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J. Biol. Chem.* 278, 36505-36512.
4. Wakasugi, K. (2004) Functional roles of neuroglobin, a vertebrate globin expressed in the brain. *Acc. Chem. Res.* (Review, invited for submission).
5. Wakasugi, K., Nakano, T., Kitatsuji, C., and Morishima, I. A membrane-bound protein interacts with neuroglobin. Submitted for publication.
6. Wakasugi, K., Nakano, T., Hira, S., and Morishima, I. Module-substituted myoglobin regulates an aminoacyl-tRNA synthetase activity. Manuscript in preparation.
7. Wakasugi, K., and Morishima, I. Module-substituted neuroglobin. Manuscript in preparation.

学会発表 国内学会 13 件、国際学会 4 件

招待講演 5 件