

細胞保護能を持つニューログロビンの発現解析と機能制御機構の解明

高橋 望・若杉桂輔*

東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻生命環境科学系

Protein Expression and Functional Regulatory Mechanism of a Neuroprotective Protein, "Neuroglobin"

Nozomu TAKAHASHI and Keisuke WAKASUGI*

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences,
The University of Tokyo, Tokyo 153-8902

ABSTRACT

Mammalian neuroglobin (Ngb) protects neuronal cells under conditions of oxidative stress. The mechanism underlying this function is only partly understood. We previously showed that human Ngb acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI) for the α -subunits of heterotrimeric $G_{i/o}$ proteins ($G_{\alpha i/o}$) and inhibits reductions in cAMP concentration, leading to protection against cell death. It has been reported that 17β -estradiol induces upregulation of Ngb expression. In the present study, we checked the effect of the phytoestrogen daidzein, an isoflavone found in soybeans, on upregulation of Ngb expression and found that daidzein upregulates the level of Ngb protein expression as does 17β -estradiol. In order to investigate the more detailed neuroprotective mechanism of Ngb, we created human E60Q Ngb mutant and clarified that Glu60 of human Ngb is a crucial residue for its GDI and neuroprotective activities. Moreover, we investigated structural and functional properties of human wild-type and E60Q Ngb proteins and demonstrated that the neuroprotective effect of human Ngb is due to its GDI activity and not due to its scavenging activity against reactive oxygen species. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 71-75, 2014.

Key words : neuroglobin, estradiol, daidzein, oxidative stress, neuroprotection

*〒153-8902 東京都目黒区駒場3-8-1

酸化ストレスにより神経細胞は細胞死を引き起こす。2000年、脊椎動物の神経細胞に特異的に発現し可逆的な酸素結合が可能なたん白質「ニューログロビン (Ngb)」が報告された¹⁾。哺乳類Ngbを過剰に発現させると虚血・再灌流 (酸化ストレス) 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、哺乳類Ngbに酸化ストレスに伴う細胞死を抑制する働きがあることが示唆された^{2, 3)}。哺乳類Ngbの発現量は、低酸素や女性ホルモンである 17β -エストラジオールの添加により増加することが報告されている^{2, 4)}。我々は、不明であったNgbによる神経細胞死抑制メカニズムの解明を目指すため、ホモロジー検索などを駆使し仮説をたて検証した結果、酸化ストレスにより生じる酸化型Ngbが、ヘテロ三量体Gたん白質の α サブユニット ($G\alpha_{i/o}$) と特異的に結合し、「GDP解離阻害因子 (GDI)」として機能することを明らかにした⁵⁾。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⁵⁾。以上のことから、Ngbは酸化ストレス応答性のセンサーたん白質として働き、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と考えられる。また、我々は、部位特異的アミノ酸置換したNgbを使った解析により、Ngbの $G\alpha_{i/o}$ に対するGDIとしての活性に重要なアミノ酸残基はGlu53, Arg97, Glu118, Glu151であることを明らかにした⁶⁾。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変異体はすべてヒト野生型Ngb同様、細胞死を抑制することが明らかになり、ヒトNgbの神経細胞死抑制活性にNgbが持つGDI活性が必須であることを実証した⁷⁾。さらに、Ngbが $G\alpha_{i/o}$ のGDIとして働くことにより $G\alpha_{i/o}$ の活性を抑え、cAMP量の減少を抑制することにより細胞死を防いでいることも明らかにした⁸⁾。

本プロジェクトでは、大豆イソフラボンであるダイゼインに、 17β -エストラジオールのように、Ngbの発現量を増加させる働きがあるかどうか、ウェスタンブロット法によりたん白質レベルでの発現量の解析を行った。また、Ngbの神経細胞死抑制効果に重要な新たなアミノ酸残基を明らかにすることにより、Ngbの神経細胞保護メカニズムをさらに解明することを目的とした。

方 法

エストラジオール、ダイゼインの添加に伴うNeuro-2a細胞内でのNgbたん白質の発現量変化の解析

マウスNeuro-2a細胞を医薬基盤研究所 JCRB細胞バンクより購入した。 17β -エストラジオール (Sigma-Aldrich) またはダイゼイン (長良サイエンス) を様々な濃度で添加後、24時間培養した。Ngbの発現量解析に関しては、細胞を破碎後、15.0%アクリルアミド濃度のゲルを用いてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。その後、一次抗体として抗Ngb (FL-151) ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、二次抗体としてHRPを融合させたロバ抗ウサギIgGのF(ab')₂フラグメント (GE Healthcare Biosciences) を使ったウェスタンブロット解析を行った。他方、 β -actinの発現量解析に関しては、細胞破碎後、12.5% SDS-PAGEで泳動し、一次抗体として抗 β -actinマウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich)、二次抗体としてHRPを融合させたヒツジ抗マウスIgG (GE Healthcare Biosciences) を使ったウェスタンブロット解析を行った。

ヒトNgbおよび $G\alpha_{i1}$ の大腸菌でのたん白質発現、および、たん白質精製

部位特異的アミノ酸置換はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて作製した。ヒトNgbの発現プラスミドを大腸菌BL21 (DE3) に形質転換後、IPTGを加えヒトNgbたん白質を発現させた⁵⁻⁸⁾。細胞を破碎後、DEAE Sephacel陰イオンカラムおよびSephacryl S-200 HR分子ふるいカラムを用いてヒトNgbのたん白質精製を行った⁵⁻⁸⁾。

ヒト $G\alpha_{i1}$ に関しては、N末端に6xHisタグ配列を融合させたたん白質として大腸菌BL21 (DE3) で発現させた⁸⁾。Niアフィニティークラムを用いた精製後、TEVプロテアーゼによりN末端6xHisタグ配列をヒト $G\alpha_{i1}$ から切断しNiアフィニティークラムにより取り除くことにより、精製したヒト $G\alpha_{i1}$ を調製した⁸⁾。

ヒト野生型NgbおよびE60Q Ngb変異体が持つ $G\alpha_{i1}$ のGDP解離阻害因子 (GDI) としての活性の測定

ヒトNgb (10 μ M) 存在下、非存在下において、³H] GDP結合型 $G\alpha_{i1}$ (0.3 μ M) に過剰量の無標識GTP (2 mM) を添加した後、 $G\alpha_{i1}$ に結合している³H] GDP量を経時的に測定した⁸⁾。

SH-SY5Y細胞を用いたヒト野生型NgbおよびE60Q Ngb変異体の酸化ストレスに対する細胞死抑制能の測定

ヒトSH-SY5Y細胞は、American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。10 μ Mレチノイン酸で6日間処理することにより分化誘導を行った⁸⁾。ヒトNgbを発現させるためのベクターをSH-SY5Y細胞にリポフェクタミン2000 (Invitrogen) を用いて遺伝子導入した⁸⁾。24時間後に、終濃度100 μ Mの過酸化水素を添加し、24時間培養した⁸⁾。

MTS法による細胞生存率の測定には、CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Reagent (Promega) を用い、ミトコンドリア膜に存在する電子伝達系の還元反応を利用してホルマゼン色素を生成させ490 nmの吸光度を測定した⁸⁾。吸光度が大きいほど、細胞が生きていることを意味している。

ヒト野生型NgbおよびE60Q Ngb変異体を持つ活性酸素(ROS)の除去能の解析

フェントン反応によりヒドロキシルラジカルを発生させ、フェナントロリンを用いて比色定量を行った⁹⁾。フェナントロリンは鉄(II)と錯体を形成し赤色を呈するが、酸化されると無色になる。536 nmの吸光を測定し、ヒドロキシルラジカル除去活性を求めた⁹⁾。

結果と考察

大豆イソフラボンの添加によるNgbのたん白質発現量の変化の解析

まず、大豆イソフラボンであるダイゼインに、17 β -エストラジオールのように、Ngbの発現量を増加させる働きがあるかどうか、ウェスタンブロット解析によりたん白質レベルでの発現量を調べた。その結果、ダイゼインを添加すると濃度依存的にNgbの発現量が増加することを見出した (Fig. 1)。ダイゼインによるNgbの発現誘導能は、17 β -エストラジオールの場合とほぼ同じであることが明らかになった (Fig. 1)。

ヒトNgbの酸化ストレスに伴う神経細胞死抑制メカニズムのさらなる解明

ヒトNgbは酸化ストレス下に立体構造を変化させ、酸化型NgbはGa₄と特異的に結合し、GDIとして働く^{5~8)}。本研究では、Ngbの細胞保護能に重要な他のアミノ酸残基を明らかにするため、酸化ストレス環境において大きく立体構造が変化する領域に位置する酸性

アミノ酸、Glu60に着目した。ヒトE60Q Ngb変異体を作製し、紫外可視吸収スペクトル、円偏光二色性スペクトルを測定したところ、E60Q Ngb変異体は、野生型Ngbと同様のヘムの配位構造、二次構造を形成しており、たん白質の安定性もE60Q Ngb変異体と野生型Ngb間で違いがないことが明らかになった (data not shown)。次に、GDIとしての活性を測定したところ、E60Q Ngb変異体は野生型Ngbとは異なりGa₄に対しGDIとして機能しないことが明らかになった (Fig. 2)。また、E60Q Ngb変異体は、野生型Ngbが持つ酸化ストレスに対する細胞死抑制能を示さなかった (Fig. 3)。以上のことからGlu60は、GDI活性および細胞保護能に重要な残基であることが明らかになった。次に、以前からNgbの細胞保護能がNgbの活性酸素種 (ROS) の除去能によるという仮説が提唱されているため、野生型およびE60Q Ngb変異体間で代表的なROSであるヒドロキシルラジカル除去能の比較解析を行った。その結果、E60Q Ngbのヒドロキシルラジカル除去能

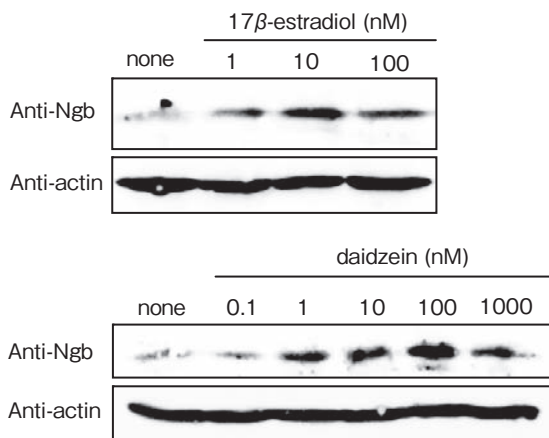


Fig. 1. Effects of 17 β -estradiol or daidzein on the expression levels of Ngb proteins in neuro-2a cells. Estradiol or daidzein was applied at various concentrations to neuro-2a cells. The cells were then incubated for 24 h. Cell lysates were analyzed on 15.0% or 12.5% SDS-PAGE and by Western blot analyses using rabbit anti-Ngb (FL-151) polyclonal antibody or mouse anti- β -actin monoclonal antibody, respectively. After washing, membranes were incubated with an HRP-linked F(ab)₂ fragment of donkey anti-rabbit IgG or an HRP-linked whole antibody of sheep anti-mouse IgG. Proteins were visualized using ECLTM western blotting detection reagents.

は野生型Ngbの場合と同じであることが明らかになった (Fig. 4). 以上のことより, Ngbの細胞保護能には, NgbのROSの除去能ではなく, GDIとしての働きが重要であると考えられる.

なお, 本研究助成のこの項目内での研究成果の一部はPLoS ONE誌にて論文発表した.

Takahashi N, Watanabe S and Wakasugi K (2013) Crucial roles of Glu60 in human neuroglobin as a guanine nucleotide dissociation inhibitor and neuroprotective agent. *PLoS ONE*, **8**, e83698.

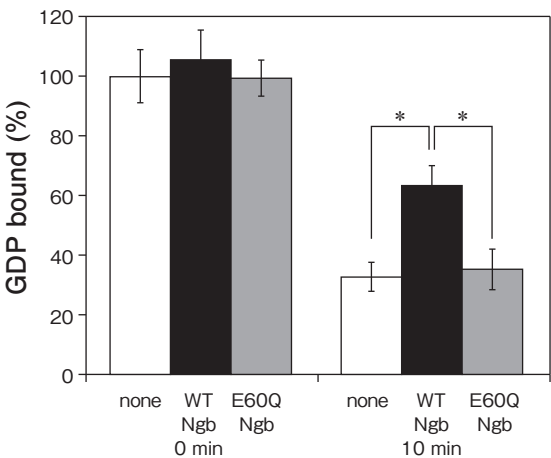


Fig. 2. Effects of human wild-type (WT) Ngb or E60Q Ngb on the dissociation of GDP from human GDP-bound Ga_{ii}. The amount of [³H] GDP bound to Ga_{ii} in the absence of human Ngb at 0 min was defined as 100%. All data are expressed as means ± SD. **p*<0.01.

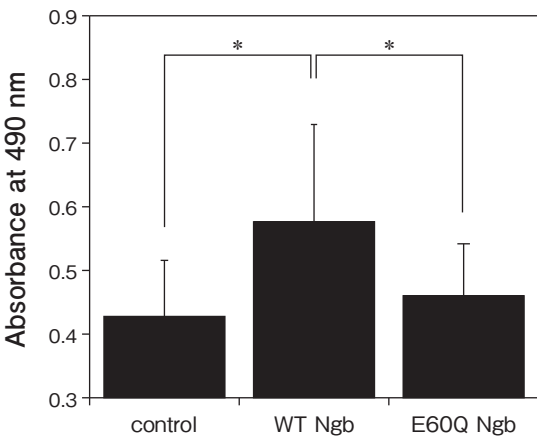


Fig. 3. Effect of the E60Q mutation in human Ngb on SH-SY5Y cell death caused by hydrogen peroxide. Differentiated SH-SY5Y cells transfected with control vector, human WT or E60Q Ngb expression vector with Lipofectamine 2000 were treated with 100 μM hydrogen peroxide, and cell viability was measured by MTS assay. All data are expressed as means ± SD. **p*<0.01.

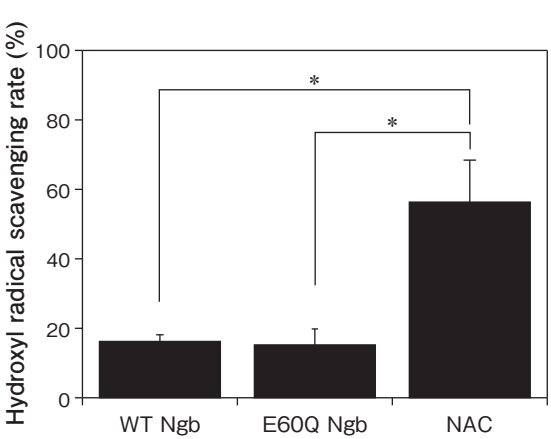


Fig. 4. Hydroxyl radical scavenging activities of human WT, E60Q Ngb, and a ROS scavenger, N-acetylcysteine (NAC). The reaction was initialized by addition of hydrogen peroxide and was incubated for 60 min. The absorbance of the mixture at 536 nm was measured. Data are presented as means ± SD. **p*<0.01.

要 約

哺乳類のニューログロビン (Ngb) は、酸化ストレスに伴う細胞死を抑制する働きがある。我々は、ヒトNgbの神経細胞死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たん白質の α サブユニット ($G\alpha_{i/o}$) と結合し、 $G\alpha_{i/o}$ に特異的な「GDP解離阻害因子 (GDI)」として機能することを発見した。また、最近、女性ホルモンである17 β -エストラジオールがNgbの発現量を増加させることが報告された。そこで、本プロジェクトでは、まず、大豆イソフラボンであるダイゼインにNgbの発現量を増加させる働きがあるかどうか、ウェスタンブロット法によりたん白質レベルでの発現量の解析を行った。その結果、17 β -エストラジオールの場合と同様、ダイゼインの添加によりNgbの発現量が増加することを見出した。また、Ngbの神経細胞死抑制メカニズムをさらに解明するために、ヒトNgbの酸化ストレス環境において大きく立体構造が変化する領域に位置するGlu60残基に着目し実験を行ったところ、E60Q Ngb変異体は、野生型Ngbと同様のヘムの配位構造をとるものの、 $G\alpha_{i/o}$ に対するGDIとしては機能せず、細胞保護能を示さないことが明らかになった。この実験結果は、ヒトNgbのGlu60がGDI活性および細胞保護能に重要な残基であることを示している。さらに、野生型およびE60Q Ngb変異体間の活性酸素種 (ROS) の除去能の解析を行った結果、これらのNgb間でROSの除去能に違いがないことが判明した。したがってヒトNgbの酸化ストレスに伴う細胞死の抑制能には、NgbのROSの除去能ではなく、GDIとしての働きが重要であることが明らかになった。

文 献

- 1) Burmester T, Weich B, Reinhardt S and Hankeln T (2000): A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature*, **407**, 520-523.
- 2) Sun Y, Jin K, Mao XO, Zhu Y and Greenberg DA (2001): Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 15306-15311.
- 3) Sun Y, Jin K, Peel A, Mao XO, Xie L and Greenberg DA (2003): Neuroglobin protects the brain from experimental stroke *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 3497-3500.
- 4) De Marinis E, Ascenzi P, Pellegrini M, Galluzzo P, Bulzomi P, Arevalo MA, Garcia-Segura LM, and Marino M (2010): 17 β -estradiol—A new modulator of neuroglobin levels in neurons: Role in neuroprotection against H₂O₂-induced toxicity. *Neurosignals*, **18**, 223-235.
- 5) Wakasugi K, Nakano T and Morishima I (2003): Oxidized human neuroglobin as a heterotrimeric G α protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem*, **278**, 36505-36512.
- 6) Wakasugi K and Morishima I (2005): Identification of residues in human neuroglobin crucial for guanine nucleotide dissociation inhibitor activity. *Biochemistry*, **44**, 2943-2948.
- 7) Watanabe S and Wakasugi K (2008): Neuroprotective function of human neuroglobin is correlated with its guanine nucleotide dissociation inhibitor activity. *Biochem Biophys Res Commun*, **369**, 695-700.
- 8) Watanabe S, Takahashi N, Uchida H and Wakasugi K (2012): Human neuroglobin functions as an oxidative stress-responsive sensor for neuroprotection. *J Biol Chem*, **287**, 30128-30138.
- 9) Kamioka Y, Fujikawa C, Ogai K, Sugitani K, Watanabe S, Kato S and Wakasugi K (2013): Functional characterization of fish neuroglobin: zebrafish neuroglobin is highly expressed in amacrine cells after optic nerve injury and can translocate into ZF4 cells. *Biochim Biophys Acta*, **1834**, 1779-1788.