

祖先型ミオグロビンのアミノ酸配列及び酸素結合特性

石田学¹、安田温²、山崎伊織²、太田元規³、磯貝泰弘⁴、今井清博^{1,5}

¹法政大・マイクロナノテクノロジー研・ナノバイオ、²法政大院・工・物質化学、³東工大・
学術国際情報センター、⁴理研播磨/Spring-8・城生体金属科学、⁵法政大・工・生命機能

E-mail: pd0004@k.hosei.ac.jp

[背景]

ヘモグロビン・ミオグロビンは、今までに最も研究されているタンパク質の1つに挙げられるが、まだ詳細に分かっていない部分も数多く存在する。特に、ヘモグロビンは、協同的な可逆的酸素結合という高度な機能を持つタンパク質であり、アロステリック相互作用の獲得に至った機能分化の経緯や、詳細な作用メカニズムなど未知な部分が多い。このグロビンタンパク質は、分類学的に下等なバクテリアから高等生物に至るまで幅広い生物種に遍在するタンパク質であり、原始グロビンから単量体のミオグロビン、そして四量体のヘモグロビンへと分子進化を遂げていく過程で、より高度な機能（アロステリック相互作用）を獲得したと考えられている¹⁾。

[目的]

本研究では、従来の現存生物タンパク質の網羅的解析とは異なり、積極的に原始グロビンへアミノ酸配列を近づけるように分子設計を行い、自然が莫大な時間をかけて行った分子設計（分子進化）を実験室内で遡る（逆分子進化）という形で再現する。また、祖先型タンパク質のアミノ酸配列推測及び合成・解析を通して得られたデータを、これまでに蓄積された数多くの研究成果と照らし合わせることにより、原始グロビンから現在までのグロビンタンパク質の機能分化や協同的酸素結合能の獲得に至った分子論的メカニズムに迫り、それらを解明することを目的とする。

そこでまず、グロビンタンパク質の中でも単純な単量体で、酸素結合が協同的でないミオグロビンについて、逆分子進化的手法を用いて推測した祖先型ミオグロビンが天然に存在するミオグロビンと同様にフォールドするか、ヘムを結合するか、酸素を結合のかなどを基準にこの手法の有効性を評価する。

[方法]

アミノ酸配列が既知のミオグロビンのアミノ酸配列を各データベース（PDB, PIR, PRF, SWISS-PROT）から収集し、アミノ酸残基数が一般的な153残基から大幅に外れているもの、変異体、フラグメント等を除外し、合計108種のアミノ酸配列を得た。これらの配列から、2つのデータセット(a)羊膜類（爬虫類、鳥類、哺乳類の計81種）と、(b)脊椎動物（データセット(a)+魚類の計101種）を作成し、ClustalWでアラインメント後、分子進化系統樹を作成した。それらを基に、PAML3.14を使い祖先型ミオグロビンのアミノ酸配列を推測した。得られたアミノ酸配列のうち、データセット(a)

では、分子進化系統樹上で哺乳類の祖先に位置する配列：node80 (n80)、データセット(b)では、全 101 種の現存脊椎生物から最も相同性が低い祖先型配列：node182 (n182) について立体構造モデルを作成し、合成の可否を側鎖のぶつかり合い、主鎖の二面角にしたがって評価した。各祖先型ミオグロビンコードする人工遺伝子を PCR 法で作成し、発現ベクター(pET22b(+))に組み込み、大腸菌 BL21(DE3)株に形質転換した。目的タンパク質は、各プラスミドを持つ大腸菌を大量培養し、IPTG による発現誘導で合成した。得られた菌体から各種クロマトグラフィー技術により精製した祖先型ミオグロビンについて種々の解析を行った。

[結果・考察]

各データセットから得られた分子進化系統樹は、実際の生物の進化系統樹と大きく異ならなかった。また、各祖先型ミオグロビンのアミノ酸配列は、必ずしも正しい祖先とは言い切れないが、ミオグロビンのアミノ酸配列としてはもっともらしいものが得られた。それぞれの祖先型ミオグロビンと現存生物の中で最もアミノ酸配列相同性の高いミオグロビンを持つ生物は、n80 ではキタオポッサム、n182 ではゼブラフィッシュで、それぞれの相同性は、93 %と 85 %であった。

各プラスミドを持つ大腸菌は、培養後、菌体が鮮赤色をしていた。このことから各祖先型ミオグロビンは正しくフォールドしてヘムを結合し、且つ、酸素結合能を有していることが示唆された。また、精製した祖先型ミオグロビンの SDS-PAGE により、各アミノ酸配列から予測される分子量 (n80 : 約 17,000 Da、n182 : 約 16,300 Da) の位置に単一なバンドを確認した。これら祖先型ミオグロビンの吸収スペクトルの例を Fig. 1 に示す。Fig. 1 より、祖先型ミオグロビンは、天然の現存生物ミオグロビンと大きく変わらない吸収スペクトルを持つことが分かる。このように、逆分子進化的手法により分子設計した祖先型ミオグロビンは、天然様の性質を持つことが示された。その他の詳細なデータについては当日発表する予定である。

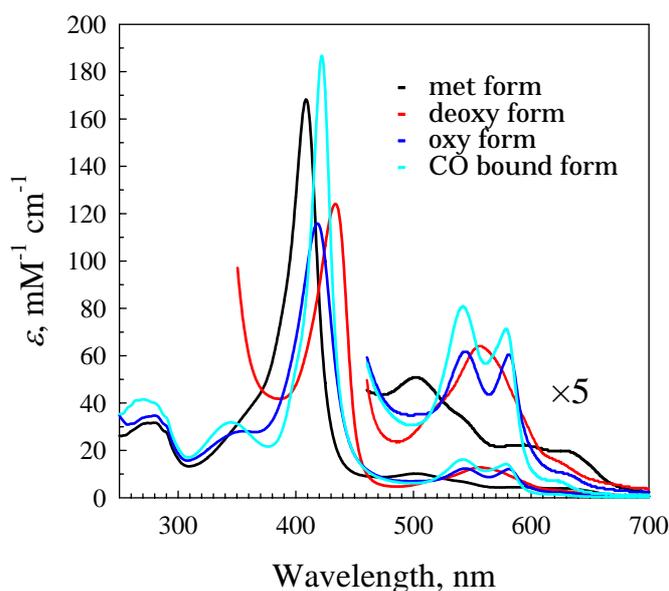


Fig. 1 祖先型ミオグロビン n80 の各吸収スペクトル

[参考文献]

- 1) Doi, Y. et al. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 2354-63.
- 2) Yang, Z. (1997) *Comput. Appl. BioSci.* **13**, 555-556.