

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19570222

研究課題名（和文）逆分子進化法によるヘム蛋白質高次機能獲得の実験的検証

研究課題名（英文） Experimental verification of acquisition of hemoprotein high-order functions by reverse molecular evolution

研究代表者

今井 清博（IMAI KIYOHIRO）

法政大学・生命科学部・教授

研究者番号：50028528

研究成果の概要（和文）：

現在知られている多数のミオグロビン蛋白質の配列データに基づき、現存しない2種の古代生物すなわち哺乳類祖先型と魚類祖先型のミオグロビンのアミノ酸配列を予測し（逆分子進化）、それらを大腸菌内で合成した。これらの祖先型ミオグロビンは、現存する近縁種すなわちキタアメリカオポッサムとゼブラフィッシュのミオグロビンに比べて、酸素結合力が強く、構造が安定で、自動酸化速度は遅いことが分かった。したがって、ミオグロビンは、哺乳類と魚類においては、構造安定性や自動酸化性を犠牲にし、酸素結合機能の環境適応を優先して進化したと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

On the basis of the sequence database for proteins now available, we constructed phylogenetic trees for myoglobin and inferred the amino acid sequences for two ancestor animal's myoglobins, one for mammalian and the other for fishes (reverse evolution). These ancestral myoglobins, synthesized in *E. coli*, showed high oxygen affinity, stable structure and lowered autooxidation rate compared to the corresponding extant neighbor animals, North American opossum and Zebra fish. Thus, it is considered that, in mammals and fishes, myoglobin has evolved so that oxygen binding function is adapted to environments at the sacrifice of structural stability and autooxidation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：ヘム蛋白質、分子進化、分子設計、祖先型、遺伝子組換え

1. 研究開始当初の背景

地球上に酸素が蓄積するに伴って、好氣的

生物は積極的に酸素を使って呼吸によりエネルギーを獲得するようになった。その際に、

生体内で酸素を運搬・貯蔵する分子が必要となった。幅広い生物種においては、ヘモグロビン (Hb)・ミオグロビン (Mb) がその役割を担うケースが数多く見られる。これらのヘム蛋白質は、原始グロビンからミオグロビン (単量体)、ヘモグロビン (四量体) へと分子進化を遂げて、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。しかし、これまでのミオグロビン、ヘモグロビンに関する数多くの研究結果からですらヘモグロビンの有するアロステリック相互作用獲得機構の解明には至っていない。

申請者はこれまでに、進化分類学的に脊椎動物の中でもっとも原始的な円口類のヤツメウナギのヘモグロビン・ミオグロビンの分子会合状態や酸素結合機能特性、ヘム・リガンド状態の解析を行ってきた。円口類のヘモグロビンは酸素化に伴ってホモ二量体 (または四量体) から酸素親和性の高い単量体へと解離する特徴があり、分子進化上、単量体ヘモグロビンと四量体ヘモグロビンをつなぐ存在であると考えられる。これまでの研究により、円口類ではヘモグロビンとミオグロビンの間に明確な区別がなく、同一蛋白質によってそれぞれの機能が担われていることが示唆され、ミオグロビンからのヘモグロビン分子進化の途中を示していることが示唆された。

2. 研究の目的

分子進化に基づいて、現存しない古代生物のグロビン (祖先型グロビン) のアミノ酸配列を予測し、実際に合成して構造・機能解析を行う。すなわち、祖先型グロビンを合成し、それらの会合状態、機能特性、ヘム・リガンド状態の解析結果を現存生物に照らし合わせて原始グロビンからの機能分化やアロステリック相互作用の獲得に至ったメカニズムに迫って行くことによって、自然が莫大な年月をかけて行った分子設計を実験室の中で再現することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) **祖先型ミオグロビンの分子設計** : 現存生物のグロビンのアミノ酸配列データベースを利用して分子系統樹を作成する。すなわち、自作のデータベースから羊膜類 (爬虫類、鳥類、哺乳類)、脊椎動物 (魚類、爬虫類、鳥類、哺乳類) 及び、153 残基の鎖長となるすべてのアミノ酸配列データをそれぞれ抽出し、ClustalW でアラインメント後、MEGA3 または TreeViewX を使って分子系統樹を作成する。この系統樹を基に、プログラム PAML を使って祖先型ミオグロビンのアミノ酸配列を推測する。

(2) **祖先型ミオグロビンの合成** : 祖先型ミオグロビンの合成には、大腸菌の蛋白質発現系

を用いる。祖先型ミオグロビンをコードする人工遺伝子は、大腸菌のオペティマルコドンを使ってオリゴ DNA を基に PCR 法により全合成し、発現ベクターに挿入する。このプラスミドを組込んだ大腸菌を培養し、祖先型ミオグロビンを大量合成する。

(3) 祖先型ミオグロビンの精製および物性

解析 : 合成した祖先型ミオグロビンを、各種クロマトグラフィー技術を駆使して単離・精製し、得られた単離祖先型ミオグロビンの紫外可視吸収スペクトル、円偏光二色性スペクトルの測定や熱変性実験などを行う。

(4) **酸素結合機能特性の解析** : 手製の自動解析装置を用いて、祖先型ミオグロビンの酸素平衡曲線を種々の pH・温度条件下及び種々の蛋白質濃度で測定し、解析する。

(5) **祖先型ヘモグロビンの分子設計** : 祖先型ミオグロビンからの発展として、祖先型ヘモグロビンのアミノ酸配列を設計する。現存生物のグロビンのアミノ酸配列データベースを利用して α 鎖、 β 鎖それぞれの分子系統樹を作成する。次に、 α 鎖、 β 鎖それぞれの系統樹においてほぼ同じ場所に位置する祖先型ヘモグロビン配列について現存生物との相同性を調べ、どの生物からも適度に相同性が低いものの中から実際に合成するアミノ酸配列の候補を絞り込む。

4. 研究成果

(1) **祖先型ミオグロビンの設計** : 現存生物すなわち、羊膜類 (爬虫類、鳥類、哺乳類)、脊椎動物 (魚類、爬虫類、鳥類、哺乳類) および、153 残基の鎖長となるすべてのグロビンの既知のアミノ酸配列データから分子系統樹を作成し、それを基にして、2つの祖先型ミオグロビン (哺乳類祖先型” n80” および魚類祖先型” n182”) のアミノ酸配列を推測した。

(2) **祖先型ミオグロビンの合成** : これらの 2つの祖先型ミオグロビンをコードする人工遺伝子 DNA を合成して、大腸菌内で発現させ、得られた祖先型ミオグロビンを抽出し、ゲルろ過やイオン交換クロマトグラフィーなどの方法で精製した。

(3) **祖先型ミオグロビンの特性** : 2つの祖先型ミオグロビンの分子量は単量体に相当し、CD (円偏光二色性) 測定から求めた α ヘリックス含量や紫外・可視吸収スペクトルから、現存ミオグロビンと同等の立体構造をもつことが分かった。

(4) **祖先型ミオグロビンの酸素結合能** : これら 2つの祖先型ミオグロビンの酸素解離曲線解析より、これらは Bohr 効果や協同作用を示さず、現存種のミオグロビンに比べて、酸素親和性が高く、その温度依存性も小さい (酸素化反応熱の絶対値が小さい) ことが明らか

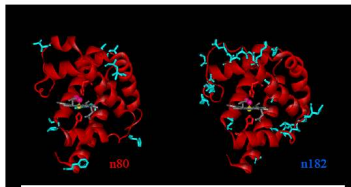
にされた。

(5) **現存近縁種ミオグロビンの合成と特性**: 上記の2つの祖先型Mb (哺乳類祖先型n80-Mbと魚類祖先型n182-Mb) の現存近縁種としてのキタアメリカオポッサムMb (Nao-Mb) とゼブラフィッシュMb (Zbf-Mb) (図1) のCDスペクトル、熱変性、酸素結合特性、自動酸化速度、天然型のプロトヘムを人工のメソヘムまたはデューテロヘムで置換したMbの酸素親和性などを測定し、祖先型Mbのそれらと比較することによって、以下の結果を得た。

2つの祖先型ミオグロビンを合成

Node80: 哺乳類の祖先型Mb

Node182: 魚類の祖先型Mb



Mb分子上の置換アミノ酸の場所



アメリカオポッサム
(N80の近縁現存種)



ゼブラフィッシュ
(N182の近縁現存種)

図1. 祖先型および現存近縁種のみオグロビン

- ①熱変性をCDスペクトル変化で追跡したところ、現存種Mbに比べて祖先型Mbの方が安定である。
- ②近縁現存種のMbはBohr効果を示さず、酸素親和性は祖先型Mbより低く、体温環境の違いと酸素親和性の温度依存性との間には相関がない (図2~図4、表1)。

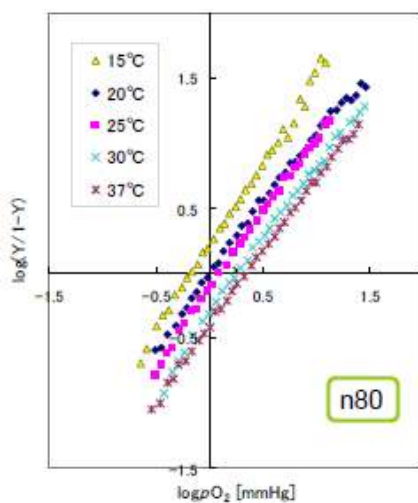


図2. 哺乳類祖先型Mbの酸素結合Hill plot

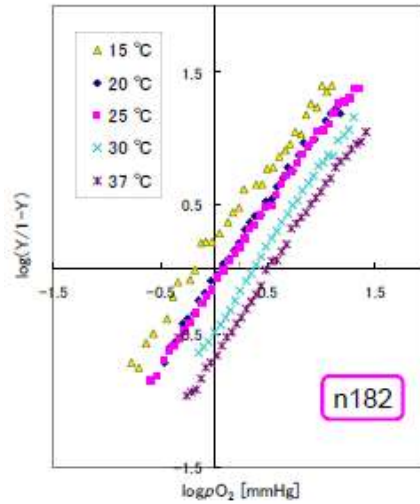


図3. 魚類祖先型Mbの酸素結合Hill plot

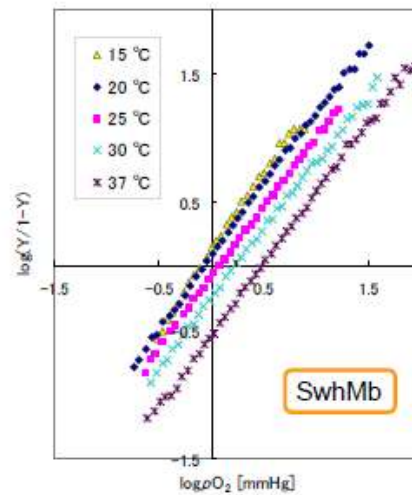


図4. マッコウクジラMbの酸素結合Hill plot

表1. 祖先型、現存近縁種のみオグロビンの酸素化反応熱および酸素親和性P₅₀の比較

動物種	ΔH [kcal/mol]	P ₅₀ [mmHg]
sperm whale	-14.9	0.5
human	-13.1	0.6
Nao	-12.1	1.5
n80	-11.9	0.9
tuna	-13.2	0.6
Zbf	-14.1	1.9
n182	-10.3	1.2

- ③自動酸化速度は、現存種Mbに比べて祖先型Mbの方が遅いが、その温度依存性には有意な差はみられない (図5、表2)。

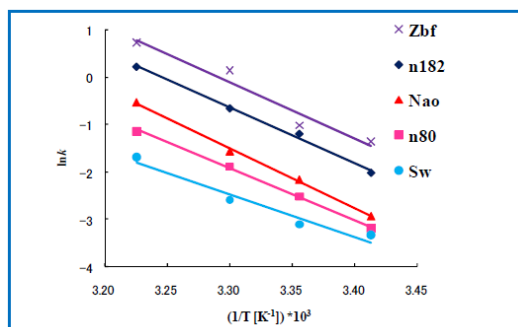


図5. 祖先型、現存近縁種のMbの自動酸化速度kのアレニウスプロット

表2. 祖先型、現存近縁種のMbの自動酸化速度kおよび酸素親和性P₅₀の比較

species of Mb	n80	Nao	n182	Zbf	Sw
body temperature [°C]	37	37	25	25	37
k [hour ⁻¹]	0.32	0.59	0.3	0.4	0.19
activation energy [kcal/mol]	22	25	23	24	18
P ₅₀ [mmHg]	0.9	1.5	1.2	1.9	0.5

④側鎖の電子吸引性の異なる人工ヘム置換の実験から、Mbの酸素親和性は、魚類では電子吸引性によって支配されるが、哺乳類では必ずしもそうではなく、ヘム周囲のアミノ酸残基との相互作用も影響することが分かった。

⑤哺乳類と魚類においては、蛋白安定性や自動酸化性を犠牲にし、酸素結合機能の環境適応を優先して進化したと考えられる。

(6) **蛋白発現技術の信頼性**: 今回の大腸菌を用いた蛋白発現・精製の過程での人工的な影響を受けないで、本来の特性を示すかどうかを検証する目的で、野生型組換えマッコウクジラMbを合成し、天然のMbと比較したところ、両者は酸素親和性、吸収スペクトル、SDS-PAGEに関して同一の特性を示した。従って、今回の蛋白合成技術は人工的な影響を与えないことが証明された (図6)。

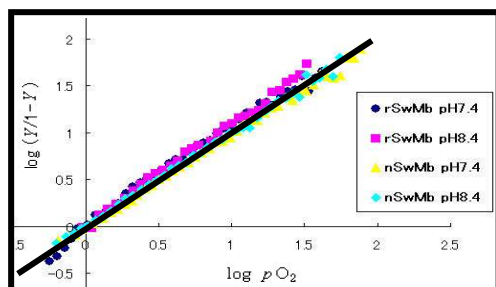


図6. 野生型組換え型と天然型のマッコウクジラ・ミオグロビンの酸素結合 Hill plot

(7) **祖先型ヘモグロビンの設計**: 祖先型ミオグロビンからの発展として、脊椎動物の祖先型ヘモグロビンのアミノ酸配列を設計する

ために、アミノ酸配列データベースから約1,500個のグロビン配列のデータを収集し、①TREE-PUZZLEプログラム使用、WAGモデルによる距離行列の作成とガンマ補正値の計算、②近隣結合法 (PhyIPプログラム)、最尤法 (PhyMLプログラム) を用いた脊椎動物の進化系統樹の作成を行った。さらに進化的に重要な位置をしめる①ヤツメウナギ、②スタウナギーヤツメウナギ、③回帰性魚類 (サケ類-ウナギ類) の祖先型Hbのα鎖、β鎖のアミノ酸配列推定と遺伝子設計を行い、蛋白発現の準備を完了した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

①Y. Aki, M. Nagai, Y. Nagai, K. Imai, M. Aki, A. Sato, M. Kubo, S. Nagatomo & T. Kitagawa: Differences in coordination states of substituted tyrosine residues and quaternary structures among hemoglobin M probed by resonance Raman spectroscopy, *J. Biol. Inorg. Chem.* **15**, 147-158 (2010). (査読有り)

②S. Neya, M. Suzuki, H. Ode, T. Hashimoto, Y. Furutani, H. Kandori, H. Hori, K. Imai, T. Komatsu: Functional evaluation of iron oxyprotoporphyrin in protein heme pocket, *Inorg. Chem.* **47**, 10771-10778 (2008). (査読有り)

③M. Nagai, Y. Nagai, Y. Aki, K. Imai, Y. Wada, S. Nagatomo & Y. Yamamoto: Effect of reversed heme orientation on circular dichroism and cooperative oxygen binding of human adult hemoglobin, *Biochemistry* **47**, 517-525 (2008). (査読有り)

④T. Watanabe, T. Takeda, S. Omiya, S. Hikoso, O. Yamaguchi, Y. Nakano, Y. Higuchi, A. Nakai, Y. Abe, Y. Aki-Jin, M. Taniike, I. Mizote, Y. Matsumura, T. Shimizu, K. Nishida, K. Imai, M. Hori, T. Shirasawa & K. Otsu: Reduction in hemoglobin-oxygen affinity results in the improvement of exercise capacity in mice with chronic heart failure, *J. Amer. College Cardiol.*, **52**, 779-786 (2008). (査読有り)

⑤Y. Aki, T. Nakagawa, M. Nagai, Y. Sasayama, Y. Fukumori & K. Imai: Oxygenation properties of extracellular giant hemoglobin from *Oligobranchia mashikoi*, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **360**, 673-678 (2007). (査読有り)

⑥Y. Aki-Jin, Y. Nagai, K. Imai & M. Nagai: Changes of near-UV CD spectra of human

hemoglobin upon the R → T quaternary structure transition, ACS Symposium Series on *New Approaches in Biomedical Spectroscopy*, **963**, 297-311 (2007). (査読有り)

⑦S. Nagao, Y. Hirai, S. Kawano, K. Imai, A. Suzuki & Y. Yamamoto: Heme orientational disorder in human adult hemoglobin reconstituted with a ring Fluorinated heme and its functional consequences, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**(3), 681-685 (2007). (査読有り)

⑧張 岩、今井清博、小林 道頼：哺乳類ヘモグロビンの協同作用とボーア効果は協調して酸素の獲得と輸送を行っている—規範タンパク質における新たな視点—、*生物物理*, **47**, 167-173 (2007). (査読有り)

⑨A. Tsuneshige: Kosmotropic Salts from the Hofmeister Series Decrease the Oxygen Affinity of Human Hemoglobin A, *Frontiers Científicas en el Siglo*, **21**, 93-101 (2007). (査読有り)

⑩A. Tsuneshige: Method for Determination of Association and Dissociation Rate Constants of Reversible Bimolecular Reactions by Isothermal Titration Calorimetry, *Anal. Chem.* **79**, 2972-2978 (2007). (査読有り)

[学会発表] (計 22 件)

①柴田友和、水関和哉、長尾 聡、太 虎林、長友重紀、鈴木秋弘、今井清博、山本泰彦：ヘム側鎖の修飾がミオグロビンの酸素親和性と酸塩基平衡に与える影響、日本化学会第 89 回春期年会 (2009 年 3 月 27 日～30 日、日大工学部 (船橋市))

②T. Shibata, K. Mizuseki, S. Nagao, H. Tai, S. Nagatomo, A. Suzuki, K. Imai & Y. Yamamoto: Relationship between oxygen affinity of myoglobin and the equilibrium constant of acid-alkaline transition in metmyoglobin, *14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry* (July 25-30, 2009, Nagoya).

③K. Imai: Hemoglobin as the normative protein, 第 47 回日本生物物理学会年会「Symposium “Hemoglobin revisited”」 (2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日、徳島)

④S. Unzai, K. Imai, T. Yokoyama, S. Park, K. Nagai & J. Tame: Structure and function of Root effect fish hemoglobins, 第 47 回日本生物物理学会年会「シンポジウム」ヘモ

グロビンはいま「」(2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日、徳島)

⑤Y. Aki, M. Nagai, K. Imai, M. Aki & T. Kitagawa: Coordination states of proximal or distal tyrosine residue in hemoglobins M and their quaternary structures probed by resonance Raman spectroscopy, 第 47 回日本生物物理学会年会 (2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日、徳島)

⑥ T. Inao, S. Kuriyama & K. Imai: Tetramer-dimer equilibrium of chemically modified hemoglobin as studied by protein concentration-dependences of the oxygen equilibrium curve, 第 47 回日本生物物理学会年会 (2009 年 10 月 30 日～11 月 1 日、徳島)

⑦ M. Nagai, Y. Nagai, Y. Aki, K. Imai, S. Nagatomo & T. Kitagawa: Environmental alteration of three tryptophan residues in human adult hemoglobin upon ligand binding, Proceedings of the XX1st International Conference on Raman Spectroscopy, pp. 828-829 (2008, August, London)

⑧ M. Nagai, Y. Nagai, Y. Aki, K. Imai, S. Nagatomo & Y. Yamamoto: Circular Dichroism and Oxygen Binding Properties of Human Adult Hemoglobin with Reversed Heme, Biophysical Society 52nd Annual Meeting and 16th International Biophysics Congress (IUPAB), (Feb. 2-6, 2008, Long Beach, California, USA)

⑨長井雅子、長井幸史、今井清博、安芸弥生、長友重紀、山本泰彦：逆配向ヘムをもつヘモグロビンの酸素平衡機能と円二色性, 第 35 回生体分子科学討論会講演要旨集, pp. 17-18 (2008 年 6 月 19 日～20 日、兵庫県立先端科学支援センター)

⑩今井清博：規範蛋白質としてのヘモグロビン、兵庫県立大学大学院生命理学研究科グローバル COE プログラム「ピコバイオロジー：原子レベルの生命科学」グローバル COE 研究集会：ヘモグロビン—この未知なるもの—、(2008 年 11 月 21 日、兵庫県立先端科学技術支援センター)

⑪常重アントニオ：ヘモグロビンの基本アロステリック単位、兵庫県立大学大学院生命理学研究科グローバル COE プログラム「ピコバイオロジー：原子レベルの生命科学」グローバル COE 研究集会：ヘモグロビン—この未知なるもの—、(2008 年 11 月 21 日、兵庫県立先端科学技術支援センター)

⑫K. Ohkubo, Y. Aki, K. Imai, Y. Nagai & M. Nagai: Environmental alteration of

three tryptophan residues in human adult hemoglobin (Hb A): A near-UV circular dichroism study, 第 46 回生物物理学会年会 (2008 年 12 月 3 日～5 日、博多)

⑬S. Kuriyama, Y. Aki & K. Imai: Functional properties of mersaryl-modified hemoglobin (2), 第 46 回生物物理学会年会 (2008 年 12 月 3 日～5 日、博多)

⑭T. Nakagawa, Y. Fukumori, K. Imai & M. Nagai, Circular dichroism of the extracellular giant hemoglobin from annelid, *Oligobranchia mashikoi*, 第 46 回生物物理学会年会 (2008 年 12 月 3 日～5 日、博多)

⑮M. Ishida, M. Hashiride, I. Yamasaki, A. Yasuda, Y. Murakami, M. Ota, Y. Isogai & K. Imai, Temperature-dependences of oxygen binding by myoglobin from animals with different body temperatures, 第 46 回生物物理学会年会 (2008 年 12 月 3 日～5 日、博多)

⑯M. Ishida, Y. Murakami, A. Yasuda, I. Yamasaki, M. Ota, Y. Isogai & K. Imai: Temperature-dependence of auto-oxidation of ancestral and closely related extant myoglobins (2), 第 46 回生物物理学会年会 (2008 年 12 月 3 日～5 日、博多)

⑰A. Tsuneshige & Y. Yashiro: Effect of Kosmotropic and chaotropic solutes on an allosteric protein under non-denaturing conditions, 第 46 回生物物理学会年会 (2008 年 12 月 3 日～5 日、博多)

⑱長井雅子、長井幸史、小久保昭秀、川口裕貴、安藝弥生、今井清博、長友重紀、北川禎三: ヒトヘモグロビンにおける 3 つのトリプトファン残基の酸素結合にともなう変化: 近紫外 CD および紫外共鳴ラマン分光による研究、第 45 回日本生物物理学会年会、横浜 (2007 年 12 月 21 日～23 日)

⑲安藝弥生、中川太郎、長井雅子、笹山雄一、福森義宏、今井清博: 有鬚動物マンコヒゲムシのもつ巨大ヘモグロビンの酸素運搬機能、第 45 回日本生物物理学会年会、横浜 (2007 年 12 月 21 日～23 日)

⑳石田 学、山崎伊織、村上祐太、太田元規、磯貝泰弘、今井清博: 組み換え祖先型ミオグロビン: 酸素結合特性に対する pH 及び温度の効果、第 45 回日本生物物理学会年会、横浜、(2007 年 12 月 21 日～23 日)

㉑石田 学、村上祐太、安田 温、山崎伊織、太田元規、磯貝泰弘、今井清博: “祖先型と最近接現存種ミオグロビンの自動酸化反応の温度依存性、第 45 回日本生物物理学会年

会、横浜 (2007 年 12 月 21 日～23 日)

㉒栗山紗子、安藝弥生、今井清博: 化学修飾ヘモグロビンの機能特性、第 45 回日本生物物理学会年会、横浜 (2007 年 12 月 21 日～23 日)

[図書] (計 1 件)

① A. Tsuneshige, K. Imai & T. Haga: Kosmotropic salts from the Hofmeister series decrease the oxygen affinity of human hemoglobin A, *Frontas Cientificas en el Siglo XXI*, Javier Navarro, Ed., Editorial Cordillera SAC, pp. 93-101 (2007). (査読有り)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 清博 (IMAI KIYOHITO)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号: 50028528

(2) 研究分担者

常重 アントニオ (TSUNESHIGE ANTONIO)
法政大学・生命科学部・教授
研究者番号: 30409346

長井 雅子 (NAGAI MASAKO)
(H19→H21: 連携研究者)
金沢大学・名誉教授
研究者番号: 60019578