

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570217

研究課題名（和文） 逆分子進化法によるヘモグロビン進化過程の解明

研究課題名（英文） Clarification of hemoglobin evolution process by reverse molecular evolution

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

研究成果の概要（和文）：脊椎動物の祖先型ヘモグロビン（Hb）が分子進化の過程において高次機能を獲得するべく自然が行った蛋白質分子設計の原理を読み取ることを目的とする研究を行った。硬骨魚類ならびに円口類の祖先型Hbの遺伝子を設計・合成し、それを大腸菌内で発現させて目的の祖先型Hbを得た。硬骨魚類の祖先型Hbは、ルート効果を示唆する強いボーア効果と弱い協同作用を示し、硬骨魚類に特有の特性をもつことが分かった。円口類祖先型Hbは弱いボーア効果と協同作用を示し、これらの効果がみられない天然型ヤツメウナギHbと対照的であった。

研究成果の概要（英文）： This study intends to learn the principle of protein molecule design which was adopted by nature to acquire high-order functions for ancestral hemoglobins of vertebrates in the course of molecular evolution. We designed and synthesized the hemoglobin genes for ancestors of teleost and cyclostomata and expressed them in *E. coli*, obtaining the ancestral hemoglobins. The teleost ancestral hemoglobins showed a strong Bohr effect which assumes a Root effect and weak cooperativity, indicating that they have characteristics of teleost. The cyclostomata ancestral hemoglobins showed a small Bohr effect and weak cooperativity in contrast with natural lamprey hemoglobin without those effects.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：ヘモグロビン、分子進化、祖先型蛋白質、硬骨魚類、円口類

1. 研究開始当初の背景

古代の地球上に酸素が蓄積するに伴って、酸素利用による効率の高い好気性呼吸を行う生物が登場し、それらは体内で酸素を運搬・貯蔵する分子すなわちヘム蛋白質を進化させた。それらは原始グロビンからミオグロ

ビン（Mb）、ヘモグロビン（Hb）と分子進化を遂げて、より高度な機能（アロステリック調節機構）を獲得した。しかし、その高度な機能の獲得の過程は解明されていない。

申請者たちの平成19年度～21年度の科学研究費補助金基盤研究（C）「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」において、ミオグロビンの既知のアミノ酸配列データを収集し、分子進化に基づいた分子系統樹を作成して、アミノ酸置換確率に基づき、哺乳類祖先型ミオグロビン”n80”および魚類祖先型ミオグロビン”n182”のアミノ酸配列を推測した。そして、それらの人工遺伝子DNAを全合成し、大腸菌蛋白質発現系を用いて大量合成した。これらの祖先型ミオグロビンの分子量、高次構造、構造安定性、酸素結合特性、自動酸化速度などを測定したところ、それらは、祖先型動物が生息していた当時の大気中酸素濃度条件に適した酸素親和性を持ち、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て、酸素結合機能の環境適応を優先して進化したことが発見された。このように、機能分化と分子進化に関する重要な知見がえられ、この「逆分子進化法」が極めて有用な手法であることが判明した。

我々は、ミオグロビンで得られた成果をさらにヘモグロビンの分子進化へと発展させるべく、脊椎動物のアミノ酸配列データベースを利用して、現存する各生物種（ナメコジウオ、ホヤ、スタウナギ、ヤツメウナギ、シーラカンス、肺魚、軟骨魚類、硬骨魚類、両性類、爬虫類）の合計1490個のグロビン配列のデータを収集、分類、解析し、それぞれ近隣結合法および最尤法による分子系統樹を作成した。そして、幾つかの祖先型ヘモグロビンのアミノ酸配列の設計を試みた。

2. 研究の目的

我々は従来、現存種ミオグロビンのアミノ酸配列データベースを解析して、祖先型ミオグロビンのアミノ酸配列を推定するという「逆進化」の手法を用いて、哺乳類ならびに魚類の祖先型ミオグロビンを設計し、合成して、それらの構造・機能解析を行った。

本研究では、それらのミオグロビン分子進化に関する新しい発見をヘモグロビン分子進化へと発展させるべく、祖先生物のもっていたと考えられる祖先型ヘモグロビンのアミノ酸配列を推定し、実際に遺伝子DNAを合成してそれらの構造や機能を現存種のヘモグロビンと比較する、いわゆる“逆分子進化学”を展開することによって、自然が莫大な年月をかけて行ったグロビン分子設計を実験室の中で再現し、その設計思想、特に、ミオグロビンにはみられないアロステリック作用のような高次機能獲得機構を学び取ることを意図した。

3. 研究の方法

(1)アミノ酸配列の設計：従来までの研究で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作成した分子系統樹を基

盤として、硬骨魚類、円口類の2つのグループの祖先型ヘモグロビンの α 鎖と β 鎖のアミノ酸配列を、プログラム PAML を使って推測する。得られた祖先型アミノ酸配列と現存生物のヘモグロビンの配列との相同性を調べ、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。

(2)祖先型ヘモグロビンの合成：祖先型ヘモグロビンをコードする人工遺伝子DNAを、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、祖先型ヘモグロビンを大量合成する。

(3)祖先型ヘモグロビンの精製および物性解析：合成した祖先型ヘモグロビンを、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ヘモグロビンのSDS-PAGE、超遠心・ゲルろ過による分子量測定、紫外可視吸収スペクトル、CDスペクトル測定による二次構造含量の推定、熱変性実験による蛋白質安定性など簡単なキャラクター化を行い、天然に存在する“蛋白質らしさ”をもっているかを検討する。

(4)合成した祖先型ヘモグロビンの酸素解離曲線を測定し、硬骨魚類としてのルート効果を備えているか、また、円口類ヘモグロビン特有の蛋白濃度と協同作用の関係などに注目して、今回得られた祖先型ヘモグロビンが古代から現代への分子進化の過程を反映しているかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 魚類祖先型ヘモグロビン

① 配列の推定と遺伝子の設計・合成

1,200個のアミノ酸配列と塩基配列を収集し、アラインメントを作成して、 α 鎖は166個、 β 鎖は172個の配列に絞った。適当なソフトを用いて近隣結合系統樹、さらに最尤系統樹を作

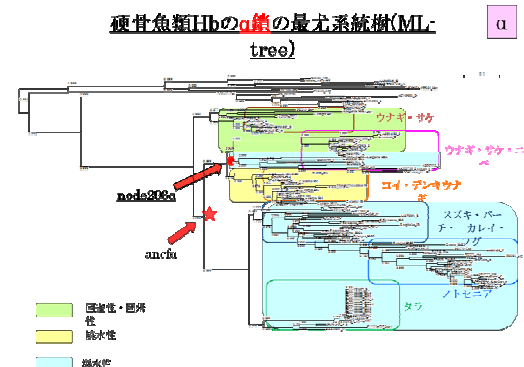


図1. 硬骨魚類の α 鎖の最尤系統樹

成し(図1、図2)、その中の各分岐点の信頼性の検討を行い、進化上の意味も考慮して、最終的に硬骨魚類祖先型Hbの α 鎖(Ancf α)と

各種精製標品(Ancf α , Ancf β , AncfHb)の分子量測定

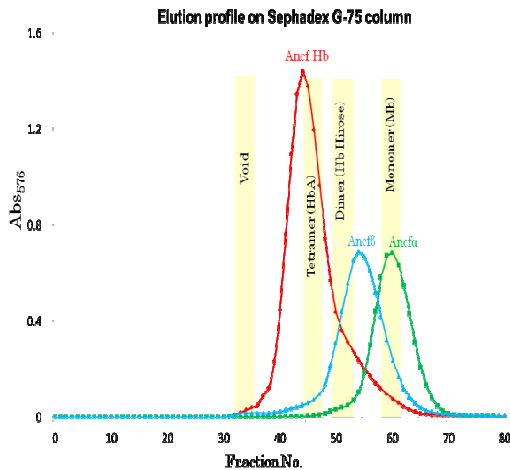


図7. ゲル濾過による精製試料の分子量測定

③ 祖先型Hbの特性

精製されたAncf α , Ancf β , AncfHbのUVスペクトルをみると、いずれも天然の α 鎖、 β 鎖、四量体Hbのスペクトルに特有のものであることが証明された(図8)。

各種ヘムリガンド結合型におけるAncf α , Ancf β およびAncfHbタンパク質の吸収スペクトル

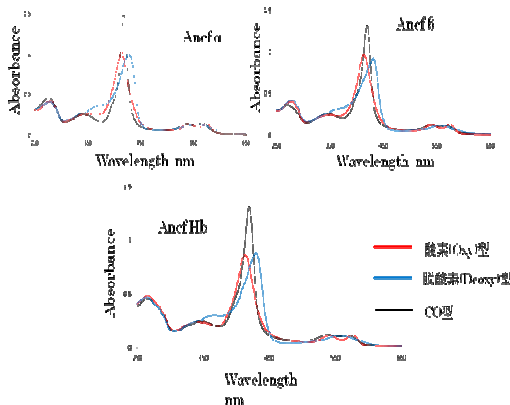


図8. 各種ヘムリガンド配位型のUVスペクトル

祖先型AncfHbのOxy型とDeoxy型の円偏光二色性(CD)スペクトルを天然型Hb Aのそれと比較すると、類似したスペクトルを示し、この祖先型Hbは天然型と同じ立体構造をもっていることが判明した(データ省略)。

AncfHbと天然型硬骨魚類Hb(Tuna Hb)の酸素結合特性(図9)を比較すると、Tuna Hbは、pHが酸性になると酸素結合容量が半減するルート効果を示すのに対して、AncfHbではpHの効果が大きくても関わらず、明瞭なルート効果は示さなかった。

Ancf α , Ancf β , AncfHbと同様の方法で合成・精製されたNode296 α 、Node203 β と、そ

異なるpHにおけるAncfHbとtuna HbのHill plot

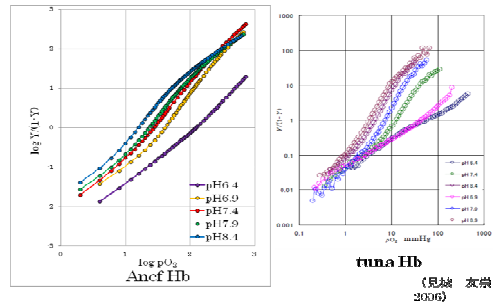


図9. AncfHbと天然型硬骨魚類(Tuna Hb)の酸素結合Hillプロットの比較

れらを会合させたNode296 α +Node203 β Mixは、それぞれ単量体と四量体の分子量をもつことが示された。さらに、それらのUVスペクトル(図10)をみると、天然のHbの特徴をそなえたスペクトルであった。

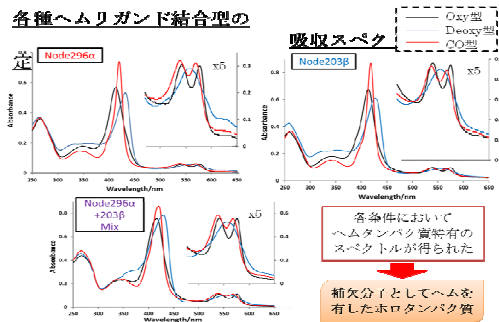


図10. Node296 α 、Node203 β およびそれらの会合体Node296 α +Node203 β MixのUVスペクトル

Node296 α +Node203 β Mixは、CDスペクトル(データ省略)でも天然型Hbのそれに類似しており、立体構造においても天然型Hbの特徴を備えていることが分かった。

Node296 α +Node203 β Mixの酸素解離曲線測定は、自動酸化が速くて困難であった。そこで、空気飽和、種々のpH条件下で可視部吸収スペクトルを測定すると、酸性条件下でTuna Hbよりも低い酸素飽和度を示した(図11)。このことは、この会合体がルート効果をもつことを示唆している。

(2) 円口類祖先型ヘモグロビン

① 配列の推定と遺伝子の設計・合成

無顎類で現存するヤツメウナギやヌタウナギなどの円口類のHbは、オキシ型で単量体、デオキシ型で二量体または四量体となり、単量体Hbから協同作用をもつ四量体Hbへの進化のつなぎの役割を演ずると考えられてきた。今回、63個の円口類のアミノ酸配列からアラインメントを作成、配列を絞り込

Node296 α +203 β Mixの各pHにおける吸収スペクトルの変化 (空气中酸素分圧 150 mmHg, 25°C)

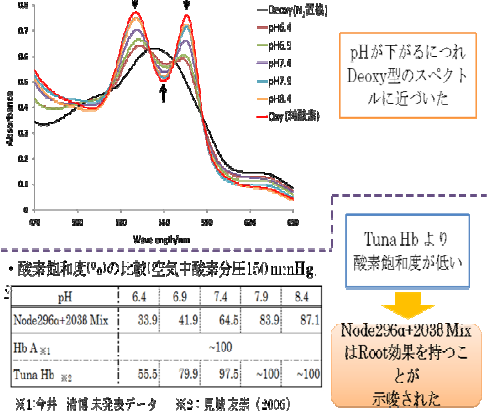


図11. 空気飽和、種々のpH条件下でのNode296 α +Node203 β Mixの可視部吸収スペクトル

み、近隣系統樹、さらに最尤系統樹を作成、円口類全体の祖先型の分岐点にあたる node23、ヤツメウナギの祖先型の分岐点にあたる node25 のアミノ酸配列を推定、遺伝子を実験ベクターに組み込んで発現プラスミドをえた。

② 祖先型Hbの合成と精製

これらのプラスミドを大腸菌 BL21 株へ導入して各形質転換体を作成し、大量発現を行った。得られたHbを、硬骨魚類Hbで行ったのと同様の方法で精製した。SDS-PAGEおよび分光学的手法による解析の結果、精製した祖先型Hbは、単量体に相当する約 14 kDa の分子量を示した。

③ 祖先型Hbの特性

可視部吸収スペクトルと CD を測定したところ、node23-Hb、node25-Hb 共に、天然のヤツメウナギのスペクトルに類似しており、ヘムの配位、蛋白立体構造に関して天然型と同等であることが分かった。

酸素結合特性をみたところ、node23-Hb、node25-Hb 共に天然のヤツメウナギHbと同等の弱いボーア効果を、しかし低い酸素親和性を示し、さらに、低蛋白濃度でも Hill 係数が 1.5 程度の弱い協同性を示した。しかし、ATP、DPG、IHP などのアロステリック因子に対して、node23-Hb は効果を示したが、node25-Hb は示さなかった (表 1)。

表 1. Node25 蛋白質の酸素結合特性

pH	P ₅₀ (mmHg)	n _{max}
6.4	27.1	1.49
6.9	25.9	1.52
7.4	23.8	1.61
7.9	21.2	1.65
8.4	20.1	1.64
HbA 7.4	9.5	2.26

を

(3) 総括

本研究で目的とした祖先型 Hb が、それぞれを構成する α 鎖、 β 鎖を別個に設計し、発現させた後に会合させて得られたことの意義は、将来のオリゴマー蛋白質の逆分子進化法による研究にとって極めて大である。

本研究で作成した硬骨魚類の祖先型 AncfHb は強いボーア効果を示し、ルート効果獲得への途中段階であることを、また、Node296 α +Node203 β Mix はルート効果の存在を示し、この進化段階でルート効果が獲得されたことを示唆して興味深い。

円口類祖先型 Hb がボーア効果をもつことは、この進化段階でそれが獲得されていたことを意味する。しかし、現存種と異なり、祖先型が低蛋白濃度で弱いながらも協同作用を示したことは、その後の進化過程で協同性を何らかの理由で破棄した可能性を示唆している。

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 7 件)

- 1) Nagai, M., Nagatomo, S, Nagai, Y, Ohkubo, K, Imai, K. and Kitagawa, T. Near-UV circular dichroism and UV resonance Raman spectra of individual tryptophan residues in human hemoglobin and their changes upon the quaternary structure transition. *Biochemistry*, 51, 5932-5941 (2012). (査読有)
- 2) Shibata, T, Matsumoto, D, Nishimura, R, Tai, H, Matsuoka, A, Nagao, S, Matsuo, T, Hirata, S, Imai, K., Neya, S, Suzuki, A. and Yamamoto, T. Relationship between oxygen affinity and autoxidation of myoglobin. *Inorg. Chem.* 51, 11955-11960 (2012). (査読有)
- 3) H. Fujimoto and K. Imai (2011) Allosteric models of hemoglobin, still evolving, In *Hemoglobin: Recent Developments and Topics* (M. Nagai, ed.), Research Signpost, Kerala, India, pp. 161-177. (査読有)
- 4) A. Sato, H. Tai, S. Nagatomo, K. Imai and Y. Yamamoto (2011) Determination of oxygen binding properties of the individual subunits of intact human adult hemoglobin, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **84**, 1107-1111. (査読有)
- 5) S. Neya, M. Suzuki, T. Hoshino, H. Ode, K. Imai, T. Komatsu, A. Ikezaki, M. Nakamura,

- Y. Furutani and H. Kandon: "Molecular insight into intrinsic heme distortion in ligand binding in hemoprotein", *Biochemistry*, Vol. 49, pp. 5642-5650 (2010). (査読有)
- 6) T. Shibata, S. Nagao, M. Fukaya, H. Tai, S. Nagatomo, K. Morihashi, T. Matsuo, S. Hirota, A. Suzuki, K. Imai and Y. Yamamoto: "Effect of heme modification on oxygen affinity of myoglobin and equilibrium of the acid-alkaline transition in metmyoglobin", *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 132, pp. 6091-6098 (2010). (査読有)
- 7) Y. Aki, M. Nagai, Y. Nagai, K. Imai, M. Aki, A. Sato, M. Kubo, S. Nagatomo and 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.*, Vol. 15, pp. 147-158 (2010). (査読有)

[学会発表] (計 27 件)

- 1) 西村 龍、松本大地、西山康太郎、柴田友和、深谷昌史、太虎 林、長尾 聡、松尾貴史、廣田 俊、鈴木秋弘、今井清博、石上 泉、小倉尚志、根矢三郎、庄司長三、渡辺芳人、山本泰彦: "ミオグロビンの機能調節機構の解明"、第 38 回生体分子科学討論会 (2011 年 6 月 23 日、筑波大学、茨城県)
- 2) 丸山夏未、安芸弥生、長井幸史、今井清博、長友重紀、小倉尚志、北川禎三、長井雅子 "ヒトヘモグロビンの酸素結合機能における近位ヒスチジンの役割" 第 85 回日本生化学会大会 (2P-357, 2012 年 12 月 14 日~16 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡、福岡県)
- 3) 杉山 将、松尾高稔、関 一葉、中川太郎、今井清博 "硬骨魚類の祖先型ヘモグロビン Node296 α ・Node203 β 遺伝子設計・合成および大腸菌内発現" マイクロ・ナノテクノロジー研究センター開設 10 周年記念シンポジウム (2012 年 10 月 13 日、法政大学、東京都)
- 4) 幕 晋一、松尾高稔、中川太郎、今井清博 "ヤツメウナギ由来の祖先型ヘモグロビン遺伝子 (node25) の発現系構築" マイクロ・ナノテクノロジー研究センター開設 10 周年記念シンポジウム (2012 年 10 月 13 日、法政大学、東京都)
- 5) 松尾高稔、喜多かつら、尾澤雄太、中川太郎、今井清博 "Expression of ancestral Cyclstomes hemoglobin Node23 gene in *Escherichia coli*" マイクロ・ナノテクノロジー研究センター開設 10 周年記念シンポジウム (2012 年 10 月 13 日、法政大学、東京都)
- 6) 安芸弥生、長井幸史、今井清博、長友重紀、小倉尚志、北川禎三、長井雅子 "ヒトヘモグロビンの α 鎖の近位ヒスチジンのグリシンへの置換が構造と酸素結合機能に与える影響" 第 50 回日本生物物理学会年会 (2012 年 9 月 22 日~24 日、名古屋大学、愛知県)
- 7) 一居桃子、長井幸史、今井清博、長井雅子 "ヒトヘモグロビンの β 145Tyr の Thr または Leu への置換が機能と構造に与える影響" 第 50 回日本生物物理学会年会 (2012 年 9 月 22 日~24 日、名古屋大学、愛知県)
- 8) 上原 航、今井清博 "ヘモグロビンの自動酸化速度に対する糖類の効果" 第 50 回日本生物物理学会年会 (2012 年 9 月 22 日~24 日、名古屋大学、愛知県)
- 9) 杉山 将、松尾高稔、関 一葉、長井幸史、中川太郎、今井清博 "硬骨魚類の祖先型ヘモグロビン遺伝子の設計・合成およびその大腸菌内発現" 第 50 回日本生物物理学会年会 (2012 年 9 月 22 日~24 日、名古屋大学、愛知県)
- 10) 長井雅子、長友重紀、長井幸史、大久保賢一、今井清博、北川禎三 "トリプトファン近紫外円二色性及び紫外共鳴ラマンに基づくヘモグロビンの四次構造変化の解明" 第 39 回生体分子科学討論会要旨集, p28-29, (2012 年 6 月 8 日~9 日、東北大学、宮城県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 清博 (IMAI KIYOHRO)
法政大学・生命機能学部・教授
研究者番号: 50028528

(2) 研究分担者

松尾 高稔 (MATSUO TAKATOSHI)
法政大学・マイクロ・ナノテクノロジー研究センター・研究員
研究者番号: 00500737
中川 太郎 (NAKAGAWA TARO)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・助手
研究者番号: 30401889

(3) 連携研究者

長井雅子 (NAGAI MASAKO)
研究者番号: 60019578