

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 30 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380115

研究課題名（和文） 水圏生物におけるグロビン類の分布と機能の新展開

研究課題名（英文） Novel approach to the distribution and function of globin proteins in aquatic organisms

研究代表者

落合 芳博 (OCHIAI YOSHIHIRO)

東海大学・海洋学部・教授

研究者番号：50160891

研究成果の概要（和文）：水圏生物、特に魚類のグロビン類（主としてミオグロビン）について、まず多くの魚種を対象に遺伝子のクローニングを行い、得られた配列情報を基に分子進化や適応の観点から相互関係を調べ、さらに、筋肉をはじめ諸組織におけるグロビン遺伝子の転写および翻訳レベルの分布を明らかにした。無脊椎動物（軟体動物の）のもつ特異なグロビンについても、基本的性状や組織分布の解明を行なった。一方、酸素分子の貯蔵以外の生理機能についてスクリーニングを行い、諸酵素活性への影響を見出した。

研究成果の概要（英文）：Attempts were made to clone the genes coding globin proteins (especially myoglobin) from a variety of fish species, and based on the deduced amino acid sequences and bioinformatic analyses, the profiles of molecular evolution and environment adaptation were examined. Distribution of globins was investigated by measuring the transcription and expression levels of globin genes in various tissues of several fish species. The properties and tissue distribution of mammalian globins were also examined. On the other hand, the physiological roles of myoglobin other than oxygen molecule binding were also found.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：グロビン類、タンパク質、構造、機能、分布

1. 研究開始当初の背景

ミオグロビンについての研究の歴史は長く、50年ほど前にタンパク質としては初めて立体構造が明らかにされた。研究対象は主にク

ジラ由来のミオグロビンであり、その後、リガンドとしての酸素分子や一酸化炭素の脱着機構についての研究が精力的に進められ、原子レベルまで詳細が明らかにされた。これで

終焉を迎えたかに見えたグロビン研究は、ゲノムプロジェクトを契機に発見されたサイトグロビン、ニューログロビンなどの新顔グロビンだけでなく (Riggs & Gorr, 2006)、一酸化窒素代謝への関与、さらに多様な非筋組織における発現など、「常識」を覆す発見が近年、相次いでなされた。これは、酸素貯蔵・運搬という機能がグロビンの役割のほんの一端に過ぎないことを示唆するものである。この時点までに研究代表者は、魚類ミオグロビンを中心にその構造安定性に関わる研究を続けてきた。その過程で、様々な予想外の展開を経験した。例えば、ミオグロビンの酸化とともに筋原繊維ATPase 活性が増大していくこと、グロビン部分の構造安定性はヘムの酸化速度と相関すること、無脊椎動物にもミオグロビンや相同タンパク質が存在すること、などである。軟体動物のアワビの歯舌筋にも特異的にミオグロビン様タンパク質が存在することを遺伝子およびタンパク質レベルで確認している。その経過の中で、ミオグロビン様タンパク質は生物界に遍く存在し、重要な機能を担っているという確信を持つに至った。また、ミオグロビンやヘモグロビンの酸化・還元状態は言うまでもなく、筋肉の色調に深くかかわるため、それらの性状を徹底的に解明することは、マグロ肉など赤身魚の肉色の制御に有用であり、水産物の利用加工上、非常に重要なテーマと考えられた。

本研究では、無脊椎動物 (海綿動物) から脊索動物 (魚類) に至る海産動物の各組織におけるグロビン・スーパーファミリー・タンパク質の遺伝子発現を明らかにし、さらにタンパク質レベルの発現解析を行うことを主目的とした。詳細な分子系統樹の作成からグロビン類の進化過程と機能獲得との関係を明らかにする。過去に研究代表者らが明らかにしたものも含め、配列情報から高次構造や生理機能を導く数多くのプログラムを駆使し、バイオインフォマティカルなアプローチにより、グロビン類の構造と機能の関連性を徹底的に明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

魚類は現存のもので2万5千種を越し、脊椎動物の約半分を占めるものの、生化学、分子生物学の対象となっているのは一部の種に限られ、哺乳類と比べると著しく研究が遅れている。水圏の環境は多岐に渡り、穏やかな環境から極限ともいえるべき環境にまで適応し、タンパク質の分子レベルでもその進化適応をうかがわせるような報告がなされている。しかし、魚類におけるグロビン類の進化につい

てははまだ混沌としている状況である。

一方、現行の生化学関連の教科書には、酸素結合以外にグロビン・タンパク質の機能に言及したものは存在しない。未だ「過去の常識」の世界に留まっており、先述のRiggs & Gorr によるスーパーファミリーの系統関係さえ扱われていない。本研究では、水圏生物を対象に、常識から脱皮した視点による新たなグロビン研究を推進することを目的とした。また、アメフラシで既に性状が調べられているミオグロビン、そして上述のようにアワビに見出されたミオグロビン様タンパク質と、動物界におけるミオグロビンの存在は散発的のようにも見えるが、多岐にわたる水圏生物を網羅的に調べることにより、散在する点を線で結ぶことができる可能性が高い。グロビン類は生息環境に適応した結果、収斂進化により酸素の貯蔵が必要とされる生物種、器官に必然的に現れるタンパク質である可能性が高い。無脊椎動物はグロビン類に関してはほとんど未知の領域とも言え、この領域を解明しようとする点でも本研究は先駆的である。グロビン類の生化学に関する記述を書きかえる多くの発見をすることを目指している。

3. 研究の方法

魚類および海産無脊椎動物からさまざまな生物種を選び、グロビン・タンパク質 (ミオグロビン、ヘモグロビン、ニューログロビン、サイトグロビン) およびそれらの遺伝子の塩基配列や発現パターンについて解析した。動物界におけるグロビン類の分布を明らかにし、さらに機能や構造についても検討を行った。データベース上の情報を活用するが、ゲノムプロジェクトの対象となっていない生物種についても広範囲に調べた。この過程で得られる可能性がある新規グロビン・タンパク質は、グロビンの進化過程を知る上で重要な存在と位置づけた。一方、タンパク質レベルでの発現が多い生物種については、特に、研究の過程で一次構造の特異性が見出されたニジマスについて (後述)、ミオグロビンを精製して構造および機能の解析を行った。アジ科魚類、マグロおよびクジラのみオグロビンについても検討した。さらに、酸素結合能や酸素以外のリガンドとの反応性についても調べた。

手法としては、近年、機能の充実が目覚ましいバイオインフォマティクスの手法や分子動力学を駆使することにより、グロビン・フォールドの構造安定性の解明、および新たな生理機能の付与を試みた。これまでの経験則にもとづく機能解明へのアプローチを超える研究を目標とした。

4. 研究成果

マアジ、ブリ、カンパチ、ヒラマサ、シマアジ、ニジマス、マダイ、ナマズおよびニホンウナギの血合筋から全RNAを抽出し、ミオグロビン遺伝子のcDNAクローニングにより一次構造を演繹し、既知の配列情報も組み込んで系統解析を行った。その結果、アジ科魚類のミオグロビンは1つのクレードを形成し、ニジマスのものはCys残基の存在や欠損がある点で特徴的な構造を有することが判明した。そのほか、二次構造予測、立体構造モデリングなどのバイオインフォマティク解析を行い、魚類ミオグロビンの分子進化ならびに環境適応の観点から特徴づけを行なった。

他方、魚類のグロビンスーパーファミリー（サイトグロビン、ニューログロビンなど）については、各種データベースを駆使してin silicoクローニングや配列情報に基づいた種々のバイオインフォマティック解析を行って（図1）、構造特性を明らかにした。特に、同一魚種におけるグロビン類タンパク質が、一次構造の相同性の低さにもかかわらず高次構造が互いによく似ることを初めて見出した。

一方、無脊椎動物のヤリイカおよびアワビについてミオグロビン遺伝子の探索を行い、アワビでミオグロビンの存在を認めた。ニジマスおよびアワビについてはさらに、各遺伝子の組織特異的発現状態について検討を行ない、組織特異的な転写レベルの違いを見出したほか、非筋組織においてもミオグロビン遺伝子の転写が行なわれていることが明らかにされた。一方、タンパク質レベルの発現が高ったクロマグロおよびイワシクジラについては、各々の骨格筋からカラムクロマトグラフィーの組み合わせによりミオグロビンを精製し、円二色測定および示差走査熱量分析により熱安定性の比較を行なった。その結果、両ミオグロビンにおける構造変化のパターンに明確な差を見出し、前者の不安定性が詳細に明らかとなった。マグロ・ミオグロビン分子内における構造安定性の差については、各領域のアミノ酸配列をもつ合成ペプチドを用いた実験により、昇温時におけるヘリックス含量の減少程度から、安定性はカルボキシ末端付近で高く、中央部付近で低いことが示唆された。

マグロ・ミオグロビンの構造情報に基づいて分子動力学シミュレーションを行なった結果、両末端や分子内の特定領域において構造のゆらぎが大きく、これが魚類ミオグロビンの不熱安定性や自動酸化速度の大きさの原因と考えられた。安定性には、温度の影響が大きい、かなり低温でも構造の揺れが予測さ

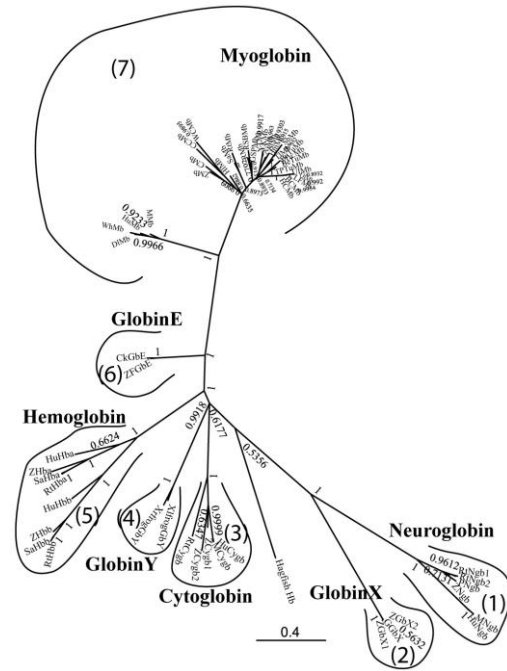


図1. 魚類由来グロビンタンパク質スーパーファミリーの無根分子系統樹。

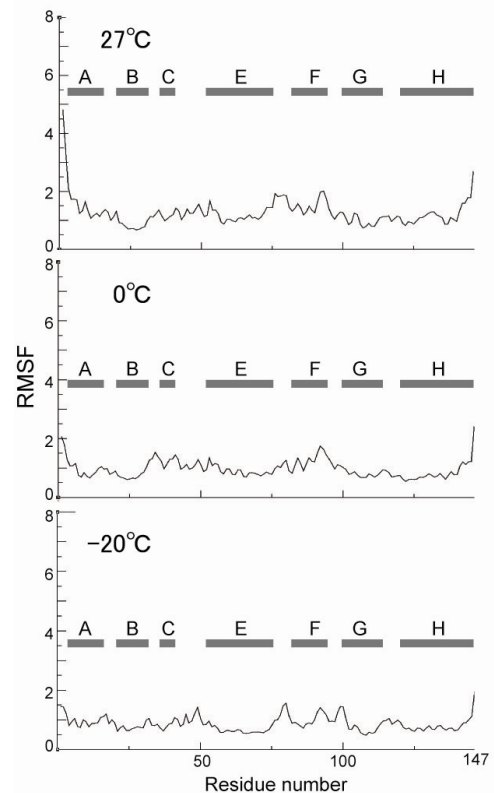


図2. マグロ・ミオグロビンの構造ゆらぎ (RMSF値) に及ぼす温度の影響. A~Hはヘリカル・セグメントを示す。

れた (図2)。

また、アワビ由来のインドールアミン酸素

添加酵素 (IDO) 様ミオグロビンについてもアミノ酸配列を決定した。ゲルろ過、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製して、可視部吸収スペクトル等の基礎的性状の解明を行なった。他方、ニジマス・ミオグロビンについては、過去の研究実績によりアミノ酸配列に特徴的なパターンが認められたため、野生型組替えタンパク質をヒスチジン・タグ (His-tag) 融合体として大腸菌に過剰発現させ、アフィニティー精製を行なった。構造安定性や生理機能に及ぼすアミノ酸置換については絞り込みに成功した。そのほか、ミオグロビンについては、PROTEIN DATA BANKの原子配置情報にもとづいて、分子動力的シミュレーションにより構造ゆらぎに関する予測を行い、既に行っているマグロ・ミオグロビンに関する構造研究結果と比較の上で熱安定性を左右する領域の同定を行なった。

また、ミオグロビンの可視部吸収はメト化 (酸化) 率やミオグロビン濃度を算定するために必須であるが、この波長域には筋肉脂質由来と思われる濁りが存在し、少なからぬ影響を及ぼすものと考えられた。Soret帯吸収については、ミオグロビンの自動酸化に伴って最大吸収波長が僅かながら変動することを認めた。マグロ肉の貯蔵中に進行するミオグロビンの変性や酸化が、品質と密接に関係することも確認した。

一方、グロビン類の分布と生理機能の関連性についても検討を加えた。ニジマスなど数種魚類の筋肉および非筋組織について、ミオグロビン遺伝子の転写および翻訳レベルを調べたところ、特に心筋および血合筋で転写、翻訳レベルが高いものの、生殖腺や鰓におけるレベルも比較的高く (図3)、さらにタンパク質レベルでも発現が認められたことから、非筋組織におけるミオグロビンの、酸素貯蔵ではない生理機能の重要性が示唆された。免疫組織学的観察により、ミオグロビンは主として各組織の表層に分布することが明らかにされた (図4)。ニジマス小脳においては、ミオグロビンの発現レベルが高いだけでなく、グロビン・スーパーファミリーに属するニューログロビン・アイソフォームの発現量も高く、両者の相補的関係が示唆された。

最後に、酵素活性に及ぼすミオグロビンの影響を調べるために、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) および筋原繊維Ca-ATPaseに対して還元型およびメト型ミオグロビンの存在下で測定した。その結果、ADHに対しては、メト型ミオグロビンは酵素活性を増強させる傾向を示したが、還元型は阻害する傾向を示した。SOD

については、メト型・還元型共に活性を阻害することが判明した。これらの影響は、基質の酸化還元状態を変化させた結果と考えられる。

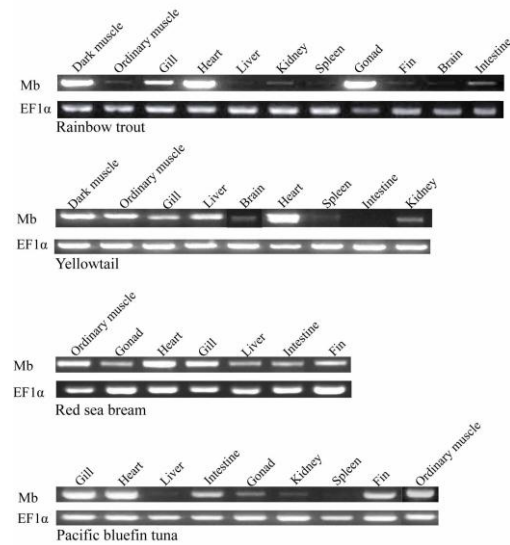


図3. (上から順に) ニジマス、ブリ、マダイおよびクロマグロの各組織におけるミオグロビン遺伝子の転写レベルの相違 (定量的RT-PCRの結果). EF-1 α をコントロールとして用いた。

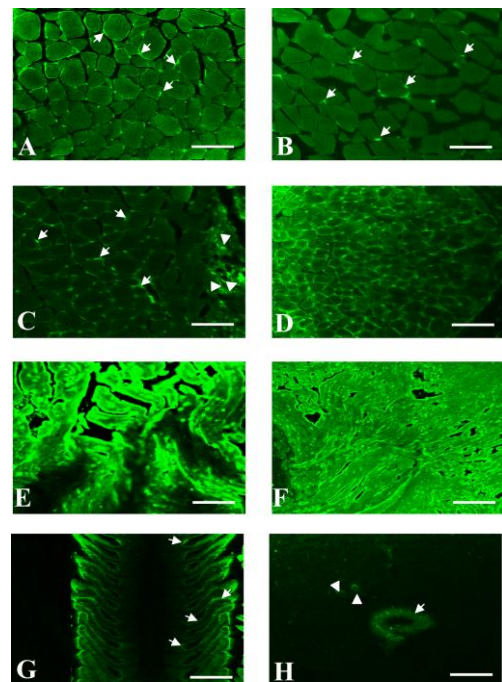


図4. ニジマス筋肉におけるミオグロビン遺伝子転写レベルの免疫組織学的観察結果. A~Dは速筋, E~Hは心筋. タンパク質の発現が見られた箇所を白矢印で示す. スケールは100 μ m.

る。一方、ミオグロビンはCa-ATPase活性を阻害したが、その機構の詳細については今後の検討課題である。

以上、本研究により、ミオグロビンを中心に、魚類および海産無脊椎動物のアミノ酸配列が多く明らかにされ、組織特異的な発現パターンについても新たな知見が多く得られた。グロビンの新たな生理機能についても、さまざまな可能性を示す結果が得られ、グロビン類についての構造と機能を理解する上で、大きな展開が当初の予定をはるかに超えて実現した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- ① M. Nurilmala, H. Ushio, G. Kaneko, Y. Ochiai: Assessment of the commercial quality evaluation on yellowfin tuna *Thunnus albacares* meat based on the properties of myoglobin. *Food Sci. Technol. Res.*, 19 巻, 237-243 (2013).
- ② 落合芳博: ミオグロビン—基礎から応用まで. 冷凍, 87巻, 341-347 (2012).
- ③ Y. Ochiai: Structural characterization of piscine globin superfamily proteins. *World Acad. Sci. Eng. Technol.*, 66 巻, 186-191 (2012).
- ④ M.M. Hasan, S. Watabe, Y. Ochiai: Structural characterization of carangid fish myoglobins *Fish Physiology and Biochemistry*, 38 巻, 1311-1322 (2012). DOI: 10.1007/s10695-012-9619-z
- ⑤ Y. Ochiai: Structural perturbation of tuna myoglobin. *World Acad. Sci. Eng. Technol.*, 74 巻, 178-182 (2011).
- ⑥ Y. Ochiai, Y. Watanabe, Uchida, H. Ozawa, S. Watabe: イワシクジラ骨格筋ミオグロビンの生化学的および熱力学的性状. 日水誌, 76 巻, 686-694 (2010).
- ⑦ Y. Ochiai, Y. Watanabe, H. Ozawa, S. Ikegami, N. Uchida, S. Watabe: Thermal denaturation profiles of tuna myoglobin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74 巻, 1673-1679 (2010). DOI: 10.1271/bbb.100290

〔学会発表〕(計8件)

- ① M.M. Hasan, G. Kaneko, H. Ushio, S. Watabe, Y. Ochiai: Widespread expression of myoglobin in muscle and non-muscle tissues of hypoxia-intolerant species, rainbow trout. Aquatic Sciences Meeting 2013, 2013年2月18日, Convention Center, New Orleans, USA.
- ② M. M. Hasan, G. Kaneko, H. Ushio, S.

Watabe, Y. Ochiai: Phylogeny of globin superfamily: diversification and distribution of myoglobin in teleosts. 日本生化学会大会, 2012年12月15日, 福岡国際会議場(福岡).

- ③ M.M. Hasan, T. Sasaki, H. Ushio, S. Watabe, Y. Ochiai: Structural characterization and tissue-specific expression of disk abalone *Haliotis discus* Indoleamine dioxygenase-like myoglobin. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference. 2012年7月13日, カルポート(高知).
- ④ M. Nurilmala, S. Watabe, Y. Ochiai: Fast preparation and autoxidation profile of tuna myoglobin. 日本水産学会春季大会 2012年3月29日, 東京海洋大学(東京).
- ⑤ Y. Ochiai: Structural and evolutionary characterization of myoglobin from southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii*. International Symposium on Muscle Biochemistry, 2011年10月28日, 東京大学(東京).
- ⑥ M. Nurilmala, S. Watabe, Y. Ochiai: Uniqueness of myoglobins from aquatic animals: their structures and stabilities. International Symposium on Muscle Biochemistry 2011年10月28日, 東京大学(東京).
- ⑦ Y. Ochiai: Evolutionary and structural aspects of fish myoglobins. International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry 2011年6月1日, 名古屋国際会議場(名古屋).
- ⑧ Y. Ochiai: Structural decay of fish myoglobin through thermal treatment. OzBIO 2010年9月28日, Melbourne Convention and Exhibition Center (Australia).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落合 芳博 (OCHIAI YOSHIHIRO)
東海大学・海洋学部・教授
研究者番号: 50160891

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし