

学 位 論 文 題 名

The diversity of protein structures and functions

(蛋白質の構造と機能の多様性に関する研究)

学位論文内容の要旨

生物は、遺伝子の変異・挿入・欠失・重複・融合を繰り返し、進化・多様化してきた。遺伝子の進化は、蛋白質の進化をもたらし、いくつかの蛋白質は、その基本機能を保ちながらも生物種によって独特の機能を獲得して多様性を示す。このような機能の多様性を示す蛋白質の構造と機能を解析する事は、蛋白質の構造と機能の相関、また進化・多様化を解明するための有力な手がかりになると期待できる。本研究では、筋収縮、ATP 再生系そして酸素運搬に際して独自の機構を持つ生物に焦点を当て、それに関与する蛋白質について、分子生物学、生理・生化学、X線結晶解析学の手法を用い、それぞれの蛋白質の構造と機能の関連性そしてその多様性について検討した。

(1) 軟体動物の筋肉収縮制御機構について

筋収縮は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴うミオシン ATPase の活性化によって起こる。脊椎動物横紋筋では、 Ca^{2+} はアクチン繊維上に存在しているトロポニン C に結合し、収縮制御はトロポミオシン (TM) -トロポニン (TN) 系によって行われている。一方、二枚貝の貝柱閉殻筋では Ca^{2+} はミオシンに結合するため、ミオシン自身が制御蛋白質であるが、完全な制御には TM-TN 系が必要であり、二重の制御機構が存在している。また、閉殻筋では、ATP をほとんど消費せずに張力を発生し続けるというキャッチ現象が知られているが、その機構は不明である。本研究では、ホッキガイ閉殻筋より新しく見いだした分子量 230K の蛋白質についてマイオニンと名付け、その単離・精製と機能の解析を行った。マイオニンのアミノ酸組成は、ミオシン繊維のコアを形成しているパラミオシンと類似していた。また、パラミオシンの分子量はマイオニンの約 1/2 の 110K であることから、マイオニンはパラミオシンタイプの2ドメイン構造であると推定した。さらに、マイオニンはミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性の Ca^{2+} 感受性を低下させる機能を持つことを明らかにした。これらの結果は、ホッキガイ閉殻筋には、ミオシン、TM-TN 系に加えて、マイオニンが関与する第3の制御系が存在すること、そしてマイオニンのキャッチ機構への関与を示唆するものであった。

次に、TM を高収率で迅速に精製する方法を考案し、この方法でウサギとホタテガイ横紋筋より TM を精製してミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性に与える影響を検討した。Bailey が示した従来の方法は、筋肉のアセトン粉末より TM を調製する方法で、調製に4日を要した。一方、今回考案した TM の調製法は、筋肉から塩抽出して得た天然アクトミオシン (NAM) より TM を調製する方法である。調製は1日で完了し、従来の方法の4～6倍という高収率で TM が得られた。ホタテガイ横紋筋 TM のウサギ

骨格筋合成アクトミオシンに対する影響を検討したところ、ホタテガイ横紋筋 TM は Ca^{2+} 濃度に関わらずウサギ骨格筋合成アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性を 25% 低下させることが確認できた。また、ホタテガイ合成アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性に対しては影響を与えないことから、ホタテガイ横紋筋 TM は、単独では制御機能を持たないことを明らかにした。

(2) 無脊椎動物における ATP 再生酵素アルギニンキナーゼの機能と構造の多様性について

ATP は、解糖系、TCA 回路、電子伝達系で産生されるが、筋肉や脳などの組織やミトコンドリアでは、急激な ATP 消費に備えて、高エネルギーリン酸基がフォスファゲンと総称される化合物に貯蔵されている。脊椎動物では、フォスファゲンとしてクレアチンリン酸 (CrP) が存在し、クレアチンキナーゼ (CK) が CrP のリン酸基を ADP に転移させることですばやく ATP を再生する。多くの無脊椎動物は、CrP の代わりにアルギニンリン酸 (ArgP) とアルギニンキナーゼ (AK) を持つ。CK は、分子量 43K の二量体であり、AK の多くは分子量 40K の単量体である。本研究では、ホッキガイ閉殻筋より、軟体動物としては初めて分子量 80K の AK を発見し、その精製、cDNA 配列の決定、反応速度論的解析を行った。また、ナマコ縦走筋より 2 量体 AK を精製し、2 量体 AK として初めて cDNA 配列を決定して AK や CK をはじめとするフォスファゲンの進化・多様化について考察した。

ホッキガイ AK は、硫安分画と各種クロマトグラフィーによって精製できた。cDNA 配列とアミノ酸配列から、ホッキガイ AK はアミノ酸残基数 724 個、分子量 81K の蛋白質であり、40K タイプの AK 遺伝子が重複した 2 ドメイン構造であることを明らかにした。また、ホッキガイ AK の各基質についてミカエリス定数 K_m を求めたところ、ATP 再生へ向かう正反応の基質である ADP と ArgP の K_m は他種軟体動物 AK と同程度であったが、ArgP 再生へ向かう逆反応の基質である ATP と Arg の K_m は低い傾向にあった。また、ナマコ AK についても cDNA 配列とアミノ酸配列を決定し、アミノ酸残基数 370 個、分子量 42KDa と算定した。ナマコ AK の全体的なアミノ酸配列は AK よりも CK に類似していたが、Arg 結合部位周辺の構造は AK 型を示した。また、系統樹の解析より、フォスファゲンは共通の遺伝子より AK と CK に分化したのち多様化が進んだと考えられるが、ナマコ AK は CK に分化した原始遺伝子より AK に分化したことを示唆する結果を得た。

(3) ヤツメウナギヘモグロビン I の機能と構造について

ヤツメウナギは最も原始的な脊椎動物の一種である。多くの脊椎動物ヘモグロビン (Hb) が 4 量体であるのに対して、ヤツメウナギ Hb は単量体/二量体/多量体の平衡状態で存在することなど独自の性質を保持している。そこで本研究では、カワヤツメより Hb を単離・精製し、生理的性質と立体構造を決定した。

ヤツメウナギ Hb は、溶血液を DEAE-Toyopearl カラムにかけることで精製できた。溶血液中には分子量の異なる 4 種類の Hb が存在していたが、そのうち含有量が 90% 以上と最も多い Hb を HbI とし、解析を進めた。アミノ酸配列を決定したところ、アミノ酸残基数 149 個、分子量 16.5K であり、ウミヤツメ Hb と比較すると 4 残基の置換があるのみであったが、ヒト Hb β 鎖と比較すると、ヤツメウナギ HbI では N 末端が 8 残基長く、C 末端側の α ヘリックス間のループ部に欠失があった。また、HbI の酸素結合特性は、HbI が低濃度の時には非協調的であるが、高濃度であると協調性が現れた。さらに、HbI 結晶構造を 2.3Å の分解能で決定したところ、単位格子中に 12 個の HbI 分子が存在しており、これ

らの分子は、2 量体、6 量体、12 量体に会合していた。ヒト Hb β 鎖と比較して付加・欠失していた部分は6 量体を構成する分子間の接触部に存在していた。以上より、ヤツメウナギ HbI は、高濃度で多量体を形成し、協調的に酸素を結合し得ることを示唆する結果となった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲

副 査 教 授 新 田 勝 利

副 査 教 授 矢 澤 洋 一 (北海道教育大旭川校)

副 査 助 教 授 渡 邊 信 久

学 位 論 文 題 名

The diversity of protein structures and functions

(蛋白質の構造と機能の多様性に関する研究)

生物は、遺伝子の変異・重複などにより、進化・多様化し、蛋白質の種分化・機能分化をもたらした。本研究では、筋収縮、ATP 再生系そして酸素運搬に焦点を当て、それに関与する蛋白質について、構造と機能の関連性そしてその多様性について検討した。

筋収縮は、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴うミオシン ATPase の活性化によって起こる。脊椎動物横紋筋では、 Ca^{2+} はアクチン繊維上に存在しているトロポニン C に結合し、収縮制御はトロポミオシン (TM) -トロポニン (TN) 系によって行われている。一方、二枚貝柱閉殻筋では Ca^{2+} はミオシンに結合するが、完全な制御には TM-TN 系が必要であり、二重の制御機構が存在している。本研究では、ホッキガイ閉殻筋より新しく見いだした分子量 230K の蛋白質マイオニンと名付け、その単離・精製と機能の解析を行った。マイオニンのアミノ酸組成は、パラミオシンと類似しており、パラミオシンの分子量はマイオニンの約 1/2 の 110K であることから、マイオニンはパラミオシンタイプの 2 ドメイン構造であると推定した。さらに、マイオニンはミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性の Ca^{2+} 感受性を低下させる機能を持つことを明らかにした。これらの結果は、ホッキガイ閉殻筋に、ミオシン、TM-TN 系に加えて、マイオニンが関与する第 3 の制御系が存在することを示唆するものであった。次に、TM を高収率で迅速に精製する方法を考案した。従来の方法では、調製に 4 日を要したが、今回考案した調製法では、調製は 1 日で完了し、従来の方法の 4～6 倍という高収率で TM が得られた。この方法で精製したホタテガイ TM は、ホタテガイ合成アクトミオシンの Mg^{2+} -ATPase 活性に対しては影響を与えないことから、ホタテガイ横紋筋 TM は、単独では制御機能を持たないことを明らかにした。

ATP は、解糖系・TCA 回路電子伝達系で産生されるが、この他にホスファゲンキナーゼによる ATP 再生系がある。脊椎動物では、クレアチンキナーゼ (CK) がクレアチンリン酸 (CrP) のリン酸基を ADP に転移させることですばやく ATP を再生する。多くの無脊椎動物は、CrP の代わりにアルギニンリン酸 (ArgP) とアルギニンキナーゼ (AK) を持つ。CK は、分子量 43K の二量体であり、AK の多くは分子量 40K の単量体である。本研究では、ホッキガイ閉殻筋より、軟体動物としては初めて分子量 80K の AK を発見し、その精製、cDNA 配列の決定、反応速度論的解析を行った。また、ナマコ縦走筋より 2 量体 AK を精製し、2 量体 AK として初めて cDNA 配列を決定して AK や CK をはじめとするフォスファゲンの進化・多様化について考察した。cDNA 配列とアミノ酸配列から、ホッキガイ AK は分子量 81K の蛋白質であり、40K タイプの AK 遺伝子が重複した 2 ドメイン構造であることを明らかにした。また、ホッキガイ AK の各基質についてミカエリス定数 K_m は ATP と Arg について低い傾向にあった。また、ナマコ AK についても cDNA 配列とアミノ酸配列を決定した。ナマコ AK の全体的なアミノ酸配列は AK よりも CK に類似していたが、Arg 結合部位周辺の構造は AK 型を示した。また、系統樹の解析より、フォスファゲンは共通の遺伝子より AK と CK に分化したのち多様化が進んだと考えられるが、ナマコ AK は CK に分化した原始遺伝子より AK に分化したことを示唆する結果を得た。

ヤツメウナギは最も原始的な脊椎動物の一種である。多くの脊椎動物ヘモグロビン (Hb) が 4 量体であるのに対して、ヤツメウナギ Hb は単量体/多量体の平衡状態で存在することなど独自の性質を保持している。ヤツメウナギ Hb の溶血液中には分子量の異なる 4 種類の Hb が存在していたが、そのうち含有量が 90% 以上と最も多い Hb を HbI とし、解析を進めた。HbI はアミノ酸残基数 149 個、分子量 16.5K であり、配列は他種ヤツメウナギとは類似していたが、ヒト Hb β 鎖と比較すると、ヤツメウナギ HbI では N 末端が 8 残基長く、C 末端側の α ヘリックス間のループ部に欠失があった。また、HbI の酸素結合特性は、HbI が低濃度の時には非協調的であるが、高濃度で協調性が現れた。さらに、HbI の結晶構造を 2.3 Å の分解能で決定したところ、単位格子中に 12 個の HbI 分子が存在しており、これらの分子は、2 量体、6 量体、12 量体に会合していた。ヒト Hb β 鎖と比較して付加・欠失していた部分は 6 量体を構成する分子間の接触部に存在していた。以上より、ヤツメウナギ HbI は、高濃度で多量体を形成して、協調的に酸素を結合し得ることを示唆する結果となった。

本研究は、進化における蛋白質の構造と機能の多様化について 3 つの異なる系において研究したものであり、その成果は、蛋白質の構造と機能の進化に関して有益な知見を与える。本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ、よって審査員一同は申請者が博士 (理学) の学位を得る十分な資格があるものと認めた。