

ヤツメウナギの祖先型ヘモグロビンNode25タンパク質の合成および機能解析

幕, 晋一 / MAKU, Shinichi

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

55

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

2

(発行年 / Year)

2014-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00010393>

ヤツメウナギの祖先型ヘモグロビン Node25 タンパク質の 合成および機能解析

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF ANCESTRAL LAMPREY HEMOGLOBIN Node25

幕 晋一

Shinichi Maku

指導教員 常重 アントニオ

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

Hemoglobins (Hb) from lamprey and hagfish are composed of monomeric components in the oxygenated state, while the monomers aggregate to oligomers, such as dimers and tetramers, in the deoxygenated state. We attempted to learn by reverse phylogenetic analysis how these species acquired cooperativity in oxygen binding through molecular evolution of Hb. The Node25 globin gene (an ancestor of cyclostomes) previously designed was constructed, cloned into pET-22b(+) and the resultant pET-Node25 was expressed in *E. coli* BL21(DE3). The produced Node25 protein was purified by using Q Sepharose and CM Sepharose column chromatography. UV-visible spectra showed that this purified Node25 protein holds protoheme group. Oxygen binding experiments showed that this protein has a small Bohr effect and weak cooperativity, but no effect of organic phosphates.

Key Words : hemoglobin, lamprey, ancestral

1. 諸言

脊椎動物のヘモグロビン(Hb)は α 鎖と β 鎖の2つずつからなる四量体構造をもつが、円口類のヤツメウナギやヌメウナギのHbは、酸素(oxy)型のときに単量体を、脱酸素(deoxy)型のときに二量体や四量体構造をとることが報告されている。

本研究では、脊椎動物のHbが単量体から二量体を経て四量体構造へと進む分子進化の過程において、獲得したHbの酸素結合の協同作用について新たな知見を得るために、現存する脊椎動物の中でも最も古い種とされる円口類のHbに注目した。

これまで当研究室では、現存する円口類Hbのアミノ酸配列をもとに作成した最尤系統樹(ML-tree)を用いてヤツメウナギの祖先型Hbに相当するNode25タンパク質を設計し¹⁾すでに同遺伝子をクローニングしたプラスミド(pGEM-Node25)を得ている。

本研究では、大腸菌を宿主としたNode25遺伝子発現系を構築したのち、産生したNode25タンパク質の精製を行い、得られた精製標品を用いて、吸収スペクトルの測定および井式自動酸素結合曲線記録装置を利用した機能解析を行い、今回、設計したヤツメウナギの祖先型HbであるNode25タンパク質の特性の検討を行った。

2. 方法

2.1 発現型プラスミド(pET-Node25)の構築および形質転換体の取得

Node25 遺伝子をサブクローニングしたプラスミド(pGEM-Node25)から同遺伝子を発現ベクターpET-22b(+)へクローニングして、発現型プラスミドpET-Node25を構築した。さらにこのプラスミドを、大腸菌 BL21 (DE3) 株へ導入して形質転換体を取得した。

2.2 産生したNode25タンパク質の抽出

得られた形質転換体を TB 培地で大量培養し²⁾、回収した菌体を超音波およびDNase I 処理した後、CO ガスで飽和させた。この破砕液を遠心したのち、回収した上清をPEI 処理して再度遠心し、上清を回収した。この抽出液を濃縮したのち、Q Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4) に対して4℃で一晩透析した。

2.3 Node25タンパク質の精製³⁾

透析後の抽出液を、Q Sepharose 担体を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーで精製し、溶出した赤く呈色した各画分を集めて、再度濃縮し、10 mM phosphate buffer, pH 5.8 に対して4℃で一晩透析した。

透析後の試料は、CM Sepharose 担体を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーで精製し、溶出した各画分の中から再度赤く呈色した画分を回収、濃縮し、50 mM phosphate buffer, pH 7 に対して透析を行い、Node25 タンパク質の精製標品を得た。

2.4 Node25タンパク質の吸収スペクトルの測定

50 μ M Node25 タンパク質精製標品の、Oxy 型、Deoxy 型およびCO 型の吸収スペクトルを測定した。

2.5 Node25 タンパク質の酸素結合特性

Node25 タンパク質の精製標品を pH (6.4, 6.9, 7.4, 7.9, 8.4) の buffer で希釈して 60 μ M にした試料を 6 ml ずつ用意した。今井式自動酸素結合曲線記録装置を用いてこれらの試料の酸素解離曲線を測定したのち Hill plot を作成し、 P_{50} (50%酸素飽和度での酸素分圧) および n_{max} (Hill 係数) を算出した。

さらに ATP, 2,3-diphosphoglycerate (DPG), inositol hexaphosphate (IHP) などの阻害剤 (終濃度 2 mM) が与える効果および、生理条件に近い 0.6 mM および 1.2 mM の高タンパク濃度での協同性も調べた。

3. 結果および考察

大腸菌内で産生した Node25 タンパク質の精製を行い、得られた最終精製物の SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB 染色した結果を図 1 に示した。

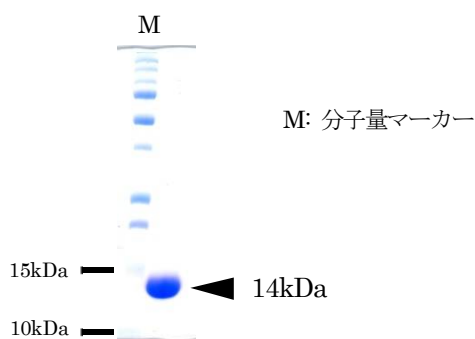


図 1. Node25 タンパク質精製標品の SDS-PAGE

この結果より、分子量約 14kDa の位置に、単一のタンパク質バンドがみられたことから、Node25 タンパク質のグロビン鎖の産生を確認できた。

Oxy, Deoxy 型および CO 型の Node25 タンパク質の吸収スペクトルを測定した結果を図 2 に示す。各吸収スペクトルには Hb 特有の Soret 帯および Q 吸収帯が見られた。この結果から、Node25 タンパク質は補欠分子であるヘムを有していることが明らかにされた。

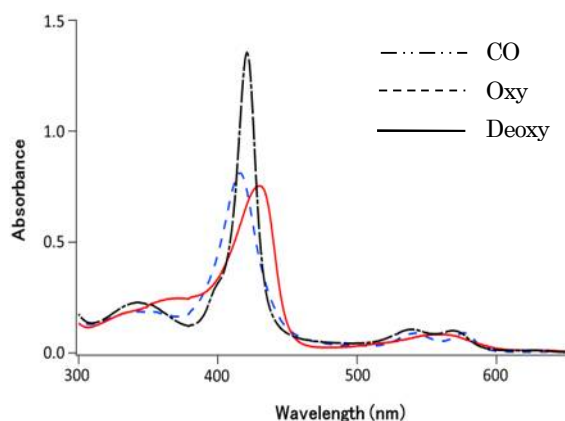


図 2. Oxy 型、Deoxy 型および CO 型の Node25 タンパク質の吸収スペクトル

種々の pH における Node25 タンパク質の P_{50} および n_{max} の値を Table 1 に示した。

Table 1. 種々の pH における Node25 タンパク質の P_{50} と

pH	n_{max}	
	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

pH が酸性からアルカリ性側へ上昇するに従って酸素親和性および Hill 係数の増加がみられることから、60 μ M という低濃度においても pH 依存的に Node25 タンパク質が協同作用を示すことを明らかにされた。Bohr 効果は存在するが小さい。

各種阻害剤 (DPG, ATP および IHP) が Node25 タンパク質の P_{50} および n_{max} の値に与える効果を Table 2 に表す。

Table 2. 各種阻害剤存在下における Node25 タンパク質の P_{50} と n_{max} (pH 7.4)

阻害剤	P_{50} (mmHg)	n_{max}
2 mM ATP	24.6	1.56
2 mM DPG	25.5	1.55
2 mM IHP	26.1	1.51
None	23.8	1.61

この結果より、各種阻害剤存在下における Node25 タンパク質の P_{50} 値と Hill 係数は一定の値を示し、阻害剤による酸素親和性と協同作用に対する効果はみられなかった。

今回合成されたヤツメウナギ祖先型 Hb が弱いながらも Bohr 効果と協同作用を示したことは興味深い。

4. 結言

ヤツメウナギの祖先型 Hb である Node25 遺伝子の大腸菌を宿主とした発現系を構築することができた。

産生した Node25 タンパク質は、Hb 特有の吸収スペクトルを示し、小さな Bohr 効果と弱い協同作用を示した。しかしながら、ATP, DPG, IHP などの阻害剤の効果はみられなかった。

参考文献

- 1) 幕 晋一, "2010 年度 卒業論文"
- 2) Shen, T.-J. *et al.*, (1997) *Protein Engineering* **10**, 1085-1097
- 3) Nagai, M. *et al.*, (2008) *Biochemistry* **47**, 517-525