S3D07

ノックインマウスを用いた光受容蛋白質の機能解析

○今井 啓雄（京大・院理・生物物理）

多くの脊椎動物の網膜には、昼間視・色覚に関わる錐体と、薄明視に関わる桿体が存在する。我々は、これらの細胞の機能の基礎となる光受容蛋白質の性質を検討し、錐体の光受容蛋白質は桿体の光受容蛋白質ロドプシンよりも活性状態の寿命が短いこと、また、リガンドであるレチナールとの結合が速いことを見出した。さらに、これらの性質が2つのアミノ酸残基（E122、P189）により制御されていることを見出した。これらのアミノ酸残基の効果を、実際の生体内での反応と結びつけようとすると、蛋白質機能や細胞内情報伝達機構に対する効果を生体内で検討する必要がある。ここ数年、トランスジェニックマウスを作製することにより、このような試みがなされてきたが、発現量の制御等の副効果による問題により、定量的な議論は困難であった。そこで我々は、ES細胞系によるノックイン技術を用いることにより、マウスのロドプシン遺伝子を変異遺伝子と入れ替え、変異蛋白質を野生型蛋白質と同程度に発現することを試みた。その結果、変異蛋白質を桿体視細胞に、野生型蛋白質と同程度に発現するマウスを作製することに成功した。本シンポジウムでは、GPCRの機能解析のモデルとして、このマウスの解析結果等についても報告する。この研究は、京都大学大学院生命科学研究科 千坂修助教授、竹市雅俊教授、京都大学医学部眼科学教室 植田良樹博士、本田孔士教授との共同研究によるものであり、この場を借りてお礼を申し上げます。

H. Imai : Single amino acid replacement of visual pigment in vivo by knock-in mouse system.

S3E02

ミオグロビン・ヘムポケットの寛容さ

○根矢 三郎（京都薬大）

簡単なヘム-グロビン複合体構造をもつミオグロビンはヘムたんぱく質の基本単位に位置づけられてきた。そのヘムポケットはボルフィリンを疎水環境におき、鉄原子を還元状態に保ち、酸素分子を可逆的に鉄原子に結合する機能をもつ。ヘムポケットはいかに柔軟であろうか？1980年代後半からのヘムポケットのアミノ酸置換が徹底的に行なわれ、その機能が分子レベルで記述できるようになった。Olsonらはヘムポケット内に鉄ボルフィリンを保持する主要因子はヘム-グロビン疎水相互作用と鉄-ヒスチジン結合であることを明らかにした。彼らは配位子結合キネティクスを調べ、アミノ酸側鎖の極性、E7残基での水素結合の有無、ヘムポケット内部にある水分子が配位子結合に大きく影響することをつき止めた。また、ヘムポケットへの水分子進入を防ぐためにヘム周辺にある疎水性残基が決定的な役割をもつことも解明している。ミオグロビン構造改変はさらにすすめられ、近位および遠位ヒスチジンやその近傍残基をかえてペルオキシダーゼ活性を付与する試みも現れた。いっぽう、鉄ボルフィリンについてはプロトヘムから誘導できるメソヘムなどを導入して置換基の電子吸引効果が古くから調べられてきた。これによりヘム鉄の電子密度と配位子結合能の関係が判明したが、それ以上の進展は見られなかった。しかし最近、アポミオグロビンが合成アルキルヘムやフタロシアニン類、あるいはテトラピロール配列をかえたボルフィリン異性体が自在に導入できるようになった。さまざまな分子形をもつボルフィリン類は、ヘムの構造と機能について新しい認識をもたらしている。ヘムポケットはアミノ酸側鎖改変を柔軟に受け入れ、多種類のボルフィリノイドを認識する寛容性をもつ。ヘムポケットの寛容性は、ミオグロビンを多様な特異機能をもつ分子素子に展開する可能性を示唆する。

S. Neya : How tolerant is the myoglobin heme pocket?

S3E01

ミオグロビンは本当に分かったか？

○今井 清博（阪大院・医学系・情報生理）

ミオグロビンは1個のヘムと単一のポリペプチド鎖から成る球状蛋白で、その生体内での機能は筋肉内の酸素貯蔵や酸素バッファーであると教科書には書いてある。それは初めてX線結晶解析法で構造が解明され、いわゆる“グロビン・フォールド”の定義のもとになった蛋白であり、ありとあらゆる研究手段が駆使されて、現在ではすでに解明し尽くされた蛋白、他の蛋白の研究の規範となる蛋白、いわば量子力学で解かれた「水素原子」に例えられている。しかし、クジラなどの潜水性哺乳類の筋肉のミオグロビン含量が高いのは、潜水中の酸素供給を可能にするためという、もっともらしい説は、その酸素容量の点から、長らく疑問視されてきた。最近、ミオグロビンは、酸化的リン酸化反応の促進、peroxidase活性による酸化ストレスからの筋の保護、NOの信号伝達素子としての作用の増強、NOによるCyt. c oxidase作用阻害の防御など、広く生体内の調節や防御にかかわる蛋白の可能性を指摘する論文が最近ぞくぞく出ている。ミオグロビンがアロステリック作用をもつという論文、ミオグロビンを欠くノックアウト・マウスがびんびんしているという論文もある。また、グロビンとは全く起源を異にする、“ミオグロビンでないミオグロビン”も発見された。これらの最近の知見は、ミオグロビンという蛋白は、生理機能もまだ確立されておらず、いまだ研究途上にあることを意味している。今後の研究の成り行きによっては、教科書の書き直しをせまる可能性も秘めている。

K. Imai : Has the myoglobin been really understood?

S3E03

ミオグロビンのモジュール構造と起源

塩生 真史、由良 敬、○郷 通子（名大・院理・生命理学）

ミオグロビンもヘモグロビンも、共通の祖先から遺伝子の重複によって生まれたグロビン族である。タンパク質はモジュールという、コンパクトな構造部品に分割できること、さらに、遺伝子を分断するイントロンの位置がモジュールの境界とよく対応していることが、最初にヘモグロビンで明らかになった（ワトソン「遺伝子の分子生物学」第4版、p.644参照）。ヘモグロビンで示されたことは、タンパク質一般において広く成り立つことを、モジュールの定量的な同定法を完成したことによって示すことができた。

タンパク質の機能・構造・進化において先端的研究が行われているのがグロビン族の特徴である。西暦2000年には、グロビンを巡る発見が3つ続いた。すなわち、（1）藍藻や原生生物が持つ短いタイプのヘモグロビンの立体構造が解明された。（2）古細菌にもヘモグロビンが見つかった。これにより、グロビン遺伝子は古細菌、真細菌、真核生物の3つの生物界に広く存在し、古い起源をもつことが明らかになった。（3）ヒト脳に存在するヘモグロビンが見つかった。環形動物由来のグロビンとアミノ酸配列が類似している。脳の発生とヘモグロビンの由来は大変興味深い。

普通、グロビン族は8個のモジュールに分解できるが、N末端側ではモジュールの添加や欠失が進化的な時間スケールで起きているため、7個あるいは9個のモジュールをもつグロビン族も存在する。新しく見つかったグロビン族の遺伝子は様々な位置にイントロンをもつことから、モジュールとイントロンの対応関係を現時点で再確認した結果、統計的に有意な相関を得られた。立体構造既知のタンパク質を全てモジュールに分解し、モジュールを分類したところ、グロビン族の持つモジュールが、他のタンパク質にも存在していた。モジュールの足し算と引き算により、タンパク質が生まれた軌跡を辿る。

M. Shionyu, K. Yura and M. Go : Module organization and origin of myoglobin