多重機能プロテアーゼインヒビターの分子進化 加藤郁之進*

分子進化の中立説は、突然変異体の中で進化的に固定されるもののなかの圧倒的多数のものは、自然選択的に中立であると主張している。しかし、現存する各種生物の生存のための精妙な生体機能を見ると、大多数の中立変異にまじって、極く稀に起こる有利な変異の固定こそが進化の過程における最も重要な出来事と考えられる。プロテアーゼインヒビターの反応中心の進化の速さと多様性は、この考えを支持するものである。

分子生物学の著しい発展によって、蛋白質のアミノ酸配列や DNA の塩基配列についての膨大なデータが蓄積され、分子進化の研究領域でもいろいろな発見がなされてきた。特に、木村、続いて King と Jukes らによって発表された“分子進化の中立説” (“The Neutral Theory of Molecular Evolution”, M. Kimura, Cambridge University Press, 1983) は、分子進化学者のあいだでコンセンサスを得てそびえたつ最も有力な学説である⁽¹⁾。それは、生じた突然変異体で固定されるものの圧倒的多数のものは、自然選択的に中立であると主張する。つまり、生じた突然変異体は他のものより不利な場合、負の自然選択 (negative Darwinian selection) によって、最終的にはその生物集団から排除されてしまう。逆に、生じた突然変異体は他のものより有利な場合、正の自然選択 (positive Darwinian selection) が働くことになるが、ほとんど起こらないと考えられている。新しく生じた突然変異体は他のものと比べて、不利でも有利でもない場合、中立と呼ばれる。

ところで、筆者らは、トリ卵白中に存在する多重機能プロテアーゼインヒビターのひとつであるオボムコイドの構造を研究している過程で、このインヒビターの機能にとって最も重要な“反応中心” (後述) 付近のアミノ酸配列が最も激しく変異を起こしていること、いわゆる超変異性 (hypervariability) を発見した^(2,3)。100 種以上のトリ

オボムコイドの第Ⅲドメインのアミノ酸配列を検討した結果、これらのプロテアーゼインヒビターの分子進化を、中立説から説明することが困難であり、これらのインヒビター分子は、種特異的な正の自然選択に従って分子進化しているという可能性がはっきりと示された。

ここでは、オボムコイド、オボインヒビターを中心に、多重機能プロテアーゼインヒビターの遺伝子構造、アミノ酸配列の解明から明らかにされたドメイン構造の仕組みと、それらの各ドメインで明らかとなった、特異的な分子進化の様子を概説してみたい。

蛋白質性プロテアーゼインヒビターとは何か

プロテアーゼの機能は言うまでもなく、生体内において種々の蛋白質やペプチド性のホルモンの分解修飾など、いわゆるプロセッシングを司ることによって、血液凝固やチモーゲンの活性化などの生体における重要な諸反応を調節している。一方、蛋白質性プロテアーゼインヒビターはその機能に応じて、肝臓、脾臓などの諸器官で造られている。インヒビターの主要機能は、生体の諸反応を司っている活性型プロテアーゼの量を調節することであると考えられている。もしも、この活性型プロテアーゼの量をコントロールできなければ、血液は一瞬のうちに凝固してしまい、食物を消化すべき器官である胃や小腸が、逆にプロテアーゼによって消化されてしまうといった、生体にとって致命的な事態が起こることになる。

蛋白質性プロテアーゼインヒビターには、その

Molecular Evolution of Multifunctional Protease Inhibitor

* Ikunosshin KATO, 宝酒造(株)薬品研究所

分子の表面に反応中心(reactive site)と呼ばれるペプチド結合が存在し、プロテアーゼ分子はそのペプチド結合と反応してその酵素作用が拮抗的に阻害される。つまり、反応中心は、酵素とインヒビターが複合体をつくる際に、酵素の活性中心と直接反応するインヒビター分子の一部分で、その阻害酵素の特異性を決める基質にアナログなアミノ酸配列と定義することができる。その特異性を最も強く支配するのが“反応アミノ酸残基” P_1 と呼ばれる部分で、次のようにかくことができる。

矢印が狭義の反応中心で、たとえば P_1 がリジンかアルギニ

ンであれば、そのインヒビターはほぼ間違いなくトリプシン様のプロテアーゼと反応すると言える。同様に、 P_1 がフェニルアラニンやロイシンなどであれば、キモトリプシン様のプロテアーゼを阻害することが予想できる。

この“反応中心モデル”に従えば、酵素とインヒビターの複合体は次のように、酵素(E)とインヒビター(I),または酵素(E)と反応中心が加水分解されたインヒビター(I^*)とに可逆的に解離する。

また、この反応を利用して、反応中心の位置を決めることができる。

多重機能プロテアーゼインヒビターの繰り返し構造

自営的(autonomous)な機能をもったドメインが、真珠の首飾りの真珠のように、1本のポリペプチド鎖上に直列に繰り返してつながった蛋白質を、多重機能蛋白質と呼ぶ。自営的な機能とは、そ

図1 ■Kazal 型の多重機能プロテアーゼインヒビターのトポロジカルな構造⁽⁶⁾

黒丸は半シスチン残基、矢印は反応中心の存在場所をそれぞれ示している。(a)ウシ脾臓のインヒビター、(b)イヌ顎下腺インヒビター、(c)赤ウミガメ卵白インヒビター、(d)トリオボムコイド、(e)アリゲータオボムコイド、(f)トリオボインヒビター

の蛋白質分子に含まれている他の機能とはまったく独立して測定可能な機能であることを意味し、またその機能は構造的にもそれぞれ異なったドメインに由来していることを意味する。したがって、同一の活性中心で異なった反応を触媒する酵素や、同一の反応中心で異なったプロテアーゼを阻害するプロテアーゼインヒビターなどは、多機能蛋白質とは呼ばない。多機能蛋白質のなかでも、同様の機能を持ったドメインが繰り返して現われる場合には多重機能蛋白質と呼ばれる⁽⁴⁾。蛋白質性プロテアーゼインヒビターでは、オボムコイド、オボインヒビター⁽⁴⁾、カルパスチン⁽⁵⁾など多くの多重機能プロテアーゼインヒビターが見いだされている。

図1は、多重機能プロテアーゼインヒビターの例として Kazal 型インヒビターの構造をトポロジカルに示したものである⁽⁶⁾。図から明らかのように、3本の S-S 結合の架橋に囲まれたドメインが1単位となっており、オボムコイドの場合は3単位、オボインヒビターの場合は7単位それぞれ繰り返されているのがよくわかる。

オボムコイドのアミノ酸配列と遺伝子構造

オボムコイドは卵白中に多量に存在する、分子量約 30,000 の糖蛋白質である。ニワトリのオボムコイドは輸卵管で生合成され、その蛋白質部分は 186 アミノ酸残基からなり、5 本の糖鎖とともに 24 アミノ酸残基からなるシグナルペプチドをもっている⁽⁷⁾。イントロンは、各ドメイン間とシグナルペプチドの間にそれぞれ 1 つと、各ドメイン内とシグナルペプチド内にそれぞれ 1 つの、合計 7 つ存在する。これらイントロンの分子内の位置は、後述するオボインヒビターの場合とまったく同一である⁽⁸⁾。

研究の発端は、1960 年に Rhodes らがオボムコイドはトリの種によって、基質特異性の異なるプロテアーゼを阻害するのみならず、1 分子のオボムコイドが複数の異なったプロテアーゼを同時に阻害するという報告を出したことから始まった⁽⁹⁾。

1973 年から筆者らは、多重活性中心、すなわちインヒビターの繰り返し構造を想定して一次構造決定にとりかかり、オボムコイドが、いわゆる多頭インヒビター (multi-headed inhibitor) であることを証明した⁽²⁾。それと同時に、当然のことながら、基質特異性の異なるプロテアーゼを阻害するということは、アミノ酸配列の相違、特に活性中心付近の一次構造の相違に由来することに気づいた (後述)。

ニワトリのオボムコイドの一次構造を図 2 に示す。ウシ脾臓から分泌される Kazal 型のトリプシンインヒビターと構造が相同なドメインが、3 個直列につながっている。各ドメインには、プロテアーゼとそれぞれ独立に反応する、いわゆる反応中心が存在する。3 個のドメインをつなぐ 2 本のコネクションペプチドは *Staphylococcus aureus* V8 のプロテアーゼやサーモライシンなどによってそれぞれ限定分解を受け、3 個のドメインはそれぞれ独立して遊離される⁽⁷⁾。

アミノ末端から順に 1 番目と 3 番目のドメインは本来どのようなプロテアーゼを阻害するのかわかっていないが、2 番目のドメインはウシトリブ

図 2 ■ニワトリのオボムコイドのアミノ酸配列⁽⁷⁾

ダイヤモンド記号◇は、プレペプチドを表わし、白丸○はオボムコイドを表わしている。太い黒線——はジスルフィド結合を、波線~~~~は糖鎖を、黒い矢印→は第Ⅱドメインの最もよく研究された、反応中心を示している。普通の矢印→は、現在あまりよくわかっていない第Ⅰ、第Ⅲドメインの反応中心を指している。白い矢印⇨は *Staphylococcus aureus* V8 のプロテアーゼによる限定分解場所を指している。破線の矢印-----はシアノゲンブロマイドによる切断位置を示している。棒線——はオボムコイド遺伝子のイントロン挿入位置である。

シンなどを阻害する。事実、V8 のプロテアーゼによって遊離された 2 番目のドメインは、やはりトリプシンをよく阻害する。特に第Ⅱと第Ⅲドメイン間で特異的に、かつ容易に酵素分解され、第Ⅲドメインを簡単に単離することができる。

オボインヒビターのアミノ酸配列と遺伝子構造

オボインヒビター分子は、オボムコイドと同様にトリ卵白中に存在するプロテアーゼインヒビターで、Kazal 型のインヒビターが 7 個つながった構造をしている。449 個のアミノ酸残基からなり、23 残基からなるシグナルペプチドがついている。アミノ末端から順にⅠからⅣまでのドメインでは、その P₁ アミノ酸残基はすべてアルギニ

という考え方を支持している。

オボムコイドとオボインヒビターの遺伝子の比較

オボムコイドとオボインヒビターの遺伝子構造は非常によく似ており、各ドメイン内の1個のイントロンの相対的な位置はまったく同一である(図2, 3参照)。オボインヒビターの第IIドメインと第Vドメインの最初のエクソンは、3塩基分だけ他のドメインやオボムコイドの第I, 第IIドメインよりも短い。オボムコイドの第IIIドメインとオボインヒビターの第VIIドメイン、つまり両者のカルボキシル末端にあるドメインは分子中で最も短く(b型ドメインと

図3 ■オボインヒビターのアミノ酸配列と繰り返しドメイン構造⁽¹⁰⁾
7つの Kazal 型ドメインが直列につながった構造をしている。ジスルフィド結合は実線で示され、イントロンの挿入位置は矢印で示されている。各ドメインの P₁ アミノ酸残基は星印*で示されている。

ンであり、トリプシン様のプロテアーゼを阻害する。ドメインVの P₁ 残基はフェニルアラニン、ドメインVIとVIIのそれはメチオニンであり、広義のキモトリプシン様のプロテアーゼをそれぞれ阻害する。オボインヒビター分子は、エラスターゼ、プロテアーゼKなどを阻害するが、VからVIIのドメインで阻害しているものと考えられる。

図3は、オボインヒビターの各ドメインの構造をその相同性を強調して示したものである。イントロン(矢印は挿入位置を示す)は、7つのドメインを通じてまったく同一位置に挿入されている。イントロンは全部で15存在し、14のイントロンのうち7つのイントロンは各ドメイン間に存在し、残りの7つのイントロンはすべて P₂₄' の位置に挿入されている。このイントロンは P₂₄' 位置のアミノ酸のコードンの2番目と3番目の塩基間に挿入されている。残りのもう1つのイントロンは、シグナルペプチドとオボインヒビターのアミノ末端の間に存在する⁽¹⁰⁾。これらのドメイン間、ドメイン内イントロンの位置はオボムコイドの場合とまったく同様であり、イントロンは蛋白質、特に多機能蛋白質の機能単位を区切っている

呼ぶ)、両者間のアミノ酸配列のホモロジーは、

図4 ■膵臓の Kazal 型インヒビター、オボムコイド、オボインヒビターのドメインの進化関連⁽¹⁰⁾
OI はオボインヒビター、OM はオボムコイド、PSTI は膵臓の Kazal 型トリプシンインヒビター、P は祖先型の単一ドメインインヒビター。ローマ数字はドメインの番号を示している。Aはa型ドメインの、Bはb型ドメインのそれぞれ祖先型を示している。

表 1 ■ 106 種のオボムコイドのアミノ酸配列

[illegible]

5つの多形分子とニワトリのオボムコイドを加えると 106 種となる。5Aと6の間に引かれている線はドメインの始まりを示しており、イントロンの挿入位置でもある。18と19の間の線は反応中心を示している。1から5まではドメインIIとIIIの連結ペプチドであり、トリによって長さが異なっている。左端はオボムコイドが由来したトリの名が記号で示されている。

表 2 ■置換アミノ酸残基の位置と種類

6	Val Ile	
7	Asp Asn	
8	Cys	
9	Ser	
10	Glu Asp Gly	
11	Tyr His	
12	Pro	
13	Lys Arg Thr Met Gln	◆■●
14	Pro His Ser	◆■●
15	Ala Val Asp Ser Gly Glu Thr	◆■●
16	Cys	◆■●
17	Thr Pro Ser Arg Leu Met	◆■●
18	Leu Pro Met Val Gln Ser Ala Thr Lys Gly	◆■●
19	Glu Asp Leu	◆■●
20	Tyr Phe Asn Asp Leu Gln Glu His Arg	◆■●
21	Arg Met Phe Lys Val Thr Leu	◆■●
22	Pro	◆■●
23	Leu Val Ile Phe	
24	Cys	
25	Gly	
26	Ser	
27	Asp Asn	
28	Asn Ser	
29	Lys Gln Ile Glu	◆
30	Thr Ser Ile	◆
31	Tyr	
32	Gly Ser Asn Ala Asp Val Arg His	◆ ●
33	Asn Ser Asp	◆■
34	Lys Arg ₁ Glu	
35	Cys	
36	Asn Asp Ala Ser Gly Tyr	◆■●
37	Phe	
38	Cys	
39	Asn Ser	■
40	Ala	
41	Val Ala Phe	
42	Val Ala Leu ₂ Met	
43	Glu Asp Gln Lys His	
44	Ser Lys	
45	Asn Ser	
46	Gly Val	
47	Thr —	
48	Leu —	
49	Thr Ile Asn Ser	
50	Leu Val Phe	
51	Ser Arg Gly Asn	
52	His Arg Asn	
53	Phe Leu Ile	
54	Gly Glu	
55	Lys Glu Thr Gln	■
56	Cys	

シチメンチョウのオボムコイド第Ⅲドメインのアミノ酸配列を縦に、それらのアミノ酸残基の置換アミノ酸残基を横に示す。横に引かれた線は活性中心を示している。いろいろな種類の酵素と接触しているアミノ酸残基は記号で右側に記されている。
◆：ヒト白血球のエラスターゼ、■：ウシキモトリプシンA、●：*S.griseus* プロテアーゼB

同一分子内の他のドメイン間でのホモロジーよりも高い。オボインヒビターの第Ⅰ～第Ⅵドメインとオボムコイド第Ⅰ、第Ⅱドメイン(a型ドメインと呼ぶ)間のホモロジーは、同一分子中のb型ドメイン間とのホモロジーよりも高い。この事実は、オボムコイドとオボインヒビターの両分子はa型とb型の2種類のKazal型の祖先遺伝子から由来したことを示唆している(図4)。

オボムコイドの反応領域におけるアミノ酸残基の超変異性

オボムコイドの活性にとって最も重要な活性中心付近のアミノ酸配列がトリの種によって激しく変異を起こす点に興味を覚え、すでに述べたように、オボムコイド第Ⅲドメインが容易に単離されかつ一次構造の解析が比較的容易であることから、100種類をこすトリの第Ⅲドメインの一次構造の比較を試みた⁽¹¹⁾(表1)。

結果は予想通りで、反応中心、特にP₁の位置で最も激しく変異を起こしており、10種類のアミノ酸残基の置換がみられる。続いてP₂'の9種類、P₃₂'の8種類、P₄とP₃'のそれぞれ7種類と続いている(表2)。しかも、これらの位置は、記号で示されたように、プロテアーゼ分子と接触しているアミノ酸残基の位置に相当することが、3種類のプロテアーゼとシチメンチョウ第Ⅲドメイン複合体のX線解析から明らかにされ

た^(12~14)。

酵素分子の活性中心を構成するアミノ酸残基を化学修飾すると、通常その酵素活性は失われてしまう。一方、プロテアーゼインヒビターにおいては、その阻害活性の特異性を最も大きく支配する P_1 の位置にあるアミノ酸残基を人工的に変換しても、その阻害特異性が変わるだけで、阻害活性が失われることはない。つまり、プロテアーゼインヒビター分子は反応中心の変異に寛容であると考えられる。しかし、トリの種によって、オボムコイドの活性を担う反応中心のアミノ酸配列がまるで種特異性を現わすかのように振る舞うのはどうしてであろうか⁽¹⁵⁾。次の項で詳しく論じよう。

蛋白質性プロテアーゼインヒビターは中立的に進化しない

プロテアーゼインヒビターの進化を中立説の立場から説明するのは、上述の反応中心領域における超変異性の例をひとつとってみても、大変困難である。それどころか、プロテアーゼインヒビターは、今世紀の生化学を支える中心的概念である、“生命の統一性”という概念から引き出すことができる5つの一般命題にことごとく反するような構造と機能をもっている。

第1命題

非常に近縁関係にあるいろいろな種から得られた、同族の蛋白質 (orthologous protein) は、同一もしくは非常に似た機能をもつ。

この命題を前提にしている故に、いろいろな酵素の基質特異性や性質を語るとき、いちいちその酵素の起源、つまり種を明確にする必要がない。たとえば、トリプシンの基質特異性は、それがヒト由来であれウシ由来であれ、ポリペプチド中のアルギニンカリジンのカルボキシル末端側のペプチド結合を切断するという前提で、通常話が進められる。他の酵素においても同様である。ところが、オボムコイドは、すでに述べたようにトリの種類によって阻害するプロテアーゼの種類が異なっているため、上述の命題に反してその起源を述べなければ機能を規定できない。たとえばニワト

リ、シチメンチョウ、コウライキジ (ring-necked pheasant) はトリプシンインヒビターであるが、キジの一種キンケイ (golden pheasant) のそれはトリプシンを阻害しない。また逆に、ニワトリのオボムコイドはキモトリプシンインヒビターではないが、上述の他のトリではキモトリプシンを強く阻害する。

第2命題

近縁関係にある蛋白質において、構造的に、また機能的に重要な部分にあるアミノ酸残基は、いろいろな種を通じてほとんど不変であるが、構造的にまた機能的に中立な位置にあるアミノ酸残基は、比較的よく変化 (突然変異の固定) を起こしている。

この命題は、生化学者に広く信じられており、近縁関係にある蛋白質のアミノ酸配列を比較する際に、種が変わっても常に不変なアミノ酸残基は機能的に重要であり、種の変化とともに変化を起こすアミノ酸残基は大して重要でないと解釈されている。この命題があまりにも強く信じられているために、近縁関係にある蛋白質の一次構造決定を試みるのは無益であると考えられてきた。何故ならば、そんな労力を払っても、2, 3の大して重要でないアミノ酸残基の変換を見いだすのが関の山だと信じられてきたからである。

筆者らは、112種のトリオボムコイドの第Ⅲドメインのアミノ酸配列を比較し、ある位置ではアミノ酸残基は不変であるが、たとえばインヒビターにとって最も重要な P_1 の位置に相当する位置18においては10種類の異なったアミノ酸残基の置換が見られるほど激しく変化を起こしていることを見いだした⁽¹⁵⁾ (表2参照)。インヒビターの場合は、これが近縁関係にある多くの蛋白質のアミノ酸配列を比較した結果であって、第2命題に従っているようには見えない。

ここで、アミノ酸残基が不変な位置を、これら第Ⅲドメインの三次元構造に照らし合わせてみると、命題のとおり構造的に重要な位置にあるアミノ酸残基は、種をこえて保存されていることが明らかで、この意味では第2命題に従っているとい

表 3 ■ 接触領域でのアミノ酸残基の置換と非接触領域での置換が K_a^{obs} に与える影響

K_a^{obs} 比率	接触部位	非接触部位
1.0→2.5	29%	92%
2.5→10.0	23%	7%
10.0→100	29%	1%
100→10 ⁷	19%	0%
比較の数	296	96

ウシキモトリプシン A, プタエラスターゼ, *S. griseus* プロテアーゼ A と B, サテライシン (Subtilisin Carlsberg) の 5 つのプロテアーゼとの相互作用に基づいている。

える。

表 2 には, これらのインヒビターが酵素と複合体をつくる時, 酵素分子と接触するアミノ酸残基を記号で示してある。シチメンチョウの第Ⅲドメインは, *S. griseus* のプロテアーゼ B (SGPB), ヒト白血球のエラスターゼ, ウシキモトリプシンなどと複合体をつくり, その結晶解析からそれらの三次元構造が明らかにされている^(12~14)。これらの酵素はすべて, シチメンチョウの第Ⅲドメインの同じ反応中心で阻害され, 表 2 でマークしてあるアミノ酸残基はすべてこれらの同族酵素と反応する。10 個所の位置, すなわち表 2 の 13~21, 36 の位置におけるアミノ酸残基と上記の酵素分子は接触している。32, 33 の位置では 3 つのうち 2 つの酵素が接触している。これらの位置以外では 3 酵素共通にはほとんど接触していない。

表 2 で明らかのように, 酵素分子と接触する部位のアミノ酸残基ほど, 変異アミノ酸残基が多いという, おどろくべき事実が浮かびあがってきた。つまり, 10 個所の最多変異ポジションは, すべて酵素分子と接触していることが明らかとなった。

ここで一つの疑問が湧いてこよう。つまり, 本当にこれらの位置のアミノ酸残基は機能しているのだろうか。表 3 は, 接触部位と非接触部位における, アミノ酸残基に置換が起こった場合の平衡定数への影響を示したものである。非接触部位の 92% では K_a^{obs} が 1.0~2.5 くらいに変化するだけであり, 10~100 の範囲で変化するのは 1% にしかすぎない。一方, 接触部位では, 100~10⁷ の変化を起こすのは 19% にものぼる。つまり, 接触部位での変異は K_a^{obs} を大きく変化させるが, 非接触部位での変異は K_a^{obs} の値への影響は

少ないといえよう。これらの事実は, 接触部位にあるアミノ酸残基はまちがいに機能部位であることを示唆している。

第 3 命題

対立遺伝子に支配される蛋白質がともに多様な位置をもつ場合, 両蛋白質は機能的に同一である。

この命題は, 中立説の当然の帰結であって, 蛋白質の多型は固定された新しい変異体を表わしている。つまり, 中立の変化が固定されただけであるから, このアレリック蛋白質は当然機能的に同一であるはずである。

112 種のトリオボムコイドの第Ⅲドメインのアミノ酸配列を調べた結果, 5 つの多型に遭遇した。これらの 5 つの多型のうち, 1 つだけ非接触部位にあり, 他の 4 つは接触部位にあり, そのうち 2 つはなんとインヒビターの酵素特異性をきめる P₁ の位置にあることがわかった。最も保守的ではないと思われるモンテズマウズラ (montezma quail) の場合を示してみよう。

↓

	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '
L 型	Ala	Cys	Thr	Leu	Glu	Tyr	Val
S 型	Ala	Cys	Thr	Ser	Glu	Tyr	Val

両型の 5 種の酵素に対する平衡定数 K_a^{obs} の変化は, 表 4 のとおりである。すなわち, 機能的に同一であるはずの多型, L 型と S 型で, 10~10⁴ 程度の差が起こっている。ということは, 命題どおりに解釈すると, プロテアーゼインヒビターの機能はプロテアーゼを阻害することではないという結論に到達してしまう。

この問題を解くためには, 接触部位における突然変異の固定が中立変異の速度よりも速いことが証明されればよい。しかし, そのような計算を正

表 4 ■ オボムコイドの各種酵素に対する平衡定数 K_a^{obs} の変化

	キモトリ プシン	エラスタ ーゼ	サテライ シン	SGPA	SGPB
L 型	4.9×10 ³	8.7×10 ⁹	3.5×10 ¹⁰	3.2×10 ¹¹	4.2×10 ¹⁰
S 型	9.6×10 ⁵	2.8×10 ⁵	1.4×10 ⁹	2.2×10 ⁸	2.9×10 ⁸

SGPA : *S. griseus* のプロテアーゼ A
SGPB : *S. griseus* のプロテアーゼ B

しく行なうためには、信頼できる系統樹とトリの種の分岐時間についての知識が必要であるが、現在のところこれらのデータを得るのは未だ無理のようである。

しかし、近縁関係にある2つのDNAのかかなり長い部分を互いに比較することによって、同じ目的を達成することができる。もしも、接触領域における非同義語的变化が、イントロンもしくは偽遺伝子における変化または接触領域における同義語的な変化より速いことがわかれば、“接触領域における突然変異の固定が中立変異の速度よりも速い”ことが証明できる。

幸いにも、オボムコイドではないが、近縁関係にあるプロテアーゼインヒビターの遺伝子配列がセットで得られている^(16,17)。

第4命題

遺伝子のDNA配列で、コードされる領域では非コード領域よりも突然変異が固定されにくい。

第5命題

遺伝子のコード領域内では、同義語的な変化のほうが非同義的な変化よりも多いのがふつうである。

これらの命題はひろく支持され、受け入れられている。近縁関係にあるDNA配列において、非コード領域の変化の速さは、中立変異の速さや同義語的コードの変化の速さの尺度になる。

Fioretti らはウシの脾臓から、脾臓のKunitz型トリプシンインヒビター(BPTI)を単離し、脾臓インヒビターII(SI)と命名した。両インヒビターは58残基のアミノ酸残基からなり、7個所で異なっている。酵素インヒビター複合体のX線解析から、12個所のアミノ酸残基が接触しているが、上記7個のアミノ酸残基はこの12個のアミノ酸残基の中に含まれている。

続いて、これら2つのインヒビターのmRNA、cDNA配列と蛋白質のアミノ酸配列が明らかにされた^(16~18)。2つのmRNAを比べてみると、12個所で異なり、そのうち9個はコード領域にあった。これら9個のうち、たった2個だけが同義語

的な変換で、3個が非同義語的な変換でかつ接触部位にあった。これらの事実は、はっきりと中立ではなく正の自然選択を示唆している。

もうひとつの例は、マウスのコントラプシンやヒトのアルファ-1アンチキモトリプシンと類縁関係にあるラットのセルピン(serpin)の場合である^(19,20)。3つのセルピンの核酸配列が解明された。セルピンは3つの領域からなっており、領域1は互いに非常に高い相同性を示している(80~90%)。続く45ヌクレオチドからなる第2領域には、ほとんど相同性は認められない。ところが、ちょうどこの領域がセルピンの反応中心領域に相当する。つづく第3領域では、再び相同性が高くなってくる。3つのラットセルピンは第2領域で超変異性を示すことが明らかになった。

さらにHill らは、第2領域における非同義語的な置換速度は、第1、第3領域における同義語的な置換速度よりもずっと速いことを示した。しかも、マウスコントラプシンとラットspi-2.1遺伝子間の反応中心領域の分岐速度は中立変異速度の6~8倍大きいと概算した。これらの事実は、セルピンの反応中心領域における異常に速い分岐速度を説明するには、正の自然選択によるものと考えざるをえないことを示唆している⁽¹⁹⁾。

蛋白質性プロテアーゼインヒビターはどうして特異な分子進化を起こすのか

上述のように、データは強力にプロテアーゼインヒビターは正の自然選択(positive Darwinian selection)によって進化していることを示唆している。では、インヒビターはどうして異なった進化形態をとるのだろうか。

a. 進化の中立説が正しいのは、蛋白質が機能的または構造的に重要なアミノ酸残基の変換に許容性がないからである。インヒビターにおいては、機能しているアミノ酸残基の変換は、その特異性が変わるだけであり、インヒビターの機能を失うことはない。つまり、正の選択を行なわせることは、人工的、技術的に可能である。

b. 他の蛋白質が正の選択による進化を起こさないのは、もし新しく望ましい特異性を獲得して

も、元の望ましい特異性を完全に失ってしまうためと考えられる。したがって、遺伝子の重複などが新しい特異性の獲得の主なメカニズムとなるのであろう。プロテアーゼインヒビターは、この遺伝子の重複メカニズムをも活用しており、最初の機能の変換に対して、一層許容性を高めることになると思われる。

c. プロテアーゼインヒビターは昆虫や微生物などの外来の酵素の作用を止めることによってホストを防衛するという証拠があり、いろいろな種類の外来酵素に対応しなければならないと考えると、速い進化が必要になろう。見掛け上は、抗体とプロテアーゼインヒビターの間に、生体防衛という機能とともに、その活性にとって最も重要な反応中心部分のアミノ酸配列が、超変異性を示すという点で共通点があるのは大変興味深い。

*

すでに述べたように、ほとんどの蛋白質は中立的に進化し、5つの命題が適用される。しかし、若干の蛋白質は正の自然選択が主な進化的変化の原因であると考えられる。特に、プロテアーゼインヒビターはそのような蛋白質の代表的なものと考えられる。

文献

- 1) M. Kimura : *Nature*, 217, 624 (1968).
- 2) I. Kato, W. J. Kohr & M. Laskowski, Jr. : "Regulatory Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors", Vol. 47, ed. by S. Magnusson *et al.*, FEBS, Copenhagen, 1978, p. 197.
- 3) 加藤郁之進 : 蛋白質 核酸 酵素, 24, 667 (1979).
- 4) 加藤郁之進 : 蛋白質 核酸 酵素, 27, 1747 (1982).
- 5) 神奈木玲児, 村地 孝 : 蛋白質 核酸 酵素, 32, 116 (1987).
- 6) M. Laskowski, Jr. & I. Kato : *Ann. Rev. Biochem.*, Vol. 49, ed. by E. E. Snell *et al.*, Annual Reviews, Inc., Palo Alto, 1980, p. 593.
- 7) I. Kato, J. Schrodde, W. J. Kohr & M. Laskowski, Jr. : *Biochemistry*, 26, 193 (1987).
- 8) J. P. Stein, J. F. Catterall, P. Kristo, A. R. Means & B. W. O'Malley : *Cell*, 21, 681 (1980)...
- 9) M. B. Rhodes, N. Bennett & R. E. Feeney : *J. Biol. Chem.*, 235, 1686 (1960).
- 10) M. J. Scott, C. S. Huckaby, I. Kato, W. J. Kohr, M. Laskowski, Jr., M.-J. Tsai & B. W. O'Malley : *J. Biol. Chem.*, 262, 5899 (1987).
- 11) M. Laskowski, Jr. *et al.* : *Biochemistry*, 26, 202 (1987).
- 12) M. Fujinaga, R. J. Read, A. Sielocki, W. Ardelt, M. Laskowski, Jr. & M. N. G. James : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4868 (1982).

- 13) M. Fujinaga, A. R. Sielocki, R. J. Read, W. Ardelt, M. Laskowski, Jr. & M. N. G. James : *J. Mol. Biol.*, in press.
- 14) W. Bode, A.-Z. Wei, R. Huber, E. Meyer, J. Travis & S. Neuman : *EMBO J.*, 5, 2453 (1986).
- 15) M. Laskowski, Jr., I. Kato, W. J. Kohr, S. J. Park, M. Tashiro & H. E. Whatley : Cold Spring Harbor Symposium, in press (1987).
- 16) I. B. Kingston & S. Anderson : *Biochem. J.*, 233, 443 (1986).
- 17) T. E. Creighton & I. G. Charles : *J. Mol. Biol.*, 194, 11 (1987).
- 18) E. G. Fioretti, M. Lacapino, M. Angeletti, D. Barra, F. Boss & F. Ascoli : *J. Biol. Chem.*, 260, 11451 (1985).
- 19) N. D. Hill & R. E. Hastie : *Nature*, 326, 96 (1987).
- 20) J.-B. Yoon, H. C. Towle & S. Seeling : *J. Biol. Chem.*, 262, 4284 (1987).

お知らせ

昭和63年度北里大学衛生学部公開講座 組換え DNA 実験技術講習会

テーマ : 遺伝子工学の基礎技術の習得

実習項目 : ① 高分子 DNA, RNA (メッセンジャー RNA) の調製, ② プラスミドの構築, 調製と制限酵素地図の作製, ③ ハイブリダイゼーション技術, ④ メッセンジャー RNA から cDNA ライブラリーの作製と目的遺伝子の同定, ⑤ 酵素抗体法によるタンパク質の検索, ⑥ その他 (DNA 塩基配列の操作法など). なお, 期間中夕刻より数回のセミナーを開催する予定です.

開催期間 : 昭和 63 年 8 月 18 日 (木) より 8 月 31 日 (水) まで (日曜日は休み)

開催場所 : 北里大学衛生学部 (神奈川県相模原市)

受講資格 : 原則として企業に所属する理科学系の卒業生で微生物 (大腸菌など) の取扱いの経験のある方

定 員 : 40 名 (希望者多数の場合は, 抽選等により決定します)

受講料 : 100,000 円. 納入方法は受講決定者に通知致します.

応募方法 : 以下のものを郵送して下さい.

- ① 氏名, 年齢, 勤務先名 (部, 課, 係, 電話番号), 最終学歴 (学部名, 学科名), 現在の専門分野を記載した申込書 (書式自由), ② 所属長の推薦状 (書式自由), ③ 返信用ハガキ (宛名と宛先は必ず記入して下さい)

申込締切 : 昭和 63 年 6 月 30 日 (必着). なお, 受講の可否は 7 月 10 日頃に通知致します.

申込先および問合せ先 : 〒228 神奈川県相模原市北里 1-15-1 北里大学衛生学部 組換え DNA 実験技術講習会係

☎ : 0427 (78) 9408

ただし, 問合せはできるだけ往復ハガキをお願いします.