

生物学レポート

ヒトとウシのヘモグロビン α 鎖と酵素タンパク質 trypsin について

— 一次構造と高次構造を調べ比較する —

畜産学科 1年 学籍番号 00000000
氏名 藍 愛子

提出日：2012年6月27日

はじめに

レポートの課題説明に記述されていた、このレポートの課題は以下のように要約される。

『大学でそれぞれの科目を学習する大きな目的と意義は、ある学問体系の中で「何がわかっていて、何がわからないのか」、「わからないことを解き明かすためにはどうしたらよいのか」、ということ理解して習得することである。そのために専門科目では講義と実習がペアになっている。』

しかしながら教養科目の一つである、この「生物学」は講義が中心で、実習は組み込まれていない。そこで担当者は、講義の中で我々の生物学に対する興味を呼び起こし、何らかの形で学生が積極的、能動的な学習態度を身に着けさせるために、このようなレポートを課したということである。そういえば、担当者は繰り返し、**active learner** になれと叫んでいた。講義を受けているのは受け身に感じるかもしれないが、講義を聴き、メモを取り、自分なりのノートを作ることにより **active learner** になれるということだった。

今回のレポートは、積極的にデータベースを自分で調べることにより、講義の中で学習したタンパク質、翻訳、ソーティング、酵素、活性中心、異なる動物間での比較（進化）、といったトピックを学ぶことが目的である。今や、ネット上には多数のデータベースが構築されていて、多くのものは自由にそのデータを閲覧し、利用することができるそうだ。

今回、細胞が作り出すタンパク質のデータベースにアクセスしてみているいろいろなことを学べそうだと思って、真剣に取り組んだ。次のページからは、実際にどのようにしてデータを収集し、どんなことを学んだかを述べてゆく。データベースへのアクセスは自宅から 6 月 12 日深夜に行い、翌日の 13 日に図書館で分からなかったことを調べ、6 月 15 日にレポートとして完成させた。

●ヒトヘモグロビン α 鎖タンパク質

指示に従って ExPASy の下記のサイトにアクセスし、

<http://www.uniprot.org/>

Search の欄に検索語「hemoglobin human」を入力して、検索結果のリストから、求めるヒトの hemoglobin alpha subunit は P69905 なので、この数字をクリックした。その結果、次のページが表示された。

<http://www.uniprot.org/uniprot/P69905>

このページに記載された名前などの主な情報は以下のとおりである。

142 個のアミノ酸からなるが、先頭のメチオニンは切り離されて最終的な形になる。

赤血球に含まれるヘモグロビンの構成要素で、ヘモグロビン β 鎖とともに、四量体 ($2\alpha 2\beta$) となる。酸素運搬タンパク質である。たくさんの Natural variant が記載されている。これらはみな、突然変異体である。

上記ページの下の方に記載された配列データから入手したヒトの hemoglobin alpha subunit のアミノ酸配列 (一次構造) は次の通りである。先頭の赤色の M は切り離されて最終的には 141 個のアミノ酸からなる α 鎖になる。実際に酸素を結合するヘムは、59 番目と 88 番目のヒスチジン (H、水色で示している) によって上下からキレート結合によって支えられている。

```

      10      20      30      40      50      60
MVLSPADKTN VKAAWGKVG A HAGEYGAEAL ERMFLSFPTT KTYFPFDLS HGSAQVKGHG
      70      80      90     100     110     120
KKVADALTNA VAHVDDMPNA LSALSDLHAH KLRVDPVNFK LLSHCLLVTL AAHLPAEFTP
      130     140
AVHASLDKFL ASVSTVLT SK YR
```

メチオニンを切り離し、二次構造 (Secondary structure) の項にあるデータ (Details をクリック) から得た配列データを見て、 α ヘリックスを下線を引いて示した。ヘモグロビンには β ストランドはない。

10 20 30 40 50 60
VLSPADKTNV KAAWGKVGAAH AGEYGAEALE RMFLSFPTTK TYFPHFDSLH GSAQVKGHGK
 70 80 90 100 110 120
KVADALTNAV AHVDDMPNAL SALSDLHAHK LRVDPVNFKL LSHCLLVTLA AHLPAEFTPA
 130 140
VHASLDKFLA SVSTVLTSKY R

「3D strucurae databases」から PDB 登録番号を「1a00」を得て、これを次のサイトの該当箇所に入力して、次のような三次元の構造を得た。分子を回転させて、ヘムがよく見えるように位置を整えた。灰色とピンク色が α 鎖で、黄色と薄緑色は β 鎖。

<http://molvis.sdsc.edu/fgij/>

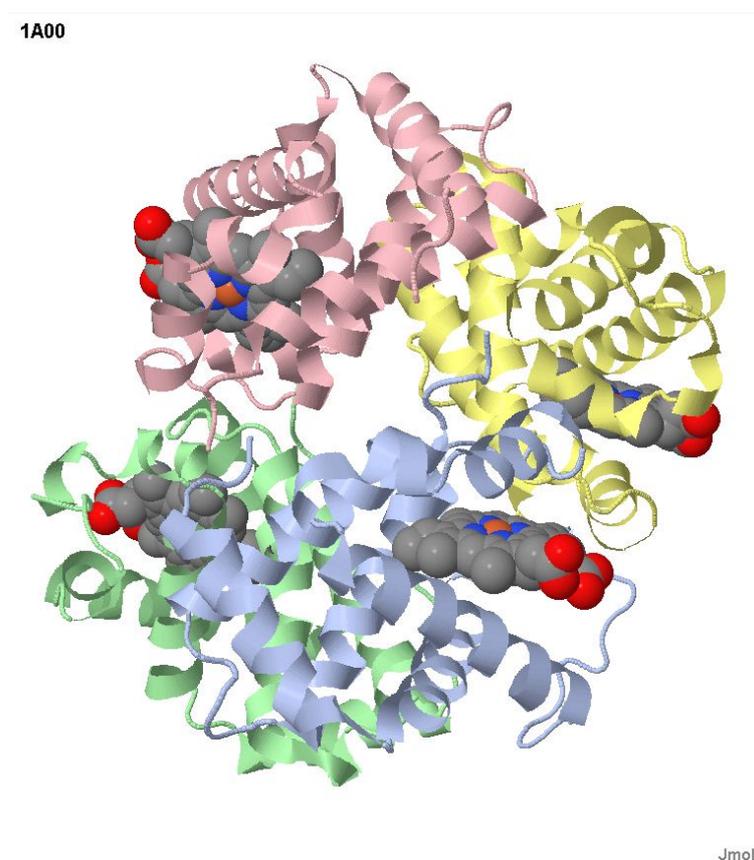


図1 ヘモグロビン ($\alpha 2\beta 2$) の立体構造。タンパク質はリボン構造で、ヘムは空間充填構造で示してある。

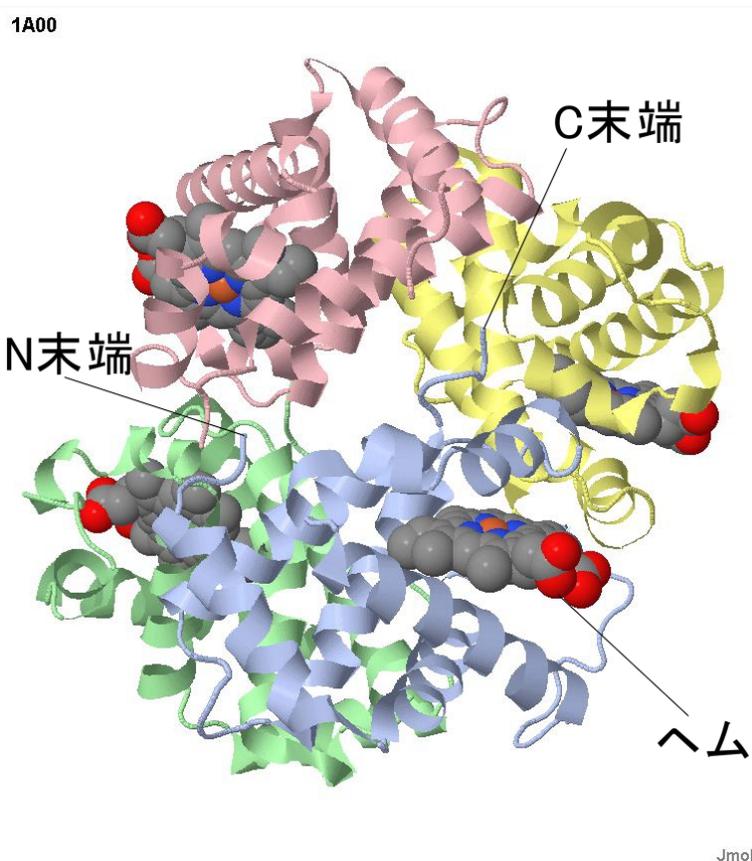


図2 図1の灰色の α 鎖のN末端とC末端およびヘムの位置を明示した。

●ウシのヘモグロビン α 鎖タンパク質

前記のタンパク質データベースから、すぐ下に登録されているウシのヘモグロビン α 鎖について調べた。

<http://www.uniprot.org/uniprot/P01966>

アミノ酸の数は142個でヒトと同じである。そのほかの記述もヒトの場合とほとんど同じである。そこでさっそくアミノ酸配列を得て、メチオニンを切り離した成熟型のタンパク質を記す。

10	20	30	40	50	60
VLSAADKGNV	KAAWGKVGGH	AAEYGAEALE	RMFLSFPTTK	TYFPFDLSH	GSAQVKHGHA
70	80	90	100	110	120
KVAAALTKAV	EHLDDLPGAL	SELSDLHAHK	LRVDPVNFKL	LSHSLLVTLA	SHLPSDFTPA
130	140				
VHASLDKFLA	NVSTVLTSKY	R			

α ヘリックスの範囲が最初の方で若干違っているが、ヒスチジンの位置は同じである。

●ヒトとウシヘモグロビン α 鎖タンパク質のアミノ酸配列と立体構造の比較
そこでヒトとブタの成熟型ペプシンのアミノ酸配列を並べて、異同を比較してみた（上の文字列を順番にコピーして並べていけばよい）。ウシで異なるアミノ酸を赤色にしてある。

	10	20	30	40	50	60
Human	MVLSPADKTN	VKAAWGKVGA	HAGEYGAEAL	ERMFLSFPTT	KTYFPHFDLS	HGSAQVKGHG
ウシ	MVLSAADKGN	VKAAWGKVG	HAAEYGAEAL	ERMFLSFPTT	KTYFPHFDLS	HGSAQVKGHG
	70	80	90	100	110	120
Human	KKVADALTN	VAHVDDMPNA	LSALSDLHAH	KLRVDPVNFK	LLSHCLLVTL	AAHLPAEFTP
ウシ	AKVAAALTKA	VEHLDDLPGA	LSELSDLHAH	KLRVDPVNFK	LLSHSLLVTL	ASHLPSDFTP
	130	140				
Human	AVHASLDKFL	ASVSTVLTSK	YR			
ウシ	AVHASLDKFL	ANVSTVLTSK	YR			

17のアミノ酸が異なっているので、11.9% (17/142x100) の違い、逆に言うと 88.1%のアミノ酸は同じである。さらにアミノ酸が異なっても、その性質は似ているものが多い（疎水性の側鎖を持つアミノ酸はやはり疎水性も持ったアミノ酸に、親水性の側鎖のものは同じく親水性に変わっている）。そのために大きな立体的な構造は変わらないものと考えられる。

そこで、三次元構造を PDB 登録番号「1fsx」として、上と同じ方法で表示した。ヒトと同じ位置関係になるように回転させた図は、次のとおりである。立体構造はほとんど変わらないことがわかる。

このようにヒトとウシでは、このタンパク質のアミノ酸配列はよく保存されていて、立体構造も大きな違いがないことがわかった。

このタンパク質は、シグナル領域が無いので、細胞内で利用される（実際は赤血球内）。

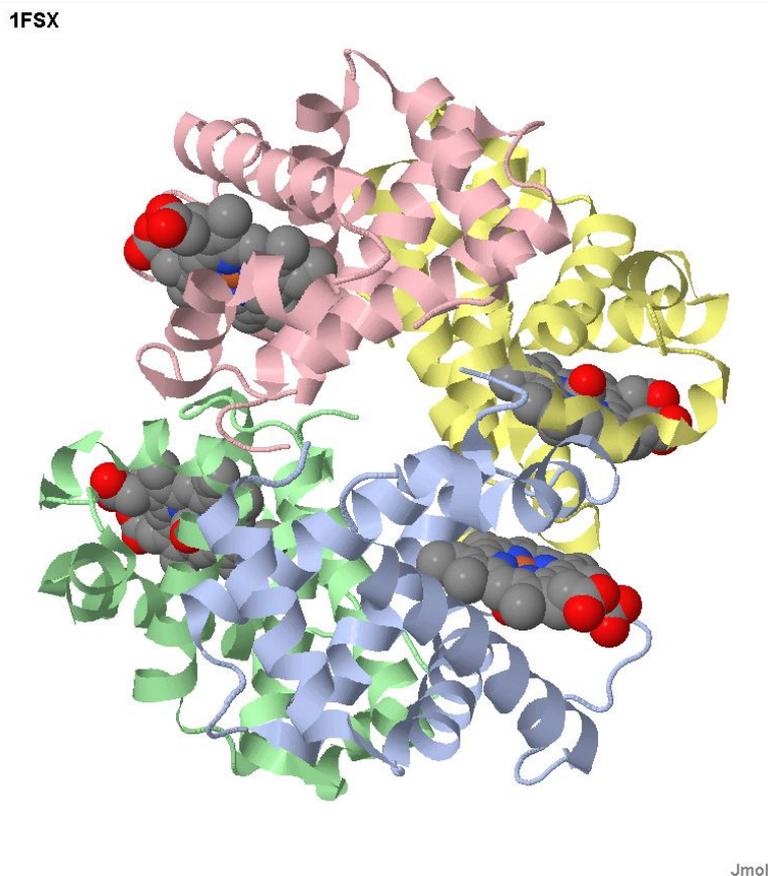


図3 ウシヘモグロビンの立体構造。図1と同じ位置から見たようにした。

●ヒト trypsin-1

分泌性のタンパク質として、この酵素タンパク質を選んだらしい。指示された通りに「trypsin-1 human」で検索して次のページを表示した。

<http://www.uniprot.org/uniprot/P07477>

ここに記されたこの酵素の概要は、アミノ酸 247 からなるが、さらに処理されて最終的な形（成熟型）になる。モノマーで働くタンパク質分解酵素で、塩基性アミノ酸であるアルギニンと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特異性を持つ。

下のほうに記載された配列データから入手したヒトの Trypsin-1 のアミノ酸配列（一次構造）は次の通りである。「Molecular processing」の項に書かれているように、先頭の茶色の 15 アミノ酸はシグナル領域、次の水色の 8 アミノ酸は切り離されるペプチド（プロペプチド）領域で、これが切り離されてアミノ酸 223 個の活性のあるトリプシンになる。活性部位のアミノ酸は 3 つで、63 番目のヒスチジン H と 107 番目のアスパラギン酸 D と 200 番目の

セリン S で、赤で示してある。

```

10      20      30      40      50      60
MNPLLIITFV AAALAAPFDD DDKIVGGYNC EENSVPYQVS LNSGYHFCGG SLINEQWVVS
70      80      90      100     110     120
AGHCYKSRIQ VRLGEHNIEV LEGNEQFINA AKIIRHPQYD RKTLLNDIML IKLSSRAVIN
130     140     150     160     170     180
ARVSTISLPT APPATGTKCL ISGWGNTASS GADYPDELQC LDAPVLSQAK CEASYPGKIT
190     200     210     220     230     240
SNMFCVGFLE GGDSCQGDS GGPVVCNGQL QGVVSWGDC AQKNKPGVYT KVYNYVKWIK
250
NTIAANS

```

上の一次配列から、先頭のシグナル配列とプロペプチドを切り離して、最終の形（成熟型）にすると、224 アミノ酸からなる次の配列となる。番号を付け直し、さらに 5 本の SS 結合（2つのシステイン残基の SH 基が-S-S-と結合したもの）を線で示した。これらの SS 結合と β シート構造が多いことによって立体構造は強固なものになっている。

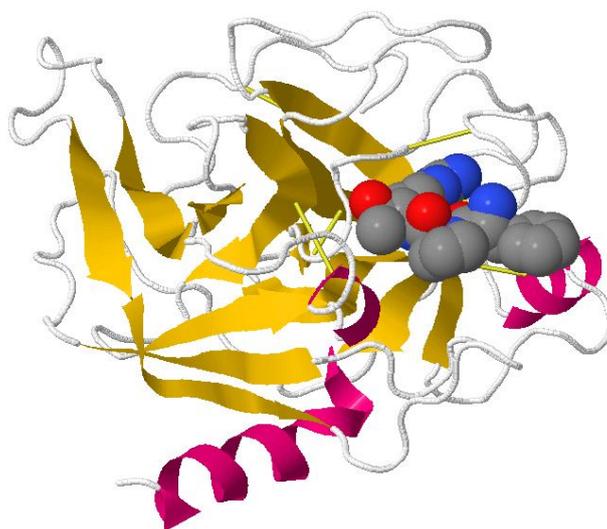
```

10      20      30      40      50      60
IVGGYNCEEN SVPYQVSLNS GYHFCGGSLI NEQWVVSAGHH CYKSRIQVRL GEHNIEVLEG
70      80      90      100     110     120
NEQFINAAKI IRHPQYDRK TLNDIMLIKL SSRAVINARV STISLPAPTP ATGTKCLISG
130     140     150     160     170     180
WGNTASSGAD YPDELQCLDA PVLSQAKCEA SYPGKITSNM FCVGFLEGGK DSCQGDSGGP
190     200     210     220     230     240
VCNGQLQGV VSWGDCAQK NKPGVYTKVY NYVKWIKNTI AANS

```

PDB 登録番号「1FXV」から次の三次元構造を得た。

1FXV



Jmol

図4 ヒトリプシンの立体構造。活性部位に阻害剤が結合した形で表されている。

● ウシ trypsin

前記のタンパク質データベースから、「trypsin bovine」を検索語にして次のページを得た。

<http://www.uniprot.org/uniprot/P00760>

ウシの場合は、アミノ酸 246 個からなるタンパク質で、アミノ酸配列（一次構造）は以下のとおりである。ヒトのものよりもアミノ酸が一つ少ない。

```
      10      20      30      40      50      60
MKTFIFLLALL GAAVAFPVDD DDKIVGGYTC GANTVPYQVS LNSGYHFCGG SLINSQWVVS
      70      80      90     100     110     120
AAHCYKSGIQ VRLGEDNINV VEGNEQFISA SKSIVHPSYN SNTLNNDIML IKLKAASLN
     130     140     150     160     170     180
SRVASISLPT SCASAGTQCL ISGWGNTKSS GTSYPDVLKC LKAPILSDSS CKSAYPGQIT
     190     200     210     220     230     240
SNMFCAGYLE GGDSCQGDS GGPVVCCKGL QGIVSWGSGC AQKNKPGVYT KVCNYVSWIK
     250
QTIASN
```

翻訳直後の分子ではアミノ酸の数が一つ少ないが、分子のプロセッシングの項目を見てみると、シグナルペプチドは 17、プロペプチドは 6 個となっていて、やはり成熟型タンパク質でもアミノ酸は一つ少ない。

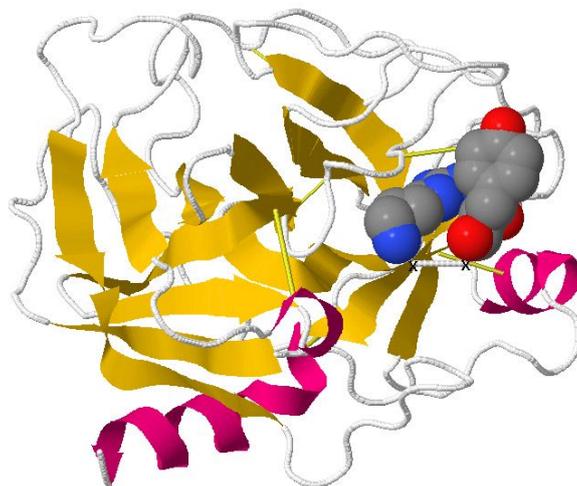
●ヒトとウシ Glucokinase のアミノ酸配列の比較

ヘモグロビン α の場合と同じように、ヒトとウシのトリプシンのアミノ酸配列の比較を行ってみた。今度は翻訳直後の配列を比較してみる。

	10	20	30	40	50	60
Human	<u>MN</u> PLLI <u>L</u> ITFV AAALAAPFDD DDKIVGGYNC EENSVPYQVS LNSGYHFCGG SLINEQWVVS					
Bovine	<u>MKT</u> FIFL <u>L</u> GA <u>AV</u> AF <u>P</u> VDD DDKIVGGY <u>T</u> C <u>G</u> ANTVPYQVS LNSGYHFCGG SLINSQWVVS					
	70	80	90	100	110	120
Human	AG <u>H</u> CYKSRIQ VRLGEHNIEV LEGNEQFINA AKIIRHPQYD RKT <u>L</u> ND <u>I</u> ML IKLSSRAVIN					
Bovine	<u>AA</u> H <u>C</u> YK <u>S</u> G <u>I</u> Q VRLGED <u>N</u> I <u>N</u> V <u>V</u> EGNEQFIS <u>A</u> <u>S</u> KSIV <u>H</u> PS <u>Y</u> N <u>S</u> NTLND <u>I</u> ML IKL <u>K</u> SA <u>A</u> SLN					
	130	140	150	160	170	180
Human	ARVSTISLPT APPATGTKCL ISGWGNTASS GADYPDELQC LDAPVLSQAK CEASYPGKIT					
Bovine	<u>S</u> R <u>V</u> A <u>S</u> ISLPT <u>S</u> CASAGT <u>Q</u> CL ISGWGNT <u>K</u> SS <u>G</u> T <u>S</u> Y <u>P</u> D <u>V</u> L <u>K</u> C <u>L</u> K <u>A</u> P <u>I</u> L <u>S</u> D <u>S</u> S <u>C</u> K <u>S</u> A <u>Y</u> P <u>G</u> QIT					
	190	200	210	220	230	240
Human	SNMFCVGFLE GGDSCQGD <u>S</u> GGPVVCNGQL QGVVSWGDC AQKNKPGVYT KVYNYVKWIK					
Bovine	SNMFC <u>A</u> G <u>Y</u> LE GGDSCQGD <u>S</u> GGPVVC <u>S</u> G <u>K</u> L <u>Q</u> G <u>I</u> V <u>S</u> WG <u>S</u> GC AQKNKPGVYT KVC <u>N</u> Y <u>V</u> SWIK					
	250					
	NTIAANS					
	<u>Q</u> TI- <u>A</u> SN					

下線を引いたアミノ酸が異なっているが、実際の酵素本体である 24 番目以降だけに注目してその配列の違いを数えると、23.3% (52/223x100) の違い、逆に言うと 76.7% のアミノ酸は同じであるので、ヘモグロビン α よりもアミノ酸の一次構造の違いは大きい (動物による変異が多い) ことになる。しかしながら、活性部位の 3 つのアミノ酸とその周辺はほぼ同じアミノ酸配列である。そこでウシのトリプシンの PDB として 1AQ7 を選び立体構造を比較した。

1AQ7



Jmol

図5 ウシのトリプシンの立体構造。これも活性部位に阻害剤が結合している。

アミノ酸配列の相同性はヘモグロビンよりも低かったが、立体構造は良く似ていることが分かる。このような立体構造をとることにより、上に述べた活性部位を形作る3つのアミノ酸、3番目のヒスチジンH、107番目のアスパラギン酸D、200番目のセリンSがお互いに近づき、電子の流れが起こってセリンに供給され、このセリンの余分な電子がペプチド結合を切断する役割をはたす。セリンを含むこのようなはたらきをする酵素のグループを、セリンプロテアーゼファミリーと呼び、キモトリプシンやトロンビンもそのうちの一つである。

このタンパク質はシグナル領域があるので分泌性で、細胞の外に出されるタンパク質である。実際には膵臓でつくられ、顆粒に貯えられ、消化管内へ分泌される。その後先頭の部分が切り離され、活性型の酵素になる。

さらにもう少し分類学的に離れた動物のこれらのタンパク質のアミノ酸配列の比較をしてみると面白いかもしれないと思った。今回は時間がなかったので、夏休みを利用して、もう一度チャレンジしてみようと思っている。ネット上にある情報から、これまで生物学で習ったことの、いろいろな側面が見えてくるようで、興味深かった。

(レポート終わり、表紙を除き10枚)