

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2004～2009

課題番号：16087205

研究課題名（和文）超分子ヘモグロビンの構造とナノ組織化機構の解明

研究課題名（英文）Structure and organization of nano-sized giant hemoglobin

研究代表者

福森 義宏 (FUKUMORI YOSHIHIRO)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：60135655

研究成果の概要（和文）：海産無脊椎動物 *Oligobranchia mashikoi* は酸素と硫化水素を同時に運搬するという特徴的な生物学的機能を有する細胞外巨大ヘモグロビンを持つ。本研究では、分子量約45万の細胞外巨大ヘモグロビンの酸素結合型の立体構造をX線結晶構造解析により決定した。さらに、同巨大ヘモグロビンの酸素非結合型の立体構造も決定し、酸素結合型立体構造との比較により、哺乳類ヘモグロビンとは異なる酸素協同性の分子機構を提案した。

研究成果の概要（英文）：A marine invertebrate, *Oligobranchia mashikoi*, has a novel extracellular giant hemoglobin which transports oxygen and sulfide simultaneously. In the present study, we determined the crystal structures of a 400-kDa Hb oxy form and deoxy form by X-ray crystallographic analyses and proposed the new mechanism on oxygen cooperativity which is quite different from those of the well-studied mammalian Hbs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	8,300,000	0	8,300,000
2005年度	17,000,000	0	17,000,000
2006年度	15,100,000	0	15,100,000
2007年度	14,600,000	0	14,600,000
2008年度	10,500,000	0	10,500,000
2009年度	10,500,000	0	10,500,000
総計	76,000,000	0	76,000,000

研究分野：生物化学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：巨大ヘモグロビン，立体構造，協同性，有鬚動物，超分子複合体

1. 研究開始当初の背景

能登半島九十九湾には、世界的にも貴重な動物である *O. mashikoi* が水深 25m 付近の硫化物に富む泥中に生息している。この動物は

深海 2000～3000m の熱水噴出口付近で生息しているチューブワームと同じ有鬚動物門に属し、体内に共生する化学合成独立栄養細菌が合成した有機物を利用することにより、第一次生産者が生存できない環境でも生育に

必要なエネルギーを獲得することができる。*O. mashikoi* 巨大ヘモグロビンは宿主ミトコンドリアの酸素呼吸に必要な酸素と共生細菌が呼吸基質として必要とする硫化水素を同時に運ぶ分子量約 450,000 の超分子複合体であり、グロビタンパク質で構成されている。このような小さなタンパク質分子が集合して巨大な複合体を形成することにより、硫化水素という動物には猛毒な低分子を酸素と同時に運搬するという極めて特徴的な生物機能を発現することができ、その構造機能相関や構造形成に大変興味を持たれるが、その解明のためには、巨大ヘモグロビンの立体構造が必要不可欠な情報である。

2. 研究の目的

海産無脊椎有鬚（ゆうしゅ）動物 *O. mashikoi* や *Lameribrachia satsuma* は酸素と硫化水素を同時に運搬するという極めて特徴的な生物学的機能を有する巨大ヘモグロビンを持つ。この超分子複合体はヒトのヘモグロビンとは全く異なり、分子量が約 450,000 と約 4,000,000 であり、その大きさは 10~30nm に達する。本研究の目的は、これらのナノサイズ超分子複合体の立体構造を高分解能 X 線結晶構造解析により明らかにし、その構造機能相関を解明すること、および、その細胞内構造形成の機構を *in vitro* において解明することである。

3. 研究の方法

試料の収集：発表論文 10 の方法
蛋白質の精製：発表論文 10 の方法
結晶化条件の検討：発表論文 11 の方法
X 線結晶構造解析：発表論文 12 の方法

4. 研究成果

(1) *O. mashikoi* 巨大ヘモグロビンの全グロビン鎖のアミノ酸配列の決定

4 種類のグロビン鎖のアミノ酸配列を c-DNA の塩基配列から推定した。具体的には、まず、SDS 電気泳動により、アミノ酸配列未知のグロビン鎖を精製し、その N 末端アミノ酸配列（約 20 残基）を決定した。得られたアミノ酸配列から PCR 用のプライマーを設計し、その cDNA を鋳型として RT-PCR を行い、目的のグロビン鎖の塩基配列を決定した。

(2) *O. mashikoi* 巨大ヘモグロビンの 2.85 Å 分解能 X 線結晶構造解析

精製した巨大ヘモグロビンの結晶化条件

を蒸気拡散法により検討した。その結果、放射光施設での X 線回折実験により、最大で 2.7 Å 分解能を示す結晶を得ることができた。そこで、Hg 等による重原子同型置換体の作成条件を検討し、ナノサイズの超分子複合体の原子レベルの構造解析をおこない、2.85 Å 分解能の立体構造を明らかにすることができた。

O. mashikoi 巨大ヘモグロビンは、4 種類のグロビン鎖から構成されるユニットを単位とし、それが 6 量体を形成していた。また、各グロビン鎖は分子内ジスルフィド結合を有し、さらに、隣接するユニットのグロビン鎖間の分子間ジスルフィド結合により超分子構造が保持されていることが明らかとなった。

一方、硫化水素結合部位については、重原子同型置換体の Hg がジスルフィド結合を形成していない Cys 残基に結合し、その周囲が Phe や Ile, Leu の疎水性アミノ酸残基に取り囲まれていたことから、硫化水素は Cys 残基と persulfide を形成することが示唆された。

(3) *O. mashikoi* 巨大ヘモグロビンの 1.95 Å 分解能 X 線結晶構造解析

O. mashikoi 巨大ヘモグロビンの立体構造の分解能 (2.85 Å) を向上させるために、結晶化条件を詳細に再検討したところ、200mM MES-NaOH (pH6.0), 24%PEG10,000, 20%glycerol で得られた結晶は 1.95 Å の分解能を示すことを確認し、精密な巨大ヘモグロビン立体構造を明らかにすることができた。その結果、2.85 Å 分解能の立体構造では、解決できなかった B1 グロビン鎖の電子密度マップと数個のアミノ酸との不一致やジスルフィド結合の曖昧さを、すべて解決することができた。さらに、この構造では、A1 グロビン鎖のヘムには酸素が配位していたが、他の 3 種類のグロビン鎖のヘムには、何も配位していない deoxy 型（一部のヘムは oxy 型）であることがわかった。

(4) *O. mashikoi* 巨大ヘモグロビンの酸素協同性

O. mashikoi 巨大ヘモグロビンの酸素協同性について信頼できる高精度のデータを得るため、今井式酸素平衡曲線自動記録装置を用いて、 P_{50} と n_{max} を求めた。その結果、 $P_{50}=1.3$, $n=1.4$ となった。しかしながら、巨大ヘモグロビンが酸素運搬体として機能するためには、酸素協同性は必須な性質である。そこで、この巨大ヘモグロビンがヒトヘモグロビンとは異なり血管中の血漿に直接溶解していることを考慮し、血液の構成成分、特に金属イオンの定量分析を行い、それらの酸素協同性と酸素親和性に及ぼす影響を検討した。その結果、血漿中には、 Ca^{2+} と Mg^{2+} が約 40-60mM と高濃度存在し、両金属イオンは、

酸素親和性と酸素協同性を上昇させる (50mM CaCl_2 : P_{50} =0.25, n =2.3 50mM MgCl_2 : P_{50} =0.52, n =2.4) ことを見出した。

(5) 金属結合型 *O. mashikoi* 巨大ヘモグロビンの 1.7 Å および 1.6 Å 分解能の X 線結晶構造解析と立体構造に基づく酸素協同性機構の解明

上記 4 の実験結果より、*O. mashikoi* 巨大ヘモグロビンには Ca^{2+} や Mg^{2+} が結合する可能性が示唆された。そこで、 Mg^{2+} および Ca^{2+} 結合型の結晶を調製し、その立体構造の解明を試みたところ、それぞれ 1.7 Å, 1.6 Å 分解能で立体構造を世界で初めて決定することができた。その結果によれば、 Mg^{2+} , Ca^{2+} の結合サイトはすべてグロビン鎖間の境界に位置しており、酸素結合型構造の安定化に寄与していることが示唆された。特に、同定できた Mg^{2+} の結合サイトは Hb 4 量体あたり 1 箇所のみであったが、 Ca^{2+} の結合サイトは 3 箇所であったことから、 Ca^{2+} のほうがより酸素結合型構造を安定化させると考えられ、上記 4 の実験結果と一致した。

(6) *O. mashikoi* 巨大ヘモグロビンの立体構造に基づく酸素協同性機構の解明

上記 3 のとおり、環形動物の巨大ヘモグロビンとしては初めて、一部のサブユニットがリガンド非結合型となっている結晶構造の解析に成功した。この立体構造は、酸素結合型と比較して構造の変化が認められ、ヘムを含めた EF ダイマー間の接触部位での構造変化が協同性の機構に重要な役割を果たしていることが明らかになった。脊椎動物ヘモグロビンと同様に巨大ヘモグロビンにおいても、ヘム平面はリガンド非結合時に折れ曲がっており、酸素結合時にはよりきれいな平面状になっている。このヘムの構造変化が、EF ダイマーの隣の F3' (His/Arg), F7' (Gln) 残基を介して隣の F' ヘリックスに伝えられ (ここでは、「'」は隣のサブユニットであることを示す)、このヘリックスに配位しているヘムの distal pocket の環境に影響を与えていることが示唆された。すなわち F' ヘリックスの動きにより、ヘムと Val E11' および His E7' との位置関係の変化を引き起こし、リガンド分子の結合に影響を与える機構が解明された。

(7) *O. mashikoi* 巨大ヘモグロビンの生合成部位の同定

O. mashikoi 巨大ヘモグロビン生合成部位を明らかにした。ヘモグロビンの生合成部位を同定するために、グロビン鎖 A2 遺伝子の塩基配列から RNA プローブを作成し、*in situ* hybridisation を行った。その結果、ヘモグロビンの遺伝子は、バクテリオサイトが

含まれる組織-栄養体-の体腔膜と心臓小体で強く発現していることが確認された。このことは、巨大ヘモグロビンは一度体腔液中に分泌された後、何らかの機構により血管に運ばれることを示唆する。

(8) *Lameribrachia satsuma* 巨大ヘモグロビンの X 線結晶構造解析

L. satsuma の V1 ヘモグロビン (分子量約 400 万) の立体構造を明らかにするために、それを構成する 4 種類のグロビン鎖のアミノ酸配列を cDNA の塩基配列から推定した。その結果、近位のヒスチジンや遠位のヒスチジンなどグロビン鎖に特徴的なアミノ酸残基や、細胞外巨大ヘモグロビンを持つ生物に特徴的な分子内と分子間の S-S 結合に使われるシステインが保存されていた。さらに、硫化物の結合部位とされるフリーのシステインも保存されていることも確認された。また、巨大 V1 ヘモグロビン (分子量約 400 万) はリンカー鎖に糖鎖が結合していることを示唆されたので、その糖鎖の構造を決定した。その結果、糖鎖は 2 種類存在することが確認された。さらに、X 線結晶構造解析の為に結晶を調製し、X 線回折実験を行った。その結果、最大で 4 Å 分解能の回折点を確認することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. 沼本修孝, 中川太郎, 福森義宏, 三木邦夫 巨大ヘモグロビンの構造と機能, 日本血液代替物学会誌「人工血液」, 16, 188-197, 2008.
2. Aida, M., M. Kanemori, Kubota, N., Matada, M., Sasayama, Fukumori, Y. Distribution and population of free-living cells related to endosymbiont a harbored in *Oligobrachia mashikoi* (a Siboglinid Polychaete) inhabiting Tsukumo Bay. *Microbes and Environments*, 23, 81-88, 2008. 査読有
3. Numoto, N., Nakagawa, T., Kita, A., Sasayama, Y., Fukumori, Y., and Miki, K. Structure of the partially unliganded met state of 400 kDa hemoglobin: Insights into ligand-induced structural changes of giant hemoglobins. *Proteins*, 73, 113-125, 2008. 査読有
4. Numoto, N., Nakagawa, T., Kita, A., Sasayama, Y., Fukumori, Y., and Miki, K. Structural basis for the heterotropic and homotropic interactions of invertebrate giant hemoglobin. *Biochemistry*, 47, 11231-11238, 2008. 査読有

5. Aki, Y., Nakagawa, T., Nagai, Y., Sasayama, Y., Fukumori, Y. and K. Imai, Oxygenation Properties of Extracellular Giant Hemoglobin from *Oligobranchia mashikoi*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 360, 673-678, 2007. 査読有
6. Kubota N, Kanemori M, Sasayama Y, Aida M, Fukumori Y. Identification of endosymbionts in *Oligobranchia mashikoi* (Siboglinidae, Annelida) *Microbes and Environments*, 22(2), 136-144, 2007. 査読有
7. Deguchi, M, Kubota, N, Matsuno, A, Kanemori, M, Fukumori Y. Sasayama Y Actual distribution of bacteriocytes in the trophosome of a beard worm (*Oligobranchia mashikoi*, Siboglinidae, Annelida): Clarification using whole-mount in situ hybridization. *Acta Zoologica*, 88, 129-135, 2007. 査読有
8. Sasayama Y., Higashide Y., Sakai M., Tatada M., and Fukumori Y. Relationship between the lifestyle of a Siboglinid (Pogonophoran) polychaete, *Oligobranchia mashikoi*, and the total sulfide and nitrogen levels in its habitat. *Zoolog Sci.*, 24, 131-136, 2007. 査読有
9. 沼本修孝, 福森義宏, 三木邦夫 巨大ヘモグロビンの謎に迫る-X線結晶構造解析で構造と機能を解き明かせ! 化学, 61, 30-34, 2006.
10. T. Nakagawa, S. Onoda, M. Kanemori, Y. Sasayama and Y. Fukumori Purification, characterization and sequence analyses of the extracellular giant hemoglobin from *Oligobranchia mashikoi*. *Zool. Sci.* 22, 283-291, 2005. 査読有
11. Numoto, N., Nakagawa, T., Kita, A., Sasayama, Y., Fukumori, Y. and Miki, K., Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of extracellular giant hemoglobin from pogonophoran *Oligobranchia mashikoi*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1750, 173-176, 2005. 査読有
12. Numoto, N., Nakagawa, T., Kita, A., Sasayama, Y., Fukumori, Y. and Miki, K., Structure of an extracellular giant hemoglobin of the gutless beard worm *Oligobranchia mashikoi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 14521-14526, 2005. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. 沼本修孝, 中川太郎, 福森義宏, 三木邦夫,

サツマハオリムシ V2 巨大ヘモグロビン (分子量 40 万) の結晶構造, 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 31 日, アスティ徳島 (徳島).

2. 沼本修孝, 中川太郎, 福森義宏, 三木邦夫, サツマハオリムシ V2 ヘモグロビンの X 線結晶構造解析, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 22 日, 神戸ポートアイランド (兵庫).

3. 沼本修孝, 中川太郎, 喜田昭子, 笹山雄一, 福森義宏, 三木邦夫, 巨大ヘモグロビン (400 kDa) のリガンド結合に伴う協同的な構造変化, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 2009 年 5 月 22 日, 熊本全日空ホテルニュースカイ (熊本).

4. 沼本修孝, 中川太郎, 福森義宏, 三木邦夫, 環形動物巨大ヘモグロビン (分子量 360 万) の 5.6 Å 分解能 X 線結晶構造解析, 第 31 回秘本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会, 2008 年 12 月 12 日, 神戸ポートアイランド (兵庫).

5. 沼本修孝, 中川太郎, 福森義宏, 三木邦夫, サツマハオリムシ巨大ヘモグロビン (分子量 360 万) の 5.6 Å 分解能結晶構造, 第 46 回日本生物物理学会年会, 2008 年 12 月 3 日, 福岡国際会議場 (福岡).

6. Nobutaka Numoto, Taro Nakagawa, Akiko Kita, Yuichi Sasayama, Yoshihiro Fukumori, Kunio Miki, Ligand-induced structural changes of giant hemoglobin, XXI Congress and General Assembly of the International Union of Crystallography, invited lecture for Microsymposia "Large macromolecular complexes", August 24, 2008, Osaka International Convention Center (Japan).

7. 沼本修孝, 中川太郎, 喜田昭子, 笹山雄一, 福森義宏, 三木邦夫, 無脊椎動物巨大ヘモグロビンの高分解能結晶構造, 第 21 回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 2008 年 1 月 14 日, 立命館大学 (滋賀).

8. 沼本修孝, 中川太郎, 喜田昭子, 笹山雄一, 福森義宏, 三木邦夫, マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの金属結合型結晶構造, 第 7 回日本蛋白質科学会年会, 2007 年 5 月 24 日, 仙台国際センター (仙台).

9. Nobutaka Numoto, Taro Nakagawa, Akiko Kita, Yuichi Sasayama, Yoshihiro Fukumori, Kunio Miki, Crystal Structure of Extracellular Giant Hemoglobin of Pogonophoran *Oligobranchia mashikoi*, The 7th Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA' 06/CrSJ), November 22, 2006, Epochal Tsukuba, (Japan).

10. 沼本修孝, 中川太郎, 喜田昭子, 笹山雄一, 福森義宏, 三木邦夫, マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの一部酸素結合型結晶構造, 第 6 回日本蛋白質科学会年会, 2006 年 4 月

- 26 日, 国立京都国際会館 (京都).
11. 沼本修孝, 中川太郎, 喜田昭子, 笹山雄一, 福森義宏, 三木邦夫, 巨大ヘモグロビンの分子会合機構, 第 43 回日本生物物理学会年会, 2005 年 11 月 25 日, 札幌コンベンションセンター (北海道).
12. Nobutaka Numoto, Taro Nakagawa, Akiko Kita, Yuichi Sasayama, Yoshihiro Fukumori, Kunio Miki, Structure of a giant hemoglobin of the gutless beard worm *Oligobranchia mashikoi*, XX Congress of the International Union of Crystallography, August 28, 2005, Fortezza da Basso (Italy).
13. 沼本修孝, 中川太郎, 喜田昭子, 笹山雄一, 福森義宏, 三木邦夫, マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの結晶構造, 第 5 回日本蛋白質科学会年会, 2005 年 6 月 30 日, 福岡国際会議場 (福岡).
14. Nobutaka Numoto, Taro Nakagawa, Akiko Kita, Yoshihiro Fukumori, Kunio Miki, Crystallographic Study of Multi Hemoglobin System from *Oligobranchia mashikoi*, The 1st Pacific-Rim International Conference on Protein Science, April 17-18, 2004, Pacifico Yokohama (Japan).

[その他]

ホームページ等

<http://pronet.s.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福森 義宏 (FUKUMORI YOSHIHIRO)
金沢大学・自然システム学系・教授
研究者番号 : 60135655

(2) 連携研究者

沼本 修孝 (NUMOTO NOBUTAKA)
京都大学・原子炉実験所・助教
研究者番号 : 20378582