

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06229

研究課題名（和文）頭足類酸素運搬タンパク質ヘモシアニンの会合体形成における修飾糖鎖の関与

研究課題名（英文）Role of glycosylation in assembly of supermolecule squid hemocyanin.

研究代表者

加藤 早苗（KATO, SANAE）

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・准教授

研究者番号：80291061

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：頭足類の血は青い。その主成分である細胞外酸素運搬タンパク質ヘモシアニンはサブユニット10量体を基本構造とする分子量3.8 Mの超巨大会合体分子であり、自然界で最大のタンパク質分子のひとつに挙げられる。本研究では、この分子の修飾糖鎖が会合体分子形成に必要であることを明らかにした。さらに、会合体分子の構造安定性はタンパク質濃度によって変わり、分子構造、および生理機能がフレキシブルに変化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、ヘモシアニン会合体形成に修飾糖鎖が必要であるとの研究成果を得た。このことは、タンパク質分子の立体構造構築に修飾糖鎖が直接的に関与するエビデンスであり、タンパク質分子の構造生物学において意義深い。また、生命維持に必須な酸素運搬体である超巨大タンパク質会合体の構造安定性が分子クラウディングの影響と受けるとの研究成果は、無脊椎動物のタンパク質の生体内代謝に関する新たな知見である。

研究成果の概要（英文）：Cephalopod hemolymph is blue. Its main component, the extracellular oxygen-carrying protein hemocyanin, is a super molecule with a molecular weight of 3.8 M based on a subunit decamer. In this study, we found that the N-glycans of this molecule are required for the formation of the super molecule assembly. Furthermore, the structural stability of the super molecule depends on the protein concentration, suggesting that the molecular structure and physiological functions of the super molecule change flexibly.

研究分野：生化学

キーワード：タンパク質 ヘモシアニン 会合体 サブユニット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭足類の血は青い。その主成分である細胞外酸素運搬タンパク質ヘモシアニンはサブユニット 10 量体を基本構造とする超巨大会合体分子であり、自然界で最大のタンパク質分子のひとつに挙げられる。

研究代表者は国内外の研究者と共同で、頭足類スルメイカ会合体分子の構造を明らかにした。図 1 にイカヘモシアニン会合体分子構造 (アミノ酸総数 33,140、分子量 3.8 MDa) を示す。酸素結合部位 1 つを含む機能ドメインが 8 個連なってサブユニットを構成する。10 個のサブユニットが会合して、分子を形成する。10 量体分子の成り立ちは以下のとおりである。すなわち、2 個のサブユニットがペアとなってサブユニット 2 量体を形成し、続いて 5 個のサブユニット 2 量体が互いに会合し、シリンダー形の会合体分子を形成する。会合体分子の結晶構造において、50 本の修飾糖鎖が検出されており、これらはサブユニット 2 量体どうしの境界上の 2 か所 (図 1 の○部位) に 5 本ずつ局在していた。つまり、サブユニット 2 量体の両隣りの境界上に糖鎖局在部位が 4 か所 (修飾糖鎖は 5 本×4 か所=20 本) あることとなる。このため、ヘモシアニンの超巨大会合体形成に修飾糖鎖が直接関与しているのではないかと推測した。

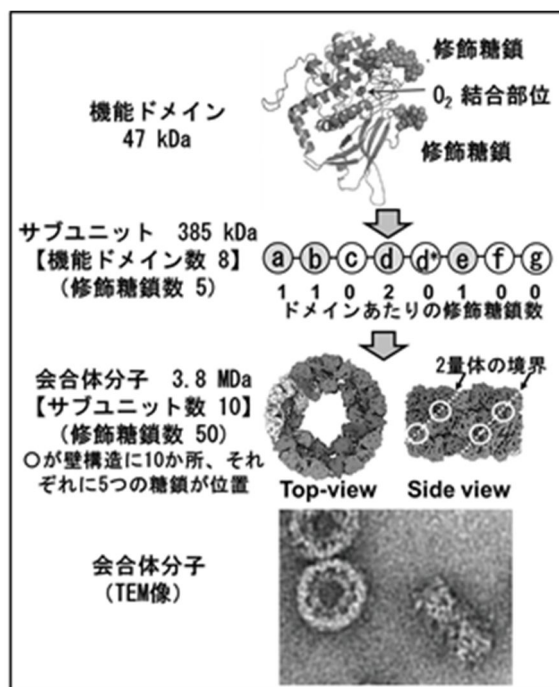


図 1 イカヘモシアニン会合体分子構造

2. 研究の目的

本研究では、修飾糖鎖が会合体形成に必要であることを証明し、会合体分子における修飾糖鎖間あるいは修飾糖鎖 - タンパク質間の相互作用の実態解明をめざした。特に、以下の 2 点について明らかにすることをめざした。

修飾糖鎖が会合体形成に必要であるか否か

修飾糖鎖間あるいは糖鎖とタンパク質間の相互作用の実態

3. 研究の方法

- 1 脱グリコシル化したサブユニットの会合体形成能の検討

アオリイカヘモシアニンをグリコシダーゼ処理し、段階的に脱グリコシル化したサブユニットを調製し、その会合体形成能を透過型電子顕微鏡観察および超遠心分析により検討する。脱グリコシルの度合いと会合体形成能の比較から、会合体形成に必要な糖鎖数 (割合) を予測する。脱グリコシルの度合いは糖鎖分析および糖染色 SDS-PAGE から確認する。予備実験では、ほぼ全ての糖鎖を除去したサブユニットは会合体形成しないことを確認している。

- 2 修飾糖鎖分析

頭足類ヘモシアニンの修飾糖鎖分析を行う。十腕目 (イカ類) はアオリイカ、コウイカ、八腕目 (タコ類) はマダコのヘモシアニンを分析試料とし、糖鎖構造の共通性を検討する。既にスルメイカヘモシアニンの糖鎖分析に着手しており、基本的実験方法は確認済である。

【2年目以降】

- 1 修飾糖鎖間あるいは糖鎖 - タンパク質間の相互作用測定

糖鎖プローブを用いた ELISA 様方法を用いて、アオリイカヘモシアニン糖鎖のアフィニティアッセイを行う。(A)ヘモシアニンサブユニットあるいは(B)ヘモシアニンのグリコシダーゼ処理から得た糖鎖をコーティングしたプレートに希釈倍率を変えたビオチン標識糖鎖プローブを反応させ、プローブ結合のアフィニティ測定を行う。プローブ糖鎖の種類は - 2 の糖鎖分析結果を基にして選択する。アフィニティの強さが A > B の場合は修飾糖鎖間の相互作用、A < B の場合は糖鎖 - タンパク質間の相互作用を推測できる。

- 2 添加糖による会合体解離の検討

アオリイカヘモシアニン溶液に糖を添加し、会合体の解離の有無とその速さを検討する。解離を引き起こす添加糖の濃度依存性から、添加糖による会合体形成の競合的阻害の有無を検討する。添加糖は一般的な単糖に加え、¹の結果から選択する。予備実験により、数 mM のグルコース添加により会合体は速やかに完全解離することを確認している。

4. 研究成果

本研究の主な成果

(1) 修飾糖鎖は会合体形成に必要であることを明らかにした。

脱グリコシル化したサブユニットは会合体形成能を失った。

イカヘモシアニンをグリコシダーゼ処理し、脱グリコシル化したサブユニットの調製を試みた。会合体形成状態でグリコシダーゼ処理を行ったところ、効率的な脱グリコシル化が進行しなかった。このため会合体における糖鎖はフリーな構造ではなく、近隣の糖鎖どうしが相互作用し合い、立体構造障害によってグリコシダーゼ消化を受けにくいことが示唆された。

次いで、会合体をサブユニットに解離させた状態でグリコシダーゼ処理を行ったところ、効率的に脱グリコシル化が進行した。ほぼ全ての糖鎖を除去したサブユニットの会合体形成能を透過型電子顕微鏡(TEM)観察により検討したところ、会合体形成能を失うことを確認した。

糖添加により会合体分子はサブユニット 2 量体へ解離した。

会合体溶液に糖を添加した時の分子会合状態を TEM 観察により検討した。主な結果を図 2 に示す。二価カチオン存在下では会合体分子構造は安定で、シリンダー形の 10 量体構造が観察された(図 2 左)。この会合体分子にグルコースを添加すると、速やかに会合体分子は解離し、サブユニット 2 量体が生成した(図 2 中央)。なお、二価カチオン非存在下における会合体構造は非常に不安定で、速やかに会合体の解離が起こるが、この場合はサブユニット 2 量体を経てサブユニット単量体まで完全解離した(図 2 右)。すなわち、グルコース添加による会合体解離と二価カチオン非存在による会合体解離の機序は共通していないこと、すなわち、糖と二価カチオンの会合体構造安定への寄与は異なるメカニズムによることであることが示唆された。

添加する糖は還元糖あるいは非還元糖に関わらず会合体解離を引き起こした。また、単糖類および二糖類について、糖の種類を変えて添加実験を行ったが、いずれの糖を添加した場合でも会合体の解離が認められた。

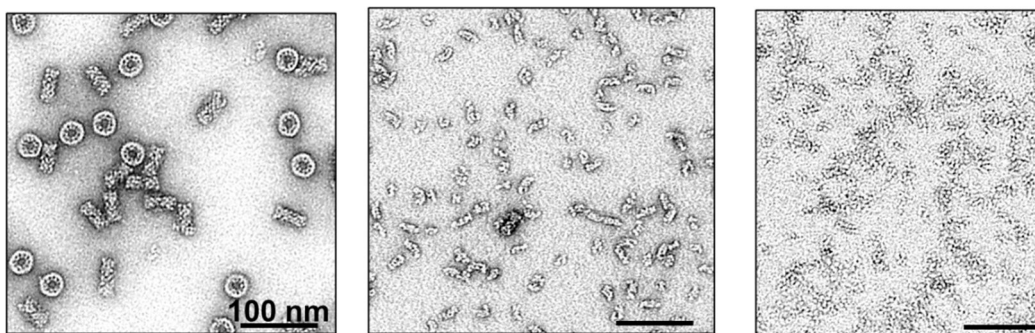


図 2 グルコース添加による会合体分子の解離

左：会合体分子の TEM 像

中央：グルコースを添加すると、会合体分子はサブユニット 2 量体へ解離した。

右：二価カチオン非存在下では、会合体はサブユニット単量体へ解離した。

(2) 修飾糖鎖間あるいは糖鎖とタンパク質間の相互作用はヘモシアニン濃度の影響を強く受けることの新たな知見を得た。

添加糖による会合体の解離はヘモシアニン濃度の影響を受けた。

当初の研究計画においては、(1)について明らかにした後に、修飾糖鎖間あるいは糖鎖とタンパク質間の相互作用測定を予定していた。そこで、糖鎖プローブを用いた ELISA 法によるヘモシアニン糖鎖のアフィニティアッセイを行うために、会合体分子を解離させたサブユニット単量体の調製を試みた。アフィニティ測定のためにヘモシアニン濃度を数 mg/mL の濃度使用する必要があると考え、数 mg/mL のヘモシアニン溶液に糖を添加して会合体解離をしようと試みたが、(1) で得られたようなサブユニット解離物が得られなかった。その理由について検討したところ、添加糖による会合体の解離はヘモシアニン濃度の

影響を顕著に受けることが明らかとなった。すなわち、(1)では20 µg/mLのヘモシアニン会合体分子に糖を添加してTEM観察を行い、会合体の解離を観察したが、一方、mg/mLオーダーのヘモシアニン会合体溶液に糖を添加しても、会合体解離は進行しにくいことが明らかとなった。会合体構造に及ぼす添加糖の影響がヘモシアニン濃度の影響を強く受けるとの結果は、当初予期しなかったものであった。

糖以外の会合体解離因子の影響もヘモシアニン濃度の影響を受けた。

二価カチオン非存在下において、ヘモシアニン会合体は解離するとの知見があり、研究代表者も以前の研究においてそれを確認していたが、それらの知見や研究結果はTEM観察によるものであり、実験の際のヘモシアニン濃度は数十µg/mLと低濃度であった。この結果を得て、二価カチオン濃度を変えたときの会合体の解離進行についてヘモシアニン濃度を変えて検討を行った。その結果、ヘモシアニン濃度がmg/mLオーダーでは二価カチオン低濃度における会合体の解離進行が抑制されることが明らかとなった。このため、ヘモシアニン会合体の構造安定性はタンパク質濃度、つまり分子クラウディングの影響を強く受けると結論した。

今後の展望

軟体動物ヘモシアニンは自然界で最大のタンパク質分子の一つに挙げられる。軟体動物の生体内で、この超巨大なタンパク質の生体内品質管理、すなわち分解消長がどのようになされているかは不明で、その議論さえも行われていない。研究代表者の以前の研究において、飼育中に衰弱したスルメイカは血中ヘモシアニン濃度が低下すること、ヘモシアニン濃度が低下した個体の鰓にはヘモシアニン分解物が蓄積していること等のデータを得ている。これらのデータと本研究で得られた結果を考察すると、生体内で局所的にヘモシアニン濃度が低くなると、ヘモシアニン会合体分子の分解が促進される可能性が考えられる。

本研究では、当初予期していなかった結果を得たが、そのことにより、生命維持に必須な超巨大タンパク質の分子構造安定性が分子クラウディングの影響を強く受けるという新たな知見を得るに至った。この知見は、無脊椎動物の酸素運搬体の生体内における調節および代謝を考える際の重要な鍵となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 加藤早苗、松井崇、田中良和	4. 巻 30
2. 論文標題 軟体動物ヘモシアニンの構造と機能	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 人工血液	6. 最初と最後の頁 45-58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中園晋也・加藤早苗
2. 発表標題 アオリイカおよびコウイカの酸素運搬タンパク質ヘモシアニンの生理機能比較
3. 学会等名 R4年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中園晋也・加藤早苗
2. 発表標題 イカ類の青い血の比較生化学：酸素運搬タンパク質ヘモシアニンの酸素結合比較
3. 学会等名 第93回日本動物学会早稲田大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中園晋也・加藤早苗
2. 発表標題 イカ類超巨大細胞外酸素運搬タンパク質ヘモシアニンの生物種間比較
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤早苗、田中志帆、東遼大、峯桜子、熊谷百慶
2. 発表標題 軟体動物ヘモシアニンの構造特性および分子進化.
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計4件

1. 著者名 加藤早苗、熊谷百慶、上西翁由	4. 発行年 2023年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 286
3. 書名 水産加工とタンパク質の科学	

1. 著者名 加藤早苗	4. 発行年 2023年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 432
3. 書名 節足動物の辞典、酸素運搬タンパク質 - ヘモシアニンとヘモグロビン - 節足動物の青い血と赤い血の成分	

1. 著者名 Sanae Kato, Takashi Matsui, Yoshikazu Tanaka	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 524
3. 書名 Subsellular Biochemistry 94, Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins.	

1. 著者名 加藤早苗	4. 発行年 2020年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 319
3. 書名 水圏生物タンパク質科学の新展開	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>鹿児島大学水産学部食品生命科学分野 加藤・熊谷研究室（水産食品科学） https://katolabfishkagoshimauniv.wordpress.com/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	熊谷 百慶 (KUMAGAI MOMOCHIKA) (70863083)	鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・助教 (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------