

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07942

研究課題名(和文) 頭足類酸素運搬蛋白質ヘモシアニンの会合体形成過程における酸素結合協同性の変化

研究課題名(英文) Effect of assembly state on an allosteric effect of cephalopod hemocyanin, respiratory supermolecule.

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多くの無セキツイ動物の血は青い。青い血の正体はヘモシアニンという巨大なタンパク質会合体である。ヘモシアニンの生理機能は生体内における酸素運搬であり、同じ生理機能を持つヘモグロビン同様にアロステリック効果を示すと考えられているものの、その生化学的検証例は非常に少ない。そこで、本研究では、サブユニット10個から成る会合体分子である頭足類ヘモシアニンについて、会合状態の異なる条件下におけるアロステリック効果の有無を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟体動物ヘモシアニンは自然界で最大分子のひとつに挙げられる。その巨大な分子量と複雑な構造のために、その分子構造解析は長らく成功しなかったが、最近、研究代表者を含む日本の研究グループによって、頭足類であるスルメイカヘモシアニンの分子全体の構造が発表された。タンパク質の分子構造とともに究明すべき事は生理機能であり、自然界最大のタンパク質の分子構造に続き、本研究でその生理機能を検証したことは学術的に意義深い。また、ヘモシアニンは生命維持に必須なタンパク質であるため、未だ養殖に成功していないイカ類の生理機能を解明することは、産業的応用への影響も大きい。

研究成果の概要(英文)：Instead of the red blood of vertebrates, most molluscs have blue hemolymph containing hemocyanin. The hemoglobin of vertebrate blood is replaced in most molluscs with hemocyanin, which plays the role of oxygen transporter. Molecules of molluscan hemocyanin are huge, cylindrical multimeric proteins; one of the largest protein molecules in the natural world. In this study, we investigated an allosteric effect of cephalopod hemocyanin containing 10 subunits, under several conditions.

研究分野：生化学

キーワード：タンパク質 酸素結合 ヘモシアニン 会合体 アロステリック効果 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

(1) 海洋軟体動物ヘモシアニン(ヘモリン)は血リンパ液に存在する細胞外酸素運搬タンパク質である。この分子は最大のタンパク質分子のひとつで、分子量 3.5 ~ 14 MDa の超巨大会合体であり、頭足類の分子は 10 量体、腹足類の分子は 20 あるいは 30 量体であると報告されている(文献)。軟体動物ヘモシアニン分子の構造解析および機能解析は長らく暗礁に乗り上げていたが、2015 年、研究代表者を含む日本の研究チームにより、頭足類スルメイカヘモシアニンの 10 量体分子結晶構造が発表された(文献 および)。これは世界初の軟体動物ヘモシアニンの高解像度結晶構造であり、当該研究分野のみならず構造生物学研究における大きなブレイクスルーとなる研究であった。

(2) 軟体動物ヘモシアニンが巨大な会合体を形成する生理的意義は不明である。会合体形成に必要な詳細条件に関する情報はわずかであった(文献)。そこで、研究代表者は頭足類ヘモシアニンの会合および解離条件に関する研究を実施し、種々データを収集していた。また、ヘモシアニンはヘモグロビンの様にアロステリック効果を持つと考えられていたが(文献)、巨大な会合体ゆえ生化学的研究はほとんど進んでいなかった。

2. 研究の目的

(1) 頭足類ヘモシアニンの会合体形成とアロステリック制御の関係を明らかにするために、会合体分子のアロステリック効果の詳細を明らかにしたいと考えた。そこで、イカヘモシアニン会合体分子(サブユニットの 10 量体、1 分子あたりの酸素結合部位数 80)の酸素結合能の測定法および解析法の新規構築を本研究の目的とした。

(2) 軟体動物ヘモシアニンの会合体形成の生理的意義およびアロステリック制御機構の解明をめざし、分子の会合状態によってアロステリック効果が変化するかどうかを明らかにしたいと考えた。そこで、頭足類ヘモシアニンの会合体形成過程における酸素結合協同性の変化を明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 酸素結合能測定法および解析法の構築:ヘモグロビンのようなヘムタンパク質とは異なり、ヘモシアニンは活性中心に銅を配位した酸素運搬タンパク質であるため、その酸素結合能測定には既報の測定方法はない。そこで、ヘモシアニンに特化した酸素結合測定法を構築し、得られた酸素結合曲線の適切な解析法を検討構築することとした。

(2) 会合体分子、会合中間体、単量体の分離:会合体である 10 量体分子と単量体、その会合中間体を区別するためには一般的に分子量による分画が行われるが、研究対象となる軟体動物ヘモシアニンは自然界最大級の分子であるため、単量体ですら生化学ツールの分子量排除限界以上となり、分画が難しい。そこで、超遠心分離による分画を試みた。

(3) アロステリックな会合中間体の探索:10 量体分子を解離させたり、単量体分子を会合させたりして得られた会合中間体について、(1)の測定・解析方法を用いて、アロステリック効果を示すか否か調べた。

4. 研究成果

(1) 酸素結合能測定法および解析法の構築

ヘモシアニン試料中の溶存酸素量を変えたときの酸素結合型ヘモシアニンを定量するため、試料溶液に O₂ 濃度を定量的に変えた O₂/N₂ 混合ガスを恒温下で一定量曝露し、紫外-可視吸収スペクトルを測定する測定システムを構築した(図 1)。

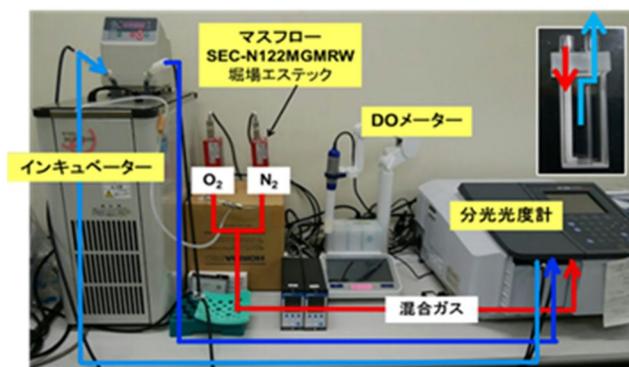


図 1. 本研究において新規構築したヘモシアニン酸素結合能測定システム。

酸素結合型ヘモシアニンには 346 nm 付近に正の吸収ピークを示したので、溶存酸素濃度に対し 346 nm のピーク値をプロットして酸素結合曲線を作成した。作成した酸素結合曲線は Hill 式を用いたデータフィッティングに供し、酸素との親和性を示す K_m 、アロステリック効果を示す Hill 係数を算出した (図 2)。

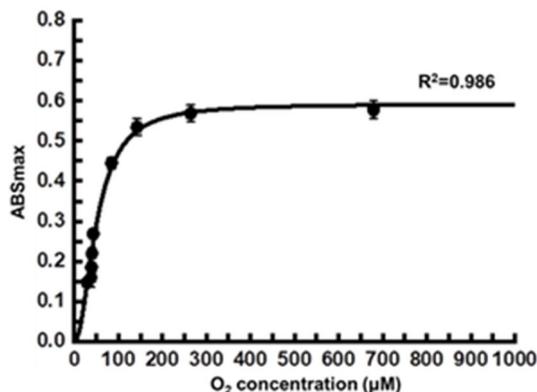


図 2. イカヘモシアニンの酸素結合曲線
Hill 係数 : 1.99 ± 0.19

(2) 諸条件が会合体分子のアロステリック効果に及ぼす影響
測定条件を種々変えて会合体の酸素結合能を測定、Hill 係数を算出したところ、中性域 (pH 7.2-7.4) では Hill 係数は安定であることが明らかとなった (図 3)。酸素結合に安定な pH 域が存在することはヘモグロビンでも良く知られており、頭足類においても、この pH 域が酸素運搬機能に適した生理的 pH である可能性が高いと思われた。この安定 pH よりわずかに低い pH (pH 7.0) では Hill 係数は急激に低下し、その値は 1 程度を示したことから、アロステリック効果がほとんどないことが明らかとなった。この pH 条件では会合体は解離しないことを確認しているため、10 量体構造を保持しているにも関わらず、アロステリック効果を示さない場合があることが認められた。すなわち、条件によっては、アロステリックではない会合体が存在する可能性があることが明らかとなった。

Fractionation of decamer and dissociated subunits by ultracentrifugation

(3) 会合中間体の分画
会合中間体の分画を試みたところ、解離条件あるいは会合条件のみで中間体を均一化するのは難しかった。そこで、解離過程および会合体形成過程に超遠心分離を行うことで会合体を除去し、会合中間体を分画した (図 4)。

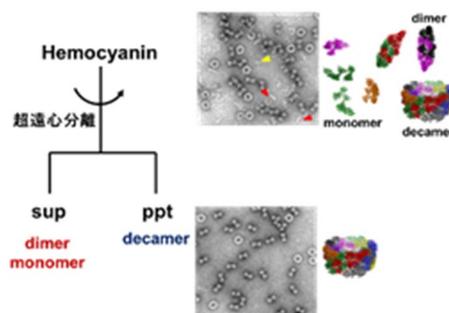


図 4. 会合中間体の分画

(4) アロステリックな会合中間体の存在同定
二価カチオンの種類を変えることで会合体の解離あるいは会合体形成を誘導した。解離過程および会合体形成過程で (3) に従い会合中間体を得た。10 量体分子が混入していないことを確認し、(1) による酸素結合能を測定したところ、(2) で明らかとなった安定 pH 域における Hill 係数は 1 より大きい値が算出され、アロステリック効果が認められた。10 量体との Hill 係数は低値であったことから、会合体の方がアロステリック効果が大きいことが示唆されたものの、アロステリック効果を示す会合中間体の存在が確認された。

(1) ~ (4) より、アロステリックな会合中間体は存在すること、さらに、アロステリック効果の発現には会合状態よりも会合体分子内の微妙な構造の影響が大きいものと推測した。

< 引用文献 >

Markl J (2013) Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochimica et biophysica acta*. 1834:1840-1852.

Matsuno A, Gai Z, Tanaka M, Kato K, Kato S, Katoh T, Shimizu T, Yoshioka T, Kishimura H, Tanaka Y, Yao M (2015) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of a 3.8-MDa respiratory supermolecule hemocyanin. *Journal of structural biology*

190:379-382.

Gai Z, Matsuno A, Kato K, Kato S, Khan M, Shimizu T, Yoshioka T, Kato Y, Kishimura H, Kannno G, Miyabe Y, Terada T, Tanaka Y, Yao M (2015) Crystal structure of the 3.8 MDa respiratory supermolecule hemocyanin at 3.0 Å resolution. *Structure* 23:2204-2212.

Zhang Q, Dai X, Cong Y, Zhang J, Chen DH, Dougherty MT, Wang J, Ludtke SJ, Schmid MF, Chiu W (2013) Cryo-EM structure of a molluscan hemocyanin suggests its allosteric mechanism. *Structure* 21 (4):604-613.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Tanaka, Y., Kato, S., Stabrin, M., Raunser, S., Matsui, T. & Gatsogiannis, C.	4. 巻 6
2. 論文標題 CryoEM reveals the asymmetric assembly of squid hemocyanin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 426-437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1107/S205225251900321X	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 松井崇、加藤早苗、田中良和.	4. 巻 61
2. 論文標題 クライオ電子顕微鏡で明らかになったスルメイカヘモシアニン(TpH)の立体構造.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本結晶学会誌	6. 最初と最後の頁 211-212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.5940/jcrsj.61.211	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 松井崇、加藤早苗、田中良和	4. 巻 91
2. 論文標題 クライオ電子顕微鏡で明らかになった超巨大酸素運搬タンパク質ヘモシアニンの会合構造.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 113-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920113	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sanae Kato, Takashi Matsui, Christos Gatsogiannis, Yoshikazu Tanaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Molluscan Hemocyanin: Structure, Evolution, and Physiology.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 91-202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s12551-017-0349-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 加藤 早苗、松井 崇、田中 良和	4. 巻 90(2)
2. 論文標題 3.8 MDa の超巨大酸素運搬タンパク質ヘモシアニン会合体のX線結晶構造解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学 Journal of Japanese Biochemical Society	6. 最初と最後の頁 238-243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.14952/SEIKAGAKU.2018.900238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka, Y., Kato, S., Stabrin, M., Raunser, S., Matsui, T. & Gatsogiannis, C.	4. 巻 6
2. 論文標題 Cryo-EM reveals the asymmetric assembly of squid hemocyanin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Union of Crystallography (IUCr)	6. 最初と最後の頁 426-437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1107/S205225251900321X .	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato Sanae, Matsui Takashi, Gatsogiannis Christos, Tanaka Yoshikazu	4. 巻 10-2
2. 論文標題 Molluscan hemocyanin: structure, evolution, and physiology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 191 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1007/s12551-017-0349-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 加藤 早苗	4. 巻 83
2. 論文標題 -2. 細胞外巨大酸素運搬タンパク質	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本水産学会誌	6. 最初と最後の頁 820 ~ 820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.2331/suisan.WA2442-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中史帆、原野美佳、加藤早苗
2. 発表標題 アオリイカヘモシアニンの酸素結合に及ぼす温度およびpHの影響.
3. 学会等名 H31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中志帆、原野美佳、加藤早苗
2. 発表標題 イカヘモシアニン酸素結合能の種間比較.
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中志帆、原野美佳、加藤早苗
2. 発表標題 軟体動物ヘモシアニンの比較生化学 - 頭足類十腕目ヘモシアニンの酸素結合能. Comparative biochemistry of Molluscs hemocyanin: oxygen-binding function of Cephalopoda Decapodiformes hemocyanin.
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中志帆、原野美佳、加藤早苗
2. 発表標題 超巨大細胞外酸素運搬タンパク質ヘモシアニンの生理的条件下での酸素結合能解析. Oxygen-binding curve for 3.8 MDa respiratory supermolecule hemocyanin under physiological conditions.
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井崇、加藤早苗、田中良和.
2. 発表標題 スルメイカヘモシアニンの構造解析
3. 学会等名 日本結晶学会令和元年度年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中志帆、松野史明、原野美佳、熊谷百慶、加藤早苗
2. 発表標題 イカ類ヘモシアニンの分子進化および酸素結合能特性
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松浦圭太、田中志帆、加藤早苗
2. 発表標題 会合状態の異なるイカヘモシアニンの分画条件の検討.
3. 学会等名 H30年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中良和、松井 崇、加藤早苗、Christos Gatsogiannis, Stefan Raunser.
2. 発表標題 スルメイカ由来ヘモシアニンのクライオ電顕構造とX線結晶構造の違い
3. 学会等名 第18回蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤早苗
2. 発表標題 青い血の化学：巨大生体分子研究への挑戦．
3. 学会等名 第50回日本化学工学会秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中志帆、加藤早苗
2. 発表標題 イカヘモシアニンの酸素結合測定システムの構築．
3. 学会等名 H30年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中志帆、松浦圭太、西田沙織、加藤早苗
2. 発表標題 超巨大細胞外酸素運搬タンパク質ヘモシアニンの酸素結合測定システムの構築Construction of measurement method of oxygen-binding of 3.8 MDa respiratory supermolecule hemocyanin.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中志帆、原野美佳、加藤早苗
2. 発表標題 超巨大酸素運搬タンパク質アオリイカヘモシアニンの酸素結合能測定
3. 学会等名 H30年度日本水産学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中史帆、原野美佳、加藤早苗
2. 発表標題 アオリイカヘモシアニンの酸素結合に及ぼす温度およびpHの影響
3. 学会等名 H31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sanae Kato, Takashi Kitayama, Shiho Tanaka and Takeya Yoshioka.
2. 発表標題 Suggestion of new quality evaluation method of a live squid as a sashimi material.
3. 学会等名 International Symposium "Fisheries Science for Future Generations" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤早苗、田中志帆、北山貴士
2. 発表標題 細胞外酸素運搬タンパク質ヘモシアニンの会合状態が酸素結合に及ぼす影響
3. 学会等名 conBio2017 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (第90回 日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤早苗
2. 発表標題 イカ類の青い血に関する研究と活イカ品質評価への応用.
3. 学会等名 第17回鹿児島県水産研究交流セミナー (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松浦圭太、田中史帆、加藤早苗
2. 発表標題 会合状態の異なるイカヘモシアニンの分画条件の検討
3. 学会等名 日本水産学会H30年度春季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

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 Subcellular Biochemistry 94, Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins. Molluscan hemocyanins.	

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 -
3. 書名 e-水産学シリーズ 「水圏生物タンパク質科学の新展開」 7章 水圏無脊椎動物の青い血液 - 酸素運搬タンパク質の科学 -	

〔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 加藤研究室 https://katolabfishkagoshimauniv.wordpress.com/research/</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
--	---------------------------	-----------------------	----