

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19550169

研究課題名（和文） タイプ3銅含有タンパク質の酸素結合挙動の研究

研究課題名（英文） Research on Oxygen Binding Properties of Type 3 Copper Proteins

研究代表者

廣田 俊 (HIROTA SHUN)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：90283457

研究成果の概要：節足動物や軟体動物の血リンパ液中に存在するヘモシアニン（Hc）はタイプ3銅含有タンパク質の一つであり、酸素運搬・酸素貯蔵タンパク質として知られている。酸素分子はヘモシアニンの銅複核部位に結合する。ヘモシアニンは高等動物において酸素分子を運搬するヘモグロビンと同様にアロステリック効果を有するが、ヘモシアニンのアロステリック効果には依然不明な点が多い。本研究では、フラッシュフォトリシス法などを用いてチチュウカイミドリガニヘモシアニンの酸素結合挙動を調べ、pHおよび乳酸の作用機構について新しい知見を得た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：タンパク質、生物無機化学、酸素結合、銅活性部位、ヘモシアニン

1. 研究開始当初の背景

タイプ3銅含有タンパク質には、節足動物や軟体動物の酸素運搬・酸素貯蔵タンパク質であるヘモシアニン（Hc）と、哺乳類、菌、キノコ類に存在し、酸素分子を使ってフェノール類やカテコール類などの基質を酸化する酵素チロシナーゼがある。節足動物由来Hcのサブユニット（分子量約75,000 Da）は3つの構造ドメインからなり、そのうち1つのドメインが酸素結合部位を有する。サブユニットは6量体を形成し、この6量体が1つ

の構造単位になっている。節足動物由来Hcには、さらに6量体が会合して大きなタンパク質超分子を生成するものもある。エビ類のHcには6量体が多いが、ザリガニやカニ類のHcでは、2つの6量体が会合した12量体を形成している。さらに種によっては、24量体や48量体にまで会合するHcが存在する。6量体間の結合に関与するサブユニットはリンカーと呼ばれ、リンカーの結合は非共有結合性のものが多いが、ジスルフィド結合が関与しているものもある。

タイプ3銅含有タンパク質の活性部位は一

対の二原子銅からなり、この二核銅部位に 1 分子の酸素分子が可逆的に結合する。タイプ 3 銅含有タンパク質は 3 種類の状態を取ることができ、それぞれ活性部位の 2 つの銅イオンが二価の酸化状態であるメト体、2 つの銅イオンが一価の還元状態に酸素分子が結合したオキシ体、オキシ体から酸素の外れたデオキシ体である。オキシ体には 340 と 560 nm 付近に結合酸素から銅への電荷移動吸収帯が観測されるが、デオキシ体やメト体では観測されない。

Hc の多量体は、ヘモグロビン (Hb) のように酸素結合に対して協同作用を示す。また、Hc は Hb と同様、pH により酸素親和性や協同性が変化するボーア効果を有し、Hc による酸素分子の脱着は、pH などの環境の違いによるボーア効果を利用して効率的に行われる。嫌気状態で生体内が酸素不足状態になると、組織内での二酸化炭素濃度や乳酸濃度が高くなるため pH が低くなり、ボーア効果により酸素親和性が低下する。しかし、嫌気条件下での代謝の最終生成物として生産される乳酸は同時に Hc のアロステリックエフェクターとして働き、乳酸により Hc の協同性が変化し、酸素親和性が増大する。その結果、例えば、アオガニ (*C. sapidus*) は嫌気下で運動することにより生体内の pH が 7.6 から 7.1 に下がるが、乳酸によりその酸素親和性はほとんど変化しないことが報告されている。このように、生体内では、酸素親和性は非常に精密に制御されている。

2. 研究の目的

生体内では、金属タンパク質が重要な役割を担っている場合が多い。Hc は酸素運搬や酸素貯蔵の機能を有する銅タンパク質であり、節足動物由来 Hc は pH や乳酸の影響を受けて酸素親和性や協同性を変化させる。アオガニなどは運動すると生体内の pH が下がるが、生産される乳酸の影響により酸素親和性はほとんど変化しない。以上のように、pH や乳酸は Hc の酸素結合挙動に影響を与えることは解かっているが、その詳しい作用機構は明らかにされていない。

以上のことを踏まえ、本研究では、Hc の酸素結合挙動に pH および乳酸が及ぼす影響およびその作用機構について検討した。酸素分子は呼吸鎖を含め、生体内の様々な反応に使われており、生命にとって最も大切な分子の一つである。生命現象を理解するうえで、タンパク質における酸素結合機構を知ることは大変意義のあることである。

3. 研究の方法

本研究では、節足動物であるチチュウカイミドリガニ (*Carcinus aestuarii*) 由来 Hc の多量体を使用した。 *C. aestuarii* Hc は pH 7.5、20 mM Ca²⁺ のとき、90% が 12 量体 (24S)、10% が 6 量体 (16S) で存在する。pH 9.2、Ca²⁺ 非共存下では、 *C. aestuarii* Hc は 16S または単量体 (5S, 75 kDa) の状態になり、5S には *CaeSS1*、*CaeSS2*、*CaeSS3* の 3 種類がある。pH を中性に戻すと、*CaeSS3* はホモ 6 量体を形成するが、*CaeSS2* は単量体のままで存在する。よって、本研究では、単量体 *CaeSS2* を精製して用いた。

酸化型 Hc (oxyHc) のフラッシュフォトリシス測定を pH、乳酸添加などの条件を変えて行った。337 nm に吸収帯を有する oxyHc に 355 nm のパルス光 (Nd:YAG の 3 倍波、5 ns、40 mJ) を照射し、酸素分子を光解離させ、酸素分子の再結合過程に伴う 337 nm の吸光度の時間変化を測定した。観測される吸光度の時間変化を指数関数でフィッティングすることで Hc の酸素結合速度定数 k_{obs} を求めた。酸素結合速度定数 k_{on} 、酸素解離速度定数 k_{off} は $k_{\text{obs}} = k_{\text{on}}[\text{O}_2] + k_{\text{off}}$ の関係式より求めた。

乳酸非存在下と存在下や pH 6.5 と 8.3 で oxyHc の紫外可視吸収スペクトルを比較することにより、Hc の活性部位構造の変化を調べた。また、等温滴定カロリーメトリー (ITC) 法を用いて、100 μM の Hc に 10 または 100 mM の乳酸を滴下することによって、Hc と乳酸の結合を pH 6.5 と 8.3 で調べた。

4. 研究成果

(1) pH が Hc に及ぼす影響

Hc の紫外可視吸収スペクトルでは、pH 変化により 560 nm 付近の吸収帯の吸収極大波長がシフトしたことから、pH によって oxyHc の活性部位構造が変化することが解かった。

次に、pH 6.5 と pH 8.3 で、様々な酸素濃度で得られた k_{obs} から k_{on} 、 k_{off} を求めた。乳酸非共存下では、pH 6.5 より pH 8.3 で大きな k_{on} が得られたが、 k_{off} はほとんど変化しなかった。次に、pH を 6.5 から 8.3 に上げると、酸素雰囲気下における多量体の k_{obs} は 69.9 ± 2.8 から $90.3 \pm 4.3 \text{ ms}^{-1}$ へ上昇し、pH に対する k_{obs} は pH 7.6 を変曲点とするシグモイド曲線を示した。単量体 *CaeSS2* も pH を上げると pH の増加に伴い k_{obs} が増大した。これらの結果から、pH により Hc の活性部位構造が変化し、酸素結合挙動が変化することが示唆された。

(2) 乳酸が Hc に及ぼす影響

Hc の紫外可視吸収スペクトルにおいて、乳酸添加による 560 nm 付近の吸収帯の吸収極大波長は pH 6.5、8.3 いずれの場合も変化しなかった。この結果から、乳酸は oxyHc の活性部位構造に影響を与えないと推測された。

次に、pH 6.5 において、乳酸濃度が約 40 mM になるまで乳酸の添加に伴い k_{obs} は増大した。Hc と乳酸に対して 1:1 結合を仮定すると、結合定数は約 $160 \pm 50 \text{ M}^{-1}$ と求めた。この乳酸添加による k_{obs} の増大量は、pH の上昇に伴い減少し、pH 8.3 では k_{obs} はほとんど変化しなかった。このことより、乳酸は pH 8.3 では酸素結合挙動に影響を与えないことが解かった。また、単量体 *CaeSS2* では、pH 6.5 で乳酸を添加しても k_{obs} は変化しなかった。この結果より、乳酸は Hc が多量体構造を取るときにのみ酸素結合に影響を及ぼすことが示唆された。

次に、Hc と乳酸の相互作用を ITC により調べた結果、pH 6.5 と pH 8.3 で乳酸濃度約 1 mM (結合定数約 $1,000 \text{ M}^{-1}$) で乳酸が Hc に結合することが解かった。pH 6.5 では高濃度 (~20 mM) の乳酸添加により、乳酸が結合定数約 100 M^{-1} でさらに結合することが示唆されたが、pH 8.3 では、この相は観測されなかった。このことより、pH を 6.5 から 8.3 に上げるとタンパク質に構造変化が生じ、高濃度での新たな乳酸結合がなくなったことが示唆された。低濃度の乳酸添加では k_{obs} の変化が小さかったことから、この乳酸濃度での Hc と乳酸の結合は Hc の酸素結合挙動に影響を与えず、pH が低いときのみ現れる高濃度領域での乳酸の結合が、 k_{obs} の変化と関係することが判明した。実際、乳酸の高濃度領域での結合定数は、酸素結合定数の変化から求めた乳酸の結合定数とよく対応していた。また、単量体 *CaeSS2* は乳酸と結合しなかったことから、乳酸は Hc の四次構造変化を誘起することにより k_{obs} が増加すると推測された。

(3) T, R 状態の平衡に乳酸が及ぼす影響

乳酸非共存下および共存下において、pH 6.5、低酸素濃度(酸素 25%飽和以下)で oxyHc のレーザーフラッシュフォトリシス測定を行った。得られた Hc の吸光度変化は、低酸素濃度になるにつれ、一成分でのフィッティング関数と一致しなくなった。そこで、pH 6.5、低酸素濃度では、Hc が酸素結合速度の異なる R と T 状態の共存状態にあると仮定し、吸光度変化に対して二成分の指数関数でフィッティングを行ったところ、フィッティング曲線が実測値に良く一致した。得られた二成分の強度比から Hc の R と T 状態の存在比を見積もり、酸素濃度に対してプロットした。pH 6.5、低酸素濃度では、乳酸を添加すると二成分の指数関数のうち速い成分の割合が増えたため、乳酸により Hc の R 状態が安定

化することが示唆された。この結果は、酸素結合曲線から見積もられている結果と一致した。

以上より、タイプ 3 銅含有タンパク質であるヘモシアニンの酸素結合挙動に関する新しい知見が得られた。特に、pH は Hc の活性部位構造と立体構造に影響を与えることにより酸素結合速度が変化するのに対して、乳酸は Hc の活性部位構造には影響を与えずに四次構造を変化させ、酸素結合速度が変わることが解かった。しかし、タイプ 3 銅含有タンパク質にはまだ不明な点が多く残されており、今後、本研究成果をもとに、これらのタンパク質の酸素結合機構をさらに明らかにしていきたい。

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 1 件)

① Shun Hirota (他 9 名, 1 番目), Molecular Basis of the Bohr Effect in Arthropod Hemocyanin, *Journal of Biological Chemistry* 誌, 283 巻, 31941-31948, 2008, 査読有

[学会発表] (計 6 件)

① 廣田俊 (他 7 名, 1 番目), 節足動物由来ヘモシアニンの酸素結合挙動に対する pH および乳酸の影響, 第 36 回生体分子科学討論会, 2009.6.19, 札幌 (予定)

② 田中直輝, 廣田俊 (他 6 名, 8 番目), 節足動物由来ヘモシアニンの酸素結合挙動に pH および乳酸が及ぼす影響に関する研究, 日本化学会第 89 春季年会, 2009.3.27, 東京

③ 田中直輝, 廣田俊 (他 5 名, 7 番目), レーザーフラッシュフォトリシス法による節足動物由来ヘモシアニンのアロステリック効果の研究, 日本生物物理学会第 46 回年会, 2008.12.4, 福岡

④ 田中直輝, 廣田俊 (他 5 名, 7 番目), ヘモシアニンのアロステリック効果のレーザーフラッシュフォトリシス法による研究, 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム, 2008.9.20, 横浜

⑤ 田中直輝, 廣田俊 (他 4 名, 6 番目), 乳酸がヘモシアニンのアロステリック効果に及ぼす影響のレーザーフラッシュフォトリシス法による研究, 日本化学会第 88 春季年会 2008, 2008.3.27, 東京

⑥ Shun Hirota (他 5 名, 1 番目), Oxygen Binding Properties of *Carcinus aestuarii* Hemocyanin Revealed by Laser Flash Photolysis, 13th International Conference

on Biological Inorganic Chemistry,
2007.7.16, Vienna, Austria

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 俊 (HIROTA SHUN)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学

研究科・教授

研究者番号：90283457