

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450298

研究課題名(和文) スルメイカヘモシアニンサブユニットの解離誘導因子の同定

研究課題名(英文) In vivo and in vitro factors affecting subunit interaction of hemocyanin molecule of cephalopod squid

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・助教

研究者番号：80291061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：多くの軟体動物の酸素運搬体であるヘモシアニンは巨大なタンパク質会合体で、最大級のタンパク質分子の一つに挙げられるが、その会合体形成機構は不明である。軟体動物ヘモシアニンの分子構造と構造安定性を知るために、分子からサブユニットへの解離を誘導する諸因子の解明を目的として本研究を実施した。その結果、血液成分であるMg<sup>2+</sup>が解離誘導因子であること、またCa<sup>2+</sup>会合促進因子であること、ヘモシアニンの結合糖鎖は会合体形成に不可欠であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Hemocyanins are multisubunit copper containing proteins functioning as oxygen transporters in many species of arthropods and molluscs. Molluscan hemocyanins are decamers, didecamers, or multidecamers of subunit containing seven or eight oxygen-binding sites. Molecular structure of molluscan hemocyanin has been determined in details using gastropod, Keyhole Limpet and cephalopod, Octopus. It is reported that the molecular structure requires divalent cations and decomposes in their absences. In this work, I represent that a kind of divalent cation induced dissociation of cephalopod, Squid *Todarodes pacificus* hemocyanin molecule.

研究分野：生物化学

キーワード：ヘモシアニン タンパク質 会合体 サブユニット 酸素結合 軟体動物

### 1. 研究開始当初の背景

軟体動物および節足動物の血リンパ液中に存在するヘモシアニン(血青素)は酸素運搬タンパク質として知られている。海洋節足動物のヘモシアニンに関する研究は比較的進んでおり、分子構造の解析が数例ある。一方、海洋軟体動物のヘモシアニン分子は節足動物のものとは大きく異なり、サブユニットサイズは350~400 kDa、頭足類はサブユニットの10量体、腹足類は10量体であると考えられている。これまでに頭足類であるミズダコのヘモシアニンにおいて、サブユニットの一部である酸素結合ドメインの構造研究が行われているが、サブユニットおよび分子全体の構造解析は困難を極めており、サブユニット間相互作用にも不明な点が多い。

研究代表者は、頭足類であるスルメイカのプロテオーム解析をすすめ、健康状態が悪化した個体では生体内のヘモシアニン量が減少していること、およびヘモシアニン分解物が鰓に蓄積していることを発見した。さらに、健康状態が悪化した個体の血リンパ液を電子顕微鏡で観察したところ、健康な個体の血リンパ液で見られるヘモシアニン分子像は少なく、代わりに比較的小さなサブユニットオリゴマー様の構造体を多く観察した。これは生体内でヘモシアニンの分子構造が壊れ、サブユニットへの解離が進行していることを示唆していた。

そこで、生体内で解離を引き起こす成分についてスクリーニングを実施し、どの成分が解離誘導因子であるかを同定し、頭足類ヘモシアニンのサブユニット間相互作用について解明したいと考え、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

軟体動物ヘモシアニンのサブユニット間相互作用の解明を目的とし、(1)頭足類ヘモシアニンサブユニットへの解離誘導因子の同定、(2)解離誘導因子の作用機作の解明、(3)サブユニットへの解離と生理機能の関係の有無、の3点を明らかにすべく研究を実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) スルメイカヘモシアニン分子の電子顕微鏡観察

スルメイカ血リンパ液および精製ヘモシアニン溶液をコロジオンカーボン支持体上に保持し、ネガティブ染色を施し、得られた分子像を透過型電子顕微鏡(日立H-7650)にて観察した。

#### (2) サブユニット解離誘導因子の同定

溶液条件を変えて(1)の分子観察を実施し、分子像に違いが観察された溶液の組成の違いに注目して、サブユニットの解離誘導因子のスクリーニングを行った。

#### (3) 解離したサブユニットの再会合実験

(2)のスクリーニングによって同定した解離誘導因子によって解離したサブユニットをゲルろ過で精製した。単離したサブユニットは解離誘導因子を含まない溶液に透析し、再会合が起こるか否かを検討した。

#### (4) 解離したサブユニットオリゴマーおよびサブユニットモノマーの酸素結合能の検討

解離したサブユニットの酸素結合能、および、解離誘導因子存在下での酸素結合能の経時変化を追跡した。酸素結合能は吸収スペクトルから算出した。

### 4. 研究成果

#### (1) 研究の主な成果

- ①電顕像(図1)から、スルメイカヘモシアニンは直径33~35 nm、高さ16~18 nmの巨大なシリンダー形分子であること、また、分子形状(直径と高さの比)から、10個のサブユニットが会合して分子を構成していることを確認した。対照として、ミズダコヘモシアニン分子を観察したところ、分子形は共通しているものの、分子サイズ、分子の表面構造に若干の違いが認められた。

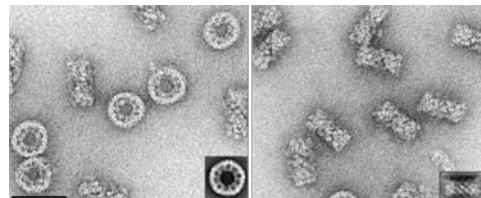


図1. スルメイカヘモシアニン電顕像  
図中右下は二次元平均画像。バーは50 nm。

- ②血リンパ組成成分に着目してスルメイカヘモシアニンの溶液組成を変えたところ、 $Mg^{2+}$ および高濃度のグルコース存在下においてシリンダー状の分子構造が壊れ、サブユニットに解離することが明らかとなった。すなわち、 $Mg^{2+}$ およびグルコースが解離誘導因子であると同定した。一方、 $Ca^{2+}$ は10量体分子構造を保持すること、また、解離したサブユニットの10量体の会合を促進することが明らかとなった。すなわち、 $Ca^{2+}$ は会合促進因子であると同定した。一方、ミズダコヘモシアニンの場合は、二価カチオンの種類に関わらずシリンダー状のヘモシアニン分子が観察された。この結果から、頭足類内でも、スルメイカとミズダコのサブユニット解離誘導因子は異なることが明らかになった。
- ③解離誘導因子および会合促進因子の両作用は可逆的であることが明らかとなった。また、10量体分子の解離を経時追跡すると、2量体を経て単量体に完全解離した。この結果は結晶構造(雑誌論文①、②)から得ら

れた情報、すなわち、2量体が会合して10量体を構成することを支持した。解離誘導因子は2量体間および2量体内の相互作用を阻害することが示唆された。(図2)

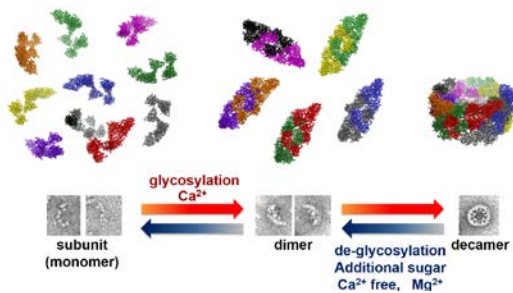


図2. スルメイカヘモシアニンの解離/会合

- ④グルコースは分子表面に位置する結合糖鎖に作用し、結合糖鎖間、あるいは結合糖鎖とアミノ酸間の相互作用を競合的に阻害するものと推測した。また、二価カチオンの作用部位については、特定するには至らなかった。
- ④解離誘導因子存在下での酸素結合能を追跡した結果、解離が進行するとともに酸素結合能が低下することが明らかとなった。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

軟体動物ヘモシアニンの会合体形成に関わる生体因子を同定することができ、さらに、会合状態が生理機能に影響を及ぼすことを明らかにすることができた。これまで、軟体動物ヘモシアニンは二価カチオン存在下で分子構造が安定化するものと考えられていたが、本研究により、二価カチオンは構造安定化と不安定化の双方に寄与することを明らかにすることができた。また、これまで、ミズダコヘモシアニンの性質が軟体動物ヘモシアニンに共通の性質であると捉えられてきたが、本研究により、動物種によって二価カチオンの作用が異なることを示すことができた。国内外の軟体動物ヘモシアニン研究において、上記研究結果は新しくかつ重要な知見として位置づけることができる。

軟体動物ヘモシアニンは最大級のタンパク質であり、構造解析は困難を極めていた。本研究で得られた生化学的情報は構造研究においても重要な知見である。本研究実施中に分子構造が数例報告されたが、多くがクライオ電顕による構造報告である中、北海道大学先端生命研田中良和准教授のグループが世界初の軟体動物ヘモシアニン結晶構造を発表し、構造生物学分野で大きなインパクトを与えた(雑誌論文①、②)。本研究はこの結晶構造解析に寄与し、特にサブユニット間結合に結合糖鎖が関与している点を生化学的に証明した。当初

の計画には予定していなかったが、本研究の発展的応用として、構造生物学とのコラボレーションを進行中である。

(3) 今後の展望

本研究により、解離誘導因子存在下では、解離の進行に伴い酸素結合能が低下することが明らかとなった。これは、サブユニットの会合状態が生理機能と密接に関係していることを示唆している。今後は会合状態と酸素結合能について解析を進めることで、ヘモシアニンのアロステリック効果の解明が期待できる。

また、解離誘導因子および会合促進因子双方ともに血リンパ液に高濃度含まれる成分であることが明らかとなった。この正反対の作用のもつ成分が共存する体液中で、ヘモシアニンの分子構造と生理機能がどうレギュレートされているかについて検討することは、生体内でのヘモシアニンの分子構造と機能の調節の実態解明に繋がる。

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3件)

- ① Matsuno, A., Gai, Z., Tanaka, M., Kato, K., Kato, S., Katoh, T., Shimizu, T., Yoshioka, T., Kishimura, H., Tanaka, Y., Yao, M. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of a 3.8-MDa respiratory supermolecule hemocyanin. *Journal of Structural Biology*, 査読有, 190, 2015, pp. 379-382, DOI: 10.1016/j.jsb.2015.04.015
- ② Gai, Z., Matsuno, A., Kato, K., Kato, S., Khan, M.R.I., Shimizu, T., Yoshioka, T., Kato, Y., Kishimura, H., Kanno, G., Miyabe, Y., Terada, T., Tanaka, Y., Yao, M. Crystal structure of the 3.8 MDa respiratory supermolecule hemocyanin at 3.0 Å resolution. *Structure*, 査読有, 23, 2015, pp. 2204-2212, DOI: 10.1016/j.str.2015.09.008

[学会発表] (計18件)

- ① 加藤早苗、吉岡武也、清水健志、岸村栄毅、田中良和. スルメイカヘモシアニン分子のサブユニット間相互作用. 平成28年度日本水産学会春季大会、2016年03月28日、東京海洋大学(東京).
- ② 加藤早苗、MRI Khan、吉岡武也、清水健志、岸村栄毅、田中良和. 分子量3.8MDaの超巨大酸素運搬タンパク質ヘモシアニン会合体形成における結合糖鎖の役割. BMB2015 日本生化学会分子生物

学会合会、2015年12月01日、神戸国際会議場（兵庫、神戸）。

- ③ 加藤早苗、吉岡武也、清水健志、岸村栄毅、田中良和。スルメイカヘモシアニン分子における糖鎖修飾部位 Role of glycosylation on assembly of subunits decamer of Cephalopod Hemocyanin. 日本動物学会第86回新潟大会 2015、2015年09月19日、新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ（新潟、新潟市）。
- ④ 加藤早苗、吉岡武也、清水健志、岸村栄毅、田中良和。スルメイカヘモシアニン超分子構造における結合糖鎖の関与。平成27年度日本水産学会春季大会、2015年03月28日、東京海洋大学（東京）。
- ⑤ 加藤早苗、吉岡武也、信太茂春、清水健志、岸村栄毅、田中良和。スルメイカヘモシアニンの分子構造および構造安定性。平成26年度日本水産学会北海道支部会、2014年12月19日、函館市国際水産・海洋総合研究センター（北海道、函館）。
- ⑥ 加藤早苗、Md. Rafiqul Islam Khan、吉岡武也、信太茂春、岸村栄毅、清水健志、田中良和。Dissociation and re-association reactions of cephalopod hemocyanin molecule, 4MDa extracellular oxygen-transporter. 第87回日本生化学会大会、2014年10月16-17日、京都国際会議場（京都）。
- ⑦ 加藤早苗、Md. Rafiqul Islam Khan、吉岡武也、信太茂春、岸村栄毅、清水健志、田中良和。頭足類ヘモシアニン分子のサブユニット間相互作用 Subunit interaction of Cephalopod Hemocyanin Molecule、日本動物学会第85回仙台大会、2014年09月13日、東北大学（宮城、仙台）。
- ⑧ 田中良和、加藤公児、蓋 作啓、田中深雪、田中 勲、姚 閔、清水健志、加藤佑基、岸村栄毅、菅野 岳、宮部好克、吉岡武也、加藤早苗（代表者）。スルメイカヘモシアニンの結晶構造解析、平成26年度日本水産学会春季大会、2014年03月28日、北海道大学水産学部（北海道、函館）。
- ⑨ 加藤早苗、Md. Rafiqul Islam Khan、吉岡武也、信太茂春、岸村栄毅、清水健志、田中良和。スルメイカヘモシアニンの構造安定化条件の検討、平成26年度日本水産学会春季大会、2014年03月28日、北海道大学水産学部（北海道、函館）。
- ⑩ 清水健志、加藤佑基、吉岡武也、岸村栄毅、菅野 岳、宮部好克、田中良和、加藤早苗。スルメイカヘモシアニンの一次構造解析、平成26年度日本水産学会春季大

会、2014年03月28日、北海道大学水産学部（北海道、函館）。

- ⑪ 加藤早苗、Md. Rafiqul Islam Khan、岸村栄毅、清水健志、信太茂春、田中良和、吉岡武也。プロテオーム解析に基づいた活スルメイカの健全性評価、平成25年度日本水産学会北海道支部大会、2013年12月20日、北海道民活動センターかでの2.7（北海道、札幌）。
- ⑫ 加藤早苗、Md. Rafiqul Islam Khan、谷口隆信、岸村栄毅、清水健志、加藤佑基、信田茂春、吉岡武也。スルメイカヘモシアニン分子のサブユニットへの解離と再会合。第84回日本動物学会大会、2013年09月28日、岡山大学（岡山）。
- ⑬ 加藤早苗、Md. Rafiqul Islam Khan、谷口隆信、岸村栄毅、清水健志、加藤佑基、吉岡武也。頭足類スルメイカ生体内におけるヘモシアニン分子の解離は酸素運搬障害を引き起こす *In vivo* Dissociation of hemocyanin molecule prevents oxygen-transporting in the living body of cephalopod squid. 第86回日本生化学会大会、2013年09月11日、パシフィコ横浜（神奈川、横浜）。

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

アウトリーチ活動：加藤早苗、知っているようで知らない「イカ」のサイエンス、旭川ウェルビーイング・コンソーシアム科学技術コミュニケーション推進事業「わくわくサイエンス」ブース展示、2014年9月28日、フィール旭川（北海道、旭川市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 早苗 (KATO, Sanae)

鹿児島大学・水産学部・助教

研究者番号：80291061

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

吉岡 武也 (YOSHIOKA, Takeya)

公益財団法人函館地域産業振興財団（北海道立工業技術センター）・研究開発部・主任研究員

研究者番号：80505701