

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291008

研究課題名(和文)分子量4MDaの巨大酸素運搬蛋白質ヘモシアニンの構造生物学研究

研究課題名(英文)Structural study of a huge respiratory supermolecule hemocyanin

研究代表者

田中 良和 (Tanaka, Yoshikazu)

北海道大学・先端生命科学研究所(研究院)・准教授

研究者番号：20374225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：スルメイカ由来ヘモシアニンの結晶化に成功し、その構造を3.0オングストローム分解能で決定した。明らかになった構造から、スルメイカヘモシアニンが円筒型の外壁領域と、5つの内部領域から構成される、10量体の会合体であることがわかった。巨大な10量体は、2つのドメインが会合したドメイン2量体が一つの構造単位となり、それが複雑に会合することで形成されていた。サブユニット同士の界面に糖鎖修飾クラスターが存在していることがわかり、生化学実験の結果を考え合わせた結果、この糖鎖クラスターがサブユニット同士の会合に貢献していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have determined the X-ray crystal structure of intact hemocyanin from Japanese flying squid at 3.0 angstrom resolution. The structure revealed the architecture of hemocyanin composed of a cylindrical wall region and five collar regions, in which the dimers of functional units (FUs) hierarchically associated to form the entire decamer. Furthermore, the roles of carbohydrates in assembly, and conserved sulfur-containing residues in copper incorporation, were revealed.

研究分野：構造生物化学

キーワード：X線結晶構造解析 ヘモシアニン 巨大蛋白質会合体 酸素運搬 糖鎖

## 1. 研究開始当初の背景

好気条件下で生育する生命体は外界から得られる酸素を用いて呼吸することによりエネルギーを獲得するため、酸素の運搬は生命活動を維持する上で最も重要な生体機構と言える。ヒトをはじめとした脊椎動物はヘモグロビンを用いて酸素を運搬するが、イカやタコ、貝などの軟体動物においてはヘモシアニンという銅含有蛋白質が酸素を運搬する。ヘモグロビンの研究が古くから行われてきたのに対し、ヘモシアニンの分子解析は著しく遅れていた。これは、ヘモシアニンが4MDaにも及ぶ巨大分子である事に起因する。イカやタコのヘモシアニンは、約50kDaの機能ドメインが8つ連続してつながった約400kDaのサブユニットが10個円状に会合した巨大分子である。酸素を運搬するという目的のために、なぜ、これほど多くのドメインを連結・会合させた巨大分子を用いる必要があるのかについては謎に包まれたままである。また、ヘモシアニンは様々な糖鎖修飾を受けるため、生体に投与した際は高い免疫原性を示す。このように巨大でかつ高い免疫原性を有する特性を利用し、ヘモシアニンはハプテンのキャリアー蛋白質や、ワクチンを投与する際の免疫活性化剤として用いられている。感染症やがんに対するワクチン開発に応用するための臨床研究も行われており、また、製剤用ヘモシアニンを提供するベンチャー企業も設立された。

このように、ヘモシアニンはバイオ・工学的に広く応用が期待されている分子であるが、一方でその分子レベルでの解析は驚くほど進んでいなかった。研究開始当初までのヘモシアニンの構造研究は、電子顕微鏡による低分解能の構造解析が主で、結晶構造は一部のドメインのみが決定されているだけであった。合理設計によりヘモシアニンを工学的に應用するために、その詳細な立体構造情報の取得と構造に基づく機能解析が切望されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、スルメイカ由来ヘモシアニンの4MDaの会合体の結晶構造を決定する。また、構造決定に必要なアミノ酸配列、糖鎖配列も決定する。明らかになる構造に基づき、ヘモシアニンの動的なアーキテクチャーを解明し、ヘモシアニンを産業応用する際に有用となる構造学的知見を得ることを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) ヘモシアニンの調製：活スルメイカよりシリンジを用いて血リンパを採取し、これを結晶化に用いた。

(2) ヘモシアニンの1次配列の決定：スルメイカ外套膜よりゲノムDNAを採取した。既知のヘモシアニンの配列を元に作成したプライマーを用いて、PCR法によりスルメイカヘモシアニンのコード領域を増幅、サブクロー

ニングし、DNAシーケンサー(ABI Genetic Analyzer 3130)によりDNA配列を決定した。エキソン領域は、プログラムGENSCAN 1.0およびSPLICEPORTを用いて決定した。

(3) ヘモシアニンの結晶化、X線回折実験：ヘモシアニンの結晶はハンギングドロップ蒸気拡散法により、100mM HEPES (pH 7.5), 200mM CaCl<sub>2</sub>, 27.5-30% PEG400の結晶化溶液を用いて調製した。得られた結晶は、X線回折実験に用いるまで液体窒素中で保管した。X線回折データは、大型放射光施設 Photon Factory BL5Aにて収集した。2つの結晶から、それぞれ2.8オングストローム分解能のX線回折データを収集した。プログラムXDSを用いてこれらのデータを処理し、最終的に3.0オングストロームの分解能のデータを収集した。結晶の吸収スペクトルは、大型放射光施設 Spring8 BL38B1にて収集した。

(4) X線結晶構造解析：結晶構造は、クライオ電子顕微鏡解析により決定された巻貝由来ヘモシアニンのC $\alpha$ モデルをサーチモデルに用いた分子置換法により決定した。位相の改良には、プログラムDMを用いた。構造精密化には、プログラムphenix.refineを用いた。

## 4. 研究成果

DNA配列を元に、スルメイカヘモシアニンの3297残基からなる全アミノ酸配列を決定した。既知のヘモシアニンとは、39%-69%程度の配列相同性であった。スルメイカヘモシアニンは、8つの類似した機能ドメイン(Functional unit, 以後FUと略す)から構成されており(FU-a, b, c, d, d\*, e, f, g), ヨーロッパコウイカヘモシアニンと同様のドメイン構成であった。

活スルメイカより採取した血リンパを用いてヘモシアニンの結晶を得た。X線回折実験の結果、イカの個体により得られる結晶の質が大きく異なることがわかったため、良質な結晶を与える個体をスクリーニングした。100パイ以上のイカを用いたスクリーニングの末、良質な個体を探すことに成功し、その血リンパから調製した2つの結晶から2.8オングストロームの分解能のX線回折データを収集した。これらのデータをマージし、最終的に分解能3.0オングストロームのX線回折データを収集した。尚、結晶は酸素結合型ヘモシアニンの特有な345nm付近の吸収特性を示したことから、得られた結晶は酸素結合型ヘモシアニンの結晶であると判断した。分子置換法により構造決定し、最終的に、28,470残基、80個のCu<sub>202</sub>クラスター、50カ所の糖鎖修飾の原子構造を決定した。

明らかになった構造は、高さ約160オングストローム、直径約350オングストロームの巨大な円筒状の10量体であった。外側の外壁領域と、その内側に存在する5つの内部領域から形成されていた(図1)。外壁領域は、FU-a, b, c, d, e, fにより構成され、内部領域は、FU-

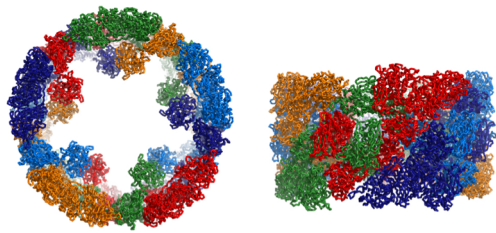


図1. ヘモシアニンの全体構造

左：上から見た図，右：横から見た図

d\*, g により構成されていた。外壁領域は，上下対称の会合した 2 量体が 5 回対称に配置した形，すなわち，D5 の対称性で会合していたのに対し，内部領域は円筒の片側に FU-g が配置し，その逆側に FU-d\* が配置していた。その結果，10 量体の全体構造としては，C5 の対称性を持った分子であることがわかった。C5 の対称性を持つヘモシアニンが，結晶中では，上下 2 つのオリエンテーションでパッキングしていたため，得られた電子密度は D5 の対称性を持っていた。その結果，内部の FU-g と FU-d\* の電子密度は互いに複雑に重なり合っており，FU-d\* の詳細な構造を決定することは困難であった。そこで，FU-d\* については，活性部位の銅イオンに由来する異常散乱シグナルを元に，ドメインの存在する大まかな位置だけを特定した（図 2）。

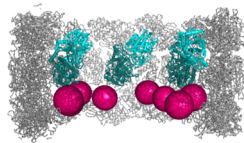


図2. ヘモシアニンの内部領域の構造

青：FU-g，ピンク：FU-d\* の位置

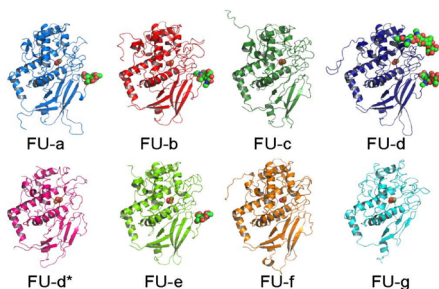


図3. FU の構造

4MDa にも及ぶ巨大な会合体を形成するヘモシアニンだが，それを構成する FU はすべて非常に類似した構造をしていた（図 3）。外壁領域に存在する 6 つの FU (FU-a, -b, -c, -d, -e, -f) は，FU-a と -b, FU-d と -e, FU-c と -f で，非常に類似した 2 回対称性を持つ 2 量体を形成していた。これらの構造的特徴から，FU の 2 量体が 1 つの構造単位となり，それらが会合する事で外壁領域が構築されているということがわかった。興味深いことに，FU-(d-e) と FU-(c-f) の 2 量体は隣接するプロトマー

間で 2 量体が形成されていた。すなわち，隣接するプロトマー同士は，複雑にドメインスワップしながらプロトマー間で FU2 量体を形成していた。これに加え，内部領域に存在する FU-g も，外壁領域で見られた 2 量体と同様の FU2 量体を遠く離れたサブユニット間で形成していた。以上の構造的特徴より，巨大な円筒状のヘモシアニンは，非常に類似した 80 個の FU が複雑にドメインスワップしながら，FU2 量体を形成し，それが共通の構造単位となって，組み上がっていることがわかった。

明らかになった構造において，FU-a, -b, -d, -e の 4 つの FU に N 型糖鎖が結合していた（図 3）。全体構造で見ると，糖鎖はすべて外壁領域の外側に結合しており，しかもそれらは非常に近接していた（図 4）。糖鎖は 3 つのプロトマーの境界に密集しており，プロトマー間の相互作用に影響を与えていると考えられた。N-グリコシダーゼ F により糖鎖を消化すると，10 量体への再会合効率が減少することが確認され，以上の結果を考え合わせ，プロトマー同士の会合に糖鎖が重要であることが明らかになった。上記の通り，ヘモシアニンの円筒構造は，FU 同士が複雑に 2 量体して形成されているが，糖鎖修飾はこれらの相互作用を補強していると推察される。

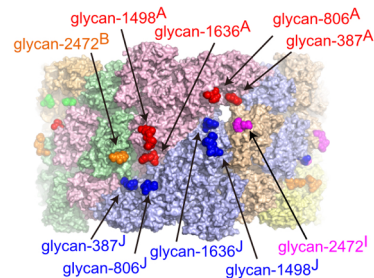


図4. ヘモシアニンの糖鎖修飾

サブユニットごとに色分けして表示している

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. 松野明日香, 田中良和, 超巨大蛋白質会合体ヘモシアニンの X 線結晶構造解析, 日本結晶学会誌 Vol. 58, 91-95 (2016) [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcrsj/58/2/58\\_91/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcrsj/58/2/58_91/_pdf) 査読有
2. Gai, Z., Matsuno, A., Kato, K., Kato, S., Khan, R. I., Shimizu, T., Yoshioka, T., Kato, Y., Kishimura, H., Kanno, G., Miyabe, Y., Terada, T., Tanaka, Y., and Yao, M., Crystal structure of the 3.8 MDa respiratory supermolecule hemocyanin at 3.0 angstrom resolution. Structure, 23, 2204-2212 (2015) <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2015.09.008> 査読有

3. Matsuno, A., Gai, Z., Tanaka, M., Kato, K., Kato, S., Katoh, T., Shimizu, T., Yoshioka, T., Kishimura, H., Tanaka, Y., and Yao, M., Crystallization and preliminary X-ray crystallographic study of a 3.8-MDa respiratory supermolecule hemocyanin. *J. Struct. Biol.*, 190, 379-382 (2015)  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.04.015> 査読有

[学会発表] (計 22 件)

1. Koji Kato, Asuka Matsuno, Yuxin Ye, Yuki Ohnishi, Akira Kitamura, Masataka Kinjo, Satoshi Abe, Takafumi Ueno, Yoshikazu Tanaka, and Min Yao, Encapsulation of Biomacromolecule into Porous Crystal of a Huge Protein Complex Hemocyanin, 新学術領域研究「動的秩序と機能」第 5 回国際シンポジウム, 2017 年 1 月 21 日~2017 年 1 月 22 日, 東京大学 (東京都, 目黒区)
2. Asuka Matsuno, Yuxin Ye, Yuki Ohnishi, Akira Kitamura, Masataka Kinjo, Satoshi Abe, Takafumi Ueno, Yoshikazu Tanaka, Min Yao, 巨大タンパク質会合体へモシアニンの多孔質性結晶を用いた生体分子の包摂, 第 54 回日本生物物理学会, 2016 年 11 月 25 日~2016 年 11 月 27 日, つくば国際会議場 (茨城県, つくば市)
3. 松野明日香, 蓋作啓, 加藤公児, 加藤早苗, 清水健志, 吉岡武哉, 岸村栄毅, 寺田透, 田中良和, 姚閔, The first crystal structure of intact 3.8MDa molluscan hemocyanin, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 13 日~2015 年 9 月 15 日, 金沢大学 (石川県, 金沢市)
4. 松野明日香, 蓋作啓, 加藤公児, 加藤早苗, 清水健志, 吉岡武哉, 岸村栄毅, 寺田透, 田中良和, 姚閔, 軟体動物の超巨大酸素運搬蛋白質会合体へモシアニンの X 線結晶構造解析, 2015 年 6 月 24 日~2015 年 6 月 26 日, 第 15 回日本蛋白質科学会, あわぎんホール (徳島県, 徳島市)
5. 松野明日香, 蓋作啓, 加藤公児, 田中良和, 姚閔, 超巨大蛋白質会合体へモシアニンの結晶構造, 2015 年 3 月 15 日~2015 年 3 月 16 日, 2015 年度量子ビームサイエンスフェスタ・第 7 回 MLF シンポジウム・第 33 回 PF シンポジウム, つくば国際会議場 (茨城県, つくば市)

6. 加藤早苗, Md. Rafiqul Islam Khan, 吉岡武哉, 信太茂春, 岸村栄毅, 清水健志, 田中良和, 分子量 4MDa の細胞外酸素運搬体へモシアニンの解離-会合, 2014 年 10 月 15 日~2014 年 10 月 18 日, 国立京都国際会館 (京都府, 京都市)

[図書] (計 1 件)

1. 田中良和 (監訳: 津本浩平, 植田正, 前仲勝実) *Essential タンパク質科学 第 2 章 タンパク質のドメイン*, 総ページ数 36 ページ (p59-94) 南江堂 (2016 年)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: へモシアニン会合体を用いた包摂体の製造方法  
発明者: 田中良和, 松野明日香, 北村朗, 金城政孝, 姚閔, 上野隆史, 安部聡  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特許出願 2016-110309  
出願年月日: 2016 年 6 月 1 日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/Topics/2015/Hemocyanin.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中良和 (TANAKA, Yoshikazu)  
北海道大学, 大学院先端生命科学研究院・准教授  
研究者番号: 20374225

(2) 研究分担者

姚閔 (YAO, Min)  
北海道大学, 大学院先端生命科学研究院・教授  
研究者番号: 40311518

加藤公児 (KATO, Koji)

北海道大学, 大学院先端生命科学研究院・助教  
研究者番号: 30452428