

中国産アオゴカイ *Perinereis aibuhitensis* と徳島産イトメ

Tylorrhynchus heterochaetus の血液に浮遊する巨大ヘモグロビンの グロビン鎖の一次構造比較

Comparative study on the primary structure of globin chains of the extracellular giant hemoglobins from the polychaete *Perinereis aibuhitensis* and *Tylorrhynchus heterochaetus*

山中瑞恵、脇加奈子、尾崎絵理香、金井拓、金井悠一郎、中辻崇、谷川和代、
橋本美城子、森由美子、倉林陽子、岸本慎哉、水本浩太、渡部稔、佐藤征弥、
真壁和裕、大橋眞、後藤寿夫*

徳島大学総合科学部自然システム学科生命科学

Abstract

Amino acid sequences of four types of globin chains a, A, b, and B of the giant Hb from the polychaete *Perinereis aibuhitensis*, which were collected at the delta of the Yangtze River in the People's Republic of China, were determined by the combination of Edman degradation and RT-PCR method. The primary structures of *Perinereis* globin chains are compared with those of globins isolated from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus* which was collected at the delta of the River Yoshinogawa in Tokushima City. *Perinereis* globin chains appeared to have 140 amino acid residues for the chain a, 144 for A, 147 for b and B, respectively. These sequences were completely in agreement with the partial cDNA sequences by RT-PCR which covered 119~137 amino acid residues. Some heterogeneities were found for the chain A by protein sequencing. On the other hand, RT-PCR revealed a few polymorphisms in the sequences of chains a, A and b. According to the phylogenetic tree constructed by UPGMA method, *Perinereis* globin chains were appeared to be separated into two strains A and B at the time later than the separation of vertebrate Mb and Hb but earlier than the separation of the alpha and beta chains of vertebrate Hb. *Perinereis* globins b and B appeared to be separated from globin A after the time when the trimeric globin chains A, b, and B had been separated clearly from the derivative of globin a according to the phylogenetic tree constructed by NJ method. The homologies between the corresponding globin chains of *Perinereis* and *Tylorrhynchus* Hbs were estimated to be within the range of 48~84%.

Keywords: giant hemoglobin, annelid, polychaete, phylogenetic tree, supramolecule

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: gotoh@ias.tokushima-u.ac.jp

1. はじめに

徳島産のゴカイ *Tylorrhynchus heterochaetus* (イトメ) と中国産のゴカイ *Perinereis aibuhitensis* (アオゴカイ) は共に環形動物門多毛綱遊在目ゴカイ科に属する近縁種である。祖先を同じくしながらも長年に渡って棲息する環境の負荷を受けて異なる種に分化した2種間にはどのような共通性と特異性が存在するのであろうか? その一端をヘモグロビン (Hb) の構造を通じて探った。

旧暦の十月、三日月の晩に *Tylorrhynchus* は川底から一斉に浮かび出て、水面を埋め尽くすように泳ぎながら下げ潮に乗って川を下る。四国の大河、吉野川の下流域には潮が入る大小の水路がたくさんあり、徳島大学の側を流れる助任川でも毎年ゴカイの生殖群泳が繰り返されてきた。地元の人々は、美しい自然の営みに感嘆してか、この虫を「ウキコ」と愛称している。おびただしい数のゴカイが川面一面に湧き上がってくる様はまさに第一級の風物詩である。

ミミズやゴカイ等の環形動物は血虫とも呼ばれるが、その血管は赤色を呈し、血液にはタンパク質としては桁違いに大きい細胞外 Hb が浮遊している。後藤と鈴木らは徳島産のゴカイ *Tylorrhynchus* の Hb を他の Hb と比較することを目的として、その構造を詳細に調べた [1,2]。環形動物の細胞外 Hb は脊椎動物の Hb の約 50 倍も大きく、六角二層の美しい形状をなしており、グロビンの分子進化の 1 極を占めている [2]。 *Tylorrhynchus* Hb から 6 種類の構成鎖が単離され、各鎖のアミノ酸配列を決定することによって、4 種類のグロビン鎖 (a、A、b、B) と 2 種類のリンカー鎖の存在が明らかになった [3-7]。巨大 Hb では初めて報告されたこれらのアミノ酸配列から、環形動物巨大 Hb の分子進化と分子構築に関わる重要な知見がもたらされ [2, 8]、この異常に大きいタンパク質は、いわば超分子の範疇に入ることが示唆されている [9,10]。この細胞外 Hb が巨大化する大きな要因は非ヘム鎖であるリンカーにある [10-14]。分子進化の面では、イトメ Hb のグロビン鎖には A 群 (a 鎖と A 鎖) と B 群 (b 鎖と B 鎖) の 2 つの系統があるこ

とが示され [6]、その後 2 系統の存在は貧毛類の *Lumbricus terrestris* (ツリミミズ) でも確認された [15]。一方、アミノ酸配列から算出される正確な各構成鎖の分子質量を基礎に、約 180 本のポリペプチド鎖から構成され、~3, 500 kDa に及ぶ巨大分子の分子構築が推定されている [16]。かつては SDS-PAGE や沈降平衡法などによって各構成鎖の分子質量が求められ、それを基礎に巨大 Hb のサブユニット構成のモデルが提案されていたが、正確を期すことは困難であった [2]。基本鎖の分子質量の測定誤差が約 200 倍に増幅されるからである。最近、アミノ酸配列によって正確に決められた構成鎖の分子質量は、ESI-MS によってその妥当性が検証されている [16]。

本稿の第 1 の目的は、揚子江の河口域周辺部で採集された *Perinereis* から単離した Hb の 4 種類のグロビン鎖について互いの進化的位置を推定すると共に、徳島産の *Tylorrhynchus* Hb との一次構造を比較することにある。一方、我々が巨大 Hb のグロビン鎖の全アミノ酸配列を初めて報告してから 20 年あまりが経過し、この間に多くの巨大 Hb のアミノ酸配列が報告されている。そこで、第 2 の目的として、*Perinereis* Hb を含む既知の細胞外巨大 Hb のグロビン鎖の分子進化の系統樹を作成し、この系統樹の特徴を再検討する。

2. 材料と方法

Perinereis Hb の精製

Perinereis は中国揚子江河口域で採集され、その輸入品を徳島市内の釣具店で購入した。*Perinereis* Hb は Tsuneshige らの方法 [17] に従い、虫を組織ごと破碎し、遠心分離や硫酸分画を行うことにより粗 Hb を分画し、超遠心とゲルろ過により精製した。まず、200 g の *Perinereis* に 0.5 mM フェニルメチルスフォニルフルオリドを含む冷した蒸留水を加え、氷冷しながらワーリング・ブレンダー (日本精機製作所) で 15 秒ずつ 3 回均質化を行った。次に、得られた懸濁液を冷却遠心機 himac CR 20E (日立工機) で遠心分離した (10,000 rpm × 15 min)。Hb が溶けている上清を分取し、硫酸分画 (30-45 % 飽和)、遠心分離 (10,000 rpm

× 15 min) を繰り返して濃縮し、得られた沈殿を少量の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶かして粗 Hb 溶液とした。次に、Sephacryl S6B (Pharmacia Biotech) を充填したカラム (4.4×100 cm, Amicon) に粗 Hb 溶液を載せてゲルろ過を行った。50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) で溶出し、フラクションコレクター SF200H (Toyo) で分取した。Hb 画分を超速心機 Hitachi 55P-72 (日立工機) で濃縮 (50,000 rpm × 3 hrs) し、再びゲルろ過と超速心を行って精製 Hb を得た。精製した Hb は少量の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶かし、氷中に保存した。

Perinereis Hb 溶液の濃度測定

精製した Hb をシアノメト型に修飾して、ヘムの濃度を分光光度計 UV-160A (島津製作所) により測定し、その値をもとに Hb の濃度を算出した。シアノメト型 Hb のヘム濃度が 1 mM のとき、吸光係数は 540 nm、1 cm path で 11.3 [18]とした。また、蟻酸やアセトニトリルに晒されて脱ヘムした試料のタンパク量は BCA 法 [19] によって定量した。試薬は Pierce の Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit を使用した。

Perinereis Hb 単量体 a 鎖の分離

Perinereis Hb の単量体 a 鎖の分離はゲルろ過によった。ゲルろ過には FPLC システム (Pharmacia Biotech) を使用した。まず、凍結乾燥した Hb (15 mg) を 70 % 蟻酸 500 μ l に溶解し、低温室で一晩静置して解離させた。その Hb 溶液を蒸留水で 2 倍に希釈し、これを 30 % 蟻酸で平衡化したカラム (Superdex 75HR 1 × 30 cm ; Pharmacia Biotech) に 200 μ l ずつかけ、流速 0.5 ml/min で溶出した。タンパク質は 280 nm の吸光度によって連続的にモニターし、フラクションコレクターで溶出液を自動的に分取した。2 つのピークが観察され、最初のピークにはグロビン三量体 (A-b-B) とリンカーが含まれ、2 番目にはグロビン単量体 (a 鎖) が含まれている (図 S2)。ゲルろ過によって得られた各分画を水に対して透析した後濃度測定し、凍結乾燥機 VD-41 (タイテック) で凍結乾燥を行い、冷暗所 (-80 °C) に保存した。他の構成鎖が含まれている場合には、さらに HPLC を用いて逆相カラムクロマトグラフィー (COSMOSIL 5C₁₈-300、4.6×150 mm, Nacalai Tesque) によって a 鎖を精製した。

HPLC による Perinereis Hb 三量体の単離

Tosoh 8020 型 HPLC システム (東ソー) を使用して Perinereis Hb 三量体を単離した。まず、逆相クロマトグラフィー用カラム (COSMOSIL 5C₁₈-300, 4.6×150 mm, Nacalai Tesque) を 0.1 % TFA を含む 10 % アセトニトリルで平衡化し、単量体 a 鎖を除去した凍結乾燥試料 (約 600 μ g) を 0.1 % TFA を含む 10 % アセトニトリル 1 ml に溶かし、それを 250 μ l ずつカラムに載せて溶出した。アセトニトリルの濃度勾配は、60 分で 10~70 % の直線勾配がかかるようにプログラムし、流速 1 ml/min で溶出しながら 220 nm の吸光度を連続的にモニターした。次に、この溶出パターンを参考にして、より適切なアセトニトリルの濃度勾配を決め、改めて別の試料をカラムにかけて新たな溶出プログラムに従ってタンパク質を溶出し、ピークごとに分取した。2 つのピークが観察され、2 番目の大きなピークに三量体が溶出された (図 S3)。この画分を凍結乾燥して、-80°C で暗所に保存した。

Perinereis Hb 構成鎖の S-S 結合の切断と SH 基の修飾

エドマン分解での PTH アミノ酸の同定が容易であることから、還元ピリジリエチル化により、タンパク質試料の S-S 結合の切断と SH 基の修飾を行った。還元ピリジリエチル化は Friedman らの方法 (16) を改良して行った。凍結乾燥したタンパク質 (Hb, 単量体 a 鎖, 三量体 A-b-B) に、8 M 尿素、1 % 2-メルカプトエタノールを含む 15 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) をタンパク質濃度 0.5~5 mg/ml になるように入れ、遮光して室温で 24 時間攪拌した。次に、最終濃度 1.5 % となるように 4-ビニルピリジン (PE) を加え、遮光して室温で 2 時間攪拌を続けた。そして 1~3 % の酢酸溶液に対して透析した後、濃度測定を行い、凍結乾燥した。PE 化のプロセスでは、メルカプトエタノールと 4-ビニルピリジンは開封直後に使用した。純度の高い窒素ガス (99.99995% 以上) を使用し、窒素置換を注意深く行った。

HPLC による Perinereis Hb の PE グロビン鎖の単離

Perinereis Hb を PE 化したグロビン鎖は Tosoh 8020 型 HPLC システム (東ソー) を用いて逆相クロマトグラフィーにより精製した。まず、逆相クロマトグラフィー用カラム (COSMOSIL 5C₁₈-300、4.6×150 mm、

Nacalai Tesque) を 0.1% TFA を含む 10% アセトニトリル溶液で平衡化した。凍結乾燥した PE 化タンパク質試料はカラムの平衡液に溶解した。このタンパク質溶液を 250 μ l ずつカラムにかけ、10~80% のアセトニトリル濃度の直線勾配で流速 1 ml/min で溶出した。この予備実験のパターンをよく観察して、より適切なアセトニトリル勾配での溶出プログラムを組んだ。改めて別の試料をカラムにかけて新しい溶出プログラムに従ってタンパク質を溶出し、各ピークごとに分取した (図 S4)。各画分を凍結乾燥して、-80°C で保存した。

Perinereis Hb グロビン鎖の臭化シアン分解

臭化シアン分解は Gross の方法 [17] に従って行った。400 μ g のタンパク質を 70% 蟻酸 400 μ l (タンパク質濃度 1%) に溶解した。この試料にタンパク質と等重量の臭化シアンを加え、室温、暗所で一晚反応させた。次に、ドラフトの中で窒素気流下で乾固し、再び 70% 蟻酸に溶解した後、凍結乾燥した。

臭化シアン分解した a 鎖のペプチド断片の単離

切断した a 鎖の断片は μ プロッター・キャピラリー HPLC システム (PERKIN ELMER) を使用して逆相カラムクロマトグラフィーによって分取した。臭化シアンで切断した試料を 6 M 塩酸グアニジンに溶解し、Dye マーカー (cLC Dye Mark II, PERKIN ELMER) を加え、0.1% TFA を含む 5% アセトニトリル溶液で平衡化したカラム (Capillary LC 150 \times 0.5 mm, PERKIN ELMER 社) にかけた。溶出は、0~40 min で 5~45%、40~80 min で 45%、80~120 min で 45~90% のアセトニトリル濃度の直線勾配、流速 5 μ l/min で行った。溶出液は PVDF 膜 (PERKIN ELMER) 上に速度 1 mm/min で自動的にプロットイングした。プロットイング後、PVDF 膜を Dye マーカーを基準にクロマトグラムに合わせ、各ピークごとに切り取ってプロテインシークエンサーにかけた。

臭化シアン分解 A 鎖と A2 鎖のペプチド断片の精製

A (=A1) 鎖と A2 鎖の臭化シアン分解産物は Tosoh 8020 HPLC システム (東ソー) を使用して、逆相クロマトグラフィー用カラム (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II, 4.6 \times 150 mm, Nacalai Tesque) にかけて各ペプチドを単離した。まず、この逆相カラムを 0.1% TFA を含

む 10%アセトニトリル溶液で平衡化した。凍結乾燥した試料はカラムの平衡液に溶解した。臭化シアン分解した試料をカラムにかけ、0.1% TFA を含む 10~80% のアセトニトリル濃度の直線勾配で流速 1 ml/min で溶出した。そのパターンから適当なアセトニトリル勾配の溶出プログラムを決めた。改めて試料をカラムにかけて、新たなプログラムで溶出し、ピークごとに分取した。各画分を凍結乾燥して、-80°C で暗所に保存した。

Perinereis グロビン鎖の酵素消化

単離した Perinereis Hb の各 PE グロビン鎖は 5 種類のタンパク質分解酵素を適宜使い分けて、消化された。使用した *Achromobacter* プロテアーゼ I (リシルエンドペプチダーゼ) と *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼ I は Wako、エンドプロテイナーゼ Asp-N とアスパラギンリシルエンドペプチダーゼ Asn-EP (Residue-specific Proteases Kit for Sequence Analysis) は Takara、トリプシン (TPCK Treated) は Sigma からそれぞれ購入した。

リシルエンドペプチダーゼは 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) に溶かし、500 μ g/ml の酵素液を調整して冷凍保存しておいた。PE 化した構成鎖 (150 μ g、10 nmol) を 8 M 尿素 110 μ l に溶かし、37°C でインキュベートして変性させた。次に、50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) を 160 μ l 加え、酵素が失活しないよう尿素濃度 3 M 近くにまで下げた。これに、酵素/基質 (モル比) 1/100 になるように酵素液 6 μ l (0.1 nmol) を加え、37°C で 4~12 時間消化した。

V8 プロテアーゼは 50 mM 炭酸水素アンモニウム (pH 7.8) に溶かし、500 μ g/ml の酵素液を調整し冷凍保存しておいた。PE 化したグロビン鎖 (150 μ g、10 nmol) を 8 M 尿素 80 μ l に溶かし、37°C で 30 分インキュベートして変性させた。次に、50 mM 炭酸水素アンモニウム (pH 7.8) を 580 μ l 加え、酵素が失活しないよう尿素濃度を 1 M 近くにまで下げた。これに、酵素/基質 (モル比) 1/100 になるように酵素液 6 μ l (0.1 nmol) を加え、37°C で 24 時間消化した。

エンドプロテイナーゼ Asp-N による消化は下記のように行った。凍結乾燥したグロビン鎖 (2 nmol) を 8 M 尿素 50 μ l に溶かし、室温で 60 分静置し変性させた。次に、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) を 400 μ l 加え、酵素が失活しないよう尿素濃度を 1

M 近くにまで下げた。さらに、酵素/基質 (モル比) 1/100 になるように酵素液 50 μ l (10 pmol) を加え、37 $^{\circ}$ C で4~12時間消化した。

アスパラギニルエンドペプチダーゼは、他の酵素処理によって比較的長目のペプチドが得られた場合にその消化に用いた。まず、凍結乾燥した試料 (約6 nmol) を、8 M 尿素 150 μ l に溶かし、37 $^{\circ}$ C で一時間インキュベートして変性させた。次に、キットに含まれているアスパラギニルエンドペプチダーゼ溶液 (0.01% Tween 20, 1 mM DTT, 1 mM EDTA を含む 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0)) 300 μ l を添加し酵素/気質 (モル比) 1/100 になるようにした。さらに、緩衝液を 300 μ l 加え、酵素が失活しないように尿素濃度を 1.6 M 近くにまで下げ、37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートして変性させた。99 % 蟻酸を 50 μ l (最終濃度 6.25 %) 加えて反応を停止させた。

トリプシン消化は以下のように行った。まず、凍結乾燥したグロビン鎖 (35 nmol) を 8 M 尿素 500 μ l に溶かし、37 $^{\circ}$ C で一時間インキュベートし変性させた。次に、0.01 % Tween 20 と 10 mM CaCl₂ を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を 2 ml 加え、酵素が失活しないように尿素濃度を 1.6 M まで下げた。これに酵素/基質 (モル比) が 1/30 になるようにトリプシンを 1.2 pmol 加えた。37 $^{\circ}$ C で 40 時間インキュベートして反応させた。99 % 蟻酸を 340 μ l (最終濃度 12 %) 加えて反応を停止させた。

いずれの場合も、酵素処理後に試料を凍結乾燥して、使用時まで -80 $^{\circ}$ C で冷凍保存した。

酵素消化したグロビン鎖のペプチドの精製

ほとんどの場合、酵素消化して得られたペプチドは直接逆相クロマトグラフィーにかけたが、ピークが多すぎて分離が悪い場合は、はじめにゲルろ過クロマトグラフィーにかけて、分子のサイズによって大まかに分離してから逆相クロマトグラフィーで精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーには、Tosoh 8020 型 HPLC システム (東ソー) を使用し、Superdex Peptide 10/300 GL カラム (1 \times 30 cm; Amersham Biosciences) にかけて。酵素処理した試料を 0.1 % TFA を含む 15 % アセトニトリル溶液で平衡化したカラムにかけて溶出した。タンパク質は 220 nm の吸光度でモニターした。1 分毎に溶出液を分取した。おおむねピーク毎に分画し、凍結乾燥して冷凍保存した。

次に、各画分を逆相クロマトグラフィーにかけた。逆相クロマトグラフィー用カラム (COSMOSIL 5 C₁₈-300, 4.6 \times 150 mm, Nacalai Tesque) は 0.1% TFA を含む 10 % アセトニトリル溶液で平衡化した。次に、酵素消化したカラムにかけ、5~55 % のアセトニトリル濃度の直線勾配で流速 1 ml/min で溶出した。そのパターンからより適切なアセトニトリルの勾配を推定して、溶出のプログラムを組んだ。改めてカラムに試料をかけて新たな溶出プログラムによってペプチドを溶出し、各ピークごとに分取して、凍結乾燥し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

アミノ酸配列の決定

HPLC により分離された各種のペプチドのアミノ酸配列や各グロビン鎖 N 末端の配列はアミノ酸シーケンサー 491 型 Procise (Applied Biosystems) により決定された。この装置には Edman 法が組み込まれている。得られたデータの解析は Model 610 Data Analysis Program によって行った。収量値がゼロに近くても "Multiple Cycle" を活用することによって前後のサイクルを明確に区別することができた。使用した試薬はすべて Applied Biosystems から購入した。

RNA の抽出

Perinereis からの全 RNA の抽出には RNeasy midi kit (QIAGEN) を使用した。まず、*Perinereis* を PBS で洗い、3 個体ずつ液体窒素で凍結させ、-80 $^{\circ}$ C で保存しておいた。凍結した虫を乳鉢に入れ液体窒素中ですりつぶし、RNase が働かないよう RLT (10 μ l/ml 2ME を含む) を数滴加えた。粉末状になったものを 250 mg/4 ml になるように RLT に加えよく懸濁し 6,500 rpm で 10 分間遠心し不溶物を取り除いた。上清に 70% エタノールを等量加えよくボルテックスし混和させた。次に、この溶液を 4 ml づつ RNase midi カラムに乗せ 5,000 rpm で 5 分間遠心することでベッドに RNA を吸着させた。カラムに buffer RW1 4 ml を載せ遠心し、さらに buffer RPE を 2.5 ml を載せて遠心することでカラムの洗浄を行った。続いて、RNA の溶出を行った。まず、溶出液は RNase free water を使用し、これをカラムに 200 μ l を載せ室温で 1 分間静置し、5,000 rpm で 3 分間の遠心により溶出して全 RNA を得た。回収された RNA を含む溶液は、これの 10% 量の 3M 酢酸ナトリウムと 2.8 倍量の 100 %

エタノールを加えてよく混和し、 -80°C で保存した。

Single strand DNA の合成

total RNA からの single strand DNA の合成は、LaBonne & Whitman [20] と Watanabe & Whitman¹の方法 [21] によって行った。あらかじめ抽出しておいた Total RNA 溶液に含まれるゲノム DNA を酵素分解して除いた。まず、total RNA を $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるよう TE buffer (pH 8.0) に溶かし、この RNA 溶液 $10\mu\text{l}$ ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) に $10\times$ DNase Buffer を $5\mu\text{l}$ 、DNase 1 を $2\mu\text{l}$ 、RNase free water を $33\mu\text{l}$ 加え (final volume $50\mu\text{l}$) をよく混和させて 37°C で 30 分間インキュベートし、total RNA に含まれるゲノム DNA を分解した。次に $5\mu\text{l}$ の DNase 1 Inactivation reagent を加え、室温で 5 分間インキュベートした。これを 2 分間 $13,500\text{ rpm}$ で遠心し、DNase 1 Inactivation reagent を沈殿させることで DNase 1 を共沈殿させて取り除き、上清 ($\sim 45\mu\text{l}$) を分取した。次に逆転写反応を行うことにより一本鎖 DNA を合成した。まず、DNA を除去した total RNA 溶液 ($\sim 45\mu\text{l}$) に oligo dT を $2\mu\text{l}$ 加えた。RNA の高次構造を壊すため 70°C で 3 分間インキュベートした後に、水中で 10 分間急冷した。10 分後、 $10\times$ MMLV RTase buffer (Wako) を $10\mu\text{l}$ 、 100 mM DTT を $10\mu\text{l}$ 、 2.5 mM dNTP (Takara) を $20\mu\text{l}$ 、RNasin ($70\text{unit}/\mu\text{l}$; Takara) $1\mu\text{l}$ 、MMLV RTase $2\mu\text{l}$ 、蒸留水 $10\mu\text{l}$ を順次加えてよく混和させた (final volume $100\mu\text{l}$)。次に、これを 37°C で 30 分間、続いて 95°C で 3 分間インキュベートを行い、直後に急冷し、一本鎖 DNA (ssDNA) を得た。これに $100\mu\text{l}$ の蒸留水を加えた (volume $200\mu\text{l}$)。

RT-PCR による目的遺伝子の増幅

プロテインシークエンサーによって決定された *Perinereis* Hb の各グロビン鎖 (a, A, b, B) のアミノ酸配列から各々の degenerate プライマーをデザインした。プライマー部位はできるだけ、コドンのゆらぎの少ない部位を選び設計した。プライマーの配列は以下の通りである：

A 鎖 UP: AAR GTN AAR CAR CAR TGG GC
Down: GGR TAD ATN ACY TCR TCC CA
a 鎖 UP: ATH AAR GTN AAR CAY CAR TGG GT
Down: CCA NGC RTC YTT RTC RAA RTG

B 鎖 UP1: GAY GAY TGY TGY TCN GCN GC
UP2: GAY GAY TGY TGY AGY GCN GC
Down: TCC CAN GCN CCN GCR TTR AA
b 鎖 UP1: GAY CAR TGY TGY TCN ATH GA
UP2: GAY CAR TGY TGY AGY ATH GA
Down: NCC RTC RAA RCA RTG RTT CCA

なお、縮重している塩基の略称は以下の通りである。
R=A/G, D=A/G/T, N=A/C/G/T, Y=C/T, H=A/T/C。また B 鎖のアッププライマーと、b 鎖のアッププライマーは 2 種類を混合して、各々のダウンプライマーと PCR に用いた。図 S15~S18 に、これらのプライマーに対応する部分にシャドーを付けて示す。

RT-PCR の反応液組成は、 $10\times$ buffer $5\mu\text{l}$ 、dNTPs (各 2 mM) $5\mu\text{l}$ 、 25 mM MgCl_2 $3\mu\text{l}$ 、rTaq polymerase $0.2\mu\text{l}$ 、primer $2\mu\text{l}$ ($50\text{ pmol}/\mu\text{l}$) $\times 2$ 、蒸留水 $25.8\mu\text{l}$ 、ssDNA (RT reaction) $8\mu\text{l}$ とした。この反応混液を予め 94°C で 2 分間熱変性させてから、改めて 94°C で 30 秒間、 55°C で 30 秒間、 72°C で 1 分間とそれぞれ熱変性、アニーリング、伸長反応を 25 サイクル繰り返し、最後に 72°C で 10 分間の伸長反応を行い、反応を終了させた。この反応には PCR 装置 (PCR ExpressTM, Thermo Bioanalysis) を使用し、DNA 増幅の結果は電気泳動により確認した。

PCR 産物の精製

PCR 産物の精製には、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を使用した。まず、PCR により目的遺伝子を増幅した試料 ($45\mu\text{l}$) に 5 倍量の buffer PB を加え、これを QIAquick spin column に乗せて 135 rpm 1 分間遠心し、カラムに吸着させて、 0.75 ml の buffer PE でカラムを洗浄した。また、溶出は $30\mu\text{l}$ の $0.1\times$ TE buffer (pH 8.0) で行った。溶出液は 4°C で保存した。

プラスミドベクターへの挿入

精製した PCR 産物をプラスミドベクターに挿入するためライゲーション反応を行った。プラスミドベクターは pCR2.1 (3.9Kb (invitrogen)) を使用した。PCR 産物 $8\mu\text{l}$ にプラスミドベクターを $2\mu\text{l}$ と Ligation high (TOYOBO) を $10\mu\text{l}$ 加え、 16°C で 6 時間インキュベートして反応させた。

コンピテントセルへのプラスミドの挿入 (形質転換)

氷中で解凍した、コンピテントセル溶液 (200 μ l) に 3.5 μ l の 2-メルカプトエタノールを加え、穏やかに攪拌し、これを氷中で 10 分間静置した。これをプラスミド溶液 10 μ l に 60 μ l ずつ加えさらに氷中で 30 分静置させ、次に 37 $^{\circ}$ C で 2 分インキュベートし、直ちに氷中に 3 分置いた。これに 500 μ l の SOC 培養液を加え、37 $^{\circ}$ C で振盪させて形質転換を行った。8,000 rpm で 2 分間遠心して大腸菌を沈澱させ、上清を 100 μ l ほど残して、取り除いた。100 μ l の上清に大腸菌を懸濁し、アンピシリンを含む LB プレートに IPTG と X-gal を染み込ませた後にスプレッドし、37 $^{\circ}$ C で一晚培養した。翌朝、得られたコロニーの中からホワイトコロニーを選んで PCR によりインサートのチェックを行った。

プラスミドの精製

インサートチェックの結果から PCR 産物を含むクローンをマスタープレートから起こし、アンピシリンを含む LB 培養液で一晚 37 $^{\circ}$ C で振盪培養した。そしてアルカリー SDS 法を利用した精製キット (QIAGEN) を使いプラスミドの精製を行った。また、精製したプラスミドを Eco R1 で切断し、電気泳動によりインサートを確認した。

DNA シークエンスによる塩基配列の決定

Big Dye terminator kit v1.1 (ABI) を用いたサイクルシークエンス (96 $^{\circ}$ C-10 秒, 50 $^{\circ}$ C-5 秒, 60 $^{\circ}$ C-4 分を 25 サイクル) により、DNA を蛍光標識した。次に、サンプル溶解液は TSR (template suppression reagent; ABI) を使用し、反応生成物の分離には Prism 310 シークエンスアナライザー (ABI) を用いて DNA のシークエンスを解析した。

塩基配列解析ソフトによる塩基配列の解析

Genetix Mac (Apple) を使い、得られた DNA シークエンスをアミノ酸配列に変換した。次にプロテインシークエンスにより求められた各グロビン鎖のアミノ酸配列を、DNA シークエンスから推定されたアミノ酸配列と比較した。

ホモロジーの検索と系統樹の作成

アミノ酸配列を決定したグロビン鎖と他のグロビン

鎖との相同性を算出するために DDBJ のホームページ [22] で提供している CLUSTALW を用いてアライメントを行った。グロビン鎖の分子進化の系統樹を Mac Vector 6.0 (帝人システムテクノロジー) の UPGMA 法 (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean: 無加重平均距離法) と TreeView PPC (Ver.1.6.6) の NJ 法 (Neighbor Joining: 近隣結合法) [23] を用いて作成した。

グロビン鎖の命名法

Perinereis Hb は尿素存在下あるいは酸性またはアルカリ側でグロビン鎖の単量体と三量体およびリンカーに解離する [14]。単量体グロビン鎖を “a”、三量体を構成するグロビンを “A”、“b”、“B” と名付けた。ここで、A 鎖は N 末端の配列が a 鎖によく似ている。また、b 鎖と B 鎖は N 末端の配列が似ており、配列全体でもみても相同性が高い。さらに、多毛類の *Tylorrhynchus* Hb と貧毛類の *Lumbricus* Hb に共通して、Cys の残基数が各グロビン鎖 a、A、b、B に対して、それぞれ順に、2、3、4、3 であることが分かっている [2]。従って、b 鎖と B 鎖は Cys の残基数で区別される。この簡便な命名法に従って、*Perinereis* Hb の一次構造解析の結果を見ながら、それぞれのグロビン鎖を同定した。

3. 結果¹と考察

Perinereis グロビン鎖の配列と各鎖間の相同性

図 1 に、Edman 分解によるアミノ酸配列と RT-PCR 法による cDNA から推定されるアミノ酸配列を併せて、*Perinereis* Hb の 4 種類のグロビン鎖を整列して示した。Edman 法によるアミノ酸配列の決定と RT-PCR 法によって作成した cDNA の配列は完全に一致した。ただし Edman 法は全域をカバーしているが、RT-PCR 法は、それぞれ、a 鎖がアミノ酸残基の 8~127、A 鎖が 11~139、b 鎖が 1~137、B 鎖は 1~131 の間に対応する

¹タンパク質の精製、ペプチドの精製、各ペプチドのアミノ酸配列、ssDNA の増幅、cDNA の配列決定等々アミノ酸配列の決定に至るまでの途中のデータの詳細は補助データとして文末にまとめて記載する。

cDNA の作成に止まっている。この点で、未完の部分が含まれるが、酵素消化などによって得られたペプチド間の配列ギャップをほとんど埋めており、図 1 に示したアミノ酸配列は信頼度が高い。a 鎖は 140、A 鎖は 144、B 鎖と b 鎖はともに 147 残基から構成されている。29 残基が 4 種のグロビンに共通であり、19.3% を占める。また、このうち 11 残基がヒト Hb の β 鎖でも保存されている。グロビン巻きが脊椎動物の Mb と類似であれば、図 1 で N 末端から 100 番目の残基が近位の His (F8) で、66 番目が遠位の His (E7) に相当するものと推定される。Perinereis グロビン間の相同性は b 鎖と B 鎖間が最も高く、54 % に達するが、他は 30~32% の範囲に収まっている (図 4)。

Perinereis グロビン鎖の heterogeneity

A1 鎖と A2 鎖のアミノ酸配列のアラインメントを図 2 に示す。PE 化した Perinereis Hb の三量体を HPLC にかけて A 鎖のピークにきわめて近い流出位置に明瞭なピークが現れる (図 S4)。このタンパク質の N 末端の 5 残基のうち 4 残基

が A 鎖と異なるが、それ以降の 20 残基あまりは全く同じであった。そこで、これを、“A2”鎖と名付けた。これらを区別するために改めてメジャー成分を“A1”鎖とした。A2 鎖は A1 鎖よりも 2 残基多く、146 残基からなる。これら 2 つのグロビン鎖間では、12 箇所に変異が認められ、そのうちの約 1/3 が N 末端に集中している。A1 鎖と A2 鎖の相同性は 91.8% で、互いに近縁であることは明白である。A2 鎖は臭化シアン分解して得られた 3 本のペプチドを Edman 分解によってアミノ酸配列を解析しただけなので、2 カ所にギャップが残された。しかし、cDNA からの情報によって Met 残基を跨いでの 2 つのギャップはつながった。また、A1 鎖と A2 鎖のアラインメントもこの結論を補完している。A2 鎖の他には HPLC 上で明瞭なピークとしてとらえられるマイナーなグロビン鎖は観察されなかった。しかし、グロビン鎖の消化産物を HPLC によって分離したペプチドのアミノ酸配列に時折 microheterogeneity が観察されることがあった (図 2)。そこで、cDNA の配列に注目したとこ

```

a  --DCNAMARIKVKHQWVDVYGA--NVDREGFATAVWRKYFHDHP-DRGLF
A  DTHCGPLQRLKVKQQWAKAYGV--GHERVELGIALWKSMFSQDPEARKLF
b  DQCCSIEDRHEVQALWQSIWSAENTGKRTLIGRRIFEEELFDINPGTKALF
B  DDCCSAADRHAVLSDWQNVWSAEFTGRRVAIGKAIFEELFAIDASAKGVF
                                     50
a  ANVNGNNIYSAQFRAHMVRVFAGLDILISLDEESDATFHSAAAHYLEFH
A  DRVHGEDVRSPAFEAHIARVFNGFDRIISSLTDEDVLNAQ--LAHLKEQH
b  GRVNVDDMGSPEFKAHVLRVMNGLDTLIGVLDDPA--TGTSLIQHLAEQH
B  GRVHVDDQSPEWAAHVIRVINGLDLAINLLEDPR--ALNEELHHLARQH
                                     100
a  KQF-G--AIPFADFGQSFLDTLPDFIHEHFDKDAWSSCYNIVSNLGA--
A  IKL-GITAHHFKLMRTGLGYVLPAQLGRCFDKAAWSACWDEVIPGIKS-
b  KARDGFKAAYFKDIGVALRRVLP-QVASCFNPEAWNHCFDGFVASITAAM
B  RERDGVKAVYFDEIEKALLKVLP-QVSSNFNAGAWDRCFTRIASVIKAEL
                                     150

```

図 1 Perinereis Hb のグロビン鎖 4 種類のアミノ酸配列のアラインメント

4 種のグロビン鎖に相同なアミノ酸を青字で示した。またヒト Hb の β 鎖と相同なアミノ残基を赤字で示した。

ろ、メジャー成分に対してアミノ酸レベルで1残基のみ置換されたグロビン鎖が、いくつか発

見された。それらに対して、A2鎖の命名に順じて、“a2”, “A3”, “b2”と名付けた(図S15~S17)。

A1	DTHCGPLQ	RLKVKQQWAK	AYGVGHERVE	LGIALWKSMT
A2	DHHTGCGPLQ	RLKVKQQWAK	AYGVGHERVE	LGLALWKSMT
A1	SQDPEARLKF	DRVHGEDVRS	PAFEAHIARV	FNGFDRIISS
A2	AQDPDARKLF	KRVHGDDVRS	PEFEAHIARV	FNGFDRIISS
A1	LTDEDVLNAQ	LAHLKEQHIK	LGITAHHFKL	MRTGLGYVLP
A2	LTDEDVLNAQ	LAHLKAQHIK	LGITGHHFKL	MRTGLGYVLP
A1	AQLGRCFDKA	AWSACWDEVI	YPGIKS	
A2	AQLGRCFDKA	AWSACWDEVI	YPGIKS	

図2. *Perinereis* Hb A1 (=A) 鎖と A2 鎖のアミノ酸配列の比較

共通なアミノ酸残基は赤色で、置換が生じているアミノ酸残基は青色で示した。12 個所の変異が認められる。なお、プロテインシーケンシングの過程でいくつかの変異が認められた: A1Gly4→Leu, A1Ser39→Ala, A1Glu43→Asp, A1Glu54→Asp, A2Pro8→Ser。

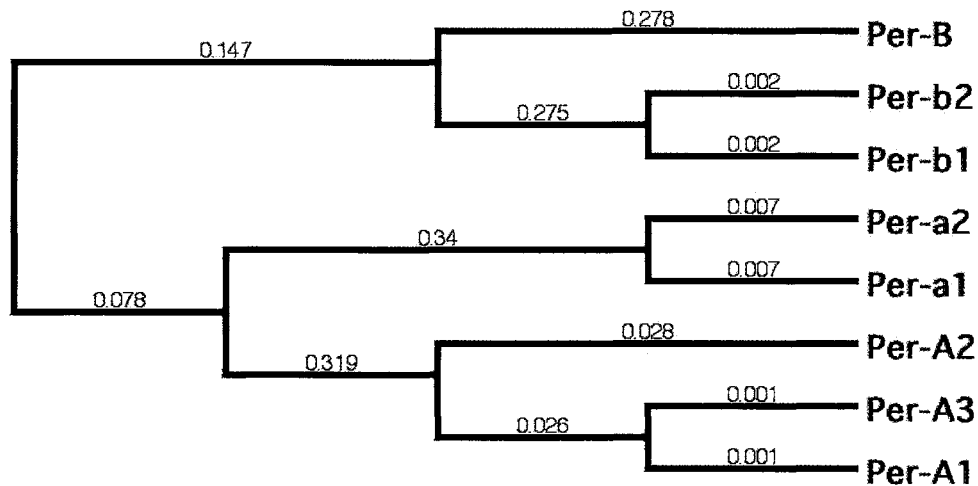


図3-1 UPGMA 法によって作成した *Perinereis* グロビン鎖の系統樹

多型として見つかったグロビン鎖 a2, A3, b2 の配列は文末に補助データとして示す。グロビン鎖 a1, A1, b1 はメジャー成分で、マイナーな成分と区別するために便宜的に用いている。Per は *Perinereis* の略。

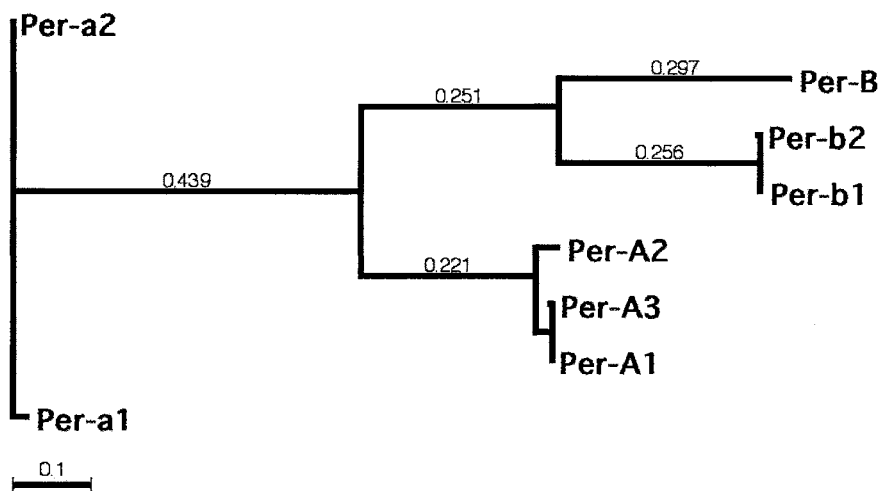


図 3-2 NJ 法によって作成した *Perinereis* グロビン鎖の系統樹
詳細は図 3-1 に同じ。

Perinereis グロビン鎖の系統樹

決定された *Perinereis* グロビン鎖 (a1, a2, A1, A2, A3, b1, b2, B) のアミノ酸配列を基に作成した分子進化の系統樹を図 3-1 と 3-2 に示す。UPGMA 法により作成された系統樹 (図 3-1) からグロビン鎖が A グループ (a1, a2, A1, A2, A3) と B グループ (b1, b2, B) に分かれることが確認できる。また、NJ 法 (図 3-2) による解析から、A 鎖と B グループのグロビン鎖 (b 鎖と B 鎖) は a 鎖と類似のグロビン鎖がかなり変異を起こしてから、互いに分岐したことが窺える。

Perinereis グロビン鎖と Tylorrhynchus グロビン鎖の相同性

Perinereis のグロビン鎖と *Tylorrhynchus* のグロビン鎖の相同性を図 4 に示した。既に述べたように、*Perinereis* のグロビン鎖間では、b 鎖と B 鎖の相同性が最も高く、その値は 54% である。これは *Tylorrhynchus* のグロビン鎖間でも同様に、b 鎖と B 鎖の相同性が最も高く、50% をわずかに越えた値である [2,6]。一方、2 種の多毛類から抽出された Hb 間では、それぞれ対応する鎖間で高い相同性が認められる。a 鎖同士では、48% とやや低いが、他の対応鎖間では 81~84% を示す。*Perinereis* Hb と *Tylorrhynchus* Hb を併せて

UPGMA 法によって分子系統樹を作成しても同様に A 系統と B 系統に分岐する。

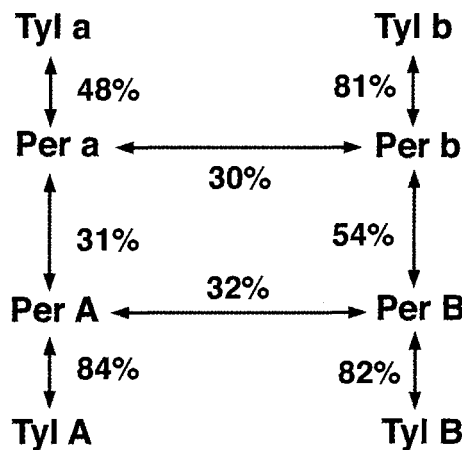


図 4 *Perinereis* グロビン鎖と *Tylorrhynchus* グロビン鎖間の相同性

CLUSTALW を用いて 2 鎖間でアライメントを行い、各鎖間の相同性を百分率で示した。Per, *Perinereis*; Tyl, *Tylorrhynchus*。

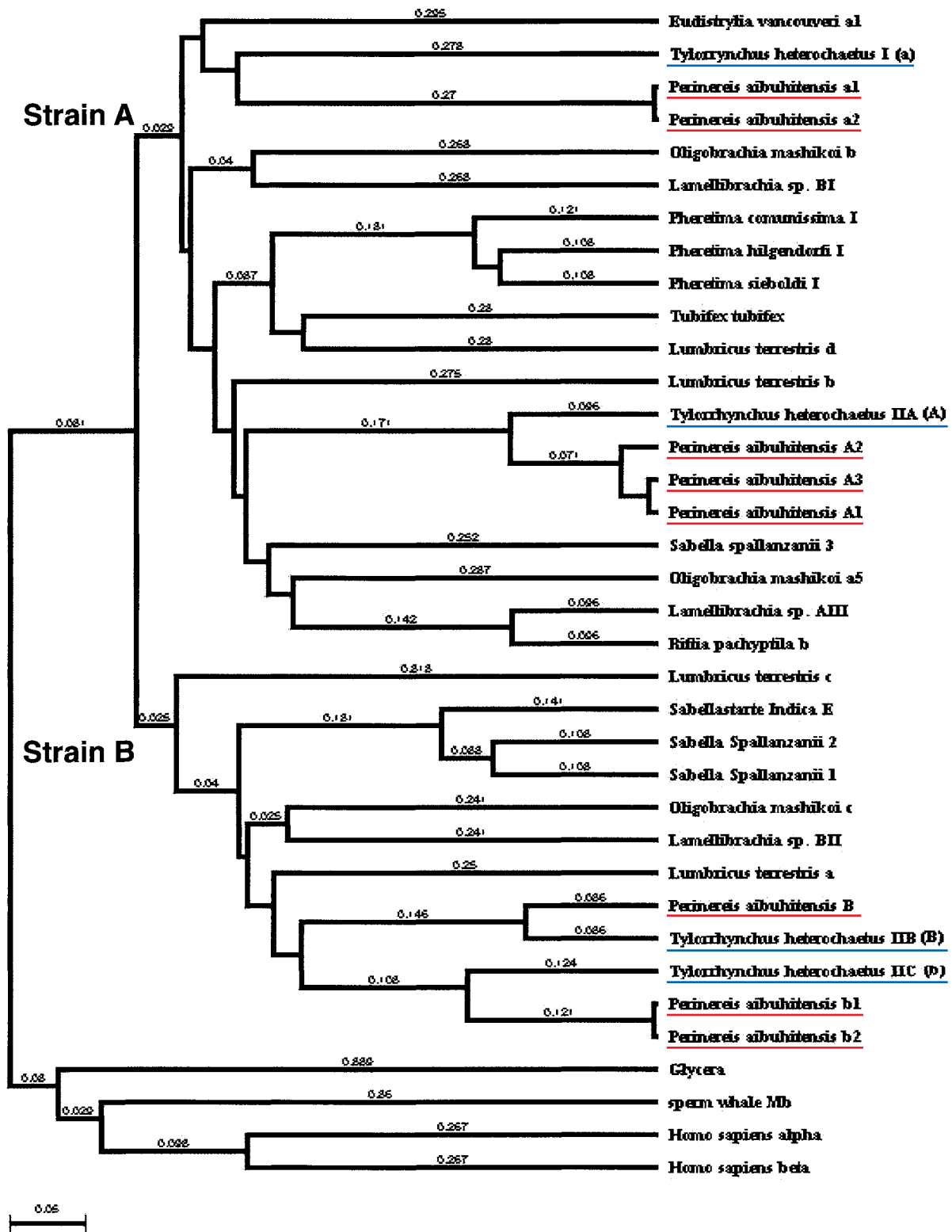


図5 UPGMA 法による細胞外巨大 Hb のグロビン鎖の系統樹

Perinereis, *Tylosynchus* [3-6], *Lumbricus* [28-30], *Tubifex* [31], *Pheretima* [32-33], *Sabellastarte* [34], *Sabella* [35], *Eudistylia* [36], *Lamelibrachia*. [37], *Riftia* [38], *Oligobrachia* [39]等からのグロビン鎖を用いて系統樹を作成した。

巨大 Hb のグロビン鎖の系統樹

図5は *Perinereis* グロビン鎖7本を含む32本の巨大 Hb のグロビン鎖について UPGMA 法によって作成した分子系統樹を示している。対照として、マッコウクジラの Mb [24]、ヒト Hb の α 鎖 [25] と β 鎖 [26]、および多毛類 *Glycera dibranchia* の細胞内 Hb [27] の配列を使用した。系統樹作成に利用した巨大 Hb のグロビン鎖は多毛類 *Tylorrhynchus heterochaetus* [3-6]；貧毛類 *Lumbricus terrestris* [28-30], *Tubifex Tubifex* [31], *Pheretima sieboldi* [32], *Pheretima hilgendorfi* [33], *Pheretima communissima* [33], 多毛類 (クロロクルオリン) *Sabellastarte indica* [34], *Sabella spallanzanii* [35], *Eudistylia vancouverii* [36]；チューブワーム類 *Lamellibrachia. sp.* [37], *Riftia pachyptila* [38]；有鬚類 *Oligobrachia mashikoi* [39] について報告されたものである。

巨大 Hb のグロビン鎖の系統樹は二つの系統あるいは family A と B に明瞭に分岐することが図5に示されている。family A と B が分岐した時点は脊椎動物の Mb と Hb が分岐した時点よりもやや遅く、脊椎動物 Hb の α 鎖と β 鎖が分岐する以前であったと推定される。また、巨大 Hb の2つの family A と B は多毛類 *Glycera* の細胞内 Hb とは異なる道を経て進化していることが分る。

種が近いものは系統樹においても近い位置を占め、中国産のゴカイ *Perinereis* のグロビン鎖と徳島産のゴカイ *Tylorrhynchus* は系統樹においてクラスターを形成している。さらに、*Perinereis* と *Tylorrhynchus* に限って注目すれば、a 鎖が属する subfamily と A 鎖が属する subfamily をもグループ化しているように見てとれる。これは、b 鎖と B 鎖の関係においても同様である。これら2種の多毛類間で成立する関係が複数の貧毛類やチューブワーム類の Hb あるいは多毛類のクロロクルオリンにおいても成立するのだろうか興味深い。

最後に、subfamily を詳しく吟味するには、各鎖の共通名に関する命名法をしっかりと定義することが肝要であり、それに基づいて既報のグロビン鎖を同定する必要があることを指摘しておきたい。現在のところ、各研究者は実験の過程

で必要性に迫られて、各鎖を命名するケースが多い。例えば、*Tylorrhynchus* Hb では、SDS-PAGE でグロビン鎖が2本のバンドを示すので、各鎖を I 鎖、II 鎖と名付け、さらに II 鎖がクロマトフォッカシングによって、A、B、C の3つの画分に分かれるので、それぞれを IIA、IIB、IIC と命名した[4]。これら4種の *Tylorrhynchus* のグロビンに対応する鎖が遠縁の貧毛類の *Lumbricus* のグロビン鎖にも存在することが明らかになり、2種間に共通する名前が生まれた[2,15]。この命名法は前述の通りであるが、N末端の配列と Cys 残基数に依存している。しかし、Cys の残基数は一般化できないことが明らかになってきた。グロビン鎖の共通名に対する命名法の改善が必要である。新たに共通名の定義を導入するには、多数のグロビン鎖の配列から作成される系統樹も考慮する必要がある。何れにしても、4種類全てのグロビン鎖の配列がそろった論文の蓄積が期待される。

4. 謝辞

本研究は文部科学省の科学研究費補助金 (14540629) の支援を受けて実施された。

5. 引用文献

1. Gotoh, T. and Kamada, S. Subunit structure of erythrocrucorin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *J. Biochem. (Tokyo)* **87**, 557-562.
2. Gotoh, T. and Suzuki, T. Molecular assembly and evolution of multi-subunit extracellular annelid hemoglobins. *Zool. Science* **7**, 1-16 (1990).
3. Suzuki, T., Takagi, T., and Gotoh, T. Amino acid sequence of the smallest polypeptide chain containing heme of extra-cellular hemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *Biochim. Biophys. Acta* **708**, 253-258 (1982).
4. Suzuki, T., Furukohri, T., and Gotoh, T. Subunit structure of extracellular hemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus* and

- amino acid sequence of the constituent polypeptide chain (IIC). *J. Biol. Chem.* **260**, 3145-3154 (1985).
5. Suzuki, T., Yasunaga, H., Furukohri, T., Nakamura, K., and Gotoh, T. Amino acid sequence of polypeptide chain IIB of extracellular hemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *J. Biol. Chem.* **260**, 11481-11487 (1985).
 6. Suzuki, T. and Gotoh, T. The complete amino acid sequence of giant multisubunit hemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *J. Biol. Chem.* **261**, 9257-9267 (1986).
 7. Suzuki, T., Takagi, T. and Gotoh, T. Primary structure of two linker chains of the extracellular hemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *J. Biol. Chem.* **265**, 12168-12177 (1990).
 8. Suzuki, T. and Gotoh, T. Subunit assembly of giant haemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *J. Mol. Biol.* **190**, 119-123 (1986).
 9. 蝦名恵、後藤寿夫 ヘモグロビンの超分子生物学 科学 (岩波書店)、**67**、226-232 (1997).
 10. Ebina, S., Matsubara, K., Nagayama, K., Yamaki, M. and Gotoh, T. Carbohydrate gluing, an architectural mechanism in the supramolecular structure of an annelid giant hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 7367-7371 (1995).
 11. Matsubara, K., Yamaki, M., Nagayama, K., Imai, K., Ishii, H., Gotoh, T. and Ebina, S. Wheat germ agglutinin-reactive chains of giant hemoglobin from the polychaete *Perinereis aibuhitensis*. *Biochem. Biophys. Acta* **1290**, 215-223 (1996).
 12. Yamaki, M., Matsubara, K., Shibuya, A., Gotoh, T. and Ebina, S. Identification of the subunit loci in the extracellular multisubunit hemoglobin from annelid *Perinereis aibuhitensis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **335**, 23-31 (1996).
 13. Yamaki, M., Kubota, K., Matsubara, K., Ebina, S. and Gotoh, T. Carbohydrate-gluing is a strategy for supramolecular clamping of submutiples in annelid extracellular multi-subunit hemoglobin *Arch. Biochem. Biophys.* **355**, 119-123 (1998).
 14. Gotoh, T., Sano, T., Shibuya, A., Yamaki, M., Imai, K., and Ebina, S. Hexagonal bilayer structuring activity of linker chains of an annelid giant hemoglobin from the polychaete *Perinereis aibuhitensis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **360**, 75-84 (1998).
 15. Gotoh, T., Shishikura, F., Snow, J.W., Ereifej, K.I., Vinogradov, S.N., and Walz, D.A. Two globin strains in the giant annelid extracellular haemoglobins. *Biochem. J.* **241**, 441-445 (1987).
 16. Green, N.B., Suzuki, T., Gotoh, T., Kuchumov, A.R., Vinogradov, S.N. Electrospray ionization mass spectrometric determination of the complete polypeptide chain composition of *Tylorrhynchus heterochaetus* hemoglobin. *J. Biol.* **270**, 18209-18211 (1995).
 17. Tsuneshige, A., Imai, K., Tyuma, I., and Gotoh, T. Spectrophotometric, electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies on the hemoglobin from the marine polychaete *Perinereis aibuhitensis* (Grube): comparative physiology of hemoglobin. *J. Biochem. (Tokyo)*. **106**, 406-417 (1989).
 18. Gotoh, T. and Shikama, K. Autoxidation of native oxymyoglobin from bovine heart muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 476-481 (1974).
 19. Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. Measurement of protein using biocinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85. (1985).
 20. LaBonne C, and Whitman M. Mesoderm induction by activin requires FGF-mediated intracellular signals. *Development.* **120** 463-72 (1994).
 21. Watanabe M, Whitman M. FAST-1 is a key maternal effector of mesoderm inducers in the early *Xenopus* embryo. *Development.* **126** 5621-34 (1999).
 22. DNA Data Bank of Japan home Page : <http://www.ddbj.nig.ac.jp>. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers.
 23. Saitou, N., Nei, M. The neighbor-joining method:

- a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425 (1987).
24. Edmundson, A.B. Amino acid sequence of sperm whale myoglobin. *Nature*, **205**, 883-887 (1965).
 25. Konigsberg, W. and Hill, R.J. The structure of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **237**, 3157-3162 (1962).
 26. Branitzer, G., Gehring-Muller, R., Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V., and Wittmann-Liebold, B., Die konstitution des normalen adulten human hamoglobins. *Hoppe-Seylers's Z. Physiol. Chem.* **325**, 283-286 (1961).
 27. Zafar, R.S., Chow, L.H., Stern, M.S., Scully, J.S., Sharma, P.R., Vinogradov, S.N., Walz, D.A. The cDNA sequences encoding two components of the polymeric fraction of the intracellular hemoglobin of *Glycera dibranchiata*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 21843-21851(1990).
 28. Shishikura, F., Snow, J.W., Gotoh, T., Vinogradov, S.N., Walz, D.A. Amino acid sequence of the monomer subunit of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 3123-3131 (1987).
 29. Fushitani, K., Matsuura, M.S.A., Riggs, A.F. The amino acid sequences of chains a, b, and c that form the trimer subunit of the extracellular hemoglobin from *Lumbricus terrestris*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 6502-6517 (1988)
 30. Jhiang, S.M., and Riggs, A.F. The structure of the gene encoding chain c of the hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19003-19008 (1989).
 31. Stern, M.S., Vinogradov, S.N., Sharma, P.K., Erefej, K., Walz, D.A. Amino acid sequence of the monomer subunit of the giant extracellular hemoglobin of the aquatic oligochaete, *Tubifex tubifex*. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 67-73 (1990).
 32. Suzuki, T. Amino acid sequence of the monomer subunit of the giant multisubunit hemoglobin from the earthworm *Pheretima sieboldi*. *Eur. J. Biochem.*, **185**, 127-134 (1989).
 33. Shishikura, F. Amino acid sequence of the monomer subunit of the extracellular hemoglobin of the earthworm *Pheretima hilgendorfi*. *Zoological Science* **13**, 551-558 (1996).
 34. Suzuki, T., Hirao, Y., Vinogradov, S.N. Primary structure of a constituent polypeptide chain of the chlorocruorin from *Sabellastarte indica*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1252**, 189-193 (1995).
 35. Pallavicini, A., Negrisol, E., Barbato, R., Dewilde, S., Ghiretti-Magaldi, A., Moens, L., Lanfranchi, G. The primary structure of globin and linker chains from the chlorocruorin of the polychaete *Sabella spallanzanii*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 26384-26390 (2001).
 36. Dewilde, S., Van Hauwaert, M.L., Vinogradov, S., Vierstraete, A., Vanfleteren, J., Moens, L. Protein and gene structure of a chlorocruorin chain of *Eudistylia vancouverii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 18-24 (2001).
 37. Suzuki, T., Takagi, T., Ohta, S. Primary structure of a constituent polypeptide chain (AIII) of the giant haemoglobin from the deep-sea tube worm *Lamellibrachia*. A possible H₂S-binding site. *Biochem. J.*, **266**, 221-225 (1990).
 38. Zal, F., Suzuki, T., Kawasaki, Y., Childress, J.J., Lallier, F.H., Toulmond, A. Primary structure of the common polypeptide chain b from the multihemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. An insight on the sulfide binding-site. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **29**, 562-574 (1997).
 39. Yuasa, H.J., Green, B.N., Takagi, T., Suzuki, N., Vinogradov, S.N., Suzuki, T. Electrospray ionization mass spectrometric composition of the 400 kDa hemoglobin from the pogonophoran *Oligobrachia mashikoi* and the primary structures of three major globin chains. *Biochim. Biophys. Acta*, **1296**, 235-244 (1996).

補助データ

ここでは *Perrinereis* グロビン鎖のアミノ酸配列決定に至る途中のデータを主に記載し、本文を補足する。図 S1 は図 1 と同じく、*Perinereis* グロビンの主

成分 4 種、a、A、b、B 鎖のアミノ酸配列を示している。青色で示した領域は RT-PCR 法で得た cDNA の配列から推定した領域を示す。この領域はアミノ酸配列から得られた結果と完全に一致した。cDNA から得られる情報としては C 末と N 末の一部が欠けている。

Per a --DCNAMARIKVKHQWVDVYGA--NVDREGFATAVWRKYFHDHP-DRGLFANVNGNNIYSAQFRAHMVRFVAGLD
 Per A DTHCGPLQRLKVKQQWAKAYGV--GHERVELGIALWKSMSQDPEARLDFRVHGEDVRSFAFEAHIARVFNQFD
 Per b DQCCSIEDRHEVQALWQSIWSAENTGKRTLIGRRIFFEELEFDINPGTKALFGRVNVDDMGSPFEKAHVLRVMNGLD
 Per B DDCCSAADRHAVLSDWQNVWSAEFTGRRVAIGKAIFFELFAIDASAKGVFGRVHVDQSSPEWAHVIRVINGLD

Per a ILISLLDEESDATFHSAAAHYLEFHKQF-G--AIPFADFGQSFLDTLPDFIHEHFDKDAWSSCYNIVSNLGA--
 Per A RIISLTDDEVLNAQ--LAHLKEQHIKL-GITAHHFKLMRTGLGYVLPALGRCFDKAAWSACWDEVYIPGIKS-
 Per b TLIGVLDDPA--TGTSLIQHLAEQHKARDGFKAAAYFKDIGVALRRVLP-QVASCENPEAWNHCDFGFVASITAAM
 Per B LAINLLEDPR--ALNEELHHLARQHRERDGVKAVYFDEIEKALLKVLP-QVSSNENAGAWDRCFTRIASVIKAEI

図S1 *Perinereis* グロビン鎖の 4 種のアミノ酸配列

全域のアミノ酸配列が決定されているが、青で示した領域は cDNA の配列によっても確認されている。なお、a、A、b 鎖は a1、A1、b1 鎖と同じものである。

グロビン a, A, b, B 鎖の分離

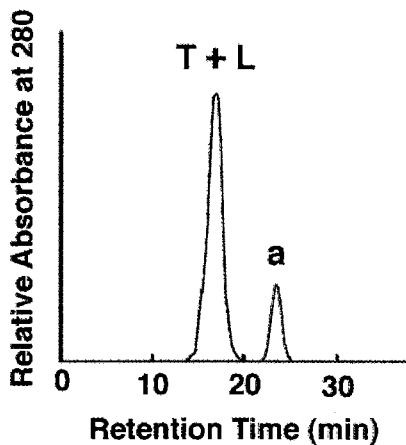


図 S2 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる *Perinereis* a 鎖の分離 2 番目のピークに a 鎖が分画される。最初のピークは三量体 (T = A-b-B) とリンカー (L) を含む。*Perinereis* Hb を 35% 蟻酸に溶解して、Superdex 75HR にかけて溶出した。溶出の条件など詳細は本文を参照。

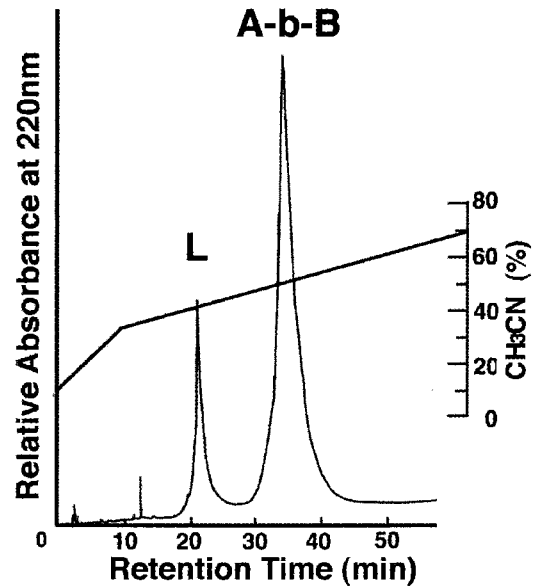


図 S3 逆相カラムクロマトグラフィーによる *Perinereis* グロビン三量体 (A-b-B) の分離 図 S2 で得られた最初のピーク (T+L) を HPLC を用いて、Cosmosil 5C₁₈-300 にかけた。溶出の条件等の詳細は本文を参照。

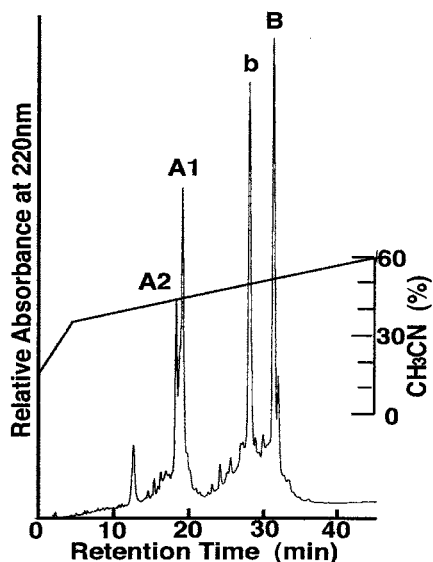


図 S4 PE 化した *Perinereis* Hb 三量体の逆相クロマトグラフィーの溶出パターン

図 S3 で得られた三量体のピーク (A-b-B) を HPLC を用いて、Cosmosil 5C₁₈-300 にかけて。溶出の条件など詳細は本文を参照。A 鎖が 2 つのピーク (A1, A2) に分離した。

A1 鎖と A2 断片化したペプチドの分離精製

A1 鎖と A2 鎖を臭化シアン分解した試料は共に 3 つの画分に分かれた (図 S5-1a と S5-2)。時に各画分がシャープな 3 ピークに分かれることもあったが、アミノ酸アミノ酸配列はまったく同じであった。

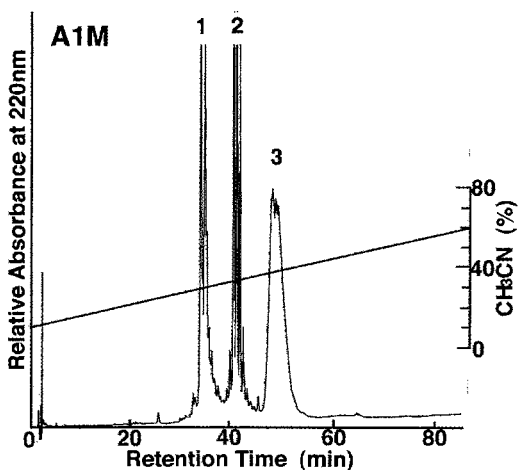


図 S5-1a 臭化シアン分解した *Perinereis* Hb A1 鎖の HPLC パターン 詳細は本文を参照。

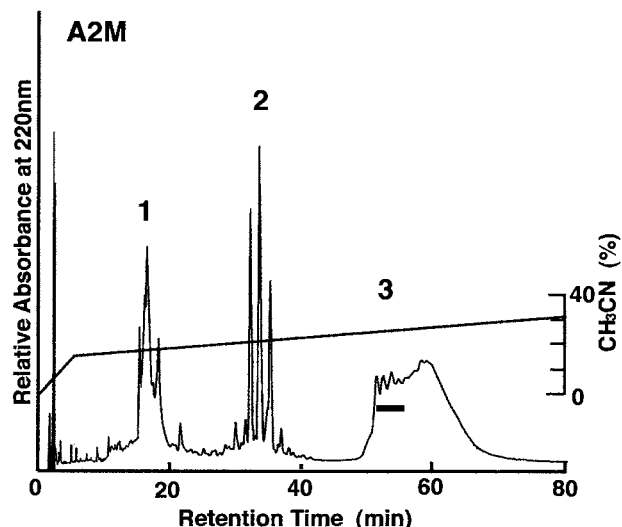


図 S5-2 臭化シアン分解した *Perinereis* Hb A2 鎖の HPLC パターン 詳細は本文を参照。

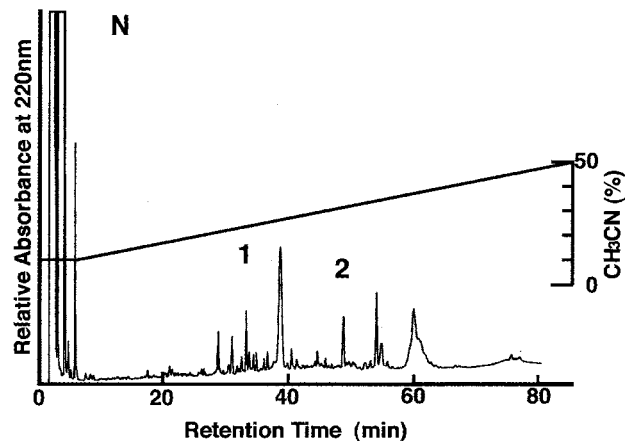


図 S5-1b アスパラギニルエンドペチダーゼ消化した *Perinereis* Hb A1 鎖の M3 の HPLC パターン

図 S5-1 で得られたピーク 3 (M3) を酵素処理して、逆相カラムにかけて。詳細は本文を参照。

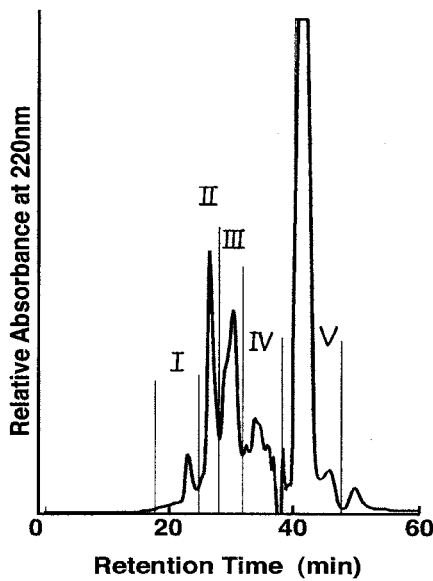


図 S6 トリプシン消化した *Perinereis* Hb A1 鎖のゲルろ過による溶出パターン

A1 鎖を酵素消化した試料はゲルろ過カラム (Super Peptide 10/300) にかけて溶出した。溶出の条件等詳細は本文を参照。以下、各画分を HPLC にかける。

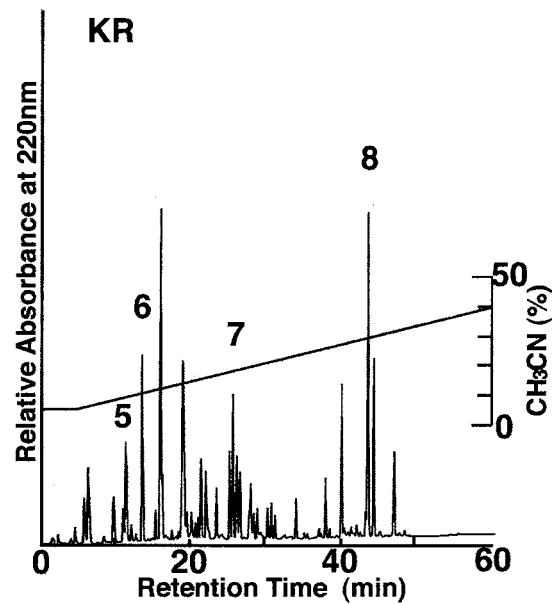


図 S6-2 ゲルろ過の画分 II の HPLC パターン

画分 II を逆相クロマトグラフィーにかけた。他は図 S6-1 と同様。

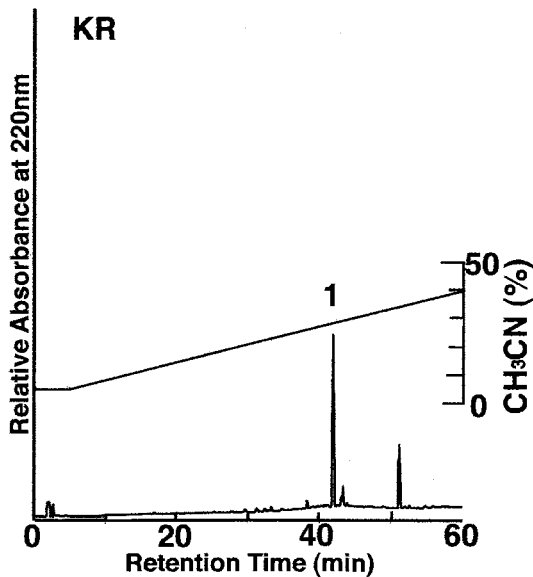


図 S6-1 ゲルろ過の画分 I の HPLC パターン

図 S6 で得られた画分 I を逆相クロマトグラフィーにかけた。溶出の条件等詳細は本文参照。得られたピーク 1 に含まれるペプチドは KR1 としてプロテインシーケンサーで分析した。

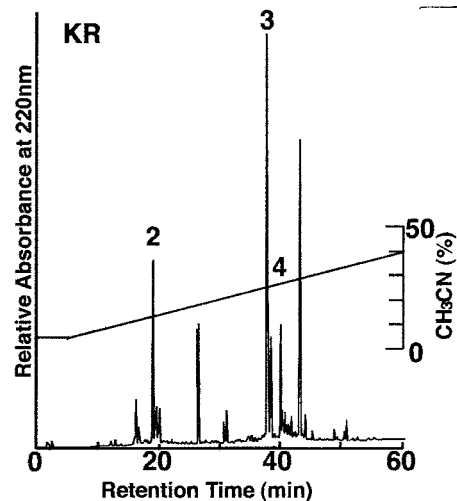


図 S6-3 ゲルろ過の画分 III の HPLC パターン

画分 III を逆相クロマトグラフィーにかけた。他は図 S6-1 と同様。

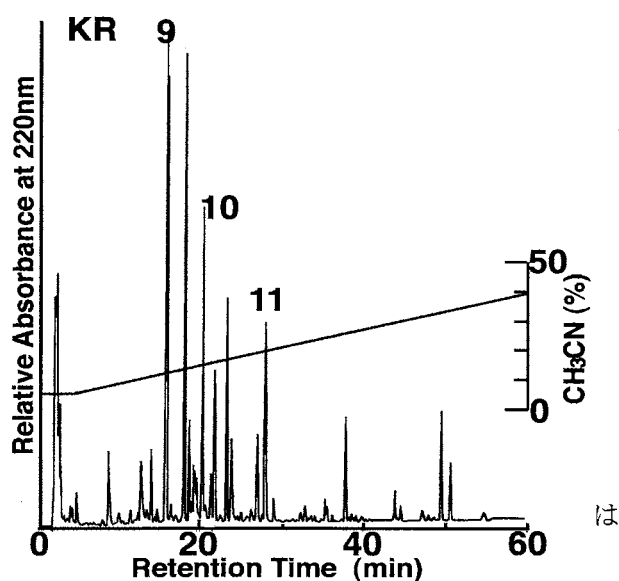


図 S6-4 ゲルろ過の画分 IV の HPLC パターン
画分 IV を逆相クロマトグラフィーにかけた。他は S6-1 と同様。なお、画分 V は不要であった。

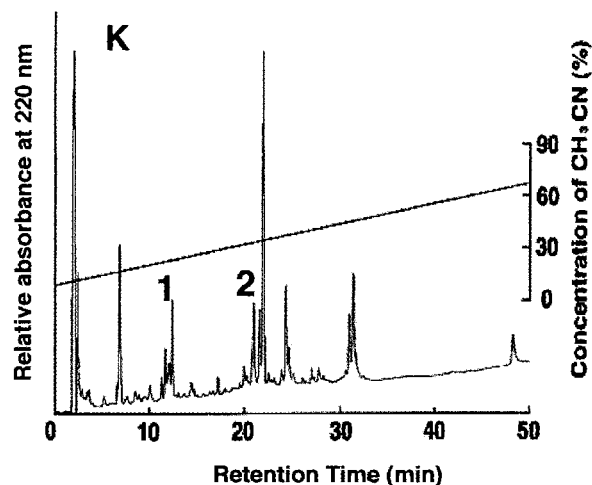


図 S7 リシルエンドペプチダーゼ消化した *Perinereis* Hb A1 鎖の HPLC パターン 詳細は本文を参照。

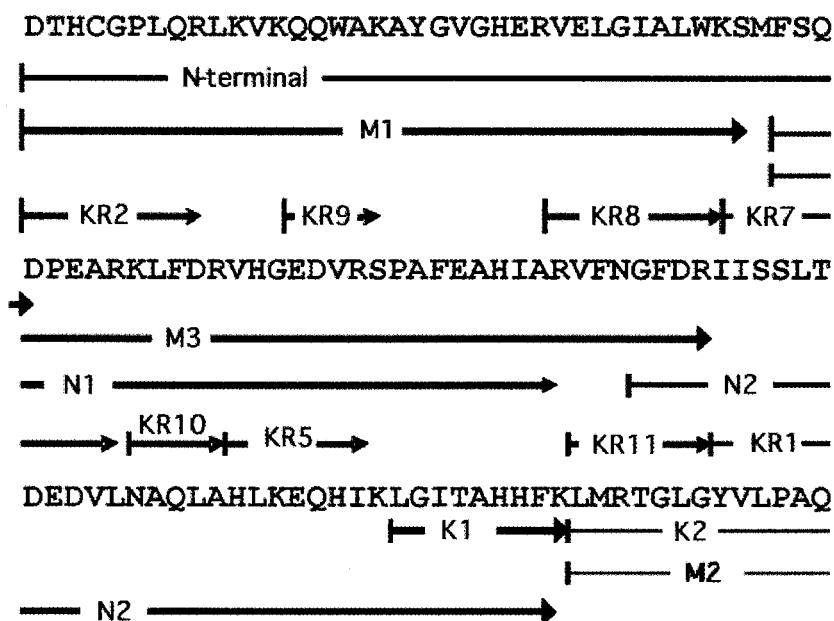


図 S8 *Perinereis* A1 鎖のアミノ酸配列を決定するに至るまでのデータのまとめ M1~M3 は臭化シアン分解産物；KR はトリプシン消化産物、K1 と K2 はリシルエンドペプチダーゼ消化産物、N1 と N2 は M3 のアスパラギンエンドペプチダーゼ消化産物。

多毛類巨大ヘモグロビンの一次構造比較

No	Amino acid (pmol)				No	Amino acid (pmol)				
1	intact	D (183.60)	M1 D (459.15)	KR2 D (410.13)	73	D (171.93)	D (108.01)	D (1821.99)		
2		T (104.19)	T (297.56)	T (847.21)	74	R (42.90)	R (166.97)	R (1779.35)		
3		H (176.40)	H (408.24)	H (771.34)	75		I (165.48)	KR1 I (1786.97)		
4		C (239.82)	C (453.60)	C (1107.47)	76		I (159.41)	I (1518.66)		
5		G (145.03)	G (369.39)	G (750.34)	77		S (64.00)	S (867.69)		
6		P (65.51)	P (188.92)	P (456.72)	78		S (58.78)	S (865.09)		
7		L (74.21)	L (193.18)	L (471.82)	79		L (102.64)	L (1164.21)		
8		Q (73.74)	Q (198.57)	Q (360.11)	80		T (72.19)	T (900.50)		
9		R (84.82)	R (272.09)	R (258.42)	81		D (66.14)	D (891.47)		
10		L (97.81)	L (230.37)		82		E (75.57)	E (866.07)		
11		K (74.82)	K (214.59)		83		D (62.19)	D (895.42)		
12		V (95.65)	V (194.50)		84		V (90.50)	V (1052.17)		
13		K (97.89)	K (246.45)		85		L (93.47)	L (950.29)		
14		Q (70.25)	Q (187.97)	KR9 Q (234.47)	88		N (59.57)	N (874.98)		
15		Q (92.04)	Q (212.37)	Q (388.74)	87		A (93.92)	A (984.13)		
16		W (11.93)	W (93.89)	W (1238.56)	88		Q (87.38)	Q (883.71)		
17		A (68.81)	A (162.86)	A (1169.28)	89		L (72.30)	L (810.89)		
18		K (54.92)	K (139.71)	K (848.96)	90		A (73.12)	A (833.63)		
19		A (111.56)	A (218.20)		91		H (44.72)	H (569.07)		
20		Y (65.48)	Y (132.02)		92		L (59.69)	L (482.72)		
21		G (50.95)	G (97.54)		93		K (51.81)	K (236.64)		
22		V (69.35)	V (138.56)		94		E (20.48)			
23		G (64.67)	G (125.46)		95		Q (46.31)			
24		H (44.57)	H (57.58)		96		H (31.85)			
25		E (22.96)	E (28.52)		97		I (38.60)			
26		R (56.70)	R (88.23)		98		K (32.24)			
27		V (50.58)	V (521.93)	KR8 V (947.60)	99	K1 L (196.92)	L (34.73)			
28		E (35.44)	E (51.39)	E (730.82)	100	G (137.97)	G (20.08)			
29		L (41.93)	L (32.17)	L (740.58)	101	I (189.92)	I (26.47)			
30		G (43.60)	G (38.36)	G (574.02)	102	T (97.43)	T (16.43)			
31		I (19.95)	I (35.32)	I (515.99)	103	A (120.89)	A (10.85)			
32		A (52.66)	A (39.18)	A (500.22)	104	H (173.02)	H (8.25)			
33		L (52.23)	L (52.71)	L (408.13)	105	H (66.95)	H (7.53)			
34		W (3.89)	W (10.15)	W (139.56)	106	F (59.49)	F (1.17)			
35		K (18.23)	K (21.87)	K (108.98)	107	K (8.26)				
36		S (10.27)	S (6.88)	KR7 S (414.65)	108	K2 L (25.57)				
37		M (14.84)		M (876.71)	109	M (20.95)				
38		F (28.84)	M3 F (3221.16)	F (801.16)	110	R (20.94)	M2 R (808.83)			
39		S (13.48)	S (889.75)	S (219.39)	111	T (16.71)	T (428.03)			
40		Q (18.29)	Q (2355.57)	Q (108.17)	112	G (13.37)	G (466.82)	KR4 T (156.83)		
41		D (3.94)	D (1895.80)	D (73.63)	113	L (13.05)	L (519.66)	G (184.76)		
42			P (1468.08)	P (72.41)	114	G (12.49)	G (466.82)	L (209.82)		
43			E (896.96)	E (52.54)	115	Y (11.52)	Y (555.53)	G (176.86)		
44			A (1564.28)	A (75.23)	116	V (12.87)	V (536.53)	Y (220.02)		
45			R (1825.42)	R (69.12)	117	L (8.13)	L (481.98)	V (211.73)		
46			K (1504.88)	K (70.88)	118	P (10.78)	P (398.90)	L (188.12)		
47			L (1565.28)	L (71.30)	KR10 L (309.40)	119	A (9.84)	A (475.86)	P (142.99)	
48			F (1357.97)	F (88.31)	F (211.91)	120	Q (7.28)	Q (413.38)	A (162.50)	
49			D (1735.94)	D (37.09)	D (145.72)	121	L (4.41)	L (371.87)	Q (142.99)	
50			R (1708.72)	R (59.97)	R (67.30)	122	G (3.65)	G (302.40)	L (119.81)	
51			V (1382.80)	V (61.18)	V (590.06)	123	R (3.42)	R (485.18)	G (72.86)	
52			H (1086.66)	H (37.19)	H (469.58)	124	C (1.90)	C (390.81)	R (58.10)	
53			G (897.93)	G (36.20)	G (423.58)	125	F (2.00)	F (318.25)	KR6 C (2711.64)	
54			E (413.81)	E (28.05)	E (398.62)	126	D (4.11)	D (247.92)	F (2264.80)	
55			D (1014.15)	D (25.82)	D (327.80)	127		K (281.79)	D (1817.91)	
56			V (974.81)	V (40.12)	V (191.43)	128		A (321.06)	K (1515.00)	
57			R (1178.67)	R (32.31)	R (95.03)	129		A (393.54)		
58			S (325.92)	S (17.40)		130		W (118.60)		
59			P (505.94)	P (23.64)		131		S (86.12)	KR3 S (1130.03)	
60			A (487.80)	A (24.98)		132		A (175.65)	A (2121.22)	
61			F (571.27)	F (24.94)		133		C (161.05)	C (2168.13)	
62			E (279.53)	E (18.61)		134		W (71.52)	W (1136.91)	
63			A (591.20)	A (28.44)		135		D (74.96)	D (1529.61)	
64			H (442.44)	H (13.48)		136		E (36.61)	E (1181.55)	
65			I (439.33)	I (18.49)		137		V (77.55)	V (926.13)	
66			A (550.77)	A (23.43)		138		I (68.96)	I (754.02)	
67			R (548.10)	R (3.81)		139		Y (66.89)	Y (772.28)	
68			V (445.83)		KR11 V (2775.25)	140		P (49.06)	P (328.82)	
69			F (508.35)		F (2691.95)	141		G (41.21)	G (227.30)	
70			N (359.57)		N (2108.96)	142		I (44.95)	I (161.39)	
71			G (359.59)	N2 G (147.12)	G (1964.90)	143		K (29.61)	K (48.96)	
72			F (497.78)	F (193.53)	F (2362.29)	144		S (8.52)		

表 S1 *Perinereis* Hb A1 鎖の PTH アミノ酸回収量

ペプチド鎖の略号は図 S8 に同じ。

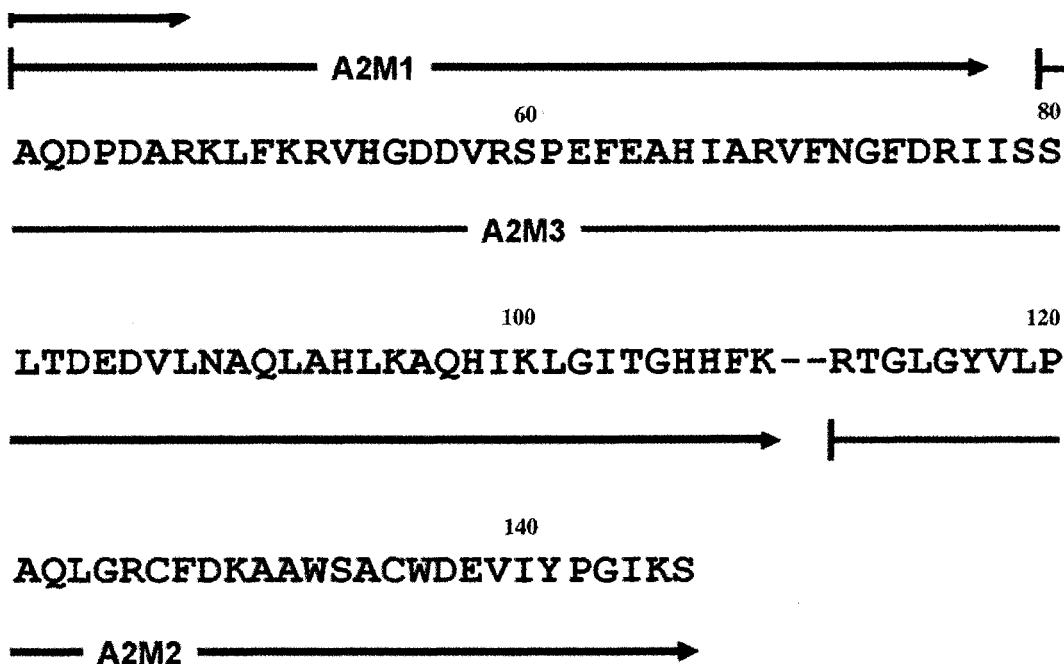


図 S9 *Perinereis* A2 鎖のアミノ酸配列を決定するに至るまでのデータのまとめ

M1~M3 は臭化シアン分解産物。この配列は 2 カ所でのりしろを欠くが、ギャップは A1 鎖との相同性および cDNA の配列で補完される。

No	Amino acid (pmol)		No	Amino acid (pmol)		No	Amino acid (pmol)		No	Amino acid (pmol)	
1	intact	D (282.09)	A2M1	D	(172.95)	41	A	(2509.06)	81	L	(172.65)
2	H (100.35)		H	(180.60)	42	Q	(1698.86)	82	T	(93.67)	
3	H (163.81)		H	(188.48)	43	D	(1436.03)	83	D	(81.59)	
4	T (128.08)		T	(87.55)	44	P	(1829.18)	84	E	(53.49)	
5	G (196.24)		G	(125.56)	45	D	(944.75)	85	D	(103.94)	
6	C (124.90)		C	(148.74)	46	A	(1702.06)	86	V	(136.75)	
7	G (119.62)		G	(102.28)	47	R	(1597.20)	87	L	(141.01)	
8			P	(32.36)	48	K	(1512.89)	88	N	(80.37)	
9			L	(83.99)	49	L	(1571.35)	89	A	(139.58)	
10			Q	(60.26)	50	F	(1407.50)	90	Q	(80.07)	
11			R	(110.99)	51	K	(1293.76)	91	L	(112.22)	
12			L	(84.82)	52	R	(1494.39)	92	A	(148.87)	
13			K	(99.44)	53	V	(1526.69)	93	H	(96.15)	
14			V	(92.21)	54	H	(1074.74)	94	L	(118.28)	
15			K	(95.82)	55	G	(748.22)	95	K	(102.18)	
16			Q	(86.23)	56	D	(860.19)	96	A	(115.28)	
17			Q	(89.81)	57	D	(862.87)	97	Q	(74.59)	
18			W	(41.57)	58	V	(1164.31)	98	H	(94.05)	
19			A	(87.54)	59	R	(1100.14)	99	I	(111.98)	
20			K	(68.99)	60	S	(233.85)	100	K	(96.99)	
21			A	(97.63)	61	P	(532.48)	101	L	(84.01)	
22			Y	(70.18)	62	E	(309.22)	102	G	(48.42)	
23			G	(41.91)	63	F	(510.87)	103	I	(68.38)	
24			V	(64.99)	64	E	(295.96)	104	T	(31.05)	
25			G	(32.58)	65	A	(533.54)	105	G	(35.11)	
26			H	(31.85)	66	H	(405.55)	106	H	(46.93)	
27			E	(14.33)	67	I	(493.19)	107	H	(69.60)	
28			R	(42.77)	68	A	(519.74)	108	F	(33.24)	
29			V	(34.71)	69	R	(510.88)	109	K	(12.78)	
30			E	(22.27)	70	V	(459.00)	110	-	-	
31			L	(26.37)	71	F	(440.20)	111	-	-	
32			G	(17.97)	72	N	(222.93)	112	A2M2	R (1550.11)	
33			L	(23.68)	73	G	(247.61)	113	T	(1012.75)	
34			A	(17.82)	74	F	(425.80)	114	G	(1118.35)	
35			L	(33.90)	75	D	(161.52)	115	L	(1252.02)	
36			W	(8.19)	76	R	(387.11)	116	G	(1023.88)	
37			K	(17.81)	77	I	(365.16)	117	Y	(1335.89)	
38			-	-	78	I	(517.29)	118	V	(1281.22)	
39			-	-	79	S	(80.18)	119	L	(1153.74)	
40			A2M3	F (2771.71)	80	S	(115.57)	120	P	(1011.69)	

表 S2 *Perinereis* Hb A2 鎖の PTH アミノ酸回収量 ペプチド鎖の略号は図 S9 に同じ。

a 鎖、b 鎖、B 鎖のアミノ酸配列の決定

A1 鎖と A2 鎖についてはアミノ酸配列の決定に至る過程を断片化したペプチドの精製も含めて詳細に

記載したが、a 鎖 b 鎖、B 鎖については省略して、アミノ酸配列を決定するに至るまでのデータのまとめと PTH アミノ酸回収量を記す。

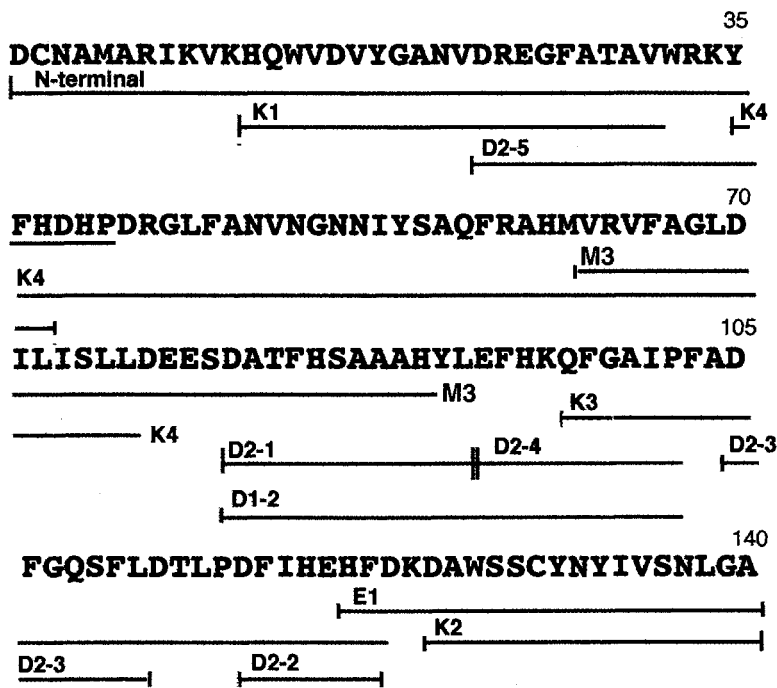


図 S10 *Perinereis* a 鎖のアミノ酸配列を決定するに至るまでのデータのまとめ

M3 は臭化シアン分解産物； K はリシルエンドペプチダーゼ、E は V8 プロテアーゼ、D はエンドペプチダーゼ Asp-N によって消化され、HPLC によって単離されたペプチド。数字は HPLC でのピーク番号を示す。D1 と D2 は酵素処理の時間が、それぞれ、4 時間と 12 時間である。特に、D1-2 がギャップを埋めるのに有効であった。

No	Amino acid (pmol)			No	Amino acid (pmol)		
1	Intact			71	I (60.6)	I (42.6)	
2	D(198)		D2-5 D(20.0)	72	L (85.7)	L (38.7)	
3	C(904)		C(27.0)	73	I (61.8)	I (46.5)	
4	N(286)		N(7.10)	74	A(14.3)	S(12.5)	
5	A(377)		A(14.3)	75	L (40.8)	L (34.5)	
6	M(655)		M(11.6)	76	L(55.0)	L(38.4)	
7	A(383)		A(13.3)	77	D(31.9)		
8	R(479)		R(11.5)	78	E(21.5)		
9	I(369)		I(11.2)	79	E(30.1)		
10	K(413)		K(0.73)	80	S(10.6)		
11	V(388)		V(5.47)	81	D(32.7)	D-2 D(25.1)	D2-3 D(103)
12	K(372)		K(0.08)	82	A(19.9)	A(33.0)	A(316)
13	H(334)	K1 H(33.3)	H(5.28)	83	T(13.9)	T(13.3)	T(85.9)
14	Q(287)	Q(44.0)	Q(3.95)	84	F(20.2)	F(29.5)	F(253)
15	W(123)	W(24.6)	W(1.70)	85	H(11.1)	H(18.9)	H(107)
16	V(259)	V(50.2)	V(0.04)	86	S(6.9)	S(11.8)	S(34.4)
17	D(112)	D(31.2)		87	A(18.9)	A(25.1)	A(263)
18	V(257)	V(41.9)		88	A(25.3)	A(24.0)	A(222)
19	Y(212)	Y(48.5)		89	A(30.1)	A(22.2)	A(177)
20	G(161)	G(31.3)		90	H(9.00)	H(11.6)	H(70.8)
21	A(206)	A(46.5)		91		Y(19.6)	Y(112)
22	N(138)	N(39.4)		92		L(15.4)	L(5.08)
23	V(225)	V(47.9)		93		E(7.77)	D2-9 E(285)
24	D(90.9)	D(23.7)	D2-10 D(55.5)	94		F(11.7)	F(396)
25	R(256)	R(34.5)	R(95.2)	95		H(4.59)	H(145)
26	E(110)	E(19.3)	E(138)	96		K(6.17)	K(297)
27	G(126)	G(32.6)	G(136)	97	K3 Q(393)	Q(4.23)	Q(62.8)
28	F(180)	F(34.3)	F(155)	98	F(467)	F(2.56)	F(68.0)
29	A(136)	A(28.2)	A(158)	99	G(359)	G(0.76)	G(33.8)
30	T(96.9)	T(15.6)	T(71.0)	100	A(401)	A(0.88)	A(31.1)
31	A(140)	A(26.2)	A(148)	101	I(356)	I(0.19)	I(8.27)
32	Y(123)	Y(23.3)	Y(135)	102	P(604)		P(0.69)
33	W(17.7)		W(4.83)	103	F(662)		
34	R(126)		R(56.4)	104	A(492)		
35	K(91.8)		K(48.4)	105	D(304)		D2-8 D(103)
36	Y(87.6)	K4 Y(83.2)	Y(69.2)	106	F(498)		F(261)
37	F(111)	F(80.4)	F(37.4)	107	G(447)		G(199)
38	H(98.1)	H(89.2)	H(2.24)	108	Q(359)		Q(162)
39	D(34.3)	D(71.0)		109	S(257)		S(39.5)
40	H(110)	H(58.4)		110	F(440)		F(10.9)
41	P(40.4)	P(79.5)		111	L(406)		L(1.64)
42		D(91.8)		112	D(238)		
43		R(79.0)		113	T(214)		
44		G(106)		114	L(170)		
45		L(135)		115	P(152)		
46		F(141)		116	D(157)		D2-4 D(190)
47		A(138)		117	F(170)		F(400)
48		N(135)		118	I(200)		I(329)
49		V(125)		119	H(153)		H(220)
50		N(118)		120	E(77.1)		E(274)
51		G(88.7)		121	H(181)	E-1 H(91.3)	H(217)
52		N(102)		122	F(146)		F(40.0)
53		N(133)		123	D(83.1)		
54		I(101)		124			
55		Y(112)		125	K2 D(63.7)		
56		S(34.3)		126	A(72.1)		
57		A(77.8)		127	W(37.2)		
58		Q(75.4)		128	S(43.4)		
59		F(84.2)		129	S(79.6)		
60		R(76.4)		130	C(191)		
61		A(69.1)		131	Y(127)		
62		H(57.9)		132	N(142)		
63	CN3 V(81.1)	M(74.9)		133	Y(180)		
64	R(97.4)	Y(73.7)		134	I(138)		
65	V(74.3)	R(54.8)		135	V(172)		
66	F(70.0)	V(78.8)		136	S(75.9)		
67	A(66.5)	F(63.4)		137	N(130)		
68	G(43.6)	A(48.6)		138	L(110)		
69	L(57.4)	G(42.5)		139	G(63.2)		
70	D(56.5)	L(49.0)		140	A(43.7)		
		D(13.2)					

表 S3 *Perinereis* Hb a 鎖の PTH アミノ酸回収量 ペプチド鎖の略号は図 S10 に同じ。

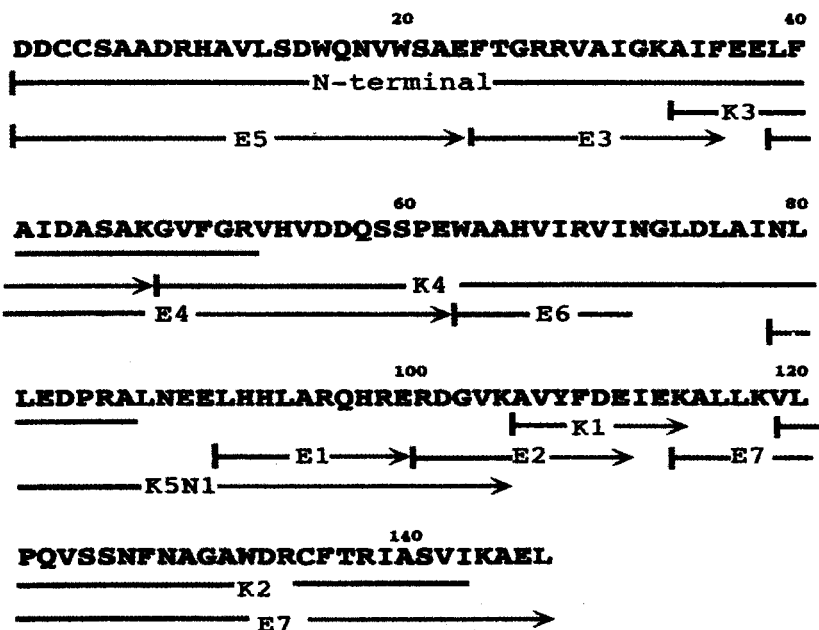


図 S11 *Perinereis* B 鎖のアミノ酸配列を決定するに至るまでのデータのまとめ

K5N1 はリシルエンドペプチダーゼで切断した断片のひとつ K5 をさらにアルギニルエンドペプチダーゼ Arg-N で切断したペプチドを示す。他の記号は図 S10 に同じ。

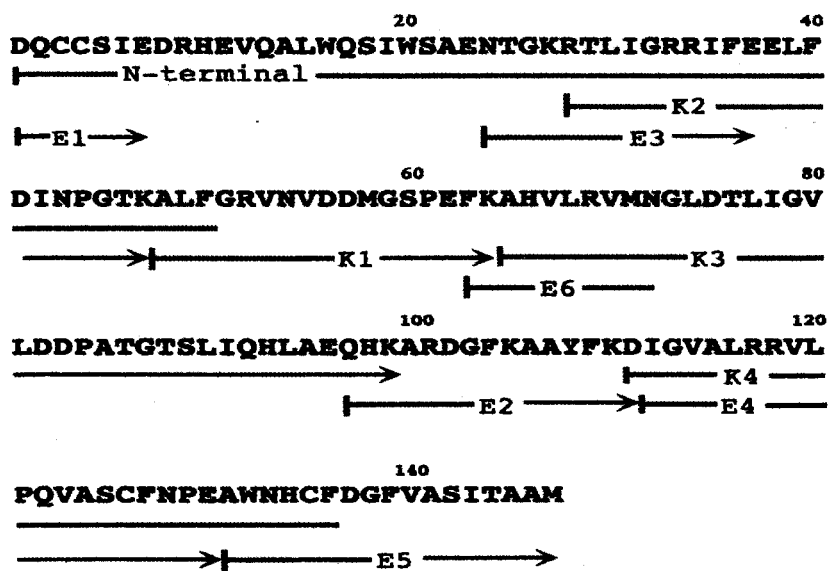


図 S12 *Perinereis* b 鎖のアミノ酸配列を決定するに至るまでのデータのまとめ

ペプチド断片を示す記号は図 S10 に同じ。

No	Amino acid (pmol)		No	Amino acid (pmol)	
1	intact		74	L (20.38)	
2	D (717.79) k1	E5 D (44.98)	75	D (8.13)	
3	D (430.13)	D (45.35)	76	L (25.27)	D4 L (3.73)
4	C (462.23)	C (33.82)	77	A (9.30)	A (3.39)
5	C (483.62)	C (24.85)	78	I (13.75)	I (3.18)
6	S (178.38)	S (10.66)	79	N (7.47)	N (3.25)
7	A (240.06)	A (19.52)	80	L (25.14)	L (2.26) K5N1
8	A (285.55)	A (17.35)	81	L (25.77)	L (2.51)
9	D (386.85)	D (23.48)	82	E (7.36)	E (0.50)
10	R (235.44)	R (21.40)	83	D (3.17)	
11	H (234.40)	H (11.04)	84	P (6.12)	
12	A (229.00)	A (10.11)	85	R (6.05)	
13	V (227.44)	V (12.51)	86	A (0.11)	
14	L (137.46)	L (9.84)	87		
15	S (85.81)	S (4.79)	88		
16	D (164.70)	D (8.09)	89		
17	W (23.06)	W (0.00)	90		
18	Q (153.57)	Q (3.66)	91	E1 L (412.73)	D1 E (15.32)
19	N (88.62)	N (4.01)	92	H (496.42)	L (23.70)
20	V (115.78)	V (2.14)	93	H (286.44)	H (10.90)
21	W (18.02)	W (0.20)	94	L (356.98)	H (14.91)
22	S (36.61)	S (0.19)	95	A (336.98)	L (18.75)
23	A (136.41)	A (0.69)	96	R (430.59)	A (14.39)
24	E (47.13)	E (0.30)	97	Q (306.65)	R (10.97)
25	F (59.96)	E3 F (597.42)	98	H (288.88)	Q (19.43)
26	T (38.30)	T (396.60)	99	R (444.58)	H (10.08)
27	G (67.57)	G (471.45)	100	E (296.35)	R (12.05)
28	R (81.12)	R (689.92)	101	E2 R (380.33)	E (10.87)
29	R (134.43)	R (658.98)	102	D (266.39)	R (9.07)
30	V (88.23)	V (523.14)	103	G (234.80)	
31	A (94.57)	A (442.26)	104	V (278.12)	
32	I (39.60)	I (405.68)	105	K (216.17)	
33	G (51.34)	G (312.91)	106	K2 A (408.36)	A (246.89)
34	K (24.20)	K (280.94)	107	V (370.02)	V (278.21)
35	A (86.72) K4	A (216.20) A (331.49)	108	Y (424.79)	Y (258.99)
36	I (31.40)	I (174.03) I (307.01)	109	F (288.29)	F (231.26)
37	F (54.23)	F (193.79) F (298.10)	110	D (560.23)	D (141.50)
38	E (17.77)	E (191.88) E (145.41)	111	E (311.14)	E (32.71) D5
39	E (18.93)	E (144.38)	112	I (180.55)	I (21.12)
40	L (22.09)	L (148.76) E4	113	E (144.43)	E (18.76)
41	F (44.84)	F (149.38) F (385.26)	114	K (70.67) E7	K (336.23)
42	A (77.35)	A (137.56) A (356.69)	115		A (353.78)
43	I (26.56)	I (114.37) I (334.55)	116		L (389.89)
44	D (15.51)	D (201.35) D (339.03)	117		L (340.59)
45	A (71.06)	A (95.83) A (330.03)	118		K (385.11)
46	S (11.47)	S (35.83) S (160.23)	119	K3	V (154.15) V (360.25)
47	A (79.83)	A (45.44) A (258.01)	120		L (126.98) L (334.67)
48	K (11.26)	K (23.57) K (253.83)	121		P (116.81) P (296.51)
49	G (16.20) K5	G (194.67) G (208.46) K5N2	122		Q (112.33) Q (317.91)
50	V (44.63)	V (352.29) V (247.12) V (11.66)	123		V (121.51) V (311.81)
51	F (31.00)	F (255.79) F (232.39) F (14.09)	124		S (51.23) S (149.12)
52	G (19.39)	G (255.25) G (171.63) G (8.15)	125		S (49.27) S (144.05)
53	R (47.35)	R (278.46) R (254.70) R (9.70)	126		N (88.17) N (213.85)
54		V (254.77) V (193.01) V (9.70)	127		F (57.27) F (198.90)
55		H (199.91) H (160.33) H (4.63)	128		N (75.65) N (184.26)
56		V (243.30) V (181.79) V (6.38)	129		A (59.77) A (172.35)
57		D (156.42) D (129.90) D (2.94)	130		G (49.05) G (146.03)
58		D (186.87) D (158.70) D (2.35)	131		A (54.03) A (160.06)
59		Q (115.50) Q (98.94) Q (9.70)	132		W (8.59) W (64.80)
60		S (53.91) S (42.23)	133		D (30.79) D (90.81)
61		S (57.92) S (50.98)	134		R (24.02) R (130.64)
62		P (46.06) P (22.68)	135		G (13.49) G (157.62)
63		E (31.66) E (10.03)	136		F (14.61) F (94.79)
64		W (1.19) E6	137		T (10.95) T (63.14)
65		A (28.79) A (112.14)	138		R (13.56) R (99.90)
66		A (42.08) A (42.75)	139		I (11.11) I (60.46)
67		H (18.34) H (57.97)	140		A (6.58) A (56.75)
68		V (26.45) V (71.56)	141		S (1.95) S (25.67)
69		I (17.93) I (63.47)	142		V (2.31) V (41.39)
70		R (25.55) R (51.19)	143		I (33.41) I (36.91)
71		V (30.70) V (65.15)	144		K (29.35) K (42.48)
72		I (22.53) I (58.39)	145		A (17.60) A (38.31)
73		N (12.84)	146		E (2.75) E (12.31)
		G (12.19)	147		L (2.47) L (0.11)

表 S4 *Perinereis* Hb B 鎖の PTH アミノ酸回収量

ペプチド鎖の略号は図 S11 に同じ。D はエンドペプチダーゼ Asp-N によって消化されたペプチドで、図 S11 はこのペプチド D を含めずに描いた。

多毛類巨大ヘモグロビンの一次構造比較

No	Amino acid (pmol)		No	Amino acid (pmol)	
1	intact	E1	74	L(23.60)	
2	D(282.39)	D(546.44)	75	D(24.90)	
3	Q(195.73)	Q(551.73)	76	T(12.11)	
4	C(317.69)	C(1222.189)	77	L(15.44)	
5	C(344.27)	C(489.09)	78	I(20.52)	
6	S(130.80)	S(233.99)	79	G(15.95)	
7	I(182.92)	I(339.91)	80	V(17.43)	
8	E(143.06)	E(324.53)	81	L(13.19)	
9	D(161.65)	D(327.99)	82	D(14.09)	
10	R(165.29)	R(569.45)	83	D(18.32)	
11	H(145.26)	H(263.07)	84	P(15.77)	
12	E(115.56)	E(90.44)	85	A(9.99)	
13	V(207.90)		86	T(3.95)	
14	Q(141.63)		87	G(5.99)	
15	A(196.21)		88	T(3.76)	
16	L(180.34)		89	S(5.13)	
17	W(11.98)		90	L(3.21)	
18	Q(176.11)		91	I(5.65)	
19	S(71.87)		92	Q(6.42)	
20	I(84.19)		93	H(4.58)	
21	W(6.73)		94	L(3.42)	
22	S(51.54)		95	A(1.49)	
23	A(148.53)		96	E(2.78)	E2
24	E(56.90)	E3	97	Q(4.47)	Q(111.50)
25	N(57.26)	N(510.18)	98	H(1.57)	H(83.20)
26	T(49.39)	T(438.00)	99		K(151.26)
27	G(122.37)	G(497.78)	100		A(171.19)
28	K(49.85) K2	K(598.61)	101		R(82.95)
29	R(104.35) R(50.93)	R(588.15)	102		D(106.04)
30	T(31.83) T(34.36)	T(381.80)	103		G(121.68)
31	L(63.23) L(40.38)	L(487.03)	104		F(133.41)
32	I(56.50) I(50.38)	I(413.61)	105		K(138.16)
33	G(109.06) G(46.93)	G(384.02)	106		A(125.23)
34	R(87.64) R(47.63)	R(492.71)	107		A(141.95)
35	R(106.55) R(55.69)	R(501.41)	108		Y(127.76)
36	I(80.0) I(49.08)	I(335.43)	109		F(122.47)
37	F(93.58) F(49.15)	F(307.66)	110	K4	K(109.65)
38	E(32.21) E(41.10)	E(157.19)	111	D(11.86)	D(82.39) E4(D)
39	E(27.12) E(47.01)	E(78.92)	112	I(12.00)	I(277.66)
40	L(38.46) L(35.54)		113	G(11.19)	G(320.93)
41	F(71.79) F(43.13)		114	V(11.67)	V(419.85)
42	D(4.68) D(41.64)		115	A(13.43)	A(419.52)
43	I(27.91) I(30.65)		116	L(7.55)	L(381.57)
44	N(14.50) N(35.68)		117	R(13.72)	R(295.81)
45	P(41.95) P(28.20)		118	R(13.88)	R(288.62)
46	G(60.4) G(22.03)		119	V(10.44)	V(398.10)
47	T(0.93) T(12.86)		120	L(9.28)	L(354.47)
48	K(9.85) K1 K(3.57)		121	P(7.12)	P(271.85)
49	A(0.10) A(67.01)		122	Q(7.85)	Q(269.06)
50	L(0.10) L(54.03)		123	V(7.91)	V(290.35)
51	F(4.69) F(70.57)		124	A(8.27)	A(238.59)
52	G(72.92)		125	S(3.43)	S(121.59)
53	R(76.57)		126	C(6.11)	C(333.54)
54	V(59.50)		127	F(6.10)	F(166.65)
55	N(70.64)		128	N(5.45)	N(173.66)
56	V(51.16)		129	P(3.11)	P(74.52)
57	D(57.99)		130	E(2.33)	E5
58	D(60.28)		131	A(2.96)	A(34.18)
59	M(38.88)		132	W(0.95)	W(53.89)
60	Q(32.81)		133	N(2.06)	N(28.30)
61	S(16.72)		134	H(1.22)	H(24.72)
62	P(16.21)		135	C(1.66)	C(31.64)
63	E(15.06)	E6	136	F(2.28)	F(25.82)
64	F(9.32) F(181.08)		137	D(1.01)	D(22.10)
65	K(1.09) K(199.77)		138	G(1.05)	G(15.47)
66	A(45.21) A(203.39)		139		F(20.68)
67	H(41.76) H(126.16)		140		V(19.93)
68	V(39.59) V(157.28)		141		A(16.59)
69	L(27.59) L(113.00)		142		S(12.98)
70	R(53.23) R(171.42)		143		I(20.08)
71	V(39.18) V(148.95)		144		T(10.51)
72	M(26.71) M(163.05)		145		A(12.14)
73	N(31.37) N(6.20)		146		A(10.15)
	G(26.43) G(9.74)		147		M(1.53)

表 S5 *Perinereis* Hb b 鎖の PTH アミノ酸回収量

ペプチド鎖の略号は図 S12 に同じ。

RT-PCR 法による cDNA の作成とその配列決定

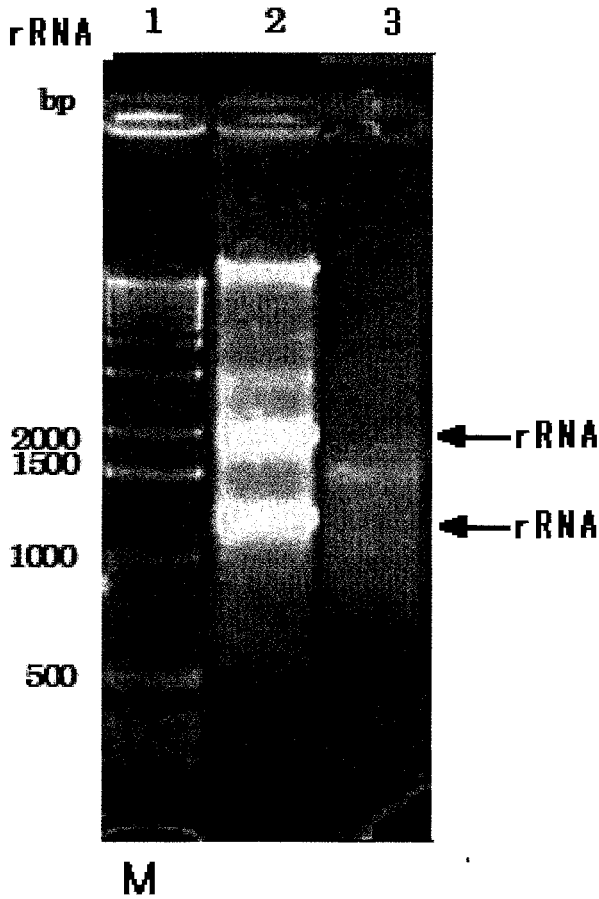


図 S13 *Perinereis* より抽出した total RNA と mRNA の 1% アガロース電気泳動によるパターン

列 1 : 分子量マーカー。2 : *Perinereis* より抽出した total RNA。rRNA の位置を矢印で示した。3 : オリゴdT カラムによるポリ(A)セレクションを行った mRNA。total RNA から精製した mRNA 溶液の純度を電気泳動で確認した。濃度の測定により、Total RNA から 4% の mRNA を得ることができた。

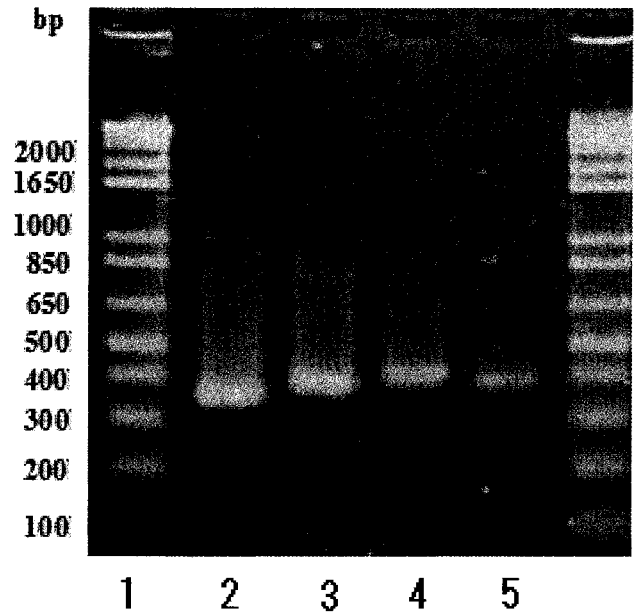


図 S14 各グロビン鎖のアミノ酸配列から設計したプライマーによる *Perinereis* cDNA の RT-PCR 産物の電気泳動パターン

列 1 : 分子量マーカー。2 : a 鎖の PCR 産物。推定される PCR 産物の塩基数は、対応するアミノ酸が 119 残基であることからより 357 塩基対。3 : A 鎖の PCR 産物。アミノ酸 129 残基/ 387 塩基対。4 : b 鎖の PCR 産物。アミノ酸 137 残基/411 塩基対。5 : B 鎖の PCR 産物。アミノ酸 132 残基/396 塩基対。アミノ酸残基数から推定される DNA の分子量は、電気泳動で確認されたものとよく一致した。このことにより、total RNA より合成した cDNA から、*Perinereis* Hb の各グロビン鎖をコードしている cDNA を PCR で増幅できていることが確認された。

A-1

```

AAG GTT AAG CAG CAG TGG GCA AAG GCC TAC GGT GTT GGC CAT GAA CGT GTG GAG CTT GGA
K   V   K   Q   Q   W   A   K   A   Y   G   V   G   H   E   R   V   E   L   G
ATC GCT CTC TGG AAG AGC ATG TTC TCC CAG GAC CCA GAA GCC AGA AAA CTC TTC GAC CGT
I   A   L   W   K   S   M   F   S   Q   D   P   E   A   R   K   L   F   D   R
GTC CAC GGA GAA GAT GTC AGG TCT CCT GCA TTT GAG GCC CAT ATT GCC CGT GTG TTC AAC
V   H   G   E   D   V   R   S   P   A   F   E   A   H   I   A   R   V   F   N
GGA TTT GAC CGC ATT ATC TCA TCT TTG ACC GAT GAG GAT GTT CTC AAC GCT CAG TTG GCT
G   F   D   R   I   I   S   S   L   T   D   E   D   V   L   N   A   Q   L   A
CAC TTG AAG GAG CAG CAC ATC AAG CTG GGC ATC ACT GCT CAC CAC TTC AAG CTC ATG CGC
H   L   K   E   Q   H   E   K   L   G   E   T   A   H   H   F   K   L   M   R
ACT GGT CTT GGC TAC GTC CTT CCC GCC CAA CTT GGC CGC TGC TTC GAC AAG GCT GCT TGG
T   G   L   G   Y   V   L   P   A   Q   L   G   R   C   F   D   K   A   A   W
TCT GCC TGC TGG GAT GAA GTA ATC TAC CC
S   A   C   W   D   E   V   I   Y
    
```

A-2

```

AAG GTT AAG CAG CAG TGG GCA AAG GCC TAC GGT GTT GGC CAT GAA CGT GTG GAG CTT GGA
K   V   K   Q   Q   W   A   K   A   Y   G   V   G   H   E   R   V   E   L   G
ATC GCT CTC TGG AAG AGC ATG TTC TCC CAG GAC CCA GAA GCC AGA AAA CTC TTC GAC CGT
I   A   L   W   K   S   M   F   S   Q   D   P   E   A   R   K   L   F   D   R
GTC CAT GGT GAT GAC GTC AGA TCT CCT GAA TTT GAG GCC CAT ATT GCC CGT GTG TTC AAC
V   H   G   D   D   V   R   S   P   E   F   E   A   H   I   A   R   V   F   N
GGA TTT GAC CGC ATC ATC TCA TCT TTG ACC GAT GAG GAT GTT CTC AAT GCT CAG TTG GCT
G   F   D   R   I   I   S   S   L   T   D   E   D   V   L   N   A   Q   L   A
CAC TTG AAG GCA CAA CAC ATC AAG CTG GGA ATC ACT GGC CAC CAC TTC AAG CTC ATG CGC
H   L   K   A   Q   H   E   K   L   G   E   T   G   H   H   F   K   L   M   R
ACT GGT CTC GGC TAC GTC CTT CCT GCC CAA CTT GGC CGC TGC TTC GAT AAG GCT GCC TGG
T   G   L   G   Y   V   L   P   A   Q   L   G   R   C   F   D   K   A   A   W
TCT GCC TGC TGG GAC GAG GTC ATC TAC CC
S   A   C   W   D   E   V   I   Y
    
```

A-3

```

AAG GTT AAG CAG CAG TGG GCA AAG GCC TAC GGT GTT GGC CAT GAA CGT GTG GAG CTT GGA
K   V   K   Q   Q   W   A   K   A   Y   G   V   G   H   E   R   V   E   L   G
ATC GCT CTC TGG AAG AGC ATG TTC TCC CAG GAC CCA GAA GCC AGA AAA CTC TTC GAC CGT
I   A   L   W   K   S   M   F   S   Q   D   P   E   A   R   K   L   F   D   R
GTC CAC GGA GAA GAT GTC AGG TCT CCT GCA TTT GAG GCC CAT ATT GCC CGT GTG TTC GAC
V   H   G   E   D   V   R   S   P   A   F   E   A   H   I   A   R   V   F   D
GGA TTT GAC CGC ATT ATC TCA TCT TTG ACC GAT GAG GAT GTT CTC AAC GCT CAG TTG GCT
G   F   D   R   I   I   S   S   L   T   D   E   D   V   L   N   A   Q   L   A
CAC TTG AAG GAG CAG CAC ATC AAG CTG GGC ATC ACT GCT CAC CAC TTC AAG CTC ATG CGC
H   L   K   E   Q   H   E   K   L   G   E   T   A   H   H   F   K   L   M   R
ACT GGT CTT GGC TAC GTC CTT CCC GCC CAA CTT GGC CGC TGC TTC GAC AAG GCT GCT TGG
T   G   L   G   Y   V   L   P   A   Q   L   G   R   C   F   D   K   A   A   W
TCT GCC TGC TGG GAT GAA GTA ATC TAC CC
S   A   C   W   D   E   V   I   Y
    
```

図 S15 DNA sequence による A 鎖の遺伝子断片をコードする塩基配列とアミノ酸配列の推定

[A-1]、[A-2]、[A-3]はそれぞれ、異なるクローンにより得られた塩基配列。4クローンのうちそれぞれ2クローン、1クローン、1クローンずつ得られた。[A-1]で示した塩基配列はプライマーを示す。A-1の塩基配列から推測されたアミノ酸配列はプロテインシークエンサーによる結果と完璧に一致している。[A-2]と[A-3]では赤字で示したアミノ酸残基がプロテインシークエンサーによるA1鎖のアミノ酸配列と異なっていたが、[A-2]についてはA2鎖のアミノ酸配列に近いことがわかった。これより[A-1]と[A-3]はA1鎖、また[A-2]はA2鎖であると考えられる。cDNAの配列はアミノ酸配列の11番目から139番目までをカバーしている(図S1を参照)。

a-1

```

ATA AAG GTC AAG CAT CAA TGG GTC GAC GTC TAC GGC GCC AAC GTG GAC AGG GAG GGC TTT
I   K   V   K   H   Q   W   V   D   V   Y   G   A   N   V   D   R   E   G   F
GCC ACC GCA GTC TGG AGG AAA TAC TTC CAC GAC CAC CCA GAC AGA GGT CTC TTT GCC AAC
A   T   A   V   W   R   K   Y   F   H   D   H   P   D   R   G   L   F   A   N
GTC AAT GGC AAC AAC ATC TAC TCG GCT CAG TTC CGT GCC CAC ATG GTC CGG GTC TTT GCT
V   N   G   N   N   I   Y   S   A   Q   F   R   A   H   M   V   R   V   F   A
GGG CTG GAC ATC CTG ATT TCC CTC CTG GAT GAG GAG AGC GAC GCC ACC TTC CAC TCG GCT
G   L   D   I   L   I   S   L   L   D   E   E   S   D   A   T   F   H   S   A
GCT GCT CAT TAC TTG GAA TTC CAC AAG CAG TTT GGC GCC ATT CCT TTC GCG GAT TTT GGA
A   A   H   Y   L   E   F   H   K   Q   F   G   A   I   P   F   A   D   F   G
CAG AGC TTC TTG GAT ACC CCG CCT GAC TTC ATT CAC GAG CAT TTC GAC AAA GAC GCC TGG
Q   S   F   L   D   T   L   P   D   F   I   H   E   H   F   D   K   D   A   W
    
```

a-2

```

ATC AAG GTC AAG CAT CAG TGG GTC GAC GTC TAC GGC GCC AAC GTG GAC AGG GAG GGC TTT
I   K   V   K   H   Q   W   V   D   V   Y   G   A   N   V   D   R   E   G   F
GCC ACC GCA GTC TGG AGG AAA TAC TTC CAC GAC CAC CCA GAC AGA GGT CTC TTT GCC AAC
A   T   A   V   W   R   K   Y   F   H   D   H   P   D   R   G   L   F   A   N
GTC AAT GGC AAC AAC ATC TAC TCG GCT CAG TTC CGT GCC CAC ATG GTC CGG GTC TTT GCT
V   N   G   N   N   I   Y   S   A   Q   F   R   A   H   M   V   R   V   F   A
GGG CTG GAC ATC CTG ATT TCC CTC CTG GAT GAG GAG AGT GAC GCC ACC TTC CAC TCG GCT
G   L   D   I   L   I   S   L   L   D   E   E   S   D   A   T   F   H   S   A
GCT GCT CAT TAC TTG GAA TTC CAC AAG CAG TTT GGC GCC ATT CCT TTC GCG GAT TTC GGA
A   A   H   Y   L   E   F   H   K   Q   F   G   A   I   P   F   A   D   F   G
CAG AGC TTC TTG GAT ACC CTG CCT GAC TTC ATT CAC GAG CAT TTC GAC AAA GAC GCC TGG
Q   S   F   L   D   T   P   P   D   F   I   H   E   H   F   D   K   D   A   W
    
```

図 S16 DNA sequence による a 鎖の遺伝子断片をコードする塩基配列とアミノ酸配列の推定

a-1 と a-2 はそれぞれ、異なるクローンから得られた塩基配列で、それぞれ2クローンから得られた。

で示した塩基配列はプライマー（上流プライマー、SA13F；下流プライマー、SA137R）を示す。a-1 の塩基配列から推定されたアミノ酸配列はプロテインシーケンサーによる結果と一致している。a-2 では赤字で示した Pro のみが a-1 およびプロテインシーケンサーによるアミノ酸配列と異なっており、多型の存在が推定される。cDNA の配列はアミノ酸配列の8番目から127番目までをカバーしている（図 S1 を参照）。

b-1

```

GAC CAG TGT TGC TCC ATC GAG GAC CGA CAT GAG GTC CAG GCG TTG TGG CAG TCC ATC TGG
D Q C C S I E D R H E V Q A L W Q S I W
AGT GCG GAG AAC ACC GGA AAG AGG ACC CTG ATT GGC CGA CGC ATC TTC GAA GAA CTC TTC
S A E N T G K R T L I G R R I F E E L F
GAC ATC AAC CCC GGC ACC AAG GCC CTG TTC GGC CGT GTC AAC GTA GAT GAC ATG GGC AGT
D I N P G T K A L F G R V N V D D M G S
CCC GAA TTC AAA GCC CAC GTC CTG CGT GTG ATG AAC GGC CTG GAC ACC TTG ATC GGA GTC
P E F K A H V L R V M N G L D T L I G V
TTG GAT GAC CCT GCC ACC GGA ACT TCC CTC ATC CAA CAC TTG GCT GAG CAG CAC AAG GCC
L D D P A T G T S L I Q H L A E Q H K A
AGG GAT GGC TTC AAG GCT GCT TAC TTC AAG GAC ATC GGA GTT GCC CCC CGC CGC GTT CTT
R D G F K A A Y F K D I G V A P R R V L
CCC CAG GTG GCG AGC TGC TTC AAC CCC GAG GCC TGG AAC CAC TGC TTC GAC GGT A
P Q V A S C F N P E A W N H C F D G

```

b-2

```

GAC CAG TGT TGC TCC ATC GAG GAC CGA CAT GAG GTC CAG GCG TTG TGG CAG TCC ATC TGG
D Q C C S I E D R H E V Q A L W Q S I W
AGT GCG GAG AAC ACC GGA aAG AGG ACC CTG ATT GGC CGA CGC ATC TTC GAA GAA CTC TTC
S A E N T G K R T L I G R R I F E E L F
GAC ATC AAC CCC GGC ACC AAG GCC CTG TTC GGC CGT GTC AAC GTA GAT GAC ATG GGC AGT
D I N P G T K A L F G R V N V D D M G S
CCC GAA TTC AAA GCC CAC GTC CTG CGT GTG ATG AAC GGC CTG GAC ACC TTG ATC GGA GTC
P E F K A H V L R V M N G L D T L I G V
TTG GAT GAC CCT GCC ACC GGA ACT TCC CTC ATC CAA CAC TTG GCT GAG CAG CAC AAG GCC
L D D P A T G T S L I Q H L A E Q H K A
AGG GAT GGC TTC AAG GCT GCT TAC TTC AAG GAC ATC GGA GTT GCC CCC CAC CGC GTT CTT
R D G F K A A Y F K D I G V A P H R V L
CCC CAG GTG GCC AGC TGC TTC AAC CCC GAG GCC TGG AAC CAC TGC TTC GAC GGT A
P Q V A S C F N P E A W N H C F D G

```

図 S17 DNA sequence による b 鎖の遺伝子断片をコードする塩基配列とアミノ酸配列の推定

b-1と**b-2** はそれぞれ、異なるクローンにより得られた塩基配列。それぞれ2クローンから得られた。で示した塩基配列はプライマー（上流プライマー、SA13F；下流プライマー、SA137R）を示す。b-1 の塩基配列から推測されたアミノ酸配列はプロテインシーケンサーによる結果と一致している。b-2 では赤字で示した His のみが b-1 およびプロテインシーケンサーによるアミノ酸配列と異なった。cDNA の配列はアミノ酸配列の N 末端から 137 番目までをカバーしている（図 S1 を参照）。

B

GAC	GAT	TGT	TGT	TCT	GCC	GCA	GAC	AGA	CAC	GCC	GTC	CTC	AGC	GAC	TGG	CAG	AAT	GTG	TGG
D	D	C	C	S	A	A	D	R	H	A	V	L	S	D	W	Q	N	V	W
TCA	GCG	GAG	TTC	ACT	GGC	CGC	AGG	GTA	GCC	ATT	GGA	AAG	GCC	ATC	TTT	GAG	GAG	CTC	TTC
S	A	E	F	T	G	R	R	V	A	I	G	K	A	I	F	E	E	L	F
GCC	ATC	GAC	GCC	AGT	GCC	AAG	GGT	GTG	TTT	GGT	AGA	GTT	CAT	GTT	GAC	GAC	CAG	AGC	TCT
A	I	D	A	S	A	K	G	V	F	G	R	V	H	V	D	D	Q	S	S
CCT	GAA	TGG	GCT	GCT	CAC	GTG	ATC	AGG	GTC	ATC	AAC	GGC	CTT	GAC	CTT	GCC	ATC	AAC	CTT
P	E	W	A	A	H	V	I	R	V	I	N	G	L	D	L	A	I	N	L
CTG	GAA	GAC	CCC	CGT	GCT	CTG	AAT	GAG	GAA	CTC	CAC	CAC	TTG	GCC	AGG	CAG	CAC	CGT	GAG
L	E	D	P	R	A	L	N	E	E	L	H	H	L	A	R	Q	H	R	E
CGT	GAT	GGA	GTC	AAG	GCT	GTC	TAC	TTC	GAT	GAA	ATC	GAG	AAG	GCC	CTC	CTG	AAG	GTC	CTG
R	D	G	V	K	A	V	Y	F	D	E	I	E	K	A	L	L	K	V	L
CCC	CAA	GTG	TCC	AGC	AAC	TTC	AAC	GCC	GGT	GCT	TGG	GA							
P	Q	V	S	S	N	F	N	A	G	A	W								

図 S18 DNA sequence による B 鎖の遺伝子断片をコードする塩基配列とアミノ酸配列の推定

上流、下流プライマーはそれぞれ [] で示した。塩基配列から推測されたアミノ酸配列はプロテインシーケンサーによる結果と一致している。cDNA の配列はアミノ酸配列の N 末端から 131 番目までをカバーしている (図 S1 を参照)。