

## アオゴカイ巨大ヘモグロビンの再構成

金井拓・佐野敏也・板東孝枝・金山明宏・中西優子・脇加奈子・村上聡・倉富久子・徳永和歌子・澁谷明宏・山下智子・佐藤高則\*・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、770-8502 徳島市南常三島町1-1

---

### Reassociation of annelid giant hemoglobin from the polychaete *Perinereis aibuhitensis*

Taku KANAI, Toshiya SANO, Takae BANDO, Akihiro KANEYAMA, Yuhko NAKANISHI, Kanako WAKI, Satoshi MURAKAMI, Hisako KURATOMI, Wakako TOKUNAGA, Akihiro SHIBUYA, Tomoko YAMASHITA, Takanori SATOH\* and Toshio GOTOH

Department of Biological Science, Faculty of Integrated Arts and Sciences, University of Tokushima,  
Tokushima 770-8502, Japan

---

#### Abstract

Annelid extracellular hemoglobin (Hb) is a supramolecule with molecular mass of  $\sim 3,500$  kDa. The giant Hb consists of 12 subassemblies (globin dodecamers, D) and 18 homodimeric linkers (L) of non-globin chain. The globin dodecamer and linker were isolated from the polychaete *Perinereis aibuhittensis* Hb separately. Subsequently, these two components were mixed in the presence of 1M urea at a neutral pH to reform a whole molecule of Hb. At first L was refined by reverse phase chromatography in organic solvent. On the other hand, *Perinereis* Hb was incubated in 4M urea solution at 4°C for 5 min, and applied to two amphoteric ion-exchange resin column to remove L stick to the resin, and to isolate only D. The eluate was condensed and subjected to gel filtration. As a result, an ingredient of molecule mass  $\sim 210$  kDa, that is D, was provided in high yield. When D and L were mixed in the molar ratio of approximately 1:1 in 50mM phosphate buffer (pH 7.2) in the presence of 1 M urea at room temperature, most of the proteins met to natural Hb size again within about 20 hours. Furthermore, similar experiments were performed in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 1 M urea in the presence of 1 mM CaCl<sub>2</sub> or 1mM EDTA. It was observed that the reassociation was affected substantially by the presence of Ca<sup>2+</sup>. In conclusion, the homodimeric linkers have the key role to form the gigantic Hb.

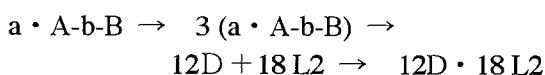
*Keyword: giant Hemoglobin, annelid, polychaete, supramolecule*

---

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

## 1. はじめに

遠心力を利用してタンパク質の分子質量を初めて計測した Svedberg はミミズやゴカイの細胞外 Hb の分子質量が 3-4 MDa にも及ぶ巨大なタンパク質であることを明らかにした [1]。これを契機にその分子構築について多くの研究が行なわれてきたが、その興味を中心は、どのような機構によって巨大化するのか、構成鎖はすべてヒト Hb と起源が同じなのかということにあった [2-4]。後藤と鈴木らは徳島産のゴカイ *Tylorrhynchus heterochaetus* (イトメ) の Hb を対象にアミノ酸配列決定や質量分析により各構成鎖の質量を精密に計測するなどして、多毛類の細胞外 Hb の分子構築を下記のように推定している [5-12]。



ここで、a、A、b、B は4種類のグロビン鎖、A-b-B は S-S 結合したグロビン三量体、D はグロビン鎖の 12 量体 (3(a·A-b-B)、Dodecamer) でサブ構造体と呼ばれる。グロビン 12 量体 D はグロビン四量体が会合した準安定な構造体であり、崩れやすい。L は非グロビン鎖で、リンカーと呼ばれる。多毛類ではリンカーが2種類 (L1、L2) あり、ホモダイマー (L1-L1、L2-L2) として存在する [10]。このリンカーの存在が Hb 巨大化の大きな要因となっており [11, 12]、12 個のサブ構造体はリンカーによってリンクされて巨大なタンパク質が構築されると推定されている。また、このフローチャートによれば、ゴカイの巨大 Hb は 180 本のポリペプチド鎖から構成されることになる。この巨大 Hb の電顕像は美しい六角二層構造をなしており、各頂点にグロビン 12 量体 D が位置している [13]。

最近、我々は中国産のゴカイ *Perinereis aibuhitensis* (アオゴカイ) の巨大 Hb を各サブユニットに分離し、それらを混合することによって再構成にほぼ成功している [14]。しかし、各サブユニットの単離が量的に不十分であり、定性的な実験に止まっている。また、再構成された最終産物の電子顕微鏡像は六角二層を示さず、金米糖状を呈していた。これらの難点を克

服するために、グロビン 12 量体 D の分離を試みてきた。これまで、アルカリ変性、酸変性や尿素あるいは塩酸グアニジン添加、あるいはまたタンパク質分解酵素によるリンカーの除去等とゲルろ過を組み合わせることによって *Perinereis* Hb からサブ構造体を単離する試みがなされた。しかし、安定なサブ構造体を収量よく得るまでには至っていない。採用された実験条件下では、グロビン 12 量体が不安定で、より小さいライマー (A-b-B)、モノマー (a) などのサブユニットへの解離が観察された。また、水溶液に溶解した状態でのリンカーの精製も困難を極めた。支持体に粘り着く傾向が強いからである。

本稿の第一の目的は *Perinereis* Hb から十分量のグロビン 12 量体とリンカーを単離する条件の開発である。さらに、得られた試料を混合して、サブユニット構成から推定されている巨大 Hb の分子構築のプロセスを検証する。

## 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 [15] 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 S6 B (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 画分を超遠心機 Hitachi 55P-72 (日立工機) で濃縮 (50,000 rpm × 3 hrs) し、再びゲルろ過と超遠心を行って精製 Hb を得た。精製された Hb は少量の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶かし、水中に冷保存した。Ca<sup>2+</sup>イオンの効果を探る実験では溶媒を予め限外ろ過によって 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.2) に置換した。

### 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 の時、吸光係数は 540 nm, 1 cm path で 11.3 [16] とした。また、リンカー等のタンパク量は BCA 法 [17] によって定量した。試薬は Pierce の Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit を使用した。

### 両性イオン交換体を用いたバッチ法によるリンカー鎖の除去

Perinereis Hb を尿素に晒すとリンカーとグロビン鎖の結合がゆるむ。この時両性イオン交換樹脂と混ぜると、両性イオン交換樹脂にリンカーが優先的に付着することが期待される。初めに至適条件をバッチ法 [18] で検討し、次にフロー法により改良を加えた。リンカーの除去方法は Kuchumov らの方法 [19] を参考にした。

第 1 の実験として蒸留水に溶けた Hb 溶液 (5 mg/ml) を 500 μl (Hb 2.5 mg) 取り、これに尿素 148.8 mg 加え (全量 648.8 μl) 尿素濃度 4 M にする。これをローテーター (BIO CRAFT) を使用して 4℃ で、0.5, 2, 12, 24, 48 時間攪拌した。更に、これに両性イオン交換樹脂 AG<sup>®</sup>501-X8(D) を 500 mg 加え 48 時間攪拌した。得られたサンプルを限外ろ過 (セントリカット超ミニ (W-10) : (株) クラボウ) により濃縮、Buffer 交換を行い (11,000 rpm × 50 min, 4℃)、Superose 6TM 10/300 GL (Amersham Biosciences) を用いてゲルろ過クロマトグラフィーにかけて、溶出パターンを比較した。また各溶出ピークを蒸留水に対して透析を行い、凍結乾燥させ SDS-PAGE にかけて構成成分を分析した。

第 2 の実験として蒸留水に溶けた Hb 溶液 (5

mg/ml) を 500 μl (Hb 2.5 mg) 取り、これに尿素 148.8 mg 加え (全量 648.8 μl) 尿素濃度 4 M にする。これをローテーターを用いて 4℃ で、0.5, 6, 12, 18, 24, 36 時間攪拌した。更に、これに両性イオン交換樹脂 AG<sup>®</sup>501-X8(D) を 500 mg 加え 24 時間攪拌した。後続の処理は第 1 の実験と同様に行った。

### 両性イオン交換体を用いたフロー法によるリンカー鎖の除去

バッチ法により得た試料をゲルろ過クロマトグラフィーにかけて、グロビン 12 量体の存在を確認した。しかし、条件を変えてもグロビン 12 量体の収量はあまり上がらなかった。そこで、尿素処理した Hb 溶液をフロー法 [18] により両性イオン交換樹脂カラムにかけて、リンカーを除去することを試みた。

第 1 の実験としてオープンカラムの流速がリンカー除去にどのような影響を与えるかをみるために流速を 0.08 ml/min, 0.16 ml/min, 0.30 ml/min と変えてみた。蒸留水に溶けた Hb 溶液 (5 mg/ml) を 500 μl (Hb 2.5 mg) 取り、これに尿素 148.8 mg を加え (全量 648.8 μl) 尿素濃度 4 M にし、15 分間 4℃ で混ぜる。これを両性イオン交換樹脂 AG<sup>®</sup>501-X8(D) (Bio-Rad Laboratories) を詰めたオープンカラム (1×20 cm : Pharmacia Biotech) に流し、フラクションコレクター Model 2110 (Bio-Rad Laboratories) で分取した。カラムはサンプルと同様の尿素濃度で平衡化した。得られたサンプルを限外ろ過 (セントリカット超ミニ (W-10) : (株) クラボウ) により濃縮し、Buffer 交換を行い (11,000 rpm × 50 min × 3, 4℃)、ゲルろ過カラム Superose 6TM 10/300 GL (Amersham Biosciences) を用いてゲルろ過クロマトグラフィーにかけて、グロビン 12 量体を得た。

第 2 の実験として尿素濃度が異なるとリンカー除去にどのような影響を与えるかを見るため Hb 溶液に尿素を 67.2 mg, 148.8 mg, 244.8 mg と加えそれぞれ尿素濃度を 2 M, 4 M, 6 M とし、尿素濃度の影響を検討した。オープンカラムの流速は第 1 の実験より最適と分かった 0.3 ml/min に固定し、他の手順も第 1 の実験と同様に行った。

第3の実験ではオープンカラムに流す前に尿素と Hb 溶液を混ぜる時間を変えるとリンカー除去にどのように影響するかを調べた。混合時間を5分、10分、15分の3条件下で実験を行った。オープンカラムの流速および尿素濃度はそれぞれ第1と2の実験で最適と分かった 0.3 ml/min および 4 M とし、他の手順は第一の実験と同様に行った。

### 遠心分離式濃縮機を用いた限外ろ過による濃縮と Buffer 交換

遠心分離式濃縮機を用いた限外ろ過によりタンパク質の濃縮と Buffer 交換を行った [20]。バッチ法、フロー法により得られたサンプルをセントリカット超ミニ (W-10) ((株)クラボウ)に入れて遠心分離 (himac CF 15D2 : HITACHI) することにより脱尿素、濃縮、Buffer 交換を行った。特にことわりのない場合は、最後に溶媒を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に置換した。

### ゲルろ過クロマトグラフィーによる *Perinereis* Hb グロビン 12 量体の分離

ゲルろ過法 [21]を用いて、グロビン 12 量体の分離と分子量の測定を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーのシステムとして FPLC システム (Pharmacia Biotech) を使用した。まず限外ろ過法により、順に濃縮 (濃度 25 mg/ml 程度)、脱尿素、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) への緩衝液置換を行った。バッチ法、フロー法により得られたサンプルを注射器に取り、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) によって平衡化されたカラム (Superose 6TM 10/300 GL : Amersham Biosciences) に流速 0.4 ml/min で流した。コントロールとして天然の *Perinereis* Hb 溶液を同様に流した。分子量既知のタンパク質マーカーとして Thyroglobulin, Ferritin, Catalase, Bovine Albumin, Cytochrome c (全て Sigma) を用いた。タンパク質は 280 nm の吸光度で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。本実験は全て室温で行った。ゲルろ過クロマトグラフィーによって得られたピークフラクションは限外ろ過法により濃縮、Buffer 交換を行った後、SDS-PAGE によって構成成分を調べた。また、分子量既知のタンパク質マーカー

の流出位置とサンプルのピークの位置関係から相対分子量を求めるための検量線を描きグロビン 12 量体と思われるタンパク質の分子量を計測した。

### 逆相クロマトグラフィーによる *Perinereis* Hb リンカーの単離

逆相クロマトグラフィー [22]によって、リンカーの単離を行った。逆相クロマトグラフィーのシステムには HPLC システム (東ソー) を使用した。まず蒸留水に溶けた Hb 溶液 (5 mg/ml) を 45  $\mu$ l (Hb 0.224 mg) 取り、終濃度 10% アセトニトリル、0.1% TFA (トリフルオロ酢酸) となるようにそれぞれを加えた。これを予め 0.1% TFA を含む 10% アセトニトリルで平衡化しておいた逆相クロマトカラム (COSMOSIL 5C18-300, 4.6 $\times$ 150 mm : Nacalai Tesque) にかけて、流速 1.0 ml/min で流した。溶出パターンの各ピークの構成成分を SDS-PAGE により調べ、リンカーのピークを同定した。また、次のような手順でリンカーを分取した。まず蒸留水に溶けた Hb 溶液 (5 mg/ml) を 224  $\mu$ l (Hb 1.12 mg) 取り、終濃度 10% アセトニトリル、0.1% TFA となるようにそれぞれを加え、全量 280  $\mu$ l にした。これを 0.1% TFA を含む 10% アセトニトリルで平衡化しておいたカラム (COSMOSIL 5C18-300, 4.6 $\times$ 150 mm) に流した。アセトニトリルのグラジエントは、Matsubara らの研究 [23] を参考にした。得られたリンカーは限外ろ過により濃縮 (10,000 rpm  $\times$  20 min  $\times$  5, 4 $^{\circ}$ C) を行い、次に溶媒を 2 M 尿素を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に置換した。

### *Perinereis* Hb グロビン 12 量体とリンカーの再会合

得られたサブ構造体とリンカーを 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) に対して透析を行い、再会合を試みた。透析は 4 $^{\circ}$ C で行った。透析膜はヴィスキングチューブ 21.4 mm (アズワン株式会社) を使用した。

まず、サブ構造体溶液 (約 1.3mg/ml) を 750  $\mu$ l (サブ構造体 約 1.0 mg) とリンカー溶液 (約 1.5 mg/ml) を 320  $\mu$ l (リンカー 約 0.5 mg) を混合し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) に対し

て透析を行った。その後、限外ろ過により濃縮を行い(10,000 rpm x 30 min × 3, 4℃)、ゲルろ過と SDS-PAGE により再会合しているか確認した。条件として、透析時間を 0, 8, 16, 24, 36 時間行い、どの程度透析を行えば再会合するかを見た。コントロールとして 12 量体のみ 24 時間透析したものとリンカーのみ 24 時間透析したものをゲルろ過かけた。ゲルろ過は反応混液の溶媒 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) を用いた。

### SDS-PAGE によるサブユニット構成の確認

SDS-PAGE は Olstein [24]の方法に従って行った。このことを利用して、得られた試料のサブユニット構成の決定を行った。装置には AE-6500 型 ラピダス・ミニスラブ<sup>®</sup>電気泳動装置 (アトー (株))、電源には Real Power BP-4 ((株) バイオクラフト) を使用し、分子質量既知のマーカーとして分子質量マーカー low range ((株) アプロサイエンス) を、ゲルはポリアクリルアミド濃度勾配が 10~20% の REAL GEL PLATE ((株) バイオクラフト) を使用し、染色液には GelCode<sup>®</sup>Blue Stain Reagent (PIERCE) を使用した。泳動液には、25 mM トリス-0.192M グリシン緩衝液 (pH 8.0) を用いた。サンプルは、終濃度で 0.1~0.2% タンパク質、20 mM Tris-HCL 緩衝液 (pH 8.0)、5% SDS、20% グリセリン、2.5% 2-メルカプトエタノールとなるように調整した。サンプルは、95℃ で 5 分間熱処理を行った後、ゲルの溝に 10 μl ずつアプライし、ゲル 1 枚につき 20 mA の電流をかけ、160 分間通電した。通電後 2 時間染色を行い、Milli Q 水により 2 時間脱色を行った。

### SDS-PAGE バンド面積とゲルろ過のピーク面積の算出

SDS-PAGE の結果とゲルろ過クロマトグラフィーの結果を定量的に表すために NIH Image (Scion Corporation) を使用し、SDS-PAGE のバンドの面積やゲルろ過クロマトグラフィーのピーク面積を測定しタイムコースを取り面積変移のグラフを作成した。

### グロビン 12 量体とリンカーの再会合に対する Ca<sup>2+</sup>の影響

得られたグロビン 12 量体とリンカーを限外ろ過により 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)、1 mM CaCl<sub>2</sub> を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)および 1 mM EDTA を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)に buffer 交換、濃縮を行い D:L=1:3 のモル比で再会合させた。また、再会合を緩やかに進める目的で 1 M Urea 存在下で 96 時間に渡って再会合させ、再会合 Hb を計時的に調べた。一定時間 4℃で静置した再会合反応液は、Superose 6<sup>TM</sup> PC 3.2/30 (Amersham Biosciences) カラムを用いた FPLC システムによるゲルろ過クロマトグラフィーにより分析した。ゲルろ過カラムの平衡化液と流出液には反応混液を用いた。

## 3. 結果と考察

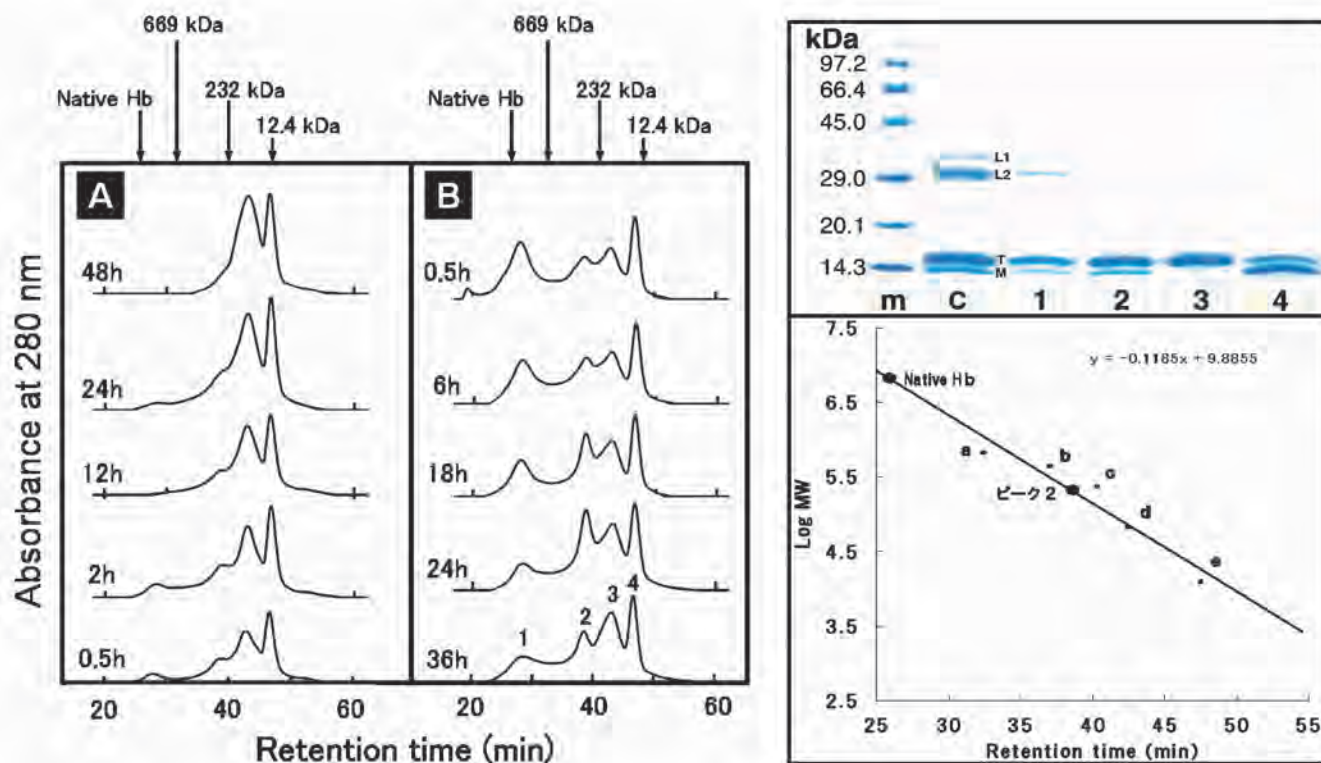
### *Perinereis* Hb からのリンカー鎖除去に対する尿素濃度と混和時間の影響

図 1 は尿素処理後にバッチ法によって両性イオン交換樹脂で処理した *Perinereis* Hb のゲルろ過クロマトグラフィーとその溶出液の SDS-PAGE のパターンを示している。最も注目すべきは、ゲルろ過におけるピーク 2 (図 1 左、パネル B、36h) がリンカーを含まず、モノマー (a) と三量体 (A-b-B) から構成されていることである (図 1 右上段、SDS-PAGE レーン 2)。ピーク 2 のバンド面積比 (M:T) はほぼ 1:3 と算出された。このことは、モル比では M:T=1:1 であることを示している。さらに、マーカーから得られた分子量検量線から (図 1 右下段)、下記の関係式が求められた。

$$\log MW = -0.1185x + 9.8855$$

この式からピーク 2 の分子質量が 205 kDa と求められた。各グロビン鎖のアミノ酸配列より解明された分子質量から算出されるグロビン 12 量体の理論分子質量は 195,374.4 Da と求められている [25]。これらのことからこの成分が *Perinereis* Hb のサブ構造体であると同定した。

しかしながら、改めてゲルろ過のパターンを見直してみると、4 M 尿素処理後 4℃で 48 時間両性イオン交換樹脂を用いて処理した場合は大部分がグロビン 12 量体よりも小さいサブユニットに解離していることが分かる。また、4 M 尿素処理後 4℃で 24 時間両性イオン交換樹脂を用



**図1. 尿素処理後にバッチ法によって両性イオン交換樹脂で処理した *Perinereis* Hb のゲルろ過クロマトグラフィーとその溶出液の SDS-PAGE** 左図；図中に表示した時間尿素処理後、4℃で 48 時間（パネル A）および 24 時間（パネル B）両性イオン交換樹脂 AG®501-X8(D)で処理した *Perinereis* Hb の溶出パターン。矢印は天然 Hb と分子質量既知のタンパク質マーカー。右図；ゲルろ過の溶出ピーク（左図 B 最下段、36h）の SDS-PAGE（上段）とゲルろ過検量曲線によるピーク 2 の分子質量測定（下段）。L1,L2、リンカー；T、トラimer；M、モノマー；m、分子量マーカー；C、天然 Hb。他の実験条件の詳細は本文を参照。

いて処理した場合でも、グロビン 12 量体よりも小さいサブユニットに解離している割合が多く、なおかつ未解離の成分も多く、グロビン 12 量体の画分が必ずしもメインピークを形成するには至っていない。バッチ法では、リンカーを除去することはできても、グロビン 12 量体を単離する好条件を見つけることができなかった。

### 両性イオン交換カラムによる *Perinereis* Hb グロビン 12 量体の分離

バッチ法によって両性イオン交換体がリンカーの除去に有効であることを確認したが、グロビン 12 量体を大量に単離する条件を見出すことはできなかった。そこで、グロビン 12 量体を収量よく単離できる条件を、両性イオン交換カラムを用いて、フロー法により検討した。図 2 の

パネル A は、4 M 尿素中で Hb を 15 分間インキュベートした後に、両性イオンを充填したオープンカラムにかけ、流速 0.08 ml/min, 0.16 ml/min, 0.30 ml/min の条件で溶出した試料をゲルろ過にかけた時の溶出パターンである。流速が遅いとグロビン 12 量体のピークの位置よりさらに小さい分子質量の位置にかなりの量のピークが出ていることが分かる。流速が早くなるにつれ、グロビン 12 量体のピークが高くなり、グロビン 12 量体より分子量が小さいタンパク質のピークが低くなることが分かった。このことから流速は 0.30 ml/min が最適である判断した。パネル B では、前処理において尿素濃度が異なるとリンカー除去にどのような影響を与えるかを検討した。Hb 溶液をそれぞれ 2 M, 4 M, 6 M の尿素濃度下、室温で 15 分間インキュベートし、

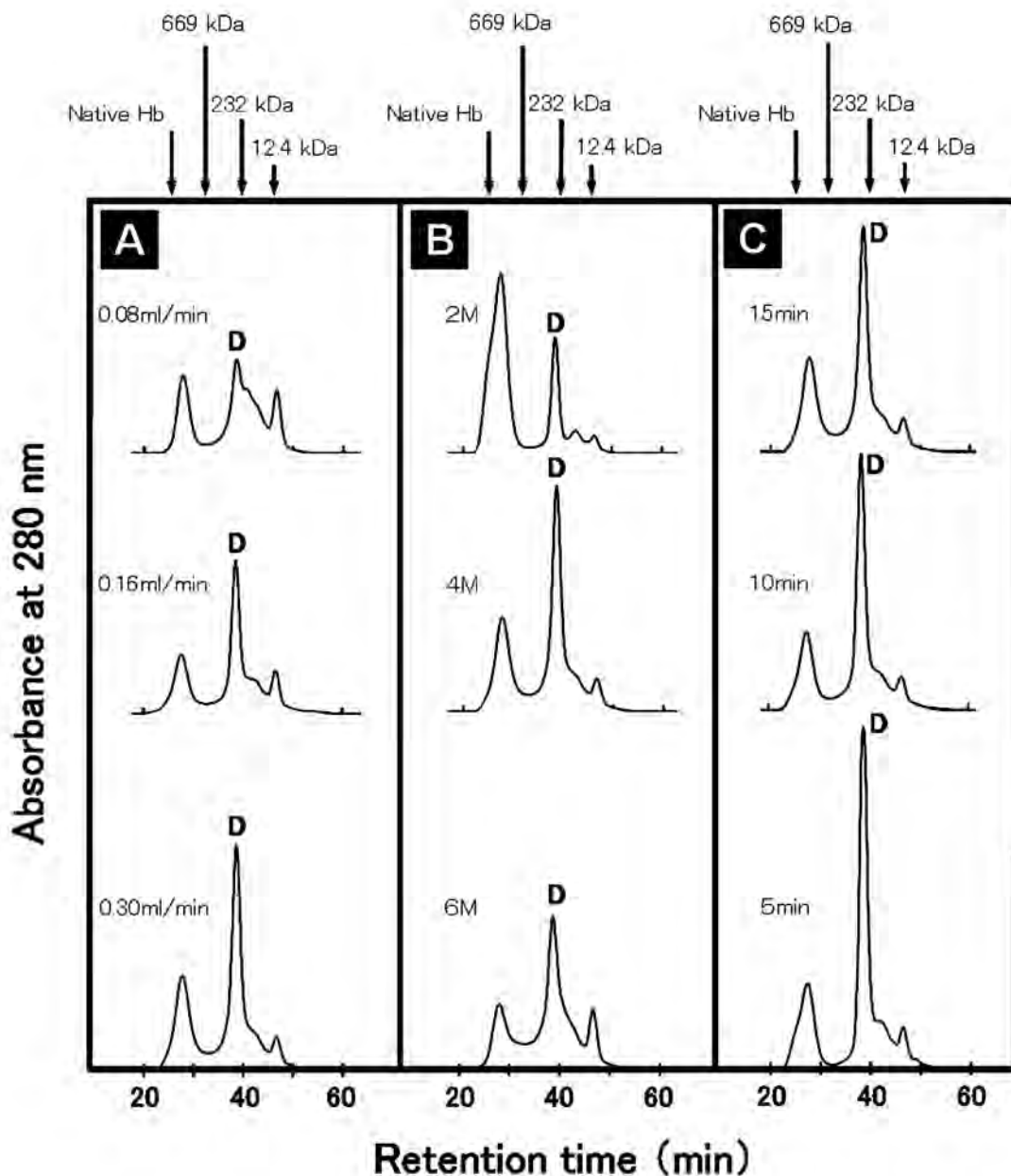


図 2. *Perinereis* Hb を尿素処理後両性イオン交換カラムを通した試料のゲルろ過カラムクロマトグラフィー

*Perinereis* Hb を尿素処理後両性イオン交換カラムを通した試料を濃縮後、ゲルろ過クロマトグラフィー (Superose 6TM 10/300 G) にかけた。D はグロビン 12 量体のピークを示す。パネル A ; Hb を 4M 尿素で 15 分間インキュベートし、4M 尿素で平衡化した両性イオン交換カラム (1×20cm) にかけて試料を調整した。数値は両性イオン交換カラムクロマトグラフィーの流速。パネル B ; 尿素濃度がサブユニットに与える影響を検討した。前処理を 15 分間尿素濃度 2M, 4M, 6M で行い、両性イオン交換カラムにかけ、試料を調整した。ゲルろ過の流速は 0.30ml/min に固定した。パネル C ; 4M 尿素でインキュベートする最適時間を検討した。両性イオン交換カラムクロマトグラフィーの流速は 0.30ml/min に固定した。他の実験条件は図 1 と同じ。詳細は本文参照。

これを両性イオン交換カラムにかけて流速 0.3ml/min で流し、得られた試料をゲルろ過にかけた場合の溶出パターンである。尿素濃度 2 M では Hb 分子からリンカーが十分に解離していないと思われる。また、尿素濃度 6 M では濃度が高すぎて、Hb 分子から解離したグロビン 12 量体がさらにトライマーやモノマーなどのより小さいサブユニットに解離していることが分かった。4 M の尿素濃度ではグロビン 12 量体のピークがシャープでかつ最も高くなっていることから、検討した条件下では最適な尿素濃度である。パネル C では、試料を両性イオンのオープンカラムに流す前に尿素と Hb 溶液をインキュベートする時間を変えた場合リンカー除去にどのように影響するかを検討した。パネル C は、インキュベート時間を 5 分、10 分、15 分の条件で実験を行った場合のゲルろ過の溶出パターンである。わずか 5 分の違いでサブ構造体のピークの高さが変わっていることは、グロビン 12 量体の分離条件がかなり微妙なものであることを反映している。インキュベートの時間として 5 分が最もグロビン 12 量体の分離に適していると判断した。以上の結果から、Hb を 4 M 尿素溶液中で、室温で 5 分間インキュベートし、両性イオン交換カラムにかけ、流速 0.3 ml/min で流した試料をゲルろ過にかけることがグロビン 12 量体の分離に最適であることが分かった。この最適条件で得られた試料のゲルろ過パターンを改めて図 3 の上段に示した。図 3 の下段はそのゲルろ過の各画分の SDS-PAGE パターンである。グロビン 12 量体画分 (レーン 2) には薄い L2 のバンドが認められる。天然の Hb (レーン C) ではリンカー対グロビンの比は NIH Image による算出により 28.4 : 71.6 で、サブ構造体では、この比が 6.8 : 93.2 と算出された。即ち、リンカーの占める割合が 28.4 % から 6.8 % に減少した。これは約 3/4 のリンカーが Hb から除かれたことを示している。約 3/4 はグロビン 12 量体に精製されたことになる。

### Perinereis Hb の再会合

図 4 は、グロビン 12 量体とリンカーを 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) に対して透析を行う時間を変化させた場合のゲルろ過の溶出パターンである。8h、16h のインキュベーションではサ

ブ構造体でも巨大 Hb でもない中間体が形成されていることが分かる。また、24 時間インキュベートした試料の溶出位置は天然の Hb とほぼ同じであった。また、SDS-PAGE パターンを肉眼で見ると、再構成された Hb と天然 Hb は同じサブユニット構成であるように思われる。しかし、NIH Image によって解析すると、天然 Hb では、リンカー対グロビンの面積比は 37.7 : 62.3 であるのに対して、再構成された Hb のそれは 42.7:57.3 であった。再構成された Hb が過剰のリンカーを組み込んでいるように思われた。一方、グロビン鎖単独のピークは認められなかった。ゲルろ過におけるピーク 2 はリンカー鎖が分解されたタンパク質と考えられる。SDS-PAGE のレーン 2 に現れた成分はその位置からして、これまでもしばしば観察されている [26, 27]。

### Perinereis Hb 再会合の経時変化

図 5 は再構成された Hb とグロビン 12 量体、中間体等 (リンカーとグロビン 12 量体の複合体)、そして図 4 におけるピーク 2 等の増減についてのタイムコースを示している。採用された条件下では、グロビン 12 量体とリンカーはともに混合直後に会合が始まり、中間体を形成しながら 24 時間以内に巨大 Hb 分子が再構成されることが分かった。

### Perinereis Hb の再会合における $Ca^{2+}$ の影響

50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.2) 中ではグロビン 12 量体とリンカーが再会合することが確認された。そのことを踏まえて、さらに、グロビン 12 量体とリンカーが再会合する際に  $Ca^{2+}$  が影響を与えるかを検討した。図 6 のパネル A は 1 M 尿素を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) 緩衝液中で再会合させた場合のゲルろ過の溶出プロファイルである。微量の  $Ca^{2+}$  の存在を避けて、Tris-HCl 緩衝液中で再会合させた。パネル B では、さらに 1 mM  $Ca^{2+}$  を加え、再会合を進めた。またパネル C では EDTA を加えて溶媒に混入する  $Ca^{2+}$  など微量の金属イオンをキレートした。図 7 は図 6 のパネル A、B、C に対応する条件下での再会合 Hb 形成についてのタイムコースを示している。Tris-HCl 緩衝液中ではリン酸緩衝液中で



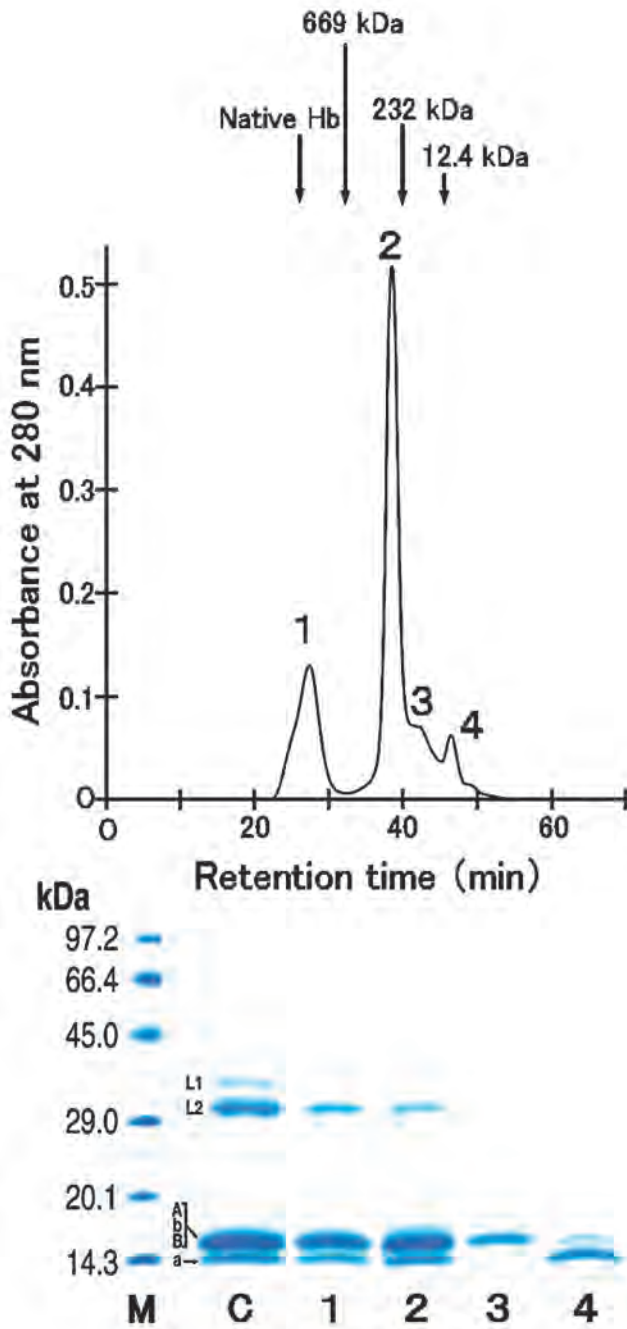


図 3. 最適条件で分離された試料のサブ構造体画分の SDS-PAGE による純度検定 上段は図 1 パネル C 流速 5min に対応。L1, L2: リンカー、A-b-B: トライマー、a: モノマー、M: 分子量マーカー、C: 天然 Hb; 数字はゲルろ過のピーク番号に対応。ピーク 2 はグロビン 12 量体。

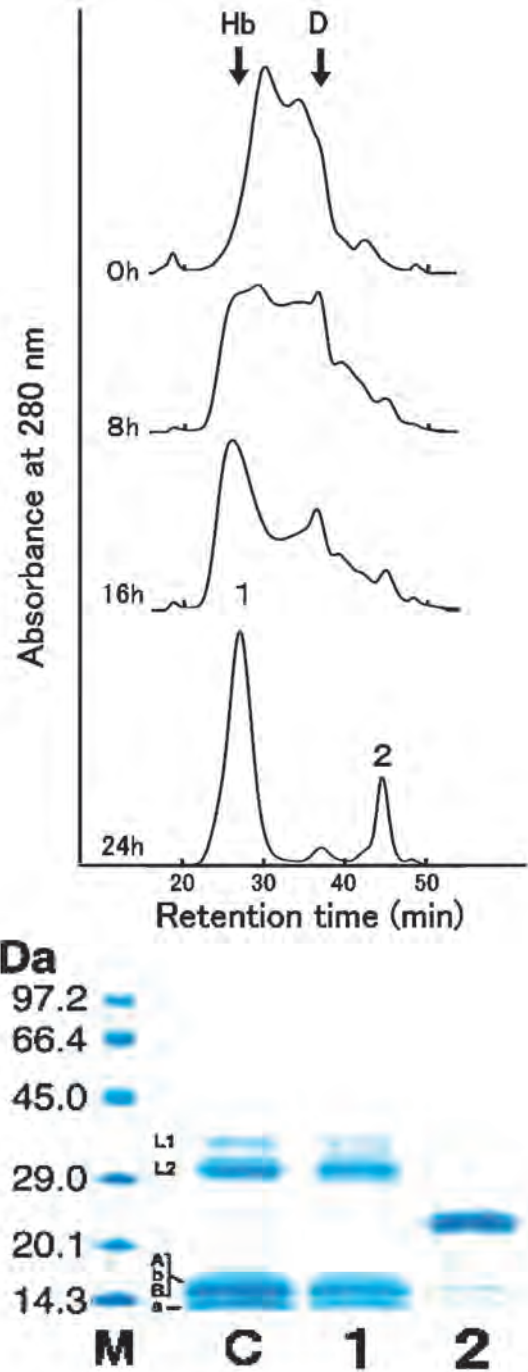


図 4. グロビン 12 量体とリンカーの混合物のゲルろ過プロフィール 単離したグロビン 12 量体とリンカーを 1M Urea, 50mM リン酸緩衝液 (pH7.2) 中で混合し、再会合 Hb の割合をゲルろ過により分析した (上段)。SDS-PAGE のパターンは 24h の溶出ピーク (下段)。他は図 3 と同じ。

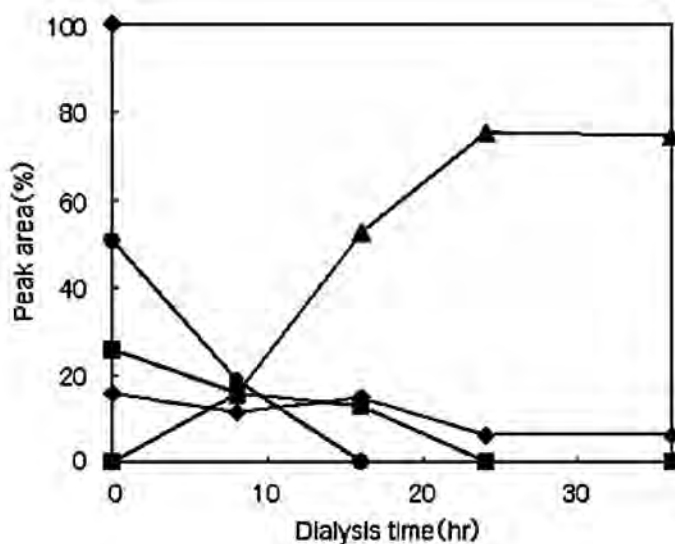


図 5. 再会合時各サブユニットの量的変化の推移 ●：再会合 Hb、■：中間体（リンカー + サブ構造体等）、▲：サブ構造体、◆：ピーク 2 を示す。全てのピーク面積を 100% として各サブユニットのピーク面積の百分率を算出した。

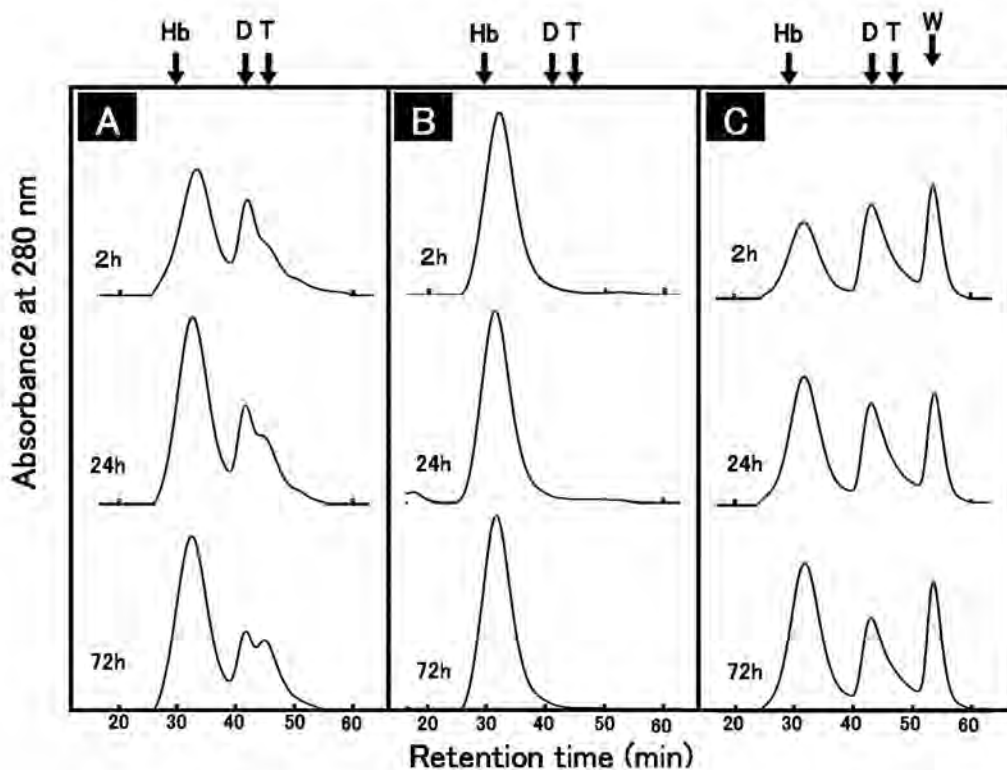


図 6.  $\text{Ca}^{2+}$  または EDTA 存在下で再会合した Hb のゲルろ過プロフィール 単離したサブ構造体とリンカーを 1M Urea, 50mM Tris-HCl (pH7.2) 緩衝液中で混合し、再会合 Hb の割合をゲルろ過により分析した。パネル A、対照；B、1mM  $\text{CaCl}_2$  存在下；C、1mM EDTA 存在下。詳細は本文参照。Hb：天然 Hb 溶出位置、D：グロビン 12 量体溶出位置、T：トライマー溶出位置、W：不明。

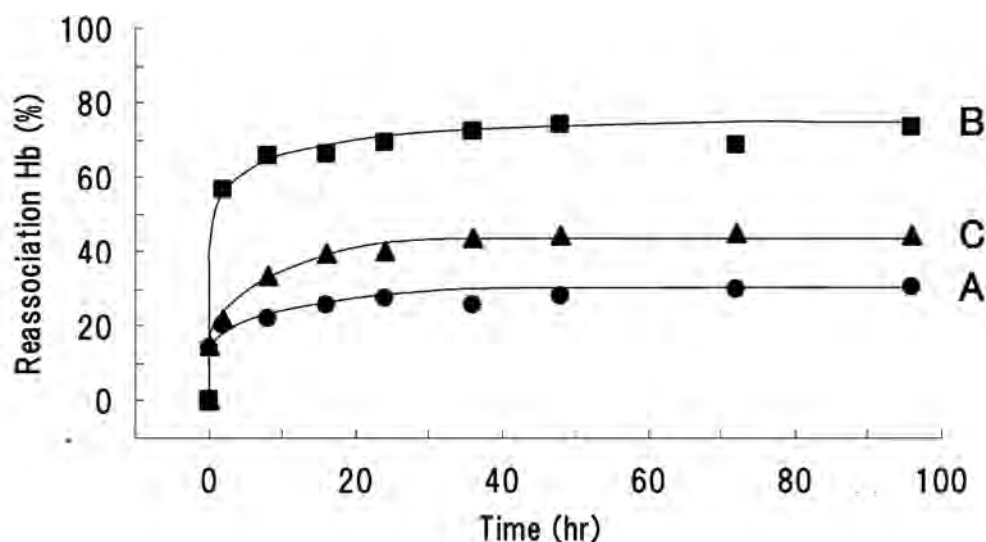


図7. Hb の再会合に及ぼす  $\text{Ca}^{2+}$  の効果

単離したサブ構造体とリンカーを 1M Urea, 50mM Tris-HCl

(pH7.2) 緩衝液中で混合し、再会合 Hb の割合をゲルろ過により分析した。ゲルろ過の溶出液は再会合の溶媒と同じである。再会合 Hb の割合は全てのピーク面積を 100%としてその百分率で算出した。A、対照；B、1mM  $\text{CaCl}_2$  存在下；C、1mM EDTA 存在下。他の実験条件は図6に同じ。データの一部は図6に示した。

再会合させた場合に見られた中間体を形成することなく再会合 Hb を形成し、 $\text{Ca}^{2+}$  を加えることにより再会合の速度が速くなることが明らかになった。また、EDTA を加えると結合の速度が緩やかになることから、グロビン鎖に  $\text{Ca}^{2+}$  結合ドメインが存在し、巨大 Hb 形成に大きく関与していることが示唆された。しかし、EDTA を加えることによって巨大 Hb 分子の再構成が完全に阻害されるわけではないことから、 $\text{Ca}^{2+}$  が巨大 Hb の分子構築にとって促進因子にはなるが、 $\text{Ca}^{2+}$  をキレートしても巨大 Hb 分子構築は完全には阻害されないことが示された。何れにせよ、溶媒としてリン酸緩衝液を使用する場合と Tris-HCl 緩衝液を使用する場合で、巨大 Hb の分子構築のプロセスに大きな違いがあることを確認した。このこともまた、微量の  $\text{Ca}^{2+}$  の存在がこのタンパク質の分子構築に大きな影響をもつことを実感させる。巨大 Hb の  $\text{Ca}^{2+}$  含量については Vinogradov らが測定している[28]。

Gotoh ら [7] は *Perinereis* Hb の再構成について下記のような実験系組んで、Hb の再構成に成功している。



今回我々は初めて下記の実験系を組んで、Hb の再構成に成功した。



つまり、巨大 Hb 分子を形成する際、四種類のグロビン鎖とリンカーが集まり瞬間的に巨大 Hb 分子を形成するのではなく、まず四種のグロビン鎖がグロビン 12 量体を形成し、それにリンカーが結合することにより巨大 Hb 分子を形成するという段階的な形成をしていることが明らかになった。これらの結果を図8にまとめた。しかし、今回の研究では、再構成された Hb の電子顕微鏡写真を撮影するには至らなかった。また、再会合 Hb と天然の Hb とのゲルろ過クロマトグラフィーの溶出位置に多少のずれがあることから、再会合 Hb と天然 Hb とでは分子半径に差があると考えられる。このことから、再会合 Hb が天然 Hb のように美しい六角二層構造を形成しているかどうかは不明である。

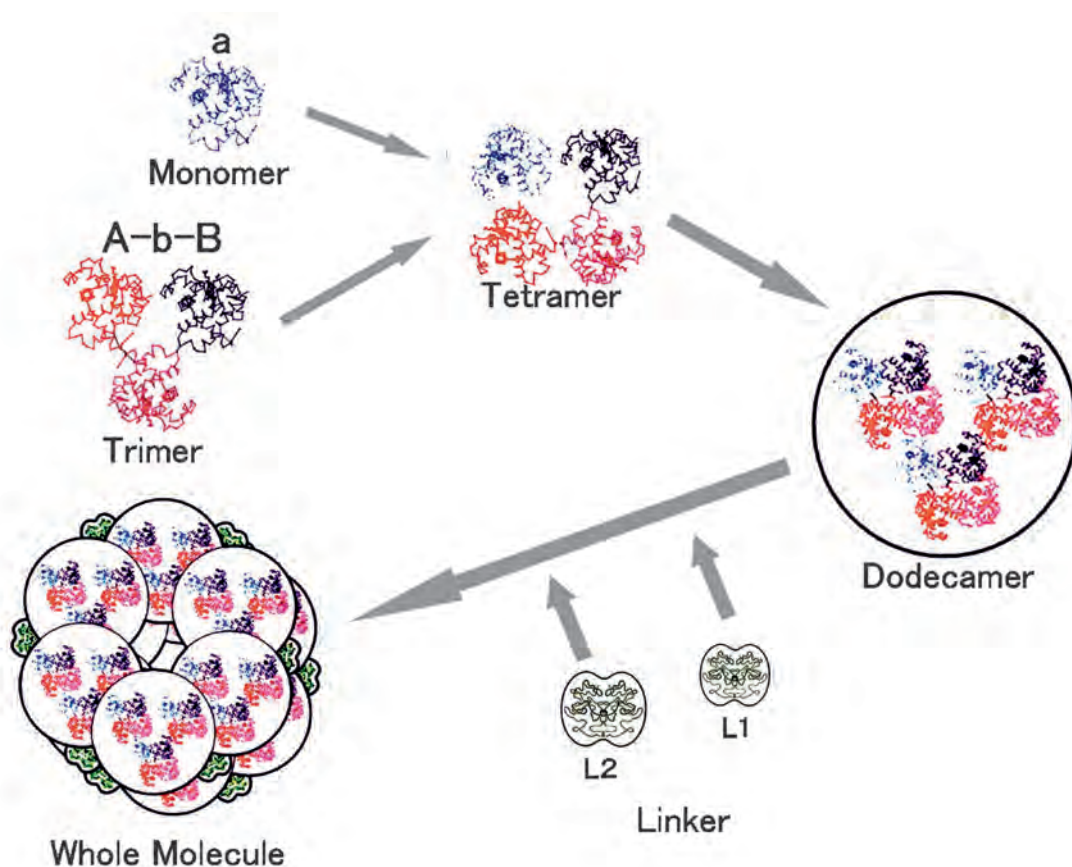


図 8. *Perinereis* Hb の分子構築のプロセス 多毛類の巨大 Hb は 12 個の Dodecamer (グロビン 12 量体) を 2 種類のリンカー (L1, L2; ホモダイマー) がつなぎ合わせることで巨大化すると推定される。グロビン 12 量体の形成に至るまでについては既に Gotoh ら [14] によって実証されている。略号については本文参照。

#### 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. Svedberg, T., Sedimentation constants, molecular weights, and isoelectric points of the respiratory proteins. *J. Biol. Chem.* **103**, 311-325 (1933)
2. Gotoh, T. and Suzuki, T. Molecular assembly and evolution of multi-subunit extracellular annelid hemoglobins. *Zool. Science*, **7**, 1 - 16 (1990)
3. 後藤寿夫、鈴木知彦 環形動物巨大ヘモグロビンの分子構築 生化学、**61**、44-48 (1989)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
  7. 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)
  8. 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)
  9. Suzuki, T. and Gotoh, T. Subunit assembly of giant haemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *J. Mol. Biol.* **190**, 119-123 (1986).
  10. Suzuki, T., Takagi T. and Gotoh., T. Primary structure of two linker chain of the extracellular hemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *J. Biol. Chem.*, **265**, 12168 - 12177 (1990)
  11. Green, N.B., Suzuki, T., Gotoh, T., Kuchumov, A.R. and Vinogradov, S.N. Electrospray ionization mass spectrometric determination of the complete polypeptide chain composition of *Tylorrhynchus heterochaetus* hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **270**, 18209-18211. (1995)
  12. Ebina S, Matsubara K, Nagayama K, Yamaki M, 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)
  13. Suzuki, T., Kapp, O.H., and Gotoh, T. Novel S-S loops in the giant hemoglobin of *Tylorrhynchus heterochaetus*. *J. Biol. Chem.* **263**, 18524-18529 (1988)
  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 *Perenereis aibuhiensis*. *Biochem. Biophys. Acta*, **360**, 75 - 84 (1998)
  15. Tsuneshige, A., Imai, K., Tyuma, I. and Gotoh. T. Spectrophotometric, electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies on the hemoglobin from the marine polychaete *Perenereis aibuhiensis* (Grube): Comparative physiology of hemoglobin. *J. Biochem.*, **106**, 406 - 417 (1989)
  16. Gotoh, T. and Shikama, K. Autoxidation of native oxymyoglobin from bovine heart muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 476-481 (1974).
  17. 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).
  18. 社団法人 日本生化学会編集、新化学実験講座Ⅰ タンパク質Ⅰ 分離・精製・性質 (1981)
  19. Kuchumov, A.R., Tavean, J-C, Lamy, J.N., Wall, J.S., Weber, R.E. and Viongradov, S.N. The Role of linkers in the reassembly of the 3.6MDa hexagonal bilayer hemoglobin from *Lumbricus terrestris*. **289**, 1361 - 1374 (1998)
  20. 大山 徹・渡部 俊弘 編集、初歩からのバイオ実験 -ゲノムからプロテオソームへ- (2002)
  21. 社団法人 日本生化学会 編集、基礎生化学実験方法3 タンパク質Ⅰ. 検出・構造解析法 (2001)
  22. 宇井 信生・岩永 貞昭・崎山 文夫共編 タンパク質・ペプチドの高速液体クロマトグラフィー (1990)
  23. Matsubara, K., Yamaki, M. Nagayama, K. Ishii, H., Gotoh, T. and Ebina., S. Identification of the subunit loci in the extracellular multisubunit hemoglobin from annelid *Perenereis aibuhiensis*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1290**, 215 - 223 (1996)
  24. Ornstein, L., Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**, Art 2, 231-249 (1964)
  25. 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 中国産アオゴカイ *Perenereis aibuhiensis* とイトメ *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 自然科学

研究 (徳島大学総合科学部) **19**, 63-92 (2005)

26. 八巻 真理子, 水銀を用いた二次元結晶化膜法によるアオゴカイ巨大ヘモグロビンの構造解析とその分子構築機序に関する研究, 学位論文 (東京農工大学, 2003)
27. Matsubara, K., Yamaki, K., Nagayanma, K., Imai, K., Ishii, H., Gotoh, T., and Ebina, S. Wheat germ agglutinin-reactive chains of giant hemoglobin from the polychaete *Perenereis aibuhiensis*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1290**, 215-223 (1996)
28. Standley, P.R., Mainwaring, M.G., Gotoh, T., and Vinogradov, S.N. The calcium, copper and zinc content of some annelid extracellular haemoglobins. *Biochem. J.* **249**, 915-916 (1988)