【総説】

トタテグモ類におけるヘモシアニンサブユニットの分子進化学的研究

桑田隆生

日本大学理工学部量子科学研究所
〒274-8501 千葉県船橋市習志野台 7-24-1
e-mail: kuwadat@lebra.nihon-u.ac.jp

はじめに

遺伝子を構成する核酸などの分子は情報高分子とも呼ばれ、塩基の配列として情報を保存しています。生物の進化の過程で、遺伝子は突然変異によりその配列を変化させ、各生物種によって異なる配列をもつようになります。つまり、それらの配列には個々の生物が辿ってきた進化の歴史が刻まれていると考えられます。このような遺伝子やその産物である蛋白質の情報から、生物の進化を明らかにしようとする試みが、分子系統学と呼ばれる研究分野です。

そうした生物の進化の解明に加え、生体内の機能分子である遺伝子や蛋白質そのものの進化、すなわち「分子進化」を明らかにしようとする試みも盛んに行われています。私は、節足動物の酸素運搬蛋白質であるヘモシアニンのアミノ酸配列の解析から、トタテグモ類の系統進化とヘモシアニンの分子進化の解明を試みてきました。

ヘモシアニン

ヘモシアニンは節足動物に広く存在する酸素運搬蛋白質です。ヘモシアニンは銅を含んでいるため、クモ類などヘモシアニンをもつ動物の血液は酸化されると青く見えます。節足動物のヘモシアニンは分子量 75 k ほどのサブユニット蛋白質から構成されており、ヘモシアニンが効率よく酸素を運搬するためには、ヘモシアニンサブユニットが6つ結合した6量体を形成する必要があると考えられています。多くの節足動物では、さらにそれら6量体が会合した多重6量体の状態で血液中に存在しています(図1)。

節足動物の血液に含まれるヘモシアニンを電気泳動法や液体クロマトグラフィー法などによって精製すると、多重6量体は乖離し、ヘモシアニンサブユニットへと分離します(図2)。この時、通常の単量体のヘモシアニンサブユニットとは別に、二つのヘモシアニンサブユニットが結合したヘモシアニンダイマーを確認することができます。ヘモシアニンダイマーは、6量体を構成するサブユニットの一つが隣り合う6量体中のサブユニットと結合して形成

図1. ヘモシアニンサブユニットの立体構造。ヘモシアニンダイマーの構成モノマーをグレーで示した。矢印でつなげたサブユニットが結合し、ヘモシアニンダイマーを形成する (Lamy et al. 1983 を改変)。

図2. 日本産トタテグモ類のヘモシアニンサブユニットの電気泳動パターン。

(A) Native 電気泳動法による泳動パターン。ヘモシアニンモノマーを番号で、ヘモシアニンダイマーをd1あるいはd2で示した。(B) ヘモシアニンダイマーのSDS電気泳動法による泳動パターン。ジグモ、キシノウエトタテグモ、ヤエヤマジョウゴグモのヘモシアニンダイマーは、分子量の異なる2つの構成モノマー(aとb)からなる、ヘテロダイマーと考えられる。カネコトタテグモのヘモシアニンダイマーは、単一のバンドを示すことなどから、ホモダイマーであると考えられる (Kuwada & Sugita 2000 を改変)。

されると考えられており、6量体が会合するために必要な分子であると推定されています (e.g., Markl et al. 1981). 大雑把に言えば、ヘモシアニンサブユニットは、6量体の形成のみに関わる通常のヘモシアニンサブユニット (以下、ヘモシアニンモノマー) と、ヘモシアニンダイマーを形成し6量体の会合に関わるヘモシアニンサブユニット (以下、ヘモシアニンダイマーの構成モノマー) の2種類に分類できるのかもしれませんが。

動物の種分化とヘモシアニンサブユニットの分子進化

図2Aは日本産トタテグモ類7種 (表1) のヘモシアニンを、Native電気泳動法 (蛋白質の電荷の違いを利用して分離する方法) でサブユニットに分離したものです。この電気泳動パターンから、トタテグモ類のヘモシアニンは、電荷の異なる複数のヘモシアニンサブユニットから構成されており、その数もトタテグモ類各種によって様々なことが解ります。このように、動物によってヘモシアニンサブユニットの数 (種類) が異なることは、トタテグモ類に限らず色々な節足動物で確認されており、それぞれのサブユニットが異なるアミノ酸配列をもっていることが明らかになっています。それではなぜ、動物ごとにヘモシアニンサブユニットの数が異なっているのでしょうか？

節足動物のヘモシアニンサブユニットはもともと共通の祖先分子に由来し、種分化によって各動物に受け継がれたと考えられています (van Holde & Miller 1995). その進化の過程で、ヘモシアニンサブユニットは、遺伝子重複や欠損によってその数を変化させてきました (図3A)。トタテグモ類では、もっとも少ないものでキノボリトタテグモの2個 (ヘモシアニンモノマー1個、ヘモシアニンダイマー1個)、多いものでヤエヤマジョウゴグモの9個 (モノマー7個、ダイマー2個) と、サブユニットの数に大きな違いが見られます。このことから、トタテグモ類の進化の過程で、ヘモシアニンサブユニットの重複あるいは欠損が何回か起こったと推測できます。

表1. 研究に用いたトタテグモ類7種

カネコトタテグモ科	
カネコトタテグモ	<i>Antrodiaetus roretzi</i> (AR / A. r.)
エゾトタテグモ	<i>A. yesoensis</i> (AY / A. y.)
ジグモ科	
ジグモ	<i>Atypus karschi</i> (AK / A. k.)
トタテグモ科	
キシノウエトタテグモ	<i>Latouchia typica</i> (LT / L. t.)
キノボリトタテグモ	<i>Ummidia fragaria</i> (UF / U. f.)
ジョウゴグモ科	
ヤエヤマジョウゴグモ	<i>Macrothele yaginumai</i> (MY / M. y.)
オオクロケブカジョウゴグモ	<i>M. gigas</i> (MG / M. g.)

括弧内はヘモシアニンサブユニットの名前と種名の略号。

図3. 動物の進化とヘモシアニンサブユニットの分子進化。
(A) 種A, B, Cの分岐以前に重複によりサブユニットxとyが生じ、種Aに至る系統でサブユニットxの欠損が生じた場合を仮定している。その結果、種Aと、種B, Cとでヘモシアニンサブユニットの数 (種類) が異なる。
(B) 種の分岐を反映した関係にないサブユニット (Ay, Bx, Cx) を用いて系統樹を構築すると、正しい種の系統関係を明らかにすることができない。
(C) 種の系統を明らかにするためには、オルソログなサブユニット (Ay, By, Cy) を比較する必要がある。

ヘモシアニンサブユニットを指標とした動物の系統解析

ヘモシアニンサブユニットのアミノ酸配列の解析から、それらのサブユニットをもつ動物の種分化の歴史を解明できると考えられていますが、大きな問題があります。先に述べたように、ヘモシアニンサブユニットは動物の進化の過程で、重複や欠損を繰り返してきたと考えられています。そのため、各動物からランダムにサブユニットを選択してそのアミノ酸配列を比較しても、正確な種の分岐を反映した系統樹を作成できない可能性があります (図3B)。正確な種の分岐を反映した系統樹を得るためには、種分化によって分岐し各種に受け継がれたサブユニット (Ay, By, Cy) を明らかにし、その配列データに基づいて系統樹を作成する必要があります (図3C)。

サブユニット Ay, By, Cy のように種分化を反映した関係にある分子を、オルソログな関係にある、と言います。ヘモシアニンサブユニットのアミノ酸配列を指標とした系統解析では、このオルソログなサブユニットの同定

は必要不可欠です。そこで私はヘモシアニンサブユニットに基づく系統解析を行うにあたり、まず、トタテグモ類におけるオルソログスなサブユニットの同定を試みました。

オルソログスなヘモシアニンサブユニットとその分布

トタテグモ類のヘモシアニンモノマーおよびヘモシアニンダイマーの構成モノマーのN末端アミノ酸配列を決定し比較したところ、オルソログスな関係にあると推定できるサブユニットのグループが8つ（グループA～H）存在することが明らかになりました。各グループのサブユニットは配列の類似度が高く、また共有派生形質とみなせる特徴的なアミノ酸配列を共有しています。これらのグループのうち、グループA～Fは通常のヘモシアニンモノマーからなり、グループGとHはヘモシアニンダイマーの構成モノマーからなるグループです。また、グループAとBのサブユニットは互いによく似た特徴を共有することから、近縁なサブユニットのグループと推定されました。

これらサブユニットのトタテグモ類各種への分布状態か

ら、グループA～Fのサブユニット、つまり、通常のヘモシアニンモノマーは、トタテグモ類の進化の過程で重複や欠損を頻繁に起こしていることが推定されました（図4A）。さらに、カネコトタテグモ科とジグモ科のクモ類に受け継がれているヘモシアニンモノマーと、それ以外のクモ類に受け継がれているヘモシアニンモノマーが、全く異なるという興味深い知見が得られました。原始的な鋏角類であるカブトガニ類では、ヘモシアニンサブユニットは6種類に分類され、アメリカカブトガニで重複が確認されているものの、それら6種類のサブユニットはカブトガニ類全種に保存されていることが明らかになっています（Sugita & Murayama 1998; Sugita & Suzuki 1998）。これらの知見と比べてみると、トタテグモ類のヘモシアニンモノマーに生じた変化が大きいことが理解できます。

一方、グループGとHのサブユニット、ヘモシアニンダイマーの構成モノマーは、通常のヘモシアニンモノマーとは異なり、トタテグモ類各種に広く分布していることが明らかになりました（図4B）。これらトタテグモ類に広く

図4. ヘモシアニンサブユニットの分布。

(A) ヘモシアニンモノマー（グループA～F）の分布。(B) ヘモシアニンダイマーの構成モノマー（グループGとH）の分布。比較にオオツチグモ科 *Aphonopelma californicum* のサブユニット AC (Voit et al. 2000) を加えている (Kuwada & Sugita 2000 を改変)。

分布するサブユニットは、トタテグモ類全体の系統解析を行うために有効なオルソログスなサブユニットであると考えられます。

ヘモシアニンサブユニットの保存性の違い

ここで少し話題を変え、ヘモシアニンサブユニットの分子進化について考察したいと思います。ヘモシアニンサブユニットの分布をみて最も目を引くのは、通常のヘモシアニンモノマーとヘモシアニンダイマーの構成モノマーの分布状態が全く異なる点です。ヘモシアニンモノマーは重複や欠損を頻繁に起こし、その数を大きく変化させています。それに対しヘモシアニンダイマーの構成モノマーは、トタテグモ類に広く受け継がれていることが解ります。ヘモシアニンダイマーはサソリ類やサソリモドキ類にも存在し、その構成モノマーの配列がトタテグモ類のものとよく似ている（オルソログスな関係にあると推定される）ことが明らかになっています（Sugita et al. 1999; Kuwada & Sugita, 2001）。つまり、ヘモシアニンモノマーとダイマーの構成モノマーとの間で、保存性に明らかな違いがあるということになります。生命を維持するために不可欠な蛋白質に大きな変化が生じることは、動物にとって非常に危険なことと考えられます。それではなぜ、ヘモシアニンモノマーの重複や欠損が許されるのでしょうか？ 逆になぜ、ヘモシアニンダイマーの構成モノマーはよく保存されているのでしょうか？ この疑問を解決する幾つかの興味深い知見があります。

Lamy ら（1983）は、アメリカカブトガニのヘモシアニンサブユニットの研究から、1種類のヘモシアニンモノマーで6量体が形成できることを示しました。また、個々のサブユニットの酸素結合能に大きな差がないことが明らかになっています（Reese & Mangum 1994）。これらの知見は、極端に言えば、ヘモシアニンモノマーが1種類あれば6量体を形成し、ヘモシアニンが酸素を運搬できることを示しています。つまり、トタテグモ類でみられるような特定のサブユニットの重複や欠損は、動物に大きなダメージを与えないのかもしれませんが、一方、ヘモシアニンダイマーは、6量体が会合して多重6量体を形成するために必要な分子です。ヘモシアニンは、サブユニットが6量体あるいは12量体（6量体×2）を形成することで、効率よく酸素を運搬できると考えられています。この12量体を形成するという機能的な制約が加わったため、ヘモシアニンダイマーの大きな変化は許されず、その構成モノマーがトタテグモ類を含むクモ形動物に広く保存されているのかもしれませんが、

ハラフシグモ類ではヘモシアニンダイマーが確認できないなど、まだまだ解明すべき点は残されていますが、ヘモシアニンサブユニットの機能分化が、その保存性に影響を

与えている可能性が推定できました。さらに、進化の過程でクモ類の呼吸器官は、書肺から気管へとダイナミックな変化を起こしています。酸素運搬蛋白質であるヘモシアニンが、その過程でどのような分子進化を経ているのか、その点も興味深い研究対象といえるでしょう。

ヘモシアニンサブユニットの解析に基づくトタテグモ類の分類体系

トタテグモ類の分類や系統に関する詳細な研究が始まったのはごく最近のことで、トタテグモ類を網羅的に調査し、その科間の系統関係を解明しようとした試みは、Raven（1985）による研究が初めてでした。形態形質を用いた分岐分類学的な解析から、Raven はトタテグモ類を *Fornicephalae*（カネコトタテグモ科、ジグモ科、トタテグモ科を含む。）と *Tuberculotae*（ジョウゴグモ科、オオツチグモ科を含む。）に大きく分類しました。一方、Goloboff（1993）による形態形質を用いた分岐分析では、トタテグ

図5. ヘモシアニンサブユニットの分子系統樹。系統樹は最大節約法、近隣結合法、最尤法を用いて作成し、それらの厳密合意樹を示す。枝に示した数値はブーティストラップ確率（上から最大節約法、近隣結合法、最尤法で得られた値）。なお、CsaHc-1~6, HT6, Lp II, Aa6, Pia はそれぞれ、シボグモの一種 *Cupiennius salei* (Ballweber et al. 2002)、カブトガニ *Tachyplesus tridentatus* (Linzen et al. 1985)、アメリカカブトガニ *Limulus polyphemus* (Nakashima et al. 1986)、キョクトウサソリの一種 *Androctonus australis* (Buzay et al. 1995)、イセエビの一種 *Paralichthys interruptus* (Bak & Beintema 1987) のヘモシアニンサブユニット。

モ類は *Atypoidea* (カネコタテグモ科とジグモ科のみを含む.) と *Avicularioidea* (残りのクモ類をすべて含む.) に再分類される結果となりました. いずれの説も, カネコタテグモ科とジグモ科の単系統性は支持していますが, それ以外のクモ類の系統関係は大きく異なっています. 特にトタテグモ科を含む分類群 *Rastelloidina* の系統的な位置に大きな違いが見られ, 両者の分類体系を評価する上で重要な分類群の一つと考えられます. 私はヘモシアニンサブユニットの分子系統解析から, Raven と Goloboff の間で見解が異なるトタテグモ類の高次分類体系について考察を行いました.

ジグモ科ジグモ, ジョウゴグモ科オオクロケブカジョウゴグモ, そしてトタテグモ科キシノウエトタテグモのヘモシアニンサブユニット (グループ G) のアミノ酸配列を解析し, 既知のサブユニットの配列データを加えて分子系統樹を作製しました (図 5). 得られた分子系統樹から, グループ G のサブユニットの単系統性が支持され, さらにその中でトタテグモ科キシノウエトタテグモのサブユニット LTd1a, オオツチグモ科 *Aphonopelma californicum* の ACb, ジョウゴグモ科オオクロケブカジョウゴグモの MGd1a が単系統群となり, ジグモ科ジグモの AKd1a はその単系統群の姉妹群となることが明らかになりました. オルソロガスなサブユニットであるグループ G のサブユニットの関係は, それらのサブユニットをもつクモ類の系統関係を反映していると考えられます. すなわち, トタテグモ科キシノウエトタテグモは, オオツチグモ科 *A.*

californicum, ジョウゴグモ科オオクロケブカジョウゴグモと近縁であると推定できます.

Raven と Goloboff の分類体系を比較する上で, 分類群 *Rastelloidina* のクモ類が一つの鍵と考えられます (図 6A, B). ヘモシアニンサブユニットの分子系統樹は, *Rastelloidina* に属するトタテグモ科クモ類がオオツチグモ科やジョウゴグモ科のクモ類と近縁であることを示し, これは Goloboff が提案した分類群 *Avicularioidea* を支持する結果と言えます (図 6C). また, カネコタテグモ科とジグモ科のクモ類と, それ以外のクモ類に受け継がれているヘモシアニンモノマーが全く異なることが明らかになっています (図 4A). このヘモシアニンモノマーの分布状態を一つの分類形質と考え, 分子系統解析の結果同様, Goloboff が提案した分類体系を支持する結果となります.

ま と め

クモ類は, 陸上の節足動物としては昆虫類について繁栄している動物群と言えます. その形態や生態の多様性は目を見張るものがあり, その大部分はツウクモ類によることは言うまでもありません. しかし, クモ類の進化の過程で最初に多様化したグループがトタテグモ類であることは, 現在, 彼等が世界中に広く分布していること, また, 地中から脱出して様々な環境に進出していることからみても明らかでしょう. また, クモ類最大の特徴である糸を使った様々な造形も, トタテグモ類の祖先が最初に始めたのかもしれませんが, これらトタテグモ類の形態学的, 生態学的, 生理学的な特徴がどのように進化してきたかを知るためには, 分類群間の正しい系統関係を解明することは非常に重要です.

今回, 日本産トタテグモ類のヘモシアニンサブユニットを用いた分子系統解析から, 分類体系に関する知見を得ることができました. しかし, 未解析の数多くの分類群が残されており, さらに多くのクモ類を解析に加えていく必要があります. 現在, 生物の進化を知る上で分子系統解析が有効な手法と考えられ, 様々な生物で盛んに研究が行われています. それらの研究は新しい知見を次々と生み出し, 系統進化学の発展に大きく貢献してきました. しかし, 同時に分子系統学の問題点も数多く指摘され, 得られた分子系統樹を他の研究結果と照らし合わせるなど, 慎重な評価が必要となっています.

Raven と Goloboff による形態形質に基づく研究は, 分岐分析によるトタテグモ類の分類を試みた点はもちろんですが, トタテグモ類の形態の多様性を改めて確認させてくれる大きな成果でした. 今後, 分子系統解析を含め様々な情報から, トタテグモ類の系統進化についてより深く理解が進み, それらの多様性が生じた過程が明らかになっていくでしょう. トタテグモ類の系統進化の解明は, トタテグモ

図 6. トタテグモ類 4 科 (ジグモ科, トタテグモ科, オオツチグモ科, ジョウゴグモ科) の系統関係. (A) Raven (1985) の分類体系に基づく系統関係. (B) Goloboff (1993) の分類体系に基づく系統関係. (C) ヘモシアニンサブユニットの分子系統樹から推定される系統関係.

類のみならず、クモ類全体の多様性を知る上でも重要な手がかりになることが期待できます。

引用文献

- Bak, H. J. & Beintema, J. J. 1987. *Panulirus interruptus* hemocyanin. The elucidation of the complete amino acid sequence of subunit a. *Eur. J. Biochem.*, 169: 333–348.
- Ballweber, P., Markl, J. & Burmester, T. 2002. Complete hemocyanin subunit sequences of the hunting spider *Cupiennius salei*: Recent hemocyanin remodeling in entelegyne spiders. *J. Biol. Chem.*, 277: 14451–14457.
- Buzy, A., Gagnon, J., Lamy, J., Thibault, P., Forest, E. & Hudry-Clergeon, G. 1995. Complete amino acid sequence of the Aa 6 subunit of the scorpion *Androctonus australis* hemocyanin determined by Edman degradation and mass spectrometry. *Eur. J. Biochem.*, 233: 93–101.
- Goloboff, P. A. 1993. A reanalysis of mygalomorph spider families (Araneae). *Am. Mus. Novitates*, 3056: 1–32.
- Kuwada, T. & Sugita, H. 2000. Evolution of hemocyanin subunits in mygalomorph spiders: Distribution of hemocyanin subunits and higher classification of the Mygalomorphae. *Zool. Sci.*, 17: 517–525.
- Kuwada, T. & Sugita, H. 2001. Hemocyanin subunits of a whipscorpion, *Typopeltis crucifer*, and a primitive spider *Heptathela kimurai*: Orthologous hemocyanin subunits in arachnids. *Zool. Sci.*, 18: 269–275.
- Lamy, J., Lamy, J., Sizaret, P.-Y., Billiald, P., Jolles, P., Jolles, J., Feldmann, R. J. & Bonaventura, J. 1983. Quaternary structure of *Limulus polyphemus* hemocyanin. *Biochemistry*, 22: 5573–5583.
- Linzen, B., Soeter, N. M., Riggs, A. F., Schneider, H.-J., Schartau, W., Moore, M. D., Yokota, E., Behrens, P. Q., Nakashima, H., Takagi, T., Nemoto, T., Vereijken, J. M., Bak, H. J., Beintema, J. J., Volbeda, A., Gaykema, W. P. J. & Hol, W. G. J. 1985. The structure of arthropod hemocyanins. *Science*, 229: 519–524.
- Markl, J., Decker, H., Stocker, W., Savel, A., Linzen, B., Schutter, W. G. & van Bruggen, E. F. J. 1981. On the role of dimeric subunits in the quaternary structure of arthropod hemocyanins. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.*, 362: 185–188.
- Nakashima, H., Behrens, P. Q., Moore, M. D., Yokota, E. & Riggs, A. F. 1986. Structure of hemocyanin II from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*. Sequences of the overlapping peptides, ordering the CNBr fragments, and the complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.*, 261: 10526–10533.
- Raven, R. J. 1985. The spider infraorder Mygalomorphae (Araneae): Cladistics and systematics. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.*, 182: 1–180.
- Reese, J. E. & Mangum, C. P. 1994. Subunit composition and O₂ binding of the crustacean hemocyanins: Interspecific relationships. *Biol. Bull.*, 187: 385–397.
- Sugita, H. & Murayama, H. 1998. N-terminal amino acid sequence comparison of Asian horseshoe crab hemocyanins: Immunologically identical hemocyanin subunits are orthologous in Asian horseshoe crabs. *Zool. Sci.*, 15: 295–299.
- Sugita, H. & Suzuki, J. 1998. Orthologous hemocyanin subunits between Asian and American horseshoe crabs and duplication of hemocyanin subunits in American horseshoe crab lineage. *Acta Arachnol.*, 47: 109–116.
- Sugita, H., Kuwada, T., Okamura, K. & Makioka, T. 1999. Identification of orthologous hemocyanin subunits in scorpions: The first step to produce a phylogenetic tree using amino acid sequence data. *Species Diversity*, 4: 35–42.
- van Holde, K. E. & Miller, K. I. 1995. Hemocyanins. *Adv. Prot. Chem.*, 47: 1–81.
- Voit, R., Feldmaier-Fuchs, G., Sckweikardt, T., Decker, H. & Burmester, T. 2000. Complete sequence of the 24-mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*. Structure and intramolecular evolution of the subunits. *J. Biol. Chem.*, 275: 39339–39344.

Received October 8, 2003 / Accepted October 20, 2003

[Review] Molecular evolution of hemocyanin subunits in mygalomorph spiders. by Takao Kuwada