巨大ヘモグロビンの超分子構造は 糖接着で保たれていた —糖鎖の新しい機能—

新技団永山たん白集積プロジェクト

松原景子・八巻真理子

1. はじめに

近年、生体分子の機能と構造に関する研究のターゲットは、単体分子から、より複雑な巨大分子、「超分子」へと移行している。なかでも、超分子の構造を形成する原理の研究は、超分子研究の中心的課題である。最近の我々の研究で、環形動物の巨大ヘモグロビン (Hb) では、たん白サブユニット間のポリペプチド鎖間接着に加え、「糖接着」(carbohydrate gluing) も超分子構築に関わっていることが新たに分かった。自然は、ペプチド同士の相互作用と、この糖接着による相互作用を巧みに使い分け、約200本ものポリペプチド鎖から成る巨大 Hb の構造を形作っているのである。このことは、たん白の超分子構造という観点からだけではなく、糖鎖の機能という側面からも新しい意味を持つ。そして、生体の階層的な形態形成の原理に新たな光を与えることが期待される¹⁾⁻³⁾。

2. 巨大 Hb は超分子である

環形動物の血液中に存在する細胞外 Hb 研究の歴史は古く、1860年代にまで遡るが、この Hb が注目されたのは分子量が300万にも達することを Svedberg が発見したからである⁴⁾。彼はこの巨大 Hb が異常に大きく、しかも、等電点も酸性側に偏っていることから、脊椎動物 Hb とは起源を異にするのではないかと疑った。その後、対称的な六角柱の形状が電子顕微鏡で示されると⁵⁾、多くの研究者が、構成するポリペプチド鎖の同定と、それらによる分子構築について興味を持つようになった。1986年に、後藤、鈴木らは、イトメ (*Tyllorrhynchus heterochaetus*) の4種のグロビン鎖の全アミノ酸配列を初めて決定し、分子構築の192鎖モデルを提唱した⁶⁾。

一方、リンカーと呼ばれるヘムを持たないたん白が

含まれることが分かり、その働きも急速に関心を集めた。この契機は、Vinogradov らが提案した、リンカーが腕輪状に連なりグロビン鎖を連結するという、腕輪モデルにある⁷⁾。鈴木、後藤らは2種のリンカーのアミノ酸配列を決定して⁸⁾、リンカーを含めた構成式 $[(a \cdot A - b - B)_4]_{12} \cdot (L1 - L1, L2 - L2)_{12}$ 、これについては後述) を導いた^{9), 10)}。

最近、遺伝子解析から、リンカーと補体 C9 等の接着性たん白との機能の類似性が指摘されている。鈴木、Riggs らは、ツリミミズ (*Lumbricus terrestris*) Hb のシステイン残基の繰り返し構造 ' (C-X₆)₃-C-X₅-C-X₁₀-C' が⁸⁾、ヒト Low Density Lipoprotein 受容体の活性部位や、補体 C9、腎糖たん白 GP330 の構造の一部に高い相同性があることを見いだした¹¹⁾。また、鈴木らは、ゴカイ (*Neanthes diversicolor*) Hb のリンカーの C 末端にある2個の分子内 S-S 結合のトポロジーが、動物 C 型レクチンの糖認識部位と相同性があることを示唆している¹²⁾。

こうして、巨大 Hb の分子構築の研究は、約60年の歴史を経て、接着性たん白リンカーの役割と、新しい構造形成の原理の解明に焦点が当てられてきた。

3. 巨大 Hb は糖鎖を含む

最もよく研究されている巨大 Hb の一つであるイトメ Hb は、ヘムを持つ A, a, B, b, の4種のグロビン鎖と^{13), 14)}、2種のリンカー L1, L2⁸⁾ の、6種のサブユニットから成る。このうち、A, b, B と L1, L2 は、S-S 結合により、それぞれ A-b-B (トライマー) と、L1-L1, L2-L2 (ホモダイマー) という会合体を形成している¹⁵⁾。

同じ環形動物多毛類に属するイソゴカイ (*Perinereis aibuhitensis*) の巨大 Hb の電子顕微鏡像を図1に示した。6個の構造単位が六角形を作り、2段に重なった、対称性の良い形状をしている。直径は29.4ナノメートル、高さは20.0ナノメートルである。12個の構造単位はサブマルチプルと呼ばれており、4種のグロビン鎖から成るさらに小さな構造単位4個が4面体構造をとったものと考えられている。この小さな構造単位は、a鎖1個とトライマー1個が非共有結合した (a·A-b-B) である。六角形の中央にも構造物が見られ、これらは、リンカーだと考えられている³⁾。この、4段階の階層性を持ったサブユニット構成を図2に示した。巨大 Hb は、 $[(a \cdot A - b - B)_4]_{12} \cdot (L1 - L1, L2 - L2)_{12}$ と表される⁸⁾⁻¹⁰⁾。

イソゴカイの巨大 Hb のサブユニット構成は、イトメと同様である。この巨大 Hb は、中性糖を含むこと

Carbohydrate Gluing in Giant Hemoglobin -A Novel Function of Carbohydrates-

Keiko MATSUBARA/Mariko YAMAKI

NAGAYAMA Protein Array Project, ERATO, Research Development Corporation of Japan (JRDC)

図1. イソ電気点巨大ヘモグロビンの電子顕微鏡像 (カーボン膜上で酢酸ウランにより負染色, 5万倍, 日本電子1200EX II)¹¹⁻¹³⁾

が確認された。構成糖は、キシロースが8%, マンノースが24%であり、他にも、グルコース、フコース、ガラクトースが同定された。また、サブユニットを分離同定する研究から、A, a, L1, L2が糖たん白であることが分かった。これらが複数のレクチンに認識されたことから、二種以上の糖鎖の存在が示唆されている²⁾。ツリミミズでは、PAS染色の結果、L2とBにマンノースとN-アセチルガラクトサミンが含まれるという報告があり¹⁵⁾、マムシ (*Marphysa sanguinea*) でも糖含有が確かめられた²⁾。

4. 糖接着 (carbohydrate gluing) の発見

巨大Hb分子は、図3に示すように、単糖を添加することにより、解離してもとの構造を失う。電子顕微鏡で観察すると、こうして解離したユニットの状態は、添加する糖の種類により、バラバラのユニット (分散型) と、これらの不規則な集合体 (凝集型) の2つの状態に区別できた。この分散型は、グルコース、マンノース、N-アセチルグルコサミンの添加により、また、凝集型は、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースの添加により起こる。分散を引き起こす単糖類は、Mäkeläの単糖とレクチンの分類法¹⁸⁾による第Ⅲ群と一致し、一方、凝集を引き起こす単糖類は第Ⅱ群と一致した。すなわち、巨大Hb分子は、第Ⅲ群の単糖で阻止されるレクチン様糖接着と、第Ⅱ群の単糖で阻止されるレクチン様糖接着の、少なくとも2種の糖接着で保持されていることが示唆された。このことは、たん白接着機能のある2種のリンカーが、別々の役割を担って階層構造の構築に寄与していることをうかが

図2. 巨大ヘモグロビンの分子構築⁸⁾⁻¹⁰⁾

わせる²⁾。

巨大Hbの構造を壊す作用は、N-アセチルガラクトサミンが最も顕著であり、10mM以下で50%の分子が壊れることが分かっている¹⁶⁾。また、これら単糖の作用は、種によって異なり、マムシでは、グルコースが顕著に働く。

つぎに、単糖添加によって構造を失った巨大Hbを透析して、単糖を除いた。いずれの単糖を用いた場合も、糖を除去するとHbはもとの構造に最構成することが、電子顕微鏡観察とゲル濾過解析から確認された (図3)。また、単糖添加後酵素処理して糖鎖を切断すると、単糖を除去しても最構成しなかった。

上述のように、環形動物細胞外Hbの超分子構築は、糖接着が極めて重要な要因となっている。このような超分子内糖接着による構造保持はこれまでに報告例がなく、斬新な発見であった。

5. おわりに

生体は、様々な階層性から成り立っている。例えば、ミトコンドリア等の細胞内小器官から、細胞、組織への集積、また、たん白の単一分子からそれらのオリゴマー、さらに超分子への集積という具合である。近年、生体分子の機能と構造を知るために、超分子を対象とした研究が盛んになりつつある¹⁹⁾。この超分子があ

図3. 巨大ヘモグロビンサブユニットの単糖による解離と再構成

a) マンノースによる解離により誘起された分散, b) マンノースによる分散からの再構成, c) N-アセチルガラクトサミンによる解離により誘起されたランダムな凝集, d) N-アセチルガラクトサミンによる凝集からの再構成¹⁶⁾

る特定の構造をとるためには、それぞれの階層に応じた特異的相互作用が構成分子間に存在するはずであり、それが超分子研究の中心的課題である。

これまで、たん白の単一分子構造から超分子構造への階層性では、たん白-たん白、たん白-DNA、特殊な例として、たん白-脂質相互作用が知られていた。我々の巨大Hbの研究から、自然は、そこに「糖接着」も用意していることが、明らかになった。約200ものポリペプチド鎖から成る巨大Hbは、糖接着をその分子構築に取り入れるることにより、自己集合を達成し、大きな構造を保持しているのである。

糖鎖は、たん白の代謝や輸送、また、細胞接着に代表される様々な重要な機能を持っていることが知られているが、新たに、生体の構造形成の基本原理に迫る役割もこうして示唆された。今、核酸、たん白に続く、構造と機能をつかさどる第三の鍵として糖鎖がクローズアップされ、糖鎖工学の発展も期待されるなか、糖鎖工学と蛋白工学を結びつけた超分子設計も現実のものとなりつつある¹⁾。

最後に、この研究に多大のご助言とご指導を頂いた、本プロジェクトの永山国昭プロジェクトリーダー、蝦

名恵技術参事、並びに、徳島大学後藤寿夫教授の各氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Edina, S., Matsubara, K., Yamaki, M., Yamamoto, K., Nagayama, K., Gotoh, T. : Gordon Research Conference on 'Oxygen Binding Proteins' (New Hampshire, July 24-29, 1994).
- 2) Matsubara, K., Yamaki, M., Ebina, S., Nagayama, K., Gotoh, T. : Gordon Research Conference on 'Oxygen Binding Proteins' (New Hampshire, July 24-29, 1994).
- 3) Yamaki, M., Matsubara, K., Ebina, S., Nagayama, K., Gotoh, T. : Gordon Research Conference on 'Oxygen Binding Proteins' (New Hampshire, July 24-29, 1994).
- 4) Svedberg, T., Eriksson, I.-B. (1933) *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 2834-2841.
- 5) Roche, J., Bessis, M., Thiéry, J. P., (1960) *Biochim. Biophys. Acta*, **41**, 182-184.
- 6) Suzuki, T., Gotoh, T., (1986) *J. Mol. Biol.*, **190**, 119-123.
- 7) Vinogradov, S. N., Lugo, S. D., Mainwaring, M. G., Capp, O. H., Crewe, A. V. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 8034-8038.
- 8) Suzuki, T., Takagi, T., Gotoh, T., (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 12168-12177.
- 9) Gotoh, T., Suzuki, T., Takagi, T., (1991) Structure and Function of Invertebrate Oxygen Carriers (Vinogradov, S. N., Kapp, O. H., eds) 217-226.
- 10) Gotoh, T., Suzuki, T., Takagi, T. (1991) Structure and Function of Invertebrate Oxygen Carriers (Vinogradov, S. N., Kapp, O. H., eds) 280-283.
- 11) Suzuki, T., Riggs, A. F. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 13548-13555.
- 12) Suzuki, T., Ohta, T., Yuasa, H. J., Takagi, T. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1217**(3), 291-296.
- 13) Suzuki, T., Furukohri, T., Gotoh, T. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 3145-3154.
- 14) Suzuki, T., Gotoh, T., (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 9257-9267.
- 15) Suzuki, T., Kapp, O. H., Gotoh, T. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 18524-18529.
- 16) Ebina, S., Yamaki, M., Matsubara, K., Yamamoto, K., Nagayama, K., Gotoh, T. (1994) *Nature Struct. Biol.*, submitted.
- 17) Shlom, J. M., Vinogradov, S. N. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 7904-7912.
- 18) Mäkelä, O., (1957) *Ann. Med. Exp. Biol. Chem.*, **35**, 1-10.
- 19) 猪飼篤, 樋口富彦, 吉村哲朗, 田中敬二. (1993) 蛋白質核酸酵素, **38**, 1023-1360.