ミジンコのヘモグロビンによる低酸素適応

小林 道 頼*

1. はじめに

ミジンコ(water flea)のヘモグロビン(Hemoglobin, Hb)は、血リンパ中に溶解している細胞外 Hb で¹⁾、分子量は比較的大きく49万と報告されている²⁾。この Hb は16個の subunit からなり、各々の subunit の分子量は3.2万で2つの heme をもつ two-domain 構造をとると考えられている³⁾。ミジンコ・Hb の最大の特徴は、生息場所によって濃度が著しく変動することである。Hb 濃度に強い影響を与える環境因子として、溶存酸素(O_2)が知られている。 O_2 が多いと Hb の少ない無色透明な(以下 pale と表す)個体が、 O_2 が少なく Hb の多い真っ赤な(以下 red と表す)個体が生息し⁴⁻¹⁰⁾、red 個体の Hb 濃度はヒト血液の約1/10に相当する¹⁰⁾。pale 個体は溶存 O_2 量が低下すると Hb を合成して red 個体になり、逆に red 個体は O_2 環境が好転すると pale 個体になる。Hb 濃度と O_2 濃度には動的平衡関係がある。多くの動物の Hb にも高地順化などで類似の現象が知られているが、ミジンコ・Hb の濃度の変動は他に例が見られない程大きく、Hb の呼吸機能を探るうえで魅力的であり強い関心がもたれている。ミジンコ・Hb の濃度の変動については他にも詳しく述べているので⁹⁾、ここでは、主にオオミジンコ(*Daphnia magna*)の生体内での Hb の O_2 飽和度、精製 Hb の酸素平衡曲線(oxygen equilibrium curve, OEC)や電気泳動法による多成分系 Hb の確認、更に、多成分系 Hb の意義を O_2 運搬効率の観点から考察し、水生の小さな生物と環境との相互作用を Hb の呼吸機能を通して述べる。

2. ミジンコ・Hb の呼吸機能

一般に血液によって運搬される O_2 量は、動脈と静脈血の O_2 含有量を測定し、その差から知ることができる。しかし、小さいものを代表する言葉にも

しばしば使われる^{みじんこ}を対象にしてそのような測定を期待するのは難がある(ミジンコ一個体の血リンパ量は極めて少なく、体長2.5mm の個体で約 $0.68\mu l^{11)}$)。ミジンコの体は透けている。そのために心臓の拍動、消化管の中で消化されていく食物、そして育房内に単為生殖卵がソーセージのように連なって産みだされ球形に変わっていく様子など、生命の営みを直接目にするができる。食作用説で有名なメチニコフがミジンコの採集に夢になったのも、血リンパ内で食細胞がバクテリアを呑み込む様子を直接顕微鏡下で観察できたからである¹²⁾。Hb に関しては、Hb 濃度が体色としてそのまま表わされ、その赤い体色が生息環境の O_2 濃度の良い指標になることと、生きている個体の Hb の吸収スペクトルから O_2 飽和度を推定できることなどにある¹³⁻¹⁵⁾。また、かたい殻は瞬間接着剤でガラス棒などにミジンコを固定し、生きている個体の吸収スペクトルを測定する時に好都合である(環形動物で同様の測定を計画した時の困難さを思うと甲殻類がもつ際立った長所と言える)。顕微分光光度計を用いれば、非常に小さいスポット(直径0.01mm 以下)での測光が可能であり、小さなミジンコが巨大な生き物に変身し、体の異なった部位での測定さえも容易となる。しかし、測光部位を動かすと、ミジンコの球状の体形や Hb 以外の物質による影響も無視できなくなる。生きている個体の Hb の O_2 飽和度は、外液中の O_2 分圧(PO_2)が一定でも、組織の O_2 消費速度により変わる。正常に O_2 消費している個体とその O_2 消費量を低下させた時の O_2 飽和度に差異が検出されれば、Hb に依存して運搬される O_2 量を探ることができる。この方法によれば吸収スペクトルの測定を体の一箇所だけに固定することができる。図1は、オオミジンコの心臓の近くの吸光度を顕微分光光度計で求め O_2 飽和度の経時変化を示した。空気飽和

*Michiyori KOBAYASHI, 新潟大学理学部生物学教室(〒950-21 新潟市五十嵐2の町8050)

図1 *Daphnia magna* 生体内 Hb の O_2 飽和度の経時変化 空気飽和水から無 O_2 水(矢印 1)にかえ, 更に空気飽和水(矢印 2)にした時の *Daphnia magna* の生体内 Hb の O_2 飽和度の変化¹⁵⁾。一定の低 O_2 水($PO_2=11$ torr, 矢印 3)で CN^- 濃度を段階的(矢印 4, 5, 6)に高めた時の Hb の O_2 飽和度の変化。矢印 4, 5, 6 では CN^- 濃度はそれぞれ 0.025, 0.25, 2.0mM で, O_2 消費量はそれぞれ約 20, 60, 100% 阻害される。

図2 *Daphnia magna* の生体内 Hb の O_2 飽和度と外液中の O_2 分圧の関係図¹⁵⁾ A: pale 個体 B: red 個体。(a)は 2 mM CN^- で 100% O_2 消費を阻害した個体, (b)は正常個体。

図3 *Daphnia magna* のHb濃度と残存O₂濃度の関係¹⁷⁾

図4 *Daphnia magna* Hb濃度とO₂親和性の関係 異なるO₂環境で飼育した *Daphnia magna* のHb濃度とその精製HbのO₂親和性(P₅₀)²⁷⁾

水から無O₂水に置き換えると、HbのO₂飽和度は急速に低下する。一定の低O₂下では、部分的なO₂飽和が維持されるが、PO₂を変えないようにしてCN⁻を添加すると、CN⁻の濃度の上昇に伴ってO₂呼吸は阻害され、同時に体内のHbのO₂飽和度は上昇する¹⁵⁾。これはCN⁻による組織のO₂消費量の低下がHbからO₂の放出を抑え、O₂飽和度が呼吸器官であるエラの状態に近づくためと考えられる。図2は、正常個体とそのO₂消費を2 mMのCN⁻により100%阻害した時のHbのO₂飽和度である¹⁵⁾。両者のO₂飽和度の差が、各PO₂でHbによって運搬されるO₂とみなされ、red個体のHbはpale個体よりも低O₂下で多量のO₂を運搬する。図には運搬されるO₂量としてHbのO₂飽和度が示されているため、redとpale個体に差があまりないように見えるが、実質的には両者のHbの濃度差(この場合は約8倍であった)を加味する必要がある。また、O₂呼吸を100%阻害したredとpale個体のHbがO₂飽和度50%になるPO₂に差があることから、両者のHbのO₂親和性(oxygen affinity)そのものに違いのあることを示唆している。Hbが高濃度に存在すると、潜水動物などで良く知られているHbによるO₂貯蔵機能が考えられるが、red個体を空気飽和水から無O₂水にさらすと、急速な脱O₂化が起こり(図1)、約1.5分で50%のHbが脱O₂化する。

このことは、HbによるO₂貯蔵能(oxygen storage)はあまり大きくないことを物語っている^{13, 16)}。

低O₂下でのHbの役割は、閉じられた容器内でミジンコがO₂欠乏により死に至る時の容器内のO₂濃度(ここでは残存O₂量と表す)からも明らかである(図3)。pale個体の残存O₂量は比較的高いが、Hb濃度の増加に伴いこのO₂量は急激に低下し、red個体は空気飽和の1/20に相当する低濃度のO₂までも摂取している^{17, 18)}。この他に、ミジンコが第二触角を使ってピョコピョコと走光性に従って泳ぐ距離を測定する実験でもHbの役割は確かめられている¹⁹⁾。低O₂下(0.5 ml O₂/l以下)ではpale個体は約10m程泳いだ時点で死んでしまうが、red個体は同じO₂条件下で100m以上の測定不能な程の距離を活発にいつまでも泳ぐことができ、Hbの威力を目の当たりにすることができる。更に、Hbに対する親和性がO₂よりも強いCOで処理したCO中毒のred個体の遊泳距離は、pale個体と同じようにO₂濃度(0.5 ml O₂/l以下)では約10m位しか遊泳できないことからHbの役割がより明確に示される¹⁹⁾。*Daphnia pulex*(和名はミジンコ)では、red個体の藻類の摂取速度が、低O₂下でpale個体のものよりも高いことが報告されている²⁰⁾。これらの結果から、ミジンコ・Hbの生理的意義は、その生存を著しい低O₂域にまで拡大し得たことにありと言

える。

ミジンコは普通単為生殖を行うが、その卵にも Hb が存在する。この単為生殖卵の Hb の O_2 飽和度は、網目が 0.3mm のネット内に卵(ほぼ球形で直径は約 0.3mm)を入れて固定し、顕微分光光度計によって求めた吸収スペクトルから知ることができる。red と pale 個体の卵の O_2 飽和度は共にそれぞれの親の Hb の O_2 飽和度とほぼ等しい²¹⁾。単為生殖卵の Hb 含有量は、親の Hb 濃度に依存する。卵の色は食物などの影響を受けるが、red 個体の卵は濃い赤い色をしている。しかし、red と pale 個体の卵の Hb の濃度差は親の血リンパに於けるものよりも少なく、pale 個体の卵には相対的に多量の Hb が存在する⁸⁾。pale 個体の卵の数は多く²²⁾、狭い育房内で鰾詰め状態で発生し、自由に遊泳できるようになって育房から出されるが、発生の途中で O_2 環境の悪化が予想され、Hb の必要性が生ずると考えられる。尚、有性生殖による耐久卵に Hb は存在しない。

3. 精製 Hb の O_2 結合特性

ミジンコ・Hb の研究は、red 個体のみから抽出されたものが用いられてきた。その主な理由は Hb の収量が高いことにあるが、同時に pale 個体が低 O_2 下で Hb を合成して red 個体になる際、Hb の濃度のみのが変化して、 O_2 結合特性は変わらない²³⁾と考えられていたためである。そして red 個体の精製 HbR の P_{50} (半飽和 O_2 分圧、Hb の酸素親和性の指標として利用されている)は、約 1.5 torr と報告され²⁴⁻²⁶⁾、低 O_2 下に生息する個体に高い濃度に存在する Hb が比較的高い O_2 親和性をもち、機能的に良く適応していると考えられてきた。しかし、これまで注目されることがなかった pale 個体の Hb(Hb_p)を多数の個体から抽出しその性質を調べたところ、吸収スペクトルや分子量などには red 個体のものと差はみられなかったが、 O_2 親和性は全く異なり P_{50} は 5.3 torr であった²⁷⁾。さらに、各種の異なった O_2 条件で飼育した個体の Hb 濃度と P_{50} 値には反比例の関係がみられた(図 4)。また、OEC の協同作用の強さの指標である n_{max} (Hill プロットの最大勾配で Hill 係数と呼ばれている)は 1.9 から 2.3 までの値が得られ、 O_2 親和性の強い Hb ほど高い値を示した²⁷⁾。尚、ミジンコ・Hb には Bohr 効果(pH の低下による O_2 親和性の低下)は余りみられない²⁵⁾。

一般に、Hb の O_2 親和性や協同作用は様々な因

図5 *Daphnia magna* Hb の電気泳動パターン red と pale そして両者のほぼ中間の Hb 濃度をもつ個体の精製 Hb の等電点電気泳動パターン。それぞれの Hb の O_2 親和性は A : $P_{50}=5.3$ torr の pale 個体の Hb, B : $P_{50}=1.4$ torr の Hb, C : $P_{50}=1.1$ torr の red 個体の Hb²⁷⁾

子(例えば、 H^+ , CO_2 , リン酸塩化合物など)の影響を強く受けるが、図 4 に示す O_2 親和性は、一定の測定条件で得られたものである。生体内 Hb の O_2 飽和度の結果も合わせて考えると、ミジンコ・Hb には機能特性の異なる成分が存在することを強く示唆している。

ミジンコ・Hb が一種類であると考えられたのは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などで一本のバンドとしてのみ検出されたためである²⁸⁾。しかし、分離能の高い等電点電気泳動法(IEF)では、等電点(pI)が 4.8 から 5.3 の間にある少なくとも 6 種類の成分が確認できた。更に、興味深いことは、 O_2 環境が異なり Hb 濃度の異なる個体群(red と pale そして両者のほぼ中間の濃度をもつ個体群)から得た Hb の IEF のパターンを比較してみると(図 5)、各々

図6 a *Daphnia magna* Hb の OEC の勾配とその比 Y'_R (red 個体の Hb の OEC の勾配) と Y'_P (pale 個体の Hb の OEC の勾配) とその比 (Y'_R/Y'_P)。b ヒト Hb の OEC の勾配とその比 Y'_A (*Daphnia* の red 個体の Hb にはほぼ等しい O_2 親和性をもつヒト Hb の OEC の勾配) と Y'_B (*Daphnia* の pale 個体の Hb にはほぼ等しい O_2 親和性をもつヒト Hb の OEC の勾配) とその比 (Y'_A/Y'_B)³¹⁾。

の Hb 成分の量比が異なり、 O_2 親和性が強い Hb ほど pI の高い成分が増加しているのである²⁷⁾。このことから、ミジンコ・Hb には O_2 親和性の異なる Hb 成分がいくつか存在し、その量比がその血リンパ全体の Hb の O_2 親和性を決めていると考えることができる。

red と pale 個体から多数の単為生殖卵 (red 個体では約 1 万個、pale 個体では約 3 万個) を集めて抽出した Hb の O_2 親和性は、それぞれの親のものと一致し、IEF でも親と同じように多成分系 Hb であることが確認された²⁸⁾。産卵により親の血リンパの Hb 濃度が低下するという報告もあり²⁹⁾、卵の Hb は親の血リンパに由来するという考えが妥当であり、親は積極的に多量の Hb を卵に送り込んでいることになる。

4. 多成分系 Hb の意義

ミジンコ・Hb の O_2 親和性が、その生息水の O_2 環境により異なることにはどんな意義があるか、 O_2 運搬効率 (oxygen transport efficiency) の観点から考察した。red と pale 個体の Hb の OEC を自動記録装置により求め、8 量体の Adair の式を採用し最小二乗法により curve-fitting し、理論曲線を得た。Hb の O_2 運搬効率は OEC の Y に対する PO_2 の平均変化率の最大値である Y の勾配 (Y を

PO_2 で微分した $Y' = dY/dPO_2$) から知ることができる³⁰⁾。図 6a はミジンコ・Hb の Y' vs. PO_2 プロットを示す。Hb_R では最大の O_2 運搬効率を示すピーク (Y'_{max}) がみられ、この時の Y の値は 0.38 であったが、Hb_P の Y' は比較的平坦で PO_2 が 0 に近い時にも低下せず変動が少ない。ここで、二つの OEC の Y' の比 (Y'_R/Y'_P) を求めた。この比は、各 PO_2 で Hb_P が Hb_R の O_2 運搬を代行すると考えた時に何倍の濃度が必要となるかのおおよその目安となるもので、 PO_2 の低い所で最大約 3 の値を得た³¹⁾。但し、OEC の測定に用いた pale と red 個体の Hb 濃度には 7 倍の差があることから、Hb_P のみでは実質的には最大 20 倍の濃度が必要になることを意味している。しかし、ここで計算に用いた 2 つの OEC は、共に Hb の各成分が混合したままで測定されたものである。 O_2 親和性の異なる Hb が混在した場合、Y' は単一の Hb 成分のものとは異なることが予想される。そこで単一の成分からなるヒト成人 Hb の OEC の中で、ミジンコ・Hb とほぼ等しい O_2 親和性を示す 2 つの OEC (A, B)³²⁾ を用いて同様の解析をおこなった (図 6b)。ヒト・Hb の Y' vs. PO_2 プロットでは、A と B 共に単一のピークが見られ、典型的な O_2 運搬体であることを示し、 Y'_{max} の時の Y は 0.38 であった。注目される Y' の比 (Y'_A/Y'_B) は低 O_2 域で最大 12 の値が得られ、ミジンコで計算した時の 4 倍に相

当する。これはヒト・HbのOECが典型的な協同作用を示すことによるが、低 O_2 下で O_2 親和性の強いHbに置換されなければ、 O_2 親和性の低いHbで同じ量の O_2 を運搬するには、異常な程の高い濃度が要求されることを如実に示している。

5. おわりに

ヒト・HbのOECの Y' vs. PO_2 プロットで典型的に示されているように、Hbは協同作用によって特定の PO_2 において多量の O_2 を結合・解離することができる。各々の動物のHbは、 O_2 結合特性が微妙に異なっている³³⁻³⁵⁾。それは、各々の動物の O_2 消費量、呼吸器官の構造、血液量、血流速度、そしてその生息場所の O_2 環境などに応じて、最も効率良く O_2 運搬ができるように微調整されているためである。動物が血流速度やHb濃度を無制限に変動させることができれば、OECがS字状を示さなくても、組織で必要とする O_2 を運搬することができる。従って、協同作用をもち O_2 運搬を効率良く行うということは、少ないエネルギーで必要な O_2 を運搬することであると言いかえることができる。水生の動物にとって O_2 の摂取は、水中では溶存 O_2 量が少ないことや O_2 分子の拡散速度が低いことなどから、空气中に生息する動物に比べて著しく困難である。さらに、溶存 O_2 量は日周や季節により、また水の深さによっても大きく変動する。夏期にはしばしば O_2 環境が悪化し、そのような状況では、Hb濃度の上昇と効率よい O_2 運搬が求められる。幅広い O_2 環境に対応して O_2 の運搬を行うには、一種類のHbよりも、 O_2 親和性の異なるHb成分をもつほうが前述したように効率が良い。このように考えると、ミジンコ・Hbの最大の特徴である濃度の変動も、少なく抑える仕組みがあつての結果とみなすことができる。ミジンコのHbによる O_2 欠乏に対する適応は、典型的な生化学的分子適応であり、進化の長い行程の産物であるとしても、極めて巧妙である。

手塚治虫は“ガラスの地球を救え”の著書のなかで「もし輪廻というものがあるならば、ぼくの来世はミジンコかもしれないし、……」と述べている。大発生したミジンコの集団がいつの間にか消えてしまうこともあり、ミジンコを弱い生き物に例えたのかもしれない。しかし、水の中に生息しているミジンコが、水の枯渇という非常事態には、雄が出現し有性生殖による耐久卵を産み乾燥に耐えることや、これまで述べてきたようにHbによって O_2 欠乏に

対応することなどをみても、その適応戦略はしたたかである。

ミジンコ・Hbに関しては、単為生殖卵を含めさらに詳細なその生理機能の解明、subunitがtwo-domain構造をとっていることからその協同作用の発現の分子機構、タンパク質としての分子構造、更に各Hb成分の遺伝子発現が O_2 分子によりどのように調節されているのかなどの興味深い分野が今後の課題である。

謝 辞

本稿の作成にあたっては東京都老人総合研究所野本茂樹氏に種々助言を戴いたことに深く感謝します。

文 献

- 1) Fox, H.M.: Proc. Roy. Soc. Lond., B 135, 195-211 (1947)
- 2) Svedberg, T., & Eriksson-Quensel, L.: J. Amer. Chem. Soc., 56, 1700-1706 (1934)
- 3) Ilan, E., Weisselberg E., & Daniel, E.: Biochem. J., 207, 297-303 (1982)
- 4) Fox, H.M., & Phear, E.A.: Proc. Roy. Soc. Lond. B 141, 179-189 (1953)
- 5) Hoshi, T., & Kobayashi, K.: Sci. Rep. Niigata Univ. Ser. D, 9, 55-62 (1972)
- 6) Kobayashi, M., Nezu, T., & Tanaka, Y.: Comp. Biochem. Physiol., 97A, 513-517 (1990)
- 7) Calvalho, G.R.: Freshwater Biol., 14, 501-506 (1984)
- 8) Kobayashi, M., & Nezu, T.: Physiol. Zool., 59, 35-42 (1986)
- 9) 小林道頼: 陸水学雑誌, 53, 385-394 (1992)
- 10) Kobayashi, M., & Hoshi, T.: Comp. Biochem. Physiol., 72A, 247-249 (1982)
- 11) Kobayashi, M.: Comp. Biochem. Physiol., 76A, 803-805 (1983)
- 12) ポール・ド・クライフ 著 秋元寿恵夫 訳 微生物の狩人(下), pp. 53-57, 岩波文庫(1970)
- 13) Hoshi, T., & Yahagi, N.: Sci. Rep. Niigata Univ. Ser. D, 12, 1-7 (1975)

- 14) 星 猛夫: 遺伝, 34, 15-24 (1978)
- 15) Kobayashi, M., & Tanaka, Y.: *Can. J. Zool.*, 69, 2968-2972 (1991)
- 16) Kobayashi, M., & Hoshi, T.: *Zool. Sci.*, 1, 523-532 (1984)
- 17) Kobayashi, M.: *Sci. Rep. Niigata Univ. Ser. D*, 16, 1-4 (1979)
- 18) Kobayashi, M.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 72A, 599-602 (1982)
- 19) Kobayashi, M., & Gono, H.: *Physiol. Zool.*, 58, 190-196 (1985)
- 20) Kring, R. L., & O'Brien, W. J.: *Ecology*, 57, 808-814 (1976)
- 21) Kobayashi, M., & Takahashi, Y.: *Comp. Biochem. Physiol.*, 107A, 127-131 (1994)
- 22) Takahashi, Y., Yokoyama, I., & Kobayashi, M.: *Sci. Rep. Niigata Univ. Ser. D*, 30, 35-40 (1993)
- 23) Mangum, C. P.: *Oxygen Transport in the Blood. The Biology of Crustacea vol. 5 Academic Press* (1983)
- 24) Fox, H. M.: *J. Exp. Biol.*, 21, 161-164 (1945)
- 25) Hoshi, T., Kobayashi, M., & Sugano, H.: *Sci. Rep. Niigata Univ. Ser. D*, 4, 1-8 (1967)
- 26) Sugano, H., & Hoshi, T.: *Biochem. Biophys. Acta*, 229, 349-358 (1971)
- 27) Kobayashi, M., Fujiki, M., & Suzuki, T.: *Physiol. Zool.*, 61, 415-419 (1988)
- 28) Kobayashi, M., Kato, S., Ninomiya, M., Fujiki, M., Igarashi, Y., & Kajita, A.: *J. Exp. Zool.*, 254, 18-24 (1990)
- 29) Green, J.: *Proc. Roy. Soc. Lond. B* 145, 214-232 (1956)
- 30) Kobayashi, M., Ishigaki, K., Kobayashi, M., & Imai, K.: *Respir. Physiol.*, 95, 321-328 (1994)
- 31) Kobayashi, M., Ishigaki, K.-I., Kobayashi, M., Igarashi, Y., & Imai, K.: *Can. J. Zool.*, in press
- 32) 今井清博: 蛋白質核酸酵素, 32, 529-536 (1987)
- 33) ボールドウィン, E. 著 丸山工作・腰原英利 訳: 生化学入門, みすず書房 (1976)
- 34) ホチャチカ, P. W., ソメロ, G. N. 著 藤田道也 訳: 環境適応の生化学 — その分子論理 —, 共立出版株式会社 (1978)
- 35) 内田清一郎, 菅原 浩: 適応の生物学, 講談社 (1982)
- 36) 手塚治虫: ガラスの地球を救え, pp. 159-168, 光文社 (1989)