

# マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの結晶構造

Structure of a giant hemoglobin from beard worm *Oligobrachia mashikoi*

沼本修孝<sup>1</sup>, 三木邦夫<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院理学研究科, <sup>2</sup>理化学研究所播磨研究所

N. Numoto<sup>1</sup> and K. Miki<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Science, Kyoto University, <sup>2</sup> RIKEN Harima Institute / SPring-8

## 1. はじめに

石川県能登半島の九十九湾海底には、有鬚(ゆうしゅ)動物門に属するマシコヒゲムシ(*Oligobrachia mashikoi*)と呼ばれる、世界的にも大変珍しい生物が生息している(図1)。この有鬚動物は、動物であるにもかかわらず口や消化管がまったく存在せず、他の生き物を食べて自身の栄養源とすることができない。もちろん動物であるからには、何らかの形で有機物を摂取しなければならないが、海中に溶存する有機物を体の表面から直接摂取するだけでは、生きていくのに必要な量を効率よく摂取することは難しい。このような有鬚動物では、生命の維持に必要な栄養源は、体内に存在する共生細菌がつくりだす有機物を獲得することで得ているのである[1]。ある種の細菌は、硫化物や鉄などの無機化合物をエネルギー源として有機物をつくりだすことができる。有鬚動物はおもに海底の熱水噴出孔付近などの硫化水素の豊富な環境に生息しており、この硫化水素をエネルギー源として有機物を産出する細菌を体内に共生させることで、効率よく栄養源を摂取するという巧みな生き方をしている。



図1 マシコヒゲムシ。

ところで、われわれヒトはもちろん、通常の生物にとって硫化水素は猛毒である。それは、酸素を結合して全身に運搬するヘモグロビンの機能を失わせたり、細胞呼吸にもっとも重要なチトクロム酸化酵素などを阻害したりするからであるが、有鬚動物の共生細菌はその硫化水素をエネルギー源として用いなければならない。すなわち、宿主である有鬚動物は、自分自身に影響が及ばないようにして硫化水素を共生細菌に引き渡さなければならないが、その機能を担っているのは、有鬚動物がもつ巨大ヘモグロビン複合体である[2,3]。マシコヒゲムシは、分子量約40万の巨大なヘモグロビン複合体をもっており、このヘモグロビンは赤血球内に存在するのではなく血液中に直接溶解するかたちで存在している。前述のように、通常のヘモグロビンは硫化水素によって酸素の運搬が阻害されるが、有鬚動物の巨大ヘモグロビンは、酸素結合部位とは別に硫化水素に対する特別な結合部位をもっており、このことによって、宿主に必要な酸素を運搬すると同時に、共生細菌が必要とする硫化水素をも宿主に悪い影響を与えないで運搬すると考えられていた。

ヒトをはじめとするほとんどの脊椎動物では、ヘモグロビンは互いに非常によく似た2種類のサブユニット（それぞれの分子量およそ16,000）から成る4量体構造（全体で分子量およそ64,000）をとっている（図2）。この脊椎動物ヘモグロビンの立体構造は、ミオグロビンとともに、X線結晶構造解析の手法により世界で最初に立体構造が明らかになったタンパク質でもある。その後、その立体構造を基にした数々の研究が行われ、酸素を結合し運搬するメカニズムも詳しく研究されている[4]。一方、無脊椎動物のヘモグロビンは、ヒトなどの脊椎動物のヘモグロビン4量体とはまったく異なった分子構築であることが知られており、中には数百万にも達する分子量を持つ巨大なヘモグロビン複合体も存在する[5]。しかしながら、このような巨大ヘモグロビンについては、これまでに立体構造が高分解能で解明された例はなく、また、有鬚動物の巨大ヘモグロビンに関しては、通常酸素運搬の機能のみならず、硫化水素をもしば無害な状態で運搬するという特殊な機能のメカニズムについて、興味を持たれていた。

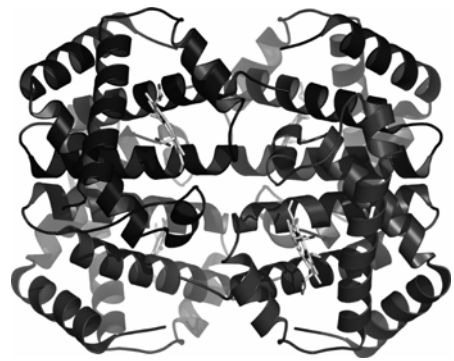


図2 ヒトヘモグロビンの4量体構造（酸素非結合型）。

## 2. マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの構造

私たちの研究グループでは、マシコヒゲムシの巨大ヘモグロビン複合体の結晶化に成功し（図3a）、大型放射光施設 SPring-8 を用いた X 線結晶構造解析で、この巨大ヘモグロビンの立体構造を解明することができた[6,7]。マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンは、ヒトのヘモグロビンサブユニットと共通の構造を持つ4種のサブユニット（A1, A2, B1, B2）から成っており、これらがそれぞれ6つずつ会合して、全体では24量体を形成していた。その形状は、外径が約120 Å、内部に直径約50 Åの空洞が存在する球状の構造（図3b）であり、またこの構造は、分子内部に非常に高い対称性をもつものであった（図4）。まず、全体の24量体構造は、球を半分に分割したものに相当する12量体構造が2つ会合したものと考えることができる。さらにこの12量体構造は、4種のサブユニットが一つずつ会合してできる4量体構造が3回対称をもって会合した構造とみなせる。そしてその4量体構造も、サブユニット組成は異なるが、共通の会合状態である2量体構造（A1-B1 と A2-B2）が2つ会合したものと考えることができる。このように、共通の構造を持った単位ブロックを構成しつつ、それらが次々

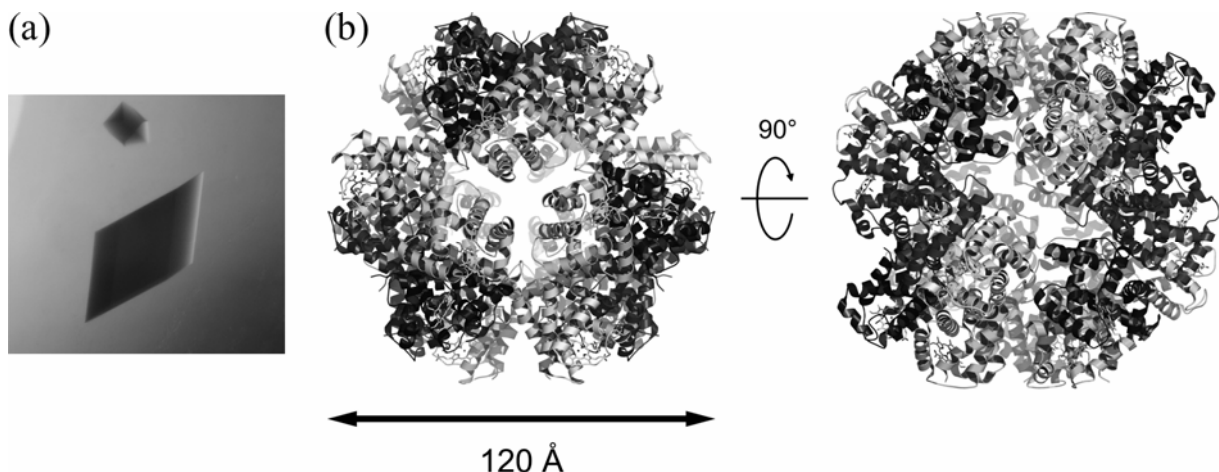


図3 マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの結晶 (a) と全体構造 (b)

と規則正しく階層的に会合することで、全体で分子量 40 万にもなる巨大なヘモグロビン複合体が組み上げられていた。加えて、それぞれのサブユニット内、またサブユニット間にも多くのジスルフィド結合が形成されており、ブロックどうしをしっかりとつなぎ止める役目を担っている。

私たちの構造解析とほぼ同時期に、同じく有鬚動物の一つであるガラパゴスハオリムシの巨大ヘモグロビンの構造や、有鬚動物と近縁の環形動物（ミミズ）のもつ巨大ヘモグロビンの部分的な構造が報告されたが[8,9]、マシコヒゲムシのものも含めて、いずれも共通の 12 量体構造をもち（図 5）、これらの動物の巨大ヘモグロビンが、

この 12 量体構造を共通の基本ユニットとして組み上げられていることが明らかになった。さらにこの 12 量体構造を構成している 4 量体構造や 2 量体構造の会合様式は、これまでその構造が明らかにされている軟体動物（アカガイ）のヘモグロビン 4 量体[10]および 2 量体構造[11]、あるいは棘皮動物（ナマコ）のヘモグロビン 2 量体構造[12]との共通性が高く、いまだに結論の出ないヘモグロビン分

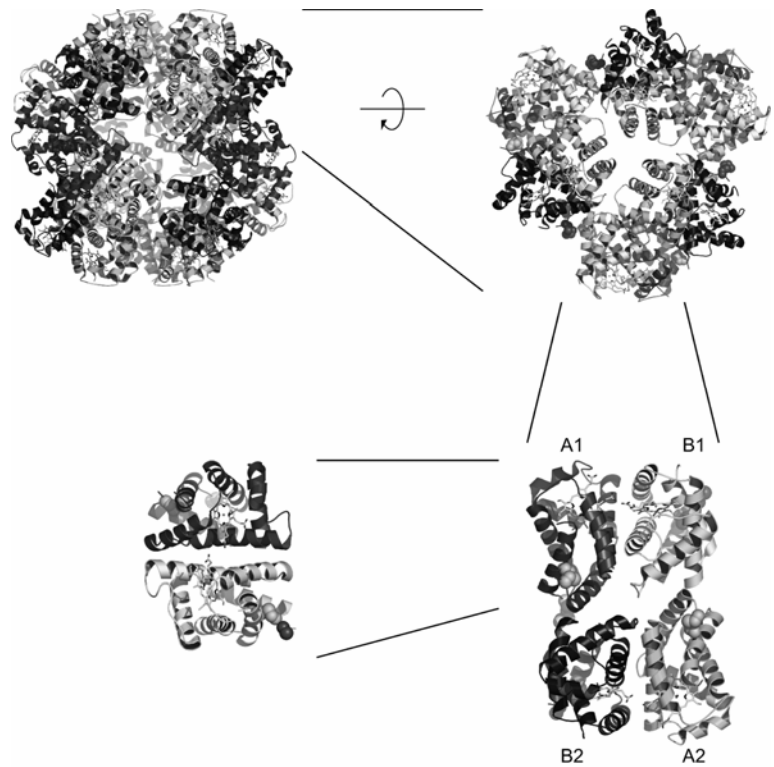


図 4 マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンにおける階層構造

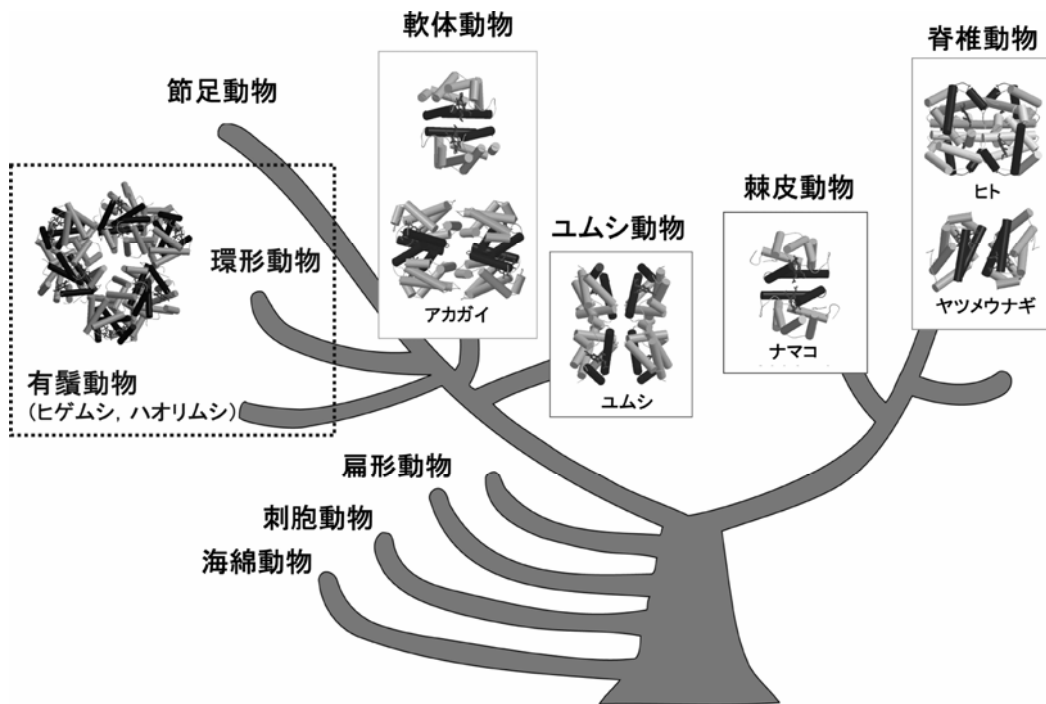


図 5 動物系統樹と構造の明らかになっている、2 量体以上のヘモグロビン。

子の進化の過程を解明する上でも、新たに加わったこれら一連の構造情報が重要な知見を与えるものと期待される。

### 3. 硫化水素結合の機構

有鬚動物の巨大ヘモグロビンの機能上の大きな特徴である硫化水素の結合に関しては、特定の結合部位の存在がこれまでの研究から提唱されていた[13]。すなわち、イオウ原子を持つシステイン残基 (Cys) が、ペルスルフィド (-S-S-) を形成して、硫化水素を安定的に結合して運搬するというものである。実際に、有鬚動物の巨大ヘモグロビンの間では、いずれもそのアミノ酸配列上のある特定の場所に、この Cys が保存されている。今回解析されたマシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンの結晶構造は、硫化水素非結合型であるが、この保存された Cys の周辺環境を検討することで、いくつかの特徴的な事実が明らかになった。マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンを構成する 4 種のサブユニットのうち、A1, A2, B2 サブユニットにそれぞれ保存された Cys が存在する。とりわけ A1 と B2 については、アミノ酸配列上で互いに対応する位置にこの Cys が存在し、かつ立体構造上の周辺環境も、2 つのサブユニットで非常によく似ていた。これらの Cys は、疎水性の芳香族アミノ酸、フェニルアラニン残基 (Phe) に取り囲まれるように存在していた (図 6)。保存された Cys 周辺のこのようなアミノ酸残基の配置から、この部位に結合した硫化水素 (硫化物イオン) が、Phe の芳香環による静電相互作用によって安定化されるというメカニズムが強く示唆される。この Cys を取り囲むように配置している Phe もまた、有鬚動物の巨大ヘモグロビンの間でよく保存されている。さらには Cys に特異的に結合する水銀化合物を結合させた結晶構造中では、これらの Phe 側鎖が実際に Cys に結合した水銀原子と接触していることも、この機構を支持している。一方、A2 サブユニットでは、A1, B2 とは異なる位置に保存された Cys が存在するが、同様に周囲を疎水性のアミノ酸残基に囲まれている。マシコヒゲムシ巨大ヘモグロビンは、このような疎水的環境にある複数の箇所でも硫化水素を結合して、非常に反応性の高いペルスルフィドが不必要な反応することを防ぎながら、安定に共生細菌まで運搬していると考えられる。

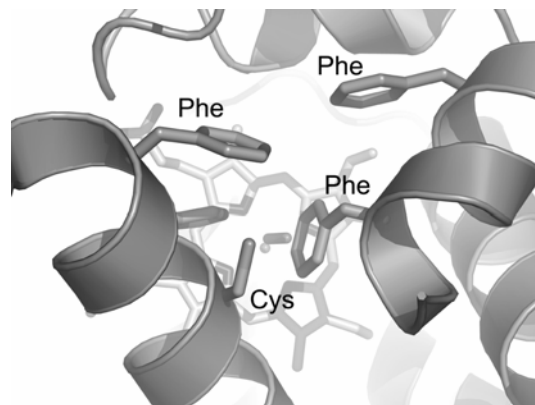


図 6 予想される硫化水素結合部位

### 4. サブユニット間の協同性

無脊椎動物ヘモグロビンのサブユニット会合形態は多岐にわたる。小さなものでは、サブユニットひとつで機能するものから、マシコヒゲムシの巨大ヘモグロビンのように 24 量体という大きな複合体を形成するもの、あるいはさらに大きな複合体まで、様々なものが存在することが知られている。なかには、酸素運搬機能をヘモグロビンとは異なるタンパク質が担っている場合さえある。例えば、イカや昆虫などでは、ヘモシアニンと呼ばれる別種のタンパク質が酸素を運搬しており、それゆえにこれらの生物の血液は赤くない。話をヘモグロビンに限っても、無脊椎動物のものが詳細に研究された例はごくわずかであり、構造と機能の詳しい研究は、アカガイのヘモグロビンなど数例にすぎない。脊椎動物ヘモグロビンの大きな特徴の一つは、酸素を結合・放出する際に、4 つのサブユニットが協同性を示すことである。4 つのサブユニットはそれぞれ 1 分子ずつ酸素を結合できるが、4 つのうち一つのサブユニットに酸素が結合 (放出) されれば、その 4 量体構造が大きく変化し、その結果、他の

サブユニットの酸素の結合（放出）を促進する．一般に，このような複数のリガンド結合部位でその結合性に互いに影響を与えあう性質を協同性という．脊椎動物のヘモグロビンは，4 量体構造であるが所以の非常に巧妙な仕掛けをつかって，効率よく酸素を結合して全身に運搬し，また必要なところで酸素を放出しているのである．それに対し無脊椎動物のヘモグロビンでは，このような協同性を強くもつものもあれば，ほとんど持たないものもある．マシコヒゲムシの巨大ヘモグロビンでは，最近になって，このような協同性はほとんど存在しないことがわかったが[5]，一方，共通の 12 量体構造をもつミミズとハオリムシの巨大ヘモグロビンには協同性が存在する．このような違いを説明するには，酸素を結合した状態と，結合していない状態の構造をそれぞれ決定して，その構造を詳細に比較する必要がある．これまでに明らかにされた巨大ヘモグロビンの構造は，いずれも酸素結合型であり，今後の酸素非結合型の構造決定によって，これらの 12 量体構造におけるヘモグロビン協同性のメカニズム説明が期待される．同様に，硫化水素結合型の構造解析によって，有鬚動物の巨大ヘモグロビンのもつ特異な硫化水素結合機能のメカニズムがより詳細に説明できると考えている．

## 5. おわりに

生命現象のプロセスを，化学や物理学の視点で理解しようとするとき，それを化学的な反応で司っている生体高分子の構造を原子レベルで説明することが重要である．タンパク質など，生体高分子の三次元的構造には，その動きに直結している情報が含まれている．この重要性は，近年，タンパク質立体構造解析数が飛躍的に増加していることに表われている．とはいえ，一つの細胞中でも数万種のタンパク質分子が働いており，極めて多くのタンパク質分子の構造がいまだ未説明のままである．とくに，生体膜に埋もれて存在している膜タンパク質や，何種類ものサブユニットで構成されている複雑で巨大な超分子複合体などでは，このことは顕著であり，かつ，これらのタンパク質が基本的な生命活動あるいは疾病などに重要な役割を果たしていることも多い．X 線結晶解析は，解析できる分子量にほとんど制限がなく，このような複雑な複合体の解析にも適しており，今後も生物学的に重要な生体超分子複合体の説明が進むと期待される．

本稿で紹介した研究は，金沢大学大学院自然科学研究科の福森義宏教授，中川太郎博士，同じく金沢大学自然計測応用研究センターの笹山雄一教授らとの共同研究の成果である．また，X 線回折実験は大型放射光施設SPring-8の複数のビームライン（BL38B1, BL41XU, BL44XU, BL45XU）で行ったものであり，それぞれのビームラインの担当者の方々のご助力に感謝申し上げたい．

## 参考文献

- [1] A. J. Southward, E. C. Southward, P. R. Dando, G. H. Rau, H. Felbeck, H. Flügel, *Nature*, **293**, 616 (1981).
- [2] A. J. Arp, J. J. Childress, R. D. Vetter, *J. Exp. Biol.*, **128**, 139 (1987).
- [3] T. Nakagawa, S. Onoda, M. Kanemori, Y. Sasayama, Y. Fukumori, *Zoolog. Sci.*, **22**, 283 (2005).
- [4] M. F. Perutz, *Sci. Amer.*, 239, 68 (1978).
- [5] R. E. Weber, S. N. Vinogradov, *Physiol. Rev.*, **81**, 569 (2001).
- [6] N. Numoto, T. Nakagawa, A. Kita, Y. Sasayama, Y. Fukumori, K. Miki, *Biochim. Biophys. Acta*, **1750**, 173 (2005).
- [7] N. Numoto, T. Nakagawa, A. Kita, Y. Sasayama, Y. Fukumori, K. Miki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 14521 (2005).
- [8] K. Strand, J. E. Knapp, B. Bhyravbhatla, W. E. Royer Jr., *J. Mol. Biol.*, **344**, 119 (2004).

- [9] J. F. Flores, C. R. Fisher, S. L. Carney, B. N. Green, J. K. Freytag, S. W. Schaeffer, W. E. Royer, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2713 (2005).
- [10] W. E. Royer, Jr., K. S. Heard, D. J. Harrington, E. Chiancone, *J. Mol. Biol.* **253**, 168 (1995).
- [11] W. E. Royer, Jr., *J. Mol. Biol.* **235**, 657 (1994).
- [12] D. T. Mitchell, G. B. Kitto, M. L. Hackert, *J. Mol. Biol.* **251**, 421 (1995).
- [13] F. Zal, E. Leize, F. H. Lallier, A. Toulmond, A. Van Dorselaer, J. J. Childress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8997 (1998).