

## 環形動物アオゴカイ *Perinereis aibuhitensis* 巨大ヘモグロビンの グロビン鎖に含まれる希有な SS 結合

脇加奈子、野網明子、橋本美城子、大熊章郎、久保いつか、金井拓、佐藤高則、渡部稔\*、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

---

### Novel S-S loops in the globin chains from the giant hemoglobin of the polychaete *Perinereis aibuhitensis*

Kanako WAKI, Akiko NOAMI, Mikiko HASHIMOTO, Akio OKUMA, Ituka KUBO,  
Taku KANAI, Takanori SATOH, Minoru WATANABE\*, Toshio GOTOH

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

---

**Abstract:** The extracellular hemoglobin (Hb) from the polychaete *Perinereis aibuhitensis* consists of four types of 144 globins and two types of 36 linker chains, having a molecular mass of about 3,500 kDa. There are two types of globin subunits: monomer chain a and disulfide-bonded trimer AbB. The amino acid sequences of the four globin chains (a, A, b, B) were already reported, previously (Yamanaka, M. *et al. Natural Science Research of Tokushima University*, **19**, 63-92, 2005). The sites of disulfide bonds in the globin subunits have been investigated. Each globin chain contains an intrachain disulfide bond between N-terminal and C-terminal Cys residues. In addition, the interchain disulfide bonds were found between chains A and b, and b and B. Therefore, it is elucidated that the chain b is situated at the center of disulfide-bonded trimer, such as A-b-B. The sites of disulfide-bonds determined all could be suitably fitted to the tree dimensional structure of each subunit in a model without stretching or twisting. It was also confirmed that there is no free Cys residue in *Perinereis* globins. The positions of Cys residues of *Perinereis* globin sequences were compared with those of other 27 chains derived from the homologous Hbs. Among 31 sequences, Cys residues were distributed in six sites. The sites 1 and 2 are located at the N-terminal region of amino acid sequences, the sites 3 and 4 at the central region, and the sites 5 and 6 at C-terminal region. Furthermore, the Cys distribution was categorized into eight patterns. *Perinereis* Hb has four patterns I, IV, VII, VIII, being lack of the central sites 3 and 4. It should be noted that the pattern II includes the unique globins from Hbs of *Lamellibrachia*, *Riftia* and *Oligobranchia* that carry H<sub>2</sub>S to the symbiotic bacteria, suggesting that these globin chains might carry H<sub>2</sub>S *in vivo*. The phylogenetic tree of 31 globin chains derived from the giant Hbs is divided into two families A and B, as already pointed out by us previously. The family A includes pattern I~V, whereas the family B includes V~VIII.

**Keywords:** giant hemoglobin, S-S loop, annelid, polychaete, phylogenetic tree, H<sub>2</sub>S

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

## 1. はじめに

環形動物の血液に浮遊する巨大ヘモグロビン (Hb) は六角二層の形をとり、その構成鎖はグロビン鎖に加えて起源の異なる非グロビン鎖を含み、Cys 残基の含量が高いことなどが知られている。その分子質量は脊椎動物の Hb の約 50 倍に相当する 3~4 MDa に達する [1]。鈴木と後藤らは、この巨大なタンパク質がヒト Hb と相同なグロビン鎖を持つことから、互いに起源が同じであることを明らかにしている [2-5]。また、グロビン鎖を束ねて巨大化するリンカーのアミノ酸配列を報告している [6]。この巨大 Hb の溶液に  $\beta$ -メルカプトエタノールやジチオスライトールなどの還元剤を添加すると Hb は容易にサブユニットに解離し、その分子質量は 1/100 以下に低下することから、分子構築上 Cys 残基の重要性が指摘されている [1]。また、巨大で六角二層をなす Hb の中には、酸素を体細胞に運搬する一方で、硫化水素を共生細菌に難なく運搬するものがあり、その結合サイトは Cys 残基である可能性が高いと言われている [7,8]。ヒト Hb でも  $\alpha$  鎖に 1 残基の Cys 残基が含まれているが [9]、硫化水素の存在下では酸素の可逆的結合は認められなくなり、ヒト Hb では硫化水素はヘム鉄に結合すると考えられている [7]。このように、Cys 残基を含むグロビン鎖の構造と機能について、分子進化や比較生化学的観点からさらに詳細な研究が求められている。

海底の熱水噴出口付近に棲むハオリムシ (*Ritia pachyptila*) が保有する巨大 Hb は硫化水素を無毒化して運搬するが、環形動物多毛類に属するアオゴカイ (*Perinereis aibuhitensis*) の巨大 Hb にはその機能はない [8]。我々は、前報でアオゴカイの Hb を構成する 4 種類のグロビン鎖 a, A, b, B のアミノ酸配列を決定し、そのすべてに Cys 残基が含まれていることを明らかにしている [10]。グロビン鎖 a, A, b, B には、それぞれ順に 2, 3, 4, 3 残基の Cys 残基が含まれており、そのうちの一部はグロビン三量体の形成に関与している。

この論文では、アオゴカイ Hb の 4 種のグロ

ビン鎖に含まれる鎖内および鎖間の SS 結合の位置を決定した。各鎖には鎖内に各 1 カ所 SS 架橋があり、グロビン三量体は A-b-B の形で SS 架橋により結合していることなどを明らかにした。12 個の Cys 残基はすべて SS 結合しており、フリーの SH 基はない。このことが硫化水素結合能を欠く要因であることが示唆された。

また、これまでに報告されている環形動物巨大 Hb のグロビン鎖の配列を並列に並べて、SH 基の位置関係を 8 パターンに整理した。さらに、Cys の変動がこの巨大 Hb の進化の過程でどのように変遷してきたかを、グロビン鎖の系統樹を描くことによって示した。

## 2. 材料と方法

### *Perinereis* Hb の精製

*Perinereis* は徳島市内の釣具店で購入した。*Perinereis* Hb は Tsuneshige らの方法 [11] に従い、虫を組織ごと破碎し、遠心分離や硫酸分画 (0.35-0.4 飽和) 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。前報に詳述した [10]。

### *Perinereis* Hb 溶液のタンパク質濃度測定

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 のとき、吸光係数は 540 nm、1 cm path で 11.3 [12] とした。また、蟻酸やアセトニトリルに晒されて脱ヘムした試料のタンパク量は BCA 法 [13] によって定量した。試薬は Pierce の Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit を使用した。

### *Perinereis* Hb 単量体 a 鎖の分離

*Perinereis* Hb の単量体 a 鎖の分離はゲルろ過によった。ゲルろ過には FPLC システム (Pharmacia Biotech) を使用した。まず、凍結乾燥した Hb (15 mg) を 70 % 蟻酸 500  $\mu$ l に溶解し、低温室で一晩静置して解離させた。その Hb

溶液を蒸留水で2倍に希釈し、これを30% 蟻酸で平衡化したカラム (Superdex 75HR 1×30 cm; Pharmacia Biotech) に200  $\mu$ l ずつかけ、流速0.5 ml/min で溶出した。タンパク質は280 nm の吸光度によって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。2つのピークが観察され、最初のピークにはグロビン三量体 (A-b-B) とリンカーが含まれ、2番目にはグロビン単量体 (a 鎖) が含まれている。ゲルろ過によって得られた各分画を水に対して透析した後濃度測定し、凍結乾燥機 VD-41 (タイテック) で凍結乾燥を行い、冷暗所 (-80  $^{\circ}$ C) に保存した。他の構成鎖が含まれている場合には、さらに HPLC を用いて逆相カラムクロマトグラフィー (COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-300, 4.6×150 mm, Nacalai Tesque) によって a 鎖を精製した。

#### HPLC による *Perinereis* Hb 三量体の単離

Tosoh 8020 型 HPLC システム (東ソー) を使用して *Perinereis* Hb 三量体を単離した。まず、逆相クロマトグラフィー用カラム (COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-300, 4.6×150 mm, Nacalai Tesque) を0.1% TFA を含む10% アセトニトリルで平衡化し、単量体 a 鎖を除去した凍結乾燥試料 (約600  $\mu$ g) を0.1% TFA を含む10% アセトニトリル1 ml に溶かし、それを250  $\mu$ l ずつカラムに載せて溶出した。アセトニトリルの濃度勾配は、60分 で10~70% の直線勾配がかかるようにプログラムし、流速1 ml/min で溶出しながら220 nm の吸光度を連続的にモニターした。次に、この溶出パターンを参考にして、より適切なアセトニトリルの濃度勾配を決め、改めて別の試料をカラムにかけて新たな溶出プログラムに従ってタンパク質を溶出し、ピーク毎に分取した。2つのピークが観察され、2番目の大きなピークに三量体が溶出された。この画分を凍結乾燥して、-80  $^{\circ}$ C で暗所に保存した。

#### *Perinereis* 単量体と三量体の酵素消化

単離した *Perinereis* Hb の単量体と三量体は3種類のタンパク質分解酵素を適宜使い分けて、消化された。使用した *Staphylococcus aureus* V8 プロテアーゼ I は Wako、エンドプロテイナーゼ

Asp-N は Takara、トリプシン (TPCK Treated) は Sigma からそれぞれ購入した。

エンドプロテイナーゼ Asp-N による消化は下記のように行った。凍結乾燥した単量体 (2 nmol) を8 M 尿素50  $\mu$ l に溶かし、室温で60分静置し変性させた。次に、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0) を400  $\mu$ l 加え、酵素が失活しないよう尿素濃度を1 M 以下にまで下げた。さらに、酵素/基質 (モル比) 1/100 になるように酵素液50  $\mu$ l (10 pmol) を加え、37  $^{\circ}$ C で4時間消化した。

トリプシン消化は以下のように行った。凍結乾燥した三量体 (180 nmol) を8 M 尿素1125  $\mu$ l に溶かし、37 $^{\circ}$ C で1時間インキュベートし変性させた。インキュベート後、溶液が中性となっていることを確認した。次に、酵素/基質 (モル比) が1/10 になるように4 pmol/ $\mu$ l に調整したトリプシン溶液 (in 0.01% Tween 20, 10mM CaCl<sub>2</sub> 含有 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.0)) を4500  $\mu$ l 加え、酵素が失活しないように尿素濃度を1.6M まで下げ、37 $^{\circ}$ C で40時間インキュベートし反応させた。99% 蟻酸を675  $\mu$ l (最終濃度12%) 加えて反応を停止させた。これを凍結乾燥して、冷凍庫に保存した。

V8 プロテアーゼは50 mM 炭酸水素アンモニウム (pH 7.8) に溶かし、500  $\mu$ g/ml の酵素液を調整し冷凍保存しておいた。三量体をトリプシン処理し、ゲルろ過によって得られた6 kDa ペプチド断片を再クロマトによって精製した試料をV8 プロテアーゼで消化した。6 kDa ペプチド断片を8 M 尿素500  $\mu$ l に溶かし、37 $^{\circ}$ C で2時間インキュベートし変性させた。インキュベート後、溶液が中性となっていることを確認した。次に、50mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 7.8) を1400  $\mu$ l 加え、酵素が失活しないよう尿素濃度を1.6 M にまで下げた。これにV8 プロテアーゼ溶液を6  $\mu$ l (0.1 nmol) 加え、37 $^{\circ}$ C で30時間インキュベートした。最後に、反応混液に99% 蟻酸を50  $\mu$ l (最終濃度2%) 加えて反応を停止させた。なお、本キットの説明書にはこの溶液に0.01% の Tween 20 が含まれていたが、故意に加えなかった。説明書通りに Tween 20 を加えてしまうと、ペプチドが粘性を帯びてしまうせいか HPLC によって分離する際、シャープなピークを得ることができな

くなることが強く疑われたからである。

いずれの場合も、酵素処理後に試料を凍結乾燥して、使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。

### 酵素消化したグロビン鎖のペプチドの精製

ほとんどの場合、酵素消化して得られたペプチドは直接逆相クロマトグラフィーにかけたが、ピークが多すぎて分離が悪い場合は、はじめにゲルろ過クロマトグラフィーにかけて、分子のサイズによって大まかに分離してから逆相クロマトグラフィーで精製した。ゲルろ過クロマトグラフィーには、Tosoh 8020 型 HPLC システム (東ソー) を使用し、Superdex Peptide 10/300 GL カラム ( $1 \times 30 \text{ cm}$ ; Amersham Biosciences) にかけて。酵素処理した試料を 0.1 % TFA を含む 10-15% アセトニトリル溶液で平衡化したカラムにかけて溶出した。タンパク質量は 220 nm の吸光度でモニターした。1 分毎に溶出液を分取した。おおむねピーク毎に分画し、凍結乾燥して冷凍保存した。次に、各画分を逆相クロマトグラフィーにかけて。逆相クロマトグラフィー用カラム (COSMOSIL 5 C<sub>18</sub>-300,  $4.6 \times 150 \text{ mm}$ , Nacalai Tesque) は 0.1% TFA を含む 10 % アセトニトリル溶液で平衡化した。次に、酵素消化した試料をカラムにかけ、5~55 % のアセトニトリル濃度の直線勾配で流速 1 ml/min で溶出した。そのパターンからより適切なアセトニトリルの勾配を推定して、溶出のプログラムを組んだ。改めてカラムに試料をかけて新たな溶出プログラムによってペプチドを溶出し、各ピークごとに分取して、凍結乾燥し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### アミノ酸配列の決定

HPLC により分離された各種のペプチドのアミノ酸配列や各グロビン鎖 N 末端の配列はアミノ酸シーケンサー 491 型 Procise (Applied Biosystems) により決定された。この装置には Edman 法が組み込まれている。得られたデータの解析は Model 610 Data Analysis Program によって行った。収量値がゼロに近くても "Multiple Cycle" を活用することによって前後のサイクルを明確に区別することができた。使用した試薬はすべて Applied Biosystems から購入した。

### SDS-PAGE によるタンパク質の純度検定

精製した *Perinereis* Hb、三量体、単量体など試料の純度は Ornstein [14]の方法に従って SDS-PAGE によって検定した。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、 $95^{\circ}\text{C}$  で 5 分間熱処理を行った後、ゲルの溝に  $10 \mu\text{l}$  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 時間脱色した。

### ホモロジーの検索と系統樹の作成

*Perinereis* Hb のグロビン鎖と他のグロビン鎖との相同性を算出するために DDBJ のホームページ [15] で提供している CLUSTALW を用いてアミノ酸配列のアライメントを行った。グロビン鎖の分子進化の系統樹は Mac Vector 6.0 (帝人システムテクノロジー) の UPGMA 法 (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean: 無加重平均距離法) を用いて作成した。

## 3. 結果と考察

### *Perinereis* Hb のグロビン単量体と三量体の精製

*Perinereis* Hb を 70% 蟻酸処理した *Perinereis* Hb の Superdex 75 HR によるゲルろ過のパターンを図 1-1 に示した。2 つのピークが観察され、はじめのピークに三量体鎖とリンカーが含まれ、2 番目のピークに単量体 a 鎖が溶出された。その同定は SDS-PAGE によって行われた。さらに、

それぞれの画分に含まれるグロビンは逆相カラムクロマトグラフィーにかけて精製された。図1-2と1-3に、それぞれ、逆相カラムクロマトグラフィーにおける単量体画分の溶出パタ

ーンと三量体鎖とリンカーの分離のパターンを示した。単量体画分と三量体画分の主たる部分をさらに再クロマトグラフィーにかけて精製した。

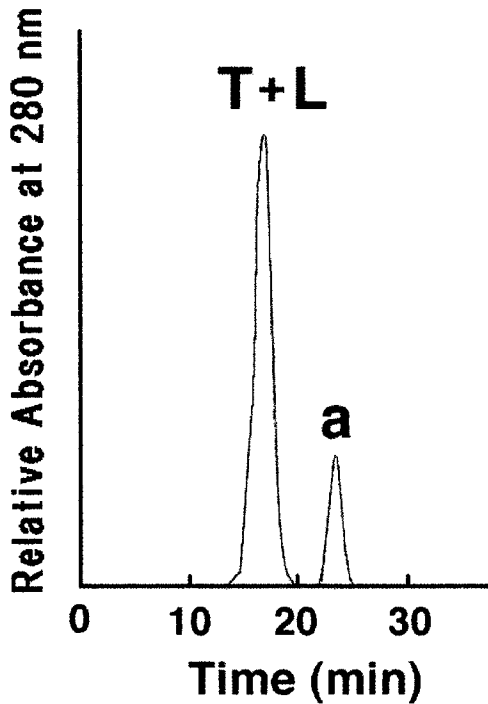


図1-1. 70% ギ酸処理した *Perinereis* Hb の Superdex 75 HR によるゲルろ過のパターン 70% ギ酸処理した *Perinereis* Hb (2 mg/ml, 200  $\mu$ l) を Superdex 75 HR カラム (1.0 $\times$ 30 cm, Pharmacia Biotech 社) にかけてゲルろ過を行った。FPLC システムを用い、カラムは予め30% ギ酸で平衡化し、同じギ酸で溶出した。流速 0.5 ml/min。T: 三量体 L: リンカー a: 単量体鎖。詳細は本文参照。

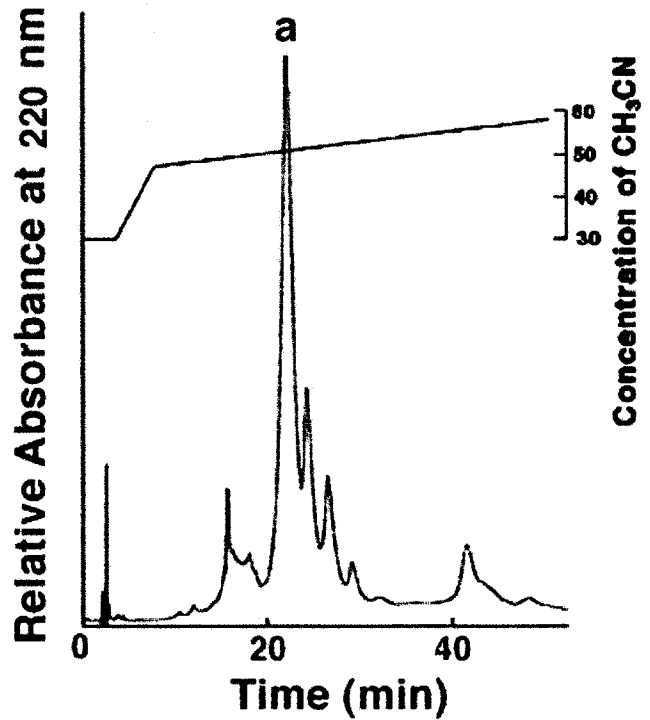


図1-2. ゲルろ過により得られた *Perinereis* Hb 単量体画分の COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-300 による逆相クロマトグラフィーの溶出パターン FPLC (図1-1) の a 鎖画分を HPLC システムに装填した逆相カラム COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-300 (4.6 $\times$ 150 mm, Nacalai Tesque 社) にかけて、アセトニトリルの濃度勾配を直線的にかけて溶出した。試料は凍結乾燥し、0.1%TFA を含む 20% アセトニトリル 500  $\mu$ l に溶かし、あらかじめ同じ溶液で平衡したカラムに載せた。流速は 1 ml/min。詳細は本文参照。

**単量体 a を酵素処理して得られる Cys 残基を含むペプチドの単離とそのアミノ酸配列**

図2はエンドプロテイナーゼ Asp-N で消化した *Perinereis* Hb 単量体鎖の COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-300 による逆相クロマトグラフィーの溶出パターンである。精製したグロビン単量体を SS 結合を保

持したまま、エンドプロテイナーゼ Asp-N で4時間消化した試料を逆相クロマトにかけて、アセトニトリル濃度 10-55%の直線勾配で溶出した。Cys 残基を含むペプチドがピーク 1に認められた。

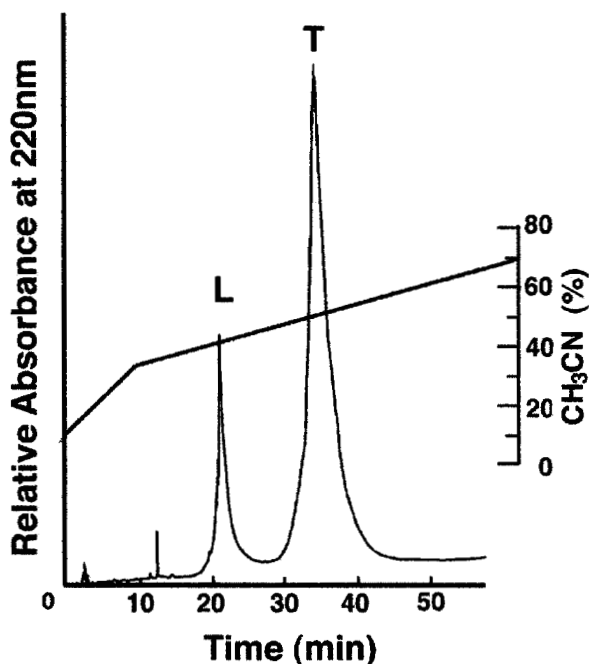


図1-3. *Perinereis* Hb の三量体鎖とリンカーの混合溶液の COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-300 による逆相クロマトグラフィーの溶出パターン 三量体とリンカーの混合物 (250  $\mu$ l, タンパク質濃度 600  $\mu$ g/ml; 図1-1の最初のピーク) を HPLC にかけて。凍結乾燥した試料は 0.1% TFA を含む 10% アセトニトリル 1 ml に溶かして、あらかじめ同じ溶液で平衡化したカラムに載せた。アセトニトリルの濃度勾配は、最初の 10 分間に 10%から 35%までに上げて、その後 50 分間に 60% まで直線的に増加させた。T は三量体鎖; L、リンカー鎖。他の条件は図1-2に同じ。

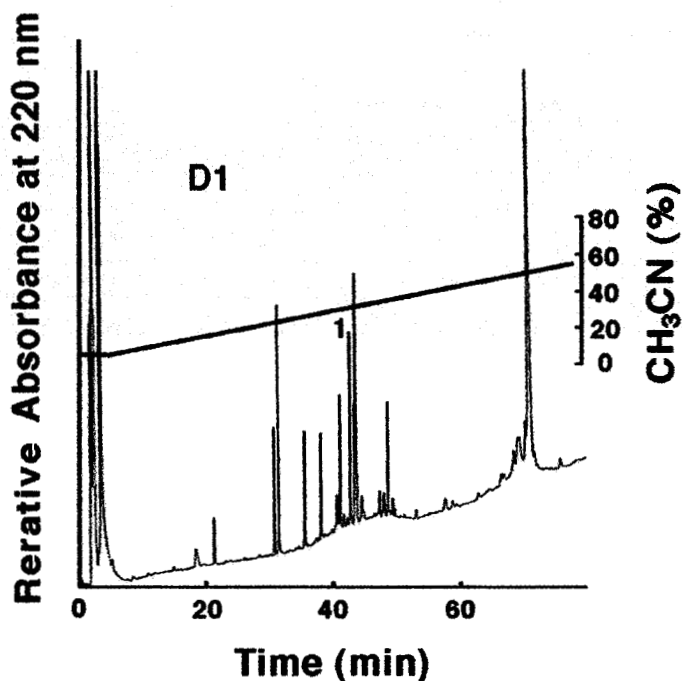


図2. エンドプロテイナーゼ Asp-N で消化した *Perinereis* Hb 単量体鎖 a の COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-300 による逆相クロマトグラフィーの溶出パターン

精製しグロビン単量体 (図1-2) を SS 結合を切断することなく、そのままエンドプロテイナーゼ Asp-N で4時間消化した試料を逆相にかけて、アセトニトリル濃度 10-55%の直線勾配で溶出した。Cys 残基を含むペプチドがピーク 1に認められた。他の実験条件は図1-3に同じ。酵素処理などの詳細は本文参照。

表1は図2のピーク1から得られたペプチドをアミノ酸シーケンスにかけて得られたアミノ酸配列を示している。サイクル1, 2, 6, 16以外は各サイクルに2種類のPTHアミノ酸のピークが現れた。この結果を、a鎖のN末端領域の配列とC末端領域の配列[10]に当てはめて、2

列に並べてみると、矛盾なく、各サイクルの回収量を振り分けることができた。実験結果はN末端領域にあるCys2とC末端領域にあるCys130がSS結合していることを明瞭に示している(図3)。

表1 エンドプロテイナーゼ Asp-N によって消化された a 鎖から得られた Cys 残基を含むペプチドのアミノ酸配列決定 このペプチドは図2のピーク1として回収された。Edman 分解による各サイクルの PTH-アミノ酸の回収量 (pmoles) を示す。サイクル1, 2, 6, 16 以外は各サイクルに2種類の PTHアミノ酸のピークが現れた。既知の *Perinereis* グロビン鎖のアミノ酸配列 [10] を基に予想される領域の配列を探して、各サイクル毎に得られた PTHアミノ酸を2列に配分して表を作成した。背景にある PTHアミノ酸のピークは極めて低い。

Cycle	Amino Acid (pmol)	Amino Acid (pmol)
1	D 285	D 285
2	- -	A 893
3	N 357	W 243
4	A 930	S 158
5	M 1030	S 214
6	A 876	- -
7	R 542	Y 368
8	I 582	N 113
9	K 873	Y 180
10	V 875	I 215
11	K 756	V 289
12	H 430	S 89.2
13	Q 386	N 87.3
14	W 75.5	L 141
15	V 158	G 63.9
16	- -	A 21.2



図3. エンドプロテイナーゼ Asp-N によって消化された a 鎖から得られた SS 架橋を含むペプチド 上段が a 鎖の N 末端配列、下段が a 鎖の C 末端の配列に相当する[10]。N 末端から 2 番目の Cys 残基と 130 番目の Cys 残基間に SS 結合が形成されている。この配列は表1に示した Edman 分解の実験結果とその振り分けに対応している。

### 三量体を酵素処理して得られる Cys 残基を含むペプチドの単離とそのアミノ酸配列

図 4-1 はトリプシン消化した三量体鎖の Super Peptide 10/300 GL カラムによるゲルろ過の溶出パターンを示している。続いて、4つの画分 (I~IV) から Cys 残基を含むペプチドを探索した。予備的に SDS-PAGE を行い (図 4

-2)、画分 II と III に含まれる主成分の分子質量は、それぞれ、おおよそ 6 kDa (ペプチド B) と 3 kDa (ペプチド A) と見積もられた。この2つの成分が求めているペプチドである可能性が高い。グロビン三量体の各鎖のアミノ酸配列 [10] から、トリプシンで消化した場合に得られる断片がある程度予測できるからである。

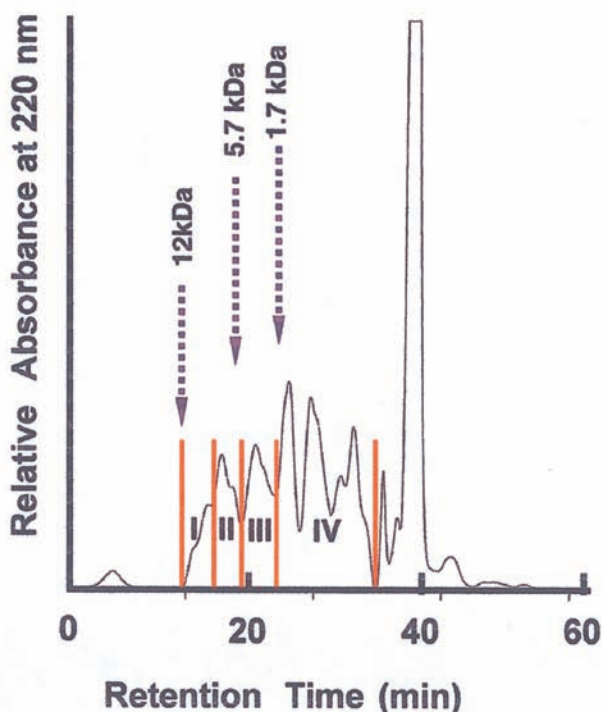


図 4-1. トリプシン消化した三量体鎖の Super Peptide10/300 GL カラムによるゲルろ過の溶出パターン *Perinereis* Hb 三量体鎖をトリプシン消化した後、HPLC システムに装填した Super Peptide 10/300 GL カラム (1.0×30 cm, Amersham Biosciences) にかけた。トリプシン処理した三量体鎖を、室温で 0.1% の TFA を含む 15% アセトニトリルで平衡化したゲルろ過カラムにかけ、同じ溶液で 0.5ml/min で溶出した。I~IV の 4 つに分画した。マーカーとしてのチトクロム C (12.4 kDa)、インスリン (5,734 Da)、renin substrate tetradecapeptide (1,760 Da) を用いた。トリプシン消化については本文の材料と方法を参照。

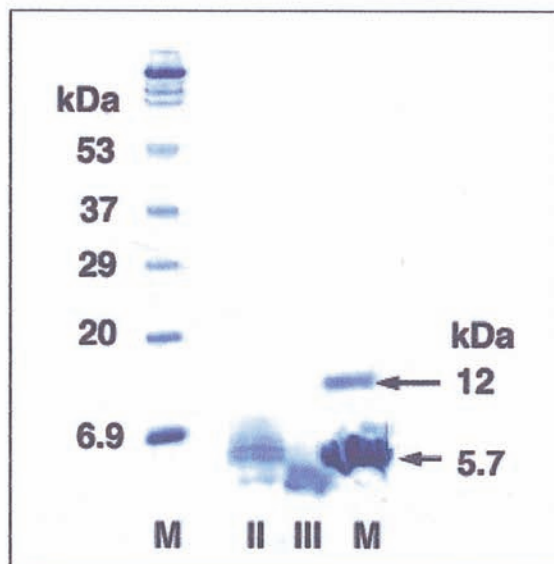


図 4-2. ゲルろ過のペプチド A と B の SDS-PAGE パターン 低分子量のマーカー (右端 M) としてチトクロム C (12.4 kDa) とインスリン (5.7 kDa) を用いた。試料 II と III はトリプシン消化した三量体鎖の SuperPeptide 10/300 GL カラムによるゲルろ過によって得られた画分 II と III (図 4-1) をさらに精製して得られた Cys 残基を含むペプチド断片である (図 4-3 と 4)。それぞれの分子質量は順に 6 kDa、3 kDa と見積もられ、それぞれを”ペプチド B” および”ペプチド A” と便宜的に名付けた。SDS-PAGE の詳細は材料と方法を参照。なお、ペプチド B は逆相クロマトではシャープなピークを示さなかった。



図4-1の各画分をそれぞれ逆相クロマトグラフィーにかけたが、配列決定に供することのできるきれいなペプチドが得られたのは画分IIIからのみであった(図4-3)。前述のように、これを便宜的に“ペプチドA”と名付けた。画分IIはCys残基を含む成分を含んでいるが、シーケンシングに耐えうるきれいな試料は得られなかった。画分IVにはCys残基を含むペプチドは見つからなかった。そこで、画分IIは図4-1と同じ条件で再度ゲルろ過を行い精製し

た。得られた成分を仮に“ペプチドB”と名付けた(図4-4)。それをシーケンシングにかけたが、同じサイクルにPTHアミノ酸が数個含まれており、アミノ酸配列の解析は困難であった。そこで、このペプチドBをV8プロテアーゼで消化してから改めて、逆相クロマトグラフィーにかけて、解析可能な2本のペプチドを得た(図4-5)。便宜上、それらを小さい順に、それぞれ、“ペプチドB1”、“ペプチドB2”と名付けた。

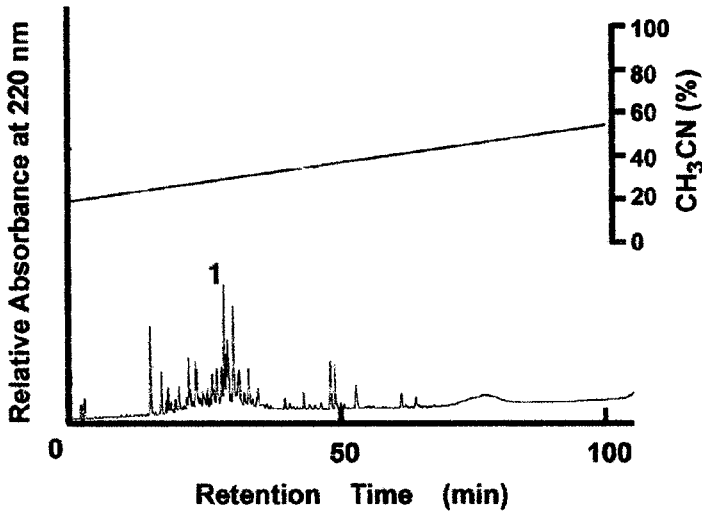


図4-3. ゲルろ過によって得られた画分IIIのCOSMOSIL 5C<sub>18</sub>-300による逆相クロマトグラフィーの溶出パターン

図4-1で得られた画分IIIをHPLCシステムに装填した逆相カラムCOSMOSIL 5C<sub>18</sub>-300(4.6×150mm, Nacalai Tesque社)に載せ、アセトニトリルの濃度勾配を直線的に2時間かけて10%から80%に増加させ溶出した。他の実験条件は図1-3に同じ。番号1を付したピークにCys残基を含む成分が見出された。これを“ペプチドA”と命名した。SDS-PAGEの解析にはこの試料を用いた(図4-2)。分子質量はおおよそ3kDaであった。

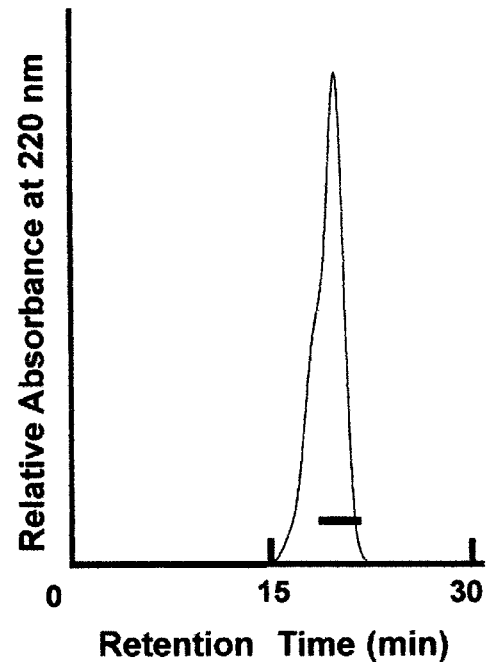


図4-4. ゲルろ過によって得られた画分IIのSuper Peptide10/300 GLカラムによる再クロマトグラフィーの溶出パターン

図4-1で得られた画分IIを再クロマトグラフィーにかけた。他の実験条件は図4-1に同じである。バーで示した分画を集めてSDS-PAGEとアミノ酸シーケンシサにかけた。SDS-PAGEから分子質量はおおよそ6kDaと見積もられた(図4-2)。この成分を“ペプチドB”と名付けた。シーケンシングの結果は複雑なので、このペプチドBをさらにV8プロテアーゼで消化して、逆相クロマトグラフィーにかけ、Cys残基を含む断片を2つ単離した(図4-5)。

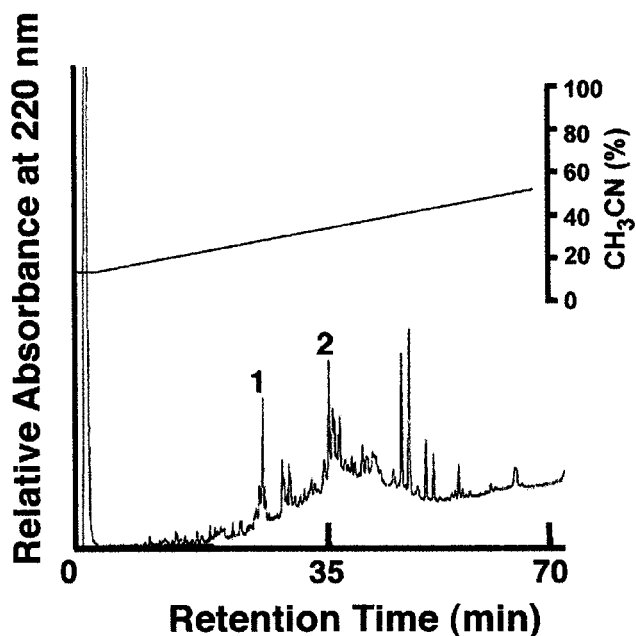


図4-5. (左) 6 kDa の成分を V8 プロテアーゼで消化した試料の COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-300 による逆相クロマトグラフィーの溶出パターン 再クロマトによって精製したペプチド B (6 kDa) を V8 プロテアーゼで消化して、逆相クロマトグラフィーにかけた。番号 1, 2 を付した試料は順に、それぞれ、"ペプチド B1"、"ペプチド B2" と命名した。実験条件は図4-3 とほぼ同様。

表 II ペプチド A のプロテインシーケンサによる PTH-アミノ酸の収量表

ペプチド A は図4-3 のピーク 1 を凍結乾燥して得られた。その他詳細は表 I と同じ。

Cycle	Amino Acid	pmoles	Amino Acid	pmoles
1	D	147.52	A	306.52
2	T	76.51	A	154.49
3	H	130.07	W	41.35
4	—	—	S	72.14
5	G	79.95	A	135.44
6	P	46.7	—	—
7	L	49.33	W	13.99
8	D	20.45	Q	36.5
9	E	15.26	R	3.94
10	V	10.01	—	—

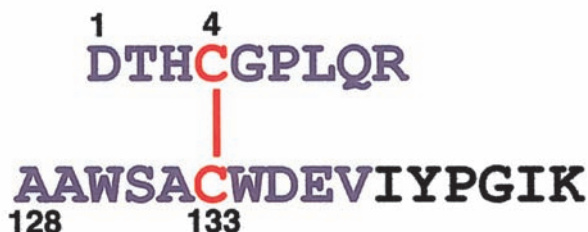


図5-1. 2つの Cys 残基を含むペプチド A に見つかった SS 架橋。上段は A 鎖の N 末端、下段は A 鎖の C 末端に由来する[10]。数値は N 末端からのアミノ酸残基の番号である。

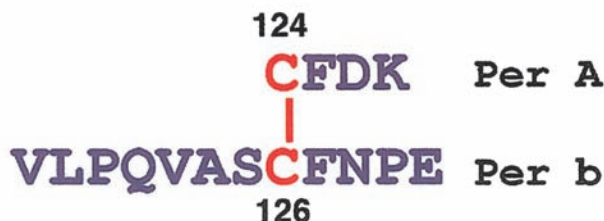


図5-2. 2つの Cys 残基を含むペプチドペプチド B1 に見つかった SS 架橋。

ペプチド B1 を解析した表 III のデータに基づいて表した。A 鎖の N 末端から 124 番目の Cys 残基と b 鎖の 126 番目の Cys 残基の間に鎖間の SS 結合があることが分かった。他は図5-1と同じ。

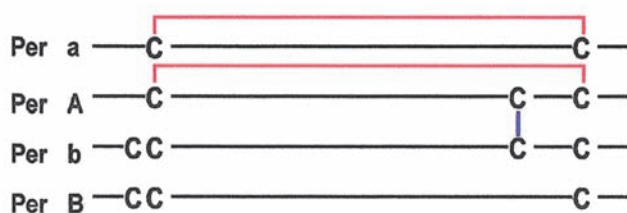


図5-3 *Perinereis* Hb の4種類のグロビン鎖の Cys 残基のサイトを強調したアラインメントと a 鎖と A 鎖の SS 架橋。アラインメントは前報 [10] によが、図6-1にも示した。赤で示した結合は鎖内の SS 架橋。a 鎖と A 鎖の鎖内 SS 架橋の位置が一致していることに注意。青で示した結合は鎖間の SS 架橋。C は Cys 残基。

表 II はペプチド A のアミノ酸シーケンスによる分析結果を示している。各サイクルに 2 残基ずつ現れ、4 サイクルと 6 サイクル目は 1 残基になっている。この欠失は明らかに Cys 残基の存在を示唆している。このデータを既に全アミノ酸配列が分かっている 4 種類のグロビン鎖の配列 [10] に照らして適宜 2 列に並べてみると、A 鎖の N 末端と C 末端に含まれる Cys 残基付近の配列が無理なく並ぶ。この結果に基づいて、このペプチド二量体の配列を整理したのが図5-1である。A 鎖の Cys4 と Cys133 に SS 架橋が存在することが明らかになった。

同様にして、ペプチド B1 のアミノ酸配列の解析から A 鎖と b 鎖間に鎖間の SS 架橋があることが分かった (表 III)。即ち、A 鎖 Cys124 と b 鎖 Cys126 の間に SS 架橋があることが確認された。図5-2にこの結果を明示した。この段階では、他に 6 個の Cys 残基が残っている。

図5-3に、ここまで明らかにになった SS 架橋のサイトと 4 種類のグロビン鎖 a、A、b、B の Cys 残基のサイトのアラインメントを示した。この図は、A 鎖の鎖内に見つかった SS 架橋のサイトが a 鎖の SS 架橋のサイトによく一致していることを示している。a 鎖と A 鎖は分子系統樹において A 系統に属し、B 系統に属する b 鎖と B 鎖とは対照的に N 末端には Cys は一残基しかない。従って、A 鎖の SS 架橋の同定は比較的容易であった。これに対して B 系統の 2 鎖は N 末端に連続する Cys 残基をもつため解析の困難が予測された。

これまでと同様にして、ペプチド B2 に含まれる b 鎖と B 鎖の断片の鎖内と鎖間にある SS 架橋が解析された (表 IV、図5-4)。

表 III ペプチド B1 の PTH アミノ酸の収量表 ペプチド B1 は図 4-5 ピーク 1 に溶出された。  
 その他詳細は表 I に同じ。

Cycle	Amino Acid	pmoles	Amino Acid	pmoles
1	D	147.52	A	306.52
2	T	76.51	A	154.49
3	H	130.07	W	41.35
4	—	—	S	72.14
5	G	79.95	A	135.44
6	P	46.7	—	—
7	L	49.33	W	13.99
8	D	20.45	Q	36.5
9	E	15.26	R	3.94
10	V	10.01	—	—

表 IV ペプチド B2 の PTH アミノ酸の収量表 ペプチド B2 は図 4-5 ピーク 2 に溶出された。  
 サイクルの後半は背景の PTH アミノ酸のピークがやや高かったが、データは無理なく読めた。  
 その他詳細は表 I に同じ。

Cycle	Amino Acid	pmoles	Amino Acid	pmoles	Amino Acid	pmoles	Amino Acid	pmoles
1	A	50.11	D	31.25	D	31.25	-	-
2	W	8.60	Q	30.11	D	19.79	F	66.36
3	N	19.34	—	—	—	—	T	21.94
4	H	17.04	—	—	—	—	R	20.83
5	—	—	S	9.15	S	9.15	—	—
6	F	17.93	I	25.74	A	31.20	—	—
7	D	10.71	E	18.21	A	27.94	—	—

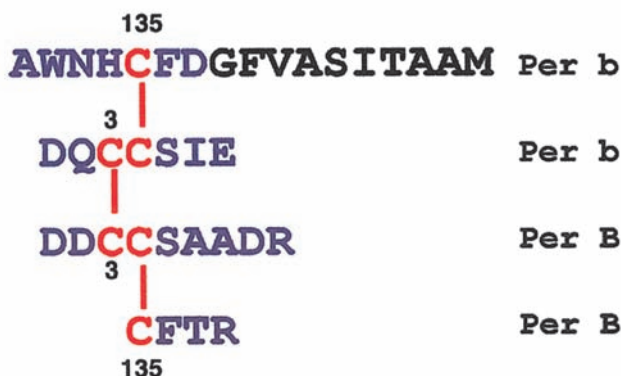


図5-4 6つの Cys 残基を含むペプチドペプチド B2 に予想される SS 架橋 ペプチド B2 を解析した表 IV のデータに基づいて表した。ただし、b 鎖および B 鎖の鎖内 SS 架橋が A 系統のそれらと相同な位置に形成されることを仮定している。詳細は本文参照。

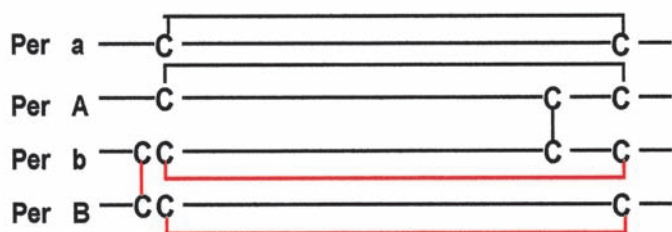


図5-5 *Perinereis* Hb の4種類のグロビン鎖の Cys 残基のサイトのアラインメントと b 鎖と B 鎖の SS 架橋のサイト Cys4 と C 末端領域にある Cys との結合サイトが a 鎖と A 鎖で確認されたもの相同な位置関係にあるとを仮定したモデル。赤で示した部分が b 鎖と B 鎖に含まれる SS 架橋の有力な結合サイト。何れのグロビン鎖でも N 末端部と C 末端部で SS 架橋している。Cys 残基が4つある b 鎖が三量体の中心に位置していることが分かる。フリーの Cys 残基は存在しない。図5-4 と4種類のグロビン鎖のアミノ酸配列 [10] を基に描かれている。

グロビン三量体に含まれる SS 架橋の全体像を図5-5に示した。鎖内の SS 結合は N 末端部と C 末端部の間に存在し、鎖間の SS 結合は N 末端部にある。しかし、双方の鎖共に Cys 残基がふたつ N 末端から3番目と4番目に連続して存在しており、鎖内の SS 結合が3番目同士にあるのか、3番目と4番目の間にあるのかを決定することはできなかった。この3番目と4番目の Cys 間の結合をうまく切断することができないからである。鎖間の SS 架橋サイトは可能性として4通りある。この中で、最も可能性が高いのは図5-5に描かれたものと思われる。この図では b 鎖と B 鎖の鎖間 SS 架橋がそれぞれの N 末端から3番目の Cys 残基間にあるように描かれている。この選択は、4種のグロビン鎖のアラインメント[10]を基礎に a 鎖と A 鎖の鎖内の SS 架橋を参考にすれば、b 鎖と B 鎖の鎖内の SS 架橋が N 末端から4番目の Cys 残基と C 末端部の Cys 残基間に形成されている可能性が高いことよっている。つまり、A 系統の a 鎖と A 鎖に存在する鎖内の SS 架橋が B 系統の b 鎖と B 鎖でも保存されていると仮定することができるからである。この結果から、グロビン三量体を本文中で表記する場合、“A-b-B”あるいは“A<sub>b</sub>B”とするのがよいであろう。

図の5-5に描かれた SS 架橋を参考に、三量体鎖の立体的模式図を描いてみた(図5-6)。ヒト Hb のβ鎖の立体構造に各 Cys 残基の位置を当てはめて、5個所の SS 架橋を渡してみたものである。ひねったり、伸ばしたりしなくても無理なく3次元の中に SS 架橋を収めることができた。

ともあれ、4種のグロビン鎖に存在する12の Cys 残基はすべて SS 結合しており、フリーの SH 基は存在しないことが明らかになった。即ち、*Perinereis* Hb ではすべての Cys 残基が構造の安定化に寄与しており、生理的機能には貢献していないと思われる。なお、この巨大 Hb 1 分子には4種類のグロビン鎖がそれぞれ36本ずつ含まれており[10]、SS 架橋はグロビン鎖だけでも216箇所存在することになる。

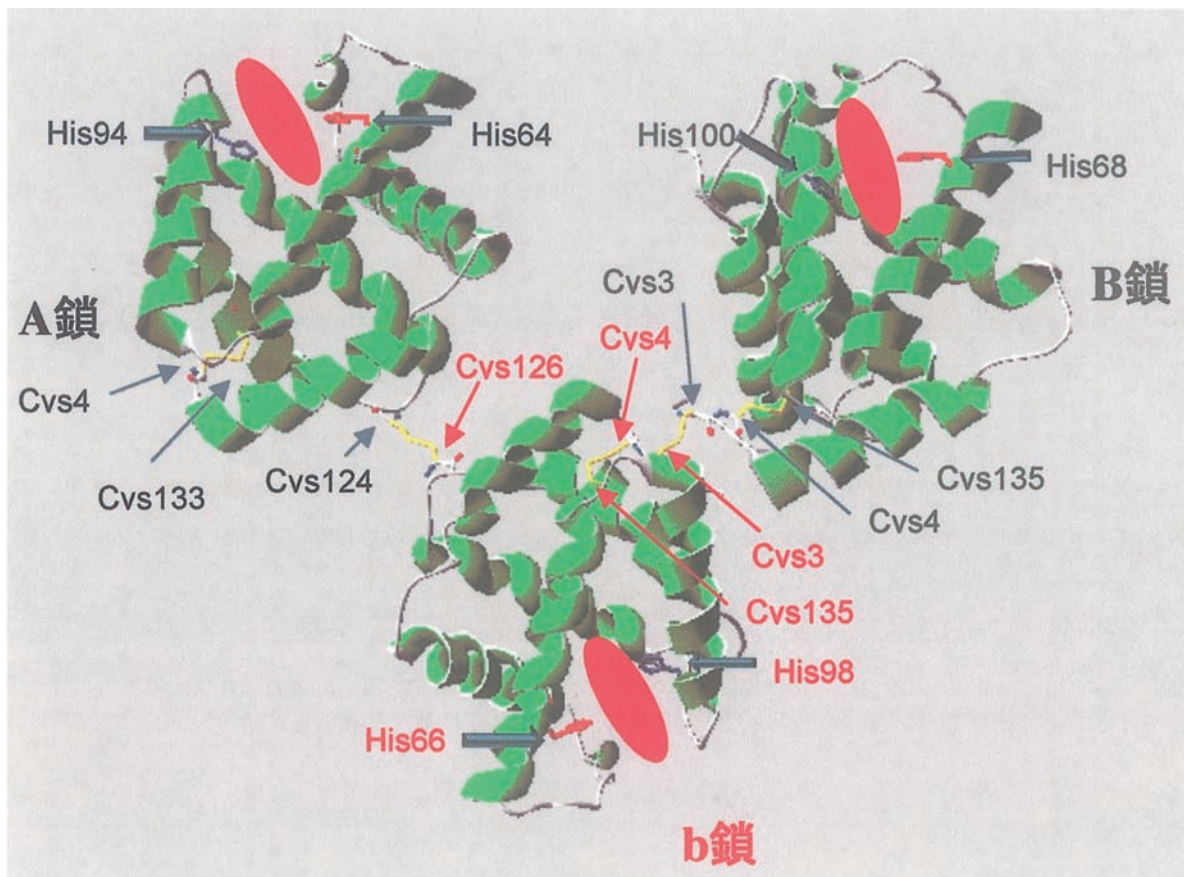


図5-6 *Perinereis* Hb 三量体の四次構造のモデル 構造モデルのTemplate は *Lumbricus* Hb [16]および *Riftia Pacyotula* Hb [17]を用い、Swiss Model (Swiss Institute of Bioinformatics (SIB))により作成した。得られた構造モデルを分子グラフィック・プログラム Swiss Pdb Viewer Ver 4.0 (SIB) により表示した。緑色のラセン構造は予測される $\alpha$ -ヘリックス構造。線状の部分はランダムコイル。赤色の楕円体はヘムプレート。黄色の部分がSS架橋で、各鎖内に1箇所ずつ、鎖間に2箇所、計5箇所ある。4残基のCysをもつb鎖が中央に位置して三量体(A-b-B)を形成している。近位のHisと遠位のHisは、それぞれ、赤と青で示した。

### グロビン鎖の分子系統樹上のCys残基の変遷

*Perinereis* のグロビン鎖は2~4のCys残基をもつが(図5-5)、最大4カ所あるCys残基のサイトが、他の環形動物のグロビンと比較して、それぞれどのような位置付けにあるのかを調べた。図6-1は環形動物に由来するグロビン鎖のアラインメントを示している。全体を見渡すと、Cys残基は6カ所に認められ、Cys残基の数が最も多いグロビン鎖はこのうち5つの

Cys残基を含んでいる。アラインメントには、*Perinereis*[10], *Tylorrhynchus* [2-5], *Lumbricus* [18-20], *Tubifex* [21], *Pheretima* [22, 23], *Sabellastarte* [24], *Sabella* [25], *Eudistylia* [26], *Lamellibrachia*. [27], *Riftia* [28], *Oligobrachia* [29]等のアミノ酸配列を用いた。対照として、人Hbの $\alpha$ 鎖[30]、 $\beta$ 鎖 [31]、マッコウクジラのみオグロビン(Mb) [32]、環形動物多毛類 *Glycera* [33]の細胞内Hbを用いた。なお、図中では慣例に従い、学名を



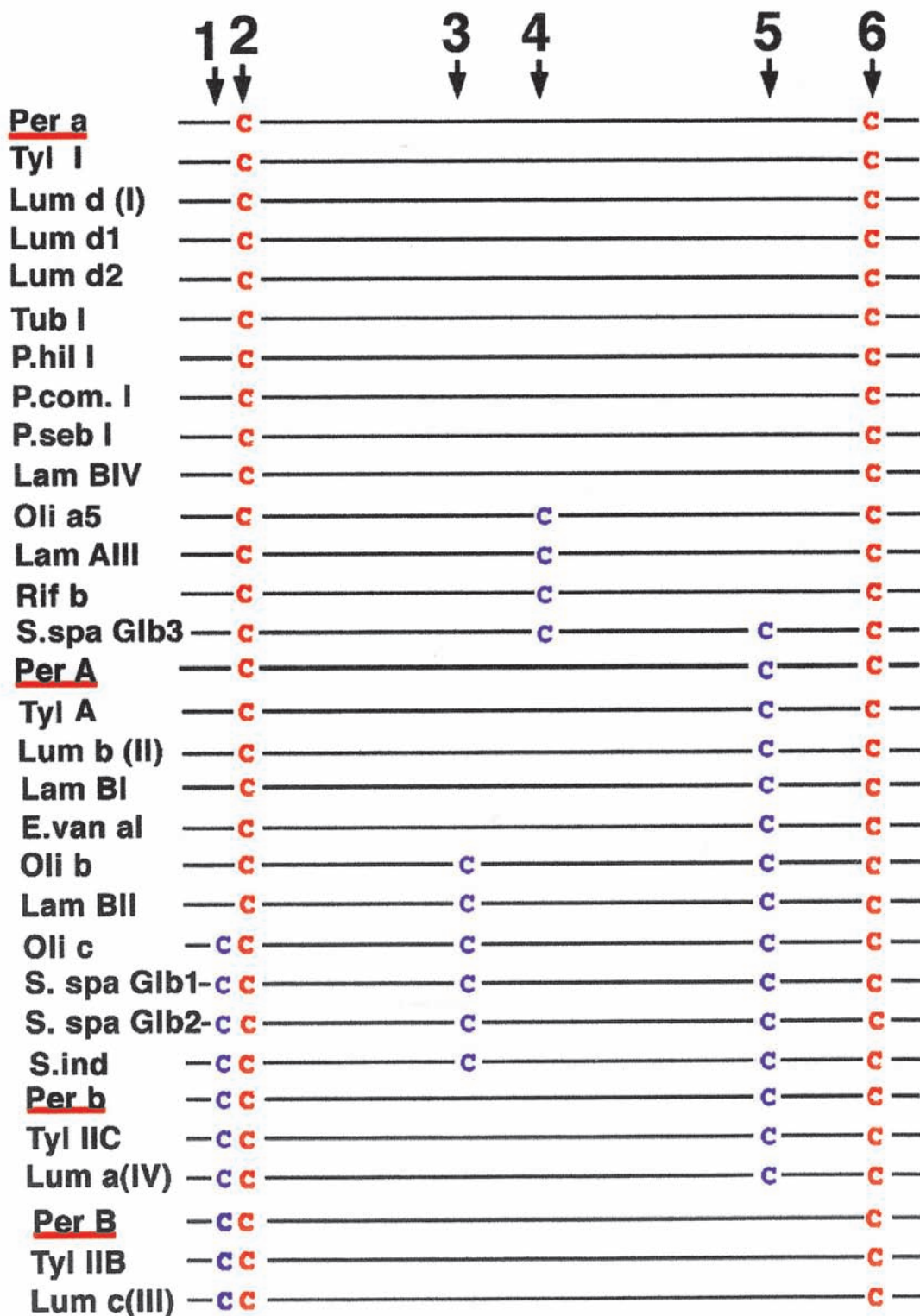


図6-2a Cys 残基のサイトを強調した環形動物グロビン鎖のアラインメント  
各配列は図6-1から適宜選択した。学名は適宜省略型で表記した。赤のアンダーラインを付した配列は *Perineres* Hb。



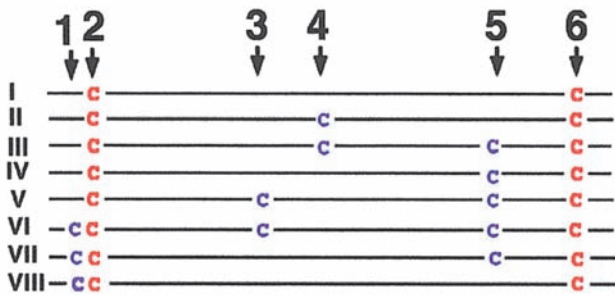


図6-2b Cys 残基サイトの8つのパターン  
Cys 残基の配置をグロビンのアラインメントを基礎に8つのパターンI~VIIIに整理した。

略記した。図6-1は見にくいので、図6-2aにCys残基のみを残して、模式的に表した。Cys残基が存在するサイトに便宜的に1から6まで番号を付けた。*Perinereis* Cys残基Hbで最も多い4残基のCysをもつb鎖はサイト1, 2, 5, 6にCys残基が位置しており、内部のサイト4と5にはない。サイト1, 2, 5, 6のCys残基はすべてSS結合に関与していることから、他のグロビン鎖でもその可能性が高い。一方で、サイト3と4のCys残基はフリーのSH基をもつ可能性が高い。ハオリムシの2種*Lamellibrachia* [27]、*Riftia* [28]とマヒコヒゲムシ*Oligobrachia* [29]は熱水噴出口の近くに棲み、そのHbは硫化水素を共生細菌に運んでいるが、それらのHbはサイト3と4に位置するグロビンを含んでいることが注目される。

*Sabellastarte* [24]や*Sabella* [25]から抽出される赤緑色のHb、エリスロクルオリンにもサイト3あるいは4にCys残基をもつグロビン鎖が含まれている。エリスロクルオリンが硫化水素を運搬することは知られていないが、その可能性もあるかもしれない。何れにしても、硫化水素を運搬するHbとエリスロクルオリンの相同性が高いことは注目に値する。

図6-2bは図6-2aを各パターン毎に整理したものである。Cys残基の配置が8つのパターンに分類される。*Perinereis*の4種のグロビン鎖は、パターンI、IV、VII、VIIIに属している。

これは、よく研究されたイトメ *Tylorrhynchus* [2-5] やツリミズ *Lumbricus* [16-18]のグロビンのパターンと同じである。これに対して、パターンIIに属するのは、*Lamellibrachia* AIII [27]、*Riftia* b [28]、*Oligobrachia* BIV [29]の3種のグロビン鎖で、何れも熱水噴出口付近に棲息する虫に含まれる巨大Hbに属している。これらのグロビン鎖と同様に*Sabella* [25]のグロビン3はサイト4にCys残基をもつが、サイト5にもCys残基が存在するので、唯一パターンIIIに収まっている。これはこれらの4種のHbが近縁であることを示唆しているように思われる。図6-2aと2bを対比しながら詳細に検討すると、熱水噴出口付近に棲息する虫が保有するHbとエリスロクルオリンの類似性が多々認められる。もうひとつだけ挙げれば、サイト3にCys残基をもつグロビン鎖は6つ報告されているが、それらはすべて熱水噴出口付近に棲息する虫が保有するHbとエリスロクルオリンに限られている。また、これらのグロビンはCys残基の配置パターンがVとVIに分類されるが、*Oligobrachia* [29]のグロビン鎖はその両方にまたがって収まっている。

一方で、Cys残基の配置がパターンIに属する*Perinereis* aと同じカテゴリーに収まるグロビン鎖BIVが*Lamellibrachia*のHb [27]にも含まれている。同様に、*Perinereis* A鎖と*Lamellibrachia* BI [25]はパターンIVに収まっている。しかし、A系統に属するグロビン鎖とは対照的に、*Perinereis* b鎖とB鎖と同じCys残基の配置パターンに属するグロビン鎖は*Lamellibrachia*のHb [27]には含まれていない。*Lamellibrachia*のグロビン鎖AIIIとBII [27]はそれぞれサイト4と3にCys残基をもつからである。これらのグロビン鎖が分子系統樹においてB系統に属するかどうか興味のあるところである。

図6-1のアラインメントに従って、グロビン鎖の分子系統樹を作成した(図6-3)。系統樹にCys残基の数とその配置パターンを付して、系統樹とそれらとの相関を検討した。我々は既に環形動物の巨大HbにはA系統とB系統があることを示しているが[1,10]、この2系統は脊椎動物のαファミリーとβファミリーとも無関係である。図6-1からも明らかなように、巨大な細胞外Hb

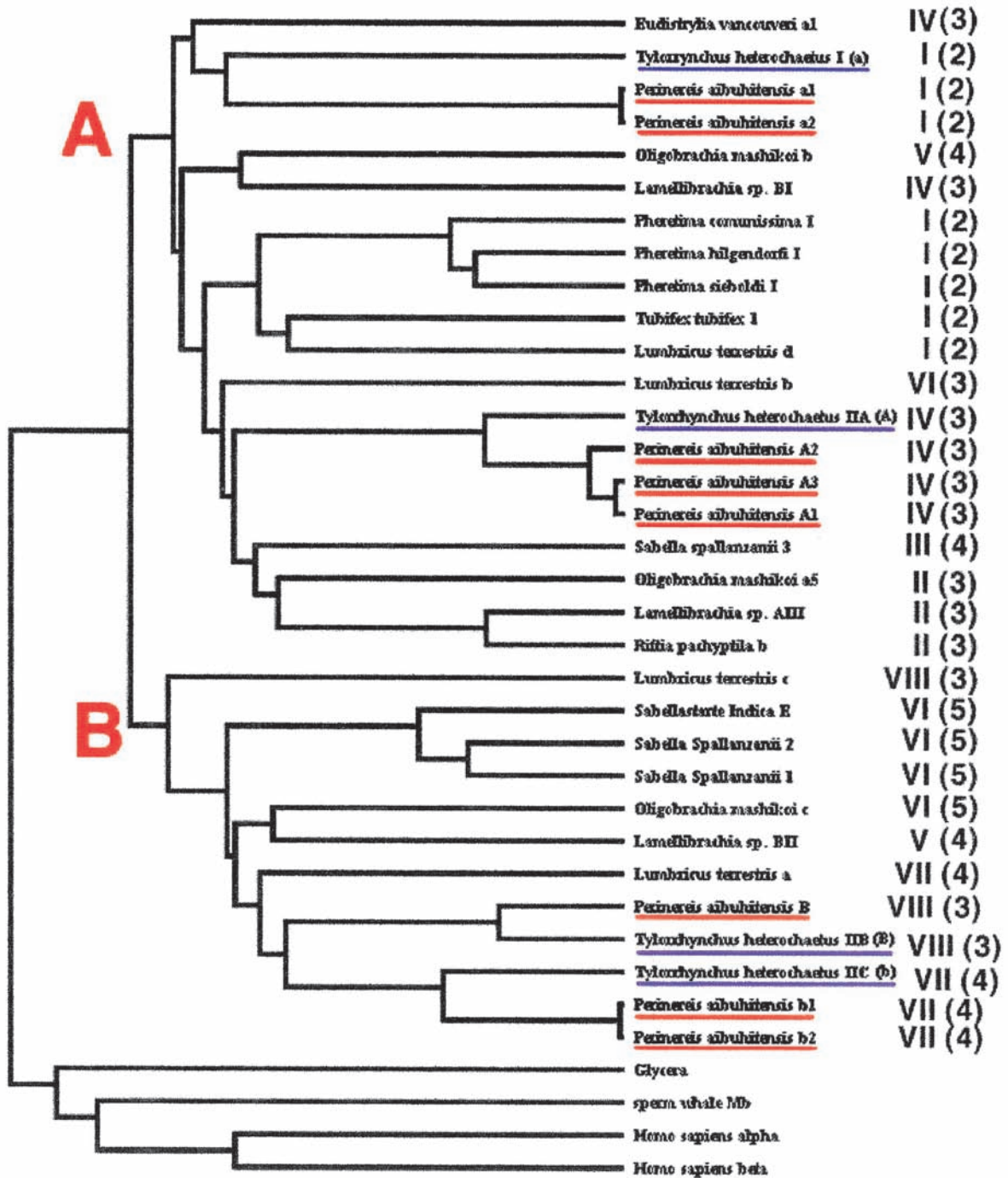


図6-3 グロビン鎖の分子系統樹と Cys 残基数および配置パターン 図6-1のアラインメントに基づいて系統樹を作成した。図の右端に Cys 残基の配置パターン(図6-2)とカッコ内に Cys 残基の数を示した。分岐点に赤字で付した A, B はそれぞれ A 系統と B 系統を示す [1]。下段の分岐はヒト Hb やマッコウクジラ Mb を含む。

の A 系統と B 系統は、脊椎動物の Hb と Mb が分岐する以前に既に分岐している。細胞外 Hb の A 系統と B 系統は、脊椎動物の Hb と Mb が分岐する以前に既に分岐している。また、A 系統と B 系統は環形動物の細胞内 Hb と異なるファミリーに属している。図 6-3 に含めた多毛類 *Glycera* のグロビンは細胞内 Hb である。

図 6-3 から明らかのように、系統 A に属するグロビン鎖は Cys の配置が I, II, III, IV, V の 5 つのパターンである。一方、B 系統に属するのは V, VI, VII, VIII の 4 パターンである。Cys の配置がサイト 4 にあるパターン II と III はすべて A 系統に属し、Cys の配置がサイト 3 に属するパターン V と VI のうちパターン VI はすべて系統 B に属している。一方、*Oligobranchia* b [29] と *Lamellibrachia* BII [27] の 2 つのグロビンはパターン V に属するが、これら 2 つの鎖は A 系統と B 系統に分かれている。何れも熱水噴出口付近に棲息する動物から抽出された Hb の構成鎖である。先に、*Lamellibrachia* のグロビン鎖 AIII と BII [27] はそれぞれサイト 4 と 3 に Cys 残基をもつので、*Perinereis* b 鎖および B 鎖と同じ Cys 残基の配置パターンに属するグロビン鎖は *Lamellibrachia* の Hb [27] には含まれていないことを指摘した。改めて系統樹の上で、これらの点を吟味してみると、*Lamellibrachia* のグロビン鎖 AIII [25] は A 系統に属し、BII [27] は B 系統に含まれていることが確認できる。

ここまで、ペプチド内における Cys 残基の配置パターンと系統樹の関係を動物の生活環境との関係も含めて若干分析したが、系統樹の上では、総じて貧毛類は貧毛類同士、多毛類は多毛類同士で同じ枝でグループを形成する傾向を認めることができる。これは、熱水噴出口付近に棲息する *Lamellibrachia* と *Oligobranchia* 同士や、異なるなる虫に含まれる複数のクルロクルオリンでも同様である。しかし、そうしたグループ化が必ずしも固定されたものではなく、微妙に崩れていることも事実である。

最後に、美しい六角二層の構造を示す巨大 Hb のグロビン鎖の命名法について言及したい。かつて、Gotoh & Suzuki [1, 34] は多毛類と貧毛類

の Hb グロビン鎖に共通する命名法を提案した。そこでは、A 系統に属する 2 鎖のうち、Cys 残基を 2 つもち、分子内で単量体鎖として存在するグロビンを a 鎖、Cys 残基を 3 つもち、三量体に組み込まれているもうひとつを A 鎖とした。また、B 系統に属する 2 種類のグロビンのうち、Cys 残基を 4 つもち、三量体鎖の中心に位置するものを b 鎖とし、Cys 残基を 3 つもつ他方を B 鎖と名づけた。この命名法は現在でも多毛類と貧毛類の Hb には一般的に広く当てはまると思われるが、深海の熱水噴出口に棲むハオリムシの Hb や多毛類がもつクロロクルオリンにまで適応することはできない。我々の命名法にコメントを寄せた Riggs [34] は、「自然の造形は予測を越えた多様性を含んでおり、一般化されたグロビンの命名法を確立することは容易でない」と指摘している。長大な DNA 上に並ぶ各グロビン鎖の位置が多種の環形動物巨大 Hb のグロビン鎖間で比較できるようになれば、はじめて命名法も確立するのもかも知れない。

#### 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. 文献

1. Gotoh T. and Suzuki T. Molecular assembly and evolution of multi-subunit extracellular hemoglobins. *Zool. Science*. **7**, 1-16 (1990).
2. Suzuki, T., Takagi, T., and Gotoh, T. Amino acid sequence of the smallest polypeptide chain containing heme of extracellular hemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus*. *Biochim. Biophys. Acta* **708**, 253-258 (1982).
3. 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).

4. 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).
5. Suzuki T. and Gotoh T. (1986) The complete amino acid sequence of giant multisubunit hemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus* *J. Biol. Chem.* **261**: 9257 – 9267 (1985).
6. Suzuki T., Takagi T. and Gotoh T. Primary structure of two linker chains of the extracellular hemoglobin from the polychaete *Tylorrhynchus heterochaetus* *J. Biol. Chem.*; **265**: 12168 – 12177 (1990).
7. Arp, A.J. and Childress, J.J. Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm *Ritita pachyptila*. *Science*, **219**, 295-297 (1983).
8. Zal, F., Bailly, ., Gotoh, T., Lallier, F.H., Toulomnd, A. and Childress, J.J. Free cysteine residues: active sites for "new" function in worm hemoglobins, sulfide carrying and/or trapping. XIIth International Conference on Invertebrate O<sub>2</sub> Binding Proteins. pp 20-21. Roscoff, France, July, 24-28, 2000.
9. Braunitzer, G., Gehring-Muller, R. Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V. and Wittmann-Liebold, B. The constitution of normal adult haemoglobin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **325**, 283-286 (1961).
10. 山中瑞恵、脇加奈子、尾崎絵里香、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、真壁和裕、大橋眞、後藤寿夫 Comparative study on the primary structure of globin chains of extracellular giant hemoglobins from the polychaete *Perinereis aibuhitensis* and *Tylorrhynchus heterochaetus* 徳島大学自然科学研究、第 19 卷、63-92 (2005).
11. Tsuneshige, A., Imai, K., Tyuma, I., and Gotoh, T. Sotometric, electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies on the hemoglobin from the marine polychaete *Perinereis aibuhitensis* (Grube): comparative physiology of hemoglobin. *J. Biochem.* (Tokyo). **106**, 406-417 (1989).
12. Drabkin, D.L. The distribution of the chromoproteins, hemoglobin, myoglobin, and cytochrome c. in the tissues of the different species, and the relationship of the total content of each chromoprotein to body mass. *J. Biol. Chem.*, **182**, 317-333 (1950).
13. Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Fujimoto, E.K., Goetze, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. Measurement of protein using biocinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85 (1985).
14. Ornstein, L., Disc electrophoresis. I. Background and theory. *New York Acad. Sci.* **121**, Art 2, 231-249 (1964).
15. DNA Data Bank of Japan home Page : <http://www.ddbj.nig.ac.jp>. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal compute.
16. Strand, K., Knapp, J.E., Bhyravbhatla, B., Royer Jr., W.E., Crystal structure of the hemoglobin dodecamer from lumbricus erythrocytes: allosteric core of giant annelid respiratory complexes. *J. Mol. Biol.*, **344**, 119 - 134 (2004).
17. Flores, J.F., Fisher, C.R., Carney, S.L., Green, B.N., Freytag, J.K., Schaeffer, S.W., Royer Jr, W.E. Sulfide binding is mediated by zinc ions discovered in the crystal structure of a hydrothermal vent tubeworm hemoglobin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2713 – 2718 (2005).
18. Shihikura, F., Snow, J.W., Gotoh, T., Vinogradov, S.N., Walz, D.A. Amino acid sequence of the monomer subunit of the extracellular hemoglobin of *Lumbricus terrestris*. *J. Biol. Chem.*, **262**, 3123-3131 (1987).
19. Fushitani, K., Matsuura, M.S.A., Riggs, A.F. The amino acid sequences of chains a, b, and c that form the trimer subunit of the extracellular hemoglobin from *Lumbricus terrestris* *J. Biol. Chem.*, **263**, 6502-6517 (1988).
20. Zhiang, S.M., and Riggs, A.F. The structure of the

- gene encoding chain c of the hemoglobin of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 19003-19008 (1989).
21. Stern, M.S., Vinogradov, S.N., Sharma, P.K., Ereifej, K., Walz, D.A. Amino acid sequence of the monomer subunit of the giant extracellular hemoglobin of the aquatic oligochaete, *Tubifex tubifex*. *Eur. J. Biochem.*, **194**, 67-73 (1990).
  22. Suzuki, T. Amino acid sequence of the monomer subunit of the giant multisubunit hemoglobin from the earthworm *Pheretima sieboldi*. *Eur. J. Biochem.*, **185**, 127-134 (1989).
  23. Shishikura, F. Amino acid sequence of the monomer subunit of the extracellular hemoglobin of the earthworm *Pheretima hilgendorfi*. *Zoological Science* **13**, 551-558 (1996).
  24. Suzuki, T., Hirao, Y., Vinogradov, S.N. Primary structure of a constituent polypeptide chain of the chlorocruorin from *Sabellastarte indica*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1252**, 189-193 (1995).
  25. Pallavicini, A., Negrisolo, E., Barbato, R., Dewilde, S., Ghiretti-Magaldi, A., Moens, L., Lanfranchi, G. The primary structure of globin and linker chains from the chlorocruorin of the polychaete *Sabella spallanzanii*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 26384-26390 (2001).
  26. Dewilde, S., Van Hauwaert, M.L., Vinogradov, S., Vierstraete, A., Vanfleteren, J., Moens, L. Protein and gene structure of a chlorocruorin chain of *Eudistylia vancouverii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 18-24 (2001).
  27. Suzuki, T., Takagi, T., Ohta, S. Primary structure of a constituent polypeptide chain (AIII) of the giant haemoglobin from the deep-sea tube worm *Lamellibrachia*. A possible H<sub>2</sub>S-binding site. *Biochem. J.*, **266**, 221-225 (1990).
  28. Zal, F., Suzuki, T., Kawasaki, Y., Childress, J.J., Lallier, F.H., and Toulmond, A. Primary structure of the common polypeptide chain b from the multihemoglobin system of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. An insight on the sulfide binding-site. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **29**, 562-574 (1997).
  29. Yuasa, H.J., Green, B.N., Takagi, T., Suzuki, N., Vinogradov, S.N., Suzuki, T. Electrospray ionization mass spectrometric composition of the 400 kDa hemoglobin from the pogonophoran *Oligobrachia mashikoi* and the primary structures of three major globin chains. *Biochim. Biophys. Acta*, **1296**, 235-244 (1996).
  30. Konigsberg, W. and Hill, R.J. The structure of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **237**, 3157-3162 (1962).
  31. Braunitzer, G., Gehring-Mueller, R., Hilschmann, N., Hilse, K., Hobom, G., Rudloff, V., Wittmann-Liebold, B. Die konstitution des normalen adulten human hamoglobins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **325**, 283-286 (1961).
  32. Herrera, A.E.R. and Lehmann, H. Residue 122 of sperm whale and horse myoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 318-323 (1974).
  33. Teske, J.G., Edmonds, C.G., Deckert, G., Satterlee, J.D. Structural features of *Glycera dibranchiata* monomer hemoglobins. Primary sequences of monomer hemoglobin components II and III. *J. Protein Chem.*, **16**, 139-150 (1997).
  34. Gotoh, T., Suzuki, T. and Takagi, T. Nomenclature of the major constituent chains common to annelid extracellular hemoglobins. *Structure and Function of Invertebrate Oxygen Carriers*. Eds. by Vinogradov, S.N. and Kapp, O.H., Springer-Verlag pp.279-283 (1991).