

## 原生動物および酵母ヘモグロビンの分子構造に関する研究

著者	岩浅 央
号	1277
発行年	1992
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/25248">http://hdl.handle.net/10097/25248</a>

氏名・(本籍)	いわ 岩	あさ 浅	ひさし 央
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	理博第1277号		
学位授与年月日	平成4年3月27日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻		
学位論文題目	原生動物および酵母ヘモグロビンの分子構造に関する研究		
論文審査委員	(主査)		
	教 授 四 釜 慶 治	教 授 竹 内 拓 司	助 教 授 井 出 宏 之

## 論 文 目 次

### 第1章 緒論

#### 第2章 原生動物のヘモグロビン：その特異な一次構造

##### 第1節 序論

##### 第2節 材料と方法

##### 第3節 結果

##### 第4節 考察

#### 第3章 酵母ヘモグロビン：二つの機能単位を有する特異な分子構造

##### 第1節 序論

##### 第2節 材料と方法

##### 第3節 結果

##### 第4節 考察

#### 第4章 総合考察と要約

#### 謝辞

引用文献

図表

Appendix : Data of the Sequenced Hemoglobins and Myoglobins

参考論文

# 論文内容要旨

## 第1章 緒論

ヘモグロビンやミオグロビンは、主として脊椎動物の血液（赤血球）や骨格筋・心筋などに存在するヘムタンパク質である。いずれも分子状の酸素を可逆的に結合することによって酸素の運搬や貯蔵に与り、生体内の好氣的代謝の維持に重要な役割を果たしている。一方、下等真核生物である原生動物や酵母などにも類似のヘムタンパク質を持つものが知られるようになり、それらの構造と機能およびグロビン族分子の起源の問題などに大きな関心が集まっている。

そこで本研究では、これら下等真核生物に見られるヘモグロビン分子の構造を解明する目的で、まず、第2章においては原生動物のゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) と2種のテトラヒメナ (*Tetrahymena pyriformis*, *T. thermophila*) について、また第3章では酵母 (*Candida norvegensis*) についてそれぞれヘモグロビンを単離精製し、タンパク質のアミノ酸配列分析とcDNAの塩基配列との解析から全一次構造の決定を試みた。また終章では、本研究で明らかとなった新知見をふまえ、グロビン族タンパク質が酸素運搬体として機能するために、どのような分子構造を必要としているのか、またその構造を進化の過程でどのようにして獲得して来たのかなどについて二、三の考察を行った。

## 第2章 原生動物のヘモグロビン：その特異な一次構造

### 〈第1節 序論〉

原生動物に見られるヘモグロビン様タンパク質に関しては、主として *Paramecium* 属の二、三種から単離精製が試みられて、部分的な性質が調べられてきた。しかし、その構造については、ほとんど解析が成されておらず、結合酸素の安定性等の生理的な性質に関しても不明の点が多い。

そこで本章では、ゾウリムシおよび2種のテトラヒメナからヘモグロビンを単離精製し、一次構造の決定を試みた。さらに、それらの構造を他の生物のグロビン族タンパク質と比較検討し、原生動物ヘモグロビンの構造的特徴を探ってみた。

### 〈第2節 材料と方法〉

まず、ゾウリムシ (*P. caudatum*, syngen 3, stock StG1) およびテトラヒメナ (*T. pyriformis*, *T. thermophila*) を大量に培養して細胞を集める。これを homogenize した後に、硫酸分画、疎水クロマトグラフィー、ゲル濾過、およびイオン交換クロマトグラフィーによってヘモグロビンを単離精製した。次に、得られたヘモグロビンは各種の酵素と CNBr によって断片化して、逆相系 HPLC によってペプチドを分離し、エドマン法によってアミノ酸配列を決定した。

### 〈第3節 結果〉

#### [A] *Paramecium caudatum* ヘモグロビンについて

単離精製したヘモグロビンを、まず lysyl endopeptidase で消化し、得られた3本のペプチド

についてアミノ酸配列を決定した。次に、全体を trypsin, V8 protease, CNBr などによって断片化したペプチドを用いて、全体のオーバーラップを取り、全一次構造を決定した。

#### [B] *Tetrahymena pyriformis* ヘモグロビンについて

*T. pyriformis* のヘモグロビンは、CM-cellulose カラム上で4つの fraction (I a, I b, II a, II b) に分離した。各 fraction の吸収スペクトルと N 末端のアミノ酸配列から、I a と I b は同一タンパク質 (I) のオキシ型とメト型であり、II a と II b は他のタンパク種 (II) のオキシ型とメト型であると結論された。そこで、I と II について、その全一次構造を決定した。その結果、II のアミノ酸配列は、I の N 末端から3番目の Lys 以降 C 末端までのそれと完全に同じであった。このことから、II は I の分解産物であって、*T. pyriformis* のヘモグロビンは成分 I からなるものと考えられた。

#### [C] *Tetrahymena thermophila* ヘモグロビンについて

*T. thermophila* のヘモグロビンを CM-cellulose カラムにかけると、その大部分が2つの fraction (I a, I b) に集中し、その後2つの minor fraction (II a, II b) が現れるが、これら4つの fraction の関係は、*T. pyriformis* ヘモグロビンの場合と同様に考えられた。そこで I a について、全体を trypsin, endoproteinase Asp-N あるいは CNBr によって断片化し、得られたペプチドを用いて全一次構造を決定した。

#### 〈第4節 考察〉

ゾウリムシのヘモグロビンは116個、テトラヒメナのヘモグロビンは、両種ともに121個のアミノ酸残基から成り、いずれも単量体で存在していることが明らかとなった。また、これらのヘモグロビンは、今までに知られている他のいかなるグロビン族タンパク質と比べても20~30残基は短いことがわかった。例えば、同じく単量体で機能している哺乳動物のミオグロビン分子は、153個のアミノ酸残基から出来ている。

一方、これら原生動物のヘモグロビン分子間では、その一次構造に比較的高い相同性が見られるものの、他の生物種のグロビン族タンパク質との相同性は極めて低い。また、hydrophathy profile の形状から考えると、原生動物のヘモグロビンでは C-ヘリックスから D-ヘリックスに相当する部分が欠損している可能性が示唆されるが、ヘムを結合する近位ヒスチジンと CD1 位のフェニルアラニンは共によく保存されていると考えられる。一方、結合酸素の安定性に大きな影響を与える遠位ヒスチジンの位置については、グルタミンで置換されている可能性が示された。しかし、一次構造のデータだけで直ちに断定することは困難であり、結合酸素の安定性の速度論的解析や種々の分光学的検証が必要と思われる。

### 第3章 酵母ヘモグロビン：二つの機能単位を有する特異な分子構造

#### 〈第1節 序論〉

*Saccharomyces* や *Candida* などのいわゆる酵母と呼ばれる単細胞性真菌類の一部にも、ヘモグロビン様のタンパク質の存在が報告されている。例えば、カンジタ酵母の一種 *C. norvegensis*

のヘモグロビンについては、分子量が約50,000の単量体で、その中にはヘムとFADをそれぞれ1モルずつ含有していることなどがわかっている。これらのことから考えて、酵母のヘモグロビンはその分子内に自前の還元系を持つものと推定されているが、その詳細な分子構造は明らかではない。

そこで本章では、酵母からヘモグロビンを単離精製し、タンパク質のアミノ酸配列分析とcDNAの塩基配列の解析とから、その全一次構造の決定を試みた。その結果、酵母のヘモグロビン分子は酸素結合部分と還元酵素に相当する部分とが融合したものであることがわかり、その進化的意義についても考察した。

### 〈第2節 材料と方法〉

まず、酵母 (*C. norvegensis*, IFO-0734) を大量に培養して細胞を集め、液体窒素で凍結融解を繰り返すことによって細胞を破砕する。次に硫酸分画を行い、続いてButyl-トヨパール、Sephadex G-75、DEAE-celluloseの各カラムにかけてヘモグロビンを精製した。得られたヘモグロビンを酵素によって断片化して各ペプチドのアミノ酸配列を決定する一方、細胞からpoly (A)<sup>+</sup> RNAを抽出し、PCR法でヘモグロビンのcDNAをクローニングして、その塩基配列を決定した。

### 〈第3節 結果〉

まず、ヘモグロビンをlysyl endopeptidaseで消化し、得られた25本のペプチドについてアミノ酸配列を決定した。次にV8 proteaseで再度断片化したペプチドを用いて全体のオーバーラップを取った。しかし、全一次構造の決定には到らなかったため、ヘモグロビンのcDNAを取り、その塩基配列を解析することにした。

まず先に決定したペプチドのアミノ酸配列に基づいてプライマーを合成し、PCR法によってcDNAの中央部分を増幅した。これをプラスミドに組み込んでサブクローニングを行い、DNAの塩基配列を解析した。続いて5'末端領域と3'末端領域の増幅をrapid amplification of cDNA ends (RACE) 法によって行い、得られた産物をサブクローニングして、塩基配列を決定した。このようにして5'非翻訳領域の10塩基およびpoly Aまでの3'非翻訳領域85塩基を含む酵母ヘモグロビンcDNAの全塩基配列を決定することができた。この塩基配列から求められるアミノ酸配列には、先に決定した全ペプチドが含まれており、かつタンパク質から直接決定された配列と完全に一致していた。

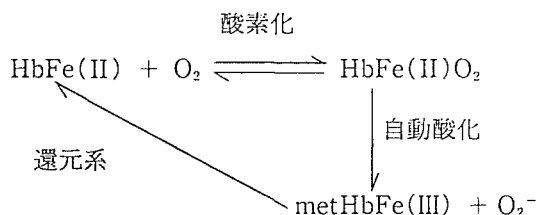
### 〈第4節 考察〉

カンジタ酵母 *C. norvegensis* のヘモグロビンは387個のアミノ酸残基から成る1本のポリペプチド鎖で、そのうち11番目から155番目までのN末側領域は、滑走細菌 *Vitreoscilla* のヘモグロビンと39%もの相同性を示した。また、この領域で、近位ヒスチジンとCD1-フェニルアラニンがよく保存されているものの、遠位ヒスチジンの位置はグルタミンによって置換されているものと考えられる。一方、156番目以降のC末側領域には、ヒト赤血球中のメトヘモグロビン還元酵素、すなわちNADH-チトクロム b<sub>5</sub>還元酵素との相同性が認められた。これらのことか

ら、酵母のヘモグロビンは酸素結合を担うグロビン部分を N 末端領域に、補酵素 FAD を有する還元系に相当する部分を C 末端領域に持つ特異な分子構造を取っていることが初めて明らかとなった。

#### 第 4 章 総合考察と要約

ヘモグロビンやミオグロビンが分子状酸素を可逆的に結合できるのは、そのヘム鉄の原子価が 2 価の状態のときである。しかし、酸素を結合したオキシ型のヘモグロビンやミオグロビンは、結合酸素によって容易に酸化され、ヘム鉄の原子価が 3 価の状態のメト型と成り、酸素結合能を失ってしまう（この反応を自動酸化反応という）。ところが、哺乳類の赤血球や筋肉中では、ここで生成したメト型のヘム鉄を再び 2 価の状態に戻してやる還元系が存在する。以上の関係を鉄の原子価に注目して書き表すと次のようになる。



このように生体内でのヘモグロビンやミオグロビンは、酸素化－酸化－還元のコイルを繰り返しながら、各々の機能をダイナミックに発現しているものと考えられる。

最近、*P. caudatum* のヘモグロビン分子については、自動酸化速度が測定され、その pH 依存曲線の形は、マッコウクジラミオグロビンの場合と良く似た形状となることが報告されている。すなわち、ゾウリムシのヘモグロビンは、他の生物種のグロビン族タンパク質と比較して極端に短く、かつアミノ酸配列にもほとんど相同性をもたないにもかかわらず、結合酸素の安定化機構自体は哺乳動物のミオグロビンのものと良く似ていると考えられる。しかしその一方で、ゾウリムシのオキシヘモグロビンは、全 pH 領域においてマッコウクジラのオキシミオグロビンよりも不安定で自動酸化しやすいことも事実である。従って、このような原生動物のヘモグロビンが細胞内でその機能を維持するためには、上記のような還元系の存在が必須と考えられる。

一方、酵母のヘモグロビンでは、分子内に自前の還元系を持つことが一次構造上からも示唆され、上記の酸素化－酸化－還元のコイルを同一分子内で完結しているものと考えられる。しかし、このような分子構造を取るヘモグロビン分子は他の生物種にはほとんど見られない。恐らく、酵母のヘモグロビンでは、オキシ型の分子種が非常に不安定で自動酸化し易いため、それを補うべく自前の還元系を分子内に備えることとなった可能性も考えられる。

このように原生動物と酵母のヘモグロビンは、同じ単細胞生物のグロビンでありながら、その分子構造はもとより、細胞内での動態についても大きく異なっている。さらに生物界全体を眺めてみても、これら下等真核生物に見られるヘモグロビン分子の構造は、他の生物種のもの

と大きく異なっている。従って、グロビン族タンパク質が、酸素分子を可逆的に結合するという同じ生理機能を発現するために獲得してきた分子構造は、かなり多様性に富んでいるものと考えられる。



## 論文審査の結果の要旨

岩浅 央提出の論文は、原生動物および酵母などに見られるヘモグロビン分子が極めて特異な構造を取っていることを、主としてタンパク質部分のアミノ酸配列順序の解析から明らかにすることを目的としたものである。

一般にヘモグロビンは、脊椎動物の血液中に存在し、分子状酸素の運搬体として重要な役割を果たしているが、これと類似のヘムタンパク質を持つものが原生動物や酵母などで知られるようになり、それらの構造と機能、さらにはヘモグロビン分子の起源などをめぐって、興味ある諸問題が提起されている。

そこで本論文では、まず原生動物のゾウリムシ (*P. caudatum*) とテトラヒメナの2種 (*T. pyriformis*, *T. thermophila*)、およびカンジダ酵母菌 (*Candida norvegensis*) を大量に培養して細胞を集め、ヘモグロビンを単離精製した。そして、アミノ酸の配列順序と cDNA の塩基配列とから、各タンパク質の全一次構造を決定している。その結果、ゾウリムシのヘモグロビンは116個、テトラヒメナのヘモグロビンは、両種ともに121個のアミノ酸残基から成り、いずれも単量体で存在していることが明らかとなった。また、これらのヘモグロビン分子は、今までに知られている他のいかなるグロビン族タンパク質とも相同性が認められず、かつ20~30残基短いことも分かった。

一方、カンジダ酵母のヘモグロビンは、387個のアミノ酸残基から成る1本のポリペプチド鎖で、そのうち11番目から155番目までのN末側領域は、滑走細菌 (*Vitreoscilla*) のヘモグロビンと39%もの相同性を示した。また、この領域では、近位ヒスチジンとCDIフェニルアラニンはよく保存されているものの、遠位ヒスチジンの位置はグルタミンによって置換されているものと考えられた。一方、156番目以降のC末側領域では、ヒト赤血球中のメトヘモグロビン還元酵素との相同性が認められた。これらのことから、酵母のヘモグロビンは、酸素を結合するグロビン部分をN末端領域に、補酵素FADを有し還元酵素に相当する部分をC末端領域に持つ極めて特異な分子構造を取っていることが初めて明らかとなった。

最後に本研究で得られた新しい知見をふまえ、グロビン族タンパク質が酸素運搬体として機能するためには、どのような分子構造を必要としているのか、またその構造を進化の過程でどのようにして獲得してきたのかなどについても考察を行なっている。

以上、本論文は、本人が自立して研究活動を行なうのに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。

よって、岩浅 央提出の論文は博士(理学)の学位論文として合格と認める。