

## カワヤツメヘモグロビンの生化学的研究

北村裕美\* , 中山亨\*\* , 毎田徹夫\*\* , 矢沢洋一\*

\*北海道教育大学大学院理科教育

\*\*長崎大学医学部生化学

## Purification and Properties of Lamprey Hemoglobin

Hiromi KITAMURA \* , Toru NAKAYAMA \*\* , Tetsuo MAITA \*\* , Yoichi YAZAWA \*

\* Division of Chemistry, Graduate School of Science, Hokkaido University of  
Education, Asahikawa, 070-8621 Japan

\*\* Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Nagasaki University,  
Nagasaki, 852-8521 Japan

### ABSTRACT

The predominant hemoglobin (Hb) component was purified from river lamprey *Lampetra japonica* using DEAE-Toyopearl column chromatography. At least five types of Hbs were observed. The most major component, named HbI, was contained 78.13% of total Hb.

The amino acid sequence of HbI was determined by Edman method. HbI consisted of 149 amino acid residues and its molecular weight was calculated to be 16,524Da. The amino acid sequence of HbI was the same as that of other species of river lamprey *Lampetra fluviatilis*. Comparing the amino acid sequences of the HbI and sea lamprey *Petromyzon marinus* HbV, 4 residues were substituted, respectively. The HbI has an extension of 8 residues at the N-terminal region and deletion at GH loop comparing with human Hb chain or chain.

### はじめに

ヤツメウナギ (lamprey) は、メクラウナギ (hagfish) と共に魚類からヒトに至る脊椎動物の中で最も原始的な部類である無顎類の円口類に属しており、現存している貴重な動物種の一つに数えられている。それゆえ、欧米を中心に多くの研究報告が出されており、動物進化の研究や我々人体の機能解明のために貴重な情報を与えてくれている<sup>1-4)</sup>。

Hbを持つ最も原始的な動物はヤツメウナギであり、ヤツメウナギHbは、電気泳動での移動度の違いにより幾つかのアイソフォームがあることが知られており、ウミヤツメ *P. marinus* では6個のアイソフォームを持ち、そのうちの一つのアイソフォームが全Hb量の40%を占めていると報告されている<sup>5)</sup>。カワヤツメ *L. fluviatilis* Hbでは3個のアイソフォームが確認され、2つのメジャー成

分と1つのマイナー成分から成るという報告がなされている<sup>6)</sup>。

そこで本研究では、カワヤツメ *Lampetra Japonica* (*L. japonica*) のHb に焦点を当て、まず、Hb のアイソフォームの数を確認し、それらを分離精製することを試みた。さらに、分離精製したHb のアミノ酸配列をエドマン法により決定し、ヒトHb で報告されている結果と比較検討した。

## 実験方法

### 材料

カワヤツメ *L. japonica* は石狩川に生息する、生きた新鮮なものを江別市漁業協同組合および石狩市漁業組合の水産漁業会社より購入した。

### カワヤツメ Hb の調製

Hb の調製過程での変性を避けるため、以下の操作はすべて4℃以下の条件で行った。5mlあるいは10mlのディスポーザブルシリンジに少量の抗凝固剤 (Acid Citrate Dextrose = ACD 液 : 113mM クエン酸ナトリウム, 15.5 m M クエン酸, 16 m M リン酸ナトリウム, 129 m M グルコース) を加えてシリンジ内を湿らせたあとにカワヤツメの心臓に穿刺して直接採血後、遠心分離機にかけて血漿と血小板、白血球を取り除き、赤血球を分離した。その赤血球に生理的食塩水を加えて洗う作業を3回繰り返した後、赤血球の5倍容の溶血溶液 (10 m M Tris-HCl buffer (pH7.6), 0.1 m M EDTA, 0.125mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM ATP, 0.1mM PMSF) を加えて氷上で30分放置後、10,000rpmで10分間遠心分離した。その上清を溶血液として、5 m M Tris-HCl buffer (pH8.0) で一晚透析した。

翌日、溶血液を陰イオン交換カラムであるDEAE-Toyopearlカラムにかけて、各Hbアイソフォームを分離調製した。10 m M Tris-HCl buffer (pH8.0) で溶出した後、0 - 0.3M NaCl の直線濃度勾配をかけて溶出した。

### SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

分離精製したHbのアイソフォームの数と分子量を測定するために、Laemmliの方法<sup>7)</sup>に従って、13%ポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行った。20mAで約1時間半泳動させ、0.2% CBB, 50%エタノール, 7.5%酢酸を含む染色液でゲルの固定・染色を20分間行い、続いて5%エタノール, 7.5%酢酸を含む脱染色液でタンパク質以外の部分を脱染色した。

### タンパク濃度の測定

Hbの濃度は575nmでの吸光度およびLowry法<sup>8)</sup>を用いて測定した。

### アミノ酸配列の決定

分離精製したHb を lysyl endopeptidase で特異的に分解し、Edman法<sup>9)</sup>を用いてアミノ酸配列を決定した。その後、cDNAによってその配列の正当性を確認した。lysyl endopeptidase はリジンのカルボキシル側で分子を切断するタンパク質分解酵素であり、Edman法は phenyl isothiocyanate (PITC) をタンパク質あるいはその断片と反応させて、分子のN末端側から1つずつアミノ酸を切り取って配列を決めていく方法である。

Hb と lysyl endopeptidase を 20 : 1 の割合で混合し、50 m M Tris - HCl (pH8.4), 4M Urea 中

で,37 で4時間インキュベート後,凍結乾燥し,HPLCにかけてHb 分子の断片を得た.この断片を,Edman分解によるアミノ酸配列の決定を自動化して行う配列決定装置(sequenator)にかけ,Hb 分子のアミノ酸配列を決定した.

. 結果と考察

カワヤツメ Hb の分離精製

DEAE-Toyopearl カラムにかける前のカワヤツメ溶血液の SDS-PAGE パターンでは,およそ 17kDa の分子量の位置に幅の広いバンドが見られた(データは示していない).Hb を精製するために溶血液を DEAE-Toyopearl カラムにかけ,10mM Tris-HCl (pH8.0)を流した後,0 - 0.3M NaCl の直線濃度勾配をかけて溶出した.Fig.1 にその溶出曲線を示した.最初に大きなピーク,Fraction No.54 に非常に小さなピーク,No.68 付近に小さなピークと3つのピークが観察された.最初の大きなピークは DEAE イオン交換樹脂には吸着せず,NaCl 濃度勾配をかける前に溶出され,No. 54 は 0.08M NaCl,3 番目のピークは 0.25M NaCl で溶出された.なお,この調製での Hb は分光光度計による吸収曲線の測定により酸素結合型であることがわかった.

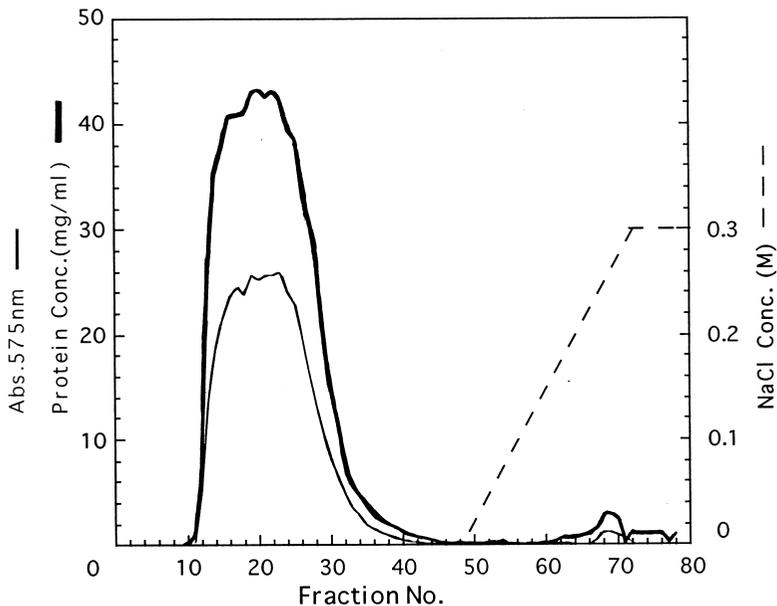


Fig.1 *L. japonica* 溶血液の DEAE カラムクロマトグラフィー. タンパク量: 42.9mg/ml × 140ml=6000mg, カラムサイズ: 4.5 × 17.0cm, 溶出液: 10mM Tris-HCl(pH8.0), No.48 より 0 - 0.3M NaCl の直線濃度勾配をかけた. 1Fraction: No.1-12=17ml, No.13-47=8ml, No.48-78=15ml.

最初のピークを SDS-PAGE にかけた結果,わずかな分子量の差が見られ,2 種類の Hb アイソフォームが確認された (Fig.2-(a)). 分子量の小さい方の Hb がこのピークの前半部分に溶出し,大

きい方のHbがピークの後半部分に溶出していた。これらを溶出される順序に従ってHb<sub>I</sub>、Hb<sub>II</sub>と名付けた。この段階で、Fraction No.11 - 17にかけてHb<sub>I</sub>が、No.41 - 44で少量のHb<sub>I</sub>が分離精製され、Hb<sub>I</sub>の多くはHb<sub>I</sub>との混合物として溶出された(No.18 - 40)。

Fig.2 (b)は、Fraction No.54と3番目のピークのSDS-PAGEパターンである。0.08M NaClで溶出されたNo.54は、溶出曲線ではピークが確認できない程タンパク濃度が低いが、薄い赤色が観察され、自記分光光度計によってHb特有の吸収パターンを示したため、Hbのアイソフォームと確認された。DEAEカラムからの溶出順に従いこれをHb<sub>II</sub>と名付けた。Hb<sub>II</sub>とHb<sub>III</sub>をこのHb<sub>II</sub>と並べてSDS-PAGEにかけると、Hb<sub>II</sub>とHb<sub>III</sub>の中間のあたりにバンドが観察された(Fig.4)。

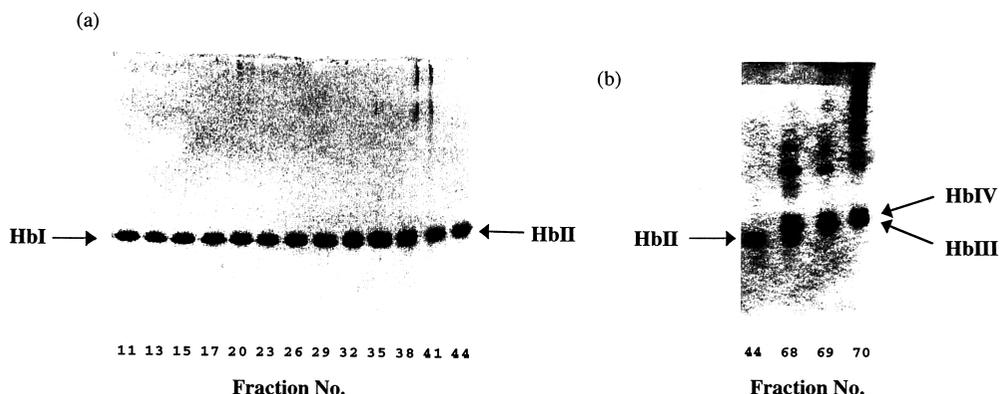


Fig2 *L. japonica* HbのSDS-PAGEパターン。0.1% SDS中で13%のアクリルアミドゲル濃度で行った。Fraction No.はFig.1のDEAEカラムクロマトグラフィーに対応する。(a)は1つめの大きなピーク、(b)はNo.54と3つめのピークのパターンである。5つのHbアイソフォーム、Hb<sub>I</sub>、Hb<sub>II</sub>、Hb<sub>III</sub>、Hb<sub>IV</sub>、Hb<sub>V</sub>が示されている。

3つめのピークは2種類のHbアイソフォームの混合物であり(Fig.2 (b), Fraction No.68-70)、分子量はHb<sub>I</sub>よりも大きく、わずかに分子量の小さい方をHb<sub>III</sub>、大きい方をHb<sub>IV</sub>と名付けた。

以上の結果から、カワヤツメ *L. japonica*の血液には5種類のアイソフォームが含まれていることが明らかになった。溶出曲線、電気泳動の結果と、デンストメーターを用いた測定により、5種類の各Hbアイソフォームの組成比を算定した(Table 1)。最も高い含有量を示したHb<sub>I</sub>が全体の78.13%であり、次いでHb<sub>II</sub>が17.88%を占めており、全Hbの約96%がこの2つのアイソフォー

Table 1 *L. japonica* Hbの各アイソフォームの組成比

アイソフォーム	組成比
Hb I	78.13%
Hb II	17.88%
Hb III	0.23%
Hb IV	2.58%
Hb V	0.64%

ムによって構成されていた。Hb<sub>1</sub> 以下 Hb<sub>2</sub>、Hb<sub>3</sub> は順次 0.23%、2.58%、0.64% と、いずれも全 Hb 量に対する割合は小さいものであった。

また、Hb<sub>1</sub> と Hb<sub>2</sub> を更に精製するために、Hb<sub>1</sub> と Hb<sub>2</sub> の混合物 (Fig.1, Fraction No.18 - 40) を集め、DEAE-Toyopearl カラムで再クロマトグラフィーを行った。得られた吸収曲線 (Fig.3) では前半部分に肩を示す 1 つのピークが観察された。ピークの前半部分を SDS-PAGE にかけた結果 (Fig.4)、その部分 (Fraction No.16 - 22) で Hb<sub>1</sub> が分離精製されていた。ピーク後半の裾の部分

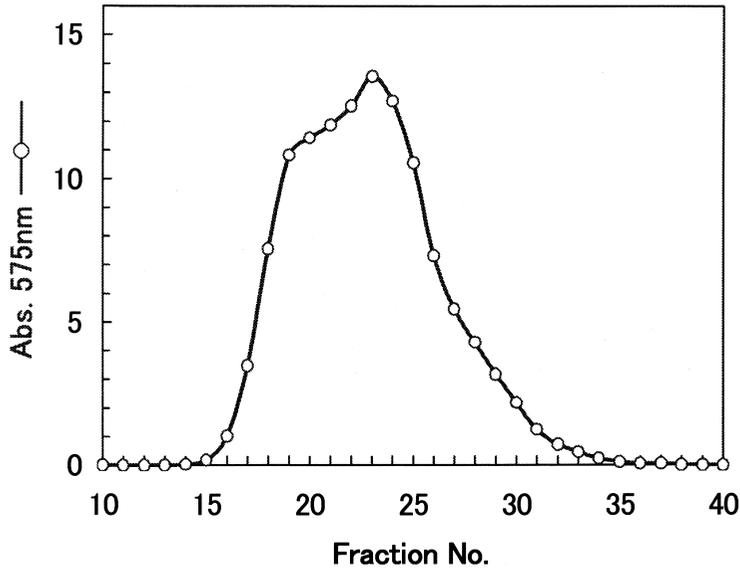


Fig3 *L. japonica* Hb<sub>1</sub> と Hb<sub>2</sub> 混合物の DEAE 再クロマトグラフィー。カラムサイズ：4.5 × 22.5cm，タンパク量：23.2mg/ml × 148ml=3430mg，溶出液：10mM Tris-HCl (pH8.0)，1Fraction=10ml。

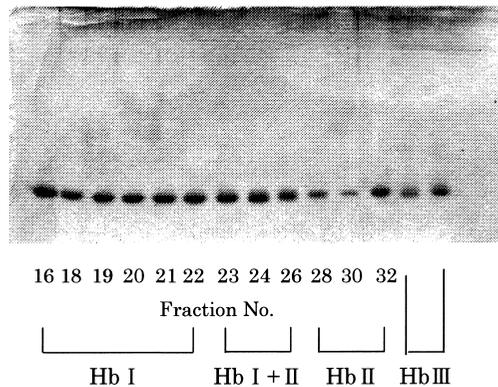


Fig.4 Fig.3 の調製で得られた *L. japonica* Hb<sub>1</sub> と Hb<sub>2</sub> の SDS-PAGE。右側の 2 レーンは Fig.1 で得られた Hb<sub>3</sub>。13%ポリアクリルアミドゲル。

(Fraction No.28 - 34)ではHb が分離精製された．このようにDEAE カラムを用いて再クロマトグラフィーを繰り返すことで，より多くのHb ，Hb を単離することに成功した．

### Hb のアミノ酸配列

分離精製した *L. japonica* Hb を lysyl endopeptidase で特異的に分解し，Edman 法を用いてアミノ酸配列を決定した(Fig.5)．その結果，Hb は149個のアミノ酸から成り，分子量は16,524Daと算定された．このHb とウミヤツメ *P. marinus* Hb ，ヒトHb 鎖，鎖とのアミノ酸配列を比較したものがFig.6である．

*L. japonica* Hb の配列は，カワヤツメのもう1つの種であるヨーロッパ産の *L. fluviatilis* のHb と同一であることがわかった<sup>10)</sup>．これら両カワヤツメHbと *P. marinus* Hb<sup>11)</sup>はいずれも149個のアミノ酸から成っていた．Hb と *P. marinus* Hb は非常に似ており，4つのアミノ酸が置換しているだけであった(Fig.6， 囲み文字)．Hb のSer5，Asn29，Met58，Ser60が，*P. marinus* Hb ではThr5，Thr29，Leu58，Thr60になっており，その配列の相同性は97%であった．

ヒトHb 鎖・鎖のアミノ酸配列とHb では配列が大きく異なっていた．Fig. 5 に示してあるHb 全てに保持されているアミノ酸は27残基だけであり(Fig.6，四角で囲んで示してある)，その中には近位・遠位ヒスチジンが含まれていた．Hb では105番目に近位ヒスチジン，73番目に遠位ヒスチジンがあり，鎖では87番目と58番目，鎖では92番目と63番目にそれぞれ近位・遠位ヒスチジンが保持されていた(Fig.6)．

また，鎖では置換しており，鎖とHb の間で保持されているアミノ酸は18残基あり(Fig.6，濃い網掛け文字)，逆に鎖では置換しており，鎖とHb 間で保持されているアミノ酸は8残基のみであった(Fig.6，薄い網掛け文字)．

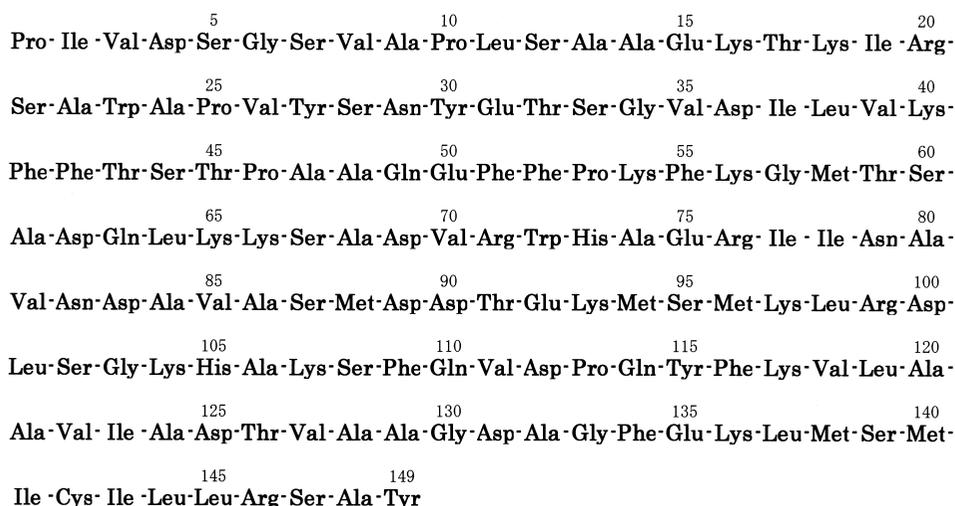


Fig.5 *Lampetra japonica* Hb I のアミノ酸配列

近位・遠位ヒスチジン：Hb 内部にある唯一の極性残基でヘム鉄の結合部位として重要な役割を担う．近位ヒスチジンはヘム鉄に直接結合し，遠位ヒスチジンはヘム鉄の近傍にあるが結合していない．また，ヘム鉄の酸素結合部位は遠位ヒスチジン側にある．



さらに、それら Hb の相同性に基づいて並べたアミノ酸配列の比較から、*L. japonica* Hb では、ヒト Hb 鎖、鎖に比べて、N 末端が 8 残基長く、C 末端付近に 9 残基の欠損があることがわかった。

## 要 約

1. *L. japonica* 溶血液の SDS - PAGE パターンでは、およそ 17 k Da の分子量の位置に幅の広いバンドが見られた。溶血液を DEAE - Toyopearl カラムにかけ、10 mM Tris-HCl で溶出した後、0 - 0.3M NaCl の直線濃度勾配をかけて溶出した。その溶出曲線では 3 つのピークが見られ、各ピークを SDS - PAGE にかけての結果、5 つの Hb アイソフォームが確認され、溶出順序に従い Hb<sub>1</sub>、Hb<sub>2</sub>、Hb<sub>3</sub>、Hb<sub>4</sub>、Hb<sub>5</sub> と名付けた。各アイソフォームの組成比は Hb<sub>1</sub> - Hb<sub>5</sub> の順に 78.13%、17.88%、0.23%、2.58%、0.64% であった。
2. 分離精製した Hb のアミノ酸配列を Edman 法により決定した。Hb は 149 個のアミノ酸から成り、分子量 16,524 Da と算定された。*P. marinus* Hb のアミノ酸配列との比較では、4 種類のアミノ酸が置換しているだけで、その相同性は 97% であった。また、ヒト Hb 鎖、鎖との比較では配列が大きく異なっており、*P. marinus* Hb を含めた 4 つの Hb サブユニット間で保持されているアミノ酸は 27 残基だけであった。さらに、Hb はヒト Hb 鎖、鎖に比べ、N 末端が 8 残基長く、C 末端付近に 9 残基の欠損が見られた。

## 参考文献

- 1) Hardisty, M. W., and Potter, I, C (Eds.) (1971 ~ 1982) *The Biology of Lampreys vol.1 vol.4*, London ; Academic Press.
- 2) 矢沢洋一, 中島由美子, 曾我知美, 宇都宮澄子 (1992 年) 北海道教育大学大雪山自然教育研究施設研究報告, 第 27 号, pp.53-60
- 3) 矢沢洋一 (1998 年) 北海道教育大学大雪山自然教育研究施設研究報告, 第 32 号, pp. 61-65
- 4) 矢沢洋一, 北村裕美, 田浦知子, 東原美由紀, 広瀬季恵, 上堂地美佳, 田中勲 (2000 年) 北海道教育大学紀要, 第 50 巻, 第 2 号, pp.1-9
- 5) Rumen, N. M. and Love, W. E. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* 103, 24-35
- 6) Allison, A. C., Cecil, R., Charlwood, P. A., Gratzner, W. B., Jacobs, S. and Snow, N. S. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 42, 43-48
- 7) Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685
- 8) Lowry, O. H., Rosengrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 9) Stryer, L. (1995) *Biochemistry 4<sup>th</sup> Ed.*, pp.53-58, W. H. Freeman and Company, New York
- 10) Zelenik, M., Rudloff, V. and Braunitzer, G. (1979) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 360, 1879-1894
- 11) Li, S. L. and Riggs, A. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 6149-6169