

カワヤツメミオグロビンの生化学的研究

矢沢洋一*・中山 亨**・毎田徹夫**

*北海道教育大学旭川校生涯教育課程健康福祉コース

**長崎大学医学部生化学教室

Purification and Properties of Lamprey Myoglobin

Yoichi YAZAWA*, Toru NAKAYAMA** and Tetsuo MAITA**

*Division of Health Science, Hokkaido University of Education, Asahikawa, 070-8621 Japan, and

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

Abstract

Myoglobin (MbI) was purified from skeletal muscle of river lamprey, *Lampetra japonica*, by using DEAE-Toyopearl column chromatography.

The amino acid sequence of MbI was determined by Edman method. MbI 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 river lamprey HbI reported by us, previously. These results obtained by our group are the first report of the cyclostomes Mb.

I. はじめに

ヤツメウナギ (lamprey) は、メクラウナギ (hagfish) と共に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、現存している最も貴重な動物達の中に数えられ、生きている化石の一つとされているが、現在の主な生息域は北半球側にある。それゆえ、欧米を中心に多くの研究報告が出されており¹⁾、動物の進化の研究や我々人体の機能解明に貴重な情報を与えてくれている。

しかし、ヤツメウナギを用いた研究は、我が国では非常に少ない。我が国に生息しているカワヤツメ (*Lampetra japonica*) は、北海道と本州中部以北の日本海沿岸等の河川に生息する長さ 50 ～ 60cm の世界で最大級のウナギとして知られており、特に北海道には石狩川を含めた河川に多く生息している。一方、本州の東北地方や日本海沿岸の河川における生息は、絶滅寸前の状態となっており、今や北海道の河川でしか捕獲できなくなった。その北海道も、近年は漁獲量が大巾に落ちてきていることが我々の調査でも明らかとなっている²⁾。この原因は護岸工事などの河川改修にあることは我々の調査で判明してきた。我々は、北海道でしか手に入れることの出来ないこの貴重な動物に関して研究を続けてきている^{2) ～ 7)}。

ヤツメウナギで最も研究されているものの 1 つにあげられるヘモグロビン (Hemoglobin=Hb) は、生体内で酸素を運搬するタンパク質としてすべての動物及び多くの植物その他の生物にその存在が知られており、多数の研究が報告されている。我々も、このヤツメウナギ (カワヤツメ lamprey,

Lampetra japonica = *L. japonica*) の5種のHbアイソフォームの存在を明らかにし、そのうち最も多量に存在するHbIの単離精製に成功し、そのアミノ酸配列(149個のアミノ酸から成っていた)を決定した⁵⁾。この精製HbIの結晶化を行い、X線回析法により、その立体三次元構造を決定した⁶⁾。

一方、脊椎動物の筋肉中にはHbによく似たミオグロビン(Mb)というタンパク質が含まれている。このMbは、酸素を結合できるのみであり、HbのようにCO₂やH⁺と結合することは出来ず、Hbよりも原始的なタンパク質であると考えられている。ヒトHbは、Mbによく似た α タイプと β タイプの2種類のポリペプチド鎖の2個ずつの集合である事が知られている(ヒトHb = α 鎖2個 + β 鎖2個)。

脊椎動物の中で最も原始的である円口類には、ヤツメウナギとヌタウナギ(メクラウナギ)の2種類しか存在しない。これらのHbは、Mbに似た1種類のタンパク質から成り、Mbと同じ祖先から進化した、ヒトHbなどよりも原始的なHbであると考えられている。すなわち、今から数億年前(脊椎動物が誕生するより以前)に現在のHbやMbの祖先タンパクが存在しており、それが進化して、Mb、円口類型Hbさらには、軟骨魚類から人に至る4個のサブユニットから成るHbに進化していったと考えられている。

円口類の血液Hbについては多くの研究報告があるにもかかわらず、筋肉中のO₂貯蔵タンパク質Mbに関する報告はまったく出されていない。これは他種の脊椎動物のHbの分子量がMbの4倍であるに対してMbとHbの分子量がほぼ等しい円口類ではその分離精製が困難であったためであると考えられる。

今回、我々はカワヤツメの骨格筋よりMb成分の1つであるMbIを単離するのに成功し、さらにアミノ酸配列を決定することが出来たので報告する。

II. 実験材料と方法

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より購入した。

カワヤツメMbの調製

Mb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。

カワヤツメの骨格筋を小さく切り刻んで重量をはかり、その5倍容の10 m M Tris (pH8.0) 溶液を加えてミキサーにかけて均質化した後、8,000rpmで10分間遠心にかけて、上清をサラシ布でこした後に、60～95%飽和硫酸で沈殿してくる分画を12,000rpmの遠心にかけて溶液に透析した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

分離したMb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⁸⁾に従って、13%ポリアクリルアミドゲルSDS-PAGEを行った。20 mA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。

タンパク質濃度の測定

Mbの濃度は575nmでの吸光度およびLowry法⁹⁾を用いて測定した。

アミノ酸配列の決定

分離精製した MbI を lysyl endopeptidase で特異的に分解し, Edman 法¹⁰⁾ を用いてアミノ酸配列を決定した. 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.

MbI と lysyl endopeptidase を 20 : 1 の割合で混合し, 50mM 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 MbI 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) につけ, Mb 1 分子のアミノ酸配列を決定した.

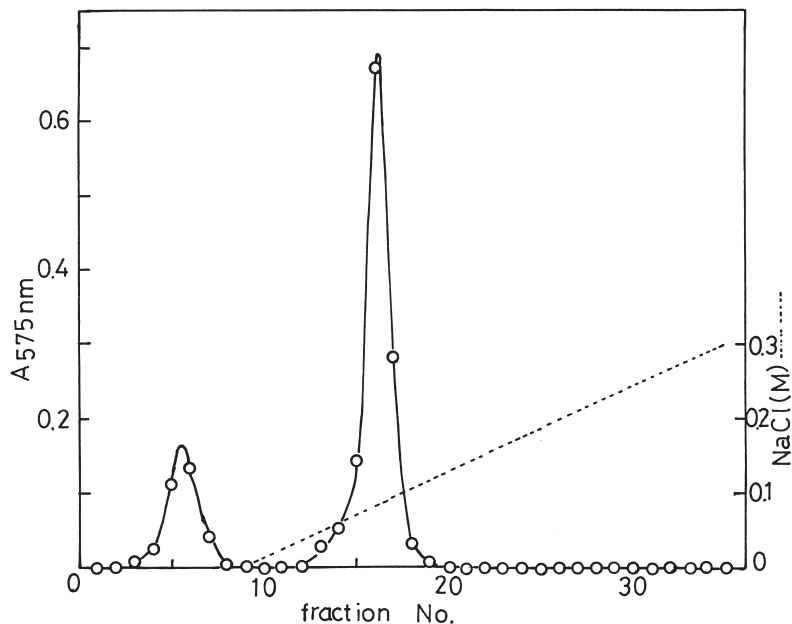


Fig. 1 カワヤツメ骨格筋抽出物 (60~95% 飽和硫酸沈殿物) の DEAE カラムクロマトグラフィー
タンパク量 $18\text{mg/ml} \times 10.2\text{ml} = 183.6\text{mg}$, カラムサイズ: $1.6 \times 9.5\text{cm}$ 溶出液: 10mM Tris HCl (pH8.0), No. 9 より 0 - 0.3M NaCl の直線濃度勾配にかけた. 1fraction = 5.2ml

Ⅲ. 結果と考察

カワヤツメ Mb の分離精製

DEAE-Toyopearl カラムにかかる前のカワヤツメ骨格筋の硫酸分画の SDS-PAGE パターンでは, 数本のバンドが見られた (Fig. 2, レーン 1). Mb を精製するために骨格筋の抽出物を DEAE-Toyopearl カラムにつけ, 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. 575nm の吸収を測定した所, 2 つのピーク (赤色を呈していた) が観察された. fraction No. 4 ~ 7 に小さなピークが出現した. さらに fraction No. 9 ~ 35 までの NaCl の直線勾配により, 0.08M NaCl 濃度の位置に大きなピークが溶出してき

た。各試料について 13% SDS-PAGE にかけたところ、10mM Tris-HCl (pH8.0) で溶出してくる fraction No.5 のみが約 17kDa の 1 本のバンドを示しており、Mb が精製されていることがわかった (Fig. 2, レーン 2)。この Mb を MbI と名づけた。

0.08M NaCl で溶出してくるメインピークには、17kDa の複数の Mb のほかに数種類のバンドが観察されており、このカラム操作による分離精製は成功しなかった (Fig. 2, レーン 4, 5)。なお、Fig. 2 のレーン 6 は分子量のマーカーとしてマガキ貝柱筋タンパク質であるミオシンを用いた。

酸素化 MbI の吸収曲線

Fig. 3 に酸素を結合した MbI の吸収曲線を示した。今まで知られている Mb や Hb と同様に 540nm と 575nm 近辺に吸収極大を示す典型的な吸収曲線を示した。

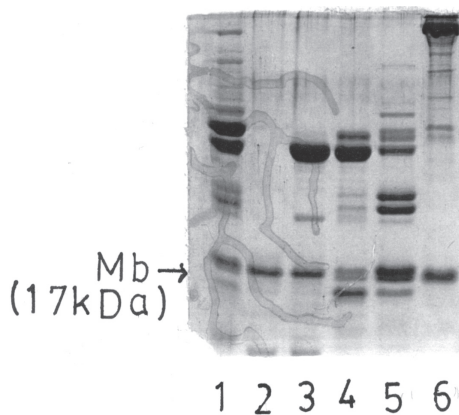


Fig. 2 カワヤツメ骨格筋抽出物の SDS-PAGE パターン

0.1% SDS 中で 13% ポリアクリルアミドゲル濃度で行った。

レーン 1；骨格筋抽出物（60~95% 飽和硫酸沈殿物）

レーン 2；DEAE-トヨパールカラム fraction No.5

レーン 3；同 No.6

レーン 4；同 No.15

レーン 5；同 No.16

レーン 6；マガキ貝柱筋天然アクトミオシン

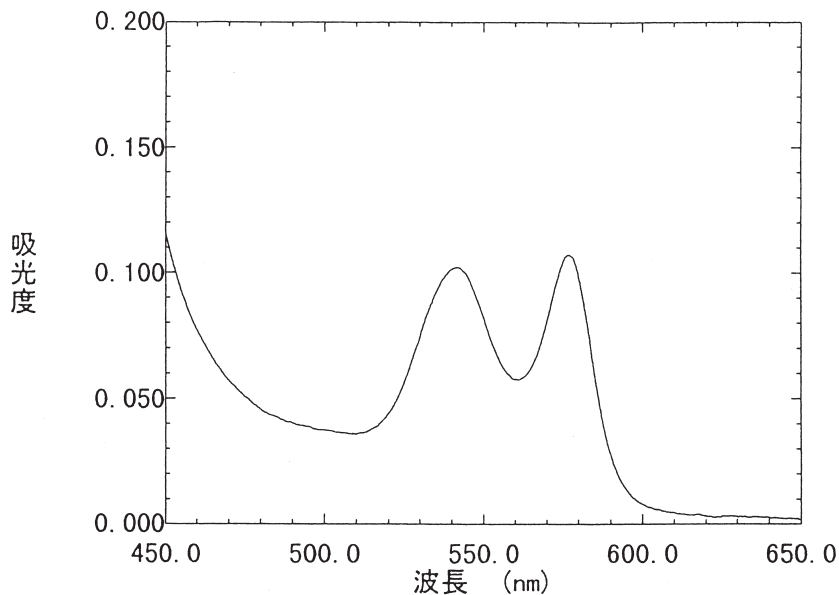


Fig. 3 カワヤツメ骨格筋 O_2 MbI の吸収曲線

MbI のアミノ酸配列

分離精製した *L. japonica* MbI を lysyl endopeptidase で特異的に分解し、Edman 法を用いてアミノ酸配列は決定した (Fig. 4). その結果、MbI 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 MbI のアミノ酸配列を先に報告したカワヤツメ赤血球 HbI と一致していた. 円口類の Mb に関する今回得られた結果が初めての報告であり、MbI と HbI が同じであることから、脊椎動物が誕生する前 (今から 6 億 5 千万年前?) の祖先型から、まず、筋肉中の Mb タイプのものが分化し、それが円口類 (カワヤツメ) で血液の赤血球中に入りこみ、その後、軟骨魚類から人類に至る 4 量体型の Hb へと進化していったと我々は考えている. すなわち、Fig. 5 に示した一般的に認められている酸素結合タンパク質の進化分岐の過程段階 に我々の得た今回の結果を加えてまとめてみると、

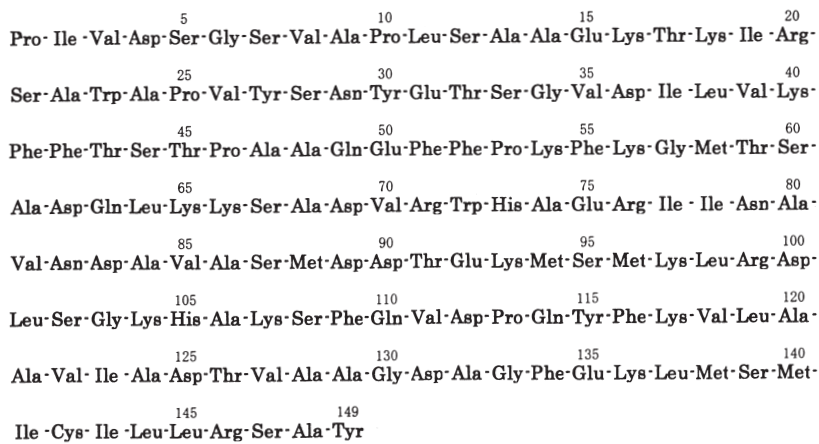


Fig. 4 カワヤツメ骨格筋 MbI のアミノ酸配列

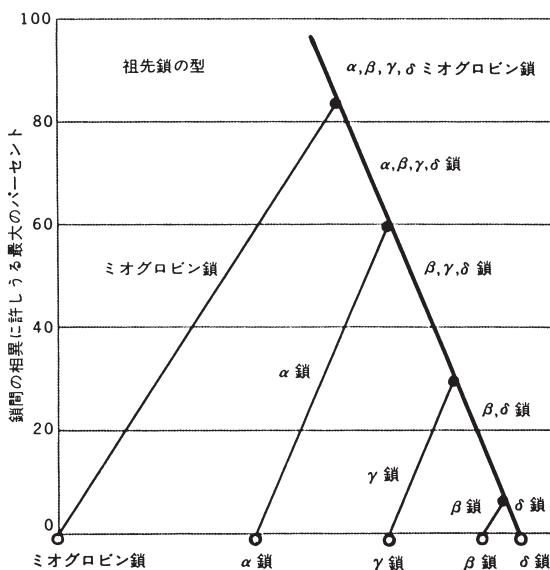


Fig. 5 Mb と Hb の進化分岐図¹¹⁾
4 個の●は祖先の遺伝子が複製されたと推定された位置である. 各点から新しい遺伝子の線ができています. 進化過程の系統樹を逆にして示した. α , β , γ , δ はヒト Hb のサブユニットを示す.

祖先型 O₂ 結合タンパク質 → Mb (筋肉中) → Mb (円口類赤血球中) → Hb (軟骨魚類から哺乳類に至る 4 量体タイプ)

ということになると考えている。この点については、今後、円口類のヌタウナギ (メクラウナギ) を用いてカワヤツメと同様に Mb と Hb 研究を試みる予定である。

IV. 要 約

1. カワヤツメ骨格筋抽出物より硫酸分画と DEAE カラムクロマト法を用いて MbI を精製した。酸素を結合した精製 MbI は今まで知られている Mb や Hb と同様に 540nm と 575nm に吸収極大ピークを持つ典型的吸収を示した。
2. Edman 法により精製した MbI のアミノ酸配列を決定した。それは 149 個のアミノ酸から成っており、分子量 16,524kDa と算定された。これは我々が先に報告したカワヤツメ赤血球 HbI とまったく同じであり、原始脊椎動物のカワヤツメ筋肉内でも HbI が MbI として合成されており、酸素貯蔵の機能を果たしていると考えられる。

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 (1998) 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.
- 3) 矢沢洋一・中島由美子・曾我知美・宇都宮澄子 (1992) 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.
- 4) 矢沢洋一 (1997) 北海道教育大学大雪山自然教育研究施設研究報告. 第 31 号, pp. 43-49.
- 5) 北村裕美・中山亨・毎田徹夫・矢沢洋一 (2001) 北海道教育大学大雪山自然教育研究施設研究報告. 第 35 号, pp. 1-9.
- 6) 上堂地美佳・ヨウミン・田中 勲・中山 亨・矢沢洋一 (2002) 北海道教育大学大雪山自然教育研究施設研究報告. 第 36 号, pp. 67-72.
- 7) 矢沢洋一 (2003) 北海道教育大学大雪山自然教育研究施設研究報告. 第 37 号, pp. 53-57.
- 8) Laemmli, U. K. (1970) Nature, 227: 680-685.
- 9) Lowry, O. H., Rosengrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol. Chem., 193: 265-275.
- 10) Stryer, L. (1995) Biochemistry 4th Ed., pp. 53-58, W. H. Freeman and Company, New York.
- 11) 三浦謹一郎・大井龍夫訳 (1974) 放射エネルギーと生命の起源. 東京化学同人.