

クライオ電子顕微鏡で明らかになった 超巨大酸素運搬タンパク質ヘモシアニンの会合構造

松井 崇^{1,2}, 加藤 早苗³, 田中 良和²

1. はじめに

軟体動物の酸素運搬タンパク質であるヘモシアニンは、銅イオンを配位し相同性の高い機能ドメイン（約50kDa, functional unit, 以下FUと表記）の繰り返しからなる350～450kDaからなるポリペプチド鎖の多量体である。イカやタコの頭足類のヘモシアニンは10量体のシリンダー構造をとり、その大きさは全体で約3.5～4.5MDaにも及ぶ。巻貝などの腹足類のヘモシアニンは2ないし3個以上の10量体がさらに積み重なった13.5MDaにもなる巨大なシリンダー状の複合体を形成する。これらの構造的な特徴から、軟体動物のヘモシアニンは以下の四つのタイプに分類される。

Type 1：巻貝の一種であるキーホールリンベツ由来ヘモシアニン（KHL）に代表される20量体のヘモシアニン。

Type 2：30量体の巨大ヘモシアニン。

Type 3：タコヘモシアニンに代表される10量体のヘモシアニン。

Type 4：イカヘモシアニンに代表される10量体のヘモシアニン。

このようなメガダルトンオーダーのヘモシアニンは単に巨

大なタンパク質として知られているだけでなく、KHLは抗体作製時のキャリアタンパク質や、免疫賦活剤や抗がん治療併用剤としても利用されている¹⁾。さらなる応用へ向けて、これまでヘモシアニンの生理機能の詳細な分析やヘモシアニンの構造解析が行われてきた。ヘモシアニンは非常に大きなタンパク質会合体であるため、これまで主に電子顕微鏡を用いてその構造が決定され²⁻⁴⁾、X線結晶構造解析によるヘモシアニンの構造解析は個々のFUに対して行われてきた^{5,6)}。その結果、KHL (Type 1)、メガヘモシアニン (Type 2)、さらに、オウムガイ (Type 3) のヘモシアニンの構造解析に成功し、それぞれN末端側の6個のFU (FU-a, b, c, d, e, f) がシリンダー構造のD₅対称な外壁領域を形成し、残りのC末端側FUの個数により内部領域の構造にはいくつかのパターンが存在することが明らかになっている⁷⁾。C末端側FUのドメイン数の変化に伴う内部構造の違いはヘモシアニンの全体構造を大きく変えることなく、それぞれの種の生息環境に適応した酸素運搬能を獲得するために進化した結果であると考えられている。

上述したヘモシアニンとは異なり、外壁領域を構成するドメインの一つであるFU-dが遺伝子重複により複製され、FU-d*ドメインを獲得したスルメイカ (*Todarodes pacificus*) 由来ヘモシアニン (TpH) は、特異なドメイン構成 (FU-a, b, c, d, d*, e, f, g) を有し、Type 4のヘモシアニンに分類される。TpHは電子顕微鏡ではなくX線結晶構造解析によりその全体構造が決定された⁸⁾。X線結晶構造解析からは、FU-d*と-gが内部領域に存在することがわかった。TpHは他のヘモシアニンと同様のD₅対称 (z軸回りに72°ずつの回転対称であるC₅対称に加え、x軸に対し180°の回転対称であるC₂対称も持つ) の外壁領域に加え、FU-d*とFU-gがそれぞれ内部領域の下部と上部領域にC₅対称な配置をとり (C_n対称とは360°÷nずつの回転対称をもつ)、全体構造もC₅対称性の分子構造を形成していることが示唆された。また、結晶中ではシリンダー型の分子が50%の割合で上下反転して積み重なって結晶化していたため、疑似のD₅対称を示す電子密度が観測された。その結果、内部領域では上向きの分子由来と下向きの分子由来の電子密度が複雑に重なりあっており、詳細な構造を決定することができなかった。そこで、我々はクライオ電子顕微鏡 (Cryo-EM) を用いた単粒子構造解析により4.2 Å分解

¹ 北里大学理学部 (〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1)

² 東北大学大学院生命科学研究科 (〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平2-1-1)

³ 鹿児島大学水産学部 (〒890-0056 鹿児島市下荒田4丁目50-20)

Three-dimensional reconstruction of 3.8MDa respiratory protein complex Hemocyanin

Takashi Matsui^{1,2}, Sanae Kato³ and Yoshikazu Tanaka² (¹School of Science, Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa, 252-0373 Japan, ²Graduate School of Life Sciences, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba-Ku, Sendai, Miyagi 980-8577 Japan, ³Faculty of Fisheries, Kagoshima University, 4-50-20 Shimoarata, Kagoshima, Kagoshima 890-0056 Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920113

投稿受付日: 2019年9月20日

© 2020 公益社団法人日本生化学会

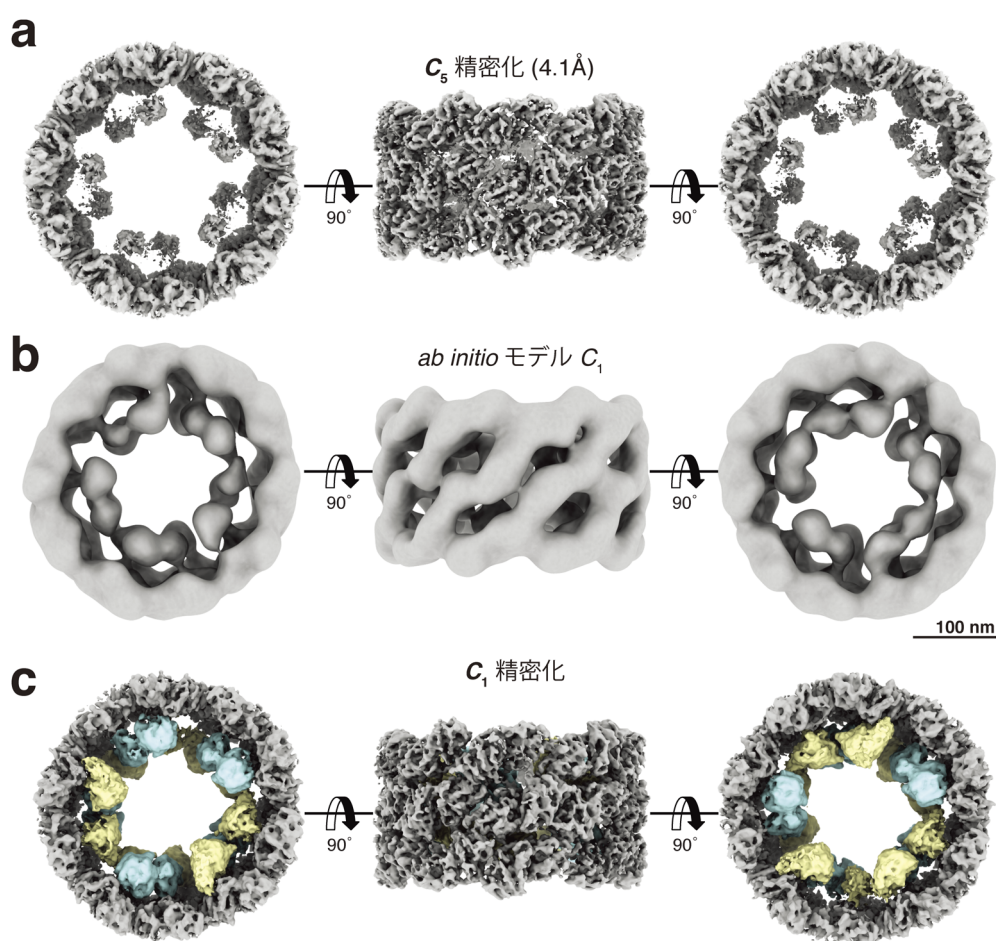


図1 TpHの3D構造

(a) C_5 対称として精密化後の立体構造, (b)回転対称のない C_1 対称として計算した*ab initio*初期構造, (c) C_1 対称として計算した精密化後の立体構造. 黄色でFU-g, シアンでFU-d*を示す. International Union of Crystallography より許可を得て引用⁹⁾.

能での3.8 MDaのTpHの会合体構造を決定した⁹⁾. 本構造解析により, TpHは外壁領域の D_5 対称とは異なり, 非対称な内部領域を持つことが明らかになった. 本稿では, ヘモシアニンの全体構造・会合様式や立体構造から見たヘモシアニンの進化における形態変化, そして, X線結晶構造解析により疑似の D_5 対称性が観察された理由について紹介する.

2. TpHの単粒子構造解析

スルメイカから採取, 精製して氷包埋したTpHはFALCON II電子直接検出器を装備したTITAN KRIOS (FEI, 300kV)で測定した. 負染色電子顕微鏡画像と既知結晶構造の特徴から, TpHが C_5 対称を持つ分子であると仮定し, Cryo-EM画像からTpHの三次元初期モデルを構築した. しかし, この初期モデル構造はX線結晶構造解析の結果と同様に, 内部領域には上向きと下向きのFUが共

に50%の存在率で上下反転して重なっていたため, 上下対称な合計40分子のFUが観測され (本来は20個のFUのみ), また, 内部構造は不明瞭であった (図1a). この結果から, C_5 対称として解析した単粒子構造は外壁領域の D_5 対称に引きずられた不正確な立体構造であることが示された.

対称性を利用して三次元初期モデルを計算すると, 疑似的な対称性を持つ不正確な立体構造へと誘導されてしまうことがわかったため, 対称性を考慮せず回転対称を持たない C_1 対称としてTpHの初期モデル構造を作成した. その結果, D_5 対称の外壁領域と非対称な20個のFUからなる内部領域が計算された (図1b). その後, 内部領域をマスクして外壁領域だけを取り出し, また, それとは逆に外壁領域をマスクして内部領域を取り出して個別に精密化し, さらに, 得られた D_5 対称の外壁領域と非対称の内部領域の構造を統合してさらなる精密化を行うことで, 外壁領域と内部領域で異なる対称性を持つ特異な分子特性を持つTpH

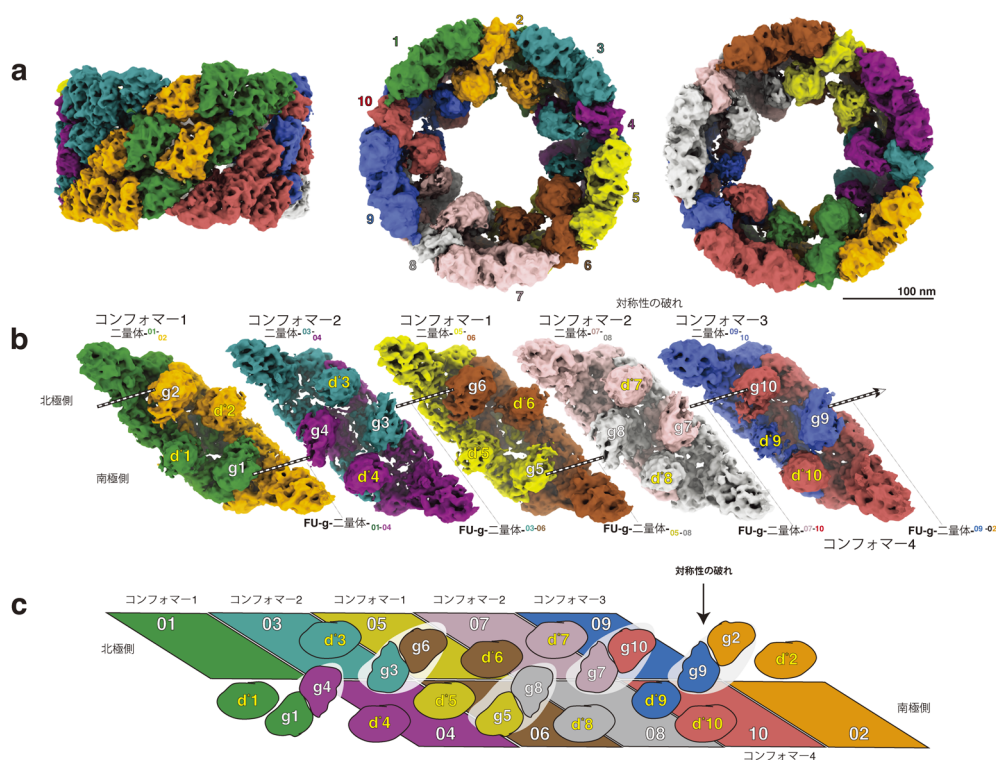


図2 TpHのシリンダー状複合体構造を構成する10個のプロトマーと各FUの配置

(a) TpHの3次元構造を横方向, 上方向, 下方向から見た構造. (b) TpHを構成する10個のプロトマーと5組のプロトマー二量体, 内部領域に存在するFU-g二量体の関係. (c) TpHの内部領域についての概略図. 各プロトマーは異なる色で表示した. 各図中のプロトマーの配色は同一である. International Union of Crystallographyより許可を得て引用⁹⁾.

の立体構造を決定することができた.

3. TpHの立体構造

Cryo-EMにより明らかになったTpHの立体構造は, 典型的な D_5 対称を持つ外壁領域と非対称なFUの配置を持つ内部領域から形成されていた. 外壁領域に比べ内部領域の分解能は低く *de novo* モデル構築は困難であったため, rigid bodyによりモデルを構築した. TpHの結晶構造のうち, 外壁領域に存在する60個のFU (FU-a-b-c-d, e-fが10個のプロトマー分存在) はCryo-EMの単粒子構造解析で得られた電子密度に非常によく収まった.

次に, 結晶構造のFU-gとFU-dを鋳型として内部領域に位置するFU-gとFU-d*のモデルを構築した. 内部領域には合計20個の電子密度が存在していた. 外壁領域と内部ドメインを連結するリンカー領域 (FU-dとFU-d*の間, FU-d*とFU-eの間, およびFU-fとFU-g間をつなぐリンカー領域) の電子密度は確認できなかったため, 10量体形成時に二量体を形成することが知られているFU-gについて, はじめにその位置を同定した. 明らかになった構造中には5個のFU二量体の電子密度が観測され, これらを

FU-gの二量体と断定した. 5個のFU-g二量体の他に, 10個のFUの電子密度が存在し, これらをFU-d*ドメインとして帰属した. その後, ポリペプチド鎖のつながりを確定するために, FU-dのC末端とFU-d*のN末端, FU-d*のC末端とFU-eのN末端, FU-fのC末端とFU-gのN末端の距離を計測し, 最終的に10個のプロトマーすべてのFUの構造を決定した (図2).

既知のヘモシアニンとTpHの構造を比較すると, 既知のヘモシアニンでは内部領域に位置するFU-g二量体は上部領域にのみ C_5 対称に存在する. しかし, TpHの構造では, 五つのFU-g二量体の配置は, 上-下-上-下-上部の順にジグザクに配列していた. その結果, 一つ目と隣接する五つ目のFU-g二量体はともに上部に位置するため対称性がなく, FU-gは非対称的な配置となっていた. 一方, FU-d*は二量体構造をとることなくFU-gとは反対側の領域に存在していた (図2).

配列を帰属した個々のプロトマーの構造を, 対称性の破れを生じたプロトマーを9および10として時計回りに命名し, 10個のプロトマー構造をそれぞれ比較した. その結果, FU-d*とFU-gの配置の違いにより, 10個のプロトマーは4種類のコンフォマーに分類された (図3). プロト

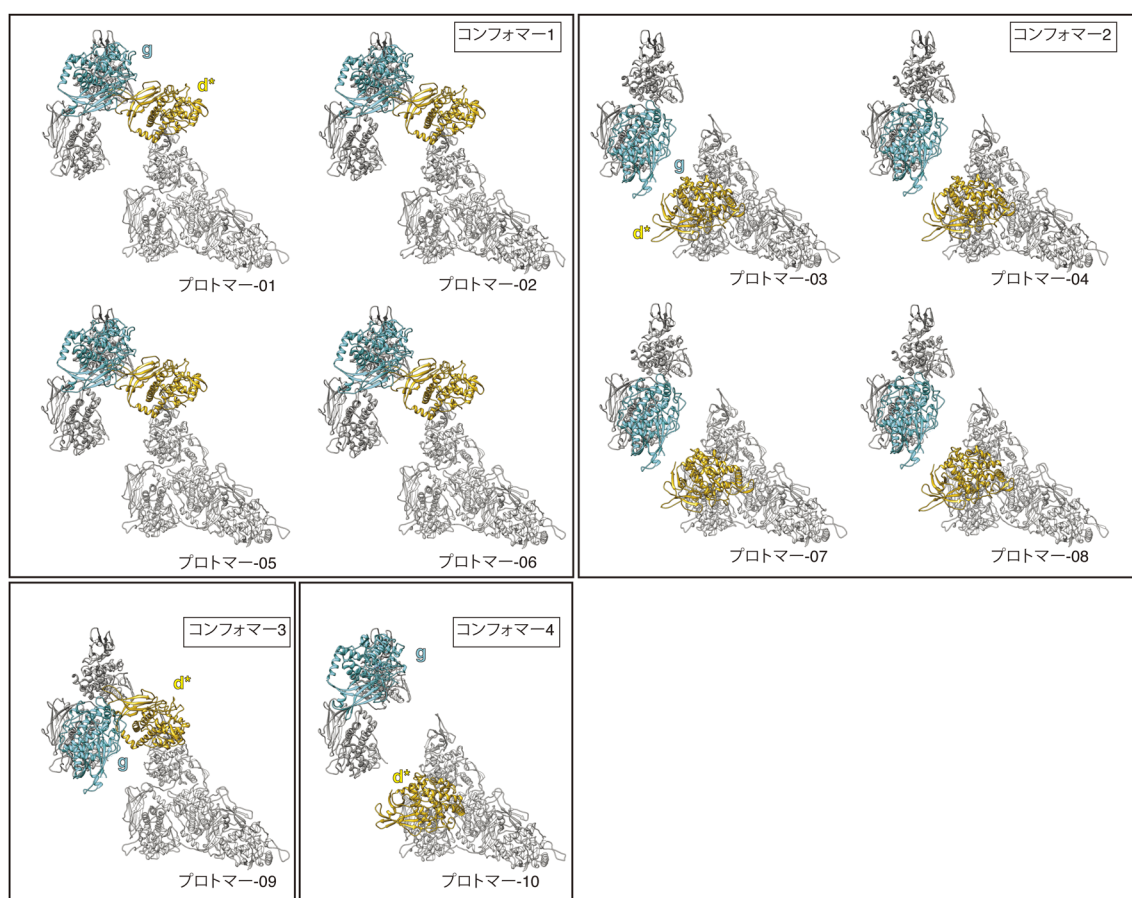


図3 プロトマーの立体構造の特徴

各プロトマーをコンフォメーションで分類した。FU-gをシアン、FU-d*を黄色で示す。International Union of Crystallographyより許可を得て引用⁹⁾。

マー 1, 2, 5, 6はコンフォマー 1に、プロトマー 3, 4, 7, 8はコンフォマー 2に分類され、さらに、対称性の破れが生じるプロトマー 9とプロトマー 10は二つのコンフォマーとは異なるコンフォマー 3と4に分類された。10量体に会合する際は、コンフォマー 1およびコンフォマー 2はそれぞれ2回対称のホモ二量体を形成し、一方、コンフォマー 3とコンフォマー 4はヘテロ二量体を形成していた (図2)。このようなコンフォマー二量体が、(コンフォマー 1ホモ二量体)-(コンフォマー 2ホモ二量体)-(コンフォマー 1ホモ二量体)-(コンフォマー 2ホモ二量体)-(コンフォマー 3とコンフォマー 4のヘテロ二量体)の順で会合して、シリンダー状の10量体構造が形成されていた。

4. 単粒子構造解析により明らかになった進化におけるヘモシアニンの形態変化

FUのドメイン構成の特徴から、Type 4ヘモシアニンである TpHはType 3ヘモシアニンのFU-dが複製されてFU-d*を獲得して進化したと考えられる。今回、単粒子構

造解析によって、これまで不明であったFU-d*を持つTpHの内部領域を含むTpHの全体構造の解明に成功したことで、進化に伴うヘモシアニンの形態変化モデルを提唱することができた。以下に我々が提唱した形態変化を説明する。

Type 3ヘモシアニンは二つの異なるコンフォマーがヘテロ二量体となり、このヘテロ二量体が五つ連結した C_5 対称の構造を形成する [図4(i)]。進化によってFU-d*を獲得したTpHもType 3と同様なヘテロ二量体を形成しようとする。しかし、FU-d*同士の立体障害により二つのプロトマーに解離し、FU-d*とFU-gが極側に位置するコンフォマー 4と、FU-d*とFU-gが赤道側に位置するコンフォマー 3を生じる [図4(ii)]。FU-d*はフレキシブルなリンカーによってFU-dおよびFU-eとつながっているためFU-d*の位置をスワップさせることが可能となる。その結果、FU-d*の位置をスワップさせることでコンフォマー 4からコンフォマー 1が、コンフォマー 3からコンフォマー 2が生成され、同一コンフォマーのホモ二量体が形成される [図4(iii)]。コンフォマー 1二量体とコンフォマー 2二

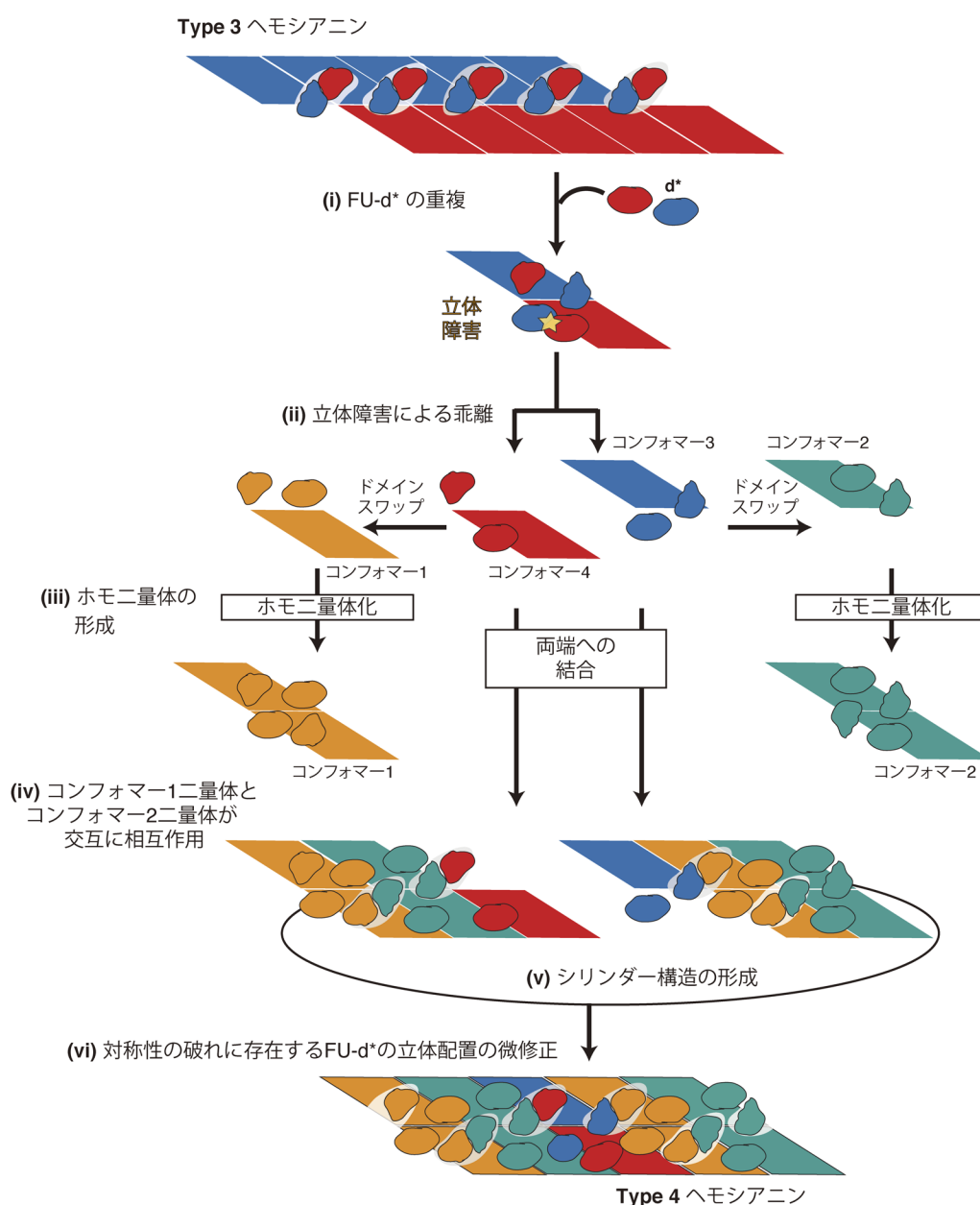


図4 Type 3からType 4への形態変化のモデル
International Union of Crystallography より許可を得て引用⁹⁾.

量体はそれぞれのFU-g同士がFU-g二量体を形成することで交互に配列する。さらに、コンフォーマー1-2-1-2の順で配列した四つのコンフォーマー二量体の両端のFU-gは、Type 3ヘモシアニンと同じ構造的特徴を持つコンフォーマー3および4のFU-gと結合してFU-g二量体を形成する〔図4(iv)〕。その結果、シリンダー状の構造を形成し〔図4(v)〕、コンフォーマー3中のFU-d*が立体障害を避ける位置に配置することでコンフォーマー3と4がヘテロ二量体を形成することで、全体構造がシリンダー状であるが内部構造は非対称なTpHの構造へと進化したと考えられる。

5. なぜ結晶構造解析では内部領域を解析できなかったか？

1節で述べたようにX線結晶構造解析ではTpHの外壁領域の詳細な構造を決定できた⁸⁾。しかし、内部構造については各10個のFU-d*とFU-g、合計20個しか存在しないにもかかわらず、 D_5 対称に配置した40個のFUが観測された。また、結晶構造を詳細に確認すると、内部構造はクリスタルパッキングには関与せず、隣接分子間同士は外壁領域のみで接していた。このことから、X線結晶構造では C_5

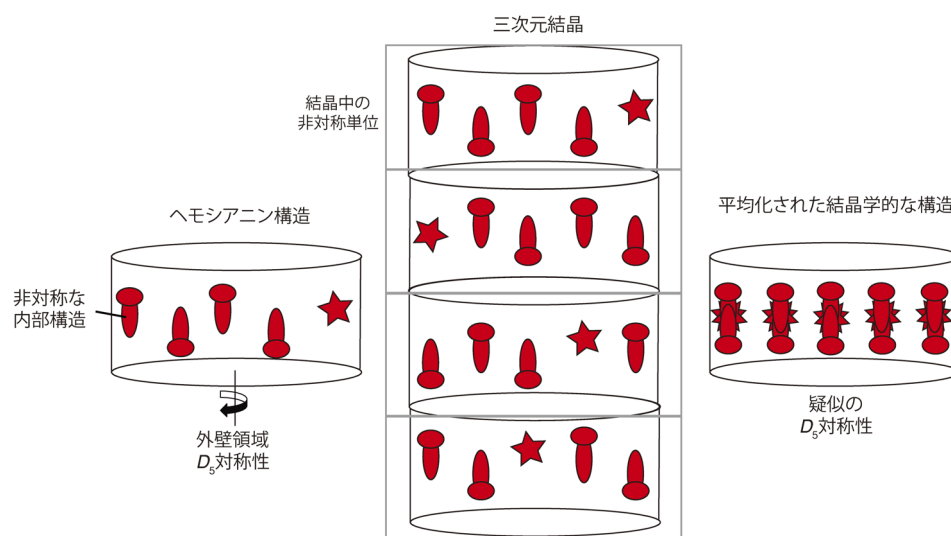


図5 C_1 対称を示すTpHの結晶化におけるパッキングによって、疑似の D_5 対称を持つ結晶構造が生まれる理由 (International Union of Crystallography より許可を得て引用⁹⁾).

対称のTpHが上下方向にひっくり返った分子が50%の確率でランダムにパッキングされ、結果として、 D_5 対称の疑似の平均構造が観測されたと結論づけられた。

一方、単粒子構造解析からは、TpHは、 D_5 対称な外壁領域と、非対称な内部構造により構成されていることがわかった。このような構造的特徴を持つTpHがストロー状に上下の別なく積み重なって結晶化した結果、 72° ずつ回転した五つの異なる向きのTpHと、さらに、上下反対向きに配向した、合計10種類の異なる向きのTpHがランダムにパッキングし、結果的に疑似の D_5 対称を与えたために、本来の非対称な内部構造を持つ分子として結晶構造が解析できなかったことが判明した (図5)。

謝辞

本研究を推進するにあたり、多くのご助言を賜りました、北海道大学大学院先端生命科学研究田中勲特任教授、姚関教授に深く感謝いたします。また、単粒子構造解析についてご助言いただきましたマックス・プランク研究所Stefan Raunser博士、Christos Gatsogiannis博士、Markus Starbin氏、守屋俊夫博士 (現・高エネルギー加速器研究機構) に心より感謝いたします。本研究はJSPS科学研究費補助金 (15KK0248, 17KK0141)、JST さきがけ (JPM-JPR1517) の支援により実施されました。

文 献

- 1) Becker, M.I., Arancibia, S., Salazar, F., Del Campo, M., & De Ioannes, A. (2014) Mollusk Hemocyanins as natural immunostimulants in biomedical applications. In Immune Response Activation (Duc, G.H.T. ed.), pp.45–72, InTech.
- 2) Gatsogiannis, C., Moeller, A., Depoix, F., Meissner, U., & Markl, J. (2007) *Nautilus pompilius* hemocyanin: 9 Å Cryo-EM structure and molecular model reveal the subunit pathway and the interfaces between the 70 functional units. *J. Mol. Biol.*, **374**, 465–486.
- 3) Gatsogiannis, C., Hofnagel, O., Markl, J., & Raunser, S. (2015) Structure of mega-hemocyanin reveals protein origami in snails. *Structure*, **23**, 93–103.
- 4) Gatsogiannis, C. & Markl, J. (2009) Keyhole limpet hemocyanin: 9-Å CryoEM structure and molecular model of the KLH1 didecamer reveal the interfaces and intricate topology of the 160 functional units. *J. Mol. Biol.*, **385**, 963–983.
- 5) Perbandt, M., Guthöhrlein, E.W., Rypniewski, W., Idakieva, K., Stoeva, S., Voelter, W., Genov, N., & Betzel, C. (2003) The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity. *Biochemistry*, **42**, 6341–6346.
- 6) Jaenicke, E., Büchler, K., Markl, J., Decker, H., & Barends, T.R.M. (2010) Cupredoxin-like domains in haemocyanins. *Biochem. J.*, **426**, 373–378.
- 7) Kato, S., Matsui, T., Gatsogiannis, C., & Tanaka, Y. (2018) Molluscan hemocyanin: Structure, evolution, and physiology. *Biophys. Rev.*, **10**, 191–202.
- 8) Gai, Z., Matsuno, A., Kato, K., Kato, S., Khan, M.R.I., Shimizu, T., Yoshioka, T., Kato, Y., Kishimura, H., Kanno, G., et al. (2015) Crystal Structure of the 3.8-MDa respiratory supermolecule hemocyanin at 3.0 Å resolution. *Structure*, **23**, 2204–2212.
- 9) Tanaka, Y., Kato, S., Stabrin, M., Raunser, S., Matsui, T., & Gatsogiannis, C. (2019) Cryo-EM reveals the asymmetric assembly of squid hemocyanin. *IUCrJ*, **6**, 426–437.

著者寸描

●松井 崇 (まつい たかし)



北里大学理学部講師。博士 (理学)。

■略歴 茨城県生まれ。2007年北里大学大学院基礎生命科学研究科博士後期課程修了。同年三菱化学生命研特別研究員。09年産総研特別研究員。10年北海道大学博士研究員。12年富山大学助教。17年東北大学助教。19年より現職。

■研究テーマと抱負 構造情報に基づいた酵素の機能改変。

■ウェブサイト <https://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/buturi/seitai/matsui/>

■趣味 サッカー観戦 (鹿島アントラーズ)、ドライブ。

●加藤 早苗 (かとう さなえ)



鹿児島大学農水産獣医学域水産学系准教授。博士 (水産学)。

■略歴 北海道生まれ。1994年北海道大学大学院水産学研究科博士後期課程修了。96年理化学研究所国際フロンティア研究員。97年NEDO産業技術研究員。2001年旭川医科大学助手。16年鹿児島大助教。18年より現職。

■研究テーマと抱負 ヘモシアニンの会合体形成と酸素運搬能に関する研究。比較生化学的視点からタンパク質の機能と構造の関係を解明したい。

■ウェブサイト <https://katolabfishkagoshimauniv.wordpress.com/>

■趣味 音楽鑑賞 (ロック)、散歩。

●田中 良和 (たなか よしかず)



東北大学大学院生命科学研究科教授。博士 (工学)。

■略歴 2004年東北大学大学院工学研究科博士課程後期修了。同年北海道大学博士研究員。06年東京大学博士研究員。08年北海道大学特任助教。12年北海道大学准教授。17年より現職。

■研究テーマと抱負 構造情報に基づいた生体高分子の分子機構の解明とその応用。

■ウェブサイト <http://www.lifesci.tohoku.ac.jp/labmos/index.html>

■趣味 野球、庭。