

199800450A

ミオグロビンの部位特異的変異による  
酸素結合機能の改変に関する研究

(課題番号 H10-血液-003)

平成10年度厚生科学研究費補助金(高度先端医療研究事業)研究報告書

平成11年3月

主任研究者 宇野公之  
(熊本大学薬学部教授)

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）  
総括研究報告書

ミオグロビンの部位特異的変異による酸素結合機能の改変に関する研究

主任研究者 宇野 公之 熊本大学薬学部 教授

### 研究要旨

救急医療の現場において、すみやか、かつ安全に酸素の供給を行うことは重要な意味を持つ。本研究では、酸素結合能を持つミオグロビンに部位特異的変異をほどこし、酸素結合性、及び安定性の改変を行った。まず遺伝子工学的手法によって、ミオグロビン変異体を大量に調製する手法を確立した。この手法を用いてヘム鉄近位水素結合ネットワークを改変することにより、ヘムの構造を一定に保ったまま自動酸化性を変化させて、より安定な酸素化型ミオグロビンを構築できる可能性を示した。また、ミオグロビンやもうひとつのヘムタンパク質であるシトクロム b562 の多重変異によって、安定な酸素結合状態を実現できると考えられた。さらに、これら変異体と合成ヘムとを再構成することにより、酸素親和性を任意に可変できる可能性を示した。以上の結果から、実用的なレベルで人工血液を構築する方策について、指針を示すことができた。

分担研究者	根矢 三郎	京 都 薬 科 大 学	助 教 授
	後藤 正文	熊 本 大 学 薬 学 部	教 授
	谷口 功	熊 本 大 学 工 学 部	教 授
	長野 哲雄	東 京 大 学 大 学 院 薬 学 系 研 究 科	教 授

### A. 研究目的

輸血用血液製剤によるウイルス感染が大きな社会問題となっている現在、代用血の開発は厚生行政上急務の課題である。輸血用血液製剤は、医療の現場で欠かすことができないという高い有用性を持つ一方で、緊急時の供給量確保に関して大きな問題を内在しており、人工血液の研究開発はこれらの問題を解決しうるものとして大きな期待が寄せられているところである。ヘモグロビンは赤血球中に大量に含まれ、酸素運搬機能を担っている。

好氣的生物であるヒトにとって酸素の欠乏は直接死に至るため、特に救急医療の現場において、すみやか、かつ安全に酸素の供給を行うことは重要な意味を持つ。ヘモグロビンの活性中心にはヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体が含まれ、ヘムに酸素分子が可逆的に脱着することによって赤血球の酸素運搬機能が発現される。これまで、鉄ポルフィリン錯体（ヘム）を有機化学的に合成し、代用血として利用する方策が盛んに検討されてきた。しかし、このような人工的化合物は生体中

には本来存在しないため、免疫反応による副作用が現れることがわかってきた。また、低分子量であるが故に腎臓を通してすみやかに体外へ排泄されるため、薬効を長時間持続させることができないという欠点を持っている。一方、遺伝子工学の手法を用いて大腸菌中でヒトのヘモグロビンを発現させ、代用血として用いることが提案されている。しかし、ヘモグロビン自身は複雑なサブユニット構造を持つため、大量調製が困難であり、医療現場で必要とされる需要に充分応えることができないという欠点を持つ。そこで、本研究では、ヘモグロビンと相同なアミノ酸配列を持ち、大量調製が可能なミオグロビンに部位特異的変異をほどこし、代用血とするべく検討した。このミオグロビン変異体について、ヘムの結合安定性、酸化性、酸素結合性、酸化還元電位、タンパク質構造等の評価を行い、ヘモグロビンと同等な特性を示すミオグロビン変異体の大量調製法を検討した。

## B. 研究方法

ミオグロビン変異体、及びシトクロム b562 変異体は宇野が調製した。大腸菌を用いた大量発現系によって、各種測定に耐える試料を得ることができた。この試料につき、後藤が共鳴ラマンスペクトルの測定を行い、それらの活性部位構造について調べた。ミオグロビンの 92 位セリンは、隣接する 93 位ヒスチジン、及びヘム側鎖のプロピオン酸と水素結合を形成しているが、92 位変異ミオグロビンではこの近位水素結合ネットワークが破壊され、自動酸化性が増すと考えられている。そこで、この水素結合の性質を明らかにするために、ヘムのプロピオン酸

側鎖を縮めたヘムを合成し、これを天然型ヘムと置換して水素結合ネットワークを改変した人工的なミオグロビンを作成した(根矢)。このミオグロビンについて酸素親和性や立体構造を決定し、近位水素結合ネットワークの酸素結合性に対する影響について検討した。また、宇野の試料について、過酸化水素との反応を長野が測定し、高酸化状態の性質について調べた。シトクロム P450 と同様な構造をとることが示唆されたため、生体分子に対する酸化活性を検討するべく、モデル系を用いて考察した。さらに、近位水素結合ネットワークを改変したヘム置換ミオグロビンについて谷口が酸化還元電位を測定し、ヘムの性質を電気化学的に評価した。

## C. 研究結果

### 1. ミオグロビンの調製と構造特性

まず、大腸菌を用いたミオグロビン変異体の大量調製法を確立した(宇野)。融合タンパク部分の切断処理と、引き続き陰イオン交換カラムの条件を改良することにより、収量を約 50 % 上昇させることができた。この手法によって精製されたタンパク質標品について共鳴ラマン法を用いてヘム近傍の構造を調べ、天然型のミオグロビンと同じであることが確認できた(後藤)。また、側鎖を置換したヘムの合成法、及びミオグロビンへの再構成法を確立した(根矢)。

### 2. 近位水素結合ネットワークの改変

上記の方法を用い、部位特異的変異によってヘムポケット内 92 位セリンを置換したミオグロビン変異体を調製した。

そして、pH、及び外来性配位子であるシアニオンの結合性に対する近位水素結合ネットワーク改変の効果調べた（宇野）。また、92位セリンの変異体の共鳴ラマンスペクトルの測定を行った（後藤）。これらの結果を総合し、92位変異体は基本的に野生型と同一のヘム構造をとることがわかった。近位水素結合ネットワークはヘム側鎖のプロピオン酸基を含むため、側鎖の長さを変えることにより水素結合に対して直接摂動を与えられる。そこで、炭素数が2つ少ないカルボキシヘミンに置換したミオグロビンを用いて、X線構造解析を行ったところ、溶媒の水分子が入り込み新たな水素結合を形成することが判明した（根矢）。以上の結果を総合し、92位変異体においても近位側で水分子を含んだ水素結合の再編成が起こっている可能性が指摘できた。

### 3. 新規ヘムポケットの構築

酸素結合性をコントロールできる新たなヘムポケット構築の可能性を探るためにミオグロビンの3重変異体、及びシトクロム b562 の変異体を調製した。後者ではヘムが脱離しやすい性質を持つことがわかったため、多重変異をほどこしてヘムを安定化する方策を考案した（宇野）。ミオグロビンの3重変異体では、近傍の97位ヒスチジンがヘムに配位して外来性配位子の結合性を低下させている可能性が示唆された。一方シトクロム変異体では、ミオグロビンと同様なヘム構造を構築できたことが共鳴ラマン法により判明した（後藤）。

### 4. ミオグロビン変異体の酸化性

ミオグロビン 92 位変異体は自動酸化

性が強いことが報告されているため、過酸化水素との反応で鉄4価高酸化状態を形成させ、ヘム鉄の酸化されやすさを検討した（長野）。その結果、S92A 変異体では有意に酸化を受けにくくなっていることがわかった。この高酸化状態は薬物の代謝に関与するシトクロム P450 の推定活性中間体と同一の構造であるので、ポルフィリンのモデル系を用いて生体分子との反応性を調べた。その結果、シトクロム P450 と同様な酸素添加反応を触媒することがわかった。ヘムの構造はヘム鉄の酸化還元電位の制御とミオグロビン還元体の酸素分子による自動酸化速度を制御する上で、重要な役割を担っている。ヘム鉄の酸化還元にもなうミオグロビンの電子移動速度は、電子移動の前後でヘム鉄の位置がどの程度変化するか（ヘム周辺の再配列）が重要な要素になることが示された（谷口）。

### D. 考察

上記のように、ミオグロビン、及びシトクロム b562 の各種変異体を用い、それらの性質について検討した。92位変異ミオグロビンでは野生型と同一のヘム構造をとることがわかった（後藤）が、これは置換ヘムで再構成したミオグロビンにおいて、ヘムとグロビンとの分子接触変化が、ミオグロビン立体構造にほとんど影響しない（根矢）こととよく対応した。また、ヘムプロピオン酸側鎖の短縮により水素結合ネットワークを破壊しても酸素結合能は保持された（根矢）。以上の結果をふまえば、水素結合ネットワークを形成しえない92位変異体でも、野生型と同様な酸素親和性をもつと考えられる。一般に、この水素結合の欠失に

よってヘム鉄の自動酸化性が増すと考えられている。確かに、92位変異体はシトクロム P450 の活性中間体と同様な高酸化状態を形成し、そのモデル系において各種基質を酸化した（長野）が、S92A 変異体では過酸化水素との反応性が低下していたことから、自動酸化性の低い酸素運搬体となる可能性が指摘できる。自動酸化性については、pH の影響も大きいことから、人工血液とした際の保存法をも含めて今後さらに検討していく必要がある。

自動酸化にともなう酸化還元反応は、電気化学的な側面から評価できる。電子の出入りにともなうヘム鉄の位置的变化が、電位に大きな影響を与える（谷口）ことから、ヘムの動きが小さくなるような変異をミオグロビンにほどこすことによって、酸素化型がさらに安定なミオグロビンを構築できると考えられる。2価（デオキシ状態）のヘム鉄には93位ヒスチジンが配位しているが、この残基の配位性が強いいため、ヘム鉄を面外へと大きく変化させている。したがってヒスチジンをヘム鉄に対して弱く配位させることが自動酸化を抑制するうえで有効であろう。その意味で、ミオグロビン3重変異体（宇野）は歪んだヒスチジン軸配位子を持つため、人工血液として利用できる可能性がある。構造的には97位ヒスチジンが配位する可能性が指摘された（後藤）が、この97位をフェニルアラ

ニン等に置換すれば、酸素等の外来性軸配位子が結合できるヘムポケットが構築できるであろう。

さらに、アミノ酸残基の変異のみでなく、ヘムを人工的な分子に置換することによっても酸素親和性を制御できることが示され（根矢）、またヘムの大量合成法も確立できた（根矢）ことから、ヘムを利用する人工的酸素運搬体の分子設計に重要な指針を得ることができた。このように、タンパク質変異体、人工ヘムの利用、及びこれらの組み合わせによって、任意の酸素親和性、安定性を持つ人工血液が構築できるものと考えられる。

## E. 結論

遺伝子工学的手法によって、変異ミオグロビンを大量に調製する手法を確立できた。近位水素結合ネットワークの改変により、ヘムの構造を一定に保ったまま自動酸化性を変化させて、より安定な酸素化型ミオグロビンを構築できる可能性を示した。また、ミオグロビンやシトクロム b562 の多重変異体の調製によって、安定な酸素結合状態を実現できると考えられた。さらに、これら変異体と合成ヘムとを再構成することにより、酸素親和性を任意に可変できる可能性を示した。以上の結果から、実用的なレベルで人工血液を構築する方策について、その指針を示すことができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- Tatsushi Mogi, Jun Minagawa, Tomoyasu Hirano, Mariko Sato-Watanabe, Motonari Tsubaki, Tadayuki Uno, Hiroshi Hori, Haruki Nakamura, Yoshifumi Nishimura, and Yasuhiro Anraku  
Substitutions of Conserved Aromatic Amino Acid Residues in Subunit I Perturb the Metal Centers of the *Escherichia coli* bo-type Ubiquinol Oxidase  
*Biochemistry* **37**, 1632-1639 (1998)
- 宇野公之, 木戸勝  
構造生物学と創薬科学  
21世紀の創薬科学 (野口照久、石井威望監修、辻本豪三、田中利男編)  
pp. 87-96, 共立出版, 東京 (1998)
- Saburo Neya, Noriaki Funasaki, Noriyuki Igarashi, Akira Ikezaki, Takao Sato, Kiyohiro Imai, and Nobuo Tanaka  
Structure and function of 6,7-dicarboxyheme-substituted myoglobin  
*Biochemistry* **37**, 5487-5493 (1998)
- Seiji Ishikawa, Saburo Neya, and Noriaki Funasaki  
Conformation-dependent binding of dipheptanoylphosphatidylcholines as revealed by proton nuclear magnetic resonance  
*J. Phys. Chem.* **102**, 2502-2510 (1998)
- Saburo Neya, Kouichi Nishinaga, Kaori Ohyama, and Noriaki Funasaki  
Synthesis of functionalized corrphycene by copper(II)-promoted cyclization  
*Tetrahedron Lett.* **38**, 4113-4116 (1998)
- Yasuhiro Mie, Kumiko Sonoda, Saburo Neya, Noriaki Funasaki, and Isao Taniguchi  
Electrochemistry of myoglobins reconstituted with azahemes and mesohemes  
*Bioelectrochem. Bioenerg.* **46**, 175-184 (1998)
- 根矢三郎  
解明された一酸化窒素合成酵素の立体構造  
ファルマシア **34**, 915-916 (1998)
- Y. Ishikawa, Y. Morishita, T. Yamamoto, H. Kurosaki, M. Goto, H. Matsuo, and M. Sugiyama  
Oxidative and random cleavage of DNA by the novel iron(II) complex capable of yielding an iron(III) hydroperoxide intermediate  
*Chem. Lett.* **1998**, 39-40 (1998)

- Masafumi Goto, Yoshinobu Ishikawa, Takao Ishihara, Chika Nakatake, Tomoe Higuchi, Hiromasa Kurosaki and (the late) Virgil. L. Goedken  
Iron(II) complexes with novel pentadentate ligands via C-C bond format ion between various nitriles and [2,4-bis(2-pyridylmethylimino)pentane]iron(II) perchlorate: synthesis and structures  
*J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1998**, 1213-1222 (1998)
- I. Taniguchi  
Electron Transfer Reactions of Semi-Artificial Biomolecules  
*Novel Trend in Electroorganic Synthesis*, S. Torii (Ed.),  
Springer-Verlag, Tokyo, pp.405-408 (1998)
- Y. Mie, K. Sonoda, S. Neya, N. Funasaki and I. Taniguchi  
Electrochemistry of myoglobins reconstituted with azahemes and mesohemes  
*Bioelectrochem. Bioenerg.*, **46**, 175-184 (1998)
- 谷口 功  
生体分子機能電極界面の構築とセンシングー生物電気化学の新しい展開ー  
分析フォーラムー極微分析法の最前線ー日本分析化学会編、pp. 42-51 (1999)
- I. Taniguchi, C.-Z. Li, M. Ishida, Q. Yao  
Electrochemical and spectroelectrochemical properties of manganese reconstituted myoglobin  
*J. Electroanal. Chem.*, **460**, 245-250 (1999).
- 長野哲雄、廣部雅昭  
活性酸素増産剤としての超原子価化合物のデザイン・合成・生物活性評価  
季刊化学総説 日本化学会刊行 有機超原子価化合物 pp. 195-205 (1998)
- Hirotatsu Kojima, Kuniko Sakurai, Kazuya Kikuchi, Shigenori Kawahara, Yataka Kirino, Hiroshi Nagashi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano  
Development of a Fluorescent Indicator for Nitric Oxide Based on the Fluorescein Chromophore  
*Biol. Pharm. Bull.*, **46**, 373-375 (1998)
- Jeon-Ok Moon, Su-Kyung Park and Tetsuo Nagano  
Hepatoprotective Effect of Fe-TPEN on Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Rats  
*Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 284-288 (1998)
- Hirotatsu Kojima, Naoki Nakatsubo, Kazuya Kikuchi, Shigenori Kawahara, Yataka Kirino, Hiroshi Nagoshi, Yasunobu Hirata and Tetsuo Nagano  
Detection and Imaging of Nitric Oxide with Novel Fluorescent Indicators: Diaminofluoresceins  
*Anal. Chem.*, **70**, 2446-2453 (1998)



- Naoki Nakatsubo, Hirotatsu Kojima, Kazuya Kikuchi, Hiroshi Nagoshi, Yasunobu Hirata, Daisuke Maeda, Yasuyuki Imai, Tatsuro Irimura and Tetsuo Nagano  
 Detection of Nitric Oxide from Bovine Aortic Endothelial Cells with New Fluorescence Indicators: Diaminofluoresceins  
*FEBS Lett.*, **427**, 263-266 (1998)
- Naoki Nakatsubo, Hirotatsu Kojima, Kuniko Sakurai, Kazuya Kikuchi, Hiroshi Nagoshi, Yasunobu Hirata Takaaki Akaike, Hiroshi Maeda, Yasuteru Urano, Tsunehiko Higuchi and Tetsuo Nagano  
 Improvement of Nitric Oxide Detection Method Using 2,3-Diaminonaphthalene and Its Application to Evaluation of Novel Nitric Oxide Synthase Inhibitors  
*Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1247-1250 (1998)
- Hirotatsu Kojima, Naoki Nakatsubo, Kazuya Kikuchi, Junji Tanaka, Yoshihisa Kudo and Tetsuo Nagano  
 Direct Evidence of Nitric Oxide Production in Rat Hippocampus Using a New Fluorescent Indicator: DAF-2DA  
*Neuroreport*, **9**, 3345-3348 (1998)
- Hiroshi Nakagawa, Tsunehiko Higuchi, Kazuya Kikuchi, Yasuteru Urano and Tetsuo Nagano  
 Selective Deoxygenation of Heteroaromatic N-oxides with Olefins Catalyzed by Ruthenium Porphyrin  
*Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1656-1657 (1998)
- Hajimu Kurumatani, Kazuya Kikuchi, Tetsuo Nagano, Masaaki Hirobe, Jun Yamazaki and Taku Nagao  
 Real Time Measurement of Nitric Oxide Release from Cultured Endothelial Cells  
*Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1286-1289 (1998)
- 長野哲雄、小島宏建  
 一酸化窒素のバイオイメーシングを目的とした生体プローブの分子設計  
*日本化学会誌*, 11月号、721-729 (1998)
- 小島宏建、菊地和也、長野哲雄  
 一酸化窒素 (NO) のバイオイメーシング  
*バイオイメーシング*, **6**, 159-160 (1998)
- 小島宏建、長野哲雄  
 一酸化窒素 (NO) の測定法  
*呼吸*, **17**, 1308-1313 (1998)
- 小島宏建、長野哲雄  
 一酸化窒素の分析法  
*ぶんせき*, **291**, 239-245 (1999)



- Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Tojo A, Nagata D, Suzuki E, Kimura K, Goto A, Kikuchi K, Nagano T, Omata M  
Effects of Hypertension, Diabetes Mellitus and Hypercholesterolemia on Endothelin Type B Receptor-Mediated Nitric Oxide Release From Rat Kidney  
*Circulation*, **99**, 1242-1248 (1999)
- Hayakawa H, Hirata Y, Kakoki M, Suzuki Y, Nishimatsu H, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Sugimoto T, Omata M  
Role of Nitric Oxide-cGMP Pathway in Adrenomedullin-induced Vasodilation in the Rat  
*Hypertension*, **33**, 689-693 (1999)
- Kakoki M, Hirata Y, Hayakawa H, Nishimatsu H, Suzuki Y, Nagata D, Suzuki E, Kikuchi K, Nagano T, Omata M  
Effects of Vasodilatory  $\beta$ -Adrenoceptor Antagonists on Endothelium-Derived Nitric Oxide Release in Rat Kidney  
*Hypertension*, **33**, 467-471 (1999)
- 小島宏建、長野哲雄  
生理活性解明へ向けた NO 測定法  
*脳の科学*, **21**, 303-307 (1999)

## 2. 学会発表

- 宇野公之、坂本力治、中野江身子、楠本亜紀子、Anthony J. Wilkinson  
三重変異によるミオグロビンヘムポケットの再構築  
第9回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 1998年5月29日
- 宇野公之、色見知子、平沼裕美、石川吉伸  
水溶性金属ポルフィリンと核酸との結合機序  
第48回錯体化学討論会 1998年9月26日
- 宇野公之、青木克昌、小山美由紀、入倉充、石川吉伸  
触手型ポルフィリンと核酸との相互作用  
第48回錯体化学討論会 1998年9月26日
- 宇野公之、山下彩、石川吉伸、入倉充  
インターカレーターを持つポルフィリンと核酸との相互作用  
第48回錯体化学討論会 1998年9月26日
- 宇野公之、上田雪絵、宇田圭希、色見知子、平沼裕美、石川吉伸  
水溶性ポルフィリンのDNA結合性と切断活性  
第15回日本薬学会九州支部大会 1998年12月13日
- 宇野公之、山下彩、石川吉伸、入倉充  
アクリジンを持つポルフィリンのDNA結合性  
第15回日本薬学会九州支部大会 1998年12月13日

- 宇野公之、青木克昌、石川吉伸、小山美由紀、入倉充  
 グリシン触手を持つポルフィリンの DNA 結合性  
 第 15 回日本薬学会九州支部大会 1998 年 12 月 13 日
- 宇野公之、坂本力治、原田美穂、石川吉伸、A. J. Wilkinson  
 ミオグロビン多重変異体の配位子結合性  
 第 15 回日本薬学会九州支部大会 1998 年 12 月 13 日
- 宇野公之  
 部位特異的変異によるヘム結合の安定化  
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 30 日
- 宇野公之、山下彩、石川吉伸、入倉充  
 インターカレーターとしてアクリジンを持つポルフィリンと DNA との相互作用  
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日
- 根矢三郎、舟崎紀昭  
 カルボン酸側鎖がついたヘムをふくむミオグロビンの結晶構造解析  
 日本薬学会第 118 年会 1998 年 4 月
- 石川誠司、秦さかえ、根矢三郎、舟崎紀昭  
 シクロデキストリン包接系における複合体構造と疎水性相互作用  
 日本薬学第 118 年会 1998 年 4 月
- 根矢三郎、舟崎紀昭、五十嵐教之、池崎章、佐藤孝雄、今井清博、田中信夫  
 ジカルボキシヘミンによるミオグロビンのプロピオン酸側鎖の水素結合ネットワーク再編成  
 第 9 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 1998 年 5 月
- 根矢三郎、舟崎紀昭  
 官能基をもつ鉄コルフィセンの合成と生物化学機能  
 日本化学会第 75 秋季年会 1998 年 9 月
- Saburo Neya, Noriaki Funasaki, Noriyuki Igarashi, Akira Ikezaki, Kiyohiro Imai, and Nobuo Tanaka  
 Intensive rearrangement of hydrogen bonding networks of heme propionates by 6,7-dicarboxyheme in myoglobin  
 International Conference on Oxygen Binding and Oxygen Activating/Sensing Heme Proteins 1998 年 9 月
- 西永公一、根矢三郎、舟崎紀昭  
 官能基のついたコルフィセンの新しい合成法  
 第 48 回錯体化学討論会 1998 年 9 月
- Saburo Neya, Noriaki Funasaki, Kiyohiro Imai, Hiroshi Hori, and Takashi Yonetani  
 Structural and functional anomaly of the myoglobin reconstituted with iron corrphycene  
 生体機能における金属イオンの特異的作用の分子科学  
 第 3 回ワークショップ 1998 年 11 月

- ・黒崎博雅、石川吉伸、山本晃央、正岡美香子、後藤正文、松尾裕彰、杉山政則  
 1,3-ジイミン構造を有する五配位鉄(II)錯体-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>系によるDNA切断とその活性種の同定  
 第9回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 1998年5月28日
- ・森 弘正、今村佳代、後藤正文、太田美智男、荒川宜親  
 クラスBβ-ラクタマーゼのコバルト置換酵素の調製と分光学的性質  
 -チオール化合物の金属部位への結合による阻害-  
 第9回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 1998年5月29日
- ・R. K. Sharma, B. S. Garg, H. Kurosaki, and M. Otsuka  
 Chemical speciation, molecular modelling and solin the chelation behaviour of anti-AIDS  
 chelator aurine tricarboxylic acid (ATA)  
 5th International SPACC symposium 1998年7月25日
- ・M. Goto, K. Imamura, H. Mori, and Y. Arakawa  
 Spectroscopic observation of binding of thiol compounds to a cobalt(II)-substituted  
 metallo-beta-lactamase  
 XXXIII International conference on coordination chemistry 1998年8月30日
- ・H. Kurosaki, T. E. Chavez-Gil, Y. Ishikawa, M. Goto  
 Iron(III) hydroperoxide intermediates, metallo-drugs derivatives from iron(II) complexes  
 XXXIII International conference on coordination chemistry 1998年8月30日
- ・山川直樹、黒崎博雅、後藤正文  
 [Pt(terpy)SCH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>]•Cl<sub>2</sub> 錯体と芳香族化合物との溶液中における相互作用  
 第48回錯体化学討論会 1998年9月27日
- ・黒崎博雅、小池尋之、石川吉伸、後藤正文  
 1,3-ジイミン構造を有する五配位鉄(II)錯体とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>との反応から生成する鉄-  
 ヒドロペルオキシド錯体種の分光学的特性と同定  
 第48回錯体化学討論会 1998年9月27日
- ・濱崎昭行、青木佐知子、岡本良成、黒崎博雅、後藤正文、大塚雅巳、井上照彦、  
 杉浦幸雄、R. K. Sharma  
 新規配位の分子設計と生物機能解析  
 第15回日本薬学会九州支部大会 1998年12月12日
- ・山川直樹、黒崎博雅、後藤正文  
 ベンゼンメチルチオレート架橋された複核ターピリジン白金錯体と芳香族化合  
 物との溶液中における相互作用  
 第15回日本薬学会九州支部大会 1998年12月13日

- I. Taniguchi  
 Electroanalytical Chemistry of Myoglobin with Modification of Distal Histidine by  
 Cyanated Imidazole,  
 Pre-satellite Symposium of the 49th ISE Meeting on the New Trends  
 in Electroanalytical Chemistry 1998年9月
- I. Taniguchi  
 Surfaces for cytochrome c electrochemistry: Effect of sulfide as an impurity in the PySH  
 promoter solution on the structures of modified surfaces  
 Post-symposium of the 49th ISE meeting: Biological Electron Transfer Systems  
 and Their Use in Molecular Sensing 1998年9月
- Y. Mie, K. Sonoda, and I. Taniguchi  
 Electrochemistry of myoglobins reconstituted with azahemes and mesohemes,  
 Post-symposium of the 49th ISE meeting: Biological Electron Transfer Systems  
 and Their Use in Molecular Sensing 1998年9月
- I. Taniguchi,  
 Functional electrodes for probing metalloproteins and bioelectrochemical systems  
 International Symposium on Bioelectrochemistry  
 of Metalloproteins and Sensing 1998年9月
- 谷口 功  
 生体分子機能電極からセンシング素子・システム構築への展開  
 分析化学会九州支部講演会 1998年11月
- 谷口 功  
 生体分子機能電極界面の構築とセンシングー生物電気化学の新しい展開ー  
 第11回分析化学フォーラム 1999年1月
- 鈴木紀行、樋口恒彦、長野哲雄、向井政博、北川禎三  
 NO合成酵素及びNO還元酵素のモデルとしてのヘム-チオレート錯体  
 第9回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 1998年5月29日
- 高田則雄、木本哲也、高橋泰城、小島宏建、長野哲雄、川戸佳  
 培養脳神経細胞でのNO信号の蛍光顕微イメージング  
 日本生物物理学会第36回年会 1998年10月3日
- 浦野泰照、樋口恒彦、長野哲雄  
 チオレート配位合成鉄ポルフィリン錯体(SR)を用いた、シトクロムP450の  
 高酸化能要因の解析  
 日本薬学会119年会 1999年3月29日
- 新垣知輝、樋口恒彦、長野哲雄  
 ルテニウムポルフィリン/2,6-ジクロロピリジンN-オキソ系に基づいた位置  
 選択的酸化反応系の構築  
 日本薬学会119年会 1999年3月29日

- ・鈴木紀行、樋口恒彦、長野哲雄、植草秀裕、大橋裕二  
 シトクロム P450、NO 合成酵素のモデルとしてのヘム-チオレート錯体：  
 NH $\cdots$ S 水素結合を有する新規錯体の構築と触媒反応性  
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日
- ・平野智也、菊地和也、長野哲雄  
 フルオレセイン類縁体を蛍光団として用いた可視光励起性新規亜鉛蛍光プローブの開発  
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日
- ・岩井美和子、浦野泰照、長野哲雄  
 リン原子の酸化を利用した蛍光性酸化還元プローブの開発  
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日
- ・梅澤直樹、浦野泰照、長野哲雄  
 新規一重項酸素検出プローブの開発  
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日
- ・小島宏建、菊地和也、樋口恒彦、長野哲雄  
 一酸化窒素感受性蛍光色素 DAF の改良  
 日本薬学会 119 年会 1999 年 3 月 29 日

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）  
分担研究報告書ミオグロビンの部位特異的変異による酸素結合機能の改変に関する研究  
－ミオグロビン変異体の調製－

主任研究者 宇野 公之 熊本大学薬学部 教授

**研究要旨**

ヘモグロビンは赤血球中に大量に含まれ、酸素運搬機能を担っている。本研究では、ヘモグロビンと相同なアミノ酸配列を持ち、大量調製が可能なミオグロビンに部位特異的変異をほどこし、代用血とするべく検討した。まず、ミオグロビンの大量調製法を確立し、いくつかの変異体を作成した。この変異体について、pH依存性、シアニオンの結合性を中心に、外来性配位子座環境を調べた。その結果、近位側水素結合ネットワークは、遠位側における配位子結合性や配位環境にほとんど影響を与えないことがわかった。また、ヘムポケット内のアミノ酸残基を置換し、新たなヘムポケット構築を試みた。他のヘムタンパク質の立体構造情報を詳細に検討した結果、ヘムの脱離を抑える手法を確立することができた。ミオグロビンの近位と遠位の軸配位子ヒスチジンを交換した3重変異体では、シアニオンに対する親和性が著しく低下した。一方、6配位型構造をとるシトクロム b562 の軸配位子である7位メチオニンを置換することにより、ミオグロビンと同様の特性を持つヘムポケットを構築することができた。これらの知見を用いることにより、ヘムポケットを自由に構築し、酸素に対する親和性を任意にコントロールする手法を確立できた。

**A. 研究目的**

輸血用血液製剤によるウイルス感染が大きな社会問題となっている現在、代用血の開発は厚生行政上急務の課題である。輸血用血液製剤は、医療の現場で欠かすことができないという高い有用性を持つ一方で、緊急時の供給量確保に関して大きな問題を内在しており、人工血液の研究開発はこれらの問題を解決しうるものとして大きな期待が寄せられているところである。ヘモグロビンは赤血球中に大量に含まれ、酸素運搬機能を担っている。好氣的生物であるヒトにとって酸素の欠

乏は直接死に至るため、特に救急医療の現場において、すみやか、かつ安全に酸素の供給を行うことは重要な意味を持つ。ヘモグロビンの活性中心にはヘムと呼ばれる鉄ポルフィリン錯体が含まれ、ヘムに酸素分子が可逆的に脱着することによって赤血球の酸素運搬機能が発現される。これまで、鉄ポルフィリン錯体（ヘム）を有機化学的に合成し、代用血として利用する方策が盛んに検討されてきた。しかし、このような人工的化合物は生体中には本来存在しないため、免疫反応による副作用が現れることがわかってきた。

また、低分子量であるが故に腎臓を通してすみやかに体外へ排泄されるため、薬効を長時間持続させることができないという欠点を持っている。一方、遺伝子工学の手法を用いて大腸菌中でヒトのヘモグロビンを発現させ、代用血として用いることが提案されている。しかし、ヘモグロビン自身は複雑なサブユニット構造を持つため、大量調製が困難であり、医療現場で必要とされる需要に充分応えることができないという欠点を持つ。そこで、本研究では、ヘモグロビンと相同なアミノ酸配列を持ち、大量調製が可能なミオグロビンに部位特異的変異をほどこし、代用血とするべく検討した。このミオグロビン変異体について、ヘムの結合安定性、酸化性、酸素結合性、酸化還元電位、タンパク質構造を調べることによって、酸素親和性及びタンパク構造安定性の評価を行い、ヘモグロビンと同等な酸素結合特性を示すミオグロビン変異体の大量調製法を検討した。

## B. 研究方法

### 1. ミオグロビン 92 位変異体

ミオグロビンは筋肉中に存在し、酸素貯蔵機能を持つ分子量約 17,000 のヘムタンパク質である。X線結晶構造解析により明らかになったミオグロビンの立体構造を図 1 に示す。酸素分子が結合するヘム鉄の第 6 配位座近傍には His64 (遠位ヒスチジン) が存在し、結合酸素に水素結合することにより、酸素の脱離を防いでいると考えられている。また、第 5 配位座には His93 (近位ヒスチジン) が結合し、ヘム自身の保持と酸素への電子供与を介した鉄-酸素結合の不安定化 (解離のしやすさ) に関与している。す

なわち、近位ヒスチジンがヘム鉄に配位結合することにより、鉄へと電子が供与されるが、酸素分子は同じく配位結合によって鉄と結合しているため、トランス位からの電子供与は結果的に鉄-酸素結合を弱めることになる。この近位ヒスチジンはすぐ隣の Ser92 と水素結合を形成している。水素結合の形成によって His93 の水素原子が Ser92 に引き寄せられる結果、近位ヒスチジンは負の部分電荷を持つ。この電荷は、ヒスチジンから鉄への電子供与を強めるため、この水素結合を部位特異的変異によって切断することにより鉄-酸素結合の強さを変化させる、すなわち酸素の結合親和性を制御することが可能と考えられる。

以上のような背景のもと、Ser92 を水素結合性のないアラニン、バリンに置換した S92A、S92V、及びより強い水素結合性を期待して酸性アミノ酸のグルタミン酸、アスパラギン酸に置換した S92E、S92D、の 4 種の変異体を調製し、野生型ミオグロビンと比較した。上記のように、水素結合の切断により鉄-酸素結合は強くなると期待されるが、酸素が結合したミオグロビン標品 (酸素化型) は徐々に酸素を放出していき、酸化型へと変化する (自動酸化)。したがって、詳細な検討が難しいと考えられたため、酸化型標品を調製し、これの軸配位子結合性について検討した。

### 2. ミオグロビン 3 重変異体

また、上記 92 位変異体に加えて、新たな酸素結合ヘムポケットを持つミオグロビン変異体構築の可能性を検討した。図 2 に、遠位ヒスチジンをバリンに、近傍の 68 位バリンをヒスチジンに置換し



た2重変異体の立体構造を示す。この変異体では、本来の軸配位子である His93 に加えて2重変異によって導入された His68 がヘム鉄に配位し、6配位型構造をとっている。したがって、もし93位の近位ヒスチジンを変異させ、側鎖体積の小さいグリシンやアラニンに置換すれば、この部分に新たなヘムポケットが構築できると考えられる。また、上記2重変異体の His68 は位置的にヘム鉄からやや遠く存在するので、His68 とヘム鉄との結合は歪んだものとなっている。したがって、近位ヒスチジンの変異により唯一の軸配位子となった His68 とヘム鉄との結合は弱く、鉄への電子供与は小さいと思われる。以上の考察に基づき、2種の3重変異体 (H64V/V68H/H93A 及び H64V/V68H/H93G) を作成し、それらの pH 安定性、外来性配位子結合性について検討した。

### 3. シトクロム変異体

さらに、ヘムポケット構築のもう一つの可能性として、大腸菌由来のシトクロム b562 を用いた研究を行った。図3にシトクロム b562 の立体構造を示す。シトクロム b562 は4本の $\alpha$ ヘリックスからなる分子量12,000の単純ヘムタンパク質である。大腸菌 K 株では本タンパク質が欠落しているにもかかわらず、成育になんら影響が現れないことから、本来の機能は不明である。しかし、ヘム鉄は6配位低スピン状態をとることから、電子伝達に関与している可能性が指摘されている。本タンパク質ではヘム鉄の軸配位子として7位のメチオニンと102位のヒスチジンが結合している。そこで、新たなヘムポケットを構築すべく、7位の

グリシン及びアラニン変異体を作成した。そして、外来性配位子の結合性、pH に対する安定性、さらには尿素に対する安定性について検討した。

### 4. pH 安定性

野生型ミオグロビンでは、中性領域で水分子がヘム鉄に配位しているが、pHの上昇により遠位ヒスチジンの脱プロトン化と共役した水分子からのプロトン放出が起こり、軸配位子は水酸基へと変化する。この過程を調べることにより、遠位側の配位座環境やヘム鉄-水結合の結合強度、ひいては第5配位子からヘム鉄への電子供与性を調べることができる。もし、92位アミノ酸と93位ヒスチジンとの間の水素結合が強くなれば、電子供与が強くなり、負電荷を持つ水酸基はヘム鉄に結合しにくくなる。したがって、よりpHを上げなければ水酸基の配位が達成されなくなる結果、pKaは上昇すると予想される。実験は、測定セルに0.1M NaClを含有した10mMリン酸ナトリウム緩衝液を入れ、そこへミオグロビンを加えた後pHをモニターした。このセルを紫外可視分光光度計 (Beckman DU640) に移し、吸収スペクトルを測定した。試料溶液のpHは、まず塩酸を用いて6付近に下げた後、NaOH溶液を用いて徐々に上昇させた。最終的にpH11付近まで測定した。

### 5. シアン結合性

シアンイオンは酸化型ヘムに対して高い親和性を持ち、容易に配位する。この結合によりヘム鉄は低スピン状態となるため、吸収スペクトルが大きく変化する。したがって、スペクトル変化を追跡する

ことにより、容易にシアニイオンの結合親和性を決定することができる。上記4.の議論と同様、シアニイオンは負の荷電を持つので、シアニイオンの親和性は第5配位子からの電子供与の影響を大きく受けると考えられる。また、シアニイオンの親和性はヘムポケットのサイズをはかる目安とすることができる。シアニイオンが容易に配位できることがわかれば、シアニイオンと同様2原子分子であり、ミオグロビン本来の配位子である酸素分子も容易に配位できるヘムポケットが構築されていると判断できる。実験は、測定セルに0.1 M NaClを含有した10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を入れ、そこへミオグロビンを加えた後、KCN水溶液を滴下しながら吸収スペクトルを測定した。

## C. 研究結果

### 1. ミオグロビンの大量調製

ミオグロビン遺伝子 (FXpmyo) を組み込んだクローニングベクター pBluescript II KS (+) は、英国ヨーク大学 Dr. Anthony J. Wilkinson から恵与された。各種変異体の調製は、市販の変異導入キット (Amersham-Pharmacia 社 Sculptor あるいは Stratagene 社 Quick Change) を用いて行った。プライマーは北海道システムサイエンス社から購入した。宿主大腸菌として、XI-1 Blue (Stratagene 社) を用いた。変異の導入は、DNA シーケンサー (ABI 社、Model 373) を用いた DNA の塩基配列決定により確認した。このクローニングベクターから Bam HI と Hind III (New England Biolabs) を用いて遺伝子を切りだし、発現ベクターである pLcII に組換えした後、宿主大腸菌 (M5219) に形

質転換した。アンピシリンを用いて選別した後、コロニーの液体培養からプラスミド DNA を抽出 (Wizard MiniPrep、Promega 社) し、上記制限酵素を用いて目的遺伝子の存在を確認した。

今回の研究で用いた大量発現系は上記英国のグループによってすでに確立されているが、カラム分離法を改良してミオグロビンの収率を上昇させることができた。精製の概略を以下に示す。

#### 1日目

大腸菌 (M5219) のグリセロールストックからアンピシリン含有 LB 培地 100 mL に植菌し、28 °C で一晩培養する。

#### 2日目

アンピシリン含有 Terrific Broth 10 L に植え継ぎ、OD600 が1になるまで28 °C で培養する。その後、42 °C で4時間程度培養し、遠心分離により菌体を回収する。菌体は遠心チューブごと-80 °C で保存しておく。

#### 3日目

菌体を解凍後、リゾチーム処理で菌を破壊し、塩化マグネシウム存在化 DNase I 処理により DNA を断片化する。DOC、及び Nonidet P-40 で可溶化後、inclusion body として菌内に含まれていたミオグロビンを遠心で回収する (白色沈殿)。緩衝液で数回洗い、DNA 等を除く。この沈殿に尿素を加え、ミオグロビンを溶かした後、一晩透析することによってホールドさせる。

#### 4日目

透析処理したミオグロビン溶液にヘミンを添加する。ヘミンはミオグロビンと高い親和性をもつので、タン

パク質中にすみやかに取り込まれる。この溶液を 10 mM Tris-HCl (pH 9.5) に透析する。遠心分離によって沈殿を除いた後、DEAE Sepharose カラムによって粗精製し、過剰なヘミンを除去する。溶出したミオグロビン分画を回収し、塩化カルシウムの添加、及び塩酸によって pH を 8.0 に調製後トリプシンを加える。25 °C で 16 時間程度攪拌する。

#### 5 日目

トリプシン処理した溶液を 10 mM Tris-HCl (pH 9.5) に対して透析する。DEAE Sepharose カラムによって精製した後、少量のフェリシアン化カリウムを加え酸化型とする。遠心により濃縮・バッファー交換を行い、フェリシアン化カリウムを除く。必要であれば、さらにゲルろ過 (Sephacryl S-100) を行う。

従来の精製法では、4 日目のヘミンを加えた段階ですぐさまトリプシン処理し、ファージ由来の cII タンパク質とのフュージョンタンパク質として発現されたミオグロビンから N 末端側の余分な残基を切り出していた。しかし、この精製段階では大腸菌由来の余分なタンパク質が多く存在しているため、菌体重量あたりのトリプシンの添加量を一定にしても切り出し効率に大きなばらつきが見られた。また、大腸菌由来の還元タンパク質によりミオグロビンが部分的に還元され、酸素化型標品が混入し、次の DEAE カラムによる分離過程で 2 つのバンドを生ずることがわかった。そこで、ヘミンを結合したフュージョンタンパク質の段階で一度粗精製し、過剰のヘミンと大腸菌由来の

余分なタンパク質を除去した結果、トリプシン処理による切り出し効率の再現性を上昇させることができた。さらに、DEAE カラムによる分離の際、pH を 9.5 に上昇させることでミオグロビンの吸着性を上げ、結果的に精製タンパク質の収量を改善することができた。この段階でミオグロビンは自動酸化され、ほぼ完全に酸化型標品となっているが、状態を揃えるためフェリシアン化カリウム処理を行った。このようにして得られた酸化型標品の吸収スペクトルの極大波長は、92 位変異体について野生型のものとはよく一致した (表 1)。変異体の種類に依存するが、10 L の培養液から約 100~250 mg の精製ミオグロビンを得ることができた。

## 2. ミオグロビン 92 位変異体の pH 変化

まず、92 位変異体の pH 依存性を調べ、第 5 配位子である近位ヒスチジンに対する水素結合の効果を検討した。各 92 位変異体と野生型の吸収スペクトル変化を図 4~8 に示す。すべての試料について等吸収点が見られたことから、このスペクトル変化は中性型、アルカリ型の 2 つの状態間での平衡反応によることがわかった。各ミオグロビンのソーレー帯における吸光度変化をあわせて図に示した (図 4~8)。プロトン 1 つが関与する場合の理論的な滴定曲線を図中に示した。実測値のプロットはこの理論曲線とよく一致していることから、この pH 変化にはプロトン 1 当量が関与していることがわかった。中性型、アルカリ型の吸収極大波長を表 1 に示す。これらの値は各変異体で非常に似ていることがわかる。したがって、少なくとも近位水素結合のネッ

トワーク変化は、ヘムの電子状態には大きな影響を及ぼさないことがわかった。上記の pH 変化のプロットから、各ミオグロビンの pKa 値を求め、表 1 に示した。ほぼすべての変異体は野生型と同じく約 8.7 という値を示した。しかしながら、S92V については pKa 値が他と比べて有意に低く、何らかの構造的な変化が予想された。

### 3. ミオグロビン 92 位変異体のシアン結合性

次に、シアンイオンの結合性について検討した。測定は pH 7.0 にて行った。吸収スペクトルの変化を図 9~13 に示す。明瞭に等吸収点が観測されることから、シアンイオンの結合過程は一段階であることがわかる。各ミオグロビンのソーレー帯における吸光度変化をあわせて図に示した (図 7)。シアンイオン 1 当量が関与する場合の理論的な滴定曲線を図中に示した。実測値のプロットはこの理論曲線とよく一致していることから、このスペクトル変化にはシアンイオン 1 当量が関与していることがわかった。シアン化型の吸収極大波長を表 2 に示す。これらの値は pH 変化の場合と同様各変異体で非常に似ていることがわかる。上記のシアン濃度変化のプロットから、シアン化型各ミオグロビンの Kd 値を求め、表 2 に示した。ほぼすべての変異体は野生型と同じく約 2 という値を示した。したがって、ヘムポケットのサイズ、環境はどの変異体についてもほぼ同じと考えられた。

### 4. ミオグロビン 3 重変異体の pH 変化

2 種の 3 重変異体 (H64V/V68H/H93A、

H64V/V68H/H93G) を作成し、それらの pH 安定性について検討した。これら変異体では、近位ヒスチジンのかわりに立体障害の小さなアラニン、グリシンといったアミノ酸残基を導入し、かつ遠位側のバリンをヒスチジンに置換することにより、ヘム鉄の軸配位子としてある。野生型ミオグロビンの場合、C2 で示したように、アルカリ性領域では軸配位子となっている水分子からプロトンが脱離し、これが遠位ヒスチジンのプロトン脱離と共役していた。3 重変異体では遠位ヒスチジンが存在しなくなるため、アルカリ領域での軸配位子変化が観測されなくなると期待される。図 14 に 2 重変異体である H64V/V68H の吸収スペクトル変化を示した。この変異体では、X線構造から明らかなように 6 配位構造をとるため、pH 5~11 の範囲で吸収スペクトル変化は見られず、酸性領域でヘムの脱離にともなう吸光度の減少と短波長シフトが観測された。一方、3 重変異体では中性からアルカリ領域にかけてはほとんど吸収スペクトル変化が観測されなかったものの、弱酸性領域で新たな吸光度変化が見られた (図 15、16)。この変化は、とくに H64V/V68H/H93G 変異体で著しく、見かけの pKa=5.88 と見積もられた。この pKa 値から、ヘム近傍に存在する His97 のプロトン解離による変化であると考えられた。さらに酸性側では、2 重変異体と同様ヘムの脱離による吸光度変化が観測された。表 3 に、H64V/V68H、H64V/V68H/H93A、H64V/V68H/H93G の中性領域での吸収極大波長を示す。3 重変異体同士は、非常に似た吸収スペクトルを示すことがわかる。また、2 重変異体では 3 重変異体に似てはいるものの、

可視部の吸収帯が短波長シフトし、630 nm 付近に小さな吸収帯が現れていることから、わずかに高スピン状態のヘムが存在していることが示唆された。

### 5. ミオグロビン 3 重変異体のシアン結合性

次に、これら 3 重変異体の外来性配位子の結合性を検討するため、シアンイオンの親和性を測定し、ヘムポケットの性質を調べた。測定は pH 7.0 にて行った。吸収スペクトルの変化を図 17~19 に示す。すべての変異体で明瞭な等吸収点が観測されたことから、シアンイオンの結合過程は一段階であることがわかった。各シアン化型変異体の吸収極大波長を表 4 に示した。これらの値は、92 位変異体のシアン化型のもの(表 2)と非常によく一致していることから、92 位変異体同様シアンが配位していることがわかる。各変異体のソーレー帯における吸光度変化をあわせて図 17~19 に示した。このプロットから算出された Kd 値を表 4 に示した。6 配位型構造をとる 2 重変異体では野生型に比べて約 5000 倍シアンイオンが結合しにくいことがわかる。これは、強い配位子であるヒスチジン残基によって、ヘムがビス配位されているためと考えられる。これに比較して、3 重変異体ではシアンイオンの結合性が数倍向上しており、93 位のヒスチジンが取り除かれた効果が明らかである。したがって、3 重変異をほどこすことにより、外来性配位子が結合できるヘムポケットを構築できたものと考えられた。

### 6. シトクロム変異体の大量調製

以上の研究により、アミノ酸残基の変

異によって 6 配位型ミオグロビンに新たなヘムポケットを構築できることがわかった。そこで、6 配位型ヘムタンパク質であるシトクロム b562 を用いて、外来性配位子が結合できるヘムポケットの構築を試みた。まず、大腸菌 B 株 11595 のゲノム DNA から PCR 法によってシトクロム b562 の遺伝子 (cybC) を取り出した。PCR のプライマーは、他の B 株由来 cybC 遺伝子の DNA 塩基配列をもとにして設計した。取り出した DNA は、クロニングベクター pBluescript II SK (+) の Hind III-EcoR I サイトに挿入した。宿主大腸菌である XL-1 Blue MRF' にこのベクターを形質転換した (Stratagene 社)。各種変異体の調製は、市販の変異導入試薬キット (Amersham-Pharmacia 社製 Sculptor あるいは Stratagene 社製 Quick Change) を用いて行った。プライマーは北海道システムサイエンス社から購入した。変異の導入は、DNA シーケンサー (ABI 社、Model 373) を用いた DNA の塩基配列決定により確認した。タンパク質精製法を種々検討し、以下の手法を確立した。

#### 1 日目

大腸菌 XL-1 Blue MRF' のグリセロールストックからアンピシリン含有 LB 培地 100 mL に植菌し、37 °C で一晩培養する。

#### 2 日目

アンピシリン含有 x2TY Broth 10 L に植え継ぎ、OD600 が 1 になるまで 37 °C で培養する。その後、IPTG (1 mM) とアミノレブリン酸 (1 mM) を加え、さらに 16 時間培養を続ける。

#### 3 日目