

遠心分離により菌体を回収する。10 mM Tris-HCl (pH 8.0) で菌体を洗浄し、再度遠心して菌体を回収する。培養液 1 L あたり 10 mL のクロロホルムを加え、強く攪拌して菌体外膜をゆるめる。室温にて 15 分間放置後 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) を加え、シトクロム b562 を抽出する。赤色のシトクロム画分を回収し、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に数時間透析する。DEAE Sepharose カラムによって粗精製後、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に透析しておく。

4 日目

再度 DEAE Sepharose カラムによって精製後、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・バッファ交換を行い、フェリシアン化カリウムを除く。必要なら、さらにゲルろ過 (Sephacryl S-100) を行う。最終的に 0.1 M NaCl 含有 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液中にシトクロムを溶かし、濃縮保存する。

培養時に x2TY 培地を用い、誘導時にヘムの合成基質であるアミノレブリン酸を加えることにより、シトクロムの収量を約 2 倍に向上させることができ、最終的に大腸菌培養液 10 L から約 100~200 mg の精製タンパク質を得ることができた。また、DEAE カラムによる精製時に、得られた標品の吸収スペクトルを測定したところ、酸素化型ミオグロビンのそれと酷似していた。したがって、7 位メチオニンの変異によってヘムポケットが構築でき、酸素が安定に結合できるようになったと考えられた。しかしながら、後

述のように M7A、M7G の変異体ではカラムでの精製時にヘムが脱離し、樹脂表面にヘムが吸着する現象が認められた。そこで、さらなる変異体 E4S/M7A/E8S、E4S/M7G/E8S を調製し、ヘムの脱離を防ぐ方策を考察した。

7. シトクロム 3 重変異体の設計と安定性

シトクロム b562 の 7 位メチオニンアラニンやグリシンに置換することにより、ヘムの脱離が起こることがわかったので、これを抑えるべくさらに変異体の調製を行った。まず、立体構造既知のヘムタンパク質において、どのようにしてヘムが安定に保持されているかを検討した。通常ヘムの保持には、(1) 軸配位子アミノ酸とヘムとの配位結合、(2) ヘム周辺のアミノ酸残基とヘムとの間のファンデルワールス力、(3) ヘム周辺置換基であるプロピオン酸とアミノ酸残基との間の水素結合や塩橋等の極性相互作用、の 3 つが重要と考えられている。そこで、ヘムから 4 Å 以内に存在する原子を立体構造データからピックアップし、その数を数えた。炭素原子は非極性の、窒素や酸素原子は極性相互作用の目安になると考えられる。図 21 にその結果を示した。まず、ヘム全体で考えると、その周辺の炭素原子数と非炭素原子数との間には弱い相関しか認められなかった。しかし、プロピオン酸残基の周辺に限ってみると、両者の間に相関係数 0.9 以上の直線関係が認められた (図 22)。このことは、炭素原子が多くて疎水性相互作用が強くなると、その分だけ非炭素原子が多くなって極性相互作用が強くなればヘムを保持できないことを示している。

ここにシトクロム b562 をプロットしてみると、直線から外れていることがわかる。シトクロムは 6 配位型構造をとり、ヘムが 2 つの軸配位子と結合しているために野生型ではヘムが脱離しなかったが、メチオニン を非配位性のアラニンやグリシンに置換した結果、容易に脱離が起こったものと考えられた。そこで、シトクロム b562 のプロピオン酸周辺を調べてみると、4 位と 8 位のグルタミン酸が周辺に存在していることがわかった。これらの残基のうちプロピオン酸の酸素原子から 4 Å 以内に存在する原子を図 22 に示した。シトクロム b562 の X 線立体構造では単位格子中に 2 分子 (A、B) のシトクロム b562 が含まれているので、それらを丸で囲んで示した。図 21 の結果をふまえると、グルタミン酸を炭素鎖の少ないアスパラギン酸やセリンに置換すれば炭素原子数を減らすかわりに非炭素原子数を増やすことができると考えられた。そこで、図 21 の直線により近づくグルタミン酸からセリン残基への置換を行うこととし、E4S/M7A/E8S、及び E4S/M7G/E8S の 2 つの変異体を調製した。

これら変異体がヘムを安定化しているかどうか検討するため、尿素添加によるヘムの脱離を調べた (図 23)。野生型標品では 4.5 M 近くの尿素を加えないと変性が起こらないのに対し、1 重変異体である M7A、M7G では 2.5 M 程度の尿素濃度で変性が起こっており、たしかにこれら変異体ではヘムが脱離しやすいことがわかった。一方、3 重変異体では 3.5 M 程度の尿素濃度まで安定になり、上記変異戦略が有効であることがわかった。また、7 位の置換体同士で比較してみると、M7A より M7G が、E4S/M7A/E8S よ

り E4S/M7G/E8S が安定であり、側鎖の小さなグリシンの方がヘムの結合にとって有利であることがわかった。シトクロム b562 は α ヘリックスバンドル型の構造をしており、側鎖の小さなグリシンの方がヘリックスのパッキングにとって都合が良いためであると思われる。いずれにしても、3 重変異によってヘムを安定化できたため、これらを含めてヘムポケットの性質をさらに検討した。

8. シトクロム変異体の pH 変化

図 24~28 に、pH を変化させたときのシトクロム変異体の吸収スペクトル変化を示した。野生型では、酸性域から中性にかけて安定であり、アルカリ域ではソーレー帯の吸光度減少をとまなうスペクトル変化が認められた。一方、変異体では中性付近に球種スペクトル変化の小さい平坦な領域がわずかに存在するものの、酸性、及びアルカリ性域ではソーレー帯の吸光度が大きく減少し、ヘムが脱離していることがわかる。しかし、7 位にグリシンを持つ M7G と E4S/M7G/E8Sの方がアラニンを持つ M7A と E4S/M7A/E8S に比べて特に酸性域で安定であり、これは上記 8. の結果と一致する。すなわち、8 位にグリシン残基を持つ方がより安定にヘムを保持できることがわかった。中性における各変異体の吸収極大波長を表 5 に示した。野生型は 6 配位低スピン状態をとるため、ソーレー帯が長波長側に出現し、可視部 500 nm 付近に 2 本のバンドを与えている。変異体では 630 nm 付近に弱い吸収帯が存在し、高スピン状態のヘムを含んでいると示唆される。また、変異体は互いに同じような吸収極大波長を示し、1 重変異体同士、3 重変異

体同士は特に似ていることがわかる。また、ミオグロビンの野生型及び92位変異体（表1）と類似しているが、このことは、各変異体のヘム近傍構造がミオグロビンのものと似通っていることを示唆している。

9. シトクロム変異体のシアン結合性

図29～33に、シアンイオンを添加したときのシトクロム変異体の吸収スペクトル変化を示した。野生型では、シアンイオンの結合によってスピン状態が変化しないため、吸収スペクトルの変化は非常に小さい。一方、変異体ではシアンイオンによって低スピン状態となるため、630 nm 付近の吸収帯が消失し、大きな吸光度変化を示している。すべての場合に等吸収点が観測されたため、シアンイオンの結合は1段階で起こっていることが示唆された。シアン化型シトクロムの吸収極大波長とシアンイオンの解離定数（ K_d ）を表6に示した。野生型シトクロムではヒスチジンとメチオニンが配位しており、ヘムの配位座が占有されているため、シアンイオンは非常に結合しにくい。これに比べて、変異体ではシアンイオンの親和性が約4000倍上昇していることがわかる。これは、7位メチオニンを取り去ったあとに、外来性配位子が容易に結合できるヘムポケットが構築されたことを示している。この K_d 値は野生型ミオグロビンのものと近く（表2）、変異によってミオグロビンと同様なヘム近傍構造を持つことが示唆された。

D. 考察

以上、X線結晶構造解析から明らかに

なっているミオグロビン、及びシトクロムb562の立体構造をもとにして各種変異体を設計・調製し、pH依存性、シアンイオンの結合性を検討することを通して、ヘムポケットの性質を検討した。

1. ミオグロビン変異体

ミオグロビン変異体の調製法はすでに確立されていたが、カラムの精製条件や融合タンパク部分の切除法を検討することによって収量を大幅に向上させることができた。92位セリンの変異体S92A、S92D、S92E、S92Vを用いて近位水素結合ネットワークの改変を行い、pHの影響、及び外来性配位子の結合性を調べた。吸収スペクトルの測定によって検討したところ、見かけの pK_a 値、及びシアンイオンの解離定数 K_d 値はこれら変異体では野生型とほとんど同じであり、また、吸収スペクトルも酷似していたことから、ヘムの電子状態すなわちヘムの構造には近位水素結合網は大きな影響を及ぼさないことがわかった。しかし、S92Vについては pK_a 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。

一方、ヘムに配位結合している近位ヒスチジンをグリシンやアラニンに置換し、遠位側に鉄配位子となる68位ヒスチジンを導入した3重変異体H64V/V68H/H93A、H64V/V68H/H93Gを調製し、新たなヘムポケット構築の可能性を検討した。これら変異体では、新しい軸配位子となるHis68とヘム鉄との結合はかなり歪んだものとなることが予想され、構築されたヘムポケットへ酸素分子が結合した場合にその親和性が大きく変化することが期待される。シアンイオンを用いて検討したところ、野生型に比べて1000

倍ほど結合しにくくなることがわかった。吸収スペクトルから判断すると、これら3重変異体はシアンフリーの時に低スピン状態をとっていると思われ、上記His68以外に強い配位力を持つアミノ酸残基が結合していると推定された。ヘムの近傍構造を調べると近位側97位にヒスチジン残基があるが、X線立体構造から判断して、距離的に配位が難しいと考えられる。しかし、93位ヒスチジンを取り去っているため、近位側で構造の再配位が起これば、97位の配位もあり得ると思われる。

2. シトクロム変異体

ヘムポケットの再構築という観点から、4本の α ヘリックスからなる単純なタンパク質であるシトクロムb562の部位特異的変異を行い、7位メチオニンの置換によって外来性配位子が結合できるか検討した。1重変異体ではヘムが脱離し易かったため、他のヘムタンパク質のヘム周辺構造を詳細に検討した。その結果、4位と8位のグルタミン酸をともにセリンに置換することによりヘムの脱離を抑えることに成功した。ヘムの安定性を尿素変性濃度を指標として検討し、7位メチオニンのグリシン置換体の方がアラニン置換より安定であることがわかった。この3重変異体を中心に外来性配位子であるシアンイオンの配位性を調べ、ミオグロビンと同程度の親和性を持つことを明らかにした。また、シアンイオンの

Kd値を比較し、アラニン置換体の方がグリシン置換よりシアンイオンに対して高い親和性を持つことがわかった。先の尿素変性の結果と考え合わせて、アラニン置換体の方がヘリックスのパッキングが弱く、ヘム近傍にすき間が生じることでシアンイオンが配位できる空間が現れたと思われる。

また、中性型シトクロムの吸収スペクトル(表6)は中性型ミオグロビンのもの(表1)と大変似ていることから、上記変異によってミオグロビンと同様のヘムポケット構造を持つ新たなタンパク質を人工的に構築できたと判断できた。これまで、ペプチド合成により人工的なヘムタンパク質を構築する試みがなされてきたが、今回の研究ではアミノ酸変異により新規機能を付与できた点、極めて意義深い。この研究の過程でヘムの脱離を防ぐ手法を考案できたが、この方法はヘムだけでなく新薬のデザインに対しても有効と思われる。

E. 結論

上記のように、ミオグロビン、及びシトクロムの精製法を確立した。また、これらヘムタンパク質の立体構造情報をもとにしてヘムポケットの再構築を行い、ここに外来性配位子が結合できることを明らかにした。今後これら変異体の酸素結合性を明らかにすることにより、医療現場の要求に対応できる人工血液が構築できると考えられる。

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)

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

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

表1 92位変異ミオグロビンの吸収極大波長と pKa 値

Mb	pKa	pH	Absorption Maxima/nm		
WT	8.80	Neutral	408	503	631
		Alkaline	413	542	582
S92A	8.53	Neutral	408	503	633
		Alkaline	413	541	581
S92D	8.65	Neutral	408	503	633
		Alkaline	412	542	583
S92E	8.79	Neutral	408	503	633
		Alkaline	413	541	582
S92V	8.09	Neutral	407	502	628
		Alkaline	414	541	579

表2 シアン化型 92位変異ミオグロビンの吸収極大波長と Kd 値

Mb	Kd/ μ M	Absorption Maxima of Cyanide Complex/nm		
WT	1.87	361	423	541
S92A	2.30	361	422	539
S92D	1.05	360	422	540
S92E	2.74	359	422	540
S92V	1.70	359	421	540

表3 2重及び3重変異ミオグロビンの吸収極大波長

Mb	pH	Absorption Maxima/nm		
H64V/V68H	7.20	412	526	632
H64V/V68H/H93A	7.24	415	534	
H64V/V68H/H93G	7.23	414	533	

表4 シアン化型2重及び3重変異ミオグロビンの吸収極大波長と Kd 値

Mb	Kd/mM	Absorption Maxima of Cyanide Complex/nm		
H64V/V68H	8.93	361	421	540
H64V/V68H/H93A	2.60	359	422	542
H64V/V68H/H93G	1.37	358	422	543

表5 中性におけるシトクロム変異体の吸収極大波長

Cytochrome b562	pH	Absorption Maxima/nm		
WT	7.25	418	531	562
M7A	7.12	407	502	631
M7G	7.18	408	496	629
E4S/M7A/E8S	7.24	408	526	624
E4S/M7G/E8S	7.26	408	532	630

表6 シアン化型シトクロム変異体の吸収極大波長と Kd 値

Cytochrome b562	Kd/ μ M	Absorption Maxima of Cyanide Complex/nm		
WT	7520	361	422	541
M7A	1.86	363	421	537
M7G	2.44	360	423	541
E4S/M7A/E8S	1.95	361	421	537
E4S/M7G/E8S	2.98	358	423	545

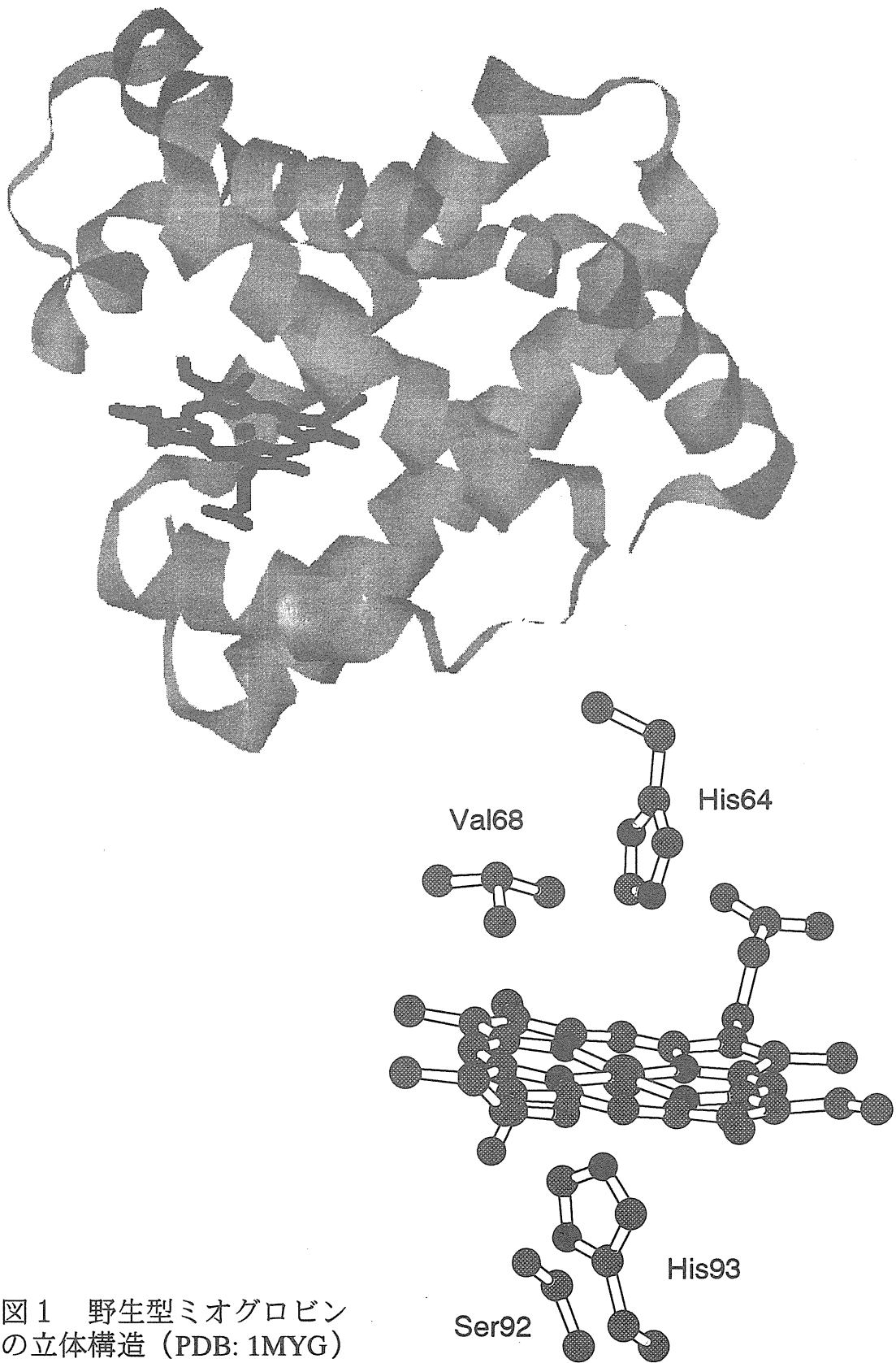


図1 野生型ミオグロビンの立体構造 (PDB: 1MYG)

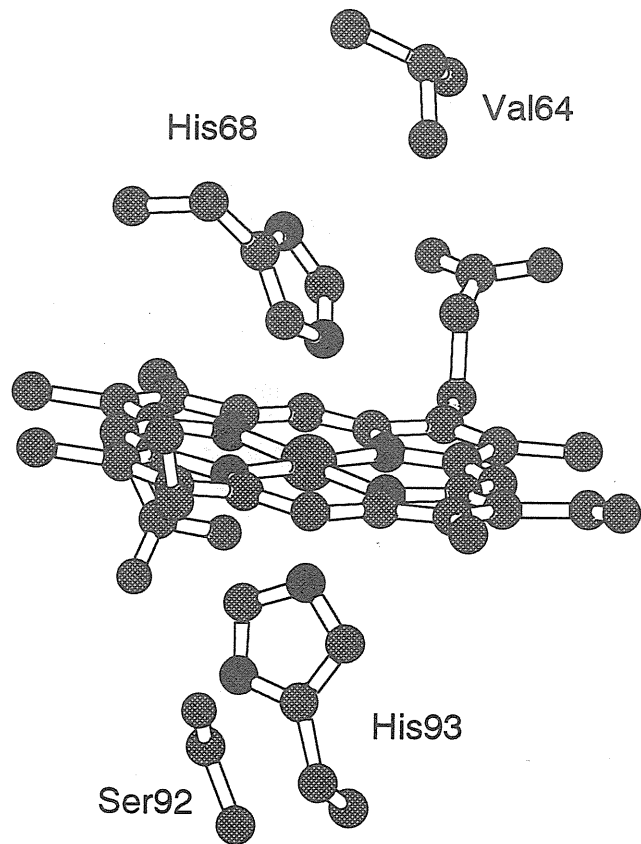
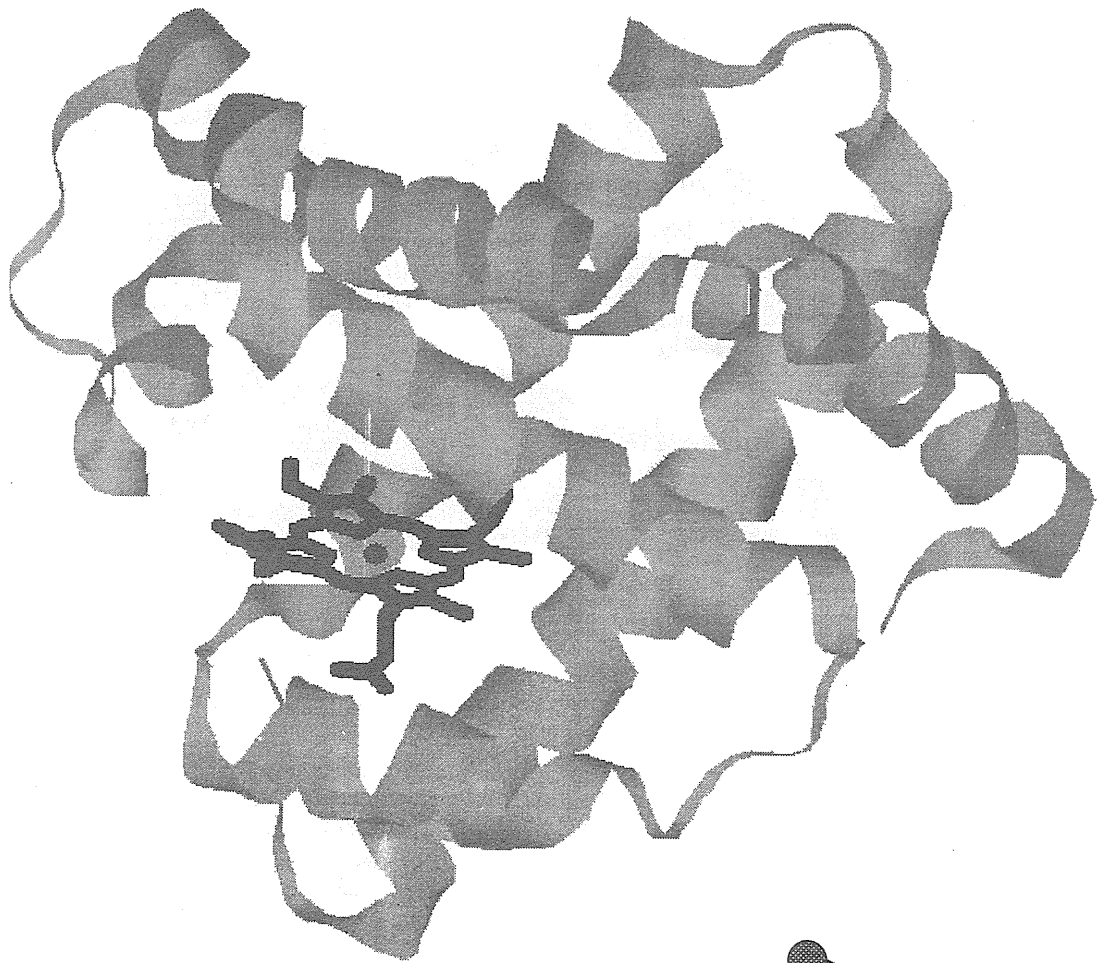


図2 ミオグロビン2重
変異体 (H64V/V68H) の
立体構造 (PDB: 1MNI)

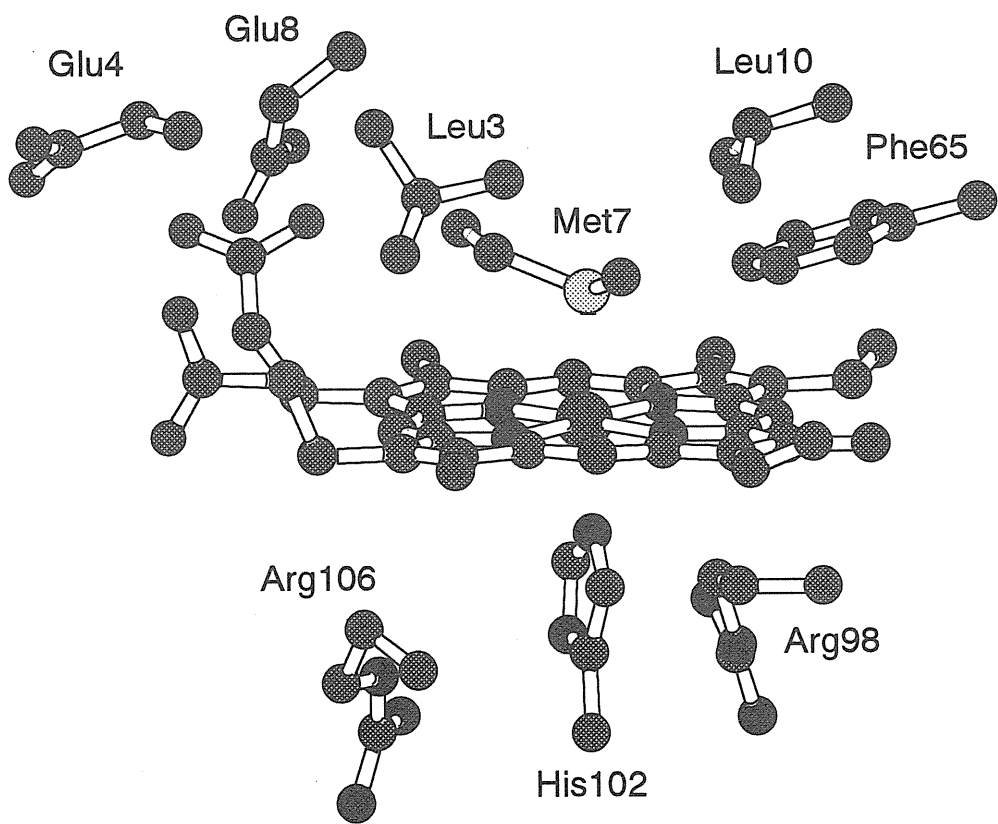
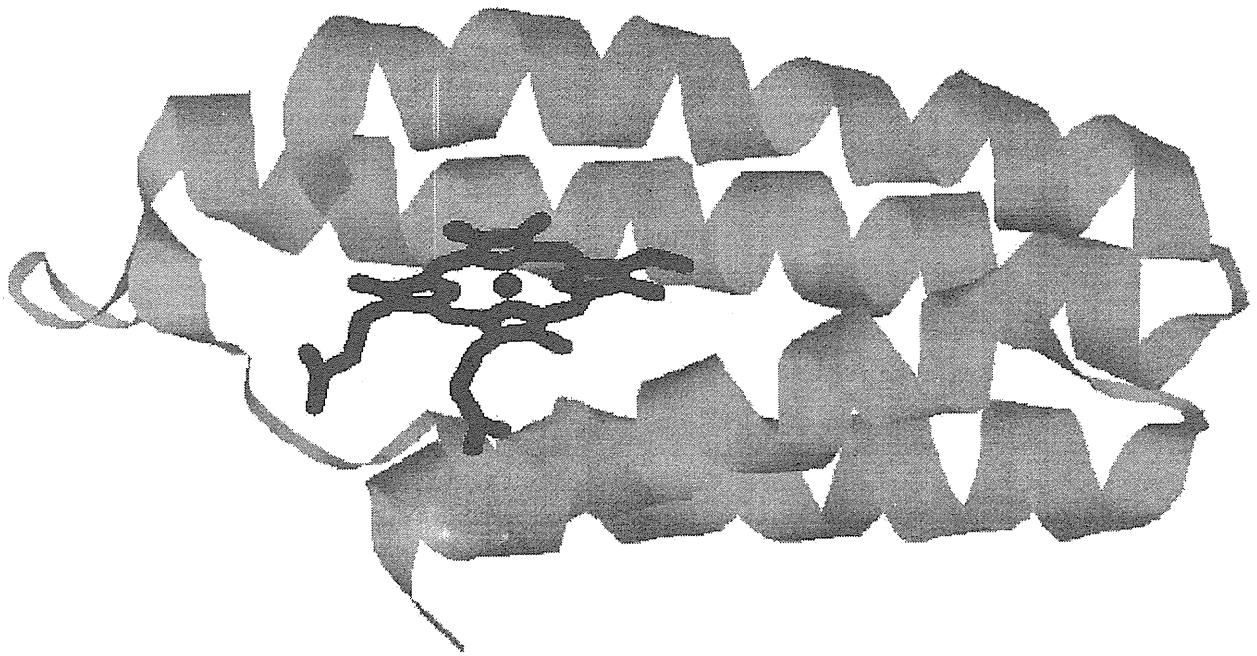


図3 野生型シトクロムb562の立体構造 (PDB: 256B)

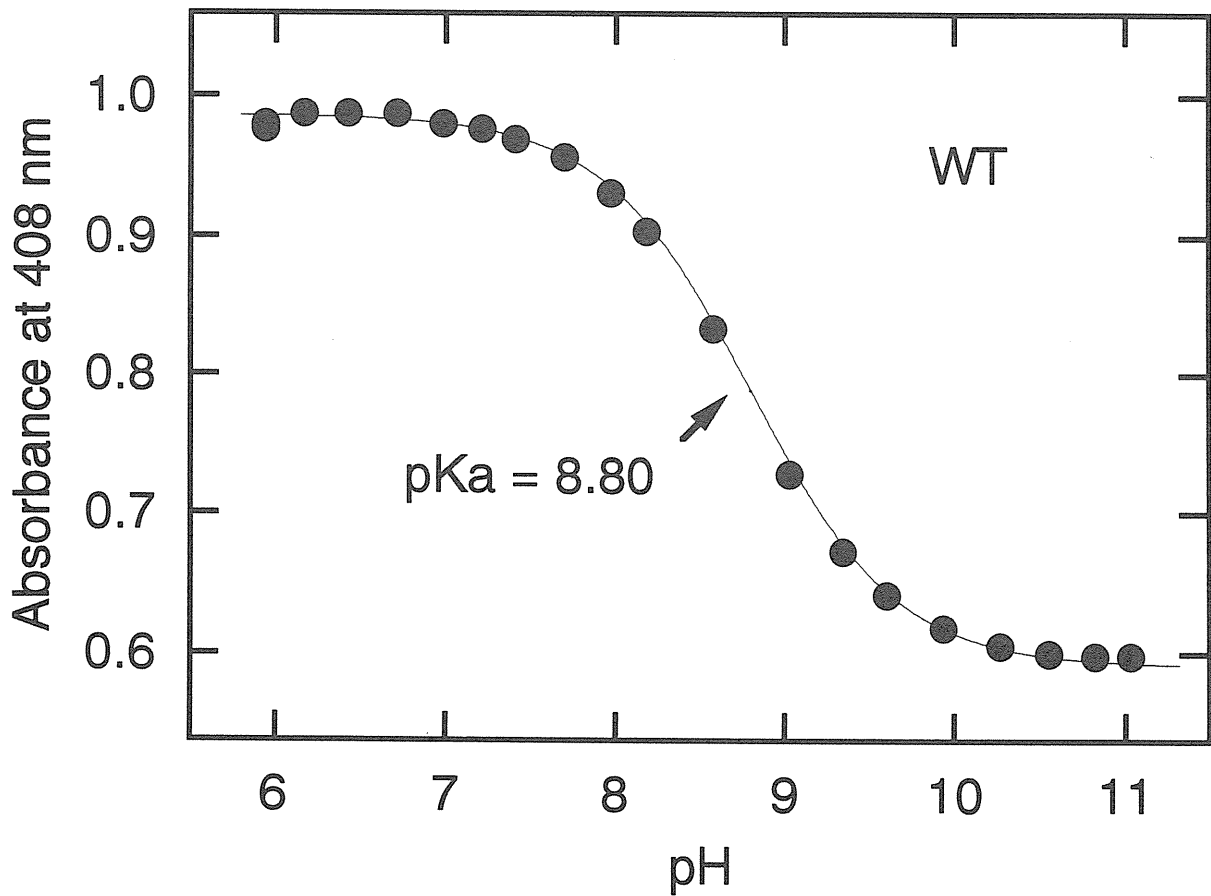
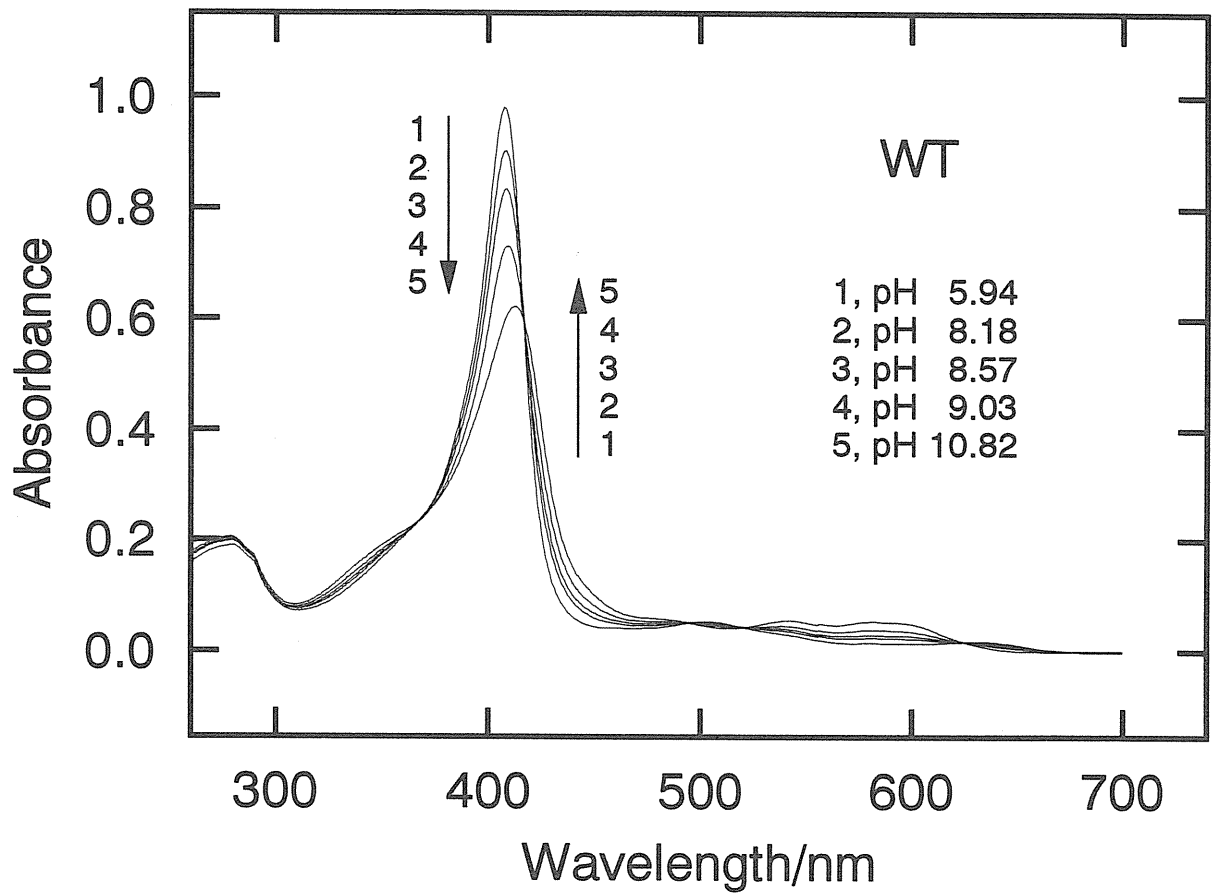


図4 野生型ミオグロビンのpH依存性

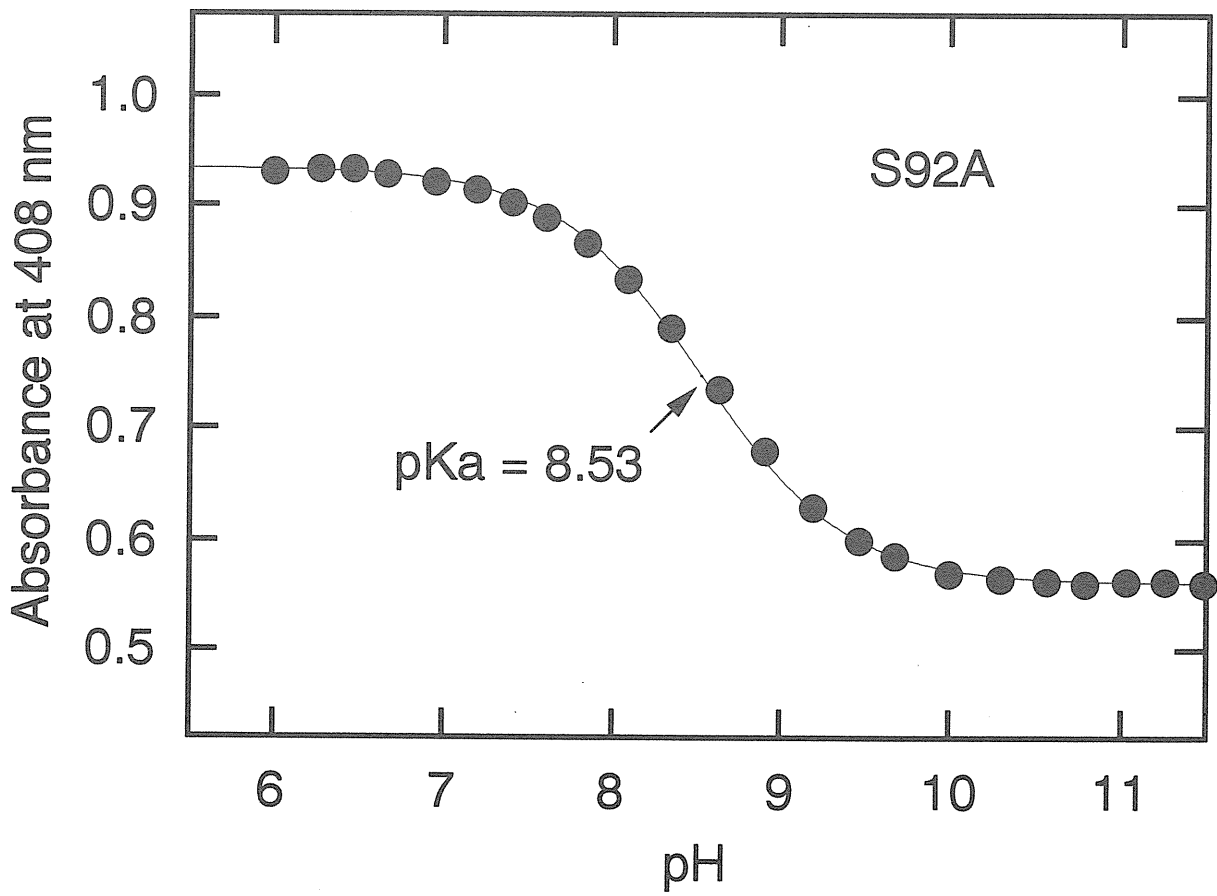
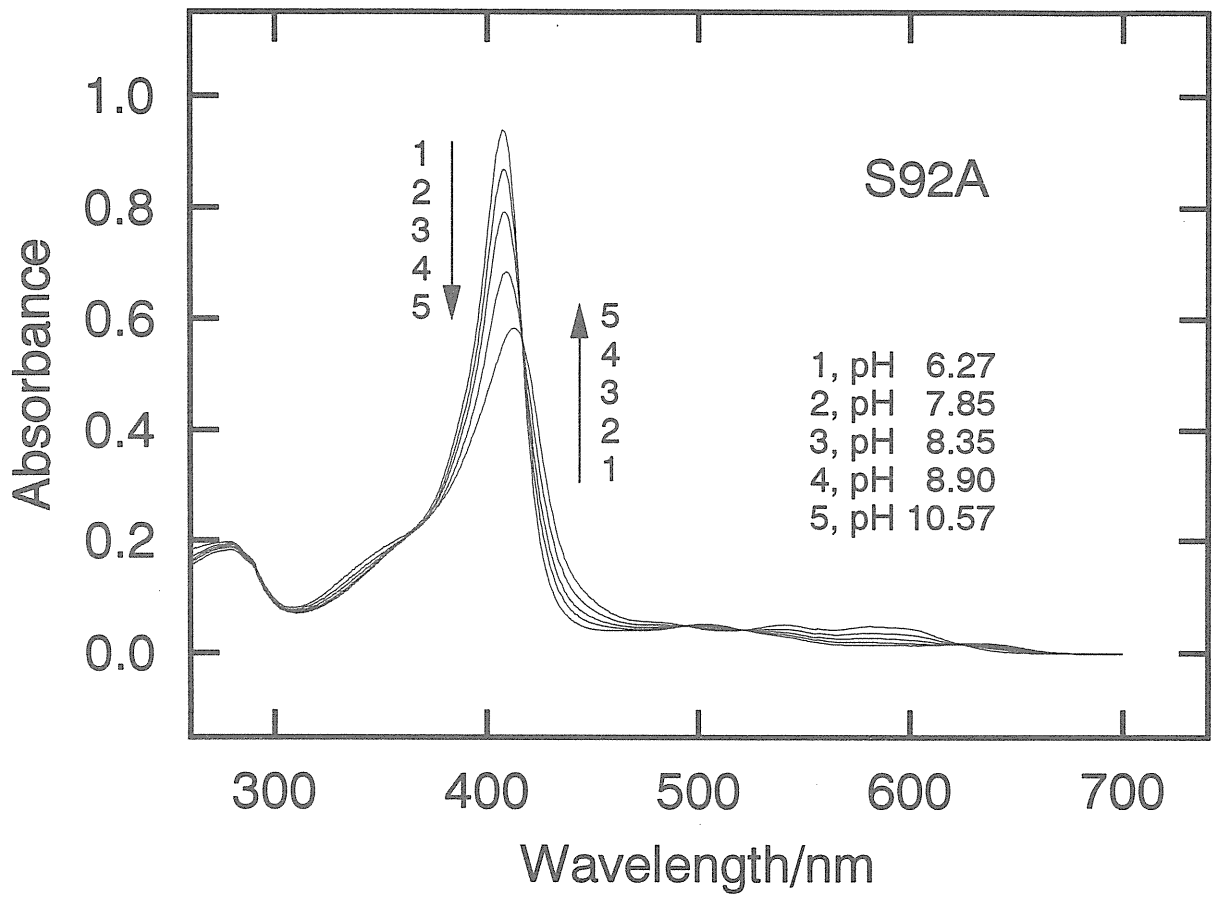


図5 S92AのpH依存性

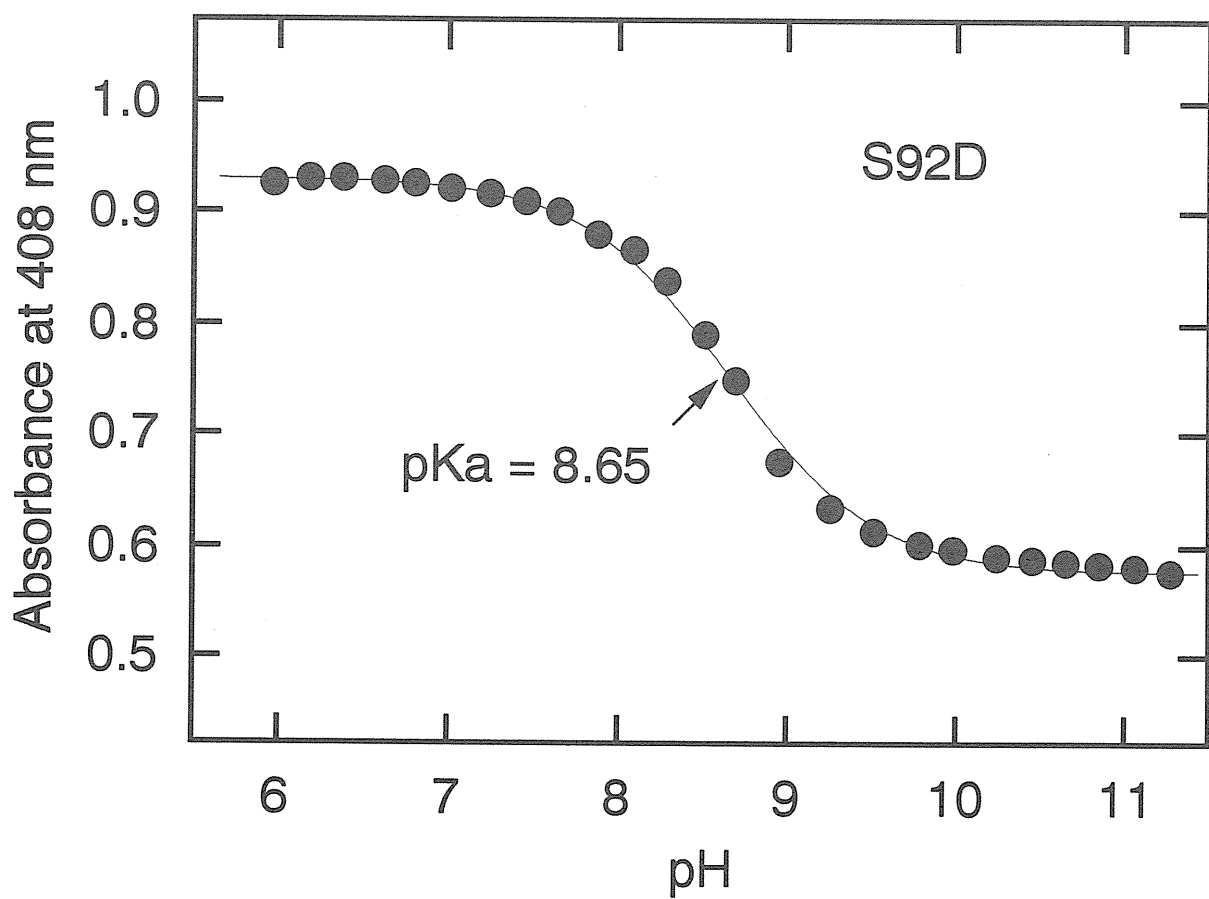
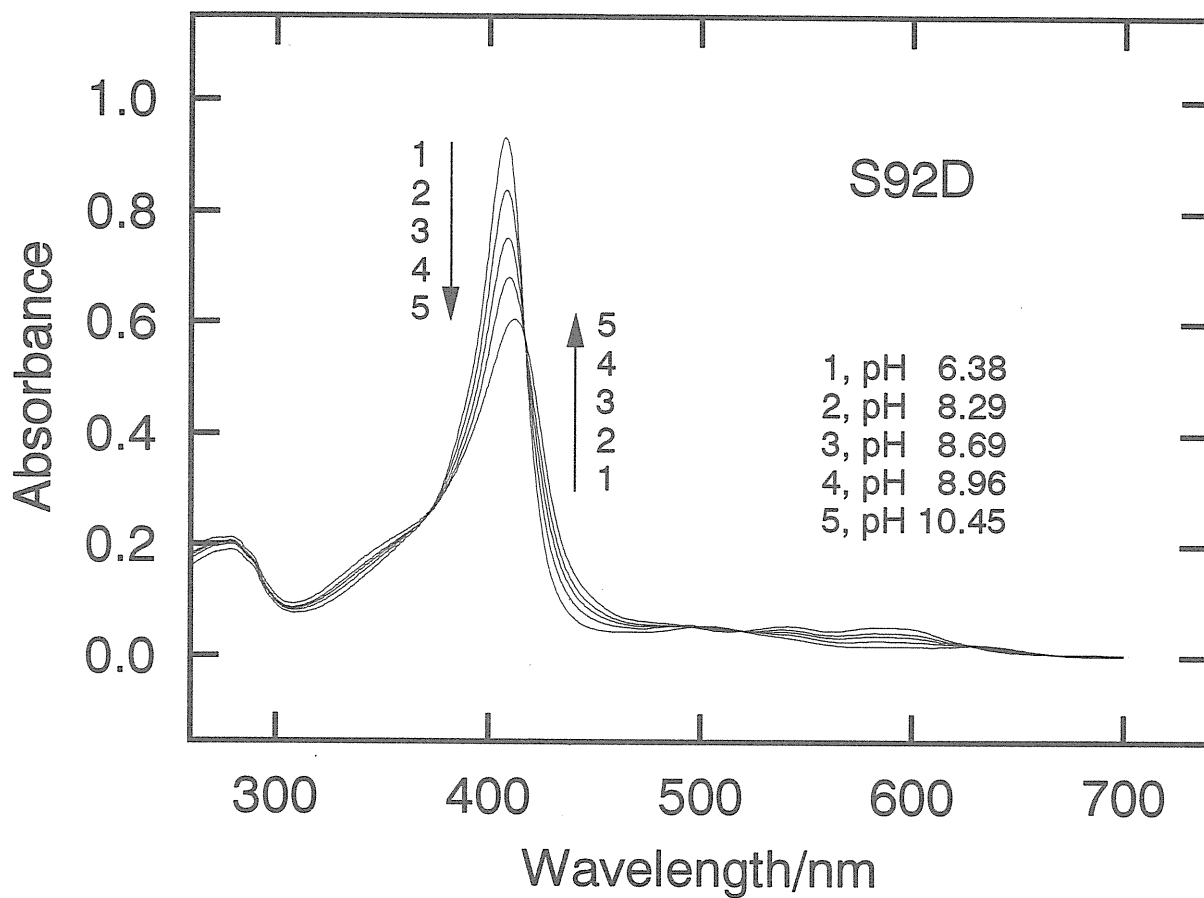


図6 S92DのpH依存性

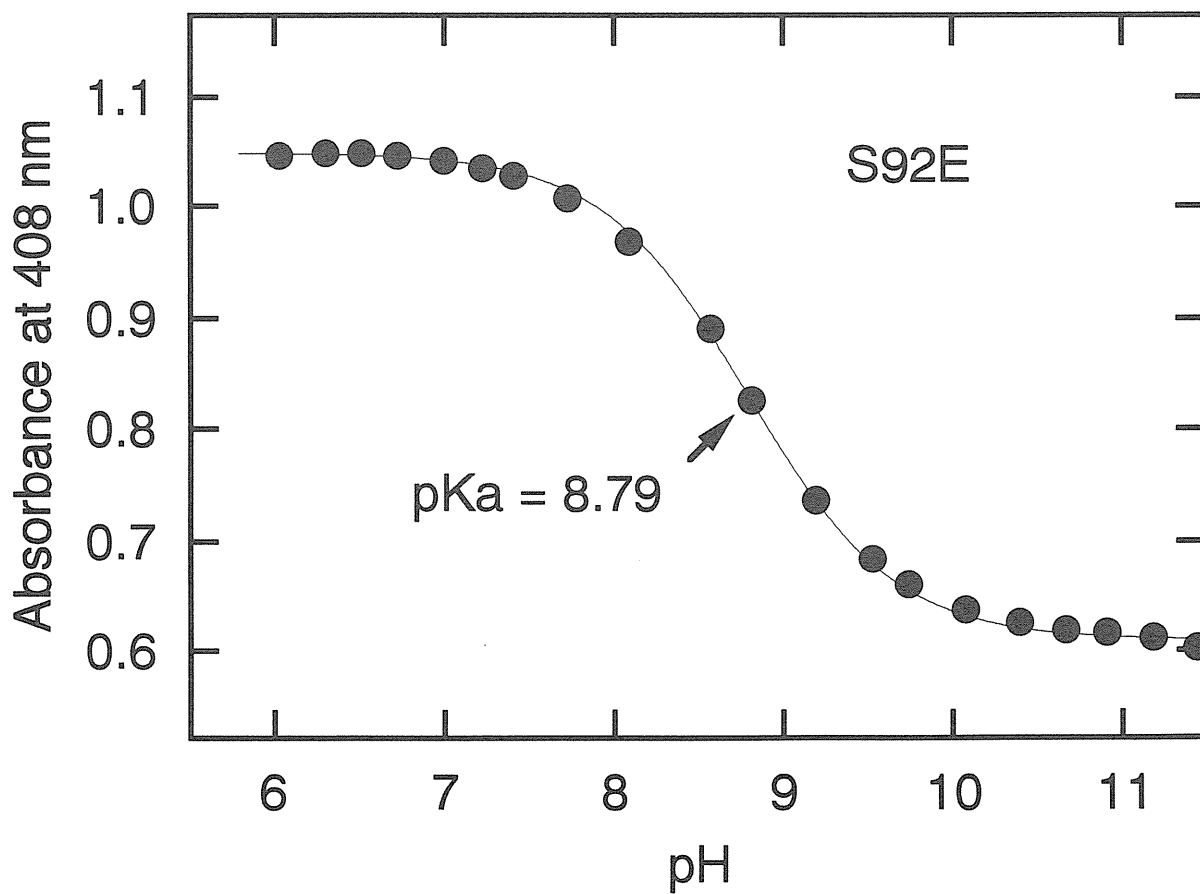
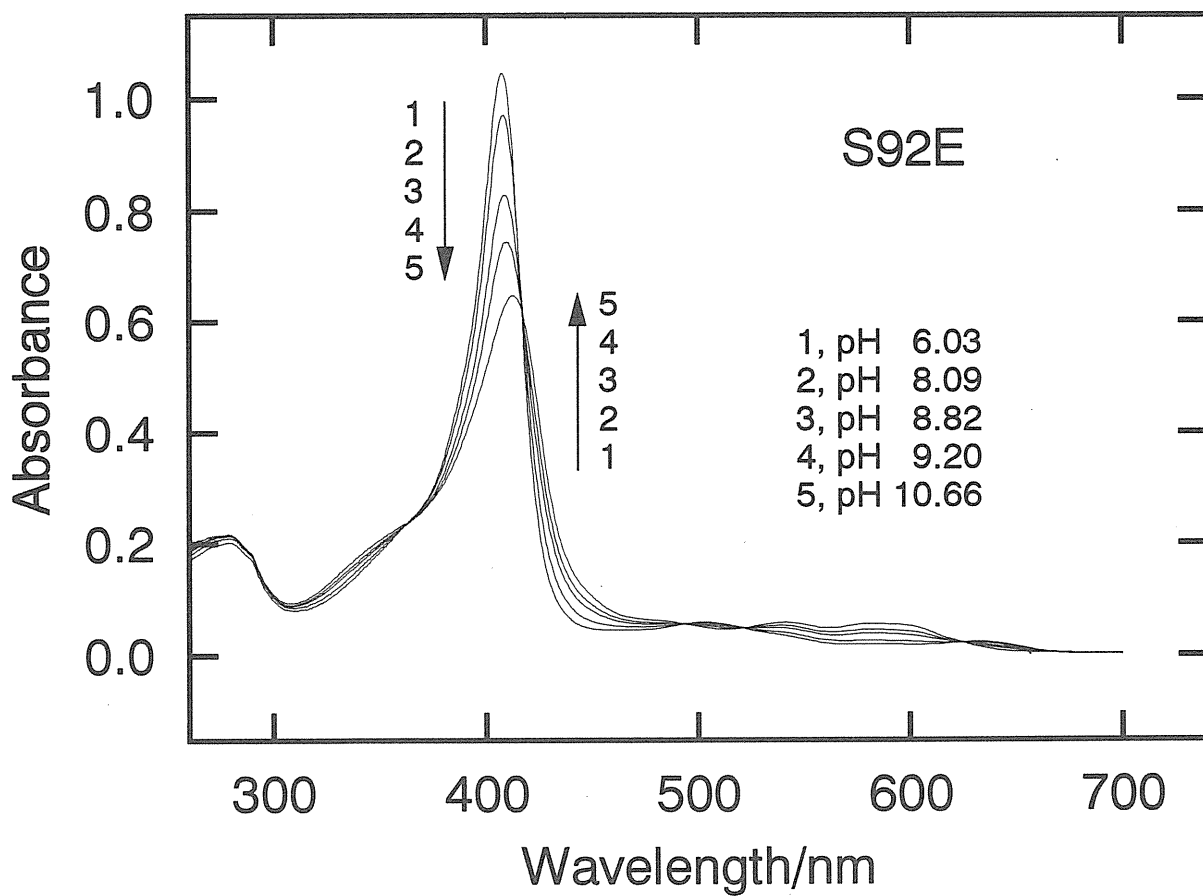


図7 S92EのpH依存性

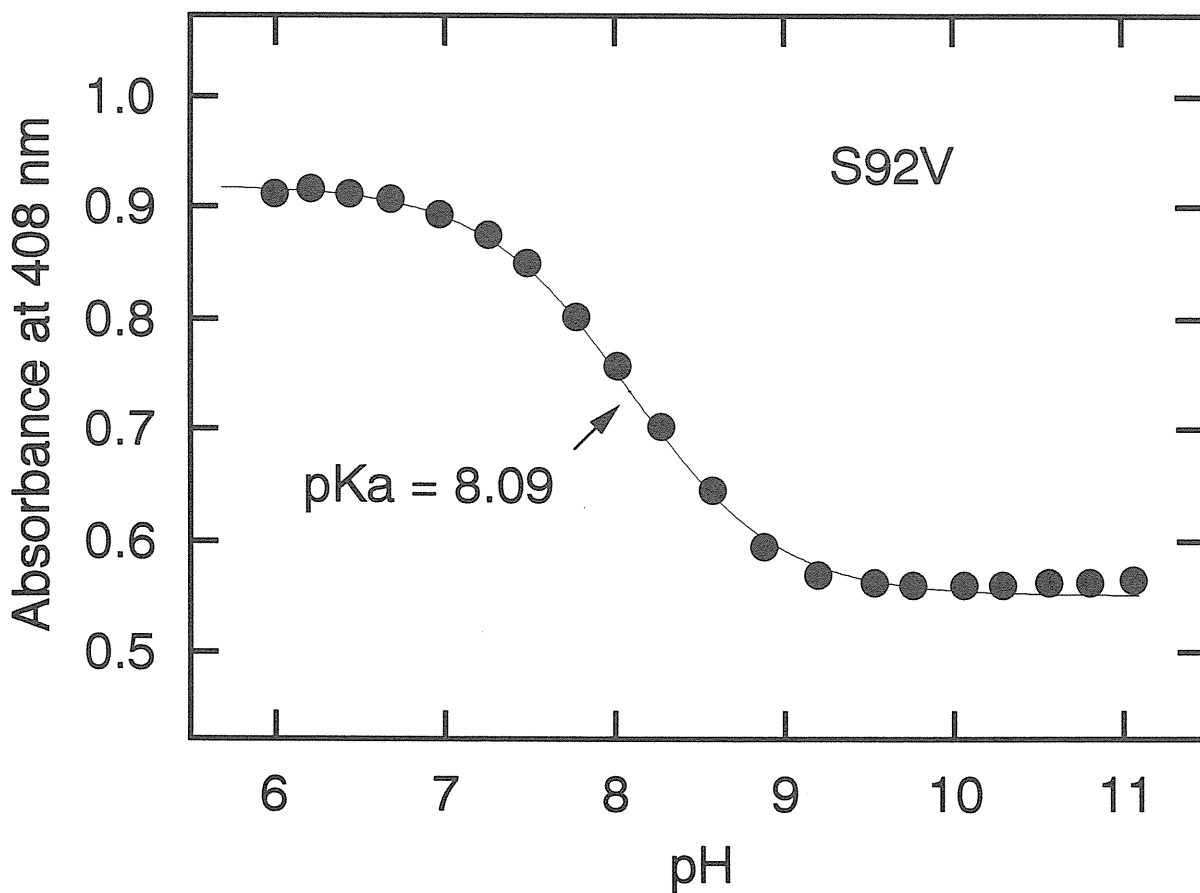
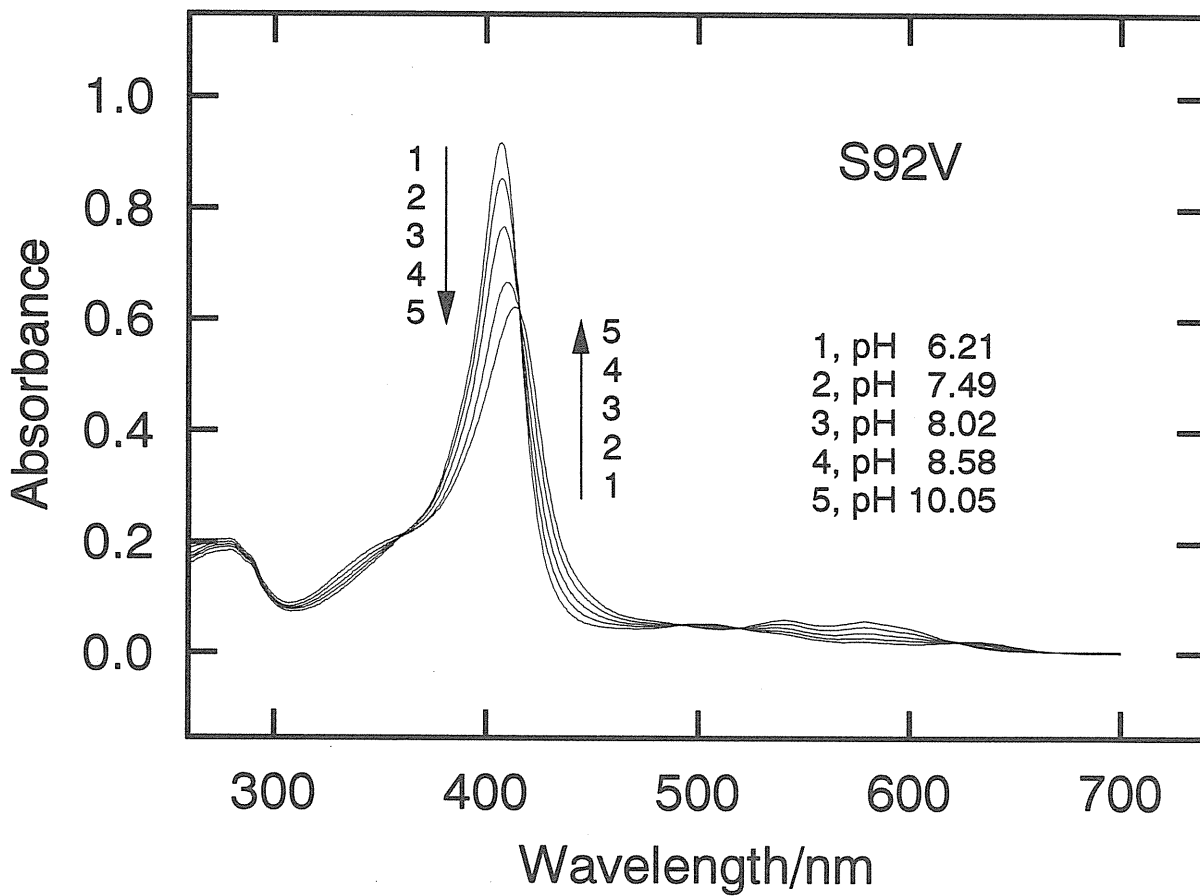


図8 S92VのpH依存性

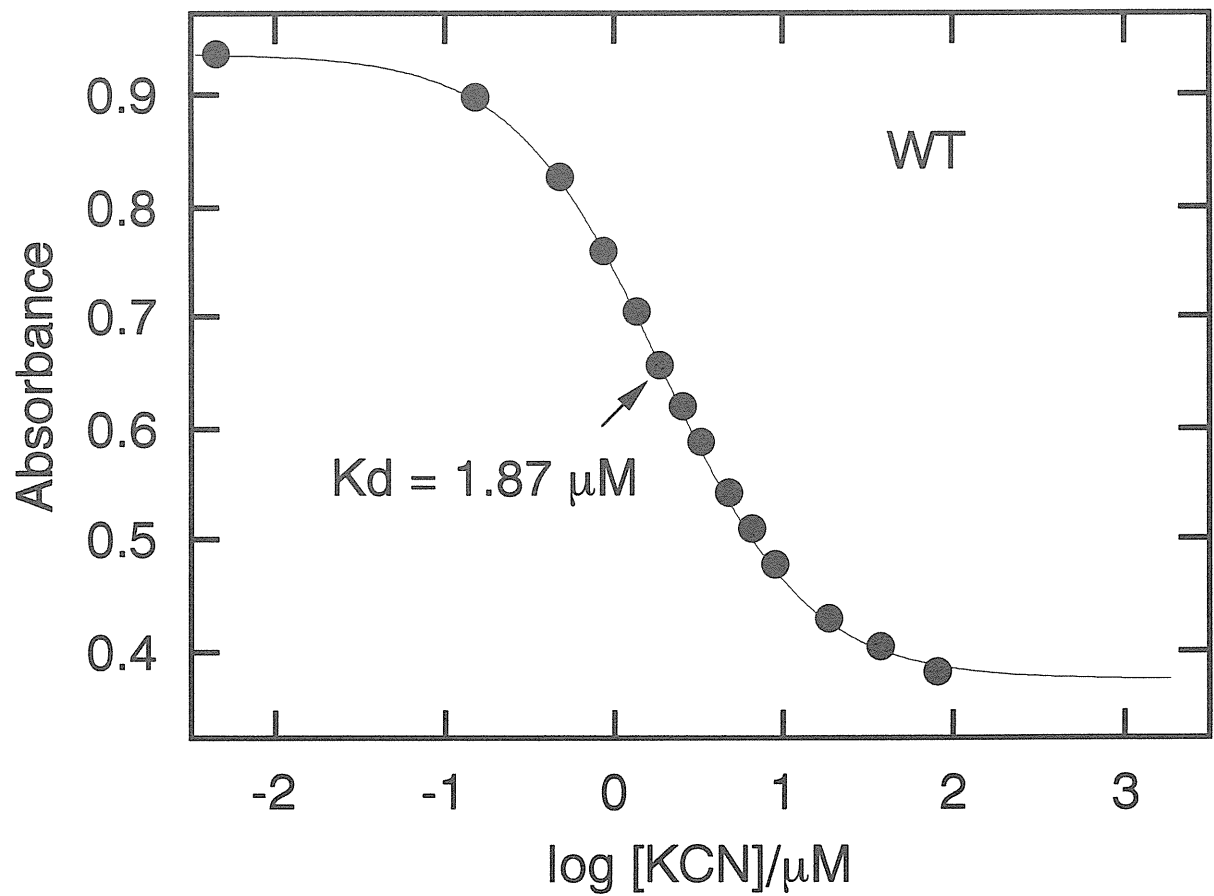
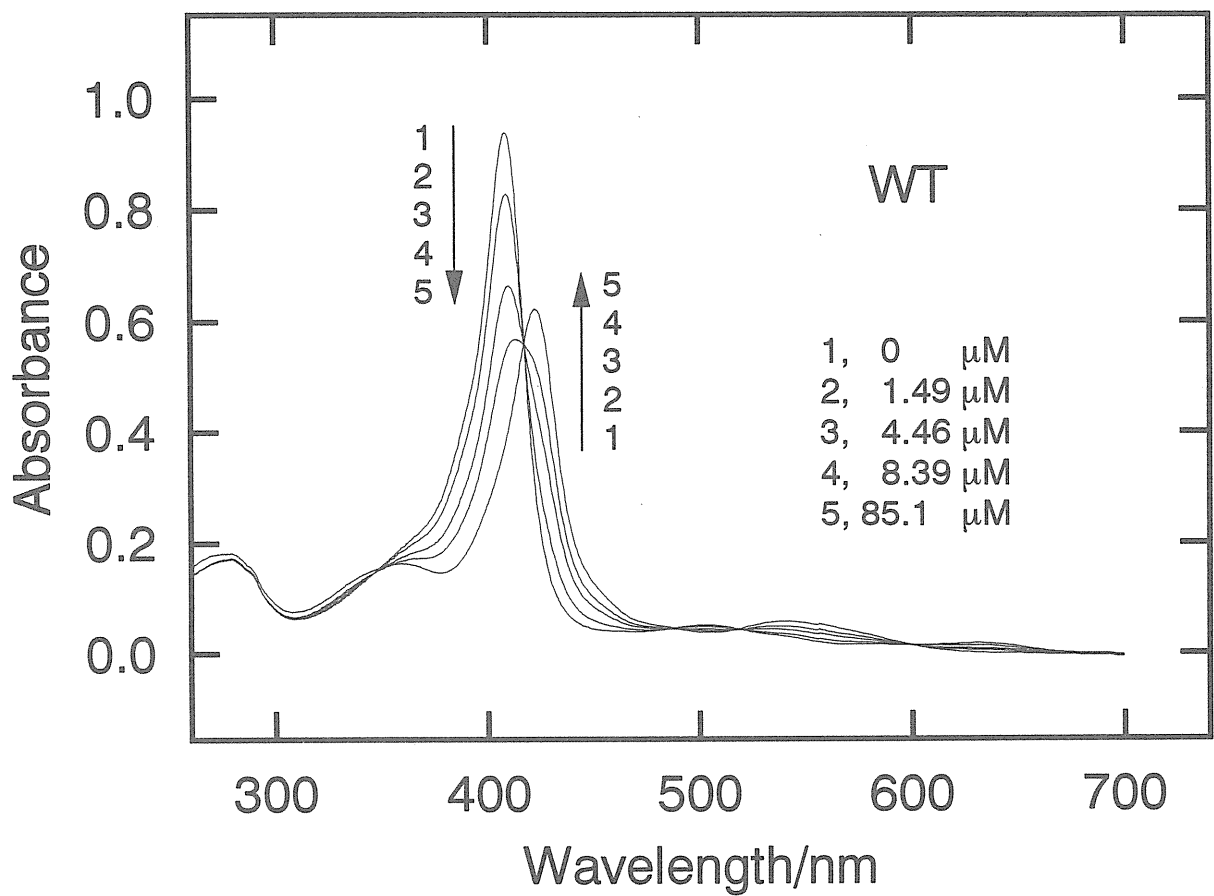


図9 野生型ミオグロビンのKCN結合性

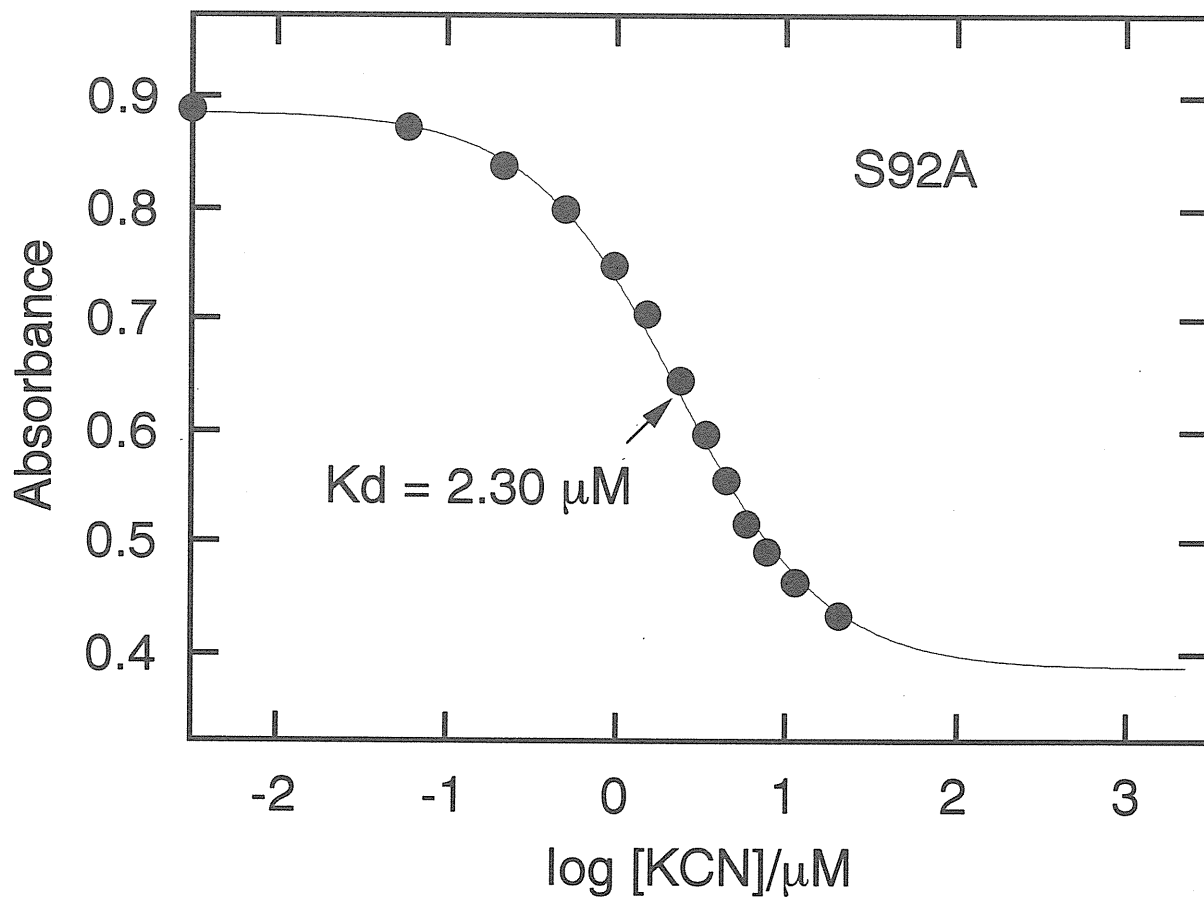
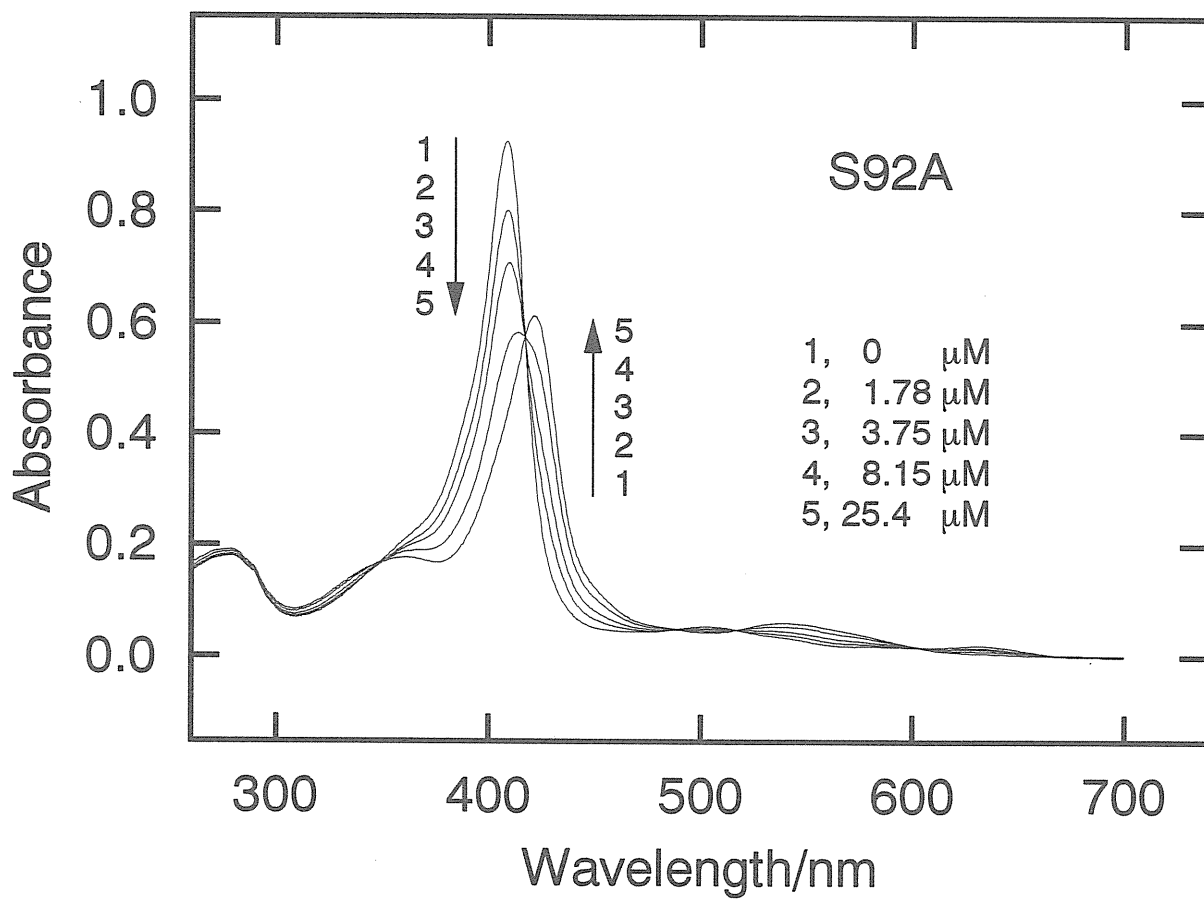


図10 S92AのKCN結合性

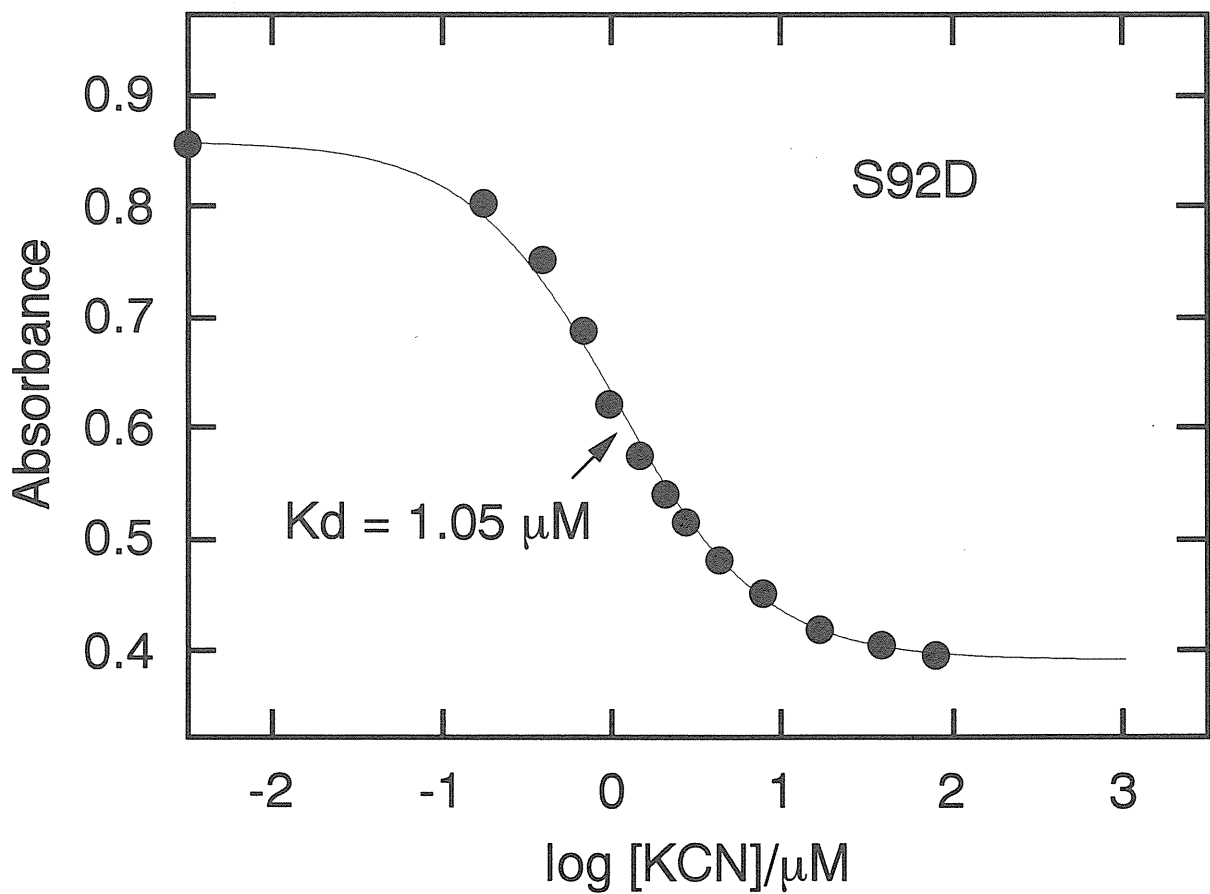
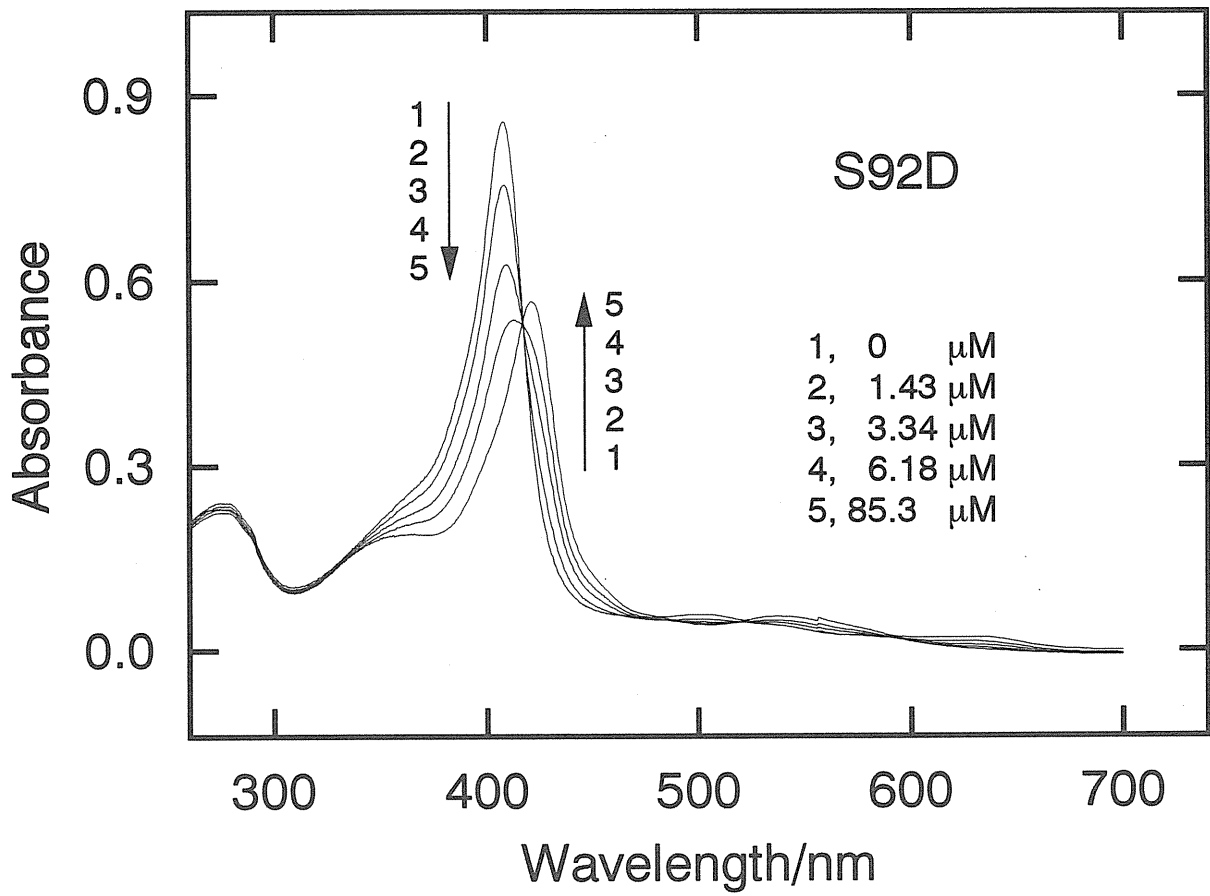


図11 S92DのKCN結合性

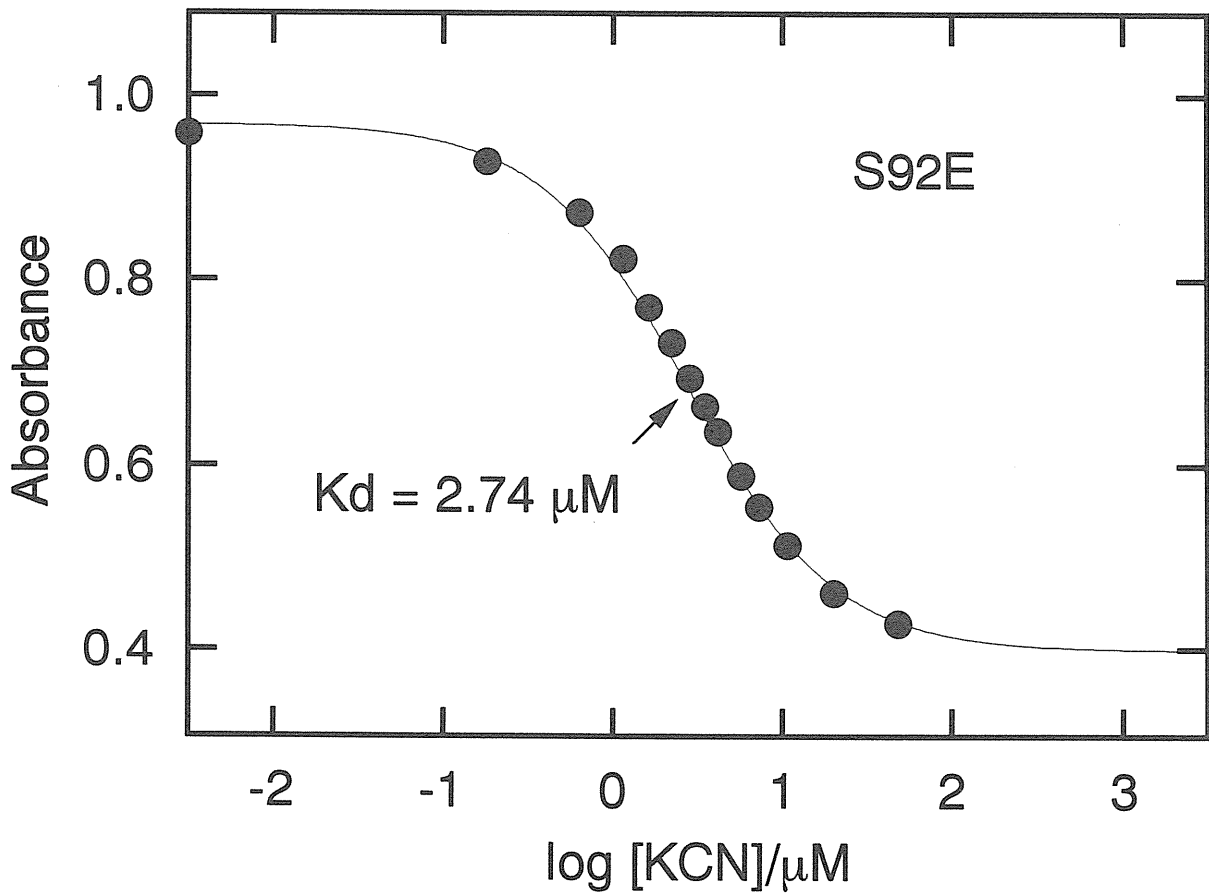
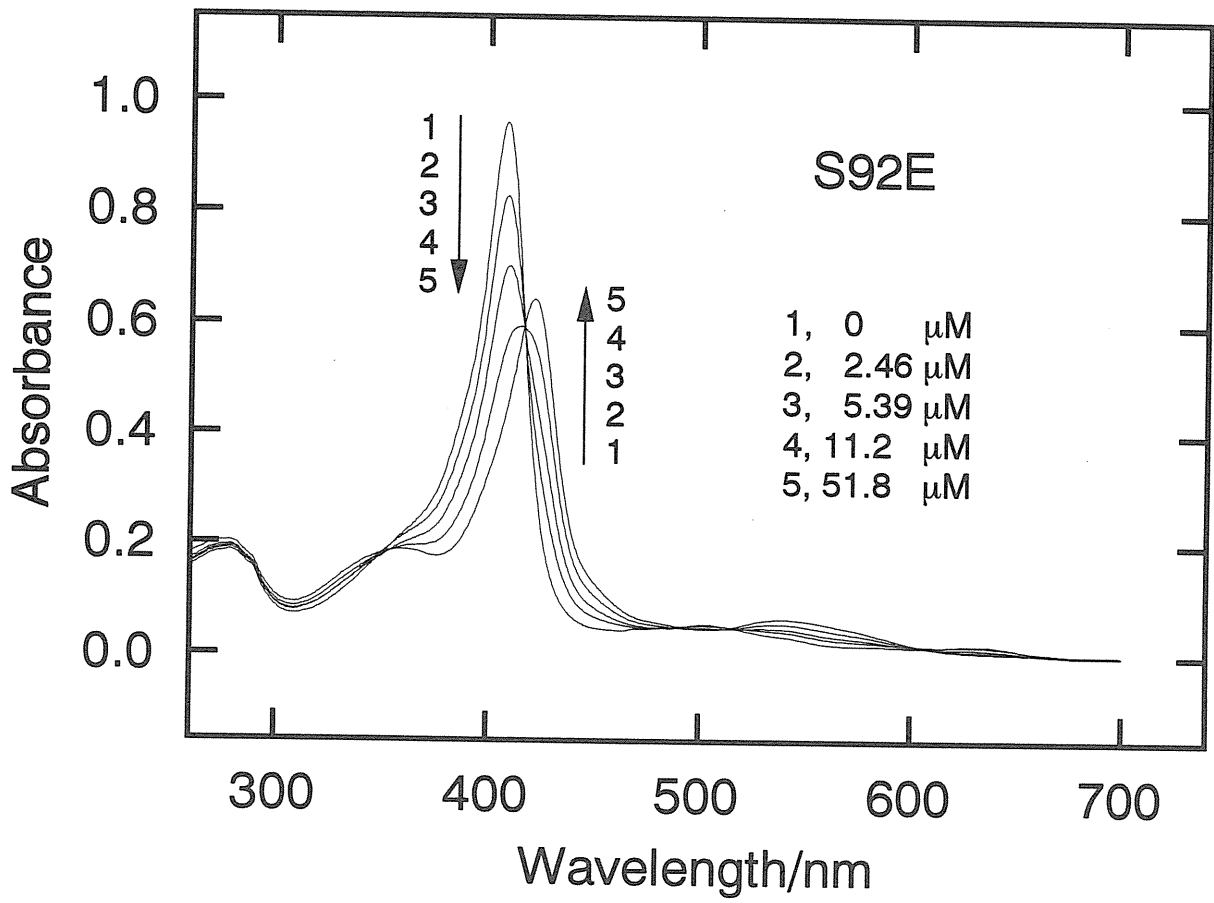


図12 S92EのKCN結合性