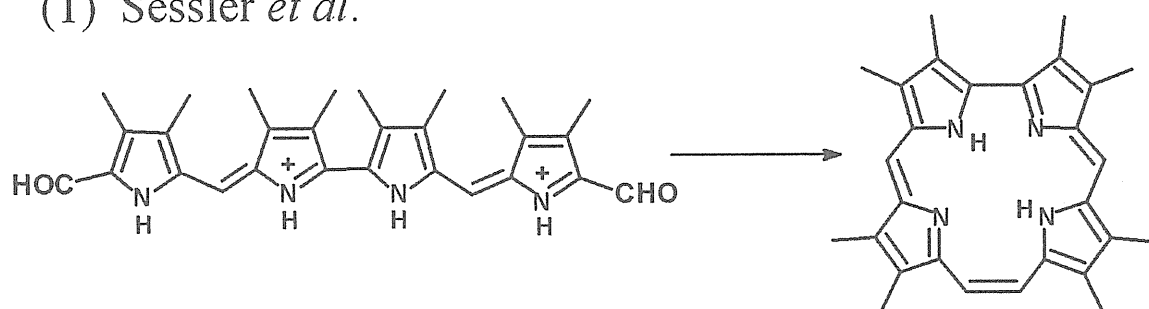


## Conventional corrophycene synthesis

(1) Sessler *et al.*



(2) Falk and Chen

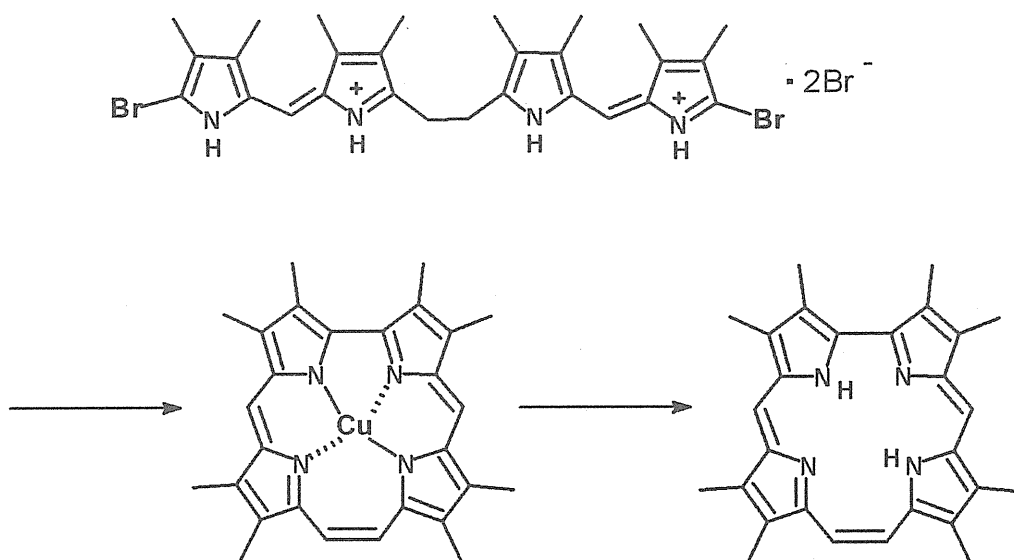


図2 従来のコルフィセン合成法

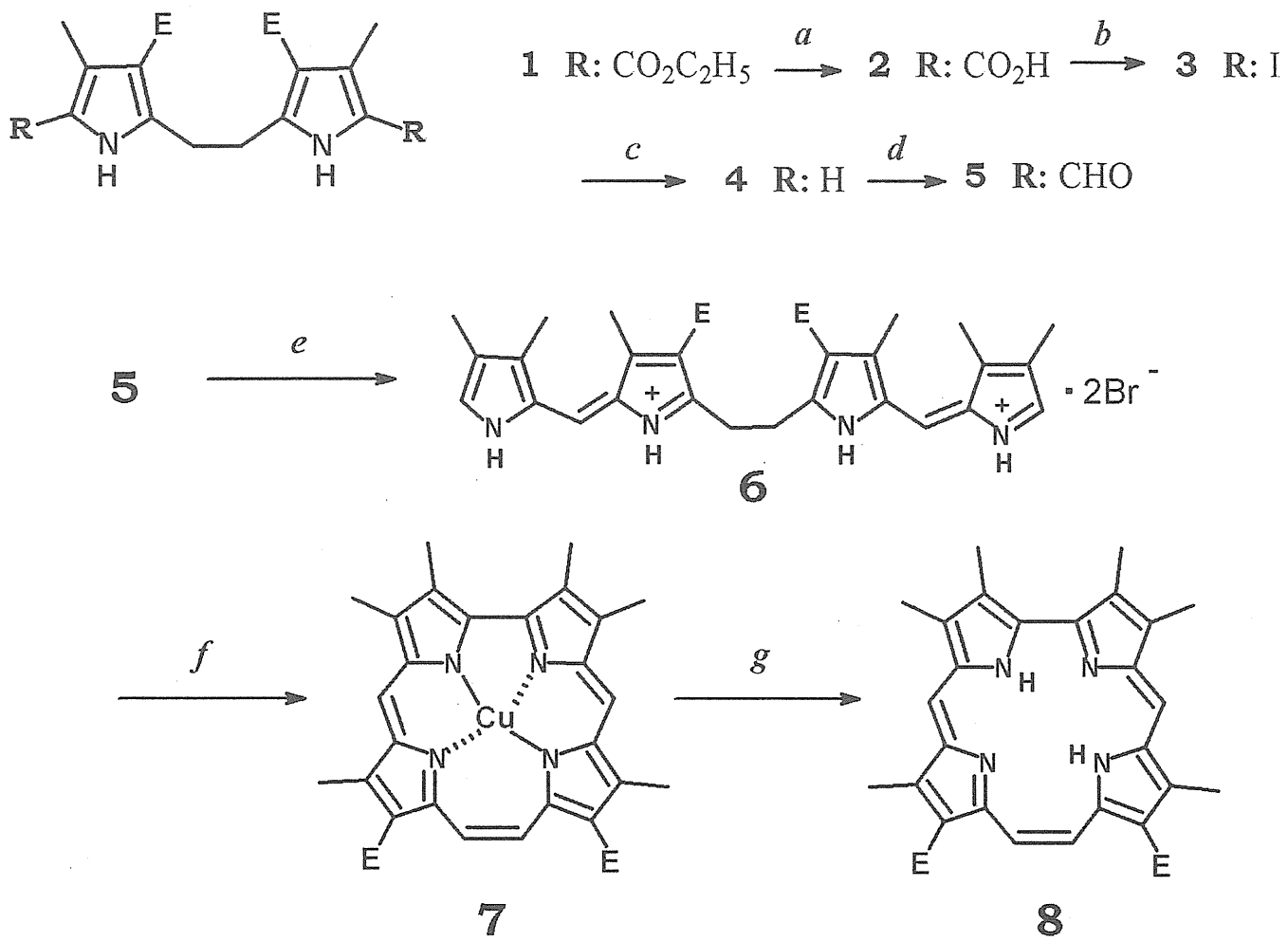


図3 新しく開発したコルフィセン合成法

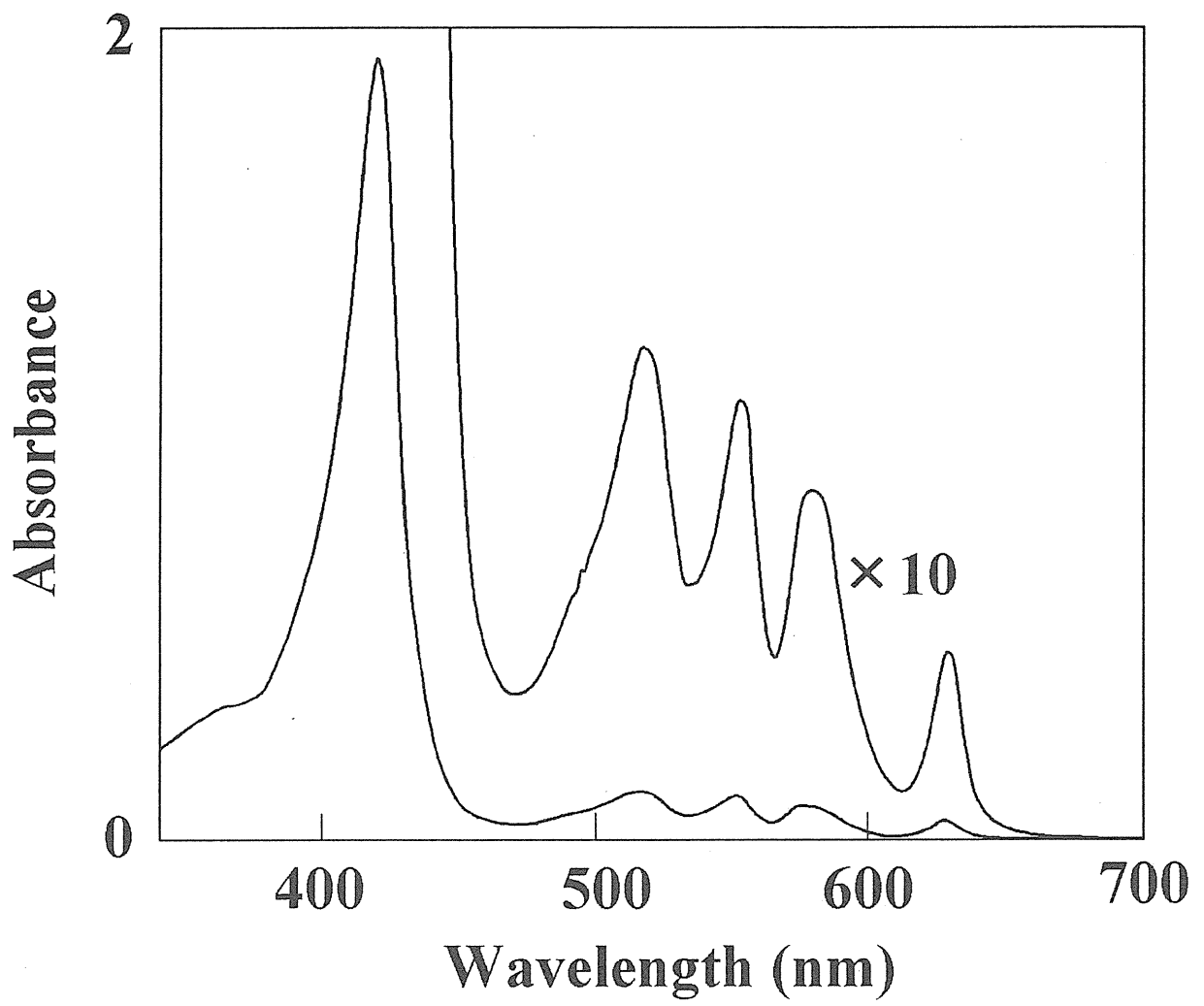


図4 コルフィセンの可視吸収スペクトル

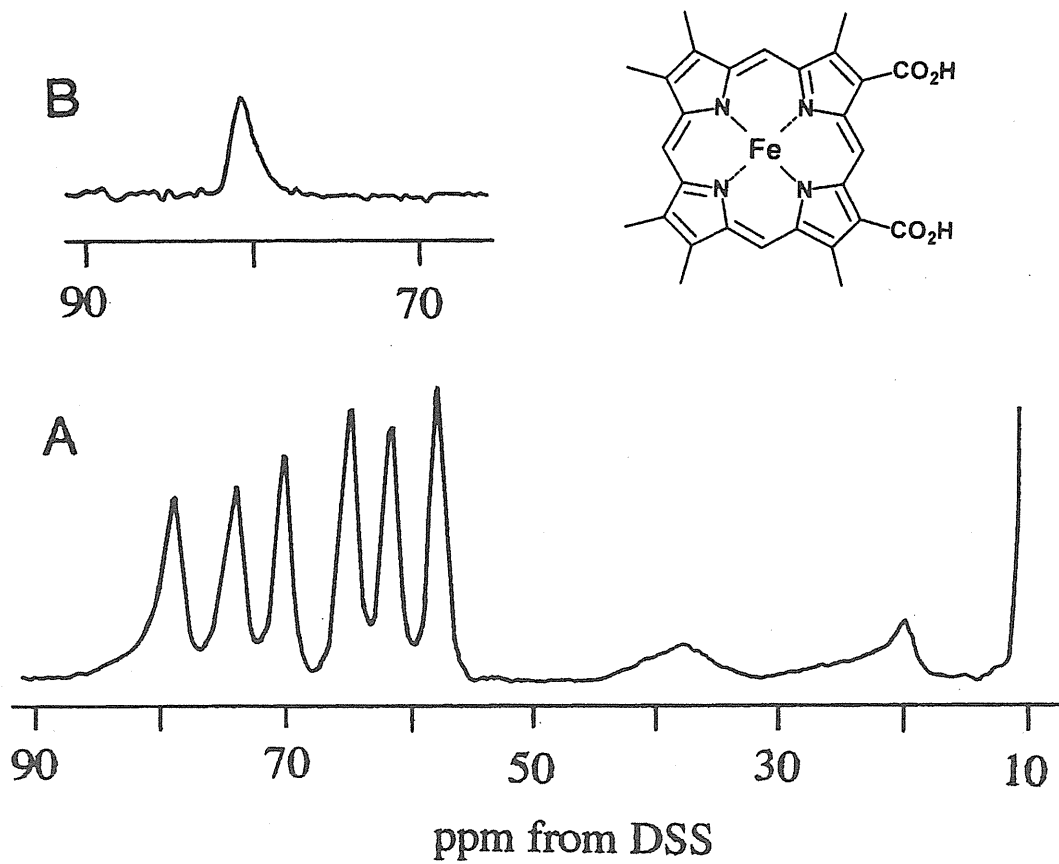


図5 ジカルボキシシルヘミン再構成ミオグロビンのプロトンNMR

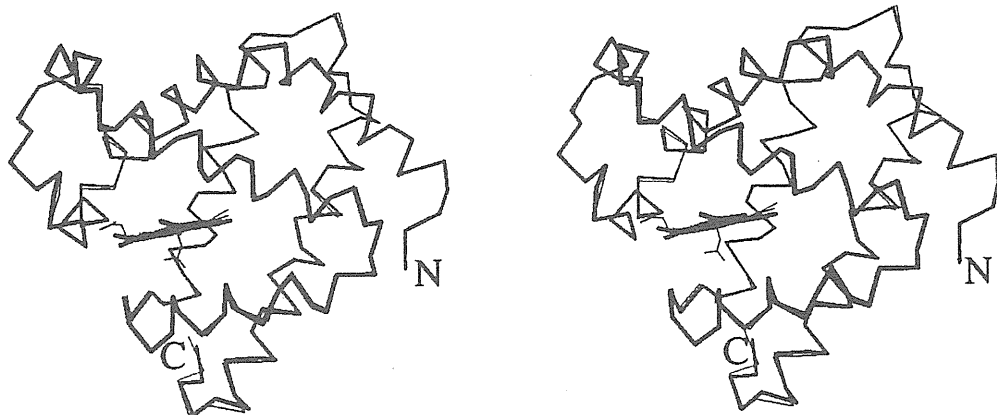
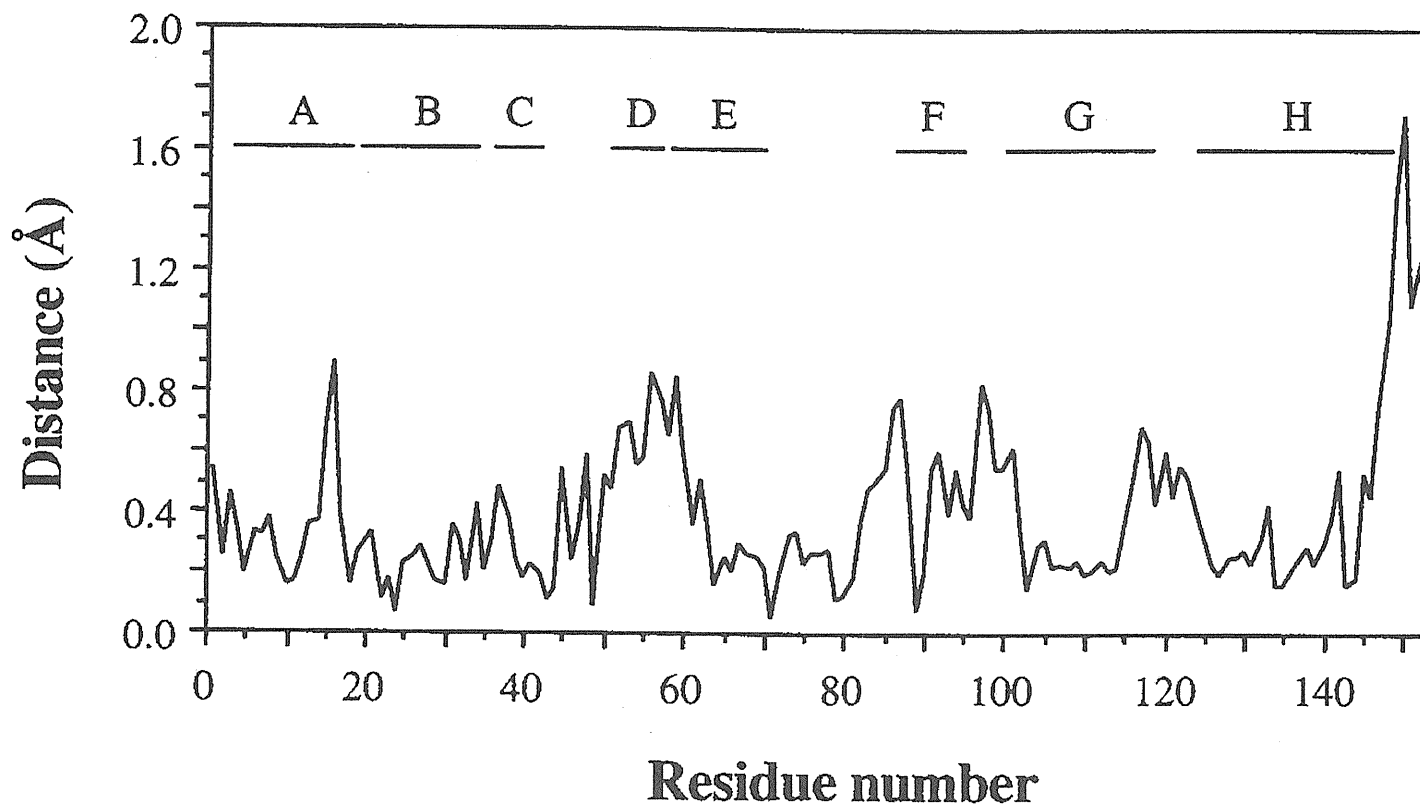


図6 天然ミオグロビンと再構成ミオグロビンの立体構造比較

図7 C $\alpha$ 炭素の変位



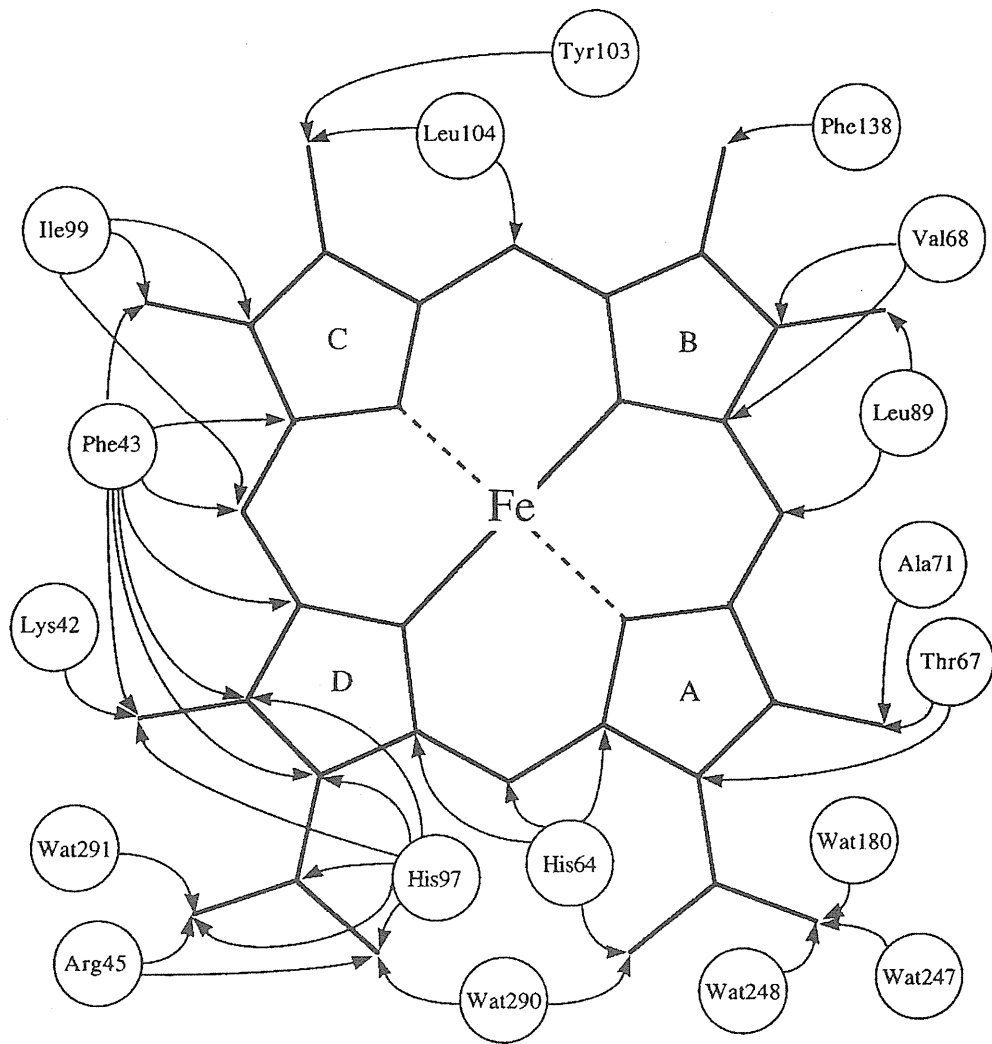


図8 ジカルボキシルヘミン再構成ミオグロビンのヘム周辺接触

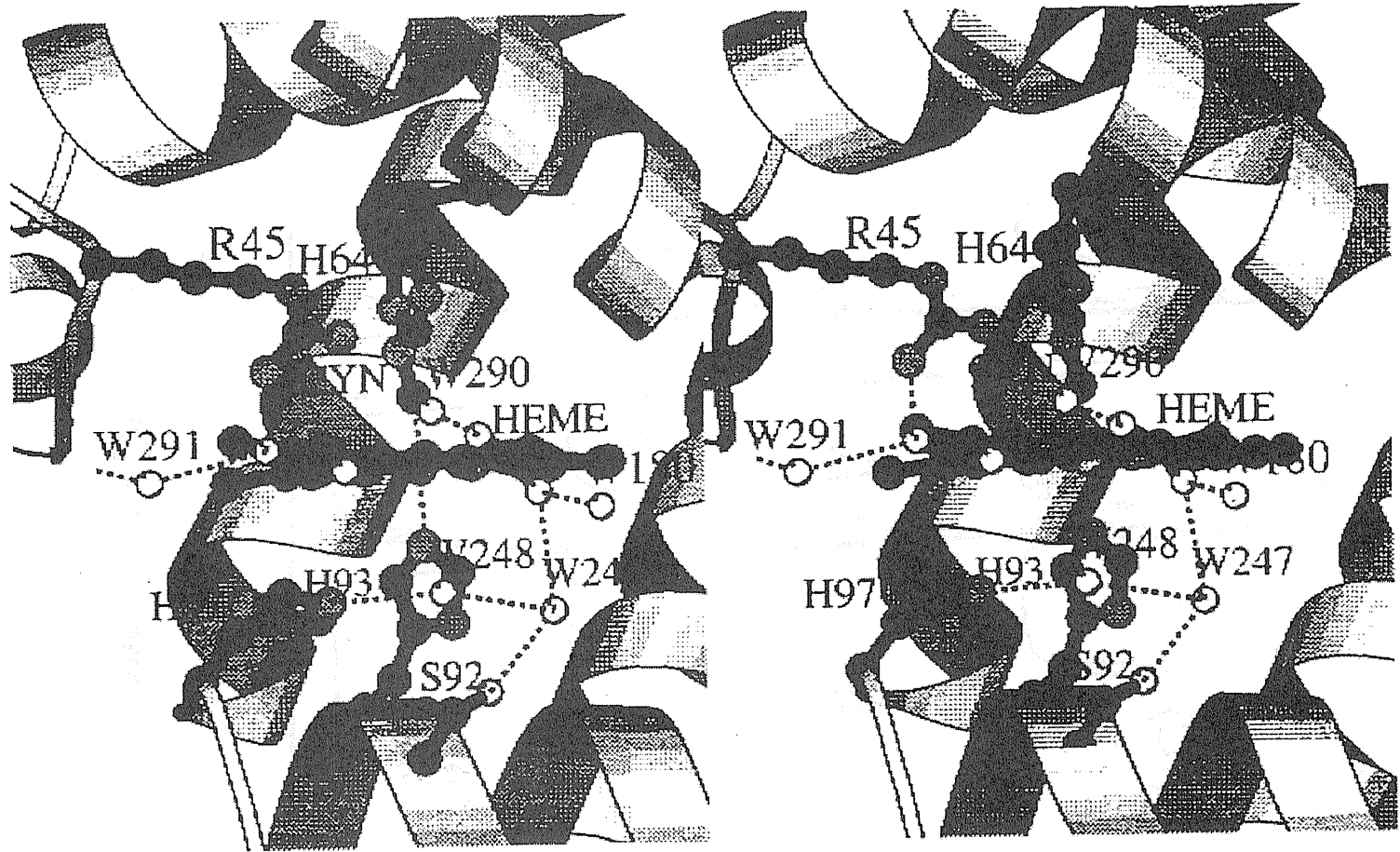


図 9 ヘムポケット外側から見た6,7-ジカルボキシルヘム



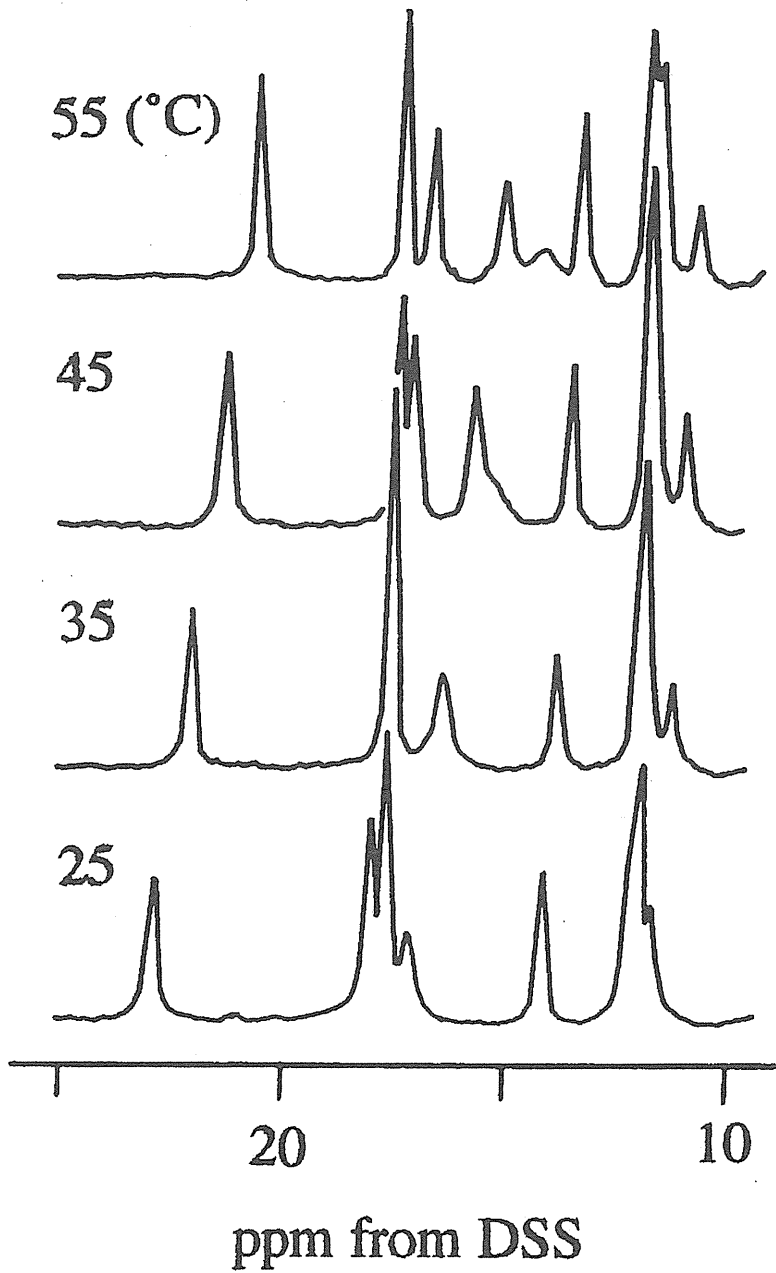


図10 ミオグロビンNMRスペクトルの温度変化

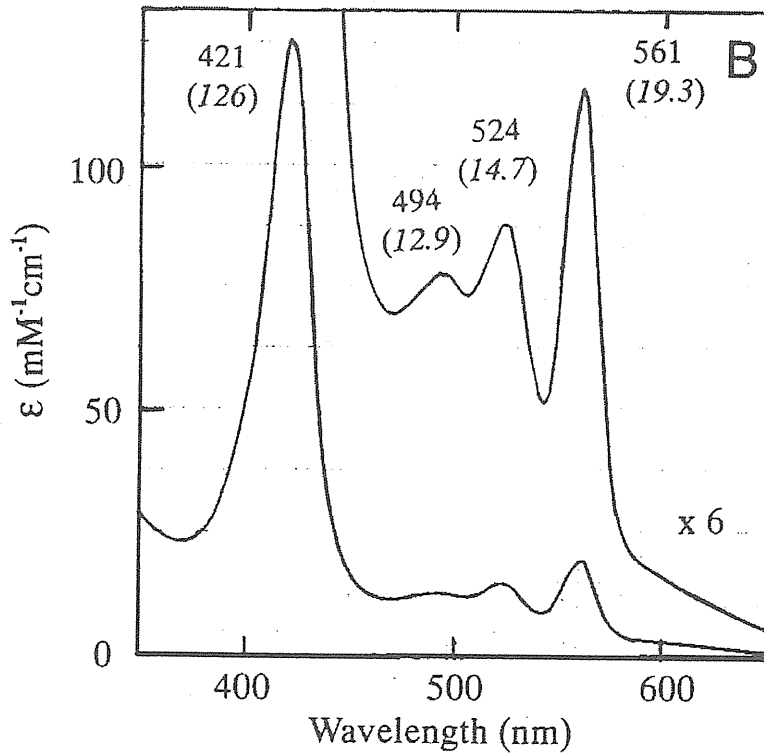
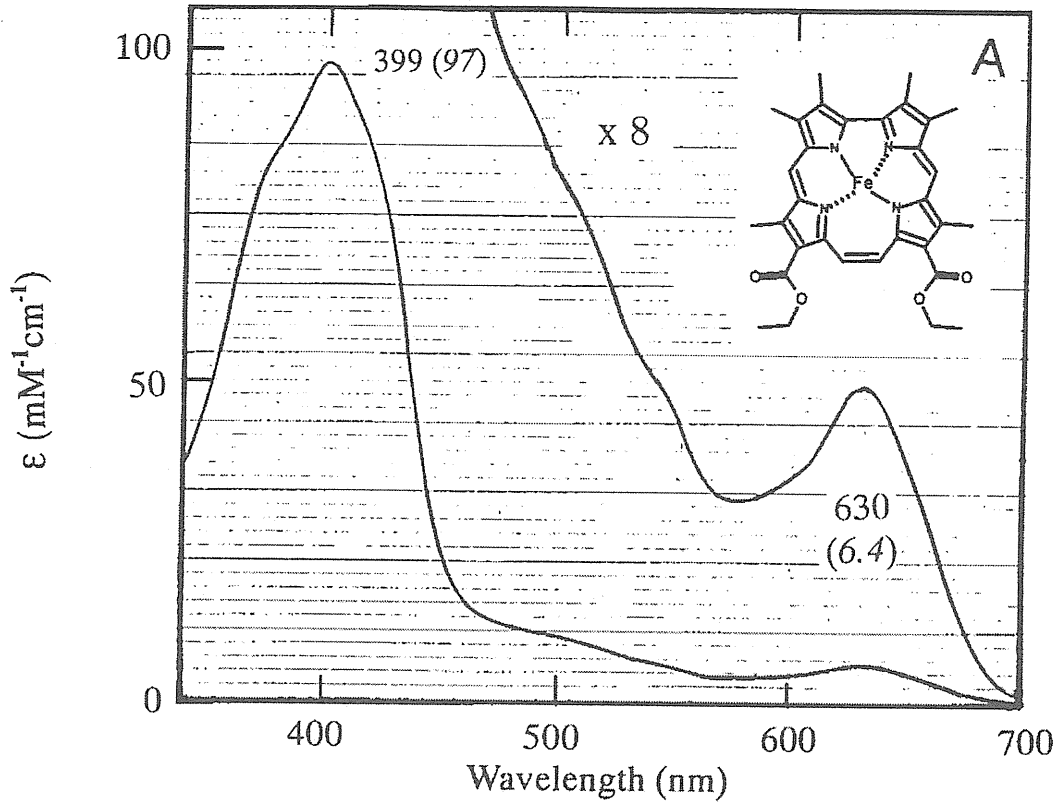


図 11 鉄コルフィセンの光吸収スペクトル

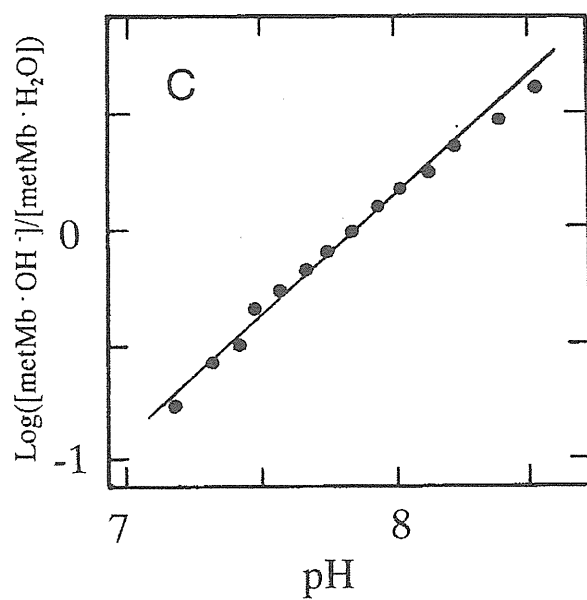
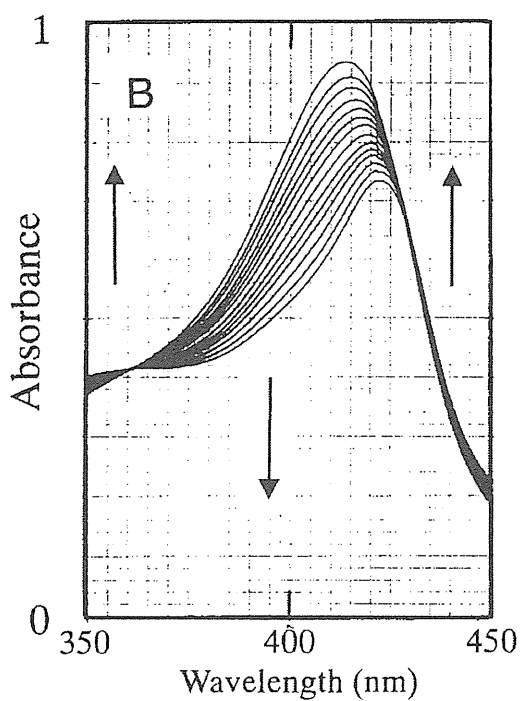
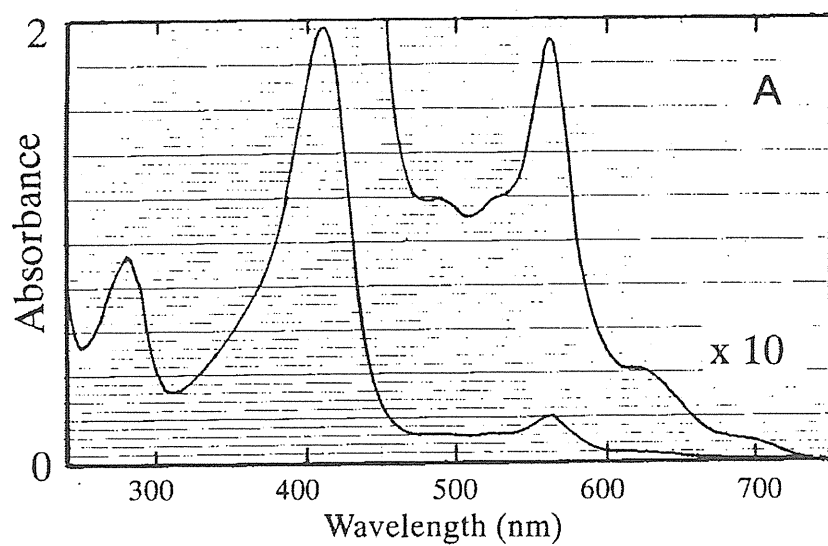


図 12 コルフィセンミオグロビンの光吸収

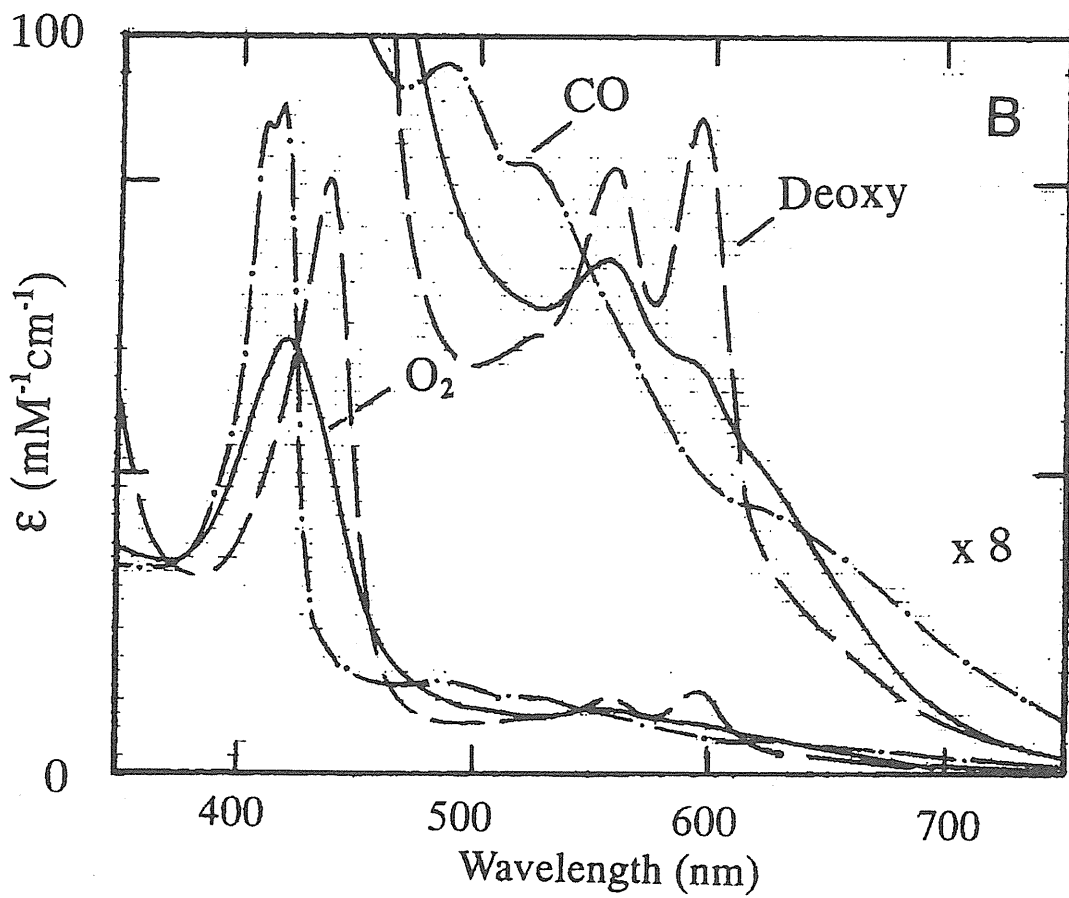
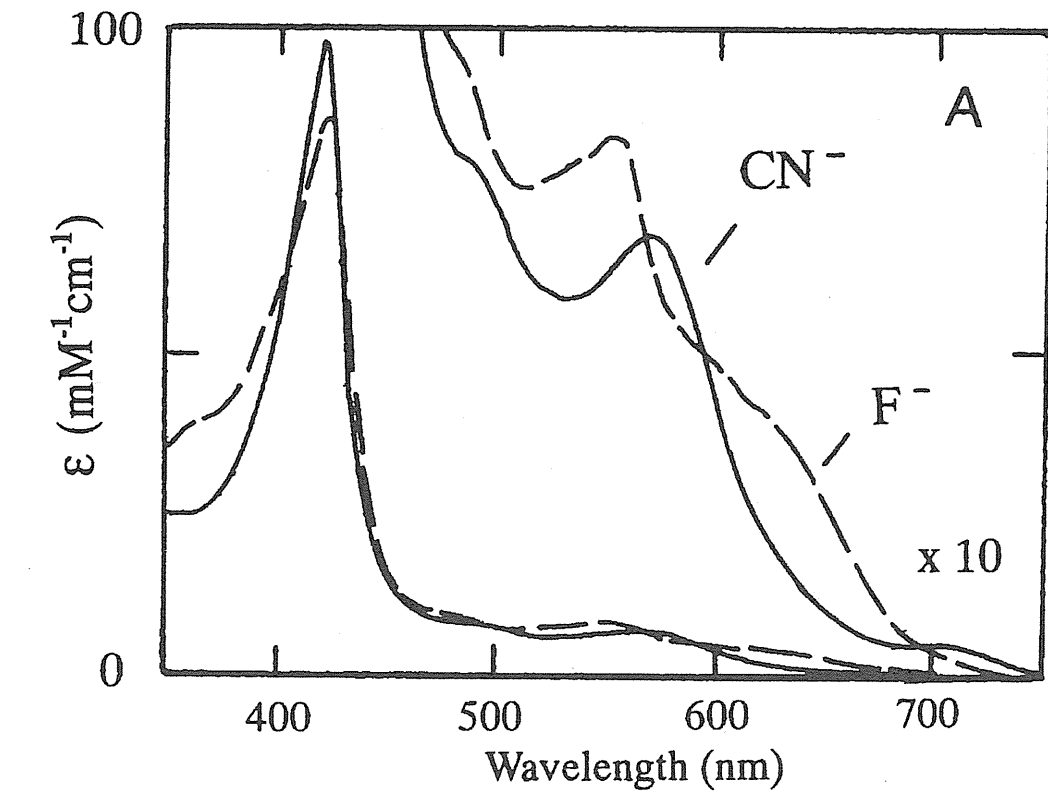


図 13 コルフィセン Mb 誘導体の光吸収

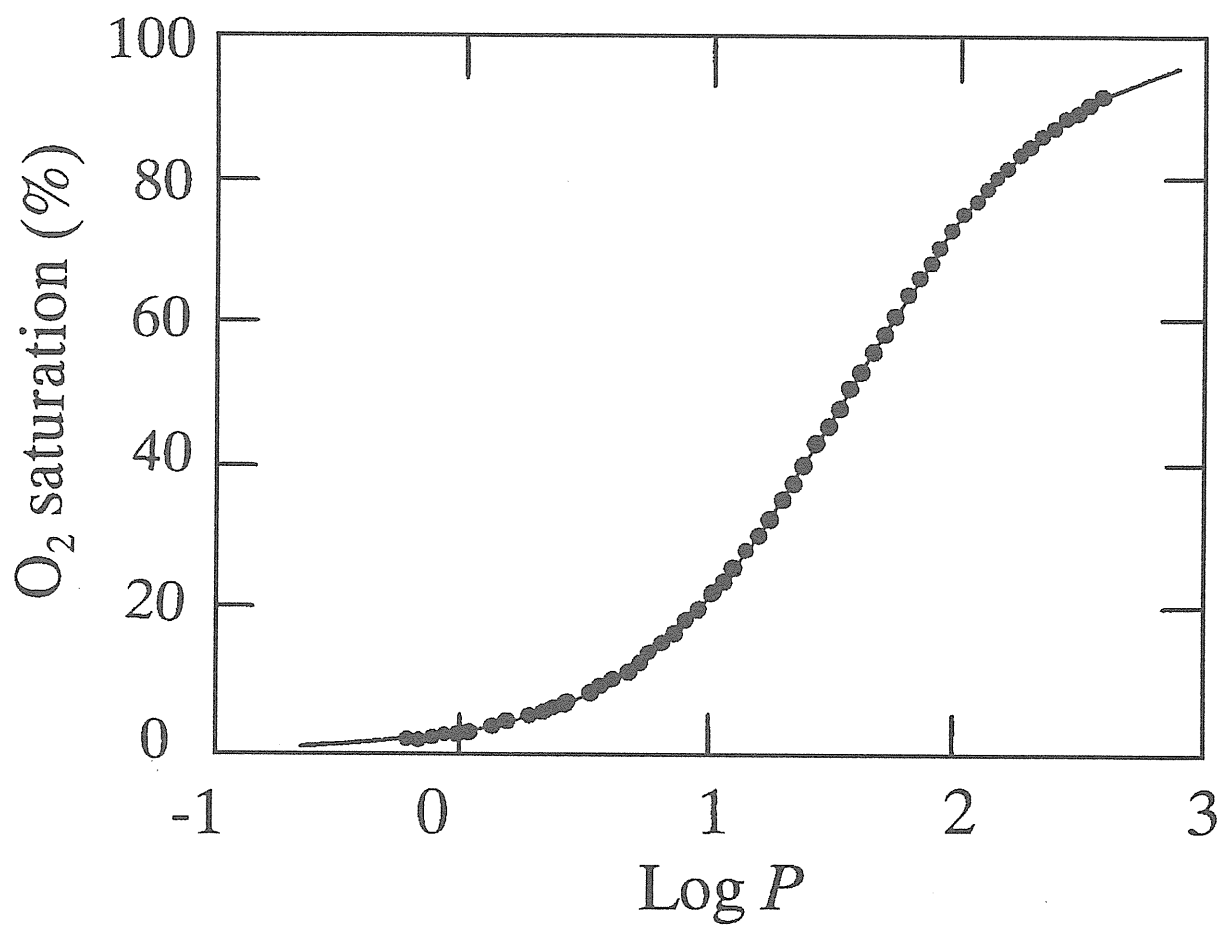


図 14 コルフィセンミオグロビンの酸素平衡

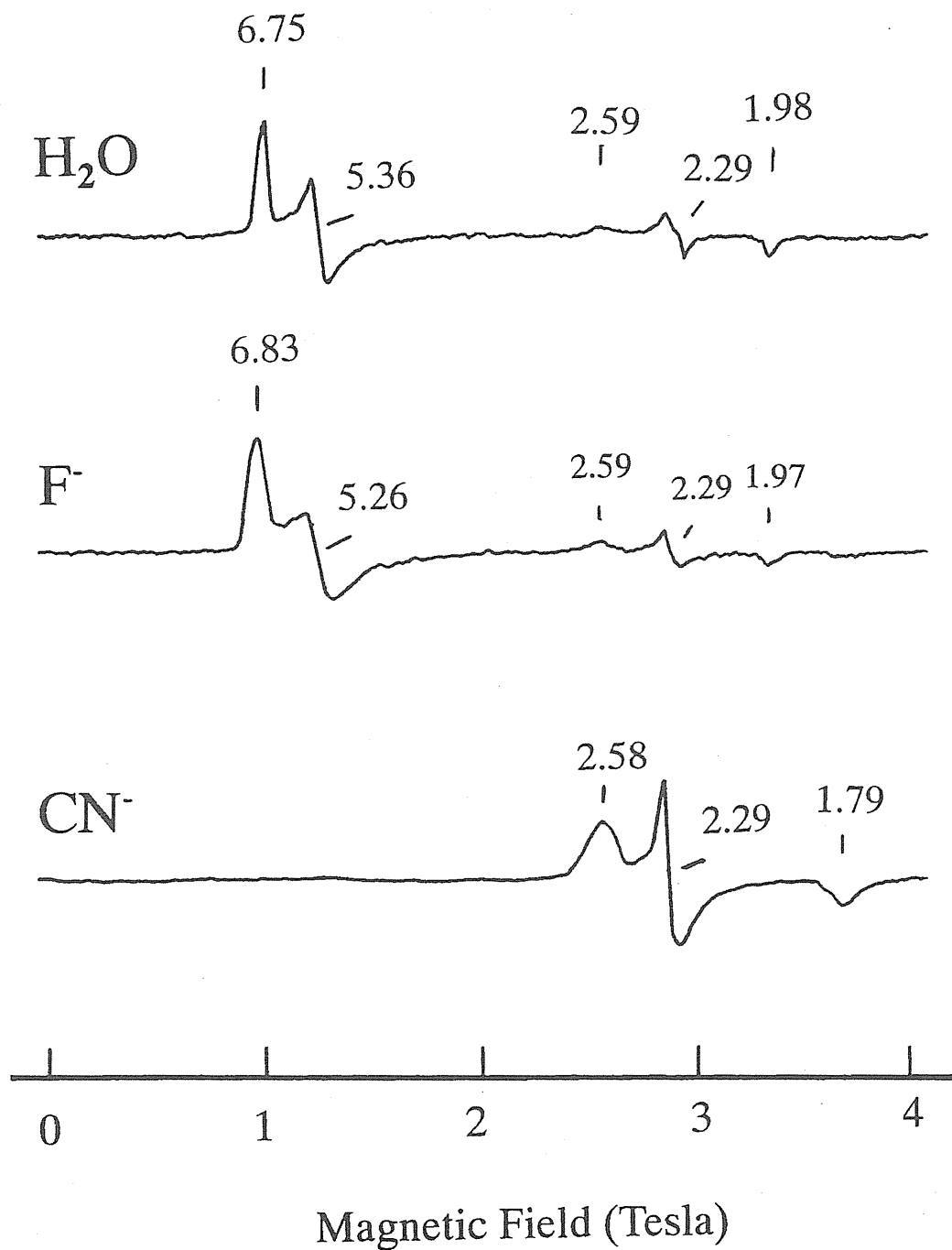


図 15 コルフィセンミオグロビンの電子スピン共鳴スペクトル

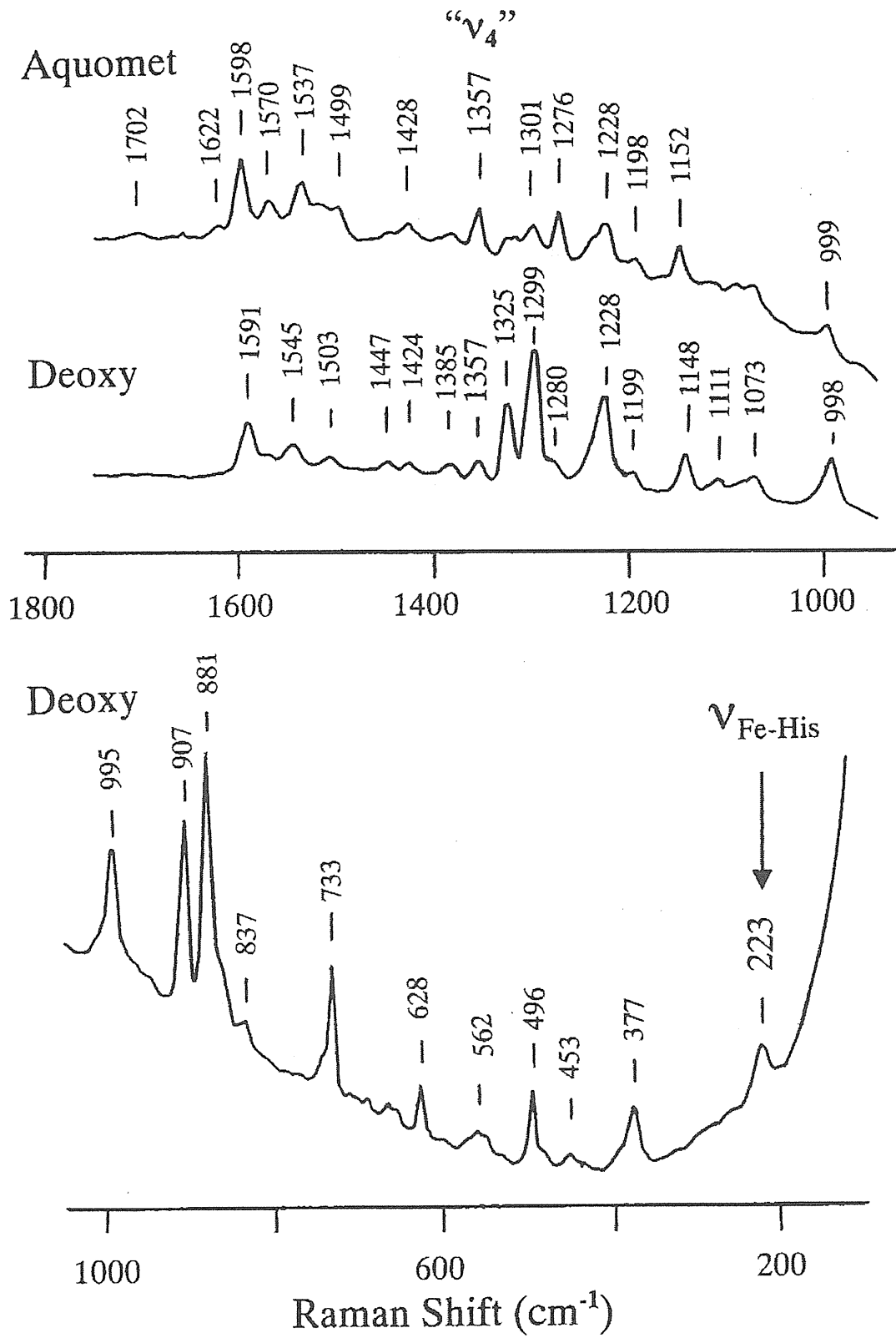


図 16 コルフィセン再構成ミオグロビンの共鳴ラマンスペクトル

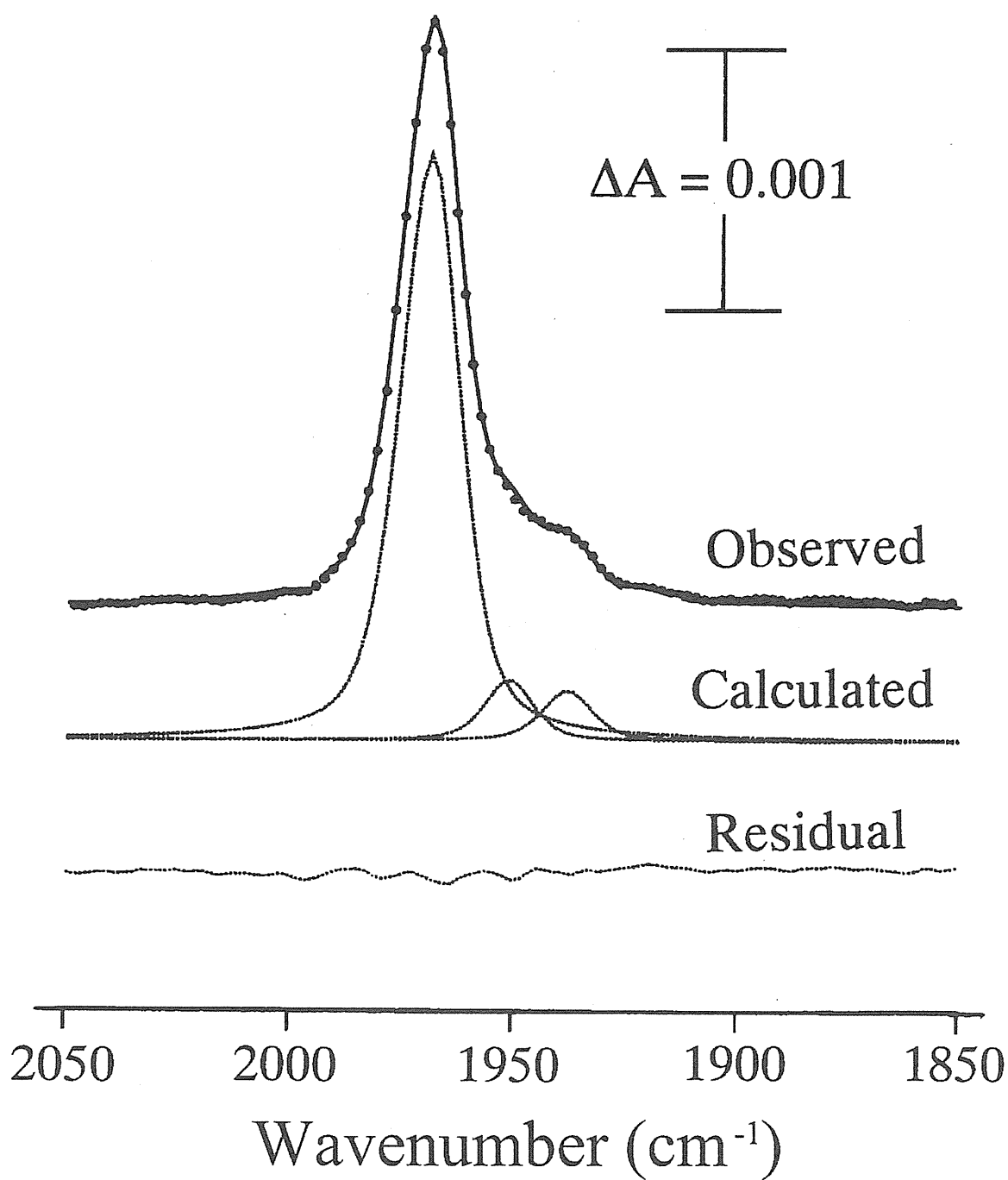


図 17 コルフィセンミオグロビンの CO 赤外吸収



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構造研究－

分担研究者 後藤 正文 熊本大学薬学部 教授

**研究要旨**

ミオグロビンとシトクロムの各種変異体について共鳴ラマンスペクトルを測定し、ヘムの構造を詳細に検討した。まず、大腸菌で発現された野生型ミオグロビンについて調べ、天然型と同様のヘム構造を持つことを示した。このことから、大腸菌を用いた大量発現系によって、天然型となんら変わらないタンパク質が得られることがわかった。ミオグロビンの92位セリンは軸配位子となっている93位ヒスチジンと水素結合し、ヘムと酸素の安定化に寄与していると考えられている。そこで、3種の92位変異体について検討した結果、92位のアミノ酸置換はヘムの構造に大きな影響を与えないことがわかった。しかしながら、バリリンへの置換によってアルカリ性でわずかに5配位成分が生ずることがわかった。また、近位と遠位の軸配位子ヒスチジンを交換した3重変異体を測定したところ、6配位低スピン状態をとるものの、軸配位子はかなり歪んだ形をとっていることが示唆された。さらに、シトクロム b562 の各種変異体について調べ、軸配位子の7位メチオニンを置換することによって、野生型ミオグロビンと同様のヘムポケットを有する人工的なヘムタンパク質が構築されていることが明らかとなった。7位アミノ酸の側鎖体積を変えることによって、酸素分子等の外来性配位子の結合親和性を制御できることを示唆できた。

**A. 研究目的**

ミオグロビンは筋肉中に多く存在し、酸素分子の貯蔵に関与するヘムタンパク質の一種である。活性中心に補欠分子団として含まれるヘムに酸素分子が結合することで、タンパク質機能が発現されている。したがって、ミオグロビンの機能を理解するためには、活性中心ヘムの構造を明らかにする必要がある。構造が明らかになれば、その情報をもとにして酸素親和性を制御する術を知ることができるであろう。以上のような観点から、本

分担研究では、ミオグロビンに含まれるヘムの構造の解明を目的とした。

ミオグロビン変異体の試料として、主任研究者である宇野が調製したものをを用いた。主任研究者の研究によって、92位変異体については野生型ミオグロビンと構造的にほぼ等しいという結果が得られている。しかしながら、その研究結果は電子吸収スペクトルによって導かれたものであり、わずかな構造変化が検出されていない恐れがある。特に S92V 変異体については、pH 挙動に明らかな差が観

測されており、何らかの構造的差異があると思われる。また、ミオグロビン3重変異体では近位側と遠位側の軸配位子が交換されているが、これが構造的にどのような違いとなっているかは不明である。この置換によって酸化型の吸収スペクトルからは6配位低スピン型構造が示唆されているが、その実体を解明する必要がある。さらに、シトクロム変異体ではミオグロビンと酷似した吸収スペクトルが観測されていたが、これが構造的に本当にミオグロビンと同じなのか、明らかにする必要がある。このような知見の積み重ねによって、真の人工血液として用いることができる部位特異的変異戦略を組み立てることができると期待される。

## B. 研究方法

A欄で述べたように、本分担研究ではミオグロビンやシトクロム変異体のヘム構造を明らかにしていくことを目的とする。ヘム構造を調べるには、共鳴ラマン法によるのが最適と考えられる。ラマン分光法は、赤外分光法と同様振動分光法の一つであり、分子の振動エネルギーを測定することによって分子構造を探る分光法である。一般に、分子の電子吸収帯に一致する励起光を照射すると、ラマン散乱光が1万倍から百万倍程度まで増強され、基本的にその電子遷移の源となる発色団の構造情報のみが得られる（共鳴効果）。そのため、タンパク質のように複雑な分子の場合でも、局所構造を抽出して構造を明らかにできる点、極めて優れた分光法である。特に、ヘムタンパク質の場合、400 nm付近に存在するソーレー帯と呼ばれる電子吸収帯は補欠分子団であるヘムに由来するため、この波長領域

の励起光を用いることによりヘムの構造情報を得ることができる。また、上記共鳴効果により、希薄な試料溶液を用いて測定が可能となる点、微量のタンパク質溶液しか得られない場合にも有効である。ヘムタンパク質については、これまで膨大な数のスペクトルが報告され、スペクトルピークの波数と構造との対応関係が確立されている。したがって、ミオグロビンやシトクロム変異体のような新規ヘムタンパク質についても、既存の解析法で構造を解明することができる。

ラマン散乱の励起光源としては、クリプトンレーザー（Spectra Physics）の406.7 nmの発振線を用い、試料のダメージを抑えるため、出力を10 mWとした。また、円筒セルを回転させながら測定した。ラマン散乱光をダブルモノクロメーター（日本分光、R-800）によって分光し、光電子増倍管（浜松ホトニクス、R595）によって検出した。測定試料は主任研究者の宇野が調製したものをを用いた。測定は、基本的に0.1 M NaClを含む10 mMリン酸ナトリウム緩衝液中で行った。試料タンパク質濃度は100  $\mu$ Mにそろえた。

## C. 研究結果

### 1. ミオグロビン92位変異体の共鳴ラマンスペクトル

まず、酸化型ミオグロビンの中性pH領域における共鳴ラマンスペクトルの測定を行った。主任研究者の結果をふまえて、すべての変異体が安定に存在するpH 6.0で測定を行った。図1、2にスペクトルを示す。これまでの研究により、野生型のミオグロビンは中性pHで水分子がヘム鉄に配位しており、6配位高ス

ピン状態をとることがわかっている。共鳴ラマンスペクトルの測定により、酸化還元状態のマーカースペクトルである  $\nu_4$  が  $1372\text{ cm}^{-1}$  に検出されたことから、精製標品は酸化型であることが確認できた。スピン状態と配位子数に敏感な高波数領域のラマン線のうち  $\nu_3$ 、 $\nu_2$  がそれぞれ  $1482$ 、 $1564\text{ cm}^{-1}$  に出現している（表1）ことから、本組換えミオグロビンは天然のものと同じ構造をとっており、大量発現とタンパク質精製の過程でなんら問題が起きていないことがわかった。92位変異体の共鳴ラマンスペクトルは、野生型のものと同様であり、特に高波数領域のスペクトル（図1）はその波数が実験誤差範囲内で完全に一致していることから、ヘムの構造は92位のアミノ酸変異によってほとんど影響を受けないことがわかった。この結果は、宇野が行った吸収スペクトル測定の結果とよく対応する。一方、低波数側のラマン線を比較すると、ピロール環のねじれ振動にわずかな変化が観測される。また、特筆すべき大きな波数変化が  $250\text{ cm}^{-1}$  付近のバンドに見られる。このバンドは Spiro らのグループによりピロール環のねじれ振動に帰属されているが、鉄の同位体により波数シフトすることから、鉄-近位ヒスチジンの伸縮振動  $\nu(\text{Fe-His})$  の可能性が指摘されている。今回の変異は92位であり、近位93位のヒスチジンと隣接することから、92位の変異によって鉄-ヒスチジン振動が大きく影響を受けることは想像に難くない。ポルフィリンの骨格振動にほとんど変化がなかったことから、この  $250\text{ cm}^{-1}$  付近のバンドはピロール由来と考えるよりは  $\nu(\text{Fe-His})$  に帰属した方が妥当と考えられる。いずれにしても、

92位のアミノ酸置換により軸配位子の結合強度が変化してもヘムの構造には大きな変化を及ぼさないことがわかった。

一方、アルカリ性に pH を上げた場合、野生型では軸配位子の水からプロトンが脱離して水酸基が鉄に配位する。この変化は遠位側の His64 のプロトン脱着と共役しているため、pH 上昇にともなうヘムの構造変化を調べることにより、遠位側環境を明らかにすることができる。アルカリ性における92位変異体の共鳴ラマンスペクトルを図3、4に示し、ラマン線の帰属を表2にまとめた。高波数側ピークの波数から、野生型標品は6配位高スピン状態をとることが明らかであり、これは水酸基の配位と矛盾しない。また、スペクトルは既報のマッコウクジラやウマ由来のミオグロビンのものとよく似ている。92位変異体は中性の場合と同様、野生型とよく一致している。しかしながら S92V 変異体では  $1583\text{ cm}^{-1}$  のピークがやや高くなり、 $1494\text{ cm}^{-1}$  に弱いピークが出現している。後者のピークは  $\nu_3$  に帰属できるが、とすれば5配位高スピン状態のヘムが存在することを示唆している。宇野の行った pH 依存性の測定では、S92V が有意に低い pKa 値を示していた。中性型のラマンスペクトルではバリニン置換の効果は特に目立ったものではなかったことから、この異常性はアルカリ型によるものと判断できる。すなわち、アルカリ型で5配位状態の成分が一部生じるために、S92V はプロトンを放出しやすくなったと考えられた。一方低波数側では、中性の場合と同様に  $250\text{ cm}^{-1}$  付近のバンドが92位の変異によって大きく変化している。しかしながら、 $489\text{ cm}^{-1}$  の鉄-水酸基の伸縮振動  $\nu(\text{Fe-OH})$  には変

化が認められなかったことから、92位の構造が変化しても遠位側の配位子には影響を与えないことがわかった。このことは、近位水素結合のネットワークが軸配位子と鉄との結合強度に与える影響は非常に小さいことを示している。

さらに、還元型の構造についても検討した。ミオグロビンが酸素分子と結合する際には還元型となる必要があることから、還元型のヘム構造を明らかにすることは非常に意義がある。図5、6に還元型ミオグロビンの共鳴ラマンスペクトルを示し、ラマン線の帰属を表3にまとめた。野生型標品で $\nu_4$ 、 $\nu_3$ 、 $\nu_2$ がそれぞれ1356、1472、1563  $\text{cm}^{-1}$ に出現していることから、還元型5配位高スピン状態であることが確認できる。92位変異体でもこれらの波数には変化がなく、ヘム構造はきわめて似ていることがわかった。低波数側では $\nu(\text{Fe-His})$ に帰属できる220  $\text{cm}^{-1}$ 付近のバンドが顕著であるが、この波数は変異によってほとんど変化していない。したがって、酸化型の場合と異なり、還元型では鉄-ヒスチジンの結合強度はほとんど変化しないことがわかった。

## 2. ミオグロビン3重変異体の共鳴ラマンスペクトル

まず、X線結晶構造解析により6配位型構造をとることが明らかなH64V/V68H 2重変異体（宇野の項、図2参照）の共鳴ラマンスペクトルを測定した（図7）。 $\nu_4$ 、 $\nu_3$ 、 $\nu_2$ がそれぞれ1374、1510、1581  $\text{cm}^{-1}$ に出現していることから、鉄3価6配位低スピン状態をとっていることが確認できた。低波数側では、182  $\text{cm}^{-1}$ に弱いラマン線が観測されたが、この波数は、 $\text{Fe}(\text{OEP})(\text{CN})(\text{py})$  錯体で観

測された $\nu(\text{Fe-py})$ 伸縮振動や鉄2価 $\text{Fe}(\text{OEP})(\text{ImH})_2$ 錯体の $\nu(\text{Fe-ImH})$ 伸縮振動ときわめて近いことから、6配位型の $\nu(\text{Fe-His})$ 伸縮振動に帰属可能である。一方、3重変異体H64V/V68H/H93A及びH64V/V68H/H93Gでは、 $\nu_3$ 、 $\nu_2$ がそれぞれ1505、1578  $\text{cm}^{-1}$ に出現し、2重変異体に比べて低波数シフトしている。また、ビニル基の $\nu(\text{C=C})$ 伸縮振動が6  $\text{cm}^{-1}$ 高波数シフトしているが、ポルフィリン環の $\nu_{10}$ モードが重なっている可能性がある。また、2重変異体の1562  $\text{cm}^{-1}$ のラマン線( $\nu_{38}$ )が1549  $\text{cm}^{-1}$ へ大きく低波数シフトしているのが顕著である。これらの波数は鉄3価6配位低スピン状態の範疇にはいるものの、全体に低波数シフトしていることから、ポルフィリン骨格が歪められ、コアサイズがやや広がっていることを示している。低波数側にはH93位の置換によって大きな変化はないものの、 $\nu(\text{Fe-His})$ 伸縮振動と考えられる180  $\text{cm}^{-1}$ 付近のラマン線が弱くなり、かつ高波数シフトしている。これらのことは、2重変異体の軸配位子であったHis93が取り払われた後に、強い配位性を持つ別のアミノ酸残基が歪んだ位置からヘム鉄に結合していることを示唆している。

2重変異体の還元型では、 $\nu_3$ が1493  $\text{cm}^{-1}$ に検出されたことから、予想どおり6配位低スピン状態をとっていることが確認された。3重変異体においてもこの波数はほとんど変化していないことから、同じく6配位状態をとっていることがわかった。

## 3. シトクロム変異体の共鳴ラマンスペクトル