

宇野の行った研究から、軸配位子のひとつである7位メチオニン置換したシトクロム b562 の変異体では、外来性配位子シアニオンが容易に配位でき、その親和性はミオグロビンと同程度のものであることが示されている。そこでまず、野生型のシトクロムについて共鳴ラマンスペクトルの測定を行った(図11)。酸化型では ν_4 、 ν_3 、 ν_2 がそれぞれ 1373、1507、1581 cm^{-1} に検出されていることから、6配位高スピン状態であることがわかる。また、 ν_{10} が 1640 cm^{-1} に出現しており、これらはX線構造解析の結果(宇野の項、図3参照)とよく一致している。還元型標品においては、 ν_4 、 ν_3 、 ν_2 がそれぞれ 1361、1491、1582 cm^{-1} に検出され、全体のスペクトルパターンも先に測定したミオグロビンの還元型2重変異体(図9、10)と酷似している。これらのことから、野生型シトクロム b562 は、酸化型、還元型ともに6配位低スピン状態をとることがわかった。

次に酸化型シトクロム変異体の測定を行った。 ν_3 、 ν_2 がそれぞれ 1486、1564 cm^{-1} に検出され、波数の値は野生型ミオグロビンのものと非常に似ている。このことは、シトクロム変異体がミオグロビンと同様の6配位高スピン状態をとっていることを示している。低波数領域まで含めて全体のパターンもほぼ同じであり、宇野が行ったシアニオンの親和性の結果と合わせて、シトクロムの変異により野生型ミオグロビンとほぼ同一のヘム近傍構造を構築できていることがわかった。詳細にスペクトルを見比べると、7位アラニン変異体(M7AとE4S/M7A/E8S)では付加的に1506 cm^{-1} に弱く ν_3 が現れ、それに対応して1580 cm^{-1} の ν_2 成分が強

くなっているのがわかる。このことは、7位アラニン変異体には共通に6配位低スピン状態あるいは5配位高スピン状態が混入していることを示している。6配位とすれば、水分子等の外来性配位子がヘム鉄に結合しているとは考えにくく、おそらく、何らかの amino 酸残基が配位子していると思われる。また、7位アラニン変異体同士、及び7位グリシン変異体同士は互いにスペクトルが等しいため、4位と8位のグルタミン酸のセリンへの変異によって、ヘム構造はまったく影響を受けていないことがわかった。したがって、上記の低スピン成分の混入は、7位のグリシンとアラニンの違いのみに依存していることが明らかである。低波数側でも同様に、7位がグリシンかアラニなかで共通したスペクトルを描いている。270 cm^{-1} 付近の $\nu(\text{Fe-His})$ に帰属可能なバンドが出現していることから、102位 His が鉄に配位していることが示唆された。

一方還元型では ν_3 、 ν_2 がそれぞれ 1470、1559 cm^{-1} に現れ、5配位高スピン状態をとっていることが明らかである(図14、15)。これらの波数はやはり野生型ミオグロビンのものとよく似ている。低波数側では $\nu(\text{Fe-His})$ に帰属されるラマン線が220 cm^{-1} 付近に検出されたことから、ヒスチジン残基が配位していることがわかった。この波数は、やはり先のミオグロビンのもの(図6)と近いが、7位アラニン変異体の方が7位グリシン変異体に比べて有意に高波数側に出現している。このことは、鉄とヒスチジンとの結合が、7位アラニン変異体の方でより強くなっていることを示す。酸化型で270 cm^{-1} 付近のバンドを $\nu(\text{Fe-His})$ に帰属

したが、こちらでも7位アラニン変異体の方が波数が高かったこととよく対応する。7位は軸配位子となっている102位ヒスチジンとはヘムを挟んで反対側に位置しており、直接的にヒスチジンに作用しているとは考えにくい。おそらく、シトクロムの α ヘリックスのパッキング様式がアラニン変異体とグリシン変異体で異なっている結果と思われる。いずれにしても、7位の変異によりミオグロビンと同等のヘム構造を持つ人工的なタンパク質を構築できていることが示された。

D. 考察

1. ミオグロビン近位水素結合網

92位セリンはヘムに直接配位している93位ヒスチジンと隣接しており、またヘムプロピオン酸やArg45との水素結合ネットワークを形成する重要な残基である。この92位を各種アミノ酸残基へ置換して、その構造的変化を分光学的に調べた。S92Aは水素結合を形成できないが、酸化型・還元型ともにヘムの骨格振動は野生型のものとはほぼ同一であった。したがって、ヘムの構造は水素結合網の改変によってほとんど影響を受けないことが明らかである。酸化型では中性、アルカリ性で $\nu(\text{Fe-His})$ に帰属されるラマン線に大きな変化が現れたものの、アルカリ性における軸配位子水酸基と鉄との伸縮振動は全く変化しなかった。したがって、92位の改変は93位ヒスチジンと鉄との結合性に変化を与えるものの、その影響はトランス位までは及ばないことが明らかである。他の92位変異体であるS92EもS92Aと同様の結果を与えたことから、置換によって導入されたグルタミン酸は93位ヒスチジンとは水素結合していない

ことが示唆された。一方、S92Aと同じく水素結合を形成しえないS92V変異体では、中性領域で野生型と類似の構造を示したが、アルカリ性では一部5配位状態をとることがわかった。 $\nu(\text{Fe-OH})$ に帰属されるラマン線の強度は他の変異体と同程度であったため、5配位成分はごくわずかであると思われる。宇野の項で示されているように、このS92V変異体では見かけの pK_a が有意に低かった。これは、S92VがバルクのpH変化を敏感に感じ取りやすい、すなわちタンパク質外部の溶媒が活性部位に接近しやすくなっていることを示唆する。このことは逆に、アルカリ性で一旦軸配位子となった水酸基が容易に脱離し、タンパク外へと出やすくなることを示す。92位のバリン置換によって遠位側への溶媒接近性が増した結果、5配位構造をとりやすくなったものと思われる。しかしながら還元型では $\nu(\text{Fe-His})$ 伸縮振動にほとんど差がなく、セリン-ヒスチジンの水素結合が失われてもそれを補うなんらかの機構が働いていると考えられる。根矢の項でも示されているように、プロピオン酸側鎖の長さを変えてもその位置に水分子が入り込み、水素結合のネットワークを再形成することが起こりうる。92位の変異で水素結合網が破壊されても、水分子が入り込んでこれを補うような機構が存在するのかもしれない。

2. ミオグロビン軸配位子交換

遠位側68位にヒスチジンを導入してヘム鉄の軸配位子とし、近位側のヒスチジンを取り去ることにより新たなヘムポケットを形成させた3重変異体H64V/V68H/H93A及びH64V/V68H/H93Gの構

造を調べた。これらは酸化型、還元型ともに6配位低スピン状態をとることがわかった。しかしながら、酸化型では通常のもの比べてポルフィリン環が広がった歪んだ配位構造をとることが示唆された。6配位構造をとることは、シアニオンの結合親和性が野生型ミオグロビンと比べて著しく低下していることと合致し、また歪んだ配位構造をとることは、通常の6配位構造をとる2重変異体H64V/V68Hに比べて3重変異体におけるシアニオンの親和性が上昇していることと矛盾しない(宇野の項参照)。それでは、この第6配位子となっているのは何であろうか。外来性配位子として存在しうるのは溶媒由来の水や水酸基であるが、これらは弱い配位子であり強い配位子であるシアニオンと容易に置き変わるため、候補から除外できる。残るのはアミノ酸残基が配位している可能性である。近位側には、93位近傍にHis97が存在する。この残基は先のSer92を介した水素結合網にも加わっているが、今の93位改変により当然この水素結合網は破壊されている。97位は位置的にヘムからやや遠いため、直接配位することは困難である。しかし、93位を変異させ側鎖の小さなグリシンやアラニンに置換したこと、及び近位水素結合網を破壊したことによって、この97位ヒスチジンがヘムに接近しやすくなることは十分考えられる。近位側にはこれ以外に強くヘムに配位できる残基は見当たらず、おそらく97位ヒスチジンがヘムの配位子となっていると思われる。この残基が配位しているとすれば、位置的にヘムから遠いため、歪んだ配位をすることと矛盾しない。今後さらに97位の変異を行えば軸配位子

を特定でき、また、近位側に容易に外来性配位子が結合できるヘムポケットを構築できるであろう。

3. シトクロムヘムポケット構築

シトクロムb562の軸配位子となっている7位メチオニンに変異をほどこした標品について共鳴ラマンスペクトルを測定した結果、これらが酸化型で6配位高スピン状態、還元型で5配位高スピン状態をとることがわかった。この配位状態は野生型ミオグロビンと同じであり、メチオニンの置換によって新たなヘムポケットが構築できていることを示している。7位をアラニンに置換したもの同士、及びグリシンにしたもの同士はそれぞれ非常に似通ったスペクトルパターンを描くことがわかった。アラニン置換体では、酸化型で6配位低スピンあるいは5配位高スピン成分が生じていたが、もし6配位低スピン成分が存在すると考えると、シアンの親和性がアラニン変異体で上昇していることを説明できない。すなわち、6配位構造をとる野生型シトクロムのように、6成分の存在によってシアニオンの親和性は低下し、Kd値が上昇するはずである(宇野の項、表6参照)。むしろ、5配位状態を考えた方が測定結果をうまく説明できる。シアンの親和性は、アラニンとグリシンの側鎖体積の違いによってうまく説明できる。7位はもともとヘムの軸配位子メチオニンが存在した位置であり、ヘムのごく近傍に位置する。ここにより側鎖の大きいアラニンが存在すれば、ヘムとの接触によってグリシンより大きな空洞が形成されるであろう。この空洞サイズの違いによって、シアニオンの親和性が規定されていると思わ

れる。また、アラニン側鎖とヘムとの立体障害によって7位がのっている α ヘリックスとヘムとのパッキングが弱くなり、タンパク質全体がよりゆるむと思われる。その結果、尿素変性でヘムが脱離しやすくなったと考えられる（宇野の項、図23参照）このパッキングがゆるむ効果により、反対側の His102 とヘムとの結合が容易になり、酸化型、還元型において鉄-ヒスチジンの結合が強くなったものと思われる。

E. 結論

以上のように、共鳴ラマン法によってミオグロビンとシトクロム b562 の変異体の活性部位構造を調べた。その結果、ミオグロビンの 92 位変異はヘム構造にほとんど影響を与えないことがわかった。近位側には 92 位を中心とした水素結合ネットワークが存在するが、これを破壊しても構造に及ぼす影響はごくわずかで

あると判明した。3重変異ミオグロビンでは、酸化型、還元型ともに6配位低スピン状態をとり、おそらく97位ヒスチジンが新しい配位子となっていると考えられた。この97位をフェニルアラニン等の残基でさらに置換することにより、新たなヘムポケットを構築できると期待される。また、シトクロム b562 の変異体では、7位の置換によって容易に外来性配位子が結合できるヘムポケットが形成されていることがわかった。7位残基の側鎖体積のわずかな違いによってヘリックスとヘムのパッキングが変化し、反対側のヒスチジン残基とヘム鉄との結合性にまで影響が及ぶことがわかった。この結果をふまえれば、7位側鎖の分子体積を変化させることによって、ヘムポケットの大きさ、ひいては酸素分子等の結合親和性をも制御できると考えられ、人工血液の構築にとって大きなメリットとなるであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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 formation 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)

2. 学会発表

- 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-H₂O₂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)SCH₂]₂C₆H₄]•Cl₂ 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_2O_2 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

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ラマン線
(cm^{-1}) の帰属 (中性型)

Mode	WT	S92A	S92E	S92V
pyr tilt	247	241	241	260
ν_9	270	270	270	
	306	306	306	306
ν_8	343	346	346	343
$2\nu_{35}$	376	376	376	373
$\delta\text{Cba}\beta$	408	408	408	408
pyr	438	438	434	434
	474	474	474	474
	501	501	501	501
ν_{49}	549	549	549	549
ν_7	675	675	675	675
ν_{47}	718	718	718	718
ν_{16}	757	757	757	757
	824	824	824	824
ν_{46}	927	927	927	927
$\gamma\text{CH=}$	989	989	989	989
	1007	1007	1007	1007
ν_{44}	1123	1123	1123	1123
$\nu_5 + \nu_8$	1135	1135	1135	1135
ν_{30}	1172	1172	1172	1172
$\nu_5 + \nu_{18}$	1211	1211	1211	1211
ν_{13}	1224	1224	1224	1224
	1316	1316	1316	1316
ν_4	1372	1372	1372	1372
δs	1428	1428	1428	1428
	1451	1451	1451	1451
ν_3	1482	1482	1482	1482
ν_{38}	1514	1514	1514	1514
ν_2	1564	1564	1564	1564
ν_{37}	1582	1582	1582	1582
$\nu\text{C=C}$	1622	1622	1622	1622

表2 92位変異ミオグロビンのラマン線
(cm^{-1}) の帰属 (アルカリ型)

Mode	WT	S92A	S92E	S92V
pyr tilt	253	267	267	263
ν_9	270			
	304	304	304	300
ν_8	347	349	349	346
$2\nu_{35}$	378	377	377	371
$\delta\text{Cba}\beta$	410	410	410	410
pyr	440	437	433	433
$\nu(\text{Fe-OH})$	489	489	489	489
ν_{49}	551	551	551	551
ν_7	677	677	677	677
ν_{47}	717	717	717	717
ν_{16}	758	758	758	755
	793	793	793	793
	829	829	829	829
ν_{46}	927	927	927	927
$\gamma\text{CH=}$	990	990	990	990
	1007	1007	1007	1007
ν_{44}	1124	1124	1124	1124
$\nu_5 + \nu_8$	1138	1138	1138	1136
ν_{30}	1174	1174	1174	1174
$\nu_5 + \nu_{18}$	1212	1212	1212	1218
ν_{13}	1224	1224	1224	
	1318	1318	1318	1311
ν_4	1375	1375	1375	1375
δs	1428	1428	1428	1428
	1452	1452	1452	1452
ν_3	1480	1480	1480	1478
				1494
ν_{38}	1510	1504	1504	1504
ν_2	1564	1564	1564	1562
ν_{37}	1585	1585	1585	1583
$\nu\text{C=C}$	1624	1622	1622	1622

表3 92位変異ミオグロビンのラマン線
(cm^{-1}) の帰属 (還元型)

Mode	WT	S92A	S92E	S92V
$\nu(\text{Fe-His})$	221	223	222	220
	305	305	305	302
ν_8	343	343	345	343
$2\nu_{35}$	368	368	368	363
$\delta\text{Cba}\beta$	404	404	404	404
ν_7	673	673	673	673
ν_{47}	725	720	719	719
	787	787	787	787
$\gamma\text{CH=}$	993	993	993	993
	1091	1091	1091	1091
ν_{44}	1115	1115	1115	1115
$\nu_5 + \nu_8$	1133	1133	1133	1133
ν_{30}	1175	1175	1175	1175
ν_{13}	1220	1220	1220	1220
	1292	1292	1292	1292
	1314	1314	1314	1314
ν_4	1356	1356	1356	1356
	1391	1391	1391	1391
δs	1426	1426	1426	1426
ν_3	1472	1472	1472	1472
ν_{38}	1524	1524	1524	1524
ν_{11}	1545	1545	1545	1545
ν_2	1563	1563	1563	1563
$\nu\text{C=C}$	1618	1618	1618	1618

表4 2重及び3重変異ミオグロビンの
ラマン線 (cm^{-1}) の帰属 (酸化型)

Mode	VH	VHA	VHG
$\nu(\text{Fe-His})$	182	187	187
ν_9	267	271	271
	302	300	300
ν_8	345	343	343
$2\nu_{35}$	376	378	378
$\delta\text{Cba}\beta$	410	410	410
	501	498	491
ν_{49}	551	561	561
ν_7	676	676	676
ν_{47}	715	715	715
ν_{16}	744	744	744
	795	795	795
ν_{46}	831		
	926	922	926
$\gamma\text{CH=}$	990	990	990
	1007	1002	1002
$\nu_5 + \nu_8$	1126	1126	1126
ν_{30}	1170	1170	1170
$\nu_5 + \nu_{18}$	1208	1208	1208
ν_{13}	1227	1229	1229
	1291	1291	1291
	1311	1311	
ν_4	1374	1374	1374
δs	1428	1428	1428
	1482	1472	1472
ν_3	1510	1505	1505
ν_{38}	1562	1549	1549
ν_2	1581	1578	1578
$\nu\text{C=C}$	1621	1627	1627

VH, H64V/V68H;

VHA, H64V/V68H/H93A;

VHG, H64V/V68H/H93G

表5 2重及び3重変異ミオグロビンの
ラマン線 (cm⁻¹) の帰属 (還元型)

Mode	VH	VHA	VHG
ν ₉	260	268	268
	296	296	296
ν ₈	346	344	344
2ν ₃₅	379	379	379
δCβαβ	410	410	410
ν ₇	673	673	673
ν ₄₇	715	715	
ν ₁₆	749	746	746
	782	791	791
	823	823	
	952	959	955
	971	971	971
γCH=	991	991	991
	1087	1087	1087
ν ₄₄	1116	1116	1116
ν ₅ + ν ₈	1129	1129	1129
ν ₃₀	1173	1173	1173
ν ₁₃	1225	1225	1225
	1299	1299	1299
	1315		
ν ₄	1361	1359	1359
	1391	1389	1387
δs	1429	1429	1429
ν ₃	1493	1492	1491
ν ₁₁	1532	1532	1532
ν ₃₈	1556	1554	1552
ν ₂	1584	1581	1579
ν ₃₇	1609	1614	1609
νC=C		1625	

表6 シトクロム b562 変異体のラマン
線 (cm⁻¹) の帰属 (酸化型)

Mode	WT	M7A	SAS	M7G	SGS
	177			256	256
ν ₉	273	270	270	270	270
		304	304	304	304
ν ₈	344	343	343	343	342
2ν ₃₅	374	376	376	376	376
δCβαβ	420	416	416	413	413
	488	486	486	486	486
ν ₄₉	556	552	552	552	552
ν ₇	676	677	677	677	677
ν ₄₇	715	715	715	715	715
ν ₁₆	736	755	755	755	755
	791	790	790	790	790
ν ₄₆	933	928	928	928	928
γCH=	987	988	988	988	988
	1004	1004	1004	1004	1004
	1052				
	1090				
ν ₄₄	1125	1127	1127	1127	1127
ν ₃₀	1173	1173	1173	1173	1173
ν ₅ + ν ₈		1213	1213	1213	1213
ν ₁₃	1230	1224	1224	1224	1224
	1310	1309	1309	1309	1309
ν ₄	1373	1373	1373	1373	1373
δs	1433	1429	1429	1429	1429
	1478				
ν ₃	1507	1486	1486	1486	1486
		1506	1506		
ν ₃₈	1565	1519	1519	1519	1519
ν ₂	1581	1564	1564	1564	1564
		1580	1580	1580	1580
ν ₃₇		1580	1580	1580	1580
νC=C	1622	1623	1623	1623	1623
ν ₁₀	1640				

SAS, E4S/M7A/E8S;

SGS, E4S/M7G/E8S

表7 シトクロム b562 変異体のラマン線 (cm⁻¹) の帰属 (還元型)

Mode	WT	M7A	SAS	M7G	SGS
ν(Fe-His)		227	227	222	222
		294	294	294	294
ν ₈	343	342	342	342	342
2ν ₃₅	379				
pyr	397				
δCβαβ	418	413	413	413	413
		485	485	485	485
ν ₇	673	671	671	671	671
ν ₄₇		714	714	714	714
ν ₁₆	748	747	747	748	748
	790	783	783	782	782
ν ₄₆	924	923	923	923	923
	967	965	965	965	965
γCH=	987	988	988	988	988
	1054				
	1087	1085	1085	1085	1085
ν ₄₄	1118	1114	1114	1114	1114
ν ₅ + ν ₈	1128	1128	1128	1128	1128
ν ₃₀	1173	1173	1173	1173	1173
		1210	1210	1210	1210
ν ₁₃	1223	1221	1221	1221	1221
	1236	1290	1290	1290	1290
ν ₁₃	1281				
ν ₄	1361	1354	1354	1354	1354
	1390	1388	1388	1388	1388
δs	1432	1423	1423	1423	1423
	1471				
ν ₃	1491	1467	1467	1465	1465
ν ₃₈	1556	1528	1528	1520	1520
ν ₂	1582	1559	1559	1559	1559
ν ₃₇		1579	1579	1579	1579
νC=C	1615	1614	1614	1614	1614

SAS, E4S/M7A/E8S;

SGS, E4S/M7G/E8S

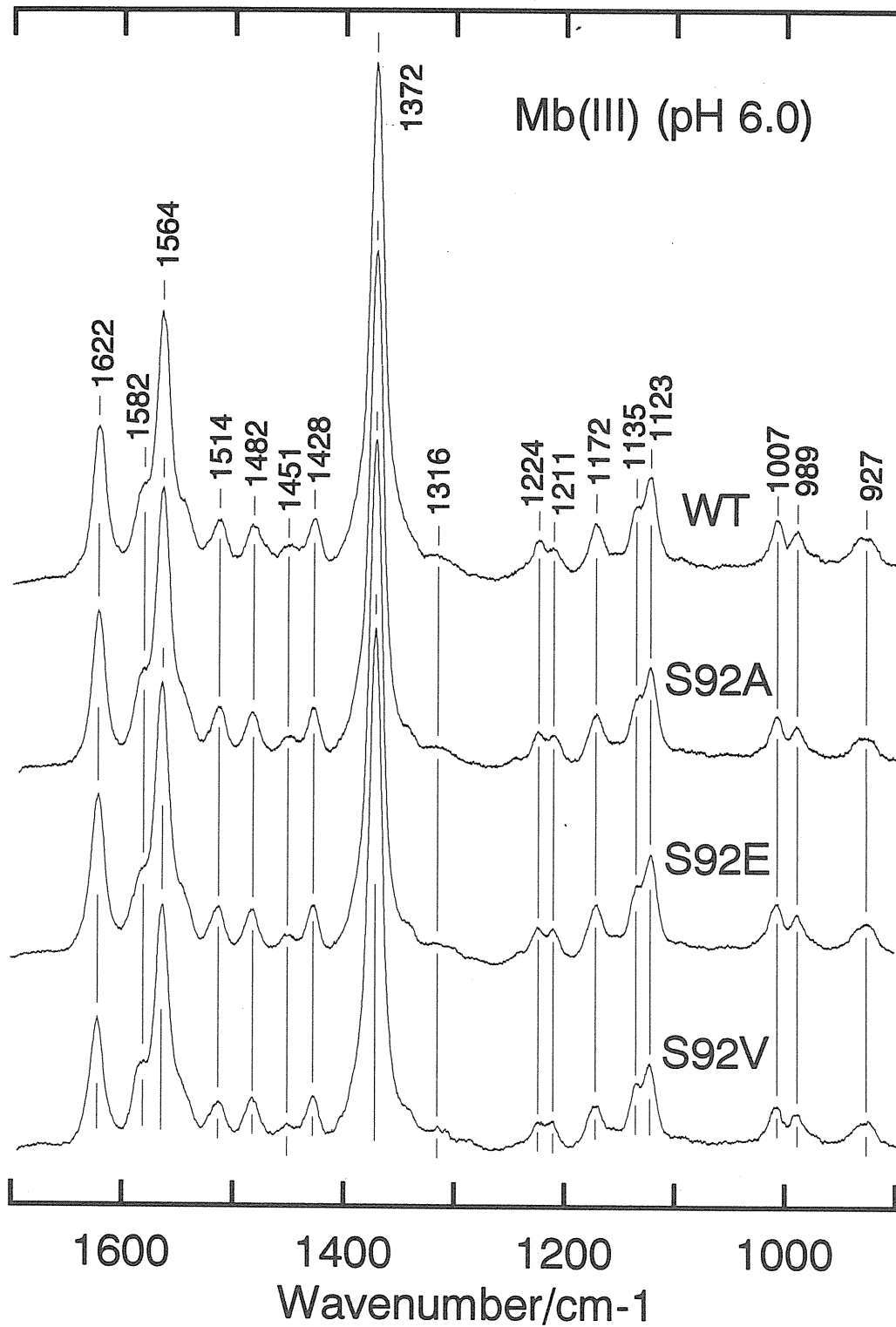


図1 中性型ミオグロビン92位変異体の共鳴ラマンスペクトル (高波数側)

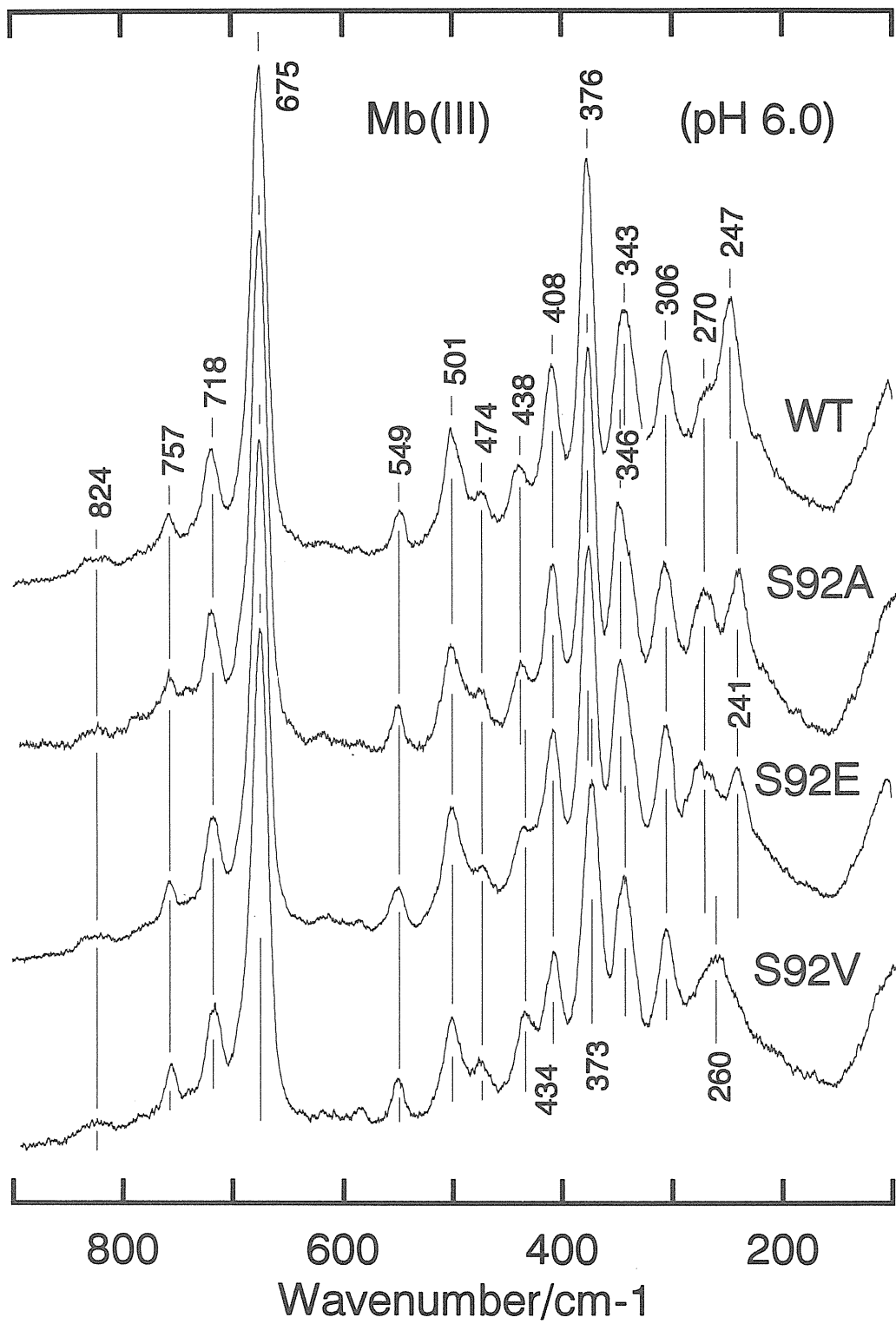


図2 中性型ミオグロビン92位変異体の共鳴ラマンスペクトル (低波数側)

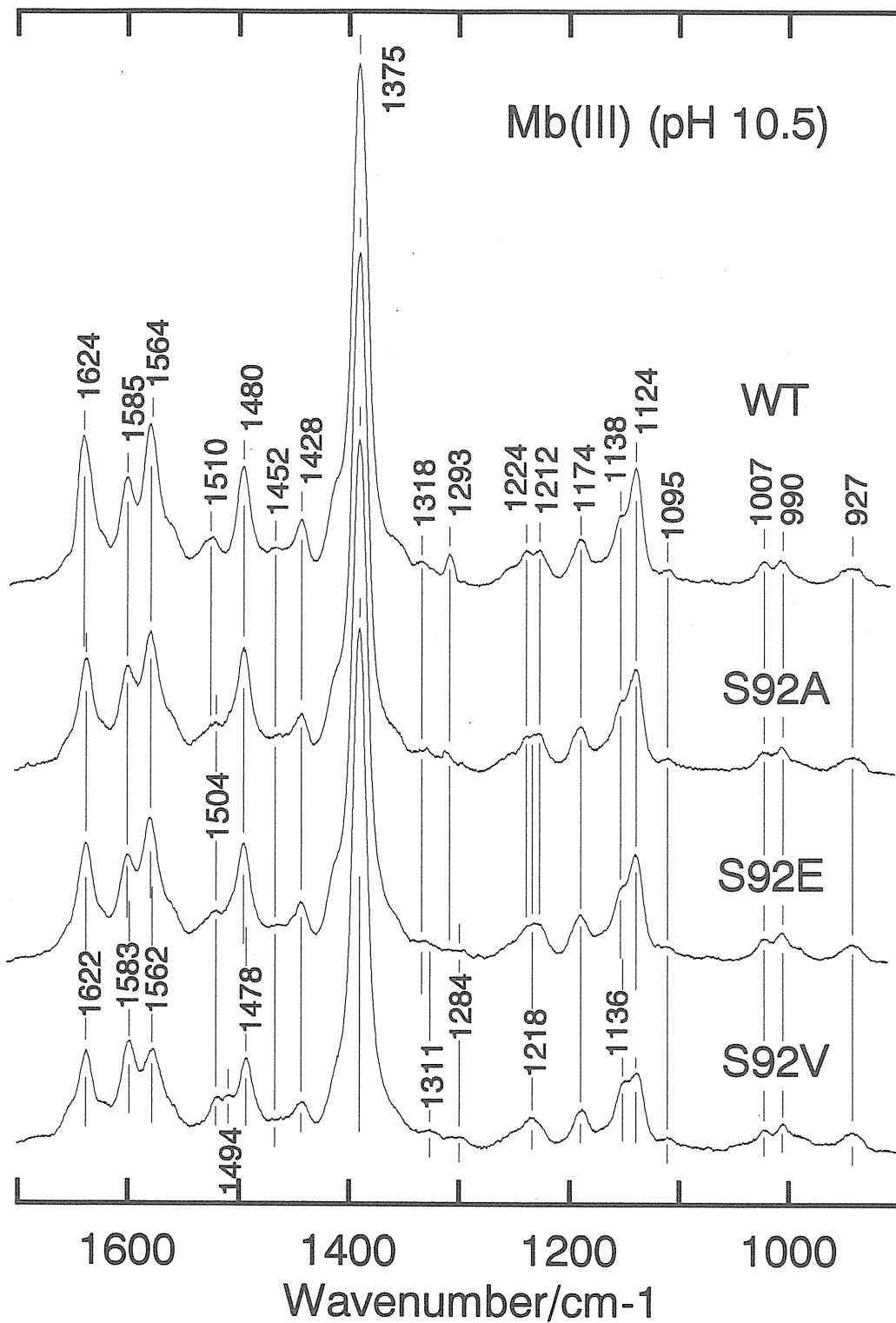


図3 アルカリ型ミオグロビン92位変異体の共鳴ラマンスペクトル (高波数側)

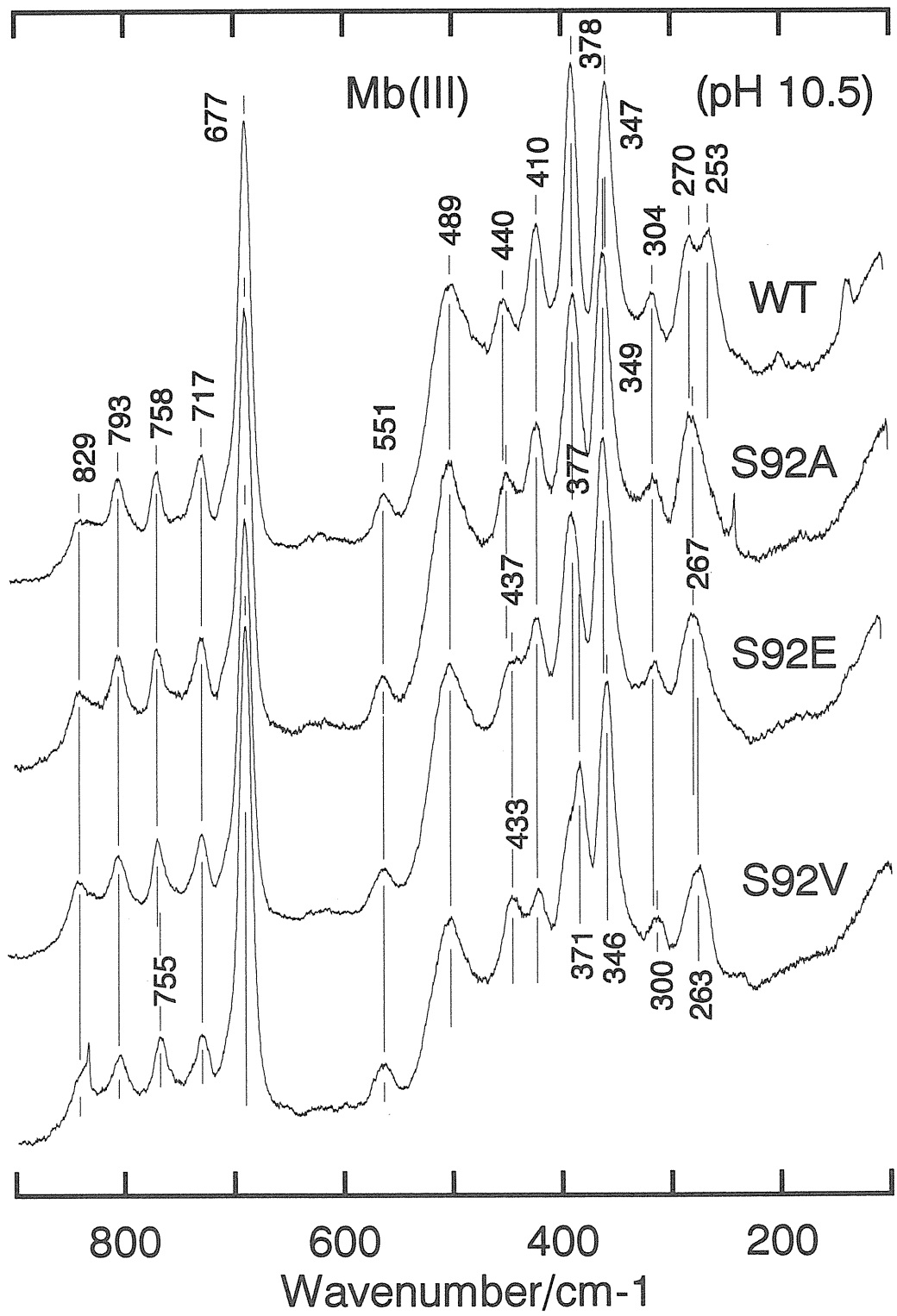


図4 アルカリ型ミオグロビン92位変異体の共鳴ラマンスペクトル（低波数側）

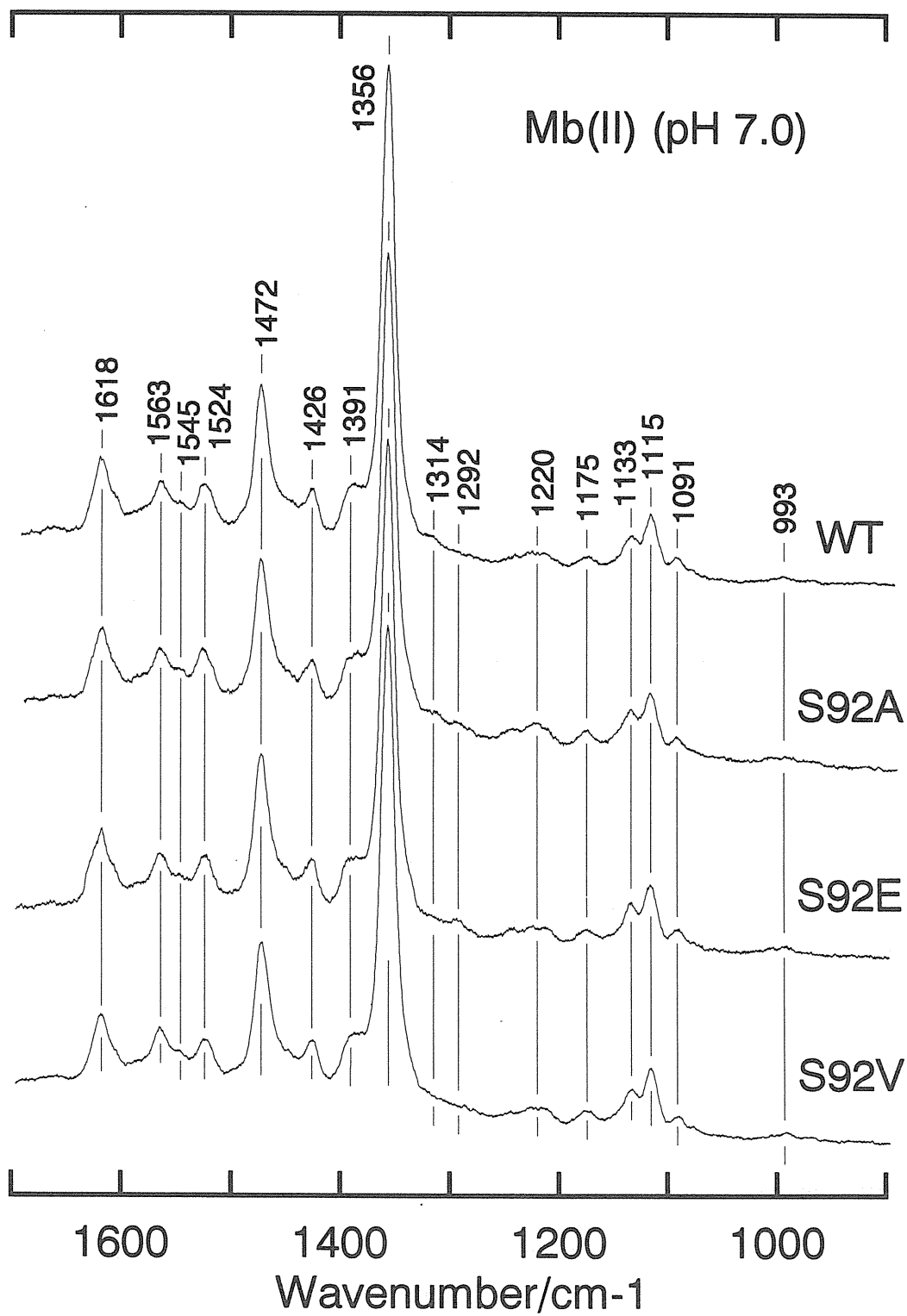


図5 還元型ミオグロビン92位変異体の共鳴ラマンスペクトル (高波数側)

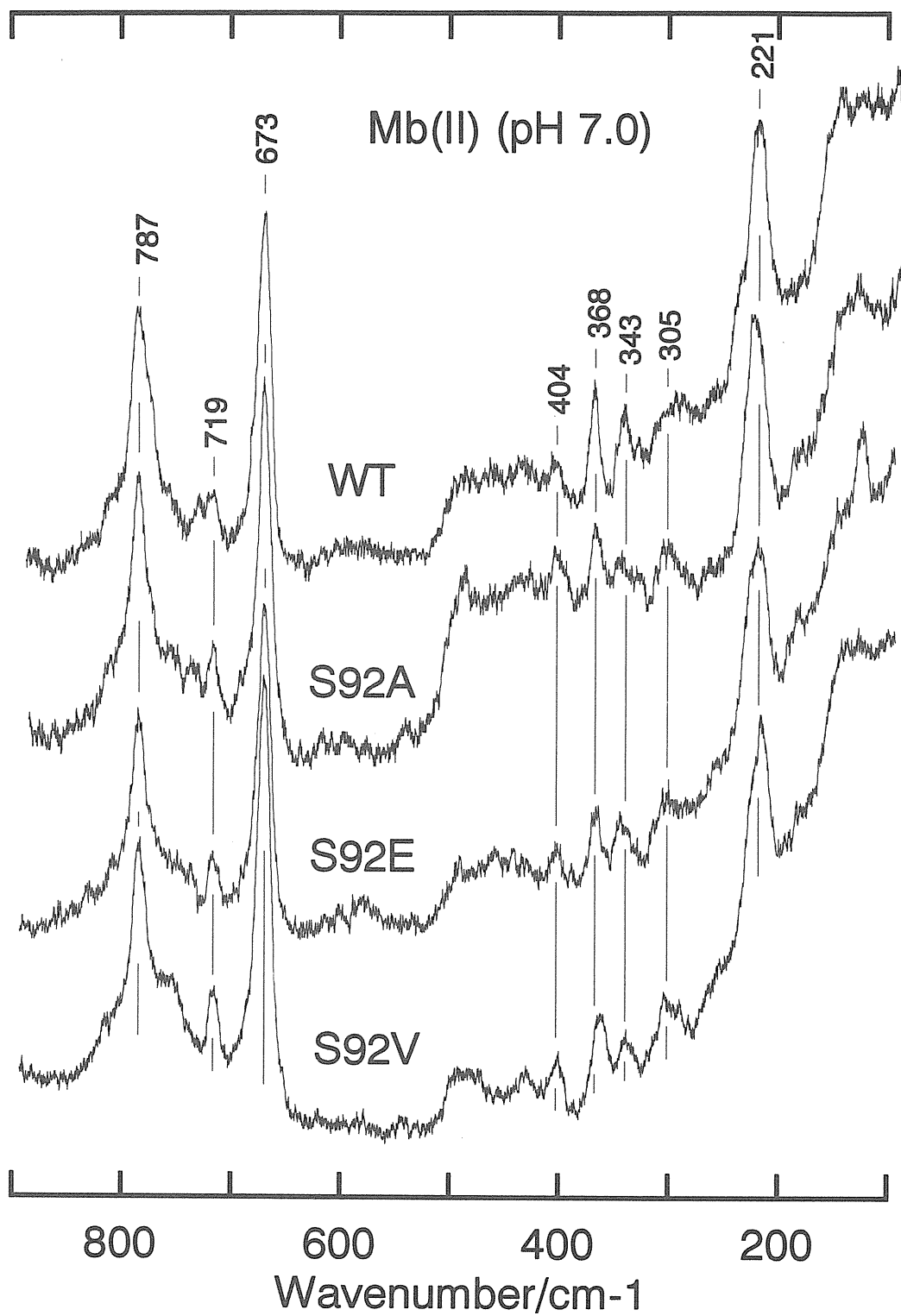


図6 還元型ミオグロビン92位変異体の共鳴ラマンスペクトル（低波数側）

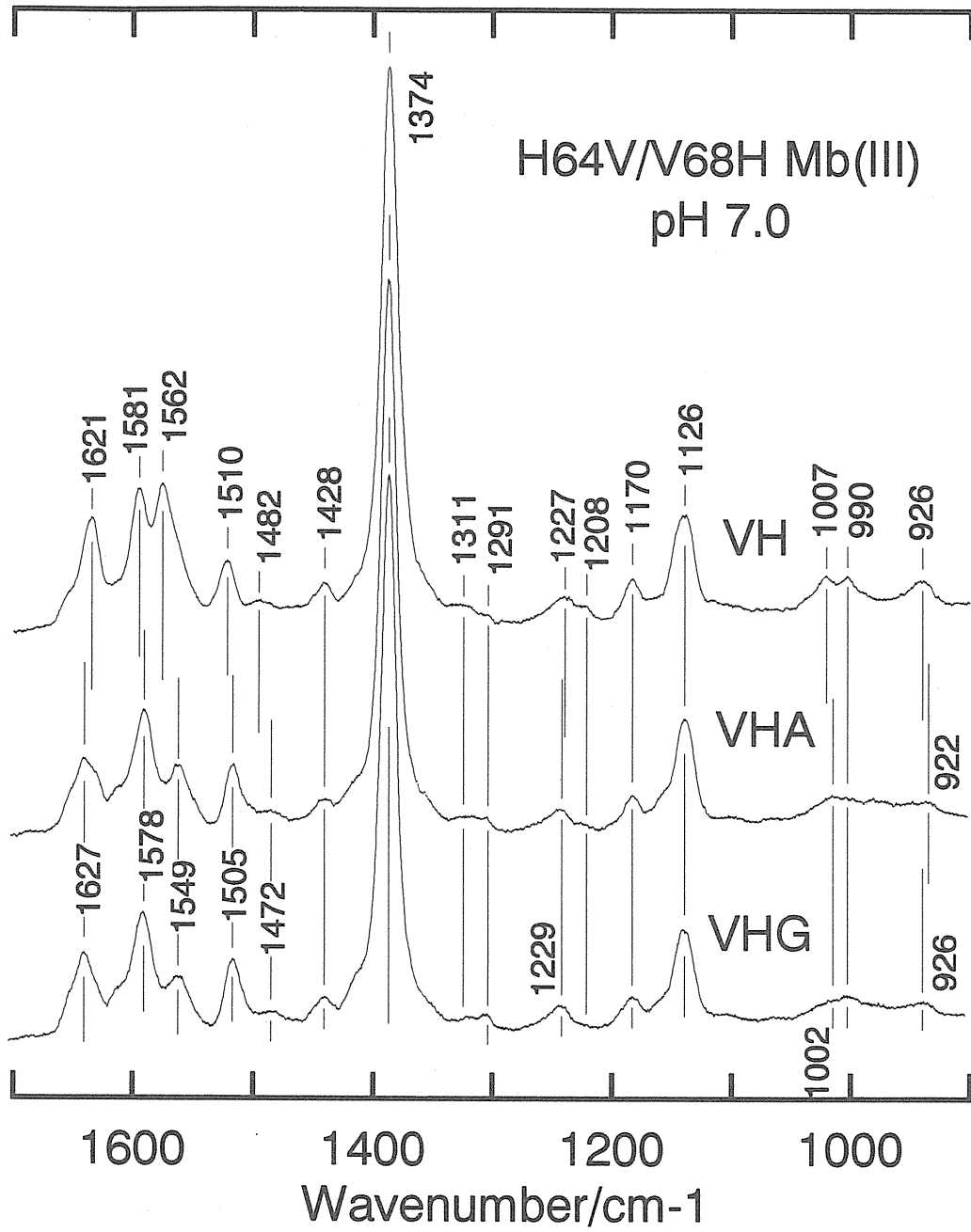


図7 酸化型ミオグロビン2重及び3重変異体の共鳴ラマンスペクトル(高波数側)

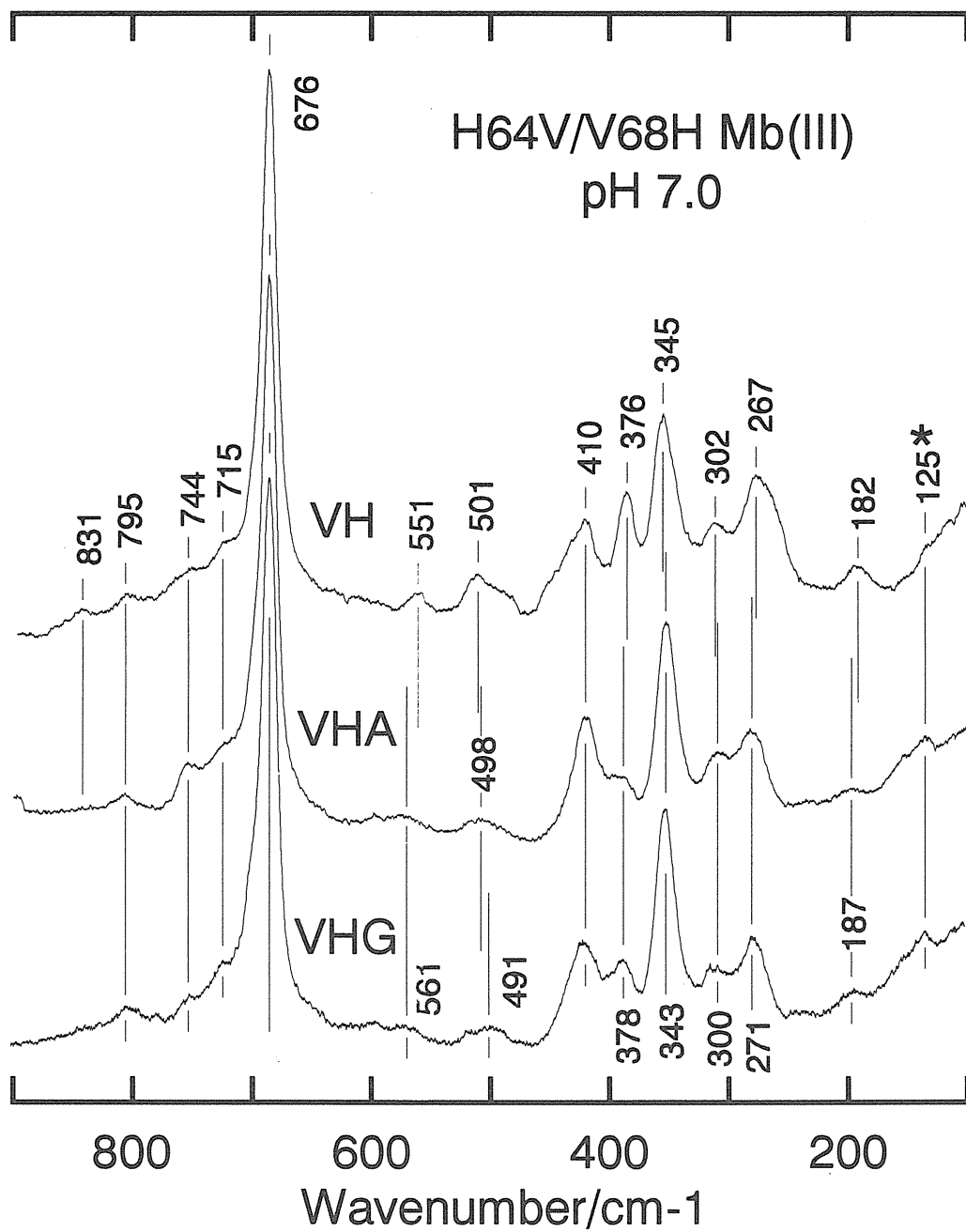


図8 酸化型ミオグロビン2重及び3重変異体の共鳴ラマンスペクトル（低波数側）

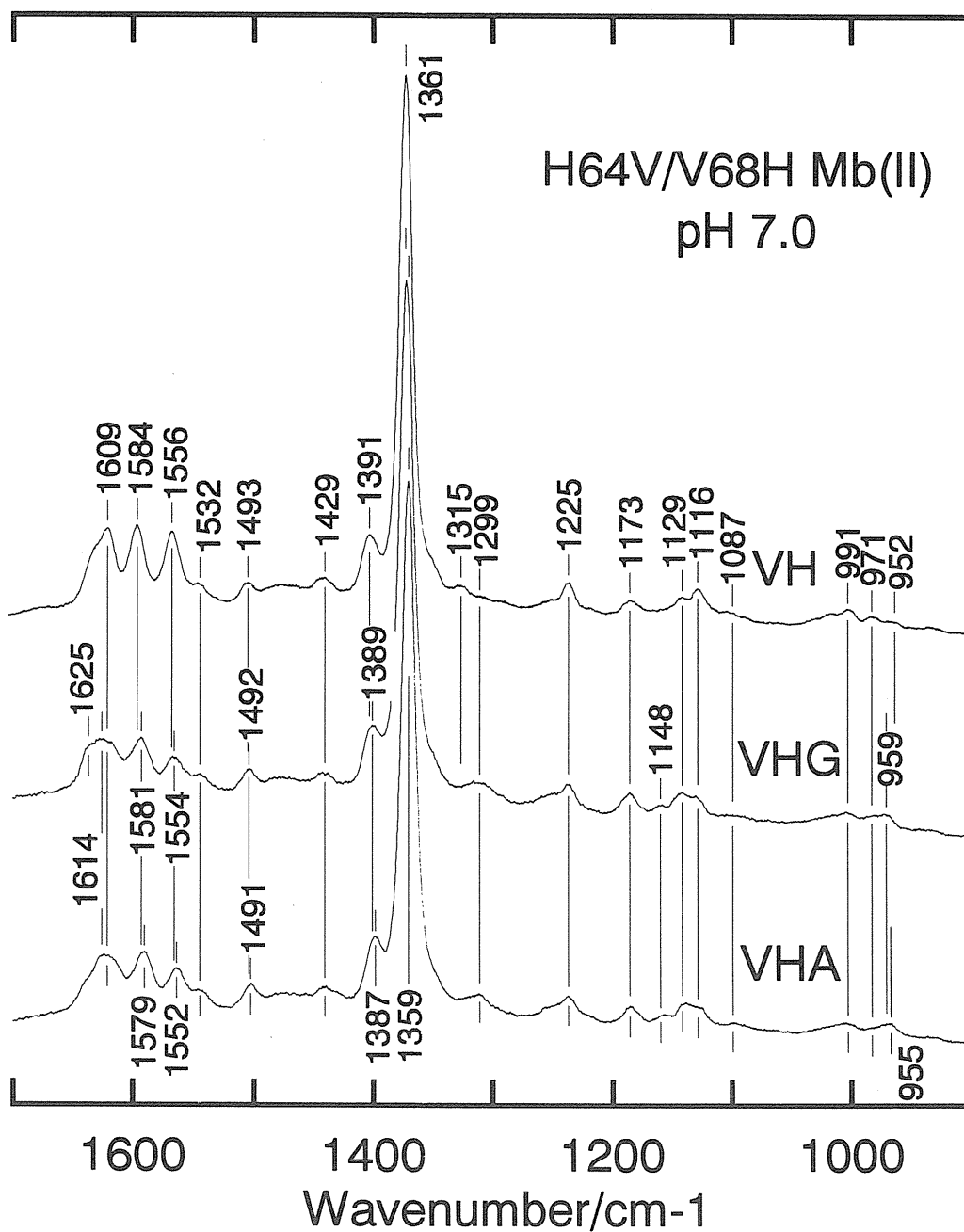


図9 還元型ミオグロビン2重及び3重変異体の共鳴ラマンスペクトル (高波数側)

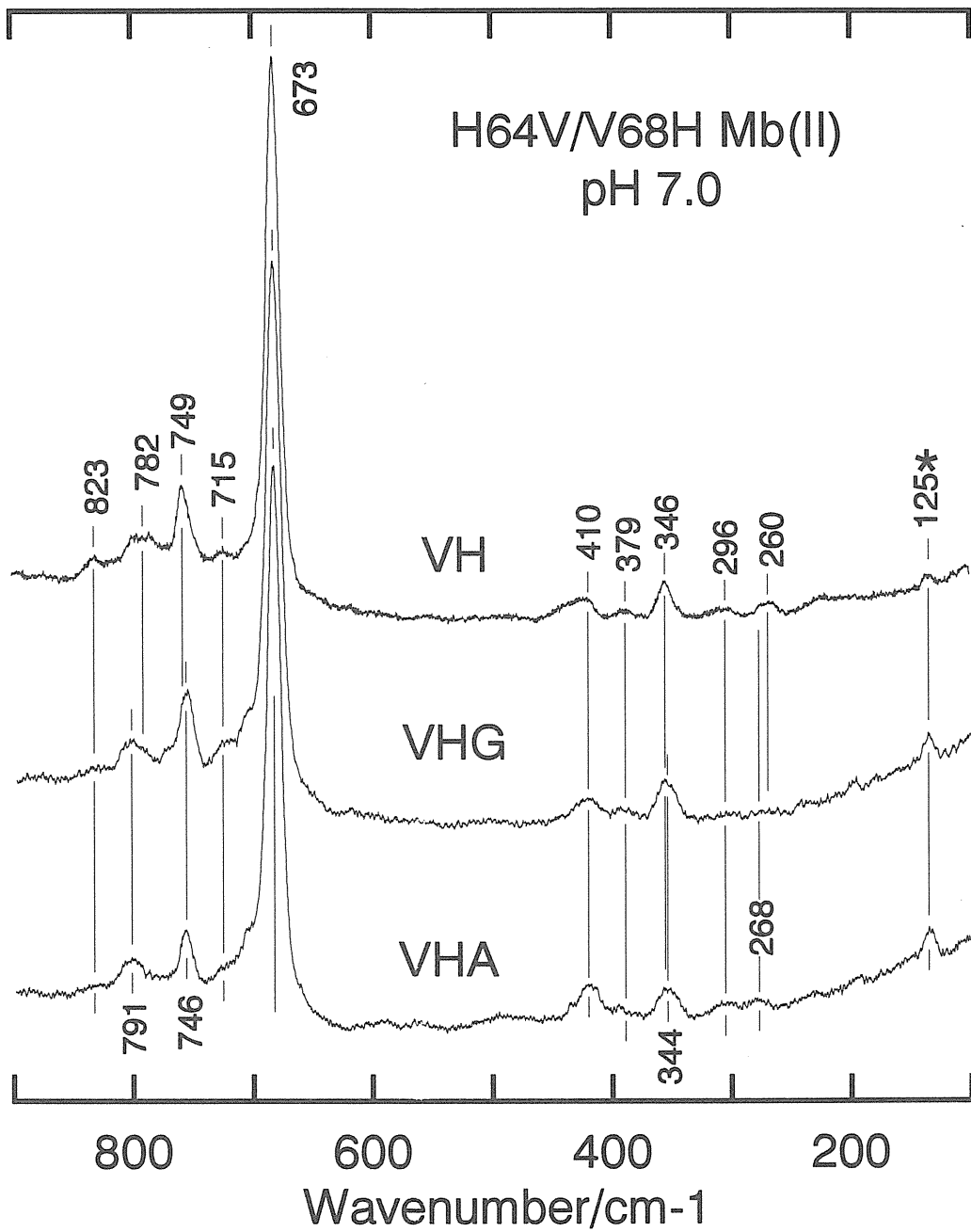


図10 還元型ミオグロビン2重及び3重変異体の共鳴ラマンスペクトル（低波数側）