ラット骨格筋ミオグロビンの単離と諸特性

奈良県立医科大学第2生理学教室 服部雅俊

ISOLATION AND PROPERTIES OF MYOGLOBIN FROM SKELETAL MUSCLES OF RAT (*RATTUS NORVEGIGUS*)

MASATOSHI HATTORI

Second Department of Physiology, Nara Medical University Received September 22, 1995

Abstract: Myoglobin was isolated and purified by heat denaturation-gel filtrationchromatofocusing procedure from water extract of skeletal muscles of the rat. One major (fraction I) and two minor (fractions II and III) components were finally obtained. Amino acid sequence of the major component was determined by an automatic Edman degradation procedure. As compared with murine myoglobin, we found amino acid replacements at 9 positions. Cysteine residue, with sulfhydryl group highly reactive to p-chloromercuribenzoate (PMB), was present at position 66 in both rat and murine myoglobins. The two minor components with higher anodic electrophoretic mobilities and with sulfhydryl group unreactive to PMB were found to be derived through mixed disulfide formation with cysteine (component II) or glutathione (component III) at the 66 th cysteine residue of the major component. In view of the hydropathy profile, secondary structures of rat and murine myoglobins were little different from each other and a prominent hydrophobic lobe around position 70, corresponding to the E-helix containing the distal histidine residue at position 64, was noted. The three components showed essentially identical oxygen equilibrium properties with neither homotropic nor heterotropic allosteric interactions. Halfoxygenation pressure (P_{50}) of the proteins calculated from the kinetic measurements, assuming a simple bimolecular reaction model, agreed very well with those determined by oxygen equilibria.

Index Terms

rat, myoglobin, primary structure, mixed disulfides, oxygenation

まえおき

ミオグロビン(Mb)は,構造,機能上の特性がヘモグロ ビン(Hb)とよく類似した単量体ヘムたんばくで,骨格 筋,心筋および例外的ながら特定平滑筋^{1,2)}にも存在する ことが知られている.その存在が知られてからすでに一 世紀の余になり³⁾,また生体たんばくとしてはその立体 構造が最初に明らかにされたたんぱくであるにもかかわ らず⁴⁾,その生理機能は現在にいたるもなお完全に解明 されたとはいい難い. その理由として, Hb においてはみ られる多彩なアロステリック機能が Mb においてはみ られないことから,研究者の興味を惹かなかったこと, また Hb の純化,調製がきわめて容易であるのに対し, Mb については多大な時間と労力を要すること等があげ られる. しかしながら最近になって,研究技法の進歩に ともない, Mb の機能について再認識,再検討の機運が高 まり, Brunori らによれば"Mb 研究のルネッサンス"5)と よばれる状況が現出しつつある. 当教室においては、従来からその研究の一環として、 鳥類筋胃平滑筋 Mb の構造と機能^{1,2)},潜水動物における 骨格筋 Mb のはたらき⁶⁾等について検討してきた.また、 哺乳類における持久運動能力と骨格筋 Mb との関連に ついてもいろいろな観点から研究を進めてきた⁷⁻⁹⁾.その 途次,げっ歯目に属するマウスの Mb が, Mb としてはき わめて例外的に Cys 残基をもつこと^{8,10)},その結果とし て当該 Cys と低分子チオール化合物(Cys ~ glutathione)との間にいわゆる Mixed disulfides の形成される ことを見出した¹¹⁾. Mixed disulfides 形成は近年いわゆ るラジカルによる組織傷害に対する生体防御機構の一環 として,その重要性がひろく認識されつつあり¹²⁾,このよ うな観点も含めて、今回、マウスと近縁関係にあり、か つ従来いまだ報告のないラット骨格筋 Mb の構造と機 能について検討した.

実験方法

実験材料

当教室で低圧暴露によるエリスロポエチン産生に関す る実験に用いたラット(Sprague-Dawley 系)から, 瀉血 死後に骨格筋を採取した.マウスと同じくラット骨格筋 の Mb 含量は比較的低いので,採取筋は-80°下に凍結 保存し,筋重量総計が約 150 g となるのをまって Mb を 調製した.

Mb の調製

既報の熱変性一ゲル濾過一クロマトフォーカシング法 によった¹⁾. 約 150 g の凍結筋に 4 倍量の氷冷脱イオン水 を加え、ジューサーを用いて抽出、低温高速遠沈(2.1000 rpm-20 min, 5℃)によりえた上清を熱変性¹³⁾(振盪下, 50 ℃-10 min)後, CO 負荷し, 再度低温高速遠沈する. 熱変 性操作により,熱に対して安定な Mb 以外のたんぱく (特に Hb)は比較的容易に除去することができる. この ようにして得られた粗 Mb 標品を,加圧限外濾過法によ り濃縮,再度高速遠沈し,Sephadex G-75(Pharmacia, Uppsala)カラム(3 X 95 cm)によりゲル濾過クロマトグ ラフィーし(50 mM Tris-50 mM NaCl-1 mM EDTA, pH 7.5), さらに Mb を純化した. このようにして純化 した Mb 画分は、ゲル電気泳動上なお不均質であったた め、PBE 94(Pharmacia, Uppsala)を担体とするクロマ トフォーカシング法によりさらに純化を試みた. すなわ ち、上記ゲル濾過 Mb 画分(約100 mg)を限外濾過濃縮 後, CO 飽和脱イオン水に対し1夜透析(4℃),低温高速 遠沈後, CO 飽和 25 mM Tris-acetate 緩衝液(pH 8.3) を低温実験室(4℃)内で1夜流し平衡しておいた PBE 94 カラムに添加し, PB 96 溶液(Pharmacia, Uppsala:

酢酸で pH 6.0 に調整, CO 飽和脱イオン水で 12 倍希釈) で展開溶出した. 画分量は 1 ml とし, 各分画を分離採取 した後, 1 夜 CO 飽和脱イオン水に対し透析, Phenyl Sepharose CL-4 B(Pharmacia, Upssala)を担体とした 疎水相互作用クロマト法(80%飽和硫安使用)²⁵⁾により 各分画に含まれる PB 96 を除去した. このようにして最 終的にえられた各画分は, CO 飽和脱イオン水に対し透 析して硫安を除去した後, 濃縮, 液体 N₂中で小滴状に凍 結後, -135℃下に保存した. 標品は使用直前に必要量を とり出し, 融解後ただちに使用した. クロマト操作は全 て低温実験室(4℃)内で行い,使用溶媒は全て氷冷, CO 飽和して用いた.

デンプンゲル電気泳動

Smithies の方法にほぼ従い,局方デンプンより自製し た泳動用デンプンを用いて泳動した¹⁴⁾. 泳動は 0.04 M Tris-EDTA-Borate 緩衝液(pH 8.6)下に行い(4°C), 泳 動終了(通常, 500 V-3 h)後にゲルを 2 分割して Amido Black 10 B 染色した.

SH 滴定

p-Chloromercuribenzoate(PMB)を用いる Boyer の 分光学的滴定法¹⁵により滴定した. Mb 試料および溶媒 緩衝液(0.1 M phosphate, pH 7.0)は予め CO によりよ く飽和して用い, PMB は市販品から再結晶を反復した 後に使用した.

Mixed Disulfide の検出, 同定

Kumari らの HPLC 法¹⁶)にほぼ準拠した. 当該法の要 点は, Mixed disulfide を含むたんぱく試料を過ギ酸酸 化することにより, 当該 disulfide 形成に関与するチオー ル化合物(Cys~glutathione等)をスルフォン酸化(それ ぞれ cysteic acid~glutathione スルフォン酸に)すると 同時に,たんぱくから切断,遊離させる.遊離スルフォ ン酸を Centricon-3(Amicon, Beverly, cut-off 分子量: 3,000)を用いて限外濾過分離後, phenylisothiocyanate (PITC)処理し, 生じた phenylthiocarbamyl(PTC)-誘 導体を逆相 HPLC 法により分離同定した. 逆相カラムと しては Beckman ODS-18(4.6 X 250 mm, 5 µm pore), 溶媒系には0.1%triethylamine -0.14 M acetate(pH 6.4)を含む7%アセトニトリルを用い, 流量 0.5 ml/min で室温下 isocratic に溶出した. なお,以上の分析には Waters 625 LC system を用い, PTC 誘導体の検出は 251 nm 下に行った. また, 同定標準としては, Cys, glutathione(還元型)を上記試料と同様に処理,分析し tr.

グロビンの調製

HCl-アセトン法(-20℃)¹⁷⁾により, MbCO 標品から

調製した.

HPLCーペプタイドマッピング

以下3法によりえたグロビン-ペプタイドを,逆相 Cosmosil 5 C 18-AR カラム(nacalai tesque, 京都; 4.6 X 150 mm, 5 µm pore)を用い, Waters 625 LC system による逆相 HPLC 法(室温, 流量 1 ml/min)により分離, 各ペプタイド・ピークは 215 nm でのモニター結果を観 察しつつ用手分離後,それぞれ凍結乾燥した.1) Trypsin 消化: 対グロビン重量比 1/100 量の TPCKtrypsin(Worthing-ton, Freehold)により0.2 M NH4 HCO₃緩衝液(pH 8.0)下に 37℃-4h 消化した.2) Staphylōcoccus aureus V 8-protease 消化: 対グロビン重 量比1/200量のV8-protease(ICN ImmunoBiologicals, Costa Mesa)により、10 mM 酢酸ア ンモニウム(pH 4.0)下, 37℃で2h 消化した. 当該条件 下,ペプチド結合は原則として Glu 残基の C 末側で切断 される¹⁸⁾. 3) Cyanogen Bromide 処理: グロビンを 70%ギ酸に溶解,グロビンと等量のCNBrを加えて室温 下に 16 h 孵置した. 当該条件下, Met 残基の C 末側ペプ チド結合が切断される19). 以上の3法でえられた各ペプ タイド混合物は、Milli-Q水により小試験官に洗いとり 凍結乾燥後, 上記の如く逆相 HPLC 法によってペプタイ ド分離した. 分離用溶媒としては, solvent A:0.1%ト リフルオロ酢酸(TFA)水溶液(pH 2.75), solvent B: 0.1%TFA/90%アセトニトリル溶液(pH2.75), solvent C:H₂O/アセトニトリル等量混合液を用い,アセ トニトリルの直線濃度勾配によりペプタイドを溶出した. なお, 濃度勾配の profile は, 各3種のペプタイド混合物 標品毎に、分離が最良となるよう工夫した(Table 1). 当 該ステップで使用する水溶液は、全て MilliQ 水を用い て作製した.

アミノ酸配列の決定

自動化 Edman 分解法²⁰⁾によった. PTH アミノ酸の分 離同定は、Seque TagTMカラム(Milligen, Burlington: PTH アミノ酸分析用、3.9 X 300 mm)または Nova-Pak^R C 18 カラム(Waters, Milford: HPLC 用, 3.9 X 300 mm)を用い、ProSequencer 6600(Milligen, Burlington)により固相法(モニター波長: 215 nm および 316 nm)で自動分析した. カップリング用 membrane として は Sequelon AA(Milligen, Burlington)を主とし、必要 に応じて Sequelon DITC(Milligen, Burlington)も使用 した. たんぱくを構成する 20 種のアミノ酸のうち、唯一 Cys はその PTH 誘導体が不安定なため、通常の Edman 分解法によっては同定することができない、このため、 Sequelon AA 膜にカップリングさせた Cys 含有ペプタ イドを気相法により S-ピリジルエチル化した後²¹⁾, 通常 の Edman 分解法を施行することにより, Cys 残基を同 定した.

02平衡曲線の測定

教室常用の分光学的方法²²により測定した(20℃).測 定の直前に、-135℃下凍結保存しておいた MbCO 試料 をとり出し融解後、任意の溶媒で3 mg/ml となるよう希 釈した.氷冷、振盪下に蛍光燈(60 W)を近接照射しつつ 加湿 100 %O₂を 30 分フラッシュして MbO₂化し、これ を測定試料とした.

O2解離一結合 Kinetics の測定

Stopped-flow 分光測定装置(Union 技研, RA 401)を 用い, 既報のとおり^{23,24})O₂結合ならびに解離反応の速度 論的測定を行った. 測定セルの光路長は 2 mm とし, 駆 動圧を 7 kg/cm²とした場合の dead time は 0.9 ms で あった²³⁾. 反応は混合後の Mb 濃度 10 μ M(ヘムあた り), 0.1 M phosphate 緩衝液(pH 7.0), 20℃下に観測 し, 測定波長は O₂結合反応の場合 430 nm, O₂解離反応で は 415 nm とした.

使用試薬は特に記載がなければ全て特級を用いた. ア ミノ酸配列決定用試薬については、アセトニトリル、イ ソプロピルアルコール、メタノールはHPLC 規格 (nacalai tesque, 京都), 酢酸、酢酸エチル, n-ヘプタン はアミノ酸配列分析用(nacalai tesque, 京都), PITC は アミノ酸配列分析用(Pierce, Rockford), TFA はたんぱ く1次構造分析用(鳥津, 京都), 4-ビニルピリジン、ト

Table 1. Elution profiles for the tryptic, V8-proteolytic and cyanogen bromide peptides from rat myoglobin

Peptides	Time	Solvent					
	(min)	A (%)	B (%)	C (%)			
Tryptic	0	100	0	0			
	40	85	15	· 0			
	80	78	22	0			
	100	54	46	0			
	115	30	70	0			
	120	0	100	0			
	140	0	0	100			
V8-	0	90	10	0			
proteolytic	86	30	70	0			
	96	0	100	0			
	106	0	0	100			
CNBr	0	90	10	0			
	90	50	50	0			
	100	30	70	0			
	120	0	100	0			
	130	0	0	100			

See text for the compositions of the solvent.



Fig. 1. Gel-filtration chromatography of water extract from rat skeletal muscles after heat-denaturation (50 °C, 10 min). Sephadex G-75 column (3×95 cm) equilibrated and eluted with 50 mM NaCl-50 mM Tris-1 mM EDTA (pH 7.5), 4 °C. Fraction volume : 4 ml.

0.8 0.6 0.6 0.4 0.2 0.2 0.550 0.00.0

Fig. 2. Visible absorption spectra of the fractions A (Hb) and B (Mb) in Figure 1. CO from.

リブチルスルフォン酸(Aldrich Japan, Tokyo)をそれ ぞれ使用した.また,標準 PTH-アミノ酸キットおよび PTH-S-ピリジルエチル Cys としてはそれぞれ和光(大 阪)および Applied Biosystems Japan(Osaka)の標品を 用いた.

実験結果

Mb の単離,純化

Sephadex G-75 を担体とするゲル濾過クロマトの結 果,可視部に吸収をもつ数個の画分が分離された(Fig. 1). 主要画分 2 個(画分 A と画分 B)を分取, CO 飽和後 の可視部分光特性から,画分 A は 541 および 570 nm に 吸収極大をもつ典型的な HbCO のスペクトルを,画分 B は 540 および 578 nm に吸収極大,570 nm 近傍に特徴的 な"肩"を有する MbCO のスペクトルを示すことがわか った(Fig. 2). Fig. 1 の結果は,熱変性処理(50℃-10 min)により,筋抽出液中に大量に存在する Hb およびそ



Fig. 3. Chromatofocusing profile of the fraction Mb in Fig. 1. About 80 mg of the sample after overnight dialysis vs. H_2O were applied onto a PBE 94 column (1×20 cm). Absorbances at 540 nm (-) and pH at 20 °C (-•-) of the effluents were monitored.

の他の非ヘムたんぱくが効率的に変性除去され,かつ, 当該処理後もなお微量残存するこれら諸たんぱくが、ゲ ル濾過により Mb 画分から分離除去されることを示し ている.しかしながら、電気泳動法によりみたところ、 画分 B (Mb 画分)中にはなおいくつかの不均質成分の存 在することがわかったので、さらにクロマトフォーカシ ング法による純化を試みた(Fig. 3). その結果, 画分 Mb はさらに互いに等電点を異にする4個以上の可視部に吸 収を有する成分から成ることがわかり, またその分光特 性からみて画分1はメト型 Mb, 画分2-4 はいずれも MbCO であることがわかった. クロマトフォーカシング 画分 1-4 を分取し、混在する PB 96 溶媒を疎水相互作用 クロマト法25)により除去した後、デンプンゲル電気泳動 した. その結果(Fig. 4 A)から画分 2 が CO 型 Mb 主成 分(画分 I), 画分1が Mb 主成分(画分 I)のメト型と Mb よりは cationic な非ヘムたんぱくの混合成分, 画分 3は上記 Mb 主成分(画分 I)と2個の Mb 副成分(画分 II, III)の混合成分, 画分4 は画分 I と画分IIIの混成成分 であることがわかった.その後,画分3および4を再度 クロマトフォーカシングして、画分II、IIIを均質状態ま で純化,単離することができた. Fig. 4 B は, 10-3 M メ ルカプトエタノールを含む条件下に、上記のクロマトフ ォーカシング画分 1-4 を電気泳動した結果で,画分 1,2 の泳動パターンには何ら変化がみられないのに対し、画 分3,4の場合には画分Ⅱ,Ⅲに相当するバンドが消え て, Mb 主成分(画分 I)に対応する単一バンドのみとな っていることが注目される.この所見はクロマトフォー カシングにより分離される画分 1-4 の相対比が、抽出筋 標品毎に大幅に変動することと考え合わせると、マウス Mb について最近われわれがえた結果¹¹⁾と同様,画分 I が native なラット Mb, 画分 II, III はそれぞれ画分 I に 由来して生成した mixed disulfide であることを強く示 唆する結果と考えられる.

ラット Mb の1 次構造決定



Fig. 4. Starch gel electrophoresis of the four fractions obtained by chromatofocusing (Fig. 3). A : without mercaptoethanol, B : with 10⁻³ M mercaptoethanol, indicating the disappearance of the anodic heterogeneous zones observed in A. 0.04 M Tris -EDTA-Borate buffer system (pH 8.6), 500V-3h, Amido Black 10 B stain.





Fig. 5 に、3 種の方法(CNBr 処理, trypsin 消化および Staphylococcus aureus V 8 protease 消化)によりラット Mb からえられたペプタイドについての HPLC-ペプタ イド・マップを示した. このようにして分離した各ペプ タイドおよびグロビンそのままを用い、自動 Edman 分 解法²⁰⁾により決定したラット Mb 1 次構造を Fig. 6 に 示した. グロビン全分子を Sequelon AA 膜に結合させ た場合、今回の方法では N 末から 50~60 位までのアミ ノ酸配列を決定することができた. なお、アミノ酸配列 の決定にあたっては、既に決定ずみのマウス Mb 1 次構 造¹⁰⁾を参照、類比した.

方法でも述べたように、たんぱく中の Cys 残基はたと え存在しても通常の Edman 分解法で決定することはで きない. そこで、マウス Mb 1 次構造からの類推で、おそ らく Cys が位置すると思われる第 66 位を含む V 8-ペプ タイド 55-85 を用い、これを Sequelon AA 膜に結合さ せた後、Hirano らの気相法²¹⁾により S-ピリジルエチル 化後、通常の Edman 分解法により配列決定を行った. そ の結果を、Subtraction 処理後に示したのが Fig. 7 B で、第 66 位には、予想どうり S-ピリジルエチル-Cys (Fig. 7 A)、したがって Cys 残基が検出された. なお、 第 65 位には Gly に対応する負ピークが、これも予想ど うり検出された.

SH 滴定

マウス Mb と同様, ラット Mb においても1分子あた り1残基, N 末から第66位に Cvs の存在することが明 らかになった. Mb 分子の立体構造からみて, 当該部位は 分子表面に位置し²⁶⁾,したがって当然 SH 試薬に対して は高い反応性を示すと考えられる.そこで PMB を用い る Boyer 法¹⁵)により, SH 滴定した結果が Fig. 8 であ る. ラット Mb 主成分である画分 I については,予想ど うり,1分子あたり1個のSH基が滴定されたが,画分 4(画分Ⅲに微量の画分 I を含有)については0.16 SH/ mole が滴定されたに過ぎず,事実上当該画分において は高反応性 SH がゼロという結果がえられた. 画分 II に ついても,画分Ⅲと同じくSH は滴定されなかった.ま た, Sephadex G-10 カラム(2.5 X 40 cm)を用い, 0.1 M -メルカプトエタノール処理することにより,画分IIおよ びIIIの SH 基反応性は完全に回復して、画分 I の場合と 同様の SH 反応性を示すことがわかった. 以上一連の事 実は, 画分 I の 66 Cys において, mixed disulfide が形 成される結果,画分II,IIIが生じる可能性を強く示唆す る.

ラット Mb における mixed disulfide 形成

既に述べたように、いくつかの状況証拠からみて、上

Sequence No.	1	9	13	19		31	35		
Mouse	GLSD	GEWQLEU	VLN VAL	WGKVE ALA	DLAGHGQ	EVLI GLY	LFKTHR	HPETLDKFI	OKFKNLKSEE
Rat		NET	ILE	GLY		SER	ALA		
Sequence No.		57							110
Mouse	DMKG	LY SEDLK	KHGCT	VLTALGT	LKKKGQH	AAEIQP	LAQSH/	ткнкіруку	LEFISE HE I
Rat	S	ER							VAL
Sequence No.	113	119)					153	
Mouse	IGLUV	LKKR HIS	SGDFG	ADAQGAM	SKALELFR	NDIAAK	YKELG	FQG	
Rat	GLN	TYR	1						

Fig. 6. Primary structure of rat myoglobin as determined by an automatic Edman degradation procedure. The result with murine myoglobin¹⁰⁾ was also shown for comparison. Amino acid replacements were indicated by three-letter designation.



Fig. 7. Sequence determination by an automatic Edman degradation procedure of cysteine residue after gas phase S-pyridylethylation.

> A: S-pyridylethyl cysteine standard (arrow), B: sequencing of the V8-proteolytic peptide 55-85 after the derivatization. The data after "subtraction" was shown, indicating the negative peak of 65Gly followed by the S-pyridylethylated 66Cys.





記画分 II, IIIがラット Mb における mixed. disulfide 形成の結果生じた可能性はきわめて高い. そこで, この可能性を, Kumari らの方法(1994)¹⁶⁾により直接検証してみた. その結果, 画分 II, IIIはそれぞれラット Mb の N末から第 66 位に存在する Cys 残基の SH と Cys および glutathione との間に形成される mixed disulfide であることが直接実証された(Fig. 9).

O_2 結合機能

Fig. 10 に、 ラット Mb 主成分(画分 I), glutathione との mixed disulfide 形成により生じた画分III, および Cys との mixed disulfide 形成により生じた画分IIにつ いてえた O₂平衡曲線を示す. なお, 画分 I のデータは異 Stopped-flow 分光法により, 画分 I (0.1 M phosphate, pH 7.0)について求めた O_2 解離速度定数(k)は 22.0±0.6 s⁻¹(n=5), O_2 結合速度定数(k'×10⁻⁶)の値は 22.0±0.8 M⁻¹・s⁻¹(n=5)となった. heterotetramer たんぱくである Hb とは異なり, monomer たんぱくである Mb における O_2 解離, 結合反応は, monophasic に進



Fig. 9. Reversed phase-HPLC determination of mixed disulfides in heterogeneous fractions of rat myoglobin after performic acid oxidation followed by PITC-derivatization¹⁶).
(A): cysteic acid (1) and glutathione sulfonic acid (2) standard with the retention time (R. T.) of 8.380 and 9.100 min, respectively. (B): rat myoglobin fraction I, (C): rat myoglobin fraction II (R. T. 8.312 min) and (D): rat myoglobin fraction III (R. T. 9.173 min).

行することが確かめられている²⁷⁾. またその O₂平衡は単 純な質量作用式によって記載でき^{24,28)}, この場合の結合 平衡定数 K は,

K=k'/k (1)
によって与えられる.一方、
$$O_2$$
平衡における半飽和 Po_2
(P_{50})とKとの間には逆比関係が成立するので、
 $P_{50}=1/K/=k/k'(M)$ (2)
によって、 P_{50} を理論的に計算することが可能となる²⁴⁾.

Fig. 10 の実線曲線は、上記の速度定数値(k, k')から算 出した P_{50} 値(0.59±0.14 torr, n=10)を用い、質量作用 式(Hill 式²⁶)、但、n=1)により計算したラット Mb 画分 I についての理論的 O_2 平衡曲線である.平衡法によりえ た実測結果と計算によりえられた理論曲線とはよく一致 した.

考 察

ラット Mbの1次構造

"まえおき"でも述べたように、同じヘムたんぱくであ りながら、Hbに比し Mb の構造、機能に関する研究は少 く、実験動物として繁用されるラットの Mb1 次構造に







Fig. 11. Hydropathy profile of rat myoglobin as compared with that of murine myoglobin. The profiles were constructed according to the Kyte-Doolittle procedure with 9 amino acids span.

ついても未だ報告がない. 今回, その1次構造を決定し, 近縁のマウス Mb のそれ¹⁰⁾と比較したところ, 9 個所(9 Leu → Met, 13 Val → Ile, 19 Ala → Gly, 31 Gly → Ser, 35 Thr → Ala, 57 Gly → Ser, 110 Ile → Val, 113 Glu → Gln, 119 His → Tyr)においてアミノ酸置換がみられた (Fig. 6).

これまでの報告からみる限り, 脊椎動物 Mb で Cys 残 基をもつものはきわめて稀である. すなわち, 霊長目に 属するヒト³¹⁾およびテナガザル(*Hylobates agilis*)²⁹⁾の *Mb* では N 末から第 110 位に Cys が存在し, またキハ ダマグロ(*Thunnus albacares*)の Mb でも, アミノ酸分 析の結果,1分子あたり1残基のCys存在が報告されているが,その所在部位は不明である³⁰.われわれの教室においても,最近鳥類14目24種,哺乳類7目13種について,Mb1次構造を決定したが,Cys残基をもつものは皆無であった(Enoki et al. :未発表).マウス Mb は Cys をもつ稀な事例の一つであって,N末から第66位にCysが存在する¹⁰.今回, ラット Mb についても,マウス Mb の場合と同一部位にCys残基の存在することを見出した(Fig. 7).その後, ラット,マウスについてみられたこのような構造上の特例が,げっ歯類全般にあてはまる特性なのかどうかについても検討したところ,マウス,

(376)

ラットと同じくげっ歯類ネズミ亜目に属するゴールデン ・ハムスター(Mesocricetus auratus)の Mb においては、 1次構造上 Cys 残基を全く認めず、同じくヤマアラシ亜 目に属するアフリカタテガミヤマアラシ(Hystrix crestata)およびモルモット(Cavia porcellus)においても Cys はみられなかった(Enoki et al. :未発表).

ラット Mb の2 次構造

今回決定しえた1次構造に基づき、Kyte および Doolittleの方法³²⁾によりいわゆる Hydropathy profile を作図、これをマウス Mb のそれと対比してみた(Fig. 11). 両 Mb 間には9 個所においてアミノ酸置換がある にかかわらず((Fig. 6), Hydropathy profile によって みる限り、両者の2次構造は細部にわたるまできわめて よく類似していることがわかる. 共通して特に注目され るのは、第70位を中心としてみられる強い hydrophobic lobeで、当該部域は Mb と O₂との可逆結合特性 に重要なかかわりをもつとされる遠位 His 残基(第64 位)を含む E-helix に対応する.

ラット Mb における mixed disulfide 形成

たんぱくに存在する Cys 残基の SH(Pr•SH)は,生体 内では酸化型低分子チオール化合物(RSSR)と可逆反応 して,いわゆる mixed disulfide 化合物(Pr•SSR)を形 成することが知られている¹³.

 $Pr \cdot SH + RSSR \rightleftharpoons Pr \cdot SSR + RSH$ (3)また、この反応に参画する低分子チオール化合物として は、glutathione(酸化型)やCystine 等が報告されてい る. たんぱくに存在する SH が, 生体要素の構造(たとえ ば、細胞膜の integrity)や機能(たとえば酵素活性)の維 持に重要なかかわりをもつことはひろく知られていると ころである. したがって, 上記の mixed disulfide 形成反 応も、このような関連から生体機能の調節にいろいろな 面で関係しているものと思われる12).特に近年注目され ているのは, oxidative stress 時に生ずる oxy-radicals その他による組織傷害等との関連である. mixed disulfideの形成反応(可逆性)は、おそらくこのような条件下 における Pr•SH のさらなる不可逆性酸化(たとえば, Pr ・SOH, Pr・SO₂H, Pr・SO₃H)に対する一種の安全弁と してのはたらきを果たしている可能性が指摘されてい る³³⁾.

Mixed disulfide の形成は、これまで多数のたんぱく について報告されているが¹²⁾, Mb についての報告は皆 無であった. 最近われわれは、マウス Mb において mixed disulfide の形成されることを見出したが¹¹⁾, 今回 さらにラット Mb についてもその生成を明らかにしえ た. Mb における mixed disulfide 形成の生理的意義につ いては、現時点ではかならずしも明らかではないが、骨格筋や心筋という Mb を有する器官において、日常的に 大巾な oxido-reduction レベルの変動が生ずることを考 えると、上に述べた oxidative stress に対する防御機構 の一環を成している可能性も十分考えられよう.

ラット MbのO2結合一解離反応

まず平衡論的アプローチにより明らかになったことは, O2平衡に対する溶媒効果が全くみられないことである (Fig. 10). したがって, 類縁ヘムたんぱくである Hb の 場合にみられるような種々の heterotropic allosteric interaction 効果(たとえば, Bohr 効果やアニオン効果) を全くみなかった. さらに, homotropic allosteric interaction 効果も全くみられず、O2平衡曲線は直交双曲線状 を示した(Fig. 10). これらの諸特性は、これまでに報告 されているいろいろな Mb を通じてみられているとこ ろと完全に一致した³⁵⁾. また, Cys や glutathione との間 に形成された mixed disulfide-Mb(画分 II, III)の O₂平 衡は、化学修飾の生起する部位(第66位)が、ヘムのリガ ンド結合特性に関連のある第64位 His(遠位 His)にご く近接しているにかかわらず²⁶⁾native 主成分(画分 I) のそれと全く差がなかった(Fig. 10). この点について も, Hb についてえられた結果³⁴⁾とは大いに異なる. 最後 に、別途、Stopped-flow 分光法で求めた O2解離一結合反 応速度定数(k, k')から, Mb と O₂間の単純な2 分子反応 を仮定して,理論的に算出した O2平衡曲線は,実測曲線 とよく一致した. この結果は, 最近われわれの報告した 4種の脊椎動物 Mb についての結果24)とも一致し、した がって従来からいろいろと議論のあった, Mb と O2との 結合反応において,両分子間の反応後に短寿命の反応中 間体の出現ないしはたんぱく立体構造に短期、過渡性変 化が生ずる等の仮説35,36)は完全に否定できる.

謝辞

稿を終えるに臨み,本研究の推進,論文の執筆両面に わたり絶えざる御指導と御鞭撻を賜った榎 泰義教授に 心よりの謝意を表します.また,ミオグロビン1次構造 の決定にあたり,種々御助力いただいた第2生理大賀好 美,石立裕美の両氏に深謝いたします.

本研究の要旨は,平成7年3月,第72回日本生理学会 大会において発表した.

文 献

- Enoki, Y., Ohga, Y., Kawase, M. and Nakatani,
 A.: Biochim. Biophys. Acta 789: 334-341, 1984.
- 2) Enoki, Y., Morimoto, T., Nakatani, A., Sakata,

S., Ohga, Y., Kohzuki, H. and Shimizu, S. : Adv. Exp. Med. Biol. 222 : 709-716, 1988.

- Kagen, J. L. : Myoglobin : Biochemical, Physiolosical and Clinical Aspects. 1. Historical Aspects. Columbia Univ. Press, New York, p1-2, 1973.
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wycoff, H. and Phillips, D. C. : Nature 181 : 662-666, 1958.
- 5) Brunori, M. : Experientia 51 : 204, 1995.
- 6) 森本委利: 奈医誌. 46: 印刷中, 1995.
- 7) **河瀬雅夫**:日本生理誌. 41:509-521, 1979.
- 8) 中谷 昭:日本生理誌. 50:112-126, 1988.
- 9) 中谷 昭:日本生理誌. 50:709-718,1988.
- 10) Harris, D. E., Gurnett, A. M., Lehmann, H. and Joysey, K. A. : FEBS Lett. 190 : 288-292, 1986.
- Enoki, Y., Ohga, Y., Ishidate, H., Sakata, S., Kohzuki, H. and Hattori, M. Comp. Biochem. Physiol. in press.
- 12) Brigelius, R.: Mixed disulfides: Biological functions and increase in oxidative stress. *in* Oxidative Stress(Sies, H., ed.). Academic Press, London, 1985.
- 13) Bünning, K. and Hamm, R. : J. Chromatogr.
 43: 450-456, 1969.
- 14) Smithies, O. : Biochem. J. 61 : 629-641, 1955.
- Boyer, P. D. : J. Am. Chem. Soc. 76 : 4331-4337, 1954.
- 16) Kumari, K., Khanna, P., Ansari, N. H. and Srivastava, S. K. Anal. Biochem. 220 : 374-376, 1994.
- 17) Rossi-Fanelli, A., Antonini, E. and Caputo, A. : Biochim. Biophys. Acta 30: 608-615, 1958.
- 18) Drapeau, G. R., Boily, Y. and Houmard, J. J. Biol. Chem. 247 : 6120-6126, 1972.
- Gross, E. and Witkop, B. : J. Biol. Chem. 237 : 1856-1860, 1962.

- 20) Edman, P.: Acta Chem. Scand. 4: 283-293, 1950.
- Hirano, H. and Watanabe, T. Electrophoresis 11: 573-580, 1990.
- 22) 榎 泰義: 奈医誌. 10: 345-355, 1959.
- Matsumura, K., Enoki, Y., Kohzuki, H. and Sakata, S. Jpn. J. Physiol. 40 : 567-571, 1990.
- 24) Enoki, Y., Matsumura, K., Ohga, Y. and Kohzuki, H. : Comp. Biochem. Physiol. 110 B : 193-199, 1995.
- 25) Pharmacia Fine Chemicals AB: Octyl-Sepharose CL-4 B and Phenyl-Sepharose CL-4 B for hydrophobic interaction chromatography. Pharmacia, Uppsala, p1-12, 1976.
- 26) Fermi, G. and Perutz, M. F. : Atlas of molecular structures in biology. 2. Haemoglobin and myoglobin. Clarendon Press, Oxford, p40, 1981.
- 27) Antonini, E. and Brunori, M.: Haemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. Elsevier, Amsterdam, p219-234, 1971.
- 28) Hill, A. V. : J. Physiol. 40 : 4 P, 1910.
- 29) Romero Herrera, A. E. and Lehmann, H. Biochim. Biophys. Acta 251 : 482-488, 1971.
- 30) Hirs, C. H. W. and Olcott, H. S. : Biochim. Biophys. Acta 82 : 178-180, 1964.
- 31) Romero Herrera, A. E. and Lehmann, H. : Nature-New Biol. 232 : 149-152, 1971.
- 32) Kyte, T. and Doolittle, R. F. : J. Mol. Biol. 157 : 105-132, 1982.
- 33) Coan, C., Ji, J. -Y., Hideg, K. and Mehlhorn, R.
 J. : Arch. Biochem. Biophys. 295 : 369-378, 1992.
- 34) Garel, M. -C., Domenget, C., Gaburi-Martin, J.,
 Prehu, C., Galacteros, F. and Beuzard, Y. : J.
 Biol. Chem. 261: 14704-14709, 1986.
- 35) Antonini, E. : Physiol. Rev. 45 : 123-170, 1965.
- 36) Brunori, M., Noble, R. W., Antonini, E. and Wyman Jr., J. J. Biol. Chem. 241: 5238-5243, 1966.