

# ヤツメウナギの祖先型ヘモグロビン Node 25 タンパク質の合成および機能解析

幕, 晋一 / MAKU, Shinichi

---

(発行年 / Year)

2014-03-24

(学位授与年月日 / Date of Granted)

2014-03-24

(学位名 / Degree Name)

修士(理工学)

(学位授与機関 / Degree Grantor)

法政大学 (Hosei University)

# 2013 年度修士論文

ヤツメウナギの祖先型ヘモグロビン Node 25 タンパク質の  
合成および昨日解析

指導教授 常重 アントニオ

指導博士研究員 松尾 高稔

大学院工学研究科

生命機能学専攻修士課程

学生証番号 11R7113

マク シンイチ  
膜 晋一

## 目次

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| 1. 要旨                                              | 1  |
| 2. 序論                                              | 2  |
| 3. 研究目的                                            | 3  |
| 4. 実験方法                                            | 4  |
| 4.1 発現型プラスミド(pET-Node25)の構築および大腸菌 BL21(DE3)株への導入   | 4  |
| 4.2 Node25 遺伝子の発現実験                                | 6  |
| 4.3 pET-Node25 を有した形質転換体の大量培養                      | 7  |
| 4.4 組換え型 Node25 タンパク質の精製                           | 8  |
| 4.4.1 産生した Node25 タンパク質の抽出                         | 8  |
| 4.4.2 QSepharose 担体を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製        | 8  |
| 4.4.3 CM-Sepharose 担体を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製      | 9  |
| 4.4.4 産生した組換え型 Node25 タンパク質を用いた SDS-PAGE           | 10 |
| 4.5 組換え型 Node25 タンパク質精製標品の吸収スペクトル測定                | 12 |
| 4.6 組換え型 Node25 タンパク質精製標品の CD スペクトル測定              | 13 |
| 4.6.1 CD スペクトル用試料の調製                               | 13 |
| 4.6.2 Oxy 型 Node25 タンパク質の CD スペクトル測定               | 14 |
| 4.6.3 Deoxy 型 Node25 タンパク質試料の CD スペクトル測定           | 15 |
| 4.6.4 ピリジンヘモクロム法を用いた Node25 タンパク質試料の定量             | 15 |
| 4.7 今井式自動酸素結合曲線記録装置を用いた Node25 タンパク質の測定            | 16 |
| 4.7.1 試料調製                                         | 16 |
| 4.7.2 各種 Node25 タンパク質試料の酸素結合曲線測定                   | 17 |
| 5. 結果                                              | 18 |
| 5.1 発現型プラスミド(pET-Node25)の構築および形質転換体の取得             | 18 |
| 5.2 大腸菌を宿主とした Node25 遺伝子の発現実験                      | 18 |
| 5.3 Node25 タンパク質の精製の結果                             | 19 |
| 5.3.1 Q Sepharose F.F.担体を用いた組換え型 Node25 タンパク質の精製結果 | 19 |
| 5.3.2 CM Sepharose 担体を用いた組換え型 Node25 タンパク質の精製結果    | 20 |

|       |                                                                         |    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3.3 | Lowry 法による各精製段階のタンパク質の定量                                                | 21 |
| 5.4   | 各種ヘムリガンド結合における Node25 タンパク質のスペクトル結果                                     | 22 |
| 5.5   | 各種ヘムリガンド結合における Node25 タンパク質の CD スペクトル                                   | 23 |
| 5.6   | 各種測定条件における Node25 タンパク質試料の Hill plot, $P_{50}$ および $n_{\max}$ の測定結果     | 24 |
| 5.6.1 | 各 pH における Node25 タンパク質の Hill Plot, $P_{50}$ および $n_{\max}$              | 24 |
| 5.6.2 | 各種阻害剤存在下における Node25 タンパク質の Hill Plot, $P_{50}$ および $n_{\max}$ (pH7.4)   | 27 |
| 5.6.3 | 異なるタンパク質濃度における Node25 タンパク質の Hill Plot, $P_{50}$ および $n_{\max}$ (pH7.4) | 30 |
| 6.    | 考察                                                                      | 32 |
| 7.    | 結言                                                                      | 33 |
| 8.    | 参考文献                                                                    | 33 |
| 9.    | 謝辞                                                                      | 34 |

## 1. 要旨

脊椎動物のヘモグロビン(Hb)は $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の2つずつからなる四量体構造をもつが、円口類のヤツメウナギやヌタウナギのHbは、酸素(oxy)型のときに単量体を、脱酸素(deoxy)型のときに二量体や四量体構造をとることが報告されている。

本研究では、脊椎動物のHbが単量体から二量体を経て四量体構造へと進む分子進化の過程において、獲得したHbの酸素結合の協同作用について新たな知見を得るために、現存する脊椎動物の中でも最も古い種とされる円口類のHbに注目した。

これまで当研究室では、現存する円口類Hbのアミノ酸配列をもとに作成した最尤系統樹(ML-tree)を用いてヤツメウナギの祖先型Hbに相当するNode25タンパク質を設計し、すでに同遺伝子をクローニングしたプラスミド(pGEM-Node25)を得ている。

本研究では、大腸菌を宿主としたNode25遺伝子発現系を構築したのち、産生したNode25タンパク質の精製を行い、得られた精製標品を用いて、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、吸収スペクトルおよびCDスペクトルを測定した結果、得られた精製標品は分子量約14 kDaの大きさを示し、補欠分子としてヘムを有したヘムタンパク質特有のスペクトルを示し、さらに円口類特有のCDスペクトルが得られた。

また、今井式自動酸素結合曲線記録装置を利用した機能解析を行った結果、Node25タンパク質はHbAよりも酸素親和性が低く、pHが酸性からアルカリ性側へ上昇するに従って酸素親和性およびHill係数の増加がみられることから、60  $\mu$ Mという低濃度においてもpH依存的にNode25タンパク質が協同作用を示し、小さなBohr効果を示したが、各種阻害剤による酸素親和性および協同作用に対する阻害効果はみられなかった。Node25タンパク質試料は、HbAよりも酸素親和性が低く、Node25タンパク質濃度が60、600、1,200  $\mu$ Mと生理条件に近づくに従い、ヤツメウナギの天然型Hbと同様にして、酸素親和性の低下と協同性作用の増加傾向が見られた。

## 2. 序論

### 2.1 円口類とは

円口類とは、脊椎動物の中でも最も古い原始的な顎のない生物(無顎類)に分類され、主に古生代に繁栄したが、その多くがデボン紀の終わりに絶滅している。現在では、ヤツメウナギおよびヌタウナギの2種類のみが現存しており、ヤツメウナギは1科6属41種、ヌタウナギは1科6属43種が報告されている。

円口類は、顎を持たず、口が頭部末端に開いた単純な孔のようにになっている。また、対鱗をもたず、体表は粘膜で覆われている。鱗はお互いに未分化な状態で連続しており、口から取り入れた水を、体側に並んだ鰓孔から排出して呼吸している。ヤツメウナギは、幼生時はアンモシーテスと呼ばれ、河原の砂底に生息し、成魚になると海に降り、産卵は河川で行う。一方、ヌタウナギは、全て海産であり、目は退化しているものが多く、卵巣、精巣の両方をもつ雌雄同体であるが、機能しているのはどちらかである。

ヤツメウナギのヘモグロビン(Hb)は、有核の赤血球内に存在し、ウミヤツメ(*Petromyzon marinus*)では、6種類<sup>1)</sup>、カワヤツメ(*Lampetra japonica*)では5種類<sup>2)</sup>それぞれ報告されており、ヌタウナギ(*Eptatretus burgeri*)のHbでは3種類存在することが報告されている。

また、硬骨魚類は主に腎臓で造血を行っているが、ヤツメウナギおよびヌタウナギでは、腸管壁に埋もれた腸脾という脾臓を持っており、そこで造血を行っていると考えられる。

### 2.2 脊椎動物および円口類のヘモグロビン(Hb)

脊椎動物のHbは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の2つずつからなる四量体構造を持ち、肺や鰓で酸素と結合した後に、血液の循環を通して各末梢組織まで酸素を運搬する。また、脊椎動物のミオグロビン(Mb)は単量体構造をとり、主に筋肉中で、Hbから受け渡された酸素の貯蔵に働いている。一方で、円口類のHbは、酸素(Oxy)型では単量体、脱酸素(Deoxy)型では二量体(ホモ二量体、ヘテロ二量体)もしくは、四量体(ヘテロ四量体)の構造をとり、脊椎動物のHbと同様、血液の循環を通して各末梢組織まで運搬している。

そのため、現在の通説では、「脊椎動物の四量体のHbは、単量体のMbのようなグロビンから進化してきた」と考えられており、「円口類のHbは、このMbとHbの中間的なHbである」と推測されている<sup>2,3)</sup>。現在も、ヤツメウナギおよびヌタウナギ類の両方のHbの研究が進められている<sup>4,5)</sup>。

### 2.3 生物進化と分子進化

一般的に、生物は、長い年月を掛けて、生存に有利な種々の形質を獲得し、これを後世へと遺伝させ続けることで、複雑かつ多種多様な高等生物へと進化し、現在にまで至ったと考えられており、その現存生物が持つDNAやタンパク質等の分子情報の中には、各生物の進化に伴った分子進化の情報が含まれていると考えられる。ゆえに、これらを用いて、

分子系統解析を行うことで、各生物進化の流れや道筋に関する知見が得ることができ、また、逆分子進化系統解析を行うことで、分子進化をたどり、既に絶滅した祖先生物の核酸やタンパク質の塩基配列やアミノ酸配列を推定することができると考えられる。

## 2.4 これまでの円口類の祖先型 Hb の成果

米国立生物工学情報センター(NCBI)のプロテインデータベースおよびヌクレオチドデータベースに登録されている現存する円口類由来 Hb の一次構造、計 65 個を収集し、その中から、ヤツメウナギは 15 個、ヌタウナギは 5 個を選別した。これらの一次構造をもとに最尤系統樹 (ML-tree) を作成し、得られた系統樹内のヤツメウナギおよびヌタウナギの祖先型に相当する分岐点 **node23** および **node25** に着目した。これら分岐点から推測されるアミノ酸配列 **Node23** および **Node25** は、ともに 150 残基からなり、453 ヌクレオチドのオープンリーディングフレームからなる **node23** および **node25** の合成遺伝子を設計した。

円口類の祖先型 Hb である **Node23** タンパク質については、喜多、松尾、今井ら<sup>6,7,8)</sup>によって大腸菌を宿主として産生した **Node23** タンパク質の精製標品を用いて、吸収および CD スペクトルを測定した結果、同タンパク質は補欠分子としてヘムを保持した特有の吸収スペクトルを示し、円口類 Hb に特徴的な CD スペクトルが得られたことから、大腸菌を宿主とした現存種に存在しない円口類の祖先型 Hb**Node23** 遺伝子の発現系を構築することに成功している。

また、**Node23** タンパク質精製標品を用いて、今井式自動酸素結合曲線記録装置を利用した機能解析を行った結果、同タンパク質は、ヒト HbA よりも酸素親和性が低く、アルカリ性側(pH8.4)から酸性側(pH6.4)の範囲で Bohr 効果に従い、酸素親和性の低下がみられた。なお、Hill 係数は 1 より大で、弱い協同性を示し、pH がアルカリ性側から酸性側に従い、1.59~1.36 へと変化して pH 依存的な性質を示した。さらに、ATP、2,3-DPG などの各種阻害剤は、**Node23** タンパク質に対して弱い阻害効果を示すことを明らかにしている。

## 2.5 今井式自動酸素結合曲線自動記録装置の原理

Hbの機能解析には、今井式酸素自動記録装置を用いた。酸素平衡曲線(OEC)とは、溶存酸素分圧(pO<sub>2</sub>)に対する酸素飽和度の依存性を表す曲線のことである。Hb溶液の酸素分圧 pO<sub>2</sub>をClark型酸素電極で、Hbの酸素飽和度Yを可視部単色光(560 nm)における吸光度変化(ΔA)としてモニターし、それぞれをX-Yレコーダーに出力しOECを自動的に記録する。

Hbの脱酸素(Deoxy)化には窒素を、再酸素化には空気又は酸素を用いた。吸光度測定には分光光度計は、U-4000 (日立製)を用いた。酸素飽和度とは、 $\text{Pr} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{PrO}_2$  (Prは酸素結合タンパク質)なる化学平衡状態において、溶液中の全タンパク質分子のうち、O<sub>2</sub>と結合した分子の割合、

$Y = [\text{PrO}_2]/([\text{Pr}] + [\text{PrO}_2])$ で与えられるY ( $0 \leq Y \leq 1$ )のことである。

Hb は酸素(Oxy) 型とDeoxy 型で可視吸収スペクトルが異なる。Hb に酸素が結合した状

態から徐々に酸素分圧を低下させていくとDeoxy 型Hb の割合が増していき、溶液中のHb のほとんどがDeoxy 型となる。その間の560 nm での吸光度変化を測定し酸素飽和度を求める。

Clark 型酸素電極では0.8 V の直流電流を印加すると陽極(Ag)と陰極(Au)で、

陰極： $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$

陽極： $4Ag + 4Cl^- \rightarrow 4AgCl + 4e^-$

全体： $4Ag + O_2 + 4H^+ + 4Cl^- \rightarrow 4AgCl + 2H_2O$

のように酸化還元反応がおこる。この場合、電極に流れる電流の強さは、単位時間に溶液から陰極表面に拡散してくる $O_2$ の量、すなわち溶液の酸素分圧( $pO_2$ )に比例する。

Hbの酸素親和性は50 %酸素飽和度の時の酸素分圧P50 [mmHg]により表し、協同性はHillプロット( $\log[Y/(1-Y)]$  vs.  $\log pO_2$ )の傾き $n_{max}$ で表わす。

### 3. 研究目的

ヘモグロビン (Hb) が分子進化の過程において獲得してきた種々の機能を解明するために作成した円口類 Hb の最尤分子系統樹をもとに現存種に存在しない祖先型 Hb (Node25) を分子設計した。大腸菌を宿主として構築したヤツメウナギの祖先型 Hb (node25)遺伝子発現系を用いて産生した組換え型 Node25 タンパク質の精製を行い、得られた精製標品の分光学的および生物物理学的手法を用いて機能解析を試み、酸素親和性および協同作用に関する新たな知見を得ることを目的とした。

### 4. 実験方法

#### 4.1 発現型プラスミド(pET-Node25)の構築および大腸菌 BL21(DE3)株への導入

現存種の円口類 Hb のアミノ酸配列をもとに作成した最尤系統樹(ML-tree)を用いて、ヤツメウナギの祖先型に相当する分岐点 node25 に注目した。この分岐点から Node25 タンパク質のアミノ酸配列を推定し、Node25 遺伝子を設計した。この設計した同遺伝子は、外部に合成を委託して Node25 遺伝子がクローニングベクターに連結したプラスミド pGEM-Node25 を得た。

<材料>

ライゲーション

- pGEM- Node25
- 制限酵素 *Nde* I (タカラバイオ)
- 制限酵素 *Eco*R I (タカラバイオ)
- 発現ベクター(pET22b(+)) (メルク)



- 10x H buffer (タカラバイオ)
- Ligation Mix (タカラバイオ)
- TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ)
- 10x Ex Taq (タカラバイオ)
- dNTP Mixture (タカラバイオ)
- アガロース (ナカライテスク)

#### 形質転換

- コンピテントセル (大腸菌 XL I -blue MRF'株)
  - LB 培地
  - SOC 培地
  - 4% X-gal
  - IPTG(100 mg/ml)
  - アンピシリン(50 mg/ml)
- 大腸菌 BL21(DE3)株 (BigDynamics Laboratory)

#### <操作>

- ① pET-22b(+), pGEM-Node25 の各プラスミドを以下のように調製し、37℃で1時間反応させた。

|               |       |
|---------------|-------|
| <i>EcoR</i> I | 1 μl  |
| <i>Nde</i> I  | 2 μl  |
| 各プラスミド        | 2 μl  |
| 10x H Buffer  | 3 μl  |
| DDW           | 22 μl |
| <hr/>         |       |
| Total         | 30 μl |

- ② 反応後、1.0%アガロースゲル電気泳動(AGE)を行い、制限酵素処理の確認を行った。  
その後、ゲルから目的の各 DNA 断片を回収、精製した。
- ③ 精製した各 DNA 断片は以下のように調製し、16℃で1時間、ライゲーション反応を行った。

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| 制限酵素処理後の <i>node25</i> を含む DNA 断片 | 1 μl  |
| 制限酵素処理後の pET-22b(+)               | 4 μl  |
| Ligation Mix                      | 5 μl  |
| <hr/>                             |       |
| Total                             | 10 μl |

- ④ 大腸菌 XL1 Blue 株のコンピテントセル 100 μl に、ライゲーション反応後溶液を 5 μl

加え、水中で 20 分間静置した。

- ⑤ 42℃のウォーターバスで 60 秒間ヒートショックし、再び氷中で 5 分間静置した。
- ⑥ SOC 液体培地を 1 ml 加え、37℃で 1 時間培養を行った。
- ⑧ LB+Amp 寒天培地から得られた形質転換体を用いてコロニーPCR を行うために、以下のようにプライマーを設計した。

Node25 F-primer : 5'- TTCGATTCATATGCCGATTGTGGATAGCGGC -3'

Node25 R-primer : 5'- AAGAATTCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCG -3'

- ⑨ 以下のように反応液を調製・混和した後、以下の条件で PCR 反応を行った。

| TaKaRa Ex Taq         | 0.1 µl<PCR> | 95℃ 1 min  | x30 |
|-----------------------|-------------|------------|-----|
| 10x Ex Taq Buffer     | 1 µl        | ↓          |     |
| dNTP Mixture          | 0.8 µl      | 95℃ 30 sec |     |
| 10 µM Node25 F-primer | 0.5 µl      | ↓          |     |
| 10 µM Node25 R-primer | 0.5 µl      | 55℃ 15 sec |     |
| 形質転換体                 | 1 µl        | ↓          |     |
| DDW                   | 6.1 µl      | 72℃ 1min   |     |
| Total                 | 10 µl       | ↓          |     |
|                       |             | 4℃ ∞       |     |

- ⑩ PCR 反応後、1.5%AGE を行い、形質転換体の中から、pET-Node25 を持つ形質転換体を選択した。
- ⑪ その後、選択した形質転換体を、LB+Amp 液体培地で一晩振とう培養し、この培養液からアルカリ SDS 法にて pET-Node25 プラスミドを抽出した。

## 4.2 Node25 遺伝子の発現実験

<材料>

- ・ 4.1 節で得た形質転換体(pET-Node25/BL21(DE3))
- ・ アンピシリンナトリウム溶液 100 mg/ml (ナカライテスク)
- ・ 1 M IPTG 溶液 (ナカライテスク)
- ・ TCA (ナカライテスク)

<操作>

- ① 4.1 節で得た形質転換体(pET-Node25/BL21(DE3))にアンピシリンナトリウム溶液を加え、160 rpm、30℃で培養した。
- ② O.D.<sub>600</sub> が 0.716 になったことを確認し、菌液を 1 ml 回収し、1 M IPTG を加え、終

濃度 1 mM にした後、さらに菌液を 1 ml 回収し、160 rpm、30℃で培養を継続した。

- ③ 培養再開後、IPTG 添加時を 0 時間として、1, 3, 5 時間後に培養液を 1 ml ずつ回収した。
- ④ 回収後、それぞれの菌液に 100%TCA を 50  $\mu$ l 加え、100%エタノールを加え、1200 rpm、4℃で 10 分間遠心し、TCA 沈殿を行い、SDS-PAGE 用の試料として 4℃で保存した。
- ⑤ 調製した試料は 4.4.4 項に従って、SDS-PAGE を行い、Node25 遺伝子の発現の有無を確認した。

### 4.3 pET-Node25 を有した形質転換体の大量培養<sup>9)</sup>

#### <材料>

- pET-Node25 を導入した形質転換体
- アンピシリンナトリウム溶液                      100 mg/ml                      (ナカライテスク)
- LB 液体培地
  - 1%   バクトトリプトン                                              (日本 BD)
  - 0.5%   バクト乾燥酵母エキス                                              (日本 BD)
  - 0.5%   NaCl                                              (ナカライテスク)
- TB 培地
  - 1.2%   バクトトリプトン                                              (日本 BD)
  - 2.4%   バクト乾燥酵母エキス                                              (日本 BD)
  - 0.4%   グリセロール                                              (ナカライテスク)
  - 17 mM   リン酸水素二カリウム( $K_2HPO_4$ )                                              (ナカライテスク)
  - 72 mM   リン酸二水素カリウム( $KH_2PO_4$ )                                              (和光純薬)
  - アンピシリンナトリウム溶液(100 mg/ml)                                              (ナカライテスク)
- 1 M IPTG   溶液                                              (ナカライテスク)
- ヘミン                                              (Alfa Aesar)
- 28%アンモニア水                                              (ナカライテスク)

#### <操作>

- ① pET-Node25 を導入した大腸菌 BL21(DE3)株の形質転換体を、アンピシリンナトリウム溶液(100 mg/ml)を 2  $\mu$ l 添加した LB 液体培地 2 ml に植菌し、150 rpm、37℃で一晩、前培養を行った。
- ② TB 培地 100 ml(アンピシリンナトリウム含有)を 2 本用意し、それぞれに前培養液を 1 ml 加えて混合し、180 rpm、30℃で約 6 時間培養した。
- ③ そして、TB 培地 900 ml(アンピシリンナトリウム含有)入った 3 l の三角フラスコを 2 本準備し、それぞれに培養液を加えて、さらに 180 rpm、30℃で一晩培養した。
- ④ 一晩培養後、培養温度を 32℃にあげ、培養液に誘導剤 1 M IPTG 溶液を 1ml ずつ添加

した。そして、試験管 2 本に 15%アンモニア溶液 (28%アンモニア水 15 ml + 滅菌 MilliQ 水 13 ml) を 3 ml とり、ヘミンを 15 mg ずつ加えて溶解した。

- ⑤ IPTG 添加 15 分後、調製したヘミン溶液を培養液に加えた。
- ⑥ さらに、5~6 時間培養を行い、その後、高速冷却遠心機 GRX-220(トミー精工)で培養液を 7,000 rpm、4℃、5 分で遠心し、沈殿の菌体を 50 ml チューブに回収した。
- ⑦ さらに、微量高速冷却遠心機 MX-301(トミー精工)で 7,000 rpm、4℃、5 min で遠心し、菌体をコンパクトな沈澱にして、菌体量を測定した後、-80℃で凍結保存、管理した。

## 4.4 組換え型 Node25 タンパク質の精製<sup>10)</sup>

### 4.4.1 産生した node25 タンパク質の抽出

<材料>

- 4.3 節で培養して集菌した菌体
- Q Buffer(pH 7.4) 20 mM Tris-HCl  
1 M Tris-HCl (pH8.0) 60 ml (和光純薬)
- 11.5 N HCl (ナカライテスク)  
11.5 N HCl で pH 7.4 に合わせ、Milli-Q 水で 3 l に調製した。
- 0.5 M MgCl<sub>2</sub> 溶液 (和光純薬)
- 0.1 M MnCl<sub>2</sub> 溶液 (和光純薬)
- DNase I(10 mg/ml) 溶液 (和光純薬)

<操作>

- ① 4℃で一晩静置して融解しておいた菌体に、2 倍量の Q Buffer をビーカーに洗い出し、攪拌後、菌体の体積を測った。
- ② 菌体液を氷上に置き、超音波破碎装置を用いて照射時間 1 秒間、インターバル時間 1 秒間、連続照射時間 30 秒間を 30 分間行い、菌体を破碎した。
- ③ 氷上の破碎液の 1/50 量の 0.5 M MgCl<sub>2</sub> 溶液および 1/100 量の 0.1 M MnCl<sub>2</sub> 溶液を添加してよく攪拌した後に、DNase I 溶液を 1 ml 加え、時々攪拌しながら 30 分間反応を行った。
- ④ 破碎液をメディウムビンに移し、シリンジで刺したゴム栓で密封して真空ポンプで脱気した後、CO ガスを充満させ、置換し、4℃で一晩攪拌した。

### 4.4.2 Q Sepharose 担体を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製

<材料>

- Q Sepharose F.F. (GE ヘルスケア)
- 1 M Tris 溶液 (和光純薬)
- 10%ポリエチレンイミン(PEI)溶液 (シグマアルドリッチ)

- ・CO ガス (太陽日酸)
- ・ウルトラセルアミコン限外ろ過ディスク YM10(直径 63.5 mm) (ミリポア)
- ・ダイアライシス メンブレン (サイズ 20) (和光純薬)

<操作>

- ① 一晩攪拌後、CO ガスを除き、高速冷却遠心機 GRX-220 (トミー精工) で 13,500 rpm、4℃、45 min で遠心した。
- ② 回収した上清は、1 M Tris 溶液を加えて、pH 8.0 に合わせた後、10% PEI 溶液を加えて(終濃度 0.3%)、10 分間攪拌した。
- ③ GRX-220 を用いて、この懸濁液を 12,500 rpm、4℃、15 min で遠心し、上清を回収した。さらに、回収した上清を限外ろ過ディスク YM10 を用いた攪拌式セル 8200(ミリポア)で原液を 10～20 ml まで濃縮し、透析チューブ中に濃縮液を注入し、Q Buffer で一晩(16 h 以上) 4℃で透析した。
- ④ 透析チューブ中から回収した大腸菌細胞抽出液は、脱気した後、CO ガスで置換し、氷上で 10 分以上静置した。
- ⑤ 調製した抽出液は、Q Buffer を送流して置換した Q Sepharose 担体上部に加えた後、担体に吸着させ、Q Buffer を送流液として精製を開始した。その後、Node25 タンパク質由来の赤褐色のバンドが Q Sepharose 担体の先端近くに達した時点で 200 drop/tube の条件で、FC 203B 型フラクションコレクター(Gilson)で溶出液を回収し、分画した。
- ⑥ 回収した各画分の中から、赤く呈色した画分のみに注目し、これらの画分について SDS-PAGE を行った。
- ⑦ SDS-PAGE の結果に従い、限外ろ過ディスク YM10 を用いた攪拌式セル 8200 (ミリポア)で再度濃縮し、透析チューブ中に注入し、10 mM リン酸 Buffer (pH5.8) で一晩 (16 時間以上) 4℃で透析した。

#### 4.4.3 CM Sepharose 担体を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーによる精製

<材料>

- ・CM Sepharose (GE ヘルスケア)
- ・10 mM リン酸 Buffer (pH5.8) (ナカライテスク)
- ・ウルトラセルアミコン限外ろ過ディスク Y M 10 (直径 63.5 mm) (ミリポア)
- ・ダイアライシス メンブレン(サイズ 20) (和光純薬)

<操作>

- ① 透析後の試料は、10 mM リン酸 Buffer (pH5.8)を送流として置換した CM Sepharose 担体上部に加えて重層させ吸着した後、10 mM リン酸 Buffer(pH5.8)を送流液として精製を開始した。その後、Node25 タンパク質由来の赤褐色のバンドが担体先端近くまで

達した時点で、100 drop/tube の条件で、FC 203B 型フラクションコレクター(Gilson)で溶出液を回収し、分画した。

- ② 回収した各画分の中から、赤く呈色した画分のみに注目し、これらの画分について SDS-PAGE を行った。
- ③ SDS-PAGE の結果に基づいて組換え型 Node25 タンパク質が単一の画分について、限外ろ過ディスク YM10 を用いた攪拌式セル 8200(ミリポア)で濃縮し、濃縮液を透析チューブに注入し、50 mM リン酸 Buffer (pH7)を用いて透析を行い、Buffer 交換した。その後、Node25 タンパク質精製標品は CO ガスを充満して飽和したメディウム瓶を 4℃ の低温室で保存管理した。

#### 4.4.4 産生した組換え型 Node25 タンパク質を用いた SDS-PAGE<sup>11, 12)</sup>

<材料>

- ・ 30%アクリルアミド保存液

|         |        |        |
|---------|--------|--------|
| アクリルアミド | 29.2 g | (和光純薬) |
|---------|--------|--------|

|                    |       |           |
|--------------------|-------|-----------|
| N,N'-メチレンビスアクリルアミド | 0.8 g | (ナカライテスク) |
|--------------------|-------|-----------|

Milli-Q 水で溶解し、100 ml にした。

- ・ ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APS) (ナカライテスク)

- ・ N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) (和光純薬)

- ・ 分離ゲル用 Buffer

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) | (和光純薬) |
|-------------------------|--------|

|      |        |        |
|------|--------|--------|
| Tris | 18.2 g | (和光純薬) |
|------|--------|--------|

|     |       |           |
|-----|-------|-----------|
| SDS | 0.4 g | (ナカライテスク) |
|-----|-------|-----------|

|    |      |        |
|----|------|--------|
| 塩酸 | 2 ml | (和光純薬) |
|----|------|--------|

Milli-Q 水で溶解し、100 ml に調製した。

- ・ 染色液

|                          |     |                |
|--------------------------|-----|----------------|
| クマシーブリリアントブルー (CBB) R250 | 1 g | (FlukaChemika) |
|--------------------------|-----|----------------|

|       |        |           |
|-------|--------|-----------|
| メタノール | 225 ml | (ナカライテスク) |
|-------|--------|-----------|

|    |       |           |
|----|-------|-----------|
| 酢酸 | 50 ml | (ナカライテスク) |
|----|-------|-----------|

Milli-Q 水を 225 ml 加えて調製した。

- ・ 脱色液

|       |        |           |
|-------|--------|-----------|
| メタノール | 100 ml | (ナカライテスク) |
|-------|--------|-----------|

|    |        |           |
|----|--------|-----------|
| 酢酸 | 300 ml | (ナカライテスク) |
|----|--------|-----------|

Milli-Q 水を 700 ml 加えて調製した。

- ・ Precision Plus Protein™ Dual Color Standard マーカー (バイオラッド)

- ・ 濃縮ゲル用 Buffer

#### 0.5 M TrisHCl (pH6.8)

|      |        |           |
|------|--------|-----------|
| Tris | 6.1 g  | (和光純薬)    |
| SDS  | 0.4 g  | (ナカライテスク) |
| 塩酸   | 4.2 ml | (ナカライテスク) |

を Milli-Q 水に加えて 100 ml にした。

#### ・ 試料処理液

|              |       |           |
|--------------|-------|-----------|
| SDS          | 0.8 g | (ナカライテスク) |
| 濃縮ゲル用 Buffer | 5 ml  |           |
| グリセリン        | 8 ml  | (ナカライテスク) |
| 2-メルカプトエタノール | 4 ml  | (ナカライテスク) |

Milli-Q 水で 40 ml にした。

#### ・ 色素溶液

|             |       |        |
|-------------|-------|--------|
| ブロモフェノールブルー | 10 mg | (関東化学) |
|-------------|-------|--------|

を Milli-Q 水 20 ml で溶解した。

#### ・ SDS-PAGE 用電極 Buffer

|              |        |           |
|--------------|--------|-----------|
| 25 mMTris    | 5 g    | (和光純薬)    |
| 0.192 M グリシン | 14.4 g | (ナカライテスク) |
| 0.1% SDS     | 1 g    | (ナカライテスク) |

を Milli-Q 水で溶解して 1 ℓとした。

#### <操作>

- ① SDS-PAGE の手法は、Laemmli 法に従って行った<sup>11, 12)</sup>。15%の SDS 含有ポリアクリルアミドゲルは、以下の分量で作成した【15% SDS 含有アクリルアミドゲル】。まず、30%アクリルアミド保存液、分離ゲル用 Buffer および Milli-Q 水を混合したのち、スパーテルで APS を微量加えて溶解したのち、脱気を約 5 分間行った。そして、TEMED 10  $\mu$ lを加えて、十分に混合したのちに組み立てた SDS-PAGE ゲル用のガラス板に流し込んだ。そして、上部にコームをさしてゲルの重合反応が終了するまでしばらく静置した。完成したゲルは、泳動槽に固定したのち、SDS-PAGE 電極用 Buffer を上・下部の泳動槽に流し込んだ。【試料調製】で準備した各試料およびプロテインマーカーをそれぞれ 10  $\mu$ l加えたのち 20 mA の定電流で 70~90 分間通電して、SDS-PAGE を行った。泳動終了後、同ゲルに染色液を浸けて染色を行い、その後、脱色液を浸けてタンパク質バンドの検出を行った。

#### 【15%SDS 含有ポリアクリルアミドゲル】

|                |        |
|----------------|--------|
| 30% アクリルアミド保存液 | 9 ml   |
| 分離ゲル用 Buffer   | 4.5 ml |

|           |            |
|-----------|------------|
| Milli-Q 水 | 4.5 ml     |
| APS       | 微量         |
| TEMED     | 10 $\mu$ l |
| Total     | 18 ml      |

【試料調製】

|       |            |
|-------|------------|
| 試料処理液 | 5 $\mu$ l  |
| 色素溶液  | 2 $\mu$ l  |
| 各試料   | 13 $\mu$ l |
| Total | 20 $\mu$ l |

SDS-PAGE 用試料の調製方法は、上述に従って混合したのちに、沸騰水で 5 分間熱処理を行い、その後、水中で急冷して調製した。

#### 4.5 組換え型 Node25 精製標品の吸収スペクトル測定

<試薬>

- 50 mM リン酸 Buffer (pH 7.0) 5 ml

還元酵素および関連試薬<sup>13, 14)</sup>

|                                     |   |              |                 |
|-------------------------------------|---|--------------|-----------------|
| • Glucose 6-phosphate               | } | 各 20 $\mu$ l | (シグマアルドリッチ)     |
| • Glucose 6-phosphate dehydrogenase |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| • NADP                              |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| • Ferredoxin NADP reductase         |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| • Ferredoxin                        |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| • Catalase                          |   |              | (ベーリンガーインゲルハイム) |
| • SOD(super oxide dimutase)         |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| • N <sub>2</sub> ガス                 |   |              | (太陽日酸)          |
| • CO ガス                             |   |              | (太陽日酸)          |
| • ジチオナイト(ハイドロサルファイトナトリウム)           |   |              | (和光純薬)          |

<操作>

- ① CO 型 Node25 タンパク質精製標品の  $\alpha$  吸収帯の吸光度を日立の分光光度計 U-2800 を利用して求めた。
- ② 測定した吸光度をもとに精製標品の濃度を求めた。その際、ミリモル吸光係数は CO 型 HbA の値である 13.4 を代用した。
- ③ Node25 タンパク質精製標品に 50 mM リン酸 Buffer (pH7.0)を加えて、終濃度 50  $\mu$ Mに



なるように調製した。

- ④ 50  $\mu\text{M}$  Node25 タンパク質精製標品を試験管へ加えたのち、ゴム栓そしてパラフィルムを巻いて密閉した。
- ⑤ 低温室内 (4°C) で横置きにして静置した精製標品の入った試験管の上部から蛍光灯を一晩 (16h 以上) 照射した。
- ⑥ 一晩、光解離反応した Node25 タンパク質精製標品を用いて 650~450 nm の波長領域を分光光度計で測定して、Node25 タンパク質が CO 型から酸素 (Oxy) 型へ変化していることを確認した。
- ⑦ 酸素型 Node25 タンパク質試料に上記の 7 種類の還元酵素および関連試薬<sup>13, 14)</sup>をそれぞれ 20  $\mu\text{l}$  加えて室温で 2 時間反応した。
- ⑧ 2 mm 石英セル付ツンベルグ管に 50  $\mu\text{M}$  に調製した酸素型 Node25 タンパク質試料を入れて密閉したのち、脱気を行い、N<sub>2</sub> ガス置換を 3 回繰り返した。そして、振とう機上に固定したのち約 40 分間振とうし、脱酸素 (Deoxy) 型 Node25 タンパク質を調製した。
- ⑨ 脱酸素型 (Deoxy 型) の Node25 タンパク質試料は、650~250 nm の波長領域で分光光度計を用いて測定した。
- ⑩ ツンベルグ管のコックを全開にして管内に空気を送り込んで密閉したのち、ツンベルグ管を振とう機に固定して約 20 分間振とうして酸素 (Oxy) 型 Node25 タンパク質を調製した。そして、Deoxy 型の場合も同様に 650~250 nm の波長領域で吸収スペクトルを測定した。
- ⑪ 最後に、再度脱気を行い、CO ガスによる置換を 3 回繰り返した。そして、振とう機上で約 20 分間振とうして、一酸化炭素 (CO) 型 Node25 タンパク質を調製した。
- ⑫ CO 型 Node25 タンパク質試料についても酸素型、脱酸素型と同条件で測定した。
- ⑬ なお、ツンベルグ管で測定用として使用しなかった Oxy 型 Node25 タンパク質試料は、10 mm 石英セルに分注して、Oxy 型の吸収スペクトルを測定したのち、スパーテルを用いて還元剤ジチオナイトを微量加え、パラフィルムで栓をした。石英セルを上下に回転して混合したのち、完全に還元された Deoxy 型 Node25 タンパク質の吸収スペクトルの測定を行った。

## 4.6 組換え型 Node25 タンパク質精製標品の CD スペクトル測定

### 4.6.1 CD スペクトル用試料の調製

<材料>

- Node25 タンパク質精製標品
- ジチオナイト (ハイドロサルファイトナトリウム)
- 還元酵素および関連試薬<sup>13, 14)</sup>
  - Glucose 6-phosphate (シグマアルドリッチ)
  - Glucose 6-phosphate dehydrogenase (シグマアルドリッチ)

- NADP (シグマアルドリッチ)
- Ferredoxin NADP reductase (シグマアルドリッチ)
- Ferredoxin (シグマアルドリッチ)
- Catalase (ベーリンガーインゲルハイム)
- SOD (Super Oxide Dimutase) (シグマアルドリッチ)

#### <操作>

- ① 約 45  $\mu$ M Node25 タンパク質試料(pH7)およびコントロール用試料(pH7)を用意するために、まず分光光度計 U-2800 の測定結果にもとづいて、Node25 タンパク質精製標品から終濃度 45  $\mu$ M、体積 5 ml 分を分取した。この原液に Milli-Q 水を加えて 2.5 ml にした後、100 mM リン酸 Buffer(pH7)2.5 ml を足して合計 5 ml で調製した。なお、コントロール用試料については、Milli-Q 水 2.5 ml に 100 mM リン酸 Buffer(pH7)2.5 ml を足して混合して用意した。
- ② 調製した 45  $\mu$ M Node25 タンパク質試料(pH7)およびコントロール試料(pH7)は、低温室(4°C)で蛍光灯を照射して一晩光解離させた。
- ② 光解離させて Oxy 型にした 45  $\mu$ M Node25 タンパク質試料(pH7)およびコントロール用試料(pH7)には、7 種類の還元酵素系関連試薬<sup>13, 14)</sup>を各 20  $\mu$ l ずつ分注して室温で約 2 時間反応させた。

### 4.6.2 Oxy 型 Node25 タンパク質の CD スペクトル測定

#### <操作>

- ① 調製した 45  $\mu$ M Node25 タンパク質試料(pH7)およびコントロール用試料(pH7)は室温 30 分間静置した。
- ② 2 mm 用石英セルにコントロール用試料(pH7) 800  $\mu$ l を加えた。このセルを分光光度計 U-2800 の試料室内に入れて 650~250 nm までの波長領域間のベースラインを測定した。
- ③ この石英セルを日本分光 円二色性分散計 J-820 の試料室内のセルホルダーに設置して積算回数 10 回を測定条件へ入力して 480~245 nm の波長領域で測定を開始した。測定終了後、再度積算回数 10 回で測定した。
- ④ Oxy 型にした 45  $\mu$ M Node25 タンパク質試料(pH7)500  $\mu$ l を 2 mm 用石英セルに加えた。
- ⑤ この試料を分光光度計 U-2800 で 650~250 nm までの波長領域間で吸収スペクトルを測定し、試料が Oxy 状態であることを確認した。
- ⑤ この試料を円二色性分散計 J-820 の試料室内のセルホルダーに設置して積算回数 5 回で 480~245 nm の波長領域でスペクトル測定を開始した。
- ⑦ 測定終了後、試料を分光光度計 U-2800 で⑤と同条件で再測定し、試料が Oxy 状態であることを再確認した。

- ⑧ ⑥⑦の操作後、3回これらを繰り返して積算回数が合計で 20 回まで測定した。

#### 4.6.3 Deoxy 型 Node25 タンパク質の CD スペクトル測定

<操作>

- ① Oxy 型 Node25 タンパク質試料(pH7)が入った 2 mm 用セルに追加で同試料 300  $\mu$ l を加えてセル内の液量を 800  $\mu$ l にした。
- ② 還元剤ジチオナイトをスパチュラで微量加えた後、セルの口部分をパラフィルムで巻いて密閉し、同セルを上下に振とうして溶液を調製した。
- ③ 調製した Node25 タンパク質試料(pH7)は、分光光度計 U-2800 を用いて 4.6.2 項と同条件で測定し、試料が脱酸素状態である Deoxy 型 Node25 タンパク質であることを確認した。
- ④ Deoxy 型 Node25 タンパク質含有の試料が入った石英セルは、口部分をパラフィルムで巻いたままの状態を円二色性分散計の試料室内のセルホルダーに設置し、積算回数 10 回、480~245 nm の波長領域で測定を開始した。
- ⑤ 測定終了後、試料を分光光度計で③と同条件で再測定し、試料が Deoxy 状態を保っていることを再確認した。
- ⑥ ④⑤の操作をもう 1 度繰り返して、積算回数が合計で 20 回まで測定した。

#### 4.6.4 ピリジンヘモクロム法を用いた Node25 タンパク質試料の定量<sup>15)</sup>

<材料>

- ・ Oxy 型 Node25 タンパク質試料(pH7)
- ・ ピリジン溶液（原液）
- ・ ジチオナイト（ハイドロサルファイトナトリウム）
- ・ 1 M NaOH 溶液

<操作>

- ① 試験管に Oxy 型 Node25 タンパク質試料(pH7)1 ml を加えた。ピリジン溶液 0.4 ml, 1 M NaOH 溶液 0.6 ml を順に加えてボルテックスミキサーでよく攪拌した。
- ② 分光光度計 U-3010 を起動させ、波長領域 600~500 nm の範囲で Milli-Q 水 2 ml を入れた 10 mm 用石英セルを用いてベースラインを測定した。
- ③ 試験管内の Node25 タンパク質溶液にスパチュラで一枚分すくった還元剤ジチオナイトを添加して混合した。
- ④ 10 mm 用石英セルに試験管内の Node25 タンパク質溶液を分注して 600~500 nm の波長領域内の吸収スペクトルを測定した。
- ⑤ ④の操作後、4 回繰り返して測定し、得られた吸収スペクトルの  $\alpha$  吸収帯の吸収極大および 590 nm の吸光度を記録した。

## 4.7 今井式自動酸素結合曲線記録装置を用いた Node25 タンパク質の測定

### 4.7.1 試料調製

#### <材料>

|                                                       |        |
|-------------------------------------------------------|--------|
| ・ Node25 タンパク質精製標品                                    | 1.4 ml |
| ・ 滅菌水                                                 | 2.1 ml |
| ・ 0.1 M Bis-Tris +0.2 M HCl Buffer (pH 6.4, 6.9, 7.4) | 3.5 ml |
| ・ 0.1 M Tris + 0.2 M HCl Buffer (pH7.9, 8.4)          | 3.5 ml |

還元酵素および関連試薬<sup>13, 14)</sup>

|                                                |   |              |                 |
|------------------------------------------------|---|--------------|-----------------|
| ・ Glucose 6-phosphate                          | } | 各 20 $\mu$ l | (シグマアルドリッチ)     |
| ・ Glucose 6-phosphate dehydrogenase            |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| ・ NADP                                         |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| ・ Ferredoxin NADP reductase                    |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| ・ Ferredoxin                                   |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| ・ Catalase                                     |   |              | (ベーリンガーインゲルハイム) |
| ・ SOD (Super Oxide Dimutase)                   |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| ・ 50 mM ATP 溶液                                 |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| 0.1 M Bis-Tris + 0.2 M HCl Buffer (pH7.4)で溶解した |   |              |                 |
| ・ 50 mM DPG                                    |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| 0.1 M Bis-Tris + 0.2 M HCl Buffer (pH7.4)で溶解した |   |              |                 |
| ・ 50 mM IHP                                    |   |              | (シグマアルドリッチ)     |
| 0.1 M Bis-Tris + 0.2 M HCl Buffer (pH7.4)で溶解した |   |              |                 |

#### <操作>

- ① Node25 タンパク質の精製標品 1.4 ml に滅菌水 2.1 ml を加え、測定する試料の pH に応じて 0.1 M Bis-Tris +0.2 M HCl Buffer (pH 6.4, 6.9, 7.4)、0.1 M Tris + 0.2 M HCl Buffer (pH7.9, 8.4)の中から選択した Buffer を 3.5 ml 加え、上述した 7 種類の還元酵素および関連試薬を各 20  $\mu$ l 分注して室温で 2 時間反応させた。
- ② ナス型フラスコに調製した各種試料を加えて、ロータリーエバポレーターに接続した。
- ③ 接続したナスフラスコは、氷水に浸し、酸素ボンベから純酸素を、エバポレーター内を通してナスフラスコ内に送流したのち、エバポレーターを起動した。さらに、蛍光灯による照射を同時に開始させ、30 分間光反応による Node25 タンパク質からの CO の解離を行った。
- ④ 各種条件の Oxy 型 Node25 タンパク質試料の濃度およびメト型の有無については、分光光度計を用いて 650~450 nm の波長領域で測定を行い確認した。
- ⑤ 各種阻害剤含有試料(pH7.4)の調製は、50 mM の各種阻害剤溶液 280  $\mu$ l、Node25 タン

パク質精製標品 1.4 ml、Milli-Q 水 1.82 ml を混合したのち、0.1 M Bis-Tris + 0.2 M HCl Buffer (pH7.4) 3.5 ml を加えて 7ml の 3 種類の試料 (pH7.4) を用意した。そして、この 3 種類の試料 (pH7) に対して 7 種類の還元酵素および関連試薬<sup>7,8)</sup>を 20  $\mu$ l ずつ分注して室温で約 2 時間反応させた。その後、上述の②～④の手順に従い試料調製を行った。

- ⑥ Node25 タンパク質の高濃度 (1.2 mM, 0.6 mM) 試料の調製は、Node25 タンパク質精製標品を、攪拌式セルを用いて濃縮し、濃度 1.2 mM、体積 7 ml 以上の濃縮液を用意した。この濃縮液を透析チューブに入れて 50 mM Bis-Tris + 0.1 M HCl Buffer (pH7.4) を用いて低温室 (4°C) で一晩 (16 時間以上) 透析した。透析後、分光光度計を用いて、濃縮液の濃度が 1.2 mM、体積が 7 ml 以上になるように調製した。調製した高濃度 (1.2 mM) 試料 7 ml には、7 種類の還元酵素および関連試薬<sup>7,8)</sup>を各 40  $\mu$ l ずつ分注して室温で一晩反応させた。その後、上述の②～④の手順に従い、試料 (pH7.4) を用意した。なお、0.6 mM の試料については、調製した 1.2 mM の試料 (pH7.4) を酸素結合曲線測定後にこの試料 (pH7.4) から 3.5 ml 分取し、0.1 M Bis-Tris+0.2 M HCl Buffer (pH7.4) を用いて 2 倍希釈にして、7ml にしたものを用意した。

#### 4.7.2 各種 Node25 タンパク質試料の酸素結合曲線測定

<操作>

- ① 4.7.1 項で 60  $\mu$ M Node25 タンパク質の各種試料を約 7 ml 用意した。
- ② 調製した各試料については、今井式自動酸素結合曲線記録装置を用いて酸素解離曲線を測定した。なお、今井式自動酸素結合曲線記録装置についてはマニュアルに従って行った。(13, 14, 15, 16)
- ③ セルに注入した各種試料は、マイクロボルトメーターの値が安定するまで待機したのち、純酸素をセルへ送って各試料中において酸素を飽和状態にしたのち、N<sub>2</sub>ガスの送流を開始して Oxy 型 Node25 試料が Deoxy 型へ変化する過程を固定波長 560 nm で測定した。さらに、Deoxy 化した各種試料は、空気の送流を開始して、Deoxy から Oxy 型への変化を上述と同様に測定した。
- ④ 測定に用いた試料の Oxy から Deoxy、Deoxy から Oxy への吸光度の変化および酸素分圧の変化は、X-Y レコーダーで記録を行った。

## 5. 結果

### 5.1 発現型プラスミド(pET-Node25)の構築および形質転換体の取得

4.1 節の方法で Node25 遺伝子をサブクローニングしたプラスミド (pGEM-Node25) から、同遺伝子について発現ベクターpET-22b(+)へクローニングして発現型プラスミド pET-Node25 を得た。

その後、pET-Node25 を有した形質転換体を取得するために、Node25 遺伝子について、pET-22b(+)へのクローニングを試みた。

得られた形質転換体を LB 寒天培地で培養し、20 株のコロニーを選択し、4.1 節の<操作>の⑧, ⑨, ⑩に従いコロニーPCRを行い、AGEを行った結果、2 株において、目的の位置にバンドがみられた。これら 2 株の形質転換体は、4.2 節の方法で Node25 遺伝子の発現実験を行い、その内 1 株から Node25 遺伝子の発現を示唆する結果が得られた。

### 5.2 大腸菌を宿主とした Node25 遺伝子の発現実験

4.2 節に調製した試料の SDS-PAGE を行った結果を図 1 に示す。

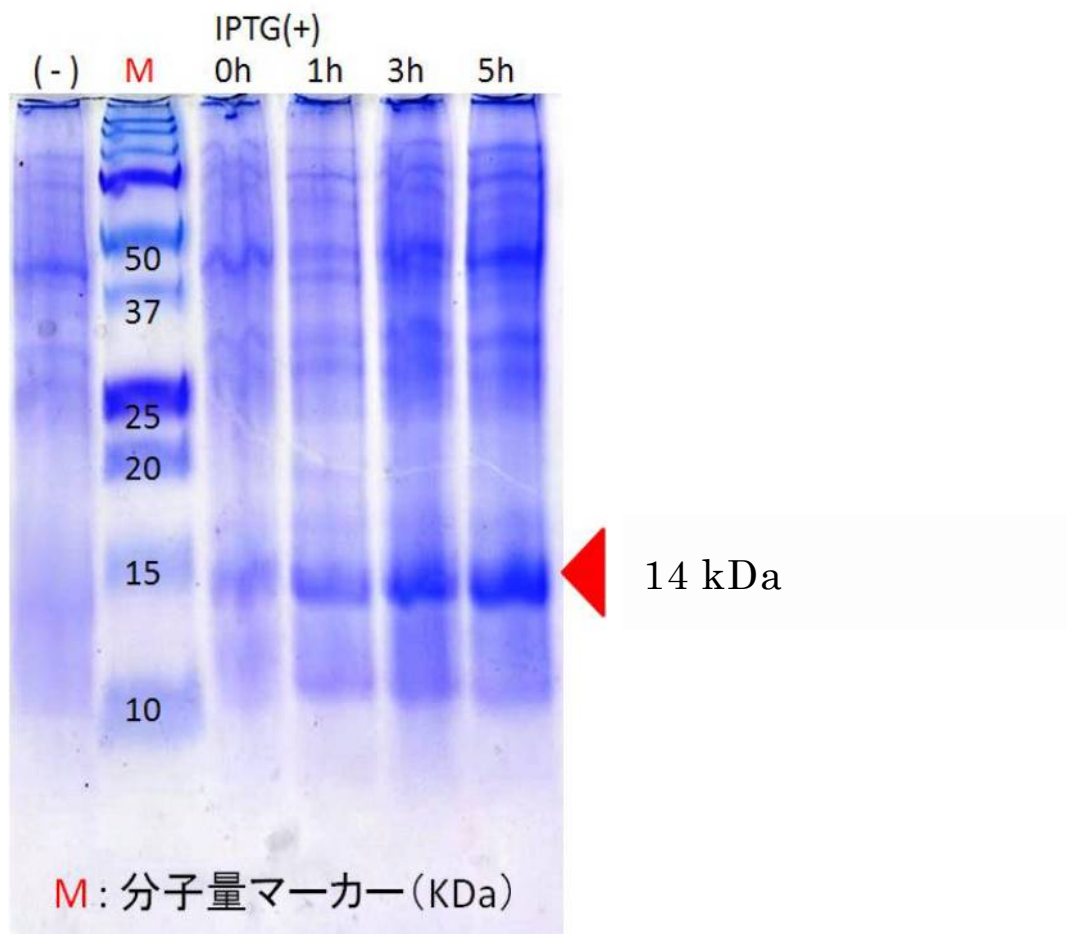


図 1 : Node25 遺伝子発現実験の SDS-PAGE の結果

誘導剤 IPTG 添加前 (一) には確認できないタンパク質のバンドが、IPTG 添加直後 (0 時間) および 1~5 時間の間で分子量約 14 kDa の位置に時間経過とともに徐々に産生量が増加していることを明らかにした。この結果より、大腸菌内において、Node25 タンパク質のグロビン鎖部分の産生を確認することができた。IPTG 添加後(0 時間)でタンパク質バンドが検出された原因として、菌体回収後に TCA 処理するまでに数分間放置していたためであると考えられる。

### 5.3 Node25 タンパク質の精製

#### 5.3.1 Q Sepharose F.F.担体を用いた組換え型 Node25 タンパク質の精製結果

大量培養した結果、得られた組換え型 Node25 タンパク質を産生した菌体は、超音波破碎を行って溶菌し、さらに、DNaseI 溶液を加えることでゲノム DNA の消化反応を行った。そして、産生した組換え型 Node25 タンパク質を安定させるために CO ガス置換を行った。さらに、遠心後(サンプル I)、上清に PEI 処理を行い、再度遠心を行った(サンプル II)。赤く呈色した透明な上澄みを回収した後、濃縮し、一晚透析を行った。透析した溶液は遠心し、上清を回収した(サンプル III)。回収した上清は、CO ガスで置換した。その後、Q Sepharose F.F.担体を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行い、分画した赤く呈色した画分に注目して、これらの画分について SDS-PAGE を行い、その結果を図 2 に示した。

なお、15%アクリルアミド含有ゲルを用いた SDS-PAGE には、4.4.4 項に従い、プロテインマーカー(M) 10  $\mu$ l、そして、カラムからの溶出液をフラクションコレクターで分画した。フラクション No.3~25 までの各画分を試料調製したものを 10  $\mu$ l ずつ(No.3~25)を加えた。

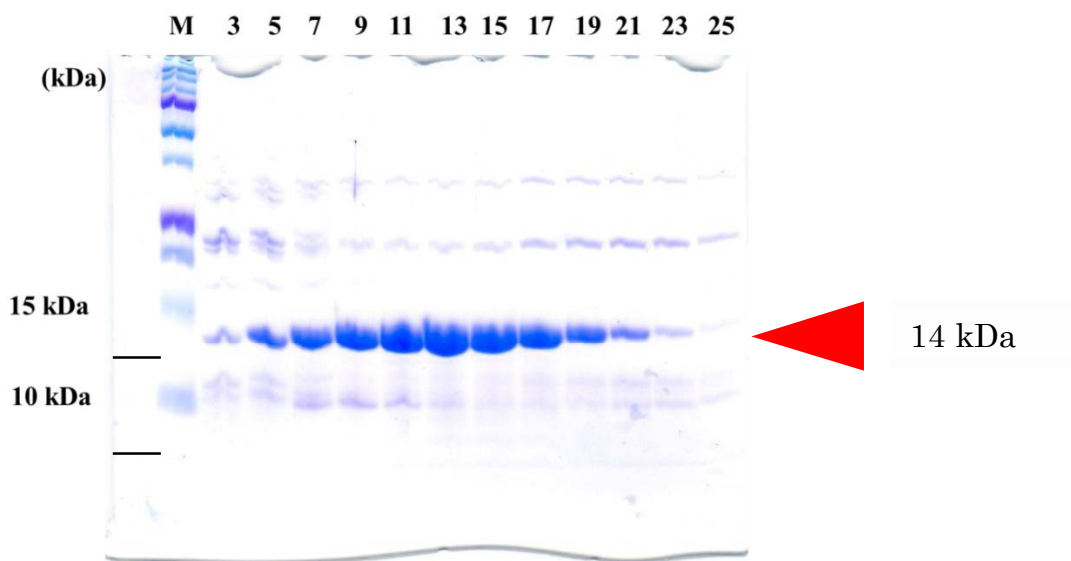


図 2. Q Sepharose 担体を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーにより分画した各画分の SDS-PAGE の結果

Lane M は分子量マーカーである。赤い矢印は、14 kDa の産生した Node25 タンパク質と考えられるバンドを意味する。

図 2 の SDS-PAGE の結果から、フラクション No.3~25 において分子量約 14 kDa の位置に産生した Node25 タンパク質のグロビン鎖に相当するタンパク質のバンドが確認出来た。さらに、このタンパク質バンドは、フラクション No.9~17 において最も濃くメジャーなタンパク質であることが明らかである。これらの画分については、分子量 10, 22, 30 kDa に大腸菌由来の夾雑タンパク質のタンパク質バンドを確認出来るもののわずかであった。そこで、フラクション No.3~25 までの各画分をまとめたのち、攪拌式セル 8200 で濃縮を行い、試料を 28 ml まで濃縮した(サンプルIV)。そして、さらに、透析チューブにこの濃縮液を注入したのち、10 mM リン酸 Buffer (pH5.8) 中に入れて、低温室(4℃)で一晩透析を行った。

### 5.3.2 CM Sepharose 担体を用いた組換え型 Node25 タンパク質の精製結果

透析後の試料を、CM Sepharose F.F.担体を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーで精製を行い、溶出液を回収して分画した赤く呈色した画分について SDS-PAGE を行い、その結果を図 3 に示す。なお、図 2 の結果と同様に、4.4.4 項に従い、SDS-PAGE 用のゲルには、プロテインマーカー(M) 10  $\mu$ l、そして、カラムからの溶出液をフラクションコレクターで分画して回収したフラクション No.1 ~8 までの各画分液を試料調製したものを 10  $\mu$ l ずつ (No.1~8)を加えた。

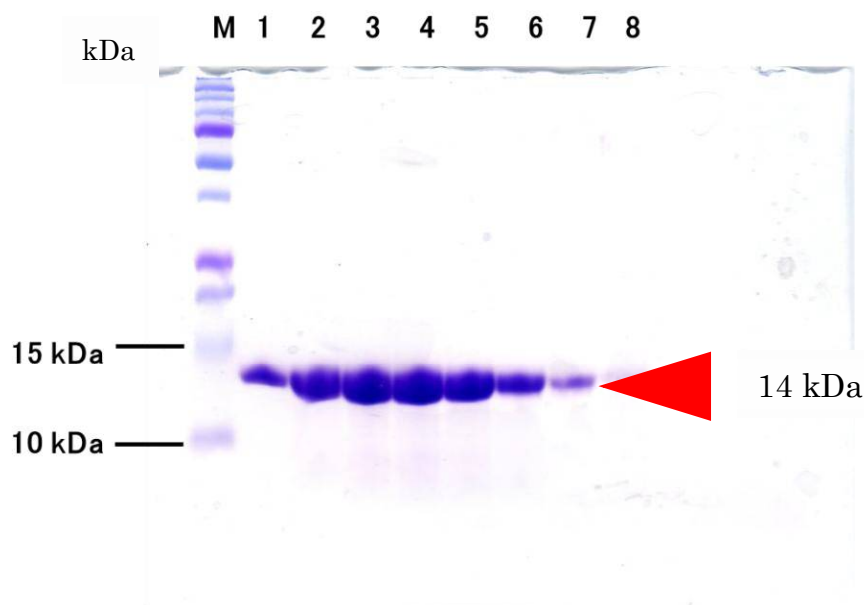


図 3. CM Sepharose 担体を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーにより分画した各画分の SDS-PAGE の結果



回収した各画分のフラクションNo.1～8においてSDS-PAGEの結果から目的のタンパク質である分子量約 14 kDa の Node25 タンパク質バンドがほぼ単一の状態で確認出来た。

そこで、5.3.1 項で述べた方法でフラクションNo.1～8までの各画分を集めたのち、再度、アミコンの限外ろ過ディスク YM10 を用いた攪拌式セル 8200 で濃縮を行い、20 ml の濃縮液を調製した(サンプルV)。今度は、この濃縮液を透析チューブに注入したのち、50 mM リン酸 Buffer (pH7.0)中に入れて、低温室(4℃)で一晩透析を行い、Buffer 交換をした。

Node25 タンパク質精製標品を 9 ml 得ることが出来た(精製標品)。この精製標品を用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色を行った結果を図 4 に示す。なお、プロテインマーカー 10  $\mu$ l、Node25 タンパク質精製標品の SDS-PAGE 用試料 5  $\mu$ lを用いた。

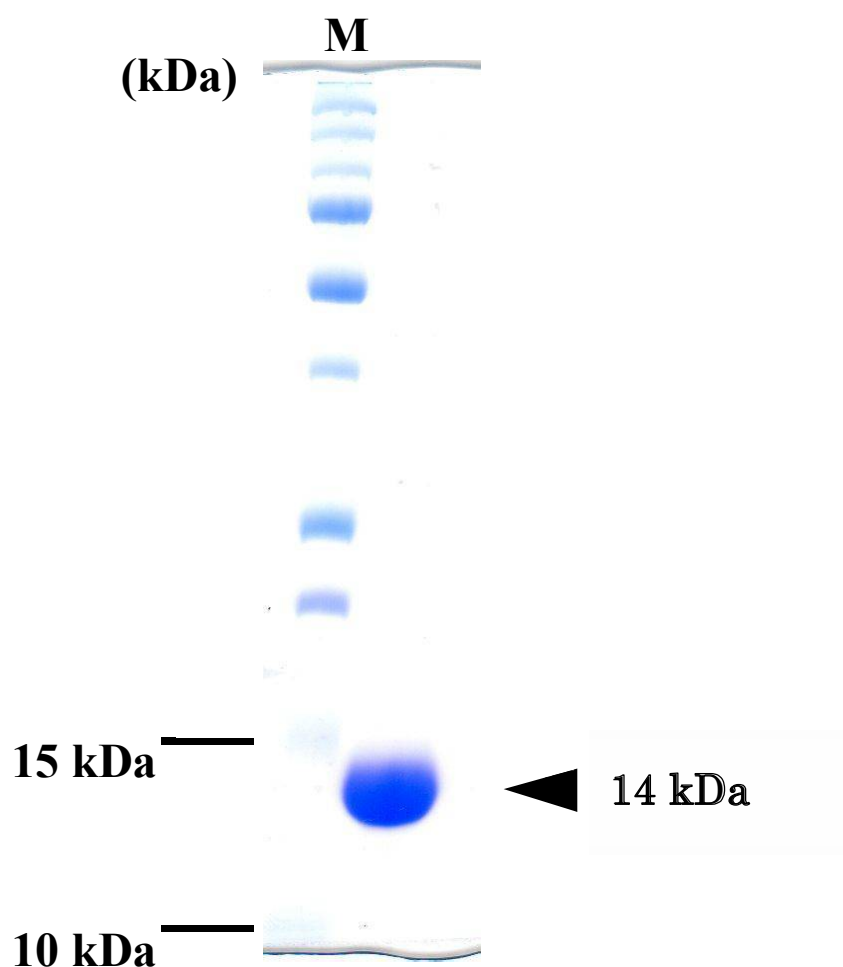


図 4. Node25 タンパク質精製標品の SDS-PAGE 結果

図 4 の結果からも明らかなように、Q Sepharose 担体および CM Sepharose 担体を用いたイオン交換クロマトグラフィーを 2 段階で行うことで、組換え型 Node25 タンパク質を単一の状態で精製することが出来た。

### 5.3.3 Lowry 法による各精製段階のタンパク質の定量<sup>16,17)</sup>

5.3.1 および 5.3.2 項において Node25 タンパク質の精製の各段階で分取したサンプル(I ~V)および Node25 タンパク質精製標品については Lowry 法を用いてタンパク質量を定量した結果を表 1 に示す。

表 1. Node25 タンパク質の各精製段階におけるタンパク質濃度および総タンパク質量

|          | 体積 (ml) | 濃度 (mg/ml) | タンパク質量(mg) |
|----------|---------|------------|------------|
| サンプル I   | 120     | 10.77      | 53.88      |
| サンプル II  | 120     | 10.65      | 53.28      |
| サンプル III | 50      | 14.01      | 70.08      |
| サンプル IV  | 28      | 4.54       | 9.08       |
| サンプル V   | 20      | 5.59       | 11.08      |
| 精製標品     | 9       | 13.99      | 27.98      |

## 5.4 各種ヘムリガンド結合における Node25 タンパク質精製標品のスペクトル結果

Node25 タンパク質精製標品は、事前に吸収スペクトルを測定した結果、精製標品全体の 20%程度がヘムに配位している Fe 原子の酸化数がⅢ価のメト型タンパク質が含まれていることを明らかにした。そこで、メト型 Node25 タンパク質を減少させるために 4.6 節および 4.7.1 項で記載した 7 種類の還元酵素および関連試薬<sup>13, 14)</sup>を添加して、室温で 2 時間反応させたのち吸収スペクトルを測定した。それに先立ち、CO 型 Node25 タンパク質試料(pH7)を 50  $\mu$ M 試験管内に入れ、ゴム栓で密閉したのち、低温室(4℃)で蛍光灯を一晩照射して Oxy 型 Node25 タンパク質精製標品を準備した。そして、上述した還元酵素および関連試薬を加えて反応した。各種ヘムリガンド結合条件(Oxy、Deoxy、CO)下で Node25 タンパク質試料の吸収スペクトルを測定した(図 5)。なお、測定には 2 mm の石英セル付のツンベルグ管を使用し、N<sub>2</sub>ガス置換で調製し Deoxy 型 Node25 タンパク質試料(pH7)から Oxy、CO 型の順で測定を行った。

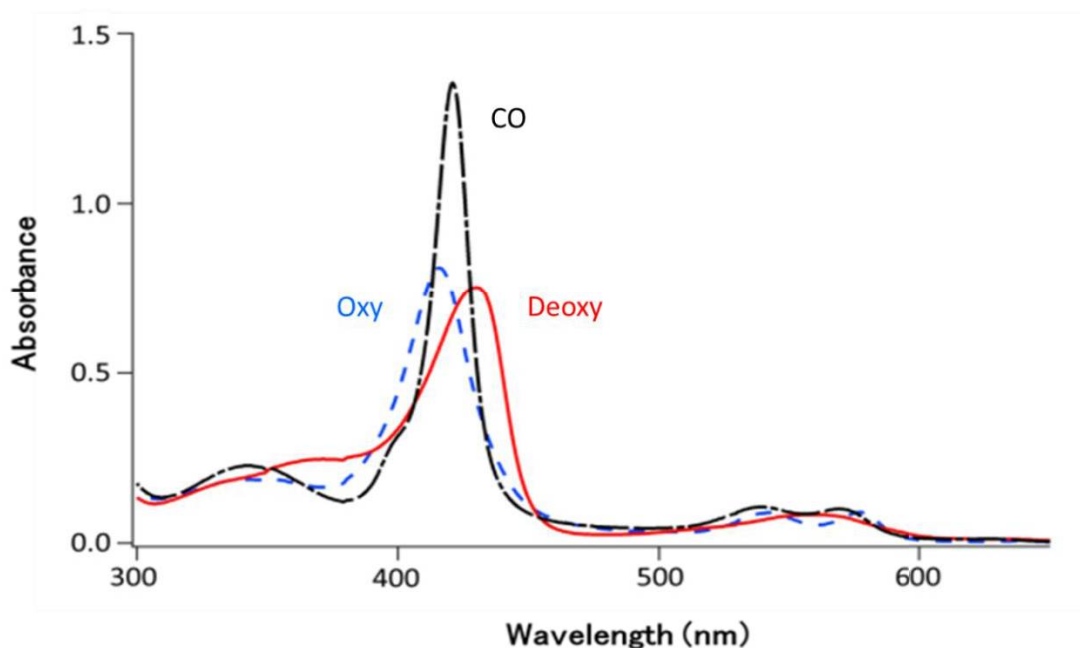


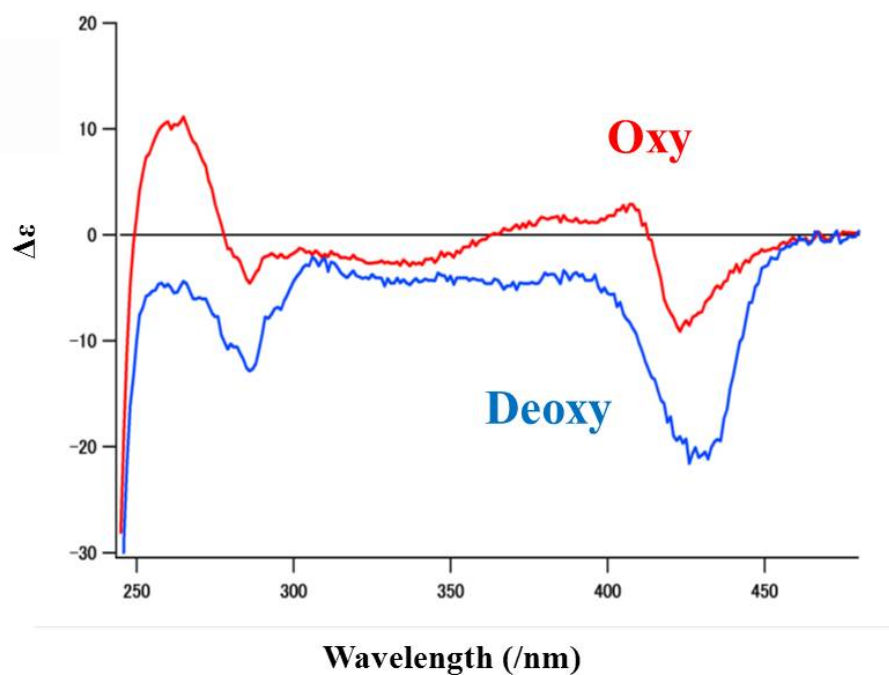
図 5. Oxy 型、Deoxy 型および CO 型の組換え型 Node25 タンパク質試料(pH7)の吸収スペクトル

Deoxy 型、Oxy 型、および CO 型 Node25 タンパク質精製標品の吸収スペクトルを測定した結果、波長領域 410～430 nm 付近に Soret 帯、そして 530～580 nm 付近に  $\alpha$  および  $\beta$  吸収帯からなる Q 吸収帯を検出することが出来た。この結果から、今回精製した Node25 タンパク質は補欠分子であるヘムを有したホロタンパク質であり、Node25 タンパク質精製標品を用いて今回初めて大腸菌を宿主としたヤツメウナギの祖先型 Hb である Node25 遺伝子の発現系を構築することが出来たことを証明した。また、産生した Node25 タンパク質が有したヘムは、酸素分子との可逆的結合能力を保持していることも明らかにした。

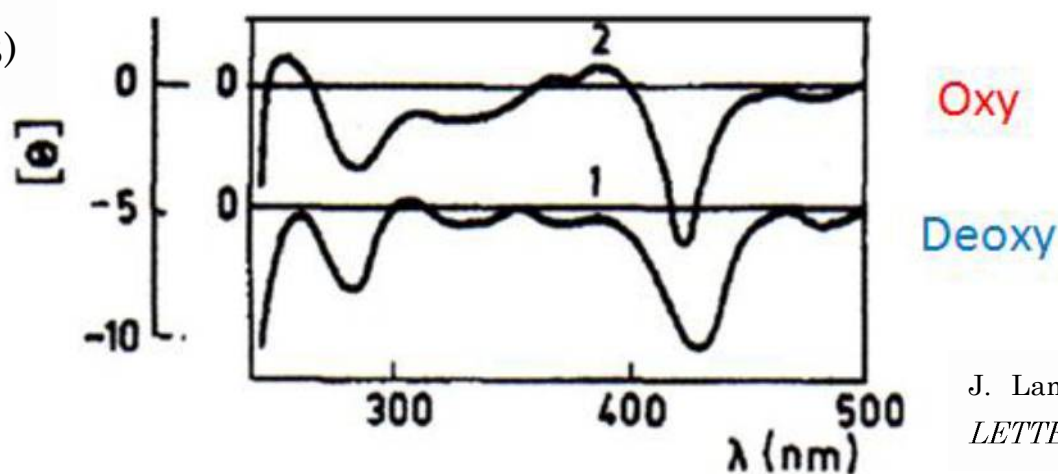
## 5.5 各種ヘムリガンド結合における Node25 タンパク質の CD スペクトル

図 6(A)に示すように、Node25 タンパク質の CD スペクトルは 420 nm 付近の Soret 帯において、図 6(B)で示したヤツメウナギの天然型 Hb の CD スペクトルの結果<sup>18,19)</sup>と同様に Oxy および Deoxy 型共にネガティブ側にスペクトルを示し、円口類 Hb 特有の CD スペクトルを示した。この結果から、現存種に存在しない、ヤツメウナギの祖先型 Hb である Node25 遺伝子を用いた、大腸菌を宿主とした発現系を構築することができた。

(A)



(B)



J. Lampe *et al* : *FEBS LETTERS* 282-284 (1972)

図 6 : Node25 (A) および天然型ヤツメウナギの Hb (B) の CD スペクトル

## 5.6 各種測定条件における Node25 タンパク質試料の Hill Plot, $P_{50}$ および $n_{max}$

### 5.6.1 各 pH における Node25 タンパク質の Hill Plot, $P_{50}$ および $n_{max}$

4.7.1 項に従い、各 pH に調製した 60  $\mu\text{M}$  Node25 タンパク質試料を 7 ml を用意した。まず、Oxy 化する際に利用した純酸素が気相に残存していないことをマイクロボルトメーターで確認したのち、再度酸素ボンベから純酸素を測定試料に送流して、飽和状態の試料を調製した。そして、 $\text{N}_2$  ガスの送流を開始して試料を Oxy から Deoxy 状態にしたのち、次に空気を測定試料に送流して Deoxy から Oxy 状態に戻した。各種測定試料の Oxy と Deoxy

間の状態変化は、固定波長 560 nm の吸光度を測定することで、各 pH の Node25 タンパク質試料の酸素解離曲線を記録した。それらのデータから作成した Hill Plot を図 7 に示す。なお、60  $\mu$ M HbA 溶液(pH7.4)の Hill plot、およびヤツメウナギの天然型 Hb の Hill Plot,  $P_{50}$  および  $n_{max}$  の結果も図 8 および標 3 に合わせて示した。なお、各 pH における Node25 タンパク質の  $P_{50}$  および  $n_{max}$  は表 2 に示した。

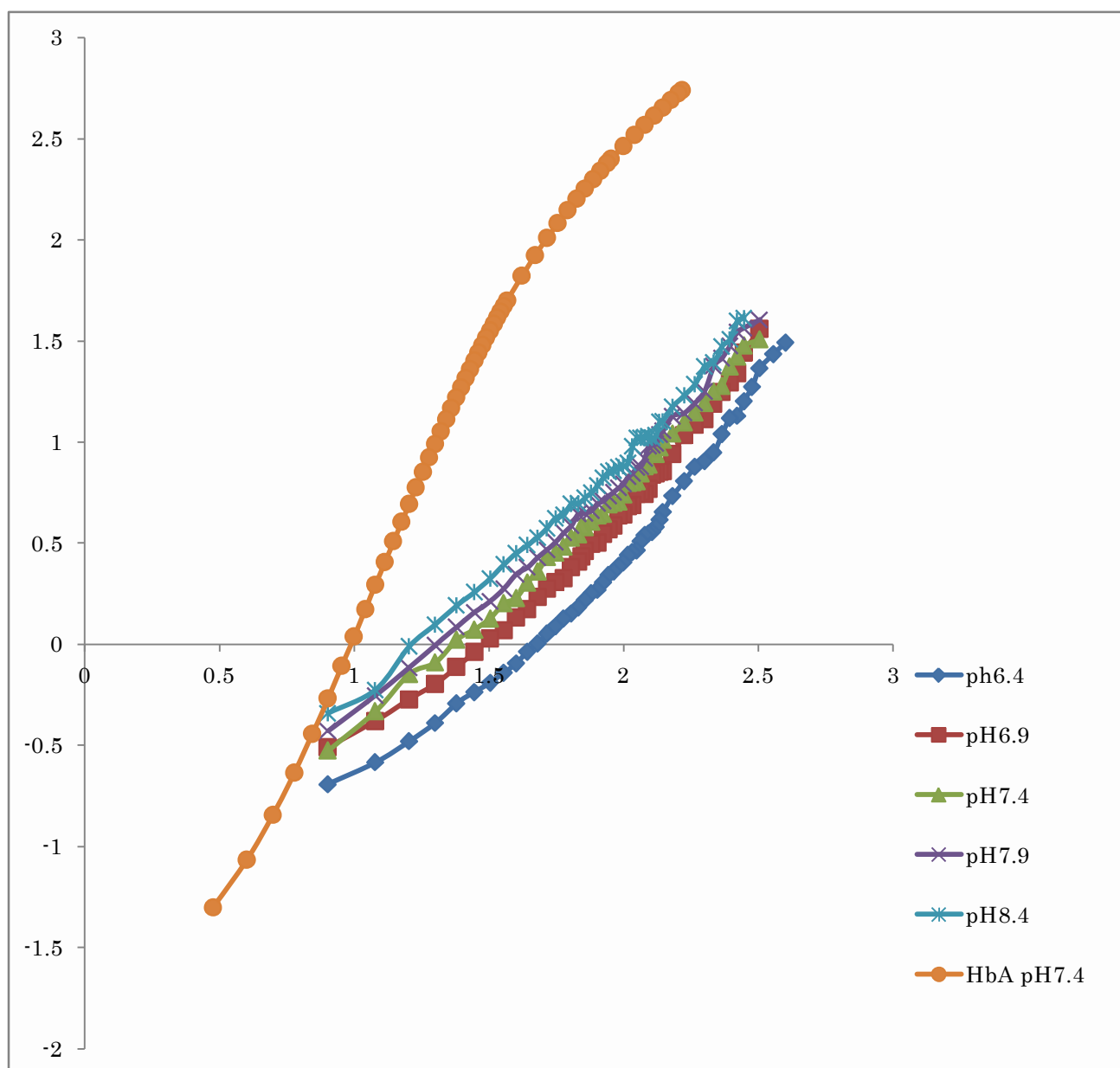


図 7. 各 pH における Node25 タンパク質酸素解離曲線のヒルプロット  
 $pO_2$  は、mmHg 単位。

表 2. 各 pH における Node25 タンパク質の  $P_{50}$  と  $n_{\max}$

| pH      | $P_{50}(\text{mmHg})$ | $n_{\max}$ |
|---------|-----------------------|------------|
| 6.4     | 27.1                  | 1.49       |
| 6.9     | 25.9                  | 1.52       |
| 7.4     | 23.8                  | 1.61       |
| 7.9     | 21.2                  | 1.65       |
| 8.4     | 20.1                  | 1.64       |
| HbA 7.4 | 9.5                   | 2.26       |

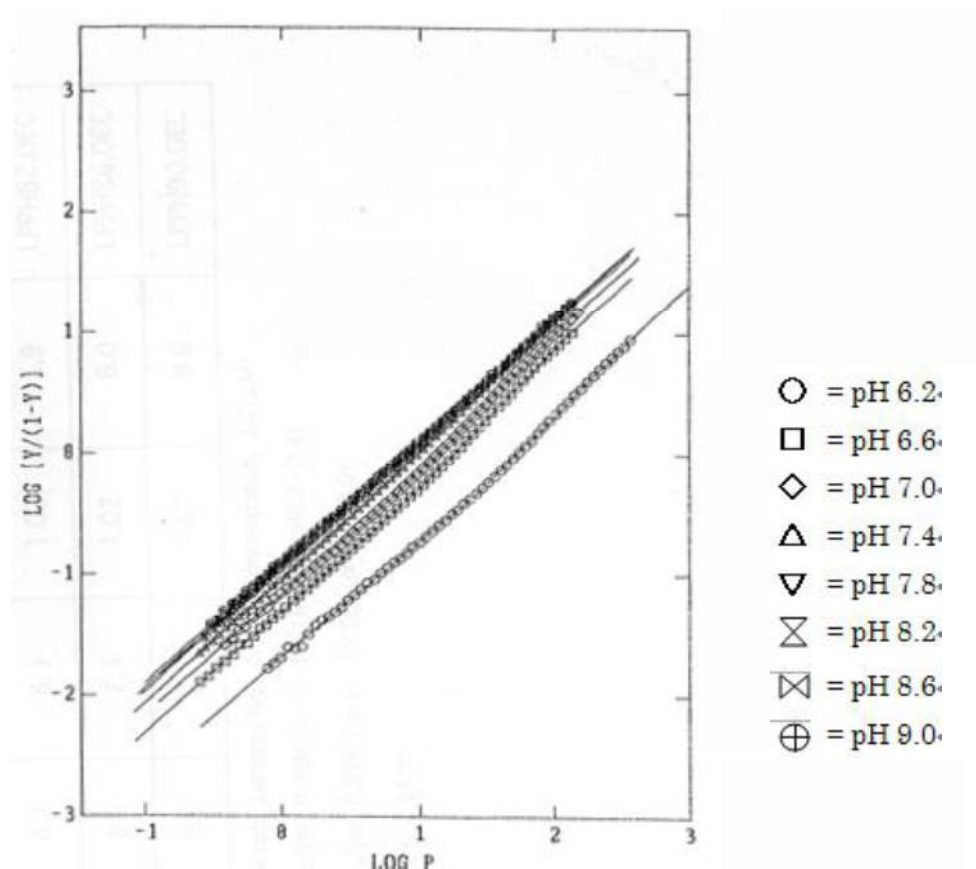


図 8. 各 pH におけるヤツメウナギの天然型 Hb の酸素解離曲線の Hill plot

表 3. 各 pH におけるヤツメウナギの天然型 Hb の  $P_{50}$  および  $n_{max}$

| pH  | $P_{50}$ ( mmHg) | $n_{max}$ |
|-----|------------------|-----------|
| 6.2 | 40.1             | 1.40      |
| 6.6 | 17.5             | 1.18      |
| 7.0 | 13.4             | 1.18      |
| 7.4 | 9.8              | 1.11      |
| 7.8 | 8.4              | 1.06      |
| 8.2 | 8.0              | 1.02      |
| 8.6 | 7.9              | 1.02      |

各 pH に調製した Node25 タンパク質の試料は HbA よりも酸素親和性が低く、pH8.4 から pH6.4 へとアルカリ性側から酸性側へとシフトするに従って順々に酸素親和性が減少していることが確認出来る。また、小さい Bohr 効果も観察された。

さらに、これら試料の Hill 係数は、1.49 (pH6.4), 1.52 (pH6.9), 1.61 (pH7.4), 1.65 (pH7.9), 1.64 (pH8.4)の値をとり、pH が酸性からアルカリ性へ上昇するに従って Hill 係数の増加が確認出来たことから、60  $\mu$ M という低濃度においても pH 依存的に Node25 タンパク質が協同性作用を示すことを明らかにした。

### 5. 6. 2 各種阻害剤存在下における Node25 タンパク質の Hill Plot, $P_{50}$ および $n_{max}$ (pH7.4)

Node25 タンパク質の酸素親和性に対する各種阻害剤の効果を評価するために 60  $\mu$ M Node25 タンパク質試料 (pH7.4)に高濃度の各種阻害剤 (2,3-DPG、ATP、IHP)溶液を加えて終濃度 2 mM に調製した試料(pH7.4)を用意した。各種試料(pH7.4)に対して、これまでと同様の操作で酸素解離曲線を記録したのち、Hill plot を作成した結果を図 9 に示す。さらに、算出した Node25 タンパク質の  $P_{50}$  および  $n_{max}$  の値を表 4 に示す。

なお、ヤツメウナギの天然型 Hb の各種阻害剤存在下における Hill plot,  $P_{50}$  および  $n_{max}$  の結果を図 10 および表 5 に合わせて示す。

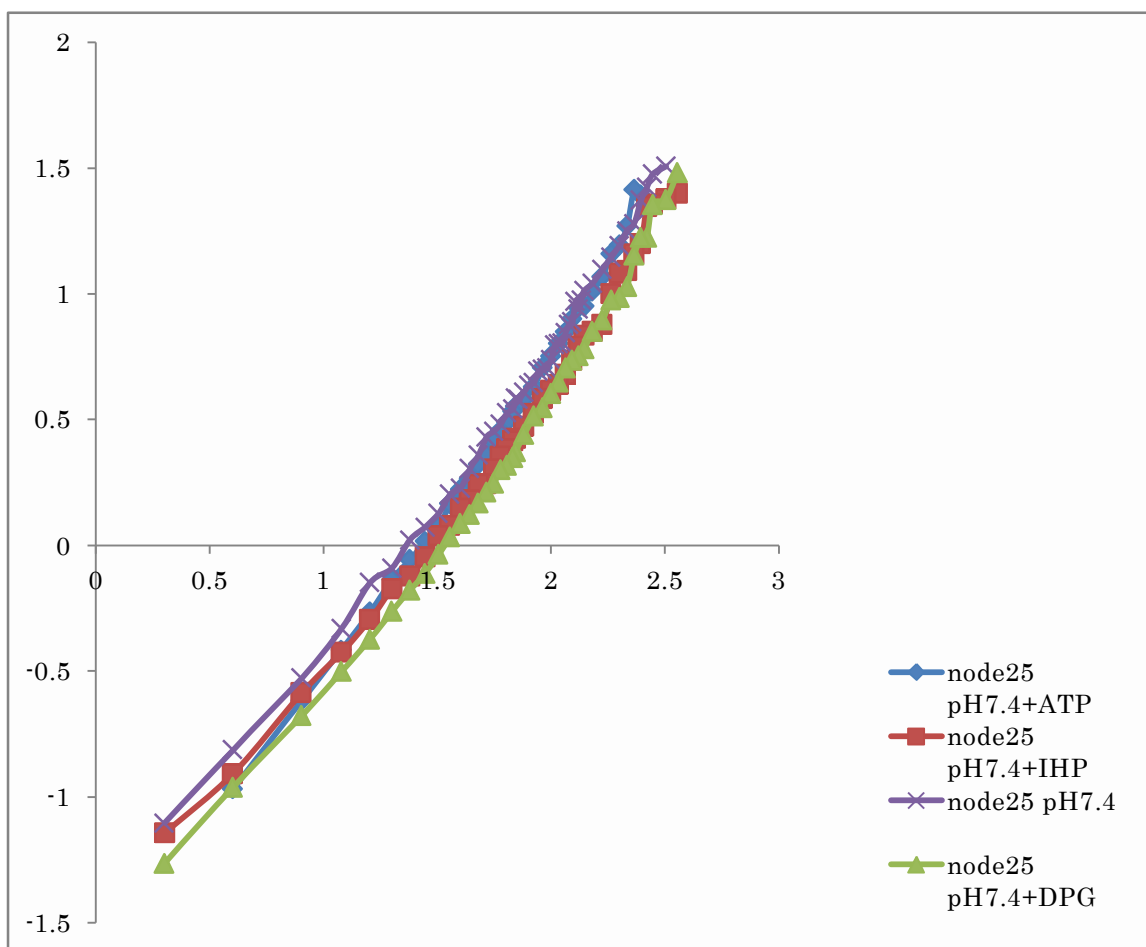


図 9. 各種阻害剤存在下における Node25 タンパク質酸素解離曲線の Hill plot

表 4. 各種阻害剤存在下における Node25 タンパク質の  $P_{50}$  および  $n_{\max}$

| Effector | $P_{50}$ (mmHg) | $n_{\max}$ |
|----------|-----------------|------------|
| None     | 23.8            | 1.61       |
| 2 mM IHP | 26.1            | 1.51       |
| 2 mM ATP | 24.6            | 1.56       |
| 2 mM DPG | 25.5            | 1.55       |



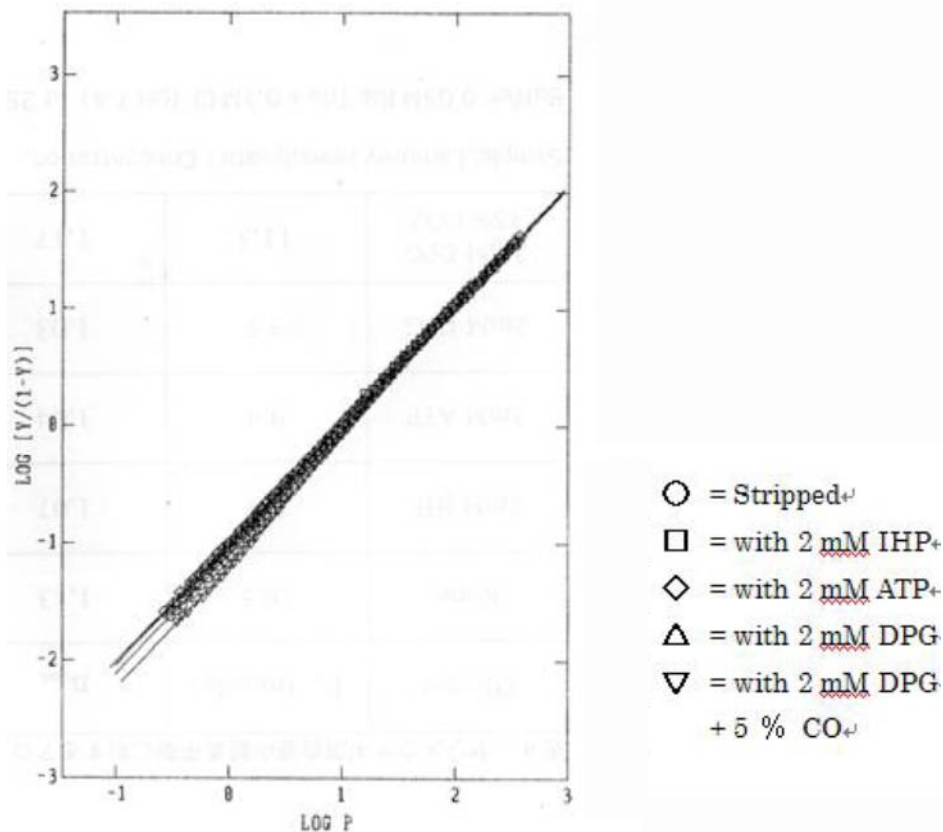


図 10. 各種阻害剤存在下におけるヤツメウナギの天然型 Hb の酸素解離曲線の Hill plot

表 5. 各種阻害剤存在下におけるヤツメウナギの天然型 Hb の  $P_{50}$  および  $n_{max}$

| Effector | $P_{50}$ (mmHg) | $n_{max}$ |
|----------|-----------------|-----------|
| None     | 10.5            | 1.13      |
| 2mM IHP  | 9.5             | 1.07      |
| 2mM ATP  | 9.4             | 1.04      |
| 2mM DPG  | 9.5             | 1.03      |

今回測定に用いた ATP、IHP および DPG の阻害剤が Node25 タンパク質の酸素に対する親和性への阻害効果は、表 5 のヤツメウナギの天然型 Hb と同様に今回用いた阻害剤の影響を受けないことが明らかになった。また、Hill 係数も約 1.5 の値をとり、阻害剤の有無による Hill 係数の変化は観察されない。

### 5.6.3 異なるタンパク質濃度における Node25 タンパク質の Hill Plot, $P_{50}$ および $n_{\max}$ (pH7.4)

各 node25 のタンパク濃度 (60  $\mu\text{M}$ 、600  $\mu\text{M}$ 、1,200  $\mu\text{M}$  )(pH7.4)における酸素解離曲線の Hill plot を図 11 に示した。さらに、算出した Node25 タンパク質の  $P_{50}$  および  $n_{\max}$  の値も表 6 に示した。なお、ヤツメウナギの天然型 Hb の異なるタンパク質濃度における Hill plot,  $P_{50}$  および  $n_{\max}$  の結果も図 12 および表 7 に示す。

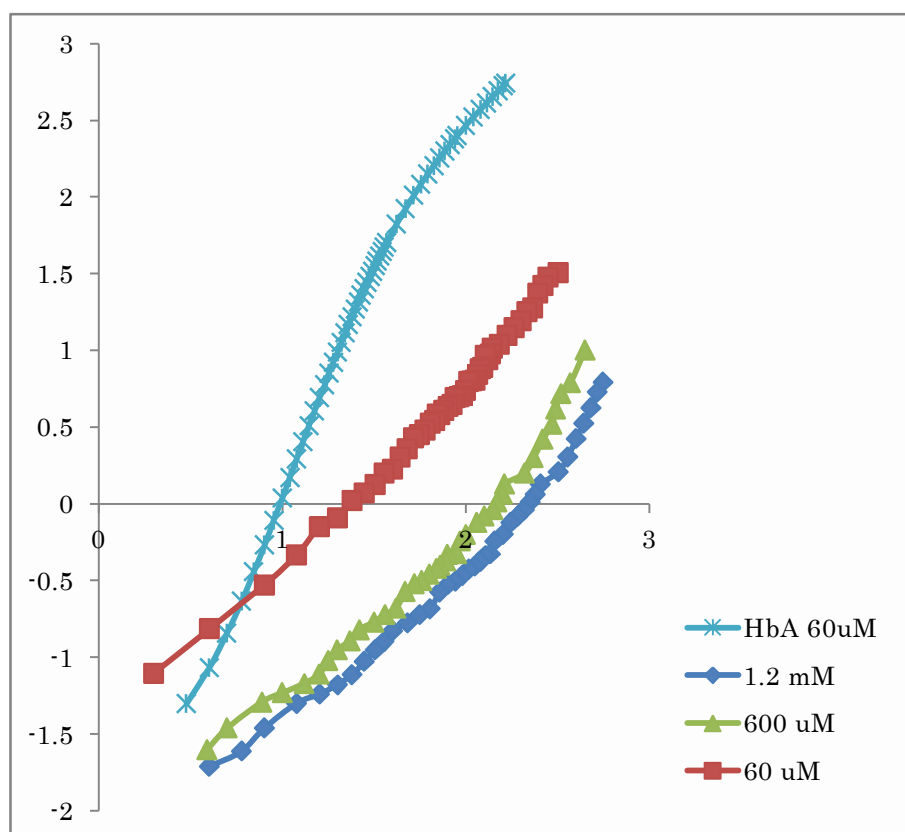


図 12. 異なるタンパク濃度における Node25 タンパク質酸素解離曲線のヒルプロット

表 7. 異なるタンパク質濃度における Node25 タンパク質の  $P_{50}$  および  $n_{\max}$

|        | 濃度( $\mu\text{M}$ ) | $P_{50}$ (mmHg) | $n_{\max}$ |
|--------|---------------------|-----------------|------------|
| HbA    | 60                  | 9.5             | 2.26       |
| Node25 | 60                  | 23.8            | 1.61       |
| Node25 | 600                 | 29.8            | 1.69       |
| Node25 | 1200                | 33.3            | 1.74       |

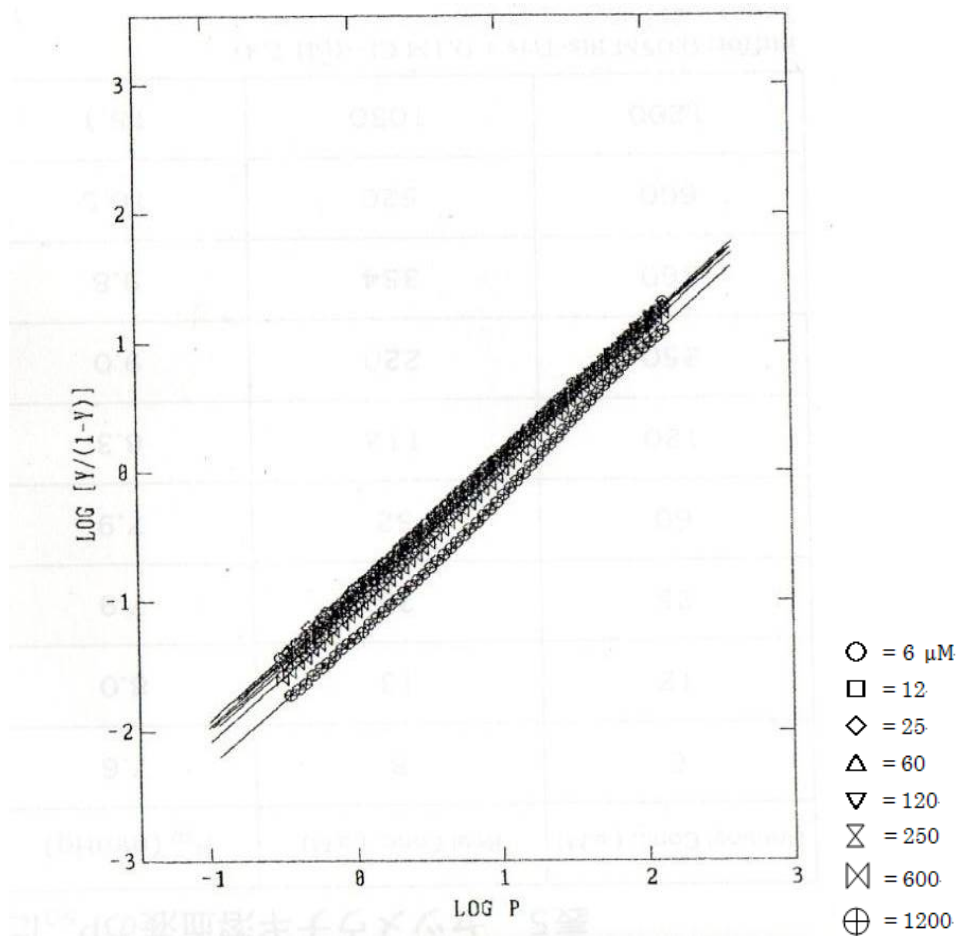


図 12. 異なるタンパク濃度におけるヤツメウナギの天然型 Hb の酸素解離曲線の Hill plot

表 7. 異なるタンパク濃度におけるヤツメウナギの天然型 Hb の  $P_{50}$  および  $n_{\max}$

| 濃度   | $P_{50}$ (mmHg) | $n_{\max}$ |
|------|-----------------|------------|
| 60   | 7.9             | 1.07       |
| 600  | 10.5            | 1.13       |
| 1200 | 15.1            | 1.22       |

各種 Node25 タンパク質試料 (pH7.4)は、HbA よりも酸素親和性が低く、Node25 タンパク質濃度が 60、600、1,200  $\mu\text{M}$ と増加するに従って、さらに酸素親和性の低下が見られ

た。なお、図 12 で示したヤツメウナギの天然型 Hb も同様の性質を示した。各濃度における Hill 係数は、Node25 タンパク質濃度が増加するに従い、1.61, 1.69, 1.74 へと増加し、同タンパク質が濃度に依存的に単量体間の協同作用を増加することを明らかにした。

今回、測定した Node25 タンパク質は生理条件において、酸素親和性および協同性についてはヤツメウナギの天然型 Hb と同様の傾向を示した。

## 6. 考察

大腸菌を宿主としたヤツメウナギの祖先型 HbNode25 遺伝子の発現系を構築することができた。pET-Node25 を有する大腸菌の形質転換体は、大量培養後、誘導剤 IPTG 添加後にヘミン溶液の添加の有無により、Node25 タンパク質の産生量に若干の変化があるものの、どちらの条件で産生される同タンパク質も補欠分子であるヘムを有したホロタンパク質であった。Node25 タンパク質の一次構造より推測された理論 pI 値 6.73 を示したことから、精製過程において CM Sepharose 担体を用いた陽イオン交換クロマトグラフィー(pH5.8) による精製でこの担体と Node25 タンパク質との静電的相互作用を利用して、精製を試みた。しかしながら、残存する大腸菌由来の大部分の夾雑タンパク質は、この担体に結合して除去出来たものの Node25 タンパク質はカラム内をパススルーして溶出するという予想外の結果となった。この現象は、Node25 タンパク質の実際の pI 値が理論 pI 値 6.73 とは明らかに異なっていることを示しており、その詳細については現時点では未解明である。また、円口類の祖先型 Hb である Node23 タンパク質の理論 pI 値は 8.61 を示し、Node25 タンパク質と同じ性質を示した。今後、遺伝工学的手法などを用いて、Node25 タンパク質の高次構造とそのタンパク質表面電荷との関係についてさらに解析していく必要がある。

産生した Node25 タンパク質精製標品の機能解析を行った結果、ヤツメウナギの祖先型 Hb である Node25 タンパク質は現存種の天然型 Hb 同様に、HbA よりも酸素親和性が低く、アルカリ性から酸性へと pH が低下するに従い、弱い Bohr 効果による酸素親和性の低下が確認された。しかしながら、協同作用は pH 依存的に、酸性側からアルカリ性側へ上昇するに従い、増加傾向を示し、この性質は、ヤツメウナギの天然型 Hb にみられない新規な性質を示した。また、ATP、IHP をはじめとする各種阻害剤による Node25 タンパク質の酸素分子に対する親和性への影響は見られなかった。さらに、生理条件に近い Node25 タンパク質高濃度環境においては、ヤツメウナギの天然型 Hb よりも酸素親和性が低下し、酸素親和性および協同性作用については、天然型 Hb と同様の傾向を示した。

今回、設計、合成した Node25 タンパク質は、作成した最尤系統樹(ML-tree)から、現在よりも 3 億年前に生息した祖先のヤツメウナギが有した Hb だと考えられる。先に現在よりも 5 億年前に生息した円口類が有していたと考えられる Node23 タンパク質は、現存種であるヤツメウナギの天然型 Hb がすでに獲得している ATP、IHP および DPG といった阻

害剤に対して感受性を保持しており、Node25 タンパク質では完全に耐性を獲得している。この結果から、今回作成した ML-tree から Hb の分子進化の過程において 3 億年前には各種阻害剤に対する耐性も有していたことを示唆している。

また、Node25 および Node23 タンパク質が現存種のヤツメウナギの天然型 Hb と異なり、pH 依存的に比較的共同性が高く、現存手よりも複合体構成能を有しているこの性質は、円口類の ML-tree 作成時に示した、円口類の Hb が脊椎動物の Hb および Mb へと進化する以前には、すでに存在していたという仮説を支持する結果を示している。

## 7. 結言

精製した Node25 タンパク質は補欠分子であるヘムを有したホロタンパク質であり、さらにヤツメウナギの Hb 特有の CD スペクトルを示しことから、本研究において、現存種に存在しない祖先型 Hb である Node25 遺伝子の大腸菌を宿主とした発現系を構築することができたと言える。

精製した Node25 タンパク質は、ヤツメウナギの天然型 Hb と比較して酸素親和性が低く、低濃度環境下において、アルカリ性側から酸性側へ pH 変化するに従い、酸素親和性が減少し、小さい Bohr 効果が検出された。しかしながら、Hill 係数  $n_{\max}$  が pH 依存的に酸性側からアルカリ性側に上昇するにつれて値が増加した。また、各種阻害剤による Node25 タンパク質の酸素親和性への影響もほぼ見られなかった。

精製した Node25 タンパク質は、生理条件に近い Node25 タンパク質高濃度環境においては、ヤツメウナギの天然型 Hb に比べて酸素親和性が低下するものの、酸素親和性および協同作用は、ヤツメウナギの天然型 Hb と同様の傾向を示した。

## 8. 参考文献

1. N.M.Ruman and W.E. Love, *Arch. Biochem. Biophys.*, 103, 24-35 (1963).
2. Y. Yazawa, T. Nakayama and T. Maita: *Reports of the Taisetsuzan institute of Science* No. 38 (2004).
3. A. C. Allison, R. Cecil, P. A. Charlwood, W. B. gratzer, S. Jacobs and N. S. Snow: *Biochim Biophys. Acta*, 42 43-48 (1960).
4. Yang Qui, David H. Maillet, James Knapp, John S. Olson and Austen F. Riggs: *J.Biol. Chem.* 275, 13517-13528 (2000).
5. Angela, F., Laura, G., Rossana, D,A., Vito, C., Mario, R., Alberto, B. and Emilia, C.:

- J. Biol. Chem.* 276,27415-27415 (2001).
6. 尾澤 雄太、松尾 高稔、今井 清博、生命機能学科 卒業論文(2011).
  7. 幕 晋一、中川 太郎、今井 清博、生命機能学科 卒業論文(2010).
  8. 幕 晋一、松尾 高稔、今井 清博：マイクロ・ナノテクノロジー研究センター開設 10 周年記念シンポジウム、講演予稿集、 pp.38 (2012).
  9. T.-J. Shen,*et al.*, *Protein Engineering*, 10,1085-1097(1997).
  10. M. Nagai, Y. Nagai, Y. Aki, K. Imai, Y. Wada, S. Nagatomo, and Y. Yamamoto: *Biochemistry* 47, 517-525 (2008).
  11. Laemmli, U. K., *Nature*, 227 (5259) 680-685 (1970).
  12. 高木 俊夫 PAGE ポリアクリルアミド電気泳動法(1990).
  13. A. Hayashi, T. Suzuki, and M. Shin: *Biochim Biophys, Acta*, 309-316 (1973).
  14. J. A. Watkins, S. Kawanishi, and W. S. Caughey: *Biochem Biophys, Reserch Communications* 742-748 (1985).
  15. D. L. Drabkin: (1942).
  16. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L.& Randall, R.J.(1951).  
Protein.measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*193, 265-275.
  17. 岡田 雅人、宮崎 香：改訂第4版タンパク質実験ノート上、pp.31-32 半土社(2011.)
  18. Y. Sugita, Y. Doshi Y. Yoneyama: *Biochem, Biophys, Reserch Communications* 31, 3, (1968).
  19. J. Lampe, H. Rein, and W. Scheler: FEBS LETTERS 282-284 (1972)
  20. 今井清博：蛋白質 核酸 酵素 39, 1102-1110 (1994).
  21. 小林 道頼、今井 清博：蛋白質 核酸 酵素 44, 706-713 (1999).
  22. 今井 清博：蛋白質 核酸 酵素 44, 706-713 (1999).
  23. 今井 清博、A.H. Mohammed Mawjood：蛋白質 核酸 酵素 44,812-817 (1999).

## 9. 謝辞

本研究を進めるにあたり、直接丁寧な御指導を賜りました法政大学マイクロナノテクノロジー研究センター博士研究員 松尾高稔 博士に御厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました法政大学生命科学部生命機能学科 今井清博教授に御厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行におきまして熱心な御指導、御鞭撻を賜りました法政大学マイクロナノテクノロジー研究センター 長井雅子博士、長井幸史 博士に御厚くお礼申しあげます。そして、研究生活を支えて頂いた生体分子機能学研究室の皆様に深く感謝申し上げます。