

論 文 要 旨

氏 名 古賀 真也

論文題目名 Heme oxygenase-1を応用した蛍光検出型ヘムセンサーの開発

生体色素の一つとして知られるヘムは、通常ヘム蛋白質の補欠分子族として存在しているが、微量ながらポリペプチドなどと結合せずに遊離状態で存在するものがある。遊離ヘムは細胞内で活性酸素種の発生源となり、細胞や遺伝子に毒性を与えるため直ちにヘム分解酵素 Heme oxygenase-1 (HO-1) によって分解される。また、遊離ヘムは細胞のガン化などを促進するという報告もあり、いくつかの重篤な疾患の原因物質である可能性が指摘されている。一方で、遊離ヘムは転写制御や概日リズム調節などの重要な生理機能の調節因子として細胞イベントに関与していることが明らかとなってきた。近年では、生体組織に含まれる遊離ヘムの病的・生理的意義を明らかにする研究が盛んに行われている。生体試料に微量に含まれる遊離ヘムの濃度を測定するには nM オーダーのヘム検出感度が必要であると考えられているが、既存のヘム定量法は検出感度や選択性に課題があり、未だ生体試料中の遊離ヘムを直接測定する方法は確立されていない。そこで本研究では、蛍光ラベル化した HO-1 変異体より構成されるヘムセンサーを開発し、それを用いて遊離ヘム濃度を *in vitro* で測定する方法を提案した。この蛍光検出型ヘムセンサーは、遊離ヘムと 1:1 の割合で結合して安定な複合体を形成し、ヘム分子と HO-1 に結合している蛍光団との間でエネルギー移動が起こり蛍光消光するように分子設計されている。実際にヘムセンサーに対してヘムを滴定し、添加したヘム濃度とそれに伴う蛍光強度変化の関係について調べたところ、ヘム濃度依存的に蛍光が消光してゆき、当量に達した時点で変化しなくなった。非線形フィッティング解析によりヘムセンサーとヘムとの解離定数を求めたところ、1 nM 程度と算出され、ヘムセンサーの強い結合親和性が示された。換言すれば、本センサーのヘム検出限界は 1 nM であり、吸収法を原理とする既存の定量法よりも 1,000 倍高感度である。また、本センサーは高いヘム

選択性を示すため夾雑物の影響を受けにくいことや、マイクロプレートを使用した小スケール・多サンプル測定系にも適用できることがわかった。

本センサーはヘモグロビンなどのヘム蛋白質に結合しているヘムは検出できないが、ヘモグロビンを変性させて遊離したヘムについてはほぼ 100%を検出できることがわかった。さらに、遊離ヘムとヘモグロビンが混在するような試料を測定する場合でも、ヘモグロビンはインタクトな状態のまま遊離ヘムのみを定量することができた。すなわち、本センサーは遊離ヘムと蛋白質に結合しているヘムとを明確に区別して検出していることが示された。したがって、ヘモグロビンを変性させヘムを抽出するための処理法を使い分けることで、測定試料に含まれる遊離ヘムおよび総ヘムを定量することができ、その値からヘモグロビンに結合していたヘムの量を算出することが可能となった。これは既存のヘム定量法では困難とされていたが、本法を用いることでその問題点を解決することができた。一方で、未知濃度のヘモグロビンを含む試料から全てのヘムを抽出し、それをヘムセンサー法で測定した結果からヘモグロビン濃度を算出することができる。これを利用して、疑似便試料に含まれるヘモグロビン濃度を測定したところ、試料の設定ヘモグロビン濃度とほぼ一致する結果が得られ、現行の大腸ガン診断便潜血検査法の代替法として利用できる水準の検出能を有することが示された。これらの知見は、本測定原理をベースとした新規医療診断技術の開発につながるものと思われる。

これらの特徴を持つヘムセンサーを用いたヘム定量法は、様々な生物学的試料に含まれる遊離ヘムまたは蛋白質結合ヘムを識別できる画期的な測定法であり、幅広い分野における研究や分析で役立つツールになるだろう。

Heme oxygenase-1 を応用した蛍光検出型ヘムセンサーの開発

古賀 真也

Koga Shinya

— 目 次 —

略語表 v

第 1 章 序論 1

1-1	へムの性質と生理的役割	1
1-2	へム分解系	4
1-3	へムオキシゲナーゼの構造と特徴	5
1-4	へム定量法の必要性	7
1-5	既存のへム定量法とその特徴	8
1-6	研究目的	10
1-7	蛍光検出型へムセンサーの設計とその特徴	12

第 2 章 実験材料および実験方法 16

2-1	試薬、材料類	16
2-2	HO-1 変異体の設計と発現系の構築	18
2-3	HO-1 変異体蛋白質の発現と精製	19
2-4	HO-1 変異体への蛍光色素導入とその濃度決定法	21
2-5	蛍光ラベル化 HO-1 に対するへム滴定実験	23
2-5-1	へム溶液の調製	23
2-5-2	吸収スペクトル測定	24
2-5-3	蛍光スペクトル測定	24
2-6	解離定数 (K_d) の算出方法	25
2-7	センサーのへム選択性試験	27
2-8	マイクロプレートを用いたへム濃度測定法	27
2-9	ヘモグロビンに含まれるへムの抽出および定量実験	28
2-9-1	ヒトヘモグロビン溶液の調製	28
2-9-2	ヘモグロビンの変性処理とへム抽出操作	29
2-9-3	へム抽出試料の定量とへム回収率の算出法	30
2-10	遊離へム/ヘモグロビン混合溶液を用いた定量試験と存在比の決定	31

2-11	疑似便に含まれるヘモグロビンの測定試験	32
第3章 実験結果 33		
3-1	HO-1 変異体 K18C の発現と精製および蛍光色素導入率の算出	33
3-1-1	K18C の発現系構築と蛋白質精製	33
3-1-2	K18C の蛍光色素導入率	35
3-2	蛍光ラベル化蛋白質のヘム滴定実験およびフィッティング解析	36
3-2-1	ヘム滴定に伴う吸収スペクトル変化とその特徴	36
3-2-2	ヘム結合時の消光による蛍光強度変化の測定とフィッティング解析	38
3-3	センサーが示すヘム選択性と dose-response curve	40
3-4	マイクロプレート測定系における結合曲線の作成と親和性解析	42
3-5	変性ヘモグロビンから遊離したヘム濃度測定および回収率の比較	44
3-6	遊離ヘム/ヘモグロビン混合溶液のヘム定量および存在比の算出	45
3-7	疑似便に含まれるヘモグロビンの定量	47
第4章 考察 49		
4-1	HO-1 変異体を応用して作製した蛍光検出型ヘムセンサーの特徴	49
4-1-1	高感度ヘムセンサーを設計するための条件	49
4-1-2	ヘム滴定時のスペクトル変化およびフィッティング解析から求めた K_d	50
4-1-3	ヘムセンサーのリガンド選択性	54
4-1-4	マイクロプレート測定系の特徴とメリット	55
4-1-5	既存の定量法および提案されている protein-based ヘム定量法との比較	56
4-1-6	ヘムセンサーの改良研究について	59
4-2	変性ヘモグロビン由来の遊離ヘム定量からわかること	61
4-3	混合モデル試料測定で示された存在比決定法の有用性と課題	62
4-4	疑似便のヘム抽出液から求められたヘモグロビン濃度とその精度	63
第5章 展望 67		
5-1	ヘムセンサー定量法の応用例	67
5-2	ヘムセンサーを利用した新規医療診断技術の提案	68
5-3	細胞内遊離ヘムに関する研究と <i>in vivo</i> 定量法への展開	71

5-3-1	細胞内遊離ヘム濃度分布とその調節メカニズム	71
5-3-2	遊離ヘムと疾患の関連性	72
5-3-3	遊離ヘムの生理調節機能	74
5-3-4	遊離ヘムの <i>in vivo</i> 定量法実現に向けて	76
第6章 結語		78
謝辞		81
参考文献		82

略語表

Amp	Ampicillin
ALAS	δ -Aminolevulinate synthase
ANS	2-Anilinonaphthalene-6-sulfonic acid
A350	Alexa Fluor 350
A350MI	Alexa Fluor 350 C ₅ -maleimide
A555	Alexa Fluor 555
A555MI	Alexa Fluor 555 C ₂ -maleimide
BCA	Bicinchoninic acid
BVR	Biliverdin reductase
CBB	Coomassie brilliant blue
CO	Carbon monoxide
CPR	NADPH-cytochrome P450 reductase
<i>cytb</i> ₅₆₂ -EGFP	Apocytochrome <i>b</i> ₅₆₂ and enhanced green fluorescent protein
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
Hb	Hemoglobin
hHb	Human hemoglobin
HO-1	Heme oxygenase-1
HO-2	Heme oxygenase-2
HRP	Horseradish peroxidase
<i>K</i> _d	Dissociation constant
MIANS	2-(4'-Maleimidylanilino)naphthalene-6-sulfonic acid sodium salt
<i>n</i>	Stoichiometry
NO	Nitric monoxide
PCR	Polymerase chain reaction

PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
PPIX	Protoporphyrin IX
ROS	Reactive oxygen species
SD	Standard deviations
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
WT	Wild type
Zn-PPIX	Zinc protoporphyrin IX

第1章 序論

1-1 ヘムの性質と生理的役割

ヘム (heme) はポルフィリンと鉄イオンからなる錯体の慣用名である。ヘムには多くの種類があり、その構成成分に由来した慣用名がついている。例えば、ポルフィリンの構造の違いから、ヘム A、ヘム B、ヘム C などがあり、これらは細菌から真核生物にまで広く存在する。その他にはヘム D、ヘム O、シロヘムなどがある。一方で、中心金属の鉄イオンの電荷や、それに配位した陰イオンの種類によっても分類され、2 価鉄錯体の場合はフェロヘム (ferroheme)、3 価鉄錯体はフェリヘム (ferriheme)、さらにフェリヘムに Cl^- や OH^- が 1 個配位したものをそれぞれヘミン (hemin)、ヘマチン (hematin) と呼ぶ。特に断りがない場合、一般に“ヘム”と言う時には、生体内に存在する最も代表的なヘム B のことを意味する。したがって、本論文も以降はヘム=ヘム B として論ずる。ヘム B は図 1-1 に示す構造からなり、分子量 616.5 である。プロトポルフィリン IX 骨格を持ち、プロトヘムや鉄-プロトポルフィリン IX とも呼ばれる。そのプロトポルフィリン IX に Fischer 命名法に基づいて番号をつけた場合 1、3、5、8 位にメチル基、2、4 位にビニル基、そして 6、7 位にプロピオン酸基を持っており、これらの置換基がヘム B の化学的性質に起因している。また、ピロール核を連結するメチン炭素を *meso* 位と呼び、それぞれを α 、 β 、 γ 、 δ と識別する。

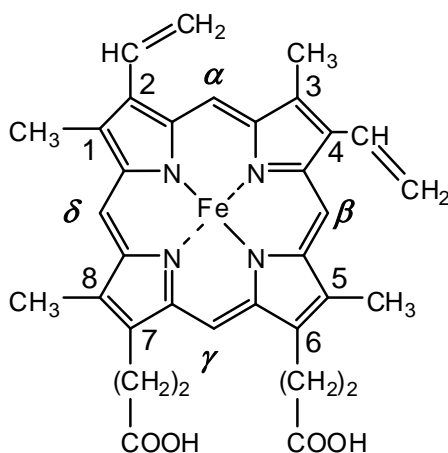


図 1-1 ヘム B の構造と Fischer 命名法による番号付け

表 1-1 ヘム蛋白質の主な種類と機能および補欠分子ヘムの役割¹⁾

ヘム蛋白質(酵素)	蛋白質機能	ヘムの役割
Hemoglobin	赤血球にあり酸素運搬	酸素運搬
Myoglobin	筋肉中での酸素貯蔵	酸素運搬
Catalase	過酸化水素の分解	酸化還元
Peroxidase	過酸化水素の還元	酸化還元
Nitric oxide synthase	一酸化窒素合成	酸化還元
Cytochrome P450	一原子酸素添加・解毒	酸化還元・電子伝達
Cytochrome <i>b</i>	電子伝達系のメンバー	電子伝達

生体内に存在するヘムの主な生理的役割は、ヘム蛋白質の補欠分子族として機能することである（表 1-1）。ヘムはグリシンとスクシニル CoA を原料として、ミトコンドリアで生合成される。その反応経路の詳細については本論文では割愛するが、8段階の酵素反応を経て合成され、ミトコンドリア外に運ばれて各種アポヘム蛋白質と結合し、その後ヘム蛋白質の構造の一部となって機能する¹⁾。例えば、生体内で最も多く存在するヘム蛋白質のヘモグロビン（Hb）は、体重 70 kg の成人男性の体内に約 700 g 存在し、そのうちの 0.8%が毎日分解・補充されていることから（Hb の寿命は 3 ヶ月程度）、細胞内では活発にヘムの生合成や輸送、代謝が行われている²⁾。また、ヘム蛋白質は生体内で普遍的に存在し、呼吸、エネルギー産生、化学反応プロセッシングなど多種多様な生理機能に関与していることから、ヘムは生体必須色素のひとつとして認識されている^{2,3)}。ヘム蛋白質は機能的観点より、①酸素運搬体、②酸化還元酵素、③電子伝達体の 3 種類に分類されるが、近年ではヘム鉄に酸素、一酸化炭素（CO）、一酸化窒素（NO）などのガス分子が結合することで細胞内シグナル物質となり、それがきっかけとなって特定の生理作用を引き起こす役割を持つセンサー蛋白質も同定されている^{4,5)}。これらの機能や反応は全てヘムの中心金属である鉄の化学的性質に由来したものである。やがてヘム蛋白質が自身の寿命を迎えると、その分解過程で結合していたポリペプチド鎖からヘムが放出される。このヘムは直ちにヘム分解系で代謝されるが、それによって鉄イオンが発生し、フェリチンなどの蛋白質によって回収・貯蔵・輸送されて再びヘム生合成などに使われる。ヘム蛋白質から放出さ

れた後のヘムは、生体内の鉄を確保するためのリサイクル資源として利用されている。

ヘム蛋白質の補欠分子族として存在するヘムを蛋白質結合ヘム (protein-bound heme) とすると、ヘム蛋白質の分解後 (溶血など赤血球中の Hb 崩壊も含まれる) に細胞質や血漿へと放出されたヘム、すなわち他の蛋白質などと結合せず単独で存在しているものを区別して遊離ヘム (protein-unbound heme) もしくはフリーヘム (free heme) と呼ぶことがある。遊離ヘムはヘム蛋白質の崩壊以外にも、細胞内に強い酸化ストレスがかかるような状況下でも発生する^{6,7)}。さらに遊離ヘムは、単純な無機鉄イオンと区別する場合に有機鉄と呼ばれ、疎水 (脂溶) 性が高く、pH が中性付近の環境下では水に難溶で、空気中の酸素と反応して二量体 (dimer) や凝集体形成を起こしやすい。一方で、アルカリや界面活性剤を含む溶液、ジメチルスルホキシド (DMSO) やジエチルエーテルなどの有機溶媒に可溶である。特に 2%塩酸を含む酸性アセトン溶液には良く溶け、数日間は安定にヘムを保存できるため、ヘムを含む測定対象試料からヘムを遊離させ溶媒側へ抽出するための処理液として用いられる (酸性アセトン処理法)^{8,9)}。また、生理条件下ではヘム分子の外殻を形成しているプロトポルフィリン IX のプロピオン酸基からプロトンが電離して負に帯電する。中心の鉄は空気中では 3 価の状態である。

遊離ヘムは細胞内で過剰に存在すると細胞毒性を誘発する有害な物質である。その主な理由は、遊離ヘムによりフェントン反応 (Fenton reaction) が引き起こされるからである。この反応は、鉄が過酸化水素 (H_2O_2) を水酸化物イオン (OH^-) とヒドロキシルラジカル (OH^\bullet) に分解する反応で、このフリーラジカルは強い酸化力を有することから、活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) の一種と認識されている。 H_2O_2 は生体内のエネルギー産生など様々な反応に伴って発生し (通常はカタラーゼなどによって制御される)、ROS は核酸、脂質、蛋白質などに対して酸化的ダメージを与えるため、深刻な遺伝子・細胞傷害を招く恐れがある。また、それに伴ってアポトーシスのへ誘導が活発化する^{2,7,10)}。したがって、遊離ヘムは細胞内で ROS の発生源となる有害な分子とみなされるため、その濃度制御や輸送については厳密にコントロールされている^{2,10,11)}。

1-2 ヘム分解系

細胞内のヘムは、小胞体に存在するヘム分解系で分解される。そのシステムは、遊離ヘムと、小胞体膜蛋白質である酵素ヘムオキシゲナーゼ (Heme oxygenase, HO) が結合することから始まり、同じく小胞体膜に存在する NADPH-シトクロム P450 還元酵素 (NADPH-cytochrome P450 reductase, CPR) から電子の供給を受け、酸素依存的にヘムを分解して鉄、CO、ビリベルジン IX α を生成する。さらに、ビリベルジン IX α はビリベルジン還元酵素 (Biliverdin reductase, BVR) により還元されてビリルビン IX α となる (図 1-2) ^{2,12,13}。この分解系で、HO は一連の反応の律速酵素であるが、ヘムを分解する過程で CPR と BVR と直接結合し、電子や基質であるヘムの受け渡しを行っている。しかし、これまでにこれら三者の酵素が同時に結合し複合体を形成するといった実験的証明はなされていない。すなわち、ヘム分解系を形成する HO/CPR/BVR の酵素間には、基質結合や生成物解離に応じて三者が秩序よく結合・解離する精緻な機序が備わっているものと考えられる。ヘム分解系の主な役割は、細胞内のヘム代謝や鉄の回収であると考えられてきたが、近年ではヘム分解の代謝産物についての生理的意義が注目され、研究が進められている。例えば、ヘムが分解されると 1 分子の CO が発生し細胞内へと放出されるが、これは生理的に CO を生成する唯一の反応であり、それが抗炎症作用や細胞増殖作用、抗アポトーシス作用などに関わるシグナル伝達分子として作用することが知られるようになった ^{2,5,6}。また、ビリベルジンやビリルビンには抗酸化活性による細胞保護効果が報告され、酸化ストレスから組織を保護する働きがあると考えられている ^{2,6}。

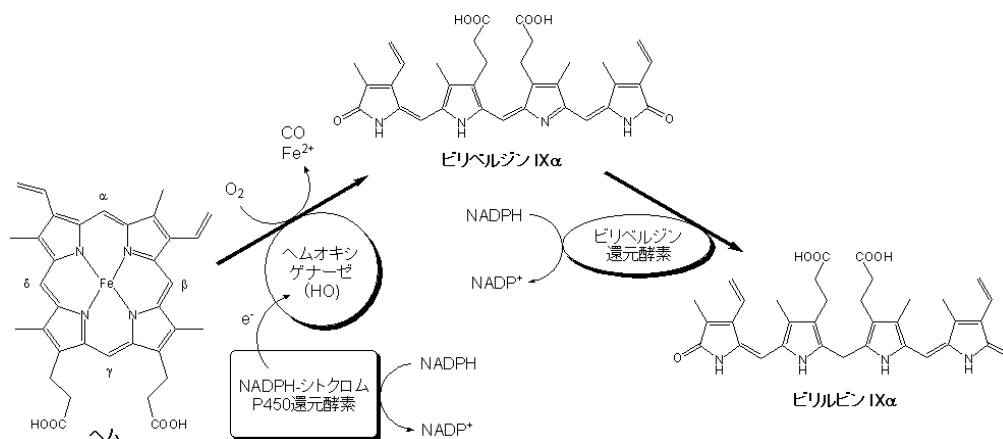


図 1-2 哺乳類におけるヘム分解系とその代謝産物

1-3 ヘムオキシゲナーゼの構造と特徴

ヘムオキシゲナーゼ (E.C. 1.14.99.3) には異なる遺伝子よりコードされる 2 つのアイソザイムが存在する。脾臓や肝臓に多く存在し、細胞内のヘム濃度上昇や、外来からの重金属や化学物質などの流入、酸化ストレスやヒートショックなどの刺激によって発現が誘導される HO-1 と、脳や神経系などに多く見られ、発現がヘム濃度や刺激によって誘導されない構成型の HO-2 が存在する。どちらも小胞体膜に存在し、分子量は HO-1 が約 33 kDa で HO-2 が約 36 kDa である^{12,14)}。両者の酵素活性や基質ヘムとの親和性に差は無く、触媒作用機序は同一と考えられている。また、アミノ酸配列上の相同性は 43% であるが、HO-2 には N 末端側に塩基性に富む伸長配列と、C 末端側の延長領域に HO-1 には見られない Cystein-Proline 残基からなる 2 箇所のヘム調節モチーフ (Heme regulatory motif, HRM) が存在する^{12,14)}。これら 2 つのアイソザイムの構造上の違いと生理的意義との関係は解明されていない。

本論文の実験では HO-1 のみを取り扱っているため、以降は HO-1 についての詳細を述べる。哺乳類 HO-1 の cDNA はこれまでにラット、ヒト、マウス、ブタなどから分離されている。蛋白質精製については、以前までは直接動物の脾臓や肝臓から精製していたが、近年では遺伝子工学的な手法の進歩により、大量発現・宿主選択的精製法が確立し、容易で安価に得られるようになった。また、突然変異やリコンビナントあるいはキメラ HO-1 を用いた研究も数多く行われ、これまでの HO-1 の構造解析や反応機構解明に大きく貢献している。

先に述べたように、HO-1 は遊離状態のヘムと結合して、酸素依存的に分解する酵素である。本来ならば、以降にヘム分解反応メカニズムの解説を行うべきであろうが、これについては吉田や松井らによる総説^{14,15)} に詳しく述べられているので、本論文では割愛した。

HO-1 に関する構造生物学的研究は近年、急速な進展を遂げている。HO-1 は主に 8 つのヘリックスから構成される単純蛋白質であり、酵素活性化のための補欠分子族を含んでいない。しかし、本酵素の基質であるヘムが自らの分解反応のための補欠分子族としての役割も果たしているという点で、他に例を見ない独特の機構を持っている。哺乳類 HO-1 のうち、現在までにヒトとラット由来の蛋白質構造が X 線結晶解析より明らかとなっている。図 1-3 にラット由来 HO-1 の立体構造とアミノ酸配列を示す。

ヘムは HO-1 と結合し複合体 (holo 型) を形成しているときには、その半分を溶媒にさらすようなかたちで proximal helix と distal helix から挟まれている。また、proximal helix 上にある配位子の His-25 によりヘムの位置が決められる。さらに、ヘムの分子内にある 2 つのプロピオン酸基は Lys-18、Lys-179 および Arg-183 と静電的に相互作用しており、これらが基質認識部位となってヘムの結合ポケット内での方向を決定している¹⁶⁾。一方、apo 型では proximal および distal helix の構造が崩れており、holo 型構造と大きく異なるが、その他は両者共にほぼ同じであり、Lys-179 や Arg-183 の側鎖構造も保持されていた¹⁷⁾。これらのことから、ヘムの HO への結合は、まず静電的相互作用によって始まり、その後ヘムポケットが形成されるという誘導適合モデルが提唱されている¹⁷⁾。興味深いことに、野生型 HO-1 には Cys 残基が 1 つも存在しない。これはラットとヒト両方に共通している。また、HO-1 とヘムの複合体は溶液中で安定性が高く、ヘム分解反応に必須な電子を供与する還元剤が共存しない限りはヘムの分解や解離は起こらず、複合体を形成したままである。これは HO-1 が基質ヘムに対して高い親和性を持って結合していることに起因する¹⁸⁾。しかし、現在のところ正確な HO-1 のヘム親和性は決定されていない。

その他、ヘムポケット内の立体構造、ヘム分解までの特異的な反応メカニズム (α -meso 位選択的水酸化から開環反応までの反応ステップ)、ヘムポケットから CO やビリベルジンが解離する仕組みなどについての詳細も明らかとなってきた。それらについては坂本や杉島の総説に詳しく解説されている^{19,20)}。

1-4 ヘム定量法の必要性

近年では、様々な生体試料に含まれるヘムを測定し、その濃度や分布を明らかにする研究が盛んである。それに伴って、測定対象に含まれるヘムを正確に定量するための技術が必要となってきた。現状では *in vitro* で一般的に使用されるヘム定量法は確立されておらず、ほとんどの研究者は吸収法を原理としたヘム測定法もしくは市販されているヘム定量用キットを用いている (原理等は次項参照)。しかし、それらの方法にはヘム検出感度の低さをはじめとする様々な課題が存在するため、測定試料の種類によってはヘム定量が困難な場合がある。よって、簡便かつ高感度に測定できる画期的な *in vitro* ヘム測定系の開発が望まれている。

この細胞や組織などの生体試料に含まれる遊離ヘムあるいは総ヘムの濃度・分布を正確に測るための技術は、分子生物学の研究のみならず、様々な研究分野において非常に有用なツールとなることが期待される。例えば、血液や便などの一般生体試料や、単離・培養された病変細胞や組織などについてヘム定量を行うことで、病理診断や治療効果の検証などに役立つと考えられる。一方で、製薬研究分野などで盛んに行われているモデル動物を使った非臨床系の実験においても、その動物の生体のコンディションをモニタリングするときの指標として、血中や便中のヘム濃度を測定する必要がある。よって、ヘム定量技術は基礎・臨床医学分野における診断法の研究開発でも役立つ。

1-5 既存のヘム定量法とその特徴

溶液試料中のヘム濃度を測定する一般的な方法として、ピリジン-ヘモクロモゲン法が知られている。本法の測定原理は、アルカリ条件化でヘム分子の第5および第6配位座にピリジンを配位結合させた錯体（ヘモクロム）を形成させ、それを $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ （ジチオナイト）などの還元剤を用いて還元型錯体（フェロヘモクロム）にしたときに現れる可視光領域の吸収から溶液中のヘム濃度を算出するものである^{21,22}。ヘムBのピリジン-ヘモクロム錯体の還元型は557 nm付近に α 帯の極大吸収を示すため、未知濃度のヘム試料をピリジン/NaOH溶液と混合してジチオナイトを添加・混合したものの557 nmにおける吸光度とモル吸光係数からヘム定量することができる²²。このピリジン-ヘモクロモゲン法はヘムを使用する実験系での濃度決定法として最も多く利用されている方法であるが、これは吸収法を原理としていることから、ヘム検出感度が低いという課題がある。測定条件を工夫して検出限界濃度を稼いだとしても μM オーダーでの定量が限界であり、これより低濃度範囲の定量値の信頼性は低い。また、本法は557 nm付近の吸収極大における吸光度から濃度を算出するが、測定対象となる未知試料の中にもこの吸収波長と重複するような吸収をもつ夾雑物が含まれているような場合は、その試料からあらかじめヘムを抽出する操作が必要となる。その他にも、ヘモクロム錯体を還元・発色させたものは経時的に測定値が変化するため、同じ試料を定量しても測定者によって結果が異なることが考えられる。加えて本法は、毒性の高いピリジンを使用することや、一度の測定につき多量の試薬や測定試

表 1-2 吸収法によるヘム定量の原理と特徴

	ピリジン-ヘモクロモゲン法 ^{21,22)}	メタノール-界面活性剤法 ^{23,24)}	ペルオキシダーゼ反応による測定法 ²⁴⁾
検出原理	ピリジン-ヘモクロモゲン錯体を還元させたときに現れる極大吸収波長の吸光度とモル吸光係数より濃度を算出	メタノール-界面活性剤混合溶液にヘムを含む測定試料を溶解した時に現れる吸収ピークとモル吸光係数で定量	ヘムのペルオキシダーゼ活性により、無色の反応基質を有色の化合物へと変化させた分の吸光度から濃度を決定
検出範囲	50 μ M ~	33 ~ 2100 nM	4 ~ 130 nM
反応時間	1 min/sample	1 min/sample	30 min/sample
特徴	<ul style="list-style-type: none"> ● 感度が低く、時間変化する ● 夾雑物の影響受けやすい ● 毒性が高い試薬を使用 ● 一度に多量の試料が必要 ● ヘム蛋白質は変性する (遊離ヘム濃度測定不可) 	<ul style="list-style-type: none"> ● 基本的には混合液に試料を入れて測定するのみ ● 夾雑物や他のポルフィリン体の影響を受ける ● 遊離ヘムと蛋白質結合ヘムの区別ができない(遊離ヘムのみの測定不可) 	<ul style="list-style-type: none"> ● 操作が煩雑で反応時間が長く、強酸を使用 ● 反応終了から測定までの時間が定量値に影響 ● ペルオキシダーゼ活性をもつ夾雑物(ヘム蛋白質)が混在すると影響を受ける

料を要するなどの課題があり、生体試料に含まれるヘム定量法としては実用性が低い。

ヘムを吸収法により定量する方法はこのほかにも存在する。それらの特徴を表 1-2 に示した。簡便な定量法として、ヘムはアルカリやメタノールなどの有機溶媒と界面活性剤の混合液に溶かすとそれぞれの溶媒において特異的な吸収ピークが現れるため、その吸光度とモル吸光係数から濃度を求める方法がある²³⁾。また、近年考案された方法ではヘムの偽ペルオキシダーゼ活性を利用した定量法がある。その原理は、測定試料にペルオキシダーゼ基質と H_2O_2 を加えてペルオキシダーゼ反応を起こし、強酸を加えて反応を停止させた後の基質の吸光度からヘム濃度を求めるというもので、数 nM のヘム定量も可能である²⁴⁾。実際にこれらの原理を基にして開発されたヘム分析キットが市販されており、国内でも購入することができる。しかし、ピリジン-ヘモクロモゲン法で問題であった夾雑物の影響や時間依存的な測定値の変化、危険な試薬の取扱いについてはほとんど改善されていない。また、これらの方法で遊離ヘムとヘム蛋白質に結合しているような結合ヘムが混在する測定試料を定量する場合、酸・アルカリ、ピリジン、有機溶媒、界面活性剤などの影響でヘム蛋白質が変性し、結合していたヘムが遊離する。よって、遊離ヘム濃度が過大評価されてしまい、試料中の

表 1-3 様々なヘム定量法の原理と特徴

	吸収法 ²¹⁻²³⁾	蛍光法 ²⁵⁾	化学発光法 ^{26,27)}
検出原理	ピリジン-ヘモクロモゲン錯体やヘムを有機溶媒等に溶解させたときに現れる極大吸収帯から濃度を算出	蛍光ラベル化したアポ型のヘム結合性蛋白質と遊離ヘムとの結合に伴って起こる蛍光強度変化をもとに定量	遊離ヘムとアポHRPが結合・再構成して示すペルオキシダーゼ活性を化学発光で検出しその強度から濃度を決定
検出範囲	μM	nM	pM
反応時間	1 min/sample	1 min/sample	30 min/sample
特徴	<ul style="list-style-type: none"> ● 感度が低く、時間変化する ● 夾雑物の影響受けやすい ● 毒性が高い試薬を使用 ● 一度に多量の試料が必要 ● 遊離ヘムの識別定量不可 	<ul style="list-style-type: none"> ● 蛍光ラベル化した蛋白質と混ぜて蛍光測定するのみ、多サンプル測定可能 ● 夾雑物や遊離していないヘムとは結合せず蛍光強度変化しない ● ラベル化した蛍光団と同じ蛍光波長を持つ試料は測定値に影響する 	<ul style="list-style-type: none"> ● 高感度定量法で多サンプル測定でき、遊離ヘムの識別定量も可能 ● 操作が煩雑、反応時間が長い、反応終了から測定までの時間が値に影響 ● ペルオキシダーゼ活性をもつ夾雑物が多量に混在すると影響を受ける可能性有

遊離ヘムのみを識別して定量することは不可能である。そこで近年では、吸収法の検出限界の低さやその他の問題を改善した新しいヘム定量法が発明され、表 1-3 に示すような蛍光や化学発光を応用した高感度ヘム検出法が考案されている²⁵⁻²⁹⁾。これらの測定法は、現時点ではアカデミックな測定技術であって開発途上なため、誰もが簡単に試すことができる方法でないものもあるが、検出感度やヘム選択性（夾雑物による影響の回避につながる）の向上は明らかであり、将来的なヘム定量ツールとして期待されている。各定量法の具体的な原理や特徴については 4 章で述べる。

1-6 研究目的

生体組織とヘムの関係を探る研究の進展に伴って多くの研究開発分野で必要とされているヘム濃度を定量するための技術は、近年の開発により進歩を遂げていることは間違いない。しかし、現状ではヘム定量を行うに当たって懸念される課題や問題点をすべてクリアしたようなオールマイティーな定量法は確立されていない。そこで本研究では、今までに考案されていない *in vitro* ヘム定量法の開発を目的とした。開発

表 1-4 開発するへム定量法の目標および既存技術との比較、問題点解決のポイント

	目標	既存技術(へモクロム吸収法)	既存技術の問題点	解決のための技術上のポイント
へム検出感度	～ nM	～ μM	へモクロム錯体のモル吸光係数が低い	HO-1の高いへム結合親和性を利用、蛍光法によりへムを検出
選択性	へムのみと強く結合し検出できる	夾雑物による吸収も一緒に検出される	へモクロム錯体の吸収が可視領域(557 nm)にある	HO-1が示す基質特異性を利用(※1)
安全性	測定時に危険な試薬を使用しない	測定時に高濃度アルカリ、有機溶媒などを使用	測定時に危険な試薬を取り扱わなければならない	HO-1が安定に存在できる中性緩衝液を使用した測定系にする(※2)
主な測定方法と測定に必要な試料量	石英セル以外の方法で10 μl以下	石英セルで1サンプルずつ測定50 μl以上使用	測定のために多量の試料が必要	96穴マイクロプレートを使った測定系への適用を検討
遊離へムと蛋白質結合へムの区別	可能	困難	測定試薬により蛋白質が変性する	上記※1と※2の性質から遊離へムのみを検出

する定量法の達成すべき目標は、へム検出感度において、既存の吸収法よりも高感度であることが絶対条件であり、nM オーダーのへム定量を可能とする。これに加えて、夾雑物の影響を受けにくくへム選択性の高い方法であることや、測定のための操作が簡便・迅速で、安全な測定法であることが望ましい。また、様々な生体試料に含まれるへムの測定を想定した実用的な測定系を考案し、近年では主流になりつつある多サンプル高速定量を可能とする High throughput 測定系への適用や病理診断技術への応用が可能となる分析ツールの創出を目指す。表 1-4 に具体的な開発目標を記した。

これらの目標を達成できるへム定量法を考案するに当たって注目したのは、実際に細胞内で遊離へムと特異的に結合し、へム代謝を行っている HO-1 の特性である。本研究より以前から、本酵素が有する遊離へムとの高い結合親和性や選択性をへム検出のためのセンサーとして利用することが発案されていた。また、HO-1 と遊離へムが結合したときのシグナルとして、蛍光の強度変化メカニズムを利用することにより、低濃度領域での結合反応を高感度かつ定量的に認識することができると考えられていた。そこで本論文では、それらのアイデアを基にして、HO-1 を応用した蛍光検出型センサーを作製するための材料の準備と選定、センサー作製後の性能評価、そしてそれを使ったへム定量の実施例などについて報告することとした。このへム検出のための酵素センサーの原理や設計については次項で述べるが、本論の 2、3 章では設

計後、実際にヘムセンサーを作製する方法や、その性能を評価する実験を行った結果について報告する。それに加えて、作製したヘムセンサーで実際に遊離ヘムまたは総ヘム濃度を定量した実施例を示し、既存のヘム定量法との性能比較や、本研究で得られた実験結果がどのような分野に応用できるかなどについて 4、5 章で論ずる。

1-7 蛍光検出型ヘムセンサーの設計とその特徴

本研究により創出する蛍光検出型ヘムセンサーは、測定試料中に存在する遊離ヘムと結合したときに起こる応答シグナル強度変化、すなわち蛍光強度の変化から試料に含まれるヘム濃度を決定するという原理である。では、どのようにしてヘムセンサーと遊離ヘムの結合を蛍光強度変化に反映させるのかというと、それにはエネルギー移動 (Energy transfer) を利用する。この現象は、ある 2 種類の分子が一定の距離内 (一般的には 10 nm 以内といわれる) に存在しているとき、特定の波長の光を照射することで励起した片方の分子 (Donor 分子) が発する蛍光エネルギーをもう片方の分子 (Receptor 分子) が吸収し二分子間でエネルギーが移動するというものである。ただし、Donor 分子が放出する蛍光波長と Receptor 分子の吸収帯波長が重なることが前提である。つまり、蛍光と吸収の両波長のピークが重なり合っていなければならず、一方で、両者の波長の重なりが大きい程、高効率でエネルギー移動が起こる。ちなみに、近年の分子生物学研究分野において、分子間相互作用を調べるための手法としてよく用いられている FRET (Fluorescence resonance energy transfer) も同じ原理である (FRET の場合は Receptor 分子が Donor 分子より受け取ったエネルギーで励起し、Donor 分子とは異なった蛍光波長が観測される)。そこで、本センサーでも遊離ヘム検出時にこの現象が 1 つのヘムセンサー分子内で起こるようにする。つまり、センサーに導入されている蛍光団と結合した遊離ヘム分子との間でエネルギー移動が発生する条件を満たすように分子設計を行う必要がある。このストラテジーが成立すれば、センサーはヘムと結合していない場合 (ヘムが測定試料中に存在しない時) は励起光によって蛍光を発するが、ヘムと結合している場合 (ヘム検出時) はその蛍光団の近くに存在するヘム分子に放出した蛍光エネルギーを吸収されるため、観測上では蛍光消光 (Fluorescence quenching) が起こる (図 1-4)。なお、ヘム分子はエネルギーを吸収しても蛍光を示さず、発熱と振動に使われる。したがって、ヘムが測定

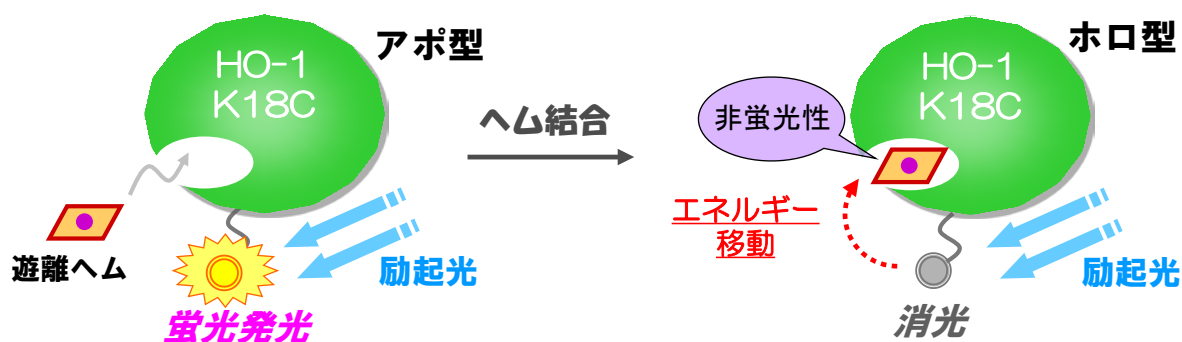


図 1-4 蛍光ラベル化した HO-1 変異体蛋白質を用いたセンサーにおけるヘム検出原理
 蛍光ラベル化した HO-1 に遊離ヘムが結合すると、励起した蛍光団の蛍光エネルギーは非蛍光性のヘム分子へとエネルギー移動して消光する。よってアポ型センサーのみが存在するときの蛍光強度と、ヘムと結合して消光したホロ型を含む蛍光強度の差からヘム濃度を決定できる。

環境中に多く存在する程、ヘムセンサー全体から観測される蛍光強度は低下すると考えられることから、ヘム試料を添加する前のセンサー全体の蛍光強度（この値を F_0 と定義する）と測定試料添加後の蛍光強度（ F ）との差（ $F_0 - F$ ）より遊離ヘム濃度の決定を行う。その濃度は既知濃度のヘム標準液を使って作成される検量線より求める。

今回設計する protein-based heme sensor は遊離ヘムをターゲット分子として認識し、直接結合して自らの分子内にある結合ポケットにヘムを保持する役目を果たす蛋白質部位と、ヘム検出の応答シグナルとなる蛍光を発する蛍光団部位で構成される。まず、本センサーの母体となる蛋白質部位は 1-3 項で特徴を述べたラット由来の apo 型 HO-1 を使用する。ただし、ここで使用する酵素は野生型 HO-1（以降、WT と表記）の構造に対して 2 点の改変を加えたものである。1 点目は、C 末端側に本来備わっている膜結合部位を削除した可溶性の蛋白質になっていることである。ラット WT は 289 残基から成る蛋白質であるが、センサーに用いたものは 267 残基である（図 1-3 を参照）。2 点目は、N 末端側から 18 番目の Lys 残基について single amino acid mutation を行い Cys 残基に置換した変異体蛋白質（以降、K18C と表記）にすることである。1-3 項でも触れたように、WT の構成アミノ酸には 1 つも Cys 残基が含まれていないが、この変異導入を行うことで HO-1 分子内の proximal helix 上に唯一の Cys が存在する蛋白質となる。なお、これらの改変を施した変異体 K18C におけるヘム結合親和性への影響などについては第 3、4 章で述べる。

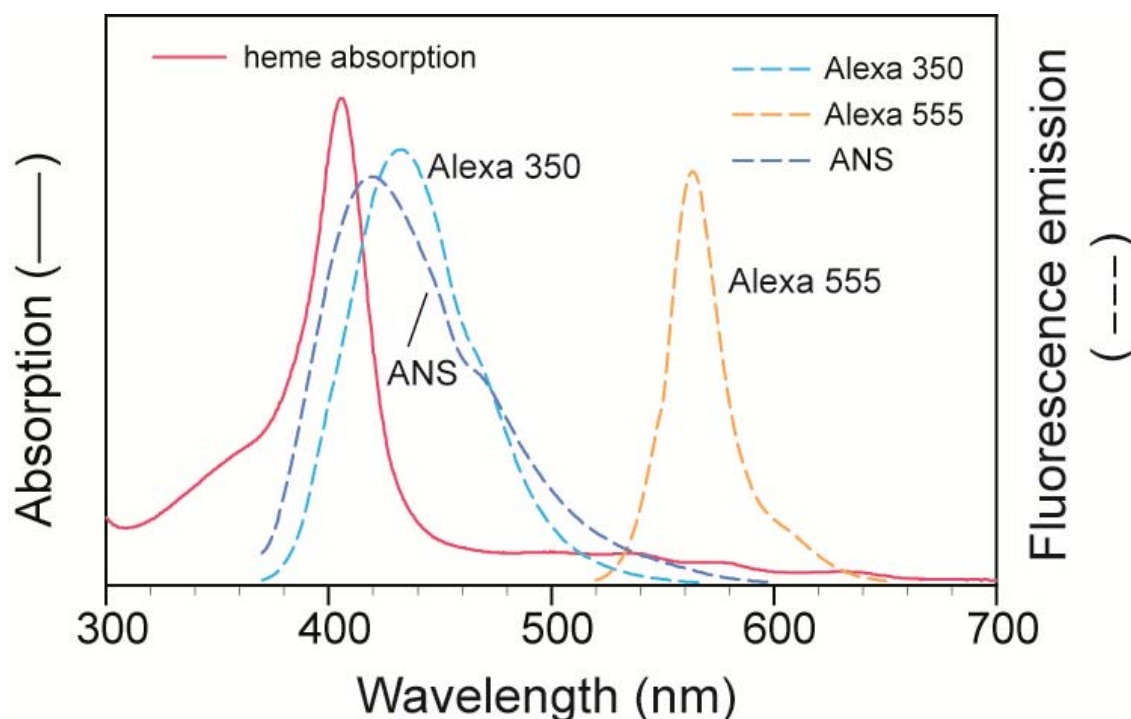


図 1-5 HO-1-ヘム複合体の吸収スペクトルと蛍光色素の標準化した蛍光スペクトル
赤実線はラットHO-1-ヘム複合体における吸収スペクトル、その他3つの破線は
ヘムセンサー作製時に蛍光ラベル化に使用した蛍光色素の標準化した蛍光スペ
クトルを示す。各色素の名称や特徴は次章の2-1項を参照。

次に、蛋白質に蛍光団を導入して蛍光ラベル化するための蛍光色素の選定条件につ
いて考えた場合、第一にヘムの吸収ピーク帯との重なりが大きくなる蛍光色素を採用
する必要があり、これがヘムセンサーの検出感度に直接影響する。図1-5内の赤実線
はHO-1-ヘム複合体の吸収スペクトルを示しており、ヘムセンサーが実際にヘムと
結合している状態の吸収ピーク帯となる。特に405 nm付近の吸収極大は、ヘム蛋白
質の配位子とヘムとが結合し複合体を形成したときに現れる固有の吸収で、これはソ
ーレー吸収帯 (Soret band) と呼ばれる。この吸収帯と大きく重なるような蛍光波長
を示す蛍光色素を選択すると、ヘム結合時のエネルギー移動効率が良くなり、その応
答シグナル、すなわち蛍光消光の度合いが大きくなり、結果として微量のヘム濃度検
出に対しても高い応答性を示すセンサーとなる。そこで、本研究では図中の点線で示
している3種類の蛍光色素を候補とし、それぞれの色素で蛍光ラベル化したセンサー
を作製して最適な色素の種類を検討した。これらの蛍光色素の特徴や各センサーの評
価および選定結果については第2、3章に記した。

センサーの母体となる HO-1 への蛍光色素導入は、マレイミド基 (maleimide) を介したチオールカップリング反応によって行う。これにより、蛍光色素を蛋白質のチオール基部位、つまり Cys 残基のところへ位置選択的に 1 分子導入することが可能である。また、この反応は適切な条件化で反応を行うと反応性が高く、安定なチオール結合を形成するため、今回の HO-1 の蛍光ラベル化のようにほぼ全ての分子に対して確実に官能基を conjugation させたい場合に有効である。したがって、前述した HO-1 変異体である K18C と、市販のマレイミド修飾された蛍光色素を用いて蛍光ラベル化することで、18 番目の Cys 残基の側鎖にマレイミド基を介して蛍光団を有するヘムセンサーが得られる。なお、この Cys-18 の側鎖はヘム結合ポケットがある方向と逆で溶媒側を向いているため蛍光団を導入するのに都合が良い環境である。この蛍光ラベル化した K18C にヘムが結合すると、図 1-6 に示すような分子構造になると考えられる。このときの蛍光団とヘムとの間の直線距離を立体構造モデリングソフト上で予測するとおよそ 3~4 nm となり、両分子間でエネルギー移動が起こるための距離条件を満たしていることがわかった。以上の条件を踏まえて蛍光ラベル化 HO-1 を作製し、それに既知濃度のヘム溶液を滴定したときの蛍光スペクトルや蛍光強度を測定して得られるヘム添加濃度と蛍光強度変化の関係から、センサーのヘム結合親和性解析や未知試料に含まれるヘム定量を行うことができる。

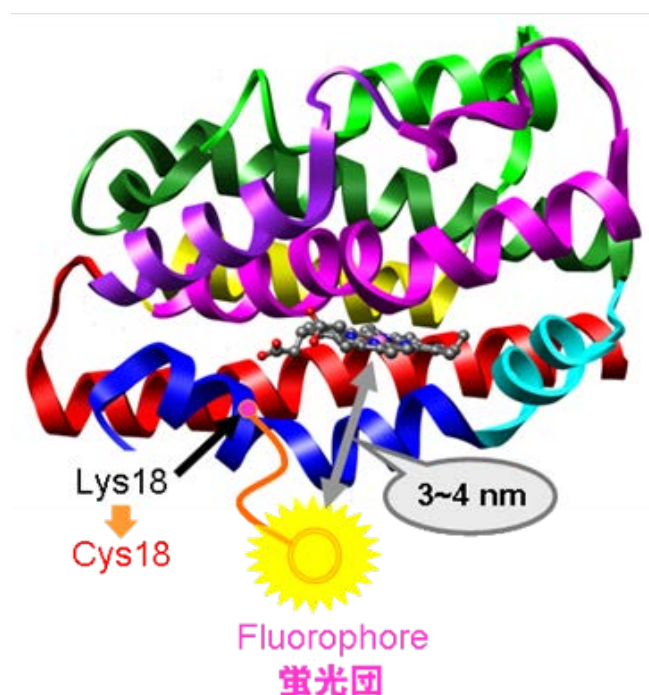


図 1-6 蛍光ラベル化したラット HO-1 K18C-ヘム複合体の立体構造
中央ポケット内の ball-and-sticks で表されたものが結合したヘム。ヘムと蛍光団との間の距離はモデリングソフト上での予測値。構造は Protein Data Bank code 1DVE のデータを引用した。

第 2 章 実験材料および実験方法

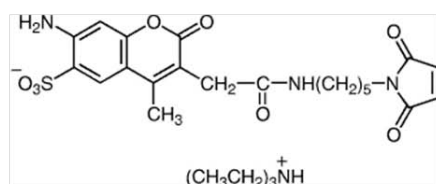
2-1 試薬、材料類

蛋白質の精製や蛍光色素の導入操作、ヘム抽出・測定などの実験に用いた試薬類のうち、ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT)、2-メルカプトエタノール、アセトン、ピリジン、ジチオナイト、硫酸第一鉄 (FeSO_4) は和光純薬工業から購入した。ヘミン、プロトポルフィリン IX (Protoporphyrin IX, PPIX)、亜鉛-プロトポルフィリン (Zinc protoporphyrin IX, Zn-PPIX)、ビリベルジン IX α はシグマ-アルドリッチジャパンより購入したものを使用した。これらすべての試薬のグレードは、特級試薬もしくは分析用試薬を用いた。K18C 変異体蛋白質を蛍光ラベル化するためのチオール反応性蛍光色素は、Invitrogen より市販されているマレイミド修飾蛍光色素の中から 3 種類を選択した。その蛍光色素は、Alexa Fluor 350 C₅-maleimide (A350MI)、2-(4'-maleimidylanilino)naphthalene-6-sulfonic acid sodium salt (MIANS)、Alexa Fluor 555 C₂-maleimide (A555MI) である。各蛍光色素の物性や特徴を表 2-1 に示した。この表において、蛍光団構造とは、マレイミド基とそれに続くリンカー以外の蛍光団の基本骨格となっている化合物を指す。色素の特徴については、メーカーカタログ等から引用した。また、表にある励起/蛍光波長はメーカーカタログに記載されている各蛍光色素の最大励起・蛍光波長とは異なり、励起波長が蛍光波長に重なって測定に影響しないようにするなどの適切な測定条件を検討した上で決定した励起波長と蛍光強度が最大となる波長を示している。モル吸光係数もメーカーが公表している値ではなく、フリーな状態の蛍光試薬を水で適切な濃度に希釈して測定したときの最大吸収波長における吸光度から求めたモル吸光係数を採用した。表下に A350MI と MIANS の化学構造を示した。A555MI の構造は公表されていないため掲載していないが、励起・蛍光波長の特徴から判断するとその構造はテトラメチルローダミン誘導体であると考えられる。また、A350MI と A555MI にはマレイミド基と蛍光団の間に直鎖状炭素からなるリンカーが組み込まれている。

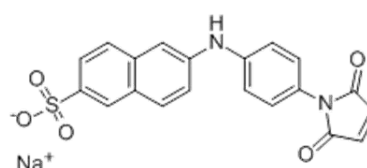
蛍光マイクロプレートリーダーを用いた測定系では、蛍光測定用の 96 穴ブラック平底マイクロプレートを使用した。本研究での実験データは全て Nunc low binding

表 2-1 蛋白質(K18C)の蛍光ラベル化に用いた色素の構造と特徴

蛍光色素略称	蛍光団構造	色素の特徴	励起/蛍光波長 (nm)	モル吸光係数 (cm ⁻¹ M ⁻¹)	K18C導入後センサー略称
A350MI	スルホン酸化クマリン	親水性 C ₅ リンカー有	353/430	17,000	K18C-A350
MIANS	アニリノナフタレンスルホン酸	疎水性 リンカー無	325/428	24,000	K18C-ANS
A555MI	テトラメチルローダミン	親水性 C ₂ リンカー有	545/564	158,000	K18C-A555



Alexa Fluor 350 C₅ maleimide
(Life technologies websiteより引用)



2-(4'-maleimidylanilino)naphthalene
-6-sulfonic acid sodium salt
(Chemical Book websiteより引用)

plate (245393) を使用した測定結果となっている。このプレートは各ウェルの表面にポリマーコーティング加工が施されており、ウェルプレートの素材であるポリスチレンと対象試料に含まれる蛋白質や抗体、あるいは疎水性が高い物質との非特異的な吸着を防止できるものである。本研究で用いるヘムや蛋白質をベースとしたセンサー（ラベル化に使用している蛍光色素にも疎水性構造を持つものがある）とプレート表面との相互作用による影響を可能な限り軽減するため、本製品を測定の推奨プレートとして採用した。本プレートは現在 Thermo Scientific から販売されている。以前は同メーカーのポリマーコーティングされていない通常プレートを使用していたが、ヘムを加えた後の蛍光強度測定値が大きくばらついたり、値が変化しなかったりすることがあった。これは添加したヘムがプレート表面に吸着されているためではないかと考え、それを軽減できる上記の low binding plate を使用したところ、この問題を回避することができた。

ヘモグロビン (Hb) 定量試験などで使用したヒト血液由来標準ヘモグロビン (hHb) 試薬は、検査医学標準物質機構が総ヘモグロビン常用参照標準物質 (JCCRM 622) として販売しているもの(血中の Hb 濃度を測定するときの基準となる)を購入した。その hHb の濃度は製品に付随している検査成績書に記載されていた値を採用した。

2-2 HO-1 変異体の設計と発現系の構築

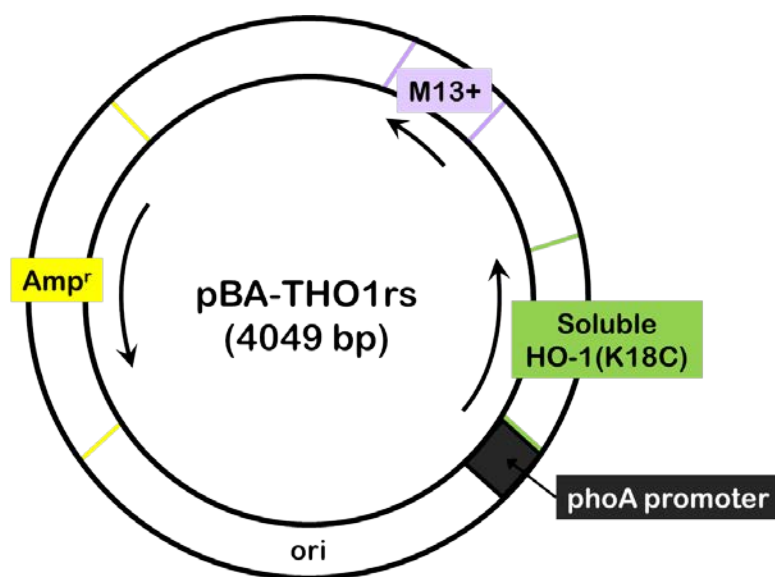


図 2-1 K18C 蛋白質を発現するプラスミドマップ³⁰⁾

Hidakaらが構築したHO-1 WTを発現するためのプラスミドをベースにしているため、*phoA* promoterの他にアンピシリン耐性遺伝子配列をもつ。K18C用に改変後もプラスミド全体のbp数は変わらない。

HO-1 変異体蛋白質 K18C をエンコードするプラスミドは、同蛋白質 WT のプラスミドをテンプレートとし、そのうちの 18 番目のアミノ酸残基を決定するコドンに対して *mutation* を実施し作製することとした。WT プラスミドは Hidaka らによって構築されたもの (pBA-THO1rs) を使用した³⁰⁾。このプラスミドにはベクターに pBAce が用いられている。本ベクターはリン欠乏応答性を示す *pho A* promoter を含んでおり、プラスミドを有する宿主がリン酸欠乏状態に陥ると本プロモーター部位を起点として下流遺伝子の強力な発現誘導が起こる。Hidaka らの構築したプラスミドでは、そのプロモーターのすぐ下流に soluble HO-1 のエンコード配列が組み込まれており、低リン酸培地を用いて宿主の大腸菌を培養することで、本蛋白質を大量発現させることができる。K18C 発現系もこの仕組みをベースとして構築するため、WT のプラスミドを大腸菌から精製し、それに 18 番目のアミノ酸残基に対応するコドンが変異するように設計したプライマーを加えて PCR (Polymerase chain reaction) を行った。WT の Lys-18 のコドンは AAG であり、これを Cys コドン TGC へ変異させるプライマーは sense: 5'-G TCC GAG GCC TTG TGC GAG GCC ACC AAG G-3', antisense: 5'-C CTT GGT GGC CTC GCA CAA GGC CTC GGA C-3' とした (下線部が 18 番目アミノ酸残基コドン)。これらのプライマーはグライナー・ジャパンに依頼して精製されたものを使用した。また、*mutation* の操作方法やそれに使用する試薬の組成や使用

量などは Stratagene QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) に付随したプロトコルに基づいて実行した。PCR は、95 °C, 30 sec → 95 °C, 30 sec → 55 °C, 1 min → 68 °C, 10 min の条件で 16 サイクル反応を繰り返し、そこへ制限酵素 *Dpn I* を添加してテンプレートの WT プラスミドを切断してから、その PCR 産物を宿主となる *Escherichia coli* DH5 α 株 (Competent Quick DH5 α 、東洋紡) へと形質転換した。この大腸菌株から得られたプラスミドの HO-1 エンコード領域を DNA sequencing にて確認したところ、遺伝子改変操作を行った 18 番目のアミノ酸残基に対応するコドンが設計通りに変異していた。よって、図 2-1 に示すような K18C 蛋白質をエンコードするプラスミドおよび大腸菌発現系の構築を確認した。K18C 発現用の大腸菌株はアンピシリン (Ampicillin, Amp) を含む LB 培地で培養し、その培養液にグリセリンを全体積の 20% となるように混合して -80 °C で保存した。

2-3 HO-1 変異体蛋白質の発現と精製

変異体蛋白質 K18C の精製法は、前項の Hidaka らが構築した発現・精製法またはその後に発表された改良法を基礎としているが^{30,31}、本研究で用いた K18C の精製ではいくつかの工程を省き簡略化した。

K18C 蛋白質発現用の大腸菌の培養は前培養と本培養の二段階で行った。前培養は、50 mg/ml Amp 含む LB 培地 3 ml に構築した K18C 発現用 DH5 α 株を植菌し、恒温シェーカーを用いて好気条件下で 16 時間振とう培養 (200 cpm, 37 °C) した。次に本培養は、低リン酸培地 250 ml 当たり前培養液 50 μ l 添加したものを 4 つ準備し (合計 1 L 培養)、恒温シェーカー使用、好気条件で 24 時間振とう培養 (210 cpm, 37 °C) を行った。本培養終了後、遠心分離操作 (6,000 rpm, 10 min, 4 °C) にて菌体を回収し、それを 134 mM KCl/20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で数回洗浄した後、湿重量を量り遠心チューブごと -80 °C で凍結保存した。本培養液を SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis、蛋白質泳動に使用したゲルのポリアクリルアミド濃度は分離ゲル 12.5%、濃縮ゲル 4.5% に設定) に供したところ、30 kDa 付近でバンドが検出された。よって、本培養条件により宿主菌体内でリン酸欠乏応答性の発現誘導が起こり、目的の蛋白質が大量発現していることを確認した。

蛋白質の精製工程は、大腸菌破碎による粗蛋白質液抽出と陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。以降に記す精製過程において使用した緩衝液や溶媒等の全ては、脱気操作を行い、終濃度が 1 mM となるように DTT が添加されている。その理由は K18C に存在する Cys のチオール基が酸化されたり、蛋白質同士でジスルフィド結合を形成したりするのを防ぐためである。これは後の蛍光ラベル化を行う際の導入率に大きく影響する要素であるため、本蛋白質の精製においては重要である。

凍結保存しておいた菌体を常温に戻し、2 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、100 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF、蛋白質分解酵素阻害剤)、リゾチームを含む 50 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethane) -HCl 緩衝液からなるソニケーションバッファを加えて懸濁し、氷上で 30 分攪拌して溶菌させた後に、超音波破碎機 (Tomy, URTRASONIC DISRUPTOR UD-201) を用いて菌体破碎操作 (50 W, 30 sec×10 set on ice) を行った。その破碎処理液を遠心分離 (12,000 rpm, 30 min, 4 °C) して得られた可溶性画分を粗酵素液として陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。陰イオン交換樹脂は TOYOPEARL DEAE-650M (東ソー) を 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したものを使用しオープンカラムに充てん (28×90 mm) した。準備した陰イオン交換カラムに粗酵素液を吸着させ、次に移動相 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) で十分にカラムを洗浄してから (Wash)、250 mM KCl/20 mM Tris-HCl 溶液 (pH 7.4) を用いたリニアグラジエント方式で塩濃度を上げてゆき (0~250 mM) 蛋白質を溶出させた (Elution)。溶出液の回収はペリスタポンプとフラクションコレクターを用いて 8 min eluted sample/fraction (移動相平均流速 1 ml/min) で行った。Wash 時の溶出液と Elution 時の各フラクションについて、260 nm および 280 nm の吸光度を測定してクロマトグラムを作成し、その溶出パターンから 280 nm の吸光度が高いフラクションを選び、それらを SDS-PAGE 分析に適用した。SDS-PAGE 分析では、蛋白質を含むフラクション液とサンプルバッファを等量混合して加熱変性させた試料をゲルにロードして電気泳動し、そのゲルを Coomassie brilliant blue で染色して (CBB 染色) バンドを検出し、各試料の蛋白質純度やメインバンドの分子量を確認した。その分析結果において 30 kDa のシングルバンドを示したフラクションを回収し、分子量 10 kDa カットオフ用の遠心濃縮管 (Centriprep 10K, Millipore) を用いて適量に濃縮し、さらにセルロース製の透析膜 (10 kDa カットオフ) で透析

して脱塩・バッファー交換（1 mM DTT/20 mM リン酸カリウム緩衝液へと置換）を行った。約 24 時間の透析後、得られた精製試料を回収し、その純度を SDS-PAGE および 280 nm/260 nm の吸光度比より確認した。その結果、本実験で作製した K18C 蛋白質の純度はこの時点で十分に高いことがわかったため、それ以上精製操作は行わなかった。よって、透析後の蛋白質試料を最終精製物としてその濃度を決定し、1 ml ずつチューブに分注して-80 °C で保存した。蛋白質濃度は 280 nm における吸光度と apo 型 HO-1 のモル吸光係数（25,900 cm⁻¹M⁻¹）より算出する紫外吸収法と、BCA（Bicinchoninic acid）法を原理とした蛋白質定量キット（Thermo Scientific）により決定した。

2-4 HO-1 変異体への蛍光色素導入とその濃度決定法

2-1 項で示した 3 種類のチオール反応性蛍光色素を使った K18C の蛍光ラベル化の方法は、これらの蛍光色素を購入した際に付随していたマニュアル記載の方法に基づいて実施した。前項の方法で精製し、冷凍保存しておいた K18C 蛋白質溶液を常温で解凍して濃度調整し、80 μM を 1 ml 用意した。それに 10 倍モル量の DTT を加え、37 °C で 30 分間インキュベートしてから（Cys チオール基の活性化）、脱気・窒素置換した 20 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）で透析して蛋白質試料中から DTT を取り除いた。透析時間は合計 4 時間とし、外液の体積は 800 ml で 2 回交換した。透析終了後、直ちに蛋白質溶液をガラスミニバイアルに回収・密閉し、その中へ高純度アルゴンガスを 20 分間送り込んで完全に酸素を追い出した。導入反応に使用する蛍光色素は、まず蛍光色素の原液（MIANS は粉末）に水を加えて溶解（MIANS の場合は色素が疎水性であるため 20%DMSO 水溶液で溶解）し、10 mM ストックソリューションを作製した。次に、一度の導入反応に必要な量（40 μl、これは 1 つの K18C チオール基に対し 5 当量の色素を添加・反応する条件となる）をとり、それに 20 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）を加えて 300 μl としたものを用意した。これを先の蛋白質試料へ攪拌しながらゆっくりと添加し、室温（22~28 °C）、アルゴン雰囲気下の反応環境下で 2 時間反応させた。また、蛍光色素の褪色を防ぐため、反応中はガラスバイアルの外側をアルミニウム箔で覆い遮光した。2 時間後、反応停止剤として 2-メルカプトエタノール希釈液（試薬原液 70 μl に 20 mM リン酸カリウム緩衝液を加

えて 300 μl としたもの) を添加してさらに 30 分間反応させた。反応終了後、その試料全量をゲルろ過クロマトグラフィーに適用し、蛍光ラベル化された蛋白質から未反応の蛍光色素と 2-メルカプトエタノールを完全に取り除いた。ゲルろ過クロマトグラフィーには Sephadex G-25 column (18 \times 200 mm) を使用し、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を移動相とした。溶出液を 1.5 ml ずつチューブにとり、各フラクションにおける 280 nm およびラベル化に使用した蛍光色素の最大吸収波長 (各蛍光団の最大励起波長とほぼ一致する) の吸光度を測定して、蛍光ラベル化された蛋白質を多く含むフラクションを回収した。このとき得られた蛍光ラベル化 K18C 蛋白質の名称を、それぞれに用いた蛍光色素の略称と組み合わせて、K18C-A350、K18C-ANS、K18C-A555 とした。ゲルろ過後に得られた蛍光ラベル化蛋白質試料はサンプルチューブに 100~500 μl ずつ分注して使用直前まで -80 $^{\circ}\text{C}$ 暗所保存した。

これらの蛍光ラベル化蛋白質は 2 つの極大吸収を持つ。一つは芳香族アミノ酸残基の吸収に由来する蛋白質分子の紫外吸収、つまり 280 nm の吸収であり、もう一つはラベル化されている蛍光団による吸収である。これらの吸収波長におけるモル吸光係数がわかっているならば、それぞれ 2 パターンの濃度を算出することができる。特に、蛍光団の吸収から求める濃度は、未反応の蛍光色素が含まれていない限りは、蛍光ラベル化されている蛋白質分子の濃度を直接示していることになるので、これは蛍光団の導入率を求めるのに役立つ。すなわち、試料中の蛋白質全体の濃度は 280 nm の吸収から算出し、そのうちの蛍光ラベル化されている分子の濃度は蛍光団の吸収から求めることができるので、この両者の比が蛍光色素の導入率を表すことになる。すべての蛋白質が蛍光ラベル化されている場合は比が 1 (導入率 100%) となる。本実験で実際に得られた蛍光ラベル化蛋白質の導入率は次章 3-1 項に記すが、この値が低すぎる場合はヘムと結合してもシグナル応答が小さいということになるため、本研究では蛍光団導入率が 80% 以上のものを対象とした。また、本論文中に示している蛍光ラベル化蛋白質の濃度は、ラベル化されていない HO-1 が含まれている分も考慮した上で、全て 280 nm における吸収から求めた値で統一した。

2-5 蛍光ラベル化 HO-1 に対するヘム滴定実験

2-5-1 ヘム溶液の調製

本研究の全ての実験で使用したヘム溶液の調製は、常温のヘミン試薬（保存は冷暗所保存）を 1 mg 程度チューブにとり、脱気した 25 mM NaOH 水溶液を 1 ml 加えてからボルテックスミキサーで 10 分程度攪拌して完全にヘミンを溶解した。このヘミン溶液をストックソリューションとして濃度を決定し、さらに 25 mM NaOH で適宜希釈して各実験に使用した。ここで用いたヘミン溶液の溶媒である 25 mM NaOH について、研究の初期段階では 100 mM NaOH や 5% DMSO/20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4) を使用していた。しかし、なるべく高濃度アルカリや有機溶媒（特に低濃度の DMSO 溶液は劣化しやすく、特有の刺激臭を発する）を使用しない測定系にするという目標達成のため、1 mM 程度のヘミンが均一に溶解する NaOH の最低濃度を検討した結果、25 mM NaOH が最適であると判断したため、常時ヘミン溶液調製に使用することとした。ヘミン溶液の濃度決定は、ピリジン-ヘモクロモゲン法をベースとした方法で行った²²⁾。すなわち、測定対象のヘミン溶液と 20%ピリジン/100 mM NaOH 溶液を吸光度測定用セル内で混合し、ジチオナイト粉末を少量加えて攪拌した後に、直ちに 556 nm における吸光度を測定した。その値とモル吸光係数 ($34.4 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$) から測定試料のヘム濃度を求めた。ヘミン溶液は 25 mM NaOH に溶かしておけば安定で、密閉して冷蔵保存すれば濃度にもよるが (200 μM 以上) 数日は保存できる。しかし、空気中の酸素と結合したり、ヘム同士で凝集したりすると実験に使用できなくなるため、原則として用事調製を行った。特に、低濃度に希釈したヘム溶液は取り扱いが難しくなり、20 μM 以下の濃度では 1 日程度経過したところで実験値が変わってくる場合もあり注意が必要である（この濃度範囲のヘム溶液はピリジン-ヘモクロモゲン法では正確な濃度を確認できない）。また、このような低濃度ヘム溶液は、一般に用いられているプラスチック製の容器やチューブ、さらにはマイクロピペットのチップなどへの非特異的な吸着（疎水性が高い分子同士の相互作用）が起こる可能性があるため、実験にはなるべくガラス製器具を使用することが望ましい。ガラス器具であっても、微量なヘム溶液を希釈するなどの操作時には注意を払って調製しなければ測定値に影響する。

2-5-2 吸収スペクトル測定

蛍光ラベル化HO-1とヘムとの結合をその複合体の吸収スペクトルから調べるヘム滴定実験は、以前にHO-1 WTや変異体を用いて行われた方法をベースとし^{18,32)}、本実験ではその一部を変更して実施した。各蛍光ラベル化蛋白質(20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)を用いて3 μ Mに希釈)と滴定に使用するヘミン溶液(25 mM NaOHで600 μ Mに希釈)を準備し、吸光度測定用の石英セルにその希釈した蛍光ラベル化蛋白質溶液(sample cell)と20 mM リン酸カリウム緩衝液(reference cell)を2 mlずつ、そしてセル内攪拌のための回転子を入れたものを用意して吸光分光光度計の測定部へセットし、そのセル内の試料が25 $^{\circ}$ Cになるように循環水サーキュレーターを用いて測定部全体の温度を調節した。吸光分光光度計はJASCO V650 ultraviolet-visible spectrophotometer(日本分光)を使用し、その測定部のセルチャージャーは回転機能制御が外部から可能なモデルを滴定実験に用いた。ヘムの滴定は、一度のヘム添加につき1 μ lずつsample cellとreference cellの両側に入れて直ちに45秒間回転子で攪拌し、その後回転を止めて15秒間待つてから、両者間の差吸収スペクトルを測定した。これに続いて、ヘミン溶液を段階的に加えてゆき、セル内のヘミン濃度が4.8 μ M(蛍光ラベル化蛋白質濃度の1.6当量)になるまで繰り返して吸収スペクトル変化を記録した。なお、ヘム滴定終了後にセル内試料のpHを測定したところ、ほとんど変化していないことが確認された。

2-5-3 蛍光スペクトル測定

蛍光ラベル化蛋白質にヘミン溶液を滴定したときに起こる蛍光強度スペクトル変化を測定し、その結果から添加したヘム濃度と最大蛍光波長における蛍光強度変化値との関係を示す滴定曲線を作成した。蛍光スペクトルの測定は、各蛍光ラベル化蛋白質を20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)を用いて50 nMに希釈した試料2 mlと回転子を蛍光測定用石英セルに入れて蛍光分光光度計(JASCO FP-6500 spectrofluorometer)の測定部にセットし、同測定機に接続されているペルチェモジュール(回転機能制御装置付き)により試料温度を25 $^{\circ}$ Cに設定した。そこへ10 μ Mヘミン溶液を1 μ l添加し、セル内の試料を5秒間攪拌してから蛍光スペクトルを測定した。その後もヘミン溶液を段階的に添加し、セル内のヘミン濃度が75 nM(蛍光ラベル化蛋白質濃度の1.5当量)になるまで繰り返して蛍光スペクトルを記録した。

ヘム滴定終了後にセル内試料の pH は変化していなかった。測定条件は、励起波長スリット幅 5 nm、蛍光波長スリット幅 10 nm とし、各蛍光ラベル化蛋白質の励起波長は表 2-1 に示す波長とした。蛍光強度検出部の感度電圧は、測定対象となる各蛍光団のモル吸光係数および量子収率が異なるため、蛍光ラベル化蛋白質の種類ごとに、測定開始時の蛍光強度が 950~1000 の範囲になるように設定した。蛍光ラベル化蛋白質の蛍光強度測定において、ヘムを滴定する前 (apo 型が 100%存在している状態) の最大励起波長における蛍光強度を F_0 、ヘム添加後 (ヘムと結合して holo 型となり蛍光消光した分子が混在する状態) の蛍光強度を F と定義し、この両者の差 F_0-F 値と滴定したヘム濃度との関係をプロットした図について非線形フィッティング解析を行った結果から滴定曲線を作成した。その非線形フィッティング解析に用いた数式や滴定曲線を求めるための結合パラメーターについては次項に示した。

2-6 解離定数 (K_d) の算出方法

蛍光ラベル化した HO-1 とヘムとの結合親和性を表す指標として、両者の分子結合モデルを基にして導出される解離定数 (Dissociation constant, K_d) を以下に示す式より求めた。

HO-1 とヘム (ここでは実際に結合実験に使用している hemin 分子) の結合平衡式は(1)式で表され、このとき hemin と複合体を形成する蛍光ラベル化 HO-1 分子 (HO* と表記) の K_d 値は(2)式を使って表される。



$$K_d = \frac{[\text{HO}^*] [\text{hemin}]}{[\text{HO}^* \cdot \text{hemin}]} \quad (2)$$

また、フリーの HO* と hemin の濃度 ($[\text{HO}^*]$ と $[\text{hemin}]$) は、トータルの HO* と hemin 濃度 ($[\text{HO}^*]_0$ と $[\text{hemin}]_0$) との関係について(3)式および(4)式のように表すことができる。

$$[\text{HO}^*] = [\text{HO}^*]_0 - nY[\text{HO}^*]_0 \quad (3)$$

$$[\text{hemin}] = [\text{hemin}]_0 - nY[\text{hemin}]_0 \quad (4)$$

ここで、 n は HO^* に結合する hemin のストイキオメトリー (stoichiometry)、 Y は複合体を形成している分子の割合を示す。 n をパラメーターとして式に組み込んでいる理由は、各実験結果において $[\text{HO}^*]$ または $[\text{hemin}]$ が適切であることを確認するためである。

さらに、(2) から (4) までの式を組み合わせると二次方程式が与えられ、これを Y について解くと以下に示す解が求められる。

$$Y = \frac{1}{2n[\text{HO}^*]_0} \times \left\{ ([\text{HO}^*]_0 + [\text{hemin}]_0 + K_d) - \sqrt{([\text{HO}^*]_0 + [\text{hemin}]_0 + K_d)^2 - 4[\text{HO}^*]_0[\text{hemin}]_0} \right\} \quad (5)$$

蛍光強度変化値を使って解析を行う場合は、 Y に $F_0 - F$ 値を代入して以下の式となる。

$$\begin{aligned} F_0 - F &= \Delta F_{\max} Y \\ &= \frac{\Delta F_{\max}}{2n[\text{HO}^*]_0} \times \left\{ ([\text{HO}^*]_0 + [\text{hemin}]_0 + K_d) - \sqrt{([\text{HO}^*]_0 + [\text{hemin}]_0 + K_d)^2 - 4[\text{HO}^*]_0[\text{hemin}]_0} \right\} \end{aligned} \quad (6)$$

ここで、 ΔF_{\max} は最大蛍光強度変化値を示す。これらの式より、 HO-1 と hemin における結合曲線は、試料中の hemin 濃度と $F_0 - F$ 値の関係をプロットしたものについて (6) 式をフィッティングすることで得られる。また、この非線形フィッティングの過程で K_d 、 n 、 $[\text{HO}^*]_0$ 、 ΔF_{\max} がこの結合曲線を表すパラメーターとして求められる。

これらのパラメーターやフィッティングカーブは、へム滴定実験より得られた結果を数値解析ソフト Origin 7.5J (OriginLab) に入力し、上記の数式モデルを基にしたフィッティングプログラムを実行して算出された結果を採用した。

2-7 センサーのヘム選択性試験

K18C-A350 センサーのリガンド選択性試験および K_d 値評価を行うため、100 nM のセンサー溶液 2 ml を蛍光測定用のセルに入れ、25 °C に設定した蛍光分光光度計（その他の測定条件は 2-5-3 項と同じ）にセットして、ヘミン溶液とその他 4 種類の試料をセル内濃度が 1~1000 nM となる範囲で滴定し、蛍光強度変化を観察した。滴定に用いた 4 種類の試料は Zn-PPIX、PPIX、ビリベルジン IX α および硫酸第一鉄であり、各試薬を 100 mM NaOH で溶解・希釈したものを使用した。これら 4 種類のうち、ヘミン滴定時と同様の濃度依存的な蛍光消光が認められた試料についてはフィッティング解析により K_d を算出し、ヘミン滴定の結果より求められた値と比較した。

2-8 マイクロプレートを用いたヘム濃度測定法

蛍光測定用マイクロプレートを用いた定量系での適性を実証するために、96 ウェルマイクロプレートの 1 ウェル当たりの総体積が 100 μ l となる測定系で、ウェル内のヘム濃度と蛍光強度変化との関係および K_d を調べた。マイクロプレートの各ウェルに 90 μ l の 100 nM K18C-A350 溶液（脱気した 20 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）を用いて濃度調製）と、10 μ l のヘミン標準溶液（ヘミンのストックソリューションを 25 mM NaOH で希釈して 1.8 μ M とした標準溶液と、25 mM NaOH 溶液を用いてヘミンの終濃度が 0~144 nM になるように調製）あるいは未知濃度のヘムを含む測定対象試料を入れて（このときのウェル内 K18C-A350 濃度は 90 nM となる）蛍光マイクロプレートリーダーの測定部にセットした（表 2-2）。使用した測定用機器は Infinite M200 PRO microplate reader (TECAN) で、測定条件は励起波長 353 nm、

表 2-2 ヘムセンサーを用いたマイクロプレート測定系におけるウェル内試料組成

プレートウェル番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
100 nM ヘムセンサー(μ l)	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
25 mM NaOH(μ l)	10	9.5	9	8.5	8	7.5	7	6	5	4	3	2
1.8 μ M ヘミン標準液(μ l)	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	4	5	6	7	8
ヘミン終濃度(nM)	0	9	18	27	36	45	54	72	90	108	126	144
ヘム当量	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6

蛍光波長 430 nm、検出感度 Gain165、測定部の設定温度 25 °C とした。また、蛍光強度測定時はマイクロプレート を 30 秒間 cycle shaking してウェル内試料をよく混合させた後に（ここで十分に攪拌させておかないと蛍光強度変化が起こらなかつたり、値が大きくばらついたりする原因となるため注意が必要）30 秒間 wait time をおいてから各ウェルの蛍光強度を測定した。マイクロプレート測定系では、ウェル内のヘム濃度が 0 nM である試料における蛍光強度を F_0 とし、その他のヘムが入っている各ウェルの蛍光強度を F として蛍光強度差を求めた。また、低濃度領域（ウェル内ヘミン濃度 0~18 nM）における本定量法のヘム検出感度を検証することを目的として、上記 100 nM K18C-A350 を用いた測定系と同様の方法で（ただし、Gain のみ 212 へ変更）、ウェル当たりの試料体積 100 μ l、K18C-A350 終濃度 9 nM の条件で実験を行った。全ての測定は 3 回ずつ行われ、その実験データの平均（means）と標準偏差（standard deviations, SD）を解析に使用した。測定終了後にウェル内試料の pH を調べたが変化は無かった。また、前項で示した非線形カーブフィッティング解析により結合曲線および K_d を算出しヘムとセンサーの親和性を求めた。一方で、100 nM K18C-A350 の結合曲線を基にした検量線は、その直線領域（0~72 nM の範囲、表 2-2 の網掛けした部分と対応）を線形フィッティングして得られた近似式より作成され、以降のヘム定量実験において未知濃度の試料を定量する際に使用した。

2-9 ヘモグロビンに含まれるヘムの抽出および定量実験

2-9-1 ヒトヘモグロビン溶液の調製

本研究で使用したヒトヘモグロビン（hHb）試料は、2-1 項で記した総ヘモグロビン常用参照標準物質として販売されているもので、このヘモグロビンは空気中の酸素と結びついた oxy-Hb の状態で存在している。この hHb 試薬の濃度調製は、付随の検査成績書に表記された濃度を元に、20 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）を用いて 20 μ M になるように試薬を希釈し、それをチューブに分注したものを hHb ストックソリューションとして各実験に使用した。実験に使用しない分の試料は -80 °C で冷凍保存し、使用時ごとに解凍して用いた。ただし、蛋白質の構造崩壊や変性が起きた試料を実験に使わないようにするために、一度解凍したものは再凍結したりせずに使い切るようにした。

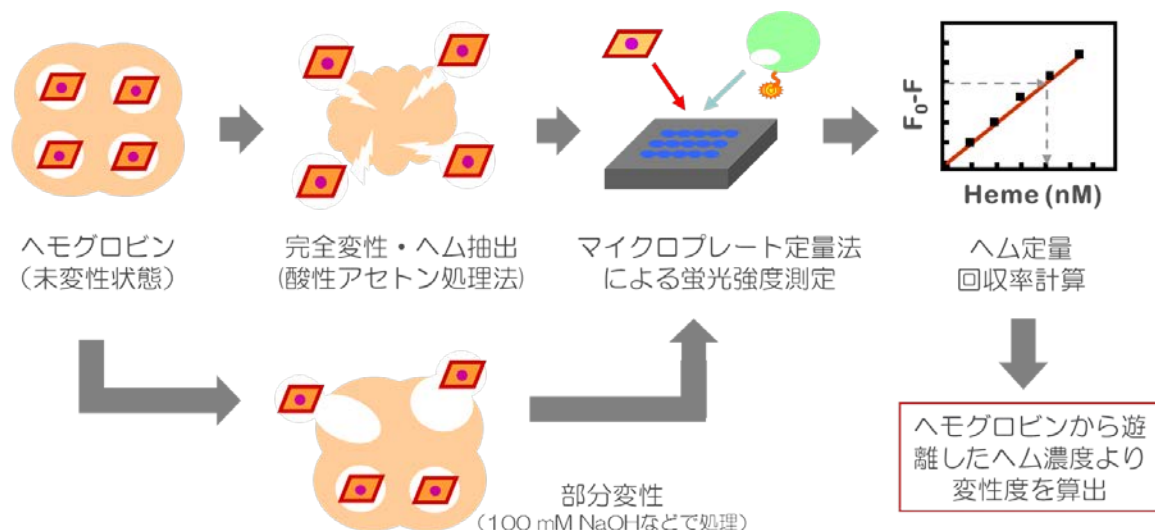


図 2-2 ヘムセンサー定量法を応用したヘモグロビン変性度測定実験法

ヘモグロビン(またはヘム蛋白質)を各処理液で変性させた測定試料を準備し、ヘムセンサーを用いてヘム定量・回収率を算出し、その結果より蛋白質の変性度を推定する。このとき、抽出されたヘムがセンサーによって 100%検出されていることが絶対条件であるが、酸性アセトン液や 100 mM NaOH を用いた場合は問題なく検出される。

2-9-2 ヘモグロビンの変性処理とヘム抽出操作

Hb に含まれるヘムを抽出して定量し、ヘムの回収率を求めることで元の Hb 濃度や変性度を間接的に決定する実験を行った (図 2-2)。まず、hHb ストックソリューションを常温で解凍し、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で 5 μ M に希釈したものを別のチューブに 100 μ l ずつ分注した。次に、3 種類のヘモグロビンを変性させるための処理液を準備し、それぞれ 900 μ l ずつ添加してボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌し、その後 10 分間氷冷した。その 3 種類のヘモグロビン変性処理液とは、①2%塩酸/アセトン溶液、②100 mM NaOH、③20 mM リン酸カリウム緩衝液であり、①は hHb と混合前に冷凍庫で、②と③は氷上で冷やしておいたものを使用した。①の処理液を使った生体試料からのヘム抽出法は広く用いられており⁸⁾、近年のヘム研究に関する文献においてもよく見かける方法である^{9,33)}。本法は塩酸を加えて酸性にしたアセトンを対象試料に加えることで蛋白質の構造を完全に変性してヘムを遊離させ、それを疎水性の高い有機溶媒層へと抽出させるという原理である。本来の酸性アセトン抽出法は、このヘム抽出液をさらにジエチルエーテルを用いて再抽出し、エバポレーターを用いて減圧濃縮するなどの工程が続くが^{8,9)}、本実験ではそれらの操作を省略し簡便化した抽出法を採用した³³⁾。すなわち、hHb を 2%塩酸/アセトン溶

液（塩酸の終濃度は約 240 mM）で完全に変性させ、遊離したヘムを含むアセトン溶液をそのまま測定試料として使用することとした。②の処理法は、アルカリ溶液により hHb が変性するという性質を利用し³⁴⁾、その影響によって遊離したヘムを測定するための試料を作製するものである。本法では①の処理法ほどの蛋白質変性は起こらず、hHb の構造を部分変性させる効果があると考えられる。③では hHb を変性させる効果はなく、ここでは①と②の結果と比較するための control として調製した。しかし、元の hHb ストックソリューションに遊離ヘムが含まれている場合や、測定試料調製の過程で hHb が変性してヘムが遊離した場合などはヘムが検出される。それらの影響がない場合は、測定試料中の hHb は intact な状態であるためにヘムは溶媒へ遊離しない。氷冷後、これらの試料を遠心分離（13,000 rpm, 10 min, 4 °C）し、得られた上清を別のチューブに移したものを測定試料としてマイクロプレート定量法によりヘム濃度を決定した。測定試料は定量操作に用いるまで氷上か冷蔵して保存した。

2-9-3 ヘム抽出試料の定量とヘム回収率の算出法

前項の方法で準備した 3 種類の hHb 抽出測定試料について、2-8 項に示すマイクロプレートを用いたヘム定量系により濃度を測定した。ウェル内の試料組成と添加する順番は、最初に 90 μ l の 100 nM K18C-A350 溶液を入れ、次に 2 μ l の各測定試料を添加して、最後に 8 μ l の 25 mM NaOH を加えて全量を 100 μ l とした。特に control に関しては intact な hHb の状態で測定しなければならず、先に 25 mM NaOH と混合してからウェル内のセンサー溶液に添加すると 25 mM NaOH によって hHb が変性し、その分のヘムが検出されてしまう恐れがあるため注意が必要である。なお、これらの試料を混合した後のウェル内試料の pH を調べたところ、pH は 7.4 からほとんど変化していなかった。ヘム定量には 2-8 項で説明した 0~72 nM の範囲で作成された検量線を使用し、それぞれの抽出試料におけるヘム濃度を求めた。さらに、その濃度を抽出操作に使用した元の hHb 試料（5 μ M）に含まれているヘム濃度（ヘモグロビン 1 分子当たり 4 分子のヘムが結合しているため、試料中の総ヘム濃度は 5 μ M \times 4 分子=20 μ M となる）で割ることにより、センサーで検出されたヘムの回収率を算出した。それぞれの試料におけるヘム濃度は、独立した 3 つの測定結果の平均値より決定した。

2-10 遊離ヘム/ヘモグロビン混合溶液を用いた定量試験と存在比の決定

遊離ヘムとヘム蛋白質（ここでは hHb を使用）が様々な割合で混在する測定試料をヘムセンサーで定量した場合、その試料中の遊離ヘムと hHb 由来のヘムを識別して定量できるか、また、両者の存在比を推測できるか検討した。最初に、遊離ヘムと hHb が設定した割合で混在するモデル混合試料を作製した。20 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7.4）であらかじめ濃度調製した hHb 溶液とヘミン溶液（この場合ストックソリューションを緩衝液で希釈しているため、この時点で溶液の pH は中性）をヘム当量比が 1:1、1:4、4:1 となるように溶解した。その各試料の組成は以下のように設定した。

1:1 混合試料 = hHb 16 μ M 1 ml + hemin 16 μ M 1ml = 80 nmol heme を含む 2 ml

1:4 混合試料 = hHb 10 μ M 1 ml + hemin 40 μ M 1ml = 80 nmol heme を含む 2 ml

4:1 混合試料 = hHb 20 μ M 1 ml + hemin 5 μ M 1ml = 85 nmol heme を含む 2 ml

次に、各モデル試料を別チューブに 100 μ l ずつ取り、4 種類の処理液（20 mM リン酸カリウム緩衝液、5 mM NaOH、25 mM NaOH、2%塩酸/アセトン溶液）のうちの 1 種類を 900 μ l 加えて 10 秒間攪拌し、10 分間氷冷した。その後遠心分離（13,000 rpm, 10 min, 4 °C）して上清を別チューブに回収し、その測定試料の 1 μ l に含まれるヘム濃度をマイクロプレート測定系により決定した。その濃度から元のモデル混合試料 2 ml 当たりに含まれるヘムのモル量を算出して設定モル数と比較した。20 mM リン酸カリウム緩衝液と 5 mM NaOH でモデル混合試料を処理した場合は hHb の変性は起こらないため遊離ヘムのみを検出し、25 mM NaOH と 2%塩酸/アセトン溶液で処理した場合は hHb が変性してヘムが遊離してくるため、モデル試料中の遊離ヘム+変性した hHb 由来のヘム濃度が検出される。特に、酸性アセトン処理を行った場合は理論上試料中のすべてのヘムが遊離するので、その結果は総ヘム検出量を表す。よって、使用する処理液を使い分けることで遊離ヘムのみ、または総ヘム量を定量するための測定試料を調製した。hHb の量は、総ヘムと遊離ヘム量の差を 4 で割って算出した。各試料のヘム濃度は 5 つの測定結果の平均値より決定した。

2-11 疑似便に含まれるヘモグロビンの測定試験

本ヘム定量法を応用した便中のヘモグロビン濃度を測定する方法を検討し、現行の便潜血検査の代替法と成り得るかを調べるための実験を行った。測定試料となる疑似便を作製するため、市販の上新粉を1種類当たり5 g用意し、それに20 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)とhHb溶液を混合して合計5 mlとしたものを少量ずつ加えながらガラスビーカー内で練り合わせて疑似固形便試料(水分率50%)を10 g作製した。この疑似便試料は混合するhHb濃度を変えて4種類作製し、それぞれの設定濃度を0(hHb未使用の疑似便)、25、50、100 µg/g疑似便とした。作製した疑似便試料はプラスチック製のフタ付きチューブに移し、実験時には室温下で使用した。各疑似便試料0.1 gずつ4検体をチューブにサンプリングし、そこへ冷やした2%塩酸/アセトン溶液(塩酸終濃度は240 mM)を300 µlずつ添加して10秒間ボルテックスミキサーで攪拌し処理液に疑似便を懸濁させた。それを遠心分離(13,000 rpm, 10 min, 4 °C)し、その上清50 µlを回収して別のチューブに移し、再度遠心分離(15,000 rpm, 10 min, 4 °C)して完全に疑似便成分の上新粉粒子を沈殿させた。遠心操作後の試料は測定に使用するまで氷上で保存した。この試料の上清2 µlに含まれるhHb由来のヘム濃度をマイクロプレート測定系で測定し、疑似便のヘム抽出液に含まれる総ヘム濃度を決定した。さらに、その値から元の疑似便試料1 g中のhHb濃度を算出して設定濃度と比較した。各試料の定量値は4つの測定結果の平均より決定した。

第3章 実験結果

3-1 HO-1 変異体 K18C の発現と精製および蛍光色素導入率の算出

3-1-1 K18C の発現系構築と蛋白質精製

HO-1 WT のプラスミドをテンプレートとして作製した K18C 用プラスミドの DNA sequencing 解析結果より、18 番目のアミノ酸残基に相当するコドンのみが変異していることを確認した。そのプラスミドを形質転換した大腸菌株を LB/Amp 培地で培養したものについて蛋白質の発現を SDS-PAGE により確認したところ、30 kDa の蛋白質を発現していた。よって、K18C 蛋白質をコードするプラスミドおよび大腸菌を宿主とした発現系の構築が達成された。本プラスミドを持つ大腸菌は LB 培地を用いた培養でも蛋白質を発現するが、低リン酸培地で培養することでより強力な発現誘導が起こり宿主内で大量発現するため、菌体量当たりの蛋白質の回収量を増やすことができる。K18C を発現する大腸菌株を前培養後、低リン酸培地 1 L を用いて本培養したところ、湿重量で 4.37 g の大腸菌ペレットを得た。それを超音波破碎・遠心分離して回収した粗酵素液を DEAE 陰イオン交換樹脂を用いたカラムクロマトグラフィーで精製した。その時のクロマトグラムを図 3-1 に示す。この結果から、Wash 時のフラクション 10~16 と、Elution 時のフラクション 40~44 のところに大きなピークが見られた。そこで、これら 2 つのピークの最も吸収が高いフラクション試料 (No.15 と No.42) について SDS-PAGE で蛋白質の純度とメインバンドの分子量を調べたところ、両者のバンドパターンにほとんど差は無く、ほぼ単一のバンドが検出され、その分子量は 30 kDa だった (図 3-2、レーン D と E)。HO-1 WT の分子量は約 30.5 kDa であり、K18C もまたほぼ同じであることと、K18C を発現した大腸菌培養液を泳動した場合に現れるメインバンド (図 3-2、レーン B) 並びに菌体破碎後の粗酵素液におけるメインバンド (同図、レーン C) と一致することから、D と E レーンのメインバンドは共に K18C 蛋白質であると判断した。したがって Wash 時の溶出液にも目的の蛋白質が含まれていることがわかった。しかし、この前半のピークを形成するフラクションにはイオン交換樹脂に結合せず溶出する HO-1 以外の蛋白質や DNA などの夾雑物も多く含まれると考えられる。一方で、後半のピークを形成する蛋白質は一度

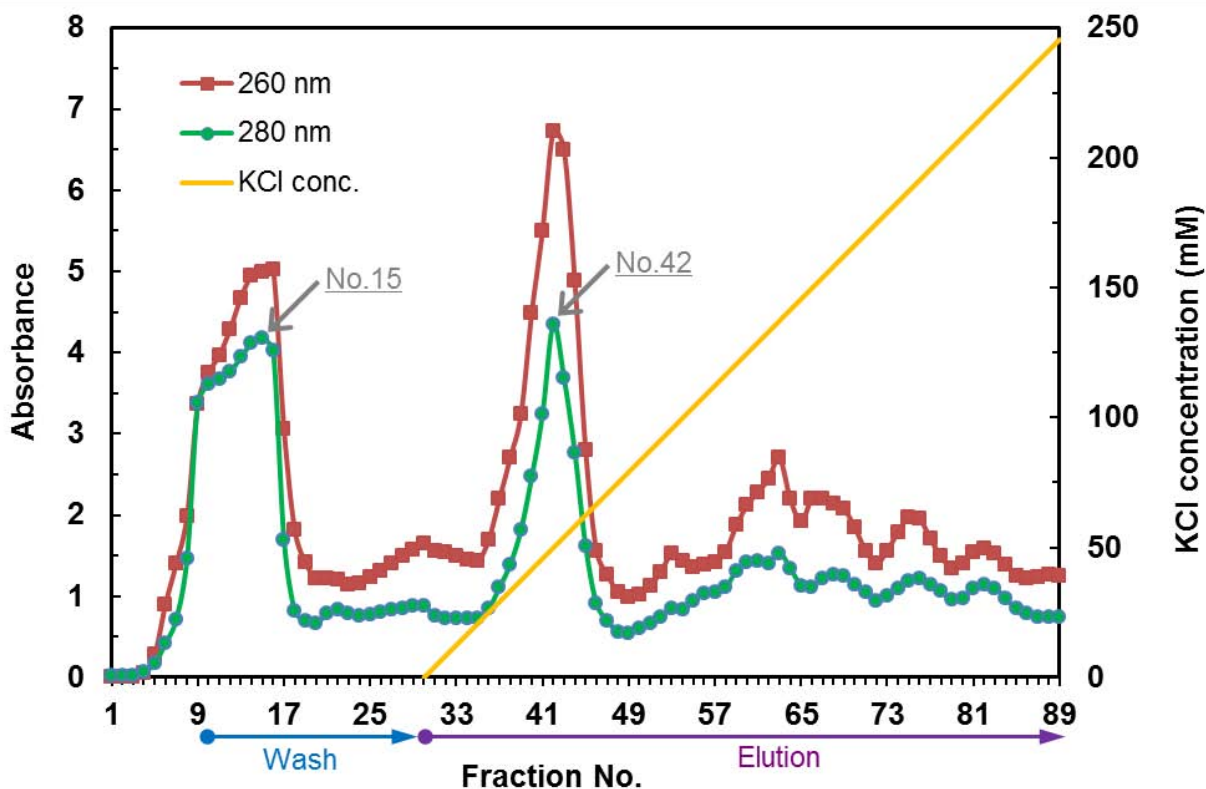


図 3-1 HO-1 変異体 K18C 精製における陰イオン交換クロマトグラム

K18C 粗酵素液を DEAE カラム樹脂に吸着させ (Fraction No.1~9)、20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) でカラムを洗浄し (Wash, No.10~29)、250 mM KCl/20 mM リン酸カリウム緩衝液を用いて吸着している蛋白質を溶出した (Elution, No.30~89)。

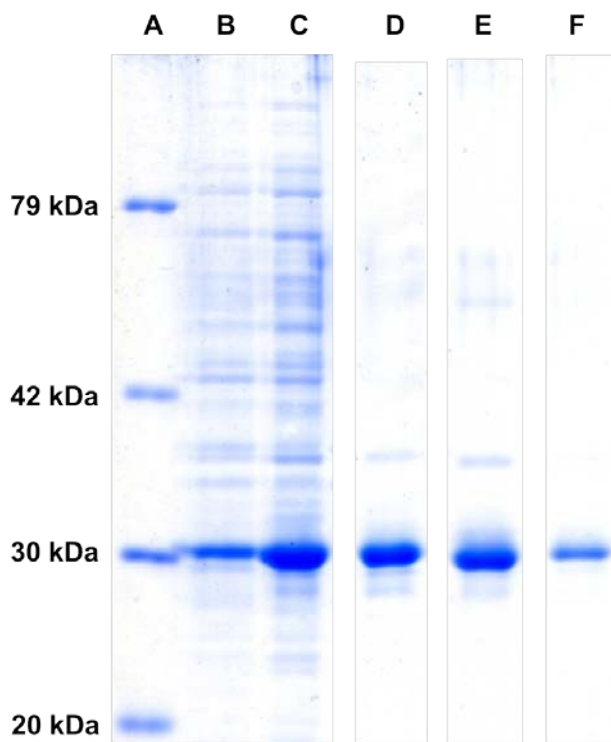


図 3-2 K18C 蛋白質試料の純度を確認するための SDS-PAGE 分析

K18C の各精製工程で得られた蛋白質試料を適宜希釈したものと SDS サンプルバッファーを等量混合して電気泳動後 CBB 染色した。レーン A:分子量マーカー、B:本培養液、C:粗酵素液 (5倍希釈)、D:陰イオン交換クロマトグラフィーFraction No.15 (5倍希釈)、E: Fraction No.42 (5倍希釈)、F:最終精製物 K18C (15倍希釈)。

陰イオン交換樹脂に結合し、その後移動相の塩濃度上昇（KCl 濃度が約 50 mM のときに溶出）と共にイオン交換されて溶出してきたものであるため、純度が高い蛋白質であると考えられる。したがって、ここでは後半のピークフラクションを目的試料として回収し、その中で夾雑蛋白質が少なく（No.40～44 について別途 SDS-PAGE を行い、そのバンドパターンから判断した）、280 nm の吸光度が大きかった No.41 と 42 のフラクション試料を濃縮・透析して最終精製物の K18C 蛋白質を得た。これについて SDS-PAGE 分析と濃度定量を行ったところ、30 kDa に単一バンドが検出され（図 3-2、レーン F）、濃度は 126 μM (3.26 mg/ml) で最終収量は 22.8 mg となった。また、各精製過程で得られた試料の吸収スペクトルを測定し 280 nm と 260 nm における吸光度の比を求めたところ、粗酵素液（656 μM ）の段階では 0.57 であったが、陰イオン交換クロマトグラフィー後に得られたピークのフラクションを混合した試料（140 μM ）では 0.67 となり、透析などの操作を行って最終的に 2 となった。また、それら 3 つの紫外吸収スペクトルを確認すると、精製工程の進行に伴って 260 nm から 280 nm へとピークがシフトしていた。よって、粗酵素液に多量に混ざっていた大腸菌由来の DNA が精製過程で取り除かれて高純度の蛋白質を回収することができた。

3-1-2 K18C の蛍光色素導入率

2-4 項に記した蛍光色素導入操作により、精製した K18C 蛋白質を蛍光ラベル化し、回収された蛋白質の濃度および蛍光色素の導入率を算出した。図 3-3 に示す吸収スペクトルは、実際に作製した K18C-A350（ゲルろ過操作時に得られた試料で最も吸収が高かったフラクション）の吸収を測定した結果である。この場合は蛋白質の紫外吸収、すなわち 280 nm における吸光度は 0.662、導入した A350 蛍光団による最大吸収 350 nm における吸光度は 0.363 であった。これらの測定値とそれぞれのモル吸光係数を用いて濃度を求めると以下のようなになる。

$$\begin{aligned} \text{総蛋白質濃度} &= 0.662 \text{ (280 nm の吸光度)} / 30,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1} \text{ (HO-1 モル吸光係数} \\ &\quad + \text{A350 による 280 nm のモル吸光係数)} / 1 \text{ cm (測定セル長)} = 22.1 \mu\text{M} \\ \text{A350 濃度} &= 0.363 \text{ (350 nm の吸光度)} / 17,000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1} \text{ (A350 のモル吸光係数)} / \\ &\quad 1 \text{ cm (測定セル長)} = 21.3 \mu\text{M} \end{aligned}$$

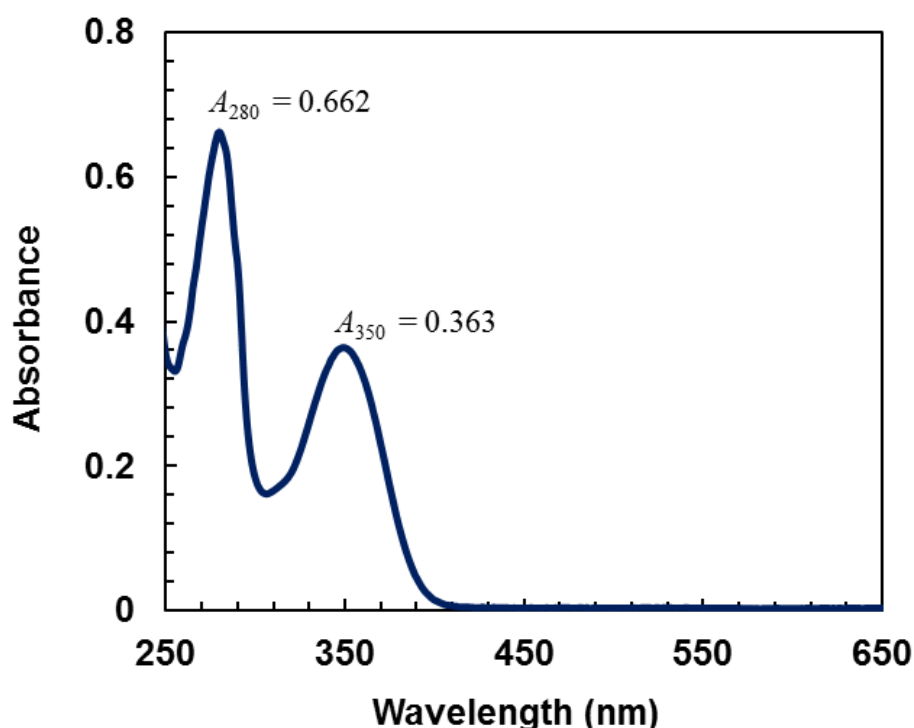


図 3-3 K18C-A350 試料の吸収スペクトル

したがって、両者の濃度から蛍光団の導入率を算出すると $21.3 \mu\text{M}/22.1 \mu\text{M} \times 100(\%)=96\%$ となる。この結果より、回収された蛋白質分子のほとんどが蛍光ラベル化されていることが確認された。この他に、本研究を進めてゆく上で K18C-A350 作製のための蛍光色素導入操作は計 6 回行ったが、それぞれの導入率の平均値を求めたところ $92 \pm 4\%$ となった。よって、これらの試料作製上のロット違いによる測定値への影響はほとんど無いものと考えた。同様にして、K18C-ANS と K18C-A555 試料の蛋白質濃度および蛍光色素導入率を 280 nm と各蛍光団の最大吸収波長 (ANS の場合は 324 nm、A555 は 553 nm) における吸光度から算出した。これら 2 種類の蛍光ラベル化蛋白質の導入率はそれぞれ 92% と 85% だった。

3-2 蛍光ラベル化蛋白質のヘム滴定実験およびフィッティング解析

3-2-1 ヘム滴定に伴う吸収スペクトル変化とその特徴

3 種類の蛍光ラベル化蛋白質溶液に対してヘム滴定を行ったときに観測された吸収スペクトル変化を図 3-4 に示した。

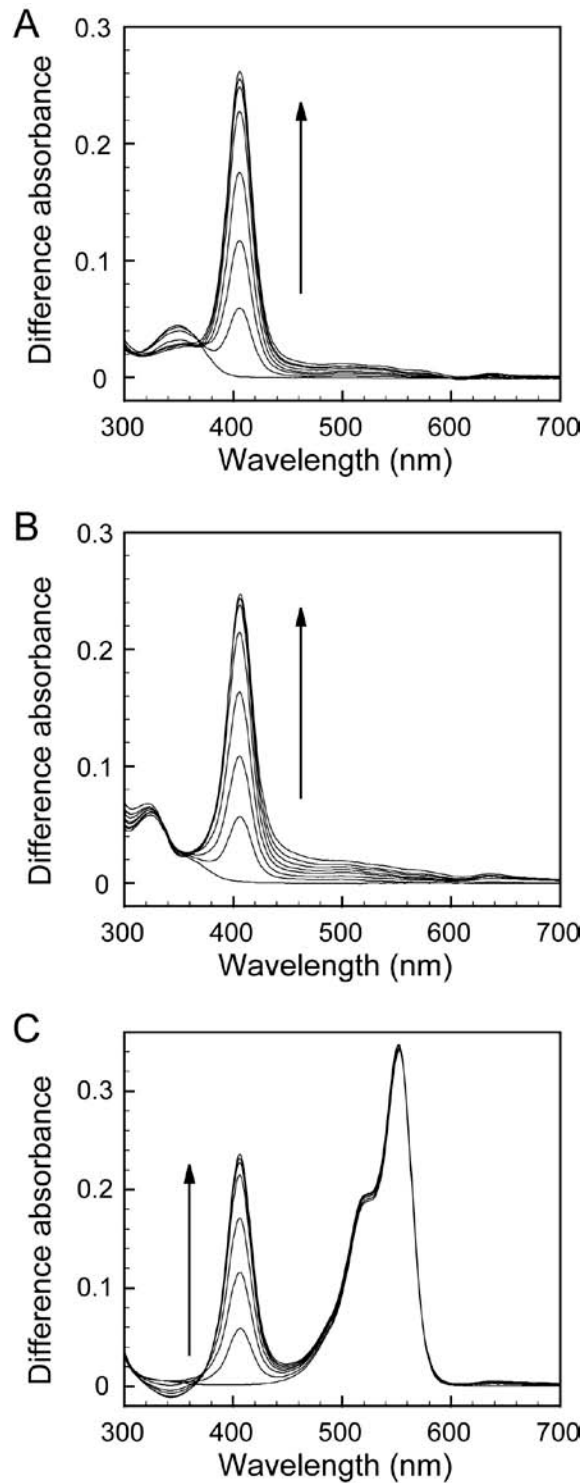


図 3-4 蛍光ラベル化 K18C 蛋白質にヘミンを滴定した場合の吸収スペクトル変化

A は K18C-A350、B は K18C-ANS、C は K18C-A555 にヘミン溶液を滴定後測定した吸収スペクトルの重ね書き図。それぞれのスペクトルは 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を用いて 3 μ M に調製した各蛍光ラベル化蛋白質 2 ml に対して、ヘミン溶液を終濃度 0、0.6、1.2、1.8、2.4、3.0、3.6、4.2、4.8 μ M (スペクトルの下から上に向かって順に対応) になるように添加し 60 秒後に測定した。

図 3-4 の A に示した K18C-A350 の吸収スペクトルでは、段階的なヘミン溶液の添加に伴って 406 nm における Soret 吸収帯の上昇が確認された。それと同時に、可視吸収帯の 540、570 および 630 nm でも吸光度上昇が起きた。これは中性環境下での 3 価鉄と HO-1 の複合体形成時に見られる特有の吸収であることが知られており^{18,35)}、これらの吸収帯の上昇は蛍光ラベル化した HO-1 変異体 K18C とヘミンが複合体を形成したことを示している。406 nm における吸光度変化はヘミン溶液の当量添加（終濃度 3 μ M のヘミン添加）でほとんど起こらなくなり、それ以上のヘミンを添加しても吸光度の上昇値は横ばいとなった。この吸収スペクトルの挙動は、WT を用いて同様の実験を行った場合の結果と一致しており^{18,32)}、K18C-A350 とヘムが化学量論比 1:1 で結合していることが示された。また、K18C 蛋白質への A350 蛍光団導入は蛋白質分子内のヘム結合部位にヘムが結合し、複合体を形成することには影響を及ぼさないことが明らかとなった。

K18C-ANS (図 3-4, B) および K18C-A555 (図 3-4, C) に対するヘミン滴定時の吸収スペクトル変化は、K18C-A350 と同様の挙動を示した。すなわち、当量まではヘム濃度依存的に Soret 吸収帯のピークが上昇し、当量に達した後は吸光度の変化が見られなくなった。また、K18C-ANS はヘム添加に伴う可視吸収帯の吸光度上昇が確認できたが、K18C-A555 の場合は蛍光団由来の吸収ピークと重なっているため、スペクトルからは判断できなかった。しかし、640 nm の上昇は確認できた。これらの結果から、K18C を蛍光ラベル化した 3 種類の HO-1 変異体は全て WT と同様にヘムと複合体を形成できる能力を維持していることが示された。

3-2-2 ヘム結合時の消光による蛍光強度変化の測定とフィッティング解析

353 nm の励起波長照射により高い蛍光強度を示していた 50 nM K18C-A350 試料に対してヘミンを滴定すると蛍光消光が起これ、そのヘム濃度依存的に蛍光強度が低下することが確認された。さらに、1 当量までヘミンを添加した時は初期蛍光強度の 10%程度まで強度が低下し（滴定前に観測されていた蛍光強度のうち 90%がヘムにより消光）、それ以上ヘミンを滴定してもほとんど蛍光強度は変わらなかった(図 3-5, A)。このヘム濃度依存的に起こる蛍光消光は、K18C-A350 とヘムが結合して複合体を形成したことで蛍光団とヘム分子との距離が近くなり、両者間でエネルギー移動が起きたことによるものと考えられる。しかしながら、K18C 蛋白質と結合させず 2-メルカ

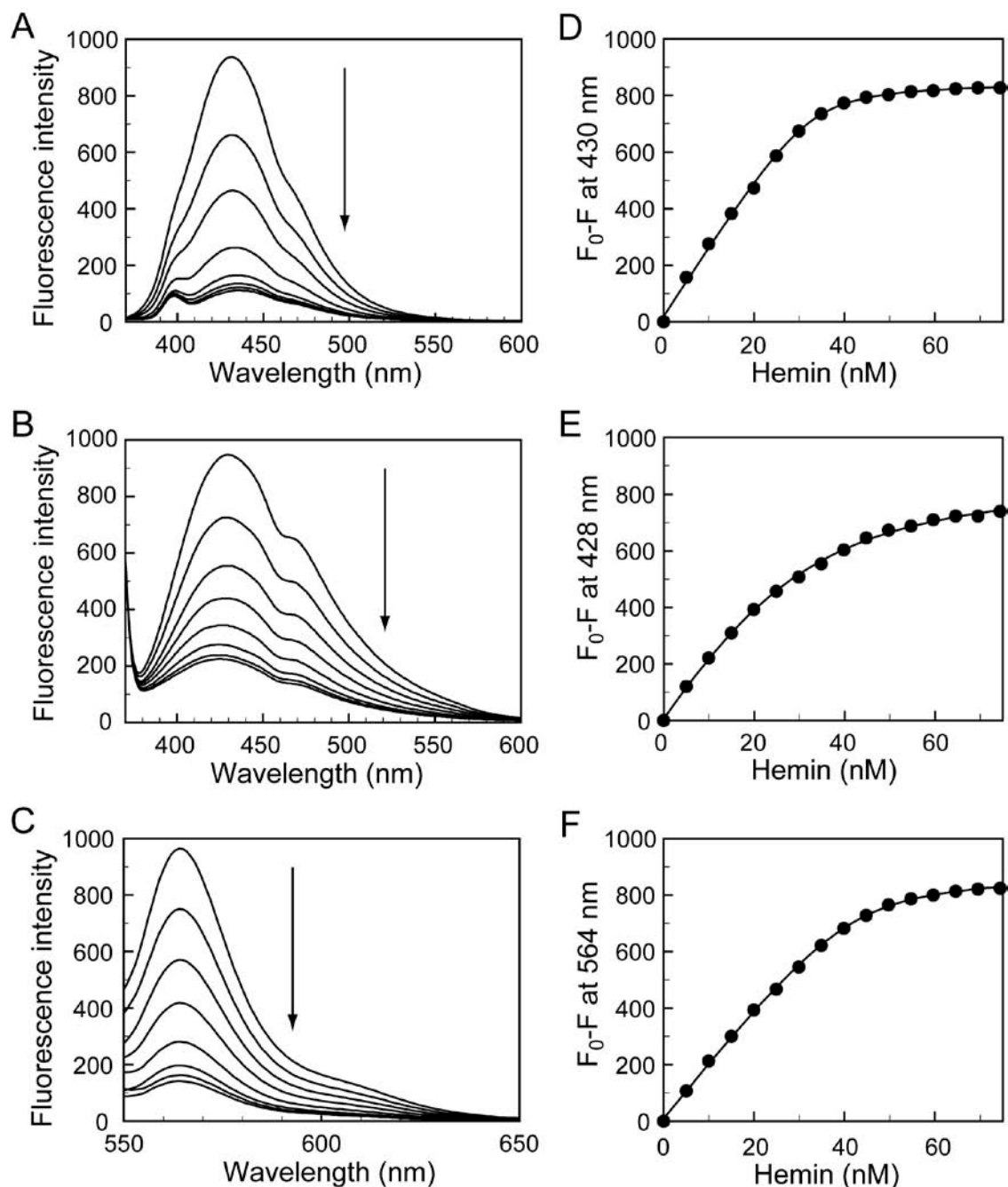


図3-5 蛍光ラベル化蛋白質にヘミンを滴定した時の蛍光スペクトル変化(A~C)および非線形カーブフィッティング解析より求めたヘム結合曲線(D~F)

(A~C) AはK18C-A350、BはK18C-ANS、CはK18C-A555にヘミン溶液を滴定後測定した蛍光スペクトルの重ね書き図。蛍光スペクトルは20 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 7.4)で50 nMに調製した蛍光ラベル化蛋白質2 mlに対し、ヘミン溶液を終濃度0から75 nMになるまで5 nMずつ濃度を上昇させるように添加して測定を行った。ここに掲載しているA~Cのスペクトル図は0~70 nMまで10 nM刻みで重ね書きしたものであり、上から下に向かって順に対応している。(D~F) DはK18C-A350における430 nmの蛍光強度差(F_0-F 値)、EはK18C-ANSにおける428 nmの蛍光強度差、FはK18C-A555における564 nmの蛍光強度差と添加ヘミン濃度との関係を示しており、非線形カーブフィッティングよりヘム結合曲線およびパラメーターを求めた。

プトエタノールとインキュベートして結合させた A350 蛍光色素溶液に対してヘミンを滴定してもほとんど蛍光強度は変化しなかった（ヘミン 1 当量添加時に消光した蛍光強度は初期強度の 2%程度）。また、ヘム滴定に伴う蛍光スペクトルのピークシフトは起こらなかった。同様に K18C-ANS（図 3-5, B）および K18C-A555（図 3-5, C）についてもヘム滴定を実施し、蛍光スペクトル変化を測定したところ、K18C-A350 の場合と同じ挙動を示し、ヘム濃度依存的な蛍光消光が確認された。両者共にヘム滴定に伴う蛍光スペクトルのピークシフトはほとんど見られなかったが、K18C-ANS についてはヘミンを 0.8 当量加えたあたりから数 nm の blue shift が観察された。

K18C-A350 のヘム滴定における添加したヘミン濃度と、それによって低下した蛍光波長 430 nm における蛍光強度差 $F_0 - F$ 値の関係をプロットした図について非線形カーブフィッティング解析を行い、結合曲線およびそれを当てはめるときのパラメーターを算出した（図 3-5, D）。その結果、 n は 0.97 で K_d 値は 1.44 ± 0.36 nM となった。また、K18C-ANS（図 3-5, E）と K18C-A555（図 3-5, F）についても結合曲線を作成し n および K_d を求めたところ、前者の n が 0.94 で K_d は 9.88 ± 0.57 nM、後者は $n = 0.96$ 、 $K_d = 2.47 \pm 0.05$ nM とそれぞれ算出された。これらの結果を見ると、ヘムと蛍光ラベル化 K18C 蛋白質との結合親和性を示す K_d 値は K18C-A350 が最も小さく、ヘムとの親和性が高いことが示された。しかし、K18C-A555 もほとんど親和性に差は無く、K18C-A350 と蛍光波長が異なるため、夾雑物の影響や測定条件などの都合に合わせて両者を選択することで、対応できる測定条件の幅が広がる。一方、K18C-ANS の K_d 値はこの他の 2 種類と比べて 10 倍程度高いが、この蛍光ラベル化蛋白質においても測定系に存在するヘム濃度により使い分けることができるのではないかと考えられる。

本項以降の実験については、ヘム親和性が最も高かった K18C-A350 蛋白質をヘムセンサーとして使用することとした。

3-3 センサーが示すヘム選択性と dose-response curve

ヘムセンサーのヘム選択性を調べるため、ヘムセンサーに対してヘミン溶液およびそれ以外の 4 種類の試料をアナライトとして滴定し、それらの添加濃度と蛍光強度変化との関係についてを調べるためリガンド選択性試験を行った。その結果を基に作製

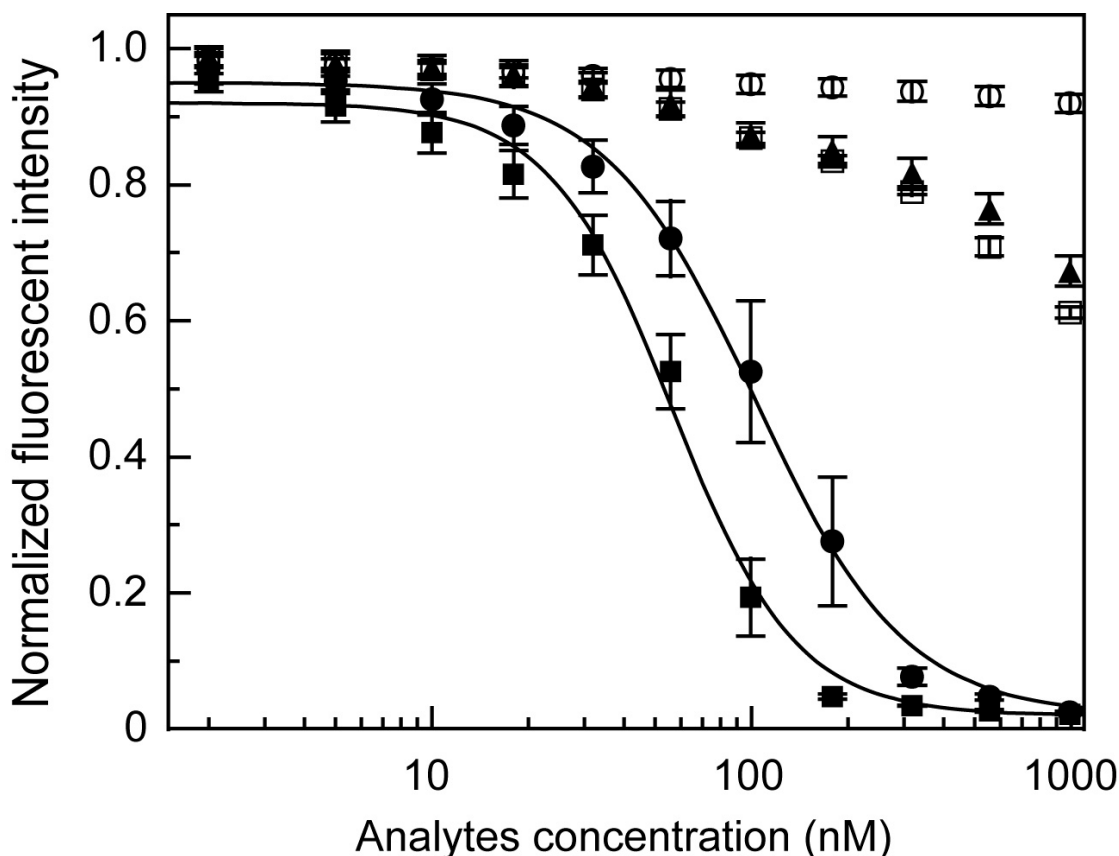


図 3-6 ヘムセンサーに対して各種アナライトを滴定した場合に観測された相対的な蛍光強度変化値より作成した用量反応曲線

100 nM のヘムセンサー溶液 2 ml (20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) で調製) に対して滴定したアナライトは、ヘミン (■)、Zn-PPIX (●)、PPIX (▲)、ビリベルジン IX α (□)、FeSO₄ (○) を 100 mM NaOH に溶解し、さらに同液で適宜希釈して調製した。アナライト添加後、430 nm における蛍光強度を測定し、その値を標準化したもの (F/F_0 値) を解析に使用した。データポイントはそれぞれ 3 回の測定値における means \pm SD を表す。

された dose-response curve (用量反応曲線) を図 3-6 に示す。この図の縦軸は 100 nM ヘムセンサー溶液に対して各種アナライトを添加した時に起こる標準化した蛍光強度変化値を、横軸は添加したアナライトのセル内終濃度 (ただし軸目盛は片対数表示) を表す。ヘミン滴定時の蛍光強度変化は、前項で示した K18C-A350 滴定結果とほぼ同じ結果となった。ただし、セル内終濃度が当量に達している 100 nM から 200 nM に変化した場合においても 100 程度の蛍光強度の低下が起こった。Zn-PPIX を滴定した場合は、ヘミン溶液滴定と同様にセル内の濃度上昇に伴って蛍光強度が減少し、

終濃度 300 nM に達した時点ではほぼ 90%の蛍光強度が消光して、それ以上のアナライト添加では強度変化は見られなくなった。その結果について、ヘミン滴定実験と同じ方法でカーブフィッティング解析を行い K_d 値を求めたところ、およそ 70 nM と算出された。一方で、PPIX、ビリベルジン IX α 、FeSO $_4$ (セル内添加後は Fe $^{3+}$ イオンとなる) を添加した場合は、当量付近の濃度になるまで滴定しても顕著な蛍光強度変化は見られなかったが、PPIX とビリベルジン IX α では終濃度 200 nM 以上の範囲で蛍光強度の低下が観察された。

3-4 マイクロプレート測定系における結合曲線の作成と親和性解析

蛍光測定用 96 ウェルマイクロプレートとヘムセンサーを用いた測定系の検証は、終濃度が 90 nM (あるいは 9 nM) になる K18-A350 溶液入りのウェルに対して、終濃度 0~144 nM (9 nM センサー溶液の場合は 0~18 nM) になるように設定したヘミン標準液を各ウェルに添加し、蛍光マイクロプレートリーダーで励起波長 353 nm、蛍光強度 430 nm における蛍光強度を測定することで実施された。マイクロプレート測定系においても、蛍光分光光度計と蛍光測定用セルを用いた測定系による結果と同様に、各ウェル内のヘムセンサーが示す蛍光強度がそのウェルごとに投入されたヘミン濃度に依存して減少し (つまりヘミン終濃度が上がるにつれて F_0-F 値が大きくなり)、当量以上になると変化しなくなった。図 3-7 の A に実線で示されている 90 nM ヘムセンサーを用いた測定系の非線形カーブフィッティング結果より、 n と K_d の値はそれぞれ 1.0、 0.77 ± 0.40 nM と求められた。一方で、それよりもさらに低いヘム濃度範囲における結合曲線とパラメーターを算出するため、9 nM ヘムセンサーを使った測定系について同様に実験を行いフィッティング解析した結果が図 3-7 の B となった。この結果でも、ヘムセンサーは良好なヘム結合応答を示しており、1~2 nM の濃度範囲であっても明確なヘム検出が可能であることが示された。さらに n 、 K_d の算出結果は 0.9、 1.20 ± 0.35 nM となった。

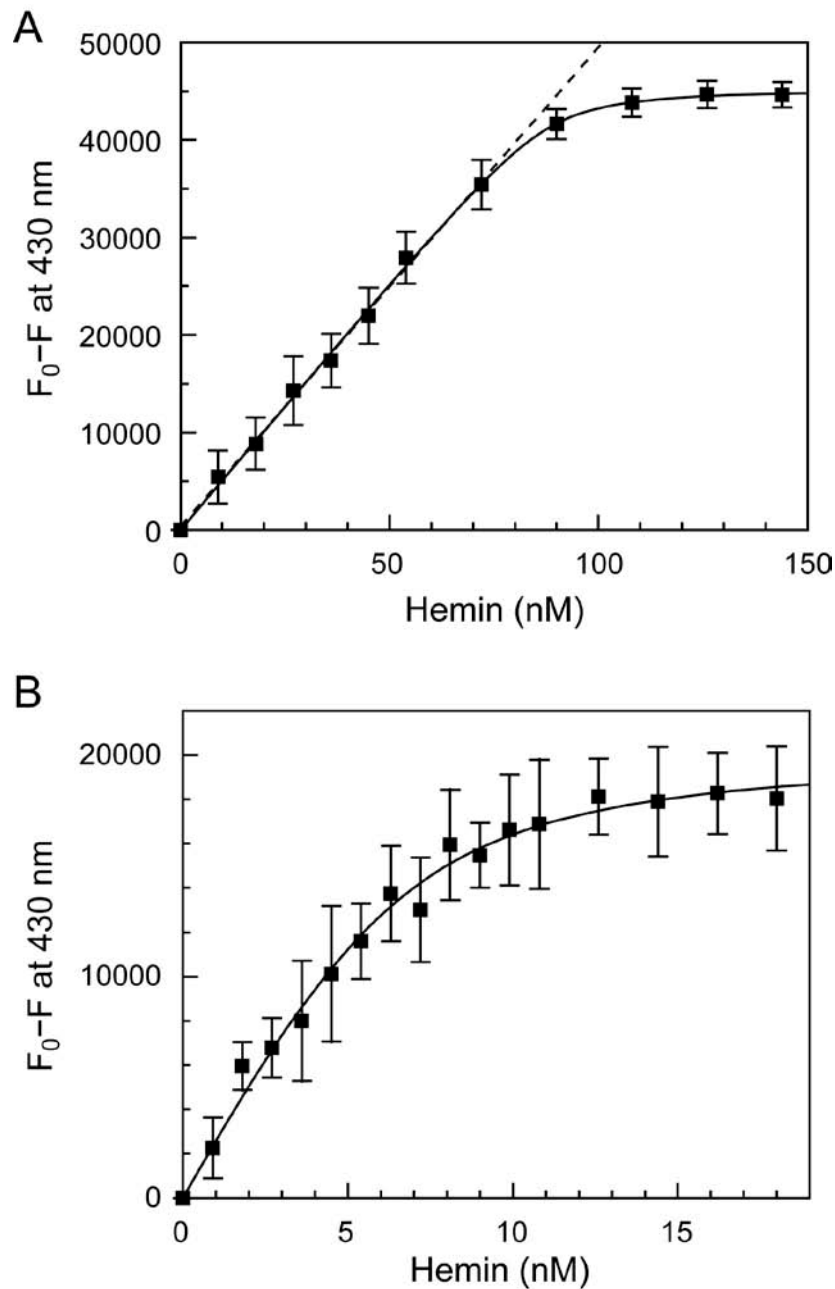


図 3-7 ヘムセンサー溶液を用いた蛍光マイクロプレート定量法の検証結果

A: 終濃度 90 nM のヘムセンサー溶液を使用した場合。実線で示した結合曲線は各ウェル内ヘミン濃度とヘミン添加によって生じた蛍光強度差との関係を示すプロット的非線形カーブフィッティング解析結果より求めた。破線で示した直線はヘミン終濃度 0~72 nM の範囲のデータを線形回帰することにより得られた検量線。

B: 終濃度 9 nM のヘムセンサー溶液を使用した場合の非線形カーブフィッティング解析より得られた結合曲線。各ポイントは 3 回の独立した実験による測定値での means ± SD を表す。

図 3-7 の A において、ヘミン終濃度が 0~72 nM の範囲について注目すると、430nm における蛍光強度差との間に良好な直線関係が認められた。これらのデータポイントを抽出して線形回帰を求めたところ、その近似式は $y = 4.91x + 0.04$ ($R^2 = 0.997$) となった (図 3-7、A に示す破線)。したがって、この線形近似曲線はマイクロプレート定量系における測定対象の遊離ヘム濃度を決定するための検量線として利用できることがわかった。

3-5 変性ヘモグロビンから遊離したヘム濃度測定および回収率の比較

3 種類の処理液を用いて作製した測定試料に含まれる変性 hHb 由来の遊離ヘム濃度を蛍光マイクロプレートを用いた測定系によって測定し、その値よりヘム回収率を求め、さらにその結果から hHb の変性度を推定する実験を行った。表 3-1 に hHb を処理した試料より算出されたヘム回収率を示す。これらの値は hHb 1 mol から最大 4 mol のヘムが遊離するという原理に基づいて計算している。まず、2%塩酸/アセトン液によって処理した hHb 試料の測定結果では、ほぼ 100%のヘムが検出された。よって、本センサーを使ったヘム回収率測定法の妥当性が示された。次に、100 mM NaOH によるアルカリ変性処理を行った hHb 試料からは 60%程度のヘムが回収された。これは、hHb がアルカリ条件下において部分的に変性し³⁴⁾、その分子上での変性した部分 (回収率からの推定では 2 ないし 3 つのサブユニット構造の崩壊を意味する) から遊離したヘム量をダイレクトに示している。一方で、20 mM リン酸カリウム緩衝液で処理した control 試料からは約 3%のヘムしか検出されなかった。したがって、各変性処理に使用した元の hHb 試料中には遊離ヘムはほとんど含まれておらず、抽出操作自体には hHb を変性させるだけのインパクトは無いことが示された。

本実験は最初 hHb ではなく、市販のウシ血液由来 Hb 粉末を使用していた。しかし、本試薬の場合では control 試料からも 10%以上のヘムが検出された。さらに、その Hb を 20 mM リン酸カリウム緩衝液に溶かしたものについて吸収スペクトルを測定してみると、hHb の場合と異なる吸収を示し、そのほとんどが met-Hb の状態であることがわかった。よって、このウシ Hb 試薬は市販される前の精製・保存工程の段階で Hb の変性や met-Hb 化が進み、intact な状態を維持できていない可能性が示唆されたため、ウシ Hb ではなく hHb 標準試薬を用いて実験を行うことになった。

表 3-1 変性処理した hHb 由来のヘム回収率とその比較

hHbの状態	変性処理法	ヘム回収率* (%)
完全変性	2%塩酸/アセトン	108 ± 7
部分的に変性	100 mM NaOH	61 ± 7
無傷(インタクト)	なし	3 ± 1

Note: 測定試料のヘム濃度は、蛍光マイクロプレート定量系により決定した。

* ヘム回収率は 1 mol の hHb から最大 4 mol のヘムが遊離する原理に基づいて算出した。これらの値は 3 回の測定値における means ± SD から求めた。

3-6 遊離ヘム/ヘモグロビン混合溶液のヘム定量および存在比の算出

ヘミン溶液と hHb 試料溶液を設定した濃度比になるように混合したモデル試料に対して 4 種類の処理液を用いてヘム・定量を行い、その結果から両者の存在比を算出した。3 種類のモデル試料を作製するにあたり、溶液中の遊離ヘム/hHb 存在比以外の条件を均等にするため、モデル試料は全て 2 ml で、それに含まれる総ヘム量も可能な限り同じになるように調製した (heme/hHb 混合比が 1:1 と 4:1 の試料の場合はヘム量 80 nmol で 1:4 の場合のみ 85 nmol)。図 3-8 に各ヘム抽出試料におけるヘム定量結果および存在比の算出結果を示した。グラフ中の破線は、各モデル試料の遊離ヘムまたは総ヘムの設定モル量を表す。まず、モデル試料を 20 mM リン酸カリウム緩衝液および 5 mM NaOH で処理した場合は、hHb の変性は起こらないため、モデル試料中に存在する遊離ヘムのみを検出するための抽出試料が得られるはずである。実際に 3 種類のモデル試料の定量結果を見ると、5 mM NaOH の場合は概ね各試料の設定濃度と同じ値を示しており、遊離ヘムを検出できていた。また、hHb の変性も見られなかった。一方、20 mM リン酸カリウム緩衝液を用いた場合は全ての結果において設定濃度の半分適度しか遊離ヘムを検出できていなかった (図 3-8、グラフ中の白色バー)。次に、モデル試料を 25 mM NaOH または 2%塩酸/アセトン液で処理した場合には、前者は hHb の部分変性、後者では完全変性によりヘムが遊離し、総ヘムの設定濃度に近い定量結果が得られた。なお、このときの 25 mM NaOH 処理試料でのヘム回収率は 60~80%となった (図 3-8、灰色バー)。

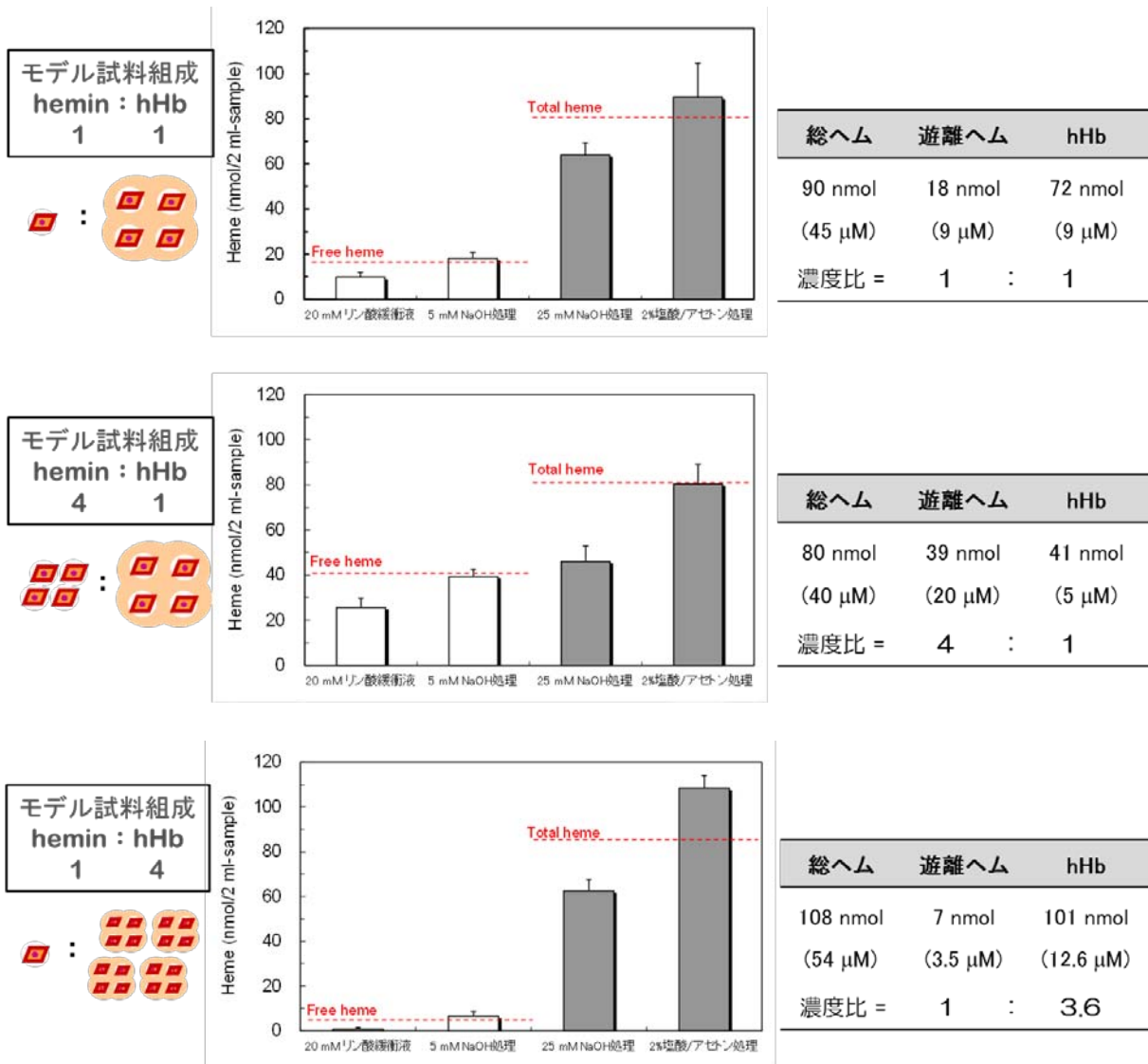


図 3-8 遊離ヘム/hHb 混合モデル試料におけるヘム定量結果と存在比の算出

グラフ:ヘミン溶液とhHb溶液を混合し作製した3種類のモデル試料(遊離ヘム:hHbの濃度比がそれぞれ1:1、4:1、1:4となるように調製)を4種類の処理液を用いてヘム抽出操作を行い、得られた測定試料に含まれるヘム量を蛍光マイクロプレート定量法により決定した。赤破線は試料の遊離ヘム(Free heme)または総ヘム(Total heme)の設定モル量を表す。また、ヘムの定量結果は5つの測定値におけるmeans \pm SDで示した。表:2%塩酸/アセトン処理試料における定量結果を総ヘム量、5 mM NaOH処理試料の結果を遊離ヘム量とし、その差からhHb由来のヘム量を算出した。さらにその値をヘムあるいはhHb濃度に換算し、存在比として比較した(表の濃度比)。

各モデル試料の定量結果からそのヘムまたは hHb 濃度を算出し (hHb 濃度 (μM) = 2%塩酸/アセトン試料から求めた総ヘム量 (nmol) - 5 mM NaOH 処理試料から求めた遊離ヘム量 (nmol)/2 ml 試料/4(ヘム→ヘモグロビン換算)で計算)、遊離ヘム濃度と hHb 濃度を比較したところ、3 種類いずれの結果においても設定した混合比と一致し (図 3-8 中の表)、正確な遊離ヘム/hHb の存在比を求めることができた。

3-7 疑似便に含まれるヘモグロビンの定量

市販の上新粉と hHb 溶液を用いて作製した 4 種類の疑似便を便潜血検査用検体と見立ててサンプリングし、それを酸性アセトン処理して得られた測定試料のヘム定量値を hHb 濃度に換算した。1 種類の疑似便当たり 4 検体ずつ (検体は疑似便を 0.1 g ずつ個別にサンプリングし、N1~N4 とナンバリングした) 測定した結果を図 3-9 にまとめて記した。グラフ中の破線は各疑似便の設定 hHb 濃度を表す。この結果から判断すると、概ね各疑似便の設定値に近い hHb 濃度を算出することができている。しかし、各検体の算出濃度に多少のばらつきが見られ、全体的に設定濃度を示す破線よりも高い値となった。特に、0 $\mu\text{g/g}$ -疑似便の結果 (図 3-9、ブルーのバー) は 3.6 ~ 6.3 $\mu\text{g/g}$ -疑似便の hHb が含まれることを意味していた。便潜血検査における一般的な陽性診断のカットオフ値は 30~50 $\mu\text{g/g}$ -便と言われているため (図 3-9、オレンジのバーに相当)、本ヘム定量法を基にした hHb 測定法でも同程度の精度で便潜血を検出できることが示された。この Hb 検出のカットオフ値である 50 $\mu\text{g/g}$ -便をヘム量に換算すると 3.1 nmol/g-便 (1.9 $\mu\text{g/g}$ -便) となるが、本実験結果ではその半分の 25 $\mu\text{g/g}$ -便を検出できていることから、今回実施した測定条件によって 1 $\mu\text{g/g}$ -便程度のヘムを検出できることが実証された。

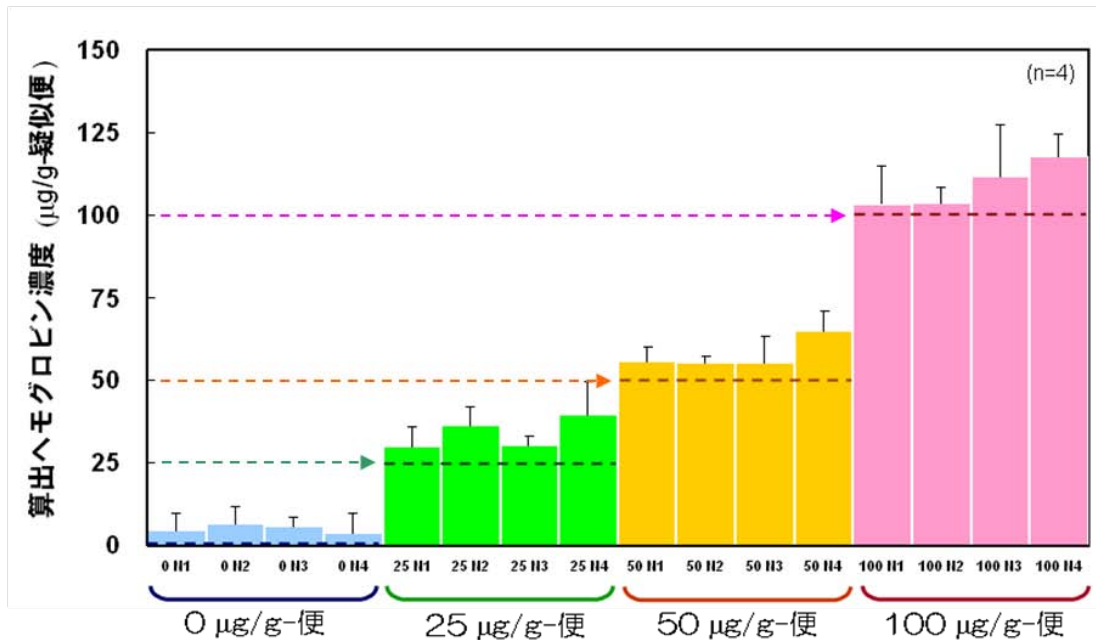
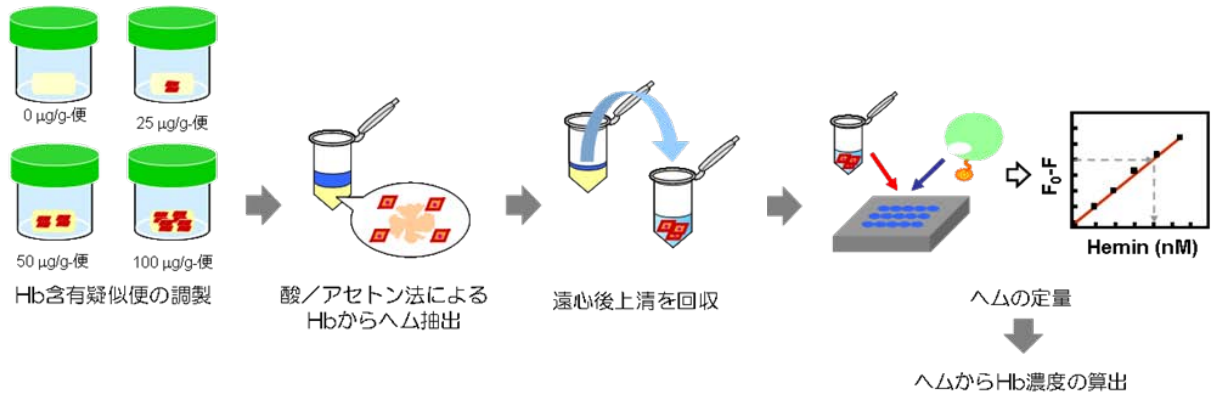


図 3-9 疑似便に含まれる hHb 濃度の測定工程および算出結果

作製した4種類の疑似便につき4検体の測定試料(N1~N4)を酸性アセトン処理法により作製し、蛍光マイクロプレート定量法により決定したヘム濃度からhHb濃度を算出した。ブルーのバーは0、グリーンは25、オレンジは50、ピンクは100 µg/g-疑似便を処理した試料から求めた算出ヘモグロビン濃度を表す。図中の破線は各種疑似便のhHb設定濃度を示している。便潜血検査の一般的な陽性診断のカットオフ値はおよそ50 µg/g-疑似便でありオレンジのバーに相当する。各検体の算出濃度は means ± SD (n = 4)で示した。

第4章 考察

4-1 HO-1 変異体を応用して作製した蛍光検出型ヘムセンサーの特徴

4-1-1 高感度ヘムセンサーを設計するための条件

本研究でデザインしたヘムセンサーは、その母体となる HO-1 の proximal helix 上にある 18 番目のアミノ酸残基の側鎖にマレイミド基を介して蛍光団を導入している。これは HO-1 のヘム結合ポケットに非常に近接した位置であり（分子モデリングソフト上では両者間の距離は約 1 nm）、ヘムセンサーとヘムが結合して複合体を形成後、両者の間で効率よくエネルギー移動するのに都合が良い。しかし、この Lys-18 はヘムと HO-1 が複合体を形成するときヘムのプロピオン酸基と静電的に相互作用してヘムの結合ポケット内での結合の向きを決定する役割を担っているため^{16,17,20}、18 番目のアミノ酸残基の変異は HO-1 が有するヘム結合親和性を低下させることも考えられる。これについては東元らによる研究成果により、Ala-18 に変異させた HO-1 でもヘムとの結合親和性は WT とほぼ変わらないという結果が示されている³²。そして、本研究で作製した K18C 変異体に蛍光色素を導入した 3 種類の蛋白質に対しヘムを滴定し、その吸収スペクトル変化を観察した実験結果では、これらの操作を行ってもなお、蛍光ラベル化した K18C は WT と同様にヘムと 1:1 の割合で安定な複合体を形成していることを裏付ける Soret 吸収帯や可視吸収帯の上昇が確認された。したがって、今回使用した K18C はヘムとの複合体形成メカニズムおよび結合親和性には影響しないものと考えられる。今回使用した蛍光色素の Alexa Fluor シリーズは親水性が高い構造からなり、また、18 番目のアミノ酸残基の側鎖は溶媒側を向いているため、蛍光色素を導入するのに適したポジションである。加えて、蛍光団を効率良く励起・蛍光させるのに都合が良いため、エネルギー移動の高効率化にもつながる。

蛍光ラベル化に使用する最適な蛍光色素を選定するために、本研究では 3 種類の市販の蛍光試薬を検討した。これらの蛍光色素が示す蛍光波長は、図 1-5 示したようにいずれも HO-1-ヘム複合体が示す吸収帯と重なることを前提として選んだものであり、A350 および ANS は Soret 吸収帯と、A555 は HO-1 複合体の可視吸収帯（ α および β 吸収帯）と重なるため、両者間でエネルギー移動が起こる。しかし、単にヘム

の吸収とこれら色素の蛍光波長が重なり合い、両者がエネルギー移動できる距離内に近づけば良いという訳ではないことが実験により示されたため(3-2-2項、A350色素溶液とヘムとの滴定実験より)、HO-1とヘムの安定な複合体形成が起きた上で、その結合しているヘムと蛍光団の間の距離並びに両者の波長の重なり合いの条件が満たされた場合に効率良く蛍光消光が起こるものと考えられる。

4-1-2 ヘム滴定時のスペクトル変化およびフィッティング解析から求めた K_d

今回作製した3種類の蛍光ラベル化蛋白質を用いたヘム滴定の結果では、いずれの蛋白質においてもヘム濃度依存的に蛍光消光し、蛍光強度変化幅も大きいことから、ヘム-蛍光ラベル化蛋白質の分子内で効率良くエネルギー移動が起きていることがわかる(図3-5)。この3種類のうち、吸収と蛍光波長の重なりが最も大きいのはK18C-ANSで、小さいのはK18C-A555である(図1-5)。しかし、蛍光スペクトル変化を見る限りではその両者間の変化幅にあまり差はなかったため、K18C-A555とヘム-HO-1複合体の α および β 吸収帯との重なり程度であってもエネルギー移動は成立する。ただし、A555はA350やANSと比べてモル吸光係数が8倍程度高いという蛍光団の特徴があり(図1-5)、これがエネルギー移動効率に影響している可能性がある。ヘム滴定時における蛍光スペクトル変化を観察すると、3種類の蛋白質ともヘミン添加に伴う蛍光波長のピークシフトは起こらなかったが、正確には当量付近になると蛍光波長のピークが不鮮明になり1nm程度red shiftする場合もあった。また、ANSの場合は0.8当量のヘミンを添加したあたりから数nm程度blue shiftした。A350およびA555の場合は顕著なピークシフトは起こっていないため、蛍光団の周りの環境が変化していないことを示している。蛍光団は18番目のアミノ酸残基の側鎖にあり、センサーがアポ型のときは溶媒にさらされた環境にあるが、ヘムと結合してホロ型になりその蛍光団がヘムおよびHO-1の疎水性領域(HO-1のヘム結合ポケット内は疎水性に富む構造になっている^{16,17,20})と近づいてもそれらとは相互作用せず、基本的には溶媒側に留まっているものと考えられる。A350とA555は親水性の蛍光色素であり、溶媒側を好むこともこの事実を支持している。一方で、ANSの場合は滴定の途中からblue shiftが起きたが、これは蛍光団の周りの環境が疎水性へと変化したことを意味する。本来この蛍光団は疎水性の蛍光色素であり、蛍光強度や蛍光スペクトルが周囲の環境の影響によって大きく変化する(最大で60nm程度blue

shift する場合もある³⁶⁾。また、蛋白質の疎水性領域とインタラクションしてピークシフトや蛍光強度変化を示す性質がある。しかし、ANS のスペクトル変化を見る限りでは顕著なピークシフトは起きていないため、蛍光団が積極的に疎水性領域と相互作用しているわけではなさそうである。

ヘムセンサーで試料中の遊離ヘムを高感度に検出するにはヘムと確実に結合して複合体を形成し、それが解離しないことが重要である。もし検出対象の遊離ヘムとセンサーが複合体を形成し消光が起きても、再びヘムがセンサーから遊離してしまうと消光しなくなり、観測される蛍光強度値が回復してしまうため正確な蛍光強度差を求めることができず、定量は不可能となる。そこで、ヘムセンサーの母体である HO-1 とヘミンとの結合モデルを基にして導出した式 (2-6 項参照) より算出される解離定数 K_d をヘムに対するセンサーの結合親和性として評価した。その K_d 算出結果は 3-2 項で示した通り、K18C-A350 が 1.44 ± 0.36 nM、K18C-ANS は 9.88 ± 0.57 nM、K18C-A555 では 2.47 ± 0.05 nM となり、K18C-A350 が最も高いヘム親和性を示した。K18C-ANS は、K18C-A350 に比べ 10 倍親和性が低い結果となり、そのヘム結合曲線の形の違いも明らかだった (図 3-5、D と E)。この理由を考えると、第一に思いつくのは ANS が疎水性の色素であるため、HO-1 のヘム結合ポケットと相互作用してヘム結合を阻害するイメージである。現在のところ、これが一番有力な説明であると考えているが、これで片づけてしまうには気になる点もあり、その一つは前述したヘム滴定に伴うピークシフトがあまり起きていないことである。もし ANS の蛍光団がヘムポケットに入り込んでヘムの邪魔をしているのであれば蛍光団の周囲の疎水性が向上するため、それに伴って大きなピークシフトが観察されそうなものである。一方で、HO-1 と結合している状態のヘムと相互作用してそれを引き抜いてしまう (ヘムはヘムポケット内で結合していても半分は溶媒にさらされているため色素と相互作用できる可能性がある) ことも考えられ、この場合ピークシフトは起こらないかもしれない。いずれにせよ ANS の蛍光団はヘムあるいはヘムポケットに届く距離内にあるため、理論上は不可能ではない。また、このような現象が起きているとすれば、果たして K_d 値の差は 10 倍程度で収まるかという疑問も出てくる。しかしながら、蛍光スペクトル変化を見る限りではおよそ 1 当量のヘムを添加した時に消光が完了し、それ以上ではほとんど変化していないため、ANS の蛍光団はヘムとセンサーの結合および複合体形成に対して重大な阻害を起こすには至っていないものと考えられる。

K18C-A555 の親和性は、K18C-A350 と比べて約 2 倍低く、ヘム結合曲線の形にあまり差は見られなかった (図 3-5、D と F)。A555 の蛍光団は A350 と同じく親水性の色素であるため、ANS の場合のようなヘム結合部位との相互作用は起こっていないものと考えられる。本蛍光色素の正式な構造は公開されていないが、試薬ラベルに分子量は~1250 と明記されており、A350 の分子量 578 に比べ 2 倍程大きい。また、両者にはマレイミド基と蛍光団との間をつなぐ直鎖炭素のリンカー (スペーサー) が存在し、その炭素数に違いがある (表 2-1 参照)。よって、これらの要素が K_d 値の差に関係しているのかもしれない。一方で、A555 の蛍光団の特徴に注目すると、メーカーカタログによれば、その最大励起は 555 nm で最大蛍光波長は 565 nm とされており、この両波長の差 (ストークスシフト) はわずか 10 nm である。一般的には、これらの波長の差は大きい程特異的な蛍光波長における強度検出に有利であるといわれているため、A555 はその点で言えば定量原理上、少し取り扱いにくい色素でもある。これら 3 種類の蛍光ラベル化蛋白質から最良なものを選択するとした場合は、単純にヘムとの親和性の高さで考えれば K18C-A350 であるが、K18C-A555 もほぼ同等の親和性であると考えることができ、この蛍光団は A350 とは異なる可視吸収帯の蛍光強度変化によりヘム検出応答を示す。また、 K_d 値が大きかった K18C-ANS についても検出しようとするヘム濃度によっては利用することができる。したがって、3 種類の中から最良のものを決定するのは判断が難しく、測定対象や条件によってこれらを使い分けることが重要であると考えられる。

ここで K18C-A350 の結果に着目し、2 点の考察を行った。K18C-A350 におけるヘミン滴定時の濃度とその蛍光強度変化値 $F_0 - F$ の関係から求めた K_d は 1.44 ± 0.36 nM であったが、一方で添加したヘミン濃度とそれに伴って上昇する 406 nm の吸光度との関係、すなわち図 3-4 の A の結果についてプロットし、図 3-5 で求めたヘム結合曲線と同様にカーブフィッティング解析を行い K_d 値を算出した (図 4-1)。その結果、約 30.5 nM となり、蛍光強度変化値から求めた場合より 20 倍程度低い親和性を示す数値が得られた。そこでこの値が妥当であるか確認するため、東元らが報告した WT HO-1 についてヘム滴定を行った場合の K_d を参照したところ 0.35 μ M だった³²⁾。よって、本実験で求めた吸収法での結果も概ね妥当であることが示されたが、蛍光法による結果との違いについて考えると、これはヘム滴定に使用したヘミン溶液と蛋白質濃度の違い (蛍光法は 50 nM に対して、吸収法では 3 μ M) に起因するものと

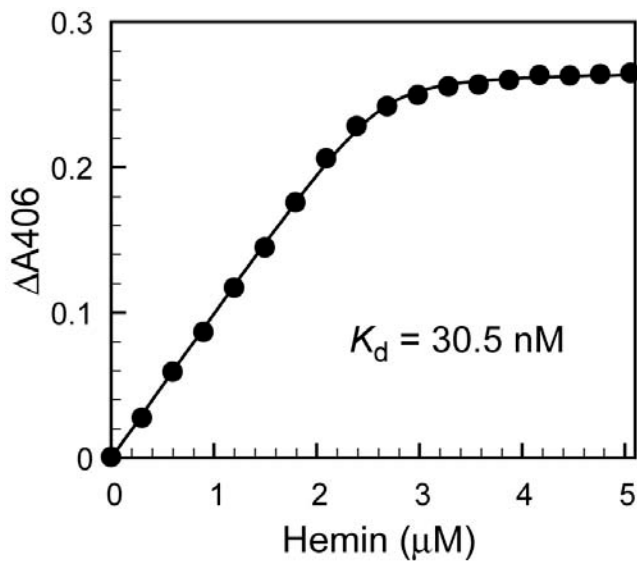


図4-1 3 μM K18C-A350に対してヘミン溶液を滴定した場合におけるセル内ヘム濃度と 406 nm の吸光度上昇との関係から求められたヘム結合曲線

図の元データとなるヘム滴定実験における吸収スペクトル変化は図 3-4 の A を参照。結合曲線および K_d 値は図 3-5 の D~F で行った解析と同じ方法で求めた。

考えられる。蛍光法の滴定実験は nM オーダーという低濃度領域でのセンサーとヘミンの結合を観測することができるため、HO-1 本来の当量濃度に近い条件で測定された関係から K_d 算出が可能であるのに対して、吸収法では μM オーダーの蛋白質とヘミン溶液の複合体の吸光度変化しか観測できず、その結果を解析して nM オーダーの K_d を算出することになるため、その値は信頼性に欠けるものであると考えられる。したがって、本センサーを用いて HO-1 のヘム親和性を求めるには蛍光法による結果を用いてフィッティング解析を行う必要がある。仮に蛍光法以外の方法を用いてさらに低濃度条件でヘムとの結合解析を行うことができるとすると、これらの K_d よりもさらに小さい値となるかもしれないが、本センサーを用いる場合は nM 範囲での解析までしかできない。しかし、本データは HO-1 がヘムに対して示す K_d を nM オーダーの条件下で測定した初の報告例である。

ところで、ヘムとの親和性の高さだけで考えれば、アポ型のヘム蛋白質はヘムに対して 10^{-13} M という非常に高い K_d を示すことが知られており²⁾、HO-1 のそれを上回っていることから、これらを同様に蛍光ラベル化して用いれば HO-1 を母体とするセンサーよりも高感度に遊離ヘムを検出できると考えられる。しかし、アポヘム蛋白質はそれ自身が非常に不安定な状態のものが多く、それらを蛍光ラベル化し、ヘムと結合して再構成するまでの保存期間に構造の変性や劣化が起こりセンサーとして使用できなくなることが懸念される。一方、HO-1 はアポ型でも単独で安定に存在することができ、ヘムが解離した後も元のアポ HO-1 構造に戻ることができる(図 1-3 参照)。

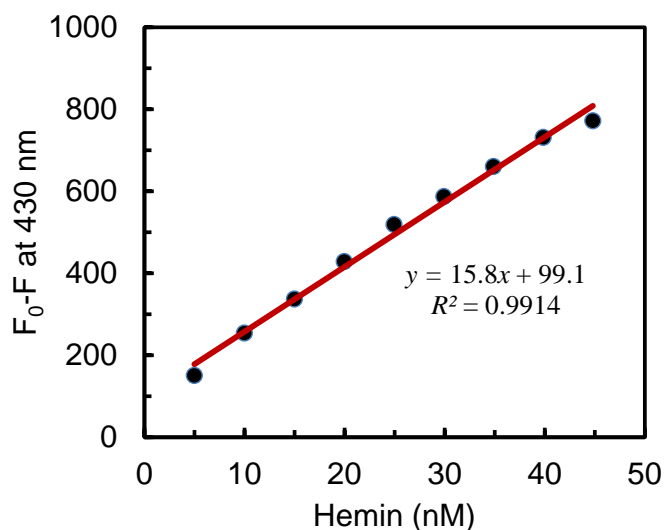


図 4-2 50 nM K18C-A350 におけるヘム滴定時の添加ヘミン濃度と蛍光強度差の関係を線形近似して得られた検量線

図 3-5、D の 5~45 nM の範囲のプロットを抽出し、それらについて線形回帰して求められた近似曲線とその一次式。蛍光分光光度計を用いた測定系において、未知試料のヘム定量を行う場合の検量線として利用することができる。

つまり、HO-1 を利用したセンサーはヘムとの結合に関わらず常に安定な構造をとって存在できるため、ヘムセンサーとして取り扱うのに都合が良い。なお、K18C-A350 蛋白質は作製後に冷凍・遮光保存しておけば少なくとも半年はヘム検出能を損なわずに存在できることが分かっている。この長期保存法については今後詳細に検討を重ね、最低 1 年間の保存が可能となる方法の開発を目指す。

もう一点は、K18C-A350 の線形近似曲線についてである。図 3-5 の D のヘム結合曲線を観察してみると、当量濃度付近まで良好な直線関係にあることがわかる。そこで、これら 5~45 nM の範囲にあるプロットについて線形回帰し得られた近似曲線を図 4-2 に示した。結合曲線の直線領域について線形回帰する操作は蛍光マイクロプレート測定系の結果に対して行ったが（図 3-7、A の中の破線）、蛍光分光光度計を用いて測定する蛍光セル測定系における滴定ヘミン濃度と蛍光強度変化の関係についても線形近似式が得られ、これは図 3-7 の場合と同様に未知試料のヘム濃度を定量するための検量線としての利用が可能である。

4-1-3 ヘムセンサーのリガンド選択性

図 3-6 に示した、ヘムセンサーに対し 5 種類のアナライトを滴定した場合の蛍光強度変化と添加濃度の関係から作成した dose-response curve により、ヘムセンサーはヘミンおよび Zn-PPIX と特異的に結合し、蛍光消光することがわかった。それに対

し、その他の3種類のアナライト(これらは全てヘムの生物学的関連物質であり、PPIXはヘム前駆体でそれ以外の2つはヘム代謝産物)を添加しても濃度依存的な蛍光消光は起こらず、当量付近まではほとんど蛍光強度変化しなかった。その後、終濃度 200 nM を超えたあたりから少しずつ蛍光強度の低下が起こり始めたが、これはヘムセンサーに結合して起こるエネルギー移動とは別のメカニズムによるものと考えられる。

もともと Zn-PPIX は、ヘムと同様に金属ポルフィリンの一種であり、その構造は中心金属が鉄ではなく亜鉛であるという点以外は同じである。したがって、HO-1 の proximal helix 上にある His 配位子との配位結合や、ヘムポケットを形成するアミノ酸残基と静電的に相互作用することができ、Zn-PPIX はしばしば HO-1 のヘム結合阻害剤として用いられている^{37,38)}。しかし、中心金属の違いにより HO-1 との結合親和性はヘムのそれよりも低いと考えられる。本実験結果により Zn-PPIX の K_d は約 70 nM と求められたが、これは HO-1 WT に対する阻害定数 (inhibitory constant) の 0.11 μ M とよく一致していたため^{37,38)}、妥当な算出値であると判断できる。したがって、ヘムセンサーが示す選択性はヘミンと Zn-PPIX の間でおおよそ 50 倍の差があることを意味している。仮に Zn-PPIX とヘムとが共存するような測定試料があるとすれば、センサーはヘムと選択的に結合し消光を示す。ただし、その全体のヘム定量値のうち 50 分の 1 の割合で Zn-PPIX による誤差が含まれるという検出精度である。

以上のことから、本ヘムセンサーはヘム前駆体や代謝産物、あるいはヘムに類似した構造の金属プロトポルフィリンなどが混在するような測定対象であっても、母体である HO-1 の基質特異性に起因するリガンド選択性により、最も高い結合親和性を示すパートナーであるヘムと結合し、蛍光消光を起こすということがわかった。このヘムセンサーの高い選択性は、生体試料などに含まれる微量な遊離ヘムを、多くの夾雑物による影響を回避して測定するための大きなアドバンテージとなる。

4-1-4 マイクロプレート測定系の特徴とメリット

3-4 項で蛍光マイクロプレート測定系におけるウェル内ヘミン濃度とヘムセンサーの蛍光強度変化の関係から求めたヘム結合曲線および K_d 値を示した。マイクロプレートを用いた測定系は多サンプルを迅速に測定するには向いているが、その性質上測定値に誤差が含まれていたり、再現性に乏しかったりすることがしばしば見受けられる。しかし、本実験結果ではデータのばらつきの指標である SD 値も全体的に大き

くなく再現性が良好であったと考えている。特に、図 3-7 の B では 0~9 nM という低濃度領域（これは図 3-7、A の原点から隣のプロットまでの範囲を拡大したものに相当する）における関係を示すプロットおよび結合曲線を示し K_d を算出できたことには満足している。この結合曲線は、蛍光セルを用いた測定系（図 3-5, D）および最終濃度 90 nM のセンサー溶液を用いたマイクロプレート測定系（図 3-7, A）により求めた K_d 値よりもさらに低い濃度条件での結果を解析したものであり、フィッティングカーブの形も正確な当量濃度を示していることから、算出された 1.20 ± 0.35 nM はこれまで示した蛍光法による K_d の中では最も正確な値であると考えられ、同時に本研究で示した K_d 算出法の妥当性が実証された。さらに、本結果はマイクロプレート測定系で 1 nM 単位の濃度差を見分けることができるヘム定量法が実現したことを表しており、この定量法の検出感度は既存技術（ピリジン-ヘモクロモゲン法）の性能よりも 1000 倍以上優れている。図 3-7 の A に示した検量線はヘミン濃度が 0.8 当量付近になるまで良好な直線性を示した。このデータの場合、検量線は対象とするプロットに対して線形近似を行い作成するため、1~72 nM の領域においてその有効範囲を必要に応じて変更することができる。特に低濃度のヘムを定量する場合には、有効にするデータ範囲を絞った近似式（0~45 nM までのデータを採用するなど）を使用した方が信頼性の高い結果を得ることができる。よって、この検量線の精度であれば 50 nM までの範囲における定量値は信頼性の高いデータであると考えられる。

本センサーを用いたマイクロプレート測定系は、ヘムセンサー溶液濃度を調節するだけで nM オーダーの測定範囲を全般的にカバーすることができる使い勝手の良い多サンプル測定型のヘム定量法であると言える。よって本法はスクリーニング測定のためのツールとして利用することも可能であり、幅広い分野での研究や分析で役立つことが期待される。

4-1-5 既存の定量法および提案されている protein-based ヘム定量法との比較

蛍光検出型ヘムセンサーを用いて遊離ヘムを選択的に検出するという原理からなる本研究で提案した定量法は、吸収法によりヘムを測定する既存の方法と比較すると、検出感度ではヘムセンサーによる定量法が上回っている。また、測定対象に含まれる夾雑物の影響も吸収法に比べて受けにくい。仮にセンサーが示す蛍光波長と同じ蛍光を示す物質が混入した試料を取り扱う場合は、A350 と A555 のように蛍光波長が異

なるセンサーを使い分けるか、測定試料をアセトンで洗浄するなどの簡単な前処理を行えば妨害波長物質を取り除くことが可能である⁹⁾。さらに、本法は 3-5 および 3-6 項で示したように、試料中のヘム蛋白質を変性させずに遊離ヘムのみを直接定量することができる。吸収法により遊離ヘムとヘム蛋白質が混在する試料を測定する場合は、その多くが有機溶媒やアルカリ、界面活性剤などを使用する測定条件になるため、遊離ヘムのみを識別して測定した結果を得ることは困難である。一方、定量操作性の面で考えると、ヘムセンサー法は時間依存的な測定値の変化は小さく、定量のための煩雑な操作や危険な試薬の取り扱いの必要がない。また、一度の測定で必要とされる試料の量も数 μ l で済む。吸収法の中にはヘムが示す偽ペルオキシダーゼ活性を利用して nM オーダーの濃度決定を可能とする定量法もあるが²⁴⁾ (1-6 項参照)、この方法は反応時間に依存して測定値が変化しやすいことや、試料中の遊離ヘムのみ定量することができないことなどの欠点があるため、ヘム検出感度以外の面でヘムセンサー法にアドバンテージがある。

近年提案されたヘム蛋白質の性質を利用した二つの高感度 *in vitro* ヘム定量法と、ヘムセンサーによる定量法について比較する。一つ目は、Takeda らによって報告されたアポシトクロム b_{562} (apocytochrome b_{562} , $cytb_{562}$) と緑色蛍光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) の融合蛋白質 ($cytb_{562}$ -EGFP) をセンサーとしてヘムを検出する方法である (表 1-3 で示した蛍光法)。この方法は、 $cytb_{562}$ のリガンドであるヘムが結合した時にアポ型だった蛋白質部分が再構成されてホロ型になり、それによってヘムと蛍光団である EGFP とが分子内でエネルギー移動できるようになり蛍光消光するという原理である^{25,39)}。したがって、 $cytb_{562}$ -EGFP に結合したヘム濃度依存的に蛍光強度が低下するので、その強度差よりヘムを定量することができる。この $cytb_{562}$ -EGFP をヘムセンサーとして使う方法は、本研究で提案した定量法にかなり近い原理と言える。この筆者らの報告によれば、 $cytb_{562}$ -EGFP によるヘムの検出感度はおよそ 10~100 nM の濃度範囲とされている。それに対し、本研究で作製した HO-1 ヘムセンサーでは 1~10 nM の範囲でも検出可能であることが示された (図 3-7, B)。この $cytb_{562}$ -EGFP についての文献ではセンサー蛋白質が示す K_d は直接算出されていないが、他の研究グループの報告によれば、熱力学的手法により求められた apocyt b_{562} の K_d 値は 9 nM 程度であると示されており⁴⁰⁾、これは HO-1 ヘムセンサーの 10 倍近く高い値となる (K18C-ANS を用いた場合と同程度のヘム親和性

といえる)。したがって、これら二つのヘムセンサー測定法が示すヘム親和性の差は、センサーの母体となっている蛋白質の K_d に起因するものと考えられるため、より高いヘム親和性を示す HO-1 を用いたセンサーのほうが検出感度は高い。加えて、apocytb₅₆₂ はそれ自身の変性しやすく、センサーの安定性や保存性に影響する可能性がある。一方 HO-1 は単純蛋白質でアポ体の状態でも安定な構造をとることができる。したがって、本研究で示したヘムセンサーの方がより取り扱いやすい分析ツールに成り得るものと考えられる。

二つ目の方法は、Masuda らが提案した西洋ワサビペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase, HRP) を応用した化学発光によるヘム検出法である^{9,26,27)} (表 1-3 の化学発光法)。この方法は、アポ型の HRP とヘムが結合すると再構成が起これ、その活性型のホロ HRP はペルオキシダーゼ活性を示すようになる。そこへ市販の化学発光基質を含む試薬を添加し、マイクロプレートに移してルミノメーターなどで化学発光量を測定し、その値からヘム濃度を決定するという方法である。その化学発光は反応開始後 2 分程度で最大に達し 15 分間は維持されるが、HRP 再構成のため少なくとも 30 分の操作時間がかかる⁹⁾。この HRP を利用した定量法は、HRP が触媒するルミノール酸化反応を原理とすることから、微量なヘムでも高感度に検出することができ、その検出限界濃度はおよそ 20 pM と報告されている^{26,27)}。これはヘムセンサー法による検出感度を 50 倍上回ることを意味する。しかしながら、この方法では測定対象となる試料からヘムを抽出するための前処理が必須となる。なぜならば、測定試料に混在する夾雑物にペルオキシダーゼ活性を示す物質があると測定値に影響する恐れがあるからで、この夾雑物には一般的なヘム蛋白質も含まれる。したがって、試料中の遊離ヘムをダイレクトに定量することは困難である。また、誤って高濃度のヘムを測定してしまうと反応基質の枯渇による測定値への影響や、化学発光検出器の焼き付けを起こす可能性があるため、あらかじめ予備測定をするなどして濃度を確認しておく必要がある⁹⁾。それに比べてヘムセンサー法ではそのような測定上の注意点はほとんど無く、前項でも述べたようにセンサー溶液の濃度を希釈して使用することで広い範囲のヘム濃度測定をカバーすることができる。そして何より、ヘムセンサーと測定試料を混合し、反応時間なく直ちに蛍光強度を測定するだけで遊離ヘム濃度を直接測定できるという強みがある。

4-1-6 ヘムセンサーの改良研究について

本研究テーマより派生した共同研究の成果により、ヘムセンサーの改良につながる様々な知見が得られている。K18C の蛍光ラベル化に使用するのに最適な蛍光色素の選定は本研究で実施したが、それに並行して蛍光色素の導入箇所の検討も行われた。本センサーと同様に、HO-1 WT を遺伝的に改変して Lys-22、Gln-91、Lys-148 のアミノ酸残基を Cys に置換し、そこへ A350MI を導入したセンサーを作製してヘム滴定を行い、 K_d 値を算出した。その結果、いずれの場所に蛍光色素を導入したセンサーであっても、 K_d およびエネルギー移動効率に差は見られず、K18C-A350 による結果と一致した。この理由について考えると、HO-1 は 30 kDa 程度の小さな蛋白質であり、分子モデリングソフト上でヘムの結合位置と各アミノ酸残基との距離を測定してみたところ、全てが直線距離で 10 nm の範囲内であった。よって、各残基の側鎖に存在する蛍光団とヘムとの間でエネルギー移動を起こすための条件は維持されていた。しかし Gln-91 について考えると、この残基はヘム結合部位の裏側にあり、最も遠い位置にある (図 4-3、赤矢印の部分に位置する)。さらに、ヘムとの間を他のヘリックスが塞ぐように位置していることから、分子設計段階ではエネルギー移動効率は低下するものと予測していたがその影響は観察されなかった。

次に、ヘム分解活性を持たない HO-1 変異体を使ったヘムセンサーの開発が行われた。本センサーはヘムと結合して複合体を形成し、安定な構造をとるため、そこに CPR によって電子が供給されない限りはヘム分解は起こらず、ホロ体を形成したまま存在する。しかし、測定試料中の夾雑物に強力な還元力を示す物質がある場合は、外部からの電子供給が起こり、ヘム分解反応が進む可能性がある。そこで、HO-1 がヘム分解反応を起こす場合に必要な電子の通り道となる Asp-140 (図 4-3 参照) を His 置換した K18C 蛋白質、すなわち K18C/D140H 変異体を発現・精製し蛍光ラベル化したヘムセンサーである K18C/D140H-A350 が創出された。このセンサーにヘムを加えてあらかじめ複合体を形成させたものに対し、還元剤であるアスコルビン酸を過剰量加えた場合のヘム分解の様子を single turnover 反応により観察したところ、20 分経過しても分解活性を示さなかった (K18C-A350 では 10 分後にヘム分解が完了した)。一方で K_d およびエネルギー移動効率は K18C-A350 と同程度であった。このヘム分解活性に必須とされる 140 番目の残基⁴¹⁾を改変させることによって分解活性を消失させたセンサーは、細胞や組織など生体物質由来の夾雑物を多く含む生体試

料についてヘム定量を行う場合に有用である。

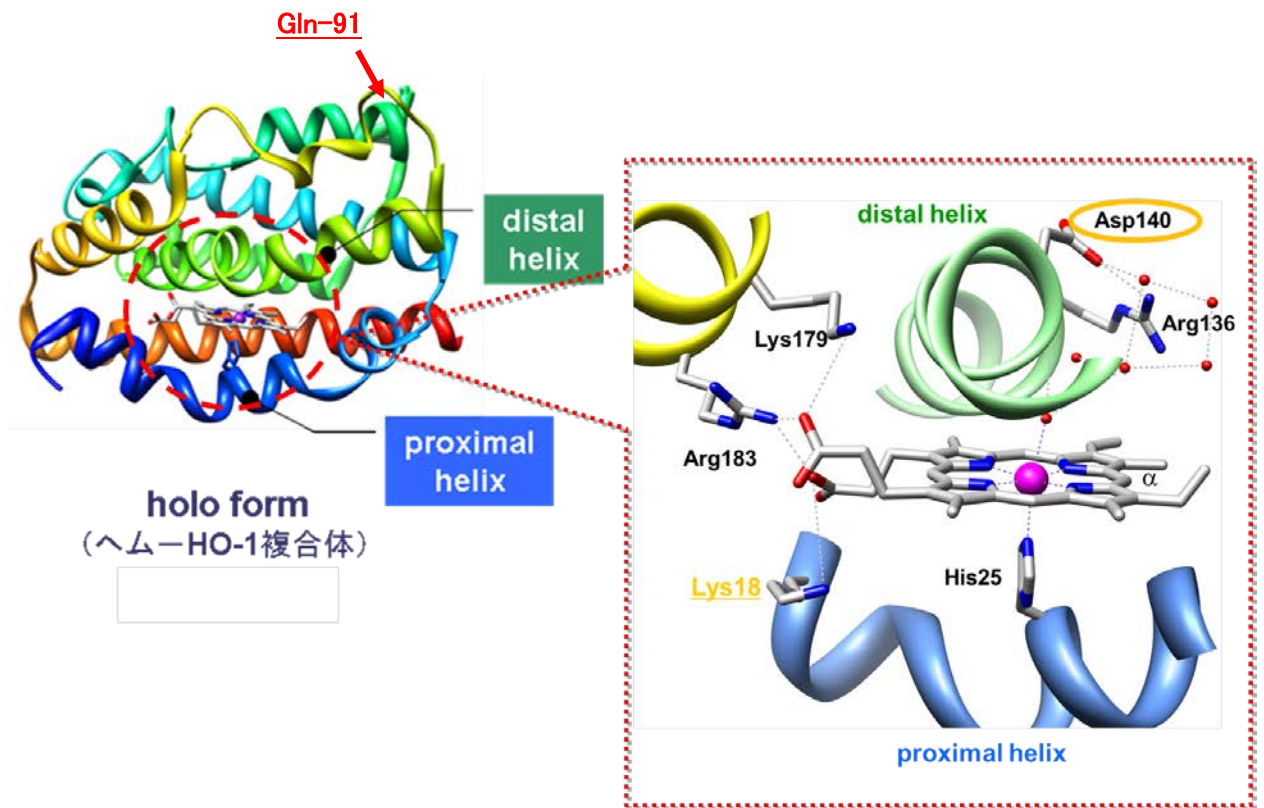


図 4-3 ヘム-HO-1 複合体におけるヘム結合ポケット近傍の拡大図^{19,20)}

4-2 変性ヘモグロビン由来の遊離ヘム定量からわかること

3-4 項まではヘミン標準液を測定対象として使用した実験内容だったが、これらの結果でヘムセンサーと遊離ヘムとの親和性および選択性が高いことが示されたため、以降は実用的な測定系におけるデータの検証を行うことにした。そこで、血液検査などでも検査対象とされる、最も一般的で身近なヘム蛋白質の一つである Hb と、それに結合しているヘムを検出するための測定法について検討した。本センサーは遊離ヘムと特異的に結合して蛍光消光を起こすものであるため、Hb そのものや蛋白質に結合した状態のヘムは検出されない。そこで、hHb を変性させてヘムを遊離させ、その濃度を測定することで試料中の総ヘム量を決定し、さらにその値から hHb 濃度を算出するという間接的なヘム蛋白質定量法を思い付いた。動物や植物の組織からヘムを抽出する方法としてよく知られている酸性アセトン抽出法は、対象試料から効率良くヘムを有機層へと抽出することができるが、その後のエーテル抽出や濃縮の工程が煩雑で、ヘム濃度測定までに時間と労力を要する。しかし本センサー定量法は、検出感度が高く、ある程度の有機溶媒が測定系に存在しても定量値には影響しないことがわかったため、測定対象を酸性アセトンで処理して得られた抽出液を濃縮せずそのままセンサー溶液と混合し測定を行った。その結果、hHb に含まれているヘムを正確に定量することができ、ヘム回収率はほぼ 100%を示した。さらに、それを 4 で割った値より元の試料に含まれていた hHb 濃度を算出したところ設定濃度と概ね一致した。一方、Hb を変性させる効果を示さない中性緩衝液（センサー溶液の溶媒と同じ 20 mM リン酸カリウム緩衝液を使用）で同様の抽出操作を行って得られた測定試料からはヘムは検出されなかった。これは、緩衝液による抽出処理試料に含まれる Hb は intact な状態であり、遊離ヘムが含まれていないこと示している。さらに、100 mM NaOH で hHb を処理した場合は試料中総ヘム量の約 60%に当たるヘムが遊離していることが示された。この濃度のアルカリを用いた hHb 処理は蛋白質の部分的な変性を起こし、それにより遊離したヘムを溶媒側へと移行させる効果がある。その試料のヘム回収率が 60%を示したということは、おそらく hHb を形成する 4 つのサブユニットのうちの 2~3 つが変性してヘムが遊離した状態にあることを意味しており、残りのサブユニットは変性せずに構造を維持し、ヘムと結合した状態にあると考えられる。酸性アセトンを用いた場合は完全変性を起こすため、全てのサブユニット構造が

崩壊し、ヘムが遊離してセンサーに検出されるため、理論上では回収率は 100%となる。したがって、各種処理液や変性剤とヘムセンサーを併用した測定法およびその定量結果から Hb 分子の変性の度合いを推測することができる。単一のヘム蛋白質のみを含む試料を完全変性させて測定した結果からはそのヘム蛋白質の濃度を間接的に測定することもできる。また、遊離ヘムと蛋白質に結合しているヘムとを明確に識別し検出する能力を有する。これらの特徴を持つ本センサーを利用したヘム蛋白質の変性試験は、血液中の異常赤血球・溶血の診断や、生体試料に含まれる各種ヘム蛋白質の種類や濃度分布などを知るための新しい分析ツールとして役立つかもしれない。

4-3 混合モデル試料測定で示された存在比決定法の有用性と課題

遊離ヘムとして用いたヘミン標準溶液と hHb 溶液を混合して作製した 3 種類のモデル試料中の存在比を決定する測定は、3-6 項の結果が示す通り、モデル試料の設定濃度に近い濃度が求められ、その濃度比もほぼ一致していた。これらの結果は、前項 4-2 でとりあげたヘム蛋白質試料に、さらに遊離ヘムが混在している測定試料であっても、その総ヘム、遊離ヘム、ヘム蛋白質に結合していたヘムの量およびその変性度をそれぞれ区別して求めることができることを意味している。したがって、本ヘム定量法は、生体試料などに含まれる様々な状態のヘムを簡単な処理法と組み合わせることで測定できる実用性の高い方法であることが示された。

しかし本法の定量精度は、試料中の遊離ヘムや総ヘムを見分けて測定するための測定試料を調製する方法に依存する要素があることも否定できない。例えば、図 3-8 の結果より、混合試料から遊離ヘムのみを回収し測定する場合は 5 mM NaOH のように弱アルカリ溶液で処理した方が遊離ヘムを溶解させやすいため、良好な回収率を示すことがわかったが、中性の 20 mM リン酸カリウム緩衝液を用いた場合ではその回収率が低下していた。よって以降は、5 mM NaOH をスタンダードな処理液として採用すれば良いかというところ簡単には判断できず、もしかすると 5 mM NaOH 処理では多少の Hb 変性が起こっている可能性もある。現に、同実験の 25 mM NaOH を用いた場合の結果では 6~8 割程度の変性が起こるというデータも得られている。したがって、リン酸カリウム緩衝液によるデータが間違っているとは判断できず、この問題に関しては今後測定データを蓄積して検討する必要がある。その他に、ヘミ

ン:hHb の比が 1:1 および 4:1 の混合モデル試料に対し 2%塩酸/アセトン処理を行った試料の定量結果が設定値よりも高かった (図 3-8、上段と下段グラフ右端のバー)。これは hHb の存在量が多い試料ほど設定値を大きく上回っており、同時にこれらの試料は 5 mM NaOH の結果でも設定濃度を超えていた。この現象は 3-5 項で示した hHb の酸性アセトン処理試料の測定結果でも見受けられた。これらの原因として、モデル試料作製上での濃度の誤差を除けば、ヘム濃度を決定するのに直接影響する F_0 値のばらつきや、検量線上の誤差・精度の影響などが考えられるが、現在でもこの問題点の改善法について検討中である。

4-4 疑似便のヘム抽出液から求められたヘモグロビン濃度とその精度

hHb の設定濃度を変えて作製した 4 種類の疑似便を便潜血検査の検体に見立ててサンプリングし、それを酸性アセトン処理して得られた測定試料に含まれるヘム濃度を決定し、その値より hHb 濃度を算出した。疑似便を作製する際に、基材として市販の上新粉を使用し、その水分含有率を 50%と設定したが、これは固形疑似便の組成としては標準的な値のようである。現に、便潜血検査診断の精度管理用標準物質として市販されている疑似便作製キットもこれに近い組成だった⁴²⁾。図 3-9 に示す結果では、概ね設定濃度に近い hHb 濃度が算出されたが、全体的に設定濃度よりも高い値となり、データのばらつきも見られた。本実験の結果において、Hb 算出濃度が測定条件の都合で真値よりも高くなってしまうと実際の検査では偽陽性となってしまう、再検査を行う必要が出てくる。逆に実際よりも低い結果になってしまうと偽陰性となり、本来は二次検査が必要な患者を見落としてしまう恐れがある。したがって、本法を便潜血検査の一次スクリーニング検査法に利用するためには、これまで本研究で示してきた実験結果以上に精度と信頼性を求められる。また、0 $\mu\text{g/g}$ 疑似便の算出濃度で 3~6 μg 程度の hHb が検出されているが、この原因はおそらく疑似便由来の上新粉の微粒子が測定時に混入したことによると考えられる。本実験法を検討する段階では疑似便を酸性アセトン処理する際に遠心分離を一度しか行っておらず、図 3-9 よりもさらにデータのばらつきや設定濃度値の超過が見られていた。そこで、遠心分離操作を 2 回繰り返すようにしたところ (2 回目は遠心回転数も 13,000 rpm から 15,000rpm へ変更)、データの改善が見られた。したがって、遠心分離で便の組成を

完全に取り除く必要があるとわかった。しかし、過度の遠心分離操作は hHb から遊離したヘムを沈殿側へ吸着させてしまう恐れもあるため、慎重に改善法を検討しなければならない。一方、本法が示した hHb の検出感度について検討したところ、便潜血検査における一般的な陽性診断のカットオフ値といわれている 30~50 $\mu\text{g/g}$ -便⁴²⁾ (この値は診断薬メーカーや医学学会誌などの間で大きく異なり 10~100 $\mu\text{g/g}$ -便の違いがある) の hHb を検出できた (図 3-9、オレンジのバー)。よって、検出感度の面では便中の hHb 検査に必要とされる条件をクリアしている。しかし、本実験データだけでは測定数が少なく、再現性および信頼性に乏しいため、もっとデータ数を増やして統計学的に分析し判断する。また、本検査法における偽陽性・偽陰性率などを把握しておく必要がある。

hHb のカットオフ値 50 $\mu\text{g/g}$ -便は、実際の便 1 g に含まれるヘム量に換算すると 3.1 nmol (1.9 μg) となるが、本実験系では 0.1 g の疑似便をサンプリングしそこへ 300 μl の酸性アセトン液を加えてヘム抽出処理した測定試料 2 μl (マイクロプレートのウェル内総体積はセンサー溶液と合わせて 100 μl になるように混合しているので試料は 50 倍希釈される) についてヘム定量を行っている。よって、カットオフ値相当のウェル内ヘム量は 2.4 pmol (1.3 ng) となる。一方で、それを定量するための検量線は 0~7.2 pmol の範囲で作成したものをを用いた。この検量線は、さらに低濃度範囲でも作成することができ、3-4 項の 9 nM ヘムセンサー溶液を用いた結合曲線を元に考えれば、ウェル内のヘム量が 0~0.9 pmol の範囲内で定量可能であり、このデータの都合上では 0.09 pmol が検出限界となる。したがって、本センサーのヘム検出感度は陽性診断のカットオフ値を判断するのに十分対応できるレベルである。ただし、実際の便潜血検査では便のサンプリング量は本実験の 10 分の 1 程度であるため (サンプリング量には個体差があり一定ではない)、測定試料に含まれるヘム量はおよそ 0.24 pmol であると考えられる。

日本国内で現在採用されている大腸ガン診断のための便潜血検査法の主な原理は免疫検査法である^{43,44)}。これは、大腸に腫瘍やポリープがある患者の便には多量の出血が含まれるため、その便中の血液成分、つまり Hb を免疫学的方法で検出して、統計学的なデータなどを基に設定されているカットオフ値と比較し診断される (一次検査)。ここでカットオフ値以上だったものは再検査あるいは二次検査 (主に内視鏡検査) となる。その検査形態は、簡易法では hHb 抗体を用いたイムノクロマト法に

よる定性的な検査キット、病院などの医療分析機関ではスクリーニング検査にも対応でき、自動化された専用検査機器およびその試薬を使用して、ラテックス凝集法や金コロイド法などの原理により半定量的に測定されている⁴³⁾。これらの方法は免疫抗体法を原理としているために、便中の hHb を検出する感度は非常に鋭敏であり、hHb のみを特異的に検出することができる（食事由来の動物性 Hb は検出されない）というメリットがある。一方でその方法にも欠点があり、大腸内の出血により Hb が便に含まれたとしても、それが大腸内を通過して排泄され、それを検出するまでの間で Hb が分解されてしまった場合は、どんなに高感度な抗体検査を行っても不検出となり、結果として偽陰性を発生させてしまうことである。便中の hHb は非常に不安定で、大腸菌などのバクテリアにより分解されたり、消化酵素などにより構造が変性したりする⁴⁴⁾。よって、大腸の上部（小腸に近い側）で出血がある場合は、その後も大腸を通り続け（排泄されるまでに時間を要する場合は大腸内に長く留まることになる）、排泄されたあとに検体として提出されて分析にかけられるまでの時間を考えると、この間に多くの Hb が失われている可能性がある。したがって、免疫診断法はその検体を診断するまでの保存法がネックとなり、不正確な診断結果を招くケースが多いといわれている。

ヘムセンサーを用いて Hb を間接的に定量する本法は、既存技術の hHb 抗体検出法に比べると、hHb の検出感度は劣ることになるが（hHb 抗体では 10^{-15} mol を選択的に検出できる）、便潜血検査への利用に至ってはこれほどまでの検出感度は必要ないものと考えられており、陽性診断の基準はあくまでカットオフ値との比較による。したがって、本法は免疫法と同等の便潜血検出感度を持つ代替法となりうるものと考えた。一方で、ヘムセンサーを用いた Hb 定量法は、免疫法のように Hb 分子そのものを検出するのではなく、それに含まれるヘムの量を測定し、その値から換算濃度を求めるものである。よって本法ではその保存性や安定性を気にする必要がない。現段階で提案される検査法は、図 3-9 に示すように検体を酸性アセトン処理して全て遊離ヘムに置き換えてからその総ヘム量を測定するため、Hb の変性度は定量に関係無い。よって、検体の保存性による影響を回避できるものと考えられる。

また、免疫法は hHb の検出感度は非常に良好であるものの、検査に抗体試薬を使用するため、その検査にかかるコストが問題視される場合がある。現に、免疫法による便検査が常套手段として用いられているのは日本を含めても世界で数か国といわ

れており、人口が多く、検査費用を抑えることを重視している国や医療発展途上国では、典型的な便検査法として知られるグアヤック化学検査法（便中に含まれるヘムが示す偽ペルオキシダーゼ活性を利用した方法で、検査値のばらつきが大きく診断結果の信頼性が低いという問題がある）などが用いられている。一方で、本法の検査試薬となるヘムセンサーは **HO-1** と蛍光色素からなるもので、**HO-1** は大腸菌で大量に発現・精製することができるため、**hHb** 抗体よりも安価に供給できる。蛍光色素のコストに至っては、現状では決して安価であるとはいえないが、診断試薬材料として大量生産されるようになればその問題をクリアできるかもしれない。したがって、ヘムセンサーを用いた便潜血検査は、免疫法と同程度の **Hb** 検出感度を持ちながらも、免疫法における課題を回避しかつランニングコストを抑えられる診断法として利用できるかもしれない。

第5章 展望

5-1 ヘムセンサー定量法の応用例

これまで示してきた結果および考察から、本研究の目標としていた蛍光検出型ヘムセンサーの創出は達成されたと考える。さらにそれを使った実用的なヘム測定法のモデルケースや診断法の実施例を示した。本法はこの他にも様々な用途に適用することができる。それは *in vitro* における生体試料のヘム定量法や既存の診断技術の代替法としての利用のみならず、新しい分析技術や診断法への応用の可能性を秘めている。また、現状では困難である細胞内の遊離ヘムを直接定量する *in vivo* 測定法への展開も見えてくるかもしれない。そこで、ヘムセンサーにおける開発達成度の現状と近い将来実現できそうなテーマ、そしてそれ以降の開発の展望について図 5-1 にまとめた。

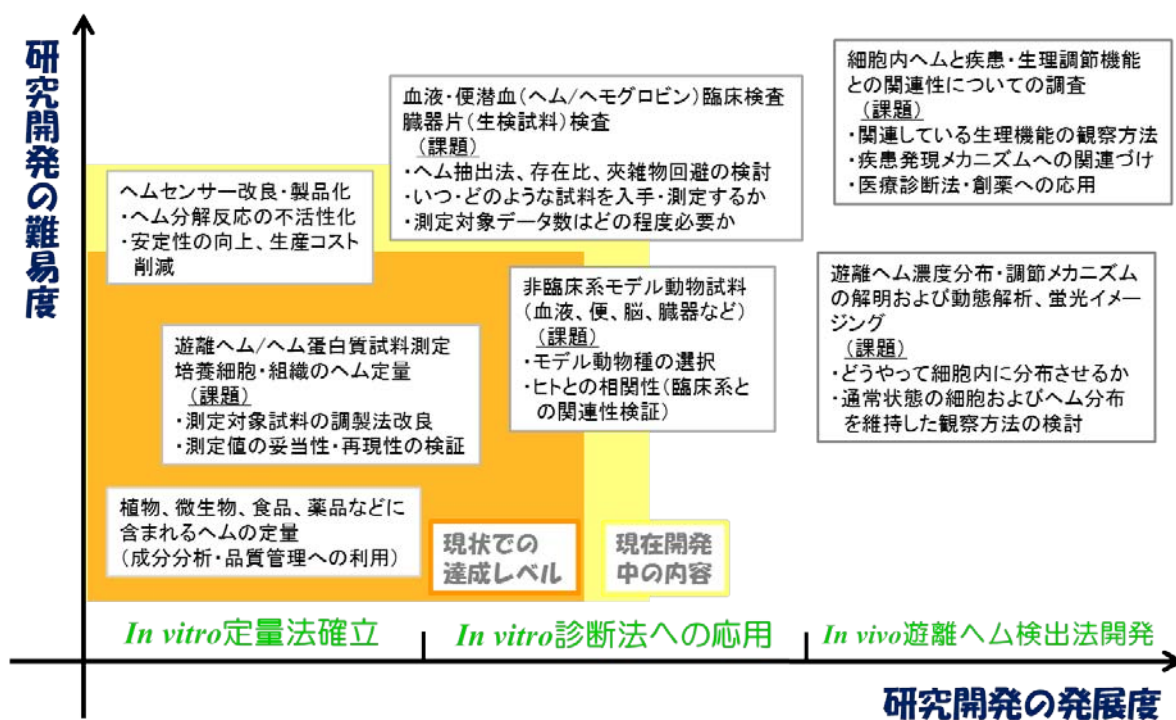


図 5-1 ヘムセンサー定量法における研究開発の発展に伴って測定可能となる対象とそれを実現するための技術的課題

現状では *in vitro* 測定系のプロトコルが確立しつつあるので、今後は実際に様々な生体試料を測定してデータの蓄積や測定法の最適化、または必要に応じてヘムセンサーの改良を行う。ここで重要なのは、測定試料の調製法（効率の良いヘム抽出や夾雑物回避の方法）や測定値の妥当性の検証である。これまでに生体試料中のヘム濃度に関して報告している文献数が乏しいため、本法で決定されたヘム濃度が正確なものであるということを示す手段について模索する必要がある。また、本法は便潜血検査のような臨床診断法への応用も可能である。また、それと同じアプローチで動物由来の生体組織を使った非臨床系の研究に役立てることもできる。これは臨床研究でネックとなる生体材料の入手の困難さを解消しやすいメリットがあるため、病理モデル動物を用いた研究は臨床基礎や創薬などの分野で盛んに行われている。これらの知見は非常に有用であるが、ヒトとの相関性がしばしば問題となる。臨床・非臨床に関わらず、各種細胞や組織におけるヘム分布はあまり知られておらず、比較的入手しやすい診断材料である血液や便についてもヘム濃度を正確に測定する方法や測定値などについての研究報告例は少ない。本法によりそれらの遊離ヘム/蛋白質結合ヘム存在比を解明することで新たな知見が得られ、臨床診断法や治療法の開発につながるかもしれない。

5-2 ヘムセンサーを利用した新規医療診断技術の提案

3-4 項から 3-7 項までの結果およびその考察を基にして、二つの医療診断技術開発のアイデアを提案する。その一つ目は「大腸での出血部位を特定できる新しい便潜血検査法」である。4-4 項で説明した、免疫法による既存の便潜血検査にはもう一つの課題があり、それは便に含まれている Hb の由来、つまり大腸内での出血箇所の特定制できないという点である。免疫法は便中の hHb を検出することで消化管の出血は発見できるが、それがどの部位からのものなのかは判断できない。仮に便から多量の hHb が検出されたとしても、その由来は大腸の上部かもしれないし、肛門付近からの出血（痔病など）、あるいは大腸以外の消化管に由来するものかもしれない。しかし、現状では便潜血検査で陽性診断となった患者は出血箇所の特定制に関する診断は行わず二次検査にまわされ、内視鏡検査を受けることになる。これは患者にとって大きな心身的負担となるが、その結果大腸には異常は見つからず（患者にも自覚症状がない痔病など）偽陽性によるものだったという場合もある。

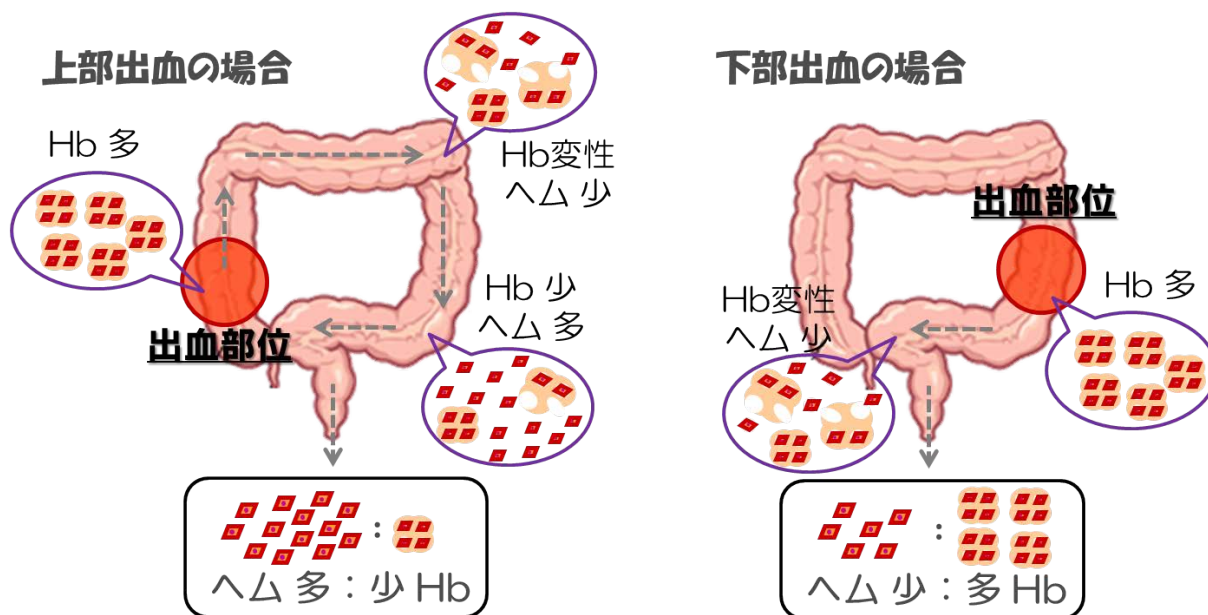


図 5-2 大腸出血箇所を特定できる新しい便潜血検査法の原理

簡便な一次検査で出血箇所の特定を可能にする画期的な臨床診断法は現在のところ存在しておらず、臨床医療分野ではその開発が望まれている。そこで、本センサーの特徴である遊離ヘムと蛋白質に結合しているヘムを識別して定量できる能力を利用して出血箇所を推定する方法を考案した。今、仮に消化管の出血による Hb を多く含む便検体があったとして、それをサンプリングし、3-6 項の場合と同様に Hb 変性処理液を使用して遊離ヘムおよび総ヘムの測定試料を作製し、それについてヘム定量を行う。次に、総ヘム濃度から遊離ヘム濃度を差し引いた値を元に便検体中の Hb 濃度を算出し、遊離ヘム濃度との存在比を求める。この時、その存在比が意味することとして、遊離ヘムの存在比が高い場合は、大腸の上部で出血し hHb を含む便が排泄・検査されるまでの間に変性して hHb がヘムに変わったことによるものと考えられるため大腸上部領域の異常や疾患の可能性が示される。逆に hHb の存在比が高い場合は、出血して間もない状態の hHb を含む便であるため大腸下部の異常が示唆される。圧倒的に Hb が多い場合は直腸疾患または痔病と判断できる (図 5-2 参照)。このように、便を処理した測定試料に含まれる遊離ヘム/hHb 濃度比から大腸の出血箇所を診断することができるかもしれない。これらの存在比を精度良く求めることで、より細かな異常箇所または疾患の種類の特特定が可能になるものと考えられる。

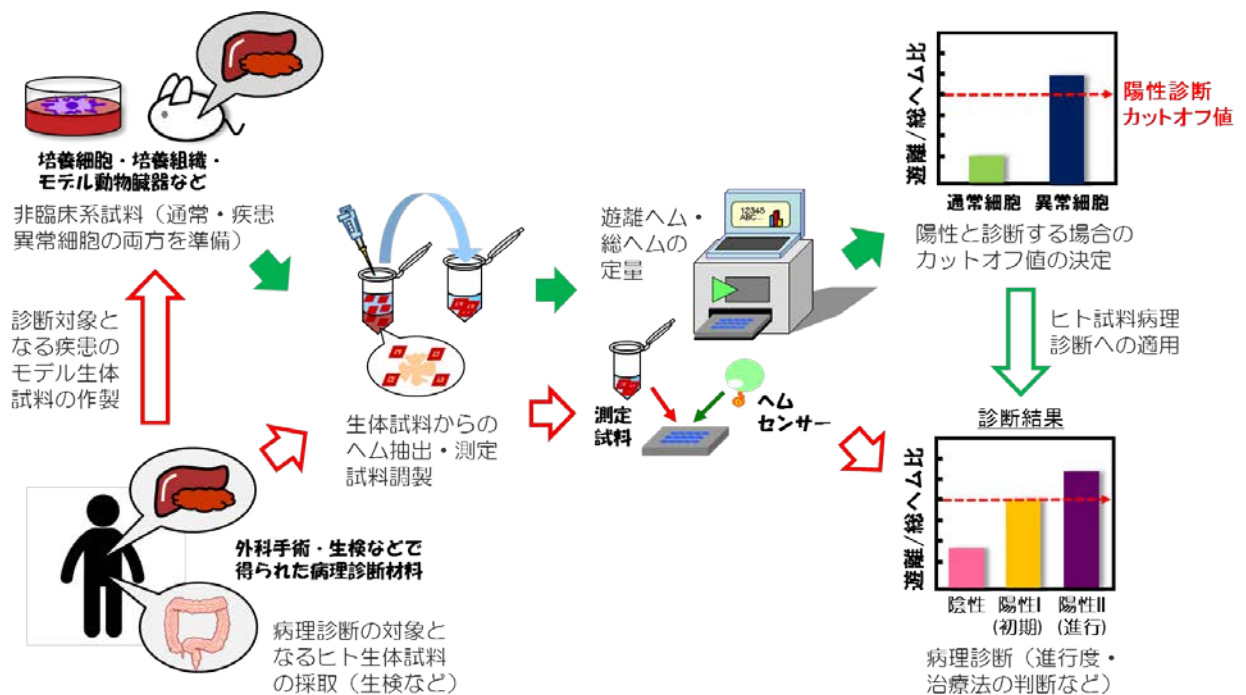


図 5-3 生検試料に対するヘム定量法を基にした病理診断法

二つ目は、非臨床系の生体試料におけるヘム定量データと臨床系の診断結果を組み合わせ、特定の組織の疾患発現や進行度を判断する診断法である。これは体内のある組織に病変の疑いがあり、それを特定するための生検を行う場合、またはすでに疾患が発現していて外科手術により摘出する場合に得られる病理診断材料についてヘムセンサー法で分析し、その試料の遊離ヘム/総ヘム存在比から陽性診断またはその進行度判定などを行うというものである（図 5-3、赤矢印のルート）。その診断のカギとなる測定試料の最適な調製方法および各疾患に対するヘム存在比（カットオフ値）は、あらかじめ非臨床系の培養細胞や組織、病理モデル化された動物を使って詳細に検討しておくことで迅速かつ正確な診断が可能となる（図 5-3、緑矢印のルート）。現在では、胸・腹部臓器の他に、皮膚、耳・鼻、口腔、咽頭・喉頭、甲状腺、乳腺、直腸、末梢神経、子宮腔部・内膜などの様々な生検材料が採取されるようになり、それらの組織片や細胞について病理組織学的検索、電顕的検索などの病理診断、時に生化学的検索、感染症検査、遺伝子解析が行われている。これと並行してその検体の一部を試料としたヘム定量分析を行うことで、その測定値や存在比を診断基準のバイオマーカーとして利用できるものと思われる。

5-3 細胞内遊離ヘムに関する研究と *in vivo* 定量法への展開

5-3-1 細胞内遊離ヘム濃度分布とその調節メカニズム

細胞内に存在する遊離ヘムは、細胞内で ROS を発生する分子とみなされるため、その濃度制御や輸送については厳密にコントロールされている^{2,10,11)}。様々な組織や細胞内の遊離ヘム濃度や動態を明らかにする研究や議論はヘム研究の発展と共に繰り返されてきたが、現在に至ってもほとんど明確されていない。その理由は、推定上細胞内に存在する遊離ヘムはとても低濃度で、しかもその動態推移はとても複雑で短時間に行われていることにある。現時点では、通常細胞における遊離ヘム濃度はおよそ 1 μM 以下で推移すると考えられているが、遊離無機鉄の濃度との関係を考慮すると 10⁻⁹ M を超えない範囲になるという学説も存在する^{2,10)}。また、細胞にはヘム濃度を短時間で適切に調節する機構が備わっているものと考えられ、それを説明する仮想的な調節機構として“細胞内ヘムプール”が知られている^{1,2,10)}。ヘムプールと言えば、あたかも細胞内に遊離ヘムが蓄えられる液胞のような器官があるものと考えそのようなものであるが（実際に、遊離ヘムは脂溶性が高いことからミクロソームなどに非特異的に結合し蓄えられているとの学説もある）、現時点で提案されているヘムプールとは、小胞体などに存在するヘム結合性蛋白質が一時的に遊離ヘムと結合・解離を行うことで細胞質内濃度を調節するという考え方である^{1,2)}。一方で、溶血などで血中に放出された遊離ヘムは、ヘモペキシンやアルブミンなどの蛋白質と強く結合して複合体を形成し、レセプターを介して細胞内に運ばれ分解される。この仕組みによって血中ヘムの濃度や毒性を制御している^{2,7)}。

細胞内にはヘム合成・分解に関わる酵素の転写・翻訳をコントロールして遊離ヘム濃度を調節するメカニズムが備わっている。ヘムはミトコンドリアで生合成されるが、その最初の反応を触媒する律速酵素である δ アミノレブリン酸合成酵素 (δ aminolevulinate synthase, ALAS) の転写・翻訳機構は遊離ヘムによって **negative feedback regulation** を受けることが知られている^{2,7,11)}。すなわち、細胞内の遊離ヘム濃度が高いとき (0.1~0.3 μM 程度²⁾) は、それ以上細胞内でヘムが合成されないようにするための処置が施される。また、HO-1 遺伝子の転写活性調節因子である Bach1 は、細胞内の遊離ヘム濃度が上昇すると (0.03 μM 前後²⁾) 核内の遊離ヘムと結合して核外へと移行し、それまで Bach1 自身が抑制していた HO-1 の転写

活性をオンの状態にすることで HO-1 の発現量を増加させ、ヘム分解を促す^{2,45,46}。

細胞内遊離ヘムの分布や動態を理解する上では、ヘムの輸送経路やその方法についての研究も重要である。第一にヘムが生合成された後、ミトコンドリアから輸出されたヘムはその後どこへ、どうやって送り届けるかという問題が生じる。仮に、ヘムが単独でミトコンドリアを通過し、サイトゾル内を自由に移動できるとしたら、その駆動力は何で、どこへ向かって移動してゆくのか、また、サイトゾル内を漂っていたら即座に HO-1 に分解されてしまうのではないかなどの疑問が湧いてくる。しかし、これらについても未だ明確な答えは出されていない。近年同定されたヘム結合性蛋白質の中には遊離ヘムに対して高い結合親和性を示し、細胞内のヘムを輸送していることが実験的に示されたものがある。例えば、細胞膜内外でのヘム輸送を行うためのトランスポーター候補である HCP1 (Heme-carrier protein 1)、HRG-1 (Heme response gene-1)、FLVCR (Feline leukaemic virus receptor) などの膜蛋白質が存在し、これらは単独または他のヘムキャリアーと連携して遊離ヘムの輸送を行っていると考えられている。さらに、数種類の ABC ファミリー蛋白質 (ABCB6、ABCG2 など) もヘム輸送蛋白質として機能するとの報告があるが、その輸送メカニズムの詳細は解明されていない^{10,47}。これらを理解するためには、いつ、どこ (由来) で、どんな状態の細胞を観察対象として選択するかが重要となる。加えて、それらの細胞が自然な状態にあるときの遊離ヘムのやり取りを再現・追跡する方法が必要である。

5-3-2 遊離ヘムと疾患の関連性

遊離ヘムは細胞内で遺伝子・細胞傷害活性を起こさないようにするためのメカニズムが備わっているが、それらが何らかの理由で機能しなくなった場合、生体組織や細胞に深刻なダメージを与え、それらはやがて疾患や機能不全に陥る。本項では、近年明らかになってきたヘムといくつかの疾患との関係について解説する。

現在最も注目されているヘム関連の疾患のひとつとして、大腸ガン (colon cancer) がある。大腸ガン (ここでは結腸ガン、直腸ガンの両方を指す) はもともと欧米など赤肉を多く摂取する民族間で高い罹患率を示すことが知られていたが、ごく最近の 2011 年 11 月に、国立がん研究センターが発表した国内における統計学的な研究成果によると、肉類の過剰摂取は結腸ガンリスクを上げるのに直接関係するという結果が報告された⁴⁸。この研究報告の中では食肉の摂取と大腸ガン罹患メカニズムとの関

係については言及していないが、赤肉と大腸ガンの因果関係について研究を行っていた Sesink らの仮説によれば、赤肉の消費が多い民族のガン罹患率が高いのは、肉に含まれるヘムを多量に体内へ摂取し続け、それらがフリーラジカルを発生して大腸などの細胞のガン化を促進するためと論じている⁴⁹⁾。その後、その仮説を基にして Ishikawa ら行った研究では、ヘムが HO-1 によって分解される過程で発生する鉄や H₂O₂が細胞内でフェントン反応を起こしフリーラジカルが発生、それが DNA 損傷を与え (Initiation)、そのダメージを受けた細胞がさらに H₂O₂の刺激を受けて過剰増殖や抗アポトーシス、炎症反応などを起こし (Promotion)、その結果異常増殖や発ガン (Carcinogenesis) が起こるというメカニズムを提案した⁵⁰⁾。これらの研究成果を根拠にして考えられる大腸ガンの発現メカニズムは、赤肉が多い食事により摂取したヘムを含む便が大腸に留まっている間に、便と直接接触している大腸表皮細胞の HO-1 と便中の遊離ヘムとが反応し、鉄と H₂O₂を経てラジカルが発生し、それが大腸表皮細胞に遺伝傷害を与えて異常増殖やガン化が始まり、それが大腸細胞の広い範囲に伝わって腫瘍が形成されるというものである⁵⁰⁾。

遊離ヘムと関連性が指摘されている二つ目の疾患は、アルツハイマー病 (Alzheimer's disease) である。これまでに、脳細胞内に存在するヘムの量や種類、その代謝に関わる HO の発現や代謝産物の産生機構などについて、アルツハイマー病患者と健常者との間で差異が認められ、アルツハイマー病の発現および進行と遊離ヘムとの関連性が研究されてきた。Atamna らはアルツハイマー病患者の側頭葉に含まれるヘムについて研究した成果より、遊離ヘムはアルツハイマー病発現の原因物質とされるアミロイドβと直接結合して複合体を形成することでペルオキシダーゼ活性を示すようになり、この複合体と H₂O₂ (ヘムが欠乏状態になるとミトコンドリアから放出される) が反応してフリーラジカルや酸化ストレスが増加し、それらが神経毒性や神経系機能不全を促進させることで病状が進行するというモデルを提案した⁵¹⁾。したがって筆者らは、アルツハイマー病の予防及び治療のためのカギは、遊離ヘム-アミロイドβ複合体の過剰形成を妨げることと、その複合体のペルオキシダーゼ活性を阻害すること、そして脳細胞内の遊離ヘムが欠乏状態に陥らないようにすることであると述べている。また、脳細胞のヘム濃度をモニターすることができれば、疾患発現の早期発見や発現後の症状進行を遅らせる対処法に役立つと考えられ、アルツハイマー病の臨床診断のための有意なバイオマーカーになることを示唆している^{33,51)}。

三つ目に挙げるのは、麻酔薬由来劇症肝炎や急性臓器不全との関連についてである。外科手術などで一般的に使用される麻酔薬を投与すると、生体内でそれを分解しようとする働きが起こり、解毒を主な仕事とするヘム蛋白質のシトクロム P450 の発現が活性化される。それに伴って、細胞内酸化ストレスの上昇やフリーラジカルが多発し、ヘム蛋白質の崩壊と放出された遊離ヘムによる細胞傷害が起こる^{6,52)}。その傷害活性が著しく向上した場合はショック状態に陥り、さらに症状が重篤化した場合は劇症肝炎や急性心不全を発症し、死に至るケースもある^{6,52)}。バクテリア感染時などに起こる敗血症発症時の炎症性組織障害や溶血もまた、生体内の ROS 増大および血中遊離ヘム濃度上昇が起こり、消化管や呼吸系に深刻なダメージを与える^{6,7,52)}。よって、これらの状態を臨床的に診断・治療するための方法が求められているが、これらの病理的メカニズムは解明されておらず、医学基礎分野での研究が進められている。Nakahira らの肝障害モデルマウスを使った研究成果によると、四塩化炭素を投与し重篤な肝障害を引き起こしたマウス肝臓由来ミクロソームでは投与 4 時間後に遊離ヘム濃度と HO-1 発現量が上昇し、シトクロム P450 濃度が低下していたことから、ミクロソームに多く含まれるシトクロム P450 が崩壊して多量の遊離ヘムが発生、それを分解すべく HO-1 が up-regulation されたことが示された⁵²⁾。よって筆者らは、肝臓などの組織内に存在する遊離ヘム濃度を追跡することで肝炎や敗血症の進行度および治療法の決定に役立つと述べている^{6,52)}。

この他に、遊離ヘムはマラリア (Malaria) にも関係している。この疾患の場合は遊離ヘムが発現の原因物質となるわけではないが、マラリア原虫を感染させたモデルマウスの血漿遊離ヘム濃度は 10 μM 程度にまで上昇する⁵³⁾。その理由は、マラリア原虫が宿主の赤血球を糧として利用するときに不要となるヘムを血中に放出するからである。この血漿中の過剰な遊離ヘムは活性酸素の発生やアポトーシス誘導を起こし、それらがトリガーとなって重篤な脳マラリアの発症を招くといわれている^{7,53)}。よって、マラリア感染者の血漿遊離ヘム濃度を測定することで、症状の進行度や治療法の診断に役立つと考えられる⁵³⁾。

5-3-3 遊離ヘムの生理調節機能

ここまで論じてきた遊離ヘムの特徴では、生体組織や細胞に対して負の働きが多いように感じられるが、近年のヘム研究成果により、遊離ヘムは細胞内で起こる様々な

生理機能の調節因子として重要な役割を担うことがわかってきた。5-3-1 項で遊離ヘムが ALAS や Bach1 などの転写因子と相互作用して発現を調節し、細胞内のヘム恒常性維持にとって必須の働きをしていることを述べた。これらの調節機構は完全に明らかにされた訳ではないが、少なくともこれらの転写因子は、核内に存在する転写の開始や抑制を司る認識部位とヘム分子とが結合・解離をすることによってオン・オフ制御されていることが実験的に証明されている。特に Bach1 の転写メカニズムに関する研究は詳細に行われており、この転写因子は小 Maf 因子と複合体を形成して HO-1 遺伝子の転写開始点から 10 kbp 以上上流にある MARE 部位に結合して発現を抑制するが、遊離ヘムと直接結合して MARE 部位から離脱しその代わりに活性化因子 Nrf2 が小 Maf と複合体を成す事で HO-1 遺伝子を活性化し発現量を増加させるというヘム依存性遺伝子発現機構が知られている^{45,46,54}。

Tang らの研究で、カルシウム依存性 Slo1 BK チャネルは保存されたヘム結合配列モチーフを有しており、ヘムがヒト Slo1 チャネルおよびラット脳にある野生型 BK チャネルを直接制御していることが示された。これは酸化型と還元型のヘムが Slo1 チャネル蛋白質に結合してチャネルの開口頻度を減らすことによって透過膜 K⁺電流を著しく阻害するという反応機構に由来するものである^{55,56}。

近年注目を集めている microRNA のプロセッシングにもヘムがトリガー分子として作用しているとの報告例がある。Faller らの研究成果から、microRNA 前駆体の成熟過程に必須と考えられている RNA 結合蛋白質 DiGeorge critical region-8 (DGCR8) は heme-binding protein の一種であり、ヘムが結合した DGCR8 の二量体が microRNA 前駆体と複合体を形成し作用するであろうことが示唆された⁵⁷。

哺乳動物の体内時計、すなわち概日リズムの分子生物学的な反応機構は転写と翻訳を組み合わせた負のフィードバック機構で進行している。哺乳動物の前脳では、2 種類の蛋白質 BMAL1 および NPAS2 よりなるヘテロ二量体が DNA の E-box と呼ばれる領域に結合し *per* と *cry* 遺伝子の転写が活性化され、さらに翻訳後修飾された両者が細胞質から核内へ移行し、その後 Per2/Cry ヘテロ二量体が BMAL1/NPAS2 ヘテロ二量体に結合してそれら自身の転写を阻害するという一連のフィードバック阻害反応が毎日 24 時間周期で進行する。NPAS2 および Per2 は 2 つのヘム結合ドメインを持っており直接ヘムが結合できるが、このうち E-box に結合している状態の NPAS2 から Per2 へとヘムが移動することで Per2/Cry ヘテロ二量体による転写阻害

をコントロールすることが知られている⁵⁸⁻⁶⁰。よって、NPAS2 はヘム結合・解離によってその機能が制御されるヘムセンサー蛋白質ではないかと推測されており、これに作用している遊離ヘムが体内時計を制御しているとも考えられるが、その反応機構の詳細は不明である⁵⁸。

その他に、ヘムは様々な細胞分化を促進することも知られている。赤芽球細胞の分化においてヘムは必須であり、ヘム依存性の赤芽球特異的蛋白質が誘導されていると考えられている。また、マウス線維芽細胞やラット筋肉細胞、そしてヒト神経芽腫細胞をヘミン溶液で処理すると分化や神経特異的蛋白質の誘導、神経軸の成長が起こることから、これらの細胞分化時には組織特異的な遺伝子が活性化されている⁵⁵。

5-3-4 遊離ヘムの *in vivo* 定量法実現に向けて

遊離ヘムは細胞や組織に対し有害である一方で、生体に必須な生理機能を調節する役割も果たしており“二面性を併せ持つ生体分子”であるといえる。細胞や組織、血液などに含まれる遊離ヘムあるいは総ヘムの濃度分布や変化を正確に測ることは、既存のヘム測定法では非常に困難であることは先に述べた。しかしながら、それら生体試料に含まれるヘム濃度を定量し、その推移をモニターすることができれば、上記で示した既往研究の進展の他に、様々な研究分野において非常に有用な生命情報に成り得る。未だ解明されていない細胞内の遊離ヘムの濃度分布や動態解析、およびその調節機構を理解するためだけでなく、ヘム蛋白質あるいは HO-1 との関係や、酸化ストレス・ROS 産生による影響、疾患発現メカニズムとヘムとの関係を考察したり、まだ知られていない生理機能や細胞内イベントを発見したりすることができるかもしれない。よって、nM オーダー以下で推移している細胞内ヘムを直接、そして正確に定量するための画期的な測定技術が様々な研究開発分野で望まれている。

それではどのようにして細胞内遊離ヘムを検出するかを考えたとき、最も有力である方法は細胞内蛍光イメージングによる手法である。つまり、本センサーを細胞内へと導入させ、その時の蛍光強度変化からヘム濃度を推定するという考え方である。しかし、この方法はセンサーをどのようにして細胞内へ分布させるかという大きな課題がある。また、導入の影響で遊離ヘムの分布が変化したり、センサーが異物とみなされて分解・排除されたりすることも考えられ、通常の状態でないものを誤って観察してしまう可能性がある。これを回避する一つの方法として、ヘムセンサー蛋白質を細

胞内で発現させる遺伝子を構築して利用するというアプローチが考えられ、その技法に対応できる新型のヘムセンサーを現在検討中である。また、今後の技術発展により細胞内の遊離ヘム分布や動態をイメージングできたとしても、それに伴って起こる細胞内イベントや疾患発現メカニズムとの連動性をどのようにして観察するかという課題も存在する。このように、遊離ヘムのライブセルイメージングの実現には数々の難点が待ちうけているが、それらを技術的に乗り越えられるツールを開発することで、その後続くヘム研究の発展・成果による多大な社会的波及効果が期待できる。生体試料に含まれる遊離ヘム濃度を求める試みは、細胞内という未開拓の地に存在する遊離ヘムを探するための **frontier** 研究であるといえるだろう。

第6章 結語

本論文の要点を以下に記した。

- (1) 本研究の成果により、目標としていた蛍光ラベル化 HO-1 変異体蛋白質 K18C から構成されるヘムセンサーが創出された (表 6-1)。このセンサーは母体となる HO-1 の特徴を維持しており、ヘムと 1:1 で結合し、安定な複合体を形成する。それを励起させると HO-1 に導入している蛍光団とヘムとの間でエネルギー移動が起こり、ヘム濃度依存的に蛍光消光を示す。
- (2) ヘム結合応答性に優れた高感度ヘムセンサーを作製するためには、ヘムと蛍光団とのエネルギー移動効率を向上させるように分子設計する。すなわち両者の吸収波長と蛍光波長の重なりおよび分子間距離 (10 nm 以内) を考慮する。
- (3) 本センサーにおけるヘム結合親和性を示す K_d 値を非線形カーブフィッティング解析より算出したところ約 1 nM となり、高いヘム親和性を示した。これは本研究による蛍光測定ヘム滴定法によって初めて示された HO-1 固有の K_d である。

表 6-1 蛍光検出型ヘムセンサーの開発における目標とその達成評価

	目標	解決のための技術上のポイント	実験結果および達成評価
ヘム検出感度	~ nM	HO-1 の高いヘム結合親和性を利用、蛍光法により結合応答を観察	1 nM
選択性	ヘムのみと強く結合し検出できる	HO-1 が示す基質特異性を利用 ※1	ヘムに対し高い選択性を示すが金属ポルフィリン (Zn-PPIX) と結合する可能性あり
安全性	測定時に危険な試薬は使用しない	HO-1 が安定に存在できる中性緩衝液を使用した測定系にする ※2	リン酸カリウム緩衝液で希釈したヘムセンサーに添加するだけで測定が可能
主な測定方法と測定に必要な試料量	石英セル以外の方法で 10 μ l 以下	96穴マイクロプレートを使った測定系への適用を検討	96穴マイクロプレート測定系で測定可能、最低 1 μ l で定量できる
遊離ヘムと蛋白質結合ヘムの区別	可能	上記※1と※2の性質から遊離ヘムのみを検出	両者を明確に区別した測定が可能

- (4) ヘムセンサーは高いヘム選択性を示す。よってヘムに類似した構造を持つ夾雑物が混在する場合であっても、最も高い結合親和性を示すヘムと特異的に結合する。しかし、金属ポルフィリンとは低い親和性を示し結合する。
- (5) 本センサーを用いたヘム測定法は蛍光マイクロプレートを用いた多サンプル測定系への適用が可能であり、ウェル内ヘム濃度とヘム添加に伴って起こる蛍光強度変化の関係について非線形近似を行うと K_a 値および結合曲線、その 1 当量付近までのデータについて線形近似を行うと直線性が高い検量線が得られる。また、本定量法における検出限界は 1 nM (1 pmol) 程度であることがわかった。
- (6) 様々な変性度の hHb を含んだ試料についてヘムを定量したところ、完全変性した hHb 試料からは 100%に近いヘム回収率を示し、未変性状態の試料からはほとんどヘムが検出されなかった。したがって、本センサーは遊離ヘムと蛋白質に結合している状態のヘムとを識別して検出していることが明らかとなった。既存のヘム定量法では遊離ヘムのみをダイレクトに測定することは困難であったが、本法ではそれが簡便な測定法により実現できる。また、hHb を部分変性させた試料に含まれるヘムを定量することにより、その変性度を推測することができる。
- (7) 遊離ヘムとヘム蛋白質が混在する試料に対し、処理液を使い分けることによって試料中の総ヘム、遊離ヘム、蛋白質に結合していたヘム量を個別に求めることができ、それぞれの存在比を知ることができる。また、蛋白質由来のヘム量から元の蛋白質濃度を算出することができる。よって、本ヘム定量法と簡便な前処理を組み合わせることで間接的なヘム蛋白質定量法としても役立つ。
- (8) 疑似便試料を便検体に見立てて作製・サンプリングし、ヘム抽出処理を行って得られた測定試料の定量結果から hHb 濃度を算出したところ、各疑似便の hHb 設定濃度とほぼ一致した。また、陽性診断のカットオフ値付近の hHb 濃度も良好に再現できたことから、本法は現行の便潜血検査（免疫診断法）の代替法となりうることが示された。

- (9) 本センサーを用いた *in vitro* ヘム定量法は様々な生体試料に含まれるヘムを定量できる検出感度を有する。よって、新規の病理診断法として応用できる可能性がある。しかしながら、細胞内遊離ヘムを直接定量する方法への適用については十分な検討が必要である。
- (10) ヘムセンサーを用いて様々な生体試料中に含まれる遊離ヘムおよび蛋白質に結合しているヘム量を求める試みは、分子生物学的な基礎研究のみならず、分析技術や医療診断、創薬などの多様な分野の発展につながる有益な生命情報を収集するための **frontier** 研究である。

現在、本ヘムセンサーはアカデミックな研究分野におけるヘム定量のためのツールとしてのみならず、一般的な分析キットとして製品化することを目標とした研究開発が進められている。現在市販されているヘム定量キットは吸収法による測定原理であるために課題が多く、ほとんど普及していないようである。本センサーを基にした定量キットは検出感度が高く操作も簡便であることと、定量のために必要な測定機器が汎用性の高い蛍光分光光度計でよいことなどが製品化を考えた上でのメリットとして挙げられる。また、本研究の成果に関する 2 件の特許を現在出願中である（特願 2009-129822 号および特願 2010-127061 号）。ヘムセンサーの開発に携わってきた者の **engineer** 心理としては、本ヘム定量法が広く一般に普及し、それを利用して得られた知見や技術が開花してゆくことを願ってやまない。その発展を見届けることで、また新たな研究開発に向けたエネルギーをもらって励起し、一人の **engineer** として輝かしく蛍光を放って居続けたいものである。

謝辞

この論文は、私が九州工業大学大学院情報工学府博士後期課程に在籍した 2008 年から 2012 年までの研究成果を基に記したものです。本研究を進めるにあたりお世話になったすべての方々に深くお礼を申し上げます。

博士後期課程に在籍した 5 年間、指導教員を務めていただきました坂本寛准教授に心よりお礼申し上げます。また、本研究のようなやりがいのあるテーマに巡り合せて頂いたことに感謝致します。

ご親切な指導を賜りました小松英幸助教に深く感謝いたします。先生には研究に関する相談にお付き合い頂き、毎度心が救われる思いでした。今後は私も先生に近づけるようにと精進してゆく次第です。

研究に必要な知識や技術の指導をしていただきました久留米大学医学部医化学講座の野口正人教授をはじめ、東元祐一郎先生、佐藤秀明先生、杉島正一先生、同講座所属の先生方にこの場を借りてお礼申し上げます。皆様研究等でお忙しい中でも、私がお邪魔させて頂いた時には丁寧にご指導頂き感謝しております。

私が坂本研究室に所属していた日々に出会い、共に時を過ごした研究室の学生後輩たちに感謝します。皆がいてくれたことで私も支えられ、成長することができました。

最後に、これまで私を陰で支えて頂いた母に感謝と敬意を表します。

参考文献

- 1) 菊地吾郎, 島田秀夫 他, 現代化学・増刊 27 ポルフィリン・ヘムの生命科学—遺伝病・がん・工学応用などへの展開—, ポルフィリン研究会編, 東京化学同人 (1995) pp. 1-8, 105-115.
- 2) S. Sassa, Biological implications of heme metabolism, *J. Clin. Biochem. Nutr.* **38** (2006) 138-155.
- 3) H. Ishikawa, M. Nakagaki, A. Bamba, T. Uchida, H. Hori, M.R. O'Brian, K. Iwai, K. Ishimori, Unusual heme binding in the bacterial iron response regulator protein: Spectral characterization of heme binding to the heme regulatory motif, *Biochemistry* **50** (2011) 1016-1022.
- 4) K.R. Rodgers, Heme-based sensors in biological systems, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3** (1999) 158-167.
- 5) P.B. Pun, J. Lu, E.M. Kan, S. Moochhala, Gases in the mitochondria, *Mitochondrion* **10** (2010) 83-93.
- 6) 高橋徹, 清水裕子 他, 酸化ストレスに対するヘムオキシゲナーゼ-1 の臓器保護的役割, *日薬理誌* **130** (2007) 252-256.
- 7) R. Gozzelino, V. Jeney, M.P. Soares, Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50** (2010) 323-354.
- 8) L.C. Stillman, M.L. Gassman, Characterization of protoheme levels in etiolated and greening plant tissues, *Plant Physiol.* **62** (1978) 182-184.
- 9) 高橋重一, 増田建, ヘムの分析, *低温科学* **67** (2009) 327-337.
- 10) A.A. Khan, J.G. Quigley, Control of intracellular heme levels: Heme transporters and heme oxygenases, *Biochim. Biophys. Acta* **1813** (2011) 668-682.
- 11) S. Kumar, U. Bandyopadhyay, Free heme toxicity and its detoxification systems in human, *Toxicol. lett.* **157** (2005) 175-188.
- 12) G. Kikuchi, T. Yoshida, M. Noguchi, Heme oxygenase and heme degradation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338** (2005) 558-567.

- 13) P.R. Ortiz de Montellano, K. Auclair, in: K. Kadish, K. Smith, R. Guilard (Eds.), *Porphyrin Handbook*, Vol. 12, Academic Press Inc., New York, 2003, pp. 183–210.
- 14) 吉田匡, ヘムオキシゲナーゼとヘム分解反応, *生化学* **75** (2003) 204-212.
- 15) T. Matsui, M. Iwasaki, R. Sugiyama, M. Unno, M. Ikeda-Saito, Dioxygen activation for the self-degradation of heme: reaction mechanism and regulation of heme oxygenase, *Inorg. Chem.* **49** (2010) 3602-3609.
- 16) M. Sugishima, Y. Omata, Y. Kakuta, H. Sakamoto, M. Noguchi, K. Fukuyama, Crystal structure of rat heme oxygenase-1 in complex with heme, *FEBS Lett.* **471** (2000) 61-66.
- 17) M. Sugishima, H. Sakamoto, Y. Kakuta, Y. Omata, S. Hayashi, M. Noguchi, K. Fukuyama, Crystal structure of rat apo-heme oxygenase-1 (HO-1): mechanism of heme binding in HO-1 inferred from structural comparison of the apo and heme complex forms, *Biochemistry* **41** (2002) 7293-7300.
- 18) T. Yoshida, G. Kikuchi, Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes, *J. Biol. Chem.* **253** (1978) 4224–4229.
- 19) 坂本寛, ヘムオキシゲナーゼの立体構造からみた反応機構, *生化学* **77** (2005) 634-638.
- 20) 杉島正一, ヘムの代謝にかかわる酵素の構造生物学, *日本結晶学会誌* **49** (2007) 99-106.
- 21) K.G. Paul, H. Theorell, Å. Åkeson, The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen), *Acta Chem. Scand.* **7** (1953) 1284-1287.
- 22) J.-H. Fuhrhop, K.M. Smith, in: K.M. Smith (Ed.), *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier, Amsterdam, 1975, pp. 757-869.
- 23) A.V. Pandey, S.K. Joshi, B.L. Tekwani, V.S. Chauhan, A colorimetric assay for heme in biological samples using 96-well plates, *Anal. Biochem.* **268** (1999) 159-161.
- 24) N.T. Huy, D.T. Xuan Trang, D.T. Uyen, M. Sasai, S. Harada, K. Kamei, An improved colorimetric method for quantitation of heme using tetramethylbenzidine as substrate, *Anal. Biochem.* **344** (2005) 289-291.

- 25) S. Takeda, N. Kamiya, T. Nagamune, A novel protein-based heme sensor consisting of green fluorescent protein and apocytochrome *b₅₆₂*, *Anal. Biochem.* **317** (2003) 116-119.
- 26) T. Masuda, S. Takahashi, Chemiluminescent-based method for heme determination by reconstitution with horseradish peroxidase apo-enzyme, *Anal. Biochem.* **355** (2006) 307-309.
- 27) S. Takahashi, T. Masuda, High throughput heme assay by detection of chemiluminescence of reconstituted horseradish peroxidase, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **12** (2009) 532-535.
- 28) T. Ohashi, K. Kakimoto, Y. Sokawa, S. Taketani, Semi-quantitative estimation of heme/hemoprotein with dichlorodihydrofluorescein diacetate, *Anal. Biochem.* **308** (2002) 392-395.
- 29) T. Ohashi, A. Mizutani, A. Murakami, S. Kojo, T. Ishii, S. Taketani, Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species, *FEBS Lett.* **511** (2002) 21-27.
- 30) T. Hidaka, Y. Omata, M. Noguchi, Cloning and expression of cDNA for soluble form of rat heme oxygenase-1, *Kurume Med. J.* **43** (1996) 313-324.
- 31) Y. Omata, S. Asada, H. Sakamoto, K. Fukuyama, M. Noguchi, Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies on the water soluble form of rat heme oxygenase-1 in complex with heme, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54** (1998) 1017-1019.
- 32) Y. Higashimoto, H. Sakamoto, S. Hayashi, M. Sugishima, K. Fukuyama, G. Palmer, M. Noguchi, Involvement of NADP(H) in the interaction between heme oxygenase-1 and cytochrome P450 reductase, *J. Biol. Chem.* **280** (2005) 729-737.
- 33) H. Atamna, W.H. Frey II, A role for heme in Alzheimer's disease: Heme binds amyloid β and has altered metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (2004) 11153-11158.
- 34) R.F. Rieder, Hemoglobin Stability: Observations on the denaturation of normal and abnormal hemoglobins by oxidant dyes, heat, and alkali, *J. Clin. Invest.* **49** (1970) 2369-2376.
- 35) S. Takahashi, J. Wang, D.L. Rousseau, K. Ishikawa, T. Yoshida, J.R. Host, M.

- Ikeda-Saito, Heme-heme oxygenase complex. Structure of the catalytic site and its implication for oxygen activation, *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 1010-1014.
- 36) 三木正雄, 日本分光学会 測定法シリーズ 42 蛍光分光とイメージングの手法, 御橋廣眞編, 学会出版センター (2006) pp. 99-100.
- 37) G.S. Drummond, A. Kappas, Prevention of neonatal hyperbilirubineamia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation, *Pro. Natl. Acad. USA* **78** (1981) 6466-6470.
- 38) S.K. Sahoo, T. Sawa, J. Fang, S. Tanaka, Y. Miyamoto, T. Akaike, H. Maeda, Pegylated zinc protoporphyrin: a water-soluble heme oxygenase inhibitor with tumor-targeting capacity, *Bioconjugate Chem.* **13** (2002) 1031-1038.
- 39) S. Takeda, N. Kamiya, R. Arai, T. Nagamune, Design of an artificial light-harvesting unit by protein engineering: cytochrome *b*₅₆₂-green fluorescent protein chimera, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289** (2001) 299-304.
- 40) C.R. Robinson, Y. Liu, J.A. Thomson, J.M. Sturtevant, S.G. Sligar, Energetics of heme binding to native and denatured states of cytochrome *b*₅₆₂, *Biochemistry* **36** (1997) 16141-16146.
- 41) J. Wang, J.P. Evans, H. Ogura, G.N. La Mar, P.R. Ortiz de Montellano, Alteration of the regiospecificity of human heme oxygenase-1 by unseating of the heme but not disruption of the distal hydrogen bonding network, *Biochemistry* **45** (2006) 61-73.
- 42) 極東製薬工業株式会社ウェブサイト 学術情報 (紹介資料)
http://www.kyokutoseiyaku.co.jp/sciences/products/ot_01.html
- 43) 竹下俊隆, 堀口潤 他, Latex 凝集反応を用いた免疫学的便潜血反応, *大腸肛門誌* **38** (1985) 780-783.
- 44) 河合忠, 北條慶一, 川井啓市, 多田正大, 石井勝, 大場康寛, 免疫学的便潜血反応試薬「モノヘム」の臨床的検討, *大腸肛門誌* **40** (1987) 308-313.
- 45) K. Furuyama, K. Kaneko, P.D. Vargas V., Heme as a magnificent molecule with multiple missions: Heme determines its own fate and governs cellular homeostasis, *Tohoku J. Exp. Med.* **213** (2007) 1-16.

- 46) J. Sun, M. Brand, Y. Zenke, S. Tashiro, M. Groudine, K. Igarashi, Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101** (2004) 1461-1466.
- 47) G.O. Latunde-Dada, R.J. Simpson, A.T. McKie, Recent advances in mammalian haem transport, *Trends Biochem. Sci.* **31** (2006) 182-188.
- 48) 独立行政法人 国立がん研究センター がん予防・検診研究センター予防研究部 ウェブサイト <http://epi.ncc.go.jp/jphc/outcome/2869.html>
- 49) A.L. Sesink, D.S. Termont, J.H. Kleibeuker, R. Van der Meer, Red meat and colon cancer: The cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme, *Cancer Res.* **59** (1999) 5704-5709.
- 50) S. Ishikawa, S. Tamaki, M. Ohata, K. Arihara, M. Itoh, Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: A possible mechanism of heme-induced colon cancer, *Mol. Nutr. Food Res.* **54** (2010) 1-10.
- 51) H. Atamna, K. Boyle, Amyloid- β peptide binds with heme to form a peroxidase: Relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (2006) 3381-3386.
- 52) K. Nakahira, T. Takahashi, H. Shimizu, K. Maeshima, K. Uehara, H. Fujii, H. Nakatsuka, M. Yokoyama, R. Akagi, K. Morita, Protective role of heme oxygenase-1 induction in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity, *Biochem. Pharmacol.* **66** (2003) 1091-1105.
- 53) A. Ferreira, J. Balla, V. Jeney, G. Balla, M.P. Soares, A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?, *J. Mol. Med.* **86** (2008) 1097-1111.
- 54) Y. Zenke-Kawasaki, Y. Dohi, Y. Katoh, T. Ikura, M. Ikura, T. Asahara, F. Tokunaga, K. Iwai, K. Igarashi, Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1, *Mol. Cell. Biol.* **27** (2007) 6962-6971.
- 55) 竹谷茂, 遺伝子発現調節のリガンドとしてのヘムの機能, *ビタミン* **84** (2010) 123-127.

- 56) X.D. Tang, R. Xu, M.F. Reynolds, M.L. Garcia, S.H. Heinemann, T. Hoshi, Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels, *Nature* **425** (2003) 531-535.
- 57) M. Faller, M. Matsunaga, S. Yin, J.A. Loo, F. Guo, Heme is involved in microRNA processing, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14** (2007) 23-29.
- 58) 北西健一, 五十嵐城太郎, 清水透, ヘムによる時計遺伝子の転写制御, *生物物理* **50** (2010) 34-35.
- 59) K. Kaasik, C.C. Lee, Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals, *Nature* **430** (2004) 467-471.
- 60) E.M. Dioum, J. Rutter, J.R. Tuckerman, G. Gonzalez, M.A. Gilles-Gonzalez, S.L. McKnight, NPAS2: A gas-responsive transcription factor, *Science* **298** (2002) 2385-2387.