

CPase-A-ペプチド反応モデルを利用したペプチドの C-末端領域の構造解析法

土井和子¹, 原野昭雄²

¹川崎医療短期大学 臨床検査科, ²川崎医科大学 生化学

(平成8年9月11日受理)

A Technique of Amino Acid Sequencing of the C-terminal Region of Peptides by CPase-A-Peptide Model Constructed with a Personal Computer

Kazuko DOI¹ and Teruo HARANO²

¹Department of Medical Technology, Kawasaki College of Allied Health Professions

²Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

(Accepted on Sep. 11, 1996)

Key words : アミノ酸配列解析, C-末端領域, Carboxypeptidase-A, Carboxypeptidase-B,
CPase-A-ペプチド反応モデル, グロビン, パーソナルコンピュータ

概 要

CPase-A-ペプチド反応モデルを利用したC-末端アミノ酸配列解析法の開発をした。反応モデルはパーソナルコンピュータ上で BASIC 言語を用い、Michaelis-Menten 式の[S]にペプチド濃度($\mu\text{mol}/\ell$), Carboxypeptidase-A (CPase-A)の Km には0.81mmol/ ℓ を, Vmax には反応時間と CPase-A 活性値の関係式を代入し、分析値と予測値が近似するようにアミノ酸加水分解係数(K1~3)を設定し、配列するアミノ酸に応じて CPase-A 活性値に加水分解係数を乗じたモデルを構築した。CPase-A-ペプチド反応によるC-末端領域にアミノ酸置換をもつ異常ヘモグロビンのアミノ酸配列決定は、アミノ酸分析値と予想されるアミノ酸配列からの予測値を比較することで可能であった。このモデルは種々のペプチドやタンパク質のアミノ酸配列解析に応用可能と考えられ、日常解析にも適用されると思われる。

はじめに

ペプチドのアミノ酸配列決定法は、N-末端アミノ酸から順次配列を決める Edman 法が一般的であるが、多くのアミノ酸残基からなるポリペプチドでは、C-末端アミノ酸からの配列解析がN-末端からの解析と併せて行われると有利である。近年、ヒドラジン分解法や Mass Spectrometry を応用する方法の報告¹⁻³⁾があるが、簡単な操作で、日常解析に応用可能な方法の開発が望まれるところである。

ペプチドのC-末端からアミノ酸を加水分解する酵素類 Carboxypeptidase-A (CPase-A) や

Carboxypeptidase-B (CPase-B) を用いたC-末端からのアミノ酸配列解析法⁴⁾の開発を試みた。正常な α 鎖や β 鎖グロビンの分析値を参考にして CPase-A-ペプチド反応モデルを構築し、 α 鎖や β 鎖グロビンのC-末端領域にアミノ酸置換をもつ異常グロビンの配列解析に応用した^{5,6)}。この方法は従来からのC-末端部のアミノ酸配列によりアミノ酸遊離速度が一定ではなく、このためとくにC-末端付近に同一のアミノ酸残基が複数個存在したり、遊離されにくいアミノ酸がある場合、解析が困難であるという欠点を有していたが^{2,7-9)}、反応モデルを作成し、配列解析に応用することで精度よく解析することができた。C-

末端領域のアミノ酸配列解析法となりうるものと考え、モデル作成と異常グロビンの解析結果を示し、本方法の特徴を述べる。

材料と方法

1. グロビン試料の精製と単離：

1) α 鎖異常ヘモグロビン(Hb)の前処理：通常の方法で作成した溶血液を Kilmartin¹⁰⁾らの方法を応用して des-(Arg141) α Hb 溶液を作成した。溶血液に CPase-B を添加 [基質 (S)：酵素 (E) = 1500 : 1, バルビタール緩衝液：pH8.2, 37°C, 60分反応] し, 0.01mol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.9) で平衡化した DEAE-セルロースカラム (DE-52: Whatman International Ltd.; カラムサイズ, 約12×200mm) を通し, CPase-B を除去し, des-(Arg141) α Hb 溶液を得た。

2) グロビンの単離：Hb 溶液を冷アセトン-HC1 で処理して得たグロビンを CM-セルロース (CM-52; Whatman International Ltd.) カラムクロマト法¹¹⁾によって α 鎖と β 鎖グロビンに分けた。溶出液は 8 mol/l 尿素-リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8; Na⁺勾配: 7.5mmol/l → 32.5 mmol/l) を用いた。分離されたグロビン鎖は脱塩後 Sephadex G-25(Fine) を充填したカラムを通した後, 凍結乾燥した。

2. グロビンの CPase-A による消化反応：1. で調製したグロビン 1.5mg を 0.01mol/l NaOH と 0.06% SDS (Sodium dodecylsulfate)-0.2 mol/l モルフォリン緩衝液 (pH8.5) の等量混合溶液 1 ml に溶かし (β 鎖グロビン: 94.5 μ mol/l 溶液となる), CPase-A (Carboxypeptidase-A DFP; C 6510, Sigma Chem. Co.) を S : E = 100 : 1 の割合に添加して 37°C に加温した。設定した時間 (10, 20, …240分など) に一定量 (100 μ l) を取り出し, 15% スルホサリチル酸 (50 μ l) を加えて反応を停止した。遠心して上清を集め自動アミノ酸分析機 (IRIKA; Model 5500) でアミノ酸組成を分析した。

3. CPase-A-ペプチド反応モデルの作成：

1) CPase-A 活性値 [mU (mili unit) × sec⁻¹ × μ mol CPA⁻¹] の測定: CBZ-Gly-Phe を 0.01 mol/l NaOH と 0.06% SDS 加 0.2M モルフォリン緩衝液 (pH8.5) の等量混合溶液に溶解して 40mmol/l 基質溶液を作成した。その溶液の

5 ml を 37°C に加温して, 上記 CPase-A 市販品 (基質溶解液を使用して 2000 倍に希釈した溶液を 40 μ l 加え反応を行った。一定時間後溶液の一部 (100 μ l) にスルホサリチル酸 (50 μ l) を加えて反応を停止し, 遊離アミノ酸 (Phe) の分析を行った。Phe の遊離量 (Phe を 1 分間に 1 μ mol 遊離したとき 1 U (unit) = 1000mU : 1 秒間に 1 nmol 遊離したとき 1 mU × sec⁻¹ とした) から酵素 1 μ mol 当たりの CPase-A 活性値 (mU × sec⁻¹ × μ mol CPA⁻¹) を 0 ~ 240 分まで求めた。グラフツール・CA - Cricket Graph III (CG) (Macintosh 使用, Model: Power Macintosh 8500) を使用して CPase-A 活性値データを入力してグラフを作成し, 近似式を求め, CPase-A 活性値 (mU × sec⁻¹ × μ mol CPA⁻¹) を反応時間に対して対数一次方程式で示した。

2) Michaelis-Menten 式を基にした CPase-A-ペプチド反応モデルの作成: CPase-A の Km は文献値を参考にして Km = 0.81mmol/l を採用した¹²⁾。調整したグロビン濃度 (94.5 μ mol/l) を基質濃度 ([S]) に代入し, 上記 3-1) で求めた CPase-A 活性値 (mU × sec⁻¹ × μ mol CPA⁻¹) と基質-酵素比率 (S : E = 100 : 1) を最大反応速度 (V_{max}) に対応させた。グロビンの C-末端領域アミノ酸配列から想定した各アミノ酸加水分解係数 (K1 ~ K3) を配列に応じて CPase-A 活性値 (mU × sec⁻¹ × μ mol CPA⁻¹) に乗じ, 反応速度 (v; 式 1) を各測定時のアミノ酸遊離量とした。アミノ酸遊離量で, 反応により新生する C-末端基質濃度 (μ mol/l) を求め, 次に配列するアミノ酸の遊離アミノ酸量を算出して反応モデルを組み立てた⁴⁾。コンピュータは Toshiba Model J 3100 SGT 101 を用い, プログラムは BASIC (MS-DOS Ver.3.1) で構築した。

v (μ mol/min)

$$= \frac{[\text{CPA 活性値} \times E \times S^{-1} \times \text{アミノ酸係数 (K1)}] \times [S]}{([S] + K_m)} \dots (式 1)$$

3) アミノ酸加水分解係数の決定: CPase-A-ペプチド反応による C-末端位アミノ酸の遊離は C-末端に位置するアミノ酸の種類や C-末端より 2 番目に位置するアミノ酸の種類によって遊離速度が異なることが知られている⁷⁻⁹⁾。正常 β 鎖グロビンの分析結果を参考にして作成したモ

Alpha globin chain

119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141
 -Pro Ala Val His Ala Ser Leu Asp Lys Phe Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg

Beta globin chain

125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146
 -Pro Val Gln Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His Lys Tyr His

図1 α鎖, β鎖グロビンのC-末端付近のアミノ酸配列

表1 CPase-A ペプチド反応モデルに用いた CPase-A の相対的アミノ酸加水分解係数

Amino Acid	K1	K2				K3			
		A&B	C	st	D	A&B	C	st	D
A:Aromatic A.A. (very fast)	Phe	100	3			2			
	Tyr	50	3			2			
B:Aliphatic A.A. (fast)	Leu	20	1.5			1			
	Val	20	1.5			1			
	Thr	20	1.5			1			
	Gln	20	1.5			1			
	Ala	8	1.5 (AlaAla: 0.2)			1			
C:Basic A.A. (slow)	His	10	1	0.2	0.3	1			
	Ser	8	1.2	0.2	0.3	1			
	Asn	5	1.2	0.2	0.3	1			
	Lys	3	1	0.2	0.3	1			
ST:Standard	Gly	3	1			1			
D:Acidic A.A. (veryslow)	Asp	0.8	0.4	0	0.03	1			
	Glu	0.8	0.4	0	0.03	1			
E:Nonreact A.A.	Pro	0	0.02			0.4			
	Arg	0	0.02			0.4			

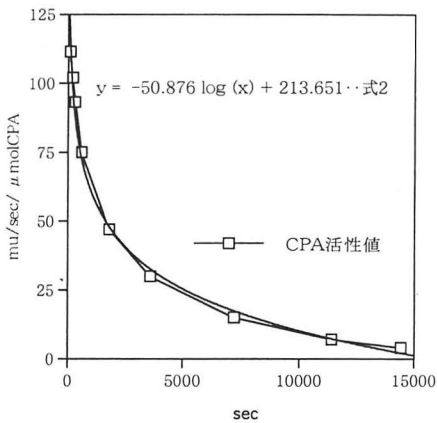


図2 CPase-A の経時変化

CBZ-Gly-Phe(40 mmol/l, SDS 加モルホリン緩衝液; pH8.5) 溶液を基質として37°C中で測定

デルから予測値を求め、シミュレーションして芳香族、脂肪族、塩基性、酸性、非反応性アミノ酸(Pro, Arg)に大別し、相対的なアミノ酸加

水分解係数(K1)を決定した。α鎖やβ鎖グロビンのC-末端領域(α140-119, β146-125; 図1)に存在しないアミノ酸(例えばGlu)については異常グロビン鎖の分析結果を参考にして決定した。

4. CPase-A-ペプチド反応モデルによるアミノ酸置換の予測: CPase-A-異常鎖グロビン反応によるアミノ酸分析値から置換アミノ酸を推測し、3-2)で作成したモデルに予想される置換配列を代入し、シミュレーションを繰り返すことによってアミノ酸置換位置と種類を決定した。この際、C-末端アミノ酸の値を基準として求めたモル比率をMacintosh上でCGを用いてグラフ化することは、配列の推定とアミノ酸置換の決定に有効であった。

結 果

CBZ-Gly-Phe-CPase-A 反応の0から240分

間までの Phe の遊離量から求めた CPase-A 活性値 ($\text{mU} \times \text{sec}^{-1} \times \mu\text{mol CPA}^{-1}$) は測定開始後より対数曲線状の低下を示し、その近似式は対数一次方程式 $[y = -50.876 \log(x) + 213.651]$ で示された (図 2, 式 2)。反応が進むと C-末端アミノ酸種が変化し⁴⁾、その濃度の総計のグロビン濃度 ($94.5 \mu\text{mol}/\ell$) を $[S]$ に、さらに $S : E = 100 : 1$ と式 2 をモデル (式 1) に代入して正常 α 鎖および β 鎖グロビンの分析値と遊離予測値とのシミュレーションで各アミノ酸の相対的加水分解係数を Phe を 100 として決定した (表 1. K 1)。C-末端より 2, 3 位に位置するアミノ酸の種類によっても CPase-A 反応によるアミノ酸遊離速度は異なる⁷⁻⁹⁾ ことからモデルで予測する際に C-末端より 2, 3 番目に位置するアミノ酸も反応速度への関与が考えられ、K 2, K 3 を定める必要があった。この影響は

芳香族および脂肪族では反応速度を増加させ、塩基性 (C)、酸性 (D) および CPase-A に対して非反応性のアミノ酸 ($E : \text{Arg, Pro}$) では反応速度を減少させることが特徴的で、アミノ酸分析値と予測値のシミュレーションにより決定した (表 1 :K 2, K 3)。これら K 1, K 2,

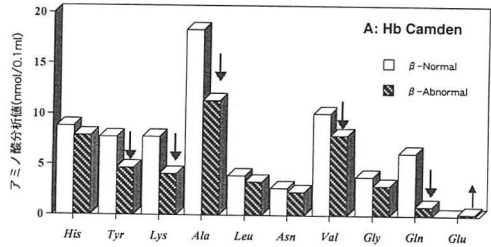


図 3 CPase-A- β -Camden 鎖反応 4 時間後のアミノ酸分析値
グロビン濃度 $94.5 \mu\text{mol}/\ell$, $S : E = 100 : 1$, $\text{pH} 8.5$, 37°C で測定

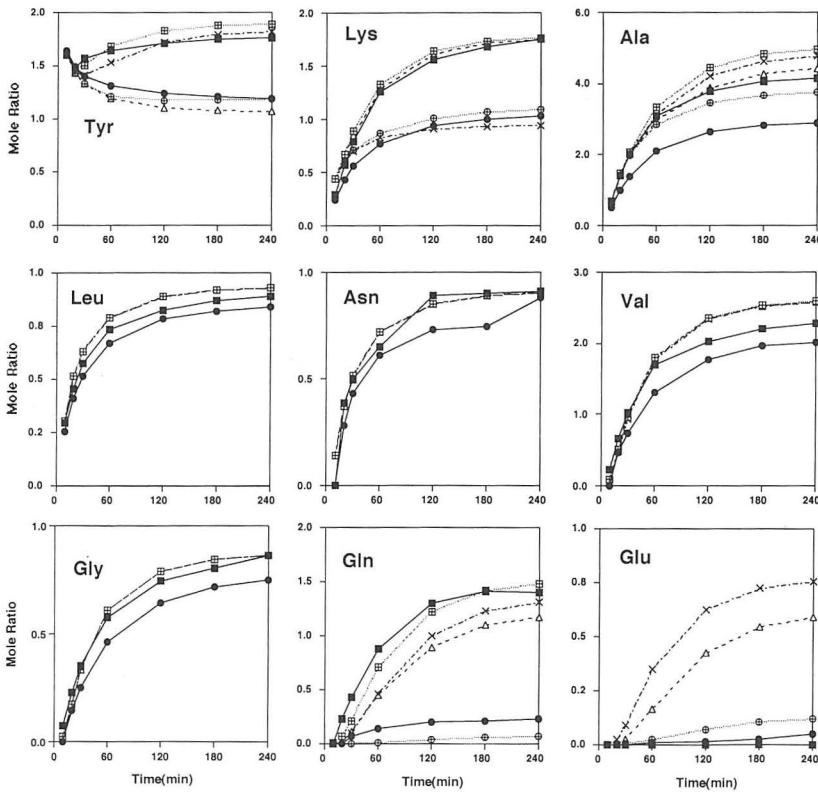


図 4 Hb Camden の配列解析 : CPase-A-ペプチド反応によるアミノ酸分析値と作成モデルによる予測値の比較
グロビン濃度 $94.5 \mu\text{mol}/\ell$, $S : E = 100 : 1$, $\text{pH} 8.5$, 37°C で反応
—■— β n 鎖分析値 —□— β n 予測値 —●— β Camden 鎖分析値
---x--- β 132Lys \rightarrow Glu 置換予測値 —○— β 131Gln \rightarrow Glu 置換予測値 - - - β 130Tyr \rightarrow Glu 置換予測値

K 3を導入することによって正常 α および β 鎖グロビン-CPase-A反応によってC-末端領域のアミノ酸配列の予想がよりよいものとなった(図4, 9: 図中の白黒四角)。この正常グロビン鎖からのデータを基にして異常鎖 β -Camden [β 131 Gln \rightarrow Glu], β -Hiroshima [β 146 His \rightarrow Asp], β -Yamagata [β 132 Lys \rightarrow Asn] および α -Hanamaki [α 139 Lys \rightarrow Glu] の解析を試みた。

β -Camden-CPase-A反応の分析結果(4時間値: 図3)では, C-末端領域(β 146~125)に位置するアミノ酸のうち Tyr, Lys, Ala, Glnの分析値に著しい低下がみられ, なかでも GlnがC-末端領域では内部に位置する(β 131および β 127位: C-末端より16および20位)とはいえ特に著しい低値を示した。他のアミノ酸は正常鎖の分析値とほとんど同じであった。また, 正常 β 鎖C-末端領域には存在しない Glu がわずかに出現していた(図3)。CPase-A-ペプチド反応モデルを用いて β 132 Lys~ β 130 Tyrの間のアミ

ノ酸を Glu で置換した配列からのアミノ酸遊離量の予測値を求め, 分析値との比較から β -Camdenは β 131 Gln \rightarrow Gluのアミノ酸置換に相当することを示した(図4)。

β -YamagataのCPase-A反応では, Asnの増加と Lysの低下が特徴的で(図5), LysのAsnへの置換と考えられた。 β 144と β 132 LysをAsnに置換した配列の予測値との比較から β -Yamagataは β 132 Lys \rightarrow Asnが最も適した構造であることを示した(図6)。 β -HiroshimaはC-末端アミノ酸である Hisの減少とC-末端領域には存在しない Aspが見出され, 短時間(10 min)のCPase-A-ペプチド反応でも Aspの存在は明瞭であった(表2)。 β 146His~ β 143 Hisの間のアミノ酸をAspに置換して同様に検討し β 146 His \rightarrow Asp置換を決定した。本例はC-末端付近に相対的アミノ酸加水分解係数の小さいAspが存在するため, 酵素添加量を増量(S:E=75:1)したCPase-A反応によるアミノ酸分析も行なった。その結果も分析値と予測値は β 146 His \rightarrow Asp置換を明瞭に示した(図7)。

α 鎖異常のHb Hanamakiでも β 鎖の分析と同様に解析した。CPase-A反応(4時間)の分析値は基準となる Tyr以外のすべてのアミノ酸の低下がみられ, 特に Lysの低下は顕著であった。また α 鎖C-末端領域には存在しないアミノ酸 Glu が検出された(図8)。CPase-A-ペプチド反応モデルにより α 139~ α 137間のアミノ酸を Glu に置換して検討したところ, α 139 Lys \rightarrow Glu置換が予想され α -Hanamaki [α 139 Lys \rightarrow Glu]

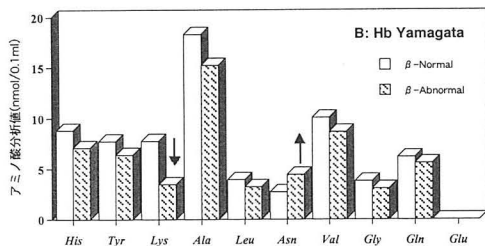


図5 CPase-A- β -Yamagata 鎖反応4時間後のアミノ酸
グロビン濃度 $94.5 \mu\text{mol}/\ell$, S:E=100:1, pH8.5, 37°Cで測定

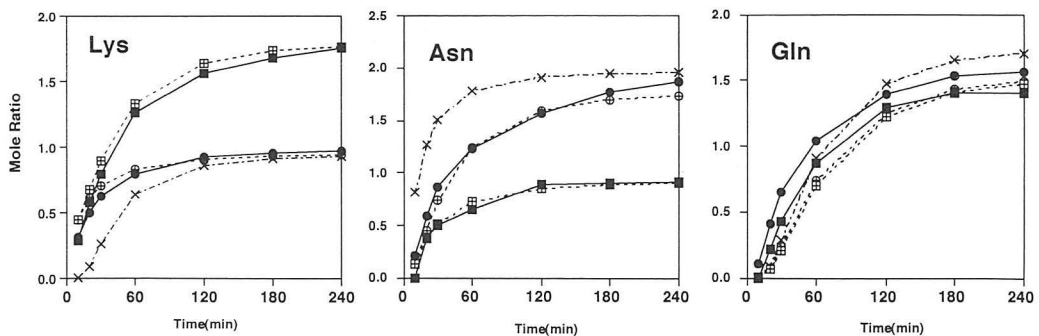


図6 Hb Yamagata の配列解析: CPase-A-ペプチド反応によるアミノ酸分析値と作成モデルによる予測値の比較
グロビン濃度 $94.5 \mu\text{mol}/\ell$, S:E=100:1, pH8.5, 37°Cで反応

—■— β n鎖分析値 - - - ■ - - β n鎖予測
—●— β Yamagata鎖分析値 - - - × - - 144Lys \rightarrow Asn置換予測 - - - ○ - - 132Lys \rightarrow Asn置換予測

表2 βn 鎖と β -Hiroshima鎖(β Abn)のCPase-A-ペプチド反応によるアミノ酸遊離値の比較

	10min		240min	
	βn	β Abn	βn	β Abn
His	4.5	* 1.2	9.3	* 5.3
Asp	0.0	↑* 5.0	0.0	↑* 5.4
Tyr	3.6	5.4	8.6	10.1
Lys	0.5	1.2	8.1	10.5
Ala	1.1	2.9	21.3	28.3
Leu	0.5	1.0	4.1	5.1
Asn	0.0	0.8	4.9	5.7
Val	0.0	1.1	11.4	15.0
Gly	0.0	0.3	3.5	4.7
Gln	0.0	0.2	6.1	9.4

S : E = 100 : 1 (βn) または S : E = 75 : 1 (β Abn), グロビン濃度 $94.5 \mu\text{mol}/\ell$, pH8.5, 37°C で反応

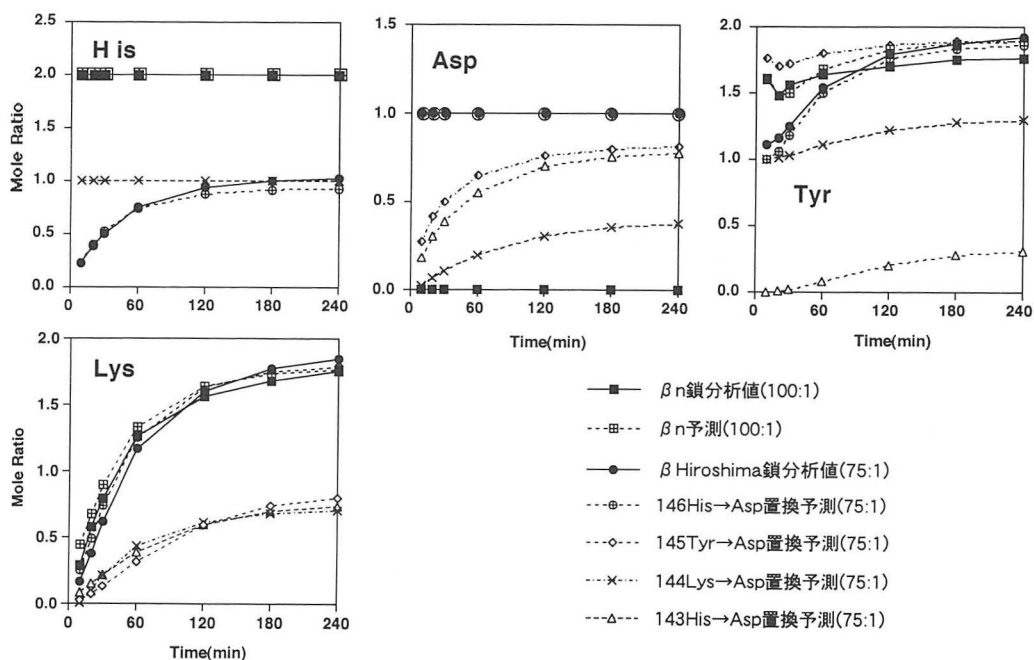


図7 Hb Hiroshima の配列解析: CPase-A-ペプチド反応によるアミノ酸分析値と作成モデルによる予測値の比較
グロビン濃度 $94.5 \mu\text{mol}/\ell$, S : E = 100 : 1, または S : E = 75 : 1, pH8.5, 37°C で反応

と一致する結果を得た (図9)。

考 察

CPase-A-ペプチド反応モデルは、実験したグロビン濃度 ($\mu\text{mol}/\ell$), CPase-Aの K_m , CPase-A活性値と S : E比, およびアミノ酸の相対的加水分解係数とで Michaelis-Menten 式を基に作成した。

CPase-A-ペプチド反応の活性値は37°Cでは

240minの間, 対数曲線状に低下し, CG上の統計処理で対数一次方程式 (図2: 式1) の関係式が得られた。この関係式を考慮に入れた CPase-A-ペプチド反応モデルでの予測値と分析値の結果は初期に構築したモデル^{4,13)}にくらべよい一致をみた (図2, 4, 6, 7, 9)。CPase-A-ペプチド反応のC-末端アミノ酸による反応速度には差異がみられ, 実験データを参考に Gly 以外を5グループに分け相対的アミノ酸加水分解係数を決定

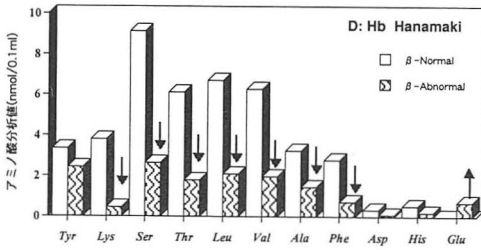


図8 CPase-A- α -Hanamaki 鎖反応4時間後のアミノ酸分析値
 グロビン濃度100.2 $\mu\text{mol}/\ell$, S : E = 100 : 1,
 pH8.5, 37°Cで測定

した。特に、芳香性アミノ酸(A)では反応性が非常に速く、塩基性、酸性、CPase-A非反応性(C-E)のアミノ酸は低い反応性のものから非反応のものがあり、これらのアミノ酸が連鎖する配列では単にC-末端アミノ酸に対する加水分解係数(K1)を考慮するだけでなく、C-末端より2, 3位に配列するアミノ酸を考慮にいれて、K2またはK3を定める必要があった(表1)。正常 α , β 鎖グロビンの配列に α 139Lys-138Ser, α 127Lys-126Asp, α 120Ala-119Pro, β 144Lys-143His, β 126Val-125ProではK2, K3の係数を設けることによって正常鎖の分析値と予測

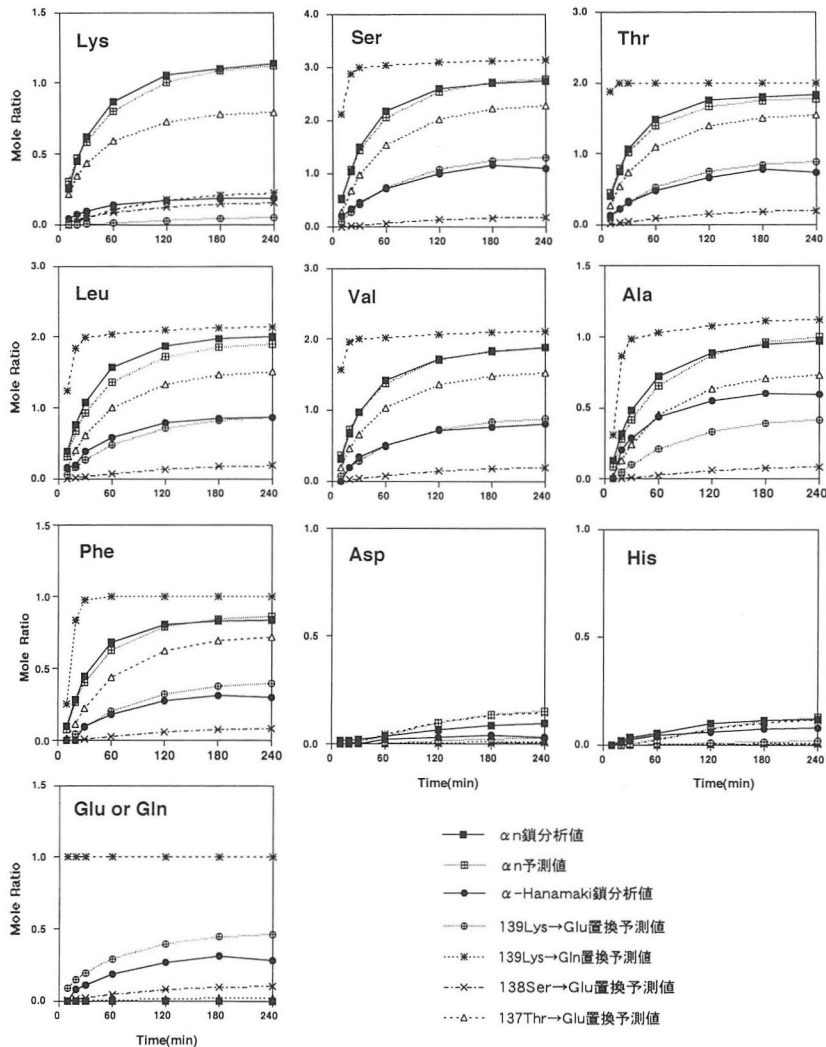


図9 Hb Hanamaki の配列解析: CPase-A-ペプチド反応によるアミノ酸分析値と作成モデルによる予測値の比較
 グロビン濃度100.2 $\mu\text{mol}/\ell$, S : E = 100 : 1, pH8.5, 37°Cで反応

値とにより一致がみられるようになった(図4, 9四角)。このようにCPase-Aの活性値, アミノ酸加水分解係数(K1, K2, K3)を考慮した反応モデルを応用して異常グロビンの β -Camden¹⁴⁾, β -Hiroshima¹⁵⁾および β -Yamagataのアミノ酸置換を決定することことが可能であることを示した。また, 一定の反応時間(10~240min)でのアミノ酸分析結果を図式化してみることににより置換を明瞭にさせる利点があった。

同様の方式により α 鎖グロビン(α -Hana-maki)についてもその構造解析がされたことは, 他のペプチドへの応用が可能であることを示した。

CPase-A-ペプチド反応によるC-末端からの配列解析は, パソコンによるCPase-A-ペプチド反応モデルを作製し, 反応によるアミノ酸遊離量予測を可能にした。従来からのCPase-A-ペプチド反応による配列の決定は単純に遊離するアミノ酸のモル比率を比較する方法で, 解析は経験によって判断していた。アミノ酸の配列や種類による反応速度を考慮していないため, C-末端より数個が限度であり, 反応速度の非常に遅い配列の場合は解析は困難であった。本方法はアミノ酸の種類や配列を考慮に入れて反応モデルを作成し, そのモデルで予測した値を用いて配列決定を行い, その解析もC-末端より20アミノ酸残基可能であった。

謝 辞

本研究は第1回黒住医学研究振興財団研究助成によって行った。

文 献

- 1) 下西康嗣: 質量分析による構造決定法, 「続生化学実験講座2 タンパク質の化学上」(日本生化学会編), 第1版, 東京, 東京化学同人, 1988, pp375-390.
- 2) 岩松明彦, 網沢 進, 崎山文夫: カルボキシ末端(C末端)アミノ酸残基の同定法, 「新基礎生化学実験法4 一次構造」(中島暉躬, 野本明男, 松橋通生, 三浦謹一郎, 松村政実編), 東京, 丸善, 1989, pp71-84.
- 3) Tsugita, A., Takamoto, K., Kamo, M. and Iwadate, H.: C-terminal Sequencing of Protein. A Novel Partial Acid Hydrolysis by Mass Spectrometry, *Eur. J. Biochem.*, **206**, 691-696, 1992.
- 4) 土井和子, 上田 智, 原野恵子, 原野昭雄: カルボキシペプチダーゼA (CPase-A) によるペプチドのC-末端アミノ酸配列の解析, *川崎医学会誌*, **17**(2), 159-166, 1991.
- 5) 土井和子, 原野昭雄: CPase-A-ペプチド反応モデルを応用したHb Hiroshima [β 146 His \rightarrow Asp]の構造解析, *臨床病理*, **43**, 58, 1995.
- 6) Doi, K., Harano, K. and Harano, T.: An Improved Technique of Amino Acid Sequencing of the C-terminal Region of Peptides., *22nd World Congress of Medical Technology Abstracts*, **18**, 1996.
- 7) 飛田 亨: カルボキシペプチダーゼ法による蛋白質およびペプチドのC末端構造分析, *蛋白質核酸 酵素*, **8**(5), 83-102, 1963.
- 8) Amber, R. P.: Enzymatic Hydrolysis with Carboxypeptidases, *Meth. Enzymol.*, **25**, 143-154, 1972.
- 9) 池仲徳治: C末端アミノ酸の決定法, 「生化学実験講座1 タンパク質の化学II」(日本生化学会編), 第1版, 東京, 東京化学同人, 1984, pp186-211.
- 10) Kilmartin, J. V., Hewitt, J. A. and Wootton, J. F.: Alteration of Functional Properties Associated with the Change in Quaternary Structure in Unliganded Hemoglobin, *J. Mol. Biol.*, **93**, 203-218, 1974.
- 11) Clegg, J. B., Naughton, M. A. and Weatherall, D. J.: Separation of the Alpha and Beta-chains of Human Hemoglobin, *Nature*, **219**(149), 69-70, 1968.
- 12) 山川民夫: 生化学データブックI, 「タンパク質分解酵素の特性」(日本生化学会編), 第1版, 東京, 東京化学同人, 1979, pp402-402.
- 13) 土井和子, 原野昭雄: CpaseA-ペプチド反応モデルを応用したHbCamden [β 131Gln \rightarrow Glu]の構造解析, *臨床病理*, **41**, 209, 1993.
- 14) Ohba, Y., Miyaji, T., Matsuoka, M., Ueda, S., Iuchi, I. and Shibata, S.: Hemoglobin Tokuchi: β 131 Glutamin \rightarrow Glutamic acid, an Example of Hb Camden in Japan, *Acta Haematol. Jpn.*, **38**(1), 1-7, 1975.
- 15) Perutz, M. F., Pulsinelli, P. D., Eyck, L. T., Kilmartin, J. V., Shibata, S., Iuchi, I., Miyaji, T. and Hamilton, H. B.: Haemoglobin Hiroshima and the Mechanism of the Alkaline Bohr Effect, *Nature New Biol.*, **232**(31), 147-149, 1971.