

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5698905号

(P5698905)

(45) 発行日 平成27年4月8日(2015.4.8)

(24) 登録日 平成27年2月20日(2015.2.20)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K	37/02	Z N A
A 6 1 K	47/48	(2006.01)	A 6 1 K	47/48	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/12	(2006.01)	A 6 1 P	9/12	
A 6 1 P	9/04	(2006.01)	A 6 1 P	9/04	

請求項の数 27 (全 134 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-512098 (P2009-512098)
 (86) (22) 出願日 平成19年5月21日 (2007.5.21)
 (65) 公表番号 特表2009-538133 (P2009-538133A)
 (43) 公表日 平成21年11月5日 (2009.11.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/012133
 (87) 国際公開番号 W02007/139767
 (87) 国際公開日 平成19年12月6日 (2007.12.6)
 審査請求日 平成22年5月20日 (2010.5.20)
 (31) 優先権主張番号 60/921,505
 (32) 優先日 平成18年5月22日 (2006.5.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 607 オークランド フランクリン ス
 トリート 1111 トウエルフス フロ
 ア
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 一酸化窒素の送達のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) 薬学的に許容される量のH-NOXタンパク質であって、前記H-NOXタンパク質はNOを結合および送達し、そして前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で $1 \times 10^{-4} s^{-1} \sim 10 s^{-1}$ の間であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が700 s^{-1} 未満であり、該H-NOXタンパク質が少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、薬学的に許容される量のH-NOXタンパク質と、(ii) 薬学的に許容される担体を含む、NOを送達するための薬学的組成物。

【請求項2】

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で $1 \times 10^{-4} s^{-1} \sim 0.012 s^{-1}$ の間である、請求項1に記載の薬学的組成物。

【請求項3】

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で $1 h^{-1}$ 未満である、請求項1または2に記載の薬学的組成物。

【請求項4】

前記H-NOXタンパク質が変異タンパク質であり、T. tengcongensis H-NOXのThr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75、Phe78、Phe82、Tyr140、及びLeu144の1または複数に対応する、請求項1～3のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項5】

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO解離定数、NOに対する k_{off} 、NOに対する k_1 、NOに対する k_2 、 O_2 解離定数、NO安定性、ヘム自動酸化速度、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させる、少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項6】

前記変異H-NOXタンパク質中の少なくとも1つのC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、請求項1～5のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項7】

前記H-NOXタンパク質が哺乳動物タンパク質であるか、または哺乳動物タンパク質由来である、請求項1～6のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項8】

前記哺乳動物タンパク質がヒトタンパク質であり、そして前記ヒトタンパク質が $\beta 1$ であるか、または $\beta 1$ 由来である、請求項7に記載の薬学的組成物。

【請求項9】

前記H-NOXタンパク質が細菌タンパク質であるか、または細菌タンパク質由来である、請求項1～6のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項10】

前記H-NOXタンパク質が別の分子または部分に共有結合している、請求項1～9のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項11】

(i) 薬学的に許容される量のH-NOXタンパク質であって、前記H-NOXタンパク質はNOを結合および送達し、そして前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10 \text{ s}^{-1}$ の間であり、前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも $1 \mu\text{M}$ であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、 700 s^{-1} 未満であり、該H-NOXタンパク質が少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、薬学的に許容される量のH-NOXタンパク質と、(ii) 薬学的に許容される担体を含む、血液中にNOを送達するための薬学的組成物。

【請求項12】

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で 1 h^{-1} 未満である、請求項11に記載の薬学的組成物。

【請求項13】

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO解離定数、NOに対する k_{off} 、NOに対する k_1 、NOに対する k_2 、 O_2 解離定数、NO安定性、ヘム自動酸化速度、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させる、少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、請求項11または12に記載の薬学的組成物。

【請求項14】

前記H-NOXタンパク質が哺乳動物タンパク質であるか、または哺乳動物タンパク質由来である、請求項11～13に記載の薬学的組成物。

【請求項15】

前記哺乳動物タンパク質がヒトタンパク質であり、そして前記ヒトタンパク質が $\beta 1$ であるか、または $\beta 1$ 由来である、請求項14に記載の薬学的組成物。

【請求項16】

前記H-NOXタンパク質が別の分子または部分に共有結合している、請求項11～15のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項17】

個体へNOを送達するための組成物であって、前記組成物は、前記個体へ有効量のNOを送達するために十分な量のH-NOXタンパク質を含み、そして前記個体に投与される

10

20

30

40

50

ことを特徴とし、前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10 \text{ s}^{-1}$ の間であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が 700 s^{-1} 未満であり、該H-NOXタンパク質が少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、組成物。

【請求項18】

個体へNOを送達するための組成物であって、前記組成物は、前記個体へ有効量のNOを送達するために十分な量のH-NOXタンパク質を含み、そして前記個体に投与されることを特徴とし、前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10 \text{ s}^{-1}$ の間であり、前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも $1 \mu\text{M}$ であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が 700 s^{-1} 未満であり、該H-NOXタンパク質が少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、組成物。

10

【請求項19】

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO解離定数、NOに対する k_{off} 、NOに対する k_1 、NOに対する k_2 、 O_2 解離定数、NO安定性、ヘム自動酸化速度、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させる、少なくとも1つの変異を含む、請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

前記H-NOXタンパク質が哺乳動物タンパク質であるか、または哺乳動物タンパク質由来である、請求項18～19のいずれか1項に記載の組成物。

20

【請求項21】

前記H-NOXタンパク質が別の分子または部分に共有結合している、請求項18～20のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項22】

NOが、前記個体へのH-NOXタンパク質の投与の前に、前記H-NOXタンパク質に結合せず、前記H-NOXタンパク質は、個体中の1つの位置から個体中の別の位置にNOを輸送する、請求項18～21のいずれか1項に記載の組成物。

【請求項23】

前記個体が、心臓血管の症状、高血圧、高血圧によって悪化した症状、血管収縮の症状、脳卒中、またはNO機能不全に罹患しているか、あるいはそれらの危険性がある、請求項18～22のいずれか1項に記載の組成物。

30

【請求項24】

前記高血圧によって悪化した症状が、心不全、腎不全、または脳卒中である、請求項23に記載の組成物。

【請求項25】

(i) 薬学的に許容される量のH-NOXタンパク質であって、前記H-NOXタンパク質はNOを結合および送達し、そして前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10 \text{ s}^{-1}$ の間であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が 700 s^{-1} 未満であり、該H-NOXタンパク質が少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む薬学的に許容される量のH-NOXタンパク質と、(ii) 薬学的に許容される担体を含む、キット。

40

【請求項26】

(i) H-NOXタンパク質であって、前記H-NOXタンパク質はNOを結合および送達し、そして前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 10 \text{ s}^{-1}$ の間であり、前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも $1 \mu\text{M}$ であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が 700 s^{-1} 未満であり、該H-NOXタンパク質が少なくとも1つの遠位ポケット変異を含むH-NOXタンパク質と、(ii) 個体へNOを送達するためのキットの使用についての説明書を含む、キット。

【請求項27】

50

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で1h⁻¹未満である、請求項26に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願への相互参照)

本願は、「Engineering H-NOX Proteins for The
therapeutic Nitric Oxide and Oxygen Deliver
y」(UC Case No. B06-084)という表題の、Michael A. M
arletta, Stephen P. L. Cary, Elizabeth M. Boo
nによる、2006年5月22日に出願された米国仮特許出願第__号の利益を請求する。この仮特許は、2006年5月22日に出願された米国特許出願第11/440,588号から、2007年5月1日における仮特許出願に変更され、その開示は、その全体が本明細書中に参考として援用される。

10

【0002】

(政府支援の研究または開発に関する陳述)

本研究は、助成金番号DE-AC03-76SFに支援された。米国政府は、本出願にかかる任意の特許に権利を有し得る。

【0003】

20

(技術分野)

本出願は、H-NOXタンパク質、および一酸化窒素(NO)を送達するためにそれらを使用する方法に関する。H-NOXタンパク質は、ヒトにNOを送達するため、および動物についての獣医学的目的のための新規の治療用ツールを提供する。

【背景技術】

【0004】

(発明の背景)

NOは、インビボでは、多くの重要なプロセスの制御において化学的メッセンジャーとしての役割を担っており、これには、血管拡張、神経伝達、炎症、血小板の凝集、ならびに消化管と血管の平滑筋の緊張の調節を含む。1867年のDrs. Lauder Br
unttonおよびWilliams Murrellによる、ニトログリセリン(GTN)
が狭心症のような心疾患の症状を治療できることの発見から、有機硝酸塩は、血管収縮の急性の症例を治療するために広く使用されている。最近の数十年の間に、血管拡張の機構が明らかになってきた。内皮細胞の中で合成されるNOは平滑筋細胞に拡散し、可溶性のグアニル酸シクラーゼ(sGC)を活性化させてサイクリックGMPを生じさせ、それにより拡張を誘導する。その結果、有機硝酸塩の臨床的な作用機構には、NOへのそれらの生体内変換と、それに続くsGCの活性化が必要されると推定される。しかし、有機硝酸塩は、耐性と呼ばれる表現形が原因で、24~48時間後に、患者において効果がなくなる。したがって、高血圧の慢性的な症例の治療については、β-ブロッカー、およびACE阻害剤のような化合物が使用される。しかし、これらには多くの制限と副作用がある。したがって、ニトロ系血管拡張剤が、狭心症および心筋梗塞のような、症状を緩和するために迅速な血管拡張が必要な急性の症状の治療には最も有用である。有機硝酸塩の長期にわたる投与によっては、効力の低下が生じ、血管系は無反応になる。この耐性は、慢性および急性のいずれの症例においても、それらをさらに使用することを妨げる。したがって、急性治療については、非継続的なニトロ系血管拡張剤の使用が使用され、これによって、限られた効果がもたらされる。血管収縮の慢性的な症例については、他の治療方法が使用され、通常は、有機硝酸塩とNO依存性血圧薬物治療の混合レジュメが使用され、これにより成果の混合がもたらされる。

30

40

【0005】

耐性についての機構には2つの主要な矛盾する理論が、NOの放出を導く硝酸塩の生体

50

内変化の機構についての研究と平行して存在する。NOは有機硝酸塩の血管拡張作用の媒介因子であると考えられているので、有機硝酸塩からのNOの放出の機構が阻害され得、耐性が生じ得る。しかし、有機硝酸塩が組織内で代謝によりNOを放出する方法は理解されていない。さらに、耐性についての機構に基づく理論は、耐性はまた血管拡張を媒介することにおける内因性NOガスおよび外因性NOガスの効力をも低下させるので、問題が多い。したがって、有機硝酸塩の生体内変化の機構は、耐性の理由とは区別されるようである。矛盾する理論は、有機硝酸塩由来のNOに対する応答が、おそらくは、NOの生成、およびNOに対する応答を最終的に阻害する反応の副産物が原因で、あるいは、NO経路の急激な活性化が、それを刺激に対してさらに鈍感にさせるフィードバック機構を有していることが原因で、標的組織の中で抑制されるようになる。この理論は、末端臓器の耐性 (end-organ tolerance) として知られている。最近、統一された理論が提案された。これには、有機硝酸塩の生体内変換の態様、さらには、NOに対する末端臓器の脱感作の態様を含む。原則として、有機硝酸塩の生体内変換は、組織内でより高いレベルのスーパーオキシド (O_2^-) を生じる。スーパーオキシドはNOと拡散速度で反応して、ペルオキシ亜硝酸 ($ONNO$) を生じる。この反応は、原則として基底NOを捕捉し、崩壊させ、これがsGCを活性化させることを防ぐ。低いNOレベルは血管収縮を導き、 $ONNO^-$ は、組織を損傷させる強力な酸化剤である。有機硝酸塩 (例えば、GTN) での長期にわたる治療によっては、患者において高血圧および組織の損傷が生じる可能性があり、これは、アスコルビン酸塩のような抗酸化剤の同時投与を用いて抑えることができる。したがって、血管収縮を緩和するために臓器および組織へNOを送達するための改良された治療薬が、主要な治療の目的である。

10

20

【0006】

NOを送達するためのヘモグロ빈をベースとする担体の使用については、いくつかの研究が行われている。しかし、ヘモグロ빈をベースとする担体は、 O_2 の存在下でのそれらのNOとの反応性 (これは、ヘモグロ빈をベースとする担体の不活化を導く) が原因で限られる。NOは O_2 と直接反応し、これは、ヘモグロ빈に結合して、メトヘモグロ빈および硝酸塩が形成される。ヘム鉄とNOはいずれも、結合した酸素原子によって酸化され、反応は、NOによる O_2 の置換が観察されないほど迅速に起こる (例えば、特許文献1を参照のこと)。

【0007】

NOは継続的に生産され、消費されるので、インビボではNOの自然な代謝回転がある。細胞を含まないヘモグロ빈が投与されると、NOの生産と消費との間での平衡は、細胞を含まないヘモグロ빈との反応によって変化する。NOとヘモグロ빈に結合した O_2 の間での酸化反応は不可逆的であり、それにより、NO、 O_2 、およびヘモグロ빈の崩壊が生じる。 O_2 が結合していないヘモグロ빈に対するNOの結合は、生理学的な時間のスケールでは事実上不可逆的である。なぜなら、ニトロシルヘモグロ빈の解離についての半減期は5~6時間であり、それにより、細胞を含まないNO担体としてヘモグロ빈が事実上不活化されるからである。一旦、NO分子がヘモグロ빈と反応すると、これはシグナル分子のプールから排除され、それにより、特定の有害な症状が引き起こされる。例えば、(O_2 が結合した、または O_2 が結合していない) ヘモグロ빈に対するNOの結合は、血管の弛緩を妨げ得、高血圧を導く可能性がある。これは、特定の細胞外ヘモグロ빈溶液の投与後に、しばしば観察される。

30

40

【0008】

NOはまた、特定の炎症応答を媒介するためにも必要である。例えば、内皮によって生産されたNOは血小板の凝集を阻害する。結果として、NOは(O_2 が結合した、または O_2 が結合していない) 細胞を含まないヘモグロ빈に結合されるので、血小板の凝集が増加し得る。血小板が凝集すると、これらは、トロンボキサン A_2 およびセロトニンのような、強力な血管収縮剤化合物を放出する。これらの化合物は、ヘモグロ빈の除去によって引き起こされた低いNOレベルと共働して作用し得、有意な血管収縮を生じる。血小板の凝集を阻害することに加えて、NOはまた、細胞壁に対する好中球の結合 (これは次

50

いで、細胞壁の損傷を導き得る）も阻害する。内皮細胞壁の損傷は、特定のヘモグロビン溶液の注入を用いて観察されている。ヘモグロビンをベースとするNO担体はまた、血漿由来の細胞を含まないヘモグロビンを除去するヘモグロビン受容体の存在の理由により、血漿からの細胞を含まないヘモグロビンの迅速なクリアランスによっても妨げられる。細胞を含まないヘモグロビンはまた、おそらくは、糸球体の中でのNOの枯渇が原因で、腎臓毒性を引き起こす可能性もあり、これにより、収縮、それに続いて機能不全が起こり得る。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

10

【特許文献1】 米国特許第6, 455, 676号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

現在のニトロ系血管拡張剤での治療の限界の理由により、NOを送達するためのさらなる、または別の治療に依然として非常に関心が集まっており、それが必要とされている。具体的には、耐性を生じにくいNO担体が必要とされている。加えて、O₂の存在下ではNOによる不活化速度が遅いNO担体（例えば、低いNO反応性、および／またはO₂に対して低い親和性を有しているNO担体）が所望される。特定の臨床的または産業的用途に適しているNO解離定数またはNO解離速度を有しているNO担体もまた、必要である。

20

【課題を解決するための手段】

【0011】

（発明の要旨）

本発明は、野生型および変異H-NOXタンパク質がヘモグロビンよりもはるかに低いNO反応性を有しており、したがって、NO担体として所望されることの驚くべき発見に一部基づく。所望される場合には、NO担体としてのH-NOXタンパク質の使用をさらに最適化させるために、NOおよびO₂リガンドへのそれらの結合を変化させるための変異がH-NOXタンパク質に導入され得る。いくつかの実施形態においては、NO担体としてのH-NOXタンパク質の使用によっては、有機硝酸塩のような現在の血管拡張剤の使用によって生じる耐性よりも少ない耐性が生じる。

30

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

（項目1）

（i）薬学的に許容される量のH-NOXタンパク質であって、前記H-NOXタンパク質のNO解離定数がヘモグロビンのNO解離定数の大きさの2桁以内であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性がヘモグロビンのNO反応性の少なくとも10分の1未満である薬学的に許容される量のH-NOXタンパク質と、（ii）薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

（項目2）

前記H-NOXタンパク質のNO解離定数が、ヘモグロビンのNO解離定数の0.1倍～10倍の間である、項目1に記載の薬学的組成物。

40

（項目3）

前記H-NOXタンパク質のNO解離定数が、ヘモグロビンのNO解離定数の0.5倍～2倍の間である、項目2に記載の薬学的組成物。

（項目4）

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも100分の1未満である、項目1～3のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

（項目5）

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも1,000分の1未満である、項目4に記載の薬学的組成物。

50

(項目 6)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目1～5のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 7)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間である、項目1～6のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 8)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 0.012 s^{-1} の間である、項目7に記載の薬学的組成物。

10

(項目 9)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ の間である、項目8に記載の薬学的組成物。

(項目 10)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1\text{ }\mu\text{M}$ である、項目1～9のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 11)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $10\text{ }\mu\text{M}$ である、項目10に記載の薬学的組成物。

(項目 12)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $50\text{ }\mu\text{M}$ である、項目11に記載の薬学的組成物。

20

(項目 13)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1\text{ }\mu\text{M}$ である、項目1～12のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 14)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目1～13のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

30

(項目 15)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1\text{ }\mu\text{M}$ であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目1～14のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 16)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 1 h^{-1} 未満である、項目1～15のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 17)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 1 h^{-1} 未満である、項目1～16のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

40

(項目 18)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1\text{ }\mu\text{M}$ であり、前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 1 h^{-1} 未満である、項目1～17のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 19)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 1 h^{-1} 未満であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目1～18のい

50

いずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 2 0)

ヘムが H-NOX タンパク質に結合している、項目 1～19 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 2 1)

前記 H-NOX タンパク質が変異タンパク質である、項目 1～20 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 2 2)

前記 H-NOX タンパク質が、少なくとも 1 つの遠位ポケット変異を含む、項目 2 1 に記載の薬学的組成物。

(項目 2 3)

前記 H-NOX タンパク質が、前記遠位ポケット中にない少なくとも 1 つの変異を含む、項目 2 0 および 2 1 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 2 4)

前記 H-NOX タンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO 解離定数、NO に対する k_{off} 、NO に対する k_1 、NO に対する k_2 、O₂ 解離定数、NO 安定性、ヘム自動酸化速度、または上記の 2 つ以上の任意の組み合わせを変化させる、少なくとも 1 つの変異を含む、項目 1～23 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 2 5)

前記 H-NOX タンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO 反応性を変化させる少なくとも 1 つの変異を含む、項目 1～24 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 2 6)

前記 H-NOX タンパク質が、*T. tengcongensis* H-NOX の Tyr 140 に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも 1 つの変異を含む、項目 1～25 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 2 7)

前記 H-NOX タンパク質が、*L. pneumophila* 8 H-NOX の Phe 148 に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも 1 つの変異を含む、項目 1～26 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 2 8)

前記変異 H-NOX タンパク質中の少なくとも 1 つの C 末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目 1～27 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 2 9)

前記変異 H-NOX タンパク質中の少なくとも約 50 個の連続する C 末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目 28 に記載の薬学的組成物。

(項目 3 0)

前記変異 H-NOX タンパク質中の約 25 個～約 200 個の連続する C 末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目 28 および 29 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 3 1)

前記 H-NOX タンパク質が以下：

10

20

30

40

【数 1】

野生型 *T. tengcongensis* H-NOX, *T. tengcongensis* H-NOX I5A, *T. tengcongensis* H-NOX I5L, *T. tengcongensis* H-NOX I5L-P115A, *T. tengcongensis* H-NOX W9F, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-Y140HT, *tengcongensis* H-NOX W9F-N74A, *T. tengcongensis* H-NOX W9Y, *T. tengcongensis* H-NOX W9N, *T. tengcongensis* H-NOX W9H, *T. tengcongensis* H-NOX N74E, *T. tengcongensis* H-NOX N74A, *T. tengcongensis* H-NOX N74H, *T. tengcongensis* H-NOX N74A-Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX F78Y-Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX F78Y/Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX P115A, *T. tengcongensis* H-NOX R135Q, *T. tengcongensis* H-NOX Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX Y40L, *T. tengcongensis* H-NOX Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX Y140A, *T. tengcongensis* I75F-His6, *T. tengcongensis* I75F, *T. tengcongensis* L144F-His6, *T. tengcongensis* L144F, *L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y, 野生型 *L. pneumophila* 1 H-NOX, 野生型 *L. pneumophila* 2 H-NOX, *L. pneumophila* 2 F9W-F142Y, wild-type *D. desulfuricans* H-NOX, *D. desulfuricans* H-NOX(728-899), *D. desulfuricans* H-NOX Y139L, 野生型 *H. sapiens* β 1 H-NOX, *H. sapiens* β 1 I140Y, *H. sapiens* β 1 I145Y, *H. sapiens* β 1(1-385), *H. sapiens* β 1(1-385) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-385) I145H, *H. sapiens* β 1(1-194), *H. sapiens* β 1(1-194) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-194) L9W-I145Y, *H. sapiens* β 2(1-217), *H. sapiens* β 2(1-217) I142Y, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105G, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105F, *H. sapiens* β 1 H-NOX C78S, *H. sapiens* β 1 H-NOX C78E, 野生型 *R. norvegicus* β 1 H-NOX, *R. norvegicus* β 1(1-385), *R. norvegicus* β 1(1-385) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-385) I145H, *R. norvegicus* β 1(1-194), *R. norvegicus* β 1(1-194) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-194) L9W-I145Y, *R. norvegicus* β 2(1-217), *R. norvegicus* β 2(1-217) I142Y, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105G, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105F, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78S, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78E, *C. botulinum* H-NOX(1-175), *C. botulinum* H-NOX(1-186), 野生型 *C. acetobutylicum* H-NOX, *C. acetobutylicum* H-NOX(1-197), *C. acetobutylicum* H-NOX(1-183), 野生型 *C. elegans* GCY-35 H-NOX, *C. elegans* H-NOX GCY-35(1-252), 野生型 *D. melangaster* β 1 H-NOX, 野生型 *D. melangaster* CG14885-PA, 野生型 *D. melangaster* CG14886, 野生型 *D. melangaster* CG4154; 野生型 *N. punctiforme* H-NOX, 野生型 *C. crescentus* H-NOX, 野生型 *S.*

【数 2】

oneidensis H-NOX, 野生型 *M. musculus* H-NOX, 野生型 *C. familiaris* H-NOX, 野生型 *B. Taurus* H-NOX, 野生型 *R. norvegicus*; 野生型 *X. laevis* H-NOX, 野生型 *O. latipes* H-NOX, 野生型 *O. curivatus* H-NOX, 野生型 *F. rubripes* H-NOX, 野生型 *A. gambiae* H-NOX, 野生型 *M. sexta* H-NOX; 野生型 *C. elegans* gcy-31, *C. elegans* gcy-32, 野生型 *C. elegans* gcy-33, 野生型 *C. elegans* gcy-34, 野生型 *C. elegans* gcy-35, 野生型 *C. elegans* gcy-36, 野生型 *C. elegans* gcy-37; 野生型 *V. cholera* H-NOX, 野生型 *V. fischerii* H-NOX, および 野生型 *N. punctiforme* H-NOX.

からなる群より選択される、項目 1 ～ 30 のいずれか 1 項に記載の記載の薬学的組成物。
(項目 32)

前記 H-NOX タンパク質が以下からなる群より選択される、項目 31 に記載の薬学的組成物：野生型 *R. norvegicus* sGC、野生型 *R. norvegicus* β 1 (1-385)、*R. norvegicus* β 1 (1-217)、*R. norvegicus* β 1 (1-194)、野生型 *T. tengcongensis* H-NOX、*T. tengcongensis* H-NOX Y140L、*T. tengcong*

10

20

30

40

50

ensis H-NOX Y140F、野生型 L. pneumophila 1 H-NOX、野生型 L. pneumophila 2 H-NOX、および L. pneumophila 2 H-NOX F142Y。

(項目 33)

前記 H-NOX タンパク質が哺乳動物タンパク質であるか、または哺乳動物タンパク質由来である、項目 1～32 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 34)

前記 H-NOX タンパク質がヒトタンパク質であるか、またはヒトタンパク質由来である、項目 33 に記載の薬学的組成物。

(項目 35)

前記ヒトタンパク質が $\beta 1$ であるか、または $\beta 1$ 由来である、項目 34 に記載の薬学的組成物。

(項目 36)

前記 H-NOX タンパク質が細菌タンパク質であるか、または細菌タンパク質由来である、項目 1～32 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 37)

前記 H-NOX タンパク質が T. tengcongensis タンパク質であるか、または T. tengcongensis タンパク質由来である、項目 36 に記載の薬学的組成物。

(項目 38)

NO が H-NOX タンパク質に結合している、項目 1～37 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 39)

前記 H-NOX タンパク質を含む 1 つ以上のリボソームまたはナノ粒子を含む、項目 1～38 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 40)

前記 H-NOX タンパク質が別の分子または部分に共有結合している、項目 1～38 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 41)

前記 H-NOX タンパク質がポリエチレングリコールに共有結合している、項目 40 に記載の薬学的組成物。

(項目 42)

前記 H-NOX タンパク質が、項目 245～314 のいずれか 1 項に記載の変異 H-NOX タンパク質である、項目 1～41 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 43)

(i) 薬学的に許容される量の H-NOX タンパク質であって、前記 H-NOX タンパク質の NO に対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記 H-NOX タンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1 \mu\text{M}$ である、薬学的に許容される量の H-NOX タンパク質と、(ii) 薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

(項目 44)

前記 H-NOX タンパク質の NO に対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 0.012 s^{-1} の間である、項目 43 に記載の薬学的組成物。

(項目 45)

前記 H-NOX タンパク質の NO に対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の間である、項目 44 に記載の薬学的組成物。

(項目 46)

前記 H-NOX タンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $10 \mu\text{M}$ である、項目 43～45 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

(項目 47)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約50 μMである、
項目46に記載の薬学的組成物。

(項目 48)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約700 s⁻¹未満である、項目43～47
のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 49)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約
1 × 10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、前記H-NOXタンパク質のO₂解離定
数が、37℃で少なくとも約1 μMである、項目43～48のいずれか1項に記載の薬学
的組成物。

10

(項目 50)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約
1 × 10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性
が、約700 s⁻¹未満である、項目43～49のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 51)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約1 μMであり、前
記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約700 s⁻¹未満である、項目43～50の
いずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 52)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満である、項
目43～51のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

20

(項目 53)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約
1 × 10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸
化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満である、項目43～52のいずれか1項に記載の薬学
的組成物。

(項目 54)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約1 μMであり、前
記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満である、項目4
3～53のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

30

(項目 55)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満であり、前
記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約700 s⁻¹未満である、項目43～54の
いずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 56)

ヘムがH-NOXタンパク質に結合している、項目43～55のいずれか1項に記載の
薬学的組成物。

(項目 57)

前記H-NOXタンパク質が変異タンパク質である、項目43～56のいずれか1項に
記載の薬学的組成物。

40

(項目 58)

前記H-NOXタンパク質が少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、項目57に記
載の薬学的組成物。

(項目 59)

前記H-NOXタンパク質が、遠位ポケット中にない少なくとも1つの変異を含む、項
目57および58のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 60)

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO解離定数、
NOに対するk_{off}、NOに対するk₁、NOに対するk₂、O₂解離定数、NO安定

50

性、ヘム自動酸化速度、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させる、少なくとも1つの変異を含む、項目43～59のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目61)

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO反応性を変化させる少なくとも1つの変異を含む、項目43～60のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目62)

前記H-NOXタンパク質が、*T. tengcongensis* H-NOXのTyr 140に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えらる少なくとも1つの変異を含む、項目43～61のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

10

(項目63)

前記H-NOXタンパク質が、*L. pneumophila* 8 H-NOXのPhe 148に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目43～62のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目64)

変異H-NOXタンパク質中の少なくとも1つのC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目43～63のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目65)

変異H-NOXタンパク質中の少なくとも約50個の連続するC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目64に記載の薬学的組成物。

20

(項目66)

変異H-NOXタンパク質中の約25個～約200個の連続するC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目64および65のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目67)

前記H-NOXタンパク質が以下：

【数3】

野生型 *T. tengcongensis* H-NOX, *T.*

tengcongensis H-NOX I5A, *T. tengcongensis* H-NOX I5L, *T. tengcongensis* H-NOX I5L-P115A, *T. tengcongensis* H-NOX W9F, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-Y140HT, *tengcongensis* H-NOX W9F-N74A, *T. tengcongensis* H-NOX W9Y, *T. tengcongensis* H-NOX W9N, *T. tengcongensis* H-NOX W9H, *T. tengcongensis* H-NOX N74E, *T. tengcongensis* H-NOX N74A, *T. tengcongensis* H-NOX N74H, *T. tengcongensis* H-NOX N74A-Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX F78Y-Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX F78Y/Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX P115A, *T. tengcongensis* H-NOX R135Q, *T. tengcongensis* H-NOX Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX Y40L, *T. tengcongensis* H-NOX Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX

30

40

【数 4】

Y140A, *T. tengcongensis* I75F-His6, *T. tengcongensis* I75F, *T. tengcongensis* L144F-His6, *T. tengcongensis* L144F, *L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y, 野生型 *L. pneumophila* 1 H-NOX, 野生型 *L. pneumophila* 2 H-NOX, *L. pneumophila* 2 F9W-F142Y, wild-type *D. desulfuricans* H-NOX, *D. desulfuricans* H-NOX(728-899), *D. desulfuricans* H-NOX Y139L, 野生型 *H. sapiens* β 1 H-NOX, *H. sapiens* β 1 I140Y, *H. sapiens* β 1 I145Y, *H. sapiens* β 1(1-385), *H. sapiens* β 1(1-385) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-385) I145H, *H. sapiens* β 1(1-194), *H. sapiens* β 1(1-194) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-194) L9W-I145Y, *H. sapiens* β 2(1-217), *H. sapiens* β 2(1-217) I142Y, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105G, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105F, *H. sapiens* β 1 H-NOX C78S, *H. sapiens* β 1 H-NOX C78E, 野生型 *R. norvegicus* β 1 H-NOX, *R. norvegicus* β 1(1-385), *R. norvegicus* β 1(1-385) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-385) I145H, *R. norvegicus* β 1(1-194), *R. norvegicus* β 1(1-194) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-194) L9W-I145Y, *R. norvegicus* β 2(1-217), *R. norvegicus* β 2(1-217) I142Y, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105G, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105F, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78S, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78E, *C. botulinum* H-NOX(1-175), *C. botulinum* H-NOX(1-186), 野生型 *C. acetobutylicum* H-NOX, *C. acetobutylicum* H-NOX(1-197), *C. acetobutylicum* H-NOX(1-183), 野生型 *C. elegans* GCY-35 H-NOX, *C. elegans* H-NOX GCY-35(1-252), 野生型 *D. melangaster* β 1 H-NOX, 野生型 *D. melangaster* CG14885-PA, 野生型 type *D. melangaster* CG14886, 野生型 *D. melangaster* CG4154; 野生型 *N. punctiforme* H-NOX, 野生型 *C. crescentus* H-NOX, 野生型 *S. oneidensis* H-NOX, 野生型 *M. musculus* H-NOX, 野生型 *C. familiaris* H-NOX, 野生型 *B. Taurus* H-NOX, 野生型 *R. norvegicus*; 野生型 *X. laevis* H-NOX, 野生型 *O. latipes* H-NOX, 野生型 *O. curivatus* H-NOX, 野生型 *F. rubripes* H-NOX, 野生型 *A. gambiae* H-NOX, 野生型 *M. sexta* H-NOX; 野生型 *C. elegans* gcy-31, *C. elegans* gcy-32, 野生型 *C. elegans* gcy-33, 野生型 *C. elegans* gcy-34, 野生型 *C. elegans* gcy-35, 野生型 *C. elegans* gcy-36, 野生型 *C. elegans* gcy-37; 野生型 *V. cholera* H-NOX, 野生型 *V. fischerii* H-NOX, および 野生型 *N. punctiforme* H-NOX.

10

20

30

からなる群より選択される、項目 4 3～6 6 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 6 8)

前記 H-NOX タンパク質が以下からなる群より選択される、項目 6 7 に記載の薬学的組成物：野生型 *R. norvegicus* sGC、野生型 *R. norvegicus* β 1(1-385)、*R. norvegicus* β 1(1-217)、*R. norvegicus* β 1(1-194)、野生型 *T. tengcongensis* H-NOX、*T. tengcongensis* H-NOX Y140L、*T. tengcongensis* H-NOX Y140F、野生型 *L. pneumophila* 1 H-NOX、野生型 *L. pneumophila* 2 H-NOX、および *L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y。

40

(項目 6 9)

前記 H-NOX タンパク質が哺乳動物タンパク質であるか、または哺乳動物タンパク質由来である、項目 4 3～6 8 のいずれか 1 項に記載の薬学的組成物。

(項目 7 0)

前記 H-NOX タンパク質がヒトタンパク質であるか、またはヒトタンパク質由来である、項目 6 9 に記載の薬学的組成物。

(項目 7 1)

前記ヒトタンパク質が β 1 であるか、または β 1 由来である、項目 7 0 に記載の薬学的組成物。

50

(項目 7 2)

前記H-NOXタンパク質が細菌タンパク質であるか、または細菌タンパク質由来である、項目43～68のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 7 3)

前記H-NOXタンパク質がT. tengcongensisタンパク質であるか、またはT. tengcongensisタンパク質由来である、項目72に記載の薬学的組成物。

(項目 7 4)

NOがH-NOXタンパク質に結合している、項目43～73のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

10

(項目 7 5)

前記H-NOXタンパク質を含む1つ以上のリボソームまたはナノ粒子を含む、項目43～74のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 7 6)

前記H-NOXタンパク質が別の分子または部分に共有結合している、項目43～75のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 7 7)

前記H-NOXタンパク質がポリエチレングリコールに共有結合している、項目76に記載の薬学的組成物。

(項目 7 8)

20

前記H-NOXタンパク質が、項目245～314のいずれか1項に記載の変異H-NOXタンパク質である、項目43～77のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

(項目 7 9)

個体へNOを送達する方法であって、前記方法は、前記送達を必要とする個体へ有効量のNOを送達するために十分な量のH-NOXタンパク質を前記個体へ投与する工程を含み、前記H-NOXタンパク質のNO解離定数はヘモグロビンのNO解離定数の大きさの2桁以内であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性はヘモグロビンのNO反応性の少なくとも10分の1未満である、方法。

(項目 8 0)

前記H-NOXタンパク質のNO解離定数が、ヘモグロビンのNO解離定数の0.1倍～10倍の間である、項目79に記載の方法。

30

(項目 8 1)

前記H-NOXタンパク質のNO解離定数が、ヘモグロビンのNO解離定数の0.5倍～2倍の間である、項目80に記載の方法。

(項目 8 2)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも100分の1未満である、項目79～81のいずれか1項に記載の方法。

(項目 8 3)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも1,000分の1未満である、項目82に記載の方法。

40

(項目 8 4)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約700 s⁻¹未満である、項目79～83のいずれか1項に記載の方法。

(項目 8 5)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約1×10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間である、項目79～84のいずれか1項に記載の方法。

(項目 8 6)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約1×10⁻⁴ s⁻¹～約0.012 s⁻¹の間である、項目85に記載の方法。

50

(項目 87)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の間である、項目86に記載の方法。

(項目 88)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約1 μM である、項目79～87のいずれか1項に記載の方法。

(項目 89)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約10 μM である、項目88に記載の方法。

(項目 90)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約50 μM である、項目89に記載の方法。

(項目 91)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約1 μM である、項目79～90のいずれか1項に記載の方法。

(項目 92)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目79～91のいずれか1項に記載の方法。

(項目 93)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約1 μM であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目79～92のいずれか1項に記載の方法。

(項目 94)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約 1 h^{-1} 未満である、項目79～93のいずれか1項に記載の方法。

(項目 95)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約 1 h^{-1} 未満である、項目79～94のいずれか1項に記載の方法。

(項目 96)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約1 μM であり、前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約 1 h^{-1} 未満である、項目79～95のいずれか1項に記載の方法。

(項目 97)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約 1 h^{-1} 未満であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目79～96のいずれか1項に記載の方法。

(項目 98)

ヘムがH-NOXタンパク質に結合している、項目79～97のいずれか1項に記載の方法。

(項目 99)

前記H-NOXタンパク質が変異タンパク質である、項目79～98のいずれか1項に記載の方法。

(項目 100)

前記H-NOXタンパク質が少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、項目99に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 0 1)

前記H-NOXタンパク質が、遠位ポケット中にない少なくとも1つの変異を含む、項目99および100のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 0 2)

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO解離定数、NOに対する k_{off} 、NOに対する k_1 、NOに対する k_2 、 O_2 解離定数、NO安定性、ヘム自動酸化速度、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させる、少なくとも1つの変異を含む、項目79～101のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 0 3)

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型H-NOXタンパク質と比較して、NO反応性を変化させる少なくとも1つの変異を含む、項目79～102のいずれか1項に記載の方法。

10

(項目 1 0 4)

前記H-NOXタンパク質が、*T. tengcongensis* H-NOXのTyr 140に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目79～103のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 0 5)

前記H-NOXタンパク質が、*L. pneumophila* 10 H-NOXのPhe 1410に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目79～104のいずれか1項に記載の方法。

20

(項目 1 0 6)

変異H-NOXタンパク質中の少なくとも1つのC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目79～105のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 0 7)

変異H-NOXタンパク質中の少なくとも約50個の連続するC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目106に記載の方法。

(項目 1 0 8)

変異H-NOXタンパク質中の約25個～約200個のC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目106および107のいずれか1項に記載の方法。

30

(項目 1 0 9)

前記H-NOXタンパク質が以下
【数5】

野生型 *T. tengcongensis* H-NOX, *T. tengcongensis* H-NOX I5A, *T. tengcongensis* H-NOX I5L, *T. tengcongensis* H-NOX I5L-P115A, *T. tengcongensis* H-NOX W10F, *T. tengcongensis* H-NOX W10F-Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX W10F-Y140HT, *T. tengcongensis* H-NOX W10F-N74A, *T. tengcongensis* H-NOX W10Y, *T. tengcongensis* H-NOX W10N, *T. tengcongensis* H-NOX W10H, *T. tengcongensis* H-NOX N74E, *T. tengcongensis* H-NOX N74A, *T. tengcongensis* H-NOX N74H, *T. tengcongensis* H-NOX N74A-Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX F710Y-Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX F710Y/Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX P115A, *T. tengcongensis* H-NOX R135Q, *T. tengcongensis* H-NOX Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX Y40L, *T. tengcongensis* H-NOX Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX Y140A, *T. tengcongensis* I75F-His6, *T. tengcongensis* I75F, *T. tengcongensis* L144F-His6, *T. tengcongensis* L144F, *L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y, 野生型 *L. pneumophila* 1 H-NOX, 野生型 *L. pneumophila* 2 H-NOX, *L.*

40

【数 6】

pneumophila 2 F10W-F142Y, 野生型 *D. desulfuricans* H-NOX, *D. desulfuricans* H-NOX(7210-101010), *D. desulfuricans* H-NOX Y1310L, 野生型 *H. sapiens* β 1 H-NOX, *H. sapiens* β 1 I140Y, *H. sapiens* β 1 I145Y, *H. sapiens* β 1(1-3105), *H. sapiens* β 1(1-3105) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-3105) I145H, *H. sapiens* β 1(1-1104), *H. sapiens* β 1(1-1104) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-1104) L10W-I145Y, *H. sapiens* β 2(1-217), *H. sapiens* β 2(1-217) I142Y, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105G, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105F, *H. sapiens* β 1 H-NOX C710S, *H. sapiens* β 1 H-NOX C710E, 野生型 *R. norvegicus* β 1 H-NOX, *R. norvegicus* β 1(1-3105), *R. norvegicus* β 1(1-3105) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-3105) I145H, *R. norvegicus* β 1(1-1104), *R. norvegicus* β 1(1-1104) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-1104) L10W-I145Y, *R. norvegicus* β 2(1-217), *R. norvegicus* β 2(1-217) I142Y, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105G, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105F, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C710S, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C710E, *C. botulinum* H-NOX(1-175), *C. botulinum* H-NOX(1-1106), 野生型 *C. acetobutylicum* H-NOX, *C. acetobutylicum* H-NOX(1-1107), *C. acetobutylicum* H-NOX(1-1103), 野生型 *C. elegans* GCY-35 H-NOX, *C. elegans* H-NOX GCY-35(1-252), 野生型 *D. melangaster* β 1 H-NOX, 野生型 *D. melangaster* CG1410105-PA, 野生型 *D. melanogaster* CG1410105, 野生型 *D. melangaster* CG1410106, 野生型 *D. melangaster* CG4154; 野生型 *N. punctiforme* H-NOX, 野生型 *C. crescentus* H-NOX, 野生型 *S. oneidensis* H-NOX, 野生型 *M. musculus* H-NOX, 野生型 *C. familiaris* H-NOX, 野生型 *B. Taurus* H-NOX, 野生型 *R. norvegicus*; 野生型 *X. laevis* H-NOX, 野生型 *O. latipes* H-NOX, 野生型 *O. curivatus* H-NOX, 野生型 *F. rubripes* H-NOX, 野生型 *A. gambiae* H-NOX, 野生型 *M. sexta* H-NOX; 野生型 *C. elegans* gcy-31, *C. elegans* gcy-32, 野生型 *C. elegans* gcy-33, 野生型 *C. elegans* gcy-34, 野生型 *C. elegans* gcy-35, 野生型 *C. elegans* gcy-36, 野生型 *C. elegans* gcy-37; 野生型 *V. cholera* H-NOX, 野生型 *V. fischerii* H-NOX, および 野生型 *N. punctiforme* H-NOX.

10

20

からなる群より選択される、項目 7 9 ~ 1 0 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

(項目 1 1 0)

前記 H-NOX タンパク質が以下からなる群より選択される、項目 1 0 9 に記載の方法：野生型 *R. norvegicus* sGC、野生型 *R. norvegicus* β 1 (1-3105)、*R. norvegicus* β 1 (1-217)、*R. norvegicus* β 1 (1-1104)、野生型 *T. tengcongensis* H-NOX、*T. tengcongensis* H-NOX Y140L、*T. tengcongensis* H-NOX Y140F、野生型 *L. pneumophila* 1 H-NOX、野生型 *L. pneumophila* 2 H-NOX、および *L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y。

(項目 1 1 1)

40

前記 H-NOX タンパク質が哺乳動物タンパク質であるか、または哺乳動物タンパク質由来である、項目 7 9 ~ 1 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 1 2)

前記 H-NOX タンパク質がヒトタンパク質であるか、またはヒトタンパク質由来である、項目 1 1 1 に記載の方法。

(項目 1 1 3)

前記ヒトタンパク質が β 1 であるか、または β 1 由来である、項目 1 1 2 に記載の方法。

。

(項目 1 1 4)

前記 H-NOX タンパク質が細菌タンパク質であるか、または細菌タンパク質由来であ

50

る、項目 79～110 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 115)

前記 H-NOX タンパク質が T. tengcongensis タンパク質であるか、または T. tengcongensis タンパク質由来である、項目 114 に記載の方法。

(項目 116)

前記 H-NOX タンパク質を含む 1 つ以上のリポソームまたはナノ粒子を含む、項目 79～115 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 117)

前記 H-NOX タンパク質が別の分子または部分に共有結合している、項目 79～116 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 118)

前記 H-NOX タンパク質がポリエチレングリコールに共有結合している、項目 117 に記載の方法。

(項目 119)

NO が、前記個体への H-NOX タンパク質の投与の前に、前記 H-NOX タンパク質に結合する、項目 79～118 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 120)

NO が、前記個体への H-NOX タンパク質の投与の前に、前記 H-NOX タンパク質に結合せず、前記 H-NOX タンパク質は、個体中の 1 つの位置から個体中の別の位置に NO を輸送する、項目 79～118 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 121)

前記 H-NOX タンパク質が、経口投与、直腸投与、または個体の血液に投与される、項目 79～120 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 122)

前記個体がヒトである、項目 79～121 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 123)

前記個体が、心臓血管の症状、高血圧、高血圧によって悪化した症状、または NO 機能不全に罹患しているか、あるいはそれらの危険性がある、項目 79～122 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 124)

前記高血圧によって悪化した症状が、心不全、腎不全、または脳卒中である、項目 123 に記載の方法。

(項目 125)

前記 H-NOX タンパク質が少なくとも 2 回個体に投与される、項目 79～124 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 126)

前記 H-NOX タンパク質が、項目 245～314 のいずれか 1 項に記載の変異 H-NOX タンパク質である、項目 79～125 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 127)

個体へ NO を送達する方法であって、前記方法は、前記送達を必要とする個体へ有効量の NO を送達するために十分な量の H-NOX タンパク質を前記個体へ投与する工程を含み、前記 H-NOX タンパク質の NO に対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記 H-NOX タンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約 $1 \mu\text{M}$ である、方法。

(項目 128)

前記 H-NOX タンパク質の NO に対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 0.012 s^{-1} の間である、項目 127 に記載の方法。

(項目 129)

前記 H-NOX タンパク質の NO に対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ の間である、項目 128 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 3 0)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約10 μMである、
項目127～129のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 3 1)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約50 μMである、
項目130に記載の方法。

(項目 1 3 2)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約700 s⁻¹未満である、項目127～
131のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 3 3)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約
1×10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、前記H-NOXタンパク質のO₂解離定
数が、37℃で少なくとも約1 μMである、項目127～132のいずれか1項に記載の
方法。

(項目 1 3 4)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約
1×10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性
が、約700 s⁻¹未満である、項目127～133のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 3 5)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約1 μMであり、前
記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約700 s⁻¹未満である、項目127～13
4のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 3 6)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満である、項
目127～135のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 3 7)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約
1×10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸
化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満である、項目127～136のいずれか1項に記載の
方法。

(項目 1 3 8)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約1 μMであり、前
記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満である、項目1
27～137のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 3 9)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満であり、前
記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約700 s⁻¹未満である、項目127～13
8のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 4 0)

ヘムがH-NOXタンパク質に結合している、項目127～139のいずれか1項に記
載の方法。

(項目 1 4 1)

前記H-NOXタンパク質が変異タンパク質である、項目127～140のいずれか1
項に記載の方法。

(項目 1 4 2)

前記H-NOXタンパク質が少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、項目141に
記載の方法。

(項目 1 4 3)

前記H-NOXタンパク質が、遠位ポケット中にない少なくとも1つの変異を含む、項
目141および142のいずれか1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 4 4)

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO解離定数、NOに対する k_{off} 、NOに対する k_{on} 、NOに対する k_{off} 、 k_{on} 解離定数、NO安定性、ヘム自動酸化速度、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させる、少なくとも1つの変異を含む、項目127～143のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 4 5)

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較してNO反応性を変化させる少なくとも1つの変異を含む、項目127～144のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 4 6)

前記H-NOXタンパク質が、*T. tengcongensis* H-NOXのTyr 140に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目127～145のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 4 7)

前記H-NOXタンパク質が、*L. pneumophila* 10 H-NOXのPhe 1410に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目127～146のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 4 8)

変異H-NOXタンパク質中の少なくとも1つのC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目127～147のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 4 9)

変異H-NOXタンパク質中の少なくとも約50個の連続するC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目148に記載の方法。

(項目 1 5 0)

変異H-NOXタンパク質中の約25個～約200個の連続するC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目148および149のいずれか1項に記載の方法。

(項目 1 5 1)

前記H-NOXタンパク質が以下：

【数 7】

野生型 *T. tengcongensis* H-NOX, *T. tengcongensis* H-NOX I5A, *T. tengcongensis* H-NOX I5L, *T. tengcongensis* H-NOX I5L-P115A, *T. tengcongensis* H-NOX W9F, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-N74A, *T. tengcongensis* H-NOX W9Y, *T. tengcongensis* H-NOX W9N, *T. tengcongensis* H-NOX W9H, *T. tengcongensis* H-NOX N74E, *T. tengcongensis* H-NOX N74A, *T. tengcongensis* H-NOX N74H, *T. tengcongensis* H-NOX N74A-Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX F78Y-Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX F78Y/Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX P115A, *T. tengcongensis* H-NOX R135Q, *T. tengcongensis* H-NOX Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX Y40L, *T. tengcongensis* H-NOX Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX Y140A, *T. tengcongensis* I75F-His6, *T. tengcongensis* I75F, *T. tengcongensis* L144F-His6, *T. tengcongensis* L144F, *L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y, 野生型 *L. pneumophila* 1 H-NOX, 野生型 *L. pneumophila* 2 H-NOX, *L.*

10

20

30

40

【数 8】

pneumophila 2 F9W-F142Y, 野生型 *D. desulfuricans* H-NOX, *D. desulfuricans* H-NOX(728-899), *D. desulfuricans* H-NOX Y139L, 野生型 *H. sapiens* β 1 H-NOX, *H. sapiens* β 1 I140Y, *H. sapiens* β 1 I145Y, *H. sapiens* β 1(1-385), *H. sapiens* β 1(1-385) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-385) I145H, *H. sapiens* β 1(1-194), *H. sapiens* β 1(1-194) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-194) L9W-I145Y, *H. sapiens* β 2(1-217), *H. sapiens* β 2(1-217) I142Y, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105G, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105F, *H. sapiens* β 1 H-NOX C78S, *H. sapiens* β 1 H-NOX C78E, wild-type *R. norvegicus* β 1 H-NOX, *R. norvegicus* β 1(1-385), *R. norvegicus* β 1(1-385) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-385) I145H, *R. norvegicus* β 1(1-194), *R. norvegicus* β 1(1-194) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-194) L9W-I145Y, *R. norvegicus* β 2(1-217), *R. norvegicus* β 2(1-217) I142Y, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105G, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105F, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78S, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78E, *C. botulinum* H-NOX(1-175), *C. botulinum* H-NOX(1-186), 野生型 *C. acetobutylicum* H-NOX, *C. acetobutylicum* H-NOX(1-197), *C. acetobutylicum* H-NOX(1-183), 野生型 *C. elegans* GCY-35 H-NOX, *C. elegans* H-NOX GCY-35(1-252), 野生型 *D. melangaster* β 1 H-NOX, 野生型 *D. melangaster* CG14885-PA, 野生型 *D. melangaster* CG14886, 野生型 *D. melangaster* CG4154; 野生型 *N. punctiforme* H-NOX, 野生型 *C. crescentus* H-NOX, 野生型 *S. oneidensis* H-NOX, 野生型 *M. musculus* H-NOX, 野生型 *C. familiaris* H-NOX, 野生型 *B. Taurus* H-NOX, 野生型 *R. norvegicus*; 野生型 *X. laevis* H-NOX, 野生型 *O. latipes* H-NOX, 野生型 *O. curivatus* H-NOX, 野生型 *F. rubripes* H-NOX, 野生型 *A. gambiae* H-NOX, 野生型 *M. sexta* H-NOX; 野生型 *C. elegans* gcy-31, *C. elegans* gcy-32, 野生型 *C. elegans* gcy-33, 野生型 *C. elegans* gcy-34, 野生型 *C. elegans* gcy-35, 野生型 *C. elegans* gcy-36, 野生型 *C. elegans* gcy-37; 野生型 *V. cholera* H-NOX, 野生型 *V. fischerii* H-NOX, および 野生型 *N. punctiforme* H-NOX.

10

20

からなる群より選択される、項目 1 2 7 ~ 1 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

(項目 1 5 2)

前記 H-NOX タンパク質が以下からなる群より選択される、項目 1 5 1 に記載の方法：野生型 *R. norvegicus* sGC、野生型 *R. norvegicus* β 1 (1-3105)、*R. norvegicus* β 1 (1-217)、*R. norvegicus* β 1 (1-1104)、野生型 *T. tengcongensis* H-NOX、*T. tengcongensis* H-NOX Y140L、*T. tengcongensis* H-NOX Y140F、野生型 *L. pneumophila* 1 H-NOX、野生型 *L. pneumophila* 2 H-NOX、および *L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y。

(項目 1 5 3)

40

前記 H-NOX タンパク質が哺乳動物タンパク質であるか、または哺乳動物タンパク質由来である、項目 1 2 7 ~ 1 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 1 5 4)

前記 H-NOX タンパク質がヒトタンパク質であるか、またはヒトタンパク質由来である、項目 1 5 3 に記載の方法。

(項目 1 5 5)

前記ヒトタンパク質が β 1 であるか、または β 1 由来である、項目 1 5 4 に記載の方法。

。

(項目 1 5 6)

前記 H-NOX タンパク質が細菌タンパク質であるか、または細菌タンパク質由来であ

50

る、項目127～152のいずれか1項に記載の方法。

(項目157)

前記H-NOXタンパク質がT. tengcongensisタンパク質であるか、またはT. tengcongensisタンパク質由来である、項目156に記載の方法。

(項目158)

1つ以上のリポソームまたはナノ粒子が前記H-NOXタンパク質を含む、項目127～157のいずれか1項に記載の方法。

(項目159)

前記H-NOXタンパク質が別の分子または部分に共有結合している、項目127～158のいずれか1項に記載の方法。

(項目160)

前記H-NOXタンパク質がポリエチレングリコールに共有結合している、項目159に記載の方法。

(項目161)

NOが、前記個体へのH-NOXタンパク質の投与の前に、前記H-NOXタンパク質に結合する、項目127～160のいずれか1項に記載の方法。

(項目162)

NOが、前記個体へのH-NOXタンパク質の投与の前に、前記H-NOXタンパク質に結合せず、前記H-NOXタンパク質は、個体中の1つの位置から個体中の別の位置にNOを輸送する、項目127～160のいずれか1項に記載の方法。

(項目163)

前記H-NOXタンパク質が、経口投与、直腸投与、または個体の血液に投与される、項目127～162のいずれか1項に記載の方法。

(項目164)

前記個体がヒトである、項目127～163のいずれか1項に記載の方法。

(項目165)

前記個体が、心臓血管の症状、高血圧、高血圧によって悪化した症状、血管収縮の症状、脳卒中、またはNO機能不全に罹患しているか、あるいはそれらの危険性がある、項目127～164のいずれか1項に記載の方法。

(項目166)

前記高血圧によって悪化した症状が、心不全、腎不全、または脳卒中である、項目165に記載の方法。

(項目167)

前記H-NOXタンパク質が少なくとも2回個体に投与される、項目127～166のいずれか1項に記載の方法。

(項目168)

前記H-NOXタンパク質が、項目245～314のいずれか1項に記載の変異H-NOXタンパク質である、項目127～167のいずれか1項に記載の方法。

(項目169)

(i) 薬学的に許容される量のH-NOXタンパク質であって、前記H-NOXタンパク質のNO解離定数がヘモグロビンのNO解離定数の大きさの2桁以内であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性がヘモグロビンのNO反応性の少なくとも10分の1未満である薬学的に許容される量のH-NOXタンパク質と、(ii) 薬学的に許容される担体を含む、キット。

(項目170)

前記H-NOXタンパク質のNO解離定数が、ヘモグロビンのNO解離定数の0.1倍～10倍の間である、項目169に記載のキット。

(項目171)

前記H-NOXタンパク質のNO解離定数が、ヘモグロビンのNO解離定数の0.5倍～2倍の間である、項目170に記載のキット。

10

20

30

40

50

(項目 172)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも100分の1未満である、項目169～171のいずれか1項に記載のキット。

(項目 173)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも1,000分の1未満である、項目172に記載のキット。

(項目 174)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約700 s⁻¹未満である、項目169～173のいずれか1項に記載のキット。

(項目 175)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約1×10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間である、項目169～174のいずれか1項に記載のキット。

(項目 176)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約1×10⁻⁴ s⁻¹～約0.012 s⁻¹の間である、項目175に記載のキット。

(項目 177)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約1×10⁻⁴ s⁻¹～約1×10⁻³ s⁻¹の間である、項目176に記載のキット。

(項目 178)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約1 μMである、項目169～177のいずれか1項に記載のキット。

(項目 179)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約10 μMである、項目178に記載のキット。

(項目 180)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約50 μMである、項目179に記載のキット。

(項目 181)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約1×10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約1 μMである、項目169～180のいずれか1項に記載のキット。

(項目 182)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約1×10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約700 s⁻¹未満である、項目169～181のいずれか1項に記載のキット。

(項目 183)

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約1 μMであり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約700 s⁻¹未満である、項目169～182のいずれか1項に記載のキット。

(項目 184)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満である、項目169～183のいずれか1項に記載のキット。

(項目 185)

前記H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂が、37℃で約1×10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満である、項目169～184のいずれか1項に記載のキット。

(項目 186)

10

20

30

40

50

前記H-NOXタンパク質のO₂解離定数が、37℃で少なくとも約1 μMであり、前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満である、項目169～185のいずれか1項に記載のキット。

(項目187)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約1 h⁻¹未満であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約700 s⁻¹未満である、項目169～186のいずれか1項に記載のキット。

(項目188)

ヘムがH-NOXタンパク質に結合している、項目169～187のいずれか1項に記載のキット。

(項目189)

前記H-NOXタンパク質が変異タンパク質である、項目169～188のいずれか1項に記載のキット。

(項目190)

前記H-NOXタンパク質が少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、項目189に記載のキット。

(項目191)

前記H-NOXタンパク質が、遠位ポケット中にない少なくとも1つの変異を含む、項目189および190のいずれか1項に記載のキット。

(項目192)

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO解離定数、NOに対するk_{off}、NOに対するk₁、NOに対するk₂、O₂解離定数、NO安定性、ヘム自動酸化速度、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させる、少なくとも1つの変異を含む、項目169～191のいずれか1項に記載のキット。

(項目193)

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO反応性を変化させる少なくとも1つの変異を含む、項目169～192のいずれか1項に記載のキット。

(項目194)

前記H-NOXタンパク質が、T. tengcongensis H-NOXのTyr 140に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目169～193のいずれか1項に記載のキット。

(項目195)

前記H-NOXタンパク質が、L. pneumophila 9 H-NOXのPhe 149に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目169～194のいずれか1項に記載のキット。

(項目196)

変異H-NOXタンパク質中の少なくとも1つのC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目169～195のいずれか1項に記載のキット。

(項目197)

変異H-NOXタンパク質中の少なくとも約50個の連続するC末端アミノ酸、または約25個～約200個のC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目196に記載のキット。

(項目198)

前記H-NOXタンパク質が以下：

10

20

30

40

【数 9】

野生型 *T. tengcongensis* H-NOX, *T. tengcongensis* H-NOX I5A, *T. tengcongensis* H-NOX I5L, *T. tengcongensis* H-NOX I5L-P115A, *T. tengcongensis* H-NOX W9F, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-Y140HT, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-N74A, *T. tengcongensis* H-NOX W9Y, *T. tengcongensis* H-NOX W9N, *T. tengcongensis* H-NOX W9H, *T. tengcongensis* H-NOX N74E, *T. tengcongensis* H-NOX N74A, *T. tengcongensis* H-NOX N74H, *T. tengcongensis* H-NOX N74A-Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX

10

【数 10】

F79Y-Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX F79Y/Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX P115A, *T. tengcongensis* H-NOX R135Q, *T. tengcongensis* H-NOX Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX Y40L, *T. tengcongensis* H-NOX Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX Y140A, *T. tengcongensis* I75F-His6, *T. tengcongensis* I75F, *T. tengcongensis* L144F-His6, *T. tengcongensis* L144F, *L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y, 野生型 *L. pneumophila* 1 H-NOX, 野生型 *L. pneumophila* 2 H-NOX, *L. pneumophila* 2 F9W-F142Y, 野生型 *D. desulfuricans* H-NOX, *D. desulfuricans* H-NOX(729-999), *D. desulfuricans* H-NOX Y139L, 野生型 *H. sapiens* β 1 H-NOX, *H. sapiens* β 1 I140Y, *H. sapiens* β 1 I145Y, *H. sapiens* β 1(1-395), *H. sapiens* β 1(1-395) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-395) I145H, *H. sapiens* β 1(1-194), *H. sapiens* β 1(1-194) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-194) L9W-I145Y, *H. sapiens* β 2(1-217), *H. sapiens* β 2(1-217) I142Y, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105G, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105F, *H. sapiens* β 1 H-NOX C79S, *H. sapiens* β 1 H-NOX C79E, 野生型 *R. norvegicus* β 1 H-NOX, *R. norvegicus* β 1(1-395), *R. norvegicus* β 1(1-395) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-395) I145H, *R. norvegicus* β 1(1-194), *R. norvegicus* β 1(1-194) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-194) L9W-I145Y, *R. norvegicus* β 2(1-217), *R. norvegicus* β 2(1-217) I142Y, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105G, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105F, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C79S, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C79E, *C. botulinum* H-NOX(1-175), *C. botulinum* H-NOX(1-196), 野生型 *C. acetobutylicum* H-NOX, *C. acetobutylicum* H-NOX(1-197), *C. acetobutylicum* H-NOX(1-193), 野生型 *C. elegans* GCY-35 H-NOX, *C. elegans* H-NOX GCY-35(1-252), 野生型 *D. melangaster* β 1 H-NOX, 野生型 *D. melangaster* CG14995-PA, 野生型 *D. melanogaster* CG14995, 野生型 *D. melangaster* CG14996, 野生型 *D. melangaster* CG4154; 野生型 *N. punctiforme* H-NOX, 野生型 *C. crescentus* H-NOX, 野生型 *S. oneidensis* H-NOX, 野生型 *M. musculus* H-NOX, 野生型 *C. familiaris* H-NOX, 野生型 *B. Taurus* H-NOX, 野生型 *R. norvegicus*; 野生型 *X. laevis* H-NOX, 野生型 *O. latipes* H-NOX, 野生型 *O. curivatus* H-NOX, wild-type *F. rubripes* H-NOX, 野生型 *A. gambiae* H-NOX, 野生型 *M. sexta* H-NOX; 野生型 *C. elegans* gcy-31, *C. elegans* gcy-32, 野生型 *C. elegans* gcy-33, 野生型 *C. elegans* gcy-34, 野生型 *C. elegans* gcy-35, 野生型 *C. elegans* gcy-36, 野生型 *C. elegans* gcy-37; 野生型 *V. cholera* H-NOX, 野生型 *V. fischerii* H-NOX, および 野生型 *N. punctiforme* H-NOX.

20

30

40

からなる群より選択される、項目 169～197 のいずれか 1 項に記載のキット。

(項目 199)

前記 H-NOX タンパク質が以下からなる群より選択される、項目 198 に記載のキット：野生型 *R. norvegicus* sGC、野生型 *R. norvegicus* β 1 (1-395)、*R. norvegicus* β 1 (1-217)、*R. norvegicus* β 1 (1-194)、野生型 *T. tengcongensis* H-NOX、T

50

. t e n g c o n g e n s i s H-NOX Y140L、T. t e n g c o n g e n s i s H-NOX Y140F、野生型L. p n e u o p h i l i a 1 H-NOX、野生型L. p n e u o p h i l i a 2 H-NOX、およびL. p n e u o p h i l i a 2 H-NOX F142Y。

(項目200)

前記H-NOXタンパク質が哺乳動物タンパク質であるか、または哺乳動物タンパク質由来である、項目169～199のいずれか1項に記載のキット。

(項目201)

前記H-NOXタンパク質がヒトタンパク質であるか、ヒトタンパク質由来であるか、ヒトβ1であるか、またはβ1由来である、項目200に記載のキット。

(項目202)

前記H-NOXタンパク質が細菌タンパク質であるか、または細菌タンパク質由来である、項目169～199のいずれか1項に記載のキット。

(項目203)

前記H-NOXタンパク質がT. t e n g c o n g e n s i sタンパク質であるか、またはT. t e n g c o n g e n s i sタンパク質由来である、項目202に記載のキット。

(項目204)

NOがH-NOXタンパク質に結合している、項目169～203のいずれか1項に記載のキット

(項目205)

前記H-NOXタンパク質を含む1つ以上のリポソームまたはナノ粒子を含む、項目169～204のいずれか1項に記載のキット。

(項目206)

前記H-NOXタンパク質が別の分子または部分に共有結合している、項目169～205のいずれか1項に記載のキット。

(項目207)

前記H-NOXタンパク質がポリエチレングリコールに共有結合している、項目206に記載のキット。

(項目208)

前記H-NOXタンパク質が、項目245～314のいずれか1項に記載の変異H-NOXタンパク質である、項目169～207のいずれか1項に記載のキット。

(項目209)

(i) H-NOXタンパク質であって、前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ～約 $1 \times 10 s^{-1}$ の間であり、前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約 $1 \mu M$ であるH-NOXタンパク質と、(ii) 個体にNOを送達するためのキットの使用についての説明書を含む、キット。

(項目210)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ～約 $0.012 s^{-1}$ の間である、項目209に記載のキット。

(項目211)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ～約 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ の間である、項目210に記載のキット。

(項目212)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約 $10 \mu M$ である、項目209～211のいずれか1項に記載のキット。

(項目213)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約 $50 \mu M$ である、項目212に記載のキット。

10

20

30

40

50

(項目 2 1 4)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目209～213のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 1 5)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1\text{ }\mu\text{M}$ である、項目209～214のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 1 6)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目209～215のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 1 7)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1\text{ }\mu\text{M}$ であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目209～216のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 1 8)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 1 h^{-1} 未満である、項目209～217のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 1 9)

前記H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 1 h^{-1} 未満である、項目209～218のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 2 0)

前記H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1\text{ }\mu\text{M}$ であり、前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 1 h^{-1} 未満である、項目209～219のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 2 1)

前記H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 1 h^{-1} 未満であり、前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目209～220のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 2 2)

ヘムがH-NOXタンパク質に結合している、項目209～221のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 2 3)

前記H-NOXタンパク質が変異タンパク質である、項目209～222のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 2 4)

前記H-NOXタンパク質が少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、項目223に記載のキット。

(項目 2 2 5)

前記H-NOXタンパク質が、遠位ポケット中にない少なくとも1つの変異を含む、項目223および224のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 2 6)

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較して、NO解離定数、NOに対する k_{off} 、NOに対する k_1 、NOに対する k_2 、 O_2 解離定数、NO安定性、ヘム自動酸化速度、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させる、少なくとも1つの変異を含む、項目209～225のいずれか1項に記載のキット。

(項目 2 2 7)

10

20

30

40

50

前記H-NOXタンパク質が、対応する野生型タンパク質と比較してNO反応性を変化させる少なくとも1つの変異を含む、項目209～226のいずれか1項に記載のキット
。

(項目228)

前記H-NOXタンパク質が、T. tengcongensis H-NOXのTyr 140に対応する1つの残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目209～227のいずれか1項に記載のキット。

(項目229)

前記H-NOXタンパク質が、L. pneumophila 9 H-NOXのPhe 149に対応する1つの残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目209～228のいずれか1項に記載のキット。

10

(項目230)

変異H-NOXタンパク質中の少なくとも1つのC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目209～229のいずれか1項に記載のキット
。

(項目231)

変異H-NOXタンパク質中の少なくとも約50個の連続するC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目230に記載のキット。

(項目232)

変異H-NOXタンパク質中の約25個～約200個の連続するC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目230および231のいずれか1項に記載のキット。

20

(項目233)

前記H-NOXタンパク質が以下：

【数 1 1】

野生型 *T. tengcongensis* H-NOX, *T. tengcongensis* H-NOX I5A, *T. tengcongensis* H-NOX I5L, *T. tengcongensis* H-NOX I5L-P115A, *T. tengcongensis* H-NOX W9F, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX W9F-Y140HT, *tengcongensis* H-NOX W9F-N74A, *T. tengcongensis* H-NOX W9Y, *T. tengcongensis* H-NOX W9N, *T. tengcongensis* H-NOX W9H, *T. tengcongensis* H-NOX N74E, *T. tengcongensis* H-NOX N74A, *T. tengcongensis* H-NOX N74H, *T. tengcongensis* H-NOX N74A-Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX F78Y-Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX F78Y/Y140L, *T. tengcongensis* H-NOX P115A, *T. tengcongensis* H-NOX R135Q, *T. tengcongensis* H-NOX Y140F, *T. tengcongensis* H-NOX Y40L, *T. tengcongensis* H-NOX Y140H, *T. tengcongensis* H-NOX Y140A, *T. tengcongensis* I75F-His6, *T. tengcongensis* I75F, *T. tengcongensis* L144F-His6, *T. tengcongensis* L144F, *L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y, 野生型 *L. pneumophila* 1 H-NOX, 野生型 *L. pneumophila* 2 H-NOX, *L. pneumophila* 2 F9W-F142Y, 野生型 *D. desulfuricans* H-NOX, *D. desulfuricans* H-NOX(728-899), *D. desulfuricans* H-NOX Y139L, 野生型 *H. sapiens* β 1 H-NOX, *H. sapiens* β 1 I140Y, *H. sapiens* β 1 I145Y, *H. sapiens* β 1(1-385), *H. sapiens* β 1(1-385) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-385) I145H, *H. sapiens* β 1(1-194), *H. sapiens* β 1(1-194) I145Y, *H. sapiens* β 1(1-194) L9W-I145Y, *H. sapiens* β 2(1-217), *H. sapiens* β 2(1-217) I142Y, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105G, *H. sapiens* β 1 H-NOX H105F, *H. sapiens* β 1 H-NOX C78S, *H. sapiens* β 1 H-NOX C78E, 野生型 *R. norvegicus* β 1 H-NOX, *R. norvegicus* β 1(1-385), *R. norvegicus* β 1(1-385) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-385) I145H, *R. norvegicus* β 1(1-194), *R. norvegicus* β 1(1-194) I145Y, *R. norvegicus* β 1(1-194) L9W-I145Y, *R. norvegicus* β 2(1-217), *R. norvegicus* β 2(1-217) I142Y, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105G, *R. norvegicus* β 1 H-NOX H105F, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78S, *R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78E, *C. botulinum* H-NOX(1-175), *C. botulinum* H-NOX(1-186), 野生型 *C. acetobutylicum* H-NOX, *C. acetobutylicum* H-NOX(1-197), *C. acetobutylicum* H-NOX(1-183), 野生型 *C. elegans* GCY-35 H-NOX, *C. elegans* H-NOX GCY-35(1-252), 野生型 *D. melangaster* β 1 H-NOX, 野生型 *D. melangaster* CG14885-PA, 野生型 *D. melangaster* CG14886, 野生型 *D. melangaster* CG4154, 野生型 *N. punctiforme* H-NOX, 野生型 *C. crescentus* H-NOX, 野生型 *S.*

10

20

30

【数 1 2】

oneidensis H-NOX, 野生型 *M. musculus* H-NOX, 野生型 *C. familiaris* H-NOX, 野生型 *B. Taurus* H-NOX, 野生型 *R. norvegicus*; 野生型 *X. laevis* H-NOX, 野生型 *O. latipes* H-NOX, 野生型 *O. curivatus* H-NOX, 野生型 *F. rubripes* H-NOX, 野生型 *A. gambiae* H-NOX, 野生型 *M. sexta* H-NOX; 野生型 *C. elegans* gcy-31, *C. elegans* gcy-32, 野生型 *C. elegans* gcy-33, 野生型 *C. elegans* gcy-34, 野生型 *C. elegans* gcy-35, 野生型 *C. elegans* gcy-36, 野生型 *C. elegans* gcy-37; 野生型 *V. cholera* H-NOX, 野生型 *V. fischerii* H-NOX, および 野生型 *N. punctiforme* H-NOX.

40

からなる群より選択される、項目 2 0 9 ~ 2 3 2 のいずれか 1 項に記載のキット。

(項目 2 3 4)

前記 H-NOX タンパク質が以下からなる群より選択される、項目 2 3 3 に記載のキット：野生型 *R. norvegicus* sGC、野生型 *R. norvegicus* β 1 (1-395)、*R. norvegicus* β 1 (1-217)、*R. norvegicus* β 1 (1-194)、野生型 *T. tengcongensis* H-NOX、T

50

. tengcongensis H-NOX Y140L、T. tengcongensis H-NOX Y140F、野生型L. pneumophila 1 H-NOX、野生型L. pneumophila 2 H-NOX、およびL. pneumophila 2 H-NOX F142Y。

(項目235)

前記H-NOXタンパク質が哺乳動物タンパク質であるか、または哺乳動物タンパク質由来である、項目209～234のいずれか1項に記載のキット。

(項目236)

前記H-NOXタンパク質がヒトタンパク質であるか、またはヒトタンパク質由来である、項目235に記載のキット。

(項目237)

前記ヒトタンパク質が β 1であるか、または β 1由来である、項目236に記載のキット。

(項目238)

前記H-NOXタンパク質が細菌タンパク質であるか、または細菌タンパク質由来である、項目209～234のいずれか1項に記載のキット。

(項目239)

前記H-NOXタンパク質がT. tengcongensisタンパク質であるか、またはT. tengcongensisタンパク質由来である、項目238に記載のキット。

(項目240)

NOがH-NOXタンパク質に結合している、項目209～239のいずれか1項に記載のキット。

(項目241)

前記H-NOXタンパク質を含む1つ以上のリポソームまたはナノ粒子を含む、項目209～240のいずれか1項に記載のキット。

(項目242)

前記H-NOXタンパク質が別の分子または部分に共有結合している、項目209～241のいずれか1項に記載のキット。

(項目243)

前記H-NOXタンパク質がポリエチレングリコールに共有結合している、項目242に記載のキット。

(項目244)

前記H-NOXタンパク質が、項目245～314のいずれか1項に記載の変異H-NOXタンパク質である、項目209～243のいずれか1項に記載のキット。

(項目245)

対応する野生型H-NOXタンパク質と比較して、NO解離定数またはNO反応性を変化させる少なくとも1つの変異を含む、単離されたH-NOXタンパク質であって、前記変異H-NOXタンパク質のNO解離定数は、ヘモグロビンのNO解離定数の大きさの2桁以内であり、前記変異H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも10分の1未満であり、前記変異H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOX Y40L、野生型T. tengcongensis H-NOX、野生型R. norvegicus sGC、またはL. pneumophila 2 H-NOX F142Yではない、単離されたH-NOXタンパク質。

(項目246)

前記変異H-NOXタンパク質が、T. tengcongensis H-NOX F78Y/Y140Lではない、項目245に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目247)

前記変異H-NOXタンパク質が以下ではない、項目245および246のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質：野生型L. pneumophila 2

10

20

30

40

50

H-NOX、野生型H. sapiens $\beta 1$ H-NOX、R. norvegicus sGC $\beta 1$ H-NOX (1-385)、野生型R. norvegicus $\beta 1$ H-NOX、野生型D. melangaster $\beta 1$ H-NOX、野生型D. melangaster CG14885-PA H-NOX、野生型C. elegans GCY-35 H-NOX、野生型N. punctiforme H-NOX、野生型C. crescentus H-NOX、野生型S. oneidensis H-NOX、または野生型C. acetobutylicum H-NOX。

(項目248)

前記変異H-NOXタンパク質が以下ではない、項目245～247のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質：T. tengcongensis H-NOX W9F、T. tengcongensis H-NOX Y140F、R. norvegicus $\beta 1$ (1-385) I145Y、R. norvegicus sGC $\beta 1$ H-NOX H105G、R. norvegicus sGC $\beta 1$ H-NOX H105F、R. norvegicus sGC $\beta 1$ H-NOX I145Y、R. norvegicus sGC $\beta 1$ H-NOX C78S、またはR. norvegicus sGC $\beta 1$ H-NOX C78E。

(項目249)

前記変異H-NOXタンパク質が、T. tengcongensis H-NOX Y140HまたはH. sapiens $\beta 1$ I140Yではない、項目245～248のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目250)

前記変異H-NOXタンパク質のNO解離定数が、ヘモグロビンのNO解離定数の0.1倍～10倍の間である、項目245～249のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目251)

前記変異H-NOXタンパク質のNO解離定数が、ヘモグロビンのNO解離定数の0.5倍～2倍の間である、項目250に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目252)

前記変異H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも100分の1未満である、項目245～251のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目253)

前記変異H-NOXタンパク質のNO反応性が、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも1,000分の1未満である、項目252に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目254)

前記変異H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目245～253のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目255)

前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間である、項目245～254のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目256)

前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 0.012 s^{-1} の間である、項目245～255のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目257)

前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^{-3}\text{ s}^{-1}$ の間である、項目245～256のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目258)

10

20

30

40

50

前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1\ \mu\text{M}$ である、項目245～257のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目259)

前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $10\ \mu\text{M}$ である、項目245～258のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目260)

前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $50\ \mu\text{M}$ である、項目259に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目261)

前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\ \text{s}^{-1}$ ～約 $10\ \text{s}^{-1}$ の間であり、前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1\ \mu\text{M}$ である、項目245～260のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

10

(項目262)

前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\ \text{s}^{-1}$ ～約 $10\ \text{s}^{-1}$ の間であり、前記変異H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 $700\ \text{s}^{-1}$ 未満である、項目245～261のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目263)

前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1\ \mu\text{M}$ であり、前記変異H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 $700\ \text{s}^{-1}$ 未満である、項目245～262のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

20

(項目264)

前記変異H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 $1\ \text{h}^{-1}$ 未満である、項目245～263のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目265)

前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、 37°C で約 $1 \times 10^{-4}\ \text{s}^{-1}$ ～約 $10\ \text{s}^{-1}$ の間であり、前記変異H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 $1\ \text{h}^{-1}$ 未満である、項目245～264のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

30

(項目266)

前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、 37°C で少なくとも約 $1\ \mu\text{M}$ であり、前記変異H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 $1\ \text{h}^{-1}$ 未満である、項目245～265のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目267)

前記変異H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、 37°C で約 $1\ \text{h}^{-1}$ 未満であり、前記変異H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 $700\ \text{s}^{-1}$ 未満である、項目245～266のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目268)

少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、項目245～267のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

40

(項目269)

遠位ポケット中にない少なくとも1つの変異を含む、項目245～268のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目270)

T. tengcongensis H-NOXのTyr140に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目245～269のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目271)

L. pneumophila 2 H-NOXのPhe142に対応する残基が任意の

50

他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目245～270のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目272)

少なくとも1つのC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目245～271のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目273)

少なくとも約50個の連続するC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目272に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目274)

約25個～約200個の連続するC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目272および273のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目275)

前記対応する野生型H-NOXタンパク質が哺乳動物タンパク質である、項目245～274のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目276)

前記対応する野生型H-NOXタンパク質がヒトタンパク質である、項目275に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目277)

前記対応する野生型H-NOXタンパク質がβ1である、項目276に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目278)

前記対応する野生型H-NOXタンパク質が細菌タンパク質である、項目245～274のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目279)

前記対応する野生型H-NOXタンパク質が*T. tengcongensis*タンパク質である、項目278に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目280)

前記変異H-NOXタンパク質が別の分子または部分に共有結合している、項目245～279のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目281)

前記変異H-NOXタンパク質がポリエチレングリコールに共有結合している、項目280に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目282)

対応する野生型H-NOXタンパク質と比較して、NOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 を変化させるか、あるいは O_2 解離定数を変化させる少なくとも1つの変異を含む、単離されたH-NOXタンパク質であって、前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、37℃で約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ～約 $10 s^{-1}$ の間であり、前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約 $1 \mu M$ であり、前記変異H-NOXタンパク質は、*T. tengcongensis* H-NOX Y40L、野生型*T. tengcongensis* H-NOX、野生型*R. norvegicus* sGC、または*L. pneumophila* 2 H-NOX F142Yではない、単離されたH-NOXタンパク質。

(項目283)

前記変異H-NOXタンパク質が、*T. tengcongensis* H-NOX F78Y/Y140Lではない、項目282に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目284)

前記変異H-NOXタンパク質が以下ではない、項目282および283のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質：野生型*L. pneumophila* 2 H-NOX、野生型*H. sapiens* β1 H-NOX、*R. norvegicus*

10

20

30

40

50

s sGC β1 H-NOX (1-385)、野生型R. norvegicus β1 H-NOX、野生型D. melangaster β1 H-NOX、野生型D. melangaster CG14885-PA H-NOX、野生型C. elegans GCY-35 H-NOX、野生型N. punctiforme H-NOX、野生型C. crescentus H-NOX、野生型S. oneidensis H-NOX、または野生型C. acetobutylicum H-NOX。

(項目285)

前記変異H-NOXタンパク質が以下ではない、項目282~284のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質：T. tengcongensis H-NOX W9F、T. tengcongensis H-NOX Y140F、R. norvegicus β1 (1-385) I145Y、R. norvegicus sGC β1 H-NOX H105G、R. norvegicus sGC β1 H-NOX H105F、R. norvegicus sGC β1 H-NOX I145Y、R. norvegicus sGC β1 H-NOX C78S、R. norvegicus sGC β1 H-NOX C78E、またはH. sapiens β1 H-NOX (1-385) I145Y。

(項目286)

前記変異H-NOXタンパク質が、T. tengcongensis H-NOX Y140HまたはH. sapiens β1 I140Yではない、項目282~285のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目287)

前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ~約 $0.012 s^{-1}$ の間である、項目282~286のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目288)

前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ~約 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ の間である、項目287に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目289)

前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約 $10 \mu M$ である、項目282~288のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目290)

前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約 $50 \mu M$ である、項目289に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目291)

前記変異H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 $700 s^{-1}$ 未満である、項目282~290のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目292)

前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ~約 $10 s^{-1}$ の間であり、前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約 $1 \mu M$ である、項目282~291のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目293)

前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ~約 $10 s^{-1}$ の間であり、前記変異H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 $700 s^{-1}$ 未満である、項目282~292のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目294)

前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約 $1 \mu M$ であり、前記変異H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 $700 s^{-1}$ 未満である、項目28

10

20

30

40

50

2～293のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目295)

前記変異H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約 1 h^{-1} 未満である、項目282～294のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目296)

前記変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 が、37℃で約 $1 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、前記変異H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約 1 h^{-1} 未満である、項目282～295のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目297)

前記変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数が、37℃で少なくとも約 $1\text{ }\mu\text{M}$ であり、前記変異H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約 1 h^{-1} 未満である、項目282～296のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目298)

前記変異H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度が、37℃で約 1 h^{-1} 未満であり、前記変異H-NOXタンパク質のNO反応性が、約 700 s^{-1} 未満である、項目282～297のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目299)

少なくとも1つの遠位ポケット変異を含む、項目282～298のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目300)

遠位ポケット中にない少なくとも1つの変異を含む、項目282～299のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目301)

T. tengcongensis H-NOXのTyr140に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目282～300のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目302)

L. pneumophila 2 H-NOXのPhe142に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を含む、項目282～301のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目303)

少なくとも1つのC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目282～302のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目304)

少なくとも約50個の連続するC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目303に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目305)

約25個～約200個の連続するC末端アミノ酸が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている、項目303および304のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目306)

前記対応する野生型H-NOXタンパク質が哺乳動物タンパク質である、項目282～305のいずれか1項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目307)

前記対応する野生型H-NOXタンパク質がヒトタンパク質である、項目306に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目308)

前記対応する野生型H-NOXタンパク質が $\beta 1$ である、項目307に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

10

20

30

40

50

(項目 3 0 9)

前記対応する野生型H-NOXタンパク質が細菌タンパク質である、項目 2 8 2 ~ 3 0 5 のいずれか 1 項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目 3 1 0)

前記対応する野生型H-NOXタンパク質がT. tengcongensisタンパク質である、項目 3 0 9 に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目 3 1 1)

前記変異H-NOXタンパク質が別の分子または部分に共有結合している、項目 2 8 2 ~ 3 1 0 のいずれか 1 項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目 3 1 2)

前記変異H-NOXタンパク質がポリエチレングリコールに共有結合している、項目 3 1 1 に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目 3 1 3)

前記H-NOXタンパク質のNO解離定数が、Homo sapiensヘモグロビン α のNO解離定数の大きさの2桁以内である、項目 2 7 9 ~ 3 9 5 のいずれか 1 項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目 3 1 4)

前記H-NOXタンパク質のNO反応性が、Homo sapiensヘモグロビン α のNO反応性の少なくとも10分の1未満である、項目 2 7 9 ~ 3 9 6 のいずれか 1 項に記載の単離されたH-NOXタンパク質。

(項目 3 1 5)

項目 2 4 5 ~ 3 1 4 のいずれか 1 項に記載のH-NOXタンパク質をコードする組換え型核酸。

(項目 3 1 6)

項目 3 1 5 に記載の核酸を含むベクター。

(項目 3 1 7)

項目 3 1 5 に記載の核酸を含む細胞。

(項目 3 1 8)

項目 3 1 6 に記載のベクターを含む細胞。

(項目 3 1 9)

タンパク質の生産に適している条件下で、項目 2 4 5 ~ 3 1 4 のいずれか 1 項に記載のH-NOXタンパク質をコードする核酸を含む細胞を培養する工程を含む、H-NOXタンパク質の生産方法。

(項目 3 2 0)

H-NOXタンパク質を精製する工程をさらに含む、項目 3 1 9 に記載の方法。

【0 0 1 2】

1つの態様においては、本発明は、変異H-NOXタンパク質を特徴とする。したがって、いくつかの実施形態においては、本発明により、対応する野生型H-NOXタンパク質のものと比較して、NO解離定数またはNO反応性を変化させる少なくとも1つの変異を含む、単離されたH-NOXタンパク質が提供される。いくつかの実施形態においては、変異H-NOXタンパク質のNO解離定数は、ヘモグロビンのNO解離定数の大きさの2桁以内であり、変異H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも10分の1未満である。いくつかの実施形態においては、変異H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも100分の1未満であり、例えば、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも1,000分の1未満である。いくつかの実施形態においては、変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、37℃では約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ~ 約 10 s^{-1} の間であり、例えば、37℃で、約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ~ 約 0.012 s^{-1} 、または約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ~ 約 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ である。いくつかの実施形態においては、変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、37℃では少なくとも約 $1 \mu\text{M}$ であり、例えば、37℃で、少なくと

10

20

30

40

50

も約 $10 \mu\text{M}$ 、または少なくとも約 $50 \mu\text{M}$ である。

【0013】

いくつかの実施形態においては、本発明により、対応する野生型H-NOXタンパク質のものと比較して、NOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 を変化させる、あるいは、 O_2 解離定数を変化させる、少なくとも1つの変異が含まれている単離されたH-NOXタンパク質が提供される。いくつかの実施形態においては、変異H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、 37°C では約 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ～約 10s^{-1} の間であり、そして、変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、 37°C では少なくとも約 $1 \mu\text{M}$ である。いくつかの実施形態においては、変異H-NOXタンパク質のNOについての k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、 37°C で、約 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ～約0.012 s^{-1} 、または約 $1 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ である。いくつかの実施形態においては、変異H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、 37°C では少なくとも約 $10 \mu\text{M}$ であり、例えば、 37°C で、少なくとも約 $50 \mu\text{M}$ である。いくつかの実施形態においては、変異H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも10分の1未満であり、例えば、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも100分の1未満、またはヘモグロビンのNO反応性の少なくとも1,000分の1未満である。

【0014】

いくつかの実施形態においては、本発明により、以下からなる群より選択される単離されたH-NOXタンパク質が提供される：T. tengcongensis H-NOX I5A、T. tengcongensis H-NOX I5L、T. tengcongensis H-NOX I5L-P115A、T. tengcongensis H-NOX W9F、T. tengcongensis H-NOX W9F-Y140L、T. tengcongensis H-NOX W9F-Y140H、T. tengcongensis H-NOX W9F-N74A、T. tengcongensis H-NOX W9Y、T. tengcongensis H-NOX W9N、T. tengcongensis H-NOX W9H、T. tengcongensis H-NOX N74E、T. tengcongensis H-NOX N74A、T. tengcongensis H-NOX N74H、T. tengcongensis H-NOX N74A-Y140H、T. tengcongensis H-NOX F78Y-Y140F、T. tengcongensis H-NOX P115A、T. tengcongensis H-NOX R135Q、T. tengcongensis H-NOX Y140F、T. tengcongensis H-NOX Y140H、T. tengcongensis H-NOX Y140A、T. tengcongensis I75F-His6、T. tengcongensis I75F、T. tengcongensis L144F-His6、T. tengcongensis L144F、L2 F9W-F142Y、D. desulfuricans H-NOX (728-899)、D. desulfuricans H-NOX Y139L、 $\beta 1$ (1-385)、 $\beta 1$ (1-385) I145Y、 $\beta 1$ (1-385) I145H、 $\beta 1$ (1-194)、 $\beta 1$ (1-194) I145Y、 $\beta 1$ (1-194) L9W-I145Y、 $\beta 2$ (1-217)、 $\beta 2$ (1-217) I142Y、C. botulinum H-NOX (1-175)、C. botulinum H-NOX (1-186)、C. acetobutylicum H-NOX (1-197)、C. acetobutylicum H-NOX (1-183)、およびC. elegans H-NOX GCY-35 (1-252)。いくつかの実施形態においては、 $\beta 1$ または $\beta 2$ タンパク質は、R. norvegicusまたはH. sapiensの $\beta 1$ あるいは $\beta 2$ タンパク質に由来する。

【0015】

いくつかの実施形態においては、本発明により、以下からなる群より選択される単離されたH-NOXタンパク質が提供される：T. tengcongensis H-NOX

10

20

30

40

50

I 5 A、T. tengcongensis H-NOX I 5 L、T. tengcongensis H-NOX I 5 L-P115A、T. tengcongensis H-NOX W9F-Y140L、T. tengcongensis H-NOX W9F-Y140H、T. tengcongensis H-NOX W9F-N74A、T. tengcongensis H-NOX W9Y、T. tengcongensis H-NOX W9N、T. tengcongensis H-NOX W9H、T. tengcongensis H-NOX N74E、T. tengcongensis H-NOX N74A、T. tengcongensis H-NOX N74H、T. tengcongensis H-NOX N74A-Y140H、T. tengcongensis H-NOX F78Y-Y140F、T. tengcongensis H-NOX P115A、T. tengcongensis H-NOX R135Q、T. tengcongensis H-NOX Y140H、T. tengcongensis H-NOX Y140A、T. tengcongensis I75F-His6、T. tengcongensis I75F、T. tengcongensis L144F-His6、T. tengcongensis L144F、L. pneumophilia 2 F9W-F142Y、D. desulfuricans H-NOX (728-899)、D. desulfuricans H-NOX Y139L、 $\beta 1$ (1-385) I145H、 $\beta 1$ (1-194)、 $\beta 1$ (1-194) I145Y、 $\beta 1$ (1-194) L9W-I145Y、 $\beta 2$ (1-217)、 $\beta 2$ (1-217) I142Y、C. botulinum H-NOX (1-175)、C. botulinum H-NOX (1-186)、C. acetobutylicum H-NOX (1-197)、C. acetobutylicum H-NOX (1-183)、およびC. elegans H-NOX GCY-35 (1-252)。いくつかの実施形態においては、 $\beta 1$ または $\beta 2$ タンパク質は、R. norvegicusまたはH. sapiens $\beta 1$ もしくは $\beta 2$ タンパク質に由来する。

【0016】

単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO解離定数は、ヘモグロビンのNO解離定数の0.1倍～10倍の間であり、例えば、ヘモグロビンの解離定数の0.5倍～2倍の間である。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO解離定数は、Homo sapiensヘモグロビン α のNO解離定数の大きさの2桁以内であり、例えば、解離定数は、Homo sapiensヘモグロビン α の解離定数の0.1倍～10倍の間、または0.5倍～2倍の間である。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO反応性は、Homo sapiensヘモグロビン α のNO反応性の少なくとも10分の1未満であり、例えば、Homo sapiensヘモグロビン α のNO反応性の少なくとも100分の1未満、または1,000分の1未満である。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃で約700 s⁻¹未満、例えば、20℃で、約600 s⁻¹、500 s⁻¹、400 s⁻¹、300 s⁻¹、200 s⁻¹、100 s⁻¹、75 s⁻¹、50 s⁻¹、25 s⁻¹、20 s⁻¹、10 s⁻¹、50 s⁻¹、3 s⁻¹、2 s⁻¹、1.8 s⁻¹、1.5 s⁻¹、1.2 s⁻¹、1.0 s⁻¹、0.8 s⁻¹、0.7 s⁻¹、または0.6 s⁻¹未満である。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、37℃では、少なくとも約1 μ Mであり、例えば、37℃で、少なくとも約10 μ M、または少なくとも50 μ Mである。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂は、37℃では約1×10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、37℃では、少なくとも約1 μ Mである。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂は、37℃では約1×10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、H-NOXタ

ンパク質のNO反応性は、20℃で約700 s⁻¹未満（例えば、20℃で、約600 s⁻¹、500 s⁻¹、100 s⁻¹、20 s⁻¹、または1.8 s⁻¹未満）である。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、37℃で、少なくとも約1 μMであり、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃で約700 s⁻¹未満（例えば、20℃で、約600 s⁻¹、500 s⁻¹、100 s⁻¹、20 s⁻¹、または1.8 s⁻¹未満）である。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度は、37℃で約1 h⁻¹未満である。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNOに対するk_{off}、k₁、またはk₂は、37℃では約1×10⁻⁴ s⁻¹～約10 s⁻¹の間であり、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度は、37℃で約1 h⁻¹未満である。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、37℃で少なくとも約1 μMであり、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度は、37℃で約1 h⁻¹未満である。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度は、37℃で約1 h⁻¹未満であり、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃で約700 s⁻¹未満（例えば、20℃で、約600 s⁻¹、500 s⁻¹、100 s⁻¹、20 s⁻¹、または1.8 s⁻¹未満）である。

10

【0017】

単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、それが由来するH-NOXタンパク質と比較して1つ以上の変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、または10個の変異）を含む。様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質は、それが由来するH-NOXタンパク質と比較して、20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3、または2個未満の変異を含む。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、少なくとも1つの遠位ポケット変異を有する。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、遠位ポケット中には存在しない少なくとも1つの変異を有する。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOXのTyr140、またはL. pneumophila 2のPhe142に対応する残基が任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を有する。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は少なくとも2つの変異を有し、ここでは、少なくとも1つの変異は、T. tengcongensis H-NOXのTyr140、またはL. pneumophila 2のPhe142に相当する残基の任意の他のアミノ酸による置換である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質中の変異は、T. tengcongensisのY140F変異またはY140L変異、あるいは、L. pneumophila 2のF142Y変異に相当する。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質中の少なくとも1つのC末端アミノ酸（例えば、少なくとも約50個の連続するC末端アミノ酸、または約25～約200の連続するC末端アミノ酸）が、対応する野生型タンパク質と比較して除去されている。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、R. norvegicusまたはH. sapiens β1もしくはβ2タンパク質のような、H-NOXタンパク質の最初の194個、217個、あるいは385個のアミノ酸を含む欠失である。

20

30

40

【0018】

単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は哺乳動物タンパク質（例えば、β1のようなヒトタンパク質）に由来する。単離されたH-NOXタンパク質の様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質は細菌タンパク質（例えば、T. tengcongensisタンパク質）に由来する。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、別の分子または部分（例えば、ポリエチレングリコール）に共有結合される。ヘムは、H-NOXタンパク質に結合される場合も、また結合されない場合もある。単離されたH-NOX

50

OXタンパク質のいくつかの実施形態においては、NOはH-NOXタンパク質に結合される。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインと、別のタンパク質（例えば、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン））の一部または全体を含む融合タンパク質である。

【0019】

単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、*T. tengcongensis* H-NOX Y40L、野生型*T. tengcongensis* H-NOX、野生型*R. norvegicus* sGC、または*L. pneumophila* 2 H-NOX F142Yではない。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、*T. tengcongensis* H-NOX F78Y/Y140Lではない。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、以下ではない：野生型*L. pneumophila* 2 H-NOX、野生型*H. sapiens* β 1 H-NOX、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX (1-385)、野生型*R. norvegicus* β 1 H-NOX、野生型*D. melangaster* β 1 H-NOX、野生型*D. melangaster* CG14885-PA H-NOX、野生型*C. elegans* GCY-35 H-NOX、野生型*N. punctiforme* H-NOX、野生型*C. crescentus* H-NOX、野生型*S. oneidensis* H-NOX、または野生型*C. acetobutylicum* H-NOX。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は以下ではない：*T. tengcongensis* H-NOX W9F、*T. tengcongensis* H-NOX Y140F、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX H105G、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX H105F、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX I145Y、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78S、または*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78E。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、*R. norvegicus* β 2 (1-217)、*R. norvegicus* β 1 (1-194)、*R. norvegicus* β 1 (1-385)、または*R. norvegicus* β 1 (1-385) I145Yではない。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、*T. tengcongensis* H-NOX W9F、*T. tengcongensis* H-NOX Y140F、または*H. sapiens* β 1 H-NOX (1-385) I145Yではない。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、*T. tengcongensis* H-NOX Y140H、*H. sapiens* β 1 I140Y、または*H. sapiens* β 1 I145Yではない。単離されたH-NOXタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、*T. tengcongensis* H-NOX Y40L、*T. tengcongensis* H-NOX F78Y/Y140L、*T. tengcongensis* H-NOX W9F、*T. tengcongensis* H-NOX Y140F、野生型*T. tengcongensis* H-NOX、*L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y、野生型*L. pneumophila* 2 H-NOX、*H. sapiens* β 1 H-NOX I140Y、*H. sapiens* β 1 I145Y、野生型*H. sapiens* β 1 H-NOX、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX (1-385)、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX (1-385) I145Y、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX H105G、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX H105F、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX I145Y、野生型*R. norvegicus* β 1 H-NOX、野生型*D. melangaster* β 1 H-NOX、野生型*D. melangaster* CG14885-PA H-NOX、野生型*C. elegans*

10

20

30

40

50

G C Y - 3 5 H - N O X、野生型 *N. punctiforme* H - N O X、野生型 *C. crescentus* H - N O X、野生型 *S. oneidensis* H - N O X、または野生型 *C. acetobutylicum* H - N O Xではない。単離されたH - N O Xタンパク質のいくつかの実施形態においては、H - N O Xタンパク質は、それらの種の省略形とGenbank識別番号にしたがってそれらの遺伝子名によって列挙される以下のH - N O Xタンパク質のいずれでもない（例えば、2006年5月21日、2006年5月22日、2007年5月21日、または2007年5月22日に入手した以下のタンパク質配列）：Np un 5 9 0 5 _ N p u _ 2 3 1 2 9 6 0 6、a l r 2 2 7 8 _ A n a _ 1 7 2 2 9 7 7 0、S O 2 1 4 4 _ S o n e _ 2 4 3 7 3 7 0 2、M d e g 1 3 4 3 _ M d e _ 2 3 0 2 7 5 2 1、V C A 0 7 2 0 _ V c h _ 1 5 6 0 1 4 7 6、C C 2 9 9 2 _ C c r _ 1 6 1 2 7 2 2 2、R s p h 2 0 4 3 _ R h s p _ 2 2 9 5 8 4 6 3 (g i : 4 6 1 9 2 7 5 7)、M m c 1 0 7 3 9 _ M c s p _ 2 2 9 9 9 0 2 0、T a r 4 _ T t e _ 2 0 8 0 7 1 6 9、D d e s 2 8 2 2 _ D d e _ 2 3 4 7 5 9 1 9、C A C 3 2 4 3 _ C a c _ 1 5 8 9 6 4 8 8、g c y - 3 1 _ C e _ 1 7 5 6 8 3 8 9、C G 1 4 8 8 5 _ D m _ 2 4 6 4 7 4 5 5、G U C Y 1 B 3 _ H s _ 4 5 0 4 2 1 5、H p G C S - b e t a 1 _ H p u l _ 1 4 2 4 5 7 3 8、G y c b e t a 1 0 0 B _ D m _ 2 4 6 5 1 5 7 7、C G 4 1 5 4 _ D m _ 2 4 6 4 6 9 9 3 (g i : N P _ 6 5 0 4 2 4 . 2、g i : 6 2 4 8 4 2 9 8)、g c y - 3 2 _ C e _ 1 3 5 3 9 1 6 0、g c y - 3 6 _ C e _ 1 7 5 6 8 3 9 1 (g i : 3 2 5 6 6 3 5 2、g i : 8 6 5 6 4 7 1 3)、g c y - 3 5 _ C e - 1 7 5 0 7 8 6 1 (g i : 7 1 9 9 0 1 4 6)、g c y - 3 7 _ C e _ 1 7 5 4 0 9 0 4 (g i : 7 1 9 8 5 5 0 5)、G C Y 1 α 3 _ H s _ 2 0 5 3 5 6 0 3、G C Y 1 α 2 - H s _ 8 9 9 4 7 7、またはG Y C α - 9 9 B _ D m _ 7 2 9 2 7 0 (g i : 6 8 0 6 7 7 3 8) (Lakshminarayananら、(2003)、「Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins」、BMG Genomics 4:5-13)。これらの名称の中で使用される種の省略形には以下を含む：Ana-Anabaena Sp; Ccr-Caulobacter crescentus; Cac-Clostridium acetobutylicum; Dde-Desulfovibrio desulfuricans; Mcsp-Magnetococcus sp.; Mde-Microbulbifer degradans; Npu-Nostoc punctiforme; Rhsp-Rhodobacter sphaeroides; Sone-Sewanella oneidensis; Tte-Thermoanaerobacter tengcongensis; Vch-Vibrio cholerae; Ce-Caenorhabditis elegans; Dm-Drosophila melanogaster; Hpul-Hemicentrotus pulcherrimus; Hs-Homo sapiens。単離されたH - N O Xタンパク質のいくつかの実施形態においては、H - N O Xタンパク質は、それらの生物名とPfamデータベース登録番号によって列挙される以下のH - N O Xタンパク質のいずれでもない（例えば、2006年5月21日、2006年5月22日、2007年5月17日、2007年5月21日、または2007年5月22日に入手した以下のタンパク質配列）：

【0020】

【化 1】

Caenorhabditis briggsae Q622M5_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*
 Q61P44_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61R54_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*
 Q61V90_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61A94_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*
 Q60TP4_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q60M10_CAEBR, *Caenorhabditis elegans*
 GCY37_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY31_CAEL, *Caenorhabditis elegans*
 GCY36_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY32_CAEL, *Caenorhabditis elegans*
 GCY35_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY34_CAEL, *Caenorhabditis elegans*
 GCY33_CAEL, *Oryzias curvinotus* Q7T040_ORYCU, *Oryzias curvinotus* Q75WF0_ORYCU,
Oryzias latipes P79998_ORYLA, *Oryzias latipes* Q7ZSZ5_ORYLA, *Tetraodon nigroviridis*
 Q4SW38_TETNG, *Tetraodon nigroviridis* Q4RZ94_TETNG, *Tetraodon nigroviridis*
 Q4S6K5_TETNG, *Fugu rubripes* Q90VY5_FUGRU, *Xenopus laevis* Q6INK9_XENLA, *Homo*
sapiens Q5T8J7_HUMAN, *Homo sapiens* GCYA2_HUMAN, *Homo sapiens* GCYB2_HUMAN,
Homo sapiens GCYB1_HUMAN, *Gorilla gorilla* Q9N193_9PRIM, *Pongo pygmaeus*
 Q5RAN8_PONPY, *Pan troglodytes* Q9N192_PANTR, *Macaca mulatta* Q9N194_MACMU,
Hylobates lar Q9N191_HYLLA, *Mus musculus* Q8BXH3_MOUSE, *Mus musculus*
 GCYB1_MOUSE, *Mus musculus* Q3UTI4_MOUSE, *Mus musculus* Q3UH83_MOUSE, *Mus*
musculus Q6XE41_MOUSE, *Mus musculus* Q80YP4_MOUSE, *Rattus norvegicus* Q80WX7_RAT,
Rattus norvegicus Q80WX8_RAT, *Rattus norvegicus* Q920Q1_RAT, *Rattus norvegicus*
 Q54A43_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY0_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY4_RAT, *Rattus*
norvegicus Q8CH85_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY5_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB1_RAT,
Rattus norvegicus Q8CH90_RAT, *Rattus norvegicus* Q91XJ7_RAT, *Rattus norvegicus*
 Q80WX9_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB2_RAT, *Rattus norvegicus* GCYA2_RAT, *Canis*
familiaris Q4ZHR9_CANFA, *Bos taurus* GCYB1_BOVIN, *Sus scrofa* Q4ZHR7_PIG, *Gryllus*
bimaculatus Q59HN5_GRYBI, *Manduca sexta* O77106_MANSE, *Manduca sexta*
 O76340_MANSE, *Apis mellifera* Q5UAF0_APIME, *Apis mellifera* Q5FAN0_APIME, *Apis*
mellifera Q6L5L6_APIME, *Anopheles gambiae* str PEST Q7PYK9_ANOGA, *Anopheles gambiae*
 str PEST Q7Q9W6_ANOGA, *Anopheles gambiae* str PEST Q7QF31_ANOGA, *Anopheles gambiae*
 str PEST Q7PS01_ANOGA, *Anopheles gambiae* str PEST Q7PFY2_ANOGA, *Anopheles gambiae*
 Q7KQ93_ANOGA, *Drosophila melanogaster* Q24086_DROME, *Drosophila melanogaster*
 GCYH_DROME, *Drosophila melanogaster* GCY8E_DROME, *Drosophila melanogaster*
 GCYDA_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYDB_DROME, *Drosophila melanogaster*

10

20

30

【 0 0 2 1 】

【化 2】

Q9VA09_DROME, *Drosophila pseudoobscura* Q29CE1_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C7_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C8_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q29BU7_DROPS, *Aplysia californica* Q7YWK7_APLCA, *Hemicentrotus pulcherrimus* Q95NK5_HEMPU, *Chlamydomonas reinhardtii*, Q5YLC2_CHLRE, *Anabaena sp* Q8YUQ7_ANASP, *Flavobacterium bacterium BBFL7* Q26GR8_9BACT, *Psychroflexus torquis* ATCC 700755 Q1VQE5_9FLAO, marine gamma proteobacterium HTCC2207 Q1YPJ5_9GAMM, marine gamma proteobacterium HTCC2207 Q1YTK4_9GAMM, *Caulobacter crescentus* Q9A451_CAUCR, *Acidiphilium cryptum* JF-5 Q2DG60_ACICY, *Rhodobacter sphaeroides* Q3J0U9_RHOS4, *Silicibacter pomeroyi* Q5LPV1_SILPO, *Paracoccus denitrificans* PD1222, Q3PC67_PARDE, *Silicibacter sp TM1040* Q3QNY2_9RHOB, *Jannaschia sp* Q28ML8_JANSC, *Magnetococcus sp* MC-1 Q3XT27_9PROT, *Legionella pneumophila* Q5WXP0_LEGPL, *Legionella pneumophila* Q5WTZ5_LEGPL, *Legionella pneumophila* Q5X268_LEGPA, *Legionella pneumophila* Q5X2R2_LEGPA, *Legionella pneumophila subsp pneumophila* Q5ZWM9_LEGPH, *Legionella pneumophila subsp pneumophila* Q5ZSQ8_LEGPH, *Colwellia psychrerythraea* Q47Y43_COLP3, *Pseudoalteromonas atlantica* T6c Q3CSZ5_ALTAT, *Shewanella oneidensis* Q8EF49_SHEON, *Saccharophagus degradans* Q21E20_SACD2, *Saccharophagus degradans* Q21ER7_SACD2, *Vibrio angustum* S14 Q1ZWES_9VIBR, *Vibrio vulnificus* Q8DAE2_VIBVU, *Vibrio alginolyticus* 12G01 Q1VCP6_VIBAL, *Vibrio sp* DAT722 Q2FA22_9VIBR, *Vibrio parahaemolyticus* Q87NJ1_VIBPA, *Vibrio fischeri* Q5EIF5_VIBF1, *Vibrio vulnificus* Q7MJS8_VIBVY, *Photobacterium sp SKA34* Q2C6Z5_9GAMM, *Hahella chejuensis* Q2SFY7_HAHCH, *Oceanospirillum sp* MED92 Q2BKV0_9GAMM, *Oceanobacter sp* RED65 QIN035_9GAMM, *Desulfovibrio desulfuricans* Q310U7_DESDG, *Halothermothrix orenii* H 168 Q2AIW5_9FIRM, *Thermoanaerobacter tengcongensis* Q8RBX6_THETN, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903 Q2ZH17_CALSA, *Clostridium acetobutylicum* Q97E73_CLOAB, *Alkaliphilus metalliredigenes* QYMF Q3C763_9CLOT, *Clostridium tetani* Q899J9_CLOTE, および *Clostridium beijerincki* NCIMB 8052 Q2WVN0_CLOBE

。単離されたH-N O Xタンパク質のいくつかの実施形態においては、H-N O Xタンパク質は、ヒトH-N O XのTyr 135、Ser 137、およびArg 139を含むY-S-Rモチーフの中には変異を有さない。

【0022】

1つの態様においては、本発明は、本明細書中に記載される変異H-N O Xタンパク質のうちの任意の1つ以上をコードする組み換え体核酸を特徴とする。特定の実施形態においては、核酸は、図2-4D、または8A-8DDに示される核酸のうちの任意のものの核酸配列のセグメント、またはその全体を含む。いくつかの実施形態においては、核酸は、H-N O Xドメインと、別のタンパク質（例えば、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン））の一部または全体を含む融合タンパク質をコードする。いくつかの実施形態においては、核酸には、H-N O X核酸に由来する少なくとも約50、100、150、200、300、400、500、600、700、800のいずれか以上の連続しているヌクレオチドを含み、および、それが由来するH-N O X核酸と比較して、1つ以上の変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の変異）を含む。様々な実施形態においては、変異H-N O X核酸には、それが由来するH-N O X核酸と比較して、約20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3、または2個未満の変異を含む。本発明はまた、変異H-N O Xタンパク質をコードする任意の核酸の縮重変異体をも特徴とする。

【0023】

なお別の態様においては、本発明により、本明細書中に記載される変異H-NOX核酸の任意の1つ以上が含まれているベクターが提供される。別の態様においては、本発明は、本明細書中に記載される変異H-NOX核酸の任意の1つ以上が含まれている細胞を特徴とする。1つの態様においては、本発明は、本明細書中に記載される任意のベクターが含まれている細胞を特徴とする。

【0024】

1つの態様においては、本発明は、H-NOXタンパク質を生産する方法を特徴とする。この方法は、本明細書中に記載される変異H-NOXタンパク質のうちの任意の1つ以上をコードする核酸を有している細胞を、変異H-NOXタンパク質の生産に適している条件下で培養する工程を含む。いくつかの実施形態においては、本発明は、変異H-NOXタンパク質を精製する工程をさらに含む。

10

【0025】

1つの態様においては、本発明は、本明細書中に記載される野生型H-NOXタンパク質または変異H-NOXタンパク質のうちの任意のもののような、1つ以上のH-NOXタンパク質を含む薬学的組成物を特徴とする。いくつかの実施形態においては、薬学的組成物は、薬学的に許容される量の本明細書中に記載されるH-NOXタンパク質と、薬学的に許容される担体を含む。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、37℃では約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、37℃では少なくとも約 $1 \mu\text{M}$ である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO解離定数は、ヘモグロビンのNO解離定数の大きさの2桁以内であり、H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも10分の1未満である。

20

【0026】

薬学的組成物のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO解離定数は、Homo sapiensヘモグロビン α のNO解離定数の大きさの2桁以内であり、例えば、NO解離定数は、Homo sapiensヘモグロビン α の解離定数の0.1倍～10倍の間、または0.5倍～2倍の間である。薬学的組成物のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO反応性は、Homo sapiensヘモグロビン α のNO反応性の少なくとも10分の1未満であり、例えば、Homo sapiensヘモグロビン α のNO反応性の少なくとも100分の1未満、または1,000分の1未満である。薬学的組成物のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は野生型タンパク質である。薬学的組成物のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、本明細書中に記載されるような変異タンパク質である。薬学的組成物の様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質は、対応する野生型タンパク質のものと比較して、NO解離定数、NOに対する k_{off} 、NOに対する k_1 、NOに対する k_2 、 O_2 解離定数、NO安定性、NO反応性、ヘム自動酸化速度、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させる少なくとも1つの変異を有する。薬学的組成物のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、以下からなる群より選択される：野生型T. tengcongensis H-NOX、T. tengcongensis H-NOX I5A、T. tengcongensis H-NOX I5L、T. tengcongensis H-NOX I5L-P115A、T. tengcongensis H-NOX W9F、T. tengcongensis H-NOX W9F-Y140L、T. tengcongensis H-NOX W9F-Y140H、T. tengcongensis H-NOX W9F-N74A、T. tengcongensis H-NOX W9Y、T. tengcongensis H-NOX W9N、T. tengcongensis H-NOX W9H、T. tengcongensis H-NOX N74E、T. tengcongensis H-NOX N74A、T. tengcongensis H-NOX N74H、T. tengcongensis H-NOX N74A-Y140H、T. tengcongensis H-NO

30

40

50

X F78Y-Y140F、*T. tengcongensis* H-NOX F78Y/Y140L、*T. tengcongensis* H-NOX P115A、*T. tengcongensis* H-NOX R135Q、*T. tengcongensis* H-NOX Y140F、*T. tengcongensis* H-NOX Y40L、*T. tengcongensis* H-NOX Y140H、*T. tengcongensis* H-NOX Y140A、*T. tengcongensis* I75F-His6、*T. tengcongensis* I75F、*T. tengcongensis* L144F-His6、*T. tengcongensis* L144F、*L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y、野生型*L. pneumophila* 1 H-NOX、野生型*L. pneumophila* 2 H-NOX、*L. pneumophila* 2 F9W-F142Y、野生型*D. desulfuricans* H-NOX、*D. desulfuricans* H-NOX (728-899)、*D. desulfuricans* H-NOX Y139L、野生型*H. sapiens* β 1 H-NOX、*H. sapiens* β 1 I140Y、*H. sapiens* β 1 I145Y、*H. sapiens* β 1 (1-385)、*H. sapiens* β 1 (1-385) I145Y、*H. sapiens* β 1 (1-385) I145H、*H. sapiens* β 1 (1-194)、*H. sapiens* β 1 (1-194) I145Y、*H. sapiens* β 1 (1-194) L9W-I145Y、*H. sapiens* β 2 (1-217)、*H. sapiens* β 2 (1-217) I142Y、*H. sapiens* β 1 H-NOX H105G、*H. sapiens* β 1 H-NOX H105F、*H. sapiens* β 1 H-NOX C78S、*H. sapiens* β 1 H-NOX C78E、野生型*R. norvegicus* β 1 H-NOX、*R. norvegicus* β 1 (1-385)、*R. norvegicus* β 1 (1-385) I145Y、*R. norvegicus* β 1 (1-385) I145H、*R. norvegicus* β 1 (1-194)、*R. norvegicus* β 1 (1-194) I145Y、*R. norvegicus* β 1 (1-194) L9W-I145Y、*R. norvegicus* β 2 (1-217)、*R. norvegicus* β 2 (1-217) I142Y、*R. norvegicus* β 1 H-NOX H105G、*R. norvegicus* β 1 H-NOX H105F、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78S、*R. norvegicus* sGC β 1 H-NOX C78E、*C. botulinum* H-NOX (1-175)、*C. botulinum* H-NOX (1-186)、野生型*C. acetobutylicum* H-NOX、*C. acetobutylicum* H-NOX (1-197)、*C. acetobutylicum* H-NOX (1-183)、野生型*C. elegans* GCY-35 H-NOX、*C. elegans* H-NOX GCY-35 (1-252)、野生型*D. melanogaster* β 1 H-NOX、野生型*D. melanogaster* CG14885-PA、野生型*D. melanogaster* CG14886、野生型*D. melanogaster* CG4154；野生型*N. punctiforme* H-NOX、野生型*C. crescentus* H-NOX、野生型*S. oneidensis* H-NOX、野生型*M. musculus* H-NOX、野生型*C. familiaris* H-NOX、野生型*B. taurus* H-NOX、野生型*R. norvegicus*；野生型*X. laevis* H-NOX、野生型*O. latipes* H-NOX、野生型*O. curivatus* H-NOX、野生型*F. rubripes* H-NOX、野生型*A. gambiae* H-NOX、野生型*M. sexta* H-NOX；野生型*C. elegans* gcy-31、*C. elegans* gcy-32、野生型*C. elegans* gcy-33、野生型*C. elegans* gcy-34、野生型*C. elegans* gcy-35、野生型*C. elegans* gcy-36、野生型*C. elegans* gcy-37、野生型*V. cholera* H-NOX、野生型*V. fischeri* H-NOX、および野生型*N. punctiforme* H-NOX。薬学的組成物の特定の実施形態においては、H-NOXタンパク質は、以下からなる群より選択さ

【 0 0 2 7 】

50

icus sGC β 1 H-NOX I145Y、野生型R. norvegicus β 1 H-NOX、野生型D. melangaster β 1 H-NOX、野生型D. melangaster CG14885-PA H-NOX、野生型C. elegans GCY-35 H-NOX、野生型N. punctiforme H-NOX、野生型C. crescentus H-NOX、野生型S. oneidensis H-NOX、または野生型C. acetobutylicum H-NOXではない。薬学的組成物のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、それらの種の省略形とGenbank 識別番号にしたがってそれらの遺伝子名によって列挙される以下のH-NOXタンパク質のいずれでもない（例えば、2006年5月21日、2006年5月22日、2007年5月21日、または2007年5月22日に入手した以下のタンパク質配列）：Npun5905_Npu_23129606、alr2278_Ana_17229770、SO2144_Sone_24373702、Mdeg1343_Mde_23027521、VCA0720_Vch_15601476、CC2992_Ccr_16127222、Rsph2043_Rhsp_22958463 (gi:46192757)、Mmc10739_Mcsp_22999020、Tar4_Tte_20807169、Ddes2822_Dde_23475919、CAC3243_Cac_15896488、gcy-31_Ce_17568389、CG14885_Dm_24647455、GUCY1B3_Hs_4504215、HpGCS-beta1_Hpul_14245738、Gycbeta100B_Dm_24651577、CG4154_Dm_24646993 (gi:NP_650424.2、gi:62484298)、gcy-32_Ce_13539160、gcy-36_Ce_17568391 (gi:32566352、gi:86564713)、gcy-35_Ce_17507861 (gi:71990146)、gcy-37_Ce_17540904 (gi:71985505)、GCY1a3_Hs_20535603、GCY1a2-Hs_899477、またはGYCa-99B_Dm_729270 (gi:68067738) (Lakshminarayanら、(2003)、「Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins」、BMG Genomics 4:5-13)。これらの名称の中で使用される種の省略形には以下を含む：Ana-Anabaena Sp; Ccr-Caulobacter crescentus; Cac-Clostridium acetobutylicum; Dde-Desulfovibrio desulfuricans; Mcsp-Magnetococcus sp.; Mde-Microbulbifer degradans; Npu-Nostoc punctiforme; Rhsp-Rhodobacter sphaeroides; Sone-Shewanella oneidensis; Tte-Thermoanaerobacter tengcongensis; Vch-Vibrio cholerae; Ce-Caenorhabditis elegans; Dm-Drosophila melanogaster; Hpul-Hemicentrotus pulcherrimus; Hs-Homo sapiens。薬学的組成物のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、それらの生物名とPfamデータベース登録番号によって列挙される以下のH-NOXタンパク質のいずれでもない（例えば、2006年5月21日、2006年5月22日、2007年5月17日、2007年5月21日、または2007年5月22日に入手した以下のタンパク質配列）：

【0028】

10

20

30

40

【化 3】

Caenorhabditis briggsae Q622M5_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*
 Q61P44_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61R54_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*
 Q61V90_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61A94_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*
 Q60TP4_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q60M10_CAEBR, *Caenorhabditis elegans*
 GCY37_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY31_CAEEL, *Caenorhabditis elegans*
 GCY36_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY32_CAEEL, *Caenorhabditis elegans*
 GCY35_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY34_CAEEL, *Caenorhabditis elegans*
 GCY33_CAEEL, *Oryzias curvinotus* Q7T040_ORYCU, *Oryzias curvinotus* Q75WF0_ORYCU,
Oryzias latipes P79998_ORYLA, *Oryzias latipes* Q7ZSZ5_ORYLA, *Tetraodon nigroviridis*
 Q4SW38_TETNG, *Tetraodon nigroviridis* Q4RZ94_TETNG, *Tetraodon nigroviridis*
 Q4S6K5_TETNG, *Fugu rubripes* Q90VY5_FUGRU, *Xenopus laevis* Q6INK9_XENLA, *Homo*
sapiens Q5T8J7_HUMAN, *Homo sapiens* GCYA2_HUMAN, *Homo sapiens* GCYB2_HUMAN,
Homo sapiens GCYB1_HUMAN, *Gorilla gorilla* Q9N193_9PRIM, *Pongo pygmaeus*
 Q5RAN8_PONPY, *Pan troglodytes* Q9N192_PANTR, *Macaca mulatta* Q9N194_MACMU,
Hylobates lar Q9N191_HYLLA, *Mus musculus* Q8BXH3_MOUSE, *Mus musculus*
 GCYB1_MOUSE, *Mus musculus* Q3UT14_MOUSE, *Mus musculus* Q3UH83_MOUSE, *Mus*
musculus Q6XE41_MOUSE, *Mus musculus* Q80YP4_MOUSE, *Rattus norvegicus* Q80WX7_RAT,
Rattus norvegicus Q80WX8_RAT, *Rattus norvegicus* Q920Q1_RAT, *Rattus norvegicus*

10

20

【 0 0 2 9】

【化 4】

Q54A43_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY0_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY4_RAT, *Rattus norvegicus* Q8CH85_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY5_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB1_RAT, *Rattus norvegicus* Q8CH90_RAT, *Rattus norvegicus* Q91XJ7_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WX9_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB2_RAT, *Rattus norvegicus* GCYA2_RAT, *Canis familiaris* Q4ZHR9_CANFA, *Bos taurus* GCYB1_BOVIN, *Sus scrofa* Q4ZHR7_PIG, *Gryllus bimaculatus* Q59HN5_GRYB1, *Manduca sexta* O77106_MANSE, *Manduca sexta* O76340_MANSE, *Apis mellifera* Q5UAF0_APIME, *Apis mellifera* Q5FAN0_APIME, *Apis mellifera* Q6L5L6_APIME, *Anopheles gambiae* str PEST Q7PYK9_ANOGA, *Anopheles gambiae* str PEST Q7Q9W6_ANOGA, *Anopheles gambiae* str PEST Q7QF31_ANOGA, *Anopheles gambiae* str PEST Q7PS01_ANOGA, *Anopheles gambiae* str PEST Q7PFY2_ANOGA, *Anopheles gambiae* Q7KQ93_ANOGA, *Drosophila melanogaster* Q24086_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYH_DROME, *Drosophila melanogaster* GCY8E_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYDA_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYDB_DROME, *Drosophila melanogaster* Q9VA09_DROME, *Drosophila pseudoobscura* Q29CE1_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C7_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C8_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q29BU7_DROPS, *Aplysia californica* Q7YWK7_APLCA, *Hemicentrotus pulcherrimus* Q95NK5_HEMPU, *Chlamydomonas reinhardtii*, Q5YLC2_CHLRE, *Anabaena* sp Q8YUQ7_ANASP, *Flavobacterium bacterium* BBFL7 Q26GR8_9BACT, *Psychroflexus torquis* ATCC 700755 Q1VQE5_9FLAO, marine gamma proteobacterium HTCC2207 Q1YPJ5_9GAMM, marine gamma proteobacterium HTCC2207 Q1YTK4_9GAMM, *Caulobacter crescentus* Q9A451_CAUCR, *Acidiphilium cryptum* JF-5 Q2DG60_ACICY, *Rhodobacter sphaeroides* Q3J0U9_RHOS4, *Silicibacter pomeroyi* Q5LPV1_SILPO, *Paracoccus denitrificans* PD1222, Q3PC67_PARDE, *Silicibacter* sp TM1040 Q3QNY2_9RHOB, *Jannaschia* sp Q28ML8_JANSC, *Magnetococcus* sp MC-1 Q3XT27_9PROT, *Legionella pneumophila* Q5WXP0_LEGPL, *Legionella pneumophila* Q5WTZ5_LEGPL, *Legionella pneumophila* Q5X268_LEGPA, *Legionella pneumophila* Q5X2R2_LEGPA, *Legionella pneumophila* subsp *pneumophila* Q5ZW99_LEGPH, *Legionella pneumophila* subsp *pneumophila* Q5ZSQ8_LEGPH, *Colwellia psychrerythraea* Q47Y43_COLP3, *Pseudoalteromonas atlantica* T6c Q3CSZ5_ALTAT, *Shewanella oneidensis* Q8EF49_SHEON, *Saccharophagus degradans* Q21E20_SACD2, *Saccharophagus degradans* Q21ER7_SACD2, *Vibrio angustum* S14 Q1ZWE5_9VIBR, *Vibrio vulnificus* Q8DAE2_VIBVU,

10

20

30

【 0 0 3 0 】

【化 5】

Vibrio alginolyticus 12G01 Q1VCP6_VIBAL, *Vibrio* sp DAT722 Q2FA22_9VIBR, *Vibrio parahaemolyticus* Q87NJ1_VIBPA, *Vibrio fischeri* Q5E1F5_VIBF1, *Vibrio vulnificus* Q7MJS8_VIBVY, *Photobacterium* sp SKA34 Q2C6Z5_9GAMM, *Hahella chejuensis* Q2SFY7_HAHCH, *Oceanospirillum* sp MED92 Q2BKV0_9GAMM, *Oceanobacter* sp RED65 Q1N035_9GAMM, *Desulfovibrio desulfuricans* Q310U7_DESDG, *Halothermothrix orenii* H 168 Q2AIW5_9FIRM, *Thermoanaerobacter tengcongensis* Q8RBX6_THETN, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903 Q2ZH17_CALSA, *Clostridium acetobutylicum* Q97E73_CLOAB, *Alkaliphilus metalliredigenes* QYMF Q3C763_9CLOT, *Clostridium tetani* Q899J9_CLOTE, および *Clostridium beijerincki* NCIMB 8052 Q2WVN0_CLOBE

10

。薬学的組成物のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、ヒトH-NOXの Tyr 135、Ser 137、および Arg 139 を含む Y-S-R モチーフの中には変異を有さない。

【0031】

他で明記されないか、または状況によって示されない限りは、本明細書中に記載される全ての野生型H-NOXタンパク質および変異H-NOXタンパク質は、本明細書中に記載される薬学的組成物のうちの任意のものにおいて使用され得る。H-NOXタンパク質には、ヘムおよび／またはNOが結合している場合も、また、結合していない場合もあり、そしてこれらは、別の分子または部分（例えば、ポリエチレングリコール）に共有結合される場合も、また結合されていない場合もある。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインと、別のタンパク質（例えば、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン））の一部または全体が含まれている融合タンパク質である。

20

【0032】

1つの態様においては、本発明により、H-NOXタンパク質を使用して、個体（例えば、哺乳動物（例えば、霊長類（例えば、ヒト、サル、ゴリラ、類人猿、キツネザルなど）、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、またはネコ））に対してNOを送達する方法が提供される。いくつかの実施形態においては、個体は、心臓血管の症状、高血圧、高血圧によって悪化した症状、血管収縮の症状、脳卒中、NO機能不全に罹患しているか、あるいはそれらの危険性がある。特定の実施形態においては、高血圧によって悪化した症状は、心不全、腎不全、または脳卒中である。

30

【0033】

したがって、いくつかの実施形態においては、本発明により、個体（例えば、ヒト）にNOを送達する方法が提供される。この方法は、個体に対して有効量のNOを送達するために十分な量のH-NOXタンパク質をそれが必要な個体に投与することによる。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、37℃では約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、37℃では少なくとも約 $1 \mu\text{M}$ である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO解離定数は、ヘモグロビンのNO解離定数の大きさの2桁以内であり、H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも10分の1未満である。

40

【0034】

この方法のいくつかの実施形態においては、NOは、個体へのH-NOXタンパク質の投与の前にH-NOXタンパク質に結合される。この方法のいくつかの実施形態においては、NOは、個体へのH-NOXタンパク質の投与の前にはH-NOXタンパク質に結合されず、H-NOXタンパク質は、個体中の1つの位置から個体中の別の位置にNOを輸送する。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、経口で、直腸に、または個体の血液に投与される。この方法の特定の実施形態においては、H-N

50

OXタンパク質は、個体の血液に投与される。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、少なくとも2回、個体に投与される。

【0035】

この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO解離定数は、Homo sapiensヘモグロビン α のNO解離定数の大きさの2桁以内であり、例えば、NO解離定数は、Homo sapiensヘモグロビン α の解離定数の0.1倍～10倍の間、または0.5倍～2倍の間である。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO反応性は、Homo sapiensヘモグロビン α のNO反応性の少なくとも10分の1未満であり、例えば、Homo sapiensヘモグロビン α のNO反応性の少なくとも100分の1未満、または1,000分の1未満である。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は野生型タンパク質である。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、本明細書中に記載されるような変異タンパク質である。この方法の様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質は、対応する野生型タンパク質のものと比較して、NO解離定数、NOに対する k_{off} 、NOに対する k_1 、NOに対する k_2 、 O_2 解離定数、NO安定性、NO反応性、ヘム自動酸化速度、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させる少なくとも1つの変異を有する。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、以下からなる群より選択される：野生型T. tengcongensis H-NOX、T. tengcongensis H-NOX I5A、T. tengcongensis H-NOX I5L、T. tengcongensis H-NOX I5L-P115A、T. tengcongensis H-NOX W9F、T. tengcongensis H-NOX W9F-Y140L、T. tengcongensis H-NOX W9F-Y140H、T. tengcongensis H-NOX W9F-N74A、T. tengcongensis H-NOX W9Y、T. tengcongensis H-NOX W9N、T. tengcongensis H-NOX W9H、T. tengcongensis H-NOX N74E、T. tengcongensis H-NOX N74A、T. tengcongensis H-NOX N74H、T. tengcongensis H-NOX N74A-Y140H、T. tengcongensis H-NOX F78Y-Y140F、T. tengcongensis H-NOX F78Y/Y140L、T. tengcongensis H-NOX P115A、T. tengcongensis H-NOX R135Q、T. tengcongensis H-NOX Y140F、T. tengcongensis H-NOX Y40L、T. tengcongensis H-NOX Y140H、T. tengcongensis H-NOX Y140A、T. tengcongensis I75F-His6、T. tengcongensis L144F-His6、T. tengcongensis L144F、L. pneumophila 2 H-NOX F142Y、野生型L. pneumophila 1 H-NOX、野生型L. pneumophila 2 H-NOX、L. pneumophila 2 F9W-F142Y、野生型D. desulfuricans H-NOX、D. desulfuricans H-NOX Y139L、野生型H. sapiens $\beta 1$ H-NOX、H. sapiens $\beta 1$ I140Y、H. sapiens $\beta 1$ I145Y、H. sapiens $\beta 1$ (1-385)、H. sapiens $\beta 1$ (1-385) I145Y、H. sapiens $\beta 1$ (1-385) I145H、H. sapiens $\beta 1$ (1-194)、H. sapiens $\beta 1$ (1-194) I145Y、H. sapiens $\beta 1$ (1-194) L9W-I145Y、H. sapiens $\beta 2$ (1-217)、H. sapiens $\beta 2$ (1-217) I142Y、H. sapiens $\beta 1$ H-NOX H105G、H. sapiens $\beta 1$ H-NOX H105F、H. sapiens $\beta 1$ H-NOX C78S、H. sapiens $\beta 1$ H-NOX C78E、野生型R. no

10

20

30

40

50

rvegicus $\beta 1$ H-NOX、*R. norvegicus* $\beta 1$ (1-385)、*R. norvegicus* $\beta 1$ (1-385) I145Y、*R. norvegicus* $\beta 1$ (1-385) I145H、*R. norvegicus* $\beta 1$ (1-194)、*R. norvegicus* $\beta 1$ (1-194) I145Y、*R. norvegicus* $\beta 1$ (1-194) L9W-I145Y、*R. norvegicus* $\beta 2$ (1-217)、*R. norvegicus* $\beta 2$ (1-217) I142Y、*R. norvegicus* $\beta 1$ H-NOX H105G、*R. norvegicus* $\beta 1$ H-NOX H105F、*R. norvegicus* sGC $\beta 1$ H-NOX C78S、*R. norvegicus* sGC $\beta 1$ H-NOX C78E、*C. botulinum* H-NOX (1-175)、*C. botulinum* H-NOX (1-186)、野生型*C. acetobutylicum* H-NOX、*C. acetobutylicum* H-NOX (1-197)、*C. acetobutylicum* H-NOX (1-183)、野生型*C. elegans* GCY-35 H-NOX、*C. elegans* H-NOX GCY-35 (1-252)、野生型*D. melanogaster* $\beta 1$ H-NOX、野生型*D. melanogaster* CG14885-PA、野生型*D. melanogaster* CG14886、野生型*D. melanogaster* CG4154；野生型*N. punctiforme* H-NOX、野生型*C. crescentus* H-NOX、野生型*S. oneidensis* H-NOX、野生型*M. musculus* H-NOX、野生型*C. familiaris* H-NOX、野生型*B. taurus* H-NOX、野生型*R. norvegicus*；野生型*X. laevis* H-NOX、野生型*O. latipes* H-NOX、野生型*O. curivatus* H-NOX、野生型*F. rubripes* H-NOX、野生型*A. gambiae* H-NOX、野生型*M. sexta* H-NOX；野生型*C. elegans* gcy-31、*C. elegans* gcy-32、野生型*C. elegans* gcy-33、野生型*C. elegans* gcy-34、野生型*C. elegans* gcy-35、野生型*C. elegans* gcy-36、野生型*C. elegans* gcy-37、野生型*V. cholera* H-NOX、野生型*V. fischerii* H-NOX、および野生型*N. punctiforme* H-NOX。この方法の特定の実施形態においては、H-NOXタンパク質は、以下からなる群より選択される：野生型*R. norvegicus* sGC、野生型*R. norvegicus* $\beta 1$ (1-385)、*R. norvegicus* $\beta 1$ (1-217)、*R. norvegicus* $\beta 1$ (1-194)、野生型*T. tengcongensis* H-NOX、*T. tengcongensis* H-NOX Y140L、*T. tengcongensis* H-NOX Y140F、野生型*L. pneumophila* 1 H-NOX、野生型*L. pneumophila* 2 H-NOX、および*L. pneumophila* 2 H-NOX F142Y。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質を含むかまたはH-NOXタンパク質をカプセル化する、1つ以上のリポソームまたはナノ粒子を含む。

【0036】

この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、*T. tengcongensis* H-NOX Y40L、野生型*T. tengcongensis* H-NOX、野生型*R. norvegicus* sGC、または*L. pneumophila* 2 H-NOX F142Yではない。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は*T. tengcongensis* H-NOX F78Y/Y140Lではない。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、野生型*L. pneumophila* 2 H-NOX、野生型*H. sapiens* $\beta 1$ H-NOX、*R. norvegicus* sGC $\beta 1$ H-NOX (1-385)、野生型*R. norvegicus* $\beta 1$ H-NOX、野生型*D. melanogaster* $\beta 1$ H-NOX、野生型*D. melanogaster* CG14885-PA H-NOX、野生型*C. elegans* GCY-35 H-NOX、野生型*N. pu*

10

20

30

40

50

nctiforme H-NOX、野生型C. crescentus H-NOX、野生型S. oneidensis H-NOX、または野生型C. acetobutylicum H-NOXではない。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOX W9F、T. tengcongensis H-NOX Y140F、R. norvegicus sGC β 1 H-NOX H105G、R. norvegicus sGC β 1 H-NOX H105F、R. norvegicus sGC β 1 H-NOX I145Y、R. norvegicus sGC β 1 H-NOX C78S、またはR. norvegicus sGC β 1 H-NOX C78Eではない。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、R. norvegicus β 2 (1-217)、R. norvegicus β 1 (1-194)、R. norvegicus β 1 (1-385)、またはR. norvegicus β 1 (1-385) I145Yではない。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOX W9F、T. tengcongensis H-NOX Y140F、またはH. sapiens β 1 H-NOX (1-385) I145Yではない。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOX Y140H、H. sapiens β 1 I140Y、またはH. sapiens β 1 I145Yではない。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOX Y40L、T. tengcongensis H-NOX F78Y/Y140L、T. tengcongensis H-NOX W9F、T. tengcongensis H-NOX Y140F、野生型T. tengcongensis H-NOX、L. pneumophila 2 H-NOX F142Y、野生型L. pneumophila 2 H-NOX、H. sapiens β 1 H-NOX I140Y、H. sapiens B1 I145Y、野生型H. sapiens β 1 H-NOX、R. norvegicus sGC β 1 H-NOX (1-385)、R. norvegicus sGC β 1 H-NOX (1-385) I145Y、R. norvegicus sGC β 1 H-NOX H105G、R. norvegicus sGC β 1 H-NOX H105F、R. norvegicus sGC β 1 H-NOX I145Y、野生型R. norvegicus β 1 H-NOX、野生型D. melangaster β 1 H-NOX、野生型D. melangaster CG14885-PA H-NOX、野生型C. elegans GCY-35 H-NOX、野生型N. punctiforme H-NOX、野生型C. crescentus H-NOX、野生型S. oneidensis H-NOX、または野生型C. acetobutylicum H-NOXではない。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、それらの種の省略形とGenbank識別番号にしたがってそれらの遺伝子名によって列挙される以下のH-NOXタンパク質のいずれでもない（例えば、2006年5月21日、2006年5月22日、2007年5月21日、または2007年5月22日に入手した以下のタンパク質配列）：Npun5905_Npu_23129606、alr2278_Ana_17229770、SO2144_Sone_24373702、Mdeg1343_Mde_23027521、VCA0720_Vch_15601476、CC2992_Ccr_16127222、RspH2043_Rhsp_22958463 (gi: 46192757)、Mmc10739_Mcsp_22999020、Tar4_Tte_20807169、Ddes2822_Dde_23475919、CAC3243_Cac_15896488、gcy-31_Ce_17568389、CG14885_Dm_24647455、GUCY1B3_Hs_4504215、HpGCS-beta1_Hpul_14245738、Gycbeta100B_Dm_24651577、CG4154_Dm_24646993 (gi: NP_650424. 2, gi: 62484298)、gcy-32_Ce_13539160、gcy-36_Ce_17568391 (gi: 32566352, gi: 8

10

20

30

40

50

6564713)、gcy-35_Ce-17507861(gi:71990146)、gcy-37_Ce_17540904(gi:71985505)、GCY1a3_Hs_20535603、GCY1a2-Hs_899477、またはGYCa-99B_Dm_729270(gi:68067738)(Lakshminarayanan、(2003)、「Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins」、BMG Genomics 4:5-13)。これらの名称の中で使用される種の省略形には以下を含む：Ana-Anabaena Sp; Ccr-Caulobacter crescentus; Cac-Clostridium acetobutylicum; Dde-Desulfovibrio desulfuricans; Mcsp-Magnetococcus sp.; Mde-Microbulbifer degradans; Npu-Nostoc punctiforme; Rhsp-Rhodobacter sphaeroides; Sone-Shewanella oneidensis; Tte-Thermoanaerobacter tengcongensis; Vch-Vibrio cholerae; Ce-Caenorhabditis elegans; Dm-Drosophila melanogaster; Hpul-Hemicentrotus pulcherrimus; Hs-Homo sapiens。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、それらの生物名とPfamデータベース登録番号によって列挙される以下のH-NOXタンパク質のいずれでもない（例えば、2006年5月21日、2006年5月22日、2007年5月17日、2007年5月21日、または2007年5月22日に入手した以下のタンパク質配列）：

【0037】

【化6】

Caenorhabditis briggsae Q622M5_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61P44_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61R54_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61V90_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61A94_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q60TP4_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q60M10_CAEBR, *Caenorhabditis elegans* GCY37_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY31_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY36_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY32_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY35_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY34_CAEL, *Caenorhabditis elegans* GCY33_CAEL, *Oryzias curvinotus* Q7T040_ORYCU, *Oryzias curvinotus* Q75WF0_ORYCU, *Oryzias latipes* P79998_ORYLA, *Oryzias latipes* Q7ZSZ5_ORYLA, *Tetraodon nigroviridis* Q4SW38_TETNG,

【0038】

【化 7】

Tetraodon nigroviridis Q4RZ94_TETNG, *Tetraodon nigroviridis* Q4S6K5_TETNG, *Fugu rubripes*
 Q90VY5_FUGRU, *Xenopus laevis* Q6INK9_XENLA, *Homo sapiens* Q5T8J7_HUMAN, *Homo*
sapiens GCYA2_HUMAN, *Homo sapiens* GCYB2_HUMAN, *Homo sapiens* GCYB1_HUMAN,
Gorilla gorilla Q9N193_9PRIM, *Pongo pygmaeus* Q5RAN8_PONPY, *Pan troglodytes*
 Q9N192_PANTR, *Macaca mulatta* Q9N194_MACMU, *Hylobates lar* Q9N191_HYLLA, *Mus*
musculus Q8BXH3_MOUSE, *Mus musculus* GCYB1_MOUSE, *Mus musculus* Q3UTI4_MOUSE,
Mus musculus Q3UH83_MOUSE, *Mus musculus* Q6XE41_MOUSE, *Mus musculus*
 Q80YP4_MOUSE, *Rattus norvegicus* Q80WX7_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WX8_RAT, *Rattus*
norvegicus Q920Q1_RAT, *Rattus norvegicus* Q54A43_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY0_RAT,
Rattus norvegicus Q80WY4_RAT, *Rattus norvegicus* Q8CH85_RAT, *Rattus norvegicus*
 Q80WY5_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB1_RAT, *Rattus norvegicus* Q8CH90_RAT, *Rattus*
norvegicus Q91XJ7_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WX9_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB2_RAT,
Rattus norvegicus GCYA2_RAT, *Canis familiaris* Q4ZHR9_CANFA, *Bos taurus*
 GCYB1_BOVIN, *Sus scrofa* Q4ZHR7_PIG, *Gryllus bimaculatus* Q59HN5_GRYBI, *Manduca*
sexta O77106_MANSE, *Manduca sexta* O76340_MANSE, *Apis mellifera* Q5UAF0_APIME, *Apis*
mellifera Q5FAN0_APIME, *Apis mellifera* Q6L5L6_APIME, *Anopheles gambiae* str PEST
 Q7PYK9_ANOGA, *Anopheles gambiae* str PEST Q7Q9W6_ANOGA, *Anopheles gambiae* str
 PEST Q7QF31_ANOGA, *Anopheles gambiae* str PEST Q7PS01_ANOGA, *Anopheles gambiae* str
 PEST Q7PFY2_ANOGA, *Anopheles gambiae* Q7KQ93_ANOGA, *Drosophila melanogaster*
 Q24086_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYH_DROME, *Drosophila melanogaster*
 GCY8E_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYDA_DROME, *Drosophila melanogaster*
 GCYDB_DROME, *Drosophila melanogaster* Q9VA09_DROME, *Drosophila pseudoobscura*
 Q29CE1_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C7_DROPS, *Drosophila pseudoobscura*
 Q296C8_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q29BU7_DROPS, *Aplysia californica*
 Q7YWK7_APLCA, *Hemicentrotus pulcherrimus* Q95NK5_HEMPU, *Chlamydomonas reinhardtii*,
 Q5YLC2_CHLRE, *Anabaena sp* Q8YUQ7_ANASP, *Flavobacterium bacterium* BBFL7
 Q26GR8_9BACT, *Psychroflexus torquis* ATCC 700755 Q1VQE5_9FLAO, marine gamma
 proteobacterium HTCC2207 Q1YPI5_9GAMM, marine gamma proteobacterium HTCC2207
 Q1YTK4_9GAMM, *Caulobacter crescentus* Q9A451_CAUCR, *Acidiphilium cryptum* JF-5
 Q2DG60_ACICY, *Rhodobacter sphaeroides* Q3J0U9_RHOS4, *Silicibacter pomeroyi*

10

20

30

【 0 0 3 9 】

【化 8】

Q5LPV1_SILPO, *Paracoccus denitrificans* PD1222, Q3PC67_PARDE, *Silicibacter* sp TM1040
 Q3QNY2_9RHOB, *Jannaschia* sp Q28ML8_JANSC, *Magnetococcus* sp MC-1 Q3XT27_9PROT,
Legionella pneumophila Q5WXP0_LEGPL, *Legionella pneumophila* Q5WTZ5_LEGPL,
Legionella pneumophila Q5X268_LEGPA, *Legionella pneumophila* Q5X2R2_LEGPA, *Legionella*
pneumophila subsp pneumophila Q5ZWM9_LEGPH, *Legionella pneumophila subsp pneumophila*
 Q5ZSQ8_LEGPH, *Colwellia psychrerythraea* Q47Y43_COLP3, *Pseudoalteromonas atlantica* T6c
 Q3CSZ5_ALTAT, *Shewanella oneidensis* Q8EF49_SHEON, *Saccharophagus degradans*
 Q21E20_SACD2, *Saccharophagus degradans* Q21ER7_SACD2, *Vibrio angustum* S14
 Q1ZWE5_9VIBR, *Vibrio vulnificus* Q8DAE2_VIBVU, *Vibrio alginolyticus* 12G01
 Q1VCP6_VIBAL, *Vibrio* sp DAT722 Q2FA22_9VIBR, *Vibrio parahaemolyticus* Q87NJ1_VIBPA,
Vibrio fischeri Q5E1F5_VIBF1, *Vibrio vulnificus* Q7MJS8_VIBVY, *Photobacterium* sp SKA34
 Q2C6Z5_9GAMM, *Hahella chejuensis* Q2SFY7_HAHCH, *Oceanospirillum* sp MED92
 Q2BKV0_9GAMM, *Oceanobacter* sp RED65 Q1N035_9GAMM, *Desulfovibrio desulfuricans*
 Q310U7_DESDG, *Halothermothrix orenii* H 168 Q2AIW5_9FIRM, *Thermoanaerobacter*
tengcongensis Q8RBX6_THETN, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903
 Q2ZH17_CALSA, *Clostridium acetobutylicum* Q97E73_CLOAB, *Alkaliphilus metalliredigenes*
 QYMF Q3C763_9CLOT, *Clostridium tetani* Q899J9_CLOTE, および *Clostridium beijerincki* NCIMB
 8052 Q2WVN0_CLOBE.

10

20

。この方法のいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、ヒトH-NOX
 の Tyr 135、Ser 137、および Arg 139 を含む Y-S-R モチーフの中には
 変異を有さない。

【0040】

他で明記されないか、または状況によって示されない限りは、本明細書中に記載される
 全ての野生型タンパク質および変異タンパク質、ならびに全ての薬学的組成物は、本明細
 書中に記載されるNOの送達方法のうちの任意のものにおいて使用され得る。H-NOX
 タンパク質には、ヘムおよび／またはNOが結合している場合も、また、結合していない
 場合もあり、そしてこれらは、別の分子または部分（例えば、ポリエチレングリコール）
 に共有結合される場合も、また結合されていない場合もある。いくつかの実施形態におい
 ては、H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインと、別のタンパク質（例えば、アル
 ブミン（例えば、ヒト血清アルブミン））の一部または全体が含まれている融合タンパク
 質である。

30

【0041】

1つの態様においては、本発明は、1つ以上のH-NOXタンパク質が含まれているキ
 ャットを特徴とする。いくつかの実施形態においては、本発明により、H-NOXタンパク
 質と、個体にNOを送達するためにこのキットを使用するための説明書が含まれているキ
 ャットが提供される。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNOに対す
 る k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、37℃では約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間
 であり、H-NOXタンパク質の O_2 解離定数は、37℃では少なくとも約 $1 \mu\text{M}$ である
 。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO解離定数は、ヘモグロビ
 ンのNO解離定数の大きさの2桁以内であり、H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘ
 モグロビンのNO反応性の少なくとも10分の1未満である。他で明記されないか、また
 は状況によって示されない限りは、本明細書中に記載される全ての野生型タンパク質お
 よび変異タンパク質、ならびに全ての薬学的組成物は、本明細書中に記載されるキットの
 うちの任意のものにおいて使用され得る。H-NOXタンパク質には、ヘムおよび／または
 NOが結合している場合も、また、結合していない場合もあり、そしてこれらは、別の分

40

50

子または部分（例えば、ポリエチレングリコール）に共有結合される場合も、また結合されていない場合もある。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインと、別のタンパク質（例えば、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン））の一部または全体が含まれている融合タンパク質である。

【0042】

1つの態様においては、本発明は、医薬品として使用されるH-NOXタンパク質（例えば、本明細書中に記載される野生型タンパク質または変異タンパク質のうちのいずれか）を特徴とする。いくつかの実施形態においては、本発明は、個体へのNOの送達方法に使用されるH-NOXタンパク質を特徴とする。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、NOの送達が有効である任意の症状（例えば、心臓血管の症状、高血圧、高血圧によって悪化した症状（例えば、心不全、腎不全、または脳卒中）、血管収縮の症状、脳卒中、あるいはNO機能不全）を治療するために使用される。

10

【0043】

いくつかの実施形態においては、本発明は、医薬品（例えば、個体にNOを送達するための医薬品）の製造のためのH-NOXタンパク質（例えば、本明細書中に記載される野生型タンパク質または変異タンパク質のうちのいずれか）の使用を特徴とする。いくつかの実施形態においては、本発明は、個体へのNOの送達のためのH-NOXタンパク質の使用を特徴とする。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、NOの送達が有効である任意の症状（例えば、心臓血管の症状、高血圧、高血圧によって悪化した症状（例えば、心不全、腎不全、または脳卒中）、血管収縮の症状、脳卒中、あるいはNO機能不全）を治療するために使用される。

20

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1A】図1Aは、NO結合およびO₂結合H-NOXタンパク質の遠位ポケット残基の三次元構造（ヘムの上）の図である。NO結合H-NOXタンパク質とO₂結合H-NOXタンパク質のヘム配位残基もまた示される（ヘムの下）。図1Aは、Pellivena, P. ら、(2004年8月31日)によって報告されたT. tengcongensis H-NOXの三次元構造に基づく。「Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(35):12854-12859。

30

【図1B】図1Bは、H-NOXドメインの構造的特徴を示しているT. tengcongensis H-NOXの三次元構造の立体的な側面図である。タンパク質の折り畳みは、リボン図によって示される。ヘム、2酸素リガンド、および近位ヒスチジンが、ball-and-stickモデルとして示されている。α-ヘリックスは、図5Bに示される命名法にしたがってA-Gと表される。β-鎖は、1-4と表される。図1Bは、Pellivena, P. ら、(2004年8月31日)、「Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(35):12854-12859による。

40

【図1C】図1C~1Hは、T. tengcongensis H-NOXの中の例示的な遠位ポケット残基を説明している、T. tengcongensis H-NOXの三次元構造の図である。図1C~1Hの中に示される以下の残基が、H-NOXの遠位ポケットに含まれている主な残基である：Thr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75、Phe78、Phe82、Tyr140、およびLeu144。これらは、ヘリックスA、D、E、およびGの中に含まれる。図1C~1Hは、PYMOL (DeLano Scientific, LLP) を使用して作成した。

【図1D】図1C~1Hは、T. tengcongensis H-NOX中の例示的な遠位ポケット残基を説明している、T. tengcongensis H-NOXの三次

50

元構造の図である。図1C～1Hの中に示される以下の残基が、H-NOXの遠位ポケットに含まれている主な残基である：Thr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75、Phe78、Phe82、Tyr140、およびLeu144。これらは、ヘリックスA、D、E、およびGの中に含まれる。図1C～1Hは、P Y M O L (De L a n o S c i e n t i f i c, L L P) を使用して作成した。

【図1E】図1C～1Hは、T. t e n g c o n g e n s i s H-NOX中の例示的な遠位ポケット残基を説明している、T. t e n g c o n g e n s i s H-NOXの三次元構造の図である。図1C～1Hの中に示される以下の残基が、H-NOXの遠位ポケットに含まれている主な残基である：Thr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75、Phe78、Phe82、Tyr140、およびLeu144。これらは、ヘリックスA、D、E、およびGの中に含まれる。図1C～1Hは、P Y M O L (De L a n o S c i e n t i f i c, L L P) を使用して作成した。

10

【図1F】図1C～1Hは、T. t e n g c o n g e n s i s H-NOX中の例示的な遠位ポケット残基を説明している、T. t e n g c o n g e n s i s H-NOXの三次元構造の図である。図1C～1Hの中に示される以下の残基が、H-NOXの遠位ポケットに含まれている主な残基である：Thr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75、Phe78、Phe82、Tyr140、およびLeu144。これらは、ヘリックスA、D、E、およびGの中に含まれる。図1C～1Hは、P Y M O L (De L a n o S c i e n t i f i c, L L P) を使用して作成した。

【図1G】図1C～1Hは、T. t e n g c o n g e n s i s H-NOX中の例示的な遠位ポケット残基を説明している、T. t e n g c o n g e n s i s H-NOXの三次元構造の図である。図1C～1Hの中に示される以下の残基が、H-NOXの遠位ポケットに含まれている主な残基である：Thr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75、Phe78、Phe82、Tyr140、およびLeu144。これらは、ヘリックスA、D、E、およびGの中に含まれる。図1C～1Hは、P Y M O L (De L a n o S c i e n t i f i c, L L P) を使用して作成した。

20

【図1H】図1C～1Hは、T. t e n g c o n g e n s i s H-NOX中の例示的な遠位ポケット残基を説明している、T. t e n g c o n g e n s i s H-NOXの三次元構造の図である。図1C～1Hの中に示される以下の残基が、H-NOXの遠位ポケットに含まれている主な残基である：Thr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75、Phe78、Phe82、Tyr140、およびLeu144。これらは、ヘリックスA、D、E、およびGの中に含まれる。図1C～1Hは、P Y M O L (De L a n o S c i e n t i f i c, L L P) を使用して作成した。

30

【図2】図2は、O₂ およびNOに結合するか、または結合すると予想される、以下のH-NOXタンパク質の配列アラインメントである：多数派 (M a j o r i t y) (配列番号1)；C e . g c y - 3 1 (配列番号2)；C e . g c y - 3 3 (配列番号3)；C e . g c y - 3 5 (配列番号4)；D m . C G 1 4 8 8 5 H N O X (配列番号5)；D m . C G 4 1 5 4 H N O X (配列番号6)；M s . B e t a 3 H N O X (配列番号7)；T t H N O X (配列番号8)；およびC a H N O X (配列番号9)。これらのH-NOXタンパク質は、これらがT. t e n g c o n g e n s i s H-NOXのY140に相当する位置にチロシンを有しているとの理由から、O₂ ならびにNOに結合すると予想される。図2で使用したアミノ酸のナンバリングは、H-NOXドメインまたは全長のタンパク質の最初のアミノ酸を、残基番号1として開始した。アラインメントは、プログラムM e g A l i g n においてデフォルトパラメータを使用して作成した。図2において使用した省略形は、図4A～4Dに関して以下に記載される。

40

【図3A】図3A～3Dは、NOに結合するが、O₂ には結合しないか、あるいはそのように予想される以下のH-NOXタンパク質の配列アラインメントである：多数派 (配列番号10)；D m . s G C b e t a 1 タンパク質 (配列番号11)；s G C b e t a 1 タンパク質 (配列番号12)；h s . s G C b e t a 1 タンパク質 (配列番号13)；h s . b e t a 2 タンパク質 (配列番号14)；M s . s G C b e t a 1 タンパク質

50

(配列番号15) ; Mm. sGC beta1タンパク質 (配列番号16) ; Np. beta1 HD一様 (配列番号17) ; Tr. sGC beta1タンパク質 (配列番号18) ; Anopheles_gambiae | XP_310919 (配列番号19) ; Apis_mellifera | MP_001011632 (配列番号20) ; Bt. sGC beta1タンパク質 (配列番号21) ; Chlamydomonas_reinhardtii | AAR02 (配列番号22) ; Oryzias_curvinotus | BAC98396 (配列番号23) ; Oryzias_Latipes | BAA76691 (配列番号24) ; Strongylocentrotus_purpuratus | X (配列番号25) ; および Sus scrofa beta1 | NP_001018042+ (配列番号26) 。アラインメントは、プログラムMegAlignにおいてデフォルトパラメータを使用して作成した。図3A~3Dにおいて使用した省略形は、図4に関して以下に記載される。

【図3B】図3A~3Dは、NOに結合するが、O₂には結合しないか、あるいはそのように予想される以下のH-NOXタンパク質の配列アラインメントである：多数派 (配列番号10) ; Dm. sGC beta1タンパク質 (配列番号11) ; sGC beta1タンパク質 (配列番号12) ; hs. sGC beta1タンパク質 (配列番号13) ; hs. beta2タンパク質 (配列番号14) ; Ms. sGC beta1タンパク質 (配列番号15) ; Mm. sGC beta1タンパク質 (配列番号16) ; Np. beta1 HD一様 (配列番号17) ; Tr. sGC beta1タンパク質 (配列番号18) ; Anopheles_gambiae | XP_310919 (配列番号19) ; Apis_mellifera | MP_001011632 (配列番号20) ; Bt. sGC beta1タンパク質 (配列番号21) ; Chlamydomonas_reinhardtii | AAR02 (配列番号22) ; Oryzias_curvinotus | BAC98396 (配列番号23) ; Oryzias_Latipes | BAA76691 (配列番号24) ; Strongylocentrotus_purpuratus | X (配列番号25) ; および Sus scrofa beta1 | NP_001018042+ (配列番号26) 。アラインメントは、プログラムMegAlignにおいてデフォルトパラメータを使用して作成した。図3A~3Dにおいて使用した省略形は、図4に関して以下に記載される。

【図3C】図3A~3Dは、NOに結合するが、O₂には結合しないか、あるいはそのように予想される以下のH-NOXタンパク質の配列アラインメントである：多数派 (配列番号10) ; Dm. sGC beta1タンパク質 (配列番号11) ; sGC beta1タンパク質 (配列番号12) ; hs. sGC beta1タンパク質 (配列番号13) ; hs. beta2タンパク質 (配列番号14) ; Ms. sGC beta1タンパク質 (配列番号15) ; Mm. sGC beta1タンパク質 (配列番号16) ; Np. beta1 HD一様 (配列番号17) ; Tr. sGC beta1タンパク質 (配列番号18) ; Anopheles_gambiae | XP_310919 (配列番号19) ; Apis_mellifera | MP_001011632 (配列番号20) ; Bt. sGC beta1タンパク質 (配列番号21) ; Chlamydomonas_reinhardtii | AAR02 (配列番号22) ; Oryzias_curvinotus | BAC98396 (配列番号23) ; Oryzias_Latipes | BAA76691 (配列番号24) ; Strongylocentrotus_purpuratus | X (配列番号25) ; および Sus scrofa beta1 | NP_001018042+ (配列番号26) 。アラインメントは、プログラムMegAlignにおいてデフォルトパラメータを使用して作成した。図3A~3Dにおいて使用した省略形は、図4に関して以下に記載される。

【図3D】図3A~3Dは、NOに結合するが、O₂には結合しないか、あるいはそのように予想される以下のH-NOXタンパク質の配列アラインメントである：多数派 (配列番号10) ; Dm. sGC beta1タンパク質 (配列番号11) ; sGC beta1タンパク質 (配列番号12) ; hs. sGC beta1タンパク質 (配列番号13)

10

20

30

40

50

; *hs. beta 2* タンパク質 (配列番号 14); *Ms. sGC beta 1* タンパク質 (配列番号 15); *Mm. sGC beta 1* タンパク質 (配列番号 16); *Np. beta 1* HD-様 (配列番号 17); *Tr. sGC beta 1* タンパク質 (配列番号 18); *Anopheles gambiae | XP_310919* (配列番号 19); *Apis mellifera | MP_001011632* (配列番号 20); *Bt. sGC beta 1* タンパク質 (配列番号 21); *Chlamydomonas reinhardtii | AAR02* (配列番号 22); *Oryzias curvinotus | BAC98396* (配列番号 23); *Oryzias latipes | BAA76691* (配列番号 24); *Strongylocentrotus purpuratus | X* (配列番号 25); および *Sus scrofa beta 1 | NP_001018042+* (配列番号 26)。アラインメントは、プログラム MegAlign においてデフォルトパラメータを使用して作成した。図 3A~3D において使用した省略形は、図 4 に関して以下に記載される。

【図 4A】図 4A~4D は、図 2 および 3A~3D の H-NOX タンパク質の配列アラインメントである：多数派 (配列番号 27); *Dm. sGC beta 1* タンパク質 (配列番号 11); *sGC beta 1* タンパク質 (配列番号 12); *hs. sGC beta 1* タンパク質 (配列番号 13); *hs. beta 2* タンパク質 (配列番号 14); *Mm. sGC beta 1* タンパク質 (配列番号 16); *Np. beta 1* HD-様 (配列番号 17); *Tr. sGC beta 1* タンパク質 (配列番号 18); *Chlamydomonas reinhardtii | AAR02* (配列番号 22); *Oryzias curvinotus | BAC98396* (配列番号 23); *Strongylocentrotus purpuratus | X* (配列番号 25); *Sus scrofa beta 1 | NP_001018042+* (配列番号 26); *gcy-31a* (配列番号 2); *gcy-33* (配列番号 3); *Ca HNOX* (配列番号 9); *T. beta 1* HD-様 (配列番号 8) *HNOX* (配列番号 8); *Ms. sGC beta 3* タンパク質 (配列番号 7); *CG14885* (配列番号 5); および *Dm. sGC* 短縮変異体 (配列番号 6)。アラインメントは、プログラム MegAlign においてデフォルトパラメータを使用して作成した。図 2~4D については、「*Dm. sGC beta 1* タンパク質」は、*Drosophila melanogaster beta 1 H-NOX* を示し; 「*sGC beta 1* タンパク質」は、*Rattus norvegicus beta 1 H-NOX* を示し; 「*hs. sGC beta 1* タンパク質」は、*Homo sapiens beta 1 H-NOX* を示し; 「*hs. beta 2* タンパク質」は、*Homo sapiens beta 2 H-NOX* を示し; 「*Mm. sGC beta 1* タンパク質」は、*Mus musculus beta 1 H-NOX* を示し; 「*Np. beta 1* HD-様」は、*Nostoc punctiforme H-NOX* を示し; 「*Tr. sGC beta 1* タンパク質」は、*Takifugu rubripes beta 1 H-NOX* を示し; 「*Anopheles gambiae | XP_310919*」は、*Anopheles gambiae beta 1 H-NOX* を示し; 「*Apis mellifera | NP_001011632*」は、*Apis mellifera beta 1 H-NOX* を示し; 「*Bt. sGC beta 1* タンパク質」は、*Bos taurus beta 1 H-NOX* を示し; 「*Chlamydomonas reinhardtii | AAR02*」は、*Chlamydomonas reinhardtii beta 1 H-NOX* を示し; 「*Oryzias curvinotus | BAC98396*」は、*Oryzias curvinotus beta 1 H-NOX* を示し; 「*Oryzias latipes | BAA76691*」は、*Oryzias latipes beta 1 H-NOX* を示し; 「*Strongylocentrotus purpuratus | X*」は、*Strongylocentrotus purpuratus beta 1 H-NOX* を示し; 「*Sus scrofa beta 1 | NP_001018042+*」は、*Sus scrofa beta 1 H-NOX* を示し; 「*gcy-31a*」は、*Caenorhabditis elegans Gcy-31a H-NOX* を示し; 「*gcy-33*」は、*Caenorhabditis e*

10

20

30

40

50

legans Gcy-33 H-NOXを示し；「gcy-35」は、Caenorhabditis elegans Gcy-35 H-NOXを示し；「Ca. HNOX」は、Clostridium acetobutylicum H-NOXを示し；「T. beta1 HD-様」は、Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOXを示し；「Ms. sGc beta3タンパク質」は、Manduca sexta β 3 H-NOXを示し；「CG14885」は、Drosophila melanogaster CG14885 H-NOXを示し；「Dm. sGC短縮変異体」は、Drosophila melanogaster Gcy-88-E-S H-NOXを示し；「Dm. CG4154 HNOX」は、Drosophila melanogaster CG4154 H-NOXを示す。

10

【図4B】図4A～4Dは、図2および3A～3DのH-NOXタンパク質の配列アラインメントである：多数派（配列番号27）；Dm. sGC beta1タンパク質（配列番号11）；sGC beta1タンパク質（配列番号12）；hs. sGC beta1タンパク質（配列番号13）；hs. beta2タンパク質（配列番号14）；Mm. sGC beta1タンパク質（配列番号16）；Np. beta1 HD-様（配列番号17）；Tr. sGC beta1タンパク質（配列番号18）；Chlamydomonas_reinhardtii | AAR02（配列番号22）；Oryzias_curvinotus | BAC98396（配列番号23）；Strongylocentrotus_purpuratus | X（配列番号25）；Sus scrofa beta1 | NP_001018042+（配列番号26）；gcy-31a（配列番号2）；gcy-33（配列番号3）；Ca HNOX（配列番号9）；T. beta1 HD-様（配列番号8） HNOX（配列番号8）；Ms. sGc beta3タンパク質（配列番号7）；CG14885（配列番号5）；およびDm. sCG短縮変異体（配列番号6）。アラインメントは、プログラムMegAlignにおいてデフォルトパラメータを使用して作成した。図2～4Dについては、「Dm. sGC beta1タンパク質」は、Drosophila melanogaster β 1 H-NOXを示し；「sGC beta1タンパク質」は、Rattus norvegicus β 1 H-NOXを示し；「hs. sGC beta1タンパク質」は、Homo sapiens β 1 H-NOXを示し；「hs. beta2タンパク質」は、Homo sapiens β 2 H-NOXを示し；「Mm. sGC beta1タンパク質」は、Mus musculus β 1 H-NOXを示し；「Np. beta1 HD-様」は、Nostoc punctiforme H-NOXを示し；「Tr. sGC beta1タンパク質」は、Takifugu rubripes β 1 H-NOXを示し；「Anopheles_gambiae | XP_310919」は、Anopheles gambiae β 1 H-NOXを示し；「Apis_mellifera | NP_001011632」は、Apis mellifera β 1 H-NOXを示し；「Bt. sGC beta1タンパク質」は、Bos taurus β 1 H-NOXを示し；「Chlamydomonas_reinfardtii | AAR02」は、Chlamydomonas reinhardtii β 1 H-NOXを示し；「Oryzias_curvinotus | BAC98396」は、Oryzias curvinotus β 1 H-NOXを示し；「Oryzias_latipes | BAA76691」は、Oryzias latipes β 1 H-NOXを示し；「Strongylocentrotus_purpuratus | X」は、Strongylocentrotus purpuratus β 1 H-NOXを示し；「Sus scrofa beta1 | NP_00101842+」は、Sus scrofa β 1 H-NOXを示し；「gcy-31a」は、Caenorhabditis elegans Gcy-31a H-NOXを示し；「gcy-33」は、Caenorhabditis elegans Gcy-33 H-NOXを示し；「gcy-35」は、Caenorhabditis elegans Gcy-35 H-NOXを示し；「Ca. HNOX」は、Clostridium acetobutylicum H-NOXを示し；

20

30

40

50

「T. beta1 HD-様」は、*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOXを示し；「Ms. sGc beta3タンパク質」は、*Manduca sexta* $\beta 3$ H-NOXを示し；「CG14885」は、*Drosophila melanogaster* CG14885 H-NOXを示し；「Dm. sGC短縮変異体」は、*Drosophila melanogaster* Gcy-88-E-S H-NOXを示し；「Dm. CG4154 HNOX」は、*Drosophila melanogaster* CG4154 H-NOXを示す。

【図4C】図4A～4Dは、図2および3A～3DのH-NOXタンパク質の配列アラインメントである：多数派（配列番号27）；Dm. sGC beta1タンパク質（配列番号11）；sGC beta1タンパク質（配列番号12）；hs. sGC beta1タンパク質（配列番号13）；hs. beta2タンパク質（配列番号14）；Mm. sGC beta1タンパク質（配列番号16）；Np. beta1 HD-様（配列番号17）；Tr. sGC beta1タンパク質（配列番号18）；*Chlamydomonas reinhardtii* | AAR02（配列番号22）；*Oryzias curvinotus* | BAC98396（配列番号23）；*Strongylocentrotus purpuratus* | X（配列番号25）；*Sus scrofa* beta1 | NP_001018042+（配列番号26）；gcy-31a（配列番号2）；gcy-33（配列番号3）；Ca HNOX（配列番号9）；T. beta1 HD-様（配列番号8） HNOX（配列番号8）；Ms. sGc beta3タンパク質（配列番号7）；CG14885（配列番号5）；およびDm. sGC短縮変異体（配列番号6）。アラインメントは、プログラムMegAlignにおいてデフォルトパラメータを使用して作成した。図2～4Dについては、「Dm. sGC beta1タンパク質」は、*Drosophila melanogaster* $\beta 1$ H-NOXを示し；「sGC beta1タンパク質」は、*Rattus norvegicus* $\beta 1$ H-NOXを示し；「hs. sGC beta1タンパク質」は、*Homo sapiens* $\beta 1$ H-NOXを示し；「hs. beta2タンパク質」は、*Homo sapiens* $\beta 2$ H-NOXを示し；「Mm. sGC beta1タンパク質」は、*Mus musculus* $\beta 1$ H-NOXを示し；「Np. beta1 HD-様」は、*Nostoc punctiforme* H-NOXを示し；「Tr. sGC beta1タンパク質」は、*Takifugu rubripes* $\beta 1$ H-NOXを示し；「Anopheles gambiae | XP_310919」は、*Anopheles gambiae* $\beta 1$ H-NOXを示し；「Apis mellifera | NP_001011632」は、*Apis mellifera* $\beta 1$ H-NOXを示し；「Bt. sGC beta1タンパク質」は、*Bos taurus* $\beta 1$ H-NOXを示し；「*Chlamydomonas reinhardtii* | AAR02」は、*Chlamydomonas reinhardtii* $\beta 1$ H-NOXを示し；「*Oryzias curvinotus* | BAC98396」は、*Oryzias curvinotus* $\beta 1$ H-NOXを示し；「*Oryzias latipes* | BAA76691」は、*Oryzias latipes* $\beta 1$ H-NOXを示し；「*Strongylocentrotus purpuratus* | X」は、*Strongylocentrotus purpuratus* $\beta 1$ H-NOXを示し；「*Sus scrofa* beta1 | NP_00101842+」は、*Sus scrofa* $\beta 1$ H-NOXを示し；「gcy-31a」は、*Caenorhabditis elegans* Gcy-31a H-NOXを示し；「gcy-33」は、*Caenorhabditis elegans* Gcy-33 H-NOXを示し；「gcy-35」は、*Caenorhabditis elegans* Gcy-35 H-NOXを示し；「Ca. HNOX」は、*Clostridium acetobutylicum* H-NOXを示し；「T. beta1 HD-様」は、*Thermoanaerobacter tengcongensis* H-NOXを示し；「Ms. sGc beta3タンパク質」は、*Manduca sexta* $\beta 3$ H-NOXを示し；「CG14885」は、*Dros*

10

20

30

40

50

ophila melanogaster CG14885 H-NOXを示し；「Dm. sGC短縮変異体」は、Drosophila melanogaster Gcy-88-E-S H-NOXを示し；「Dm. CG4154 HNOX」は、Drosophila melanogaster CG4154 H-NOXを示す。

【図4D】図4A～4Dは、図2および3A～3DのH-NOXタンパク質の配列アラインメントである：多数派（配列番号27）；Dm. sGC beta1タンパク質（配列番号11）；sGC beta1タンパク質（配列番号12）；hs. sGC beta1タンパク質（配列番号13）；hs. beta2タンパク質（配列番号14）；Mm. sGC beta1タンパク質（配列番号16）；Np. beta1 HD-様（配列番号17）；Tr. sGC beta1タンパク質（配列番号18）；Chlamydomonas__reinhardtii | AAR02（配列番号22）；Oryzias__curvinotus | BAC98396（配列番号23）；Strongylocentrotus__purpuratus | X（配列番号25）；Sus scrofa beta1 | NP_001018042+（配列番号26）；gcy-31a（配列番号2）；gcy-33（配列番号3）；Ca HNOX（配列番号9）；T. beta1 HD-様（配列番号8） HNOX（配列番号8）；Ms. sGc beta3タンパク質（配列番号7）；CG14885（配列番号5）；およびDm. sGC短縮変異体（配列番号6）。アラインメントは、プログラムMegAlignにおいてデフォルトパラメータを使用して作成した。図2～4Dについては、「Dm. sGC beta1タンパク質」は、Drosophila melanogaster $\beta 1$ H-NOXを示し；「sGC beta1タンパク質」は、Rattus norvegicus $\beta 1$ H-NOXを示し；「hs. sGC beta1タンパク質」は、Homo sapiens $\beta 1$ H-NOXを示し；「hs. beta2タンパク質」は、Homo sapiens $\beta 2$ H-NOXを示し；「Mm. sGC beta1タンパク質」は、Mus musculus $\beta 1$ H-NOXを示し；「Np. beta1 HD-様」は、Nostoc punctiforme H-NOXを示し；「Tr. sGC beta1タンパク質」は、Takifugu rubripes $\beta 1$ H-NOXを示し；「Anopheles__gambiae | XP_310919」は、Anopheles gambiae $\beta 1$ H-NOXを示し；「Apis__mellifera | NP_001011632」は、Apis mellifera $\beta 1$ H-NOXを示し；「Bt. sGC beta1タンパク質」は、Bos taurus $\beta 1$ H-NOXを示し；「Chlamydomonas__reinhardtii | AAR02」は、Chlamydomonas reinhardtii $\beta 1$ H-NOXを示し；「Oryzias__curvinotus | BAC98396」は、Oryzias curvinotus $\beta 1$ H-NOXを示し；「Oryzias__latipes | BAA76691」は、Oryzias latipes $\beta 1$ H-NOXを示し；「Strongylocentrotus__purpuratus | X」は、Strongylocentrotus__purpuratus $\beta 1$ H-NOXを示し；「Sus scrofa beta1 | NP_00101842+」は、Sus scrofa $\beta 1$ H-NOXを示し；「gcy-31a」は、Caenorhabditis elegans Gcy-31a H-NOXを示し；「gcy-33」は、Caenorhabditis elegans Gcy-33 H-NOXを示し；「gcy-35」は、Caenorhabditis elegans Gcy-35 H-NOXを示し；「Ca. HNOX」は、Clostridium acetobutylicum H-NOXを示し；「T. beta1 HD-様」は、Thermoanaerobacter tengcongensis H-NOXを示し；「Ms. sGc beta3タンパク質」は、Manduca sexta $\beta 3$ H-NOXを示し；「CG14885」は、Drosophila melanogaster CG14885 H-NOXを示し；「Dm. sGC短縮変異体」は、Drosophila melanogaster Gcy-88-E-S H-NOXを示し；「Dm. CG4154 HNOX」は、Drosop

10

20

30

40

50

hila melanogaster CG4154 H-NOXを示す。

【図5】図5Aは、H-NOXファミリーのメンバーの配列アラインメントである。配列のナンバリングは、T. tengcongensis H-NOXのナンバリングである。不変の残基は「V」で示し、極めて高度に保存されている残基を「s」で示す。T. tengcongensis H-NOXのY140を「H」で示す。他のH-NOXタンパク質中のFe¹⁺-O₂複合体を安定化させ得る予想される遠位ポケットチロシン残基は以下である。Caenorhabditis elegans GCY-35の70位；Drosophila melanogaster CG14885-PAの140位、Caenorhabditis elegans GCY-35の138位；Clostridium acetobutylicumの140位。ナンバリングは、Thermoanaerobacter tengcongensisに従った。登録番号は以下である：Homo sapiens β1 [gi:2746083] (配列番号28)、Rattus norvegicus β1 [gi:27127318] (配列番号29)、Drosophila melanogaster β1 [gi:861203] (配列番号30)、Drosophila melanogaster CG14885-PA [gi:23171476] (配列番号31)、Caenorhabditis elegans GCY-35 [gi:52782806] (配列番号32)、Nostoc punctiforme [gi:23129606] (配列番号33)、Caulobacter crescentus [gi:16127222] (配列番号34)、Shewanella oneidensis [gi:24373702] (配列番号35)、Legionella pneumophila (ORF2) [CUCGC_272624] (配列番号36)、Clostridium acetobutylicum [gi:15896488] (配列番号37)、およびThermoanaerobacter tengcongensis [gi:20807169] (配列番号38)。アラインメントは、プログラムMegAlign、Lasergene、DNA Starを使用して作成した(「dnastar.com/products/megalign.php」にてworld-wide webを参照のこと)。Clustal-Wデフォルトパラメータを使用した。図5Bは、例示的なH-NOXドメインの配列アラインメントである。二次構造の注釈、およびアラインメントの上部のナンバリングは、T. tengcongensis由来のH-NOXドメインに対応する。α-ヘリックスを螺旋で、βシートを矢印で示した。遠位ポケットは、α-ヘリックスαA、αD、αE、およびαGによって定義した。Pubmed/NCBI登録番号は以下である：Ther_tengcongensis gi|20807169| (配列番号39)、Clos_acetobutylicum gi|15896488| (配列番号40)、Clos_tetani GI:75543266 (配列番号41)、Desu_desulfuricans gi|23475919| (配列番号42)、Vibr_vulnificus gi|27361734| (配列番号43)、Caul_crescentus gi|16127222| (配列番号44)、Micr_degradans gi|23027521| (配列番号45)、Vibr_cholerae gi|15601476| (配列番号46)、Shew_oneidensis gi|24373702| (配列番号47)、Rat_beta1_sGC gi|27127318| (配列番号48)、Rat_beta2_sGC gi|21956635| (配列番号49)、Nost_punctiforme gi|23129606| (配列番号50)、およびNost_sp. gi|17229770| (配列番号51)。コンセンサス配列を図5Bの一番下に示す(配列番号52)。アラインメントは、プログラムMULTALIN (Corpet, F. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-10890)を使用して作成し、図5Bは、プログラムESPRIT (Gouet, P. ら、(1999) Bioinformatics 15:305-308)を使用して調製した。

【図6】図6Aおよび6Bは、T. tengcongensis H-NOXドメインの

ヘム環境の三次元構造の図である。図6Aおよび6Bは、Pellicena, P. ら、(2004年8月31日)による。「Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(35):12854-12859。

【図7】図7A~7Fは、Tt H-NOX (図7A)、Tt Y140L (図7B)、Tt W9F-Y140L (図7C)、Tt F78Y-Y140L (図7D)、L2 H-NOXおよびL2 F142Y (図7E)、ならびにβ1(1-385)およびβ1(1-385)I145Y (図7F)についての、嫌氣的還元の後(Fe^{II} 非連結複合体;それぞれのグラフの一番上のライン)、空気への暴露前および後(Fe^{II}-O₂ 複合体;それぞれのグラフの一番下のライン)のH-NOXタンパク質のUV可視スペクトル分析のグラフである。L2 F142Yおよびβ1(1-385)I145YのFe^{II} およびFe^{II}-O₂ 複合体に加えて、還元および空気への暴露後の野生型L2 H-NOXおよびβ1-(1-385) H-NOXのスペクトルを、それぞれ、図7Eおよび7Fの真ん中のラインに示し、これらのタンパク質が、遠位ポケットチロシンの付加前にはO₂には結合しないことを明らかにした。それぞれのパネルの上左隅に記載した2つまたは3つの数字は、グラフの中のラインのピークについての波長を示す。数字は、対応するラインがグラフの中に垂直に現れるように、垂直に記載した。例えば、図7Aの430nmの値は、グラフの一番上のラインについての波長のピークを示し(これは、Fe^{II} 非連結複合体を示す)、図7Aの416nmの値は、グラフの一番下のラインについての波長のピークを示す(これは、Fe^{II}-O₂ 複合体を示す)。空気の存在下での波長のシフトは、このタンパク質がO₂に結合することを示す。空気の存在下では、500nmと600nmの間に二重のピークが形成されることもまた、O₂結合の指標である。図7A~7Fは、Boon, E. M. ら、(2005)「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chem. Biol. 1:53-59による。

【図8A】図8A~8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53~162)。

【図8B】図8A~8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53~162)。

【図8C】図8A~8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53~162)。

【図8D】図8A~8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53~162)。

【図8E】図8A~8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53~162)。

【図8F】図8A~8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53~162)。

【図8G】図8A~8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53~162)。

【図8H】図8A~8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53~162)。

10

20

30

40

50

【図 8 Y】図 8 A～8 D D には、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた（配列番号

50

53～162)。

【図8Z】図8A～8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53～162)。

【図8AA】図8A～8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53～162)。

【図8BB】図8A～8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53～162)。

【図8CC】図8A～8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53～162)。

【図8DD】図8A～8DDには、H-NOXタンパク質をコードする例示的な核酸のポリヌクレオチド配列と、対応するH-NOXタンパク質のアミノ酸配列を含めた(配列番号53～162)。

【発明を実施するための形態】

【0045】

(発明の詳細な説明)

本発明は、H-NOXタンパク質がヘモグロビンよりもはるかに低いNO反応性を有していることの驚くべき発見に一部基づく。この固有の低いNO反応性(および高いNO安定性)は、野生型および変異H-NOXタンパク質を望ましいNO担体とする。なぜなら、H-NOXタンパク質は、O₂の存在下でNOによって不活化される可能性が低いからである。重要なことは、いくつかのH-NOXタンパク質中に遠位ポケットチロシンが存在することである(Pellucena, P. ら、(2004年8月31日))。「Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(35):12854-12859は、望ましくない高いNO反応性を示唆しており、これによりNO担体としての使用が禁止されている。例えば、構造的に類似する遠位ポケットチロシンから類推すると、Mycobacterium tuberculosisヘモグロビンタンパク質はNOと極めて迅速に反応し、感染した宿主によって生産されるNOを効率よく除去し、防御性のNOを回避するために、Mycobacteriumによって使用される(Ouellet, H. ら、(2002年4月30日))。「Truncated Hemoglobin HbN Protects Mycobacterium Bovis From Nitric Oxide」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(9):5902-5907)。しかし、本発明者らは、驚くべきことに、H-NOXタンパク質が、実際には、ヘモグロビンよりもはるかに低いNO反応性を有しており、それによってNO担体としてそれらを使用することが可能となることを発見した。

【0046】

加えて、NO担体としてのH-NOXタンパク質の有用性を、H-NOXタンパク質に結合するNOの量を最大にし、そしてH-NOXタンパク質に結合したO₂とのNOの反応によって酸化されるH-NOXタンパク質の量を減少させるように、NOまたはO₂に対するそれらの親和性を変更することによって改善することができることが発見されている。具体的には、NOまたはO₂に対するH-NOXタンパク質の親和性、およびNOリガンドとO₂リガンドの間を区別するH-NOXタンパク質の能力は、1つ以上のアミノ酸変異の導入によって変化させることができ、H-NOXタンパク質を、所望される親和性でNOまたはO₂に結合するように、状況に応じて仕立て上げることができる。例えば、H-NOXタンパク質によるNOまたはO₂結合についての解離定数または解離速度は

10

20

30

40

50

、1つのアミノ酸変異の導入によって変化させることができる。NOおよび/またはO₂に対する親和性をさらに変化させるためのさらなる変異を導入することができる。したがって、H-NOXタンパク質ファミリーは、NOの送達について、改善されたか、または最適な力学的特性および熱力学的特性を示すように操作することができる。例えば、様々な臨床的用途および産業的用途についてH-NOXタンパク質の有用性を改善する、NO結合についての変化した解離定数および/または解離速度を有する変異H-NOXタンパク質が作成されている。いくつかの実施形態においては、O₂について低い親和性（例えば、37℃で少なくとも約1 μMのO₂解離定数）を有しているH-NOXタンパク質が、H-NOXタンパク質に結合するO₂の量を最少にするために使用され、それにより、NOのH-NOXタンパク質に対する結合が促進され、そしてH-NOXタンパク質のヘムに結合したO₂とのNOの反応が原因で酸化されるH-NOXタンパク質の量が減少される。このH-NOXタンパク質の酸化の減少は治療される個体の臓器、組織、および細胞によって使用され得るNOおよびO₂のより少ない崩壊を生じる。NOに結合し、これを送達するようにH-NOXタンパク質を調整する能力は、現在の血管拡張剤の重要な欠点に取り組み、そしてこれを克服する治療的手段である。したがって、本発明により、NOの送達のためのタンパク質、組成物、キット、および方法が提供される。

【0047】

NOの送達においてH-NOXタンパク質を使用することについては多くの利点がある。有機硝酸塩は、耐性が原因で限られた時間の間について有効である。H-NOXタンパク質は、硝酸塩のNOへの生体内変換の必要なく個体に直接NOを送達するので、NO担体としてのH-NOXタンパク質の有効性は、この生体内変換経路の阻害によっては制限されない。ヘモグロビンをベースとするNO担体についての主要な限界は、O₂に対するそれらの高い親和性と、NOによって不活化されるそれらの傾向である。上記のように、ヘモグロビンをベースとする担体によるNOのなおさらに低いレベルの分解は、血管と臓器の緊張性の（tonic）休止状態に対して深刻な影響を有し得、高血圧と胃腸障害を導く可能性がある。分子内および分子間架橋が、酸素担体として使用される場合の、ヘモグロビンをベースとする媒体の毒性を最小にするために使用されている（「Blood Substitutes」, R. Winslow編, Academic Press, 2006）。これらの修飾によっては、ヘモグロビンの管外遊出に関する深刻な毒性の問題のうちのいくつかが克服されるが、高いNO反応性は残る。対照的に、H-NOXタンパク質は、ヘモグロビンよりもはるかに低いNO反応性を有する。この低い反応性によって導かれるNO、O₂、およびH-NOXタンパク質の分解は少ない。なぜなら、NOは、H-NOXタンパク質に結合したO₂とはほとんど反応しないからである。NOに対して所望される解離定数と解離速度を有しているH-NOXタンパク質を選択する能力もまた、多すぎるNOが放出されること（高血圧を引き起こす）を防ぐことによって副作用を最小にすることができ、そして望ましくない部位（例えば、血管収縮していない部位）でNOが放出されることを防ぐことができる。最も小さいNO反応性でNOに結合し、これを送達するようにH-NOXタンパク質を操作することにより、新しい血液ガスNO担体が提供される。ここでは、H-NOXタンパク質が、NOによって不活化されることなくNOを送達する。これらのH-NOXタンパク質、組成物、キット、および方法は本明細書中以下にさらに記載される。

【0048】

NOの送達のためには、操作されたH-NOXタンパク質は、現在のニトロ系血管拡張剤に伴う耐性についてのなかなか解決できない問題を克服する重要な代換えを提示する。NOの送達媒体としてのH-NOXタンパク質の使用により、慢性高血圧によって悪化した疾患を治療するための新しい治療的手段が提供される。

【0049】

H-NOXタンパク質

H-NOXタンパク質ファミリーの概要

他で明記されない限りは、全ての野生型H-NOXタンパク質または変異H-NOXタ

10

20

30

40

50

ンパク質を、本明細書中に記載される組成物、キット、および方法において使用することができる。本明細書中で使用される場合は、「H-NOXタンパク質」は、H-NOXドメイン（ヘム酸化窒素および酸素結合ドメイン（Heme-Nitric oxide and OXygen binding domain）について命名された）を有しているタンパク質を意味する。H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインに加えて、1つ以上の他のドメインを含む場合も、また含まない場合もある。H-NOXタンパク質は、高度に保存されており、十分に特性決定されているヘムタンパク質のファミリーのメンバーである（Iyer, L. M. ら、（2003年2月3日）「Ancient Conserved Domains Shared by Animal Soluble Guanylyl Cyclases And Bacterial Signaling Proteins」, BMC Genomics 4 (1) : 5 ; Karow, D. S. ら、（2004年8月10日）「Spectroscopic Characterization of the Soluble Guanylate Cyclase-Like Heme Domains From Vibrio Cholerae And Thermoanaerobacter Tengcongensis」, Biochemistry 43 (31) : 10203-10211 ; Boon, E. M. ら、（2005）「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chem. Biol. 1 : 53-59 ; Boon, E. M. ら、（2005年10月）「Ligand Discrimination in Soluble Guanylate Cyclase and the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins」, Curr. Opin. Chem. Biol. 9 (5) : 441-446 ; Boon, E. M. ら、（2005）「Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors」, J. Inorg. Biochem. 99 (4) : 892-902）。H-NOXタンパク質はまた、Pfam 07700タンパク質またはHNOBタンパク質とも呼ばれる（Pfam-タンパク質ドメインファミリーのアラインメントのAデータベース、およびHidden Markov Models, Copyright (C) 1996-2006 The Pfam Consortium; GNU LGPL Free Software Foundation, Inc., 59 Temple Place-Suite 330, Boston, MA 02111-1307, USA）。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、6個の α ヘリックス、それに続く2つの β 鎖、続く1つの α ヘリックス、続く2つの β 鎖が含まれている二次構造を有するか、あるいはそれらを有すると予想される。H-NOXタンパク質は、ヘムに結合することができるアポタンパク質であっても、また、ヘムが結合したホロタンパク質であってもよい。H-NOXタンパク質は、ヘム基に共有結合することができ、また共有結合以外で結合することもできる。いくつかのH-NOXタンパク質はNOに結合するがO₂には結合せず、他のH-NOXタンパク質はNOとO₂の両方に結合する。単離されている通性好気性菌に由来するH-NOXドメインはNOに結合するが、O₂には結合しない。偏性好気性原核生物、C. elegans、およびD. melanogasterに由来するH-NOXタンパク質はNOにも、O₂にも結合する。哺乳動物は2つのH-NOXタンパク質： β 1と β 2を有している。マウス、ラット、ウシ、およびヒトのH-NOX配列のアラインメントは、これらの種が>99%の同一性を共有していることを示している。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のH-NOXドメイン、または完全なH-NOXタンパク質は、自然界に存在しているThermoanaerobacter tengcongensis H-NOXタンパク質または自然界に存在しているsGCタンパク質（例えば、自然界に存在しているsGC β 1タンパク質）の対応する領域に対して、少なくとも約10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、95、97、98、99、または99.5%同一である。本明細書中にさらに議論されるように、H-NOXタンパク質は、状況に応じ

10

20

30

40

50

て、対応する自然界に存在しているH-NOXタンパク質と比較して1つ以上の変異を含む場合がある。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインに加えて、1つ以上のドメインを含む。特定の実施形態においては、H-NOXタンパク質は、別のタンパク質に由来する1つ以上のドメイン、または別のタンパク質の完全な配列を含む。例えば、H-NOXタンパク質は、H-NOXドメインと、別のタンパク質（例えば、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン））の一部または全体が含まれている融合タンパク質であり得る。いくつかの実施形態においては、H-NOXドメインだけが存在する。

【0050】

*Thermoanaerobacter tengcongensis*に由来する原核生物のO₂結合H-NOXの結晶構造（Nioche, P. ら、（2004年11月26日）「Femtomolar Sensitivity of a NO Sensor From *Clostridium Botulinum*」, *Science* 306（5701）：1550-1553；Pellicena, P. ら、（2004年8月31日）「Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclase」, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101（35）：12854-12859）は、チロシン側鎖のヒドロキシル基が、Fe^{II}-O₂部分に対して重要な意味を持つH-結合を形成することを示している。この遠位ポケットの水素結合ネットワーク（主にY140が関与している）は、Fe^{II}-O₂複合体を安定化させる（図6B）。このチロシンは、O₂を識別し、NOにしか結合しないH-NOXタンパク質中には存在しない。例えば、この水素結合ネットワークは、sGCおよび好気性原核生物に由来するH-NOXタンパク質中には存在しないと予想され、このことは、これが、これらのヘムタンパク質によって提示されるO₂に対する顕著なリガンド選択性における極めて重要な分子因子であることを示唆している。図7A～7Gは、NOに結合するが、O₂には結合しない野生型H-NOXタンパク質の遠位ポケット中へのチロシンの付加により、変異H-NOXタンパク質をO₂に結合させることができることを明らかに示している。したがって、折り畳まれたH-NOXヘムの遠位ヘムポケットの中のチロシンは、O₂結合をオンまたはオフに切り替えるためのスイッチのような役割を担う。

【0051】

図6Aおよび6Bに示されるように、ポルフィリンの構造はかなり湾曲している。図6Aに示されるように、保存されているY-S-Rモチーフは、ヘム基のプロピオン酸側鎖と水素結合相互作用を形成する。図6Bに示されるように、保存されているH102はヘムに対する近位リガンドである（図6B）。

【0052】

本明細書中で使用される場合は、「タンパク質」は、自然界の供給源から単離されたかどうか、組み換え技術によって生産されたかどうか、または化学合成されたかどうかにはかかわらず、タンパク質とタンパク質の断片を含む。タンパク質は、1つ以上の修飾（例えば、翻訳後修飾（例えば、グリコシル化など）、または任意の他の修飾（例えば、PEG化など））を有する場合がある。タンパク質は、1つ以上の自然界には存在しないアミノ酸（例えば、側鎖の修飾を有しているアミノ酸）を含む場合がある。様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質は、少なくとも約50、100、150、181、200、250、300、350、400以上のアミノ酸を有する。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、約50～約600のアミノ酸、例えば、約100～約500のアミノ酸、約150～約400のアミノ酸、約150～約300のアミノ酸、または約175～約200のアミノ酸が含まれ得る。

【0053】

H-NOXタンパク質の供給源

任意の属または種に由来するH-NOXタンパク質を、本明細書中に記載される組成物

、キット、および方法において使用することができる。様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質は、哺乳動物（例えば、霊長類（例えば、ヒト、サル、ゴリラ、類人猿、キツネザルなど）、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、もしくはネコ）、昆虫、酵母、または細菌に由来するタンパク質であるか、あるいは、そのようなタンパク質から誘導される。例示的な哺乳動物のH-NOXタンパク質としては、野生型のヒトおよびラットの可溶性グアニル酸シクラーゼ（例えば、 $\beta 1$ サブユニット）が挙げられる。H-NOXタンパク質の例としては、野生型の哺乳動物H-NOXタンパク質（例えば、H, sapiens、M. musculus、C. familiaris、B. taurus、およびR. norvegicus）；および野生型の哺乳動物以外の脊椎動物のH-NOXタンパク質（例えば、X. laevis、O. latipes、O. curivatus、およびF. rubripes）が挙げられる。哺乳動物以外の野生型のNO結合H-NOXタンパク質の例としては、D. melanogaster、A. gambiae、およびM. sextaの野生型H-NOXタンパク質が挙げられる。哺乳動物以外の野生型のO₂結合H-NOXタンパク質の例としては、C. elegans gcy-31、gcy-32、gcy-33、gcy-34、gcy-35、gcy-36、およびgcy-37；D. melanogaster CG14885、CG14886、およびCG4154；ならびにM. sexta beta-3の野生型H-NOXタンパク質が挙げられる：原核生物の野生型H-NOXタンパク質の例としては、T. tengcongensis、V. cholera、V. fischeri、N. punctiforme、D. desulfuricans、L. pneumophila 1、L. pneumophila 2、およびC. acetobacteriumが挙げられる。

【0054】

例示的なH-NOXタンパク質についてのNCBI登録番号としては以下が挙げられる：Homo sapiens $\beta 1$ [gi:2746083]、Rattus norvegicus $\beta 1$ [gi:27127318]、Drosophila melanogaster $\beta 1$ [gi:861203]、Drosophila melanogaster CG14885-PA [gi:23171476]、Caenorhabditis elegans GCY-35 [gi:52782806]、Nostoc punctiforme [gi:23129606]、Caulobacter crescentus [gi:16127222]、Shewanella oneidensis [gi:24373702]、Legionella pneumophila (ORF2) [CUCGC_272624]、Clostridium acetobutylicum [gi:15896488]、およびThermoanaerobacter tengcongensis [gi:20807169]。

【0055】

例示的なH-NOXタンパク質にはまた、それらの種の省略形とGenbank識別番号にしたがってそれらの遺伝子名によって列挙される以下のH-NOXタンパク質も含む（例えば、2006年5月21日、2006年5月22日、2007年5月21日、または2007年5月22日に入手した以下のタンパク質配列、これらはその全体が参照としてそれぞれ本明細書中に組み込まれる）：Npun5905__Npu__23129606、alr2278__Ana__17229770、SO2144__Sone__24373702、Mdeg1343__Mde__23027521、VCA0720__Vch__15601476、CC2992__Ccr__16127222、Rsph2043__Rhsp__22958463 (gi:46192757)、Mmc10739__Mcs__22999020、Tar4__Tte__20807169、Ddes2822__Dde__23475919、CAC3243__Cac__15896488、gcy-31__Ce__17568389、CG14885__Dm__24647455、GUCY1B3__Hs__4504215、HpGCS-beta1__Hpul__14245738、Gycbeta100B__Dm__24651577、CG4154__Dm__24646993 (gi:NP_650424.2、gi:62484298)、gcy-32__Ce__13539160、

gcy-36_Ce_17568391 (gi:32566352、gi:86564713)、gcy-35_Ce-17507861 (gi:71990146)、gcy-37_Ce_17540904 (gi:71985505)、GCY1a3_Hs_20535603、GCY1a2-Hs_899477、またはGYCa-99B_Dm_729270 (gi:68067738) (Lakshminarayanら、(2003)、「Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins」、BMG Genomics 4:5-13)。これらの名称の中で使用される種の省略形には以下を含む：Ana-Anabaena Sp; Ccr-Caulobacter crescentus; Cac-Clostridium acetobutylicum; Dde-Desulfovibrio desulfuricans; Mcsp-Magnetococcus sp.; Mde-Microbulbifer degradans; Npu-Nostoc punctiforme; Rhsp-Rhodobacter sphaeroides; Sone-Shewanella oneidensis; Tte-Thermoaerobacter tengcongensis; Vch-Vibrio cholerae; Ce-Caenorhabditis elegans; Dm-Drosophila melanogaster; Hpul-Hemicentrotus pulcherrimus; Hs-Homo sapiens。

10

【0056】

20

他の例示的なH-NOXタンパク質には、それらの生物名とPfamデータベース登録番号によって列挙される以下のH-NOXタンパク質を含む（例えば、2006年5月21日、2006年5月22日、2007年5月17日、2007年5月21日、または2007年5月22日に入手した以下のタンパク質配列、これらは、それらの全体がそれぞれ参照として本明細書中に組み込まれる）：

【0057】

【化9】

Caenorhabditis briggsae

Q622M5_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61P44_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*

Q61R54_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q61V90_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*

Q61A94_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae* Q60TP4_CAEBR, *Caenorhabditis briggsae*

30

【0058】

【化 1 0】

Q60M10_CAEER, *Caenorhabditis elegans* GCY37_CAEEL, *Caenorhabditis elegans*
 GCY31_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY36_CAEEL, *Caenorhabditis elegans*
 GCY32_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY35_CAEEL, *Caenorhabditis elegans*
 GCY34_CAEEL, *Caenorhabditis elegans* GCY33_CAEEL, *Oryzias curvinotus* Q7T040_ORYCU,
Oryzias curvinotus Q75WF0_ORYCU, *Oryzias latipes* P79998_ORYLA, *Oryzias latipes*
 Q7ZSZ5_ORYLA, *Tetraodon nigroviridis* Q4SW38_TETNG, *Tetraodon nigroviridis*
 Q4RZ94_TETNG, *Tetraodon nigroviridis* Q4S6K5_TETNG, *Fugu rubripes* Q90VY5_FUGRU,
Xenopus laevis Q6INK9_XENLA, *Homo sapiens* Q5T8J7_HUMAN, *Homo sapiens*
 GCYA2_HUMAN, *Homo sapiens* GCYB2_HUMAN, *Homo sapiens* GCYB1_HUMAN, *Gorilla*
gorilla Q9N193_9PRIM, *Pongo pygmaeus* Q5RAN8_PONPY, *Pan troglodytes* Q9N192_PANTR,
Macaca mulatta Q9N194_MACMU, *Hylobates lar* Q9N191_HYLLA, *Mus musculus*
 Q8BXH3_MOUSE, *Mus musculus* GCYB1_MOUSE, *Mus musculus* Q3UT14_MOUSE, *Mus*
musculus Q3UH83_MOUSE, *Mus musculus* Q6XE41_MOUSE, *Mus musculus* Q80YP4_MOUSE,
Rattus norvegicus Q80WX7_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WX8_RAT, *Rattus norvegicus*
 Q920Q1_RAT, *Rattus norvegicus* Q54A43_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY0_RAT, *Rattus*
norvegicus Q80WY4_RAT, *Rattus norvegicus* Q8CH85_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WY5_RAT,
Rattus norvegicus GCYB1_RAT, *Rattus norvegicus* Q8CH90_RAT, *Rattus norvegicus*
 Q91XJ7_RAT, *Rattus norvegicus* Q80WX9_RAT, *Rattus norvegicus* GCYB2_RAT, *Rattus*
norvegicus GCYA2_RAT, *Canis familiaris* Q4ZHR9_CANFA, *Bos taurus* GCYB1_BOVIN, *Sus*
scrofa Q4ZHR7_PIG, *Gryllus bimaculatus* Q59HN5_GRYBI, *Manduca sexta* O77106_MANSE,
Manduca sexta O76340_MANSE, *Apis mellifera* Q5UAF0_APIME, *Apis mellifera*
 Q5FAN0_APIME, *Apis mellifera* Q6L5L6_APIME, *Anopheles gambiae* str PEST
 Q7PYK9_ANOGA, *Anopheles gambiae* str PEST Q7Q9W6_ANOGA, *Anopheles gambiae* str
 PEST Q7QF31_ANOGA, *Anopheles gambiae* str PEST Q7PS01_ANOGA, *Anopheles gambiae* str
 PEST Q7PFY2_ANOGA, *Anopheles gambiae* Q7KQ93_ANOGA, *Drosophila melanogaster*
 Q24086_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYH_DROME, *Drosophila melanogaster*
 GCY8E_DROME, *Drosophila melanogaster* GCYDA_DROME, *Drosophila melanogaster*
 GCYDB_DROME, *Drosophila melanogaster* Q9VA09_DROME, *Drosophila pseudoobscura*
 Q29CE1_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q296C7_DROPS, *Drosophila pseudoobscura*
 Q296C8_DROPS, *Drosophila pseudoobscura* Q29BU7_DROPS, *Aplysia californica*

【 0 0 5 9】

【化 1 1】

Q7YWK7_APLCA, *Hemicentrotus pulcherrimus* Q95NK5_HEMPU, *Chlamydomonas reinhardtii*,
 Q5YLC2_CHLRE, *Anabaena* sp Q8YUQ7_ANASP, *Flavobacterium bacterium BBFL7*
 Q26GR8_9BACT, *Psychroflexus torquis* ATCC 700755 Q1VQE5_9FLAO, marine gamma
 proteobacterium HTCC2207 Q1YPI5_9GAMM, marine gamma proteobacterium HTCC2207
 Q1YTK4_9GAMM, *Caulobacter crescentus* Q9A451_CAUCR, *Acidiphilium cryptum* JF-5
 Q2DG60_ACICY, *Rhodobacter sphaeroides* Q3J0U9_RHOS4, *Silicibacter pomeroyi*
 Q5LPV1_SILPO, *Paracoccus denitrificans* PD1222, Q3PC67_PARDE, *Silicibacter* sp TM1040
 Q3QNY2_9RHOB, *Jannaschia* sp Q28ML8_JANSC, *Magnetococcus* sp MC-1 Q3XT27_9PROT,
Legionella pneumophila Q5WXP0_LEGPL, *Legionella pneumophila* Q5WTZ5_LEGPL,
Legionella pneumophila Q5X268_LEGPA, *Legionella pneumophila* Q5X2R2_LEGPA, *Legionella*
pneumophila subsp *pneumophila* Q5ZWM9_LEGPH, *Legionella pneumophila* subsp *pneumophila*
 Q5ZSQ8_LEGPH, *Colwellia psychrerythraea* Q47Y43_COLP3, *Pseudoalteromonas atlantica* T6c
 Q3CSZ5_ALTAT, *Shewanella oneidensis* Q8EF49_SHEON, *Saccharophagus degradans*
 Q21E20_SACD2, *Saccharophagus degradans* Q21ER7_SACD2, *Vibrio angustum* S14
 Q1ZWES_9VIBR, *Vibrio vulnificus* Q8DAE2_VIBVU, *Vibrio alginolyticus* 12G01
 Q1VCP6_VIBAL, *Vibrio* sp DAT722 Q2FA22_9VIBR, *Vibrio parahaemolyticus* Q87NJI_VIBPA,
Vibrio fischeri Q5E1F5_VIBF1, *Vibrio vulnificus* Q7MJS8_VIBVY, *Photobacterium* sp SKA34
 Q2C6Z5_9GAMM, *Hahella chejuensis* Q2SFY7_HAHCH, *Oceanospirillum* sp MED92
 Q2BKV0_9GAMM, *Oceanobacter* sp RED65 Q1N035_9GAMM, *Desulfovibrio desulfuricans*
 Q310U7_DESDG, *Halothermothrix orenii* H 168 Q2AIW5_9FIRM, *Thermoanaerobacter*
tengcongensis Q8RBX6_THETN, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* DSM 8903
 Q2ZH17_CALSA, *Clostridium acetobutylicum* Q97E73_CLOAB, *Alkaliphilus metalliredigenes*
 QYMF Q3C763_9CLOT, *Clostridium tetani* Q899J9_CLOTE, および *Clostridium beijerincki* NCIMB
 8052 Q2WVN0_CLOBE

10

20

30

これらの配列は、本明細書中に記載される Pfam データベースを使用した H-NOX タンパク質ファミリーに属するとのこれらのタンパク質の同定に基いて、H-NOX タンパク質をコードすると予想した。

【0060】

さらに別の H-NOX タンパク質および核酸（これらは、本明細書中に記載される薬学的組成物および方法での使用に適している可能性がある）は、標準的な方法を使用して同定することができる。例えば、標準的な配列アラインメントおよび／または構造予測プログラムを使用して、既知の H-NOX タンパク質および核酸のものとのそれらの一次タンパク質構造および／または予想されるタンパク質二次構造の類似性に基いて、さらに別の H-NOX タンパク質および核酸を同定することができる。例えば、Pfam データベースでは、定義されたアラインメントアルゴリズムと、Hidden Markov Models（例えば、Pfam 21.0）が使用されて、タンパク質がファミリー（例えば、H-NOX タンパク質ファミリー）に分類される（タンパク質ドメインファミリーのアラインメントの Pfam-A データベース、および Hidden Markov Models, Copyright (C) 1996-2006 The Pfam Consortium; GNU LGPL Free Software Foundation, Inc., 59 Temple Place-Suite 330, Boston, MA 02111-1307, USA）。標準的なデータベース（例えば、swissprot-trembl データベース（「expasy.org」にて world-wide web、Swiss Institute of Bioinformatics

40

50

Swiss-Prot group CMU-1 rue Michel Servet CH-1211 Geneva 4, Switzerland) もまた、H-NOXタンパク質ファミリーのメンバーを同定するために使用することができる。H-NOXタンパク質の二次構造および／または三次構造は、標準的な構造予測プログラム（例えば、Predict Protein (630 West, 168 Street, BB217, New York, N. Y. 10032, USA) のデフォルト設定を使用して予測することができる。あるいは、H-NOXタンパク質の実際の二次構造および／または三次構造は、標準的な方法を使用して決定することができる。

【0061】

いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOXの中の以下の遠位ポケット残基のうちの任意のものに対応する位置に同じアミノ酸を有する：Thr4、Ile5、Thr8、Trp9、Trp67、Asn74、Ile75、Phe78、Phe82、Tyr140、Leu144、または上記の2つ以上の任意の組み合わせ。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、それらのアミノ酸配列の配列アラインメントに基づいて、T. tengcongensis H-NOXのPro115またはArg135に対応する位置に、それぞれ、プロリンまたはアルギニンを有する。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、R. norvegicus $\beta 1$ H-NOXのHis5に対応するヒスチジンを有する。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、6個の α ヘリックス、それに続く2つの β 鎖、続く1つの α ヘリックス、続く2つの β 鎖が含まれている二次構造を有するか、あるいはそれらを有すると予想される。この二次構造は、H-NOXタンパク質について報告されている。

【0062】

所望される場合には、新しく同定されたH-NOXタンパク質を、それがヘムに結合するかどうかを決定するために、標準的な方法を使用して試験することができる。NO担体として機能するH-NOXタンパク質の能力は、H-NOXタンパク質がNOに結合するかどうかを、標準的な方法（例えば、本明細書中に記載される方法）を使用して決定することによって試験することができる。所望される場合には、本明細書中に記載される変異のうちの1つ以上を、NO担体としてのその特性を最適化させるために、H-NOXタンパク質に導入することができる。例えば、そのNO解離定数、NOに対する k_{off} 、NOに対する k_1 、NOに対する k_2 、 O_2 解離定数、NO安定性、NO反応性、ヘム自動酸化速度、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させるための少なくとも1つの変異を、導入することができる。標準的な技術（例えば、本明細書中に記載される技術）を使用して、これらのパラメータを測定することができる。

【0063】

本明細書中で議論される場合には、変異H-NOXタンパク質（例えば、以下に議論されるクラスIおよびクラスII変異体）を、これらの、または他の自然界での野生型の供給源配列（例えば、配列番号2～4Dもしくは8A～8DDに列挙される配列、または本明細書中に記載される任意の他の配列）から突然変異誘発によって導くことができる。本明細書中で使用される場合は、「由来する」は、その中に1つ以上の変異が導入されるタンパク質の供給源をいう。例えば、「哺乳動物タンパク質に由来する」タンパク質は、野生型（すなわち、自然界に存在している配列）の哺乳動物タンパク質の配列に1つ以上の変異を導入することによって生じる目的のタンパク質を意味する。

【0064】

変異H-NOXタンパク質

本明細書中でさらに議論されるように、H-NOXタンパク質は1つ以上の変異（例えば、対応する野生型タンパク質のものと比較して、NO解離定数、NOに対する k_{off} 、 O_2 解離定数、 O_2 に対する k_{off} 、ヘム自動酸化速度、NO反応性、NO安定性、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを変化させる変異）を含む場合がある。操作されたH-NOXタンパク質のパネルは、本明細書中に記載され、加えて、当業者に公知の

技術を使用して本明細書中に提供される教示を参照して、ランダムな突然変異誘発、それに続く必要な、もしくは所望される解離定数、解離速度、NO反応性、安定性、生理適合性、または上記の2つ以上の任意の組み合わせについての経験的スクリーニングによって作成することができる。あるいは、突然変異誘発は、H-NOXタンパク質の実験によって決定された三次元構造または予測された三次元構造から明らかである遠位ポケット残基（本明細書中の図1A；および例えば、Boon, E. M. ら、(2005)「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chemical Biology 1:53-59（これは、特に野生型および変異H-NOXタンパク質の配列に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる）を参照のこと）、あるいは、配列アラインメントから同定された進化的に保存されている残基（本明細書中の図2～4D；および例えば、Boon, E. M. ら、(2005)「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chemical Biology 1:53-59（これは、特に野生型および変異H-NOXタンパク質の配列に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる）を参照のこと）のような、特定の領域または残基に対して選択的に標的化させることができる。

【0065】

本明細書中で使用される場合は、「変異タンパク質」は、自然界に存在しているタンパク質と比較して1つ以上の変異を有しているタンパク質を意味する。1つの実施形態においては、変異タンパク質は、自然界に存在している全てのタンパク質の配列とは異なる配列を有する。様々な実施形態においては、変異タンパク質のアミノ酸配列は、自然界に存在しているタンパク質の対応する領域に対して、少なくとも約10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、95、97、98、99、または99.5%同一である。いくつかの実施形態においては、変異タンパク質は、全長のタンパク質に由来する少なくとも約25、50、75、100、150、200、300、または400個のいずれかの連続するアミノ酸が含まれているタンパク質断片である。配列同一性は、例えば、配列分析ソフトウェアをその中に特定されているデフォルトパラメータとともに使用して測定することができる（例えば、Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison WI 53705）。このソフトウェアプログラムは、様々なアミノ酸の置換、欠失、および他の修飾に対して、相同性の程度を割り当てることにより類似する配列を一致させる。

【0066】

本明細書中で使用される場合は、「変異」は、自然界に存在している参照核酸またはアミノ酸配列の中の変化を意味する。例示的な核酸変異は、挿入、欠失、フレームシフト変異、サイレント変異、ナンセンス変異、またはミッセンス変異を含む。いくつかの実施形態においては、核酸変異はサイレント変異ではない。例示的なタンパク質変異としては、1つ以上のアミノ酸の挿入（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸の挿入）、1つ以上のアミノ酸の欠失（例えば、N末端、C末端および／もしくは内部残基の欠失、例えば、少なくとも約5、10、15、25、50、75、100、150、200、300個以上のアミノ酸の欠失、または約5、10、15、25、50、75、100、150、200、300、もしくは400個のアミノ酸の欠失）、1つ以上のアミノ酸の置換（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸の置換）、あるいは上記の2つ以上の組み合わせが挙げられる。H-NOXタンパク質の例示的な機能的短縮はβ1配列の残基1～385を含む。いくつかの実施形態においては、変異タンパク質は、自然界に存在しているタンパク質と比較して少なくとも1つのアミノ酸変化を有する。いくつかの実施形態においては、変異体核酸配列は、自然界に存

在しているタンパク質と比較して少なくとも1つのアミノ酸変化を有しているタンパク質をコードする。いくつかの実施形態においては、核酸は、自然界に存在しているタンパク質と同じアミノ酸配列を有しているタンパク質をコードする自然界に存在している核酸の縮重バージョンではない。特定のアミノ酸変異に関して使用される命名法は、最初に野生型アミノ酸を特定し、続いて、残基番号、最後に置換残基を識別する。例えば、Y140Lは、残基番号140のチロシンがロイシンで置き換えられることを意味する。

【0067】

「進化的に保存されている変異」は、同じタンパク質ファミリーの中の別のタンパク質の対応する位置における、1つのアミノ酸による1つのタンパク質中の1つのアミノ酸の置換である。例示的な進化的に保存されている変異（クラスI変異とも記載される）が、表IAに列挙される。表IAにおいては、変異は、ヒトβ1 H-NOXの配列にしたがってナンバリングされている／注釈が付けられているが、全てのH-NOX配列について同様である。したがって、任意の他のH-NOXタンパク質中の対応する位置を、示された残基になるように変異させることができる。例えば、ヒトβ1 H-NOXのPhe4を、他のH-NOXタンパク質がこの位置にチロシンを有しているので、チロシンに変異させることができる。対応しているフェニルアラニン残基を、任意の他のH-NOXタンパク質中でチロシンに変異させることができる。特定の実施形態においては、1つ以上の変異を進化的に保存されている残基に限定される。いくつかの実施形態においては、1つ以上の変異には、少なくとも1つの進化的に保存されている変異、および少なくとも1つの進化的には保存されていない変異が含まれ得る。所望される場合には、これらの変異H-NOXタンパク質は、本明細書中に提供される教示を参照して、NO/O₂解離定数、NO反応性、安定性、および生理適合性についての経験的なスクリーニングが行われる。

【0068】

表1A. 進化的に保存されている残基を標的化する例示的なクラスI H-NOX変異

【0069】

【表1A】

F4Y	Q30G	I145Y
F4L	E33P	I145H
H7G	N61G	K151E
A8E	C78H	I157F
L9W	A109F	E183F

いくつかの実施形態においては、変異は遠位ポケットの変異であり、例えば、α-ヘリックスA、D、E、またはGの中の残基の変異である（Pellucena, P. ら、(2004年8月31日)「Crystal Structure of An Oxygen-Binding Heme Domain Related to Soluble Guanylate Cyclases」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(35):12854-12859)。例示的な遠位ポケット変異（クラスII変異とも記載される）は、表IBに列挙される。表IBにおいては、変異は、ヒトβ1 H-NOXの配列にしたがって番号付けされる／注釈が付けられるが、全てのH-NOX配列について同様である。いくつかの置換によっては、それぞれ記載される残基で可変性の変異が提供されるので、個々の示された位置の残基を、任意の他の自然界に存在しているアミノ酸または自然界には存在しないアミノ酸（「X」で示される）に変化させることができる。そのような変異によっては、様々な所望される親和性、安定性、および反応性の特性を有しているH-NOXタンパク質を得ることができる。

【0070】

表1B. 遠位ポケット残基を標的化する例示的なクラスII H-NOX変異

【0071】

【表 1 B】

V8X	M73X	I145X
L9X	F77X	I149X
F70X	C78X	

特定の実施形態においては、変異はヘム遠位ポケット変異である。本明細書中に記載されるように、H-NOXファミリーのNO結合メンバーにおいてO₂結合を妨げる重要な分子的決定要因は、ヘムの遠位ポケット中にH結合ドナーがないことである。したがって、いくつかの実施形態においては、変異は、H-NOXドメインと遠位ポケット中のリガンドとの間でのH結合を変化させる。いくつかの実施形態においては、変異体は、遠位ポケットのH結合ドナーを崩壊させ、対応する野生型H-NOXドメインと比較して、O₂リガンド結合の減少をもたらす。例示的な遠位ポケット残基としては、T. tengcongensis H-NOXのThr 4、Ile 5、Thr 8、Trp 9、Trp 67、Asn 74、Ile 75、Phe 78、Phe 82、Tyr 140、およびLeu 144、ならびに任意の他のH-NOXタンパク質中の対応する残基が挙げられる。

10

【0072】

遠位ポケット中には存在しない残基もまた、ヘム基の三次元構造に影響を与え得る。この構造は、次に、ヘム基の中の鉄に対するO₂およびNOの結合に影響を与える。したがって、いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、遠位ポケットの外側に1つ以上の変異を有する。変異させることができるが、遠位ポケット中にはない残基の例としては、T. tengcongensis H-NOXのPro 115およびArg 135が挙げられる。いくつかの実施形態においては、変異は、ヘム鉄に結合する残基としてHis 105を含む近位ポケットの中にある。

20

【0073】

2つ以上の変異が存在するいくつかの実施形態においては、少なくとも1つの変異が遠位ポケット中にあり、そして少なくとも1つの変異は遠位ポケットの外側にある（例えば、遠位ポケット中の変異）。いくつかの実施形態においては、全ての変異が遠位ポケット中にある。

【0074】

いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のアミノ酸配列は、自然界に存在している生物によって生産されるタンパク質の配列と同じではない。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のアミノ酸配列は、2006年5月21日、または2006年5月22日に任意のデータベースにおいて見られた配列（例えば、H-NOX核酸またはアミノ酸配列であると予想されるか、またはそうであることがわかっている全ての公知の配列）と同じではない。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のアミノ酸配列は、2007年5月21日、または2007年5月22日に任意のデータベースにおいて見られた配列（例えば、H-NOX核酸またはアミノ酸配列であると予想されるか、またはそうであることがわかっている全ての公知の配列）と同じではない。

30

【0075】

ヒト以外の供給源に由来するH-NOXタンパク質の免疫原性を低下させるためには、H-NOXタンパク質のアミノ酸を、ヒトH-NOXの中の対応するアミノ酸に変異させることができる。例えば、ヒト以外のH-NOXタンパク質の三次構造の表面上にある1つ以上のアミノ酸を、ヒトH-NOXタンパク質中の対応するアミノ酸に変異させることができる。いくつかのバリエーションにおいては、1つ以上の表面アミノ酸の変異を、2つ以上の遠位ポケット残基の変異、遠位ポケットの外側の1つ以上の残基の変異（例えば、近位ポケットの中の変異）、あるいは上記の2つ以上の組み合わせと組み合わせることができる。

40

【0076】

例示的な変異は表2に示される。加えて、表2に列挙される任意の残基は、任意の他のアミノ酸に変異させることができる。本発明はまた、本明細書中に記載される変異の任意

50

の組み合わせ（例えば、二重変異、三重変異以上の多重変異）にも関する。例えば、本明細書中に記載される変異の任意の組み合わせは、同じH-NOXタンパク質中に作成することができる。他の哺乳動物H-NOXタンパク質または哺乳動物以外のH-NOXタンパク質中の同等の位置の変異もまた、本発明に含まれることに留意されたい。所望される場合には、表2に記載された残基以外の残基も変異させることができる。例示的な変異H-NOXタンパク質には、対応する野生型H-NOXドメインと比較してNOまたはO₂リガンド結合の変化をもたらす1つ以上の変異が含まれ、これは、生理学的に適合する哺乳動物NO血液ガス担体として作動する。

【0077】

表2および全ての後の表においては、変異についての残基の番号は、記載される特定のH-NOXタンパク質の配列の中の位置を示す。例えば、T. tengcongensis I5Aは、T. tengcongensis H-NOXの5番目の位置でのイソロイシンのアラニンによる置換をいう。同じイソロイシンのアラニンへの変異は、任意の他のH-NOXタンパク質中の対応する残基において作成することができる（この残基は、他のH-NOXタンパク質の配列の中では5番目の残基である場合も、また、5番目の残基ではない場合もある）。哺乳動物β1 H-NOXドメインのアミノ酸配列が最大2個のアミノ酸によって異なるので、野生型ラットβ1 H-NOXタンパク質に導入されると所望される変異H-NOXタンパク質を生じる変異はまた、他の哺乳動物（例えば、ヒト）に由来する野生型β1 H-NOXタンパク質に導入されると所望される変異H-NOXタンパク質を生じると予想される。

【0078】

いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、T. tengcongensis H-NOXのIle5、Trp9、Asn74、Pro115、Arg135、または、Tyr140、β1（1-385）のI145、あるいは、L. pneumophila 2のPhe142に対応する残基が、任意の他のアミノ酸によって置き換えられる少なくとも1つの変異を有する。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は少なくとも2つの変異を有し、この場合、少なくとも1つの変異は、T. tengcongensisのIle5、Trp9、Asn74、Pro115、Arg135、または、Tyr140、β1（1-385）のI145、あるいは、L. pneumophila 2のPhe142に対応する残基の任意の他のアミノ酸による置換である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質中の変異は、T. tengcongensisのI5A変異、I5L変異、W9F変異、Y140F変異、Y140L変異、Y140H変異、W9F Y140H二重変異、またはF78Y Y140F二重変異、あるいは、β1のI145Y変異に対応する。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質中の変異は、T. tengcongensis H-NOXのW9Y変異、W9H変異、W9N変異、N74H変異、N74E変異、N74A変異、P115A変異、R135Q変異、I5L P115A二重変異、N74A Y140H二重変異、またはW9F N74A二重変異に対応する。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質中の少なくとも1つのC末端アミノ酸（例えば、少なくとも約50個の連続するC末端アミノ酸、または約25～約200個の間の連続するC末端アミノ酸）が、対応する野生型タンパク質（例えば、R. norvegicusまたはH. sapiens β1）と比較して除去されている。

【0079】

10

20

30

40

【表 2 - 1】

表 2 *T. tengcongensis* (*Tt*), *L. pneumophila* (*Lp*), *D. desulfuricans* (*Dd*), *V. cholera* (*Vc*), *N. punctiforme* (*Np*), *C. botulinium* (*Cb*), *C. acetobutylicum*, (*Ca*), ラット, ヒト, *C. elegans* (*Ce*) 由来の例示的なH-NOX変異体

<i>Tt</i>	<i>Lp</i>	<i>Dd</i> <i>Dd</i> H- NOX(728- 899)	他の細菌	ラット	ヒト	蠕虫 <i>Ce</i> GCY- 35(1-252)	
<i>Tt</i> H-NOX	<i>L2</i> H-NOX		<i>Vc</i> H-NOX	β 1(1-385)	β 1(1-385)		10
<i>Tt</i> H-NOX His6	<i>L2</i> F142Y	<i>Dd</i> Y139L	<i>Np</i> H-NOX <i>Cb</i> H- NOX(1- 175)	β 1(1-385) I145Y	β 1(1-385) I145Y		
<i>Tt</i> I5A	<i>L2</i> F9W- F142Y		<i>Cb</i> H- NOX(1- 186)	β 1(1-385) I145H	β 1(1-385) I145H		
<i>Tt</i> I5L	<i>L1</i> H-NOX		<i>Ca</i> H- NOX(1- 197)	β 1(1-385) C78Y	β 1(1-385) C78Y		
<i>Tt</i> I5L- P115A	<i>L1</i> F142Y		<i>Ca</i> H- NOX(1- 183)	β 1(1-194)	β 1(1-194)		20
<i>Tt</i> W9F				β 1 H105F	β 1 H105F		
<i>Tt</i> W9F- Y140L				β 1 H105G	β 1 H105G		
<i>Tt</i> W9F- Y140H				β 1(1-194) I145Y	β 1(1-194) I145Y		
<i>Tt</i> W9F- N74A				β 1(1-194) L9W-I145Y	β 1(1-194) L9W- I145Y		
<i>Tt</i> W9Y				β 2(1-217)	β 2(1-217)		30
<i>Tt</i> W9N				β 2(1-217)	β 2(1-217)		
<i>Tt</i> W9H				I142Y	I142Y		
<i>Tt</i> N74E							
<i>Tt</i> N74A							

【 0 0 8 0 】

【表 2 - 2】

<i>Tt</i>	<i>Lp</i>	<i>Dd</i>	他の細菌	ラット	ヒト	蠕虫
<i>Tt</i> N74H						
<i>Tt</i> N74A-						
Y140H						
<i>Tt</i> I75F						
His6						
<i>Tt</i> F78Y-						
Y140L						
<i>Tt</i> F78Y-						
Y140F						10
<i>Tt</i> P115A						
<i>Tt</i> R135Q						
His6						
<i>Tt</i> Y140F						
<i>Tt</i> Y140L						
<i>Tt</i> Y140H						
<i>Tt</i> Y140A						
<i>Tt</i> L144F						
His6						

H-NOXタンパク質に対する修飾

20

野生型H-NOXまたは変異H-NOXタンパク質のうちの任意のものを、治療への応用または産業への応用を促進するために、標準的な方法を使用して修飾するおよび／または処方することができる。例えば、そして特に、非相同に操作されたH-NOXタンパク質に應用される場合には、免疫学的監視によるそのような薬剤の隔離（架橋、PEG化、糖質の装飾などを含む）のための様々な方法（例えば、Rohlf s, R. J. ら、（1998年5月15日）「Arterial Blood Pressure Responses to Cell-Free Hemoglobin Solutions And The Reaction With Nitric Oxide」, J. Biol. Chem. 273 (20): 12128-12134; Migita, R. ら、（1997年7月）「Blood Volume And Cardiac Index i n Rats After Exchange Transfusion With Hemoglobin-Based Oxygen Carriers」, J. Appl. Physiol. 82 (6): 1995-2002; Vandegriff, K. D. ら、（2004年8月15日）「Kinetics of NO and O₂ Binding to a Maleimide Poly(ethylene glycol)-Conjugated Human Haemoglobin」, Biochem J. 382 (Pt 1): 183-189（これらはそれぞれが、特にタンパク質の修飾に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる））、ならびに当業者に公知の他の技術は当該分野で公知である。H-NOXタンパク質のヒトタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン）との融合により、血清半減期、粘性、およびコロイド浸透圧を増大させることができる。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、その免疫原性を低下させるため、および／またはその血漿保持時間を増大させるために、その合成の間あるいは後に修飾される。H-NOXタンパク質はまた、カプセル化させることもできる（例えば、リポソームまたはナノ粒子の中へのカプセル化）。

30

40

【0081】

野生型H-NOXタンパク質および変異H-NOXタンパク質の特徴

本明細書中に記載されるように、様々なNO解離定数、O₂解離定数、NO k_{off}、O₂ k_{off}、NO反応性、および安定性を提供する多くの多様なH-NOX変異タンパク質が作成されている。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、NOを送達するために現在使用されている任意の化合物（例えば、NOへの生体内変換の

50

ための任意の有機硝酸塩)と比較して、類似するか、あるいは改善されたNO解離定数、 O_2 解離定数、 k_{off} 、 O_2 k_{off} 、NO反応性、自動酸化速度、血漿保持時間、または上記の2つ以上の任意の組み合わせを有する。

【0082】

上記で議論されるように、内因性の低いNO反応性（および高いNO安定性）により、野生型H-NOXタンパク質および変異H-NOXタンパク質は所望されるNO担体となる。なぜなら、 O_2 の存在下でのNOによるH-NOXタンパク質の不活化の可能性は低いからである。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、 O_2 に対して低い親和性（例えば、37℃で少なくとも約1 μ Mの O_2 解離定数）を有するか、または O_2 に対しては検出できるほどの親和性は有さない。存在する場合にも、 O_2 はH-NOXタンパク質にはほとんど結合しないので、H-NOXタンパク質のヘムに結合した O_2 は、NOによっては最小限にしか酸化されない。したがって、最小限のNO、 O_2 、およびH-NOXタンパク質だけが、このNO酸化によって不活化される。したがって、さらに多量のNOを個体の所望される部位に送達することができ、そして個体の組織によって使用され得る O_2 はほとんど破壊されない。

10

【0083】

本明細書中で使用される場合は、「ヘモグロビン」は、赤血球の中の鉄を含む O_2 輸送メタロプロテインである、十分に特性決定されているヘモグロビンのファミリーに由来するタンパク質またはその変異体を意味する。精製された、間質を含まないヒトヘモグロビンは、約200~500 nMの O_2 に対する動力的 K_D を有する。この値はサブユニットに依存する。

20

【0084】

「6-配位 Fe^{II} -NO複合体」によっては、Boon, E. M. ら、(2006年8月)「Nitric Oxide Binding to Prokaryotic Homologs of the Soluble Guanylate Cyclase $\beta 1$ HONOX Domain」, J. Biol. Chem. 281 (31): 21892-21902 (これは、特に、6-配位 Fe^{II} -NO複合体を含むH-NOXタンパク質試料の割合と5-配位 Fe^{II} -NO複合体を含むH-NOXタンパク質試料の割合の決定に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)に記載されているように、およそ416~422 nmでUV-Vis Soretピークを生じる6-配位第一鉄ニトロシルを意味する。

30

【0085】

「5-配位 Fe^{II} -NO複合体」によっては、Boon, E. M. ら、(2006年8月)「Nitric Oxide Binding to Prokaryotic Homologs of the Soluble Guanylate Cyclase $\beta 1$ HONOX Domain」, J. Biol. Chem. 281 (31): 21892-21902 (これは、特に、6-配位 Fe^{II} -NO複合体を含むH-NOXタンパク質試料の割合と5-配位 Fe^{II} -NO複合体を含むH-NOXタンパク質試料の割合の決定に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)に記載されているように、およそ397~400 nmでUV-Vis Soretピークを生じる5-配位第一鉄ニトロシルを意味する。

40

【0086】

本明細書中で使用される場合は、「 k_{off} 」は、タンパク質からのNOまたは O_2 の放出速度のような解離速度を意味する。数字 k_{off} が小さければ小さいほど、遅い解離速度を示す。6-配位 Fe^{II} -NO複合体を有しているH-NOXタンパク質について、NOに対する k_{off} は、Boon, E. M. ら、(2006年8月)「Nitric Oxide Binding to Prokaryotic Homologs of the Soluble Guanylate Cyclase $\beta 1$ HONOX Domain」, J. Biol. Chem. 281 (31): 21892-21902、およびBoon, E. M. ら、(2005)「Molecular Basis For

50

NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chemical Biology 1: 53-59 (これらはそれぞれ、特に、H-NOXタンパク質のNO k_{off} の計算に関してその全体が参照として本明細書中に組み込まれる)に記載されているように計算される。5-配位Fe^{II}-NO複合体を有しているH-NOXタンパク質について、NOに対する k_{off} は、Winger, J. A. ら、(2007年1月)「Dissociation of Nitric Oxide from Soluble Guanylate Cyclase and Heme-Nitric Oxide/Oxygen Binding Domain Constructs」, J. Biol. Chem. 282 (2): 897-907 (これは、特に、H-NOXタンパク質のNO k_{off} 、NO k_1 、およびNO k_2 の計算に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)に記載されているように、NOに対する k_1 およびNOに対する k_2 によって記載される。5-配位Fe^{II}-NO複合体と6-配位Fe^{II}-NO複合体の混合物が含まれているH-NOXタンパク質については、NOに対する k_{off} は、Winger, J. A. ら、(2007年1月)「Dissociation of Nitric Oxide from Soluble Guanylate Cyclase and Heme-Nitric Oxide/Oxygen Binding Domain Constructs」, J. Biol. Chem. 282 (2): 897-907 (これは、特に、H-NOXタンパク質のNO k_{off} 、NO k_1 、およびNO k_2 の計算に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)に記載されているように、NOに対する k_1 およびNOに対する k_2 によって記載される。

【0087】

いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、37℃では約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 10 s^{-1} の間であり、例えば、37℃で、約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 0.012 s^{-1} 、約 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 0.007 s^{-1} 、約 0.005 s^{-1} ～約 0.011 s^{-1} 、または $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ～約 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$

である。様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質のO₂に対する k_{off} は、37℃では約1～約1,000 s^{-1} の間であり、例えば、37℃で、約1～約50 s^{-1} 、約50～約100 s^{-1} 、約100～約250 s^{-1} 、約250～約500 s^{-1} 、約500～約750 s^{-1} 、または約750～約1,000 s^{-1} である。

【0088】

「 k_{on} 」によっては、タンパク質に対するNOまたはO₂の結合の速度のような会合速度を意味する。 k_{on} の数字が小さければ小さいほど、遅い会合速度を示す。様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質のO₂に対する k_{on} は、20℃では約0.14～約60 $\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の間であり、例えば、約6～約60 $\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約6～12 $\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約15～約60 $\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、約5～約18 $\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、または約6～約15 $\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ である。

【0089】

「解離定数」によっては、「動力的解離定数」または「計算された解離定数」を意味する。「動力的解離定数」または「 K_D 」は、当業者に公知であり、そして／または本明細書中に記載される方法を含む標準的な方法(例えば、標準的な分光測定法、ストップフロー測定法、または閃光光分解法)を使用して絶対値として決定された K_D 値のような、動力的解離速度(k_{off})の動力的結合速度(k_{on})に対する比を意味する。「計算された解離定数」または「計算された K_D 」は、計算された k_{off} に基づく動力的解離定数の近似をいう。計算されたNOに対する K_D については、H-NOXタンパク質についてのNOに対する k_{on} の値は710 $\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と推測され、これは、4℃で測定された報告された $\beta 1$ (1-385)に対する k_{on} であり、37℃でも有意には増大しない(Zhao, ら、(1999)「A Molecular Basis for Nitric Oxide Sensing by Soluble Guan

10

20

30

40

50

ylate Cyclase」, PNAS. 96:14753-14758 (これは、特に、H-NOXタンパク質についてのNO k_{on} の計算に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)。計算されたO₂に対するK_Dについては、 k_{on} の値は、本明細書中に記載される動力的K_Dと k_{off} との間での相関関係から導かれる。

【0090】

様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質によるNO結合についての動力的K_Dまたは計算されたK_Dは、同じ条件下（例えば、20℃）でのヘモグロビンのK_Dの約0.1～約100倍の間であり、例えば、同じ条件下（例えば、20℃）でのヘモグロビンのK_Dの約0.1～約10倍の間、約0.5～約2倍の間である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO解離定数は、37℃では約0.1～約20 pMの間であり、例えば、37℃で、約0.5～約15、約0.5～約12、約0.7～約4、または約0.7～約3である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO解離定数は、37℃では少なくとも約0.1 pMであり、例えば、37℃で、少なくとも約0.5、1、3、5、10、12、50、100、400、500、1000、2000、3000、または4000 pMのいずれかである。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO解離定数は、37℃では約5000 pM未満であり、例えば、37℃で、約4000 pM、3000 pM、2000 pM、1000 pM、500 pM、400 pM、100 pM、50 pM、12 pM、10 pM、5 pM、3 pM、または1 pM未満のいずれかである。

【0091】

様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質によるO₂結合についての動力的K_Dまたは計算されたK_Dは、同じ条件下（例えば、20℃）でのヘモグロビンのK_Dの約0.01～約100倍の間であり、例えば、同じ条件下（例えば、20℃）でのヘモグロビンのK_Dの約0.1～約10倍の間、または約0.5～約2倍の間である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、37℃では少なくとも約1 μMであり、例えば、37℃で、少なくとも約5 μM、10 μM、20 μM、30 μM、40 μM、50 μM、60 μM、70 μM、80 μM、90 μM、または100 μMのいずれかである。いくつかの実施形態においては、37℃ではO₂に対する結合は検出できない、例えば、本明細書中に記載されるUV可視分光測定法を使用した場合には、検出できるO₂結合が存在しない（例えば、O₂の存在下では約418 nmには検出できるピークがない、例えば、SoretピークがO₂が存在しない場合に見られるものと同じ約431 nmのままである場合、あるいは、酸化されたタンパク質が原因でSoretピークが約410 nmにシフトする場合）。

【0092】

本明細書中で使用される場合は、「NO親和性」は、タンパク質に対するNOの結合（例えば、ヘム基に対する結合、またはタンパク質と会合したヘム基に結合した酸素に対する結合）の強度をいう定量的用語である。この親和性は、NOに対する k_{off} と k_{on} の両方の影響を受ける。NO K_D値が数的に小さければ小さいほど、高い親和性を意味する。「酸素親和性」は、タンパク質のヘム部分に対する酸素の結合の強度を意味する定量的用語である。この親和性は、酸素に対する k_{off} と k_{on} の両方の影響を受ける。酸素K_Dが数的に小さければ小さいほど、高い親和性を意味する。

【0093】

本明細書中で使用される場合は、「NO安定性」は、酸素の存在下でのNOによる酸化に対するタンパク質の安定性または抵抗性をいう。例えば、酸素の存在下でNOに結合していると酸化されないタンパク質の能力は、タンパク質のNO安定性の指標である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質の約50%未満、40%未満、30%未満、10%未満、または5%未満のうちのいずれかが、20℃で約1、2、4、6、8、10、15、または20時間のいずれかのインキュベーションの後に酸化される。

【0094】

本明細書中で使用される場合は、「NO反応性」は、ヘム結合タンパク質のヘムのなか

の鉄が $2 \mu\text{M}$ のタンパク質濃度で、酸素の存在下で NO によって酸化される速度をいう。 s^{-1} の単位での NO 反応性の数値が小さければ小さいほど、低い NO 反応性を示す。様々な実施形態においては、H-NOX タンパク質の NO 反応性は、 20°C では約 700s^{-1} 未満であり、例えば、 20°C で、約 600s^{-1} 、 500s^{-1} 、 400s^{-1} 、 300s^{-1} 、 200s^{-1} 、 100s^{-1} 、 75s^{-1} 、 50s^{-1} 、 25s^{-1} 、 20s^{-1} 、 10s^{-1} 、 5s^{-1} 、 3s^{-1} 、 2s^{-1} 、 1.8s^{-1} 、 1.5s^{-1} 、 1.2s^{-1} 、 1.0s^{-1} 、 0.8s^{-1} 、 0.7s^{-1} 、または 0.6s^{-1} 未満である。様々な実施形態においては、H-NOX タンパク質の NO 反応性は、 20°C では、約 $0.1 \sim$ 約 600s^{-1} の間であり、例えば、 20°C で、約 $0.5 \sim$ 約 400s^{-1} の間、約 $0.5 \sim$ 約 100s^{-1} の間、約 $0.5 \sim$ 約 50s^{-1} の間、約 $0.5 \sim$ 約 10s^{-1} の間、約 $1 \sim$ 約 5s^{-1} の間、または約 $0.5 \sim$ 約 2.1s^{-1} の間である。様々な実施形態においては、H-NOX タンパク質の反応性は、同じ条件下（例えば、 20°C ）でのヘモグロビンの反応性の、少なくとも約 10 分の 1、100 分の 1、1,000 分の 1、または 10,000 分の 1 である。

【0095】

本明細書中で使用される場合は、「自己酸化速度」は、ヘム結合タンパク質のヘムの中の鉄が自己酸化される速度をいう。 s^{-1} の単位での自己酸化速度の数値が小さければ小さいほど、おそい自動酸化速度を示す。様々な実施形態においては、H-NOX タンパク質のヘム自己酸化速度は、 37°C では約 1.0h^{-1} 未満であり、例えば、 37°C で、約 0.9h^{-1} 未満、 0.8h^{-1} 未満、 0.7h^{-1} 未満、 0.6h^{-1} 未満、 0.5h^{-1} 未満、 0.4h^{-1} 未満、 0.3h^{-1} 未満、 0.2h^{-1} 未満、 0.1h^{-1} 未満、または 0.05h^{-1} 未満のいずれかである。様々な実施形態においては、H-NOX タンパク質のヘム自動酸化速度は、 37°C では約 $0.006 \sim$ 約 5.0h^{-1} の間であり、例えば、 37°C で、約 $0.006 \sim$ 約 1.0h^{-1} 、 $0.006 \sim$ 約 0.9h^{-1} 、または約 $0.06 \sim$ 約 0.5h^{-1} である。

【0096】

様々な実施形態においては、変異 H-NOX タンパク質は、(a) ヘモグロビンのものの大きさの 2 桁以内の、NO もしくは O_2 解離定数、会合速度 (NO もしくは O_2 に対する k_{on})、または解離速度 (NO もしくは O_2 に対する k_{off}) を有する、(b) sGC $\beta 1$ のものよりも弱い NO 親和性 (例えば、少なくとも約 10 倍、100 倍、または 1000 倍弱い) を有する、(c) ヘモグロビンの少なくとも 1,000 分の 1 未満である結合した O_2 との NO 反応性を有する、(d) ヘモグロビンのものよりも少なくとも 2 倍、10 倍、100 倍、または 1000 倍高いインビボでの血漿保持時間を有するか、あるいは (e) 上記の 2 つ以上の任意の組み合わせを有する。

【0097】

例示的な適切な NO 担体により、ヘモグロビンのものの大きさの 2 桁以内である、例えば、ヘモグロビンのものの約 $0.01 \sim$ 約 100 倍の間、例えば、約 $0.1 \sim$ 約 10 倍の間、または約 $0.5 \sim$ 約 2 倍の間の解離定数が提供される。様々な確立されている技術 (例えば、本明細書中に記載される技術) (Boon, E. M. ら、(2005) 「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chem. Biol. 1: 53-59; Boon, E. M. ら、(2005 年 10 月) 「Ligand Discrimination in Soluble Guanylate Cyclase and the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins」, Curr. Opin. Chem. Biol. 9 (5): 441-446; Boon, E. M. ら、(2005) 「Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors」, J. Inorg. Biochem. 99 (4): 892-902)、Vandegriff, K. D. ら、(2004 年 8 月 15 日) 「Kinetics of NO and O_2 Binding to a Maleimide Poly(et

ethylene glycol) - Conjugated Human Haemoglobin」, Biochem J. 382 (Pt 1): 183-189 (これらはそれぞれが、特に解離定数の測定に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる))、ならびに当業者に公知の他の技術を、解離定数を定量するために使用することができる。例示的なNO担体により、H-NOXタンパク質の結合したO₂との低い、または最小のNO反応性(例えば、ヘモグロビンのものよりも低いNO反応性)が提供される。いくつかの実施形態においては、NO反応性は、ヘモグロビンのものよりもはるかに低く、例えば、少なくとも約10分の1、100分の1、1,000分の1、または10,000分の1である。様々な確立されている技術を(Boon, E. M. ら、(2005)「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chem. Biol. 1: 53-59; Boon, E. M. ら、(2005年10月)「Ligand Discrimination in Soluble Guanylate Cyclase and the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins」, Curr. Opin. Chem. Biol. 9(5): 441-446; Boon, E. M. ら、(2005)「Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors」, J. Inorg. Biochem. 99(4): 892-902)、Vandegriff, K. D. ら、(2004年8月15日)「Kinetics of NO and O₂ Binding to a Maleimide Poly(ethylene glycol) - Conjugated Human Haemoglobin」, Biochem J. 382 (Pt 1): 183-189 (これらはそれぞれが、特にNO反応性の測定に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる))ならびに当業者に公知の技術を、NO反応性を定量化するために使用することができる。野生型T. tengcongensis H-NOXはそのような低いNO反応性を有しているので、他の野生型H-NOXタンパク質および変異H-NOXタンパク質は同様の低いNO反応性を有し得る。例えば、T. tengcongensis H-NOX Y140Hは、野生型T. tengcongensis H-NOXのNO反応性と同様のNO反応性を有する。

【0098】

NO送達のための例示的な変異体は、sGC β1のNO親和性よりも弱い、好ましくは、少なくとも10分の1、100分の1、または1000分の1の弱いNO親和性を有する。治療的なNOの送達(例えば、心臓発作、心臓切開手術、または脳卒中の間/後)のためには、様々な親和性を有している多様な操作されたH-NOXタンパク質が、特定の疾患状態における効力について0.1~1000nMのNO親和性のいくつかの実施形態の範囲を用いて、経験的に試験される。

【0099】

加えて、適切なNO担体により、高いか、または最大の安定性(特に、インビボでの安定性)が提供される。様々な安定性の数的指標(例えば、酸化的安定性(例えば、自己酸化またはNOによる酸化に対する安定性)、温度安定性、およびインビボ安定性)が使用され得る。本明細書中に記載されている技術(Boon, E. M. ら、(2005)「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chem. Biol. 1: 53-59; Boon, E. M. ら、(2005年10月)「Ligand Discrimination in Soluble Guanylate Cyclase and the H-NOX Family of Heme Sensor Proteins」, Curr. Opin. Chem. Biol. 9(5): 441-446; Boon, E. M. ら、(2005)「Ligand Specificity of H-NOX Domains: From sGC to Bacterial NO Sensors」, J. Inorg. Biochem. 99(4): 892-902)、な

らびに、当業者に公知の技術のような様々な確立されている技術を、安定性を定量化するために使用することができる。血漿、血液、または組織中でのインビボ安定性についての、例示的な安定性の数的指標としては、保持時間、クリアランス速度、および半減期が挙げられる。好熱性生物に由来するH-NOXタンパク質は、高温で安定であると予想される。様々な実施形態においては、血漿保持時間は、ヘモグロビンの血漿保持時間よりも少なくとも約2倍、10倍、100倍、または1000倍大きい（例えば、Bobofchak, K. M. ら、(2003年8月)「A Recombinant Polymeric Hemoglobin With Conformational, Functional, And Physiological characteristics of an in vivo O₂ transporter」, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 285 (2):H549-H561）。当業者に明らかなように、ヘモグロビンをベースとする担体は、血漿に由来する細胞を含まないヘモグロビンを除去するヘモグロビン受容体の存在が原因で、血漿からの細胞を含まないヘモグロビンの迅速なクリアランスによって制限される。血漿中にはH-NOXタンパク質に対する受容体が存在しないので、野生型H-NOXタンパク質および変異H-NOXタンパク質は、ヘモグロビンよりも長い血漿保持時間を有すると予想される。所望される場合には、血漿保持時間は、標準的な方法（例えば、本明細書中に記載される方法、および当業者に公知の方法）を使用して、PEG化、またはH-NOXタンパク質の架橋、または別のタンパク質とH-NOXタンパク質との融合によって増大させることができる。

【0100】

様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質のNO解離定数は、ヘモグロビンのNO解離定数の大きさの2桁以内であり、H-NOXタンパク質のNO反応性は、ヘモグロビンのNO反応性の少なくとも10分の1未満である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、37℃では約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ～約 $10 s^{-1}$ の間であり、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、37℃では少なくとも約1 μMである。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、37℃では約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ～約 $10 s^{-1}$ の間であり、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は、37℃では少なくとも約1 μMである。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、37℃では約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ～約 $10 s^{-1}$ の間であり、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃で約 $700 s^{-1}$ 未満（例えば、20℃で、約 $600 s^{-1}$ 未満、 $500 s^{-1}$ 未満、 $100 s^{-1}$ 未満、 $20 s^{-1}$ 未満、または $1.8 s^{-1}$ 未満）である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は37℃では少なくとも約1 μMであり、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃で約 $700 s^{-1}$ 未満（例えば、20℃で、約 $600 s^{-1}$ 未満、 $500 s^{-1}$ 未満、 $100 s^{-1}$ 未満、 $20 s^{-1}$ 未満、または $1.8 s^{-1}$ 未満）である。いくつかの実施形態においては、HNOXタンパク質のNOに対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 は、37℃では約 $1 \times 10^{-4} s^{-1}$ ～約 $10 s^{-1}$ の間であり、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度は、37℃で約 $1 h^{-1}$ 未満である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のO₂解離定数は37℃では少なくとも約1 μMであり、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度は、37℃で約 $1 h^{-1}$ 未満である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質のヘム自動酸化速度は、37℃で約 $1 h^{-1}$ 未満であり、H-NOXタンパク質のNO反応性は、20℃で約 $700 s^{-1}$ 未満（例えば、20℃で、約 $600 s^{-1}$ 未満、 $500 s^{-1}$ 未満、 $100 s^{-1}$ 未満、 $20 s^{-1}$ 未満、または $1.8 s^{-1}$ 未満）である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質溶液の粘性は、1～4センチポアズ（cP）の間である。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質溶液のコロイド浸透圧は、20～50 mmHgの間である。

【0101】

表 3 には、野生型 H-NOX タンパク質および変異 H-NOX タンパク質についての例示的な大きさ、酸素親和性、自動酸化安定性、NO 反応速度、および修飾が列挙される。表 3 においては、媒体の大きさは、修飾された（例えば、PEG 化された）H-NOX タンパク質または未修飾の H-NOX タンパク質の分子量をいう。

【0102】

表 3. H-NOX タンパク質についての例示的な実施形態

【0103】

【表 3】

媒体の大きさ	酸素親和性	安定性(自動酸化)	NO 親和性	NO 反応性 (s ⁻¹)	粒子の装飾
>1 MD	少なくとも 1 μ M	1 時間	1 pM	0.01 ~ 0.1	架橋
0.5 kD ~ 1 MD	少なくとも 10 μ M	1 h ~ 12 h	500 pM	0.1 ~ 1	PEG 化
0.1 kD ~ 0.5 kD	少なくとも 50 μ M	12 h ~ 48 h	1 nM	1 ~ 10	カプセル化
0.01 kD ~ 0.1 kD	少なくとも 75 μ M	48 h ~ 2 週間	1 μ M	10 ~ 100	

10

特定の変異体についての例示的なデータが表 4 ~ 14 に報告される。表 4 ~ 14 においては、 β 1 および B 2 は、ラット H-NOX タンパク質に由来するタンパク質をいう。哺乳動物 β 1 H-NOX ドメインのアミノ酸配列が最大 2 個のアミノ酸によって異なるので、同様の結果が、他の哺乳動物 β 1 H-NOX タンパク質（例えば、ヒト β 1）の中の対応している変異について予想される。

20

【0104】

表 4 は、NO 結合についての解離定数を、H-NOX タンパク質中の 1 つ以上の残基を変異させることによって有意に変化させることができることを明らかに示している。加えて、sGC に対する NO の解離定数および解離速度に劇的に影響を与えるアロステリック調節因子の能力は、NO の解離定数と解離速度を変化させるように sGC または他の H-NOX タンパク質の構造を変化させる変異の能力をサポートする。所望される場合には、NO 結合に対する解離定数は、本明細書中に記載されるように、表 4 に列挙される任意の変異を組み合わせることによって、または H-NOX タンパク質中に 1 つ以上のさらに別の変異を導入することによって、さらに変化させることができる。

30

【0105】

表 4. H-NOX および他のヘムタンパク質に対する NO 結合についての K_D 値

【0106】

【表 4】

ヘムタンパク質	k_{on} (μ M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (pM) 37 °C ^a
sGC	> 140 ^b	0.001 ~ 0.66 ^{c,d}	0.71 ~ 4710
β 1 (1-385)	710 ^b	0.0023 ~ 0.0087 ^{c,d}	3.24 ~ 12.3
Hb (T)	18 ^{e,f}	0.004 ^{e,f}	411 ^g (222)
Hb (R)	18 ^{e,f}	0.00005 ^{e,f}	5.14 ^g (2.28)
Mb	17 ^{e,h}	0.00012 ^{e,h}	13.1 ^g (7.06)
Tt H-NOX	I	0.00056 ^j	0.78
Tt H-NOX Y140L	I	0.00013 ^j	0.18
Lt H-NOX	I	0.00103 ~ 0.0087 ^j	1.45 ~ 12.3
L2 H-NOX	I	0.00036 ~ 0.00218 ^j	0.51 ~ 3.1
L2 H-NOX F142Y	I	0.00051 ^j	0.72

40

^a k_{off} : k_{on} の比から計算した ; ^b Zhao, ら、(1999) 「A Molecular Basis for Nitric Oxide Sensing by

50

Soluble Guanylate Cyclase」, PNAS. 96:14753-14758、4℃で測定した、速度は拡散速度に近づき、37℃でも有意には増大しない；^cWinger, J. A. ら、(2007年1月)「Dissociation of Nitric Oxide from Soluble Guanylate Cyclase and Heme-Nitric Oxide/Oxygen Binding Domain Constructs」, J. Biol. Chem. 282(2):897-907；^dk値、5配位および6配位からのNO解離から最も適合した範囲を括弧でくくった、それぞれ、飽和NO、およびNOトラップとしての30mMのNa₂S₂O₄を使用し、0.88~2.2μMのタンパク質を含む、2~4回の解離実験から平均した。データは、二重指数関数方程式による最良の適合であった： $\Delta A_t = \Delta A_1 (1 - e^{-k_1 t}) + \Delta A_2 (1 - e^{-k_2 t})$ ；^e20℃で測定した；^fMorris、ら、1980, J. Biol. Chem. 255:8050-8053；^gK_D計算、37℃に調整した、速度は10℃ごとに倍にした、括弧内には20℃での値を示す；^hMoore、ら、(1976)「Cooperativity in the Dissociation of Nitric Oxide from Hemoglobin」, J. Biol. Chem. 251:2788-2794；ⁱβ1(1-385)と同じk_{on}と仮定した(710μM⁻¹s⁻¹)；^jBoon, E. M. ら、(2006年8月)「Nitric Oxide Binding to Prokaryotic Homologs of the Soluble Guanylate Cyclase β1 HONOX Domain」, J. Biol. Chem. 281(31):21892-21902。

【0107】

表5は、NO結合についての解離速度(k_{off})を、H-NOXタンパク質の1つ以上の残基を変異させることによって有意に変化させることができることを明らかに示している。これらの例示的な変異H-NOXタンパク質のk_{off}は、37℃では0.00013~0.011s⁻¹の範囲である。表5については、ヘムタンパク質からのNO解離定数は、それぞれ引用されている参考文献に示されているように化学トラップを使用して導かれた。比較のために、有機硝酸塩とNONOateからのNO解離速度をNO電極を使用して測定し、オキシヘモグロビントラップを使用して確認した。必要な場合には、10℃ごとに速度がほぼ倍増するという事実を使用して、37℃に調整した。所望される場合には、NO結合についてのk_{off}を、本明細書中に記載されるように、表5に列挙される1つの変異または二重変異のいずれかを組み合わせることによって、あるいは、H-NOXタンパク質に1つ以上のさらに別の変異を導入することによって、さらに変化させることができる。

【0108】

表5. 37℃でのヘムタンパク質とニトロ系血管拡張剤NOの解離速度の比較

【0109】

【表 5】

ヘムタンパク質またはニトロ系血管拡張剤	k_{off} (s^{-1})
sGC	0.001 ~ 0.66 ^a
$\beta 1$ (1-385)	0.0023 ~ 0.0087 ^a
$\beta 2$ (1-217)	0.0069 ~ 0.011 ^a
$\beta 1$ (1-194)	0.0009 ~ 0.0041 ^a
Tt H-NOX	0.00056 ^b
Tt H-NOX Y140L	0.00013 ^b
Tt H-NOX Y140F	$2.0 \pm 0.3 \times 10^{-4}$ ^g
L1 H-NOX	0.00103 ~ 0.0087 ^b
L2 H-NOX	0.00036 ~ 0.00218 ^b
L2 H-NOX F142Y	0.00051 ^b
Hb (T)	0.004 ^c
Hb (R)	0.00005 ^c
Mb	0.00012 ^d
ニトロフォリン (pH 5.0)	0.02 ~ 21 ^e
ニトロフォリン (pH 8.0)	0.6 ~ 15 ^e
DEA/NO	0.0083 ^f
nPRONO	0.00012 ^f
ClCH ₂ CH ₂ ONO	0.000022 ^f
tBuONO	0.000008 ^f

^a Winger, J. A. ら、(2007年1月)「Dissociation of Nitric Oxide from Soluble Guanylate Cyclase and Heme-Nitric Oxide/Oxygen Binding Domain Constructs」, J. Biol. Chem. 282 (2): 897-907; ^b Boon, E. M. ら、(2006年8月)「Nitric Oxide Binding to Prokaryotic Homologs of the Soluble Guanylate Cyclase $\beta 1$ H-NOX Domain」, J. Biol. Chem. 281 (31): 21892-21902; ^c Morris, ら、(1980)「The role of diffusion in limiting the rate of ligand binding to hemoglobin」, J. Biol. Chem. 255: 8050-8053; ^d Moore, ら、(1976)「Cooperativity in the dissociation of nitric oxide from hemoglobin」, J. Biol. Chem. 251: 2788-2794; ^e Maes, ら、(2004)「Role of Binding Site Loops in Controlling Nitric Oxide Release: Structure and Kinetics of Mutant Forms of Nitrophorin 4」, Biochemistry 43 (21): 6679-90; ^f Artz, J. D. ら、(1998)「NO Release from No Donors and Nitrovasodilators: Comparisons between Oxyhemoglobin and Potentiometric Assays」, Chem. Res. Toxicol. 11 (12): 1393-1397; ^g Boon, E. M. ら、(2006)「Sensitive and Selective Detection of Nitric Oxide Using an H-NOX Domain」, JACS 128: 10022-10023。

【0110】

表6に示されるように、野生型H-NOXタンパク質に1つ以上の変異を導入することにより、自動酸化速度およびO₂解離速度を変化させることが可能となる。所望される場合には、自動酸化速度またはO₂解離速度を、本明細書中に記載されるように、表6に列挙される1つの変異または二重変異のいずれかを組み合わせることによって、あるいは、H-NOXタンパク質に1つ以上のさらに別の変異を導入することによって、さらに変化させることができる。

【0111】

表6. 野生型H-NOXタンパク質およびクラスI I変異H-NOXタンパク質について、自動酸化に対する安定性、O₂結合特性（例えば、O₂解離速度）、および遠位ポケットH結合残基が列挙される

【0112】

【表6-1】

タンパク質	安定性	O ₂ 結合活性 ^b	遠位ポケット残基
Tt H-NOX, 原核生物H-NOX、および強いO ₂ 結合因子			
Tt H-NOX	$k_{ox} \sim 0^c$	$k_{off} = 1.22$	Trp9, Phe78, Tyr140
Tt Y140F	$k_{ox} = 0.05$	$k_{off} = 15.7^d$	Trp9, Phe78, Phe140
Tt Y140L	$k_{ox} = 0.19$	$k_{off} = 20.^d$	Trp9, Phe78, Leu140
Tt Y140H	$k_{ox} = 0.87$	$k_{off} = 5.03$	Trp9, Phe78, His140
Tt Y140A	安定 ^a	部分的な複合体 ^{d,e}	Trp9, Phe78, Ala140
Tt W9F	$k_{ox} \sim 0^c$	$k_{off} = 1.84$	Phe9, Phe78, Tyr140
Tt W9F-Y140L	$k_{ox} = 0.12$	複合体の形成なし	Phe9, Phe78, Leu140
Tt W9F-Y140H	$k_{ox} = 0.11$	$k_{off} = 23.4$	Phe9, Phe78, His140
Tt F78Y-Y140L	$k_{ox} \sim 0^c$	$k_{off} = 0.83$	Trp9, Tyr78, Leu140
Tt F78Y-Y140F	$k_{ox} \sim 0^c$	$k_{off} = 1.48$	Trp9, Tyr78, Phe140
その野生型タンパク質がO ₂ には結合しない原核生物H-NOXタンパク質			
L2 H-NOX	安定 ^a	複合体の形成なし	Phe9, Phe78, Phe142
L2 F142Y	安定 ^f	$k_{off} = 3.68$	Phe9, Phe78, Tyr142
L2 F9W-F142Y	安定 ^f	O ₂ に結合した ^e	Trp9, Phe78, Tyr142
L1 H-NOX	$k_{ox} = 0.31$	複合体の形成なし	Leu9, Leu78, Phe142
L1 F142Y	$k_{ox} = 1.8$	$k_{off} = 1.73^d$	Leu9, Leu78, Tyr142

【0113】

10

20

30

【表 6 - 2】

その野生型タンパク質が O ₂ には結合しない真核生物H-NOX			
β2(1-217)	$k_{ox} = 0.18$	複合体の形成なし	Leu9, Cys76, Ile142
β2(1-217) I142Y		g	Leu9, Cys76, Tyr142
β1(1-194)	$k_{ox} = 4.3$	複合体の形成なし	Leu9, Cys78, Ile145
β1(1-194) I145Y	$k_{ox} = 2.8$	g	Leu9, Cys78, Tyr145
β1(1-194) L9W-I145Y	$k_{ox} \sim 10$	g	Trp9, Cys78, Tyr145
β1(1-385)	安定 ^e	複合体の形成なし	Leu9, Cys78, Ile145
β1(1-385) I145Y	$k_{ox} = 0.72$	$k_{off} = 2.69$	Leu9, Cys78, Tyr145
β1(1-385) I145H			Leu9, Cys78, His145
β1(1-385) C78Y			Leu9, Tyr78, Ile145
野生型構築物として O ₂ に結合すると予想される他のH-NOX			
Dd H-NOX(728-899)	$k_{ox} = 0.98$	$k_{off} = 5.80$	Phe9, Phe75, Tyr139
Dd Y139L			Phe9, Phe75, Leu139
Cb H-NOX(1-175)	安定ではない構築物 ^h	g	Trp9, Phe78, Tyr140
Cb H-NOX(1-186)	わずかにより安定 ⁱ	g	Trp9, Phe78, Tyr140
Ca H-NOX(1-197)	安定ではない構築物 ^h	g	Trp9, Phe78, Tyr140
Ca H-NOX(1-183)	わずかにより安定 ⁱ	g	Trp9, Phe78, Tyr140
Ce GCY-35(1-252)	安定	O ₂ に結合した ^e	Phe9, Thr78, Tyr144

^a この構築物は、酸化（37℃での自動酸化速度 k_{ox} [h⁻¹] によって評価した）および／またはヘムの喪失に対して安定である。^b O₂ 結合活性は、20℃でのヘムからの O₂ の解離速度によって評価した（s⁻¹）。^c 37℃で24時間の後でもなお、自動酸化の指標は存在しなかった。^d タンパク質のうちの小さい割合だけが O₂ と複合体を形成しており、報告される速度は、この集団についての反応速度論を示す。^e タンパク質は O₂ に結合するが、 k_{off} は決定しなかった。^f 比較的安定であったが、このタンパク質は、これが酸化されるとタンパク質が沈殿し、これによって k_{off} を測定することが難しくなる。^g 不安定性または迅速な酸化が原因で適用できなかった。

16 ^h 「安定ではない構築物」は、タンパク質が試験した条件下ですぐに酸化されることを意味する。ⁱ 「やや高く安定」は、タンパク質が、試験した条件下では数分間から数時間かけて酸化されるが、24時間を越えては安定なままであることを意味する。

【0114】

表7は、1つ以上の変異に導入によるH-NOXタンパク質のO₂ 会合速度（ k_{on} ）、O₂ 解離速度（ k_{off} ）、O₂ 解離定数（ K_D ）、および酸化速度（ k_{ox} ）の変化を示す。いくつかの実施形態においては、表7に列挙した1つの変異または二重変異のうちの任意のものが別の変異（例えば、表7の別の変異または本明細書中に記載される任意の他の変異）と組み合わせられて、O₂ 会合速度、O₂ 解離速度、O₂ 解離定数、自動酸化速度、または上記の2つ以上の組み合わせがさらに変化する。

【0115】

表7. ヒスチジルーリガンド Fe^{1+} ヘムタンパク質についての O_2 結合の動力学的定数

【0116】

【表7】

タンパク質	K_D^a	k_{on}^b	k_{off}^c	k_{ox}^d	Ref.
Tt H-NOX	89.7 ± 6.2	13.6 ± 1.0	1.22 ± 0.09	e	I
Tt P115A	21.2 ± 2.1	10.4 ± 1.1	0.22 ± 0.01	e	J
Tt I5A	~80		0.82 ± 0.03	0.7	J
Tt I5L	~1000		9.50 ± 0.64	0.6	J
Tt I5L-P115A	~30		0.28 ± 0.01	0.6	J
Tt W9F	305 ± 31	6.02 ± 0.62	1.84 ± 0.17	e	I
Tt Y140F	f	15.7 ± 1.4	15.7 ± 9.8	0.05	J
Tt Y140L	~2000	二重	20.1 ± 2.0	0.19	I
Tt Y140H	~500		5.03 ± 0.69	0.87	J
Tt W9F-Y140H	~2500		23.4 ± 3.7	0.11	J
Tt W9F-Y140L	O_2 との複合体は観察されなかった			0.12	I
Tt F78Y-Y140F	~150		1.48 ± 0.33	e	J
Tt F78Y-Y140L	~80		0.83 ± 0.17	e	I
Tt W9F-N74A	ミリモル濃度	非常に遅い			J
Dd H-NOX	ミリモル濃度	非常に遅い	7.13 ± 0.45	0.14	J
Dd Y139L	O_2 との複合体は観察されなかった				j
$\beta 1(1-385)$ I145Y	70,000,00	0.00004	2.69 ± 0.61	0.72	i
L2 F142Y	9200 ± 3000	0.40 ± 0.14	3.68 ± 0.71		i
Hs Hb β	267	60	16		n
Hs Hb α	560	50	28		k
Sw Mb	880	17	15	0.006	k
Bj FixL	140,000	0.14	20	2.7	l
HemAT-B	720	32	23	0.06	m

^a 20℃での解離定数 (nM) ; ^b 20℃でのヘムに対する O_2 会合速度 ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$) ; ^c 20℃でのヘムからの O_2 の解離速度 (s^{-1}) ; ^d 37℃でのヘムの自動酸化速度 (h^{-1}) ; ^e 37℃で24時間の後でもなお、自動酸化の指標は存在しなかった。^f タンパク質のうちの小さい割合だけが O_2 と複合体を形成したが、この集団についての反応速度論は測定できなかった; Boone, E. M. ら、(2005年6月)「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chemical Biology 1(1):53-59による、^j 未公開データ; ^k Springer, B. A. ら、(1994)「Family Physicians Key Partners in Preventing Suicide Among Youth」, Ch

em. Rev. 94:699-714; ¹Gilles-Gonzalezら、(1994)「Heme-Based Sensors, Exemplified by the Kinase FixL, are a New Class of Heme Protein with Distinctive Ligand Binding and Autoxidation」, Biochemistry 33:8067-8073。
^mAono, S. ら、(2002)「Resonance Raman and Ligand Binding Studies of the Oxygen-Sensing Signal Transducer Protein HemAT from *Bacillus Subtilis*」, J. Biol. Chem. 277:13528-13538。
ⁿAntonini, E. ら、(1971)「Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands」, North-Holland Publ., Amsterdam。

【0117】

表8は、H-NOXタンパク質のO₂会合速度、O₂解離速度、O₂自動酸化速度、NO反応性、およびFe^{II}-O₂複合体の安定性を、1つ以上の変異の導入によって変化させることができることを示す。いくつかの実施形態においては、表8に列挙されている1つの変異または二重変異のうちの任意のものが別の変異（例えば、表8の別の変異または本明細書中に記載される任意の他の変異）と組み合わせられて、H-NOXタンパク質のO₂会合速度、O₂解離速度、O₂自動酸化速度、NO反応性、またはFe^{II}-O₂複合体の安定性がさらに変化する。当業者に明らかであるように、1つ以上のさらに別の変異（例えば、本明細書中に記載される変異）の導入を、これらの値をさらに変化させるために使用することができる。

【0118】

表8. H-NOXタンパク質のO₂会合速度、O₂解離速度、O₂自動酸化速度、NO反応性、およびFe^{II}-O₂複合体の安定性

【0119】

【表8】

タンパク質	k_{on}^a	K_{off}^b	k_{ox}^c	NO反応性 ^d	FeII-O ₂ 複合体の安定性
Hs Hb	23	11	0.006	<0.001 s (~7,000 s ⁻¹) ^e	RTでは空気中での空気中のo/nを酸化する、空気中で4℃では安定、安定嫌気性
Tt H-NOX	13.6	1.22	非常に遅い	0.54 ± 0.07 s ⁻¹	常に安定
Tt Y140H	~10	5.03	0.87	1.7 ± 0.4 s ⁻¹	RTでは空気中での空気中のo/nを酸化する、空気中で4℃では安定、安定嫌気性
βI(1-385) I145Y	~105	2.69	0.72	Fe ^{III} -NO に対して緩やか	RTでは空気中での空気中のo/nを酸化する、空気中で4℃では安定、安定嫌気性

^a 20℃でのヘムに対するO₂の会合速度 (μM⁻¹s⁻¹) ; ^b 20℃でのヘムからのO₂解離速度 (h⁻¹) ; ^c 37℃でのヘムの自動酸化速度 (h⁻¹) ; ^d NO反応性の決定のために、精製したタンパク質 (Tt WT HNOX、Tt Y140H HNOX、Homo sapiensヘモグロビン (Hs Hb)) を2 μMの緩衝液の中に調製し、一酸化窒素 (NO) を20℃の緩衝液Aの中に200 μMで調製した (緩衝液A : 50 mMのHepes、pH7.5、50 mMのNaCl)。ストップフロー分光光

度計を使用して、0.00125秒の積分時間で、タンパク質をNOと1:1で迅速に混合した。最大変化の波長を、単一指数関数にフィットさせて、原則として、NOによる酸化の律速工程を測定した。反応の最終産物は、HNOXタンパク質についてはferric-NOであり、Hs Hbについてはferric-aquoであった。^eHs Hbについて、NOとのタンパク質の反応は、反応が実験の不感時間(0.001秒)以内に完了したほどに早かった。ヘモグロビンのNO反応性は、Eich, R. F. ら、(1996)「Mechanism of NO-Induced Oxidation of Myoglobin and Hemoglobin」, Biochemistry 35:6976-6983に基づく、20℃ではおよそ $7,000\text{ s}^{-1}$ である。

【0120】

10

表9は、O₂結合についての解離定数を、H-NOXタンパク質の1つ以上の残基を変異させることによって有意に変化させることができることを明らかに示している。これらの例示的なH-NOXタンパク質についての動力学的K_D値は、20℃では21.20nM~1000000.00nMまでの範囲である。所望される場合には、O₂結合についての解離定数を、本明細書中に記載されるように、表9に列挙される1つの変異または二重変異のいずれかを組み合わせることによって、あるいは、H-NOXタンパク質に1つ以上のさらに別の変異を導入することによって、さらに変化させることができる。

【0121】

表9. O₂結合についての解離定数の値によって並べられた、野生型H-NOXタンパク質および変異H-NOXタンパク質ならびに参照タンパク質

20

【0122】

【表 9】

タンパク質	動力学的 K_D (nM)	$\pm$	計算した K_D (nM)
<i>Tt</i> P115A	21.2	2.1	
<i>Tt</i> N74H			27
<i>Tt</i> I5L-P115A			30
<i>Tt</i> N74A			32
<i>Tt</i> I5A			80
<i>Tt</i> F78Y-Y140L			80
<i>Tt</i> H-NOX His6			89
<i>Tt</i> H-NOX	89.7	6.2	
<i>Tt</i> wt			90
<i>Tt</i> F78Y-Y140F			150
<i>Tt</i> W9Y			218
<i>Tt</i> R135Q His6			252
<i>Hs</i> Hb β			267
<i>Tt</i> W9F	305	31	
<i>Tt</i> W9H			456
<i>Tt</i> Y140H			500
<i>Hs</i> Hb α			560
<i>Tt</i> W9N			573
<i>Tt</i> I75F-His6			713-773
HemAT-B			720
<i>Sw</i> Mb			880
<i>Tt</i> I5L			1000
<i>Tt</i> L144F-His6			1092-1185
<i>Tt</i> Y140L			2000
<i>Tt</i> W9F-Y140H			2500
<i>L2</i> F142Y	9200	3000	
<i>Bj</i> FixL			140000
<i>Tt</i> W9F-N74A			1000000
<i>Dd</i> H-NOX			1000000
β 1(I-385) II45Y			1000000

表 10 は、 O_2 結合についての解離速度を、H-NOX タンパク質中の 1 つ以上の残基を変異させることによって有意に変化させることができることを明らかに示している。これらの例示的な H-NOX タンパク質についての解離速度は、 20°C では 0.21 s^{-1} ~ 23.4 s^{-1} までの範囲である。所望される場合には、 O_2 結合についての解離速度を、本明細書中に記載されるように、表 10 に列挙される 1 つの変異または二重変異のいずれかを組み合わせることによって、あるいは、H-NOX タンパク質に 1 つ以上のさらに別の変異を導入することによって、さらに変化させることができる。

【0123】

表 10. O_2 結合についての解離速度の値によって並べられた、野生型 H-NOX タンパク質および変異 H-NOX タンパク質ならびに参照タンパク質

【0124】

【表 10】

タンパク質	$k_{off}(s^{-1})$	±
Tt N74A	0.21	0.004
Tt P115A	0.22	0.01
Tt I5L-P115A	0.28	0.03
Tt N74E	0.38	0.01
Tt N74H	0.44	0.01
Tt I5A	0.82	0.03
Tt F78Y-Y140L	0.83	0.17
Tt H-NOX His6	1.2	0.02
Tt H-NOX	1.22	0.09
Tt F78Y-Y140F	1.48	0.33
L1 F142Y	1.73	
Tt W9F	1.84	0.17
$\beta 1(1-385)$ I145Y	2.69	0.61
Tt W9Y	3.07	0.1
Tt R135Q His6	3.56	0.08
L2 F142Y	3.68	0.71
Tt Y140H	5.03	0.69
Tt W9H	6.42	0.11
Dd H-NOX	7.13	0.45
Tt W9N	8.09	0.14
Tt I5L	9.5	0.64
Tt I75F-His6	10.48	0.12
Sw Mb	15	
Tt Y140F	15.7	9.8
Hs Hb β	16	
Tt L144F-His6	16.06	0.21
Bj FixL	20	
Tt Y140L	20.1	2
HemAT-B	23	
Tt W9F-Y140H	23.4	3.7
Hs Hb α	28	

表 1 1 は、 O_2 結合についての会合速度を、H-NOXタンパク質中の 1 つ以上の残基を変異させることによって有意に変化させることができることを明らかに示している。これらの例示的な H-NOXタンパク質についての会合速度は、 $20^\circ C$ では $60 \mu M^{-1} s^{-1} \sim 0.14 \mu M^{-1} s^{-1}$ までの範囲である。所望される場合には、 O_2 結合についての会合速度を、本明細書中に記載されるように、表 1 1 に列挙される 1 つの変異または二重変異のいずれかを組み合わせることによって、あるいは、H-NOXタンパク質に 1 つ以上のさらに別の変異を導入することによって、さらに変化させることができる。

【0125】

表 1 1. O_2 結合についての会合速度の値によって並べられた、野生型 H-NOXタンパク質および変異 H-NOXタンパク質ならびに参照タンパク質

【0126】

10

20

30

40

【表 1 1】

タンパク質	$k_{on} (\mu M^{-1} s^{-1})$	$\pm$
<i>Hs</i> Hb β	60	
<i>Hs</i> Hb α	50	
HemAT-B	32	
<i>Sw</i> Mb	17	
<i>Tt</i> Y140F	15.7	1.4
<i>Tt</i> H-NOX	13.6	1
<i>Tt</i> P115A	10.4	1.1
<i>Tt</i> W9F	6.02	0.62
<i>L2</i> F142Y	0.4	0.14
<i>Bj</i> FixL	0.14	
<i>Tt</i> W9F-N74A	非常に遅い ^a	
<i>Dd</i> H-NOX	非常に遅い ^a	
β 1(1-385) I145Y	非常に遅い ^a	

表 1 2 は、NO 結合および O₂ 結合に対する例示的な H-NOX 変異の影響を示している。Fe が連結していない形態について表 1 2 に列挙されるそれぞれの数字は、1 つのピークについての数字である（これは、 β 列および α 列の間に列挙される）。NO または O₂ が結合している場合には、この 1 つのピークが 2 つのピーク β と α に分かれる（これらはそれぞれ、 β 列および α 列の下に列挙される。所望される場合には、NO または O₂ 結合を、本明細書中に記載されるように、表 1 2 に列挙される 1 つの変異または二重変異のいずれかを組み合わせることによって、あるいは、H-NOX タンパク質に 1 つ以上のさらに別の変異を導入することによって、さらに変化させることができる。

【0 1 2 7】

表 1 2：いくつかのヒスチジルーリガンド Fe^{1 1} ヘムタンパク質複合体についての UV 可視ピークの位置^a

【0 1 2 8】

【表 1 2 - 1】

タンパク質	Soret	β	α
Fe ^{II} が連結していない複合体			
sGC	431	555	
β 1(I-385) I145Y	429	549	
Tt H-NOX	431	565	
Tt W9F-Y140L	430	560	
Vc H-NOX	429	568	
Np H-NOX	430	555	
L2 H-NOX	428	557	
L2 F142Y	428	557	
Tt I75F-His6	431	569	
Tt L144F-His6	433	564	
Hb	430	555	
Fe ^{II} -NO複合体			
sGC	398	537	572
β 1(I-385) I145Y	399/416	542	574
Tt H-NOX	420	547	575
Tt W9F-Y140L	423	540	573
Vc H-NOX	398	540	573
Np H-NOX	416/400	543	576
L2 H-NOX	399/416	544	575
L2 F142Y	417	544	578
Tt I75F-His6	418	545	574
Tt L144F-His6	416	544	574

10

20

30

【 0 1 2 9】

【表 1 2 - 2】

Hb	418	545	575
Fe^{II}-O₂ 複合体			
sGC	観察された複合体なし		
β1(1-385) I145Y	416	541	575
Tt H-NOX	416	556	591
Tt W9F-Y140L	観察された複合体なし		
Vc H-NOX	観察された複合体なし		
Np H-NOX	観察された複合体なし		
L2 H-NOX	観察された複合体なし		
L2 F142Y	417	542	577
Tt I75F-His6	416	552	589
Tt L144F-His6	416	544	574
Hb	415	541	577
^a nm (at 20 °C)			

表 1 3 には、いくつかの Fe (I I) 、 Fe (I I I) 、 Fe (I I) - NO 、および Fe (I I) - O₂ 複合体についての UV 可視ピークの位置が含まれる。ヘモグロビンまたは H-NOX タンパク質が嫌気性である場合には、これは約 4 3 1 nm に S o r e t ピークを有し、そしてこれは連結されていない状態である。H-NOX タンパク質が NO に結合しない場合には、S o r e t ピークは、NO が添加されても変化しないであろう。H-NOX タンパク質が NO に結合し、6-配位第二鉄-ニトロシル複合体を形成する場合には、その S o r e t ピークは、NO が添加されると、4 2 0 nm ~ 4 2 4 nm の間にシフトするであろう。H-NOX タンパク質が NO に結合し、5-配位第二鉄-ニトロシル複合体を形成する場合には、S o r e t ピークは約 3 9 9 nm にシフトするであろう。H-NOX タンパク質が O₂ に結合しない場合には、S o r e t ピークは、O₂ が添加されても変化しないであろう。H-NOX タンパク質が O₂ に結合する場合には、その S o r e t ピークは、O₂ が添加されると、4 1 4 nm ~ 4 1 8 nm の間にシフトするであろう。これは、ヘモグロビンにおいて起こるシフトと同じであり、ヘムに結合した O₂ の指標である。酸化された H-NOX (Fe (I I I)) についての S o r e t ピークは、保存または使用後の H-NOX タンパク質の状態と関係し得る。所望される場合には、NO または O₂ 結合を、本明細書中に記載されるように、表 1 3 に列挙される 1 つの変異または二重変異のいずれかを組み合わせることによって、あるいは、H-NOX タンパク質に 1 つ以上のさらに別の変異を導入することによって、さらに変化させることができる。

【0 1 3 0】

表 1 3 . いくつかの Fe (I I) 、 Fe (I I I) 、 Fe (I I) - NO 、および Fe (I I) - O₂ 複合体についての UV 可視ピークの位置

【0 1 3 1】

10

20

30

40

【表 1 3 - 1】

複合体	タンパク質	Soret	β	α
Fe (II)	Tt wt	430	563	
	Tt W9Y	430	569	
	Tt N74A	433	558	
	Tt N74H	431	561	
	Tt N74A-Y140H	430	567	
	Tt W9H	431	563	
	Tt N74E	433	559	
	Tt W9N	431	569	
	Tt wt His ₆	430	565	
複合体	タンパク質	Soret	β^a	α
Fe (III)	Tt wt	413	550	585
	Tt W9Y	409	N.A.	
	Tt N74A	416	554	586
	Tt N74H	408	N.A.	
	Tt N74A-Y140H	407	N.A.	
	Tt W9H	407	N.A.	
	Tt N74E	408	N.A.	
	Tt W9N	408	N.A.	
	Tt wt His ₆	413	550	586

^a「N. A.」は、より長い波長での低いシグナルが原因である、割り当てることができない α バンドと β バンドを示す

複合体	タンパク質	Soret	β	α
Fe(II) - NO	Tt wt	420	550	578
	Tt W9Y	420	552	576
	Tt N74A	421	572	
	Tt N74H	424	562	
	Tt N74A-Y140H	421	549	576
	Tt W9H	420	548	575
	Tt N74E	422	544	571
	Tt W9N	421	541	576

【 0 1 3 2 】

【表 1 3 - 2】

	Tt wt His ₆	420	547	576
複合体	タンパク質	Soret	β	α
Fe(II)-O ₂	Tt wt	416	556	591
	Tt W9Y	416	555	590
	Tt N74A	418	553	589
	Tt N74H	418	553	589
	Tt N74A-Y140H	414	555	584
	Tt W9H	418	556	589
	Tt N74E	417	555	587
	Tt W9N	416	588	553
	Tt wt His ₆	416	556	591

表 1 4 には、例示的な *T. tengcongensis* H-NOX タンパク質についての自動酸化速度が含まれる。所望される場合には、自動酸化速度を、本明細書中に記載されるように、表 1 4 に列挙される変異の任意の組み合わせによって、あるいは、H-NOX タンパク質に 1 つ以上のさらに別の変異を導入することによって、さらに変化させる

ことができる。表14の中の2nmおよび3nmの値の平均は、観察期間全体にわたる、2～3nmのUV-Vis Soretピークのシフトをいう；この例示的な小さな変化は、自己酸化が原因であり得る。

【0133】

表14. *T. tengcongensis* (Tt) H-NOXタンパク質についての自動酸化速度

【0134】

【表14】

タンパク質	自動酸化速度 (25 °C, hr ⁻¹) ^a
<i>Tt</i> wt	安定
<i>Tt</i> W9Y	安定
<i>Tt</i> N74A	安定
<i>Tt</i> N74H	4°Cでは安定、RTでは非常に遅い(2nm)
<i>Tt</i> W9H	安定
<i>Tt</i> N74E	4°Cでは非常に遅い(2nm)、RTでは遅い
<i>Tt</i> W9N	4°Cでは安定、RTでは非常に遅い(3nm)
<i>Tt</i> wt His ₆	安定
<i>Tt</i> I75F-His ₆	安定
<i>Tt</i> L144F-His ₆	安定

^a 「安定」は、少なくとも24時間の後にはヘムの酸化がないことを示す。

「RT」は室温を示す。

【0135】

H-NOX核酸

本発明はまた、本明細書中に記載される変異H-NOXタンパク質のうちの任意のものをコードする核酸を特徴とする。本明細書中で使用される場合は、「核酸」は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態の、2つ以上のデオキシリボヌクレオチドおよび／またはリボヌクレオチドを意味し、これは、他の場所に明記されない限りは、自然界に存在しているヌクレオチドと同様の様式で核酸にハイブリダイズする、自然界に存在しているヌクレオチドの公知のアナログを含む。いくつかの実施形態においては、核酸は組み換え体核酸である。「組み換え体核酸」によっては、目的の核酸が由来する生物体の自然界に存在しているゲノムの中で目的の核酸に隣接している1つ以上の核酸（例えば、遺伝子）が含まれていない目的の核酸を意味する。いくつかの実施形態においては、H-NOX核酸は、組み換え体核酸がH-NOXタンパク質（例えば、H-NOXタンパク質に由来する別のドメインを含むかまたはそれを含まないH-NOXドメイン）と、別のタンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン）の全体または一部が含まれている融合タンパク質をコードするように、別のタンパク質の全体または一部をコードする別の核酸に対して動作可能であるように連結される。したがって、この用語は、例えば、ベクターの中に、自律複製するプラスミドもしくはウイルスの中に、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAの中に組み込まれたか、あるいは、別の分子（例えば、cDNA、ゲノムDNA断片、またはPCRもしくは制限エンドヌクレアーゼ消化によって生産されたcDNA断片）として存在する、組み換え体DNAを含む。

【0136】

本発明はまた、本明細書中に記載される任意の変異H-NOXタンパク質をコードする1つ以上の核酸を含むベクターを特徴とする。本明細書中で使用される場合は、「ベクタ

一」は、宿主細胞の中で目的の1つ以上の核酸を送達し、そして状況に応じてこれを発現することができる構築物を意味する。ベクターの例としては、プラスミド、ウイルスベクター、DNAまたはRNA発現ベクター、コスミド、およびファージベクターが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態においては、ベクターは、発現制御配列の制御下に核酸を含む。「発現制御配列」は、目的の核酸の転写を指示する核酸配列を意味する。発現制御配列はプロモーター（例えば、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーター）あるいはエンハンサーであり得る。発現制御配列は、転写される核酸セグメントに動作可能であるように連結される。

【0137】

特定の実施形態においては、核酸は、図2～4Dまたは8A～8DDに示される任意の核酸の核酸配列のセグメントまたは全体を含む。いくつかの実施形態においては、核酸は、H-NOX核酸に由来する少なくとも約50、100、150、200、300、400、500、600、700、800個以上の連続しているヌクレオチドが含まれ、そしてこれには、それが由来するH-NOX核酸と比較して、1つ以上の変異（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の変異）を含む。様々な実施形態においては、変異H-NOX核酸は、それが由来するH-NOX核酸と比較して、約20、15、12、10、9、8、7、6、5、4、3、または2個未満の変異を含む。本発明はまた、変異H-NOXタンパク質をコードする任意の核酸の縮重変異体をも特徴とする。

【0138】

本発明はまた、本明細書中に記載される変異H-NOXタンパク質をコードする少なくとも1つの核酸が含まれている細胞、または細胞の集団を含む。例示的な細胞としては、昆虫、植物、酵母、細菌、および哺乳動物の細胞が挙げられる。これらの細胞は、本明細書中に記載される方法のような標準的な方法を使用する変異H-NOXタンパク質の生産に有用である。

【0139】

H-NOXタンパク質の処方

本明細書中に記載される任意の野生型H-NOXタンパク質または変異H-NOXタンパク質は、薬学的組成物または非薬学的組成物の処方に使用することができる。以下でさらに議論されるように、これらの処方物は、様々な治療への応用および産業的応用に有用である。

【0140】

いくつかの実施形態においては、薬学的組成物は、1つ以上の野生型H-NOXタンパク質または変異H-NOXタンパク質（例えば、本明細書中に記載される野生型H-NOXタンパク質または変異H-NOXタンパク質のいずれか）と薬学的に許容される担体を含む。様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質は、単離されたタンパク質または精製されたタンパク質である。「薬学的に許容される担体」によっては、有効成分と組み合わせられた場合に、その性分が生物学的活性を保つことができ、そして当業者の知識に基づいて許容されない免疫応答（例えば、重篤なアレルギーまたはアナフィラキシーショック）を誘発することのない、任意の物質を意味する。例としては、リン酸緩衝化生理食塩溶液、水、エマルジョン（例えば、油／水エマルジョン）、および様々なタイプの湿潤剤のような、任意の標準的な薬学的担体が挙げられるが、これらに限定されない。エアゾール投与または非経口投与のための例示的な希釈剤は、リン酸緩衝化生理食塩水または生理食塩水（0.9%）である。そのような担体が含まれている組成物は、周知の従来法によって処方される（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、A. Gennaro、編、Mack Publishing Co.、Easton PA、1990；およびRemington, The Science and Practice of Pharmacy 第20版、Mack Publishing、2000（これらはそれぞれが、特に処方物に関してその全体が参照として本明細書中に組み込まれる）を参照のこと）。

【0141】

当業者に公知の任意の適切な担体を本発明の薬学的組成物において使用することができるが、担体のタイプは投与の態様に応じて変化するであろう。組成物は、任意の適切な投与様式（例えば、静脈内、動脈内、膀胱内、吸入、腹腔内、肺内、筋肉内、皮下、気管内、経粘膜、眼内、クモ膜下、または経皮投与を含む）のために処方することができる。皮下注射のような非経口投与については、担体には、例えば、水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックス、または緩衝液が含まれ得る。経口投与については、任意の上記の担体または固体担体（例えば、マンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、または炭酸マグネシウム）を使用することができる。生体分解性マイクロスフェア（例えば、ポリアセテートポリグリコレート）もまた、担体として使用される場合がある。

10

【0142】

いくつかの実施形態においては、薬学的組成物または非薬学的組成物は、緩衝液（例えば、中性の緩衝化生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水など）、炭水化物（例えば、グルコース、マンノース、スクロース、デキストランなど）、抗酸化剤、キレート化剤（例えば、EDTA、グルタチオンなど）、保存剤、NOの結合および／または輸送に有用な別の化合物、不活性な成分（例えば、安定化剤、増量剤など）、あるいは上記の2つ以上の組み合わせを含む。いくつかの実施形態においては、組成物は、凍結乾燥物として処方される。H-NOXタンパク質はまた、周知の技術を使用してリポソームまたはナノ粒子の中にカプセル化される場合もある。H-NOXタンパク質に使用することができる別の例示的な処方物は、例えば、米国特許第6,974,795号および同第6,432,918号（これらはそれぞれ、特に、タンパク質の処方に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる）に記載されている。

20

【0143】

本明細書中に記載される組成物は、徐放性処方物（例えば、投与後に化合物の緩やかな放出を生じるカプセルまたはスポンジのような処方物）の一部として投与される場合がある。そのような処方物は、通常、周知の技術を使用して調製することができ、そして例えば、経口、直腸、または皮下への埋め込み、あるいは所望される標的部位への移植によって投与することができる。徐放性処方物は、担体マトリックスの中に分散された、および／または速度制御膜によって囲まれているレザーバーの中に含まれるH-NOXタンパク質を含む場合がある。そのような処方物に使用される担体は生体適合性であり、これは生体分解性でもあり得る。いくつかの実施形態においては、この処方物によって、比較的一定のレベルのH-NOXタンパク質の放出が提供される。徐放性処方物の中に含まれているH-NOXタンパク質の量は、移植部位、放出速度および期待される期間、および治療もしくは予防される症状の性質に応じて様々である。

30

【0144】

いくつかの実施形態においては、薬学的組成物は、有効量の野生型H-NOXタンパク質または変異H-NOXタンパク質を含む。用語「有効量」は、効力と毒性についてのそのパラメータの組み合わせにおいて、実施する専門家の知識に基づいて所定の治療的形態において有効であるはずである、本明細書中に記載される1つ以上のタンパク質のそのような量を意図する。当該分野で理解されているように、有効量は、単回用量であっても、また、それ以上の用量であってもよい。臨床的状况で理解されるように、薬学的組成物の有効量は、別の薬物、化合物、または薬学的組成物との組み合わせにおいて得られる場合も、またそうではない場合もある。したがって、有効量は、1つ以上の他の薬剤との組み合わせにおいて、所望されるかもしくはは有用な結果を得ることができるか、または所望されるかもしくはは有用な結果が得られる場合には、1つ以上の治療薬を投与する状況において考慮することができ、そして、単一の薬剤が、有効量で投与されるように考慮することもできる。

40

【0145】

血液代用物としてのヘモグロビンの例示的な用量は、患者の体重1キログラムあたり、約10mg～約5グラムまたはそれ以上の細胞外ヘモグロビンである。同様の用量のH-

50

NOXタンパク質をNOの送達に使用することができる。したがって、いくつかの実施形態においては、ヒトに投与されるH-NOXタンパク質の有効量は、数グラム～約350グラムを超えるまでの間である。他の例示的なH-NOXタンパク質の用量としては、適切な注入速度（例えば、約0.5ml/分）での、約4.4、5、10、または13G/DL（この場合、G/DLは、循環への注入の前のH-NOXタンパク質溶液の濃度である）のいずれかが挙げられる（例えば、Winslow, R. 第12章、Blood Substitutesを参照のこと）。いくつかの実施形態においては、10mg未満のH-NOXタンパク質の用量が、一時的な血管拡張のために使用される。それぞれの投与形態の個々の用量の中に含まれる有効成分の単位含有量が、それ自体が有効量を構成する必要はないことが理解されるであろう。なぜなら、必要な有効量は、複数回の投与による作用の合計によってもたらされ得るからである。薬学的組成物の中に含まれるH-NOXタンパク質の量の選択は、利用される投与形態、治療される症状、その分野の当業者の決定にしたがって達成される特定の目的に応じて様々である。

10

【0146】

例示的な組成物としては、遺伝子操作された、組み換え体H-NOXタンパク質が挙げられる。これは、単離されている場合も、また精製されている場合もあり、これは、対応する野生型H-NOXタンパク質と比較してNOもしくはO₂リガンド結合がまとめて変化されており、生理学的に適合する哺乳動物の血液ガスNO担体として作動することができる1つ以上の変異体を含む。例えば、本明細書中に記載されている変異H-NOXタンパク質である。

20

【0147】

本発明によってはまた、1つ以上の野生型H-NOXタンパク質または変異H-NOXタンパク質が含まれているか、あるいは原則としてそれらから構成されているNO担体が提供される。タンパク質（例えば、血液または消化器系に送達されるタンパク質）の処方のための適切な緩衝液および他の成分は当該分野で公知である。

【0148】

薬学的組成物が投与されるヒト被験体において免疫応答を軽減または予防するためには、ヒトH-NOXタンパク質（野生型ヒトタンパク質、または1つ以上の変異が導入されているヒトタンパク質のいずれか）、あるいは他の非抗原性H-NOXタンパク質（例えば、哺乳動物H-NOXタンパク質）を使用することができる。ヒト以外の供給源に由来するH-NOXタンパク質の免疫原性を低下させるまたは排除するためには、H-NOXタンパク質中のアミノ酸を、ヒトH-NOXタンパク質中の対応するアミノ酸に変異させることができる。例えば、ヒト以外のH-NOXタンパク質の三次構造の表面上にある1つ以上のアミノ酸を、ヒトH-NOXタンパク質中の対応するアミノ酸に変異させることができる。

30

【0149】

H-NOXタンパク質の治療的応用

本明細書中に記載される任意の野生型H-NOXタンパク質または変異H-NOXタンパク質（例えば、単離または精製されたH-NOXタンパク質）あるいは薬学的組成物は、治療的応用において使用することができる。

40

【0150】

特定のH-NOXタンパク質を、治療される特定の適応症についての所望されるNO解離定数、O₂解離定数、NO k_{off}、O₂ k_{off}、NO反応性、NO安定性、自動酸化速度、血漿保持時間、半減期、または上記の2つ以上の任意の組み合わせに基づいて、そのような応用のために選択することができる。H-NOXタンパク質は、NOの送達が有効である任意の症状を治療するために使用することができる。例示的な標的の適応症としては、機能性NO欠乏症の疾患（例えば、血管拡張剤またはNO担体が適用される場合）が挙げられ、これには、慢性高血圧によって悪化した症状（例えば、心不全、腎不全、および脳卒中を含む）。様々な実施形態においては、治療される症状は心臓血管の症状（例えば、心筋梗塞、または心臓の外科手術）、高血圧、血管収縮の症状（例えば、脳

50

卒中)、勃起障害、便秘、または腸閉塞である。便秘または腸閉塞の治療については、H-NOXタンパク質は、括約筋調節能力の障害を治療するためにNOを送達するために使用することができ、それにより、平滑筋が弛緩する。例えば、消化器系において機能するH-NOXタンパク質は、H-NOXタンパク質が消化器系を通過するのに伴い、回腸の平滑筋を弛緩させることができる。これらの方法および組成物を、急性の状況(組織または特異的な部位にNOが迅速に提供される、例えば、急性心筋梗塞または脳卒中)、ならびに、慢性の状況(例えば、慢性高血圧、または急性心筋梗塞もしくは脳卒中からの急性期後の回復)の両方に应用することができる。

【0151】

様々な実施形態においては、本発明は、個体にNOを送達するために十分な量の野生型H-NOXタンパク質もしくは変異H-NOXタンパク質を、それが必要な個体に投与することによる、個体(例えば、哺乳動物、例えば、霊長類(例えば、ヒト、サル、ゴリラ、類人猿、キツネザルなど)、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、またはネコ))に対してNOを送達する方法を特徴とする。いくつかの実施形態においては、本発明は、血液ガスを個体(例えば、哺乳動物)に運搬または送達する方法が提供される。この方法は、1つ以上のH-NOX組成物を個体(例えば、哺乳動物)の血液に送達する工程を含む。血液、消化器系、または組織(例えば、哺乳動物の血液または組織)にタンパク質を送達するための方法は当該分野で公知である。様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質は、ヘムに結合することができるアポタンパク質であっても、また、ヘムが結合したホロタンパク質であってもよい。H-NOXタンパク質は、個体へのH-NOXタンパク質の投与の前に結合されたヘムを有している場合も、またそれを有していない場合もある。他の実施形態においては、NOは、個体への投与の前にはH-NOXタンパク質に結合されず、H-NOXタンパク質は、個体中の1つの位置から個体中の別の位置にNOを輸送する。例えば、特定の実施形態においては、H-NOXタンパク質は、血流の中のNOに結合し、NO濃度が非常に低い場所(例えば、血管収縮の部位)でのみこれを放出する。この標的化されたNOの送達によっても、局所的なNO濃度とは無関係にNOを放出し、したがって、全身的に作用を及ぼし、頭痛および周囲のヒリヒリ感のような副作用を伴う従来の血管拡張剤によって生じる副作用よりも副作用は少なくなり得る。

【0152】

本発明の方法は、任意の個体を治療するために使用することができる。本明細書中での使用のためには、他の場所に明記されない限りは、「個体」は、本明細書中で使用される場合は、哺乳動物(霊長類(例えば、ヒト、サル、ゴリラ、類人猿、キツネザルなど)、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、またはネコを含むがこれらに限定されない)が意図される。したがって、本発明により、ヒト用の医薬品と、獣医学的状況(農業用動物および家畜ペットにおける使用を含む)の両方における用途が見出される。個体は、心臓血管の症状(例えば、心筋梗塞または心臓の外科手術)、高血圧、高血圧によって悪化した症状(例えば、心不全、腎不全、または脳卒中)、血管収縮の症状(例えば、脳卒中)、NO機能不全、勃起障害、便秘、または腸閉塞のような適応症と診断されている場合も、それらを有している疑いがある場合も、あるいは、それらを発症する危険性がある場合もある。個体は、これらの適応症に関係している1つ以上の症状を示す場合がある。個体は、そのような症状を発症する遺伝的素因があり得るか、または別の理由でそのような素因があり得る。

【0153】

本明細書中で使用される場合は、「その必要がある」には、症状または疾患(例えば、心臓血管の症状(例えば、心筋梗塞または心臓の外科手術)、高血圧、高血圧によって悪化した症状(例えば、心不全、腎不全、または脳卒中)、血管収縮の症状(例えば、脳卒中)、NO機能不全、勃起障害、便秘、または腸閉塞)を有しているか、あるいは、そのような症状または疾患の「危険性がある」個体を含む。本明細書中で使用される場合は、「危険性がある」個体は、症状(例えば、心臓血管の症状(例えば、心筋梗塞または心臓の外科手術)、高血圧、高血圧によって悪化した症状(例えば、心不全、腎不全、または脳卒中)、血管収縮の症状(例えば、脳卒中)、NO機能不全、勃起障害、便秘、または

腸閉塞)を発症する危険性がある個体である。「危険性がある」個体は、検出することができる疾患もしくは症状を有している場合も、また有していない場合もあり、そして本明細書中に記載される治療方法の前に検出することができる疾患が明らかになっている場合も、また明らかになっていない場合もある。「危険性がある」は、個体が1つ以上のいわゆる危険因子を有していることを示す。危険因子は、疾患または症状の発症と相関関係がある測定可能なパラメータであり、当該分野で公知である。1つ以上のこれらの危険因子を有している個体は、これらの危険因子(単数または複数)を有していない個体よりも、疾患または症状を発症する可能性が高い。これらの危険因子には、年齢、性別、人種、食事療法、これまでの病歴、病気の前兆の存在、遺伝的(すなわち、遺伝性)な検討材料、および環境暴露を含むが、これらに限定されない。

10

【0154】

これらの方法は、そのためにはNOの送達が有効である任意の症状を治療するか、または遅らせるために使用することができる。「治療」または「治療する」によっては、有効な結果または所望される結果(臨床的結果を含む)を得るためのアプローチを意味する。本発明の目的のためには、有用な結果または所望される結果には、症状(例えば、心臓血管の症状(例えば、心筋梗塞または心臓の外科手術)、高血圧、高血圧によって悪化した症状(例えば、心不全、腎不全、または脳卒中)、血管収縮の症状(例えば、脳卒中)、NO機能不全、勃起障害、便秘、または腸閉塞であるが、これらに限定されない)に伴う兆候の緩和、症状に伴う兆候の程度の縮小、または症状に伴う兆候の悪化を防ぐことを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態においては、本明細書中に開示される1つ以上のタンパク質での治療には、副作用は付随しないか、または現在利用することができる治療に付随する副作用よりも少ない副作用が付随する。

20

【0155】

本明細書中で使用される場合は、疾患または症状の発症を「遅らせること」は、疾患または症状(例えば、心臓血管の症状(例えば、心筋梗塞または心臓の外科手術)、高血圧、高血圧によって悪化した症状(例えば、心不全、腎不全、または脳卒中)、血管収縮の症状(例えば、脳卒中)、NO機能不全、勃起障害、便秘、または腸閉塞)の発症を引き伸ばす、妨げる、遅くする、妨害する、安定化させる、および/またはあとに延ばすことを意味する。この遅延は、治療される疾患および/または個体の病歴に応じて、様々な時間の長さであり得る。当業者に明らかであるように、十分な、または有意な遅延には、事実上、予防が含まれ得、この場合、個体は、疾患または症状を発症しない。例えば、この方法により、この方法を使用しなかった場合と比較して、所定の時間枠の中での疾患の発症の可能性が低下する場合があります、そして/また、所定の時間枠の中での疾患の程度が軽減する場合もある。いくつかの実施形態においては、そのような比較は、統計学的に有意な数の被験体を使用する臨床試験に基づく。疾患の発症は、標準的な臨床的技術を使用して検出することができる。発症はまた、最初は検出不可能であり得る疾患の進行をもまた意味する場合があります、これは、発生、再発、および発症を含む。

30

【0156】

体内の特定の部位(例えば、組織または臓器)へのNOが結合したH-NOXタンパク質の直接の送達のためのいくつかの実施形態においては、NOについての k_{off} は、 K_D よりも重要である。なぜなら、NOはタンパク質にすでに結合しており(k_{on} を重要ではなくしてしまう)、NOが体内の特定の部位またはその付近で放出される(k_{off} による影響を受ける速度で)必要があるからである。急性の症状の治療のためのいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、NOに対して比較的高い k_{off} 、 k_1 、または k_2 (例えば、少なくとも約 0.05 s^{-1} 、 0.1 s^{-1} 、または 1.0 s^{-1} のいずれか)を有しており、その結果、血管拡張が迅速に起こる。全身的投与についてのいくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、NOに対して比較的低い k_{off} 、 k_1 、または k_2 (例えば、約 0.05 s^{-1} 未満、 0.01 s^{-1} 未満、または 0.001 s^{-1} 未満のいずれか)を有しており、その結果、NOは、H-NOXタンパク質が低いNO濃度の部位(例えば、血管収縮している部位)に達するまでは放出さ

40

50

れない。

【0157】

H-NOXタンパク質はまた、画像化のためにも使用することができる。具体的には、光イメージング(light imaging)(例えば、光コヒーレンス・トモグラフィー;例えば、Villard, J. W. (2002)「Use of a Blood Substitute to Determine Instantaneous Murine Right Ventricular Thickening with Optical Coherence Tomography」, Circulation 105:1843-1849(これが、特に光コヒーレンス・トモグラフィーに関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)を参照のこと)が、赤血球によって曖昧にされる。H-NOX溶液での灌流により、循環および血管壁の鮮明な画像が可能となる。なぜなら、H-NOXタンパク質は赤血球よりもはるかに小さいからである。

10

【0158】

本発明のH-NOXタンパク質および薬学的組成物は、任意の従来の手段(例えば、経口、局所、眼内、クモ膜下、肺内、気管内、またはエアゾール投与)によって;経皮または粘膜吸収によって;あるいは注射(例えば、皮下、静脈内、動脈内、膀胱内、または筋肉内注射)によって、個体に投与することができる。H-NOXタンパク質はまた、血液への投与のための多量の非経口用の溶液の中に含まれる場合もある。例示的な実施形態においては、H-NOXタンパク質は、個体の血液に投与される(例えば、血管(例えば、静脈、動脈、または毛細血管)への投与)。

20

【0159】

いくつかの実施形態においては、組成物の持続性の徐放性処方物が使用される。H-NOXタンパク質の投与は、例えば、投与の目的に応じて数秒間~数時間の期間にわたって行われ得る。急性の症状については、例示的な投与期間は、可能な限り迅速である。他の例示的な期間としては、約10、20、30、40、60、90、または120分が挙げられる。H-NOX溶液についての例示的な注入速度は、約30mL/時間~約13,260mL/時間、例えば、約100mL/時間~約3,000mL/時間である。例示的なH-NOXタンパク質の全用量は、13,260mL/時間で20分間かけて投与される約900mg/kgである。ブタについてのH-NOXタンパク質の例示的な全用量は、約18.9グラムである。

30

【0160】

例示的な投与頻度としては、1週間に少なくとも1回、2回、3回、4回、5回、6回、または7回(すなわち、毎日)が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、1日に少なくとも2回、3回、4回、または6回投与される。H-NOXタンパク質は、例えば、数日間~数週間の期間にわたって投与することができる。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質は、さらに長い期間(例えば、数ヶ月間または数年間)にわたって投与される。組成物の投与頻度は、投与を行う医師の判断に基づいて、治療期間全体を通じて調整される場合がある。

【0161】

上記のように、H-NOXタンパク質の投与量の選択は、利用される投与形態、投与頻度および回数、治療される症状、ならびに当業者の決定にしたがって達成される特定の目的に応じて様々である。いくつかの実施形態においては、ヒトに投与されるH-NOXタンパク質の有効量は、数グラム~350グラムを超えるまでの間である。

40

【0162】

いくつかの実施形態においては、2つ以上の異なるH-NOXタンパク質が、同時に、連続して、または一斉に投与される。いくつかの実施形態においては、NOの送達に有用な別の化合物または治療が、1つ以上のH-NOXタンパク質の投与と同時に、連続して、または一斉に投与される。

【0163】

H-NOXタンパク質の産業的応用

50

本明細書中に記載されるH-NOXタンパク質および組成物はまた、多くのインビトロでの応用または産業的応用にも使用することができる（例えば、米国特許第6,455,676号（これは、特に、インビトロでの応用または産業的応用に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる）を参照のこと）。特定のH-NOXタンパク質は、特定の応用についての所望されるNO解離定数、O₂解離定数、NO k_{off}、O₂ k_{off}、NO反応性、NO安定性、自動酸化速度、血漿保持時間、半減期、または上記の2つ以上の任意の組み合わせに基づいて、そのような応用のために選択することができる。産業的応用の様々な実施形態においては、H-NOXタンパク質は、ヘムに結合することができるアポタンパク質であっても、また、ヘムが結合したホロタンパク質であってもよい。

10

【0164】

H-NOXタンパク質は、それについてNOが所望される溶液にNOを加えるために使用することができる。嫌気性醗酵が必要なバイオリクターを使用する実施形態においては、H-NOXタンパク質は、細胞にNOを送達するために使用される。例えば、ミトコンドリアへのNOの送達、酸化リン酸化を制限する場合があります、乳酸経路を介する代謝を促進する場合があります。（バイオ燃料発生器としての嫌気性醗酵下で培養された）*Clostridium acetobutylicum*のH-NOXタンパク質は、自然な状態でその機能を果たし得る。さらに、H-NOXタンパク質は、NOの除去が必要な溶液からNOを除去するために使用することができる。例えば、H-NOXタンパク質は、NOが細胞増殖および／またはミトコンドリア機能の阻害因子である場合には、バイオリクターの中のNOを吸着する、または除去するために使用することができる。NOの除去によりミトコンドリア機能は改善され得るか、アポトーシスが制限され得るか、細胞あたりの生産性が向上し得るか、または、上記の2つ以上の任意の組み合わせが生じ得る。

20

【0165】

H-NOXタンパク質を含むキット

本明細書中に記載される任意のH-NOXタンパク質と適切なパッケージングが含まれている製品およびキットもまた提供される。いくつかの実施形態においては、本発明は、（i）H-NOXタンパク質（例えば、本明細書中に記載される野生型H-NOXタンパク質もしくは変異H-NOXタンパク質、または本明細書中に記載されているようなその処方物）と、（ii）個体にNOを送達するためのキットの使用についての説明書が含まれているキットを含む。様々な実施形態においては、本発明は、（i）H-NOXタンパク質（例えば、本明細書中に記載されている野生型H-NOXもしくは変異H-NOX、または本明細書中に記載されているようなその処方物）と、（ii）本明細書中に記載される任意の産業的な用途（例えば、溶液へのNOの添加、または溶液からのNOの除去）についてのキットの使用のための説明書が含まれているキットを特徴とする。

30

【0166】

本明細書中に記載される組成物についての適切なパッケージングは当該分野で公知であり、これは例えば、ウイルス（例えば、密封されたウイルス）、容器、アンプル、瓶、広口瓶、柔軟性のあるパッケージング（例えば、密封されたマイラー、またはプラスチックバッグ）などを含む。これらの製品は、さらに滅菌および／または密封される場合もある。本明細書中に記載される組成物が含まれている単位投与量形態もまた提供される。これらの単位投与量形態は、1単位の投与量、もしくは複数の単位の投与量で適切なパッケージングの中で保存することができ、これもまた、さらに滅菌し、密封することができる。本発明のキットの中に供給される説明書は、通常は、ラベルまたはパッケージの挿入物に印刷された文書（例えば、キットの中に含められる紙シート）であるが、機械で読み取ることができる説明書（例えば、磁気ディスクまたは光学保存ディスク上にある説明書）もまた許容される。H-NOXタンパク質の使用に関する説明書は、一般的には、投与量、投与スケジュール、および意図される治療または産業的な用途のための投与経路に関する情報を含む。キットはさらに、個々の適切な治療の選択についての記載を含む場合がある。

40

50

【0167】

容器は、単位用量、大量包装（例えば、多用量パッケージ）、または副次的単位用量であり得る。例えば、長期間（例えば、約2週間、約3週間、約4週間、約6週間、約8週間、約3ヶ月間、約4ヶ月間、約5ヶ月間、約6ヶ月間、約7ヶ月間、約8ヶ月間、約9ヶ月間のいずれそれ以上）にわたり個体の効果的な治療を提供するために十分な投与量の本明細書中に開示されるH-NOXタンパク質が含まれているキットもまた提供され得る。キットにはまた、複数の単位用量のH-NOXタンパク質と使用のための説明書が含まれ得、薬局（例えば、病院薬剤部および調剤薬局）での保存および使用に十分な量でパッケージされ得る。いくつかの実施形態においては、キットは、再構成、再懸濁、または再水和して、一般的にH-NOXタンパク質の安定な水性懸濁液を形成させることができる乾燥（例えば、凍結乾燥された）組成物を含む。

10

【0168】

H-NOXタンパク質の生産のための例示的な方法

本発明によってはまた、本明細書中に記載される任意の変異H-NOXタンパク質の生産のための方法も提供される。いくつかの実施形態においては、この方法は、変異H-NOXタンパク質の生産に適している条件下で、変異H-NOXタンパク質をコードする核酸を有している細胞を培養する工程を含む。様々な実施形態においては、変異H-NOXはまた、精製（例えば、細胞または培養培地からのH-NOXタンパク質の精製）される。

【0169】

上記のように、いくつかの野生型H-NOXタンパク質および核酸の配列は公知であり、本発明の変異H-NOXタンパク質および核酸を作成するために使用することができる。組み換え体H-NOXタンパク質の変異、発現、および精製のための技術は、例えば、Boon, E. M. ら、(2005)「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chemical Biology 1:53-59、およびKarrow, D. S. ら、(2004年8月10日)「Spectroscopic Characterization of the Soluble Guanylate Cyclase-Like Heme Domains From Vibrio Cholerae And Thermoanaerobacter Tengcongensis」, Biochemistry 43(31):10203-10211（これは、特に、組み換え体H-NOXタンパク質の変異、発現、および精製に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる）に記載されている。これらの技術または他の標準的な技術を使用して、任意の変異H-NOXタンパク質を作成することができる。

20

30

【0170】

具体的には、本明細書中に記載される変異H-NOXタンパク質は、当該分野で公知の多くの方法によって作成することができる。変異は、アミノ酸の化学的修飾によってアミノ酸レベルで、または所定のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列の変更によってコドンレベルでのいずれかで、行うことができる。タンパク質中の任意の所定の位置でのアミノ酸の置換は、そのアミノ酸をコードするコドンを変化させることによって行うことができる。これは、例えば以下を使用する部位特異的突然変異誘発によって行うことができる：(i) Taylor, J. W. ら、(1985年12月20日)の方法に基づくAmersham技術(Amersham mutagenesisキット、Amersham, Inc., Cleveland, Ohio)「The Use of Phosphorothioate-Modified DNA in Restriction Enzyme Reaction to Prepare Nicked DNA」, Nucleic Acids Res. 13(24):8749-8764; Taylor, J. W. ら、(1985年12月20日)「The Rapid Generation of Oligonucleotide-Directed Mutations at High Frequency Using Phosphorothioate-Mo

40

50

modified DNA」, Nucleic Acids Res. 13 (24) : 8765-8785; Nakamaye, K. L. ら、(1986年12月22日)「Inhibition of Restriction Endonuclease Nci I Cleavage by Phosphorothioate Groups and its Application to Oligonucleotide-Directed Mutagenesis」, Nucleic Acids Res. 14 (24) : 9679-9698; および Dente ら、(1985) DNA Cloning, Glover, 編, IRL Press, 791-802頁、(ii) Promega キット (Promega Inc., Madison, Wis.)、または (iii) Kunkel, T. A. (1985年1月)の方法に基づく Biorad キット (Biorad Inc., Richmond Calif.)「Rapid And Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection」, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 (2) : 488-492; Kunkel, T. A. (1987)「Rapid And Efficient Site-Specific Mutagenesis Without Phenotypic Selection」, Methods Enzymol. 154 : 367-382; Kunkel, 米国特許第4, 873, 192号 (これらはそれぞれ、特に、タンパク質の突然変異誘発に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)。突然変異誘発はまた、変異体オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的突然変異誘発を利用する手段のような、他の市販されている手段によって、または市販されていない手段によって行うこともできる。

10

20

【0171】

部位特異的突然変異誘発はまた、以下に記載されているようなPCRに基づく突然変異誘発を使用して行うこともできる: Zhengbin ら、(1992)、PCR Methods and Applications Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York の205~207頁、; Jones, D. H. ら、(1990年2月)「A Rapid Methods For Site-Specific Mutagenesis And Directional Subcloning by Using the Polymerase Chain Reaction to Generate Recombinant Circles」, Biotechniques 8 (2) : 178-183; Jones, D. H. ら、(1991年1月)「A Rapid Method For Recombination And Site-Specific Mutagenesis by Placing Homologous Ends on DNA Using Polymerase Chain Reaction」, Biotechniques 10 (1) : 62-66 (これらはそれぞれ、特に、タンパク質の突然変異誘発に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)。部位特異的突然変異誘発はまた、当業者に公知の技術を用いるカセット突然変異誘発を使用して行うこともできる。

30

【0172】

変異H-NOX核酸は、標準的な技術を使用して、発現ベクターのようなベクターに取り込ませることができる。例えば、制限酵素を使用して、変異H-NOX核酸とベクターを切断することができる。その後、切断された変異H-NOX核酸と切断されたベクターの適合する末端を連結させることができる。得られるベクターは、コードされるH-NOXの発現のために、標準的な技術 (例えば、エレクトロポレーション) を使用して、細胞 (例えば、昆虫細胞、植物細胞、酵母細胞、または細菌細胞) の中に挿入することができる。

40

【0173】

具体的には、異種タンパク質が、多くの生物学的発現システム (例えば、昆虫細胞、植物細胞、酵母細胞、および細菌細胞) の中で発現されている。したがって、任意の適切な生物学的タンパク質発現システムを利用して、多量の組み換え体H-NOXタンパク質を

50

生産することができる。いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質（例えば、変異H-NOXタンパク質または野生型H-NOXタンパク質）は単離されたタンパク質である。本明細書中で使用される場合は、「単離されたタンパク質」は、タンパク質が自然界においてそれと会合している1つ以上の成分（例えば、核酸、脂質、および他のタンパク質を含む）から分離されたタンパク質を意味する。単離されたタンパク質はまた、2、5、10、20、50種類以上の様々なタンパク質ライブラリーのような、タンパク質のライブラリーの中には存在しない。単離されたタンパク質は、例えば、タンパク質をコードする組換え型核酸の発現によって、またはタンパク質の化学合成によって得ることができる。

【0174】

所望される場合には、H-NOXタンパク質は、標準的な技術を使用して精製することができる。本明細書中で使用される場合は、「精製されたタンパク質」は、タンパク質が生産される場合に存在する1つ以上の成分から分離されたタンパク質（例えば、変異H-NOXタンパク質または野生型H-NOXタンパク質）を意味する。いくつかの実施形態においては、タンパク質は、そのうちの少なくとも約60重量%には、タンパク質が生産される場合に存在する他の成分は含まれない。様々な実施形態においては、タンパク質は、少なくとも約75重量%、90重量%、または99重量%純粋である。精製されたタンパク質は、例えば、自然界の供給源、組み換え発現システム、または化学合成のための反応混合物からの精製（例えば、抽出）によって得ることができる。例示的な精製方法としては、免疫沈降、カラムクロマトグラフィー（例えば、免疫アフィニティークロマトグラフィー）、磁気ビーズ免疫親和性精製、およびプレートに結合させた抗体を用いるpanning、ならびに当業者に公知の他の技術）が挙げられる。純度は、任意の適切な方法によって（例えば、カラムクロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、またはHPLC分析によって）アッセイすることができる。いくつかの実施形態においては、精製されたタンパク質は、本発明の薬学的組成物の中に取り込ませられるか、または、本発明の方法において使用される。本発明の薬学的組成物は、精製されたタンパク質に加えて、添加剤、担体、または他の成分を含む場合がある。

【実施例】

【0175】

純粋に本発明の例と意図され、したがって、いかなる方法においても本発明を限定するようには解釈されるべきではない実施例でもまた、上記で議論された本発明の詳細な態様と実施形態が記載される。実施例は、以下の実験が行われる全てのまたは限られた実験であることを示すようには意図されない。他の場所に明記されない限りは、温度はセ氏温度であり、圧力は大気圧であるかまたはほぼ大気圧である。

【0176】

（実施例1）

野生型H-NOXタンパク質および変異H-NOXタンパク質の生産

野生型H-NOXタンパク質および変異H-NOXタンパク質を、原則として、Boon, E. M. ら、(2005)「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chemical Biology 1:53-59、およびKarow, D. S. ら、(2004年8月10日)「Spectroscopic Characterization of The Soluble Guanylate Cyclase-Like Heme Domains From Vibrio Cholerae And Thermoanaerobacter Tengcongensis」, Biochemistry 43(31):10203-10211（これらはいずれも、特に、H-NOXタンパク質の突然変異誘発、発現、および精製に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる）に記載されているとおりに、標準的な方法を使用して生産させ、発現させ、そして精製した。突然変異誘発は、Stratagene (La Jolla, CA) によるQuickChange（登録商標）プロトコルを使用

して行った。細胞培養物中でのタンパク質の発現、およびその後のタンパク質の精製は、Karow, D. S. ら、(2004年8月10日)「Spectroscopic Characterization of the Soluble Guanylate Cyclase-Like Heme Domains From *Vibrio Cholerae* And *Thermoanaerobacter Tengcongensis*」, *Biochemistry* 43 (31): 10203-10211に記載されているとおりに行った。

【0177】

(実施例2)

変異H-NOXタンパク質の特性決定

10

計算したNOに対する K_D : k_{off} に対する k_{on} の比

計算したNOに対する K_D を決定するために、H-NOXタンパク質についてのNOに対する k_{on} の値を $710 \mu M^{-1} s^{-1}$ と仮定し、NOに対する解離速度(6-配位 Fe^{II} -NO複合体を有しているH-NOXタンパク質についての k_{off} 、または5-配位 Fe^{II} -NO複合体を有しているH-NOXタンパク質についての k_1 もしくは k_2)を、以下に記載するように決定した。

【0178】

k_{off} 、 k_1 、および k_2 (NO解離速度)

6-配位 Fe^{II} -NO複合体を有しているH-NOXタンパク質についての k_{off} 値

20

6-配位 Fe^{II} -NO複合体を有しているH-NOXタンパク質について、NOに対する k_{off} を、Boon, E. M. ら、(2006年8月)「Nitric Oxide Binding to Prokaryotic Homologs of the Soluble Guanylate Cyclase $\beta 1$ HNOX Domain」, *J. Biol. Chem.* 281 (31): 21892-21902、およびBoon, E. M. ら、(2005)「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, *Nature Chemical Biology* 1: 53-59 (これらはそれぞれ、特に、H-NOXタンパク質についての k_{off} の計算に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)に記載されているとおりに計算した。簡単に説明すると、嫌気性の50mMのトリエタノールアミン、50mMのNaCl (pH7.5) 緩衝液の中に希釈したH-NOXタンパク質の Fe^{II} -NO複合体(5 μM のヘム最終濃度)を、飽和させた一酸化炭素、および同じ緩衝液(嫌気性)の30mM(最終濃度)の垂ジチオン酸塩トラップ($Na_2S_2O_4$)と迅速に混合した(Kharitonov, V. G. ら、(1997) *Biochemistry* 36: 6814-6818、およびMoore, E. G. ら、(1976) *J. Biol. Chem.* 251: 2788-2794 (これらはそれぞれ、特に、NO解離速度の計算に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)。CO結合がこれらの実験の律速段階ではないことは、以前に明らかにされている(Kharitonov, V. G. ら、(1997) *Biochemistry* 36: 6814-6818)。これを、トラップとしてのCOを用い

40

ないで、30mMの $Na_2S_2O_4$ だけを使用した実験において確認した。データを、100 μL ~1mLの大きさで、1cmの路長の石英キュベットを使用して、様々な温度(0~70 $^{\circ}C$)に設定したNeslab RTE-100定温浴が備えられているCary 3E分光光度計(Cary 3E, Varian Inc., Palo Alto, CA)上で、定期的にスキャンすることによって獲得した。ヘムからのNOの解離を、 Fe^{II} -CO複合体の形成として、423nmでモニターした。スペクトルの差を、それぞれのその後のスキャンから最初のスキャンを減算することによって計算した。NO解離速度は、時間に対する423nmでの吸光度の増大と、Kaleidagraph 3. x (Synergy Software, Reading, PA)を使用した $f(x) = A \times (1 - e^{-kx})$ の形の単一指数関数との適合によって決定した。具体的には、ヘム

50

COの濃度の単一指数関数的増大（NOトラップによるCOの結合が原因である）は、以下の方程式1によって記載することができる：

$$\Delta A_t = \Delta A_T (1 - e^{-k_1 t}) \quad (\text{方程式1})$$

式中、 ΔA_t は、時間 t での単一の振幅の変化であり； ΔA_T は、単一振幅の変化の合計であり、そして k_1 は、観察された反応速度定数である。それぞれの実験は、最大6回行い、得られた速度を平均した。測定した解離速度はCOおよび亜ジチオン酸塩濃度（3 mM、30 mM、および300 mMの亜ジチオン酸塩を試験した）とは無関係であった。

【0179】

5-配位 Fe^{II} -NO複合体を有しているH-NOXタンパク質についての k_1 および k_2 値

5-配位 Fe^{II} -NO複合体を有しているH-NOXタンパク質について、NOに対する k_{off} は、Winger, J. A. ら、(2007年1月)「Dissociation of Nitric Oxide from Soluble Guanylate Cyclase and Heme-Nitric Oxide/Oxygen Binding Domain Constructs」, J. Biol. Chem. 282 (2): 897-907 (これは、特に、H-NOXタンパク質のNO k_{off} 、NO k_1 、およびNO k_2 の計算に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)に記載されているように、NOに対する k_1 およびNOに対する k_2 によって記載される。簡単に説明すると、5-配位 Fe^{II} -NO複合体を有しているH-NOXタンパク質のヘムからのNOの解離を、以前に記載されているCO/亜ジチオン酸塩トラップ方法(Cray, S. P. L. ら、(2005) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 102: 13064-13069、およびKharitonov, V. G. ら、(1997) Biochemistry 36: 6814-6818 (これらはそれぞれ、特に、NO解離速度の計算に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる))を使用して、37℃および10℃で測定した。トラップ溶液は以下のように調製した：50 mMのHEPES (pH 7.4)、50 mMのNaCl中の亜ジチオン酸ナトリウム($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)の溶液を、嫌気性チャンバー(Coy Laboratory Products)を使用して、Teflon-sealed Reaction Vial (Pierce)の中で調製した。溶液を嫌気性バイオチャンバーから取り出し、溶液全体に10分間気体を泡立たせることによって、COで飽和させた。H-NOXタンパク質-NO複合体を、50 mMのHEPES (pH 7.4)、50 mMのNaCl中で25℃で10分間、過剰のDEA/NO (10 mMのNaOH中)とともにインキュベーションすることによって形成させた。ニトロシル種への完全な変換を、Soret最大の431 nm~399 nmへのシフトを追うことによって確認した。H-NOXタンパク質を、隔壁で密閉された嫌気性キュベット(100 μL ~1 mLの大きさの、1 cmの路長を有している石英キュベット)に入れ、酸素を除去したガスプラント(oxygen-scavenged gas train)を使用して酸素除去した。少量のDEA/NO (3等量まで)を、ニトロシル種を維持するために酸素除去の直前に添加した(残りは全て、その後、トラップ溶液中の大過剰量の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ によって崩壊された)。嫌気性キュベットの頭部の空間をCOで置き換え、キュベットとトラップ溶液をアッセイ温度で1分間平衡化させた。反応は、Hamilton gas-tight注射器での嫌気性キュベットへのCO/亜ジチオン酸塩溶液の添加と、混合によって開始させた。反応混合物中の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ の最終濃度は30 mMであった。最終的なタンパク質濃度は、 $\beta 1$ (1-194)、 $\beta 1$ (1-385)、および $\beta 2$ (1-217)については1.9~2.5 μM 、sGCについては0.88~2.5 μM であった。データの収集は、トラップの添加の10秒後に開始した。反応を、Neslab RTE-100温度制御装置が取り付けられているCary 3E分光光度計(Cary 3E, Varian Inc., Palo Alto, CA)を使用して、電気的吸収分光によってモニターした。データは、1.5 nmのデータ点の間隔を用いて、380~450 nmの範囲全体について収集した。スペクトルは、全部で3時間の間あるいは反応が完了するまで、5分間は

18秒おきに、10分間は1分おきに、そしてその後は2分おきに記録した。緩衝液のベースラインを、それぞれのスペクトルから減算し、スペクトルを、410nmでの等吸収点に対する正規化によって、ベースラインのそれについて補正した。スペクトルの差は、全てのその後のスペクトルからの0時スペクトルの減算によって得た。423nm (ΔA_{423} ; $\beta 1 (1-194)$) および $\beta 1 (1-385)$) または424nm (ΔA_{424} ; sGC および $\beta 2 (1-217)$) での吸光度の変化についての値をスペクトルの差から抽出し、それぞれの実験についての解離の経時変化を得るために時間に対してプロットした。解離の経時変化は、2連または3連で得、それぞれの実験を、数日間かけて2～5回繰り返した。一般的には、多量の精製したsGCを得ることは比較的困難であるので、全長のsGCについての ΔA_{424} の値（これらは、実験のタンパク質濃度と比例する）は、ヘムドメイン構築物よりも小さかった。

10

【0180】

曲線のフィッティング、データ分析、および図面の作成は、Kaleidagraph 3. X (Synergy Software Reading, PA) を使用して行った。個々の解離実験によるデータを、観察した速度定数を得るために、以下の方程式2に示すような二重指数関数にフィットさせた。具体的には、方程式2は、ヘム-COの濃度の二重指数関数的増大 (NOトラップによるCOの結合が原因である) を記載する：

$$\Delta A_t = \Delta A_1 (1 - e^{-k_1 t}) + \Delta A_2 (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{方程式 2})$$

式中、 ΔA_t は、時間 t での単一の振幅の変化であり； ΔA_1 および ΔA_2 は、単一振幅の変化の合計に対するそれぞれの指数プロセスの寄与であり、そして k_1 および k_2 は、それぞれのプロセスについて観察された反応速度定数である。

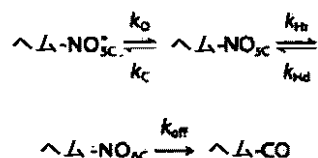
20

【0181】

観察したデータは、反応図式1に概説するように、2つの5-配位ヘム-NO複合体の最初の平衡混合物から解離が進行するモデルと一致する。したがって、 k_1 は、ヘム-NO_{5C} 立体構造からのNOの解離に相当し、一方、 k_2 は、観察した反応の速度を示し、ヘム-NO NO*_{5C} からヘム-NO_{5C} へのより遅い変換によって制限される $k_o - k_c$ に相当する。

【0182】

【化12】



30

反応図式 1

5-配位 Fe^{II}-NO複合体と6-配位 Fe^{II}-NO複合体の混合物を含むH-NOXタンパク質についての k_1 および k_2 の値

5-配位 Fe^{II}-NO複合体と6-配位 Fe^{II}-NO複合体の混合物が含まれているH-NOXタンパク質については、NOに対する k_{off} は、NOに対する k_1 とNOに対する k_2 によって記載される。NOに対する k_1 と k_2 は、Winger, J. A. ら、(2007年1月)「Dissociation of Nitric Oxide from Soluble Guanylate Cyclase and Heme-Nitric Oxide/Oxygen Binding Domain Constructs」, J. Biol. Chem. 282 (2) : 897-907 (これは、特に、H-NOXタンパク質のNO k_{off} 、NO k_1 、およびNO k_2 の計算に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる) に記載されているように、5-配位 Fe^{II}-NO複合体を有しているH-NOXタンパク質について上記に記載したように測定した。

40

【0183】

50

計算したNOに対する K_D

計算したNOに対する K_D のために、H-NOXタンパク質についてのNOに対する k_{on} の値を $710 \mu M^{-1} s^{-1}$ と仮定した。これは、4℃で測定された $\beta 1$ (1-385)についての報告された k_{on} であり、37℃でも有意には増大しない (Zhao, ら、(1999)「A Molecular Basis for Nitric Oxide Sensing by Soluble Guanylate Cyclase」, PNAS. 96: 14753-14758 (これは、特に、H-NOXタンパク質についてのNO k_{on} の計算に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)。したがって、計算された O_2 に対する K_D を、 k_{on} ($710 \mu M^{-1} s^{-1}$ と仮定した)に対する k_{off} 、 k_1 、または k_2 のいずれかの比 (上記のように測定した) を計算することによって決定した。

10

【0184】

O_2 に対する動力的 K_D : k_{on} に対する k_{off} の比

O_2 についての動力的 K_D 値を、原則として、Boon, E. M. ら、(2005)「Molecular Basis For NO Selectivity in Soluble Guanylate Cyclase」, Nature Chemical Biology 1: 53-59 (これは、特に、 O_2 会合速度、 O_2 解離速度、 O_2 結合についての解離定数、自動酸化速度、およびNO解離速度の測定に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)に記載されているとおりに、野生型H-NOXタンパク質および変異H-NOXタンパク質について決定した。

20

【0185】

k_{on} (O_2 会合速度)

ヘムに対する O_2 の会合を、20℃での閃光光分解を使用して測定した。非常に速い対再結合速度論の結果として、 $Fe^{1+}-O_2$ 複合体をフラッシュオフ (flash off) させることは不可能であった；したがって、 $Fe^{1+}-CO$ 複合体について、560nmのレーザー光線での閃光光分解を行い (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA)、5-配位 Fe^{1+} 中間体を生じさせ、続いて、それに対する分子 O_2 の結合を様々な波長で行った。タンパク質試料を、10mMの垂ジチオン酸塩での嫌気性還元、その後のPD-10カラム (Millipore, Inc., Billerica, MA) 上での脱塩によって作成した。その後、試料を、100 μL ~1mLの大きさの、1cmの路長を有している人工空気石英キュベットの中の50mMのTEA、50mMのNaCl (pH 7.5) 緩衝液中に20 μM のヘムとなるように希釈した。COガスをこのキュベットの頭部の空間全体に流して、 $Fe^{1+}-CO$ 複合体を形成させ、この形成を、UV-可視スペクトル分析 (Soret 最大423nm) によって確認した。この試料を、その後、なお1気圧のCOガス下での閃光光分解後のCO-再結合速度論を測定するために使用したか、またはこれを開き、 O_2 -再結合事象を観察するために閃光光分解前に緩衝液を完全に酸化させるために30分間、空気中で攪拌するかのいずれかを行った。ヘムに対する O_2 の会合を、時間に対して複数の波長でモニターした。これらの記録を、Igor Proソフトウェア (Wavemetrics, Inc., Oswego, OR; 最新の2005年バージョン) を使用して単一指数とフィットさせた。この速度は、観察波長とは無関係であったが、 O_2 濃度に依存していた。UV可視スペクトルを全体を通じて使用して、複合体と中間体の全てを確認した (Cary 3K, Varian, Inc. Palo Alto, CA)。一時的な吸光度のデータは、Dmochowski, I. J. ら、(2000年8月31日)「Enantiometric Discrimination of Ru-Substrate by Cytochrome P450cam」, J Inorg Biochem. 81 (3): 221-228 (これは、特に、機器に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)に記載されている機器を使用して収集した。機器は、20nsの反応時間を有しており、データを200メガ試料 (megasample) s^{-1} でデジタル化した。

30

40

【0186】

50

k_{off} (O_2 解離速度)

k_{off} を測定するために、嫌気性 50 mM の TEA、50 mM の NaCl (pH 7.5) 緩衝液中に希釈したタンパク質 (5 μ M のヘム) の $Fe^{II}-O_2$ 複合体を、様々な濃度の亜ジチオン酸塩を含む、および／または CO ガスで飽和されている等量の同じ緩衝液 (嫌気性) と迅速に混合した。データを、20 °C に設定した Neslab RTE-100 定温浴が取り付けられている HI-TECH Scientific SF-61 ストップフロー分光光度計 (TGK Scientific LTD., Bradford On Avon, United Kingdom) 上で獲得した。ヘムからの O_2 の解離は、437 nm ($Fe^{II}-Fe^{II}-O_2$ 差スペクトルの最大) での吸光度、または 425 nm ($Fe^{II}-Fe^{II}-CO$ 差スペクトルの最大) の増大としてモニターした。最終的な記録を、機器の一部であるソフトウェアを使用して、単一指数関数にフィットさせた。それぞれの実験は、少なくとも 6 回行い、得られた速度を平均した。測定した解離定数は亜ジチオン酸塩濃度 (100、50、25、10、5、および 2.5 mM の亜ジチオン酸塩を試験した) とは無関係であり、還元された種についてのトラップとしての飽和 CO (10 mM の亜ジチオン酸塩が存在する場合、およびそれが存在しない場合の両方) とは無関係であった。

10

【0187】

O_2 についての動力的 K_D

O_2 についての動力的 K_D を、上記の k_{off} および k_{on} の測定を使用して、 k_{on} に対する k_{off} の比を計算することによって決定した。

20

【0188】

計算した K_D

計算した K_D を測定するために、上記のようにして得た k_{off} と動力的 K_D の値をグラフにした。 k_{off} と動力的 K_D の間での直線の関係は、方程式 ($y = mx + b$) によって定義した。その後、 k_{off} 値を線に沿って外挿し、Excel:MAC 2004 (Microsoft, Redmond, WA) を使用して計算した K_D を導いた。測定した k_{on} がいない場合には、この外挿により、 K_D に対して k_{off} を関係付ける方法が提供される。

【0189】

自動酸化速度

自動酸化速度を測定するために、タンパク質試料を嫌氣的に還元させ、その後、嫌気性の 50 mM の TEA、50 mM の NaCl (pH 7.5) 緩衝液中に 5 μ M のヘムとなるように希釈した。これらの試料を、その後、37 °C に設定した Neslab RTE-100 定温浴が取り付けられている Cary 3E 分光光度計の中でインキュベートし、これを定期的にスキャンした (Cary 3E, Varian Inc., Palo Alto, CA)。自動酸化速度は、時間に対してプロットした $Fe^{III}-Fe^{II}$ 差スペクトルの最大と最小の間の差と、Excel:MAC 2004 (Microsoft, Redmond, WA) を使用した単一指数関数とのフィットから決定した。

30

【0190】

NO との反応の速度

NO 反応性を、緩衝液 A の中に 2 μ M で調製した精製したタンパク質 (Tt WT HNOX、Tt Y140H HNOX、および Homo sapiens ヘモグロビン (Hs Hb))、ならびに緩衝液 A 中に 200 μ M で調製した NO を使用して測定した (緩衝液 A: 50 mM の HEPES (pH 7.5)、50 mM の NaCl)。データは、20 °C に設定した Neslab RTE-100 定温浴が取り付けられている HI-TECH Scientific SF-61 ストップフロー分光光度計 (TGK Scientific LTD., Bradford On Avon, United Kingdom) 上で獲得した。タンパク質を、0.00125 秒の積分時間で、1:1 の割合で NO と迅速に混合した。最大変化の波長を、原則として、NO による酸化の律速工程を測定することにより、分光光度計の一部であるソフトウェアを使用して単一指数関数にフィ

40

50

ットさせた。反応の最終産物は、HNOXタンパク質についてはf e r r i c - N Oであり、H s H bについてはf e r r i c - a q u oであった。

【0191】

p 5 0の測定

所望される場合には、変異H-NOXタンパク質または野生型H-NOXタンパク質についてのp 5 0値を、Guarnone, R. ら、(1995年9月/10月)「Performance Characteristics of Hemox-Analyzer For Assessment of The Hemoglobin Dissociation Curve」, Haematologica 80(5):426-430(これは、特に、p 5 0値の測定に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる)に記載されているように測定することができる。p 5 0値は、HemOx分析計を私用して決定した。測定チャンバーは0%の酸素で開始し、100%の酸素に向かって緩やかに徐々に上昇させた。チャンバーの中の酸素プローブにより、酸素飽和%を測定した。第2のプローブ(UV-Visスペクトル)により、2つの波長での吸光度を測定し、ヘムタンパク質(例えば、ヘムと錯体形成したH-NOXのようなタンパク質)のUV-Visスペクトルの α ピークと β ピークに波長を合わせた。これらの吸光度のピークは、ヘムタンパク質が酸素に結合するのに伴い、直線的に増大した。その後、非結合から100%の結合までの変化の割合を酸素率の値(%)に対してプロットした、曲線を作成した。p 5 0は、ヘムタンパク質の50%が酸素に結合した、曲線上の点である。

【0192】

詳細には、Hemox-Analyzer(TCS Scientific Corporation, New Hope, PA)によって、50 μ Lの血液またはヘムタンパク質を漸増酸素分圧の上昇に曝すこと、そしてそれを窒素ガスで酸素除去することにより、オキシヘムタンパク質解離曲線(ODC)を決定した。クラーク酸素電極によって酸素圧の変化を検出し、これを、x-yレコーダーのx軸上に記録した。得られたオキシヘムタンパク質画分の増大を、560nmと576nmの二重波長分光光度計によって同時にモニターし、y軸上に表示した。血液試料を前中央部の(antromedial)静脈から採取し、ヘパリンで抗凝固処理し、そしてアッセイまで氷水(wet ice)の上で4℃に保った。50 μ Lの全血を5 μ LのHemox溶液(7.4 $\pm$ 0.01の値に溶液のpHを保つ製造業者によって提供された緩衝液)の中に希釈した。試料-緩衝液を、Hemox-Analyzerの一部であるキュベットの中に入れ、混合物の温度を平衡化させて、37℃にした。その後、試料を空気で100%に酸素処理した。pO₂値の調整の後、試料を窒素で酸素除去し、酸素除去プロセスの間に、曲線をグラフ用紙上に記録した。P 5 0値を、Hemox-Analyzerの一部であるソフトウェアを使用して、O₂飽和度が50%である点として、x軸上に外挿した。完全な記録に必要な時間はおおよそ30分であった。

【0193】

任意のH-NOXタンパク質についてのp 5 0値は、ヘモグロビンの親和性と比較したO₂に対するH-NOXタンパク質の相対的な親和性の指標として、ヘモグロビンのp 5 0値と比較することができる。表15には、ヘモグロビンについての以前に報告されたp 5 0値を列挙する。

【0194】

表15. ヘモグロビン変異体とそれらの報告されている酸素親和性

【0195】

【表 15】

名称	修飾	K _D (nM)	p50 (mmHg)	参考文献／製造業者
ヘモグロビン(間質を含まない)		~400	14	
ヘモグロビン (RBC's)			27	
Hemopure (HBOC-201)	ウシ 重合		36	Biopure
Oxyglobin (HBOC-301)	ウシ 重合		54	Biopure
Hemospan (MP4)	マレイミド - PEG		5	Sangart
Polyheme	ピリドキサル		28-30	Northfield Labs
Hemolink	0-ラフィノース		40	Hemosol
Hemassist	ジアスピリン		32	Baxter

粘性の測定

所望される場合には、H-NOX溶液の粘性を、200/sの剪断速度で、CPE-40垂形支軸を有しているコーン／プレート血流計（モデルDV-III、Brookfield; Middleboro, MA）を使用して測定することができる。血液稀釈酸素送達実験において投与した1～4センチポアズ（cP）の間の粘性を有している溶液が、安全であると報告されている（Winslow, R. M. ら、（2004年10月）「Comparison of PEG-Modified Albumin And Hemoglobin in Extreme Hemodilution in the Rat」, J Appl Physiol. 97（4）：1527-1534、米国特許第6,974,795号および同第6,432,918号（これらはそれぞれ、特に、粘性の測定に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる））。したがって、いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質溶液の粘性は、1～4cPの間である。

【0196】

コロイド浸透圧の測定

所望される場合には、コロイド浸透圧を、製造業者の説明書（モデル4420、Wescor; Logan, UT）にしたがってコロイド浸透圧計を使用して測定することができる。コロイド浸透圧を測定するための例示的な方法は、Vandegriff, F. D. ら、（1997年11月）「Colloid Osmotic Properties of Modified Hemoglobins: Chemically Cross-Linked Versus Polyethylene Glycol Surface-Conjugated」, Biophys. Chem. 69（1）：23-30、「anaesthesiamcq.com/FluidBook/fl2_4.php」にてworld-wide webの中、米国特許第6,974,795号および同第6,432,918号（これらはそれぞれ、特に、コロイド浸透圧の測定に関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる）に記載されている。血液稀釈酸素送達実験において投与した20～50mmHgの間のコロイド浸透圧を有している溶液が、安全であると報告されている（Winslow, R. M. ら、（2004年10月）「Comparison of PEG-Modified Albumin And Hemo

g l o b i n i n E x t r e m e H e m o d i l u t i o n i n t h e R a t」, J A p p l . P h y s i o l . 9 7 (4) : 1 5 2 7 - 1 5 3 4) 。したがって、いくつかの実施形態においては、H-NOXタンパク質溶液のコロイド浸透圧は、20～50 mmHgの間である。

【0197】

(実施例3)

NO担体H-NOX変異体についての心疾患モデル

2つの動物モデルを使用して、標準的な硝酸塩での治療に対して、NO担体としてのH-NOXタンパク質の効力を比較することができる。慢性心臓血管疾患のラットモデルにおいて、硝酸イソソルビド (ISDN) を用いた信頼できるNOの送達とH-NOXタンパク質の効果と比較するために、確立されているプロトコル (Shimamura, S. ら、(2006)、J Vet Med Sci Vol. 68 (3) : 213-7 (これは、特に、心臓血管疾患のモデルに関して、その全体が参照として本明細書中に組み込まれる) の適応は、雄のWistarラットを使用して行うことができる。心臓血管の肥大を刺激するために、腹部大動脈開腹術と、挿入した21ゲージ針の上での収縮点の適用 (これはその後、均一な血管の収縮を可能にするために除去した) によって、腹部大動脈を収縮させた (腹部大動脈の収縮または「AC」モデル)。擬似手術を行ったラットには同様の外科手術を受けさせたが、ACは作成しなかった。外科手術後、ラットを1つのグループあたり14匹の動物 (薬物について7匹、プラセボについて7匹) の処置グループに無作為に分け、7日間回復させた。グループについての処置 (対照のグループを、プラセボとしてそれぞれの試験例において対にした) は以下である: (1) 経口でsr-ISDNまたはプラセボを投与したACラット; (2) 本明細書中に記載した1つ以上の野生型H-NOXタンパク質もしくは変異H-NOXタンパク質、またはプラセボ (例えば、不活化したH-NOXタンパク質) をIV投与したACラット; (3) および (4) それぞれ、(1) または (2) と同様に処置した擬似処置を行ったラット。処置は、12週間、1日に1回行い、その後、動物を屠殺し、心臓を、心筋細胞の形態、線維症、コラーゲンの沈着、心室径、大動脈の形態の決定のための標準的な組織病理学的分析のために、および疾患の進行もしくは予防を評価するための他の標準的な分析のために、取り出した。

【0198】

急性心筋梗塞後の長期間の左心室リモデリングの媒介におけるISDNの効力に対してH-NOXの効力を比較するために、イヌモデル (ここでは、ISDNは長期にわたる投与によるいくらかの効力が示されている) を、標準的なプロトコル (Bodh I. Jugdutt, MBChB, MSc: Mohammad I. Khan, MBBS (1994). Circulation 89 (S)) を使用して行った。それぞれの実験について、いずれかの性別の40匹の健康な雑種犬 (体重16～29 kg) に、一般的な麻酔 (ペントバルビタールナトリウム、30 mg/kg、IV) 下で左側開胸術を行った。ポリエチレンカテーテルを、外頸静脈、内頸動脈、および左心房に挿入し、ヘパリン化生理食塩水を満たし、それらの末端を頸の後ろから外に出した。絹の結紮糸を、最初の斜め方向の分岐と2番目の斜め方向の分岐の間に、左中前方の下降冠状動脈を取り囲むように配置し、結んだ。金属ビーズを、連続的なトポグラフィーのために一貫する心エコー図の方向になるように、左中心室レベルで、短軸平面の中の前方、側方、および後方の心外膜面上に縫いつけた。その後、心膜と胸郭を閉じた。ペニシリン (100万単位) およびストレプトマイシン (1 g) を筋肉内に投与し、犬をそれらのケージに戻した。

【0199】

冠動脈の結紮の2日後、70匹の健康な生存している犬を硝酸塩での治療 (n=10)、H-NOXタンパク質での治療 (例えば、状況に応じて本明細書中に記載される任意のアッセイを使用してインビトロで特性決定し、状況に応じて毒性および/または薬物動態についての最適化を行った1つ以上の野生型または変異H-NOXタンパク質) (10)、およびマッチング対照のサブグループ (処置しない、n=20); サブグループ1 (10匹の対照、10匹の硝酸塩)、およびサブグループ2 (10匹の対照、10匹のH-N

OXタンパク質)に無作為に分けた。犬は、水分には自由に近づけるようにし、水分の制限または薬物療法による心不全を治療する試みは行わなかった。6週間で、生存している犬を麻酔し、心臓を、静脈内への塩化カリウムの過量投与を用いて心臓拡張期で停止させ、取り出し、通常の生理食塩溶液で洗浄し、重さを測定した。血液試料を血液ガス、ヘモグラム、および電解質をモニターするために採取した。標準的な手順を使用して、回復の間に測定(例えば、ECG、血行動態など)を行い、死後分析には、慢性的な心不全(例えば、コラーゲンの蓄積、心筋細胞の形態など)について上記に記載した測定値を含めた。心筋梗塞および/または慢性的なACモデル実験において有効であるか、またはISDN(急性および慢性の心不全についての硝酸塩をベースとする治療法について重要な標準)よりも有効であるH-NOXタンパク質が、心筋梗塞および/または慢性のACの治療に特に有用である。そのようなH-NOXタンパク質は、NOの送達が有効である他の適応症を治療するためにもまた有用であると予想した。

10

【0200】

上記の実施例と詳細な記載は、説明のために与えられ、限定のために与えられるものではない。本明細書中で引用された全ての刊行物、特許出願、および特許はそれぞれの個々の刊行物、特許出願、または特許が、具体的に、かつ個別に参照として組み込まれることが示されているかのように、参照として本明細書中に組み込まれる。上記発明は、理解の明確化の目的のための説明および例によって、いくらか詳細に記載されているが、本発明の教示を参照して、特定の変更および修飾を、添付の特許請求の範囲の精神または範囲から逸脱することなくそれに対して行うことができることは、当業者には容易に明らかである。

20

【0201】

他の場所に明記されない限りは、本明細書中で使用される全ての技術的および科学用語の意味は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されている意味である。本明細書中に記載された方法および材料と同様あるいは同等の任意の方法および材料もまた、本発明を実施または試験するために使用できることもまた、当業者に明らかであろう。

【0202】

本明細書中で使用については、他の場所に明記されない限りは、用語「a」、「an」、「および「the」などの使用は1つ以上を意味する。

【0203】

本明細書中の「約」の値またはパラメータの言及には、その値またはパラメータ自体に関する実施形態を含む(そして、それらが記載される)。例えば、「約X」との記載には「X」の記載を含む。

30

【0204】

本明細書中に記載される本発明の態様と実施形態には、複数の態様と複数の実施形態「が含まれている」、それら「からなる」、および「原則としてからなる」を含むことが理解される。

【図 1 A】

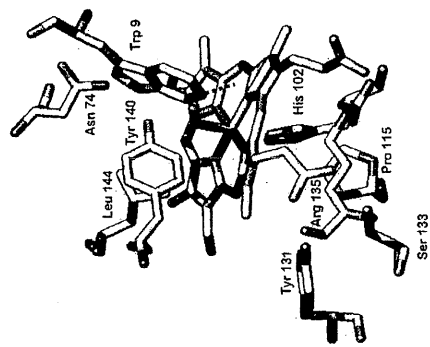


Figure 1A

【図 1 B】

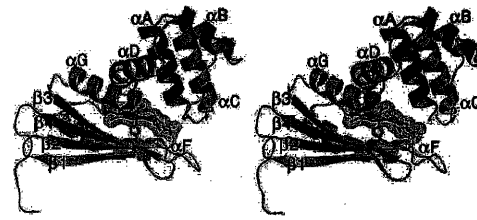
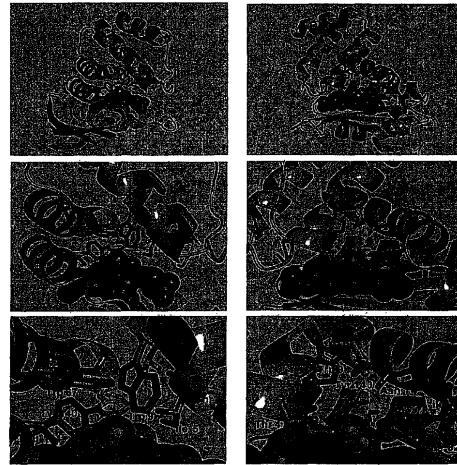


Figure 1B

【図 1 C - 1 H】



Figures 1C-1H

【図 2】

酸素に結合するH-NOXの例

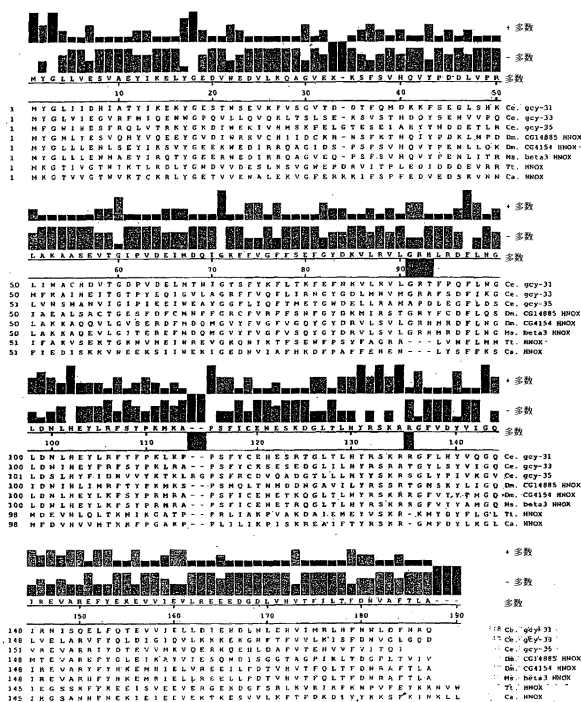
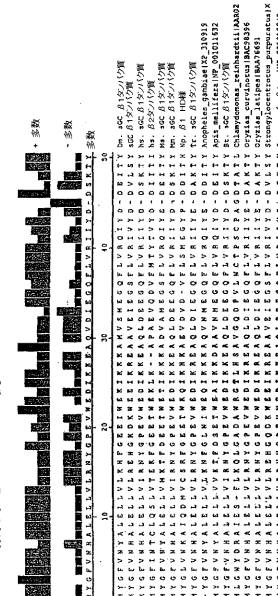


Figure 2

【図 3 A】

NOに結合するH-NOXの例



【図 5 B】

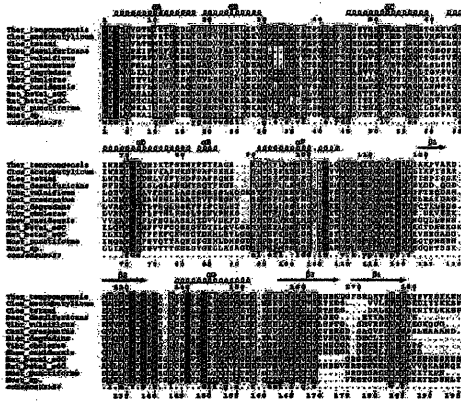
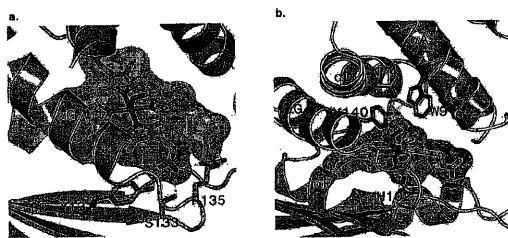


Figure 5B

【図 6】

Figures 6A and 6B



【図 8 A】

変異H-NOXおよび親WT H-NOXの配列

ヌクレオチド、続いてアミノ酸配列

Thermomonas *tencongensis* H-NOX**FL WT**

(配列番号 53)
ATGAAGGGGACAAATCGTCGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGGGTTGGGAACCATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAGAACTGGTAAATAT
GTCAACGAAATATGAGAGAGGTAGGAGGAGACATAAACTTCAGCGAATGCTTTCC
CTCTATTTCAGAGGAGAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGATGAGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAGGAGCCACTCTCAAGGCTTATTGCAAGGCTGTTGCAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTCTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTATGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGAAAGAGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAGCTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTGATGA

(配列番号 54)
MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDLSKSVGWEPDRVITPLEDIDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQNIKTSEWFPSPYAGRRVLNPLMMDEVLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

FL Y140F

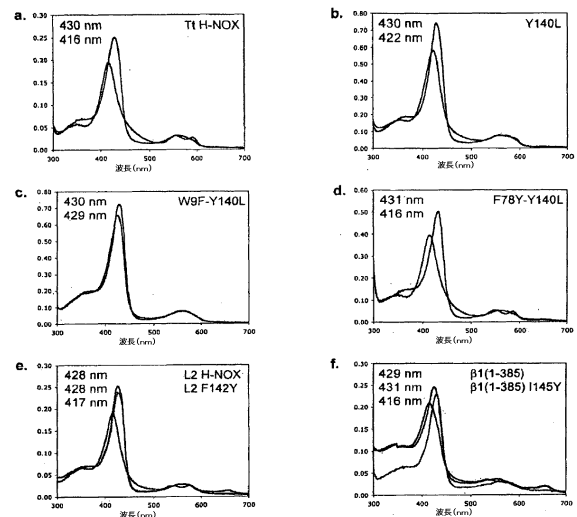
(配列番号 55)
ATGAAGGGGACAAATCGTCGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGGGTTGGGAACCATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAGAACTGGTAAATAT
GTCAACGAAATATGAGAGAGGTAGGAGGAGACATAAACTTCAGCGAATGCTTTCC
CTCTATTTCAGAGGAGAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGATGAGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAGGAGCCACTCTCAAGGCTTATTGCAAGGCTGTTGCAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTCTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTATGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTGAAAGAGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAGCTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTGATGA

(配列番号 56)
MKGTIVGTWIKTLRDLYGNDVVDLSKSVGWEPDRVITPLEDIDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQNIKTSEWFPSPYAGRRVLNPLMMDEVLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

Figure 8A

【図 7】

Figures 7A ~ 7F



【図 8 A A】

Rn_B1(1-385) H105G

(配列番号 149)

ATGTACGGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAGGCCAGTTCTCTTGAGATAAAT
CTACGATGATTCCAAAACCTATGACITGGTGGCTGCTGCGAGCAAGTCTCAACCTCAATATG
TGTTGAAATCTGCGAGATGTTGGGAAGATGTTTTCGCTCTGCTCAAGAGTCTGGCTATGAT
ACCATCTTGGCTGCTCGGATCTAATGTCAGGAGTGTTCGAGAACCTCGACGCCCTGGGG
GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACTTCTCTCCGGTGCACCGATGCAAGAA
AAGGGCAAGGGCTCATCTGCACTACTCTCGGAAGAGAGGGGCTTCAGGACATTTGATGAT
CGGGATTATCAAGAGTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGTTATTC
GCAAGAAAGTGAAGATGTGATCATACCAATTTTAAATTGAAGAAAAGAAATCAAAAGAAAG
AGGATTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC
CGTACACCTTCTGCAAGGGTTCTCTTTCATCATCATATTTGACCGGGAGCTATGATCAACGCA
GTGTGAAATGTCTATCTACAGATGCTCCCGCAGCTCCAGCTGGGAAGTGCAGCGCTTCTGTC
TGCTCTCTCTCTGCTCGCCCTCATATTTGACATCAGTTTCCACGGATTTCTTCAACATCAT
ACCGCTCTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTGTGCTGATGTGAGAAACTTGAAGAACTGAGGA
TGAATGATCGGGGAGAGATTAAGTGCCTCGCTCAAGGCCAAATGATCTATTACCGGA
AGCAGATAGCATCTCTCTCTCTGTTACCAAGTGTGATGAACCTGGATGACATAACAAGAAAG
AGCGCTGTACCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACAGAGACCTGGTCTTTTGGGAGAG
ACAGTCTCCGGAGGAGTACAAACTGACACAGAGCTGGAAATCTCACAGACAGGCTGCGAC
TCACACTGAGGGCTTTGGAGATTTGA

(配列番号 150)

MYGFVNHALELVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
ILQPMGKMFVFCQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDAJDILATVPMGRAPSRCTDAEKGK
LILHYYSERELQDIVIGHIKTVAQIHGTEDMKVIQQRSECDHTQFLIEKESKEEDFYDLDRFE
RNGTQDSRISPYTFCKAPFHPIIDRLVVTQCGNAIRVRLPQLQPKCSLLSVFLVRPHIDISFHGI
LSHNTVYVLSRKEGLLDVLEKLEDELTGAELSLRLKGMIMYLPEDSILFLCPSVMNLDLTLR
RLYLSDIPLIDATRDLLVLLGEQFREEYKLTLQELILTDRLQLTLRALED

Rn_B1(1-194)

(配列番号 151)

ATGTACGGGTTTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCGCAGCTGGATGAAGAGGCCAGTTCTCTTGAGATAAAT
CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAGGTCTCAACCTCAATG
TGTTGAAATCTGCGAGATGTTGGGAAGATGTTTTCGCTCTCTGCTCAAGAGTCTGGCTATGAT
ACCATCTTGGCTGCTCGGATCTAATGTCAGGAGTGTTCGAGAACCTCGACGCCCTGGAG
GACCACCTCCCGACCATCTACCGAGGATGCGCGCACTCTCCGGTGCACCGATGCAAG
AAGGGCAAGGGCTCATCTGCACTACTCTCGGAAGAGAGGGGCTTCAGGACATTTGATG
CGGGATTATCAAGACTGATGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATACATGAAGGTTATTC
GCAAGAAAGTGAAGATGTGATCATACCAATTTTAAATGAAGAAAAGAAATCAAAAGAAAG
AGGATTTTATGAAGATTGA

(配列番号 152)

MYGFVNHALELVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
ILQPMGKMFVFCQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDAJDILATVPMGRAPSRCTDAEKGK
LILHYYSERELQDIVIGHIKTVAQIHGTEDMKVIQQRSECDHTQFLIEKESKEEDFYDLDRFE

Figure 8AA

【図 8 B】

Zn_Y140L

(配列番号 57)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGGTGGGTTTGGGAACCCAGATAGGGTAAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAAGGAATAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAACCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAACAATAAACCTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAAGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCCAAGGCTTATTGCAAAAGCGCTGTGCAAAAG
ATGCCATTGAATAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATCTCTTTTATAGGGCTTATAG
AGGGTAGTCTTAAATTTTTCAGGAAGAAATAATTCAGTGGAGAGGTCGAAAGAGCGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 58)

MKGTTVGTWIKTLRDLYGNDVVDSELSKVGWEPDRVITPLEDIDDDVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRNIKTSEWFPSPYFAGRLVNFLLMMMDVEHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMMDLFLGLEGSSKFKKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRJFKNPVFE

Zn_Y140H

(配列番号 59)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGGTGGGTTGGGAACCCAGATAGGGTAAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGGAATAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAAGCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAACAATAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAAGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCCAAGGCTTATTGCAAAAGCGCTGTGCAAAAG
ATGCCATTGAATAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATCACTTTTATAGGGCTTATAG
AGGGTAGTCTTAAATTTTTCAGGAAGAAATTTTCAGTGGAGAGGTCGAAAGAGCGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 60)

MKGTTVGTWIKTLRDLYGNDVVDSELSKVGWEPDRVITPLEDIDDDVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRNIKTSEWFPSPYFAGRLVNFLLMMMDVEHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMMDLFLGLEGSSKFKKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRJFKNPVFE

Zn_Y140A

(配列番号 61)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGGTGGGTTGGGAACCCAGATAGGGTAAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGGAATAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAAGCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAACAATAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAAGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCCAAGGCTTATTGCAAAAGCGCTGTGCAAAAG
ATGCCATTGAATAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATGCTTTTATAGGGCTTATAG
AGGGTAGTCTTAAATTTTTCAGGAAGAAATTTTCAGTGGAGAGGTCGAAAGAGCGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 62)

MKGTTVGTWIKTLRDLYGNDVVDSELSKVGWEPDRVITPLEDIDDDVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRNIKTSEWFPSPYFAGRLVNFLLMMMDVEHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMMDLFLGLEGSSKFKKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRJFKNPVFE

Figure 8B

【図 8 C】

Zn_W9F

(配列番号 63)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTTATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGGTGGGTTGGGAACCCAGATAGGGTAAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGGAATAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAAGCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAACAATAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAAGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCCAAGGCTTATTGCAAAAGCGCTGTGCAAAAG
ATGCCATTGAATAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATCTTTTATAGGGCTTATAG
AGGGTAGTCTTAAATTTTTCAGGAAGAAATTTTCAGTGGAGAGGTCGAAAGAGCGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 64)

MKGTTVGTWIKTLRDLYGNDVVDSELSKVGWEPDRVITPLEDIDDDVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRNIKTSEWFPSPYFAGRLVNFLLMMMDVEHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMMDLFLGLEGSSKFKKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRJFKNPVFE

Zn_W9F/Y140L

(配列番号 65)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTTATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGGTGGGTTGGGAACCCAGATAGGGTAAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGGAATAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAAGCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAACAATAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAAGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCCAAGGCTTATTGCAAAAGCGCTGTGCAAAAG
ATGCCATTGAATAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATCTTTTATAGGGCTTATAG
AGGGTAGTCTTAAATTTTTCAGGAAGAAATTTTCAGTGGAGAGGTCGAAAGAGCGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 :66)

MKGTTVGTWIKTLRDLYGNDVVDSELSKVGWEPDRVITPLEDIDDDVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRNIKTSEWFPSPYFAGRLVNFLLMMMDVEHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMMDLFLGLEGSSKFKKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRJFKNPVFE

Zn_W9F/Y140H

(配列番号 67)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTTATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGGTGGGTTGGGAACCCAGATAGGGTAAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGGAATAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAAGCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAACAATAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAAGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCCAAGGCTTATTGCAAAAGCGCTGTGCAAAAG
ATGCCATTGAATAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATCTTTTATAGGGCTTATAG
AGGGTAGTCTTAAATTTTTCAGGAAGAAATTTTCAGTGGAGAGGTCGAAAGAGCGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 :68)

MKGTTVGTWIKTLRDLYGNDVVDSELSKVGWEPDRVITPLEDIDDDVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRNIKTSEWFPSPYFAGRLVNFLLMMMDVEHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMMDLFLGLEGSSKFKKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRJFKNPVFE

Figure 8C

【図 8 B B】

Rn_B1(1-194)1145Y

(配列番号 153)

ATGTACGGTGTGTGTAACCATGCCCTGGAGCTGCTGCTGTTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGGCGCAGCTGGATGAAGAAGAGCCGATTCCTTTGTGAAGATAAT
CTACGATGATTTCAAAAACCTATGACTGTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAAGTCCCTCAACCTCAATGC
TGGTGAATCTCTGAGATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTCTGTCAAAAGATGCTGGCTATGAT
ACCATCTTGGCTGTCTGGGATCTTAATGTCAGGGAGTGTTCGACAAACCTCGACGCCCTGCAC
GACCACTCGCCACCATCTACCCAGGATCGCGGCACTCTCTCCGGTGCACCGATGACAGAA
AAAGGCCAAAGGGCTCATTTGCTCACTTACTCGGAAGAAGAGGGCTCTCAGAGCTACGGTAT
CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTATTTCGA
GCAAAAGATGAAGAATGTGATCATACCAATTTTAAATTGAAGAAAAGAAATCAAAAAGAG
AGGATTTTATGAAGATTGA

(配列番号 154)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDVLAAASKVLNLNAGE
ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNREFLQNLDALHDHLATYTPGMRAPSRCTDAEKGK
LILHYYSERELQDYVIGIKTVAQQIHGTIDMKVIQQRSECDHTQLIEEKSEKEDPYED

Rn_B1(1-194)19W-1145Y

(配列番号 155)

ATGTACGGTGTGTGTAACCATGCCCTGGAGCTGCTGCTGTTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGGCGCAGCTGGATGAAGAAGAGCCGATTCCTTTGTGAAGATAAT
CTACGATGATTTCAAAAACCTATGACTGTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAAGTCCCTCAACCTCAATGC
TGGTGAATCTCTGAGATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
ACCATCTTGGCTGCTCGGATCTAATGTCAGGAGTGTTCGTGCAAACTCGAGGCCCTGCAC
GACCACTCGCCACCATCTACCCAGGATGCGCGCACTCTCTCGGTGCACCGATGACAGAA
AAAGGCCAAAGGGCTCATTTGCTCACTACTCGGAAGAGAGGGCTCTCAGGATCACTGAT
CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTGA
GCAAAAGATGAAGAATGTGATCATACCAATTTTAAATTGAAGAAAAGAAATCAAAAGAG
AGGATTTTATGAAGATTGA

(配列番号 156)

MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDVLAAASKVLNLNAGE
ILQMFQKMFVFCQESGYDTILRVLGSNREFLQNLDALHDHLATYTPGMRAPSRCTDAEKGK
LILHYYSERELQDYVIGIKTVAQQIHGTIDMKVIQQRSECDHTQLIEEKSEKEDPYED

Figure 8BB

【図 8 C C】

Rattus norvegicus B2

(配列番号 157)

ATGTATGGATTCATCAACACCTGCGCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACA
TGGGAAGAGCTGAAGGCTCTGCGAGAAGTGCAAGATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGAT
GACATCATACCAATTAAAGCTCATCAAGAAGCTGCAAGGTTCTGGATGTGTCCATGGAAGGCC
WYDEGAAGCTTTTGGGAAATGCTTTTAAAGTGTGTAGATGATGTGCTCTATGACAGAGATGCT
TGGGCAAGCTTGGAGGAAATCTCACCGAGITTAITGAAACCTAGATGACCTCCACCTTACCT
TGGCACTGTCTCATCAGGAATAAGAACCGACCATCTTGTGAGTGGAGGAAGGAGCTGACGG
CGCATGCTCTCCTCACTACTACTCAGACAGCAATGGTCTTGTGTGCATATTGACAGGCTCATATTG
AAGCTGTGGCGCAAGGACTCTTGTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCTTGATATGAACGAAG
GCTGGGAAGAAGGAGAGAGTGAAGTGTGCTGCTGCGGAGGAGGAGGAGGCTGACAGA
CAGATAAGAGGAGCAAAAGCGAACGCGCCACAGAGCTGCGAGGACAGCCAGACAGGAG
AGGCTCTCCAGGGAACACTCTCTCGGATGAAGGAGAGATATTGAACACTCCCTGTTTGGCTGT
GGGAGAAATCTCACTCACTGCTGTGAGGGCATCGGCTTTTGAAGAAAGGCGCCCTCAGGG
ACACCTTCCAGCCGCTCTATCTGAGAGAGCATAGGGTGGAAAGGAGGAGTGTGTGTGTATGCTT
TTCTTTTCCACATTGTCTGTGATGAAGCAATAAGGCTCAAGGCTGAGTGAATATTGAC
AGTATGTCCCTGGAATCTTAAACCCAGAAAGTTTGCACTAGATGAGTATTTTCCATCATCCACCC
TCAAGTTACTTTCAACATCTCCAGCATCTGCAAGTTCATTAACAGTCAAGTTTGTCTGAAGACA
AAGAAAGAAATGATGCCAAAGCAAGGAAGAGCCAGCCGATGCTCAAACTCCGGGCTCAGA
TGATCTGGATGGAGTCTCTGAGGTGCTATGATCTTCACTGTGTCCCAAAGCTCGCAGCTGCTG
AAGAGCTGGGAAGAGAGAGATGATCTTTGTGATATCTCTGCGACGACAGACAGAGGATGCT
CTCATCTCTCTCAACCCAGCAGAGGCTGGCAGAGATGAGAGCTGTCTGCCAAGTGAAGAAAGAA
GAAGGAGGAGTTGGGTGCTCTTCCAACTCACTGGCATCGAAGAAAGAAAGACAGAGAGCT
TGTGTATGCCATGCTGCTGCAATGTGGCCAAACCACTCAAGGAGGGCGAGAAGGTGGCT
GCAGAGAGAAATTTGAACATGATACAATCTCTTTACGCGATGTTGTGACATTTTACCAACATCTGT
CGAGCTGTGTGAACCTTCCAAATGGTGAACATGCTGAATTGATCTCAAGTTGTGACAGG
TATCAACGAGTGCATAGTGTCTACAAAGATGAGAAACAAATAGGGAGTGCTTACATGTGGTGGGT
GGATACCAAGTACCGGTGAAAGCCATGCTCAAGAGTGCACAAATTTTGTCTTGGGATGAGA
ATTCTGCAAAAGAGAGTGAATCTCTGCTGCTGGGGAACCTTACAGATACAGATGGAGGATG
CACACTGGACAGCTTTAGCAGGTGTGTGKAGAGACAGATGCTCGGTACTGCTGTGTGGT
GACACTGTATACACAGCCCTGATGAGTGAAGTACAGGCTCTCCACGAAAGTGCATCTGAG
CCCCAGGCCACAGAGCCCTGAAAACAAAGGGTTTGAATTTGTCAAGGAGAGGCGAGATCG
AAGTGAAGGGGAAAGGAAGATGACCACTACTTTCTGTCCAGAACCTGTAATGCCACCGAG
GTGAGATAATGGGGCGAGCTCTACGCCCGCTGATGGGAAGGAAGTATGTACTCCCGGAA
ACAAAGTGCAGAAAGTCCCTGCTGCTGCGAGAGACAGAGCACTCAGCAACATGCTCAGAAAG
GAGACCCAGCAGAGCGCTCTTAATGAAGTACACACTCTGCGGAGCCGATGGCAGAGCGCAAA
TCCACAGATGCGAGTCAATAACCGCATCCACAGATGAGACCAAGCAAGTGTCTGCTGAT
TGGCCCTGTGCTGTCTGCTTTCTGTGTGTGCTGCTGA

(配列番号 158)

MYGFINTCLQSLVTEKFGREETWEKLKAPAEVQDVMTYTVYDDIITKLIQEACKVLDVSMEAILK
LFOEYFFPKCMSGYDRMLRTLGGNLTEFIENLDALHSLYLAISQEMNAPSRFEBEGADGAMLLH
YYSDRHLGCHVPGHIEAVAKDFDVTDAVMSILDMNEEVERTGKKEHVFLVVOKAHRQIRGAKA
SRPGSESDSQAQDEALQGLTILRMKERYNLNVPVCGEKSHSIAVRAVSLPGLRDLRTDPVYPERL
YRREVPDAPPHVDEALRVQCAQVNIQKYVPLGTQKALDEYSHIPVTFMSSICKFELFQ
FVLKTRKEMMPKARKSOPMLKLRGMWMSLEKCMFEMCPNSVRLSOLKEKSKMHSIDIAHPDT
TRDILLNQRLAEMLSEKQLEKKKEBLRVLSNHLAEKKKTETLLYAMLPEHVNQLKEGRVVA
AGEFETCTILFSDVVTFTNICAACEPIQVNMNLSMYSKFDRLSVHDVYVETIGDAYMYVGVNVP
VPVSHAGRVANFALGMRISAKEVMNPVTGEPQIRVGHITGPGVAGVVGDKMPRYCLFGDVTNP
ASRMSHGLPSKVLSPTAHERALKNKQPIVRRBREVVKQKGMVTYTLQNLNATEDIMEGRSPA
PADGKEVCTPGNQVRKSPAVRNNDTHQQQVYKGDADASAEVETLACSPVAGNSTDAVNNQPSF
DEKTSVVASGPNLSAFVVL

Figure 8CC

【図 8 D】

Fl. W9F-N74A

(配列番号 69)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATTATATAAAGCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACACAGATAGCGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGCTAAGGTGAGTGA AAAA AACTGGTAA AAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAGGCATAAAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAAGGCTTATTGCAAAGCCCTGTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAAAGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 70)

MKGTIVGTIKTLRDLYGNDVVDLSLSVGVWEPDRVITPLEIDDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGRQNIKTFSEWFPYSFAGRRLVNFMMDMEVHLQLTKMIKGATPPRIIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEISVVEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

Fl. W9Y

(配列番号 71)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATACATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACACAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGCTAAGGTGAGTGA AAAA AACTGGTAA AAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAGAACATAAAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAAGGCTTATTGCAAAGCCCTGTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAAAGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 72)

MKGTIVGTIKTLRDLYGNDVVDLSLSVGVWEPDRVITPLEIDDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGRQNIKTFSEWFPYSFAGRRLVNFMMDMEVHLQLTKMIKGATPPRIIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEISVVEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

Fl. W9N

(配列番号 73)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACAAATATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACACAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGCTAAGGTGAGTGA AAAA AACTGGTAA AAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAGAACATAAAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAAGGCTTATTGCAAAGCCCTGTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAAAGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 74)

MKGTIVGTIKTLRDLYGNDVVDLSLSVGVWEPDRVITPLEIDDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGRQNIKTFSEWFPYSFAGRRLVNFMMDMEVHLQLTKMIKGATPPRIIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEISVVEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

Figure 8D

【図 8 E】

Fl. W9H

(配列番号 75)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACACACATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACACAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGCTAAGGTGAGTGA AAAA AACTGGTAA AAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAGAACATAAAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAAGGCTTATTGCAAAGCCCTGTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAAAGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 76)

MKGTIVGTIKTLRDLYGNDVVDLSLSVGVWEPDRVITPLEIDDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGRQNIKTFSEWFPYSFAGRRLVNFMMDMEVHLQLTKMIKGATPPRIIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEISVVEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

Fl. I5A

(配列番号 77)

ATGAAGGGGACAGCACTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACACAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGCTAAGGTGAGTGA AAAA AACTGGTAA AAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAGAACATAAAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAAGGCTTATTGCAAAGCCCTGTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAAAGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 78)

MKGTIVGTIKTLRDLYGNDVVDLSLSVGVWEPDRVITPLEIDDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGRQNIKTFSEWFPYSFAGRRLVNFMMDMEVHLQLTKMIKGATPPRIIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEISVVEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

Fl. I5L

(配列番号 79)

ATGAAGGGGACACTGTTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACACAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGCTAAGGTGAGTGA AAAA AACTGGTAA AAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAGAACATAAAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAAGGCTTATTGCAAAGCCCTGTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAAAGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 80)

MKGTIVGTIKTLRDLYGNDVVDLSLSVGVWEPDRVITPLEIDDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGRQNIKTFSEWFPYSFAGRRLVNFMMDMEVHLQLTKMIKGATPPRIIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEISVVEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

Figure 8E

【図 8 D D】

Homo sapiens B2 (1-217)

(配列番号 159)

ATGTATGGATTTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACA
TGGGAGAAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAAGTGAAGAATGTCTTCATGACCTACACCCGTGTATGAT
GACATCATCACCATTAAAGCTCATCCAAGAAGCTGCAGAGGTTCTGGATGTGCTCCATGGAGAACC
ATTCTGAAGCTCTTTGGCGAATACCTCTTTAAAGTCTGTGAAGATGTCTGCGTATGACAGGATGC
TGGCGACACTTGGAGGAAATCTCACCGAGTTTATTGAAAAACCTGATGGCATCCACAGTTTACC
TGCGACTGCTCATCAGGAATGAAGGCACCTCTCTGAGTGTGAGGAGAAGGAGCTGACCGGG
CGCATGCTCTCTCCACTACTACTACGACAGACATGGTCTGTGTACACATTGTACACAGGTATCATTTG
AAGCTGTGGCCAAGGACTCTTTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCTCTGGATATGACAGGAAG
AGGTGGAAAGGACAGGGAAGAAAGAACATGTTGTGTTTGTGCTGCTGCAGAAAGGCTCACAGA
CAGATAACAGGAGCAAAAGCGACCGCGCCACAAGGCAGTGAAGGACAGCCAGGACAGACCAGG
AGGCTCTCCAGGGGAACACTCTT

(配列番号 160)

MYGFINTCLQSLVTEKFGREETWEKIKAPAEEVQDVFMVTVVYDDHITIKLQEACKVLDVSMIAJLK
LFGVEYFFKFKCMSOYDRMLRTLGNLTIEFENLDALHSYLALSYQEMNAPSFRVEEGADGAMLLH
YYSDRHGLCHIVPGHIEAVAKDFDFTDVAMSILDMNEEVERTGKKEHVFLVYVQKAHRQIRGAKA
SRPQSEDSQADQEAQLQGTLL

Homo sapiens B2 (1-217) 1142Y

(配列番号 161)

ATGTATGGATTTCATCAACACCTGCCTGCAGTCTCTTGTGACAGAGAAATTTGGTGAGGAGACA
TGGGAGAAGCTGAAGGCTCCTGCAGAAAGTGAAGAATGTCTTCATGACCTACACCGTGTATGAT
GACATCATCACCATTAAAGCTCATCCAAGAAGCTGCAGAGGTTCTGGATGTGCTCCATGGAGAAGC
ATTCTGAAGCTCTTTGGCGAATACCTCTTTAAAGTCTGTGAAGATGTCTGCGTATGACAGGATGC
TGGCGACACTTGGAGGAAATCTCACCGAGTTTATTGAAACCTAGATGCACCTCCACAGTTTACC
TGCGACTGCTCTATCAGGAAATGAACCGCACCTCTTTTCAGATGGAGGAAGGAGCTGACGGG
GCGATGCTCTTCCCACTACTACTACGACAGACATGGTCTGTGCTACTATGTACACAGGTATCATTTG
AAGCTGTGGCCAAGGACTCTTTGACACTGATGTGGCCATGAGTATCTCTGGATATGACAGGAAG
AGGTGGAAAGGACAGGGAAGAAACATGTTGTGTTGCTGCTGCAGAAAGGCTCACAGA
CAGATAAGAGGAGCAAAAGGCAAGCCGCGCCACAAGGCAGTGAAGGACAGCCAGGACAGACCAGG
AGGCTCTCCAGGGGAACACTCTT

(配列番号 62)

MYGFINTCLQSLVTEKFGREETWEKIKAPAEEVQDVFMVTVVYDDHITIKLQEACKVLDVSMIAJLK
LFGVEYFFKFKCMSOYDRMLRTLGNLTIEFENLDALHSYLALSYQEMNAPSFRVEEGADGAMLLH
YYSDRHGLCHIVPGHIEAVAKDFDFTDVAMSILDMNEEVERTGKKEHVFLVYVQKAHRQIRGAK
ASRPQSEDSQADQEAQLQGTLL

Figure 8DD

【図 8 F】

Fl. I5L-P115A

(配列番号 81)

ATGAAGGGGACACTGTTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACACAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGA AAAA AACTGGTAA AAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAGAACATAAAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAAGGCTTATTGCAAAGCCCTGTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAAAGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 82)

MKGTIVGTIKTLRDLYGNDVVDLSLSVGVWEPDRVITPLEIDDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGRQNIKTFSEWFPYSFAGRRLVNFMMDMEVHLQLTKMIKGATPPRIIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEISVVEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

Fl. P115A

(配列番号 83)

ATGAAGGGGACAACTCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACACAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGA AAAA AACTGGTAA AAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAGAACATAAAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAGGAGCTTATTGCAAAGCCCTGTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAAAGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 84)

MKGTIVGTIKTLRDLYGNDVVDLSLSVGVWEPDRVITPLEIDDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGRQNIKTFSEWFPYSFAGRRLVNFMMDMEVHLQLTKMIKGATPPRIIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEISVVEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFE

Fl. N74E

(配列番号 85)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACACAGATAGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGTCTAAGGTGAGTGA AAAA AACTGGTAA AAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTAGGAAGGCCAGAACATAAAAACCTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAGGCTAGTGAATTTTAAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCTCCAAAGGCTTATTGCAAAGCCCTGTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAAAGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAAATTTCAAGTGAAGAGGTCGAAAGAGGGCGAAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTGA

(配列番号 86)

MKGTIVGTIKTLRDLYGNDVVDLSLSVGVWEPDRVITPLEIDDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGRQNIKTFSEWFPYSFAGRRLVNFMMDMEVHLQLTKMIKGATPPRIIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMYYDFLGLIEGSSKFFKEISVVEVERGEKDGFSRLKVRIFKPNVFEYKKK

Figure 8F

【図 8 G】

FL N74A/V140H

(配列番号 87)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGGTAAGGTGAGTGAAAAAATCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGCGAGGCCATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAAGCCTGTTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGACGATTACTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAGGAGAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTTCCGAAAGAGCGCAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTATAAGAAA
AATTGA

(配列番号 88)

MKGTIVGTWIKLRDLYGNDVVDESLSVGVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEYKKN

FL R135Q-His6

(配列番号 89)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAATCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGCGAGACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAAGCCTGTTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAACAGAAGATGTACGATTACTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAGGAGAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTTCCGAAAGAGCGCAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTATAAGAAA
AATCTCGAGCACACCACCACCACCTGA

(配列番号 90)

MKGTIVGTWIKLRDLYGNDVVDESLSVGVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEYKKNLKHHEHHHHH

Figure 8G

【図 8 I】

FL W9N

(配列番号 95)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACAAATATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAATCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGCGAGACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAAGCCTGTTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAGGAGAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTTCCGAAAGAGCGCAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTATAAGAAA
AATTGA

(配列番号 96)

MKGTIVGTWIKLRDLYGNDVVDESLSVGVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEYKKN

FL W9H

(配列番号 97)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACACATATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAATCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGCGAGACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAAGCCTGTTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAGGAGAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTTCCGAAAGAGCGCAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTATAAGAAA
AATTGA

(配列番号 98)

MKGTIVGTWIKLRDLYGNDVVDESLSVGVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEYKKN

Figure 8I

【図 8 H】

FL N74A

(配列番号 91)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAATCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGCGAGGCCATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAAGCCTGTTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAGGAGAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTTCCGAAAGAGCGCAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTATAAGAAA
AATTGA

(配列番号 92)

MKGTIVGTWIKLRDLYGNDVVDESLSVGVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEYKKN

FL N74A-His6

(配列番号 93)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAATCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGCGAGGCCATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAAGCCTGTTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAGGAGAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTTCCGAAAGAGCGCAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTATAAGAAA
AATCTCGAGCACACCACCACCACCTGA

(配列番号 94)

MKGTIVGTWIKLRDLYGNDVVDESLSVGVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEYKKNLKHHEHHHHH

Figure 8H

【図 8 J】

FL N74H

(配列番号 99)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAATCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGCGAGCATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAAGCCTGTTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAGGAGAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTTCCGAAAGAGCGCAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGTATAAGAAA
AATTGA

(配列番号 100)

MKGTIVGTWIKLRDLYGNDVVDESLSVGVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEYKKN

FL I75K

(配列番号 101)

ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTGGGAACCAAGATAGGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGGCTAAGGTGAGTGAAAAAATCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGAGGTTAGGAAGCGAGACATAAAAACTTTCAGCGAATGGTTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAGAGGCTAGTGAATTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAAGCCTGTTGCAAAAAG
ATGCCATTGAAATGGAGTACGTTTCTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTTCAGGAGAGAAATTTCAAGTGAAGAGGTTCCGAAAGAGCGCAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCCGTTTGTAGCACCCACC
CACCACCTGA

(配列番号 :102)

MKGTIVGTWIKLRDLYGNDVVDESLSVGVWEPDRVITPLEDIDDDEVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRQAIKTFSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDEVHLQLTKMIKATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSKRKMVDYFLGLIEGSSKFFKEEISVEEVERGEKDGFSRLKVRKFKNPVFEHHHHHHH

Figure 8J

【図 8 K】

L144F

(配列番号 103)
ATGAAGGGACAATCUTCGBGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GGTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACGAGATAGGCTAATTACACTCTCGAAG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAAGCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGGCTAGGAAGGCAGAACATAAAACCTTTCAGCGAATGGTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAAGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAAGCCTGTGCAAAAAAG
ATGCGATTGAATGAGTACGTTCTTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGTTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGAAGAGGTGCAAGAGGCGCAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCGCTTTTGTAGCACCACCAC
CACCACCACCTGA

(配列番号 104)
MKGITVGTWIKTLRDLYGNDVVDLSKSVGWEPDRVITPLEDIDDDVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSRKMYDYFLGIBGSSKFFKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKKNPVFEHHHHHH

L2-WT-His6

(配列番号 105)
ATGAAGGGGACAATCGTCGGGACATGGATAAAGACCCTGAGGGACCTTTACGGGAATGATGT
GCTTGATGAATCTTTAAAAAGTGTGGGTTGGGAACGAGATAAGGTAATTACACCTCTGGAGG
ATATTGATGACGATGAGGTTAGGAGAATTTTGCTAAGGTGAGTGAAAAAAGCTGGTAAAAAT
GTCAACGAAATATGGAGAGGCTAGGAAGGCAGAACATAAAACCTTTCAGCGAATGGTTCC
CTCCTATTTTGCAGGGAGAAAGCTAGTGAATTTTTTAATGATGATGGATGAGGTACACCTACA
GCTTACCAAGATGATAAAGGAGCCACTCCTCCAAGGCTTATTGCAAAAGCCTGTGCAAAAAAG
ATGCGATTGAATGAGTACGTTCTTAAAGAAAGATGTACGATTACTTTTTAGGGCTTATAG
AGGGTAGTTCTAAATTTTCAAGGAAGAAATTTTCAGTGAAGAGGTGCAAGAGGCGCAAAA
GATGGCTTTTCAAGGCTAAAGTCAGGATAAAATTTAAAAACCCGCTTTTGTAGTATAAGAAA
AATCTCGAGCACCACCACCACCACCTGA

(配列番号 106)
MKGITVGTWIKTLRDLYGNDVVDLSKSVGWEPDRVITPLEDIDDDVRRIFAKVSEKTKGNVNEI
WREVGQRNIKTSEWFPSYFAGRRLVNFLMMMDVHLQLTKMIKGATPPRLIAKPVAKDAIEME
YVSRKMYDYFLGLIBGSSKFFKEISVEEVERGEKDGFSRLKVRIFKKNPVFEYKKNLEHHHHHH

Figure 8K

【図 8 L】

Legionella pneumophila ORF2**L2 WT**

(配列番号 107)
ATGATGCTCTATGAAAGGAATCATATTTCAACGAATTTCTCAATTTGTAGAAAAAAGTGAATCC
TACACCCTGGTAGATCAAAATTTATGGATAGTCATTTGAAGTCCCATGGTGCCTACACGCTCT
ATCGGTACATACTCTCCCAAGAATTAATTTCAATTTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGC
AAACCAACATCAGTGATTTTACAAGAAATATGGTGAGTATTTGTTGAGGTTTGTGCAAAAAAA
TATCCTCAATTTTTCAGGAAAAAAGTCGGTGTTCATTTTGGGAAGCGCTGTGAACACAT
ATTCATTTGCAAGTGAAAAAATTTGTTATGACTTACTGAACTACCCCAATTTTGAATGCCAAT
CACAGTCAAAATCAATGGAAATGATTTACACITCTTCGCGCTCTTTGGCCGATTTTGGCGAA
GGTTTATAAAAGGTTGTATTAATATCATAAAGAAACATGACTATTGTTGCGTAAAAATCTG
CCTGCAAAAACAGGCTTTAAGGTAAAGTTGTATTAACAAAAGGCGATCTCGATGAGTGA

(配列番号 108)
MMSMKGIIFNEFLNFVEKSESYTLVDQIMDSHLKSHGAYTSIGTSPKELFOLVKALAMKNGKPT
SVILQYGEYLFVFAKKYPPQFFREKKSVPQFLEALETHHFVKKLYDYTELPHFECQYHSQNM
EMITYSSRPLADFAEGLIKGCIKYHKENMTIVRENLPKTFGKVRVLT.KGDPDE

L2-F142Y

(配列番号 109)
ATGATGCTCTATGAAAGGAATCATATTTCAACGAATTTCTCAATTTGTAGAAAAAAGTGAATCC
TACACCCTGGTAGATCAAAATTTATGGATAGTCATTTGAAGTCCCATGGTGCCTACACGCTCT
ATCGGTACATACTCTCCCAAGAATTAATTTCAATTTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGC
AAACCAACATCAGTGATTTTACAAGAAATATGGTGAGTATTTGTTGAGGTTTGTGCAAAAAAA
TATCCTCAATTTTTCAGGAAAAAAGTCGGTGTTCATTTTGGGAAGCGCTTGAACACAT
ATTCATTTGCAAGTGAAAAAATTTGTTATGACTTACTGAACTACCCCAATTTTGAATGCCAAT
CACAGTCAAAATCAATGGAAATGATTTACACITCTTCGCGCTCTTTGGCCGATTTGCGGAA
GGTTTATAAAAGGTTGTATTAATATCATAAAGAAACATGACTATTGTTGCGTAAAAATCTG
CCTGCAAAAACAGGCTTTAAGGTAAAGTTGTATTAACAAAAGGCGATCTCGATGAGTGA

(配列番号 110)
MMSMKGIIFNEFLNFVEKSESYTLVDQIMDSHLKSHGAYTSIGTSPKELFOLVKALAMKNGKPT
SVILQYGEYLFVFAKKYPPQFFREKKSVPQFLEALETHHFVKKLYDYTELPHFECQYHSQNM
EMITYSSRPLADYAEGLIKGCIKYHKENMTIVRENLPKTFGKVRVLT.KGDPDE

Figure 8L

【図 8 M】

L2-F9W-F142Y

(配列番号 111)
ATGATGCTCTATGAAAGGAATCATATGGAACGAATTTCTCAATTTGTAGAAAAAAGTGAATCC
TACACCCTGGTAGATCAAAATTTATGGATAGTCATTTGAAGTCCCATGGTGCCTACACGCTCT
ATCGGTACATACTCTCCCAAGAATTAATTTCAATTTGGTTAAAGCGCTTGCTATGAAAAATGGC
AAACCAACATCAGTGATTTTACAAGAAATATGGTGAGTATTTGTTTGAAGGTTTGTGCAAAAAA
TATCCTCAATTTTTCAGGAAAAAAGTCGGTGTTCATTTTGGGAAGCGCTTGAACACAT
ATTCATTTGCAAGTGAAAAAATTTGATGACTATACGTAACCTACCCCAATTTTGAATGCCAAT
CACAGTCAAAATCAAAATGAAATGATGACTATACGTAACCTCTTCGGGCTTTGCGCGATATAGCGGA
GGTTTATAAAAGGTTGTATTAATATCATAAAGAAACATGACTATTGTTGCGTAAAAATCTG
CCTGCAAAAACAGGCTTTAAGGTAAAGTTGTATTAACAAAAGCGCATCTCGATGAGTGA

(配列番号 112)
MMSMKGIIFNEFLNFVEKSESYTLVDQIMDSHLKSHGAYTSIGTSPKELFOLVKALAMKNGKPT
TSVILQYGEYLFVFAKKYPPQFFREKKSVPQFLEALETHHFVKKLYDYTELPHFECQYHSQNM
MEMITYSSRPLADYAEGLIKGCIKYHKENMTIVRENLPKTFGKVRVLT.KGDPDE

Legionella pneumophila ORF1**L1-WT**

(配列番号 113)
ATGAAGGTATCGGTTTACCTCCTAAATGACATGATTATAGAACAATTTGGCATAGAAAAAC
TGGGACCAACTCGTATCTCTCACTAGACCTTCCAAAGTGGTGAAGTTATACAGCAGCGCGCACT
TACTCGGATACAGAAATTCAGCAATTTGATTAAAGGCCATTGCGAAGAGGACCAATCAGCAGCT
TCTGTTTTTTATAGAGGCTTTGGTGAAATACATGTTTCTATCTTATCGAGTAAGTGCGCAATTTT
TTAAAAAAGGCATGACATTTAAAGAAATTTTAAAAAGCATTTGATGGAAACAAATTCATGTTGG
AAGTAGAAAAATTTACCCAGATGAAACATTAACCTACCAATAGCTATGAAGAGCCTGCTGCA
AACCAATTTGGTATGTGTATGATGATGATAGAACATCTGTGATTTTGCATAAGCGGCTATC
CAGGGAGCAGCGCAACATTTTAAAAAGAAATTTACCATTAAGCAGACTCACTGCATGTTAAA
AAAAGATGATCATTTGCTGTTTGGAGATTACCTTTGAAGTGA

(配列番号 114)
MKGIVFTSLNDMIIHQFIETWDQLVSSLDLPSGGSYTAGGTSYDTEFQQLIKAIKRTNQHASVFL
EAFGEYMFPLSSKCAIFLKKDMTLKEFLKSIDGTHVEVKLYPDELTPTISYEPPAANQLVMVYR
SHRRLCHEAMGLIQGAAQHFKKKTITQTHCMLKDDHCRLEITFE

Figure 8M

【図 8 N】

L1-F142Y

(配列番号 115)
ATGAAGGTATCGTITTTACCTCCTTAAATGACATGATTATAGAACAAATTTGGCATAGAAAAAC
TGGGACCAACTCGTATCTCTCACTAGACCTTCCAAAGTGGTGGAGTTATACAGCAGCGCGGCAT
TACTCGGATACAGAAATTTCAGCAATTTGATTAAAGGCCATTGCGAAGAGGACCAATCAGCAGCT
TCTGTTTTTTATAGAGGCTTTGGTGAAATACATGTTTCTTATCTTATGAGTAAAGTGGCAATTTT
TTAAAAAAGGACATGACATTAAAGAAATTTTAAAAAGCATTTGAAGAACAAATTCATGTTGG
AAGTAGAAAAAGTTATACCCAGATGAAACATTAACCTACCAATAGCTATGAAGAGCCTGCTGCA
AACCAATTTGGTATGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
CAGGGAGCAGCGCAACATTTTAAAAAGAAATTTACCAATTTGACATTAAGGAGACTCACTGCATGTTAAA
AAAAGATGATCATTTGTGTTTGGAGATTACCTTTGAGTGA

(配列番号 116)
MKGIVFTSLNDMIIHQFIETWDQLVSSLDLPSGGSYTAGGTSYDTEFQQLIKAIKRTNQHASVFL
EAFGEYMFPLSSKCAIFLKKDMTLKEFLKSIDGTHVEVKLYPDELTPTISYEPPAANQLVMVYR
SHRRLCHEAMGLIQGAAQHFKKKTITQTHCMLKDDHCRLEITFE

Denitrovibrio desulfuricans**Dd-H-NOX(728-899)**

(配列番号 117)
ATGAAGATGCGCGGTATTTTGGCGAAAAATATTTAGAAATTTTATAAAGAGATCTATGGGGAT
GAGCTGTTTGTCTCATGTTTCTAAAAACATGGGCGAGCGCTGCTTCATGGCGGGAATTCCTACC
CTGATCAGGTGTTGGCGCCAGATGGCTGAAATAGTATGCCAGCGCAGCGGCGAAGAGCCCAAG
TTGTTTTTTTGAAGAAGCAGGCGCTGCAAGCCTGCAAGCTTTTAAAGAAATGATCAGGCAATGAC
TTTAAAGGGGAAACCCCTAAAGAGTTTCTGCTGGCCATGAATGATATCCACAGGCACTTGAACA
AAGGCAATCCCGGCGTACGCCCGCTCAAAATGAGTATGAGCATCAGGCGCATACCGCTTGT
ATGACATATAAGTCGAGAGGGAATACGAGAAATCACTTTGGGCGATCATCAAGGCAAGCTGCTG
GGAAGTTTAAAGGAAAAAGTGCATATCAGCTCGGAGCATGCGGTTAAGGGCGCAACAAGC
GCAAGGTTACATTATTATAATGA

(配列番号 118)
MKMRGILPKIFMNFKEIYGDVFAHVSCTMGPEVFMFGNSYDPQVLQMAEIVCQRTGEQPKLF
FEKAGASLQAFNMYRQYFKGETLKEFLLMNDIHRHLTKDNPGRVPPKFEYDDQGDVLMTY
KSQRDYGEYVGIKAAAEPKKEKVRISSEHAGKRGITARTVPIK

Figure 8N

(配列番号 128)
 MGVFNHLELVIRNYGPEVWEDIKKEALQDEEGQFLVRIYDSDSYDLVAAASKVLNLNAGE
 LQMFGMKFFVYQESGYDTILRVLGNSVREFLQNLDALHDHLATIPGMRAPSRCTDAEKGK
 LILHYYSERFGLQDVIQIKTVAQQIHGTEIDMVKTVQRNEEDCHDTQLIEEKSEEDFYEDLRF
 ENGTQYSRSPYTFCKAFPHFIIDRVLTPVTCQGNATVRLVPLQPGNSCLISVSLVRPHIDISF
 ELSHINTVSLPDKSEGLLDVLEKLECEDELGTGETSCLRLKGQMYILPLAEDSLFLCSPSVMNLDL
 TRRGILYDPLDHDATDLVLGGEQPREYKLTQLEILTDRIQLTRALD

【図 8 S】

Hs. B1 (1-385) H105F

(配列番号 129)
ATGTACGGATTTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTCAGAATAAT
ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAAGTCTCAATCTCAATGC
TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTTTTGCCAAGAAATCTGGTTATGAT
ACAATCTTGGGTGCTCTGGGCTCTAATGTCAGAGAATTTCTACAGAACTTGATGCTCTGTTCG
ACCACCTTGTACCATCTACCCAGGAATGGCTGACCTTCTTTAGGTGCACTGATGCAGAAAA
AGGGCAAAAGGACTCATTTTGCATCTACTACAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCTATTG
GAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCAAG
CAAGAATAAGAAATGTGATCATCTCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAGA
GGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTGAAGAAAAATGGTACCCAGGAATCAGCATCAGCCC
ATATACATTCTGCAAGCTTTTCCCTTTTCATATAATATTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCAG
TGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCTTGGGAATTGCAGCCTTCTGTCTG
TCTTCTCGCTGGTTGCTCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTTCTCACATCAATCT
GTTTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATGA
ACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAGC
AGATAGCATACTTTTCTATGTTACCAAGTGTCTGAALCTGGGACGATTTGACAAGGAGAGGG
GCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCACGGCGCATCTTGTCTTTTGGGAGAAC
ATTITAGAGAGGAATACAAACTCACCACAAAGAAATCCCTCACTGACAGGCTACAGCTCA
CGTTAAGGCCCTGGGAAGATTGA

(配列番号 130)
MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
ILQMPGKMFVFCQESGYDILRVLSNVREFLQNLDAFDHDLATYPMRAPSFRCCTDAEKGKGL
ILHYYSEREGLDQVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFE
ENGTQESRISPYTFCKAPFFHIIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPCNCSLLSVFSLVRPHDISFHI
LSHINTVFLRSKEGLLDVBEKLECEDELGTGEISCLRLKGQMIYLPEDSILFLCSPVMNLDLTRL
GLVLSDIPLHDATRDLLVLEQFREYKLTQELEILTDRLQLTRALED

Figure 8S

【図 8 T】

Hs. B1 (1-385) H105C

(配列番号 131)
ATGTACGGATTTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTCAGAATAAT
ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAAGTCTCAATCTCAATGC
TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTTTTGCCAAGAAATCTGGTTATGAT
ACAATCTTGGGTGCTCTGGGCTCTAATGTGACAGAAATTTCTACAGAACTTGATGCTCTGGGT
GACCACCTTGTCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCTTAAAGTGCACTGATGCAGAA
AAGGGCAAAAGGACTCATTTTGCATCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCAIT
GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
GCAAGAATAAGAAATGTGATCATCTCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG
AGGATTTTTATGAAGATCTTGACAGATTGAAGAAAAATGGTACCCAGGAATCAGCATCAGCC
CATATACATCTGCAAAAGCTTTTCCCTTTTCATATAAATATTGACCGGGACCTAGTGGTCACTCA
GTGTGGCAATGCTATATACAGAGTTCTCCCCAGCTCCAGCTTGGGAATTGCGAGATCTCTGTCT
GATCTCTCGCTGCTGCTCTCATATTGATATTAGTTTCCATGGGATCCTTTCTCACATCAATAC
TGTTTTTGTATTGAGAAGCAAGGAAGGATTGTGGATGTGGAGAAATTAGAATGTGAGGATG
AACTGACTGGGACTGAGATCAGCTGCTTACGTCTCAAGGGTCAAATGATCTACTTACCTGAAG
CAGATAGCATACTTTTCTATGTTTCAACCAAGTGTCTAGAACCTGGACGATTTGACAAGGAGAG
GGCTGTATCTAAGTGACATCCCTCTGCATGATGCCAAGCGGCATCTTGTCTTTTGGGAGAAC
AATTTAGAGAGGAATCAAACTCACCCAGAACTCGGAATCTCACTGACAGGCTACAGCTC
ACGTTAAGAGCCCTGGAAGATTGA

(配列番号 132)
MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
ILQMPGKMFVFCQESGYDILRVLSNVREFLQNLDAFDHDLATYPMRAPSFRCCTDAEKGKGL
LILHYYSEREGLDQVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFE
EENGTQESRISPYTFCKAPFFHIIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHDISFHI
LSHINTVFLRSKEGLLDVBEKLECEDELGTGEISCLRLKGQMIYLPEDSILFLCSPVMNLDLTRL
RGLVLSDIPLHDATRDLLVLEQFREYKLTQELEILTDRLQLTRALED

Hs. B1(1-124)

(配列番号 133)
ATGTACGGATTTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTCAGAATAAT
ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAAGTCTCAATCTCAATGC
TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTTTTGCCAAGAAATCTGGTTATGAT
ACAATCTTGGGTGCTCTGGGCTCTAATGTGACAGAAATTTCTACAGAACTTGATGCTCTGCA
GACCACTTGGGCTGCTGCTCATACAGGAATGCTGACCTTCTTTAAGTGCACTGATGCAGAA
AAGGGCAAAAGGACTCATTTTGCATCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATATTGTCAIT
GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
GCAAGAATAAGAAATGTGATCATCTCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG
AGGATTTTTATGAAGATTGA

(配列番号 134)
MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
ILQMPGKMFVFCQESGYDILRVLSNVREFLQNLDAFDHDLATYPMRAPSFRCCTDAEKGKGL
LILHYYSEREGLDQVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

Figure 8T

【図 8 U】

Hs. B1(1-194) H145Y

(配列番号 135)
ATGTACGGATTTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTCAGAATAAT
ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAAGTCTCTCAATCTCAATGC
TGGGAATAATCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTTTTGCCAAGAAATCTGGTTATGAT
ACAAATCTTGGGTGCTCTGGGCTCTAATGTGACAGAAATTTCTACAGAACTTGATGCTCTGCAC
GACCACCTTGTCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCTTTAAGTGCACATGATGCAGAA
AAGGGCAAAAGGACTCATTTTGCATCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATTATGTCAIT
GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
GCAAGAATAAGAAATGTGATCATCTCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG
AGGATTTTTATGAAGATTGA

(配列番号 136)
MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
ILQMPGKMFVFCQESGYDILRVLSNVREFLQNLDAFDHDLATYPMRAPSFRCCTDAEKGKGL
LILHYYSEREGLDQVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

Hs. B1(1-194) L9W-1145Y

(配列番号 137)
ATGTACGGATTTTGTGAATCACGCCCTGGAGTTGCTGGTGATCCGCAATTACGGCCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCCACAGTTAGATGAAGAAGGACAGTTTCTTGTCAGAATAAT
ATATGATGACTCCAAAACCTTATGATTTGGTTGCTGCTGCAAGCAAAAGTCTCAATCTCAATGC
TGGAGAAATCCTCCAAATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTTTTGCCAAGAAATCTGGTTATGAT
ACAATCTTGGGTGCTCTGGGCTCTAATGTGACAGAAATTTCTACAGAACTTGATGCTCTGCAC
GACCACCTTGTCTACCATCTACCCAGGAATGCGTGCACCTTCTTTAAGTGCACATGATGCAGAA
AAGGGCAAAAGGACTCATTTTGCATCTACTACTCAGAGAGAGAAGGACTTCAGGATTATGTCAIT
GGAATCATCAAAACAGTGGCACAACAAATCCATGGGCACTGAAATAGACATGAAGGTTATTCA
GCAAGAATAAGAAATGTGATCATCTCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGAGTCAAAAGAAG
AGGATTTTTATGAAGATTGA

(配列番号 138)
MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
ILQMPGKMFVFCQESGYDILRVLSNVREFLQNLDAFDHDLATYPMRAPSFRCCTDAEKGKGL
LILHYYSEREGLDQVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNECDHTQFLIEEKESKEEDFYED

Figure 8U

【図 8 V】

Rattus norvegicus B1(1-385)

Rn. WT (1-385)

(配列番号 139)
ATGTACGGATTTTGTGAACCATGCCCTGGAGTCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGGCCACAGTTAGATGAAGAAGGCCAGTTTCTTGTCAGAATAAT
CTACGATGATTCCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGCGAGCAAAAGTCTCAACCTCAATGC
TGGTGAATCTGTCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTTTGTCAGAGCTTGGCTATGAT
ACCATCTTGGGTGCTCTGGGATCTAATGTACAGGAGTTTTCAGAGAACTTCAGGACCTTGCA
GACCACCTTGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACTTCTTCCGGTGACCGGATGCAGAA
AAAGGCCAAAGGGCTCATTCTGCATCTACTCCGGAAGAGAGGGGCTTCAGGACATTTGAT
CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCAGTGAAGATAGACATGAAGGTTATTCA
GCAAGAAGTGAAGAATGTGATCATACCAATTTTTAATTGAAGAAAAAGATCAAAAGAAG
AGGATTTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAAGCGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGC
CGTACACCTCTGCAAAAGCGTTTCCCTTTCACATCATATTTGACCGGGACCTAGTATGACCGCA
GTGTGGAATGCTATCTACAGAGTGTCTCCCGAGCTCCAGCTGGGAAGTGCAGGCTTCTGTC
TGCTCTTCTCTTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACCGGATTTTTCACACATCAAT
ACCGCTTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTTCGTGGATGTTGAGAAGCTGGAATGAGGGA
TGAAGTACTGGGCGAGAGATTAGCTGCTCCGTCTCAAAGGCCAAATGATCTAATCCCGGA
AGCAGATAGCATCTCTTCTCTGTTACCAAGTGTGATGAACCTTGGATGACCTAACCAAGAAG
AGGGCTGTACTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACAGAGAGCTGGTCTTTTGGGAGA
ACAGTTTCGGGAGGAGTACAACTGACACAAGAGCTGGAAATCTCTACAGACAGGCTGCACT
CTACACTGAGGGCTTTGGAGATTGA

(配列番号 140)
MYGFVNHALELLVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDDSKTYDLVAAASKVLNLNAGE
ILQMPGKMFVFCQESGYDILRVLSNVREFLQNLDAFDHDLATYPMRAPSFRCCTDAEKGKGL
LILHYYSEREGLDQVIGIKTVAQQIHGTEIDMKVIQQRNECDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRFE
ENGTQESRISPYTFCKAPFFHIIFDRDLVVTQCGNAIYRVLPQLQPGKCSLLSVFSLVRPHDISFHI
LSHINTVFLRSKEGLLDVBEKLECEDELGTGEISCLRLKGQMIYLPEDSILFLCSPVMNLDLTRL
RGLVLSDIPLHDATRDLLVLEQFREYKLTQELEILTDRLQLTRALED

Figure 8V

【図 8 W】

Rn. B1 (1-385) 1145Y

(配列番号 141)
ATGTACGGTITTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGCGCCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCCTTTGTGAATAAT
CTACGATGATTCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGGAGCAAAAGTCTCAACCTCAATGC
TGGTGAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
ACCATCTTGGCTGCTGGGATCTAATGTCAGGGAGTITTTGCAGAACTCGACGCCCTGCAC
GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACTTCCTTCGGGTGCACCGATGCAGAA
AAAGGCCAAAGGGCTCATTTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAAGGACTACGTGAT
CGGGATTATCAAGACTGTGATCTCAAGACATCCATGGCACTGAGTAGACATGAAGGTTATTCA
GCAAGAAGTGAAGAAATGTGATCATACCCAATTTTAAATTGAAGAAAAGAAATCAAAGAAG
AGGATTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC
CGTACACCTTCTGCAAGCGCTTTCCTTTTACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA
GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGTCTCCCGCAGTCCAGCTGGGAAAGTGCAGCCTTCTGTC
TGCTTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCAGGGGATTCTTTCACACATCAAT
ACCGTCTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTGTGCTGGATGTTGAGAACTTGAATGTGAGGA
TGAACCTGACTGGGCGAGAGATTAGCTGCCCTCGCTCAAAGGCCAAATGATCTATTACCGGA
AGCAGATAGCATCTCTCTCTGTCTACCAAGTGTGATGAACCTGGATGACCTAACAAAGAAG
AGCCTGTACTGTGAGTAGCATCCCTCTGCTGTTCACCAAGTGTGATGAACCTGGATGACCTAACAAAGAAG
ACAGTTCGGGAGGAGTACAAACTGACCAAGAGCTGGAAATCTCACAGACAGGCTGCAGC
TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(配列番号 142)
MYGFVNHALLELVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDSDSKTYDLVAAASKVLNINAGE
ILQMFQKMPFVFQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDAIHDHILATTYPGMRAPSFRCCTDAEKGK
LILHYYSEREGLDQVIGIKTVAQIHHGTEDMKVIOQRSEECDDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF
EENGTDQSRISPYTFCKAFPHIHDRDLVVTQCGNAILYRVLPOLQPKCSLLSVFSLVRPHDISFHG
ILSHINTVFLRSKEGLLDVEKLECEDELTAIEISCLRLKGQMIYLPEDSILFLCSPSVMNLDLTLR
RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

Figure 8W

【図 8 X】

Rn. B1 (1-385) 1145H

(配列番号 143)
ATGTACGGTITTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGCGCCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCCTTTGTGAATAAT
CTACGATGATTCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGGAGCAAAAGTCTCAACCTCAATGC
TGGTGAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
ACCATCTTGGCTGCTGGGATCTAATGTACAGGGAGTITTTGCAGAACTCGACGCCCTGCAC
GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACTTCCTTCGGGTGCACCGATGCAGAA
AAAGGCCAAAGGGCTCATTTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAAGGACTACGTGAT
CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
GCAAGAAGTGAAGAAATGTGATCATACCCAATTTTAAATTGAAGAAAAGAAATCAAAGAAG
AGGATTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACGGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC
CGTACACCTTCTGCAAGCGCTTTCCTTTTACATCATATTTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA
GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGTCTCCCGCAGTCCAGCTGGGAAAGTGCAGCCTTCTGTC
TGCTTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATCTTTCACACATCAAT
ACCGTCTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTGTGCTGGATGTTGAGAACTTGAATGTGAGGA
TGAACCTGACTGGGCGAGAGATTAGCTGCCCTCGCTCAAAGGCCAAATGATCTATTACCGGA
AGCAGATAGCATCTCTCTCTGTTCACCAAGTGTGATGAACCTGGATGACCTAACAAAGAAG
AGCCTGTACTGTGAGTAGCATCCCTCTCCATGATGCTACAGAGACCTGTGCTCTTTGGGAGA
ACAGTTCGGGAGGAGTACAAACTGACACAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC
TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(配列番号 144)
MYGFVNHALLELVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDSDSKTYDLVAAASKVLNINAGE
ILQMFQKMPFVFQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDAIHDHILATTYPGMRAPSFRCCTDAEKGK
LILHYYSEREGLDQVIGIKTVAQIHHGTEDMKVIOQRSEECDDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF
EENGTDQSRISPYTFCKAFPHIHDRDLVVTQCGNAILYRVLPOLQPKCSLLSVFSLVRPHDISFHG
ILSHINTVFLRSKEGLLDVEKLECEDELTAIEISCLRLKGQMIYLPEDSILFLCSPSVMNLDLTLR
RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

Figure 8X

【図 8 Y】

Rn. B1 (1-385) C78Y

(配列番号 145)
ATGTACGGTITTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGCGCCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCCTTTGTGAATAAT
CTACGATGATTCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGGAGCAAAAGTCTCAACCTCAATGC
TGGTGAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTCTATCAAGAGTCTGGCTATGAT
ACCATCTTGGCTGCTGGGATCTAATGTACAGGGAGTITTTGCAGAACTCGACGCCCTGCAC
GACCACCTCGCCACCATCTACCCAGGGATGCGCGCACTTCCTTCGGGTGCACCGATGCAGAA
AAAGGCCAAAGGGCTCATTTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAAGACATTTGAT
CGGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
GCAAGAAGTGAAGAAATGTGATCATACCCAATTTTAAATTGAAGAAAAGAAATCAAAGAAG
AGGATTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACCGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC
CGTACACCTTGTGCAAAAGGCTTTCCTTTTACATCATATTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA
GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGTCTCCCGCAGTCCAGCTGGGAAAGTGCAGCCTCTGTC
TGCTCTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTCACACATCAAT
ACCGTCTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTGTGCTGGATGTTGAGAAACTTGAATGTGAGGA
TGAACCTGACTGGGCGAGAGATTAGCTGCCCTCGCTCAAAGGCCAAATGATCTATTACCGGA
AGCAGATAGCATCTCTCTCTGTTCACCAAGTGTGATGAACCTGGATGACCTAACAAAGAAG
AGGCTGTACTCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGCTCTTTGGGAGA
ACAGTTCGGGAGGAGTACAAACTGACACAAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC
TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(配列番号 146)
MYGFVNHALLELVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDSDSKTYDLVAAASKVLNINAGE
ILQMFQKMPFVFQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDAIHDHILATTYPGMRAPSFRCCTDAEKGK
LILHYYSEREGLDQVIGIKTVAQIHHGTEDMKVIOQRSEECDDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF
EENGTDQSRISPYTFCKAFPHIHDRDLVVTQCGNAILYRVLPOLQPKCSLLSVFSLVRPHDISFHG
ILSHINTVFLRSKEGLLDVEKLECEDELTAIEISCLRLKGQMIYLPEDSILFLCSPSVMNLDLTLR
RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

Figure 8Y

【図 8 Z】

Rn. B1 (1-385) H105E

(配列番号 147)
ATGTACGGTITTTGTGAACCATGCCCTGGAGCTGCTGGTGATCCGCAATTACGGTCCCGAGGTG
TGGGAAGACATCAAAAAGAGCGCCAGCTGGATGAAGAAGGCCAGTTCCTTTGTGAATAAT
CTACGATGATTCAAAACCTATGACTTGGTGGCTGCTGGAGCAAAAGTCTCAACCTCAATGC
TGGTGAATCCTGCAGATGTTTGGGAAGATGTTTTCGTCTCTGTCAAGAGTCTGGCTATGAT
ACCATCTTGGCTGCTGGGATCTAATGTACAGGGAGTITTTGCAGAACTCGACGCCCTGTGCG
ACACCTTGGCAAGGCTTTCCTTTTACATCATATTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA
AAGGCCAAAGGGCTCATTTGCACTACTACTCGGAAAGAGAGGGGCTTCAAGACATTTGAT
GGGATTATCAAGACTGTAGCTCAACAGATCCATGGCACTGAGATAGACATGAAGGTTATTCA
GCAAGAAGTGAAGAAATGTGATCATACCCAATTTTAAATTGAAGAAAAGAAATCAAAGAAG
AGGATTTTATGAAGATCTGGACAGGTTTGAAGAGAACCGTACCCAGGACTCCCGTATCAGCC
CGTACACCTTGTGCAAAAGGCTTTCCTTTTACATCATATTGACCGGGACCTAGTAGTCACGCA
GTGTGGAAATGCTATCTACAGAGTGTCTCCCGCAGTCCAGCTGGGAAAGTGCAGCCTCTGTC
TGCTCTCTCTCTGGTCCGCCCTCATATTGACATCAGTTTCCACGGGATTCTTTCACACATCAAT
ACCGTCTTTGTACTGAGAAGCAAGGAAGGGTGTGCTGGATGTTGAGAAACTTGAATGTGAGGA
TGAACCTGACTGGGCGAGAGATTAGCTGCCCTCGCTCAAAGGCCAAATGATCTATTACCGGA
AGCAGATAGCATCTCTCTCTGTTCACCAAGTGTGATGAACCTGGATGACCTAACAAAGAAG
AGGCTGTACTCTGAGTGACATCCCTCTCCATGATGCTACACGAGACCTGGCTCTTTGGGAGA
ACAGTTCGGGAGGAGTACAAACTGACACAAAGAGCTGGAAATCCTCACAGACAGGCTGCAGC
TCACACTGAGGGCTTTGGAGGATTGA

(配列番号 148)
MYGFVNHALLELVIRNYGPEVWEDIKKEAQLDEEGQFLVRIYDSDSKTYDLVAAASKVLNINAGE
ILQMFQKMPFVFQESGYDTILRVLSNVREFLQNLDAIHDHILATTYPGMRAPSFRCCTDAEKGK
LILHYYSEREGLDQVIGIKTVAQIHHGTEDMKVIOQRSEECDDHTQFLIEEKESKEEDFYEDLDRF
EENGTDQSRISPYTFCKAFPHIHDRDLVVTQCGNAILYRVLPOLQPKCSLLSVFSLVRPHDISFHG
ILSHINTVFLRSKEGLLDVEKLECEDELTAIEISCLRLKGQMIYLPEDSILFLCSPSVMNLDLTLR
RGLYLSDIPLHDATRDVLVLLGEQFREYKLTQELEILTDRLQLTLRALED

Figure 8Z

【配列表】

0005698905000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 P 13/12 (2006.01) A 6 1 P 13/12
 A 6 1 P 9/10 (2006.01) A 6 1 P 9/10
 A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 1 1

(72)発明者 キャリー, スティーブン ピー. エル.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 2, サン マテオ, ハッドン ドライブ 1 0 1
 0

(72)発明者 ブーン, エリザベス エム.
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 1 7 9 0, ストーニー ブルック, ノース ロード 4

(72)発明者 ウィンガー, ジョナサン エー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 6 1 1, オークランド, ホイットモア プレイス 2
 , ナンバー 1

(72)発明者 マーレッタ, マイケル エー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 7 0 5, バークレー, グラバット ドライブ 2 6 0

審査官 松浦 安紀子

(56)参考文献 Trends Biochem. Sci. , 2 0 0 6 年 4 月, Vol.31, No.4, pp.231-239
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1 9 9 9 年, Vol.96, No.26, pp.14753-14758
 Biochemistry, 1 9 9 7 年, Vol.36, No.22, pp.6814-6818
 Nat. Chem. Biol. , 2 0 0 5 年, Vol.1, No.1, pp.53-59
 J. Inorg. Biochem., 2 0 0 5 年, Vol.99, No.4, pp.892-902
 Curr. Opin. Chem. Biol., 2 0 0 5 年, Vol.9, No.5, pp.441-446

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 3 8 / 0 0
 A 6 1 K 4 7 / 4 8
 A 6 1 P 9 / 0 0
 A 6 1 P 9 / 0 4
 A 6 1 P 9 / 1 0
 A 6 1 P 9 / 1 2
 A 6 1 P 1 3 / 1 2
 A 6 1 P 4 3 / 0 0
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)