

Absorption and Circular Dichroic Spectra of HbM Iwate, HbM Boston, HbM Hyde Park, HbM Saskatoon and HbM Milwaukee

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7996

HbM Iwate, HbM Boston, HbM Hyde Park, HbM Saskatoon, HbM Milwaukee の吸収および 円偏光二色性スペクトル

金沢大学医学部生化学第一講座 (主任: 米山良昌教授)

高 間 静 子

(昭和62年12月1日受付)

ヘモグロビンは α 鎖と β 鎖の2種類のサブユニットが結合した四量体 ($\alpha_2\beta_2$) で、組織に酸素を運搬する重要な役割を果たしている。酸素が直接結合する各鎖 (サブユニット) のヘム鉄には、ヘム面を上下にはさむように近位ヒスチジンと遠位ヒスチジンが配置している。これらの α 鎖と β 鎖のどちらかの近位、または遠位ヒスチジン (His) のいずれかがチロジン (Tyr) に置換したヘモグロビンは、ヘモグロビン M (HbM) と呼ばれ、ヘム鉄は三価に安定化している。HbM では異常鎖に酸素が結合できない上に、正常鎖の酸素結合能にも影響を及ぼしていることが知られている。本研究では、これらの HbM のアミノ酸置換がヘモグロビン分子の構造に、どのように影響を与えているかを知る目的で、全メト型ヘモグロビンで吸収スペクトルと円偏光二色性 (CD) を測定し、正常ヘモグロビン (HbA) のそれらと比較検討した。可視領域 (500~650 nm) の吸収スペクトルでは、Tyr 置換型 HbM の吸収極大は、それぞれ HbM Iwate では 480 と 590 nm に、HbM Boston は 490 と 600 nm に、HbM Hyde Park は 485 と 575 nm に、HbM Saskatoon は 490 と 600 nm にみられ、HbA の吸収極大 (500 と 630 nm) よりも、blue shift していた。もう一つの異常 HbM, HbM Milwaukee は β 鎖の E11 のバリン (Val) がグルタミン酸 (Glu) に置換した Hb で、異常鎖はまた三価状態に安定化している。HbM Milwaukee の吸収スペクトルを HbA のそれと比較すると、HbA の 630 nm の吸収極大は HbM Milwaukee では 622 nm に blue shift していた他は、吸収スペクトルの性質は HbA とよく似ていた。近紫外領域 (250~350 nm) では、5 種類の HbM は HbA と同じ 275 nm に吸収極大がみられたが、Tyr 置換型の 4 種類の HbM は HbA よりも約 20% 高かった。一方、タンパク側の構造がよく反映されると考えられている CD スペクトルでは、HbM の間で2つの大きな相違がみられた。第一の違いは α 鎖異常 HbM と β 鎖異常 HbM の間の相違で近紫外領域にみられ、第二の相違は近位 His 置換 HbM と遠位 His 置換 HbM の間の相違で可視領域の CD にみられた。 α 鎖異常 HbM の CD スペクトルでは、近紫外領域の 280 nm 付近に大きな負の CD がみられた。それに対し、 β 鎖異常の HbM の近紫外領域の CD スペクトルは HbA と非常に似ていた。一方、可視領域の CD スペクトルでは、近位 His 置換の HbM Iwate と HbM Hyde Park は HbA と同様正の CD 帯のみを示したが、その 520 と 580 nm の CD 極大は HbA の約 2 倍以上大きかった。それに対し遠位 His 置換の HbM Boston と HbM Saskatoon では、650 nm 付近に他の近位 His 置換 HbM や HbA ではみられない負の CD 帯を示した。しかし、HbM Milwaukee では、250~650 nm の波長域にわたって CD スペクトルは正常ヘモグロビンと大きな差はなかった。以上の結果から、吸収では HbA と HbM は大きく異なるが、HbM 間では差がみられなかった。しかし、個々の HbM は特徴的な CD スペクトルを示し、これらの事実から HbM のそれぞれは異なったタンパク構造であることが分かった。これらの相違が HbM 間の機能異常やヘモグロビン分子の安定性などの相違に結びつくものと考えられる。

Key words Hb M, Hb A, absorption spectra, circular dichroism

Abbreviations: CD, circular dichroism; Hb, hemoglobin; MetHb, methemoglobin; His, histidine; Tyr, tyrosine.

遺伝性黒血症に関しては、Hörlein らの報告が最初である¹⁾。この疾病は常染色体性優性遺伝形式で伝わり、ヘモグロビンのヘム周辺のアミノ酸が1個他のアミノ酸に置換した点突然変異である。異常鎖は常に酸化型に安定化されており、Singer によって HbM と命名された²⁾。この HbM は現在までのところ、変異部位の相違により、 α 鎖異常に HbM Iwate ($\alpha 87\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$)³⁾、HbM Boston ($\alpha 58\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$)⁴⁾ の2種類、 β 鎖異常に HbM Hyde Park ($\beta 92\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$)⁵⁾、HbM Saskatoon ($\beta 63\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$)⁶⁾、HbM Milwaukee ($\beta 67\text{Val} \rightarrow \text{Glu}$)⁷⁾ の3種類の合計5種類がみつかっている。わが国では、19世紀の初め頃よりこの遺伝病は「口黒」「血黒」と呼ばれ、岩手県でその存在が知られている。田村らはこの疾病を持つ家族の家系調査を行い、1家系5世代で35人が発症していたという報告をしている⁸⁾。

これらの HbM の変異部位は (図1)、ヘム鉄とグロビンとの直接かかわりあうところにある。近位ヒスチジンと呼ばれている F ヘリックス 8 番目のヒスチジンは、ヘム鉄と結合しており、また遠位ヒスチジンと呼ばれている E ヘリックス 7 番目のヒスチジンは、酸素がヘム鉄に可逆的に結合するのを容易にし、ヘム鉄を酸化させないように保護している⁷⁾。HbM では、 α

鎖か β 鎖のどちらかのこの近位または遠位ヒスチジンのいずれかがチロジンに置換している。その異常鎖のヘム鉄は三価に安定化され、酸化型 Hb (メト Hb) となり酸素と結合できなくなっている。正常 Hb では Hb が酸化されても、赤血球内の酵素系によってすぐ還元されて機能回復するが、HbM ではヘムは酸化したまま常にメト Hb にとどまっている。したがって、Hb 分子の半分はメト型となりそれが褐色色調を示し⁹⁾、正常鎖の赤色色調と混って特有の色調 (チョコレート色) となり、そのために M 症の患者は紫藍症を呈する。しかし、これらの5種類の HbM 症は、紫藍症の程度、溶血性貧血の有無、ハインツ小体の有無などがそれぞれの間で異なり臨床症状は様々ではない⁹⁾。HbM Iwate, HbM Boston, HbM Milwaukee では、明瞭なチアノーゼが認められるが溶血性貧血はない。一方、HbM Hyde Park, HbM Saskatoon ではチアノーゼは不明瞭だが溶血性貧血が認められ、HbM Saskatoon では赤血球内にハインツ小体が認められている¹⁰⁾。HbM を機能面からみると、 α 鎖異常の HbM Iwate, HbM Boston の正常鎖は、酸素親和性が低く協同性 ($n=1.1 \sim 1.2$) をほとんど示さず Bohr 効果もみられない¹¹⁾¹²⁾。しかし、 β 鎖異常の HbM Milwaukee の正常鎖の酸素親和性は、正常ヘモグロビンよりもやや低い¹³⁾¹⁴⁾、HbM Hyde Park, HbM Saskatoon ではほとんど正常に近く、協同性 ($n=1.2 \sim 1.6$) は弱いながら存在し、Bohr 効果も認められる^{15)~18)}。したがって、ヘモグロビンの重要な機能である酸素結合やヘモグロビタンパクの安定性に、近位・遠位ヒスチジンが共に非常に重要な役割を果していることが推察される。

本論文では、5種類の HbM について、それぞれのアミノ酸置換がヘモグロビン分子の構造に、どのような影響を与えているかを知る目的で、広い波長域 (250~650 nm) での吸収スペクトル、円偏光二色性スペクトルを詳しく調べ検討を加えた結果、興味ある知見を得たので報告する。

材料および方法

I. 赤血球の保存とヘモグロビンの調整

1. 患者赤血球の収集と保存

HbM 症の患者血液は、それぞれ HbM Iwate は岩手県の坂井博毅博士、HbM Boston はスウェーデンの Sahlgren's Hospital の臨床検査部門の R. Jagenburg 博士、HbM Hyde Park は秋田県の刈田宏作博士、HbM Milwaukee は米国ウィスコンシン医科大学血液腫瘍部門の A. Pisciotto 博士、HbM Saskatoon は富山県中央病院小児科の押田喜博博士からわけてもら

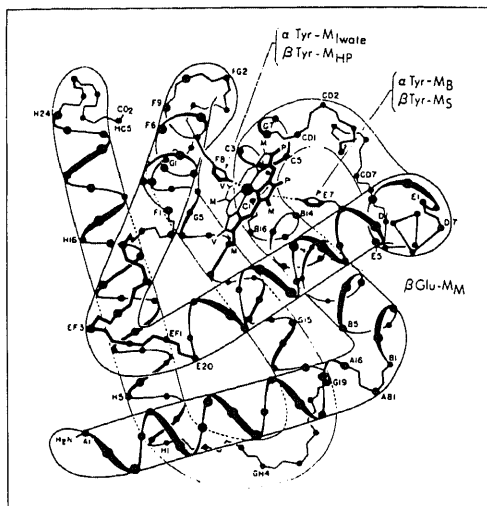


Fig. 1. Three-dimensional model of a hemoglobin subunit modified from that of Dickerson showing substituted sites in HbM.

MHP, HbM Hyde Park; HbMB, HbM Boston; HbMS, HbM Saskatoon; HbMM, HbM Milwaukee; Tyr, tyrosine; Glu, glutamic acid. A-H, α -helix from aminoterminal to carboxy terminal.

い、採血1週間以内に氷冷状態で入手した。血漿を遠心分離して除いたあと、赤血球を生理食塩水で3回洗浄した。この赤血球を2倍量の保存用グリセリン緩衝液(クエン酸三カリウム9.4g, リン酸二水素ナトリウム2.8g, リン酸水素二ナトリウム3.1g, グリセリン400mlに水を加えて1リットルに調整したもの)に懸濁し、2mlづつ小バイアル瓶に分注し -80°C のフリーザー(Revco, 米国)中に保存した。

2. 異常ヘモグロビンの調整

1) HbM Iwate, HbM Boston, HbM Saskatoon, HbM Milwaukee の分離・精製

-80°C に凍結保存しておいた患者赤血球を室温で融解後、0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で一晩透析したのち遠心(9000 rpm, 10 min)して溶血液を得た。HbM 症の患者はすべてヘテロ接合体であるので、溶血液には正常ヘモグロビンのHbAと異常ヘモグロビンのHbMの両方が含まれており、HbAとHbMの分離が必要である。HbMの分離には、イオン交換樹脂のAmberlite CG-50を主として用いた¹⁹⁾²⁰⁾。HbM Iwate, HbM Boston, HbM MilwaukeeはHbAとの分離が容易であるので、 2×10 cmの短かいカラムを、HbM SaskatoonはHbAとの分離がやや困難であるため、 2×40 cmの長いカラムを用いた。Amberlite CG-50のカラムは、各々、約20リットルの0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で、約1週間かけて十分に平衡化した。低温(4°C)下でそのカラムに同じ緩衝液で平衡化した患者溶血液を吸着させ、同じ緩衝液でゆっくり(20 ml/hr)展開させた。HbAは0.05 M リン酸緩衝液

(pH 7.0)では樹脂に吸着しないため、そのまま溶出するので、溶出液に着色(ピンク色)がなくなるまで緩衝液を流した。HbMの分画はカラムの樹脂の上部に茶褐色の層として残り、イオン強度を上げると溶出してくるので、0.2 M リン酸緩衝液(pH 7.0)に切りかえて溶出し、フラクションコレクターで分取した。図2にHbM Milwaukeeの典型的な溶出パターンを示した。

2) HbM Hyde Park の分離・精製

HbM Hyde Parkは、イオン交換樹脂のAmberlite CG-50では分離できないので、調製用等電点電気泳動法を用いてHbAと分離した。また、オキシ型では、HbAとHbMは分離が困難であるので、完全酸化型のメトヘモグロビンの状態で泳動した。まず、HbM Hyde Parkの溶血液にヘムの5倍量の赤血カリ $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を加え、室温で30分間放置しメト化した。余分の赤血カリはSephadex G-25カラムに通して除去した。カラムに通すことによって希釈されたこのメトヘモグロビン溶液を、タンパク濃縮装置(Amicon, 米国)を使用して、全量が3ml以下になるように濃縮した。調製用泳動槽はNagaiらの方法に従い、Sephadex G-75(super fine)を用いて作製した²⁰⁾。使用したアンフォライン液(LKB社, スウェーデン)のpH範囲はpH 6.0~8.0であるため、予め、pH 6.0~8.0を前泳動して、pH 7.0~8.0の部分のゲルを採取し、全長(24 cm)に対してpH 7.0~8.0の勾配で分離を行った。泳動24時間後十分にpH勾配できたところで、ヘモグロビンの分離像を肉眼で識別すると、陰極側の最端にHbAの茶色の帯が、また、それより少し陽極側に緑茶褐色の帯が観察された(図3)。後者の帯の部分のゲルをスパーテルで採取し、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で溶出しゲルを除去しHbM Hyde Park溶液を得た。ゲルより溶出したHbM溶液は透析膜(Visking社)に入れ、0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.0)中で48時間透析し、アンフォラインを除いて実験に供した。

3) ヘモグロビンの純度の検定

精製した5種類のHbMのそれぞれに、正常ヘモグロビンやminor componentヘモグロビンの混在がないかを確かめる純度検定は、HbM IwateとHbM Bostonはオキシ型で、 β 鎖異常のHbMはオキシ型ではHbMとHbAの分離が困難であるため、フェリシヤナイドを加えて全メト型にして行った。純度検定はPAG plate(pH 3.5~9.5, LKB社, スウェーデン)を用いて等電点電気泳動で行った。その結果、精製した5種類のHbMの泳動像はすべて、HbMのみの単一の泳動バンドを示した。図4は、HbMを含む患者溶

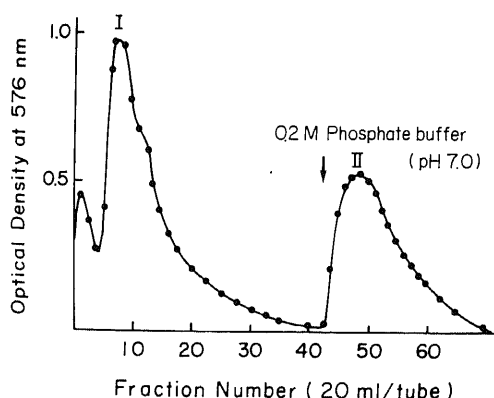


Fig. 2. The elution profile of HbM Milwaukee and HbA in an Amberlite CG-50 column chromatography.

Column was equilibrated with 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0.

I, HbA fraction; II, HbM Milwaukee fraction. Details are given in the text.

血液のオキシ型およびメト型の等電点電気泳動像を示した。

3. 正常ヘモグロビンの調整

対照として用いた正常ヒト血液は、5～10人分を混合して用いた。血液に生理食塩水を加えて遠心分離して、上澄を除去することを3回繰り返して血漿を取り除いた後、血球に冷やした蒸留水を3倍量加え、低温室に30分間放置すると完全に赤血球は溶血する。その溶血液に終濃度が0.1Mになるようにして1MのNaClを加えて混和し、遠心(10000 rpm, 15 min)す

ると、ゴースト(赤血球膜)は沈殿する。上澄を採取して正常ヘモグロビン(HbA)として用いた。

4. ヘモグロビンの酸化と還元

完全酸化型ヘモグロビン(メトHb)は、精製したヘモグロビン溶液に、ヘム当たり2倍量の赤血カリを加え、25°Cで15分間放置すると得られる。加えた余分の赤血カリおよび反応産物(黄血カリ)は、Dowex 1X8のミニカラムに通して取り除き、Sephadex G-25カラムにて0.05Mリン酸緩衝液に平衡化した。異常鎖をも還元した完全還元型ヘモグロビン(デオキシ型Hb)は、粉末のハイドロサルファイト($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 和光純薬工業)をヘモグロビン溶液に直接加えて得た。HbMの中で β 鎖異常のHbM Saskatoon, HbM

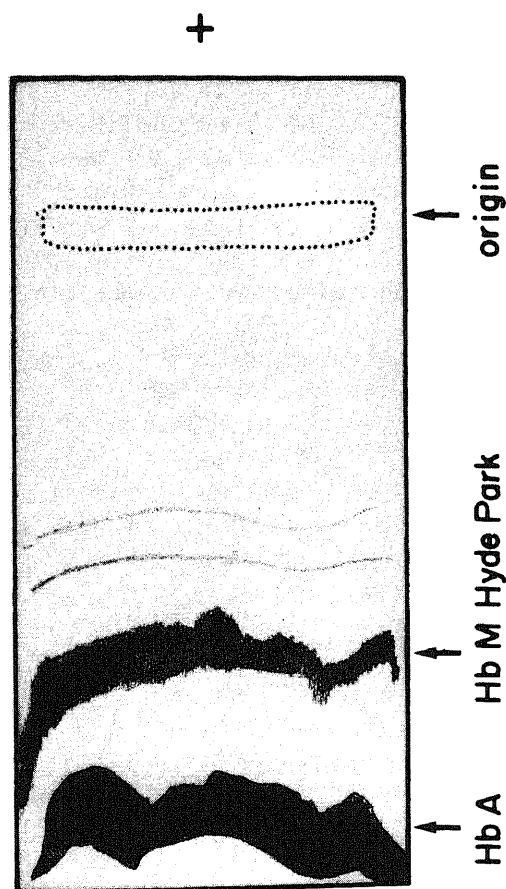


Fig. 3. Preparative isoelectrofocusing pattern of HbM Hyde Park.

Preparative electrofocusing on Sephadex G-75 gel bed (pH range, 7-8) was used for purification. The hemolysate of the HbM Hyde Park specimen was treated with potassium ferricyanide before isoelectric focusing. Pattern shows separation of a brown MetHb A band and a greenish brown MetHb M Hyde Park band.

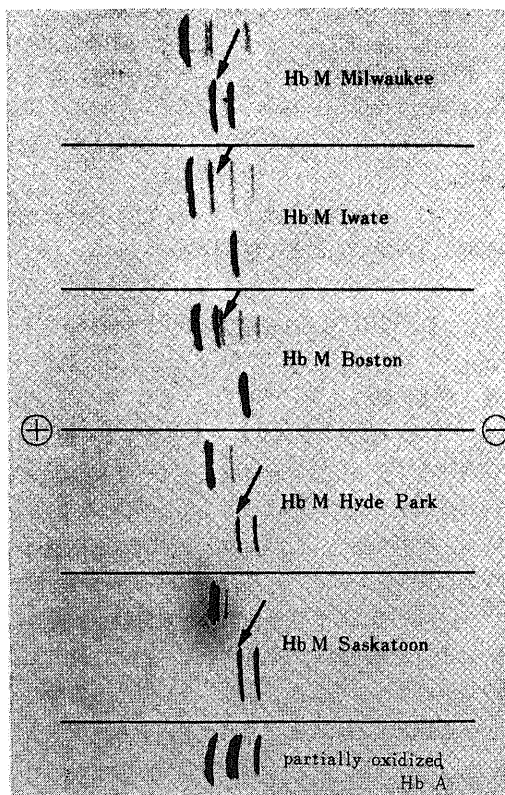


Fig. 4. Isoelectric focusing pattern of five species of HbM.

Half of hemolysate from patient's blood were directly applied as partially oxygenated form (upper band in each lane), and remaining half were oxidized by the addition of ferricyanide solution and applied as fully oxidized form (lower band in each lane). Arrows show the band of each HbM. PAG Plate of pH range from 3.5~9.5 (LKB) were used.

Hyde Park, HbM Milwaukee の異常鎖は、ハイドロサルファイトを 1 mg/ml を加えたのち、約 30 分後には異常鎖も完全に還元されるが、 α 鎖異常の HbM Iwate や HbM Boston の異常鎖は非常に還元しにくいので、3 倍量のハイドロサルファイト (3 mg/ml) を加え、25°C で 24 時間 N_2 気流中に放置すると還元される。また、異常鎖はハイドロサルファイトを除くと、再び酸化されてしまうため、デオキシ型 HbM のスペクトルはハイドロサルファイト存在下で測定した。

5. ヘモグロビンの濃度測定

ヘモグロビンの濃度 (ヘム濃度) は、ヘムをビリジンヘモクロームに変換して定量した。ヘモグロビン溶液 2 ml 当たり、0.8 ml のビリジンを加え、ついで 1 N の NaOH を 1.2 ml 加え、全量を 4 ml としたのち、ハイドロサルファイトを加えて還元型ビリジンヘモクロモゲンにして、可視部の吸収スペクトルより定量した。ビリジンヘモクロモゲンの 557 nm のミリモル分子吸光係数には $\epsilon_{\text{mM}} = 34.4$ を用いた²¹⁾。

II. 吸収スペクトル、および円偏光二色性スペクトルの測定

吸収スペクトルは Cary 17D Spectrophotometer (Model 17D, Varian 社, 米国) を用い、円偏光二色性 (CD) スペクトルは自記旋光分散計 (Jasco J-20, 日本分光) を用いて、25°C で測定した。ヘモグロビンの CD スペクトルのモル楕円率 (θ) は、 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 / \text{decimole}$ であらわした。CD の補正は、d-10-カンファースルホン酸の水溶液を用い、290 nm での $e_R - e_L$ の値を $2.2 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ として行なった²²⁾。ヘモグロビン濃度は、可視領域のスペクトル測定には $100 \mu\text{M}$ を、Soret 帯・近紫外領域のスペクトル測定には $50 \mu\text{M}$ を用いた。また、測定に用いたセルは、650~450 nm の波長領域では光路 1 cm の石英セルを、450~350 nm の波長領域では 0.2 cm の石英セルを、さらに 350~250 nm の波長領域では 0.5 cm の石英セルを使用した。

吸収スペクトル、および円偏光二色性スペクトル測定に使用した緩衝液は、近紫外領域の測定では 0.05 M リン酸緩衝液を用い、Soret 帯、可視領域の測定では 0.05 M bis-Tris, 0.1 M NaCl を用いた。pH は 6.0, 7.0, 8.5 の 3 種を用いた。吸収および CD スペクトルの大きさは、すべてヘム濃度あたりに換算した。

成 績

I. HbA と HbM の吸収スペクトルの相違

HbM の構造上の異常を吸収・CD スペクトルで調べるために、まず、HbM のどの状態で正常ヘモグロビンのそれと比較するのが最も適しているのかを検討した。まず、完全還元型 (還元剤を加えて正常鎖、異常

鎖共に、ヘム鉄を二価に保ったデオキシ型)、つぎに、部分酸化型 (正常鎖はオキシ型、異常鎖はメト型)、および完全酸化型 (正常鎖、異常鎖共にヘム鉄が酸化しているメト型) の 3 つの状態について比較した。

HbM としては HbM Iwate を用い、350~450 nm (Soret 帯)、および 450~650 nm (可視領域) の吸収スペクトルについて HbA と比較した (図 5)。完全還元型のデオキシ HbM Iwate とデオキシ HbA を比較すると、HbM の Soret 帯の吸収が 14% 程正常ヘモグロビンに比べ低い他は、HbM Iwate と HbA との間に大きな相違はみられなかった (図 5A)。また、部分酸化型の HbM Iwate と部分酸化型の HbA (α 鎖はメト型、 β 鎖はオキシ型) を比較すると、540 nm と 575 nm の吸収帯が HbA よりも HbM の方がやや大きいことと、HbM Iwate では 600 nm に大きな異常バンドを示すが全体の形は似ていた (図 5B)。次に完全メト型の HbM Iwate と完全メト型 (酸化型) の HbA とを比較した。図 5C に示すように、メト HbM Iwate の Soret 帯の吸収の位置は、メト HbA と同じ 405 nm にあるが、その吸光度はメト HbA よりも 20% 低かつ

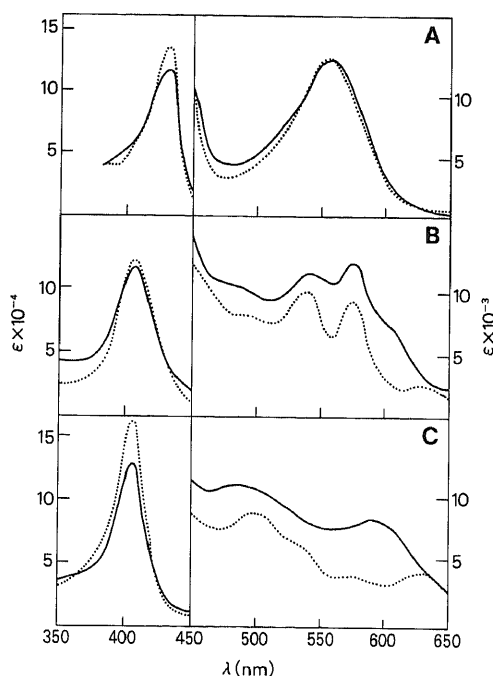


Fig. 5. Comparison of absorption spectra of HbA and those of HbM Iwate in three different states. A, completely reduced form (deoxy Hb). B, partial oxidized form (β chains is oxygenated and α chains oxidized). C, fully oxidized form (MetHb). HbA,; HbM Iwate, —.

た。また、可視部では HbA の吸収帯の位置は 500 nm と 630 nm にあるのに対し、メト HbM Iwate では、吸収極大はそれぞれ 480 nm, 590 nm に大きく blue shift していた。また、全体的にメト HbM Iwate の吸収の大きさは HbA よりも約 25~50% 程大きいという相違がみられた (図 5C)。以上の結果から、HbM と正常ヘモグロビンと比較するには、HbA との差が最も著しいメト型ヘモグロビンで比較するのが最も適切と考えられたので、以下の実験はすべて完全メト型ヘモグロビンについて実験を行った。

II. メト HbM の吸収スペクトル

1. 近紫外領域

ヘモグロビンの近紫外領域の吸収スペクトルには、タンパク側の吸収とヘムの吸収の両方が含まれていると言われている。図 6 にメト HbA と 5 種類のメト HbM の近紫外領域 (250~350 nm) の吸収スペクトルを示した。図 6 左は、 α 鎖異常の HbM Iwate と HbM Boston の吸収スペクトルを、図 6 右には β 鎖異常の HbM Hyde Park, HbM Saskatoon, および HbM Milwaukee のそれぞれの吸収スペクトルを示し、比較のためにメト HbA の吸収を示した。この領域での HbA の吸収帯は 275 nm にあり、その吸収極大の位置は HbM Iwate では 2 nm 程長波長側に shift しているが、他の 4 つの HbM は HbA と同じであった。しかし、Tyr 置換型 HbM の HbM Iwate, HbM Boston, HbM Hyde Park, HbM Saskatoon の 275 nm のヘム当たりのミリモル分子吸光係数は、それぞれ 34.1, 33.0, 35.7, 35.2 と、いずれも HbA の 28.3 よりも約 20% 高かった。一方、HbM Milwaukee の 275 nm のミリモル分子吸光係数は 28.6 で HbA とほぼ同じで

あった (表 1)。Tyr 置換型の 4 種類の HbM の 275 nm での吸収が HbA よりも高かった原因としては、Tyr が 1 個増えたことによるタンパク側の影響による増大か、またはヘム鉄の遠位側または近位側に配位

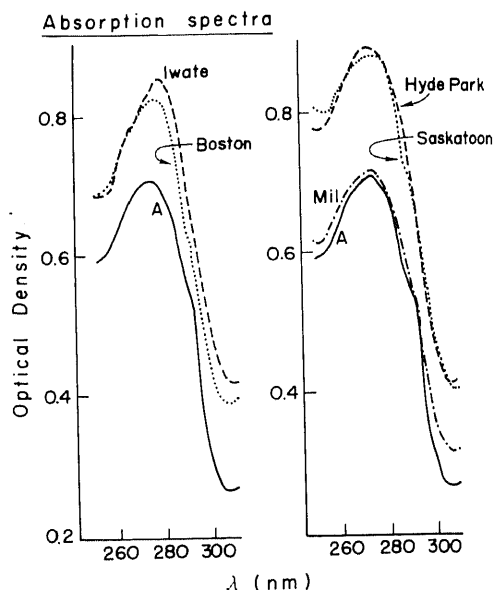


Fig. 6. Absorption spectra of five Hbs M in the ultraviolet region.

The spectrum was measured at the concentration of $50 \mu\text{M}$ hemoglobin (in heme basis) in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0 using a 5 mm light path quartz cell. Fully oxidized hemoglobins were used. Left, absorption spectra of α -abnormal HbM and HbA (for a control); right, those of β -abnormal Hbs M.

A, HbA; Mil, HbM Milwaukee.

Table 1. Absorption maxima and molecular extinction coefficients of methemoglobins M in the visible, Soret and ultraviolet regions

Hemoglobin	Visible		Soret		Ultraviolet	
	λ max	$\epsilon \times 10^{-3}$	λ max	$\epsilon \times 10^{-3}$	λ max	$\epsilon \times 10^{-3}$
MetHb M Iwate	480	11.1	405	131	277	34.1
	590	8.3				
MetHb M Boston	490	11.1	405	126	276	33.0
	600	6.9				
MetHb M Hyde Park	485	10.5	404.5	140	275	35.7
	575	7.0				
MetHb M Saskatoon	490	10.6	405	135	276	35.2
	600	7.3				
MetHb M Milwaukee	498	8.6	405	147	275	28.6
	622	5.2				
MetHb A	500	9.1	405	166	275	28.3
	630	4.0				

している His 残基が Tyr に置換したことでヘムの電子状態が変化したことによる吸収増大か、あるいはその両方が関係しているのか等が考えられる。そこで、この領域に吸収をもつ芳香族アミノ酸のフェニールアラニン (Phe)、チロジン (Tyr)、トリプトファン (Trp) の 3 種の各々の近紫外領域の吸収スペクトルを、ヘモグロビンの吸収を測定した同じ条件で測定し、それらのアミノ酸の 275 nm の吸収への寄与を検討した。その結果、これらの芳香族アミノ酸の 275 nm でのミリモル分子吸光係数は、Phe は 0.01, Tyr は 1.42, Trp では 5.15 であった。HbA の各サブユニットの芳香族アミノ酸の数は、 α 鎖では、Phe は 7 個、Tyr は 3 個、Trp は 1 個で、 β 鎖では、Phe は 8 個、Tyr は 3 個、Trp は 2 個である。ヘム当たり ($\frac{\alpha+\beta}{2}$) にすると、Phe は 7.5 個、Tyr は 3 個、Trp は 1.5 個となる。一方、Tyr 置換型 HbM Iwate, HbM Boston, HbM Hyde Park, HbM Saskatoon では、Phe と Trp の数は HbA と同数であるが、Tyr が 1 個増加したことにより、Tyr のヘム当たりの数は 3.5 個となり HbA よりも 0.5 個分多いことになる。この 0.5 個分の Tyr が増加したことによる吸収増大への寄与は、単純計算で求めると、ヘモグロビンの 275 nm の吸収を約 6% 上昇させることになる。しかし、この波長域での HbM の吸収帯は HbA よりも約 20% も高い。275 nm の HbM の吸収増大は芳香族アミノ酸である Tyr が 1 個増えたことからくる吸収増大のみとは考えられず、Tyr に置換したことにより、ヘムの電子状態が変化したこと

による影響が大きいのではないかと考えられる。一方、HbM Milwaukee ではこの近紫外領域の吸収スペクトルは HbA とほぼ同じであった。

2. Soret 帯

図 7 に HbM と HbA の Soret 帯の吸収スペクトルを示した。Soret 帯では、吸収帯の位置は、 α 鎖異常の HbM (図 7A) においても、 β 鎖異常の HbM (図 7B) においても HbA と変わらず 405 nm にあった。しかし、405 nm の吸収帯の大きさは HbA に比べ HbM ではいずれも低く、HbM Iwate, HbM Boston, HbM Hyde Park, HbM Saskatoon, HbM Milwaukee のそれぞれのミリモル分子吸光係数は 131, 126, 140, 135, 147 で、HbA の 166 よりも 10~20% 程低かった (表 1)。

3. 可視領域

可視領域における HbM と HbA の吸収スペクトルを図 8 に示した。HbA は 500 と 630 nm に吸収帯を示すのに対し、HbM Iwate では 480 と 590 nm に、HbM Boston では 490 と 600 nm に、HbM Hyde Park では 485 と 575 nm に、HbM Saskatoon では 490 と 600 nm にみられ、いずれも HbA の吸収極大の位置よりも大幅に blue shift していた。しかも、これらの HbM の吸収帯は HbA に比べて約 25%~50% 程増大していた。一方、HbM Milwaukee の吸収スペクトルは、HbA の 630 nm の吸収が 622 nm に blue shift している他は、HbA と吸収帯の位置や吸収強度においてもあまり異なっていなかった。

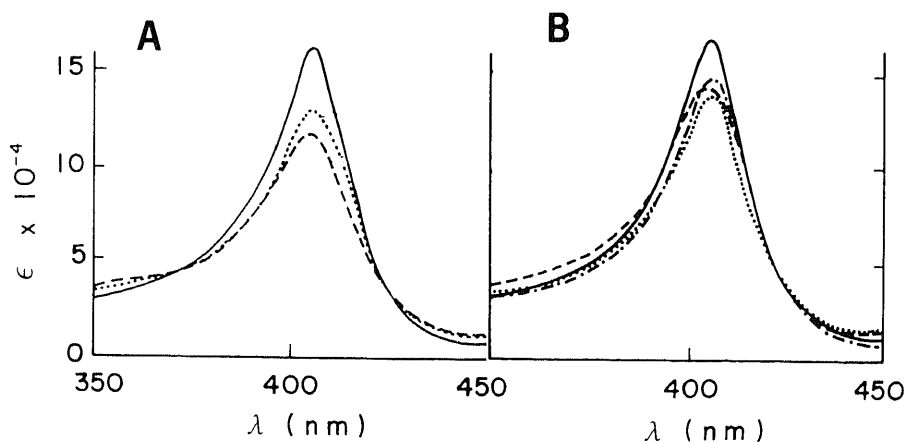


Fig. 7. Absorption spectra of Hbs M in the Soret region.

The spectrum was measured as methemoglobin M (50 μ M in heme) with a light path of 2 mm in 0.05 M bis-Tris buffer, pH 7.0 containing 0.1 M NaCl. The spectrum of MetHb A was superimposed in the figure as a control.

A, α -abnormal Hbs M: ---, HbM Iwate; ·····, HbM Boston; —, HbA.

B, β -abnormal Hbs M: ---, HbM Hyde Park; ·····, HbM Saskatoon; - - - , HbM Milwaukee; —, Hb A.

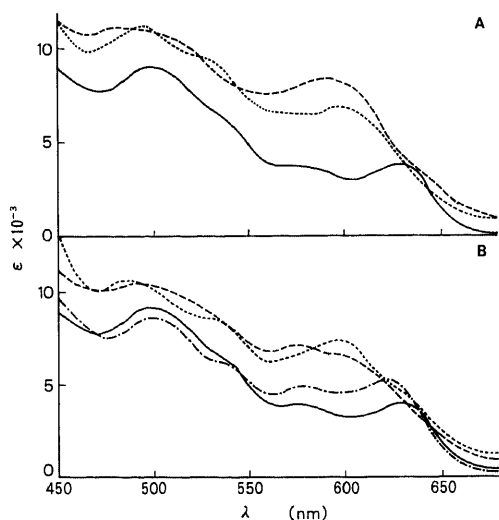


Fig. 8. Absorption spectra of Hbs M in the visible region.

The spectrum was measured as methemoglobin M (100 μ M in heme) with a light path of 10 mm. A, α -abnormal Hbs M: ---, HbM Iwate; ·····, HbM Boston; —, HbA (as a control).

B, β -abnormal Hbs M: ---, HbM Hyde Park; ·····, HbM Saskatoon; —, HbM Milwaukee —, HbA.

III. HbM の円偏光二色性 (CD) スペクトル

1. 近紫外領域

近紫外領域の HbA と HbM の CD スペクトルを図 9 に示した。この波長域の吸収スペクトルでは Tyr 置換型 HbM は互によく似ていたが、CD スペクトルは α 鎖異常の HbM と β 鎖異常の HbM との間に大きな違いがみられた。260 nm の正の CD 帯が HbM Saskatoon と HbM Milwaukee では、HbA に比べ 20% 程高いのと、HbM Saskatoon では、300 nm 付近の正の CD が HbA に比べて約 2 倍大きい点を除いては、 β 鎖異常の HbM では CD スペクトルの形、大きさ共に HbA とはあまり相違はなかった。HbM Hyde Park の CD スペクトルは HbA とほとんど差がなかった (図 9 下段)。それにひきかえ、 α 鎖異常の HbM (図 9 上段) の CD スペクトルでは、形、大きさ共に正常ヘモグロビンとも β 鎖異常の HbM と大きく違っていた。一番顕著な相違は、HbM Iwate や HbM Boston では、280~285 nm に正常ヘモグロビンではみられない負の CD がみられたことである。また、正常ヘモグロビンにみられる 260 nm 付近の CD 極大は、HbM Iwate では半分に減少している。もう一つの相違は、HbA にもみられる 300~320 nm 付近の幅広い正の CD は、HbM Iwate では約 2 倍、HbM Boston では約 3 倍と、HbA のそれよりも大きかつ

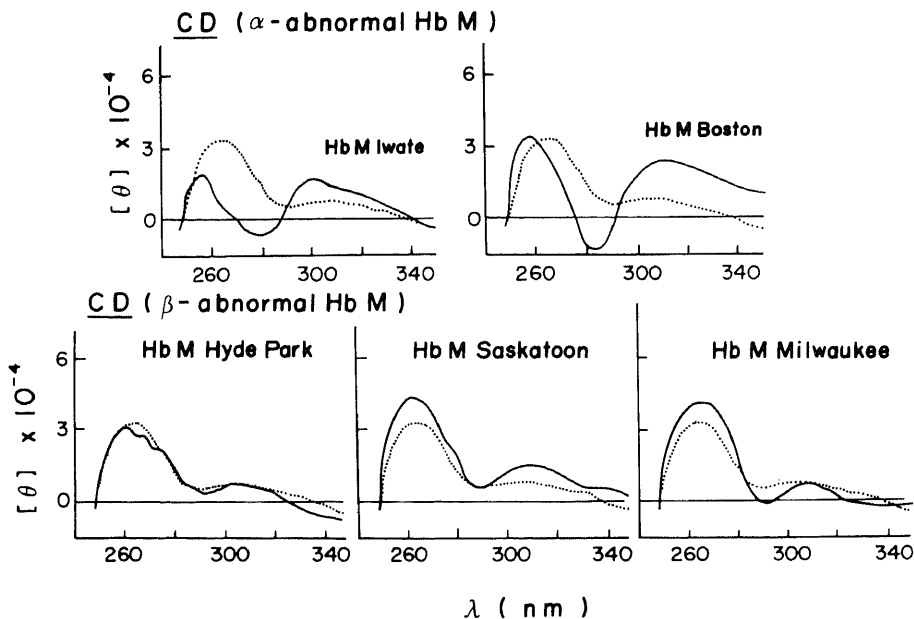


Fig. 9. CD spectra of Hbs M in the ultraviolet region.

Hemoglobin (50 μ M in heme) were used as a metderivative in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0. ·····, HbA; —, HbM.

た。

次に、特に変化のみられた HbM Iwate と、260 nm 付近の正の CD 帯がやや大きかった HbM Milwaukee について、pH の変化が CD スペクトルに

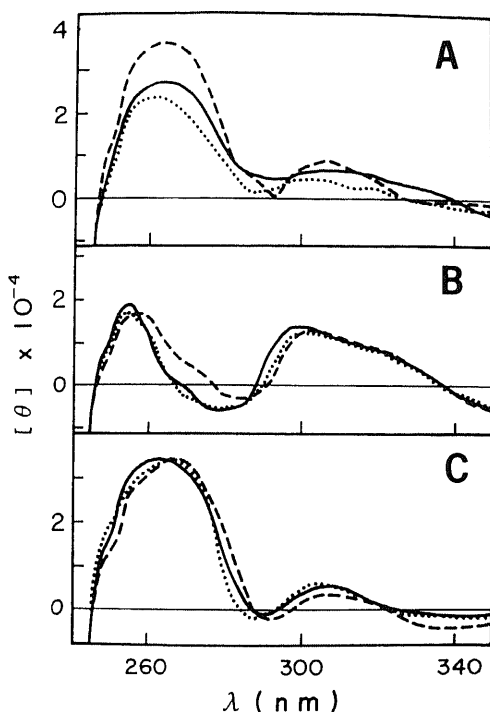


Fig. 10. CD spectra of HbA (A), HbM Iwate (B) and HbM Milwaukee (C) as a function of pH in the ultraviolet region. 0.05 M phosphate buffer were used. ---, pH 8.5; —, pH 7.0; ·····, pH 6.0.

どのように影響するかについて調べた (図 10)。ヘモグロビンの構造は pH により微妙な影響を受け四次構造が変化して酸素親和性が変わり、組織への酸素の受け渡しが起こることが知られており Bohr 効果と呼ばれている。これらの pH による構造変化は、260 nm 付近の CD 帯によく反映され、リガンド型 (即ち、四次構造が R 型) では大きな CD を与える。一方、還元型 (即ち四次構造が T 型) では、この 260 nm の CD 帯は約半分に減少し、新たに 285 nm に負の CD を示すことが知られている²⁹⁾。酸化型ヘモグロビンの四次構造は、一般にリガンド型と同じ R 型の範ちゅうに入れられているが、やはり pH による影響を受ける。図 10A に示すように、HbA では 3 つの異なった pH で CD の大きさが変化し、アルカリ側 (pH 8.5) では、260 nm の CD が大きく、酸性側 (pH 6.0) では小さかった。酸化型の HbM Iwate の 3 つの pH における CD スペクトルを見ると (図 10B)、アルカリ側 (pH 8.5) では、270 nm 付近で、わずかに正の CD 帯の上昇がみとめられるが、3 つの pH で CD スペクトルの形にほとんど変化がなかった。つぎに、HbM Milwaukee の pH 7.0 における正の CD 帯の大きさは、HbA の pH 8.5 の場合とほぼ等しく、この大きさは pH を下げても変化しなかった (図 10C)。

2. Soret 帯

図 11 に、5 種類の HbM と対照の HbA の Soret 帯の CD スペクトルを示した。正常ヘモグロビンは、Soret 帯では 413 nm に正の、395 nm に負の CD 極大を示す complex CD を示す。HbM ではいずれも負の CD 帯は顕著ではなく、HbA の正の CD 極大と同じ波

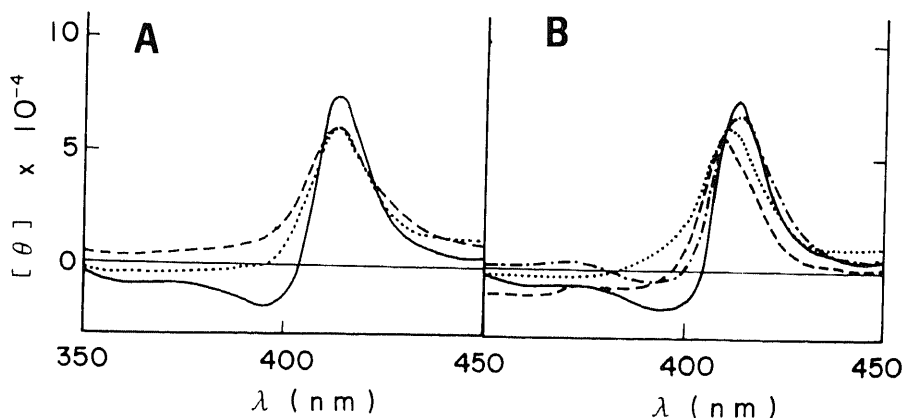


Fig. 11. CD spectra of HbM in the Soret region.

A, α -abnormal Hbs M: ---, HbM Iwate; ·····, HbM Boston; —, HbA.

B, β -abnormal Hbs M: ---, HbM Hyde Park; ·····, HbM Saskatoon; —, HbM Milwaukee; —, HbA. Other conditions are the same as in Fig. 7.

長域に正の CD 極大のみを示した。また、その正の CD 極大の大きさは、 α 鎖異常の HbM (図 11A) でも、 β 鎖異常の HbM (図 11B) においても、HbA に比べて 10~20% 減少していた。

3. 可視領域

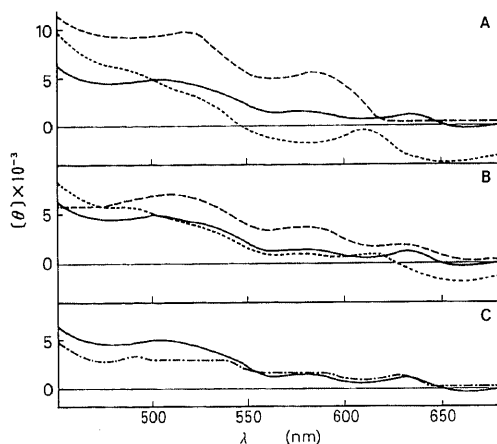


Fig. 12. CD spectra of Hbs M in the visible region. A, α -abnormal Hbs M: ---, HbM Iwate; ·····, HbM Boston; —, HbA. B, β -abnormal Hbs M: ---, HbM Hyde Park; ·····, HbM Saskatoon; —, HbA. C, β -abnormal HbM: ---, HbM Milwaukee; —, HbA. Other conditions are the same as in Fig. 8.

HbA と 5 種類の HbM の可視領域の CD スペクトルを図 12 に示した。Tyr 置換型 HbM の可視領域の吸収スペクトルは互いに似ていたのに対し、CD スペクトルでは非常に異なっていた。この波長域での CD スペクトルでは、 α 鎖と β 鎖異常 HbM との間の違いではなく、近位 His 置換と遠位 His 置換 HbM との間の相違がみられた。まず、 α 鎖異常の HbM の CD スペクトル (図 12A) をみると、近位 His 置換の HbM Iwate では、HbA の CD スペクトルと全体の形は似ているが、520 nm, 585 nm の正の CD 極大は、HbA の 2 倍またはそれ以上に大きかった。HbA の 500 nm のミリモル楕円率は 4.9 で、580 nm では 1.4 であるのに対して、HbM Iwate では、それぞれ、9.8 と 5.6 の値を示した (表 2)。一方、遠位 His 置換の HbM Boston では、500 nm 付近は正の CD を示すが、580 nm 付近では負の CD を示した。また、非常に特徴的なことは、HbM Boston では、HbA にも HbM Iwate にもみられない 650 nm 付近に大きな負の CD 帯を示したことである。

次に β 鎖異常の Tyr 置換型 HbM の CD スペクトル (図 12B) をみると、スペクトルの全体の形は α 鎖異常の HbM と大差はないが、HbM Hyde Park, HbM Saskatoon のそれぞれの CD 極大は、 α 鎖異常の HbM に比べてやや小さい。しかし、 α 鎖異常の HbM でみられた近位 His と遠位 His 置換の HbM の間の CD の著しい相違は、 β 鎖異常の近位 His と遠位

Table 2. Molar ellipticities of methemoglobins M in the visible, Soret and ultraviolet regions

Hemoglobin	Visible		Soret		Ultraviolet	
	θ max	$(\theta) \times 10^{-3}$	θ max	$(\theta) \times 10^{-3}$	θ max	$(\theta) \times 10^{-3}$
MetHb M Iwate	520	9.8	413	62.9	257	18.0
	585	5.6			278	-6.0
					300	16.0
MetHb M Boston	500	4.9	413	67.2	257	32.5
	580	-1.7			283	-13.0
	650	-3.8			310	22.5
MetHb M Hyde Park	520	7.1	411	58.6	260	31.0
	585	3.6			305	6.5
	635	1.8				
MetHb M Saskatoon	500	5.0	412	62.1	262	41.5
	580	0.9			310	14.0
	650	-1.7				
MetHb M Milwaukee	500	3.1	414	68.9	266	40.0
	580	1.5	395	-5.0	308	7.5
MetHb A	500	4.9	413	75.3	263	32.0
	580	1.4	395	-19.0	310	7.0

His 置換の HbM においても同様にみとめられた。即ち、 β 鎖の近位 His 置換の HbM Hyde Park では正の CD 帯のみで、520 と 585 nm 付近に CD 極大を示し、いずれも HbA に比べて、おおよそ 2 倍近く大きかった。一方、遠位 His 置換の HbM Saskatoon では、580 nm 付近では負の CD 帯ははっきりしないが、650 nm では HbM Boston 同様、顕著な負の CD 帯がみられた。しかし、HbM Milwaukee は 500 nm 付近の正の CD 帯が HbA と比べてやや低い以外は、正常ヘモグロビンの CD スペクトルと変わらなかった (図 12C)。

IV. 可視領域の吸収・CD スペクトルの pH 変化

HbA における 3 価のヘム鉄原子は、常に 6 配位型である。水分子が酸性 pH では第 6 配位座側にありスペクトルは典型的な high spin 型となる。pH 上昇に伴いメト HbA では第 6 配位子の水分子が OH 基に置きかわり、スペクトルは low spin 型となる。図 13 に HbA と HbM Iwate の 3 種の pH (6.0, 7.0, 8.5) における吸収と CD スペクトルを示した。図 13A に示したように、HbA では pH 6.0 と pH 7.0 で 500 nm と 630 nm に charge transfer band がみられる典型的な high spin 型の吸収スペクトルを示すが、pH を 8.5 に上げると 500 と 630 nm の吸収帯は減少し、その代わりに、540 と 575 nm に吸収帯を有する low spin 型に変化した。この吸収の変化に伴って CD スペクトルにも pH による変化がみられた (図 13C)。

一方、HbM Iwate では、490 nm と 600 nm にみられる吸収帯は、pH 6.0 と pH 7.0 の場合ではほとんど

変化はなく、pH 8.5 でも 550 nm 付近にわずかな吸収増大がみられるのみである。HbA の pH 変化に比較すると、その変化の大きさは約半分であるので、この変化は HbM Iwate の正常 β 鎖だけの pH 変化によるものと考えられる。また、HbA にみられる 500 と 630 nm の吸収帯は、HbM Iwate では 490 と 600 nm へと約 10~30 nm blue shift しているが、やはり、鉄とポルフィリン間の charge transfer band と考えられる。また、HbM Iwate では pH を 8.5 に変えてもスペクトルが変わらないところからみて、高い pH であっても high spin 型を維持しているものと思われる (図 13B)。HbM Iwate の CD スペクトル (図 13D) でも、この 3 つの pH ではほとんど変化がみられなかった。

考 察

ヘモグロビンの機能は酸素に対する親和性、協同作用 (ヘム間相互作用)、および Bohr 効果の 3 つの面から検討することができる。HbM の酸素結合能を測定する場合、異常鎖には酸素が結合できないので正常鎖の機能を測定することになる。したがって、協同作用は当然低いことが予想され、 α 鎖異常の HbM では、Hill の n 値は 1.1~1.2 の範囲であることが報告されている⁹⁾。酸素親和性は α 鎖異常 HbM で非常に低く、 β 鎖異常 HbM では正常と同じか、やや高い結果が得られており、 α, β 鎖のいずれの変異かによって正常鎖に与える影響も大きく違っている。Bohr 効果は pH の変化による酸素親和性の変化であるが、通常酸性側 pH (組織) では親和性が低く、弱アルカリ性側 (肺)

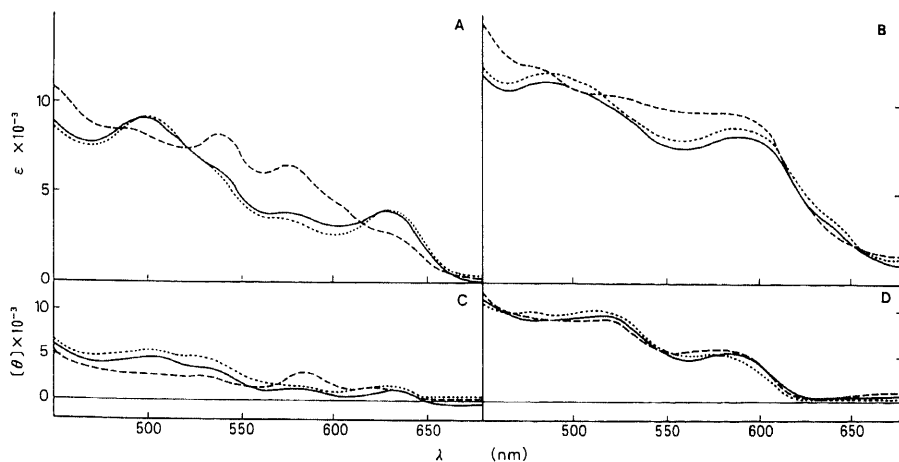


Fig. 13. Changes of absorption and CD spectra of HbA, and HbM Iwate as a function of pH.

A, absorption spectra of HbA; B, absorption spectra of HbM Iwate; C, CD spectra of HbA; D, CD spectra of HbM Iwate. ---, pH 8.5; —, pH 7.0; ·····, pH 6.0. 0.05 M bis-Tris buffer was used.

では親和性が高く生理的な合目性がある。 β 鎖異常 HbM はほぼ正常に近い Bohr 効果を示すのに対し、 α 鎖異常 HbM ではほとんど Bohr 効果を示さない^{15)~18)}。このような HbM 間にみられる機能面の相違は何に由来するのであろうか。

ヘモグロビンの赤い色調はヘムに由来している。ヘモグロビンの吸収スペクトルは吸収される電磁波のエネルギーが小さい順に、赤外、可視、紫外などに分類される。ヘモグロビンの吸収スペクトルは、主としてポルフィリンの2つの π - π^* 遷移に基づく、いわゆるB帯(Soret帯)および α - β バンドとして示されるQ帯(可視領域)からなる²⁴⁾。ヘモグロビンでは、このポルフィリンの π 電子の π - π^* 遷移のみならず、鉄・軸配位子とポルフィリンの電子が相互に関与した電荷移動遷移が加わってくる。ヘモグロビンのデオキシ型に酸素が結合してオキシ型になると、Soret帯もQ帯も大きく変化する。メト型ではpHによって吸収スペクトルは大きく変化する。

HbMはヘム鉄に直接あるいは間接に配位している軸配位子のHisがTyrに置換したもの、およびその近傍のアミノ酸変異によるものなので、当然吸収スペクトルにも大きな影響があることが予測される。図6~8に示したように、近紫外領域、Soret帯、可視領域に至るまで、Tyr置換型の4種類(HbM Iwate, HbM Boston, HbM Hyde Park, HbM Saskatoon)のHbMでは、正常ヘモグロビンと比べて、吸収スペクトルに大きな変化がみられた。一方、遠位His近傍のアミノ酸変異によるHbM Milwaukeeでは、他の4つのHbMに比べると吸収スペクトルの変化は小さく、HbAと大きな差はなかった。したがって、遠位His近傍のアミノ酸変異は、His自身の変異よりもヘモグロビンの構造への影響はずっと小さいものと考えられる。Tyr置換型のHbMの吸収スペクトル変化の特に著しかったのは、近紫外の280 nm付近と可視領域であった。近紫外領域の変化では変異アミノ酸が芳香族アミノ酸であるTyrであるので、そのアミノ酸自身の寄与による吸収の変化かとも考えたが、アミノ酸の吸収への寄与は単純計算で6%の増加にすぎず、したがって、20%もの大きな吸収増大はヘムの変化に起因しているものと推察される。可視領域での特徴は正常ヘモグロビンの吸収極大の位置がHbMでは大きくblue shiftしていることと、その吸収極大は約25~50%も増大していることの2点であった。この吸収の変化が、HbM特有のチョコレート色につながり紫藍症の原因となっているものと考えられる。この吸収スペクトルの変化は軸配位子のHisがTyrに変異したことで、ポルフィリン環の π - π^* 遷移と鉄とポル

フィリン間の、あるいは鉄と軸配位子間の電荷移動遷移に変化を与えたことに起因しているものと考えられる。

タンパクの立体構造を知る手段としては、X線結晶解析法があるが、タンパク質を溶液のまま立体構造を知る手段としては、CDが最も有用である²⁵⁾。タンパク質(グロビン)から切り離したヘム自身は光学的に不活性で、吸収スペクトルはみられるがCDはみられない。しかし、ヘムがタンパク質(グロビン)と結合すると光学活性を示し、広い波長域でヘモグロビンのCDスペクトルが観察される。ヘモグロビンのCDスペクトルから、近紫外領域では芳香族アミノ酸の環境と、ヘムとグロビンの相互作用の状態を、また300 nm以上の領域では、ヘムとグロビンの相互作用の状態を把握することができる。したがって、Tyr置換型HbMではHbAと比べてCDスペクトルに特に大きな変化が期待される。正常ヘモグロビンの近紫外のCDスペクトルでは、260 nmを中心に大きな正のCD帯がみられ、この波長域は芳香族アミノ酸のCDバンドも関与するところであるが、ヘモグロビンのCDの大部分はヘムによるものでアミノ酸側鎖に由来する部分は非常に小さいと考えられている。また、近紫外領域およびSoret帯のCDには、ヘモグロビンの四次構造がよく反映すると報告されている²⁶⁾²⁷⁾。さらに、ヘモグロビンの近紫外のCDスペクトルを最初に報告したBeychokら²³⁾によれば、260 nmの正のCDは α 鎖で非常に大きく β 鎖の約2倍であること、 α と β を会合させた四量体の正常ヘモグロビン($\alpha_2\beta_2$)ではそれぞれのサブユニットのCDの和になること、リガンド型ヘモグロビンの方がデオキシ型より2倍以上大きいという。一方、可視領域のCDスペクトルでは、特にメト型ヘモグロビンでhigh spin型、low spin型で異なったCDスペクトルを与えることが報告されている²⁸⁾。いずれのCD帯においても、ヘムの吸収帯を通して結合タンパク質の動態をみているという点から考えると、軸配位子にアミノ酸置換が起こったHbMにおいて、CDスペクトルはそのアミノ酸置換の影響をみるのに非常に有効な手段と考えられる。

本論文に示したように、HbMのCDスペクトルにおいても吸収スペクトルと同じく、特に大きな変化がみられたのはTyr置換型の4種類のHbMであった。これらのHbMでは、近紫外領域と可視領域で特に大きなCDスペクトルの変化がみられた。まず、近紫外では、 α 鎖異常HbMと β 鎖異常HbMとの間にはっきりとしたCDスペクトルの相違が観察された。 α 鎖異常のHbM Iwateでは、260 nmの正のCDバンドは正常の1/2程に小さくなり、その代わりに285 nmに正

常 Hb ではみられなかった大きな負の CD バンドがあらわれた。また、310 nm の正の CD バンドは、正常 Hb に比べて約 2 倍位大きくなっていた。HbM Boston においても基本的には HbM Iwate と同様な変化がみられた。Beychok ら²³⁾の報告では、サブユニットの α 鎖と β 鎖とを会合させた四量体のデオキシ型の CD では、サブユニットの CD ではみられない負の CD バンドが 285 nm に出現するので、これはヘモグロビンの T 型構造の指標になるという。従って、285 nm に負の CD 帯がみられた HbM Iwate や HbM Boston では、その正常 β 鎖の酸素結合能が低く、いわゆる四次構造が T 型に凍結した構造であることとよく一致している。一方、 β 鎖異常の HbM では、いずれも CD スペクトルの形、大きさともに、ほぼ正常ヘモグロビンの CD に類似していた。つまり、 β 鎖異常 HbM では、四次構造はほぼ正常ヘモグロビンと同じに保たれているのではないかと考えられる。この結果も、 β 鎖異常 HbM の正常鎖の酸素結合能がほぼ正常であるという結果と矛盾しない。

つぎに可視領域における HbM の CD スペクトルでは、近位 His 変異 HbM と遠位 His 変異 HbM との間に明確な相違が観察された。正常ヘモグロビンのオキシ型、およびデオキシ型では、ほぼその最大吸収の位置に正の CD を示すことが知られている²⁹⁾。また、メト型 HbA においてもその最大吸収の 500 nm, 575 nm, 630 nm の位置に、それぞれ正の CD が観察された。これに対し、HbM Iwate, HbM Hyde Park などの近位 His 変異 HbM では、500 nm や 600 nm の最大吸収の位置に正の CD がみられるが、正常ヘモグロビンに比べて 2~3 倍大きかった。しかし、630 nm に CD バンドがみられないことを除いては、スペクトルの型は HbA と類似していた。一方、HbM Boston, HbM Saskatoon などの遠位 His 変異 HbM では、500 nm の正の CD バンドは正常とあまり差はないが、575 nm にはほとんど CD 帯がないかまたは負のバンドを示した。またこれらの遠位 His 変異 HbM では、650 nm に顕著な負の CD バンドが観察されたことが特徴的である。HbM の X 線結晶解析によると、HbM Boston では置換した遠位 Tyr のフェノールの OH 基がヘム鉄と強く結合し、近位 His との結合は切断されているという³⁰⁾。また HbM Iwate では、ヘム鉄は置換した近位 Tyr のフェノールの OH 基と強く結合していることが示唆されている³¹⁾³²⁾。この Tyr のヘム鉄との結合は、His とヘム鉄との結合よりかなり強いと考えられ、ヘム鉄のヘム面から位置の移動を伴っているらしい。これらのことから考えると、ヘム鉄がヘム面から近位側に偏位した Hb の HbM Iwate と HbM Hyde Park

は、大きな正の CD スペクトルを示すのであろう。また、ヘム鉄がヘム面より遠位側に偏位した場合は、HbM Boston と HbM Saskatoon にみられるように、逆に負の CD バンドを示すのではないかと考えられる。もう一つの遠位 His 近傍のアミノ酸置換でメト型になり HbM に分類されている HbM Milwaukee の近紫外領域および可視領域での CD は、正常ヘモグロビンとほぼ同じであることは、吸収や CD スペクトルでみる限り、正常 Hb とその立体構造やヘムの電子状態は大きな違いがないものと判断される。

結 論

ヘモグロビン M 症 (遺伝性黒血症) として知られている 5 種類の HbM (HbM Iwate, HbM Boston, HbM Hyde Park, HbM Saskatoon, HbM Milwaukee) について、アミノ酸置換がヘモグロビン分子の構造に、どのように影響を与えているかを知る目的で、全メト型における吸収および CD スペクトルを、250~650 nm 波長域にわたって測定し以下の結果を得た。

1. Tyr 置換型の HbM (HbM Iwate, HbM Boston, HbM Hyde Park, HbM Saskatoon) の可視領域 (450~650 nm) の吸収スペクトルの形は互いに似ているが、その吸収は HbA よりも 25~50% 大きく、HbA でみられた 500 と 630 nm の吸収極大は、HbM では 20~30 nm blue shift していた。

2. 近紫外領域の HbM の吸収スペクトルでは、HbA と同じ位置の 275 nm に最大吸収に示すが、Tyr 置換型の 4 種類の HbM はいずれも HbA よりも約 20% 大きかった。

3. α 鎖異常 HbM Iwate と HbM Boston では、近紫外領域の 280 nm 付近に正常ヘモグロビンではみられない大きな負の CD がみとめられた。一方、 β 鎖異常の HbM では、CD スペクトルの形、大きさ共に HbA とは大きな相違はなかった。

4. 近位 His 置換 HbM の HbM Iwate と HbM Hyde Park では可視領域の CD スペクトルは正の CD のみを示し、その極大は HbA の 2 倍以上大きかった。一方、遠位 His 置換の HbM Boston と HbM Saskatoon では、500 nm 付近に正の CD 帯を示したが、650 nm に負の CD 帯を示した。

5. β 鎖の遠位 His 近傍のバリンがグルタミン酸に置換して HbM となった HbM Milwaukee は、250~650 nm の波長域にわたって、吸収・CD スペクトル共に HbA と大きな差はなかった。

以上 5 つの HbM について、そのヘムの状態を主として、吸収および CD スペクトルの面から追究した。吸

収では、HbA と HbM では大きく異なるが、HbM 間に顕著な差はみとめられなかった。しかし、CD スペクトルでは、個々の HbM の特徴がよく反映されていた。即ち、 α 鎖異常 HbM と β 鎖異常 HbM の相違は、主として近紫外領域の CD にみられ、近位側と遠位側のアミノ酸置換の相違は、可視領域の CD に明瞭にみとめられた。以上の知見を、従来報告されている HbM の機能異常との相関について考察を加えた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導御校閲を承りました米山良昌教授に深く感謝の意を表します。また、研究遂行に際し、たゆめめ激励と御指導、論文作成上での御助言などを頂きました本学医療技術短期大学部、長井雅子教授に深く感謝申し上げます。さらに、研究中に貴重な御助言、温かい激励と御協力を頂きました医学部生化学第一教室の友田燐夫助教授をはじめ、教室の諸先生各位に厚くお礼申し上げます。

尚、研究に必要な患者血液は、HbM Iwate は坂井医院の坂井博毅院長（岩手県）、HbM Boston は Sahlgren's Hospital 臨床検査部門の R. Jagenburg 博士（スウェーデン）、HbM Hyde Park は西部診療所長の刈田宏作博士（秋田県）、HbM Saskatoon は富山県立中央病院小児科の押田喜博博士、HbM Milwaukee は Medical College of Wisconsin 血液腫瘍部門の A. V. Pisciotta 博士より御提供戴いた。また、対照として用いた血液は、本学医学部付属病院中央検査部より分けて戴きました。厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Hörlein, H. & Weber, G.: Über chronnische familiäre Methamoglobinämie und eine Modifikation des Methamoglobins. Dtsch. Med. Wochenschr., **73**, 476-478 (1948).
- 2) Singer, K.: Hereditary hemolytic disorders associated with abnormal hemoglobins. Am. J. Med., **18**, 633-652 (1955).
- 3) Shibata, S., Miyaji, T., Iuchi, I., & Tamura, A.: Substitution of tyrosine for histidine (87) in the α chain of Hemoglobin M Iwate. Acta Haematol. Jpn., **27**, 13-18 (1964).
- 4) Gerald, P. S. & Efron, M. L.: Chemical studies of several varieties of Hb M. Proc. Nat. Acad. Sci., **47**, 1758-1761 (1961).
- 5) Heller, P., Coleman, R. D. & Yakulis, V. J.: Hemoglobin M Hyde Park: A new variant of abnormal methemoglobin. J. Clin. Invest., **6**, 1021 (1966).
- 6) 田村 彰, 高橋又郎, 石井温義, 明石精一: 遺伝性黒血症について。人類遺伝学雑誌, **4**, 180-195 (1959).
- 7) Dickerson, R. E.: Structure, function, evolution, and pathology. Benjamin, California, 1983.
- 8) Bunn, H. F. & Forget, B. G.: Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects. p623-633, Saunders Company, Philadelphia, 1986.
- 9) 柴田 進: 図解赤血球: HbM 症 (HbM disease). 297-300 頁, 金芳堂, 京都, 1979.
- 10) Baine, R. M., Wright, J. M., Johnson, M. H., & Cadana, C. L.: Biosynthetic evidence for instability of Hb M Saskatoon. Hemoglobin, **4**, 201-207 (1980).
- 11) Kikuchi, G., Hayashi, N., & Tamura, A.: Oxygen equilibrium of Hemoglobin M Iwate. Biochim. Biophys. Acta, **90**, 199-201 (1964).
- 12) Suzuki, T., Hayashi, A., Yamamura, Y., Enoki, Y., & Tyuma, I.: Functional abnormality of Hemoglobin M Osaka. Biochem. Biophys. Res. Commun., **19**, 691-695 (1965).
- 13) Hayashi, A., Suzuki, T., Imai, K., Morimoto, H., & Watari, H.: Properties of hemoglobin M Milwaukee-1 variant and its unique characteristics. Biochim. Biophys. Acta, **194**, 6-15 (1969).
- 14) Udem, L., Ranney, H. M., Bunn, H. F., & Pisciotta, A.: Some observations on the properties of hemoglobin M Milwaukee-1. J. Mol. Biol., **48**, 489-498 (1970).
- 15) Suzuki, T., Hayashi, A., Shimizu, A., & Yamamura, Y.: The oxygen equilibrium of hemoglobin M Saskatoon. Biochim. Biophys. Acta, **127**, 280-282 (1966).
- 16) Ranney, H. M., Nagel, R. L., Heller, P., & Udem, L.: Oxygen equilibrium of hemoglobin M Hyde Park. Biochim. Biophys. Acta, **160**, 112-115 (1968).
- 17) Hayashi, A., Suzuki, T., Shimizu, A., Imai, K., Morimoto, H., Miyaji, T. & Shibata, S.: Some observations on the physicochemical properties of hemoglobin M Hyde Park. Arch. Biochem. Biophys., **125**, 895-901 (1968).
- 18) Shih, T. B., Imai, K., Tyuma, I., Hayashi, A., & Shibata, S.: Further studies on the functional properties of hemoglobin M Hyde Park. Hemoglobin, **4**, 125-147 (1980).
- 19) Hayashi, A., Suzuki, T., Shimizu, A. & Yamamura, Y.: The properties of Hemoglobin M. Unequivalent nature of the α and β subunits in the hemoglobin molecule. Biochim. Biophys. Acta, **168**, 262-273 (1968).
- 20) Nagai, M., Sugita, T., & Yoneyama, Y.:

- Enzymatic reduction of hemoglobins M Milwaukee-1 and M Saskatoon by NADH-cytochrome b_5 reductase and NADPH-flavin reductase purified from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **225**, 4599-4602 (1980).
- 21) Nagai, M., Sugita, Y. & Yoneyama, Y.: Oxygen equilibrium and circular dichroism of hemoglobin-Rainier ($\alpha_2\beta_2^{145}\text{Tyr} \rightarrow \text{Cys}$). *J. Biol. Chem.*, **247**, 285-290 (1972).
- 22) Urry, D. W. & Pettegrew, J. W.: Model systems for interacting heme moieties. II. The ferriheme octapeptide of cytochrome c. *J. Amer. Chem. Soc.*, **89**, 5276-5283 (1967).
- 23) Beychok, S., Tyuma, I., & Benesch, R.: Optically active absorption bands of hemoglobin and its subunits. *J. Biol. Chem.*, **242**, 2460-2462 (1967).
- 24) 米沢貞次郎, 永田親義, 加藤博史, 今村 詮, 諸熊窪治: 改定量子化学入門 (下). 第九章, 光と分子, 439-506 頁, 化学同人, 京都, 1969.
- 25) 浜口浩三, 武貞啓子: 蛋白質の旋光性. 156-173 頁, 東京大学出版会, 東京, 1971.
- 26) 馬渡一浩: 原子価雑種ヘモグロビンの構造と機能. 十全医会誌, **89**, 166-176 (1980).
- 27) Mawatari, K., Matsukawa, S. & Yoneyama, Y.: Different effects of subunit association upon absorption and circular dichroism spectra of methemoglobin. *Biochim. Biophys. Acta*, **745**, 219-228 (1983).
- 28) Nagai, M., Takama, S. & Yoneyama, Y.: Hemoglobin M: Effect of the proximal or distal histidine replacement on circular dichroism in the visible region. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **128**, 689-694 (1985).
- 29) Sugita, Y., Nagai, M. & Yoneyama, Y.: Circular dichroism of hemoglobin in relation to the structure surrounding the heme. *J. Biol. Chem.*, **246**, 383-388 (1971).
- 30) Pulsinelli, P. D., Perutz, M. F. & Nagel R. L.: Structure of hemoglobin M Boston, a variant with a five coordinated ferric heme. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **70**, 3870-3874 (1973).
- 31) Peisach, J. & Gersonde, K.: Binding of CO to mutant α chains of hemoglobin M Iwate; evidence for distal imidazole ligation. *Biochemistry*, **16**, 2539-2545 (1977).
- 32) La. Mar, G. N., Nagai, K., Jue, T., Budd, D. L., Gersonde, K., Sick, H., Kagimoto, T., Hayashi, A. & Taketa, F.: Assignment of proximal histidyl imidazole, exchangeable proton NMR resonances to individual subunits in hemoglobins A, Boston, Iwate and Milwaukee. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **96**, 1172-1177 (1980).

Absorption and Circular Dichroic Spectra of HbM Iwate, HbM Boston, HbM Hyde Park, HbM Saskatoon and HbM Milwaukee Shizuko Takama, Department of Biochemistry (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—*J. Jusen Med. Soc.*, **96**, 1189—1204 (1987)

Key words: absorption spectrum, circular dichroism, HbA, HbM

Abstract

Hemoglobin (Hb), a tetramer consisting of two α and two β chains, is an important blood pigment to carry oxygen from lung to tissues. Oxygen binds directly to each heme moiety of subunits in which the proximal and distal histidine coordinate to the heme. Abnormal hemoglobins, in which either the proximal or distal histidine in the α or β chains is replaced by tyrosine, are called hemoglobin M (HbM), and their hemes are stably oxidized. It is known that the ferric heme of abnormal chains is not only unable to bind with oxygen but also has influence on the oxygen binding of normal chains in hemoglobin M. In order to know how these amino acid replacements of Hbs M have effect on their heme moieties, absorption and circular dichroism

(CD) spectra were measured in the fully oxidized form (MetHbM) and compared with those of normal hemoglobin (HbA). In visible regions, the absorption maxima of tyrosine substituted Hbs M were blue shifted compared with those of HbA (500, 630 nm) such as in HbM Iwate (480, 590 nm), HbM Boston (490, 600 nm), HbM Hyde Park (485, 575 nm) and HbM Saskatoon (490, 600 nm). Another variant of HbM, HbM Milwaukee, has an amino acid substitution of Ell valine (Val) by glutamic acid (Glu) in β chains, and their abnormal chains are also stabilized in ferric state. Comparing the absorption spectrum of HbM Milwaukee with that of HbA, an absorption maximum at 630 nm of HbA is blue shifted to 622 nm in HbM Milwaukee, but other properties of absorption of HbM Milwaukee are very similar to those of HbA. In ultraviolet regions, the five Hbs M had a similar absorption maximum at 275 nm to that of normal hemoglobin. However, the absorption maximum of four tyrosine substituted Hbs M are about 20% greater than that of normal hemoglobin. On the other hand, two great differences among Hbs M were observed in CD spectra which is well known to reflect the conformation of protein. The first difference in CD was found between α and β abnormal Hbs M in the ultraviolet region, and the second difference in CD was observed between the proximal and distal histidine substituted HbM in the visible region. In the CD spectra of α abnormal Hbs M a distinctive negative trough was observed at around 280 nm, however, CD spectra of all β abnormal Hbs M were very similar to that of HbA in this region. On the other hand, the proximal histidine substituted Hbs M, HbM Iwate and HbM Hyde Park showed only positive CD in the visible region like HbA, but their CD maxima of 520 nm and 580 nm were two times greater than those of HbA. While CD spectra of the distal histidine substituted Hbs M, HbM Boston and HbM Saskatoon, exhibited a negative trough at around 650 nm which was not observed in the other proximal histidine substituted Hbs M, HbM Iwate and HbM Hyde Park, and normal HbA. However, the CD spectrum of HbM Milwaukee was not so different from that of normal hemoglobin in the spectral regions from 250 nm to 650 nm. As shown above, absorption spectra of Hbs M are greatly different from that of HbA, but did not vary among Hbs M. However, each HbM has a characteristic CD spectrum, and from these facts, it is suggested that Hbs M have different protein structures from each other. These differences might be correlated to the functional abnormality or stability of the hemoglobin molecule of Hbs M.