

原子価雑種ヘモグロビン構造と機能

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/2297/8821

原子価雑種ヘモグロビンの構造と機能

金沢大学大学院医学研究科生化学第一講座 (主任: 米山良昌教授)

馬 渡 一 浩

(昭和55年1月10日受付)

ヒトヘモグロビン (HbA) は, α , β 鎖が各々 2 個ずつから成る 4 量体で, これらのヘムへの酸素結合は独立ではなく, 協同的に行なわれる. HbA ($\alpha_2\beta_2$) の α 又は β 鎖のいずれか一方が 3 価鉄ヘムをもち, 残りの 2 価鉄鎖しか酸素を結合できなくした原子価雑種ヘモグロビン ($\alpha_2^+\beta_2, \alpha_2\beta_2^+$, + は 3 価鉄鎖を示す) は, 2 個の酸素を結合した, いわゆる酸素化の中間体並びにヘモグロビン M (HbM) のモデルとして位置づけられよう. HbM 症に関しては, 多くの研究が行なわれてきたが, それらの機能を構造と結びつけて分子論的に解釈するには, 明らかにすべき点が多い. 一方, 酸素化の中間体の構造研究はヘモグロビン (Hb) の協同的酸素結合の構造論的機構の解明に重要である. ところで, Hb による協同的酸素結合はデオキシ型 T 構造からオキシ型 R 構造への 4 次構造変化により起こることが知られている¹⁾²⁾. この 4 次構造変化における $\alpha_1\beta_2$ 接触面, 塩橋の役割の重要性については, 異常 Hb, 修飾 Hb を用いた研究結果から明らかにされてきた³⁾⁴⁾. しかし, ヘム部分とグロビンの相互作用が果たす役割については, 多くの議論がなされているが, まだはっきりしていない. この点に関して Perutz は, 酸素結合によりヘム鉄がポルフィリン面外から面内へ移動する, この変位が Hb の T 型 4 次構造から R 構造へ変化する引き金になると考えている⁵⁾. 原子価雑種 Hb の 3 価鉄鎖に高スピン型リガンド (F, H₂O) を結合させるとヘム鉄はポルフィリン面から近位ヒスチジン側に突出し, 低スピン型 (N₃, CN) では面内にとどまるようになる. このようにヘム鉄とポルフィリン面との距離をいろいろ変えることが, 機能にどのような影響を与えるかを検討することで Perutz モデルが検証されるに違いない. 本研究では, HbM 及び中間体 Hb の構造と機能の基礎的理解を深める目的の一環として, 原子価

雑種 Hb の酸素平衡機能を Monod, Wyman, Changeux の two-state, allosteric model (MWC モデル⁷⁾) で解析し, 詳細に検討した. 更に, 分光学的に得られたヘム及びグロビン部分の構造変化を機能変化と対応づけ, Hb の構造と機能の関係について議論した.

材料及び方法

I. 試薬

[bis(2-Hydroxyethyl)imino-tris(Hydroxymethyl)methane], (bis-Tris と省略) 及びイノントールヘキサリン酸 (IHP) は Sigma 社のもの, その他の試薬は市販の特級のものをを用いた.

II. 原子価雑種 Hb の調製

正常のヒトから調製した 3 倍溶血液に, ヘム濃度当り 8 倍量のパラクロロ安息香酸第 2 水銀 (pCMB) を加え, pH 6.0 で一夜処理し, CM セルロースカラム上で pH 6.5 ~ pH 8.0 の連続勾配溶出法により, $\alpha^{\text{pCMB}}, \beta^{\text{pCMB}}$ 鎖を分離した⁸⁾. 結合した pCMB は 1 気圧の二酸化炭素 (CO) 存在下で単離鎖を 20mM のジチオスレイトールで 12 時間, 0 °C で処理し, セファデックス G-25 (Pharmacia) カラムを通して除去した. CO 型単離鎖は酸素気相中で照射により酸素化型とした. 3 価鉄鎖への変換⁹⁾は, 嫌気的条件下, 0 °C で単離鎖の 1M グリシン溶液にヘムの 1.2 倍量のフェリシアン化カリウムを加えて, 酸化し, 直ちに Dowex 1×8 (室町化学) のカラムを通し, 過剰の酸化剤を除去した. この 3 価鉄鎖 (α^+ 又は β^+) にほぼ等量のパートナーの 2 価鉄鎖 (β 又は α) を混合し, 再構成する. 再構成 Hb (原子価雑種 Hb) の精製は, 前以って pH 6.8 に平衡化した CM-32 (Whatman) カラムに混合液を吸着し, pH を段階的に上げて, 過剰の β 鎖とオキシ HbA をまず

Structure and Function of Valency Hybrid Hemoglobins. Kazuhiro Mawatari, Department of Biochemistry (Director: Prof. Y. Yoneyama), School of Medicine, Kanazawa University.

除去し、次に pH 7.4 で原子価雑種 Hb を溶出した。得られた標品は等電点ゲル電気泳動 (LKB-PAG, pH 3.5 - 9.5) で単一バンドを与えた。

Ⅲ. 原子価雑種 Hb 誘導体の調製

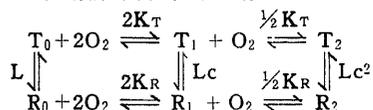
原子価雑種 Hb の精製標品はセファデックス G-25 カラムを通し、0.1M NaCl を含む 0.05M bis-Tris 緩衝液、pH 7.0 (bis-Tris 緩衝液と省略) の溶液にし、aquo (H₂O) 型とした。この溶液に、bis-Tris 緩衝液に溶かした NaF, NaN₃, KCN を各々 0.1M, 1mM, 1mM 加え fluoro (F) 型, azide (N₃) 型, cyano (CN) 型を調製した。ヘム濃度はピリジンヘモグロメゲン法で 557nm の mM 当りの分子吸光係数を 34 として計算した。以下の実験はすべて、40 ~ 60 μM のヘム濃度の Hb を用い、25 °C、bis-Tris 緩衝液中で行なった。

Ⅳ. 酸素平衡機能の測定

Hb 溶液を密閉セル中で攪拌し、気相に Q ガス (ヘリウム: イソブタン = 99.05:0.95) を通し、Hb の脱酸素化に伴う 595nm の吸光度変化をユニオン SM 401 型分光光度計で測定し、同時に酸素電極 (YSI4001, Yellow Spring) で測定した溶存酸素分圧の変化を連続的に X-Y レコーダ上に記録し、酸素解離曲線を得た。この Hill プロットから、Hb の 50% 飽和に必要な酸素分圧の P₅₀ (mmHg)、及び 50% 飽和点での Hill 定数 (n) を求め、各々酸素親和性、協同性 (cooperativity) の指標とした。

Ⅴ. 酸素平衡機能の解析

原子価雑種 Hb の酸素平衡機能を Monod, Wyman, Changeux の two-state allosteric model⁷⁾ に基づき解析した。原子価雑種 Hb は酸素結合部位が 2 つしかない為、酸素平衡式は次の様に表わされる。



(デオキシ Hb)

(オキシ Hb)

$$L = T_0/R_0, \quad c = K_R/K_T$$

ここで L はデオキシ状態の 2 つの 4 次構造 (T₀, R₀) 間の平衡定数、K_R, K_T は各々 R 型, T 型 4 次構造の酸素解離定数である。また、この解離定数の比、K_R/K_T を c で表わす。酸素解離曲線の測定から得られる P₅₀, n は、L, c, K_R を用いて (1), (2) 式で表わすことができる。

$$(P_{50})^2 = \frac{L+1}{Lc^2+1} K_R^2 \quad (1)$$

$$n = \left[\frac{2}{1 + \frac{Lc+1}{(Lc^2+1)(L+1)} \frac{1}{2}} \right] \quad (2)$$

また、飽和度を Y、酸素分圧を P とすると、酸素解離曲線の Hill プロットは (3) 式で考えられる。

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{(Lc+1)(P/K_R) + (Lc^2+1)(P/K_R)^2}{(L+1) + (Lc+1)(P/K_R)} \quad (3)$$

K_R は Hb の種類、測定条件によらず、ほぼ単離 α, β 鎖のものに近く、一定であり、ここでは 0.4mmHg と仮定された⁸⁾。実測の P₅₀, n 及び K_R を (1), (2) 式に代入して L と c を求めた。L と c を (3) 式に代入し、P の値を変えて、Y/(1-Y) の変化を計算すると、Hill プロットの理論曲線が得られる。

Ⅵ. 分光学的性質

分光学的測定に用いるデオキシ型 Hb は、石英セル付 Thunberg 管中でオキシ型 Hb を脱気、Q ガス置換をくり返すことで調製した。IHP を結合したデオキシ型 Hb は、このデオキシ型 Hb と側管の IHP とを混合して得られるが、この際、Hb 濃度変化をなくする為、1mM の IHP を側管に乾固しておいた。IHP は 1NHCl で中和し、bis-Tris 緩衝液に溶解したものをを用いた。円偏光二色性 (CD) 及び磁気円偏光二色性 (MCD) スペクトルは、日本分光、J-20 型自記旋光分散計を用いて測定した。MCD スペクトルは 4.5KG の永久磁石 (N-S 間が 10 mm) に試料セルを置いて測定した値から CD スペクトルの値を差し引いて求めた。CD スペクトルの大きさは、分子ダ円率 (θ), MCD は単位磁場当りの分子ダ円率 (θ_M) で表わした。紫外部差スペクトルは、コンピュータ連動のユニオン SM401 型分光光度計で測定した。デオキシ型とオキシ型の差スペクトルは次の様にして測定した。デオキシ型 Hb のスペクトルをコンピュータに 5 回加算記憶させる。次にこのスペクトルから、Thunberg 型セルを開放し、オキシ型 Hb とし、このスペクトルを 5 回差し引くと、デオキシ型とオキシ型との間の差スペクトルが得られる。IHP induced 差スペクトルは、デオキシ型 Hb のスペクトルを 10 回コンピュータに加算記憶させた後、側管の IHP を Hb 溶液に溶解してから、スペクトルを 10 回差し引くことによって得た。差スペクトルの大きさは、ヘム濃度 (mM) 当りの分子吸光係数の差、Δε mM で表わした。

成 績

I. 酸素平衡機能

原子価雑種 Hb の 3 価鉄鎖に F, H₂O, N₃, CN などのリガンドを結合させて、スピン状態を変えた時の 2 価鉄鎖の酸素平衡曲線 (OEC) を 1mMIHP 存在下、非存在下で測定した (図 1)。これらの Hill プロットから

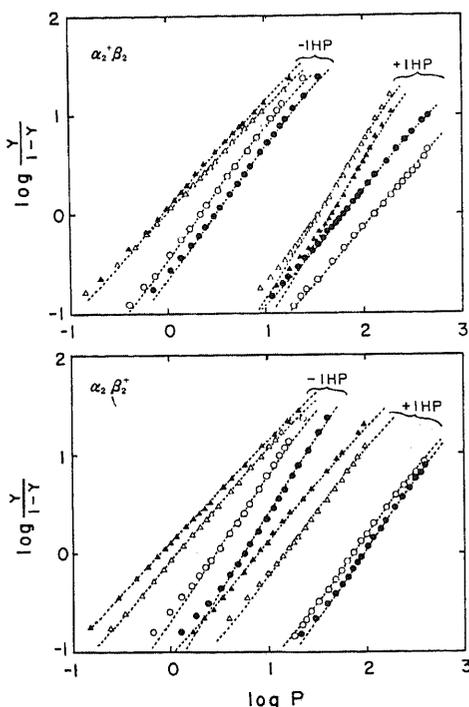


図1. 原子価雑種 Hb 誘導体の酸素平衡曲線の Hill プロット及びそれに対する IHP の効果 (●), F (0.1M); (○), H₂O; (△), N₃ (1mM); (▲), CN (1mM) 60 μM のヘム濃度を用いて 0.1M NaCl-0.05 M bis-Tris 緩衝液 (pH7.0) 中, 25°C で測定した. IHP は 1mM になるように加えた. 波線は本文中に述べられた方法で求められた理論曲線である.

得られる P_{50} , n , 並びに, これらの値から MWC モデルに従って式 (1), (2) から求めた L , c を同時に表 1 に示した. 図 1 の点線は, この L と c を式 (3) に代入して計算した理論曲線である. 理論曲線と実測の曲線がよく一致することから, P_{50} , n から計算された L と c の値の妥当性が確かめられた. IHP 非存在下においては, $\alpha_2\beta_2, \alpha_2\beta_2^+$ とともに, CN, N₃, H₂O, F の順に OEC は右側により酸素親性が低くなった. また, OEC の傾き (Hill の n) は, $\alpha_2\beta_2, \alpha_2\beta_2^+$ のいずれにおいても, CN, N₃ に比べて H₂O, F の方が大きく, 協同性が高くなった. MWC モデルによる解析結果から見ると, CN, N₃, H₂O, F の順に L は大きくなっている. また, c は $\alpha_2\beta_2$ において, N₃ と CN との間で逆転はあるが, CN, N₃, H₂O, F の順に小さくなり, 3 価鉄鎖のスピンの状態の変化は, 2 価鉄鎖の L のみならず c をも変えるという重要な知見が MWC モデルによる解析から明らかとなった. IHP 添加により, 原子価雑種 Hb の OEC は一般的にいって大きく右側にずれ, 酸素親性が著しく低下した. 即ち, $\alpha_2\beta_2^+$ の場合の P_{50} と n は IHP 非存在下の場合と同じく, CN, N₃, H₂O, F の順に大きくなった. しかし, n の値を IHP 存在下 (+IHP と省略), 非存在下 (-IHP) で比較すると, F, H₂O は IHP 添加で小さく, N₃, CN は大きくなった. L は, -IHP の時と同じ様に CN, N₃, H₂O, F の順に大きくなり, c は逆に小さくなる傾向を示した. $\alpha_2\beta_2$ の場合は, P_{50} は $N_3 < CN < F < H_2O$ の様に, -IHP の場合とは異なる関係になった. n は, 低スピン型 (N₃, CN) の方が高スピン型 (F, H₂O) より大きかった. ま

表 1 原子価雑種 Hb 誘導体の酸素平衡機能とそれに及ぼす IHP の効果

		-IHP				+IHP			
		Oxygen equilibrium parameter		MWC parameter		Oxygen equilibrium parameter		MWC parameter	
		P_{50} (mmHg)	Hill's n	L	c	P_{50} (mmHg)	Hill's n	L	c
$\alpha_2\beta_2$	F	3.1	1.38	66.8	0.0439	62	1.20	48300	0.00457
	H ₂ O	2.2	1.37	32.2	0.0552	134	1.17	238000	0.00205
	N ₃	0.98	1.08	9.33	0.278	34	1.65	7830	0.00248
	CN	0.90	1.13	5.38	0.220	47	1.67	14700	0.00166
$\alpha_2\beta_2^+$	F	5.8	1.66	213.3	0.0095	97	1.44	71800	0.00165
	H ₂ O	3.0	1.52	57.3	0.0254	77	1.36	49800	0.00242
	N ₃	1.2	1.18	10.3	0.157	15	1.33	2140	0.0132
	CN	0.80	1.05	6.63	0.370	8.0	1.20	656	0.0323

P_{50} (mmHg) と n は図 1 の Hill プロットから求めた. L と c はこの P_{50} と n の値を用いて本文中の式 (1), (2) から求めた. この時 K_R は 0.4 mmHg と仮定した.

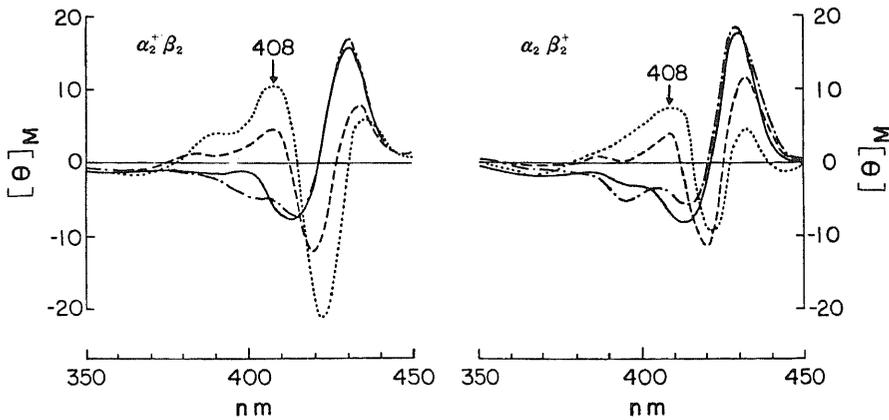


図2. デオキシ型原子価雑種 Hb 誘導体の Soret 帯 MCD スペクトル
 — F; - - - H₂O; N₃; - · - · - CN
 40 μM のヘム濃度で4mm の石英セル付 Thunberg 管を用いて25° C で測定した。
 矢印の408 nm の MCD 強度を図8に用いた。

た、 $\alpha_2\beta_2^+$ の場合と同じ様に、IHP 添加により、高スピン型の n は小さく、低スピン型の n は大きくなった。 L は P_{60} と同じ順序に大きくなるが、 c はすべての誘導体において、ほぼ同じオーダーにあり、大きく変化しない。 $\alpha_2\beta_2^+$ の高スピン型もこれとほぼ近い値であった。

II. 分光学的性質

II-1. ヘム部分 (MCD)

3 価鉄ヘムの Soret 帯の MCD スペクトル強度は、スピン状態に依存することが知られている¹⁰⁾。そこで、デオキシ型原子価雑種 Hb 誘導体の Soret 帯 MCD スペクトルを測定した (図2)。同じ誘導体を $\alpha_2^+\beta_2$ と $\alpha_2\beta_2^+$ で比較してみると、MCD スペクトルでは、両者の間でスペクトルの形状はよく似ていた。低スピン型 (N_3 , CN) では、408nm 付近に大きな正の極大、430nm 付近に小さな極大を与え、高スピン型 (F , H_2O) では、それらに対応する波長付近に小さな負の MCD、大きな正の極大を与える。このことから見て、408nm 及び 430nm 付近の MCD 強度は、3 価鉄鎖のスピン状態を反映していることが示唆される。IHP 添加により、 $\alpha_2^+\beta_2$ 、 $\alpha_2\beta_2^+$ のデオキシ型のスペクトルは、すべての誘導体において 430nm 付近のピークが短波長側へ有意にシフトする (図3)。 $\alpha_2\beta_2^+$ 誘導体では、このシフトに加えて 430nm 付近の吸収帯が鋭くなった。低スピン型の場合は、 $\alpha_2^+\beta_2$ 、 $\alpha_2\beta_2^+$ のいずれにおいても 410nm 付近の吸収帯の強度低下が見られた。

II-2. グロビン部分

デオキシ Hb の酸素化の過程で起こるオキシ Hb への 4 次構造変化は、 $\alpha_1\beta_2$ 接触面において著しく、こ

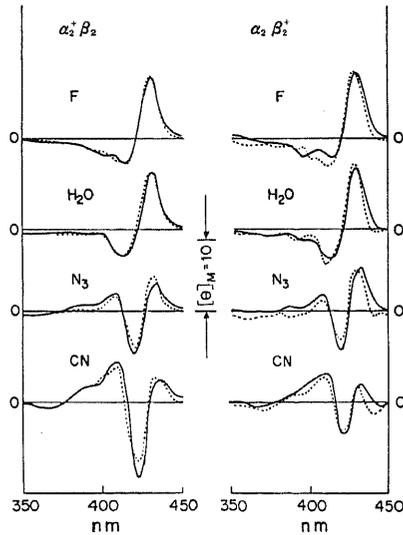


図3. デオキシ型原子価雑種 Hb 誘導体の Soret 帯 MCD スペクトルに対する IHP 効果
 —, IHP 添加前; ·····, 1mM IHP 添加後
 測定条件は図2と同じ。

の接触面変化に敏感な紫外部の CD、差スペクトルが溶液中における T → R 変化の指標として用いられている¹¹⁾。そこで、原子価雑種 Hb 誘導体の脱酸素化及び IHP 結合に伴うグロビンの 4 次構造変化をこれらの方法を用いて検討した。

1). 紫外部 CD スペクトル

原子価雑種 Hb 誘導体のオキシ型、デオキシ型の紫

外部 CD スペクトルを測定した (図 4)。すべての誘導体のオキシ型は、280 - 290nm 付近に、2つの谷をもっていた。デオキシ型の $\alpha_2^+\beta_2$, $\alpha_2\beta_2^+$ の高スピン型では、その谷が1つであるが、低スピン型では、オキシ型の様に谷が2つあった。しかし、IHP 添加によりこの低スピン型 Hb の2つの谷は変化して1つになり、高スピン型 Hb では、1つの負の谷の強度が大きくなった。

2). 紫外外部差スペクトル

原子価雑種 Hb 誘導体のデオキシ型とオキシ型の紫

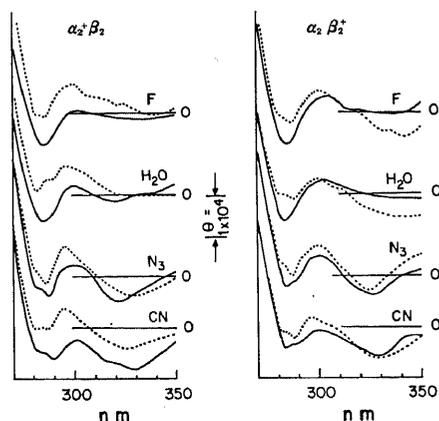


図 4. 原子価雑種 Hb 誘導体の紫外外部 CD スペクトル
 — デオキシ型 ; - - - オキシ型
 測定条件は図 2 と同じ。

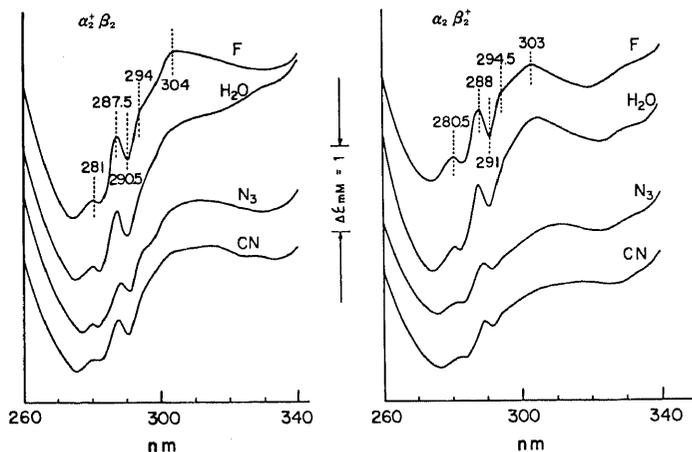


図 5. デオキシ型とオキシ型原子価雑種 Hb 誘導体の紫外外部差スペクトル
 本文中に述べた方法に従い測定した。数字は波長を表わす。287.5nm 付近のピークと 291nm 付近の谷との吸光度差を差スペクトルの大きさとし、表 2 にまとめた。

外部差スペクトルを測定した (図 5)。すべての誘導体で類似の差スペクトルが得られた。この差スペクトルの 294 - 295nm 付近に肩が存在することから、脱酸素化に伴って、これらの Hb では 4 次構造変化が起こることが示唆される。287.5nm 付近のピークと 291nm 付近の谷との吸光度差を差スペクトルの大きさに対応づけると、 $\alpha_2^+\beta_2$, $\alpha_2\beta_2^+$ とともに高スピン型で大きく、低スピン型で小さかった (表 2)。デオキシ Hb に IHP が結合した結果生ずるスペクトル変化 (IHP induced 差スペクトル) は、デオキシ型とオキシ型の差スペクトルと相似形をしている (図 6)。この場合も 294nm 付近に肩が認められることから、この差スペクトルは、4 次構造変化が起こっていることを示している。また、差スペクトルの大きさは、高スピン型で小さく、低スピン型で大きかった。しかし、デオキシ型とオキシ型の差スペクトルに IHP induced 差スペクトルの大きさを加えると、すべての誘導体がほぼ同じ大きさであった (表 2)。

考 察

1. 酸素平衡機能

1・1). - IHP の場合

原子価雑種 Hb 誘導体の 2 価鉄鎖の酸素親和性は、3 価鉄鎖のスピ状態に依存しており、OEC の MWC モデルによる解析から 3 価鉄鎖のスピ状態が L と c を変えていることがわかる (表 1)。L は、 $\alpha_2^+\beta_2$, $\alpha_2\beta_2^+$ 共に $\text{CN} < \text{N}_3 < \text{H}_2\text{O} < \text{F}$ の順に大きくなる。

即ち、3価鉄鎖が高スピンの程Lは大きく、R-T平衡がT型にずれていることを示す。cは $\alpha_2\beta_2$ 、 $\alpha_1\beta_2$ いずれの誘導体でも、高スピン型のFとH₂O、また、低スピン型のN₃とCNは各々、似た値を示すが、高スピン型と低スピン型では明らかな違いを示す。c(= K_R/K_T)の中のK_Rが一定という仮定は許されるので、このことは3価鉄鎖のスピンの状態が、K_Tをも変えてしまったことを意味する。2価及び3価鉄ヘムの高スピン型誘導体(デオキシHbA、FメトHbAとH₂OメトHbA)のヘム鉄はポルフィリン面から近位ヒスチ

ジン側へ各々0.6 Å, 0.2 Å突出し、低スピン型(オキシHbA、CNメトHbA、N₃メトHbA)ではヘム鉄がポルフィリン面内にあることが知られている⁴⁾。PerutzはデオキシHbが酸素を結合する際に、ヘム鉄がポルフィリン面へ移動することがR-T平衡をR側にずらす引き金となるという、いわゆる trigger mechanismを提唱している⁹⁾。しかし、Hopfieldは、ヘム間相互作用のエネルギーは、ヘム部分や塩橋等の特定の部分に局在しているのではない、という distributed modelを提唱し、ヘム鉄の変位は、K_RとK_Tの比、cに比例すると考えている¹²⁾。今回の測定条件とは異なるが、Nagaiは原子価雑種Hb誘導体(F、H₂O、N₃、CN)の酸素平衡機能のP₅₀が高スピン型(F、H₂O)の方が低スピン型(N₃、CN)より大きいことから、前に述べたPerutzの仮説が基本的に正しいことを示した¹³⁾。また、Lに対してHillのnをプロットした場合に、同一のベル型曲線に必ずしも乗らないことから、原子価雑種Hbの各誘導体ではLだけでなくcも違っている可能性をも示唆した。今回の(1)、(2)式を用いた計算結果は、Nagaiの推測を数値的に確認するばかりではなく、理論的考察を深めるのに役立つ。即ち、3価鉄鎖のスピンの状態はcと相関していること、又、各誘導体のLとcの間には、大きなLをもつ誘導体は小さなc、小さなLの誘導体は大きなcをもつことが定性的に示される。そこで、すべての誘導体のlog cをlog Lに対してプロットすると、これらの値は、-log c = 0.8log Lの直線上に乗ることがわかった(図7)。この関係は、今まで明らかにされてはいない

表2 紫外部差スペクトルの大きさ

	$\Delta \epsilon \text{ mM}$			
	[Deoxy-Oxy] (A)	IHP (B)	(A)+(B)	
$\alpha_2\beta_2$	F	0.25	0.19	0.44
	H ₂ O	0.25	0.20	0.45
	N ₃	0.09	0.34	0.43
	CN	0.12	0.31	0.43
$\alpha_1\beta_2$	F	0.32	0.10	0.42
	H ₂ O	0.26	0.16	0.42
	N ₃	0.10	0.32	0.42
	CN	0.06	0.39	0.45

(A)、デオキシ型とオキシ型の差スペクトルの大きさ；(B)、IHP induced 差スペクトルの大きさ；(A)+(B)、AとBの差スペクトルの和

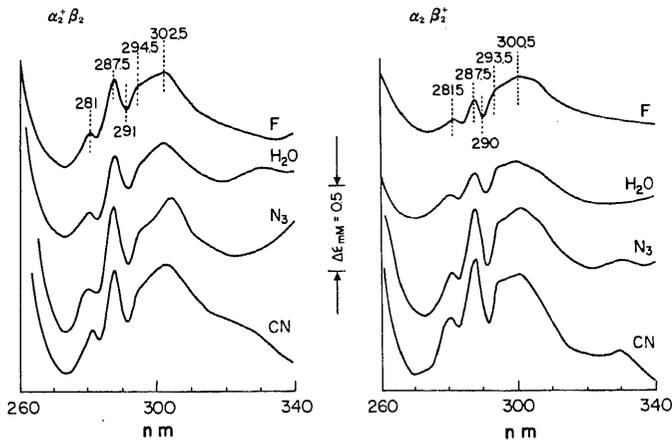


図6 原子価雑種Hb誘導体の紫外部IHP差スペクトル
本文中に述べた方法に従い測定した。図5と同様、287.5nm付近のピークと291nm付近の吸光度差を差スペクトルの大きさとした。

が、Lとcを変える原因が密接に関連していることを示しており、Perutz仮説とHopfieldの理論の両方を一度に包括するものとして極めて重要である。なぜならPerutz仮説のヘム鉄とポルフィリン面の距離とHopfieldの言う近位ヒスチジンのポルフィリン面への距離は、その性質上ほとんど等しいパラメータであり、一方はそれがLと相関し、他者はcと相関すると考えていたが、実はこの両者は全く無縁ではなかったのである。即ち、Lを変える様な変化がHbに起こるならば、その時にはcも、従って K_T も対応して変化すること、及びその逆もあるということである。原子価雑種Hbの場合には、その様にする因子は3価鉄鎖のスピンの状態なのである。そこで、Hbのアロステリック機構を支配するLと K_T の構造的な意味づけについて考察しよう。Perutz仮説に従えば、ヘム鉄がポルフィリン面内に接近するにつれて、T構造を安定化していた塩橋が不安定になり、終いに切断すると、それはもはや元のT構造を保てなくR-T平衡はR型に傾く為にLが小さくなるのである。BaldwinとChothiaは最近、cを規定しているのはヘムにかかっている緊張(Tension)ではなく、鉄が内面に向かって動く時に如何に制約を受けるかであると述べている¹⁴⁾。そしてこの制約は近位ヒスチジンのNやC原子がポルフィリンのNと立体的反発を起こす事によって受けると考えている。従って、この様な制約を受けない様にヘム鉄がポルフィリン面内に入ることが出来れば、酸素

親和性は高くcは大きな値をとるだろう。制約を受けるか否かは近位ヒスチジンの配向の仕方に依存する。近位ヒスチジンはFヘリックスに位置するので、このヘリックスが自由に動く事が出来れば制約の原因はなくなる。そのFヘリックスは $\alpha_1\beta_2$ 接触面によってその自由度が制限されている。従って、原子価雑種Hbの場合には、3価鉄鎖のヘム鉄のポルフィリン面内への移動による構造変化が、この $\alpha_1\beta_2$ 接触面まで達し、更にデオキシの2価鉄鎖の近位ヒスチジンのヘムへの配向を変えている為にcが3価鉄のスピンの状態に依存するのであろう。また、高スピン型の $\alpha_2^+\beta_2^-$ と $\alpha_2\beta_2^+$ のLとcがそれぞれ異なる値を持つ事は以下の様に考えられる。即ち、デオキシHbAの α 、 β 鎖のヘム鉄とポルフィリン面の距離は共に約0.6 Åであるが、メトHbAでは α^+ 鎖は0.1 Å、 β^+ 鎖は0.2 Åである⁴⁾。原子価雑種Hbにおいても同様な変位の差があるとすれば、 $\alpha_2^+\beta_2^-$ の α^+ 鎖のヘム鉄の方が $\alpha_2\beta_2^+$ の β^+ 鎖よりポルフィリン面に近く、R-T平衡がよりR側に傾き、T状態の酸素親和性が高くなるだろう。

1・2). + IHP の場合

IHP添加により、Lは著しく大きく、cは小さくなる(表1)。 $\alpha_2^+\beta_2^-$ では、Lは N_3 、CN、F、 H_2O の順に大きく、3価鉄鎖のスピンの状態との相関は、はっきりしない。cもF型を除き、ほぼ同じ値(0.002)をとり、-IHPの場合の様な関係は見られなくなる。 $\alpha_2\beta_2^+$ では、LはCN、 N_3 、 H_2O 、F、cは、F、 H_2O 、 N_3 、CNの順に大きくなり、-IHPの場合と同じ傾向を示している。Nagaiは、 $\alpha_2^+\beta_2^-$ 、 $\alpha_2\beta_2^+$ ではリガンドが異っても、各々、cが0.01、0.004のベル型曲線に乗ることから、+IHPの場合には、cが同じであることを示した¹⁵⁾。今回の結果は、 $\alpha_2^+\beta_2^-$ のすべての誘導体及び $\alpha_2\beta_2^+$ の高スピン型は、cの値が0.002に近く、 $\alpha_2\beta_2^+$ の低スピン型のcとは全く異なる事を明らかにし、Nagaiの結果とは完全には一致しなかった。OgataとMcConnellは、スピラベルした有機リン酸の $\alpha_2^{+CN}\beta_2^-$ 、 $\alpha_2\beta_2^{+CN}$ のデオキシ型への結合定数を電子スピン共鳴法により測定し、有機リン酸は、 $\alpha_2\beta_2^{+CN}$ より $\alpha_2^{+CN}\beta_2^-$ の方へ強く結合することを報告している¹⁶⁾。Perutzらは、IHPの結合した高スピン型(F、 H_2O)のメトHbAはT型4次構造をとるが、低スピン型(N_3 、CN)では、T型にはならない事、なお、高スピン型メトHbでは、デオキシHbと同様に β 鎖間にIHPが結合することを報告した¹¹⁾。IHPによるcの変化が $\alpha_2^+\beta_2^-$ と $\alpha_2\beta_2^+$ とは異なることは以上の事を考慮すると説明できる。即ち、 $\alpha_2^+\beta_2^-$ 誘導体では、IHPは2価鉄 β 鎖間にデオキシHbAと同じ様に強く結合する為、3価鉄鎖のスピンの

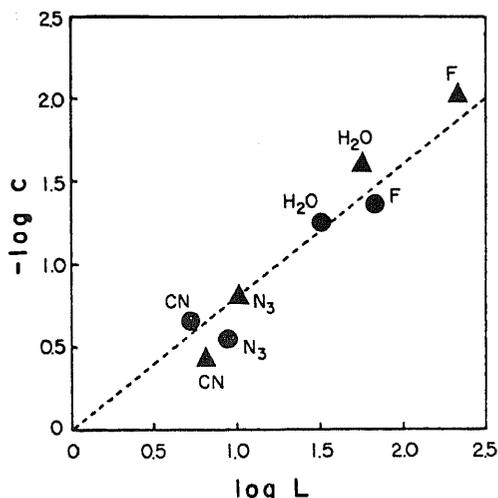


図7. $\log L$ と $\log c$ との関係

表1のIHP非存在下の場合の値を用いてプロットした。

(●), $\alpha_2^+\beta_2^-$; (▲), $\alpha_2\beta_2^+$

態の K_T への依存度が失われ、 K_T はほぼ一定になるが、 $\alpha_2\beta_2^+$ 誘導体においては、3 価鉄 β 鎖が高スピン型では、IHP の結合が強く、 $\alpha_2^+\beta_2$ 誘導体とはほぼ同じ K_T をもつが、低スピン型では IHP の結合が弱く、 K_T が高スピン型ほど大きくならない。IHP が結合すると、 $\alpha_2^+\beta_2$ のいずれの誘導体も、ほぼ同じ c の値をもつようになるが、 L はなお、各誘導体で様々な値をとる。この事の原因については、依然として不明である。

2. 分光学的性質と酸素平衡機能との関係

2・1). ヘム部分

デオキシ型 Soret 帯 MCD スペクトルは、 $\alpha_2^+\beta_2$ と $\alpha_2\beta_2^+$ で、いずれの誘導体においても、ほぼ相似のスペクトルを与える。更に、このスペクトル形は、構成単離鎖である 3 価鉄鎖と 2 価鉄鎖の単純重ね合わせによって近似できる。3 価鉄ヘムの Soret 帯 MCD スペクトルの強度は 3 価鉄ヘムのスピン状態と強く相関することが知られている¹⁰⁾。従って、原子価雑種 Hb の Soret 帯 MCD スペクトルにおける 3 価鉄鎖の寄与を見積ることによって、3 価鉄ヘムのスピン状態を知ることができる。長波長側スペクトルには、デオキシ鎖の正の MCD が大きく寄与しているの、その寄与の少ない短波長側の波長 408nm の MCD 強度を 3 価鉄鎖のスピン状態の指標とし、 L との関係調べた (図 8)。- IHP の場合、原子価雑種 Hb のすべての誘導体が一本の直線上にあることから、 L は 3 価鉄鎖のスピン状態に強く依存することが明らかになった。3 価鉄

ヘム誘導体では、F 型は完全な高スピン、CN 型は完全な低スピンであり、 H_2O 型と N_3 型は高スピンと低スピンとが平衡 (スピン平衡) にあり、各々、高スピン側、低スピン側にスピン平衡がずれていることがわかって¹⁰⁾。従って、 L の 3 価鉄鎖のスピン状態への依存性は、 $R-T$ 平衡とスピン平衡との間に密接な関係があることを示唆している。+ IHP では、 $\alpha_2^{+H_2O}\beta_2, \alpha_2^{+CN}\beta_2$ を除くすべての誘導体が - IHP とは異なるが、一本の直線上にあり、 L が 3 価鉄鎖のスピン状態に依存していることを示している。- IHP の場合に、 L が 3 価鉄鎖のスピン平衡と相関するならば、IHP 添加の場合も、- IHP の時の直線上に乗らなくてはならない。従って、以上の結果は、IHP 添加による L の変化は 3 価鉄鎖のスピン状態に依存性を残しつつも、それ以外の因子が加わった事によることを示唆している。IHP は、408nm 付近の MCD 強度を N_3, CN の低スピン型では、 $\alpha_2^+\beta_2, \alpha_2\beta_2^+$ 共に減少させ (図 3)、3 価鉄鎖のスピン平衡を高スピン側にずらしている事を示している。しかし、このスピン平衡変化だけでは、低スピン型の IHP 添加による L の変化を説明できない。また、 $\alpha_2^+\beta_2$ 誘導体では、 N_3 と CN 及び H_2O と F の間で L の逆転 (表 1) が見られるが、図 8 からわかる様に、IHP 添加により N_3 と CN の 408nm の MCD 強度は小さくなるが、逆転は見られない。この事から、 $\alpha_2^+\beta_2$ 誘導体において見られる L の逆転は 3 価鉄鎖のスピン平衡の逆転ではないことがわかる。又、 $\alpha_2^+\beta_2, \alpha_2\beta_2^+$ 共にすべての誘導体の長波長側 (~430nm) のデオキシ鎖由来の正の MCD 吸収ピークは、IHP 添加によって短波長側へシフトし、かつ鋭くなっており、デオキシ鎖のヘムスピン状態が変化した事を示すものと考えられる。更に、表 1 から、IHP 添加によって、すべての誘導体の c が変わり、 T 状態の酸素親和性が変化することがわかる。以上の事から、IHP 添加による L の変化は、3 価鉄鎖のスピン平衡の変化ではなく、デオキシ鎖の状態を質的に変える様なグロビン部分の変化によることが示唆される。

2・2). グロビン部分

紫外部の CD スペクトルにおいて、285nm 付近の CD は、 $\alpha_1\beta_2$ 接触面のチロジン、トリプトファンに由来し、定性的には、この負の CD が 2 つの谷をもつ Hb は R 型、1 つの谷の場合は T 型 4 次構造の Hb であることが知られている¹¹⁾。また、紫外部差スペクトルにおいても、294nm 付近の肩の存在は R 型から T 型への 4 次構造変化が起こることの指標として用いられている¹¹⁾。従って、紫外部 CD の結果 (図 4) は、デオキシ型 $\alpha_2^+\beta_2, \alpha_2\beta_2^+$ の高スピン型は T 型、低スピン

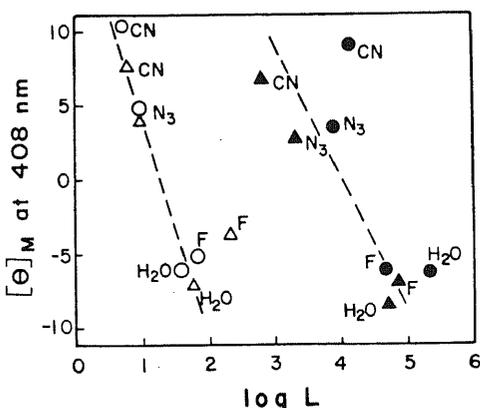


図 8. デオキシ型 Soret 帯 MCD 強度と $\log L$ との関係

図 2 の 408 nm の MCD 強度を表 1 の L の対数に対してプロットした。

(○), $\alpha_2^+\beta_2$; (●), $\alpha_2^+\beta_2$ + IHP
(Δ), $\alpha_2\beta_2^+$; (▲), $\alpha_2\beta_2^+$ + IHP

型は R 型、すべてのオキシ型は R 型構造をとることを示している。これらの Hb がデオキシ型からオキシ型へ変化する時の紫外部の差スペクトルには、294nm 付近に肩が認められ、すべての誘導体で R-T 変換が起こることを示している (図 5)。しかし、差スペクトルの大きさ (表 2) は、 $\alpha_2^+\beta_2$ 、 $\alpha_2\beta_2^+$ 共に高スピン型の方が低スピン型より大きく、これら高スピン型デオキシ Hb の方がより T 型へ平衡がずれていることを示し、高スピン型が大きな L、小さな c をもつことと非常によい対応を示している。即ち、L が大きいことは、R-T 平衡が T 型の方へ大きく傾き、T 型分子の量的増加を意味する。小さな c は、T 状態が構造的に安定化していることを意味し、いずれも大きな差スペクトル、T 型 CD スペクトルを与えることができる。低スピン型の小さな L、大きな c は各々 R-T 変換を行なう分子数が少なく、T 型は R 型構造と大きな差がないことに対応し、いずれも小さな差スペクトル、R 型 CD スペクトルを与える原因と考えられる。また、高スピン型の差スペクトルの大きさは、 $\alpha_2^+\beta_2$ より $\alpha_2\beta_2^+$ の方が大きい (表 2)。このことは、 $\alpha_2\beta_2^+$ の方が $\alpha_2^+\beta_2$ より大きな L、小さな c をとる (表 1) ことと非常によく対応している。先に述べた様に $\alpha_2^+\beta_2$ の α^+ 鎖のヘム鉄は $\alpha_2\beta_2^+$ の β^+ 鎖に比べてポルフィリン面の近くにあるとすれば説明できる。これらの結果は、3 価鉄鎖のヘム鉄の位置の変化が、 $\alpha_1\beta_2$ 接触面まで及んでいることを強く示唆している。

これらの Hb のデオキシ型に IHP を添加した場合は、すべての誘導体のデオキシ型 CD スペクトルは、単一の負の谷を示し、T 型構造をとることを示している。この事は、IHP の結合による紫外部差スペクトルが、294nm 付近に肩を示すことと一致している (図 6)。また、この差スペクトルは高スピン型より低スピン型の方が大きい (表 2)。ところが、IHP の結合による差スペクトルの大きさに、デオキシ型とオキシ型の差スペクトルの大きさを加えると、いずれの誘導体でも、その大きさはほぼ同じになることが明らかになった (表 2)。この事は、IHP 結合により、 $\alpha_2^+\beta_2$ 、 $\alpha_2\beta_2^+$ 共にすべての誘導体において、デオキシ T 型 $\alpha_1\beta_2$ 接触面が形成された事を示している。しかし、これらの Hb のうち、 $\alpha_2\beta_2^+$ の N_3 、CN 型は、明らかに他の Hb とは異なる c をもっている (表 1)。このことは、T 型の $\alpha_1\beta_2$ 接触面が完全に形成されたとしても、T 状態の酸素親和性 (K_T) は、種々の値をとり得る事を示唆している。

以上、原子価雑種 Hb を用いて、4 次構造変化におけるヘム鉄の果たす役割に関しての知見が得られた訳であるが、この事は、今後、酸素化中間体及び HbM の構

造と機能の関係を解明する上で、非常に有用な手がかりを提供すると考えられる。

結 論

原子価雑種ヘモグロビン ($\alpha_2^+\beta_2$ 、 $\alpha_2\beta_2^+$) の種々の誘導体 (F, H₂O, N₃, CN) の酸素平衡曲線を自動記録法で正確に求め、Monod, Wyman, Changeux の two-state allosteric model により解析した。また、イノシトールヘキサリン酸 (IHP) の効果についても検討した。こうして得られたアロステリック・パラメータの L と c を用いて得られる理論曲線はすべての場合において実測値とよく一致した。この解析から得られた結果は、

1. IHP 非存在下の場合、 $\alpha_2^+\beta_2$ と $\alpha_2\beta_2^+$ の高スピン型誘導体 (F 又は H₂O) は大きな L、小さな c をもつが、低スピン型 (N₃ 又は CN) は逆に、小さな L、大きな c であった。L と c との間には、逆比例関係が見られた。
2. IHP はすべてのヘモグロビンの L を増加させ、c を減少させた。かつ、 $\alpha_2\beta_2^{+N_3}$ と $\alpha_2\beta_2^{+CN}$ を除いたすべてのヘモグロビンは、ほぼ同じ c の値をとる様に変化した。

ヘム及びグロビン構造がこのアロステリックの性質に如何なる関与をしているかを知る為に、Soret 帯の磁気円偏光二色性 (MCD)、紫外部の円偏光二色性 (CD)、デオキシ型とオキシ型の差スペクトル、IHP induced 差スペクトルを測定した。

1. IHP はデオキシ型鎖のヘム近傍の 3 次構造を変えるが、3 価鉄鎖のスピン平衡は大きく変えない。
2. デオキシ型原子価雑種ヘモグロビン誘導体の 408nm の MCD 強度は L と相関する。
3. 紫外部 CD スペクトル及び差スペクトルから見て、高スピン型の $\alpha_1\beta_2$ 接触面は T 構造であった。しかし、低スピン型では R 構造であり、IHP 添加により T 構造に変わった。

以上の結果をまとめて、ヘモグロビンのアロステリック機構を議論した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を戴いた、米山良昌教授に感謝いたします。また、本研究遂行中、御教示を戴いた松川茂博士をはじめ第一生化学教室員に厚く御礼申し上げます。

更に、酸素平衡機能の解析に際し、貴重な御助言、御協力を戴いた、本学医療技術短期大学部、下川弥吉教授、酸素平衡機能測定装置の一部を作製して戴いた、医学部工作係、武田与吉氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Perutz, M. F., Ladner, J. E., Simon, S. R. & Ho.

- C. : Influence of globin structure on the state of the heme. I. Human deoxyhemoglobin. *Biochemistry*, **13**, 2163-2173 (1974).
- 2) **Perutz, M. F.** : Regulation of oxygen affinity of hemoglobin : Influence of structure of the globin on heme iron., *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 327-386 (1979).
- 3) 松川茂, 馬渡一浩, 米山良昌: ヘモグロビンの酸素化過程における構造変化. *化学の領域*, **32**, 61 - 75 (1978).
- 4) **Perutz, M. F.** : Structure and function of hemoglobin. *Brit. Med. Bull.*, **32**, 195 - 208 (1976).
- 5) **Matsukawa, S., Nishibu, M., Nagai, M., Mawatari, K. & Yoneyama, Y.** : Analysis of optical properties of hemoglobins in terms of the two - state model, especially from studies on abnormal hemoglobins with amino acid substitution in the $\alpha_1\beta_2$ contact region. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2358-2363 (1979).
- 6) **Perutz, M. F.** : Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*, **228**, 726 - 739 (1970).
- 7) **Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J. C.** : On the nature of allosteric transitions : A plausible model. *J. Mol. Biol.*, **12**, 88-118 (1965).
- 8) **Bucci, E. & Fronticelli, C.** : A new method for the preparation of α and β subunits of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, **240**, PC551 - 552 (1965).
- 9) **Banerjee, R. & Cassoly, R.** : Preparation and properties of the isolated α and β chains of human hemoglobin in the ferric state. *J. Mol. Biol.*, **42**, 337-349 (1969).
- 10) **Vickery, L., Nozawa, T. & Sauer, K.** : Magnetic circular dichroism studies of myoglobin complexes. Correlations with heme spin state and axial ligation. *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 343-350 (1976).
- 11) **Perutz, M. F., Fersht, A. R., Simon, S. R. & Roberts, G. C. K.** : Influence of globin structure on the state of the heme. II . Allosteric transitions in methemoglobin. *Biochemistry*, **13**, 2174-2186 (1974).
- 12) **Hopfield, J. J.** : Relation between structure, co-operativity and spectra in a model of hemoglobin action. *J. Mol. Biol.*, **77**, 207-222 (1973).
- 13) **Nagai, K.** : The effect of ferric ligands on the oxygen affinity of the ferrous subunits in valency hybrid haemoglobins. *J. Mol. Biol.*, **111**, 41-53 (1977).
- 14) **Baldwin, J. & Chothia, C.** : Haemoglobin : The structural changes related to ligand binding and its allosteric mechanism. *J. Mol. Biol.*, **129**, 175-220 (1979).
- 15) **Ogata, R. T. & McConnell, H. M.** : The binding of a spin-labeled triphosphate to hemoglobin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **36**, 325-336 (1971).

Structure and Function of Valency Hybrid Hemoglobins—Kazuhiro Mawatari, Department of Biochemistry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Juzen. Med. Soc.*, 89, 166–176 (1980).

Abstract Oxygen equilibrium curves of various (F, H₂O, N₃ and CN) derivatives of valency hybrid hemoglobins ($\alpha_2^+\beta_2$ and $\alpha_2^+\beta_2$, + denotes ferric heme) were precisely determined by an automatic recording method either in the presence or absence of inositol hexaphosphate (IHP), and were analyzed in terms of the two-state allosteric model of Monod, Wyman and Changeux. The curve calculated with a pair of allosteric parameters, L and c thus obtained for each hemoglobin was found to well fit the experimental curve. The results obtained from this analysis were as follows.

1. In the absence of IHP, the high spin (F or H₂O) derivatives of both hybrids have always large L and small c, while the low spin (N₃ or CN) have small L and large c. An inverse relationship was observed to exist between L and c.

2. IHP increases L and decreases c of all the hemoglobins and their derivatives except $\alpha_2\beta_2^{+N_3}$ and $\alpha_2\beta_2^+$ have nearly equal c value.

Magnetic circular dichroism (MCD) in the Soret region and circular dichroism (CD) as well as [deoxy minus oxy]- or IHP induced-difference spectra in the UV region were measured to clarify how the structure of heme and globin participates in the allosteric properties.

1. IHP can affect the tertiary structure, especially heme vicinity of the deoxy chains but exert a little effect on the spin equilibrium of the ferric heme.

2. The MCD intensity $[\theta]_M$ at 408nm of the deoxy hybrids correlates with L.

3. Judging from the CD spectra and the difference spectra of the deoxy hybrids, $\alpha_1\beta_2$ contact region of the high spin derivatives was confirmed to have the structure characteristic of the T structure, while that of low spin derivatives the character of the R structure, which is changed to that of the T structure upon the addition of IHP.

On the basis of the above results, the allosteric mechanism of hemoglobin was discussed.