

異常ヘモグロビン,Hb J Capetown,Hb
Chesapeake,Hb Yakima,Hb
Kempseyの吸収スペクトル並びに円偏光二色性とそ
れらに対するイノシトールヘキサリン酸の効果につ
いて

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/2297/8684

異常ヘモグロビン, Hb J Capetown, Hb Chesapeake, Hb Yakima, Hb Kempsey の吸収スペクトル並びに円偏光二色性とそれらに対するイノシトールヘキサリン酸の効果について

金沢大学医学部附属病院検査部 (部長: 松原藤継教授)

金沢大学医学部生化学第1講座 (指導: 米山良昌教授)

西 部 万 千 子

本論文の要旨は第47回日本生化学会総会 (1974年), 第39回日本血液学会総会 (1977年) において発表した。
(昭和52年6月23日受付)

Model¹¹⁾ にもとづいて議論した。

実験材料及び方法

I. 試薬

(bis(2-hydroxy-ethyl) imino-tris (hydroxy-methyl)methane, (bis-tris と省略) 及び IHP は Sigma 社のものを用いた。

II. ヘモグロビンの調製

正常ヒト溶血液から遠心 (10,000r.p.m., 25分) によりゴーストを取り除いた上澄を Hb A として用いた。異常 Hb を有する患者赤血球は, 生理食塩水で洗った後, 保存液 (40%グリセロール, 0.04Mリン酸緩衝液, pH7.0) 中に懸濁し, -80°C で保存した。異常 Hb は, diethyl amino ethyl (DEAE) セルロースカラムクロマトグラフィーにより Hb A から, 長井らの方法⁹⁾ で次のように分離精製した。まず, 保存血球を解凍後, 水に対して透析溶血し, 遠心によりゴーストを除去した。上清をセファデックス G-25に通して0.01Mトリス緩衝液, pH8.3に交換し, 同じ緩衝液で平衡化した DEAE セルロース (DE⁻32, Whatman) カラムにのせ, 0から0.1M食塩勾配で Hb A と分離した。Hb A と分離の容易な Hb J Capetown, Hb Chesapeake は $1.5 \times 20\text{cm}$ のカラムを, 分離の困難な Hb Yakima, Hb Kempsey は $1.5 \times 45\text{cm}$ のカラムを用いた。1回の分離には, 約40mg (赤血球量にして約2ml) のヘモグロビンを用

アロステリック蛋白として知られるヘモグロビン (Hb) は, 二種のサブユニットからなる $\alpha_2\beta_2$ 四量体である。この Hb に酸素が結合した場合, Hb の三次, 四次構造が大きく変化することが知られている。異名鎖間の接触面は, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_1\beta_2$ と2ヶ所存在し, X線回折等の研究により, 特に $\alpha_1\beta_2$ 接触面が Hb に酸素がつく際大きく変化することが報告されている¹⁾。また, この $\alpha_1\beta_2$ 接触面にアミノ酸置換を有する異常 Hb では, アロステリック蛋白としての協同性に変化をきたすものが多いことから, $\alpha_1\beta_2$ 接触面はヘモグロビンの機能に重要な部位であることがわかる。

本研究では, $\alpha_1\beta_2$ 接触面にアミノ酸置換を有する異常 Hb のうち, Hb J Capetown ($\alpha_1^{92\text{Arg}}\beta_2^{\text{Glu}}$)²⁾³⁾, Hb Chesapeake ($\alpha_1^{92\text{Arg}}\beta_2^{\text{Leu}}$)⁴⁾⁵⁾, Hb Yakima ($\alpha_1\beta_2^{92\text{Asp} \rightarrow \text{His}}$)⁶⁾⁷⁾, Hb Kempsey ($\alpha_1\beta_2^{92\text{Asp} \rightarrow \text{Asn}}$)⁸⁾ について, 吸収, および円偏光二色性 (CD) スペクトルを測定し, これらの Hb において, アミノ酸置換がヘムの電子状態にどのように影響しているかについて検討した。又, これらの異常 Hb は, 強力なアロステリックエフェクターであるイノシトールヘキサリン酸 (IHP) により機能回復がみられるが⁹⁾¹⁰⁾, IHP がスペクトル面にも大きく影響することがわかった。スペクトル面からみたこれらの異常 Hb の構造とその機能との関連性について, Monod らの Two-State-

Absorption Spectra and Circular Dichroism of Hb J Capetown, Hb Chesapeake, Hb Yakima and Hb Kempsey, and Effects of Inositol Hexaphosphate on those Spectra
Machiko Nishibu Central Clinical Laboratory, Kanazawa University Hospital (Director : Prof. F. Matsubara) The First Department of Biochemistry, (Director : Prof. Y. Yoneyama) School of Medicine, Kanazawa University.

いた。Hb A のサブユニットは Bucci らの方法¹²⁾で分離調製した。

Hbの純度は、discontinuous polyacryl amide ゲル電気泳動(平板ゲルは0.076Mトリスクエン酸緩衝液、pH8.9で調製し、泳動には0.3Mホウ酸緩衝液、pH8.2を用いる。)で調べ、Hb A と異なる位置に単一バンドを示すことで確認した。

有機リン酸塩を含まない Hb (stripped Hb) は、Benesch ら¹³⁾の方法で次のように調製した。0.1M NaClを含む0.05M bis-tris 緩衝液、pH7.0 で平衡化したセファデックスG-25カラム(1.5×50cm)にHb溶液を約2ml (1.5mM) のせ、室温で約5時間かけて溶出した。

Hb濃度は、Hb 溶液(2ml)にピリジン(0.8ml)と1N NaOH (1.2ml)を加えて振盪し、測定直前に少量のジチオナイト($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)を加えてピリジンヘモクロームに変化させ、557nmの吸光度(ヘムのミリモル分子吸光係数、 $34\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)より求めた。

III. ヘモグロビンの酸素平衡

酸素平衡による Hb の機能の測定は、杉田らの分光学的方法¹⁴⁾により、日立分光光度計EPS-2型を用いて25°Cで行なった。機能測定には50 μM Hb(ヘムとして)を用い、deoxygenation は1cm light path のセル付ツンベルグ管で、Qガス(ヘリウム-イソブタン、99.05:0.95)を時々フラッシュしながら吸引して行なった。酸素親和性の高い Hb の場合は、Qガスフラッシュだけでは完全に deoxygenation にくいので、少量の水素化ホウ素ナトリウム(NaBH_4)を加えた。IHP 存在下で pH7.5 以下の場合、一気圧の空気(20%酸素)では完全に oxy Hb になりにくいので、100%酸素ガスを用いた。

IV. ヘモグロビンの分光学的測定

吸収スペクトルは、Cary Model 14自記分光光度計を用い、CD スペクトルは JASCO J-20 自記旋光分散計を用いて25°Cで測定した。CD スペクトルの標準物質としては、d-10 camphor sulfonic acid (290nmで $\text{eR-eL}=2.2\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)を用いた。Hb の CD スペクトルのモル橢円率(θ)は、ヘム当り、 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{dmole}$ であらわした。吸収の微分スペクトルは、日立356二波長分光光度計を用いて、 $\Delta\lambda=1\text{nm}$ で長波長側から測定した。deoxygenation は機能の測定の時と同様に行なった。

IHP を添加した Hb と stripped Hb 間の差スペクトルは、Union SM 401 型分光光度計で次のように測定した。まず、stripped Hb のスペクトルを10回くり返し測定し、得られたデータを直結したコ

ンピューターに加算記憶させる。次に、同じ Hb 溶液に1mM IHPを加えてから、(pH7.0に調整した10mM IHP 溶液の一定量を乾固したものを溶解する。)再び10回くり返してスペクトルを測定し、コンピューターで差を演算させ求めた。

V. データ処理

Soret 帯の CD のモル橢円率(θ)とアロステリック定数(L)との関係は、電子計算機 FACOM F230-35型を用いて、非線形最小二乗最適化法にもとづき解析した。

実験結果

I. 異常ヘモグロビンの吸収、CD スペクトル

四種の $\alpha_1\beta_2$ 接触面アミノ酸変異 Hb の Soret 帯、可視部における吸収、CD スペクトルを測定し、Hb A のスペクトルと比較した。

oxy 型スペクトルは、すべての異常 Hb とも Hb A のスペクトルと大きな差はみられなかった。従って、アミノ酸置換によるヘムの電子状態への影響は、oxy 型では非常に小さいと思われる。

deoxy 型では、機能異常の著しい Hb Yakima, Hb Kempsey に大きなスペクトル変化がみられ、機能異常の程度が小さい Hb Chesapeake や Hb J Capetown では、あまり変化がみられなかった。図1に Hb Yakima 及び Hb Kempsey の吸収、CD スペクトルを示す。この図に明らかなように、oxy 型では CD で僅かな変化がみられるのみで、吸収、CD ともほぼ Hb A のスペクトルに一致した。しかし、deoxy 型では吸収、CD ともに変化は大きい。その主な変化は、

1. Soret 帯の吸収強度の低下 (Hb Yakima で10%, Hb Kempsey で12%), CD の橢円率の低下 (Hb Yakima で21%, Hb Kempsey で26%)
2. Soret 帯 CD の正の極大値の red shift (2nm)
3. 可視部における吸収強度の低下(約4%) CD 橢円率の低下(約22%)
4. 可視部の吸収極大の red shift (1-2nm)
5. 吸収、CD ともに585nm付近に存在する肩の消失であった。

可視部吸収スペクトルの red shift の大きさ、肩の成分の有無を更に詳しく検討する為に、deoxy 型 Hb Yakima と Hb Kempsey の微分スペクトルを測定し、deoxy Hb A と比較した(図2)。Hb A より調製した α , β サブユニットの微分スペクトルも、対照として測定した。 α 鎖と β 鎖間の微分ス

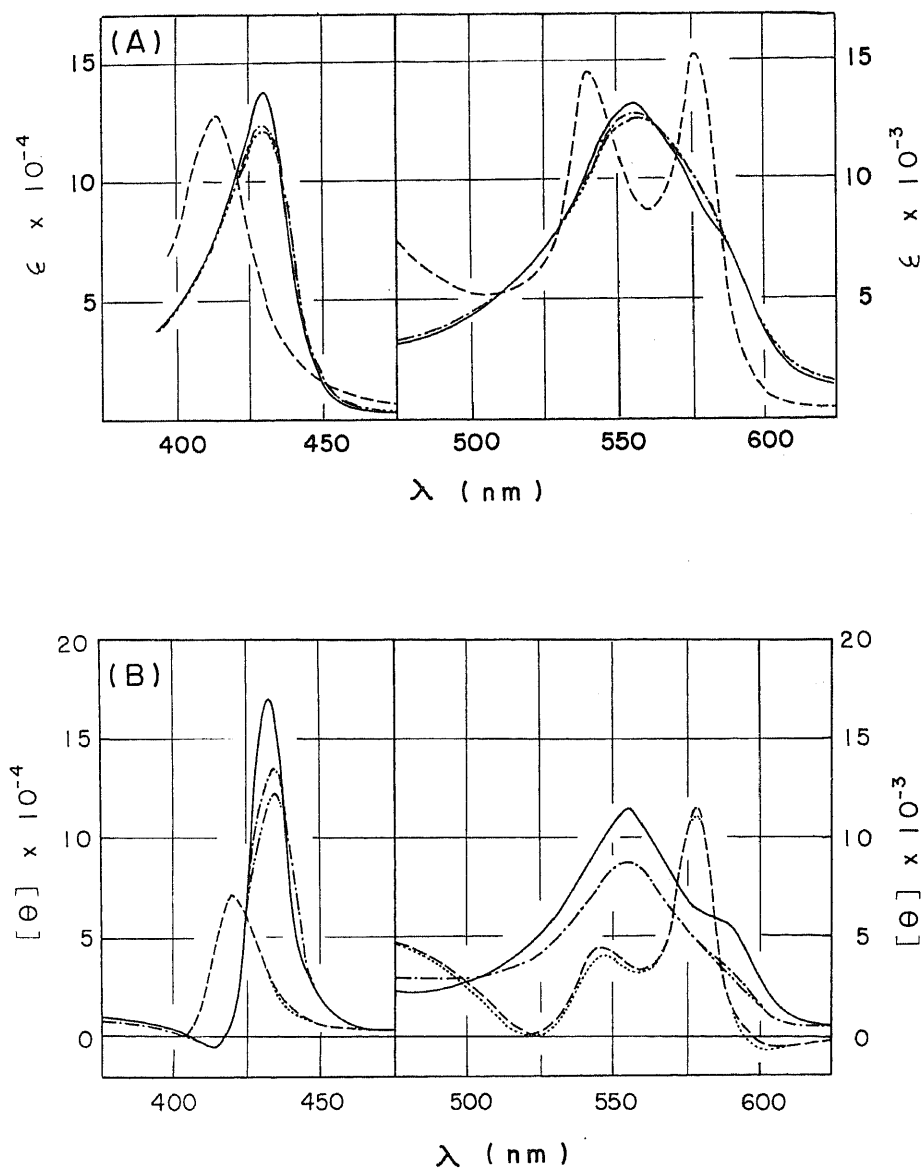


図1. Hb Yakima, Hb Kempsey と HbA の吸収

(A), CD スペクトル (B)

- oxy 型 HbA ;
- oxy 型 Hb Yakima と Hb Kempsey ;
- deoxy 型 HbA ;
- deoxy 型 Hb Yakima ;
- deoxy 型 Hb Kempsey.

可視部 (475-625nm) は Hb 濃度, 100 μ M (heme) で10mmのセルを, Soret 帯 (375-475nm) は Hb 濃度50 μ Mで 2 mmのセルを用いた.
0.1Mリン酸緩衝液, pH7.0, 25°Cで測定.

ベクトルの相違は僅かではあるが存在するが、ここでは、両スペクトルの平均を示した。吸収スペクトルの吸収極大の位置は、一次微分すると0点を通る点となり、又、肩の成分の有無は、微分スペクトル中に屈曲点があるかどうかで判断することができる。図から0点を横切る位置は、Hb A 555nm, Hb Yakima 556nm, Hb Kempsey 557nm, 及びサブユニット560nmとなる。又、580nm付近にみられる屈曲点はいずれの場合もはっきり認められ、肩の成分の存在は確実である。肩の位置はHb A と Hb Yakima はほぼ同じで580nm, Hb Kempsey では583nm, サブユニットは585nmとなり、Hb Kempsey とサブユニットではHb A にくらべ red shift していた。従って、Hb Yakima, Hb Kempsey 及びサブユニットで585nm付近の肩がはっきり認められないのは、555nm付近の red shift, 580nm付近の吸収強度の増加、肩の位置の red shift 及び600nm付近の吸収強度の低下が重なりあった結果と思われる。

図3では、deoxy 型の Hb Kempsey の CD スペクトルを Hb A 及びサブユニットと比較した。この図にみるように、Hb Kempsey のスペクトルの形は Hb A のそれとは大きく変化した。Soret 帯の正の極大の減少、及び red shift, 可視部の楕円率

の低下、肩の消失等の特徴は、むしろ協同性を示さないサブユニットのスペクトルに似ている。

以上のことから、アミノ酸置換による協同性の低下は、ヘムの電子状態が大きく変化したことに起因していることが示唆される。

II. 異常ヘモグロビンの機能に対する IHP の効果

著者らは、先に Hb Yakima 及び Hb Kempsey の機能回復に IHP が著しい効果をもつことを示した⁹⁾。Hb Chesapeake に対する IHP の効果については、今井の報告¹⁰⁾がある。著者は上に述べた異常 Hb のスペクトルに対して、IHP がどのような効果を示すかを調べるに際して、同一条件下でそれぞれの Hb の機能に対する IHP の効果について調べた。異常 Hb の他に、対照として Hb A とそのサブユニットについても調べた。

表1に示すように、Hb Yakima と Hb Kempsey はサブユニットに近い酸素親和性を示し、Hill の n もほぼ1に近く協同性はない。一方、Hb J Capetown は酸素親和性も Hill の n もほぼ Hb A のそれに近く、機能異常の程度が小さいことがわかる。Hb Chesapeake は Hb A とサブユニットの中間的な酸素親和性を示し、又、Hill の n も1.2と小さいが有意に存在する。

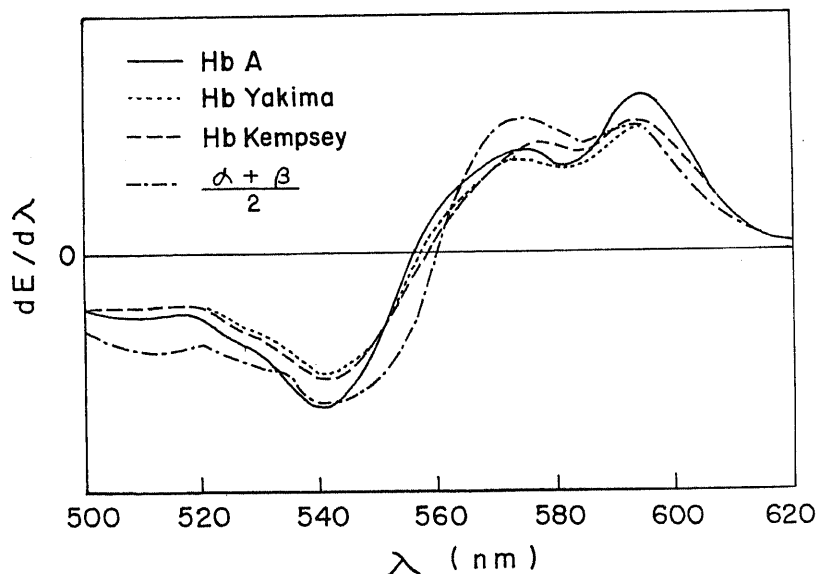


図2. deoxy 型 HbA, Hb Yakima, Hb Kempsey 及びサブユニットの微分スペクトル

Hb 濃度, 100 μ M (heme) でセルの light path は10mm. 0.1Mリン酸緩衝液, pH7.0, 25°Cで測定. $\lambda_1 - \lambda_2 = 1$ nmにとり、長波長側からスペクトルをとった。

これらの異常 Hb に対して, IHP はその酸素親和性を著しく低下 (mmHg にして 5~8 倍) させ, 同時に Hill の n を増加させる. しかし, 酸素親和性も Hill の n も Hb A の値迄に完全に回復してはいない. 異常 Hb の高い酸素親和性と Hill の n の低下は, アロステリック平衡がアミノ酸置換によって極端に R state 側に移行したことによると

考えると, これに対する IHP の効果は, アロステリック平衡の T state 側への平衡の移動によると考えられる. その R-T の平衡定数 L を Edelstein らの式¹⁵⁾を用い, K_R (サブユニットの酸素親和性) を 0.4mmHg とし⁹⁾, Hb の P_{50} (50% 酸素飽和を示す酸素分圧) から計算すると, 表 1 に示したようになる.

Ⅲ. IHP による異常ヘモグロビンの吸収, CD スペ

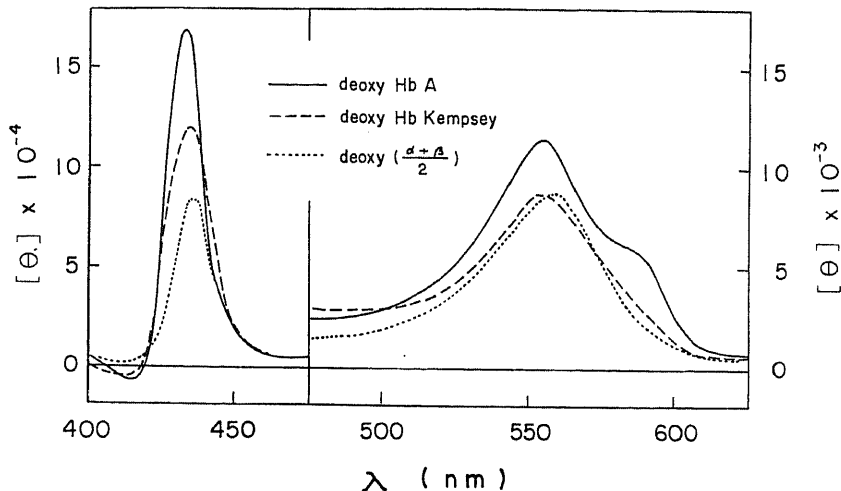


図 3. deoxy 型 Hb A, Hb Kempsey, 及びサブユニットの CD スペクトルの比較

測定条件は図 1 に同じ, サブユニットの α 鎖と β 鎖は異なった CD スペクトルを与えるので²⁴⁾、ここでは各波長における両鎖の平均値を示した。

表 1. ヘモグロビンの機能に及ぼす IHP の効果

Hemoglobin		Hill's n	Affinity (P_{50}) mmHg	Allosteric Constant L
Hb A	-IHP	2.7	5.4	3.3×10^4
	+IHP	2.6	54.0	3.3×10^8
Hb J Capetown	-IHP	2.2	3.0	4.1×10^3
	+IHP	2.4	19.5	5.7×10^6
Hb Chesapeake	-IHP	1.2	0.72	10
	+IHP	1.9	5.6	3.8×10^4
Hb Yakima	-IHP	1.0	0.36	1.0
	+IHP	1.8	2.25	1.0×10^3
Hb Kempsey	-IHP	1.0	0.28	2.5×10^{-1}
	+IHP	1.6	1.40	1.5×10^2
α Chain	-IHP	1.0	0.43	
	+IHP	1.0	0.43	
β Chain	-IHP	1.0	0.25	
	+IHP	1.0	0.25	

50 μ M Stripped Hb (0.05M bis-tris, pH 7.0, 0.1 M NaCl) を用い, 加えた IHP は終濃度 1mM である. Affinity (P_{50}) は 50% HbO_2 を与える時の酸素分圧 (mmHg), Allosteric Constant の L は Edelstein ら¹⁵⁾の式にもとづき $L = (Hb \text{ の } P_{50} / \text{サブユニットの } P_{50})^4$ から求めた. ここではサブユニットの P_{50} を 0.4mmHg⁹⁾ とした。

クトルの変化

1. deoxy Hb における吸収, CD スペクトルの変化

可視部や Soret 帯において, もともと Hb A のスペクトルとあまり差のない Hb J Capetown, Hb Chesapeake では, IHP を添加することによってのスペクトル変化は殆んど見られなかった. しかし, Hb A の吸収, CD スペクトルと異なったスペクトルを与える Hb Yakima, Hb Kempsey では, IHP の添加によって大きく変化し, Hb A に近いスペクトルを与えるようになった (図4). IHP 添加による

Hb Yakima, Hb Kempsey のスペクトル変化を要約すると, 次のようになる.

1) Soret 帯での吸収強度の増加, CD の正の極大の楕円率の増加, 及び極大値の blue shift (435nm から433nmへ)

2) 可視部における吸収極大の位置の blue shift ならびに吸収強度の増加, 585nm付近に肩の出現.

3) 可視部 CD の正の極大の楕円率の増加, 585 nm付近に明瞭な肩の出現.

以上述べたように, Soret 帯及び可視部における異常 Hb と HbA の相違, 又, IHP を加えたことに

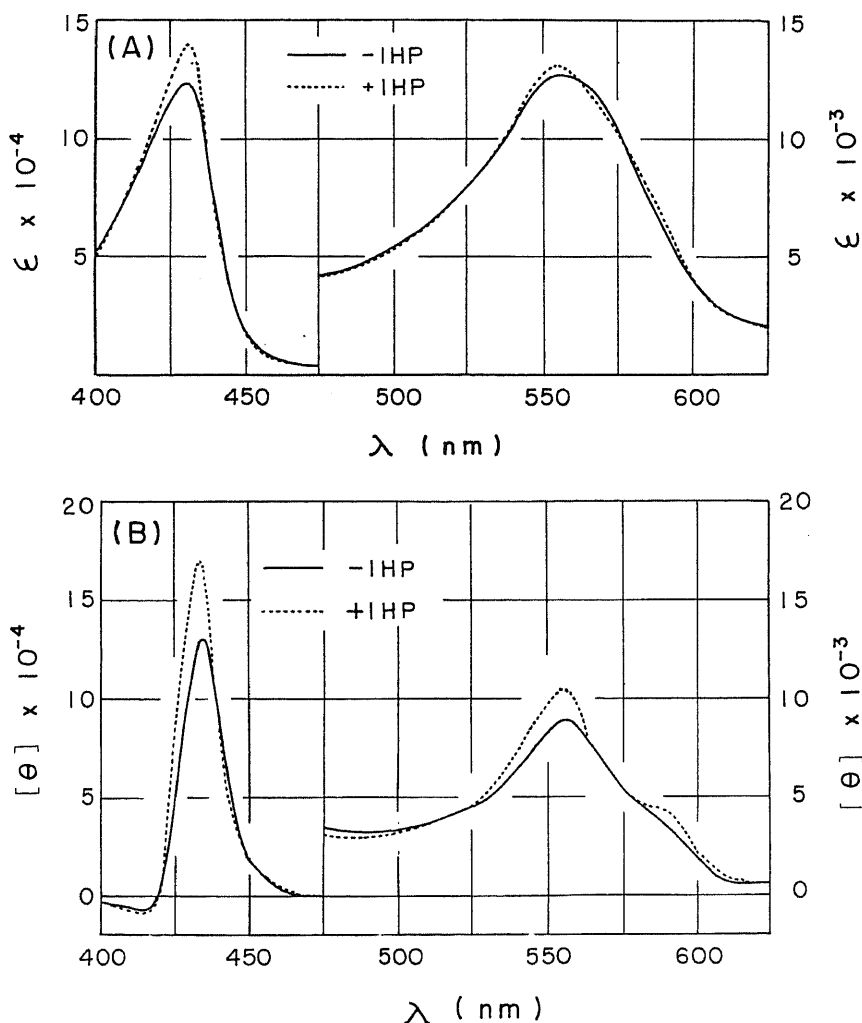


図4. deoxy Hb Yakima の IHP による吸収 (A), CD スペクトル (B) の変化

緩衝液は0.1M NaCl含有の0.05M bis-tris, pH7.0を用い, 他の条件は図1に同じ. 加えた IHP は終濃度 1mM.

よるスペクトル変化は、主に deoxy 型で顕著であった。表2に IHP が存在する場合としない場合の吸収極大の位置、分子吸光係数、CD の極大の位置、モル橢円率を示した。

2. 可視部における IHP 差スペクトル

IHP による吸収スペクトルの変化は oxy 型 Hb でも見られる。図5に可視部における oxy 型、deoxy 型の各 Hb の IHP 差スペクトルを示した。oxy 型ではその変化は Hb A で最も顕著で、次に Hb J Capetown で、酸素親和性の高い Hb Chesapeake, Hb Yakima, Hb Kempsey ではその変化は小さかった。Hb A に IHP を加えると、1 気圧空気 (20% 酸素) の条件では、部分的酸素離脱が起こることが報告されているので¹⁶⁾、ここでは100% 酸素の条件で測定した。100% 酸素下では、低温スペクトル¹⁷⁾と一致するので、酸素の離脱はないと考えてよい。従って、図5に示された差スペクトルは、IHP によりヘムの電子状態が変わったことによるスペクトル変化と見ることができる。

一方、deoxy 型では oxy 型とは逆に Hb Yakima, Hb Kempsey で IHP を加えたことにより、著しいスペクトル変化がみられた。しかし、Hb A、及

び機能変化の小さい異常 Hb では、IHP によるスペクトル変化は殆んどなかった。

考 察

Soret 帯、可視領域の吸収、CDスペクトルは、ヘムの電子状態を知る有力な手段であるが、特に後者では、さらにヘムの立体化学的情報が反映されることが知られている。単離したサブユニットのoxy, deoxy 型スペクトルは、拘束のない場合のヘムの電子状態を表わしていると思われる。サブユニットを再結合させた場合の大きなスペクトル変化は、 α , β 鎖間に相互作用が働き、その蛋白構造が変化してヘムの電子状態に影響を与えた結果と考えられる。サブユニットと $\alpha_2\beta_2$ 四量体としての Hb A の間にみられるスペクトルの相違は、特にCDで著しい。又、異常 Hb にみられるCDスペクトルの変化も特に deoxy 型の Soret 帯で大きいことから、その正の極大のモル橢円率と機能との間に相関関係がみられるかどうか、Monodらの Two-State-Model¹¹⁾にもとづいて検討した。

今、deoxy 型で R state のモル橢円率を $[\theta_R]$ 、T state のモル橢円率を $[\theta_T]$ とし、ある deoxy 型の Hb のスペクトル $[\theta]$ は、 $[\theta_R]$ と $[\theta_T]$ の平

表2. deoxy 型 Hb の吸収 (極大の位置と分子吸光係数) とCD (極大の位置とモル橢円率) のIHPによる変化。

Hemoglobin	Absorption Band		CD Band	
	Max (nm)	$\epsilon \times 10^{-3}$	Max (nm)	$\theta \times 10^{-3}$
Hb A	-IHP 430 555	141 13.3	433 555	173 11.1
	+IHP 430 555	140 13.4	433 555	175 11.5
Hb J Capetown	-IHP 430 555	140 13.3	433 555	171 10.9
	+IHP 430 555	140 13.4	433 555	170 11.0
Hb Chesapeake	-IHP 430 555	140 13.4	433 555	173 11.3
	+IHP 430 555	142 13.4	433 555	170 10.7
Hb Yakima	-IHP 430 556	122 12.9	435 555	135 8.8
	+IHP 430 555	141 13.4	433 555	168 10.5
Hb Kempsey	-IHP 430 557	122 12.8	435 555	128 8.7
	+IHP 430 555	140 13.3	433 555	162 10.9

衡にあるとする。又, deoxy Hb で R state と T state の割合をそれぞれ $[R]$, $[T]$ とすると, $[\theta]$ はその $[R]$, $[T]$ の寄与により次の式であらわされる。

$$[\theta] = \frac{[R]}{[R] + [T]} [\theta_R] + \frac{[T]}{[R] + [T]} [\theta_T] \cdots \cdots (1)$$

ここで, $\frac{[T]}{[R]} = L$ (allosteric constant)

であるから, (1)式は

$$[\theta] = \frac{1}{1+L} [\theta_R] + \frac{L}{1+L} [\theta_T] \cdots \cdots (2)$$

となる。図6に各Hbの $[\theta]$ の実測値を縦軸に、酸素平衡から求めた $1+L$ の値を横軸にプロットした。次にコンピューターでこの各点の誤差が最小となる $[\theta_R]$ と $[\theta_T]$ を求めると、 $[\theta_R]$ は 11.0×10^4 , $[\theta_T]$ は 16.9×10^4 となる。この $[\theta_R]$ の値は、 α , β 両サブユニットの算術平均からの 8.0×10^4 の値よりはかなり高くなった。このことは、deoxy型でのR状態は α 鎖と β 鎖の単なる混合体とは異なることを意味する。又、求められた $[\theta_T]$ の値はHb Aの deoxy 型のモル積

円率とほぼ一致する。

以上述べたように、異常Hbの $[\theta]$ と L の間により相関関係があることがわかった。従って、IHPを加えた時の $[\theta]$ の変化はR-T間の平衡、即ち、 L が大きく変化したことによると考えられる。既に報告されている異常HbのHb Rainier¹⁸⁾, Hb Ube¹⁹⁾, Hb Hiroshima¹⁹⁾やHb AのC末端をカルボキシペプチダーゼAで処理したHb^{20,21)}のSoret帯の $[\theta]$ の値と、各Hbの酸素平衡から求めた $1+L$ の値を図の上にプロットすると、ほぼこの曲線上にのる。従って、この $[\theta]$ と L の相関関係は、ここで用いた $\alpha_1\beta_2$ 接触面変異Hbのみならず他の異常Hb一般にもあてはまることがわかった。このSoret帯のCDは、Hsu²²⁾によればポルフィリンの $\pi\pi^*$ 遷移と周囲の蛋白部分の芳香族アミノ酸との相互作用によるといわれているので、蛋白の高次構造の変化がより敏感に反映されるのであろう。ここでは、Soret帯CDの正の極大値 $[\theta]$ の変化のみで機能との関係を議論したが、更にSoret帯の吸収スペクトルや、可視部にみられる異常Hbの吸収、CDスペクトルの変化も同じ

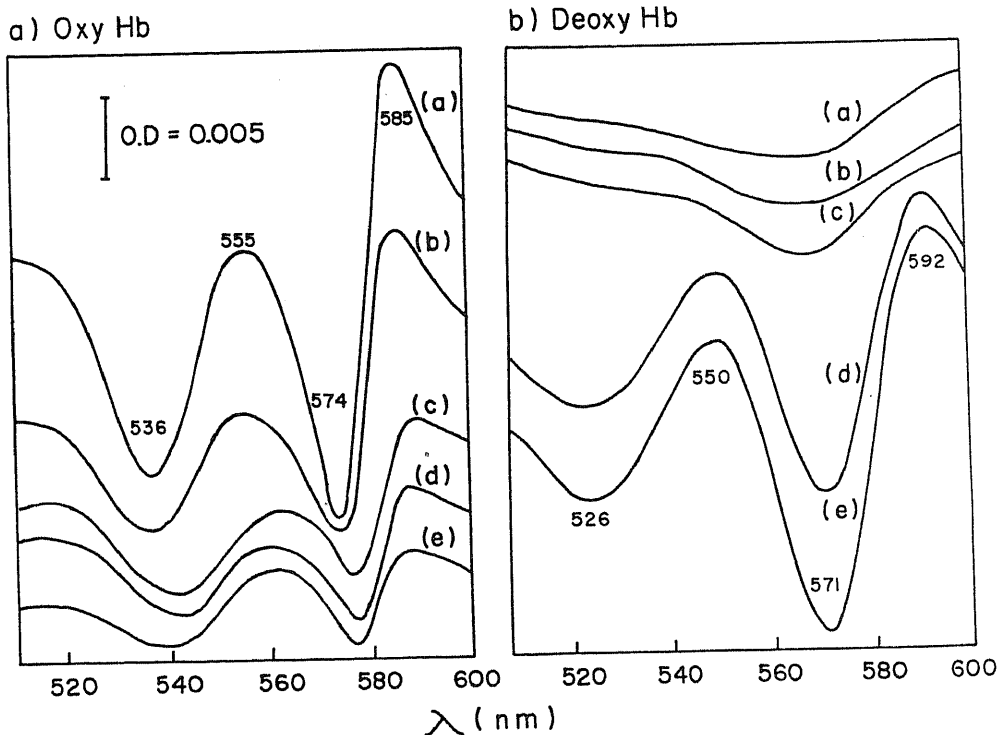


図5. 可視におけるIHP差スペクトル
Hb濃度 $50\mu\text{M}$, 他の条件は図4に同じ。
(a)Hb A, (b)Hb J Capetown, (c)Hb Chesapeake,
(d)Hb Yakima, (e)Hb Kempsey.

ように説明される。すなわち、あるR型のスペクトルと、HbAに近似されるT型のスペクトルがあり、異常Hbはその機能異常の程度によってR型（極端にはサブユニットのスペクトル）に近ずいたり、T型とあまり変らなかったり、又はその中間的なスペクトルを示すものと考えられる。

次に、可視部にみられたoxy型及びdeoxy型でのIHP差スペクトルについて議論する。MonodらのTwo-State-Modelによれば、oxy型（リガンドタイプ）HbにおいてもR-T平衡は存在する。従って図5にみられたoxy型ではHbA、及び正常に近い機能を示す異常Hb（HbJ Capetown）でのIHPによるスペクトル変化は、平衡がIHPにより幾分T側にshiftすることに起因すると考えられる。酸素親和性の著しく高い異常Hb（HbYakima, HbKempsey）では、その平衡はR側に極端に片寄っていると考えると、IHPを加えてもT conformationをとる迄に至らないので差スペクトルは小さい。一方、deoxy型ではHbA及び酸素親和性のそれ程高くない異常Hbにおいては、R-T平衡は殆んどT側に片寄り、Hbの殆んどはT conformationをとる。従って、それに更にIHPを加えてもそれ以上のconformation変化は起こらないのであろう。しかし、機能変化の著しいHbYakima, HbKempseyでは、deoxy型になってR-T平衡がややT側に移行しても依然としてT conformationがとれないと考えられる。そこにIHPを加えると大幅にT側に平衡が移動し、RからT conformationに変化し、

その変化が差スペクトルにあらわれたと考えるとよく説明がつく。

Rerutz¹⁾、やPulsinelli²³⁾はX線回折により、HbYakima, HbKempseyはHbAでdeoxy型を安定化すると考えられる水素結合が、その部位($\beta 99$)のアミノ酸置換によりできにくいことを示唆している。従って、deoxy型におけるHbYakima, HbKempseyのHbAとのスペクトルの相違はそれを反映しているのであろう。又、IHPを加えたことにより、HbYakimaとHbKempseyの酸素親和性は著しく減少し、Hillのnが増大し、協同性を回復していることを考えると、IHPによるスペクトル変化は、deoxyHbYakima, HbKempseyがIHPと結合したことにより、その高次構造がより正常のHbに近ずいたとえられる。

一方、HbChesapeakeやHbJ CapetownのIHPを加えない時の吸収、CDスペクトルは、共にHbAとくらべて大きな相違はない。しかし、IHPを加えたことによるoxy型の差スペクトルはHbAと異なり、このことはHbChesapeake, HbJ CapetownのHbAにくらべ酸素親和性が高く、Hillのnがやや低下しているという機能異常を反映していると思われる。

結 論

$\alpha_1\beta_2$ 接触面にアミノ酸変異を有し、機能異常を伴う異常ヘモグロビン(Hb), HbJ Capetown ($\alpha_2^{92\text{Arg}-\text{Glu}}\beta_2$), HbChesapeake ($\alpha_2^{92\text{Arg}-\text{Leu}}\beta_2$), HbYakima

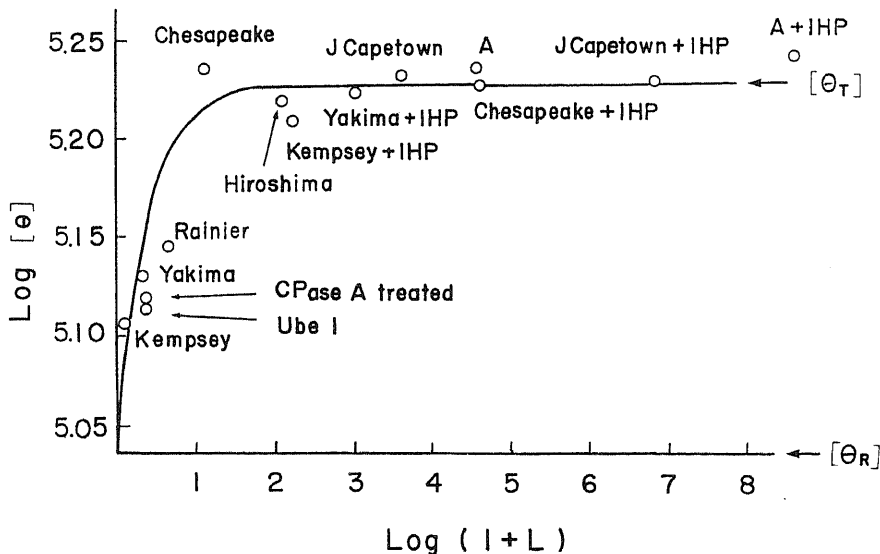


図6. deoxy型HbのSoret帯におけるモル比率とアロステリック定数Lとの関係

($\alpha_1\beta_2^{99\text{Asp-His}}$), Hb Kempsey ($\alpha_1\beta_2^{99\text{Asp-Asn}}$) について, 350nmから650nmの波長域の吸収, 円偏光二色性(CD)スペクトルを測定し次の結果を得た.

1. oxy型 Hb では, いずれの異常 Hb も Hb A と比べて吸収, CD共に大きなスペクトルの差はなかった.

2. deoxy型 Hb では, Hb J Capetown, Hb Chesapeake で Hb A と比べてスペクトルの差はないが, Hb Yakima, Hb Kempsey で次の点に大きなスペクトルの変化がみられた.

1). Soret 帯における吸収強度の低下 (10%減少), CD の正の極大の red shift (2nm), 楕円率の低下 (25%減少)

2). 可視部の 555nm の吸収極大の red shift (1-2 nm), 吸収強度及び楕円率の低下, 585nm にみられる肩の消失.

3. 強力なアロステリックエフェクターであるイノシトールヘキサリン酸 (IHP) が吸収, CD スペクトルに与える効果について調べた. その結果,

1). oxy 型 Hb の IHP 差スペクトルでは, HbA と Hb J Capetown に IHP による大きな変化がみられたが, 他の異常 Hb では変化が小さかった.

2). deoxy 型 Hb では, oxy 型の時と逆に Hb Yakima, Hb Kempsey に IHP による大きなスペクトル変化がみられたが, Hb A では変化がなかった. IHP によるスペクトル変化によって, Hb Yakima, Hb Kempsey のスペクトル異常は解消し, Hb A のスペクトルに近くなった.

4. 同一条件で上記の異常Hbの機能を測定し, その機能に及ぼす IHP の影響について調べ, 異常 Hb の吸収, CDスペクトル, 及びそれらに対する IHP の効果と機能との関連性について, Monod らの Two-State-Model にもとづいて議論した.

謝 辞: 稿を終るに臨み, 御校閲を賜った松原藤継教授, 御指導, 御校閲を賜った米山良昌教授に感謝の意を捧げるとともに, 研究遂行に際し, 御指導, 御協力を頂きました本学医療技術短期大学の長井雅子助教授, 医学部第一生化学教室の松川茂学士に感謝します. 本研究の一部は, 文部省科学研究費 (844029), (957030), (968026) 内藤研究助成金 (74-126), 三菱財団自然科学助成金 (昭和51年度) によって行われ, 記して感謝します.

又, 貴重な試料を提供された Johns Hopkins 大学, S. Charache 博士 (Hb Chesapeake), Cape-Town 地域血液型研究所, M. C. Botha 博士 (Hb J Capetown), Oregon大学, R. T. Jones 博士 (Hb Yakima), Kanematsu 研究所 Sydney 病院, S. Gordon 博士 (Hb Kempsey) に感謝します.

文 献

- 1) Perutz, M. F. & TenEyck, L. F. : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 36, 295 (1971).
- 2) Botha, M. C., Beale, D., Isaacs, W. A. & Lehmann, H. : Nature, 212 792 (1966).
- 3) Nagel, R. L., Gibson, Q. H. & Jenkins, T. : J. Mol. Biol., 58, 643 (1971).
- 4) Clegg, J. B., Naughton, M. A. & Weatherall, D. J. : J. Mol. Biol., 19, 91 (1966).
- 5) Gibson, Q. H. & Nagel, R. L. : J. Biol. Chem., 249 255 (1974).
- 6) Jones, R. T., Osgood, E. E., Brimhall, B. & Kobber, R. D. : J. Clin. Invest., 46, 1840 (1967).
- 7) Novy, M. J., Edwards, M. J. & Metcalf, J. : J. Clin. Invest., 46, 1848 (1967).
- 8) Reed, C. S., Hampson, R., Gordon, S., Jones, R. T., Novy, M. J., Brimhall, B., Edward, M. J. & Koler, R. D. : Blood, 31, 623 (1968).
- 9) Nagai, M., Nishibu, M., Sugita, Y. & Yoneyama, Y. : J. Biol. Chem., 250, 3169 (1975).
- 10) Imai, K. : J. Biol. Chem., 249, 7607 (1974).
- 11) Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J. P. : J. Mol. Biol., 12, 88 (1965).
- 12) Bucci, E. & Fronticelli, C. : J. Biol. Chem., 240, 551 (1965).
- 13) Benesch, R., Benesch, R. E. & Yu, C. I. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 59, 526 (1968).
- 14) Sugita, Y. & Yoneyama, Y. : J. Biol. Chem., 246, 389 (1971).
- 15) Edelstein, S. J. : Nature, 230, 224 (1971).
- 16) Gibson, Q. H. & Gray, R. D. : Biochim. Biophys. Res. Commun., 41, 415 (1970).
- 17) Adams, M. L. & Schuster, T. M. : Biochim. Biophys. Res. Commun., 58, 525 (1974).
- 18) Nagai, M., Sugita, Y. & Yoneyama, Y. : J. Biol. Chem., 247, 285 (1972).
- 19) 米山良昌, 長井雅子, 杉田良樹, 宮地隆興, 山田兼雄, 柴田 進 : 臨床化学シンポジウム, 12, 178 (1972).

- 20) Sugita, Y., Nagai, M. & Yoneyama, Y. : J. Biol. Chem., 246, 383 (1971).
21) Bonaventura, J., Bonaventura, C., Giardina, B., Antonini, A., Brunori, M. & Wyman, J. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 69, 2174 (1974).
22) Hsu, M. C. & Woody, R. W. : J. Amer. Chem. Soc., 93, 3515 (1971).
23) Pulsinelli, P. D. : J. Mol. Biol., 74, 57 (1973).
24) Nagai, M., Sugita, Y. & Yoneyama, Y. : J. Biol. Chem., 244, 1651 (1969).

A b s t r a c t

The absorption spectra and circular dichroism (CD) of abnormal hemoglobins were measured over the range of 350 to 650 nm. Abnormal hemoglobins, Hb J Capetown ($\alpha_1^{92\text{Arg}\rightarrow\text{Glu}}\beta_2$), Hb Chesapeake ($\alpha_1^{92\text{Arg}\rightarrow\text{Leu}}\beta_2$), Hb Yakima ($\alpha_2\beta_2^{99\text{Asp}\rightarrow\text{His}}$) and Hb Kempsey ($\alpha_2\beta_2^{99\text{Asp}\rightarrow\text{Asn}}$), in which amino acids at $\alpha_1\beta_2$ contact were substituted, were used in the present experiments.

1. In the oxygenated state, the absorption and CD spectra of these abnormal hemoglobins did not show any large differences from those of Hb A in the all spectral regions measured.
2. In the deoxygenated forms, the spectra of Hb Chesapeake and Hb J Capetown were not very different from those of Hb A, while the spectra of Hb Yakima and Hb Kempsey differed markedly from those of Hb A as follows;
 - 1) The absorption maximum at Soret band was decreased (10%). The positive extremum of CD at Soret band was redshifted (2 nm), and the molar ellipticity was greatly decreased (25%).
 - 2) The absorption maximum at 555 nm was redshifted (1-2 nm). The maximum of absorption and CD spectra around 555 nm was decreased. A shoulder at 585 nm of Hb A could not be found in the spectra of Hb Yakima and Hb Kempsey.
3. The effects of inositol hexaphosphate (IHP) on absorption and CD spectra of hemoglobins were measured.
 - 1) In the oxygenated forms, large spectral changes due to IHP were shown in Hb A and Hb J Capetown, but small spectral changes were found in Hb Chesapeake, Hb Yakima and Hb Kempsey.
 - 2) Conversely, in the deoxygenated forms, large spectral changes due to IHP were shown in both Hb Yakima and Hb Kempsey, but no apparent changes found in Hb A, Hb J Capetown and Hb Chesapeake.
4. The oxygen equilibrium of abnormal hemoglobins and the effects of IHP on these functions were measured. The correlations between spectra and function of these abnormal hemoglobins were discussed according to Two-State-Model by Monod, et al..