

Mechanisms for the Autoxidation of Hemoglobin A, Hemoglobin Kempsey (β 99sap \rightarrow asn) and Myoglobin

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/2297/7635

正常ヘモグロビン (Hemoglobin A), 異常ヘモグロビン (Hemoglobin Kempsey (β 99asp \rightarrow asn)) および ミオグロビンの自動酸化反応機構

金沢大学医学部生化学第一講座 (主任: 米山良昌教授)

滝 沢 剛 則

(昭和59年1月14日受付)

ヘモグロビン (hemoglobin, Hb) は空気中で自動酸化してメトヘモグロビン (methemoglobin, metHb) に変化するが, その反応機構については不明な点が多い. 本稿では, 正常ヘモグロビン A (hemoglobin A, Hb A), β 鎖に異常アミノ酸置換があり酸素親和性の異常に高い異常ヘモグロビン Kempsey (hemoglobin Kempsey, Hb Kempsey) ($\beta_{99asp-asn}$), および単量体ヘムタンパク質であるミオグロビン (myoglobin, Mb) の自動酸化反応機構を等電点電気泳動法を用いて解析した. その結果, Hb A および Hb Kempsey の自動酸化反応途中でオキシヘモグロビン (oxyhemoglobin, oxyHb), metHb 以外に 2 種類の間mediate Hb($\alpha^{2+}\beta^{3+}$)₂, ($\alpha^{3+}\beta^{2+}$)₂ が形成することが明らかとなった. oxyHbA, oxyHb Kempsey およびオキシミオグロビン (oxymyoglobin, oxyMb) の自動酸化反応は, いずれも種々の条件下で一次反応で進行し, カタラーゼ, superoxide dismutase (SOD) により抑制された. これらの結果から, Hb および Mb の自動酸化反応に H₂O₂, O₂ の関与する反応過程が示唆された. また, oxyHbA は Hb のアロステリックエフェクターとして知られるイノシトール 6 リン酸 (inositol hexaphosphate, IHP) 添加により, 自動酸化速度が著しく促進された. 一方, oxyHb Kempsey の自動酸化反応は oxyHbA に比し遅く, また, IHP 添加による効果はほとんど認められなかった. これらの結果は, Hb の四次構造が R 状態 (Relaxed form, oxyHb A の四次構造) よりも T 状態 (Tense form, deoxyhemoglobin の四次構造) において自動酸化速度が速いことを示している. また, Hb Kempsey の自動酸化速度が遅いことは, Hb Kempsey の四次構造が R 状態に偏位していることで説明できる. Mb の自動酸化反応過程は H₂O₂ や O₂ が関与している点など Hb と類似点もあるが, 単量体であるため中間体の形成がなく, Hb の自動酸化反応の単純なモデルとして有用と考えられる.

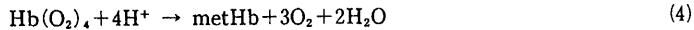
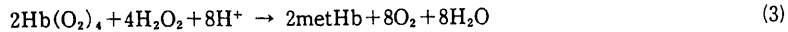
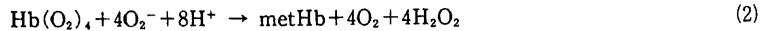
Key words Autoxidation, Hemoglobin A, Hemoglobin Kempsey, Myoglobin.

ヘモグロビン (hemoglobin, 以下 Hb と略) は空气中に放置しておくともメトヘモグロビン (methemoglobin, 以下 metHb と略) に変化する. いわゆる自動酸化することが知られている¹⁻³⁾. しかしながらそのメカニズムについては不明な点が多い. Winterbourn らは酸素化ヘモグロビン (oxyhemoglobin, 以下 oxyHb と略) の自動酸化反応について次頁の反応式を考えた.

これらの反応式は, 単量体ヘムタンパク質であるミオグロビン (myoglobin, 以下 Mb と略) の自動酸化反応で示唆されてきたが³⁾, これらの反応式の妥当性についてはまだ十分に検討されていない.

一方, Hb は α 鎖, β 鎖による 4 量体ヘムタンパクであるが, Mansouri らは α 鎖, β 鎖の間に自動酸化速度の違いがあることから, oxyHb 自動酸化の経過中に

Mechanisms for the Autoxidation of Hemoglobin A, Hemoglobin Kempsey ($\beta_{99asp-asn}$) and Myoglobin. **Takenori Takizawa**, Department of Biochemistry (I), (Director: Prof. Y. Yoneyama), School of Medicine, Kanazawa University.



$(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ と $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ の原子価雑種ヘモグロビン (以下原子価雑種 Hb と略) が生成するだろうと推定した⁵⁾。最近 Tomoda らは等電点電気泳動を用いることにより $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$, $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ の原子価雑種 Hb を同定し, 種々の酸化剤による oxyHb の酸化反応の経過中に上記 2 種の間mediateヘモグロビン (以下中間体 Hb と略) が生成されることを証明した⁶⁾⁻⁹⁾。しかし, Hb の自動酸化反応の途中でこれら中間体 Hb ができるといふことは, 明らかではなかった。本稿では, 1) 正常ヒト赤血球より得られたヘモグロビン (hemoglobin A, 以下 Hb A と略), 2) 酸素親和性が非常に高く 4 量体の高次構造が R 構造 (Relaxed form, oxyHb A 構造) に偏位しているヘモグロビン Kempsey (hemoglobin Kempsey ($\beta_{99\text{asp}}-\text{asn}$)¹⁰⁾¹¹⁾, 以下 Hb Kempsey と略) および 3) 単量体である Mb の等電点電気泳動を種々の条件下で検討した。そして, $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$, $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ などの中間体 Hb の存在を等電点電気泳動法で明らかにするとともに, これらの時間的変動を詳しくしらべた。これらの結果から, Hb, Mb の等電点電気泳動に H_2O_2 , O_2^- が関与していること, 中間体 Hb が形成されること, そして, Hb 自動酸化反応が Hb の高次構造と密接に関連していることを明らかにし, Hb および Mb の自動酸化機構を検討した。

材料および実験方法

1. oxyMb の調製

ウマ Mb 粉末 (Sigma 社, 米国) を蒸留水に溶解し不溶物を遠心分離した。得られた上清は 10 mM リン酸緩衝液 pH 6.8 で平衡化した CM-Sephadex C-50 (生化学工業, 東京) (2 × 5 cm) カラムに吸着させた。以下のカラム操作はすべて 4°C で行った。上記緩衝液と 10 mM K_2HPO_4 溶液それぞれ 100 ml ずつの pH 勾配で溶出し, メトミオグロビン (metmyoglobin, 以下 metMb と略) を精製した。得られた metMb (Fe^{3+}) 溶液に過剰のジオチナイト (和光純薬, 東京) を加え, 還元型 Mb (Fe^{2+}) に変換した。次に, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.6, 7.0, 7.4, 7.8) で平衡化した Sephadex G-25 (coarse grade, Pharmacia 社, スエーデン) (2 × 25 cm) カラムに還元型 Mb (Fe^{2+}) を通して試料を得た。

2. Mb の自動酸化反応の測定

前述の溶出液について実験を行った。すなわち, 小試験管に試料を分注し, カタラーゼ (EC, 1. 11. 1. 6) (Boehringer Mannheim 社, 西ドイツ), superoxide dismutase (以下 SOD と略) (EC 1. 15. 1. 1) (Sigma 社, 米国) 存在下または非存在下で, 37°C において自動酸化反応をしらべた。約 50 μl の試料を一定時間ごとにとり出し, Ampholine polyacrylamide gel (LKB 社, スエーデン) にのせ等電点電気泳動 (4°C, pH 3.5-9.5) を行った。電気泳動終了後ゲルをトリクロロ酢酸溶液で固定し, oxyMb, metMb の割合を下記の Hb と同様の方法で求めた。

3. Hb A と Hb Kempsey の調製

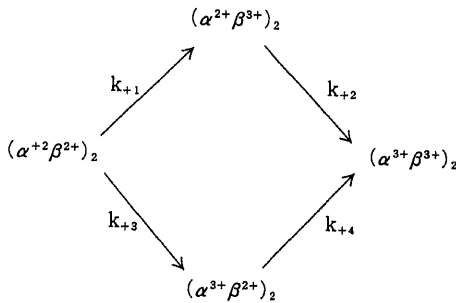
Hb A, Hb Kempsey は Matsukawa らの方法¹²⁾ に従い, Hb Kempsey の患者溶血液を DEAE-Cellulose (DE 32 Whatman 社, 英国) (2 × 60 cm) カラムに通すことにより分離精製した。Hb A と Hb Kempsey の純度は Ampholine polyacrylamide gel 等電点電気泳動 (pH 3.5-9.5) で検定したが, 両者の混合はまったく認められなかった。これらの Hb 溶液は, Dowex 1 × 8 (室町化学, 東京) (1 × 5 cm) カラムに通し 2, 3-ジホスホグリセリン酸を除いた。さらに 10 mM リン酸緩衝液 pH 7.0 で平衡化した Sephadex G-25 (coarse grade) (2 × 25 cm) カラムに通した。溶出液にはカタラーゼ, SOD 活性は認められなかった。

4. Hb A, Hb Kempsey の自動酸化反応の測定

Hb A 溶液 (ヘム濃度 450 μM), Hb Kempsey 溶液 (ヘム濃度 370 μM) をそれぞれ小試験管に分注しイノシトール 6 リン酸 (inositol hexaphosphate 以下 IHP と略) (Sigma 社, 米国) 存在下, 非存在下, また, カタラーゼ, SOD 存在下, 非存在下で 37°C において自動酸化反応をしらべた。約 50 μl の試料を一定時間ごとにとり出し, Ampholine polyacrylamide gel にのせ等電点電気泳動 (4°C, pH 3.5-9.5) を行った。電気泳動終了後ゲルをトリクロロ酢酸で固定し, ゲルスキャン (島津二波長 tlc スキャナー LS-900) を行った¹³⁾。oxyHb, 原子価雑種 Hb ($(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$, $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$), メトヘモグロビン (methemoglobin, 以下 met Hb と略) の割合はチャート用紙を切り取り, 各重量を測定することにより求めた。得られた値は以下の式にあて

はめた。Scheme に示す反応速度定数を用いて oxyHb, $(\alpha^{2+}\beta^3)_2$, $(\alpha^3+\beta^{2+})_2$, metHb の変動値を(1)~(4)式のようにあらわすことができる⁹⁾。

[Scheme]



$$f_1 = e^{-(k_{+1}+k_{+3})t} \quad (1)$$

$$f_2 = \frac{k_{+1}}{k_{+1}+k_{+3}-k_{+2}} [e^{-k_{+2}t} - e^{-(k_{+1}+k_{+3})t}] \quad (2)$$

$$f_3 = \frac{k_{+3}}{k_{+1}+k_{+3}-k_{+4}} [e^{-k_{+4}t} - e^{-(k_{+1}+k_{+3})t}] \quad (3)$$

$$f_4 = 1.0 - (f_1 + f_2 + f_3) \quad (4)$$

反応速度定数 $k_{+1} \sim k_{+4}$ は, (1)~(4)式を用いて実測値と最も適合する値を最小二乗法により求めた⁹⁾。

成 績

1. Mb 自動酸化におよぼすカタラーゼおよび SOD の影響

1) Mb 自動酸化反応の等電点電気泳動法による分析

Mb を pH 7.0, 37°C において 4 時間孵置すると, Mb の自動酸化は部分的に進行する。この試料について等電点電気泳動法で分析した(図 1(a))。対照の oxyMb, metMb がまったく異った位置に泳動されるので, これらの Mb が等電点電気泳動法で十分に同定できることが明らかになった。この電気泳動の結果をゲルスキャンで分析したものが図 1(b)である。それぞれのピークから oxyMb, met Mb の割合を求め, それぞれ 44.2%, 55.8% であった。

2) Mb 自動酸化におよぼすカタラーゼ, SOD の影響

pH 7.0 において, カタラーゼおよび SOD 存在下,

非存在下で oxyMb の自動酸化反応を等電点電気泳動でしらべた。その結果, oxyMb は metMb へ経時的に変化し, その反応は一次反応であった(図 2)。これらの結果から, 見かけの一次反応定数 (k_{obs}) を求めた。カタラーゼ, SOD 非存在下では $k_{obs} = -0.153 \text{ h}^{-1}$ であった。一方, カタラーゼ存在下では $k_{obs} = -0.105 \text{ h}^{-1}$ であり酵素が存在しない場合に比し 31% の減少, SOD 存在下では $k_{obs} = -0.137 \text{ h}^{-1}$ であり 10% の減少, 両酵素存在下では $k_{obs} = -0.100 \text{ h}^{-1}$ であり 35% の減少がみられた。

II. Hb A, Hb Kempsey の自動酸化におよぼす

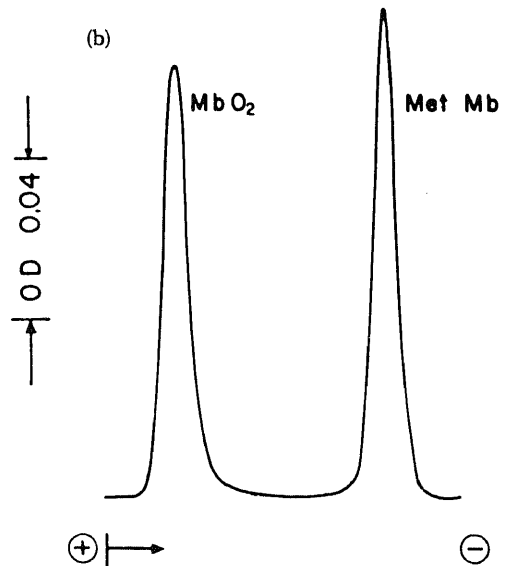
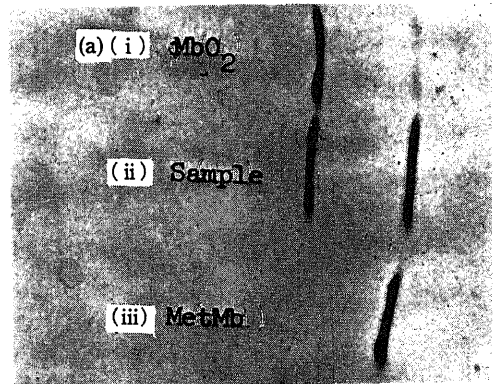


Fig. 1. Isoelectric-focusing pattern of partially autoxidized myoglobin (Mb) (a) Protein band pattern of partially autoxidized Mb (ii) compared with that of authentic oxyMb (i) and metMb (iii). (b) Gel-scanning pattern of partially autoxidized Mb performed at 630 nm with a gel scanner.

カタラーゼ, SOD および IHP の影響

1) 部分的に自動酸化した Hb A, Hb Kempsey の等電点電気泳動パターン

図3に種々の条件下で Hb A, Hb Kempsey の自動酸化を行い(30時間), それらについて等電点電気泳動法でしらべた結果を示す。その結果, oxyHb, metHb のみならず2種類の間体 Hb, すなわち $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ と $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ の原子価雑種 Hb が存在していることが示された。これらの原子価雑種 Hb は等電点電気泳動終了後の位置から, 陽極側より $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$, $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ である¹³⁾。図3のうち Hb A (+Enz) (カタラーゼ, SOD 存在下のもの) の等電点電気泳動ゲルスキャンしたものが図4(a), (b)である。Mb の場合と同様にそれぞれのピークの面積から oxyHb, $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$, $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$, metHb の割合(%)を求めることができる。この場合, oxyHb は 29.7%, $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ は 22.9%, $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ は 27.8%, metHb は 19.6% であることが明らかとなった(図4(a))。

2) oxyHb A の自動酸化反応での経時的変化

図5は種々の条件下における oxyHb A の経時的変化を等電点電気泳動法で分析した結果である。oxyHb A は条件によって反応速度に違いはあるが, すべて一次反応で減少した。カタラーゼ, SOD 両酵素ともない場合には, oxyHb A の自動酸化速度(kobs)は IHP 存在下で顕著に促進した [$k_{obs} = -7.06 \times 10^{-2} \text{h}^{-1} (-1 \text{HP})$, $-14.02 \times 10^{-2} \text{h}^{-1} (+1 \text{HP})$]。カタラーゼおよび SOD の添加により oxyHb A の自動酸化速度は, 1

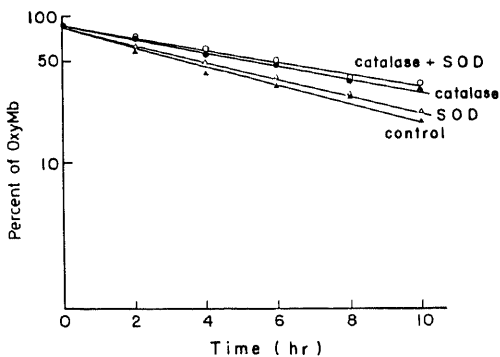


Fig. 2. Semilogarithmic plot of fractions of oxyMb during autoxidation

The autoxidation of Mb was studied at pH 7.0, at 37°C in the presence or absence of catalase (1300 units) and superoxide dismutase (SOD) (29 units), \blacktriangle , control; \triangle , SOD (+); \bullet , catalase (+); \circ , catalase+SOD (+)

The percentage fractions of oxyMb during the autoxidation of Mb were determined by analysis by isoelectric-focusing electrophoresis.

HP 存在下では 43.6% ($k_{obs} = -3.98 \times 10^{-2} \text{h}^{-1}$), 非存在下では 28.5% ($k_{obs} = -10.02 \times 10^{-2} \text{h}^{-1}$) 酵素を添加しない場合に比し減少した。

3) Hb A 自動酸化反応での oxyHb, 間体 Hb および metHb の経時的変化

種々の条件下において, Hb の自動酸化反応を等電点電気泳動法で詳しく検討した。oxyHb, 間体 Hb, metHb は図6(a)-(b)に示すように変化した。いずれの

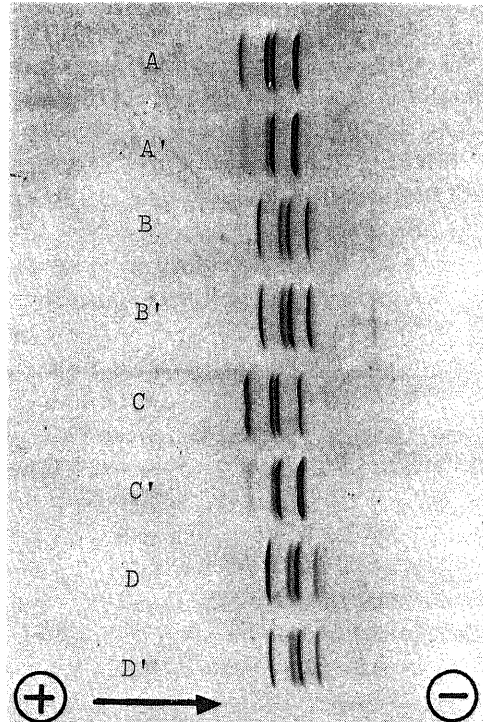


Fig. 3. Isoelectric-focusing pattern of partially autoxidized hemoglobin A (Hb A) and hemoglobin kempsey (Hb Kempsey)

The samples Hb A and Hb Kempsey at 30-hour obtained from the partially autoxidized Hb solutions [Hb A, 451 μM heme; Hb Kempsey, 369 μM heme, in the presence or absence of both catalase (1300 units) and superoxide dismutase (SOD) (29 units), with or without inositol hexaphosphate (IHP) (500 μM)] were applied on Ampholine polyacrylamide gel plate (pH 3.5-9.5). The isoelectric-focusing was performed at 4°C for 1.5 hours, and the gel was fixed with a fixing solution.

A: Hb A, enzymes (-), IHP (-); A': Hb A, enzymes (-), IHP (+); B: Hb Kempsey, enzymes (-), IHP (-); B': Hb Kempsey, enzymes (-), IHP (+); C: Hb A, enzymes (+), IHP (-); C': Hb A, enzymes (+), IHP (+); D: Hb Kempsey, enzymes (+), IHP (-); D': Hb Kempsey, enzymes (+), IHP (+)

条件でも oxyHb が減少するにつれて中間体 Hb が増加し、さらに metHb が増加した。そして、中間体 Hb の中でも $(\alpha^3\beta^{2+})_2$ が $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ よりも常に多く存在していた。oxyHb から中間体 Hb を経て metHb にいたる反応は、カタラーゼ、SOD により阻害された (図 6(c))。また IHP により促進された (図 6(b), (d))。材料および実験方法で述べた $f_1 \sim f_4$ 式を用いて得られる曲線 (実線) は、実測値といずれもよく一致した。これらの結果から、各ステップの反応速度定数 $k_{+1} \sim k_{+4}$ を求めた (表 1)。

4) oxyHb Kempsey の自動酸化反応での経時的变化

種々の条件下における oxyHb Kempsey の経時的变化 (%) を図 7 に示した。Hb A と同様 oxyHb Kempsey は、いずれの条件下でも一次反応で減少し

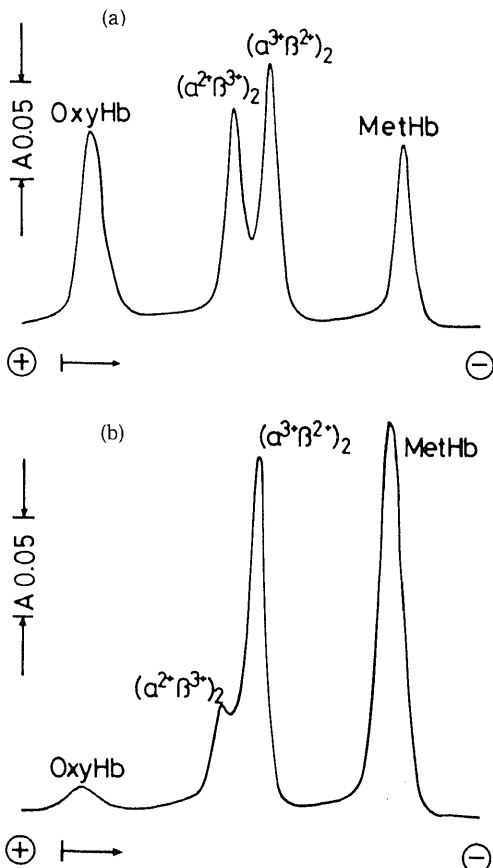


Fig. 4. Gel-scanning pattern of partially autoxidized hemoglobin

The samples in the presence of catalase and superoxide dismutase (SOD) in Fig. 3 (C and C') were gel-scanned at 630 nm.

(a) IHP (-) (b) IHP (+)

た。しかし、oxyHb A と異なり、カタラーゼ、SOD 両酵素のない場合、oxyHb Kempsey 自動酸化速度におよぼす IHP の影響はほとんどみられなかった。しかしながら、カタラーゼ、SOD を加えた場合 oxyHb Kempsey の自動酸化速度はかなり抑制された (-IHP: $k_{obs} = -5.39 \times 10^{-2} h^{-1} (-Enz)$, $-3.13 \times 10^{-2} h^{-1} (+Enz)$, +IHP: $k_{obs} = -5.29 \times 10^{-2} h^{-1} (-Enz)$, $-4.01 \times 10^{-2} h^{-1} (+Enz)$) (-Enz はカタラーゼ, SOD を加えていない場合, +Enz はカタラーゼ, SOD を加えている場合)。両酵素の阻害効果は -IHP で 41.9%, +IHP で 24.2% であった。

5) Hb Kempsey 自動酸化反応での oxyHb, 中間体 Hb, metHb の経時的变化

図 8 (a)-(d) は、種々の条件下での Hb Kempsey の自動酸化反応における oxyHb, 中間体 Hb, metHb の経時的变化である。これら Hb 誘導体の変動は、Hb A の場合と同様に逐次的であった。また、 $(\alpha^3\beta^{2+})_2$ が $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ より常に多く存在した。しかし、Hb A と異なりカタラーゼ、SOD を加えない場合、これら Hb 誘導体の変動は IHP 添加でもほとんど影響されなかった (図 8 (b))。カタラーゼ、SOD を加えることにより、-IHP, +IHP いずれの場合でも自動酸化反応の進行が抑制された (図 8 (c), (d))。Hb A の場合と同様、最小

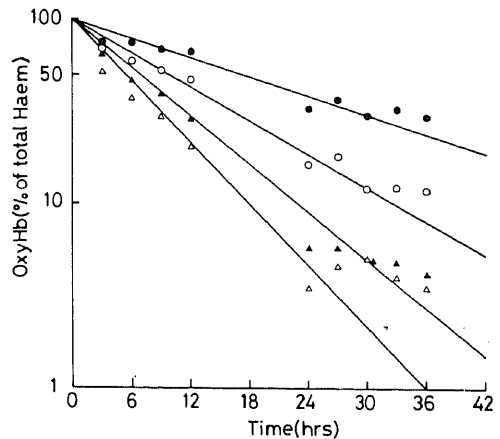
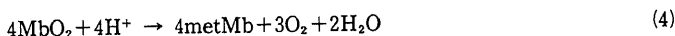
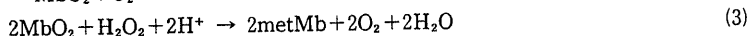
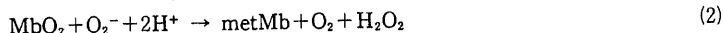


Fig. 5. Semilogarithmic plot of fractions of oxyhemoglobin A (oxyHb A) during autoxidation

The autoxidation of Hb A was studied at pH 7.0, 37°C in the presence or absence of both catalase and superoxide dismutase (SOD), with or without inositol hexaphosphate (IHP). The percentage fractions of oxyHb A during the autoxidation of Hb were determined by analysis with isoelectric-focusing electrophoresis.

○: enzymes (-), IHP (-); △: enzymes (-), IHP (+); ●: enzymes (+), IHP (-); ▲: enzymes (+), IHP (+)



二乗法により各実測値に最も適合する曲線を求め、実線で示した。得られた反応速度定数を表2に示した。

考 察

MbはHbが4量体タンパク質であるのに対して単量体タンパク質である。それゆえ、Mbの自動酸化反応機序はHbの自動酸化反応を考えるうえでモデルとなりうる。図1では、等電点電気泳動法がMbの自動酸

化反応を定量的に評価するうえで有用であることを示した。さらに、図2ではこの方法を用いて種々の条件下でMbの自動酸化反応を分析した。これらの結果から、Mbの自動酸化反応における一次反応定数を求めた。そして、これらの反応速度定数を比較することにより、Mbの自動酸化反応機構が推定できる。WinterbournらのMbの自動酸化についての反応式⁴⁾を用いると、Mbの自動酸化は上のような反応過程であらわせる。この(4)式の化学量論的關係は、Brownらによって実験的に示された³⁾。これらの反応式にしたがえば、oxyMbの自動酸化はカタラーゼ存在下では(3)式が除去されるので50%、SOD存在下では(2)式が除去されるので25%、両酵素存在下では(2)、(3)式が除去されるので75%減少することが理論的に考えられる。実験的に得られた反応定数の比較によりpH7.0での結果(カタ

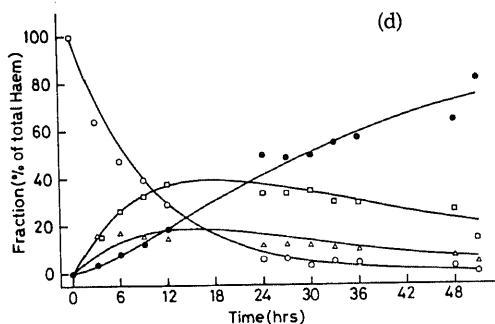
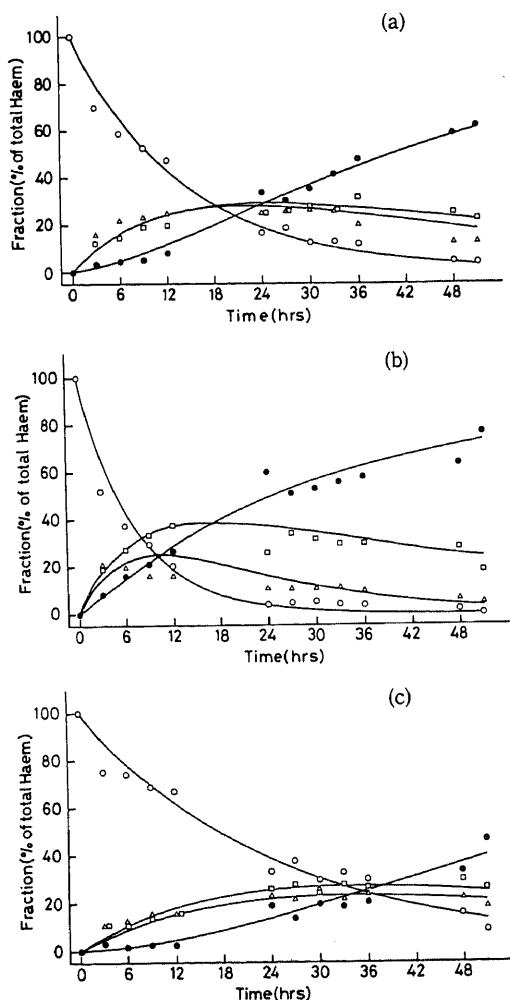


Fig. 6. Fractional changes in oxyhemoglobin (oxyHb), intermediate hemoglobins and methemoglobin (metHb) during the autoxidation of Hb A under various conditions at pH 7.0

After isoelectric-focusing of the samples [in the presence or absence of catalase and superoxide dismutase (SOD), with or without inositol hexaphosphate (IHP)], which were obtained at constant intervals (0-52 hours), the gel plates were scanned at 630 nm. Then the fractions of oxyHb, $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$, $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ and metHb were estimated.

○ : oxyHb, △ : $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$, □ : $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$, ● : metHb

(a) : enzymes (-), IHP (-); (b) : enzymes (-), IHP (+); (c) : enzymes (+), IHP (-); (d) : enzymes (+), IHP (+)

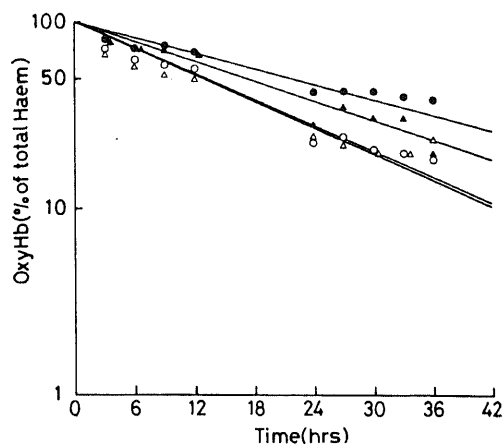


Fig. 7. Semilogarithmic plot of fractions of oxyhemoglobin Kempsey (oxyHb Kempsey) during autoxidation

The conditions are the same to those stated in the legend to Fig. 5, except that oxyHb Kempsey was used in the place of oxyHb A.

○ : enzymes (-), IHP (-); △ : enzymes (-), IHP (+); ● : enzymes (+), IHP (-); ▲ : enzymes (+), IHP (+)

ラーゼで31%, SODで10%, 両者で35%の減少)は、低値であるが理論値をかなりみたとと思われる。また、これらの結果はMbの自動酸化反応に O_2^- 、 H_2O_2 が関与していること、そして、その反応が一連の反応(1)~(3)で進行することを強く示唆している。

これらの連鎖反応では、反応はシグモイド状に進行するはずで一般的には一次反応で進行しないと考えられる。しかし、(2)、(3)式は(1)式に比し反応が非常に速い⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾のために、見かけ上(1)式のみ依存した一次反応で進行していくと考えられ、実験的にもそれがうらづけられた(図2)。このようにMbの自動酸化反応は(1)式に依存した反応であると考えられる。また、理論式(1)~(4)と種々の条件下で実験的に得られた値がかなりよい対応関係を示すので、Mbの自動酸化反応は(1)~(4)式のように進行することが考えられる。

これらの考えをHb Aの自動酸化反応についても導入して検討してみた。図3~6に示すようにHb Aの自動酸化反応では、1) oxyHbが2種類の間mediate Hb ($\alpha^{2+}\beta^{3+}$)₂、($\alpha^{3+}\beta^{2+}$)₂を経てmetHbに酸化されること、そして、2)カタラーゼ、SODにより自動酸

Table 1. Rate constants estimated by non-linear least-square analysis for the autoxidation of hemoglobin A under various conditions at pH 7.0

The values represent the apparent first-order constant [$10 \times$ rate constant (hr^{-1})] \pm S.D.. The rate constants k_{+1} , k_{+2} , k_{+3} , k_{+4} best fitting to all experimental points were obtained by the use of NONLIN computer program (Metzler, 1969) and eqns. (1)~(4) in the experimental section.

Rate constant	(-) Enzymes		(+) Enzymes	
	(-) IHP	(+) IHP	(-) IHP	(+) IHP
k_{+1}	3.53 ± 0.20	6.70 ± 0.60	1.82 ± 0.10	3.51 ± 0.29
k_{+2}	2.85 ± 0.14	6.31 ± 0.52	1.92 ± 0.08	4.44 ± 0.34
k_{+3}	3.53 ± 0.18	7.32 ± 0.33	2.16 ± 0.10	6.51 ± 0.33
k_{+4}	2.40 ± 0.16	1.76 ± 0.21	1.98 ± 0.09	2.86 ± 0.24

Enzymes: catalase and superoxide dismutase
IHP: inositol hexaphosphate

Table 2. Rate constants estimated by non-linear least-square analysis for the autoxidation of hemoglobin Kempsey under various conditions at pH 7.0

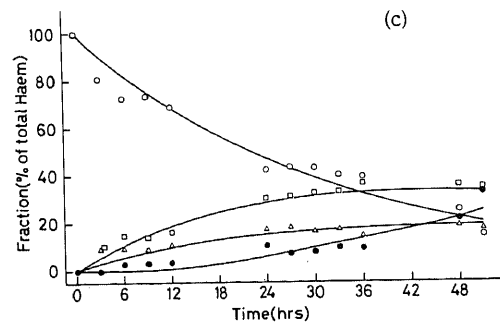
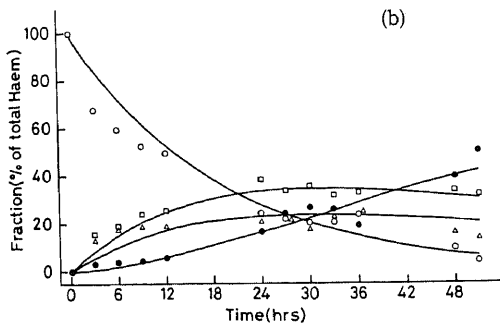
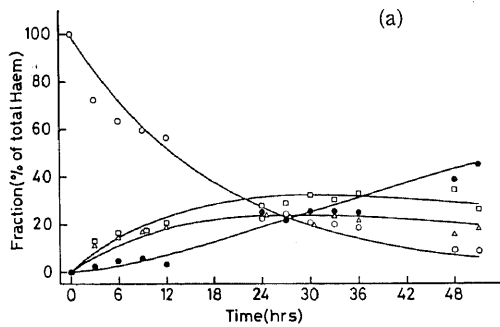
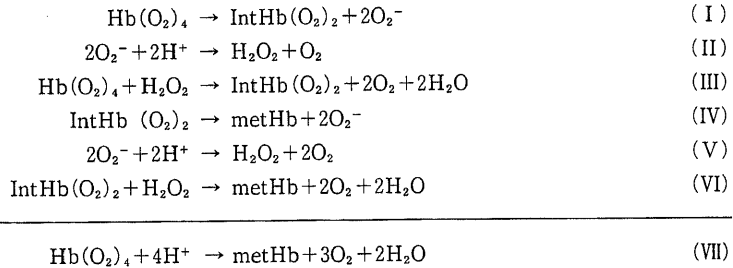
The values represent the apparent first-order rate constant [$10 \times$ rate constant (hr^{-1})] \pm S.D..

Rate constant	(-) Enzymes		(+) Enzymes	
	(-) IHP	(+) IHP	(-) IHP	(+) IHP
k_{+1}	2.37 ± 0.14	2.17 ± 0.25	1.05 ± 0.14	1.49 ± 0.13
k_{+2}	2.06 ± 0.12	1.80 ± 0.23	1.22 ± 0.14	1.66 ± 0.18
k_{+3}	3.02 ± 0.13	3.12 ± 0.26	2.08 ± 0.17	2.52 ± 0.12
k_{+4}	1.75 ± 0.14	1.73 ± 0.28	1.56 ± 0.18	1.03 ± 0.14

Enzymes: catalase and superoxide dismutase
IHP: inositol hexaphosphate

化が抑制されることを実験的に示した。これらの結果から、次のような反応式が Hb の自動酸化反応につい

て考えられる。



これらの反応過程では、(II)、(V)、(III)、(VI)式はカタラーゼ、SOD によって阻害されるが、これらの酵素存在下では反応阻害率は理論的に 50%と考えられる。実験的には、oxyHb A の自動酸化速度はカタラーゼ、SOD 両酵素を加えることにより約 44%阻害された ($-\text{IHP} : k_{+1} + k_{+3} = -7.06 \times 10^{-1} \text{h}^{-1} (-\text{Enz}), -3.98 \times 10^{-2} \text{h}^{-1} (+\text{Enz})$ (図 5)。これらの値は、上記の反応過程より類推される理論値とほぼ一致しており、上記の反応式の妥当性を支持する。また、oxyHb A の自動酸化反応は oxyMb と同様一次反応で進行した。これは、(II)、(III)、(V)、(VI)式に示す oxyHb と

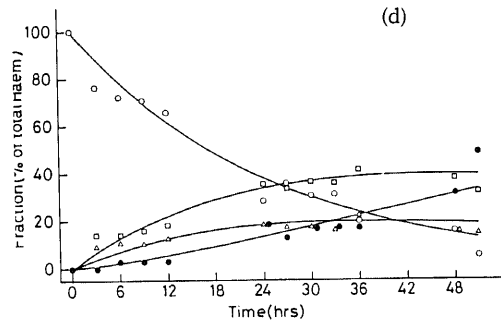


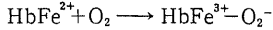
Fig. 8. Fractional changes in oxyhemoglobin (oxyHb), intermediate hemoglobins and methemoglobin (metHb) during the autoxidation of Hb Kempsey under various conditions at pH 70.

The conditions are the same to those stated in Fig. 7, except that oxyHb Kempsey was used in the place of oxyHb A.

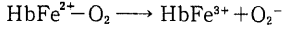
○ : oxyHb, △ : $(\alpha^{3+}\beta^{3+})_2$, □ : $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$, ● : metHb
(a): enzymes (-), IHP (-); (b): enzymes (-), IHP (+); (c): enzymes (+), IHP (-); (d): enzymes (+), IHP (+)

O_2^- , H_2O_2 との反応が非常に速い¹⁰⁾⁵⁾ために, 反応全体が見かけ上(I), (IV)式に依存した一次反応で進行するものと考えられる。

WeissはoxyHbが次の平衡状態にあると考えた¹⁶⁾。



そして, 自動酸化が次のように起ることを示唆した,



この反応は上記の(I), (IV)式に相当している。それゆえ, カタラーゼ, SOD存在下での自動酸化反応は(I)+(IV)式の和で進行していると考えられる。

また, 非常に酸素親和性の強いHb Kempseyの自動酸化反応についても詳しく検討した(図7, 8(a)~(d))。この場合, 1) 一次反応で自動酸化反応が進行すること, 2) 反応過程で2種類の間体Hb ($\alpha^{2+}\beta^{3+}$)₂, ($\alpha^{3+}\beta^{2+}$)₂が生成すること, 3) カタラーゼ, SODにより反応が抑制されることが明らかになった。これらの結果はHb Kempseyの自動酸化反応においてもHb Aと同様のメカニズムで反応が進行していることを示唆している。しかしながら, Hb Kempseyの自動酸化速度はoxyHb Aの場合と比べ有意に遅かった。-IHPの場合, oxyHb Kempseyでは $k_{+1} + k_{+3} = -5.39 \times 10^{-1} h^{-1} (-Enz)$, $-3.13 \times 10^{-2} h^{-1} (+Enz)$ であるのに対し, oxyAでは $k_{+1} + k_{+3} = -7.06 \times 10^{-2} h^{-1} (-Enz)$, $-3.98 \times 10^{-2} h^{-1} (+Enz)$ であった。この違いはHbの4次構造の違いによって説明できる。すなわち, oxyHb Kempseyの4次構造がR状態に非常に偏位しており¹⁰⁾¹¹⁾, R状態ではHbは自動酸化しにくいと考えられる。ここで, R状態(Relaxed form)とはoxyHb Aの4次構造をあらわし, deoxyHb(deoxyhemoglobin)のT状態(Tense form)と対応する(Perutz)¹⁷⁾。R状態の特徴としては, 1) α 鎖間および α , β 鎖間を結ぶ塩橋(salt bridge)が切断されている。2) ヘム鉄は酸素と遠位ヒスチジン側で結合し, ポルフィリン平面内において低スピン状態にある。T状態の特徴としては, 1) α 鎖間および α , β 鎖間を結ぶ塩橋が結合している。2) 酸素はヘム鉄より離れ, ヘム鉄はポルフィリン平面より近位ヒスチジン側に突出した高スピン状態にあることなどが知られている¹⁷⁾。

IHPはHbのアロステリックエフェクターとして知られているが, IHPがHbに結合することによりoxyHb Aの4次構造がR状態からT状態に移ることがすでに報告されている¹⁸⁾。Tomodaらは種々の酸化剤によるHb Aの酸化反応をしらべ, IHP添加により酸化速度が促進することを明らかにするとともに, T状態のHbの方がR状態のHbよりも酸化されや

すいことを示した⁹⁾⁷⁾。Hb Aの自動酸化反応の場合でも1HPを加えることにより反応が著しく促進した($-Enz: k_{+1} + k_{+3} = -7.06 \times 10^{-2} h^{-1} (-IHP)$, $-14.02 \times 10^{-2} h^{-1} (+IHP)$)。このようなIHPによるHbの自動酸化反応の促進は, T状態のHbの方がR状態の場合よりも自動酸化されやすいことを示している。また, R状態により偏位したHb Kempseyの自動酸化反応がHb Aよりも遅いことは上の考えを示唆している。またこの場合, IHPの効果がまったくみられなかった($-Enz: k_{+1} + k_{+3} = -5.39 \times 10^{-2} h^{-1} (-IHP)$, $-5.29 \times 10^{-2} h^{-1} (+IHP)$)。これはIHPの結合によってもHb Kempseyの4次構造がR状態のままである¹⁰⁾¹¹⁾ことで説明できる。さらに, 酸素親和性が低く著しくT状態に偏位しているHb Kansas($\beta_{102asp-thr}$)の自動酸化速度は, Hb Aよりも非常に速かった(Takizawa, 未発表データ)。このことも, Hbの高次構造がHb自動酸化反応に密接に関与していることを示唆している。

一方, Hb AおよびHb Kempseyいずれの場合も自動酸化経過中($\alpha^{3+}\beta^{2+}$)₂の割合が($\alpha^{2+}\beta^{3+}$)₂の割合よりも常に多く存在した(図6(a)-(d), 8(a)-(d))。このことは, α 鎖の方が β 鎖より自動酸化速度が速いためと考えられる。表1, 2より α 鎖の自動酸化速度を示す k_{+3} と β 鎖の自動酸化速度を示す k_{+1} を比較すると, Hb A, Hb Kempseyともにほとんど常に $k_{+3} > k_{+1}$ が成立する。また, IHPの効果はHb Aの場合 α 鎖, β 鎖ほぼ同じ程度にみられた。フェリシアンカリ, フェリチクロムCなどによるHb Aの酸化反応の場合, β 鎖の方が α 鎖よりも酸化しやすく, IHPによる酸化促進効果も β 鎖に顕著であることが明らかにされている⁹⁾⁷⁾。これらの事実, Hb自動酸化反応は酸化剤によるHb酸化反応とは異なっていることを示唆している。

以上述べてきたように, Hbの自動酸化反応は, 単量体ヘムタンパク質であるMbと同様 H_2O_2 , O_2^- を生成する反応と, これらの活性酸素が関与する反応よりなっていることが明らかになった。Hbの自動酸化反応では, oxyHbは($\alpha^{3+}\beta^{2+}$)₂, ($\alpha^{2+}\beta^{3+}$)₂などの中間体HbをへてmetHbへ変化するが示された。また, Hbの自動酸化には, その4次構造が重要であることを異常HbであるHb KempseyやHbのアロステリックエフェクターであるIHPを用いて明らかにした。

結 論

Hb A, 酸素親和性の異常に高いHb KempseyおよびMbの自動酸化反応機構をカタラーゼ, SOD存在下

または非存在下で検討した。また、Hb の場合、Hb のアロステリックエフェクターとして知られる IHP の効果もしらべた。これらの自動酸化反応の経時的变化の解析には、等電点電気泳動法を用いた。その結果、下記のことが明らかになった。

1) Hb の自動酸化反応では、途中経過で oxyHb, metHb のみならず 2 種類の間体 Hb ($\alpha^{2+}\beta^{3+}$)₂, ($\alpha^{3+}\beta^{2+}$)₂ が存在した。

2) oxyHb A, oxyHb Kempsey および oxyMb いずれも、種々の条件下で一次反応で自動酸化が進行した。また、カタラーゼ、SOD によりいずれも反応が抑制された。これらの結果より、その反応機構は Mb の場合(1)~(4)式、Hb の場合(I)~(VII)式が妥当と考えられた。

3) Hb A の自動酸化反応は IHP により著しく促進した。Hb Kempsey の自動酸化は Hb A に比し遅く、IHP により促進しなかった。このことより、Hb 自動酸化は Hb の四次構造が T 状態のときの方が R 状態のときよりも速いと考えられた。

4) Hb 自動酸化反応の経過中、Hb A, Hb Kempsey いずれも ($\alpha^{3+}\beta^{2+}$)₂ の割合が ($\alpha^{2+}\beta^{3+}$)₂ の割合よりも常に多く存在した。このことより、 α 鎖、 β 鎖の間に機能的差異があると考えられた。

5) Mb 自動酸化反応は、Hb 自動酸化反応のより単純な実験系として有用なモデルである。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った米山良昌教授に深く感謝いたします。また終始直接の御指導、御教示をいただきました友田燁夫助教授に心から感謝いたします。あわせて、有用な御討論をいただいた金沢大学薬学部製剤学教室辻彰教授、ならびに御助言いただいた生化学研究室各位に感謝いたします。

文 献

- 1) Brooks, J.: The oxidation of haemoglobin to methaemoglobin by oxygen. II-The relation between the rate of oxidation and the partial pressure of oxygen. Proc. R. Cond. Ser. B, 118, 560-577 (1935).
- 2) George, P. & Stratmann, C. J.: The oxidation of myoglobin to metmyoglobin by oxygen. Biochem. J., 57, 568-573 (1954).
- 3) Brown, W. D. & Mebine, L. B.: Autoxidation of oxymyoglobin. J. Biol. Chem., 244, 6696-6701 (1969).
- 4) Winterbourn, C. C., McGrath, B. M. & Carrell, R. W.: Reactions involving superoxide

and normal and unstable haemoglobins. Biochem. J., 155, 493-502 (1976).

- 5) Mansouri, A. & Winterhalter, K. H.: Nonequivalence of chains in hemoglobin oxidation. Biochemistry, 12, 4946-4949 (1973).
- 6) Tomoda, A. & Yoneyama, Y.: Analysis of intermediate hemoglobins in solution of hemoglobin partially oxidized with ferricyanide. Biochem. Biophys. Acta, 581, 128-135 (1979).
- 7) Tomoda, A., Tsuji, A. & Yoneyama, Y.: Mechanism of hemoglobin oxidation by ferricytochrome c under aerobic and anaerobic conditions. J. Biol. Chem., 255, 7978-7983 (1980).
- 8) Tomoda, A., Tsuji, A. & Yoneyama, Y.: Involvement of superoxide anion in the reaction mechanism of haemoglobin oxidation by nitrite. Biochem. J., 193, 169-179 (1981).
- 9) Tomoda, A., Yoneyama, Y. & Tsuji, A.: Changes in intermediate haemoglobins during autoxidation of haemoglobin. Biochem. J., 195, 485-492 (1981).
- 10) Lindstrom, T. R., Baldassare, J. J., Bunn, H. F. & Ho, C.: Nuclear magnetic resonance and spin-label studies of hemoglobin Kempsey. Biochemistry, 12, 4212-4217 (1973).
- 11) Bunn, H. F., Wohl, R. C., Bradley, T. B., Cooley, M. & Gibson, Q. H.: Functional properties of hemoglobin Kempsey. J. Biol. Chem., 249, 7402-7409 (1974).
- 12) 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, 2358-2362 (1978).
- 13) Tomoda, A., Takeshita, M. & Yoneyama, Y.: Characterization of intermediate hemoglobin produced during methemoglobin reduction by ascorbic acid. J. Biol. Chem., 253, 7415-7419 (1978).
- 14) Eyer, P., Hertle, H., Kiese, M. & Klein, G.: Kinetics of ferrihemoglobin formation by some reducing agents, and the role of hydrogen peroxide. Mol. Pharmacol., 11, 326-334 (1975).
- 15) Behar, D., Czapski, G., Rabani, J., Dorfman, L. M. & Sciwarz, H. A.: The acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl

radical. *J. Phys. Chem.*, **74**, 3209-3213 (1970).

16) Weiss, J. J. : Nature of the iron-oxygen bond in oxyhaemoglobin. *Nature*, **202**, 73-84 (1964).

17) Perutz, M. F. : Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*, **228**, 726-739

(1970).

18) Adams, M. L. & Schuster, T. M. : Phosphate-dependent spectroscopic changes in liganded hemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **58**, 525-531 (1974).

Mechanisms for the Autoxidation of Hemoglobin A, Hemoglobin Kempsey ($\beta_{99asp \rightarrow asn}$) and Myoglobin Takenori Takizawa, Department of Biochemistry (I), (Director: Prof. Y. Yoneyama), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - *J. Juzen Med. Soc.*, **93**, 1-11 (1984)

Key words: Autoxidation, Hemoglobin A, Hemoglobin Kempsey, Myoglobin

Abstract

Hemoglobin (Hb) is autoxidized to methemoglobin (metHb) spontaneously in the air. However, the mechanism of this autoxidation remains to be clarified. In this paper, the autoxidation of normal human Hb (Hb A), mutant Hb Kempsey (Hb Kempsey) where aspartate at β_{99} is replaced by an asparagine residue, and horse myoglobin (Mb) was analyzed by isoelectric-focusing electrophoresis on Ampholine polyacrylamide gel plate. It was found that two intermediate Hbs [$(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$, $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$] were produced by the partial autoxidation of Hb A and Hb Kempsey. The amounts of $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ were always higher than those of $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ during the autoxidation of these Hbs. OxyHb A, oxyHb Kempsey and oxyMb autoxidized in first order kinetics under various conditions, and the rates of the reactions were suppressed in the presence of catalase and superoxide dismutase (SOD). The autoxidation rates of oxyHb A were considerably accelerated by the addition of inositol hexaphosphate (IHP), a strong allosteric effector of Hb. However, the autoxidation rates of oxyHb Kempsey was slower than that of Hb A and was hardly altered with IHP. These results suggest that the T state hemoglobin is more susceptible to autoxidation than the R state, where the R and T state correspond to oxy- and deoxyform in quaternary structure of the protein, respectively. The process of Mb autoxidation seems to be similar to that of Hb in terms of involvement of H_2O_2 and O_2^- , and is available to a good model of Hb autoxidation.