

# ヒト赤血球のメトヘモグロビン還元機構に関する研究

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8950">http://hdl.handle.net/2297/8950</a>

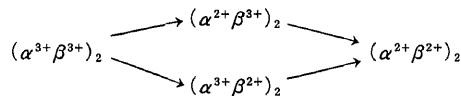
## ヒト赤血球のメトヘモグロビン還元機構に関する研究

金沢大学医学部生化学第一講座 (主任: 米山良昌教授)

井 田 雅 祥

(昭和57年9月22日受付)

亜硝酸ナトリウムで処理したヒト赤血球でのメトヘモグロビン還元を、メチレン・ブルー存在下、非存在下で、37°C, pH 7.4において検討した。メトヘモグロビン還元反応の分析は Ampholine ポリアクリルアミド平板ゲル等電点電気泳動で行った。その結果、メトヘモグロビン還元過程で $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ ,  $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ の2種類の部分還元型ヘモグロビンが中間体として産生されることが見いだされた。これら部分還元型ヘモグロビンの変動を経時的に調べたところ、メチレン・ブルーの有無にかかわらず、 $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ は常に $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ より多く存在した。この中間体ヘモグロビンの量的な差は、メトヘモグロビンを構成する $\alpha$ 鎖・ $\beta$ 鎖の酸化還元電位の違いによって説明できる。また、メチレン・ブルーの存在下で赤血球のメトヘモグロビン還元は著しく促進された。以上の結果より、ヒト赤血球におけるメトヘモグロビン還元過程は次のように進むと考えられる。



また、メトヘモグロビン還元中の、中間体ヘモグロビンなどの時間的変動を分析してメトヘモグロビン反応速度定数を得た。このことから、赤血球中での NADH チトクローム  $b_5$ 還元酵素と NADPH メトヘモグロビン還元酵素の、メトヘモグロビン還元への貢献度を推定し、メトヘモグロビン還元機構を細胞レベルで検討した。

**Key words** ヒト赤血球, メトヘモグロビン還元機構, メト型中間体ヘモグロビン

赤血球はヘモグロビン (以下 Hb と略す) 脚注を高濃度に含む遊離細胞であり、酸素の運搬を主な役割としていることはよく知られている。この働きが十分に発揮されるためには、赤血球中の Hb が還元状態 ( $Fe^{2+}$ ) であることが必要であり、Hb が酸化されてメト Hb ( $Fe^{3+}$ ) に変化すると酸素結合能を失う。Hb は4個のヘムをもつ四量体タンパク質であるが、自動酸化によってメト Hb に変化する。ヒト赤血球では1日の酸化量は全 Hb の約2~4%である<sup>1)</sup>といわれる。生成されたメト

Hb は、赤血球中のメト還元酵素によって還元型 Hb に戻る。

赤血球には2種類のメト還元酵素が存在しており、各々 NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NADH と略す) 及び NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH と略す) を補酵素としている<sup>2)3)</sup>。前者は、現在では NADH チトクローム  $b_5$ 還元酵素であることが明らかになっており<sup>4)5)</sup> 解糖系 (Embden - Meyerhof 経路) で生成される NADH と共役してメト Hb 還元を行い、赤血球でのメト Hb の全還元能の70%以上を担っている<sup>6)</sup>。後者は、NADPH フラビン還元酵素として知られており<sup>7)</sup>、この酵素によるメト Hb の還元は通常6%程度しか働いてい

脚注: オキシヘモグロビンをオキシ Hb あるいは $(\alpha^{2+}\beta^{2+})_2$ ,  $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ 、バレンシー・ハイブリッドを $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ ,  $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ 、バレンシー・ハイブリッドを $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ 、メトヘモグロビンをメト Hb あるいは $(\alpha^{3+}\beta^{3+})_2$ と示す

Reduction of Methemoglobin in Human Red Cells. Masayoshi Ida, Department of Biochemistry, Kanazawa University School of Medicine.

ないと考えられており<sup>9)</sup>, メチレン・ブルーが少量存在すると著しく活性化される<sup>9)</sup>.

これまで、これらメト Hb 還元酵素系については赤血球から分離した酵素を用いて研究されてきた。その研究はメト Hb を基質とする反応度論的解析が主であつて、分光学的測定法に頼っていた。一般に分光学的に反応スペクトルが等吸収点を通ることは、反応過程で中間体が存在しないことを示している。メト Hb が還元される場合、可視部吸収スペクトルは等吸収点を通るのでメト Hb は直接還元型 Hb に変化し、反応中に中間体 Hb は生成されないと考えられてきた。

ところが、フェリシアン化カリウムや亜硝酸ナトリウムなどの酸化剤で Hb を部分酸化したのちカラム・クロマトグラフィーで Hb を分離すると、メト型中間体 Hb が得られるという報告がある<sup>10)11)</sup>しかしながら、この場合、中間体 Hb の分離と同定が充分になされていなかったため、メト型中間体 Hb の存在を明確に示すまでには至らなかった。

近年、友田らは 2 種類のメト型中間体 Hb, ( $\alpha^{3+}\beta^{2+}$ )<sub>2</sub> と ( $\alpha^{2+}\beta^{3+}$ )<sub>2</sub> の存在を平板ゲル等電点電気泳動法を用いて明らかにした<sup>12)</sup>。これは還元型 Hb, メト型中間体 Hb, メト Hb の等電点が異なることを利用したものである。彼らは、ヒト赤血球より得た NADH チトクローム b<sub>5</sub> 還元酵素や NADPH フラビン還元酵素によるメト Hb 還元反応では、反応の過程で上記 2 種類のメト型中間体 Hb が生成されることを明らかにした<sup>13)14)</sup>。しかしながら、これらのメト Hb 還元酵素が赤血球中でどのように働いているかは明らかでなく、赤血球レベルでの検討が必要である。

このような観点に基づいて、本稿では赤血球におけるメト Hb 還元反応をとりあげ、とくに中間体 Hb の存在状態とその動的变化について調べ、NADH および NADPH メト Hb 還元酵素の寄与について検討する。さらに、その結果に基づいて赤血球におけるメト Hb 還元機構を明らかにしたい。

### 材料及び方法

実験に用いたヒト赤血球は、日本赤十字センター金沢支部より得た ACD (Acid Citrate Dextrose, ACD と略) 血液を遠心分離した。セファデックス G-25 (coarse grade) は、ファルマシア社、平板ゲルは、Ampholine polyacrylamide gel plates (pH 3.5-9.5: LKB 社) を用いた。亜硝酸ナトリウム、メチレン・ブルーは和光純薬、硫酸ストレプトマイシンは武田製薬の製品を用いた。

### 方 法

採血後 1 日のヒト ACD 血液を遠心分離して (4°C にて 3,000 回転, 10 分間), 上清と顆粒球層を除いて赤血球を得た。得られた赤血球を 4 倍容量の 0.9% NaCl 溶液に浮遊して、前述の要領で遠心操作を行い 2 回洗浄した。この赤血球を約 9 倍量の 0.9% NaCl 溶液に浮遊して、これに 0.9% NaCl 溶液に溶かした 0.5 M 亜硝酸ナトリウムを、最終濃度が 20 mM となるように加えた。室温 (25°C) に 30 分間放置したのち (この操作によって、赤血球中の還元型は Hb はほぼ完全にメト Hb に酸化された), 赤血球浮遊液を遠心分離した (4°C にて 3,000 回転, 10 分間)。0.9% NaCl 溶液で洗浄を 5 回繰り返すことにより赤血球中の亜硝酸ナトリウムを除いた。この赤血球にグルコースを含まないリンゲル液を 9 倍容量加えた (ヘマトクリット: 約 10%)。この赤血球浮遊液を以下の実験に用いた。

#### (a) メチレン・ブルー非存在下の実験

赤血球浮遊液 (硫酸ストレプトマイシン添加: 50 mg/100 ml 赤血球浮遊液) を 37°C の恒温槽に孵置した。pH は 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液で 7.4 に合わせ、グルコース (最終濃度 10 mM) を加えて反応を開始した。反応中の pH は pH-stat (東亜 auto-burette TBS-10 A) を用いて一定に保った。実験は 32 時間まで続けたが、この間溶血は全く認められなかった。試料 1 ml を一定時間ごとに採取して 4 ml の氷冷再溜水で溶血し、4°C で、10,000 回転, 15 分間の遠心を行った。得られた溶血液は平板ゲルにのせ、等電点電気泳動を行った。泳動終了後、平板ゲルはゲル固定液 (0.14 M スルフォサリチル酸, 0.7 M トリクロル酢酸, 7 M メタノール) で固定し、Gilford spectrometer 2500 G を用いて 630 nm で吸光度のスキanningを行った。記録用紙に描かれたオキシ Hb, メト型中間体 Hb [( $\alpha^{2+}\beta^{3+}$ )<sub>2</sub> + ( $\alpha^{3+}\beta^{2+}$ )<sub>2</sub>], メト Hb の各分画は切り取って各々を秤量し重量%の各評価を行った。

#### (b) メチレン・ブルー存在下の実験

前述の赤血球浮遊液を 37°C の恒温槽に孵置し、0.1 M 水酸化ナトリウム溶液を用いて pH 7.4 に調整したのち、グルコースとメチレン・ブルーを、各々最終濃度 10 mM, 10  $\mu$ M となるように添加して反応を開始した。反応液中の pH は pH-stat を用いて一定に保った。試料は前述のように一定時間ごとに採取して溶血させたのち遠心 (10,000 回転, 15 分) を行った。上清の溶血液に含まれるメチレン・ブルーは、10 mM, pH 7.0 のリン酸カリウム緩衝液で平衡化したセファデックス G-25 (coarse, 1.5×20 cm カラム) で除去した。こうして得られた溶血液を、前述の要領で等電点電気泳動法を用いて解析した。

得られたオキシ Hb, メト型中間体 Hb, メト Hb の

割合(%)は、次の微方程式(1)-(3)[non-linear regression analysis (NONLIN program<sup>15)</sup>]による繰り込んで、Digital computer (FACOM M-160) でシミュレーションを行った。

$$\begin{aligned} \text{metHb} & \quad \text{intermediate Hb} & \quad \text{oxyHb} \\ (\alpha^3+\beta^3)_2 & \xrightarrow{k_1} [(\alpha^2+\beta^3)_2 + (\alpha^3+\beta^2)_2] & \xrightarrow{k_2} (\alpha^2+\beta^2)_2 \\ f_1 = f_1^0 e^{-k_1 t} & \dots\dots\dots (1) \\ f_2 = f_1^0 \frac{k_1}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) + f_2^0 e^{-k_2 t} & \dots\dots\dots (2) \\ f_3 = 1.0 + f_3^0 - (f_1 + f_2) & \dots\dots\dots (3) \end{aligned}$$

ここで、 $f_1, f_2, f_3$ はそれぞれ、時間  $t$  における全 Hb に対する  $(\alpha^3+\beta^3)_2, [(\alpha^2+\beta^3)_2 + (\alpha^3+\beta^2)_2], (\alpha^2+\beta^2)_2$  の各割合 (%) を、また、 $f_1^0, f_2^0, f_3^0$  はそれぞれ、0 時間におけるそれらの値を示す。

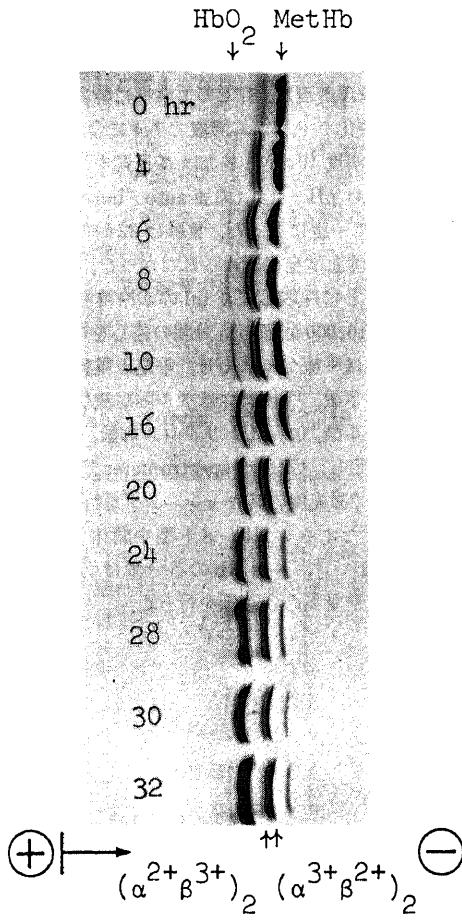


Fig. 1. Isoelectric focusing pattern of samples on Ampholine polyacrylamide gel plates. Gel photographs relating to samples obtained at intervals during methemoglobin reduction of red cells in the absence of methylene blue.

成 績

I メチレン・ブルー非存在下でのメト Hb 還元反応  
図 1 は、平板ゲル等電点電気泳動で分析した赤血球のメト Hb 還元反応の時間的推移である。

ゲル上の 4 本のバンドは、その泳動位置から、(-) 側よりメト Hb,  $(\alpha^3+\beta^2)_2, (\alpha^2+\beta^3)_2$  およびオキシ Hb であった<sup>12)</sup>。その結果、反応開始時に大部分を占めていたメト Hb は、時間の経過とともに減少し、2 種類のメト型中間体 Hb へ変化した。また、メト型中間体 Hb の増減にもなってオキシ Hb が増加した。

図 2 は、16 時間後に採取した縮料のゲル・スキャンニング・パターンであるが、オキシ Hb とメト Hb 以外に  $(\alpha^2+\beta^3)_2, (\alpha^3+\beta^2)_2$  に対応する 2 つのピークが存在する。

これらの分画は、前述の重量測定法で分赤すると、各々、オキシ Hb : 19.9%,  $(\alpha^2+\beta^3)_2$  : 21.6%,  $(\alpha^3+\beta^2)_2$  : 26.4%, メト Hb : 32.1% であった。

このような方法で、図 1 の結果についてメト Hb, メト型中間体 Hb, オキシ Hb の変動を分析したのが表 1 である。

このことは、赤血球中でのメト Hb の還元反応は次のように進むことを示している (図 3)。

なお、この場合、 $(\alpha^3+\beta^2)_2$  が常に  $(\alpha^2+\beta^3)_2$  より多かった。

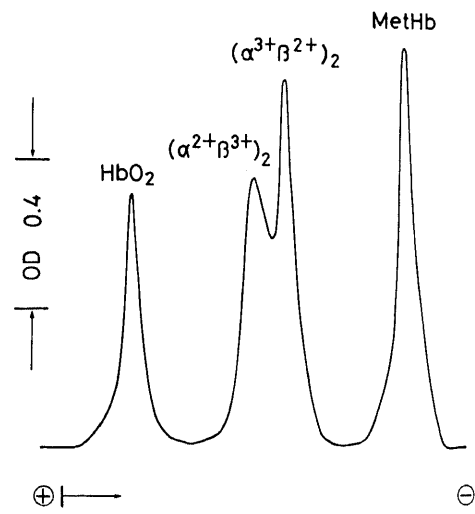


Fig. 2. Gel-scanning pattern of the samples at 16 hrs. The 16 hour incubated sample in Fig. 1 was gel-scanned at 630 nm.

Table 1. Fractions (%) of methemoglobin,  $(\alpha^3+\beta^{2+})_2$ ,  $(\alpha^2+\beta^{3+})_2$  and oxyhemoglobin during methemoglobin reduction in nitrite-treated erythrocytes in the absence of methylene Blue. The gels shown in Fig. 1 were scanned and the fractions of hemoglobin derivatives such as methemoglobin,  $(\alpha^3+\beta^{2+})_2$ ,  $(\alpha^2+\beta^{3+})_2$  and oxyhemoglobin were estimated.

時間(時)	0	4	8	10	16	20	24	28	32
メト Hb	89.0	75.4	56.9	53.7	32.1	19.4	10.6	11.3	5.9
$(\alpha^3+\beta^{2+})_2$	8.2	15.9	23.0	21.8	26.4	26.9	28.8	26.9	20.0
$(\alpha^2+\beta^{3+})_2$	2.8	7.6	16.1	17.2	21.6	20.1	11.4	12.0	10.0
オキシ Hb	0	1.1	4.0	7.3	19.9	33.6	49.2	49.8	64.1

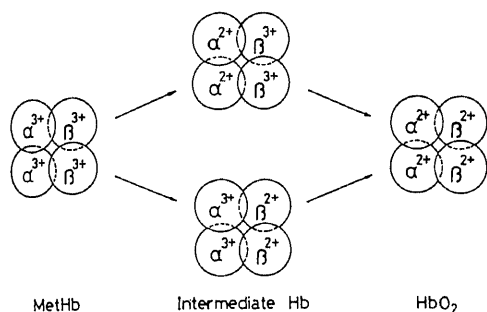


Fig. 3. Schemes of methemoglobin reduction by the enzyme systems.

図4の実線で示す曲線は、メト Hb 還元反応が、 $(\alpha^{3+}\beta^{3+})_2 \xrightarrow{k_1'} [(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2, (\alpha^3+\beta^{2+})_2] \xrightarrow{k_2'} (\alpha^2+\beta^{2+})_2$  のように進行すると仮定し、微分方程式(1), (2), (3)に表1の値を入れてコンピューターでシミュレートしたものである。

その結果、メト Hb、メト型中間体 Hb、オキシ Hb の各実験値はこの曲線によくのっていた。コンピューターによる解析で求めた2つの反応速度定数  $k_1'$ ,  $k_2'$  は、各々、 $(1.138 \pm 0.038) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ ,  $(0.802 \pm 0.030) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$  であった。

II メチレン・ブルー存在下でのメト Hb 還元反応  
メチレン・ブルー存在下でメト Hb 還元反応を行うと、この場合も反応経過中に平板ゲル上に4本のバンドが認められ[図5:各(-)側より、メト Hb,  $(\alpha^3+\beta^{2+})_2$ ,  $(\alpha^2+\beta^{3+})_2$  およびオキシ Hb であった], 時間とともに変動した。

この結果を、前述のようにゲル・スキャンニングを行ない、これらの Hb の全 Hb に対する割合を算出した

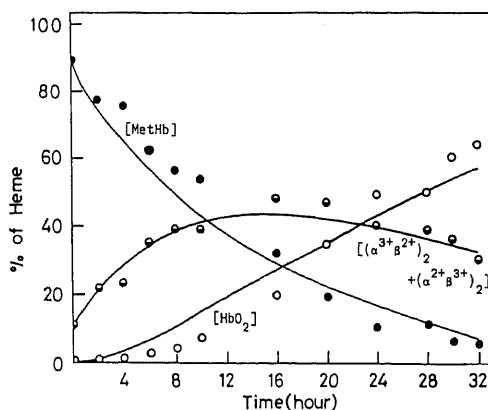


Fig. 4. Fractional changes in methemoglobin, intermediate hemoglobins, and oxyhemoglobin during the reduction of methemoglobin in the absence of methylene blue. The results in fig. 1 were analyzed by scanning at 630 nm and the fractions of methemoglobin, intermediate hemoglobins and oxyhemoglobin were plotted against time. (●): methemoglobin, (○):  $(\alpha^3+\beta^{2+})_2 + (\alpha^2+\beta^{3+})_2$ , (○): oxyhemoglobin. The curves drawn through the experimental points were obtained by the computer analysis.

(表2)。

その結果、メト Hb 還元反応は80分でほぼ終了し、メチレン・ブルーが存在しない場合に比べメト Hb 還元反応が著しく促進されていることが明らかになった。また、2種類のメト型中間体 Hb は、 $(\alpha^3+\beta^{2+})_2$  の方が  $(\alpha^2+\beta^{3+})_2$  よりも常に多く存在した。これらの結果から、メチレン・ブルー存在下でもメト Hb 還元反応は図3に示したコースをたどって進むと考えられる。さらにこ

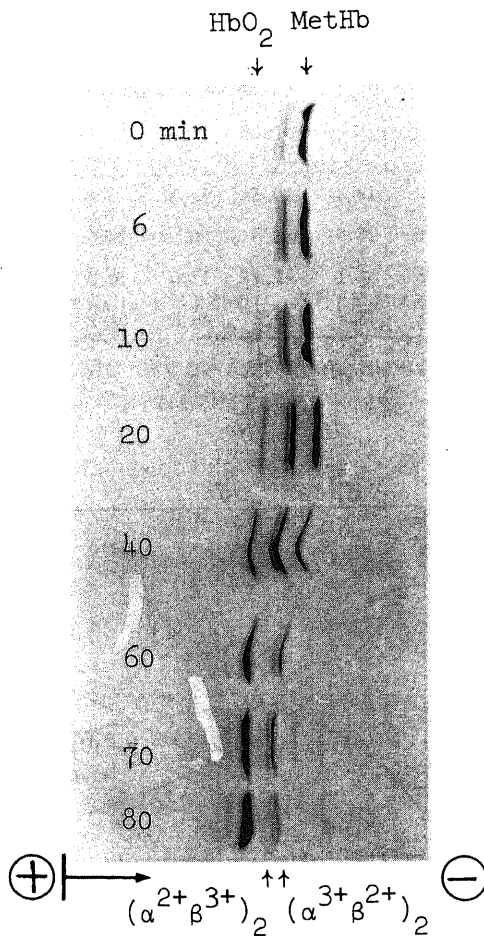


Fig. 5. Isoelectric focusing pattern of samples on Ampholine polyacrylamide gel plates. Gel photographs relating to samples obtained at intervals during methemoglobin reduction of red cells in the presence of methylene blue.

これらの値を、反応が  $(\alpha^3\beta^{3+})_2 \xrightarrow{k''} [(\alpha^2+\beta^{3+})_2, (\alpha^3+\beta^{2+})_2] \xrightarrow{k'''} (\alpha^2+\beta^{2+})_2$  のように進むと考慮して、微分方程式(1), (2), (3)に代入しコンピューターでシミュレートした。その結果、メト Hb, 2種類のメト型中間体 Hb およびオキシ Hb の各実験値は、期待値(実線)によく合った(図6)。

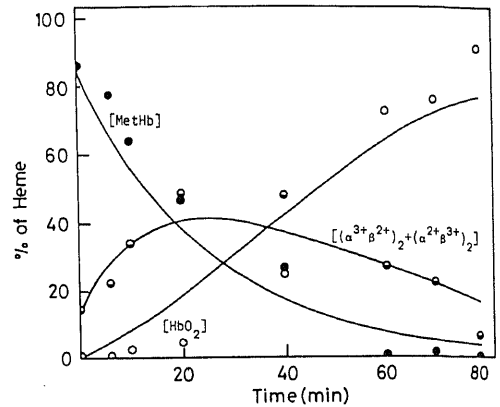


Fig. 6. Fractional changes in methemoglobin, intermediate hemoglobins, and oxyhemoglobin during the reduction of methemoglobin in the presence of methylene blue. The results in fig. 5 were analyzed by scanning at 630 nm and the fractions of methemoglobin, intermediate hemoglobins and oxyhemoglobin were plotted against time. (●): methemoglobin, (○):  $(\alpha^3+\beta^{2+})_2 + (\alpha^2+\beta^{3+})_2$ , (○): oxyhemoglobin. The curves drawn through the experimental points were obtained by the computer analysis.

Table 2. Fractions (%) of methemoglobin,  $(\alpha^3+\beta^{2+})_2$ ,  $(\alpha^2+\beta^{3+})_2$  and oxyhemoglobin during methemoglobin reduction in the nitrite-treated erythrocytes in the presence of methylene Blue. After isoelectric focusing of the samples obtained during the reduction of methemoglobin in the presence of methylene Blue, the gel plate was fixed and was scanned at 630 nm. By this procedure the fractions of methemoglobin,  $(\alpha^3+\beta^{2+})_2$ ,  $(\alpha^2+\beta^{3+})_2$  and oxyhemoglobin were estimated.

時間(分)	0	6	10	20	40	60	70	80
メト Hb	85.5	77.3	63.8	47.1	26.8	0.5	1.3	0
$(\alpha^3+\beta^{2+})_2$	9.4	16.6	26.2	35.1	32.9	20.3	17.5	5.7
$(\alpha^2+\beta^{3+})_2$	4.9	5.7	7.8	13.3	15.4	7.0	5.4	3.2
オキシ Hb	0.2	0.4	2.2	4.4	24.9	72.2	75.8	91.1

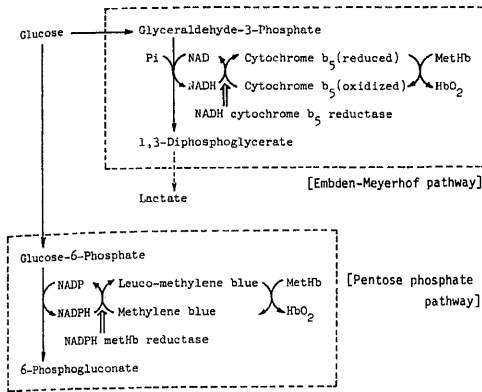


Fig. 7. Mechanism of methemoglobin reduction by methemoglobin reducing systems.

これらの変化は典型的な一次の逐次反応であり、メト Hb はメト型中間体 Hb を経てオキシ Hb に逐次的に変化すると考えられる。この場合の反応速度定数  $k_1'$ ,  $k_2'$  は、各  $(37.47 \pm 0.36) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ ,  $(29.29 \pm 0.27) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$  であった。

#### 考 察

ヒト赤血球では、Embden - Meyerhof 系と Pentose phosphate 系の 2 つの代謝系しか存在せず、グルコースはこれらの反応系で代謝される。赤血球中のメト Hb 還元反応は、グルコースが存在しない場合にはほとんど進行しない(井田, 未発表)。今回の実験のようにグルコース存在下でメト Hb 還元反応が進むということは、赤血球のメト Hb 還元反応が解糖系および Pentose phosphate 回路と共役していることを示している(図 7)。

Scott<sup>6)</sup>によると、赤血球溶血液でのメト Hb の還元に対するメト Hb 還元酵素の貢献度は、Embden - Meyerhof 経路を利用する NADH メト還元酵素が 73% で、Pentose phosphate 回路を利用する NADPH メト還元酵素が 6% であるという。これらの推定がそのまま赤血球にあてはまるならば、NADPH メト還元酵素活性は、メチレン・ブルー非存在下では、NADH メト還元酵素の約 1/12 ということになる。一方、メチレン・ブルーの添加により赤血球のメト Hb 還元活性は大幅に促進されるが、これはメチレン・ブルーにより赤血球の Pentose phosphate 回路が特異的に活性化され、その結果 Pentose phosphate 回路と共役した NADPH メト還元酵素系が十分に働きうようになったためである。これを裏付ける証拠として、Pentose phosphate 回路の鍵酵素であるグルコース-6-リン酸水素酵素が欠損した患者(先天性 G-6-PD 欠損症)の

赤血球では、メト Hb 血症が引き起こされた場合でもメチレン・ブルーの投与効果がないことがあげられる<sup>16)</sup>。正常の赤血球の場合は、本実験で示したようにメチレン・ブルーがひじょうに大きな効果を示す。本実験によって、メチレン・ブルー存在下 [ $k_1' = (37.47 \pm 0.36) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ ,  $k_2' = (29.29 \pm 0.27) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ ] のメト Hb 還元活性は、メチレン・ブルー非存在下 [ $k_1' = (1.138 \pm 0.038) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ ,  $k_2' = (0.802 \pm 0.030) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ ] に比べて約 30 倍程促進されていることが明らかになった。このことは、メチレン・ブルー添加の効果は、実際の赤血球中では約 400 倍にもなっていることを示している。それ故、遺伝的に NADH チトクローム  $b_5$  還元酵素が欠損したメト Hb 血症<sup>17)</sup> の患者にメチレン・ブルーが投与されることがあるが、これは残存している NADPH メト Hb 還元酵素を活性化していることにほかならない。

また、図 1, 2 に示したように、赤血球のメト Hb 還元において 2 種類のメト型中間体 Hb [ $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$ ,  $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$ ] が生成されることが明らかになった。特に  $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$  のレベルは  $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$  よりも常に高く存在したが、このことはメト Hb 還元において  $\alpha$  鎖よりも  $\beta$  鎖の方が NADH および NADPH メト Hb 還元酵素によって還元されやすいことを示している。その理由としては、これらの酵素系のメト Hb の最終電子供与体であるチトクローム  $b_5$  とメチレン・ブルーの酸化還元電位が Hb の  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖よりも低いためであることが考えられる [ $(\beta$  鎖 =  $0.113 \text{v}$ )<sup>18)</sup> > ( $\alpha$  鎖 =  $0.052 \text{v}$ )<sup>18)</sup> > (チトクローム  $b_5$  =  $0.02 \text{v}$ )<sup>19)</sup> > (メチレン・ブルー =  $0.011 \text{v}$ )<sup>19)</sup>。友田ら<sup>13)14)</sup>は、赤血球より精製した NADH チトクローム  $b_5$  還元酵素と NADPH フラビン酵素を用いてメト Hb 還元を調べ、このことを明らかにしている。因みに、酸化還元電位が  $\beta$  鎖と  $\alpha$  鎖の間にあるアスコルビン酸 ( $E_0[V] = 0.058$ )<sup>20)</sup> によるメト Hb 還元反応では、中間体として  $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$  しか存在しない<sup>12)21)</sup>。

なお、遺伝性 NADH チトクローム  $b_5$  還元酵素欠損症の患者赤血球では  $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$  と  $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$  が高い濃度で存在していることが明らかになっている<sup>22)</sup>、この場合も  $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2 > (\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$  という関係が成り立っている。この赤血球ではメト Hb 還元系がほとんど働いていないので、これらのメト型中間体 Hb は Hb の自動酸化によって生じたものと考えられ、この場合は Hb の  $\alpha$  鎖の方が  $\beta$  鎖よりも酸化されやすいことを示している。

また、 $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$  や  $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$  のようなメト型中間体 Hb は還元型 Hb [ $(\alpha^{2+}\beta^{2+})_2$ ] よりも酸素親和性が強い<sup>23)</sup>、これはいわゆる Dahling Roughton 効果<sup>24)</sup> として説明がつく。すなわち、メト型 Hb が増加するにつれ

て酸素親和性が高くなるというものである。このことから、メト Hb 血症の赤血球の酸素運搬能は比較的良いと考えられる。この場合、赤血球の酸素放出能は逆に低下していると考えられ、生理的には不都合である。しかし、Vermold ら<sup>25)</sup>は、遺伝性 NADH チトクローム  $b_5$  還元酵素欠損症の患者赤血球の 2,3-ジホスホグリセリン酸(酸素化 Hb に結合して酸素放出を促す)が正常赤血球の約 2 倍存在することを示しており、メト Hb 血症でのメト型中間体 Hb の増加による赤血球酸素放出能はかなり回復していることを示唆している。

以上、NADH チトクローム  $b_5$  還元酵素、NADPH メト Hb 還元酵素によりメト Hb が赤血球においてどのように還元されるかを調べたが、反応中のメト Hb、メト型中間体 Hb、オキシ Hb の変動はコンピューターによる期待値とよく一致しており、いわゆる一次逐次反応で進行することが明らかになった。また、メチレン・ブルーの存在下でも非存在下でも、 $k_1$  と  $k_2$  の間にあまり差がないことから [メチレン・ブルー(+):  $k_1' = (37.47 \pm 0.36) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ ,  $k_2' = (29.29 \pm 0.27) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ ; メチレン・ブルー(-):  $k_1 = (1.138 \pm 0.038) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ ,  $k_2 = (0.802 \pm 0.030) \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ ], メト Hb とメト型中間体 Hb の間には基質としての反応性にあまり差がないと考えられる。

今後、これらのメト Hb 還元系が種々の病態においてどのように働くかを詳しく検討する必要があると思われる。

## 結 論

ヒト赤血球中でおこるメト Hb 還元反応を生理的条件下 (37°C, pH 7.4) において調べ、その反応の変化を平板ゲル等電点電気泳動法を用いて分析した。

1. ヒト赤血球中のメト Hb は、メチレン・ブルーの有無にかかわらず、2 種類のメト型中間体 Hb [ $(\alpha^{3+} \beta^{2+})_2$ ,  $(\alpha^{2+} \beta^{3+})_2$ ] を経てオキシ Hb に還元された。

2. メチレン・ブルーの有無にかかわらず、2 種類のメト型中間体 Hb の量的関係は常に  $(\alpha^{3+} \beta^{2+})_2$  の方が  $(\alpha^{2+} \beta^{3+})_2$  よりも多かった。これらの量的関係を経時的に調べ反応速度定数を推定した。このような量的関係は酸化還元電位によって説明される。

3. メチレン・ブルー存在下ではメト Hb 還元反応は著しく進行した。この促進は、Pentose phosphate 回路と共役した NADPH メト Hb 還元酵素系が活性化されることによると考えられ、赤血球中では約 400 倍活性化されていると推定される。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った、米山良昌教

授に深甚の謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたって、御教示を頂いた友田雄夫助教授をはじめ、第一生化学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

さらに、反応の動的解析に際し、貴重な御助言、御協力を頂いた、本学薬学部、辻彰教授に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Bodansky, O.: Methemoglobinemia and methemoglobin-producing compounds. *Pharmacol. Rev.*, **3**, 144 - 196 (1951).
- 2) Scott, E. M. & Hoskins, D. D.: Hereditary methemoglobinemia in Alaska Eskimos and Indians. *Blood*, **13**, 795 - 802 (1958).
- 3) Kiese, M.: Die Reduktion des Hämiglobins. *Biochem. Z.*, **316**, 264 - 294 (1944).
- 4) Sugita, Y., Nomura, S. & Yoneyama, Y.: Purification of reduced pyridine nucleotide dehydrogenase from human erythrocytes and methemoglobin reduction by the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **246**, 6076 - 6078 (1971).
- 5) Passon, P. G. & Hultquist, D. E.: Soluble cytochrome  $b_5$  reductase from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **275**, 62 - 73 (1972).
- 6) Scott, E. M., Duncan, I. M. W. & Ekstrand, V.: The reduced pyridine nucleotide dehydrogenase of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **240**, 481 - 4 (1965).
- 7) Yubisui, T., Matsuki, T., Tanishima, K., Takeshita, M. & Yoneyama, Y.: NADPH flavin reductase in human erythrocytes and the reduction of methemoglobin through flavin by the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1469 - 1474 (1977).
- 8) Gibson, Q. H.: Reduction of methaemoglobin in red blood cells and studies on cause of idiopathic methaemoglobinaemia. *Biochem. J.*, **42**, 13 - 23 (1948).
- 9) Huennekens, M. E., Kerwar, G. K. & Kajita, A.: Hereditary disorders of erythrocyte metabolism. (Beutler, E. ed) p.87 - 101, Grune and Stratton, New York, 1969.
- 10) Bunn, H. F. & Drysdale, J. W.: The separation of partially oxidized hemoglobins. *Biochim. Biophys. Acta.*, **229**, 51 - 57 (1971).
- 11) Huisman, T. H.: Studies on the heterogeneity of hemoglobin. *Arch. Biochem.*, **113**, 427 - 434 (1966).
- 12) Tomoda, A., Takeshita, M. & Yoneyama, Y.: Characterization of intermediate hemoglobin



- produced during methemoglobin reduction by ascorbic acid. *J. Biol. Chem.*, **253**, 7415 - 7419 (1978).
- 13) Tomoda, A., Yubisui, T., Tsuji, A. & Yoneyama, Y.: Kinetic studies on methemoglobin reduction by human red cell NADH cytochrome  $b_5$  reductase. *J. Biol. Chfm.*, **254**, 3119 - 3123 (1979).
- 14) Tomoda, A., Yubisui, T., Tsuji, A. & Yoneyama, Y.: Changes in intermediate haemoglobins during methemoglobin reduction by NADPH flavin reductase. *Biochem. J.*, **179**, 227 - 231 (1979).
- 15) Metzler, C. M. Technical Report no. 7292/69/7292/005, Upjohn, Kalamazoo.
- 16) Rosen, P. J., Johnson, C., McGehee, W. G. & Beutler, E.: Failure of methylene blue treatment in toxic methemoglobinemia. *Ann. Intern. Med.*, **75**, 83 - 86 (1971).
- 17) Scott, E. M.: The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. *J. Clin. Invest.*, **39**, 1176 - 1179 (1960).
- 18) Banerjee, R. & Cassoly, R.: Preparation and properties of the isolated alpha and beta chains of human hemoglobin in the ferric state. *J. Mol. Biol.*, **42**, 337 - 349 (1969).
- 19) Velick, S. F. & Strittmatter, P.: The oxidation-reduction stoichiometry and potential of microsomal cytochrome. *J. Biol. Chem.*, **221**, 265 - 275 (1956).
- 20) Ball, E. G.: Studies on oxidation reduction. *J. Biol. Chem.*, **118**, 219 - 239 (1973).
- 21) Tomoda, A., Tsuji, A., Matsukawa, S., Takeshita, M. & Yoneyama, Y.: Mechanism of methemoglobin reduction by ascorbic acid under anaerobic conditions. *J. Biol. Chem.*, **253**, 7420 - 7423 (1978).
- 22) Tomoda, A., Imoto, M., Hirano, M. & Yoneyama, Y.: Analysis of met-form haemoglobins in human erythrocytes of normal adults and of a patient with hereditary methaemoglobinaemia due to deficiency of NADH - cytochrome  $b_5$  reductase. *Biochem. J.*, **505** - 507 (1979).
- 23) 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).
- 24) Darling, R. C. & Roughton, F. J. W.: The effect of methemoglobin on the equilibrium between oxygen and hemoglobin. *Am. J. Physiol.*, **137**, 56 - 68 (1942).
- 25) Versmold, H., Hohne, E., Riegel, K., Betke, K. & Kleihauer, E.: Oxygen carrying functions of blood in hereditary methemoglobinemia: Ambivalent effects of 2, 3 - diphosphoglycerate. p 171 - 174. In E. Gerlach, K. Moser, E. Deutsch & W. Wilmanns (ed.), *Erythrocytes, Thrombocytes, Leukocytes*, Georg Thieme Publishers, Stuttgart, 1973.

**Reduction of Methemoglobin in Human Red Cells** Masayoshi Ida, Department of Biochemistry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - *J. Juzen Med. Soc.*, **91**, 794-802 (1982)

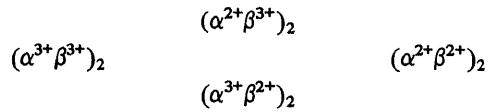
**Key words:** Human red cell, Methemoglobin, Methemoglobin reduction, Intermediate hemoglobin.

#### Abstract

The reduction of methemoglobin in the nitrite treated human red cells was studied in the presence or absence of methylene blue under the physiological conditions (pH 7.4, 37°C).

It was found that the two intermediate hemoglobins such as  $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$  and  $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$  were produced during the reduction of methemoglobin, by using the isoelectric focusing electrophoresis on Ampholine polyacrylamide gel plates. Regardless of the presence or absence of

methylene blue, the contents of  $(\alpha^{3+}\beta^{2+})_2$  were always greater than those of  $(\alpha^{2+}\beta^{3+})_2$  during the reduction. In the presence of methylene blue, the reduction of methemoglobin in the cells were considerably accelerated. The differences in the contents of the intermediate hemoglobins were explained by the differences in redox potentials of  $\alpha$  and  $\beta$  chains in methemoglobin. From these results, the course of methemoglobin reduction in human red cells was suggested as follows;



The actual contribution of methemoglobin reducing systems including NADH cytochrome  $b_5$  reductase and NADPH methemoglobin reductase was estimated by the comparison of the reaction rate constants of methemoglobin reduction. On the basis of these results, the mechanism of methemoglobin reduction in human red cells was discussed.