ヘモグロビンサブユニットの過酸化水素によるヘミクロームの生成

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 杉本, 和 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8679

金沢大学十全医学会雑誌　第86巻　第5・6号　686—713（1977）

ヘモグロビンサブユニットの過酸化水素による ヘミクロームの生成

金沢大学医学部生化学第一講座（主任：米山良昌教授）
金沢大学医学部生化学第一講座（指導：友田爾夫講師）
杉　本　　和

（昭和52年10月6日受付）

ヘミクロームはヘム鉄の第5，第6配位座にイミダゾールなどの塩基性窒素が結合したヘムの誘導体であるが，ヘモグロビンから誘導されるヘミクロームは第5位にグロビンのF（8）ヒスチヂン，第6位にE（7）ヒスチヂンが結合していると考えられている[1]．

ヘモグロビン由来のヘミクロームは生体内ではハインツ小体の成分としてサラセミア血症，一部の不安定血色素症の赤血球内に存在することが確められており，ヘモグロビンの変性，更に分解の中間体と考えられる[2,3]．それ故ヘミクローム生成の機序を明らかにすることはヘモグロビンの変性，次いで起こる赤血球の破壊の過程を知る上に重要と思われる．

これまで in vitro でのヘモグロビン由来のヘミクローム生成はヘモグロビンサブユニットの自動酸化[4]，異常ヘモグロビンの自動酸化[5]，またはフェリシアン塩，サリチル酸塩などの酸化剤によるヘモグロビンサブユニットの酸化[6]においてみられることが報告されている．しかし，これらの報告は生理的条件からはずれたpH，温度，あるいは非生理的物質である酸化剤の使用による実験にもとづいており，生体内でのヘミクローム生成の原因および過程を説明できるとは考えられない．

そこで生体内に生理的に存在すると考えられる過酸化水素およびその生成系を用いてヘモグロビンサブユニットへの影響をみたところヘミクローム生成が容易に起こることが明らかになった．そこで種々の条件下で過酸化水素によるヘモグロビンサブユニットのヘミクローム生成を調べた．本報告ではこれらの実験結果から，ヘミクローム生成とヘモグロビン構造との関係，ヘミクローム生成に対するヘモグロビンのSH基の役割りを検討し，赤血球内でのヘミクローム生成の可能性とその機構の解明を試みた．

実験材料および実験方法

1．実験材料

ヘモグロビンは正常赤血球から Huisman らの方法[7]で DEAE Sephadex カラムクロマトグラフィで精製した．精製した標品は catalase，superoxide dismutase（以下SODと略記）の活性はみられなかった．

ヘモグロビンのα鎖，β鎖は Bucci の方法[8]に従いヘモグロビンに p-chloromercuribenzoate（以下PCMBと略記）の添加により分離した．ヘモグロビンサブユニットに結合したPCMBの除去は Tyuma らの方法[9]によった（以下遊離のSH基をもったα鎖，β鎖をそれぞれα_{SH}，β_{SH}，PCMBの結合したα鎖，β鎖をそれぞれα_{PMB}，β_{PMB}と略記）．

2．過酸化水素によるヘミクローム生成

ヘモグロビンサブユニット30～50μMを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）に過酸化水素120μMを加え，Hitachi 124自記分光光度計またはユニオン技研SM401型自記分光光度計を用い吸収スペクトルの変化を波長578nmまたは500～650nm，240～320nmにて25℃で測定した．

3．過酸化水素生成系によるヘミクローム生成

酵素による過酸化水素生成系として xanthine oxidase 系および glucose oxidase 系を用いた．これらの系では1mM xanthine，1mM glucoseを基質として用い0.1Mリン酸緩衝液中，25℃でそれぞれ30μM/min，15μM/minの速度で過酸化水素を生成した．これらの酵素系を用いてヘモグロビンサブユニットのヘミクローム生成を578nmの吸収の変化で調べた．

4．ESR（電子スピン共鳴 electron spin

Hemichrome Formation from Hemoglobin Subunits in the Presence of Hydrogen Peroxide. **Kazu Sugimoto,** The First Department of Biochemistry. (Director : Prof. Y. Yoneyama.), School of Medicine, Kanazawa University.

resonance）スペクトルの測定

ESR スペクトルは 0.1M リン酸緩衝液(pH7.0)中，室温で α_{SH}（0.65mM）または β_{SH}（0.73mM）に過酸化水素（1.2mM）を添加後，それぞれ 20 分後，15 分後に日本電子 JES-PE-3X 電子スピン共鳴装置を用い，X バンドにおいて－150℃で測定した．

5．PCMB 添加の実験

β_{SH}（25μM）および α_{SH}（25μM）に PCMB を濃度を変えて（0－50μM）添加後，過酸化水素（120μM）によるヘミクローム生成速度を 25℃，578nm で測定した．

実験結果

1．過酸化水素によるヘモグロビンサブユニットの酸化

α_{SH}，α_{PMB}，β_{SH}，β_{PMB} の過酸化水素による可視部吸収スペクトルの時間的変化を図 1 に示す．過酸化水素によりヘモグロビンの 541nm，578nm の吸収の山は消失し 535nm に吸収の山，565nm に肩をもつヘミクローム型の吸収があらわれる．このさい 525nm および 582nm に等吸収点がみられる．さらに放置するとヘミクローム型の吸収スペクトルの基線が上昇してくるがこれはヘミクロームは不安定であって沈澱しやすいのでそのためと思われる．図 1（D）に示すように β_{PMB} でとくに沈澱生成が早い．生成したヘミクローム型の吸収はハイドロサルファイドで還元すると図 1（A）破線に示すように 558，528nm に吸収の山をもつヘモクローム様物質が得られる．これらの図より過酸化水素に対する反応性は $\beta_{PMB} > \alpha_{PMB} > \alpha_{SH} > \beta_{SH}$ の順に高いことがわかる．

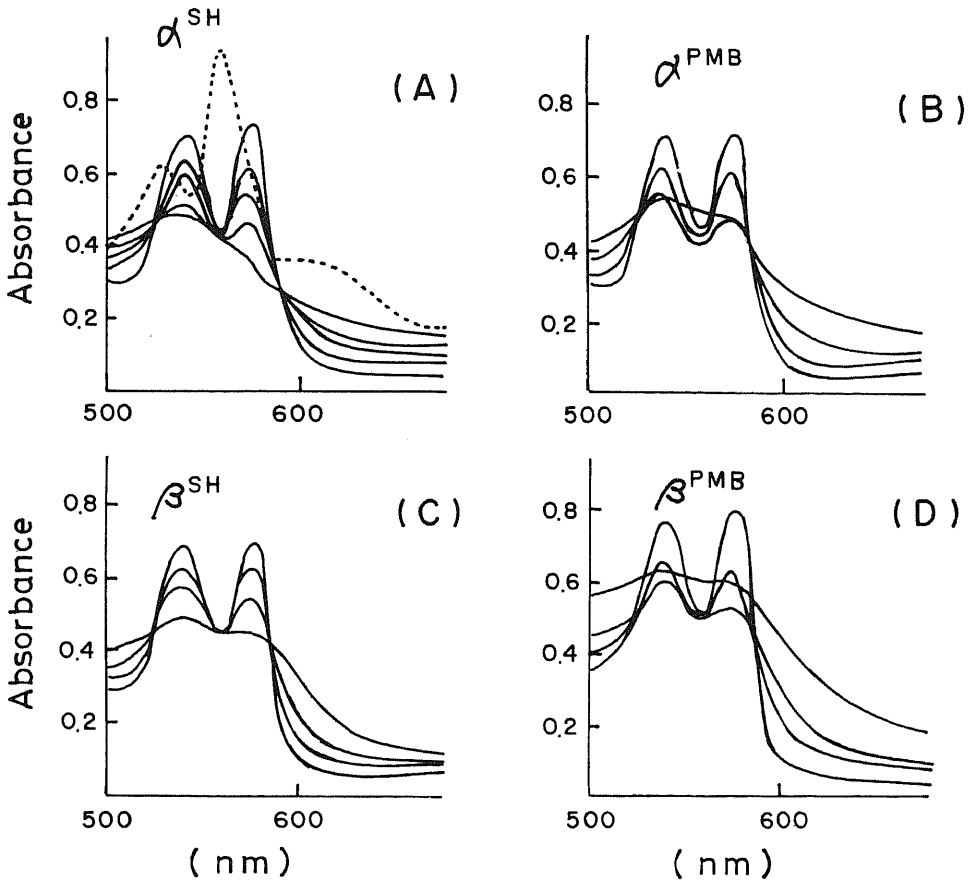

図1　過酸化水素によるヘモグロビンサブユニットの時間的変化
A）α_{SH}（48μM）過酸化水素添加後 0，0.5，2，5分後
B）α_{PMB}（47.9μM）過酸化水素添加後 0，0.5，2，4分後
C）β_{SH}（46.7μM）過酸化水素添加後 0，0.5，2，10分後
D）β_{PMB}（52.7μM）過酸化水素添加後 0，0.5，2，5分後

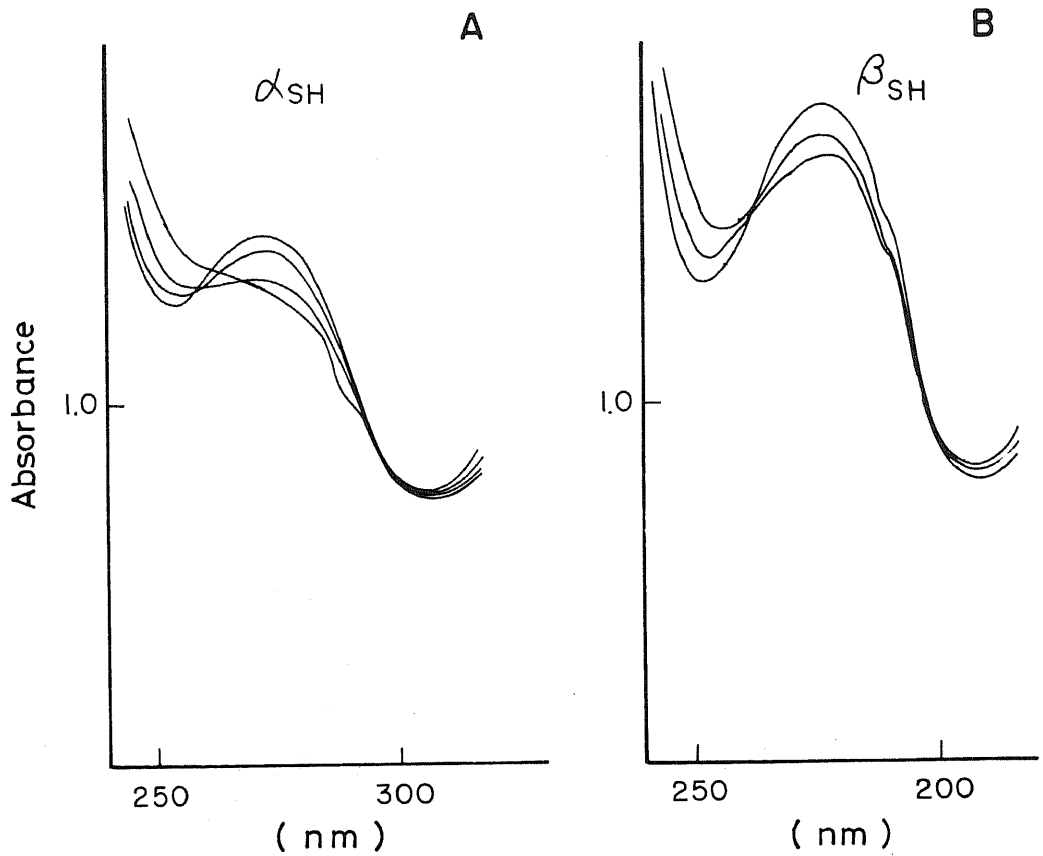

図2 過酸化水素によるヘモグロビンサブユニットの時間的変化
A) αSH (49.0μM) 過酸化水素添加後 0,0.2,1,3分後
B) βSH (47.0μM) 過酸化水素添加後 0,1,3分後

過酸化水素による吸収の変化は紫外部領域においても観察される(図2A,B). 274.5nmの吸収減少はチロシンおよびトリプトファンの分解を意味すると思われる. これらの吸収はヘミクロームに特有であることが知られており, ヘモグロビンサブユニットは過酸化水素によりヘミクロームに変化することが紫外部領域においても認められる.

過酸化水素によるヘミクローム生成反応は 1000 unit catalase により完全阻害されるが, 30 unit SOD による影響は全くみられない.

2. 過酸化水素生成によるヘミクローム生成

Xanthine oxidase 系と glucose oxidase 系は過酸化水素を生成することが知られているが, これらの酵素系によるヘモグロビンサブユニットのヘミクロームの変化を 578nm の吸収で測定した (図 3). αSH, βSH いずれの場合もこれらの酵素系の添加後, 経時的に 578nm の吸収は減少する. 最終生成物の可視部吸収スペクトルは過酸化水素による酸化生成物と一致するのでこれらの反応系で生成する物質はヘミクロームであると考えられる. これらの反応系では 1000 unit catalase により約 88 %のヘミクローム生成の阻害がみられるが, 30 unit SOD の存在下では xanthine oxidase 系でいく分促進効果があった.

3. ESR によるヘミクロームの同定

過酸化水素によるヘモグロビンサブユニットの酸化生成物がヘミクロームであることをさらに同定するために ESR を用いた. 図 4 は αSH, βSH に過酸化水素を加えてからそれぞれ 20 分後, 15 分後の ESR スペクトルである. g = 2.45,2.29,2.05 に吸収の山がみられ, g = 6 付近の高スピン領域には吸収はみられない. これはヘミクロームの典型的な ESR スペクトルとして報告されているもの[6]とよく一致している.

αSH において特にみられる g = 2 の大きな吸収は本実験で特異的に観察されるが, これはスーパーオキ

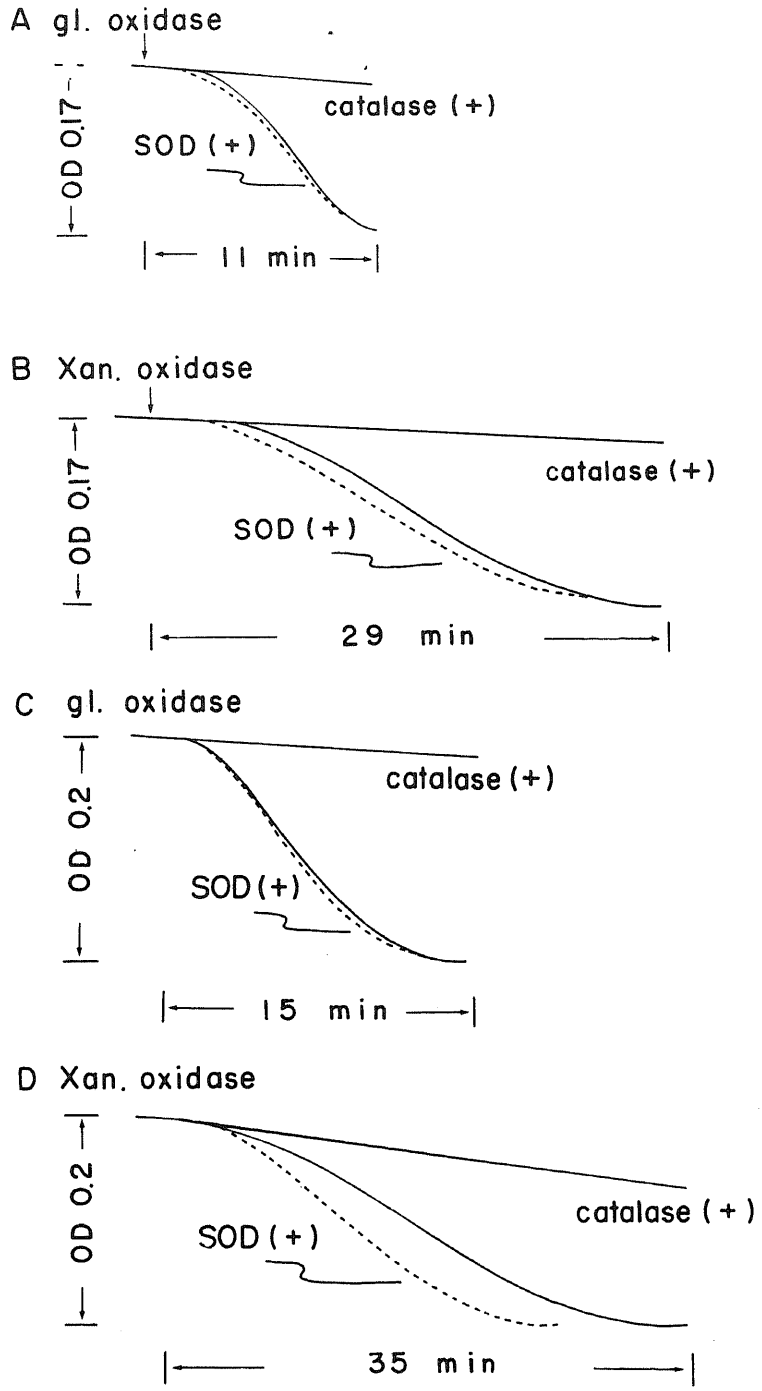

図3　過酸化水素生成系によるヘモグロビンサブユニットの酸化
A）グルコースオキシダーゼ系による α_{SH} (42.7μM) の変化
B）キサンチンオキシダーゼ系による α_{SH} (42.7μM) の変化
C）グルコースオキシダーゼ系による β_{SH} (42.0μM) の変化
D）キサンチンオキシダーゼ系による β_{SH} (42.0μM) の変化

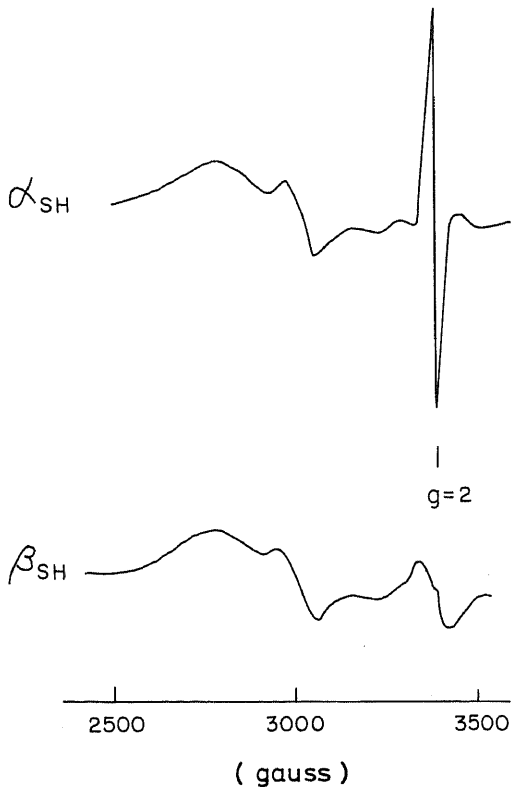

図4 過酸化水素添加後のヘモグロビンサブユニットの ESR スペクトル
α_{SH} (0.65mM), β_{SH} (0.73mM) に過酸化水素 (1.2mM) を添加後それぞれ20分後，15分後

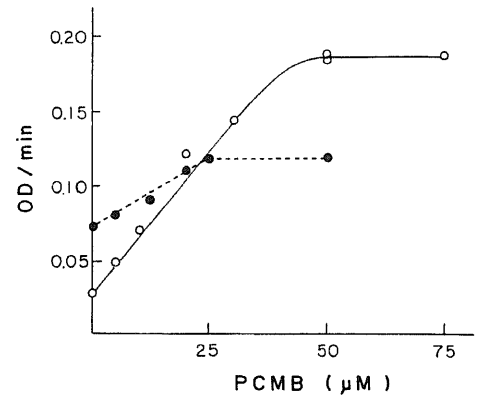

図5 β_{SH} (○——○) および α_{SH} (●——●) の PMB 化とヘミクローム生成速度

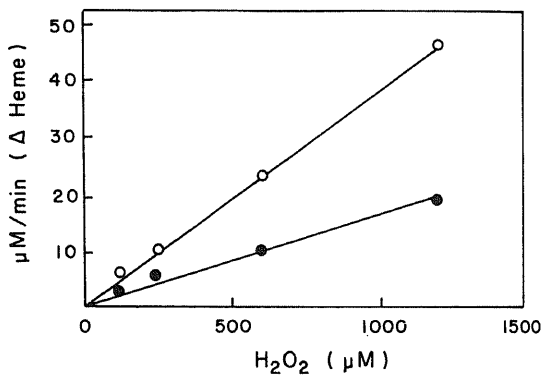

図6 過酸化水素濃度の影響

サイドラジカルの ESR スペクトルとして知られている g 値[10]と一致するが，しかしその本体については明らかでない．

4．ヘミクローム生成と SH 基

図 1 に示すように α_{SH}, β_{SH} に比し α_{PMB}, β_{PMB} ではヘミクローム生成が速い．これはヘモグロビンサブユニットの SH 基に PCMB の結合がヘミクローム生成に関係していることを示唆する．そこで SH 基への PCMB 添加の比率とヘミクローム生成速度の関係を α 鎖および β 鎖について調べた（図 5 ）．

SH 基への PCMB 添加によりヘミクローム生成速度は PCMB の濃度に比例して上昇し，1 分子の α 鎖に対し 1 分子以上の PCMB，1 分子の β 鎖に対しては 2 分子以上の PCMB の存在下でヘミクローム生成速度は最大に達する．この最大値は α_{PMB} および β_{PMB} の速度と一致し，最大速度を持つときは α 鎖に存在する 1 個の SH 基，β 鎖では 2 個の SH 基に対し PCMB が飽和していることがわかる．以上のことから α_{SH} と α_{PMB} の反応速度の差および β_{SH} と β_{PMB} の反応速度の差は PCMB の結合によって生じるといえる．

5．過酸化水素濃度との関係

ヘモグロビンサブユニットと過酸化水素の反応様式を知るために，過酸化水素の濃度を 120 ～ 1200μM の範囲で変えヘモグロビンサブユニット (α_{SH}, β_{SH}) のヘミクローム形成の初速度を測定した．図 6 に示すようにヘミクローム生成の初速度は過酸化水素濃度に比例する．この比例関係はヘミクローム生成がヘモグロビンサブユニット中のヘム鉄と過酸化水素との二次反応であることを示す．二次反応として α_{SH}, β_{SH} の反応速度定数を計算するとそれぞれ $9.2 \times 10^2 M^{-1} \cdot min^{-1}$, $3.82 \times 10^2 M^{-1} \cdot min^{-1}$ となる．これらの結果からヘモグロビンサブユニット中のヘム鉄 1 分子は過酸化水素 1 分子と反応してヘミクロームを生成すると推定される．

考　　察

Brunori ら[4]はヘモグロビンサブユニットの自動酸化，Rachmilewitz ら[6]はフェリシアン塩などの酸化剤を用いたヘモグロビンサブユニットの酸化にさいしてヘミクロームの生成がみられることを報告している．これらの研究者はヘモグロビンが四量体の状態ではヘミクロームが得られないことも示している．一方，ヘモグロビン四量体は過酸化水素によりメトヘモグロビンを形成することを Eyer ら[11]が報告している．著者ら（未発表）も正常ヘモグロビン四量体に過酸化水素を作用させた場合はメトヘモグロビンを形成することをみ，Eyer らの報告を確めた．

これらのことから正常ヘモグロビン四量体とヘモグロビンサブユニットとでは酸化に対する反応様式の違いがあると考えられる．そしてこの反応様式の差異はヘモグロビンの構造と関連があると思われる．すなわちヘモグロビン四量体はいわゆるヘム間相互作用がありこの相互作用の発現にはα鎖，β鎖間接触面が重要なことが知られているが，このα・β鎖間接触面はまたヘムにも近くヘモグロビンの過酸化水素との反応にもα鎖，β鎖よりなるヘモグロビン四量体と同種の鎖よりなるサブユニットとの間に差異を生ずるのであろう．つまり四量体内でα鎖，β鎖が配置することによりE（７）ヒスチヂンのヘム鉄第６配位を妨げ，そのためヘミクローム生成が起らずヘム鉄の酸化のみが行なわれてメトヘモグロビンが生成されるといえよう．

一方ヘモグロビンサブユニットではα鎖，β鎖の同種鎖のみよりなるのでE（７）ヒスチヂンはヘム鉄第６位に容易に結合でき，ヘミクロームの生成にいたると考えられる．

不安定血色素ではそのほとんどがヘム鉄近傍の変異，一部はα・β鎖間接触面近くに変異があるがそのため過酸化水素による酸化によってE（７）ヒスチヂンのヘム鉄との結合が容易となりヘミクロームを生成し，最終的にはヘモグロビンの変性物であるハインツ小体生成をみると思われる．

フェリシアン塩などの酸化剤によるヘモグロビンサブユニットのヘミクローム生成時には中間体としてメトヘモグロビンサブユニットが存在することが吸収スペクトルとESRスペクトルから同定されている[6]．過酸化水素によるヘモグロビンサブユニットの酸化においては図１にみられるように混濁を原因とする基線の上昇以外には等吸収点のずれはみられず吸収スペクトルからはメトヘモグロビンサブユニットの存在は考えられない．ESRスペクトルからもメト型ヘモグロビンに特有なｇ＝６付近のシグナルは反応の過程中または反応後にも検出されなかった．

過酸化水素によるヘミクロームの生成はメトヘモグロビンサブユニットを中間体としないと考えるのは以上の結果に加えてシアン塩存在下でのヘミクローム生成の実験による．メトヘモグロビンサブユニットにシアンが配位したシアン化メトヘモグロビンサブユニットは安定であってフェリシアン塩または過酸化水素によってヘミクロームを生成しない．シアン塩存在下でのフェリシアン塩によるヘモグロビンサブユニットの酸化ではシアン化メトヘモグロビンサブユニットが最終生成物であり，ヘミクロームの生成はみられない[12]．ところが過酸化水素によるヘモグロビンサブユニットの酸化ではシアン塩の有無にかかわらず生成するのはヘミクロームであり，メトヘモグロビンサブユニット，あるいはシアン化メトヘモグロビンサブユニットの生成は全くみられなかった．

これらの事実から過酸化水素によるヘモグロビンサブユニットの酸化はフェリシアン塩などの酸化剤による酸化と違った反応過程をとるのであってメトヘモグロビンサブユニットのような中間体は存在しないといえよう．

αまたはβ鎖のSH基をPCMB化するとヘミクローム生成は速くなる（図１）．またヘミクローム生成速度はヘモグロビンサブユニットのPCMB化に比例する（図５）．これらのことはヘモグロビンサブユニットに存在するSH基が過酸化水素による酸化反応に影響をもつことを示す．SH基のPCMB化はヘモグロビンの三次構造の変化を容易にすると考えられる．

ヘミクローム生成の際，一部のSH基が酸化されるという報告がある[5,14]．またSH基の酸化がヘミクロームないしハインツ小体生成に関係するという説[15]もあるが，Winterbourn ら[14]はSH基の酸化とヘミクローム生成とは直接関係がなく，SH基はフリーラジカルのスカベンジャーとして働くのではないかと述べている．

ヘモグロビンサブユニットの自動酸化[4]，異常ヘモグロビンの自動酸化[14]ではSODにより酸化が阻害されるが，本論文では図３にみられるようにSODにより阻害は認められずむしろ促進がみられた．SODはスーパーオキサイドから過酸化水素を生成する反応を触媒するが，生成した過酸化水素がヘミクローム生成反応に関与するためSODがヘミクローム生成を促進する結果となるものと思われる．Xanthine oxidase 系でSOD促進効果がみられたのは xanthine oxidase 系が過酸化水素のみならずスーパーオキサイドを生成

するためと考えられる.

過酸化水素生成系によるヘミクローム生成は図3に示すように catalase により完全に阻害されるものではないこと, catalase の過酸化水素に対する Km が高いこと[16]から catalase 活性の高い赤血球内においても catalase による分解をまぬがれた過酸化水素がヘモグロビンを酸化する可能性は大きい. ことにサラセミア血症のように過剰の α 鎖または β 鎖が存在する場合, 過酸化水素による持続的酸化がヘミクローム生成をもたらすものと考えられる.

結 語

1. ヘモグロビンサブユニットは過酸化水素および xanthine oxidase 系, glucose oxidase 系などの過酸化水素生成系により低スピン三価鉄化合物に酸化された. この酸化物は吸収スペクトルと ESR とからヘミクロームであることが明らかになった. このヘミクローム生成反応は catalase により阻害されるが, SOD では殆んど影響がない.

2. ヘモグロビンサブユニットの過酸化水素によるヘミクローム生成は α_{PMB} と β_{PMB} の反応速度が α_{SH} と β_{SH} のそれより速かった.

これらのヘミクロームは直接2価のオキシサブユニットより生成され, その間に3価のメト型を経由しない.

3. ヘモグロビンサブユニットの過酸化水素によるヘミクローム生成の二次反応速度定数は α_{SH} で $9.2 \times 10^2 M^{-1} \cdot min^{-1}$, β_{SH} で $3.82 \times 10^2 M^{-1} \cdot min^{-1}$ となった.

4. 正常ヘモグロビン四量体は過酸化水素によりメトヘモグロビンに酸化されるが, ヘミクロームは生成しないことが知られている. ヘモグロビン四量体では $\alpha \cdot \beta$ 鎖の四量体内配置のためにヘミクローム生成をみないものと思われる.

5. これらの成績にもとづき異常ヘモグロビン血症やサラセミア血症におけるヘミクローム生成に過酸化水素が関与しうることを論じた.

終始御懇篤なる御指導と御校閲を戴いた米山良昌教授に深く感謝いたします.

また, 御教示と御助力を戴いた友田燁夫講師はじめ第一生化学教室員各位に厚く御礼申し上げます.

文 献

1) **Rachmilewitz, E. A.** : Red Cell Structure and Metabolism (ed. by Ramot B.) p.94, Academic Press, New York, 1969.

2) **Rachmilewitz, E. A., Peisach, J., Bradley, T. B. & Blumberg, W. E.** : Nature, **222**, 248 (1969).

3) **Rachmilewitz, E. A. & White, J. M.** : Nature New Biol., **241**, 115 (1973).

4) **Brunori, M., Falcioni, G., Fioretti, E., Giardina, B. & Rotilio G.** : Eur. J. Biochem., **53**, 99 (1975).

5) **Winterbourn, C. C. & Carrell R. W.** : J. Clin. Invest., **54**, 678 (1974).

6) **Rachmilewitz, R. A., Peisach, J. & Blumberg, W. E.** : J. Biol. Chem., **246**, 3356 (1971).

7) **Huisman, T. H. J. & Dozy, A. M.** : J. Chromatogr., **19**, 160 (1965).

8) **Bucci, E. & Fronticelli, C.** : J. Biol. Chem., **240**, PC 551 (1965).

9) **Tyuma, I., Benesch, R. E. & Benesch, R.** : Biochemistry, **5**, 2957 (1966).

10) **Knowles, P. F., Gibson, J. F., Pick, F. M. & Bray, R. C.** : Biochm. J., **111**, 53 (1969).

11) **Eyer, P., Hertle, H., Kiese, M. & Klein, G.** : Mol. Pharm., **11**, 326 (1975).

12) **Rachmilewitz, E. A.** : Ann. N. Y. Acd. Sci., **165**, 171 (1969).

13) **Harvey, J. W. & Kaneko, J. J.** : Br. J. Haematol., **32**, 193 (1976).

14) **Winterbourn, C. C., McGrath, B. & Carrell, R. W.** : Biochem. J., **155**, 493 (1976).

15) **Jacob, H. S., Brain, M. C. & Dacie, J. V.**, : J. Clin. Invest., **47**, 2664 (1968).

16) **Ogura, Y.** : Arch. Biochem. Biophys., **57**, 288 (1955).

Abstract

Human hemoglobin subunits were converted to low spin ferric compound by hydrogen peroxide and hydrogen peroxide generating systems with xanthine oxidase or glucose oxidase. The low spin compound was identified as hemichrome by their optical and electron spin resonance spectra.

This conversion was completely or largely inhibited by catalase, while scarcely influenced by superoxide dismutase (SOD). P-Mercuribenzoate (PMB) derivatives of oxy α and β chains reacted faster with hydrogen peroxide than untreated oxy α and oxy β chains. The hemichrome was shown to be directly transformed from the oxy chains, not via met chains.

Normal hemoglobin tetramer is known to be oxidized by hydrogen peroxide to methemoglobin, not to hemichrome. It was considered that hemichrome formation was related to the quarternary structure of hemoglobin male and i. e., the polynerization of hemoglobin subunits to the tetramer seems to serve for protecting against the attack of oxidants, such as hydrogen peroxide.

Pathological importance of hydrogen peroxide was discussed from the view point of hemichrome formation associated with abnormal hemoglobin and thalassemia.