

ヤツメウナギ血色素の四次構造と機能

金沢大学医学部第一生化学講座 (主任: 米山良昌教授)

(指導: 杉田良樹助教授)

土 肥 祥 子

(昭和48年2月5日受付)

本論文の要旨は第23回1972年11月蛋白構造討論会において発表した。

哺乳類のヘモグロビンはアロステリック蛋白質の典型であり、その構造と機能の関係に関する研究は膨大な量にのぼっている。しかし酸素平衡曲線などの定量的研究は主としてヒト、ウマ等高等な哺乳動物に限られていた。ところがこれらのヘモグロビンは2つの異名鎖から成る四量体であり、どのようなアロステリックモデルがふさわしいかを考えるには解析すべきパラメーターが多すぎる。ヘモグロビンの構造と機能の研究の為にパラメーターの少ない下等動物ヘモグロビンで詳細な定量的研究は重要であり、また他面、ヘモグロビンの比較生化学、進化の点から考えても興味深い。これまでにヤツメウナギ (*Petromyzon marinus*) のヘモグロビンについて酸化型も還元型もpH依存性の解離-会合平衡を示すことが Briehl¹⁾ によって報告された。彼はヤツメウナギのヘモグロビンの特異な酸素平衡は還元型の単量体のみが酸素と反応するという仮説によって説明した。Behlke ら²⁾ はまた別な種のヤツメウナギ *Lampetra fluviatilis* からのヘモグロビンが解離-会合平衡にあり、酸性側では還元型のみならず配位子結合型ヘモグロビンも二量体や四量体まで会合することを示している。最近 Andersen ら³⁾ は *P. marinus* のヘモグロビンの配位子との反応の速度論的測定や沈降平衡法により、希薄溶液での酸素との結合定数と、二量体 \leftrightarrow 単量体の解離平衡恒数を報告し、ヤツメウナギのヘモグロビンの酸素平衡における協同作用は協同作用のない単量体、二量体のサブユニット相互作用によって説明されるとした。そして赤血球中でも還元型はほとんど二量体として、酸化型はほとんど単量体として存在し、四量体はこの解離-会合平衡にほとんど寄与していないと考えた。しかしながら彼らの希薄溶液での沈降平

衡の結果は蛋白溶液の非理想性等を考慮すると実際の赤血球などにみられる高濃度での解離-会合にまでは適用できないと思われる。

この論文では、希薄溶液については沈降平衡法で、高濃度については沈降速度法により広範囲な濃度の分子量分布を測定し、それと平行して吸収スペクトルの濃度変化や広範囲な濃度の酸素平衡を測定した。Andersen¹⁾ の観測とちがって、ヤツメウナギ *Entosphenus japonicus* のヘモグロビンの解離-会合平衡や酸素平衡には二量体よりもむしろ四量体が大きく貢献していることを支持する結果を得た。そして単量体 \leftrightarrow 二量体 \leftrightarrow 四量体の平衡系を仮定した会合定数と単量体と四量体の個有酸素結合定数によって、このヘモグロビンの特異的な機能の発現を定量的に説明でき、生理的条件下での機能を考察した。

実 験 材 料

ヤツメウナギの赤血球はカワヤツメ *Entosphenus japonicus* の心臓から注射器で採血した。赤血球はヘパリン入り生理食塩水で洗った後、血球部分の3倍量の蒸留水で溶血し、礎質は12,000rpm、15分の遠心沈澱で除いた。上清のヘモグロビン部分は Tris-EDTA-Borate 緩衝液pH8.6 (18.3g Tris, 2.8g Na₂EDTA, 3g Borate/liter) に対して透析し、蔗糖密度勾配電気泳動法により単離した主成分をヤツメウナギのヘモグロビンとした。ヘモグロビンの濃度はピリジンヘモクロームに換えて557nmでの分子吸光係数32.2mM⁻¹cm⁻¹を使って決定した。特にことわらない限り実験は全て0.1Mリン酸緩衝液中で行った。Tris は Sigma の製品を、Phenylisothianate (P TC), 1-Fluoro-2, 4-dinitrobenzene (FDNB),

The Quaternary Structure and Function of Blood Pigment from the lamprey *Entosphenus japonicus*. Yoshiko Dohi, Department of Biochemistry (I) (Director: Profs. Y. Yoneyama and Y. Sugita), School of Medicine, Kanazawa University.

Iodoacetate (IA), N-Ethylmaleimide (NEM), 標準 PTH-アミノ酸は和光純薬製を, P-Chloromercuribenzoate (PCMB), 無水ヒドラジンは市販品を再結晶化, 蒸留して使用した.

実験方法

I. アミノ酸分析

-20°の冷塩酸-アセトン(2NHCl-アセトン=2:1000)で処理して調製したグロビンは6NHCl 105°で封管中で17, 24, 48時間加水分解した. アミノ酸分析は日立KLA-3B自動アミノ酸分析機によった.

II. 末端分析

N末端分析は2, 4-Dinitrophenyl (DNP) 法⁵⁾とDopheideら⁶⁾の揮発性緩衝液を用いるPTC法とによった. DNPやPhenylthiohydantoin (PTH)誘導体はペーパークロマトグラフィー⁷⁾によって同定した.

またN末端をアシル化している基の決定は短時間のヒドラジン分解により生成したアシルヒドラジドをペーパークロマトグラフィー⁹⁾で同定した. このアシル基(formylと同定されたが)の定量はグロビンの加水分解液からエーテルで抽出し, 更に0.1N NaOH抽出液をクロモトロブ酸と反応させて分光学的に定量した.

C末端決定は赤堀ら¹⁰⁾のヒドラジン分解法により, 遊離のアミノ酸の同定は自動アミノ酸分析機で同定した.

III. SH基の修飾

ヘモグロビン中のシステインの個数はPCMBによる滴定をBoyer¹¹⁾の方法によって決定した. 修飾ヘモグロビンは種々のSH試薬をヘモグロビン中のSH基の20倍量加え, 反応後過剰のSH試薬は透析で除いたものを用いた.

IV. 沈降

沈降平衡は単色光の吸収走査装置のついたSpinco Model Eで行った. Yphantis¹²⁾の多重チャンネルセルを用い液柱を3mmの高さにし, 回転数20,000rpmで19~24時間平衡にさせた. 460-600nmのいくつかの波長での吸光度を記録した. 還元型ヘモグロビンの実験の場合はツンベルグ管中で吸引とQガス(ヘリウム:イソブタン(99.05:0.95))置換とをくりかえし, 更に側管に予じめ入れてあるヂチオナイト(1mg/ml)で完全に還元し, 更にN₂ガスを充滿したビニルバッグの中で超遠心機用セルに注入した. 実験の前後で, 還元型が変化しないことを吸収スペクトルで確かめてある.

沈降定数の測定はSpinco Model E分析用超遠心機で行い, 回転数は59,780rpmと56,100rpmでシュリーレン光学系を用いた. 希薄溶液の場合は合成界面セルを用い, また0.8mM以上の高濃度ヘモグロビンの場合は光路3mmのセルを用いた. 沈降定数*s*はシュリーレン図形の二次モーメントから計算した界面の移動から重量平均沈降定数をSvedberg¹³⁾の式により*s*_{20,w}に換算した. 重量平均分子量は式

$$\bar{M}_w = \frac{2RT}{\omega^2(1-\rho\bar{v})} \cdot \frac{d \ln C}{dr^2}$$

により計算した. ここでρは0.1Mリン酸緩衝液の密度で1.0061g/mlを, \bar{V} はヤツメウナギのヘモグロビンの偏比容でピクノメーターにより測定して0.736ml/gの値を使用した.

V. 拡散定数

拡散の測定はシュリーレン光学系のある日立ゼリウス電気泳動装置により光路12mmのセルで行った. 拡散時間は25-30時間とした. 還元型ヘモグロビンの場合には粉末ヂチオナイトをヘモグロビン溶液に加え, 溶液の上に酸素化を防ぐ為に流動パラフィンを重ねた. 沈降の実験と同様, 実験の前後で還元型が変化しないことを吸収スペクトルで確かめた. 拡散定数*Da*はシュリーレン図形の面積と高さの自乗と時間との関係*Da*=1/4πt·(A/H)²から計算され, これも*D*_{20,w}に換算した.

VI. 計算

分子量分布のデータの解析や理論的酸素平衡曲線は電子計算機FACOM230-35によって計算した.

VII. 吸収スペクトルと円偏光二色性(CD)

吸収スペクトルは日立自記分光光度計EPR-2型で測定し, 高濃度での吸光度は光路0.5cmと0.1cmのセルを用いて測定した. CDはJASCO ORD/UV 5分光光度計で222nmの負の吸収を種々のヘモグロビン濃度について, 光路1.0cm, 0.5cm, 0.1cmのセルを用いて測定した.

VIII. 酸素平衡測定

酸素平衡曲線は20°, 0.1Mリン酸緩衝液中で分光学的方法によって測定した. 酸素ヘモグロビン量は日立自記分光光度計EPR-2により酸素化型と還元型ヘモグロビンの可視部の吸収の差スペクトルによって決定した. 3mM以上の高濃度のヘモグロビンの酸素結合能はVan Slyke装置を使って検圧法¹⁴⁾で測定した.

実験結果

I. ヤツメウナギのヘモグロビンの精製

カワヤツメ *E. japonicus* からの溶血液上清は、アクリルアミドゲル電気泳動上で2本のバンドを示す。その1つは全体の92-93%で他の1つは7-8%を占める。Tris-EDTA-Borate 緩衝液pH8.6の蔗糖密度勾配電気泳動により分離された主成分を全ての実験に使った。この主成分はポリアクリルアミドゲル上で1本のバンドを示し、CM-セルロース、DEAE-セルロースのカラムクロマトグラフィー、等電点分画法等全て1本のバンドを示した。

この主成分のアミノ酸組成は表1に示す。この組成は Braunitzer と藤木⁽⁵⁾ によって報告された *L. fluviatilis* と全くよく似ている。主成分のN末端をDNP法とPTC法で決定した結果、ヘム1モル当り0.84モルの遊離のプロリンとヒドラジン分解法によりアン

ル化されたN末端は0.24モルのホルミル基があった。C末端にはヘム1モル当りチロシンが0.98モルみられた。この主成分はN末端がホルミル基でブロックされたものと遊離のプロリンより成っているわけであるが、両者はDEAE-セルロース、CM-セルロース、電気泳動で分離できず、これを一諸にして主成分として取り扱った。

II. 還元型のヤツメウナギヘモグロビンの分子量

還元型ヘモグロビンの沈降係数は図1Aに示す如くヘモグロビンの濃度に大きく依存しているのが特長である。ヘモグロビンの全濃度Ctはヘム当りであらわしてある。低濃度では還元型ヘモグロビンの沈降定数 $s_{20,w}$ は濃度の増加に伴ない急激に増加し、約1mM位の濃度で最高値に達し、その後更に濃度の増加に伴い通常の流体力学的効果によりゆっくり減少する。この約1mM以上の高濃度でのpH5.9における $s_{20,w}$ の濃度勾配は四量体であるヒトヘモグロビンのそれと非常によ

表1. *E. japonicus* からのヘモグロビンのアミノ酸組成

Amino acid.	Residue/mole protein. ⁽¹⁾	Braunitzer et al
Aspartic acid	14.11	14
Threonine	7.22 ⁽²⁾	7
Serine	15.24 ⁽²⁾	15
Glutamic acid	11.29	11
Proline	6.17	6
Glycine	6.53	7
Alanine	20.43	20
Valine	11.79	12
Methionine	5.73	6
Isoleucine	7.67	8
Leucine	9.13	9
Tyrosine	3.79	4
Phenylalanine	7.86	8
Lysine	13.28	13
Histidine	1.95	2
Arginine	4.26	4
Cysteine	0.97 ⁽³⁾	1
Tryptophan	2.40 ⁽⁴⁾	2
No. of Residues	149.77	149

(1) 24, 48時間加水分解後のアミノ酸のモル比の平均値

(2) 時間0に外挿した値

(3) P-Chloromercuribenzoate で滴定して決定

(4) 分光学的方法により決定

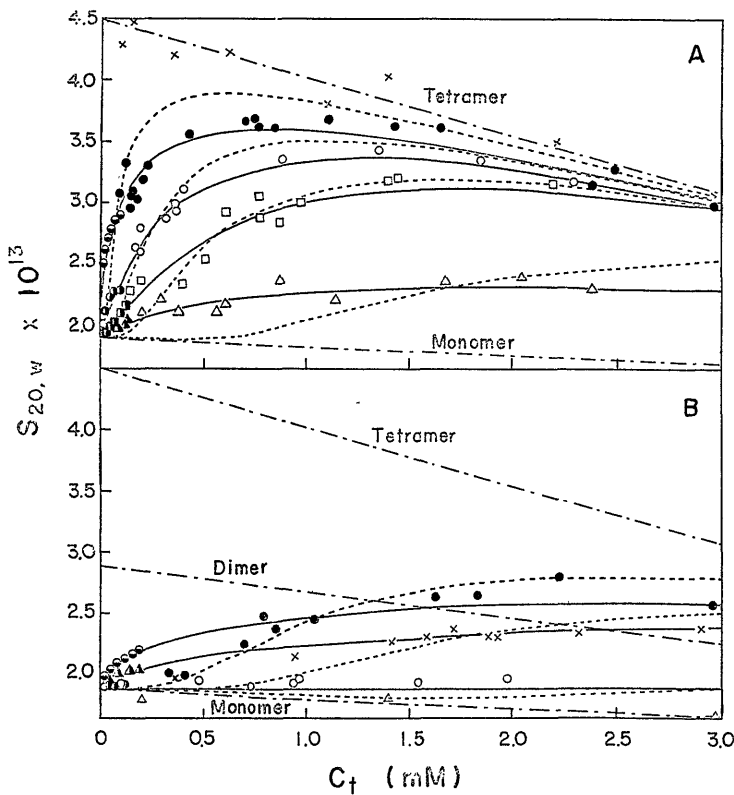
く似ている。このことは後に述べる拡散定数のデータと合わせて、ヒトヘモグロビンとこのヤツメウナギのヘモグロビンの物理化学的性質と分子量がほぼ同じであることを示唆している。図1Aからヤツメウナギの還元型ヘモグロビンは早い可逆的な解離-会合平衡にあり、その会合体は四量体より大きくなることはないと考えられる。この平衡はpH依存性でその会合はpH 5.6近くで最大であり、またどのpHでもヒトヘモグロビンの濃度勾配に近づく。

同様のことが拡散定数 $D_{20,w}$ の測定からもいえる。図2に20°で0.1Mリン酸緩衝液でのpH5.9とpH6.9の場合の濃度変化を示す。1 mM以上の高濃度での $D_{20,w}$

は $S_{20,w}$ の場合と同様に四量体であるヒトヘモグロビンのそれとほぼ同じ値を示す。高濃度の直線部分の濃度零への外挿より $s_{20,w}^0$ と $D_{20,w}^0$ はそれぞれ4.5Sと 6.30×10^{-7} が得られた。この値から高濃度でのヤツメウナギの還元型ヘモグロビンの分子量は Svedberg の式より67,200と計算され、これは四量体のヒトヘモグロビンとほぼ同じである。

低濃度でのヤツメウナギヘモグロビンの分子量は沈降平衡法で決定した。図3に示すようにセル中の濃度と中心よりの距離の自乗の関係は直線ではなく、ヘモグロビンの濃度が高くなるにつれて分子量が大きくなっていることを示唆している。また分子量の増加はpH

図1 ヤツメウナギのヘモグロビンの沈降係数の濃度変化



0.1M Na-K リン酸緩衝液, 20°.

各点は実験値で、実線、点線は理論値.

A. 還元型ヘモグロビン

●と○, pH 5.9; ○と●, pH 6.9; □と■, pH 7.4;

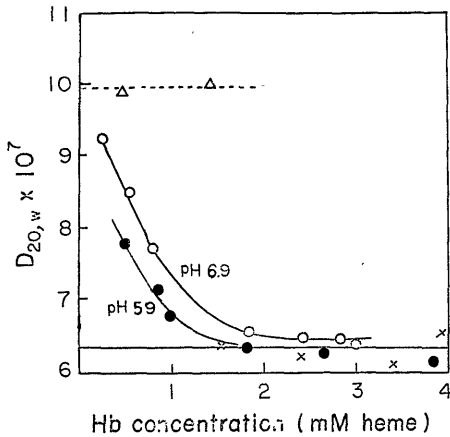
△と▲, pH 7.9; ×, ヒトヘモグロビン, pH 5.9.

半分黒い点は沈降平衡より求めた分子量を沈降係数に換算したもの.

B. 酸素化型ヘモグロビン

●と○, pH 5.9; ○と●, pH 6.9; ×と▲, pH 6.5; △, pH 7.9.

図2 ヤツメウナギヘモグロビンの拡散定数の濃度変化



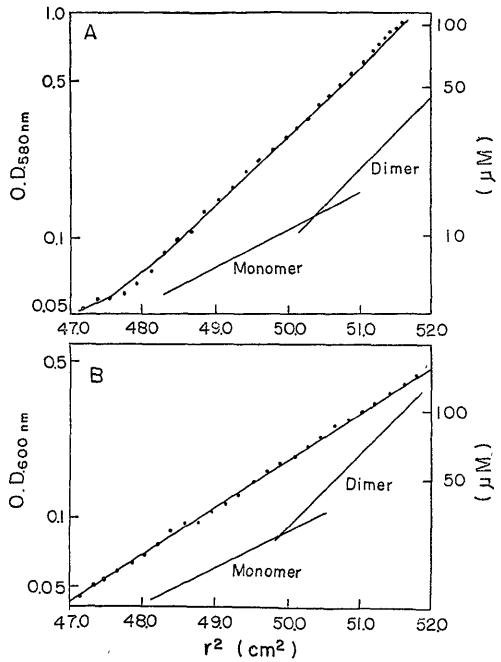
実験条件は図1と同じ。
 還元型ヘモグロビン：●, pH 5.9; ○, pH 6.9。
 酸素化型ヘモグロビン：△, pH 6.9:
 ヒトヘモグロビン：×, pH 5.9。

に依存していて、3つのpHでのセル中の各点での見かけの重量平均分子量を図5に示す。種々の初濃度でのこの曲線は重ならず、セルの底面側では分子量の増加は小さくなっているが、これは底面側ほど大きい外部圧がかかり、ヘモグロビンの解離が起って見かけ上分子量が小さくなっていることによるのであろう。このような現象があるにもかかわらず、二量体以上の会合体の形成は明らかである。

Ⅲ. 酸素化型ヤツメウナギヘモグロビンの分子量

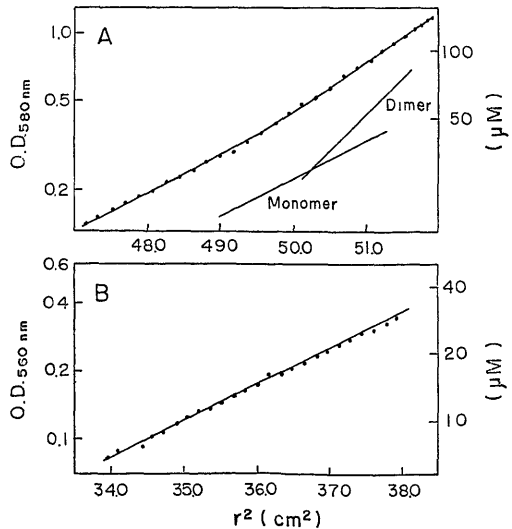
図1Bに示すように酸素化型ヘモグロビンも還元型ヘモグロビンに比べ会合の程度は小さいが同様にpHに依存した四量体までの解離-会合平衡にあると考えられる。沈降平衡は酸素化型であると自動酸化が起ってメト型になるため、一酸化炭素ヘモグロビンで行った。図4に示すようにpH6.9の18μMでは吸光度の対数 (logO.D.) とセルの中心からの距離の自乗 (r²) のプロットは直線性を示し、分子量として17,300が得られ、高いpHで低濃度のヤツメウナギヘモグロビンは事実上単量体であることを示す。また酸素化型ヘモグロビンのpH7.9でのs_{20,w}⁰は1.90S, D_{20,w}⁰は10.1×10⁻⁷が得られ、これより Svedberg の式によって高いpHでの酸素化ヘモグロビンの分子量は18,100がえられた。上記の2つの分子量はアミノ酸分析から計算された最小分子量18,000とよく一致する。一酸化炭素ヘモグロビンの会合度は非常に小さいので沈降平衡は初

図3 ヤツメウナギの還元型ヘモグロビンの沈降平衡



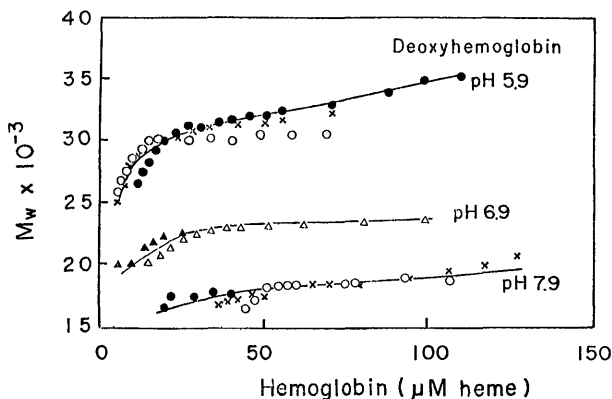
0.1M リン酸緩衝液, 20°。
 A : ヘムの初濃度, 52μM (pH5.9)
 B : ヘムの初濃度, 61μM (pH6.9)
 実線は単量体と二量体に相当する理論線。

図4 ヤツメウナギの一酸化炭素ヘモグロビンの沈降平衡



A : ヘム初濃度, 60μM, (pH 5.9)
 B : ヘム初濃度, 18μM, (pH 6.9)

図5 ヤツメウナギの還元型ヘモグロビンの分子量の濃度変化



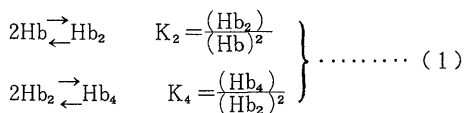
初濃度 (pH 5.9) ○, 19μM; ×, 29μM; ●, 59μM.
 初濃度 (pH 6.9) ▲, 18μM; △, 61μM.
 初濃度 (pH 7.9) ●, 28μM; ○, 49μM; ×, 85μM.

濃度70-90μMで行った。

IV. 会合定数の決定

還元型及び酸化型ヘモグロビンの種々の濃度における沈降速度や沈降平衡のデータの解析は、この解離-会合平衡は単量体⇌二量体⇌四量体平衡系と仮定して電子計算機を用いて行った。次の3つの仮定をした。i) ヤツメウナギヘモグロビンの偏比容 \bar{V} はpH, 温度, 会合度によらず一定で0.736ml/gである。ii) 単量体の無限希釈の沈降定数は1.90Sである。iii) n量体の分子は単量体より重量のファクターとして n^3 に比例して、形のファクターとして1/1.044に比例して沈降する。

解離-会合平衡は単量体⇌二量体⇌四量体の系を考え、それぞれ単量体⇌二量体, 二量体⇌四量体の会合定数を K_2, K_4 とすると、



全濃度Ctと会合定数との関係は

$$\begin{aligned} \text{Ct} &= C_1 + 2 C_2 + 4 C_4 \\ &= C_1 + 2 C_1^2 K_2 + 4 C_1^4 K_2^2 K_4 \dots\dots (2) \end{aligned}$$

この C_1, C_2, C_4 は単量体, 二量体, 四量体のモル濃度である。この平衡系の重量平均沈降定数 \bar{s}_w は

$$\begin{aligned} \bar{s}_w &= (s_1 C_1 + 2 s_2 C_2 + 4 s_4 C_4) / \text{Ct} \\ &= (s_1 C_1 + 2 s_2 C_1^2 K_2 + 4 s_4 C_1^4 K_2^2 K_4) / \text{Ct} \dots\dots (3) \end{aligned}$$

ここで s_1, s_2, s_4 は単量体, 二量体, 四量体の沈降定数でそれらはそれぞれ溶液の濃度と次のような直線的関係があると仮定した。

$$\begin{aligned} s_1 &= s_1^0 (1 - g_1 C_1) \\ s_2 &= s_2^0 (1 - g_1 C_1 - 2 g_2 C_2) \\ s_4 &= s_4^0 (1 - g_1 C_1 - 2 g_2 C_2 - 4 g_4 C_4) \end{aligned}$$

g_1 に $36M^{-1}$, s_1^0 に1.90Sが図1BのpH7.9の $s_{20, w}$ の濃度零への外挿した時の傾きと切片より得られた。この時ほとんど会合は実際にはおこっていないと考えられる。 g_1 に $108M^{-1}$, s_4^0 に4.5Sが図1AのpH5.9での高濃度の直線部分の傾きと零外挿によって得られた。 g_2 の値, $72M^{-1}$ は g_1 と g_4 の平均値と仮定した。 s_2^0 は前に述べた仮定より $1.52s_1^0 = 2.89$ と計算された。

広範囲な濃度変化に合う会合定数を得るために沈降平衡によって得られた低濃度での分子量と次の方法で $s_{20, w}$ に換えた。低濃度でも単量体⇌二量体⇌四量体平衡系が成りたつとすると重量平均分子量は

$$\begin{aligned} \bar{M}_w &= (M_1 C_1 + 2 M_2 C_2 + 4 M_4 C_4) / \text{Ct} \\ &= (M_1 C_1 + 2 M_2 C_1^2 K_2 + 4 M_4 C_1^4 K_2^2 K_4) / \text{Ct} \dots\dots (4) \end{aligned}$$

となる。分子量の濃度変化(図5の実線)の曲線に合う4式の K_2, K_4 を電子計算機による最小自乗法で決め、それを用いて各Ctでの $s_{20, w}$ を決めた。 \bar{M}_w から換えた $s_{20, w}$ は図1の半分黒くぬった点で示してある。最小自乗法により計算機で決められた最も実験値に適する K_2, K_4 は表2にまとめた。別の会合平衡系として単量体⇌四量体平衡系を仮定し、同様な解析をしたが、表2や図1の点線でみられるように、実験値とのずれが大きい。このことから還元型も酸化型も最もよく

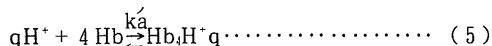
表2. *E. japonicus* のヘモグロビンの会合定数

	pH	$K_2 \text{ M}^{-1}$	$K_4 \text{ M}$	RMIN ⁽¹⁾	Species
M-D-T system ⁽²⁾	5.9	8.1×10^4	6.5×10^8	0.088	Deoxy-Hb
	6.9	3.9×10^8	7.0×10^8	0.059	
	7.4	9.4×10^2	7.0×10^8	0.082	
	7.9	6.6×10^2	8.4×10^1	0.067	
	5.9	1.4×10^3	3.2×10^2	0.050	Oxy-Hb
	6.5	5.4×10^2	1.5×10^2	0.042	
	7.0	5.2×10^1	8.0×10^1	0.024	
	pH	$K_4 \text{ M}^{-3}$	RMIN	Species	
M-T system ⁽³⁾	5.9	2.0×10^{13}	0.283	Deoxy-Hb	
	6.9	3.4×10^{10}	0.157		
	7.4	2.6×10^9	0.124		
	7.9	3.2×10^7	0.186		
	5.9	1.8×10^8	0.138	Oxy-Hb	
	6.5	2.8×10^7	0.138		
	7.0	1.1×10^6	0.049		

- (1) 最小自乗法による実験値と計算値の偏差
- (2) 単量体↔二量体↔四量体平衡系
- (3) 単量体↔四量体平衡系

合う平衡系は単量体↔二量体↔四量体であることがいえる。

このヤツメウナギヘモグロビンの会合定数はpH5.9付近で最も大きくアルカリ性になると小さくなる。これは会合のとき四量体にプロトンが結合することを意味する。全系の平衡は



とかける。qは四量体当りに結合したプロトンの数でK'aと見かけの会合定数Kaとは

$$\log K_a = \log K'_a - qpH$$

の関係がある。図6AにKaとpHの関係を示したが酸素化型、還元型ともpH5.9付近で最大であり、qは3.3-3.6が得られた。また図6BにみられるようにK₂の方がK₄よりpH依存性が大きいことより、会合に関連している酸性基は単量体↔二量体平衡に関与し、二量体↔四量体平衡には別のpKをもつ酸性基の関与によるのであろう。

V. SH基の修飾

会合の機構を調べる為にはサブユニット間の接触面についての情報を得る一つの手段として、ヘモグロビンのただ一つのシステインをSH試薬で修飾して、その修飾ヘモグロビンの会合の程度を調べた。図7A, B

はPCMB, NEM, IAで修飾した還元型ヘモグロビンの沈降定数の濃度変化とpH変化を示す。未処理のヘモグロビンより会合度がやや小さくなっているが、それほど顕著な差はみられず、pKは却ってアルカリ側にずれていてpH6.0とpH7.0での会合度の差が少ない。このC末端近くのシステインは会合接触面を占めているとはいえないが修飾されたことによりサブユニット間の接触面でのpKをかえた効果によるのであろう。

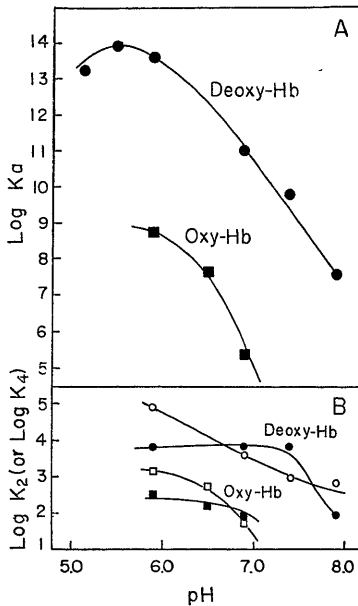
VI. 吸収スペクトルの濃度変化

図8に見られるように、可逆的な解離-会合平衡はヘモグロビンの可視部の吸収スペクトルにも反映されている。種々の濃度でのα, β, γ帯の分子吸光係数を測定した。ヘモグロビンの濃度はビリジンヘモクロームで決定した。わずかに、深色性がみられ、やはり会合によってヘム近くのコンフォーメーションの変化により単量体のみときとちがう吸収を示していることがわかる。またB図にみられるようにαヘリックス含量を示す円偏光二色性の222nmの負の吸収は濃度ともに増加していることから二次、三次構造が変化していることが考えられる。

VII. ヤツメウナギのヘモグロビンの酸素平衡

pH5.9とpH6.9の種々のヘモグロビン濃度での酸素

図6 ヤツメウナギの還元型と酸素化型ヘモグロビンの会合定数のpH変化



(A)全系の会合定数 $K_a (=K_2 K_4)$ のpH変化

●, 還元型ヘモグロビン;

■, 酸素化型ヘモグロビン.

(B)還元型ヘモグロビンの会合定数, ○, K_2 ;

●, K_4 .

酸素化型ヘモグロビンの会合定数, □, K_2 ;

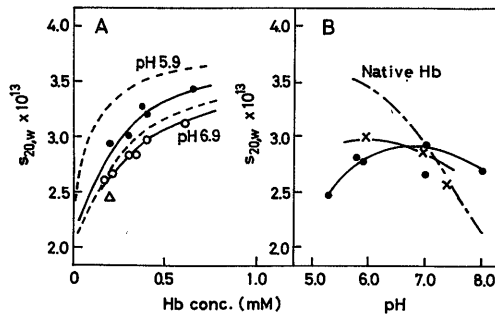
■, K_4 ;

平衡について、酸素飽和度Yと酸素分圧 pO_2 との関係としてHillの式

$$\log Y / (1 - Y) = n \log pO_2 + \log K$$

に従って図示したものが図9 A, Bである. (A)は分光学的にB)は検圧的に測定したもので図からも見られるように酸素に対する親和性や50%飽和付近でのn値(ヘム間相互作用定数)は濃度に大きく依存している. 即ちpH5.9の時, 希薄溶液では $n=1.15$ であり, ヘモグロビン濃度が $3.7 \times 10^{-4} M$ になると n は1.54まで増加して極大となる. 更に濃度が高くなると傾斜はほぼ直線になり $n=1.0$ である. 50%飽和での酸素分圧とヘモグロビン濃度との関係を図10に示した. pHが低いほど勾配が大きく, 即ち Bohr 効果もヘモグロビン濃度が大きくなればなるほど大きくなる. $5 \times 10^{-6} M$ 以下の希薄溶液では(この条件では全体の90%以上が単量体と考えられる)どのpHでも酸素親和性の濃度変化の曲線は1点に収れんする. その $\log pO_2$ は0.63である. このことから無限希釈での $pO_2 1/2$ は単量体の酸素結合定数の直接的な決定法と考えられる. こうして計算された単量体の酸素平衡定数は 0.24 mm Hg^{-1} あるいは $1.6 \times 10^5 M^{-1}$ であった. また7.5mMのような非常に濃度の高いヘモグロビンでは酸素親和性は非常に低く, pH5.9で $pO_2 1/2$ は350mmHgであり, n は1.0であった. この濃度ではほとんどが四量体であると仮定することにより四量体の酸素平衡定数を求めることができ, $2.43 \times 10^{-3} \text{ mmHg}^{-1}$ の値が得られた.

図7 ヤツメウナギのSH基修飾ヘモグロビンの沈降係数



(A) PCMBで修飾したヘモグロビンの沈降係数の濃度変化

●—● pH 5.9

○—○ pH 6.9

----- は非修飾ヘモグロビン

(B) ×—× PCMBで修飾

●—● NEMで修飾

図8 ヤツメウナギのヘモグロビンの吸光係数, 楕円率の濃度変化

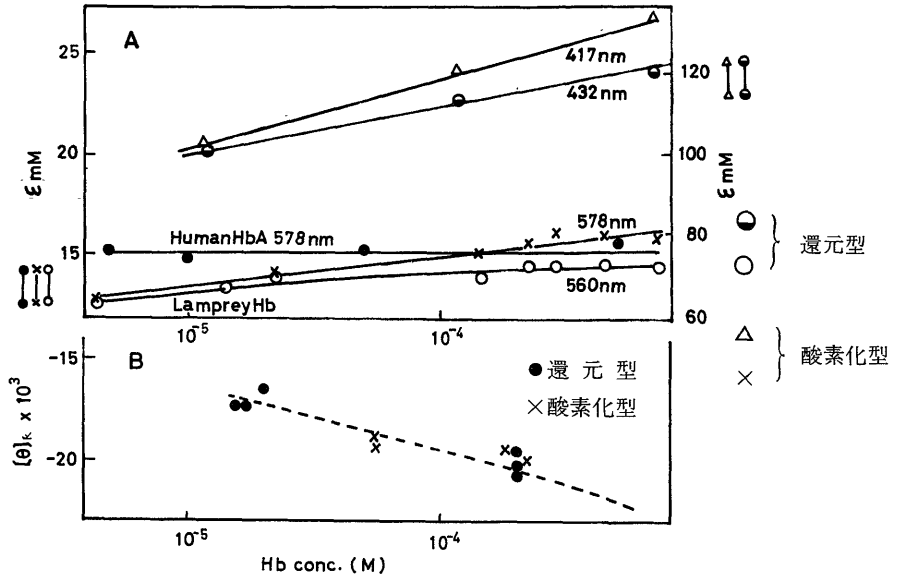


図9(A) ヤツメウナギヘモグロビンの酸素平衡曲線

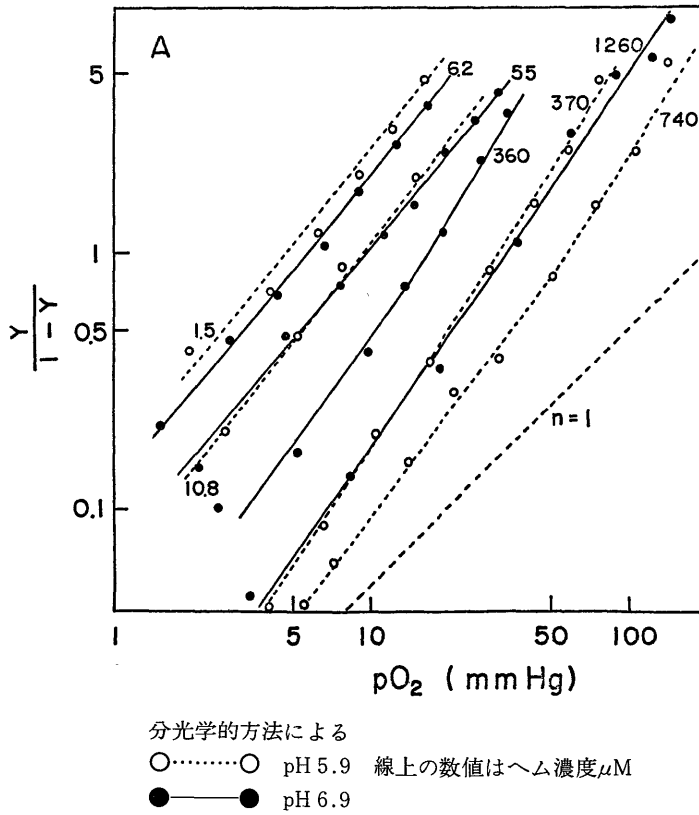
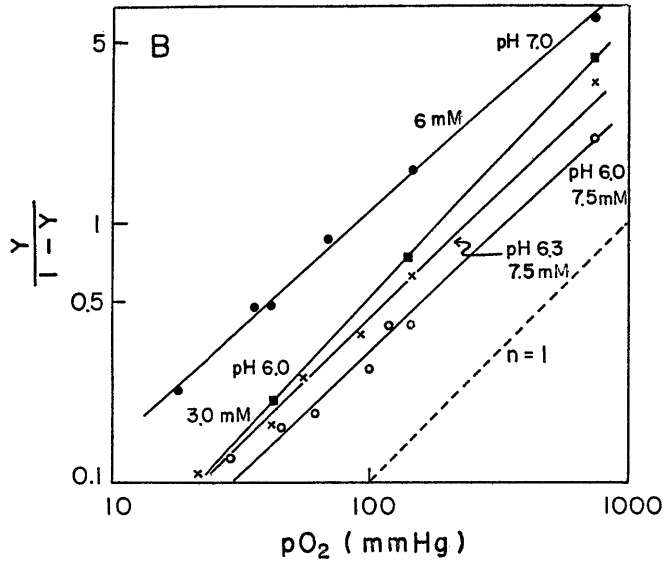
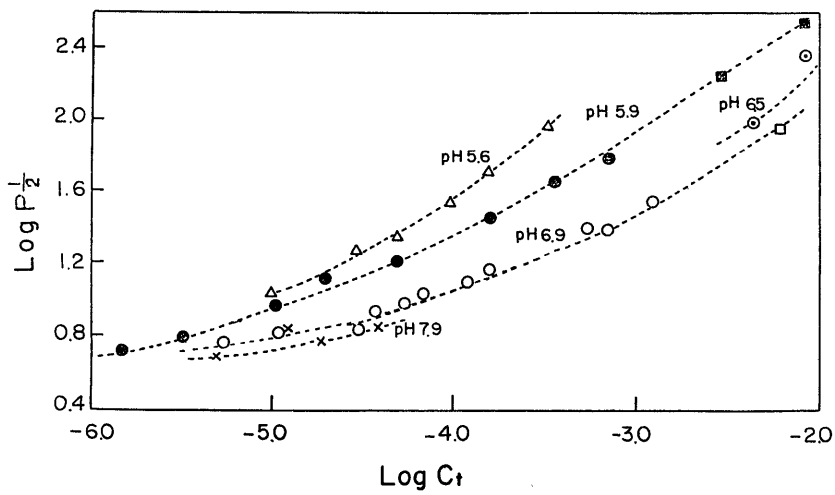


図 9(B) ヤツメウナギヘモグロビンの酸素平衡曲線



検圧法によるもの

図10 ヤツメウナギヘモグロビンの酸素親和性の濃度変化



pH 5.9の■, pH 6.9の□, pH 6.5の◎は検圧法で得られた実験値
 その他は全て分光学的方法による値。

考 察

ヤツメウナギのヘモグロビンが解離-会合平衡にあり、そしてその還元型ヘモグロビンが酸素化型ヘモグロビンより大きい会合定数を示すことによって特徴ある酸素平衡を説明しようとする試みがなされており、今までも解離-会合について定量的研究がなされてきた¹³⁾¹⁴⁾。最近 Andersen⁴⁾は協同作用のない単量体と二量体の解離-会合平衡がヤツメウナギ (*P. marinus*) のヘモグロビンの配位子結合における協同作用の発現に必要であると示唆した。彼は一酸化炭素ヘモグロビンの二量体 \leftrightarrow 単量体の解離定数を決め、広範囲な pH で一酸化炭素ヘモグロビンはほとんど単量体であり、還元型は 50-100 μ M の解離定数から計算して赤血球中ではほとんど二量体であり、四量体 \leftrightarrow 二量体解離定数は非常に大きい為、四量体は無視している。しかしながら今までの沈降係数のデータによる¹⁾と $s_{20, w}$ は 3.8~4.5S まで増加するので、単量体 \leftrightarrow 二量体モデルだけでは説明できない。また Behlke ら²⁾は *L. fluviatilis* のヘモグロビンで還元型ヘモグロビンは 300 μ M 位の濃度で四量体化がみられることを報告している。*E. japonicus* からのヘモグロビンの広範囲な濃度及び pH での沈降平衡法、沈降速度法から得られた結果は単量体 \leftrightarrow 二量体 \leftrightarrow 四量体系を仮定することによってうまく説明できた。そこで得られた会合定数からすると pH 7.0 でも赤血球中では還元型ヘモグロビンは四量体が大部分を占めていることになる。 K_2 , K'_2 は Andersen⁴⁾の結果より小さく、 K_1 , K'_1 は Andersen からのとほぼ同じ位である。Andersen⁴⁾らの報告している会合定数との違いはいくつかの理由が考えられる。一つはヤツメウナギの種類の相違、あるいはヘモグロビンの精製の程度の違いによる可能性である。Andersen の用いた *P. marinus* のヘモグロビンは六個の分画をもち、それらは組合せによって異名鎖が四量体を形成する場合と同名鎖が四量体を形成する場合とが考えられる。このようなサブユニットの不均一なことはサブユニット相互作用エネルギーの面から問題となる。四量体であるヒトヘモグロビンの β_1 (ヒトヘモグロビンは α 鎖 2 個、 β 鎖 2 個よりなるが、その β 鎖のみを分離したものはサブユニット相互作用を示さないのに、ヒトヘモグロビン A は酸素平衡で協同作用を示すことはよく知られていることである。坂内ら¹⁵⁾はヌタウナギ *Eptatretus burgeri* からのヘモグロビンが 4 個の分画をもち、そのうち特異的な 2 個の分画のみが四量体をつくりうることを示したが、これはこれらの分画が等価に働いてな

いことを示すものである。

P. marinus と *E. japonicus* からのヘモグロビンの会合定数の違いは、会合定数を決定する場合の仮定した解離-会合系モデルの相違によると思われる。即ち、Andersen は希薄溶液では四量体を考慮せず単量体 \leftrightarrow 二量体平衡のみを考え、又低い pH、高濃度では単量体を無視して二量体 \leftrightarrow 四量体平衡のみを採用しているが、私は広範囲な濃度及び pH で全て単量体 \leftrightarrow 二量体 \leftrightarrow 四量体を仮定した。

またもう一つの相違は会合定数の決定方法であろう。図 5 にみられるように沈降平衡実験では、遠心場よりうける外圧がヘモグロビン溶液の会合に大きな影響を与えているように見え、見かけ上会合定数を小さく計算するおそれがある。この圧力の効果は沈降速度の測定の場合にもきいているようである。即ち沈降時間と $\log \gamma_H$ との関係は直線よりむしろ上向きにわん曲している。これはヘモグロビンが時間がたつと沈降して圧力の効果がでてくることを示すと考えられる。私は種々の初濃度での沈降平衡の結果を処理する場合、セルの底面側のデータを除き、圧力の影響を小さくするようにした。

ヒトヘモグロビンの会合定数はヤツメウナギより大きい^{17)~19)}。Edelstein らによると K_1 , K'_1 も 3 ケタ大きい。解離-会合平衡のちがいは定量的なものばかりではない。ヒトヘモグロビンはコンフォーメーションの変化を通じて四量体としてへみ間相互作用を示しているが、ヤツメウナギヘモグロビンは会合に関連したコンフォーメーション変化を通して酸素親和性や協同作用の変化を示している。

会合定数の酸素化による変化はヤツメウナギヘモグロビンでは顕著である。全系の会合定数 K_a は pH 5.9 において還元型で $4.3 \times 10^{13} M^{-3}$ 、酸素化型で $6.3 \times 10^8 M^{-3}$ であった。これは酸素化に伴いサブユニット接触面で構造的変化を示しているし、またヤツメウナギヘモグロビンの会合の機構を理解する上にこの構造上の情報は重要である。Li と Riggs²⁰⁾は *P. marinus* のヘモグロビンの分画 V の完全なアミノ酸配列を決定した。ウマヘモグロビンの α 鎖と β 鎖の酸素化によって変化するとされている $\alpha_1\beta_2$ 接触面を占めているアミノ酸をヤツメウナギヘモグロビンと比べると、 $\alpha_1\beta_2$ 接触面の 10 個のアミノ酸のうち 5 個はヤツメウナギヘモグロビンでも同じである。また Henderickson と Love²¹⁾は *P. marinus* のヘモグロビンの分画 V の三次構造をエックス線解析でしらべ、ウマヘモグロビンの $\alpha_1\beta_2$ 接触面とよく似た接触面がヤツメウナギヘモグロビンの二量体会合に関与していることを示唆

した。α₁β₂面とは別のα₁β₁接触面をつくっているウマヘモグロビンのその面に相当するアミノ酸はヤツメウナギヘモグロビンにはない。私の扱っている *E. japonicus* のヘモグロビンの一次構造は決定されていないが、このヘモグロビンのアミノ酸組成は非常によく *L. fluviatilis* のそれと似ており、N末端、C末端²²⁾が同じなのでアミノ酸配列もほとんど同じと考えられる。また *L. fluviatilis* と *P. marinus* のヘモグロビンは5個のアミノ酸の置換、2個のアミノ酸の脱落と2個のアミノ酸の入れかわりだけであとは同じであるから、生化学的性質をもつ部分は *P. marinus* と *E. japonicus* はほぼ同じと考えられる。単量体⇌二量体と二量体⇌四量体の会合定数のpKの違いは2種の接触面に関することを示している。α₁β₂面に相当する接触面は二量体化に関係しα₁β₁面に似た弱い接触面は四量体化に関係しているのかもしれない。N末端部とヘリックスGとHの部分で別のサブユニット接触面をつくっているとも考えられるが、C末端近くの反応性システインのSH基を修飾したヤツメウナギヘモグロビンの会合の測定結果、このシステインは会合にそれほど大きく影響を与えていないことがわかる。しかし、会合のpKが修飾ヘモグロビンではアルカリ側にずれている。詳細な分析を待たねばわからないが、SH修飾ヘモグロビンの小さい会合定数は、システインを含むC末端部分が、四量体化に関係する接触面ではないかとも考えられる。

分光学的性質と会合、機能についてはヒトの血色素で詳しく検討され、ヒトヘモグロビンの単離鎖(α鎖、β鎖)より四量体のヘモグロビンAの方が還元型において特に Soret 帯について深色性があることが報告されている²³⁾。吸収スペクトルにおいても明らかであるが、CDスペクトルでは更にそれが著しい²⁴⁾²⁵⁾。α鎖は単量体、β鎖は四量体であり何れも協同作用を示さないし、ヘモグロビンAは協同作用を示すので、この深色性は協同作用に関係あるものと思われる。ヤツメウナギヘモグロビンの深色性は酸素化型、還元型とも可視部で見られるが、会合に関係あると考えられ、また更にそれを通じて協同作用との関係もあるように見えるが、更に検討が必要であろう。ヒトヘモグロビンでは単離鎖とヘモグロビンAとの間のα-ヘリックス含量の差ははっきりしないがヤツメウナギのヘモグロビンにおいて会合によりα-ヘリックス含量が増加する結果を得たのは非常に興味深い。

ヤツメウナギのヘモグロビンの酸素平衡は三つの特徴を示す。1) 酸素親和性はヘモグロビンの濃度が増加するにつれて大きく減少する。2) ヘム間相互作用

*n*は希薄溶液では1.1で、高濃度でも1.0であり、その中間では1.6まで増加する。3) 酸素に対する親和性のpH変化(Bohr効果)はヘモグロビン濃度が高くなれば大きくなる。上の三つの性質は次のような仮説で説明できよう。すなわちヤツメウナギヘモグロビンは協同作用のない高親和性の単量体と、協同作用をもたず低親和性の二量体と四量体の会合平衡にあるのである。そのスキームを図11に示した。ここでK₂、K₄は還元型ヘモグロビンの単量体⇌二量体、二量体⇌四量体の平衡会合定数であり、K'₂、K'₄は酸素化ヘモグロビンのそれであり、超遠心分析より求めたものである。二量体、四量体はそれぞれ協同作用がないとすると、単量体、二量体、四量体のそれぞれの個有酸素結合定数をAL、BI、CIとすると、

$$BI = \sqrt{(K_2'/K_2)}AL^2$$

$$CI = \sqrt[4]{(K_2'^2 K_4'/K_2^2 K_4)}AL^4$$

である。このスキームにおける酸素平衡はどのpH、どの濃度においても、次の二つの方法で実験的に得られたこれらのパラメーターを使って、電子計算機により計算できる。1) K₂、K₄、K'₂、K'₄、ALを使う方法、2) K₂、K₄、AL、CIを使う方法である。

1)の方法で得られたBIは $0.31 \times 10^{-1} \text{mmHg}^{-1}$ 、CIは $1.25 \times 10^{-2} \text{mmHg}^{-1}$ であり、計算された親和性は実験値より高い。実験的に得られたCIは $2.43 \times 10^{-3} \text{mmHg}^{-1}$ である。実験値と計算値の相違は酸素化型ヘモグロビンの会合定数の決定の不正確さによるのかもしれないので2)の方法で酸素平衡を計算した。計算された酸素親和性は図12の実線で示した。酸素親和性の濃度変化をよく説明している。50%飽和付近での*n*値の濃度変化とpH変化を実験値とならべて示したのが図13である。この図から見て、了解されるようにこの機構において協同作用の出現するに最も重要なパラメータは蛋白濃度である。すなわち、還元型と酸素化型ヘモグロビンの多量体の割合の相違が最も大きいところで*n*は最大値を示す。この最大*n*値を示す濃度は実験値と計算値は各pHでよい一致を示している。図1

図11

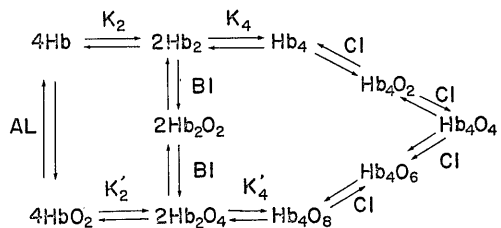


図12 ヤツメウナギヘモグロビンの酸素親和性の濃度変化（実験値と計算値の比較）

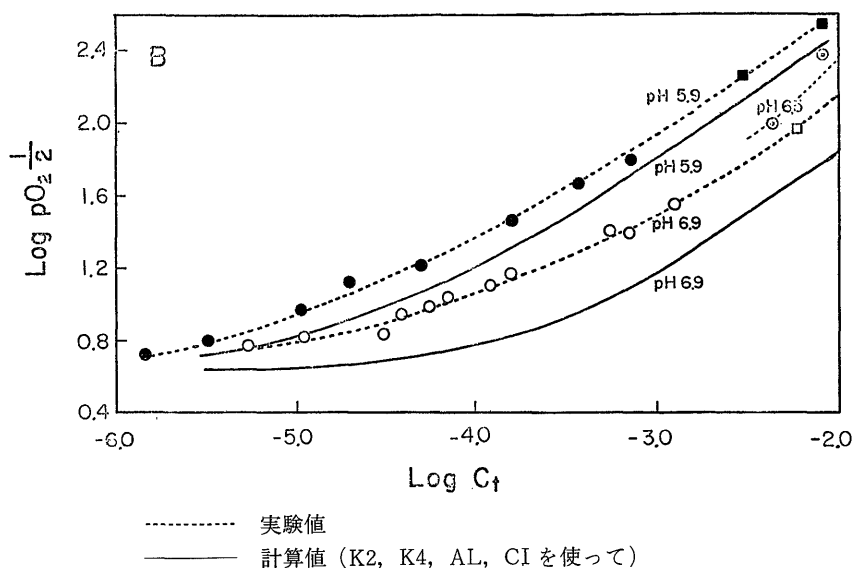
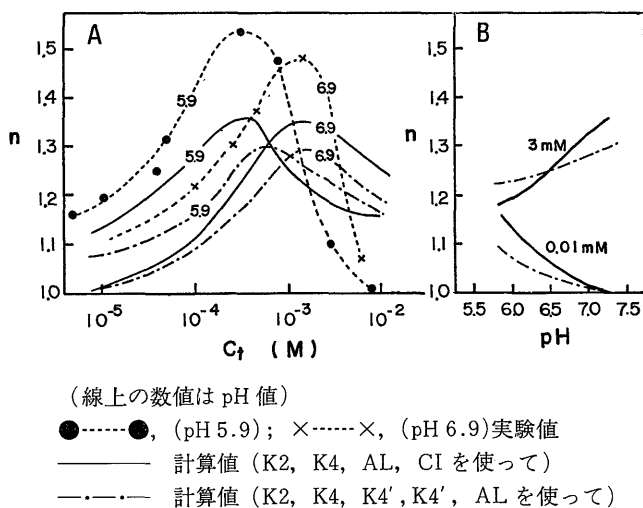


図13 ヤツメウナギヘモグロビンのHillのn値の濃度変化とpH変化



3Bに見られるように会合定数の大きい、低pHでは濃度が高いほどnは1.0に近づくが、会合定数の小さい、高いpHでは濃度が低くならないとn値は増加しない。実験値と計算値のずれは、溶液の理想性からのずれが会合定数に影響しているかもしれないので詳しく論ずることはできないが、ここで提唱しているスキームにより定性的、定量的にヤツメウナギのヘモグロビンの特徴ある機能を説明しえたと思う。またヤツメウナギ等円口類の赤血球中の生理的pHは7.5以上であるといわれ

ているが²⁶⁾、図13BからもこのpHで濃度の高い赤血球中でヘモグロビンの機能を充分果していることがうなずける。

結 論

ヤツメウナギ、*E. japonicus* からのヘモグロビンの解離-会合について、広範囲な濃度 (0.01-3.4 mM) 及びpH (5.6-8.0) で沈降平衡法と沈降速度法で定量的研究をし、また会合の機構を調べる為に唯一の

反応性システインを修飾したヘモグロビンの会合や、ヘモグロビンの吸収スペクトルの濃度変化等を調べた。平行して広範囲に酸素解離平衡を分光学的方法と検圧法で測定し、次のような結果を得た。

1. 単量体と最高会合体の分子量は17,300と67,300の値が得られ、これらはそれぞれヒトヘモグロビンのサブユニットと四量体のそれと同じである。

2. 沈降速度法や沈降平衡法の結果は、単量体 \leftrightarrow 二量体 \leftrightarrow 四量体の速い可逆的な平衡を仮定して電子計算機により分析し、実験値をよく説明する各pHでの会合定数を還元型、酸素化型とも決定した。その解離-会合平衡はpH依存性がありpHが高くなると会合定数は小さくなる。pH5.9付近で会合定数は最高値を示し、 K_2 として $8.1 \times 10^4 M^{-1}$ 、 K_4 として $6.5 \times 10^9 M^{-1}$ が得られた。会合定数は酸素化型の方が還元型より小さい。赤血球のような生理的条件下では還元型の二量体、四量体の割合は10%と85%であり、酸素化型のそれらは36%と15%であり、四量体の存在は無視できない。

3. ヘモグロビンの唯一の反応性SH基をPCMB, NEM, IAで修飾したヘモグロビンの会合の程度は未修飾ヘモグロビンより少し小さく、会合のpKがアルカリ側にずれている。

4. ヘモグロビンの吸収スペクトルの山、 α 、 β 、 γ 帯の吸光係数はヘモグロビンの濃度増加により深色性を示す。また蛋白の α -helix含量をCDによって測定するとこれも濃度が高くなるにつれ増加する。

5. ヤツメウナギのヘモグロビンの酸素平衡の測定をすると、酸素に対する親和性はヘモグロビンの濃度及びpHに大きく依存し、pH5.9で5 mmHgから350 mmHgまで変化する。ヘム間相互作用定数 n はほとんど単量体とみなせる希薄溶液と、ほとんど四量体とみなせる高濃度では1.0で中間では1.6まで濃度によって増加する。

6. ヤツメウナギのヘモグロビンの濃度依存性の酸素平衡を、還元型と酸素化型ヘモグロビンの会合定数と、酸素親和性が高く協同作用のない単量体と、親和性が低く協同作用のない二量体、四量体の酸素結合定数とによるスキームをたてて説明を試みた。ほぼこの特徴ある機能と、生理的条件下での赤血球中にもあてはめて説明できた。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜った米山良昌教授、杉田良樹助教授に感謝の意を捧げるとともに、研究遂行に際し御助言、御協力を頂きました群大の宇井信生教授、京大の内山敬康講師に感謝します。また電子計算機のプログラミングに御助言いただきました金大計

算機センターの車古正樹氏、理学部の青野茂行教授に感謝いたします。

文 献

- 1) Briehl, R. W. : J. Biol. Chem., **238**, 2361 (1963).
- 2) Behlke, J. & Scheler, W. : FEBS Letters, **7**, 177 (1970).
- 3) Andersen, M. E. & Gibson, Q. H. : J. Biol. Chem., **246**, 4790 (1971).
- 4) Andersen, M. E. : J. Biol. Chem., **246**, 4800 (1971).
- 5) Sanger, F. : Biochem. J., **39**, 507 (1945).
- 6) Dopheide, T. A. A., Moore, S. & Stein, W. H. : J. Biol. Chem., **242**, 1833 (1967).
- 7) Edman, P. & Sjoquist, J. : Acta. Chem. Scand., **10**, 1507 (1956).
- 8) Sjoquist, J. : Acta. Chem. Scand., **7**, 447 (1953).
- 9) 佐竹一夫・関得一郎 : 化学の領域, **4**, 557 (1951).
- 10) Akabori, S., Ohno, K. & Narita, K. : Bull. Chem. Soc., Japan, **25**, 214 (1952).
- 11) Boyer, P. D. : J. Amer. Chem. Soc., **76**, 4331 (1954).
- 12) Yphantis, D. A. : Biochemistry, **3**, 297 (1964).
- 13) Svedberg, T. & Pederson, K. : The Ultracentrifuge, p. 28, London. Oxford University Press, 1940.
- 14) Van Slyke, D. D. & Neil, J. M. : J. Biol. Chem., **61**, 523 (1924).
- 15) Braunitzer, G. & Fujiki, H. : Naturwissenschaften, **56**, 322 (1969).
- 16) Bannai, S., Sugita, Y. & Yoneyama, Y. : J. Biol. Chem., **247**, 505 (1972).
- 17) Chiancone, E., Gilbert, L. M., Gilbert, G. M. & Kellett, G. L. : J. Biol. Chem., **243**, 1212 (1968).
- 18) Ackers, G. K., Thompson, T. E. : Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A., **53**, 342 (1965).
- 19) Edelsein, S. J., Rekmars, M. J., Olson, J. S. & Gibson, Q. H. : J. Biol. Chem., **245**, 4372 (1970).
- 20) Li, S. L. & Riggs, A. : J. Biol. Chem., **245**, 6149 (1970).
- 21) Hendrickson, W. A. & Love, W. E. : N-

- ature, **232**, 197 (1971).
 22) Fujiki, H., Braunitzer, G. & Rudloff, V. : Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **351**, 901 (1970).
 23) Brunori, M., Antonini, E., Wyman, J. & Anderson, S. R. : J. Mol. Biol., **34**, 357 (1968).
 24) Nagai, M., Sugita, Y. & Yoneyama, Y. : J. Biol. Chem., **244**, 1651 (1969).
 25) Sugita, Y., Nagai, M. & Yoneyama, Y. : J. Biol. Chem., **246**, 383 (1971).
 26) Manwell, C. : The Biology of Mixine, P. 372. Oslo, Norway, Universitets for forlagnet, 1963.

Abstract

Quantitative studies were made on the association of hemoglobin from the lamprey, *Entosphenus japonicus*, in a wide range of concentration (0.01 to 3.4 mM) and pH (5.6 to 8.0) with the aids of sedimentation equilibrium, sedimentation velocity and diffusion measurements. To obtain informations for the association mechanism, ultracentrifugal studies were made on the hemoglobin which was modified at a single sulfhydryl group with PCMB, NEM or IA, and the concentration dependency of absorption spectra and circular dichroism were measured. Oxygen equilibrium was determined also in the wide range of concentration by colorimetry and manometry.

1) Molecular weights of monomers and the largest aggregate were calculated to be 17, 300 and 67, 300, respectively, which corresponded to that of the subunit of human hemoglobin and that of tetrameric human hemoglobin, respectively.

2) The data of the sedimentation velocity and sedimentation equilibrium were computer-analyzed assuming the rapid equilibrium of the monomer-dimer-tetramer, and the association constants for both deoxygenated and oxygenated hemoglobin were obtained. The association-dissociation equilibrium was dependent on pH. For the deoxygenated hemoglobin, the maximum value of $8.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for K_2 , the constant for the monomer-dimer equilibrium, and $6.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ for K_4 , the constant for the dimer-tetramer equilibrium, were obtained at pH 5.9, and the values of both association constants decreased at higher pH. The association constants for oxyhemoglobin were much smaller than those for deoxyhemoglobin. The fractions of the dimers and tetramers, calculated for the lamprey deoxygenated hemoglobin under the physiological conditions in red cells, were 10% and 85%, respectively, and those for oxyhemoglobin were 36% and 15%, respectively.

3) The associations of sulfhydryl group modified hemoglobin with SH reagents were slightly smaller than those for native hemoglobin and the pK of pH dependent association appeared to shift to an alkaline pH.

4) α , B and γ bands of absorption spectra for lamprey hemoglobin showed a small hyperchromicity with increasing hemoglobin concentration, and α -helix content for lamprey deoxygenated and oxygenated hemoglobin increased with an increase in hemoglobin concentration by circular dichroism measurement.

5) In the oxygen equilibrium of lamprey hemoglobin, it was shown that the oxygen partial pressure at half saturation, pO_2 1/2, increased with increasing concentrations of hemoglobin, from 5 mm Hg at 2 μM to 350 mm Hg at 7.5 mM at pH 5.9, and that heme-heme interaction constant, n , increased from 1.1

at a very low concentration of hemoglobin to 1.6 at 0.6 mM, and then decreased to 1.0 at 7.5 mM.

6) An assumption was made that monomers and tetramers each had a different constant affinity for oxygen which were determined experimentally from the oxygen equilibrium at a very low concentration and a very high concentration of hemoglobin, respectively. Oxygen equilibrium curves for lamprey hemoglobin were calculated from these two oxygen equilibrium constants and the association-dissociation constants determined both for deoxygenated and oxygenated hemoglobin. The results agreed well with those obtained experimentally, the model was shown to be able to account for the characteristic oxygen binding properties of lamprey hemoglobin, namely heme-heme interaction, oxygen affinity and effect.
