

## ヘモグロビンのリガンド結合と サブユニット間相互作用

金沢大学医学部 杉田良樹  
生化学教室

高等動物のヘモグロビンは肺から組織へ酸素を運搬し、また炭酸ガスを肺から排出するという、生理的機能を行なうのにたいへん好都合な特徴を持つタンパク質である。ヘモグロビンの示す機能は、分子が $\alpha$ 鎖2個と $\beta$ 鎖2個との4個のサブユニットから構成され、酸素や種々のエフェクターが結合するとそのサブユニットのコンホメーションが変化すると共に、サブユニット間の相互作用で分子全体のコンホメーションが変化することによることが知られている。すなわち酸素などのリガンド結合におけるホモトロピックなアロステリック効果、また水素イオンや種々の有機リン酸塩がリガンド結合におよぼすヘテロトロピックなアロステリック効果などが、ヘモグロビン分子のX線結晶解析の結果やESR, NMR, 可視、紫外などの分光学的解析により、タンパク分子の三次構造、四次構造、さらに各ペプチド中のアミノ酸残基の配位の変化として詳細に解析されている。ここでは主としてリガンド結合により一つのサブユニットに起こった変化がどのように他のサブユニットのヘムの状態の変化としてとらえられているかと、ヘム状態の変化とリガンド結合の機能的解析との関係について述べる。ヘモグロビンの構造と機能については多くの総説<sup>1)~5)</sup>があるので参照されたい。

### 1. 単離した $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖および四量体の性質

ヘモグロビンの酸素平衡の特性は次の三つのパラメーターで表わされる。1) 酸素親和性、 $p_{1/2} : \log p$ を横軸に酸素飽和度 $Y$ を縦軸にとった酸素平衡曲線は、温度、 $pH$ などの条件により形を変えず、横軸に沿って移動する。そこで $Y=1/2$ のときの酸素分圧を酸素親和性の指標として用いる。2) ヘム間相互作用、Hillの $n$  : ヘモグロビンの酸素平衡曲線は $p$ に対し $Y$ をプロットすると、ミオグロビンのように直角双曲線にならずにS字状になる。これはヘムの一つまたはいくつかに酸素が結合することにより他のヘムの親和性が増加することによるもので、この曲線はHillの実験式 $Y =$

$Kp^n / (1 + Kp^n)$  にあてはめられ、このときの $n$ の値でヘム間相互作用の強さを表わす。実験的には $\log p$ を横軸に $\log Y / (1 - Y)$ を縦軸にとりプロットし、中央附近の最大勾配をとる。 $n=1$ は相互作用のないことを示す。3) Bohr効果、 $dp_{1/2} / dpH$  : 酸素親和性に対する水素イオン濃度の影響で $dp_{1/2} / dpH$ で表わす。

表1. HbAとその単離鎖との性質 (pH7, 20°)

		HbA( $\alpha_2\beta_2$ )	$\alpha$	$\beta_4$
アミノ酸残基数		574	141	146
オキシ型の等電点		7.15	7.82	6.74
O <sub>2</sub> 結合	$P_{1/2}$ (mmHg)	~ 10	0.46	0.40
	Hillの $n$	28	1.0	1.0
	Bohr効果	(+)	(-)	(-)
吸収ピーク (nm)	オキシ型	414.5 (128) <sup>a)</sup>	414.0 (130) <sup>a)</sup>	415.5 (125) <sup>a)</sup>
		542	541	542
		576	576	577
	デオキシ型	430.5 (133) <sup>a)</sup>	430.0 (114) <sup>a)</sup>	428.5 (114) <sup>a)</sup>
		555	557	558

a) ソーレー帯のピークの分子吸光係数 ( $mM^{-1}cm^{-1}$ )

四量体であるヘモグロビン (正常人Hbの95%以上はHbA) は native な性質を保つ $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖、すなわち再構成により元のヘモグロビンとまったく同じ性質を示す単離鎖に分けることができる<sup>6)</sup>。単離された $\alpha$ 鎖は単量体、 $\beta$ 鎖は四量体( $\beta_4$ )として存在する。単離鎖およびHbAの性質を表1に示す。 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖の立体構造はX線解析の結果ほとんど等しいことがわかっているが、 $\alpha$ 鎖はヘリックスDがなくアミノ酸残基数も5個少ないこと、 $\beta$ 鎖はヘム近傍のリガンドが結合する附近にVal. E11の側鎖が存在することが主な相違である。 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖およびHbAの可視、紫外部の吸収曲線はデオキシ型のピークの大きさ以外はほぼ同じであるが、円偏光二色性では著しい相違がみられる<sup>7)</sup>。

$\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖 (四量体) ともに酸素結合においては親和性は高く, ヘム間相互作用と Bohr 効果はなくなっていて, HbA の性質は  $\alpha$ ,  $\beta$  二種のサブユニットからなる四量体であることが必要条件と思われる。表 2 に種

表 2 種々の再構成ヘモグロビンの機能

	$\log P \frac{1}{2}$	n	$d \log P \frac{1}{2} / dpH$
単離鎖 $\alpha^a$	-0.28	1.0	0
$\beta^a$	-0.42	1.0	0
$\alpha\beta$ (apo) <sup>b)</sup>	-0.27	1.15	-0.34
$\alpha$ (apo) <sub>2</sub> $\beta_2$	0.19	1.08	
$\alpha_2\beta_2^{+c)}$	0.79	1.1	-0.70
$\alpha_2^+\beta_2$	0.60	1.3	-0.50
HbA <sup>d)</sup>	1.06	2.9	-0.56

- a) CPase A 処理 HbA, Hb - ハプトグロビン複合体などがこの群に属する。
- b)  $\beta$  (apo) はヘムを欠く  $\beta$  鎖ポリペプチドを示す。
- c)  $\alpha$  heme -  $\beta$  porphyrin,  $\beta$  鎖に置換のある HbM などがこれに属する。
- d) いくつかの Hb (たとえばヨード酢酸処理 Hb) が属する。

種のサブユニットからヘモグロビンを再構成したときの機能を示す。単離鎖 (たとえば  $\alpha$  鎖) の酸素親和性は, それと異名 ( $\beta$  鎖) のヘムを欠くポリペプチド鎖と結合すると低下し, 正常の機能を持たないメトヘム (3価鉄) を持つポリペプチド ( $\beta^+$  鎖) と結合した場合にはさらに正常値に近づく。後者では Bohr 効果はほぼ HbA に等しい大きさで表われるがヘム間相互作用は小さい。n 値は 2 価鉄ヘムを含む異名鎖と再編成されないと, 正常値に近いものとはならない。

## 2 四量体の構造

四量体ヘモグロビンでは 4 個のサブユニットは正四面体の各頂点に位置するように配位し, 分子は 1 本の 2 回対称軸を持つ。  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖との接触面に 2 種あり, 鉄原子間距離が長く接触面積が大きく, 結合が主として van der Waals 力によるものを  $\alpha_1\beta_1$  接触といい, 接触点が主として FG 角, G ヘリックスと C ヘリックスの一部とで小さいものを  $\alpha_1\beta_2$  接触と呼ぶ。先にのべたように酸素結合能に表われる機能の特徴は四量体のコンホメーション変化に依存しているが, 最初にオキシ型とデオキシ型との高次構造の差が X 線解析により見いだされた。さらに分解能をあげた結果では, デオキシ型がリガンド結合型 (または鉄が 3 価になったメト型) になると  $\alpha_1\beta_1$  接触は “ゆるむ” が “ずれ” はなく, 接触に関与する原子数は 110 から 98 へと減少す

るが, 4 ないし 5 個の水素結合に変化はない。これに対し  $\alpha_1\beta_2$  接触では, CD  $\beta$  と FG  $\alpha$  との接触は変化しないが CD  $\alpha$  と FG  $\beta$  との接触は図 1 のように変化する。  $\alpha$  鎖どうしの間では図 2 C に示すように N 末端を主とする二対のイオン結合があるが, リガンド結合により消失する。  $\beta$  鎖間には直接の結合はない。

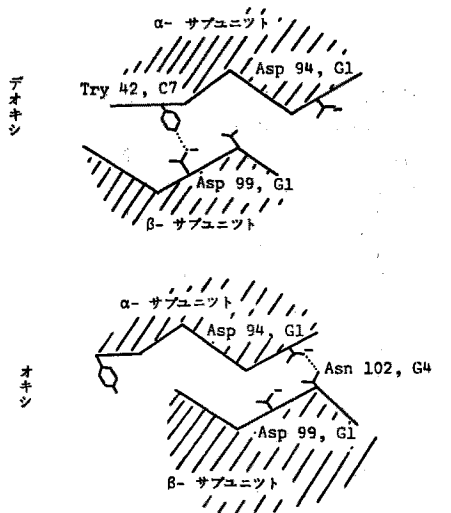


図 1.  $\alpha_1\beta_2$  接触の変化を示す

## 3 Perutz のアロステリック効果のモデル<sup>2) 8)</sup>

ヘモグロビンの機能の特性を構造と関連づけて論ずるときには近頃では X 線解析と結晶型との結果から考えられた Perutz のモデルが基本とされることが多いので, このモデルの概略を述べる。これはリガンド結合によりサブユニットの三次構造変化と四次構造変化とが協調的に起こり, この変化を通してヘム間相互作用やヘテロトロピックなアロステリック効果が表われるとするものである。

図 3 に示すようにリガンド結合したヘム鉄は 2 価の低スピン状態で, この鉄の原子半径だと鉄原子はポルフィリン環の面内にある。デオキシ型は高スピン状態で鉄はポルフィリン面から近位ヒスチジン側へ 0.75 Å 変位している。鉄が 3 価のメトヘモグロビンでも低スピンでは鉄は面内にあり高スピンでは 0.4 Å 近位ヒスチジン側へ変位している。デオキシ型に酸素が結合すると上記の鉄の原子半径の変化によりポルフィリン環と近位ヒスチジンの属する F ヘリックスとの距離は

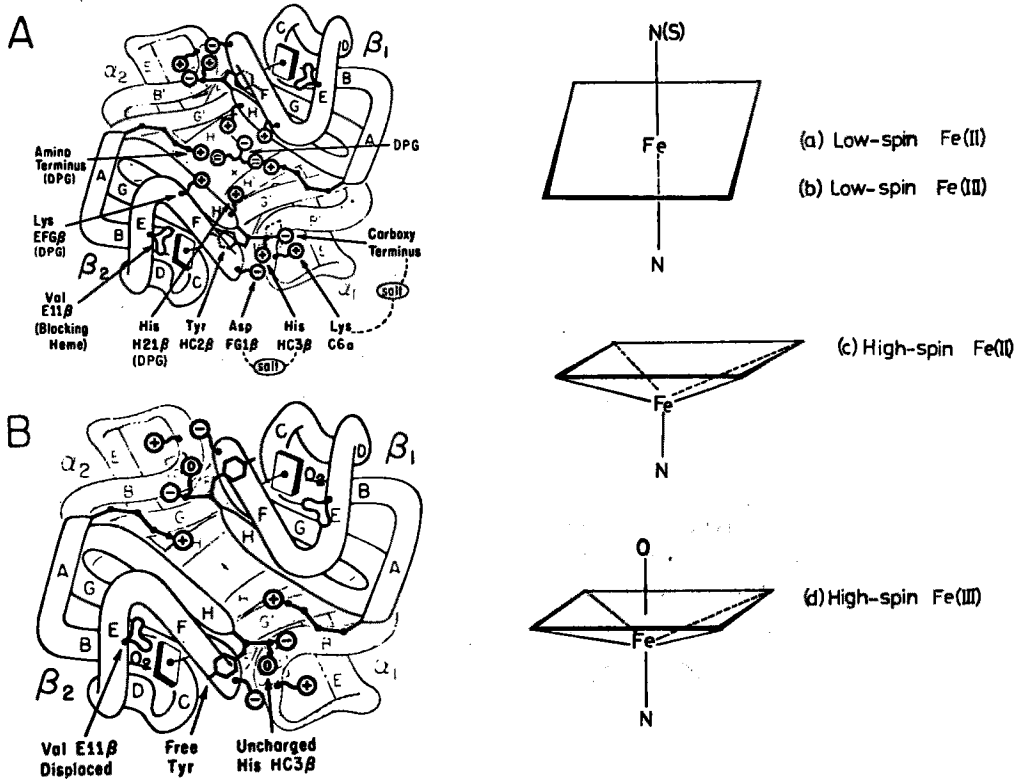


図3 鉄原子のポルフィリン面に対する位置

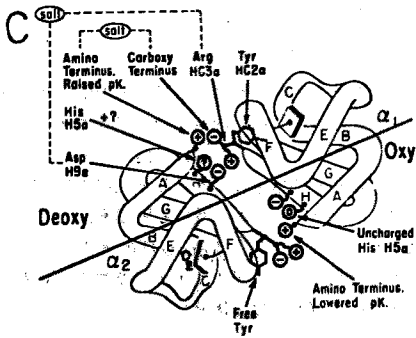


図2 ウマ・ヘモグロビンの(A)デオキシ型をβ鎖側から、(B)オキシ型をβ鎖側から、(C)α鎖側からみた図。α-ヘリックスを円筒で表わしA<sub>1</sub>B<sub>1</sub>…の番号をつけ、C末端部のα-炭素を黒点で表わしてある。機能に関係するか、DPG結合に関係する側鎖のみを示してある。

近くなる。そしてFヘリックスとHヘリックスの間けきが狭くなる。図2に示すようにデオキシ型ではC末端から二番目のチロシン残基(HC2)のフェノール基はVal FG5のCOと水素結合してチロシン側鎖はHとFとのヘリックスの間に入っているが、オキシ型でチロシン側鎖は外に出ている。このためC末端残基のArg HC3 $\alpha_1$ とHis HC3 $\beta_1$ とはそれぞれVal NA1 $\alpha_2$ とAsp H9 $\alpha_2$ との水素結合、Asp FG1 $\beta_1$ とLys C6 $\alpha_2$ との水素結合を切断する。三次構造の変化による $\alpha_1\beta_2$ 接触の変化については図1に示した。

C末端の三次構造変化と四次構造の変化との関連はC末端を修飾したヘモグロビンの結晶型から推論される<sup>9)</sup>ヒトヘモグロビンのC末端のArg HC3 $\alpha$ とHis HC3 $\beta$ とを酵素作用により除いたヘモグロビン、およびArg HC3 $\alpha$ を除きCys F9 $\beta$ にN-エチルサクシミドを結合させたヘモグロビンは、ともに酸素親和性が強くヘム間相互作用を示さない。それらのデオキシ型結晶は正常ヒトヘモグロビンのオキシ型結晶と同

じであり、ウマヘモグロビンで $\beta$ 鎖C末端の2残基を切断したのもオキシ型、デオキシ型の結晶ともに正常ヘモグロビンのオキシ型結晶と同型を示す。このようにしてあるヘムにリガンドが結合して四次構造が変化したとき、他のヘムのリガンド親和性が変化するであろうか。Perutz<sup>8)</sup>はメトヘモグロビンを部分的に還元し、還元された2価鉄ヘムを持つサブユニットがデオキシ型のときとCO型のときとでメト型サブユニットにどのような相違が表われるかを差スペクトルで調べた。デオキシ型ではCO型よりメトの630 nm, 1000 nmのピークが長波長側にずれ、吸収強度が減少していることがわかった。これは鉄がより高スピン状態にあることを示す<sup>10)</sup>すなわちデオキシ型では他方のヘムもより高スピン状態にあり、リガンド親和性も減少していると考えられる。Banerjeeら<sup>11)</sup>は吸収スペクトルやESRから単離 $\beta$ 鎖のメト型は低スピンの割合が多く2価鉄状態での酸素親和性が高いが、Cys93が安息香酸水銀と結合した場合や $\alpha$ 鎖と結合してHbAとなった場合にはほとんど高スピンとなり同時に2価鉄としたときの酸素親和性が低下していることを示した。

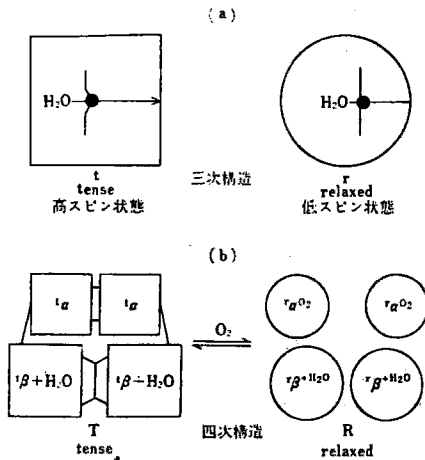


図4 (a) ヘム鉄のスピン状態により三次構造がtとrに変化する。

(b)  $\beta$ 鎖がメトヘムを含む四量体で $\alpha$ 鎖にO<sub>2</sub>が結合することにより三次構造と四次構造が同時に変化する。T状態の $\beta$ 鎖間の実線は2,3-DPGを、他の実線は水素結合を表す。

このように四次構造が変化するとその分子内の他のサブユニットの三次構造およびリガンド親和性が変化すると考えられることからPerutzは図4のようなモデル機構を考えた。サブユニットの三次構造にtとr

の二つのコンホメーションを考え、tはデオキシ型に相当し高スピンでリガンド低親和性、rはオキシ型に相当し低スピンで高親和性であるとする。四次構造にもデオキシ型に相当する水素結合で結ばれたTとオキシ型に相当する水素結合の切れたRを考え、四次構造がたとえばTをとるとその分子内のサブユニットは一般的には三次構造tをとるというMonodら<sup>12)</sup>の考えたようなconcerted mechanismを考えた。

Perutzらはヘテロトロピックなアロステリック効果もこのT状態とR状態との平衡の変化として説明している。Bohr効果については、図2Aに示すように $\beta$ 鎖のC末端のヒスチジンのイミダゾール基はデオキシ型では同一サブユニットのAsp FG1と水素結合を作りそのためpKが上昇している。オキシ型では図2Bのように三次構造の変化からC末端は2つの水素結合が切れて自由になるが、このためイミダゾール基のpKが低下して水素イオン(Bohrプロトン)が放出される。 $\alpha$ 鎖のC末端は図2CのようにVal NA1 $\alpha_2$ とAsp H9 $\alpha_2$ との間に水素結合を形成しているがオキシ型ではこれが切れてN末端のアミノ基からプロトンが放出される。有機リン酸塩のうち2,3ジホスホグリセリン酸(DPG)の結合の部位が明らかであるが図2Aのようにデオキシ型では分子の中心の空洞内にあり $\beta$ 鎖間を塩結合で架橋し、T状態を安定化しリガンド親和性を低下させている。オキシ型では $\beta$ 鎖間の間隙が狭くなるため分子外に排出される。

#### 4. 中間体のモデルとしての

##### ハイブリッドヘモグロビン

アロステリック効果の典型として興味を中心となっているヘム間相互作用は、四量体のサブユニットのいくつかにリガンドが結合した場合に他のサブユニットのリガンド親和性の低下によるものとして理解されている。ヘムが他のサブユニットから受ける影響を検出する多くの試みがなされている。Perutzは前述のごとくメトヘモグロビンの一部をチチオナイトで還元して還元されたヘムのリガンド結合状態の変化による残ったメトヘムの吸収スペクトルの変化を調べた。もっと正確に半分のヘムを一定の状態に、例えばメト型やNO結合型に固定するために $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖を分離して処理した後再構成したハイブリッドヘモグロビンが用いられる。Banerjeeら<sup>13)</sup>は一方のサブユニットをメト型にした四量体の酸素平衡を測定した。 $\alpha^{2+}\beta^{3+}$ ,  $\alpha^{3+}\beta^{2+}$ 共に親和性はHbAと単離鎖との中間にあるが $\alpha^{3+}\beta^{2+}$ の方が少し親和性が高かった。両者ともBohr効果を

示し  $n$  は  $\alpha^{3+}\beta^{2+}$  では 1.3,  $\alpha^{2+}\beta^{3+}$  は pH 依存性で低い pH では 1 より大きい値を示した. Brunori ら<sup>14)</sup> は一方のサブユニットをシアンメト型として Banerjee らとほぼ同じ効果を得たが  $n$  は  $\alpha^{+}\text{CN}\beta$  では 1.2,  $\alpha\beta^{+}\text{CN}$  で 1. 親和性は両者等しかった. Banerjee ら<sup>15)</sup> はさらにメト型サブユニットに F, CN,  $\text{N}_3$  を結合させたときの他方の酸素平衡を測定した. 図 5 に示すようにメト型が高スピンのとき他方のヘムの酸素親和性は低い. また ESR の測定から高い pH でメト型が低スピンになり易い条件 (pH 約 10) では  $\alpha^{3+}\beta^{2+}$  で  $\beta$  ヘムがデオキシ型 (高スピン) だと  $g=6$  付近に高スピンの吸収がみられオキシ型では吸収が消える. しかし  $\alpha^{2+}\beta^{3+}$  ではデオキシ型, オキシ型が等しいピークを示す. また Henry と Banerjee<sup>16)</sup> は  $\alpha^{2+}$  に不対電子を持つ NO を結合させたハイブリッドヘモグロビンで NO の ESR に対する  $\beta$  サブユニットの影響を調べた (図 6).  $\beta^{3+}$  が低スピンのときは  $\alpha^{2+}\text{NO}$  は  $\alpha^{2+}\text{NO}$  の単離鎖と同じピークを示し  $\beta^{3+}$  が高スピンのときは異なる型のピークを示す. これらのことから彼らはヘム間相互作用は  $\beta$  から  $\alpha$  の方向のみに伝わるかといっている. X線解析の結果ではメト型高スピンではヘモグロビンの三次・四次構造はすでにいわゆる R 型になっているので Banerjee らの結果は機能変化が X線解析上の構造変化と直接対応しないと解釈すべきだろうか.  $\beta$  から  $\alpha$  へのみ伝わるかとならずしも解釈できないことは後で述べる. スピンラベルしたヘモグロビンの種々の一酸化炭素飽和度での ESR 測定で,  $n$  が大きいヘモグロビンは等吸収点が存在せず中間体の存在が考えられるが, Hb Yakima, Hb Chesapeake など相互作用のないものは鋭い等吸収点を示す.<sup>17)</sup>

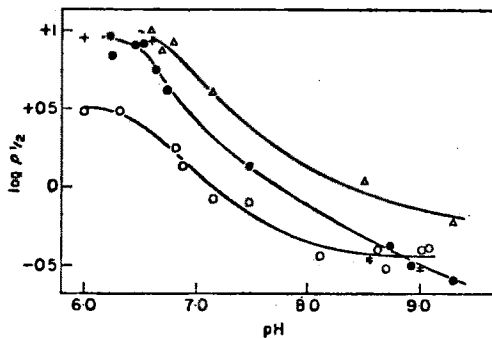


図 5.  $\alpha^{2+}\beta^{3+}$  の誘導体の pH に対する  $\log P_{1/2}$  の変化.  $\alpha^{2+}\beta^{3+}\text{H}_2\text{O}$  (+);  $\alpha^{2+}\beta^{3+}\text{F}^-$  (- $\Delta$ - $\Delta$ -);  $\alpha^{2+}\beta^{3+}\text{CN}^-$  (- $\bullet$ - $\bullet$ -);  $\alpha^{2+}\beta^{3+}\text{OH}^-$  (- $\circ$ - $\circ$ -);  $\alpha^{2+}\beta^{3+}\text{N}_3^-$  (- $\circ$ - $\circ$ -). タンパク濃度 6mg/ml, 0.1 M リン酸および硝酸緩衝液, 20°.

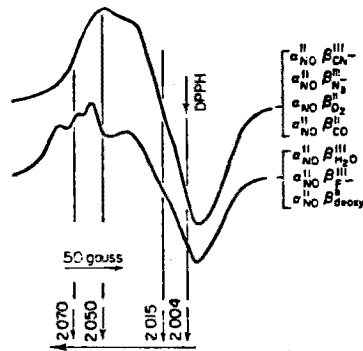


図 6.  $\alpha\text{NO}\beta$  ハイブリッド・ヘモグロビンの室温での ESR スペクトル. ヘム濃度は 0.2 mM. 0.1 M リン酸緩衝液 pH 6.95. DPPH: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.

NMR を検出法として用いた同種の実験で Ogawa ら<sup>18)</sup> は片方のサブユニットをシアンメトとしたヘモグロビンを用いた. 図 7 はポルフィリンのメチルプロトンによる低磁場のスペクトルである. オキシ型サブユニットはこの領域でははっきりしたピークを示さず  $\text{Hb}^{\text{III}}\text{CN}$  はほぼ  $\alpha^{\text{III}}\text{CN}\cdot\beta^{\text{II}}\text{O}_2$  と  $\alpha^{\text{II}}\text{O}_2\cdot\beta^{\text{III}}\text{CN}$  との和である.<sup>19)</sup>  $\beta$  鎖がオキシ型からデオキシ型になると  $\alpha^{\text{III}}\text{CN}$  のピークは高磁場の方へシフトする. 図 7(e) の  $\text{Hb}^{\text{II}}\text{deoxy}$  の -24 ppm のピークは  $\beta$  鎖によるもので -18 ppm 付近のピークは  $\alpha$  鎖によるものであることは Davis らにより種々の異常ヘモグロビンの測定から推定されている.<sup>20)</sup> 図 7(c) では  $\beta^{\text{II}}\text{deoxy}$  のピークは  $\text{Hb deoxy}$  のピークの位置と変っていない. Ogawa ら<sup>18)</sup> は  $\alpha^{\text{III}}\text{CN}\cdot\beta^{\text{II}}$  の  $\alpha^{\text{III}}\text{CN}$  は  $\beta^{\text{II}}$  がオキシ型のときは  $\text{Hb}^{\text{III}}\text{CN}$  と “変化のない” ピークを示し  $\beta^{\text{II}}$  がデオキシ型のときは Bis Tris 緩衝液中では “変化のない” 型, リン酸緩衝液中または DPG の存在下では “変化した” ピークを示すとした.  $\alpha^{\text{II}}\cdot\beta^{\text{III}}\text{CN}$  の  $\beta^{\text{III}}\text{CN}$  は  $\alpha^{\text{II}}$  がデオキシ型のとき, 強いアロステリックエフェクターであるイノシトール六リン酸の存在するときのみ “変化した” ピークを示す. “変化した” ピークは Hill の  $n$  が 1 より大きい状態で見られることから, これはリガンド結合の中間体に相当し,  $\alpha^{\text{II}}\text{CN}\cdot\beta^{\text{III}}$  の方が  $\alpha^{\text{II}}\cdot\beta^{\text{III}}\text{CN}$  より中間体の構造をとり易いことが, 先に述べた Banerjee ら<sup>13)</sup> の酸素平衡で  $\alpha^{3+}\beta^{2+}$  の  $n$  が 1.3 と高いことに関連するのではないかと述べている. またシアンメトサブユニットが “変化した” ピークを示すときデオキシサブユニットのピークは  $\text{Hb deoxy}$  と変っていないと述べている.

Lindstrom ら<sup>21)</sup> はデオキシヘモグロビンの NMR の低

磁場スペクトルのピークはリガンドとしてブチルイソサイアナイドを加えていくとまず $\beta$ 鎖に相当するピークから消えて行くことからリガンドは $\beta$ 鎖に先に結合するとしている。

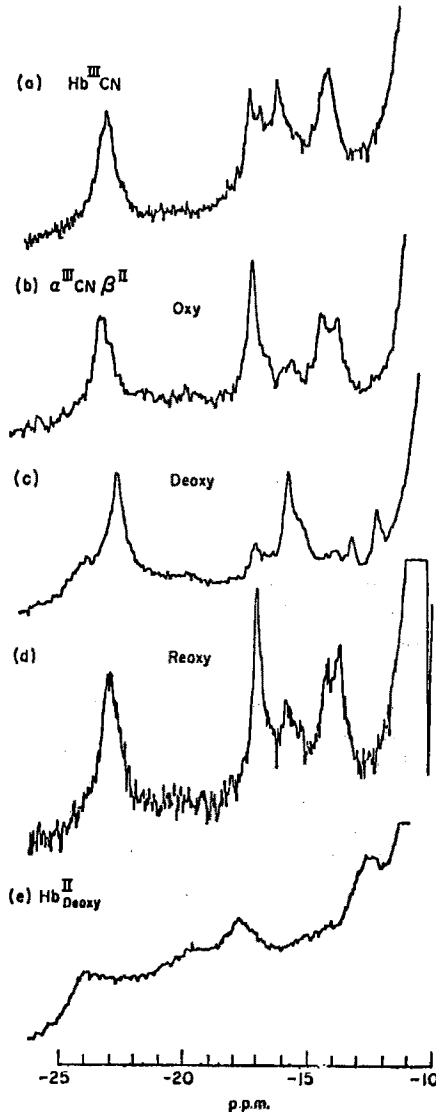


図7. 220 MHz NMRスペクトル。(a)  $Hb^{III} CN$ ; (b)  $(\alpha^{III} CN \beta^{II} O_2)_2$ ; (c) デオキシ型  $(\alpha^{III} CN \beta^{II})_2$ ; (d) (e) を再びオキシ型にしたもの; (e) デオキシ Hb.  $D_2O$  中で 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.1  $\pm$  0.1, 15° へム濃度は約  $10^{-2} M$

上述のごとくあるへみをメト型にしたり NO 型にしてそれに対する他のサブユニットの影響をみていることが多い。このようなリガンド型でみた構造変化がへム間相互作用を示す機能と関連を持つならば、それは相手のサブユニットがデオキシ型するとき、すなわち中間体のときと四量体中の全サブユニットがリガンド結合型のときとで、リガンドの解離速度定数が異なることを示す。デオキシ型のへみが中間体中にあるときと他のサブユニットもデオキシ型であるときとで異なる構造を表わし、それが機能の上に表われるならばデオキシ型への結合速度定数の相異となるわけだが、デオキシ型のへみの変化を測定した報告は少ない。杉田らは側鎖を修飾したへみを含むヘモグロビンの吸収スペクトルはピークの波長が互いに異なること<sup>22)</sup>を利用して $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖に異なるへみを持つハイブリッドヘモグロビンを再構成した<sup>23)</sup>図8に構成単離鎖を重ね合わせたものを対照としたソーレー帯の差スペクトルを示す<sup>24)</sup>。デオキシ型では四量体は単離鎖よりピークが大きいことが知られているが、差スペクトルのピークは $\alpha$ 鎖のピークに一致し $\beta$ 鎖のピーク的位置には差は認められない。また $\alpha NO \cdot \beta deoxy$ のハイブリッドヘモグロビンでは、 $\alpha NO$ の吸収は単離した $\alpha NO$ および $\alpha NO \cdot \beta NO$ より非常に小さく、 $\beta deoxy$ の吸収はほぼ単離 $\beta$ 鎖の吸収に等しい。 $\alpha deoxy \cdot \beta NO$ では差スペクトルで大きなピークはみられない。これらの結果から、 $\alpha$ 鎖はリガンド結合した中間体のときは単離鎖およびリガンド結合四量体の両方と異なる構造で(この時ハプトグロビンとの結合速度から四次構造も両者と異なることが示された<sup>25)</sup>)、デオキシ型中間体は単離鎖に近い構造であるといえよう。 $\beta$ 鎖はソーレー帯で単離鎖と異なるピークを示すことはない。

二種類のサブユニットの一方のへみへリガンドを脱着させたときの三次、四次構造の状態を Cys  $\beta 93$  の SH 基の反応性から解析したものに Maeda<sup>26)</sup>、Antonini<sup>14)</sup> の報告があり、スピンラベルしたへみを含むヘモグロビンの ERS を測定したものに Asakura<sup>27)</sup> の報告があるので参照されたい。

### 5. リガンド結合の中間段階の X 線解析

デオキシ型とメト型との X 線解析結果に基づく Perutz の説が正しいかどうか中間段階を確めるため、Anderson<sup>28)</sup> は母液にアクリルアミドを加えてデオキシ型を結晶させた。ついでアクリルアミドを重ねさせて四次構造を T 状態に固定した後、酸素でへみを酸化して三次構造を r 状態にしたもの (T; r) の X 線解析を行

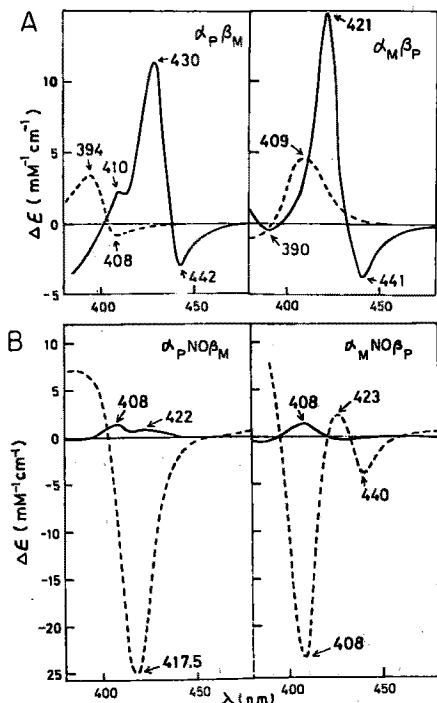


図 8. プロトヘムとメゾヘムを持つハイブリッドヘモグロビンの四量体の吸収から単離鎖の吸収を引いた差スペクトル。  $\alpha_p \beta_M$  は  $\alpha$  鎖にプロトヘム、  $\beta$  鎖にメゾヘムを持つ四量体。

(A) 実線はデオキシ型、破線はオキシ型の差スペクトル。  
(B) 実線は  $\alpha NO \cdot \beta NO$  と  $(\alpha NO + \beta NO)$  との差スペクトルで破線は  $\alpha NO \cdot \beta deoxy$  と  $(\alpha NO + \beta deoxy)$  との差スペクトル。

なった。図 9 に示すようにデオキシ型とくらべて鉄原子はポルフィリン面に近づき His F 8  $\alpha$  により F ヘリックスが引きよせられ Leu F 7  $\alpha$  がヘムの上方のプロピオニル基のつく部分を左に押す。ヘムは鉄を中心として傾き反対側の下端が Val FG 5  $\alpha$  を右へ押し  $\alpha_1 \beta_2$  接触が図 1 に示す変化の方向に変わる。 Asp G 1  $\alpha$  と Asn G 4  $\beta$  とは接近するが水素結合は形成しない。これらの変化は Perutz の説を支持するものであり、ビス (N-マレイミドメチル) エーテルで  $\beta$  鎖を修飾し、四次構造を R に固定したものを還元して三次構造を t にしたもの (R ; t) の X 線解析でみられる変化<sup>9)</sup> と逆に対応する変化である。しかし (T ; r) では Tyr HC 2 は F と H の両ヘリックスの間にあり、この間隙はむしろ開いている。Anderson<sup>28)</sup> は  $\alpha_1$

$\beta_2$  接触に起こる歪みが最初の構造変化でこの歪みは C 末端が F H 間から出て幾つかの水素結合を切ることで消され、結果として F H 間が狭くなるのではないかと推論している。ヤツメウナギのヘモグロビンでは鉄原子の移動は認められるが Tyr HC はデオキシ型、メト型ともにヘリックス F、H の間にある。<sup>29)</sup>

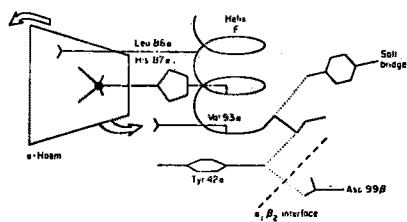


図 9. リガンド結合による  $\alpha$  鎖三次構造変化の機構。この変化により点線で示した水素結合がゆるむ。

遺伝的アミノ酸置換により機能に異常のあるヘモグロビンの X 線解析から、構造と機能との関係を推定するものとして  $\alpha_1 \beta_2$  接触に置換のある Hb Kansas, Richmond,<sup>30)</sup> Hb Yakima,<sup>31)</sup> また C 末端に置換のある Hb Rainier<sup>32)</sup> などがあり  $\alpha$  または  $\beta$  のヘム鉄に配位しているヒスチジンがチロシンに置換し分子の半分がメト型になった HbM の解析結果<sup>33) 34)</sup> も報告されている。

## 6. ハイブリッドヘモグロビンのフロー法によるリガンド結合の解析

Gibson<sup>33)</sup> はシアンメトハイブリッドヘモグロビンの酸素解離、およびブチルイソシアナイドの結合解離の速度を測定した。反応は皆ほぼ一次反応で、常に  $\beta$  鎖の方が  $\alpha$  鎖より早く、その解離速度はそれぞれヘモグロビン中の  $\beta$  鎖および  $\alpha$  鎖からの解離速度に等しく、結合速度はそれぞれの鎖への最初の結合速度より少し大きい。CO の結合だけは複雑で  $\alpha$ 、 $\beta$  鎖とも二相性を示した。

Gibson らは、C 末端にアミノ酸置換のある異常ヘモグロビンおよび C 末端を修飾したヘモグロビンでも CO の結合が二相性であり、減速的であることを見出し、<sup>36)</sup> これは波長に関係ないことから  $\alpha$ 、 $\beta$  鎖の差によるものでなく、また Hill の n が約 2 であることから R、T の二つの状態によるものでもなく、CO 結合速度の異なる二つ以上の中間状態が存在するのではないかと考えた。CO 結合速度はイノシトール六リン酸を加える

と加速度的曲線に変わりその形は波長依存性になる。CO解離速度も修飾ヘモグロビンと正常ヘモグロビンとで異なるが、それはCO結合速度の差よりずっと小さい。 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖とに異なるヘムを持つハイブリットヘモグロビンを用い、酸素解離速度を測定した杉田ら<sup>23)</sup>の結果では、 $n$ が大きくても解離は $\alpha$ 、 $\beta$ 鎖から独立に一次反応に従い固有の速度( $\beta$ 鎖 $\geq$  $\alpha$ 鎖)で行なわれている。 $\beta$ 鎖は単離鎖のときよりも四量体中では解離速度が大きい。中村ら<sup>37)</sup>は同じ試料でCOの解離は酸素の解離と同様の性質を持ち、CO結合は加速度的であることを示した。すなわちヘム間相互作用はリガンドの解離速度が変化するよりも、リガンドの結合速度の変化によるところが大きいと考えられる。これからヘム間相互作用のヘムへの影響はデオキシ型の変化として検出することが重要である。しかしAntoniniら<sup>38)</sup>は $\alpha$ NO $\cdot$  $\beta$ 、 $\alpha$  $\cdot$  $\beta$ NOの半リガンド結合ヘモグロビンへのCO結合速度はデオキシ型ヘモグロビンへの結合速度より少ししか大きくないことを示している。Gibsonらは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖とのソーレー帯の吸収ピークが2~3 nm異なることを利用して四量体中の $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖を区別してリガンド結合の測定を、主としてブチルイソサイアナイドを用いフロー法<sup>39)</sup>、温度ジャンプ法<sup>40)</sup>などで行なっている。彼らの結果によるT型に3個のリガンドが結合するとR型になるが、 $\alpha$ 、 $\beta$ 鎖を区別すると中間体の数が8個、解離および結合の速度定数が32個にもなるので電算機を使用してもこれらの定数を決定するのはまだ困難な段階にあるといえよう。

## 文 献

- 1) E. Antonini, M. Brunori: *Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands*, North Holland Pub. Co., Amsterdam London (1971)
- 2) M. F. Perutz: *Nature*, **228**, 726 (1970)
- 3) J. Wyman: *Advances in Protein Chemistry*, **19**, 223 (1964)
- 4) 杉田良樹: 蛋白質・核酸・酵素, **18**, 502 (1973)
- 5) 今井清博: 生物物理, **61**, 20 (1972)
- 6) E. Bucci, C. Fronticelli: *J. Biol. Chem.*, **240**, PC 551 (1965)
- 7) M. Nagai, Y. Sugita, Y. Yoneyama: *J. Biol. Chem.*, **244**, 1651 (1969)
- 8) M. F. Perutz: *Nature*, **237**, 495 (1972)
- 9) M. F. Perutz, L. F. Ten Eyck: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **36**, 295, (1971)
- 10) D. W. Smith, R. J. P. Williams: *Structure and Bonding*, **7**, 1 (1970)
- 11) R. Banerjee, Y. Alpert, F. Leterrier, R. J. P. Williams: *Biochemistry*, **8**, 2862 (1969)
- 12) J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeux: *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965)
- 13) R. Banerjee, R. Cassoly: *J. Mol. Biol.*, **42**, 351 (1969)
- 14) M. Brunori, G. Amiconi, E. Antonini, J. Wyman, K. H. Winterhalter: *J. Mol. Biol.*, **49**, 461 (1970)
- 15) R. Banerjee, F. Stetzkowski, Y. Henry: *J. Mol. Biol.*, **73**, 455 (1973)
- 16) Y. Henry, R. Banerjee: *J. Mol. Biol.*, **73**, 469 (1973)
- 17) J. J. Baldassare, S. Charache, R. J. Jones, C. Ho: *Biochemistry*, **9**, 4707 (1970)
- 18) S. Ogawa, R. G. Shulman: *J. Mol. Biol.*, **70**, 315 (1972)
- 19) S. Ogawa, R. G. Shulman, M. Fujiwara, T. Yamane: *J. Mol. Biol.*, **70**, 301 (1972)
- 20) D. G. Davis, T. R. Lindstrom, N. H. Mock, J. J. Baldassare, S. Charache, R. T. Jones, C. Ho: *J. Mol. Biol.*, **60**, 101 (1971)
- 21) T. R. Lindstrom, J. S. Olson, N. H. Mock, Q. H. Gibson, C. Ho: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 22 (1971)
- 22) Y. Sugita, Y. Yoneyama: *J. Biol. Chem.*, **246**, 389 (1971)
- 23) Y. Sugita, S. Bannai, Y. Yoneyama, T. Nakamura: *J. Biol. Chem.*, **247**, 6092 (1972)
- 24) Y. Sugita (投稿中)
- 25) S. Bannai, Y. Sugita: *J. Biol. Chem.*, **248**, 7527 (1973)
- 26) T. Maeda, S. Ohnishi: *Biochemistry*, **10**, 1177 (1971)
- 27) T. Asakura, H. R. Drott: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1199 (1971)
- 28) L. Anderson: *J. Mol. Biol.*, **79**, 495 (1973)
- 29) W. E. Love, P. A. Klock, E. E. Lattman, E. A. Padlan, K. B. Ward, W. A. Hendrickson: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **36**, 349 (1971)
- 30) J. Greer: *J. Mol. Biol.*, **59**, 99 (1971)
- 31) P. D. Pulsinelli: *J. Mol. Biol.*, **74**, 57 (1973)
- 32) J. Greer, M. F. Perutz: *Nature New Biol.*, **230**, 261 (1971)
- 33) J. Greer: *J. Mol. Biol.*, **59**, 107 (1971)
- 34) M. F. Perutz, P. D. Pulsinelli, H. M. Ranney: *Nature New Biol.*, **237**, 259 (1972)



- 35) R. Cassoly, Q. H. Gibson : J. Biol. Chem., 247, 7332 (1972)
- 36) K. Moffat, J. S. Olson, Q. H. Gibson : J. Biol. Chem., 248, 6387 (1973)
- 37) T. Nakamura, Y. Sugita, S. Bannai : J. Biol. Chem., 248, 4119 (1973)
- 38) E. Antonini, M. Brunori, J. Wyman, R. W. Noble : J. Biol. Chem., 241, 3236 (1966)
- 39) J. S. Olson, Q. H. Gibson : J. Biol. Chem., 247, 1713 (1972)
- 40) F. X. Cole, Q. H. Gibson : J. Biol. Chem., 248, 4998 (1973)

## ABSTRACT

## Subunit Interaction on Ligand Binding of Hemoglobin

Yoshiki SUGITA

Department of Biochemistry, Kanazawa University, School of Medicine.

The Perutz model for the cooperative ligand binding and the interactions between hemoglobin subunits is briefly described. Several results are presented indicating that the binding of the ligand or changes of spin states of the irons at some hemes of a tetramer alter the states of the other hemes as detected by spectrophotometry, ESR and NMR, which support the Perutz model. The importance of describing the difference in the states of deoxygenated hemes between totally deoxygenated Hb and the intermediates in ligand binding is stressed. Kinetic results suggesting the presence of the intermediate states and the kinetic parameters for half liganded tetramers are introduced.

投 稿 歓 迎

談話室への投稿を歓迎します。特に自然科学、生命科学のあり方をめぐっての広い範囲の討論を期待しています。Vol. 13 No. 3 (通巻67号)の“談話室”に対するレスポンス、あるいはモノ著「偶然と必然」、ステント著「進歩の終焉」などに対する批判でも結構です。

どしどしお寄せ下さい。

編集実行委員会