血色素の分光学: 共鳴ラマン分光と蛍光ラベルエフェクターによる協同作用の研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 米山, 良昌, 馬渡, 一浩, 松川, 茂, Yoneyama, Yoshimasa, Mawatari, Kazuhiro, Matsukawa, Shigeru メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00034924

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

血色素の分光学－共鳴ラマン分光と蛍光ラベルエフェクターによる協同作用の研究

(60480134)

昭和61年度科学研究費補助金（一般研究Ｂ）研究成果報告書

昭和62年３月

研究代表者　米　山　良　昌

（金沢大学医学部教授）

はしがき

本研究は文部省科学研究費補助金（一般研究Ｂ，課題番号60480134）を昭和60，61年度の２カ年に受け，正常及び異常血色素を用い，ヘム近傍の構造は共鳴ラマン分光法，アロステリックエフェクター結合部位の構造は蛍光ラベルエフェクターにより明らかにし，血色素のアロステリック機構，協同作用の分子メカニズムの解明に寄与するために行われた。

研究組織

研究代表者：米山良昌（金沢大学医学部教授）

研究分担者：松川　茂（金沢大学医学部講師）

〃　：馬渡一浩（金沢大学医療技術短期大学部講師）

研究経費

昭和60年度	3,400 千円
昭和61年度	2,700 千円
計	6,100 千円

研　究　発　表

学会誌等

1) Matsukawa, S., Mawatari, K., Yoneyama, Y., and Kitagawa., T. : Correlation between the Iron-Histidine Stretching Frequencies and Oxygen Affinity of Hemoglobins. A Continuous Strain Model.
J. Am. Chem. Soc. 107, 1108－1113 (1985).

2) 馬渡一浩，松川茂，米山良昌，武田与吉 :
異常ヘモグロビンの検出及び精製，分取システムの確立．日本臨床代謝学会記録，22，230－231 (1985).

3) Matsukawa, S., Mawatari, K., Shimokawa, Y., Takeda, Y., Yoneyama, Y., Itoh, M., Kurokawa, H., and Kitagawa, T. :
Allosteric Mechanism Deduced from the Analysis of the Variation of Structure and Function of Abnormal Hemoglobins. Acta Haematol. Jpn., 48, 2002－2014 (1985).

4) 松川茂，馬渡一浩，米山良昌，北川禎三 : Hbの機能異常に対応して変化する構造と変化しない構造．　第36回タンパク質構造討論会予稿集，P. 103～106 (1985).

5) Matsukawa, S., Mawatari, K., Yoneyama, Y., and Kitagawa, T. :
Functional and Structural Analyses on Abnormal Hemoglobins with Impaired Oxygen Binding Properties－To Elucidate the Allosteric Mechanism of Hemoglobin. J. Protein Chem. 6, 109－119 (1987)

6) Mawatari, K., Matsukawa, S., and Yoneyama, Y. :
Valency Hybrid Hemoglobins with Special Attention to Subunit Organization. Biomed. Biochim. Acta (1987) 印刷中.

7) Mawatari, K., Matsukawa, S., Yoneyama, Y., and Takeda, Y. :
Assessment of the $\alpha_1\beta_2$ Contact Structure of Valency Hybrid Hemoglobins by Ultraviolet Difference Spectra.
Biochim. Biophys. Acta (1987) 印刷中.

8) Mawatari, K., Matsukawa, S., and Yoneyama, Y. :
Effect of Inositol Hexaphate on the Structures and Functions of Valency Hybrid Hemoglobins. (発表予定)

口頭発表

1）松川茂，馬渡一浩，米山良昌

蛍光プローブによる Hb と有機リン酸化合物の相互作用の研究．日本薬学会第105年会講演要旨集， P．337 （1985）．

2）馬渡一浩，松川茂，米山良昌，谷島清郎

異常 Hb 血症及びヒト Hb 血症患者の赤血球に出現する Hb 分子種のＦＰＬＣ による迅速分析法．日本薬学会第105年会講演要旨集， P．381 （1985）．

3）松川茂，馬渡一浩，武田与吉，米山良昌，北川禎三

異常及び修飾 Hb の原子価雑種の Fe－His 結合の共鳴ラマン分光と酵素平衡機能との関係

生化学，57， P．737（1985）

4）馬渡一浩，松川茂，武田与吉，米山良昌，北川禎三

Valency Hybrid ヘモグロビンの鉄－近位ヒスチジン結合様式の pH依存性

生化学，57，P．737（1985）

5）Matsukawa，S.，Mawatari，K.，Yoneyama，Y.，and Kitagawa，T.

Functional and Structural Analyses on Abnormal Hemoglobins with Impaired Oxygen Binding Properties.

Abstracts of International Conference on Macromolecular Structure and Function.（1985）

6）馬渡一浩，松川茂，米山良昌

Des Arg（α141）Valency Hybrid ヘモグロビンの酵素平衡機能

生化学，58， P．1095（1986）

7）山口順道，馬渡一浩，友田燁夫，米山良昌

ホモゲンチジン酸による赤血球内ヘモグロビンの修飾について

生化学，58， P．1097（1986）

8）Mawatari，K.，Matsukawa，S.，and Yoneyama，Y.

Valency Hybrid Hemoglobins with Special Attention to Subunit Organization.

Abstracts of 11th International Symposium on Structure and Function of Erythroid Cells，P.74（1986）

出 版 物

1）米山良昌，松川茂，友田燁夫，長井雅子，馬渡一浩

ヘモグロビン

続・生化学実験講座　第８巻　血液（上），　印刷中（1987）

2）馬渡一浩

等電点電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによるヘモグロビンの分離・分析

蛋白質・核酸・酵素　（1987）　32，439－445.

3）松川　茂

酸素親和性異常 Hb の構造と機能相関

蛋白質・核酸・酵素　（1987）　印刷中

研　究　成　果

I. 共鳴ラマン分光による血色素（ヘモグロビン）の協同作用に関する研究

〔要　旨〕

種々の酸素親和性異常ヘモグロビンの酸素平衡曲線を測定し，これらの曲線を２状態モデルで解析することによって，アロステリック・パラメータを求めた。K_R は異常ヘモグロビンの種類によらず，ほぼ一定であった。しかし，K_T と L は異常ヘモグロビンによって値が大きく異なっていた。しかも，K_R と K_T の比を c とした時，両者の間には $\log c = -0.4 \log L$ という関係がみられた。このことは，異常ヘモグロビンのアロステリック機能の異常はデオキシ型Ｒ状態にあるのではなく，デオキシ型Ｔ状態の酸素親和性の多様性にあることを示唆している。この多様性の構造因子を分子レベルで明らかにするために，酸素親和性異常ヘモグロビンの低波数領域の共鳴ラマンスペクトルを種々の条件下でデオキシ型について測定した。異常ヘモグロビンのヘム鉄と近位ヒスチジンとの伸縮振動に由来するラマン線のみが，測定条件や酸素親和性の異常の程度に対応して変化した。しかも，このラマン線の振動数変化は，異常ヘモグロビンのデオキシ型Ｔ状態の酸素親和性の違いと相関することがわかった。デオキシ型Ｔ状態のヘム鉄－近位ヒスチジン結合の強さはグロビンによってヘムに及ぼされる拘束の強さに依存して変化することから，この結合がヘモグロビンの酸素結合や構造変化の調節機構にとって重要な構造因子であることを示唆している。

〔　序　〕

Ｘ線結晶構造解析を基にして，Perutz はデオキシ型ヘモグロビンは酸素親和性の低いＴ型構造，リガンド結合型は酸素親和性の高いＲ型構造と異なる四次構造をとり，ヘモグロビンの示す協同的酸素結合は酸素化過程で起こるＴ型からＲ型への四次構造変化によってもたらされるという概念を提唱した。この概念は Monod らによって提案されている２状態モデル（又はＭＷＣモデル）の構造的基盤を与えていると思われる。デオキシ型のヒト成人ヘモグロビン（HbA）は多くのサブユニット分子内又はサブユニット分子間に形成される塩橋，水素結合そして多くの疎水性相互作用によって拘束され，束縛された構造をとっている。このデオキシ型構造は，ヘテロトロピックなアロステリック・エフェクターであるイノシトール・六・リン酸（ＩＨＰ），塩素イオン，水素イオンの結合によって更に束縛され，安定化する。従って，これらのエフェクターはヘモグロビンに結合し，酸素親和性を低下させることができる。ところが，Ｒ型構造ではＴ型構造を安定化している，すべ

ての塩橋及びサブユニット内，サブユニット間相互作用は切断されている。また，$\alpha_1\ \beta_2$ サブユニット界面がR→T四次構造変化に伴なって起こる構造変化の重要な部位である。このように，ヘモグロビンの協同的酸素結合の立体化学的機構のあらましについては，良く実証されてきた。しかし，酸素親和性の調節機構やR→T構造変化のトリガー機構については，未だに論争があり，実験的にも証明されていないことが多い。

そこで，これらの問題を解析するために，我々は，$\alpha_1\beta_2$ サブユニット界面にアミノ酸置換の起こった異常ヘモグロビンの構造と機能との相関関係について研究した。この界面の相互作用の不完全さ故に，これらの異常ヘモグロビンは種々な程度の機能異常を示すことが期待される。従って，異常ヘモグロビンの機能と構造の違いとを比較・検討することによって，アロステリックな酸素結合にとって必須な構造因子が明らかにできると考えられる。ここでは，必須な構造因子の候補として，ヘム鉄と近位ヒスチジンとの結合〔Fe－Nε(His) 結合〕を考え，共鳴ラマン分光法により，異常ヘモグロビンのFe－Nε(His)結合の強さを検討した。その結果を同一条件下で測定した酸素解離曲線の解析から得られるアロステリック・パラメータとの相関を検討した。

〔実験方法〕

異常ヘモグロビンとして，以下に挙げる6種類を用いた。カッコ内にアミノ酸置換部位を示した。Hb J Capetown (α 92 Arg→Glu)，Hb Chesapeake (α 92 Arg→Leu)，Hb Yakima (β99 Asp→His)，Hb Kempsey (β99 Asp→Asn)，Hb Hirose (β37 Trp→Ser)，Hb Kansas (β102 Asn→Thr)。

これらの異常ヘモグロビンは，陽イオン交換樹脂を用いて，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により精製した。カラムとしてはTSKgel CM-3SW（内径21.5mm，長さ150mm），平衡化緩衝液としては50mMリン酸緩衝液（pH 6.3）を用いた。流速は5ml／分で，異常ヘモグロビンはNaClの濃度勾配法により，正常HbAと分離した。

精製した種々の異常ヘモグロビンの酸素平衡曲線は，自動記録装置を用いて，25℃で異なる，いくつかの溶媒条件下で測定した。

測定した酸素平衡曲線はMonodらの2状態モデルに基づき，Trial and Error法により解析し，L，c，K_R の3つのアロステリック・パラメーターを決定した。

異常ヘモグロビンの共鳴ラマンスペクトルはJEOL D-400 ラマン分光光度計により，酸素平衡曲線測定と同一溶媒条件下で測定した。共鳴ラマンスペクトルは，He／Cd レーザーの441.6nmの光を用い200－300μMのヘモグロビン（0.3ml）を用いて行った。

〔結果及び考察〕

1）異常ヘモグロビンの酸素平衡機能

図1に0.1 M Na Cl 存在化，pH 7.0で測定した単離α，β鎖，正常Hb A，そして種々の異常ヘモグロビンの酸素平衡曲線のHill プロットを示した。Hill プロットでは，酸素親和性の指標である P_{50}（50％飽和時の酸素分圧）は，Hill 曲線の横軸との交点から求まる。また，ヘモグロビンの協同的酸素結合能の目安となるHill 係数は，P_{50} の時の Hill 曲線の傾きから決定できる。

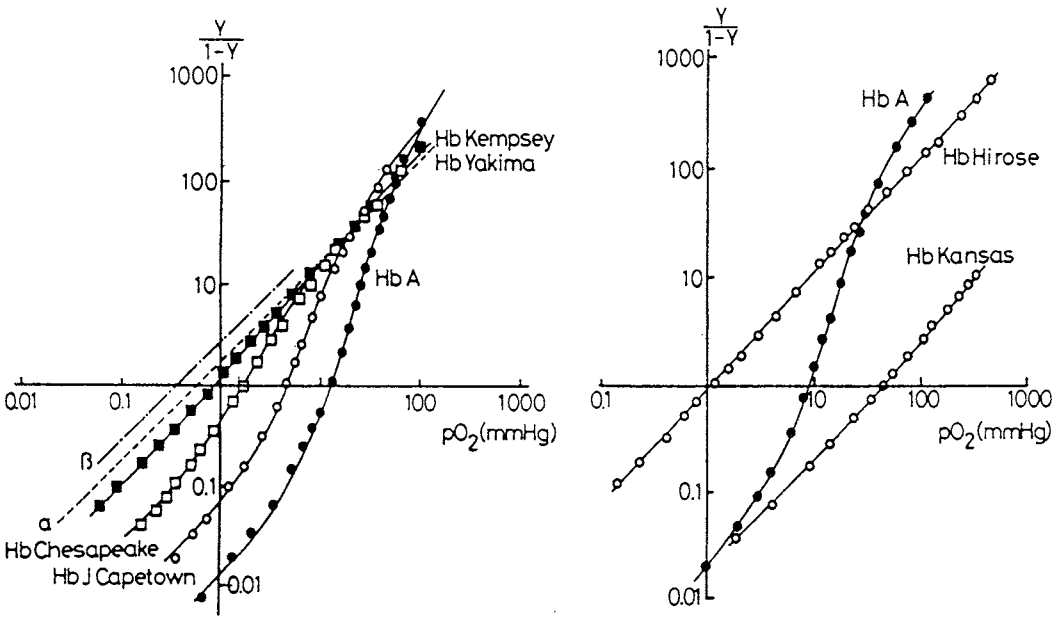


図1. 正常および異常ヘモグロビンの酸素平衡曲線

酸素平衡曲線は，ヘモグロビンの脱酸素化過程を自動記録装置によって，25℃で測定した。緩衝液は0.1 M Na Clを含む0.05 Mビス・トリス／酢酸，pH 7.0を用いた。αとβ鎖はHb Aを pCMB処理して分離した後，CO型でジチオスレイトールにより，SH基を再生して得た。

図1に示したように，異常ヘモグロビンは異なるHill曲線を与える。例えば，β鎖異常のHb Kempsey と Hb Yakima は，高酸素親和性で協同性が低く，単離鎖と同じではないが，非常に良く似た曲線を示した。ところが，Hb J Capetown と Hb Chesapeake は，HbA と Hb Kempsey の中間の酸素親和性と協同性を示した。Hb Hirose は非常に高い酸素親和性，Hb Kansas は低酸素親和性を示すが，両者共に，今回の測定条件下では協同性を示さなかった。

2）異常ヘモグロビンの酸素平衡曲線の2状態モデルによる解析

次に，異常ヘモグロビンの機能異常が2状態モデルでは，どの様に記述されるかについて検討した。Monod らが提唱した2状態モデルでは，ヘモグロビンの協同性を説明するために，次の仮定がなされている。即ち，ヘモグロビンは，酸素親和性の異なる2つの四次構造，T状態とR状態が平衡で存在し，T状態の酸素親和性（K_T）とR状態の酸素親和性（K_R）は酸素化過程を通して一定であると考える。従って，ヘモグロビンの協同性は，酸素化過程で，TとR構造の割合が逆転することによって説明される。デオキシ状態でのTとR状態との平衡定数をLとすると，異なる酸素平衡曲線は K_T と K_R を変えることなく，Lの値のみを変えて説明される。このことから高酸素親和性ヘモグロビンは低酸素親和性ヘモグロビンより，小さなL値をもつことが期待されるのである。

ある酸素分圧（pO_2）での酸素飽和度（Y）は2状態モデルでは，K_R，K_T，L を用いて次の式で表わされる。

$$Y = Lca(1+ca)^3 + a(1+a)^3 / L(1+ca)^4 + (1+a)^4 \quad \cdots\cdots (1)$$

ここで，$a = pO_2 / K_R$，　$c = K_R / K_T$ である。

図1に示したように，正常及び異常ヘモグロビンの酸素平衡曲線の上方は，ほぼ一つの斬近線上に収束する傾向がある。しかし，下方の傾き1の斬近線は，ヘモグロビンの種類によって異っていた。この結果は，K_R はヘモグロビンの種類によらずほぼ一定なのに対し，K_T はヘモグロビンにより，異なっていることを示唆している。事実，これらのすべての酸素平衡曲線は，K_R と K_T を一定にし，Lのみを変えることによってはシュミレーションできなかった。これらの結果はMonod らの原報により定義された2状態モデルでは，異常ヘモグロビンの機能異常は説明できないことを示している。

そこで，我々は，Continuous Strain モデルという，2状態モデルを拡張したアロステリック・モデルを提唱した。このモデルでは，Lのみならず K_T をも変数とし，ヘモグロビンはすべて2状態モデルと同様に，酸素化過程でTからR状態へと遷移するが，T状態はヘモグロビンの種類，溶液条件によって異なると考えるのである。これによって，異常ヘモグロビンの示す種々の酸素平衡曲線はすべて非常に良くフィットできた（図1）。

更に，このモデルでの解析から得たLと K_T の値の間に極めて興味ある関係を我々は発見した。図2に異なる溶液条件下で測定した異常ヘモグロビンの酸素平衡曲線の解析から得られたLとcの値をプロットした。驚くことに，ほとんどすべての点が，log Lが1から8の範囲内では，$\log c = -0.4 \log L$ で与えられる直線上又は，その近傍に存在することがわかった。このことは，これまで独立と考えられていたLとc（又は K_T）は相互に依存すること，即ち，Lはcによって決定されることを示している。

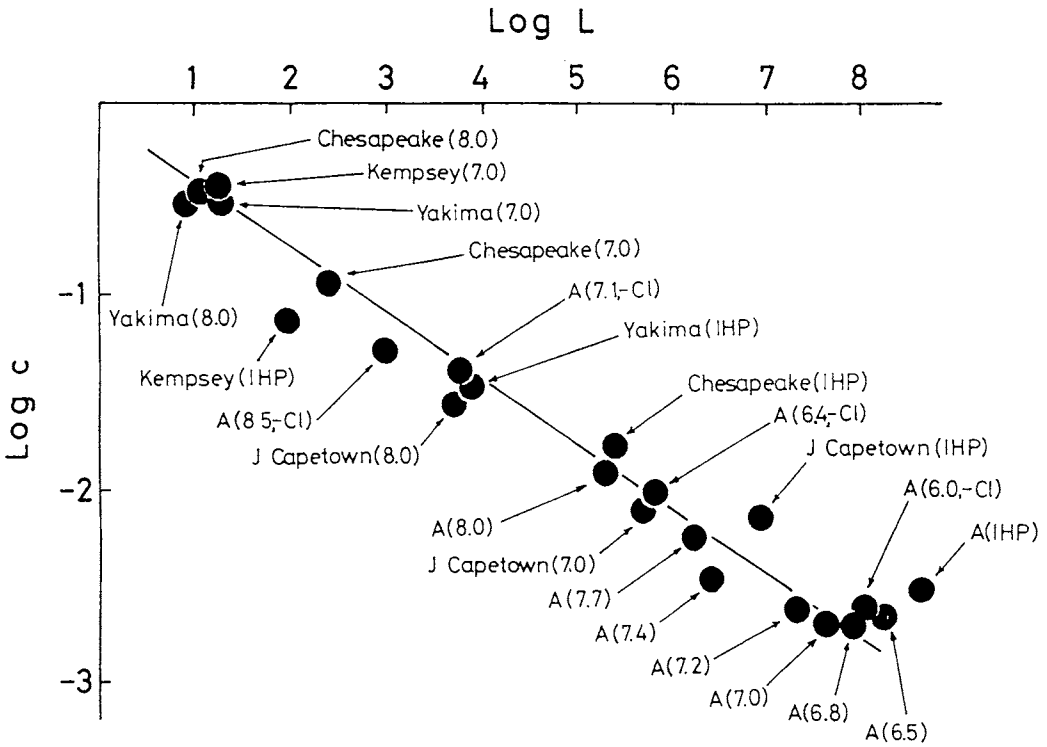


図2. 種々のヘモグロビンのLとcの間の関係
　Lとc値はコンピューター・ディスプレイを用いたTrial and Error法により決定した。

3) アロステリック・パラメータの理論的側面

式(1)において，Y＝0.5の時の酸素分圧はP_{50}であるので，Lは理論的に式(2)で与えられる。

$$L = (1+b)^3 (b-1) / (1+cb)^3 (1-cb) \cdots\cdots (2)$$

ここで，$b = P_{50} / K_R$である。

P_{50}がある値をとるヘモグロビンには式(2)を満足すべき適当なLとcの値の組み合わせが数多く存在する。しかし，cとP_{50}の値はHill係数，n，にも相互に依存するため，ヘモグロビンには，最適なLとcの組み合わせが選び出される可能性がある。n値はP_{50}におけるHill曲線の傾きで定義され，(3)式で表わされる。

$$n = \{ d \log [Y/(1-Y)] / d \log pO_2 \} P_{50} \quad \cdots\cdots (3)$$

式(1)と(3)より，nはcとbを用いて(4)式で表わされる。

$$n = 1 + [3(1-cb)(b-1)/(1+cb)(b+1)] \cdots\cdots (4)$$

式(2)と(4)からわかるように，Lはcとbの関数であり，nもcとbの関数である。式(2)と(4)からb又はcを消去すると，式(2)は式(4)と関係づけられる。このことは，Lとcそして Hill 係数は互いに依存しあうことを意味している。

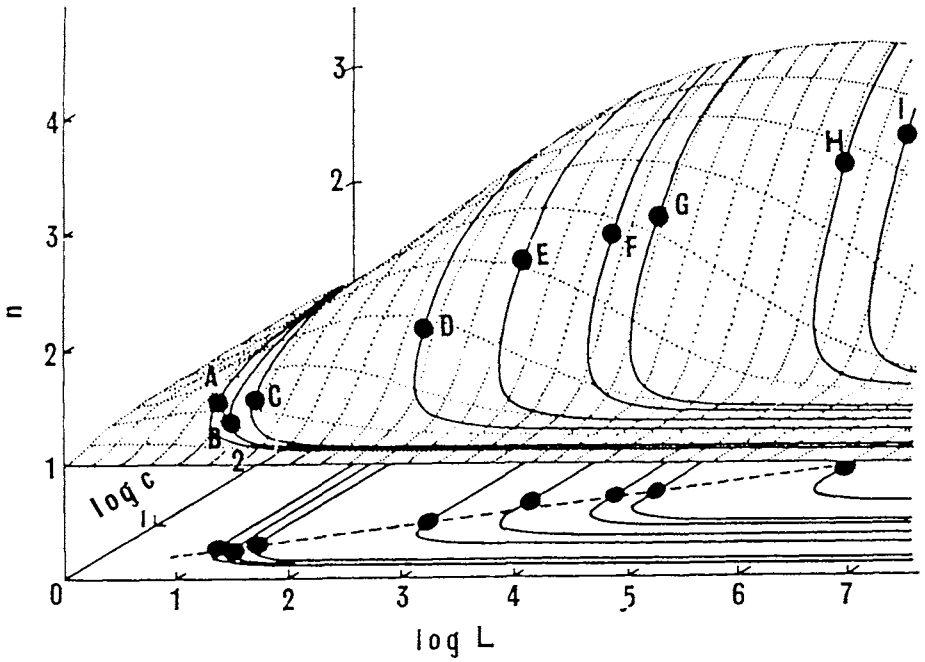


図3. L，cそしてHill 係数の間の関係を表わす3次元表示
〔A〕 Hb Chesapeake (pH 8.0)；〔B〕 Hb Kempsey ；〔C〕 Hb Yakima ：〔D〕 Hb Chesapeake ；〔E〕 HbA (pH 8.0 − Cl^-)；〔F〕 Hb J Capetown (pH 8.0)；〔G〕 HbA (− Cl^-)；〔H〕 HbA (pH 8.0)；〔I〕 Hb J Capetown.
カッコ内に何も書かれていない場合には，ヘモグロビンは 0.1 M NaCl を含む 0.05 M ビスートリス／酢酸 (pH 7.0) で測定した。

図3はアロステリック・パラメータ，Lとc，及びn値の関係を3次元表示したものである。底面は log c と log L との関係を示している。2つの垂直面は log c の n 及び log L の n への依存性を表わしている。実線は，異なる P_{50} をもつ種々のヘモグロビンにおけるLとcのnへの理論的依存性を示している。底面の実線は3次元曲線の投影によって得られる。各々の投影曲線は式(2)でbを一定にして，L又はcの値を変えて計算できる。 黒丸は実測のn値と最適なLとcの値の組み合わせを用いてプロットしたものである。これらの点は，ランダムに分布しているというよりはむしろ，曲線の尾根の近くの傾斜部に規則的に分布しているように見える。尾根の部分は，どんなcの値であろうが，最大のn値をとるところに相当する。従って，どのよう

なヘモグロビンのｎ値も理論的に予測される最大のｎ値より，少し小さめ（約80％）であることがわかった。又，Ｌ，ｃそしてｎの組み合わせによって決定される点の分布が規則正しいことは偶然でないことを示している。あるKRとKTの値をもつ時，ヘモグロビンのｎ値はpO_2軸に対して，酸素平衡曲線が対称の時に最大となる。

以上のことから，ヘモグロビンは一般に，ある限られた能力内では，協同性が大きくなるよりはむしろ，より酸素親和性を低下させることを優先するような傾向にあることを強く示唆している。

4） log L と log c との関係のエネルギー論的意味

次に，我々は，ＴとＲ状態へのリガンド結合とＴからＲ状態への構造変化に伴なう自由エネルギー変化に関する説明を試みた。

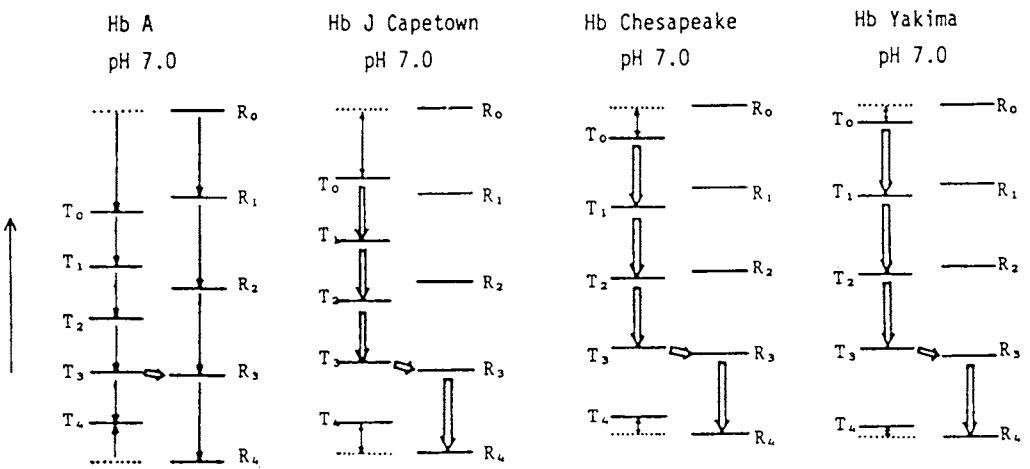


図4. 種々のヘモグロビンの酸素化過程と構造変化に伴なう自由エネルギー変化
Ti と Ri は各々ｉ個の酸素が結合したＴとＲ状態を表わす（但し，ｉ＝０～４）。
この図ではR_0状態はすべてのヘモグロビンで共通であると仮定した。白抜きの矢印で示したように，どのヘモグロビンでもＴからＲ状態への構造変化は３個目の酸素が結合した後に起こる。

図４にHb A についての自由エネルギー・ダイヤグラムを示した。この図からアロステリック・パラメーターについての式が導かれる。

$$-4RT\ln K_R + RT\ln L_4 = -4RT\ln K_T + RT\ln L_0 \quad \cdots\cdots(5)$$

ここで，L_0とL_4は各々，完全デオキシ型と完全オキシ型のＲとＴ状態の平衡定数である。この式は次のように書き直すことができる。

$$RT \log L_4 = 4RT \log c + RT \log L_0$$
$$\log L_4 = 4 \log c + \log L_0 \qquad (6)$$

$\log c = -0.4 \log L_0$ なので式(6)の $\log c$ を消去すると新しい関係式(7)が導き出される。

$$\log L_4 = -0.6 \log L_0 \qquad (7)$$

式(7)は R_4 と T_4 状態の自由エネルギー変化は R_0 と T_0 の自由エネルギー変化の関数であることを意味している。

更に，図4はContinuous Strainモデルに基づいて，最適なL，K_R そして K_T の組み合わせから計算される3つの異常ヘモグロビンの自由エネルギー・ダイヤグラムも示してある。いかなるヘモグロビンでも R_4 と T_4 の間の自由エネルギー変化は式(7)で与えられる。このことは，どんなヘモグロビンでも，TからR状態への四次構造変化は3個目の酸素が結合した後に共通に起こることを示唆している。

$\alpha_1 \beta_2$ サブユニット界面にアミノ酸置換のある異常ヘモグロビンでは，点突然変異によって引き起こされる構造変化は，デオキシ型T構造を安定化しているサブユニット間及びサブユニット内相互作用を弱めることである。その結果，正常Hb Aと比較して，R状態は変わらないが，デオキシ型T状態が不安定化するのである。K_T 値の増加は逆に，デオキシ状態でのR－T平衡をR側へシフトさせる。異常ヘモグロビンの K_T 値は $\alpha_1 \beta_2$ 接触面の相互作用の弱まりかたの程度に依存して大きく変わっている。また，図4からわかるように，K_R と K_T の値の差が小さくなるにつれて，ヘム間相互作用の自由エネルギー（$-RT \ln K_R / K_T$）が減少することもわかった。

5） $\log L$ と $\log c$ との間の関係の構造的根拠　―共鳴ラマン分光法を用いて―

ヘム間相互作用の自由エネルギーはデオキシ型T構造の特定の場所に局在するか，又は，ヘモグロビン分子全体に分散していると考えられる。どちらが正しいとしても，重要なことはヘモグロビンの酸素結合のアロステリック機構はデオキシ型T状態の構造の中に包含されているらしいことである。そこで，我々はデオキシT状態におけるヘムとグロビンとの間の相互作用の様式に着目した。というのは，酸素結合はデオキシ型ヘムの鉄原子で起こるからである。拘束のかかっているデオキシヘモグロビンでは，ヘム鉄はポルフィリン面より近位ヒスチジン側へとび出していることが知られている。このヘム鉄の変位は近位ヒスチジンの引く力によって達せられている。その結果，鉄－ヒスチジン結合はポルフィリン面に対して傾いている。この場合には，ヒスチジンのイミダゾール基とピロールの窒素との立体的反発を防ぐために，鉄－ヒスチジン結合はより弱まり，拘束のないデオキシヘモグロビンに比べて引き伸ばされているであろう。

鉄－ヒスチジンの結合様式は共鳴ラマン分光法により，非常に良く特性がわかっている。鉄－

ヒスチジン結合の伸縮振動に由来するラマン線は210－220 cm^{-1}付近に現われることがKitagawaらにより明らかにされている。しかも，このラマン線はヘモグロビンの四次構造変化に伴なってシフトするとの報告もある。我々は，Fe－Hisラマン線の振動数変化は単に四次構造変化のみによるものではないと考えて以下の実験を行った。

デオキシ型異常ヘモグロビンの低波数領域の共鳴ラマンスペクトルを酸素平衡曲線測定と同一溶液条件下で鉄－ヒスチジン伸縮振動に注目して測定した。従って，酸素平衡曲線から得られたK_Tの値とラマン・シフトとの相関を直接，比較することが可能となる。

図5に正常及び異常ヘモグロビンの低波数領域の共鳴ラマンスペクトルを示した。極めて高酸素親和性を示す，Hb Yakima，Hb Kempsey そしてHb HiroseのFe－Hisラマン線は219から220 cm^{-1}付近にみられ，Hb Aより約5 cm^{-1}ほど高波数側へシフトしていることがわかった。一方，Hb AとHb Kempseyの間の中間型酸素親和性を示すα鎖異常ヘモグロビン（Hb J Capetown，Hb Chesapeake）はHb Aと同様に215 cm^{-1}にFe－His ラマン線を示した。Fe－His結合以外のラマン線の酸素親和性の違いによる差は認められなかった。このことからFe－Hisラマン線の振動数シフトは異なる酸素親和性をもつデオキシ型T状態の構造を反映するのではないかと考えられる。

このことを更に確認するために，我々は，アロステリック・エフェクターがFe－His ラマン線の振動数に及ぼす効果について調べた。1mMのIHPを機能異常ヘモグロンに添加すると酸素親和性の著しい低下とかなりの協同性の

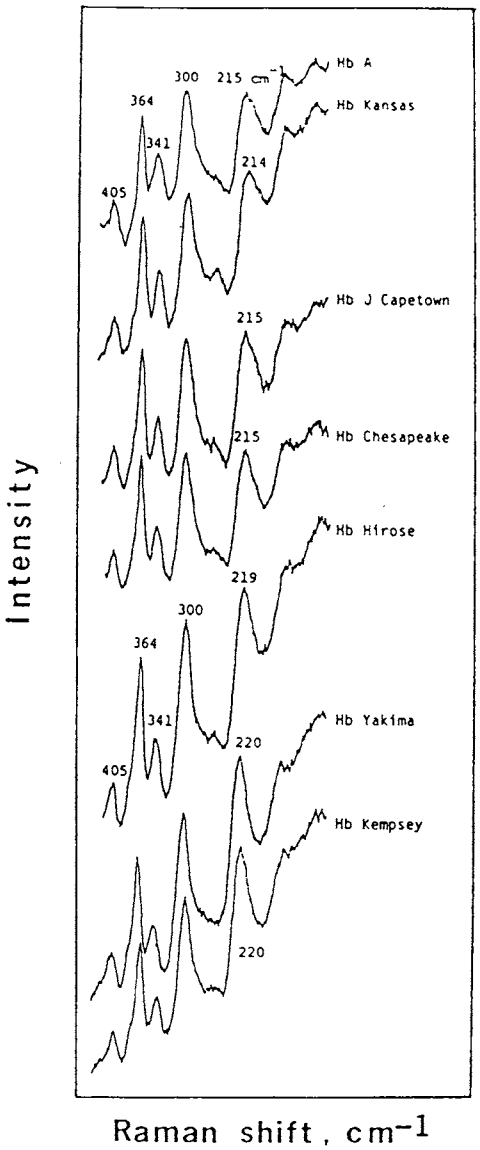


図5. 正常及び異常ヘモグロビンの低波数領域の共鳴ラマンスペクトル
ヘモグロビン濃度はヘム当たり200－300μMで0.1 M NaClを含む0.05 Mビストートリス／酢酸，pH 7.0中で測定した。

回復がみられることが知られている。又，Cl^-イオンの除去やヘモグロビン溶液のH^+イオンの減少はヘモグロビンの酸素親和性を著しく増加させることも知られている。従って，もし，Fe－His結合ラマン線がヘモグロビンの酸素親和性と関係があるならば，デオキシヘモグロビンへのＩＨＰの結合によりラマン線は低波数側に，Cl^-イオンの除去やpHの上昇は高波数側にシフトするにちがいない。

図6はHb Kansasを除いて，この予想が当っていることを示している。ところが，Hb KansasではCl^-の除去と高pH条件でのFe－Hisラマン線の振動数変化はみられなかった。しかし，Hb YakimaとHb Kempseyでは，IHP添加によってラマン線が各々3と4 cm^{-1}だけ低波数側にシフトした。また，pH 8.5 + Cl^-では，Hb J CapetownとHb ChesapeakeのFe－Hisラマン線はpH 7.0+Cl^-の時より，約5 cm^{-1}高波数側にシフトしていた。pH 8.5 + Cl^-では，Hb Chesapeakeの酸素結合能はpH 7.0+Cl^-でのHb KempseyやHb Yakimaに非常に良く似ているが，Hb J CapetownはHb AとHb Kempseyの中間の酸素親和性を示した。

以上の結果は，鉄－ヒスチジン結合に由来するラマン線の変化はデオキシ型T状態の酸素親和性の変化に良く対応

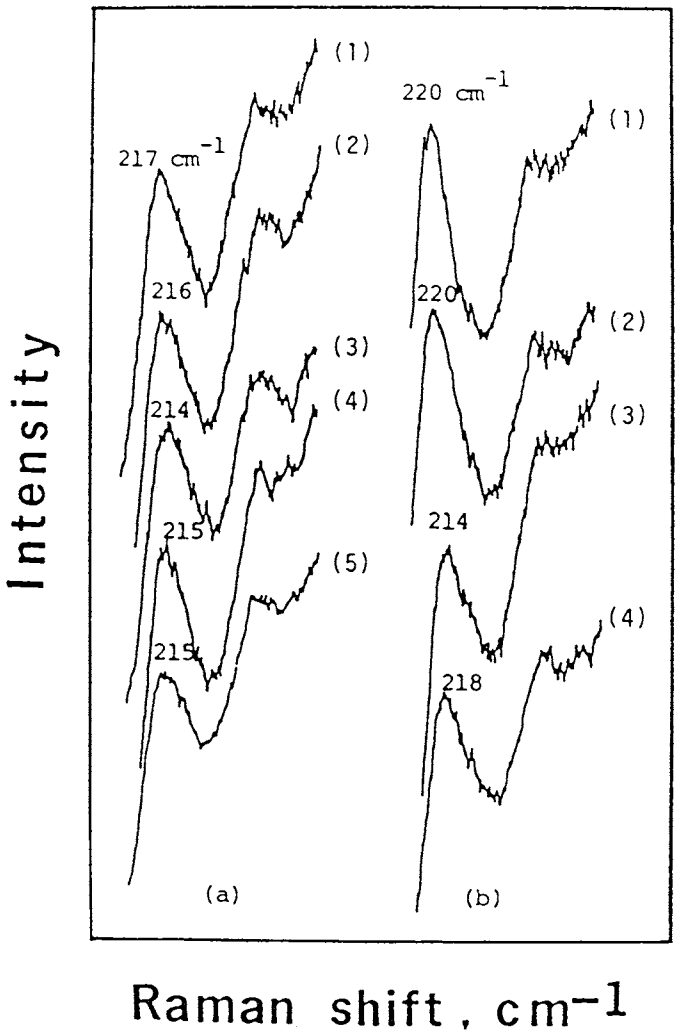


図6. 異常ヘモグロビンのFe－His伸縮振動
(a) pH 7.0で1mM IHP存在下の場合
(1) Hb Kempsey, (2) Hb Yakima, (3) Hb Chesapeake, (4) Hb J Capetown, (5) Hb A
(b) pH 8.5でCl^-非存在下の場合
(1) Hb Chesapeake, (2) Hb J Capetown, (3) Hb Kansas, (4) Hb A

するという我々の考えを強く支持している。このことをもっと定量的に確かめるために，我々はFe－His結合ラマン線の振動数を酸素平衡曲線の解析から得たT状態の酸素親和性（K_T）に対してプロットし，図7に示した。

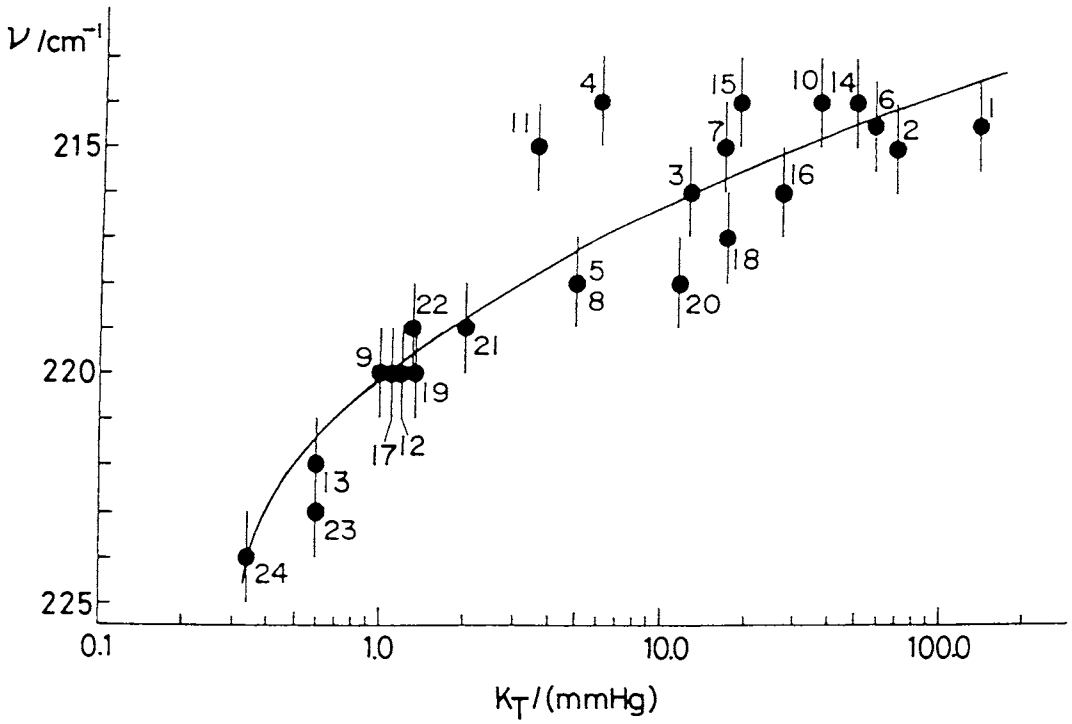


図7. Fe－His ラマン線の振動数とT状態の酸素親和性（K_T）との関係

1. Hb A (pH 7.0, +IHP), 2. Hb A (pH 7.0, +Cl⁻), 3. Hb A (pH 8.5, +Cl⁻),
4. Hb A (pH 7.0, −Cl⁻), 5. Hb A (pH 8.5, −Cl⁻),
6. Hb J Capetown (pH 7.0, +IHP), 7. Hb J Capetown (pH 7.0, +Cl⁻),
8. Hb J Capetown (pH 8.5, +Cl⁻), 9. Hb J Capetown (pH 8.5, −Cl⁻),
10. Hb Chesapeake (pH 7.0, +IHP), 11. Hb Chesapeake (pH 7.0, +Cl⁻),
12. Hb Chesapeake (pH 8.5, +Cl⁻), 13. Hb Chesapeake (pH 8.5, −Cl⁻),
14. Hb Kansas (pH 7.0, +Cl⁻), 15. Hb Kansas (pH 8.5, −Cl⁻),
16. Hb Yakima (pH 7.0, +IHP), 17. Hb Yakima (pH 7.0, +Cl⁻),
18. Hb Kempsey (pH 7.0, +IHP), 19. Hb Kempsey (pH 7.0, +Cl⁻),
20. Hb Hirose (pH 7.0, +IHP), 21. Hb Hirose (pH 7.0, +Cl⁻),
22. Hb Hirose (pH 8.5, +Cl⁻), 23. α鎖, 24. β鎖

多くの実測値の点が，Continuous Strain モデルから予想される理論曲線上もしくは近傍に存在することがわかる。又，この図から明らかなようにK_Tの変化に対応してFe－His 結合の振動数は変化すること，即ち，K_Tの増加に伴ない低波数側へ，K_Tの減少に伴ない高波数側へシ

フトすることが明らかとなった。この様に，我々の予測は定量的に確められた。

以上，酸素親和性異常ヘモグロビンの機能解析と共鳴ラマン分析から，異常ヘモグロビンの酸素親和性の異常の原因は，デオキシ型T状態の拘束がアミノ酸置換によって種々な程度に弱められた結果，異った酸素親和性を示すことにあることが明らかとなった。この様なT状態の多様性は，デオキシ型T状態のFe－His結合の張力の強さに反映されており，ヘモグロビンのアロステリーの構造的裏付けがなされたと考えられる。

Ⅱ. 蛍光ラベル・エフェクターによる血色素協同作用の研究

〔要　旨〕

$\alpha_1\beta_2$接触面にアミノ酸置換をもつヘモグロビンを含めた，酸素親和性異常ヘモグロビンのβ鎖間の有機リン酸結合部位の構造を調べるために，蛍光プローブを結合したATP（MANT-ATP）を合成した。MANT-ATPは，正常ヘモグロビンに1：1で結合し，著しく酸素親和性を低下させるアロステリック・エフェクターであることがわかった。MANT-ATP を用いた滴定や平衡ゲルロ過法でのIHP結合量の結果から，機能異常ヘモグロビンの有機リン酸結合部位である$\beta_1\beta_2$鎖間の中心洞の構造は正常ヘモグロビンとほとんど変わらないことが明らかとなった。

〔　序　〕

四量体であるヒトヘモグロビン（Hb A）は酸素化又は脱酸素化に伴ない，可逆的な四次構造変化をする。この過程の各段階での四次構造及び各サブユニット内の三次構造変化が提唱され，アロステリック構造変化の理解が深まった。我々は，溶液中のヘモグロビンの構造変化に関して理解を深めるために，ヒトの異常ヘモグロビンの構造と機能との相関の研究を続けている。特に$\alpha_1\beta_2$接触面及びその近傍にアミノ酸置換をもつ異常ヘモグロビンは，前章で示したように酸素平衡機能が多様性を示すことから，ヘモグロビンのアロステリック特性の解明にとり極めて重要な知見を与えてきた。現在までに我々の得た知見は以下のとおりである（前章の結果も含めて）。

1）異常ヘモグロビンの酸素平衡機能の2状態モデルによる解析では，デオキシ型T状態が各ヘモグロビンで固有の状態をとること，またT状態の特性である酸素親和性（K_T）が決定されると，一義的にそのヘモグロビンのアロステリック特性は決定される〔Ⅰ－2）参照〕。

2）デオキシ型T状態のFe－His結合の強さがK_Tと相関する〔Ⅰ－5）参照〕。

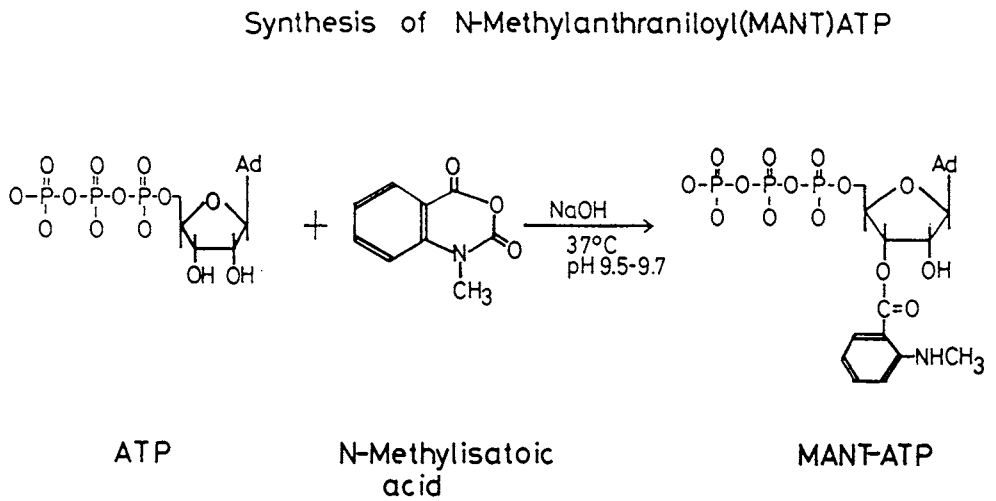
3）$\alpha_1\beta_2$接触面の酸素化に伴なう構造変化は，β 37 Trpの蛍光特性の変化として検出でき，高酸素親和性及び低酸素親和性ヘモグロビンでは，構造変化が小さい。

4）デオキシヘモグロビンのβ 93 Cys の SH 試薬に対する反応性はデオキシ型T状態の酸素親和性と相関し，高酸素親和性ヘモグロビンほど反応性が高い。

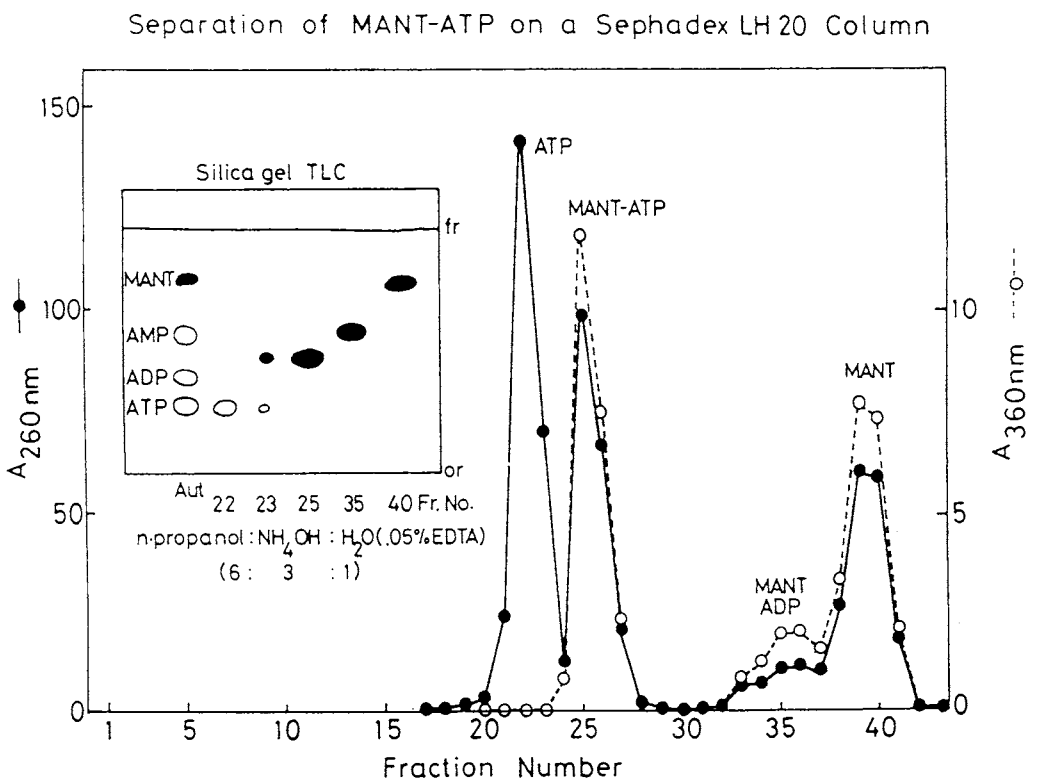
そこで，今回，我々は異常ヘモグロビンの有機リン酸結合部位の構造を蛍光プローブを結合したATP（MANT-ATP）を用いて検討した。

〔実験方法〕

Hb Kempsey，Hb Yakima，Hb Chesapeake，Hb J Capetown，Hb Kansas，Hb Hirose



図Ⅱ－1. ATPのN－メチルアントラニル酸エステル（MANT－ATP）の合成法



図Ⅱ－2. Sephadex LH－20によるMANT－ATPの精製
ATPによる260 nmとMANT部に由来する360 nmの両者に吸収をもつ25番目のフラクションがMANT－ATPである。

の各異常ヘモグロビンは患者赤血球から，又，胎児ヘモグロビン（Hb F）は臍帯血からHPLC法により分離・精製した（Ⅰ章の実験方法を参照のこと）。

ATPのN-メチルアントラニル酸エステル（MANT-ATP）は平塚の方法によって合成（図1）し，Sephadex LH-20カラムによって精製した（図2）。ヘモグロビンとMANT-ATPとの結合は日立MPF-40型蛍光分光光度計で25℃で測定した。即ち，デオキシヘモグロビンへのMANT-ATPの滴定はツンベルグ型蛍光セルを用い，脱酸素化した1mM MANT-ATPの滴定液をガスタイトシリンジで嫌気的に注入し，混和後，蛍光スペクトルを測定した。滴定中のヘモグロビンは，可視部吸収スペクトルから判定する限り，オキシヘモグロビンへの変化はなかった。

平衡ゲルロ過法によるデオキシヘモグロビンに対するIHPの結合に以下のようにして測定した。種々のIHP濃度の0.05Mビス・トリス／塩酸＋0.1M NaCl（pH 7.0）溶液に窒素ガスを通気し，更に1mg／mlの$Na_2S_2O_4$を加えて脱酸素化した緩衝液をSephadex G-25カラム（2cm×100cm）に通し平衡化したうえで，200μMのデオキシヘモグロビンを添加し，25℃，毎分1mlの流量で溶出する。カラムから溶出直後のヘモグロビンは完全にデオキシ型に保たれていた。ヘモグロビンに結合したIHPの量は湿式法で分解後，無機リン酸を定量して算出した。

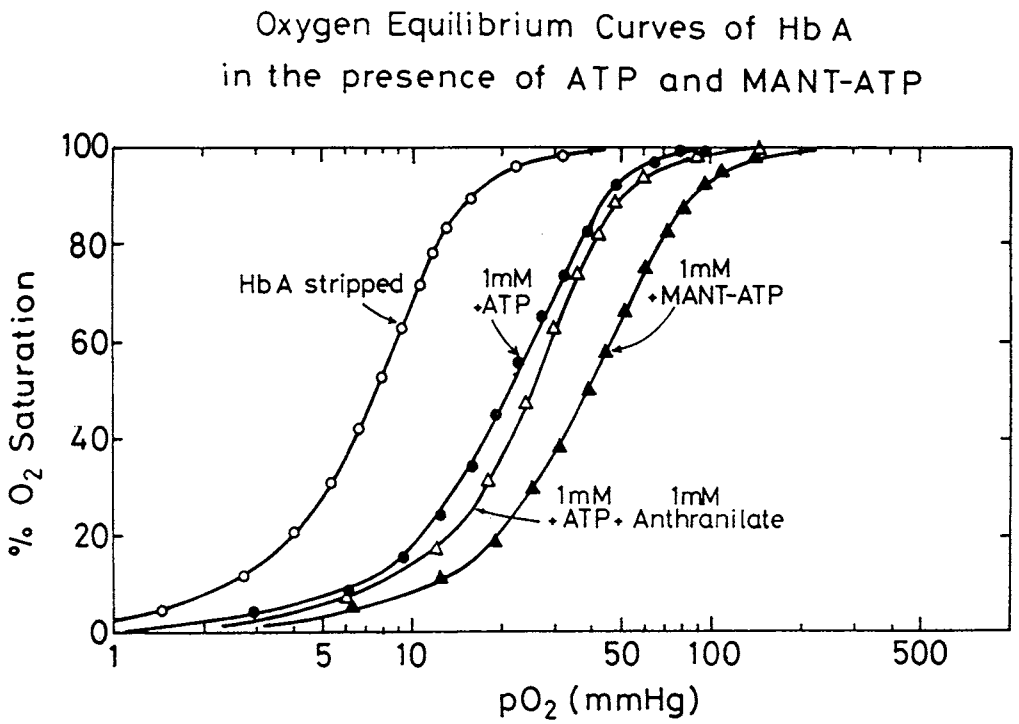
酸素解離曲線は自動記録法で行い，MANT-ATPは最終濃度が1mMになるように加えた。

〔結果と考察〕

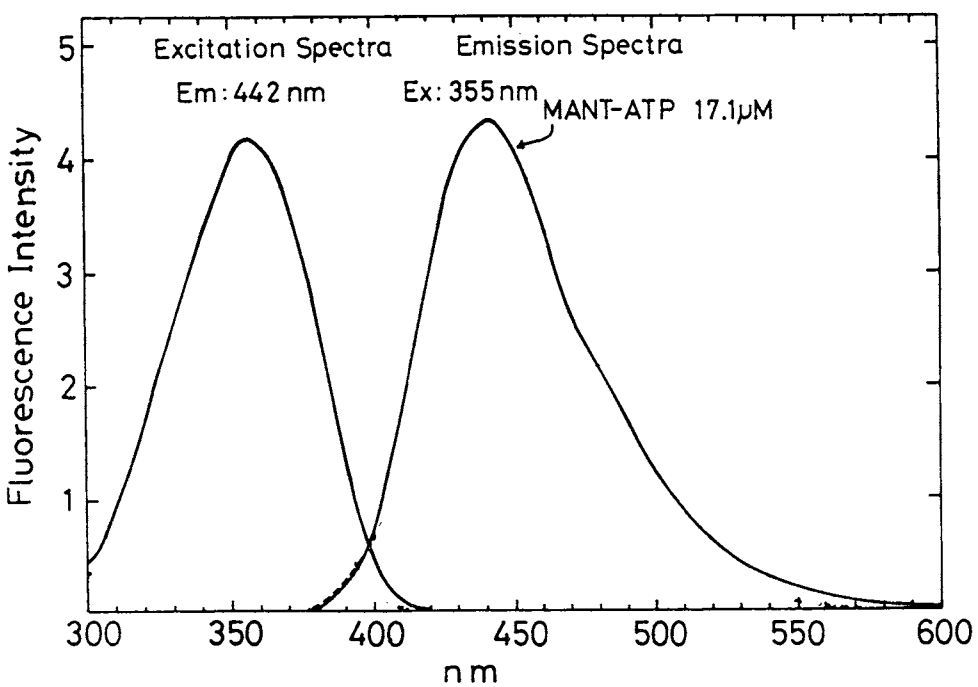
ある種の有機リン酸は，ヘモグロビンの酸素親和性を低下させる。これらの有機リン酸がデオキシヘモグロビンの$\beta_1\beta_2$鎖間に位置した塩基性アミノ酸からなる空洞に特異的に強く結合するからである。この中心洞は，デオキシヘモグロビンでは有機リン酸をちょうど結合するのに十分な容積だが，オキシヘモグロビンでは，$\alpha_1\beta_1$と$\alpha_2\beta_2$ダイマーの配列方法が変化して空洞の容積と塩基性アミノ酸の配列が変化してしまうため結合は弱くなる。即ち，デオキシヘモグロビンがオキシ化する時にT→R構造変化に伴ない有機リン酸結合は低下する。

高酸素親和性のデオキシ型ヘモグロビンの構造はオキシ型，即ちR型四次構造に近いので，有機リン酸の結合はT構造をとるデオキシヘモグロビンに比べ，弱くなると推測される。事実，これを支持する実験結果も報告されてきた。我々は有機リン酸のデオキシヘモグロビンに対する解離定数（K_D）が各異常ヘモグロビンで異なり，そのK_DがK_Tと何らかの関係をもつだろうと想定した。この目的のために蛍光ラベルしたATP（MANT-ATP）を用いた。

図3はMANT-ATPがヘモグロビンのアロステリック・エクェクターになりうるかどうかを酸素平衡曲線に与える影響として検討したものである。pH 7.0で0.1M NaCl，1mM MANT-ATP存在下で，Hb AのP_{50}は40mmHgとなり，1mM IHP存在下でのP_{50}＝54mmHgに迫る強いエフェクターであることが判明した。

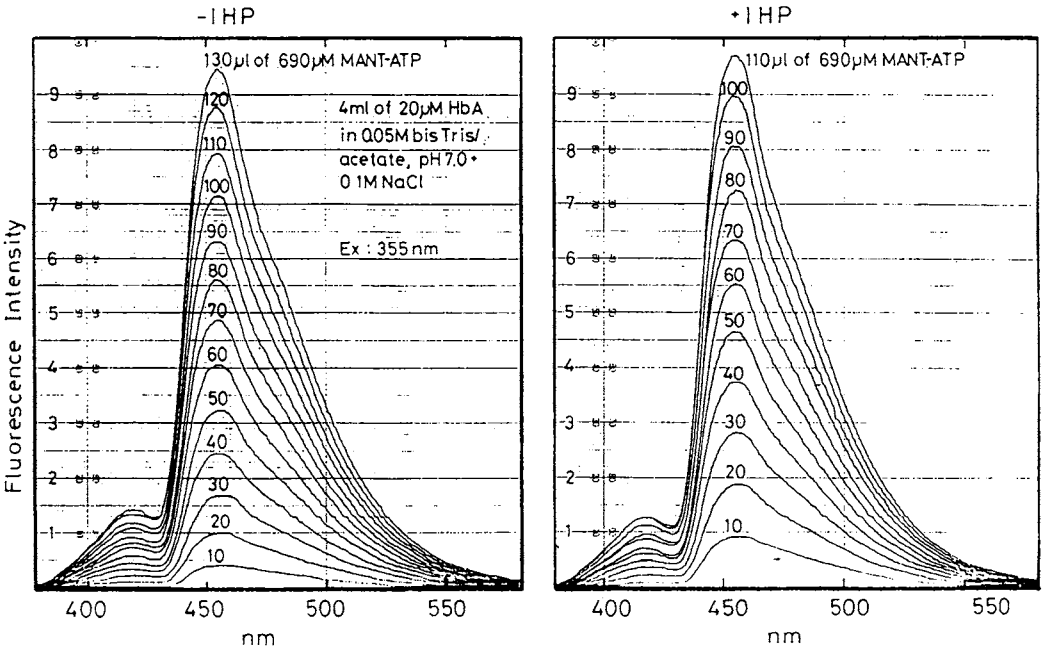


図Ⅱ－3　HbAの酸素平衡曲線に対するATP，MANT－ATPの効果



図Ⅱ－4　MANT－ATPの励起および蛍光スペクトル

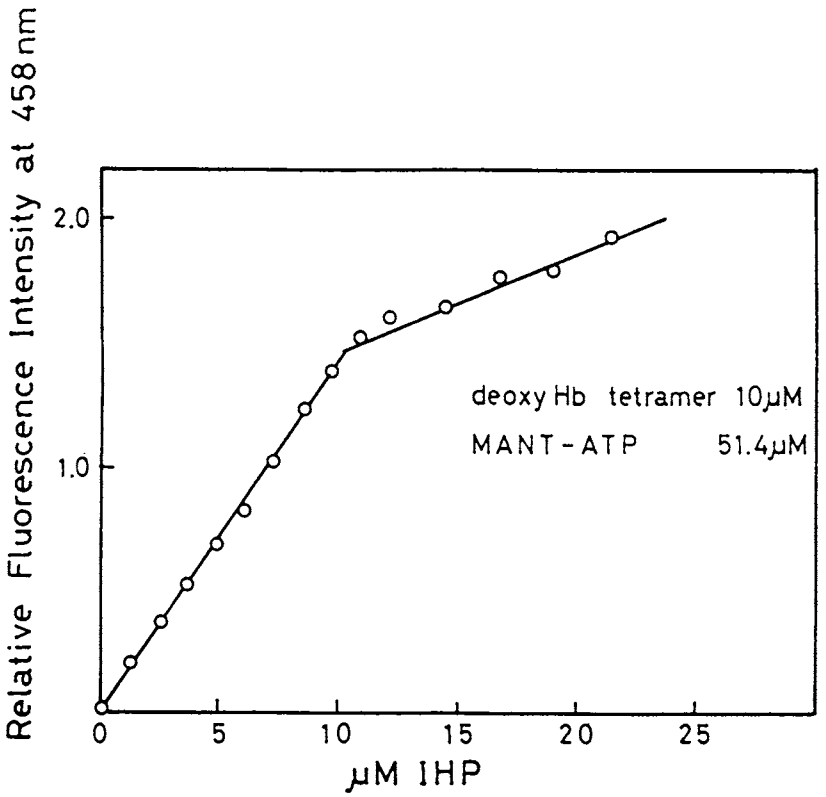
図4にMANT－ATPの励起及び蛍光スペクトルを示した。MANT－ATPの励起スペクトルは355 nm，蛍光スペクトルは442 nmに極大をもつことがわかった。



図Ⅱ－5　IHP存在下（右），非存在化（左）でのデオキシヘモグロビンに対するMANT－ATP滴定に伴なう蛍光スペクトル変化

図5はIHP存在下，非存在下でのデオキシヘモグロビン（20μMヘム）に対するMANT－ATPの滴定に伴なう蛍光スペクトル変化を示したものである。442 nmにあった蛍光の極大波長は455 nmに移動し，蛍光強度の著しい低下が認められた。 この蛍光強度の低下の原因は ヘムのSoret帯による再吸収によると考えられる。 この消光現象は2つの要素から成る。①ヘモグロビン分子の周囲に存在するMANT－ATP の出す蛍光も部分的に再吸収により消光される。②ヘモグロビンと特異的に結合したMANT－ATP の蛍光は完全にヘムによって消光される。

IHPはMANT－ATPと同一部位に結合すると考えられるため，MANT－ATP を拮抗的にヘモグロビンから遊離させると考えられる。

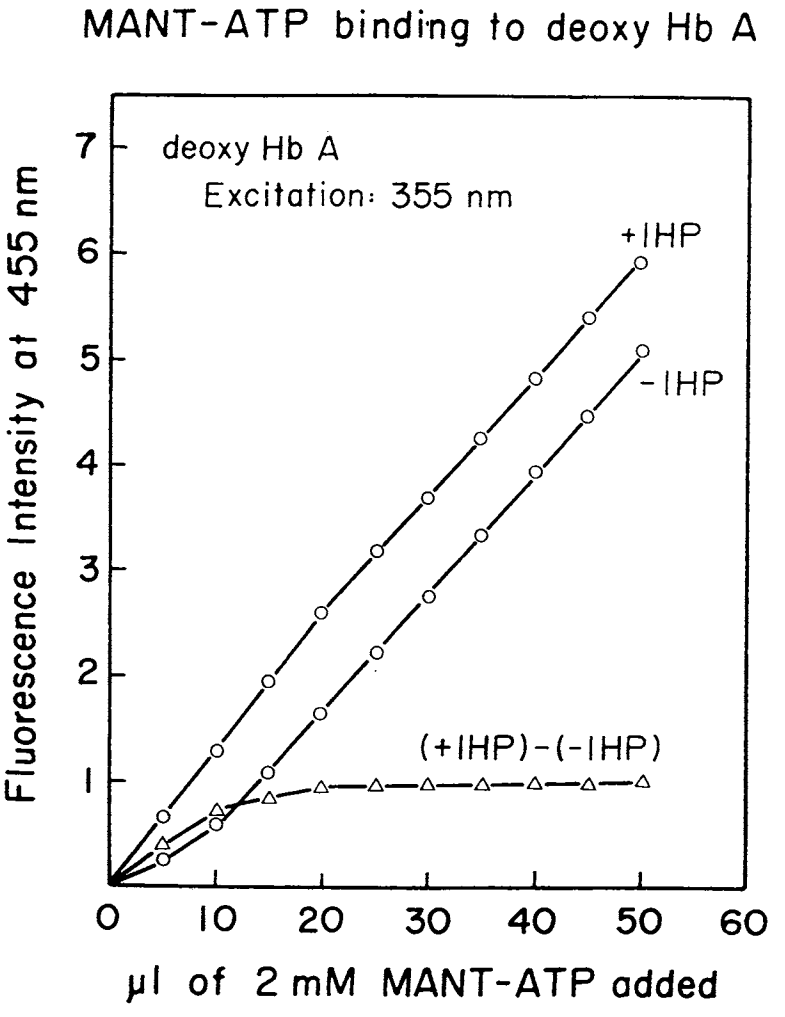


図Ⅱ－6　IHPによるデオキシヘモグロビンからのMANT－ATPの遊離

図6から明らかなように，MANT－ATPはデオキシヘモグロビンに1：1でIHPが結合した時に完全に遊離することがわかった。従って，IHP存在下，非存在下でのMANT－ATPの滴定を行い，蛍光強度の差からデオキシヘモグロビンに結合しているMANT－ATPの量を算出できる。IHP存在下の方がIHP非存在下の時に比較して蛍光強度は大である（図5）。この差は，IHPによって遊離したMANT－ATPの蛍光に相当するので，この差がデオキシヘモグロビンに結合したMANT－ATPの結合量になる。

図7に蛍光強度のMANT－ATPの濃度に対する依存性が示されている。この飽和曲線〔(＋IHP)－(－IHP)〕からMANT－ATPのデオキシヘモグロビンに対するK_Dが求められる。表1に各種ヘモグロビンに対するMANT－ATPのK_Dをまとめて示した。

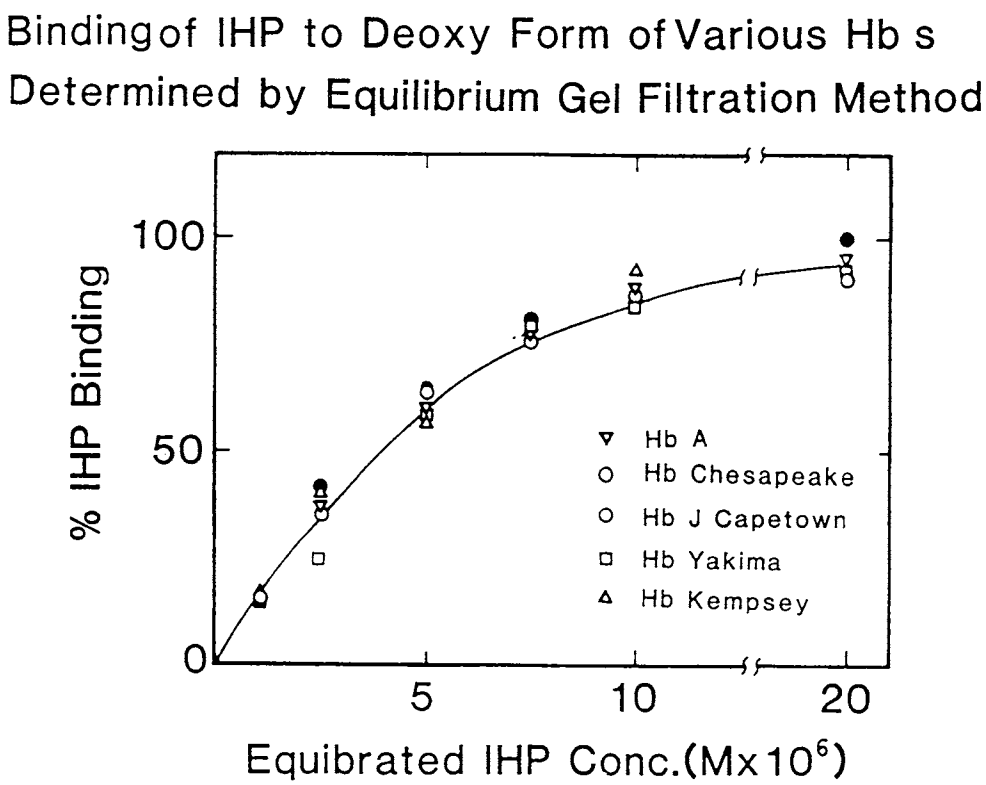
予想に反して，高酸素親和性異常ヘモグロビン又は低酸素親和性異常ヘモグロビンのK_DはHbAのものとほぼ等しかった。HbAのpH 8.5とHbFではK_Dが大きくなった。このことは，MANT－ATPの結合がpH依存的であり，結合部位のアミノ酸置換が強く影響する反面，酸素親和性の違いはほとんど反映しないことを示している。



図Ⅱ－7. デオキシヘモグロビン（HbA）に対するMANT－ATPの結合
図5の蛍光強度変化を滴定MANT－ATP量に対してプロットした。

表1. Dissociation Constants of MANT-ATP to Normal and Abnormal Hemoglobins

Hemoglobin	pH	K_D (M)	O_2 Affinity	Binding Site
Hb A	7.0	2.50×10^{-6}	normal	normal
	8.5	1.92×10^{-5}	high	"
Hb Kansas	7.0	1.80×10^{-6}	low	"
Hb Chesapeake	7.0	1.85×10^{-6}	high	"
Hb Kempsey	7.0	2.20×10^{-6}	very high	"
Hb F	7.0	1.37×10^{-5}	normal	amino acid substitution



図Ⅱ－8　平衡ゲルロ過法による各種デオキシ型異常ヘモグロビンに対するＩＨＰ結合量の濃度依存性

この事実を更に確かめるために，平衡ゲルロ過法による検討を行い，その結果を図８に示した。平衡化緩衝液中のＩＨＰ濃度とデオキシヘモグロビンに対するＩＨＰ結合量はヘモグロビン種が変わっても，ほとんど違いがみられなかった。この結果はMANT－ＡＴＰの結果とよく一致する。

以上の結果より，デオキシヘモグロビンのβ鎖間の中心洞の構造は，有機リン酸の結合でみるかぎり，酸素親和性異常ヘモグロビンと正常ヘモグロビンで明確な差はないこと，及び，有機リン酸結合部位の構造は，従来，四次構造変化に対応して変化すると考えられていたが，これが当てはまらないことを示唆している。