



Title	異常ヘモグロビンの酸素平衡特性の研究
Author(s)	今井, 清博
Citation	大阪大学, 1970, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/2062
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

異常ヘモグロビンの酸素平衡特性の研究

昭和45年3月

大阪大学大学院基礎工学研究科物理系生物工学専攻

今井 清 博

目

次

概 要

I. 序 説	1 頁
--------	-----

II. 方 法

(1) 酸素平衡曲線の測定	5
---------------	---

(2) 異常ヘモグロビンの酸素平衡特性の分析

(2-1) 定性的分析	7
-------------	---

(2-2) 熱力学的解析	8
--------------	---

III. 材 料	10
----------	----

IV. 結 果

(1) 酸素平衡曲線自動記録装置の信頼性	12
----------------------	----

(2) 異常ヘモグロビンの酸素平衡特性

(2-1) Hb Shimonoseki, Hb Ube II, Hb Hikari, Hb Gifu	13
---	----

(2-2) Hb Agenogi	13
------------------	----

(2-3) Hb Hiroshima	13
--------------------	----

(2-4) Hb M Boston	15
-------------------	----

(2-5) Hb M Hyde Park	17
----------------------	----

(2-6) Hb M Milwaukee I	17
------------------------	----

(3) 酸素平衡曲線の熱力学的解析

(3-1) Hb A	18
------------	----

(3-2) Hb M Boston, Hb M Milwaukee I	20
-------------------------------------	----

V. 検 討

(1) 酸素平衡曲線の測定法について	22
--------------------	----

(2) 異常ヘモグロビンの酸素平衡とその意味について

(2-1) Hb Shimonoseki, Hb Ube II, Hb Hikari, Hb Gifu	23
---	----

(2-2) Hb Agenogi	24
------------------	----

(2-3) Hb Hiroshima	26
--------------------	----

(2-4) Hb M Boston, Hb M Hyde Park, Hb M Milwaukee I	30
---	----

(3) ヘモグロビンの構造と機能の関係の解明へのアプローチ	34
-------------------------------	----

謝 辞	36
-----	----

参考文献, 図および表, 付録

1箇所にアミノ酸置換をもつヒトの異常ヘモグロビンを天然に存在する“化学修飾ヘモグロビン”と見なし、その酸素平衡機能を調べることによってヘモグロビン分子内の局部的構造異常がその機能にどのような影響を与えるかについての情報を得、多くの種類の異常ヘモグロビンを用いてそのような情報を蓄積することによって、ヘモグロビン分子を構成するアミノ酸残基の1個々々もしくは残基のグループを、そのもつ機能的役割に従って分類し、ヘモグロビンの構造と機能の関係を明らかにすることを最終の研究課題とする。本研究ではその第一段階として、このような研究目的に合致するようなヘモグロビンの酸素平衡曲線の測定法を開発し、それを用いて主に日本で発見された9種類の異常ヘモグロビンの酸素平衡特性を調べ、それらの機能異常のもつ意味と構造に関する知見を基礎にして検討した。

酸素平衡曲線は筆者の試作した自動記録装置によって測定した。その場合、ヘモグロビン溶液中の酸素分圧はClark型の酸素電極によって、またヘモグロビンの酸素飽和度は分光学的方法によってそれぞれ測定した。酸素ヘモグロビンの脱酸素化は反応槽中の気相部を純窒素ガスで充満させ、溶液中から溶存酸素を気相中に拡散させる方法で行なった。曲線はX-Yレコーダーによって自動記録され、通常1本の曲線を記録するのに要する時間は約90分であった。測定可能なヘモグロビン濃度の範囲は $6 \times 10^{-6} \sim 1.2 \times 10^{-3}$ Mであった。数日程度の比較的短期間のうちに測定した曲線の再現性は極めて良好であったが、長期間にわたって測定した曲線の再現性はそれより劣る傾向があった。約一年間にわたって正常ヘモグロビンを用いて同一の条件で測定した多数の曲線について再現性を調べたところ、酸素飽和度に関して単一測定値に含まれる標準誤差は曲線の中央(50%飽和)付近で最大となり、約2%であったが、曲線の両端へいくにつれて減少した。

Hb Shimonoseki (E3 α , Gln \rightarrow Arg), Hb Ube II (E17 α , Asn \rightarrow Asp), Hb Hikari (E5 β , Lys \rightarrow Asn) および Hb Gifu (E6 β , Asn \rightarrow Lys) の4種のヘモグロビンはいずれも測定誤差の範囲内で正常ヘモグロビンと等しい酸素平衡機能を有することが明らかにされた。これらのヘモグロビンのアミノ酸置換の部位はいずれも分子表面に位置するので、一般に分子表面にあって外向きの残基は機能の発現に対して特別の役割をもっていないと結論した。Hb Agenogi (F6 β , Glu \rightarrow Lys)

はわずかで"はあるが明らかに Hb A より低い酸素親和性を示したが, Bohr 効果やヘム間相互作用は正常であった。Hb Hiroshima (H21 β , His \rightarrow Asp) は Hb A に比べて非常に高い酸素親和性を示し, Bohr 効果の大きさやヘム間相互作用の強さもかなり減少していた。酸素平衡曲線は単純な S 字型を示さず, 比較的酸素飽和度の高い領域で異常な形状を呈する部分を有した。Hb Agenogi と Hb Hiroshima のもつ機能異常のもつ意味を, 構造に関する知見を基礎にして, とくに Perutz らの提出した Bohr 効果のモデルとの関連において検討した。Hb M Boston (E7 α , His \rightarrow Tyr) は異常に低い酸素親和性と極めて小さい Bohr 効果と, ヘム間相互作用の完全な消失を示した。Hb M Hyde Park (F8 β , His \rightarrow Tyr) はやや高い酸素親和性とやや大きな Bohr 効果と, ヘム間相互作用の存在を示した。Hb M Milwaukee I (E11 β , Val \rightarrow Glu) は異常に低い酸素親和性と大きな Bohr 効果と, かなり弱いヘム間相互作用の存在を示した。これらの M-type ヘモグロビンのデータを, α 鎖または β 鎖のみを π 型にした valency hybrid のデータと比較して, 正常鎖のもつ intrinsic な性質について議論した。さらに, Hb M Boston と Hb M Milwaukee I のデータに熱力学的解析を加え, 酸素との反応に関する平衡定数や反応熱やエントロピー変化などを求めた。その結果 Hb M Boston は酸素と結合してもしなくても常に Hb A のデオキシ型と類似の構造をとっているという示唆が得られた他, Hb M Milwaukee I の反応熱は Hb A のそれより小さく, また第一段階目と第二段階目の酸素化反応が互いに異なった機構で起こるという示唆も得られた。顕著な機能異常をもつヘモグロビン (Hiroshima, M Boston, M Milwaukee I) を含む全溶血液の酸素平衡曲線はいずれも二相性を示したが, その程度は理論的に期待されるものに比べてかなり弱まっていることが見い出された。これは分子が $\alpha_2\beta_2$ 型の異常ヘモグロビンの場合には, 正常ヘモグロビンとの相互作用によって常に現われる現象であると考え, これを "平滑効果" と名付けた。

本研究で開発された酸素平衡曲線測定法は連続曲線を与えるという点で従来の方法に比べて優れており, Hb Hiroshima の曲線の形状異常や, 全溶血液が一般に示した平滑効果はこの利点を生かして見い出された。この測定法のもつ利点として次の3点があげられる。(a) 簡単な操作と短い時間で比較的正確な曲線が得られる。(b) 比較的広い範囲で測定条件を選択できる。(c) 曲線の微細な形状を観察するのに適している。

I. 序 説

(1)

ヘモグロビンは 1 分子あたり 4 個の“ヘム”と呼ばれる活性中心をもつ機能蛋白質である。ヘムは水溶液中の分子状酸素と可逆的に結合する。ヘモグロビン分子は酸素の他、水素イオンや有機リン酸塩¹⁾ (たとえば 2,3-diphosphoglycerate や adenosine triphosphate など) や溶存二酸化炭素²⁾ などの低分子とも反応する。これらのリガンドがヘモグロビンと反応する際には種々の結合部位の間の相互作用がみられる。酸素の結合(酸素化)の場合には homotropic な相互作用がみられ、“ヘム間相互作用”と呼ばれている。2,3-diphosphoglycerate の結合の際にも homotropic な相互作用³⁾ が観測されている。また、ヘモグロビンの酸素化は水素イオン濃度の影響を受けたり (Bohr 効果)、2,3-diphosphoglycerate¹⁾ や二酸化炭素⁴⁾ の濃度の影響を受けたりし、これらは heterotropic な相互作用のあらわれであると考えられる。そしてヘム間相互作用をはじめ、ヘモグロビンの酸素化と連係した各種の effector の作用には、それぞれ生理的意味があることが知られている。このような複雑な機能を有するヘモグロビンは典型的なアロステリック蛋白の 1 つに数えられ、古くから多くの研究者達の興味を引いてきた。とくに、ヘモグロビンの酸素平衡曲線 (oxygen equilibrium curve, 以下 OEC と略記する) が独特の S 字型を呈するのは、ヘム間相互作用という“協同現象”のためであって、その分子論的機構を解明するために精力的に研究が進められ、種々のモデル⁵⁻¹¹⁾ が提出されたが、現象論の範囲を脱しきれず、完全には解明されていない。Bohr 効果についても、酸素化と連係しているプロトン解離基の化学的同定・個数・蛋白中での空間位置の決定などに問題が残されている。最近、ヘモグロビンと有機リン酸塩との反応の研究が盛んであるが、反応部位の決定に精力が注がれている。

このような機能の研究と平行して、ヘモグロビン分子の立体構造の研究も最近急速に発展し、X線結晶解析法によって

現在 2.8 \AA の分解能で ウマ・オキシヘモグロビン¹²⁾ の、また 5.5 \AA の分解能で ウマ¹³⁾ と ヒト¹⁴⁾ のデオキシヘモグロビンの立体構造がそれぞれ明らかにされている。これらの構造解析の結果から、それまでにも種々の物理化学的方法¹⁵⁾ で存在が予測されていたヘモグロビン分子の酸素化に伴う構造変化の存在が実証され、その後はその知見を基礎にして種々のアロステリック効果の機作を論ずるのが盛んになった。そして分解能が高まるにつれて、ヘモグロビンの構造と機能の関係を原子レベルで議論することが次第に可能になりつつある。実際、Perutz ら¹⁶⁾ は彼等の 2.8 \AA 分解能の構造に関するデータを基礎にして、最近、Bohr 効果に関する具体的なモデルを提出した。今後は構造に関する知識を基盤にし、種々の物理化学的手段を駆使して、ヘモグロビンの構造と機能の関係を解明する方向の研究が いっそう盛んになるものと思われる。

ヘモグロビンの構造と機能の関係を解明するのに有効と思われる いま 1 つの手段がある。それは“異常ヘモグロビン”を利用する方法である。1949 年に Pauling ら¹⁷⁾ によって鎌型赤血球貧血症の患者から発見された Hb S に端を発して、その後発見されて同定された異常ヘモグロビンの数は加速度的に増加し、最近 100 を越えるに至った¹⁸⁾。当初はほとんどの異常ヘモグロビンは正常な酸素結合能を有するものと考えられていたが、機能についての研究が進むにつれて、異常な機能を有するものも少なくなることが明らかにされた(付録 I 参照)。ところで、ほとんどの異常ヘモグロビンはヘモグロビンの合成にあずかる遺伝子 DNA における突然変異の結果として、ただ 1 箇所(ヘモグロビン分子全体では 2 箇所)のアミノ酸残基が他の種類の残基で置換されており、いわば天然に得られる“化学修飾ヘモグロビン”である。そこで、それらの機能を詳細に調べて正常ヘモグロビンのそれと比較することによって、ヘモグロビン分子の蛋白部分の局部的構造異常がその機能に対していかなる影響

を与えるかという情報が得られ、そのような研究を多くの種類の異常ヘモグロビンについて行なうことによって、分子中の1個々々のアミノ酸残基の機能的役割が少しずつ解明されることが期待される。もちろん、このような研究方法はヘモグロビン分子の構造に関する豊富な知見と組合せられたときこそ最大の効力を発揮できることはいうまでもない。最近 Lehmann ら¹⁹⁾が構造に関する知見を基盤にして、各種の異常ヘモグロビンの機能異常を説明することを試みているが、異常ヘモグロビンの機能を研究することはX線による構造解析の結果に対して、1側面からの“検証”になるほか、構造解析のみからは知り得なかったような意外な情報をもたらすことも期待できる。筆者はこのような想定のもとに異常ヘモグロビンの酸素平衡機能の研究に着手した。

ところで、上述の研究方法は本質的に多くの種類の異常ヘモグロビンを扱うことを必要とし、その上材料そのものが貴重なので、少量の試料を用いて多数のOECを比較的高い精度で測定することが要求される。OECを測定するのに従来から伝統的に用いられている方法には分光測定法²⁰⁻²²⁾やガス分析法²³⁻²⁵⁾があるが、これらの方法では本来連続曲線であるべきOECがいくつかの測定点の集合として得られ、正確なOECを得るために多数の点を測定しようとする、多大の労力と時間を必要とする。また、有限の数の測定点の集合では、OECの微細な構造を見逃がす恐れがある。そこでまず筆者はOECを連続曲線として自動記録する装置を試作し、それを用いて9種類の異常ヘモグロビンの酸素平衡機能の研究を行なった。その結果、試作された装置は異常ヘモグロビンの機能の研究という目的に十分合致するものであることが明らかにされ、同時に、測定した異常ヘモグロビンの機能に関するデータから、ヘモグロビンの構造と機能の関係の解明に役立つ重要な情報が得られるのでここに報告する。

なお、この論文は現在までにすでに発表された筆者らの

(4)

論文 18, 26-30) の内容の 1 部に, 新しく得られたいくつかのデータを
加えてまとめたものである。

(1) 酸素平衡曲線の測定

OEC はすべて筆者らの酸素平衡曲線自動記録装置²⁶⁾によって測定された。図 1 は装置の動作原理を示すブロック・ダイアグラムである。ステンレス・スチール製の反応槽の中にヘモグロビン溶液(約 6 ml)を入れ、それをマグネチック・スターラーで攪拌しながら反応槽中の気体を純窒素ガス(99.999%)で置換すると、溶液中の溶存酸素が気相中に拡散し、溶液中の酸素分圧が低下してゆくのので、最初酸素で飽和していたヘモグロビンは次第に脱酸素化される。このとき反応槽を分光光度計に組み込んでおいて、ある波長の単色光を用いてヘモグロビン溶液の吸光度変化を測定すると、その変化の割合はヘモグロビンの酸素飽和度に比例する。いっぽう、溶液中の酸素分圧を Clark 型の酸素電極(39065 Polarographic Oxygen Sensor, Beckman)で測定し、その電気信号を先の分光光度計からの電気信号とともに X-Y レコーダーに送ってやると、記録紙の上に OEC が自動的に記録される。

図 2 は反応槽の構造の詳細図である。反応槽本体はその両側の外壁に密着した 2 個のサーモジュールによって 0°C から 40°C までの任意の温度に調節され、測定中を通じて ± 0.1 deg の範囲内で一定温度に保たれる。溶液の温度はサーミスタによって測定される。反応槽の光路長は 28 mm である。分光光度計には Hitachi-Perkin Elmer の 139 UV-VIS Spectrophotometer を、酸素電極電流の増幅には大倉電気の AM 2001 Micro Volt Meter をそれぞれ使用した。

この装置に使用された酸素電極の電流が正確に溶液中の酸素分圧に正比例するかどうか問題があるので、次のようにして確認した。すなわち、反応槽中に酸素分圧未知の気体を送り込んで、液相と気相の酸素分圧を十分平衡させた後、気相中の酸素含有量を Haldane のガス分析装置で測定し、同時に酸素電極電流(増幅して負荷抵抗の両端電圧として)を記録する。

気体の中の酸素の混合比をいろいろ変えて、同様の操作を繰り返す。

反応槽中に窒素ガスを通じて“脱酸素化曲線 (deoxygenation curve)”を記録した後、窒素ガスの代りに空気を通じると、今度は“酸素化曲線 (oxygenation curve)”が記録される。当初はこの両曲線は互いに一致せず、通常、任意の酸素飽和度に対して後者の酸素分圧が後者のそれに比べて約 10% ほど低くなる様相を呈した。すなわち、見かけ上一種の“履歴現象”が観測された。しかし、これは溶液中の酸素分圧の時間的变化に対して、酸素電極の動作が十分速く追従できないためであることがわかった。そこで、気体を反応槽中に直接導入しないで、100 ml 程度の空のフラスコを経由して通じてやり、酸素分圧の変化速度を緩和してやると、両曲線は互いに一致するようになった。この場合、1本の脱酸素化曲線を記録するのに要する時間は測定条件にもよるが、中性の pH、温度 20°C、ヘモグロビン濃度 6×10^{-5} M では約 90 分であった。

試料の蛋白濃度に応じて、酸素化に伴う吸光度の変化の大きさから考えて測定に便利と思われる波長の単色光を選ぶことが必要である。種々の波長 (730, 680, 600, 576, 564, 542, 429, 409, 371 m μ) の単色光をえらんで OEC を測定したところ、蛋白濃度が減少するにつれて酸素親和性がやや増加したが、測定条件 (蛋白濃度も含めて) が同一である限り、波長が異なっても常に同一の OEC が得られた (表 1 参照)。したがって、蛋白濃度に応じてこれらの波長から適当なものを選ぶことが許される。これらの波長を選ぶことによって、 6×10^{-6} M から 1.2×10^{-3} M の範囲の濃度のヘモグロビン溶液の OEC を測定することが可能であった。通常、 6×10^{-5} M のヘモグロビン濃度の条件で測定したので、564 m μ の単色光を用いた。

(2) 異常ヘモグロビンの酸素平衡特性の分析

(2-1) 定性的分析

各種の異常ヘモグロビンの OEC を種々の条件のもとで測定し、それらの OEC を正常ヘモグロビンの OEC と比較しながら、異常ヘモグロビンの酸素平衡特性を次の 3 点に絞って議論した。

(a) 酸素親和性 ————— $\log p_{1/2}$

ここに $p_{1/2}$ は 50% 飽和時の酸素分圧 (mmHg)。一般に横軸を酸素分圧の対数 ($\log p$) で目盛ったときの OEC が 50% 飽和の点に関して点対称である場合には、酸素化に伴う全自由エネルギー変化量 ΔF_t のヘム 1 個当りの大きさは $\Delta F_t = RT \ln p_{1/2}$ で与えられる³¹⁾。このように $\ln p_{1/2}$ が ΔF_t に比例することから、 $\log p_{1/2}$ を酸素親和性の指標に使うことは妥当であると考えられる。実際のヘモグロビンの OEC は完全には点対称でないので、厳密には上述の論拠は成立しないが、本論文で行なう定性的な議論では $\log p_{1/2}$ で十分目的が果たされることが考えられる。

(b) Bohr 効果の大きさ ————— $r = \partial \log p_{1/2} / \partial \text{pH}$

pH 変化に対して、OEC が横軸 ($\log p$) に沿って単に平行移動とする場合 (一般に成立する) には、酸素化の際にヘモグロビン分子⁶⁾に取り込まれるプロトンのヘム当りの個数は r に等しい。したがって、この r を Bohr 効果の大きさの指標に使うことは妥当である。

(c) ヘム間相互作用の強さ ————— $n = [d \log (y/(1-y)) / d \log p]_{\max}$

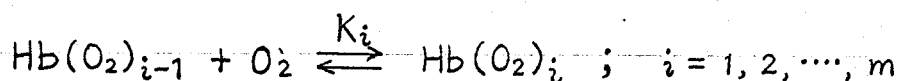
ここに y は酸素飽和度である。Wyman³¹⁾ は $n = d \log (y/(1-y)) / d \log p$ で定義される n が p の関数として知られているとき、その n から酸素化の際のヘム間相互作用のエネルギーを計算できることを示した。したがって、この相互作用エネルギーをもってヘム間相互作用の強さの指標とするのが妥当である。しかし、任意の酸素飽和度において、 n が大きいほどその状態でのヘム間相互作用のエネルギーも大きいことが知られているので、便宜上、 n の最大値をもってそのヘモグロビンのヘム間相互作用の強さを表わす指標とする。 n の最大値 (Hill の定数と呼ぶ) は Hill プロット ($\log (y/(1-y))$ vs $\log p$) の直線部分から求められる。 $n=1$ は相互作用が

存在しないことを意味し、 n が 4 に近づくほど強い相互作用を意味する。

(2-2) 熱力学的解析

特に異常な機能を示したヘモグロビンに対しては、その OEC の熱力学的解析を試み、酸素化反応に関する平衡定数や熱力学関数などを求めた。

まず、Adair の説³²⁾に従ってヘモグロビンと酸素との反応を



ここに K_i : 第 i 段階目の酸素化に対する巨視的平衡定数

m : ヘモグロビン 1 分子中の酸素化可能なヘムの数

(M-type Hb では $m=2$, その他の Hb では $m=4$)

で記述し、OEC を与える式として

$$y = \frac{K_1 p + \dots + i K_1 K_2 \dots K_i p^i + \dots + m K_1 K_2 \dots K_m p^m}{m (1 + K_1 p + \dots + K_1 K_2 \dots K_i p^i + \dots + K_1 K_2 \dots K_m p^m)}$$

ここに y : 酸素飽和度 ; p : 酸素分圧

を想定する。この場合、次の 2 つの条件が満足されるものとする。

(a) ヘモグロビン分子は酸素と反応する際、常に四量体のままである。

(b) α 鎖と β 鎖の intrinsic な酸素親和性に差異は無い。

そして、上式に含まれる平衡定数 K_1, K_2, \dots, K_m を Rubin³³⁾ の非線型最小二乗法を用いて求めた。その際、実験的に求めた OEC に含まれる y についての誤差が図 5 (b) に見られるように、OEC 上の場所によって異なるので、その誤差の y に対する依存性を放物線で近似し、

$$w = -0.08 y^2 + 0.075 y + 0.005$$

なる関数を重み関数 (weight function) として用いた。測定点は 1 本の曲線につき約 20 点ずつ選んだ。

巨視的平衡定数では正味のヘム間相互作用の強さをあらわに表現できないので、本稿では常に、関係式

$$k_i = \frac{i}{m-i+1} K_i$$

で与えられる微視的平衡定数 k_i ($i=1, 2, \dots, m$) を用いた。

これらの平衡定数の温度依存性から、次の各式によって各段階の酸素化に伴うエンタルピー変化量、エントロピー変化量を求めた。

$$\Delta H_i = RT^2 \frac{\Delta \ln k_i}{\Delta T} \quad (k_i \text{ は } (\text{mol/l})^{-1} \text{ 単位})$$

$$\Delta S_i = R \frac{\Delta (T \ln k_i)}{\Delta T} \quad (k_i \text{ は } (\text{mol/l})^{-1} \text{ 単位})$$

なお、最小二乗法による計算には大阪大学大型計算機センターの NEAC Series 2200 Model 500/200 を使用した。

この研究に使用された異常ヘモグロビンは Hb Shimonoseki (E3 α , Gln \rightarrow Arg)³⁴⁾, Hb Ube II (E17 α , Asn \rightarrow Asp)³⁵⁾, Hb Hikari (E5 β , Lys \rightarrow Asn)³⁶⁾, Hb Agenogi (F6 β , Glu \rightarrow Lys)³⁷⁾, Hb Hiroshima (H21 β , His \rightarrow Asp)³⁸⁾, Hb Gifu (EF4 β , Asn \rightarrow Lys)³⁹⁾, Hb M Boston (E7 α , His \rightarrow Tyr)⁴⁰⁾, Hb M Milwaukee I (E11 β , Val \rightarrow Glu)⁴¹⁾, Hb M Hyde Park (F8 β , His \rightarrow Tyr)⁴²⁾ の 9 種類である。

Hb Shimonoseki, Hb Ube II, Hb Hikari, Hb Agenogi, Hb Hiroshima の 5 種は 山口大学医学部の 柴田 進教授らによって、また、Hb Gifu は 岐阜大学医学部の 松友 啓典氏によって、それぞれ採血され、異常成分と正常成分とが分離・精製されて、筆者に提供された。その際、溶血液からの各ヘモグロビン成分の分離・精製は、Tris-EDTA-borate 緩衝液 (pH 8.6) を用いた デンプン電気泳動法⁴³⁾ によって行なわれた。同一の溶血液から異常成分と共に分離された正常成分は、異常成分の“対照”として OEC の測定に用いた。分離された各成分が十分純粋であることは、それらの一部を更に pH 7.0 における寒天電気泳動にかけて確認された。また、溶血液中の各成分の含有量は、溶血液の寒天電気泳動の泳動縞上の光学密度 (OD) の分布から求められた。

Hb M Boston, Hb M Milwaukee I, Hb M Hyde Park (以下、それぞれ Hb M_B, Hb M_M, Hb M_H と略記する) は 大阪大学医学部の 林 昭氏によって分離・精製され、筆者に提供された。分離・精製は pH 7.0 のリン酸緩衝液を用いた Amberlite CG-50 カラムクロマトグラフィーによって行なわれた。各成分の含有量はクロマトグラムから求められた。

試料の蛋白濃度は、一度ピリジン・ヘモクロモゲン誘導体に変換してから 556 m μ における OD を測定して求めた⁴⁴⁾。本稿でのヘモグロビン濃度はすべて“ヘム当り”で表現し、ヘム当りの分子量は 16,100 とした。

本研究に用いられた異常ヘモグロビンには、Hb M_B を除いて、OEC の測定中に生成される メトヘモグロビンの量が正常ヘモグロ

ビンのそれに比べて多いという徴候は見られなかった。Hb MB の OEC を測定する際、正常鎖のヘム鉄の自動酸化を抑制するために、測定前に還元酵素系⁴⁵⁾ (glucose-6-phosphate を電子供与体とし、NADP と NADP-Ferredoxine Reductase と Ferredoxine を電子伝達系とした還元系) を加えた。

米国から空輸された Hb MM の場合を除いて、他の異常ヘモグロビンの OEC の測定は採血後 10 日位で完了するようにした。

(1) 酸素平衡曲線自動記録装置の信頼性

この装置に使用した酸素電極の校正曲線は図3の様である。溶液中の酸素分圧に対して酸素電極の電流（増幅して負荷抵抗の両端電圧として検出）が正確に比例していることが知られる。

図4はレコーダー・チャートに記録されたOECの写真である。曲線には大したノイズも含まれず、極めて滑らかであった。

正常ヘモグロビンのOECを同一の条件で幾度も測定して再現性を調べたところ、数日程度の短い期間内に測定されたOECは極めて良く再現したが、もっと長期にわたって測定されたOECの再現性はそれより劣るのが常であった。約1年間にわたって一定の条件で測定された多数のOECについて、その再現性を調べたところ、図5(a), (b)の様な結果が得られた。それによると、再現性は曲線上の場所によって異なり、酸素飽和度に関しては曲線の中央（50%飽和）付近では標準誤差にして約2%程度であったが、曲線の中央付近から両端の方へ遠ざかるにつれて誤差は減少した（図5(b)）。また、OECの横軸（酸素分圧）に関する再現性は、曲線の中および高飽和度領域では標準誤差にして3%程度であったが、低飽和度領域では誤差が増加した（図5(a)）。

OECの測定中に生ずると思われるメトヘモグロビンの生成量を、OECの測定前と後の試料の吸収スペクトルを基に見積もったところ、一般にpHの高い条件では無視し得るほどであったが、pHが低くなるにつれて増加した。pH: 6~8, 温度: 20°C, Hb濃度: 6×10^{-5} M, 溶媒: 0.1 M リン酸緩衝溶液——の条件下では1回のOEC測定によるメトヘモグロビンの生成量は高々全ヘモグロビン量の3%であった。また、測定中の攪拌などの作用によって、試料溶液に混濁や沈殿が生ずるようなことは全く見られなかった。

この装置によって測定されたOECは他の研究者⁴⁶⁾によって同一の条件下で通常の分光測定法によって測定されたOECによく一致した。

(2) 異常ヘモグロビンの酸素平衡特性

本研究で調べられた異常ヘモグロビンの酸素平衡特性を表2にまとめた。以下、各々の異常ヘモグロビンの酸素平衡特性を定性的に分析しながら述べる。

(2-1) Hb Shimonoseki, Hb Ube II, Hb Hikari, Hb Gifu

これらの異常ヘモグロビンの分離・精製された溶液またはそれらを含む全溶血液のOECを種々のpHで測定して、同一の条件で同時に測定した正常ヘモグロビンのOECと比較したところ、いずれも図5に示した誤差の範囲内で一致した。したがって、これらの異常ヘモグロビンはいずれも正常な酸素平衡機能を有するものと見なされる。

(2-2) Hb Agenogi

分離・精製されたヘモグロビン溶液と全溶血液のOECを測定した。その結果の1例を図6に示した。また、酸素親和性 $\log p_{1/2}$ とヘム間相互作用の強さ n のpH依存性を図7に示した。これらの結果から知られるように、Hb Agenogiの酸素親和性はHb Aのそれと比べ、酸素分圧にして1.3倍程度低い。この差異は図5に示した実験誤差よりはるかに大きく、有意であると考えられる。また、この差異が異常成分の分離・精製の操作やOEC測定の操作などによって、ヘモグロビンの性質が人工的に変えられた結果でないことは、全溶血液(42%が異常成分)のOECが精製されたHb AgenogiとHb AのOECの中間に位置することから判断できる。いっぽう、Bohr効果とヘム間相互作用の強さに関しては、Hb AgenogiとHb Aとの間に差異はみられなかった。また、Hb AgenogiのOECの温度依存性も正常であった。すなわち、 10°C から 20°C への 10°deg の温度上昇に対して、 $p_{1/2}$ は約2.2倍に増加した。

(2-3) Hb Hiroshima

分離・精製された成分のOECは5点のpHで測定された。図8と図9にその結果を示した(複雑さを避けるため、pH 6.0のOEC

は省略した)。精製された Hb A の OEC は正常人から得た全溶血液の OEC によく一致した。したがって、精製された成分のうち、少なくとも Hb A の方は精製の操作の影響によって性質が変化するようなことは無かったといえる。Hb Hiroshima の OEC は比較的高い酸素飽和度の領域で異常な形状を呈する部分を有し、Hb A の OEC とは異なって、単純な S 字形を示さなかった。すなわち、Hb Hiroshima の OEC は 2 箇所 (図 8 と図 9 の中で太い矢印で示した箇所) で異常な屈曲点を有した。この様相は pH の低い条件になるほど顕著になった。この OEC の異常な形状は、その微分曲線によってさらに明瞭に観察される。図 10 と図 11 は図 8 と図 9 の OEC の y をそれぞれ $\log p$ で微分した曲線を表わしている。Hb A の微分曲線はほぼ左右対称で、しかも pH 変化に対して形状がほとんど変化しないのに対して、Hb Hiroshima の微分曲線は OEC の形状異常の部分に対応する位置に“肩”を有して非対称であり、しかも pH 変化によって形状が変化する。pH 7.8 では“肩”がほぼ消失するが非対称のままである。一度 pH 6.5 の条件で OEC の測定に使った試料の pH を透析によって 7.4 に上げ、もう一度 OEC を測定すると、pH 6.5 の条件で示した顕著な形状異常は消失し、pH 7.4 の新しい試料の OEC によく一致した。したがって、Hb Hiroshima の OEC の有する形状異常は pH 変化によって可逆的に回復する性質のもので、蛋白の変性やヘム鉄の酸化のような非可逆的な過程を含むものではないといえる。

Hb Hiroshima の酸素平衡特性を図 12 に示した。酸素親和性は Hb A のそれより高く、著しい場合の pH 6.5 では $p_{1/2}$ にして約 5 倍、 $\log p_{1/2}$ にして約 0.70 だけ異なる。Bohr 効果は Hb A に比べてかなり減少していた。すなわち、pH 7.4 における r の値は、Hb A が -0.62 であったのに対して、Hb Hiroshima は -0.30 となり、ほぼ半減していることがわかった。Hill の定数 n を求めるために Hill プロットを行なうと、図 13 に 1 例を示したように、Hb Hiroshima の場合には pH 7.8 の場合を除いて二相性を示した。それで、Hb Hiroshima の n 値は Hill プロットの主要な直線部分の勾配から求めた。

Hb A の n 値は 約 3.0 で、pH 変化に対してほぼ一定であるのに対して、Hb Hiroshima の n 値は 2.0 ないし 2.6 と小さく、しかも pH の増加と共に増大した。

Hb Hiroshima を含む全溶血液の OEC の測定も行なった (図 9 参照)。するとその OEC は二相性を呈した。そこで、溶血液に含まれる全ヘモグロビンの約 50% が Hb Hiroshima であるという事実を基礎にし、また酸素化の過程において両方のヘモグロビンが互いに独立に酸素と反応するという仮定のもとに、純粋な Hb Hiroshima と Hb A の OEC から全溶血液のもつべき OEC を合成してみると、これも二相性を示した (図 9 参照)。これらの様子は OEC の微分曲線を求めるともっと明瞭に観察される (図 11 参照)。すなわち、Hb A の微分曲線は単峰性であるのに対して、全溶血液の場合は実験で求めた OEC も計算によって求めた OEC も、その微分曲線は双峰性である。

計算によって求めた溶血液の OEC は、実験によって得られた溶血液の OEC と比較した場合、ほぼ等しい $p_{1/2}$ を与え、また形状においても本質的には類似している。このことは純粋な Hb Hiroshima と Hb A とそして全溶血液の 3 個の互いに独立の実験結果が互いに矛盾しないことを意味している。しかしながら、実験で得られた全溶血液の OEC の二相性は、計算曲線から期待される二相性に比べてかなり弱まっている。なお、一旦分離・精製された Hb Hiroshima と Hb A とを等量ずつ混合していわゆる“人工溶血液”を作り、その OEC を測定したところ、天然の全溶血液の OEC に一致した。したがって、上述の二相性が減少するという現象は、天然の全溶血液に内在するかも知れない何か未知の因子によるものではないといえる。

(2-4) Hb M Boston

このヘモグロビンの酸素平衡はすでに Suzuki⁴⁷⁾ によって報告されている。それによると、Hb M_B の酸素親和性は Hb A のそれに比べて異常に低く、Bohr 効果は全くみられず、 n 値は 1.2 である。とこ

ろが、このヘモグロビンの正常鎖のヘム鉄は自酸化性が非常に強く、OECの測定中でも自動酸化が進行するので、正確なOECを得るのが困難であった。

そこで本研究においては、この困難を克服するためにOECの測定前に試料溶液に還元酵素系を添加して自動酸化を抑制し、筆者の装置を用いてより正確なOECを測定することを試みた。還元酵素系を添加した後、残留していたメト型^{注)}のヘモグロビンが完全にオキシ型^{注)}に変化したことを、吸収スペクトルの時間変化によって確認してからOECの測定を開始した。OECの測定の終了後も吸収スペクトルはほとんど変化していなかった。なお、Hb Aに対しても同様に酵素系を添加してOECを測定した。

こうして測定されたOECを図14に、また、その結果から導かれる酸素平衡特性を図15に示した。Hb M_Bの酸素親和性はHb Aに比べて異常に低く、大気中の酸素圧下でも酸素飽和度はわずかに69~77%にすぎなかった。これは先にSuzukiらによって得られた結果によく一致する。しかし、Suzukiらの実験ではBohr効果は全く観測されなかったが、筆者の得た結果ではpH 7.4において $r = -0.14$ となり、Hb Aの $r = -0.50$ に比べてはるかに小さいが、存在することが明らかにされた。また、ヘム間相互作用については、Suzukiらの結果では $n = 1.2$ と、わずかに存在しているかのようであったが、筆者の得た結果では $n = 0.96$ と、全く消失していることがわかった。

Hb M_Bを含む全溶血液のOECを測定して、計算曲線と比較した(図16参照)。計算曲線はHb M_BとHb Aとは独立に酸素と反応するという仮定と、Hb M_Bは機能的には二量体であるという事実を考慮して求めた。この場合もHb Hiroshimaの場合と同様に、実験曲線と計算曲線との間にわずかではあるが、明らかに有意

注) メトヘモグロビン M Boston = $\alpha_2 \frac{\text{Fe(III)}-\text{E7Tyr}}{\beta_2 \frac{\text{Fe(III)}-\text{H}_2\text{O}}{\text{Fe(II)}-\text{O}_2}}$
 オキシヘモグロビン M Boston = $\alpha_2 \frac{\text{Fe(III)}-\text{E7Tyr}}{\beta_2 \frac{\text{Fe(II)}-\text{O}_2}}{\beta_2 \frac{\text{Fe(III)}-\text{H}_2\text{O}}{\text{Fe(II)}-\text{O}_2}}$

の差がみられる。そこでこの現象をさらに詳しく調べる目的で、一度分離された Hb M_B と Hb A とを種々のモル比で混合して“人工溶血液”を作り、それらの OEC を測定して計算曲線と比較した。その結果、図 17 にみられるように、計算曲線から期待される如く実験曲線も二相性を呈しているが、その程度は計算曲線に比べてかなり弱まっている。この傾向は Hb Hiroshima の場合と一致する。

(2-5) Hb M Hyde Park

測定された OEC を図 18 に、また、酸素平衡特性を図 19 に示した。Hb M_H は Hb A に比べてやや高い酸素親和性を示した。Bohr 効果は存在し、むしろその大きさは Hb A のそれをやや上回った。ヘム間相互作用も存在し、 n 値は 2 より大であった。

Hb M_H を CG-50 カラムクロマトグラフィーで分離した際、Hb M_H から二次的に生成されたと考えられる成分 (Hb M_HX²⁹⁾ と呼んでいる) が分離された。この成分の OEC を測定したところ (図 18 参照)、酸素親和性は非常に高く、Bohr 効果もヘム間相互作用も消失しており、あたかもミオグロビンや Hb H (= β_4)⁴⁸⁾ と同様の挙動を示した。また、564 m μ での酸素化に伴う吸光度変化は、その分子を機能的に二量体とみなしたときに期待される値の 2.6 倍にも達した。

(2-6) Hb M Milwaukee I

測定された OEC を図 20 に、また、酸素平衡特性を図 21 に示した。Hb M_M の酸素親和性は Hb A のそれに比べて異常に低く、pH 6.5 での酸素飽和度は大気中酸素圧下でもわずかに 78 % であった。Bohr 効果は Hb A より大きく、 $r = -0.94$ であった。ヘム間相互作用は $n = 1.4 \sim 1.6$ で、Hb A の $n = 3.0$ に比較してかなり弱いが存在した。また、 n 値は pH の増加と共に増大した。

Hb M_M を含む全溶血液の OEC を測定したところ、図 22 の結果が得られた。Hb M_B の場合と同様の方法で計算曲線を求めて実験曲線と比較すると、両者は大筋では一致するが、Hb Hiroshima

や Hb M_B の場合と同様に実験曲線の形状は計算曲線から期待される二相性を大きく失っていた。

OEC の温度依存性を調べたところ (図 23 参照), 20°C から 10°C への温度変化に対する $\log p_{1/2}$ の増加量は Hb A では 0.27 であったのに対して Hb M_M ではわずかに 0.15 となり, Hb A の約半分であった。また, 温度変化に対して Hb A の OEC の形状は不変であったのに対して, Hb M_M の場合には形状が変化した。すなわち, 20°C では $n = 1.41$ であったのに対して 10°C では $n = 1.26$ となり, ヘム間相互作用が弱まる傾向を示した。

(3) 酸素平衡曲線の熱力学的解析

本研究で調べられた 9 種類の異常ヘモグロビンのうち, 4 種類 (Hb Hiroshima, Hb M_B, Hb M_H, Hb M_M) が特に著しい機能異常を有していることが明らかにされた。そこで, これらのヘモグロビンの OEC を熱力学的な方法で解析して, それらの酸素平衡特性をもっと定量的に分析することを試みた。ただし, Hb Hiroshima の OEC は単純な S 字形でなく, その酸素化反応には Adair の反応様式とは別の機構が関係していると思われるので, また, Hb M_H の OEC は後に「検討」で述べるように, OEC がそのまま真の酸素平衡を表わしているかについて疑問があるので, この解析の対象から外した。

(3-1) Hb A

現在までに各種異常ヘモグロビンの対照として測定した正常ヘモグロビンの OEC や, それとは別に随時測定した正常人のヘモグロビンの OEC などのデータを集めて, 同一のプログラムを使って平衡定数を計算したところ, 全 OEC の約 6 割から得られた平衡定数の符号はすべて正であったが, 残りの約 4 割から得られた平衡定数の一部は負数となり, 物理的に意味のない結果が得られたので, これらの結果は捨て去った。

pH 7.0, 温度 20°C, Hb 濃度 6×10^{-5} M の条件で測定した

OEC からは 7 組の物理的に意味のある平衡定数が得られた。この結果をもとにして“単一測定”から得られる平衡定数に含まれる標準誤差を求めてみると、

$$k_1 : 20.3\%, \quad k_2 : 53.4\%, \quad k_3 : 74.4\%, \quad k_4 : 78.3\%$$

となった。

他の pH においても上と同様の誤差が生ずるものと見なして、各 pH で得られた幾組かの平衡定数の平均値に誤差を附して、その pH 依存性を表わすと図 24 の結果が得られた。その結果、4 個の平衡定数の中で k_4 のみが卓越して大きいこと、 k_3 は大きな pH 依存性を示すが、他の k の pH 依存性はあまり大きくないことなどがわかる。また、第三段階目の酸素化反応が Bohr 効果の主役を果たしていることが示唆される。

次に、ヘム間相互作用の強さを表わす別の指標として、

$$f_i = \frac{k_i}{k_1}, \quad i = 2, 3, 4$$

で定義される“促進因子 (enhancement factor)”⁴⁹⁾ を求めた (表 3 参照)。これらの f_i の値から、第二、三段階の酸素化ではさほど強力な cooperativity はみられないが、第四段階目の酸素化のみぬきんでて親和性が高まっている。このことは傾向としては Roughton⁴⁹⁾ がヒツジ・ヘモグロビンを使って、精密なガス分析法によって測定した OEC から得た結果 ($f_2 = 4.7$, $f_3 = 7.9$, $f_4 = 283$) と一致する。

次に 10°C と 20°C で測定した OEC から得られた平衡定数から、各段階の酸素化反応に伴う反応熱 (ΔH_i) とエントロピー変化 (ΔS_i) を計算すると、表 4 の結果が得られた。 10°C での測定回数が少ないので、平衡定数したがって ΔH_i や ΔS_i に含まれる誤差が大きくて、確定的な結論は下し難いが、大よそ次のような事がいえるだろう。各 ΔH_i の値に特に有意の差があるという証拠はみられない。それらの平均値 $\Delta \bar{H}_i = -13.8 \pm 4.1 \text{ kcal/mol}$ のみ意味をもつと考えるべきであろう。 ΔS_i については、 ΔS_1 , ΔS_2 , ΔS_3 は

いずれも大きな負値をとっているが、 ΔS_4 のみ正值に転ずる傾向がある。このことは先に述べた f_4 のみ大きな値をとるという事実と共に、第四段階目の酸素化に伴ってヘモグロビン分子に構造変化が、それも、より秩序性の低い方向に起こっていることを示唆している。

(3-2) Hb M Boston, Hb M Milwaukee I

これらのヘモグロビンのデータはすべて単一測定によるものである。しかし、平衡定数の計算は極めて容易で、すべて成功した。図5(a)に示したOECの横軸に関する誤差をもとにして、平衡定数に含まれる誤差を見積もったところ、いずれも $\pm 6\%$ 程度であった。

図25はHb M_BとHb M_Mの平衡定数のpH依存性をHb Aのそれと比較したものである。両ヘモグロビンともその k_1 と k_2 はいずれもpH変化に対してほぼ同様の依存性を示している。そして、それらの曲線の勾配はHb M_Bの微小なBohr効果と、Hb M_Mの大きなBohr効果をもそれぞれ反映している。また、Hb M_Bの k_1 と k_2 がHb Aの k_1 に極めて近い値をとっているが、このことはこのヘモグロビンは酸素と結合してもしなくても、その構造はデオキシ型のままであるということを示唆している。

促進因子を求めると表3の結果が得られた。Hb M_Bでは n 値が1に極めて近いことを反映して f_2 の値も1に極めて近い値をとっており、cooperativityがほとんど存在しないことを示している。このことは上述のようにHb M_Bの分子が酸素と反応する際に、デオキシ型に“凍結”されたままであることを示している。Hb M_Mの f_2 の値はpHの増加と共に n 値が増大した事実を反映して、pHの増加と共に増大している。しかし、その値はHb Aの f_4 に比べれば非常に小さく、ヘム間相互作用の微弱さを表わしている。

反応熱とエントロピー変化を求めると表4の結果が得られた。Hb M_Bでは ΔH_1 と ΔH_2 または ΔS_1 と ΔS_2 との間に有意な差はない。また、 $\Delta \bar{H}_2$ の値もHb Aと比較して有意な差はみられない。これに対して、Hb M_Mでは ΔH_1 と ΔH_2 との間に有意な差が存在し、

第一段階目の酸素化反応は発熱的であるが、第二段階目のそれは吸熱的であることを示している。また、 $\Delta\bar{H}_i$ も Hb A に対して有意な差を有し、平均の反応熱が Hb A より小さいことを示している。これは Hb M_M の OEC の温度依存性が Hb A のそれに比べて小さいという事実を反映している。また、 ΔS_1 と ΔS_2 との間にも大きな差がみられ、Hb M_M では酸素化に伴う自由エネルギー変化に対する $\Delta\bar{H}_i$ と ΔS_i の寄与の大きさが、第一段階と第二段階とで異なることを表わしている。

(1) 酸素平衡曲線の測定法について

ヘモグロビンの OEC を測定する方法としては、特に精密な OEC を測定する目的で、Roughton ら⁴⁹⁾ によってガス分析法が用いられたこともあるが、現在は分光測定法²⁰⁻²²⁾ が最も普及している。しかし、これらの方法は通常、manometric な操作を併用するため、労力と熟練を必要とするばかりでなく、得られる OEC が有限個の測定点の集合であるため、含まれる情報量も少ない。そこで、OEC を連続曲線として測定・記録する試みは過去にもいくつかなされた^{50,51)} が、操作が面倒であったり、測定条件の選択の余地が少ないなどの欠点があった。

これに対して、本研究で開発した測定法には次のような特長がある。まず第一に、試料を反応槽に注入しただけで自動的に OEC が記録されるという手軽さがある。次に、脱酸素化には気体の拡散という“穏和な”方法を用いているので、試料の変質が少ない。また、反応の進行と測定が常に同時なので、試料の厳密な温度調節が意味をもつ。これらの事情は OEC の酸素飽和度に関する最大誤差が 2% という比較的高い精度に貢献している。比較的短期間のうちに測定された OEC の再現性は非常に良好であったが、このことは異常ヘモグロビンの研究の場合のように限られた期間内に測定を完了しなければならぬ場合には好都合である。また、測定条件の選択範囲も極めて広い。すなわち、Hb 濃度は $6 \times 10^{-6} \text{ M}$ から $1.2 \times 10^{-3} \text{ M}$ まで、温度は 0°C から 40°C まで、その他 pH、塩濃度、塩の種類なども自由に選択できる。さらに、得られる OEC が連続曲線であるため、多くの情報が得られる。とくに、OEC が単純な S 字形曲線でない場合に、その微細な形状を観察するのに都合がよい。Hb Hiroshima の OEC の異常な形状や、全溶血液の OEC の二相性の減少などの現象はこのようにして発見された。ここで、本研究で開発された測定法をまとめると次のようになる。

(a) 簡単な操作と短い時間で、比較的正確な OEC が得られる。

(b) 比較的広い範囲で測定条件を選択できる。

(c) OEC の微細な形状を観察するのに適している。

いっぽう、OEC を熱力学的に解析する目的には、この測定法の精度

はまだかなり不足している。それには、分光光度計をもっと安定なものにしたり、OECの下端付近での酸素分圧の減少速度をもっと速くするなどの工夫が必要とされる。また、異常ヘモグロビンのような貴重な試料を扱う場合には、反応槽の容積をさらに小さくして、少量の試料で測定できるようにすることが要求される。

(2) 異常ヘモグロビンの酸素平衡とその意味について

ここでは、個々の異常ヘモグロビンの酸素平衡特性のデータのもつ意味を、構造に関する知識を基盤にして検討する。

(2-1) Hb Shimonoseki, Hb Ube II, Hb Hikari, Hb Gifu

これらのヘモグロビンはいずれも実験誤差の範囲内において正常な酸素平衡機能を有することが明らかになった。

この結果はX線回折法によるヘモグロビンの構造解析の結果^(12, 52, 53)と両立する。すなわち、構造解析によると、これらの4種の異常ヘモグロビンのアミノ酸置換の部位(E3 α , E17 α , E5 β , EF4 β)はいずれも分子の表面に露出しており、水分子と接触していると考えられる。したがって、これらのヘモグロビンで起きたアミノ酸置換はせいぜい分子表面の荷電量を変化させるだけであって、ヘムに直接影響を及ぼしたり、蛋白の高次構造に影響を及ぼしたりすることによって機能異常をもたらすようなことは期待されそうもない。

E3 α やE17 α の部位でのアミノ酸置換はHb Mexico (E3 α , Gln \rightarrow Glu)⁵⁴⁾やHb G Philadelphia (E17 α , Asn \rightarrow Lys)⁵⁵⁾でもみられるが、これらのヘモグロビンの保有者は何らの臨床上の異常をももたず、おそらくこれらのヘモグロビンの機能も正常であると思われる。したがってE3 α またはE17 α での荷電の変化はヘモグロビンの機能には何の影響も与えないと考えられる。E5 β はアミノ酸配列が既知の哺乳動物ヘモグロビンの間ではinvariantな部位であって、何か重要な役割を有することを連想させるが、ここにアミノ酸置換を有するHb Hikariは正常な機能を示した。さらに、同じ部位にアミノ酸置換を有するHb N Seattle

(E5 β , Lys \rightarrow Glu)⁵⁶⁾ の保有者には何らの臨床的異常も認められていない。したがって、E5 β なる部位についても、E3 α や E17 α に対して行なったのと同様の考察が当てはまると考えられる。

このようにして本研究で得られた正常機能を有する4種の異常ヘモグロビンのデータは“一般にヘモグロビン分子の表面に露出しているアミノ酸残基はヘモグロビンの機能に対して特別の役割を有していない”¹⁹⁾ という説をさらに確証するものである。

しかし、この説には2, 3の例外がみられる。たとえば、後述するように本研究で調べられた Hb Agenogi と Hb Hiroshima は外向きの残基が置換されたものでありながら、いずれも明らかな機能異常を有している。

(2-2) Hb Agenogi

Hb Agenogi はわずかなではあるが、明らかに Hb A と異なる機能をもつことが明らかにされた。アミノ酸置換の起きている部位 F6 β はアミノ酸配列が既知の哺乳動物ヘモグロビンの間では invariant であり、したがって、この部位はヘモグロビンの機能発現のための何らかの役割を演じているかも知れないという考えをいだかせる。ただ、F6 β の残基は F8 β の近位ヒスチジンから2残基分、すなわちらせん状主鎖の約半回転分だけ離れていて、ヘム面の反対側に向いていると考えられるので、ヘムとの直接の相互作用はありそうにない。

最近、Perutz らによって提出された Bohr 効果のモデル¹⁶⁾ によると、 β 鎖 C 末端 (HC3 β) の His のイミダゾール基と α 鎖の α アミノ基 (NA1 α) はいずれもオキシヘモグロビン中では free な状態にあるが、デオキシヘモグロビン中では前者は同一の β 鎖の FG1 の Asp と、また後者は相手の α 鎖の C 末端 (HC3 α) のカルボキシル基とそれぞれ水素結合を形成し、その結果前者も後者もそれらの pK 値が増加する。アルカリ Bohr 効果の約 3/4 はこの機構で説明できるという。また、酸性 Bohr 効果の方は、FG1 β の Asp と HC3 α の Arg がそれぞれデオキシヘモグロビン中でこれらの相手の残基である HC3 β の His と NA1 α の Val と結合して、自

この pK 値が低下するという機構によって説明されるという。

ところで、Hb Agenogi の場合には、F6 β での Glu \rightarrow Lys というアミノ酸置換は上述の HC3 β と FG1 β との間の結合に対して何らかの影響を及ぼす可能性がある。なぜなら、F6 β の部位は FG1 β から 4 残基分すなわち主鎖のヘリックスの約 1 回転分だけ離れており、FG1 β と同一の方向に向いていると考えられるからである。もし、この新しく導入された Lys がデオキシ Hb Agenogi の中の HC3 β と FG1 β との間の結合を、正常ヘモグロビンの場合よりも強めるように影響したと仮定すると、デオキシ型がそれだけ安定になり、その結果 Hb Agenogi の酸素親和性が低く現れることが期待される。

ところで、これらの oxygen-linked acid groups すなわち HC3 β , His と FG1 β , Asp の環境が新しく導入された Lys によって変えられ、その結果それらの pK 値が正常ヘモグロビンの場合に比べて変化した場合、Bohr 効果の曲線の位置はもちろん形も変化することが一般に期待される。ところが、pH 5.9 から 7.8 の範囲の測定結果に関する限り、Hb Agenogi の Bohr 効果の曲線の形は Hb A のそれとほとんど等しかった(図 7 参照)。

以前に Wyman⁶⁾ は oxygen-linked acid groups の pK 値を用いて、Bohr 効果の曲線を与える次の式を導出した。

$$\log p_{1/2} = \text{constant} + \log \frac{(H^+ + K'_1)(H^+ + K'_2)}{(H^+ + K''_1)(H^+ + K''_2)}$$

ここに、 K'_1 と K'_2 および K''_1 と K''_2 はそれぞれデオキシおよびオキシヘモグロビンの oxygen-linked acid groups の解離定数であり、添え字 1 と 2 はそれぞれアルカリ、酸性 Bohr 効果に関する groups に対応する定数を意味する。上式を Hb A と Hb Agenogi の Bohr 効果の曲線に適用してみたところ、デオキシ Hb A の pK_2 ($= -\log K'_2$) に比べてデオキシ Hb Agenogi の pK_2 を 0.1 だけ小さくとり、上式に含まれる他の定数をすべて共通にすると、pH 5.9 ~ 7.8 の測定範囲に関する限り、両ヘモグロビンの曲線が良く表現できることがわかった。すなわち、 $\Delta pK_2 = -0.1$ の変化は曲線の形はほとんど変えずに、

$p_{1/2}$ を 1.3 倍だけ増加させる効果をもった。デオキシヘモグロビンの pK_2 が Hb A に比べて Hb Agenogi の方が低下しているという仮定は、先に述べた HC3 β と FG1 β との結合がデオキシ Hb Agenogi 中で強められているという仮定と一致する。

このようにして、1つの可能性として Hb Agenogi の機能異常を次のように説明することができよう。新しく導入された Lys が oxygen-linked acid groups の環境を変え、デオキシ型で形成されるそれらの groups 間の結合を強めることによって、デオキシ型とオキシ型との間の平衡を前者の方に移動させ、その結果酸素親和性が低下する。

(2-3) Hb Hiroshima

Hb Hiroshima は著しい機能異常を有することが明らかにされた。酸素平衡特性はデンプン電気泳動法で分離・精製されたヘモグロビン溶液について調べられたが、これらの試料が分離・精製の操作の影響を受けずに、native な性質を保持していたかどうかは最後まで残る問題である。しかし、少なくとも対照として使用された Hb A はこの種の影響はほとんど受けていないことがわかった。また、Hb Hiroshima についても、この種の影響を受けたとしても少なかったと思われる。なぜなら、精製された試料の測定結果と全溶血液の測定結果とが互いにほぼ両立したからである。しかしながら、実験的に得られた全溶血液の OEC と、純粋な Hb Hiroshima と Hb A の OEC から合成した得られた全溶血液のための OEC との間に、わずかなではあるが意味のある差異が見い出された。すなわち、前者のもつ二相性は後者のもつ二相性に比べてかなり不明瞭になっていた(図9と11参照)。

一般に、酸素親和性の非常に異なる2種のヘモグロビンの混合溶液のもつ OEC は、もし両ヘモグロビンの分子が酸素化の過程で何の相互作用も及ぼし合わないならば、両ヘモグロビンの OEC を単に濃度比に従って合成したものになり、二相性を表わすはずである。全溶血液の実験曲線には確かにそのような様相が観測されたが、その程度は理

論的に期待されるものよりかなり減少していた。このような二相性が減少する現象は Hb M_B や Hb M_M の全溶血液においても見い出すことができた(図 16, 17, 22 参照)。Hb M_H では酸素親和性の差があまり大きくなかったので、この現象の存在は不明である。また、他の研究者達によって得られた結果によると、Hb Chesapeake⁵⁷⁾ や Hb Kansas⁵⁸⁾ や Hb J Cape Town⁵⁹⁾ や Hb Yakima⁶⁰⁾ や Hb Kempsey⁶¹⁾ などの著しい機能異常をもつヘモグロビンを含む全血または全溶血液の OEC が二相性をもつという報告はなされていない(もっと精密な測定がなされれば、二相性が観測されるかも知れない)。そこで一般に、“酸素親和性の異なる 2 種のヘモグロビンの混合溶液の OEC は、その二相性が理論的に期待されるものより減少して現われるという一種の「平滑効果」を受ける”といえよう。

この効果の現われる原因は両ヘモグロビン分子の間の相互作用にあると考えられる。そしてこの相互作用の実体は“サブユニット交換”であろう。ヘモグロビン分子は溶液の pH やイオン強度などに関して moderate な条件下でも、対称型解離によって $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2\alpha\beta$ という四量体と二量体との平衡にあることが知られている^{52, 62)}。そこでたとえば Hb Hiroshima を含む全溶血液の中には $\alpha_2\beta_2$ (= Hb A) と $\alpha_2\beta_2^*$ (= Hb Hiroshima) という 2 種の四量体が混在していて、これらの一部が $\alpha\beta$, $\alpha\beta^*$ という二量体の形で存在すると、 $\alpha_2\beta\beta^*$ という形の一種の“混成分子”もある割合で存在することが当然考えられる。すなわち、2 種のヘモグロビンの相互作用は $\alpha_2\beta_2 + \alpha_2\beta_2^* \rightleftharpoons 2\alpha_2\beta\beta^*$ というサブユニット交換の形で起こるものと考えられる。そして、この混成分子が OEC の二相性を平滑なものにしていると考えられる。 $\alpha_2\beta\beta^*$ のような混成分子の実在することは Guidotti⁶²⁾ や Benesch ら⁶³⁾ によって実証されている。また、Bellingham ら⁶⁴⁾ は Hb H (= β_4) や Hb Bart's (= γ_4) のような、 $\alpha\beta$ という形の交換のための単位をもたないヘモグロビンでは、それを含む全血の OEC はある領域だけ影響を受ける(二相性になる)のに対して、Hb Zürich や Hb Köln や Hb St Mary's などの $\alpha_2\beta_2$ 型のヘモグロビンでは、それらを含む全血の OEC は全域にわたって影響を受ける(二相性

消失)ことを報告しているが、この事実も前述の混成分子の存在ならびにそれによる平滑効果の存在を支持している。平滑効果を定量的に分析するには、混成分子の OEC や 其の全溶血液液中での存在量(酸素化の過程で変化するかも知れない)などに関する知識が必要であるが、現在ほとんど得られていない。

Hb Hiroshima の OEC は酸素飽和度の高い領域に異常な形状をもつことが明らかにされた。特に pH の低い条件では OEC は二相性をもつようにもみえる。その場合 Hill plot も二相性を示したので、主要な直線部分から n 値を計算したが、このような n がなお本来の意味をもっているかどうか疑問である。したがって Hb Hiroshima のヘム間相互作用が弱まっているという結論はこのような注意のもとに認識されねばならない。また、酸素親和性の指標として $\log p_{1/2}$ を用いる根拠もなくなり、むしろ溶存酸素の“median activity”³¹⁾の対数を用いるのが妥当であると考えられる。しかし本稿で $\log p_{1/2}$ を用いて行なった Hb Hiroshima の酸素親和性や Bohr 効果に関する議論は本質的には変わらないと考えてよい。Hb Hiroshima の OEC の形状異常の原因は未知である。以前に Guidotti¹⁰⁾ はヘモグロビンとリガンドとの反応に関するモデルを提出したが、それによるとヘモグロビン分子の中で $\alpha\beta$ dimer が互いに負の相互作用を及ぼし合うと、その場合の OEC および Hill plot は二相性(彼の用語では double S-shaped)を示すという。Hb Hiroshima がこの場合に該当するか否かは非常に興味ある問題であるが、さらに詳細な研究が望まれる。

さて、Hb Hiroshima の機能異常を構造に関する知識を基礎にして議論したい。以前に Perutz^{52, 53)} はウマ・オキシヘモグロビンの試験的なモデル(これはヒト・オキシヘモグロビンにも準用できる)を提出し、その中で、 β 鎖の H21 His は相手の β 鎖の H17 Asn と互いに水素結合で結ばれていると報告した。そこで筆者は Hb Hiroshima での H21 β , His \rightarrow Asp のアミノ酸置換は上述の水素結合に影響を与え、特に酸素化に伴って起こる β 鎖間の距離変化に影響を与える結果、ヘム間相互作用が減少するものと結論した²⁸⁾。ところがその後、

Perutzら¹²⁾によって分解能 2.8 \AA のウマ・オキシヘモグロビンのモデルが提出され、それによると上述の $\text{H21}\beta$, His に関係する結合は存在しないばかりか、 $\text{H21}\beta$, His は分子の外側に向いている“external residue”であることが明らかにされた。そのため上述の説明は効力を失ったことになるが、最近 Perutz は筆者に次のような示唆を与えてくれた。それによると、彼等の提出した Bohr 効果のモデル(既に述べた)によると $\text{HC3}\beta$ の His がアルカリ Bohr 効果にあずかる解離基となっているが、Hb Hiroshima でこの His から 3 残基分だけ離れた位置 $\text{H21}\beta$ の His が Asp で置換されることによって、デオキシ型の場合に $\text{HC3}\beta$, His のイミダゾール基は Hb A の場合と同様に $\text{FG1}\beta$ の Asp と水素結合を形成するだけでなく、 $\text{H21}\beta$, Asp と水素結合を形成する機会が生じ、実際にはこの 2 つの状態の間の“動的平衡”にあると考えられる。その場合 β 鎖は瞬間的にオキシ型の構造($\text{HC3}\beta$, His のイミダゾール基が自由)をとる時間をもつことになり、その結果 Hb Hiroshima の酸素親和性が高まり、Bohr 効果は減少することになる。この説の是非は最後にはデオキシ Hb Hiroshima の単結晶の X 線解析を行なって、 β 鎖末端付近の構造異常を調べることによって確認されるものと思われる。

いずれにしても Hb Hiroshima の機能に関するデータは β 鎖末端付近の残基が機能発現に対して重要な役割をもっていることを示している。以前に Antonini ら⁶⁵⁾はカルボキシペプチダーゼ A によって β 鎖 C 末端の His と Tyr の 2 個の残基が切断されたヘモグロビンは高い酸素親和性を示し、ヘム間相互作用を失うことを報告した。また Nagel ら⁶⁶⁾は紫外域差スペクトルの実験から、 $\text{HC2}\beta$, Tyr がヘモグロビンの酸素化に伴って構造変化によると思われる環境変化を受けることを報告した。これらの事実と筆者の Hb Hiroshima の機能異常の事実と共に、 β 鎖 C 末端付近の残基がヘモグロビンの機能発現に対して重要な役割を果たしていることを裏付けている。このようにして、 $\text{H21}\beta$ のように構造解析の結果からは external residue であってヘモグロビンの構造や機能にとくに重要な役割を演じているとは予期されなかった部

位でも、 $\text{HC3}\beta$ や $\text{FG1}\beta$ のような重要な部位の近傍にある場合には、その部位でのアミノ酸置換はときには顕著な機能変化をもたらすことがあることがわかった。これと同様の議論は Hb Agenogi のアミノ酸置換の部位 $\text{F6}\beta$ についても適用できると考えられる。

Hb Hiroshima は別の方面からも興味をもたれている。それは、最近新しくヘモグロビンのアロステリック・リガンドの1つに教えられるようになった $2,3\text{-diphosphoglycerate}$ がヘモグロビンと反応する部位は、 Hb Hiroshima でアミノ酸置換の起きている $\text{H21}\beta$ ではないかという推測^{3, 67)} である。筆者はこのような観点から、 Hb Hiroshima の次の研究課題の1つとして、 $2,3\text{-diphosphoglycerate}$ が OEC に与える影響を調べることを計画中である。

(2-4) Hb M Boston , Hb M Hyde Park , Hb M Milwaukee I

M-type ヘモグロビンは他の異常ヘモグロビンとは異なって、分子の半分すなわち2本の α 鎖または2本の β 鎖がメト型になっていて酸素化が不能であること、しかし分子全体はほぼ完全な構造を保っていることなどの理由で、正常鎖のもつ intrinsic な性質を知るには都合の良い材料であると思われる⁶⁸⁾。もし実際に正常鎖が intrinsic な性質を保持しているならば、M-type ヘモグロビンの性質はその構造異常が α 鎖にあるか β 鎖にあるかによって2通りに分類され、同時に α 鎖と β 鎖の、完全な分子の中での機能的差異を分離して知ることができるはずである。

現在までに5種類の M-type ヘモグロビンが発見されているが、そのうち Hb M Boston , Hb M Iwate ($\text{F8}\alpha$, $\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$; 以後 Hb M_I と略記する)⁶⁹⁾, Hb M Saskatoon ($\text{E7}\beta$, $\text{His} \rightarrow \text{Tyr}$; 以後 Hb M_S と略記する)⁷⁰⁾ の3種の酸素平衡特性はすでに知られており、残りの2種 (Hb M_H , Hb M_M) は本研究で調べられた。これらの5種のヘモグロビンの酸素平衡特性を比較して表5に示した。

酸素親和性については、 Hb M_M を除外して考えると、intrinsic な酸素親和性は α 鎖の方が β 鎖よりも高いといえるが、 Hb M_M を

考慮に入れると必ずしもそのような結論は当たらない。

Bohr 効果に対しては β 鎖よりも α 鎖の方が大きく貢献していることが示唆されている。しかしこれは先に述べた Perutz ら¹⁶⁾ の Bohr 効果のモデルとは両立しないようである。

ヘム間相互作用は Hb M_H^{注)} と Hb M_M のみに明らかに存在しているが、 α 鎖と β 鎖の貢献度については何もいえない。もっとも、この作用は分子全体が一体となってはじめて発揮される性質のものと考えられるので、 α 鎖と β 鎖の貢献度に分離すること自体意味のないことと思われる。

最近、ヘモグロビン分子の α 鎖または β 鎖のみをメト型にした、1 種の“人工ヘモグロビン M” (valency hybrid と呼ばれる) の酸素平衡が報告された⁷¹⁾ が、このデータ (表 5 に併載) と M-type ヘモグロビンのデータとを比較することは興味あることのように思われる。報告によると、 α 鎖がメト型の valency hybrid ($\alpha_2^{3+}\beta_2^{2+}$) も β 鎖がメト型の valency hybrid ($\alpha_2^{2+}\beta_2^{3+}$) もともに酸素親和性が非常に高く、ヘム間相互作用は完全または極度に消失していて、一見単離鎖の性質⁷²⁾ に類似しているが、どちらも Bohr 効果は保持しており、その大きさは M-type ヘモグロビンと傾向において一致している。

さて、M-type ヘモグロビンと valency hybrid とで、どちらにおいて正常鎖がより native な環境におかれているかという点、もちろん valency hybrid の方であると考えられる。M-type ヘモグロビンでは実際に一次構造が変化し、しかも新たに導入された Tyr または Glu 残基がヘムの鉄原子と安定な結合をつくっていると考えられる⁷³⁾ ので、それだけ蛋白の高次構造が native な状態から変化していると思われる。これに対して valency hybrid では一方のサブユニットのヘム鉄が酸化しているだけであり、しかも蛋白の高次構造の上では鉄の“酸化”の効果は

注) Hb M_H の n 値は 2.3 と、理論的に期待される最大値 2 より大きい。このヘモグロビンの OEC は測定に用いられた単色光の波長に依存するという現象が見出されており、分光学的な方法で測定された OEC が真の OEC を表わしているかどうか疑問が残されている²⁹⁾。

“酸素化”と等価であることが X 線解析の結果¹⁴⁾から知られている。このような観点から valency hybrid は永久に分子の半分が酸素化されたヘモグロビンとみなされ、その場合分子全体が“O 状態”⁷⁴⁾にあるので、正常鎖のヘムの酸素親和性が高まると考えると、valency hybrid の高い酸素親和性は native な環境にある正常鎖の性質の反映であるともみることができる。これに対して M-type ヘモグロビンの正常鎖が置かれている環境は、かなり複雑のようである。ただ、後述するように Hb M_B の場合には分子全体が永久に“R 状態”⁷⁴⁾にあると考えるのが妥当であるように思われる。また、Hb M_I の場合も正常鎖のヘム鉄が酸化されてもされなくても、分子は常に R 状態のままであるという報告¹⁹⁾がある。

Bohr 効果については、M-type ヘモグロビンも valency hybrid もともに、そのデータは α 鎖の方が大きな貢献をしていることを示唆している。しかし、この効果をはたして各サブユニットに要素として分離できるかどうかには疑問が残されている⁷⁵⁾。

一般にヘム間相互作用が発現するには、ヘモグロビン分子が異名鎖から構成されていることが必須条件であると考えられている⁷⁵⁾。この観点から、Hb M_H と Hb M_M の結果は大きな関心をいだかせる。すなわち、これらのヘモグロビンでは同名鎖 (β 鎖) の間で相互作用が起きている。同名鎖間の協同現象はヤツメウナギ・ヘモグロビンでも見出されているが、この場合は酸素化と分子の解離が連係していて、協同現象はあくまで見かけ上のものであると考えられる⁷⁶⁾。オリゴマーの中での同名鎖間の協同現象としては、Hb M_H と Hb M_M が最初の例ではないかと思われる。ただ、Hb M_H では正常鎖 (α 鎖) が酸素化されると、異常鎖 (β 鎖) のヘム鉄の電子状態に大きな変化が起こるという現象が EPR の実験⁷⁷⁾から見出されており、異名鎖間の相互作用が存在するので、このヘモグロビンの協同現象は $\alpha_1 \rightarrow \beta \rightarrow \alpha_2$ という風に異名鎖を媒介としたものかも知れない。その意味では、Hb M_H は純粋な意味での同名鎖間の相互作用には該当しない。しかし、Hb M_M の場合には EPR の実験でも異名鎖間の相互作用は観測さ

れていないので、真の意味での同名鎖間の協同現象が存在するのかも知れない。Kotani⁷⁸⁾は Monodら⁹⁾のアロステリック効果に関するモデルを一般化し、その論文の中で、同じ種類のプロトマーから成るオリゴマーの四次構造に熱的な“ゆらぎ”があり、そのゆらぎが各プロトマーにとって常に等価に起こっているとき、各プロトマーの間に起こる相互作用は常に“協同的”であることを示した。ヘモグロビンの場合には正のヘム間相互作用($n > 1$)が起こることになる。Hb M_Mはこのモデルが適用される1例かも知れない。

Hb A, Hb M_B, Hb M_MのOECには熱力学的解析を試みたが、その場合あくまでヘモグロビン分子は四量体のままで酸素と反応するという前提があった。しかし Guidottiの報告¹⁰⁾によると、デオキシ型のヘモグロビンはほとんど四量体であるが、0.2 M NaCl (pH 7.0) 中でのCOHbの解離定数は $K = 5 \times 10^{-6}$ M であり、これを本研究で用いた 6×10^{-5} M の濃度のヘモグロビン溶液に準用すると、全オキシヘモグロビンのうち実に25%が二量体の形で存在することになる。したがって酸素化の過程では四量体と二量体との平衡の移動が伴っていることになり、上述の前提は成立しない。そういう訳で、ここに示した熱力学的解析はあくまで試験的なものである。

ヘモグロビンの酸素親和性は通常 $p_{1/2}$ または $\log p_{1/2}$ で表現されるが、それを各段階の平衡定数に分解して検討することによって新たな知見が得られた。すなわち、Hb M_Bの k_1 と k_2 はいずれも Hb Aの k_1 にほぼ等しく、ここに、Hb M_Bの分子は常にデオキシ型に“凍結”されたままであり、そのために酸素親和性が異常に低いことが示唆された。また、Hb M_Mでは k_1 が Hb Aのそれより小さいために酸素親和性が異常に低下しているが、ヘム間相互作用が存在するために k_2 はむしろ Hb Aのそれより大となる。

熱力学関数に関しては、Hb M_Bでは特にHb Aと異なる特徴はみられなかったが、Hb M_Mでは平均の反応熱がHb Aより小さいことが明らかにされた。ヒト・ヘモグロビンでOECの温度依存性が減少している例はHb Kansas⁵⁸⁾でも報告されている。また、Hb M_Mで

は第一段階と第二段階とで酸素化に伴う自由エネルギー変化に対する ΔH_i と ΔS_i の寄与の大きさが異なっているが、これは各段階の酸素化が違うメカニズムで起こっていることを表わしている。

(3) ヘモグロビンの構造と機能の関係の解明へのアプローチ

近年、世界各地で発見された異常ヘモグロビンの数が増加するにつれて、それらの機能の研究も盛んになりつつある。現在までに得られた異常ヘモグロビンの機能に関するデータから、ヘモグロビンの構造と機能の関係について得られた知見をまとめてみると、次の様になると筆者は理解している。

(a) 個々のアミノ酸残基の中には、構造や機能の維持に極めて重要なものとさほど重要でないものなどがあり、多種多様である。

(b) invariant な残基には重要な役割をもつものが多い。

(c) ヘム周囲の非極性残基群はヘムとグロビンとの結合を安定化し、ヘムに疎水性の環境を与えて鉄原子が二価状態をとるのを安定にしているのので、これらの残基がとくに極性残基で置換されると、ヘモグロビンの構造や機能は致命的な影響を受ける。

(d) サブユニット間の界面にある残基には分子内結合¹⁸⁾をつくらせて四次構造を安定にしているものが多い。とくに $\alpha_1\beta_2$ 界面にある残基は“酸素化に伴う構造変化”に関係し、その部位でのアミノ酸置換は正常な構造変化を阻害して、ヘム間相互作用を消失させる。

(e) 分子表面にある残基は主に極性基で、水分子と接触しているが、機能的には特別の役割をもっていない。

(f) あるサブユニット内部で生じた変化(ヘムへのリガンドの配位、ヘム鉄の酸化、アミノ酸置換など)の影響は敏感に他のサブユニットに伝達される。

(g) 正常な機能が発揮されるには、 α 鎖と β 鎖との相互作用が本質的に不可欠である。

本研究で得られた9種類の異常ヘモグロビンのデータは(d)を除く他の説をさらに強く支持している。

現在、X線回折法による構造解析の結果から、1個のサブユニット内部で形成される残基とヘムとの間の分子内結合や、異なるサブユニットの残基間に形成される分子内結合が詳しく知られている(付録Ⅱ参照)。著しい機能異常を有する異常ヘモグロビンの多くは、この分子内結合にたずさわる残基が置換された例が多く(付録ⅠおよびⅡ参照)、この点では構造解析の成果が異常ヘモグロビンの機能の研究によって検証されつつあると見なすことができる。そして、異常ヘモグロビンの機能の研究は構造解析のみからは予期されなかったような情報をもたらすことさえある。たとえば、本研究で調べられた Hb Agenogi や Hb Hiroshima のアミノ酸置換の部位は分子表面に位置していて、特別の機能を果たしているようには予期されなかったが、実際にはそこでのアミノ酸置換は明らかな機能異常をもたらした。そして、その機能異常の構造上の裏付けが Perutz によって彼等の提出した Bohr 効果のモデルとの関連において検討されるようになった⁷⁹⁾。

ヘモグロビンの蛋白部分は 574 個のアミノ酸残基から構成されているが、これらの残基の各々が構造の維持や機能の発現に対して果たす役割の重みはさまざまで、極めて広範囲にわたって分布しているようであるが、最終的には 1 つ 1 つの残基のもつ役割の種類と重みを知りたいと思っている。ヘモグロビンのもつ複雑な機能を 1 つ 1 つの残基の役割に明確に分解できるかどうか問題があるが、少なくとも、たとえばヘムに直接作用して酸素親和性を調節する残基のグループ、サブユニットとサブユニットとの間の情報またはエネルギーの交換を担ってヘム間相互作用の発現に関係するグループ、種々のアロステリック・リガンドと反応する残基のグループなどのように分類することは可能であると思われる。そして、付録Ⅱの図は X 線による構造解析の結果のみを基礎にして、蛋白の高次構造の中で各アミノ酸残基の間に存在して機能の発現にも重大な関係をもつと思われる分子内結合を二次元的に表現したものであるが、この図の上で、各残基をそのもつ機能的役割によって分類し、グループ別にまとめて色分けするなどして、ヘモグロビンの機能発現の機構

が一目瞭然でわかるような図——ヘモグロビンの活性地図——をつくり上げることが筆者および筆者の研究グループのいまだく目標である。そのためにはさらに多くの種類の異常ヘモグロビンの機能や種々の物理化学的性質を調べ、データを蓄積することが必要である。本研究ではその目標達成の第一段階として研究目的にふさわしい酸素平衡の測定手段の開発を遂行し、同時にいくつかの異常ヘモグロビンが著しい機能異常を有することを明らかにし、そのもつ意味を構造異常との関連において検討した。また、いくつかの面白い現象も見い出されたが、それらの機構についてはもっと研究手段を増やすことによって解明への道を開いてゆきたい。

謝 辞

本稿を終るにあたり、主に理論方面で親切な指導をして下さり、特に協同現象の概念に関して深い示唆を与えて下さった小谷正雄前教授に、また実験と理論の両面にわたって種々の問題の細部に至るまで筆者と一緒に思考し、終始親切に指導して下さいった森本英樹助教授に対し、深甚なる謝意を表します。また、貴重な異常ヘモグロビンの試料を快く提供して下さいった山口大学医学部の柴田進教授はじめ同研究室の方々、岐阜大学医学部の松友啓典氏、M-typeヘモグロビンを提供して下さい一緒に実験し、いろいろ助言して下さいった大阪大学医学部の林昭氏はじめ同研究室の方々、および自己の血液を提供して下さいった異常ヘモグロビン保有者の方々に深く感謝します。また、測定装置開発に際して基本的なアイデアを寄せて下さった大阪大学医学部の巨弘助教授、装置開発に協力して下さいった平田和歌氏と黒田正雄氏、新しい情報を与えて下さり、いろいろ親切な助言をして下さった同学部の中馬一郎教授に改めて感謝の意を表します。最後に終始筆者を激励して精神的援助を与えて下さった飯塚哲太郎助手や上野山晴三氏をはじめとする当研究室の皆様にお礼を申し上げます。

参 考 文 献

- 1) R. Benesch and R.E. Benesch, *Nature*, 221, 618 (1969)
- 2) J.K.W. Ferguson and F.J.W. Roughton, *J. Physiol.*, 83, 68 (1934)
- 3) L. Garby, G. Gerber and C.H. de Verdier, *European J. Biochem.*, 10, 110 (1969)
- 4) 西田 玲子, *日本生理学雑誌*, 30, 727 (1968)
- 5) L. Pauling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 21, 186 (1935)
- 6) J. Wyman, *Adv. Protein Chem.*, 4, 407 (1948)
- 7) J. Wyman and D.W. Allen, *J. Polymer Sci.*, 7, 499 (1951)
- 8) D.E. Koshland, G. Némethy and D. Filmer, *Biochemistry*, 5, 365 (1966)
- 9) J. Monod, J. Wyman and J.P. Changeaux, *J. Mol. Biol.*, 12, 88 (1965)
- 10) G. Guidotti, *J. Biol. Chem.*, 242, 3673, 3685, 3694 and 3704 (1967)
- 11) R.E. Benesch, R. Benesch and G. Macduff, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56, 1272 (1966)
- 12) M.F. Perutz, H. Muirhead, J.M. Cox and L.C.G. Goaman, *Nature*, 219, 131 (1968)
- 13) W. Bolton, J.M. Cox and M.F. Perutz, *J. Mol. Biol.*, 33, 283 (1968)
- 14) H. Muirhead, J.M. Cox, L. Mazzarella and M.F. Perutz, *J. Mol. Biol.*, 28, 117 (1967)
- 15) R. Benesch and R.E. Benesch, *J. Mol. Biol.*, 6, 498 (1963)
- 16) M.F. Perutz, H. Muirhead, L. Mazzarella, R.A. Crowther, J. Greer and J.V. Kilmartin, *Nature*, 222, 1240 (1969)
- 17) L. Pauling, H.A. Itano, S.J. Singer and I.C. Wells, *Science*, 110, 543 (1949)
- 18) 今井 清博, *代謝*, 6, 798 (1969)
- 19) M.F. Perutz and H. Lehmann, *Nature*, 219, 902 (1968)
- 20) D.W. Allen, K.F. Guthe and J. Wyman, *J. Biol. Chem.*, 187, 393 (1950)
- 21) A. Rossi-Fanelli and E. Antonini, *Arch. Biochem. Biophys.*, 77, 478 (1958)
- 22) R. Benesch, G. Macduff and R.E. Benesch, *Anal. Biochem.*, 11, 81, (1965)

- 23) W. Paul and F.J.W. Roughton, J. Physiol. London, 113, 23 (1951)
- 24) F.J.W. Roughton, J. Physiol. London, 126, 359 (1954)
- 25) A.B. Otis and F.J.W. Roughton, Proc. Roy. Soc. London Ser. B, 144, 55 (1955)
- 26) K. Imai, H. Morimoto, M. Kotani, H. Watari, W. Hirata and M. Kuroda, Biochim. Biophys. Acta, 200, 189 (1970)
- 27) K. Imai, H. Morimoto, M. Kotani, S. Shibata, T. Miyaji and K. Matsutomo, Biochim. Biophys. Acta, 200, 197 (1970)
- 28) K. Imai, Arch. Biochem. Biophys., 127, 543 (1968)
- 29) A. Hayashi, T. Suzuki, A. Shimizu, K. Imai, H. Morimoto, T. Miyaji and S. Shibata, Arch. Biochem. Biophys., 125, 895 (1968)
- 30) A. Hayashi, T. Suzuki, K. Imai, H. Morimoto and H. Watari, Biochim. Biophys. Acta, 194, 6 (1969)
- 31) J. Wyman, Adv. Protein Chem., 19, 223 (1964)
- 32) G.S. Adair, J. Biol. Chem., 63, 529 (1925)
- 33) D.I. Rubin, Chem. Eng. Prog. Symposium Series, 59, 90 (1963)
- 34) 宮地 隆興, 井内 岩夫, 竹田 勇, 柴田 進, 日本血液学会雑誌, 26, 531 (1963)
- 35) T. Miyaji, I. Iuchi, K. Yamamoto, Y. Ohba and S. Shibata, Clin. Chim. Acta, 16, 347 (1967)
- 36) S. Shibata, T. Miyaji, I. Iuchi, S. Ueda and I. Takeda, Clin. Chim. Acta, 10, 101 (1964)
- 37) T. Miyaji, H. Suzuki, Y. Ohba and S. Shibata, Clin. Chim. Acta, 14, 624, (1966)
- 38) H.B. Hamilton, I. Iuchi, T. Miyaji and S. Shibata, J. Clin. Invest., 48, 525 (1969)
- 39) K. Matsutomo, in preparation.
- 40) P.S. Gerald and M.L. Efron, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 47, 1758 (1961)
- 41) A.V. Pisciotta, S.N. Ebbe and J.E. Hinz, J. Lab. Clin. Med., 54, 73 (1959)
- 42) P. Heller, R.D. Coleman and V.J. Yakulis, "Plenary Sessions of the XIth Congress of the International Society of Haematology", p.427. Government Printer, Sydney (1966)
- 43) 上田 智, 臨床血液, 3, 26 (1962)

- 44) K.G. Paul, H. Theorell and Å. Åkeson, *Acta Chem. Scand.*, 7, 1284 (1953)
- 45) A. Hayashi, T. Suzuki and M. Shin, in preparation.
- 46) B. Sullivan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 407 (1967)
- 47) T. Suzuki, A. Hayashi and Y. Yamamura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 691 (1965)
- 48) R.E. Benesch, H.M. Ranny, R. Benesch and G.M. Smith, *J. Biol. Chem.*, 236, 2926 (1961)
- 49) F.J.W. Roughton, A.B. Otis and R.L.J. Lyster, *Proc. Roy. Soc. London Ser. B*, 144, 29 (1955)
- 50) W. Niesel and G. Thews, *Arch. Ges. Physiol.*, 273, 380 (1961)
- 51) C.H. Colman and I.S. Longmuir, *J. Appl. Physiol.*, 18, 420 (1963)
- 52) M.F. Perutz, *J. Mol. Biol.*, 13, 646 (1965)
- 53) M.F. Perutz, J.C. Kendrew and H.C. Watson, *J. Mol. Biol.*, 13, 669 (1965)
- 54) R.T. Jones, B. Brimhall and R. Lisker, *Biochim. Biophys. Acta*, 154, 488 (1968)
- 55) R.B. Thompson, R.L. Warrington and W.N. Bell, *Amer. J. Physiol.*, 208, 198 (1965)
- 56) R.T. Jones, B. Brimhall, E.R. Huehns and A.G. Motulsky, *Biochim. Biophys. Acta*, 154, 278 (1968)
- 57) S. Charache, D.J. Weatherall and J.B. Clegg, *J. Clin. Invest.*, 45, 813 (1966)
- 58) K.R. Reissmann, W.E. Ruth and T. Nomura, *J. Clin. Invest.*, 40, 1826 (1961)
- 59) J.G. Lines and R. McIntosh, *Nature*, 215, 297 (1967)
- 60) M.J. Novy, M.J. Edwards and J. Metcalfe, *J. Clin. Invest.*, 46, 1848 (1967)
- 61) C.S. Reed, R. Hampson, S. Gordon, R.T. Jones, M.J. Novy, B. Brimhall, M.J. Edwards and R.D. Koler, *Blood*, 31, 623 (1968)
- 62) G. Guidotti, W. Konigsberg and L.C. Craig, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 50, 774 (1963)
- 63) R. Benesch, R.E. Benesch and I. Tyuma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 56, 1268 (1966)

- 64) A.J. Bellingham and E.R. Huehns, *Nature*, 218, 924 (1968)
- 65) E. Antonini, J. Wyman, R. Zito, A. Rossi-Fanelli and A. Caputo, *J. Biol. Chem.*, 236, PC60 (1961)
- 66) R.E. Nagel, H.M. Ranny and L.L. Kucinskis, *Biochemistry*, 5, 1934 (1966)
- 67) C.-H. de Verdier and L. Garby, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 23, 149 (1969)
- 68) A. Hayashi, T. Suzuki, A. Shimizu and Y. Yamamura, *Biochim. Biophys. Acta*, 168, 262 (1968)
- 69) N. Hayashi, Y. Motokawa and G. Kikuchi, *J. Biol. Chem.*, 241, 79 (1966)
- 70) T. Suzuki, A. Hayashi, A. Shimizu and Y. Yamamura, *Biochim. Biophys. Acta*, 127, 280 (1966)
- 71) R. Banerjee and R. Cassoly, *J. Mol. Biol.*, 42, 351 (1969)
- 72) I. Tyuma, R.E. Benesch and R. Benesch, *Biochemistry*, 5, 2957 (1966)
- 73) P.S. Gerald and M.L. Efron, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 47, 1758 (1961)
- 74) H. Muirhead and M.F. Perutz, *Nature*, 199, 633 (1963)
- 75) I. Tyuma, *J. Physiol. Soc. Jap.*, 29, 1 (1967)
- 76) R.W. Briehl, *J. Biol. Chem.*, 238, 2361 (1963)
- 77) A. Hayashi, T. Suzuki, A. Shimizu, H. Morimoto and H. Watari, *Biochim. Biophys. Acta*, 177, 407 (1967)
- 78) M. Kotani, *Supplement of Progress of Theoretical Physics*, Extra Number, 233 (1968)
- 79) M.F. Perutz, personal communication.

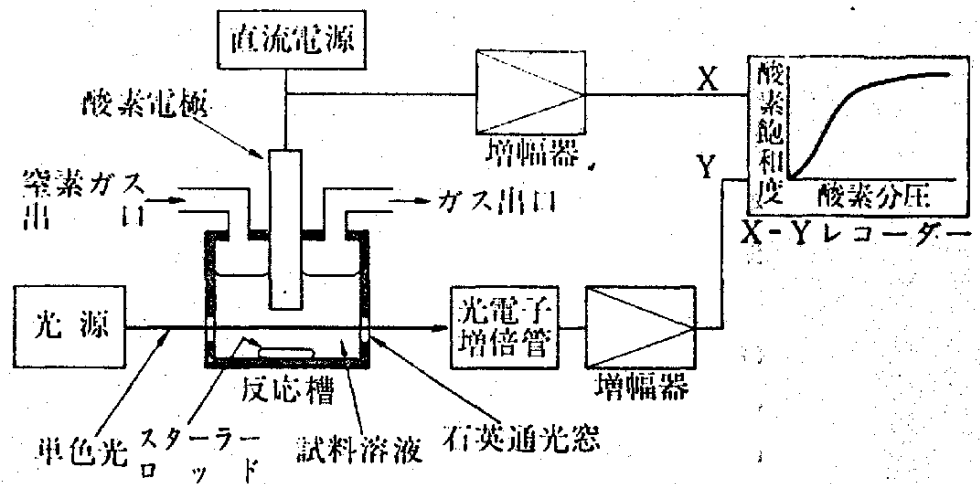


図 1. 酸素平衡曲線自動記録装置動作原理

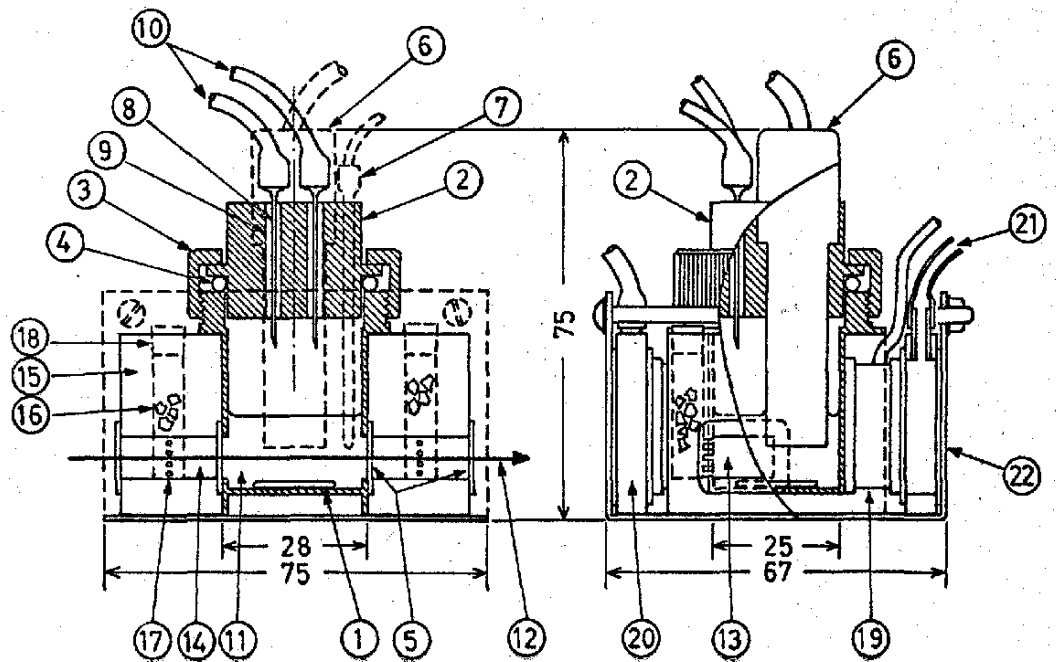


図 2. 反応槽の構造。左方は側面から見た断面図。右方は正面から見た一部断面の図。斜線を施した部分はステンレス・スチールでつくられた部分とす。(1) 反応槽本体, (2) 蓋, (3) 蓋を反応槽本体に固定する袋ナット, (4) 反応槽内部を気密にするための O リング, (5) コルツ板, (6) 酸素電極, (7) サーミスタ・プローブ, (8) 反応槽に通気するための注射針, (9) ゴムパッキング, (10), ガスを導くためのゴム管, (11) ヘモグロビン溶液, (12) 単色光ビーム, (13) 単色光の通過する窓, (14) 乾燥室, (15) アクリル樹脂のブロック, (16) シリカゲル粒, (17) 乾燥室とシリカゲル室を連絡する細孔, (18) ゴム栓, (19) サーマジュール, (20) ウォーター・ジャケット, (21) 冷却水を導くゴム管, (22) 反応槽全体を支える枠。乾燥室は反応槽内部の温度が露点以下の場合に窓に水滴が付着するのを防ぐ。

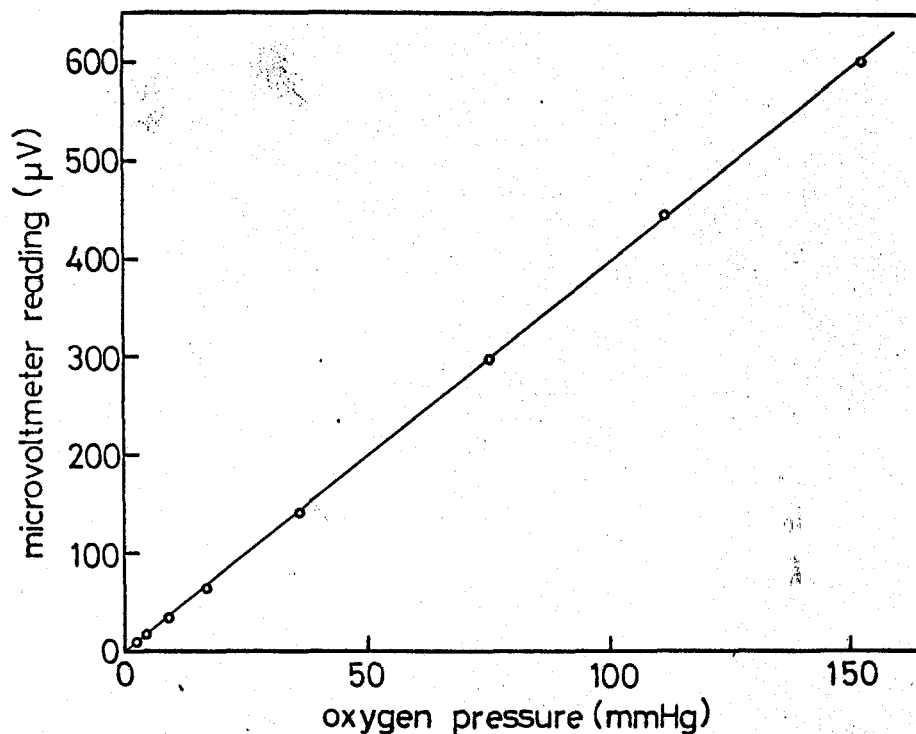


図3. 酸素電極の校正曲線

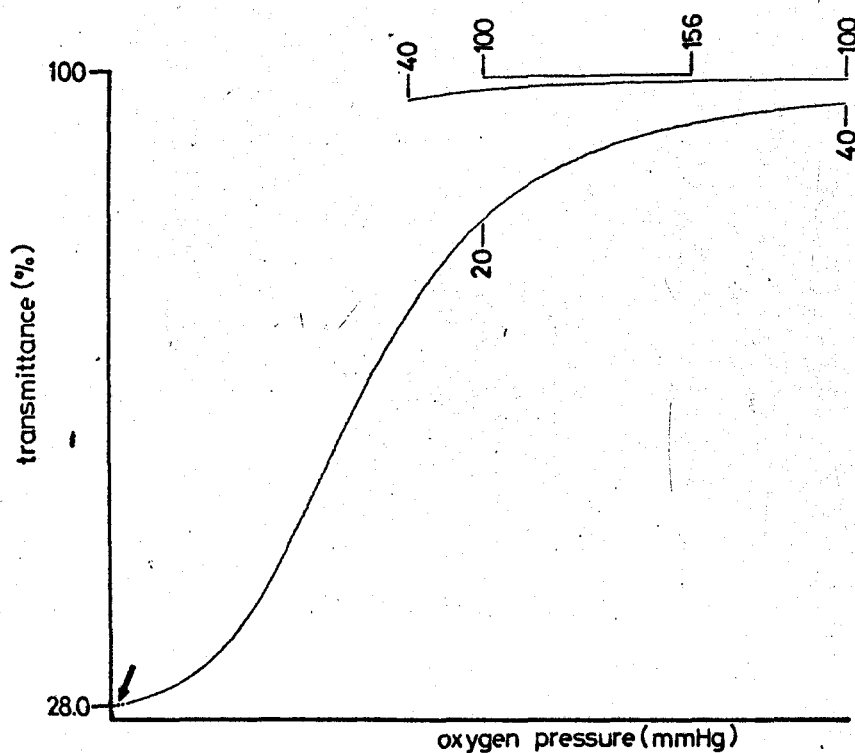


図4. レコーダー・チャートに記録された酸素平衡曲線。ヘモグロビン濃度, $6 \times 10^{-5} \text{ M}$; 溶媒, 0.1 M リン酸緩衝液; pH, 6.8; 温度, 20°C 。曲線は右上から左下へ向かって描かれた。曲線末端付近の太い矢印は原点への外挿部分を意味する。縦軸は溶液の透過率(分光光度計の出力に比例)で、これより吸光度変化、したがって酸素飽和度を計算する。曲線に付けた数字は酸素分圧(mmHg)。

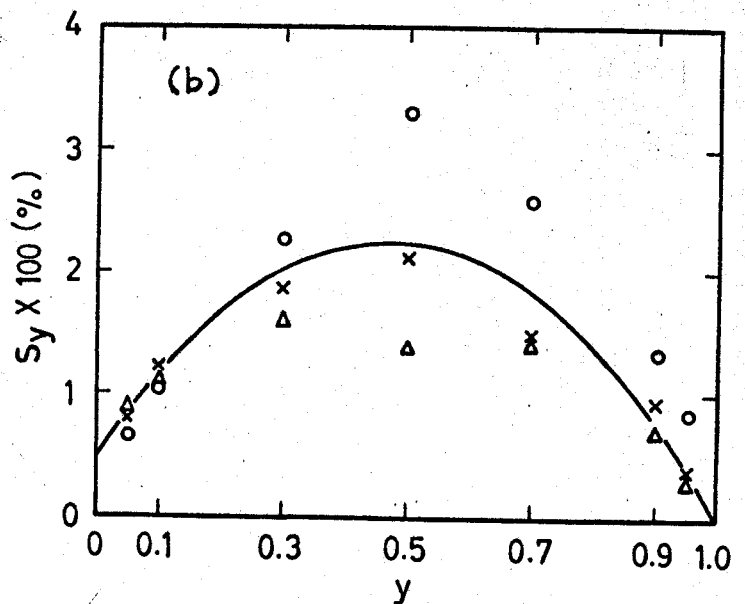
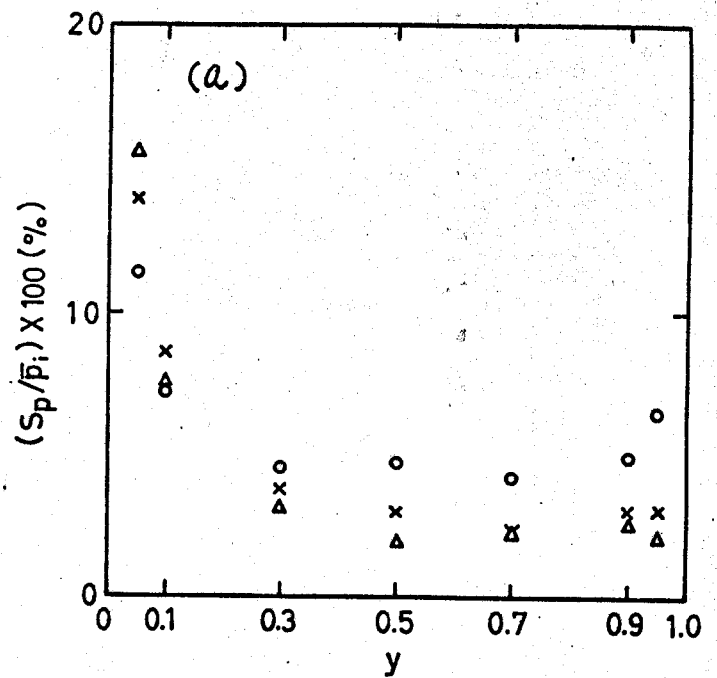


図5. 酸素平衡曲線の再現性。 約一年間にわたって測定された曲線群に対して再現性が調べられた。 実験条件：ヘモグロビン濃度， $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ；溶媒， 0.1 M リン酸緩衝液；温度， 20°C 。 ○ pH 7.4，△ pH 7.0，× pH 6.5。 曲線群の数は pH 7.4, 7.0, 6.5 に対してそれぞれ 8, 8, 7 本。(a) 酸素飽和度 y に対して酸素分圧の相対標準誤差 S_p/\bar{p}_i をプロットしたもの。 S_p は $S_p = \sqrt{(\sum (p_i - \bar{p}_i)^2)/(n-1)}$ によって定義される。ここに p_i は i 番目の曲線上のある y に対する酸素分圧， \bar{p}_i は n 個の p_i の平均値， n は曲線の数である。総和は i について 1 から n まで行なう。(b) y の標準誤差 S_y を y に対してプロットしたもの。 S_y は $S_y = \sqrt{(\sum (y_i - \bar{y}_i)^2)/(n-1)}$ によって定義される。ここに y_i は i 番目の曲線上の \bar{p}_i に対する y ， \bar{y}_i は n 個の y_i の平均値，他は (a) の場合と同様である。(b) 図の曲線は最小二乗法による平衡定数の計算(Ⅱ.方法を参照)の際に用いた重み関数 ($w = S_y = -0.08y^2 + 0.075y + 0.005$) を表わす。

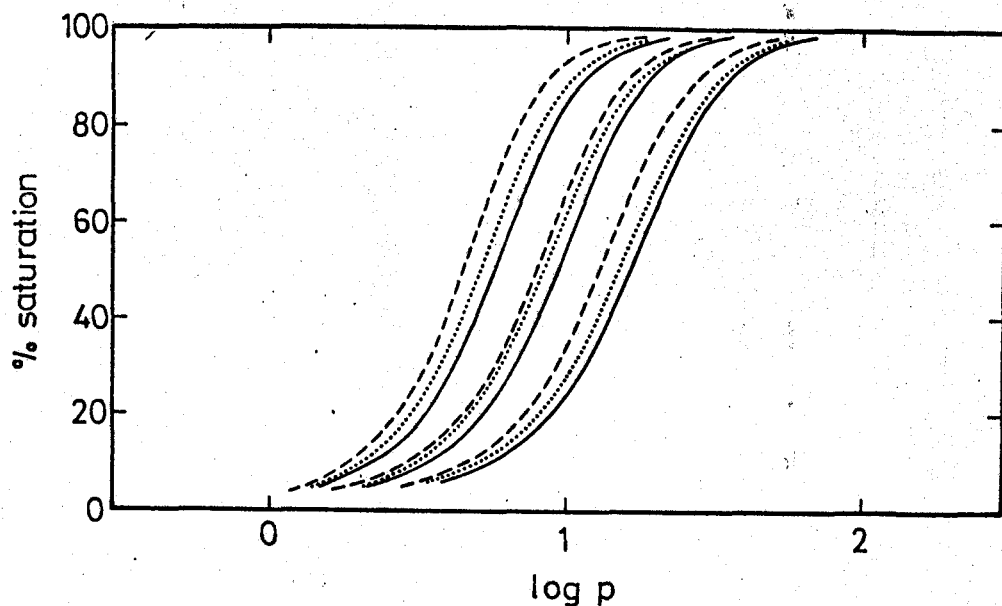
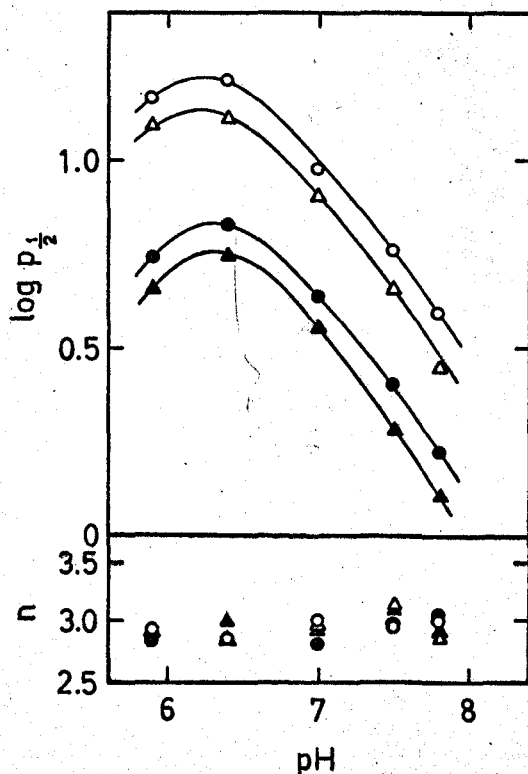


図6. 精製された Hb Agenogi と Hb A および Hb Agenogi を含む全溶血液の酸素平衡曲線。ヘモグロビン濃度, $6 \times 10^{-5} \text{ M}$; 溶媒, NaCl でイオン強度を 0.2 に調節した 0.01 M リン酸緩衝液。p は酸素分圧 (mmHg)。——, Hb Agenogi; ----, Hb A; ·····, Hb Agenogi を含む全溶血液。左方から右方へ向かって各曲線群に対して pH 7.5, 7.0, 6.4。

図7. Hb Agenogi の酸素平衡特性。実験条件は図6の場合と同じ。 $p_{1/2}$ は 50% 酸素飽和度を達するのに必要な酸素分圧 (mmHg)。n は Hill の定数 (本文の II. 方法をみよ)。○と●はそれぞれ 20°C と 10°C における Hb Agenogi のデータを, △と▲はそれぞれ 20°C と 10°C における Hb A のデータを表わす。



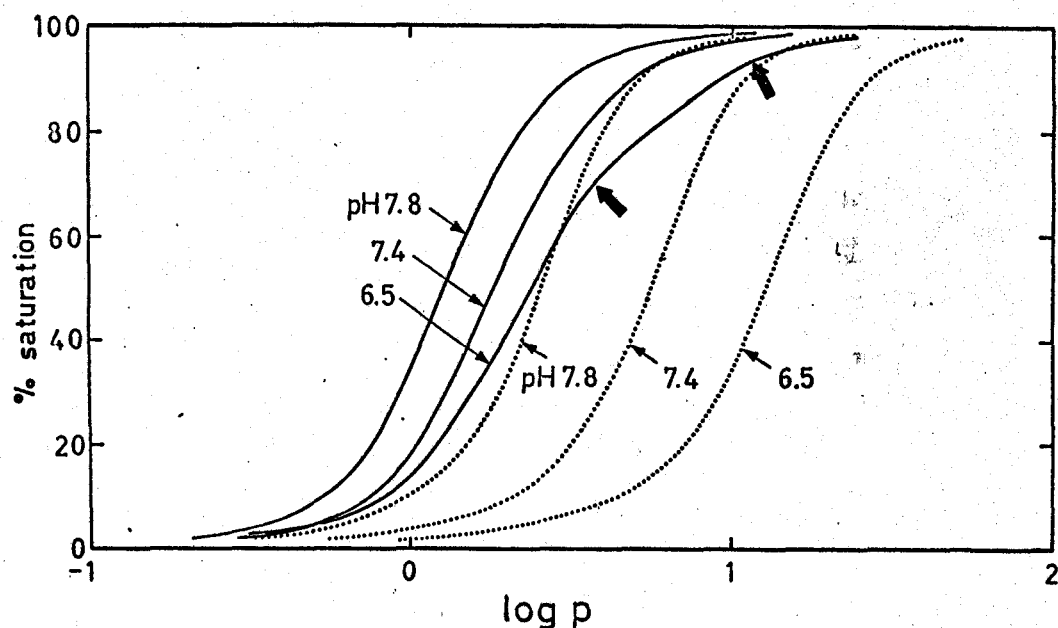


図 8. 精製された Hb Hiroshima と Hb A の酸素平衡曲線。ヘモグロビン濃度, 6×10^{-5} M; 溶媒, 0.1 M リン酸緩衝液; 温度, 20°C。——, Hb Hiroshima; ……., Hb A。太い矢印は曲線が異常な形状をもつ部分(本文参照)を表す。

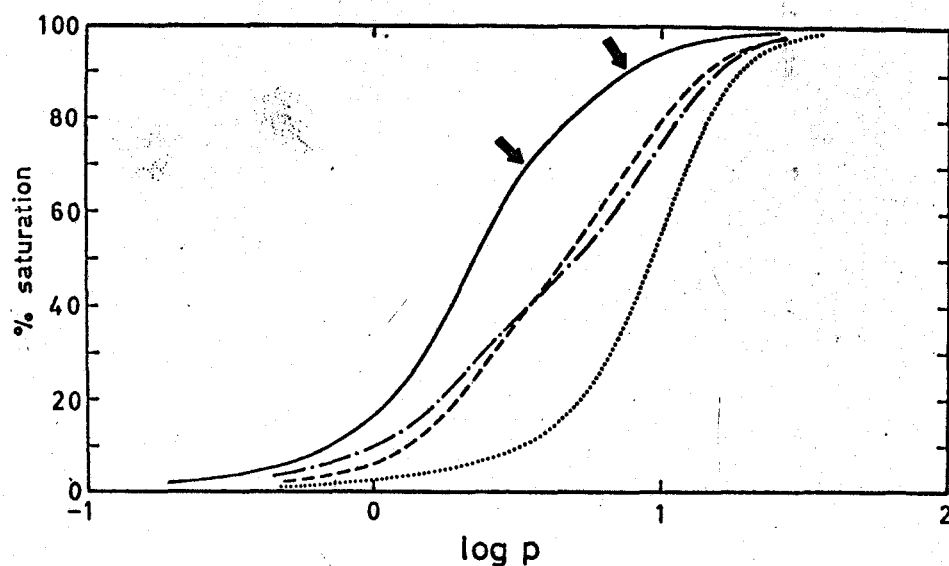


図 9 精製された Hb Hiroshima (——) および Hb A (……) および Hb Hiroshima を含む全溶血液の酸素平衡曲線。ヘモグロビン濃度, 6×10^{-5} M; 溶媒, 0.1 M リン酸緩衝液; pH, 7.0; 温度, 20°C。- - -, 全溶血液が 50% の Hb Hiroshima を含むという事実のもとに, Hb Hiroshima と Hb A の曲線から合成した曲線。太い矢印は曲線が異常な形状をもつ部分(本文参照)を表す。

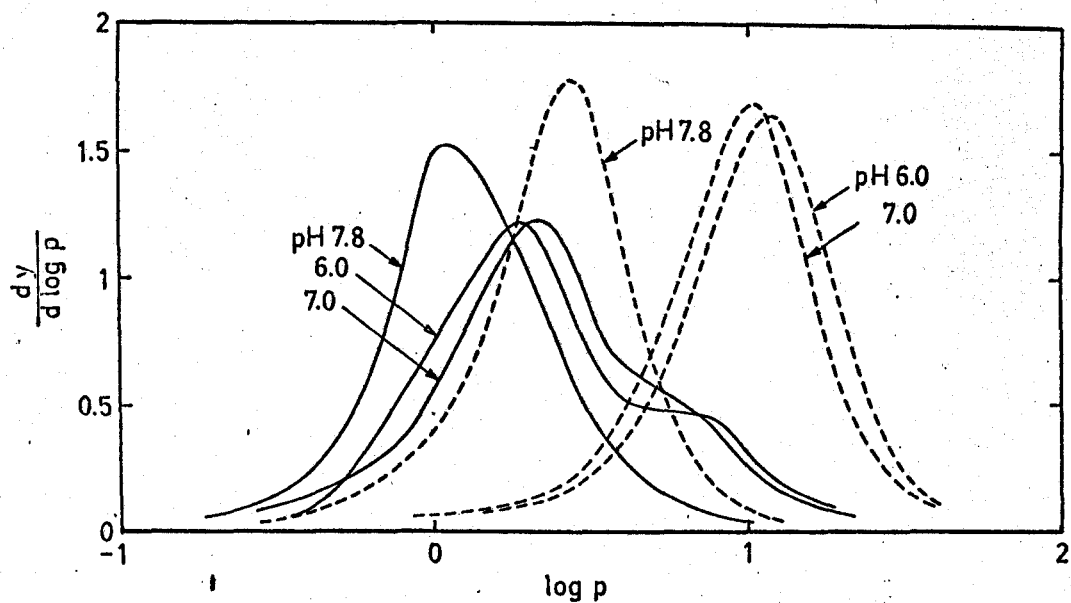


図 10. 図 8 と 9 の中の Hb Hiroshima と Hb A の酸素平衡曲線の微分曲線。ここに y は酸素飽和度, p は酸素分圧 (mmHg)。——, Hb Hiroshima; ---, Hb A. pH 7.4 と 6.5 の場合の曲線は複雑さをさけるため省略してある。

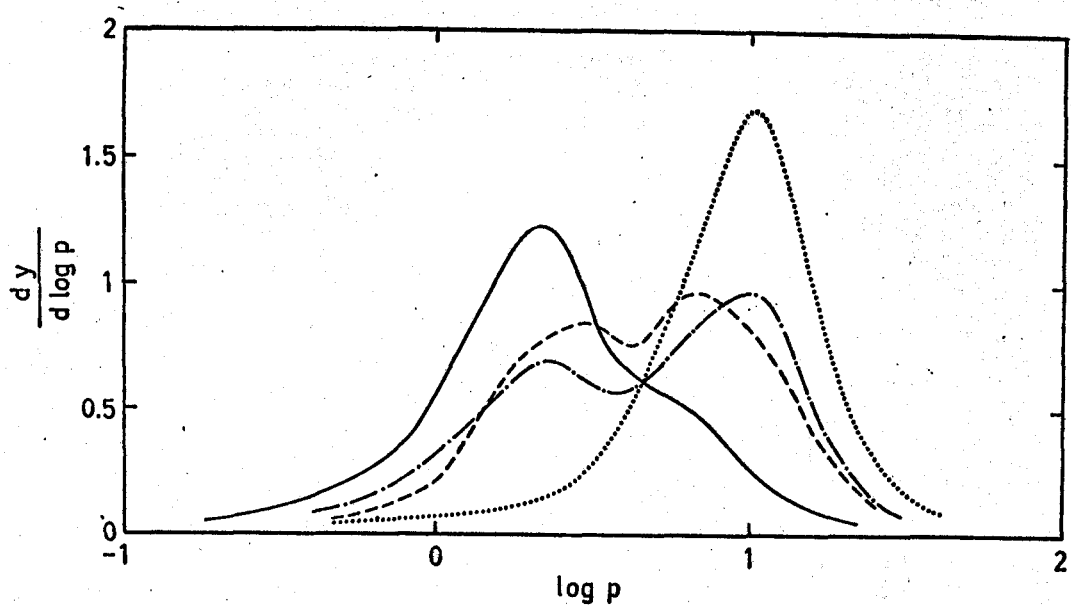


図 11. 図 9 の酸素平衡曲線の微分曲線。ここに y は酸素飽和度, p は酸素分圧 (mmHg)。——, 精製された Hb Hiroshima; ……., 精製された Hb A; ---, Hb Hiroshima を含む全溶血液 (実験曲線); —・—, 同じく全溶血液 (合成曲線)。

図 12. Hb Hiroshima と Hb A の酸素平衡特性。 $p_{\frac{1}{2}}$, 50% 酸素飽和度に必要な酸素分圧 (mmHg), n , Hill の定数 (Ⅱ. 方法参照)。○—○, Hb Hiroshima; △—△, Hb A. 実験条件は 図 8 と 9 の場合と同様。

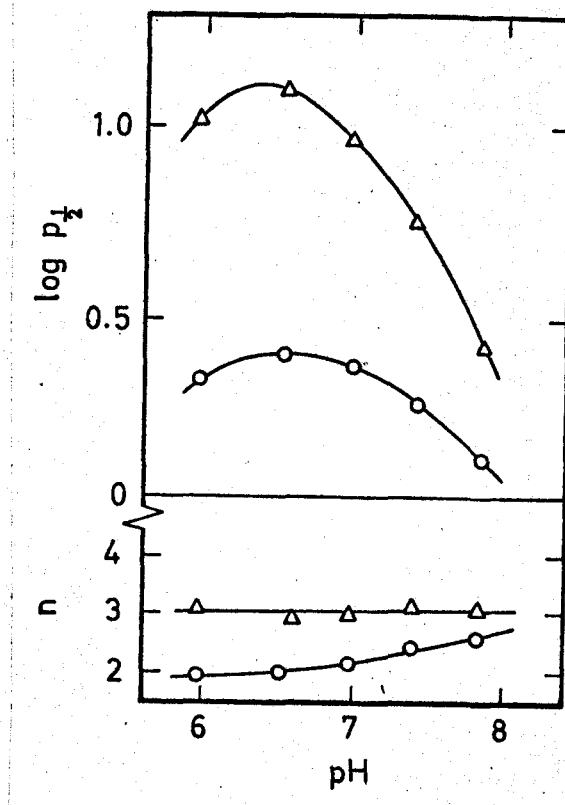
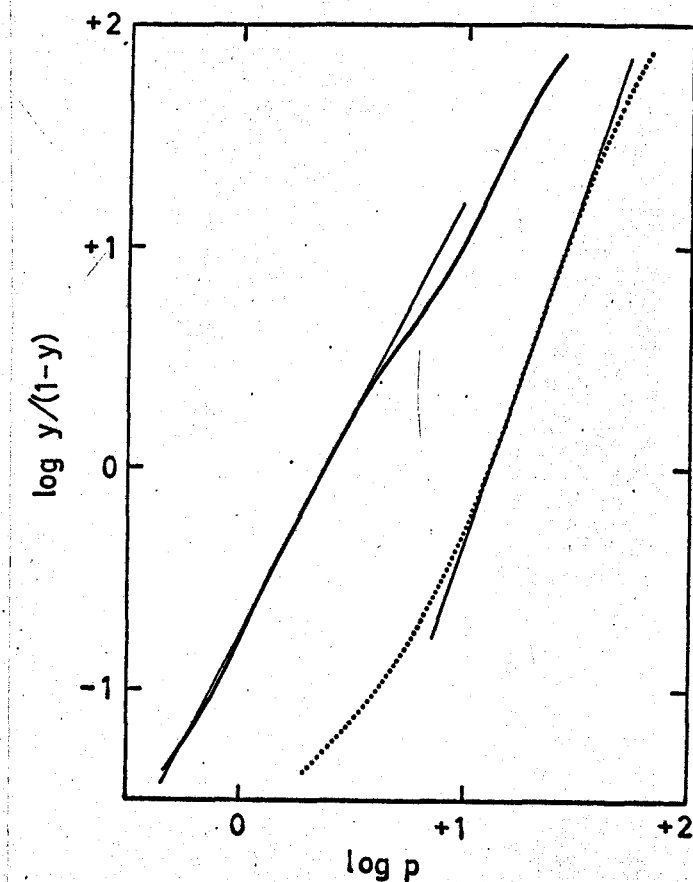


図 13. 酸素平衡曲線の Hill プロット。 図 8 の pH 6.5 の曲線を Hill の式の対数表現: $\log y/(1-y) = n \log p + \log K$ に従ってプロットした。ここに y は酸素飽和度, K は定数。——, Hb Hiroshima; ·····, Hb A. 直線は n の決定に用いた勾配を示す。



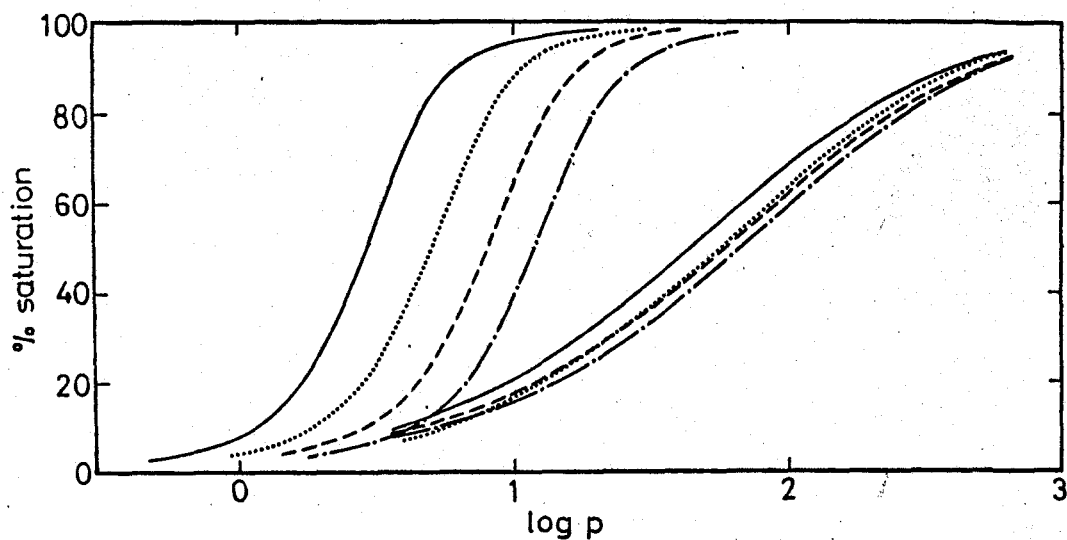
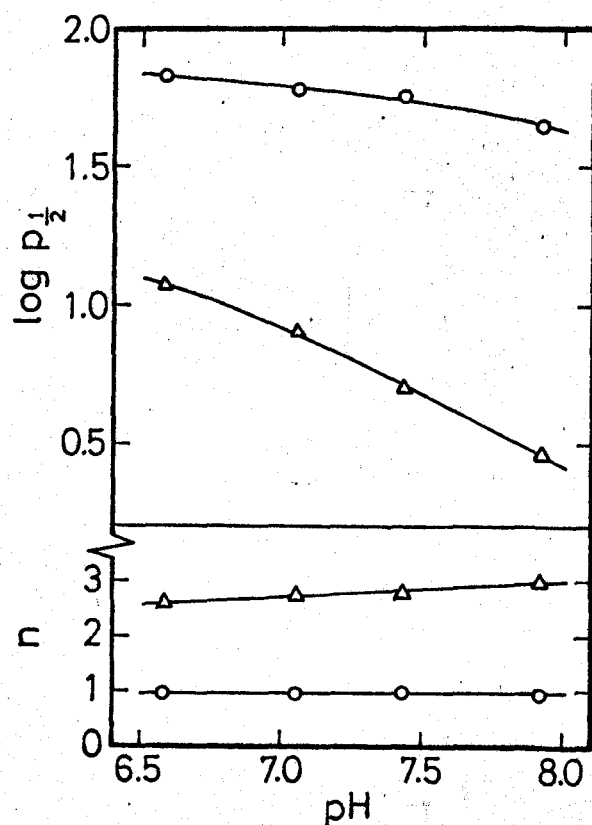


図 14. Hb M Boston と Hb A の酸素平衡曲線。右側の曲線群が Hb M Boston で、左側の曲線群が Hb A。ヘモグロビン濃度, 6×10^{-5} M; 溶媒, 0.1 M リン酸緩衝液; 温度, 20°C。——, pH 7.92; ·····, pH 7.43; ----, pH 7.05; —·—, pH 6.58。

図 15. Hb M Boston と Hb A の酸素平衡特性。 $p_{1/2}$, 50% 酸素飽和度を達するのに必要な酸素分圧 (mmHg)。 n , Hill の定数 (I. 方法参照)。○—○, Hb M Boston; △—△, Hb A。実験条件は図 14 の場合と同様。



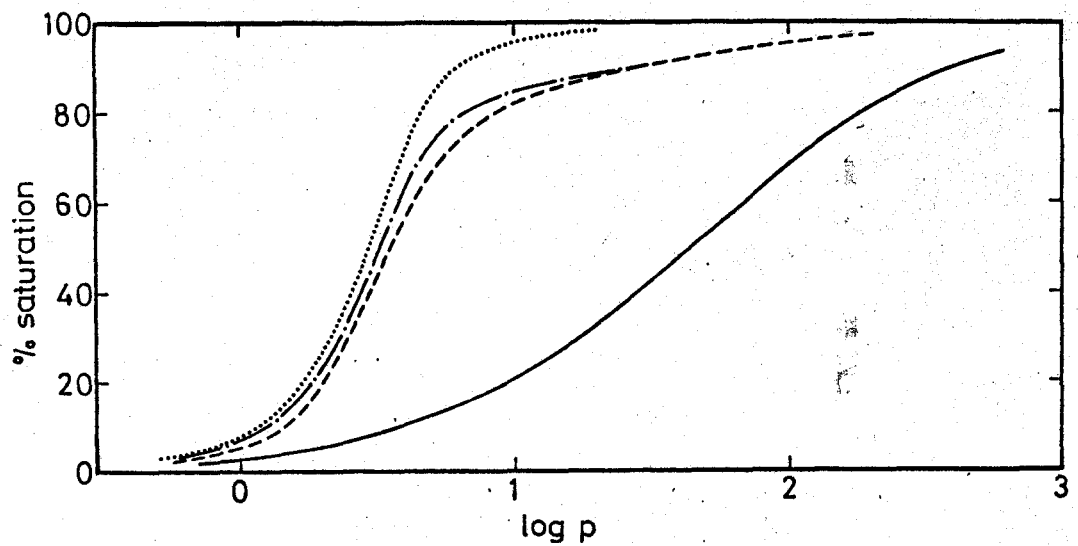


図16. Hb M Boston (—) および Hb A (·····) および Hb M Boston を含む全溶血液 (---) の酸素平衡曲線。ヘモグロビン濃度, 6×10^{-5} M; 溶媒, 0.1 M リン酸緩衝液; pH, 7.92; 温度, 20°C 。—·—, 全溶血液が 26% の Hb M Boston を含むという事実をもとに, Hb M Boston と Hb A の曲線から合成した曲線。

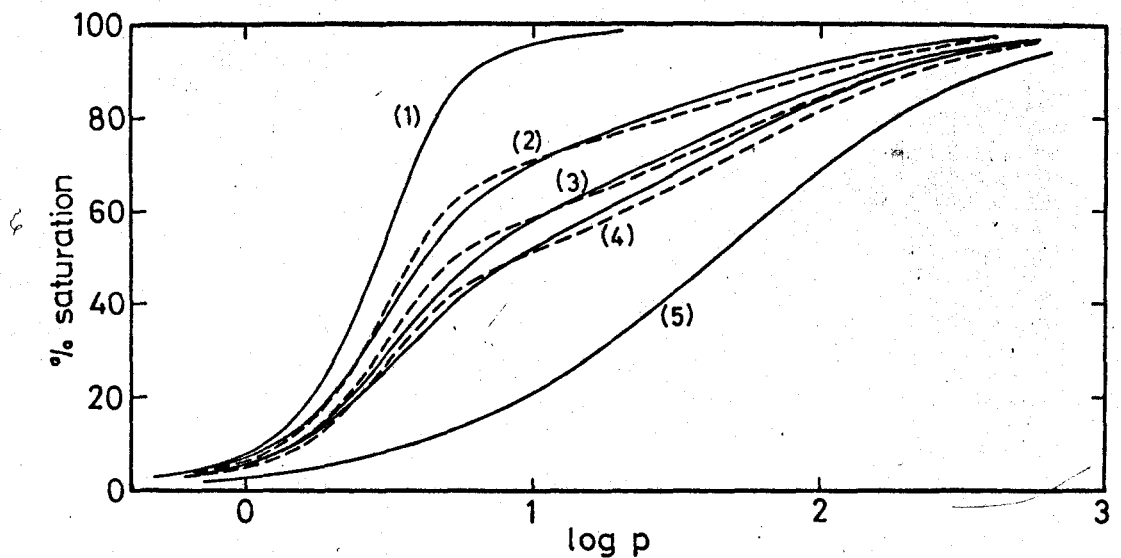


図17. Hb M Boston と Hb A の混合溶液の酸素平衡曲線。混合比 (血容量当りのモル比) Hb M Boston : Hb A は (1) から (5) まで順番にそれぞれ 0:1, 1:1, 2:1, 3:1, 1:0。実線は実験曲線。破線は混合比に従って (1) と (5) から合成した曲線。全ヘモグロビン濃度, 6×10^{-5} M; 溶媒, 0.1 M リン酸緩衝液; pH, 7.92; 温度, 20°C 。

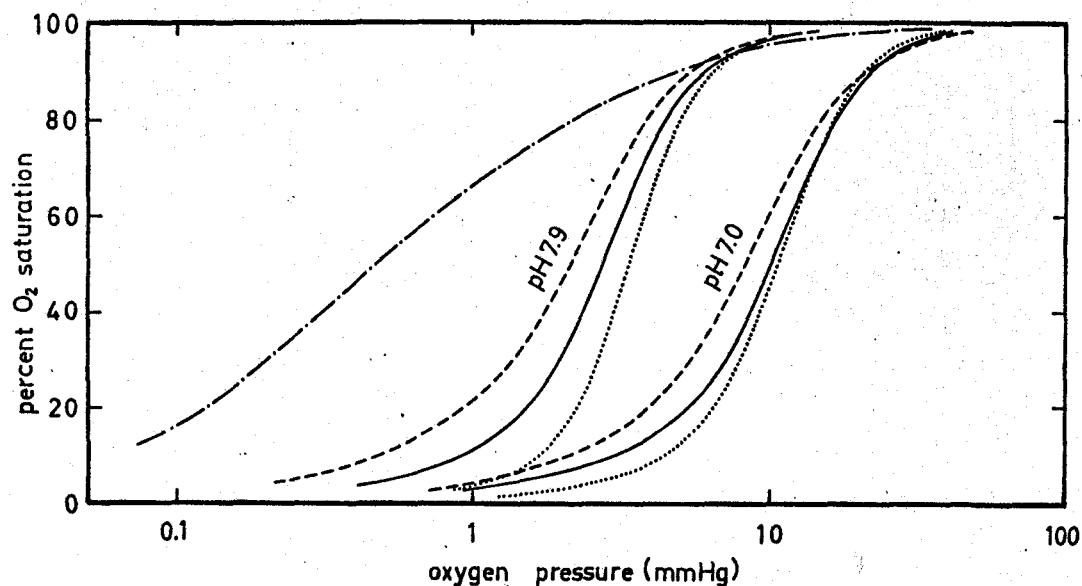
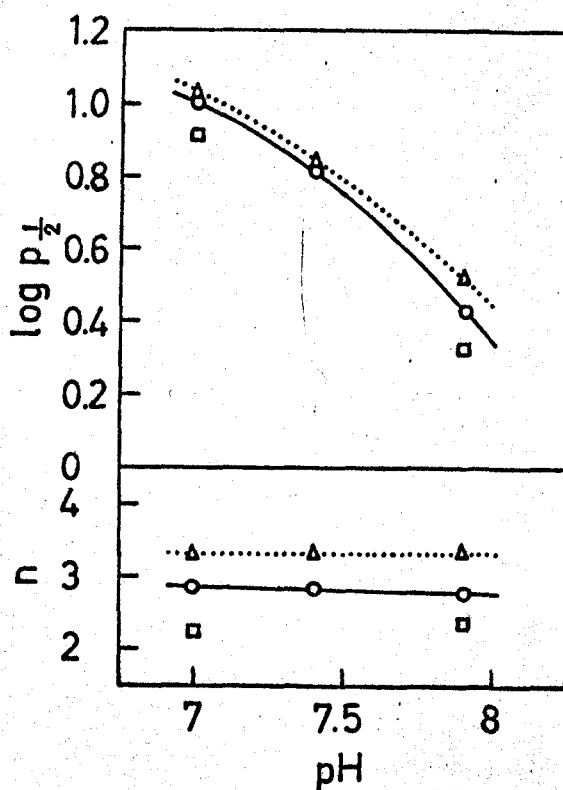


図 18. Hb M Hyde Park (---), Hb A (.....), Hb M Hyde Park を含む全溶血液 (—) および Hb M_HX (—, pH 7.0) の酸素平衡曲線。ヘモグロビン濃度, 6×10^{-5} M; 溶媒, 0.1 M リン酸緩衝液; 温度, 20°C.

図 19. Hb M Hyde Park と Hb A の酸素平衡特性。 $p_{1/2}$, 50% 酸素飽和度を達するのに要する酸素分圧 (mmHg)。 n , Hill の定数 (II. 方法参照)。 □ Hb M Hyde Park, △ Hb A, ○ Hb M Hyde Park を含む全溶血液。実験条件は図 18 の場合と同様。



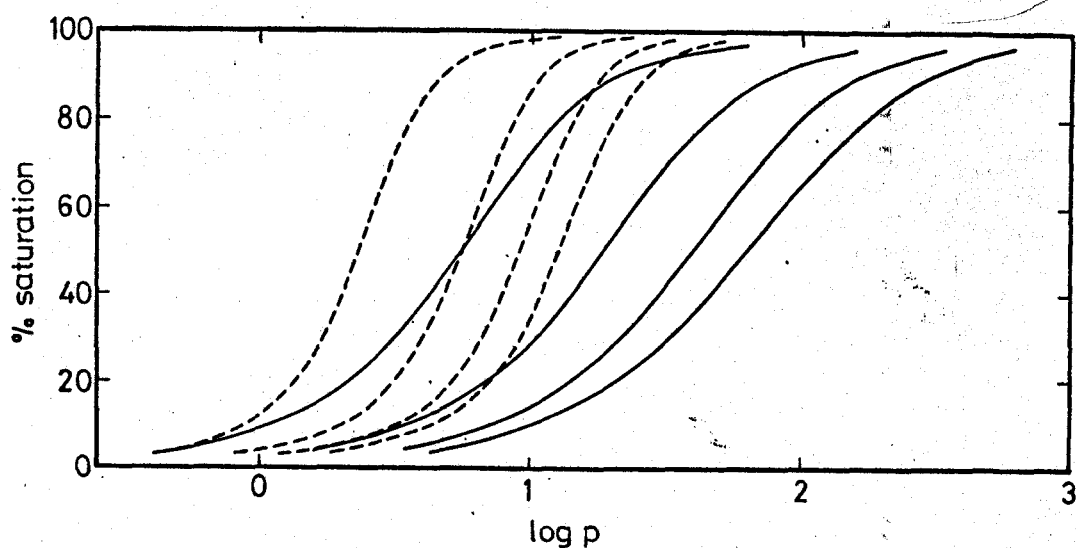
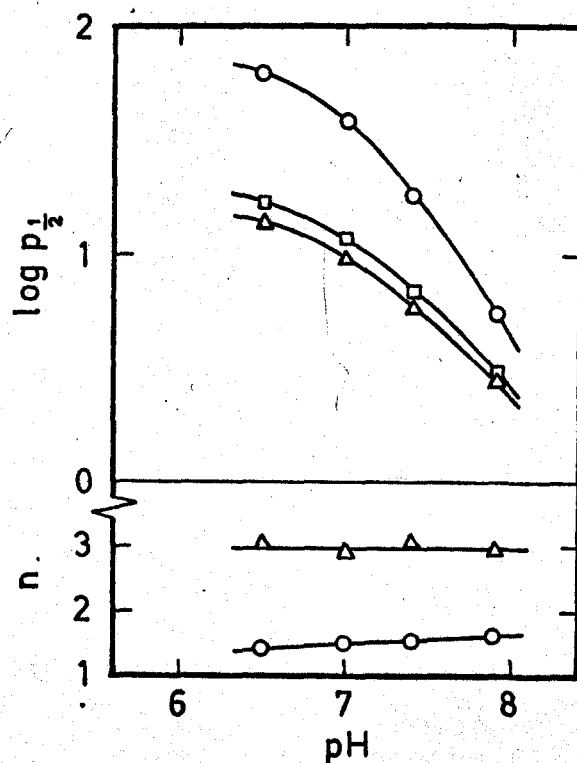


図 20. Hb M Milwaukee I (——) と Hb A (---) の酸素平衡曲線。各曲線に対して左から右へ順番にそれぞれ pH 7.9, 7.4, 7.0, 6.5。ヘモグロビン濃度, $6 \times 10^{-5} M$; 溶媒, 0.1 M リン酸緩衝液; 温度, $20^{\circ}C$ 。

図 21. Hb M Milwaukee I と Hb A の酸素平衡特性。○—○, Hb M Milwaukee I; △—△, Hb A; □—□, Hb M Milwaukee I を含む全溶血液。 $p_{1/2}$, 50% 酸素飽和度を達するのに要する酸素分圧 (mmHg)。 n , Hill の定数 (I. 方法参照)。実験条件は図 20 と同様。



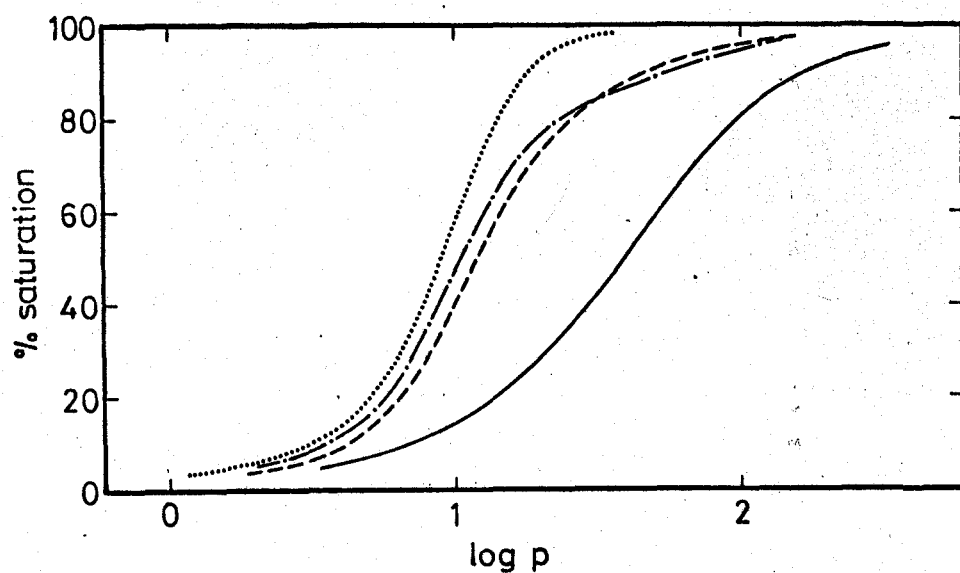


図 22. Hb M Milwaukee I (—), Hb A (·····) および Hb M Milwaukee I を含む全溶血液 (---) の酸素平衡曲線。 —·— は全溶血液が 39% の Hb M Milwaukee I を含むという事実のもとに, Hb M Milwaukee I と Hb A の曲線から合成した曲線。ヘモグロビン濃度, 6×10^{-5} M; 溶媒, 0.1 M リン酸緩衝液; pH, 7.0; 温度, 20°C。

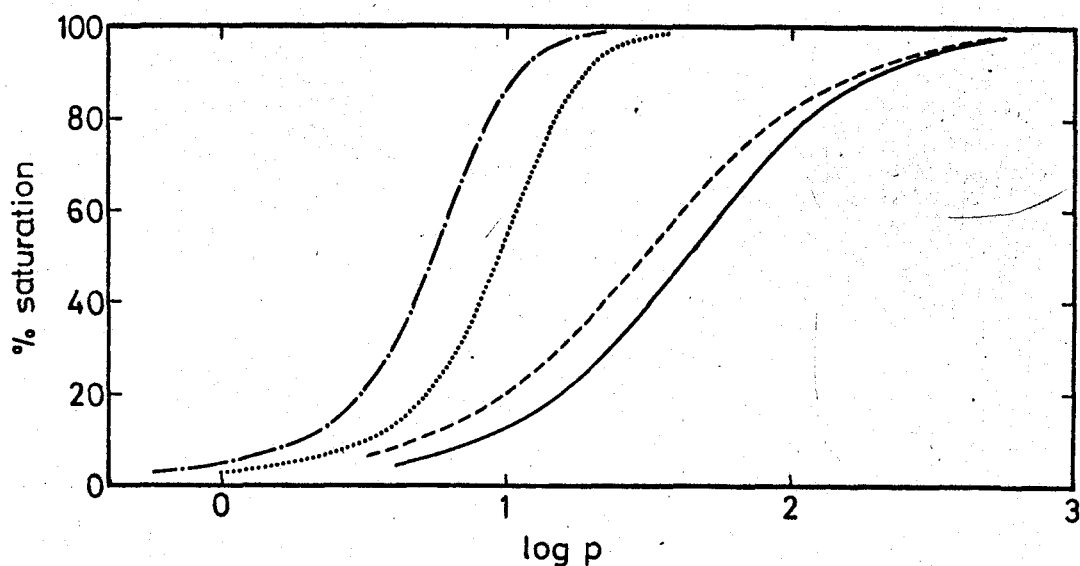


図 23. Hb M Milwaukee I と Hb A の酸素平衡曲線の温度依存性。 — と --- はそれぞれ Hb M Milwaukee I の 20°C と 10°C における曲線。 ····· と —·— はそれぞれ Hb A の 20°C と 10°C における曲線。他の実験条件は図 22 の場合と同様。

図 24. Hb A の微視的平衡定数の pH 依存性。縦方向の棒は酸素平衡曲線の測定誤差に由来する平衡定数の標準誤差を表わす。ヘモグロビン濃度、 $6 \times 10^{-5} \text{ M}$ ；溶媒、 0.1 M リン酸緩衝液；温度、 20°C 。

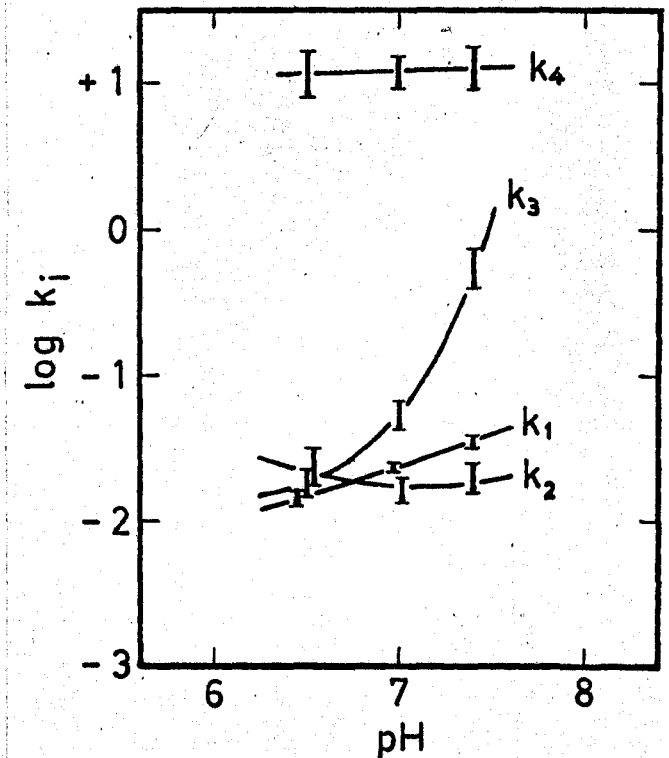
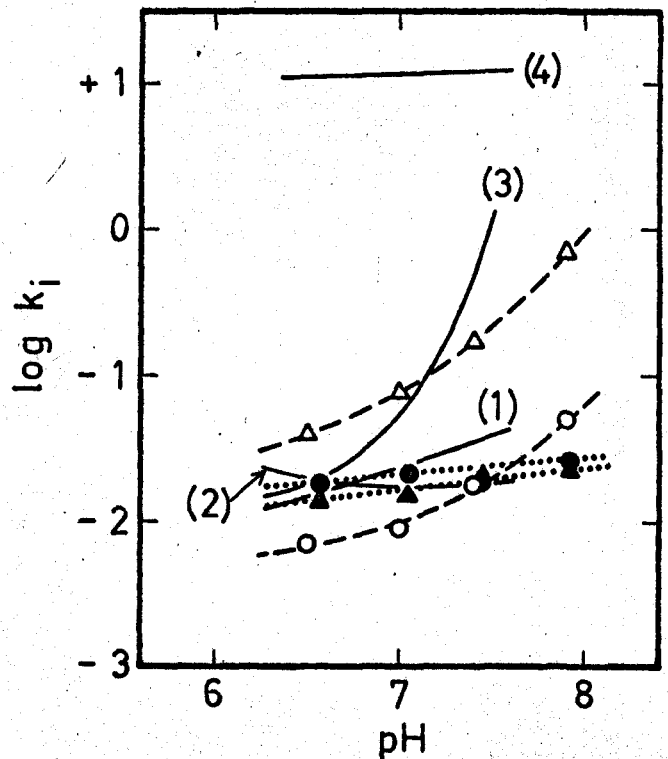


図 25. Hb A の微視的平衡定数 (1), k_1 ；(2), k_2 ；(3), k_3 ；(4), k_4) と比較した Hb M Boston および Hb M Milwaukee I の微視的平衡定数。●……● と ▲……▲ はそれぞれ Hb M Boston の k_1 および k_2 。○--○ と △--△ は Hb M Milwaukee I の k_1 および k_2 。実験条件は図 24 の場合と同様。



Hb concn. (%)	wave length (mμ)	730	680	600	576	564*	542	429*	409*	371*
		—	—	—	—	—	—	—	—	—
1		10.2	10.1	—	—	—	—	—	—	—
0.2		—	9.9	—	—	9.9	—	—	—	—
0.1		—	—	9.4	9.4	9.6	9.6	—	—	—
0.05		—	—	—	—	9.2	—	—	—	9.0
0.01		—	—	—	—	—	—	8.0	8.0	8.0

表1 酸素平衡曲線の測定波長に対する不変性。 表中の数字は50%飽和時の酸素分圧 $p_{\frac{1}{2}}$ (mmHg)。 曲線の他の部分も $p_{\frac{1}{2}}$ と同程度に一致した。 実験条件： 温度，20°C，pH 7.0； 溶媒，0.1 M リン酸緩衝液。 星印を付した波長は 迷光を防ぐために用いた干渉フィルターの透過光の波長に合わせて選んだ。

designation	replacement of amino acid residue	variability of residue	location of replacement site	oxygen affinity	Bohr effect	heme-heme interaction	experimental conditions	sample	abnormal fraction in hemolysate
Shimonoseki	54 α (E3) Gln \rightarrow Arg	V _p	ext		all normal		pH:6.0,6.6,7.2,7.5,7.9 temp.:20°	Hb	13%
Ube II	68 α (E17) Asn \rightarrow Asp	V	ext		all normal		pH:6.5,7.0,7.4 temp.:20°	WH	31%
Hikari	61 β (E5) Lys \rightarrow Asn	I	ext		all normal		pH:6.5,7.0,7.4,7.9 temp.:20°	Hb and WH	60%
Gifu	80 β (EF4) Asn \rightarrow Lys	V	ext		all normal		pH:6.5,7.4,7.0,7.8 temp.:20°	Hb	40%
Agenogi	90 β (F6) Glu \rightarrow Lys	I	ext	slightly low	normal	normal	pH:5.9,6.4,7.0,7.5,7.8 temp.:10°,20°	Hb and WH	42%
Hiroshima	143 β (H21) His \rightarrow Asp	I	ext	very high	decreased (r=-0.30)	decreased (n=2.0~2.6)	pH:6.0,6.5,7.0,7.4,7.8 temp.:10°,20°	Hb and WH	50%
M Boston	58 α (E7) His \rightarrow Tyr	I	heme	very low	very small (r=-0.14)	absent	pH:6.6,7.1,7.4,7.9 temp.:10°,20°	Hb and WH	26%
M Hyde Park	92 β (F8) His \rightarrow Tyr	I	heme	slightly high	slightly increased	decreased (n~2.3)	pH:6.5,7.0,7.4,7.9 temp.:20°	Hb and WH	21%
M Milwaukee I	67 β (E11) Val \rightarrow Glu	I	heme	very low	increased (r=-0.94)	decreased (n=1.4~1.6)	pH:6.5,7.0,7.4,7.9 temp.:10°,20°	Hb and WH	39%

表2 本研究で調べられた異常ヘモグロビンのアミノ酸置換と酸素平衡機能。
アミノ酸残基の変異性：アミノ酸配列が既知の哺乳動物のヘモグロビンの α 鎖または β 鎖同士を比較したとき、立体構造上つねに同一の残基で占められている場合はI (invariant), 特定の残基で占められていない場合はV (variable), 極性のアミノ酸に限られる場合はV_pとした。置換部位の位置：ヘムの近傍の場合を

heme, 分子表面で外向きの場合をextとした。rとnはそれぞれ Bohr 効果, ヘム間相互作用の強さ(本文参照)。試料：酸素平衡曲線と測定した試料が精製されたヘモグロビン溶液の場合はHb, 全溶血液の場合はWHとした。

pH		7.9	7.4	7.0	6.5
Hb A	n		2.89	2.98	2.91
	f_2		0.519	0.685	1.62
	f_3		15.9	2.24	1.25
	f_4		370	505	810
Hb M Boston	n	0.94	0.97	0.95	0.95
	f_2	0.808	1.06	0.749	0.805
Hb M Milwaukee I	n	1.63	1.53	1.50	1.40
	f_2	14.8	9.72	8.53	5.79

表3 Hillの定数と促進因子(本文参照)。

	Hb A		Hb M Boston		Hb M Milwaukee I	
	10°C	20°C	10°C	20°C	10°C	20°C
k_1 (mmHg ⁻¹)	0.0528±0.0076	0.0236±0.0018	0.0481±0.0029	0.0209±0.0013	0.0169±0.0010	0.00819±0.00049
k_2 (")	0.0666±0.0252	0.0162±0.0033	0.0302±0.0018	0.0157±0.0009	0.0680±0.0041	0.0705 ±0.0042
k_3 (")	0.293 ±0.155	0.0530±0.0149	_____	_____	_____	_____
k_4 (")	14.9 ±8.3	11.9 ±3.5	_____	_____	_____	_____
ΔH_1 (kcal/mol)	- 9.9± 2.7		-10.4±1.4		- 8.6±1.4	
ΔH_2 (")	-19.9± 7.1		- 7.5±1.4		+ 4.0±1.4	
ΔH_3 (")	-24.9± 9.9		_____		_____	
ΔH_4 (")	- 0.4±10.4		_____		_____	
$\overline{\Delta H}_1$ (")	-13.8± 4.1		- 9.0±1.0		- 84.6±1.0	
ΔS_1 (cal/deg.mol)	-15.0± 9.3		-15.2±4.8		-12.6±4.8	
ΔS_2 (")	-50.0±24.6		- 7.4±4.8		+34.6±4.8	
ΔS_3 (")	-64.4±34.2		_____		_____	
ΔS_4 (")	+30.0±36.0		_____		_____	
$\overline{\Delta S}_1$ (")	-24.9±14.0		-11.3±3.4		+11.0±3.4	

表4 微視的平衡定数と反応熱 および エントロピー変化

表5 機能的二量体ヘモグロビンの酸素平衡特性

酸素化可能な サブユニット	ヘモグロビン	表 現	酸 素 平 衡 特 性		
			親 和 性	Bohr 効果	n 値
α 鎖	Hb M Saskatoon	$\alpha_2^{\text{Fe(II)}-\text{O}_2} \beta_2^{\text{Fe(III)}-\text{Tyr(E7)}}$	ほぼ正常	やや大きい	1.2
	Hb M Hyde Park	$\alpha_2^{\text{Fe(II)}-\text{O}_2} \beta_2^{\text{Fe(III)}-\text{Tyr(F8)}}$	高 い	やや大きい	2.3
	Hb M Milwaukee I	$\alpha_2^{\text{Fe(II)}-\text{O}_2} \beta_2^{\text{Fe(III)}-\text{Glu(E11)}}$	非常に低い	大 き い	1.4~1.6
	valency hybrid	$\alpha_2^{\text{Fe(II)}-\text{O}_2} \beta_2^{\text{Fe(III)}-\text{H}_2\text{O}}$	非常に高い	大 き い	1.1
β 鎖	Hb M Boston	$\alpha_2^{\text{Fe(III)}-\text{Tyr(E7)}} \beta_2^{\text{Fe(II)}-\text{O}_2}$	非常に低い	極めて小さい	1.0
	Hb M Iwate	$\alpha_2^{\text{Fe(III)}-\text{Tyr(F8)}} \beta_2^{\text{Fe(II)}-\text{O}_2}$	非常に低い	な し	1.0
	valency hybrid	$\alpha_2^{\text{Fe(III)}-\text{H}_2\text{O}} \beta_2^{\text{Fe(II)}-\text{O}_2}$	非常に高い	小 さ い	1.3

付録Ⅰ 表1 異常ヘモグロビンとその酸素結合力

名 称	アミノ酸置換						酸素結合力 ^{*3}			備 考 ^{*4}	参考文献 ^{*5}	名 称	アミノ酸置換						酸素結合力 ^{*3}			備 考 ^{*4}	参考文献 ^{*5}																																							
	異常鎖	通し番号 の位置	立体構造 上の位置	位置の*1 特 徴	変異性*2 置 換		親和性	Bohr効果	S字性				異常鎖	通し番号 の位置	立体構造 上の位置	位置の*1 特 徴	変異性*2 置 換		親和性	Bohr効果	S字性																																									
J Toronto	α	5	A3	ext	V	Ala→Asp	正 常	正 常	WH	10	K Ibadan	β	46	CD5	ext	I	Gly→Glu	正 常	正 常	正 常	Hb	23																																								
J Paris	α	12	A10	ext	V	Ala→Asp					G Copenhagen	β	47	CD6	ext	Vp	Asp→Asn						正 常	正 常	正 常	Hb	11																																			
J Oxford	α	15	A13	ext	V	Gly→Asp					J Bangkok	β	56	D7	ext	V	Gly→Asp											ほぼ正常	やや大	1.2	Hb. β 鎖は酸化型. 紫藍症 不安定	24																														
I	α	16	A14	ext	?	Lys→Glu					Dhofar	β	58	E2	ext	Vn	Pro→Arg																高 い	やや大	～1.5	WB. 酸化し易い. 沈殿しやすい Hb. β 鎖は酸化型. 紫藍症	25																									
J Medellin	α	22	B3	ext	V	Gly→Asp					Hikari	β	61	E5	ext	I	Lys→Asn																					非常に低い	やや大	～1.5	不安定. 溶血性貧血. 酸化しやすい	26																				
Memphis	α	23	B4	ext	V	Glu→Gln					N Seattle	β	61	E5	ext	I	Lys→Glu																										低 い	正 常	正 常	Hb	27															
G Audhali	α	23	B4	ext	V	Glu→Val					M Saskatoon	β	63	E7	heme	I	His→Tyr																															正 常	正 常	正 常	Hb	11										
Chad	α	23	B4	ext	V	Glu→Lys					Zürich	β	63	E7	heme	I	His→Arg																																				非常に高い	なし	なし	不安定. 溶血性貧血. 酸化しやすい β 鎖からヘムが欠如. 溶血性貧血	28					
G Chinese	α	30	B11	$\alpha_1\beta_1$	I	Glu→Gln					M Milwaukee I	β	67	E11	heme	I	Val→Glu																																									高 い	ほぼ正常	～2.3	Hb. β 鎖は酸化型. 紫藍症. 不安定	29
Torino	α	43	CD1	heme	I	Phe→Val					Sydney	β	67	E11	heme	I	Val→Ala																																													
L Ferrara	α	47	CD5	ext	I	Asp→Gly	J Cambridge	β	69	E13	ext	V	Gly→Asp	非常に高い	正 常	1.1	WH. 多血症	31																																												
Hasharon	α	47	CD5	ext	I	Asp→His	G Korle-Bu	β	73	E17	ext	V	Asp→Asn						非常に低い	存在する	1.3	Hb. 不安定. 酸化し易い. 紫藍症	32																																							
J Sardegna	α	50	CD8	ext	I	His→Asp	Seattle	β	76	E20	?	V	Ala→Glu											非常に高い	正 常	1.0	Hb. 多血症	30																																		
Russ	α	51	CD9	ext	I	Gly→Arg	J Iran	β	77	EF1	ext	Vp	His→Asp																非常に高い	正 常	1.1	WH. 多血症	31																													
Shimonoseki	α	54	E3	ext	Vp	Gln→Arg	G Accra	β	79	EF3	ext	I	Asp→Asn																					非常に低い	存在する	1.3	Hb. 不安定. 酸化し易い. 紫藍症	32																								
Mexico	α	54	E3	ext	Vp	Gln→Glu	D Ibadan	β	80	EF4	ext	V	Asn→Lys																										非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																			
Norfolk	α	57	E6	ext	V	Gly→Asp	Borås	β	87	F3	ext	V	Thr→Lys																															非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34														
M Boston	α	58	E7	heme	I	His→Tyr	Santa Ana	β	88	F4	heme	I	Leu→Arg																																				非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34									
Ube II	α	68	E17	ext	V	Asn→Asp	Santa Ana	β	88	F4	heme	I	Leu→Pro																																									非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34				
G Philadelphia	α	68	E17	ext	V	Asn→Lys	Gun Hill	β	90	F6	ext	I	Glu→Lys																																														非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性
Stanleyville II	α	78	EF7	ext	V	Asn→Lys	Sabine	β	91	F7	?	?	Leu→Pro	非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																												
Ann Arbor	α	80	F1	?	?	Leu→Arg	M Hyde Park	β	92	F8	heme	I	His→Tyr						非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																							
Etobicoke	α	84	F5	gen	I	Ser→Arg	Oak Ridge	β	94	FG1	ext	?	Asp→Asn											非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																		
G Norfolk	α	85	F6	ext	Vp	Asp→Asn	N Baltimore	β	95	FG2	ext	V	Lys→Glu																非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																													
M Iwate	α	87	F8	heme	I	His→Tyr	Köln	β	98	FG5	heme	I	Val→Met																					非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																								
Broussais	α	90	FG2	ext	I	Lys→Asn	Yakima	β	99	G1	$\alpha_1\beta_2$	I	Asp→His																										非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																			
Chesapeake	α	92	FG4	$\alpha_1\beta_2$	I	Arg→Leu	Kempsey	β	99	G1	$\alpha_1\beta_2$	I	Asp→Asn																															非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34														
J Cape Town	α	92	FG4	$\alpha_1\beta_2$	I	Arg→Gln	Kansas	β	102	G4	{heme $\alpha_1\beta_2$ }	I	Asn→Thr																																				非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34									
Manitoba	α	102	G9	gen	I	Ser→Arg	New York	β	113	G15	$\alpha_1\beta_1$	I	Val→Glu																																									非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34				
Dakar	α	112	G19	ext	I	His→Gln	Hijiyama	β	120	GH3	ext	Vp	Lys→Glu																																														非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性
Chiapas	α	114	GH2	$\alpha_1\beta_1$	I	Pro→Arg	O Arab	β	121	GH4	ext	V	Glu→Lys	非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																												
J Tongariki	α	115	GH3	ext	V	Ala→Asp	D Punjab	β	121	GH4	ext	V	Glu→Gln						非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																							
O Indonesia	α	116	GH4	ext	Vp	Glu→Lys	Khartoum	β	124	H2	$\alpha_1\beta_1$?	Pro→Arg											非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																		
Bibba	α	136	H19	heme	I	Leu→Pro	Hofu	β	126	H4	ext	Vn	Val→Glu																非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																													
Singapore	α	141	HC3	?	V	Arg→Pro	Wien	β	130	H8	gen	Vn	Tyr→Asp																					非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																								
Koellicker	α	141	HC3	?	V	Arg→欠損	K Woolwich	β	132	H10	$\beta_1\beta_2$	I	Lys→Glu																										非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																			
Tokuchi	β	2	NA2	gen	V	His→Tyr	Hope	β	136	H14	gen	I	Gly→Asp																															非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34														
S	β	6	A3	ext	V	Glu→Val	Hiroshima	β	143	H21	ext	?	His→Asp																																				非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34									
C	β	6	A3	ext	V	Glu→Lys	Rainier	β	145	HC2	gen	I	Tyr→His																																									非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34				
Leiden	β	6 or 7	A3or4	ext	V	Glu→欠損	F Texas I	γ	5	A2	ext	V	Glu→Lys																																														非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性
C Harlem	β	6	A3	ext	V	Glu→Val	F Texas II	γ	6	A3	ext	V	Glu→Lys	非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																												
Siriraj	β	73	E17	ext	V	Asp→Asn	F Alexandra	γ	12	A9	ext	V	Thr→Lys						非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																							
G San Jose	β	7	A4	ext	V	Glu→Lys	F Hull	γ	121	GH4	ext	V	Glu→Lys											非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																		
Porto Alegre	β	9	A6	ext	V	Ser→Cys	A ₂ Sphakia	δ	2	NA2	ext	V	His→Arg																非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																													
Sogn	β	14	A11	gen	Vn	Leu→Arg	A' ₂	δ	16	A13	ext	V	Gly→Arg																					非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																								
J Baltimore	β	16	A13	ext	V	Gly→Asp	A ₂ Flatbush	δ	22	B4	ext	V	Ala→Glu																										非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																			
D Bushman	β	16	A13	ext	V	Gly→Arg	A ₂ Babinga	δ	136	H14	ext	I	Gly→Asp																															非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34														
G Coushatta	β	22	B4	ext	V	Glu→Ala	H																																										非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34									
E Saskatoon	β	22	B4	ext	V	Glu→Lys	Bart's																																															非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34				
Freiburg	β	23	B5	gen	Vn	Val→欠損	Lepore																																																				非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性
Riverdale-Bronx	β	24	B6	gen	I	Gly→Arg								非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																												
G Taiwan-Ami	β	25	B7	ext	Vn	Gly→Arg													非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																							
E	β	26	B8	$\alpha_1\beta_1$	I	Glu→Lys																		非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																																		
Genova	β	28	B10	gen	I	Leu→Pro																							非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																													
Tacoma	β	30	B12	$\alpha_1\beta_1$	I	Arg→Ser																												非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																								
Philly	β	35	C1	$\alpha_1\beta_1$	I	Tyr→Phe																																	非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34																			
Hammersmith	β	42	CD1	heme	I	Phe→Ser																																						非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34														
G Galveston	β	43	CD2	ext	Vp	Glu→Ala																																											非常に高い	正 常	1.2	WB. 多血症. アルカリ耐性	34									

*1 アミノ酸置換のおこる位置がヘムの周囲である場合は heme, サブユニットとサブユニットとの境界面にある場合は $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_1\beta_2$, $\beta_1\beta_2$ など, その他分子内部または表面の陥入部などにあって分子内結合に関係するような場合は gen (general), 分子の表面にあって外向きの場合は ext (external) などと区別してある.

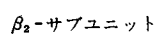
*2 1次構造が明らかにされた哺乳動物のヘモグロビンの α 鎖同士または β 鎖同士を比較したとき, 立体構造上つねに同一のアミノ酸で占められる位置を I (invariant), 特定のアミノ酸で占められていない位置を V(variable), variable な場合でも極性のアミノ酸にかぎられる場合は

Vp, 非極性のアミノ酸にかぎられる場合は Vn として区別してある.

*3 正常な成人のヘモグロビン (Hb A) を比較の対象としている. 親和性は P_{50} が 2 倍以上異なる場合に “非常に” という用語を用いてあるが, 概念的である. S 字性はヘム間相互作用の強さで, 可能な場合には Hill の定数 n で示してある.

*4 酸素結合力を測定した試料が全血の場合は WB, 全溶血液の場合は WH, 分離された Hb 溶液の場合は Hb としてある.

*5 酸素結合力に関する文献を中心にあげた.

β_1 -サブユニット~~図2~~ ウマ・オキシヘモグロビンの1次構造と分子内結

合
この説明の個所にもう1個のサブユニット (α_2) が存在するが、分子の対称性を考慮して省略してある。ヘプタド鎖は1次構造のみをあらわし、立体構造はあらわしていない。太い部分はらせん構造、細い部分は非らせん構造の部分を意味する。円形はヘムである。残基と残基またはヘムとをむすぶ直線は分子内結合(本文参照)をあらわす。実線は非極性の、破線は極性の結合である。図に示したほかに、 α_1 の HC2 (Tyr) と β_2 の C2 (Pro) および C3 (Trp) とのあいだに非極性結合が存在する。 α_1 と α_2 および β_1 と β_2 のあいだにはいくつかの極性結合が存在すると考えられているが、明らかにではない。ヒト・ヘモグロビンの1次構造はウマ・ヘモグロビンのそれとやや異なるが、分子内結合に関係するような重要な残基はほぼ同じと考えてよい。この図は文献1~3)を参考にして筆者が構成したものである。

BBA 35514

AUTHOR

STUDIES ON THE FUNCTION OF ABNORMAL HEMOGLOBINS

I. AN IMPROVED METHOD FOR AUTOMATIC MEASUREMENT OF THE
OXYGEN EQUILIBRIUM CURVE OF HEMOGLOBIN

KIYOHICO IMAI, HIDEKI MORIMOTO, MASAO KOTANI, HIROSHI WATARI*, WAKA
HIRATA** AND MASAO KURODA***

*Laboratory of Biophysics, Faculty of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka
(Japan) and *Department of Physicochemical Physiology, Osaka University Medical School, Osaka
(Japan)*

(Received November 3rd, 1969)

SUMMARY

An apparatus with which the continuous oxygen equilibrium curve of hemoglobin can be recorded automatically was constructed and its performance was examined. The oxygen pressure in the hemoglobin solution and the degree of saturation of the hemoglobin with oxygen are determined by means of a Clark's oxygen electrode and by spectrophotometry, respectively. The deoxygenation of oxyhemoglobin is attained by introducing nitrogen gas into the reaction cell after about 90 min and the reoxygenation of deoxyhemoglobin by introducing air. The deoxygenation curve coincided well with the successive oxygenation curve of the same sample. The curves measured using monochromatic lights of various wavelengths in the visible range coincided well with each other, in so far as the measurements were done under the same conditions. This method is applicable to hemoglobin solutions of concentrations of 0.01-2%. The curve is reproduced very well if the experiments are carried out under the same conditions and within several days. This reproducibility, however, becomes worse when the experiments are carried out over a longer period. The standard error of the fractional saturation for the curves which have been measured over the past one year depends on the position on the curve and is a maximum, about 2%, near the point of half saturation. This apparatus can furnish us with easy, speedy and accurate means to measure the oxygen equilibrium curve and can facilitate the observation of fine structures of the curve. This method is suitable for studies on the function of abnormal hemoglobins.

Please send corrections
by return of mail

② Present address: Department of Metabolism, Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.

*** Present address: Biomedical Research Center, Osaka University Medical School, Osaka, Japan.

* The wavelengths with asterisks were selected by the fitting of certain interference filters which were used in order to eliminate stray light.

put to the slip 3

INTRODUCTION

The comparative studies of the properties of many kinds of hemoglobins (chemically modified hemoglobins, abnormal hemoglobins, hemoglobins from various kinds of animals, *etc.*) afford very important and concrete information about the relationship between the structure and function of hemoglobin. Recently over one hundred kinds of abnormal hemoglobins have been discovered¹ and extensive screening programmes of human hemoglobin all over the ^{world} will afford new variants at an increasing rate. In order to study the functions of a number of abnormal hemoglobins, we require an easy and speedy method for measurement of the oxygen equilibrium curve of hemoglobin. Recently we have constructed an apparatus suited to such a measurement and the result is reported in this paper. This apparatus has already been applied to studies of several kinds of abnormal hemoglobins. Some of the data have already been published^{2,3} and the remaining data will be reported in the succeeding paper⁴.

APPARATUS AND ITS OPERATION

Apparatus

The principle of our apparatus and the detailed structure of the reaction cell are shown in Fig. 1 and Fig. 2, respectively. The percentage saturation of hemoglobin with oxygen is determined from the change in absorbance of monochromatic light of a certain wavelength and the oxygen partial pressure is determined by means of a Clark's oxygen electrode (39065 polarographic oxygen sensor, Beckman) directly soaked in the hemoglobin solution. The light path of the cell is 28 mm. The proper volume of the sample is 6 ml. The temperature of the sample is measured by the thermister and can be controlled at a desired temperature from 0 to 40° by thermomdules. It can be maintained within the variation of $\pm 0.1^\circ$ during measurements. The spectrophotometer used is 139 UV-VIS spectrophotometer, Hitachi-Perkin

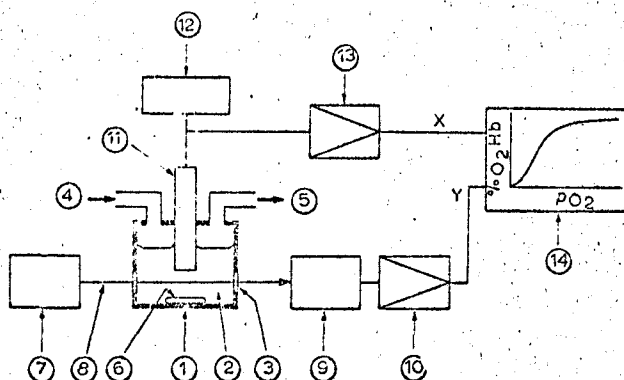


Fig. 1. The diagram showing the principle of automatic measurement of oxygen equilibrium curve of hemoglobin. 1, reaction cell; 2, hemoglobin solution; 3, window through which the light passes; 4, inlet of nitrogen or air; 5, outlet of gas; 6, stirrer rod; 7, light source and monochromator; 8, monochromatic light; 9, photomultiplier; 10, amplifier for photomultiplier output; 11, oxygen electrode; 12, d.c. power supply; 13, amplifier for oxygen electrode current; 14, X-Y recorder.

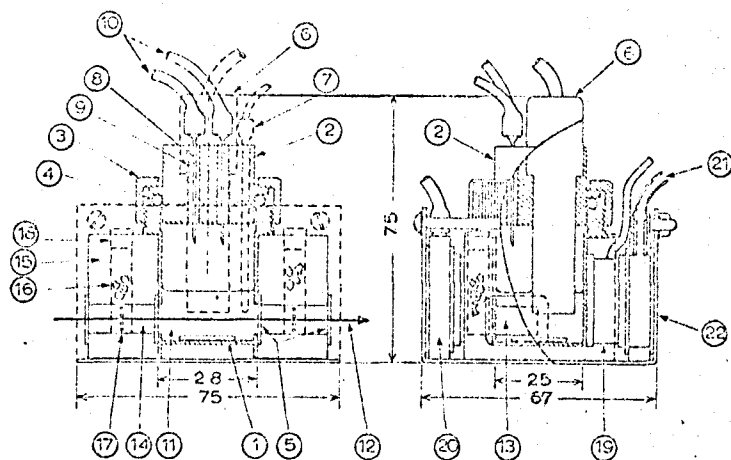


Fig. 2. The structure of the reaction cell assembly. The left and the right are the sectional side view and the front view partially in section, respectively: 1, reaction cell; 2, lid; 3, nut to fix the lid to the cell; 4, rubber O-ring to keep the inside of the cell air-tight; 5, quartz plates; 6, oxygen electrode; 7, thermister probe; 8, shringe needles through which gas draws into or out of the cell; 9, rubber packings; 10, rubber tubes to lead gas; 11, hemoglobin solution; 12, monochromatic light; 13, window through which the light penetrates; 14, dry compartment; 15, block of acrylic plastic; 16, silica gel grain; 17, pores connecting the silica gel rooms to the dry compartments; 18, rubber cap of silica gel room; 19, thermomodule; 20, water jacket to cool the thermomodule; 21, rubber tube to lead the water; 22, frame to hold the whole assembly. The shaded areas represent the parts made of stainless steel. The light path through the cell is 28 mm. The capacity of the cell is about 20 ml. The proper volume of the sample is 6 ml. The dry compartments prevent surface of the windows of water drop formation when the temperature of the sample is below dew point.

Elmer. The amplifier for the oxygen electrode current is AM2001 micro voltmeter, Okura Electric Co.

Calibration of oxygen electrode

The oxygen electrode used for the apparatus was calibrated by measuring the oxygen partial pressure of gas equilibrated with the solution by means of a Haldane's gas analyzer. The output of the microvoltmeter attached to the oxygen electrode depended linearly on the oxygen partial pressure, as shown in Fig. 3. Usually the sensitivity of the microvoltmeter is adjusted regarding the solution equilibrated with air as the standard. In this case the oxygen partial pressure in the air is assumed to be $(760 - q) \cdot 0.209$ mm Hg where q is the saturated vapor pressure of water at the ambient temperature.

The selection of monochromatic light for determination of percentage saturation of hemoglobin with oxygen

We measured oxygen equilibrium curves of hemoglobin using various wavelengths: 730, 680, 600, 576, 564*, 542, 429*, 409*, and 371* mμ. The oxygen affinity became slightly higher as the hemoglobin concentration decreased, but the oxygen equilibrium curve for a certain wavelength coincided well with that for another wavelength when they were measured under the same experimental conditions (see Table I). Therefore we can select a suitable wavelength in accordance with the

TABLE I

INVARIANCE OF OXYGEN EQUILIBRIUM CURVE TO WAVELENGTH OF MONOCHROMATIC LIGHT USED FOR MEASUREMENT

The values in the table are p_1 in mm Hg, the oxygen pressure at half saturation of hemoglobin with oxygen. Temp., 20°; pH 7.0; in 0.1 M phosphate buffer. The wavelengths with asterisk were chosen by fitting to those of the filters instead of the characteristic wave lengths of oxy- or deoxy- hemoglobin, such as 560, 430, 415 and 375 mμ (confer the footnote). The other parts of the curves than that at half saturation coincided also with each other as well as p_1 . At 730 mμ the curve can be measured for hemoglobin up to a concentration of 2%.

Hb concn. (%)	λ (mμ):	p_1								
		730	680	600	576	564*	542	429*	409*	371*
1		10.2	10.1	—	—	—	—	—	—	—
0.2		—	9.9	—	—	9.9	—	—	—	—
0.1		—	—	9.4	9.4	9.6	9.6	—	—	—
0.05		—	—	—	—	9.2	—	—	—	9.0
0.01		—	—	—	—	—	—	8.0	8.0	8.0

extent of absorbance change induced by oxygenation, which depends on the hemoglobin concentration. Our apparatus can work adequately for hemoglobin of concentrations of 0.01–2%. It must be mentioned here that for the abnormal Hb M Hyde Park a discrepancy among the oxygen equilibrium curves determined at various wavelengths was observed² and that it would be possible that similar cases may be found in other hemoglobins than the normal hemoglobin.

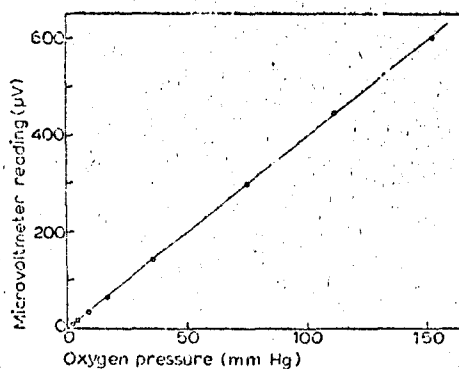


Fig. 3. The calibration curve of the oxygen electrode. Ordinate, the reading of the microvoltmeter which amplifies the oxygen electrode current; abscissa, oxygen pressure determined with Haldane's gas analyzer.

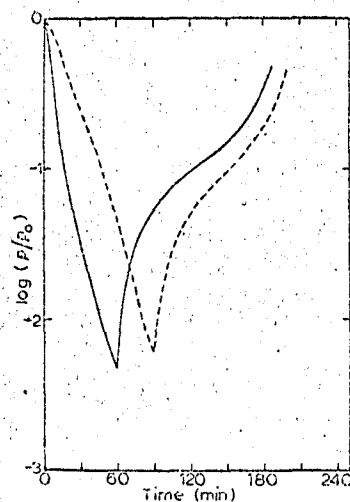


Fig. 4. The rate of change of the oxygen pressure during deoxygenation and successive oxygenation of hemoglobin. Ordinate, $\log(p/p_0)$ where p_0 and p are the oxygen partial pressure at start (equals to that in atmosphere) and at every moment, respectively. Concentration of hemoglobin, 0.1%; temp., 20° and pH 7.0 in 0.1 M phosphate buffer. —, deoxygenation was done as quickly as possible; ---, deoxygenation was done purposefully slowly in order to make the oxygen electrode detect the oxygen pressure change. In both cases the reoxygenation rate was decreased intentionally, but it can be increased, if necessary, to the same rate as in deoxygenation.

Deoxygenation and oxygenation procedure

In order to deoxygenate the oxygenated hemoglobin solution, we substituted the air of the gas phase in the cell by nitrogen gas, with gentle stirring of the hemoglobin solution by a magnetic stirrer. Similarly, we substituted the nitrogen gas by air at an appropriate rate in order to reoxygenate the deoxygenated hemoglobin. It takes about an hour to deoxygenate the oxyhemoglobin solution, but this is too fast for accurate determination of oxygen equilibrium curve compared with the slow response of the oxygen electrode. In such a case, if one measured a deoxygenation curve and the succeeding reoxygenation curve for an identical sample, the latter was usually shifted to the left of the former along the abscissa by about 10% of each value of oxygen pressure in the whole curve. In order to obtain an accurate deoxygenation curve, we set a flask of 100 ml filled with air before the gas inlet of the reaction cell and introduced the nitrogen gas at the rate of about 10 ml/min in order to decrease the deoxygenation rate. It then takes about 90 min to attain deoxygenation but the successive oxygenation curve coincides well with the deoxygenation curve. In Fig. 4 examples for deoxygenation and successive oxygenation rate are shown for both the cases where the deoxygenation and successive oxygenation curves coincided and did not coincide with each other. It is undoubted that the system in the liquid phase is at equilibrium at all times because of the high reaction rate of hemoglobin with dissolved oxygen and rapid stirring of the solution. The determination speed is limited by the low diffusion rate of gas between the gas and liquid phases at the end of the curve and by the slow response of the oxygen electrode.

MATERIALS

The blood of one of the authors, who is a non-smoker, collected in acid-citrate-dextrose solution was washed 5 times with 0.85% NaCl and the red cells were hemolyzed by addition of 1.5 vol. of de-ionized water and 0.5 vol. of toluene, followed by centrifugation. 2,3-Diphosphoglycerate-free hemoglobin was prepared according to the method of BENESCH *et al.*⁵ mentioned previously. Myoglobin was extracted from sperm whale muscle and purified according to the method of KENDREW AND PARRISH⁶. A red cell suspension was obtained by diluting fresh human blood with 150 vol. of isotonic buffer (0.15 M Na_2HPO_4 + 0.15 M KH_2PO_4). The protein concentration of the sample was determined by spectrophotometry after conversion to pyridine hemochromogen⁷.

RESULTS

Reproducibility of oxygen equilibrium curve and reliability of the apparatus

The curve recorded on the X-Y recorder chart had no significant noise and an example is shown in Fig. 5. The curve was reproduced very well if the experiment was carried out in the same conditions and within several days. But it is usual that the reproducibility becomes worse when the experiment continues to be carried on for longer period. In Fig. 6, the reproducibility of all the oxygen equilibrium curves of hemoglobin which have been measured over the past one year in certain conditions is shown with respect to the fractional saturation. The standard error of the determined fractional saturation was maximum, about 2%, near the half saturation, but

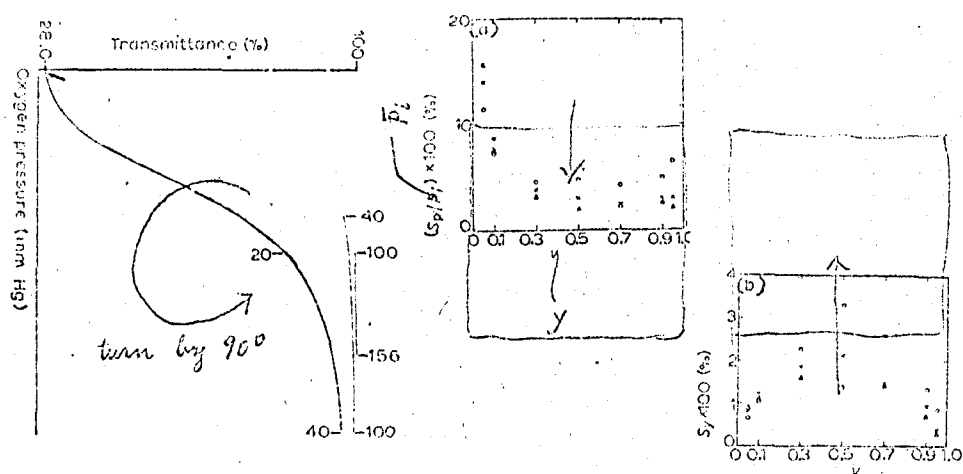


Fig. 5. Oxygen equilibrium curve of the hemoglobin drawn on the recorder chart. Hemoglobin concentration, 0.1% in 0.1 M phosphate; pH 6.8; temp., 20°. The curve was drawn from the right-hand to the left-hand. An arrow at the end of the curve represents the extrapolation of the curve to the origin. Ordinate is the transmittance change, to which the output of the spectrophotometer is proportional. The absorbance change and subsequently the percentage saturation are calculated from the transmittance change. The numbers added to the curve represent the oxygen pressure in mm Hg.

Fig. 6. Reproducibility of the oxygen equilibrium curve of hemoglobin. The curves measured over about one year were used for the estimation of reproducibility. Experimental condition: hemoglobin concentration, 0.1% in 0.1 M phosphate buffer; temp., 20°. O, pH 7.4; Δ, pH 7.0; ×, pH 6.5. The numbers of curves used are 8, 8 and 7 for pH 7.4, 7.0 and 6.5, respectively. (a) Relative standard error of oxygen pressure, S_p/\bar{p}_i , against fractional saturation, y . S_p is defined by $S_p = \sqrt{(\sum(p_i - \bar{p}_i)^2)/(n-1)}$ where p_i is the oxygen pressure at a certain value of y on the i -th curve and \bar{p}_i is the average of n values of p_i and n is the number of the curves; the summation is performed in terms of i from 1 to n . (b) Standard error of fractional saturation, S_y , against y . S_y is defined by $S_y = \sqrt{(\sum(y_i - \bar{y}_i)^2)/(n-1)}$ where y_i is the fractional saturation at \bar{p}_i on the i -th curve and \bar{y}_i is the average of n values of y_i and the other matters follow (a).

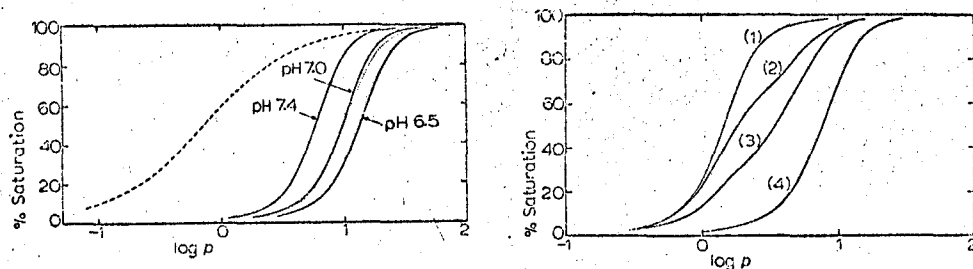


Fig. 7. The oxygen equilibrium curves of human hemoglobin, red cell suspension and sperm whale myoglobin. Abscissa, $\log p$ where p is oxygen pressure in mm Hg. —, hemoglobin, concentration, 0.1% (60 μ M by heme); in 0.1 M phosphate buffer;, red cell suspension, in isotonic buffer (pH 7.4) of 150 times volume of blood; — — —, myoglobin, concentration 0.1%, in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.3). Each curve was measured at 20° using 564-m μ light.

Fig. 8. The oxygen equilibrium curves of human hemoglobin with 2,3-diphosphoglycerate added successively. (1) 2,3-diphosphoglycerate-free; (2) 0.5 mole of 2,3-diphosphoglycerate per 1.0 mole of Hb by tetramer; (3) 1.0 mole per 1.0 mole; (4) 10.0 mole per 1.0 mole. Concentration of hemoglobin, 0.1% (15 μ M by tetramer); in 0.01 M Tris-HCl buffer; pH 7.4; temperature, 20°; wavelength of monochromatic light, 564 m μ .

became smaller as the extent of saturation become increased or decreased. The relative standard error of the determined oxygen pressure was about 3% as a minimum. The methemoglobin formation during the measurement was checked from the optical spectrum curves of the sample before and after measurement. At higher pH, the formation was negligible but became larger at lower pH. For the normal hemoglobin it was always below 3% of the total hemoglobin when examined under the following conditions: hemoglobin concentration, 0.1%; in 0.1 M phosphate buffer (pH 6-8; temp. 20°). The formation rate increased as the hemoglobin concentration decreased but it was always below 5% even for the concentration of 0.01%.

Some data obtained by this apparatus

In Fig. 7 typical results measured by this apparatus for human hemoglobin, sperm whale myoglobin and red cell suspension are shown. Previously BENESCH *et al.*⁵ have shown that organic phosphate has a profound effect on the oxygen equilibrium curve of hemoglobin and the hemoglobin solution with 2,3-diphosphoglycerate added in insufficient quantity to saturate the hemoglobin fully, gives a biphasic oxygen equilibrium curve. We also examined the effect using 0.01 M Tris-HCl buffer and the results are shown in Fig. 8. In this result one of the distinct features of this apparatus is seen clearly in the fact that the fine structure of oxygen equilibrium curve is clearly observed by continuous recording.

DISCUSSION

Up to date oxygen equilibrium curves of hemoglobin have usually been measured by the method of spectrophotometry⁸⁻¹⁰ or gas analysis¹¹⁻¹³, which has been usually combined with manometric procedures. These methods, however, give us discrete points on the curve and it requires much trouble to determine many points on the curve in order to obtain an accurate curve. Formerly some attempts to obtain a continuous curve were made by some investigators^{14,15}. Their methods are, however, somewhat troublesome and choice of the measurement conditions is limited in a narrow range, while it is possible in our method to choose a comparatively wide variety of conditions such as hemoglobin concentration, environment, etc.

The oxygen equilibrium curves measured with our apparatus coincide well with other investigator's data¹⁶ measured by the spectrophotometrical method under the same conditions. The reproducibility of oxygen equilibrium curve is very good if the experiments are carried out within a short period. The measurement of oxygen equilibrium curve of abnormal hemoglobin is such a case and so the discussion on functional differences between normal and abnormal hemoglobins becomes reliable to that extent.

It is an advantage that we can obtain a continuous curve, as in this way the fine structure of the curve can be clearly observed. This was shown in the study on Hb Hiroshima³.

Now we may present the following advantageous features of the apparatus reported here: (1) This apparatus can furnish us with an easy, speedy and accurate means for the measurement of the oxygen equilibrium curve. (2) The experiment can be easily carried out over a comparatively wide variety of conditions. (3) The fine structure of the curve can be easily observed.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to express our gratitude to Prof. I. Tyuma and Dr. K. Shimizu for a generous supply of 2,3-diphosphoglycerate and for valuable discussion and to Dr. A. Hayashi and his collaborators for assistance in gas analysis and for valuable discussion.

REFERENCES

- 1 M. F. PERUTZ AND H. LEHMANN, *Nature*, 219 (1968) 902.
- 2 A. HAYASHI, T. SUZUKI, A. SHIMIZU, K. IMAI, H. MORIMOTO, T. MIYAJI AND S. SHIBATA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125 (1968) 895.
- 3 K. IMAI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 127 (1968) 543.
- 4 K. IMAI, H. MORIMOTO, M. KOTANI, S. SHIBATA, T. MIYAJI AND K. MATSUTOMO, *Biochim. Biophys. Acta*, ²⁷⁵ *fill up the volume and page numbers of the succeeding paper (BBA 355/5)*.
- 5 R. BENESCH, R. E. BENESCH AND C. I. YU, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 59 (1968) 526.
- 6 J. C. KENDREW AND R. G. PARRISH, *Proc. Roy. Soc. London Ser. A*, 238 (1956) 395.
- 7 K. G. PAUL, H. THEORELL AND A. ÅKESON, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 1284.
- 8 D. W. ALLEN, K. F. GUTHE AND J. WYMAN, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 393.
- 9 A. ROSSI-FANELLI AND E. ANTONINI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 77 (1958) 478.
- 10 R. BENESCH, G. MACDUFF AND R. E. BENESCH, *Anal. Biochem.*, 11 (1965) 81.
- 11 W. PAUL AND F. J. W. ROUGHTON, *J. Physiol. London*, 113 (1951) 23.
- 12 F. J. W. ROUGHTON, *J. Physiol. London*, 126 (1954) 359.
- 13 A. B. OTIS AND F. J. W. ROUGHTON, *Proc. Roy. Soc. London Ser. B*, 144 (1955) 55.
- 14 W. NIESEL AND G. THEWS, *Arch. Ges. Physiol.*, 273 (1961) 380.
- 15 C. H. COLMAN AND I. S. LONGMUIR, *J. Appl. Physiol.*, 18 (1963) 420.
- 16 B. SULLIVAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28 (1967) 407.

Author, please check these references very carefully, especially the data indicated.

Biochim. Biophys. Acta,

AUTHOR

Elsevier Publishing Company, 110-112 Spuistraat - Amsterdam C.

BIOCHIMICA et BIOPHYSICA ACTA

22-12-1969

slip 1-6

1st proof

IN ALL CORRESPONDENCE
CONCERNING THIS PAPER
REFER TO:

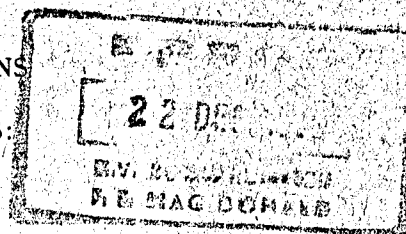
BBA 35515

BBA 35515

STUDIES ON THE FUNCTION OF ABNORMAL HEMOGLOBINS

II. OXYGEN EQUILIBRIUM OF ABNORMAL HEMOGLOBINS

SHIMONOSEKI, UBE II, HIKARI, GIFU, AND AGENOGI



KIYOHIO IMAI, HIDEKI MORIMOTO, MASAO KOTANI, SUSUMU SHIBATA*, TAKAO-KI MIYAJI* AND KEITEN MATSUTOMO**

Laboratory of Biophysics, Faculty of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka (Japan); *Third Department of Internal Medicine, Yamaguchi University Medical School, Ube (Japan); and **First Department of Internal Medicine, Gifu University Medical School, Gifu (Japan)

Gifu

(Received November 3rd, 1969)

SUMMARY

Oxygen equilibrium functions of abnormal hemoglobins discovered from Japanese families were studied. Hb Shimonoseki (E3 α , Gln \rightarrow Arg), Hb Ube II (E17 α , Asn \rightarrow Asp), Hb Hikari (E5 β , Lys \rightarrow Asn) and Hb Gifu (EF4 β , Asn \rightarrow Lys) have the same function as that of Hb A. These results further confirm the widely known fact that external residues generally do not have a very important role in the function of hemoglobin. Hb Agenogi (F6 β , Glu \rightarrow Lys), however, has a different function from that of Hb A: it has a slightly but obviously lower oxygen affinity than that of Hb A while the shape of the curves of the Bohr effect and the heme-heme interaction are normal. A plausible mechanism for the lower oxygen affinity is proposed from the viewpoint of altered surroundings of oxygen-linked acid groups which are brought about by an interaction between the groups and the newly introduced residue, lysine.

INTRODUCTION

curve

Hemoglobin is one of the model allosteric proteins¹ and its molecular mechanisms of oxygen-transport function suited to the physiological purposes have been studied by many investigators. Recently, on the one hand, detailed information on the structure of hemoglobin molecule at the atomic level has been obtained²⁻⁴ and on the other hand functional abnormalities of many variants of human hemoglobin have been studied, and so it has become possible that one can offer some explanation at the molecular level of the pathology of abnormal hemoglobin⁵. For more detailed studies on the relationships between structure and function of hemoglobin it would be very useful to investigate the function of other kinds of abnormal hemoglobins.

Recently we constructed an apparatus with which the continuous oxygen

35515 = I

Please send corrections
by return of mail

equilibrium curve of hemoglobin can be recorded automatically⁶ and applied it to studies of various kinds of abnormal hemoglobins discovered from Japanese families. Some of the data are already published^{7,8} and the remaining data are reported in this paper.

METHODS AND MATERIALS

Abnormal hemoglobins used for this study, which were discovered from Japanese families, are designated as Shimónoseki (E3 α , Gln \rightarrow Arg)⁹, Ube II (E17 α , Asn \rightarrow Asp)¹⁰, Hikari (E5 β , Lys \rightarrow Asn)¹¹, Gifu (EF4 β , Asn \rightarrow Lys)¹² and Agenogi (F6 β , Glu \rightarrow Lys)¹³.

Abnormal and normal (as control) fractions of hemoglobin were separated from the same hemolysate of carrier's blood by starch-block electrophoresis¹⁴ using Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.6). The purity of the samples was ascertained by agar-gel electrophoresis (pH 7.0). The protein concentration of the sample was determined by spectrophotometry after conversion to pyridine hemochromogen¹⁵.

Oxygen equilibrium curves were measured by the method reported in the preceding paper⁶. The wavelength of monochromatic light used for measurement was 564 m μ . No difference in methemoglobin formation rate between abnormal and normal hemoglobins was observed during experimental procedure as far as it was tested by spectroscopy.

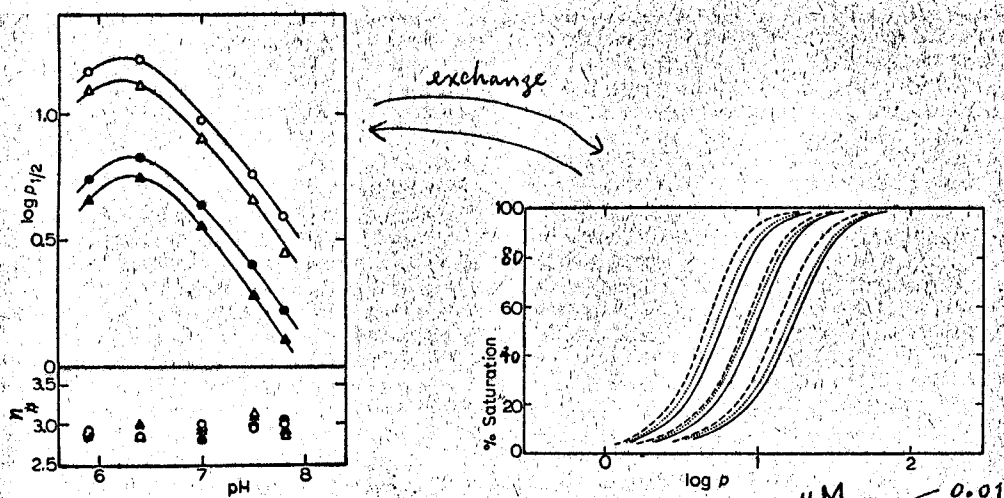


Fig. 1. Oxygen equilibrium curves of the separated fractions of Hb Agenogi and Hb A and the whole hemolysate containing Hb Agenogi. Hemoglobin concentration, 60 μM ; in 0.05 M phosphate buffer of 0.2 ionic strength adjusted by NaCl. p , oxygen pressure in mm Hg; —, Hb Agenogi; —, Hb A; ·····, whole hemolysate containing Hb Agenogi. From left to right for the sets of curves, pH 7.5, 7.0, and 6.4.

Fig. 2. Bohr effect and heme-heme interaction of Hb Agenogi. Experimental conditions are the same as described in Fig. 1. $p_{1/2}$, oxygen pressure in mm Hg required to attain the half saturation, n , the constant involved in the Hill's empirical equation. \circ and \bullet , Hb Agenogi at 20° and 10°, respectively; \triangle and \blacktriangle , Hb A at 20° and 10°, respectively.

TABLE I

COMPARISON OF THE OXYGEN EQUILIBRIUM FUNCTION OF THE ABNORMAL HEMOGLOBINS WITH THAT OF NORMAL HEMOGLOBIN
 The oxygen equilibrium curves were measured in the conditions: hemoglobin concentration, 60 μ M by heme; in 0.1 M phosphate buffer except those of Hb Agenogi which were measured using 0.01 M phosphate buffer of 0.2 ionic strength adjusted by NaCl. The signs for variability are accorded to ref. 5.

Designation	Replacement of amino acid residue	Variability of residue	Oxygen affinity	Bohr effect	Heme-heme interaction	Experimental conditions	Sample	Abnormal fraction in hemolysate (%)
Agenogi	90 β (F6) Glu \rightarrow Lys	I	Slightly low	Normal	Normal	pH: 5.9, 6.4, 7.0, 7.5, 7.8; temp.: 10°, 20°	Purified and hemolysate	42
Hikari	61 β (E5) Lys \rightarrow Asn	I	Normal	Normal	Normal	pH: 6.5, 7.0, 7.4, 7.9; temp.: 20°	Purified and hemolysate	60
Gifu	80 β (EF4) Asn \rightarrow Lys	V	Normal	Normal	Normal	pH: 6.5, 7.4; temp.: 20°	Purified	40
Shimonoseki	54 α (E3) Gln \rightarrow Arg	V _p	Normal	Normal	Normal	pH: 6.0, 6.6, 7.2, 7.5, 7.9; temp.: 20°	Purified	13
Ube II	68 γ (E17) Asn \rightarrow Asp	V	Normal	Normal	Normal	pH: 6.5, 7.0, 7.4; temp.: 20°	Hemolysate	31

RESULTS

The oxygen equilibrium functions of the five abnormal hemoglobins are summarized in Table I. Hb Agenogi had a slightly different function from that of Hb A, while the other four hemoglobins had the same function as Hb A: the oxygen equilibrium curves of them coincided with that of Hb A, within the error which was estimated from the reproducibility of the curve in the preceding paper (see Fig. 6 in the preceding paper).

Examples of the oxygen equilibrium curves of the separated fractions of Hb Agenogi and Hb A and the whole hemolysate containing Hb Agenogi are given in Fig. 1. In Fig. 2 the oxygen affinity in terms of p_1 , oxygen pressure required to attain the half saturation, and Hill's constant, n , a numerical measure of heme-heme interaction, are plotted against pH. Hb Agenogi had a slightly but obviously lower oxygen affinity than that of Hb A: p_1 of the former was about 1.3 times as large as that of the latter. This abnormal oxygen affinity of Hb Agenogi is probably a true property of this abnormal hemoglobin itself and is not an artificial property introduced by separation procedure because the oxygen equilibrium curve of the whole hemolysate containing Hb Agenogi is located between those of Hb Agenogi and Hb A. The shape of the curve of Bohr effect (dependency of $\log p_1$ on pH) and heme-heme interaction of Hb Agenogi were, however, normal in comparison with those of Hb A. The temperature dependency of the oxygen affinity of Hb Agenogi was also normal: p_1 increased by about 2.2 times when the temperature increased by 10° .

DISCUSSION

Neither clinical nor hematological abnormalities^{9-11,13} are associated with the abnormal hemoglobins studied here except Hb Gifu. This fact is consistent with the result that these hemoglobins have the same function as or similar one to that of normal hemoglobin. The carriers of Hb Gifu are accompanied with mild polycythemia¹². But it is uncertain whether or not this ~~anemia~~ ^{disease} is associated with the abnormal hemoglobin.

The functional normality of the four abnormal hemoglobins except Hb Agenogi is also consistent with the data from the study on the structure of the hemoglobin molecule on atomic level by X-ray analysis. In all these hemoglobins the replacement of residues occurs at the external site of the molecule³, and so it causes only the change of surface charge carried by the molecule and would not give any effect on the stability or conformational change of the molecule. The residues at E3 α and at E17 α , where the replacements occur for Hb Shimonoseki and Hb Ube II, respectively, are variable among mammalian hemoglobins and are also replaced in other variants: Hb Mexico (E3 α , Gln \rightarrow Glu)¹⁶ and Hb G Philadelphia (E17 α , Asn \rightarrow Lys)¹⁷ which give no clinical symptoms. Therefore the change of charge carried by the residue at E3 α or E17 α seems to exert no influence on the function of hemoglobin. The residue at E5 β is invariant among mammalian hemoglobins of known sequence but its replacement in Hb Hikari causes no functional abnormality. Furthermore no clinical symptom has been reported for the carrier of Hb N Seattle¹⁸ which has the replacement, Lys \rightarrow Glu, at the same site, E5 β , as Hb Hikari. For this site the same consideration as for the sites, E3 α and E17 α , seems to apply. Among a number of hemo-

globin variants discovered in the world up to date most of those do not have any functional abnormality. Some of those, however, show a markedly abnormal function. In these variants the replacement of the residue is usually located at the boundary of the sub-units or the surroundings of heme. The replacement of the residue either prevents the molecule from a normal conformation change during eoxygnation or impairs the stability of the molecule⁵. On the contrary variants which contain the replacement of external residue, among which most of variants are included, usually do not show any abnormalities, as also shown in this study. Our study further confirms that external residues generally do not have a very important role in the function of hemoglobin⁵.

Hb Agenogi has a slightly, but obviously different, function from that of Hb A. The site, F6 β , at which the replacement occurred is invariant among the mammalian hemoglobins of known sequence and so it may have some special role for the function of hemoglobin. The residue at F6 β is apart from the proximal histidine at F8 β by two residues and is faced towards the side opposite to the heme plane, and so direct interaction between the residue and the heme is not probable.

According to the mechanism of the Bohr effect recently proposed by PERUTZ *et al.*¹⁹, the imidazole groups of the C-terminal histidines of the β -chains and the α -amino groups of the α -chains are free in oxyhemoglobin, while in deoxyhemoglobin the former are bound to the aspartates FG1 of the same β -chain and the latter to the C-terminal carboxyl groups of its partner chains, resulting in a raise of their pK values. About three-quarters of the alkaline Bohr effect can be accounted for by this mechanism. The acid Bohr effect can be derived from the lowering of the pK values of the carboxylic groups of aspartate ~~GF1 β~~ and arginine HC3 α by linkages with their partners, histidine HC3 β and valine NA1 α , respectively, which are formed in deoxy-hemoglobin. FG1 β

In the case of Hb Agenogi the linkage between HC3 β and FG1 β may be affected by replacement of F6 β Glu by Lys because the site, F6 β , is four residues, namely about by a helical turn, apart from FG1 β and will point in the same direction as FG1 β . If the newly introduced residue, Lys, strengthens the linkage between HC3 β and FG1 β in deoxygenated Hb Agenogi, the deoxygenated form will become the more stable and consequently the oxygen affinity of Hb Agenogi will be lowered.

It is generally expected that the shape of the curve of Bohr effect will be affected when the surroundings around the oxygen-linked acid groups, HC3 β His and FG1 β Asp, are altered by the newly introduced residue, Lys, and their pK values are changed. The shape of the curve of the Bohr effect for Hb Agenogi is, however, almost identical with that for Hb A as far as the measurement was carried out at between pH 5.9 and 7.8 (see Fig. 2). Previously WYMAN²⁰ derived the following equation for Bohr effect,

$$\log p_{1/2} = \text{Constant} + \log \frac{(H^+ + K_1') (H^+ + K_2')}{(H^+ + K_1'') (H^+ + K_2'')}$$

where K_1' and K_2' , and K_1'' and K_2'' are dissociation constants of the oxygen-linked acid groups for deoxy- and oxyhemoglobin, respectively. The subscripts, 1 and 2, of the constants refer to the groups responsible for the alkaline and acid Bohr effect, respectively. A tentative analysis of the Bohr effect according to the equation suggests that when the pK₂ value for deoxyhemoglobin ($= -\log K_2'$) decreases by about 0.1

leaving the other constants unchanged, then the p_i value of the hemoglobin increases by about 1.3 times, while the shape of the curve of Bohr effect is little changed, at least for pH values between 5.9 and 7.8. This is just the case for Hb Agenogi. The decrease of the pK_2 value for deoxyhemoglobin suggests altered surroundings around FG1 β Asp and is consistent with the above mentioned assumption of strengthened linkage between HC3 β and FG1 β in the deoxygenated form. Thus one of the plausible mechanisms for the abnormal function of Hb Agenogi can be proposed as following: the newly introduced residue, Lys, alters the surroundings around the oxygen-linked acid groups and affects the linkage between them in the deoxygenated form, resulting in an altered equilibrium between the deoxygenated and oxygenated forms.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express their gratitude to Dr. A. Hayashi for valuable discussion. The authors also thank Dr. H. Watari for valuable advice on experimental techniques.

REFERENCES

- 1 J. MONOD, J. WYMAN AND J. P. CHANGEAUX, *J. Mol. Biol.*, 12 (1965) 88.
 - 2 M. F. PERUTZ, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965) 646.
 - 3 M. F. PERUTZ, J. C. KENDREW AND H. C. WATSON, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965) 669.
 - 4 M. F. PERUTZ, H. MUIRHEAD, J. M. COX AND L. C. G. GOAMAN, *Nature*, 219 (1968) 131.
 - 5 M. F. PERUTZ AND H. LEHMANN, *Nature*, 219 (1968) 902.
 - 6 K. IMAI, H. MORIMOTO, M. KOTANI, H. WATARI, W. HIRATA AND M. KURODA, *Biochim. Biophys. Acta*, fill up the volume and page numbers of the preceding paper (BBA 35514)
 - 7 A. HAYASHI, T. SUZUKI, A. SHIMIZU, K. IMAI, H. MORIMOTO, T. MIYAJI AND S. SHIBATA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125 (1968) 895.
 - 8 K. IMAI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 127 (1968) 545. Y
 - 9 T. MIYAJI, I. IUCHI, I. TAKEDA AND S. SHIBATA, *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi*, 26 (1963) 531.
 - 10 T. MIYAJI, I. IUCHI, K. YAMAMOTO, Y. OHBA AND S. SHIBATA, *Clin. Chim. Acta*, 16 (1967) 347.
 - 11 S. SHIBATA, T. MIYAJI, I. IUCHI, S. UEDA AND I. TAKEDA, *Clin. Chim. Acta*, 10 (1964) 101.
 - 12 K. MATSUMOTO, in preparation.
 - 13 T. MIYAJI, H. SUZUKI, Y. OHBA AND S. SHIBATA, *Clin. Chim. Acta*, 14 (1966) 624.
 - 14 S. UEDA, *Japan. J. Clin. Hematol.*, 3 (1962) 26.
 - 15 K. G. PAUL, H. THEORELL AND A. ÅKESON, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 1284.
 - 16 R. T. JONES, B. BRIMHALL AND R. LISKE, *Biochim. Biophys. Acta*, 154 (1968) 488.
 - 17 R. B. THOMPSON, R. L. WARRINGTON AND W. N. BELL, *Am. J. Physiol.*, 208 (1965) 198.
 - 18 R. T. JONES, B. BRIMHALL, E. R. HUEHNS AND A. G. MOTULSKY, *Biochim. Biophys. Acta*, 154 (1968) 278.
 - 19 M. F. PERUTZ, H. MUIRHEAD, L. MAZZARELLA, R. A. CROWTHER, J. GREER AND J. V. KILMARTIN, *Nature*, 222 (1969) 1240.
 - 20 J. WYMAN, *Advan. Protein Chem.*, 4 (1948) 407.
- 12 K. Matsutomo, in preparation.

Author, please check these references very carefully, especially the one indicated.

Biochim. Biophys. Acta,

Oxygen-Equilibrium Characteristics of Abnormal Hemoglobin Hiroshima ($\alpha_2\beta_2^{143\text{Asp}}$)

KIYOHIO IMAI[†]

Laboratory of Biophysics, Faculty of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka (Japan)

Received January 8, 1968; accepted May 10, 1968

Oxygen-equilibrium characteristics of human abnormal hemoglobin (Hb) Hiroshima ($\beta^{143}\text{His} \rightarrow \text{Asp}$) were studied. The purification of the abnormal hemoglobin fraction was attained by starch-block electrophoresis (pH 8.6). Hb Hiroshima has an increased oxygen affinity, a decreased Bohr effect and a reduced heme-heme interaction (Hill's constant, $n = 2.0 \sim 2.6$), in comparison with those of Hb A. The constant n shows a tendency to increase with the increase of pH. The oxygen-equilibrium curves of Hb Hiroshima have a section of singular shape at the upper range of saturation and are not of simple sigmoid form. The data of hemolysate containing Hb Hiroshima are nearly consistent with the results expected from the data of purified samples, but a slight discrepancy between them is seen in respect of fine structure of the oxygen-equilibrium curves. The implication of the functional abnormality of Hb Hiroshima is discussed from the viewpoint of altered relationships between two β -chains caused by the amino acid substitution and it is pointed out that the amino acid residue of β^{143} plays an important role to the oxygen-combining behavior of hemoglobin.

It is a problem of much interest to investigate what role each residue plays in hemoglobin (Hb) molecule in order to exhibit its excellent physiological function. The investigation of the function of abnormal human hemoglobins with single amino acid substitution is very profitable for the clarification of interrelationships between structure and function of hemoglobin.

Recently S. Shibata[†] *et al.* (1) have discovered a new variant designated as Hb Hiroshima in a Japanese family and have determined the amino acid substitution of Asp for His in the 143rd amino acid residue of the β -chain. The oxygen-equilibrium function of this abnormal hemoglobin was studied and the results are reported in the present paper.

MATERIALS AND METHODS

The samples used for this study are purified Hb Hiroshima, purified Hb A (control) and hemolysate

of patient's and normal's blood. Hb Hiroshima and Hb A were purified from the same hemolysate of patient's blood by starch-block electrophoresis (2) using Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.6) and the purity of the samples was ascertained by agar gel electrophoresis (pH 7.0). The content of abnormal hemoglobin in the hemolysate was determined by scanning the agar gel plate after electrophoresis (pH 8.6). The purification procedures were performed by S. Shibata[†] and the purified samples and hemolysates were sent to the author. Each sample was dialyzed 24 hours at 4° against 0.1 M phosphate buffer ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$) and was diluted with the buffer to adequate concentration before measurement. The protein concentration of the sample was determined by spectrophotometry after conversion to pyridine hemochromogen (3).

Oxygen - equilibrium curves (O_2 - equilibrium curves) of hemoglobin were measured by the automatic recording method by K. Imai *et al.* (4). In this method the oxygen partial pressure in the sample was measured with Clark's oxygen electrode and the percentage saturation of hemoglobin with oxygen was measured spectrophotometrically using the monochromatic light of 564 m μ . The curves obtained by this method are continuous and fine structures of them can be easily observed. Frequently, before and after measurement of the curves, the optical spectra of the samples were measured and methemo-

[†] His address: The Third Department of Internal Medicine, Yamaguchi University Medical School, Ube (Japan).

globin formation in the samples during measurement was ascertained to be too small to exert a significant influence on the curves, judging from the change in the spectra. Preparation and measurement had been performed within 10 days after the collection of blood.

RESULTS

O₂-Equilibrium curves of purified hemoglobins. The O₂-equilibrium curves of purified hemoglobins were measured at five different pH values, and the results are shown in Figs. 1 and 5 (the curve for pH 6.0 is omitted in order to avoid complication). The curves of Hb A coincided well with the curves of dialyzed hemolysate from normal's blood. Therefore the process of purification did not affect the curves at least in the case of normal hemoglobin. The O₂-equilibrium curves of Hb Hiroshima have a section of singular shape at the upper range of saturation and are not of simple sigmoid form. For example, at pH 6.5 and 7.0, they have a flattened section between the two points indicated by the bold arrows in Figs. 1 and 5. This feature gets less distinct as the pH becomes higher and the curve for pH 7.8 is nearly of simple sigmoid form. These features in the O₂-equilibrium curves of Hb Hiroshima can be clearly seen on the curves in Fig. 2, where $dy/d \log p$ is plotted against $\log p$ (y is fractional saturation of hemoglobin with oxygen and p is oxygen pressure). The differential curves for Hb A are nearly invariant in shape with pH and are translated only along the abscissa. In the case of Hb Hiroshima, however, this invariance is not realized. The differential curves for Hb Hiroshima have a shoulder in accordance with the flattened section on the O₂-equilibrium curve at the upper range of saturation. Furthermore the shape of the differential curves changes with pH; that is, the shoulder gets less distinct as the pH becomes higher and disappears at pH 7.8. However the differential curve for pH 7.8 is yet considerably asymmetrical unlike that of Hb A. The O₂-equilibrium curve was measured on the sample of Hb Hiroshima which had been used for measure-

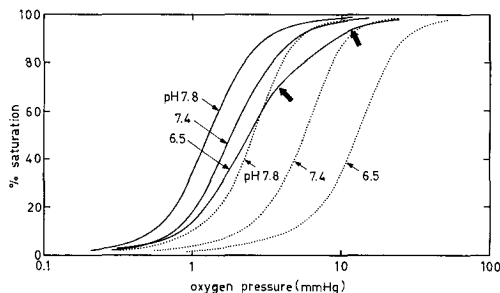


FIG. 1. O₂-Equilibrium curves of purified Hb Hiroshima and purified Hb A (control). Concentration of Hb, 0.1%; in 0.1 M phosphate buffer; temperature, 20°. —, Hb Hiroshima and ·····, Hb A. Bold arrows indicate the both ends of the section where the curve has a singular shape.

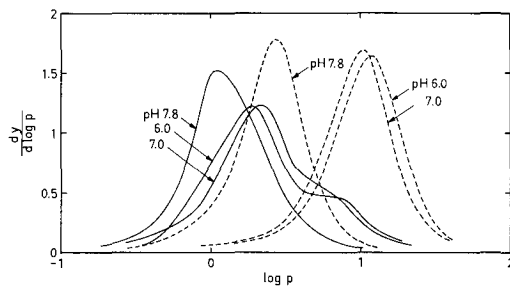


FIG. 2. The differential curve obtained from the data in Figs. 1 and 5 by plotting $dy/d \log p$ against $\log p$, where y is fractional saturation of hemoglobin with oxygen and p is oxygen pressure in mm Hg. The curves for pH 7.4 and 6.5 are omitted in order to avoid complication. —, Hb Hiroshima and ·····, Hb A.

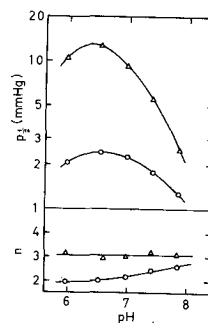


FIG. 3. O₂-Equilibrium characteristics of Hb Hiroshima and Hb A, derived from the data in Figs. 1 and 5. $p_{1/2}$, oxygen pressure required to attain the half saturation of hemoglobin with oxygen; n , the constant involved in Hill's equation. ○—○, Hb Hiroshima and △—△, Hb A.

ment at pH 6.5 and then had been dialyzed once more against alkaline buffer (pH 7.4). The curve thus obtained lost such a flattened section as observed at pH 6.5 and coincided well with the curve for the sample at pH 7.4 which had not been subjected to such treatment.

O₂-Equilibrium characteristics. The O₂-equilibrium characteristics derived from the data in Figs. 1 and 5 are summarized in Fig. 3. The oxygen affinity of Hb Hiroshima is higher than that of Hb A. In the condition of pH 6.5 where the difference in affinity is maximum, $p_{1/2}$ (oxygen pressure required to attain the half saturation of hemoglobin with oxygen) of Hb Hiroshima is only one-fifth of $p_{1/2}$ of Hb A. The Bohr effect (dependence of $p_{1/2}$ on pH) for Hb Hiroshima is considerably decreased in comparison with that for Hb A. The data in Fig. 1 and Fig. 5 were plotted according to logarithmic form of Hill's equation and Hill's constants n , a numerical expression of heme-heme interaction, were determined. The Hill's plot for Hb Hiroshima except at pH 7.8 was biphasic curve (see Fig. 4) and n was calculated from the slope of the main linear region. The values of n for Hb Hiroshima are 2.0 ~ 2.6 and are smaller than 3.0 for Hb A. But the value of n for Hb Hiroshima shows a tendency to increase with the increase of pH (see Fig. 3).

O₂-Equilibria of hemolysates. The O₂-equilibrium curve of dialyzed hemolysate of patient's blood is shown in Fig. 5 with those of purified Hb Hiroshima and Hb A. The curve of hemolysate is biphasic and not of simple sigmoid form. The curve which was obtained by calculation on the assumption that the hemolysate is the mixture of equal amount of the abnormal and normal hemoglobins² is also shown in Fig. 5. The calculated curve is also biphasic. These extraordinary features of the O₂-equilibrium curves can be clearly seen on the curves in Fig. 6, where $d y/d$

² The content of the abnormal hemoglobin fraction in the hemolysate was about 50% according to the analysis by scanning the agar gel plate after electrophoresis (5).

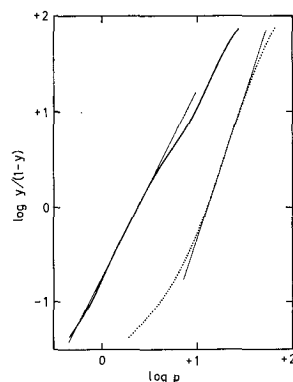


FIG. 4. Hill's plots of O₂-equilibrium curves. The data for pH 6.5 in Fig. 1 were plotted according to the logarithmic form of Hill's equation; $\log y/(1-y) = n \log p + \log K$ where y is fractional saturation of hemoglobin with oxygen, p is oxygen pressure in mm Hg, n and K are constants. —, Hb Hiroshima and ·····, Hb A. The straight lines indicate the slope used for determination of n value.

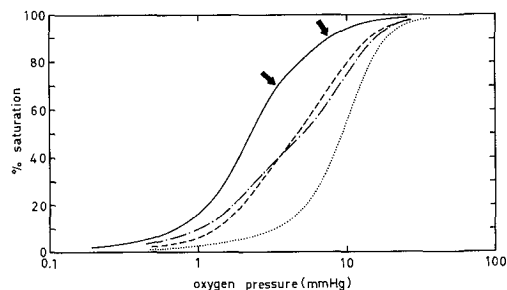


FIG. 5. O₂-Equilibrium curves of purified Hb Hiroshima (—) purified Hb A (·····) and hemolysate containing Hb Hiroshima (----). Concentration of Hb, 0.1%; in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0); temperature 20°. — · —, O₂-equilibrium curve calculated on the assumption that the hemolysate contains Hb Hiroshima by 50%. Bold arrows indicate the both ends of the section where the curve has a singular shape.

$\log p$ is plotted against $\log p$. Both differential curves of the two O₂-equilibrium curves of hemolysate obtained by calculation and experiment have double peaks unlike that of Hb A which has a single peak. The calculated O₂-equilibrium curve of hemolysate is similar to the experimental one on oxygen affinity measured by $p_{1/2}$ and nearly in shape. This fact indi-

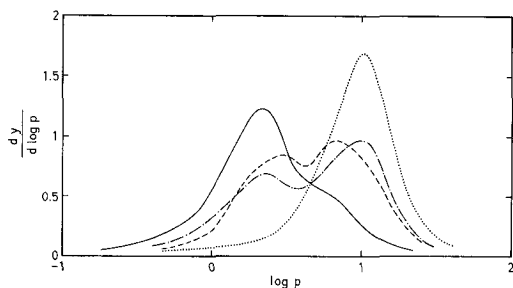


FIG. 6. The differential curve obtained from the data in Fig. 5 by plotting $d y / d \log p$ against $\log p$. —, purified Hb Hiroshima; ·····, purified Hb A; ----, hemolysate containing Hb Hiroshima and — · —, obtained from the calculated curve.

icates that the three independent results for the normal and abnormal hemoglobins and the hemolysate are nearly consistent with each other. The experimental O_2 -equilibrium curve of hemolysate, however, has less biphasic feature than the calculated one.

DISCUSSION

It was shown that Hb Hiroshima has a remarkable functional abnormality. Mild polycythemia in the carriers of the abnormal hemoglobin (5) seems to be associated with the increased oxygen affinity of the abnormal hemoglobin as in the case of Hb Chesapeake (6).

The influence of purification on the O_2 -equilibrium curve can be neglected for normal hemoglobin. The influence is probably small for Hb Hiroshima because the results of the purified samples are nearly consistent with the results of the hemolysate. A small but significant discrepancy in the shapes of curves, however, is seen between the curve of hemolysate and the curve calculated from the data of purified Hb Hiroshima and Hb A, that is, the former has less biphasic feature than the latter. Generally it can be expected that the O_2 -equilibrium curve for the mixture of hemoglobins of high and low oxygen affinity is biphasic, if no interaction between the molecules of those hemoglobins occurs. This feature is really observed in the hemolysate containing Hb Hiroshima, although less distinctly than expected

theoretically. However, the data of hemolysate or blood containing other abnormal hemoglobins with a marked functional abnormality (Hb Chesapeake (6), Hb Kansas (7) and Hb J-Cape Town (8)) do not show the feature mentioned above. It seems that hemolysate suffers from a "flattening effect" which reduces the biphasic feature in the curves expected theoretically.

The O_2 -equilibrium curves of Hb Hiroshima have a section of singular shape at the upper range of saturation if pH is not very high, and the Hill's plots of them are biphasic. The heme-heme interaction in this hemoglobin seems to be reduced so far as it is estimated by the n value obtained from the slope of the main linear region of Hill's plot. But the n value has no longer an important meaning under such circumstances as in Hb Hiroshima and the reduced heme-heme interaction in Hb Hiroshima should be understood with this note. However, in the condition of high pH as at pH 7.8, the Hill's plot for Hb Hiroshima is monotonous sigmoid curve and the reduced heme-heme interaction is probably true. The cause of the singular shape in O_2 -equilibrium curves of Hb Hiroshima mentioned above is not still unknown. Recently G. Guidotti (9) proposed a model for the reaction of hemoglobin with ligands. According to his model, O_2 -equilibrium curve and its Hill's plot are biphasic (double S-shaped by his term) when the two $\alpha\beta$ dimers in hemoglobin molecule interact with each other negatively on oxygen affinity (in the case

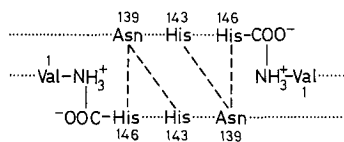


FIG. 7. The links between the two β -chains of hemoglobin molecule near the amino and carboxyl termini (by Perutz). —, salt bridges formed by the α -amino groups and the α -carboxyl groups; ----, hydrogen bonds formed by the γ -amino groups of β 139 Asn and the imidazole rings of β 143 His and β 146 His. The β 143 His is substituted by Asp in Hb Hiroshima.

of "negative interaction" by his term). Hb Hiroshima may be the case where the negative interaction occurs, but further studies are required.

According to a tentative atomic model of horse oxyhemoglobin by Perutz (10), the two β -chains are linked with each other near the amino and carboxyl termini in horse oxyhemoglobin (see Fig. 7). Probably the same situation applies also to human oxyhemoglobin. The β 143 His residues are not ionized and linked with β 139 Asn by the hydrogen bonds formed between the imidazole rings of the His and the γ -amino groups of the Asn in normal hemoglobin. The amino acid substitution of Asp for His in the 143rd residue of the β -chain in Hb Hiroshima probably exerts an influence on the linkages between the two β -chains. Consequently the two β -chains of Hb Hiroshima may fail to maintain a normal relative location between themselves. According to X-ray analysis (11), a change of distance between the two β -chains occurs due to oxygenation by 7 Å measured at the level of the hemes. In the case of Hb Hiroshima the hemoglobin molecule may fail to undergo the normal conformational change on oxygenation and so the heme-heme interaction becomes reduced. It seems to be necessary for the normal functional behavior of hemoglobin that two β -chains should maintain normal relative locations between themselves. Normal hemoglobin treated with carboxy-peptidase A which removes the last two residues, His and Tyr, of the β -chains exhibits increased oxygen affinity and absence of heme-heme interactions (12). R. L. Nagel *et al.* (13) suggested that the 145th residues of the β -chains, Tyr, undergo environmental change during reactions with oxygen. It

can be said that the carboxyl termini of the β -chains play an important role for occurrence of conformational change in hemoglobin molecule. The reduced heme-heme interaction in Hb Hiroshima is very significant in relation to these facts. It can be expected according to the data from X-ray analysis that the β 143 His residue plays an important role to the oxygen-combining behavior of hemoglobin. This has been proved by this study.

ACKNOWLEDGMENTS

The author expresses his gratitude to Prof. S. Shibata and his collaborators for a generous supply of the samples and for valuable information. The author also thanks Prof. M. Kotani and Dr. A. Hayashi for valuable advice on the manuscript.

REFERENCES

1. SHIBATA, S., MIYAJI, T., OHBA, Y., YAMAMOTO, K., AND HAMILTON, H. B., unpublished data.
2. UEDA, S., *Japan. J. Clin. Hematol.* **3**, 26 (1962).
3. PAUL, K. G., THEORELL, H., AND ÅKESON, Å., *Acta Chem. Scand.* **7**, 1284 (1953).
4. IMAI, K., MORIMOTO, H., KOTANI, M., WATARI, H., HIRATA, W., AND KURODA, M., to be submitted.
5. SHIBATA, S., AND MIYAJI, T., personal communication.
6. CHARACHE, S., WEATHERALL, D. J., AND CLEGG, J. B., *J. Clin. Invest.* **45**, 813 (1966).
7. REISSMANN, K. R., RUTH, W. E., AND NOMURA, T., *J. Clin. Invest.* **40**, 1826 (1961).
8. LINES, J. G., AND MCINTOSH, R., *Nature* **215**, 297 (1967).
9. GUIDOTTI, G., *J. Biol. Chem.* **242**, 3673, 3685, 3694, 3704 (1967).
10. PERUTZ, M. F., *J. Mol. Biol.* **13**, 646 (1964).
11. MUIRHEAD, H., AND PERUTZ, M. F., *Nature* **199**, 633 (1963).
12. ANTONINI, E., WYMAN, J., ZITO, R., ROSSIO-FANELLI, A., AND CAPUTO, A., *J. Biol. Chem.* **236**, PC 60 (1961).
13. NAGEL, R. E., RANNY, H. M., AND KUCINSKIS, L. L., *Biochemistry* **5**, 1934 (1966).

Some Observations on the Physicochemical Properties of Hemoglobin M_{Hyde Park}

AKIRA HAYASHI, TOMOKAZU SUZUKI, AKIRA SHIMIZU

The Third Department of Internal Medicine, Osaka University Medical School, Osaka, Japan

KIYOHIO IMAI, HIDEKI MORIMOTO

Department of Physics, Faculty of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, Osaka, Japan

TAKAOKI MIYAJI AND SUSUMU SHIBATA

The Third Department of Internal Medicine, Yamaguchi University Medical School, Ube, Japan

Received November 3, 1967

Hemoglobin M_{Hyde Park} (Hb M_H) and its modified product (Hb M_HX) in oxygenated form were obtained by chromatographic procedures. The patient's blood containing Hb M_H revealed EPR spectra with both high and low spin-type signals. In an O₂ equilibrium study, Hb M_H showed similar functional abnormalities to Hb M_{Saskatoon}, a somewhat higher O₂ affinity and a smaller *n* value than Hb A, and a Bohr effect that was almost normal. But the *n* value and the O₂ affinity of the O₂ equilibrium curves varied considerably according to the wavelength used for calculation, suggesting the conformational change of the abnormal subunit of Hb M_H. The abnormal subunit of methemoglobin M_H was able to react with cyanide, and its *K'* value was similar to that of Hb M_{Boston}. Heat-denaturation also disclosed the remarkable instability of Hb M_H, which was compatible with the results of the *in vivo* hematologic study.

In 1966 Heller and his co-workers (1, 2) discovered a new variant of hemoglobin M (Hb M) in the United States, named it hemoglobin M_{Hyde Park} (Hb M_H), and determined its primary structure as $\alpha_2\beta_2^{92\text{Tyr}}$. Soon after, Shibata and co-workers (3) discovered Hb M_{Akita} in Japan and identified it with Hb M_H. In Hb M_H the proximal histidine of $\beta 92$ is substituted by tyrosine. It may be expected that such an abnormality greatly affects the properties of Hb as in other Hbs M, and the analysis of the properties of Hb M_H gives us valuable information on the structure and function of Hb.

This paper briefly discusses the physicochemical properties of Hb M_H in comparison with those of Hb M_{Iwate} (Hb M_I, $\alpha_2^{87\text{Tyr}}\beta_2$), Hb M_{Boston} (Hb M_B, $\alpha_2^{58\text{Tyr}}\beta_2$), and Hb M_{Saskatoon} (Hb M_S, $\alpha_2\beta_2^{63\text{Tyr}}$).

MATERIALS AND METHODS

Whole blood was obtained from heterozygous individuals with Hb M_{H(Akita)}. The red cells were washed with physiological saline hemolyzed by adding distilled water without adding toluene, and centrifuged 1 hour at 10,000 rpm. The resulting hemolyzate, after being dialyzed against the elution buffer, was subjected to column chromatography.

Isolation of HbM_H. Isolation of Hb M_H was performed at 4-6° in oxygenated forms, using Amberlite CG-50 and 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). When a freshly prepared hemolyzate was applied, four fractions were clearly separated on the column in order of elution rate: O₂Hb A₃ (see footnote 1)¹ (from Hb A and Hb M), O₂Hb A, O₂Hb M_H, and an abnormal fraction (we call this

¹ Hb A₃ corresponds to the fraction that was termed by Schneck and Schroeder (4).

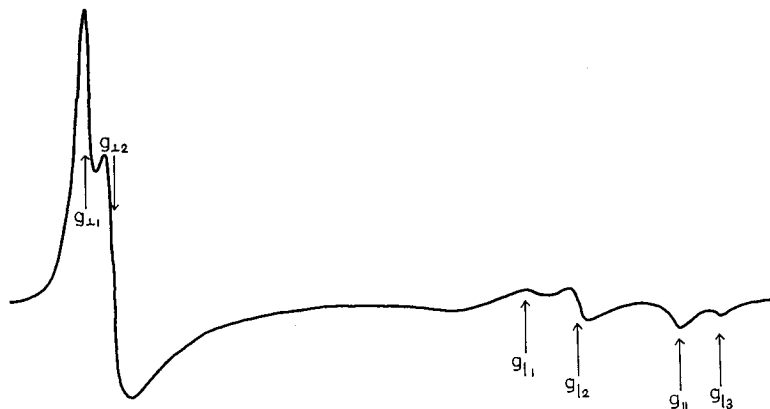


FIG. 1. EPR spectrum of patient's blood containing Hb M_H .

fraction $O_2Hb M_HX$).² After complete elution of Hb A_2 and Hb A from the column, Hb M_H could be eluted with 0.07 M potassium phosphate buffer, and then $O_2Hb M_HX$, which remained on the column, with 0.5 M NaCl solution. In this separation procedure, the completely pure Hb M_H fraction was not obtained. The purity of the separated Hb M_H fraction was examined by comparing the electron paramagnetic resonance (EPR) spectra of the patient's blood with the EPR of the separated Hb M_H . The results showed that Hb M_H employed in this study contained small amounts of an impurity that occurred during chromatography that was composed mainly of Hb M_HX . Care must be taken not to use material treated with toluene or material more than 10 days old, and not to spend more than 20 hours for the chromatographic procedure. These precautions prevent the increase of Hb M_HX and the appearance of other minor fractions.

Determination of EPR spectra. Electron paramagnetic resonance spectra were recorded at liquid nitrogen temperature using 9200 megacycles/second, and the magnetic field was measured by nuclear magnetic resonance of protons in water.

Reactivity of Hb M_H with potassium cyanide. Equilibrium analysis of MetHb M_H with cyanide was performed as previously reported (5).

Oxygen equilibrium of Hb M_H . Two spectrophotometric procedures were employed. One is the automatic recording method of Imai *et al.* (6), and the determination was performed at 560 $m\mu$. The

other method is the traditional method of Allen and Wyman (7) with minor modifications as described previously (8). The change of absorbancy accompanying oxygenation was measured over the range of 450–650 $m\mu$ with a recording spectrophotometer.

Kinetic analysis of heat-denaturation of Hb M_H . Heat-denaturation of MetHb M_H was performed at 64° as described by Betke and co-workers (9) with minor modifications. Methemoglobin M_H was incubated at 64° after a prior incubation of 2 minutes at 50°, and cooled in ice water; the precipitate was then centrifuged and the resulting supernatant fluid was measured at 500 $m\mu$.

All spectra were measured with a Cary recording spectrophotometer, model 15. Hemoglobin concentration was determined by the pyridine hemochromogen method; the ϵ/mM at 556 $m\mu$ was assumed to be 34.7 unless designated otherwise.

RESULTS

EPR spectra of blood containing Hb M_H and the isolated Hb M_HX . As shown in Fig. 1 the patient's blood had EPR absorptions between $g = 6.0$ and $g = 2.0$ that exhibited characteristic splittings near $g = 6.0$, as observed in other Hbs M (10). The EPR spectra also exhibited the signal of a low spin type, which has not been observed in the blood containing other Hbs M . The purified $O_2Hb M_H$ also showed the EPR spectra similar to those of the patient's blood. Table I compares the results of EPR measurement, indicated in terms of g values, with those of other Hbs M . During the chromatographic procedure, a unique fraction ($O_2Hb M_HX$) appeared at the top of

² Abbreviations used: $O_2Hb M_H$, oxyhemoglobin M_H ($\alpha_2Fe(II)-O_2$ $\beta_2Fe(III)-92Tyr$); COHb M_H , carbon monoxyhemoglobin M_H ($\alpha_2Fe(II)-CO$ $\beta_2Fe(III)-92Tyr$); MetHb M_H , methemoglobin M_H ($\alpha_2Fe(III)-H_2O$ $\beta_2Fe(III)-92Tyr$).

the column, and was reddish colored, as O₂Hb A, eluted very slowly, and seemed to be unique to the hemolyzate containing Hb M_H. The tryptic peptide mapping was performed with the β -chain of O₂Hb M_HX after aminoethylation. The resulting peptide map closely resembled that obtained with Hb M_H. This O₂Hb M_HX also showed the EPR absorption with a high spin-type signal. Figure 2 indicates the signal of high spin type at $g = 6.0$, which resembles that of MetHb A, although the signal width is slightly broad.

Visible spectra of O₂Hb M_H and O₂Hb M_HX. Figure 3 presents the visible spectra of

TABLE I
 g -VALUES OF EPR SPECTRA FOR
Hbs M AND Methb A

Hemoglobin	High spin type ^a		Low spin type		
	g_{\perp}	g_{\parallel}	$g_{\perp,1}$	$g_{\perp,2}$	$g_{\parallel,3}$
	$g_{\perp,1}$	$g_{\perp,2}$	g_{\parallel}		
MetHb A	6.02	2.0			
Hb M _{Iwate}	6.2	5.8	—		
Hb M _{Boston}	6.30	5.71	2.00		
Hb M _{Saskatoon}	6.65	5.35	2.0		
Hb M _{Hyde Park}	6.31	5.68	2.0	1.90	2.27 2.44

^a \perp and \parallel indicate perpendicular and parallel to the heme normal, respectively. $g_{\perp,1}$ and $g_{\perp,2}$ are two principal values of g in the heme plane. The signals at $g = 4.3$ and $g = 6.0$ for Hb M_S are omitted in the table.

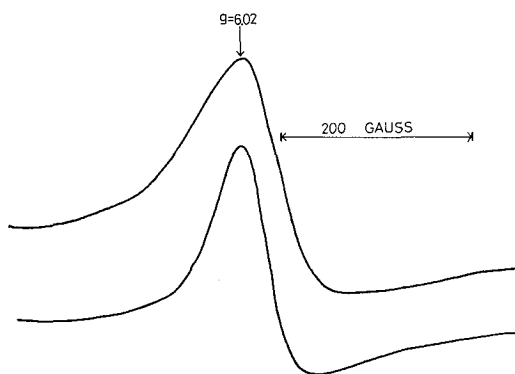


FIG. 2. EPR spectra around $g = 6.0$ of O₂Hb M_HX and MetHb A. Upper trace, O₂Hb M_HX; lower trace, MetHb A.

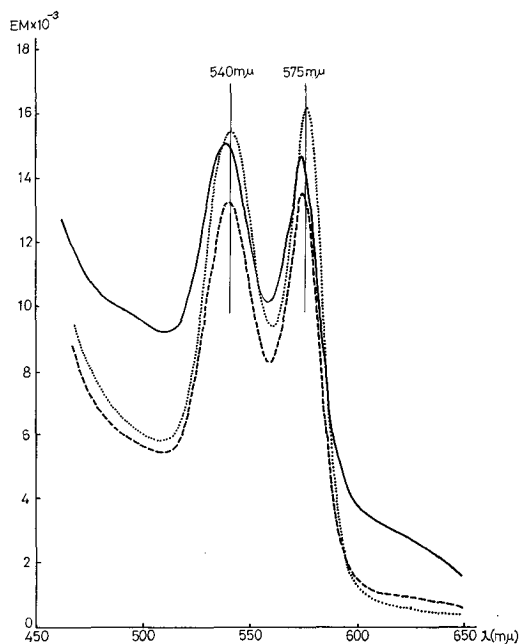


FIG. 3. Visible spectra of O₂Hb M_H, O₂Hb M_HX, and O₂Hb A in 0.1 M potassium phosphate buffer at pH 7.0. With O₂Hb M_HX, concentration was determined by the cyano methemoglobin method. O₂Hb M_H (—); O₂Hb M_HX (---); O₂Hb A (···).

O₂Hb M_H and O₂Hb M_HX. The spectrum of O₂Hb M_H showed high absorbancy around 470–520 mμ and 570–650 mμ in comparison with O₂Hb A. The absorbancy of Hb M_HX closely resembled that of O₂Hb A, although the absorption maxima of the α -, β -, and γ -bands (the γ -band is not cited in the figure) were slightly dislocated to shorter wavelengths (574, 540, and 411 mμ, respectively) and were apparently different from those of Hb M_H.

Reactivity of Hb M_H with cyanide. In the titration of MetHb M_H with increasing concentrations of cyanide, the absorption spectra of MetHb M_H changed in a complicated manner. Finally, when the cyanide concentration was increased beyond 1.0 M, the spectrum of MetHb M_H became indistinguishable from that of the cyanide complex of MetHb A. Figure 4 shows the cyanide equilibrium curve with MetHb M_H. This curve, if assayed at 630 mμ, was biphasic as observed in the case of the other Hbs M (5).

When assayed at $597\text{ m}\mu$, an isosbestic point for MetHb A and its cyanide complex, the curve showed a monophasic character as seen in Fig. 4. The K' value of this curve was $2.7 \times 10^{-2}\text{ M}$ and was similar to that of abnormal α subunit of MetHb M_B . The reactivity of the patient's hemolyzate to azide was also examined by using the EPR technique; in a high concentration of azide (approximately 2.0 M), the EPR signal around $g = 6.0$ of the patient's hemolyzate completely disappeared and a typical low

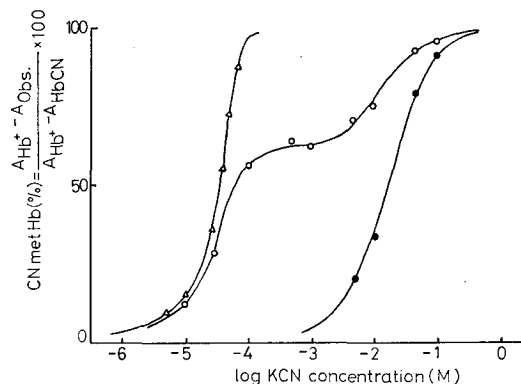


FIG. 4. Equilibrium for reaction of MetHb A and Met Hb M_H with cyanide. Hb concentration, $5 \times 10^{-5}\text{ M}$ as heme, in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). Equilibrium was measured at $630\text{ m}\mu$ for MetHb A (Δ) and MetHb M_H (\circ) and at $597\text{ m}\mu$ for the heme linked with β -chain of MetHb M_H (\bullet).

spin-type signal similar to that of MetHb A azide complex appeared.

Oxygen equilibrium of the hemolyzate containing Hb M_H , purified Hb M_H , and Hb M_HX . Figure 5 shows the results of the oxygen equilibrium performed with the automatic recording method. There were significant differences in oxygen affinity and n value in Hill's equation between hemolyzate containing Hb M_H and Hb A; the hemolyzate exhibited a higher affinity and a smaller n value than that of Hb A. In the purified Hb M_H , these behaviors were further accentuated, but an almost normal Bohr effect and an n value of more than 2.0 were present. These results are summarized in Fig. 6. On the other hand, the curve for Hb M_HX was remarkably different from that of the above-mentioned Hbs; it showed a very high affinity for oxygen ($P_{1/2} = 0.46\text{ mm Hg}$) and a hyperbolic character, but an apparent Bohr effect was not observed. The change in absorbancy accompanying deoxygenation of Hb M_HX was quite large (about 2.6 times of the theoretical value calculated on the assumption that the two hemes in a Hb molecule are in the ferrous state and are able to carry oxygen). Figure 7 shows the results obtained by the traditional method. In comparison with the results of the automatic recording method under similar conditions, a higher oxygen affinity was observed. Although we cannot give a complete

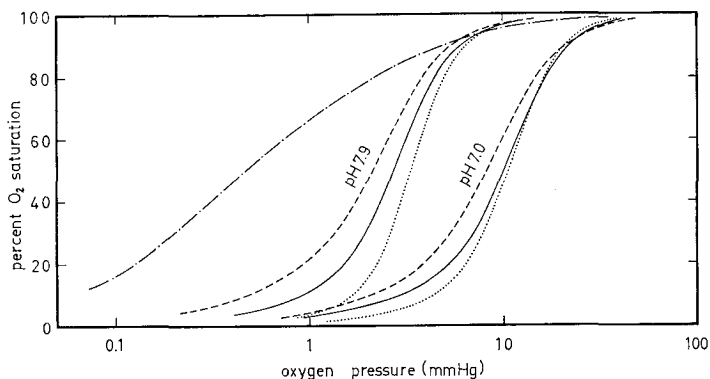


FIG. 5. Oxygen equilibrium curves of patient's hemolyzate containing Hb M_H , purified Hb M_H , Hb M_HX , and Hb A obtained by the automatic recording method. Hb concentration, about $6 \times 10^{-5}\text{ M}$ as heme, in 0.1 M sodium phosphate buffer; temperature, 20° , $\lambda = 560\text{ m}\mu$. Patient's hemolyzate (—); Purified Hb M_H (---); Hb A (....); Hb M_HX (-.-.-) (pH 7.0).

interpretation of these differences, they will be partly explained by the facts that the materials used for each study were not the same and that the traditional method required more time than the automatic recording method. The most striking phenomenon was the transition in shape and location of the curves with the wavelength

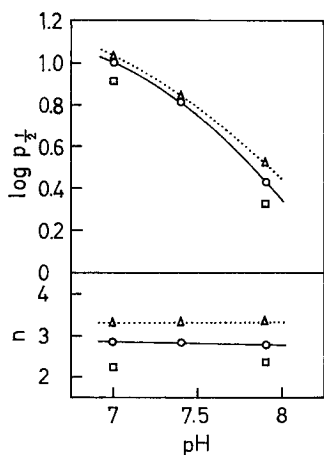


FIG. 6. Bohr effect and n value of the patient's hemolyzate, purified Hb M_H and Hb A. Patient's hemolyzate (O); Purified Hb M_H (□); Hb A (Δ).

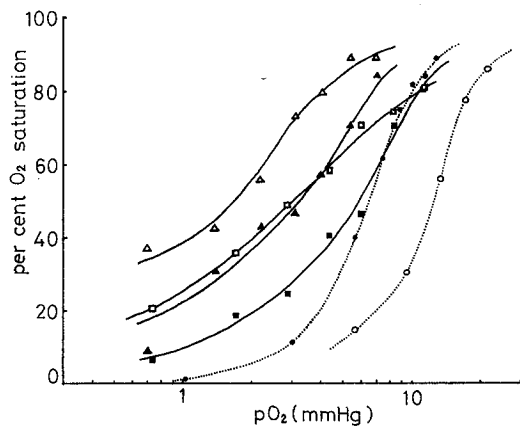


FIG. 7. Oxygen equilibrium curves of Hb M_H and Hb A obtained by the method of Allen *et al.* with minor modifications. Hb concentration, about 1.5×10^{-4} M for Hb M_H and 3×10^{-4} M for Hb A as heme, in 0.1 M potassium phosphate buffer; temperature, 21°. Hb M_H: ■, pH 7.0, 560 mμ; ▲, pH 7.4, 560 mμ; □, pH 7.0, 576 mμ; △, pH 7.4, 576 mμ. Hb A: ○, pH 6.6, 560 mμ; ●, pH 7.3, 560 mμ.

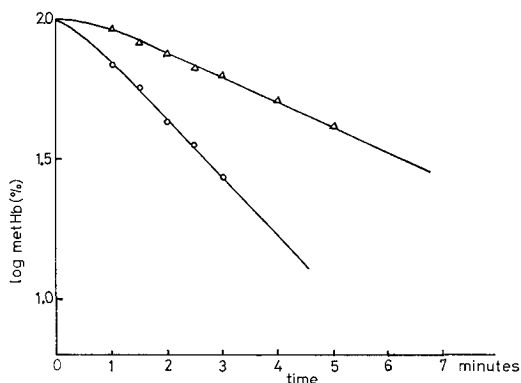


FIG. 8. Heat-denaturation rate of MetHb M_H and MetHb A. MetHb (final concentration, 6×10^{-5} M) in 0.1 M potassium phosphate buffer at pH 6.8 was incubated at 64°. Measurement of the remaining MetHb was made at 500 mμ. MetHb M_H, ○; MetHb A, Δ.

used for calculation. As shown in Fig. 7, the transition of the curves between 560 and 576 mμ was considerably large. But in Hb A such a phenomenon has not been observed.

Rate of the heat-denaturation of Hb M_H. As shown in Fig. 8, MetHb M_H was quite unstable for the heat treatment, and its half-time was only 100 seconds.

DISCUSSION

For the isolation of Hb M with a β -subunit abnormality, an electrophoretic procedure in ferric form has been widely used. As already reported, Hb M_S has been successfully separated from Hb A in oxygenated form by using a chromatographic procedure (8). In this study, a chromatographic technique was also employed for the separation of Hb M_H from Hb A in oxygenated form, and an O₂Hb M_H fraction with a small amount of impurities was obtained. As compared with Hb M_S, the main difficulty in the separation of Hb M_H was its instability, which caused an impurity in the separated Hb M_H fraction. The chromatographic procedure revealed the presence of Hb M_HX, which exists in the patient's blood. But it seems to be likely that Hb M_H is partly modified to Hb M_HX in the course of chromatography, resulting in the main component of the impurity in the separated Hb M_H. The structural study disclosed that

Hb M_HX had the same primary structure as Hb M_H.

We have reported EPR spectra of blood with Hbs M (10). These spectra are the EPR absorptions due to Fe²⁺ in the hemes of abnormal subunits. The blood with Hb M_H also showed EPR absorption that has a characteristic splitting near $g = 6.0$ as observed in Hb M_I, M_B, and M_S. Further, the blood has signals of the low spin type, which have not been observed in the blood containing other Hbs M. These facts give us a powerful tool of high diagnostic value. But the genesis of the low spin-type signals remains unknown. The separated O₂Hb M_H also showed essentially the same EPR spectrum as that of the patient's blood. Hemoglobin M_HX behaved strangely in a spectroscopic study: the EPR spectrum of O₂Hb M_HX exhibited distinct absorption at $g = 6.0$ without splitting and rather resembled that of MetHb A. This fact was considered to be the important evidence that O₂Hb M_HX contained ferric heme iron, while the visible spectrum of this fraction in oxygenated form closely resembled that of O₂Hb A.

The abnormal reactivity of Hb M variants with various ligands such as cyanide, azide, and fluoride has been reported by us (5). With Hb M_H, Heller and his co-workers (2) observed that the abnormal subunits of Hb M_H are incapable of ligand formation with cyanide, although there was no statement with the concentration of cyanide used. This result was not consistent with our findings; the abnormal subunits of Hb M_H were able to react with cyanide and azide as did those of Hb M_I, M_B and M_S, but the cyanide concentration needed to form a completely bound complex was lower than that for Hb M_I, and was similar to that of Hb M_B. This fact was further confirmed by the result of the reactivity of the patient's hemolyzate to azide examined with EPR technique.

We have previously reported the functional abnormalities of Hb M_B (11) and Hb M_S (8). Hemoglobin M_H also showed some abnormalities in oxygen equilibrium, which were alike to those of Hb M_S. It seems to be more likely that the features of

the functional abnormalities in Hbs M are mainly due to whether abnormality is in the α - or β -subunit, and not to whether it is in proximal or distal histidine. The abnormality in the β -subunit showed a slightly higher affinity for oxygen and a normal Bohr effect (8), while those in the α -subunit showed a remarkably low oxygen affinity and little Bohr effect (11, 12). However, heme-heme interaction given as an n value was not observed in both abnormalities, except that Hb M_H showed a larger n value than that of other Hbs M. Further, there was another important fact in oxygen equilibrium study of Hb M_H; considerable transitions of oxygen equilibrium curves in accordance with the wavelength used for calculation were observed. The interpretation of this result, which we favor, is that the absorbance of abnormal subunit, which is incapable of carrying oxygen, may change during oxygenation. This hypothesis is also supported by the fact that the EPR spectrum of the abnormal subunit in Hb M_H is remarkably changed by oxygenation (13). From these results it is reasonable to consider that a conformational change occurs in the Hb M_H molecule during oxygenation that affects the electronic state of ferric irons and also the hemes in abnormal subunits. Therefore, the larger n value observed in Hb M_H may be false, and the true value may be smaller. Further work with the gasometric method is required to elucidate the true function of Hb M_H. Although no comparable data from other abnormal Hbs are available, it should be emphasized that the spectroscopic method in the oxygen equilibrium study on abnormal Hbs has to be considered again from another point of view.

On the other hand, the oxygen equilibrium curve of Hb M_HX was in remarkable contrast to that of Hb M_H and rather resembled that of myoglobin or Hb H: Hb M_HX had a high affinity for oxygen, and a diminished Bohr effect and n value. The above results would appear to indicate that the conformational change does not occur during oxygenation of Hb M_HX. In the course of the oxygen equilibrium study of this fraction, however an interesting finding was observed: a remarkably large change of absorbance was

induced by oxygenation, which was more than twice the value calculated from a theoretical base. The significance of this finding is not yet understood.

Instability is an important property of Hb M_H. The results of the heat-denaturation study clearly showed that Hb M_H is one of the most unstable Hbs M, and this finding is compatible with the results of the hematologic study (3) that demonstrated the presence of hemolytic anemia in the patient with Hb M_H. This property also may be closely related to the formation of the above-mentioned Hb M_HX. The treatment of Hb M_H with organic solvent remarkably increases the formation of Hb M_HX, but the mechanism whereby Hb M_H is modified is unclear. Further experimentation is going on to explain fully these interesting observations.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Dr. I. Iuchi, Dr. H. Watari, Dr. Y. Yamamura, and Dr. M. Kotani for their valuable discussions.

REFERENCES

1. HELLER, P., COLEMAN, R. D., AND YAKULIS, V. J., *J. Clin. Invest.* **45**, 1021 (1966).
2. HELLER, P., COLEMAN, R. D., AND YAKULIS, V. J., "Plenary Sessions of the XIth Congress of the International Society of Haematology," p. 427. Government Printer, Sydney (1966).
3. SHIBATA, S., MIYAJI, T., KARITA, K., IUCHI, I., OHBA, Y., AND YAMAMOTO, K., *Proc. Japan Acad.* **43**, 65 (1967).
4. SCHNECK, A. G., AND SCHROEDER, W. A., *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1472 (1961).
5. HAYASHI, A., SHIMIZU, A., SUZUKI, T., AND YAMAMURA, Y., *Biochim. Biophys. Acta* **140**, 251 (1967).
6. IMAI, K., MORIMOTO, H., KOTANI, M., WATARI, H., HIRATA, W., AND KURODA, M., in preparation.
7. ALLEN, D. W., GUTHE, K. F., AND WYMAN, J., *J. Biol. Chem.* **187**, 393 (1950).
8. SUZUKI, T., HAYASHI, A., SHIMIZU, A., AND YAMAMURA, Y., *Biochim. Biophys. Acta* **127**, 280 (1966).
9. BETKE, K., AND GREINACHER, Z., *Kinderheilk.* **75**, 235 (1954).
10. HAYASHI, A., SHIMIZU, A., YAMAMURA, Y., AND WATARI, H., *Science* **152**, 207 (1966).
11. SUZUKI, T., HAYASHI, A., YAMAMURA, Y., ENOKI, Y., AND TYUMA, I., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **19**, 691 (1965).
12. HAYASHI, N., MOTOKAWA, Y., AND KIKUCHI, G., *J. Biol. Chem.* **241**, 79 (1966).
13. HAYASHI, A., SUZUKI, T., SHIMIZU, A., MORIMOTO, H., AND WATARI, H., *Biochim. Biophys. Acta* **177**, 407 (1967).

BBA 35420

PROPERTIES OF HEMOGLOBIN M, MILWAUKEE-1 VARIANT AND ITS UNIQUE CHARACTERISTIC

AKIRA HAYASHI^a, TOMOKAZU SUZUKI^a, KIYOHIO IMAI^b, HIDEKI MORIMOTO^b AND HIROSHI WATARI^c^aThird Department of Internal Medicine, Osaka University, Osaka, ^bLaboratory of Biophysics, Faculty of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka, and ^cDepartment of Physicochemical Physiology, Faculty of Medicine, Osaka University, Osaka (Japan)

(Received April 17th, 1969)

SUMMARY

The physicochemical properties of Hb M Milwaukee-1 ($\alpha_2\beta_2^{67\text{Glu}}$) were studied in comparison with other Hb M variants and Hb Sydney ($\alpha_2\beta_2^{67\text{Ala}}$).

Using the patient's blood containing Hb M Milwaukee-1, EPR spectra with high-spin-type signals were revealed which resembled those of Hb M Saskatoon indicating that the glutamic acid residue at E 11 has an effect on the heme iron analogous to the tyrosine residue at E 7.

In an O_2 equilibrium study, Hb M Milwaukee-1 showed a diminished heme-heme interaction, 1.4–1.6 in terms of n value, and this value seemed to be dependent on pH or temperature. Although the affinity for O_2 was as low as about 60 mm Hg of P_{50} at pH 6.5, the Bohr effect was distinctly present in this Hb M, and its magnitude was larger than that of Hb A. The effect of temperature on the O_2 affinity, however, was significantly smaller in this Hb M than that observed in Hb A.

In contrast to Hb Sydney, Hb M Milwaukee-1 was as stable as Hb A in a heat denaturation experiment, reflecting the stabilizing effect of the intramolecular bonding between the ferric heme iron and the substituted glutamic acid residue on the whole molecule.

INTRODUCTION

A group of abnormal hemoglobins, which are now categorically known as the Hb M (ref. 1), has been found in many parts of the world. Most of them have been identified as one of the following four variants of Hb M; Hb M Iwate ($\alpha_2\beta_2^{87\text{Tyr}\beta_2}$) (ref. 2), Hb M Hyde Park ($\alpha_2\beta_2^{92\text{Tyr}}$) (ref. 3), Hb M Boston ($\alpha_2\beta_2^{58\text{Tyr}\beta_2}$) (ref. 4) and Hb M Saskatoon ($\alpha_2\beta_2^{63\text{Tyr}}$) (ref. 4). These hemoglobins M have a structural abnormality in the proximal or the distal histidine of the α or the β subunits of Hb molecule and have the same kind of the amino acid substitution, histidine with tyrosine. We have studied the physicochemical properties of these hemoglobins M and have obtained an im-

portant evidence which suggests the unequivocal nature of the α and β subunits in Hb-molecule⁵.

A fifth variant of Hb M, Hb M Milwaukee-1, was discovered in the U.S.⁶, and it was found that in this Hb M the site and the kind of the amino acid substitution was different from other Hb M variants; valine in 67 β (E 11), a position four residues or one helical turn apart from the distal histidine, was replaced by glutamic acid⁴.

This report deals with the physicochemical properties of Hb M Milwaukee-1, especially with spectroscopy, O₂ equilibrium and stabilities, and will discuss the significance of the results in comparison with other Hb M variants and Hb Sydney ($\alpha_2\beta_2^{67Ala}$) (ref. 7).

MATERIALS AND METHODS

Whole blood specimen from an heterozygous patient possessing Hb M Milwaukee-1 was kindly supplied from Dr. A. V. Pisciotta with the help of Dr. J. Wittenberg and Dr. H. M. Ranney.

The red cells obtained from them were washed with physiological saline and were then hemolyzed by adding distilled water and toluene. Hb M Milwaukee-1 was isolated in the oxy form (HbO₂ M Milwaukee-1; $\alpha_2\text{Fe}^{2+}-\text{O}_2\beta_2\text{Fe}^{3+}-\text{Glu}$) from the hemolysate by chromatography on an Amberlite CG-50 column. The chromatography was performed at 4–6° with the use of 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). After the complete elution of normal Hb A out of the column with the buffer, Hb M Milwaukee-1 was eluted with 0.5 M NaCl solution. The resulting Hb M and Hb A were dialyzed against an appropriate buffer.

Following procedures were employed for the study of the physicochemical properties of Hb M Milwaukee-1.

Determination of EPR spectra was performed using Japan Electron EPR spectrometer, Model JES 3 BX. EPR spectra were recorded at a temperature of liquid nitrogen or liquid hydrogen, and the magnetic field was measured by nuclear magnetic resonance of protons in water. Deoxygenation was carried out by repeated evacuation and introduction of nitrogen gas into the EPR sample tube. All visible spectra were measured with a Cary recording spectrometer, Model 14, at room temperature (23–25°). The O₂ equilibrium analysis was performed using the automatic recording method by IMAI *et al.*⁸ at 20° and at 564 m μ , unless otherwise designated. Sedimentation velocity measurements were made with Hitachi ultracentrifuge analyzer, Model UCA-1A; and all procedures for stability experiments were performed as described previously^{5,9}. Hb concentrations were measured by the pyridine hemochromogen method¹⁰, assuming the ϵ_{MM} at 556 m μ to be 34.7.

RESULTS

Spectroscopic features

EPR spectra of the patient's blood and the purified Hb M Milwaukee-1

In Fig. 1, the EPR spectrum of the patient's blood containing Hb M Milwaukee-1 is presented, in comparison with that of Hb M Saskatoon and MetHb A. It is due to the ferric heme iron in the abnormal β subunits of Hb M Milwaukee-1. The spectrum is essentially the same as that of the purified Hb M Milwaukee-1. The signal shape of

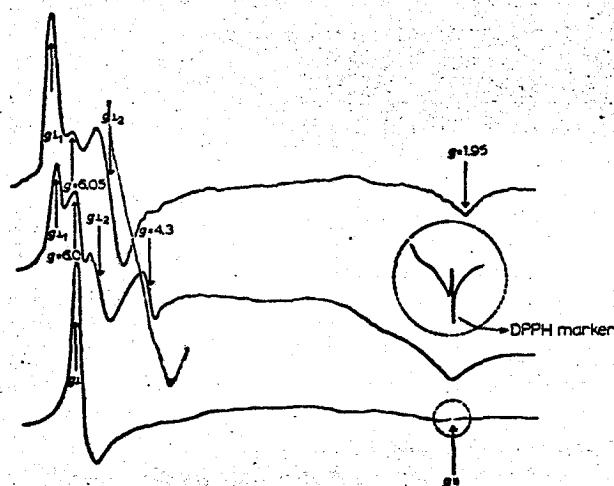


Fig. 1. EPR spectra of the patient's blood containing Hb M Milwaukee-1 (upper), of the patient's blood containing Hb M Saskatoon (middle) and of the purified MetHb A (lower).

the spectrum is like that of the patient's blood containing Hb M Saskatoon, except for the absorption around $g = 4.3$ of Hb M Saskatoon. There is a doublet signal around $g = 6.0$, which is a characteristic common to the patient's blood containing each Hb M^{11,12}. The extent of the g value splitting, however, was found to be the most prominent among five variants of Hb M (Table I). In the middle of the doublet signal, there was a small absorption similar to that in Hb M Saskatoon, g value of which is 6.05 and corresponds to that of MetHb A. In the higher magnetic fields, also, a broad absorption was observed at $g = 1.95$.

Effect of the deoxygenation of the normal α subunits on the EPR spectrum, which is due to the ferric heme in the abnormal β subunits, was also checked; there occurred no significant change in g values of this spectrum by deoxygenation.

Visible spectra of the purified MetHb M Milwaukee-1 ($\alpha_2\text{Fe}^{3+}\text{-H}_2\text{O}\beta_2\text{Fe}^{3+}\text{-Glu}$)

Fig. 2 shows the visible spectrum of MetHb M Milwaukee-1, in comparison with

TABLE I

g VALUES OF THE EPR SPECTRA FOR THE BLOOD CONTAINING EACH Hb M AND FOR MetHb A

\perp and \parallel indicate perpendicular and parallel to the heme normal, respectively. $g_{\perp 1}$ and $g_{\perp 2}$ are two principal values of g in the heme plane.

Hemoglobin	$g_{\perp 1}$	$g_{\perp 2}$	g_{\parallel}
MetHb A		6.02	2.0
Hb M Iwate	6.2		5.8
Hb M Boston	6.30		5.71
Hb M Hyde Park*	6.31		5.68
Hb M Saskatoon*	6.65	6.0	5.35
Hb M Milwaukee-1	6.86	6.05	5.05

* The signals at $g = 4.3$ for Hb M Saskatoon and at $g = 1.90$, $g = 2.27$ and $g = 2.44$ for Hb M Hyde Park are omitted in the table.

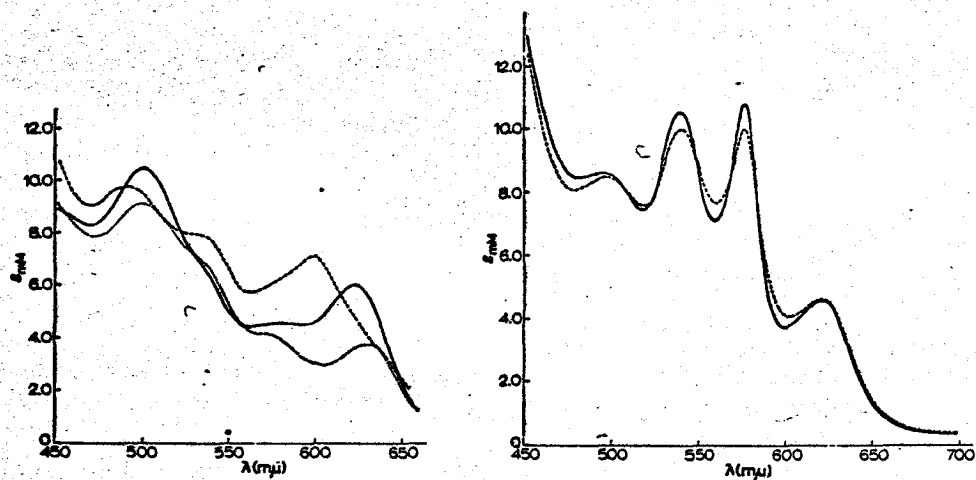


Fig. 2. Visible spectra of MetHb M Milwaukee-1, MetHb M Saskatoon and MetHb A in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). —, MetHb M Milwaukee-1; ---, MetHb M Saskatoon; ·····, MetHb A.

Fig. 3. Visible spectra of HbO₂ M Milwaukee-1 in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) under air and under pure O₂ gas. The spectra at pH 7.9 under air or pure O₂ gas were essentially the same with the spectra at pH 6.5 under pure O₂ gas. —, HbO₂ M Milwaukee-1 at pH 6.5 under air; —, HbO₂ M Milwaukee-1 at pH 6.5 under pure O₂ gas.

those of MetHb M Saskatoon and MetHb A. It produced a spectrum which obviously differed from MetHb M Saskatoon and MetHb A, and its absorption maxima were found around 500 and 623 mμ, in contrast with those around 490 and 598 mμ in MetHb M Saskatoon. Another absorption maximum around 540 mμ observed in MetHb M Saskatoon, which seems to correspond to the low-spin β band, was slightly found in MetHb M Milwaukee-1.

As shown in Fig. 3, the spectrum of HbO₂ M Milwaukee-1 in lower range of pH was significantly different in air from that in pure O₂ gas; the absorption intensity of the α and β bands increased in pure O₂ gas. In higher range of pH, whereas, the spectral change of HbO₂ M Milwaukee-1 depending on O₂ pressure was not observed.

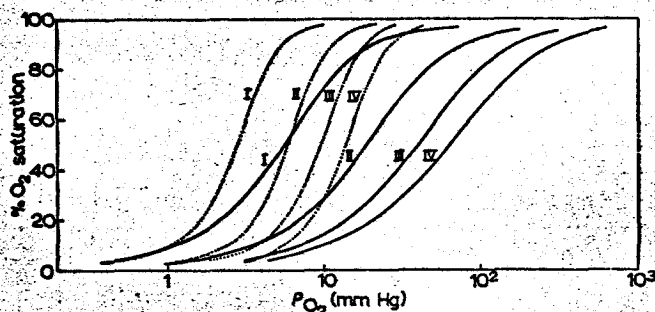


Fig. 4. O₂ equilibrium curves of the purified Hb M Milwaukee-1 and Hb A. Hb concn., $6 \cdot 10^{-5}$ M as heme, in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.9, 7.4, 7.0 and 6.5); temp. 20°; $\lambda = 564$ mμ. —, HbO₂ M Milwaukee-1; ·····, HbO₂ A. I, pH 7.9; II, pH 7.4; III, pH 7.0; IV, pH 6.5.

O_2 equilibrium

As predicted from the results of the spectral change in lower range of pH (Fig. 3), purified HbO₂ M Milwaukee-1 showed very low affinity for O₂; the position of the curves was unusually shifted to the right in all pH ranges, in comparison with that of Hb A (Fig. 4). The shape of the curves of Hb M Milwaukee-1 was less sigmoid than those of Hb A. The value of n in the empirical equation of Hill, a numerical expression of the heme-heme interaction, were 1.4–1.6 and seemed to be pH dependent (Fig. 5). The Bohr effect, *i.e.* the effect of pH on the O₂ equilibria, was apparently present in Hb M Milwaukee-1 as shown in Fig. 5. And the magnitude of this effect in Hb M Milwaukee-1, in terms of $-\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$ at pH 7.4 was 0.94 and was larger than that, 0.60, of Hb A.

Fig. 6 shows the O₂ equilibrium curves of Hb A, hemolysate containing Hb M Milwaukee-1 and purified Hb M Milwaukee-1 at pH 7.0. From the chromatographic procedure, the hemolysate was found to be composed of about 60% of Hb A and 40% of Hb M Milwaukee-1. On the assumption that both fractions in hemolysate behave independently of each other, the curve for hemolysate would correspond to the calculated one in Fig. 6. The observed curve, however, was apparently different from the calculated one, showing the presence of some interaction between the molecule of Hb A and Hb M Milwaukee-1.

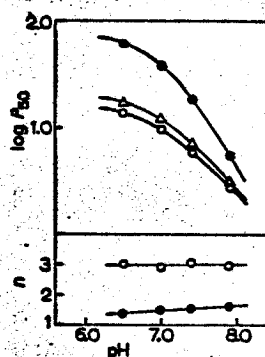


Fig. 5. Bohr effect and n values of the purified Hb M Milwaukee-1, the patient's hemolysate and Hb A. ●—●, purified Hb M Milwaukee-1; △—△, patient's hemolysate; ○—○, Hb A.

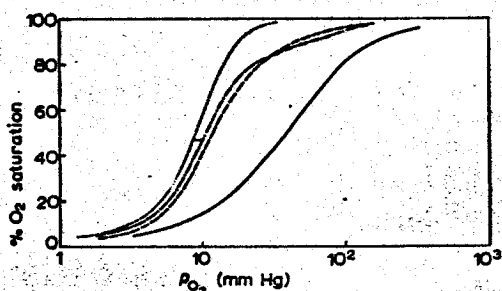


Fig. 6. O₂ equilibrium curves of the purified Hb M Milwaukee-1, the patient's hemolysate and Hb A. Hb concn., $6 \cdot 10^{-5}$ M as heme, in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0); temp., 20°; $\lambda = 564 \text{ m}\mu$. —, purified Hb M Milwaukee-1; ---, patient's hemolysate; ·····, Hb A; — · —, calculated curve of the patient's hemolysate (refer to text).

The effect of temperature on the O₂ affinity and n values of the O₂ equilibrium curves of Hb A and Hb M Milwaukee-1 are shown in Fig. 7. In Hb A, a change of temperature obviously influenced the O₂ affinity, while n values remained unchanged. In Hb M Milwaukee-1, however, the effect of temperature on the O₂ affinity was almost one half of that observed in Hb A. These observations suggest that the heat of oxygenation is significantly smaller in Hb M Milwaukee-1 than in Hb A. Further, it may be interesting to note that the n value of the curves of Hb M Milwaukee-1 seems to be temperature dependent; 1.26 at 10° and 1.41 at 20°, respectively. The theoretical

analysis for these interesting phenomena is now in progress from thermodynamical point of view.

Although these results were obtained at $564 \text{ m}\mu$, there was slight transition in shape and location of the curves of Hb M Milwaukee-I in accordance with the other wavelength used for measurements. But the extent of this transition in Hb M Milwaukee-I was not so remarkable as observed in Hb M Hyde Park¹². So the above-mentioned phenomenon would not affect our explanations of the obtained results.

The ultracentrifuge analysis of Hb M Milwaukee-I also revealed that there was no significant change in sedimentation coefficients between oxy and deoxy form of Hb M Milwaukee-I. The low O_2 affinity of Hb M Milwaukee-I seems to involve essentially different mechanism from Hb Kansas, the O_2 affinity of which is also very low¹³.

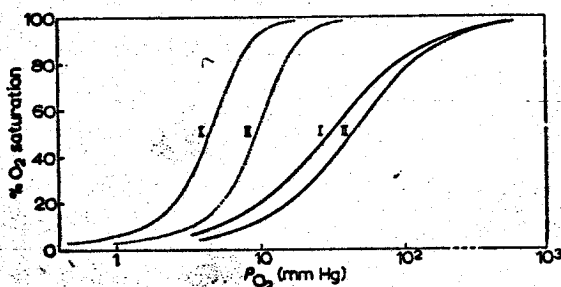


Fig. 7. The effect of temperature on the O_2 equilibrium curves of Hb M Milwaukee-I and Hb A. Hb concn., $6 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ as heme, in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0); temp., 10° and 20° ; $\lambda = 564 \text{ m}\mu$. —, purified Hb M Milwaukee-I; ·····, Hb A. I, 10° ; II, 20° .

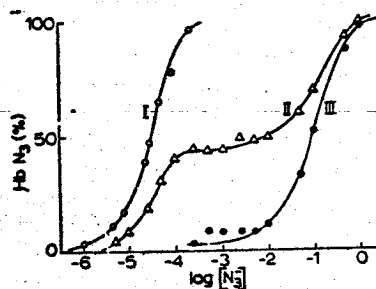


Fig. 8. Equilibrium for the reaction of MetHb M Milwaukee-I and MetHb A with azide. Hb concn., $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ as heme, in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). Equilibrium was measured at $630 \text{ m}\mu$ for MetHb A (I), MetHb M Milwaukee-I (II), and at $603 \text{ m}\mu$ for the ferric hemes in the abnormal β subunits of MetHb M Milwaukee-I (III).

Stabilities

Stabilities of the intramolecular bonding in the abnormal β -subunits of Hb M Milwaukee-I

It has been suggested that the intramolecular bonding of Hb M between the ferric heme iron and the substituted tyrosine residue in the abnormal subunits is so stable that the ferric heme is difficult to react with reducing agent or with various ligands^{14,19}. Fig. 8 shows the plot of percent formation of azide complex versus logarithm of the azide concentration. If assayed at $630 \text{ m}\mu$, the curve for MetHb M Milwaukee-I was biphasic, reflecting its heterogenous reactivity to azide, the first phase for normal α and the second for abnormal β subunits. When assayed at $603 \text{ m}\mu$, an isosbestic point for MetHb A azide complex and MetHb A, the curve for abnormal β subunits was obtained. The apparent K' value for this curve was $1 \cdot 10^{-1} \text{ M}$ and considerably larger than that for the abnormal β subunits of Hb M Saskatoon. The apparent equilibrium constants of the abnormal β subunits of Hb M Milwaukee-I for azide and for cyanide are compared with those of other hemoglobins M in Tables II and III.

The ferric heme iron of the abnormal β subunits of Hb M Milwaukee-I was reduced by sodium dithionite under CO gas. The rate of the reduction, together with those of

TABLE II

APPARENT EQUILIBRIUM CONSTANTS (K') FOR THE FERRIC HEMES IN THE ABNORMAL SUBUNITS OF Hb M AND FOR MetHb A TOWARD AZIDE

K' values were graphically obtained from the plot of the percent formation of HbN₃ complex.

Hemoglobin	K' (M)
Hb M Milwaukee-1	$1.0 \cdot 10^{-1}$
Hb M Iwate	•
Hb M Boston	•
Hb M Hyde Park	Not examined
Hb M Saskatoon	$2.9 \cdot 10^{-3}$
MetHb A	$3.3 \cdot 10^{-6}$

* K' values for Hb M Iwate and Hb M Boston could not be obtained because the affinity of the ferric hemes in the abnormal α subunits of these hemoglobins M toward azide was quite low.

TABLE III

APPARENT EQUILIBRIUM CONSTANTS (K') FOR THE FERRIC HEMES IN THE ABNORMAL SUBUNITS OF Hb M AND FOR MetHb A TOWARD CYANIDE

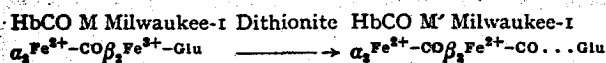
K' values were graphically obtained from the plot of the percent formation of HbCN complex.

Hemoglobin	K' (M)
Hb M Milwaukee-1	$7.1 \cdot 10^{-4}$
Hb M Iwate	$2.8 \cdot 10^{-1}$
Hb M Boston	$3.5 \cdot 10^{-2}$
Hb M Hyde Park	$2.7 \cdot 10^{-2}$
Hb M Saskatoon	$2.9 \cdot 10^{-4}$
MetHb A	$3.5 \cdot 10^{-6}$

TABLE IV

REDUCTION RATE OF HbCO M TO HbCO M' BY SODIUM DITHIONITE

HbCO M (final concn., $3.25 \cdot 10^{-4}$ M as heme) in borate-phosphate buffer was reduced with sodium dithionite (final concn., $1.5 \cdot 10^{-2}$ M) at pH 7.0. The reaction was performed in pure CO gas at 25° and measured at 600 m μ . HbCO M' is formed from HbCO M by the action of sodium dithionite under CO gas, and its absorption spectrum is identical with that of HbCO A. The reaction may be represented by the following formula:



Hemoglobin	Half time (sec)
HbCO M Milwaukee-1	23
HbCO M Iwate	Not examined
HbCO M Boston	260
HbCO M Hyde Park	55
HbCO M Saskatoon	15
HbCO A	•

* The reduction rate of MetHb A to HbCO A under above condition was too rapid to be measured with accuracy.

TABLE V

AUTOXIDATION RATE OF HbO₂ M AND HbO₂ A

Autoxidation of HbO₂ (final concn., $2.5 \cdot 10^{-4}$ M as heme) in 0.04 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) was performed in pure O₂ gas at 37°.

Hemoglobin	Half time (h)
HbO ₂ M Milwaukee-1	15.4
HbO ₂ M Iwate	3.4
HbO ₂ M Boston	4.1
HbO ₂ M Hyde Park	9.4
HbO ₂ M Saskatoon	30.1
HbO ₂ A	18.8

other hemoglobins M, are collected in Table IV. These results indicate that the intramolecular bonding between abnormal ferric iron and the substituted glutamic acid residue of Hb M Milwaukee-1 was less stable than that of the α -chain variants but more stable than that of Hb M Saskatoon.

Stabilities of the ferrous heme irons in the normal α subunits

As previously reported⁵, the autoxidation rate of the normal heme iron of hemoglobins M was very different according to which subunit was abnormal; the β -heme iron of Hb M Boston and Hb M Iwate, abnormal in the α subunits, was higher in rate of autoxidation than the α -heme iron of Hb M Saskatoon and Hb M Hyde Park, abnormal in the β subunits. The α -heme iron of Hb M Milwaukee-1 was oxidized by molecular O₂ in similar rate to Hb A, Hb M Saskatoon and Hb M Hyde Park (Table V), while HbCO M Milwaukee-1 showed considerably higher rate than HbCO A in the oxidation by potassium ferricyanide.

Stability of MetHb M Milwaukee-1 in heat denaturation experiment

The denaturation rate of MetHb M Milwaukee-1 was measured at 64°. As shown in Table VI, Hb M Milwaukee-1 was as stable as Hb A against heat and distinctly different from Hb M Saskatoon and Hb M Hyde Park, abnormal in the β subunits.

TABLE VI

HEAT DENATURATION RATE OF MetHb M AND MetHb A

MetHb (final concn., $6 \cdot 10^{-5}$ M) in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) was incubated at 64°. Measurement of the remaining MetHb was made at 500 and 630 m μ (ref. 5).

Hemoglobin	Half time (min)
MetHb M Milwaukee-1	4.0
MetHb M Boston	14.9
MetHb M Hyde Park	1.6
MetHb M Saskatoon	1.9
MetHb A	4.1

DISCUSSION

We have already reported that the patient's blood containing each Hb M exhibits EPR absorptions around $g = 6.0$ and 2.0 (refs. 11 and 12). Particularly, the

absorption near $g = 6.0$ shows typical splitting which is explained by the anisotropy of g values in the heme plane¹⁵. All of these hemoglobins M have the same kind of amino acid replacement, histidine with tyrosine, and it has been believed that the substituted tyrosine residue formed an intramolecular bonding with the ferric heme iron^{14,4}. The results in Fig. 1 showed that Hb M Milwaukee-1 also have the splitting near $g = 6.0$ as observed in other hemoglobins M, though its extent is the largest among Hb M variants (Table I). This seems to indicate that the substituted glutamic acid residue of Hb M Milwaukee-1 has an effect on the heme iron analogous to the tyrosine residue in other hemoglobins M. Further, Hb M Milwaukee-1 has a small signal at $g = 6.0$ as observed in Hb M Saskatoon. If it is assumed that the ferrous heme iron in the normal α subunits of Hb M Milwaukee-1 is oxidized to ferric state, then the EPR signal will appear at $g = 6.0$. But this is less likely, because powerful reducing system is in action in fresh red cell and the autoxidation rate of the ferrous heme iron of Hb M Milwaukee-1 is as low as coexisting Hb A. Another explanation offered for this finding is that the abnormal β -heme iron of Hb M Milwaukee-1 or Hb M Saskatoon is in electronically heterogenous state; a part of the ferric heme iron in the abnormal β subunits shows the signal similar to that of MetHb A.

In hemoglobins M, the heme iron in the abnormal subunits is in ferric state and cannot combine with O_2 , whereas the heme iron in normal subunits is in ferrous state and is able to carry O_2 . Therefore the obtained results of O_2 equilibrium of Hb M Milwaukee-1 show the function of the hemes in normal α subunits. In contrast to the normal α subunits of Hb M Saskatoon¹⁶ and Hb M Hyde Park¹², that of Hb M Milwaukee-1 show very low affinity for O_2 , which is rather like that of Hb M Boston¹⁷ and Hb M Iwate¹⁸. But different from these α -chain variants of Hb M, Hb M Milwaukee-1 clearly shows the Bohr effect, characterizing the β -chain variants of Hb M. Its magnitude was larger than that of Hb A. Further, the heme-heme interaction given as an n value was apparently present in Hb M Milwaukee-1 (Fig. 5). These results suggest that a conformational change occurs in Hb M Milwaukee-1 molecule during oxygenation.

There is a discrepancy between the observed curve and the predicted one in the O_2 equilibrium of the hemolysate containing Hb M Milwaukee-1 (Fig. 6); the predicted biphasic feature for the curve of the hemolysate was considerably diminished in the observed curve. The similar phenomenon was also indicated in the hemolysate containing Hb Hiroshima (refer to "flattening effect" in ref. 19). The discrepancy of the observed curve suggests the existence of some interaction between the molecules of Hb A and Hb M Milwaukee-1. One of the plausible explanations is the formation of the hybrid molecule, $\alpha_2^A\beta^A\beta^M$. It is conceivable that the shape of the obtained curve would be determined by the amount and the functional behavior of the hybrid molecule, although the presence of such a molecule has not been demonstrated.

It was shown that MetHb M Milwaukee-1 molecule was as stable as MetHb A in heat denaturation (Table VII). This observation is quite interesting in the light of the results on the stability of Hb Sydney against heat⁷. Hb Sydney is known to have an amino acid substitution, valine with alanine, at E 11 β as Hb M Milwaukee-1⁷. In contrast to Hb M Milwaukee-1, it was reported that Hb Sydney was quite unstable against heat⁷. The possible reason for this difference in the heat stability between Hb M Milwaukee-1 and Hb Sydney may reside in the presence or absence of the intramolecular bonding between the heme iron and the substituted amino acid residue; in Hb M Milwaukee-1, it is suggested that the carboxyl group of the substituted

glutamic acid residue forms a stable ionic linkage with the ferric heme iron, thereby stabilizing it in ferric form²⁰. This hypothesis is also supported by the results of the reaction of the ferric heme iron with azide, cyanide and the reducing agent (Tables II-IV). On the other hand, in Hb Sydney the replacement of E 11 valine by alanine removes two methyl groups which are normally in contact with the heme group and causes the weakening of the hemoglobin linkage making the entire molecule unstable²⁰.

Furthermore the results of stability experiments *in vitro* are closely related with clinical signs of the patients possessing each abnormal hemoglobin; the patients possessing Hb Sydney reveal severe hemolytic anemia²¹, while those who have Hb M Milwaukee-1 reveal none of the hemolytic signs⁶.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors' would like to thank Professor Y. Yamamura and Professor M. Kotani for their helpful comments.

REFERENCES

- 1 P. S. GERALD AND E. M. SCOTT, in J. B. STANBURY, J. B. WYNGAARDEN AND D. S. FREDRICKSON, *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, 1966, p. 1090.
- 2 S. SHIBATA, A. TAMURA, I. IUCHI AND T. MIYAJI, *Proc. Japan Acad.*, 40 (1964) 220.
- 3 P. HELLER, R. D. COLEMAN AND V. J. YAKULIS, *J. Clin. Invest.*, 45 (1966) 1021.
- 4 P. S. GERALD AND M. L. EFRON, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 47 (1961) 1758.
- 5 A. HAYASHI, T. SUZUKI, A. SHIMIZU AND Y. YAMAMURA, *Biochim. Biophys. Acta*, 168 (1968) 262.
- 6 A. V. PISCIOTTA, S. N. EBBE AND J. E. HINZ, *J. Lab. Clin. Med.*, 54 (1959) 73.
- 7 R. W. CARRELL, H. LEHMANN, P. A. LORKIN, E. RAIK AND E. HUNTER, *Nature*, 215 (1967) 626.
- 8 K. IMAI, H. MORIMOTO, M. KOTANI, H. WATARI, W. HIRATA AND M. KURODA, in preparation.
- 9 A. HAYASHI, A. SHIMIZU, T. SUZUKI AND Y. YAMAMURA, *Biochim. Biophys. Acta*, 140 (1967) 251.
- 10 K. G. PAUL, H. THEORELL AND Å. Å. ÅKESON, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 1284.
- 11 A. HAYASHI, A. SHIMIZU, Y. YAMAMURA AND H. WATARI, *Science*, 152 (1966) 207.
- 12 A. HAYASHI, T. SUZUKI, A. SHIMIZU, K. IMAI, H. MORIMOTO, T. MIYAJI AND S. SHIBATA, *Arch. Biochem. Biophys.*, 125 (1968) 895.
- 13 J. BONAVENTURA AND A. RIGGS, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 980.
- 14 P. S. GERALD AND P. GEORGE, *Science*, 129 (1959) 393.
- 15 H. WATARI, K.-J. HWANG, K. KIMURA AND K. MURASE, *Biochim. Biophys. Acta*, 97 (1965) 472.
- 16 T. SUZUKI, A. HAYASHI, A. SHIMIZU AND Y. YAMAMURA, *Biochim. Biophys. Acta*, 127 (1966) 280.
- 17 T. SUZUKI, A. HAYASHI, Y. YAMAMURA, Y. ENOKI AND I. TYUMA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19 (1965) 691.
- 18 N. HAYASHI, Y. MOTOKAWA AND G. KIKUCHI, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 79.
- 19 K. IMAI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 127 (1968) 543.
- 20 M. F. PERUTZ AND H. LEHMANN, *Nature*, 219 (1968) 902.
- 21 E. RAIK, E. HUNTER AND D. A. LINDSAY, *Med. J. Australia*, 1 (1967) 955.

Biochim. Biophys. Acta, 194 (1969) 6-15

代 謝 Metabolism and Disease Vol.6 No.11 (1969) 別 刷

異常ヘモグロビンと酸素結合能

今 井 清 博

中 山 書 店

- 91) 和田文雄, 林 隆彦, 坂本幸哉: 生化学, **41**, 296 (1969)
- 92) Wada, F., Shimakawa, H., Takasugi, M., Kotake, T. & Sakamoto, Y.: *J. Biochem.*, **64**, 109 (1968)
- 93) Tephly, T.R. & Mannering, G. J.: *Mol. Pharmacol.*, **4**, 10 (1968)
- 94) Gigon, P. L., Gram, T. E. & Gillette, J. R.: *Mol. Pharmacol.*, **5**, 109 (1969)

文 献 抄 録

An Improved Fluorometric Method for Measurement of Alloxan in Biological Fluids

Bilic, N. & Felber, J.-P.: *Anal Biochem.*, **29**, 91 (1969)

現在生体試料中のアロキサンの定量法がいくつか報告されているが不満な点が少なくない。今回高感度かつ再現性のよい方法を確立した。

溶血が生じないように硫酸ナトリウムをふくむクエン酸—リン酸緩衝等張液 (pH 4.00) 中で 1, 2-フェニレンジアミンを反応させるとアロキサンは分解することなく定量的に反応して蛍光物質 (蛍光波長 485 mμ)

を生成する。

パラバン酸, 尿酸, システイン, グルタチオン, エルゴチオニン, アラントインおよびカフェインが, 1, 2-フェニレンジアミンにより蛍光を発しないことはすでに明らかにされているが, さらに精査した結果アスコルビン酸 (蛍光波長 415 mμ), 尿素およびアミノ酸も本法の妨害にならないことがわかった。(T)

異常ヘモグロビンと酸素結合能

今井清博*

はじめに

近来、宇宙通信をはじめ電子計算機やテレビ・ラジオ・ステレオなどの家庭電化器具にいたるまでの、いわゆる電子機器を生みだした電子工学の分野では、半導体素子が絶大なる貢献をしてきたことは周知のとおりである。このように半導体素子が驚異的な働きを有するのは、つきつめれば、非常に純粋なシリコンやゲルマニウムの“完全な”結晶にごくわずかの不純物を添加することによって、結晶の電気的特性が劇的に、多種多様に変化するからにほかならない。このようにして“完全なるもの”の研究はもちろん必要にして欠くべからざるものではあるが、“不完全なるもの”の研究はしばしば前者の研究だけからは予期されなかったような意外な知識をもたらすものである。このことはなにを研究するさいにもあてはまるようである。

赤血球のなかにあって、体内の酸素運搬の役を担っているヘモグロビンはずいぶん前から多くの研究者によって研究されてきた。とくに近年英国の Perutz ら¹⁻³⁾のグループによって、ヘモグロビン分子の原子レベルでの立体構造が明らかにされ、ヘモグロビンの生理機能の機構が分子もしくは原子のレベルで解明される日もそう遠くはなさそうに思われる。いっぽう、1949年に Pauling ら⁴⁾が鎌型赤血球貧血症の患者から異常ヘモグロビン(Hb S)を初めて発見してから約20年間、この“欠陥ヘモグロビン”ともいうべき異常ヘモグロビンが世界各地でつぎつぎと新しく発見され、それらの構造や機能がくわしく調べられてきた。そしてこの異常ヘモグロビンの研究は“完全ヘモグロビン”ともいうべき正常ヘモグロビンだけの研究からは期待されないような貴重な知見を

どんどんもたらしつつある。

この稿では現在までに世界各地で発見されて構造異常が明らかにされた異常ヘモグロビンを紹介し、それらの酸素結合能を正常ヘモグロビンのそれと比較し、分子論的立場から検討する。また異常ヘモグロビンの存在と連関する種々の疾患と、それに対する補償効果にもふれる。そして、異常ヘモグロビンの研究が他の学問分野とのかかわりあいにおいて、どのような意義をもっているかについて論じたい。

I. ヘモグロビンの構造と機能

1. ヘモグロビンの構造

ヘモグロビンは分子量が約64,500の球状蛋白質である。それはグロビンという蛋白部分と、ヘムとよばれる1個の鉄原子をふくむ平面状の低分子の4個の補欠分子族とからなる。グロビンは4本のポリペプチド鎖からなり、それらのうち2本ずつはたがい同一のもので、それぞれ α 鎖、 β 鎖とよばれる。各ペプチド鎖はそれぞれ1個ずつヘムを有し、それぞれを α サブユニット、 β サブユニットと称する。したがってヘモグロビン分子は $\alpha_2\beta_2$ という記号であらわされる。 α 鎖と β 鎖はそれぞれ141個、146個のアミノ酸からなり、その配列順序(1次構造)は現在完全に知られている。ヘモグロビン分子の原子レベルでの立体構造は、英国の Perutz ら³⁾のグループによるX線結晶解析による方法で、かなりの精度(分解能2.8Å)で解明されている。それによると、 α 鎖も β 鎖も基本的には同一の構造を有し、図1のようにあらわされる。各ペプチド鎖はところどころでまっすぐにのびる8個のらせん構造(A, B, ……、H)を

*大阪大学基礎工学部生物工学科(大阪府豊中市待兼山町1-1)
Department of Biophysical Engineering, Faculty of Engineering Science, Osaka University
Kiyohiro Imai: Oxygen-transport function of abnormal hemoglobins

とり、他の部分はランダムな非らせん構造 (NA, AB, (BC), CD, …… , HC) をとる (2次構造)。さらに各ペプチド鎖は非らせん構造の部分でおりたたまれて立体的な構造をとる (3次構造)。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列して (4次構造)、1個の球形のヘモグロビン分子 (最大径64Å) をつくる。分子は1本の二回対称軸を有する。ペプチド鎖のなかの各残基の位置は、らせん構造または非らせん構造の部分で N 末端側から数えた番号であらわす。たとえば α 鎖の N 末端から85番目のアスパラギン酸と、 β 鎖の N 末端から90番目のグルタミン酸とは、通し番号は異なるが、ともに F ヘリックスの6番目の残基であって、立体構造の上では同一の位置にある。

4個のヘムはそれぞれグロビンのくぼんだ部分に挿入されており、ヘムの周囲は非極性の残基でおおわれている。ヘムの中央に2価の鉄原子が位置し、鉄の第1から第4配位座まではプロトポルフィリンの4個の窒素原子が、また第5配位座はグロビンの F8 の残基であるヒスチジン (近位ヒスチジンという) のイミダゾール基の窒素原子が占めている。第6配位座からは分子状酸素が可逆的に結合 (酸素化という) する。なお第6配位座にグロビンの E7 のヒスチジン (遠位ヒスチジンという) が近接している。

グロビンの高次 (3次、4次) 構造や、グロビンとヘムとの結合はおおむね残基間の、または残基とヘムとの非極性結合によって安定化している。この種類の結合をここでは“分子内結合”とよぶことにする (図2参照)。

グロビンの内部はすべて非極性の残基で占められており、たとえ1個でも極性の残基がグロビンの内部に取り込まれると、たちまち高次構造は破壊され、そのような分子は実際には存在できないと考えられている。これとは逆に分子の表面は多くの極性残基が露出していて、水分子と接触している。また分子の二回対称軸に沿って、比較的大きな (数分子の水がはいれる) 細長い空洞があり、内部は極性基でおおわれている。図2に示されるように異名鎖間の接触の仕方には2通りあり、それぞれ $\alpha_1\beta_1$ 接触、 $\alpha_1\beta_2$ 接触とよばれる。これらのサブユニッ

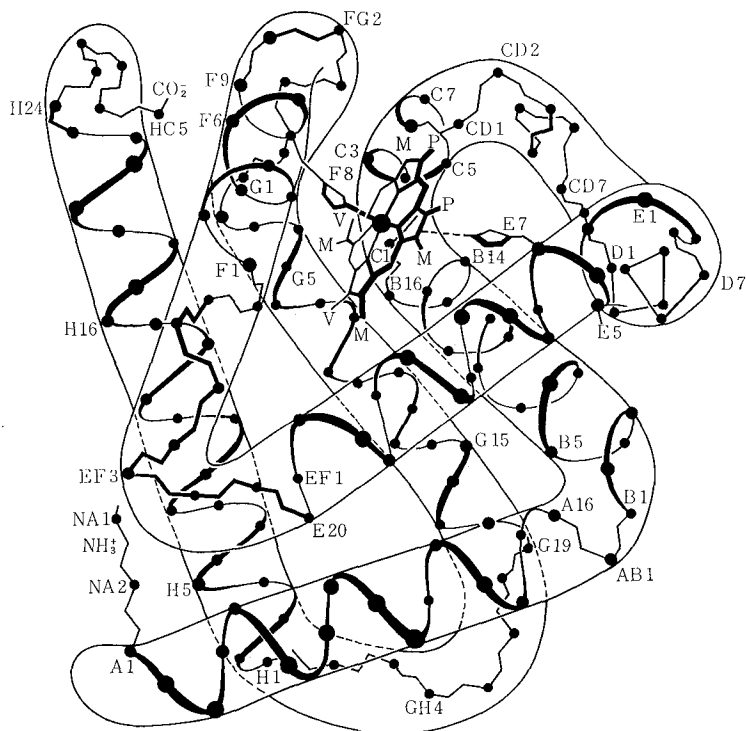


図1 サブユニットの立体構造

この図は、本来マッコウクジラ・ミオグロビンの分子構造をあらわすものであるが、 α 鎖、 β 鎖も基本的にはこれと同一の構造を有する。両鎖の構造がもっとも異なる点は β 鎖には存在する D ヘリックスが α 鎖には欠如していることである (文献1) より転写)。

ト境界面での分子内結合もおおむね非極性結合である。これらの結合は共有結合に比べてはるかに弱いもので、環境 (溶媒の性質) によっては1個の分子が二量体や単量体にまで解裂することがある。

たんにヘモグロビンの構造といっても、酸素を結合したオキシヘモグロビンと、酸素を解離したデオキシヘモグロビンとで、立体構造に差異のあることが知られている。これを“酸素化にともなう構造変化”という。すなわち酸素化の場合、各サブユニットの2次、3次構造はほとんど変化しないが、サブユニット間の相対位置 (とくに2個の β 鎖間の) がかなり変化する。この構造変化のさいに、 $\alpha_1\beta_1$ 界面では1Å程度の“ずれ”しかおこらないが、 $\alpha_1\beta_2$ 界面では約6Åもの“ずれ”がおこる。

正常な成人の赤血球のなかには、これまでのべてきたヘモグロビン (Hb A= $\alpha_2\beta_2$ と表現する) が圧倒的に多いのであるが、この他に微量成分として、3%以下の Hb A₂ (= $\alpha_2\delta_2$) や1%以下の Hb F (= $\alpha_2\gamma_2$) などがふくまれる。 δ 鎖や γ 鎖は β 鎖と同数のアミノ酸からなり、その配列もかなり類似している。Hb Fは胎児ヘモグロビンと称して、胎児の時期に主成分となる。以下、

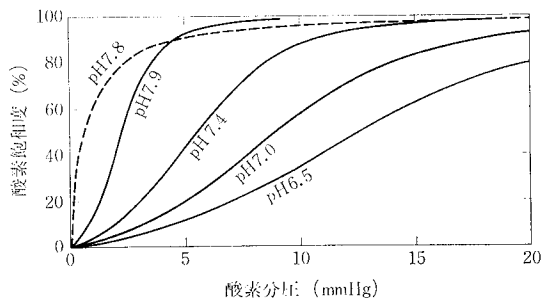


図3 ヘモグロビンとミオグロビンの酸素平衡曲線

実線は成人の正常ヘモグロビンであり、破線はマッコウクジラ・ミオグロビンである。ミオグロビンの曲線は直角双曲線型であるが、ヘモグロビンの曲線はS字型となるのが特徴である。蛋白濃度 $6 \times 10^{-5} \text{M}$ (ヘムあたり)、緩衝溶液 0.1M phosphate, 温度 20°C 。いずれもⅢ章でのべる方法によって測定された。

とくにことわらないかぎり、たんにヘモグロビンというとき Hb A をさすことにする。

2. ヘモグロビンの機能

ヘモグロビンが赤血球に運ばれて体内を循環するとき、酸素分子との結合・解離反応はつねに“化学平衡”の状態を保ちつつおこなわれると考えられる。したがってヘモグロビンの酸素運搬という機能の各特性を論ずる場合には、よく“酸素平衡曲線”(oxygen equilibrium curve, 以後 OEC と略記する) が用いられる。図3はヘモグロビンとミオグロビンの OEC の例で、横軸は溶液中の酸素分圧、縦軸はある酸素分圧でのヘモグロビンのもつ全ヘムの酸素化された割合、すなわち酸素飽和度である。

これらの曲線にあらわれたヘモグロビンの酸素結合能に関する諸特性は、通常つぎの3点にしばって議論される。

1) 酸素親和性: P_{50}

OEC が左寄りになるほど、そのヘモグロビンの酸素親和性は高いという。通常、50%の酸素飽和度に達するのに必要な酸素分圧 P_{50} で表現する。 P_{50} の数値が小さいほど親和性が高いことになる。ヘモグロビンの酸素親和性は、一般に溶液の pH、溶媒の種類(緩衝溶液や塩などの種類と濃度)、ヘモグロビンの濃度、それに特殊な物質——たとえば2,3-DPG (2,3-diphosphoglycerate) のような有機リン酸塩⁵⁾——などの影響を受けやすい。したがってヘモグロビンの酸素親和性を議論する場合には、これらの測定条件につねに留意しなければならない。

2) Bohr 効果の大きさ: γ

ヘモグロビンが酸素化されると、条件にもよるが、ヘモグロビン1分子につき、2, 3個の水素イオンを溶液

中に放出したり、逆に取り込んだりする。したがってヘモグロビンの酸素親和性は溶液の pH に依存する。これを Bohr 効果⁶⁾という。生理的 pH 付近では pH が低下すると親和性が低くなる。このことは動脈血に比べて静脈血のほうが pH が低下する傾向があり、そのため組織中ではヘモグロビンが酸素を放出しやすくなることを意味する。この効果は能率よいガス交換をおこなうためにヘモグロビンがもつ“特技”のうちの一つなのである。この効果の強さは通常 $\gamma = \Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$ なる指標で表現される。この γ はヘモグロビンが放出する水素イオンの個数と直接関係する量である。

3) ヘム間相互作用の強さ: n

前述のように1分子のヘモグロビンは4個の活性中心——ヘム——をもつので、ヘモグロビンと酸素との反応は4段階の平衡過程⁷⁾からなっている。ところでいまかりに4個のヘムがたがいに同等でしかも独立であるとするとき、期待される OEC は直角双曲線であるが、図3から知られるように実際には S 字状をなしている。すなわち分子中の4個のヘムは少なくともたがいに独立ではなく、1個目の酸素は比較的結合しにくくても、いったん一つのヘムが酸素化されるとそれが他のヘムに影響をおよぼして、2個目、3個目、4個目とつづく酸素はしだいに結合しやすく(反応の自由エネルギー変化が大きく)なるものと解釈される。これを“ヘム間相互作用”と称する。ヘモグロビンの OEC が S 字状をなすのはこの作用が存在するためであって、この S 字性が強いほど赤血球と肺泡や組織とのガス交換が能率よくおこなわれる。

ヘモグロビンの OEC を比較的よく表現する式として、つぎの Hill の経験式⁸⁾が一般に広く用いられている。

$$y = \frac{Kp^n}{1 + Kp^n} \text{ または } d \log \left(\frac{y}{1-y} \right) / d \log p = n$$

ここに y は酸素飽和度、 p は酸素分圧、 K は定数である。Wyman⁹⁾は実験的に求めた OEC から n を p の関数として求めると、その n から酸素化にともなうヘム間の相互作用のエネルギーが計算できることを熱力学的考察から示した。それで実際には n の最大値 ($p = P_{50}$ における n と考えてよい) をもってヘム間相互作用の強さをあらわす指標とし、これを Hill の定数とよぶ。 $n=1$ は相互作用が存在しないことを意味し、 n が4に近づくほど相互作用は強くなる。正常ヘモグロビンでは通常 $n=2.5 \sim 3.0$ である。

ヘム間相互作用の分子論的な機構はまだ完全には解明されていないが、前述したような“酸素化にともなう構造変化”が媒介となって、一つのヘムから他のヘムへ影

響がおよぶと考えるのが定説である。

II. 異常ヘモグロビンとは

異常ヘモグロビンとは正常人のもつヘモグロビンとは異なる分子構造をもって産生されるヘモグロビンである。現在のところ構造異常はグロビンの部分にかざられている。異常ヘモグロビンのなかでもっとも多いのは、 α 鎖または β 鎖のいずれか1個のアミノ酸が他の種類のアミノ酸によって置換されたもので、これはヘモグロビン合成の情報を担う遺伝子の突然変異によって、すなわちDNAのなかの1個の塩基が他の塩基で置換されることによって生ずるものと考えられている。2個のアミノ酸が同時に置換された例も発見されている(Hb C Harlem)。また、 α 鎖または β 鎖のなかの1個または数個のアミノ酸が欠損しているもの、または β 鎖と δ 鎖とが部分的に融合して α 鎖の相手の鎖となって生じたものがあり、これらは減数分裂のさいに遺伝子が交叉して生じたものと考えられている。その他 β 鎖のみからなるもの(Hb H= β_4)や γ 鎖のみからなるもの(Hb Bart's= γ_4)なども発見されているが、これらは遺伝子欠陥により α 鎖の産生が部分的に抑制されたためと考えられている。

異常ヘモグロビンのなかにはその物理化学的性質(吸収スペクトル、酸素結合能、熱安定性、酸・アルカリ耐性、溶解度、ヘム鉄の易酸化性など)が正常ヘモグロビンのそれと比べて異なるものが少なくなく、それが原因でその保有者はいわゆる異常ヘモグロビン症で総称される遺伝性血液病をとまうことがある。ただほとんどの保有者はヘテロ接合体であるため、異常ヘモグロビンの含有量はたかだか50%程度であって、致命的にはならないのが普通である。Hb SやHb Cではホモ接合体の患者も発見されており、前者ではいわゆる“鎌型赤血球貧血症(sickle cell anemia)”と称する重症の溶血性貧血症(hemolytic anemia)がともなう。

表1に現在までに世界で発見され、1次構造の異常が決定された異常ヘモグロビンをまとめておいた。これまで日本では17種類の異常ヘモグロビンが発見され、同定されている。

III. 酸素結合能の測定法

ヘモグロビンの生理機能を研究するには、そのOECを測定することが不可欠である。OECの測定法として古くから伝統的におこなわれているものに、ガス分析法^{38~40)}や分光測定法^{41~43)}があるが、これらの方法は本来連続曲線であるべきOECを、その上の1点ずつを比

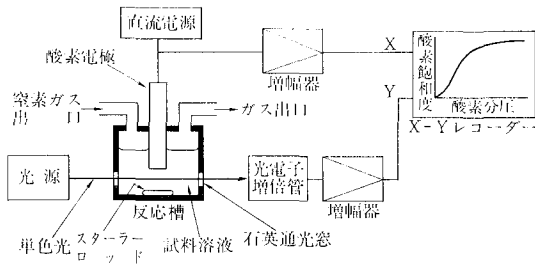


図4 酸素平衡曲線自動記録装置動作原理

較的複雑な操作をおこなって決定するので、精密なOECをうるには多数の点を測定しなければならず、多大の労力と時間と熟練を必要とする。そこで筆者ら¹¹⁾はOECを自動的に連続曲線として記録する装置を試作し、それが異常ヘモグロビンの研究に対してとくに威力を発揮することが明らかにされたので、以下その概要を紹介する。

図4は装置の動作原理を示すブロック・ダイヤグラムである。ステンレス・スチール製の反応槽のなかにヘモグロビン溶液(約6ml)をいれ、マグネチック・スターラーで攪拌しながら反応槽中の気体を純酸素ガスで置換してやると、溶液中の溶存酸素が気相中に拡散し、溶液中の酸素分圧が低下してゆくの、ヘモグロビンはしだいに脱酸素化される。このとき反応槽を分光光度計に組み込んでおいて、ある波長の単色光でヘモグロビン溶液の吸光度変化を測定すると、その変化の割合はヘモグロビンの酸素飽和度に比例する。いっぽう、溶液中の酸素分圧をClark型の酸素電極で測定し、その電気信号を先の分光光度計からの電気信号とともにX-Yレコーダーに送ってやると、記録紙の上にOECが自動的に記録される。1本のOECを描くのに要する時間は約90分である。反応槽全体の温度はサーモモジュールによって一定に調節される。このようにしてえられるOECは縦軸の酸素飽和度に関してたかだか2%の誤差の範囲内で再現することが知られている。この装置による測定法の特長はつぎのようである。

(a) 操作が簡単で、所要時間が短く、比較的正確なOECがえられる。

(b) 測定条件を広い範囲内で選択することができる。

(c) えられるOECが連続曲線なので、異常な形状をなす曲線の分析に有利である。

筆者らはこれまでこの方法によって、主に山口大医学部の柴田らによって発見された約10種類の異常ヘモグロビンの酸素結合能を測定し、良好な結果^{26,29,33)}をえた。

IV. 異常ヘモグロビンの酸素運搬能

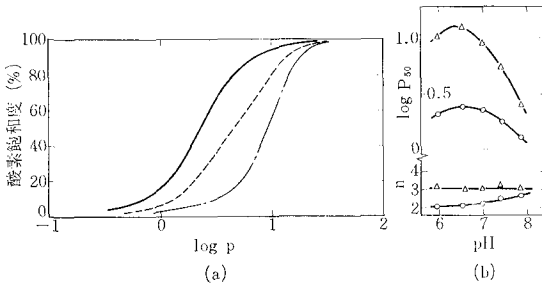


図5 Hb Hiroshima の酸素結合能

(a) 酸素平衡曲線。実線は Hb Hiroshima, 点線は Hb A, 破線は全溶血液 (約50%の Hb Hiroshima をふくむ)。いずれも, 蛋白濃度 $6 \times 10^{-5} \text{M}$ (ヘムあたり), 緩衝溶液 0.1M phosphate, pH 7.0, 温度 20°C . 横軸は酸素分圧 p (mm Hg) の対数をとってある。Ⅲ章でのべた方法で測定された。(b) P_{50} (mmHg) の pH 依存性 (Bohr 効果) と n の pH 依存性。○—○ は Hb Hiroshima, △—△ は Hb A. 測定条件は(a)と同様。

大半の異常ヘモグロビンは正常な酸素結合能を有するが, なかには Hb A に比べていちじるしく異なった機能を有するものも少なくない。また分子自身が不安定で, 溶血性貧血の原因となっているものも多い。生体内ではこのような異常ヘモグロビン症に対して, いろいろな補償効果があらわれているのを見ることができ。以下このような内容をあつかうが, 最近 Perutz ら²¹⁾がヘモグロビンの病理学を分子論的な立場から解明することを試みているので, 詳細を知りたい読者はそれを参照されたい。

1. 正常機能を有する異常ヘモグロビン

現在までに発見された異常ヘモグロビンの大多数にはなんらの機能異常も認められず, その保有者も一般に無症状である。表1の備考欄にとくに症状の記されていないもののなかで, 酸素結合能の報告のなされていないものも多く残っているが, これらは多分正常な酸素結合能を有するか, もし異常であってもわずかな差にとどまると考えてさしつかえなからう。これらの正常機能を有するヘモグロビンのアミノ酸置換は, ほとんど分子の表面でおこっているのが特徴で (表1参照), 置換によって生じた分子の荷電の変化によって初めて発見されたものが実に多い。分子表面での荷電変化は一般には機能に影響をおよぼさないと考えられる。

2. 異常な酸素結合能を有する異常ヘモグロビン

1) Chesapeake¹⁶⁾, J Cape Town¹⁷⁾, Yakima³⁰⁾, Kempsey³¹⁾, Kansas³²⁾, Hiroshima³³⁾, Rainier³⁴⁾

これらのヘモグロビンはいずれもいちじるしい機能異常を有する。図5は Hb Hiroshima の酸素結合能をあらわしたものである。pH にもよるが, いちじるしい場合には Hb Hiroshima の酸素親和性は Hb A のそれの5倍

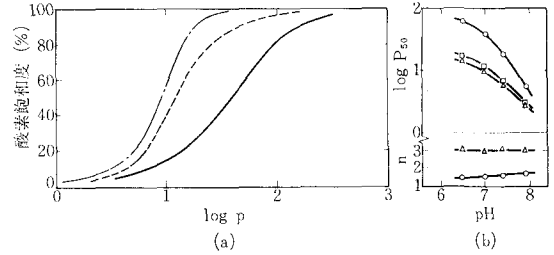


図6 Hb M Milwaukee I の酸素結合能

(a) 酸素平衡曲線。実線は Hb M Milwaukee I, 点線は Hb A, 破線は全溶血液 (約40%の Hb M Milwaukee I をふくむ)。測定条件は図5の場合と同様。Ⅲ章の方法で測定された。

(b) Bohr 効果と, n の pH 依存性。○—○ は Hb M Milwaukee I, △—△ は Hb A, □—□ は全溶血液。測定条件は(a)と同様。

にも達する。

これらのヘモグロビンのなかで, Hb Kansas を例外として他はいずれもいちじるしく高い酸素親和性を示す。このようなヘモグロビンは組織に達しても, 結合している酸素を解離しにくいので, それだけガス交換機能は低下する。これらのヘモグロビンの保有者に共通して多血症 (polycythemia) がみられるのは, その機能低下に対する一種の補償効果のあらわれであると考えられる⁴⁴⁾。Hb Kansas は逆に酸素親和性が異常に低く, 動脈血中でも酸素飽和度はわずかに60%でしかなく, その保有者は紫藍症 (cyanosis) を呈する⁴⁵⁾。

これらのヘモグロビンのアミノ酸置換の位置は, Hb Hiroshima と Hb Rainier を除けばすべて FG 領域または G 領域にあり, これらの領域は $\alpha_1\beta_2$ 界面に面している (図2参照)。この界面は酸素化にともなう構造変化のさいに大きな“ずれ”のおこる部分である。これらのヘモグロビンの OEC の S 字性がほぼ消失しているのは, この領域でのアミノ酸置換の結果, $\alpha_1\beta_2$ 界面での分子内結合に重大な欠陥がもたらされて正常な構造変化をおこなえなくなったためと考えられる³²⁾。これらの置換部位の残基がいずれも invariant である (表1参照) ことは, それらがヘモグロビンの機能発現に対していかに重要であるかをさらに物語るものである。これらのヘモグロビンではヘム間相互作用が消失しているのに, Bohr 効果は正常のままである。このことは両現象がかならずしも連関しているとはかぎらないことを意味している。

Hb Hiroshima と Hb Rainier の機能異常に対する分子論的根拠はまだ明らかではないが, これらの機能異常の事実, Antonini ら⁴⁶⁾によっておこなわれたカルボキシペプチダーゼA による化学修飾の実験結果や, 最近 Perutz ら⁴⁷⁾によって提出された Bohr 効果のモデルな

どとならんで、 β 鎖の C 末端付近の残基が機能発現に重要な役割を演じていることを裏づけるものである。

2) H³⁶, Bart's³⁶⁾

Hb H は β 鎖の、Hb Bart's は γ 鎖の四量体である。いずれも異常に高い酸素親和性を示し、Bohr 効果はなく、OEC の S 字性もまったく消失（直角双曲線型）している。これらの事実はヘモグロビンが正常な酸素結合能を発揮するには、 α 鎖と β 鎖または γ 鎖との相互作用が不可欠であることを示している。これらの保有者は軽度の溶血性貧血をともなうが、前項のヘモグロビン群とは異なって多血症を示さない（本章 4 節参照）。

3) E¹⁴⁾, Agenogi¹¹⁾, D Punjab¹⁸⁾

酸素親和性にやや異常が認められるが、他の機能は正常である。Hb E のホモ接合体に軽度の溶血性貧血がみられるほかは、いずれも機能異常と関連した症状はみられない。

4) M Boston¹³⁾, M Iwate¹⁵⁾, M Saskatoon²⁴⁾, M Hyde Park²⁹⁾, M Milwaukee I²⁶⁾

これらを総称して M-type ヘモグロビンという。初めからの 4 種は α 鎖または β 鎖の遠位または近位ヒスチジンがいずれもチロシンによって置換されたものであり、最後のものは E11 β のバリンがグルタミン酸によって置換されたものである。これら M-type ヘモグロビンの特徴は、異常鎖のヘム鉄が *in vivo* の状態からすでに酸化されていて 3 価の状態にあることで、そのため独特の吸収スペクトルを呈する。分離された異常ヘモグロビン成分はチョコレート色を呈し、これらの保有者は紫藍症（黒血症）をともなう。異常鎖のヘム鉄が酸化されているのは、置換によって導入された残基が鉄原子とイオン結合を形成して、鉄の 3 価状態を安定にするためである。異常鎖のヘムは酸素結合能を有しないが、正常鎖のヘムはなおその機能を有し、酸素親和性は Hb M Boston, Hb M Iwate, Hb M Milwaukee I では非常に低く（図 6 参照）、Hb M Saskatoon, Hb M Hyde Park ではほぼ正常かやや高い。Bohr 効果は α 鎖異常のものでは消失しているが、 β 鎖異常のものはむしろ Hb A より強い。OEC の S 字性は Hb M Hyde Park* と Hb M Milwaukee I のみにみられるが、Hb A に比べて小さい。これらの機能異常の事実は異常鎖での構造異常が正常鎖の機能に影響をおよぼしていることを示している。Hb M Saskatoon と Hb M Hyde Park は不安定で、保有者には軽度の溶血性貧血がみられる。M-type ヘモグロビ

ンの性質を比較することによって、完全なヘモグロビン分子中での α 鎖と β 鎖の役割を明らかにする試みがなされている⁴⁸⁾。

3. 不安定ヘモグロビン

α 鎖異常のものでは Torino⁴⁹⁾, Hasharon⁵⁰⁾, Bibba⁵¹⁾, β 鎖異常のものでは Sogn⁵²⁾, Freiburg²⁰⁾, Riverdale-Bronx⁵³⁾, Genova⁵⁴⁾, Tacoma²¹⁾, Philly²¹⁾, Hammersmith²²⁾, Zürich²⁵⁾, Sydney⁵⁵⁾, Seattle²⁷⁾, Borås⁵⁶⁾, Santa Ana⁵⁷⁾, Gun Hill²⁸⁾, Sabine⁵⁸⁾, Köln⁵⁹⁾, Kansas³²⁾, Wien⁶⁰⁾などがこれに該当する。これらのヘモグロビンは熱に対して非常に不安定で、Hb A ならほとんど影響を受けない 50°C でも容易に変性して沈澱してしまうといわれる。そのため *in vivo* でも徐々に変性していわゆる Heinz 小体を形成したり、溶血性貧血をおこしたりする。不安定になる機構はいくつか考えられているが、ヘム周辺のアミノ酸置換によってヘム—グロビン結合がゆるみ、ヘムが離脱してグロビンが破壊される場合、サブユニット界面のアミノ酸置換によってサブユニット解離が促進されて変性する場合、ヘリックス構造を中断させるといわれるプロリンと他のアミノ酸との置換によって高次構造が破壊される場合、などがある。不安定ヘモグロビンには中性アミノ酸相互の置換が多いが、もっとも、グロビンの内部で荷電の変化する置換を想定しても、そのようなヘモグロビンは実在しないものと考えられる。また、不安定ヘモグロビンには β 鎖異常のものが圧倒的に多いのも注目すべきことである。

これらのヘモグロビンのなかで異常な酸素結合能を有するものがいくつか見いだされている（Freiburg, Tacoma, Hammersmith, Zürich, Seattle, Gun Hill, Köln）が、測定が困難なものが多く、より精密なデータがえられることが望まれる。

なお、Hb C, Hb D, Hb E, Hb H, Hb Bart's, Hb M Saskatoon, Hb M Hyde Park など多少不安定で、軽度の溶血性貧血を引きおこす。

4. 異常ヘモグロビンによる溶血性貧血症にみられる補償効果

異常に高い酸素親和性を有するヘモグロビンは組織とのガス交換の能率が悪くなるので、その補償効果のあらわれとして一般にその保有者は多血症をともなうことを先にのべた。

前節でのべた不安定ヘモグロビンは一般に赤血球の寿命を短縮させ、その保有者の血液中の赤血球体積は正常人のそれより小さい。このようにしておこる溶血性貧血

*この Hb の n 値は理論的に期待される最大値 2 より大きいので不合理であるが、この Hb 場合には n 値がそのままヘム間相互作用の強さをあらわすかどうか疑問が残されている²⁹⁾。

表 2 溶血性貧血の補償

異常ヘモグロビンの性質		該当する異常ヘモグロビン	補償の程度
酸素親和性が高い	HbA との相互作用あり	Zürich, Köln, St Mary's	完 全
	HbA との相互作用なし	H, Bart's	不完全
酸素親和性が正常または低い		C, D, E, Seattle	

にも一種の補償効果がみられる。Bellingham ら²⁷⁾はこの補償効果の程度を決定する一つの因子は、異常ヘモグロビンが組織に酸素を供給する能力であることを示した。

かれらは幾人かの不安定ヘモグロビン保有者の血液を調べたところ、溶血性貧血症の軽重の尺度を赤血球体積にとると、一般に全血の酸素親和性が正常ないしは低い場合 (C, D, E, Seattle) には補償は不完全であったが、全血の酸素親和性が高い場合 (Zürich, Köln, St Mary's) には完全な補償 (赤血球体積がほぼ正常) がみられた (表2参照)。これは、全血の酸素親和性が正常または低い場合には、赤血球寿命の短縮に対する補償がおこるだけ (不完全補償) であるが、ふくまれる異常ヘモグロビンのために全血の酸素親和性が高い場合 (図7(a)参照) には、それだけ組織への酸素供給能力が低下するので、その分だけ余分に補償が加算される (完全補償) ものと解釈される。ところが、同じく酸素親和性が高い Hb H や Hb Bart's では不完全補償しかみられなかった。これは図7にみられるように、Hb Zürich などをつくむ全血では OEC の全域にわたって酸素親和性が高まっている (同図(a)) のに対して、Hb H や Hb Bart's などの全血の OEC は生理的に重要な領域がほとんど正常のままである (同図(b)) からであると考えられる。両者の全血の OEC の形状が異なるのは、Hb A (= $\alpha_2\beta_2$) は血球のなかでも $\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2\alpha\beta$ の解離平衡にあると考えられており、Zürich のような $\alpha_2\beta_2$ 型のヘモグロビンと共存すると、たがいに二量体を交換して相互作用するため OEC 全体が影響を受けるが、Hb H (= β_4) や Hb Bart's (= γ_4) のようなヘモグロビンと共存した場合には、 $\alpha\beta$ のような交換のための相補体が存在しないので、両者はたがいに独立に酸素と反応するためであると考えられている。

V. 異常ヘモグロビンの機能の研究からえられた情報

異常ヘモグロビンの生理機能を研究することによって、ヘモグロビン分子中のあるアミノ酸残基が他の残基で置換されると、それが機能に及ぼす影響を与えるかという情報を与える。そのようにしてなるべく多数の異常ヘモグロビンの機能を調べることによって、分子中の

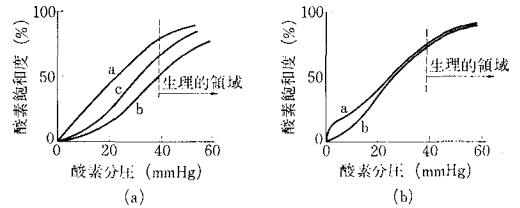


図 7 等張溶液に浮遊した赤血球の酸素平衡曲線²⁷⁾. pH 7.1, 温度37°C.

(a) 相互作用のある場合. 曲線 a は Hb A のほかに 10% の Hb Köln をふくむ赤血球, 曲線 b は Hb E のほかに 5% の Hb F をふくむ赤血球, 曲線 c は Hb A のみをふくむ赤血球.

(b) 相互作用のない場合. 曲線 a は Hb F と Hb A のほかに 25% の Hb Bart's をふくむ新生児の赤血球, 曲線 b は Hb F と Hb A をふくむ正常な新生児の赤血球.

個々の残基の役割を明らかにする手がかりがえられる。

現在までにえられた知見をまとめてみると、

(a) 個々の残基のなかには、構造や機能の維持にきわめて重要なものと、さほど重要でないものなど、多種多様である。

(b) invariant な残基には重要な役割をもつものが多い。

(c) ヘム周囲の非極性残基はヘムとグロビンとの結合を安定化し、鉄原子に疎水性の環境を与えてそれが 2 価状態をとるのを安定にしている。

(d) サブユニット間の界面にある残基には分子内結合をつくって 4 次構造を安定にしているものが多い。とくに $\alpha_1\beta_2$ 界面にある残基は“酸素化にともなう構造変化”に関係し、その位置でのアミノ酸置換は正常な構造変化を阻害して、ヘム間相互作用を消失させる。

(e) 分子表面にある残基は主に極性で、水分子と接合しているが、機能的には特別の役割をもっていない。

(f) 正常な機能が發揮されるには、 α 鎖と β 鎖との相互作用が本質的に不可欠である。

VI. 異常ヘモグロビンの研究の意義

1. ヘモグロビンの構造と機能の關係の解明

異常ヘモグロビンはいわば天然にえられる“化学修飾されたヘモグロビン”である。その機能を詳細に調べて HbA のそれと比較することによって、構造と機能の關係を解明する手がかりがえられる。もちろん、このような手法はヘモグロビン分子の原子レベルでの構造が明らかにされているからこそはじめて可能となるのである。しかし、逆に異常ヘモグロビンの研究成果が、X 線による構造解析に対して有用なデータを与えていることも事実である⁶¹⁾。そして、異常ヘモグロビンの機能異常の研究から、個々のアミノ酸の役割が少しずつ明らかにされる

につれて、それが構造解析の結果に対する一つの“検証”になっている事実を見のがすことはできない。

1分子のヘモグロビンは574個のアミノ酸残基から構成されているが、一つ一つの残基はなんらかの役割を演じているにちがいない。最終的にはそこまで解明するのがわれわれの目標なのである。

周知のようにヘモグロビンは典型的なアロステリック蛋白の一つである。アロステリック蛋白には基質との反応のさいの構造変化が本質である。ヘモグロビンは生体内の呼吸作用に参与する機能蛋白であるが、ヘモグロビン分子自身も酸素と反応するさいに“呼吸”しているという形容はあたらないだろうか。構造変化にとまって、分子内部の空洞に低分子が入り出している可能性は十分考えられる。精巧な“分子機械”としてのヘモグロビンの研究は、そのままアロステリック蛋白全体の研究に絶大なる貢献をはたすであろう。

2. 病理学への寄与

Hb S の発見を発端にして世界各地で種々の異常ヘモグロビンが発見されるにつれて、異常ヘモグロビンによって引き起こされる先天性疾病について、病因論的研究がなされ、いわゆる“分子病”なる概念が確立した。この分野でもヘモグロビン分子の立体構造解析のはたしている役割は大きい。構造解析にたずさわってきた Perutz と、異常ヘモグロビンを多数発見してその病理学にたずさわってきた Lehmann とはたがい協力しあって、“分子病理学”なる新しい分野を開拓しつつある²¹⁾。

3. 分子遺伝学への寄与

異常ヘモグロビンについての家系調査は比較的容易で、そのため、表現型としての異常ヘモグロビンの遺伝のしかたを調べることによって、分子遺伝学ならびにヘモグロビンの生合成の研究に貢献することができる。

4. 蛋白質化学への寄与

異常ヘモグロビンの検出方法や構造異常の決定法などの手法はそのまま他の蛋白質化学に応用できる。

む す び

現在までに100種あまりの異常ヘモグロビンが発見されており、現在もなお増加の一途をたどっている。それらのなかの大半は正常な機能を有し、その保有者も無症状であるが、なかには異常な酸素結合能を有するものや、分子自身が不安定なものも少なくなく、それらの保有者は種々の疾患をとまうが、それに対する補償効果もみられ、興味深い。いっぽう、X線解析によるヘモグロビン分子の立体構造の研究成果はヘモグロビンの病理学に多大なる貢献をなしつつある。また、異常ヘモグロ

ビンの研究は、X線による構造解析と“車の両輪”のような関係を保ちつつ、ヘモグロビンの構造と機能の関係の解明に貴重な情報を提供している。

将来、図2のもっと発展した模式図——“ヘモグロビンの活性地図”とでもいえよう——を見ただけで、任意の異常ヘモグロビンの機能を予想できるようになることが筆者のねがいなのである。

本稿を終るにあたり、ご校閲をくださった阪大医学部第1生理の中馬一郎教授、資料集めに協力くださった阪大医学部第3内科の林 昭、鈴木友和両氏、および一部未発表のデータを提供してくださった九大医学部第1内科の藤田 繁氏に深甚なる謝意を表したい。

文 献

- 1) Perutz, M. F.: *J. Mol. Biol.*, **13**, 646 (1965)
- 2) Perutz, M. F., Kendrew, J. C. & Watson, H. C.: *J. Mol. Biol.*, **13**, 669 (1965)
- 3) Perutz, M. F., Muirhead, H., Cox, J. M. & Goaman, L. C. G.: *Nature*, **219**, 131 (1968)
- 4) Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J. & Wells, I. C.: *Science*, **110**, 543 (1949)
- 5) Benesch, R., Benesch, R. E. & Yu, C. I.: *Proc. U. S. Natl. Acad. Sci.*, **59**, 526 (1968)
- 6) Bohr, C., Hasselbloch, K. & Krough, A.: *Scand. Arch. Physiol.*, **16**, 402 (1904)
- 7) Adair, G. S.: *J. Biol. Chem.*, **63**, 529 (1925)
- 8) Hill, A. V.: *Biochem. J.*, **15**, 577 (1921)
- 9) Wyman, J.: *Advances in Protein Chem.*, **19**, 223 (1964)
- 10) Huisman, T. H. J. & Schillhorn van Veen, J. M.: *Nature*, **204**, 701 (1964)
- 11) Imai, K. et al.: in preparation
- 12) Fujita, S., Imamura, T., Ohta, Y., Seita, M., Hanada, M. & Yanase, T.: *Proc. Japan. Acad.*, **45**, 199 (1969)
- 13) Suzuki, T., Hayashi, A. & Yamamura, Y.: *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **19**, 691 (1965)
- 14) Thompson, R. B., Warrington, R. L. & Bell, W. N.: *Am. J. Physiol.*, **208**, 198 (1965)
- 15) Hayashi, N., Motokawa, Y. & Kikuchi, G.: *J. Biol. Chem.*, **241**, 79 (1966)
- 16) Nagel, R. L., Gibson, Q. H. & Charache, S.: *Biochemistry*, **6**, 2395 (1967)
- 17) Lines, J. G. & McIntosh, R.: *Nature*, **215**, 297 (1967)
- 18) Huisman, T. H. J., Still, J. & Nechtman, C. M.: *Biochim. et Biophys. Acta*, **74**, 69 (1963)
- 19) Bookchin, R. M., Nagel, R. L. & Ranny, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 248 (1967)
- 20) Jones, R. T., Brimhall, B., Huisman, T. H. J., Kleihauer, E. & Betke, K.: *Science*, **154**, 1024 (1967)

- 21) Perutz, M. F. & Lehmann, H. : *Nature*, **219**, 902 (1968)
- 22) Jacob, H. S., Brain, M. C., Dacie, J. V., Carrell, R. W. & Lehmann, H. : *Nature*, **218**, 1214 (1968)
- 23) Fujita, S. et al. : personal communication
- 24) Suzuki, T., Hayashi, A., Shimizu, A. & Yamamura, Y. : *Biochim. et Biophys. Acta*, **127**, 280 (1966)
- 25) Muller, C. J. & Kingma, A. : *Biochim. et Biophys. Acta*, **50**, 595 (1961)
- 26) Hayashi, A., Suzuki, T., Imai, K., Morimoto, H. & Watari, H. : *Biochim. et Biophys. Acta*, in press
- 27) Bellingham, A. J. & Huehns, E. R. : *Nature*, **218**, 924 (1968)
- 28) Bradley, T. B., Wohl, R. C. & Rieder, R. F. : *Science*, **157**, 1581 (1967)
- 29) Hayashi, A., Suzuki, T., Shimizu, A., Imai, K., Morimoto, H., Miyaji, T. & Shibata, S. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **125**, 895 (1968)
- 30) Novy, M. J., Edwards, M. J. & Metcalfe, J. : *J. Clin. Invest.*, **46**, 1848 (1967)
- 31) Reed, C. S., Hampson, R., Gordon, S., Jones, R. T., Novy, M. J., Brimhall, B., Edwards, M. J. & Koler, R. D. : *Blood*, **31**, 623 (1968)
- 32) Bonaventura, J. & Riggs, A. : *J. Biol. Chem.*, **243**, 980 (1968)
- 33) Imai, K. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **127**, 543 (1968)
- 34) Stamatoyannopoulos, G., Yoshida, A., Adamson, J. & Heinenberg, S. : *Science*, **159**, 741 (1968)
- 35) Benesch, R. E., Ranny, H. M., Benesch, R. & Smith, G. M. : *J. Biol. Chem.*, **236**, 2926 (1961)
- 36) Horton, B. F., Thompson, R. B., Dozy, A. M., Nechtman, C. M., Nichols, E. & Huisman, T. H. J. : *Blood*, **20**, 302 (1962)
- 37) Eddison, G. G., Briehl, W. & Ranny, H. M. : *J. Clin. Invest.*, **43**, 2323 (1964)
- 38) Paul, W. & Roughton, F. J. W. : *J. Physiol.*, **113**, 23 (1951)
- 39) Roughton, F. J. W. : *J. Physiol.*, **126**, 359 (1954)
- 40) Otis, A. B. & Roughton, F. J. W. : *Proc. Roy. Soc. (London)*, B **144**, 55 (1955)
- 41) Allen, D. W., Guthe, K. F. & Wyman, J. : *J. Biol. Chem.*, **187**, 393 (1950)
- 42) Rossi-Fanelli, A. & Antonini, E. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **77**, 478 (1958)
- 43) Benesch, R., Macduff, G. & Benesch, R. E. : *Analytical Biochem.*, **11**, 81 (1965)
- 44) Charache, S., Weatherall, D. J. & Clegg, J. B. : *J. Clin. Invest.*, **45**, 813 (1966)
- 45) Reissmann, K. R., Ruth, W. E. & Nomura, T. : *J. Clin. Invest.*, **40**, 1826 (1961)
- 46) Antonini, E., Wyman, J., Zito, R., Rossi-Fanelli, A. & Caputo, A. : *J. Biol. Chem.*, **236**, PC 60 (1961)
- 47) Perutz, M. F., Muirhead, H., Mazzarella, L., Crowther, R. A., Greer, J. & Kilmartin, J. V. : *Nature*, **222**, 1240 (1969)
- 48) Hayashi, A., Suzuki, T., Shimizu, A. & Yamamura, Y. : *Biochim. et Biophys. Acta*, **168**, 262 (1968)
- 49) Beretta, A., Prato, V., Gallo, E. & Lehmann, H. : *Nature*, **217**, 1016 (1968)
- 50) Charache, S. & Mondzac, A. M. : *Blood*, **30**, 879 (1967)
- 51) Kleihauer, E. F., Reynolds, C. A., Dozy, A. M., Wilson, J. B., Moore, R. R., Berenson, M. P., Wright, C. S. & Huisman, T. H. J. : *Biochim. et Biophys. Acta*, **154**, 220 (1968)
- 52) Monn, E., Gaffney, P. J. & Lehmann, H. : *Scand. J. Haematol.*, **5**, 353 (1968)
- 53) Ranney, H. M., Jacobs, A. S., Udem, L. & Zalusky, R. : *Biochem. Biophys. Research Commun.*, **33**, 1004 (1968)
- 54) Sanson, G., Carell, R. W. & Lehmann, H. : *Nature*, **214**, 877 (1967)
- 55) Carrell, R. W., Lehmann, H., Lorkin, P. A., Raik, E. & Hunter, E. : *Nature*, **215**, 626 (1967)
- 56) Hollender, A., Lorkin, P. A., Lehmann, H. & Svensson, B. : *Nature*, **222**, 953 (1969)
- 57) Opfell, R. W., Lorkin, P. A. & Lehmann, H. : *J. Med. Genet.*, **5**, 257 (1968)
- 58) Schneider, R. G., Veda, S., Alperin, J. B., Brimhall, B. & Jones, R. T. : *New Engl. J. Med.*, **280**, 739 (1969)
- 59) Carrell, R. W., Lehmann, H. & Hutchison, H. E. : *Nature*, **210**, 915 (1966)
- 60) Pietschmann, H., Lorkin, P. A., Lehmann, H. & Braunsteiner, H. : in press
- 61) Perutz, M. F. : personal communication

α_1 -サブユニット

β_1 -サブユニット

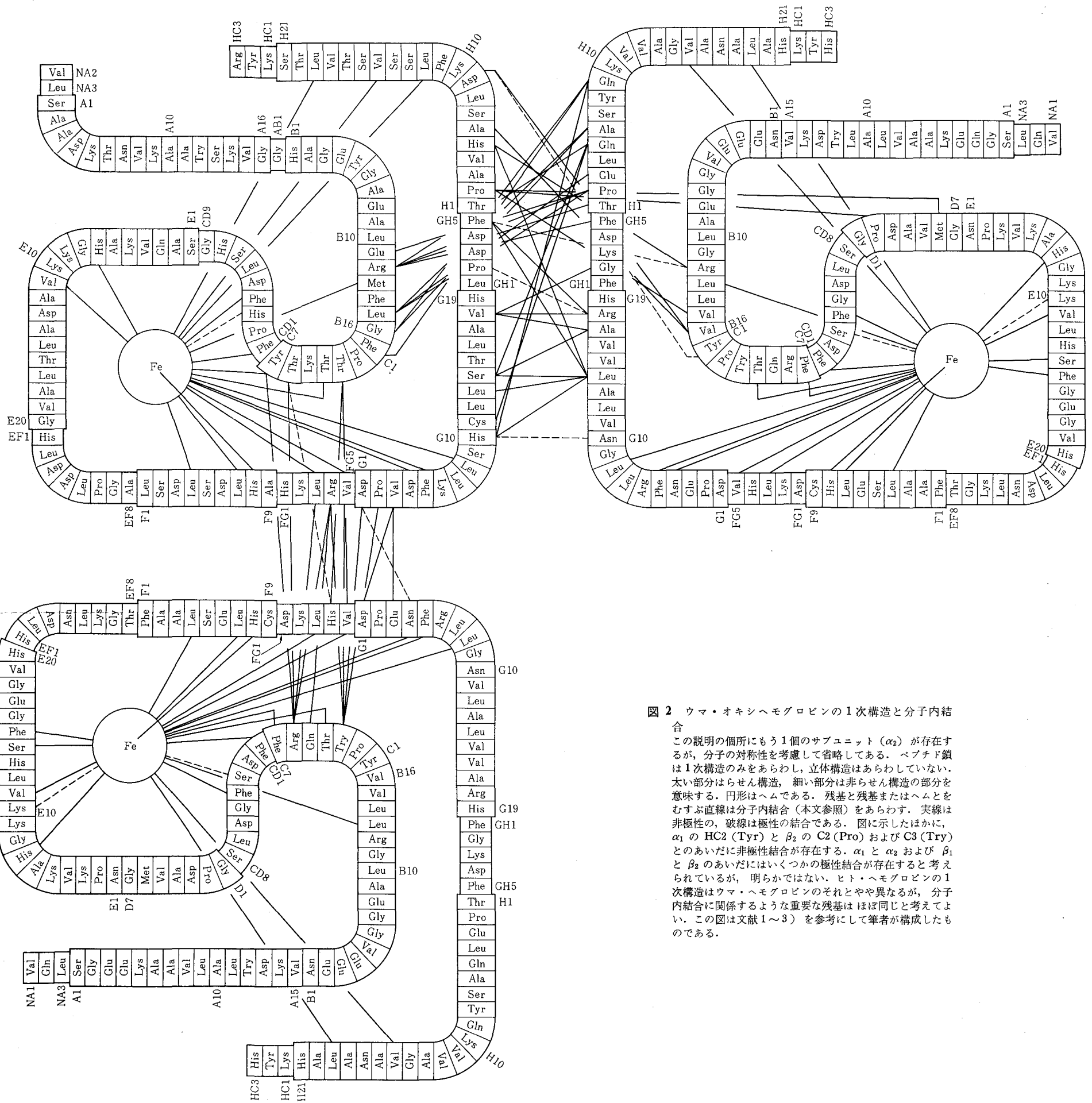


図 2 ウマ・オキシヘモグロビンの1次構造と分子内結合

この説明の箇所にもう1個のサブユニット(α_2)が存在するが、分子の対称性を考慮して省略してある。ペプチド鎖は1次構造のみをあらわし、立体構造はあらわしていない。太い部分はらせん構造、細い部分は非らせん構造の部分を意味する。円形はヘムである。残基と残基またはヘムとをむすぶ直線は分子内結合(本文参照)をあらわす。実線は非極性の、破線は極性の結合である。図に示したほかに、 α_1 のHC2(Tyr)と β_2 のC2(Pro)およびC3(Try)とのあいだに非極性結合が存在する。 α_1 と α_2 および β_1 と β_2 のあいだにはいくつかの極性結合が存在すると考えられているが、明らかではない。ヒト・ヘモグロビンの1次構造はウマ・ヘモグロビンのそれとやや異なるが、分子内結合に関係するような重要な残基はほぼ同じと考えてよい。この図は文献1~3)を参考にして筆者が構成したものである。

β_2 -サブユニット