



Title	金属置換混成ヘモグロビンを用いたヘモグロビンの協同性の研究
Author(s)	雲財, 悟
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3144084
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

金属置換混成ヘモグロビンを用いたヘモグロビンの
協同性の研究

大阪大学基礎工学研究科 博士論文

雲財 悟

目次

	ページ
はじめに	．．．．． 5.

第1章 序論

(1)ヘモグロビンの機能	．．．．． 9.
--------------	----------

その1 ホモトロピック効果

その2 ヘテロトロピック効果

Bohr 効果

有機リン酸効果

(2)ヘモグロビンの構造	．．．．． 17.
--------------	-----------

X線結晶構造解析によるヘモグロビンの3次元構造の概略

結晶構造解析から推定されるヘモグロビンのリガンド結合に伴う構造変化の道筋とサブユニット界面の変化

(3)ヘモグロビンの性質を説明するためのアロステリックモデル	．．．．． 21.
--------------------------------	-----------

(4)金属置換混成ヘモグロビン	．．．．． 24.
-----------------	-----------

その1 電荷混成ヘモグロビン

その2 マンガン(III or II)-鉄(II)混成ヘモグロビン

その3 コバルト(II)-鉄(II)混成ヘモグロビン

その4 ニッケル(II)-鉄(II)混成ヘモグロビン

その5 マグネシウム(II)-鉄(II)混成ヘモグロビン

その6 ポルフィリン-鉄(II)混成ヘモグロビン

その7 その他の金属置換混成ヘモグロビン

第2章 クロム(III)-鉄(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡機能 についての研究

(1)概要	．．．．36.
(2)序論	．．．．36.
(3)実験方法	．．．．38.
(4)実験結果	．．．．44.
(5)考察	．．．．47.

第3章 金属置換混成ヘモグロビンの一酸化炭素・酸素結合の 速度論的研究

(1)概要	．．．．51.
(2)序論	
その1 なぜ金属置換混成ヘモグロビンを速度論的研究に使ったか	．．．．52.
その2 ヘモグロビンの4次構造変化の速度について	．．．．56.
その3 リガンド結合速度・解離速度の測定方法と解析方法の理論	．．．．61.

記号についての約束

Stopped-flow 法によるヘモグロビンの一酸化炭素 (CO) 結合
速度の測定について

Stopped-flow 法によるヘモグロビンの一酸化炭素 (CO) 解離
速度の測定について

レーザーフォトリシス (光解離) 法によるヘモグロビンの酸素
(O₂) 結合速度の測定について

Stopped-flow 法によるヘモグロビンの酸素 (O₂) 解離速度の測定について

各測定方法でのヘモグロビンの初期状態について

(3)実験方法 72.

(4)実験結果と考察 77.

金属置換混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線

デオキシ金属置換混成ヘモグロビンの一酸化炭素結合速度

CO 結合型金属置換混成ヘモグロビンの CO 解離速度

金属置換混成ヘモグロビンの O₂再結合速度と O₂解離速度

金属置換混成ヘモグロビンの O₂解離速度

(5)第 3 章のまとめ 115.

第 4 章 まとめ 118.

～

Appendix-1 混成ヘモグロビンの 4 量体-2 量体平衡が酸素平衡曲線に与える影響 125.

Appendix-2 シアノメト-鉄(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡機能について 130.

Appendix-3 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ の酸素平衡機能とリガンド結合・解離速度 138.

Appendix-4	今までに報告されている金属置換混成ヘモグロビンの 酸素平衡パラメータ	・ ・ ・ ・ 148.
謝辞		・ ・ ・ ・ 150.
References		・ ・ ・ ・ 152.

はじめに

ヒト成人ヘモグロビン(HbA)は、呼吸ガスの酸素分子を肺からヒトの身体全体に運ぶ役割を持つアロステリック蛋白質である。HbAは2本の α 鎖と2本の β 鎖からできている4量体で、それぞれのポリペプチドにはヘムが1個ずつ入っている。1個の酸素分子が1個のヘムに可逆的に結合するので、HbAは4個の酸素と可逆的に結合できるのだが、その4段階の酸素の結合過程は一様ではない。4つめに結合する酸素に対する平衡定数は、1つめに結合する酸素に対する平衡定数に比べて約200倍酸素親和性が高いことが知られている。これは各ヘム同士が互いの酸素親和性に影響を与え合っているからである。ヘムに酸素が結合すると、そのヘモグロビン分子内の他のヘムの酸素親和性が上昇する、また逆にどこかのヘムから酸素が離れると他のヘムの酸素親和性が低下する。この現象がヘモグロビンの協同作用と呼ばれるものである。

ヘモグロビンの協同作用は、酸素結合にともなう蛋白質分子の構造変化で裏付けられている。1つの酸素も結合していないヘモグロビン（デオキシヘモグロビンという）は、酸素親和性の非常に低い構造が安定なので、最初に結合する酸素に対する親和性は低い。他方、4つ酸素が結合したヘモグロビン（オキシヘモグロビン）は、酸素親和性の高い構造が安定なので、4つ目に結合する酸素に対する親和性は非常に高い。さて、その他の1個、2個、3個、の酸素が結合している中間段階のヘモグロビンの構造は先程の2つの状態に比べて不安定であるらしい。中間段階ヘモグロビンができたとしても、その不安定さのために酸素が離れてデオキシヘモグロビンになるか、もしくは酸素がさらに結合してオキシヘモグロビンになってしまう。平衡状態では、中間段階ヘモグロビンの濃度はほんのわずかで、ほとんどのヘモグロビンがオキシヘモグロビン、もしくはデオキシヘモグロビンになっている。この「中間段階ヘモグロビンができにくい」という性質が、ヘモグロビンの協同作用の実体である。

酸素濃度の高い条件では、ヘモグロビンに酸素が結合する場合が多いので、平衡はオキシヘモグロビンの方向に偏っている。酸素濃度が下がると、酸素が離れるヘモグロビンも現れ、そういうヘモグロビンは中間段階状態を嫌って酸素親和性の低い構造に変わり、さらに酸素を放出してデオキシヘモグロビンとなる。生理的にはこの性質が利用されているようだ。酸素濃度の高い肺の血液中では平衡はオキシヘモグロビンの方向に傾いていて、酸素はしっかりヘモグロビンに結合している。酸素濃度の低い身体各組織の血液中に來ると、ヘモグロビンの平衡がオキシヘモグロビンの方向からデオキシヘモグロビンの方向へ移動する。その時放出される酸素が身体各組織で利用される。

協同性の詳しいメカニズムを研究するには、ヘモグロビンが酸素を1個、2個、3個、4個と結合する過程で、ヘモグロビンの構造と酸素親和性がどんなふうに変わっていくか、なぜ中間段階ヘモグロビンの構造はオキシヘモグロビン構造やデオキシヘモグロビン構造に比べて不安定なのか、を調べなければならない。しかし、中間的な酸素濃度のヘモグロビン溶液でも、協同作用のおかげでオキシヘモグロビンと、デオキシヘモグロビンが主な成分で、酸素分子が1、2、もしくは3個結合した中間段階のヘモグロビン分子の濃度は低い。通常の酸素平衡状態のヘモグロビン溶液では、中間段階の分子を研究することは難しい。どうにかして中間段階のヘモグロビンを固定するか、またはそのモデルを作る工夫が求められる。

酸素結合の中間段階ヘモグロビン分子のモデルを作るのに、金属置換混成ヘモグロビンを使う方法がある。この混成ヘモグロビンは、ヘモグロビンを構成する α 鎖もしくは β 鎖のヘム（鉄(II)プロトポルフィリン）を、他の金属プロトポルフィリンと交換したものである。だから、混成ヘモグロビンはヘムを持つサブユニット2つ、金属ポルフィリンを持つサブユニット2つからできている。例外はあるが、金属プロトポルフィリンには酸素が結合しない。混成ヘモグロビンには通常のヘムを持つサブユニットは2つしかないので、酸素が2個しか結合しない。使う金属イオンの種類に依存して、混成ヘモグロビン全体の構造や、ヘムを持つサブユニットの酸素親和性が大きく影響を受けることが知られている。この特徴を利用して、オキシヘムのモデル、あるいはデオキシヘムのモデルとして使える金属ポルフィリンの候補が挙げられた。

「オキシヘムのモデル」には、ヘモグロビンの中でちょうど酸素の結合したオキシヘムのように振る舞う金属ポルフィリンが望まれる。この候補には、シアン化物イオンを結合した鉄(III)イオンを持つヘムと、クロム(III)プロトポルフィリンが挙げられている。他方、「デオキシヘムのモデル」には、ヘモグロビンの中でちょうど酸素を結合していないデオキシヘムのように振る舞い、しかも酸素は結合しない金属ポルフィリンが望まれる。この条件を満たす金属ポルフィリンにはニッケル(II)ポルフィリンや銅(II)ポルフィリンが挙げられている。オキシヘムモデルを使った金属置換混成ヘモグロビンは、普通のヘモグロビンの4つのサブユニットのうち、2つのサブユニットに酸素が結合した状態を固定したモデルとなる。そして通常のヘムを持つサブユニットには酸素が結合するわけだが、この酸素結合過程は通常のヘモグロビンの4段階酸素結合過程のうちの後半3、4個目の酸素結合過程のモデルとなる。他方、デオキシヘムモデルを使った金属置換混成ヘモグロビンは、2つのサブユニットに酸素が結合しないヘモグロビンのモデルとなる。この混成ヘモグロビンが1個も酸素を結合していないときは通常のデオキシヘモグロビンと同等であり、混成ヘモグロ

ピンが酸素を2個結合する過程は通常のアキシヘモグロビンが酸素を2個結合する過程のモデルとなる。これら、オキシヘムモデルやアキシヘムモデルを使えば、ヘモグロビンの酸素結合中間段階のモデルを実現することができ、それらの性質を調べられるのではないかと期待する。

ヘモグロビンの協同作用と構造変化の関係を記述する手段として2状態モデルがよく使われる。2状態モデルとは、アキシヘモグロビン型の4次構造を持つ酸素親和性の低い状態（緊張した状態、Tense state、略してT-状態）とオキシヘモグロビン型の4次構造を持つ酸素親和性の高い状態（緩和状態、Relaxed state、略してR-状態）の2つの状態だけにヘモグロビンがなれる（他の状態にはまったくない）と仮定して、ヘモグロビンのいろいろな性質をこの2つの状態の平衡の移動だけで説明しようとするモデルである。しかし、蛋白質のようなやわらかいもののモデルにしては、極端ではないだろうか。確かにこのモデルでヘモグロビンの実際の性質を説明できる場合もあるのだが、それはヘモグロビン溶液中ではそのほとんどがオキシヘモグロビンとアキシヘモグロビンだからだろう。2状態モデルは、中間段階ヘモグロビンにも通用するのだろうか。また、2状態モデルでヘモグロビンの性質の全てを説明できるだろうか。

本論文ではいろいろな金属置換混成ヘモグロビンの性質を、2状態モデルで説明できるかどうかを検討する。2状態モデルの枠におさまらないヘモグロビンがあれば、それは通常のヘモグロビンを使っている場合は不安定で観測されない状態だと期待する。

金属置換混成ヘモグロビンを使えば、最も高い酸素親和性を持つヘモグロビンから最も低い酸素親和性を持つヘモグロビンまで系統的に用意することができる。混成ヘモグロビンは、(1)高い酸素親和性を持つものとしてクロム(III)-鉄(II)混成ヘモグロビン、(2)中間的酸素親和性を持つものとしてマンガン(III)-鉄(II)混成ヘモグロビン、(3)低い酸素親和性を持つものとしてニッケル(II)-鉄(II)混成ヘモグロビン、(4)非常に低い酸素親和性を持つものとしてマグネシウム(II)-鉄(II)混成ヘモグロビン、の4種類の混成ヘモグロビンを用意した。この内、(1)と(3)は、先程述べた「オキシヘムモデル」と「アキシヘムモデル」を使った混成ヘモグロビンである。また、オキシヘムモデルやアキシヘムモデルとはできないが、中間的な酸素親和性を示している金属ポルフィリンを使った混成ヘモグロビンが(3)のマンガン(III)-鉄(II)混成ヘモグロビンである。それから、マグネシウム(II)ポルフィリンを用いた金属置換混成ヘモグロビンの酸素親和性は、アキシヘモグロビンより低いので（有機リン酸非存在下）、普通の意味でのアキシヘムモデルとはいえないが、ヘモグロビンの酸素親和性を非常に低くす

る金属ポルフィリンとして有用である。このような様々なヘモグロビンの性質は2状態モデルで説明することができるのだろうか。

この論文は全部で4つの章から構成されている。第1章では、序論としてヘモグロビンの機能と構造について概説する。第2章でクロム(III)-鉄(II)混成ヘモグロビンの調製方法とその酸素平衡機能について述べる。クロム(III)-鉄(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡機能を調べて、クロム(III)ポルフィリンが良いオキシヘムモデルであることを示すのが目的である。第3章では様々な酸素親和性の混成ヘモグロビンを用意し、それらの一酸化炭素結合、解離速度、および酸素結合速度、解離速度の測定したことについて述べる。リガンド結合（解離）速度を測定すると、違う速度を持つヘモグロビン成分がいくつかある場合、速度の違いが測定結果に直接現れるのでそれぞれの速度を知ることができる。これは反応速度測定の重要な特徴である。求められる速度定数に、2状態モデルの枠に入らないものを探すのが目的の一つである。また、混成ヘモグロビンを使う利点の一つにヘモグロビンの α (Fe)サブユニットと β (Fe)サブユニットの機能をはっきり区別して調べることができるという点がある。リガンド結合（解離）速度は α と β とでどのような違いがあるかを調べるのがもう一つの目的である。第4章でこの論文のまとめを行う。

第 1 章 序論

(1) ヘモグロビンの機能

その1 ホモトロピック効果

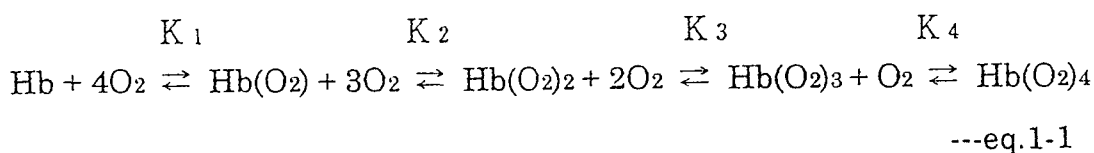
ヘモグロビンは、呼吸ガスの酸素分子を身体全体に運ぶ役割を持つ蛋白質で、血液に含まれる赤血球の中に大量にある。ヘモグロビンは酸素分圧の高い肺で酸素と結合し、血液の流れに乗って身体各組織に運ばれ、酸素分圧が低い場所で酸素を放出する働きを持つ。このヘモグロビンの働きは、ミオグロビンの酸素結合の性質と比べるとよく分かる。図 1-1 にヘモグロビンとミオグロビンの酸素平衡曲線を示す。横軸は酸素分圧、縦軸はヘモグロビン、ミオグロビンの酸素飽和度（全体のヘムの内、何%に酸素が結合しているかを示す）を示す。ミオグロビンの酸素平衡曲線は、一般の酵素と基質の協同性のない結合を示す曲線と同じで、直角双曲線型となっているが、ヘモグロビンの酸素平衡曲線は S 字型となっている。この S 字型の酸素平衡曲線はヘモグロビンの協同作用によるものである。酸素が 1 個も結合していないヘモグロビンの酸素親和性は低いのだが、ヘモグロビン分子中の酸素結合部位のどこかに酸素が結合すると、他の結合する部位の酸素親和性が上昇する。逆に、酸素で飽和しているヘモグロビンから酸素が少し離れると、他の結合部位の酸素親和性が下がって酸素がどんどん離れる。これらがヘモグロビンの協同作用である。わずかに酸素濃度に変化するだけでヘモグロビンから大量の酸素が放出され、もしくは酸素の取り込みが起こる。

このヘモグロビンの協同作用は生理的にとても重要である。肺の静脈血の酸素分圧は約 100mmHg で、身体組織の静脈血の酸素分圧は安静時で約 40mmHg と言われている。ヘモグロビンが肺から身体組織に運ばれる時には、ヘモグロビンは肺で結合した酸素の約 23% を放出することが図 1-1 から分かる。ミオグロビンではこうはいかない。ミオグロビンの酸素親和性はどんな酸素分圧でも常に非常に高く、身体組織での酸素分圧下でも全結合能のわずか 2% の酸素が放出されるだけである。ヘモグロビンとミオグロビンの機能の違いはそれぞれの役割が違うからだ、とされている。ヘモグロビンは血液の流れに乗って呼吸ガスを運搬するという生理的役割を能率よく行うための機能蛋白質であり、ミオグロビンは動物の筋肉組織など身体組織にあって酸素貯蔵体として機能しているとされている。

ヘモグロビンは 4 つのサブユニットからできていて、1 つのサブユニットに 1 個の酸素が結合できるようになっている。酸素が 1 個も結合していないヘモ

グロビンはデオキシヘモグロビン(Deoxy hemoglobin)と呼ばれる。酸素が4個結合したヘモグロビンはオキシヘモグロビン(Oxy hemoglobin)と呼ばれる。ヘモグロビンが4つ酸素を結合していく経路はいろいろなものが考えられる(図1-2)。ヘモグロビンは2つの α 鎖と2つの β 鎖からできているので、いろいろな酸素結合の中間段階の分子種がある。酸素平衡曲線が測定されるとき、つまりヘモグロビン溶液の酸素濃度(分圧)が少しずつ上げられたり下げられたりするとき、これらいろいろな結合段階のヘモグロビンの存在比が変化する(溶液中の酸素分子と、いろいろな結合段階にあるヘモグロビンと、またそのヘモグロビン同士は平衡状態にある)。

ヘモグロビンの酸素平衡曲線の測定方法は Imai によって確立された(1981a, 1982)。ヘモグロビン溶液の酸素濃度(酸素分圧)を少しずつ変えていき、同時に吸光スペクトルの変化を利用して、何%のヘムが酸素で飽和しているか測定する(図1-3)。残念ながら、図1-2に出てくるような中間段階分子種の濃度は分からない*。ヘモグロビンの酸素平衡曲線を解析するとき、ヘモグロビン分子内の α 鎖と β 鎖の違いをなくして簡単にしたモデル反応式がよく使われる。式1-1がヘモグロビンの4段階酸素結合過程を表現するモデル反応式である。



ここで定義される4個の平衡定数を Adair 定数という。酸素分圧が p で、 i 個目の酸素が結合するときの平衡定数は

$$K_i = [i/4 - (i-1)] [\text{Hb}(\text{O}_2)_i] / [\text{Hb}(\text{O}_2)_{i-1}] P \quad (i=1, 2, 3, \text{ or } 4)$$

---eq.1-2

として表される。式1-2中の係数の $[i/4 - (i-1)]$ は、 i 段目の酸素解離の仕方に i 通りあって、酸素結合の仕方に $4 - (i-1)$ 通りあることに対する補正である。これ

* ヘモグロビンの酸素平衡曲線を測定するとき、 α サブユニットと β サブユニットの吸光スペクトルのわずかな違いを利用して、 α サブユニットと β サブユニットのどちらにどのくらい酸素が結合しているかを解析した実験が報告されている(Nasuda-Kouyama et al., 1983)。それによると β サブユニットが α サブユニットよりも少し酸素親和性が高いという結果が出ているが、ヘモグロビンの酸素結合過程の中間段階分子種をすべて区別できているわけではない。

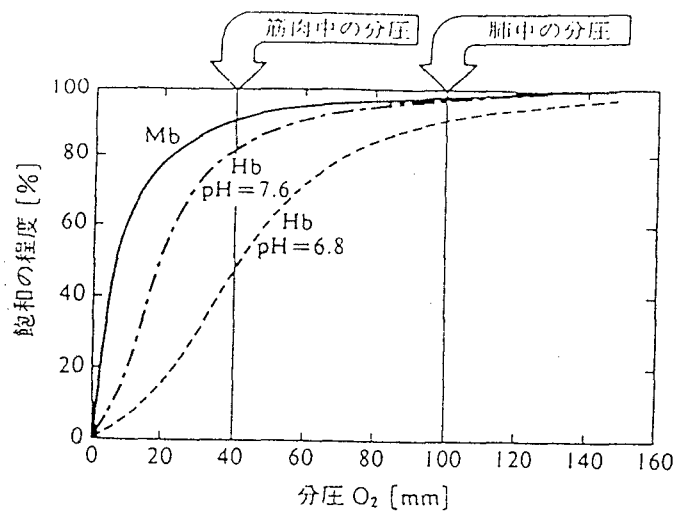


図 1-1 ヘモグロビンとミオグロビンの酸素平衡曲線

縦軸はヘモグロビン・ミオグロビンの酸素飽和度(%)、
横軸は酸素分圧 (mmHg) を示す。

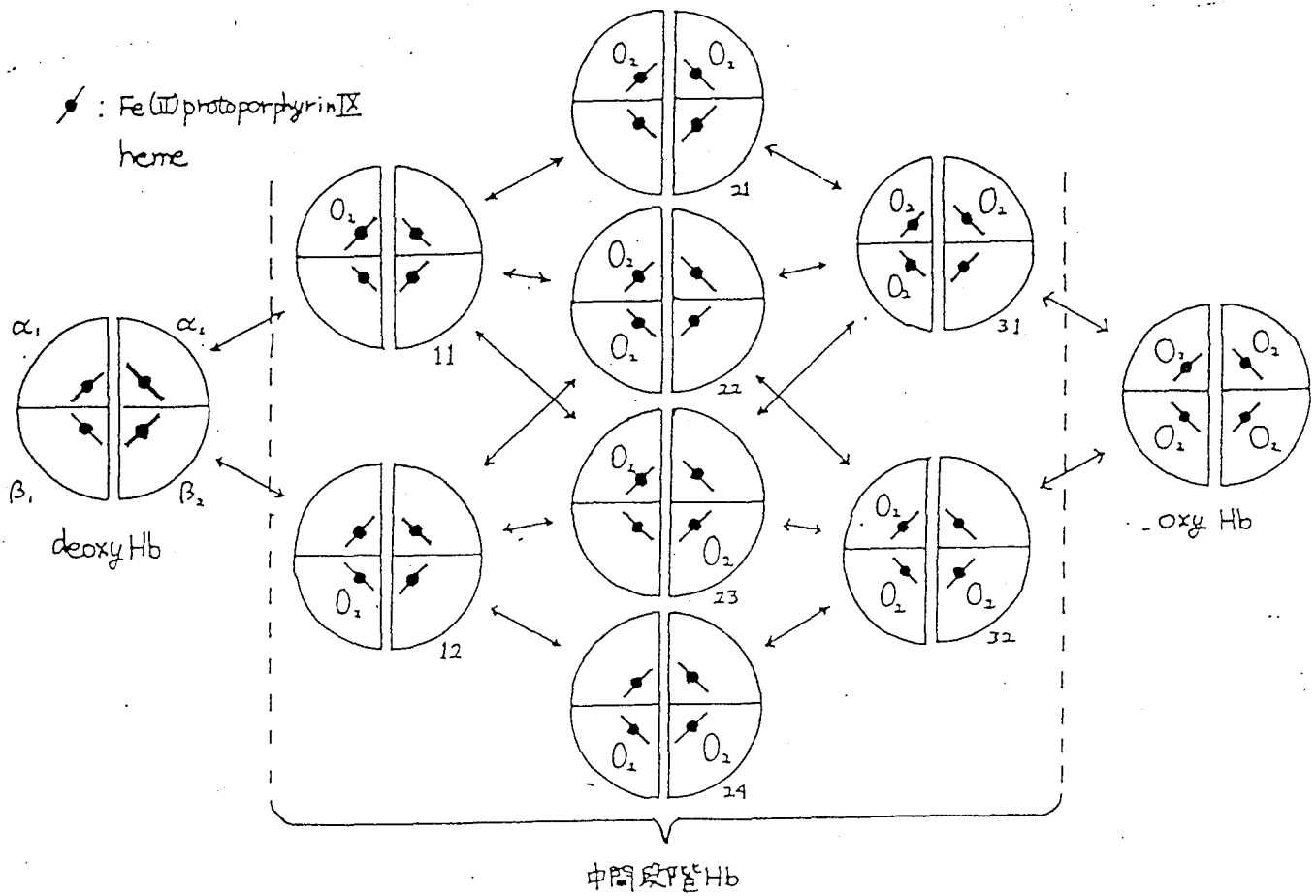


図 1-2 ヘモグロビンの酸素分子結合過程

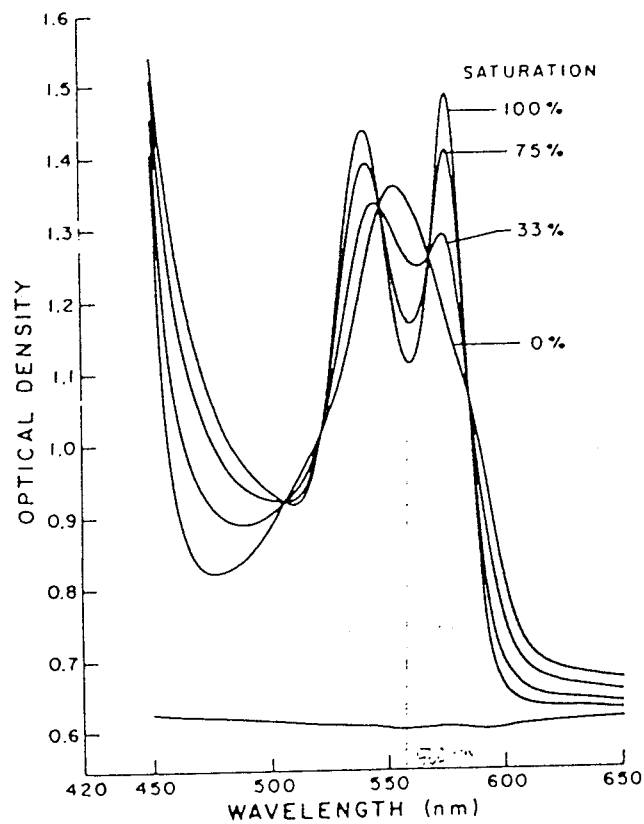
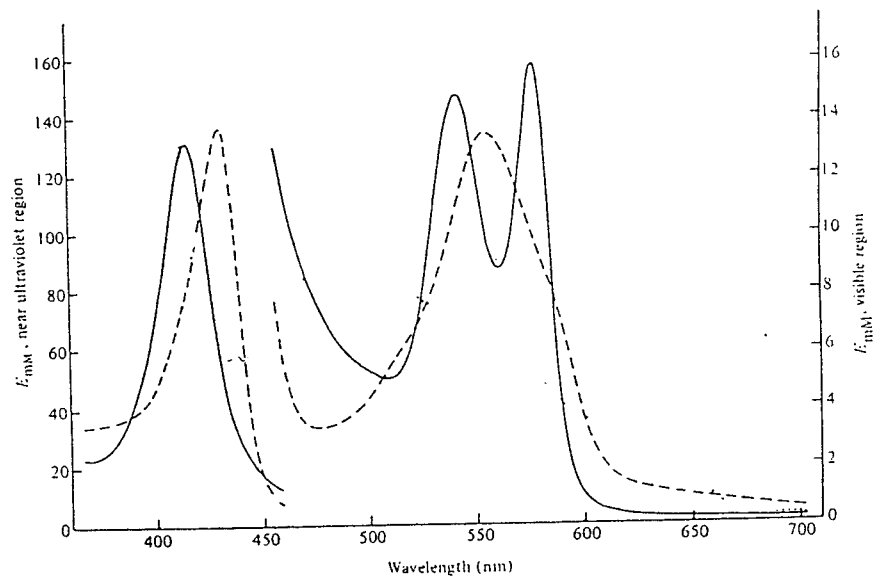


図 1-3 HbA の吸光スペクトル

(上図) 実線：オキシヘモグロビンの吸光スペクトル

破線：デオキシヘモグロビンの吸光スペクトル

縦軸はミリモル吸光係数を示す。左の縦軸は紫外吸収に近い所の吸光係数、
右の縦軸は可視光吸収部分の吸光係数を示す。

条件：0.1M potassium phosphate, pH7.4.

(下図) 酸素飽和度の変化に伴うヘモグロビンの吸光スペクトルの変化

らの Adair 定数を用いると、酸素が結合できるヘムの数の内、酸素が結合したヘムの割合を示すヘモグロビンの酸素飽和度 Y は、酸素分圧 P の関数として次のように書ける。

$$\begin{aligned}
 Y(P) &= \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)] + 2[\text{Hb}(\text{O}_2)_2] + 3[\text{Hb}(\text{O}_2)_3] + 4[\text{Hb}(\text{O}_2)_4]}{\{[\text{Hb}] + [\text{Hb}(\text{O}_2)] + [\text{Hb}(\text{O}_2)_2] + [\text{Hb}(\text{O}_2)_3] + [\text{Hb}(\text{O}_2)_4]\}} \\
 &= \frac{K_1P + 3K_1K_2P^2 + 3K_1K_2K_3P^3 + K_1K_2K_3K_4P^4}{1 + 4K_1P + 6K_1K_2P^2 + 4K_1K_2K_3P^3 + K_1K_2K_3K_4P^4}
 \end{aligned}$$

---eq.1-3

Y(P) = 0.5 の時の酸素分圧は P₅₀ と呼ばれ、ヘモグロビンの酸素親和性を表す尺度として良く使われる。

実際に酸素平衡曲線を解析するとき、Hill plot を用いて解析されることが多い。なぜなら、Hill plot を用いることにより、P₅₀ の値はもちろん、ヘモグロビンに 1 個目に結合する酸素と 4 個目に結合する酸素に対する親和性、そしてヘモグロビンの協同作用がどのくらい大きいかを見積もることができるからだ。酸素平衡曲線を、ただ単に「酸素濃度 (分圧)」 v.s. 「ヘモグロビンの酸素飽和度」のグラフ (例えば冒頭の図 1-1) にするよりも、Hill plot にした方が得られる情報が多い。

Hill plot は、酸素平衡曲線の測定点を、「酸素分圧の対数」 v.s. 「酸素の結合しているヘムの濃度と酸素の結合していないヘムの濃度の比をとったその対数」のグラフにプロットしなおしたものである (図 1-4)。式で書くと、log P v.s. log {Y/(1-Y)} のグラフをプロットすることになる。横軸には log P が、縦軸には log {Y/(1-Y)} がとられる。式 1-3 を使うと {Y/(1-Y)} は、

$$\frac{Y}{1-Y} = \frac{K_1P + 3K_1K_2P^2 + 3K_1K_2K_3P^3 + K_1K_2K_3K_4P^4}{1 + 3K_1P + 3K_1K_2P^2 + K_1K_2K_3P^3}$$

---eq.1-4

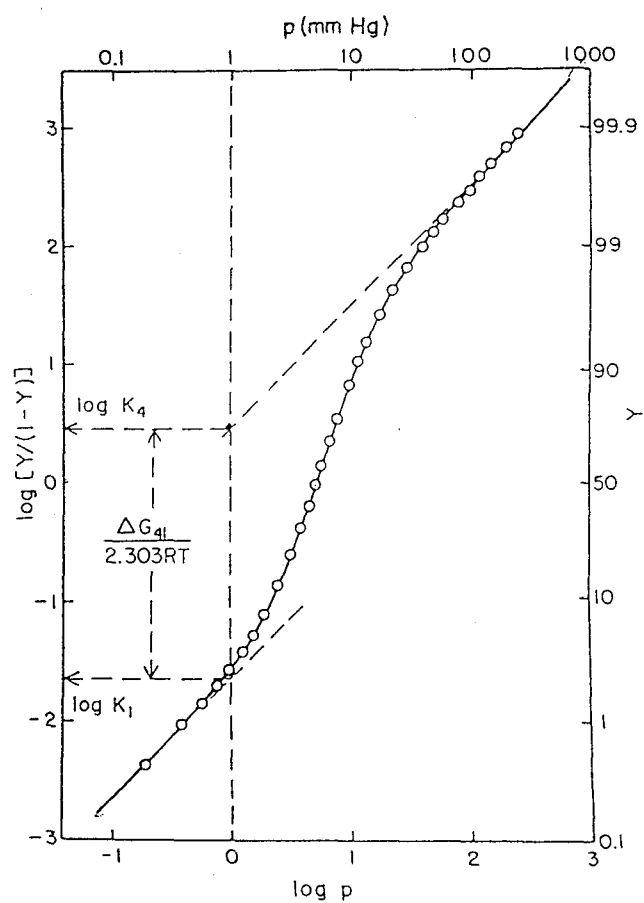


図 1-4 ヘモグロビンの酸素平衡曲線の Hill plot

測定条件：50mM bis-Tris, 100mM Cl^- , pH7.4, 25℃,
 ヘモグロビンの濃度は 600 μM (ヘムあたり). *ななめ*の
 破線は、Hillplot の上方、および下方の漸近線を示す。

となる。だから酸素分圧がとても低い時、つまり $p \rightarrow 0$ の時、 $\{Y/(1-Y)\}$ は K_1P に漸近する。対数をとると、 $\log \{Y/(1-Y)\}$ は $\log K_1 + \log P$ に漸近する。これは Hillplot にはどうあらわれるかというと、横軸は $\log P$ をとっているから酸素分圧がとても低いときには Hillplot は傾きが1で、縦軸 ($\log P = 0$) との交点が $\log K_1$ である漸近線に漸近していく。同じように、酸素分圧がとても高いとき、つまり $p \rightarrow \infty$ の時、 $\{Y/(1-Y)\}$ は K_4P に漸近する。対数をとると、 $\log \{Y/(1-Y)\}$ は $\log K_4 + \log P$ に集束する。酸素分圧がとても高いときには Hillplot は傾きが1で、縦軸 ($\log P = 0$) との交点が $\log K_4$ である漸近線に漸近していく。もちろん K_1 や K_4 の値は、大きければ大きいほどヘモグロビンの酸素親和性が高いことを示す。Hill plot の漸近線の場所がグラフ中で高ければ高いほど、酸素親和性が高いということになる。通常、漸近線 “ $\log K_4 + \log P$ ” が漸近線 “ $\log K_1 + \log P$ ” よりも高い位置にあり、 K_4 の値が K_1 の値よりもどのくらい大きいかかわかる。ちなみに、ミオグロビンの酸素平衡曲線を Hill plot にすると、ミオグロビンの酸素親和性は全然変化しないので(無理に書けば、 $K_1 = K_2 = K_3 = K_4$ となる)、すべての測定点が傾き1の直線上に並ぶ。

Hillplot を特徴づけるパラメータには、前出の P_{50} と、ヘモグロビンの協同作用の強さの尺度となる Hill 定数 $n_{\max}$ がある。 P_{50} は Hillplot の横軸 ($\log \{Y/(1-Y)\} = 0$) との交点から求まり、 $n_{\max}$ は Hillplot の最大勾配から求まる。

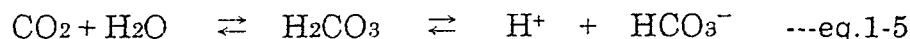
実際には測定されたデータに最も良く合う理論モデルのパラメータ・Adair 定数 ($K_1 \sim K_4$) はどのくらいか、という作業が最小2乗法を使って行われる。その結果は Imai が詳しくまとめている(1982)。ほとんどの条件で、ヘモグロビンに酸素が結合すればするほど、ヘモグロビンの酸素親和性が高くなることを示す結果が得られた。すなわち、 $K_1 < K_2 < K_3 < K_4$ となったのである。もちろんこれはヘモグロビンの酸素結合反応を簡単にしたモデル式(式1-1)のパラメータであるから、ヘモグロビンの性質をすべて表しているものではないのだが、ヘモグロビンの協同作用を具体的に示す良い目安といえよう。

その2 ヘテロトロピック効果

Bohr (ボーア) 効果

ヘモグロビンの酸素親和性が、溶液中の CO_2 濃度によって影響を受けることは今世紀初頭に Bohr らによって報告されたが、その後の研究からこの現象は主に pH 減少にともなうヘモグロビンの酸素親和性の低下であることが明らかにされてきた。生理的には、細胞の代謝で生じた CO_2 が赤血球中で炭酸脱水素酵素によって炭酸となり、これからプロトンと重炭酸イオンが生じ(式1-5)、

プロトンがヘモグロビンに作用してヘモグロビンの酸素親和性を下げ、酸素の放出を促している、とされている。



ヘモグロビン溶液の pH が 6.5 より高い範囲では溶液のプロトン濃度が高ければ高いほど (pH が 6.5 に近いほど)、ヘモグロビンの酸素親和性は低くなる。このようなプロトンの効果が、ヘモグロビンのアルカリ Bohr 効果と呼ばれている (Wyman, 1948, 1964)。溶液の pH が 6.5 よりも低い範囲では、プロトンの濃度が高いほど (pH が低いほど) ヘモグロビンの酸素親和性は逆に高くなる。これは酸性 Bohr 効果と呼ばれている (Wyman, 1948, 1964)。しかし、溶液の pH が 6.0 よりも低い条件では、ヘモグロビンが不安定になってしまって Bohr 効果についての良いデータは得にくい (Sun et al., 1997)。この節で挙げる Bohr 効果とは、前者のアルカリ Bohr 効果のことである。

Bohr 効果にはいったい幾つくらいのプロトンが関係しているか。これは Wyman によって関連式で定量的に表された。

$$\left(\frac{\partial \text{H}^+}{\partial Y} \right)_{\text{pH}} = \left(\frac{\partial \log P}{\partial \text{pH}} \right)_Y \quad \text{あるいは、} \quad \left(\frac{\partial \text{H}^+}{\partial \log P} \right)_{\text{pH}} = \left(\frac{\partial Y}{\partial \text{pH}} \right)_Y \quad \text{---eq.1-6}$$

式 1-6 中で、 H^+ はサブユニットあたりの結合するプロトンの個数、 Y は酸素飽和度である。したがって、ヘモグロビンの 4 段階酸素結合に伴うプロトン放出量の平均を ΔH^+ とすると、

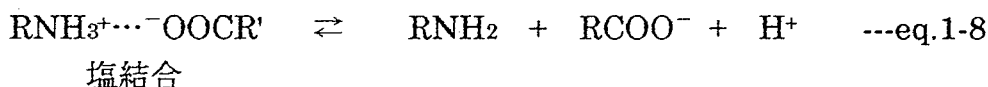
$$\Delta \text{H}^+ = \left(\frac{\partial \log P_m}{\partial \text{pH}} \right)_Y \quad \text{---eq.1-7}$$

と表すことができる。酸素平衡曲線の形 (Y v.s. $\log P$) が pH に依存しないときは、 P_m の代わりに P_{50} を使うことができる。つまり酸素平衡曲線の pH 依存性から簡単にプロトンの結合量を求めることができるのである。実際には、

0.1MCl⁻存在下、pH7.4、25℃ の条件では、△H⁺の値は負の値、つまりヘモグロビンに酸素が結合するとプロトンがヘモグロビンから放出されることを示し、その数字は酸素 1 個あたり約 0.6 個のプロトンであることが知られている。だからデオキシヘモグロビンに酸素が 4 個結合してオキシヘモグロビンになると、4x0.6、すなわち 2.4 個のプロトンが放出される(Imai, 1982)。

プロトンと可逆的に結合するヘモグロビンの場所として可能性のある基には、α および β 鎖の N 末端 α アミノ基と、ヒスチジン残基のイミダゾール基が考えられる。なぜなら、中性（生理的）pH で、これらの基はプロトンを結合し、また放出することからである。ヘモグロビンは、酸素結合に伴って分子の構造が変化し、酸素親和性が高くなる（次節参照）。だから、その構造変化に伴って周囲の環境が変わってしまうアミノ基やヒスチジン残基が、ヘモグロビンの酸素結合に影響を与えるプロトン結合部位である可能性が高い。

いくつかの実験的アプローチが Bohr 効果に対応するヘモグロビン分子上の特定の部位を同定するために用いられている。Perutz ら(Perutz, 1970; Perutz et al., 1980, 1985a, b; Shih & Perutz, 1987; Shih et al., 1993)はデオキシヘモグロビンとオキシヘモグロビンの 3 次元立体構造を比較し、例えばデオキシヘモグロビン構造の中では存在し、オキシヘモグロビン構造の中では切れているような水素結合や塩結合を探ることによって Bohr プロトンの結合場所を同定しようとした。このような例が考えられる。



このような塩結合は、結合が切れているときより、形成されているときのほうがプロトンが安定に結合する。プロトン濃度が高くなる（つまり溶液の pH が下がる）と、上の式では平衡が左へずれる。この塩橋がデオキシヘモグロビンの構造に特有ならば、デオキシヘモグロビン構造がオキシヘモグロビン構造よりも安定になり、見かけのヘモグロビンの酸素親和性が下がることになる。

Perutz らは、X 線結晶構造解析で α および β サブユニット間で、α および β 鎖の N 末端の α アミノ基と C 末端のカルボキシル基の相互作用が変わることを示した。また、彼は β 鎖の 94 番目のアスパラギン酸のカルボキシル基と同一 β 鎖の C 末端アミノ酸であるヒスチジンのイミダゾール基との間で、デオキシヘモグロビンでは塩結合が形成されていて、オキシヘモグロビンではそれが切れていることを示した。彼らはこのヒスチジンのイミダゾール基が Bohr 効果に関与するひとつの基であろうと推察した。これら Bohr プロトン結合場所候補の pKa の値がいろいろな方法によって測定され、CO 型ヘモグロビンとデオキシヘ

モグロビンでは pKa の値が変化する、つまりプロトン親和性が変化することが示されている(Kilmartin, et al., 1973)。他に化学修飾と NMR による研究、あるいはヒスチジンのイミダゾールの重水素交換法の研究から、Perutz らが示した数個のイミダゾール基が、Bohr 効果に関係していることが確かめられている(Greenfield et al., 1972; Ohe & Kajita, 1980)。

しかし、Kilmartin らが指摘している(1973)ように、これらの α および β 鎖の α アミノ基と、 β 鎖の C 末端のヒスチジン残基の pKa の値の変化量からは、Bohr 効果を定量的に説明できない。Perutz らが示した数個のアミノ酸残基以外の残基も、Bohr 効果に関係していると考えられる。

ヘモグロビン分子中のどのアミノ酸残基が Bohr 効果に貢献しているか。Ho らのグループと、Craescu らのグループは、プロトン NMR スペクトルを利用して、ヘモグロビン分子中のどのヒスチジン残基がどのくらいプロトンを取り込んだり放出したりしているか調べている(Craescu, et al., 1986; Sun, et al., 1997)。ヒスチジン残基の C2 プロトン由来の NMR シグナルが、溶液の pH に依存してシフトするのを利用して、そのヒスチジン残基の pKa の値を調べている。しかし、プロトン NMR スペクトルに現れるどのシグナルが、ヘモグロビン中のどのヒスチジン由来かさえも混乱していた。Ho らのグループが最近注意深く調べた結果を報告している(Sun, et al., 1997)。まず、シグナルの同定の混乱は、(i) オキシヘモグロビンのプロトン NMR シグナルと、CO 結合型ヘモグロビンのそれとがまったく同じだとして同定の基準にしていた実験がある(Craescu, et al., 1986)が、実はその両者は微妙に違う(Russu & Ho, 1986)；(ii) ヘモグロビン中の一個のアミノ酸残基が他のものに置き換わっている異常ヘモグロビンが、NMR シグナル同定の証拠としてよく使われている。しかし、アミノ酸残基が置き換わったという歪みが、しばしばそのごく狭い範囲だけではなく周囲にまで伝わっている場合があるので、いくつかの異常ヘモグロビンはシグナル同定の証拠としては不適当である(Ho & Russu, 1985)；このふたつの大きな理由によって引き起こされていたと述べている。

Sun ら(1997)によると、Bohr 効果に関係しているアミノ酸残基は、Perutz らが指摘したアミノ酸残基以外にもたくさんあるらしい。彼らはそのアミノ酸残基を 3 種類に分類している。(i) ヘモグロビン分子中のプロトン結合・解離が可能なヒスチジン残基；(ii) Perutz らが指摘した N 末端や C 末端のアミノ酸残基；(iii) その他のアミノ酸残基で、プロトン結合・解離が可能で、生理的 pH 条件でヘモグロビンの構造変化に伴って pKa の値が変わるようなもの。Sun らは(i)と(ii)に属するアミノ酸残基の pKa の値を調べてそれぞれ Bohr 効果にどのくらい貢献しているか計算した。現在までに Bohr 効果と関係があるとわかっているアミノ酸残基の結合・放出するプロトンの数を合計すると、デオキシヘ

モグロビンにリガンドが結合したときに放出されるプロトンの数の 75%になった、としている。また、 Cl^- イオンなどの陰イオンが、特定のヒスチジン残基の Bohr 効果への貢献度に影響を与えることも指摘している。

Sun らの分類(iii)に属するアミノ酸残基の pK_a の値については、直接的な測定方法が無いため、よくわかっていない。候補はある。 β サブユニットの 43 番目のグルタミン酸の pK_a の値が、本来の 4.8 から大きくずれていて、しかもオキシヘモグロビン中($\text{pK}_a=7.0$)とデオキシヘモグロビン中($\text{pK}_a=6.25$)とで pK_a 値に違いが見られる、と報告されている(Rao & Acharya, 1992)。

有機リン酸効果

ヘモグロビンの酸素親和性を調節する重要なアロステリックエフェクターに、DPG (2,3-diphosphoglycerate) や IHP (inositol hexaphosphate) などの有機リン酸がある。DPG は、赤血球中の解糖系のバイパスで大量に作られる有機リン酸で、デオキシヘモグロビンにだけ結合し、ヘモグロビンの見かけの酸素親和性を低くさせるような働きをする。IHP は、赤血球の中には無いが、DPG より強いエフェクターとして知られていて、有機リン酸効果を見る実験や、ヘモグロビンのデオキシ型構造を安定化させる目的でよく使われる。DPG がヘモグロビンに結合する場所は、DPG が結合したヘモグロビンの X 線結晶構造解析から明らかになった(Arnold, 1972)。それはヘモグロビンのセントラルキャビティ (中央空洞) と呼ばれる場所の入り口付近 (図 1-5) で、2つの β サブユニットと接触がある領域である。この空洞の内側には正電荷を持ったアミノ酸残基が空洞側に向かっている。DPG は負電荷を持っているので、丁度空洞にはまり込み、デオキシヘモグロビンの構造を安定化する。なお、オキシヘモグロビン型の構造では β サブユニット間の距離が縮まってしまい、DPG が入るスペースがなくなってしまって DPG はオキシヘモグロビンに結合できない。

また、 Cl^- などの陰イオンは、一般にヘモグロビンのデオキシ型構造を安定化させる作用があることが知られている。 Cl^- イオンが結合する場所の一つ知られていて、 α 、 β 両サブユニットの C 末端などによって構成されている網目状の水素結合群の中である (ヘモグロビンの 4 次構造変化についての項で後述)。

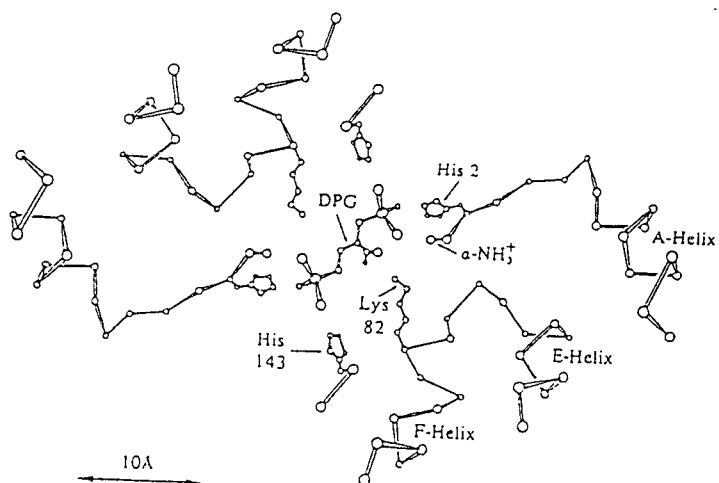


図 1-5 デオキシヘモグロビンの DPG 結合部位

負電荷を持つ DPG 分子は、ヘモグロビンの β サブユニットの正電荷を持つアミノ酸残基 (β 1 バリン、 β 2、 β 143 ヒスチジン、 β 82 リジン) と塩橋を形成している。

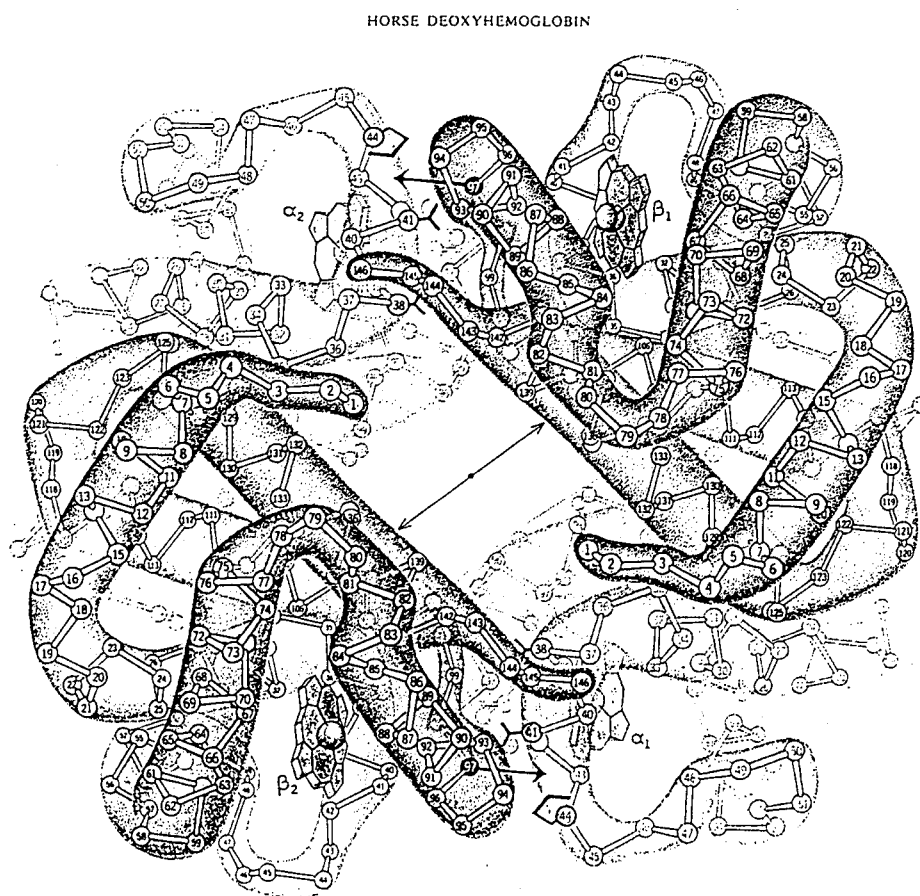


図 1-6 デオキシヘモグロビンの立体構造

2つの α サブユニット、2つの β サブユニット、合計 4つのサブユニットからヘモグロビンはできている。
(ただしこの図はウマヘモグロビンの構造)

(2) ヘモグロビンの構造

X線結晶構造解析によるヘモグロビンの3次元構造の概略

ヘモグロビンは2本の α 鎖と2本の β 鎖から構成されている4量体で、分子量は約64500の球状蛋白質である。酸素が結合していない状態のヘモグロビン(デオキシヘモグロビン)の全体の構造を図1-6に示す。 α 鎖は141個の、 β 鎖は146個のアミノ酸からできていて、それぞれの鎖はヘム(図1-7、鉄(II)プロトポルフィリンIX)を巻き込んで1つのサブユニットとなっている。図1-8に β サブユニットの図を示す。 β 鎖には全部で8部分の α ヘリックス構造があり、その他の部分はヘリックス構造はとっていない。このヘリックス構造とその間の部分にはわかりやすいように名前が付けられている。 β 鎖N末端からA、B、C、 $\cdots$ 、H、と名付けられ、ヘリックスでない部分は、NA、AB、BC、 $\cdots$ 、HC(それぞれN末端とAヘリックスの間、AヘリックスとBヘリックスの間、 $\cdots$ という意味)と名付けられている。 α 鎖の構造も、Dヘリックスのほとんどが無い点を除けば β 鎖の構造と非常に似ている。

α 鎖、 β 鎖のヘムが入っている空間はヘムポケットと呼ばれ、ヘムに向かっているアミノ酸残基のほとんどが疎水性残基である。ヘムは2つのプロピオン酸をヘムポケットから外側の水溶液側に突き出す形でヘムポケットに入っていて、2つのビニル基を含む非極性端はヘムポケットの奥に位置している。ヘムポケット内でのヘムの安定化にはヘムポケット内の疎水性アミノ酸残基とヘムのファンデルワールス接触が役立っているが、その他に重要なのが各鎖のFヘリックスの8番目にあるヒスチジンのイミダゾール窒素原子とヘムの鉄(II)イオンとの共有結合である。このヒスチジンはF8His、近位ヒスチジン(proximal histidine)と呼ばれ、ヘモグロビンの協同性を説明するのに特に重要である。また、その近位ヒスチジンと反対側のヘムポケットにはEヘリックスの7番目にあるヒスチジンがヘムの方向に向いている。これは遠位ヒスチジン(distal histidine)と呼ばれている。このヒスチジンはヘムには結合していないが、ヘムに酸素分子が結合したとき、その酸素と水素結合を形成して酸素結合を安定化させるという重要な役割を持っている。

図1-9にヘモグロビンの各サブユニットの位置関係を示した。各サブユニットはそれぞれ正四面体の頂点に位置するように配列している。ヘモグロビン分子中には1つの α サブユニットをもう1つの α サブユニットに、そして1つの β サブユニットをもう1つの β サブユニットに移すような2回転対称軸が存在する。同種のサブユニットを区別するため、4個のサブユニットには図1-9に示した添字がつけられることが多い。 α サブユニットと β サブユニットの接触には2通りの型、 $\alpha 1\beta 1$ (もしくは $\alpha 2\beta 2$)型と $\alpha 1\beta 2$ (もしくは $\alpha 2\beta 1$)型があ

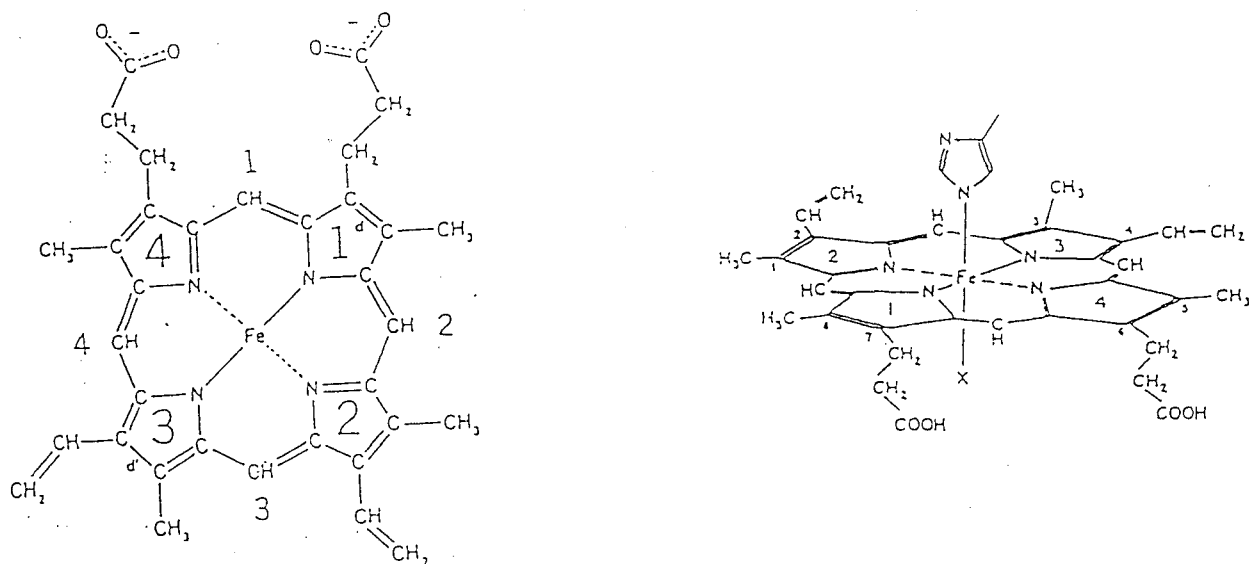


図 1-7 ヘム（鉄プロトポルフィリン IX）の構造

鉄イオンには4つのピロール環の窒素原子が配位する（左図）。

ヘモグロビン中では、近位ヒスチジンのイミダゾール基のN ϵ が第5配位子座を、酸素や一酸化炭素などの外来性配位子が第6配位子座を（右図）占める。

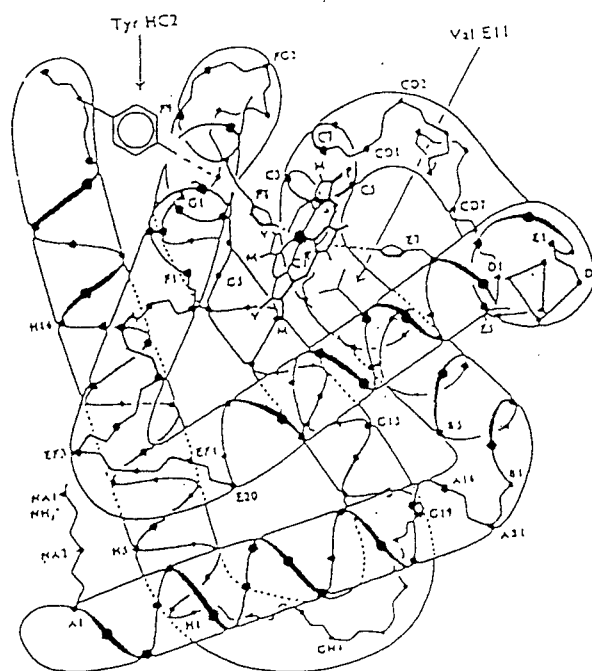


図 1-8 ヘモグロビンの β サブユニットの立体構造

ペプチド鎖中、アミノ酸の α -炭素が黒丸で示されている。

立体構造の主骨格が、ヘリックス状になったペプチド鎖でできているのがわかる。

ヘムはEヘリックスとFヘリックスの間の空間に収まっている。また、 α サブユニットも、 β サブユニットとはほぼ同じ構造である。

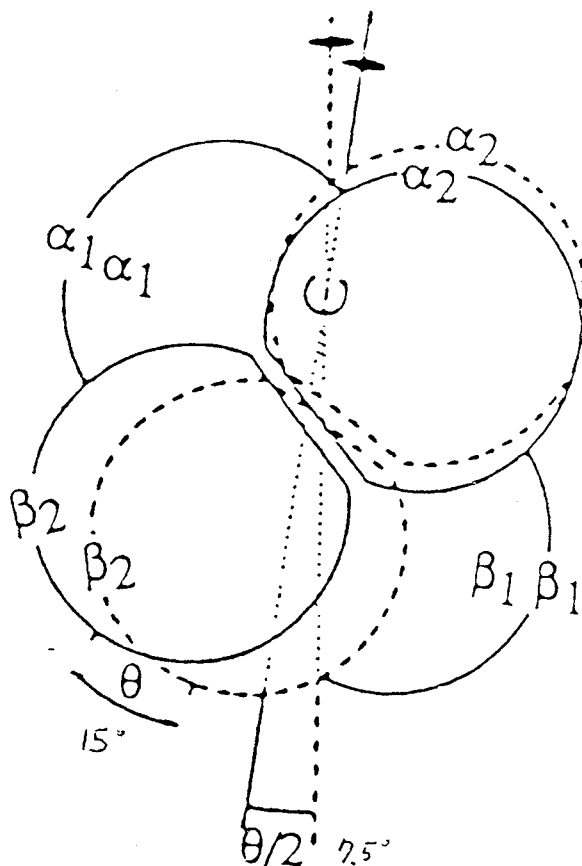


図 1-9 CO 結合に伴うヘモグロビンの 4 次構造変化

実線はデオキシヘモグロビンのサブユニットの配置を示す。 $(\alpha_1\beta_1)$ 2 量体を基準にして、 $(\alpha_2\beta_2)$ 2 量体が、CO 結合に伴ってどう配置が変わるかを破線で示した。デオキシヘモグロビンに CO が 4 個結合すると、 $(\alpha_2\beta_2)$ 2 量体は 2 回回転対称軸に直交する軸 P を中心に約 15 度回転し、さらにこの P 軸に沿って紙面の奥へ向かって 0.8 Å 移動し、 $(\alpha_1\beta_1)$ 2 量体と接近する。

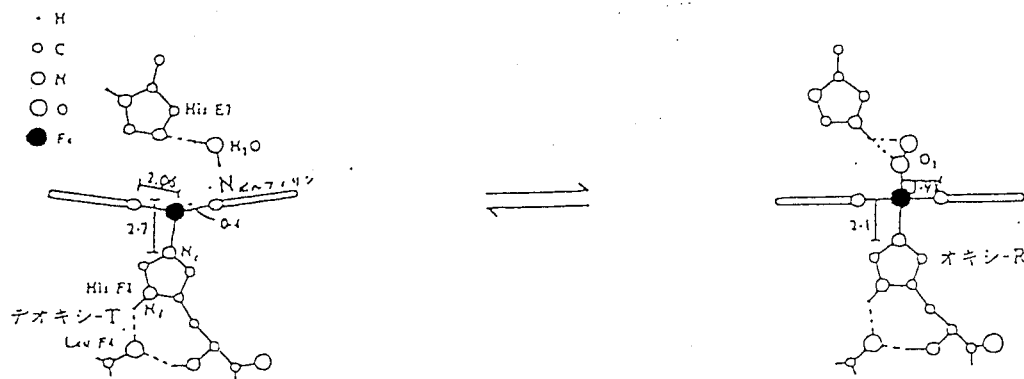


図 1-10 酸素結合に伴う α サブユニット内のヘムの構造の変化

これらはヘム平面を真横から見た模式図。左の酸素が結合していない状態では、ヘム平面はドーム状に曲がっていて、鉄イオンはポルフィリン平面から近位ヒスチジンの方向に少しはみ出している。右図が酸素の結合した状態を示した図。酸素は遠位ヒスチジンと水素結合を形成している。ポルフィリン平面は平らになり、鉄イオンはポルフィリン平面からはみ出していない。デオキシ型構造に比べて、近位ヒスチジンとポルフィリン平面の間の距離が短い。

る。ヘモグロビンが酸素親和性の高い構造から酸素親和性の低い構造へと変わると、前者の接触にはあまり構造の変化は無いが、後者の接触の仕方に大きな変化が起こり、2量体 $\alpha_1\beta_1$ と2量体 $\alpha_2\beta_2$ の相対的位置関係が変わるとされている(図 1-9)。実験に使われるような条件では、溶液中の4量体ヘモグロビンの一部は2つの2量体に別れる。 $\alpha_1-\beta_1$ の間(もしくは $\alpha_2-\beta_2$ の間)のサブユニット間結合は強く、サブユニットへの分離は観測されていない。だから、4量体ヘモグロビンは2量体 $\alpha_1\beta_1$ と2量体 $\alpha_2\beta_2$ との平衡にあるといえる($\text{Hb} \rightleftharpoons \alpha_1\beta_1 + \alpha_2\beta_2$)。オキシヘモグロビンやデオキシヘモグロビンでその平衡定数が測定されていて、デオキシヘモグロビン4量体の方がオキシヘモグロビン4量体よりも2量体に割れにくい(詳しくは Appendix-1 参照)。

結晶構造解析から推定されるヘモグロビンのリガンド結合に伴う構造変化の道筋とサブユニット界面の変化

以下の話はX線結晶構造解析から求められたオキシヘモグロビン(Shaanan, 1983)、一酸化炭素結合型ヘモグロビン(Boldwin, 1979)の3次元構造と、デオキシヘモグロビンのそれ(Fermi et al., 1984)とを比較して、そこから推定されたヒトのヘモグロビンの構造変化の道筋である。

デオキシヘモグロビン中のヘムは、近位ヒスチジンだけが配位した5配位構造である。この時、ヘムの鉄(II)イオンは高スピン状態である($s = 2$)。鉄(II)イオンは3d電子を6個持っているが、そのうち2個の電子が d_{γ} 軌道(dz^2 と dx^2-y^2)に入っている。 dx^2-y^2 軌道はポルフィリンの窒素原子の方向に向いているので、ここに電子が入るとポルフィリンの窒素原子の電子対を押しやる。結果、鉄(II)イオンはポルフィリン面から少し飛び出した形になっている(図 1-10)。ポルフィリンは少し平面がそり曲がったドーム型となる。

リガンド(酸素、もしくは一酸化炭素)は、近位ヒスチジンが配位している配位座(第5配位座と呼ばれることが多い)と反対側の配位座(第6配位座と呼ばれる)に結合する。鉄(II)イオンは6配位構造になり、配位子場の対称性が上がる。その結果、鉄(II)イオンの6個の3d電子は全て d_{ϵ} 軌道(d_{xy} 、 d_{yz} 、 d_{zx} の3つ)に入った方が安定になる。この時、 $S = 0$ で低スピン状態と呼ばれる。鉄(II)イオンの d_{ϵ} 軌道は、Fe(II)イオンに配位しているポルフィリンの窒素原子の方向には電子分布があまりないので、鉄(II)イオンと窒素原子の間の距離は短くなる。結果、鉄(II)イオンはポルフィリン面内に収まる形となり、ポルフィリンは平たくなる(図 1-10)。リガンドがヘムに結合することによって、ヘム内の鉄(II)イオンの位置が変わるわけである。この変化に引っ張られて Fe(II)に結合している近位ヒスチジンの場所も変化し、この変化がヘモグロビン分子

全体に伝えられる、とされている。

リガンド結合に伴うヘム近傍の変化、特に鉄(II)イオンの位置の変化について具体的な数字を示す(Fermi et al., 1984)。まず、デオキシヘモグロビンの場合、鉄(II)イオンはポルフィリンの平均平面から、 α サブユニットで $0.58 \text{ \AA}$ 、 β サブユニットで $0.50 \text{ \AA}$ 、近位ヒスチジン側に突き出ている。このとき、近位ヒスチジンはヘムの第5配位子座の軸方向に対して少し傾いて鉄(II)イオンに配位している。鉄(II)イオンと近位ヒスチジンとの距離は、 α サブユニットのそれの方が β サブユニットのものよりも少し長く、近位ヒスチジンのイミダゾール基のヘム面に対する傾きも α サブユニットの方がわずかに大きい。また、デオキシヘモグロビンの α サブユニットのヘムポケットの遠位側には水分子があり、遠位ヒスチジンと水素結合を形成している。この水分子はオキシヘモグロビン中には無い。デオキシヘモグロビンの β サブユニット中には水分子は入ってきていない。ヘムに酸素が結合すると、鉄(II)イオンはポルフィリン面内に収まる。鉄(II)イオンとポルフィリンの平均平面との距離は、 α サブユニットで $0.16 \text{ \AA}$ 、 β サブユニットで $0.00 \text{ \AA}$ となる。近位ヒスチジンのイミダゾール基の窒素は、約 $0.62 \text{ \AA}$ ヘムに近づくと共に、鉄(II)イオンとの結合距離が $0.2 \text{ \AA}$ 縮まり、鉄に配位するときの傾きが少し緩和される。

リガンド結合に伴うヘムの構造変化は、鉄(II)イオンに結合している近位ヒスチジンを介して F ヘリックス全体を $1 \text{ \AA}$ 程度移動させる。この動きは $\alpha_1\beta_2$ 界面の水素結合に関与する FG 領域のアミノ酸に伝わる。 $\alpha_1\beta_2$ 界面にはデオキシヘモグロビンの4次構造を保つのに必要な水素結合が形成されているのだが、FG 領域が動くことによって水素結合が不安定になる。そしてデオキシヘモグロビン型の4次構造が不安定になり、4次構造変化が起こる。デオキシヘモグロビン、オキシヘモグロビン、それぞれの $\alpha_1\beta_2$ 界面で形成されている水素結合を図1-11に示した。 $\alpha_1\beta_2$ 界面には重要な接触領域が2つある、とされている。1つはヘモグロビンが4次構造変化してもあまり相対位置関係は変わらない接触領域(α_1 のFG領域と β_2 のCヘリックスの間のファンデルワールス接触領域、 $\alpha_1\text{FG4Arg}-\beta_2\text{C6Arg}$ と、 $\alpha_1\text{G1Asp}, \alpha_1\text{G2Pro}-\beta_2\text{C3Trp}$ との間)、もう1つはヘモグロビンの4次構造変化に伴って大きくスライドする領域(α_1 のCヘリックスと β_2 のFG領域の間の水素結合接触領域)である。 α_1 のCヘリックスと β_2 のFG領域はヘモグロビンが4次構造変化することによって相対的に $6 \text{ \AA}$ 移動する。デオキシヘモグロビンに特有な水素結合(例えば $\alpha_1\text{C7Tyr}-\beta_2\text{G1Asp}$)はプロトン核磁気共鳴(NMR)でも同定されていて、ヘモグロビンの4次構造の標識として使われているので重要である。

ヘモグロビンの4次構造変化で他に重要なものが、 β サブユニットの遠位側のアミノ酸残基の位置の変化である。デオキシヘモグロビンの β サブユニットの

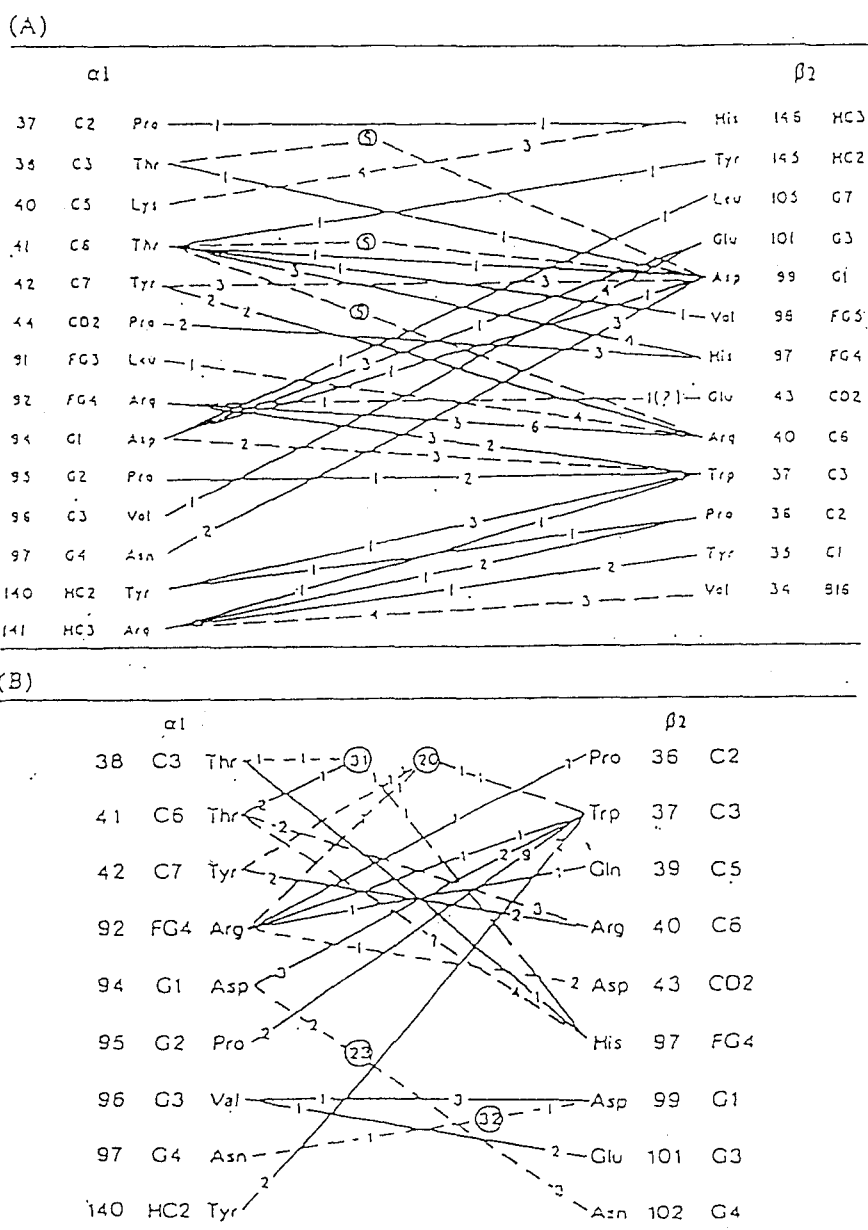


図 1-11 デオキシヘモグロビン(A) と、メトヘモグロビン(B)の $\alpha 1$ - $\beta 2$ 接触面の違い
 (A)と(B)は、それぞれヒトとウマのヘモグロビンのX線結晶構造解析の結果に基づく。
 実線はファンデルワールス接触、破線は水素結合を示す。また、丸で囲んだS、
 または数字は、水素結合ネットワークに含まれる水分子の個数である。

中では、遠位ヒスチジンのイミダゾール環の端と E ヘリックスの 11 番目の残基バリンの γ メチル基が丁度ヘムの第 6 配位子座に非常に近い場所にあり、これらがリガンド結合に対する立体障害となっていると考えられている。オキシヘモグロビン型構造では E ヘリックスの位置が少し移動しており、ヒスチジンとバリンはリガンド結合をじゃまする位置にはない。他方、 α サブユニットにはこのような構造変化は観測されていない。この事実をふまえて Perutz は「 β サブユニットの遠位側の E7 ヒスチジンと E11 バリンは、デオキシヘモグロビン型構造中の β サブユニットのリガンド親和性を下げる役割を果たしている。デオキシヘモグロビンに酸素が結合するとき、まず α サブユニットに結合し、ヘモグロビンの 4 次構造変化が起こり、それからヘムの遠位側の障害物がなくなった β サブユニットに酸素が結合する」という仮説を立てた(1970)。しかし、デオキシヘモグロビンの β サブユニットには全く酸素が結合しないわけではない。

デオキシヘモグロビン中での α 、 β サブユニットの C 末端は、デオキシ型構造を安定化させる網目状の水素結合の形成に関与している (図 1-12)。先に述べた Bohr 効果に関与すると考えられている水素結合はここにある。これらの水素結合はデオキシヘモグロビンの構造の中だけで形成されていて、オキシヘモグロビンの中では形成されていない。

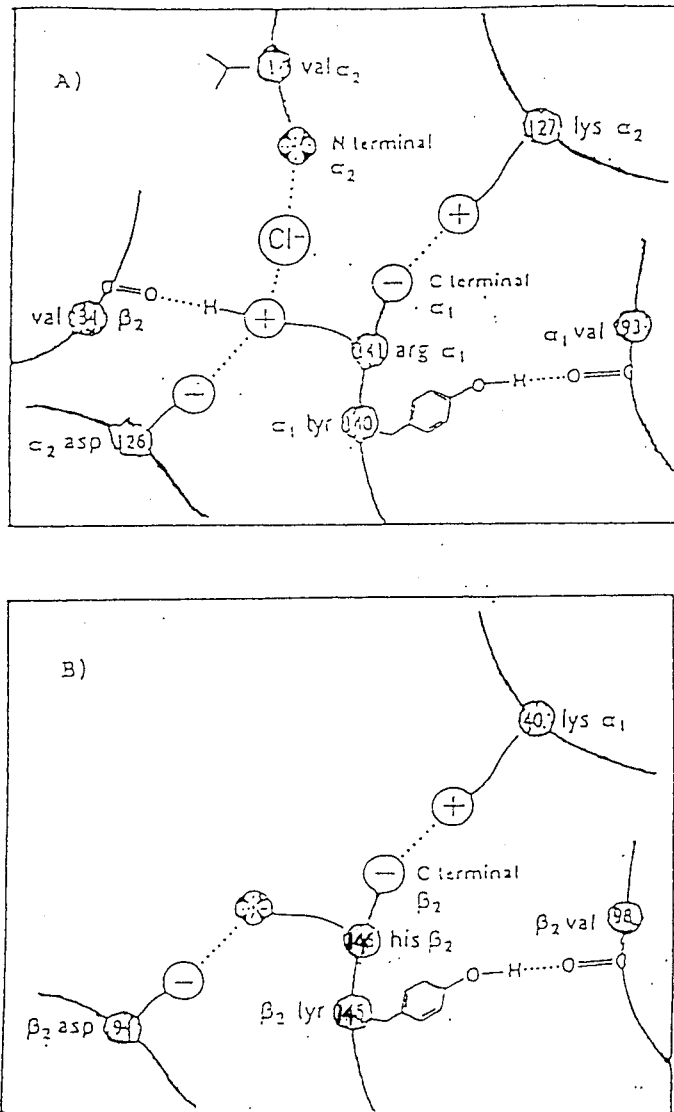


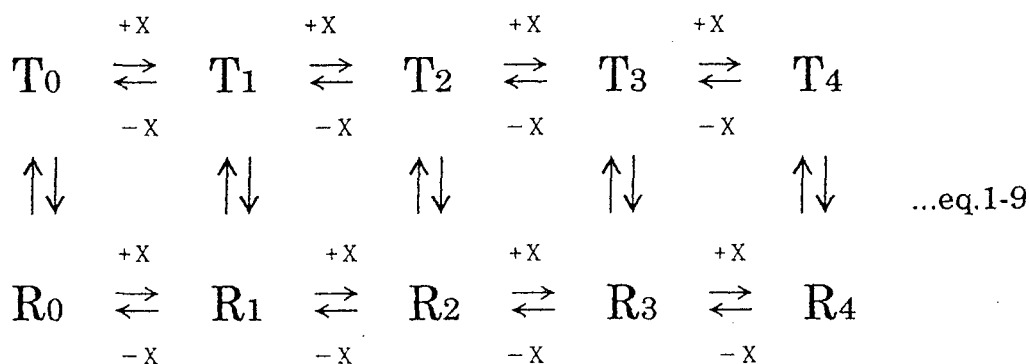
図 1-12 ヘモグロビンの α サブユニットのC末端(A)と、 β サブユニットのC末端(B)の関係する電荷、および水素結合ネットワーク

(3) ヘモグロビンの性質を説明するためのアロステリックモデル

ヘモグロビンの酸素結合の協同作用は、ヘムに酸素が結合している、していない、という情報がヘモグロビン分子の構造変化を介して他のヘムに伝わることで生み出されるとされている。協同作用と構造変化を結びつけるモデルとして Mond-Wyman-Changeux(MWC)の2状態モデル(Mond et al., 1965)が最も有名である。

MWC モデルは一斉転移モデルとでも言うべきもので、ヘモグロビン分子は、デオキシヘモグロビン型4次構造を持つ酸素親和性の低い状態（緊張した状態、Tense state、略して T-状態）と、オキシヘモグロビン型4次構造を持つ酸素親和性の高い状態（緩和状態、Relaxed state、略して R-状態）の2つのどちらかしかとれない、他の状態にはまったくなれない、と考えるモデルである。ヘモグロビンが T-状態なら、1個目から4個目までリガンドに対する親和性は等しく低く、ヘモグロビンが R-状態なら、1個目から4個目までリガンドに対する親和性は等しく高いと考える。ヘモグロビンの協同性は、この2つの状態の間の平衡の移動で説明される。

T_n をリガンドが n 個結合した T-状態ヘモグロビン、 R_n をリガンドが n 個結合した R-状態ヘモグロビンとすると、MWC 2状態モデルの枠組みではリガンド（酸素または一酸化炭素）結合過程とヘモグロビンの構造の全体の平衡状態をこのように書ける。



+Xはリガンドの結合、-Xはリガンドの解離を示す。デオキシヘモグロビンには T_0 と R_0 の2つの状態があるわけだが、この2つの状態間の平衡定数は L とよく呼ばれる。 L はこう書ける。

$$L = \frac{[To]}{[Ro]} \quad \text{---eq.1-10}$$

[To]は T-状態であるデオキシヘモグロビン、[Ro]は R-状態であるデオキシヘモグロビンの濃度を示す。（約束：以後、ヘモグロビンなどの濃度を示すときは、[] で囲むことにする） 2 状態モデルでは、デオキシヘモグロビンは T-状態である方が安定としているので、L の値は 10^5 などの数字が使われることになる。T-状態ヘモグロビン、R-状態ヘモグロビンそれぞれのリガンド平衡定数を K_T 、 K_R とする。1 個だけリガンドが結合したヘモグロビンも T_1 と R_1 の 2 状態の間の平衡状態にある。 T_1 と R_1 の状態間の平衡定数は、このように書ける。

$$\frac{[T_1]}{[R_1]} = \frac{[X] [To] K_T}{[X] [Ro] K_R} = L c \quad \text{---eq.1-11}$$

[X]はリガンドの濃度、c は K_T 、 K_R の比 (K_T/K_R) である。同様に、 $[T_2]/[R_2] = Lc^2$ 、 $[T_3]/[R_3] = Lc^3$ 、 $[T_4]/[R_4] = Lc^4$ 、と書ける。つまり、 K_T 、 K_R 、そして L の 3 つの値があれば、式 1-9 の平衡系の全ての平衡定数を表現できる。2 状態モデルでは、T-状態、R-状態のヘモグロビンの状態は一定、つまり K_T 、 K_R の値はヘモグロビンに結合しているリガンドの数に依らず変化しない、またヘテロトロピック効果に参与する非ヘムリガンド（プロトンや DPG など）の作用は、L 値の変化（R-状態ヘモグロビンと T-状態の平衡のシフト）を通じて発現するものとされている。2 状態モデルのパラメータを使うと、ヘモグロビンのリガンド平衡曲線はこの式で書ける。

$$Y ([X]) = \frac{[T_1]+[R_1] + 2([T_2]+[R_2]) + 3([T_3]+[R_3]) + 4([T_4]+[R_4])}{4([To]+[Ro]+[T_1]+[R_1]+[T_2]+[R_2]+[T_3]+[R_3]+[T_4]+[R_4])} \quad \text{---eq.1-12}$$

Y はヘモグロビンの飽和度である。2 状態モデルの仮定から、 K_R はこのように書ける。

$$[Ro] + [X] \rightleftharpoons [R_1] / 4 \quad \text{だから、} [R_1]/4 = K_R [Ro] [X] \quad \text{---eq.1-13}$$

$$[R_1] / 4 + [X] \xrightleftharpoons{K_R} [R_2] / 6 \quad \text{だから、} [R_2] / 6 = K_R [R_1] [X] / 4 \quad \text{---eq.1-14}$$

$$[R_2] / 6 + [X] \xrightleftharpoons{K_R} [R_3] / 4 \quad \text{だから、} [R_3] / 4 = K_R [R_2] [X] / 6 \quad \text{---eq.1-15}$$

$$[R_3] / 4 + [X] \xrightleftharpoons{K_R} [R_4] \quad \text{だから、} [R_4] = K_R [R_3] [X] / 4 \quad \text{---eq.1-16}$$

1/4 や 1/6 という係数は統計上の補正である。T-状態ヘモグロビンについても同じことができる。これらをまとめると、

$$Y([X]) = \frac{L K_T [X] (1 + K_T [X])^3 + K_R [X] (1 + K_R [X])^3}{L (1 + K_T [X])^4 + (1 + K_R [X])^4} \quad \text{---eq.1-17}$$

実際、 K_T 、 K_R 、そして L の3つのパラメータをうまく選べばいろいろな溶液条件で測定されたヘモグロビンの酸素平衡曲線を式1-17によって精度よく再現することが可能である(表1-1、図1-13B; Imai, 1982)。他のアロステリックモデル(逐次モデルと呼ばれるKNFモデル、Koshland, et al., 1966)では実際の実験で得られた酸素平衡曲線をうまく説明できない場合が多い(図1-13A)。これらの結果を見ると、2状態モデルは定性的に正しく見える。しかし、表1-1のパラメータの特徴を見ると K_R の値は本質的に一定だが、 K_T の値は溶液条件(pH、有機リン酸条件)に依存して変化するのが分かる。この現象はMWC 2状態モデルの基本的仮定、すなわち非ヘムリガンドの作用は K_R 値、 K_T 値を変えず、 L の値のみを変えることによって生ずるという仮定に反する。試みに K_R 値と K_T 値を完全に固定して L の値を加減することによって表1-1に示した溶液条件下で測定した複数の酸素平衡曲線を式1-17で記述することは全く不可能だった(図1-13C、Imai, 1982)。このように単純なMWC 2状態モデルは自己矛盾を含んだモデルであって、定量的にヘモグロビンの酸素結合過程を説明することはできない。

表 1-1 ヘモグロビンの酸素平衡曲線の Hillplot に、2 状態 MWC モデルの理論曲線をベスト
フィットさせたときに得られたパラメータ

表中のシンボルの右側のパラメータが、図 1-13B 中の同じ形のシンボルにフィット
させた曲線のパラメータ。表中の K_R はあまり変化しないが、 K_T が溶液条件に依存
して変化しているのがわかる。

Condition set number	Conditions	K_T	K_R	c	L (T_0/R_0)	Lc^4 (T_4/R_4)	i_s	D
1	pH 9.1, 2.6 mM Cl^-	0.148	3.82	0.0387	2.8×10^2	6.2×10^{-4}	1.73	3.6×10^{-4}
2	● pH 9.1, 0.1 M Cl^-	0.0604	3.34	0.0181	2.7×10^3	2.9×10^{-4}	1.97	2.4×10^{-4}
3	pH 7.4, 7 mM Cl^-	0.0929	3.82	0.0243	3.7×10^3	1.3×10^{-3}	2.21	8.9×10^{-4}
4	△ pH 7.4, 0.1 M Cl^-	0.0241	3.31	0.00728	8.7×10^4	2.5×10^{-4}	2.31	2.1×10^{-4}
5	◆ pH 7.4, 0.1 M Cl^- , 5% CO_2	0.0181	3.92	0.00462	7.3×10^5	3.3×10^{-4}	2.51	4.2×10^{-4}
6	pH 7.4, 0.1 M phosphate buffer	0.0147	3.26	0.00451	5.7×10^5	2.4×10^{-4}	2.45	4.8×10^{-4}
7	▲ pH 7.4, 0.1 M Cl^- , 2 mM DPG	0.00800	3.00	0.00267	3.0×10^6	1.5×10^{-4}	2.52	1.3×10^{-3}
8	□ pH 7.4, 0.1 M Cl^- , 2 mM IHP	0.00601	0.909	0.00661	2.8×10^6	5.4×10^{-3}	2.96	1.2×10^{-3}
9	pH 6.5, 0.1 M Cl^-	0.0117	1.60	0.00731	6.2×10^5	1.8×10^{-3}	2.71	6.9×10^{-4}
10	pH 6.5, 0.1 M Cl^- , 2 mM IHP	0.00402	0.0635	0.0633	4.0×10^3	6.5×10^{-2}	3.01	7.5×10^{-4}

K_T and K_R are given in mmHg^{-1} . D is the root mean square of residuals

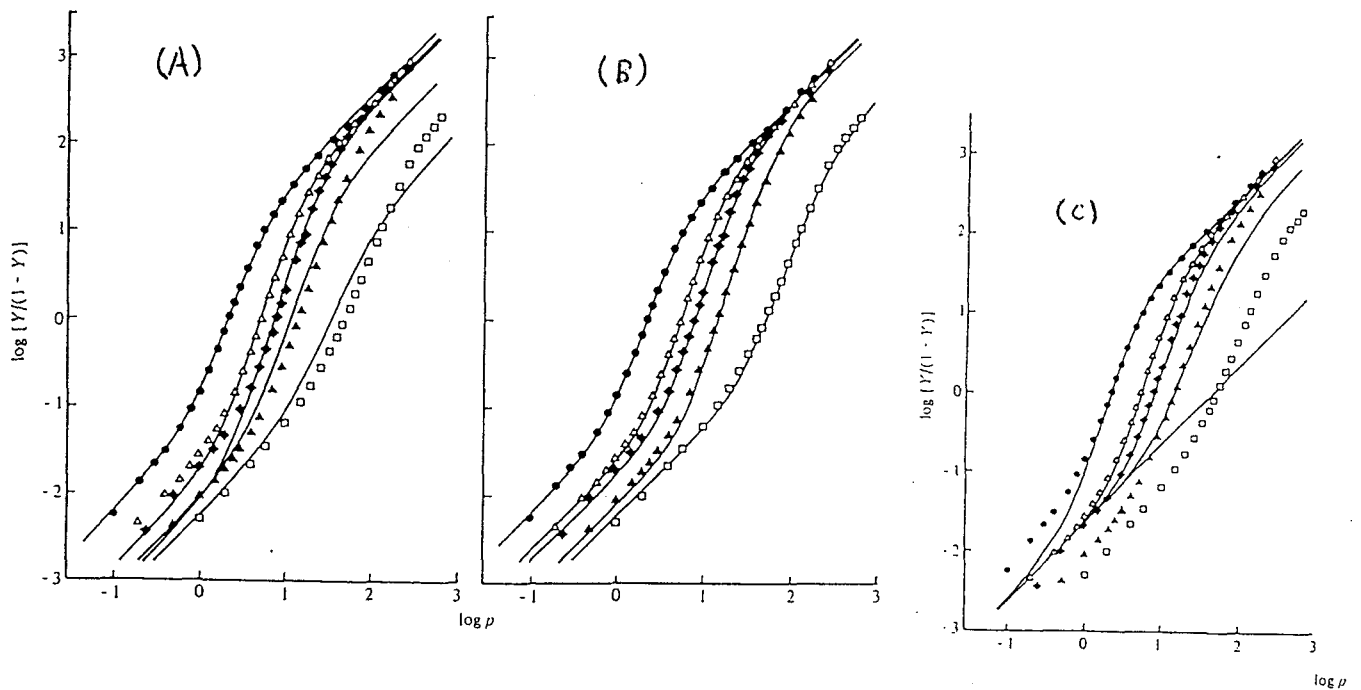


図 1-13 ヘモグロビンの酸素平衡曲線の Hillplot にアロステリックモデルの理論曲線を
フィットさせたもの

図中、シンボルは、ヘモグロビンの酸素平衡曲線の測定点（A、B、C 図で共通）。
曲線は、アロステリックモデルの理論曲線をパラメータを変化させて測定点に
フィットさせたもの。

(A) Square KNF モデルによるベストフィット

(B) 2 状態 MWC モデルによるベストフィット

(C) 2 状態 MWC モデルによるベストフィット、ただし R 状態、T 状態ヘモグロ

ビンの酸素平衡定数を固定した場合。 In (c), lines were calculated with $K_T = 0.0241 \text{ mmHg}^{-1}$ and $K_R = 3.31 \text{ mmHg}^{-1}$ and by adjusting L values so that the calculated P_{50} values would be equal to the experimental values.

(4) 金属置換混成ヘモグロビン

ここで述べる金属置換混成ヘモグロビンは、ヘモグロビンの4つのサブユニットの α サブユニット、もしくは β サブユニットのヘムを他の金属ポルフィリンに置き換えたものである。対になるサブユニットのヘムはそのままである。 α サブユニットのヘムを他の金属イオンポルフィリン(Metalloporphyrin、略してM)で置き換えたヘモグロビンは $\alpha_2(M)\beta_2(Fe)$ 、 β サブユニットのヘムを置き換えたヘモグロビンは $\alpha_2(Fe)\beta_2(M)$ と書かれる。

金属置換混成ヘモグロビンは、ヘモグロビンの協同性の研究にとってとても重要である。ヘモグロビンの協同作用はヘム付近の微妙な構造変化によって引き起こされているのはほぼ確かである。金属置換混成ヘモグロビンの利点は、ヘモグロビンのヘムの金属イオンを取り替えることにより最も重要な場所の構造を3次元的に微妙に変化させることができ、それがヘモグロビンの他のサブユニット中のヘムにどのような影響を与えるか調べることができる所である。また、たいていの金属ポルフィリンには酸素や一酸化炭素などのリガンドは結合しない。通常のヘモグロビンには4つものリガンドが結合するのでややこしい。金属置換法は、ヘモグロビンの活性部位の数を減らして単純化するという利点もある。また、ヘモグロビン中の金属ポルフィリンの構造は、相補サブユニットのヘムのリガンド結合・解離の影響はあまり受けない場合が多い。だから、ある特定の状態のヘモグロビンを固定することができる。

金属ポルフィリンには、酸素や一酸化炭素などのリガンドは結合しないが、もともとそれ自体がオキシヘムとほぼ同じ構造を持ち、ヘモグロビン分子全体に与える影響がオキシヘムとほぼ同じである金属ポルフィリンもある。その金属ポルフィリンは「オキシヘムモデル」「オキシヘムのアナログ」となり得る。逆に、リガンドは結合せず、デオキシヘムと同じ構造を持ち、ヘモグロビンに与える影響がデオキシヘムとほぼ同じである金属ポルフィリンもある。その金属ポルフィリンは「デオキシヘムモデル」「デオキシヘムのアナログ」となり得る。オキシヘムモデル、デオキシヘムモデル、それぞれよいモデルかどうかは金属置換混成ヘモグロビンの鉄(II)サブユニットの酸素親和性が主な判定基準として使われる。オキシヘムモデルにもデオキシヘムモデルにもなりそうにならない金属ポルフィリンもあるが、様々なリガンド親和性を持つヘモグロビンを安定化できることはとても重要である。使った金属ポルフィリンの構造と混成ヘモグロビンのリガンド親和性とを関係づけることができるので、ヘモグロビンのリガンド親和性の調節がどのように行われているのかを調べる手段となり得る。

今までに報告された金属置換混成ヘモグロビンの性質を紹介する。

その1 電荷混成ヘモグロビン(Valency Hybrid Hemoglobin)

普通のヘモグロビンのヘムの中心金属は鉄(II)イオンであるが、この混成ヘモグロビンは鉄(III)イオンを持つヘムと鉄(II)イオンを持つヘムの2種類の電荷ヘムを含むヘモグロビンである $\{\alpha_2(\text{Fe}^{3+})\beta_2(\text{Fe}^{2+})$ と、 $\alpha_2(\text{Fe}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{3+})\}$ 。鉄(III)イオンを持つヘム(メトヘム)は酸素や一酸化炭素を結合しない。代わりに、水分子や OH^- イオン、シアニ化物イオン (CN^-)、アザイドイオン (N_3^-) などを結合する。これらをメトヘムに結合させて、鉄(II)イオンを持つヘムの方の酸素平衡曲線が測定されている(Nagai, 1980)。メトヘムのスピン状態や構造は配位子に依存しているので、混成ヘモグロビンの酸素親和性もメトヘムの配位子に依存している。

歴史的によく調べられているのがシアノメト混成ヘモグロビン $\{\alpha_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)\beta_2(\text{Fe}^{2+})$ と、 $\alpha_2(\text{Fe}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)\}$ である。シアニ化物イオンが結合したメトヘムは、その構造がオキシヘムとよく似ている。(i)シアンが結合したメトヘムは、オキシヘムと同じように低スピンで鉄(III)イオンはポルフィリン面の中央にあり、ポルフィリン面は平らである(Hoard, 1971; Scheidt & Reed, 1981; Shaanan, 1983)。(ii) X線結晶構造解析によって判ったシアノメトヘモグロビン(4つ全てのヘムがメトヘムであるヘモグロビン)の構造は、オキシヘモグロビンの構造にとってもよく似ていた(Deatherage et al., 1976)。また、 $\alpha_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)\beta_2(\text{Fe}^{2+})$ と、 $\alpha_2(\text{Fe}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)$ の鉄(II)サブユニットの酸素親和性は非常に高かった(Maeda et al., 1972; Nagai, 1977; Iwata & Morimoto, 1993)。この混成ヘモグロビンに2個目の酸素が結合するときの平衡定数 (K_2 の値) が通常のヘモグロビンに4個目の酸素が結合するときの平衡定数 (K_4 の値) に近いことからシアノメトヘムが鉄(II)サブユニットの酸素親和性に与える影響が、通常のオキシヘムのものとよく似ていると推定することができる。

シアノメトヘムはオキシヘムのモデルだから、シアノメト混成ヘモグロビンは、4つのサブユニット中、2つのサブユニットの酸素結合状態を固定したヘモグロビンのモデルといえる。デオキシ状態にした $\alpha_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)\beta_2(\text{Fe}^{2+})$ と、 $\alpha_2(\text{Fe}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)$ は、酸素が2個結合した中間段階ヘモグロビンのモデルといえよう。Ogawa と Shulman (1972)はこの混成ヘモグロビンのプロトンNMRを測定して、この混成ヘモグロビンはIHPが結合することによってヘムのメチル基由来のシグナルがオキシ型からデオキシ型へと変化することを示した。他方、デオキシ状態の $\alpha_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)\beta_2(\text{Fe}^{2+})$ と、 $\alpha_2(\text{Fe}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)$ のCO結合速度は、有機リン酸が溶液中にない条件ではオキシ型構造並の速い速度であるが、IHPを加えるとデオキシヘモグロビン並の遅い速度に変わってしまう(Cassoly

et al., 1971; Cassoly & Gibson, 1972)。また、これら混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線も、もともとは非常に高い酸素親和性を持っているのだが、IHP を加えることにより非常に低くなる(Nagai, 1980)。これらの大きな変化は、2 状態モデルで言うところの $R_2 \rightarrow T_2$ の構造変化が起きている (リガンドが 2 個だけ結合している中間段階ヘモグロビンは、もとは R 状態だったのが、IHP が結合することにより T 状態になった) と推論された。酸素が 2 個結合している中間段階ヘモグロビンの構造は微妙な状態にあり、溶液の pH を変えたり DPG や IHP を結合させたりすることによって容易に $R \rightarrow T$ の構造変化が起こったと考えられたのである。これは丁度 2 状態モデルから期待される現象が実際に起こったと解釈された。

しかし、2 状態モデル的に見えない実験結果の報告もある。IHP によってシアノメト混成ヘモグロビンの酸素親和性は低下する。 $\alpha_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)\beta_2(\text{Fe}^{2+})$ の酸素親和性の場合、IHP が結合することによって 1 個目に結合する酸素の親和性は 100 倍低くなるのでオキシ型構造からデオキシ型構造に変化したと見ることができるが、 $\alpha_2(\text{Fe}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)$ の場合は、10 倍しか低くならない。この変化量はオキシ型からデオキシ型に構造が変化したと考えるには小さい(Nagai, 1977)。NMR の研究には、ヘモグロビン分子は構造が必ずしも一斉転移していないという報告がいくつかある。ヘモグロビンがデオキシ型構造の時だけ存在する水素結合が $\alpha_1\beta_2$ 界面にあるのだが ($\alpha 42\text{Tyr} \cdots \beta 99\text{Asp}$)、これに由来する 14ppm NMR シグナルがシアノメト混成ヘモグロビンに IHP を加えても観測されない(Miura & Ho, 1982)。同じ混成ヘモグロビンのシアノメトヘムの側鎖メチル基の H の NMR シグナルは IHP が加えられるとオキシ型からデオキシ型に変化する(Ogawa & Shulman, 1972)にも関わらず、である。

シアノメトヘムがオキシヘムのモデルであることを利用して、酸素結合中間段階のヘモグロビンの分子種すべてのモデルを作り、このモデルの 4 量体ヘモグロビンが 2 量体に解離する速度を測定することによって中間段階ヘモグロビン分子種の“協同作用の自由エネルギー”を調べる方法が Ackers らのグループによって開発された(Smith & Ackers, 1985)。ヘモグロビンに酸素が結合していくとき、どのサブユニットにどの順番で結合したらどのくらいの協同作用が起こるかを調べたのである。彼らの一連の研究によると(Ackers et al., 1992; Daugherty et al., 1991; Doyle & Ackers, 1992; Daugherty et al., 1994)、シアノメト混成ヘモグロビンを酸素結合中間段階ヘモグロビンのモデルとして使った系では、1、2 個目のリガンド結合過程でヘモグロビン 4 量体中の $\alpha_1\beta_1$ (もしくは $\alpha_2\beta_2$) 2 量体に結合する場合に非常に大きな協同作用があった。2 個リガンドが結合しているヘモグロビンの中間段階分子種は 4 種類考えられるが、そのうち片方の 2 量体に 2 つのリガンドが結合している分子種 ($[\alpha(\text{Fe}-\text{O}_2)\beta(\text{Fe}-$

O₂)] α (Fe) β (Fe)] に相当するモデル分子種が他の分子種に比べて非常に安定で、ヘモグロビン溶液中に平衡状態で多量に存在している、というのである。

しかしこのシアノメト混成ヘモグロビンを使った実験系には問題があることがわかっている。ヘモグロビンの4量体-2量体平衡の性質を調べる時、非常に時間がかかる場合がある。例えばデオキシヘモグロビンとシアノメトヘモグロビンを嫌気条件で混合して $[\alpha(\text{Fe}^{3+}\text{-CN})\beta(\text{Fe}^{3+}\text{-CN})][\alpha(\text{Fe}^{2+})\beta(\text{Fe}^{2+})]$ という混成ヘモグロビンを調整する場合、デオキシヘモグロビンが2量体に分かれる速度が非常に遅いので平衡状態に達するまでに数十時間かかる。これだけ長い時間デオキシヘモグロビンとシアノメトヘモグロビンを溶液中で混ぜておくとヘムの電子交換が起こってしまうのである(Shibayama et al., 1997)。ヘモグロビン分子中の鉄(II)ヘムと鉄(III)ヘムの分布がランダムになってしまい、特定のシアノメト混成ヘモグロビン分子種は長時間保てない。 $[\alpha(\text{Fe-O}_2)\beta(\text{Fe-O}_2)][\alpha(\text{Fe})\beta(\text{Fe})]$ という分子種のモデルである $[\alpha(\text{Fe}^{3+}\text{-CN})\beta(\text{Fe}^{3+}\text{-CN})][\alpha(\text{Fe})\beta(\text{Fe})]$ が他の酸素結合中間段階分子種モデルに比べて安定だと報告されたのも、この電子交換が原因だと考えられる。この分子種はデオキシヘモグロビンとシアノメトヘモグロビンを混ぜて、それらの2量体交換を通して溶液中に存在させる。しかし、長時間の間に電子の交換によって様々な分子種ができてしまっているのに気付かず、その様々なヘモグロビンの性質を $[\alpha(\text{Fe}^{3+}\text{-CN})\beta(\text{Fe}^{3+}\text{-CN})][\alpha(\text{Fe})\beta(\text{Fe})]$ の性質だと勘違いしたようだ。ヘモグロビン間の電子の交換に注意してデオキシヘモグロビンとシアノメトヘモグロビンを混ぜた溶液中では $[\alpha(\text{Fe}^{3+}\text{-CN})\beta(\text{Fe}^{3+}\text{-CN})][\alpha(\text{Fe}^{2+})\beta(\text{Fe}^{2+})]$ は平衡状態でどのくらい存在するかを調べた結果、ヘモグロビン分子全体の8.6%以下とわかった(Shibayama et al., 1997)。この数字はAckersらが主張している数字、ほぼ50%に比べてはるかに小さい。

その2 マンガン(III)-鉄(II)混成ヘモグロビンとマンガン(II)-鉄(II)混成ヘモグロビン

マンガン(III)ポルフィリン、マンガン(II)ポルフィリンは酸素や一酸化炭素を結合しない。マンガン(III)-鉄(II) (Mn(III)-Fe(II)) 混成ヘモグロビンの鉄(II)サブユニットは高い一酸化炭素親和性を示した。一酸化炭素結合のK₂の値は速度論的解析から求められている。結合速度はCO型ヘモグロビンの光部分解離で、解離速度はCO-NO置き換え法で測定されている(これらの方法については第3章で述べる)。CO結合の平衡定数は結合速度定数と解離速度定数の比から求められていて、通常のヘモグロビンのCO結合のK₄とよく一致したと報告されている(Blough & Hoffman, 1982, 1984a)。この性質を見るとMn(III)ポルフィリンは良いオキシヘムモデルといえそうだが、酸素親和性については少し違う。

Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのうち、 α_2 (Mn(III)) β_2 (Fe)混成ヘモグロビンの酸素結合の K_2 の値は、通常のヘモグロビンの酸素結合の K_4 の値より少し小さいのでオキシヘムのモデルとはいえない。他方、 α_2 (Fe) β_2 (Mn(III))混成ヘモグロビンの K_2 の値は、ヘモグロビンの酸素結合の K_4 の値とほぼ同じなので、 β サブユニットの中にあるとき Mn(III)ポルフィリンはよいオキシヘムであるらしい (Masuda & Morimoto, 1993)。他の特徴として、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンはシアノメト混成ヘモグロビンより大きな協同性を示すことがわかっている (Warterman & Yonetani, 1970; Masuda & Morimoto, 1993)。

Mn(II)ポルフィリンは溶液中に酸素が存在する条件では Mn(III)ポルフィリンへと酸化されてしまうので、Mn(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線は測定できない。それで、酸素が無い条件で一酸化炭素の結合速度と平衡曲線が測定されている (Hoffman et al., 1975; Blough & Hoffman, 1982, 1984a, 1984b)。Mn(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 結合の K_1 は、通常のデオキシヘモグロビンのそれとほぼ似た値を示すので Mn(II)ポルフィリンは良いデオキシヘムのモデルとされている。CO 結合速度も通常のデオキシヘモグロビンの CO 結合速度と同じくらい、またはそれよりも遅い速度が観測されていて、特に β (Fe)サブユニットの結合速度は溶液中に IHP が存在すると遅くなる、と報告されている (Blough & Hoffman, 1982)。

また α_2 (Fe-CO) β_2 (Mn(II))という分子は X 線結晶構造解析の結果が報告されている (Arnone et al., 1986)。硫酸溶液中でこの分子は通常のデオキシヘモグロビンと同じ結晶型となった。 α_2 (Fe) β_2 (Mn(II))をデオキシ状態で結晶させておいて、その後 CO 分子を結合させている。分解能は 3.0 Å である。分子全体の構造変化は α サブユニット内にとどまっており、サブユニット界面や β サブユニットなどの構造変化は無い。 α サブユニットのヘムに CO が結合したことによって鉄(II)イオンが約 0.35 Å ポルフィリン面に近づき、近位ヒスチジンも同じだけ鉄(II)イオンに引っ張られて動き、 α サブユニットの F ヘリックスを引っ張っているが、その動きは $\alpha_1\beta_2$ 界面まで伝わっていない。この F ヘリックスの動きはオキシヘモグロビンとデオキシヘモグロビンの構造の違いに比べて小さい。他方、Mn(II)ポルフィリンを持つ β サブユニットの構造は鉄(II)イオンが Mn(II)イオンに変わった以外はデオキシヘモグロビンの β サブユニットの構造とほとんど変わらなかった。しかし、根本的に分解能が低いところでしか解析されておらず、CO 分子の占有率も低い (結晶中できちんとヘムが CO で飽和していないと考えられる) のでヘモグロビンの構造を詳しく議論するのは難しい。

その3 コバルト(II)-鉄(II)混成ヘモグロビン

コバルト(II)-鉄(II) (Co(II)-Fe(II)) 混成ヘモグロビンはシアノメト混成ヘモグロビンに次いで研究の歴史が長い。ヘモグロビンの4つのヘムをコバルト(II) (Co(II)) ポルフィリンに置き換えた Co(II)ヘモグロビンの Co(II)サブユニットは酸素を可逆的に結合し、しかも酸素結合過程の協同作用まで示すことが明らかになっている。その酸素親和性は、通常のヘモグロビンより P_{50} の値を基準にすると約 10 倍低く、協同性もヘモグロビンの $n_{\max}$ が 3.0 近くなのに比べて約 2.0 と小さな値しか示さない(Hoffman & Petering, 1970; Imai et al., 1977)。ただし、Co(II)サブユニットは一酸化炭素分子をほとんど結合しない。

Co(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは Co(II)サブユニットと Fe(II)サブユニットの両方に酸素を結合するわけだが、Co(II)サブユニットの酸素親和性が Fe(II)サブユニットのものに比べて低いので、Co(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線を測定すると、酸素濃度が低いときは酸素は Fe(II)サブユニットにまず結合し、Co(II)サブユニットには酸素濃度が高くなってから結合する。この酸素平衡曲線の Hillplot から K_1 の値、つまり Fe(II)サブユニットが1個目の酸素を結合する平衡定数を見積もることができる。その結果、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Co})$ の K_1 の値は通常のヘモグロビンの K_1 の値に近かったので、デオキシ $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Co})$ はほぼデオキシヘモグロビンと同じ構造をしていると考えられる。だから β サブユニット内の Co(II)ポルフィリンは良いデオキシヘムモデルといえる。他方、 $\alpha_2(\text{Co})\beta_2(\text{Fe})$ の K_1 の値はヘモグロビンのそれより約 10 倍大きい。つまり酸素親和性が 10 倍高い。 α サブユニット内の Co(II)ポルフィリンは良いデオキシヘムモデルとは言えない(Tsubaki & Nagai, 1979)。また、デオキシ4次構造の重要な指標である 14ppm の NMR シグナルが、デオキシ $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Co})$ では通常のデオキシヘモグロビンと同様に観測されるが、 $\alpha_2(\text{Co})\beta_2(\text{Fe})$ では溶液条件に依存して観測されたりされなかったりする。強度の強い 14ppm シグナルを観測するには pH を下げ、IHP を加えなければならない(Inubushi, unpublished results)。このように、 α サブユニット中の Co(II)ポルフィリンはデオキシヘムモデルとしては使えない。

デオキシ Co(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの一酸化炭素結合速度も測定されている(Ikeda-Saito & Yonetani, 1980)。一酸化炭素分子は Fe(II)サブユニットにのみ結合する。この速度は酸素平衡機能や NMR の結果とは違って、 $\alpha_2(\text{Co})\beta_2(\text{Fe})$ 、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Co})$ の両混成ヘモグロビンともに通常のデオキシヘモグロビンの CO 結合速度と同じくらい遅いものだった。ヘモグロビン溶液に IHP を加えるとさらに遅くなった。このようにデオキシ状態の Co(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは CO 結合速度の点ではデオキシヘモグロビンと同等に見える。

その4 ニッケル(II)-鉄(II)混成ヘモグロビン

デオキシヘムのモデルとして最もよく研究されているのがニッケル(II) (Ni(II)) ポルフィリンである。Ni(II)ポルフィリンには酸素も一酸化炭素も結合しない。Ni(II)ポルフィリンを使った Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素親和性は低い。 $\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$ 、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$ 両混成ヘモグロビンの K_1 の値は、通常のヘモグロビンの K_1 の値と非常によく似ているので、ヘモグロビン分子中の Ni(II)ポルフィリンはデオキシヘムとはほぼ同じ影響を鉄(II)サブユニットに与えていると考えられた。この確認はいろいろな溶液条件 (pH, IHP) や、化学修飾を施したヘモグロビンでも行われている (Shibayama et al., 1986a, b) ので、Ni(II)ポルフィリンは良いデオキシヘムのモデルとして使われている (Shibayama et al., 1993, 1995a, b)。Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素結合過程は、通常のヘモグロビンの1個目、2個目の酸素結合過程のモデルとなる。また、 $\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$ 中の Ni(II)ポルフィリンの吸光スペクトルはヘモグロビンの構造変化に伴って変化することもわかっている。吸光スペクトルの変化は α サブユニット中の Ni(II)ポルフィリンの4配位、5配位の変化と対応づけられている。混成ヘモグロビンがデオキシ型構造をしているときは近位ヒスチジンは Ni(II)ポルフィリンに配位しておらず、オキシ型構造では近位ヒスチジンが配位した5配位状態と、配位していない4配位状態が、1対1くらいになっている。 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$ 中の Ni(II)ポルフィリンの吸光スペクトルもヘモグロビンの構造変化に伴って変化するが、その変化は小さく、必ずしも配位状態の変化と対応づけられていない。Ni(II)ポルフィリンの吸光スペクトル変化は Ni(II)ポルフィリン付近の構造を知る手段となる。

Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡機能と構造変化の指標の関係が調べられている。構造変化の指標は NMR シグナル (Shibayama et al., 1987)、吸光スペクトル、共鳴ラマン法による α サブユニットのヘムと近位ヒスチジンとの結合の伸縮振動の変化、といろいろある。酸素平衡機能と構造変化の指標の関係が2状態モデル (一斉転移モデル) で期待されるようなものではない例がいくつかある。 $\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$ は、溶液の pH が高いとき、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットに酸素が結合するに伴って α サブユニットの Ni(II)ポルフィリン-近位ヒスチジン結合も、 $\alpha_1\beta_2$ 界面も構造変化するのに、酸素平衡曲線は協同性を全く示していない。化学修飾して少し酸素親和性を高くした $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$ でも同様の現象が観測されている。酸素の結合していないヘム近傍の状態を共鳴ラマンで調べると既にオキシ型構造をしているのに、酸素平衡曲線はかなり大きな協同性を示した。どちらの例も、ヘモグロビン分子全体が一斉に構造変化しているとは考えにくいことを示している。

Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンはレーザーフォトリシス法 (本論文第3章で述

べる) を用いてリガンドの再結合を測定するのに適している。酸素、一酸化炭素、一酸化窒素の再結合が測定されている(Shibayama et al., 1995b)。Ni(II)ポルフィリンの他にヘモグロビンのリガンド親和性を低くさせる金属ポルフィリンにはMn(II)、Mg(II)、Zn(II)ポルフィリンなどがあるが、Mn(II)ポルフィリンは酸素がある条件では使えないし、Mg(II)、Zn(II)ポルフィリンはフラッシュでポルフィリンが励起してしまう(Zemel & Hoffman, 1981; 第3章)。リガンド親和性が低いヘモグロビンのレーザーフォトリシス実験にはNi(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンが最適である。

その5 マグネシウム(II)-鉄(II)混成ヘモグロビン

金属置換混成ヘモグロビンを調整することの目的の一つが、「ヘモグロビン分子の機能を調節していると考えられるヘムの近くを微妙に変化させて、その影響がヘモグロビン分子全体にどのような影響が現れるか観察する」であることは既に述べた。ヘモグロビンの機能の調節には立体構造変化が重要であると考えられているので、イオン半径などが鉄(II)イオンに近い鉄族遷移元素が選ばれた。主に森本研究室で、実際に金属置換混成ヘモグロビンが調製されている金属イオンを周期律表の順番に挙げると：チタニウム(IV)、バナジウム(IV)、クロム(III)、マンガン(II) & (III)、鉄(III)、コバルト(II) & (III)、ニッケル(II)、銅(II)、亜鉛(II)。他に周期律表では鉄の真下にあるルテニウム(II)も金属置換混成ヘモグロビンに使われている(Ishimori & Morishima, 1988)。チタニウムの左隣のスカンジウムとカルシウムは、おそらくイオン半径が大きすぎる(Shannon & Prewitt, 1969)という理由で、それらの元素のイオンがポルフィリンに導入されたという報告はない。周期律表中でこれらの元素の近くにあつて、その金属ポルフィリンがよく知られているものにマグネシウム(II)イオンがある。マグネシウムが入っているポルフィリンの中にはクロロフィルがあり(Clayton, 1980; Parson, 1988)、また、マグネシウムポルフィリン自体よく調べられている(Fuhrhop & Granick, 1971; Smith, 1976)ので情報が豊富である。マグネシウムポルフィリンをヘモグロビンの中に入れたらヘモグロビンの構造はどうか？この計画が始まった当初、ヘモグロビンの構造はほぼその中の近位ヒスチジンの位置によって調節されているだろうと考えられていた。だから、ポルフィリンと近位ヒスチジンの間の結合の強さや原子間距離を左右するであろう金属ポルフィリン中の金属イオンの3d電子の数、特に金属イオンから見て近位ヒスチジンの方向に存在している d_y 電子の数が、ヘモグロビンの構造に大きな影響を与えるだろうと考えられていたのである。実際、 d_y 電子の数が多ければ多いほど混成ヘモグロビンの酸素親和性は下がる傾向にあつた。 d_y 電子の数が多いう金属ポルフィリン(ニッケル(II)、銅(II)、亜鉛(II)など)を使った混成ヘモグ

ロビンの酸素親和性は低く、 $d\gamma$ 電子の数が少ない金属ポルフィリン (クロム(III)、鉄(III)低スピンなど) を使った混成ヘモグロビンの酸素親和性は高かった。

さてマグネシウム(II)イオンには $3d$ 電子がない。この金属ポルフィリンを使った混成ヘモグロビンの性質は一体どんなものか。やはり森本研究室でその性質が詳しく調べられている。マグネシウム(II)-鉄(II) ($Mg(II)-Fe(II)$) 混成ヘモグロビンの鉄(II)サブユニットのリガンド親和性は非常に低い。酸素親和性の点で他のものと比較すると、 $Mg(II)-Fe(II)$ 混成ヘモグロビンの K_1 の値は同じ条件の通常のヘモグロビンや $Ni(II)-Fe(II)$ 混成ヘモグロビンのものよりも小さい。溶液に IHP を加えると、 $Mg(II)-Fe(II)$ 、 $Ni(II)-Fe(II)$ 、通常のヘモグロビンの K_1 の値は全て小さくなり、ほぼ同じくらいになる(Fujii & Morimoto, 1995)。このあたりがヘモグロビンが持ち得る酸素親和性の下限と考えられる。 $Mg(II)-Fe(II)$ 混成ヘモグロビンは IHP が無くても、 $Ni(II)-Fe(II)$ 混成ヘモグロビンや通常のデオキシヘモグロビンに比べて、最も酸素親和性が低い状態に近い状態にあると考えられる。だからヘモグロビンのリガンド親和性をとても低い状態を安定化したときは、非常に有用な混成ヘモグロビンである。しかしマグネシウム(II)ポルフィリンには $3d$ 電子が全く無いのに、なぜ混成ヘモグロビンの構造をリガンド親和性が非常に低い状態に安定化させてしまうのかはよくわかっていない。

混成ヘモグロビンの中で、 $Mg(II)-Fe(II)$ 混成ヘモグロビンの X 線結晶構造解析が最もよく研究されている(Park et al., 1996)。この混成ヘモグロビンの結晶構造解析は、 $\alpha_2(Fe)\beta_2(Mg)$ が特徴のある性質を持っていたので行われた。通常の溶液中で、この混成ヘモグロビン中の β サブユニット内のマグネシウムポルフィリンの吸光スペクトルが、 $\alpha(Fe)$ サブユニットのリガンド結合・解離や、溶液の pH、IHP 条件に依存して変化するのである。この混成ヘモグロビンはデオキシヘモグロビンよりも酸素親和性が低いにも関わらず、である。酸素親和性が低い状態なのに、ヘモグロビン分子中では何らかの構造変化が起こっているとしかない。これは 2 状態モデルの約束の「ヘモグロビン T 状態の性質はまったく変化しない」と完全に対立する現象である。X 線結晶構造解析は、この $\alpha_2(Fe)\beta_2(Mg)$ のマグネシウムサブユニットのスペクトル変化は一体どのような構造の変化によるものなのかを探るために行われた。また、 $Mg(II)-Fe(II)$ 混成ヘモグロビンは何故通常のデオキシヘモグロビンよりも低い酸素親和性を示すのかを探るためでもある。通常のデオキシヘモグロビンとの違いは立体構造の違いから生じているはずである。

$\alpha_2(Mg)\beta_2(Fe)$ 、 $\alpha_2(Fe)\beta_2(Mg)$ のデオキシ型、CO 結合型の結晶構造の結果が出ている。先に述べた $Mn(II)-Fe(II)$ 混成ヘモグロビンと比べると、高分解能までのデータを使って解析されていて、しかも CO 型結晶では CO 分子の占有率も高いので、デオキシヘモグロビンに CO が結合したときの構造変化について詳

しく議論ができる。残念ながらデオキシ Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの構造は通常のデオキシヘモグロビンとそっくりで、酸素平衡機能で見られた違いは現れてはいなかった。デオキシ Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンと CO 結合型 Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの構造を比べたとき、CO 分子が Fe(II)サブユニットに結合したことによって構造が変化した、と見えるのは Fe(II)サブユニットのヘム近傍と近位ヒスチジンと、それにつながる F ヘリックスだけだった。 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットに CO が結合したときは F ヘリックスの他に E ヘリックスも少し動いたように見えた。Mg(II)ポルフィリンの構造は (Mg(II)イオンに配位している近位ヒスチジンの位置も含めて)、混成ヘモグロビンがデオキシ型でも、CO 結合型でも、通常のデオキシヘムの構造と非常によく似ていた。

その6 ポルフィリン-鉄(II) (PP-Fe(II)) 混成ヘモグロビン

ポルフィリン (PP) とは、その名前の通り中心金属イオンを持たないポルフィリン骨格だけを示す。この混成ヘモグロビンでは、ポルフィリンはヘムポケットの中の周囲のアミノ酸残基のファンデルワールス力のみによって固定されていると考えられる。だからだろうが、 β サブユニットからポルフィリンは簡単に抜け出てしまうようである。この混成ヘモグロビンは金属置換混成ヘモグロビンとは言えないが、ヘモグロビンの酸素結合過程で協同作用を発揮するために重要だと考えられているヘム-近位ヒスチジン間の結合を切ってしまう、その影響を調べることができる重要な混成ヘモグロビンである(Fujii et al., 1993)。ヘム-近位ヒスチジン間結合が切れると $\alpha_2(\text{PP})\beta_2(\text{Fe})$ と $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{PP})$ とで違った性質が現れることがわかった。 $\alpha_2(\text{PP})\beta_2(\text{Fe})$ は、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンと同じ程度の非常に低い酸素親和性、非協同的な酸素結合を示した。 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{PP})$ は通常のデオキシヘモグロビンと同じ程度の酸素親和性を示した。 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{PP})$ とヘモグロビンの K_1 の値はよく似ていたのである。見かけ上、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{PP})$ は大きめの酸素結合協同性を示した ($n_{\text{max}}=1.3$ くらい)。

他の金属置換混成ヘモグロビンとの比較、ポルフィリンの環電流効果によって誘起されるプロトンシグナルの測定などから、(i) $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの酸素親和性は α サブユニット中の近位ヒスチジンの位置によって調節されていること、(ii) $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの酸素親和性を調節しているのは、 β サブユニットの近位ヒスチジンの位置だけではなく、 β サブユニットの E ヘリックスの 11 番目のアミノ酸残基・バリンのポルフィリン面に対する位置関係——リガンドが β サブユニットのヘムに結合すると、リガンドがヘムの真上にある E11 バリンに接触し、バリンの位置を動かす、この動きも $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの酸素親和性の調節に関与しているのではないか、という 2 つの結論が導き出されている。

その7 その他の金属置換混成ヘモグロビン

今までに紹介した金属イオン以外にも Cr(III) (Unzai et al., 1996; 本論文第2章), Cu(II) (Shibayama et al., 1985)、Co(III)CN⁻ (Yoshida et al., 1993)、V(II)O (Matsubara et al., 1993)、Ti(II)O (Matsubara et al., 1993)、Ru(II)CO (Ishimori & Morishima, 1988)、などの金属イオンを用いた金属ポルフィリンが混成ヘモグロビンの調整に使われている。

これらの混成ヘモグロビンは、酸素親和性を基準にすると大まかに4つのグループに分けることができる。(i) Fe(II)サブユニットが通常のおキシヘモグロビンと同じくらいの高い酸素親和性を持っている混成ヘモグロビン、(ii) Fe(II)サブユニットがおキシヘモグロビンとデオキシヘモグロビンの間の中間的な酸素親和性を持っている混成ヘモグロビン、(iii) Fe(II)サブユニットが通常のおキシヘモグロビンと同じくらいの低い酸素親和性を持っている混成ヘモグロビン、(iv) Fe(II)サブユニットが通常のおキシヘモグロビンよりも低い酸素親和性を持っている混成ヘモグロビン、の4グループである。今までに紹介した混成ヘモグロビンをこのグループに分けると、

- (i) Fe³⁺CN⁻、Fe³⁺N₃、Cr(III)、Co(III)CN⁻、
- (ii) Mn(III)、Fe³⁺F⁻、Fe³⁺H₂O、V(II)O、Ti(II)O、Co(II)、
- (iii) Ni(II)、Cu(II)、Zn(II)
- (iv) Mg(II)、Protoporphyrin、

となる。同じ金属ポルフィリンを使った場合でも、 α 置換混成ヘモグロビンと β 置換混成ヘモグロビンとで分類がすこし違う。上の分類は α 置換混成ヘモグロビンを分類したものである。ほとんどの金属置換混成ヘモグロビンでは β 置換混成ヘモグロビンの酸素親和性の方が α 置換混成ヘモグロビンのものより高い(例外: Co(II)ポルフィリン、Cr(III)ポルフィリンを使った場合は、 α 置換混成ヘモグロビンの方が β 置換混成ヘモグロビンよりも酸素親和性が少し高い)。だから、 α 置換混成ヘモグロビンは中間的酸素親和性を示しているが β 置換混成ヘモグロビンは高い酸素親和性を示している金属ポルフィリンの例(Mn(III)、V(II)O)などがいくつかある。

金属ポルフィリンと混成ヘモグロビンの酸素親和性の関係は、 α 置換と β 置換とである程度違って見える。モデル物質のX線結晶構造解析から各金属ポルフィリンが配位子を結合しているときの構造がある程度わかっている(表1-2)。 α 置換混成ヘモグロビンでは、 α サブユニット中の近位ヒスチジンとポルフィリン面の間の距離が長ければ長いほど、 β (Fe)サブユニットの酸素親和性が低くなる傾向がある(図1-14A、表1-2)。一方、 β 置換混成ヘモグロビンでは α 置換のものとは違った特徴がある。IHPが無い条件では中間的酸素親和性を示す β 置換混成ヘモグロビンはほとんどなく、酸素親和性の高いものと低いものには

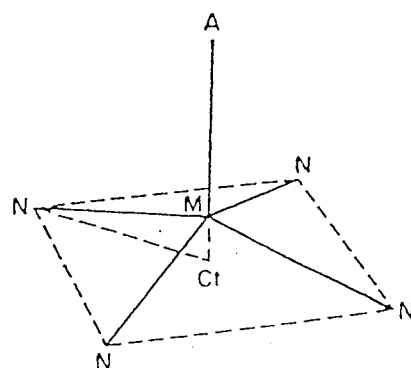
表 1-2 メタルポルフィリンの構造とそれを使った金属置換混成ヘモグロビンの酸素親和性

	$n_d n_{3d}$	Ionic($\text{\AA}$) Radius	Model ($\text{\AA}$)		O_2 (*) Affinity
			Ct-N	X-M-Ct	
Zn^{2+}	4.10	.68(V)	2.05	2.14+0.33(V)	Low
Cu^{2+}	3.9	.65(V)	2.00	(IV)	Low
$Ni^{2+}(h)$	2.8	.70(VI)	2.04	2.16 (VI)	Low
$Ni^{2+}(l)$	2.8		1.96	(IV)	Low
$Fe^{2+}(h)$	2.6	.77(VI)	2.09	2.16+0.42(V)	Low
$Mn^{2+}(h)$	2.5	.82(VI)	2.13	2.19+0.52(V)	L(CO)
$Fe^{3+}(h)$	2.5	.65(VI)	2.02	2.19+0.45(V)	Int.
Co^{2+}	1.7	.65(VI)	1.97	2.16+0.13(V)	Int. α (Co) Low β (Co)
Mn^{3+}	1.4	.65(VI)	2.01	2.44-0.12(VI)	Int.
$Fe^{2+}(l)$	0.6	.61(VI)	2.00	2.06 (VI)	Int.
Co^{3+}	0.6	.53(VI)	1.98	2.06 (VI)	High
$Fe^{3+}(l)$	0.5	.55(VI)	1.99	2.09+0.03(VI)	High
Cr^{3+}	0.3	.62(VI)			High
V^{4+}	0.1	.59(VI)	2.06	1.62+0.48(V)	Int. α (Vo) High β (Vo)

* O_2 Affinity for the Fe subunits of $d_2(M)\beta_2(Fe)$ & $d_2(Fe)\beta_2(M)$

Model

$P_y Zn^{2+}$ (TPP) meso-Tetra (4-pyridyl) porphyrin
 Cu^{2+} (TPP) meso-Tetra (n-propyl) porphyrin
 $Im_2 Ni^{2+}$ (TMePP) meso-Tetra (4-methylpyridyl) porphy.
 Ni^{2+} (OEP) octaethylporphyrin.
 $2MeIm Fe^{2+}$ (TPP) meso-Tetraphenylporphyrin (h.s.)
 $COFeImIm$ (TriaPP) picket fence porphyrin (l.s.)
 $Cl^- Fe^{3+}$ (TPP) (h.s.)
 $N_3^- Fe^{3+} P_y$ (TPP) P_y : Pyridine (l.s.)
 $ImImMn^{2+}$ (TPP) Im : Imidazole
 $Cl^- Mn^{3+} P_y$ (TPP) $ImIm$: 1-Methylimidazole
 $ImImCo$ (TPP) $2MeIm$: 2-Methylimidazole
 $(Pip)_2Co$ (TPP)⁺ Pip : Piperidine
 $V^{4+}O^{2-}$ (Deoxo) deoxophyllo etio porphyrin



The square-pyramidal (C_{4v}) geometry that characterizes the coordination groups in the zinc, magnesium, and high-spin iron porphyrins.

図 1-14 金属置換混成ヘモグロビンの酸素親和性

- (A) α 置換混成ヘモグロビンの P_{50} の値を○で示した
 (B) β 置換混成ヘモグロビンの P_{50} の値を○で示した

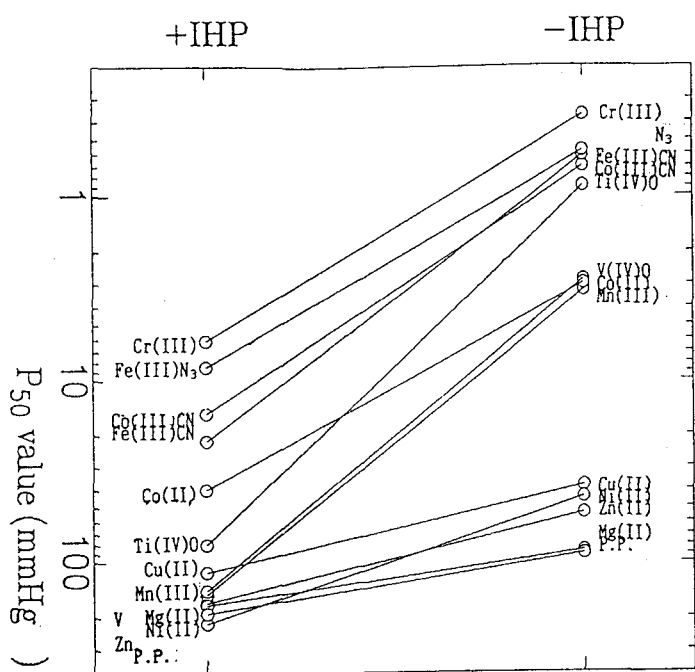
測定条件：50mM Tris or bis-Tris, 100mM Cl⁻, pH7.4, 25°C.

-IHP は IHP なしで測定された場合の P_{50} の値を示す。

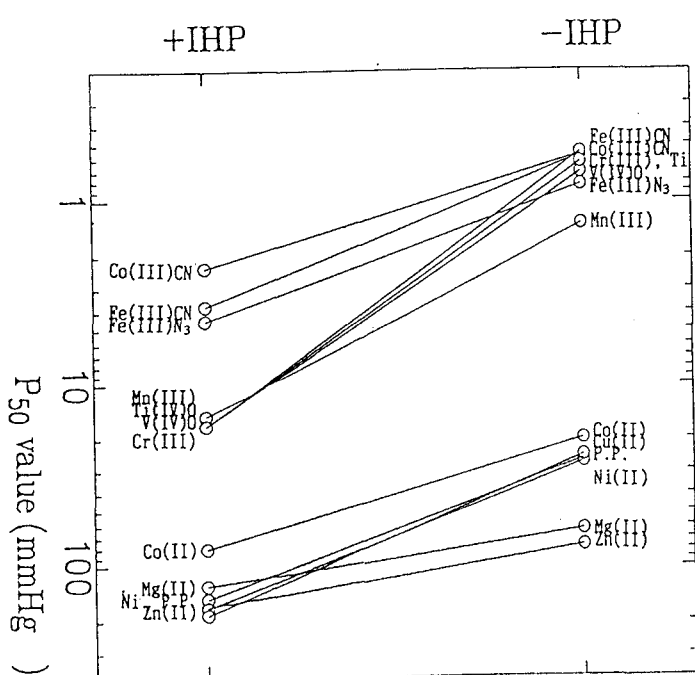
+IHP は、2mM IHP 条件で測定された場合の P_{50} の値を示す。

図中、○印が左にあるほど酸素親和性が高いことを示す。

P_{50} values of alpha-substituted hybrid Hbs
 (at pH7.4)



P_{50} values of beta-substituted hybrid Hbs
 (at pH7.4)



っきり分かれている（図 1-14B）。 β 置換混成ヘモグロ빈は α 置換混成ヘモグロ빈のように細かい酸素親和性の調節ができないように見える。IHP が無い条件で、酸素親和性が低い β 置換混成ヘモグロ빈にはデオキシヘモグロ빈と同じくらいの酸素親和性のもの（Ni(II)、Cu(II)、Co(II)、Protoporphyrin）と、それよりも極端に酸素親和性が低いもの（Mg(II)、Zn(II)）の 2 種類がある。この違いが何故生じるのかは判っていないが、 β サブユニット内の金属ポルフィリンと近位ヒスチジンの、もしくは β サブユニット内の金属ポルフィリンとファンデルワールス接触しているアミノ酸残基の相互作用が、 α (Fe)サブユニットの酸素親和性の調節に関係していると考えられている。IHP が溶液に加えられると、 β 置換混成ヘモグロ빈の酸素親和性が低いものは、全てほぼ似た酸素親和性を持つようになる（図 1-14B）。 β 置換混成ヘモグロ빈のうち、酸素親和性が高いものは IHP の結合によってあまり酸素親和性が低くならないもの（ $\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-$ 、 Fe^{3+}N_3 、 Co(III)CN^- を使ったヘモグロ빈）と中間的酸素親和性になるもの（Cr(III)、Mn(III)、V(II)O、Ti(II)O を使ったヘモグロ빈）の 2 種類がある。この 2 グループの主な違いは金属ポルフィリンの第 6 配位子座の配位子の大きさなので、配位子が β サブユニットのヘムポケットの遠位側アミノ酸残基に与える物理的接触が、 α (Fe)サブユニットの酸素親和性の調節に関係しているかもしれない。

第2章 クロム(III)-鉄(II)混成ヘモグロビンの 酸素平衡機能についての研究

(1)概要

ヒト成人ヘモグロビン(HbA)の α サブユニット、もしくは β サブユニット、いずれかのヘムをクロム(III)プロトポルフィリン IX (Cr(III)PPIX) で置き換えた Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビン ($\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ 、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$) を調製して、その酸素平衡機能を調べた。Cr(III)PPIX が入ったサブユニットには酸素や一酸化炭素は結合しない。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビン中の Fe(II)サブユニットの酸素平衡曲線を測定して、2段階酸素結合過程の式を使って解析した。測定は pH の範囲が pH6.5 から 8.4、25°C、inositol hexaphosphate 存在、非存在下の各条件で行った。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンに2番目に結合する酸素に対する平衡定数は、HbA に4番目に結合する酸素に対する平衡定数とよく一致した。この結果は、Cr(III)PPIX がパートナー Fe(II)サブユニットに与える影響と、オキシヘムが Fe(II)サブユニットに与える影響とがとてもよく似ていることを示す。つまり Cr(III)PPIX は、オキシヘムを固定化したオキシヘムモデルとして使えることを示す。

オキシヘムモデルとしては、Fe(III)CN⁻を中心に持つヘムが一般的に使われてきたが、Cr(III)PPIX はそれに比べるといくつか長所がある。Cr(III)PPIX は dithionite や還元酵素系と共存していても、Cr(II)に還元されない。還元酵素系存在下ではメトヘムを少なくできるので、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線を非常に安定に測定することができる。また、ポリエチレングリコールと dithionite 存在下で、デオキシ化した Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの単結晶を得ることに成功した。

(2)序論

第1章で述べたように、ヘモグロビンの協同作用のメカニズムを調べるには酸素結合中間段階のヘモグロビンの性質を調べる必要があるが、ヘモグロビンの協同作用そのもののせいでヘモグロビン溶液中ではそれらの濃度はとても低く、調べようがない。中間段階分子種のモデルを作ろうという試みは昔から行われている。

Fe(III)CN⁻を中心に持つヘムがオキシヘムモデルとして、シアノメトヘム-Fe(II)混成ヘモグロビンは酸素結合の中間段階ヘモグロビンのモデルとしてよく使われている (Banerjee & Cassoly, 1969; Brunori et al., 1970; Cassoly et al., 1971; Hoard, 1971; Ogawa & Shulman, 1971; Maeda, et al., 1972;

Banergee et al., 1973; Deatherage et al., 1976; Nagai, 1977; Scheidt & Reed, 1981; Szabo & Karplus, 1975; Miura & Ho, 1982; Smith & Ackers, 1985; Ackers et al., 1992; Doyle & Ackers, 1992; Daugherty et al., 1992; Perrella et al., 1994)。しかし、このシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンをデオキシ化して実験するのはとても難しい。なぜなら、一般に嫌気性を保つには dithionite が使われるが、dithionite はメトヘムを還元してしまうのでシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンと dithionite は共存させることができないからである。Dithionite を直接使わずに溶液中の酸素を酵素系 (glucose oxidase, glucose, catalase を共存させる) で除き、デオキシシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンを嫌気状態で長時間保つ技術が報告されている (Smith & Ackers, 1985) が、Shibayama らによってデオキシシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンを長時間放置すると、ヘムの中で電子のやりとりが起こってしまうことが報告された (1997)。つまり、特定のシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンを長時間安定に保つことはできない。Dithionite を使えないのと同様に、Fe(II)サブユニットのメト化 (酸化) を抑えるためにとても有用なメトヘモグロビン還元酵素系も、シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンと共存させることはできない。シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線が Nagai らによって測定されているが、Fe(II)サブユニットのヘムの酸化が測定中にどうしても起こってしまい、この酸化が酸素平衡曲線の誤差を引き起こしている、と報告している。特にヘモグロビンに 1 個目に結合する酸素に対する平衡定数の見積もりへの影響が大きい (1977)。

他方、Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンが、最初の 1、2 個目の酸素結合過程の中間段階ヘモグロビンを調べるためによく研究されている (Shibayama et al., 1986a, b, 1987, 1993, 1995; Luisi et al., 1989, 1990)。しかし、Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは 3、4 個目の酸素結合過程の中間段階ヘモグロビンを調べるためには使えない。シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビン以外に、中間段階ヘモグロビンのモデルとして使える酸素親和性が高い Fe(II)サブユニットを持つ金属置換混成ヘモグロビンが望まれていた。

Kajitani らによって、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線が測られた (1989)。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンは溶液の pH や IHP 条件にかかわらず、とても高い酸素親和性を持ち、Cr(III)PPIX をオキシヘムモデルとするには Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素親和性は高すぎると考えられていたが、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンは光感受性を持つと判明した。従来は Fe(II)サブユニットに結合した CO をはずすために、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンに強力な光を当てるという操作を行っていたが、この操作を行わずに調製した Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線は、pH、および IHP 依存性を示すこと

が明らかになったのである。

この章では Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの調製方法、安定性、酸素平衡機能について述べる。また、Cr(III)PPIX がオキシヘムモデルとしてふさわしいことについて述べる。

(3)実験方法

Cr(III)PPIX の調製方法

Cr(III)PPIX の調製方法は基本的に Hori ら(1991)の方法と同じである。Cr(III)PPIX の調製、保存は暗条件とする。

100ml の {5.0% (w/v) 硫酸/メタノール} にメノウ乳鉢でよくすりつぶした protoporphyrinIX (SIGMA 社、以下 PPIX と略) を 500mg 溶かす。4℃条件で 20 時間攪拌する。PPIX の 2 つの propion 酸残基はエステル化を受ける。

(PPIXdimetyler, 以下 PPIXDME と略、の合成) 水中で、この溶液に硫酸を中和するだけの 10%アンモニア水を入れる。溶液にクロロホルムと蒸留水とを同時に 400ml ずつ加え、激しくかき回す。エステル化された PPIX はクロロホルムにとけ込む。静置後、上層の蒸留水を除く。再び蒸留水を加え、かき回した後、上層の蒸留水を除くという作業を数回繰り返す。最終的には分液ろうとを使用して水層を完全に除く。PPIXDME クロロホルム溶液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水する。溶液から吸引濾過して無水硫酸ナトリウムを除き、溶液をエバポレーターを使用して 5 ml 程度にまで減圧濃縮する。この溶液に過剰量のメタノールを加えて PPIXDME を再結晶させ、遠心分離 (3500r.p.m.×5min.) によって PPIXDME を得る。得られた PPIXDME はさらに数度にわたってメタノールで洗浄を行い、デシケータで減圧乾燥する。得られた PPIXDME を精製する。展開液としてクロロホルム・メタノール混合液 (クロロホルム:メタノール=5:1) を用いたシリカゲルカラム (Silica gel 60 7734.5000 Merck 試料 1.0mg あたり 1.0g) に通し、メインバンドを集め、エバポレーターとデシケータで減圧乾燥させる (PPIXDME 400mg 生成)。得られた PPIXDME にクロム(III)を導入する。PPIXDME 200mg をメノウ乳鉢でよくすりつぶし、75ml の DMF に溶かす。窒素雰囲気下でマントルヒーターによりこの溶液の温度を還流させながら 145℃まで上げる。ここへ Cr(CO)₆ (Strem Chemicals) 750mg を加える。金属ボルフィリンの生成を溶液の光吸収スペクトルを観測することにより確認し、反応開始後約 5 分で溶液を水中で急冷する。100℃以下まで温度を下げた後、メタノールを 80ml 加える。その後、エバポレーターで溶液を減圧乾燥する。得られた Cr(III)PPIXDME の精製は少量のメタノール (0.1% HCl(v/v)を含む) に

溶かし、シリカゲルカラム（展開溶媒は 0.1% HCl を含むメタノール）を通すことによって行われる。メインバンドを集めて減圧乾燥する（Cr(III)PPIXDME 180mg 生成）。Cr(III)PPIX を得るため、Cr(III)PPIXDME を加水分解する。Cr(III)PPIXDME 100mg を 20ml のメタノール溶液（1.0% KOH, 1.0% H₂O）に溶かし、7 時間 50℃ に保つ。Cr(III)PPIX をシリカゲルの薄層クロマトグラフィ（Thin Layer Chromatography; TLC Art. 5789 Merck）を用いて精製する。（展開溶媒は 0.1% HCl-メタノール）メインバンドをシリカゲルから同じ溶媒で抽出し、減圧乾燥によって Cr(III)PPIX が得られる（30mg）。試料の純度は TLC にかけて 1 点スポットになること、および光吸収スペクトルの観測により確認する。

ヘモグロビンの調製

以下の操作は原則として 4℃ 条件下で行う。また、HbA が CO 配位型の場合、扱う緩衝液は CO 飽和状態にしておく。

採血した血液を遠心分離（3000r.p.m. × 10min.）し、血清をアスピレーターで除く。冷えた 0.85% NaCl 溶液で赤血球を洗う。また遠心分離し、NaCl 溶液で洗うという操作を 3 回繰り返す。赤血球液と等量の冷えた蒸留水を加えて溶血する（0℃ 条件で 30min. 放置）。溶液の体積の 10% 量のトルエンを加え、よくかき混ぜる。溶液を遠心分離にかける（10000r.p.m. × 60min.）。上澄み（トルエン）と沈澱（赤血球膜）を除いたものを溶血液 1 とする。沈澱に冷えた蒸留水を加え、よく混ぜ、遠心分離（10000r.p.m. × 60min.）にかけ、再び沈澱を除いたものを溶血液 2 とする。溶血液 1, 2 とともに再び遠心分離（10000r.p.m. × 60min.）にかけ、沈澱をほとんど取り除く。溶血液 1, 2 とともに CO ガスを吹入して HbA を CO 配位型にする。溶血液 1, 2 の順に 2mM Tris 緩衝液と平衡をとった溶液体積の 5 倍体積の Sephadex G25f カラムに乗せ、展開する。メインバンドを集める。この溶液から有機リン酸など電荷を帯びた低分子を除くため、脱塩カラム（IRA400, IRA120 mixbed）に通す。こうして得られたものを stripped HbA とする。stripped HbA からマイナーコンポーネント HbA₂ を除くため、stripped HbA を 5mM Na/phos. pH7.2 buffer で平衡をとった CM23cellulose カラム（蛋白 1.0g に対して 1.4ml）にのせ、通ってくるものを集める。こうして得られたものを A2 free HbA とする。A2 free HbA からマイナーコンポーネント HbA₁ を除くため、A2 free HbA を DE23cellulose カラム（5mM Tris 1mM acetate pH7.2 と平衡をとった。蛋白 1.0g に対して 10ml）の上部に吸着させる。[50mM Tris 28mM Acetate pH8.2] という緩衝液で溶出する。カラム体積の 3 倍量までを集める。こうして HbA が得られる。蛋白重量濃度にして、4 ~ 5 % 濃度にまで濃縮しておく。試料の純度は等電点電気

泳動、光吸収スペクトルで確認する。試料は CO 雰囲気下、4℃条件で保存する。

α鎖、β鎖の調製

以下の操作は原則として4℃条件下で行う。また、HbA、α鎖、β鎖がCO配位型の場合、扱う緩衝液はCO飽和状態にしておく。

PMB (p-hydroxymercurybenzoic acid) を、用意した HbA の SH 基 (HbA 1分子あたり6つ) の1.5倍量用意する。[2M Gly/NaOH pH8.0] 溶液に溶かして、2.0% PMB 溶液にする。HbA 溶液は5%以上の濃度にする。HbA 溶液に PMB 溶液を加える。この溶液に、0.2% NaCl 溶液となるように NaCl を必要量加える。H₃PO₄ を加えて溶液の pH を 5.9 まで下げる。CO 雰囲気下、4℃条件で一晩放置する。電気泳動でほとんどの HbA が α鎖と β鎖に分かれているのを確認してから、HbAPMB 溶液を遠心分離 (10000r.p.m. □ 30min.) にかけて沈澱を除く。HbAPMB 溶液を Sephadex G25f カラム (eq. 20mM Na/phos pH8.2 溶液体積の5倍体積) に通し、緩衝液の置き換え、余剰 PMB の除去を行う。HbAPMB 溶液を DE23cellulose カラム (20mM Na/phos pH8.2 buffer と平衡をとった。カラム体積は HbA 1.0g あたり 100ml) にのせ、カラムの平衡をとった緩衝液と同じもので押し出す。β-PMB 鎖はカラム上部に吸着し、α-PMB 鎖は素通りして降りてくる。α-PMB 鎖が全部出たら、β-PMB 鎖から PMB をはずすためにメルカプトエタノールが入った押し出し用緩衝液 (20mM Na/phos pH8.2 Buffer 100ml につき 0.3ml の 2-メルカプトエタノールを入れたもの) を β-PMB 鎖がカラムの底まで降りてくるまで DE カラムに流す。押し出し用緩衝液 (0.3 M Tris/Cl pH7.2) を DE カラムに流すことによって β-SH 鎖を押し出す。他方、集めた α-PMB 鎖溶液は、溶液 100ml につき 0.4ml のメルカプトエタノールを加え CO 雰囲気下、4℃条件で 1.0 時間放置後、H₃PO₄ を加えて pH を 7.26 まで下げ、CM23cellulose カラム (20mM Na/phos pH7.26 カラム体積は HbA 1.0g あたり 15ml) にのせる。α-PMB 鎖はカラム上部に吸着する。α-PMB 鎖から PMB をはずすためにメルカプトエタノールが入った緩衝液 (20mM Na/phos pH7.26 Buffer 80ml につき 0.26ml の 2-メルカプトエタノールを入れたもの) を α-PMB 鎖がカラムの底に降りてくるまで流す。CM23 カラムにカラムと同体積程度の緩衝液 (20mM Na/phos pH7.2) を流し、カラム内を洗っておく。押し出し用緩衝液 (100mM Tris/Cl pH8.2) を流すことによって α-SH 鎖を押し出す。α-SH、β-SH 鎖溶液とともに適当な体積まで濃縮し、その5倍体積の Sephadex G25f カラム (eq. 20mM Tris/Cl pH8.2) に通して、メルカプトエタノールの除去、および緩衝液の置き換えをしておく。こうして α-SH、β-SH 鎖溶液が得られる。溶液は蛋白重量濃度にして 4～5% 濃度にま

で濃縮しておく。試料の純度は等電点電気泳動、光吸収スペクトルで確認する。試料は4℃、CO 雰囲気下で保存する。

Cr(III)-Fe(II)混成 Hb の調製

あらかじめ α 、 β 鎖のSH基をdithiothreitolで還元を行う。CO型の高濃度(タンパク重量濃度で4~5%)の α もしくは β 鎖溶液中に、DTTを3~5mg/mlになるように加える。この溶液をCO雰囲気下、氷の中(零度)で1時間放置する。ヘムをCr(III)PPIXに置き換えるサブユニット(α 鎖もしくは β 鎖)のCOはずし(Kilmartin & Rossi-Bernardi, 1971)を行う。塩酸アセトン法(Rossi-Farelli et al., 1958)でそのサブユニット(500mg)のヘムを抜き、アポサブユニット溶液を調製する。アポサブユニットの対になるサブユニットを、アポサブユニットと等モル数アポサブユニット溶液に滴下する(in 20mM Borate/NaOH about pH10)。COを飽和させた脱イオン水でセミヘモグロビン溶液を4倍に薄める。この溶液を5mM Tris/Cl pH8.8 bufferで平衡をとったDE52celluloseカラムにのせる(カラム体積は約150ml/セミヘモグロビン1g)。グロビンのほとんどはカラムの上部に吸着する。セミヘモグロビンを50mM Tris/Cl pH7.2 bufferをカラムに流して溶出する。メインバンドがセミヘモグロビンである。セミHb溶液が得られる(450mg)。セミヘモグロビン溶液を10~20mlまで(COはずし操作が出来る体積)濃縮する。セミHbのCOはずしを行う。DMFに溶かしたCrPPIXとセミHbとの間でタイトレーションを行い、必要量のCr(III)PPIXをできるだけ少量のDMFに溶かし(DMFの体積は最大アポHbA溶液の10分の1程度に抑える)、セミHb溶液に滴下する。2時間かくはんをする。この溶液を、10mM phos/K pH6.8 bufferで平衡をとったSephadexG25カラムに通すことによって、Bufferの交換と、余剰なCr(III)PPIXの除去を行う。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンを10mM phos/K pH6.8で平衡をとったCM52カラム($\phi=3\text{cm}$ 、 $l=20\text{cm}$)の上部に吸着させる。そして、塩濃度・pH勾配(10mM phos/K pH7.00 800ml~15mM phos/K pH7.60 800ml)をかけることによって蛋白を溶出、精製する。メインバンドを集めて濃縮する。緩衝液をTris/Cl pH8.2に換えた後に液体窒素中で保存する。試料の純度は等電点電気泳動、光吸収スペクトルで確認する。(Cr(III)-Fe(II)混成Hbは130mg得られる。)

Cr(III)Hbの調製

CO型HbAのCOはずしを強力な光を当てることによって行う。塩酸アセトン法でHbA(500mg)からヘムを抜き、アポHbA溶液(緩衝液:20mM

Borate/NaOH pH10 250ml) を調製する。DMF に溶かした Cr(III)PPIX とでタイトレーションを行い、必要量の Cr(III)PPIX をできるだけ少量の DMF に溶かし (DMF の体積は最大アポ HbA 溶液の 10 分の 1 程度に抑える)、アポ HbA 溶液に滴下する。2 時間かくはんをする。適当な体積まで濃縮後、その体積の 5 倍量体積の SephadexG25f (10mM phos/K pH6.8buffer で平衡をとった) を通し、CM52cellulose カラム (10mM phos/K pH6.8buffer で平衡をとった。φ=3cm、l=20cm) の上部に蛋白を吸着させる。塩濃度・pH 勾配をかけて (10mM phos/K pH7.35 800ml~25mM Tris/Cl pH8.10 800ml) 蛋白を溶出し、メインバンドを集めて濃縮する。緩衝液を Tris/Cl pH8.2 に換えた後に液体窒素中で保存する。試料の純度は等電点電気泳動、光吸収スペクトルで確認する。CrHb は 130mg 得られる。

光吸収スペクトルの測定とミリモル吸光係数の決定

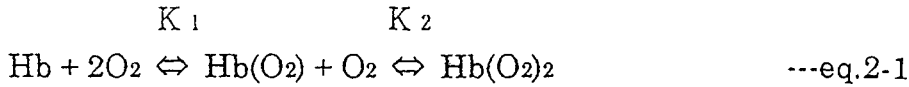
Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンと Cr ヘモグロビンの光吸収スペクトルは Shimadzu UV-2200A spectrometer で測定する。ミリモル吸光係数は、Lowry 法(Lowry et al., 1951)で決定する。

酸素平衡曲線の測定

HbA、および Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線は、Imai らの方法(1970, 1981)で測定した。緩衝液は 50mMTris あるいは 50mMbis-Tris (2,2-bis-hydroxymethyl-2,2',2''-nitriotriethanol) に、100mM の Cl⁻(クロライドイオン)を含むものを使って、pH は pH6.5, 7.4, 8.4、温度は 25℃に調節した。測定に使われた光路長は、ヘモグロビンの濃度が 60 μM、12 μM (ポルフィリンを基準にして) の時は 15mm に、ヘモグロビン濃度が 240 μM の時は 8mm にした。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの Cr(III)サブユニットの光吸収スペクトルは、Fe(II)サブユニットの酸素化・脱酸素化に依存しなかったため、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線は HbA の測定と同様に、Fe(II)サブユニットの 560nm (ヘモグロビンの濃度がポルフィリンを基準に 240 μM もしくは 60 μM の時) もしくは 430nm (ヘモグロビン 12 μM) の光吸収の変化を利用して測定した。ヘムの酸化を抑えるために、カタラーゼと superoxidedismutase を加えた(Lynch et al., 1976; Winterbourn, 1976)。また、酸化してしまったヘムを積極的に還元するために、メトヘモグロビン還元酵素系(Hayashi et al., 1973)を加えた測定も行った。酸素平衡曲線の測定のあとで、少量のシアン化カリウム溶液をヘモグロビン溶液に加えた時の 630nm の光吸収の変化から酸化されたヘムの濃度を計算した(Fujii et al., 1993)。

得られた酸素平衡曲線のデータは、2 段階酸素結合 Adair 解析を使って 2 つ

の平衡定数を求めた。2段階酸素結合 Adair 解析は、第1章で述べた4段階酸素結合 Adair 解析と基本はまったく同じである。



酸素分圧が p で、 i 個目の酸素が結合するときの平衡定数は

$$K_i = [i/2 - (i-1)] [\text{Hb}(\text{O}_2)_i] / [\text{Hb}(\text{O}_2)_{i-1}] P \quad (i=1 \text{ or } 2) \quad \text{---eq.2-2}$$

として表される。式 2-2 中の係数の $[i/2 - (i-1)]$ は、 i 段目の酸素解離の仕方に i 通りあって、酸素結合の仕方に $2 - (i-1)$ 通りあることに対する補正である。これらの Adair 定数を用いると、酸素が結合できるヘム数の内、酸素が結合したヘムの割合を示すヘモグロビンの酸素飽和度 Y は、酸素分圧 p の関数として次のように書ける。

$$\begin{aligned} Y(P) &= \frac{[\text{Hb}(\text{O}_2)] + 2[\text{Hb}(\text{O}_2)_2]}{[\text{Hb}] + [\text{Hb}(\text{O}_2)] + [\text{Hb}(\text{O}_2)_2]} \\ &= \frac{K_1 P + K_1 K_2 P^2}{1 + 2K_1 P + K_1 K_2 P^2} \end{aligned} \quad \text{---eq.2-3}$$

式 2-3 が描く曲線と、実際に測定されたデータとが最もよく合うような K_1 と K_2 を、最小二乗法を使って求める。

Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの自動酸化の速度の測定

混成ヘモグロビンの自動酸化に対する安定性を見積もるため、Brantley (1993)らの方法を用いて混成ヘモグロビンの自動酸化の速さを測った。測定は、空気雰囲気下で、緩衝液は酸素平衡曲線を測定するときと同じものを使い、37℃条件で、410nm の光吸収が増えてくるのを Shimadzu UV-2100 spectrometer で測定した。これには自動試料変換機がついていて、一定時間ごとに6つまでのサンプルの光吸収の変化の速度を測定することができる。ヘモグロビンの濃

度は金属ポルフィリンを基準にして 200 μ M で、1mm 光路長のサンプルセルが使われた。

Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの結晶の調整

デオキシ化された Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが、Ward (1975)らの方法に従って結晶化された。結晶化は窒素雰囲気下で、25~30%の polyethylene glycol 1000 と 50mM sodium phosphate、50mM dithionite 存在下、pH7.0 条件で行われた。

(4)実験結果

Cr(III)ヘモグロビン、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの電気泳動について

図 2-1 に、CO 型の Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンと Cr ヘモグロビンの等電点電気泳動の結果を示した。比較するものとして、CO 型の HbA、 α 鎖、 β 鎖、そして $\alpha_2(\text{Mn}^{3+})\beta_2(\text{Fe})$ の電気泳動の結果もでている。Cr(III)イオンが Fe(II)に比べて正電荷を持っているせいで、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンと Cr ヘモグロビンは陰極方向、つまり高 pH 方向にバンドがあらわれているのが分かる。 $\alpha_2(\text{Mn}^{3+})\beta_2(\text{Fe})$ のバンドの場所と Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのバンドの場所はほぼ一致している。

Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンに強力な光を当てると Cr(III)PPIX は壊れないが、グロビン部分が破壊されるらしい。等電点電気泳動の最中に強力な光をサンプルに当てると、サンプルはきちんとしたバンドにならずにボンヤリと広がってしまう。同じ操作を普通のヘムを持つ HbA や単離した α 、 β 鎖にほどこしても同じことは起こらず、きちんとしたバンドになる。

Cr(III)ヘモグロビン、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの光吸収スペクトルと実験条件でのヘモグロビンの安定性について

図 2-2 A, B, C に Cr ヘモグロビン、 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ 、そして $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ 混成ヘモグロビンの光吸収スペクトルを示した。これらのスペクトルはヘモグロビン溶液の pH に依存して変化した。溶液の pH を 6.5 から 8.4 まで上げると、Cr ヘモグロビンの吸収スペクトルは等吸収点を持ちつつ変化した。Cr ヘモグロビンの Soret Band のピークは 445nm から 439nm までシフトし、764nm 付近のピークは 752nm 付近までシフトした (図 2-2A、A')。Cr(III)-Fe(II)

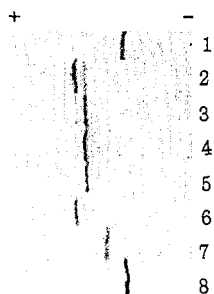


図 2-1 Cr(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの等電点電気泳動の図

レーン 1、8 : α サブユニット ; レーン 2、6 : ヘモグロビン
 レーン 3 : $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$; レーン 4 : $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$;
 レーン 5 : $\alpha_2(\text{Mn}^{3+})\beta_2(\text{Fe})$

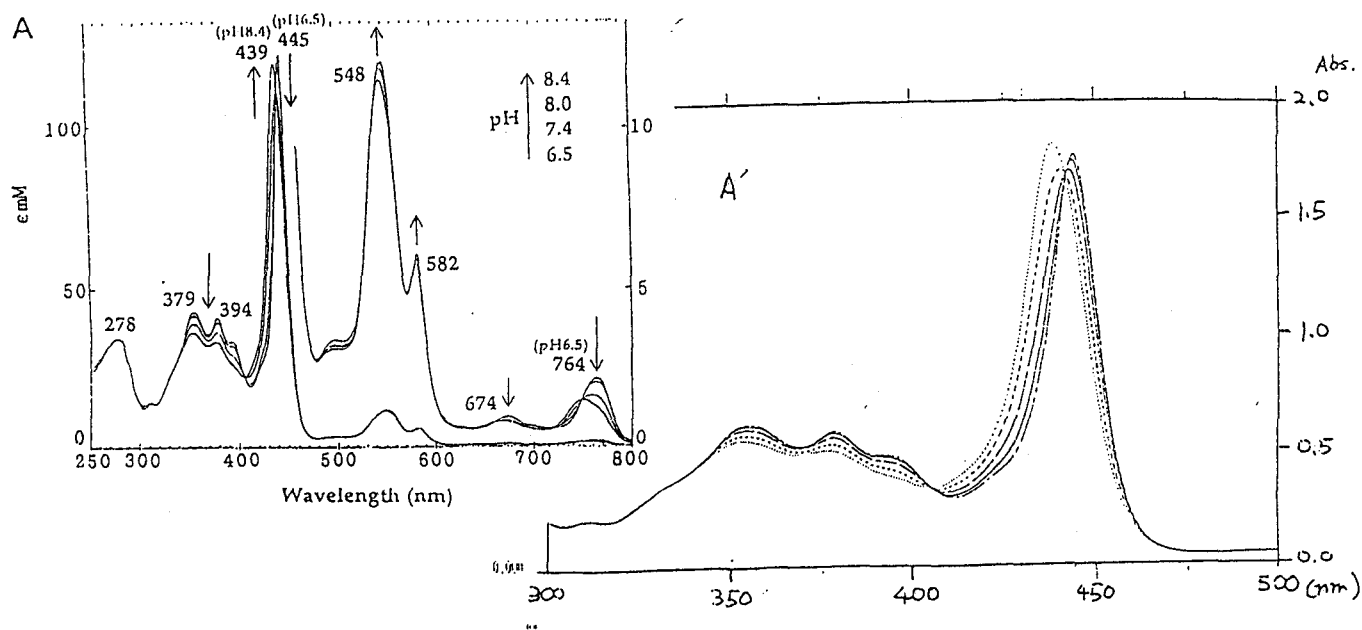


図 2-2 Cr(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの吸光スペクトル

(A) Cr ヘモグロビン ; (A') Cr ヘモグロビンの Soretband 付近の拡大図

図中、矢印は溶液の pH 上昇に伴い、吸光スペクトルがどう変わるかを示す。Cr(III) ポルフィリン由来の Soretband は、溶液の pH 上昇に伴って等吸収点を保ちつつ、短波長側にシフトしていく。図中、縦軸は金属ポルフィリン基準のミリモル吸光係数を示す。

溶液条件 : 50mM Tris, or bis-Tris, 100mM Cl⁻, 25°C

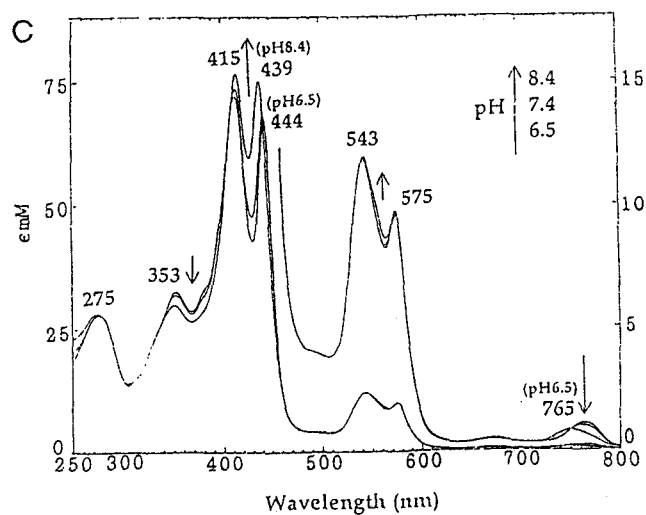
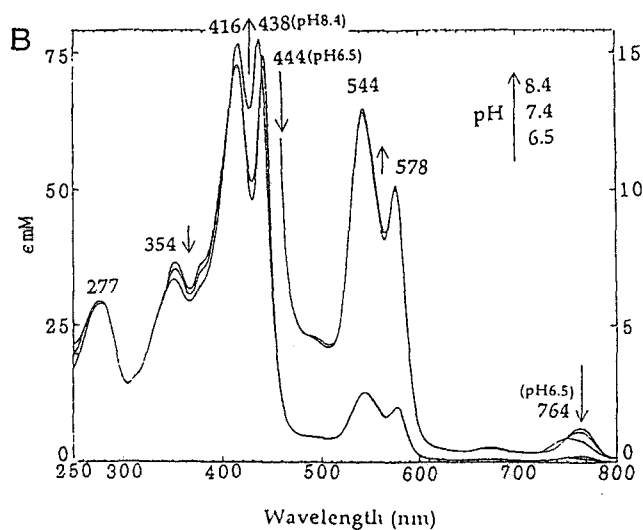


図 2-2 Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの吸光スペクトル

(B) オキシ型 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビン

(C) オキシ型 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ 混成ヘモグロビン

図中、矢印は溶液の pH 上昇に伴い、吸光スペクトルがどう変わるかを示す。Cr(III) ポルフィリン由来の Soretband は、溶液の pH 上昇に伴って等吸収点を保ちつつ、短波長側にシフトしていく。図中、縦軸は金属ポルフィリン基準のミリモル吸光係数を示す。

溶液条件： 50mM Tris, or bis-Tris, 100mM Cl⁻, 25℃

混成ヘモグロビンの吸光スペクトルはほぼ単純な Cr(III)サブユニットのスペクトルと、Fe(II)サブユニットのスペクトルの和に見える。実際、 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ のスペクトルと $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ のスペクトルの和は HbA のスペクトルと Cr ヘモグロビンのスペクトルの和と非常によく重なる (図 2-3 A, B)。また、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのオキシ型とデオキシ型の差スペクトルは、単離 β 鎖のそれとよく一致している (図 2-4 A, B, C, D)。これは Cr(III)サブユニットは酸素と結合せず、また Cr(III)サブユニットの吸光スペクトルは、ヘモグロビン分子内の Fe(II)サブユニットの酸素結合状態に依存しないということを示している。

Cr(III)ヘモグロビンの吸収スペクトルは、窒素雰囲気下で 50mM dithionite と共存させても、空気雰囲気下でメトヘモグロビン還元酵素系と共存させても変化しなかった。つまり、Cr(III)イオンはこれらの還元剤や酵素系で Cr(II)イオンに還元されなかった。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンは、シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンと違って、メトヘモグロビン還元酵素系を溶液に共存させてヘムの酸化を抑えて酸素平衡曲線を測定することができる。Dithionite と共存させれば、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンはデオキシ状態を安定に保つことができる。図 2-5 A に窒素雰囲気下で 50mM Dithionite と共存させたデオキシ $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ 混成ヘモグロビンの吸収スペクトルを示した。吸収スペクトルは 4 日たってもほとんど変化しなかった。時間がたつと dithionite が分解してその光吸収が減っていくのが分かる (400nm より短波長側の吸収の減少)。その後、一酸化炭素をサンプルセルに加えると、吸収スペクトルは CO 型の $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ 混成ヘモグロビンの吸収スペクトルとなった。比較するものとしてデオキシ化するという操作を加えていない CO 型の $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ 混成ヘモグロビンの吸収スペクトルを図 2-5 B に示した。

酸素型の Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの Fe(II)サブユニットの自動酸化の速度が 37℃ 条件で測定された。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンと HbA の 410nm の吸光度の変化を図 2-6 に示した。混成ヘモグロビンの自動酸化の速度は HbA のそれによく似ていることが分かる。 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの自動酸化速度は HbA のそれより少し速く、 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの自動酸化速度は HbA のそれより少し遅い。つまり Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンは HbA と同じ程度自動酸化に対して安定である。

このように、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンは酸素平衡曲線の測定や結晶化実験の溶液条件でも安定であることが分かった。

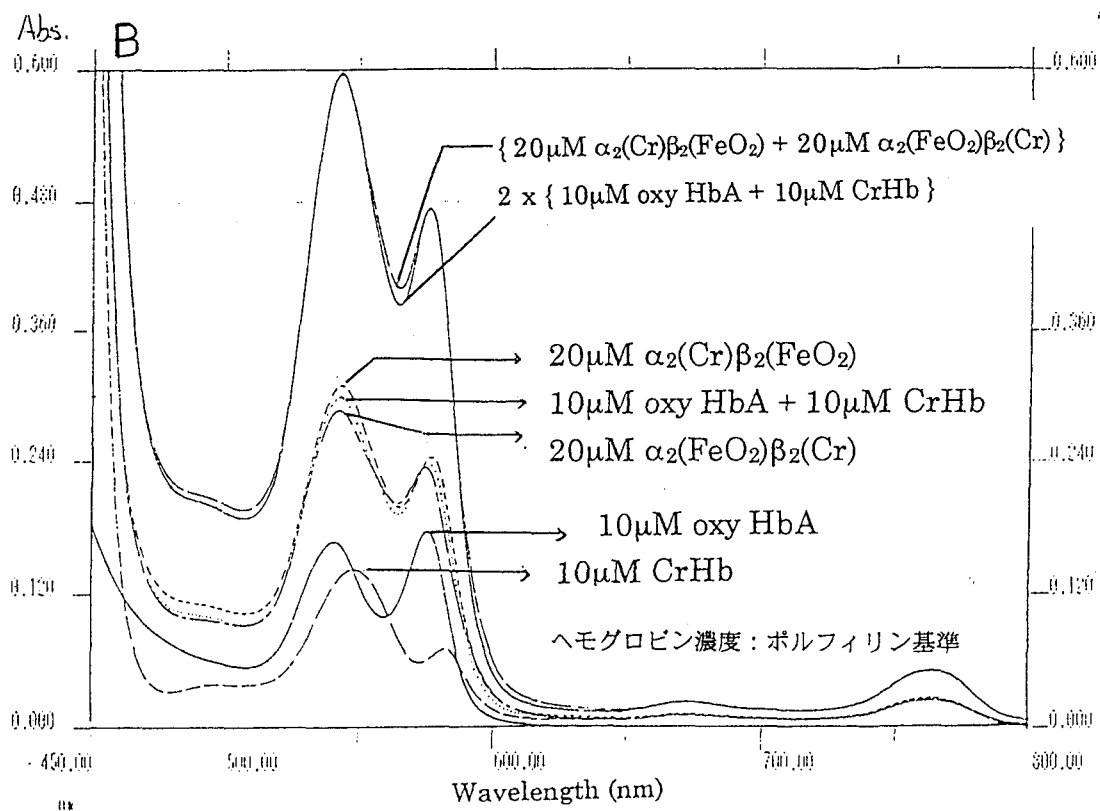
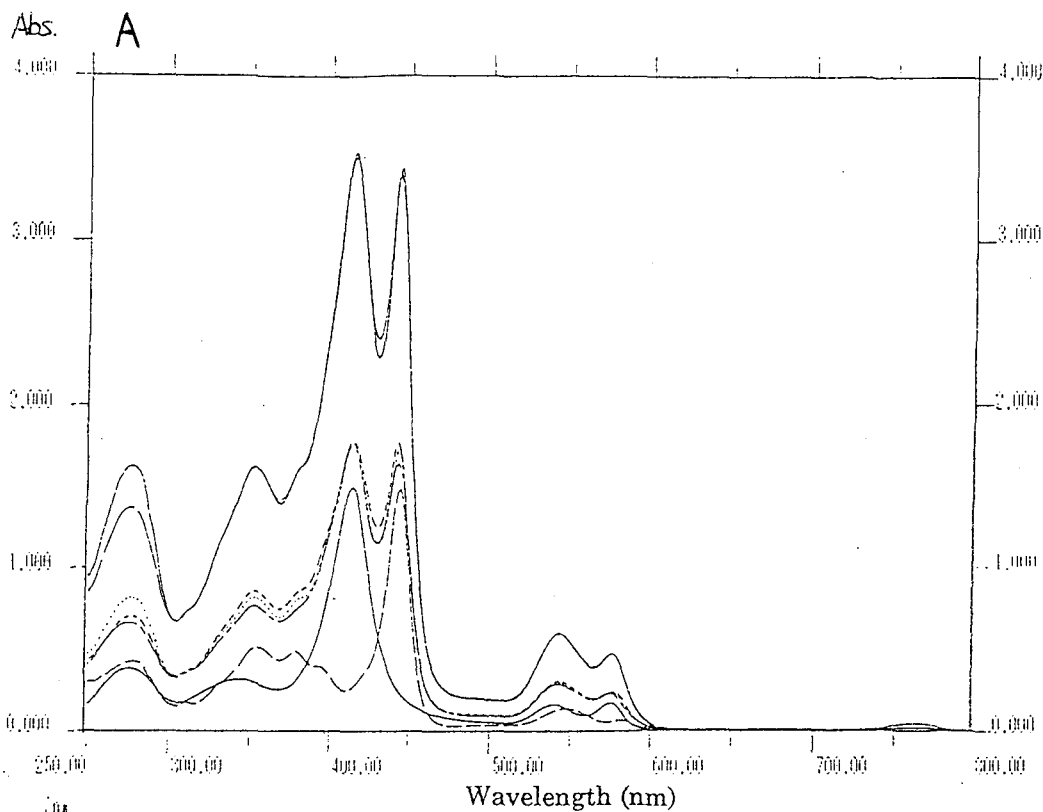


図2-3 Crヘモグロビンの吸収スペクトルとオキシヘモグロビンの吸収スペクトルの足し算
(A)スペクトル全体図 (B)可視領域を拡大したもの

(Crヘモグロビン + オキシヘモグロビン) は、オキシ型 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ とともに、オキシ型 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ とともに少し違う。

(Crヘモグロビン + オキシヘモグロビン) は、(オキシ型 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ + オキシ型 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$) と良く一致する。

この違いは、 $\alpha(\text{Cr})$ サブユニットと $\beta(\text{Cr})$ サブユニットの吸光スペクトルが少し違うから生じたと考えられる。

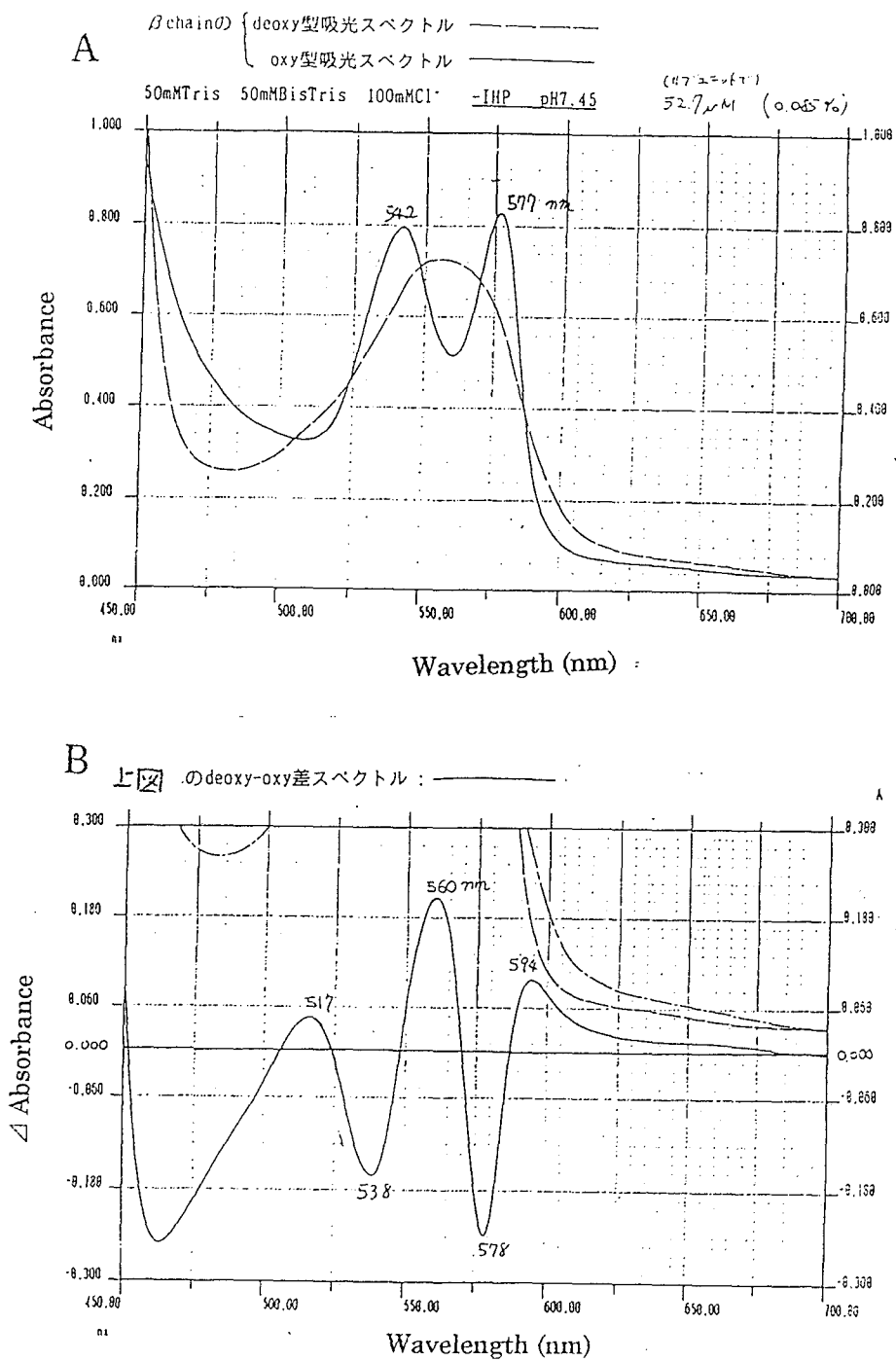


図 2-4 β (Fe)サブユニット、 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ の吸光スペクトルの吸光スペクトル

- (A) オキシ型 β (Fe)サブユニット (実線) と、デオキシ型 β (Fe)サブユニット (破線)
- (B) (A)の (デオキシ) - (オキシ) 差スペクトル

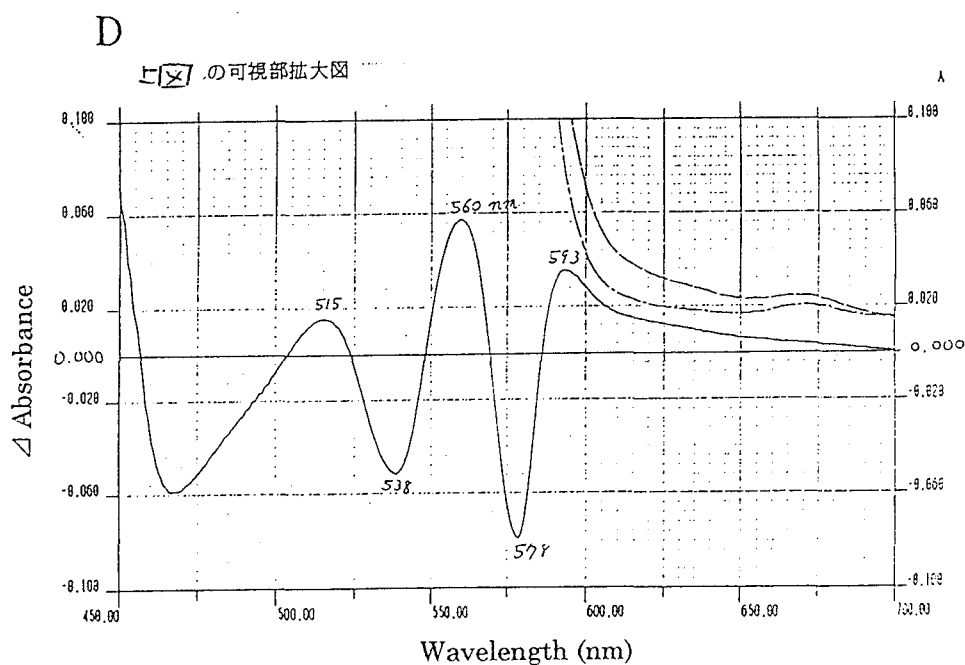
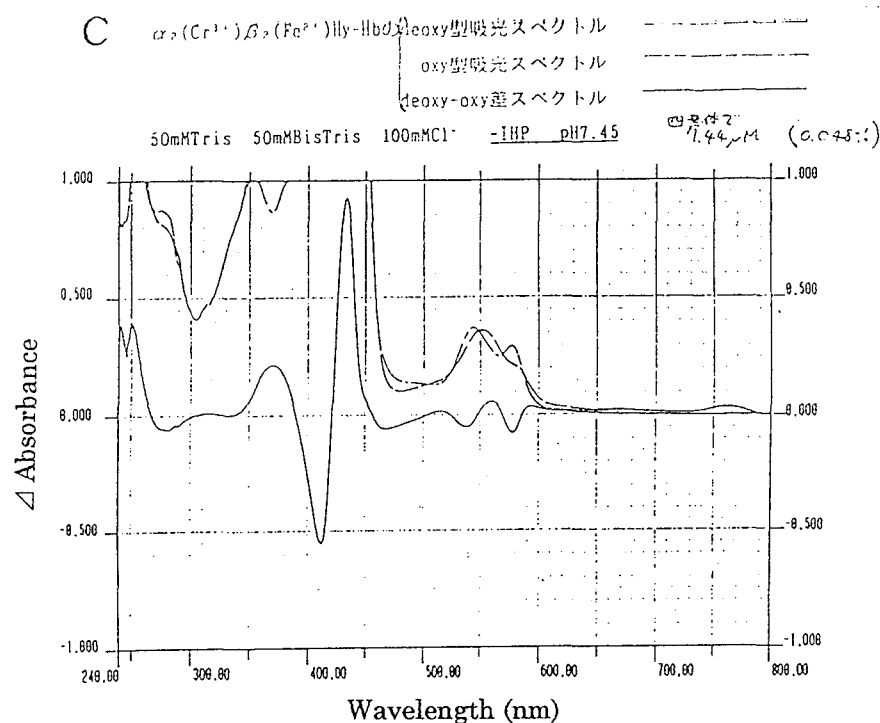


図 2-4 (C) デオキシ型 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ (破線①) と、オキシ型 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ (破線②) と、
(デオキシ) - (オキシ) 差スペクトル (実線)

(D) (C)の可視領域の拡大図

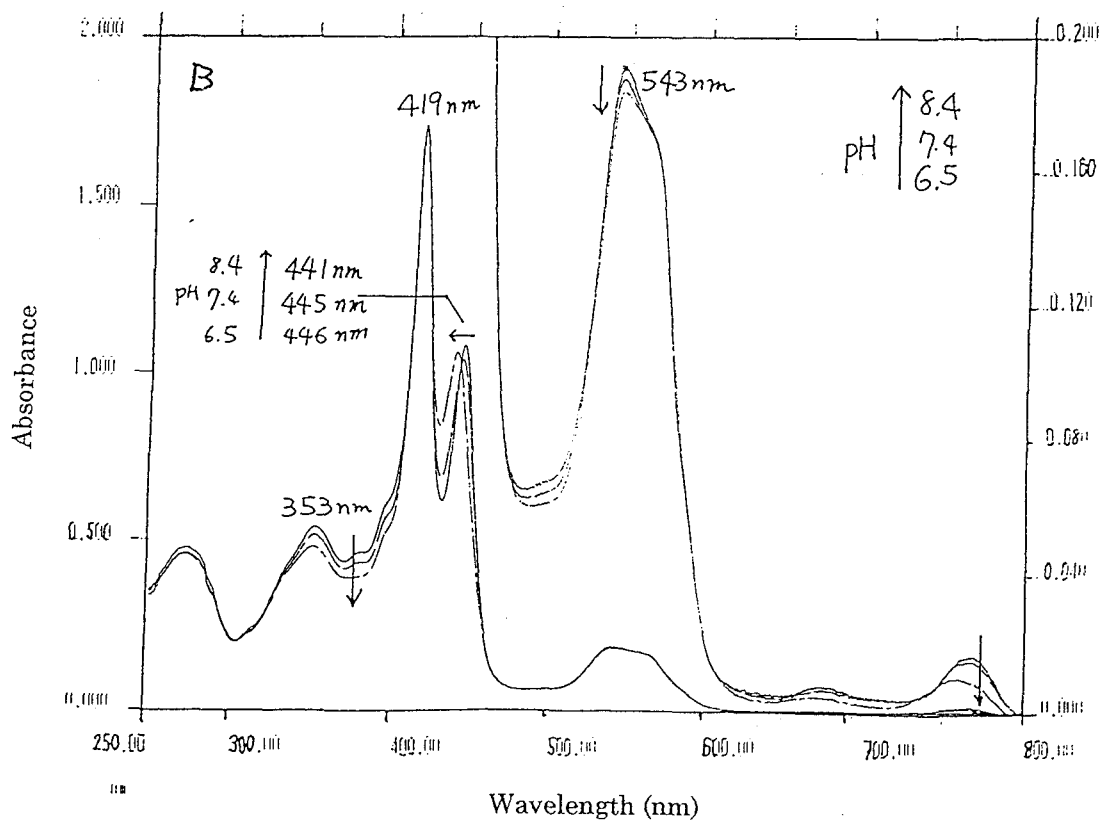
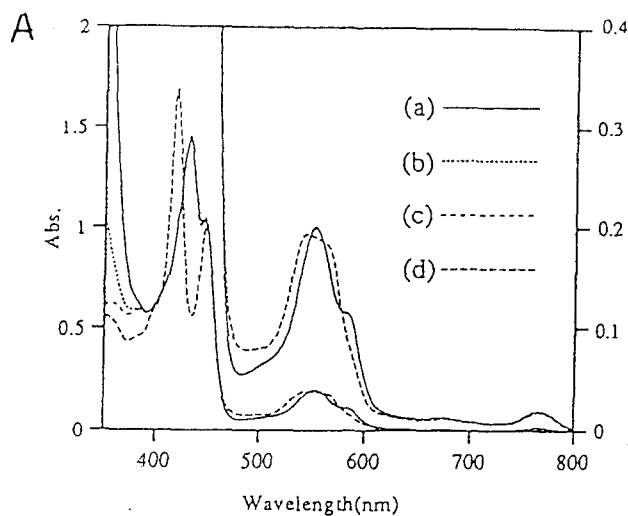


図 2-5 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ ヘモグロビンの吸光スペクトル

(A) 50mM Dithionite 存在条件のデオキシ型 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ ヘモグロビン(a)；

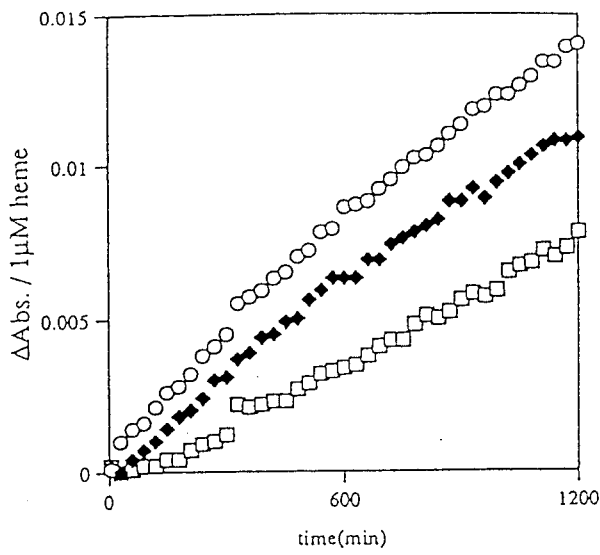
48 時間後(b)； 96 時間後(c)。Dithionite の吸収が時間と共に減っていくのがわかる (350nm 付近)。その後、CO ガスを光学セルに吹き込んでヘモグロビンに CO を結合させた(d)。条件：50mM Tris, 100mM Cl, pH7.4, 20℃, N_2 雰囲気、ヘモグロビン濃度、ポルフィリン基準で 170 μM 。1mm の光路長光学セルを使用。

(B) $\alpha_2(\text{Fe-CO})\beta_2(\text{Cr})$ ヘモグロビンの吸光スペクトルの pH 依存性

溶液の pH の上昇 (図中矢印) に伴って等吸収点を保ちつつスペクトルは変化する。

溶液条件： 50mM Tris, or bis-Tris, 100mM Cl-, 25℃

図2-6 Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのFe(II)サブユニットの自動酸化反応



○: $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$; □: $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$; ◆: HbA
 ヘム $1 \mu\text{M}$ につきどれだけ吸光度が変化したかを縦軸に示してある。
 測定条件: 50mM Tris, 100mM Cl^- , 37°C. Detected at 410nm.
 ヘモグロビン濃度、200 μM (ポルフィリン基準)

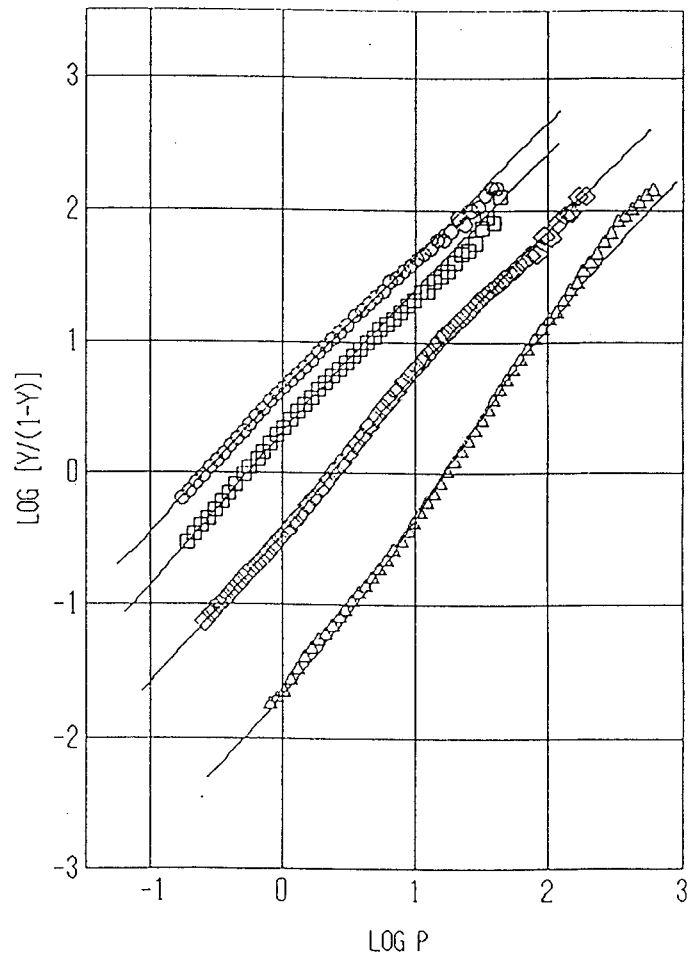
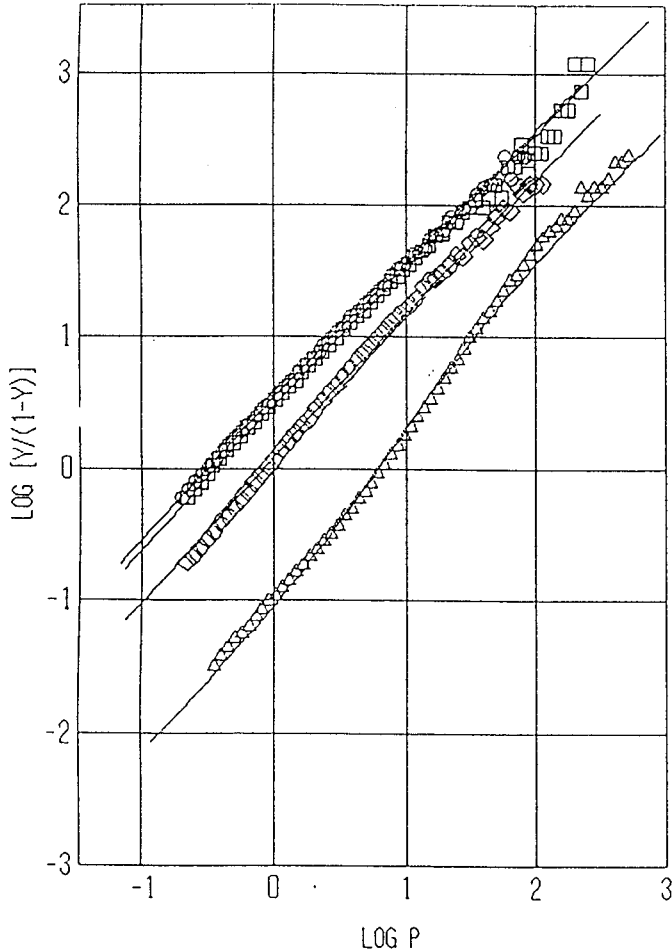


図2-7 Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線のHillplot

(A) $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ の酸素平衡曲線のHillplot

(B) $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ の酸素平衡曲線のHillplot

溶液条件: 50mM Tris, or bis-Tris, 100mM Cl^- , 25°C, Detected at 560nm.

○: pH8.4; □: pH7.4; ◇: pH6.5; △: pH7.4, 2mM IHP.

表 2-1 Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡パラメータ

実験条件： 50mM Tris or bis-Tris, 100mM Cl⁻, 25°C；ヘモグロビン濃度、60 μM、() 内のパラメータは、ヘモグロビン濃度 240 μM、[] 内のパラメータはヘモグロビン濃度 12 μM 条件で測定された（濃度はポルフィリン基準）；ヘモグロビン濃度が 60, 240 μM の場合は、560nm で、12 μM の場合は 430nm で測定された。

pH	IHP ^a	Red ^b	K_1^c	K_2^d	P_{50}^e	n_{max}^f	met ^g
$\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$							
6.5	-	-	0.88	1.6 ^h	0.85	1.2	10.6
	+	-	0.026	0.070 ^h	24	1.3	8.2
	+	-	[0.030]	[0.082]	[20]	[1.3]	[8.3]
	+	+	[0.021]	[0.082]	[24]	[1.3]	[2.5]
7.4	-	-	2.2	3.4 ^h	0.37	1.1	5.7
	-	-	(2.8)	(3.3)	(0.33)	(1.0)	(3.1)
	-	+	(1.8)	(2.5)	(0.47)	(1.1)	(1.3)
	+	-	0.069	0.39 ^h	6.1	1.4	1.4
8.4	-	-	2.7	3.7 ^h	0.32	1.1	3.3
	+	-	0.73	2.9 ^h	0.69	1.3	4.4
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$							
6.5	-	-	0.25	0.72 ^h	2.4	1.3	4.0
	+	-	0.012	0.039 ^h	47	1.4	3.2
	+	-	[0.010]	[0.043]	[48]	[1.4]	[3.0]
	+	+	[0.010]	[0.043]	[50]	[1.4]	[<0.7]
7.4	-	-	1.2	2.7 ^h	0.55	1.2	2.4
	-	+	(1.1)	(3.1)	(0.55)	(1.2)	(0.7)
	-	+	1.1	2.5	0.60	1.3	0.7
	+	-	0.018	0.20 ^h	17	1.6	0.9
8.4	+	-	(0.015)	(0.23)	(17)	(1.6)	(1.2)
	+	+	0.026	0.15	16	1.4	0.7
	-	-	3.2	4.5 ^h	0.26	1.1	1.8
	+	-	0.52	3.0 ^h	0.81	1.4	1.8

^a + : 2mM IHP 存在条件。- : IHP の無い条件

^b + : メトヘム還元酵素系存在条件。- : 還元酵素系の無い条件

^c 混成ヘモグロビンの鉄(II)サブユニットの Adair 定数（最初の酸素結合過程、torr⁻¹）

^d 混成ヘモグロビンの鉄(II)サブユニットの Adair 定数（最後の酸素結合過程、torr⁻¹）

^f Hill plot の最大勾配

^g 酸素平衡曲線測定後のメトヘム含有量（全体のヘムの内の百分率）

^h log K_2 の値を図 2-8 に示した。

表 2-2 酸素結合速度と解離速度を測定することによって得られたヘモグロビンの K_1 の値

K_1 for α subunit ($\times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$)	K_1 for β subunit ($\times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$)	Condition
2.3 (± 0.9)	4.5 (± 1.7)	pH 7.0, 20° C 0.1 M bis-Tris 0.1 M KCl
3.10 (± 0.13)	2.76 (± 0.09)	pH 7.4, 21.5° C 0.1 M Tris 0.1 M NaCl
3.5 (± 1.0)	3.7 (± 1.1)	pH 7.4, 25° C 50 mM bis-Tris 0.1 M NaCl
2.6	2.6	pH 7.0, 20° C 0.1 M bis-Tris 0.1 M KCl
1.6 ^a (2.7 torr ⁻¹)	2.1 ^b (3.4 torr ⁻¹)	pH 7.4, 25° C This study 50 mM bis-Tris 0.1 M Cl ⁻

^a K_2 of $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$.

^b K_2 of $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$.

Cr(III)-Fe(II)hybridHb の酸素平衡機能について

図 2-7 A, B に Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の Hillplot を挙げた。表 2-1 に 2 段階 Adair 解析から求められた Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡パラメータを挙げた。パラメータには K_1 、 K_2 、 P_{50} 、 $n_{\max}$ の各値が挙げられた。また、表 2-1 には酸素平衡曲線を測定したあとで求められた酸化されたヘム（メトヘム）の濃度が、全体のヘムの濃度に対する百分率で表されている。酸化されたヘムの濃度は、メトヘム還元酵素系共存下で測定された条件の場合、非常に低くなったことが分かる。しかし、酸素平衡曲線（とそのパラメータ）は還元酵素系が加えられることによって大きな影響は受けなかった。また、酸素平衡曲線は混成ヘモグロビンの濃度の影響もほとんど受けなかった。なお、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンは光感受性を持つが、酸素平衡曲線を測定するための 560nm の光ではヘモグロビンの機能に異常が現れるということとはなかった。還元酵素系存在条件で、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線を同じサンプルで続けて連続して測定しても、誤差の範囲内で全く同じ平衡曲線を測定することができたからである。

IHP が無い溶液条件では、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンはとても高い酸素親和性を示した。pH8.4 条件では $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ と $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ の両混成ヘモグロビンがほとんど協同性を示さず ($n_{\max}=1.0-1.1$)、単離 α 鎖や単離 β 鎖とはほぼ同じ高い酸素親和性を示した。溶液の pH が下がるに従って、両混成ヘモグロビンの協同性は強くなり、pH6.5 条件では $n_{\max}$ の値が 1.2~1.3 となる。測定された全ての pH 条件で、 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ の $n_{\max}$ の値は $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ のものよりも少し小さく、また $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ が示した Bohr 効果は $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ が示したものよりも小さかった。

$\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ と $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ の両混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線は IHP が溶液に加えられることで大きな影響を受けた。酸素親和性は低くなって、Bohr 効果は大きくなった（酸素親和性が pH に大きく依存するようになった）。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの K_2 の値の pH、IHP 依存性を図 2-8 に示した。 K_2 の pH、IHP 依存性は HbA の K_4 の値 (Imai et al., 1970; Imai & Imaizumi, unpublished observations) の pH、IHP 依存性とよく一致した。この結果から Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの中で、Cr(III)PPIX はちょうどオキシヘムと同じ影響を周りに与えていると考えることができる。

デオキシ Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの結晶と結晶型について

デオキシ $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの結晶が、2%タンパク質濃度（重量濃度）、27~28%ポリエチレングリコール濃度（重量濃度）、50mM dithionite、

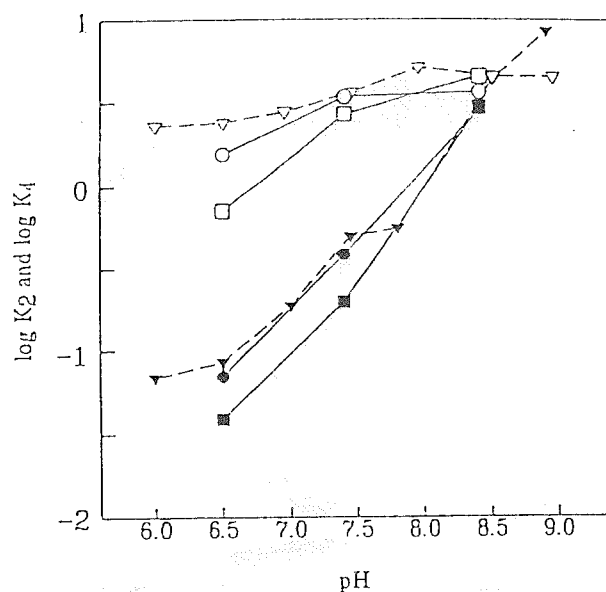


図2-8 Cr(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの K_2 の値 (torr⁻¹) の pH 依存性

○: $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ の K_2 の値 (torr⁻¹)

□: $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ の K_2 の値 (torr⁻¹)

▽: ヘモグロビンの K_1 の値 (torr⁻¹; Imai, 1982; Imai & Imaizumi, unpublished results)

黒シンボルは、2mM IHP 存在条件での K_2 、もしくは K_1 の値 (torr⁻¹)

溶液条件: 50mM bis-Tris or Tris, 100mM Cl⁻, 25℃, ヘモグロビンの濃度、60μM (ホルフィリン基準)、測定波長、560nm.

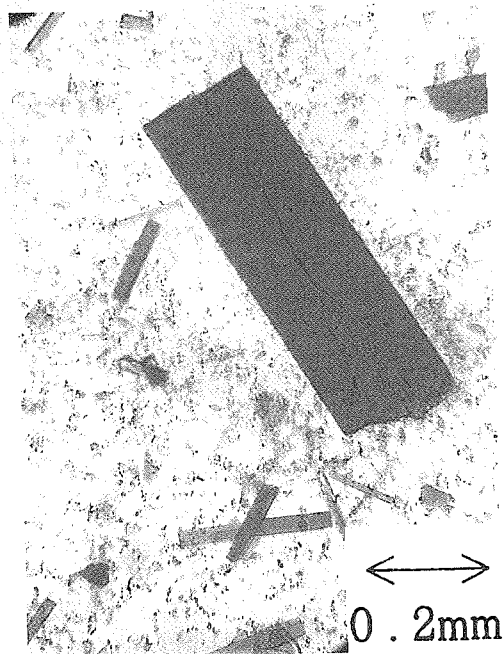


図2-9 デオキシ $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ の単結晶

結晶は、2%ヘモグロビン濃度、50mM sodium phosphate、pH7.0、27~28%の Polyethylene glycol 1000、50mM dithionite、窒素雰囲気条件で得られた。

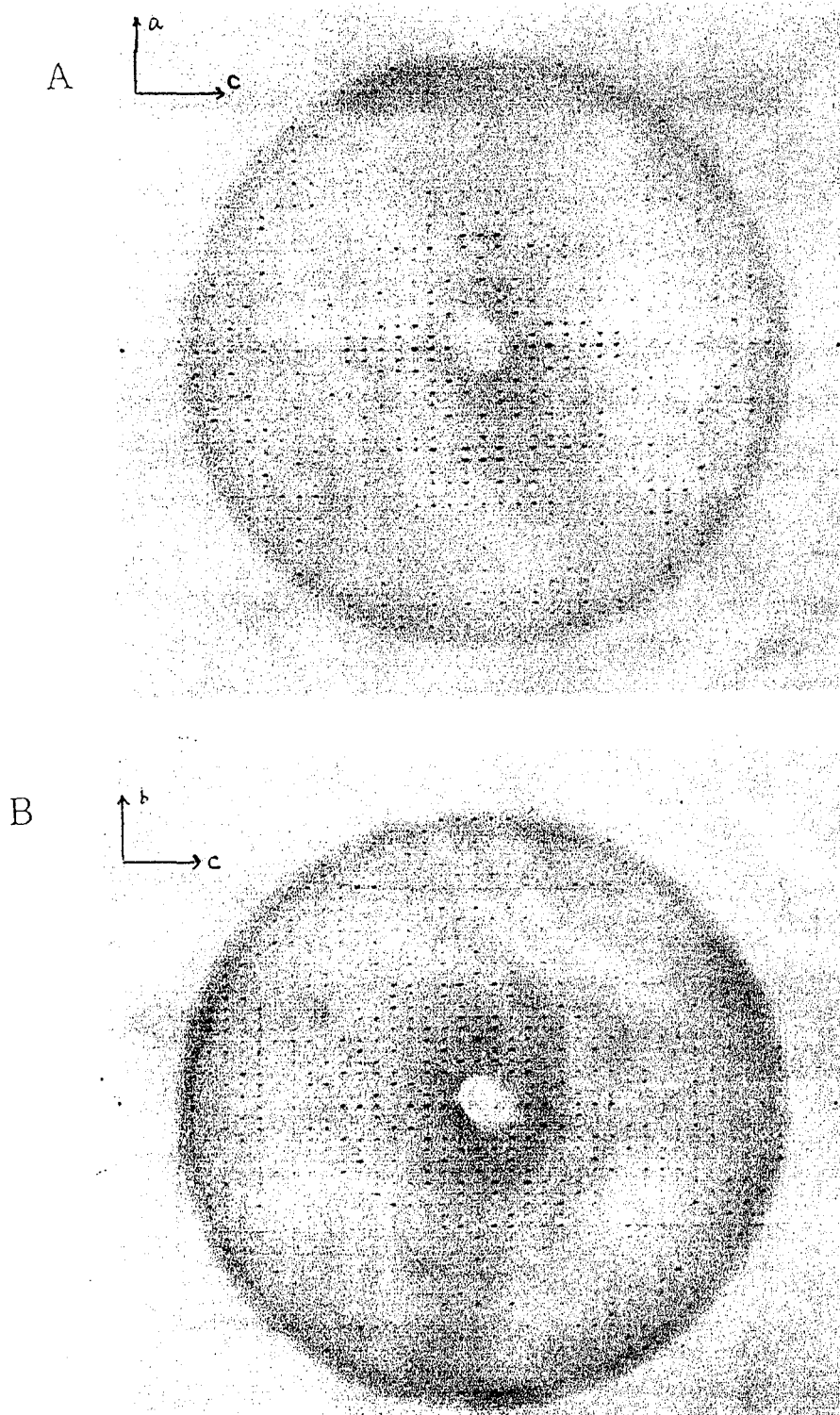


図 2-10 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの結晶のフレセッション写真

(A) ac 面フレセッション写真 (実物大)

(B) bc 面フレセッション写真 (実物大)

測定条件：ヘモグロビンの結晶にX線をあてる場合、結晶はキャピラーと呼ばれる細いガラス管状のものの内側に嫌気状態を保ったまま固定される。測定は蛋白工学研究所のフレセッション写真測定装置を使った。X線は銅の K_α 線（波長は $1.54 \text{ \AA}$ ）、カメラ長は 100mm 。装置にヘモグロビンの結晶を据え付ける際、顕微鏡で見ながら結晶の ac 面、もしくは bc 面がX線に対して垂直になるように調節した。このヘモグロビンの結晶は、結晶の外見の面と、本当の結晶面とが一致しているのでわかりやすい。

窒素雰囲気下条件で得られた (図 2-9)。結晶の precession 写真が窒素雰囲気を保ったまま撮られた。得られた写真 (図 2-10) のパターンから、このヘモグロビンの結晶系は $P2_12_12$ 空間群に属することが分かった。格子定数は $a = 96 \text{ \AA}$, $b = 98 \text{ \AA}$, $c = 66 \text{ \AA}$ だった (参考: デオキシヘモグロビンの結晶型は同じ $P2_12_12$ 空間群に属し、その格子定数は $a = 97.1 \text{ \AA}$, $b = 99.3 \text{ \AA}$, $c = 65.8 \text{ \AA}$ である (Kavanaugh et al., 1992)。)。

(5) 考察

Cr(III)ヘモグロビン、そして Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの光吸収スペクトルは、pH に依存して等吸収点を持ちつつ変化した。これは Cr(III)サブユニットが2つの状態の間の平衡状態にあり、そしてその平衡は pH に依存しているということを示している。ほとんどの Cr(III)イオンの錯体は6配位8面体構造をとることが知られている(Earley & Cannon, 1965)。また、Cr(III)PPIX は全体で1個余分に正電荷を持っているので、負電荷または極性を持つ配位子が必要なはずである。これらの理由から、Cr(III)サブユニットの中では近位ヒスチジンが第5配位子として Cr(III)PPIX の Cr(III)イオンに配位し、残りの第6配位子座には H_2O 分子もしくは OH^- イオンが配位していると考えられる。これはメトヘムの状態と全く同じである。メトヘモグロビンの吸光スペクトルは pH に依存して等吸収点を持ちつつ変化する (Antonini & Brunori, 1971)。メトヘモグロビンの吸光スペクトルの pH 依存性を図 2-11 に示す。Cr(III)ヘモグロビン、そして Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの光吸収スペクトルの pH 変化は、メトヘモグロビンのそれと同様、Cr(III)イオンの第6配位子座の H_2O 分子と OH^- イオンの間の平衡の移動によると考えられる。Fiechtner らは Cr(III)ヘモグロビンの中では近位ヒスチジンと遠位ヒスチジンの両方が Cr(III)PPIX の Cr(III)イオンに配位した hemichrome 構造が形成されていると報告しているが(1980)、彼らが報告した Cr(III)ヘモグロビンのスペクトルは今回調整された Cr(III)ヘモグロビンのものとかなり違う。とくに可視光領域の吸光度と紫外領域の吸光度の大きさの比が違う。Fiechtner らの報告したスペクトルの紫外領域の吸光度はとても大きい。これは Cr(III)PPIX の濃度に比べて蛋白質部分、つまりグロビン部分の濃度が極端に高いことを示している。Fiechtner らの調整した Cr(III)ヘモグロビンはきちんと Cr(III)PPIX が収まっていないアポヘモグロビンが非常に多いと考えられる。

CO 型 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ 、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ の 4 量体-2 量体平衡定数はそれぞれ 5

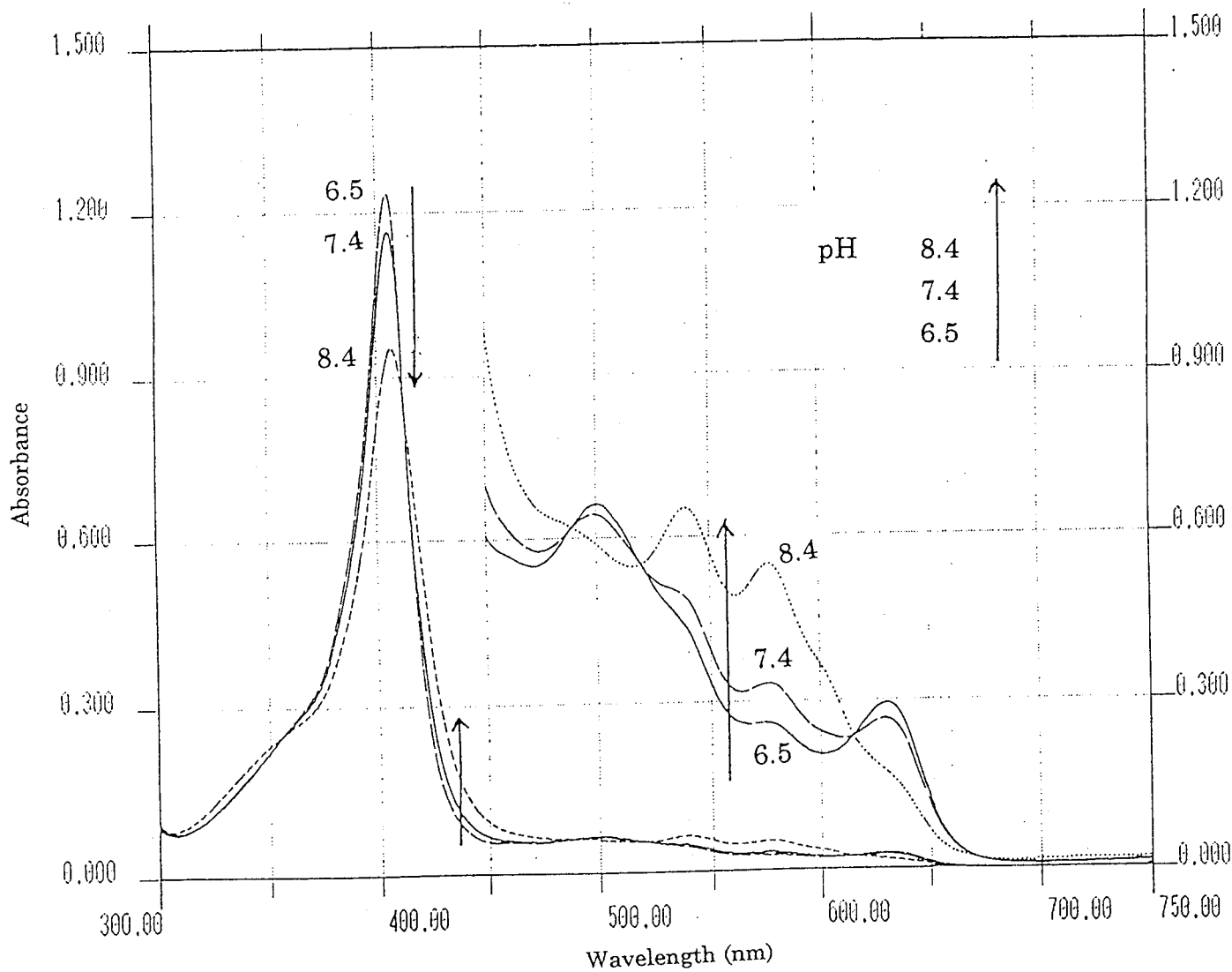


図 2-11 メトヘモグロビンの吸光スペクトルの溶液 pH 依存性

溶液の pH 上昇 (図中矢印) に伴ってスペクトルは等吸収点を保ちつつ変化する。

メトヘムの第 6 配位子座のリガンド (ヘムに 1 個だけ配位) は、 H_2O 分子もしくは OH^- イオンなので、溶液の pH 変化に伴ってどちらが多く配位するかが変化し、それが吸光スペクトルに現れる。

溶液条件: 50mM Tris, or bis-Tris, 100mM Cl⁻, 25℃

$\times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、 $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ という結果が出ている (Kajitani ら(1989)の CO 型で調整した Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使った測定結果)。この数字はオキシヘモグロビンの 4 量体-2 量体平衡定数とほぼ同じで、この平衡定数なら酸素平衡曲線の測定条件では、混成ヘモグロビンの一部は 2 量体に別れているはずだが、実際の酸素平衡曲線の Hillplot はほとんどヘモグロビンの濃度に依存しなかった。

2 段階酸素結合過程の Hillplot のヘモグロビン濃度依存性を計算してみた (Appendix-1)。2 量体に別れた混成ヘモグロビンは単離鎖と同じ酸素親和性を持っていると仮定して、得られている混成ヘモグロビンの 4 量体-2 量体平衡定数と、仮の Adair 定数として実験から求められた K_1 、 K_2 の値を使って、酸素平衡曲線をシミュレートしてみた。また、IHP 存在下ではヘモグロビンの 4 量体-2 量体平衡定数は約 20 倍になる (2 量体に割れにくくなる) ことが知られているので、IHP がある条件での酸素平衡曲線の計算には 20 倍にした 4 量体-2 量体平衡定数を用いた。ヘモグロビンの濃度が薄くなるにしたがって 2 量体の濃度が上がり、見かけの酸素親和性が高くなった。Hillplot は左上に移動していくように見えた。しかし、もともと Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素親和性がとても高く 2 量体ヘモグロビンに似ているので、Hillplot のヘモグロビン濃度依存性は実際に実験が行われた範囲 (ヘモグロビンの濃度がポルフィリンを基準に 12、60、240 $\mu \text{ M}$) ではとても小さい。この計算結果は実際に実験で得られた Hillplot で見られた結果と一致する。

$\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ 、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ の K_2 の値は、酸素平衡曲線から求められた HbA の K_4 の値と、色々な溶液の pH 条件・IHP 条件下でよく一致した (図 2-8)。他方、近頃 HbA に 4 つ目に結合する酸素の結合速度と解離速度が測定されている。 α サブユニット、 β サブユニットの酸素の結合・解離速度がそれぞれ測定されていて、それらを使って HbA に 4 つ目に結合する酸素の平衡定数が計算されている (Mathews et al., 1989; Philo & Lary, 1990; Vandegriff et al., 1991; Fronticelli et al., 1993)。表 2-2 で速度定数から計算された平衡定数 (K_4) の値と Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの K_2 の値とを比較した。 K_4 の値と K_2 の値は誤差範囲内で一致している。これらの事実は Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの中では、Cr(III)PPIX が Fe(II)サブユニットの酸素平衡機能に与える影響は、オキシヘムが与える影響とよく似ていることを示している。

Perutz のヘモグロビンの立体化学理論(1990)によれば、ヘモグロビンの酸素親和性の調節はヘムの Fe(II)イオンの位置の移動と、Fe(II)と共有結合している近位ヒスチジンの位置の移動によって行われているとされている。この視点か

ら考えると、Cr(III)PPIXにはオキシヘムモデルとして適当な特徴がいくつかある。Cr(III)イオンが入ったポルフィリンはほぼ平らで、Cr(III)イオンはそのちょうど中心にあると考えられている(Summerville et al., 1977)。この構造はオキシヘムの構造とよく似ている。また、Cr(III)イオンのイオン半径は $0.62 \text{ \AA}$ (Buchler, 1975)で、オキシヘム中の Fe(II)イオン (lowspin Fe(II)イオン) のイオン半径 ($0.61 \text{ \AA}$) とほぼ同じである。そしてほとんどの Cr(III)イオンの錯体は6配位8面体構造をとり(Earley & Cannon, 1965)、配位子をととても強く結合するので(Summerville et al., 1977)、Cr(III)サブユニットの中ではCr(III)PPIXと近位ヒスチジンは強く結合し、その結合距離はオキシヘムと近位ヒスチジンとの距離程度だと考えられる。このようにCr(III)PPIXが入ったヘムポケット内の構造は、オキシヘムが入ったヘムポケット内の構造とよく似ていると考えられる。

シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンが、ヘモグロビンの協同性のメカニズムを理解するために、酸素結合の中間段階を表しているモデルヘモグロビンとしてよく使われてきた。シアンが結合した Fe(III)PPIX が、オキシヘムのモデルとしてみんなに受け入れられた理由はやはりその構造とシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素結合機能による。(1) X線結晶構造解析によって出されたシアノメトヘモグロビン (混成ヘモグロビンではなく、4つのヘム全てがシアノメトヘム) の3次元立体構造(Deatherage et al., 1976)がオキシヘモグロビンの立体構造(Shaanan, 1983)にととてもよく似ていた;(2)シアンが結合したメトヘムの構造は、ちょうどオキシヘムのようにヘム全体が平らで、Fe(III)イオンはヘムの中央に収まっている(Hoard, 1971; Scheidt & Reed, 1981; Scheidt, 1977); (3)シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの中のシアノメトサブユニット由来の NMR スペクトルは、シアノメトヘモグロビン(4つのヘムがシアノメトヘム)の NMR スペクトルととてもよく似ていた (ただし有機リン酸が無い溶液条件, Ogawa & Shulman, 1971, 1972); (4)シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの Fe(II)サブユニットは、とても速いリガンド結合速度を示し(Cassoly et al., 1971, 1972)、とても高い酸素親和性を示した(Maeda et al., 1972; Nagai, 1977)。これらの事実が根拠となって、シアノメトヘムがオキシヘムのモデルに、シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンがヘモグロビンの酸素結合の中間段階を調べるためのモデルヘモグロビンとして使われてきた。シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビン酸素平衡曲線が精密に測られたが、 $\alpha_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)\beta_2(\text{Fe})$ 、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN}^-)$ の K_2 の値は HbA の K_4 の値とよく一致した(Nagai, 1977; Iwata & Morimoto, unpublished observation)。つまり、シアノメトヘムはCr(III)PPIXと同様に良いオキシヘムモデルである。実際、シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平

平衡曲線は Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのそれとほぼ似ているのである（注：Appendix 2）。

しかし、シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンにはどうしようもない欠点がある。Fe(II)サブユニットのヘムが自動酸化に対して不安定である。デオキシ化したシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンを長時間放置すると、Fe(III)ヘムと Fe(II)ヘムの間で電子のやりとりが起こるので(Shibayama et al., 1997)、特定のヘモグロビン分子種を調べるのに長時間かかるのならシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンは不適当である。また、おそらく同じ理由で、シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの X 線結晶構造解析は全く報告されていない。これは還元剤を使わずに Fe(II)サブユニットを自動酸化させずに保つのが難しいからだと考えられる。シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線は本当は P₅₀の点を中心に点対称でなければならないのだが、酸素平衡曲線の測定中に起こるヘムの自動酸化によって曲線が点対称からずれてしまうことが報告されている(Nagai, 1977)。自動酸化してしまったヘムを還元しようとしても、メトヘムの還元剤や還元酵素系を溶液に加えればシアノメトヘムまで還元されてしまう。普通のヘモグロビン用の標準的な技術がシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンには適用できないのである。

シアノメトヘムと対照的に、ヘモグロビンに入った Cr(III)PPIX は 50mM dithionite 存在溶液条件でもメトヘム還元酵素系を共存させても Cr(II)PPIX に還元されない。メトヘム還元酵素系がある条件で Fe(II)サブユニットの自動酸化を抑えれば、混成ヘモグロビンの正当な酸素平衡曲線を測定できる。さらに、dithionite を使えば Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのデオキシ化が簡単に達成できるので嫌気条件での実験を容易に行うことができる。実際にデオキシ $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの単結晶がポリエチレングリコールと 50mM dithionite 存在条件下で得られている。

第3章 金属置換混成ヘモグロビンの 一酸化炭素・酸素結合の速度論的研究

(1) 概要

ヘモグロビンのリガンド結合の協同作用は、オキシヘモグロビン構造とデオキシヘモグロビン構造だけが安定で、リガンド結合中間段階ヘモグロビンの構造が不安定なので起こる。金属置換混成ヘモグロビンが、その不安定な状態を実現していることを期待して、それらの一酸化炭素、および酸素の結合速度と解離速度を測定した。測定手段は Stopped flow 法、リガンド置き換え法、光解離法である。クロム(III)-鉄(II) (Cr(III)-Fe(II))、マンガン(III)-鉄(II) (Mn(III)-Fe(II))、ニッケル(II)-鉄(II) (Ni(II)-Fe(II))、マグネシウム(II)-鉄(II) (Mg(II)-Fe(II)) の各混成ヘモグロビンが使われた。これらの混成ヘモグロビンはそれぞれ、非常に高い酸素親和性 (Cr(III)-Fe(II))、中間的酸素親和性 (Mn(III)-Fe(II))、低い酸素親和性 (Ni(II)-Fe(II))、非常に低い酸素親和性 (Mg(II)-Fe(II)) と、いろいろな酸素親和性を持っていて、ヘモグロビンが持ちうる酸素親和性のすべての範囲をほぼカバーしている。このようないろいろなヘモグロビンの中に、通常のヘモグロビンの不安定な構造状態を実現しているものを探した。

観測・解析された速度定数は、ヘモグロビン 2 状態モデルのように、大まかに 2 つのグループに分かれた。ひとつは高い酸素親和性を持つヘモグロビンの速度定数に相当するグループ (速い結合速度・遅い解離速度)、もうひとつは低い酸素親和性を持つヘモグロビンの速度定数に相当するグループ (遅い結合速度・速い解離速度) である。前者に分類された速度定数は使われた混成ヘモグロビンに依存しなかったが、後者に分類された速度定数は溶液条件 (pH, IHP 条件) に依存した。 α サブユニットの速度定数と β サブユニットの速度定数とは速さや IHP 依存性などで多少の違いがある。最も高いリガンド親和性を持つヘモグロビンと、最も低いリガンド親和性を持つヘモグロビンとを比べると、協同性の大きさ (平衡定数の比) は酸素と一酸化炭素とであまり違いはないが、酸素結合の協同性はリガンド解離速度変化によるところが大きく、一酸化炭素結合の協同性はリガンド結合速度の変化が重要であることが分かった。この性質は α サブユニットと β サブユニットの両方で見られる。

(2)序論 その1 なぜ金属置換混成ヘモグロビンを速度論的実験に使ったか

ヘモグロビンのリガンド（酸素、一酸化炭素など）の結合機能を調べるには第2章で述べたような酸素平衡曲線を測る方法の他に、リガンドが結合する速度や解離する速度を測る方法もある。測定手段の基本である Stopped flow 法（高速混合法）や Flash-photolysis 法（光解離法）を確立したのは Gibson である (1959a,b)。反応速度の測定には、平衡の測定と違った利点がある。例えば、溶液中にリガンド結合速度の異なるヘモグロビンが数種類ある場合、反応速度を測るとそれぞれ違った相となって現れるから、それぞれの結合速度定数を知ることができる。平衡系では異なるリガンド親和性を持つ成分がいくつかあっても平均的な性質しか分からないことが多い。

反応速度を測定することに利点があるといっても、ヘモグロビンのリガンド結合（解離）速度を測る場合、一般的にその結果の解析は難しい。通常のヘモグロビンを用いる場合、 α サブユニットと β サブユニットの速度の違いを考えなければならない。リガンドの結合・解離に伴うヘモグロビンの4次構造変化のことを考えなければならない場合もある。第1章で述べたヘモグロビンの酸素平衡曲線の Adair 解析のように、リガンド結合の速度論的解析にもリガンド結合中間段階ヘモグロビン分子種の濃度の変化のことを考えた解析もある (Olson, 1981b) が、求めるべきパラメータが多く、ヘモグロビンのリガンド結合の全ての速度定数を決定するのは難しい。

今回、リガンドの結合・解離速度の測定の手法を金属置換混成ヘモグロビンに適用してみた。金属置換混成ヘモグロビンはリガンドが結合する4つのヘムの内、半分を結合しないようにしているので解析が比較的簡単である。 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニット、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットのリガンド結合速度、解離速度を別々に調べることができる。最も重要なのは、混成ヘモグロビンを用いることが、ヘモグロビンの協同性の本質を調べる手段であることだ。金属置換混成ヘモグロビンを使う理由は、本論文の「はじめに」の項で述べた。ヘモグロビンの協同性の本質は、オキシヘモグロビンでもなく、デオキシヘモグロビンでもない、ヘモグロビンの構造の変わり目にある。オキシヘモグロビン型構造とデオキシヘモグロビン型構造だけが安定で、他のヘモグロビンの状態が不安定なことが協同性の本質である。その不安定な状態がなぜ不安定か、どのような性質を持っているのか、を調べたい。その不安定な状態を、金属置換混成ヘモグロビンが実現してくれることを期待する。

いろいろな金属ポルフィリンを使った金属置換混成ヘモグロビンを作ることによって、非常に高い酸素親和性を持つものから非常に低い酸素親和性を持つ

ものまで、いろいろな酸素親和性のヘモグロビンを用意できる。今回は4種類の混成ヘモグロビンを用意した。(1)オキシヘモグロビン並に非常に高い酸素親和性を持つ Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビン、(2)オキシヘモグロビンとデオキシヘモグロビンとの間の中間的酸素親和性を持つ Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビン、(3)デオキシヘモグロビン並に低い酸素親和性を持つ Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビン、(4)デオキシヘモグロビンよりさらに低い酸素親和性を持つ Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンである。酸素平衡機能で見る限り、(1)から(4)のヘモグロビンはそれぞれ違った酸素親和性を持っている。これらの性質は見かけの酸素平衡機能であって、その内容にどのようなヘモグロビン成分があるのかはわからない。速度論的解析をすれば、速いものと遅いものとを区別できるので、どのような成分があるかわかるだろう。通常のヘモグロビンを使っているのは、観測するのが難しい中間的な性質を持った状態を実現しているものを、4種類の混成ヘモグロビンの中に探すのだ。探す際の目安は、「2状態モデルで説明できないようなヘモグロビン成分」である。オキシヘモグロビンの性質とも言えない、デオキシヘモグロビンの性質とも言えない速度成分があれば分離して観測できる。何か得体の知れない速度定数を持つ成分があったら、それが「普段は不安定で観測できないヘモグロビン成分」の候補である。

先に挙げた混成ヘモグロビンの(1)と(3)は、それぞれ、「オキシヘムモデル」と「デオキシヘムモデル」を使った、酸素結合の中間段階ヘモグロビンを固定したものに相当する混成ヘモグロビンである。本来、酸素結合段階の中間段階ヘモグロビンは不安定で、溶液中にはほとんど存在しない。Cr(III)-Fe(II)やNi(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは、その不安定な状態のヘモグロビンの性質を示してくれるのではないかと期待される。また、リガンド結合中間段階のモデルではないが、最初から中間的性質を示している混成ヘモグロビンもある。(2)のMn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの内、 $\alpha_2(\text{Mn})\beta_2(\text{Fe})$ は、中途半端な酸素親和性を持っている(Masuda & Morimoto, 1993)ので、中間段階ヘモグロビンを実現したものの候補である。 $\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$ は、ヘモグロビン溶液のpHが高い条件では、オキシヘモグロビンとデオキシヘモグロビンの中間くらいの酸素親和性を示すが、協同作用をほとんど示さない、という変な性質を持っている(Shibayama et al., 1986a)ので、やはり中間的性質を持つヘモグロビンの候補である。これらは見かけの酸素親和性であるので、速度論的解析によってどのようなヘモグロビン成分があるのかははっきりするだろう。はたして、中間的性質を持ったヘモグロビンが本当に実現しているだろうか。

金属置換混成ヘモグロビンを速度論的研究に使ったもう一つの目的が、ヘモグロビンのリガンド結合(解離)速度の最も速い速度と最も遅い速度はどのく

らいかを調べることである。実はヘモグロビンのリガンド（酸素や一酸化炭素）結合速度定数、解離速度定数の同定がいまだに混乱している部分がある。特にリガンド親和性が低い構造での速度定数の同定に混乱がある。過去にやはり混成ヘモグロビンを使って出された CO 結合速度定数は溶液の pH、IHP 条件に依存して変化していたりする(Cassoly & Gibson, 1972; Ikeda-Saito & Yonetani, 1980; Blough & Hoffman, 1982)。ミュータントヘモグロビンを利用した実験で求められたデオキシヘモグロビンの CO 結合速度定数(Mathews et al., 1991)は、 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットと $\beta(\text{Fe})$ サブユニット、どちらの結合速度定数が速いかという点で、先程の混成ヘモグロビンから求められた結果との間に食い違いがある。リガンド親和性の低い構造のヘモグロビンの O_2 結合・解離に関する速度定数は報告件数さえ非常に少ない(Sawicki & Gibson, 1977b; Shibayama et al., 1995b)。

また、——これはヘモグロビンの根本的な性質に関わる問題なのだが——
—— リガンド親和性の高いオキシヘモグロビン型構造と、リガンド親和性の低いデオキシヘモグロビン型構造の2つが、安定なヘモグロビンの構造であることははっきりしているのだが、後者のヘモグロビンの性質は、溶液の条件に依存するらしい。非常にしばしばリガンド親和性の低い状態のヘモグロビンの性質が溶液の pH や有機リン酸の有無に依存することが指摘されている(Blough & Hoffman, 1982; Imai, 1982)。その変化の規模はあまり大きくない。デオキシヘモグロビン型構造中の、なんらかの小さな構造変化に起因していると考えられるのだが、残念ながら具体的には何もわかっていない。弱ったことに、ヘモグロビンの研究の世界では、この溶液依存性を示すリガンド親和性の低い状態のヘモグロビンを、なんとなくまとめて「T 状態ヘモグロビン」と呼んでいるようだ。古典的 2 状態モデルでは、R 状態ヘモグロビン、T 状態ヘモグロビンの性質は、それぞれ溶液条件に依存しない、という項目があるのだが。

金属置換混成ヘモグロビンを使えば、 α サブユニットと β サブユニットについてそれぞれ区別して調べることができる。金属置換混成ヘモグロビンには、ほぼ常に非常に高い酸素親和性を示すものや、逆に非常に低い酸素親和性を示すものがあるから、最も速い（もしくは遅い）リガンド結合（もしくは解離）速度を決めるのに役に立つだろう。特に役に立ちそうなのは、リガンド親和性の低い状態のヘモグロビンの速度定数の同定である。Ni(II)-Fe(II)や Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは、リガンド親和性が低い。リガンド親和性の低い状態のヘモグロビンの性質の溶液条件依存性も調べられるだろう。今回はヘモグロビンの状態をとことんまでリガンド親和性の低い状態に引っ張って（つまり溶液の pH を下げたり溶液に IHP を加えたりする）リガンド結合・解離速度定数はどこまで変わるかを見極めることにする。

混成ヘモグロビンには α 置換混成ヘモグロビンと β 置換混成ヘモグロビンがあるから全部で8分子種のヘモグロビンの酸素、一酸化炭素の結合速度、解離速度を測定した。この章の中では、得られたリガンド結合過程と解離過程はまずは2状態モデル的に解析している。反応過程が単相性なら1つの速度定数を持つ指数関数をそれにフィットさせて1つの速度定数を得る。反応過程が単相性でない場合は、異なる速度定数を持つ反応成分が2つあると仮定して2つの指数関数の和を反応過程にフィットさせ、2つの速度定数を得る。これを全ての金属置換混成ヘモグロビンについて行って見て、得られた速度定数が2状態モデル的にはっきり2つに分類できるかどうか検討する。

一酸化炭素の結合速度の測定はStopped-flow法でデオキシ混成ヘモグロビン溶液と一酸化炭素を含む溶液とを高速混合することによって行った。一酸化炭素の解離速度の測定はStopped-flow法で一酸化炭素型混成ヘモグロビン溶液と一酸化窒素を含む溶液とを高速混合し、ヘモグロビンの一酸化炭素が一酸化窒素に置き換わる場所を調べることによって行った。酸素の結合速度の測定は、酸素型混成ヘモグロビンにDye-laserの光をあてることによって酸素を解離させ、ヘモグロビンに酸素が再結合する場所を調べることによって行った。酸素の解離速度の測定は2種類の方法を使った。ひとつは一酸化炭素の解離速度を測定する場合と同様に、Stopped-flow法で酸素型混成ヘモグロビン溶液と一酸化炭素を含む溶液とを高速混合し、ヘモグロビンの酸素が一酸化炭素に置き換わる場所を調べることによって行った。もうひとつは酸素の光解離実験のデータのグラフを外挿して酸素の解離速度を見積もる方法である（後述）

序論 その2 ヘモグロビンの4次構造変化の速度について

ヘモグロビンを速度論的実験に使う際、気になることの一つにヘモグロビンの4次構造変化の速度がある。リガンドが結合や解離をしている最中にヘモグロビンの4次構造も変化しているはずだ。つまり、速いリガンド結合（解離）速度を示すヘモグロビンが、遅いリガンド結合速度定数を示すヘモグロビンに変わってしまうかもしれないし、その逆の構造変化もあるだろう。歴史的にはどのように考えられてきたのか見てみよう。なお、ここでいうヘモグロビンの4次構造変化とは、「リガンド親和性の高いヘモグロビン（いわゆる R-状態）」が、「リガンド親和性の低いヘモグロビン（いわゆる T-状態）」に構造が変化する速度、またはその逆の構造変化の速度を示す。先に述べたリガンド親和性の低いヘモグロビン中の構造変化は含まない。

通常のおキシヘモグロビン（または一酸化炭素結合型ヘモグロビン）や、デオキシヘモグロビンを見ていても、これらのヘモグロビン分子の4次構造の平衡状態はほとんど動かない。それぞれ、リガンド親和性の高い状態、または低い状態に構造の平衡が極端に偏っているからだ。ヘモグロビンの構造が変化し始めるのは、デオキシ状態のヘモグロビンにリガンドが結合したり、ヘモグロビンに結合していたリガンドが外れたりする時である。中間段階ヘモグロビンは、リガンド親和性の高い状態と、リガンド親和性の低い状態の（他の構造状態もあるかも知れない）どちらにでもなれる微妙なものだと考えられる。2つ（またはそれ以上？）の構造状態の間を行ったり来たりしている平衡状態にあると考えられる。この行ったり来たりする構造変化の速度は一体どれくらいか。

最初にリガンド結合中間段階のヘモグロビンの4次構造変化速度について述べているのはデオキシ型シアノメト混成ヘモグロビンを使った実験の報告だろう。リガンド結合中間段階ヘモグロビンの「モデル」を使った実験である。デオキシ型シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンは、酸素が2つ結合した中間段階ヘモグロビンと同等と期待する。Cassoly と Gibson が、デオキシ化したシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 結合速度を Stopped-Flow 法で測定している(1972)。酸素の無い条件でデオキシ型シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビン溶液と、CO 溶液とを高速混合して、ヘモグロビンの吸光度の変化を観察することにより CO がヘモグロビンに結合する速度を測定したのである。CO 結合の時間変化は2相となった。速い反応と遅い反応の和が観測されたのである。もしヘモグロビンの構造変化速度（構造の入れ替わる速度）が CO 結合反応に比べて充分速ければ、見かけ上、反応曲線の平均化が起こって反応曲線は2相にはならないはずだ。実験結果はほとんどヘモグロビン濃度依存性を示さなかったので、速

い結合速度を示す成分は2量体ヘモグロビンのCO結合反応だとは考えられない。また、デオキシ型シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンのCO結合速度定数はCO濃度依存性をほとんど示さなかった(注:見かけの速度ではなくて、速度定数が濃度依存性を示さなかった)。これらの事実から、この混成ヘモグロビン溶液中には速いCO結合速度定数を持つヘモグロビン成分と遅い結合速度定数を持つヘモグロビン成分の2種類があり、それぞれ2状態モデル的にR-状態ヘモグロビンとT-状態ヘモグロビンだと解釈された。そして、反応曲線はほとんどCO濃度依存性を示さなかったので、ヘモグロビンがその2つの構造状態の間を行き来する速度はごく遅いものだ、と判断された。CO濃度が極端に薄い場合にのみCO結合速度定数がCO濃度依存性を示したので、この条件ではヘモグロビンの構造変化速度が見かけのCO結合反応に影響を与えていると考えられた。この時間オーダーが秒程度だったので、ヘモグロビンの構造が変わる速度はあまり速くなく、 1 s^{-1} よりも遅いだろうと結論づけられている。OgawaとShulmanはデオキシ型シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンのグロビンやヘム側鎖のHに由来するプロトンNMRのシグナルを調べている(1972)が、NMR測定装置の時間分解能から考えるとヘモグロビンの構造交換速度は秒程度かそれよりも遅いとするしかない。交換速度が速いと、溶液中に存在するいろいろな構造状態のヘモグロビン由来のプロトンNMRシグナルが平均化されてしまい、シグナルがブロード(なだらか)になるはずである。

Sharmaらのグループでは、Double-Mixing Stopped-Flow装置を使って、主にCOが2つ結合した中間段階ヘモグロビンのCO結合(解離)速度を測定している(Berjis et al., 1990; Sharma, 1988, 1989)。彼らの方法は、まず1段目のStopped-Flow装置で水(H_2O)結合型Valency混成ヘモグロビン*のメトヘムを還元剤を使ってすばやく還元する。するとCOが2個だけ結合した中間段階ヘモグロビンができる $[\alpha_2(\text{Fe}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{2+}\text{CO})]$ 、もしくは $\alpha_2(\text{Fe}^{2+}\text{CO})\beta_2(\text{Fe}^{2+})$ 。COの解離速度は極端に遅いので、この分子種はしばらくこのままでいる。続いて2段目のStopped-Flow装置でこのヘモグロビンのデオキシサブユニットのCO結合(解離)速度を測定する。彼らは $\alpha_2(\text{Fe}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{2+}\text{CO})$ と $\alpha_2(\text{Fe}^{2+}\text{CO})\beta_2(\text{Fe}^{2+})$ は、還元されてできあがった直後は速い $\text{T} \rightleftharpoons \text{R}$ 構造交換速度を示しているが、やがて交換速度は非常に遅いもの(秒程度)に変わってしまう、と述べている(Berjis et al., 1990)。同様の結果がRollemaらによっても報告されている(1978)。このように、リガンド結合中間段階ヘモグロビンの構造変化の速度をStopped-Flow測定装置を使って観察すると、リガンド親和性の高い構造状態と

* $\alpha_2(\text{Fe}^{3+}\text{H}_2\text{O})\beta_2(\text{Fe}^{2+}\text{CO})$ と、 $\alpha_2(\text{Fe}^{2+}\text{CO})\beta_2(\text{Fe}^{3+}\text{H}_2\text{O})$ の2種類の混成ヘモグロビン。

低い構造状態の間の平衡状態は、非常に遅い交換速度で成り立っているという結果が出た。

しかし、他方では全く違うヘモグロビンの4次構造変化速度も報告されている。測定方法は主に光解離法である。最初に確立したのは Sawicki と Gibson で、一酸化炭素結合型 (CO 型) ヘモグロビンを使っている(1976)。CO 型ヘモグロビンにレーザーなどの強力な光を当てると、CO がヘムからはずれ、ヘムポケットから飛び出す。この直後のヘモグロビンは、CO が結合していたときの構造を保っている。「R-状態デオキシヘモグロビン」とでもいうべきものである。もちろんこんな状態は不安定である。だからヘモグロビンは CO が再結合しない限り通常のアキシヘモグロビンの構造になろうとする。光解離直後に現れるアキシ型構造を持つデオキシヘモグロビンと、通常のアキシヘモグロビンの吸光スペクトルは少し違うことがかねてから知られていた(Gibson, 1959a; 図 3-1A)。この吸光度の違いを利用すれば、アキシ型構造を持つデオキシヘモグロビンが通常のアキシヘモグロビンへと4次構造が変化する速度を測定することができる。その測定には通常のアキシヘモグロビンの吸収スペクトルと、通常のアキシ結合型ヘモグロビンの吸収スペクトルの等吸収点の波長の吸光度が使われる。Sawicki と Gibson は 425nm という波長をヘモグロビンの4次構造が変化する速度を測定するために選んでいる。他方、ヘモグロビンの CO 結合速度だけを測定したい場合は、4次構造変化に伴うスペクトル変化の影響を受けない 436nm という波長(アキシ型構造デオキシヘモグロビンの吸光スペクトルと、通常のアキシヘモグロビンのその等吸収点)を利用している。

こうして測定されたヘモグロビンの4次構造変化の速度は、非常に速かった。Sawicki と Gibson は観測結果を2状態モデル的に解析した。アキシ型構造を持つデオキシヘモグロビンが素早く通常のアキシヘモグロビンへと構造変化する速度を見積もった。20℃、pH9.2 条件で、その構造変化は単指数関数的に起こり、速度は 6400S^{-1} としている。この速度は、いったん光解離した CO がヘモグロビンに再結合する速度と競争するような速さである。CO が再結合する前に通常のアキシヘモグロビンになったものには、通常の遅い速度で CO が結合する。CO が再結合するまでに通常のアキシヘモグロビンにならなかったものには、速い速度で CO が結合する。こうして光解離によるヘモグロビンの CO 再結合反応 (436nm で測定される) は2相を呈する (図 3-1B)。

Sawicki と Gibson はこの実験の中でリガンド結合中間段階ヘモグロビンの構造変化速度にも触れている。彼らはレーザーの強度を弱くして、ヘモグロビンに結合している CO を少ししか光解離させない場合、その構造変化の速度は遅くなることを見いだした。ヘモグロビンの4次構造変化の速度は、ヘモグロビ

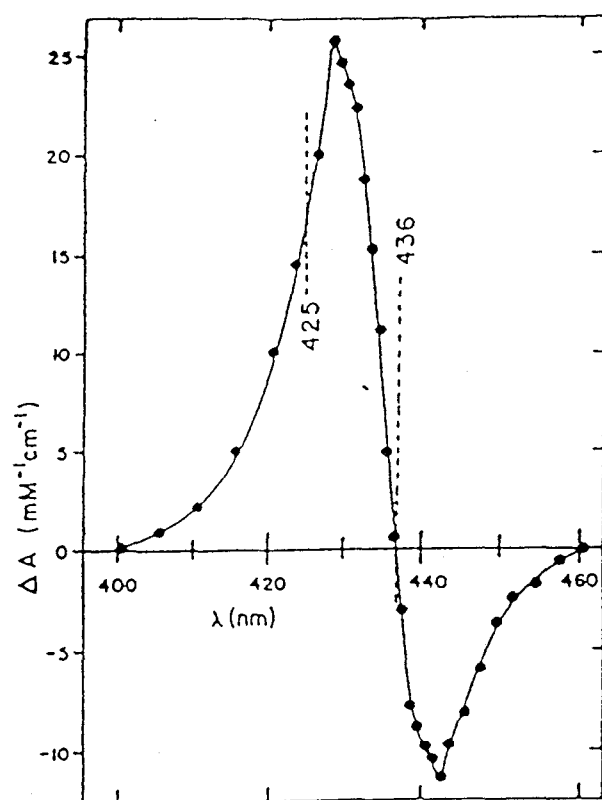


図 3-1 ヘモグロビンの 4 次構造変化に伴う吸光スペクトル変化(Sawicki & Gibson, 1976)

条件：0.05M sodium borate buffer, pH9.2, 20℃

(A) オキシヘモグロビンの 4 次構造を保ったデオキシヘモグロビンと、通常のデオキシヘモグロビンの吸光スペクトル差スペクトル (Soret band 付近)

黒実線は、実験で測定された点をつないだだけのもの。ヘモグロビン濃度：50μM

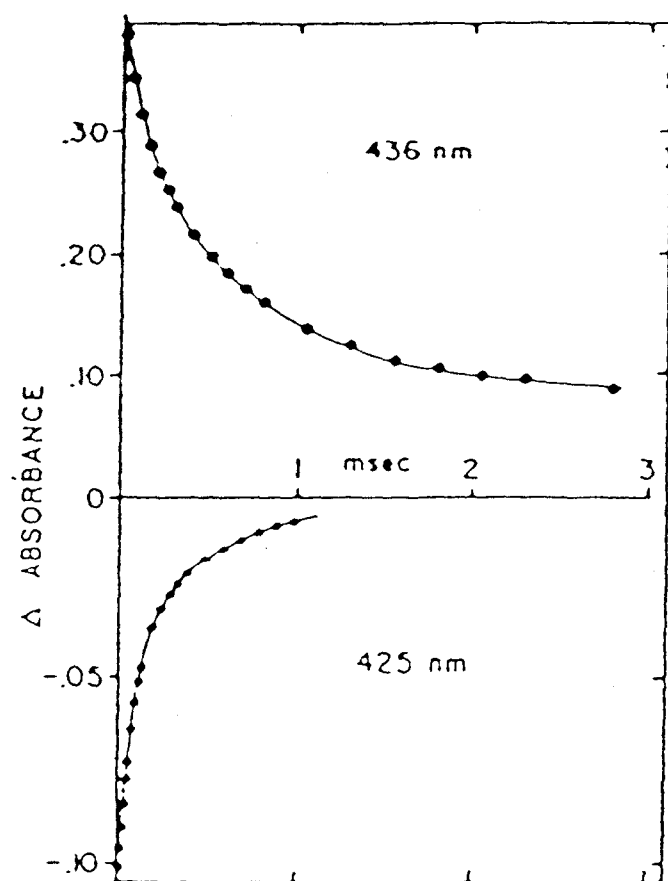


図3-1 (B) 条件：0.05M borate buffer pH9.2, 20℃, ヘモグロビン濃度：59 μ M,
CO 濃度：total 250 μ M

(上図) CO 結合型ヘモグロビンの CO を光解離させて、CO がヘモグロビンに再結合しているところを 436nm の吸光度の変化を利用して測定している。436nm は、オキシヘモグロビンの 4 次構造を保ったデオキシヘモグロビンと、通常のデオキシヘモグロビンの吸光スペクトルの等吸収点なので、ヘモグロビンの 4 次構造変化に伴う吸光度変化が無い。だから、純粋に「ヘモグロビンの CO 結合反応」だけを測定できる。

(下図) CO 結合型ヘモグロビンの CO を光解離させると、425nm ではヘモグロビンの 4 次構造変化を測定できる。425nm は、通常の CO 結合型ヘモグロビンと、通常のデオキシヘモグロビンの吸光スペクトルの等吸収点である。下図に現れているのは、オキシヘモグロビンの構造を保ったデオキシヘモグロビンが、光解離によって出現し、それがなくなっていく様子。(なくなり方：CO が再結合してしまう、もしくは、通常のデオキシヘモグロビンへと 4 次構造変化する)

ンに結合しているリガンドの数に依存するのである。やはり彼らは2状態モデル的に結果を解析し、リガンドが1個結合している毎に構造変化の速度は約2.4倍遅くなる、という大まかな仮定で実験結果の反応曲線をフィットできたとしている。ということは、2個COが結合したオキシ型構造を持つ中間段階ヘモグロ빈は、約 1000S^{-1} の速度でデオキシ型構造へと変化していたことになる。構造変化の速度は溶液のpHにも依存するので、中性pHではさらに速度が速いらしい($>10^4\text{S}^{-1}$?)。これらの速度は、Stopped-Flow装置で見積もられたヘモグロ빈の構造変化速度よりはるかに(千倍から一万倍)速い。

また、SawickiとGibsonは同様の実験を酸素の結合したヘモグロ빈を使って行っている(1977a)。やはりこの実験でも、レーザーによってオキシヘモグロ빈から酸素が解離した直後はその4次構造を保ったデオキシヘモグロ빈が現れ、それが通常のデオキシヘモグロ빈へと4次構造変化するところが観測されている。ただし、酸素がヘモグロ빈に再結合する速度はCOに比べて5~10倍速いので、酸素濃度が高く、溶液のpHが高い条件ではヘモグロ빈が構造変化する前に酸素がすぐ再結合してしまう。構造変化が観測されるのは見かけの酸素結合速度が遅くなる酸素濃度が薄い条件である。その条件では酸素が再結合する速度とヘモグロ빈の構造変化の速度が競争するので、酸素再結合反応曲線は2相を呈する。オキシ型構造デオキシヘモグロ빈が通常のデオキシヘモグロ빈へと4次構造変化する速度は 20°C 、pH9.0条件で 6400S^{-1} 、pH7.0条件では 7900S^{-1} 。酸素がヘモグロ빈に1個結合している毎にその速度は約10倍遅くなるという仮定をすると実験結果をうまくフィットできるそうなので、2個酸素が結合したオキシ型構造を持つ中間段階ヘモグロ빈が、デオキシ型構造へと4次構造変化する速度は、pH7.0条件でおおよそ 80S^{-1} ということになる。この速度もStopped-Flow装置で見積もられたヘモグロ빈の構造変化速度よりずいぶん速い。SawickiとGibsonがこれらの実験をしてから光解離法によるヘモグロ빈の4次構造変化速度がいくつか報告されているが、いずれの結果もSawickiとGibsonが報告した“速い4次構造変化速度”を支持するものだった(Zhang et al., 1990; Ferrone et al., 1985; Cho & Hopfield, 1991)。

実験方法によって全く異なる構造変化の速度が観察されるとはどういうことか。Philoらはそこが気になってValency混成ヘモグロ빈の4次構造変化速度を測定している(Philo et al., 1996)。考え方は本章のものとよく似ている。Valency混成ヘモグロ빈のメトヘムのリガンドをいろいろ換えると、Fe(II)サブユニットのリガンド親和性が変わる。彼らはそれを利用して、様々なリガンド親和性状態にあるヘモグロ빈を用意して、それらのCO光解離・再結合実

験をした*。それによると、リガンド結合中間段階と見なせるヘモグロビン (CO が解離した混成ヘモグロビン) は、かなり速い速度 ($19000\sim 50S^{-1}$) でリガンド親和性の高い構造と低い構造の間を行き来している。しかし、シアノメト混成ヘモグロビンだけには、その速い4次構造変化を示すヘモグロビン成分以外に、いったんリガンド親和性の低い状態になったらそのまま止まっているヘモグロビン成分もあった、と報告している。Philoらはそれを「T locked state」と呼び、過去に stopped-flow 法で観測された「遅い4次構造変化速度」は、このヘモグロビン成分の4次構造変化速度のことではないか? としている。しかし、その「T locked state」の正体がはっきりしているわけではないし、存在するという証拠が充分にあるわけでもない。

このように、リガンド結合中間段階ヘモグロビンの構造変化の速度には諸説あり、今でも混乱している。どんな実験条件で、どのくらいの速さの4次構造変化速度が現れるか。平衡状態にあるリガンド結合中間段階ヘモグロビン (モデルヘモグロビンや CO が2個結合したヘモグロビンなど) を使った場合はゆっくりした4次構造変化が、レーザーフォトリシスなどでいきなり平衡をずらして調べた場合は速い構造変化が観測されるという特徴くらいしかはっきりしていない。

リガンド結合速度とヘモグロビンの構造変化が競争するような条件では、ヘモグロビンの構造変化の速度が見かけの反応曲線に影響を与えることがある (上述の CO や O_2 結合型ヘモグロビンのレーザーフォトリシスの例)。速度論的実験をする時には、現れる反応曲線が一体何に由来するものなのかその都度考えねばならない。

* $\alpha_2(Fe^{3+}L)\beta_2(Fe^{2+})$ と、 $\alpha_2(Fe^{2+})\beta_2(Fe^{3+}L)$ が使われている。L(リガンド) = CN^- の場合は、 Fe^{2+} サブユニットの酸素親和性は非常に高い。同様に、 $L = N_3^-$: 親和性高; $L = H_2O$: 親和性中間的; $L = OH^-$: 親和性中間的。ただし、Valency 混成ヘモグロビンでカバーできる酸素親和性の範囲は、オキシヘモグロビン並のとても高い状態から中間的な状態までで、デオキシヘモグロビン並の低い酸素親和性を示すヘモグロビンは用意できない。

序論 その3 リガンド結合速度・解離速度の測定方法と解析方法の理論

記号についての約束

これからヘモグロビンのリガンド結合速度定数や解離速度定数を記号で示すことが多い。記号は Olson ら(1994)の書き方と同じものを使う。

リガンド結合速度定数を示すには、アルファベットの小文字 k にダッシュをつけたもの「 k' 」を使う。ほとんどの場合、単位は ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$) である。リガンド解離速度定数を示すには、アルファベットの小文字「 k 」をそのまま使う。ほとんどの場合、単位は (s^{-1}) ある。そして、各記号の右下に適宜 CO とか O₂ とか、何のリガンドの結合（解離）速度定数を示しているかを書き添える。

そして、ヘモグロビンのリガンド結合の平衡定数はアルファベットの大文字「 K 」で書き示す。やはり適宜記号の右下にリガンドを書き示す。この平衡定数は結合定数とする。だから、

$$\frac{k'_{\text{co}}}{k_{\text{co}}} = K_{\text{co}}, \text{そして} \quad \frac{k'_{\text{o}_2}}{k_{\text{o}_2}} = K_{\text{o}_2} \quad \text{--- eq.3-0 A, B}$$

が成り立つ。

また、一酸化炭素や酸素、ヘモグロビンの濃度を記号で示すときは、[CO]、[O₂]、[Hb]、などと示す。

Stopped-flow 法によるヘモグロビンの一酸化炭素 (CO) 結合速度の測定について

Stopped-flow 法を使った最も単純に見える実験は、デオキシヘモグロビン溶液と一酸化炭素 (CO) 溶液とを嫌気条件下で混ぜて、吸光度の時間変化を測定してどのくらいの速さで一酸化炭素がヘモグロビンに結合するかを見るものである。436nm の吸光度の変化が測定される。序論その2で述べたが、436nm とはヘモグロビンの4次構造変化にともなう吸光度変化が無い波長だからだ。ヘモグロビンの CO 結合にともなう吸光度変化だけを測定できる。

デオキシヘモグロビンと CO が結合するところを考えてみよう。CO 濃度がヘモグロビンの濃度に比べて過剰で、CO の濃度は不変（定数）と見なせる時、この結合反応は擬一次反応(pseudo-first-order reaction)と言える。



CO の結合速度定数を k'_{co} 、解離速度定数を k_{co} とすると、CO 結合型ヘモグロ

ビンの濃度 ([HbCO]) が増える速度は、デオキシヘモグロビンの濃度 ([Hb]) と CO の濃度 ([CO]) を使ってこのように書ける。

$$\frac{d[\text{HbCO}]}{dt} = k'_{\text{co}}[\text{Hb}][\text{CO}] - k_{\text{co}}[\text{HbCO}] \quad \text{---eq.3-2}$$

初期条件 (時間 $t = 0$ の時、ヘモグロビンはデオキシヘモグロビンばかりで、CO 結合型ヘモグロビンは全く無い) をふまえてこの微分方程式を解くと、CO 結合型ヘモグロビンの濃度の時間変化はこうになる。

$$[\text{HbCO}] = C \{1 - \exp(-[k'_{\text{co}}[\text{CO}] + k_{\text{co}}] t)\} \quad \text{--- eq.3-3}$$

C は全ヘモグロビン濃度である。ヘモグロビンから CO がはずれる速度は、結合速度に比べて極端に遅いことが分かっている (Olson, 1981a) ので、 k_{co} は無視することができる。

$$[\text{HbCO}] = C \{1 - \exp(-k'_{\text{co}}[\text{CO}] t)\} \quad \text{--- eq.3-4}$$

$$\text{また、} [\text{Hb}] = C \exp(-k'_{\text{co}}[\text{CO}] t) \quad \text{--- eq. 3-5}$$

実際に観測されるのは、ヘモグロビン溶液の 436nm の吸光度がデオキシヘモグロビンの減少にともなって減っていくところである。

$$\Delta \text{Abs}(t) = \Delta \text{Abs}(\text{total}) \exp(-k'_{\text{co}}[\text{CO}] t) \quad \text{--- eq.3-6}$$

$\Delta \text{Abs}(t)$ は時間 t の時の吸光度変化、 $\Delta \text{Abs}(\text{total})$ は全体の吸光度変化である。見かけの速度定数 k_{apparent} はこう書ける。

$$k_{\text{apparent}} = k'_{\text{co}}[\text{CO}] \quad \text{---eq.3-7}$$

さて、実際にデオキシヘモグロビン溶液と CO 溶液を混ぜて起こる反応は、デオキシヘモグロビンに CO が 4 個結合する反応である。1 個目の結合速度が最も遅く全体の反応の律速段階となっていて、ここの速度が見かけの反応曲線の形をだいたい決めている (Olson, 1981a)。 α サブユニットと β サブユニットとで CO の結合速度が少し違うはずであるが、 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットと $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの間で結合速度も吸光スペクトルも違いが小さい。 α と β のどちらにリ

ガンドが結合したかはっきりした目印がない。

だから、 $\alpha(\text{Fe})$ と $\beta(\text{Fe})$ の機能をはっきり区別できる Valency 混成ヘモグロビンや金属置換混成ヘモグロビンがリガンド結合速度や解離速度を測定するためによく使われている(Cassoly & Gibson, 1972; Hoffman et al., 1975; Ikeda-Saito & Yonetani, 1980; Blough & Hoffman, 1982, 1984; Shibayama et al., 1995b; Philo et al., 1996)。

最近ではヘモグロビン中の $\alpha(\text{Fe})$ サブユニット、もしくは $\beta(\text{Fe})$ サブユニットのヘムポケット内の遠位側のアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に変えた人工異常ヘモグロビンが、 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットと $\beta(\text{Fe})$ サブユニットのリガンド結合・解離速度の違いを調べるために使われている(Mathews et al., 1989, 1991)。異常サブユニットのリガンド結合の性質は、アミノ酸残基の交換で正常サブユニットの性質と変わってしまうと期待できるので、正常サブユニットと異常サブユニットからできているヘモグロビンを使えばそれぞれの速度定数を区別することができる。デオキシ化された正常鎖-異常鎖混成ヘモグロビンのCO結合速度が測定され、デオキシヘモグロビン中では、正常 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットのCO結合速度の方が、正常 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットのそれよりも速いと結論づけられている(Mathews et al., 1991)。この結果はValency混成ヘモグロビンや、金属置換混成ヘモグロビンを使って出された結論とは一致していない。IHPがある条件では、メトシアン混成ヘモグロビンや Mn(II)PPIX 、 Co(II)PPIX を使った金属置換混成ヘモグロビンの中では $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットのCO結合速度の方が $\beta(\text{Fe})$ のものよりも速いという結果が出ている(Cassoly & Gibson, 1972; Hoffman et al., 1975; Ikeda-Saito & Yonetani, 1980; Blough & Hoffman, 1982, 1984; 表3-3参照)。

Stopped-flow 法によるヘモグロビンの一酸化炭素 (CO) 解離速度の測定について

COで飽和しているヘモグロビンのCOの解離速度は、一酸化窒素(NO)との置き換えをすることによって測定することができる。ヘモグロビンのNOに対する親和性がCOに対する親和性に比べて高いことを利用している。この実験はStopped-flow装置で行う(図3-2)。Stopped-flowの片方のシリンジにCO型ヘモグロビン溶液を、もう片方のシリンジにNOを含む緩衝液をいれて、両者を嫌氣的条件下で高速混合する。置き換わる速度はやはり吸光度の時間変化を測定することによって調べられる。CO-NO置き換え反応はこのように書ける(次ページ)。

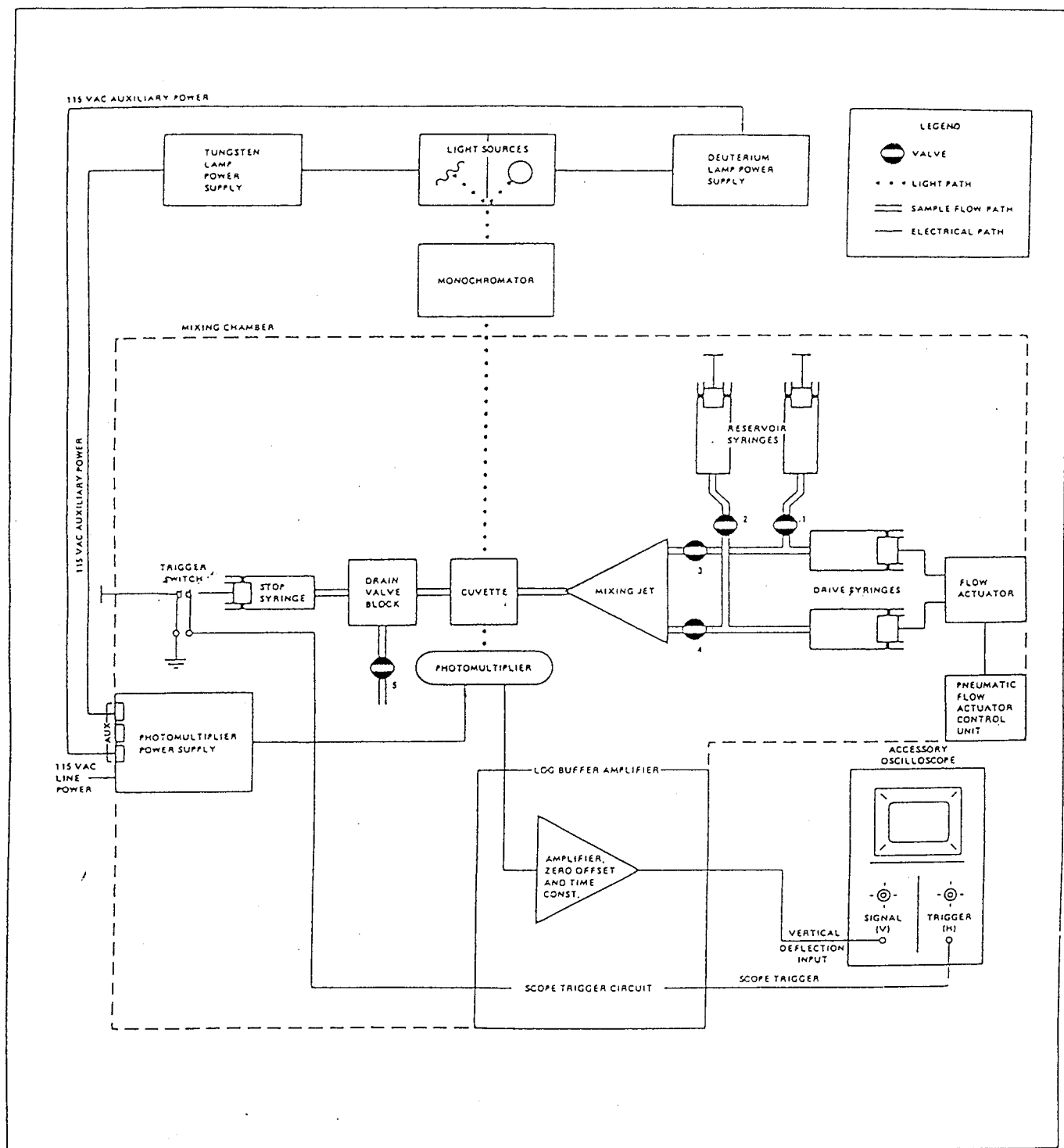
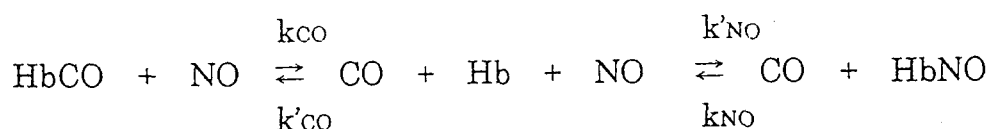


図 3-2 Stopped-Flow 装置の模式図



---eq.3-8

k'_{co} 、 k'_{no} をそれぞれ CO と NO の結合速度定数、 k_{co} 、 k_{no} をそれぞれ CO と NO の解離速度定数とする。CO の濃度も NO の濃度もヘモグロビンに比べて十分に高く一定で、デオキシヘモグロビンの濃度は十分に低い場合、いくつか微分方程式が成り立つ。

$$\frac{d[\text{HbCO}]}{dt} = -k_{\text{co}}[\text{HbCO}] + k'_{\text{co}}[\text{Hb}][\text{CO}] \quad \text{---eq.3-9}$$

$$\frac{d[\text{HbNO}]}{dt} = -k_{\text{no}}[\text{HbNO}] + k'_{\text{no}}[\text{Hb}][\text{NO}] \quad \text{---eq.3-10}$$

$$[\text{HbCO}] + [\text{Hb}] + [\text{HbNO}] = C \quad \text{--- eq.3-11}$$

Cは全てのヘモグロビン濃度を示し、一定である。また、ヘモグロビンから CO がはずれたらすかさず NO が結合すると考える。つまり、定常状態が成り立つとする。それを式で表すと、

$$\frac{d[\text{Hb}]}{dt} = 0 \quad \text{---eq.3-12}$$

これらの式から CO 結合型ヘモグロビンの濃度の時間変化（または NO 結合型ヘモグロビンの濃度の時間変化）を導き出すことができる。反応は 1 次反応、つまり 1 つの指数関数 ($\exp(kt)$) で表すことができ、見かけの速度定数 k_{apparent} はこうなる。

$$k_{\text{apparent}} = \frac{k_{\text{co}} k'_{\text{no}} [\text{NO}] + k_{\text{no}} k'_{\text{co}} [\text{CO}] + k_{\text{co}} k_{\text{no}}}{k'_{\text{co}} [\text{CO}] + k'_{\text{no}} [\text{NO}] + k_{\text{no}}} \quad \text{---eq.3-13}$$

NO の解離速度は CO の解離速度よりかなり遅い ($k_{NO} \ll k_{CO}$, Olson, 1981a) ので、式 3-13 中で k_{NO} が関係している項は無視することができる。

$$k_{\text{apparent}} = \frac{k_{CO} k'_{NO} [NO]}{k'_{CO}[CO] + k'_{NO} [NO]} \quad \text{---eq.3-14}$$

さらに、NO の結合速度は CO の結合速度よりかなり速い ($k'_{NO} \gg k'_{CO}$, Olson, 1981a)。だから、 $k'_{CO}[CO]$ の項も無視できる。結局、CO-NO 置き換え実験で観測される反応の見かけの速度定数は、

$$k_{\text{apparent}} = k_{CO} \quad \text{---eq.3-15}$$

つまり、CO の解離速度がそのまま見えるのである。測定はやはり吸光度の変化を見ることによって行うが、NO 結合型ヘモグロ빈は溶液に IHP を加えるとヘモグロ빈の 4 次構造が変化してしまい、吸光スペクトルまで変わってしまうことが知られている。その影響がない波長、つまり NOHb の IHP によるスペクトル変化の等吸収点である 405.7nm が測定に使われる (Salhany et al., 1975)。CO-NO 置き換えによる測定方法は、Mn(III)-Fe(II) 混成ヘモグロ빈や (Blough & Hoffman, 1984)、単離されたヘモグロ빈の α サブユニットや β サブユニットの CO 解離速度の測定に使われている (Olson, 1981a)。また、CO 結合速度の測定と同様に、正常鎖-異常鎖混成ヘモグロ빈の CO 解離速度を測定して、CO 型ヘモグロ빈から最初にはずれる CO の解離速度を α 、 β サブユニットについてそれぞれ決定した実験も報告されている (Mathews et al., 1989)。

レーザーフォトリシス (光解離) 法によるヘモグロ빈の酸素 (O_2) 結合速度の測定について

ヘモグロ빈に結合した酸素 (O_2) を光解離させ、その再結合過程を吸光度の時間変化から調べる実験について、Sawicki と Morris がまとめている (1981)。今対象にしているのは、ヘモグロ빈に結合していたリガンドが光によってヘモグロ빈分子の中から完全に外に出て、改めてリガンドがヘモグロ빈に結合する速度である。光解離した後、リガンドがヘムポケットから出て行かずに高速でヘムに再結合する現象 (Geminate recombination, Martin & Vos, 1994) は対象外である。

リガンドの再結合過程を調べるには、光解離用のレーザー強度と光吸収観測の時間分解能が大事である。酸素はヘモグロ빈のリガンドの中で結合・解離

速度とともに最も速いもののひとつなので高い時間分解能が要求される。昔から一酸化炭素の光解離には写真撮影用のフラッシュランプなどが使われていたが、これには光をパルス的にサンプルにあてようとしても、光が切れる時に光の強度がだらだらと減衰してしまう欠点があるので酸素の再結合測定には使えない。また、酸素の量子収量*は一酸化炭素より10倍も低いので(Saffran & Gibson, 1977)、酸素を解離させるには強力な光が必要である。

酸素の光解離・再結合の実験には色素レーザー光がよく使われる。この光はフラッシュランプと違って、カットオフが1 μ 秒以内に終わるのできちんとしたパルス光を作ることができる；大容量のエネルギーをサンプルに与えることができる；染色液を選ぶことで光解離に使うフラッシュ光の波長を選ぶことができ、吸光度測定用の波長を避けることができる、などの長所がある(Sawicki & Morris, 1981)。

普通のヘモグロビンを使う実験で酸素を解離させるのに強力なレーザー光をあててたくさんの酸素を解離させると、デオキシヘモグロビンや他の中間段階分子種が多数現れ、ヘモグロビンの構造変化まで起こるので(Sawicki & Gibson, 1977a)、実験結果の解析・解釈が非常に難しくなる。だから、レーザーの強さをフィルター等を使って弱くして、ヘモグロビンに結合している酸素のごく一部分を光解離させ、ヘモグロビンの4段階目の酸素結合速度を調べている報告が多く見られる。この実験は部分光解離実験(Partial photolysis)と呼ばれる(Sawicki & Gibson, 1977a; Mathews et al., 1989; Philo & Lary, 1990;

* 量子収量：Quantum yield. 量子収率、量子効率などとも呼ばれる。光によってある現象が起こる場合、現象の起こった回数の、吸収された光子の数に対する比をいう。ここでは、光子1個につき何個の酸素（または一酸化炭素）がヘモグロビンから光解離されるか、を示す数字である。リガンド親和性が高いヘモグロビンやミオグロビンの量子収量が小さいのは、光によってリガンドがヘムから離れても、ヘムポケットからリガンドが飛び出す前にヘムに再結合してしまうからだとされている(Saffran & Gibson, 1977)。

参考：ヘモグロビン・ミオグロビンの量子収量 (pH7.0, 20℃)

(Saffran & Gibson, 1977; Sawicki & Gibson, 1978; J.S.Olson, personal communication)

	酸素分子	一酸化炭素分子
オキシ型構造ヘモグロビン	0.03 ~ 0.05	~0.5
デオキシ型構造ヘモグロビン	0.5 ~ 1.0	1.0
ミオグロビン	~0.15	0.95

Vandegriff et al., 1991; Fronticelli et al., 1993; Mathews & Olson, 1994)。ヘモグロビンの酸素親和性が高い状態なら、見かけの酸素の結合速度は非常に速く ($5 \sim 10 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$, in the presence of $1260 \mu\text{M O}_2$)、ヘモグロビンの構造変化よりも速いので、その影響はほとんどない(Sawicki & Gibson, 1977a)。

他方、酸素親和性が低い状態のヘモグロビンの酸素結合速度、解離速度の報告例は非常に少ない。Sawicki と Gibson が低酸素濃度条件下でのヘモグロビンの酸素再結合をフラッシュフォトリシスを使って測定した報告(1977b)と、Shibayama らの Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使った報告(1995b)くらいしかない。報告例が少ないのは実験結果の解析が難しいからだと考えられる。この難しさについては後ほど述べる。

ヘモグロビンに酸素 (O_2) が再結合する反応を式にしてみよう。複雑さを避けるため、ヘモグロビンの構造変化は今は考えない。反応式は一酸化炭素がヘモグロビンに結合する反応を式にしたときとほぼ同様である。 O_2 がヘモグロビンの濃度に比べて過剰にあり、 O_2 の濃度は不変(定数)と見なせる時、この結合反応は擬一次反応(pseudo-first-order reaction)と言える。



O_2 の結合速度定数を k'_{O_2} 、解離速度定数を k_{O_2} とすると、 O_2 結合型ヘモグロビンの濃度 ($[\text{HbO}_2]$) が増える速度は、デオキシヘモグロビンの濃度 ($[\text{Hb}]$) と O_2 の濃度 ($[\text{O}_2]$) を使ってこのように書ける。

$$\frac{d[\text{HbO}_2]}{dt} = k'_{\text{O}_2}[\text{Hb}][\text{O}_2] - k_{\text{O}_2}[\text{HbO}_2] \quad \text{--- eq.3-17}$$

酸素の反応の場合、解離速度が無視できるほど遅くないので(Olson, 1981a)、一酸化炭素のように式を簡単にはできない。結局、観測される吸光度の時間変化はこのように書ける。

$$\Delta \text{Abs}(t) = \Delta \text{Abs}(\text{total}) \exp\{- (k'_{\text{O}_2}[\text{O}_2] + k_{\text{O}_2}) t\} \quad \text{---eq.3-18}$$

$\Delta \text{Abs}(t)$ は時間 t の時の吸光度変化、 $\Delta \text{Abs}(\text{total})$ は全体の吸光度変化である。酸素再結合の実験で観測される見かけの反応速度定数はこう書ける。

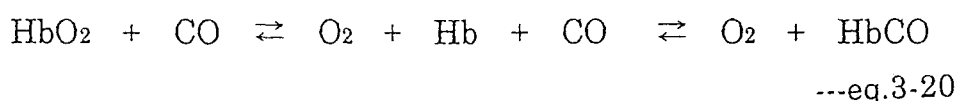
$$k_{\text{apparent}} = k'_{\text{O}_2}[\text{O}_2] + k_{\text{O}_2} \quad \text{---eq.3-19}$$

だから、ヘモグロビンの酸素結合速度や解離速度を求めるには、酸素再結合実験をいくつかの酸素分圧下で行って、得られた見かけの反応速度 k_{apparent} を酸素濃度の関数としてグラフにプロットする。そのプロットに最もよく合う直線を引く。その直線の傾きと、 $[\text{O}_2] = 0$ 線との交点（縦軸切片）がそれぞれ k'_{O_2} と k_{O_2} に対応する。

しかし、この式は酸素濃度がヘモグロビンの濃度に比べて過剰に高いときのみに通ずる近似式である。溶液中の酸素濃度がヘモグロビンのヘムの濃度と似た程度の時、光解離によってヘモグロビンから酸素が放出され、溶液中の酸素濃度が増えることになる。そしてヘモグロビンが酸素を再結合するにしたがって溶液中の酸素濃度が減っていく、という複雑なことが起こる。酸素濃度が低ければ低いほど、見かけ上酸素結合が遅いので、反応速度が時間と共に変わるのである。だから酸素濃度が低いときの実験結果の解析には別の方法が必要で、一般的には数値積分法(Numerical integration techniques; Olson, 1981b)というものが使われる。ヘモグロビンの酸素再結合実験の結果から解離速度定数を求めたい時、つまりデータをグラフにプロットして得られる直線の Y 切片をきちんと求めたい時には低酸素濃度条件の実験データが必要になり、データの解析に数値積分法が使われる。過去に報告されている低酸素濃度でのヘモグロビンの酸素再結合実験には、Sawicki と Gibson の低酸素飽和状態のヘモグロビンの酸素光解離実験(1977b)や、Shibayama らの Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素光解離実験(1995b)がある。これらの実験は酸素親和性が低い状態のヘモグロビンの酸素の結合速度や解離速度を求めるために行われていて、特に低い酸素分圧下条件での酸素結合にともなう吸光度の時間変化の解析に数値積分法が使われている(Shibayama, personal communications)。Sawicki と Gibson の実験(1977b)では、酸素飽和度が 0 ～ 20% のヘモグロビンの酸素光解離実験を行っている。再結合する酸素のほとんどはデオキシヘモグロビンに結合するが、観測された再結合にともなう吸光度の時間変化は、結合速度・解離速度ともに 1 成分の吸光度時間変化では説明できなかった。彼らは、観測された吸光度の時間変化を 2 成分で説明している。それらはほぼ同じ吸光度変化幅を持ち、異なる速度を持っている、としている。そして結合・解離、ともに速い成分を $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの酸素結合および解離に、遅い成分を $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットのそれと結論している。Shibayama らもほぼ同じ実験をしており(1995b)、いわゆる T-状態ヘモグロビンの中では $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの方が $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットより速い酸素結合速度を示した、という結果を報告している。この定性的な点では Sawicki と Gibson の実験結果と一致する。

Stopped-flow 法によるヘモグロビンの酸素 (O₂) 解離速度の測定について

ヘモグロビンの一酸化炭素解離速度は、一酸化炭素を一酸化窒素で置き換えることによって測定したが、これと同様に酸素の解離速度は、酸素で飽和しているヘモグロビンの酸素を一酸化炭素で置き換えることによって測定することができる。 Stopped-flow の片方のシリンジに O₂ 型ヘモグロビン溶液を、もう片方のシリンジに CO を含む緩衝液を入れて、両者を高速混合する。置き換わる速度はやはり吸光度の時間変化を測定することによって調べられる。 O₂-CO 置き換え反応はこのように書ける。



k'_{O₂}、k'_{CO}をそれぞれ O₂ と CO の結合速度定数、k_{O₂}、k_{CO}をそれぞれ O₂ と CO の解離速度定数とする。 O₂ の濃度も CO の濃度もヘモグロビンに比べて十分に高く一定で、デオキシヘモグロビンの濃度は十分に低い場合、つまり定常状態が成り立っている場合、いくつか微分方程式が成り立ち、CO-NO 置き換え実験と同じように微分方程式は解ける。見かけの反応は 1 つの指数関数で表すことができ、見かけの速度定数 k_{apparent} はこうなる。

$$k_{\text{apparent}} = \frac{k_{\text{O}_2} k'_{\text{CO}} [\text{CO}] + k_{\text{CO}} k'_{\text{O}_2} [\text{O}_2] + k_{\text{O}_2} k_{\text{CO}}}{k'_{\text{O}_2} [\text{O}_2] + k'_{\text{CO}} [\text{CO}] + k_{\text{CO}}}$$

---eq.3-21

CO の解離速度は O₂ の解離速度よりかなり遅い (k_{CO} ≪ k_{O₂}, Mathews & Olson, 1994) ので、式 3-20 中で k_{CO} が関係している項は無視することができる。

$$k_{\text{apparent}} = \frac{k_{\text{O}_2} k'_{\text{CO}} [\text{CO}]}{k'_{\text{O}_2} [\text{O}_2] + k'_{\text{CO}} [\text{CO}]}$$

---eq.3-22

簡単にできるのはここまで。実際の O₂-CO 置き換え実験はいろいろな酸素濃度条件で行い、いくつか k_{apparent} を集める。式 3-21 を変形させる。

$$\frac{1}{k_{\text{apparent}}} = \frac{1}{k_{\text{O}_2}} + \frac{k'_{\text{O}_2} [\text{O}_2]}{k_{\text{O}_2} k'_{\text{CO}} [\text{CO}]}$$

---eq.3-23

縦軸に $(1/k_{\text{apparent}})$ 、横軸に $([\text{O}_2]/[\text{CO}])$ をとったグラフを作り、データをプロットする。そうして得られた直線は、傾きが $(k'_{\text{O}_2}/k_{\text{O}_2}k'_{\text{CO}})$ 、切片が $(1/k_{\text{O}_2})$ である。つまり、直線の縦軸切片の逆数がヘモグロビンの酸素解離速度を示す。この方法でオキシヘモグロビンから1個目にはずれる酸素の解離速度を詳しく調べた実験が報告されている(Olson, et al., 1971)。 α 、 β サブユニットのわずかな吸光スペクトルの違いを利用して、ヘモグロビンの中での α 、 β サブユニットの酸素解離速度の違いを指摘している。酸素結合型4量体ヘモグロビンから最初にはずれる酸素の解離速度を、 α サブユニットと β サブユニットそれぞれ区別して測定するために、異常鎖-正常鎖混成ヘモグロビンの酸素解離速度を測定した実験も報告されている(Mathews et al., 1989)。いずれの実験でも、4量体ヘモグロビン中の β サブユニットの酸素解離速度の方が α サブユニットのものより速いという結果が出ている。一方、単離された α 、 β 鎖の酸素解離速度は逆の結果が報告されている(Olson, 1987)。単離されたものでは α 鎖の酸素解離速度が β 鎖よりも速い。

各測定方法でのヘモグロビンの初期状態について

上の段落で4種類の測定方法を述べた。ヘモグロビンに、もしくはヘモグロビンから (1) CO 分子が結合する速度の測定、(2) CO 分子が解離する速度の測定、(3) O₂ 分子が結合する速度の測定、(4) O₂ 分子が解離する速度の測定、の4つである。ミオグロビンなどの性質が変わらない蛋白質を調べる場合は、これらの測定をする分には問題はほとんどない。しかし、ヘモグロビンの性質を調べる場合には注意が必要である。ヘモグロビンはリガンドが結合しているかしていないかでその性質が変わってしまう。つまり、測定する時の初期状態でリガンドが結合していれば、そのヘモグロビンの平衡状態はリガンド親和性が高いものが多い方向に片寄っているし、リガンドが結合していなければ親和性の低いものが多い方向に片寄っている。

今回は金属置換混成ヘモグロビンを使っているから、ヘモグロビンの状態の変化にはある程度制限がある。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線を見れば、酸素が結合していない状態でも酸素親和性がかなり高いことがわかる(本論文第2章)。逆に、Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンや Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは酸素が結合していても酸素親和性は低い(それぞれの酸素平衡曲線より)。もちろんヘモグロビンの状態は溶液条件に依存するから、あらゆる条件でこれらが成立するわけではない。しかし、その制限の範囲内でもリガンドが結合しているかしていないかの初期状態は、見かけのリガンド結合・解離速度に影響を与えるだろう。

ヘモグロビンに CO 分子が結合する速度の測定では、ヘモグロビンの初期状態はデオキシ状態である。だからヘモグロビンの平衡状態は、リガンド親和性が低いものが多い方向に片寄っている。Ni(II)-、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンへの CO 結合反応は、ほぼ通常のデオキシヘモグロビンへの CO 結合反応と同じだろう。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンへの CO 結合反応は、リガンドが2こだけ結合している中間段階ヘモグロビンへの CO 結合反応に相当する。

CO 解離速度と O₂ 解離速度はリガンド置き換え法を利用して測定するわけだが、この方法はヘモグロビンに常にリガンドが結合しているので、ヘモグロビンの平衡状態はリガンド親和性が高いものが多い方向に片寄っている。だから、4つのリガンドが結合しているヘモグロビン（もしくはそれに相当する混成ヘモグロビン）から最初のリガンドがはずれる速度を調べたい場合には最適なのだが、Ni(II)-、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使ってリガンド親和性の低い状態のヘモグロビン調べる場合は注意が必要である。初期状態でこれらのヘモグロビンの状態はリガンド親和性が高いものが多い方向へ片寄っていると考えられる。リガンド親和性の低いヘモグロビンを安定化させるには、溶液条件を変えて平衡をそちらに移動させなければならない。

O₂ 結合速度はレーザーフォトリシスを使って測定される。ということは、初期状態はヘモグロビンに酸素が結合している。だからヘモグロビンの平衡はリガンド親和性が高いものが多い方向に片寄っている。光によって酸素がはずれた直後はこの初期状態がほぼ保たれているはずだ。その後、ヘモグロビンの4次構造変化が起こって平衡は酸素親和性が低いものが多い方向へ少しずれるだろう。どのくらいずれるかはヘモグロビンの4次構造変化速度に依存する。酸素が再結合する速度が圧倒的に速ければ、ヘモグロビンの4次構造変化が起こるひまはない。ヘモグロビンの初期平衡状態がそのまま観察される。酸素が再結合する速度とヘモグロビンの4次構造変化速度が張り合うようならば、光がサンプルに当たった直後からしばらくすると、初期平衡状態から酸素親和性が低いものが多い方向へ平衡がずれた状態が観察されるだろう。

(3)実験方法

金属置換混成ヘモグロビンの調整

混成ヘモグロビンの調整は金属ポルフィリンの調整以外は原則的に 4℃条件で、Cr(III)PPIX、Mg(II)PPIX を用いる調整は暗い所で行う。

Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの調整は、第2章で述べた通り。

Mn(III)PPIX は Masuda(1993)らの方法に従って調整した。Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの調整方法は Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンと使う金属ポルフィリンが違っただけで手順は全く同じである。

Ni(II)PPIX は Shibayama(1986a)らの方法に従って調整した。Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを調整するには、まずアポ α 鎖、もしくは β 鎖を調整する。アポ α (β) 鎖溶液に、アポの 1.2 倍量のモル数の Ni(II)PPIX を少量の DMF に溶かして加える。約 2 時間、温度 0℃でゆっくり攪拌した後、サンプルを濃縮して、20mM Borate/NaOH, pH10.5 緩衝液と平衡をとった SephadexG25 カラムに通して過剰に加えた Ni(II)PPIX を除く。こうして調整した Ni(II)サブユニットに対になる単離鎖溶液を CO 結合型で加える。この時は CO 雰囲気下で、32mM DL-dithiothreitol があり、Ni(II)サブユニットと相手の単離鎖とは等モル数という条件にする。この条件のまま 0℃で 1 時間放置する。この後、サンプルを 20mM Tris/Cl pH7.2 緩衝液と平衡をとった SephadexG25f カラムに通し、続いて同じ緩衝液と平衡をとった DE23 セルロースカラム(Whatman)と CM23 セルロースカラム(Whatman)に通して精製する。素通りするヘモグロビン溶液を集めて濃縮し、液体窒素温度で保存する。この Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは CO 結合型である。酸素結合型にしたいときは、このサンプルを HbA などの CO はずしと同じ操作を行う。

Mg(II)PPIX は Park(1996)らの方法に従って調整した。Mg(II)PPIX が入った単離 α 、もしくは β 鎖の調整の仕方は Ni(II)PPIX を使った場合とほぼ同様である。 α 、もしくは β 鎖のヘムを抜く前に dithiothreitol で SH 基の還元を行っておく。塩酸アセトン法でアポ α (or β) 鎖溶液を調整する。アポ α (or β) 鎖溶液に、等量より少し多い目の Mg(II)PPIX を DMF に溶かして加える。サンプルを濃縮後、20mM Tris/Cl pH8.8 緩衝液と平衡をとった SephadexG25f カラムに通す。同じ緩衝液で平衡をとった DE23 カラムにサンプルを通す。素通りするサンプルを集める。カラムに吸着したものも、50mM Tris/Cl pH8.2 緩衝液で溶出できるものは集める。集めたサンプルを精製された Mg(II)サブユニットとして使う。Mg(II)PPIX には光感受性があるので(Zemel & Hoffman, 1981) Mg(II)サブユニットを CO 型のサブユニットと再構成するわけには行かない。CO はずし操作をすると Mg(II)PPIX が壊れてしまうからである。Mg(II)サブユ

ニットの対になる単離鎖は、あらかじめ dithiothreitol で SH 基の還元を行ってから CO はずしを行って O₂ 結合型にしておく。Mg(II)サブユニットと、対になる O₂ 結合型のサブユニットを等量混ぜる。約 1 時間後、20mM Tris/Cl pH7.2 緩衝液と平衡をとった ShephadexG25f カラムに通し、続いて同じ緩衝液と平衡をとった DE23 セルロースカラム(Whatman)と CM23 セルロースカラム(Whatman)に通して精製する。素通りするヘモグロビン溶液を集めて濃縮し、液体窒素温度で保存する。

金属置換混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の測定

Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の測定は第 2 章で述べた通り、Imai らの方法で測定する。

Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の測定は、Mn(III)サブユニットの吸光スペクトルは Fe(II)サブユニットの酸素の着脱にほとんど依存しないので(Masuda et al., 1993)、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの場合と同様に 560nm の吸光度変化を測定した。

Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の測定は、Cr(III)-Fe(II)や Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの場合と違う点がある。 $\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの $\alpha(\text{Ni})$ サブユニットの吸光スペクトルは、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの酸素着脱にともなって変化することが分かっている(Shibayama et al., 1986a)。だから、酸素平衡曲線の測定には、Ni(II)サブユニットの吸光度変化の影響が小さくて Fe(II)サブユニットの吸光度変化だけを追跡できる波長を選ぶ必要がある。Shibayama らの初期の実験では 430nm が測定波長として使われていたが、この波長で測るのはヘモグロビン濃度を薄くしないと吸光度が大きすぎて測れない。その後、470nm という波長が $\alpha(\text{Ni})$ サブユニットの吸光度変化が小さく、主に $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの吸光度変化を測れるという理由で酸素平衡曲線の測定に使われている(Shibayama et al., 1993)。なお、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$ 混成ヘモグロビンの $\beta(\text{Ni})$ サブユニットの吸光スペクトルは、 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの酸素着脱にともなった変化は非常に小さいので、従来通り 560nm で酸素平衡曲線が測定された。

Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンも Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンと同じ問題がある。 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$ 混成ヘモグロビンの $\beta(\text{Mg})$ サブユニットの吸光スペクトルは、 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの酸素着脱にともなって変化する。だから、酸素平衡曲線の測定は、 $\beta(\text{Mg})$ サブユニットの吸光スペクトル変化の等吸収点の 1 つである 552nm で行われた(Miyazaki et al., in preparation)。

全ての酸素平衡曲線は、ヘモグロビンの濃度が金属ポルフィリン基準で 60 μM 、緩衝液は 50mM bis-Tris もしくは Tris, 100mM Cl⁻, pH7.4, 25℃の各条件で

測定された。

デオキシ金属置換混成ヘモグロビンの一酸化炭素結合速度の測定

一酸化炭素結合速度の測定は stopped-flow 装置を使って行った。緩衝液は 50mM bis-Tris または Tris, 100mM Cl^- , pH6.5, 7.4, または 8.4、25℃条件で実験を行う。あらかじめ窒素ガスを泡立てて酸素を除いた緩衝液を用意しておく。濃縮してある酸素結合型混成ヘモグロビンを金属ポルフィリン基準で 10 μM になるように stopped-flow 装置用のシリンジ（注射器）の中で薄める。このときサンプルが Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの場合は、ヘモグロビンの完全なデオキシ化をするために少量の Dithionite を溶液に加える。Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの場合はもともとの酸素親和性がとても低いので Dithionite を使わなくてもデオキシ化がほぼ達成できる。他方、1 気圧の一酸化炭素ガスで泡立てて平衡をとった緩衝液を、脱酸素化した緩衝液で適度に薄めた溶液（今回使ったのは 33.3 μM CO 溶液）を作っておく。デオキシ化した混成ヘモグロビン溶液と一酸化炭素溶液とを stopped-flow 装置で高速混合する。436nm の吸光度の時間変化を測定することで Fe(II)サブユニットの一酸化炭素結合の速度を調べる。必要に応じて吸光度の時間変化曲線を積算して SN 比を良くする。IHP を加えるときは、混成ヘモグロビン溶液が入ったシリンジに、100 μM IHP となるように濃い IHP 溶液を少し加える。こうして得られた吸光度時間変化に最も良く合う指数関数のパラメータを最小二乗法によって探す。1つの指数関数でフィットできない時は、2つの指数関数でフィットさせる。こうして見かけの速度定数が得られる。一酸化炭素の結合速度定数は序論で述べた式 3-7 を使って計算して出される。

一酸化炭素結合型金属置換混成ヘモグロビンの一酸化炭素解離速度の測定

CO 結合型混成ヘモグロビンの CO 解離速度は CO-NO 置き換え実験によって測定される。使う緩衝液は、CO 結合速度実験と同じものを使う。酸素を除いた 100 μM CO 溶液を Stopped-flow 装置用のシリンジの中に用意する。濃縮された酸素結合型混成ヘモグロビンを金属ポルフィリン基準で 10 μM になるようにその CO 溶液の中に加える。これで CO 結合型混成ヘモグロビン溶液ができる。他方、酸素を除いた緩衝液をトノメータの中で 1 気圧一酸化窒素ガスと平衡をとる。Stopped-flow 装置用のシリンジの中へ注射針を使ってトノメータから一酸化窒素(NO)溶液を入れる。Stopped-flow 装置で CO 結合型混成ヘモグロビン溶液と NO 溶液とを高速混合する。405.7nm の吸光度変化を測定することによって CO が NO と置き換わる速度を調べる。必要に応じて吸光度時間変化を積算して SN 比を良くする。こうして得られた吸光度時間変化に最も良く合う指

数関数のパラメータを最小二乗法によって探す。序論で述べた式 3-15 から、見かけの速度定数はそのまま一酸化炭素の解離速度定数となる。

金属置換混成ヘモグロビンの酸素再結合速度の測定

金属置換混成ヘモグロビンの酸素再結合過程は色素パルスレーザーを使った酸素の光解離実験から測定される。測定は米国 Rice 大学の J.S.Olson 氏の協力を得て行われたが、測定装置の配置は Sawicki と Morris が述べているもの(1981)本質的に同じものである(図 3-3)。

緩衝液は CO 結合実験で使ったものと同じものを使う。いくつかの酸素濃度条件で実験を行う必要があるので、1 気圧酸素ガスを泡立てて平衡をとった緩衝液や、0.5 気圧酸素・0.5 気圧窒素ガスというもので平衡をとった緩衝液、またある酸素濃度の緩衝液を酸素を除いた緩衝液で薄めたもの、などを用意する。サンプルセルは光路長が 1.0mm でゴム栓でふたのできるものを使う。緩衝液を入れる前に、サンプルセルの中の酸素濃度を入れる予定の緩衝液に合わせておく。注射器と注射針とを使って緩衝液をサンプルセルに入れる。濃縮された酸素結合型混成ヘモグロビンを注射器でサンプルセルの中に入れる。ヘモグロビンの濃度は金属ポルフィリン濃度で 200 μ M になるようにする。IHP を加えるときは、濃い IHP 溶液(100mM)をサンプルセルに注射器と針を使って IHP が 100 μ M となるように加える。

色素レーザー装置 (Phase-R (New Durham, NH) 2100B dye laser) にはエタノールに溶かした 0.1mM の色素、rhodamine575 (Exiton, Inc)を入れて使う。パルス幅が約 300 ナノ秒で、577nm に極大点があるガウス分布型強度を持つレーザー光が発射される。レーザー光は直径約 2mm のビームとなってサンプル(ヘモグロビン溶液)が入った 1mm 光路長のサンプルセル表面に当てられる。レーザー光によってヘモグロビンの鉄(II)サブユニットに結合していた酸素がヘモグロビンから離れる。オキシヘムからデオキシヘムへと吸光スペクトルが変化する。サンプルの吸光度変化の測定は、サンプルセル表面の光解離用レーザー光が当たるスポットと同じ場所に、測定用の光の焦点を合わせて行う。測定に使われる波長は、ヘモグロビンの一酸化炭素結合の測定についての頁で述べたのと同様、436nm の吸光度変化が測定されることが多い。吸光度測定用の光はサンプルを通り抜けてモノクロメーターで受ける。電圧の変化に変えられた吸光度の時間変化のデータはデジタルオシロスコープ(Tektronix, model 2430)で測定され、IBM 社製パーソナルコンピュータに取り込まれ、保存される。

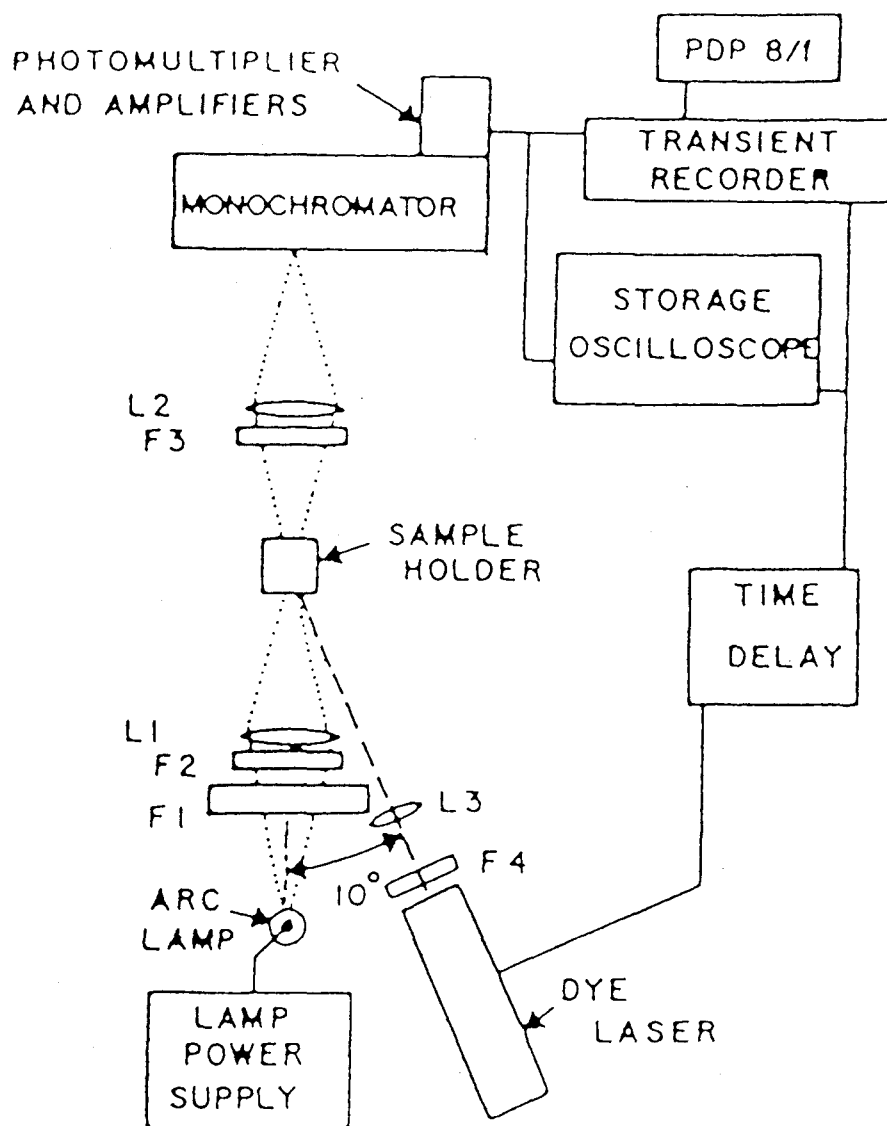


図3-3 色素レーザーフォトリシス装置の模式図

こうして得られた吸光度時間変化に最も良く合う指数関数のパラメータを最小二乗法によって探す。1つの指数関数でフィットできない時は、2つの指数関数でフィットさせる。こうして見かけの速度定数が得られる。酸素濃度を横軸に、見かけの速度定数を縦軸にとったグラフをつくって得られたデータをプロットする。そのプロットに最も良く合う直線を最小二乗法によって探す。反応曲線を2つの指数関数でフィットしたときは、2つの成分があると見なして速いものと遅いもの、それぞれ別々にプロットしてそれぞれにあう直線を探す。前節で述べたように、直線の傾きが酸素の結合速度定数を示し、縦軸切片が酸素の解離速度定数を示す（式 3-19）。ただし、ヘモグロビンの酸素親和性がとても高く、その解離速度が見かけの反応速度に比べて十分に遅いのが明らかだと見なせる場合は、直線の縦軸切片をあらかじめ 0 s^{-1} と決めておく。

金属置換混成ヘモグロビンの酸素解離速度の測定

酸素結合型 Cr(III)-Fe(II)、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素解離速度は stopped-flow 法で酸素-一酸化炭素置き換え反応を見ることによって測定された。緩衝液は CO 結合実験で使ったものと同じものを使う。いろいろな酸素濃度の緩衝液を用意する。この内のひとつの緩衝液を stopped-flow 装置用のシリンジの中に入れ、濃縮された酸素結合型混成ヘモグロビンを金属ポルフィリン基準で $10\mu\text{M}$ になるようにその緩衝液の中に加える。他方、酸素を除いて1気圧一酸化炭素と平衡をとった緩衝液を stopped-flow 用のシリンジの中に入れる。IHP を加えるときは、混成ヘモグロビン溶液の中へ濃い IHP 溶液(100mM)を IHP が $100\mu\text{M}$ となるように加える。Stopped-flow 装置で O_2 結合型混成ヘモグロビン溶液と CO 溶液とを高速混合する。 423nm の吸光度変化を測定することによって O_2 が CO と置き換わる速度を調べる。必要に応じて吸光度時間変化を積算して SN 比を良くする。こうして得られた吸光度時間変化に最も良く合う指数関数のパラメータを最小二乗法によって探す。こうして見かけの速度定数が得られる。前節で述べたように、 $[\text{O}_2]/[\text{CO}]$ を横軸に、見かけの速度定数の逆数を縦軸にとったグラフをつくって得られたデータをプロットする。そのプロットに最も良く合う直線を最小二乗法によって探す。直線の縦軸切片が酸素の解離速度定数の逆数を示す（式 3-23）。

(4)結果と考察

金属置換混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線

Cr(III)-、Mn(III)、Ni(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の Hill plot を図 3-4A、B に、酸素平衡パラメータを表 3-1 に示す。それぞれ今までに報告された酸素平衡機能 (Appendix-5) とほぼ一致している。

表 3-1 金属置換混成ヘモグロビンの酸素平衡パラメータ

Hybrid Hb	P ₅₀ (mmHg)	n _{max}	K ₁ (mmHg ⁻¹)	K ₂ (mmHg ⁻¹)
α ₂ (Cr)β ₂ (Fe)	0.37	1.1	2.2	3.4
α ₂ (Mn)β ₂ (Fe)	2.0	1.4	0.24	0.99
α ₂ (Ni)β ₂ (Fe)	30	1.0	0.037	0.029
α ₂ (Mg)β ₂ (Fe)	61	1.1	0.015	0.017
α ₂ (Fe)β ₂ (Cr)	0.55	1.2	1.2	2.7
α ₂ (Fe)β ₂ (Mn)	0.95	1.2	0.64	1.7
α ₂ (Fe)β ₂ (Ni)	34	1.4	0.013	0.062
α ₂ (Fe)β ₂ (Mg)	73	1.3	0.0091	0.021

測定条件：50mM Tris, 100mM Cl⁻, pH7.4, 25℃.

ヘモグロビン濃度は金属ポルフィリン (ヘムも含む) を基準にして 60μM。

測定波長：Cr(III)-、Mn(III)-Fe(II)混成 Hb、α₂(Fe)β₂(Ni)、α₂(Mg)β₂(Fe)は 560nm、α₂(Ni)β₂(Fe)は 470nm、α₂(Fe)β₂(Mg)は 586nm。

P₅₀、ヘモグロビンの酸素飽和度が 50%の時の酸素分圧

n_{max}、ヘモグロビンの酸素平衡曲線の Hillplot の最大勾配

K₁、ヘモグロビンの 1 個目に結合する酸素の平衡定数 (結合定数 mmHg⁻¹)

K₂、ヘモグロビンの 2 個目に結合する酸素の平衡定数 (結合定数 mmHg⁻¹)

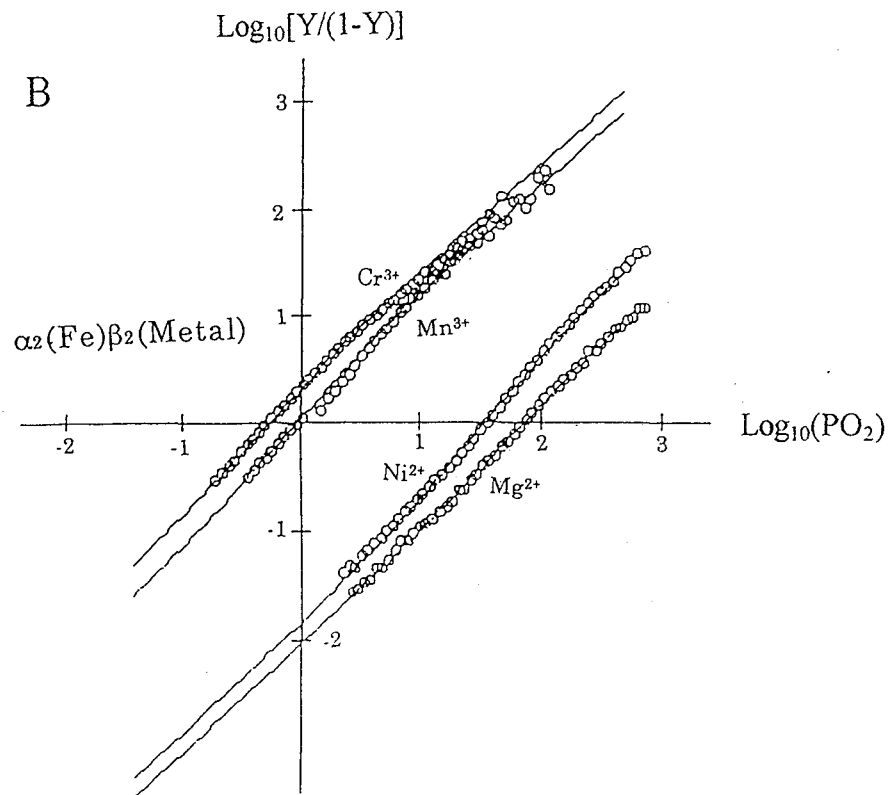
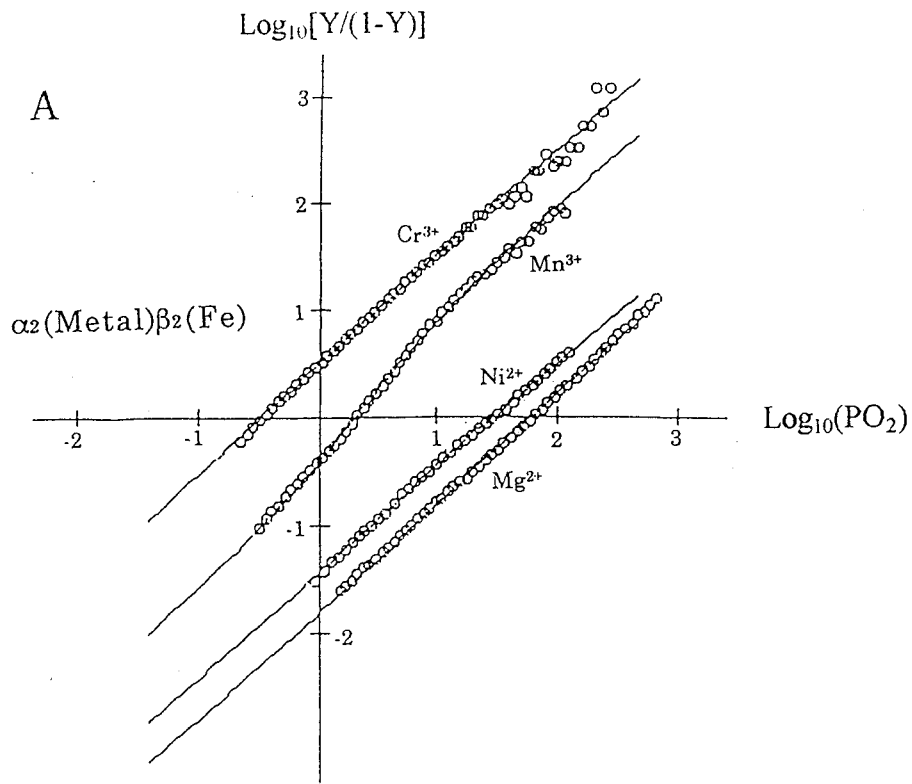


図 3-4 金属置換混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の Hillplot

測定条件：50mM bis-Tris, 100mM Cl⁻, pH7.4, 25℃.

(A) α 置換混成ヘモグロビン ($\alpha_2(\text{Metal})\beta_2(\text{Fe})$) の酸素平衡曲線の Hillplot

(B) β 置換混成ヘモグロビン ($\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Metal})$) の酸素平衡曲線の Hillplot

デオキシ金属置換混成ヘモグロбинの一酸化炭素結合速度

デオキシ Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの一酸化炭素(CO)結合過程は全ての測定で二相性を示した(図 3-5A)。まずは2状態モデル的に解析する。最小二乗法を用いて、反応曲線を速い速度定数を持つ指数関数と遅い速度定数を持つ指数関数の和でフィットする。得られた速い相・遅い相の比率と、それぞれのCO結合速度定数(k'_{co})を表 3-2 に示した。他方、Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンのCO結合過程は全て単相性を示した。つまり、反応曲線はある速度定数を持つ指数関数ひとつだけでフィットすることができた(図 3-6B)。得られた k'_{co} の値を表 3-2 に示した。各混成ヘモグロビンの k'_{co} の値を図 3-7 A, B に示した。図 3-7 A には $\alpha_2(\text{Metal})\beta_2(\text{Fe})$ 、図 3-7 B には $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Metal})$ の k'_{co} の値を示してある。

表 3-2 デオキシ型金属置換混成ヘモグロビンの CO 結合速度定数

pH	IHP ^a	$\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$		$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$	
		fast ^b ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	slow ^c ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	fast ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	slow ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
6.5	—	6.1 (79%) ^d	0.28 (21%) ^e	3.2 (39%)	0.28 (61%)
	+	2.3 (22%)	0.11 (78%)	6.6 (6%)	0.15 (94%)
7.4	—	7.0 (86%)	0.47 (14%)	5.0 (86%)	0.49 (14%)
	+	2.1 (20%)	0.13 (80%)	4.8 (38%)	0.16 (62%)
8.4	—	7.7 (90%)	0.57 (10%)	7.0 (90%)	1.3 (10%)
	+	6.5 (83%)	0.26 (17%)	5.9 (73%)	0.44 (27%)

pH	IHP	$\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$	$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$	$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$	$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$
		($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
6.5	—	0.085	0.15	0.051	0.12
	+	0.065	0.11	0.047	0.12
7.4	—	0.086	0.19	0.041	0.19
	+	0.061	0.12	0.037	0.14
8.4	—	0.095	0.34	0.058	0.20
	+	0.068	0.21	0.047	0.13

(表 3-2 つづき)

pH	IHP	HbA ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$)
6.5	—	0.18
	+	0.095
7.4	—	0.23
	+	0.081
8.4	—	0.32
	+	0.14

測定条件：50mM Tris or bis-Tris, 100mM Cl^- , 25°C. ヘモグロビンの濃度は、金属ポルフィリンを基準にして、混合後 5 μM . 一酸化炭素の濃度は、混合後 16.7 μM . 436nm の吸光度変化が測定された。

a、+：混合後、ヘモグロビン溶液中に 50 μM IHP がある条件。

—：ヘモグロビン溶液に IHP が無い条件。

b：Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した 2 相の CO 結合曲線の、速い相の速度定数。

c：Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した 2 相の CO 結合曲線の、遅い相の速度定数。

d, e：それぞれ、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した 2 相の CO 結合曲線の速い相と遅い相の存在比。全体の吸光度変化の何%変化したかが示してある。速い相と遅い相の存在比を足すと 100%、つまり全体の吸光度変化量となる。

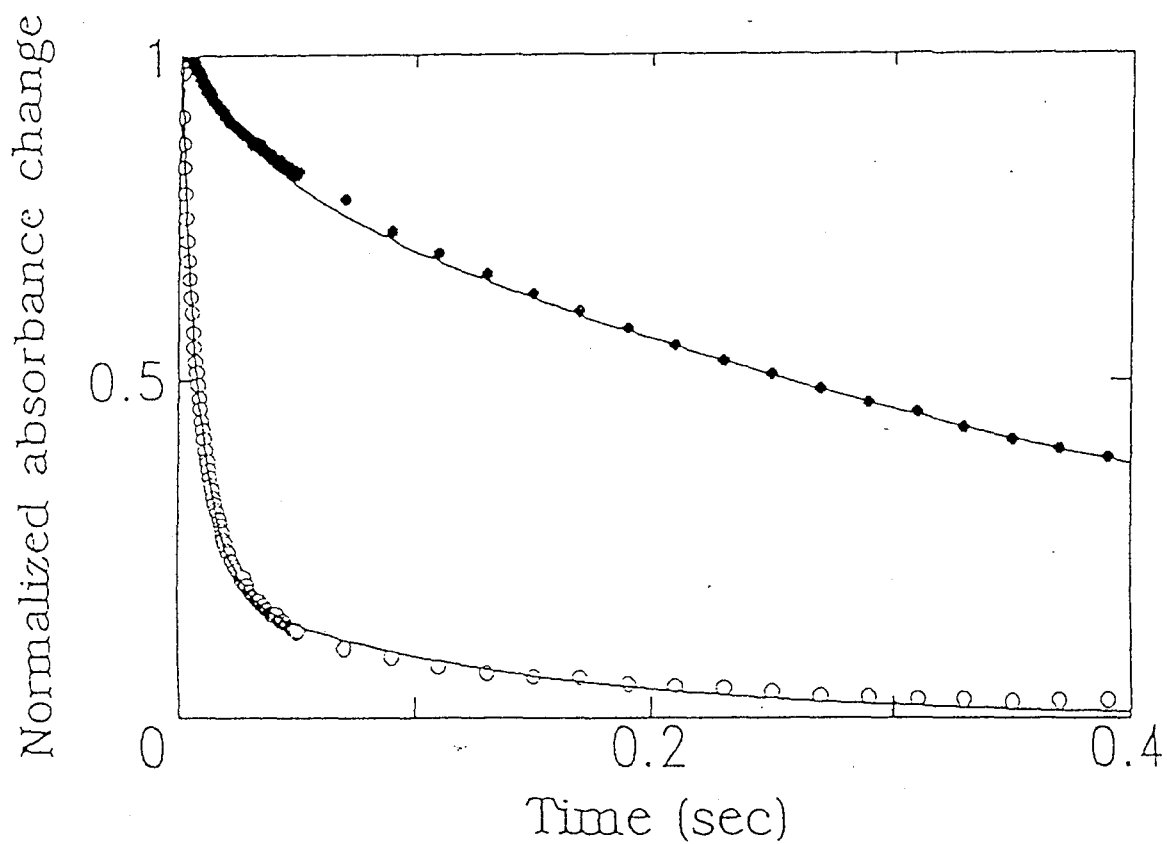


図 3-5 規格化されたデオキシ型 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの CO 結合反応曲線

○: -IHP

●: 100 μM IHP 条件 (混合前のヘモグロビン溶液中の IHP 濃度)

測定条件: 50mM bis-Tris, 100mM Cl⁻, pH7.4, 25℃, Detected at 436nm.

CO 濃度、33.6 μM (混合前); ヘモグロビン濃度、10 μM (ポルフィリン基準、混合前).

Stopped-Flow 装置で測定された。

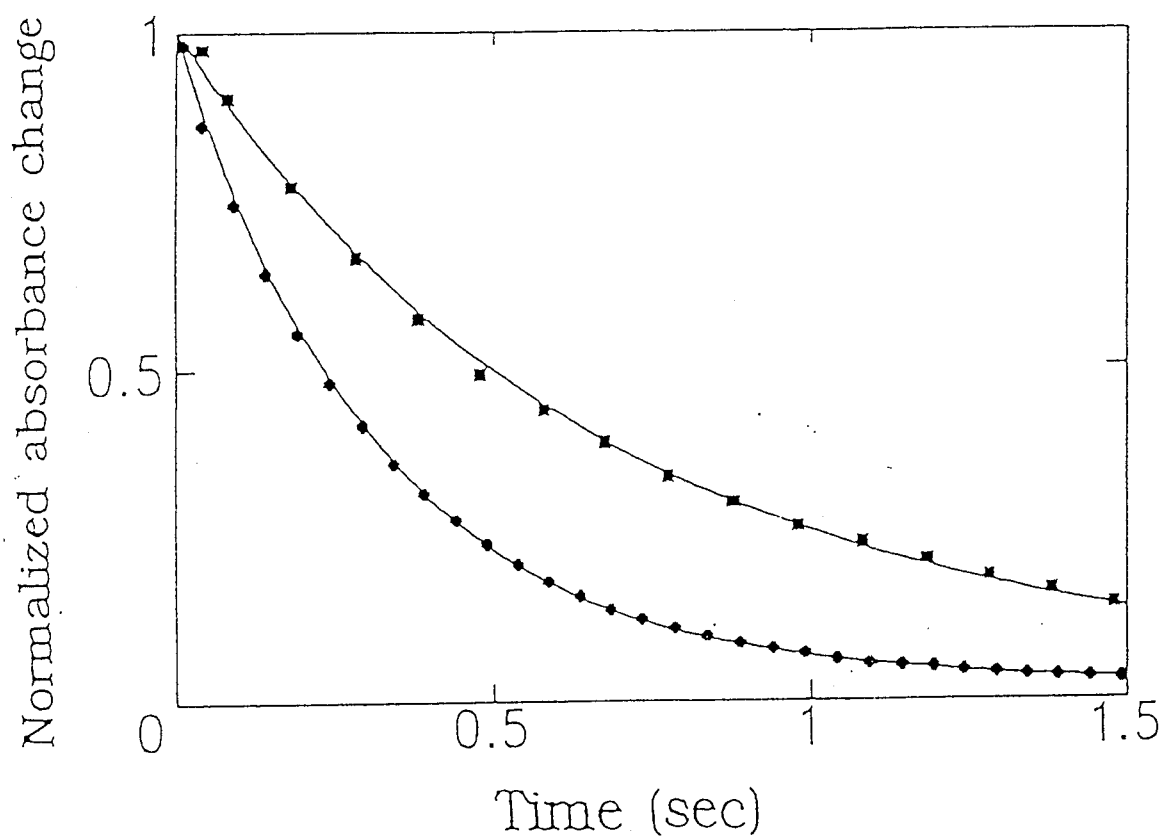


図 3-6 規格化されたデオキシ型 Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 結合反応曲線

■: $\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$

●: $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$

測定条件: 50mM bis-Tris, 100mM Cl, pH7.4, 25°C, Detected at 436nm.

CO 濃度、33.6 μM (混合前). ヘモグロビン濃度、10 μM (ポルフィリン基準、混合前).

Stopped-Flow 装置で測定された。

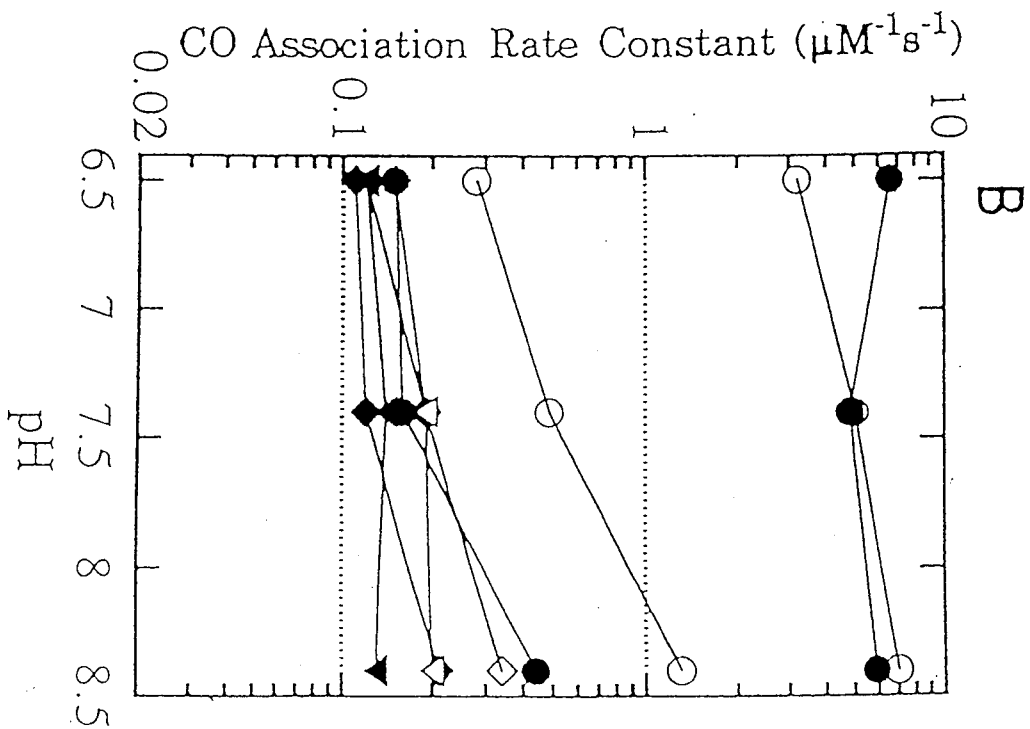
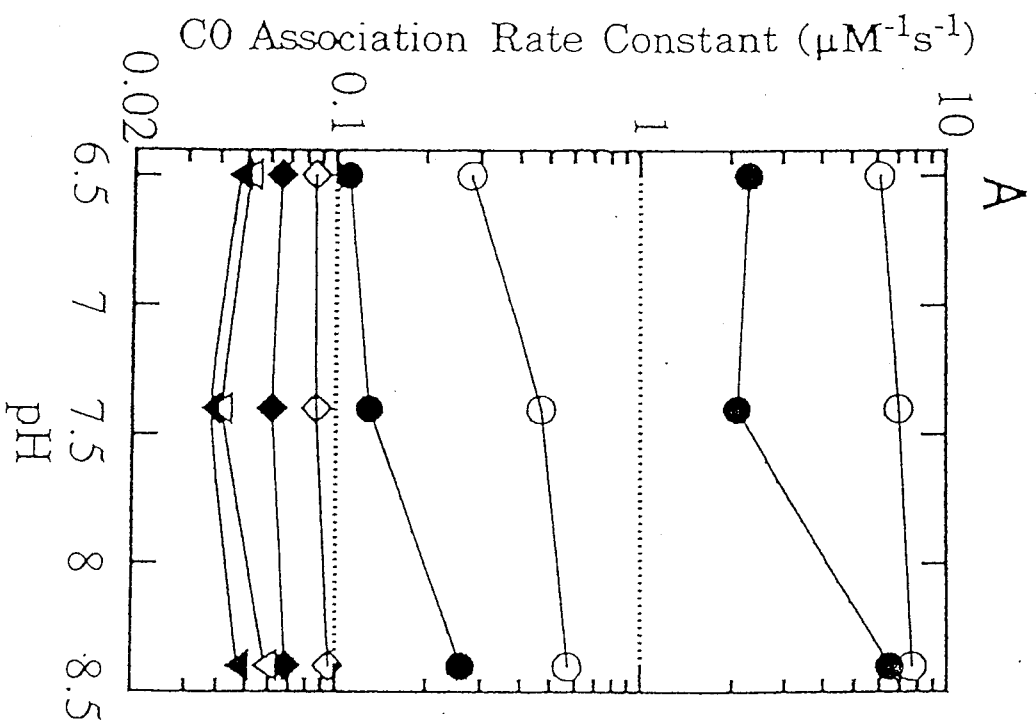


図 3-7 デオキシ型金属置換混成ヘモグロビンの CO 結合速度定数の pH 依存性
 (A) α_2 置換混成ヘモグロビン ($\alpha_2(\text{Metal})\beta_2(\text{Fe})$) の CO 結合速度定数
 (B) β_2 置換混成ヘモグロビン ($\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Metal})$) の CO 結合速度定数
 測定条件: 50mM bis-Tris or Tris, 100mM Cl⁻, 25°C, Detected at 436nm.
 CO 濃度、33.6 μM (混合前). ヘモグロビン濃度、10 μM (ボルフイリン基準、混合前).
 Stopped-Flow 装置で測定された。

○: Cr(III)-Fe(III)混成ヘモグロビン
 ◇: Ni(II)-Fe(III)混成ヘモグロビン
 ▽: Mg(II)-Fe(III)混成ヘモグロビン
 黒シンボルは、100 μM IHP 存在条件 (混合前のヘモグロビン溶液中の IHP 濃度)

図 3-7A, B に見られるように、求められた速度定数は大まかに 2 つに分かれた。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した速い CO 結合速度のグループと、Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した遅い CO 結合速度のグループである。

速い CO 結合速度定数は、過去にヘモグロビンの 4 段階目の CO 結合速度定数として報告されているものと非常によく一致している。これはオキシヘモグロビン型のものの性質が観測されているとして良いだろう。他方、遅い CO 結合速度定数は、通常のアデオキシヘモグロビンの CO 結合速度とほぼ同じ速度を示している。過去の報告と今回の結果の比較は後ほど行う。

中間的 CO 結合速度定数が見つかった？

中には中間的に見える速度定数もある。これは Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した 2 相性の CO 結合曲線の遅い相の速度定数である。観測された反応曲線に、2 つの指数関数の和を単純にフィットさせて得た結果のものである。アデオキシ Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンは、リガンドが 2 個だけ結合しているヘモグロビンのモデルである(本論文第 2 章; Unzai et al., 1996)。アデオキシ混成ヘモグロビンはリガンド親和性が高い構造状態にも、低い構造状態にも（他にもあるかも）なれる微妙な条件下にあると考えられる。

しかし、中間的な速度定数があったからと言って、それが本当に「オキシヘモグロビン型 (R 状態)」でもなく、「アデオキシヘモグロビン型 (T 状態)」でもない、「中間的な性質を持つヘモグロビン」の速度定数だ、としてしまうのには証拠が足りない。なぜなら、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した 2 相の CO 結合反応の遅い相がどうやってつくられたかはっきりわからないからである。本当に中間的な性質を持つヘモグロビンがあるのならば、この中間的な速度の CO 結合反応の後でさらに遅い CO 結合反応が観測されてもおかしくないのだが、そういう事実はない。また、序論で述べた通り、リガンド結合中間段階のヘモグロビンが、どのくらいの速さの 4 次構造変化を示すのかははっきりしていない (Philo et al., 1996)。見かけの反応曲線は、ヘモグロビンの構造変化の速度を反映しているかも知れないのだ。残念ながら今回の実験からは、アデオキシ Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンがどのくらいの 4 次構造変化速度を示しているかわからないので、観測された 2 相の反応曲線、特に遅い相が何に由来するものなのか結論を得ることができない。

ここではアデオキシ型 Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 結合反応が何故 2 相になったかを推定する。

過去の報告と比較してみると、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡機能、

CO 結合反応速度の性質はメトシアン-Fe(II)混成ヘモグロビンのものに非常に似ている。デオキシ型メトシアン混成ヘモグロビンも2相性のCO結合曲線を示した。また、IHPを溶液に加え、溶液のpHを下げるにしたがって、2相のうちの遅いCO結合反応相の割合が増えた(Cassoly & Gibson, 1972)。CassolyとGibsonが、「デオキシシアノメト混成ヘモグロビンは、2つの状態——CO結合速度の速いR状態と、CO結合速度の遅いT状態——の間を行き来する平衡状態にあり、その入れ替わりはあまり速くない (1S^{-1} 以下)。それぞれのCO結合反応が別々の相となって直接観測されている」と解釈したのは序論で触れた。彼らはCO結合速度定数が溶液のpH、IHP条件に依存するのはR状態、T状態、それぞれの状態の中での、ヘモグロビンの性質の変化だと考えているようだ。それにしては大きすぎはしないか。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した遅い相のCO結合速度定数は、Ni(II)-Fe(II)やMg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンのものに比べて10倍近く大きいこともある(図3-7)。単純な2状態モデルでは説明できそうにない。

ヘモグロビンの4次構造の変化によって2相のCO結合反応曲線がつくられたのだろうか。その可能性を探ってみる。2相の結合曲線が観測されたので、全てのヘモグロビン分子が非常に速い速度 (10^3S^{-1} やそれ以上) で親和性の違う構造状態の間を行き来している可能性は否定された。もしそのような速い速度で構造の入れ替わりがあったなら、見かけの反応曲線は平均化され、一つの指数関数で表せるようになるはずだからだ。

Philoらが言う通り(1996)、ヘモグロビンの4次構造の状態には3つあり(R状態、T状態、locked-T状態)、リガンド結合の中間段階では、R状態ヘモグロビンとT状態ヘモグロビンはものすごく速い速度($10^3\sim 10^4\text{S}^{-1}$)で4次構造の入れ替わりが起こっていて、locked-T状態のヘモグロビンはそのまま取り残されている (1S^{-1} 以下の速度でT、またはR状態になる) としよう。デオキシCr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンは、リガンドが2個だけ結合しているヘモグロビンのモデルだから、この3状態が混ざった平衡状態にあると考えられる。そこへCO溶液を混ぜたら一体どんな反応曲線が観測されるだろうか？ COを混ぜた直後は、速い4次構造変化による見かけの反応曲線の平均化が起こるだろう。R状態の速い結合速度定数と、T状態の遅い結合速度定数の中間的な速度定数を持つ相があらわれる。これが速い相に見える。その後、取り残されたlocked-T状態ヘモグロビンにCOがゆっくり結合する。これが遅い相に見える。このように、2相のCO結合反応曲線が観測されると考えられるが、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのCO結合反応で見られたような遅い相のpH、IHP依存性を説明できない。locked-T状態ヘモグロビンのCO結合速度がpH、IHP条件に依存する、とすれば説明できるかも知れないが、これではヘモグロビン

の状態の数が3状態では済まない。

他に CO 結合反応が2相に見える理由に、ヘモグロビンの4次構造変化の速度が、CO 結合速度と競争する場合が考えられる。単純にするために、デオキシ Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが、R状態ヘモグロビンとT状態ヘモグロビンの混ざったものだとしよう。ヘモグロビンはこの2つの状態の間を行き来する平衡状態にある。その構造が入れ替わる速度が、R状態ヘモグロビンのCO結合速度よりは遅く、T状態ヘモグロビンのCO結合速度より速い場合。そこへCOを混ぜると、まずR状態ヘモグロビンにCOが速く結合してしまう(速い相が観測される)。するとT状態ヘモグロビンだけ残る。T状態ヘモグロビンにゆっくりCOが結合してしまう前に、T状態ヘモグロビンはR状態ヘモグロビンへと構造変化する。ヘモグロビンの構造が変わった途端にCOがすぐ結合する。こうして、T→R構造変化の速度が律速段階になった反応が遅い相となって観測される。ヘモグロビンの4次構造変化の速度が、溶液のpH、IHP条件に依存するとすれば、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのCO結合曲線の遅い相のpH、IHP依存性を説明できる。しかし、この説ではデオキシシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの見かけのCO結合速度が、溶液のCO濃度とほぼ比例関係にある(Cassoly & Gibson, 1972)ことを説明できない。CO結合反応の遅い相が、もし構造変化が律速段階となってできた相ならば、見かけのCO結合速度は溶液のCO濃度には比例しないはずである。

現在までに、デオキシ Cr(III)-Fe(II)、デオキシシアノメト混成ヘモグロビンがなぜ2相のCO結合反応曲線を示すのかうまく説明できる説はない。

ヘモグロビンのCO結合速度定数の上限と下限について

ヘモグロビンが示しうる最も速いCO結合速度定数を見積もってみよう。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンは、溶液のpHが7.4、8.4でIHPがない条件ではそのCO結合過程のほとんどが速い成分で、その速度のpH効果はほとんど無かった。前章のCr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡機能の性質の研究から、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンは非常に高い酸素親和性を持つことがわかっている。pH8.4でIHPがない条件ではほとんど協同性を示さず($n_{\max} = 1.0-1.1$)、単離鎖とはほぼ同じ酸素親和性を示しているので、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンはpH8.4ならデオキシ状態でもほぼリガンドに対する親和性がとても高い。これらの事実から、溶液のpHが7.4から8.4で、IHPがない条件でのCr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのCO結合過程の速い成分の結合定数は、ヘモグロビンが持ちうるCO結合速度定数の速さの上限と考えられる。 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ の $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの約 $7 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ の $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの約 $6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ のというCO結合速度定数がそれぞれ上限と考えられる。

Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した速い CO 結合速度定数を、過去に報告された定数と比べてみよう。今までに R-状態ヘモグロビンの CO 結合速度として報告されているものは、CO 結合型 Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンや(Blough & Hoffman, 1984)、CO 結合型異常鎖-正常鎖混成ヘモグロビン(Mathews et al., 1989)の CO 光部分解離実験をして α (Fe)、 β (Fe)それぞれの CO 結合速度を区別して求められたり、CO 結合型 HbA の CO 光部分解離実験をして、その見かけの反応過程から α (Fe)と β (Fe)それぞれの CO 結合過程を見分けて結合定数を求められたりしている(Vandegriff et al., 1991)。

表 3-3 CO 親和性が高い金属置換混成ヘモグロビンの CO 結合速度定数

	pH	k'co ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	References
$\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$	7.4	7.0	①(This study)
$\alpha_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN})\beta_2(\text{Fe}^{2+})$	6.6	3.6 ± 0.3	②
$\alpha_2(\text{Mn}^{3+})\beta_2(\text{Fe})$	7.6	9.6	③
$\beta(\text{Fe})$ of HbA	7.0	7.1 ± 2.4	④
$\beta(\text{Fe})$ of HbA	7.4	15 ± 3	⑤
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$	7.4	5.0	①(This study)
$\alpha_2(\text{Fe}^{2+})\beta_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN})$	6.6	4.8 ± 0.08	②
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mn}^{3+})$	7.6	9.0	③
$\alpha(\text{Fe})$ of HbA	7.0	2.9 ± 0.5	④
$\alpha(\text{Fe})$ of HbA	7.4	5.0 ± 1	⑤

測定条件

- ① This study, 50mM bis-Tris, 100mM Cl, 25°C.
- ② Cassoly & Gibson (1972) 0.1M bis-Tris, 20°C.
- ③ Blough & Hoffman (1984) 50mM Tris (or bis-Tris) 25°C.
- ④ Mathews et al. (1989) 0.1M bis-Tris, 0.1M KCl, 20°C.
- ⑤ Vandegriff et al. (1991) 50mM bis-Tris, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 25°C.

①、②は Stopped-flow 装置でデオキシ混成ヘモグロビン溶液と CO 溶液とを混合して 2 相性の CO 結合反応曲線を得ている。そのうち、速い成分の結合速度定数を示した。③～⑤は光部分解離法から求められた、ヘモグロビンに 4 個目 (Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの場合は 2 個目) に結合する酸素の結合速度定数。

さて他方、ヘモグロビンの示しうる CO 結合速度定数の下限は、図 3-7 からほぼ明らかだと考えられる。 α 置換、 β 置換混成ヘモグロビン、ともに溶液 pH が下がり、IHP が加えられるとともに CO 結合速度は遅くなり、ある一定の速度まで遅くなると pH、IHP の影響もあまり効かなくなってもうそれ以上遅くならないように見える。図 3-7A、B それぞれから、ヘモグロビンの最も遅い CO 結合速度が、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットは約 $0.04\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (図 3-7A 下部)、 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットは約 $0.12\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (図 3-7B 下部) だと考えられる。これらの数字は、過去にリガンド親和性の低いヘモグロビンの CO 結合速度定数として報告されている値とよく一致する。

表 3-4 リガンド親和性が低い金属置換混成ヘモグロビンの CO 結合速度定数

	pH	k'co		References
		(-IHP) ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	(+IHP) ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	
$\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$	6.5	0.085	0.065	①(This Study)
$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$	6.5	0.051	0.047	①(This Study)
$\alpha_2(\text{Mn}^{2+})\beta_2(\text{Fe})$	6.6	0.13	0.050	②
$\alpha_2(\text{Co}^{2+})\beta_2(\text{Fe})$	7.0	0.10	0.039	③
$\alpha_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN})\beta_2(\text{Fe})$	6.6	2 ± 0.6	0.07	④
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$	6.5	0.15	0.11	①(This Study)
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$	6.5	0.19	0.14	①(This Study)
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mn}^{2+})$	6.6	0.15	0.11	②
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Co}^{2+})$	7.0	0.11	0.062	③
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Fe}^{3+}\text{CN})$	6.6	0.27 ± 0.1	0.18	④

k'co : デオキシ混成ヘモグロビンの CO 結合速度定数

IHP : + は IHP が存在しない条件で測定されたことを示し、- は IHP 存在条件で測定されたことを示す。

測定条件

① This study (表 3-2) 50mM bis-Tris, 100mM Cl, 25°C, pH6.5.

② Blough & Hoffman (1982) 50mM Tris (or bis-Tris) 25°C.

ヘモグロビン濃度は混合前に金属ポルフィリンを基準にして 3~5 μM .

また、+IHP は 200 μM IHP が存在する条件での測定を示す。

③ Ikeda-Saito & Yonetani (1980) 50mM bis-Tris, 20°C.

ヘモグロビン濃度は混合後 10 μ M(per metal)。+IHP は 2mM IHP が存在する条件での測定を示す。

④ Cassoly & Gibson (1972) 0.1M bis-Tris, 20°C.

ヘモグロビン濃度は 8 μ M(per metal)。-IHP 条件で示した結合速度定数は、現れた 2 相反応曲線のうちの遅い相の速度定数。+IHP は 10 μ M IHP が存在する条件での測定を示す。IHP 存在条件では単相だった。

このように、用いられたヘモグロビンに依存しない CO 結合速度定数の下限が存在するのがはっきりわかる。下限の値は、 α (Fe)サブユニットのものの方が β (Fe)サブユニットのものより約 2 倍大きい。他に、Perrella らが低温での電気泳動を利用して測定した HbA の CO 結合速度を報告しているが、IHP がある条件では HbA に 1 つ目に結合する CO の結合速度は α (Fe)サブユニットの方が β (Fe)サブユニットより速いと結論しており(Perrella et al., 1992)、今回の金属置換混成ヘモグロビンを使った実験と一致している。

CO 結合速度の最も遅い反応は溶液の pH が低くて IHP が加えられた条件で観測される。今回の実験中、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンはもともとリガンド親和性が非常に低いので、溶液に IHP を加えなくても非常に下限に近い CO 結合速度定数を示したと考えられる。

Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは、一つの指数関数で示せるような CO 結合反応曲線を示した。序論で述べた通り、2 状態モデル的に言うのなら、T 状態ヘモグロビンの CO 結合速度定数が、溶液の pH や IHP 条件に依存して変化した様に見える。

ところで、Mathews らはデオキシ化した正常鎖-異常鎖混成ヘモグロビンの CO 結合速度を測定して、T-状態ヘモグロビンの中の α (Fe)、 β (Fe)サブユニットの CO 結合速度定数を同定した、と報告している(1991)。彼らの言う T-状態ヘモグロビン中の α (Fe)サブユニットの CO 結合定数は、金属置換混成ヘモグロビンを使った実験から求められている結合定数とよく一致する(0.10 μ M⁻¹s⁻¹, in the presence of IHP, pH7.0)が、 β (Fe)サブユニットの結合速度定数はかなり速い速度定数が示されている(0.14 μ M⁻¹s⁻¹, in the presence of IHP, pH7.0)。このズレはどこから来たか。Mathews らは α (Fe)サブユニットの CO 結合速度定数は、 α_2 (Fe) β_2 (Fe)E11Val $\rightarrow$ Ile という混成ヘモグロビン—— α (Fe)サブユニットは天然型とはほぼ同じ (N 末端にメチオニンがついているが)、 β (Fe)サブユ

ニットはヘムポケット内の遠位側アミノ酸残基である E11 バリンをイソロイシンに変えた人工異常サブユニット——の CO 結合速度を測定することによって直接 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの CO 結合速度定数を同定していて、これは他の結果とよく一致する。しかし、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの CO 結合速度は、この $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの数字とデオキシヘモグロビンの CO 結合速度から計算して求められているのである。

$$k'_\beta = 2k'_{\text{HbA}} - k'_\alpha \quad \text{---eq.3-24}$$

k'_β 、 k'_{HbA} 、 k'_α はそれぞれ $\beta(\text{Fe})$ サブユニット、ヘモグロビン、 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの CO 結合速度定数である。要するに $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの結合速度と $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの結合速度の平均がヘモグロビンの結合速度として見える、という式である。ただしこの式が成り立つのは、Mathews らが行っているようなヘモグロビンの数に比べて混ぜられる CO 分子の数が少ない場合 (CO の数はヘムの数の 5%) である。さて、Mathews らもデオキシヘモグロビンの CO 結合速度を測定しているが、その求めた定数 ($0.12 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, in the presence of IHP, pH7.0) が今までに報告されている定数 ($0.07 \sim 0.09 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Antonini et al., 1967; Hopfield et al., 1972; Perrella et al., 1992) よりも少し速いめである。Mathews らが使ったこのヘモグロビンの CO 結合定数が少し大きかったことが、彼らの報告した $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの CO 結合定数が大きくなってしまった原因だと考えられる。

このように、 α サブユニットと β サブユニットの速度定数の平均値と、一方の速度定数とを使って、もう一方の速度定数を計算して求めるのは、少し無理がある。

混成ヘモグロビンの CO 結合速度の解析の結論

混成ヘモグロビンの CO 結合速度は、だいたい速い結合速度と遅い結合速度の 2 グループに分類できる。それぞれ、今までに「R 状態ヘモグロビン」と「T 状態ヘモグロビン」の CO 結合速度定数と言われていたものに相当する。遅い結合速度のグループに分けられた速度定数は溶液条件に依存するので、ヘモグロビンの性質は単純な 2 状態モデルでは説明はできない。

その他、中間的な結合速度定数に見えるものもあったが、これが中間的性質のヘモグロビンのものだ、とは現在の所できない。

CO 結合型金属置換混成ヘモグロビンの CO 解離速度

金属置換混成ヘモグロビンの CO-NO 置き換わり過程は、溶液の pH 条件や IHP 条件に関係なく全て単相性を示した。つまり、反応曲線はある速度定数を持つ指数関数ひとつだけでフィットすることができた。CO の解離速度はヘモグロビンの 4 次構造変化の速度(10^4 s^{-1} or 1 s^{-1} , 序論より)や、ヘモグロビンの 4 量体-2 量体平衡の速度(s^{-1} , Kellet & Gutfreund, 1970)に比べて極端に遅い($0.2 \text{ s}^{-1} \sim 0.01 \text{ s}^{-1}$, 次ページ)ので、平均化された置き換わり過程が単相曲線として観察されたものと考えられる。だから、2 状態モデル的ではない中間的な速度の CO 解離速度が観察されても、2 状態モデルは間違っているとと言えるわけではない。速い CO 解離速度を持つ成分と遅い解離速度を持つ成分がある場合でも、平均化された中くらいの速度の CO 解離反応が見える。CO 解離速度の測定からはヘモグロビン溶液中に速度成分がいくつあるかは分からない。

Cr(III)-Fe(II)、Mn(III)-Fe(II)、Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 解離速度定数(k_{CO})を表 3-5 に示した(次ページ)。Cr(III)-Fe(II)、Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 解離速度定数を図 3-8 に示した。Mn(III)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 解離速度定数の値は、pH、IHP 効果も含めてそれぞれ Cr(III)-Fe(II)、Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンのものとほぼ同じだったので図 3-8 に示していない。HbA の CO 解離速度定数の値も図 3-8 に比較するために示した。

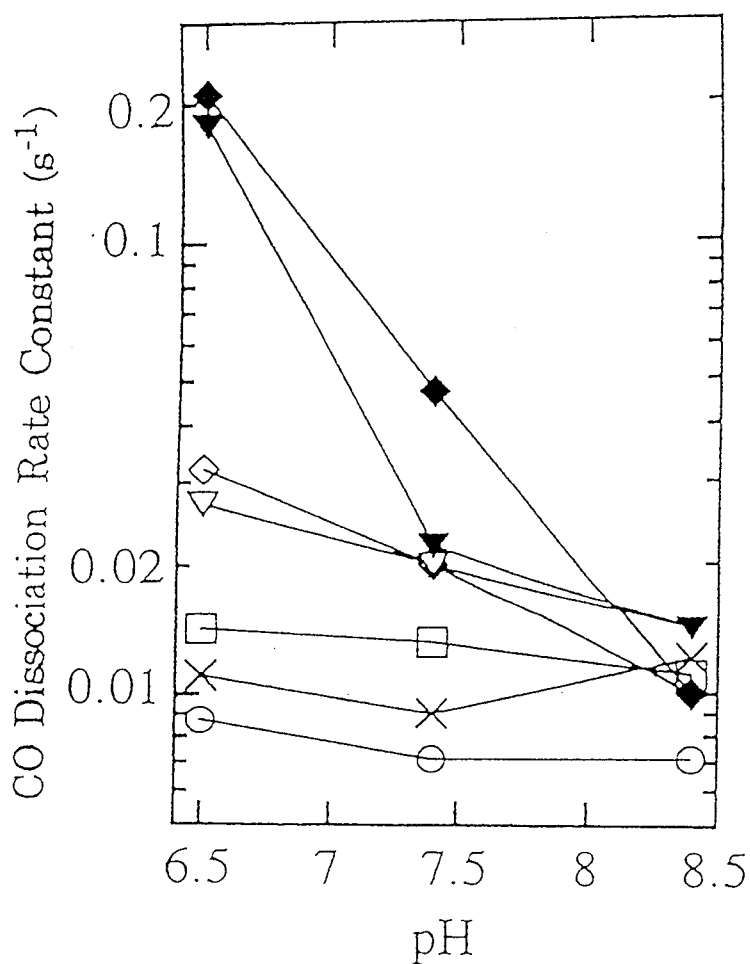


図 3-8 CO 結合型混成ヘモグロビンの CO 解離速度定数の pH 依存性

○: $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$; □: $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$; ◇: $\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$; ▽: $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$

×: ヘモグロビン

測定条件: 50mM bis-Tris or Tris, 100mM Cl⁻, 25°C, Detected at 405.7nm.

CO 濃度, 100 μM (混合前); NO 濃度, 2000 μM (混合前), ヘモグロビン濃度, 10 μM (ポルフィリン基準、混合前).

CO 結合型混成ヘモグロビン溶液と、NO 溶液とを Stopped-Flow 装置で混合して CO が解離するのを測定した。

表 3-5 CO 型金属置換混成ヘモグロビンの CO 解離速度

pH	IHP	HbA	$\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$	$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$	$\alpha_2(\text{Mn})\beta_2(\text{Fe})$	$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mn})$
		(s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(s ⁻¹)	(s ⁻¹)
6.5	—	0.011	0.0087	0.014	0.0097	0.018
	+	0.012	0.0095	0.013	0.012	0.018
7.4	—	0.0090	0.0071	0.013	0.0069	0.012
	+	0.0096				
8.4	—	0.012	0.0071	0.011	0.0077	0.010

pH	IHP	$\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$	$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$	$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$	$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$
		($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
6.5	—	0.032	0.027	0.024	0.10
	+	0.21	0.18	0.17	0.23
7.4	—	0.020	0.020	0.017	0.028
	+	0.047	0.022	0.024	0.051
8.4	—	0.010	0.014	0.013	0.016
	+	0.010	0.014	0.012	0.016

測定条件: 50mM Tris or bis-Tris, 100mM Cl⁻, 25°C. ヘモグロビン濃度: 5 μM on a metal basis after mixing. CO、NO の濃度: 混合後、それぞれ 50 μM 、1000 μM . CO-NO 置き換え反応は 420、または 405.7nm の吸光度変化を測定して調べた。

IHP +: 混合後、50 μM IHP 条件で測定された。

IHP -: IHP は存在しない条件で測定された。

IHP が無い条件では、CO-NO 置き換わり反応の最中は Fe(II)サブユニットに CO または NO が結合しているので、HbA や Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンはリガンド親和性が高い状態に保たれている。これは Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンでも言えることである。実際、Cr(III)-Fe(II)、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 解離速度定数の値は HbA のものに非常に近い。Cr(III)-Fe(II)、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 解離速度定数の値はほとんど pH 依存性を示さなかった。これらの結果から、Cr(III)-Fe(II)、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 解離速度定数の値がヘモグロビンが持ちうる最も遅い CO 解離速度だと考えられる。 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ と $\alpha_2(\text{Mn})\beta_2(\text{Fe})$ の CO 解離速度の方が $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ と $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mn})$ のものより少し遅く、前者の速度が約 0.007s⁻¹、後者の速度が約 0.012s⁻¹である。

他方、Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは Fe(II)サブユニットに CO、または NO が結合しているので、ヘモグロビンの構造の平衡状態がリガンド親和性が高い方向に移動している。だから、これらの混成ヘモグロビンの CO 解離速度定数は溶液の pH や IHP 条件に強く依存している。CO 結合型 Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは、pH6.5、IHP 存在条件下ではほぼデオキシヘモグロビンと似た 4 次構造をしているし(Shibayama et al., 1986a)、その条件下で Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンと Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンとがほぼ似た CO 解離速度を示しているので、pH6.5、IHP 存在条件での Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 解離速度定数がヘモグロビンが持ちうる最も速い速度定数だと考えられる。 $\alpha(\text{Fe})$ 、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの最も速い CO 解離速度定数はどちらも約 0.2s^{-1} である。

Samaja らは CO が 1 個だけ結合した HbA の CO 解離速度定数を報告している。 $\alpha(\text{Fe})$ 、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの速度定数としてそれぞれ $0.16\text{-}0.22\text{ s}^{-1}$ 、 $0.10\text{-}0.15\text{ s}^{-1}$ と報告している(Samaja et al., 1987)。この速度はほとんど IHP 依存性が無い。他にもリガンド親和性が低い状態の HbA の CO 解離速度が報告されているが(Sharma et al., 1976, 1991; Simolo et al., 1985)、このいずれもが今回私が測定した最も速い CO 解離速度定数とよく一致している。

混成ヘモグロビンの CO 解離速度の解析の結論

残念ながら測定手段の制限のため、中間的解離速度を持つヘモグロビンを観測することはできない。混成ヘモグロビンには常にリガンドが結合しているので、混成ヘモグロビンの平衡状態はオキシヘモグロビン型のものが増える方向に偏っている。デオキシヘモグロビン型の混成ヘモグロビンを安定化させるのが難しい。

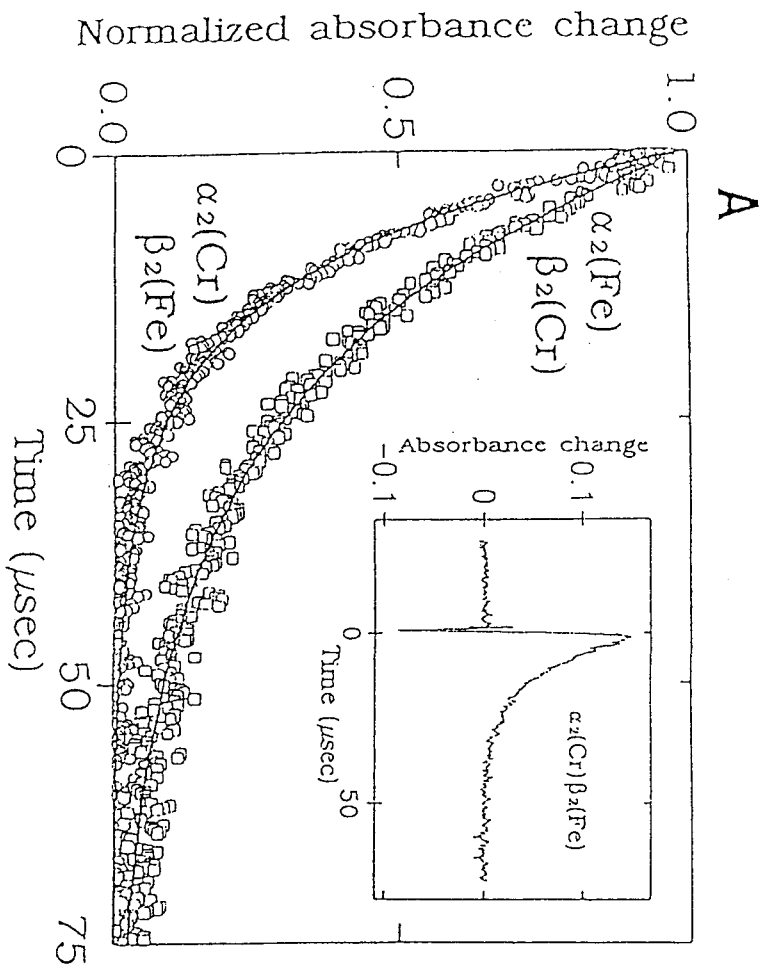
金属置換混成ヘモグロビンの O₂再結合速度と O₂解離速度

酸素結合反応以外の吸光度変化が観測された

酸素結合型金属置換混成ヘモグロビンの光解離（レーザーフォトリシス）実験はいくつかの酸素濃度条件で行われた。もちろん酸素が再結合するのになう吸光度変化が観測されたわけだが、Cr(III)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンではそれ以外に極端に速い吸光度時間変化も観測された（図 3-9A 内の挿入図、図 3-9E）。この 2 種類の混成ヘモグロビンは光感受性を持っている(Unzai et al., 1996; Kuila et al., 1991; Miyazaki et al., In preparation)ので、その極端に速い吸光度変化は、光で励起された金属ポルフィリンに由来していると考えられる。Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの場合、その速い吸光度変化は酸素再結合による速い吸光度変化と重なっている。速い吸光度変化の見かけの速度は、1260 μ M 酸素条件下で約 $0.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ くらいだった（その他の速度定数は Appendix-3 に示した）。この速い吸光度変化の速度は酸素濃度が高くなるにつれて速くなる傾向がある。Mg(II)サブユニット由来と考えられるその速い吸光度変化の吸光度変化幅は、測定する波長に依存し（図 3-10）、その波長依存性は Mg(II)PPIX のトリプレット状態の光吸収スペクトルと基底状態のそれとの差スペクトルにとってもよく似ていた(Kuila et al., 1991)。どちらの波長依存性も、432nm 付近に等吸収点を持ち、475nm 付近になだらかなピークがある。これらの事実より、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンのフラッシュフォトリシスで観測された極端に速い吸光度変化は、光で励起されてできたトリプレット状態の Mg(II)PPIX が基底状態に戻っていく過程であると考えられる。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの場合は（図 3-9A 内の挿入図）光が当たってまず吸光度が下がり、すぐに普通の酸素再結合の吸光度時間変化に戻っている。この間の時間は 2.5 μ sec 以内に終わっており、酸素の再結合過程と考えるには速すぎる。同じような極端に速い吸光度時間変化は Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンのフラッシュフォトリシス実験でも観測されていて、それはピコ秒領域で時間変化するような速い反応である(Shibayama et al., 1995b)。その速い時間変化は Ni(II)PPIX-近位ヒスチジン間結合がフラッシュ光で切れて元通り結合する過程と考えられている。この変化は速すぎて Fe(II)サブユニットのリガンド結合・解離機能にはほとんど影響を与えていないとされている。

このように混成ヘモグロビンを使ったフラッシュフォトリシス実験では、金属ポルフィリン由来の吸光度変化が観測されることもあるが、その変化速度が酸素結合・解離速度よりも極端に速いのでこれらを区別して測定することができる。ただし Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンのフラッシュフォトリシス実験の場合、残念ながら Mg(II)サブユニット由来の吸光度変化と Fe(II)サブユニットの酸

図 3-9 酸素結合型金属置換混成ヘモグロビンのレーザーフォトリシスによる酸素再結合反応
測定条件：50mM bis-Tris or Tris, 100mM Cl⁻, 25°C, Detected at 436nm, ヘモグロビン濃度, 200 μM.



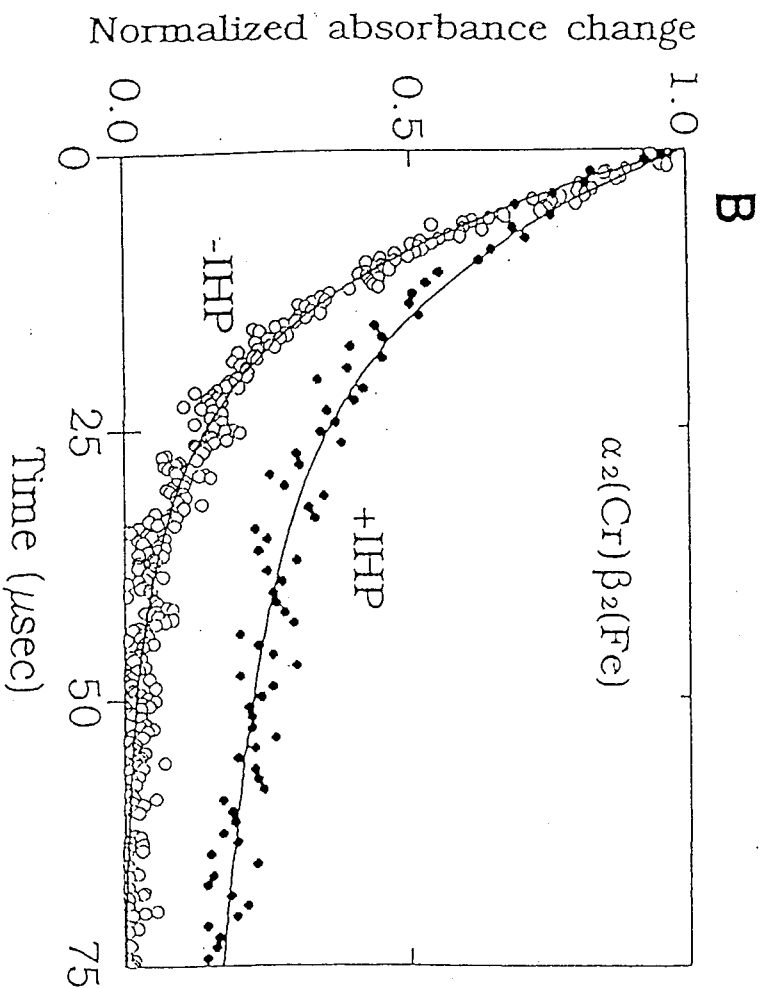
(A) 規格化された Cr(III)-Fe(III) 混成ヘモグロビンの酸素再結合反応

○: $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$; □: $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$; pH7.4, 酸素濃度、1260 μM.

いずれも単指数関数でフィットされている (黒実線)。

図内の挿入図に、規格化していない $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ の酸素再結合反応曲線を示した。

レーザーが当てられた瞬間 ($t=0$) 吸光度は減少しているが、これは Cr(III) ポルフィリンの吸光度変化だと考えられる。



(B) 規格化された $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの酸素再結合反応曲線

○: IHP の無い条件; ●: IHP 100 μM 条件, pH6.5, 酸素濃度 1260 μM.

○は単指数関数で、●は2つの指数関数の和でフィットされている (黒実線)。

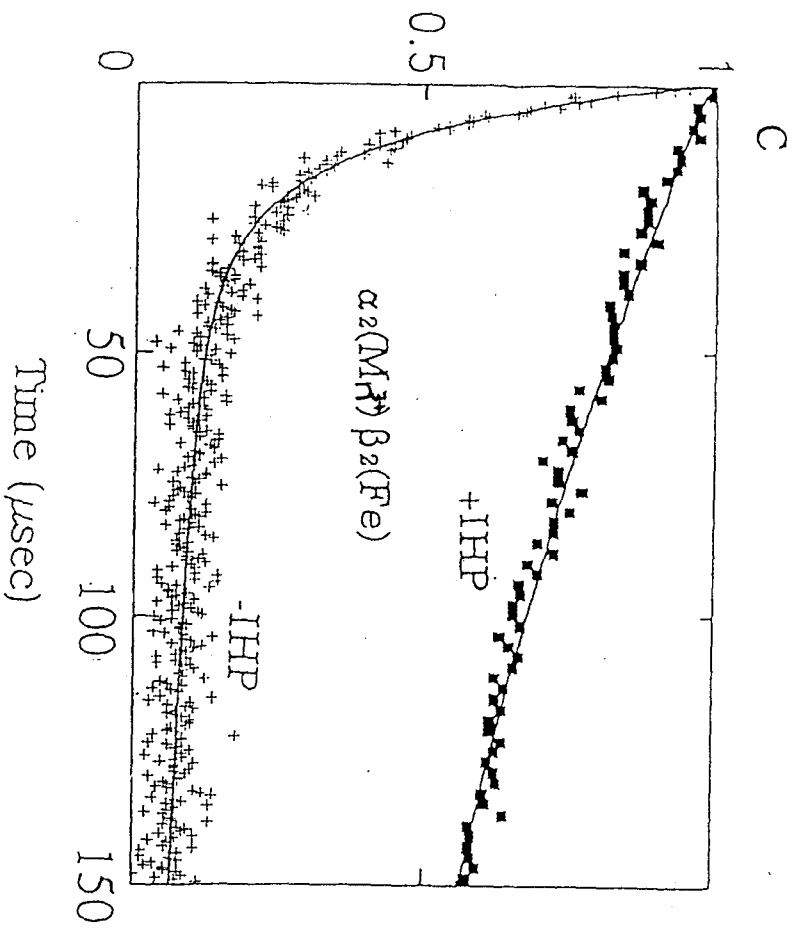
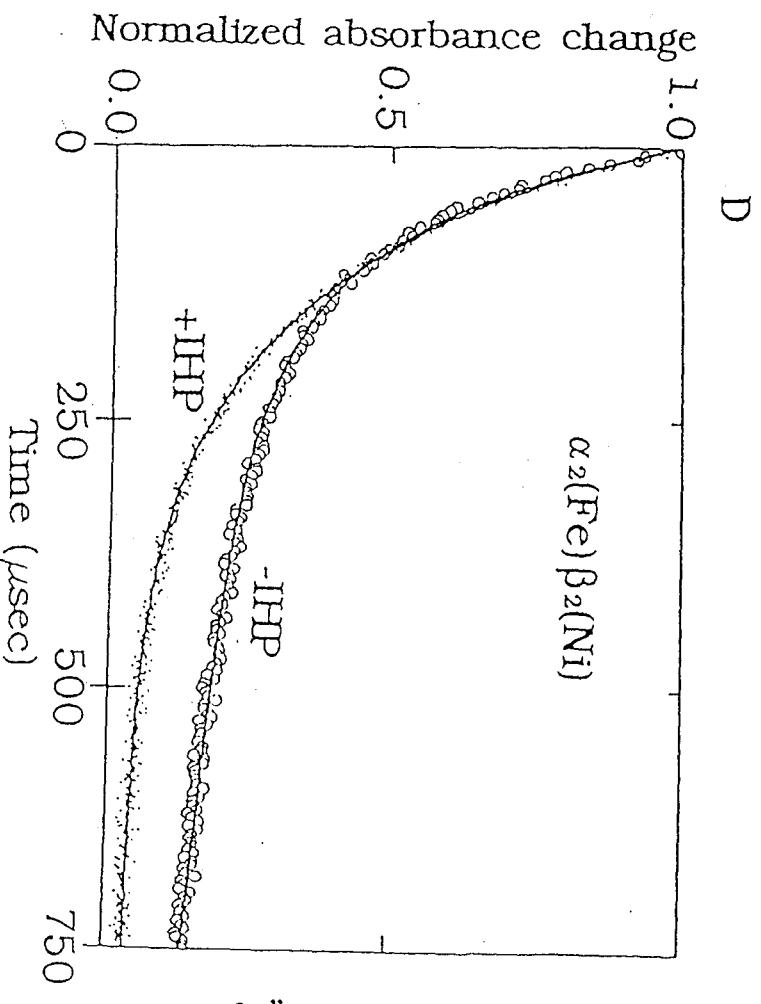


図 3-9 (C) 規格化された $\alpha_2(\text{Mn}^{3+})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの酸素再結合反応曲線

○: IHP の無い条件; ●: IHP 100 μM 条件, pH6.5, 酸素濃度 1260 μM .

○は2つの指数関数の和で、●は単指数関数でフィットされている (黒実線)。

酸素再結合反応曲線は、溶液に IHP が加えられると遅い反応だけになってしまった。



(D) 規格化された $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$ 混成ヘモグロビンの酸素再結合反応曲線

○: IHP の無い条件; ∴ IHP 100 μM 条件, pH7.4, 酸素濃度 262 μM (空気雰囲気)

○は2つの指数関数の和で、∴は単指数関数でフィットされている (黒実線)。

酸素再結合反応曲線は、溶液に IHP が加えられると単指数関数でフィットできるようになる。

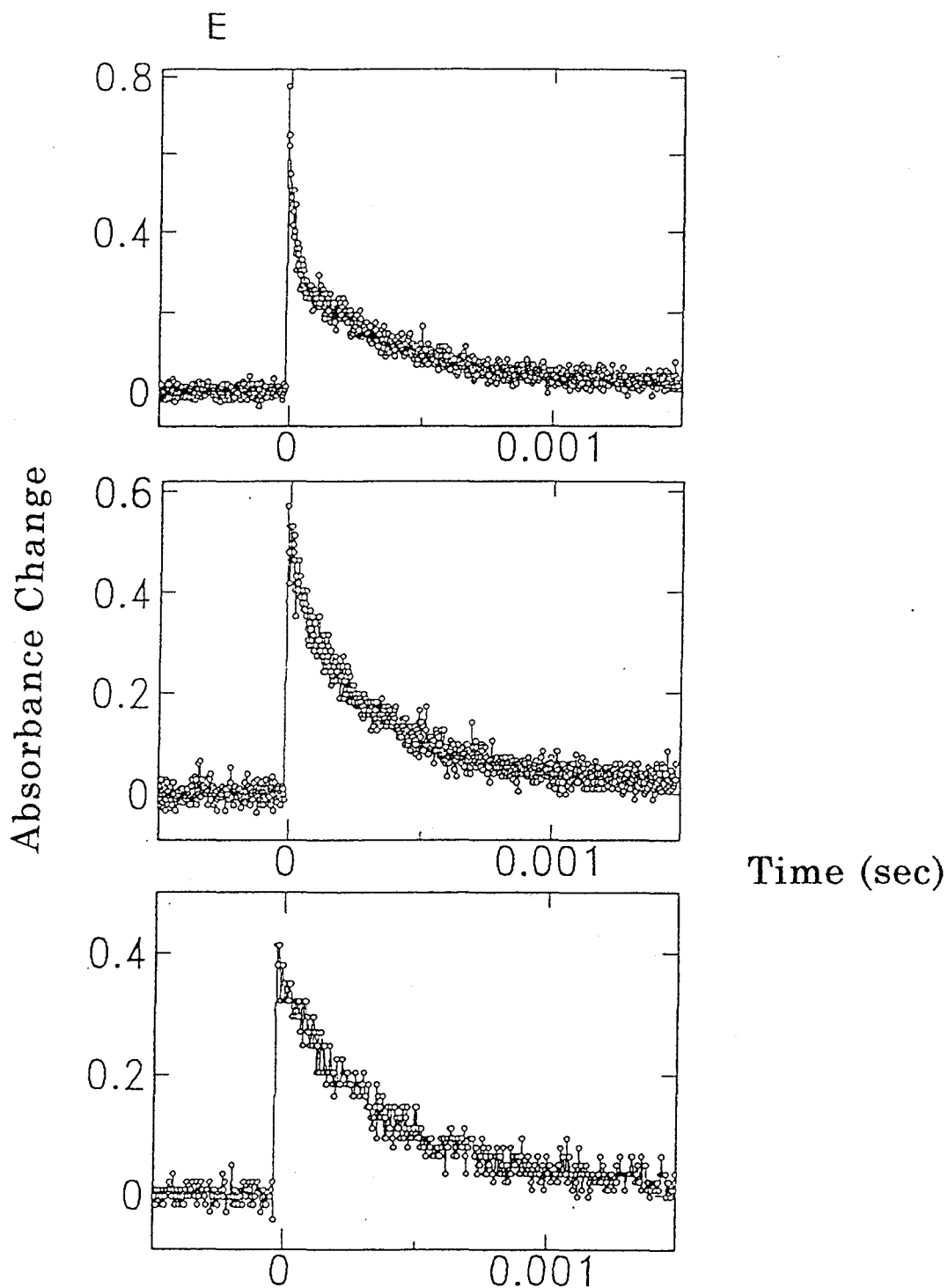


図 3-9 (E) $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの酸素再結合反応曲線
pH7.4, 酸素濃度 262 μM (空気雰囲気)

(上図) 436nm で測定された

(中図) 432nm で測定された

(下図) IHP 100 μM 条件で、432nm で測定された。

436nm で測定した場合は、とても速い成分が目立つが、432nm ではそれは極端に減る。そして、IHP が加えられると (432nm では) ほとんど観測されない。このとても速い成分は Mg(II) ポルフィリンがレーザーによって励起され、トリプレット状態になり、基底状態になっていくのを示す吸光度変化だと考えられる。

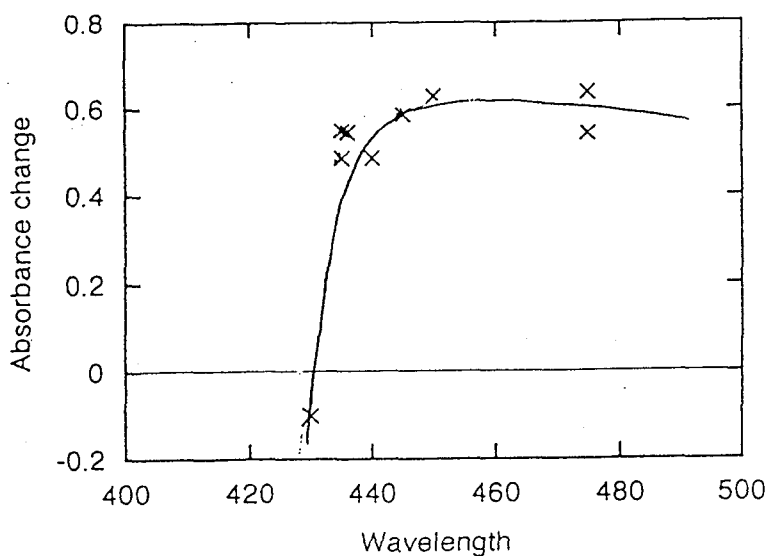
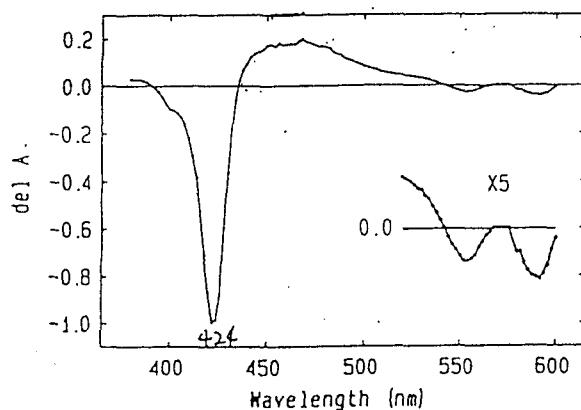


図 3-10 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンのレーザーフォトリシスで観測されたとても速い成分の吸光度変化の大きさの波長依存性

測定条件: 50mM bis-Tris or Tris, 100mM Cl⁻, 25°C, Detected at 436nm, ヘモグロビン濃度, 200 μM .

参考として、亜鉛(II)ポルフィリンの吸光スペクトルの、トリプレット状態と基底状態との間の差スペクトルの図を示した(Kuila et al., 1991)。亜鉛(II)ポルフィリンとマグネシウム(II)ポルフィリンの吸光スペクトルは、本質的に同じである。



[³(ZnP) - ZnP] kinetic difference spectrum of ZnHb. Conditions: 0.050 M KP_i, pH 7.0; [tetramer] $\sim 3 \mu\text{M}$; [IHP] $\sim 25 \mu\text{M}$.

素結合解離にともなう吸光度変化とが同じ方向(フラッシュ後、いったん 436nm の吸光度が大きくなって減衰する)なので酸素結合の速度が速いときには 2 つの吸光度変化が重なってしまって区別できない。酸素結合速度が遅い成分は区別できるのでそれは解析できる。

混成ヘモグロビンの酸素再結合反応の特徴

Cr(III)-Fe(II)、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素再結合にともなう吸光度の時間変化は単相性、もしくは 2 相性だった。単相性か 2 相性かどちらを示すかは溶液条件に依存した。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素再結合過程を示す吸光度時間変化を規格化して、図 3-9A に示した。Cr(III)-Fe(II)、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素結合過程は、pH が高いとき(pH8.4)単相性で速度はとても速かった。溶液の pH が下げられたり、ヘモグロビン溶液に IHP が加えられたりすると遅い酸素結合過程の成分が現れた。遅い成分の存在比は $\alpha_2(\text{Mn})\beta_2(\text{Fe})$ のもののほうが $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ のものより多かった。他方、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mn})$ と $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$ の観測された酸素再結合過程の性質は互いによく似ていた。

Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素再結合過程は pH7.4 で測定されている。Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素再結合過程を示す吸光度変化を規格化して図 3-9D に示した。Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの吸光度変化は溶液に IHP が無い条件では 2 相性で、IHP が加えられると遅い速度を持つ成分だけの単相曲線となった。先に述べた通り、436nm で観測された Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの吸光度変化には酸素濃度、IHP 条件に関わらず常に Mg(II)サブユニット由来の極端に速い成分があった(図 3-9E)。

観測された酸素の再結合反応を示す吸光度の時間変化には、大まかにいうと「速い変化」と「遅い変化」があったことになる。条件(使った混成ヘモグロビンの種類、溶液の pH、IHP 条件)によって、「速い変化」がほとんどであったり、「遅い変化」がほとんどであったり、中途半端な条件ではその両方の和の 2 相の曲線が観測された。

この結果を、まずは 2 状態モデル的に解析してみよう。「速い変化」とは、酸素親和性が高いヘモグロビンに酸素が高速で結合しているのを示す吸光度変化、他方、「遅い変化」とは、酸素親和性が低いヘモグロビンに酸素がゆっくり結合しているのを示す吸光度変化だと考えてみる。解析すれば速度定数が得られる。その結果の速度定数が、本当に 2 状態モデル的にきれいに 2 つのグループに分かれるかどうか注目してみる。

観測された酸素の再結合反応を示す吸光度の時間変化に、1 つの指数関数、

もしくは2つの指数関数の足し算を最小二乗法を使ってフィットさせた。得られた見かけの速度定数の酸素濃度依存性は式 3-19 を使って解析される。吸光度の時間変化が2相性で2つの指数関数でフィットした場合は、速い成分・遅い成分それぞれ別に解析した。観測された（見かけの）速度定数の酸素濃度依存性を示すグラフを作ると、測定点が一定の傾きの直線の上にはほぼ乗ることがわかった。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素再結合過程の見かけの速度定数の酸素濃度依存性を図 3-11A、B に示した。Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素再結合過程の遅い成分の速度定数の酸素濃度依存性を 3-11C、D に示した。見かけの速度定数は酸素濃度に比例しているので、最小二乗法によりそれぞれに最もよく合う直線を求めた。ただし、混成ヘモグロビンの酸素親和性が高くて、酸素解離速度が見かけの速度定数に比べて極端に遅いのが明らかな場合はグラフ中の原点を通る直線をフィットさせた。式 3-19 より、直線の傾きが酸素の結合速度定数を示し、縦軸切片が酸素解離速度を示す。

求められた酸素の結合速度定数(k'_{O_2})の値を表 3-6（次ページ）と図 3-12A、B に示した。

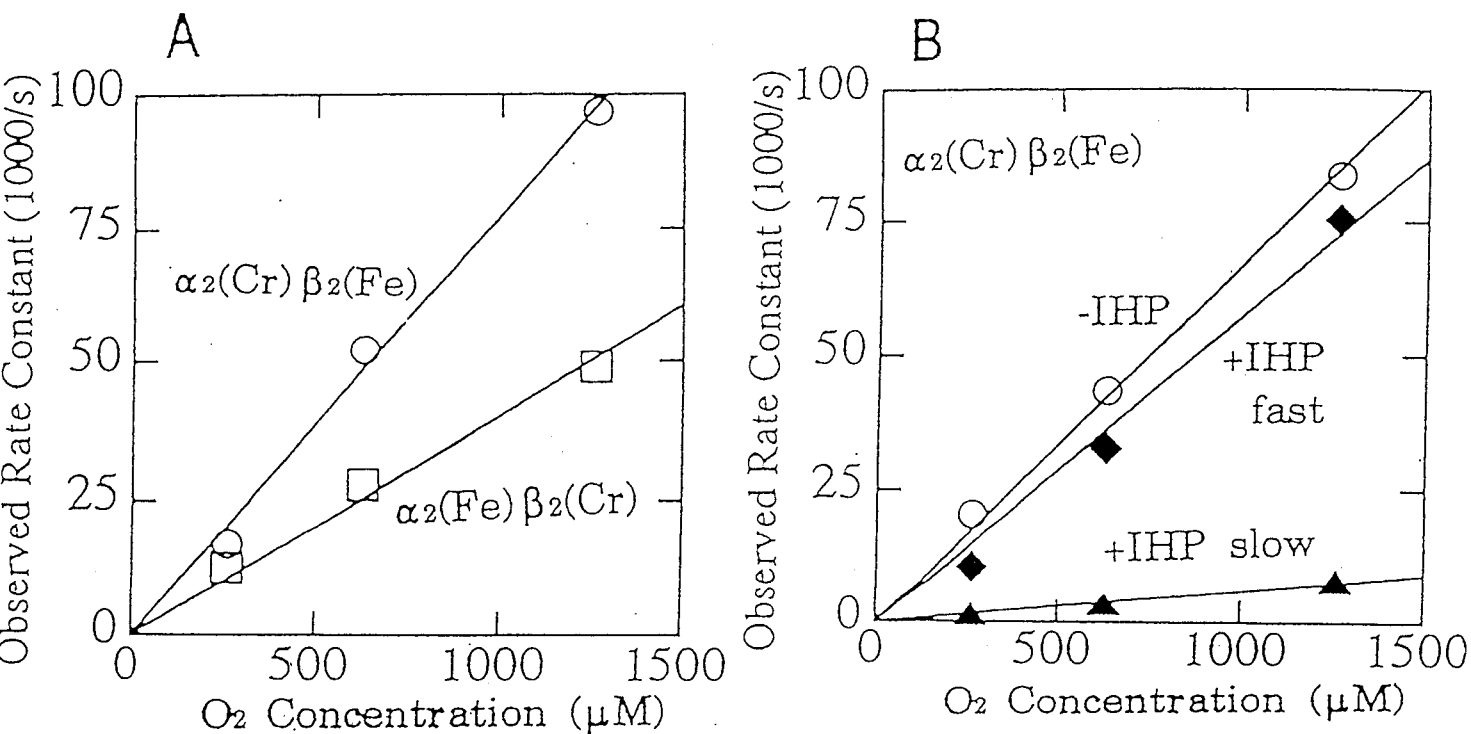


図 3-11 金属置換混成ヘモグロビンの見かけの酸素再結合速度の酸素濃度依存性

(A) Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの見かけの酸素再結合速度の酸素濃度依存性

条件：50mM bis-Tris, 100mM Cl, pH7.4, 25℃, Detected at 436nm,

ヘモグロビン濃度, 200 μM. ○: $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$; □: $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$.

Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素再結合反応曲線は、この条件では単指数関数でフィットできる。見かけの速度定数は酸素濃度に比例する。データに最もよくあう直線を黒実線で示した。直線の傾きが真の酸素結合速度定数を示す。

(B) $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ の見かけの酸素再結合速度の酸素濃度依存性

条件：50mM bis-Tris, 100mM Cl, pH6.5, 25℃, Detected at 436nm,

ヘモグロビン濃度, 200 μM. ○: -IHP 条件 (単指数関数でフィットされた) ;

100 μM IHP 条件では 2 相性となった。◆: +IHP 条件での速い相の速度定数;

▲: +IHP 条件での遅い相の速度定数.

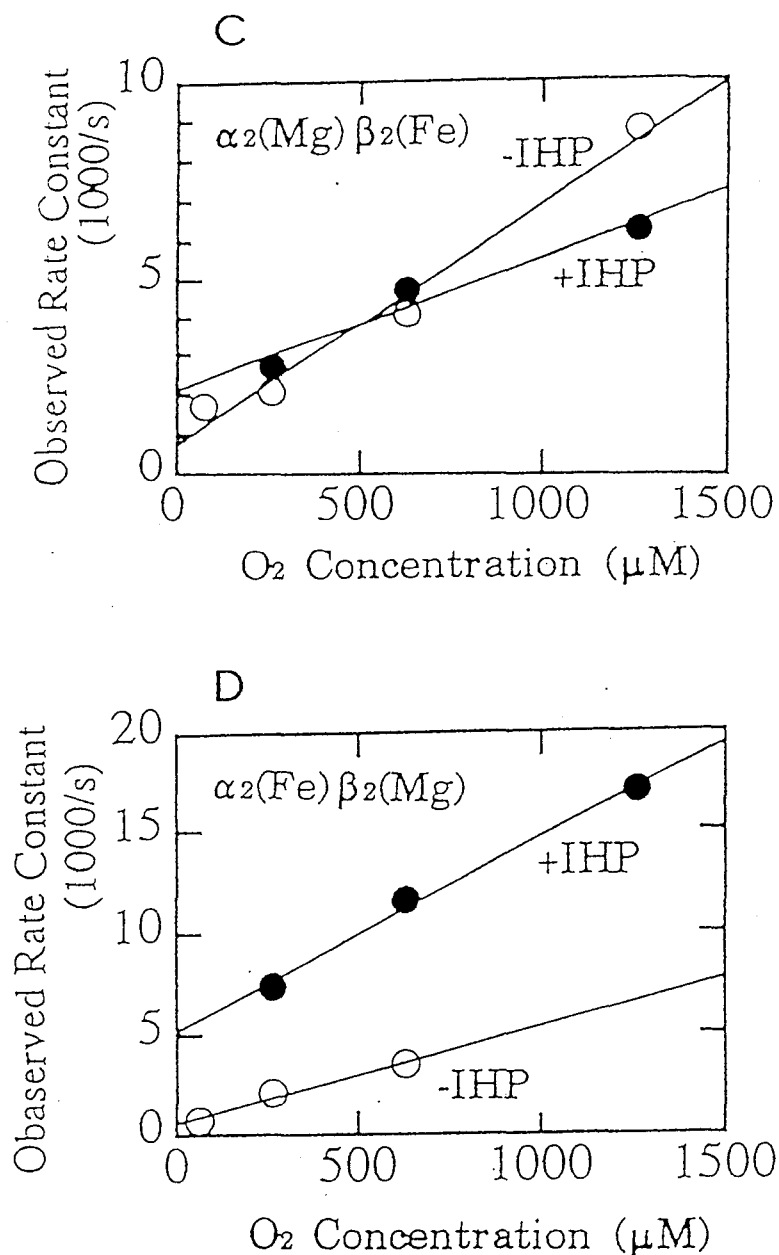


図 3-11 (C) $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ の見かけの酸素再結合速度の酸素濃度依存性
 条件：50mM bis-Tris, 100mM Cl⁻, pH7.4, 25℃, Detected at 436nm,
 ヘモグロビン濃度, 200 μM . ○: -IHP 条件; ●: 100 μM IHP 条件

(D) $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$ の見かけの酸素再結合速度の酸素濃度依存性
 条件：50mM bis-Tris, 100mM Cl⁻, pH7.4, 25℃, Detected at 436nm,
 ヘモグロビン濃度, 200 μM . ○: -IHP 条件; ●: 100 μM IHP 条件

レーザーフォトリシス実験で、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した反応曲線のうち、遅い相が酸素再結合反応を示すもの、と考えて、その見かけの速度定数の酸素濃度依存性をグラフにした。見かけの速度定数は酸素濃度にはほぼ比例した。データに最も良く一致する直線を黒実線で示した。グラフ中、直線の傾きが真の酸素結合速度定数、直線のグラフ縦軸切片が真の酸素解離速度定数を示す。

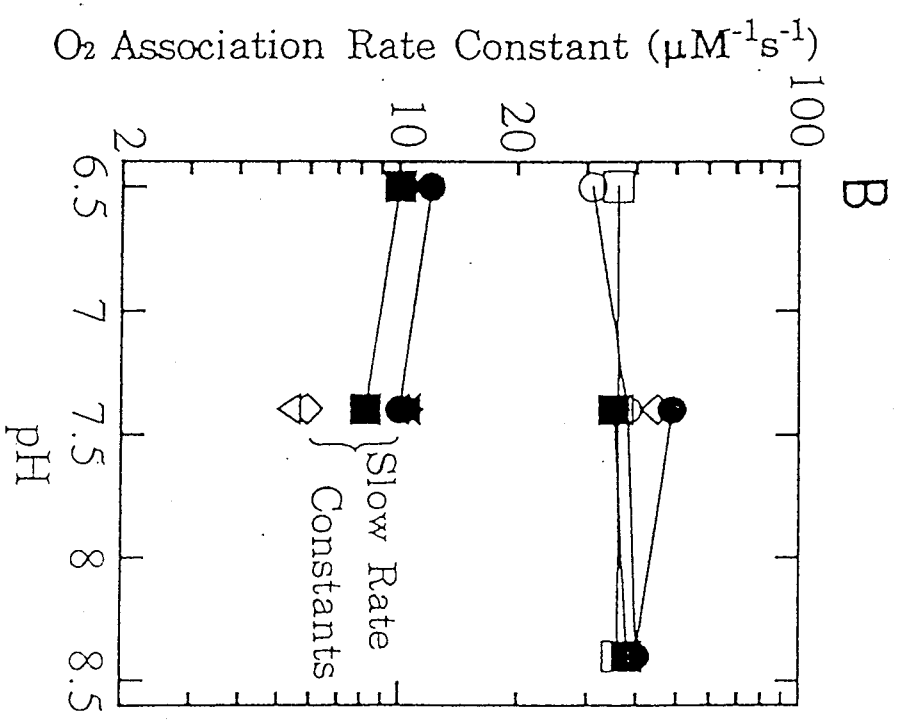
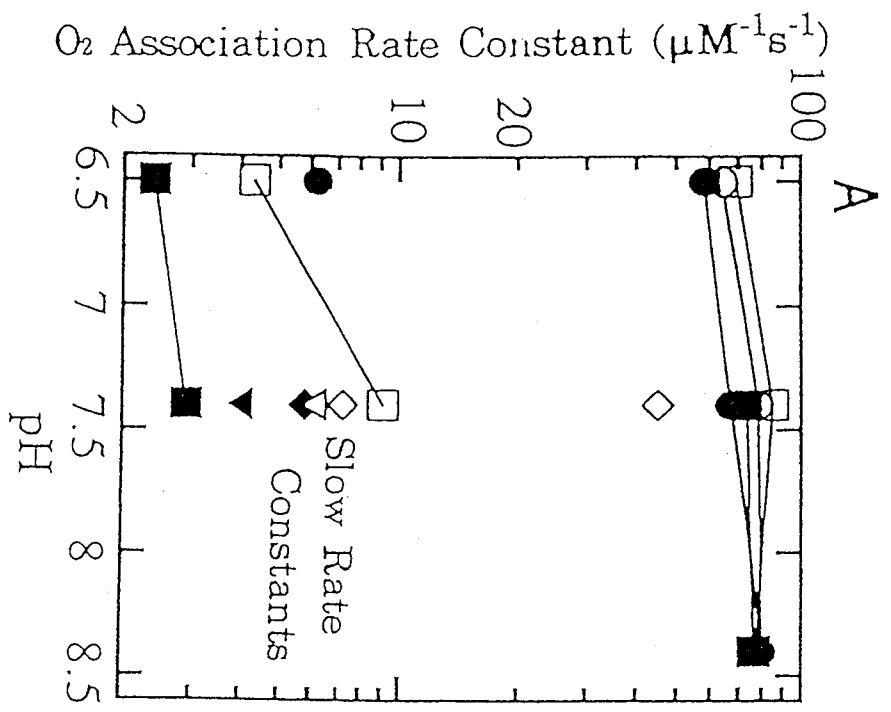


図 3-12 金属置換混成ヘモグロビンの酸素結合速度定数の pH 依存性
 (A) α_2 置換混成ヘモグロビン ($\alpha_2(\text{Metal})\beta_2(\text{Fe})$) の酸素結合速度定数
 (B) β 置換混成ヘモグロビン ($\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Metal})$) の酸素結合速度定数
 測定条件: 50mM bis-Tris or Tris, 100mM Cl⁻, 25°C, Detected at 436nm.
 ヘモグロビン濃度、200μM

○: Cr(III)-Fe(III) 混成ヘモグロビン; □: Mn(III)-Fe(III) 混成ヘモグロビン;
 ◇: Ni(III)-Fe(III) 混成ヘモグロビン; ▽: Mg(III)-Fe(III) 混成ヘモグロビン;
 白シンボルは、IHP の無い条件、黒シンボルは、100μM IHP 存在条件での速度定数
 図中、遅い速度定数は pH、IHP 依存性をほとんど示さない。他方、遅い速度定数は
 金属ボルナイリンや pH、IHP 依存性を示す。

表 3-6 金属置換混成ヘモグロビンの酸素結合速度定数

pH	IHP	$\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$		$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$	
		$k'_{\text{O}_2}(\text{fast})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{slow})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{fast})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{slow})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
6.5	—	64	-	31	-
	+	58 (60%)	6.2 (40%)	-	12
7.4	—	78	-	38	-
	+	67	-	49 (70%)	10 (30%)
8.4	—	80	-	40	-
	+	80	-	40	-

pH	IHP	$\alpha_2(\text{Mn})\beta_2(\text{Fe})$		$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mn})$	
		$k'_{\text{O}_2}(\text{fast})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{slow})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{fast})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{slow})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
6.5	—	69 (70%)	4.3 (30%)	36	-
	+	-	2.4	-	10
7.4	—	85 (90%)	9.1 (10%)	36	-
	+	73 (50%)	2.9 (50%)	35 (70%)	8.2 (30%)
8.4	—	77	-	36	-
	+	76	-	36	-

pH	IHP	$\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$		$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$	
		$k'_{\text{O}_2}(\text{fast})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{slow})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{fast})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{slow})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
7.4	—	45 (40%)	7.2 (60%)	45 (70%)	5.9 (30%)
	+	-	5.8	-	11

pH	IHP	$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$		$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$	
		$k'_{\text{O}_2}(\text{fast})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{slow})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{fast})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$k'_{\text{O}_2}(\text{slow})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
7.4	—	(Not determined)	6.1	(Not determined)	5.3
	+	(Not determined)	4.0	(Not determined)	11

IHP：—は IHP が存在しない条件で測定されたことを示す。+は 100 μM IHP が存在する条件で測定されたことを示す。

$k'_{\text{O}_2}(\text{fast})$ ：混成ヘモグロビンが示した速い酸素再結合速度定数。混成ヘモグロ

ピンが2相の再結合過程を示した場合は2つの指数関数をフィットさせて、速い成分の見かけの速度定数から求めた。速い成分が反応全体のうち占める割合を速度定数の後ろのカッコの中に百分率で示した。速い成分しか観測されなかった場合は、遅い成分の欄には－（バー）が示されている。

$k'_{O_2}(\text{slow})$ ：混成ヘモグロビンが示した遅い酸素再結合速度定数。混成ヘモグロビンが2相の再結合過程を示した場合は、遅い成分の見かけの速度定数から酸素再結合速度定数を求めた。遅い成分が反応全体のうち占める割合は百分率で示した。

$k'_{O_2}(\text{fast})$ 、 $k'_{O_2}(\text{slow})$ 、両速度成分の存在割合は各酸素濃度で観測された存在割合の平均値である。この存在割合は、酸素濃度が低くなるにつれて速い速度成分の割合が少し減り、遅い速度成分の割合が少し増える傾向があったが、あまり顕著ではない。図3-13に、2相の反応が観測された場合、酸素濃度にどのくらい依存して遅い相の存在割合が変化したかを示す。

解析の結果出てきた速度定数は、ほぼ2グループに分かれてしまった

図3-12A, Bから α 置換、 β 置換混成ヘモグロビンの両方で、酸素結合速度定数は速い数字を示すものと遅い数字を示すものの2グループに分けることができることがわかる。遅い速度定数を示すものには少し速度に幅があるが、酸素親和性の低いヘモグロビンの酸素結合速度に相当する範囲に収まっている。様々な酸素親和性を持つ金属置換混成ヘモグロビンを使ったにも関わらず、ヘモグロビン溶液中には、だいたい2状態モデル的に「高い酸素親和性を持つもの」と「低い酸素親和性を持つもの」の2種類のヘモグロビンがある、と考えざるを得ない。

本当は、もっといろいろな速度定数が出てくることを期待していた。今回の酸素再結合実験は、ヘモグロビンの構造が微妙な状態——酸素親和性の高いものもあれば、低いものもあり、いろいろな分子種が混じっていると考えられる状態——の時の性質を調べるのに最も適した方法だからである。まず、酸素の再結合速度はとても速いので、もし中途半端な酸素親和性を持つヘモグロビンが溶液中にあれば、それが構造変化してしまわないうちに性質を調べることができるのでは？と期待した。また、光によってヘモグロビンから酸素が離れた直後、ヘモグロビンの構造の平衡状態はオキシ型構造からデオキシ型構造の方向へずれ始める。その構造変化の最中に、オキシ型構造でもなく、デオキシ型構造でもないヘモグロビンがあらわれて、その性質を調べられないか？とも期待した。しかし実際には、速度定数は速いものと遅いものの2グループ

に分類できたのである。2相性の酸素再結合反応曲線が観測された場合でも、速い相の速度、遅い相の速度、それぞれが酸素濃度に比例したので（例：図 3-11B）、異なる結合速度定数を持つ2種類のヘモグロビンが溶液中にあったと考えられる。

2相の酸素再結合反応曲線が観測された場合、遅い反応相はどのようにして形成された？

CO結合曲線の解釈についての項で、ヘモグロビンの4次構造変化が律速となっている反応が遅い相を形成しているという可能性について述べた。しかし、今回の実験で観測された酸素再結合反応の見かけの速度は、速い相の速度定数も、遅い相の速度定数も、酸素濃度に比例している。この事実は、遅い反応相がヘモグロビンの4次構造変化の速度とは関係なく、観測されている速度で酸素を結合しているヘモグロビン成分が確かにあることを示す。

では、混成ヘモグロビンの酸素再結合反応で2相の反応曲線が観測された場合、遅い相は、通常のアキシヘモグロビンの酸素再結合実験のようにつくられているのだろうか。序論でも述べたが、通常のアキシヘモグロビンにレーザーをあてて酸素を解離させ、酸素が再結合するところを観測すると、条件によっては2相の反応曲線が観測される。レーザーがあてられた直後、アキシヘモグロビンの構造を保ったデオキシヘモグロビンという非常に不安定なものがあらわれる。このヘモグロビンは4次構造変化して通常のアキシヘモグロビンになろうとする。ここでヘモグロビンの4次構造変化の速度と、酸素の再結合速度の競争が始まる。4次構造変化する前に酸素が結合する場合は、アキシヘモグロビンの性質が保たれているので速い酸素の再結合速度が観測される。酸素が再結合する前に、4次構造変化を起こしてしまったヘモグロビンは、通常のアキシヘモグロビンとなり、ここにゆっくり酸素が結合するのが遅い相として観測される。こうして、通常のアキシヘモグロビンの酸素再結合実験では2相の反応曲線が観測される。金属置換混成ヘモグロビンでも同様だろうか？

必ずしもそうではないと考えられる。もともと酸素親和性の低いNi(II)-Fe(II)やMg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使った場合は、最初から酸素親和性の低い状態のヘモグロビンがあったので遅い酸素結合反応相も観測された、と考える方が自然である。また、Cr(III)-Fe(II)とMn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使った場合でも、2相の酸素再結合反応が観測された場合、レーザーをあてられる前から酸素親和性の低いヘモグロビンがあったと考えられる実験がある。酸素光解離のためのレーザーのパワーをフィルターを使って弱くすると、2相の酸素結合曲線の遅い相の存在率が増えた、という結果が出ているのである（図 3-14）。この現象は、ヘモグロビン溶液に最初から酸素親和性の低いものがある、とし

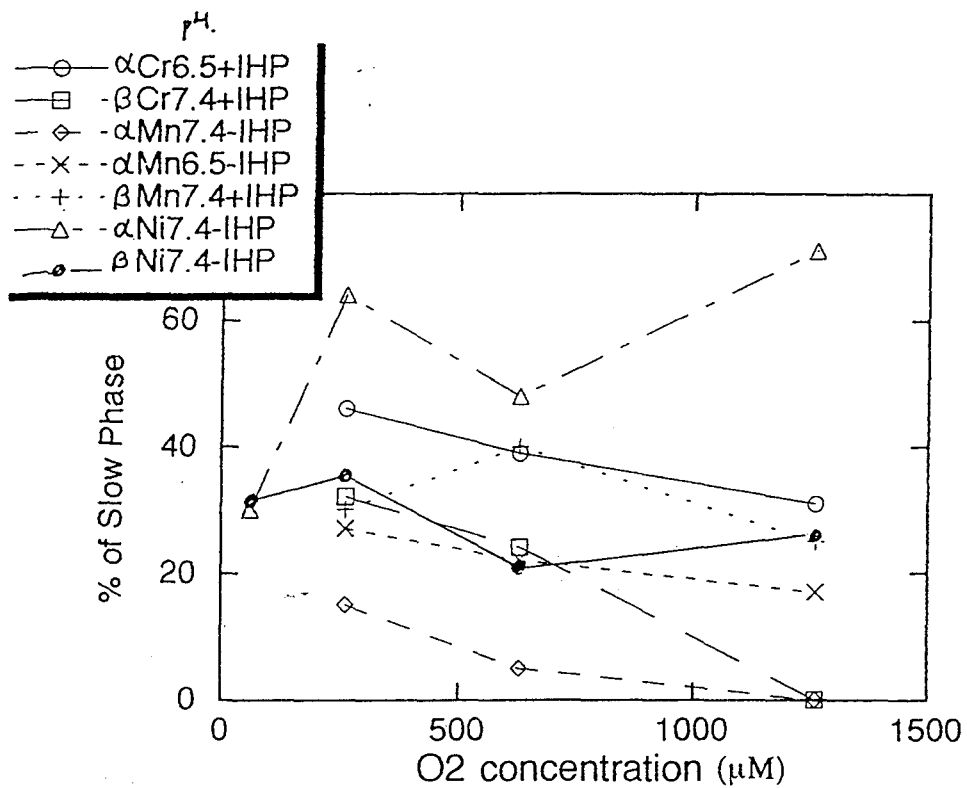


図 3-13 金属置換混成ヘモグロビンの酸素再結合実験で 2 相の反応曲線が観測された場合の遅い相の存在率の酸素濃度依存性

測定条件：50mM bis-Tris or Tris, 100mM Cl⁻, 25℃, Detected at 436nm.

ヘモグロビン濃度、200μM

全体に左肩上がり（酸素濃度が低いほど、遅い相の存在率が大きいことを示す）だが、極端ではない。

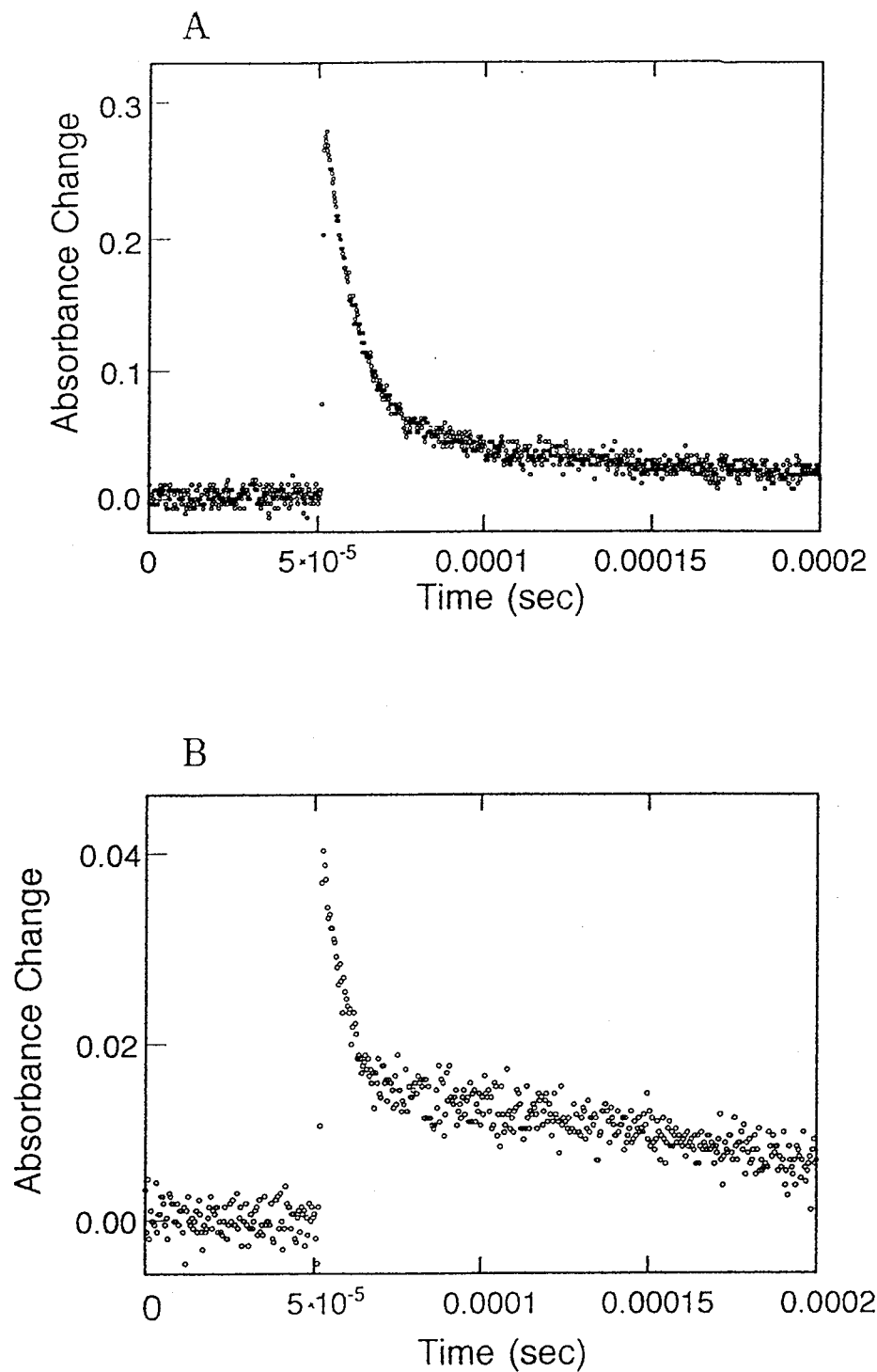


図 3-14 $\alpha_2(\text{Mn}^{3+})\beta_2(\text{Fe})$ の酸素再結合反応曲線のレーザー強度依存性

測定条件：50mM bis-Tris, 100mM Cl⁻, pH6.5, 25℃, Detected at 560nm,
ヘモグロビン濃度、200 μM ; 酸素濃度, 1260 μM ; IHP はない。

(A) $\alpha_2(\text{Mn}^{3+})\beta_2(\text{Fe-O}_2)$ にレーザーをそのままあてて、酸素がヘモグロビンに再結合するところを 436nm で測定したもの。

Fast phase : Slow phase = 80% : 20%

(B) $\alpha_2(\text{Mn}^{3+})\beta_2(\text{Fe-O}_2)$ にあてるレーザーの強さを、フィルターを通過させることによって弱くして、酸素解離量（吸光度変化）を(A)図の実験の約 10 分の 1 に減らした場合の酸素再結合反応曲線

Fast phase : Slow phase = 50% : 50%

ないと説明できない。レーザーのパワーを弱くしているので、あまり酸素の解離は起こっておらず、ヘモグロビンの構造変化もあまり起こっていないはずだからだ。レーザーのパワーを弱くすると見かけの遅い相の存在率が増えた事は、酸素親和性の高いヘモグロビンと低いヘモグロビンとの量子収量の違いで説明できる。もちろん酸素親和性の高いヘモグロビンの量子収量の方が小さい（酸素が放出されにくい：序論その3の注釈参照）。レーザーのパワーを弱くすることで酸素親和性の高いヘモグロビンからは酸素があまり放出されなくなり、結果として酸素親和性の低いヘモグロビンの酸素の放出・再結合が目立った、と説明できる。

もちろん、混成ヘモグロビンを使った系でも、通常のヘモグロビンと同様の4次構造変化が起こっていると考えられる。酸素はその濃度に比例した速度で再結合する。酸素濃度が低くなれば、それに比例して見かけの酸素再結合速度が遅くなる。レーザーフォトリシス実験で、ヘモグロビンの4次構造変化速度と酸素再結合速度が競争している条件では、酸素濃度が薄くなればなるほど、酸素が再結合する前にデオキシヘモグロビン型に4次構造変化してしまうものが増えるはずだ。このことが、実験条件の酸素濃度が減るにしたがって2相反応曲線の遅い相の存在率が増える傾向があった、という結果にあらわれていると考えられる*。しかし、今回の金属置換混成ヘモグロビンを使った実験では、この傾向は顕著ではない。だから、2相の酸素再結合曲線が観測された場合、その遅い相は、光解離をする前にすでに溶液中にあった酸素親和性の低いヘモグロビンに酸素がゆっくり結合することによる吸光度時間変化が主なものだと考えられる。

ここで注意しなければならないのが、先程も述べたヘモグロビンの量子収率である。2相性を示した酸素再結合曲線の部分光解離の例で見たように、見かけの速い相：遅い相の存在比はレーザーのパワーに依存して変わってしまう。だから、必ずしも、見かけの両者の存在比がヘモグロビン溶液中に存在する酸素親和性の高いヘモグロビンと低いヘモグロビンの存在比を示すわけではない。今回のニッケル(II)-鉄(II)混成ヘモグロビンを使った実験では、50~100%の光解離を得られているが、クロム(III)-鉄(II)、マンガン(III)-鉄(II)混成ヘモグロビンを使った実験では、20~50%の光解離を得られたにすぎない。だから、光解離率の

* 酸素濃度が下がり、酸素が結合していない混成ヘモグロビンが増えたので、レーザーをあてる前の平衡状態で酸素親和性の低いヘモグロビンの割合が増えた可能性もある。この場合、レーザーをあてる前に既に酸素親和性の低い状態のヘモグロビンが存在していると考えられることになる。

小さかった実験では、酸素親和性の低いヘモグロビンの存在比が実際以上に大きくあらわれていると考えられる。

過去に報告されている酸素結合速度定数との比較

今回あらわれた2グループの酸素結合速度定数を、過去に報告されたヘモグロビンの酸素結合速度定数と比べてみる。

求められた酸素結合速度定数のうち、速い数値を示したものは、ほとんど pH 依存性や IHP 依存性を示さず、また使われた金属ポルフィリンにも依存しなかったもので、それらはヘモグロビンが持ちうる最も速い酸素結合速度定数であると考えられる。約 $40\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $80\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ がそれぞれ $\alpha(\text{Fe})$ 、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの最も速い酸素結合速度定数である。これらの数値は今までに報告されている、光部分解離実験によって求められたヘモグロビンの4個目に結合する酸素の結合速度定数と非常に近い(Mathews et al., 1989; Philo & Lary, 1990; Vandegriff et al., 1991; Fronticelli et al., 1993)。

表 3-7 酸素親和性が高いヘモグロビンの酸素結合速度定数

	pH	k'_{O_2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	References
$\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$	7.4	78	①(This study)
$\alpha_2(\text{Mn}^{3+})\beta_2(\text{Fe})$	7.4	85	①(This study)
$\beta(\text{Fe})$ of HbA	7.0	100 ± 13	②
$\beta(\text{Fe})$ of HbA	7.4	64 ± 1	③
$\beta(\text{Fe})$ of HbA	7.4	146 ± 29	④
$\beta(\text{Fe})$ of HbA	7.0	87	⑤
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$	7.4	38	①(This study)
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mn}^{3+})$	7.4	36	①(This study)
$\alpha(\text{Fe})$ of HbA	7.0	28 ± 9	②
$\alpha(\text{Fe})$ of HbA	7.4	28 ± 1	③
$\alpha(\text{Fe})$ of HbA	7.4	42 ± 8	④
$\alpha(\text{Fe})$ of HbA	7.0	34	⑤

測定条件

① This study, 50mM bis-Tris, 100mM Cl^- , 25°C.

フラッシュフォトリシス実験で Cr(III)-、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した酸素再結合速度。

② Mathews et al. (1989) 0.1M bis-Tris, 0.1M KCl, 20°C.

異常鎖-正常鎖混成ヘモグロビンを使った酸素の部分光解離実験から求められた酸素結合速度定数。

③ Philo & Lary (1990) 0.1M Tris, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 21.5℃.

④ Vandegriff et al. (1991) 50mM bis-Tris, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 25℃.

⑤ Fronticelli et al. (1993) 0.1M bis-Tris, 0.1M KCl, 20℃.

③～⑤は、オキシヘモグロビンを使った酸素の部分光解離実験から求められた酸素結合速度定数。

さて他方、求められた酸素結合速度定数のうち、遅い値を示しているものは、速い値を示している速度定数のグループとは違って pH 依存性や IHP 依存性を示した。 α 置換混成ヘモグロビンの速度定数の値は、IHP が溶液に加えられることによって小さくなる。中でも $\alpha_2(\text{Mn})\beta_2(\text{Fe})$ の速度定数の値は IHP 存在下では極端に小さくなり、 $\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$ や $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ の速度定数の値よりもさらに小さくなってしまっている。これは $\alpha_2(\text{Mn})\beta_2(\text{Fe})$ の酸素親和性が IHP 存在下で $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ と同じくらい低くなる (Appendix-5, Masuda & Morimoto) ことに対応しているかもしれない。このようにヘモグロビン中の $\beta(\text{Fe})$ サブユニットが最も遅い酸素結合速度を示すのは、溶液中に IHP がある場合であることがわかった。その最も遅い結合速度定数の値は $2 \sim 6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ だと考えられる。

β 置換混成ヘモグロビンの $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの速度定数の IHP 依存性は予想外のものであった。 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$ や $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$ の酸素結合速度は IHP が加えられることによっておよそ倍に速くなったのである (約 $5\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ が約 $10\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ になった)。これは一見、IHP が加えられると混成ヘモグロビンの酸素親和性が低くなる性質と相反するよう見えるが、実は矛盾はない。後の頁で述べるが、IHP が加えられると $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$ や $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$ の酸素解離速度も極端に速くなる。IHP による酸素解離速度の加速が酸素結合速度の加速よりも激しいので、平衡定数は IHP が加えられると小さく (親和性が低く) なる。

今までに T-状態ヘモグロビンの酸素結合速度として報告されているものは、序論で述べた通り、Sawicki と Gibson の低酸素濃度条件下のヘモグロビンを使った実験(1977b)と、Shibayama らの Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使った実験(1995b)で求められたものがある。どちらも IHP はない条件で測定されている。この条件なら、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットが示した酸素結合速度が $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットのものより速い、という点では今回の金属置換混成ヘモグロビンの結果も含めて共通している。なお、過去に IHP 存在条件下で酸素親和性の低いヘモグロビンの酸素結合速度を測定した実験は報告されていない。

表 3-8 IHP 非存在下での遅い酸素結合速度の比較

k'_{O_2} for $\alpha(\text{Fe})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k'_{O_2} for $\beta(\text{Fe})$ ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	References
5.3~5.9	4~9	①(This study)
1.1~2.9	11.3~11.8	②
4.8	7.5	③

- ① This study. 50mM bis-Tris, 100mM Cl^- , pH7.4, 25°C. Ni(II)-、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した酸素再結合過程の遅い成分の酸素結合速度。
 ② Sawicki & Gibson (1977b) 50mM phosphate buffer, pH7.0, 20°C.
 ③ Shibayama et al. (1995b) 0.1M KPi , pH6.6, 20°C.

酸素型混成ヘモグロビンのフラッシュフォトリシスの結果からは酸素解離速度も分かる（序論その3）。見かけの反応速度定数の酸素濃度依存性にフィットさせた直線と、縦軸との切片が酸素解離速度を示す。しかし、Cr(III)-、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの速く酸素を再結合する成分の酸素解離速度は、見かけの反応速度定数に比べて極端に小さいと考えられるのでこの方法を使って解離速度を見積もるのは難しい。Cr(III)-、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンでも、遅い酸素再結合速度を示す成分の場合は縦軸切片が大きく酸素解離速度を見積もることができるものもある（ $\alpha_2(\text{Mn})\beta_2(\text{Fe})$ 、pH6.5、+IHP で縦軸切片が約 1000 s^{-1} ； $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mn})$ 、pH7.4、+IHP で縦軸切片が約 $1000 \pm 1000 \text{ s}^{-1}$ ）。しかしそのほとんどの縦軸切片は 0 s^{-1} を付近で、しかもデータの精度も良くないので酸素解離速度の見積もりは難しかった。Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使った実験では、酸素濃度の低い条件でのデータもあり、縦軸切片もある程度大きかったので酸素解離速度の見積もりはできた（表 3-9）。

表 3-9 Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの遅い酸素結合速度を示した成分の酸素解離速度

Hybrid Hb	IHP	$k_{O_2} (\text{s}^{-1})$
$\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$	—	500
	+	1300
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$	—	200
	+	4300
$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$	—	800
	+	2100
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$	—	600
	+	5200

50mM bis-Tris, 100mM Cl^- , pH7.4, 25°C.

IHP: ー、ヘモグロビン溶液中に IHP は無い条件での測定。+、ヘモグロビン溶液中に 100 μ M IHP がある条件での測定。

k_{O2}: ヘモグロビンの酸素解離速度。酸素再結合過程の見かけの速度定数の酸素濃度依存性のデータのプロットにフィットさせた直線の縦軸切片から求めた値。

しかし、やはり精度は良くない。どうしても誤差が大きい。Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素解離速度は、酸素平衡曲線から求められた平衡定数と、今回の実験から求められた酸素結合速度定数の比から求めてみる。酸素平衡定数として混成ヘモグロビンの K₁ の値を使う。酸素解離速度定数(k_{O2})は結合速度定数(k'_{O2})と K₁ の値から $\{k_{O2} = k'_{O2} / K_1\}$ によって計算される。平衡定数を比較するものとして HbA の K₁ の値も表に挙げた。

表 3-10 酸素親和性が低い状態の混成ヘモグロビンの酸素平衡定数、酸素結合速度定数、酸素解離速度定数

Hybrid Hb	IHP	K _{O2} (μ M ⁻¹)	k' _{O2} (μ M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{O2} (s ⁻¹)
α_2 (Ni) β_2 (Fe)	ー	0.014	7.2	530
	+	0.0028	5.8	2100
α_2 (Fe) β_2 (Ni)	ー	0.019	5.9	300
	+	0.0036	11	3000
α_2 (Mg) β_2 (Fe)	ー	0.0065	6.1	1000
	+	0.0026	4.0	1500
α_2 (Fe) β_2 (Mg)	ー	0.0062	5.3	850
	+	0.0023	11	4700
HbA	ー	0.013		
	+	0.0030		

IHP: ー、ヘモグロビン溶液中に IHP は無い条件での測定。+、ヘモグロビン溶液中に IHP がある条件での測定。酸素平衡曲線は 2mM IHP、酸素結合速度は 100 μ M IHP 条件で測定されている。

K_{O2}: 混成ヘモグロビンの Adair 定数。酸素平衡曲線から求められた K₁ の値。Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの K₁: (Shibayama et al., 1986a, 50mM bis-Tris, 100mM Cl⁻, pH7.5, 25 $^{\circ}$ C); Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの

K_1 : (Miyazaki et al., in preparation, 50mM bis-Tris, 100mM Cl^- , pH7.4, 25°C); HbA の K_1 の値 (Imai, 1982, 50mM bis-Tris, 100mM Cl^- , pH7.4, 25°C). 760mmHg 酸素分圧を $1260\mu\text{M}$ 酸素濃度とした。
 $1.00\text{mmHg}^{-1} = 0.603\mu\text{M}^{-1}$ 。

k'_{O_2} : 混成ヘモグロビンの酸素結合速度定数の値。見かけ上遅い酸素再結合過程を示した成分の酸素結合速度定数の値。(50mM bis-Tris, 100mM Cl^- , pH7.4, 25°C)

k_{O_2} : 計算された混成ヘモグロビンの酸素解離速度定数の値。混成ヘモグロビンの酸素平衡定数と酸素結合速度定数の比 $\{k_{\text{O}_2} = k'_{\text{O}_2} / K_1\}$ から求めた。

表 3-10 の酸素解離速度定数は、表 3-9 に挙げた解離速度定数とよく一致することが分かる。つまり、酸素再結合実験で観測された見かけの遅い時間変化を、酸素が結合していない状態（酸素平衡曲線の K_1 の値を使ったので）の混成ヘモグロビンに酸素が結合している過程だと仮定してみたところ、酸素平衡定数と酸素結合速度定数、酸素解離速度定数の 3 者のつじつまが合ったことになる。酸素再結合実験であらわれた遅い反応は、酸素親和性の低いデオキシ型ヘモグロビンに酸素がゆっくり結合しているのを示していたと考えられる。

Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素親和性 (K_1) は IHP 依存性や金属ポルフィリン依存性を示しているが、その変化が結合速度・解離速度の変化と結びつけられた。 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットと $\beta(\text{Fe})$ サブユニットとで速度定数の変化の仕方が違う。Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの酸素親和性が低くなるとき、結合速度は少し速くなって逆行しているが、酸素の解離速度が速くなるのが顕著なので、 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットの酸素親和性は主に酸素の解離速度の変化で調節されているように見える。他方、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの酸素親和性が低くなるときは、酸素の結合速度は遅くなり、酸素の解離速度は速くなる。つまり、結合速度と解離速度の両方の変化が、酸素親和性の調節に貢献している。

混成ヘモグロビンの O_2 結合速度の解析の結論

混成ヘモグロビンの O_2 結合速度も、速い結合速度と遅い結合速度の 2 グループに分類できた。それぞれ、今までに「R 状態ヘモグロビン」と「T 状態ヘモグロビン」の O_2 結合速度定数と言われていたものに相当する。

速い結合速度定数は、用いられた混成ヘモグロビンや、溶液の pH、IHP 条件にほとんど依存しなかったので、2 状態モデルでいう所の R 状態ヘモグロビンの結合速度定数にはほぼそのまま相当する。

しかし、遅い結合速度のグループに分けられた速度定数は溶液条件に依存する。その変化は、混成ヘモグロビンの K_1 の値（最初に結合する酸素に対する平衡定数）の溶液条件に依存した変化とつじつまの合うものだった。ヘモグロビンの酸素親和性が低い状態の中での酸素親和性の調節のされ方が、 α (Fe) サブユニットと β (Fe) サブユニットとで違う。

金属置換混成ヘモグロビンの O₂ 解離速度

Cr(III)-Fe(II)、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素解離速度は、O₂-CO 置き換え反応によって測定された（見かけの速度定数は Appendix-4 の表に示した）。

見かけの反応速度定数の逆数の {酸素濃度 / 一酸化炭素濃度} 依存性のグラフを図 3-15 に、また図中のデータにフィットさせた直線と縦軸との切片から求めた酸素解離速度定数(k_{o2})を表 3-11 に示した。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの解離速度定数の値は Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのものとよく似ていた。混成ヘモグロビン中の β(Fe)サブユニットの酸素解離速度定数が α(Fe)サブユニットのものより少し大きかった。

表 3-11 Cr(III)-Fe(II)、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素解離速度

pH	IHP	α ₂ (Cr)β ₂ (Fe)	α ₂ (Fe)β ₂ (Cr)	α ₂ (Mn)β ₂ (Fe)	α ₂ (Fe)β ₂ (Mn)
		k _{o2} (s ⁻¹)	k _{o2} (s ⁻¹)	k _{o2} (s ⁻¹)	k _{o2} (s ⁻¹)
6.5	—	47	28	26	21
	+	23	23	14	54
7.4	—	31	17	29	16
	+	23	22	22	18
8.4	—	31	14	25	12
	+	32	12	24	11

この O₂-CO 置き換え反応の最中は、ずっとリガンド（酸素もしくは一酸化炭素）が混成ヘモグロビンに結合しているので、ヘモグロビンの構造はリガンド親和性が高い状態が保たれていると考えられる。また、混成ヘモグロビンの酸素解離速度定数の値は pH や IHP 条件にほとんど依存しなかった。これらのことから、Cr(III)-Fe(II)、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した酸素解離速度は、ヘモグロビンの最も遅い酸素解離速度だと考えられる。約 15 s⁻¹が α(Fe)サブユニットの、約 30 s⁻¹が β(Fe)サブユニットの最も遅い酸素解離速度である。これらの値は以前に報告されていた HbA の酸素解離速度と非常に近い(Olson, 1971b)。

表 3-11 には Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素解離速度定数は出していない。この O₂-CO 置き換え実験では、酸素親和性の低い状態のヘモグロビンの酸素解離速度の見積もりが難しかったからである。

Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの O₂-CO 置き換え実験も行った。濃縮された混成ヘモグロビンと、酸素で飽和した緩衝液で薄めることによってヘモグロビン溶液を用意した。他方、一酸化炭素溶液を薄めたものを用意した。その両者を Stopped-flow 装置で混合するという実験を行い、ヘモグロビンに結合してい

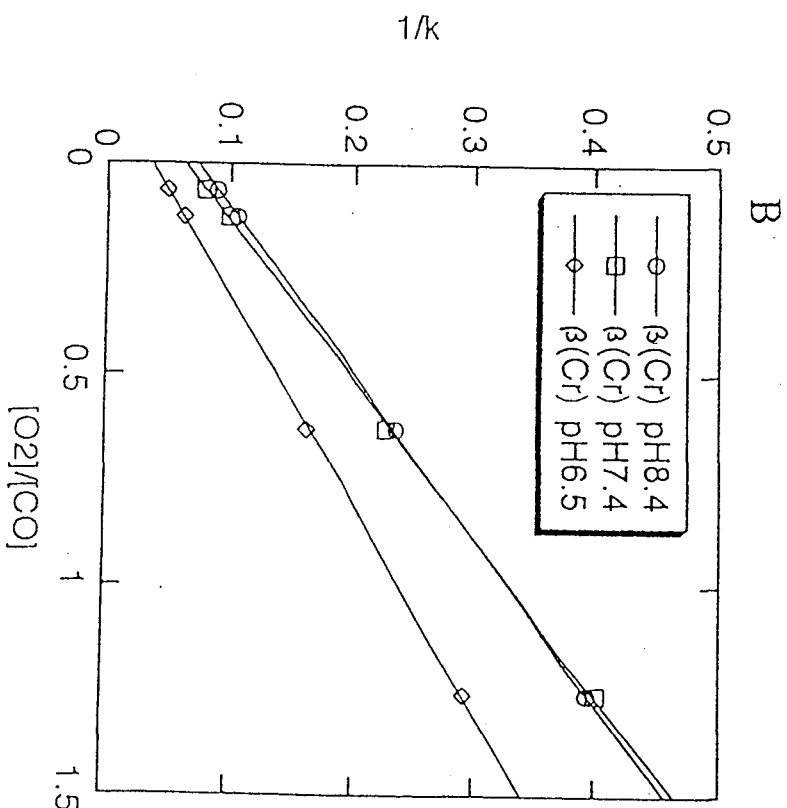
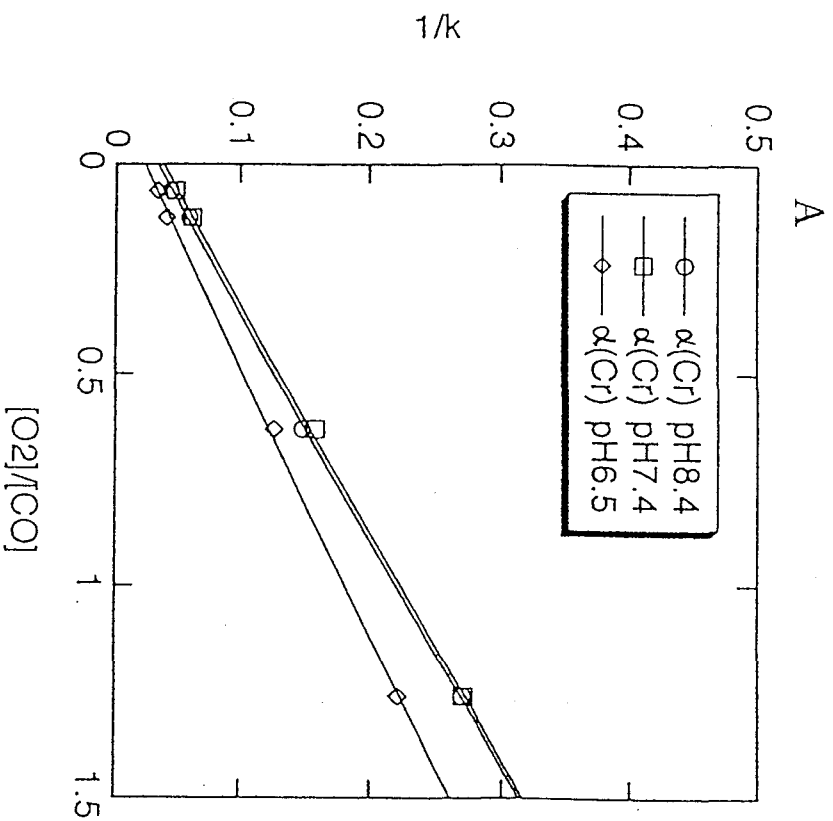


図 3-15 Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素-一酸化炭素置き換え実験の解析

(A) $\alpha_2(Cr)\beta_2(Fe)$ の実験の解析

(B) $\alpha_2(Fe)\beta_2(Cr)$ の実験の解析

条件 : 50mM bis-Tris, 100mM Cl, pH7.4, 25°C, Detected at 423nm,

ヘモグロビン濃度, 10 μ M(混合前、ポルフィリン基準); CO 濃度, 1000 μ M (混合前).

グラフの縦軸は、見かけの反応の速度定数の逆数、グラフ横軸は実験時の酸素濃度と一酸化炭素濃度の比を示す。実験結果のデータは比例関係にあった。データに最も良く一致する直線を黒実線で示す。直線のグラフ縦軸切片の逆数が、酸素解離速度定数を示す。図中では pH6.5 条件での実験のデータにフィットさせた直線の縦軸切片が、他の pH 条件に比べて最も小さい。つまり、酸素解離速度定数が大きい (酸素がはずれるのが速い) ことを示している。しかし、酸素解離速度定数の pH 依存性は、そんなに大きなものではない。

る酸素が一酸化炭素で置き換わるところを測定したのである。Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは酸素親和性が低いので、ヘモグロビン溶液の酸素濃度を高くしないと最初から酸素のはずれたヘムができてしまう。最初からデオキシヘムが混在するような条件で、混成ヘモグロビン溶液と一酸化炭素溶液とを Stopped-flow 装置で混合すれば、酸素解離速度とはまったく関係のない単なるデオキシヘム-CO 結合反応まで起こってしまう。

Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンはもともと酸素親和性が非常に低い。そこへ無理矢理酸素を結合させているのである。Fe(II)サブユニットは酸素が結合したという情報をヘモグロビン分子全体に伝えようとするだろう。その他方で、Mg(II)ポルフィリンは、リガンド親和性が低いヘモグロビンの状態を安定にする性質がある。この両者の対立がヘモグロビン分子内で起こっているはずだ。オキシヘモグロビン型でもなく、デオキシヘモグロビン型でもない、普段は不安定で観測されないヘモグロビンの構造状態が実現されるかも知れない。

この実験条件——混成ヘモグロビン溶液の酸素分圧を1気圧にして、混合するCO溶液のCO濃度を薄めてどんな反応が起こるのか観測するという条件では、Cr(III)-Fe(II)やMn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの実験結果を解析するために使った近似式 (eq.3-22、eq.3-23、ページ) が使えない。その近似式を作るとき無視した項が、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使った実験では無視できなくなり、また、その逆もあるからだ。ここで見かけの反応速度定数と[CO]、[O₂]の関係を見直してみよう。

$$k_{\text{apparent}} = \frac{k_{O_2} k'_{CO} [CO] + k_{CO} k'_{O_2} [O_2] + k_{O_2} k_{CO}}{k'_{O_2} [O_2] + k'_{CO} [CO] + k_{CO}}$$

---eq. 3-21

Mg(II)-Fe(II)を使った実験では、[CO]の値を10~500μMの範囲で変えてみた。他方、[O₂]の値は630μMで一律である(25℃条件で、溶液が1気圧の一酸化炭素と平衡が取れているとき、[CO]=1000μM、1気圧の酸素と平衡が取れているとき、[O₂]=1260μMとしている)。eq.3-21の分子の第1、2項は無視できない。分子の第3項は、ほとんどの場合無視できる。つまり、ヘモグロビンが極端に酸素親和性の低い状態にならない限り、分子は第1項と2項で表せるだろう。他方、分母はほぼ第1項だけで近似できると考える。CO濃度が高いとき、第2項が大きくなるが、k'_{O₂}の値はk'_{CO}の値よりも5~10倍大きいので、第1項が分母の値のほとんどを占めることは変わらない。こうして、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンのO₂-CO置き換え実験用の近似式ができた。

$$\begin{aligned}
 k_{\text{apparent}} &= \frac{k_{\text{O}_2} k'_{\text{CO}} [\text{CO}] + k_{\text{CO}} k'_{\text{O}_2} [\text{O}_2]}{k'_{\text{O}_2} [\text{O}_2]} \\
 &= \frac{k_{\text{O}_2} k'_{\text{CO}} [\text{CO}]}{k'_{\text{O}_2} [\text{O}_2]} + k_{\text{CO}} \quad \text{---eq. 3-25}
 \end{aligned}$$

[O₂]の値は630μMに固定してあるので、この式は、見かけの反応の速度定数が、COの濃度に比例するというを示す単純なものとなる。実際の実験では本当に見かけの速度定数はCO濃度に比例するのだろうか。Mg(II)-Fe(II)を使ったO₂-CO置き換え実験では、混成ヘモグロビンの420nm付近の吸光度が大きすぎて測定に使えないので、436nmの吸光度変化を測定に使った。単相の反応曲線が観測された。見かけの反応曲線に一つの指数関数をフィットさせて*得られた速度定数を図にしたのが図3-16A、Bである。見かけの速度定数は、どのヘモグロビンでもCO濃度に比例するようだ。しかし、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使った実験の結果は、普通のヘモグロビンのものとほとんど変わらなかったのである。

オキシヘモグロビンのO₂-CO置き換え反応実験では、まず間違いなくヘモグロビンはリガンド親和性の高い状態のまま保たれている。その場合のリガンド結合速度定数や解離速度定数は前節から見当がついている。今までにわかっているオキシヘモグロビンの速度定数を使って計算すると、図3-16中のHbAのデータにフィットさせた直線の傾きは、およそ4 × 10⁻³ (μM)、縦軸切片はおよそ0.01 (s⁻¹)となるはずである。実際に図3-16中で最小二乗法で得られた直線の傾きは、4.2 × 10⁻³ (μM)、縦軸切片は精度が悪くて0.07 (s⁻¹)となっている。縦軸切片は信用できないが、傾きは予想通りとなった。

では、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使って観測された反応は一体何だったのか。単なるデオキシヘムとCOの結合反応か？ 単純なCO結合反応の速度は、今回の見かけの反応より10倍以上速いので、この説は否定される。では、

* HbAの反応曲線は、αサブユニットとβサブユニットに酸素解離速度の違いがあるので(Olson et al., 1971)、本当は423nmで反応を測定して、2つの指数関数でフィットするべきなのだが、ここでは簡単にするために1つの指数関数だけでフィットした結果を示した。1つの指数関数だけでも、HbAの反応曲線はおおむね良くフィットすることができた。

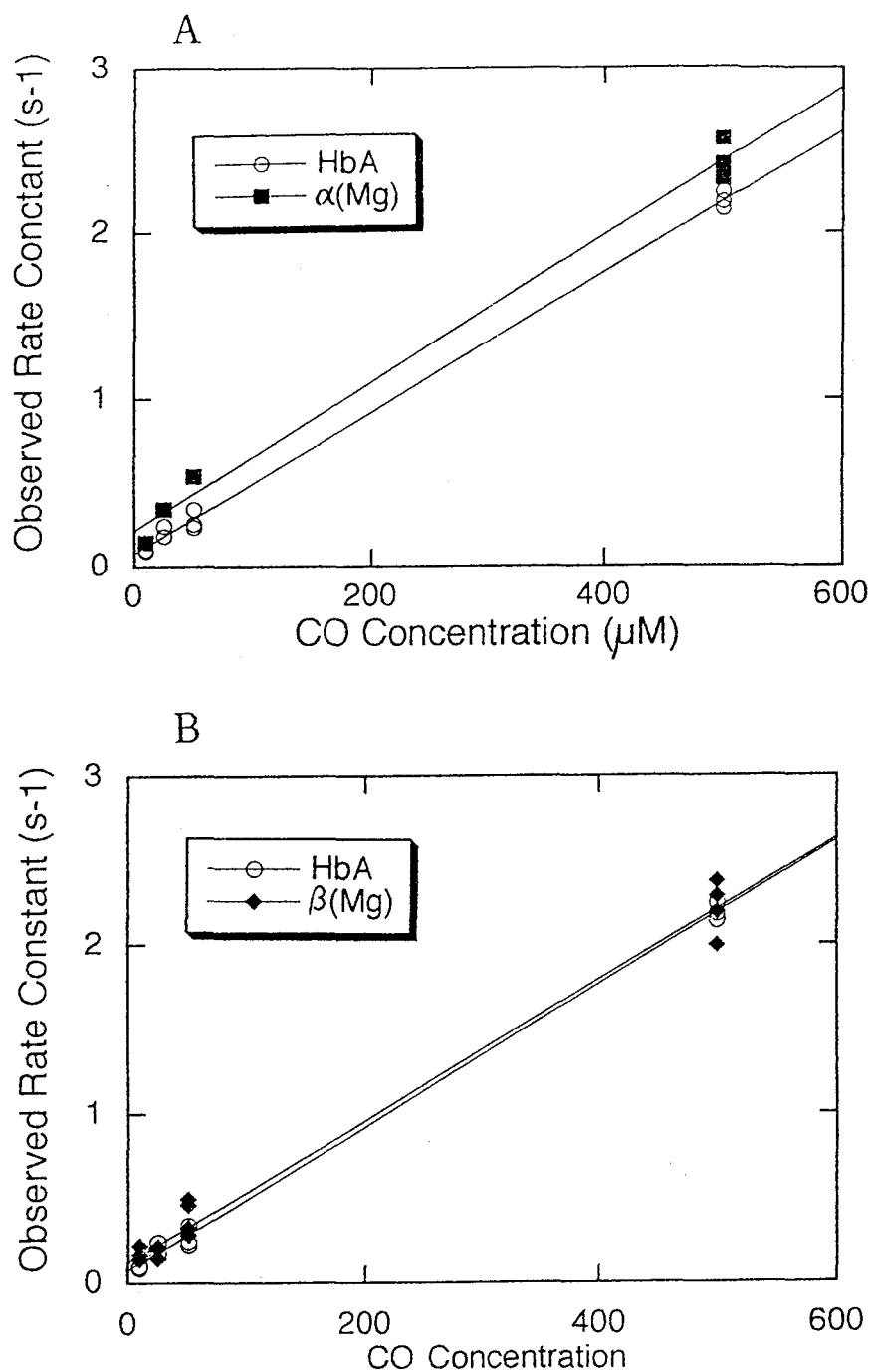


図 3-16 Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンおよび通常のヘモグロビンの酸素—一酸化炭素置き換え実験の結果の解析

測定条件：50mM bis-Tris, 100mM Cl⁻, pH7.4, 25℃, Detected at 436nm,
ヘモグロビン濃度、10 μM （混合前）；

(A) $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ を使った実験の結果と、HbAを使った実験の結果

$\blacksquare$: $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$; $\circ$: HbA

(B) $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$ を使った実験の結果と、HbAを使った実験の結果

$\blacklozenge$: $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$; $\circ$: HbA

各ヘモグロビンは酸素結合型で、1気圧酸素と平衡の取れた緩衝液（酸素濃度 1260 μM ）中に薄めた。Stopped-flow 装置で、そのヘモグロビン溶液と一酸化炭素溶液とを混合し、ヘモグロビンに結合している酸素が、一酸化炭素に置き換わる速度を測定する。CO 溶液の CO 濃度をいろいろ変えた。図中の CO 濃度は、Stopped-flow 装置で混合した後の濃度である。

リガンド親和性の低い状態のヘモグロビンの O_2 -CO 置き換わり反応か？ 前節でリガンド親和性の低い状態のヘモグロビンの結合・解離速度定数の見当がついているので、計算してみよう。 $\alpha_2(Mg)\beta_2(Fe)$ の場合、直線の傾きは $0.013 (\mu M)$ となり、 $\alpha_2(Fe)\beta_2(Mg)$ の場合は $0.025 (\mu M)$ となる (pH7.4、IHP の無い条件の速度定数を使った)。これらの傾きは、実際に得られた直線の傾き ($0.004 \sim 0.005 \mu M$) より、3~6 倍大きい。これに相当する速い反応は、 $Mg(II)$ - $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンを使った O_2 -CO 置き換わり反応では観測されていない。ということは、実際に観測された反応曲線は、酸素親和性の低いヘモグロビンの O_2 -CO 置き換わり反応でもなさそうである。

結局、 $Mg(II)$ - $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンを使って観測された反応曲線は、酸素親和性の高い状態のヘモグロビンの O_2 -CO 置き換わり反応だったと考えざるを得ない。この実験の系では、常に酸素もしくは一酸化炭素がヘモグロビンに結合しているので、ヘモグロビンの平衡はリガンド親和性が高いものが多くなる方向に引っ張られている。 $Mg(II)$ ポルフィリンの影響が、この傾向に負けてしまって、リガンド親和性の低い状態のヘモグロビンは溶液中にほとんど存在し得ないのだろうか。 $Cr(III)$ - $Fe(II)$ 、 $Mn(III)$ - $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンを使った実験ではもちろん、 $Mg(II)$ - $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンを使った実験でも、IHP を溶液に加えても見かけの反応に変化はほとんど無かった。それから、前節で述べた $\alpha_2(Fe)\beta_2(Mg)$ を使った酸素の再結合実験では、1 気圧酸素分圧条件で遅い酸素再結合成分が観測されなかった。これらの事実は、酸素濃度が高い条件ではリガンド親和性の低い状態のヘモグロビンができにくいことを示している。しかしその一方で、 $\alpha_2(Mg)\beta_2(Fe)$ の酸素再結合実験では、1 気圧酸素条件でもちゃんと遅い酸素再結合成分が観測されているので、今回の O_2 -CO 置き換え実験の結果との間に矛盾がある。いずれにせよ、 O_2 -CO 実験は、リガンド親和性の低い状態のヘモグロビンの性質を調べるための手段には適していない。また、残念ながら中間的性質を示すヘモグロビン成分も観測されなかった。

混成ヘモグロビンの O_2 解離速度の解析の結論

O_2 -CO 置き換え実験は、リガンド親和性の高いヘモグロビンの酸素解離速度を測定するのに適した方法である。混成ヘモグロビンを使うことによって、ヘモグロビン中の $\alpha (Fe)$ サブユニットと $\beta (Fe)$ サブユニットの酸素解離速度の違いがはっきりした。

その一方で、この方法は、リガンド親和性の低いヘモグロビンの酸素解離速度を調べるには不適當である。実験の性質上、ヘモグロビンにリガンドを常に結合させておく必要があるので、リガンド親和性の低いヘモグロビンを安定にしておくのが難しい。

ヘモグロビンのリガンド結合・解離速度定数と平衡定数のまとめ

今までの実験で求めた速度定数をまとめる。ヘモグロビンの最も速い結合速度定数と最も遅い解離速度定数を表 3-12、3-13、3-14、3-15 にまとめた。

表 3-12 ヘモグロビンの最も速い CO 結合速度定数と最も遅い CO 解離速度定数 (最も CO 親和性の高い状態のヘモグロビンの速度定数に相当)

	k'_{co} ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{co} (s^{-1})	K_{co} (μM^{-1})
$\alpha(Fe)_{subunit}$	5.9 (± 0.9)	0.012 (± 0.001)	510
$\beta(Fe)_{subunit}$	7.4 (± 0.4)	0.007 (± 0.0003)	1000

k'_{co} : Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの pH7.4、8.4 条件での速い CO 結合速度定数の平均値。

k_{co} : Cr(III)-、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの pH7.4、8.4 条件での CO 解離速度定数の平均値。

K_{co} : 結合速度定数と解離速度定数の比 (k'_{co}/k_{co}) から求めた CO 平衡定数

表 3-13 ヘモグロビンの最も遅い CO 結合速度定数と最も速い CO 解離速度定数 (最も CO 親和性の低い状態のヘモグロビンの速度定数に相当)

	k'_{co} ($\mu M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{co} (s^{-1})	K_{co} (μM^{-1})
$\alpha(Fe)_{subunit}$	0.12 (± 0.01)	0.21 (± 0.03)	0.57
$\beta(Fe)_{subunit}$	0.042 (± 0.004)	0.19 (± 0.02)	0.22

k'_{co} : Mg(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの IHP 存在条件での CO 結合速度定数の平均値 (at pH6.5、7.4、8.4)。

k_{co} : Ni(III)-、Mg(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの pH6.5、IHP 存在条件での CO 解離速度定数の平均値。

K_{co} : 結合速度定数と解離速度定数の比 (k'_{co}/k_{co}) から求めた CO 平衡定数

表 3-14 ヘモグロビンの最も速い O₂ 結合速度定数と最も遅い O₂ 解離速度定数
(最も O₂ 親和性の高い状態のヘモグロビンの速度定数に相当)

	k'_{O_2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{O_2} (s^{-1})	K_{O_2} (μM^{-1})
$\alpha(\text{Fe})\text{subunit}$	39 (± 4)	15 (± 2)	2.6
$\beta(\text{Fe})\text{subunit}$	77 (± 5)	29 (± 2)	2.7

k'_{O_2} : Cr(III)-、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの pH7.4、8.4 条件での速い酸素結合速度定数の平均値。

k_{O_2} : Cr(III)-、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの pH7.4、8.4 条件での酸素解離速度定数の平均値。

K_{O_2} : 結合速度定数と解離速度定数の比 (k'_{O_2}/k_{O_2}) から求めた O₂ 平衡定数

表 3-15 ヘモグロビンの最も遅い O₂ 結合速度定数と最も速い O₂ 解離速度定数
(最も O₂ 親和性の低い状態のヘモグロビンの速度定数に相当)

	k'_{O_2} ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{O_2} (s^{-1})	K_{O_2} (μM^{-1})
$\alpha(\text{Fe})\text{subunit}$	11 (± 1)	3500 (± 900)	0.0030 (± 0.0006)
$\beta(\text{Fe})\text{subunit}$	4.9 (± 0.9)	1800 (± 300)	0.0027 (± 0.0001)

k'_{O_2} : Ni(II)-、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの pH7.4、IHP 存在条件での遅い酸素結合速度定数の平均値。

k_{O_2} : 結合速度定数と平衡定数の比 (k'_{O_2}/K_{O_2}) から求めた酸素解離速度定数。

K_{O_2} : pH6.5、7.4、IHP 存在条件で測定した酸素平衡曲線から求めた Ni(II)-、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの K_1 の値の平均値。

——最も CO 親和性が高い状態のヘモグロビンの CO 平衡定数——

今回の実験では $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの方が $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットよりも速い CO 結合速度、遅い CO 解離速度を示したので、結果として $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの方が $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットよりも約 2 倍高い CO 親和性を示している。

Perrella らが低温での等電点電気泳動技術を使って HbA の CO 平衡定数を求めている(1986)。HbA に 4 個目に結合する CO は、 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットもしくは $\beta(\text{Fe})$ サブユニットに結合する場合があるが、その平衡定数の平均値が報告されている。その値は今回の実験から求めたヘモグロビンの CO 平衡定数に非常に近い。また、Perrella らの論文のデータを読みとると、4 段階目の CO 結合では、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの CO 親和性が $\alpha(\text{Fe})$ のものより高いことが分かる（平衡状態で、3 個の CO が結合した中間段階分子種のうち、 $\alpha_2(\text{Fe-CO})\beta(\text{Fe-CO})\beta(\text{Fe-deoxy})$ の濃度が $\alpha(\text{Fe-CO})\alpha(\text{Fe-deoxy})\beta_2(\text{Fe-CO})$ よりも低かった）。この結果も今回の実験と一致している。

他方、 Mn(III)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの一酸化炭素結合速度が部分光解離法で、また一酸化炭素解離速度が CO-NO 置き換え法で測定されている(Blough & Hoffman, 1982, 1984)。報告されている速度定数は、今回の実験の結果とほぼ一致しており、高い CO 親和性を持つヘモグロビンの CO 結合・解離速度は使う金属ポルフィリンに依存しないことが分かった。

——最も CO 親和性が低い状態のヘモグロビンの CO 平衡定数——

今回の実験では、CO 解離速度は $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットと $\beta(\text{Fe})$ サブユニットとであまり違いはないが、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの CO 結合速度が IHP 存在条件下で $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットよりも遅いので、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの CO 親和性は $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットのものより低い。同じ結果が Mn(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの CO 平衡曲線や(Brough & Hoffman, 1982, 1984)、IHP が存在する条件下での HbA の NMR 実験から得られている(Johnson & Ho, 1974)。

——最も O_2 親和性が高い状態のヘモグロビンの CO 平衡定数——

今回の実験の結果から計算で求めたヘモグロビンの O_2 平衡定数は、HbA の酸素平衡曲線から求められ 4 段階目の酸素結合過程の平衡定数(Imai, 1982)とよく一致する。その他、比較のために R-状態とされているヘモグロビンの O_2 結合速度定数や解離速度定数の比から求められた平衡定数と、 Cr(III)-Fe(II) 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線から求めた K_2 の値を表 3-16 に示した（次ページ）。 $\alpha(\text{Fe})$ サブユニットと $\beta(\text{Fe})$ サブユニットの O_2 平衡定数はほぼ同じか、 $\beta(\text{Fe})$ サブユニットが少し高い O_2 親和性を示しているのが分かる。

表 3-16 酸素親和性が高いヘモグロビンの酸素平衡定数

	pH	K _{O2} (μM^{-1})	References
$\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$	7.4	2.5	①(This study)
$\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$	7.4	2.1	②
$\alpha_2(\text{Mn}^{3+})\beta_2(\text{Fe})$	7.4	2.9	①(This study)
$\beta(\text{Fe})$ of HbA	7.0	4.5 ± 1.7	③
$\beta(\text{Fe})$ of HbA	7.4	2.8 ± 0.1	④
$\beta(\text{Fe})$ of HbA	7.4	3.7 ± 1.1	⑤
$\beta(\text{Fe})$ of HbA	7.0	4.5 ± 1.7	⑥
HbA	7.4	2.1	⑦
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$	7.4	2.2	①(This study)
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$	7.4	1.6	②
$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mn}^{3+})$	7.4	2.3	①(This study)
$\alpha(\text{Fe})$ of HbA	7.0	2.3 ± 0.1	③
$\alpha(\text{Fe})$ of HbA	7.4	3.1 ± 0.13	④
$\alpha(\text{Fe})$ of HbA	7.4	3.5 ± 1.0	⑤
$\alpha(\text{Fe})$ of HbA	7.0	2.3 ± 0.9	⑥

測定条件

① This study, 50mM bis-Tris, 100mM Cl^- , 25℃.

フラッシュフォトリシス実験で Cr(III)-、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが示した酸素再結合速度定数と、 O_2 -CO 置き換え実験で求められた酸素解離速度定数の比から平衡定数が計算された。

②この論文の第2章から (Unzai et al. (1996))。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線から求められた K_2 の値。50mM bis-Tris, 100mM Cl^- , 25℃.

③ Mathews et al. (1989) 0.1M bis-Tris, 0.1M KCl, 20℃.

④ Philo & Lary (1990) 0.1M Tris, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 21.5℃.

⑤ Vandegriff et al. (1991) 50mM bis-Tris, 0.1M NaCl, 1mM EDTA, 25℃.

⑥ Fronticelli et al. (1993) 0.1M bis-Tris, 0.1M KCl, 20℃.

⑦ Imai (1982) 50mM bis-Tris, 0.1M 0.1M Cl^- , 25℃.

③～⑥は、オキシヘモグロビンを使った酸素の部分光解離実験から求められた酸素結合速度定数と、 O_2 -CO 置き換え実験で求められた酸素解離速度定数を使ってヘモグロビンに4個目に結合する酸素の平衡定数を計算したもの。

また、⑦はヘモグロビンの酸素平衡曲線から求められた K_4 の値。

——最も O₂ 親和性が低い状態のヘモグロビンの O₂ 平衡定数——

酸素親和性が低い状態のヘモグロビンの酸素平衡定数は Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンを使ってよく調べられている (Shibayama et al., 1986a, b, Miyazaki et al., 1997)。これらの混成ヘモグロビンはもともと酸素親和性が低い、溶液の pH を下げ、IHP を加えるとさらに酸素親和性が下がる。しかしそれにも限度がある。IHP 存在下、pH 中性以下の条件では、これらの混成ヘモグロビンは協同性、Bohr 効果ともに示さず、 α (Fe) と β (Fe) の平衡定数の値の違いはあまりない。この時の酸素平衡定数は、IHP 存在、pH 6.5 条件での HbA の K_1 の値 ($0.00403 \text{ mmHg}^{-1}$, Imai, 1982) に非常に近い。この様子を図 3-17 に示した。Ni(II)-、Mg(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビン、HbA の K_1 の値の pH 依存性、IHP 依存性を示した図である。黒く塗りつぶされたシンボルは IHP 存在下での K_1 の値を示す。 α 置換混成ヘモグロビンでも β 置換混成ヘモグロビンでも HbA でも、IHP が存在して pH が 7.5 よりも低いような条件では、もうそれ以上酸素親和性が低くならない様子がわかる。

表 3-15 に示したのはその最も酸素親和性が低い状態のヘモグロビンの酸素結合速度定数・解離速度定数・平衡定数である。そのような最も低い酸素親和性を示す状態にあるヘモグロビンが示す酸素結合速度と解離速度は、それぞれ最も「遅い」酸素結合速度定数と、最も「速い」酸素解離速度定数となるだろうと考えていた。 β (Fe) サブユニットについてはそれはほぼ正しかったが、 α (Fe) サブユニットについては違っていた。 α (Fe) サブユニットの酸素結合速度は特殊な IHP 依存性を示し、最も酸素親和性が低い状態の酸素結合速度は最も「遅い」結合速度ではなかったからである。

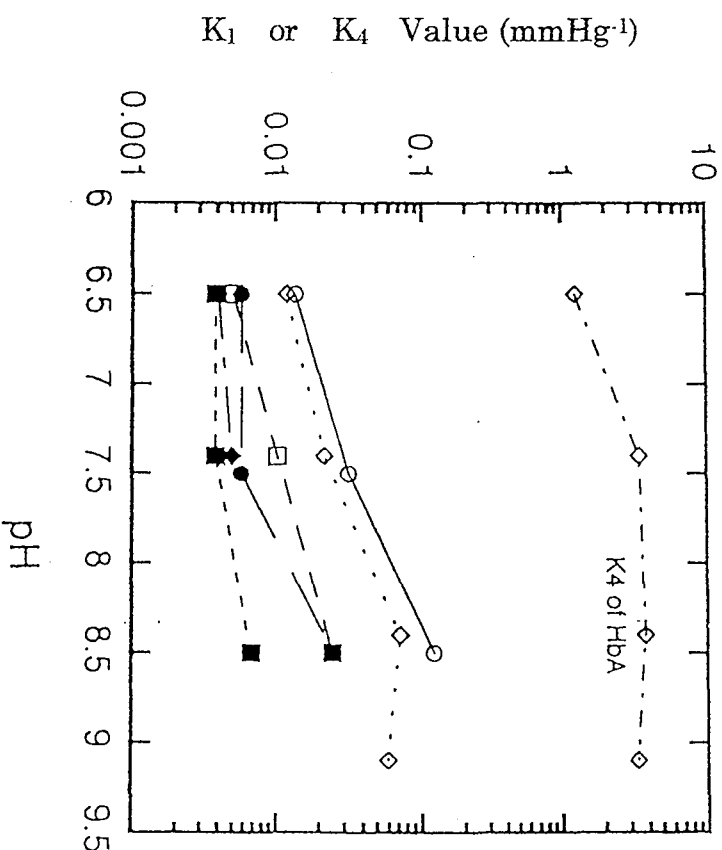
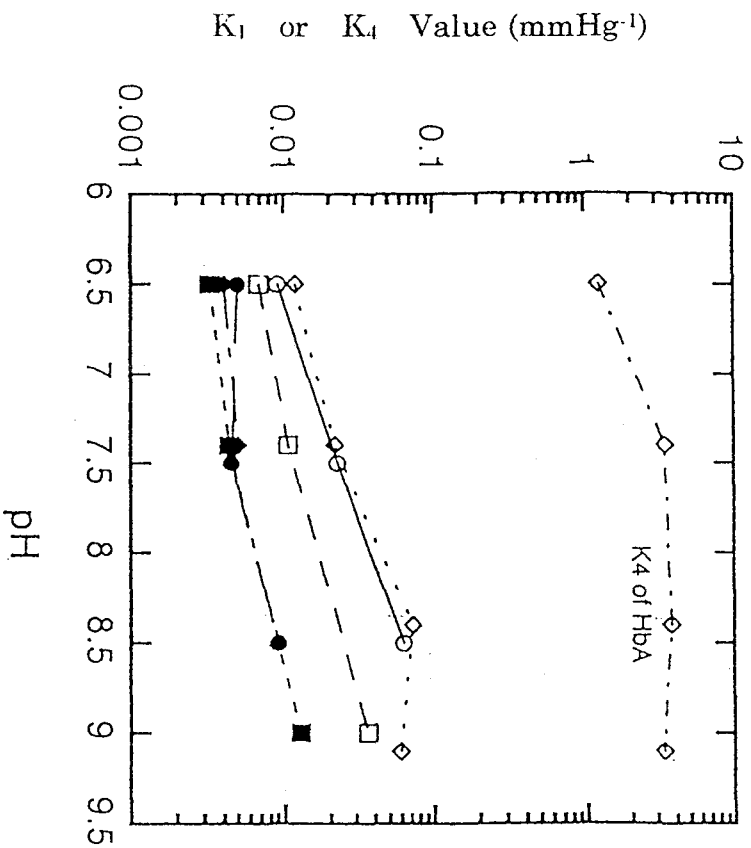


図3-17 ヘモグロビン、金属置換混成ヘモグロビンの K_1 の値のpH依存性

(A) α 置換混成ヘモグロビン ($\alpha_2(\text{Metal})\beta_2(\text{Fe})$) の K_1 の値

(B) β 置換混成ヘモグロビン ($\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Metal})$) の K_1 の値

○: $\text{Ni}(\text{II})$ - $\text{Fe}(\text{II})$ 混成ヘモグロビン (Shibayama et al., 1986a);

□: $\text{Mg}(\text{II})$ - $\text{Fe}(\text{II})$ 混成ヘモグロビン (Fujii & Morimoto, 1995);

◇: ヘモグロビン (Imai, 1982; Imai & Imaizumi, unpublished results)

黒シンボルは、2mM IHP 存在条件で測定されている。

測定条件: 50mM bis-Tris or Tris, 100mM Cl, 25°C, ヘモグロビン濃度、60 μM 。

α 置換、 β 置換混成ヘモグロビン、そして通常のヘモグロビンの K_1 の値も、IHPが存在し、溶液のpHが7.5よりも低い条件ではほぼ同じ値に落ちつくのがわかる。この付近の酸素親和性が、ヘモグロビンが示しうる最も低い酸素親和性だと考えられる。比較対称としてヘモグロビンの K_4 の値をグラフ中に示した。 K_1 の値と、ヘモグロビンの最も低い状態の酸素平衡定数は、およそ1000倍の違いがある。

ヘモグロビンの協同性とリガンド結合速度・解離速度

ヘモグロビンのリガンド親和性の高い状態と、低い状態とではリガンド結合速度と解離速度が大きく違うことがわかった。では、結合速度の変化と、解離速度の変化は、それぞれどのくらいリガンド親和性の調節に貢献しているだろうか。

Szabo がヘモグロビンのリガンドの結合の平衡定数と、結合速度定数、解離速度定数の関係について報告している(1978)。ヘモグロビンの最初(1個目)のリガンド結合過程と、最後(4個目)のリガンド結合過程のリガンド親和性を比べると、後者が高い。もちろん1個目の結合過程と4個目の結合過程では、結合速度定数と解離速度定数も違う。4個目の結合過程の方が、リガンド結合速度は速く、解離速度は遅い。Szabo は、4個目のリガンド結合過程の速度定数は、1個目のリガンド結合過程のものに比べて何倍違うか、また、結合速度定数の違いと解離速度定数の違いのどちらがより大きくリガンド親和性(平衡定数)の変化に貢献しているか、について報告しているのである。ここに Szabo の報告した表をそのまま挙げてみよう。

表 3-17 Szabo が示したヘモグロビンの速度定数の比

Ligand (Reference)	k'_4/k'_1	k_1/k_4
NO ①	1	~100
O ₂ ②	4~8	150
CO ③	40	10

(k'_4/k'_1) は、結合速度定数の比。4個目のリガンド結合過程のリガンド結合速度が、1個目のリガンド結合過程の結合速度に比べて、何倍速いかを示す。

(k_1/k_4) は、解離速度定数の比。1個目のリガンド結合過程のリガンド解離速度が、4個目のリガンド結合過程の解離速度に比べて、何倍速いかを示す。

① Cassoly & Gibson (1975)

② Gibson (1970); Illegengritz & Schuster (1974)

③ MacQuarrie & Gibson (1972)

Reference のデータは古いことは否めないが、最近知られている速度定数に近い数字が使われている。(k'_4/k'_1)、(k_1/k_4)、共に、大きければ大きいほど、1個目のリガンド結合過程と4個目のリガンド結合過程で、速度定数が大きく違うことを示す。

NO と O₂ がリガンドに使われた場合、(k_1/k_4) の値が大きいので、解離速度定数の違いが大きいことがわかる。特に NO の場合、(k_1/k_4) の値が大きいのは対照的に、(k'_4/k'_1) の値が1である。これはヘモグロビンの NO 結合

は、1 個目でも 4 個目でも、結合速度がほとんど変わらないことを示す。ヘモグロビンの協同作用により、1 個目の NO 結合過程と 4 個目の NO 結合過程の親和性を比べると後者が高いので、NO 親和性の調節は、ほぼ NO 解離速度が変わることによってのみ行われているらしい。NO がヘモグロビンに結合すればするほど、解離速度がどんどん遅くなって NO 親和性が高くなるようだ。

O₂ の場合は、NO の場合ほど極端ではないが、1 個目の結合過程と 4 個目の結合過程とでは、結合速度の違いが小さく、解離速度の違いが大きい。これは、ヘモグロビンの O₂ 解離速度の変化が O₂ 親和性の調節に重要であることと示している。

他方、CO の場合は NO や O₂ の場合とは対照的に、1 個目の結合過程と 4 個目の結合過程とで、結合速度の違いが大きく (k'_4/k'_1 の値が大きい)、解離速度の違いは小さい (k_1/k_4 の値は小さい)。これはヘモグロビンの CO 結合速度の変化が CO 親和性の調節に重要であることを示している。

ここでは Szabo の真似をしてみよう。Szabo はヘモグロビンの α サブユニットと β サブユニットの区別をしない速度定数を使って上の表を作った。本論文では α と β の速度定数の区別をつけて調べた。 α と β の一酸化炭素、酸素結合について Szabo の表を作ってみる。

速度定数に記号を割り当てる。記号は 2 状態モデルで使われている R 状態、T 状態、という言葉の借りることにする。ヘモグロビンの最も速いリガンド結合速度定数と最も遅い解離速度定数を R-状態ヘモグロビンの速度定数とし、それぞれ $k'_{\text{co}}^{\text{R}}$ (or $k'_{\text{o}_2}^{\text{R}}$)、 k_{co}^{R} (or $k_{\text{o}_2}^{\text{R}}$) と書き表すことにする。また、ヘモグロビンの最も遅いリガンド結合速度定数と最も速い解離速度定数を T-状態ヘモグロビンの速度定数とし、それぞれ $k'_{\text{co}}^{\text{T}}$ (or $k'_{\text{o}_2}^{\text{T}}$)、 k_{co}^{T} (or $k_{\text{o}_2}^{\text{T}}$) と書き表すことにする。ヘモグロビンの研究の世界では、溶液依存性があるにも関わらず、ヘモグロビンのリガンド親和性の高い状態をまとめて「R 状態」、リガンド親和性の低い状態をまとめて「T 状態」、とあいまいに使っているが、ここではヘモグロビンのリガンド親和性が極限まで高くなった状態を R 状態、リガンド親和性が極限まで低くなった状態を T 状態と呼ぶことにする。

表 3-17 に R-状態ヘモグロビンは、リガンド結合速度 (解離速度) の点でどのくらい T-状態ヘモグロビンと違っているかを示した。R-状態ヘモグロビンのリガンド結合速度定数と T-状態ヘモグロビンのその比、そして R-状態ヘモグロビンのリガンド解離速度定数と T-状態ヘモグロビンのその比を示してある。比が大きければ大きいほど、R-状態ヘモグロビンと T-状態ヘモグロビンの間の速度定数の違いが大きく、ヘモグロビンの協同作用に重要であることを示している。

表 3-17 R-状態ヘモグロビンと T-状態ヘモグロビンの結合速度定数の比、そして R-状態ヘモグロビンと T-状態ヘモグロビンの解離速度定数の比

Ligand: CO	$\frac{k'_{\text{CO}^{\text{R}}}}{k'_{\text{CO}^{\text{T}}}}$	$\frac{k_{\text{CO}^{\text{T}}}}{k_{\text{CO}^{\text{R}}}}$	$\frac{K_{\text{CO}^{\text{R}}}}{K_{\text{CO}^{\text{T}}}}$
$\alpha(\text{Fe})$	51	18	900
$\beta(\text{Fe})$	180	26	4700

Ligand: O ₂	$\frac{k'_{\text{O}_2^{\text{R}}}}{k'_{\text{O}_2^{\text{T}}}}$	$\frac{k_{\text{O}_2^{\text{T}}}}{k_{\text{O}_2^{\text{R}}}}$	$\frac{K_{\text{O}_2^{\text{R}}}}{K_{\text{O}_2^{\text{T}}}}$
$\alpha(\text{Fe})$	3.7	340	880
$\beta(\text{Fe})$	16	62	980

注：酸素結合・解離速度定数の比の計算に使った T-状態ヘモグロビンの速度定数は、IHP 存在条件で測定された定数である。Szabo の表と同様に、結合速度の比は (R/T)、解離速度の比は (T/R) を計算した。このふたつの比を掛け算すると、R-状態ヘモグロビンと T-状態ヘモグロビンの平衡定数の比 ($K^{\text{R}}/K^{\text{T}}$) に等しくなる。

速度定数の比の特徴は、Szabo が示した特徴と基本的に同じである。つまり、ヘモグロビンのリガンド親和性が最も高い状態と、リガンド親和性が最も低い状態とを比べると、CO の結合では、結合速度の違いが大きく、O₂ の結合では、解離速度の違いが大きい。やはり、CO 親和性の調節には結合速度の変化が重要で、他方、O₂ 親和性の調節には解離速度の変化が重要なのである。これが α 、 β サブユニットの両方に言えることがわかった。

(5) 第3章のまとめ

ヘモグロビンの協同性の実体は、リガンド結合中間段階ヘモグロビンができていくことであると本論文の「はじめに」の項で述べた。通常のヘモグロビン溶液では、リガンド結合中間段階ヘモグロビンだけを取り出して調べるのは無理だ。第3章でいろいろな混成ヘモグロビンを使ったのは、その不安定な状態のヘモグロビンをどうにか安定にして、その性質を調べたかったからである。オキシヘムモデルを使った混成ヘモグロビン (Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビン)、デオキシヘムモデルを使った混成ヘモグロビン (Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビン) を使うことは、ヘモグロビンに酸素が1、2、3個結合している状態を安定に実現する最も適当な手段だと考えられる。また、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンと Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの間の酸素親和性を持っている Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンも使った。このヘモグロビンは中間的な酸素親和性を持っているので、どんな構造状態にあるのか興味があったのである。

この第3章では、混成ヘモグロビンのリガンド結合、解離の速度論的実験を行って解析した。中間的な、普段は不安定で観測されない状態のヘモグロビンを実現しようと工夫した。酸素平衡機能で見える限りはいろいろな酸素親和性を持つ混成ヘモグロビンを用意した。この中に、オキシヘモグロビン型でもなく、デオキシヘモグロビン型でもない、中間的な性質を持ったヘモグロビンがどこかに実現されていないかと探した。しかし、観測、解析の結果得られた速度定数のほとんどは、速い速度定数のグループと、遅い速度定数のグループにだいたい分かれてしまった。大まかには、2状態モデル的な性質が観測されたわけだ。どの混成ヘモグロビンもその実体は、リガンド親和性の高いもの（オキシヘモグロビン型）とリガンド親和性の低いもの（デオキシヘモグロビン型）の2種類のヘモグロビンの混じりでできていて、その2者の間の平衡が移動することによって見かけの酸素親和性が変わるように見える。ただしリガンド親和性の低いヘモグロビンの性質は溶液依存性を示すので、単純な2状態モデルではヘモグロビンの性質を説明できない。

中間的な反応速度も観測されてはいる。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのCO結合速度や、Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンのCO解離速度がそうである。しかし、前者は中間的な性質を持つヘモグロビンのCO結合速度、と言うには証拠が足りない。いわゆる「T状態ヘモグロビン」の溶液依存性で説明できないことはない。後者はCO解離速度が他の速度（ヘモグロビンの4次構造変化、ヘモグロビン2量体交換速度）に比べて遅すぎて、平均化された反応速度が見かけの速度として現れていて、特定の4次構造を持つヘモグロビンの性質を反映していないと考えられる。

ヘモグロビンのリガンド親和性を極限まで高くした状態の速度定数と、極限まで低くした状態の速度定数が、 α (Fe)サブユニット、 β (Fe)サブユニット、それぞれ別々に明らかになった。リガンド親和性の高い状態の速度定数を調べるのに Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンが役立った。このヘモグロビンは、リガンドがはずれても、ヘモグロビンの構造の平衡状態は極端にデオキシ型ヘモグロビンが増える方向に移動しない。だから、リガンド親和性の高い状態のヘモグロビンの性質を安定に調べることができた。他方、リガンド親和性の低い状態の速度定数を調べるのには、Ni(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンが役に立った。CO-NO、O₂-CO リガンド置き換え実験では、リガンド親和性の低い状態を安定にさせる工夫が足りなかったが、O₂ レーザーフォトリシス実験では、リガンド親和性の低い状態のヘモグロビンの酸素再結合過程を調べることができた。そして、その溶液条件依存性も観察できたのである。酸素親和性の低い状態のヘモグロビン分子中で、 α (Fe)サブユニットと β (Fe)サブユニットは、酸素結合（解離）速度の点で、それぞれ異なる IHP 依存性を示した。

問題が何点かある。

まず、オキシヘモグロビン型でもなく、デオキシヘモグロビン型でもない、中間状態のヘモグロビンが見つからなかった、と述べたが、本当に中間的な条件での測定が多数行われたわけではない。例えば、デオキシ Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの CO 結合反応が測定されていない。Stopped-flow 装置での測定の際に、混成ヘモグロビン溶液から酸素を完全に除くために Dithionite が使われているのだが、Mn(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンには適用できない。Dithionite で Mn(III)ポルフィリンが Mn(II)ポルフィリンに還元されてしまうからである。Mn(II)ポルフィリンはデオキシヘムモデルとして使われるもので (Blough & Hoffman, 1982, 1984)、Mn(III)ポルフィリンと性質が違う。

また、第3章の序論（その3）で述べた、測定の際のヘモグロビンの初期条件の問題が絡んでくる。実験の性質上、混成ヘモグロビンからリガンドを完全にはずした状態で測定を始める場合（CO 結合反応実験）と、混成ヘモグロビンをリガンドで飽和させた状態で測定を始める場合（O₂ 再結合実験、リガンド置き換え反応実験）ばかりであった。ヘモグロビンの平衡状態があらかじめ偏った実験系が多かったのである。確かに、高い酸素親和性を示すヘモグロビンと低い酸素親和性を示すヘモグロビンとが共存するような系があることも、2相の反応曲線が観測されることによって確認されているが（O₂ 再結合実験）、多数例観測されているわけではない。

測定の初期状態で、中間段階ヘモグロビンを無理矢理作り出すような工夫が必要である。早い話、半分だけリガンド飽和させた初期条件で測定を開始した

らどうなるかという実験が考えられるだろう。 Ni(II)-Fe(II) 、または Mg(II)-Fe(II) 混成ヘモグロビンのヘムの半分が飽和するだけの CO をあらかじめヘモグロビン溶液に加えて置いて、Stopped-flow 装置でさらに CO 溶液と混合したらどんな CO 結合速度成分があらわれるか？ とか、 Mn(III)-Fe(II) を使った酸素再結合実験で、実験条件の酸素濃度をさらに低くして酸素がはずれた状態の混成ヘモグロビンが共存する中で酸素を再結合させたらどんな成分があらわれるか？（序論その3で述べたが、この場合解析が難しくなる）とか、いろいろ考えつく。また、Philo らの実験(1996)を真似て、ヘモグロビンにリガンドが結合している最中に、ヘモグロビンの4次構造はどんな変化をしているかを波長を選んで測定するのも重要だろう。見かけのリガンド結合反応の速度が、ある特定の4次構造を持つヘモグロビンの性質か、それともヘモグロビンの4次構造変化の速度が律速になって見かけのリガンド結合反応となっているのか、はっきりする。

今回の実験は、ヘモグロビンのリガンド親和性を極限まで高くした状態の速度定数と、極限まで低くした状態の速度定数の同定に役立った。極限状態の結合速度定数や解離速度定数の同定は、ある速度について、それ以上その速度を速くさせようとしたり、もしくは遅くさせようとしても、もうそれ以上変わらなくなることを確認することで行った。ほとんどの速度定数は条件を満たしているが、条件が不十分なものがある。リガンド親和性の低い状態のヘモグロビンのリガンド解離速度が一体どこまで速くなるのか突き詰められていない。 CO 解離速度が $\text{pH}6.5$ 、IHP 存在条件で約 0.2s^{-1} まで遅くなることは分かったが、もうそこから速くはならない、ということは示されていない。酸素解離速度も、具体的な速度定数は酸素再結合実験の結果の解析から間接的に得られているだけで、どこまで解離速度が速くなるか示せていないのである。 CO-NO 、 $\text{O}_2\text{-CO}$ 置き換え実験でわかったことだが、リガンドが結合したヘモグロビンを、リガンド親和性が低い状態に保つことは Ni(II) ポルフィリンや Mg(II) ポルフィリンの性質だけでは不十分で、非常に難しい。なんらかの工夫が求められる。

第4章 まとめ

アロステリック蛋白質の中で、ヘモグロビンほどよく調べられたものは他に
あるまい。蛋白質の構造が変化することによって、その機能が発揮される典型
例として長年研究されている。純粋なヘモグロビンは簡単に大量に得ることが
できるので、思い切った実験ができるのが特徴である。

ヘモグロビンには2つの安定な構造がある。一つはオキシヘモグロビンがな
りやすい酸素親和性の高い構造。もう一つはデオキシヘモグロビンがなりやす
い酸素親和性の低い構造。それぞれの酸素親和性は、平衡定数にして約200倍
違う。安定な構造が(主に)2つしかなく、それ以外の構造が不安定であるた
めに、ヘモグロビンの協同作用が起こると言える。不安定な構造の性質は、酸
素結合中間段階ヘモグロビンに強く現れていると考えられる。どんな酸素濃度
条件でも、中間段階ヘモグロビンは存在濃度が極端に低い。酸素で飽和してい
るヘモグロビン溶液の酸素濃度を減らすと、酸素が少し外れた中間段階ヘモグ
ロビンはその不安定さのために4次構造変化を起こし、酸素親和性の低い構造
になり、残りの酸素を放出してしまう。逆に、酸素のないデオキシヘモグロビ
ン溶液に少し酸素を混ぜると、酸素が少し結合した中間段階ヘモグロビンは、
その不安定さのために4次構造変化を起こし、酸素親和性の高い構造になり、
さらに酸素を結合する。このように、ヘモグロビン分子中の任意の酸素結合部
位に酸素が結合した、または結合部位から酸素が解離した、という情報は、ヘ
モグロビンの4次構造の不安定化を引き起こし、ついにはヘモグロビンの4次
構造を変化させ、結果的に他の酸素結合部位の酸素親和性が協同的に調節され
ていると考えられている。

中間段階ヘモグロビンの4次構造がどうして不安定なのかがわかれば、ヘモ
グロビンの協同作用の機構がはっきりする。だから、ヘモグロビンの協同作用
の研究している人達の手法は、普段よく見える構造——オキシヘモグロビン
とデオキシヘモグロビン——以外の構造のヘモグロビンを捕らえようとして
いる点でみんな共通している。「不安定な構造状態のヘモグロビンを無理矢理
捕まえて、その性質を調べる」 焦点はここである。

最近発表されているヘモグロビンの協同作用の研究の手法を紹介してみよう。

Ackersのグループは本論文と同様、リガンド結合中間段階ヘモグロビンのモ
デルを使って、その性質を調べようとしている。本論文第1章で触れたシアノ
メト混成ヘモグロビンを使った手法である(Smith & Ackers, 1985; Ackers et
al., 1992; Daugherty et al., 1991; Doyle & Ackers, 1992; Daugherty et al.,
1994)。中間段階ヘモグロビン(のモデル)4量体が、どのくらい2量体ヘモグ

ロビンに割れやすいかを調べて、その割れやすさ（4量体-2量体平衡定数）がデオキシヘモグロビンやオキシヘモグロビンとどのくらい違うか比べる。最近、実験に使っているヘモグロビンのモデルに欠陥があることが指摘されたが (Shibayama et al., 1997)、溶液中で混成ヘモグロビンを混ぜ合わせ、すべてのリガンド結合中間段階ヘモグロビン分子種のモデルを実現したという手法自体はとても優れたものである。

本論文の第3章の、酸素の光解離実験についてのページでも触れたことだが、CO結合型ヘモグロビンのCO光解離を行うと、COが結合していたときの4次構造を保ったデオキシヘモグロビンという変なものがあらわれる。このヘモグロビンは4次構造変化をして、通常のデオキシヘモグロビンになろうとする。その構造変化の際に、オキシヘモグロビン型でもなく、デオキシヘモグロビン型でもない中間的な構造があらわれないか、ということを分光学的手法で調べているグループがある。Spiroらのグループがそうで、紫外線（250nmや230nm）でヘモグロビンを励起させて観測されるラマンスペクトルのシグナルを、ヘモグロビンの3次構造、4次構造の指標に使っている (Rodgers et al., 1992; Jayaraman et al., 1995a; Huang et al., 1997)。主に使われているのは、ヘモグロビン分子中の $\alpha_1\text{-}\beta_2$ 界面などに存在するタイロシンとトリプトファンの振動に由来するシグナルで、ヘモグロビンの構造変化に伴ってシグナルが変化するものが指標に使われているのである。最近ではコンピューターや測定装置の性能が良くなっていて、ナノ秒やマイクロ秒単位の時間分解能で紫外ラマンスペクトルが測定できる。だから、CO結合型ヘモグロビンのCOを光解離させた直後のヘモグロビンの紫外ラマンスペクトルが測定できる。こうして、CO結合型ヘモグロビンの構造を保ったデオキシヘモグロビンが、通常のデオキシヘモグロビンへと4次構造変化するまでの間にあらわれると考えられる、途中の構造のモデル——ヘモグロビン中のEヘリックスや、Fヘリックス、サブユニット界面などに歪みが生じている構造——を発表している (Jayaraman et al., 1995a)。また、本論文や、Ackersのグループのように、オキシヘムモデルを使ってリガンド結合の中間段階ヘモグロビンのモデルを作って、その紫外ラマンスペクトルを調べた報告もある (Mukerji et al., 1994; Jayaraman et al., 1995b)。

結晶中の蛋白質にレーザーフォトリシスを適用し、フォトリシス直後にあらわれるものの立体構造解析も行われている。

結晶中のミオグロビンに結合しているCOを光解離させ、その直後のミオグロビンの立体構造が、ラウエX線回析のデータを使って求められている (Srajer

et al., 1996)。単波長X線での結晶構造解析と違って、白色X線の場合は結晶にX線を一発あてれば構造解析に必要なデータを集めることができるので、ナノ秒単位の時間分解能での構造解析が可能である。Srajer らの場合は、CO 結合型ミオグロビンの結晶を用意し、結晶にレーザー光をあてて CO を光解離させ、その直後のヘムと蛋白質部分の緩和 (relaxation) 過程と、CO が再結合しているところの立体構造を、ナノ秒単位で捕らえて解析している。

残念ながらヘモグロビンの結晶で同様の実験が行われたという報告はいまだに無い。

Shibayama らはヘモグロビンの4次構造の変化を、ヘモグロビンの外側から物理的に止めようと、ヘモグロビンを樹脂の中に閉じ込めるという仕事をしている (Shibayama & Saigo, 1995)。ヘモグロビンを変性させずに多孔質の樹脂で固めることに成功している。酸素や一酸化炭素は樹脂を通過できるので、固められたヘモグロビンのリガンド結合機能が測定できる。オキシヘモグロビンを固めると、酸素親和性が高くて協同作用を示さないヘモグロビンが得られた。デオキシヘモグロビンを固めると、酸素親和性が低くて協同作用を示さないヘモグロビンが得られた。酸素飽和度 50% のヘモグロビンを固めると、オキシヘモグロビンを固めたものとデオキシヘモグロビンを固めたものが両方観測された。中間的な性質を持つヘモグロビンもあるかも知れないのだが、通常のヘモグロビン溶液中にはもともと酸素結合中間段階ヘモグロビンの存在率が少ない。だから、中間段階ヘモグロビンができやすいような条件のヘモグロビン溶液を樹脂で固め、ヘモグロビンの4次構造変化を制限してしまえば、通常の溶液中では不安定な4次構造も止めておけるのではないかと期待される。

今までに述べた手法とは少し追求する対象が異なるが、X線結晶構造解析に使われる結晶の中にあるヘモグロビンの酸素結合機能を直接調べる実験が最近よく報告されている (Kavanaugh et al., 1995; Bettati et al., 1996; Mozzarelli et al., 1997)。ヘモグロビンの結晶の周囲の酸素分圧を変えながら、結晶の吸光スペクトルを顕微鏡分光光度計で測定している。

本論文中で何度か触れたが、ヘモグロビンの酸素親和性の低い構造 (いわゆる T 状態ヘモグロビン) は溶液依存性を示す。その依存性は、ヘモグロビン分子の中のどのような構造変化に由来するのかわかっていない。だから、デオキシヘモグロビンの結晶を作り、そのヘモグロビンの酸素結合機能を直接調べることによって、どこの構造変化が重要なのかを知ろうとしているようだ。この手法も、結晶にすることによってヘモグロビンの4次構造変化を制限し、特定の構造の性質を調べるという点では、今までに述べた他の手法と共通している。

デオキシヘモグロビンの結晶中では、ヘモグロビンの酸素親和性は非常に低く、溶液中でヘモグロビンが示し得る最低の酸素親和性と同じくらいである。つまり、酸性 pH 条件(pH~6.5)で、IHP が存在している溶液中のデオキシヘモグロビンの1個目の酸素結合過程の酸素親和性や、同じ条件下のNi(II)-Fe(II)、Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素親和性と同じくらいである。また、結晶中のヘモグロビンの酸素平衡機能は、pH 依存性も無いし(Rivetti et al., 1993; Bettati et al., 1996)、IHP や bezafibrate (Marden et al., 1990)などのアロステリックエフェクター依存性も示さない(Moozzarelli, et al., 1997)。だから、結晶中のヘモグロビンの構造は、最も酸素親和性の低い状態を固定したものであるらしい。そこから少しヘモグロビンを変化させようという努力もなされている。 α サブユニットのN末端アルギニン残基は、酸素親和性の低いヘモグロビンの構造を安定化させる水素結合やイオン結合を形成しているとされている(Perutz, 1976, 1994; Kavanaugh et al., 1992)。実際、ヘモグロビンからそのアルギニン残基を取り除いてしまうと、溶液中のヘモグロビンの酸素親和性が上昇したり(Antonini et al., 1961; Bonaventura et al., 1974; Shibayama et al., 1986b)、CO 結合速度が速くなったりする(Bonaventura et al., 1974)。このヘモグロビンの結晶を作って、その酸素平衡機能を測定すると、通常のヘモグロビンの結晶の酸素親和性に比べて約 15 倍も高いという結果が出た。しかも酸素親和性に pH 依存性があった(Kavanaugh, et al., 1995)。酸素親和性の変化は、ヘモグロビンが4次構造変化をした、というには小さいものなので、酸素親和性の低い状態の中でのヘモグロビンの変化の結果だと考えられる。結晶構造解析で通常デオキシヘモグロビンの構造と比較しても、 α サブユニットのN末端アルギニン残基を取り除いた影響は、そのごく近所にしか見られず(N末端とC末端のペプチドがいくらか動いただけ)、ヘム付近の構造は通常のデオキシヘモグロビンのものとそっくりだったので、結局、アルギニン残基を除いたら何故酸素親和性が高くなったかについてはわかっていない。この構造解析の分解能(2.1 Å)ではわからない小さな変化が重要なのだろうか。

~~~~~

本論文では、オキシヘモグロビン構造、デオキシヘモグロビン構造以外の、不安定な構造を平衡状態で実現するために、金属置換混成ヘモグロビンを使った。ヘモグロビンの構造の平衡に影響を与えるヘムの構造を、「中心金属イオンだけを交換する」という最低限の化学修飾で微妙に調節できるので、この方法はヘモグロビンの不安定な中間段階構造を安定化させるのに最も適したものと思われる。

本論文第2章では、新しい「オキシヘムモデル」を示した。

オキシヘモグロビン構造、デオキシヘモグロビン構造以外の不安定な状態のヘモグロビンの性質は、リガンド結合の中間段階のヘモグロビン、つまりリガンド ( $O_2$ ,  $CO$ ) が1、2、もしくは3個結合したヘモグロビンに現れていると考えられる。実際、ヘモグロビン溶液中ではほとんどがオキシヘモグロビンもしくはデオキシヘモグロビンで、中間段階ヘモグロビンの濃度は極端に低い。通常の溶液中ではそれら中間段階ヘモグロビンを捕まえることが難しいので、モデルを作ろうという発想は昔からあった。オキシヘムのモデルとして最も有名でよく使われているのがシアノメトヘムである。しかし、このオキシヘムモデルにはいろいろと問題がある。シアノメトヘム- $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンを、リガンド結合中間段階ヘモグロビンのモデルにするには、 $Fe(II)$ サブユニットから酸素をはずさなければならないが、酸素親和性が高いので容易ではない。酸素を還元して無くしてしまう還元剤は、メトヘムを還元してしまうために使えない。致命的に、シアノメトヘム- $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンは、そのX線結晶構造解析が報告されていない。本論文第2章では、このシアノメトヘムに代わる新しいオキシヘムモデルを紹介した。 $Cr(III)$ - $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンを調製し、その酸素平衡機能を測定することによって、クロム(III)プロトポルフィリンが良いオキシヘムモデルであることを示した。また、還元剤(Dithionite)を使っても、クロム(III)ポルフィリンは $Cr(II)$ ポルフィリンへと還元されないので、嫌気状態での実験が非常にやりやすいことも示した。結晶構造解析に使えるデオキシ型 $Cr(III)$ - $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンの結晶が還元剤存在下で得られたし、還元剤を使って酸素を除いた $Cr(III)$ - $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンの $CO$ 結合反応を、本論文の第3章で測定している。

第3章では、今までに研究されて酸素平衡機能がよくわかっている混成ヘモグロビン—— $Mn(III)$ - $Fe(II)$ 、 $Ni(II)$ - $Fe(II)$ 、 $Mg(II)$ - $Fe(II)$ 混成ヘモグロビン——と、第2章で紹介した $Cr(III)$ - $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンとを用意した。この4種類の混成ヘモグロビンは、高い酸素親和性( $Cr(III)$ - $Fe(II)$ )、中間的酸素親和性( $Mn(III)$ - $Fe(II)$ )、低い酸素親和性( $Ni(II)$ - $Fe(II)$ )、非常に低い酸素親和性( $Mg(II)$ - $Fe(II)$ )と、それぞれ異なる酸素親和性を示す。この4種類の混成ヘモグロビンは、通常のヘモグロビンが示し得る酸素親和性——高い方は、オキシヘモグロビンが示す酸素親和性、低い方は、IHP存在条件でのデオキシヘモグロビンの最初の酸素結合過程の酸素親和性——の、ほぼ全域の中のいろいろな酸素親和性の状態を平衡状態で実現している。 $Cr(III)$ - $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンはオキシヘムモデルを、 $Ni(II)$ - $Fe(II)$ 混成ヘモグロビンはデオキシヘムモデルを使った混成ヘモグロビンだから、この2種類の混成ヘモグロビンはリガンド結合中間段階のモデルでもある。これら様々な混成ヘモグロビンの中に、不安

定な構造状態のヘモグロビンを実現しているものがあることを期待して、ヘモグロビンのリガンド結合・解離の速度論的実験を行った。これだけ広い酸素親和性の状態の範囲を調べたのは、ヘモグロビンの酸素親和性の極端に高い状態と、極端に低い状態の性質もはっきりさせるためである。混成ヘモグロビンの中に、中間的な状態を実現しているものがあれば、はっきりわかるようにするためである。

しかし、測定・解析の結果、得られた速度定数は、大筋ではヘモグロビン 2 状態モデルのようなものであった。速度定数は、ほぼ 2 つのグループに別れてしまい、中間的な速度を持った成分はあまり見つからなかったのである。金属置換混成ヘモグロビンを利用して、オキシヘモグロビン型でもなく、デオキシヘモグロビン型でもない、本来は不安定な中間的ヘモグロビン構造を捕らえようとした。しかし、Fe(II)サブユニットのリガンド結合・解離速度の性質を見る限り、金属置換混成ヘモグロビンでさえも、通常のヘモグロビンと同様に極端な 2 つの構造状態——オキシヘモグロビン型構造とデオキシヘモグロビン型構造——のどちらかに落ちついてしまうらしい。しかも、その状態は使った金属ポルフィリンに依存しない。オキシヘモグロビン型構造のものと、デオキシヘモグロビン型構造のものが共存するような条件もあった。2 相の反応曲線が観測された実験である。ヘモグロビンの状態が微妙で、2 つの構造状態のどちらにでもなれる条件だと解釈されたが、そのような条件でさえ、中間的な性質を持つ、と断言できるようなヘモグロビンは観測されなかった。不安定な中間的性質を持つヘモグロビン構造を捕らえるには、さらに工夫が必要である。

第 3 章では、ヘモグロビンの最も酸素親和性の高い状態と、最も低い状態のリガンド結合速度・解離速度を明らかにすることにも力を入れた。中間的な性質のヘモグロビンの速度定数があれば、それをはっきりさせるためである。あらためてわかったのが、酸素親和性が高い状態のヘモグロビンのリガンド ( $O_2$ ,  $CO$ ) 結合・解離速度は、ほとんど溶液条件に依存しなかったが、酸素親和性の低い状態のヘモグロビンのリガンド結合・解離速度は、溶液条件 (pH, IHP 条件) に依存したことだ。ヘモグロビン 2 状態モデル的に言えば、T 状態ヘモグロビンの性質が溶液条件に依存したことになる。このことは以前から指摘されていた (Imai, 1982) ので、それを裏付けたことになった。金属置換混成ヘモグロビンを使って  $\alpha$  (Fe) サブユニットと  $\beta$  (Fe) サブユニットを別々に調べたので、特に酸素の結合・解離速度で、それぞれ異なる溶液条件依存性を示すことがわかった。

酸素親和性の低い状態のヘモグロビンの酸素親和性は溶液依存性を示すが、もうそれ以上酸素親和性が下がらない下限とも言うべき状態がある。IHP を加えても、pH を下げても、ほとんど酸素親和性は下がらない。Ni(II)-Fe(II)、

Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンで見られている。その状態ではヘモグロビンは、使った金属ポルフィリンの種類 (Ni(II)、Mg(II)ポルフィリン) に依存せず、ある特定の低い酸素親和性 ( $0.004 \sim 0.006 \text{ mmHg}^{-1}$ ) を示す。この最も酸素親和性の低い状態では、ヘモグロビンのリガンド結合・解離速度も、金属ポルフィリンに依存しない、ある特定の速度定数に落ちつく。その速度定数は、第3章の表 3-13 と表 3-15 にまとめた。

# Appendix-1 混成ヘモグロビンの4量体-2量体平衡が酸素平衡曲線に与える影響

実験に使われるような条件では、溶液中の4量体ヘモグロビンの一部は2つの2量体に別れる(Rosemeyer & Huehns, 1967)。2量体中の $\alpha \cdot \beta$ サブユニットの結合は強く、サブユニットへの分離は観測されていない(Kellett & Schachman, 1971)。だから、4量体ヘモグロビンは2個の2量体ヘモグロビンとの平衡にあるといえる( $\text{Hb} \rightleftharpoons \alpha_1\beta_1 + \alpha_2\beta_2$ )。オキシヘモグロビンやデオキシヘモグロビンでその平衡定数が測定されている(Ip et al., 1976; Ip & Ackers, 1977; Chu & Ackers 1981)。ヘモグロビンの4量体-2量体平衡定数の定義はIpとAckersが1977年に使った定義はこうである。ヘモグロビンの4量体-2量体平衡定数 $K_{TD}$ (結合定数)は

$$K_{TD} = [T] / [D]^2 \quad \text{---eq.A1-1}$$

ただし、[T]は“4量体ヘモグロビン”の濃度、[D]は“2量体ヘモグロビン”の濃度を示す。これはヘムを基準に示した濃度ではなく、“4量体”と“2量体”が単位溶液体積あたりいくつあるかを示す濃度である。表A1-1にChuとAckers(1981)がゲル濾過法で測定した $K_{TD}$ の値を示す。

表A1-1 ヘモグロビンの4量体-2量体平衡定数

| Sample     | pH  | $K_{TD} (M^{-1})$    |
|------------|-----|----------------------|
| Oxy HbA    | 6.5 | $0.15 \times 10^6$   |
|            | 7.4 | $1.0 \times 10^6$    |
|            | 8.5 | $6.7 \times 10^6$    |
| Deoxy Hb A | 6.5 | $2.3 \times 10^{11}$ |
|            | 7.4 | $5.0 \times 10^{10}$ |
|            | 8.5 | $6.9 \times 10^9$    |

Chu & Ackers (1981) J.Biol.Chem. 256, 1199-1205. 実験条件: 0.1M bis-Tris or Tris, 1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 0.1M  $\text{NaCl}$ , (Total  $\text{Cl}^-$  concentration of these buffers was 0.18M), 21.5°C

また、ヘモグロビンの4量体-2量体平衡はIHPによって大きな影響を受け、平衡定数にして20~30倍も4量体が安定になることが報告されている(Chiancone et al., 1974: 50mM bis-Tris/HCl, pH7.0, 7~10°C,  $\pm 30\mu\text{M}$  IHP)。

ヘモグロビンの酸素平衡曲線を測るときは、ヘモグロビンの濃度はヘムを基

準にして  $60\mu\text{M}$  という条件がよく使われる。4 量体-2 量体平衡定数  $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  (pH7.4, オキシヘモグロビンの平衡定数) を使うと、全体のヘムの濃度の内 12% が 2 量体になる濃度である (Imai, 1982)。Imai と Yonetani (1977) はヘモグロビンの 2 量体化が酸素平衡曲線にどんな影響を与えるのか、酸素平衡曲線のヘモグロビン濃度依存性を見ることによって調べた。ヘモグロビンの濃度はヘムを基準にして  $1 \mu\text{M}$  から  $600\mu\text{M}$  まで調べてあり、ヘモグロビンが薄くなるにしたがって見かけの酸素親和性が高くなり、協同性が弱くなると報告されている。ヘモグロビンの濃度  $60\mu\text{M}$  とは、酸素親和性が高くなり始める薄い濃度である。

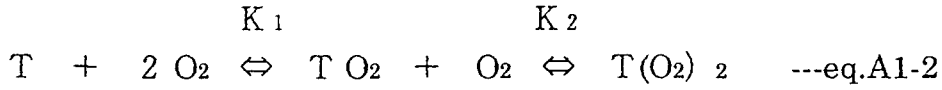
Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線にヘモグロビンの 2 量体化はどのくらいの影響を与えるのか、計算によって調べてみた。Kajitani らによって CO 型 Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの 4 量体-2 量体平衡定数がゲル濾過法を用いて測定されている (1989)。 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe-CO})$  の  $K_{\text{TD}}$  の値は  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 、 $\alpha_2(\text{Fe-CO})\beta_2(\text{Cr})$  の  $K_{\text{TD}}$  の値は  $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  と報告されている (50mM Tris, 0.1M Cl, 1mM EDTA, pH7.4, 室温。ただし、平衡定数の計算に使ったヘモグロビンの濃度やダイマーの濃度はすべて金属ポルフィリン基準なので Chu と Ackers (1981) の定義と少し違う)。これらの数字を使って Cr(III)-Fe(II) の酸素平衡曲線を計算して描いてみた。

仮定：

1. 2 量体に別れた Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンは非常に高い酸素親和性を持ち、その平衡定数は HbA が 4 つ目の酸素結合過程に示す酸素親和性と同じとする。親和定数は HbA の酸素平衡曲線から求められた pH7.4~8.4 条件の  $K_4$  (Imai, et al., 1977, 1982) の値の平均値、約  $4 \text{ mmHg}^{-1}$  とする。2 量体ヘモグロビンには酸素の結合する場所が 1 カ所しかないので協同性は示さない。
2. 現在の所、完全に 4 量体を形成している Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡定数が分かっているわけではないので、実際に酸素平衡曲線を測定して得られた 2 つの平衡定数 (Adair 定数) を代用する。
3. CO 結合型の Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの 4 量体-2 量体平衡定数は、酸素結合型 Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのそれと同じであるとする。(実際には CO 型 HbA の  $K_{\text{TD}}$  の値とオキシ型 HbA のそれとは 2 倍程度の差があることが報告されている：Chiancone et al., 1974)



各分子種と酸素平衡定数の関係を式にしてみる。

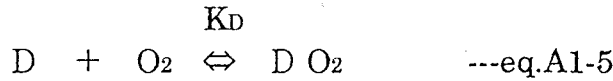


$$K_1 = \frac{1}{2} \times \frac{[T O_2]}{[T][O_2]} \quad \text{そして、} \quad K_2 = \frac{2}{1} \times \frac{[T(O_2)_2]}{[T O_2]}$$

---eq.A1-3 & eq.A1-4

T は 4 量体ヘモグロビンを示し、[T]は 4 量体ヘモグロビンの濃度を示す（ヘモグロビン基準）。関係式中の係数については第 2 章の混成ヘモグロビンの Adair 解析についてのページ参照。

同様に、2 量体に酸素が結合するところを式にする。



$$K_D = \frac{[D O_2]}{[D][O_2]} \quad \text{---eq.A1-6}$$

D は 2 量体ヘモグロビンを示し、[D]は 2 量体ヘモグロビンの濃度を示す（2 量体基準）。

4 量体-2 量体平衡定数  $K_{TD}$  はリガンドが 2 つ結合しているヘモグロビンの平衡定数である。

$$K_{TD} = \frac{4[T(O_2)_2]}{(2[D O_2])^2} \quad \text{---eq.A1-7}$$

4 と 2 という係数は金属ポルフィリン基準にするための補正である。使おうとしている 4 量体-2 量体平衡定数  $K_{TD}$  が金属ポルフィリン基準で求められているため補正した。しかし相殺される。

式 A1-3 から式 A1-7 を使えば、[T]と[D]の関係を導き出せる。

$$K_{TD} = \frac{K_1 K_2 [T]}{(K_D)^2 [D]^2} \quad \text{---eq.A1-8}$$

また、4 量体ヘモグロビンと 2 量体ヘモグロビンの濃度の合計は一定である。

$$4 \times \{[T] + [TO_2] + [T(O_2)_2]\} + 2 \times \{[D] + [D O_2]\} = C \quad \text{---eq.1-9}$$

C はヘモグロビンの総濃度である。これは金属ポルフィリンを基準にした濃度である。

式 A1-3 から A1-8 までを使うと、式 A1-9 を [D] と [O<sub>2</sub>] だけの式にすることができる。[O<sub>2</sub>] を固定すると [D] の 2 次方程式と見ることができる。2 次方程式の解の公式を使えば [D]、つまりデオキシ 2 量体ヘモグロビンの濃度（注：ポルフィリン基準ではない）を求めることができる。これは任意の酸素濃度の時の 2 量体ヘモグロビン濃度である。

デオキシ 2 量体ヘモグロビンの濃度が出れば、他の分子種の濃度も出る。すると、酸素が結合しているヘムの濃度（G とする）も分かる。

$$G = [TO_2] + 2[T(O_2)_2] + [D O_2] \quad \text{---eq.A1-10}$$

この式は式 A1-3 から式 A1-8 を使って [D] と [O<sub>2</sub>] だけの式にできる。

$$G = \frac{K_T K_D^2 [D]^2}{K_1 K_2} (2 K_1 [O_2] + 2 K_1 K_2 [O_2]^2) + K_D [O_2] [D]$$

---eq.A1-11

G を総ヘム濃度で割ったものが、ヘムの酸素飽和度である。総ヘム濃度は (C / 2) である。なぜなら、混成ヘモグロビンのポルフィリン濃度の半分が酸素結合可能なヘムだから。

混成ヘモグロビンの K<sub>1</sub> と K<sub>2</sub> の値、2 量体ヘモグロビンの酸素平衡定数、そしてヘモグロビンの 4 量体-2 量体平衡定数を入力すると、任意の酸素濃度条件でのデオキシ 2 量体ヘモグロビンの濃度を計算し、それをもとにヘムの酸素飽和度を計算し、Hillplot を描くプログラムを作った。ヘモグロビンの濃度が 2mM から 0.2nM（ポルフィリン基準）まで変わるとき、Hillplot がどう変わるかが分かるようになっている。

図 A1-1A、B に計算された pH7.4 条件での、そして図 A1-1C、D には pH6.5 条件での、α<sub>2</sub>(Cr)β<sub>2</sub>(Fe)の酸素平衡曲線の Hillplot のヘモグロビン濃度依存性を

示した。酸素平衡曲線の計算は、 $K_1$ と $K_2$ の値は第2章の表2-1に出ているものを使い、2量体ヘモグロビンの酸素平衡定数は $4\text{mmHg}^{-1}$ を使い、4量体-2量体平衡定数は $5 \times 10^5 \text{M}^{-1}$  (pH7.4条件で、Kajitani らが出した数値) を使った。pH6.5条件での計算のための4量体-2量体平衡定数は、 $5 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ の10分の1の数値を使った。通常のヘモグロビンは、pH7.4条件よりもpH6.5条件の方が、2量体に約10倍割れやすいから(表A1-1)。また、IHPを加えることによって $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ はどのくらい4量体が安定になるのか分からないが、通常のヘモグロビンで観測された数字を真似して20~30倍安定になると考えて、IHP存在条件での4量体-2量体平衡定数は、pH7.4で $1.0 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ 、pH6.5条件で $1.5 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ を使った。

図A1-1A、B、C、Dの中では、ヘモグロビンの濃度が薄くなるにしたがって酸素平衡曲線のHillplotが左上に移動して行くように見える。ヘモグロビンが薄くなればなるほど、ヘモグロビンの4量体-2量体平衡が2量体に分かれる方向に移り、酸素親和性が高くなったように見えるのである。図A1-1A、B、C、D、それぞれでHillplotの移動が目立ち始めるのは、ヘモグロビンの濃度が、A:  $2\mu\text{M}$ ; B:  $2\mu\text{M}$ ; C:  $20\mu\text{M}$ ; D:  $2\mu\text{M}$ の条件である(ヘモグロビン濃度はポルフィリン基準)。これらの濃度までヘモグロビンの濃度を薄めると、濃い条件でのHillplotとの違いが明らかになる。これは、ヘモグロビン濃度をかなり薄くしないと、2量体ヘモグロビンの影響はCr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線に現れないことを意味する。もともとCr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素親和性は高く、2量体ヘモグロビンの性質に近い。これがCr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線に2量体ヘモグロビンの影響が出にくい理由だと考えられる。

このように、通常の実験条件(ヘモグロビンの濃度 $60\mu\text{M}$ 、ポルフィリン基準。第2章ではIHP存在条件下で $12\mu\text{M}$ 条件でも測定されている)では、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線に2量体ヘモグロビンの影響が強くあらわれることはない。ただし、pH6.5、IHPの無い条件では、比較的2量体ヘモグロビンの影響が現れやすいと考えられる。何故なら、pHの低い条件ではヘモグロビンは2量体に割れやすくなり、他方、4量体ヘモグロビンの見かけの酸素親和性は低くなって2量体ヘモグロビンの性質との違いが大きくなるからだ(図A1-1C)。特にヘモグロビン濃度を薄くした時、Hillplotの下部へ与える影響が比較的大きいと考えられるので、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの $K_1$ の値の見積もりたい場合は薄いヘモグロビン溶液は使えない。

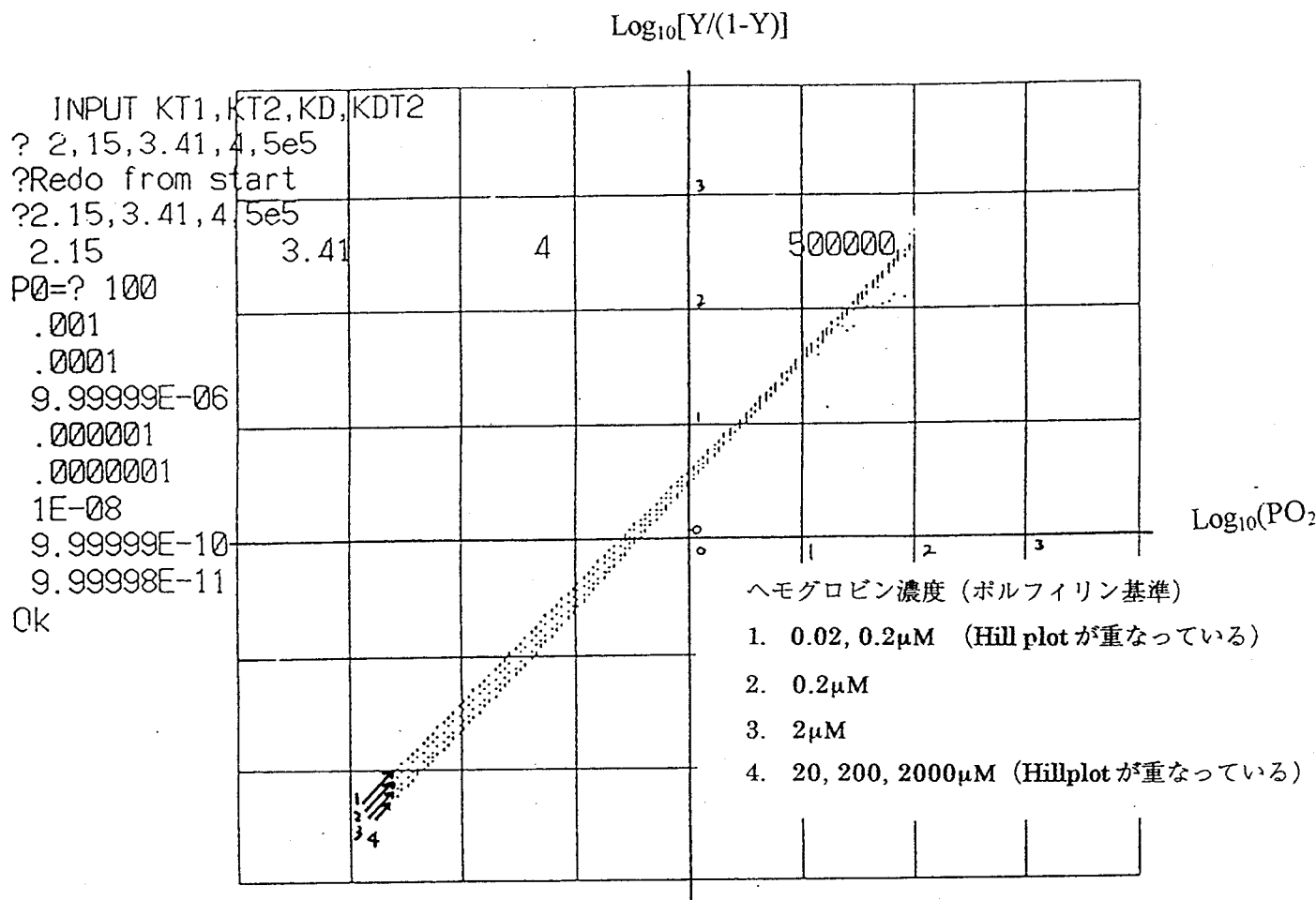


図 A1-1  $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の Hillplot のヘモグロビン濃度依存性のシミュレーション

ヘモグロビンの濃度が薄くなると、2量体ヘモグロビンの濃度が高くなり、ヘモグロビンの見かけの酸素親和性が高くなる。それを計算でどのくらいの影響が出るか確かめてみた。条件：2量体ヘモグロビンの酸素平衡定数、4 (mmHg<sup>-1</sup>)；

A: (pH7.4条件の定数を使用)  $K_1 = 2.2$  (mmHg<sup>-1</sup>)；  $K_2 = 3.4$  (mmHg<sup>-1</sup>)；

4量体2量体平衡定数  $K_{TD} = 5 \times 10^5$  (M<sup>-1</sup>)

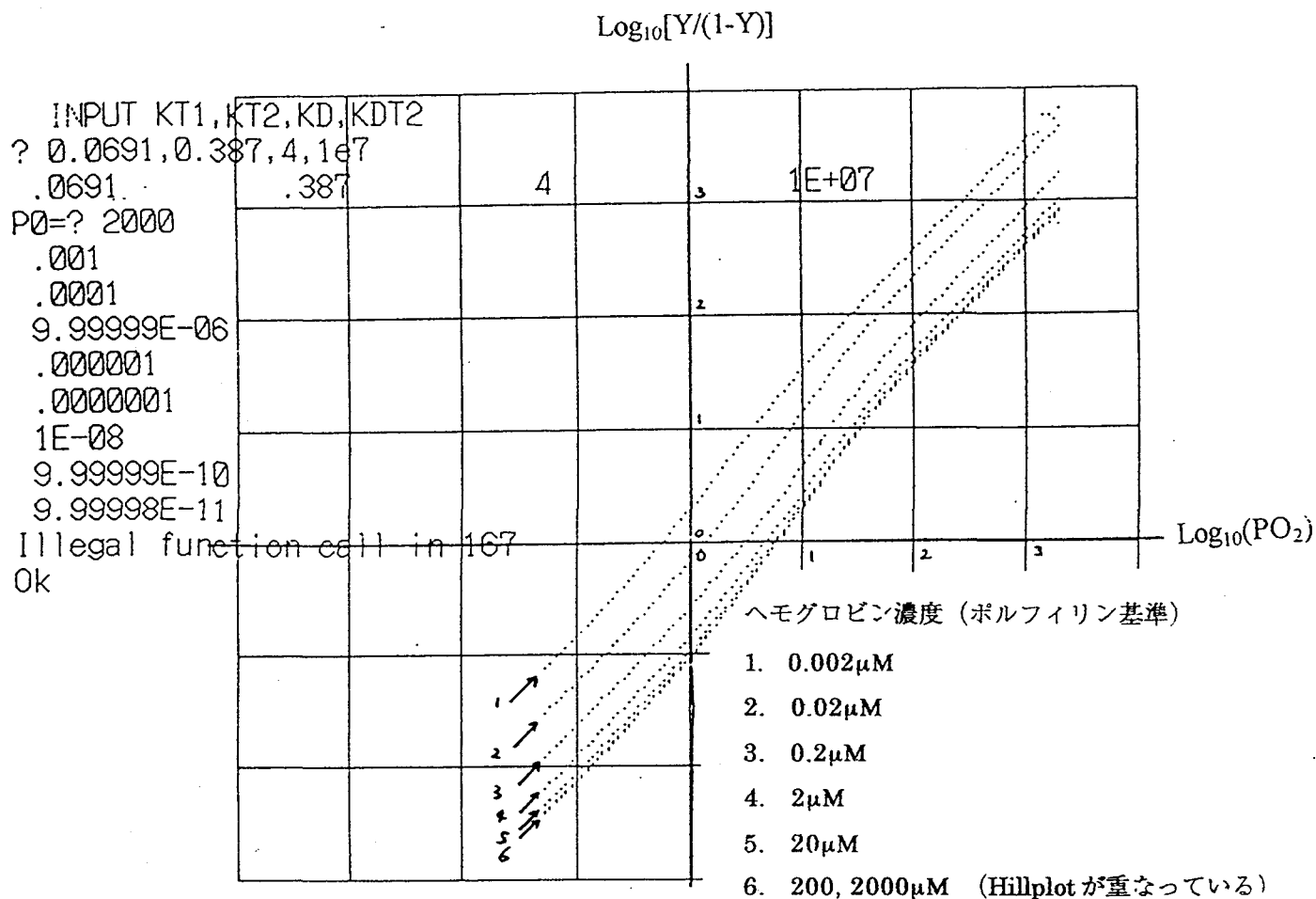


図 A1-1 B: (pH7.4, 2mM IHP 条件の定数を使用)  $K_1 = 0.069 \text{ (mmHg}^{-1}\text{)}$ ;  
 $K_2 = 0.39 \text{ (mmHg}^{-1}\text{)}$ ;  $K_{TD} = 1 \times 10^7 \text{ (M}^{-1}\text{)}$

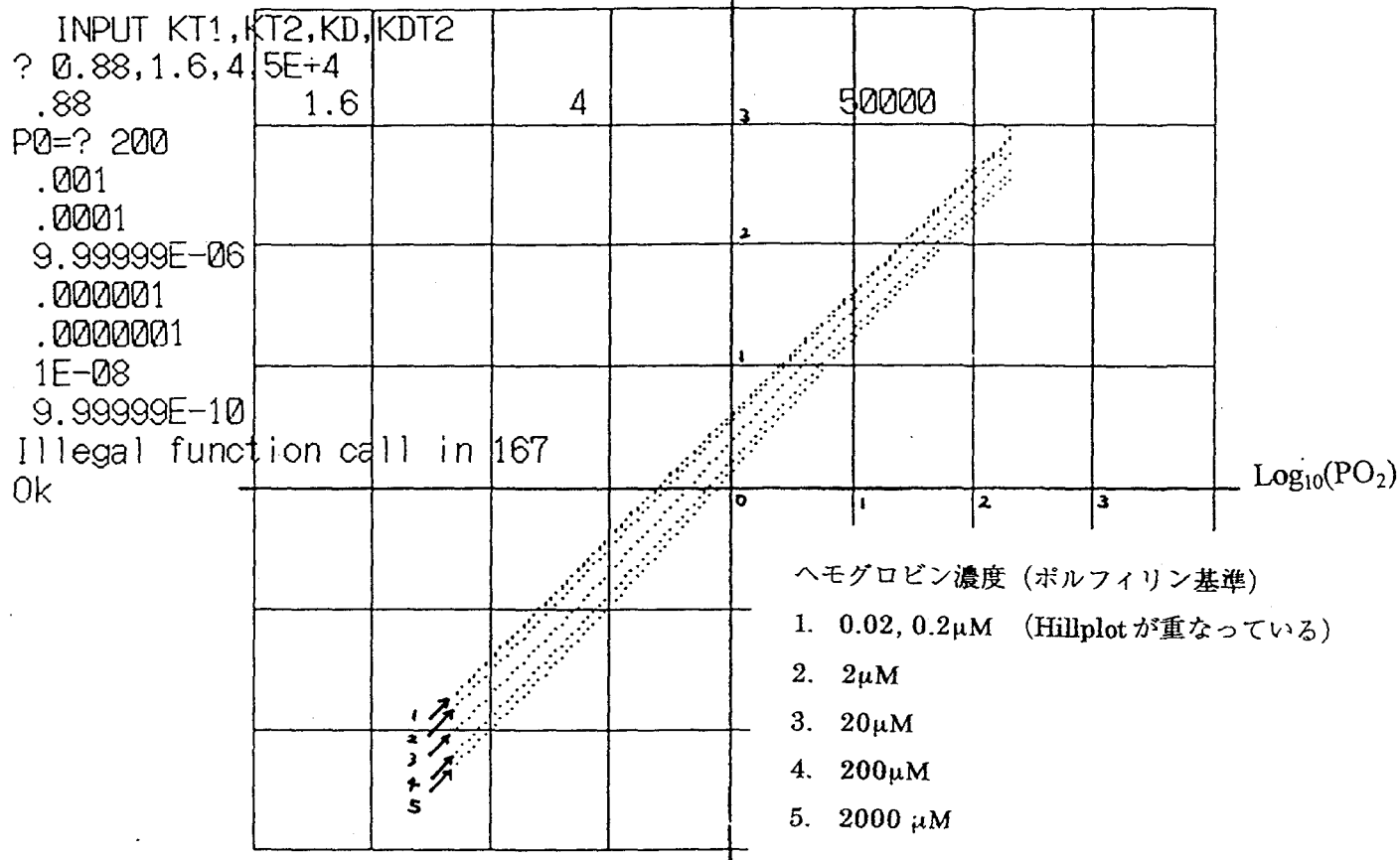


図 A1-1 C: (pH6.5 条件の定数を使用)  $K_1 = 0.88$  (mmHg<sup>-1</sup>);  $K_2 = 1.6$  (mmHg<sup>-1</sup>);  
 $K_{TD} = 5 \times 10^4$  (M<sup>-1</sup>)

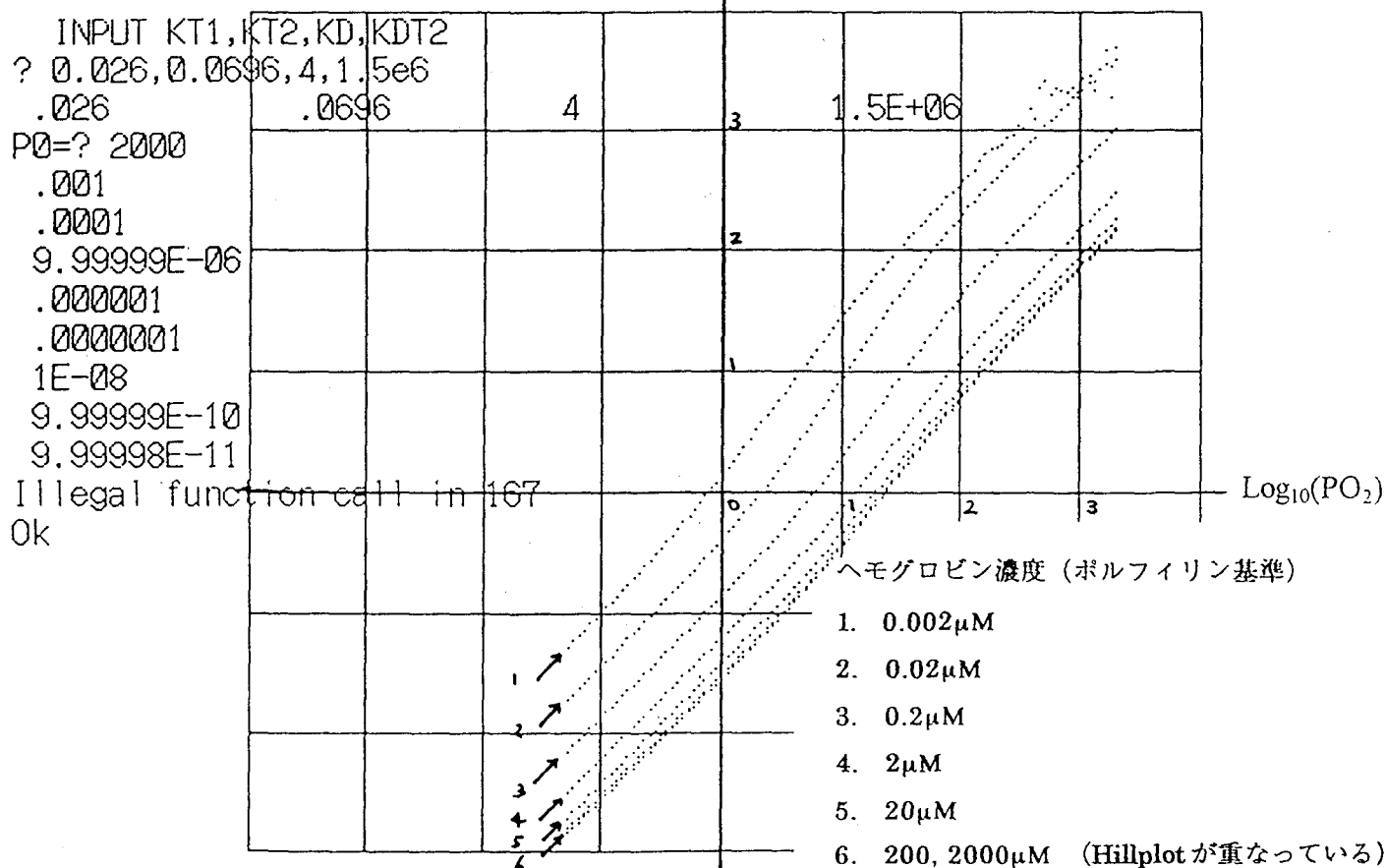


図 A1-1 D: (pH6.5, 2mM IHP 条件の定数を使用)  $K_1 = 0.026$  (mmHg<sup>-1</sup>);  
 $K_2 = 0.70$  (mmHg<sup>-1</sup>);  $K_{TD} = 1.5 \times 10^6$  (M<sup>-1</sup>)

## Appendix-2 シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡機能について

シアノメトヘムは良いオキシヘムモデルとして、またシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンはリガンド結合を2個分固定したモデルとして長年研究されている。(Banerjee & Cassoly, 1969; Brunori et al., 1970; Cassoly et al., 1971; Hoard, 1971; Ogawa & Shulman, 1971; Maeda, et al., 1972; Banerjee et al., 1973; Datherage et al., 1973; Deatherage et al., 1976; Nagai, 1977; Scheidt & Reed, 1981)。いわば、本論文2章で紹介したCr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの先輩にあたる。

シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビン、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビン、どちらも4量体ヘモグロビンに2つのオキシヘムモデル(CN<sup>-</sup>イオンが結合したFe(III)ポルフィリン、もしくはCr(III)ポルフィリン)を含み、それらオキシヘムモデルが入ったサブユニットは通常のリガンド(O<sub>2</sub>, COなど)を結合しない。相補サブユニットであるFe(II)サブユニットがリガンドを結合することができる。P<sub>50</sub>を基準にすると、通常のヘモグロビンに比べて、どちらの混成ヘモグロビンも非常に高い酸素親和性を示す。

CN<sup>-</sup>イオンが結合したFe(III)ポルフィリン、Cr(III)ポルフィリン、この2つのオキシヘムモデルの共通点を挙げておこう。

1. 中心金属イオンの電荷が3+である。
2. 中心金属イオンのイオン半径が、オキシヘムのFe(II)イオンの半径と同じ程度である(Low Spin Fe(II)イオン、0.61 Å; Fe(III)CN<sup>-</sup>、0.61 Å; Cr(III)、0.62 Å. Buchler, 1975)。
3. ポルフィリン平面の構造が平らで、オキシヘムに似ていると考えられる(CN<sup>-</sup>イオンが結合したFe(III)ポルフィリン: Hoard, 1971; Banerjee et al., 1973; Deatherage et al., 1976; Scheidt & Reed, 1981. Cr(III)ポルフィリン: Summerville et al., 1977)
4. ヘモグロビンのヘムポケット内で、ポルフィリンの中心金属イオンと近位ヒスチジンは、しっかり結合していると考えられる(Deatherage et al., 1976; Summerville et al., 1977)。
5. 第6配位子座にO<sub>2</sub>, CO等とは異なるリガンドが配位している。シアノメトヘムはCN<sup>-</sup>イオンがしっかり結合している。Cr(III)ポルフィリンの場合は、H<sub>2</sub>O、もしくはOH<sup>-</sup>イオンが配位していると考えられる(本論文第2章; Unzai et al., 1996)

シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線がIwataらによって測定されている(Iwata & Morimoto, 1993)。その酸素平衡パラメータはCr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのものとどのくらい似ているのか比べてみる。

表 A2-1 Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンとシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡パラメータ

|                                           | pH  | IHP | P <sub>50</sub> | K <sub>1</sub> | K <sub>2</sub> | n <sub>max</sub> |
|-------------------------------------------|-----|-----|-----------------|----------------|----------------|------------------|
| $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$   | 6.5 | -   | 0.85            | 0.88           | 1.6            | 1.2              |
|                                           | 7.4 | -   | 0.37            | 2.2            | 3.4            | 1.1              |
|                                           | 8.4 | -   | 0.32            | 2.7            | 3.7            | 1.1              |
|                                           | 6.5 | +   | 24              | 0.026          | 0.07           | 1.3              |
|                                           | 7.4 | +   | 6.1             | 0.069          | 0.39           | 1.4              |
|                                           | 8.4 | +   | 0.69            | 0.73           | 2.9            | 1.3              |
| $\alpha_2(\text{FeCN})\beta_2(\text{Fe})$ | 6.7 | -   | 1.4             |                | 1.3            | 1.3              |
|                                           | 7.5 | -   | 0.61            |                | 2.2            | 1.2              |
|                                           | 8.6 | -   | 0.55            |                | 2.9            | 1.2              |
|                                           | 6.7 | +   | 58              |                | 0.024          | 1.3              |
|                                           | 7.7 | +   | 22              |                | 0.13           | 1.5              |
|                                           | 8.9 | +   | 0.80            |                | 3.0            | 1.4              |
|                                           | pH  | IHP | P <sub>50</sub> | K <sub>1</sub> | K <sub>2</sub> | n <sub>max</sub> |
| $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$   | 6.5 | -   | 2.4             | 0.25           | 0.72           | 1.3              |
|                                           | 7.4 | -   | 0.55            | 1.2            | 2.7            | 1.2              |
|                                           | 8.4 | -   | 0.26            | 3.2            | 4.5            | 1.1              |
|                                           | 6.5 | +   | 47              | 0.012          | 0.039          | 1.4              |
|                                           | 7.4 | +   | 17              | 0.018          | 0.20           | 1.6              |
|                                           | 8.4 | +   | 0.81            | 0.52           | 3.0            | 1.4              |
| $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{FeCN})$ | 6.7 | -   | 0.88            |                | 1.6            | 1.2              |
|                                           | 7.6 | -   | 0.58            |                | 2.7            | 1.3              |
|                                           | 8.7 | -   | 0.49            |                | 3.1            | 1.3              |
|                                           | 6.6 | +   | 8.1             |                | 0.28           | 1.2              |
|                                           | 7.5 | +   | 3.7             |                | 0.56           | 1.4              |
|                                           | 8.6 | +   | 0.51            |                | 0.51           | 1.3              |

測定は 50mM bis-Tris or Tris, 100mM Cl<sup>-</sup>, 25℃緩衝液条件で行われた。ヘモグロビンの濃度はすべて約 60 $\mu$ M(on a metal basis)で測定された。

IHP: +、IHP なしでの測定； -、2mMIHP 条件での測定

P<sub>50</sub>: 単位は mmHg； K<sub>1</sub>、K<sub>2</sub>: 単位は mmHg<sup>-1</sup>



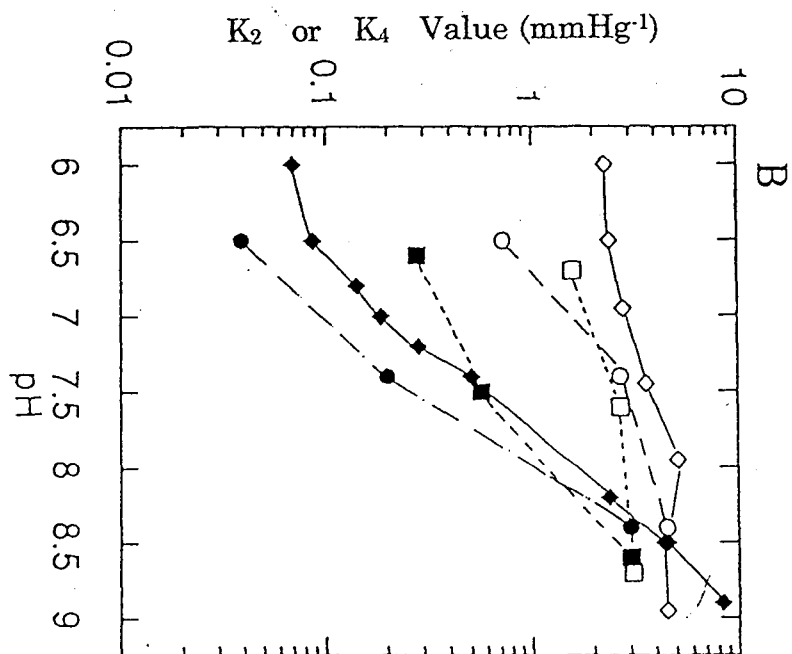
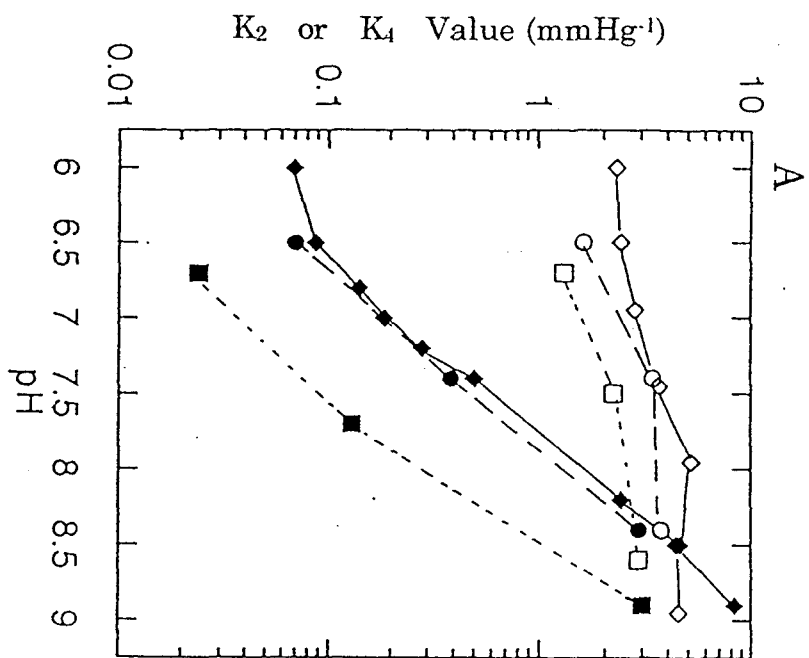


図 A2-1

シアノメト混成ヘモグロビンと  $\text{Cr(III)-Fe(II)}$  混成ヘモグロビンの  $K_2$  の値の pH 依存性  
測定条件: 50mM bis-Tris or Tris, 100mM Cl, 25°C, 混成ヘモグロビン濃度、60 $\mu\text{M}$ .  
比較するものとして、HbA の  $K_4$  の値をグラフ中に示した。

A:  $\alpha$  置換混成ヘモグロビンの  $K_2$  の値の pH 依存性  
B:  $\beta$  置換混成ヘモグロビンの  $K_2$  の値の pH 依存性

○:  $\text{Cr(III)-Fe(II)}$  の  $K_2$  の値 ( $\text{mmHg}^{-1}$ )

□: シアノメト・ $\text{Fe(II)}$  混成ヘモグロビンの  $K_2$  の値 ( $\text{mmHg}^{-1}$ )

◇: HbA の  $K_4$  の値 ( $\text{mmHg}^{-1}$ ) Imai & Imaizumi, unpublished results.

酸素親和性の目安である  $P_{50}$  を比べても、IHP が無い条件では Cr(III)-Fe(II) 混成ヘモグロビンとシアノメト混成ヘモグロビンの間には大きな違いはない。細かく見れば Cr(III)-Fe(II) 混成ヘモグロビンでは  $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$  の方が  $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$  より、逆にシアノメト混成ヘモグロビンでは  $\alpha_2(\text{FeCN})\beta_2(\text{Fe})$  の方が  $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{FeCN})$  よりも Bohr 効果が大きいのだが、違いはあまり大きくない。

Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンとシアノメト混成ヘモグロビンの違いが大きいのはヘモグロビン溶液に IHP が加えられた場合である。溶液に IHP が加えられると、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンでは  $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$  も  $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$  も酸素親和性が同じ程度低くなる。pH6.5 条件での  $P_{50}$  の数値を基準にすると、双方ともに約 20 倍親和性が低くなる。ところが、シアノメト混成ヘモグロビンでは、 $\alpha_2(\text{FeCN})\beta_2(\text{Fe})$  と  $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{FeCN})$  とで、IHP が加えられた時の酸素親和性の低くなる程度が違う。pH6.5 では、IHP が加えられると  $\alpha_2(\text{FeCN})\beta_2(\text{Fe})$  は約 40 倍も酸素親和性が下がるが、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{FeCN})$  は約 10 倍下がるにすぎない。これは Nagai らが報告したシアノメト混成ヘモグロビンの酸素平衡曲線の Hillplot にも見られている性質である(1977)。

Cr(III)PPIX や、シアノメトヘムがよいオキシヘムのモデルかどうか判断するには混成ヘモグロビンの  $K_2$  の値を見なければならない。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンとシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの酸素平衡定数をグラフにして比べてみた。 $K_2$  の値の pH、IHP 依存性をグラフにした。図 A2-1a には  $\alpha$  置換混成ヘモグロビンの、図 A2-1b には  $\beta$  置換混成ヘモグロビンの  $K_2$  の値を示した。比較するものとして HbA の  $K_4$  の値も示した。

本気で HbA (通常のヘモグロビン) の  $K_4$  の値と混成ヘモグロビンの  $K_2$  の値とを比べるには、 $K_2$  の値は  $\alpha$  置換混成ヘモグロビンのものと  $\beta$  置換混成ヘモグロビンのものの平均値 (Average of  $K_2 = 2 K_{2\alpha} K_{2\beta} / (K_{2\alpha} + K_{2\beta})$ ) を使わなくてはならない。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの場合、 $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Cr})$  の  $K_2$  の値も、 $\alpha_2(\text{Cr})\beta_2(\text{Fe})$  の  $K_2$  の値も、HbA の  $K_4$  の値と非常に近いので、平均値を出すまでもない。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの  $K_2$  の値は、HbA の  $K_4$  の値に非常に近い。他方、先程述べたように、シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンの場合、IHP 存在条件で  $\alpha_2(\text{FeCN})\beta_2(\text{Fe})$  の酸素親和性と  $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{FeCN})$  のそれとが  $P_{50}$  の値で 7~8 倍違うことがある。もちろん  $K_2$  の値にも違いがある。しかし、その 2 つの  $K_2$  の値の平均値は、HbA の  $K_4$  の値に非常に近いものになる。

このように、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンでも、シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンでも、混成ヘモグロビンの  $K_2$  の値がヘモグロビンの  $K_4$  の値に似ている。この点ではシアノメトヘム、Cr(III)PPIX、共に良いオキシヘムのモデルと言える。では本物の HbA の中では、4 段階目の酸素結合過程で、 $\alpha(\text{Fe})$  サブユ

ニットと  $\beta(\text{Fe})$  サブユニットはそれぞれどのような性質を持っているのだろうか。

HbA 溶液に IHP が存在する場合の HbA 分子中の  $\alpha(\text{Fe})$  サブユニットと  $\beta(\text{Fe})$  サブユニットの違いについて調べてある報告がいくつかある。Ho らのグループは NMR の技術を使って、ヘモグロビンの酸素飽和度を変えた時  $\alpha(\text{Fe})$  サブユニットと  $\beta(\text{Fe})$  サブユニットのどちらに多くの酸素が結合しているかを調べている (Johnson & Ho, 1974; Viggiaano et al., 1979)。IHP が無いときは、平衡状態で酸素は  $\alpha(\text{Fe})$  と  $\beta(\text{Fe})$  にランダムに結合していくが、IHP がある時は、平衡状態で酸素は  $\alpha(\text{Fe})$  に多く結合する、という結果が報告されている。しかしこれは低い酸素飽和度 (50% 飽和以下) についてだけの結果であり、Cr(III)-Fe(II) やシアノメト混成ヘモグロビンの酸素親和性に相当する HbA の  $K_4$  の値についての結果ではない。

Gray と Gibson (1971) は IHP 存在下でオキシ HbA の酸素の光部分解離を行い、酸素の再結合を測定している。また、Stopped-flow で HbA の  $\text{O}_2\text{-CO}$  置き換え実験をして、オキシ HbA の酸素解離速度とその IHP 依存性を調べている。それらによると、酸素の再結合・解離反応は IHP が無い条件では単相だが、IHP が加わることによって2相になる、しかし2相の成分の2つの速度定数は互いによく似ているので定数の詳しい決定は難しいそうである。彼らはこの2成分を  $\alpha(\text{Fe})$  と  $\beta(\text{Fe})$  のそれぞれの反応ではないかと推定している。下の表に彼らの出した速度定数を示す。

表A2-2 オキシヘモグロビンの4段階目の酸素結合過程の結合速度定数と解離速度定数 (だと Gray と Gibson が思っているもの)

|           | $k'_{\text{O}_2} (\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$ | $k_{\text{O}_2} (\text{s}^{-1})$ |
|-----------|----------------------------------------------------|----------------------------------|
| HbA, -IHP | 33*                                                | 45                               |
| HbA, +IHP | 5.4 (fast phase)                                   | 100 (fast phase)                 |
|           | 2.8 (slow phase)                                   | 80 (slow phase)                  |

$k'_{\text{O}_2}$ : HbA に4つめに結合する酸素の結合速度定数、と彼らが思っているもの;

$k_{\text{O}_2}$ : 酸素で飽和している HbA から最初に解離する酸素の解離速度定数と彼らが思っているもの。

結合速度の測定条件: 0.05mM bis-Tris, pH7.0, 0.01M NaCl, 22°C. 光部分解離は HbA の濃度は 21.6 から 28.0 $\mu\text{M}$  まで(tetramer)、酸素濃度が 250 から 1200 $\mu\text{M}$  まで、+IHP は IHP が 100 $\mu\text{M}$  から 122 $\mu\text{M}$  までの様々な条件で測定されている。表中の  $k'_{\text{O}_2}$  の値は、実際に得られた速度定数の平均値。

O<sub>2</sub>-CO 置き換え実験の測定条件は、0.05mM bis-Tris, pH7.0, 0.01M NaCl, 22℃, CO の濃度：混ざった後での濃度が450μM； IHPがある場合の測定は、COが入った緩衝液にIHPを240μMになるように入れておき、混ざった後での濃度が120μMになる。酸素の濃度は混ざった後での濃度が100 から 600μMの間で様々な濃度の条件を使う。

\* : Gibson (1970) が過去に測定した速度定数。測定条件は、0.1M phosphate buffer, pH7.0, 21.5℃, Hb の濃度は41.5μM。

しかし、この IHP 存在下での実験には疑問がある。ヘモグロビンの酸素の光部分解離実験について Gray と Gibson も自分たちで指摘しているが、IHP が含まれている溶液中では HbA は、例えば空気と平衡がとれている溶液中では、全体のヘムの 80% しか酸素飽和していない。だから、酸素の再結合反応を観測するとヘモグロビンの4つ目の酸素結合だけでなく、他の酸素結合中間段階のヘモグロビンの酸素再結合も見えていることになる。さらに、量子収量の問題もある。いわゆる R-状態ヘモグロビンと T-状態ヘモグロビンとでは量子収量がかなり違う (Morris & Gibson, 1984)。だから、オキシヘモグロビンの部分光解離をすると、量子収量の大きなヘム（つまり光が当たったとき、簡単に酸素が離れるヘム）の酸素再結合ばかり観測することになりかねない。実際、Gray と Gibson が IHP 存在条件下で観測した酸素結合速度は、速い成分も遅い成分も、いわゆる T-状態ヘモグロビンの酸素結合速度にほぼ等しい値になっている (Gibson et al., 1977; Shibayama et al., 1995)。結合速度定数と解離速度定数の比から平衡定数を計算してみると、ヘモグロビンの K<sub>4</sub> の値と言うよりも K<sub>1</sub> の値に近い数字になってしまう。これが酸素3個と IHP も結合したヘモグロビンの酸素の結合速度と考えるのは妥当ではない。このデータから IHP 存在条件下のヘモグロビン分子内での α(Fe) サブユニットと β(Fe) サブユニットの酸素平衡定数の違いを考えるのは無理である。

Perrella らは低温での電気泳動を利用して、ある一酸化炭素濃度の時、CO 結合中間段階 HbA の各分子種がどのくらいの濃度で存在しているか調べているが、同じ方法で各分子種の一酸化炭素結合速度とその IHP 依存性を報告している (1992)。この報告の中では k<sub>4</sub> を 6.0μM<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> に固定して他の CO 結合段階の結合速度定数を求めているが、α(Fe) の k<sub>3</sub> と β(Fe) の k<sub>3</sub> とでは、IHP の有無に関わらずあまり変わらない（せいぜい2倍程度。条件は 10mM phosphate, 0.1M KCl, pH7.0, 2 or 10mM IHP）。他方、Salhany らは CO-NO 置き換え実験でヘモグロビンの CO 解離速度を調べている (Salhany et al., 1975)。α と β の区別はしていないが、CO で飽和している HbA から最初にはずれる CO の解離速度は、IHP の有無にあまり影響を受けないことが報告されている。これらの結果から、IHP 存在下で HbA の3つ目、4つ目に結合する CO に対する α(Fe) サブユニッ

トと  $\beta(\text{Fe})$  サブユニットの親和性の違いは小さいと考えられる。だから、IHP 存在下で  $\alpha(\text{Fe})$  サブユニットと  $\beta(\text{Fe})$  サブユニットの酸素親和性がかなり違うシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンは、酸素結合中間段階モデルとして不適當である、としたい所だが、Perrella らと Salhany らのデータは酸素結合のデータではなく一酸化炭素結合のデータである。IHP がある時、平衡状態でのヘモグロビンの酸素結合と一酸化炭素結合にはかなり違いがある(Johnson & Ho, 1974)。

2 ページ以上にわたって過去の報告について述べてきたが、結局、ヘモグロビンの 4 段階目の酸素結合過程の詳しい IHP 依存性 ( $\alpha(\text{Fe})$  サブユニットと  $\beta(\text{Fe})$  サブユニットが、それぞれどんな依存性を示すか) はわかっていないのである。シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンと、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンのどちらがより良く本物のヘモグロビンの酸素結合過程を模倣しているのかははっきりしない。

金属置換混成ヘモグロビンは、本当に良い「リガンド結合の中間段階分子種」のモデルか？

ヘモグロビンの 4 段階酸素結合過程のうち、前半 2 段階の平衡定数は、Shibayama らが Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを利用して求めようとしてきた(Shibayama et al., 1986a, b, 1993, 1995a)。非対称な中間段階分子\* のモデルは、ヘモグロビン 2 量体間に架橋を架けることで実現した(Shibayama et al., 1993, 1995a)。通常のデオキシヘモグロビン中では、 $\alpha(\text{Fe})$  サブユニットの方が  $\beta(\text{Fe})$  サブユニットよりも酸素親和性が少し高く (平衡定数で 2~3 倍程度)、サブユニット間の相互作用は  $\alpha_1$ - $\alpha_2$  ( $\alpha$  サブユニット同士) 間が最も強く、次に  $\alpha_1$ - $\beta_1$  間、 $\alpha_1$ - $\beta_2$  間が強く、ただ一経路  $\beta_1$ - $\beta_2$  間の相互作用は他と比べて弱いことがわかってきた。デオキシヘモグロビン中では  $\alpha(\text{Fe})$  サブユニットの方が  $\beta(\text{Fe})$  サブユニットよりも少し酸素親和性が高いという証拠は他にもある(Huestis &

---

\*  $[\alpha_1(\text{Fe}-\text{O}_2)\beta_1(\text{Fe}-\text{O}_2)][\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Fe})]$  と、 $[\alpha_1(\text{Fe}-\text{O}_2)\beta_1(\text{Fe})][\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Fe}-\text{O}_2)]$  のこと。これらの分子のモデルを Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使って実現するために、ヘモグロビンの通常の協同作用の機能にはほとんど影響を与えない 2 量体間架橋が施された(Shibayama et al., 1991)。 $\beta$  サブユニットの 82 番目のアミノ酸残基リジン同士をビスフマレートと呼ばれる架橋剤でつないでしまう。これでヘモグロビン 2 量体の交換が起こらなくなり、非対称ヘモグロビン分子を実現できる。

XL $[\alpha_1(\text{Fe}-\text{O}_2)\beta_1(\text{Fe}-\text{O}_2)][\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Ni})]$  と、(Shibayama et al., 1993)  
XL $[\alpha_1(\text{Fe}-\text{O}_2)\beta_1(\text{Ni})][\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe}-\text{O}_2)]$  が調製された(Shibayama et al., 1995a)。  
XL は 2 量体間クロスリンクを意味する。

Raftery, 1972; Asakura & Lau, 1978; Sawicki & Gibson, 1977)。ヘモグロビンに酸素が結合していく過程で、しやすい分子種の1つが、 $\alpha_2(\text{Fe-O}_2)\beta_2(\text{Fe})$ であることはまず間違いない。

Imai がヘモグロビンの酸素平衡曲線を4段階酸素結合過程で解析している事を本論文第1章で述べた。 $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$ 、 $K_4$ の4つの平衡定数でヘモグロビンの酸素平衡曲線を表現している。そして、ほとんどの条件で( $K_3$ の値)  $\ll$  ( $K_4$ の値)であることを見出している。多くの条件で $K_4$ の値は $K_3$ の値の10倍以上大きい(Imai, 1982)。実際には、ヘモグロビンに酸素が結合していく過程は様々な経路が考えられ、微視的な平衡定数は全部で16個ある(第1章の図1-2)。Imai が示した4つの平衡定数は、この16個の平衡定数を反映している。平衡状態で存在率の大きい中間段階ヘモグロビン分子種に関する微視的平衡定数が、より強く見かけの平衡定数に反映されているはずだ。Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使った実験などから、中間段階でしやすい分子種の1つが、 $\alpha_2(\text{Fe-O}_2)\beta_2(\text{Fe})$ であることが示されている。残った $\beta(\text{Fe})$ サブユニットに酸素が結合するとき、Imai が示したように強い協同作用が起こるのだろうか。

しかし、酸素結合中間段階の後半の結合過程(3、4個目の酸素結合過程)のモデルとして候補に挙げられている混成ヘモグロビンには、そのような強い協同性を示すものはない。pH7.4、有機リン酸のない条件でのシアノメト-Fe(II)、Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンの $K_1$ と $K_2$ の値は、せいぜい2~3倍しか違わない。 $\alpha_2(\text{Mn})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの協同性は比較的大きくて、 $K_2$ の値が $K_1$ の値の6倍の大きさになることもある。しかし、 $\alpha_2(\text{Mn})\beta_2(\text{Fe})$ の $K_2$ の値がHbAの $K_4$ の値より小さいので、Mn(III)ポルフィリンは厳密には良いオキシヘムモデルではない。非対称な中間段階分子種のモデル\* が強い協同性を示すのでは? という報告もある(Imai, 1982)が、ヘモグロビン2量体の間に架橋することによって実現された非対称型シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビン(シアノメトヘムを2つ持つもの)は、強い協同性を示さず、酸素親和性が高かった(Miura et al., 1987)。

ヘモグロビンに酸素が結合する場合の自由エネルギー変化は、酸素結合の平衡定数で表せる( $\Delta G_n = -RT \ln(K_n)$ ;  $R$ は気体定数、 $T$ は絶対温度、 $n=1, 2, 3, 4$ )。デオキシヘモグロビンに4つの酸素が結合してオキシヘモグロビンとなる場合の自由エネルギー変化は、4つの平衡定数の積で表せる( $\Delta G_1 + \Delta G_2 +$

---

\* シアノメトヘモグロビン溶液と、通常のヘモグロビン溶液とを混ぜると、 $[\alpha_1(\text{Fe-CN})\beta_1(\text{Fe-CN})][\alpha_2(\text{Fe-O}_2)\beta_2(\text{Fe-O}_2)]$ という混成ヘモグロビンもできる。これら3種類のヘモグロビンが混在している溶液の酸素平衡曲線が測定されている。

$\Delta G_3 + \Delta G_4 = -RT \ln (K_1 K_2 K_3 K_4)$  )。デオキシヘモグロビンに4つの酸素分子が結合してオキシヘモグロビンとなる時の自由エネルギー変化は、温度が一定なら、結合過程の途中でどのような中間段階分子種を経由するかに関係なく一定である。だから、 $K_1$ 、 $K_2$ 、 $K_3$ 、 $K_4$ の4つの平衡定数は様々な経路のものが考えられるが、どの経路でも4つの積は等しいはずだ。例えば、デオキシヘモグロビンに酸素が  $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$  というサブユニットの順番で結合する経路と、 $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$  の順番で結合する経路とがあるが、それぞれの経路に出てくる4つの平衡定数の積は、等しいはずである。しかし、対称な混成ヘモグロビン (Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンと、Cr(III)-Fe(II)、もしくはシアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビン) を使って得た平衡定数は、その規則を満たしていない。Ni(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンは、デオキシヘモグロビンの最初の結合過程では  $\alpha$ (Fe)サブユニットの方が  $\beta$ (Fe)サブユニットよりも2~3倍酸素親和性が高いことを示唆しているが、後半の酸素結合過程のモデルであるはずのCr(III)-Fe(II)、シアノメト混成ヘモグロビンの酸素結合過程では、 $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの酸素親和性は同じ程度だからだ。

このように、混成ヘモグロビンを使って、通常のヘモグロビンの酸素結合過程を再現しようという試みは、あまりうまくいっていない。Cr(III)-Fe(II)混成ヘモグロビンも、シアノメト-Fe(II)混成ヘモグロビンも、この点では共通している。

### Appendix 3 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ の酸素平衡機能とリガンド結合・解離速度

$\beta$  サブユニットのヘムポケット内の遠位側アミノ酸残基は、 $\beta$  サブユニットのリガンド親和性の調節に重要な役割を果たしている、ということが指摘されている。Perutz らは、オキシヘモグロビンとデオキシヘモグロビンの結晶構造を詳しく比較して、 $\beta$  サブユニットのリガンド親和性は  $\beta$  サブユニットの E ヘリックスのアミノ酸残基の立体障害で調節されていると主張した。デオキシヘモグロビン中の  $\beta$  サブユニットのリガンドが結合する空間は、E ヘリックスのアミノ酸残基 (E7 ヒスチジンと E11 バリン) で塞がれていてリガンドは結合しにくい、オキシ型ヘモグロビンの中の  $\beta$  サブユニットではその残基はヘモグロビンの構造変化によってリガンド結合をじゃまする位置からはなれている、というのである(Perutz, 1970; Shaanan, 1983; Derewenda et al., 1990)。

Mathews らはヘモグロビンのヘムポケットの遠位側アミノ酸残基を他のアミノ酸残基に置き換えた人工異常ヘモグロビンを用いて、それがリガンド結合速度と解離速度、そして平衡定数にどんな影響を与えるかを調べている(1989, 1991)。彼らが使ったのは、 $\alpha$  サブユニットも、 $\beta$  サブユニットも、通常のヘム (Fe(II)) を持つヘモグロビンである。 $\alpha$  サブユニットの E ヘリックスの 11 番目の残基のバリンを他のアミノ酸残基に変えた場合、ヘモグロビンの構造がデオキシヘモグロビン型構造でも、オキシヘモグロビン型構造でも、 $\alpha$  サブユニットのリガンド結合・解離速度に影響があった。バリンより小さい残基に変えた場合 (グリシン、アラニン) は結合、解離速度ともに速くなる傾向があり、大きい残基に変えた場合 (ロイシン、イソロイシン) は、速度は遅くなる傾向がある。他方、 $\beta$  サブユニットの E11 バリンを他のアミノ酸残基に変えたとき、 $\beta$  サブユニットの著しいリガンド結合・解離速度の変化が見られたのはヘモグロビンがデオキシ型構造をしているときだけで、オキシヘモグロビン型構造をしているときは野生型と比べてほとんど違いは無かった。この結果は  $\beta$  サブユニットの E11 バリンの場所は、デオキシヘモグロビン型構造とオキシヘモグロビン型構造とで変化していることを示し、Perutz らの X 線結晶構造解析からの推定と一致している。

ただし例外がある。 $\beta$  サブユニットの E11 バリンをイソロイシンにした場合である。Mathews らの実験では、 $\beta$  サブユニットの E11 バリンをイソロイシンに置換した異常ヘモグロビン  $\alpha_2(\text{Fe}, \text{野生型})\text{-}\beta_2(\text{Fe}, \text{E11 Ile})$  は特に大事である。 $\beta\text{E11-Ile}$  サブユニットのリガンド結合速度は、ヘモグロビンの 4 次構造に依存せずに野生型  $\beta$  サブユニットの結合速度と比べて 10 倍くらい遅くなっている。だから、 $\alpha_2(\text{Fe}, \text{野生型})\text{-}\beta_2(\text{Fe}, \text{E11 Ile})$  ヘモグロビンのリガンド結合・解離反応



を見れば、野生型  $\alpha$  サブユニットと異常  $\beta$  サブユニットの反応を区別できる。そして、それぞれの速度定数を同定しているのである。この同定した野生型  $\alpha$  サブユニットの速度定数を元にして、Mathews らは他の野生型-異常型混成ヘモグロビンの速度定数も同定している。

また、 $\alpha_2(\text{Fe}, \text{野生型})\beta_2(\text{Fe}, \text{E11 Ile})$  は、酸素平衡曲線も測定されている (Nagai et al., 1987)。このヘモグロビンは、はっきり協同性を示す。そして  $K_1$ 、 $K_4$  の値は、どちらも通常のヘモグロビンと比べて数倍小さくなっている。この事実は、ヘモグロビンがどんな 4 次構造をしていても、 $\beta$  サブユニットの E11 バリンをイソロイシンに置換した影響がヘモグロビンの酸素平衡機能に出ることを示す。ただしこの場合、アミノ酸置換によって酸素親和性が下がったのは、 $\beta\text{E11-Ile}$  サブユニットだけなのか、それともアミノ酸置換の影響が野生型  $\alpha$  サブユニットに伝わって、その酸素親和性も下げてしまっているのかは、はっきりわからない。

$\alpha_2(\text{Fe}, \text{野生型})\beta_2(\text{Fe}, \text{E11 Ile})$  を、リガンド親和性が低い状態 (デオキシヘモグロビン型構造) にして、そのアミノ酸置換がリガンド結合にどのような影響を与えているかはあまり調べられていない。デオキシ状態にしたヘモグロビンの CO 結合速度が調べられているのと (Mathews et al., 1991)、酸素平衡曲線から  $K_1$  の値が求められている程度である (Nagai et al., 1987)。デオキシヘモグロビン型構造を安定化させる  $\text{Mg(II)}$  ポルフィリンを  $\alpha$  サブユニットに入れ、 $\beta$  サブユニットの E11 バリンをイソロイシンに置換した混成ヘモグロビン ( $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ ) を使えば、デオキシヘモグロビン型構造中の  $\beta\text{E11-Ile}$  サブユニットの性質だけを調べられるだろう。

$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の X 線結晶構造解析が Park らによって行われている (Park et al., 1995)。T-構造ヘモグロビンの中で、 $\beta$  サブユニットの配位子結合をじゃまする立体障害が大きくなったらヘム周辺にどのような影響を及ぼすかを調べた研究である。結果は  $\beta\text{E11}$  のバリンをイソロイシンに置換しても、ヘモグロビンの構造にはほとんど影響がなく、 $\beta$  サブユニットのヘム周辺のごく一部のアミノ酸残基だけがほんの少し動いた程度だった。

以下に  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の酸素平衡、酸素結合・解離速度、一酸化炭素結合・解離速度の各性質のデータを  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものと比べながら示す。実験条件は、特に示さない限り、すべて 50mM Tris or bis-Tris, 100mM  $\text{Cl}^-$ , 25°C である。

## $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ の酸素平衡機能

表 A3-1  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ 、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  の酸素平衡機能 (G. Miyazaki, 1977)

|                                                      | pH  | IHP | $P_{50}(\text{mmHg})$ | $n_{\text{max}}$ | $K_1(\text{mmHg}^{-1})$ |
|------------------------------------------------------|-----|-----|-----------------------|------------------|-------------------------|
| $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ | 8.4 | —   | 99                    | 1.0              | 0.010                   |
|                                                      | 7.4 | —   | 177                   | 1.0              | 0.0056                  |
|                                                      | 7.4 | +   | 247                   | 1.1              | 0.0033                  |
| $\beta(\text{Fe})\text{E11Ile}$<br>(isolated chain)  | 7.4 | —   | 1.44                  |                  |                         |
| $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$              | 8.4 | —   | 28                    | 1.2              | 0.024                   |
|                                                      | 7.4 | —   | 68                    | 1.0              | 0.015                   |
|                                                      | 7.4 | +   | 160                   | 1.0              | 0.0063                  |
| native $\beta(\text{Fe})$<br>(isolated chain)        | 7.4 | —   | 0.20                  |                  |                         |
| HbA                                                  | 8.4 | —   | 2.09                  | 2.79             | 0.0720                  |
|                                                      | 7.4 | —   | 5.32                  | 3.02             | 0.0218                  |
|                                                      | 7.4 | +   | 48.8                  | 2.53             | 0.00502                 |

測定波長、560nm；ヘモグロビン濃度、金属ポルフィリンを基準にして  $60\mu\text{M}$ ；+IHP は 2mM の IHP が存在する条件で測定したことを意味する。

$\text{Mg(II)}\text{-Fe(II)}$  混成ヘモグロビンの  $K_1$  の値は  $P_{50} = (K_1 K_2)^{-1/2}$ 、 $n_{\text{max}} = 2/[1 + (K_1/K_2)^{1/2}]$  から求めた (Shibayama et al., 1995a)。また、HbA の酸素平衡パラメータは Imai (1982) の文献から引用した。(pH 8.4 のデータは未発表だが、Shibayama らの文献 (1991) に紹介されている)

$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の酸素親和性は、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものに比べて少し低くなっている ( $P_{50}$  が大きい) ことがわかる。IHP を  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  溶液に加えると、その酸素親和性は下がるが、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のように  $P_{50}$  が 2 倍も大きくなるわけではない。

## $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ の酸素再結合実験

$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の酸素再結合実験を、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  を使った場合と同様に行った。やはり  $\text{Mg(II)}$  サブユニット由来と考えられる非常に速い吸光度変化も観測された。その速い成分の速度は、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  を使って観測された速い成分の速度とはほぼ同じ (おおよその速度： at  $1260\mu\text{M O}_2$ ,  $2.0 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ; at  $630\mu\text{M}$

O<sub>2</sub>, 1.0x10<sup>5</sup> s<sup>-1</sup>; under Air, 0.5x10<sup>5</sup> s<sup>-1</sup>) だった。しかし、それに続く酸素再結合反応を示す吸光度変化は、α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)E11Ile と α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)とで明らかに違った。前者のものの方が反応が遅い。見かけの酸素再結合反応速度と、酸素濃度の関係を図 A3-1 に示す。比較するために α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)の実験結果も示した。それぞれのデータには、最もよく合う直線をフィットさせてある。

α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)E11Ile の実験結果の直線の傾きは、α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)のものより小さい。直線の傾きから、それぞれのヘモグロビン β サブユニットの酸素結合速度定数、直線の縦軸切片から酸素解離速度定数を求めて、表 A3-2 にまとめた。

表 A3-2 α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)E11Ile、α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)の酸素結合・解離速度定数

|                                              | pH  | IHP | k' <sub>O2</sub> (μ M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | k <sub>O2</sub> (s <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------------------|-----|-----|-------------------------------------------------------|------------------------------------|
| α <sub>2</sub> (Mg)β <sub>2</sub> (Fe)E11Ile | 7.4 | —   | 0.80                                                  | 500                                |
|                                              |     | +   | 0.57                                                  | 400                                |
| α <sub>2</sub> (Mg)β <sub>2</sub> (Fe)       | 7.4 | —   | 6.1                                                   | 800                                |
|                                              |     | +   | 4.0                                                   | 2100                               |

\*測定波長、436nm；ヘモグロビン濃度、金属ポルフィリンを基準にして 200μM；+IHP は 100μ M の IHP が存在する条件で測定したことを意味する。

α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)E11Ile 酸素結合速度定数は、α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)のもの 1/7～1/8 程度の大きさである。つまり、酸素再結合速度は α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)E11Ile の方が遅い。他方、精度は悪いのだが、酸素解離速度定数に関しては、α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)E11Ile のものの方が、α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)のものよりも小さい。つまり、α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)E11Ile の方が、酸素が離れる速度が遅い。

表 A3-2 に示した速度定数を使って、ヘモグロビンの酸素平衡定数を計算してみる。結合速度定数と解離速度定数の比を計算すれば、平衡定数となる。

表 A3-3 α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)E11Ile、α<sub>2</sub>(Mg)β<sub>2</sub>(Fe)の酸素平衡定数

|                                              | pH  | IHP | K <sub>O2</sub> (μ M <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------------------|-----|-----|--------------------------------------|
| α <sub>2</sub> (Mg)β <sub>2</sub> (Fe)E11Ile | 7.4 | —   | 0.0016                               |
|                                              |     | +   | 0.0014                               |
| α <sub>2</sub> (Mg)β <sub>2</sub> (Fe)       | 7.4 | —   | 0.0076                               |
|                                              |     | +   | 0.0019                               |

\*表 A3-2 の結合速度定数と解離速度定数の比から平衡定数 K<sub>O2</sub> を求めた。

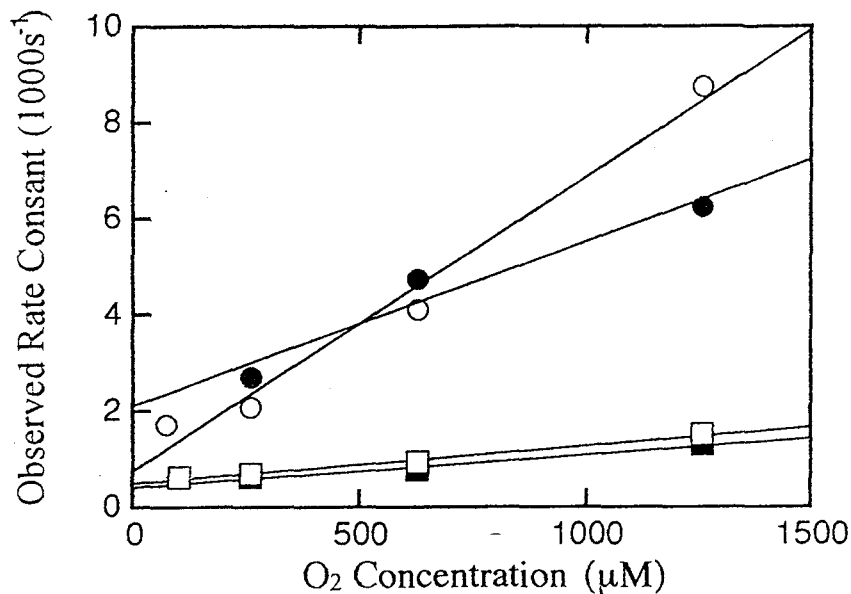


図 A3-1  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe-O}_2)$ ヘモグロビンのレーザーフォトリシス実験で観測された、見かけの酸素再結合速度の酸素濃度依存性

測定条件：50mM bis-Tris, 100mM Cl<sup>-</sup>, 25℃, 混成ヘモグロビン濃度、200μM (ポリフィリン基準)

○:  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe-O}_2)$

□:  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe-O}_2)\text{E11(Val} \rightarrow \text{Ile)}$

白抜きシンボル：IHP なし； 黒シンボル：100μM IHP；

図中、データに最も良くあう直線を黒実線で示した。直線の傾きが真の酸素結合速度定数、直線の縦軸切片が酸素解離速度定数を示す。 $\beta$ サブユニットの E11 の位置のバリンをイソロイシンに変えたことにより、直線の傾きがとても小さくなった（およそ 8 分の 1）。つまり、酸素結合速度が遅くなった。

速度論的に求めたヘモグロビンの酸素結合平衡定数と、酸素平衡曲線から求めた、ヘモグロビンの1個目に結合する酸素に対する平衡定数とを比べてみよう。

表 A3-4  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ 、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ の酸素平衡定数

|                                                      | pH  | IHP | $K_1(\text{mmHg}^{-1})$ | $K_{O_2}(\text{mmHg}^{-1})$ |
|------------------------------------------------------|-----|-----|-------------------------|-----------------------------|
| $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ | 7.4 | —   | 0.0056                  | 0.0026                      |
|                                                      |     | +   | 0.0033                  | 0.0023                      |
| $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$              | 7.4 | —   | 0.015                   | 0.012                       |
|                                                      |     | +   | 0.0063                  | 0.0031                      |

\* $K_1$ の値は酸素平衡曲線から求められた値(表 A3-1 から)。

\* $K_{O_2}$ は速度論的に計算された酸素平衡定数(表 A3-3 から)。

単位は  $\text{mmHg}^{-1}$  に統一してある。

フラッシュフォトリシスの実験から求めた酸素解離速度定数(グラフの縦軸切片)は精度が悪いので、結合速度定数との比から酸素平衡定数を計算するのは無理があるのだが、この速度定数から求めた平衡定数は酸素平衡曲線を測定することによって求めた  $K_1$  の値と2倍程度の範囲の近い数字になった(表 A3-4)。このことより、観測された  $\text{Mg(II)-Fe(II)}$  混成ヘモグロビンの酸素再結合反応は、デオキシ状態の混成ヘモグロビンのものだったと考えられる。

デオキシヘモグロビン型4次構造中の  $\beta$  サブユニットにアミノ酸置換を導入した影響は、平衡定数には大きくあらわれていない。 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  のものと、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものとは  $P_{50}$  の値で比べて2~3倍しか変わらない。アミノ酸置換導入により、酸素結合速度が  $1/7 \sim 1/8$  に遅くなったが、酸素解離速度も遅くなったので、平衡定数的には大きな変化が無かったと考えられる。

$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の酸素解離速度は、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものに比べて本当に遅いのだろうか。次の実験を見てみよう。

#### $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ の $\text{O}_2\text{-CO}$ 置き換え実験

$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  混成ヘモグロビンの  $\text{O}_2\text{-CO}$  置き換え実験も行った。

実験の方法はこの論文の第3章の  $\text{Mg(II)-Fe(II)}$  混成ヘモグロビンの酸素解離速度の測定と同様である。 $\text{Mg(II)-Fe(II)}$  混成ヘモグロビンは酸素親和性が極端に低いので、実験の初期状態で酸素で飽和しない恐れがある。だから、1気圧酸素と平衡を取った緩衝液で混成ヘモグロビン溶液を用意し、他方、一酸化炭素濃度を薄くした緩衝液を用意してその両溶液を Stopped-flow 装置で高速混合した。この実験の条件では、 $\text{Cr(III)-Mn(III)-Fe(II)}$  混成ヘモグロビンで使われた解

析方法は使えない。第3章の Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンの O<sub>2</sub>-CO 置き換え実験用の解析方法を使う。見かけの O<sub>2</sub>-CO 置き換わり速度の速度定数を縦軸に、[CO 濃度]を横軸にとったグラフを作る (図 A3-2)。

第3章で述べた通り、通常のヘモグロビンを使って得られた結果と、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ を使って得られた結果は、ほとんど同じだった。その理由をいろいろと考えた結果、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ を使った O<sub>2</sub>-CO 置き換え実験で観測された反応は、Mg(II)ポルフィリンを使ったにも関わらず、オキシヘモグロビン型の構造を持つヘモグロビンの O<sub>2</sub>-CO 置き換わりだったと結論づけた。

しかし、今回の  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  混成ヘモグロビンを使った実験では、明らかに HbA や  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの結果と速度の異なる置き換わり反応が起こっている。見かけの反応速度と CO 濃度の関係は、

$$k_{\text{apparent}} = \frac{k_{\text{O}_2} k'_{\text{CO}} [\text{CO}]}{k'_{\text{O}_2} [\text{O}_2]} + k_{\text{CO}} \quad \text{---eq. 3-25}$$

で表される。O<sub>2</sub> 濃度は今回の実験では固定してあるので、見かけの反応速度は CO 濃度に比例する。その傾きは、 $(k_{\text{O}_2} k'_{\text{CO}} / k'_{\text{O}_2})$  に等しいはずだ。 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  混成ヘモグロビンを使った実験結果の直線の傾きは、通常のヘモグロビンや  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ 混成ヘモグロビンの結果の直線の傾きより明らかに小さい (約 1/5)。直線の傾きに関わるヘモグロビンの  $k_{\text{O}_2}$ 、 $k'_{\text{CO}}$ 、 $k'_{\text{O}_2}$  の3つの速度定数は、 $\beta$  サブユニットのアミノ酸置換によってどのような影響を受けたのだろうか。 $\beta$  サブユニットの E11 バリンをイソロイシンに換えると、ヘモグロビンの4次構造に関係なく、 $\beta$  サブユニット O<sub>2</sub> の結合速度定数 ( $k'_{\text{O}_2}$ ) は 7~10 倍小さくなり、CO の結合速度定数 ( $k'_{\text{CO}}$ ) も 10~20 倍小さくなることがわかっている (Mathews et al., 1989, 1991, 本論文のこの章)。この範囲で  $k'_{\text{CO}}$  と  $k'_{\text{O}_2}$  を変化させても、直線の傾き  $(k_{\text{O}_2} k'_{\text{CO}} / k'_{\text{O}_2})$  は、最小で元の直線の傾きのおよそ 1/3 までにしか小さくならない。

そこで、酸素の解離速度定数 ( $k_{\text{O}_2}$ ) が、アミノ酸置換の結果、小さくなると仮定すれば説明がつく。つまり、「 $\beta$  サブユニットの E11 バリンをイソロイシンに換えると、 $\beta$  サブユニットの酸素解離速度が遅くなる」と仮定すると、図 A3-2 中の直線の傾きが小さくなった結果を説明できるのだ。アミノ酸置換により、 $\beta$  サブユニットの酸素の解離速度定数 ( $k_{\text{O}_2}$ ) が 1/2 に遅くなる、といった程度の仮定で、直線の傾き  $(k_{\text{O}_2} k'_{\text{CO}} / k'_{\text{O}_2})$  が小さくなった事実を説明できる。

残念なのは、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  混成ヘモグロビンを使って観測された O<sub>2</sub>-CO 置き換わり反応が、デオキシヘモグロビン型4次構造のヘモグロビンの性質

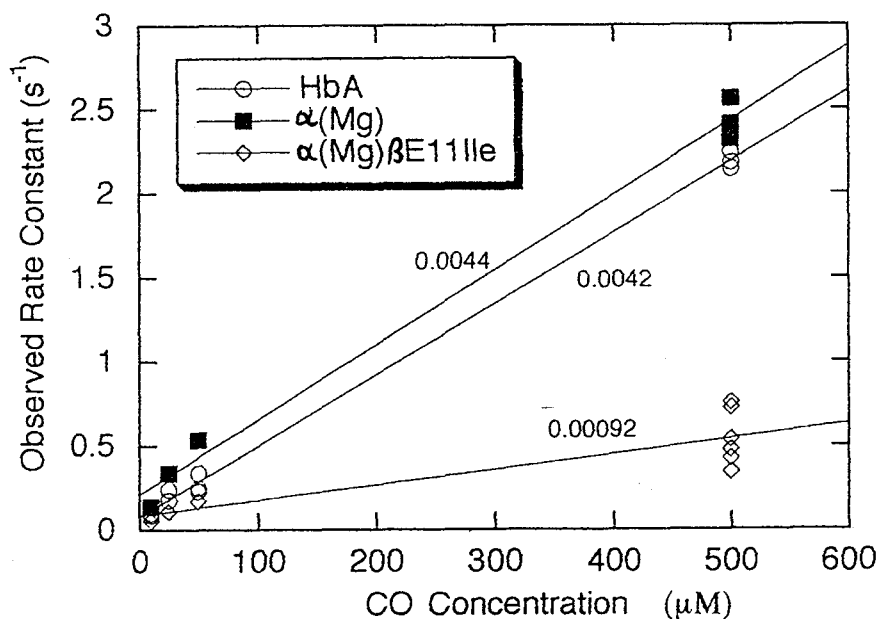


図 A3-2  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11}(\text{Val} \rightarrow \text{Ile})$ ヘモグロビンを使った酸素-一酸化炭素置き換え実験の結果の解析

測定条件：50mM bis-Tris, 100mM Cl<sup>-</sup>, 25℃,

混成ヘモグロビン濃度、10μM (混合前、ポルフィリン基準)

HbA、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ を使った実験結果を比較対称としてグラフ中に示した。

各ヘモグロビンは酸素結合型で、1気圧酸素と平衡のとれた緩衝液中に薄めておく。Stopped-flow 装置で CO 溶液と混合し、ヘモグロビンに結合している酸素が一酸化炭素と置き換わる速度を測定する。CO 溶液の CO 濃度をいろいろ変えた。図中の CO 濃度は、混合後の CO 濃度。データの点に最も良く合う直線 (図中黒実線) を最小二乗法で求めた。図中、直線に添えた数字は、直線の傾きの値を示す。

なのか、それともオキシヘモグロビン型 4 次構造のヘモグロビンの性質なのかわからない事である。第 3 章で、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ や  $\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$ を使っても、デオキシヘモグロビン型 4 次構造のヘモグロビンの性質を調べることはできなかった。 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  混成ヘモグロビンでも、同じかも知れない。

#### デオキシ $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ の CO 結合反応

デオキシ状態の  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の CO 結合反応は、Stopped-flow 装置を使ってデオキシ Mg(II)-Fe(II)混成ヘモグロビンを使った実験と同様に行った。

表 A3-5 デオキシ状態の  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ 、 $\text{E11Ile}\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ の CO 結合速度定数

|                                                      | pH  | IHP <sup>-</sup> | $k'_{\text{CO}}(\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$ |
|------------------------------------------------------|-----|------------------|-------------------------------------------------|
| $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ | 7.4 | —                | 0.0042                                          |
|                                                      |     | +                | 0.0036                                          |
| $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$              | 6.5 | —                | 0.051                                           |
|                                                      |     | +                | 0.047                                           |
|                                                      | 7.4 | —                | 0.041                                           |
|                                                      |     | +                | 0.037                                           |
|                                                      | 8.4 | —                | 0.058                                           |
|                                                      |     | +                | 0.047                                           |
| HbA                                                  | 6.5 | —                | 0.18                                            |
|                                                      |     | +                | 0.095                                           |
|                                                      | 7.4 | —                | 0.23                                            |
|                                                      |     | +                | 0.081                                           |

測定波長、436nm；ヘモグロビン濃度、Stopped-flow 装置で混合後、金属ポルフィリンを基準にして  $5\mu\text{M}$ ；+IHP は混合後、 $50\mu\text{M}$  の IHP がある条件で測定したことを意味する。CO の濃度は混合後、 $16.7\mu\text{M}$ 。

$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の CO 結合速度は、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$ のものに比べて約 1/10 に遅くなった。この結果は、Mathews らの  $\alpha_2(\text{Fe}, \text{野生型})\beta_2(\text{Fe}, \text{E11Ile})$ ヘモグロビンを使った実験結果(1991)とよく一致する。



### $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ の CO 解離速度の測定

$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の CO 解離速度は、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  を使った実験と同様、CO-NO 置き換え反応を利用して行われた。

表 A3-6  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ 、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  の CO 解離速度定数

|                                                      | pH  | IHP | $k_{\text{CO}}(\text{s}^{-1})$ |
|------------------------------------------------------|-----|-----|--------------------------------|
| $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ | 6.5 | —   | 0.065                          |
|                                                      |     | +   | 0.20                           |
|                                                      | 7.4 | —   | 0.043                          |
|                                                      |     | +   | 0.054                          |
| $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$              | 6.5 | —   | 0.024                          |
|                                                      |     | +   | 0.17                           |
|                                                      | 7.4 | —   | 0.017                          |
|                                                      |     | +   | 0.024                          |
|                                                      | 8.4 | —   | 0.013                          |
|                                                      |     | +   | 0.012                          |
| HbA                                                  | 6.5 | —   | 0.011                          |
|                                                      |     | +   | 0.012                          |
|                                                      | 7.4 | —   | 0.0090                         |
|                                                      |     | +   | 0.0096                         |

\*測定波長、405.7nm；ヘモグロビン濃度、Stopped-flow 装置で混合後、金属ポルフィリンを基準にして  $5\mu\text{M}$ ；+IHP は混合後、 $50\mu\text{M}$  の IHP がある条件で測定したことを意味する。CO、NO の濃度は、混合後それぞれ  $50\mu\text{M}$ 、 $1000\mu\text{M}$ 。

$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の CO 解離速度が、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものに比べて速いの  
がわかる。他方、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の CO 結合速度は  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものに  
比べて約 1/10 程度の速さでしかない（表 A3-5）。ということは、  
 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の CO 親和性は、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものに比べて極端に低い  
ことになる。CO-NO 置き換え実験では、念のため、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  溶液の  
CO 濃度を  $1000\mu\text{M}$ （混合後は  $500\mu\text{M}$ ）の条件でも行った。CO 親和性が低く  
ても、CO で飽和させるつもりでやったのだが、観測された結果は CO 濃度  
 $100\mu\text{M}$ （混合後は  $50\mu\text{M}$ ）条件で観測された結果とほぼ同じであった。だから、  
初期条件でヘモグロビンが CO で飽和していない心配はしなくてもよい。

$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  は、pH6.5、IHP 存在条件で CO 解離速度が最も速い状態になる

と考えている。その条件の  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の CO 解離速度は、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものとあまり変わらない。 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の CO 解離速度はまだ速くなる余地があるのか？ それとも、アミノ酸の側鎖が違っていても、CO 解離速度の上限にはあまり関係がないのか？

#### $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ の NO 結合速度の測定

一酸化窒素 (NO) の結合速度の測定はこの論文でふれていないが、方法は一酸化炭素(CO)の結合速度の測定とほぼ同様、デオキシ混成ヘモグロビン溶液と NO 溶液 (嫌氣的なもの、Dithionite は使っていない) を Stopped-flow 装置で高速混合して吸光度変化を測定する。NO 溶液の NO 濃度条件をいくつか変えて測定する。見かけの結合速度と NO 濃度のグラフを作る (図 A3-3)。NO 解離速度は結合速度に比べてとても遅いと考えて (表 A3-7)、原点を通る直線をデータのグラフにフィットさせる。直線の傾きを NO 結合速度とする (この論文の第 3 章の CO 結合速度定数の求め方と同じ)。

表 A3-7 参考：ヘモグロビンの NO 解離速度定数

|                           | $k'_{\text{NO}}$ (単位: $10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ ) | Conditions & References     |
|---------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------|
| Isolated $\alpha$ subunit | 46                                                 | 50mM phosphate, pH7.0, 20°C |
| Isolated $\beta$ subunit  | 22                                                 | (Cassoly & Gibson (1975))   |
| HbA, $k_T$                | 1000                                               | 50mM phosphate, pH7.0, 22°C |
| HbA, $k_R$                | 9.5                                                | (Moore & Gibson (1976))     |

HbA の  $k_T$  と  $k_R$  の値は、測定結果を 2 状態モデルで解析して計算された、測定結果を最も良く説明できる値である。

表 A3-8 デオキシ  $\text{Mg(II)-Fe(II)}$  混成ヘモグロビンの NO 結合速度定数

|                                                      | pH  | IHP | $k'_{\text{NO}} (\mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ |
|------------------------------------------------------|-----|-----|----------------------------------------------------|
| $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ | 7.0 | —   | 11                                                 |
| $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$              | 7.0 | —   | 27                                                 |
| deoxy HbA <sup>ref.</sup>                            | 7.0 | —   | 26                                                 |

条件: 0.1M potassium phosphate, 0.3mM EDTA, 20°C, detected at 436nm, ヘモグロビン濃度、混合後 5 $\mu\text{M}$ ; NO 濃度、混合後 2.5, 5.0, 10, 50 $\mu\text{M}$  の各条件。

<sup>ref.</sup> Cassoly & Gibson, (1975); Szabo (1978); Olson (1981a). 50mM phosphate, pH7.0, 20°C, detected at 432 and 412nm.

デオキシ  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  の NO 結合速度は、通常のデオキシヘモグロビンとは

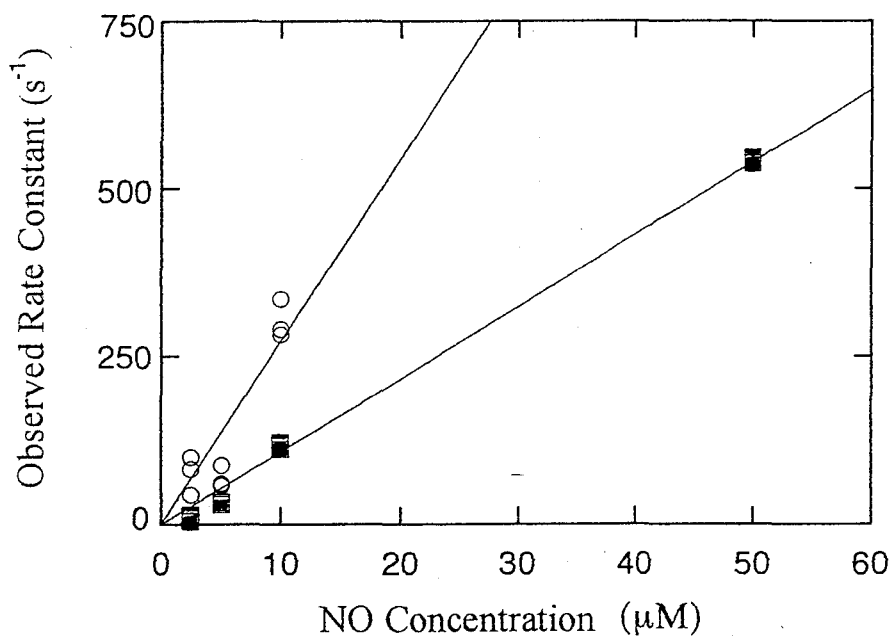


図 A3-3  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  混成ヘモグロビンの見かけの NO 結合速度の NO 濃度依存性

測定条件：0.1M KPi, pH7.0, 20℃, Detected at 436nm,

ヘモグロビン濃度、10μM (混合前)

○:  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe-O}_2)$

■:  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe-O}_2)\text{E11(Val} \rightarrow \text{Ile)}$

ヘモグロビンから NO が解離する速度は十分に遅い、と考えると、データにフィットさせる直線はグラフの原点を通るものにした。直線の傾きが真の NO 結合速度定数を示す。β サブユニットの E11 の位置のバリンをイソロイシンに変えたことにより、直線の傾きがおよそ 2 分の 1 になった。つまり、それだけ NO 結合速度が遅くなった。

ほぼ同じ速さになった（注：NO の結合速度は、ヘモグロビンの 4 次構造に関係なくほぼ一定である：Cassoly & Gibson, (1975); Szabo (1978); Olson (1981a)）。

その速度に比べると、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の NO 結合速度は、明らかに遅い。 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の NO 結合速度は、デオキシヘモグロビンや  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものに比べて 1 / 2 程度に遅くなっている。

#### $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$ を使った実験のまとめ

表 A3-1 から A3-8 までで、 $\beta$  サブユニットの E11 バリンをイソロイシンに置き換えた影響が特に大きく見えるのは  $\beta$  サブユニットの  $\text{O}_2$ 、CO、NO の結合速度が著しく遅くなったことである。速度定数を  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものと比べると、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  のものは、 $\text{O}_2$  結合速度が 1/7～1/8、CO 結合速度が約 1/10、NO 結合速度が約 1/2.5 まで遅くなっている。

他方、アミノ酸置き換えのリガンド解離速度に対する影響は、 $\text{O}_2$  解離速度と CO 解離速度とで違いがある。 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の  $\text{O}_2$  の解離速度は  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものに比べて同じ程度か、もしくは遅くなっている。一方、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の一酸化炭素の解離速度は  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものに比べて同じ程度か、もしくは速くなっている。

$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の酸素平衡機能と  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものを比べても、前者が少し低い酸素親和性を示しただけで、 $\text{O}_2$  結合速度の違い（7～8 倍違う）のような大きな違いは無かった。これは  $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})\text{E11Ile}$  の酸素解離速度が、 $\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$  のものに比べて遅かったからだと考えられる。

#### Appendix-4 今までに報告されている金属置換混成ヘモグロビンの酸素平衡パラメータ

今までに森本研究室で卒業生が報告した金属置換混成ヘモグロビンの酸素平衡パラメータを以下に示す。測定条件はすべて 50mM Tris or bis-Tris, 100mM Cl<sup>-</sup>, 25℃, ヘモグロビン濃度は金属ポルフィリンを基準にして (ヘムも含む) 60μM である。各氏の論文の中に P<sub>50</sub> と n<sub>max</sub> の値しか出ていなかった場合は、K<sub>1</sub> の K<sub>2</sub> の値を計算して示した。

(計算式:  $P_{50} = (K_1 K_2)^{-1/2}$ ;  $n_{max} = 2/[1 + (K_1/K_2)^{1/2}]$ . Shibayama et al., 1995a)

(Masuda et al., 1993)

α<sub>2</sub>(Mn)β<sub>2</sub>(Fe)

| pH  | IHP | P <sub>50</sub> (mmHg) | n <sub>max</sub> | K <sub>1</sub> (mmHg <sup>-1</sup> ) | K <sub>2</sub> (mmHg <sup>-1</sup> ) |
|-----|-----|------------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 6.5 | —   | 13                     | 1.3              | 0.042                                | 0.14                                 |
| 7.5 | —   | 3.2                    | 1.4              | 0.13                                 | 0.73                                 |
| 8.5 | —   | 1.1                    | 1.1              | 0.74                                 | 1.1                                  |
| 6.5 | +   | 150                    | 1.0              | 0.0067                               | 0.0067                               |
| 7.4 | +   | 150                    | 1.0              | 0.0067                               | 0.0067                               |
| 8.4 | +   | 3.5                    | 1.0              | 0.29                                 | 0.29                                 |

α<sub>2</sub>(Fe)β<sub>2</sub>(Mn)

| pH  | IHP | P <sub>50</sub> (mmHg) | n <sub>max</sub> | K <sub>1</sub> (mmHg <sup>-1</sup> ) | K <sub>2</sub> (mmHg <sup>-1</sup> ) |
|-----|-----|------------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 6.5 | —   | 4.8                    | 1.2              | 0.13                                 | 0.31                                 |
| 7.4 | —   | 1.3                    | 1.3              | 0.41                                 | 1.4                                  |
| 8.4 | —   | 0.64                   | 1.5(?)           |                                      |                                      |
| 6.5 | +   | 30                     | 1.2              | 0.022                                | 0.050                                |
| 7.4 | +   | 15                     | 1.3              | 0.036                                | 0.12                                 |
| 8.4 | +   | 0.91                   | 1.6(?)           |                                      |                                      |

(Shibayama et al., 1986b)

$\alpha_2(\text{Ni})\beta_2(\text{Fe})$

| pH  | IHP | P <sub>50</sub> (mmHg) | n <sub>max</sub> | K <sub>1</sub> (mmHg <sup>-1</sup> ) | K <sub>2</sub> (mmHg <sup>-1</sup> ) |
|-----|-----|------------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 6.5 | —   | 110                    | 1.0              | 0.0091                               | 0.0091                               |
| 7.5 | —   | 44                     | 1.0              | 0.023                                | 0.023                                |
| 8.5 | —   | 16                     | 1.0              | 0.063                                | 0.063                                |
| 6.5 | +   | 200                    | 1.0              | 0.0050                               | 0.0050                               |
| 7.5 | +   | 220                    | 1.0              | 0.0045                               | 0.0045                               |
| 8.5 | +   | 110                    | 1.0              | 0.0091                               | 0.0091                               |

\*protein concentration, 16 $\mu$ M (porphyrin base) 、detected at 430nm.

$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Ni})$

| pH  | IHP | P <sub>50</sub> (mmHg) | n <sub>max</sub> | K <sub>1</sub> (mmHg <sup>-1</sup> ) | K <sub>2</sub> (mmHg <sup>-1</sup> ) |
|-----|-----|------------------------|------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 6.5 | —   | 73                     | 1.0              | 0.014                                | 0.014                                |
| 7.5 | —   | 27                     | 1.1              | 0.032                                | 0.043                                |
| 8.5 | —   | 5.8                    | 1.3              | 0.12                                 | 0.25                                 |
| 6.5 | +   | 170                    | 1.0              | 0.0059                               | 0.0059                               |
| 7.5 | +   | 170                    | 1.0              | 0.0059                               | 0.0059                               |
| 8.5 | +   | 36                     | 1.2              | 0.025                                | 0.031                                |

\*protein concentration, 60 $\mu$ M (porphyrin base) 、detected at 560nm.

(Fujii et al., 1993)

$\alpha_2(\text{Mg})\beta_2(\text{Fe})$

| pH  | IHP | $P_{50}(\text{mmHg})$ | $n_{\text{max}}$ | $K_1(\text{mmHg}^{-1})$ | $K_2(\text{mmHg}^{-1})$ |
|-----|-----|-----------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|
| 6.5 | —   | 142                   | 1.0              | 0.00693                 | 0.00716                 |
| 7.4 | —   | 85.8                  | 1.0              | 0.0107                  | 0.0127                  |
| 9.0 | —   | 17.7                  | 1.2              | 0.0363                  | 0.0882                  |
| 6.5 | +   | 221                   | 1.2              | 0.00328                 | 0.00617                 |
| 7.4 | +   | 215                   | 1.0              | 0.00438                 | 0.00486                 |
| 9.0 | +   | 64.6                  | 1.1              | 0.0123                  | 0.0186                  |

$\alpha_2(\text{Fe})\beta_2(\text{Mg})$

| pH  | IHP | $P_{50}(\text{mmHg})$ | $n_{\text{max}}$ | $K_1(\text{mmHg}^{-1})$ | $K_2(\text{mmHg}^{-1})$ |
|-----|-----|-----------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|
| 6.5 | —   | 147                   | 1.1              | 0.00512                 | 0.00848                 |
| 7.4 | —   | 55.0                  | 1.3              | 0.0103                  | 0.0321                  |
| 8.5 | —   | 14.7                  | 1.5              | 0.0248                  | 0.186                   |
| 6.5 | +   | 212                   | 1.1              | 0.00386                 | 0.00575                 |
| 7.4 | +   | 201                   | 1.1              | 0.00387                 | 0.00632                 |
| 8.5 | +   | 86                    | 1.3              | 0.00685                 | 0.0198                  |

\*detected at 560nm

## 謝辞

本論文中の一連の実験は、大阪大学基礎工学部、Rice University 生化学研究室で行われたものです。本論文をまとめるにあたり、筆者の指導をしていただいた森本英樹先生に深く感謝します。また、大阪大学在学中に、基礎的な実験の指導をしていただいた宮崎源太郎先生、堀 洋先生に深く感謝します。また、森本研究室の皆様に感謝します。そして、様々な貴重な御意見を下さった、自治医科大学の柴山修哉先生に深く感謝します。

約1年間の渡米期間中、研究の場を与えていただき、ご指導下さった John S. Olson 先生に深く感謝します。また、渡米期間中、様々な面でお世話になった斉藤正男先生、Olson's Laboratory の皆様に感謝します。そして、酸素平衡曲線測定装置を制作する際に、貴重な御意見を下さった今井清博先生に深く感謝します。現在、研究の場を与えて下さっている Medical Research Council の長井潔先生に深く感謝します。

最後に、徳島の両親と、岩国の姉に感謝します。



## References

- Ackers, G.K., Doyle, M.L., Myers, D., & Daugherty, M.A. (1992).  
Science 255, 54-63.
- Alston, K., Schechter, A.N., Arcoleo, J.P., Greer, J., Parr, G.R., & Friedman, F.K. (1984).  
Hemoglobin 8(1), 47-60.
- Anderson, N.L. (1975)  
J.Mol.Biol. 94, 33-.
- Antonini, E., Wyman, J., Zito, R., Rossi-Fanelli, A., and Caputo, A. (1961)  
J.Biol.Chem. 236, PC60-63.
- Antonini, E., Chiancone, E., and Brunori, M. (1967)  
J.Biol.Chem., 242, 4360-4366.
- Antonini, E., and Brunori, M. (1971)  
*Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands.*  
North-Holland publishing company, Amsterdam, London.
- Arnone, A. (1972)  
Nature 237, 146.
- Arnone, A., Rogers, P., Blough, N.V., McGoury, J.L., and Hoffman, B.M. (1986)  
J.Mol.Biol. 188, 693-706.
- Asakura, T., and Lau, P.W. (1978)  
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 75, 5462-5465.
- Baldwin, J., & Chothia, C. (1979).  
J.Mol.Biol. 129, 175-220.
- Banerjee, R., & Cassoly, R. (1969).  
J. Mol. Biol. 42, 351-320.
- Banerjee, R., Stretzkowski, F., & Henry, Y. (1973).  
J.Mol.Biol. 73, 455-467.
- Berjis, M., Bandyopadhyay, D., and Sharma, V.S. (1990)  
Biochemistry, 29, 10106-10113.
- Bettati, S., Mozzarelli, A., Rossi, G.L., Tsuneshige, A., Yonetani, T., Eaton, W., and Henry, E.R. (1996)  
Proteins 25, 425-437.
- Blough, N.V., and Hoffman, B.M. (1982)  
J.Am.Chem.Soc. 104, 4247-4250.

- Blough, N.V., and Hoffman, B.M. (1984)  
*Biochemistry* 23, 2875-2882.
- Blough, N.V., Zemel, H., and Hoffman, B.M. (1984)  
*Biochemistry* 23, 2883-2891.
- Bonaventura, J., Bonaventura, C., Brunori, M., Giardina, B., Antonini, R., Bossa, F., and Wyman, J. (1974)  
*J.Mol.Biol.* 82, 499-511.
- Brunori, M., Amiconi, G., Antonini, E., Wyman, J., & Winterhalter, K.H. (1970).  
*J.Mol.Biol.* 49, 461-471.
- Buchler, J.W. (1975).  
 Oxydation states of the central metal ions. in *Porphyrins and Metalloporphyrins* (Smith, K.M., ed.) Chap.5, pp191-195, Elsevier, Amsterdam.
- Cassoly, R., and Gibson, Q.H. (1972)  
*J.Biol.Chem.* 247, 7332-7341.
- Cassoly, R., and Gibson, Q.H. (1975)  
*J.Mol.Biol.* 91, 301-313.
- Clayton, R.K. (1980)  
*Photosynthesis: Physical mechanisms and chemical patterns.* Cambridge, U.K. : Cambridge University Press.
- Chiancone, E., Anderson, N.M., Antonini, E., Bonaventura, J., Bonaventura, C., Brunori, M., & Spagnuolo, C. (1974)  
*J.Biol.Chem.* 249, 5689-5694.
- Cassoly, R., Gibson, Q.H., Ogawa, S., & Shulman, R.G. (1971).  
*Biochem.Biophys.Res.Comm.* 44, 1015-1021.
- Cassoly, R., & Gibson, Q.H. (1972).  
*J.Biol.Chem.* 247, 7332-7341.
- Cho, K.C., and Hopfield, J.J. (1979)  
*Biochemistry*, 18, 5826-5833.
- Chu, A.H. & Ackers, G.K. (1981)  
*J.Biol.Chem.* 256, 1199-1205.
- Craescu, C.T., Schaeffer, C., Mispelter, J., Garin, J., and Rosa, J. (1986)  
*J.Biol.Chem.* 261, 7894-7901.
- Daugherty, M.A., Shea, M.A., Johnson, J.A., LiCata, V.J., Turner, G.J., and Ackers, G.K. (1991)  
*Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 88, 1110-1114.

- Daugherty, M.A., Shea, M.A., & Ackers, G.K. (1994).  
Biochemistry 33, 10345-10357.
- Deatherage, J.F., Loe, R.S., Anderson, C.M., & Moffat, K. (1976).  
J.Mol.Biol. 104, 687-706.
- Derewenda, Z., Dodson, G., Emsley, P., Harris, D., Nagai, K., Perutz, M., and Renaud, J.-P. (1990)  
J.Mol.Biol. 211, 515-519.
- Doyle, M.L. & Ackers, G.K. (1992).  
Biochemistry 31, 11182-11195.
- Earley, J.E. & Cannon, R.D. (1965).  
Transition Metal Chem. 1, 33-109.
- Fermi, G., Perutz, M., Shana'an, B. and Fourme, R. (1984)  
J.Mol.Biol. 175, 159-174.
- Ferrone, F.A., Martino, A.J., and Basak S. (1985)  
Biophys. J. 48, 269-282.
- Fiechtner, M.D., McLendon, G., & Bailey, M.W. (1980).  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 92, 277-284.
- Fronticelli, C., Brinigar, W.S., Olson, J.S., Bucci, E., Gryczynski, Z., O'Donnel, J.K., and Kowalczyk, J. (1993)  
Biochemistry, 32, 1235-1242.
- Fuhrhop, J. and Granick, S. (1971)  
Biochem. Prep. 13, 55-58.
- Fujii, M., Hori, H., Miyazaki, G., Morimoto, H., and Yonetani, T. (1993)  
J.Biol.Chem. 268, 15386-15393.
- Fujii, M., and Morimoto, H. (1995)  
Unpublished results. (藤井元康、大阪大学基礎工学部博士論文)
- Fung, L. W. and Ho, C. (1975)  
Biochemistry 14, 2526-2535.
- Gibson, Q.H. (1959a)  
Biochem.J. 71, 293-303.
- Gibson, Q.H. (1959b)  
in "Progress in biophysical chemistry" vol.9, pp.1-53, Pergamon, New York.
- Gibson, Q.H., Parkhurst, L.J., and Geraci, G. (1969)  
J.Biol.Chem. 244, 4668-4676.

- Gibson, Q.H. (1973)  
Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 1-4.
- Gray, R.D., and Gibson, Q.H. (1971)  
J.Biol.Chem. 246, 7168-7174.
- Greenfield, N.J., and Williams, M.N. (1972)  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA 67, 637
- Hayashi,A., Suzuki,T., and Shin,M. (1973).  
Biochim.Biophys.Acta. 310, 309-316.
- Ho, C., and Russu, I.M. (1985)  
in New Methodologies in Studies of Protein Configuration (Wu, T.T., Ed.) pp1-35, Van Nostrand  
Reinhold Company, New York.
- Hoard,J.L. (1971).  
Science 174, 1295-1302.
- Hoffman, B., and Petering, D.H. (1970)  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 67, 637.
- Hoffman, B.M., Gibson, Q.H., Bull, C., Crepeau, R.H., Edelstein, S.J., Fisher, R.G., and  
McDonald, M.J. (1975)  
Ann.N.Y.Acd.Sci. 244, 174-186.
- Hopfield, J.J., Ogawa, S., and Shulman, R.G. (1972)  
The rate of Carbon Monoxide binding to Hemoglobin Kansas.  
Biochem.Biophys.Res. Commun. 49, 1480-1484.
- Hori,H., Tsubaki,M., Yu,N-T., and Yonetani,T. (1991).  
Biochim.Biophys.Acta. 1077, 392-399.
- Huang, S., Peterson, E.S., Ho, C., and Friedman, J.M. (1997)  
Biochemistry 36, 6197-6206.
- Huestis, W.H., and Raftery, M.A. (1972)  
Biochem.Biophys.Res.Communic. 49, 1358-1365.
- Ikeda-Saito,M., Yamamoto,H., & Yonetani,T. (1977).  
J. Biol. Chem. 252, 8639-8644.
- Ikeda-Saito, M. and Yonetani, T. (1980)  
J.Mol.Chem. 138, 845-858.
- Imai,K., Morimoto,H., Kotani,M., Watari,H., Hirata,W., & Kuroda,M. (1970).  
Biochim.Biophys.Acta. 200, 189-196.
- Imai, K., Yonetani, T., and Ikeda-Saito, M. (1977)  
J.Mol.Biol. 109, 83-97.

- Imai, K. (1981a).  
Methods in Enzymology. (Antonini, E., et al. eds) 76, pp438-449, Academic Press, New York.
- Imai, K. (1981b).  
Methods in Enzymology. (Antonini, E., et al. eds) 76, pp470-486, Academic Press, New York.
- Imai, K. (1982)  
Allosteric Effects in Haemoglobin, Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Ip, S.H.C., and Ackers, G.K (1977)  
J.Biol.Chem. 252, 82-87.
- Ip, S.H.C., Johnson, M.L. and Ackers, G.K (1976)  
Biochemistry, 15, 654-660.
- Ishimori, K., and Morishima, I. (1988)  
Biochemistry, 27, 4060-4066.
- Iwata, S., and Morimoto, H. (1993)  
Unpublished results. (岩田昌子、大阪大学基礎工学部卒業論文)
- Jayaraman, V., Rodgers, K.R., Mukerji, I., and Spiro, T.G. (1993)  
Biochemistry 32, 4547-4551.
- Jayaraman, V., Rodgers, K.R., Mukerji, I., and Spiro, T.G. (1995a)  
Science 269, 1843-1848.
- Jayaraman, V., and Spiro, T.G. (1995b)  
Biochemistry 34, 4511-4515.
- Johnson, M.E., and Ho, C. (1974)  
Biochemistry, 13, 3653-3661.
- Kavanaugh, J.S., Rogers, P.H., Case, D.A., and Arnone, A. (1992)  
Biochemistry, 31, 4111-4121.
- Kavanaugh, J.S., Chafin, D.R., Arnone, A., Mozzarelli, A., Rivetti, C., Rossi, G.L., Kwiatkowski, L.D., and Noble, R.W. (1995)  
J.Mol.Biol. 248, 136-150.
- Kellett, G.L., and Gutfreud, H. (1970)  
Nature, 227, 921-926.
- Kellett, G.L., and Schachman, H.K. (1971)  
J.Mol.Biol., 59, 387-399.
- Kilmartin, J.V., Breen, J.J., Roberts, G.C.K., Ho, C. (1970)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1246-1249.

- Kilmartin, J.V., & Rossi-Bernardi, L. (1971).  
Biochem. J. 124, 31-45.
- Kilmartin, J.V., Breen, J.J., Roberts, G.C.K., and Ho, C. (1973)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1246
- Koshland, Jr. D.E., Nemethy, G., and Filmer, D. (1966)  
Biochemistry 5, 365-.
- Kuila, D.K., Natan, M.J., Rogers, P., Gingrich, D.J., Baxter, W.W., Arnone, A., and Hoffman, B.M. (1991)  
J. Am. Chem. Soc. 113, 6520-6526.
- Lowly, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951).  
J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Luisi, B., & Shibayama, N. (1989).  
J. Mol. Biol. 206, 723-736.
- Luisi, B., Liddington, B., Fermi, G., Shibayama, N., (1990).  
J. Mol. Biol. 214, 7-14.
- Lynch, R.E., Lee, G.R., Cartwright, G.E. (1976).  
J. Biol. Chem. 251, 1015-1019.
- Maeda, T., Imai, K., & Tyuma, I., (1972).  
Biochemistry 11, 3685-3689.
- Marden, M.C., Bohn, B., Kister, J., Poyart, C. (1990)  
Biophys. J. 57, 397-403.
- Masuda, M. and Morimoto, H. (1993)  
Unpublished results. (増田 真、大阪大学基礎工学部卒業論文)
- Mathews, A.J., Rohls, R.J., Olson, J.S., Tame, J., Renaud, J.-P., and Nagai, K. (1989)  
J. Biol. Chem. 264, 16573-16583.
- Mathews, A.J., Olson, J.S., Renaud, J.-P., Tame, J., and Nagai, K. (1991)  
J. Biol. Chem. 266, 21631-21639.
- Mathews A.J. and Olson, J.S. (1994)  
Methods Enzymol. 232, 363-386.
- Matsubara, S., Nasu, K., Niimi, H., Iida, K., and Morimoto, H. (1993)  
Unpublished results. (松原茂樹、大阪大学基礎工学部修士論文)
- Matrin, J.-L., and Vos, M.H. (1994)  
Methods Enzymol. 232, 416-430.

- Minton, A.P., and Imai, K. (1974)  
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 71, 1418-1421.
- Miura, S., and Ho, C. (1982)  
Biochemistry 24, 6280-6287.
- Miura, S., Ikeda-Saito, M., Yonetani, T., and Ho, C. (1987)  
Biochemistry 26, 2149-4155.
- Monod, J., Wyman, J. and Changeux, J.-P. (1965)  
J.Mol.Biol. 12, 88-118.
- Morimoto, H., Shibayama, N., and Miyazaki, G. (1987)  
蛋白質核酸酵素、vol.32,NO.6、血色素の分子生理と分子病理
- Morris, R.J., and Gibson, Q.H. (1984)  
J.Biol.Chem. 259, 365.
- Mozzarelli, A., Rivetti, C., Rossi, G.L., Eaton, W.A., and Henry, E.R. (1997)  
Protein Science 6, 484-489.
- Mukerji, I., and Spiro, T.G. (1994)  
Biochemistry 33, 13132-13139.
- Nagai, K. (1977).  
J.Mol.Biol. 111, 41-53.
- Nagai, N., Luisi, B., Shih, D., Miyazaki, G., Imai, K., Poyart, C., De Young, A., Kwiatkowski, L., Noble, R.W., Lin, S.-H., and Yu, N.-T. (1987)  
Nature 329, 858-860.
- Nasuda-Kouyama, A., Tachibana, H., and Wada, A. (1983)  
J.Mol.Biol. 164, 451-476.
- Ogawa, S., Shulman, R.G. (1971).  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 42, 9-15.
- Ogawa, S., Shulman, R.G. (1972).  
J.Mol.Biol. 70, 315-336.
- Ohe, M. and Majita, A. (1980)  
Biochemistry 19, 4443-4450.
- Olson, J.S., and Gibson, Q.H. (1971a)  
J.Biol.Chem. 246, 5241-5253.
- Olson, J.S., Andersen, M.E., and Gibson, Q.H. (1971b)  
J.Biol.Chem. 246, 5919-5923.

- Olson, J.S., and Gibson, Q.H. (1972)  
J.Biol.Chem. 247, 1713-1726.
- Olson, J.S. (1981a)  
Methods Enzymol. 76, 631-651.
- Olson, J.S. (1981b)  
Methods Enzymol. 76, 652-667.
- Olson, J.S., Rohlf, R.J., and Gibson, Q.H. (1987)  
J.Biol.Chem. 262, 12930-12938.
- Parson, W.W. (1988)  
Photosynthesis and other reactions involving light. in Biochemistry (G.Zubay, ed.) 2nd ed., pp.564-597. New York: Macmillan.
- Park, S.Y., Nakagawa, A., and Morimoto, H. (1995)  
Unpublished results. (朴 三用、大阪大学基礎工学部博士論文)
- Park, S.Y., Nakagawa, A., and Morimoto, H. (1996)  
J.Mol.Biol. 255, 726-734.
- Perrella, M., Sabbioneda, L., Samaja, M., and Rossi-Bernardi, L. (1986)  
J.Biol.Chem. 261, 8391-8396.
- Perrella, M., Davids, N., and Rossi-Bernardi, L. (1992)  
J.Biol.Chem. 267, 8744-8751.
- Perrella, M., Benazzi, L., Ripamonti, M., & Rossi-Bernardi, L. (1994).  
Biochemistry 33, 10358-10366.
- Perutz, M.F., Muirhead, H., Cox, J.M., Gorman, L.C.G. (1970)  
Nature, 228, 726-739.
- Perutz, M.F., Ladner, J.E., Simon, S.R., and Ho, C. (1974)  
Biochemistry 13, 2163.
- Perutz, M.F. (1976)  
Br.Med.Bull. 32, 195-208.
- Perutz, M.F. (1979)  
Nature 228, 726-739.
- Perutz, M.F., Kilmartin, J.V., Nishikura, K., Fogg, J.H., Butler, P.J.G., & Rolfe, H.S. (1980)  
J.Mol.Biol. 138, 649-670.
- Perutz, M.F., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., Shih, D.T.-b., & Craescu, C.T. (1985a)  
J.Mol.Biol. 186, 471-473.



- Perutz, M.F., Gronenborn, A.M., Clore, G.M., Fogg, J.H., & Shih, D.T.-b. (1985b)  
J.Mol.Biol. 183, 491-498.
- Perutz, M.F., Fermi, G., Luisi, B., Shaanan, B., and Liddington, R.C. (1987) Accs.Chem.Res. 20,  
309-321.
- Perutz, M.F., Shih, D.T.-b., and Williamson, D. (1994)  
J.Mol.Biol. 239, 555-560.
- Philo, J.S., and Lary, J.W. (1990)  
J.Biol.Chem. 265, 139-143.
- Philo, J.S., Dreyer, U., and Lary, J.W. (1996)  
Biophys.J. 70, 1949-1965.
- Rao, M.J., and Acharya, A.S. (1992)  
Biochemistry, 31, 7231-7236.
- Rivetti, C., Mozzarelli, A., Rossi, G.L., Henry, E.R., Eaton, W.A. (1993)  
Biochemistry 32, 2888-2906.
- Rodgers, K.R., Su, C., Subramaniam, S., and Spiro, T.G. (1992)  
J.Am.Chem.Soc. 114, 3697-3709.
- Rohlfs, R.J., Mathews, A.J., Carver, T.E., Olson, J.S., Springer, B.A., Egeberg, K.D., and Sliger,  
S.G. (1990)  
J.Biol.Chem. 265, 3168-3176.
- Rollema, H.S., Raap, A., de Bruin, S.H. (1978)  
Eur.J.Biochem. 83, 313-317.
- Rosemeyer, M.A., and Huehns, E.R. (1967)  
J.Mol.Biol. 25, 253-.
- Rossi-Ferelli, A., Antonini, E., and Caputo, A. (1958)  
Biochim.Biophys.Acta., 30, 608.
- Russu, I.M., and Ho, C (1986)  
Biochemistry, 25, 1706-1716.
- Saffran, W.A. and Gibson, Q.H. (1977)  
J.Biol.Chem. 252, 7955-7958.
- Samaja, M., Rovida, E., Niggeler, M., Perrella, M., and Rossi-Bernardi, L. (1987)  
J.Biol.Chem. 262, 4528-2533.
- Sawicki, C.A., and Gibson, Q.H. (1976)  
J.Biol.Chem. 251, 1533-1542.

- Sawicki, C.A., and Gibson, Q.H. (1977a)  
J.Biol.Chem. 252, 5783-5788.
- Sawicki, C.A. and Gibson, Q.H. (1977b)  
J.Biol.Chem. 252, 7538-7547.
- Sawicki, C.A., and Gibson, Q.H. (1978)  
J.Biol.Chem. 254, 4058-4063.
- Sawicki, C.A., and Morris, R.J. (1981)  
Methods Enzymol. 76, 667-681.
- Scheidt, W.R. (1977)  
Accounts of Chemical Research 10, 339-345.
- Scheidt, W.R., & Reed, C.A. (1981).  
Chem.Rev. 81, 543-555.
- Shaanan, B. (1983)  
J.Mol.Biol. 171, 31-59.
- Shannon, R.D., and Prewitt, C.T. (1969)  
Acta Cryst. B25, 925-945.
- Sharma, V.S., Schmidt, M.R., and Ranney, H.M. (1976)  
J.Biol.Chem. 251, 4267-4272.
- Sharma, V.S. (1988)  
J.Biol.Chem. 263, 2292-2298.
- Sharma, V.S. (1989)  
J.Biol.Chem. 264, 10582-10588.
- Sharma, V.S., Bandyopadhyay, D., Berjis, M., Rifkind, J., and Boss, G.R. (1991)  
J.Biol.Chem. 266, 24492-24497.
- Shaanan, B. (1983).  
J.Mol.Biol. 171, 31-59.
- Shibayama, N., Itaroku K., and Morimoto, H. (1985)  
Unpublished results. (柴山修哉、大阪大学基礎工学部修士論文)
- Shibayama, N., Morimoto, H., and Miyazaki, G. (1986a)  
J.Mol.Biol. 192, 323-329.
- Shibayama, N., Morimoto, H., & Kitagawa, T. (1986b).  
J.Mol.Biol. 192, 331-336.
- Shibayama, N., Inubushi, T., Morimoto, H., & Yonetani, T. (1987).  
Biochemistry 26, 2194-2201.

- Shibayama, N., Imai, K., Hirata, H., Hiraiwa, H., Morimoto, H., and Saigo, S. (1991)  
Biochemistry, 30, 8158-8165.
- Shibayama, N., Imai, K., Morimoto, H., and Saigo, S. (1993).  
Biochemistry 32, 8792-8798.
- Shibayama, N., Imai, K., Morimoto, H., and Saigo, S. (1995a)  
Biochemistry, 34, 4773-4780.
- Shibayama, N., Yonetani, T., Regan, R.M., and Gibson, Q.H. (1995b)  
Biochemistry 34, 14658-14667.
- Shibayama, N., and Saigo, S. (1995c)  
J.Mol.Biol. 251, 203-209.
- Shibayama, N., Morimoto, H. and Saigo, S. (1997)  
Biochemistry, 36, 4375-4381.
- Shih, D.T.-b., & Perutz, M.F. (1987)  
J.Mol.Biol. 195, 419-422.
- Shih, D.T.-b., Luisi, Ben F., Miyazaki, G., Perutz, M.F., & Nagai, K (1993)  
J.Mol.Biol. 230, 1291-1296.
- Simolo, K., Stucky, G., Chen, S., Bailey, M., Scholes, C., & McLendon, G. (1985).  
J.Amer.Chem.Soc. 107, 2865-2872.
- Smith, K.M. (Editor) (1976)  
Porphyrins and Metalloporphyrins.  
Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Smith, F.R., & Ackers, G.K. (1985).  
Proc.Natl.Acad.Sci. 82, 5347-5351.
- Srajer, V., Teng, T.-y., Ursby, T., Pradervand, C., Ben, Z., Adachi, S., Schildkamp, W., Bourgeois, D., Wulff, M., and Moffat, K. (1996)  
Science 274, 1726-1729.
- Summerville, D.A., Jones, R.D., Hoffman, B.M., and Basolo, F. (1977).  
J.Am.Chem.Soc. 99:25, 8195-8202.
- Sun, D.P., Zou, M., Ho, N.T., & Ho, C (1997)  
Biochemistry, 36, 6663-6673.
- Szabo, A., & Karplus, M. (1975).  
Biochemistry 14, 931-940.
- Szabo, A. (1978)  
Proc.Natl.Acad.Sci. 75, 2108-2111.

- Tsubaki, M., and Nagai, K. (1979)  
J.Biochem. 86, 1029-1035.
- Unzai, S., Hori, H., Miyazaki, G., Shibayama, N., and Morimoto, H. (1996)  
J.Biol.Chem. 271, 12451-12456.
- Vandegriff, K.D., Le Tellier, Y.C., Winslow, R.M., Rohlf, R.J., and Olson, J.S. (1991)  
J.Biol.Chem. 266, 17049-17059.
- Viggiano, G., Ho, N.T., and Ho, C. (1979)  
Biochemistry, 18, 5238-5247.
- Ward, K.B., Wishner, B.C., Lattman, E.E., and Love, W.E. (1975).  
J.Mol.Biol. 98, 161-177.
- Wartermann, M.R. and Yonetani, T. (1970)  
J.Biol.Chem. 245, 5847-5852.
- Winterbourn, C.C., McGrath, B.M., and Carrel, R.W. (1976).  
Biochem.J. 155, 493-502.
- Wyman, J. (1948)  
Adv. Protein Chem. 4, 407-531.
- Wyman, J. (1964)  
Adv. Protein Chem. 19, 223-286.
- Yoshida, K., Motizuki, Y., and Morimoto, H. (1993)  
Unpublished results. (吉田康一、大阪大学基礎工学部卒業論文)
- Zhang, N., Ferrone, F.A., and Martino, A.J. (1990)  
Biophys.J. 58, 333-340.