Osaka University Knowledge Archive

Title	ヘモグロビンMの物理化的性質及び同定法に関する研究
Author(s)	清水, 章
Citation	大阪大学, 1967, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/29136
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【22】

氏名・(本籍)	清水　章（しみず　あきら）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 1157 号
学位授与の日付	昭和42年3月28日
学位授与の要件	医学研究科内科系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**ヘモグロビン M の物理化的性質及び同定法に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 山村 雄一 (副査) 教授 次田 皓　教授 中馬 一郎

論文内容の要旨

〔目　　的〕

呼吸器や循環器が正常であるにもかゝわらず，赤血球中にメトヘモグロビンが多量に含まれるためにチアノーゼを示す遺伝性疾患の一つにヘモグロビン M 症があげられる。この患者はヘモグロビン M（HbM と略記する）と呼ぶ異常ヘモグロビンを有しており，Hb M はヘムとグロビンの結合に重要な役割をしている部位にアミノ酸交換があり，自動酸化性が強く，生体内還元系の働きを受け得ないために血中で分子の半分はメトヘモグロビンの状態で存在するとされている。

Hb M には各種の変異種があり，これまでに4種類の Hb Mの一次構造が明らかにされている。これらの Hb M は蛋白質化学上きわめて貴重な材料であり，一次構造の明らかになった Hb M の機能をしらべることは，ヘモグロビンの独特の働きと構造との関係を理解する上に重要な情報を提供してくれるものと考えられる。この研究では，以下にのべる化学的方法により$Hb\ M_{Osaka}$ 及び $Hb\ M_{Iwate}$ のアミノ酸交換の位置を確認し，更に，HbM_{Osaka}, HbM_{Iwate} HbM_{Kurume} の三つの構造の異なる HbM の物理化学的性質を調べ，構造の相違と機能上の特性との関連を明らかにし，同時にこれらの特性を利用することにより，各種のHbMを物理化学的に区別する方法を見いだすことを目的とする。

〔方法ならびに成績〕

異常成分の分離：アンバーライト CG-50 燐酸カリ緩衝液（(pH 7.0) を用いるカラムクロマトグラフィーにより，HbM_{Iwate},$Hb\ M_{Osaka}$, HbM_{Kurume} をいずれも酸素化型で純粋に分離することに成功した。HbM_{Kurume} の分離には前2種の HbM に比しよりメッシュのこまかい樹脂を必要とした。

グロビンのトリプシン分解ペプチドのカラムクロマトグラフィ：HbM_{Osaka}, $Hb\ M_{Iwate}$ を交流分配によって α, β, 両サブユニットに分離し，アミノ酸分析により異常組成の見いだされた α 鎖 100 mg をトリプシンで分解し，pH 6.4 に於ける可溶性分画を Dowex 1×2 でピリジン，コリジン，酢酸の緩

衝液を用い，カラムクロマトグラフィー (0.9×150 cm) により分離した。クロマトグラフィーのスケール，緩衝液の pH，濃度，流速，温度などの条件を一定にしておくと，異常ペプチドは正常の場合と異なった位置に溶出されるので，溶出曲線を比較することにより，異常ペプチドを見いだしうることを示した。

Hb M_{Iwate}, Hb M_{Osaka} の異常ペプチドのアミノ酸配列を調べ，各々 α 鎖のアミノ末より，87番目及び58番目においていずれもヒスチヂンがチロジンに置き換わっていることを明らかにした。

分光分析：分離した Hb M_{Iwate}, Hb M_{Osaka}, Hb M_{Kurume} の各種配位子との結合型について吸収スペクトルを調べると，酸性メトヘモグロビン型でHb A と最も明瞭な相違を示した。各 Hb M の間にも明確な差が認められた。

シアンとの反応性：上記三種のメト Hb M を 5×10^{-5}M の濃度でシアン濃度 10^{-6}M〜1M の間15段階について反応させ分光学的に追求した。メト Hb A の吸収極大である 630 mμ の吸収の変化を縦軸に，シアン濃度を横軸にとると Hb A では一相性のS字状の曲線が得られるが，Hb M では二相性となり，異常鎖のヘムの反応が正常鎖のそれよりも高濃度のシアンを要することがわかった。そこでメト Hb A とシアンメト Hb A との等吸収点である 597 mμ で吸収の動きを調べると Hb M の異常鎖のみの反応をとらえることができる。これによると，シアンと各 HbM の異常鎖のヘムとの親和性にはいちぢるしい差があり，この差はヘムと異常グロビンとの分子内結合の強さの差によるものと思われる。

Hb M の電子スピン共鳴 (ESR)：メト Hb A は酸性型において高スピンの ESR 吸収を示すことが知られている。分離した各 Hb M を酸性メトヘモグロビンとし，Varian V-4500 ESR スペクトロメーターを用いて液体窒素温度で ESR 吸収を測定し，Kneubühl の方法により g 値を算出した。g=6.0附近の各 Hb M の ESR 吸収の形は，Hb A とことなるだけでなく，Hb M それぞれが独特の形を示すことを見いだした。別に行なわれた理論的解析により，Hb M の異常鎖のヘムの g=6.0 附近の吸収が分裂していることが明らかになった。分裂の大きさは各 Hb M の間でいちじるしく異なっており，Hb M_{Iwate}, Hb M_{Osaka}, Hb M_{Kurume} の順に強くなる。一方正常鎖のヘムの吸収はメト Hb A と同様に g=6.0 に認められる。

Hb M の異常鎖は体内ですでにメトヘモグロビンとして存在するので新鮮な血液のまゝの状態で ESR 吸収をとえらることができる。正常人血液ではESR吸収はなく，Hb M の ESR 吸収は先天性メトヘモグロビン血症の場合とも異なるので，小量の血液 (0.2 ml) を用い迅速，確実に Hb M 症を診断することができ，さらに Hb M の種類を同定することが可能である。

〔総　　括〕

1．グロビンのトリプシン分解ペプチドをカラムクロマトグラフィーによって分離して得た溶出曲線を比較し，見いだされた異常ペプチドのアミノ酸配列を調べて，Hb M_{Osaka}, および Hb M_{Iwate} の一次構造を明らかにした。

2．Hb M_{Osaka}, Hb M_{Iwate}, Hb M_{Kurume} の三つの Hb Mの吸収スペクトル，配位子との反応性，ESR 吸収のいずれもが，それぞれに特有の性質をもつことを明らかにし，これらの物理化学的性質の差を Hb M の同定法に応用しうることを示した。

論文の審査結果の要旨

この研究は1963年にみいだされた Hb M_{Osaka} の一次構造を明らかにし，ついで Hb M_{Iwate} の構造についても調べ，これに Hb M_{Kurume} を加え，我国でみいだされている3つの Hbb M の物理化学的性質をくわしく検討している。

従来異常ヘモグロビンの構造決定にもっぱら用いられていたフィンガープリトン法にはいくつかの欠点があるので，これを避け，カラムクロマトグラフィーを用いる一層正確な方法によって Hb M_{Osaka}, Hb M_{Iwate} の構造を決定し，同時にカラムクロマトグラフィーが個々のヘモグロビンに個有のものであることを示している。

3つの Hb Mを酸素化型のまゝで純粋に精製する方法を確立し，こうして分離した材料を用いて吸収スペクトル，シアンとの反応性，電子スピン共鳴吸収を調べ，各ヘモグロビンの構造のちがいに応じて，これらの性質に差のあることを見いだした。

Hb M は蛋白質の構造と機能の関係を研究する上に重要な材料であり，Hb M の構造決定および光学的諸性質を正確に調べることは，将来のヘモグロビンの化学あるいは蛋白質化学の進歩のために寄与するところ大である。

電子スピン共鳴の利用という医学的には未開の分野に研究を進めたことは，高い独創性をもっており，また物理化学的性質の差を診断学的にも応用しうることを示している点，臨床医学の上からも有意義である。