



Title	ヘモグロビンにおける四段階酸素結合とヘテロトロピック陰イオン性リガンド結合との関係
Author(s)	今泉, 和彦
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/31581">https://hdl.handle.net/11094/31581</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	いま 泉 和 彦
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 3873 号
学位授与の日付	昭和52年3月25日
学位授与の要件	医学研究科 生理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ヘモグロビンにおける四段階酸素結合とヘテロトロピック陰イオン性リガンド結合との関係
論文審査委員	(主査) 教授 中馬 一郎 (副査) 教授 山野 俊雄 教授 中山 昭雄

### 論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕 Adair によると、ヘモグロビン(Hb)の酸素平衡曲線(OEC)は、下式で記述される。

$$Y = \frac{k_1 p + 3 k_1 k_2 p^2 + 4 k_1 k_2 k_3 p^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 p^4}{1 + 4 k_1 p + 6 k_1 k_2 p^2 + 4 k_1 k_2 k_3 p^3 + k_1 k_2 k_3 k_4 p^4} \quad (1)$$

ここにYは酸素飽和度、pは酸素分圧、 $k_i (i=1 \sim 4)$ は統計係数の補正をしたi段階目の酸素結合定数である。各 $k_i$ 値を実験的に定めることは、従来非常に困難であった。しかし、今井らによってOECの自動記録装置が開発され、精密なOECが得られるようになり、これから比較的容易に $k_i$ 値を決定できることとなった。さらにこれに基づいて、Hbの酸素化の中間状態の情報を得ることが可能となった。一方、Hbの酸素親和性を調節するヘテロトロピック・リガンドとして、哺乳動物赤血球に存在する2, 3ジホスホグリセリン酸(DPG)や塩素イオン( $Cl^-$ )および鳥類赤血球中にあるイノシ五リン酸のアナログであるイノシ六リン酸(IHP)が最近注目されている。

本研究は、これらの陰イオン性リガンドの存在下および非存在下においてOECを測定することによって $k_i$ 値を決定し、これを用いた定量的解析を通じて、Hbへの酸素結合と陰イオン性リガンド結合との関係を、それらの競合結合を考慮して明らかにすることを意図したものである。

〔方 法〕 材料：脱リン酸化したヒトHb

測定法：oxy-Hbの差スペクトルは、純酸素の存在下でヘム濃度 $60 \mu M$ 、 $0.05 M$ ピス・トリス緩衝液(pH 6.5, 7.0, 7.4)又は $0.05 M$ トリス緩衝液(pH 9.1)、温度 $11 \sim 13^\circ$ の条件でCary 118C型自記分光光度計を用いた。OECは今井らの自動記録法により、測定条件は温度 $25^\circ$ 、pH 7.4とし、林

らのメトHb還元酵素系を添加した以外は上と同じである。

〔解析〕DPGおよびIHPの結合部位はHb四量体当たり1個、Cl<sup>-</sup>の結合部位は等価で独立なもの2個あるものとし、両種結合部位間の相互作用を考えると、一般に次式が成立する。

$$P_m^{(Cl^-+Q)} = P_m^{(o)} \cdot \left\{ \frac{(1 + J_4[Cl^-])^2 + R_4[Q]}{(1 + J_0[Cl^-])^2 + R_0[Q]} \right\}^{-\frac{1}{4}} \quad (2)$$

$$k_i^{(Cl^-+Q)} = k_i^{(o)} \cdot \frac{(1 + J_j[Cl^-])^2 + R_j[Q]}{(1 + J_{j-1}[Cl^-])^2 + R_{j-1}[Q]} \quad (3)$$

ここにP<sub>m</sub>はメジアン酸素分圧 (= 1/√k<sub>1</sub>k<sub>2</sub>k<sub>3</sub>k<sub>4</sub>)、P<sub>m</sub><sup>(Cl<sup>-</sup>+Q)</sup>、P<sub>m</sub><sup>(o)</sup>はCl<sup>-</sup>とQ(DPG又はIHP)の存在下および非存在下におけるP<sub>m</sub>、k<sub>i</sub><sup>(Cl<sup>-</sup>+Q)</sup>、k<sub>i</sub><sup>(o)</sup>はCl<sup>-</sup>とQの存在下におけるk<sub>i</sub>、[Cl<sup>-</sup>]、[Q]はCl<sup>-</sup>とQの濃度、J<sub>j</sub>はHb(O<sub>2</sub>)<sub>j</sub>に対するCl<sup>-</sup>の結合定数、R<sub>j</sub>はHb(O<sub>2</sub>)<sub>j</sub>に対するQの結合定数である。(j=0~4)。各定数は、[Cl<sup>-</sup>]や[Q]を種々変化させたOECからP<sub>m</sub>とk<sub>i</sub>を得、これらの値のCl<sup>-</sup>やQの濃度依存性から最小二乗法を用いたcurve-fittingにより決定した。

#### 〔結果〕

1. oxy-Hbの吸収スペクトルがIHPやDPGなどによって変化する現象が報告されている現状に鑑み、陰イオン性リガンドによって生ずるHbO<sub>2</sub>の差スペクトルを測定し、差吸収の極大・極小・零を与える各波長で得られるk<sub>i</sub>の波長依存性を求めることによって、まず分光測光法の妥当性を検討した。その結果、Cl<sup>-</sup>では差スペクトルが極めて小さく、DPG又はIHP存在下では少なくともk<sub>1</sub>とk<sub>4</sub>については有意な波長依存性を認めなかった。以後の実験は差吸収が零である566nmを用いてOECの測定を行なった。

2. oxy-およびdeoxy-Hbに対する結合定数については種々の報告があるが、これらはいずれも共存イオン(とくにCl<sup>-</sup>)の効果をも含めた「見掛け」のものである。そこで、Cl<sup>-</sup>に対する結合定数をまず決定し、次にこれを用いて、Cl<sup>-</sup>効果を含まない真の結合定数をDPGとIHPについて決定した。結果は表1に示すように、結合定数の大きさは、IHP>DPG>Cl<sup>-</sup>の順である。deoxy-Hbに対する結合定数とoxy-Hbに対するそれとの概略比は、Cl<sup>-</sup>では10<sup>2</sup>、DPGでは10<sup>4</sup>、IHPでは10<sup>6</sup>である。これらの値の大きさから各リガンドの酸素親和性低下作用の差を説明することができる。

3. 3つのリガンドとも、Hbに酸素が結合するごとにリガンドに対する親和性は次第に減少するが、

表1 Hbの各酸素化段階の各リガンドに対する結合定数(M<sup>-1</sup>)

配位子	i=0	1	2	3	4
Cl <sup>-</sup>	1.3×10 <sup>2</sup>	4×10	2×10	2	1.2
DPG	1.6×10 <sup>7</sup>	5×10 <sup>5</sup>	5×10 <sup>4</sup>	2×10 <sup>3</sup>	9.7×10 <sup>2</sup>
IHP	4.7×10 <sup>9</sup>	1×10 <sup>6</sup>	2×10 <sup>5</sup>	8×10 <sup>3</sup>	3.1×10 <sup>3</sup>

その減少の程度はリガンドの種類によって異なる。IHPの場合には、Hbに1番目の酸素が結合すると、結合定数は約 $1/10^3$ に激減するが、 $\text{Cl}^-$ とDPGではそれぞれ $1/3$ 、 $1/35$ となる。 $\text{Cl}^-$ とDPGは3番目の酸素が結合したときに結合定数の低下が最大である。

4.  $\text{Cl}^-$ の $J_3$ と $J_4$ およびDPGの $R_3$ と $R_4$ とがほぼ同じであること、四段階目に放出される $\text{Cl}^-$ およびDPGの個数が極めて小さいこと、両リガンドともHill・プロットの上の漸近線がリガンド濃度に関係なくほぼ収束することから、 $\text{Hb}(\text{O}_2)_3$ の状態はほぼ束縛のとれた状態であると考えられる。

5. DPGについては、すでにBenesch, 中馬らによって0.1M NaCl存在下の見掛けの結合定数が報告されている。それらの値に比べて表1の結合定数は約 $10^2$ 倍大きい、これに $\text{Cl}^-$ の影響を加算するとほぼ同じ大きさの見掛けの結合定数が得られた。

6. deoxy-Hbに対するIHPの見掛けの結合定数は、 $1.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ と報告されているが、表1の値から0.1M  $\text{Cl}^-$ 共存下の見掛けの結合定数を求めると $2.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ となった。またoxy-Hbに対する結合定数は文献値の $1/1000$ である。

7. 各酸素化段階で放出される各リガンドの個数は、リガンド濃度に依存する。 $\text{Cl}^-$ とDPGは第3段階目において最大であり、IHPでは第1段階目が最も大きく、第4段階目においても放出される。

#### [総括]

1. 分光測光法による酸素平衡曲線測定法の妥当性を検討し、すくなくとも $k_1$ と $k_4$ については波長依存性のないことを証明した。
2. Hbの各酸素化段階に対する $\text{Cl}^-$ , DPG, IHPの真の結合定数を決定した。
3. これに基づいて各酸素化段階で放出されるヘテロトロピック・リガンドの個数を決定した。

### 論文の審査結果の要旨

本研究は、まず分光測光法によるヘモグロビン酸素飽和度測定の実証性を実証し、次にこの方法によって求めた精密な酸素平衡曲線をAdairの四段階酸素結合理論によって解析したものである。重点は、ヘテロトロピック・リガンドである $\text{Cl}^-$ , DPG, IHPの結合定数の決定におかれ、まず $\text{Cl}^-$ の各酸素化段階に対する結合定数を求め、次にこれを用いてDPG, IHPの $\text{Cl}^-$ 効果を含まない真の結合定数を始めて決定することに成功している。

この研究は、ヘモグロビンの生理機能の発現に重要な役割を演じているヘテロトロピック・リガンドの作用機序を理解するために貴重な寄与をなすものであり、医学とくに生理学の進歩に貢献するところすくなくないものと認める。