

Title	トリチウム交換法によるヒトヘモグロビン・Bohr効果に関するアミノ酸残基 (α 鎖122番目ヒスチジン) の同定
Author(s)	西倉, 和子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/32462
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	西 倉 和 子
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 4698 号
学位授与の日付	昭和54年8月4日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	トリチウム交換法によるヒトヘモグロビン・Bohr効果に関する アミノ酸残基 (α 鎖122番目ヒスチジン) の同定
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〕

pH6以上では、還元型ヘモグロビンは、酸素型ヘモグロビンより、より多くの水素イオンを結合する(alkaline Bohr効果)。これは、タンパク中に、酸素化によってそのpK値が下がり、水素イオンを放つ解離基(alkaline Bohr group)が存在することによるものである。今までに alkaline Bohr groupの一部として、 β 鎖C末端146番目ヒスチジン(His 146 β)と、 α 鎖N末端1番目バリン(Val 1 α)が同定されており、これらは alkaline Bohr効果の約60%に寄与していることが明らかになっている。しかし、残る40%に関与しているアミノ酸は知られておらず、Perutzは初期のX線解析結果から、 α 鎖122番目ヒスチジン(His 122 α)を、残る alkaline Bohr groupの一つの候補としてあげてきたが、このヒスチジンに関する各種実験結果は一定せず、alkaline Bohr groupとして未だ同定されていなかった。本研究では、His 122 α が alkaline Bohr groupであるか否かを決定し、さらにもし alkaline Bohr groupであるならば、alkaline Bohr効果に対してどの程度の寄与をしているかを明らかにすることを目的とし、トリチウム交換法を用いて、このヒスチジンの酸素化に際してのpK値変化を直接測定した。

〔方法ならびに成績〕

測定法：大江等により開発された“トリチウム交換法”は、intactのタンパク中の個々のヒスチジンのpK値を決定するもので、ヒスチジン・イミダゾール環のC-2の位置でのpH依存性的水素-トリチウム交換反応に基付いている。還元型ヘモグロビン(deoxy Hb)あるいは一酸化炭素ヘモグロビン(CO Hb)を高濃度三重水素水とともに、さまざまなpHで培養した。交換反応終了後、ヘモグロビン

をトリプシン・キモトリプシンで分解し、目的のヒスチジンを含むペプチドを、滲紙電気泳動・ペーパークロマトグラフィーにより分離した。滲紙より抽出したペプチドの一部は放射活性を測定し、残りはアミノ酸分析によりそのヒスチジン含量を測定した。これにより、交換したトリチウムの放射比活性を算出し、さらに各pHにおけるトリチウム交換反応の一次速度定数 k を求めた。 k のpH依存性から、deoxy Hb及びCO Hbにおける各ヒスチジンのpK値を決定した。

測定条件：ヘム濃度1.2mM。pH4.9~5.5;0.1M Sodium cacodylate-HCl 0.1M NaCl緩衝液, pH5.5~7.5;0.05M bis-Tris-HCl 0.1M NaCl緩衝液, pH7.5~8.2;0.1M Tris-HCl 0.1M NaCl緩衝液。交換反応;20mCi二重水素水(放射比活性270cpm/nmol)存在下, 37°C, 38時間。

1. 滲紙電気泳動とペーパークロマトグラフィーにより、His 122 α を含むペプチド; His 122-Lys 127 α , を分離した。 β 鎖2番目ヒスチジン(His 2 β)を含むペプチド; Val 1-Lys 8 β , についてもそのpK値を測定し比較検討した。
2. His 2 β は、deoxy Hb, CO HbともにpK値6.4を示した。T構造(deoxy構造)からR構造(oxy構造)に転移しても、pK値が変化しないことは、このヒスチジンがBohr効果に関与しないことを意味する。
3. His 122 α は、deoxy HbでpK6.6, CO HbでpK6.1を示した。deoxy HbからCO Hbへの変化でそのpK値が下がることから、このヒスチジンがalkaline Bohr groupの一つであることが明らかになった。
4. 他のalkaline Bohr group(His 146 β 及びVal 1 α)について報告されているpK値, そして本研究で得られたHis 122 α のpK値を用い、酸素化によりこれらの解離基から放たれる水素イオン量のpH依存性曲線を作製し、全alkaline Bohr効果に対する各alkaline Bohr groupの寄与の程度を検討した。His 146 β 及びVal 1 α がそれぞれ40%と20%寄与しているのに対して、His 122 α は20%寄与していた(pH7.4では10%)。
5. His 146 β , Val 1 α 及びHis 122 α が合計80%のalkaline Bohr効果に関与することから、残る20%に寄与するさらにもう一つ(あるいは一つ以上)のalkaline Bohr groupが存在することが示唆される。この未知の解離基は、deoxy HbでpK 7.4, oxy HbでpK6.9を有することが予想された。

[総括]

His 122 α は、T構造からR構造への転移で、そのpK値を6.6から6.1に変化させることから、このヒスチジンが、alkaline Bohr groupの一つとして同定された。His 122 α は、alkaline Bohr効果に対して20%(pH7.4で10%)寄与しており、先に報告されているHis 146 β 及びVal 1 α と合わせて、alkaline Bohr効果の80%の起因が明らかになったことになる。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ヘモグロビン分子中のヒスチジンのpK値を、トリチウム交換法を用いて測定し、 α 鎖122

番目ヒスチジンをアルカリ Bohr 効果に関与するアミノ酸残基として同定することに成功したものであり、ヘモグロビンの持つ生理機能の分子論的解釈に関する重要な知見をもたらした。したがって、本研究は、生理学に貢献するところが少なくないものと思われる。