

## ヘモグロビンMの分子病理学

|        |   |
|--------|---|
| 著者     | 友田 ？夫，米山 良昌，馬渡 一浩，長井 雅子   |
| 雑誌名    | 昭和63(1988)年度 科学研究費補助金 一般研究(B)<br>研究成果報告書  |
| 巻<br>号 | 1987<br>1988  |
| ページ    | 50p.  |
| 発行年    | 1989-03-01  |
| URL    | <a href="http://hdl.handle.net/2297/47209">http://hdl.handle.net/2297/47209</a> |

# ヘモグロビンMの分子病理学

(62480132)

昭和63年度科学研究費補助金

一般研究(B)研究成果報告書

平成元年3月

研究代表者 友田 燐 夫

(金沢大学医学部助教授)

# ヘモグロビンMの分子病理学

## 目次

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| I. はしがき                           | 2     |
| II. 研究組織                          | 3     |
| III. 研究経費                         | 3     |
| IV. 研究発表                          | 4~7   |
| 1. 学会誌等                           | 4     |
| 2. 口頭発表等                          | 5     |
| 3. 出版物                            | 7     |
| V. 研究成果                           |       |
| 1. 試料                             | 8     |
| 1. 1 H b Mを含む患者血液                 | 8     |
| 1. 2 H b Mの分離精製                   | 8     |
| 2. 方法                             | 8~11  |
| 2. 1 E S Rスペクトルの測定                | 8     |
| 2. 2 共鳴ラマンスペクトルの測定                | 9     |
| 2. 3 赤外吸収スペクトルの測定                 | 9     |
| 2. 4 $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルの測定 | 10    |
| 2. 5 N A D Hメトヘモグロビン還元酵素活性の測定     | 10    |
| 3. 結果と考察                          | 12~21 |
| 3. 1 H b Mの吸収と円偏光二色性 (C D) スペクトル  | 12    |
| 3. 2 共鳴ラマン分光法によるH b Mの異常鎖の構造解析    | 12    |
| 3. 3 H b Mのリガンド結合機能               | 14    |
| 3. 4 H b M症患者の病態                  | 18    |
| 4. 図表                             | 22~50 |
| VI. 発表抄録                          | 51~96 |
| VII. 謝辞                           | 97    |

## 1. はし か き

ヘモグロビン (Hb) は赤血球中において、肺から組織に酸素を運搬する重要な役割を担っている蛋白質で、 $\alpha$ 鎖2つ $\beta$ 鎖2つからなる4量体である。それぞれのサブユニットにヘムが存在し、酸素が脱着する。そのヘモグロビンのもつアロステリック機能が旨く働き、酸素の受け渡しがスムーズにゆくためには、ヘムポケットや $\alpha$ 、 $\beta$ 鎖接触面の蛋白構造が特に重要である。これらの部分にアミノ酸置換がおこると、ヘモグロビンは正常な機能が果せなくなり、それを有する人は何等かの病的症状が現れる。

これら点突然変異のため機能異常を示す異常ヘモグロビンは多数あるが、これ等を有する患者には様々な病態がみられる。高酸素親和性Hbでは多血症を、低酸素親和性Hbではチアノーゼを、HbM症ではメト血症(特有のチアノーゼ)を、また不安定血色素では溶血性貧血を伴う。異常Hbはそのアミノ酸変異が、どのように機能異常や構造異常に反映されるか、また患者に現れる病態を分子レベルで研究する上で重要である。

ヘムポケット内の特に重要なアミノ酸残基はヘムを挟むようにして蛋白側から上下に突きだしてきているヒスチジン(His)である。片方のHis(F8)はヘム鉄に直接共有結合しており近位Hisと呼ばれ、もう片方のHis(E7)は酸素分子等のリガンドがつく側においてヘム鉄の安定性やリガンド親和性に影響を与え遠位Hisとよばれている。リガンド結合サイトの遠位側にはもう1つのアミノ酸E11バリン(Val)は $\beta$ 鎖で機能調節に関係しているといわれている。この近位、遠位またはE11Valが他のアミノ酸に置き替わると、ヘム鉄は安定性を失い酸化されるかまたは蛋白質より脱離してしまうものもある。

本研究では、これ等ヘムポケット内にアミノ酸変異を有する異常Hbのうち特にメト血症を引き起こすので知られるHbMを選び、その構造、リガンド結合機能および患者における病態について検討した。

## I I . 研究組織

### 研究代表者

昭和62年度 米山良昌 (金沢大学医学部・教授)

昭和63年度 友田燁夫 (金沢大学医学部・助教授)  
(米山教授の退官に伴い、米山教授の代わりに代表者となる)

### 研究分担者

長井雅子 (金沢大学医療短期大学部・教授)

馬渡一浩 (金沢大学医療短期大学部・講師)

## III. 研究経費

昭和62年度 3,100 千円

昭和63年度 2,000 千円

合計 5,100 千円

## IV. 研究発表

### 1. 学会誌等

- 1) K. Mawatari, M. Nagai, K. Tanishima, & Y. Yoneyama:  
Application of high performance liquid chromatography to diagnosis of hereditary methemoglobinemia.  
The IVth International Congress of Inborn Error of Metabolism, Sendai(Japan). Abstracts, pp112, 1987, 5月.
- 2) 長井雅子、米山良昌、北川禎三: H b Mの共鳴ラマンスペクトル  
生化学、59巻、888頁、1987年、8月。
- 3) 長井雅子、米山良昌、北川禎三: ヘモグロビンMにおけるヘムの状態  
第38回タンパク質構造討論会講演要旨集、61-64頁、1987年、10月。
- 4) 長井雅子: ヘモグロビンM  
蛋白質核酸酵素、32巻、643-649頁、1987年、5月。
- 5) M. Nagai, S. Takama, & Y. Yoneyama:  
Reduction and spectroscopic properties of Hemoglobins M.  
Acta Haematologica, 78, 95-98, 1987, 12月。
- 6) 長井雅子、馬渡一浩、堀田成紀、谷口 昂、米山良昌:  
H b M S a s k a t o o n症患者の血中における異常鎖二価型の存在について  
日本血液学会雑誌、51巻、267頁、1988年、4月。
- 7) 長井雅子、米山良昌、堀田成紀、谷口 昂、堀 洋、森本英樹:  
ヘモグロビンM症の赤血球中における異常鎖の還元について  
日本臨床代謝学会記録、XXV、178-179頁、1988年、4月。
- 8) 馬渡一浩、松川 茂、長井雅子、米山良昌:  
ヘモグロビンM症のHPLC/多波長検出器を用いた迅速鑑別法

生化学、60巻、657頁、1988年、8月。

9) 長井雅子、米山良昌、北川禎三:

HbMにおけるヘム鉄と置換チロシン残基との相互作用

生化学、60巻、658頁、1988年、8月。

10) M. Nagai, & Y. Yoneyama:

Presence of ferrous form abnormal chains in Hemoglobin M Saskatoon patient's erythrocytes.

The XXIIth Congress of the International Society of Hematology, Milano (Italy). Abstracts, pp488, 1988, 8月。

11) M. Nagai, Y. Yoneyama, & T. Kitagawa:

Interaction of the substituted tyrosine with heme in four Hemoglobin M and its relation to function.

Symposium of Oxygen Binding Proteins, Structure, Function, Kinetics, and Genetics, Orange Grove (USA), ppPVII-13, 1988, 10月。

12) M. Nagai, Y. Yoneyama, & T. Kitagawa:

Characteristics in tyrosine coordinations of four Hemoglobins M probed by resonance Raman spectroscopy.

Biochemistry, in press.

2. 口頭発表等

1) K. Mawatari, M. Nagai, K. Tanishima, & Y. Yoneyama:

"Application of high performance liquid chromatography to diagnosis of hereditary methemoglobinemia"

The IVth International Congress of Inborn Error of Metabolism. Sendai, Japan. May 26 - 30, 1987.

2) 長井雅子、米山良昌、北川禎三:

「HbMの共鳴ラマンスペクトル」

第60回日本生化学会大会、金沢大学、10月12-15日、1987年

3) 長井雅子、米山良昌、北川禎三:

「ヘモグロビンMにおけるヘムの状態」

第38回タンパク質構造討論会、京都大学、10月16-17日、1987年

4) 長井雅子、馬渡一浩、堀田成紀、谷口 昂、米山良昌:

「HbM Saskatoon 症患者的血中における異常鎖二価型の存在について」

第50回日本血液学会総会、京都国際会館、4月7-9日、1988年

5) 長井雅子、米山良昌、堀田成紀、谷口 昂、堀 洋、森本英樹:

「ヘモグロビンM症の赤血球中における異常鎖の還元について」

第25回日本臨床代謝学会、東京都市センター、4月23-24日、1988年

6) M. Nagai, & Y. Yoneyama:

"Presence of ferrous form abnormal chains in Hemoglobin M Saskatoon patient's erythrocytes"

The XXIIth Congress of the International Society of Hematology,  
Milano, Italy. August 28 - September 2, 1988.

7) 馬渡一浩、松川 茂、長井雅子、米山良昌:

「ヘモグロビンM症のHPLC/多波長検出器を用いた迅速鑑別法」

第61回日本生化学会大会、東京大学、10月3-6日、1988年

8) 長井雅子、米山良昌、北川禎三:

「HbMにおけるヘム鉄と置換チロシン残基との相互作用」

第61回日本生化学会大会、東京大学、10月3-6日、1988年

9) M. Nagai, Y. Yoneyama, & T. Kitagawa:

"Interaction of heme with the substituted tyrosine in Hemoglobins  
M and its relation to function"

Symposium on Oxygen Binding Heme Proteins, Structure, Dynamics,



Function, and Genetics. Pacific Grove, California (USA).  
October 9 - 13, 1988.

### 3. 出版物

1) 米山良昌、松川 茂、友田燁夫、長井雅子、馬渡一浩、岡崎太郎:

ヘモグロビン

続生化学実験講座、第8巻、「血液 上」、283-314頁、1987年、4月。  
東京化学同人

## V. 研究成果

### 1. 試料

#### 1.1 HbMを含む患者血液

HbMを含む患者血液は次の方々から頂いた。

HbM Iwate: 坂井博毅博士 (坂井病院、岩手県)

HbM Boston: Dr. Rudolf Jagenburg  
(Sahlgren's Hospital, Sweden)

HbM Hyde Park: 刈田宏作博士 (西部診療所、秋田県)

HbM Saskatoon: 堀田成紀博士 (金沢大学医学部、小児科)  
梁 成雄博士 (沼津市立病院、小児科)

HbM Milwaukee: Dr. A. V. Pisciotta  
(Medical College of Wisconsin, USA)

#### 1.2 HbMの分離精製

HbMを有する患者血液は、氷冷下で運搬し採血後4日以内に入手した。血しょう部分を除き、赤血球を生理食塩水で3回洗浄した後、packed cellと等量の血液保存用のグリセリン・緩衝液 (クエン酸カリ 9.4g, リン酸一ナトリウム 3.1g, リン酸水素二ナトリウム 2.8g, グリセリン 400mlを1リットルに溶解したものを) を加え、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて保存した。

HbM Iwate, HbM Boston, HbM Milwaukeeはイオン交換カラムクロマトグラフィー (Amberlite CG-50) によってHbAと分離した。分離の一例を図1に示した。HbM Hyde Park, HbM Saskatoonは調整用等電点電気泳動法にて、完全酸化型でHbAと分離した (図2)。精製Hbの純度は、等電点電気泳動 (平板ゲル) にて、単一バンドであることによって確めた。

### 2. 方法

#### 2.1 ESRスペクトルの測定

ヘモグロビンは通常は二価鉄で反磁性の性質を持つため、電子スピン共鳴 (ESR) は示さない。しかし、酸化されて三価鉄となると常磁性となるため電子スピン共鳴吸収を起

こす。HbMは古くから正常Hbの酸化型とは異なる特有のESRスペクトルを示すことが知られている。ESRスペクトルは大阪大学基礎工学部生物工学科の森本研究室にて、堀 博士のもとで測定した。マイクロ波はXバンド（周波数9.35 GHz, 波長3 cm）を用い、手製のESR測定機で液体ヘリウム温度（4.2 K）で測定した。

## 2.2 共鳴ラマンスペクトルの測定

ヘモグロビンの補欠分子族であるヘムの振動に起因するラマンスペクトルで、HbMのアミノ酸置換とヘムとの関係を、一酸化炭素（CO）結合型のCO伸縮に由来するラマンスペクトルでHbMのリガンド結合性を調べた。

光源にはクリプトン（406.7 nm）、アルゴン（488 nm）レーザーを用い、ラマンスペクトルはJEOL-400D型で測定した。ヘム由来のラマンは円筒型石英セルで、CO型についてはCOの光解離を防ぐため回転セル（1800 rpm）を用いた。ラマンスペクトルの波長校正にはインデンを使用した。ラマンスペクトルの測定は岡崎共同利用研究機構分子科学研究所で行い、分子動力学部門の北川禎三教授との共同研究である。

## 2.3 赤外吸収スペクトルの測定

水溶液中の赤外スペクトルの測定は難しいとされているが、CO結合型HbのCO伸縮振動が水の吸収とも蛋白質のペプチドの吸収とも重ならない1900-2000  $\text{cm}^{-1}$ に見られるところから、Caughey博士らを中心としてCO伸縮の赤外スペクトルを通してヘモグロビンのリガンド結合機能の研究が進められている。

本研究では、患者の赤血球をintactのまま測定する場合はフーリエ変換赤外分光光度計（Perkin Elmer 1800）で、ヘモグロビンを水溶液で測定する場合はPerkin Elmer 180型赤外分光光度計で測定を行った。赤外スペクトルはいずれもコロラド州立大学生化学教室のWinslow S. Caughey教授のもとで測定した。

### 1) 赤血球の顕微分光

分光セルは厚さ1 mm、直径13 mm、BaF<sub>2</sub>ウインドウ、光路5  $\mu\text{m}$ のものを用いた。FTIRの付属赤外顕微鏡で一個の赤血球に焦点を合わせたのち10  $\mu\text{m}$ を1  $\mu\text{m}$ 毎に測定した。1スペクトル測定は、1000回加算（8-10分）の平均である。測定範囲は4000-1000  $\text{cm}^{-1}$ で、CO伸縮領域と蛋白の骨格のペプチド由来のスペクトル部分の両方を測定した。測定条件は2  $\text{cm}^{-1}$  interval, 4  $\text{cm}^{-1}$ 分解能、23℃で、溶媒にはH<sub>2</sub>OとD<sub>2</sub>Oの両方を用いた。

### 2) 溶液の赤外分光

CO型ヘモグロビン (4-8 mM, ヘム濃度) をCaF<sub>2</sub>ウインドウのベックマンFH-01セル (光路, 5 μm) で測定した。1900-2000 cm<sup>-1</sup>の範囲の赤外スペクトルを9-16回測定、加算してコンピューター (Tektronix) で平均化した。測定温度は20℃。

CO伸縮振動であるかどうかの同定には、<sup>13</sup>COやC<sup>18</sup>O等の同位体を用いた。

#### 2.4 <sup>13</sup>C-NMRスペクトルの測定

COのCを<sup>13</sup>Cに置換した安定同位体をリガンドとして得たCO型ヘモグロビンの核磁気共鳴吸収 (NMR) を測定すると、遊離の<sup>13</sup>CO (184.6 ppm) の位置よりかなり離れた所 (206 ppm) にヘモグロビンに結合したCOの共鳴吸収がみられる。この<sup>13</sup>C-NMRを通して、正常HbとHbMの蛋白構造の相違を検討した。

NMRはBruker PTS-500のFT-NMR spectrometer (500 MHz) を用い、0.05 Mリン酸緩衝液 pH7, 25% D<sub>2</sub>O, 1 mMヘモグロビンの条件で測定した。NMR測定はコロラド州立大学化学教室のNMRセンターでDr. B. Hawkinsのもとで行った。

#### 2.5 NADHメトヘモグロビン還元酵素活性の測定

赤血球中では、ヘモグロビンは一定の割合で酸化が起こるため、それを元の還元型に戻すメトHb還元酵素が二種類 (NADH-チトクロムb<sub>5</sub>還元酵素, NADPH-フラビン還元酵素) 存在する。主な酵素は前者でこの酵素の欠損が生じると赤血球中にメトHbが増加してメト血症となる。ここでは、その主な酵素のNADH-チトクロムb<sub>5</sub>還元酵素の活性を溶血液を用いて調べた。活性測定は、分光学的に時間経過を見る方法と、電気泳動した後テトラゾリウムを用いてゲル上で活性染色する方法とによった。

##### 1) 分光学的方法

溶血液中の酵素活性測定には、基質としてジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) を用いる簡便法 (NADH-diaphorase活性) とチトクロムb<sub>5</sub>を用いる直接法とがある。

##### 「NADH-diaphorase活性測定の反応液」

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| 0.2 M Tris-HCl緩衝液, pH 7.4 | 0.1 ml   |
| 1 mM DCIP                 | 0.1 ml   |
| 0.1 M EDTA                | 5 μl     |
| d. w.                     | 0.685 ml |
| 10倍溶血液                    | 0.1 ml   |

10  $\mu$ l の 10 mM NADH を加えて反応をスタートし、600 nm の DCIP の吸収の減少の時間経過をみる。

「NADH-チトクロム  $b_5$ 還元酵素活性測定の実験液」

|                      |            |
|----------------------|------------|
| 0.5 M リン酸緩衝液, pH 7.0 | 0.1 ml     |
| 1 mM チトクロム $b_5$     | 50 $\mu$ l |
| 0.1 M EDTA           | 5 $\mu$ l  |
| d. w.                | 0.775 ml   |
| 10 倍溶血液              | 50 $\mu$ l |

20  $\mu$ l の 10 mM NADH で反応をスタートし、556 nm の還元型チトクロム  $b_5$  の増加でみる。対照には溶血液のみを用いる。

## 2) 活性染色

溶血液を等電点電気泳動 (pH 3.5 - 9.5) した後、ゲルを下記の反応液に浸し還元MTTの紫色の発色で酵素の位置を知る。一定時間における発色の程度で活性強度を比較することができる。

反応液: 2.5 mg MTT (テトラゾリウム)  
1 mg NADH  
0.1 ml 1 mM チトクロム  $b_5$   
5 ml 0.1 M Tris-HCl 緩衝液, pH 8.2

### 3. 結果と考察

#### 3.1 HbMの吸収と円偏光二色性(CD)スペクトル

図3に5種のHbMのアミノ酸置換部位を示した。アミノ酸置換はいずれもヘムに近接したところであり、異常鎖のヘム鉄は酸化された状態に安定化しており、天然に存在する *valency hybrid* Hbである。その吸収およびCDにおける特性をHbAと比較して調べた。まず、どの状態で比べるのが適当かを検討するため、完全還元型(Deoxy, 異常鎖も還元剤で還元したもの)、Oxy型(正常鎖は酸素結合型、異常鎖はメト型)、および完全酸化型(正常鎖、異常鎖ともに酸化型)の3型についてHbMとHbAと比較した(図4)。Deoxy型では、HbMとHbAとの差は小さい。Oxy型ではOxyとMetが混在していて分析が難しい。しかし、Met型ではSoret帯可視領域ともにHbMはHbAとは大きく異なったスペクトルを示したので、以下の構造に関する検討はすべてMet型について行った。この場合はHbM Iwateを例にとったが、HbMはHbM Milwaukeeを除きすべてほぼ同様のスペクトルを与える。HbM Milwaukeeは正常Hbと似たスペクトルを示す。図5、図6にHbMの紫外領域の吸収とCDスペクトルを示した。HbM MilwaukeeはHbAとほぼ同様のスペクトルであるのに対して、Tyr置換型のHbMは何れも強いhyperchromicityがみられ、この変化は一個のTyr増加に由来すると考えるよりずっと大きいので、ヘムの変化によると考えられる。280-290nmにかけて見られる負のCDはDeoxyHbのT-stateマーカーと言われるものの一つであるが、 $\alpha$ 鎖異常のHbM Iwate, HbM Bostonに顕著に見られる。この両HbMは、正常鎖の酸素親和性が異常に低く、T型にfrozenしたHbと考えられているが、その特性がMet型にあっても変わらないものと考えられる。紫外域の各HbMの吸収極大と最大CDの値を表1に示した。

#### 3.2 共鳴ラマン分光法によるHbMの異常鎖の構造解析

##### 1) HbMのポルフィリンの振動モード

488nmのアルゴンレーザー光でヘモグロビンのラマン散乱を励起すると、図7に見られるように多数のポルフィリン由来のラマン線がみられる。1372 $\text{cm}^{-1}$ の強いラマン線は $\nu_4$ とよばれ、ポルフィリン環の $C\alpha-C_m$ の全対称伸縮振動によるものであるが、HbMとHbAとの間で差はない。1600 $\text{cm}^{-1}$ 付近( $\nu_{10}$ )、1475-1490 $\text{cm}^{-1}$ ( $\nu_3$ )のラマン線の振動モードから、ヘムの配位数やスピン状態が判別できる。

5配位高スピン型では1628と1490  $\text{cm}^{-1}$ に、6配位高スピン型では1607、1478  $\text{cm}^{-1}$ に現れる。従って、HbM Iwate, HbM Boston, HbM Hyde Parkの3つは、5配位高スピン型に、HbM SaskatoonとHbAは6配位高スピン型に分類される。

## 2) Fe-tyrosinateの指紋バンド

Tyr置換型のHbMではポルフィリンの振動モードに加えて、Fe-tyrosinate蛋白に特有のラマン線が期待される。1600、1500  $\text{cm}^{-1}$ にフェノール環の振動モードが、1270  $\text{cm}^{-1}$ にCO伸縮振動が、また600  $\text{cm}^{-1}$ 付近にFe-O伸縮振動が見られるが、それらは結合状態によって変化するはずである。図8の低波数域のHbMのラマンスペクトルでみると、Fe-O伸縮振動は4HbMでは顕著であるがHbAにはない。HbM間で比べると、HbM Bostonでは603  $\text{cm}^{-1}$ と最もFe-O結合が強いことが分かる。HbM Saskatoonでは578  $\text{cm}^{-1}$ と最もその結合は弱い。一方、図7の高波数域では破線で示している位置に、何れのHbMでもFe-tyrosinateの指紋バンドが見られ、ヘム鉄と置換TyrはどのHbMでも結合していることが判明した。

## 3) HbMにおけるヘム鉄の軸配位

上記のラマンスペクトルから明らかとなったポルフィリンの振動モードとFe-Tyr蛋白の指紋バンドから、5HbMのヘムと軸配位のアミノ酸との関係を推定し図9に示した。HbM Iwate, HbM Hyde Parkでは、ヘム鉄は近位Tyrとのみ結合している。HbM Bostonでは遠位Tyrと結合して、正常ヘモグロビンで見られる近位Hisとの結合は切断していると考えられる。一方、HbM Saskatoonでは、ヘムは近位Hisとも遠位Tyrとも結合した6配位型をとるのであろう。データには示さなかったがHbM MilwaukeeはHbAと全く同様のラマンスペクトルを示すため、近位HisとE11Valとの両方が結合した6配位型と考えられる。

## 4) pHによる変化

Tyr置換型の中でHbM Saskatoonのみが、ヘム鉄とTyrとの結合が弱いことが考えられたので、pHによるヘムとTyrとの結合の変化を検討した。対照として、 $\alpha$ 鎖の遠位His置換のHbM Bostonの変化も検討した。図10にHbM Saskatoon, HbM BostonとHbAのpH5と7の比較および3ヘモグロビンの600nmにおけるpH titration curveを示した。HbM

BostonとHbAではpH7と5では僅かの変化しか見られないのに対して、HbM SaskatoonではpH低下に伴って顕著な変化が見られた。pH5で得られたスペクトルは正常ヘモグロビンの吸収と似ていることから、HbM SaskatoonではpH5付近でTyrとの結合は切れるものと思われる。そこでpH5におけるラマンスペクトルをとってみた。図11に示すように、HbM SaskatoonではpH5にすると、Fe-O伸縮振動もFe-tyrosinateの指紋バンドも消えた。一方、HbM Bostonではこれ等のラマン線はすべて顕著でpH5でもHbM Saskatoonとは異なり、ヘムとTyrとの結合は切れていないと思われる。HbM SaskatoonにみられるこのpH変化はpH4.3までは可逆的で、蛋白の変性のせいではない。pH titration curveから求めると、HbM Saskatoonの遠位Tyrの $pK_a$ は5.2であった。

### 3.3 HbMのリガンド結合機能

ヘモグロビンの酸素結合に伴う構造変化は、典型的なアロステリック蛋白の構造変化としてよく知られている。そのアロステリック蛋白としての性質は、リガンドに対する親和性、Bohr効果として知られるpH変化に伴うリガンド親和性の変化、協同的リガンド結合の指標となるHillの“n”値の3つに分けて考えることが出来る。HbMの場合、通常は異常鎖は酸化された状態にあってリガンド結合できないが、還元剤で還元してやるとTyrとの結合は切れてリガンドと結合出来るようになる。その場合、酸素はリガンドとして用いられないがエチルイソシヤニド(EIC)や一酸化炭素(CO)などの非酸化性のリガンドを用いて、その機能を調べることが出来る。

今回はCOをリガンドとして用い、CO結合に対しての近位His置換(HbM Iwate, HbM Hyde Park)と遠位His置換(HbM Boston, HbM Saskatoon)の影響を、赤外分光、共鳴ラマン分光、 $^{13}C$ -核磁気共鳴(NMR)によって調べた。

#### 1) 赤外吸収スペクトル

遊離のCOの振動スペクトルは $2140\text{ cm}^{-1}$ の赤外領域に観察されるが、ヘモグロビンと結合すると $1950\text{ cm}^{-1}$ へと大幅に低波数にシフトする。これは遊離のCOの状態より、束縛された状態にあることを意味するが、更にリガンド結合サイトにあるアミノ酸、主として遠位Hisの立体障害によりbent-end-on型の結合をとると考えられている。従って、この $1950\text{ cm}^{-1}$ に見られる $\nu_{CO}$ の赤外スペクトルを指標として、そのリガンド周辺の蛋白の構造を伺い知ることが出来る。



図12にHbM MilwaukeeとHbM Bostonのfull-CO型(正常鎖、異常鎖ともにCOが結合したもの)、およびhalf-CO型(正常鎖にのみCOが結合)の吸収スペクトルを示した。Full-CO型のスペクトルは、両HbMともよく似ており、また正常HbのCO型ともほぼ同じである。しかし、half-CO型ではHbM Bostonでは異常鎖のメト型の吸収がHbM MilwaukeeやHbAとは異なるため、両者の間に相違が見られる。他のTyr置換型HbMのhalf-COの吸収スペクトルはHbM Bostonの場合とほぼ同じである。

図13にHbM Boston-COの赤外スペクトルをHbA-COと比べて示した。HbA-COの $\nu_{CO}$ は $1950\text{ cm}^{-1}$ にシングルピークを示すが $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖は $2\text{ cm}^{-1}$ 異なることが分かっているので、波型分析にはそのfactorを導入した。一方、HbM Boston-COは $1952$ と $1970\text{ cm}^{-1}$ とに分裂した(図13B)。図13Cに見られるように、HbM Bostonのhalf-COは $1951\text{ cm}^{-1}$ にシングルピークのみを示し、これが正常 $\beta$ 鎖の $\nu_{CO}$ であるのでfull-COの $1970\text{ cm}^{-1}$ の $\nu_{CO}$ は異常 $\alpha$ 鎖のものであることが分かる。スペクトルは示さないがHbM Saskatoonのfull-COも $1951$ と $1970\text{ cm}^{-1}$ に2つの $\nu_{CO}$ を示した。遠位His置換HbMは $\alpha$ 鎖異常でも $\beta$ 鎖異常でも $\nu_{CO}$ に与える影響は同じらしい。ところが近位His置換HbMのHbM Iwate, HbM Hyde Parkのfull-COは共に $1950\text{ cm}^{-1}$ 辺りにシングルピークしか示さなかった(表2)。これ等のHbMの異常鎖は先に示したように酸化型では近位Tyrと結合しているが、還元してやるとその結合は切れ今度は遠位Hisと結合することがNMRなどの研究から示唆されている。とすると、COは通常のHbとは異なり近位側に結合することになる。それにもかかわらず $\nu_{CO}$ で見ると、正常Hbの遠位His側のリガンドサイトにCOが結合した場合と同様であると言う今回の知見は大変興味深い。

遠位His側のリガンドサイトのE11Valは $\beta$ 鎖にあっては、リガンド親和性に影響を与えると考えられており、このVal $\rightarrow$ Gluの置換がHbM Milwaukeeである。この異常鎖も通常は酸化しているが、還元剤で容易に還元されリガンドと結合するようになる。図14にHbM Milwaukee-COの赤外吸収スペクトルを示した。シングルピークではあるが、正常HbCOに比べてバンド幅が広い。正常 $\alpha$ 鎖のパラメーターをHbA-COのデータより求め、このスペクトルから差し引くと図14Aに示すように異常鎖の $\nu_{CO}$ は $1947\text{ cm}^{-1}$ とでてくる。正常HbCOの $\beta$ 鎖の $\nu_{CO}$ に比べ、低波数側にシフトした。

## 2) 共鳴ラマンスペクトル

C O型H bの共鳴ラマンでは3つのC O由来のラマン線が期待される。即ち、C O伸縮振動の $\nu_{CO}$  (1950  $\text{cm}^{-1}$ あたり)、鉄とC O間の伸縮振動の $\nu_{Fe-CO}$  (500  $\text{cm}^{-1}$ 付近)、および変角振動 $\delta_{Fe-C-O}$  (580  $\text{cm}^{-1}$ )である。これらのラマン線をプローブとして、H bM C OのC O結合様式を調べた。

共鳴ラマン測定には強力なレーザー光を使用するので、C Oの光解離を避けるためラマン散乱測定には回転セルを使用した。しかし、それでもなお光解離が懸念されたので、高波数域のポルフィリンの振動モードから測定条件を検討した。その結果、サンプルポイントで4 mWのレーザーパワーに調節すると、図15に示すようにすべてのH bM C OおよびH bA C OのC Oは解離していない状態をとっていることが分かったので、以下のラマンスペクトルの測定にはこの条件を用いる。

まず赤外スペクトルで $\nu_{CO}$ バンドに分裂のみられたH bM B o s t o n C Oについて調べた。図16の上段のスペクトルに見られるように $\nu_{CO}$ は赤外同様1953と1972  $\text{cm}^{-1}$ とに2本のバンドが認められた。 $\delta_{Fe-C-O}$ に関しては、この条件でははっきりしないが、 $\nu_{Fe-CO}$ は幅広いラマンバンドを示し、502と489  $\text{cm}^{-1}$ とに2本あるようである。502  $\text{cm}^{-1}$ は正常鎖由来で、489  $\text{cm}^{-1}$ は異常 $\alpha$ 鎖由来と思われる。その他のラマン線はすべてH bA C Oと同じであった。次にこれ等の異常バンドが本当にC O由来かどうかを調べるために、 $^{13}\text{C}$ および $^{18}\text{O}$ に置換した安定同位体のC O、 $^{13}\text{C}^{16}\text{O}$ と $^{12}\text{C}^{18}\text{O}$ による同位体シフトをみた(図16)。 $\nu_{CO}$ は $^{13}\text{C}$ Oの場合も $^{18}\text{O}$ の場合も軽C Oに比べ約40  $\text{cm}^{-1}$ 程大きく低波数側にシフトし、2つのバンドは確かにC O由来であることが分かった。ポルフィリンモードの $\nu_4$ と $\nu_7$ の結合音と思われる2050  $\text{cm}^{-1}$ のラマン線はこれ等同位体によってはシフトしない。

一方、 $\nu_{Fe-CO}$ と考えられる500  $\text{cm}^{-1}$ 付近のラマンバンドの同位体シフトでは奇妙な結果が得られた。正常 $\beta$ 鎖由来と考えられる502  $\text{cm}^{-1}$ のラマン線は $^{13}\text{C}$ Oでも $^{18}\text{O}$ 置換でもH bA C Oの場合と同程度低波数側へシフトするのに対して、異常鎖由来と考えられる489  $\text{cm}^{-1}$ のラマン線は $^{13}\text{C}$ Oでは動かず、 $^{18}\text{O}$ でのみ低波数側へシフトした。どうも正常のヘモグロビンとはC Oの結合様式が異なるらしい。

また、異常鎖由来の $\nu_{CO}$ の値はヘムのモデル化合物などでリガンド結合サイトに立体障害のない場合のC O結合型の $\nu_{CO}$ と近いので、異常鎖ではC Oはヘム面に対して垂直に結合しているらしい。垂直に結合したC Oはヘム鉄との結合が非常に強いとされているので、その結合性を光解離実験でみてみた。図17に示すように、上段のH bA C Oではセルが回転しているときはC O結合型のラマンスペクトルが得られるが、回転を止めるとC Oは光解離してd e o x y型のスペクトルとなる。しかし、H bM S a s k a t o o n C Oでは、セルを静止すると正常鎖のC Oは光解離するのにに対して異常鎖はC Oが結合したま

までであることを示唆する結果が得られた。従って、異常鎖にはCOは垂直に結合し、その結合は非常に強いことが示唆される。

### 3) $^{13}\text{C}$ -NMR

核磁気共鳴 (NMR) というとプロトン ( $^1\text{H}$ ) NMRが一般的であるが、最近 $^{13}\text{C}$ 核種にたいするNMR、すなわち $^{13}\text{C}$ -NMRが蛋白構造を研究する上で重要になりつつある。図18にHbM Hyde Park  $^{13}\text{C}$ Oの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示したが、0~70 ppmあたりにはnatural abundanceに起因する蛋白のアミノ酸のaliphaticな部分の情報が得られ、また、80~180 ppmあたりでは蛋白中のaromatic amino acidについての情報が得られる。Hbのリガンドとして $^{13}\text{C}$ Oを用いると、遊離の $^{13}\text{C}$ Oは184.6 ppmに、Hbに結合した $^{13}\text{C}$ Oは206 ppmに共鳴吸収が見られ、蛋白側のスペクトルとは重ならない。そこでHbMに結合した $^{13}\text{C}$ Oの $^{13}\text{C}$ -NMRを測定し、アミノ酸置換が $^{13}\text{C}$ O結合に与える影響をみた。

図19にHbM Boston, HbM Saskatoon, HbM Milwaukeeの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルをHbAと対比させて示した。HbAでは $\alpha$ ,  $\beta$ 鎖はそれぞれ僅かに共鳴吸収の位置が異なることが知られているが、赤外吸収で $\nu_{\text{CO}}$ に著しい差の見られたHbM BostonとHbM Saskatoonでは、ここでも正常Hbの吸収帯 (206 ppm) とはかなり異なる位置 (204 ppm) に共鳴吸収が見られた。遊離の $^{13}\text{C}$ Oの位置と離れるほどCOは拘束された状態にあると理解されるので、HbM Boston, HbM Saskatoonの異常鎖に見られた化学シフトのより小さい吸収帯はCOがより自由に束縛が解かれた状態にあると考える事が出来る。

このHb  $^{13}\text{C}$ Oの化学シフトとCOの伸縮振動 ( $\nu_{\text{CO}}$ ) とは相関するとの報告があるので、図20に両者の関係をプロットしてみた。この図で $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖間に傾斜の相違が見られるが、プロット数が少ないので有意かどうかは分からないが少なくとも $\nu_{\text{CO}}$ と $\delta$  ppmとの間では、はっきりした相関関係が見られた。

### 4) リガンド結合機能のまとめ

赤外、共鳴ラマン、 $^{13}\text{C}$ -NMRで5種のHbMCOの異常鎖のリガンド結合性を調べた結果、次のことが明らかとなった。

1) 近位His置換のHbM Iwate, HbM Hyde Parkでは、通常のリガンド結合サイトとは全く異なる近位側にCOが結合すると考えられるのに、そのCO結合性は驚くほど正常HbのCO結合型に似ていた。

2) 遠位His置換のHbM Boston, HbM SaskatoonではそのCO

結合性に正常Hbとは著しい相違がみられた。結合したCOはより自由なふるまいが出来るもので、正常Hbのbent-end-on型とは異なり垂直(perpendicular)に結合していると考えられる。従って、Hisの代わりにあるTyrはリガンドに対して殆ど立体障害を与えないものと思われる。

3)  $\beta E11Val \rightarrow Glu$  置換では、CO結合性に対して小さいがHbM BostonやHbMSaskatoonとは異なった影響を与えていることが示唆される。

### 3.4 HbM症患者の病態

HbMは今まで述べてきたように置換アミノ酸が同じでも、置換位置(近位か遠位か)やサブユニットが異なるとその構造上の性質が異なることが分かる。我々が前に報告した異常鎖のメトヘモグロビン還元酵素による還元性の相違は、これら構造上の相違に基づくことが今回の研究成果により明らかとなった。しかし、HbMを有する患者の病態、例えばHbM含量が高いのにもかかわらずチアノーゼが弱い(HbM Saskatoon)、不安定血色素様の性質をもつもの(HbM Saskatoon, HbM Hyde Park)等とヘモグロビンの構造との関連は殆ど分かっていない。

そこで、今回我々はチアノーゼが弱く不安定血色素の病態を示すHbM Saskaatoon症の患者2家系のチアノーゼについて調べてみた。チアノーゼが、非常に顕著なHbM Iwate, HbM Boston症患者血中のHbM含量は20~30%である。それに対してHbM Saskatoon症ではチアノーゼが弱いにもかかわらず、全血中のHbM含量は約50%である。In vitroの実験で、HbM Saskaatoonの異常鎖が赤血球からのメトヘモグロビン還元酵素によって容易に還元されることも考え合わせると、患者体内で異常鎖はある程度還元型で存在する可能性が考えられる。そこで電子スピン共鳴(ESR)による酸化型異常鎖の定量を試みた。

#### 1) HbM Saskaatoon症患者全血中の酸化型異常鎖の定量

酸化型HbA(メトHbA)のXバンドによるESRスペクトルを見ると、 $g=6$ に非常に鋭い共鳴吸収が見られる。HbMではその異常鎖の異方性の相違により、それぞれ異なった $g$ 値を与えるため、少量の全血を用いて鑑別診断が可能である。中でも、HbM Saskaatoonの異方性は大きいため、正常鎖の酸化型とも区別でき酸化型異常鎖の定量が可能である。

図21にHbM Saskaatoon-Numazuの新鮮血、精製メトHbM SaskaatoonおよびメトHbAのESRスペクトルを示した。メトHbAでは $g=6$ にシグナルが見られるだけであるが、メトHbM Saskaatoonでは正常鎖の $g$

= 6に加えて  $g = 6.7$  に異常鎖由来の ESR シグナルが見られる。ヘム当たりの ESR 強度は異常鎖では正常鎖の  $1/5$  であるが、この ESR 強度を用いて酸化型異常鎖の定量が出来る。その結果、HbM Saskatoon-Numazu の新鮮血では、酸化型異常鎖は全体の  $8.3\%$  であった。従って、あとの  $40\%$  程は還元型で存在することになる。それでは患者血液を  $37^{\circ}\text{C}$  でインキュベートすると酸化型が増えるのではないかと考え、 $37^{\circ}\text{C}$  に置いたものと  $0^{\circ}\text{C}$  に置いたものとを比較してみた。図 22 に溶血液の吸収スペクトルを示した。 $37^{\circ}\text{C}$ 、15 時間インキュベートしたものでは  $0^{\circ}\text{C}$  のものに比べ、 $\alpha$ 、 $\beta$  バンドが減少し  $500, 600\text{ nm}$  が上昇するといった変化がみられ、酸化が起こっていることが明白であるが、吸収スペクトルの変化のみでは正常鎖、異常鎖どちらがどれだけ酸化されているか分からない。そこで、同じ条件の全血の ESR スペクトルをみると、図 23 にしめすような変化がみられ、異常鎖の酸化は  $21\%$  にまで増加したが正常鎖の酸化は  $4.6\%$  であった。 $37^{\circ}\text{C}$ 、15 時間インキュベートしても、まだ半分の HbM は還元型で存在する。これは赤血球中のメトヘモグロビン還元酵素が働いているためと思われる。表 3 に 2 家系の HbM Saskatoon 症 (Numazu, Inami) 患者の新鮮血の異常鎖酸化型 HbM の全ヘモグロビンに対する割合を示した。症例 1 の HbM Saskatoon-Numazu の場合は、異なる時期に 2 度測定したが、酸化型は  $3\sim 8\%$  であった。ところが、症例 2 の HbM Saskatoon-Inami では新鮮血で既に  $25\%$  酸化型が存在し、 $37^{\circ}\text{C}$  インキュベートするとほぼ全量の HbM は酸化された。HbM Saskatoon-Numazu 患者は一見して、HbM 症とは思われないくらいチアノーゼが弱いのにに対して、HbM Saskatoon-Inami 患者は顕著なチアノーゼを呈していた。この 2 患者間の酸化型量の差は、とても個人差によるものとは考えにくい。そこで、これは赤血球中のメトヘモグロビン還元酵素活性に相違があるのではないかと考えられたので、患者溶血液のメトヘモグロビン還元酵素 (NADH-チトクロム  $b_5$  還元酵素) 活性を測定してみた。

## 2) 患者血液中のメトヘモグロビン還元酵素活性

まず、電気泳動したのち活性染色をして正常の人の活性と比べた。図 24 に示すように Numazu 患者では対照血とほぼ同等の濃度の染色が認められるのに、Inami 患者血では明らかに活性が低く、染色濃度からみて対照の半分以下と考えられる。次に活性を直接測定したところ、表 4 に示すように Numazu 患者血ではジアホラーゼ活性のみでも、NADH-チトクロム  $b_5$  還元酵素活性のみでも正常範囲内であった。しかしながら、Inami 患者血では正常の半分または半分以下の活性しかなかった。この結果から、Inami 患者は点突然変異による HbM 症であるうえに、メトヘモグロビン還元酵素欠

損症のヘテロ型であると言える。ヘモグロビンの精査から、HbM症はこの子が発端者であることが分かっているが、酵素欠損の遺伝子は両親のどちらかから受けついでものと考えられるので、家族調査が必要である。

結論として、2家系のHbMSaskatoon症患者間の異常鎖酸化型HbM含量の相違はメトヘモグロビン還元酵素活性の相違によるものであることが分かった。通常正常のヘモグロビンの場合は、メトヘモグロビン還元酵素欠損症のヘテロであってもチアノーゼの症状は示さないが、HbM症の場合、ヘモグロビンの酸化が正常に比べてずっと速いので、酵素が完全にあるときと半分の時の相違が2患者間のチアノーゼの差となって顕れたのであろう。

### 3) HbM Boston症の場合

$\beta$ 鎖の遠位His $\rightarrow$ Tyr置換HbがHbM Saskatoonであるが、 $\alpha$ 鎖の遠位His $\rightarrow$ Tyr置換HbはHbM Bostonである。HbM Saskatoon症と対比させるためにHbM Bostonの酸化型異常鎖の定量をESRで行った。図25に示すようにHbM Bostonの場合は $g=6.3$ の所に異常鎖のシグナルが観察される。この $g$ 値のヘム当たりの強度を尺度として新鮮血および37℃、15時間インキュベートした血液の酸化型異常鎖の定量を行った。図25A, Bで明らかのように、HbM Bostonでは新鮮血で既に異常鎖は100%酸化されており、37℃にインキュベートしても変わらなかった。カラムクロマトグラフィーによる分離パターンから計算するとHbM Bostonは全血中22%存在する。ESR強度から計算してもHbM含量は約22%となり、よい一致がみられた。

### 4) 赤血球の顕微分光

最後に患者の赤血球一個、一個についてのHbMの存在様式を顕微分光で調べた結果について述べる。先の赤外分光の項でHbM BostonとHbM SaskatoonのCO型では正常鎖、異常鎖が別々の吸収帯であることを示した。HbM症の場合すべての患者はHbAとHbMを含むヘテロ接合体である。患者の個々の赤血球に両Hbを有しているのか、ある赤血球ではHbAのみを有しある赤血球ではHbMのみを有するのかなどといった遺伝子発現の問題に赤外分光を使って挑戦してみた。

最新型のFTIR（フーリエ変換赤外分光光度計）に顕微分光の付属品をつけたものでパーキンエルマー社の技術部門との協同研究で行った。図26に示すように正常赤血球にCOを吹き込んだ場合、 $1951\text{ cm}^{-1}$ にシングルピークの赤外スペクトルが見られるのみであるが、HbM Saskatoon症患者赤血球では明瞭な2本の赤外吸収バンド

が認められた。図27に別々の4個の赤血球のスペクトルを示した。それぞれにHbMとHbAの両方が含まれていることが分かる。HbAに相当する $1951\text{ cm}^{-1}$ の吸収帯の方が大きいのは、HbMが50%含まれていてもその半分は正常鎖でHbACOのスペクトルと重なるからである。

この結果から、ヘモグロビン合成の遺伝子発現は各赤血球ごとに両方共起っていることが判明した。

#### 4. 図表

表 1. H b M の紫外領域における吸収強度 (分子吸光係数,  $\epsilon$ ) と CD (分子楕円率,  $\theta$ ).

| Hemoglobins    | $\epsilon \times 10^{-4}$ (275 nm) | $(\theta) \times 10^{-4}$ (260 nm) |        |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------|--------|
|                | pH 7.0                             | pH 7.0                             | pH 8.5 |
| Hb M Iwate     | 0.855                              | 1.3                                | 2.3    |
| Hb M Boston    | 0.825                              | 3.6                                | 4.6    |
| Hb M Hyde Park | 0.890                              | 3.6                                | 4.6    |
| Hb M Saskatoon | 0.880                              | 5.0                                | 5.5    |
| Hb M Milwaukee | 0.715                              | 4.6                                | 4.5    |
| Hb A           | 0.705                              | 3.6                                | 5.0    |

表 2. H b M C O の赤外吸収のパラメーター,  $\nu_{CO}$  と half band width  $\Delta\nu_{1/2}$ .

|                | Full-CO                        |                   | Half-CO                        |                   |
|----------------|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------------------|
|                | $\nu_{CO}$ (cm <sup>-1</sup> ) | $\Delta\nu_{1/2}$ | $\nu_{CO}$ (cm <sup>-1</sup> ) | $\Delta\nu_{1/2}$ |
| Hb A           | $\alpha$ 1950.2                | 7                 |                                |                   |
|                | $\beta$ 1952.2                 | 7                 |                                |                   |
| Hb M Boston    | $\alpha^M$ 1970.2              | 7.4               | 1950.8                         | 8.1               |
|                | $\beta$ 1951.8                 | 7.7               |                                |                   |
| Hb M Saskatoon | $\alpha$ 1950.6                | 7.9               | 1951.8                         | 8.4               |
|                | $\beta^M$ 1970.2               | 8.0               |                                |                   |
| Hb M Milwaukee | $\alpha$ 1950.7                | 7.4               | 1950.4                         | 8.2               |
|                | $\beta^M$ 1947.0               | 10.0              |                                |                   |
| Hb M Iwate     | 1950.3                         | 12.0              | 1951.6                         | 7.8               |
| Hb M Hyde Park | 1950.1                         | 12.0              | 1950.2                         | 7.0               |



表 3. HbM SaskatoonとHbM Bostonを含む患者  
新鮮血中の酸化型異常鎖の定量。

| Blood                     | Abnormal chains oxidized |                 | Normal chains oxidized |                 |
|---------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
|                           | mM                       | (% of total Hb) | mM                     | (% of total Hb) |
| Normal                    | -                        |                 | 0.03                   | (0.3)           |
| HbM Saskatoon<br>(Numazu) | 0.15                     | (3.3)           | 0.03                   | (0.5)           |
|                           | 0.41                     | (8.4)           | 0.05                   | (1.1)           |
| HbM Saskatoon<br>(Inami)  | 1.18                     | (24.8)          | 0.22                   | (4.7)           |
| HbM Boston                | 2.12                     | (22.7)          | 0.12                   | (1.3)           |

HbM Saskatoonの酸化型異常鎖は  $g = 6.7$ 、HbM Bostonの酸化型異常鎖は  $g = 6.3$ 、および酸化型正常鎖は  $g = 6.0$  の ESR シグナル強度より定量した。ESR測定条件：周波数，Xバンド ( $9.35 \text{ GHz}$ )；温度， $4.2 \text{ K}$ 。

表 4. 二家系のHbM Saskatoon症患者溶血液中の  
メトHb還元酵素活性。

| Blood                     | NADH-diaphorase act. | NADH-cytochrome $b_5$<br>reductase act. |
|---------------------------|----------------------|---|
|                           | nmol/min/mg Hb       | nmol/min/mg Hb                          |
| Normal                    | 2.43                 | 1.51                                    |
|                           | 2.51                 | 1.55                                    |
| HbM Saskatoon<br>(Numazu) | 2.80                 | 1.67                                    |
|                           | 2.83                 | 1.59                                    |
| HbM Saskatoon<br>(Inami)  | 1.54                 | 0.44                                    |
|                           | 1.55                 | 0.46                                    |

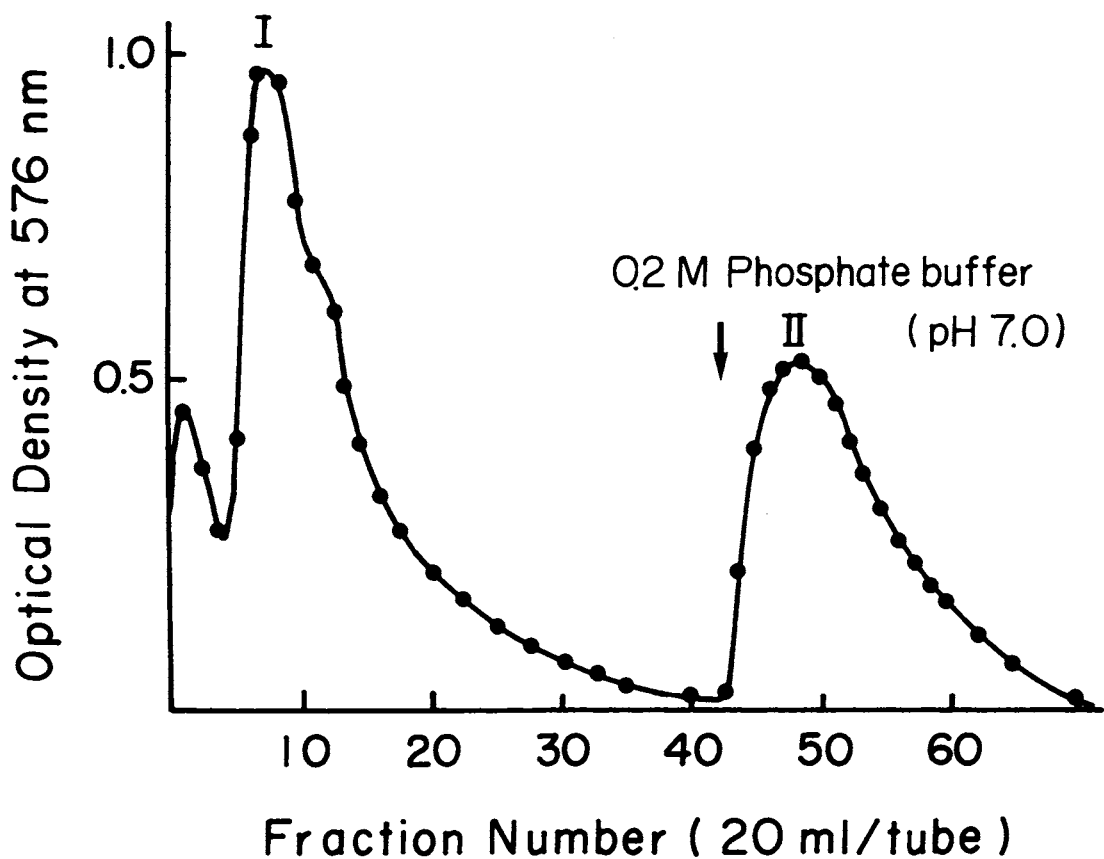


図 1. Amberlite CG-50 カラムクロマトグラフィーによる  
 HbM Milwaukee の分離。  
 I, HbA; II, HbM Milwaukee。  
 カラムは 0.05 M リン酸緩衝液で平衡化し、吸着しない HbA 分画  
 が流れ出た後、0.2 M に緩衝液の濃度を上げて HbM を流出させる。

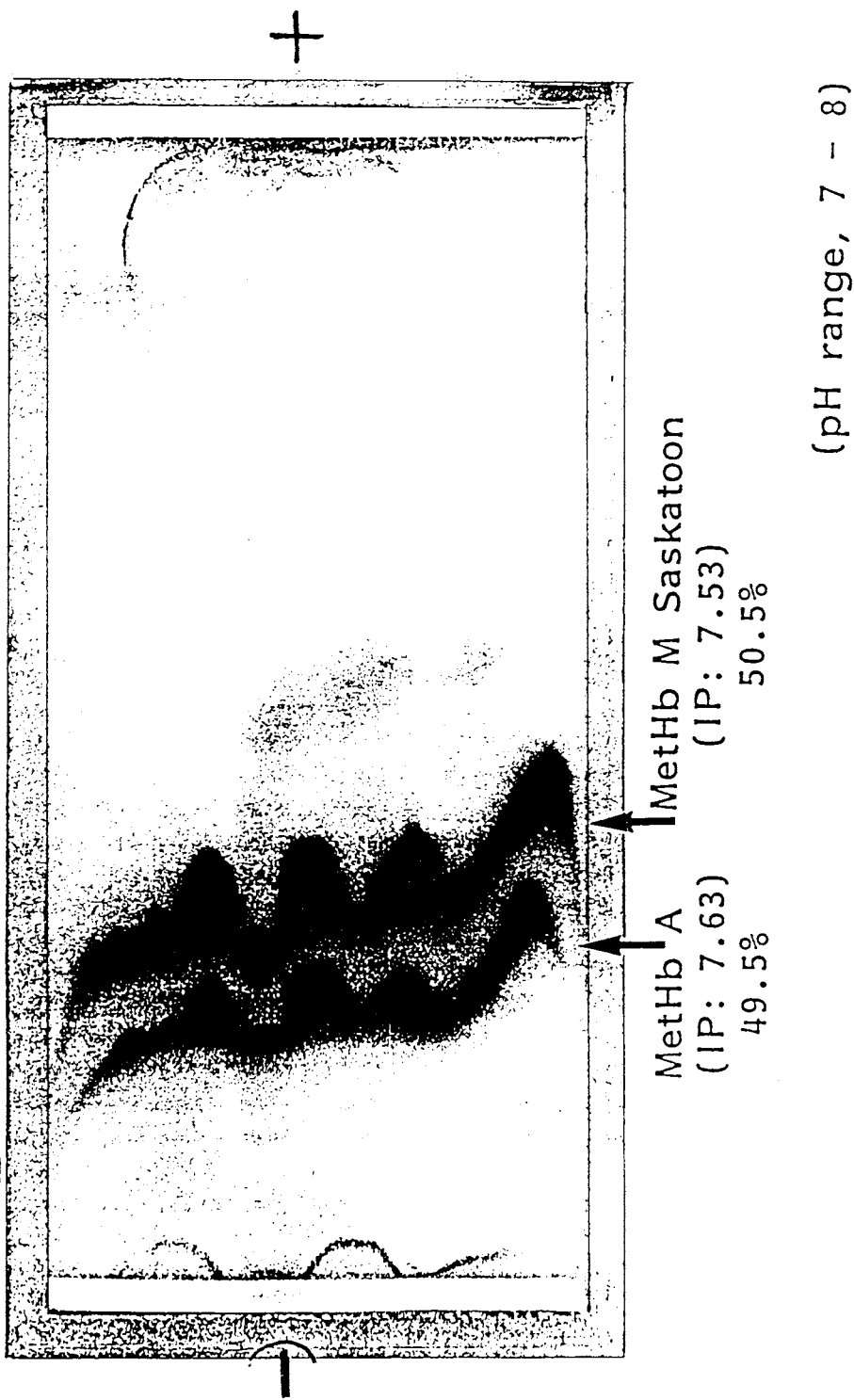


図 2. 等電電気泳動法によるHbM Saskatoonの分離.

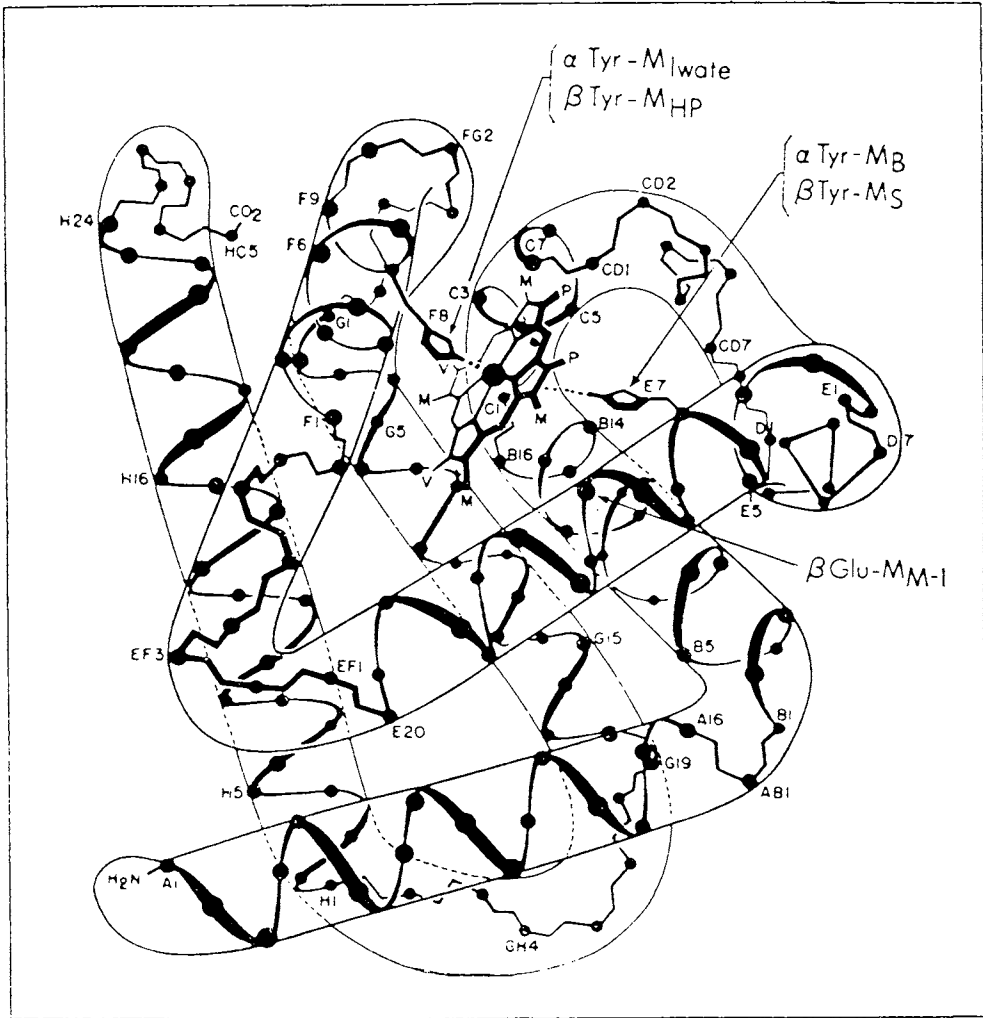


図 3. 5種のHbMのアミノ酸置換部位。

MHP, HbM Hyde Park; MB, HbM Boston; MS, HbM Saskatoon; MM-1, HbM Milwaukee.

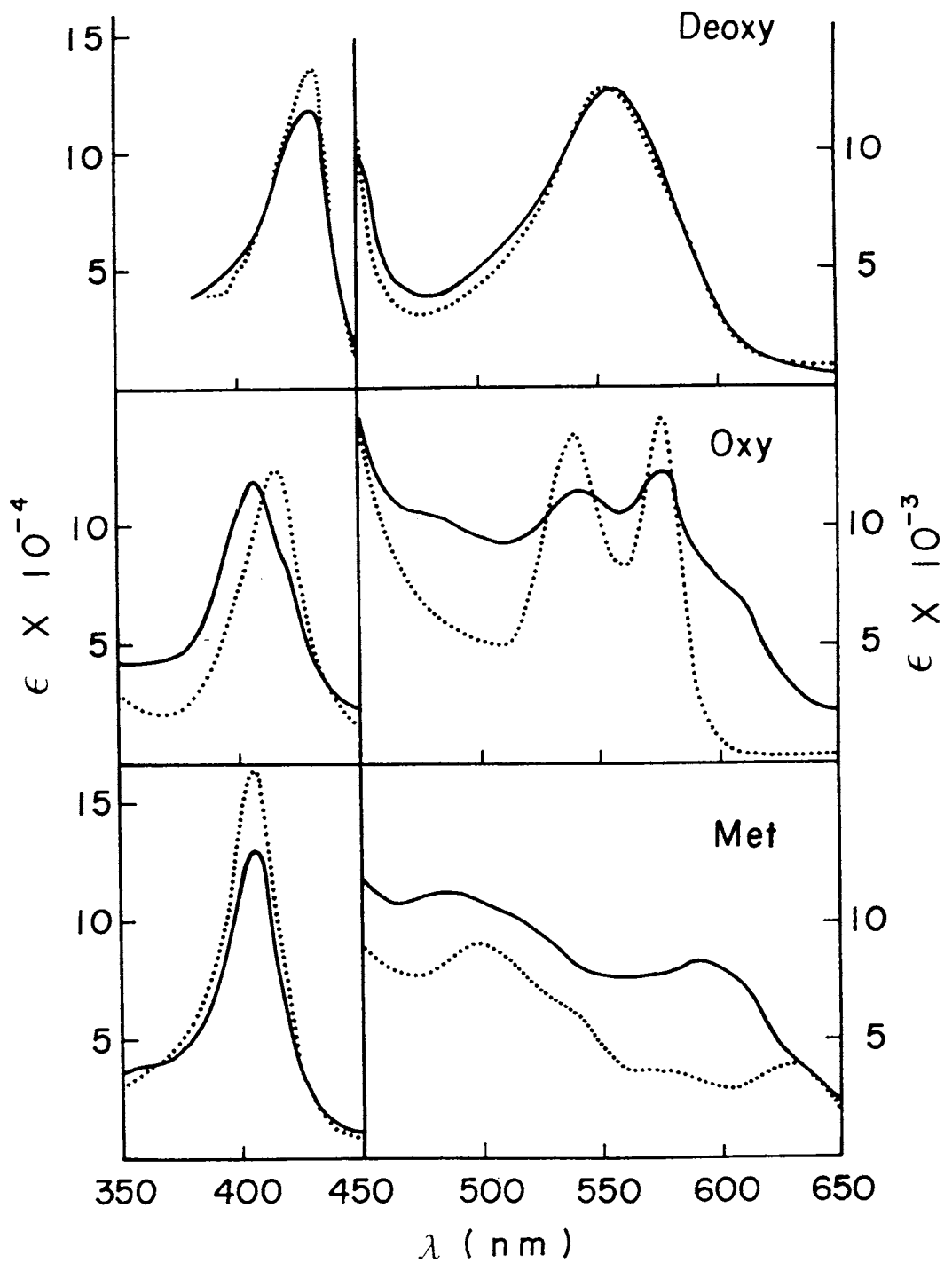


図 4. HbM Iwate の吸収スペクトルと正常Hbとの比較.  
 ————, HbM Iwate; ..... , HbA.

# Absorption spectra

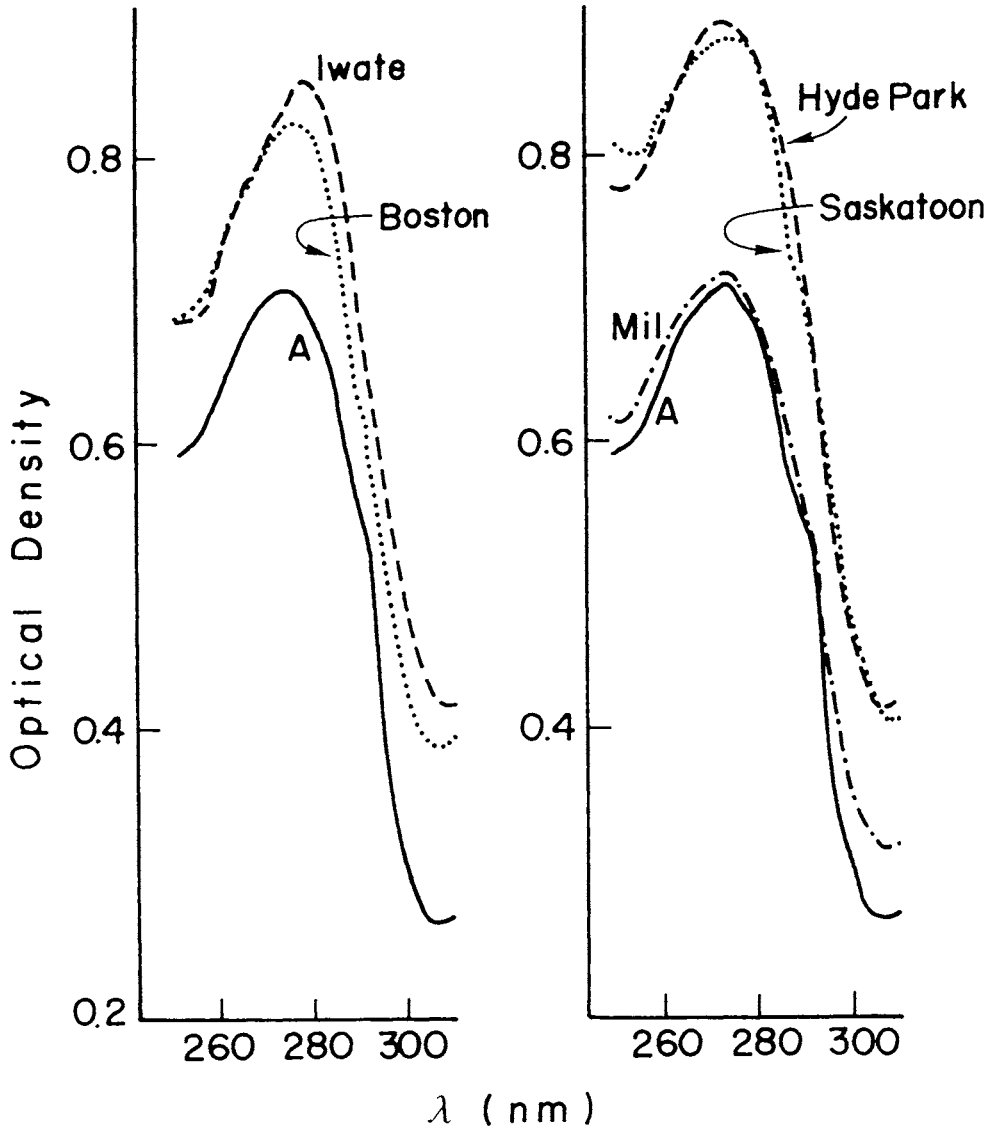


図 5. 紫外領域の5種のHbMの吸収スペクトル。  
A, HbA (対照); Mil, HbM Milwaukee.  
測定条件: 0.1Mリン酸緩衝液, pH 7.0.

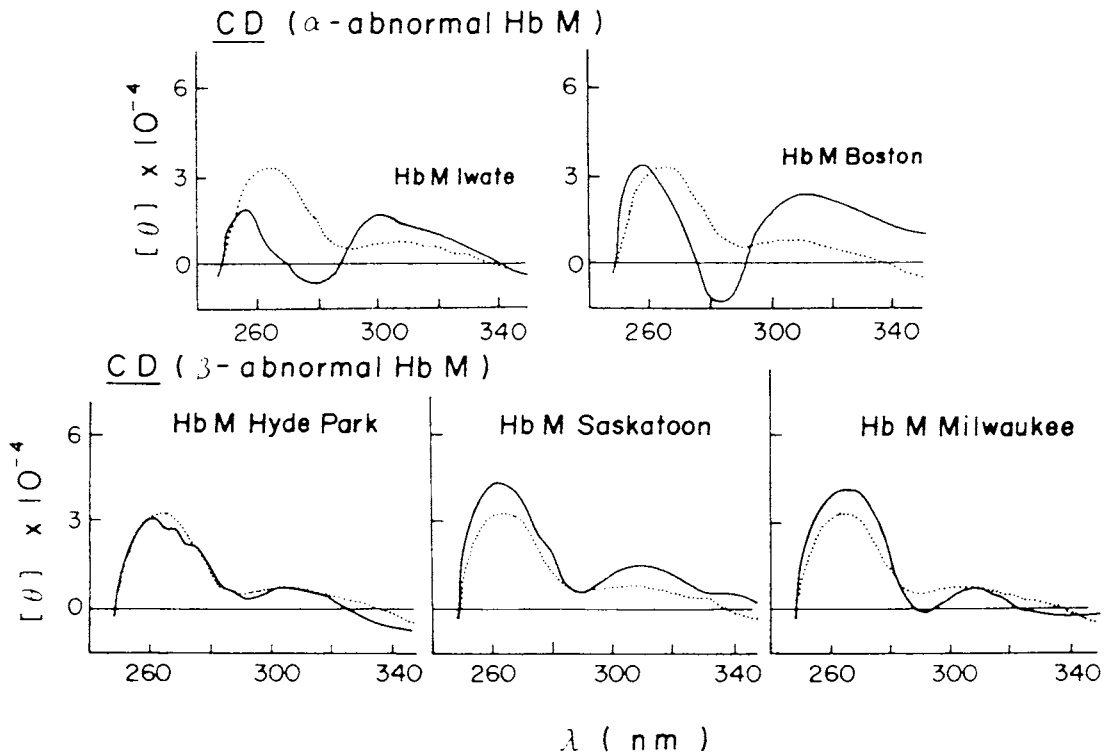


図 6. 紫外領域のH b MのCDスペクトル。  
 ———— , H b M; ..... , H b A.  
 測定条件: 図5に同じ。

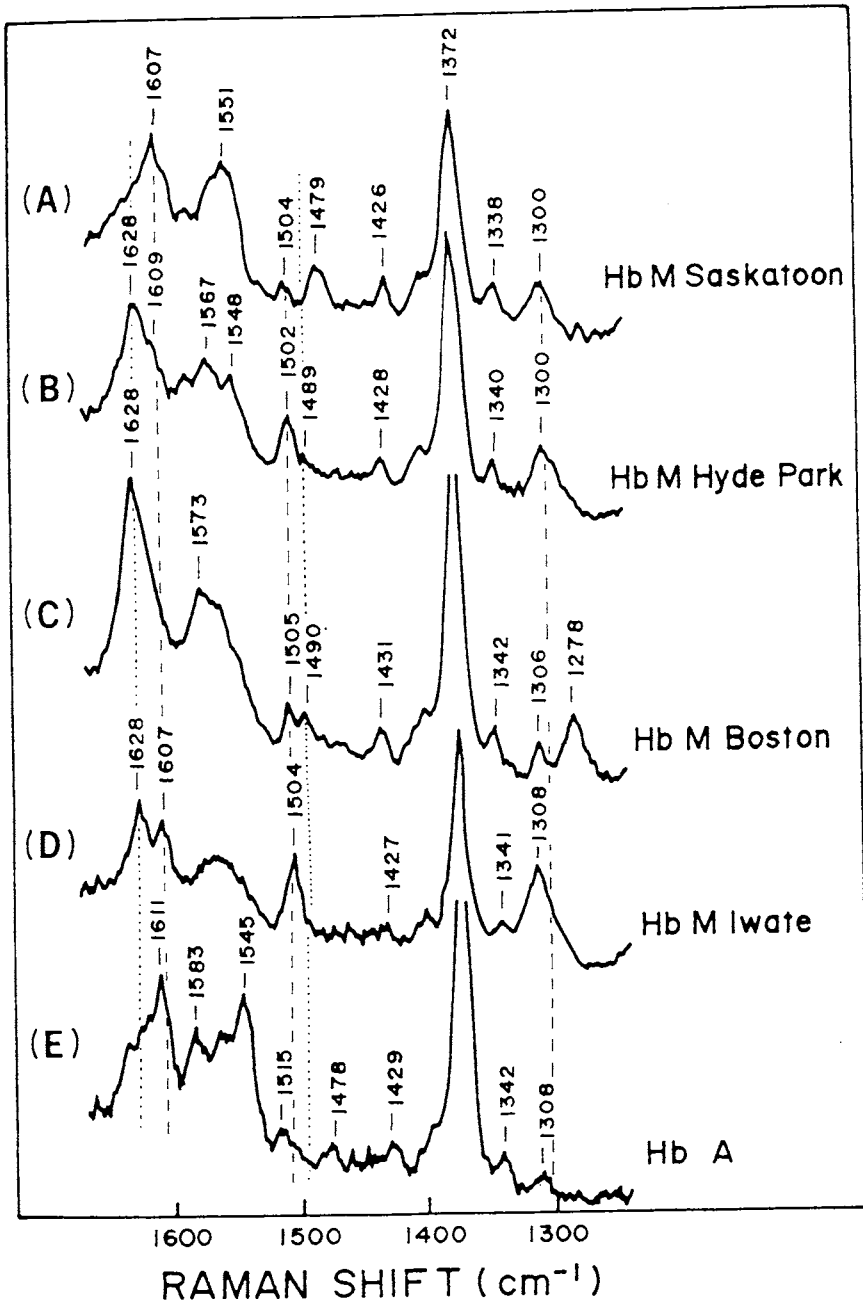


図 7. 高波数域のHb Mの共鳴ラマンスペクトル。

測定条件: 0.05 M bis-tris, pH 7, 0.1 M NaCl  
 488 nm 励起, Hb 濃度, 300 μM (ヘム)。

-----, Fe-tyrosinate 由来の振動モード;

....., 5 配位 high spin 型ヘムのポルフィリンの振動モード。



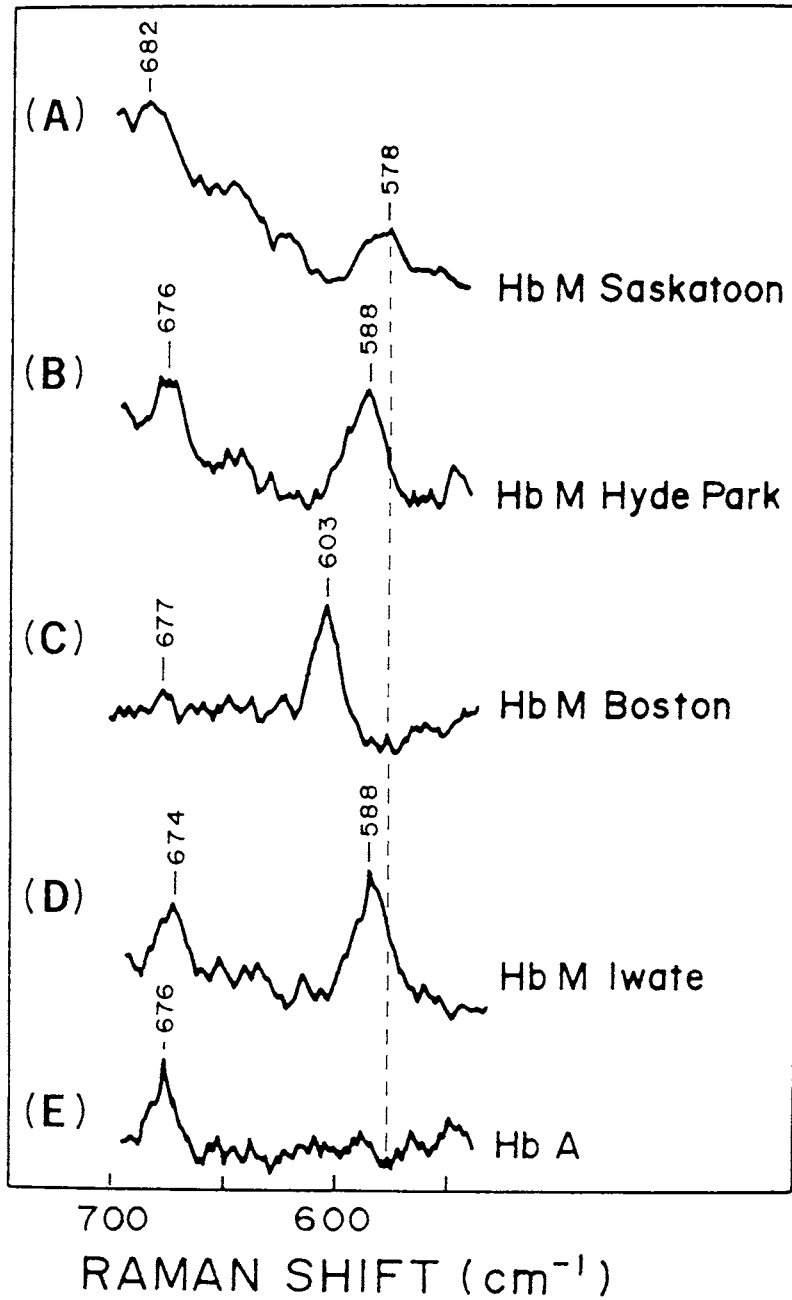
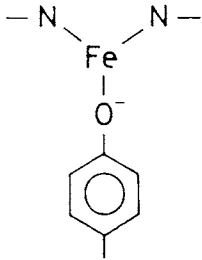
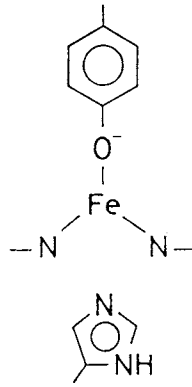


図 8. 低波数域のメト型Hb Mの共鳴ラマンスペクトル  
 -----, Fe-O (phenolate) 振動モード  
 674~682 cm<sup>-1</sup>のラマン線, ポルフィリンのν<sub>7</sub>振動モード  
 測定条件は図7に同じ。

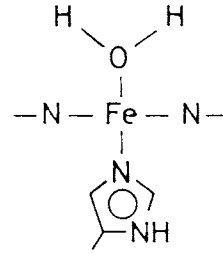
$\alpha$ -abnormal



Hb M Iwate



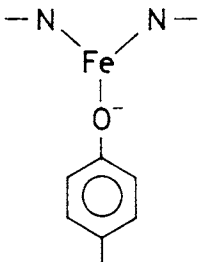
Hb M Boston



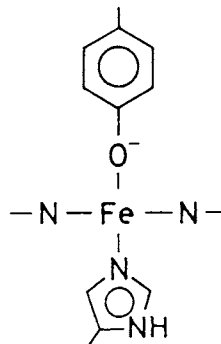
Normal

Hb A

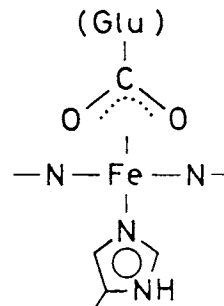
$\beta$ -abnormal



Hb M Hydepark



Hb M Saskatoon



Hb M Milwaukee

図 9. 5種類のHbMのヘム近傍の構造

ヘム面 (-N-Fe-N-) の上側, 遠位His (E7) の位置;

下側, 近位His (F8) の位置。

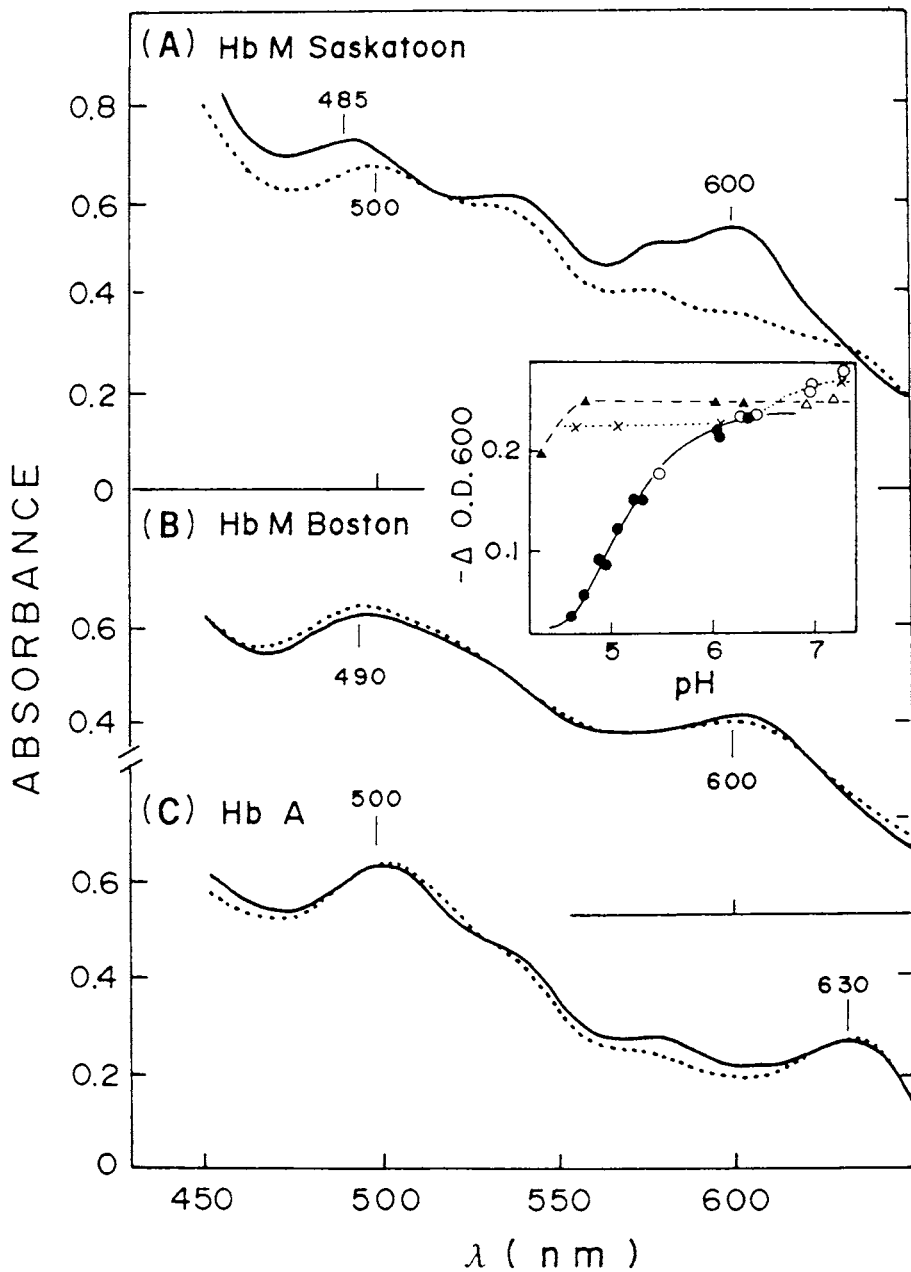


図 10. Hb M の吸収スペクトルの pH による変化

——, pH 7 (0.05M bis-tris, 0.1M NaCl)  
 ..... , pH 5 (0.1M citrate-phosphate).

(挿入図) pH 滴定曲線. ○, Hb M Saskatoon; Δ, Hb M Boston;  
 x, Hb A; open symbol, 0.1M phosphate  
 buffer; closed, 0.1M citrate phosphate  
 buffer.

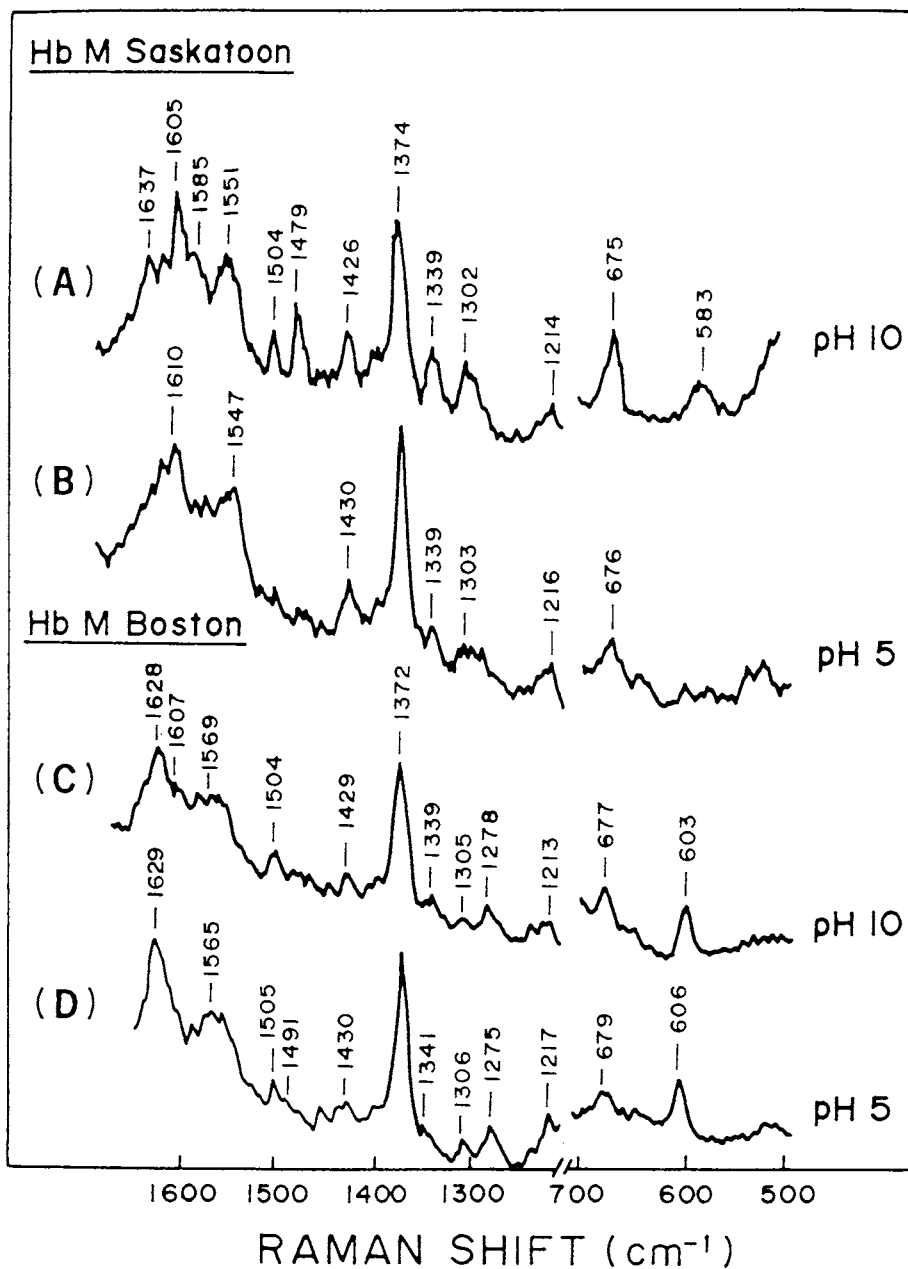


図 11. HbMの共鳴ラマンスペクトルのpH変化  
 pH5, 0.1M citrate phosphate buffer;  
 pH10, 0.1M glycine NaOH buffer;  
 Hb, 200  $\mu$ M in heme.

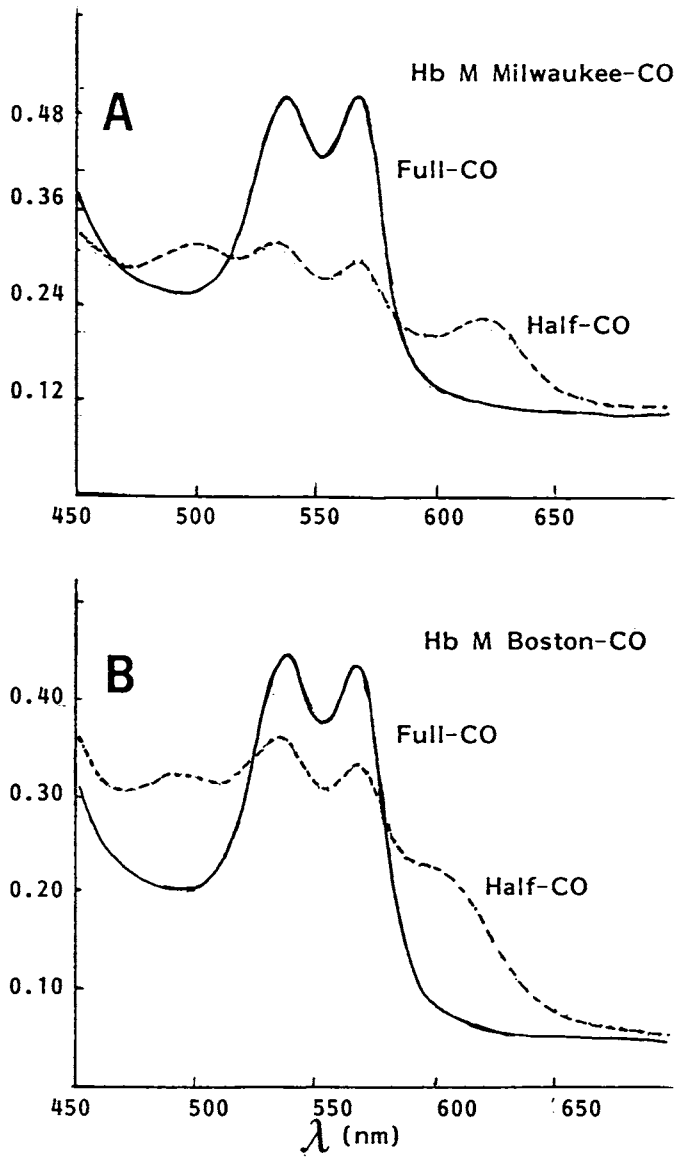


図 12. HbM Milwaukee (A) と HbM Boston の一酸化炭素 (CO) 結合型の可視吸収スペクトル。  
 ————, full-CO; ..... , half-CO  
 (正常鎖にのみ CO が結合)

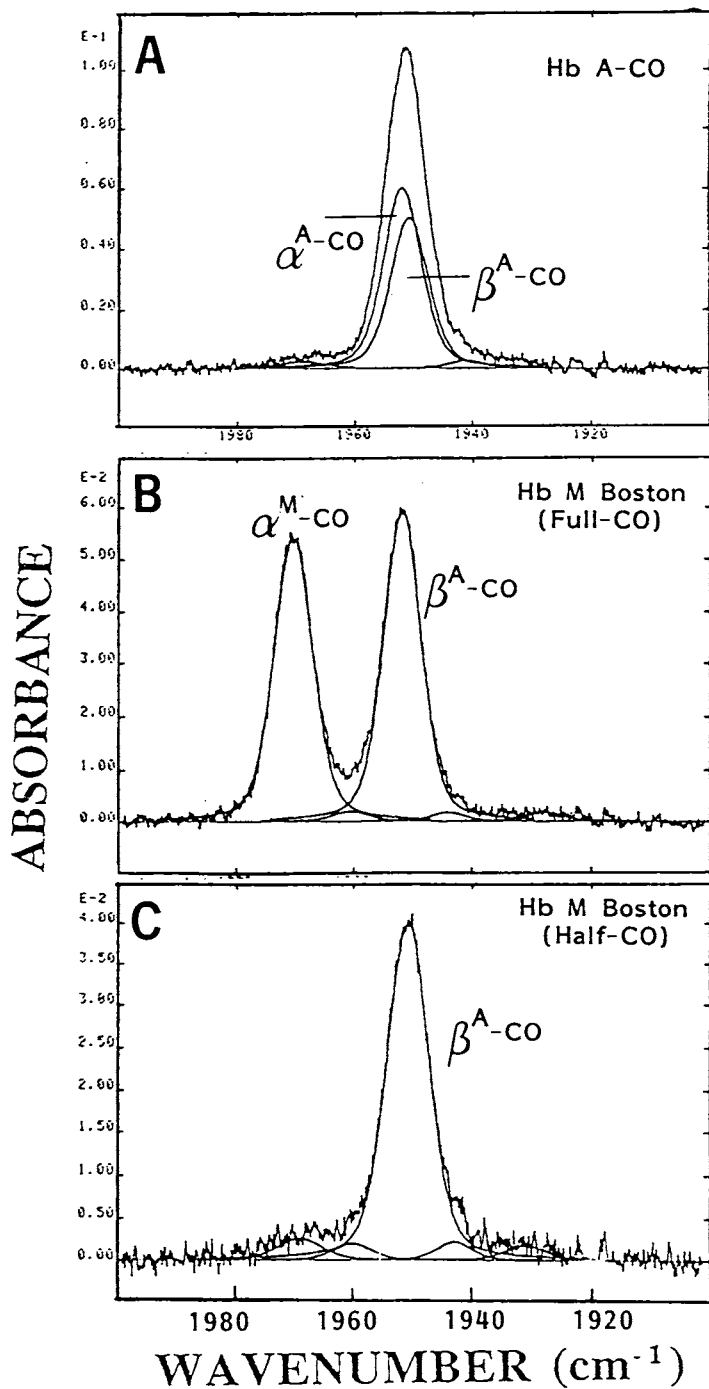


図 13. HbM Boston COの赤外吸収スペクトルと波型分析  
 A, Hb ACO (対照); B, HbM Bostonのfull-CO型;  
 C, HbM Bostonのhalf-CO型。

Hb濃度: HbA, 7.7 mM; HbM Boston, 4.5 mM。

Buffer: 0.05M phosphate buffer, pH 7。

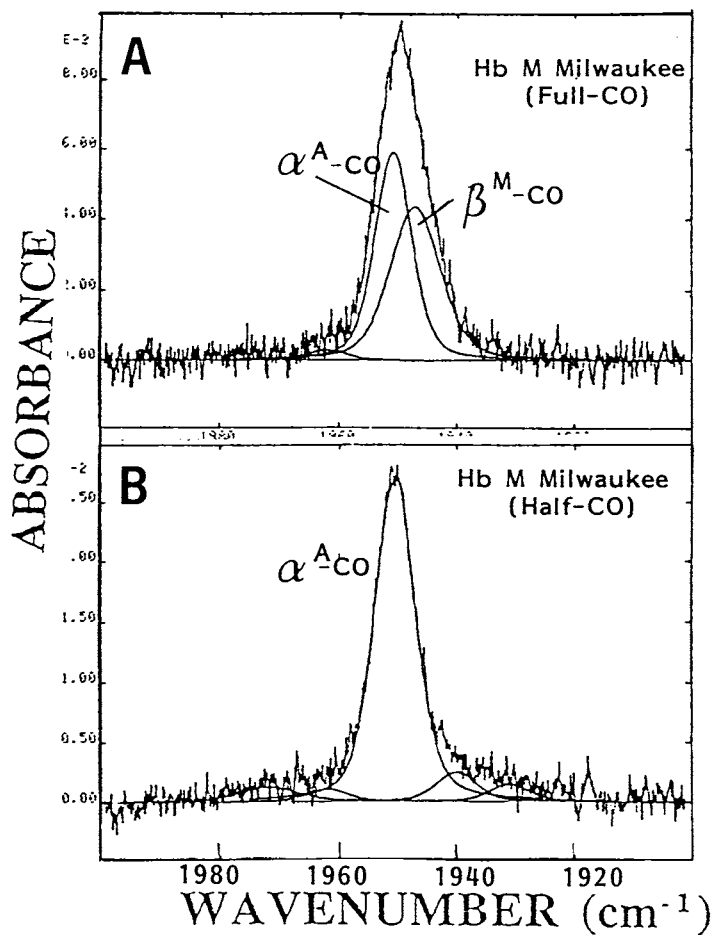


図 14. HbM Milwaukee COの赤外吸収スペクトル。  
 波型分析にはLorenzen (25%)・Gaussian (75%)で  
 band parameterは表2の値を用いた。

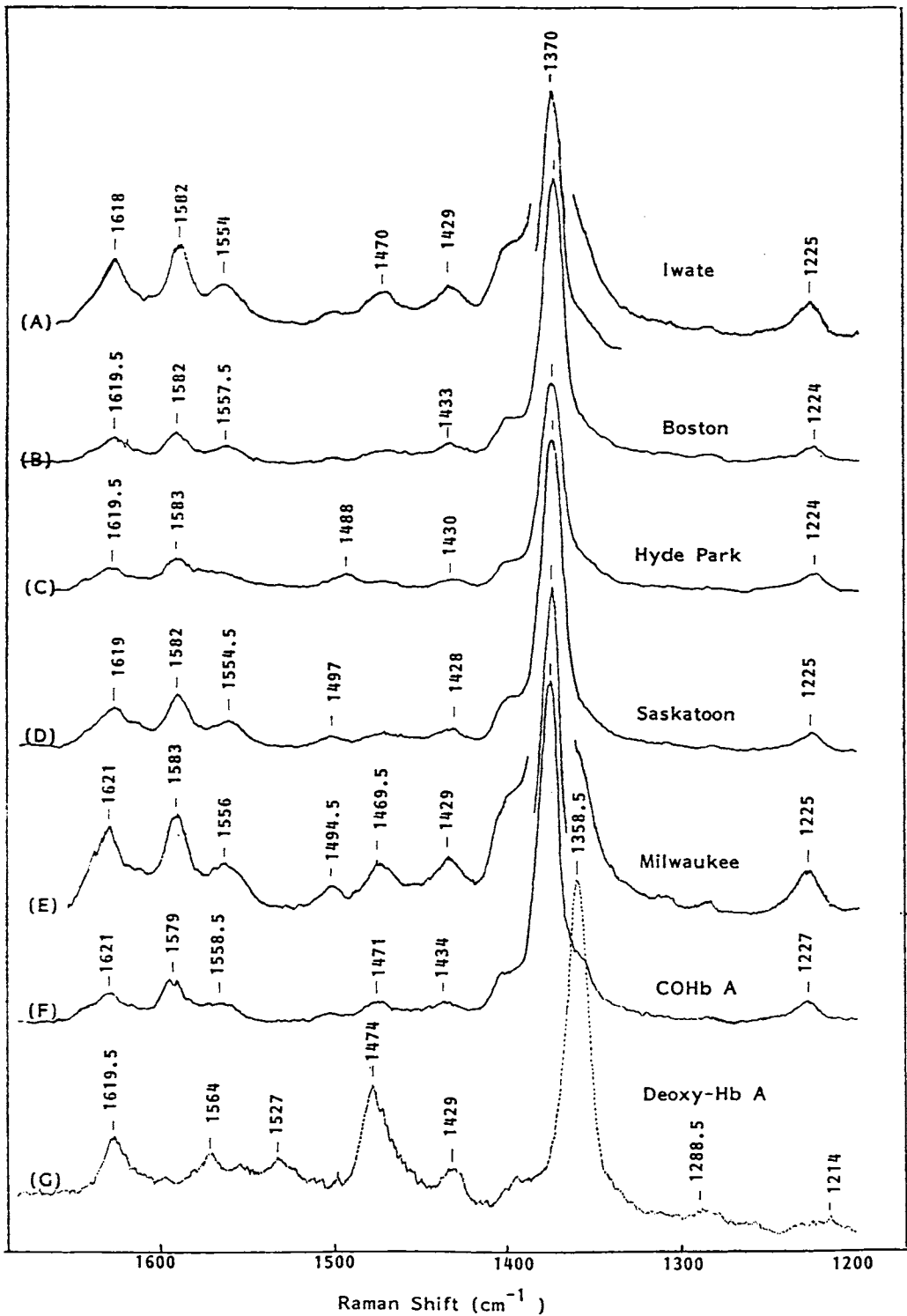


図 15. 高波数域のHbMCOの共鳴ラマンスペクトル。

測定条件:  $\lambda_0 = 406.7 \text{ nm}$  (クリプトンレーザー); power, 4 mW (at sample point); 0.05M bis-tris buffer, pH7, 0.1M NaCl含有; Hb, 100  $\mu\text{M}$  in heme.



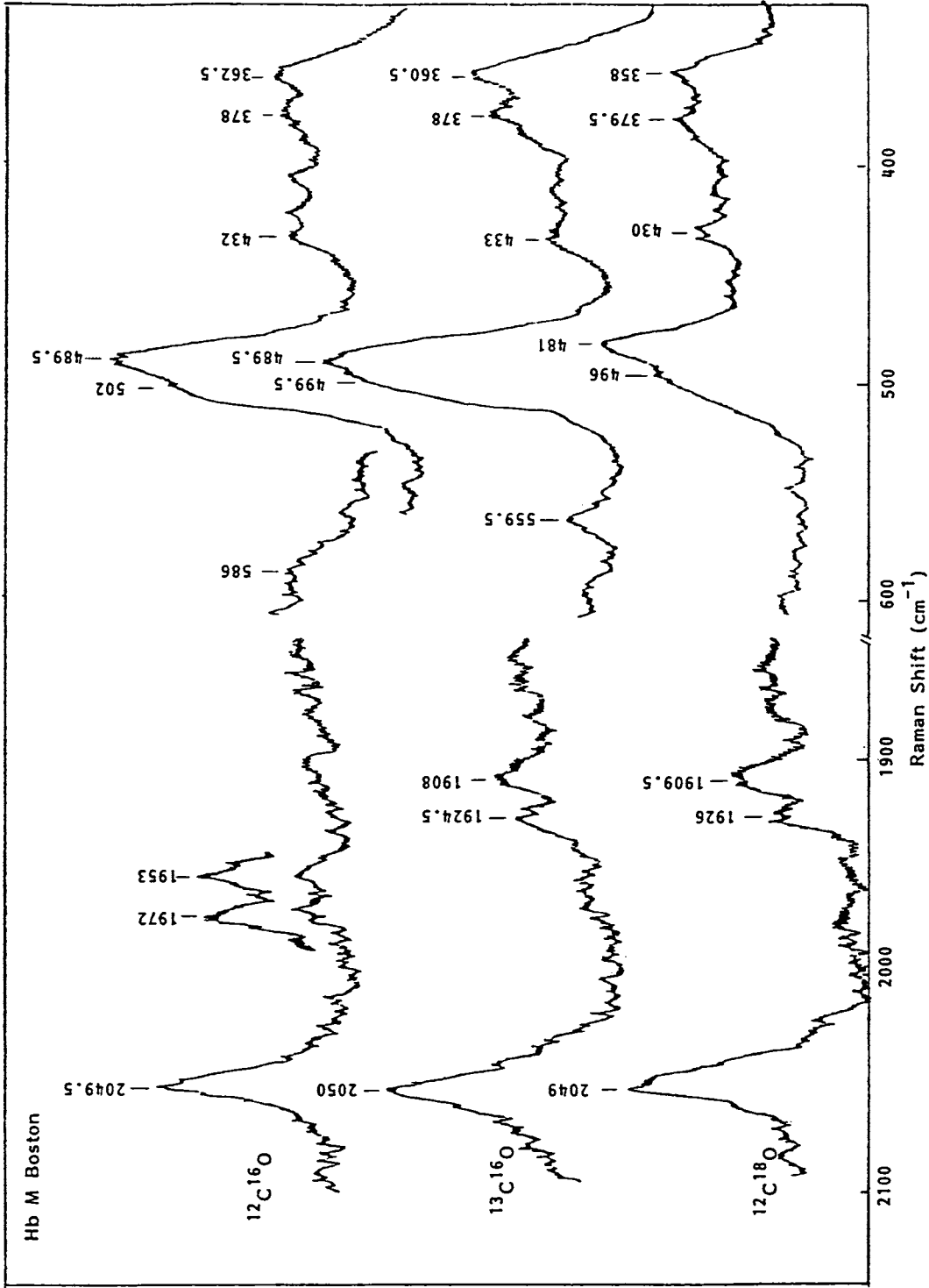


図 16. Hb M Boston CO の共鳴ラマンスペクトルに対する同位体置換効果。  
 測定条件は図 15 に同じ。99% enriched  $^{13}\text{C}$  および  $^{18}\text{O}$  を用い CO 由来  
 の振動バンドの同定を行う。2050  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_4$  +  $\nu_7$ ; 1950  $\text{cm}^{-1}$  付近,  $\nu_{\text{CO}}$ ;  
 500  $\text{cm}^{-1}$  付近,  $\nu_{\text{Fe}-\text{CO}}$ 。

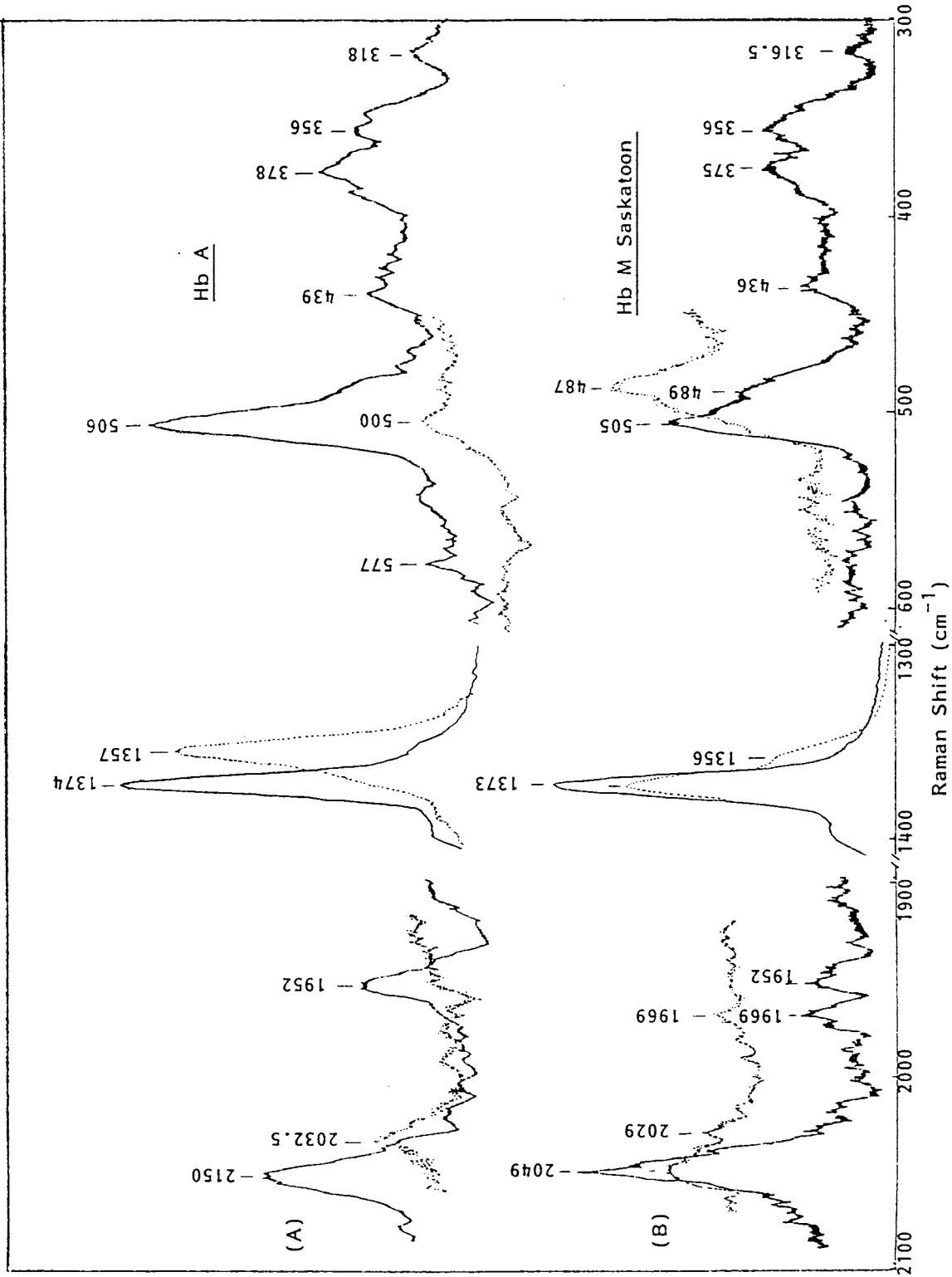


図 17. HbM SaskatoonCOとHbA COの共鳴ラマンスペクトル。  
 —, 回転セル (1800 rpm); ..... , 静止セル。



GAUH6805.002.  
DATE 11-8-87  
TIME 16:15

SF 125.772  
G1 1000.000  
SI 16384  
TD 16384  
SW 50000.000  
HZ/PT 6.104

PH 10.0  
RD 1.000  
AQ .164  
RS 100  
NS 100000

DE 15.0  
DW 10  
FX 62500  
G2 9000.000  
GP 8H CPD

LB 15.000  
GB 0.0  
NC 4  
CX 25.00  
CY 0.0  
F1 249.998  
F2 -50.005  
X1 .02  
DC 1.000  
HZ/CM 1.509E3  
PPH/CM 12.000  
IS 1  
SR -10569.68

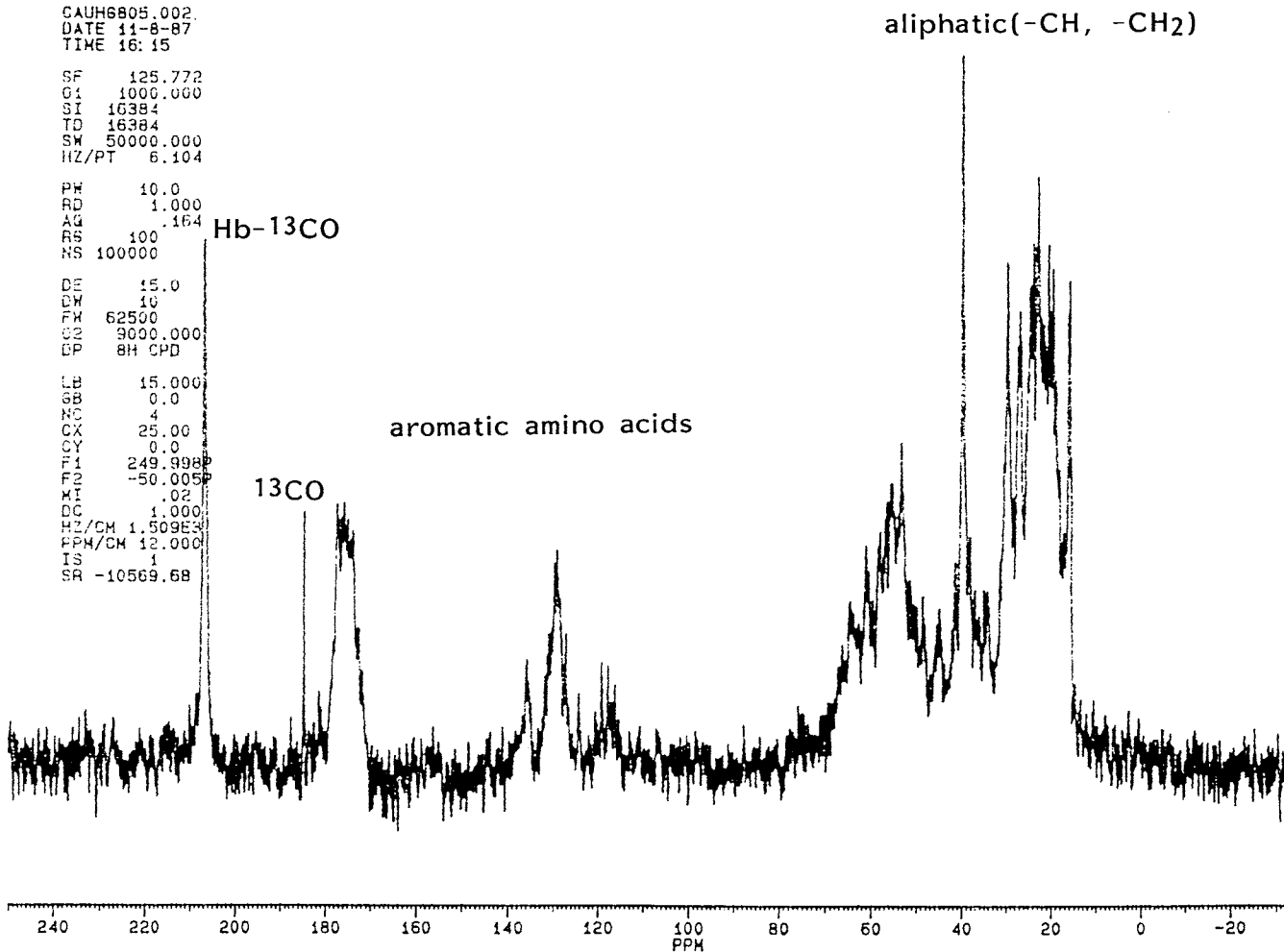


図 18. HbM Hyde Park-<sup>13</sup>Cの<sup>13</sup>C-NMRスペクトル。  
測定条件: 0.05Mリン酸緩衝液, pH7, 25%D<sub>2</sub>O, 1mM Hb.  
500MHz FTIR (Bruker PTS-500)。

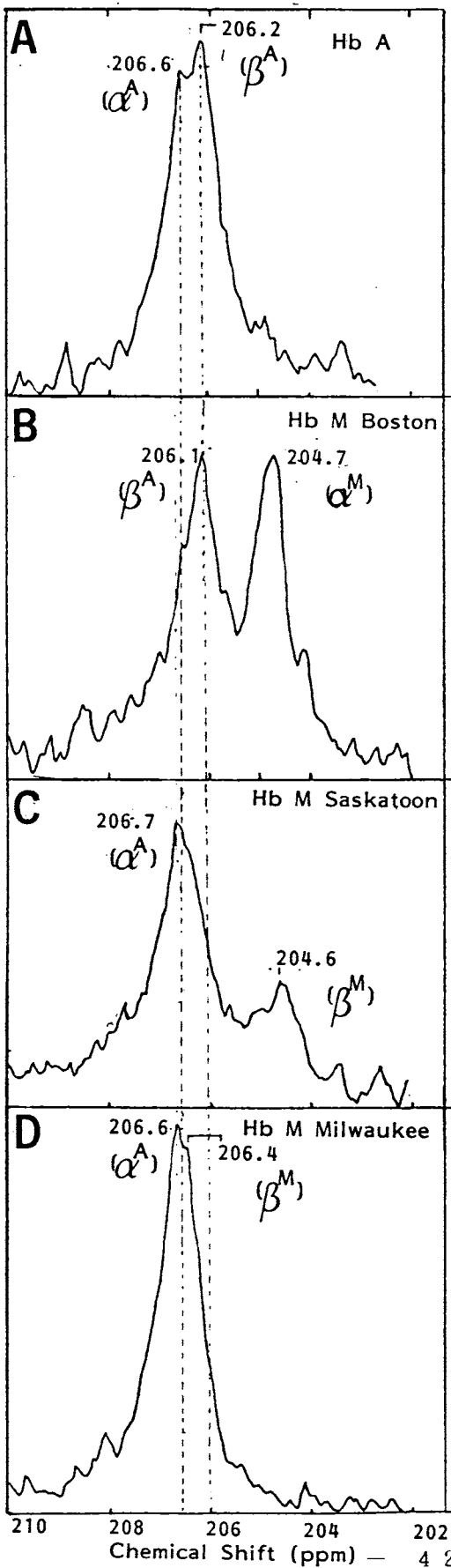


図 19. HbM<sup>13</sup>Cの<sup>13</sup>C-NMRスペクトル。  
 HbM Milwaukee, HbM Bostonは精製Hbを使用、  
 HbM Saskatoonには20%程HbAが混在している部分精製Hb  
 を使用。あとの条件は図18に同じ。

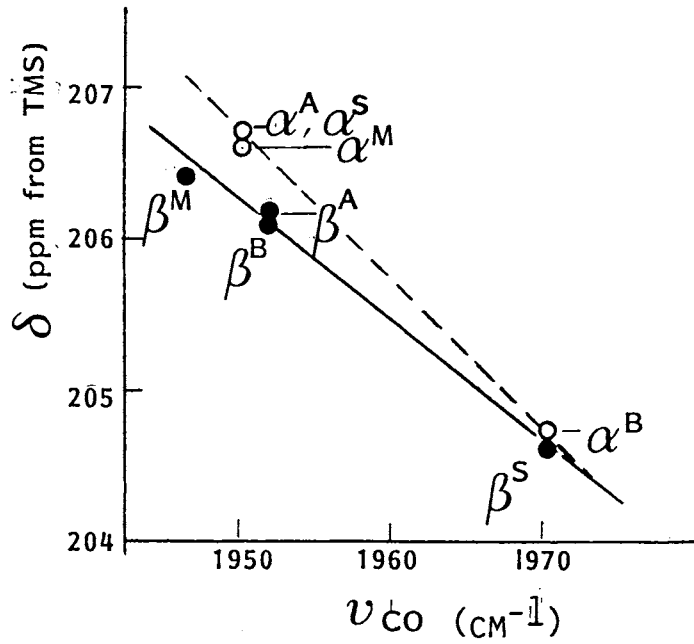


図 20. CO伸縮振動 ( $\nu_{CO}$ ) と化学シフト ( $\delta$  ppm) との相関関係。

A, HbA; B, HbM Boston; M, HbM Milwaukee;  
S, HbM Saskatoon.

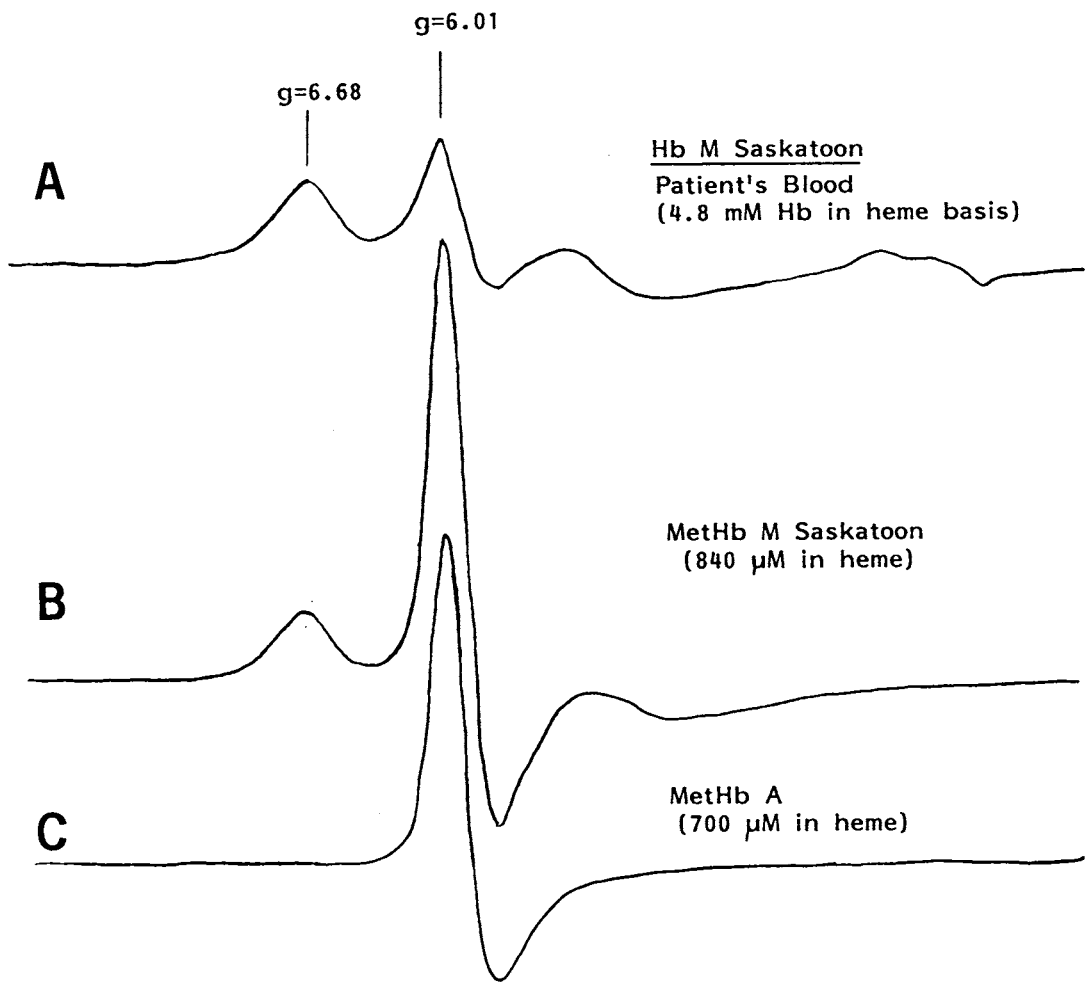


図 21. HbM Saskatoon 症患者全血の ESR スペクトル。

A, 患者全血; B, 精製メトHbM Saskatoon;

C, メトHbA.

ESR測定条件: 周波数, Xバンド (9.35 GHz), 温度, 4.2 K.

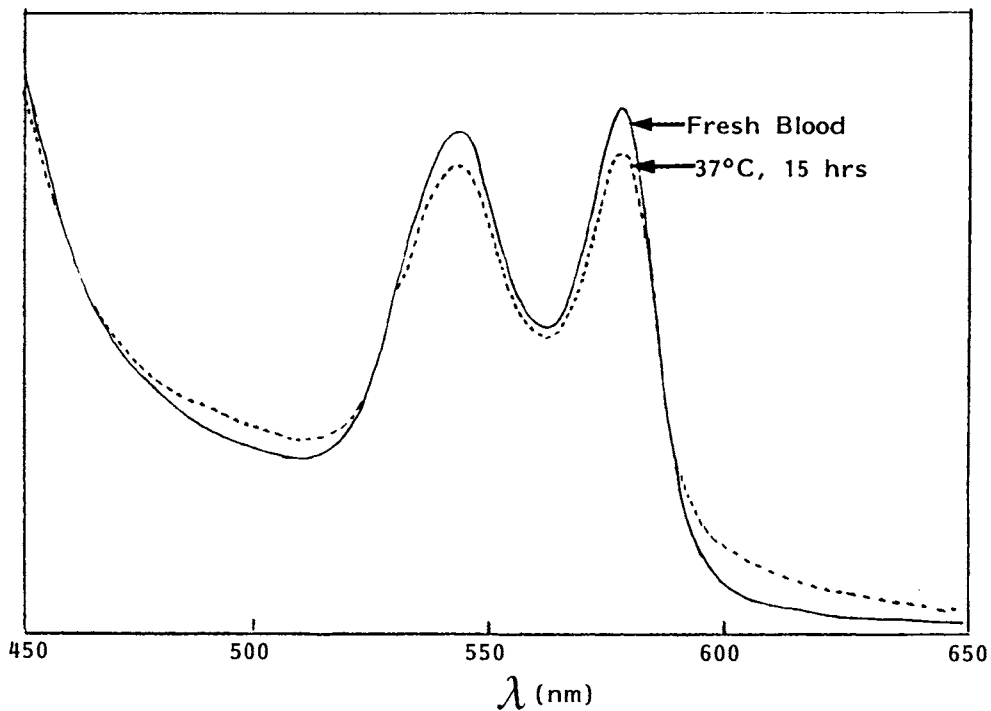


図 22. HbM Saskatoon 症患者溶血液の吸収スペクトル。  
 ————, 新鮮血; ..... , 37°C, 15 h incubate.  
 全血のままインキュベートし、その後溶血して遠心、上清の吸収スペクトルをとる。

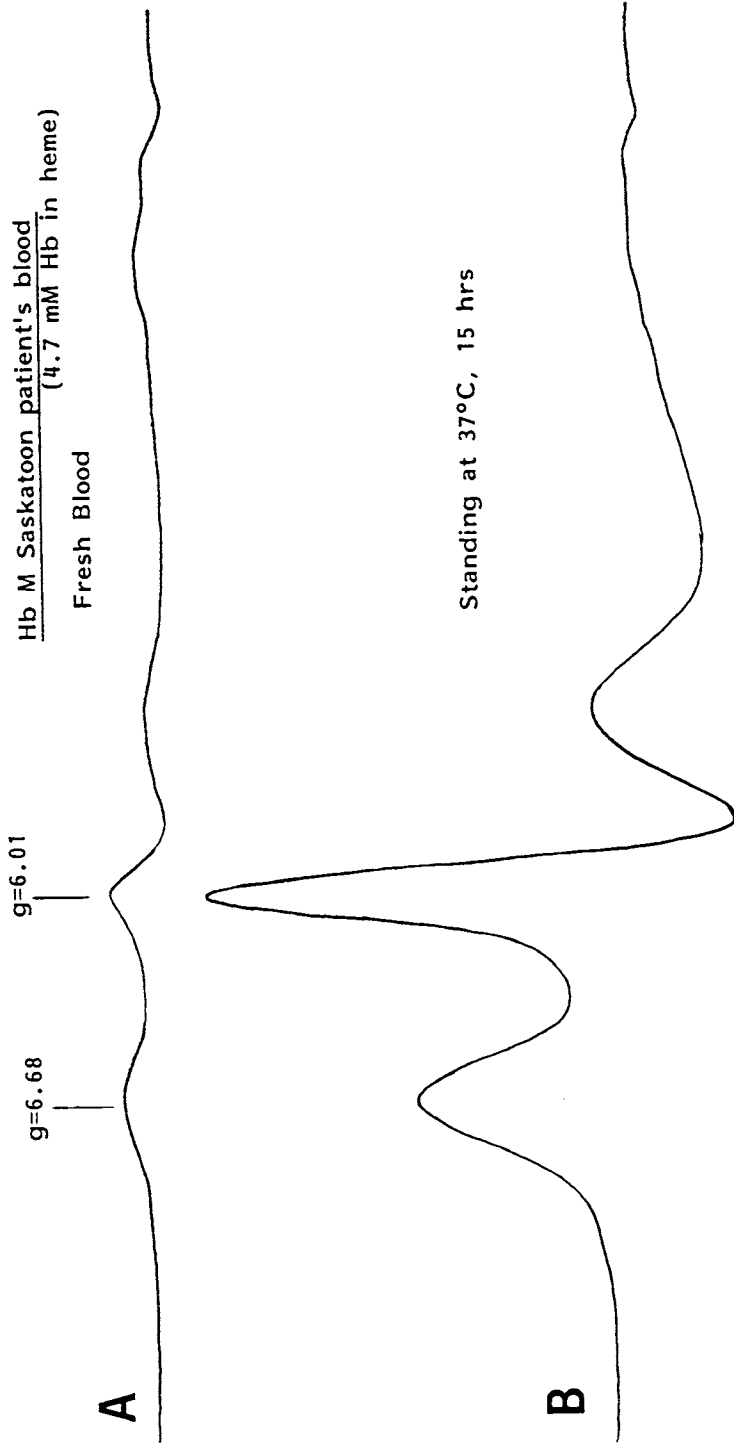


図 23. HbM Saskatoon 症患者血液の ESR スペクトル。  
A, 新鮮血; B, 37°C, 15 h incubate.



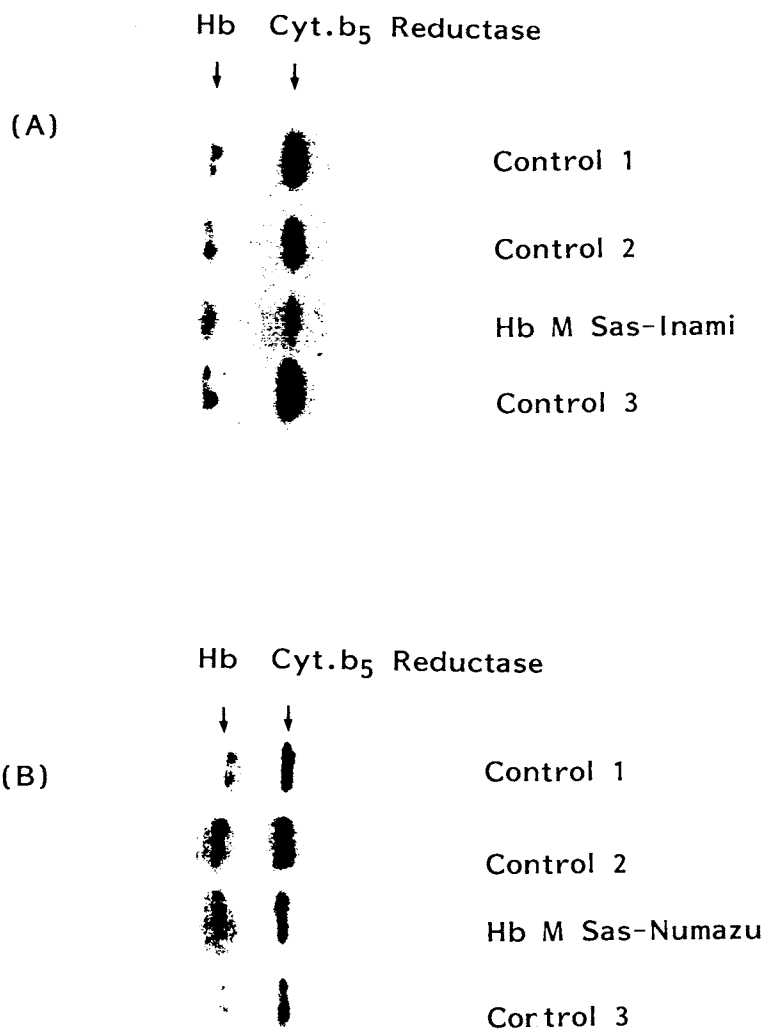


図 24. Hb M Saskatoon 症患者溶血液における NADH-チトクロム b<sub>5</sub> 還元酵素活性 (活性染色)。

溶血液の一定量を等電点電気泳動し、ゲルをチトクロム b<sub>5</sub>, NADH, MTT 液中に浸すと、酵素活性のあるところが紫色となる。Hb も非特異的に MTT を還元するので少し発色。

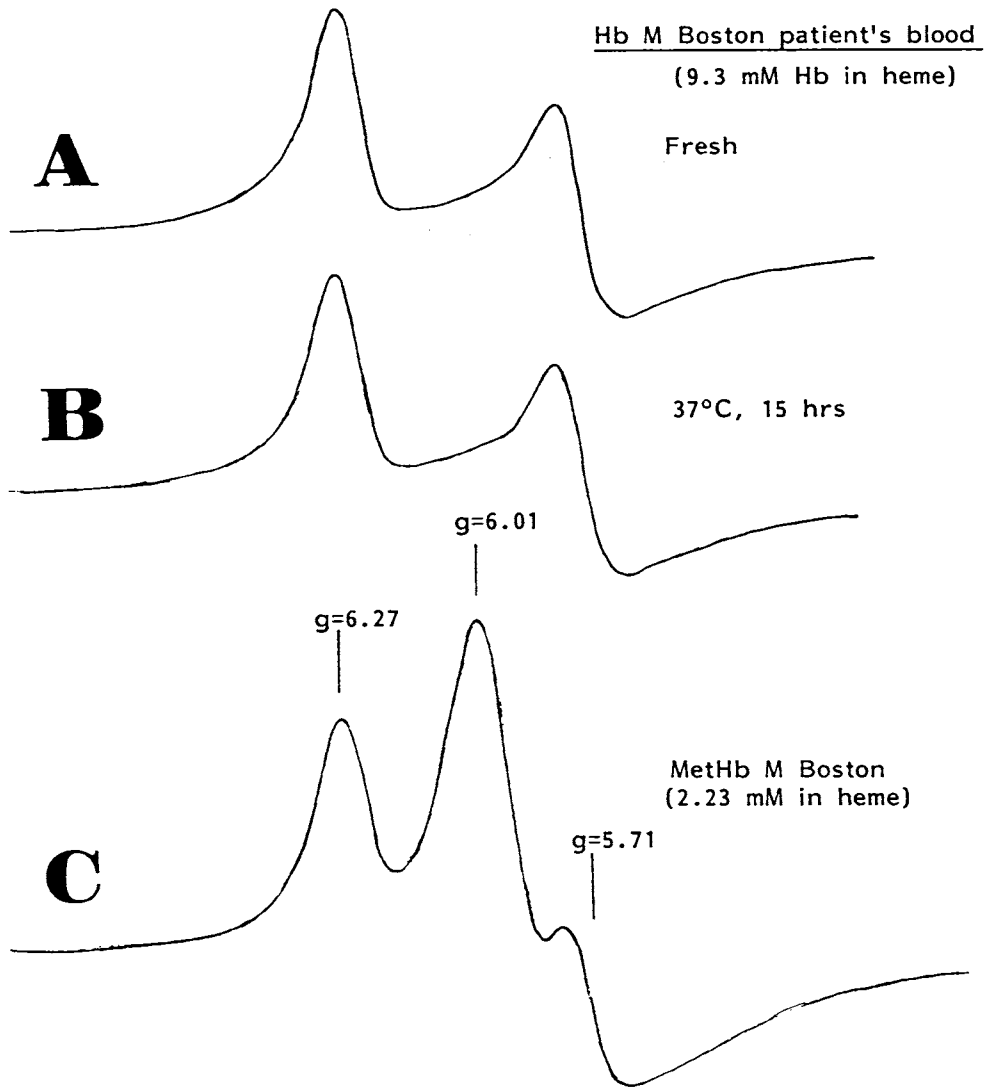


図 25. Hb M Boston 症患者全血の ESR スペクトル。  
 A, 新鮮血; B, 37°C, 15 h incubate;  
 C, 精製メトHb M Boston.

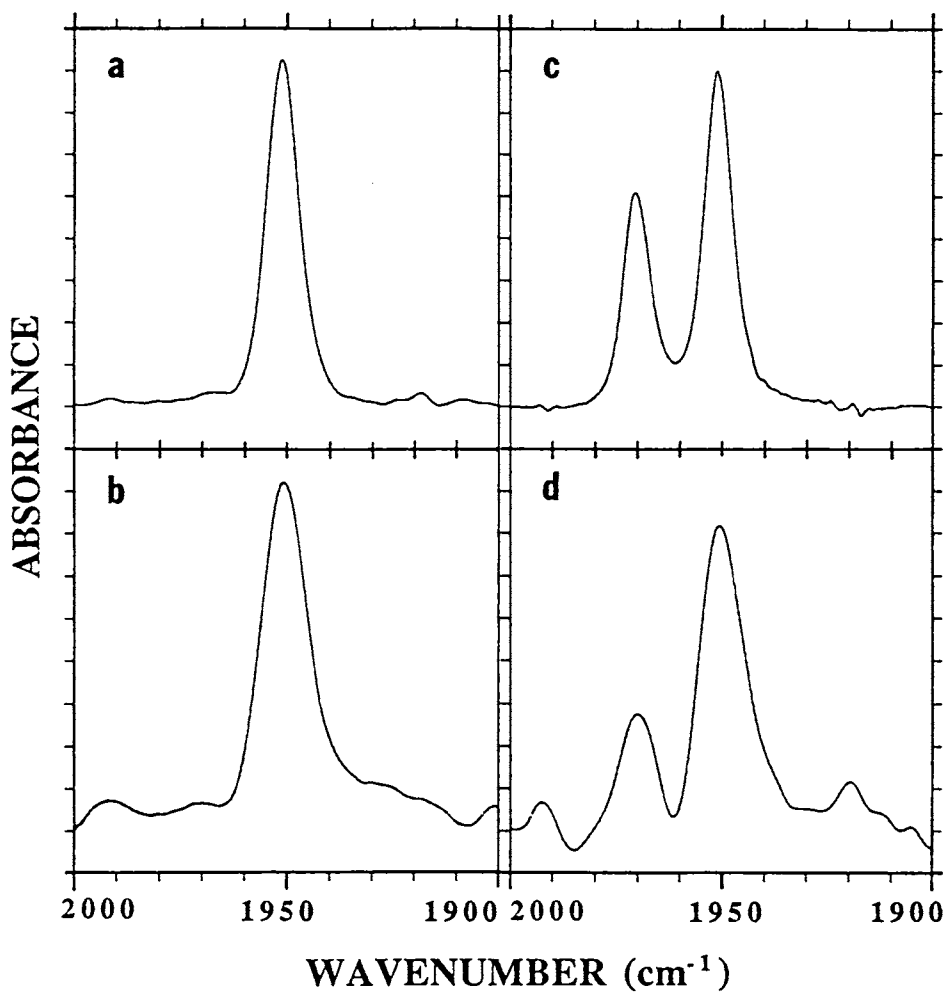


図 26. 赤血球におけるHbCOの赤外顕微分光.

- a, HbACO (溶液); b, 正常赤血球一個におけるHbCOスペクトル;  
 c, 精製HbM Saskatoonのfull-CO型 (溶液);  
 d, HbM Saskatoon症患者赤血球一個におけるHbCOスペクトル  
 (dithionite含有)。

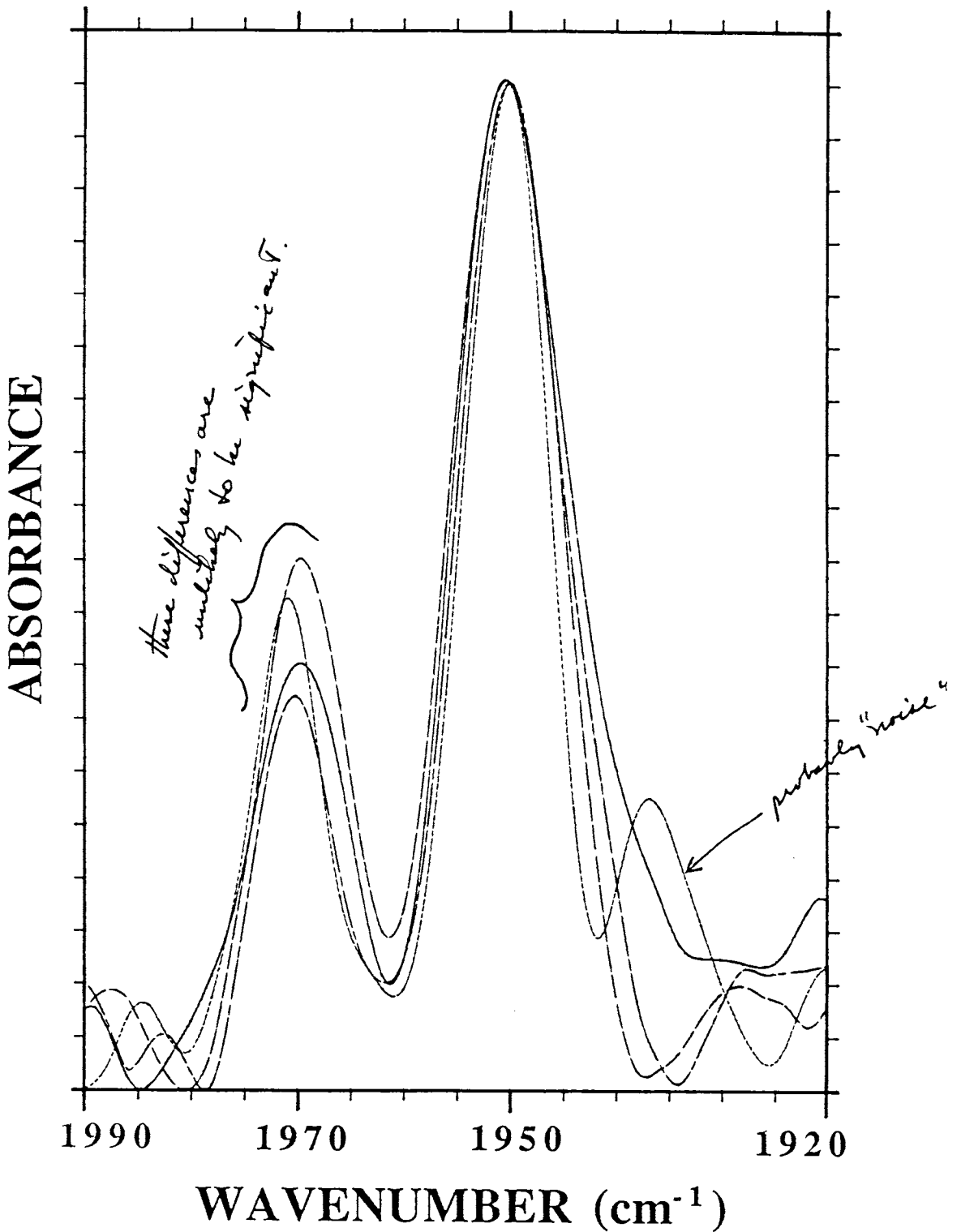


図 27. HbM Saskatoon 症患者的赤血球の HbCO 赤外吸収スペクトル。

4 個の赤血球について、それぞれ測定したものを重ねてある。