

ヘモグロビンの初期変性物と思われる Hb Fr. 3

川崎医科大学 生化学(Ⅲ)教室

山崎壽子・井内岩夫

(平成3年9月27日受理)

Some characterization of physical and chemical nature of Hb Fr. 3
produced by the cold room storage of hemolysate

Toshiko YAMASAKI, Iwao IUCHI

Department of Biochemistry

Kawasaki Medical School

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on September 27, 1991)

概 要

溶血液の長期保存中(4°C)に、HPLCや電気泳動により検出される新たな血色素(Hb)の形成を認めた。これを我々はHbの初期変性物と考えFr.3と呼び、異常血色素と区別する為、その特徴を調べ構造解析を行った。Fr.3は陽イオン交換HPLCではHbA_{1c}とHbA₀との間に検出され、等電点電気泳動(IEF)ではHbA₀やHbA_{1c}よりも+側に泳動された。またゲル濾過により小分子を除いておくと、Fr.3の形成は認められなかった。Fr.3のβ鎖を分離し、トリプシン消化により得た各ペプチドのアミノ酸組成、アミノ酸配列を調べた結果、Fr.3の特徴的な変性部位がCoreにあることがわかった。さらにPCMBによるSH基の検出法によりβ鎖93番目のCys-SHが修飾を受けていることがわかった。

Abstract

A new hemoglobin (Fr. 3) was demonstrated when hemolysate was stored at 4°C for more than one month, which was detected by HPLC and isoelectric focusing (IEF). The Fr. 3 appeared at site between the peaks of HbA₀ and HbA_{1c} in cation-exchange HPLC chromatogram, and was separated as sharp Hb band with lower isoelectric point than HbA₀ and HbA_{1c} by IEF. This new product, however, was not detected when the hemolysate was treated with Sephadex G-25 (gel-filtration) before storage. Structural analysis of Fr. 3 established SH radical of β 93 Cys-SH was chemically modified.

はじめに

生体成分を検査、研究する場合、できるだけ試料の新鮮なうちに操作することが原則である。当研究室においても異常血色素の研究の為に新鮮な血液試料を用いる事を原則としているが、例えば一週間分のサンプルを収集した後、研究室に輸送、処理する等の場合、全ての試料を新鮮なうちに、ということは事実上困難である。そこでしばしば冷蔵保存にたよることになるが、この保存による成分の分解、変性も無視できない。

今回我々は正常ヒト溶血液を4℃にて保存するとその前処理の如何により新たな血色素が溶血液中に形成されることを見出した。これは正常血色素の分解又は変性により形成された血色素と考えられ、異常血色素とは区別しなければならない。そこでまずこの変性血色素の特徴を調べ、その構造決定を行ったので報告する。

材料と方法

- I. 溶血液：正常ヒト血液を常法に従って調製した溶血液を4℃にて一か月以上保存し、Fr. 3を含む溶血液を得た。¹⁾
- II. 陽イオン交換 HPLC：カラムは TSKgel CM-3SW (東洋曹達) を用い、緩衝液はヒストリス緩衝液 (0.03M, pH6.4, 0.0015M KCN を含む) とし、酢酸ナトリウムの濃度勾配 (0.03 M→0.15 M) により溶出した。Hb の検出波長は254 nm を用いた。²⁾
- III. Hb の PCMB 化：0.1 g/dl の PCMB (p-Chloromercuribenzoic acid) と一酸化炭素型とした Hb とを、4℃で一夜反応させた。溶媒には0.15Mリン酸緩衝液 (pH5.9) を用いた。
- IV. Hb のトリプシン消化物の HPLC による分離：脱ヘムした Hb ないしは精製した α 、 β 鎖を1/100量のトリプシン (Tp) とともに pH8.2, 37℃の条件下で3時間消化を行い、pH6.4での可溶性分画を HPLC にかけて分析した。カラムは Cosmosil 5C₁₈-AR (半井化学) を用い、緩衝液はトリエチルアミン-酢酸緩衝液 (0.01 M, pH6.0) とし、アセトニトリルの濃度勾配 (0%→40%) により溶出した。ペプチドの検出波長は214 nm を用いた。³⁾
- V. SH 基の定量：0.01 M リン酸緩衝液 (pH6.8) で希釈した溶血液とモル比で0~30倍量の PCMB 系列液とを反応させ、波長250 nmにおける吸光度を測定した。⁴⁾

成 績

4℃にて1カ月以上保存した溶血液（正常ヒト血液由来）の陽イオン交換 HPLC による溶出パターンを図1に示した。新鮮な溶血液からは、HbA_{1c}、HbA₀、HbA₂が順に検出されたが、保存溶血液にはさらに新たなHbのピーク、Fr.3がHbA_{1c}とHbA₀とのピークの間を観察された。このFr.3の形成はIEFによっても確認された(図2)。しかし新鮮な溶血液からゲル濾過により小分子を除いておくとFr.3の形成速度が遅くなり、1~2か月の保存では事実上その形成はなかった。このFr.3をα鎖とβ鎖に分けそのでんぶんゲル電気泳動像をコントロールのHbA₀の場合と比較するとβ鎖の泳動パターンが互いに異なっていた(図3)。

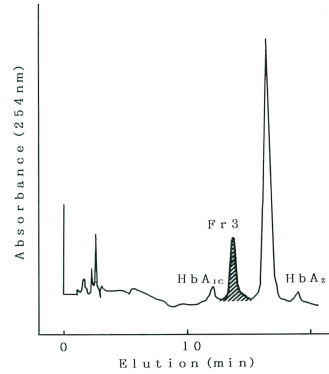


図1 陽イオン交換 HPLC による保存溶血液の溶出

陽イオン交換 HPLC, 次いで逆相 HPLC を用いて分取したHbA₀とFr.3とのβ鎖をTp消化し、逆相 HPLC に

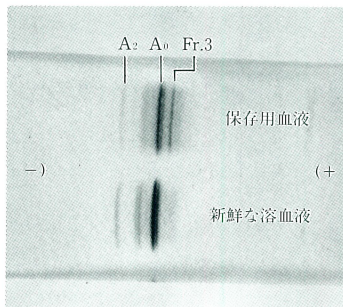


図2 IEFによる溶血液の泳動像

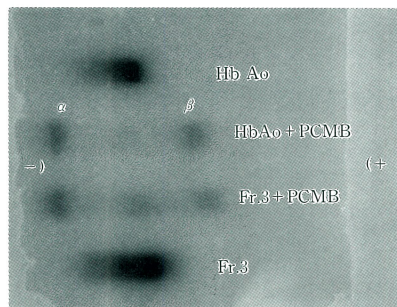


図3 PCMB化HbA₀およびFr.3の でんぶんゲル電気泳動による泳動像

かけ各ペプチドに分離した(図4)。するとHbA₀にはみられない溶出ピーク、βTpXがFr.3に観察された。そこでPICO TAGアミノ酸分析器(Waters社)によりこのβTpXのアミノ酸組成を調べた。その結果このβTpXは、βTp10+11のアミノ酸組成と一致した(表1)。さらにペプチドシーケンサー(Applied Biosystems社)にかけてアミノ酸配列を調べると、Fr.3特有のピークはβTp10とβTp11とが結合したものであることがわかった。

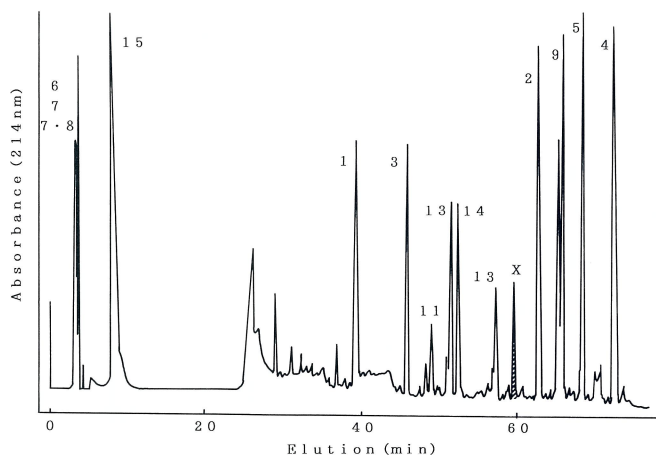


図4 逆相 HPLC による Tp 消化 Fr. 3 の β 鎖の溶出

次に Fr. 3 と HbA₀ の SH 基含量を調べ、比較した。HbA₀ が PCMB と 1 : 2 のモル比で反応しているのに対して Fr. 3 は PCMB と反応しなかった(図5)。このことより Fr. 3 では β 鎖93番目(Tp10)の Cys が何らかの修飾を受けていると考えられた。

表 1

TpX (Fr. 3) のアミノ酸組成

…ASP, Glu, Glyの値は操作上の誤差を含む

	β T p X	β T p 1 0 + 1 1 の理論残基数
Asp	2.66	3
Glu	3.54	2
Ser	1.33	1
Gly	2.18	1
His	1.76	2
Arg	1.05	1
Thr	1.72	2
Ala	0.94	1
Pro	0.90	1
Val	0.96	1
Leu	3.45	3
Phe	2.01	2
Lys	1.12	1

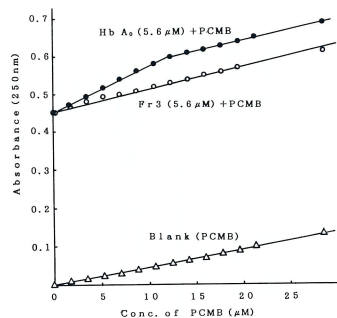


図5 HbA₀, Fr. 3 中の SH 基の定量

考 察

正常ヒト溶血液を 4℃ で 1 カ月以上保存すると既知の生理的 Hb とは異なる Hb (Fr. 3) が無視し得ない量 (3 ~ 17%) で検出された。これは Hb の長期保存による変性産物であり、異常 Hb とは区別しなければならない。また溶血液をゲル濾過 (Sephadex G-25) 後に同様の条件下で保存しても Fr. 3 が形成されにくい。このことから赤血球中の小分子が Fr. 3 の形成に関与していることが考えられた。また IEF の結果より (図 2) Fr. 3 が HbA₀ より負に荷電していることがわかった。PCMB 処理 Hb のでんぷんゲル電気泳動より β サブユニットの異常が観察された (図 3) のでまず β 鎖の N 末端以外の Lys 残基にグルコースが結合したと⁵⁾考え、Tp 消化後の β 鎖の各ペプチドについて質量分析を行った。しかし測定したどのペプチドにも分子量 (180-18) の増加や他の物質の化学結合を疑う成績はなくこれらの仮定は否定し得た。またこの質量分析の結果で一部の β Tp13 の Thr から脱水が起こっていたことが確認された。これは図 4 では 2 つの β Tp13 のうち溶出時間の遅い方のピークとして現れているが、この脱水 β Tp13 は HbA₀ と Fr. 3 との両者に共通に含まれていたため今回検索中の Fr. 3 を特徴づける変化ではなかつ

た。また私共の質量分析法 (SIMS 法)⁶⁾ においては質量数1500以上の分子は測定困難で今回 β Tp5, β Tp9 および Core の質量分析は行えなかった。

Fr. 3 の β Tp 消化物の HPLC パターンに HbA₀ にはみられない未知のピーク (TpX) が現れた。これをアミノ酸分析にかけてアミノ酸組成を調べると、 β Tp10 と β Tp11 の等量混合物と同じ組成であること、さらにペプチドシーケンサーによるアミノ酸配列検査によりこの β TpX は β Tp10 と β Tp11 とが結合したものであることがわかった。 β Tp10 と β Tp11 は Core と呼ばれる不溶性画分に含まれており、HPLC ピークとしては通常検出されない。これらの結果より Fr. 3 の変性部位が Core にあることが示唆された。

β 鎖の Core は Tp10, Tp11 および Tp12 であるが、そのうち今回 Tp10 と Tp11 が可溶性となり HPLC にて検出された。この2つのペプチドの中で比較的变化を受けやすいと思われるアミノ酸に β 93 の Cys がある。 β 鎖の三次構造を考えるとこの Cys は internal に位置するが、リガンドの付加により酸化などを受けやすくなる。そこでこの Cys が何らかの修飾を受けていることが考えられたので、SH 残基の定量を行った。HbA₀ には PCMB と反応する β 93Cys が2個あるので PCMB と 1 : 2 のモル比で反応した。他方 Fr. 3 は PCMB と反応しなかったことより Fr. 3 の β 93Cys が何らかの修飾を受け、PCMB と反応しない状態にあることが考えられた。

Fr. 3 形成には赤血球内の小分子が関与し、また Fr. 3 分子は HbA₀ と比べ負に荷電していること等を合わせて考えると、Fr. 3 の β 93Cys の SH 基が酸化されて $-\text{SO}^-$ (sulfoxide) 又は $-\text{SO}_2^-$ (sulfonic acid) になっていることが推定され、おそらくこの酸化に関与する小分子は酸化型グルタチオンやアスコルビン酸などの酸化剤であろうと推定している。この推定は、ゲル濾過後の溶血液をより長時間 (半年以上) 保存すると、溶存酸素などによる酸化を受け、少量の Fr. 3 の形成がみられた事実とも矛盾しない。

参 考 文 献

1. Jonxis, J.H.P. and Huisman, T.H.J.: A laboratory manual on abnormal hemoglobins. Oxford and Edinburgh, Blackwell, 1968
2. B. BISSE and H. WIELAND: HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF HUMAN HAEMOGLOBINS, SIMULTANEOUS QUANTITATION OF FOETAL AND GLYCATED HAEMOGLOBINS. J. Chromatogr., 434: 95-110, 1988
3. 日高 和夫, 井内 岩夫, 島崎 俊一: 異常血色素に関する研究IX: 異常血色素のトリプシン消化物の高速液体クロマト法による分離と同定について。川崎医学会誌, 一般教養篇, 10: 49-54, 1984
4. Susumu SHIBATA, Iwao IUCHI, Takaoki MIYAJI, Satoshi UEDA and Isamu TAKEDA: Hemolytic Disease Associated with the Production of Abnormal Hemoglobin and Intraerythrocytic Heinz Bodies. ACTA HAEM. JAP. 26: 164-173, 1963
5. Robert Shapiro, Michael J. McManus, Clyde Zalut and H. Franklin Bunn: Sites of Nonenzymatic Glycosylation of Human Hemoglobin A. J. Biol. Chem. 255 (7): 3120-3127, 1980
6. Kazuo HIDAKA and Iwao IUCHI: Structural Analysis of Human Hemoglobin Variants by

- Molecular Secondary Ion Mass Spectrometry. KAWASAKI MEDICAL JOURNAL, 15(2): 53~58, 1989
7. H. LEHMANN, R.G. HUNTSMAN: MAN'S HAEMOGLOBINS. NORTH-HOLLAND PUBLISHING COMPANY, AMSTERDAM, OXFORD. 1974
 8. John S. Sack, Lawrence C. Andrews, Karen A Magnus, Jonathan C. Hanson, Jonathan Rubin & Warner E. Love: LOCATION OF AMINO ACID RESIDUES IN HUMAN DEOXY HEMOGLOBIN, HEMOGLOBIN, 2(2): 153-169, 1978