1F1415

単一酸素電極によるヘモグロビン酸素解離曲線の自動測定. (2) 携帯型装置の試作

○今井 清博 (阪大院・医学系・情報生理)

筆者は、以前に、単一の酸素電極を用いてヘモグロビンの酸素解離曲線を自動測定する下記の原理を考案した (Imai, 1977, 1982)。セルに入れた緩衝液を攪拌しながら、気相中の酸素分圧を零に保って液相中の溶存酸素を気相中に拡散させると、液相中の酸素分圧の対数 ($\log(p/p_0)$; p_0 は p の初期値) は時間に対して直線的に減少する。しかるに、ヘモグロビン溶液の場合には、初めは $\log(p/p_0)$ は直線的に減少するが、ヘモグロビンが実質的に酸素を解離し始めると、このセミログプロットは直線から上方へ外れる。この、セミログプロットの、初期の直線からの縦軸方向のずれの距離に関して p/p_0 を積分すると、酸素飽和度を p の関数として求めることができる。この方法では、分光光度計が不要なので、低コストで、装置を小型化できると、さらに赤血球浮遊液のような懸濁液でも使えるという長所がある反面、解析がやや面倒であった。近年、パソコンの小型化と高性能化に伴い、上記の長所を生かし、短所を補うことが可能となった。今回、小型セルの設計、小型酸素電極増幅器、ノート型パソコンなどの利用による携帯型酸素解離曲線自動解析装置を試作した。増幅器、磁気攪拌器、圧電式空気ポンプは充電式バッテリーで駆動、小型の超高純度素素ポンプ使用。酸素分圧信号は A/D 変換器を通じてパソコンで実時間収集し、解析。プログラミングは BASIC を使用。本装置は実用化されれば、野外での動物血液の生理機能の研究、高地適応の研究、宇宙飛行士、高圧酸素治療患者、運動選手の呼吸機能のモニタリングなどに有用であると考えられる。本研究は、(財) 中谷電子計測技術振興財団研究助成金の援助を受けた。文献: 今井清博 (1977) 第 15 回日本生物物理学会年会予稿集, p. 381.; Imai, K. (1982) Allosteric Effects in Haemoglobin, Cambridge University Press, London.

K. Imai : Automatic measurement of the oxygen dissociation curve of hemoglobin using a single oxygen electrode. (2) a portable apparatus

1F1445

Hb M Boston の正常鎖への CO 結合による異常鎖へム近傍の構造変化

○長友 重紀¹, 堀 洋², 神 弥生³, 長井 雅子³, 北川 禎三¹ (¹ 分子研, ² 阪大・基礎工, ³ 金沢大・医)

【序】Hb(ヘモグロビン)は酸素結合に伴い酸素親和性の増大という協同性を有する。これは酸素結合に伴う四次構造変化によると考えられている。それが生じるのは α -ヘム、または β -ヘムへ酸素が配位した効果がまだ酸素の配位していないヘムへ伝わり、そのヘムの酸素親和性を上げているためと考えられている。しかし直接個々のヘムに対する酸素親和性の変化を調べるのは容易ではないので、その伝達の影響を調べるのは難しいが、Hb M のように一方のヘムが Fe^{3+} の場合、 Fe^{3+} には O_2 、CO が結合できないので Fe^{3+} の変化を追うことで Fe^{2+} に配位した効果が調べられる。以前の年会 (第 34 回 1996) で Hb M Boston を用いて pH の違いによるその効果を論じたが、今回可視、紫外共鳴ラマン等でさらに重要な実験結果が得られたのでそれを報告する。【結果・考察】(以下の文章での比較は pH7 と pH9 での α (Fe^{3+}) β (Fe^{2+} -CO) とする。) Soret 帯励起の可視ラマンでの比較では α -ヘム (Fe^{3+}) の ν_2 、 ν_3 バンドの変化が観測され、pH9 にすると α -ヘム (Fe^{3+}) の配位数の割合の変化 (5 配位高スピン $\rightarrow$ 6 配位高スピン) が生じたと考えられる。 α -ヘムでは遠位側から Fe-Tyr の配位があるので、6 配位性の原因は近位 His 側からの寄与となる。紫外共鳴ラマン (UVR) では主に Trp バンドの変化が観測された。過去の実験から 235nm 励起での Trp のバンドの変化は主に Trp β 37 に由来するとされるが、pH9 ではこの Trp バンドは T から R 型に変化し、Trp β 37 に影響が生じたことを示唆している。Trp β 37 は Asp α 94 と Deoxy 状態 (T 構造) では水素結合をしているが、R 構造ではその水素結合が存在しないことが明らかにされているので、UVR の結果は Aspa94 を含む α -FG コーナーの変化を示唆する。したがって pH9 での α -ヘムの EPR の g 値異方性の増大は、 β -ヘムへの CO 結合 $\rightarrow$ Trp β 37 の変化 $\rightarrow$ Asp α 94 の変化 $\rightarrow$ His α 87 の変化によって引き起こされたと考えられる。

S.Nagatomo, H.Hori, Y.Jin, M.Nagai and T.Kitagawa : Structural changes of the Heme in abnormal subunits upon CO-binding to normal subunits of Hb M Boston: Resonance Raman and EPR studies

1F1430

Studies on Metal Substituted Hybrid Dimeric Hemoglobin

○Venkatesh Balan¹, Miyazaki Gentaro¹, Imai Kiyohiro², Hori Hiroshi¹, Morimoto Hideki¹ (¹Facul. Eng. Sci., Osaka Uni., ²Osaka Med. Univ.)

It is widely accepted that there are no co-operative interactions in hemoglobin (Hb) dimer. However, direct experimental studies on it have been limited. There are two reasons for this. Firstly, it is difficult to obtain stable deoxy Hb dimer solution. Secondly, even if stable dimer solution be obtained, it is still difficult to study properties of deoxy dimer because it is susceptible to autooxidation and the properties are usually much affected, especially in the determination of the first oxygen binding constant. Recently Kiger et. al., (Biochemistry 1998, 37, 4336-4345) reported that Hb (β W37E) [Trp-37(C3) was replaced by Glu (β W37E)] is dimer even in deoxy form in μ M concentration region. We have prepared the same mutant Hb and substituted the Mg-protoporphyrin for one of the hemes to get two kinds of Mg-Fe hybrid dimer. In these dimers the oxygen binding affinity is not affected by the autooxidation. Properties of these mutant Hb (β W37E) and mutant hybrid Hb [α (Mg) β (Fe)], [α (Fe) β (Mg)] molecules were studied using molecular weight determination experiments, oxygen equilibrium measurement, Mass spectrometry, Absorption measurements and by EPR spectroscopic studies. Details of the results from these findings will be discussed.

B. Venkatesh, G. Miyazaki, K. Imai, H. Hori, H. Morimoto : Studies on Metal Substituted Hybrid Dimeric Hemoglobin

1F1500

紫外共鳴ラマン分光による Hb M Iwate と Hb M Boston の構造解析

○長井 雅子¹, 神 弥生¹, Li Renqiang¹, 安藝 理彦², 長友 重紀³, 北川 禎三³ (¹ 金沢大 医, ² 総研大 数物, ³ 分子研)

ヘモグロビン (Hb) のヘムは F-helix8 番目 (F8) の His (近位 His) と E-helix7 番目の遠位 His に挟まれた位置にあり、近位 His とヘム鉄とは共有結合している。遠位 His は酸素結合サイトにあり、結合酸素と水素結合を形成すると考えられている。Hb は α 鎖 2 個、 β 鎖 2 個からなる 4 量体であるが、Hb M Iwate (α 87His $\rightarrow$ Tyr) では α 鎖の近位 His が、Hb M Boston (α 58His $\rightarrow$ Tyr) では遠位 His がそれぞれ Tyr に置換した異常 Hb である。その変異によってヘム鉄が酸化しているのみならず、正常 β 鎖の酸素親和性が著しく低下しているのが特徴である。最近われわれは 235nm 励起紫外共鳴ラマン (UVR) によって Tyr や Trp の変化を通して Hb の 4 次構造変化をみてきた。Hb M Iwate や Hb M Boston では正常 β 鎖に CO が結合しても UVR の変化は非常に小さく、両 Hb M 共 β 鎖の CO 結合の有無に拘わらず 4 次構造は deoxy 型 (T) のままであることが分かった。しかし、変異した Tyr に関する情報は 235nm UVR では検出できなかった。そこで、244nm に励起波長を変えたところ 1605, 1166 cm^{-1} に明瞭な tyrosinate 由来のラマンバンドが検出され、変異 Tyr は Fe(III)-tyrosinate の形でヘム鉄に結合していることが判明した。この特徴的ラマンバンドは異常鎖を還元すると消失した。還元によりヘム鉄と Tyr との結合は切れ、ヘム鉄は Hb M Iwate では E7His と、Hb M Boston では F8His と結合する。ではこの完全還元型 Hb M に CO が結合したとき 4 次構造変化はどうなるであろうか。この点も含めて UVR 分光による 2 つの α 鎖異常 Hb M の構造解析について報告する。

M. Nagai, Y. Jin, R. Li, M. Aki, S. Nagatomo, and T. Kitagawa : Structure analysis of Hb M Iwate and Hb M Boston by UV resonance Raman spectroscopy