ヘモグロビンにおけるアロステリック効果

大阪大学医学部 第一生理学教室 中 馬 一 郎※

Monod, Wyman, Changeux¹⁾ の有名な論文の冒頭に述べられているように、ヘモグロビンは最も古くから知られた最も代表的なアロステリック蛋白質である。すなわち、機能的には、ヘモグロビンの酸素との平衡曲線はS字状を呈し、また pH の変化による移動 (Bohr 効果) が認められる。一方構造的には、1分子のヘモグロビンはそれぞれ2本の α および β ポリペプチド・サブユニット (protomer) が対称的に配列した4量体($\alpha_2\beta_2$)である。現在までの知見を総合すると、ヘモグロビンのこれら機能特性は、基質とみなされる酸素がアロステリック・リガンドであって、これがヘモグロビンに結合するとその高次構造が酸素に対する親和性の低い状態 (R state) から親和性の高い状態 (O state) へアロステリック遷移することに基因するものであると解釈される。以下、本稿ではこの見解を導くに到った最近の研究結果を整理するとともに、今後解決されるべき問題のいくつかを提起してみたいと思う。

なお、ヘモグロビンの機能と構造については筆者自身²⁻¹⁰⁾を含め最近多くの綜説があり、本誌にも¹¹⁾¹²⁾Lumry, 右衛門佐のものが発表されているので、これらを参照されたい。また、アロステリック効果については上記の論文以外に本誌に発表されたものとして、¹³⁾¹⁴⁾早石・岡崎, 岩槻の綜説がある。

1. ヘモグロビンの機能特性

ヘモグロビンの酸素平衡機能は次の三つの特性、(1) 酸素親和性、(2) ヘム間相互作用、(3) Bohr 効果、であらわされる。定量的には酸素飽和百分率 y に対して酸素分圧 p をプロットした酸素平衡曲線に対する Hill¹⁵⁾の経験式

$$\frac{y}{100} = \frac{Kp^n}{1 + Kp^n} \quad (1)$$

において(1)は $y=50$ に対応する酸素分圧 p_{50} ($K=1/p_{50}^n$) で、(2)は n 値により、(3)は $\Delta \log p_{50}/\Delta pH$ で表

現することができる。図1に示すように、酸素平衡曲線の形状は、ヘモグロビンの $1/4$ 量体に相当するミオグロビンでは直角双曲線 ($n=1.0$) であるが、ヘモグロビン (全血) ではS字状 ($n=2.5\sim 3.0$) となる。

図1. ミオグロビン(A)とヘモグロビン (全血) (B) の酸素平衡曲線

この特性は Bohr 効果とともに、肺胞 (酸素分圧約 100mmHg, 炭酸ガス分圧約 40mmHg) においてできるだけ多くの酸素を取り、末梢組織 (安静時で酸素分圧約 35mmHg, 炭酸ガス分圧約 50mmHg) の需要に応じて酸素を放出するというヘモグロビンの生理的使命によく合致している。

さて、ヘモグロビン・酸素平衡曲線がS字状性を示すことの説明として、ヘム間相互作用説が古くから提出されているが、この説は次のように要約される。まず1分子のヘモグロビン中の4個のヘムに酸素が1分子ずつ段階的に結合すると仮定し (intermediate compound hypothesis¹⁶⁾), さらに4個のヘムは酸素に対する親和性は同等であるが、独立ではなく、酸素を結合していないヘム間には酸素との結合を阻止する相互作用が働くと考えられる。そうすると、最初に結合する酸素はこの相互作用にうち勝たねばならないから結合しにくい、1個酸素分子が結合すると、酸素化ヘムと非酸素化ヘム間には相互作用がないから、2番目の酸素はそれだけ最初のものより結合しやすく、3、4番目と順次結合の容易さが増大してS字状の平衡曲線

Allosteric Effects in Hemoglobin;

※ Itiro TYUMA: Department of Physico-Chemical Physiology, Medical School, Osaka University.

を与えると理解される。なお、酸素を結合したヘムが結合していないヘムに対して酸素親和性を増大させるような相互作用 (decoying effect) を及ぼすと仮定しても、形式的には同じことであるが、後述のように単離した α, β 鎖の酸素親和性は非常に高く、この考えは妥当でない。Pauling と Wyman¹⁶⁾ はそれぞれヘム間相互作用説を定式化し酸素平衡曲線の S 字状性を定量的にもかなりの程度まで説明することに成功している。

一方、ヘム間相互作用の実体として古くは各ヘム間に直接相互作用が働くと想像されたが、X線回折の結果明らかにされたヘム間距離は最も近いものでも $25 \text{ \AA}$ ¹⁹⁾ あり、直接相互作用が及ぶとは考えられない。そこでこの難点を選けるため、St. George と Pauling の crevice theory²⁰⁾、Wyman と Allen の entropy effect theory²¹⁾、Lumry の rack model¹¹⁾ などの諸説が展開された。これらの説はそれぞれ細かいニュアンスの差はあるが、酸素分子がヘムの鉄に結合するとヘモグロビン分子全体に高次構造の変化が生じ、そのため残りのヘムの酸素親和性が増大すると仮定する点において共通している。すなわち、一つのヘムに酸素が結合した影響は、蛋白部分の構造を介して別のヘムに伝達されると考えるのである。この説によれば Bohr 効果も、高次構造の変化に基づく解離基の pK 変化として説明される。それでは実際にヘモグロビン分子の高次構造が酸素化によって変化するものであろうか。次にこの疑問に答える最近の実験事実をまとめてみよう。

なお、ヘム間相互作用の定式化、実体についての諸説の詳細については別の綜説で述べたのでここでは省略する。

2. 酸素化に伴うヘモグロビン高次構造の変化

ヘモグロビンが酸素と結合している状態 (オキシ型) と結合していない状態 (デオキシ型) でその高次構造を異にするであろうことは、両状態で結晶形および溶解度²²⁻²⁴⁾ に差があることから古くより推測されていた。その後、誘電率増加度²⁵⁾ や粘度²⁶⁾、アルカリ変性速度^{27, 28)}、酸素や低分子との反応性^{29, 30, 31)} にも差異が認められ、さらに次に列挙するように上の見解を決定的にする事実が最近続々と発表された。

(1) まず Perutz^{32, 33)} らは X 線回折によって、ウマのヘモグロビンの β 鎖の反応性 SH 基間の距離がオキシ型では $30.0 \text{ \AA}$ であるのに対し、デオキシ型では $37.3 \text{ \AA}$

と著明に広がっていることを証明し、前者の高次構造を O state、後者のそれを R state と名付けた。なお、 α 鎖については、ヒトのデオキシヘモグロビンとウマのオキシヘモグロビンについての比較からであるが、鉄原子間距離に変化は認められていない。いままで述べてきたことから、酸素に対する親和性は R state では低く、O state では高いと考え、かつ Monod¹⁾ らに従って両状態間に R 側に片寄った平衡状態が成立していると仮定すると、酸素平衡曲線の S 字状性は一応説明することができる。ただし、オキシ型 = O state、デオキシ型 = R state の関係が恒等的に成立するものではないことは次の実験結果から明らかである。

(2) Gibson³⁴⁾ は、一酸化炭素ヘモグロビンを flash photolysis した際に生ずるデオキシヘモグロビンは数 msec の間ではあるが通常のものより酸素および一酸化炭素との結合速度が速いことを観測した。この "rapidly reacting form" はリガンドが離れてもごく短時間は高次構造が O state のままに止まっているために出現すると考えられる。

(3) bromthymol blue のデオキシヘモグロビンへの吸着速度はオキシヘモグロビンに対するよりも数倍速い³⁵⁾。一方、carboxypeptidase A でヘモグロビンを処理すると β 鎖の C 末端のヒスチジンとその次のチロシンが切断されるが、この標本ではヘム間相互作用が完全に失われる ($n = 1$) とともにオキシ-デオキシ型間にみられた bromthymol blue の吸着速度の差も消失する。これに対し、carboxypeptidase B は α 鎖の C 末端のアルギニンのみを遊離し、この際ヘム間相互作用は維持され ($n = 2.6 \sim 2.8$)³³⁾ またオキシ-デオキシ型間の吸着速度の差も保存される。なお、沈降係数の測定から両酸素処理によっても分子量は変化せず 4 量体のままであることが保証されている。

(4) ヒトヘモグロビンは 1 分子につき 6 個の SH 基を持つが、そのうちいわゆる反応性があるのは β 鎖の 93 番のものだけである。iodoacetamide はヘモグロビンがオキシ型であるときはこの SH 基と容易に定量的に反応するが、デオキシ型であるときには全く反応しないという著明な差が認められる³⁶⁾。また、上記 carboxypeptidase B 処理標本ではこの差が保存されているのに対し、carboxypeptidase A 処理標本ではデオキシ型でも SH 基が反応性になっていることが認められる。以上 (3) (4) の成績は carboxypeptidase A 処理がヘモグロビンの高次構造を O state に固定すると考えれば容易に理解されよう。

(5) 2M NaCl ではオキシヘモグロビンは完全に半裂し、2量体 $\alpha\beta$ となるが(平均分子量 33,000~36,800)、デオキシヘモグロビンは開裂しにくく平均分子量が 42,600~46,200 の範囲に止まる。また、acid hybridization³⁸⁾ の速度はオキシ型に比べデオキシ型では非常に遅い。これらの結果から、ヘムに酸素が結合した O state のほうが各サブユニット間の結合の強さが弱い (less constrained) と推測され、Monod¹⁾ らの考えと一致する。

(6) nitroxide-maleimide を用いて β 鎖の反応性 SH 基をスピン・ラベルする場合、ヘモグロビンがデオキシ型であれば電子スピン共鳴法によって比較的鋭いいわゆる weakly immobilized signal が得られるが(図 2a)、オキシ型であるときには巾の広い strongly immobilized signal が観測される。また、carboxypeptidase A で処理したヘモグロビンではオキシ型であっても strongly immobilized signal は出現しない。⁴⁰⁾ Ohnishi⁴⁰⁾ らはこのスピンラベル・ヘモグロビンを結晶化した標本について理論的研究を行ない、strongly immobilized signal の成因は、オキシ型では β 鎖上

に F, G, H, および FG ポリペプチドセグメントとヘムからなるポケット状の部分ができおり、そこに nitroxide 環が陥入するためであるとしている。carboxypeptidase A で C 末端のアミノ酸 2 個を除くと、H セグメントの一部が欠損してポケットの一方の壁がなくなり、nitroxide 環の運動を制限しなくなると考えられ、また酸素がヘムから離れるとポケットの大きさまたは形状が変化し nitroxide 環が入りこめなくなるため weakly immobilized signal が現われるのであろう。いずれにせよこの知見は、酸素化によって単に β 鎖間の距離が変化するのみならず(1)、 β 鎖内においても高次構造に変形が生ずることを証明した点において重要な意味を持っている。

(7) 一方、Hayashi⁴¹⁾ らは異常ヘモグロビン、Hb M Hyde Park ($\alpha_2\beta_2^{92\text{Tyr}}$)、において正常 α 鎖に酸素を結合せしめると異常 β 鎖の三価ヘムに帰属される電子スピン共鳴 signal が著明に変化することを見出した(図 3)。この結果は一つのヘムの酸素化が同一分子内の

図2. nitroxide-maleimide でスピン・ラベルしたウマのデオキシヘモグロビン(a)とオキシヘモグロビン(b)の電子スピン共鳴スペクトル。³⁹⁾

図3. HbM^{Hyde Park} の電子スピン共鳴スペクトル。⁴¹⁾ reoxygenated: deoxygenated のスペクトルを測定した後、同じ試料に酸素を添加してオキシ型として測定したもの。

別のヘムの conformation に影響を与えること——すなわちヘム間相互作用——を実証した最初のものとしてきわめて意義の深いものである。

(8) 筆者らの行った円偏光二色性スペクトルの測定結果によると、デオキシヘモグロビンではオキシ型に比べてヘムに帰属される260m μ の円率率が約半減しているほか、前者にはみられない負の小さい吸収帯が280m μ 付近に認められる(図5)。この吸収はおそらくアミノ酸残基に起因するものと考えられ、たとえば両状態では α と β 鎖間の距離が異なるからその接触面にある

チロシン (42 α および 35 β) の環境が変化していることを反映しているものではないかと考えられる。他方, helix 含量については, Briehl⁴³⁾ はオキシ型とデオキシ型に有意の差を認めていないが, Brunori⁴⁴⁾ らは後者のほうが約 8% 大きいと述べており, いまだ一致した見解は得られていない。

3. アロステリック効果におけるサブユニットの意義

Monod¹⁾ らの理論によれば, ある機能蛋白質がアロステリック効果を発現するためには, それが対称的に配置したサブユニット (protomer) から構成されていなければならない。このことは図 1 に示したミオグロビンとヘモグロビンの機能の比較からも推測されていたことであるが, 一体各サブユニットは酸素平衡機能上どのような意義を担っているものであろうか。この疑問に答えるためには, まず各サブユニットそれぞれ単独の機能を解明しなければならない。

一般にヘモグロビンの各サブユニット間の結合は強固なものではなく, たとえば過剰の水銀剤を添加するとヒト成人・ヘモグロビン (HbA) は容易に α 鎖と β 鎖に解裂し, クロマトグラフィーによってそれぞれを単離することができる。この点が同じくアロステリック蛋白質である aspartate transcarbamylase と一致するのは単なる偶然かも知れないがはなはだ興味深い。このようにして単離したサブユニットは完全に水銀を除去すると, β 鎖は自然に 4 量体 (β_4) に会合し, α 鎖は単量体 (α) $\rightleftharpoons$ 2 量体 (α_2) の平衡状態となる。しかし, 両鎖を単に当量混合しただけで直ちにもとの 4 量体 $\alpha_2\beta_2$

図4. 単離 α, β 鎖, それぞれから再構成した HbA

および天然の HbA の酸素平衡曲線。

左: ○ β 鎖 pH 7.53, ● β 鎖 pH 7.02, △ α 鎖 pH 7.53, ▲ α 鎖 pH 7.02

右: ○ 再構成 HbA pH 7.53, △ 再構成 HbA pH 7.02, ● 天然の HbA pH 7.53, ▲ 天然の HbA pH 7.02

β_2 に再構成され, 機能的にも天然のものと区別不可能の HbA となる (図 4)。これら単離鎖の酸素平衡機能は Tyuma⁴⁵⁾ らの成績を図 4 に示すように, 酸素親和性は β 鎖のほうが α 鎖よりも高いが, ともに母 HbA に比し 10 ~ 20 倍高く, また両鎖ともヘム間相互作用および Bohr 効果を全く失っている。(n=1.0, $\Delta \log p_{50}/\Delta pH=0$)。すなわち, たとえ 2 または 4 量体であっても同名鎖のみからなる場合にはヘモグロビンの生理的特性は全く⁴⁷⁾ 発現しない。これに関連して, Perutz と Mazzarella⁴⁸⁾ は β 鎖のみからなる異常ヘモグロビン, HbH (β_4)^{*} では 2 の (1) で述べた酸素化に伴う X 線回折像の変化がみられずオキシの状態でもデオキシ HbA と類似の回折像を示すことを見出している。また, Benesch⁴⁸⁾ らは HbH が永久的に “rapidly reacting form” (2 の (2)) であることを報告している。前者の成績は HbH の高次構造が R state に, 後者のそれは O state に固定されていることを意味し, たがいに相反するが, ともに酸素化によって変化しないという点において一致している。Monod¹⁾ らの理論に従えば, これら二つの state のうち一方が inaccessible であれば相互作用がなくなるのは当然である。いずれにせよ, 酸素親和性を生理的範囲に維持し, アロステリック効果を発現する上において, ヘモグロビン分子が異名鎖から構成されていることが特別な意味を持っていることは疑いのないところであろう。

また, 詳細は別の綜説にゆずるが, 諸種のヘモグロビン M^{49, 50, 51)} および一方の鎖のみをシアンメト化して再構成したヘモグロビンについての成績を綜括すると, 異名鎖からなる 4 量体であっても, 一方の鎖のヘムがメトまたはシアンメト型に固定されている場合にはヘム間相互作用は完全に消失する。しかし Bohr 効果のほうは必ずしもそうでなく, ある程度保存される場合が多い。すなわち, 同じアロステリック効果ではあるが, ヘム間相互作用のほう Bohr 効果よりも高次構造の integrity⁵²⁾ に対する依存度が高いと考えられる。

さて次の問題は, 4 量体 $\alpha_2\beta_2$ として組み入れられたとき各サブユニットの高次構造がどのように変化するかということである。この点を筆者らは円偏光二色⁴²⁾

* HbH は上述の方法で HbA から単離した β_4 鎖と全く同一の性質を示す。⁴⁵⁾

** 異なった pH における酸素平衡曲線は横軸の目盛を適当に選ぶと完全に重ね合わせることができる。このことは Bohr proton の結合が $R \rightleftharpoons O$ の平衡に影響しないことを意味し, monod 流にえば Bohr proton 自体はアロステリック・リガンドではない。¹⁾

図5. HbA (実線) ならびそれから単離した α 鎖 (破線) および β 鎖 (点線) の円偏光二色性スペクトル。⁴²⁾

性スペクトルによって追究した。まず、 $222\text{m}\mu$ の負の極大における円率から helix 含量を求めると、オキシ型について α 鎖72%, β 鎖67%, HbA 69%という値が得られ、測定誤差を考慮すると両鎖の helix 含量は4量体に組み入れられても変化しないといえる。次にヘムに帰属される Soret 帯および $260\text{m}\mu$ の吸収帯はともにオキシ、デオキシ型とも α 鎖のほうが β 鎖より高く、吸収帯の面積で比較するとオキシ型で $\alpha/\beta = 3.2 \sim 3.5$, デオキシ型ではこの比がさらに大きくなる。この差は両鎖のヘムの環境の差またはヘムとグロビンの部分との結合の強さの差異を反映しているものであろう。図5に示すように HbA はちょうど両鎖の中間の値を示し、両吸収帯の面積はオキシ、デオキシ型とも $(\alpha + \beta)/2$ にほぼ等しい。したがって、これらの領域に光学活性を与える両鎖の構造的特徴は4量体 $\alpha_2\beta_2$ を構成する場合にも保存されと考えられる。一方、4量体 $\alpha_2\beta_2$ に特異的なのは2の(8)でふれた $280\text{m}\mu$ 付近の小さい吸収帯であって、オキシ型ではさきと同様 HbA の吸収は両鎖のその算術平均に等しいが、デオキシ型では両鎖のいずれも認めるべき吸収を示さず、HbA にのみ負の吸収帯が観察される。すなわち、この吸収帯はさきに述べたように酸素化に依存するのみならず、 α と β 鎖の結合にも依存した注目すべき性質を持っているが、その帰属はいまだ決定的でない。ともあれ、以上の成績から α , β 鎖の高次構造は $\alpha_2\beta_2$ の4量体となっても、あまり大きくは変化しないのではないかと考えられる。

第3のそして最も困難な問題は、4量体に組み込まれた状態における各サブユニットの機能的役割を決定することである。かつて想定されたように各サブユニットは機能的に全く等価であろうか、それも一方のサブユニットが他方に対して支配的であろうか。ヘモグ

ロビンの四つのサブユニットがいずれも酸素を結合することは既定の事実であるから、aspartate transcarbamylase のように catalytic サブユニットと regulatory サブユニットの二つに割然と分離していることは考えられないが、ヘム間相互作用や Bohr 効果に関して α , β 鎖のいずれかが主役を演ずる可能性は必ずしも否定できないし、また第1番目の酸素は両鎖のどちらか一方に選択的に結合することも考えられる。このような点を追及する研究は次に述べるように最近や々と試みられるようになった段階で、結果に対する考察も憶測の域を脱していない。

Riggs と Herner⁵³⁾ はロバのヘモグロビン ($\alpha_2^D\beta_2^D$) とハツカネズミのヘモグロビン ($\alpha_2^M\beta_2^M$) から2種の hybrid, $\alpha_2^D\beta_2^M$ と $\alpha_2^M\beta_2^D$, を作成した。これらの酸素平衡機能を母ヘモグロビンのそれとともに表1にまとめた。これからわかるように、 $\alpha_2^M\beta_2^M$ の機能は $\alpha_2^M\beta_2^A$ に類似して酸素親和性が低く、Bohr 効果が大であるに対し、 $\alpha_2^M\beta_2^D$ は $\alpha_2^D\beta_2^D$ に似て酸素親和性が高く、Bohr 効果が小さい。すなわち、hybrid 分子の酸素平衡機能はその β 鎖が由来する母ヘモグロビンのそれとよく似ている。このことから、かれらは β 鎖が4量体全体としての機能を支配するものであると述べている。

表1 ロバとハツカネズミのヘモグロビンおよびそれらの hybrid の酸素平衡機能⁵¹⁾

成 分	$P_{50}(\text{mmHg})$	$\Delta \log p_{50}/\Delta \text{pH}$	n
ハツカネズミ $\alpha_2^M\beta_2^M$	12.3	0.93	2.4
ロバ $\alpha_2^D\beta_2^D$	4.7	0.53	2.3
hybrid I $\alpha_2^D\beta_2^M$	14.4	0.75	2.0
hybrid II $\alpha_2^M\beta_2^D$	4.7	0.41	2.0

しかしながら、その後 Antonini⁵⁴⁾ らおよび Enoki と Tomita⁵¹⁾ によってえられたイヌのヘモグロビン ($\alpha_2^{\text{can}}\beta_2^{\text{can}}$) と HbA ($\alpha_2^A\beta_2^A$) の hybrid 分子についての成績は、このような単純な結論が一般には成立するものではないことを示している。たとえば、両母ヘモグロビンの機能は、イヌのほうが酸性側の逆 Bohr 効果が強い点を除いてほとんど等しいのであるが、 $\alpha_2^A\beta_2^{\text{can}}$ には逆 Bohr 効果が全く認められず、アルカリ側の Bohr 効果は母ヘモグロビンのいずれよりも大きく、酸素親和性は逆に両母ヘモグロビンよりも小さい。また、 $\alpha_2^{\text{can}}\beta_2^A$ の Bohr 効果の程度は両母ヘモグロビンの

中間の値を示し、酸素親和性はそのいずれよりも大である。この問題は将来もっと多種類の hybrid 分子、異常ヘモグロビンならびに化学的に修飾したヘモグロビンを用いて追及する必要があると考えられる。

4. サブユニット交換説

ヘモグロビン分子の4個のヘムのうちのいくつかを一酸化炭素と結合させるか、または酸化してメト型とすると、このヘム間の相互作用が減少し、酸素親和性が増加することが古くから知られ、それぞれ⁵⁵⁾ Haldane および⁵⁶⁾ Darling-Roughton 効果とよばれている。これは aspartate transcarbamylase の活性が低濃度の拮抗的阻害剤によって増加する⁵⁷⁾のと類似の現象であって、一酸化炭素との結合およびヘム鉄の酸化は酸素化と同様のアロステリック効果をヘモグロビン分子の高次構造に与えて O state に変化させることに基因すると理解されている。

さて、Darling-Roughton 効果を利用した実験成績から、最近 Benesch ら^{58,59)} は酸素との結合に際しヘモグロビン分子の間でサブユニットの交換がおこるという大胆な仮説を提出した。その実験的根拠は次のよう

である。いま、総ヘモグロビンの50%が3価のメト型となった HbA 溶液を次の二つの方法で作製する。(1) 総 HbA の半当量のフェリシアン化カリウムを加えて50%だけ酸化する。(2) 2価の HbA とメト HbA を当量混合する。(1)の場合 Darling-Roughton 効果を生ずることは当然であるが、(2)の場合には実験温度とイオン強度により異なった結果がえられる。図6に示すように、まず低温、低イオン強度下では混合液の酸素平衡曲線は2価の HbA のみのそれと完全に一致し、共存メト HbA 分子は2価 HbA 分子に対しなんらの影響を与えない。これに反し、高温、高イオン強度下では(1)の場合と全く同様の Darling-Roughton 効果が出現する。いいかえれば、この条件下ではメト HbA 分子と2価 HbA 分子間に交換反応がおこるのである。

3価と2価のヘモグロビン分子間の交換反応の機作としては、(1)電子の交換、(2)ヘムの交換、(3)サブユニットの交換の三つが考えられる。このうち(1)はフェロシアンイドなどの電子運搬体が共存しても交換反応速度を増加しないこと、電子交換反応は一般にイオン強度や温度の影響を受けにくいこと、ならびに非常に還元されにくいシアンメトヘモグロビンについても交換反

図6. メトと2価ヘモグロビン間の交換反応に及ぼす温度とイオン強度の影響⁵⁸⁾
 × 100% 2価ヘモグロビン, ○ (1)の方法で作製した50%メトヘモグロビン, ● (2)の方法で作成した50%メトヘモグロビン, 説明本文

応がみられることから、(2)については交換反応の速度がヘム交換の速度(半減期が時間のオーダー)⁶⁰⁾に比し非常に速いこと(数分以内に完了)からともにその可能性が疑われるが、次の実験成績から完全に否定することができる。すなわち、交換現象は異種のヘモグロビン間、たとえば HbA と HbS ($\alpha_2\beta_2^{6V\alpha 1}$), Hb C ($\alpha_2\beta_2^{6L\gamma 4}$), および HbF ($\alpha_2\gamma_2$) 間においてもまったく同様に観察されるのに対し、HbA と単離 α, β 鎖およびミオグロビン間には全く認められない。この事実ならびにヘモグロビン分子のサブユニットへの解裂が非常に速やかで、とくに高温、高イオン強度下で促進されることから、この交換反応はサブユニット単位で行なわれると結論され、その機構は現在の定説³⁾に従って次のように $\alpha\beta$ 2 量体単位で行なわれると考えられる。

Benesch^{58, 59)} らは酸化ヘムと酸素化ヘムの類似から、この考えをさらに発展させ、正常の酸素化過程においてもサブユニットの交換が行なわれていると仮定し、次の模式を提出した。

Oxygenation of R state: Low affinity

Dissociation

Exchange: Transformation of R state to O state

Oxygenation of O state: High affinity

ただし $\alpha\beta$ および $(\alpha\beta)^0$ はそれぞれデオキシおよびオキシ型のサブユニットを $(\alpha\beta)^*$ は O state のデオキシ型サブユニットをあらわすものである。まず、酸素化の第一段階の反応は酸素親和性の低い R state にあるデオキシヘモグロビンが Adair¹⁸⁾ の仮定したように段階的に酸素化されると考える(反応(1))。これが酸素平衡曲線のはじめの平坦部に対応する。酸素分圧が上昇するにつれて少量ながら全ヘムが酸素化された 4 量体が生成され、これが解裂してオキシ 2 量体となる(反応(2))。酸素化されるとヘモグロビンが解裂しやすくなることは 2 の(5)ですでに述べた。

次の反応(3)はこの模式で最も重要な段階である。ここでオキシ 2 量体とデオキシ 4 量体間にサブユニットの交換がおこり、半オキシヘモグロビン分子が生成される。この hybrid 分子においてデオキシ型のサブユニットはオキシ型サブユニットの影響を受けて R state から O state へアロステリック遷移をする。デオキシ型サブユニットでも O state をとりうる可能性については 2 の(2)で述べたところならびに Haldane および Darling-Roughton 効果から容易に推測されるし、また R state では β 鎖間の距離が異なるので、一方の $\alpha\beta$ サブユニットが R state で他が O state という 4 量体を考えることは構造的に無理である (Monod¹⁾ のいう対称性の保存)。

最後に、酸素親和性の高い半オキシヘモグロビンのこりの配位座に酸素を結合して一応反応は完了するが(反応(4))、これがさらに反応(2)により解裂して、反応(3)を誘起し、次に反応(4)と連鎖的に反応が進行する。すなわち、酸素化が進むにつれて主体となる反応が(1)から(4)に移動する。このように考えると、酸素化に伴ないヘモグロビンの酸素親和性が増加すること(酸素平衡曲線の立ち上りの部分の傾斜が急峻であること)が容易に理解される。

サブユニット交換説の要点は、単にリガンド(基質)のみならず、リガンド-サブユニット複合体もアロステリック効果をおこしうると考える点にあり、一般のアロステリック蛋白質の場合にもこのような可能性が考えられる。現在までのところこの説に対する決定的な反論は出されていないが、仮想的半オキシ hybrid 分子の実験的証明、Bohr 効果をどのように説明するか、また n 値といかにして定量的に関係づけるか、など多くの問題が将来にのこされている。

5. ヘモグロビンに対する allosteric effector

赤血球内におけるヘモグロビンの酸素平衡機能に関して、古来一つの謎があった。それは、全血または赤血球浮遊液の示す酸素平衡曲線と、それから分離したヘモグロビン溶液のそれとが非常に異なり、赤血球内環境を再現するために種々の物質を後者に添加しても両曲線を一致させることが不可能であるという事実である。すなわち、Barcroft⁶¹⁾ 以来ヘモグロビン溶液を完全に透析して塩類を除くと、酸素親和性が高く、 n 値が 1 に近づくことが知られ、Rossi-Fanelli⁶²⁾ らおよび筆者らの最近の研究もこれを確認した。この透析ヘモ

グロビンに種々の塩類を添加すると、酸素親和性が減少し、 n 値が増加するが、赤血球内に存在する濃度でこれらの数値を全血の値にまで変化させることは、数種の塩類を同時に添加しても、今日まで不可能であった。それ故、ヘモグロビンがアロステリック効果を発現する上に塩類の存在が重要な意義を持つことは認識されてはいたが、その作用機作については満足な説明がなされていなかった。³⁾

次に述べる最近の Benesch⁶³⁾の研究はこの疑問を見事に解決するとともに、酸素以外にもこれと構造を全く異にする allosteric effector が存在することを確立した点において、注目すべき業績である。かれらはまず塩類のなかでリン酸塩に上記効果がとくに強い^{28, 62)}ということと赤血球内には他のリン酸塩にくらべ 2,3-diphosphoglycerate (DPG) が圧倒的に多く⁶⁴⁾ヘモグロビンとはほぼ等モル存在するという二つの事実に着目し、DPG とヘモグロビンの関係を精査した。⁶⁵⁾その結果、常用の Drabkin 法（一夜透析）で調製したヘモグロビン溶液はなおヘモグロビン 1 モルあたり約 0.6 モルの DPG を含み、その酸素平衡曲線は線密に測定すると図 7 に示すように、中央付近に屈曲点を持つ二相性となるが、sephadex 処理によって完全に

図7. ヘモグロビン・酸素平衡曲線に及ぼす DPG の影響⁶⁶⁾
○: “stripped hemoglobin” ●: Drabkin 法によるヘモグロビン △: “stripped hemoglobin” に当モル量の DPG を添加したもの、本文参照

DPG を除去すると曲線はさらに左方へ移動し、屈曲点が消失するとともにヘム間相互作用が全く認められなくなる ($n=1.1$) ことが明らかとなった。また、このようにして完全に DPG を除いた “stripped hemoglobin” に当モル量の DPG を添加すると曲線は著明に右方へ移動し、単相性となり、ヘム間相互作用も全血と等しくなる ($n=2.7$)。添加 DPG 量が当モル量よ

り少ない場合には、曲線は両者の中間に位置し、また、たとえば $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$ モル当量の際にはそれぞれ 75, 50, 25% 酸素飽和度の点に屈曲点が認められる (図 9 参照)。

これらの成績は、DPG がヘモグロビン分子と当量的に結合し、その酸素親和性を減少させるとともにヘム間相互作用を発現させる——すなわち allosteric inhibitor である——と考えれば理解することができる。すなわち、Drabkin 法で作製したヘモグロビンや “stripped hemoglobin” に当モル量以下の DPG を加えた場合にみられる屈曲点のある酸素平衡曲線の最初の部分は、酸素親和性の高い “stripped hemoglobin” によるものであり、屈曲点以後の部分は親和性の低いヘモグロビン—DPG 複合体に対応するものとして無理なく説明できる。さて、DPG が allosteric inhibitor である¹⁾とすると、Monod¹⁾らの理論によれば R state すなわちデオキシヘモグロビンとのみ結合するはずである。そして直接結合実験の結果は見事にこの事実を⁶⁶⁾証明した。すなわち、図 8 に示すように、デオキシヘ

図8. DPG とオキシおよびデオキシヘモグロビンとの結合⁶⁶⁾

モグロビンは DPG とモル比が 1 対 1 の割合まで非常に強く結合するが、オキシヘモグロビンは全く DPG と結合しない。また、表 2 にまとめたように、“stripped hemoglobin” に赤血球内濃度の DPG を添加した際の酸素平衡機能は全血のそれとよく一致し、従来の疑問を一掃することができるのである。

表 2 全血と DPG—ヘモグロビン複合体の酸素平衡機能の比較 (30°C)⁶³⁾

	whole blood ⁶⁷⁾	Hb in 2×10^{-3} M DPG
$\log P_{50}$, pH 6.94	1.45*	1.46
$\log P_{50}$, pH 7.69	1.07*	1.04
n	2.7	2.7
$\Delta \log P_{50} / \Delta pH$	0.5	0.56

* Calculated from the values at pH 7.40 and $\Delta \log P_{50} / \Delta pH$

さて、DPG の上述の作用は決してこの物質に特有のものではなく、表3に一括するように他の phosphate ester にも程度こそ小さいが、同様の作用が認められる。この表からわかるように organic tri- および diphosphate が最も作用が強く、次いで organic monophosphate, inorganic phosphate の順となる。このことから、DPG の持つ大きい負荷電がヘモグロビンとの結合に際し重要な役割を演じていると考えられ

表3 諸種のリン酸エステルのヘモグロビン・酸素平衡機能に及ぼす影響 (濃度 $5 \times 10^{-3} M$)^{63, 66)}

Compound	log P ₅₀	n	molar concentration in erythrocyte $\times 10^3$
None	-0.64	1.1	
Inorganic phosphate	0.38	1.9	0.28-0.48
Ferrocyanide	0.44		
Citrate	0.54		
3-phosphoglycerate	0.50	2.7	0.05-0.08
2-phosphoglycerate	0.59	2.5	
Glucose-6-phosphate	0.42		0.08-0.10
Fructose-1,6-diphosphate	0.64		0.06-0.12
AMP	0.65	1.8	0.01-0.02
Pyrophosphate	0.73	2.7	
ADP	0.88	2.4	0.19-0.25
ATP	0.84	2.5	0.9-1.2
2,3-diphosphoglycerate	0.90	2.7	3.6-5.0

るが、citrate, ferrocyanide などこれよりも負荷電の多いものの効果が小さいことから、他の因子の働く可能性も考慮する必要がある。また表3にあげた物質の中で赤血球中の濃度がヘモグロビンに対して効果を示す

図9. ヘモグロビン・酸素平衡機能に及ぼすphytateの影響⁶⁶⁾
phytate とヘモグロビンのモル比
×: 0, Δ: 0.25, ○: 0.50, ●: 0.75,
▲: 1.00

ほど十分高いのは、DPGを除いてはATPだけである。

一方、鳥類および海亀類の赤血球には DPG の代りに phytic acid (inositol hexaphosphate) が多量に存在する。そしてこの物質が HbA に対しても、DPG よりさらに強力な allosteric inhibitor⁶⁶⁾ として作用することが明らかにされた。図9では当モル量以下を添加した際の酸素平衡曲線の屈曲が明瞭に認められる。

以上の成績から、DPG の赤血球濃度が *in vivo* におけるヘモグロビンの酸素平衡機能を調節する因子として重要な生理的意義を持つことが明らかとなった。そしてこの事実はまた現在まで未解決でいたいま一つの問題——胎児血と成人血の酸素親和性の差——を説明する一つの手掛りを与えるものである。すなわち、胎児血が成人血よりも酸素親和性が高いことは古くから知られ、それぞれのもつヘモグロビンが一次構造を異にすることからこの合目的な差異はヘモグロビン分子自体の機能上の差に基づくものであると解釈されていた。ところがその後、両血液から分離したヘモグロビン溶液について比較すると、酸素平衡機能上全く差が認められないことが明らかにされるに及んで^{68, 69)}、両ヘモグロビンがおかれている環境——胎児赤血球と成人赤血球の組成——の差が原因であろうと考えられるようになった

が、どのような成分に差があるかということについてはいまだ明らかにされていない。しかし、ニワトリのヒナの血液の酸素親和性の孵化後の減少経過⁷⁰⁾が血球中の phytic acid の増加経過と非常によく一致している事実から考えて、ヒトの場合には DPG の濃度差が胎児血と成人血の酸素親和性の差異の原因となっているのではないかと推測される。

DPG の allosteric inhibitor としての作用が発見されるに及んで、ヘモグロビンのアロステリック蛋白質としての機能はますます魅力的となってきた。DPG がヘモグロビン1分子あたり1分子結合するとして、 α, β 鎖のどちらに結合するのか、またその結合様式はどのようなものであるか、など解決されるべき問題は多い。しかし、DPG—ヘモグロビン複合体のX線回折の実験がすでに Perutz によって開始されたと聞いている。1930年代にすでに確立されたヘモグロビンの酸

素平衡機能を分子のレベルで理解しうるのもそう遠い将来ではあるまい。

文 献

- 1) J. Monod, J. Wyman, J.-P. Changeux: *J. Mol. Biol.*, **12**, 88 (1965)
- 2) G. Braunitzer, K. Hilse, V. Rudloff, N. Hilschmann: *Advances in Protein Chem.*, **19**, 1(1964)
- 3) A. Rossi-Fanelli, E. Antonini, A. Caputo: *ibid.*, **19**, 73 (1964)
- 4) J. Wyman: *ibid.*, **19**, 223 (1964)
- 5) E. Antonini: *Physiol. Revs.*, **45**, 123 (1965)
- 6) A. Riggs: *ibid.*, **45**, 619 (1965)
- 7) F.J.W. Roughton: *Handbook of Physiology* (ed. W. O. Fenn, H. Rahn) Section 3, Vol. 1, p. 767, Am. Physiol. Soc., Washington, D.C. (1964)
- 8) 中馬一郎: *生体の科学*, **13**, 231 (1962)
- 9) 中馬一郎: *代謝*, **3**, 1 (1966)
- 10) 中馬一郎: *日本生理学雑誌*, **29**, 1 (1967)
- 11) R. Lumry: *生物物理*, **1**, 138 (1961)
- 12) 右衛門佐重雄: *同誌*, **2**, 168 (1962)
- 13) 早石 修: *同誌*, **3**, 2 (1963)
- 14) 岡崎令治, 岩槻紀夫: *同誌*, **6**, 262 (1966)
- 15) A.V. Hill: *J. Biol. Chem.*, **51**, 359 (1922)
- 16) L. Pauling: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **21**, 186 (1935)
- 17) J. Wyman: *Advances in Protein Chem.*, **4**, 410 (1948)
- 18) G. S. Adair: *J. Biol. Chem.*, **63**, 517 (1925)
- 19) A. F. Cullis, H. Muirhead, M.F. Perutz, M.G. Rossmann, A.C.T. North: *Proc. Roy. Soc.*, **A265**, 161 (1962)
- 20) R. C. C. St. George, L. Pauling: *Science*, **114**, 629 (1951)
- 21) J. Wyman, D.W. Allen: *J. Polymer Sci.*, **7**, 499 (1951)
- 22) W.L. Bragg, M.F. Perutz: *Acta Cryst.*, **5**, 323 (1952)
- 23) H.M. Jope, J.R.P. O'Brien: *Haemoglobin* (ed. R.J.W. Roughton, J.C. Kendrew), p.269, Interscience, New York (1949)
- 24) M.F. Perutz, J.M. Mitchison: *Nature*, **166**, 677 (1950)
- 25) S. Takasima, R. Lumry: *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4238 (1958)
- 26) H. Matsumiya, R. Lumry: (11) に引用
- 27) F. Haurowitz, R.L. Hardin, M. Dicks: *J. Phys. Chem.*, **58**, 103 (1954)
- 28) Y. Enoki, I. Tyuma: *Jap. J. Physiol.*, **14**, 280 (1964)
- 29) M. Ottesen, W.A. Schroeder: *Acta Chem. Scand.*, **15**, 926 (1961)
- 30) I.M. Klotz, L. Tosi: *Biochim. Biophys. Acta*, **63**, 33 (1962)
- 31) R. Zito, E. Antonini, J. Wyman: *J. Biol. Chem.*, **239**, 1804 (1964)
- 32) H. Muirhead, M.F. Perutz: *Nature*, **199**, 633 (1963)
- 33) M.F. Perutz, W. Bolton, R. Diamond, H. Muirhead, H. C. Watson: *ibid.*, **203**, 687 (1964)
- 34) Q.H. Gibson: *Biochem. J.*, **71**, 203 (1959)
- 35) E. Antonini, J. Wyman, R. Zito, A. Rossi-Fanelli, A. Caputo: *J. Biol. Chem.*, **236**, PC60 (1961)
- 36) R.E. Benesch, R. Benesch: *Biochemistry*, **1**, 735 (1962)
- 37) R.E. Benesch, R. Benesch, M.E. Williamson: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 2071 (1962)
- 38) H.M. Ranney, R.E. Benesch, R. Benesch, A. Jacob: *Biochim. Biophys. Acta*, **74**, 544 (1963)
- 39) J.C.A. Boyens, H.M. McConnell: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **56**, 22 (1966)
- 40) S. Ohnishi, J.C.A. Boyens, H.M. McConnell: *ibid.*, **56**, 809 (1966)
- 41) A. Hayashi, T. Suzuki, A. Shimizu, H. Morimoto, H. Watari: to be published.
- 42) S. Beychok, I. Tyuma, R.E. Benesch, R. Benesch: *J. Biol. Chem.*, **242**, 2460 (1967)
- 43) R.W. Briehl: *Fed. Proc.*, **21**, 72 (1962)
- 44) M. Brunori, J. Engel, T.M. Schuster: *J. Biol. Chem.*, **242**, 773 (1967)
- 45) I. Tyuma, R.E. Benesch, R. Benesch: *Biochemistry*, **5**, 2957 (1966)
- 46) J.C. Gerhart, H.K. Schachman: *ibid.*, **4**, 1054 (1965)
- 47) M.F. Perutz, L. Mazzarella: *Nature*, **199**, 639 (1963)
- 48) R. Benesch, Q.H. Gibson, R.E. Benesch: *J. Biol. Chem.*, **239**, PC1688 (1964)
- 49) T. Suzuki, A. Hayashi, Y. Yamamura, Y. Enoki, I. Tyuma: *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **19**, 691 (1965)
- 50) G. Kikuchi, N. Hayashi, A. Tamura: *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 199 (1964)
- 51) 林 昭, 清水 章, 鈴木友和, 山村雄一: *医化学シンポジウム*, **5**, 23 (1966)
- 52) Y. Enoki, S. Tomita: to be published
- 53) A. Riggs, A.E. Herner: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 1664 (1962)
- 54) E. Antonini, J. Wyman, E. Bucci, C. Fronticelli, M. Brunori, M. Reichlin, A. Rossi-Fanelli: *Biochim. Biophys. Acta*, **104**, 160 (1965)
- 55) C.G. Douglas, J.S. Haldane, J.B.S. Haldane: *J. Physiol.*, **44**, 275 (1921)
- 56) R.C. Darling, F.J.W. Roughton: *Am. J. Physiol.*, **137**, 56 (1942)
- 57) J.C. Gerhart, A.B. Pardee: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **28**, 491 (1963)
- 58) R.E. Benesch, R. Benesch, G. Macduff: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **54**, 535 (1965)
- 59) R. Benesch, R.E. Benesch, I. Tyuma: *ibid.*, **56**, 1268 (1966)
- 60) H.F. Bunn, J.H. Jandl: *ibid.*, **56**, 974 (1966)
- 61) J. Barcroft, M. Camis: *J. Physiol.*, **39**, 118 (1909)
- 62) A. Rossi-Fanelli, E. Antonini, A. Caputo: *J. Biol. Chem.*, **236**, 397 (1961)
- 63) R. Benesch, R.E. Benesch: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **26**, 162 (1967)
- 64) I. Greenwald: *J. Biol. Chem.*, **63**, 339 (1925)
- 65) D.L. Drabkin: *ibid.*, **164**, 703 (1946)
- 66) R. Benesch, R.E. Benesch: personal communication
- 67) P. Astrup, K. Engel, J.W. Severinghaus, E. Munson: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **17**, 515, (1965)
- 68) E.F. McCarthy: *J. Physiol.*, **102**, 55 (1943)
- 69) D.W. Allen, J. Wyman, C.A. Smith: *J. Biol. Chem.*, **203**, 81 (1953)
- 70) F.G. Hall: *J. Physiol.*, **83**, 222 (1934)
- 71) M. Oshima, T.G. Taylor, A. Williams: *Biochim. J.*, **92**, 42 (1964)