— 原 著 —

ラットヘモグロビンの多様性 HPLC によるグロビン鎖の分離と構造解析*

田中 彰

日本医科大学産婦人科学教室 (主任: 荒木 勤教授)

日本医科大学第1生化学教室 (指導: 岡崎太郎教授)

Heterogeneity of rat hemoglobin

Isolation of constituent globin chains by HPLC and their amino acid sequence analysis

Akira Tanaka

Department of Obstetrics and Gynecology and Department of Biochemistry, Nippon Medical School

In order to elucidate the molecular mechanism of the heterogeneity of rat hemoglobin, hemoglobin components in adult rat hemolysate were isolated and differences in the primary structures of their constituent globins were determined. The results obtained were as follows:

1) Crystalline hemoglobin prepared from the hemolysate of an adult male Wistar rat was separated into nine hemoglobin components by means of DEAE-cellulose column chromatography, each giving a single band on polyacrylamide gel electrophoresis.

2) Of these hemoglobins, six major components, designated DE-I, II, IV, V, VI and VII, were further subjected to reverse-phase HPLC to yield their respective constituent α and β globins.

3) Peptide mapping and NH_2 -terminal amino acid sequence analysis of the β globins confirmed that DE-I and II hemoglobins possessed the previously known III β globin, while DE-IV, V, VI and VII hemoglobins contained the previously known II β globin.

4) The mechanism underlying the heterogeneity of rat hemoglobin was discussed on the basis of these findings.

Key words: rat hemoglobin, hemoglobin heterogeneity, reverse-phase HPLC, amino acid sequences

緒 言

一般に高等動物のヘモグロビン (Hb) は、2本の α 鎖 (α グロビン) と2本の β 鎖 (β グロビン) から成る4量体構造 ($\alpha_2\beta_2$) をとっている。しかし、1個体が有する α および β グロビン鎖の種類はそれぞれ単一なものではなく、両鎖の種々の組み合わせによってHb分子の多様性を生ずる。また、グロビン鎖の種類は個体発生の過程においても変化し、この現象はいわゆるHb転換 (hemoglobin switching) として知られて

いる。これらグロビン鎖の生成は、それぞれをコードする遺伝子が一定のプログラムに沿って発現することによっており、その異常はサラセミアをはじめとする諸種の遺伝性疾患を招来する。しかし、グロビン遺伝子発現の転換機構や、造血細胞の分化過程との相関についてはいまだに不明の点が多い。

成熟ラットは多種のHbを有し、同一個体内に約10種のHb¹⁾を持つことが知られている。また、その量は均等でなく、各Hb成分の相対比がラットの成熟過程¹⁾や、造血組織²⁾の違いによっても異なることが報告されている。したがって、ラットHbの多様性の解析は単にその生理的意義を明らかにするだけでなく、ひろくグロビン遺伝子の分化、発現機構を解明する上でのよいモデルになると思われる。現在までに、ラットHb

Correspondence to Akira Tanaka, Department of Obstetrics and Gynecology, Nippon Medical School Hospital, 1-1-5, Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

* 本論文は学位論文である。

を構成するグロビン鎖としては3種の α 鎖, 4種の β 鎖が単離³⁾され, それぞれのアミノ酸配列^{3,4)}が報告されているが, 各Hbのグロビン構成に関しては不明の点が多い。また, 各々の同名鎖間にみられる一次構造上の差異は極めてわずかであり, そのすべてが非対立遺伝子 (non-allelic gene) の存在に由来するか否かも現在のところ明らかでない。

以上の観点から, 著者はラットHbの多様性の成因を明らかにすることを目的として, 改めて成熟ラットから諸種のHb成分を単離し, その構成グロビン鎖をHPLCを用いて精製して各々の一次構造を決定しようとして試みた。本実験では主成分である6種のHbについて, その β グロビン鎖の同定を行ったので以下に報告する。

実験材料および方法

(1) ラットHbの精製

日本生物材料センターより購入した成熟雄ウィスター系ラット (*Rattus norvegicus*) (250 g) 1個体からエーテル麻酔下で心臓穿刺により採血した。採取した血液試料に直ちに一酸化炭素 (CO) で飽和した5容のヘパリン加生理食塩水を加え, COガスを3分間通気した後, 700×g, 10分間室温にて遠心し赤血球を分離した。続いて, 得られた赤血球に5容のCO飽和生理食塩水を加え同様に遠心し, この操作を3回繰り返して洗浄赤血球を得た。洗浄赤血球に4容のCO飽和0.1 mM EDTA溶液, pH 7.4を加え室温で10分間放置して溶血した後, さらに0.1容の9% NaClを加え, 20,000×g, 10分間室温にて遠心して溶血液を分離した。

この溶血液をCOで飽和した5 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4に対して4℃, 48時間透析した²⁾。この透析によりほとんど(95%以上)のHbは結晶化し沈殿した。この溶液を4℃で20,000×g, 20分間遠心してHb結晶を集め, 以下の実験に使用した。なお, 一酸化炭素ヘモグロビンの確認は, 600~480 nm にかけての吸収スペクトルにより行った。また, 分光学的測定はすべて日立340型および200-1型自記分光光度計によった。

(2) イオン交換クロマトグラフィーによるHb成分の分離

Datta らの方法¹⁾に準じて, HbCOについて, Hb成分のDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーによる分離を行った。結晶化したHbCOを5 mM Tris-

glycine緩衝液, pH 8.6に溶解して, 0.01% KCNを含む5 mM Tris-HCl, pH 8.7に対して透析した後, その30 mgを0.01% KCNを含む0.2 M glycine溶液で平衡化したDEAEセルロース (DE-52) カラム (1.0×23.0 cm) に apply した。溶出は12 ml/時の流速で室温で行い, 以下のごとく0.2 M glycine-0.01% KCN溶液中のNaCl濃度勾配によった。すなわち, NaClの勾配は, 容量500 mlの三角フラスコの上部に容量300 mlの分液ロートを接続し, はじめに, 三角フラスコ内に0.2 M glycine-0.01% KCN溶液250 ml, 分液ロート内に, 2 mM NaCl-0.2 M glycine-0.01% KCN溶液250 mlを入れ, 20時間溶出した。次いで, 分液ロート内の溶液を10 mM NaCl-0.2 M glycine-0.01% KCN溶液250 mlに替え, 溶出を続行し, 同様に分液ロート内の溶液を20時間後20 mM NaCl-0.2 M glycine-0.01% KCN溶液に, さらに, 20時間後に30 mM NaCl-0.2 M glycine-0.01% KCN溶液に, またさらに, 20時間後に60 mM NaCl-0.2 M glycine-0.01% KCN溶液に替えて, NaClの濃度勾配による溶出を行った。溶出液は4 mlずつ分取した。

分取した溶出液について415 nmの吸光度を測定し, それぞれのピークをHb画分として分集した。なお, HbCOの確認は600~480 nmの吸収スペクトルにより行った。

(3) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

PAGEはLaemmleらの方法⁵⁾によった。厚さ2 mmのslab gelを用い, stacking gelには4%, separating gelには10%アクリルアミドを使用した。試料をゲルの上端にのせ30 mA, 4時間の条件で泳動を行った。染色にはCoomassie brilliant blue-Rを使用した。また, SDS-PAGEの場合は, 0.1% SDSを含む10%のゲルを用い, 試料は1% SDS存在下で100℃, 90秒間前処置をしたものを用いた。

(4) 逆相高速液体クロマトグラフィー (逆相HPLC) による構成グロビン鎖の分離

逆相HPLCによる構成グロビン鎖の分離は基本的にSchroederらの方法⁶⁾にしたがい, 以下のごとく行った。Vydac C₄カラム (VYDAC 214 TP 54)をLKB社製ULTROCHROM GTi HPLCシステムに装着し溶媒A (トリフルオロ酢酸:水=0.1:99.9, v/v) で平衡化した後, Hb試料(200 μ g—1 mg)を注入し, 溶媒B (アセトニトリル:トリフルオロ酢酸:水=90:0.1:9.9, v/v/v)によって直線濃度勾配をつくり, ヘムおよびグロビン鎖を溶出した。勾配は0分時に溶媒

A 65%, 溶媒 B 35%, 120 分時に溶媒 A 55%, 溶媒 B 45% となるように作成した。流速は 1 ml/分とした。溶出液は 220 nm における吸光度を経時的に測定した。分離したグロビンは濃縮後 4℃ にて保存した。

(5) グロビン鎖 SH 基のビリジリエチル化

分離したグロビンを 1 M グアニジン塩酸 (HPLC 用) に溶解し、グロビンの 20 倍量 (モル比) のメルカプトエタノールを加え、室温で 30 分間放置して還元した。次いで、メルカプトエタノールの 3 倍量 (モル比) の 4-ビリジリエチルを加え、60 分間反応させ SH 基を S-β-(4-ビリジリエチル) システイン (PEC)⁷⁾ とした。これを直ちに、Vydac C₄ カラムの逆相 HPLC に注入し、溶媒 A (トリフルオロ酢酸: 水 = 0.1: 99.9, v/v) と溶媒 B (アセトニトリル: トリフルオロ酢酸: 水 = 90: 0.1: 9.9, v/v/v) を用いた勾配にて、PEC 化したグロビン鎖を溶出分離した。勾配は 0 分時に溶媒 A 100%, 溶媒 B 0%, 40 分時に溶媒 A 0%, 溶媒 B 100% となるように作成し、流速は 1 ml/分とした。分離したグロビンは濃縮後 4℃ にて保存した。

(6) ペプチドマッピング

PEC 化した β グロビンのトリプシン消化は Koide らの方法⁹⁾ に準じて行った。トリプシンは L-(1-tosyl-amino-2-phenyl)-ethyl chloromethyl ketone (TPCK) で処理したものをを用いた。PEC 化した β グロビンを 1 M グアニジン塩酸を含む 0.1 M Tris-HCl, pH 7.8 に 1% (w/v) の濃度となるように溶解し、1/100 重量のトリプシンを加え、37℃, 20 時間消化を行った。得られたペプチドに対して Shelton らの方法⁹⁾ に準じ Vydac C₁₈ カラムを用いて、以下のごとくペプチドマッピングを行った。Vydac C₁₈ カラム (VYDAC 218 TP 54) を溶媒 A (トリフルオロ酢酸: 水 = 0.1: 99.9, v/v) で平衡化した後、トリプシン消化を行った β グロビンを注入し、溶媒 B (アセトニトリル: トリフルオロ酢酸: 水 = 90: 0.1: 9.9, v/v/v) によって直線濃度勾配をつくり、各ペプチドに溶出分離した。勾配は、0 分時に溶媒 A 100%, 溶媒 B 0%, 120 分時に溶媒 A 40%, 溶媒 B 60% となるように作成し、流速は 1 ml/分とした。分離したペプチドは -20℃ にて保存した。

(7) アミノ酸配列の決定

PEC 化した β グロビンおよび上述のトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列は気相シーケンサー (Applied Biosystems 470 A gas phase sequencer および model 120 A PTH analyzer system) による自

動 Edman 分解を行い、得られたフェニルチオヒダントイン誘導体を順次 HPLC により同定し決定した。

(8) 蛋白質濃度の測定

試料の蛋白質濃度は Lowry らの方法¹⁰⁾ にしたがひ、ウシ血清アルブミンを基準として定量した。

以上の実験に使用した試薬類はすべて市販の特級品を用いた。

結 果

1. Hb 成分の分離

Fig. 1 は成熟ラット 1 個体より得られた Hb を DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー (DE カラム) により分離した結果である。図のようにラット Hb は本カラムにより 9 種類の画分に分離された。それぞれの画分を溶出順に I (DE I) から IX (DE IX) 成分とした。各 Hb 成分の割合は DE I (7%), DE II (13%), DE III (3%), DE IV (22%), DE V (9%), DE VI (30%), DE VII (9%), DE VIII (5%), DE IX (2%) であった。各成分の数および割合はともに再現性が極めて高く、個体差も示さなかった。

Fig. 2 は DE カラムによって分離した各 Hb 成分のポリアクリルアミドゲル電気泳動像である。左端の "W" に示したように未分離 Hb は泳動により 6 成分に分離された。DE カラムにより分離した各 Hb 成分の移動度は、溶出順にそれぞれの成分に対応し、いずれ

Fig. 1 Separation of rat hemoglobins by DEAE cellulose column chromatography. Carbon monoxide hemoglobin (30 mg) was applied to DE-52 column (1.0×23.0 cm) equilibrated with 0.2 M glycine-0.01% KCN solution. After washing with 400 ml of the same solution, the column was developed with the NaCl gradient as described in Methods. The flow rate was 12 ml/h and fractions of 4 ml were collected.

Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis of rat hemoglobins

The samples were applied to a 10% polyacrylamide gel. Gel was stained with Coomassie blue:

- lane W: non-separated hemoglobins
- lane I: separated hemoglobin I (DE I)
- lane II: DE II lane III: DE III
- lane IV: DE IV lane V: DE V
- lane VI: DE VI lane VII: DE VII

も単一なバンドを示したが DE V, DE VI 成分はこの条件下では明瞭な分離を示さなかった。一方、分離した各成分は、未分離 Hb と同様に、SDS ポリアクリルアミドゲル泳動上でいずれも単一のバンド (MW=16,000) を示し、Hb 以外の夾雑タンパク質を含まないことが確認された。

2. 逆相 HPLC による構成グロビン鎖の分離

以上のごとく、ラット Hb は 9 種の成分に分離されたが、各 Hb 成分を構成するグロビン鎖の構造を解析する目的から、逆相 HPLC を用いて構成グロビン鎖の分離を試みた。Fig. 3 は未分離 Hb について Vydac C₄ カラムによる逆相 HPLC を行った結果である。図のように、はじめに、ヘム成分が溶出し、次いで α グロビン、 β グロビンの順に分離溶出した。図から、両グロビンのうち、 α グロビンのピークが単一であるのに対して、 β グロビンには二つの肩がみられ、逆相 HPLC 上少なくとも 3 種の β グロビンに分かれることが示唆された。しかし、分離条件をいろいろ変えて検討しても、これ以上よい分離は得られなかった。

次いで、DE カラムより分離した Hb 成分についてそれぞれの構成グロビンの分離を試みた。Fig. 4 は DE I から DE IX のうち小成分である DE III, DE VIII および DE IX を除いた Hb 成分について上記と同様に

Fig. 3 Globin chain separation of non-separated rat hemoglobin by reverse-phase HPLC using a Vydac C₄ column

1 mg of non-separated Hb was applied to the column.

- Eluent: solution A; 0.1% TFA
- solution B; 90% acetonitrile in 0.1% TFA
- Gradient: 35% B~45% B/120 min
- Flow rate: 1 ml/min

Vydac C₄ カラムによる逆相 HPLC を行った結果である。いずれもヘム、 α 鎖、 β 鎖の順に溶出された。しかし、未分離 Hb の場合と異なって、 α 鎖、 β 鎖はいずれも単一ピークを示し、また、両者の成分比がほぼ同一であることから、DE カラムにより分離した Hb 成分は、それぞれ、単一の α 鎖および β 鎖よりなることが示唆された。一方、各グロビンの溶出パターンを比較したところ、 α 鎖および β 鎖の溶出位置は各成分間でほとんど差を示さず、溶出位置からそれぞれの相違を知ることはできなかった。

3. β グロビン鎖の一次構造の解析

分離した各々の Hb 分子の構成グロビン鎖の構造を明らかにするため、9 種類の Hb のうち主成分である DE I, II, IV, V, VI, VII の 6 種の Hb の β 鎖について、以下のように一次構造の解析を行った。

(1) ペプチドマッピング

逆相 HPLC によって分離したそれぞれの β グロビンをトリプシン消化し、再び Vydac C₁₈ カラムを用いた逆相 HPLC によりペプチドマップを作成した。Fig. 5 はこのうち DE II および DE VI の β グロビンのマップである。両者は互いによく類似しているが、各ピークのうち No. 1 で示したペプチド (P-1) は DE II に特異的であり、これに対して No. 26 のペプチド (P-26)

Fig. 4 Globin chain separation of the DEAE-separated rat hemoglobins by reverse-phase HPLC using a Vydac C_4 column
200 μ g of each hemoglobins were applied to the column.

Eluent: solution A; 0.1% TFA
solution B; 90% acetonitrile in 0.1% TFA

Gradient: 35% B~45% B/120 min

Flow rate: 1 ml/min

I, DE I; II, DE II; IV, DE IV; V, DE V;
VI, DE VI; VII, DE VII

は DE VI に特異的であることが分かる。一方、ほかの Hb の β グロビンのマップはこの両者のいずれかに一致し、DE I は DE II のマップと、DE IV, V, VII は DE VI のマップと同一であった。この事実は、DE I, II は互いに同一の β グロビンを、DE IV, V, VI, VII はこれとは異なる β グロビンを有することを示唆する。そこで、それぞれのマップに特異的な P-1 および P-26、両マップに共通な P-25 (No. 25) の、3 種のペプチドを選び、気相シーケンサーを用いてアミノ酸配列を測定した。Table 1 がその結果である。この結果を従来報告されているラット Hb の β グロビン鎖のアミノ酸配列^{3,4,11-13}) と比較したところ、P-1 は III β グロビンの 41~44 番、P-26 は II β グロビンの 41~59 番、また P-25 は II β , III β 両グロビンの 31~40 番のアミノ酸配列と一致し、これから DE I, II は III β を、DE IV, V, VI, VII は II β を有することが強く示唆された。

Fig. 5 Separation of tryptic peptides of rat β globins by reverse-phase HPLC using a Vydac C_{18} column
Samples were the trypsin digested DE II (upper) and DE VI (lower). The numerals in the figures were the peptide numbers.

Eluent: solution A; 0.1% TFA
solution B; 90% acetonitrile in 0.1% TFA

Gradient: 0% B~60% B/120 min

Flow rate: 1 ml/min

Table 1 Amino acid sequences of tryptic peptides of the isolated β globins

tryptic peptide*	amino acid sequence
P-1	Tyr Phe Ser Lys
P-25	Leu Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg
P-26	Tyr Phe Asp Ser Phe Gly Asp Leu Ser Ser Ala Ser Ala Ile Met Gly Asn Pro Lys

*P-1, P-25 and P-26 indicate the peaks 1, 25 and 26 shown in Fig. 4.

(2) N-末端近傍のアミノ酸配列の決定

ペプチドマップから推定される各 Hb の β グロビン鎖構成をさらに確かめるため、上記のグロビンのす

	1									10										20
III β	Val	His	Leu	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala	Thr	Val	Ser	Gly	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	Ala
DE I	Val	His	Leu	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala	Thr	Val	Ser	Gly	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	Pro
DE II	Val	His	Leu	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala	Thr	Val	Ser	Gly	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	Pro
II β	Val	His	Leu	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	Asn	Gly	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	Pro
DE IV	Val	His	Leu	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	Asn								
DE V	Val	His	Leu	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	Asn	Gly	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	Pro
DE VI	Val	His	Leu	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	Asn	Gly	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	Pro
DE VII	Val	His	Leu	Thr	Asp	Ala	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	Asn	Gly	Leu	Trp	Gly	Lys	Val	Asn	Pro
	21									30										40
III β	Asp	Asn	Val	Gly	Ala	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg
DE I	Asp	Asn	Val	Gly	Ala	Glu														
DE II	Asp	Asn	Val	Gly	Ala	Glu														
II β	Asp	Asp	Val	Gly	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg
DE IV																				
DE V	Asp	Asp	Val	Gly	Gly	Glu														
DE VI	Asp	Asp	Val	Gly	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg										
DE VII	Asp	Asp	Val	Gly	Gly	Glu														
	41									50										60
III β	Tyr	Phe	Ser	Lys	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile	Met	Gly	Asn	Pro	Gln	Val
DE I																				
DE II																				
II β	Tyr	Phe	Asp	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val
DE IV																				
DE V																				
DE VI																				
DE VII																				

Fig. 6 NH₂-terminal amino acid sequences of the isolated β globins
 The sequences of II β and III β have been reported by Garrick et al^{3,4)}.
 ■ indicates the portions where the amino acid residues are different between II β and III β.
 The amino acid residue at No. 20 of III β, Ala, is substituted by Pro in DE I and DE II.

べてについて、N-末端から12ないし30番までのアミノ酸配列を決定し、従来報告されている配列^{3,4,11-13)}と比較した。Fig. 6はその結果である。これから上述のペプチドマップで推定されたように今回分離したDE IおよびDE IIの各HbはIII βを、DE IV, V, VI, VIIの各HbはII βを有することが確認された。

考 察

ラットHbは多様性を示し、このことがラットHbの構造、機能、ならびにグロビン生成の機構を知るうえでの障害になっている。以前には、成熟ラットの溶血液中に6種のHb²⁾の存在することが等電点電気泳動およびイオン交換クロマトグラフィーで明らかにされていたが、Dattaら¹⁾はさらに独自の溶出法を用いて、DEAE-セルロースカラムにより10種のHbを分

離した。一方、これらを構成するグロビン鎖に関しては、CM-セルロースカラムによって3種のα鎖(0α, Iα, IIα)と4種のβ鎖(0β, Iβ, IIβ, IIIβ)が単離^{3,14)}され、それぞれのアミノ酸の全配列ないしは部分配列^{3,4)}が決定されている。これらのグロビン鎖の組み合わせから、原理的には12種(3α×4β)のHbの存在が可能である。しかし、各グロビンの間には同一のアミノ酸配列^{3,4)}を示すものもあり、すべてのグロビン鎖に対応する遺伝子が非対立性に存在するか否かについてはいまだ不明である。また、上述の10種のHb成分がそれぞれどのようなグロビン構成を有するかについても疑問である。著者は本実験においてこれらの従来の知見を再検討することを目的として、HPLCを解析の主要な手段として構成グロビン鎖の分離同定を試みた。

各Hb成分の分離は、再現性に優れることから

Datta らの方法¹⁾に準拠したが、得られた 9 種の Hb の分離パターンは従来の報告と極めてよく一致した。しかし、DE VII, VIII, IX 成分に関してはその溶出位置が若干異なり、Datta ら¹⁾の同番号成分とは必ずしも一致しなかった。また、Datta ら¹⁾は再クロマトによって Hb IV を IV a, IV b の 2 成分に分離したが、今回はそのような分離はみられなかった。これらの差異は著者が酸素ヘモグロビン (HbO₂) の代わりにより安定な一酸化炭素ヘモグロビン (HbCO) を用いたことによるのかもしれない。一方、シアノメトヘモグロビン (CN-metHb) ではよい分離結果が得られなかった。また、著者は試料の精製に際してラット Hb を結晶化して用いたが、結晶化によって特定のヘモグロビン成分が失われることはなく、その分離パターンは非結晶成分と全く同一であった。

Hb を構成するグロビン鎖の分離には、従来から 8 M 尿素を用いた CM-セルロースカラムによる Clegg らの方法¹⁵⁾が最もよく用いられている。しかし、逆相 HPLC は試料の微量化、分析の精度、再現性などで前者より優れており、また脱ヘム操作を要さない点でも試料の二次的変化を防ぐことから有用である。Schroeder ら⁹⁾はすでに Vydac C₄カラムを用いてラットグロビンの分離を試みているが、著者は今回同様の方法によって、DEAE-セルロースカラムで分離した 9 種の Hb 成分のうち主成分である 6 種 (DE I, II, IV, V, VI, VII) の構成グロビン鎖を単離した。

すでに述べたように、Garrick ら^{3,4)}は 3 種の α 鎖および 4 種の β 鎖のアミノ酸配列 (I β , II β , III β については全配列、ほかは部分配列) を決定している。各鎖間の差異はわずかであるが、 β 鎖に関しては差異のほとんどが N-末端近傍に存在する。著者はこの点を解析に利用して、分離した各々の β 鎖についてペプチドマッピングおよび N-末端より 12~30 番のアミノ酸配列の決定を行った。その結果、6 種の Hb のうち DE I, II を構成する β 鎖は III β であり、DE IV, V, VI, VII では II β であることが明らかになった。

以上の結果から、はじめに、DE I, II Hb の違いは α 鎖によるものと考えることができる。事実、著者は現在両 Hb の α 鎖がそれぞれ II α , I α であると思われる結果を得ている (未発表)。しかしながら同様の考えでいずれも II β 鎖を有する DE IV~VII Hb の相違を説明するには 4 種の α 鎖の存在を想定する必要を生じる。しかし、現在までにラット Hb に関して 3 種^{3,4,14)}を越える α 鎖の報告はなく、その可能性は極め

て少ない。したがって、この 4 種の Hb の成因については、いずれかのグロビン鎖の post-translational な変化を考えるのが最も妥当であると思われる。これに関して、さきに I β , II β が CM-セルロースカラムで分離⁹⁾されるにもかかわらず、同一の一次構造⁴⁾を有していた事実は極めて興味深い。これに対して逆相 HPLC では両者の分離はみられなかった。これらの事実は両者のいずれかが non-covalent modification を受けている可能性を強く示唆するものである。

Hb の多様性の解析は、本質的にはそれぞれのグロビン鎖をコードする遺伝子の構造解析を必要とすると思われる。この点に関してわれわれは現在 cDNA およびゲノム DNA の解析を行っている。しかし、一方においてタンパク質レベルでの解析も必須であって、両面からの検討が相まって、はじめてその分子機構の全容が明らかになるものと考えられる。今後、分離したすべての Hb 成分について一次構造の解析を行う予定である。

結 論

1) ウィスター系成熟雄ラット 1 個体の溶血液より、結晶化 Hb を得た。

2) DE カラムによりラット Hb を 9 種の単一で異なる Hb に分離した。各 Hb の成分比は、それぞれ DE I (7%), DE II (13%), DE III (3%), DE IV (22%), DE V (9%), DE VI (30%), DE VII (9%), DE VIII (5%), DE IX (2%) であった。

3) 6 種の Hb 主成分 (DE I, II, IV, V, VI, VII) について Vydac C₄カラムを用いた逆相 HPLC を行い、それぞれの Hb を構成する α および β グロビンを分離した。

4) すべての β グロビンについてペプチドマッピングおよび N-末端近傍のアミノ酸配列の解析を行い、DE I および DE II を構成する β グロビンは III β グロビンであり、DE IV, V, VI, VII を構成する β グロビンは II β グロビンであることを明らかにした。

5) これらの結果から、少なくとも DE IV, V, VI, VII にみられる Hb の多様性にはグロビン鎖の post-translational modification が関与していることが推定された。

稿を終るにあたり、アミノ酸配列の解析をしていただいた星薬科大学微生物学教室入江昌親教授、また、直接御指導いただいた第 1 生化学教室阿部靖子博士ならびに佐藤浩之助手、御協力を

いただいた教職員各位に感謝の意を表します。

なお本論文の要旨は、第 60 回日本生化学会大会(1987 年 10 月)において発表した。

文 献

- 1) Datta, M.C. and Gilman, J.C.: Rat hemoglobin heterogeneity; Postnatal changes in proportions of multiple components and effects of erythropoietin on marrow cell cultures. *Hemoglobin*, 5, 701~714, 1981.
- 2) Stein, S., Cherian, M.G. and Mazur, A.: Preparation and properties of six rat hemoglobins; Nonuniform biosynthesis in marrow erythroid cells. *J. Biol. Chem.*, 246, 5287~5293, 1971.
- 3) Garrick, L.M., Sloan, R.L., Ryan, T.W., Klonowski, T.J. and Garrick, M.D.: Primary structure of the major β -chain of rat haemoglobins. *Biochem. J.*, 173, 321~330, 1978.
- 4) Garrick, M.D. and Garrick, L.M.: Red Blood Cells of Domestic Mammals. p. 165~207, Elsevier Science Publishers B.V., New York, 1983.
- 5) Laemmle, U.K. and Favre, M.: Maturation of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, 80, 575~599, 1973.
- 6) Schroeder, W.A., Shelton, J.B., Shelton, J.R., Huynh, V. and Teplow, D.B.: High performance liquid chromatographic separation of the globin chains of non-human hemoglobins. *Hemoglobin*, 9, 461~482, 1985.
- 7) Cavins, J.F. and Friedman, M.: An internal standard for amino acid analyses; S- β -(4-pyridylethyl)-L-cystein. *Anal. Biochem.*, 35, 489~493, 1970.
- 8) Koide, T., Tsunasawa, S. and Ikenaka, T.: Studies on soybean trypsin inhibitors. *Eur. J. Biochem.*, 32, 408~416, 1973.
- 9) Shelton, J.B., Shelton, J.R., Schroeder, W.A. and Powars, D.R.: Hb Aztec or alpha 2/76 (EF5) Met to Thr (beta-2) detection of a silent mutant by high performance liquid chromatography. *Hemoglobin*, 9, 325~332, 1985.
- 10) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265~275, 1951.
- 11) Crkvenjakov, R., Bucan, M., Konstantinovic, M., Fogel, M., Savic, A. and Glisin, V.: Characterization of two rat globin cDNA clones. *Hemoglobin*, 8, 597~611, 1984.
- 12) Ohshita, Y. and Hozumi, T.: Sequence of the rat β -globin mRNA. *Nucleic Acids Res.*, 15, 1336, 1987.
- 13) Satoh, H., Fujii, H. and Okazaki, T.: Molecular cloning and sequence analysis of two rat major globin cDNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146, 618~624, 1987.
- 14) Garrick, L.M., Sharma, V.S., McDonald, M.J. and Ranney, H.M.: Rat haemoglobin heterogeneity. *Biochem. J.*, 149, 245~258, 1975.
- 15) Clegg, J.B., Naughton, M.A. and Weatherall, D.J.: Abnormal human haemoglobin; Separation and characterization of the α and β chains by chromatography, and the determination of two new variants, Hb Chesapeake and Hb J (Bangkok). *J. Mol. Biol.*, 19, 91~108, 1966.

(受付: 1988 年 4 月 22 日)