

# HEMOGLOBIN HIROSHIMA, A BETA-CHAIN MUTANT ASSOCIATED WITH INCREASED OXYGEN-AFFINITY AND COMPENSATORY POLYCYTHEMIA

HEMOGLOBIN HIROSHIMA , 酸素親和性増強と代償性多血症を伴う  
 $\beta$ 鎖変異型ヘモグロビン

HOWARD B. HAMILTON, M.D.

IWAO IUCHI, M.D. 井内岩夫

TAKAOKI MIYAJI, M.D. 宮地隆興

SUSUMU SHIBATA, M.D. 柴田 進



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION

国立予防衛生研究所 - 原爆傷害調査委員会

JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE

## TECHNICAL REPORT SERIES

### 業 績 報 告 書 集

The ABCC Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, advisory councils, and affiliated government and private organizations. The Technical Report Series is in no way intended to supplant regular journal publication.

ABCC業績報告書は、ABCCの日本人および日本人専門職員、顧問、諮議会、政府ならびに民間の関係諸団体の要求に応じるための日英両語による記録である。業績報告書集は決して通常の誌上発表に代るものではない。

Approved 承認 30 May 1968

Research Project 研究課題 2-64

## HEMOGLOBIN HIROSHIMA, A BETA-CHAIN MUTANT ASSOCIATED WITH INCREASED OXYGEN-AFFINITY AND COMPENSATORY POLYCYTHEMIA

HEMOGLOBIN HIROSHIMA . 酸素親和性増強と代償性多血症を伴う  
β鎖変異型ヘモグロビンHOWARD B. HAMILTON, M.D.<sup>1</sup>IWAO IUCHI, M.D.<sup>2</sup> 井内岩夫TAKAOKI MIYAJI, M.D.<sup>3</sup> 宮地隆興SUSUMU SHIBATA, M.D.<sup>3</sup> 柴田 進ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION  
HIROSHIMA AND NAGASAKI, JAPAN

A Cooperative Research Agency of  
U.S.A. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - NATIONAL RESEARCH COUNCIL  
and  
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE  
with funds provided by  
U.S.A. ATOMIC ENERGY COMMISSION  
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH  
U.S.A. PUBLIC HEALTH SERVICE

原 爆 傷 害 調 査 委 員 会

広島市立総合病院

米 国 学 士 院 学 術 会 議 十 厚 生 省 国 立 子 供 衛 生 研 究 所  
及 西 日 本 共 同 調 査 研 究 機 関

米 国 原 子 力 委 員 会、厚 生 省 国 立 子 供 衛 生 研 究 所 及 日 本 共 同 調 査 研 究 機 関 研 究 費 による

Department of Clinical Laboratories, ABCC<sup>1</sup>; Department of Clinical Pathology, Kawasaki Hospital, Okayama<sup>2</sup>;

Third Division of Internal Medicine, Yamaguchi University School of Medicine, Ube<sup>3</sup>

ABCC 臨床検査部<sup>1</sup>; 岡山県川崎病院臨床病理部<sup>2</sup>; 山口大学医学部第3内科学教室<sup>3</sup>

## ACKNOWLEDGMENT

### 感謝のことば

We thank Professor Goro Kikuchi, Department of Biochemistry, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan, for the manometric determinations and Dr. Kiyohiro Imai, Department of Basic Engineering, Osaka University, Osaka, Japan, for the spectrophotometric determinations and permission to use his data. We are grateful to Dr. Helen M. Ranney and Dr. Ronald L. Nagel of Albert Einstein College of Medicine, New York, and to Dr. Reinhold Benesch and Dr. Ruth E. Benesch of Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, for many helpful suggestions in connection with the preparation of this report. We are indebted to Dr. Masahide Sasaki of the Department of Clinical Pathology, Kawasaki Hospital, Okayama, Japan, and Mr. Takaji Nishizawa and Miss Hiroko Hamada of the Department of Clinical Laboratories, ABCC, for obtaining samples from relatives of the proband living some distance from Hiroshima City.

This investigation was supported in part by an USPHS research grant (GM 09469-06) from the Division of General Medical Sciences, USPHS to Dr. Taku Komai, Professor Emeritus of Kyoto University, Kyoto, Japan.

東北大学医学部生化学教室の菊地吾郎教授からは、このヘモグロビンの酸素親和性測定についてご援助をいただいた。また大阪大学基礎工学部小谷研究室の今井清博氏からは、酸素親和性分光学的測定につきご協力をいただき、その資料の使用の許可をいただいた。ここに深甚の感謝を表したい。また、本報告書の作成にあたってニューヨーク市 Albert Einstein 医科大学の Dr. Helen M. Ranney と Dr. Ronald L. Nagel ならびにニューヨーク市 Columbia 大学医学部の Dr. Reinhold Benesch と Dr. Ruth E. Benesch から多くの有益な助言を寄せていただいたことは感謝にたえない。広島市から相当遠距離に住んでいる発端者の血縁者からの血液標本の入手に尽力された岡山市川崎病院臨床病理部の佐々木匡秀博士および ABCC 臨床検査部の西沢孝次氏と浜田倫子氏に感謝する。

本調査の一部は、米国公衆衛生局総合医科学部門から京都大学名誉教授の駒井卓博士に与えられた研究助成金 (GM 09469-06) により行なわれた。

## CONTENTS

### 目 次

Introduction	緒 言 .....	1
Methods	実験方法 .....	1
Results	実験成績 .....	3
Discussion	考 察 .....	12
Summary	要 約 .....	17
References	参考文献 .....	18

Table	1. Hematologic data for females in family segregating for hb Hiroshima gene hb Hiroshima 遺伝子の分離が認められた家系における女子家族員の血液検査所見 .....	5
	2. Comparison of amino acid content of $\beta$ Tp-14,15 of hb A with the abnormal peptide of hb Hiroshima hb A の $\beta$ T <sub>p</sub> -14, 15 と hb Hiroshima 異常ペプチドのアミノ酸分析の比較 .....	10
	3. Comparison of amino acid analysis of hydrolysates prepared by carboxypeptidase A and B treatment of C terminal of $\beta$ chain of hb A and hb Hiroshima hb A と hb Hiroshima の $\beta$ 鎖 C 末端のカルボキシペプチダーゼ A および B 処理によってできた加水分解物のアミノ酸分析の比較 .....	11
	4. Comparison of amino acid sequences of $\beta$ Tp-14,15 of hb A with the abnormal peptide of hb Hiroshima hb A の $\beta$ T <sub>p</sub> -14, 15 と hb Hiroshima 異常ペプチドのアミノ酸配列の比較 .....	11
	5. Comparison of some hemoglobin variants having increased oxygen affinity 酸素親和性増強を示す異常血色素の比較 .....	14

Figure 1.	Pedigree of hb Hiroshima kindred 図 hd Hiroshima の家系 .....	4
	2. Oxygen equilibria of hb A, Hiroshima and an unfractionated hemolysate containing equal proportions of hb A and Hiroshima hb A, hb Hiroshima および hb A と hb Hiroshima を等量含む非分画溶血液の酸素平衡 .....	6
	3. Effect of pH on oxygen equilibria of hb A and Hiroshima, determined under the same conditions as in Figure 2 図 2 と同じ条件のもとにおける hb A と hb Hiroshima の酸素平衡に対する pH の影響 .....	6
	4. Hill plot for hb A and Hiroshima of data shown in Figure 2 図 2 に示した hb A と hb Hiroshima に関する資料の Hill 曲線 .....	7
	5. Agar gel electrophoresis of unfractionated hemolysates from a carrier of hb Hiroshima and a normal control hb Hiroshima 保有者および正常対照例から得た非分画溶血液の寒天ゲル電気泳動像 .....	8

6. A: CMC column chromatography of hb A and Hiroshima hb A と hb Hiroshima の CMC カラムクロマトグラフィー	
B: CMC column chromatography of hemolysates treated with p-chloromercuribenzoic acid to separate $\alpha$ and $\beta$ chains $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖を分離するための p-クロロ水銀安息香酸処理溶血液の CMC カラムクロマトグラフィー .....	8
7. A: Urea dissociation electrophoresis of hb A and Hiroshima hb A および hb Hiroshima の尿素解裂電気泳動法	
B: Hybridization of hb A and Hiroshima with canine hemoglobin hb A および hb Hiroshima とイヌ血色素との雑種生成試験 .....	9
8. Fingerprints of tryptic digests of purified $\beta$ chains 精製 $\beta$ 鎖のトリプシン消化物のフィンガープリント .....	9

Presented in part at the 12th International Congress of Genetics, 19-28 August 1968, Tokyo; and The 12th International Congress of Hematology, 1-6 September 1968, New York. A paper based on this report was published in the Journal of Clinical Investigation 48:525-35, 1969; and Kawasaki Byoin Igaku Zasshi —Medical Journal of Kawasaki Hospital 1:53-65, 1968.

この研究の一部は、1968年8月19日-28日東京で開催された第12回国際遺伝学会と、1968年9月1日-6日ニューヨークで開催された第12回国際血液学会において発表された。

本報告に基づく論文は Journal of Clinical Investigation 48: 525 - 35, 1969および川崎病院医学雑誌 1: 53-65, 1968年に発表した。

# HEMOGLOBIN HIROSHIMA, A BETA-CHAIN MUTANT ASSOCIATED WITH INCREASED OXYGEN-AFFINITY AND COMPENSATORY POLYCYTHEMIA

## HEMOGLOBIN HIROSHIMA, 酸素親和性増強と代償性多血症を伴う $\beta$ 鎖変異型ヘモグロビン

### INTRODUCTION

In the past 15 years, the structure of hemoglobin has been studied in detail and a great deal is known about its structural constituents and spatial organization. The oxygen transport functions of the hemoprotein have been shown to depend on interactions between heme and globin and on those between the four polypeptide chains of the molecule. The latter interactions are important, in turn, in the dissociation into symmetrical dimers and subunit exchange that occur during oxygen binding. Nevertheless, the relation between function and specific structural features is as yet but poorly understood. One approach to studying the correlation of structure with function is through abnormal hemoglobins where a known structural abnormality is associated with physiological malfunction of the red blood cell.

This report describes a recently discovered abnormal hemoglobin in several members of a Japanese family in whom there is evidence of dysfunction of the red blood cells. This hemoglobin, named hb Hiroshima, is one of two fast moving  $\beta$  chain variants discovered during a systematic survey for hemoglobinopathies among 9262 individuals who visited the ABCC clinic in Hiroshima between June 1963 - November 1965 as voluntary participants in the ABCC-JNIH Adult Health Study and Study of Children Exposed In Utero.<sup>1,2</sup> The other abnormal hemoglobin, hb Hijiya, found during this survey has been reported elsewhere.<sup>3</sup>

### METHODS

Blood for hematologic studies was collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). Erythrocyte counts were performed electronically using a Model A Coulter Counter and total hemoglobin was determined by the cyanomet-hemoglobin method.<sup>4</sup>

### 緒言

過去15年間に血色素の構造について詳細な研究が行なわれ、その構成と立体構造について多くの知見が得られている。血液蛋白質の酸素運搬機能は、ヘムとグロビンの間の相互作用および分子を構成する4つのポリペプチド鎖の間の相互作用に依存することが認められている。この後者の相互作用は、酸素結合の際の対称的な2量体への解離および subunit 交換においても重要である。しかし、機能と特定の構造特性との間の関係については、まだじゅうぶんに解明されていない。構造と機能との相関関係を研究する一つの方法は、構造異常と赤血球の生理学的機能障害との関連が認められている異常血色素を研究することである。

本報告では、日本人の一家系若干名に最近発見された異常血色素について述べるが、これは赤血球の機能障害を伴っていたものである。この血色素は、hb Hiroshima と命名され、1963年6月から1965年11月までの期間に、広島における ABCC 一予研成人健康調査および胎内被爆児調査<sup>1,2</sup> で自発的に受診した9262人について行なわれた異常血色素症の系統的調査で発見された2種類の泳動度の速い  $\beta$  鎖変異型の一つである。この調査で発見された他の一つの異常血色素は、hb Hijiya であり、これについては別に報告した。<sup>3</sup>

### 実験方法

血液学的検査の血液試料は、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加して採取し、赤血球数は、A型 Coulter 計数器を用いて電子工学的に計算し、総血色素量はシアノメトヘモグロビン法<sup>4</sup> によって測定した。

Oxygen affinity of red blood cell suspensions and unfractionated hemolysates were determined manometrically by the spectrophotometric method of Allen et al.<sup>5</sup> using a modified tonometer.<sup>6</sup> Oxygen equilibrium curves of purified preparations of hemoglobin were obtained by oxygen electrode and continuous automatic recording spectrophotometry.<sup>7</sup> At all times during the latter determinations the methemoglobin content of the test samples was less than 3% of the total.

The abnormal hemoglobin of the index case and others in the family was first identified by agar gel electrophoresis at pH 8.6.<sup>8</sup> Methods for further characterization of the hemoglobin are identical to those described in other studies from these laboratories<sup>1,9</sup> and include the following: paper and starch gel electrophoresis; column chromatography on carboxymethylcellulose (CMC) and amberlite IRC 50; tests of solubility of reduced hemoglobin, hb F and alkali resistance. The last two tests were performed on unfractionated hemolysates by the methods of Singer et al.<sup>10</sup> and Betke et al.<sup>11</sup>

The abnormal hemoglobin was separated from hb A by starch block electrophoresis,<sup>9</sup> dialysed in Visking tubing against deionized water at 5C, and concentrated by immersion in Sephadex G 25 powder. Hb A was purified in the same manner, and in tests of oxygen affinity, was eluted from the same starch block from which hb Hiroshima was obtained.

The chain location of the anomaly was determined by urea dissociation electrophoresis and by hybridization tests between hb Hiroshima and canine hemoglobin.<sup>1</sup> Globin was prepared by the method of Anson and Mirsky<sup>12</sup>; alpha and beta chains were separated by CMC column chromatography of hemolysates after treatment with p-chloromercuri-benzoic acid.<sup>13</sup> Fingerprints of tryptic digests were prepared by standard procedures.<sup>14,15</sup> The abnormal peptide on the fingerprints was hydrolysed with 6N HCl at 105C for 22 hours and the amino acid composition determined by silica gel thin layer chromatography<sup>16</sup> and automatic amino acid analysis.<sup>17</sup>

Carboxypeptidase A and B (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)<sup>18</sup> hydrolysis was performed to determine the amino acid composition of the C terminal of  $\beta$  Hiroshima and  $\beta$  A. The  $\beta$  chain, dissolved in N/1000 HCl, was dialysed against three changes of N/1000 HCl for 18 hours, freeze-dried and redissolved in water to a concentration of 0.2%, and the pH, initially 3-4, was adjusted to 7.65 with N/10 NaOH. Carboxypeptidase A (10  $\mu$ l, corresponding to 0.2mg of protein: substrate-enzyme ratio, 100:1) was added and hydrolysis carried out at 25C.

赤血球懸濁液と非分画溶血液の酸素親和性は, Allen らの分光学的方法<sup>5</sup>に従って, 改良型トノメーター<sup>6</sup>を用いて測定した. 精製血色素の酸素平衡曲線は, 酸素電極と連続自動記録分光測定<sup>7</sup>によって求めた. この後者の測定では, 検体のメトヘモグロビン含有量は, 常に総血色素量の3%以下であった.

発端者(指標例)とその他の家族員における異常血色素は, 最初 pH 8.6の寒天ゲル電気泳動法<sup>8</sup>によって検出された. 血色素の性状を調べるのに用いた方法は, 本研究室における以前の研究<sup>1,9</sup>と同じで, 次のとおりであった. すなわち, 濾紙およびでんぷんゲル電気泳動; カルボキシメチルセルローズ (CMC) および Amberlite IRC 50カラムクロマトグラフィ; 還元血色素の溶解度, hb F およびアルカリ性抵抗の諸検査などである. 最後の2つの検査は, Singer らの方法<sup>10</sup>と Betke らの方法<sup>11</sup>に従って, 溶血液そのままを用いて行なった.

異常血色素は, でんぷんブロック電気泳動法<sup>9</sup>によって hb A から分離し, Visking 管に入れて 5C で脱イオン水に対して透析した後, Sephadex G 25粉末をまぶして脱水濃縮した. hb A も同じ方法で精製し, その酸素親和性の検査は, hb Hiroshima の分離に用いたでんぷんブロックからの溶出液を使用して行なった.

鎖異常の決定は, 尿素解裂電気泳動法および hb Hiroshima とイヌ血色素との間の雑種生成試験<sup>1</sup>によって行なった. グロビンは Anson-Mirsky 法<sup>12</sup>によって調製した.  $\alpha$ 鎖と  $\beta$ 鎖の分離は, p-クロル水銀安息香酸処理溶血液の CMC カラムクロマトグラフィによった.<sup>13</sup> トリプシン消化物のフィンガープリントは, 標準的な方法によって作成した.<sup>14,15</sup> フィンガープリントにおける異常ペプチドは, 6N HCl を用いて 105C で22時間加水分解し, アミノ酸組成は, シリカゲル薄層クロマトグラフィ<sup>16</sup>と自動アミノ酸分析法<sup>17</sup>によって決定した.

hb Hiroshima の  $\beta$ 鎖と hb A の  $\beta$ 鎖の C 末端のアミノ酸組成を決定するため, カルボキシペプチダーゼ A と B (ミズーリ州セントルイス市 Sigma Chemical 社製) で加水分解を行なった.<sup>18</sup> すなわち, N/1000 HCl に溶解した  $\beta$ 鎖を, N/1000 HCl に対して 3回18時間透析し, 凍結乾燥後に 0.2% の濃度に水で再溶解し, pH は最初の 3-4 から N/10 NaOH で 7.65 に調節した. 次にカルボキシペプチダーゼ A (10  $\mu$ l, これは蛋白 0.2mg に相当; 基質: 酵素比は 100:1) を加え, 25C で加水分解を行



Carboxypeptidase B (50  $\mu$ l, corresponding to the same concentration as carboxypeptidase A) was added 120 minutes later. The pH of the mixture was maintained at 7.6-7.7 with N/10 NaOH. During hydrolysis, 0.5 ml samples were withdrawn from the reaction mixture as follows: before addition of enzyme, 30, 120, 140, 180 and 360 minutes after the addition of carboxypeptidase A, the latter four intervals corresponding, respectively, to 0, 20, 60 and 240 minutes after the addition of carboxypeptidase B. These 0.5 ml hydrolysates were boiled for 5 minutes at 100 C, cooled, freeze-dried, and subjected first to high voltage paper electrophoresis (pyridine-acetic acid-water, pH 6.4, at 2600 v, 90 mA for 30 minutes) and then chromatography (butanol:acetic acid:water = 3:1:1). Ninhydrin was used to identify the locations of the amino acids on the chromatograms.

Absorption spectra of acid and alkaline oxy- and methemoglobin, and of alkaline deoxygenated hemoglobin and cyanomethemoglobin were determined with a Hitachi-Perkin Elmer model 139 UV-VIS spectrophotometer.

## RESULTS

**Index Case and Family Study** The proband is a 44-year-old housewife who, with the exception of hyperthyroidism treated by thyroidectomy, has been in reasonably good health during her 8 years' observation at the ABCC clinic. Neither the proband nor any relative was exposed to the atomic bomb. The only finding of note has been a persistent elevation of the erythrocyte count, hemoglobin and hematocrit: over 5.5 million, 15.5 g/100 ml and 50% respectively. Erythrocyte morphology and fragility were within normal limits. Hb Hiroshima accounted for 50.7% of the total hemoglobin, hb A<sub>2</sub> for 2.3% and hb F for 2.2%. Ferrohemoglobin solubility and alkaline resistance were normal.

Among the proband's relatives (Figure 1), hemolysates from seven females contained about 50% of hb Hiroshima. All are in good health, with the exception of a 41-year-old housewife (II<sub>1</sub>) who is anemic and has recently complained of occasional chest pains, but details pertaining to her complaint are not available. Among those who have had children (I<sub>1</sub>, II<sub>1,10,12</sub>) there is no record of spontaneous abortions or miscarriages. Both parents and a brother (II<sub>7</sub>) of the proband died of tuberculosis; another brother (II<sub>11</sub>) died in action during the war; the only brother (II<sub>2</sub>) of II<sub>1</sub> was born prematurely and died in infancy, cause unknown, but there was no report of cyanosis, jaundice, or physical anomalies. It is not particularly surprising that the trait has been found only in females in this kindred, since in the two branches of the family where the gene

なった. 120分後にカルボキシペプチダーゼB (50 $\mu$ l, これはカルボキシペプチダーゼAと同じ濃度に相当)を加えた. 混合液のpHはN/10 NaOHで7.6-7.7に保った. 加水分解の途中で, 反応中の混合液から0.5mlずつ次のように取り出した. すなわち, 酵素添加前, カルボキシペプチダーゼA添加後30分, 120分, 140分, 180分および360分; この最後の4つは, それぞれカルボキシペプチダーゼB添加後0分, 20分, 60分および240分に相当する. これら水解物0.5mlを100Cで5分間煮沸し, 冷却後に凍結乾燥した. それから, まず高圧濾紙電気泳動法(ピリジン-酢酸-水, pH 6.4, 2600V, 90mA, 30分間)を行ない, 次にクロマトグラフィ(ブタノール:酢酸:水=3:1:1)を行なった. クロマトグラムにおけるアミノ酸の位置は, ニンヒドリンを用いて決定した.

酸性およびアルカリ性の酸素ヘモグロビンとメトヘモグロビン, ならびにアルカリ性の還元メトヘモグロビンとシアノメトヘモグロビンの吸光スペクトルは, 日立-Perkin Elmer 139 UV-VIS 型分光光度計によって測定した.

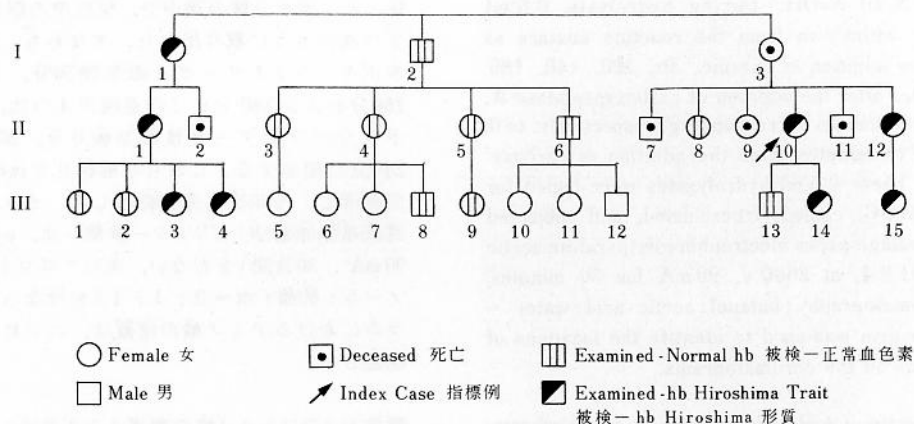
## 実験成績

**指標例および家系調査** 発端者は, 44歳の主婦で, 甲状腺機能亢進症のために甲状腺切除術を受けた以外は, ABCCにおける8年間の経過観察での健康状態は良好である. 発端者も血縁者も原爆に被爆していない. 特記すべき唯一の所見は, 赤血球数, 血色素量およびヘマトクリット値の上昇が持続していることであり, それぞれ $5.5 \times 10^6$ 以上, 15.5 g/100 ml および50%であった. 赤血球の形態および脆弱性は正常であった. 全血色素中, hb Hiroshimaは50.7%, hb A<sub>2</sub>は2.3%, hb Fは2.2%を占めていた. 鉄血色素溶解度とアルカリ抵抗は正常であった.

発端者の血縁者(図1)の中の女性7人から得た溶血液のhb Hiroshima含有量は約50%であった. このうちの1人, 41歳の主婦(II<sub>1</sub>)に貧血があり, 最近はときおり胸痛を訴えることがあったが, その詳細は不明である. この1例を除いては, 全員健康状態は良好である. この中の経産婦(I<sub>1</sub>, II<sub>1, 10, 12</sub>)には, 自然流産の既往歴はない. 発端者の両親と兄(II<sub>7</sub>)は結核で死亡; 弟(II<sub>11</sub>)は戦死; II<sub>1</sub>の唯一人の弟(II<sub>2</sub>)は早産で, 乳児期に死亡しており, その死因は不明であるが, 紫斑病, 黄疸または身体的異常はなかったという. この形質が, この家系の女性だけにみられるということは特に驚くにあたらない. なぜならば, この異常血色素の遺伝子が分離している2家族では,

FIGURE 1 PEDIGREE OF hb HIROSHIMA KINDRED

図1 hb Hiroshima の家系



for the abnormal hemoglobin is segregating, there is only one male (III<sub>13</sub>) available for testing. The pattern of inheritance of the trait is consistent with that of a simple autosomal (co-dominant) gene.

Results of hematologic studies of carriers and several normal females in the kindred are shown in Table 1. With the exception of II<sub>1</sub>, the carriers of hb Hiroshima have significantly higher hemoglobins, hematocrits and erythrocyte counts than their noncarrier relatives ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  and  $0.02 < P < 0.05$ , respectively). The city and country carriers, in turn, differ significantly from one another with respect to hemoglobin and hematocrit values ( $P < 0.01$ ), an observation that is probably explicable in terms of different socioeconomic circumstances.

**Oxygen Equilibrium Studies** Oxygen equilibria of erythrocyte suspensions and unfractionated hemolysates from two carriers (I<sub>1</sub> and II<sub>1</sub>) of hb Hiroshima were determined tonometrically and for either preparation the oxygen affinity was greater than normal control values and the sigmoid shape of the equilibria curves was less pronounced than usual. The  $P_{50}$  (oxygen pressure required to half saturate the hemoglobin) for an erythrocyte suspension at pH 7.5 and 23C was 5.0 mmHg compared to 10.5 for hb A and the  $P_{50}$  for an hemolysate of the mutant hemoglobin was 1.9 compared to 4.4 for hb A.

Oxygen equilibria determined by oxygen electrode and continuous recording spectrophotometry of hb Hiroshima showed characteristics almost identical with those for suspensions and hemolysates described above. Figure 2 shows curves for purified hb Hiroshima and an hemolysate from another carrier (III<sub>3</sub>) compared with hb A. At

調査対象となりうる男性は1人のみ(III<sub>3</sub>)であるからである。この形質の遺伝型式は、単純な常染色体(等優性)遺伝子様式に一致する。

この家系における保有者と正常な女性数人の血液検査の結果を表1に示す。II<sub>1</sub>を除いては、hb Hiroshima 保有者の血色素量、ヘマトクリット値および赤血球数は、非保有血縁者よりは有意に高い(それぞれ  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$  および  $0.02 < P < 0.05$ )。次に、都市部居住の保有者と郡部居住の保有者とでは、血色素量およびヘマトクリット値に有意差があるが ( $P < 0.01$ )、この観察結果はおそらく社会経済的環境の相違によって説明できると思われる。

**酸素平衡試験** hb Hiroshima 保有者2例(I<sub>1</sub>とII<sub>1</sub>)の赤血球懸濁液と非分画溶血液の酸素平衡について分圧測定を行なった結果、いずれの標本も酸素親和性は正常対照値より大きく、その平衡曲線のS状カーブは普通のものほど顕著でなかった。pH 7.5, 23Cにおける赤血球懸濁液の  $P_{50}$  (血色素の半飽和に必要な酸素分圧)は、hb Aの10.5 mmHg に対して hb Hiroshima は 5.0 mmHg であり、溶血液の  $P_{50}$  は hb A の 4.4 に対してこの変異血色素は 1.9であった。

hb Hiroshima の酸素電極と連続記録分光測定で得た酸素平衡は、上記の懸濁液および溶血液の場合とほとんど同じ特徴を示した。図2では、別の保有者(III<sub>3</sub>)の精製 hb Hiroshima と溶血液について求めた曲線を hb A と比較

TABLE 1 HEMATOLOGIC DATA FOR FEMALES IN FAMILY SEGREGATING FOR hb HIROSHIMA GENE

表1 hb Hiroshima 遺伝子の分離が認められた家系における女子家族員の血液検査所見

Pedigree Number 家系番号	Hb	Hct	RBC	Retics	MCV	MCH	MCHC
	血色素量 g/100 ml	ヘマトクリット値 %	赤血球数 $\times 10^6/\text{mm}^3$	網状赤血球 %	平均血球容積 $\mu^3$	平均血球血色素量 $\mu\text{g}$	平均血球血色素濃度 %
	Carriers of hb Hiroshima*				hb Hiroshima 保有者		
I <sub>1</sub>	14.5	45.0	4.84	0.9	93.0	30.0	32.2
II <sub>1</sub> †	11.2	38.0	4.28	1.3	88.8	26.2	29.5
III <sub>3</sub>	14.4	45.5	4.93	1.2	92.3	29.2	31.6
III <sub>4</sub>	14.5	46.0	5.37	1.1	85.7	27.0	31.5
II <sub>10</sub>	17.0	52.5	5.32	-	98.7	32.0	32.4
III <sub>14</sub>	17.0	53.0	5.50	2.5	96.4	30.9	32.1
II <sub>12</sub>	17.4	54.5	5.47	1.7	99.5	31.8	31.9
III <sub>15</sub>	17.0	53.0	6.20	1.5	85.5	27.4	32.1
	Normal Complement of hb A				hb A 含有量の正常な者		
III <sub>1</sub>	12.9	38.5	4.55	1.1	84.6	28.4	33.5
III <sub>2</sub>	12.5	38.5	4.25	0.9	90.6	29.4	32.5
II <sub>4</sub>	10.8	34.5	4.24	1.9	81.4	25.3	31.3
II <sub>5</sub>	12.5	37.0	3.77	1.0	98.1	33.2	33.8
III <sub>9</sub>	12.5	38.5	4.58	2.1	84.1	26.9	31.9

\* The first four of the hb Hiroshima carriers and all of the normal relatives live in a small farming community whereas the remaining four carriers live in Hiroshima City.

上記 hb Hiroshima 保有者の最初の4人と正常な血縁者全員は小さな農村に居住しており、残りの保有者4人は広島市に居住している。

† Said to be in ill-health, see text.

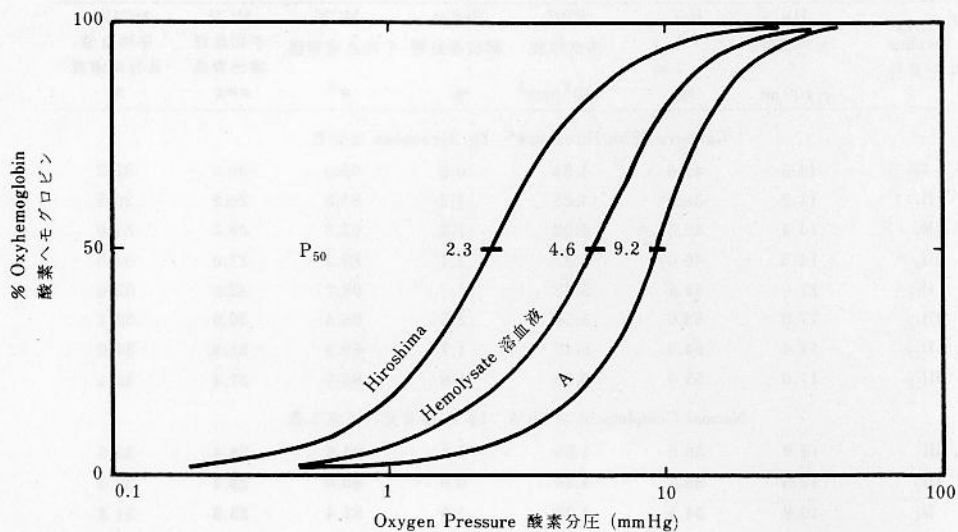
健康状態が悪いといわれている。本文参照。

pH 7.0 and 20C the  $P_{50}$  values were 2.3, 4.6 and 9.2 respectively. The effect of pH (Bohr effect) on the oxygen equilibrium of purified hb Hiroshima is compared with hb A in Figure 3. At pH values decreasing from 7.8 to 6.5, though the curves shifted progressively to the right, the change was less than for hb A. The reduction in the pH or Bohr effect is shown more clearly in the inset to Figure 3. The Bohr effect factor ( $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$ ) is reduced by about one-half for hb Hiroshima, being  $-0.27$  over the pH range between 7.4 to 7.0, compared to  $-0.53$  for hb A. Figure 4 is a Hill plot<sup>19</sup> of the data shown in Figure 2 for purified hb Hiroshima and hb A. The slope of the curve,  $n$ , for the mutant hemoglobin is about 2.0 at pH 7.0, compared to 3.0 for hb A implying reduction in heme-heme interaction in hb Hiroshima. Also, as seen in the inset to Figure 3,  $n$  tended to increase as pH increased, being 2.4 at pH 7.4, and 2.6 at pH 7.8. Imai<sup>17</sup> has analyzed the oxygen equilibria curves for hb Hiroshima in detail, and pointed out that at the upper ranges of oxygen saturation, the Hill plot is biphasic and the conventional interpretation of the significance of  $n$  probably does not hold.

した。pH 7.0, 20Cでは、 $P_{50}$ 値はそれぞれ2.3, 4.6および9.2であった。酸素平衡に及ぼすpHの影響(Bohr効果)について精製hb Hiroshimaとhb Aを図3において比較する。pH値が7.8から6.5に減少するにつれて、曲線は次第に右方へ移動するが、hb Hiroshimaにおけるこの変化はhb Aより小さい。pHの減少の影響、すなわちBohr効果は、図3の挿入図にいつそうはっきりみられる。Bohr効果係数( $\Delta \log P_{50}/\Delta \text{pH}$ )は、hb Hiroshimaでは約半分に減少しており、pH 7.4-7.0の範囲で $-0.27$ であったのに対して、hb Aでは $-0.53$ であった。図2に示した精製hb Hiroshimaおよびhb Aの資料のHill曲線<sup>19</sup>を図4に示した。pH 7.0における曲線の傾斜 $n$ は、変異型血色素で約2であるが、hb Aで3.0であり、hb Hiroshimaにおけるヘム間相互作用の減少があることを示唆している。また、図3の挿入図にみられるように、 $n$ はpHの増加とともに増加する傾向があり、pH 7.4で2.4、pH 7.8で2.6であった。Imai<sup>20</sup>は、hb Hiroshimaの酸素平衡曲線を詳細に分析し、酸素飽和の上限でHill曲線が二相性であることを指摘して、 $n$ の意義に関する従来の解釈はおそらく当てはまらないであろうと述べている。

FIGURE 2 OXYGEN EQUILIBRIA OF hb A, HIROSHIMA AND AN UNFRACTIONATED HEMOLYSATE CONTAINING EQUAL PROPORTIONS OF hb A AND HIROSHIMA

図2 hb A, hb Hiroshima および hb A と hb Hiroshimaを等量含む非分画溶血液の酸素平衡

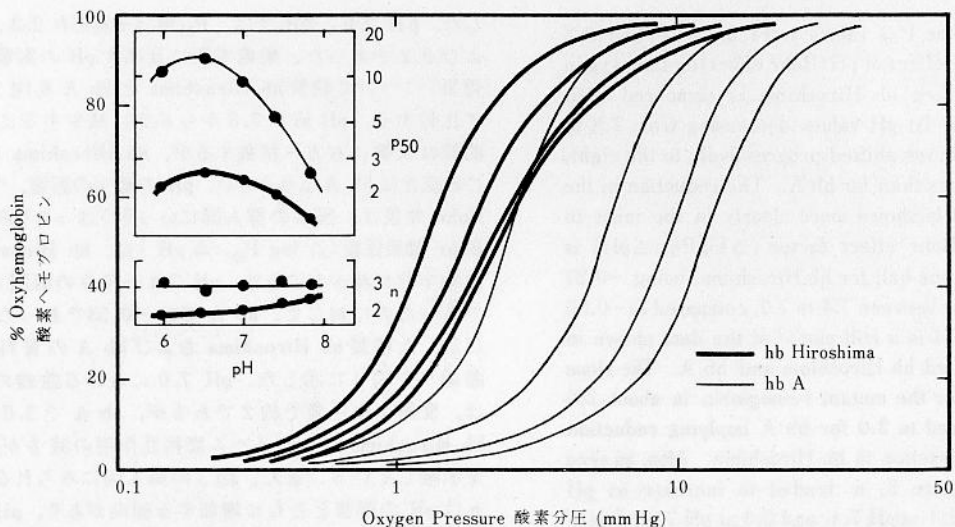


Purified hb Hiroshima from III-3; unfractionated hemolysate from III-4 (see Figure 1). Both samples, and control obtained on the same day. Purified samples prepared in the same manner at the same time, and eluted from the same starch block. Curves determined with oxygen electrode and continuous recording spectrophotometer at 564 m $\mu$ . Temperature 20 C, pH 7.0. P<sub>50</sub>=oxygen pressure required to produce 50% oxyhemoglobin.

精製 hb Hiroshima は III-3 ; 非分画溶血液は III-4 から得た (図1 参照). この2つの試料と対照試料は同じ日に採取した. 精製ヘモグロビンは, 同じ方法, 同じ時に作成し, 同じでんぶんゲルから溶出した. 曲線は, 酸素電極と連続記録分光測定, 564 m $\mu$ , 温度20 C, pH 7.0 で求めた. P<sub>50</sub> は50%酸素ヘモグロビンを得るために必要な酸素分圧.

FIGURE 3 EFFECT OF pH ON OXYGEN EQUILIBRIA OF hb A AND HIROSHIMA, DETERMINED UNDER THE SAME CONDITIONS AS IN FIGURE 2

図3 図2と同じ条件のもとにおける hb A と hb Hiroshima の酸素平衡に対する pH の影響



From left to right for each set of curves, pH 7.8, 7.4, 7.0 and 6.5. Inset summarizes the pH effect. Upper panel: semi-log plot of P<sub>50</sub> against pH, demonstrating that hb Hiroshima is less sensitive to pH changes than hb A. Lower panel: plot of the Hill constant, n, against pH. For hb Hiroshima, n tends to increase with increase in pH (see text).

それぞれの曲線は, 左から pH 7.8, 7.4, 7.0 と 6.5. 挿入図に pH の影響をまとめた. 上段: pH と P<sub>50</sub> との半対数図では, pH の変化による影響が hb A よりも hb Hiroshima が小さいことがわかる. 下段: Hill 常数 n と pH との関係を示す図. hb Hiroshima では, pH の増加につれて n が増加する傾向がある (本文参照).

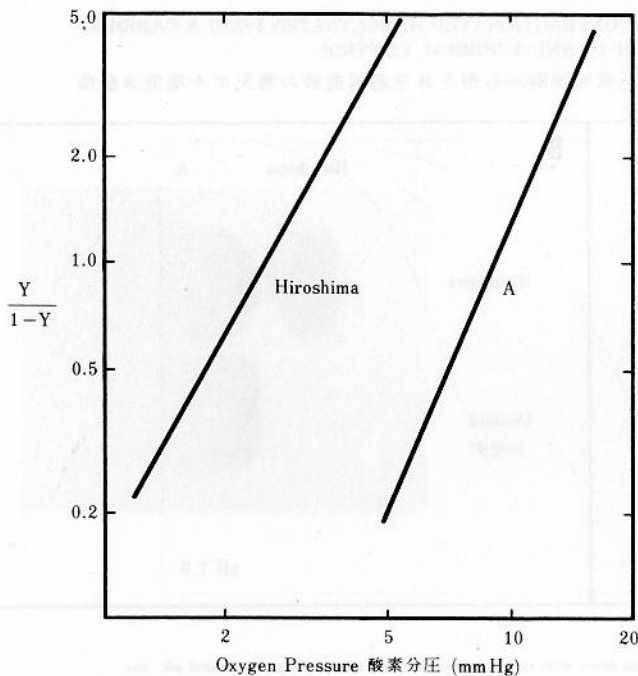


FIGURE 4 HILL PLOT FOR hb A AND HIROSHIMA OF DATA SHOWN IN FIGURE 2.

図4 図2に示したhb A とhb Hiroshima に関する資料の Hill 曲線。

Y-% OXYHEMOGLOBIN.  
FOR hb A, n=3; FOR hb HIROSHIMA, n=2.1

Y=%酸素ヘモグロビン。  
hb A では n = 3 ; hb Hiroshima では n = 2.1

#### Physical and Chemical Characteristics of hb Hiroshima

The electrophoretic mobility of hb Hiroshima at pH 8.6 was greater than that of hb A, but at neutral or acid pH, on agar gel it migrated less rapidly than hb A towards the anode (Figure 5). Hb Hiroshima descended more rapidly than hb A in either CMC (Figure 6) or Amberlite IRC 50 column chromatography. On CMC chromatography of hemolysates treated with p-chloromercuribenzoic acid to separate  $\alpha$  and  $\beta$  chains, a third component, presumably the abnormal chain of hb Hiroshima was eluted first, followed by  $\beta$  and  $\alpha$  A.

Electrophoresis of hb Hiroshima in 6M urea demonstrated that the  $\beta$  chain was abnormal and this was confirmed by hybridization tests of hb Hiroshima chains with those of canine hemoglobin:  $\alpha_2^{\text{can}} \beta_2^{\text{Hiro}}$  migrated more rapidly towards the anode than control  $\alpha_2^{\text{can}} \beta_2^{\text{A}}$  (Figure 7).

In fingerprints of hb Hiroshima globin, spots containing beta tryptic peptide number 14 and 15 were absent and a new spot was present immediately below  $\alpha$  Tp-6. In fingerprints of purified  $\beta$  Hiroshima chain,  $\beta$  Tp-14 and 15 were replaced by an abnormal spot immediately above and partially overlapping  $\beta$  Tp-8, 9 (Figure 8).

Table 2 compares the amino acid content of the abnormal spot with expected values<sup>21</sup> for the missing peptides. The only difference is that asx\* is present in the abnormal peptide in approximately double the expected amount and his is reduced to about half of normal.

\* asx = aspartic acid and asparagine. By this method they are indistinguishable.

アスパラギン酸またはアスパラギンを指すが、この方法では両者の区別ができない。

hb Hiroshima の物理的および化学的特徴 pH 8.6 における hb Hiroshima の電気泳動度は、hb A のそれよりも速かったが（陽極に向かって先に動いたが）、中性または酸性側の pH における寒天ゲル電気泳動法では、hb Hiroshima の陽極への移動度は hb A よりも遅かった（図 5）。hb Hiroshima は、CMC カラムクロマトグラフィ（図 6）または Amberlite IRC 50 カラムクロマトグラフィで hb A より早く降下した。 $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖を分離するために、p-クロル水銀安息香酸処理溶血液について CMC クロマトグラフィを行なった結果、おそらく hb Hiroshima の異常鎖と思われる第 3 の成分がまず溶出し、次いで  $\beta$  A (hb A の  $\beta$  鎖) と  $\alpha$  A (hb A の  $\alpha$  鎖) が溶出した。

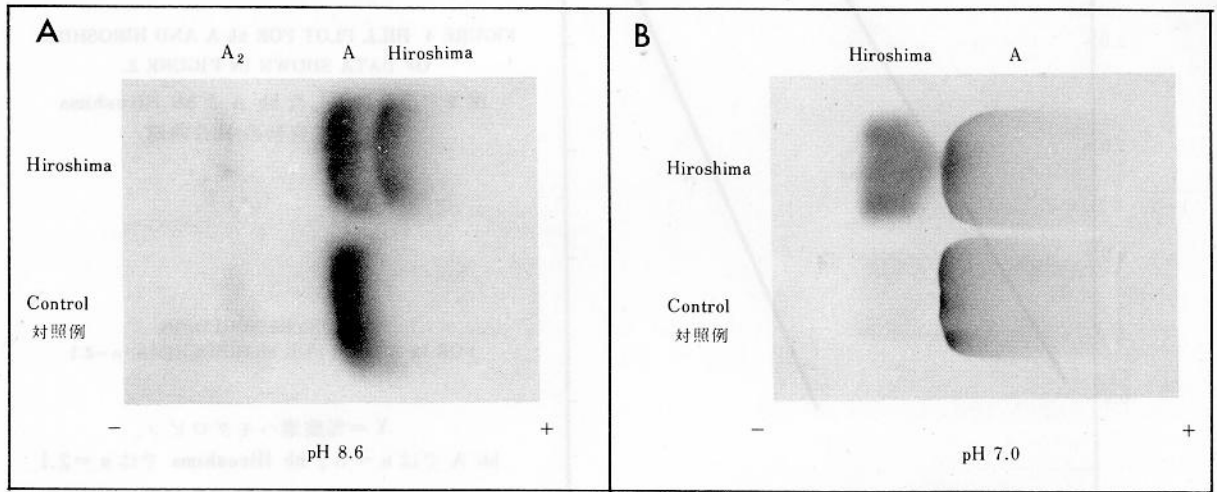
6 M 尿素を用いて hb Hiroshima の電気泳動を行なった結果、 $\beta$  鎖に異常が証明され、これは、hb Hiroshima とイヌ血色素との雑種生成試験によって確認された。すなわち、 $\alpha_2^{\text{can}} \beta_2^{\text{Hiro}}$  は、対照の  $\alpha_2^{\text{can}} \beta_2^{\text{A}}$  より早く陽極へ移動した（図 7）。

hb Hiroshima のグロビンのフィンガープリントでは、 $\beta$  Tp -14 と 15 を含む斑点が消失しており、 $\alpha$  Tp -6 のすぐ下に新しい斑点が 1 つあった。精製  $\beta$  Hiroshima 鎖のフィンガープリントでは、 $\beta$  Tp -14 と 15 の代わりに、 $\beta$  Tp -8,9 のすぐ上に、これと一部重なって一つの異常斑点ができた（図 8）。

表 2 は、異常斑点のアミノ酸分析と消失していたペプチドの期待値<sup>21</sup> との比較を示す。異常ペプチドの asx\* が期待値の約 2 倍あり、his は正常の約半分に減少している点が違っているにすぎない。

FIGURE 5 AGAR GEL ELECTROPHORESIS OF UNFRACTIONATED HEMOLYSATES FROM A CARRIER OF hb HIROSHIMA (II-10) AND A NORMAL CONTROL

図5 hb Hiroshima 保有者 (II-10) および正常対照例から得た非分画溶血液の寒天ゲル電気泳動像



A: pH 8.6; B: pH 7.0. In alkaline medium, hb Hiroshima moves more rapidly towards the anode than hb A, and at neutral pH, less rapidly. In B the faint band at the left in the control is hb F.

A: pH 8.6; B: pH 7.0. hb Hiroshima の陽極側への移動は、アルカリ性溶媒で hb A より速いが、中性の pH では hb A より遅い。B において対照例の左側にみられるわずかな泳動帯は hb F である。

FIGURE 6 A: CMC COLUMN CHROMATOGRAPHY OF hb A AND HIROSHIMA B: CMC COLUMN CHROMATOGRAPHY OF HEMOLYSATES TREATED WITH p-CHLOROMERCURIBENZOIC ACID TO SEPARATE  $\alpha$  AND  $\beta$  CHAINS

図6 A: hb A と hb Hiroshima の CMC カラムクロマトグラフィ。B:  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖を分離するための p-クロル水銀安息香酸処理溶血液の CMC カラムクロマトグラフィ

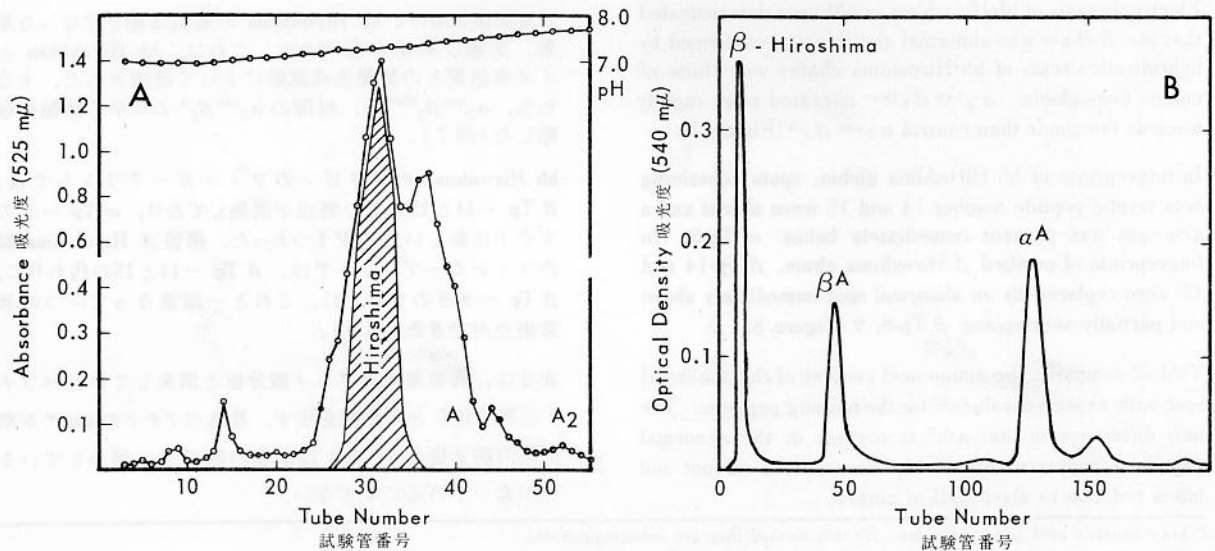
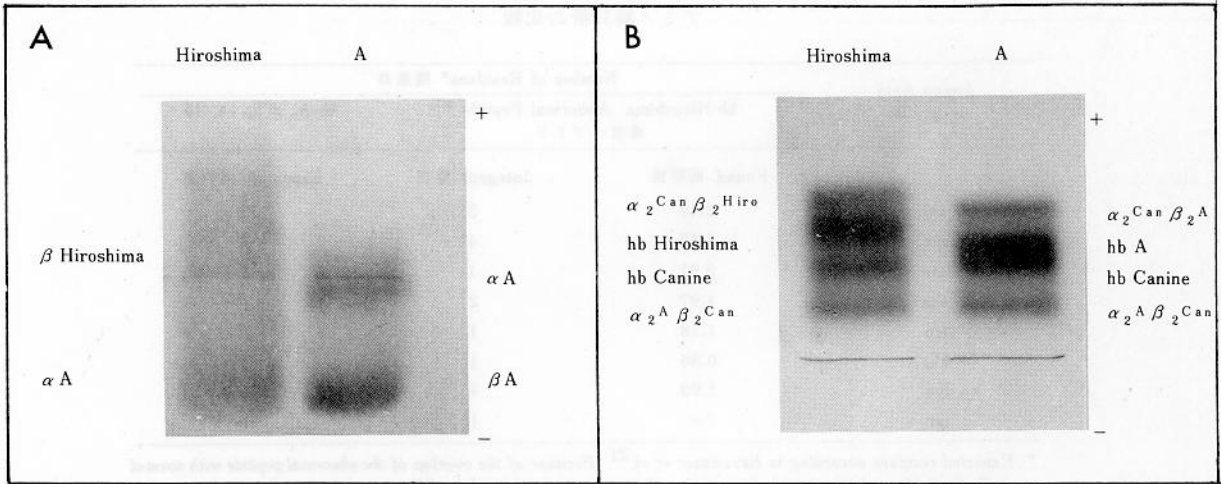


FIGURE 7

図 7



A: Urea dissociation electrophoresis of hb A and Hiroshima. The  $\beta$  chain of hb Hiroshima moves more rapidly towards the anode.

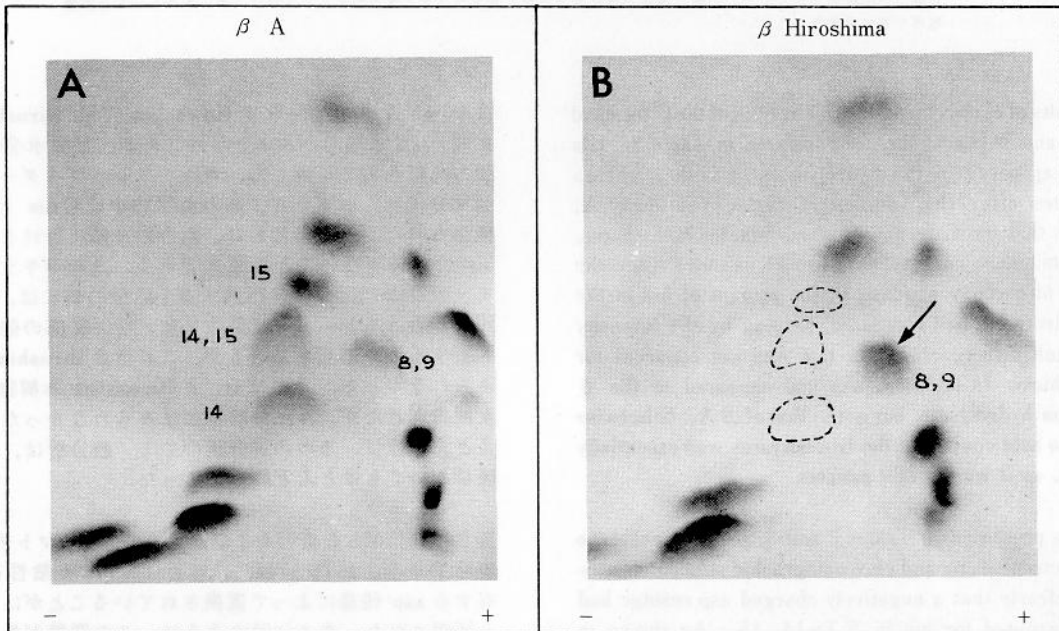
hb A および hb Hiroshima の尿素解裂電気泳動法. hb Hiroshima の  $\beta$  鎖の方が陽極側へ速く移動する.

B: Hybridization of hb A and Hiroshima (Hiro) with canine (can) hemoglobin. The hybrid  $\alpha_2^{can} \beta_2^{Hiro}$  has the highest anodal mobility.

hb A および hb Hiroshima (Hiro) とイヌ (can) 血色素との雑種生成試験. 雑種  $\alpha_2^{can} \beta_2^{Hiro}$  が最も速く陽極側へ移動する.

FIGURE 8 FINGERPRINTS OF TRYPTIC DIGESTS OF PURIFIED  $\beta$  CHAINS

図 8 精製  $\beta$  鎖のトリプシン消化物のフィンガープリント



The areas enclosed by the dotted lines indicate the positions of the peptide spots  $\beta$  Tp-14, 15, and 14 and 15 that are missing from hb Hiroshima. The arrow indicates an abnormal spot overlapping  $\beta$  Tp-8, 9.

点線で囲んだ部分は, hb Hiroshima に欠如しているペプチド斑点の  $\beta$  Tp-14, 15 および 14 と 15 の位置を示す. 矢印は,  $\beta$  Tp-8, 9 に重なっている異常斑点を指す.

TABLE 2 COMPARISON OF AMINO ACID CONTENT OF  $\beta$  Tp-14, 15 OF hb A WITH THE ABNORMAL PEPTIDE OF hb HIROSHIMA

表2 hb A の  $\beta$  Tp -14, 15 と hb Hiroshima 異常ペプチドの  
アミノ酸分析の比較

Amino Acid アミノ酸	Number of Residues* 残基数		
	hb Hiroshima 異常ペプチド	Abnormal Peptide	hb A, $\beta$ Tp-14, 15
	Found 観察値	Integral 整数	Expected 期待値
val	2.40	3	3
ala	4.15	4	4
gly	0.91	1	1
asx	1.97	2	1
leu	1.18	1	1
his	0.86	1	2
lys	1.03	1	1
tyr	++	1	1

\* Expected residues according to Braunitzer et al.<sup>21</sup> Because of the overlap of the abnormal peptide with normal  $\beta$  Tp-8, 9, the values given for the abnormal peptide were obtained by difference between the total for each acid in the combined normal and abnormal spots and those for the normal  $\beta$  Tp-8, 9 known for hb A. There was no evidence suggesting partial hydrolysis of the abnormal peptide. If hydrolysis occurred, cleavage would be expected between lys  $\beta$  144 and his  $\beta$  145, giving a normal  $\beta$  Tp-15 in the usual position on fingerprint, but no such spot was found. The actual value for val is low because one residue at the N terminal of the tryptic peptide was partially destroyed by ninhydrin. Accurate measurement of tyr was not achieved because it is partially destroyed during acid hydrolysis but it was always present when the abnormal peptide spot was tested with  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphthol and nitric acid.

残基数の期待値は Braunitzer らによる。<sup>21</sup> 異常ペプチドと正常な  $\beta$  Tp - 8, 9 が重なっている。そこで、異常ペプチドの観察値を求めるにあたって、正常と異常ペプチドの混合している斑点に含まれているそれぞれのアミノ酸値から hb A の正常  $\beta$  Tp - 8, 9 の既知のアミノ酸値を引いた。異常ペプチドが部分的にも加水分解された形跡はない。加水分解があったとすれば、Lys  $\beta$  144 と His  $\beta$  145 の間で分裂してフィンガープリント上の通常位置に正常な  $\beta$  Tp - 15 が現われるはずであるが、このような斑点は認められなかった。Val の実測値が低いのは、トリプシンで消化したペプチド断片の N 末端における残基 1 個が、ニンヒドリンによって一部破壊されたためである。Tyr は、酸加水分解で一部破壊されるので、正確に測定できなかったが、異常ペプチド斑点の  $\alpha$  - ニトロソ  $\cdot$   $\beta$  - ナフトールと硝酸処理で常に検出された。

The results of carboxypeptidase hydrolysis of the C terminal of  $\beta$  A and  $\beta$  Hiroshima are compared in Table 3. His and tyr appeared in the hydrolysates of both  $\beta$  chains 30 minutes after the addition of carboxypeptidase A, evidence that the C terminal his was intact in both chains. By 140 minutes, corresponding to 20 minutes after the addition of carboxypeptidase B, the amount of his in the  $\beta$  A hydrolysate had increased, judging by the intensity of the ninhydrin reaction, but this was not apparent for  $\beta$  Hiroshima. In addition, asp had appeared in the  $\beta$  Hiroshima hydrolysate, but not in that of  $\beta$  A. Otherwise the amino acid content of the two mixtures was essentially identical, as it was at 360 minutes.

The data presented in Tables 2 and 3, plus the evidence from electrophoretic and chromatographic studies, demonstrated clearly that a negatively charged asp residue had been substituted for his in  $\beta$  Tp-14, 15. As shown in Table 4, the two possible positions for the substitution are at  $\beta$  143 or the C terminal 146, both normally occupied by his.<sup>17</sup> However, position 146 is excluded by the carbo-

$\beta$  A (hb A の  $\beta$  鎖) と  $\beta$  Hiroshima (hb Hiroshima の  $\beta$  鎖) の C 末端のカルボキシペプチダーゼ加水分解の成績の比較を表 3 に示した。カルボキシペプチダーゼ A 添加 30 分後に、いずれの  $\beta$  鎖の水解物中にも his と tyr が検出されたが、このことは、両方の  $\beta$  鎖における C 末端 his に傷害がないことの証拠である。カルボキシペプチダーゼ B 添加 20 分後に相当する 140 分の時には、 $\beta$  A 水解物における his の量は、ニンヒドリン反応の強さから判断すると、増加しているが、これは  $\beta$  Hiroshima にはみられなかった。そのほか、 $\beta$  Hiroshima 水解物に asp が検出されたが、 $\beta$  A 水解物にはみられなかった。このことを除けば、2 つの混合液のアミノ酸分析は、360 分後においてもほとんど同じであった。

表 2 と 3 に示した資料および電気泳動とクロマトグラフィーの結果から、 $\beta$  Tp - 14, 15 における his が陰性荷電を有する asp 残基によって置換されていることがはっきりと証明された。表 4 に示すように、この置換が生ずる可能性のある位置が二つあり、それは、 $\beta$  143 と C 末端の 146 であり、ともに普通は his がその位置を占めている。<sup>17</sup> しかしながら、146 番目の位置は、カルボキシペプチダー



TABLE 3 COMPARISON OF AMINO ACID ANALYSIS OF HYDROLYSATES PREPARED BY CARBOXYPEPTIDASE A AND B TREATMENT OF C TERMINAL OF  $\beta$  CHAIN OF hb A AND hb HIROSHIMA

表3 hb A と hb Hiroshima の  $\beta$  鎖 C 末端のカルボキシペプチダーゼ A および B 処理によってできた加水分解物のアミノ酸分析の比較

Incubation Time 培養時間	$\beta$ Chain	Amino Acid アミノ酸									
		His	Tyr	Lys	Asp	Ala	Leu	Asn	Val	Gly	Glu
Before hydrolysis 加水分解前	Hiro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A 30'	Hiro	+*	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
A 120'	Hiro	+	+	±	±	-	-	-	-	-	-
	A	(Not tested 未検)									
A 140'	Hiro	+	+	+	+	++	+	±	+	+	-
B 20'	A	++	+	+	-	++	+	±	++	+	-
A 180'	Hiro	+	+	+	+	+++	+	+	++	+	-
B 60'	A	(Not tested 未検)									
A 360'	Hiro	+	+	+	+	+++	++	+	+++	+	-
B 240'	A	+	+	+	-	+++	++	+	+++	+	-

\* +, ++, +++: color intensity of amino acid-ninhydrin reaction. アミノ酸ニンヒドリン反応の発色の強さ。

TABLE 4 COMPARISON OF AMINO ACID SEQUENCES OF  $\beta$  Tp-14, 15 OF hb A WITH THE ABNORMAL PEPTIDE OF hb HIROSHIMA

表4 hb A の  $\beta$  Tp -14, 15 と hb Hiroshima 異常ペプチドのアミノ酸配列の比較

$\beta$ Tp-14,15	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146
hb A	val	-val	-ala	-gly	-val	-ala	-asn	-ala	-leu	-ala	-HIS	-lys	↑ tyr	-his
hb Hiroshima	val	-val	-ala	-gly	-val	-val	-asn	-ala	-leu	-ala	-ASP	-lys	-tyr	-his

The arrow (↑) between lys and tyr in hb A marks the point of cleavage between  $\beta$  Tp-14 on the left and  $\beta$  Tp-15 on the right. Presumably the substitution of a negatively charged asp for his at  $\beta$  143 prevents cleavage at this point (see text). Hence in fingerprints of hb Hiroshima, a single abnormal spot replaces the two spots normally present in fingerprints of hb A.

hb A の lys と tyr の間の矢印 (↑) は、左側の  $\beta$  Tp-14 と右側の  $\beta$  Tp-15 が分離する点である。  $\beta$  143 の his が陰性荷電の asp によって置換されているためにこの点での分離が妨害されていると思われる (本文参照)。したがって、フィンガープリントでは、hb A の場合は斑点が普通 2 個認められるのに対して、hb Hiroshima の場合は異常斑点が 1 個認められる。

xypeptidase analysis and it is concluded that the histidine at  $\beta$  143 in hb A is replaced by aspartic acid in hb Hiroshima: therefore, hb Hiroshima is designated as  $\alpha_2^A \beta_2^{143asp}$ . Hb Kenwood, previously reported as having either asp or glu substituted at  $\beta$  143,<sup>22</sup> was later found to be identical with hb N<sub>Baltimore</sub>,  $\beta$  95 lys  $\rightarrow$  glu.<sup>23</sup>

The substitution of a negatively charged asp for his accounts for the electrophoretic characteristics of hb Hiroshima. At alkaline and neutral pH, the positive charge of the his imidazole side chain is probably largely suppressed, so that in effect, the substitution of asp adds at least two more negative charges per molecule of

ゼ分析によって関係ないと証明されたので、hb A における  $\beta$  143 のヒスチジンが、hb Hiroshima ではアスパラギン酸によって置換されているという結論になる。したがって、hb Hiroshima は  $\alpha_2^A \beta_2^{143asp}$  として示すことができる。以前に  $\beta$  143 が asp または glu によって置換されると報告された hb Kenwood<sup>22</sup> は、その後、hb N<sub>Baltimore</sub>,  $\beta$  95 lys  $\rightarrow$  glu, と同じであると認められた。<sup>23</sup>

hb Hiroshima の電気泳動上の特徴は、his が陰性荷電を有する asp によって置換されていることでじゅうぶん説明できる。アルカリ側と中性の pH では、his イミダゾール側鎖の陽性荷電はおそらく非常に抑圧され、その結果、asp の置換によって血色素分子 1 個当たりの陰性荷電が少なくとも 2 荷、すなわち、 $\beta$  鎖 1 個当たりに陰性荷電

hemoglobin, or one more per beta chain, thus enhancing their respective mobilities towards the anode at pH 8.6.

That, on tryptic digestion, cleavage does not occur between  $\beta$  144 lys and  $\beta$  145 tyr in the abnormal peptide of hb Hiroshima is apparently attributable to the presence of the acidic asp at  $\beta$  143. An analogous situation exists for two other mutant hemoglobins, J<sub>Oxford</sub> and J<sub>Baltimore</sub>,<sup>24,25</sup> with substitutions respectively at  $\alpha$  15 and  $\beta$  16, in homologous sections of the two chains. In each case, the substitution of asp for gly is in a position immediately preceding lys. At this location in hb A ( $\alpha$  16 or  $\beta$  17), the lysyl bond is readily hydrolyzed, but in these mutants it is not. Other lysyl bonds in normal hb A that are similarly resistant to tryptic hydrolysis are at  $\alpha$  6,  $\alpha$  98, and  $\beta$  95, all of which are preceded by an asp residue.

Absorption spectra of alkaline and acid oxy- and methemoglobin and of alkaline deoxy and cyanomethemoglobin derivatives of hb Hiroshima between 450 and 650  $m\mu$  and in the Soret region were not significantly different from those of hb A.

## DISCUSSION

Among the large number of variant hemoglobins, a majority are evidently clinically insignificant, at least in the heterozygous state. Erythrocyte dysfunction attributable to abnormal structure of hemoglobin includes several different pathologic effects such as tactoid formation on deoxygenation (hb S, sickle cell anemia), unstable hemoglobin molecules (hb Köln and Zurich), increased stability of methemoglobin (hb M diseases), and impaired oxygen affinity (hb Kansas, Chesapeake).<sup>26</sup> Hb Hiroshima clearly falls into the last group.

In the face of increased oxygen affinity and compensatory erythremia, one might expect to find evidence for decreased  $P_{O_2}$  reserve in, for example, pregnancy, anemia, or prolonged exercise.<sup>27,28</sup> In the carriers of hb Hiroshima there are no clinically apparent effects attributable to the mutant hemoglobin, but whether individuals homozygous for the trait would be at a disadvantage is, of course, unknown, and in view of the rarity of the gene, even in Japan where consanguinity is somewhat higher than in the West, it is unlikely that affected homozygotes will be found. Others have reported high normal values of urinary erythropoietin in carriers of high oxygen affinity hemoglobins<sup>28,29</sup> and we might anticipate similar findings in our cases but so far have not been able to perform such studies.

The amino acid substitution in hb Hiroshima has affected three of the important properties associated with the

が1荷追加されることになり、かくして、pH 8.6で陽極への移動度が増加する。

トリプシン消化でhb Hiroshimaの異常ペプチドが $\beta$  144 lysと $\beta$  145 tyrとの間で分離しないことは、 $\beta$  143に酸性のaspが存在するためであると思われる。この他に2種の異常血色素、すなわち、J<sub>Oxford</sub>とJ<sub>Baltimore</sub><sup>24,25</sup>にも同様の状態が認められており、2つの鎖の対応する部位にそれぞれ $\alpha$  15と $\beta$  16のところに置換がみられる。両者ともに、lysのすぐ前のところで、glyがaspによって置換されている。hb Aでは、この位置( $\alpha$  16または $\beta$  17)におけるlysyl結合は容易に加水分解されるが、この2つの変異型では、容易に水分解しない。正常なhb Aにおけるlysyl結合の中で、これと同じようにトリプシン加水分解に対して抵抗を示すのは、 $\alpha$  6、 $\alpha$  98および $\beta$  95で、これらはすべてその前にasp残基が位置している。

hb Hiroshimaのアルカリ性と酸性の酸素ヘモグロビンおよびメトヘモグロビン、ならびにアルカリ性の還元ヘモグロビンとシアノメトヘモグロビン産物の450—650  $m\mu$ 域およびSoret域における吸光スペクトルは、hb Aと有意差を示さなかった。

## 考 察

現在多くの種類の異常血色素が発見され記載されているが、その大部分は、少なくともヘテロ接合体の状態では、臨床的に重要な症状を伴わないようである。血色素構造の異常に起因する赤血球機能障害のために、若干の病的影響が認められている。たとえば、脱酸素(酸素放出)の結果現われるタクトイド形成(hb S、鎌状赤血球貧血)、血色素分子の不安定(hb KölnおよびZurich)、メトヘモグロビン安定性の増強(hb M病)および酸素親和性の障害(hb Kansas, Chesapeake)<sup>26</sup>などがある。hb Hiroshimaは明らかにこの最後の部類に属する。

酸素親和性の増強および代償性赤血球増加があるので、たとえば、妊娠、貧血または長時間にわたる運動<sup>27,28</sup>などによって、 $P_{O_2}$ 予備低下の徴候が現われると考えられる。hb Hiroshima保有者には、この異常血色素に起因すると思われる臨床的影響はないようであるが、この形質に対してホモ接合体の者は不利な状態にあるかどうかは、もちろん、わからない。近親結婚が西洋諸国よりも少し多い日本においてすら、この遺伝子はまれであることを考えると、影響の現われているホモ接合体が発見される可能性は少ない。酸素親和性の増強を示す血色素をもつ保有者では、尿中ヘマトポエチンの正常値が高いという報告もあるので、<sup>28,29</sup>われわれの症例にも同じような所見がみられると期待されるかもしれないが、これについては、まだ検査を行っていない。

hb Hiroshimaにおけるアミノ酸置換は、酸素と血色素との可逆的な結合に関係する3つの重要な性質、すなわち

reversible combination of oxygen with hemoglobin: low oxygen affinity, heme-heme interaction and pH dependence.<sup>30</sup> The oxygen equilibrium curve is shifted towards lower pressures with respect to % oxygenation, so that at pH 7.0, the  $P_{50}$  is about one quarter that of normal. The normal sigmoid shape of the curve is somewhat altered and  $n$ , the slope of the curve, is reduced from three to about two, indicating reduction, though not complete abolition of heme-heme interaction. Finally, the Bohr effect, though present, is less than normal as shown by a reduction of the Bohr effect factor to about half that for hb A. All three of these factors must be taken into account in relating the structural change in hb Hiroshima to its functional changes.

The allosteric properties of hemoglobin depend on interactions between the alpha and beta subunits and an important factor in the binding of oxygen is dissociation of the tetrameric molecule into two symmetric dimers accompanied by subunit exchange.<sup>31</sup> Interference with interactions between unlike subunits impairs heme-heme interaction and may interfere with the Bohr (pH) effect. Though related, heme-heme interaction and the Bohr effect are separable, implying that different parts of the hemoglobin molecule participate in these two functions.<sup>32</sup> Chemical manipulation of hemoglobin can produce this separation and several recently discovered mutant hemoglobins exhibit this property as well.

Table 5 compares hb Hiroshima with several other high oxygen affinity mutant hemoglobins, all of whose abnormalities are ascribable to the substitution of a single amino acid in the alpha or beta chain.<sup>27, 29, 33-35</sup> The following are not included: Hb M where abnormal oxygen affinity is related to stabilization of the heme iron in the ferric form; hb Zurich<sup>36</sup> whose instability is clinically more important than its slightly increased oxygen affinity;<sup>37</sup> hb Ypsilanti, which has not yet been fully characterized with respect to the Hill constant, Bohr effect, or exact location and nature of the substitution in the beta chain.<sup>38</sup> On the basis of the available evidence, hb Hiroshima appears to be unique among these mutants in showing a considerable reduction of the Bohr effect.

The cluster of mutations at  $\alpha$ -FG4 and  $\beta$ -G1 has been commented on by others<sup>34, 35</sup> who suggest that the most probable explanation for high oxygen affinity for these hemoglobins is an interference with the normal interactions that occur between the  $\alpha$ -FG interhelical region and the  $\beta$ -G helix. Contacts between the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in this area are altered in turn restricting the spatial rearrangements that occur during oxygenation-deoxygenation, tending to stabilize the molecule in the oxygenated conformation.<sup>27, 39</sup>

酸素親和性, ヘム間相互作用および pH 依存性<sup>30</sup>に影響を及ぼしている. 酸素平衡曲線では, 酸素飽和度の百分率は分圧の低い方へ移動して, pH 7.0 における  $P_{50}$  は正常の約 4 分の 1 である. この曲線の正常な S 形状はやや変形しており, 曲線の傾斜  $n$  は 3 から約 2 に減少し, これはヘム間相互作用の完全な消失とはいえないとしても, その減少があることを示している. 最後に, Bohr 効果は, 存在するとしても, 正常よりは少なく, Bohr 係数が hb A の場合の約半分に減少している. hb Hiroshima における構造変化と機能変化との関係を見る場合には, この 3 つの要因をすべて考慮に入れなければならない.

色素の allosteric 性質は,  $\alpha$  subunit と  $\beta$  subunit との相互作用に依存しており, 酸素との結合の際における重要な要因は, 4 量体分子が 2 つの対称的な 2 量体に解離して, subunit 交換が行なわれることである.<sup>31</sup> 異種の subunit 間の相互作用に障害があれば, ヘム間相互作用にも障害が生じ, さらに Bohr (pH) 効果も障害されるかもしれない. ヘム間相互作用と Bohr 効果は, 互いに関係があるが, それぞれ分離することができるので, 色素分子の異なった部分が, この 2 つの機能に関与していることを意味する.<sup>32</sup> 色素の化学的操作によって, この 2 つを分離することができ, 最近発見されたいくつかの異常色素もこの性質を示している.

表 5 では, hb Hiroshima とその他の酸素親和性の増強を示す若干の異常色素との比較を示す. これらの異常は, すべて  $\alpha$  鎖または  $\beta$  鎖におけるアミノ酸 1 個の置換によるものである.<sup>27, 29, 33-35</sup> ここでは, 次のものは含まれていない: 酸素親和性の異常がヘム鉄が第 2 鉄の形で安定していることに関係している hb M; 酸素親和性のわずかな増強があることよりも色素が不安定なことが臨床的に重要である hb Zurich<sup>36, 37</sup>; Hill 常数, Bohr 係数または  $\beta$  鎖における置換の正確な位置または性質がまだじゅうぶんに解明されていない hb Ypsilanti.<sup>38</sup> 現在までの所見によれば, hb Hiroshima は Bohr 効果が著しく減少している点で, 異常色素の中でも特異な存在であるように思われる.

突然変異が  $\alpha$ -FG4 と  $\beta$ -G1 に集中していることに関して他の学者も言及しているが,<sup>34, 35</sup> これらの色素の酸素親和性が高いのは, おそらく  $\alpha$ -FG ヘリックス間部と  $\beta$ -G ヘリックスとの間の正常な相互作用が妨害されているためであろうと示唆している. すなわち, この部分における  $\alpha$  subunit と  $\beta$  subunit の接触に変化があり, ひいては酸素飽和-還元過程において起こる空間的再配置が制限されて分子を酸素飽和状態に固定する傾向が生ずる.<sup>27, 39</sup>

TABLE 5 COMPARISON OF SOME HEMOGLOBIN VARIANTS HAVING INCREASED OXYGEN AFFINITY

表5 酸素親和性増強を示す異常血色素の比較

Hemoglobin 血色素	Amino Acid Substitution アミノ酸置換	Charge Change 荷電変化	Location of Substitution 置換の位置			n <sup>†</sup>	Bohr Effect* Bohr 効果	% Mutant hb in Heterozygote ヘテロ接合体におけ る変異型血色素(%)	Erythremia 多血球血症
			Chain 鎖	Residue 残基	Segment <sup>†</sup> 区分				
Chesapeake	arg → leu	-1	α	92	FG 4	1.3	normal 正常	23-35	+
Capetown	arg → gln	-1	α	92	FG 4	1.9	normal 正常	35	0
Yakima	asp → his	+2	β	99	G 1	1.0	normal 正常	37-39	+
Kempsey	asp → asn	+1	β	99	G 1	1.1	normal 正常	45-47	+
Hiroshima	his → asp	-2	β	143	H 21	2.0-2.6	reduced 低下	48-52	+
Rainier	tyr → his	+1	β	145	H 23	1.2	normal 正常	30	+

<sup>†</sup> Perutz's numbering system which permits comparison of homologous sections of myoglobin, and the alpha, beta and gamma chains.<sup>40</sup>

Perutzの順位番号方式で、これによってミオグロビンの相同部分とα-, β-およびγ-鎖の比較が可能になる。<sup>40</sup>

<sup>†</sup> Hill constant,<sup>19</sup> normal values between 2.7 and 3.0. Though these values are probably not strictly comparable, since the conditions under which they were obtained are not identical, they at least give some indication of the reduction in heme-heme interaction. Note further that the values obtained for Chesapeake, Yakima, and Hiroshima apply to purified samples of the mutant hemoglobin, while the others refer to mixed hemolysates with varying proportions of hb A. The value for Hiroshima varies with pH, see text.

Hill 常数で、<sup>19</sup> 正常値は2.7-3.0。ここに示した値は、それぞれ測定条件が異なるため、おそらく厳密には比較できないであろうが、ヘム間相互作用の低下について少なくともある程度の指標となる。Chesapeake, Yakima および Hiroshima の値は、変異型血色素の精製標本について求められているのに対し、その他の値は、hb A をいろいろの割合で含む溶血液について求めたものであることを指摘したい。Hiroshima の値は pH によって変化する。本文参照。

\* The Bohr effect for Yakima is given as "near normal" for a mixed hemolysate, and the Bohr effect factor is slightly reduced; for a purified sample of Yakima, the data also suggest a slight reduction of the Bohr effect.<sup>28</sup> Similarly, the data for Kempsey suggest some reduction of the Bohr effect.<sup>35</sup>

Yakima の Bohr 効果は、溶血液の場合は「ほとんど正常」で、Bohr 効果係数はやや低下しているという；Yakima の精製された試料の場合は、Bohr 効果の軽度の低下が示唆されている。<sup>28</sup> Kempsey に関する資料も Bohr 効果の若干の低下を示唆している。<sup>35</sup>

In hb Hiroshima, on the other hand, the substitution near the C-terminal of the beta chain suggests a somewhat different explanation of the increased oxygen affinity, namely, that there may be interference with interactions between the two sister beta chains instead of between unlike alpha and beta subunits. According to Perutz's model for horse hemoglobin,<sup>40,41</sup> which may also apply to human hemoglobin, the sister beta chains are thought to be cross-linked by hydrogen bonds between asn at βH17 and the two his residues at βH21 and H24. In addition, the two chains are linked ionically through the amino terminal val NA1 and the carboxy terminal his H24. Muirhead et al<sup>42</sup> have shown that in human oxyhemoglobin, the amino terminal of one beta chain is 6 Å away from the carboxy terminal of the other chain, whereas in the deoxy form, the distance is doubled and the contacts between the sister chains are broken. Obviously, a substitution of the more negatively charged asp for his at H21 would profoundly alter these cross-linkages. Moreover,

他方, hb Hiroshima では, β鎖のC末端近くに置換がみられることは, 酸素親和性増強についてやや異なった解釈を示唆している。すなわち, 異種のα subunit とβ subunit との間の相互作用の障害があるのではなく, 2つの姉妹β鎖の間の相互作用が妨害されているのであるかもしれない。ヒト血色素にもあてはまると思われる Perutz のウマ血色素に対する模型によると,<sup>40,41</sup> これら姉妹β鎖は, βH17におけるasnとβH21およびH24における2つのhis残基との水素結合によって交叉連鎖されていると考えられる。その上, 2つの鎖は, アミノ酸末端のval NA1とカルボキシ末端のhis H24によってイオン結合している。Muirheadら<sup>42</sup>は, ヒト酸素ヘモグロビンにおける一方のβ鎖のアミノ酸末端は, 他方の鎖のカルボキシ末端から6Å離れているが, 脱酸素状態では, この距離は2倍になり, 姉妹鎖間の接触が切断されることを証明している。H21におけるhisが陰性荷電の大きなaspによって置換されると, これら交差連鎖が著しく変化することは明らかである。その上, H21の残基は, C

the residue at H21 is separated by almost one helical turn from the C terminal H24,<sup>43</sup> and its side chain, therefore, is oriented in the same direction as that of the terminal residue. Substitution of the more polar asp in hb Hiroshima would lead to charge rearrangements through the addition of the more negative in the proximity of the C charge terminal, tending in turn, to strengthen the ionic bond with the N terminal of the sister chain. Strengthening these bonds would tend to fix the hemoglobin molecule in the contracted quaternary oxy-conformation, interfere with dissociation into symmetrical alpha-beta dimers, leading to an increase in oxygen affinity. Parenthetically, it should be noted that simple steric hindrance seems an unlikely explanation, since asp is smaller than his.

The recently reported importance of 2, 3-diphosphoglycerate (DPG) in hemoglobin function raises the question of its possible role in the increased oxygen affinity of hb Hiroshima. Benesch et al<sup>44</sup> showed that DPG combines reversibly with normal hemoglobin in equimolar amounts, that its binding is reciprocal to that of oxygen, and that it reduces the affinity of hemoglobin for oxygen. Moreover, DPG is evidently bound to the beta chain of the hemoglobin molecule when it is in the expanded deoxy form, according to Perutz and Lehmann.<sup>45</sup> These investigators also pointed out that lysyl and arginyl residues along the dyad axis of the central cavity could serve to neutralize the five negative charges of DPG and indicated that lys  $\beta$  H10, the only one of the nine invariant residues in mammalian hemoglobin with no known function<sup>43</sup> might be a binding site for DPG.<sup>45</sup> Alternatively, his  $\beta$  H21 has been tentatively suggested as a possible binding site for DPG on the basis of recent studies of the influence of pH on the binding of DPG to hemoglobin,<sup>46</sup> along with the apparently favorable orientation of the histidine residue at  $\beta$  H21.<sup>47</sup> These observations together with the stereochemical effects described in the preceding paragraph suggest that a contributing factor to the increased oxygen affinity of hb Hiroshima may be its reduced affinity for DPG. Experiments are underway to determine whether or not this is so.

Hb Hiroshima and Rainier have substitutions in the  $\beta$  H helix, close to the carboxy terminal of the chain and the substitutions are two residues apart. Though both have increased oxygen affinity, hb Rainier has a normal Bohr effect, but increased resistance to alkali denaturation,<sup>29</sup> whereas hb Hiroshima has a decreased Bohr effect and its resistance to alkali denaturation is unaffected. One possible explanation for the reduction of the Bohr effect in hb Hiroshima is suggested by recent studies of normal hemoglobins. The beta chains are thought to contribute more to the Bohr effect than the alpha chains.<sup>48</sup> The most probable sources of the 'alkaline' Bohr protons are considered to be the imidazole side chains of his residues,

末端 H 24 からヘリックスのほとんど 1 回転離れており,<sup>43</sup> したがって、その側鎖は、末端残基と同一方向を向いている。hb Hiroshima では、もっと極端部の asp が置換されているため、C 末端近くに陰性荷電が 1 荷増加することによって、荷電の再配置を生ずる結果となり、それが他方では姉妹鎖の N 末端とのイオン結合を強化する傾向となる。これらの結合を強化することは、血色素分子を収縮した 4 原子酸素結合状態に固定し、対称的なアルファ・ベーター 2 量体への解離を妨害する傾向を生じ、酸素親和性増強を来たす。ついぞながら、asp は his よりも小さいので、単なる立体構造の障害をもってこの異常ヘモグロビンの酸素親和性の変化を説明できないと思われる。

血色素機能に 2, 3-ジフォスフォグリセレート (DPG) が重要であることが最近報告されているが、それが hb Hiroshima の酸素親和性増強に関与している可能性が考えられる。Benesch ら<sup>44</sup> は、DPG が正常血色素と等モル値の可逆的結合をし、しかも、その結合は酸素と反比例し、血色素の酸素親和性を低下させることを証明した。その上、Perutz と Lehmann<sup>45</sup> によると、血色素分子が膨張した脱酸素状態の時に DPG は  $\beta$  鎖と結合することは明らかである。これらの研究者は、中央凹没部の dyad axis に並ぶ lysyl と arginyl 残基は、DPG の 5 荷の陰性荷電を中和する働きを持ちうることを指摘し、また、哺乳動物の血色素における 9 つの不变残基の中で lys  $\beta$  H10 のみの機能が不明であるが、<sup>43</sup> これが DPG の結合部位であるかもしれないと述べている。<sup>45</sup> 他方、血色素と DPG の結合に対する pH の影響に関する最近の研究結果や、<sup>46</sup>  $\beta$  H21 における his 残基が有利な位置にあると考えられること<sup>47</sup> などからして、his  $\beta$  H21 も一応 DPG 結合部位と考えられることが示唆されている。これらの観察結果、ならびに前章で述べた立体化学的構造への影響を考えるならば、hb Hiroshima の酸素親和性増強に関与する要因は、DPG 親和性の低下であるかもしれないことが示唆される。はたしてそうであるかどうかを決定するために実験を続けている。

hb Hiroshima と hb Rainier では、 $\beta$  鎖のカルボキシ末端近くの  $\beta$  H ヘリックスに置換があり、この 2 つの置換は互いに 2 残基離れている。両者とも、酸素親和性は増強している。しかし、hb Rainier の Bohr 効果は正常であり、アルカリ変性に対する抵抗は増強している。<sup>29</sup> 一方、hb Hiroshima では、Bohr 効果は減少しており、アルカリ変性に対する抵抗は影響を受けていない。最近行われた正常血色素に関する研究によれば、hb Hiroshima における Bohr 効果の減少の説明が示唆されている。すなわち、Bohr 効果における  $\beta$  鎖の役割は  $\alpha$  鎖よりも大であると考えられる。<sup>48</sup> 「アルカリ」性 Bohr プロトンの出所としては、ヘム鉄連鎖に関係する鎖以外に his 残基の

other than those involved in heme-iron linkage. The histidine residues at  $\beta$  FG4 and possibly those near the carboxy terminal of the  $\beta$  chain may be potential sources of Bohr protons.<sup>32,49</sup> Removal of the latter produces products with increased oxygen affinity and a reduced Bohr effect.

With respect to the shifts in interatomic distances that accompany the oxygenation-deoxygenation reaction,<sup>42</sup> Rossi-Bernardi and Roughton<sup>48</sup> suggested that as consequence of stereochemical effects, the two pairs of hydrogen bridges between the gamma amino asn  $\beta$  H17 and the imidazole side chains of his  $\beta$  H21 and  $\beta$  H24 might participate in the Bohr reaction. In hb Hiroshima, the replacement of his by asp at  $\beta$  H21 not only alters the bonding relationships in the molecule as previously discussed, but also removes a pair of potential sources of Bohr protons, one from each subunit.

While this interpretation is no doubt an oversimplification, it is evident that the substitution of asp for his at the beta carboxy terminal in hb Hiroshima provides a clear illustration, along with that of hb Rainier, that this area of the beta chain plays an important role in several different functions of hemoglobin,<sup>50</sup> in contrast to the more restricted participation of other segments of the chains, such as the  $\alpha$  FG interhelical region and the  $\beta$  G helix, where substituents cause an increase in oxygen affinity but apparently have no effect on the pH dependence of the reaction. Taken together, these recently discovered naturally occurring high oxygen affinity mutant hemoglobins provide considerable support for the current picture that is developing to explain at the molecular level the complicated relationship of structure to function in hemoglobin.

In all hb Hiroshima carriers, the mutant and normal adult hemoglobin are present in equal proportions, implying that the synthetic mechanisms for the mutant  $\beta$  chain are probably as efficient as those for the normal chain, and that presumably the affinity of  $\beta$  Hiroshima for heme is equivalent to that of  $\beta$  A. Among the variants listed in Table 5, with the exception of hb Rainier, the  $\beta$  mutants are present in higher proportion in heterozygotes than the  $\alpha$  variants, which is consistent with the observation that in general, the proportion of the abnormal pigment in carriers of  $\beta$  variants tends to be higher than in those with  $\alpha$  variants.<sup>24</sup>

The amino acid substitution in hb Hiroshima is ascribable to a single step mutation in the Codon<sup>51</sup> for his(CAC or CAU)\* to that for asp(GAC or GAU). This point mutation, C to G, is the transversion type (pyrimidine to purine or

イミダゾール側鎖が最も有力であると考えられている。Bohr プロトンの潜在的な出所として、 $\beta$  FG 4における his 残基あるいは $\beta$  鎖のカルボキシ末端近くの残基が考えられている。<sup>32,49</sup> 後者の残基を取り除けば、酸素親和性増強と Bohr 効果減少を示す産物が得られる。

酸素飽和一還元反応に伴って生ずる原子間距離の変動<sup>42</sup>については、Rossi-BernardiとRoughton<sup>48</sup>は、 $\gamma$ アミノ酸 asn  $\beta$  H 17と、his  $\beta$  H 21および $\beta$  H 24のイミダゾール側鎖との間の2組の水素結合が、立体化学的影響の結果、Bohr 反応に関与しているかもしれないことを示唆している。hb Hiroshima では、 $\beta$  H 21において his が asp によって置換されているために、前述のように、分子における結合関係が変えられるのみならず、1対の Bohr プロトンの潜在的な出所、すなわち、各 subunit から一つずつ取り除かれることになる。

この解釈は、あまりにも簡単であることは確かであるが、hb Hiroshima の $\beta$  鎖カルボキシ末端において his が asp によって置換されていることは、hb Rainier の場合と同じく、 $\beta$  鎖のこの部分が血色素のいろいろの機能に重要な役割を演じていることをはっきり示していることは明らかである。<sup>50</sup> これは $\beta$  鎖の他の部分、たとえば $\alpha$  FG ヘリックス間部や $\beta$  G ヘリックスなどのように関与が限定されているのとよい対照をなし、これらでは、置換によって酸素親和性の増強はあるが、反応の pH 依存性に影響がないようである。これを総合すると、最近発見されたこれらの自然発生の酸素親和性の高い異常血色素は、血色素における構造と機能の複雑な関係を分子のレベルで説明するために展開されている現在の知見にかなりの支持を与えるものである。

すべての hb Hiroshima 保有者では、変異型と正常な成人型血色素は等しい割合で存在しており、これは変異型 $\beta$  鎖に対する合成機構が正常な鎖のそれとは効率がおそらく等しく、ヘムに対する $\beta$  Hiroshima の親和性は $\beta$  A のそれとおそらく等しいことを意味する。表5にあげた変異型では、hb Rainier を除けば、ヘテロ結合体における $\beta$  変異型の割合は、 $\alpha$  変異型よりも大きい。このことは、 $\beta$  変異型の保有者における異常血色素の割合は $\alpha$  変異型保有者よりも一般に大きいという観察に一致するものである。<sup>24</sup>

hb Hiroshima におけるアミノ酸置換は、his (CACまたはCAU)\*から asp (GACまたはGAU)へのCodon<sup>51</sup>における単一段階突然変異に起因すると考えられる。CからGへのこの点突然変異は、転位型のもの(ピリミジン

\* Abbreviations 略字: C=cytosine, A=adenosine, U=uracil, G=guanine

vice versa) which, according to Vogel and Röhrborn<sup>52</sup> is less likely to occur than the transition mutation (purine to purine or pyrimidine to pyrimidine). Among the mutants listed in Table 5, half (Capetown, Kempsey, Rainier) are transitions, which even in this small group, is reasonably consistent with other data<sup>52</sup> for abnormal hemoglobins showing a higher proportion of transitions than expected on the basis of random mutation alone.

## SUMMARY

During a survey for hemoglobinopathies in over 9000 residents of Hiroshima Prefecture, Japan, a fast moving hemoglobin was identified in 8 members of three generations in a Japanese family. The abnormal hemoglobin, named hb Hiroshima, constitutes about 50% of the total hemoglobin in hemolysates from the carriers who have a mild erythremia but are otherwise apparently clinically unaffected. All preparations of hb Hiroshima have increased affinity for oxygen, by either tonometric or oxygen electrode determinations. At pH 7.0, the oxygen pressure,  $P_{50}$  required to half saturate an unfractionated hemolysate from a carrier was one-half that of hb A, and the  $P_{50}$  of a purified sample containing no hb A was one-fourth that of hb A. The pH dependence of the oxygen equilibrium (Bohr effect) is below normal, as shown by the absolute value of the Bohr effect factor which is about half that of hb A, in the pH range between 7.0 and 7.4. The Hill constant,  $n$ , for hb Hiroshima between pH 7.0 and 7.4 is 2.2-2.4, compared to 2.8-3 for hb A under the same conditions, indicating reduction of, but not complete abolition of heme-heme interaction. Urea dissociation and canine hybridization tests located the biochemical lesion in the beta chain. Fingerprints (Ingram), carboxypeptidase digestion, and amino acid analysis demonstrated that the substitution was at residue 143 in the beta chain, where histidine was replaced by aspartic acid.

In contrast to other recently described high oxygen affinity mutants that show intact Bohr effects, all three of the major characteristics of the reversible combination of hemoglobin with oxygen (oxygen equilibrium, heme-heme interaction, and pH dependence) are affected in hb Hiroshima. A tentative interpretation of these effects, relating structure to function, is offered in terms of recently developed models of normal hemoglobin.

からプリン, またはその逆)である. Vogel と Röhrborn<sup>52</sup>によると, これは移行型突然変異(プリンからプリン, またはピリミジンからピリミジン)よりは発生の可能性は少ない. 表5にあげた変異体の中の半分(Capetown, Kempsey, Rainier)は移行型である. 少数例にすぎないとしても, このことは, 突然変異の無作為的な発生の場合の期待値よりも移行型が多く認められるという異常血色素に関するその他の資料<sup>52</sup>とかなり一致している.

## 要約

広島県在住の9000人以上について異常血色素症の調査を行ない, 1家系3世代8人に泳動度の速い血色素を検出した. この異常血色素は, hb Hiroshima と命名され, 溶血液総血色素の約50%を占めていた. 保有者には, 軽度の赤血球数増加以外に臨床症状はなかった. hb Hiroshima の標本はすべて, 分圧測定または酸素電極測定のいずれにおいても酸素に対する親和性の増強を示した. 保有者から得た非分画溶血液を pH 7.0 で半飽和するために必要な酸素分圧  $P_{50}$  は, hb A のその半分であり, hb A を含まない精製標本の  $P_{50}$  は hb A のその4分の1であった. 酸素平衡の pH 依存性 (Bohr 効果) は, Bohr 効果係数の絶対値によって示されるように正常より低く, pH 7.0-7.4 の範囲の pH では, hb A のその約半分であった. hb Hiroshima では, pH 7.0-7.4 における Hill 常数  $n$  は約 2-2.4 で, これに対して同じ条件における hb A のそれは 2.8-3 であり, これはヘム間相互作用の完全な消失がないにしても減少があることを示す. 尿素解離試験および犬雑種生成試験によって生化学的異常が  $\beta$  鎖にあることを決定できた. フィンガープリント法 (Ingram), カルボキシポリペプチダーゼ消化試験およびアミノ酸分析の結果, 置換の位置は  $\beta$  鎖の第 143 番目の残基であると認められ, ヒスチジンがアスパラギン酸によって置換されていた.

最近報告された Bohr 効果を示さないその他の酸素親和性の大きい変異種に比べると, hb Hiroshima では, 血色素と酸素との可逆性結合の主要特性の3つ(酸素平衡, ヘム間相互作用および pH 依存性)がすべて障害されている. これらの影響については, 最近考えられている正常血色素の模型に基づいて, 構造と機能の見地から暫定的な解釈を試みた.

## References

### 参考文献

1. HOLLINGSWORTH JW, BEEBE GW, et al: Medical findings and methodology of studies by the Atomic Bomb Casualty Commission on atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki. In the Use of Vital and Health Statistics for Genetic and Radiation Studies. New York, United Nations, 1962. pp 77-100; Hiroshima Igaku—J Hiroshima Med Ass 17:1249-77, 1965  
(広島および長崎におけるABCCの被爆者調査の医学的所見と方法)
2. WOOD JW, KEEHN RJ, et al: The growth and development of children exposed in utero to the atomic bomb, Hiroshima and Nagasaki. Amer J Public Health 57:1374, 1967  
(広島および長崎における胎内被爆者の成長および発育)
3. MIYAJI T, SHIBATA S, et al: Hemoglobin Hijiya: A new fast moving hemoglobin in a Japanese family. Science 159:204, 1968  
(Hemoglobin Hijiya: 日本人の1家族に発見された新しい泳動度の速い血色素)
4. CROSBY WH, MUNN JI, FURTH FW: Standardizing a method for clinical hemoglobinometry. US Armed Forces Med J 5:693, 1954  
(臨床的血色素測定方法の標準化)
5. ALLEN DW, GUTHE KF, WYMAN JR: Further studies on the oxygen equilibrium of hemoglobin. J Biol Chem 187:393, 1950  
(血色素の酸素平衡に関する追加研究)
6. KIKUCHI G, HAYASHI N, TAMURA A: Oxygen equilibrium of hemoglobin M<sub>Iwate</sub>. Biochim Biophys Acta 90:199, 1964  
(Hemoglobin M<sub>Iwate</sub>の酸素平衡)
7. IMAI K, MORIMOTO H, et al: An improved method for automatic measurement of oxygen equilibrium curves of haemoglobin. In preparation  
(血色素酸素平衡曲線の自動測定改良法)
8. SHIBATA S, IUCHI I: A simple technique of agar gel electrophoresis for rapid separation of hemoglobins. Acta Hemat Jap 24:51, 1961  
(寒天電気泳動による迅速血色素分離法)
9. 上田 智: 澱粉電気泳動法. 臨床血液 3: 26, 1962年  
(UEDA S: Starch block electrophoresis. Rinsho Ketsueki—Jap J Clin Haemat)
10. SINGER K, CHERNOFF AI, SINGER L: Studies on abnormal hemoglobins. 1. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematologic disorders by means of alkali denaturation. Blood 6:413, 1951  
(異常血色素の研究. 1. 鎌状赤血球貧血およびその他の血液障害における異常血色素のアルカリ性変性による証明方法)
11. BETKE K, MARTI HR, SCHLICHT I: Estimation of small percentages of foetal hemoglobin. Nature 184:1877, 1959  
(胎児血色素の微量測定法)
12. ANSON ML, MIRSKY AE: Protein coagulation and its reversal: The preparation of insoluble globin, soluble globin, and heme. J Gen Physiol 13:469, 1930  
(蛋白質凝固とそのリバーサル: 不溶性グロビン, 溶性グロビンおよびヘムの調製法)
13. BUCCI E, FRONTICELLI C: A new method for the preparation of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of human hemoglobin. J Biol Chem 240(i):PC551, 1965  
(ヘモグロビンの $\alpha$ および $\beta$ 半量体の新しい調製方法)
14. INGRAM VM: Abnormal human hemoglobins. 1. The comparison of normal and sickle cell hemoglobins by fingerprinting. Biochim Biophys Acta 28:529, 1958  
(異常ヒト血色素. 1. 正常人血色素と鎌状赤血球血色素のフィンガープリントによる比較)
15. BAGLIONI C: An improved method for the fingerprinting of human hemoglobin. Biochim Biophys Acta 48:392, 1961  
(ヒト血色素のフィンガープリント改良法)
16. BRENNER M, NIEDERWIESER A: Dünnsicht-Chromatographie von Aminosäuren. Experientia 16:378, 1961  
(アミノ酸の薄層クロマトグラフィ)
17. BRAUNITZER G, HILSE K, et al: The hemoglobins. Advances Protein Chem 19:1, 1964  
(血色素)
18. GUIDOTTI G: The action of carboxypeptidase A and B on the separated  $\alpha$  and  $\beta$  chains of normal adult hemoglobin. Biochim Biophys Acta 42:177, 1960  
(正常成人血色素の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖に対するカルボキシペプチダーゼAとBの作用)
19. HILL AV: The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. J Physiol 40:iv, 1910  
(血色素分子の集合による解離曲線への影響)



20. IMAI K: Oxygen equilibrium characteristics of abnormal hemoglobin Hiroshima ( $\alpha_2\beta_2^{143asp}$ ). Arch Biochem Biophys 127:543, 1968  
(異常血色素の Hemoglobin Hiroshima ( $\alpha_2\beta_2^{143asp}$ ) の酸素平衡特性)
21. BRAUNITZER G, GEHRING-MÜLLER R, et al: Die Konstitution des normalen adulten Humanhäoglobins. Hoppe-Seylers Z Physiol Chem 325:283, 1961  
(正常成人血色素の組成)
22. BAYRAKCI C, JOSEPHSON A, et al: A new fast hemoglobin. In Abstr 10th Congr Internat Soc Hemat, Stockholm, 1964  
(新しい泳動度の速い血色素)
23. HELLER P: Personal communication  
(私信)
24. LIDDEL J, BEAL D, et al: A new hemoglobin - J $\alpha$  Oxford, found during a survey of an English population. Nature 204:276, 1964  
(英国における人口調査で発見された新しい血色素 - J $\alpha$  Oxford)
25. BAGLIONI C, WEATHERALL DJ: Abnormal hemoglobins. X. Chemistry of hemoglobin J<sup>Baltimore</sup>. Biochim Biophys Acta 78:673, 1963  
(異常血色素. X. Hemoglobin J<sup>Baltimore</sup> の化学)
26. CONLEY CL, CHARACHE S: Mechanisms by which some abnormal hemoglobins produce clinical manifestations. Seminars Hemat 4: 53, 1967  
(若干の異常血色素における臨床症状発生の機序)
27. CHARACHE S, WEATHERALL DJ, CLEGG JB: Polycythemia associated with hemoglobinopathy. J Clin Invest 45:813, 1967  
(異常血色素症に合併した多血球血症)
28. NOVY M, EDWARDS MJ, METCALF J: Hemoglobin Yakima: 2. High oxygen affinity associated with compensatory erythrocytosis and normal hemodynamics. J Clin Invest 46:1848, 1967  
(Hemoglobin Yakima : 2. 代償性赤血球増加と正常血液動態を伴った酸素親和性増強)
29. STAMATOYANNOPOULOS G, YOSHIDA A, et al: Hemoglobin Rainier ( $\beta$ 145 tyrosine  $\rightarrow$  histidine): alkali resistant hemoglobin with increased oxygen affinity. Science 159:741, 1968  
(Hemoglobin Rainier ( $\beta$  145 tyrosine  $\rightarrow$  histidine): 酸素親和性増強を示すアルカリ抵抗血色素)
30. RANNEY HM, BRIEHL RW, JACOBS AS: Oxygen equilibrium of hemoglobin  $\alpha^A$  and of hemoglobin reconstituted from hemoglobin  $\alpha^A$  and H. J Biol Chem 240:2442, 1965  
(Hemoglobin  $\alpha^A$  および Hemoglobin  $\alpha^A$  と H で再構成した血色素の酸素平衡)
31. BENESCH R, BENESCH RE, TYUMA I: Subunit exchange and ligand binding. 2. The mechanism of the allosteric effect in hemoglobin. Proc Nat Acad Sci 56:1268, 1966  
(Subunit 交換と配位子結合. 2. 血色素における allosteric 効果の機序)
32. ANTONINI E: Interrelationship between structure and function in myoglobin and hemoglobin. Physiol Rev 45:123, 1965  
(ミオグロビンと血色素における構造と機能の相互関係)
33. LINES JG, McINTOSH R: Oxygen binding by haemoglobin J<sup>Capetown</sup> ( $\alpha_2$  Arg  $\rightarrow$  Gln). Nature 215:297, 1967  
(Hemoglobin J<sup>Capetown</sup> ( $\alpha_2$  Arg  $\rightarrow$  Gln) の酸素結合)
34. JONES RT, OSGOOD EE, et al: Hemoglobin Yakima: 1. Clinical and biochemical studies. J Clin Invest 46:1840, 1967  
(Hemoglobin Yakima: 1. 臨床的・生化学的研究)
35. REED CS, HAMPSON R, et al: Erythrocytosis secondary to increased oxygen affinity of a mutant hemoglobin, hemoglobin Kempsey. Blood 31:623, 1968  
(変異型血色素 Hemoglobin Kempsey の酸素親和性増強に続発した赤血球増多)
36. BACHMANN F, MARTI HR: Hemoglobin Zurich. 2. Physio-chemical properties of the abnormal hemoglobin. Blood 20:272, 1962  
(Hemoglobin Zurich. 2. その生理化学的特質)
37. MOORE WMO, BATTAGLIA FC, HELLEGERS AF: Whole blood oxygen affinities of women with various hemoglobinopathies. Amer J Obstet Gynec 97:63, 1967  
(各種異常血色素症女性患者の全血の酸素親和性)
38. RUCKNAGEL DL, GLYNN KP, SMITH JR: Hemoglobin Ypsi, characterized by increased oxygen affinity, abnormal polymerization and erythremia. Clin Res 15:270, 1967  
(酸素親和性増強, 異常重合と赤血球増多を特徴とする Hemoglobin Ypsi)
39. NAGEL RL, GIBSON QH, CHARACHE S: Relation between structure and function in hemoglobin Chesapeake. Biochem 6:2395, 1967  
(Hemoglobin Chesapeake における構造と機能の関係)
40. PERUTZ MF: Structure and function of haemoglobin. 1. A tentative model of horse oxyhaemoglobin. J Molec Biol 13:646, 1965  
(血色素の構造と機能. 1. ウマ酸素ヘモグロビン構造模型の試案)

41. PERUTZ MF, MUIRHEAD JM, GOAMAN LCG: Three-dimensional Fourier synthesis of horse oxyhaemoglobin at 2.8 Å resolution: the atomic model. *Nature* 219:131, 1968  
(分解能 2.8 Å におけるウマ酸素グロビンの 3 次元 Fourier 合成: 原子構造模型)
42. MUIRHEAD H, COX JM, et al: Structure and function of haemoglobin. 3. A three dimensional Fourier synthesis of human deoxyhemoglobin at 5.5 Å resolution. *J Molec Biol* 28:117, 1967  
(血色素の構造と機能. 3. 分解能 5.5 Å におけるヒト酸素ヘモグロビンの 3 次元 Fourier 合成)
43. PERUTZ MF, KENDREW JC, WATSON HC: Structure and function of haemoglobin. 2. Some relations between polypeptide chain configuration and amino acid sequence. *J Molec Biol* 13:669, 1965  
(血色素の構造と機能. 2. ポリペプチド鎖構造とアミノ酸配列との間の若干の関係)
44. BENESCH R, BENESCH RE, YU CI: Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. *Proc Nat Acad Sci USA* 59:526, 1967  
(ヒト血色素における酸素とジ・フォスファグリセラートの交互結合)
45. PERUTZ MF, LEHMANN H: Molecular pathology of haemoglobin. *Nature* 219:902, 1968  
(血色素の分子病理)
46. GARBY L GERBER G, DE VERDIER CH: Manuscript in preparation  
(準備中)
47. PERUTZ MF, GARBY L: Personal communication  
(私信)
48. ROSSI-BERNARDI L, ROUGHTON FJW: The effect of temperature on the oxygen-linked ionizations of hemoglobin. *J Biol Chem* 242:784, 1967  
(血色素の酸素連鎖イオン化に及ぼす温度の影響)
49. BENESCH R, BENESCH RE: Some relations between structure and function in hemoglobin. *J Molec Biol* 6:498, 1963  
(血色素の構造と機能との間の若干の関係)
50. ROSSI-FANELLI A, ANTONINI E, CAPUTO A: Hemoglobin and myoglobin. *Advances Protein Chem* 19:74, 1964  
(血色素とミオグロビン)
51. NIRENBERG M, LEDER P, et al: RNA code words and protein synthesis. 7. On the general nature of the RNA code. *Proc Nat Acad Sci* 53:1161, 1965  
(RNA コードと蛋白合成. 7. RNA コードの一般性質)
52. VOGEL F, RÖHRBORN G: Amino-acid substitutions in haemoglobins and the mutation process. *Nature* 210:116, 1966  
(血色素におけるアミノ酸置換と突然変異過程)