

## LIGAND KINETICS IN HEMOGLOBIN HIROSHIMA

Hemoglobin Hiroshima における配位子動態

RONALD L. NAGEL, M.D.

QUENTIN H. GIBSON, M.D., Ph.D., D.Sc.

HOWARD B. HAMILTON, M.D.



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の日本人および米人専門職員、顧問、評議会、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例の誌上発表に代るものではない。

## LIGAND KINETICS IN HEMOGLOBIN HIROSHIMA

Hemoglobin Hiroshima における配位子動態

RONALD L. NAGEL, M.D.

QUENTIN H. GIBSON, M.D., Ph.D., D.Sc.

HOWARD B. HAMILTON, M.D.

## ACKNOWLEDGMENT

謝辞

This work was supported by United States Public Health Service Grants GM 14378 and  
 PO 5 AM13130, the Japanese Medical Research Fund Grant G-70-34 and a Grant from  
 the New York Heart Association. R.L.N. is a Career Scientist of the Health Research  
 Council of the City of New York, Contract 1-604.

この研究は、米国公衆衛生局の助成金 GM 14378 および PO 5 AM 13130、日本医療研究基金の助成金 G-70-34、およびニューヨーク心臓協会からの助成金によって行われた。R.L.N. は、ニューヨーク市健康研究評議会との契約 1-604 によるキャリアサイエンティストである。



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

広島および長崎

米国学士院 - 学術会議と厚生省国立予防衛生研究所  
 との日米共同調査研究機関

米国原子力委員会、厚生省国立予防衛生研究所および米国公衆衛生局の研究費による

LIGAND KINETICS IN HEMOGLOBIN HIROSHIMA

Hemoglobin Hiroshima における配位子動態

RONALD L. NAGEL, M.D.  
QUENTIN H. GIBSON, M.D., Ph.D., D.Sc.  
HOWARD R. HAMILTON, M.D.

ACKNOWLEDGMENT

謝 辞

This work was supported by United States Public Health Service Grants GM 14276 and PO 2 AM13430; Life Insurance Medical Research Fund Grant G-70-34 and a Grant from the New York Heart Association. R.L.N. is a Career Scientist of the Health Research Council of the City of New York, Contract I-604.

この研究は、米国公衆衛生局助成金 GM 14276 および PO 2 AM 13430, 生命保険医学研究助成金 G-70-34, および New York 心臓病協会よりの助成金によって行なわれた。R.L.N. は、New York 市保健研究会議の常勤科学者である (契約 I-604)。

A paper based on this report was published in the following journal:

本報告に基づく論文は下記の雑誌に発表された。

Journal of Clinical Investigation 50:1772-5, 1971

## CONTENTS

### 目次

Summary	要約	1
Introduction	緒言	1
Methods	方法	1
Results	結果	2
Discussion	考察	5
References	参考文献	8
Figure 1. Kinetics of the combination between carbon monoxide and Hb A and Hb Hiroshima		
図	断続流動法で測定した Hb A および Hb Hiroshima の一酸化炭素結合反応の動態	3
2.	Kinetics of the reaction of oxy Hb A and Hb Hiroshima with dithionite 酸化型の Hb A および Hb Hiroshima の亜二チオン酸塩との反応の動態	3
3.	Kinetics of the replacement of O <sub>2</sub> bound to Hb Hiroshima by carbon monoxide at different O <sub>2</sub> concentrations 異なる O <sub>2</sub> 濃度下における Hb Hiroshima の結合 O <sub>2</sub> の一酸化炭素による置換	4
4.	Combination rate of haptoglobin with Hb A and Hb Hiroshima, studied by fluorescence quenching 蛍光消退に基づいて検査した Hb A および Hb Hiroshima とのハプトグロビン結合速度	4

## LIGAND KINETICS IN HEMOGLOBIN HIROSHIMA

## Hemoglobin Hiroshima における配位子動態

RONALD L. NAGEL, M.D.<sup>1</sup>; QUENTIN H. GIBSON, M.D., Ph.D., D.Sc.<sup>2</sup>; HOWARD B. HAMILTON, M.D.<sup>3</sup>

## SUMMARY

Hemoglobin Hiroshima ( $\beta^{146} \text{His} \rightarrow \text{Asp}$ ) is an electrophoretically fast moving variant with a four-fold increase in oxygen equilibria and a decreased Bohr effect. Based on a decreased rate of dissociation of  $\text{O}_2$  by dithionite and an increased rate of binding of CO by the deoxy form, we have concluded that the kinetic basis of the high affinity exhibited by Hb Hiroshima is the concurrence of a faster combination rate and a slower dissociation rate for ligands.

## INTRODUCTION

Hemoglobin Hiroshima ( $\beta^{146} \text{Histidine} \rightarrow \text{Aspartic acid}$ ), discovered by Hamilton and co-workers<sup>1</sup> in several members of a Japanese family, is a fast moving beta chain variant associated with increased oxygen affinity and compensatory erythrocytosis. The present report deals with a preliminary account of the kinetic basis of the oxygen equilibria of this hemoglobin variant.

## METHODS

Venous blood from a donor known to be heterozygous for Hb Hiroshima was sent from Japan to New York in iced containers and processed within 48 hours.

Hemolysates were prepared by the method of Drabkin<sup>2</sup> with minor modifications. Hemoglobin Hiroshima was isolated by starch block electrophoresis<sup>3</sup> using veronal buffer, 0.04M at pH 8.6,

## 要約

Hemoglobin (Hb) Hiroshima ( $\beta^{146} \text{His} \rightarrow \text{Asp}$ )は、酸素平衡の4倍の増強と Bohr 効果の低下とを示す電気泳動度の速い変異型血色素である。亜二チオン酸塩による  $\text{O}_2$  解離速度の低下および還元型による CO 結合速度の増加があるので、配位子における結合速度の増加と解離速度の低下との併発が、Hb Hiroshima にみられる酸素親和性増強の動態的根拠であると著者らは結論した。

## 緒言

Hemoglobin (Hb) Hiroshima ( $\beta^{146} \text{ヒスチジン} \rightarrow \text{アスパラギン酸}$ )は、Hamilton とその共同研究者<sup>1</sup>が一日本人家族のうちの数名に発見した、酸素親和性増強と代償性赤血球増加を伴う泳動度の速い  $\beta$  鎖変異型血色素である。本報告は、この変異型血色素にみられる酸素平衡の動態的根拠についての予報である。

## 方法

Hb Hiroshima に関して異型接合と確認されている者 1 人の静脈血を採取し、冷蔵容器に入れて日本から New Yorkへ送って48時間以内に処理した。

溶血液の調製は、Drabkin の方法<sup>2</sup>に若干の改変を加えた変法に従った。Hb Hiroshima は、pH 8.6, 0.04M のペロナル緩衝液を使用して澱粉ブロック電気泳動法<sup>3</sup>

Department of Medicine, Albert Einstein College of Medicine<sup>1</sup>; Department of Biochemistry and Molecular Biology, Cornell University<sup>2</sup>; and Department of Clinical Laboratories, ABCC<sup>3</sup>

Albert Einstein 医科大学内科学教室<sup>1</sup>; Cornell 大学 Wing 講堂生化学・分子生物学教室<sup>2</sup>; および ABCC 臨床検査部<sup>3</sup>

and the variant, which migrated cathodally to HbA, was eluted from the starch with 0.001M phosphate buffer, pH7. The purity of the isolated hemoglobin was verified by starch gel electrophoresis (TRIS-borate buffer, pH8.6).<sup>4</sup>

Haptoglobin comprised about 90% of a preparation which was purified according to the method of Nagel and Gibson.<sup>5</sup>

The binding of CO by hemoglobin and the reaction of oxyhemoglobin with dithionite was measured by the stopped flow method using the apparatus of Gibson and Milnes<sup>6</sup> with some modifications. An analogue-to-digital converter (Digital Equipment Corporation, model 130 E, Maynard, Mass.) was used to digitize the photomultiplier output which was then transferred to a PDP 8/I computer under control of a program described by DeSa and Gibson.<sup>7</sup>

Hemoglobin binding to haptoglobin was measured by the method of Nagel and Gibson<sup>5</sup> based on the quenching of the aromatic amino acid fluorescence by the hemes of hemoglobin. Excitation at 287m $\mu$  was used and light was obtained from a dissect current xenon lamp and a Bausch and Lomb 250 mm grating monochromator. An EM 1 photomultiplier type 9525-B and a Corning Glass filter No. 7-60 detected the protein fluorescence at 350m $\mu$ . As in the absorbance stopped flow experiments, the data were collected directly into the memory of a PDP - 8/I computer, but visual observation of the reaction was simultaneously possible with an oscilloscope.

## RESULTS

**Binding of CO.** The kinetics of the reaction between deoxy Hb A and deoxy Hb Hiroshima with carbon monoxide is shown in Figure 1. Hemoglobin solutions were 24  $\mu$ M (heme), prior to mixing, and in 0.1M potassium phosphate buffer, pH 7.0. The carbon monoxide solutions were prepared by bubbling buffer with pure CO at 1 atm. of pressure and diluted with oxygen-free 0.1M potassium phosphate buffer, pH 7.0. The final concentration of carbon monoxide after mixing was 97.5  $\mu$  moles/liter. Dithionite was added to the deoxy-Hb solution and the CO-phosphate buffer, which were subsequently mixed in equal volumes in the stopped flow apparatus. The reaction was followed at 450m $\mu$  and the experiments were performed at 22C. The second order constant for Hb A is  $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  and  $3.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$  for Hb Hiroshima.

**The Reaction of Oxy Hb and Dithionite.** The solutions of Hb A and Hb Hiroshima were

of deoxy Hb A, which migrated cathodally to HbA, was eluted from the starch with 0.001 M phosphate buffer (pH 7) with dithionite. The purity of the isolated hemoglobin was verified by starch gel electrophoresis (TRIS-borate buffer, pH 8.6) with dithionite.<sup>4</sup>

以前の報告に記述した方法<sup>5</sup>で精製した検体におけるハプトグロビン含有率は約90%であった。

血色素のCO結合反応および酸化型血色素の亜二チオン酸塩に対する反応は、GibsonおよびMilnes<sup>6</sup>の装置を若干改造して、断続流動法によって測定した。光電増幅器の出力は、Analogue-to-digital converter (Digital Equipment社製130 E型)で数値化し、次に、DeSaおよびGibson<sup>7</sup>の報告したプログラムを使用し、これをPDP 8/I型電子計算機で処理した。

ハプトグロビンとの血色素結合の測定は、芳香族アミノ酸蛍光光度が血色素のヘムによって消滅することを応用したNagelおよびGibsonの方法<sup>5</sup>に従った。励起波長として287 m $\mu$ を使用し、光源として直流キセノン電球とBausch and Lomb社製の250 mm格子単色光器を用いた。EM 1光電増幅器9525-B型と7-60号 Corning ガラスフィルターを使用して、350 m $\mu$ に蛋白蛍光を検出した。断続流動吸着試験の場合と同様、資料はPDP 8/I型電子計算機の記憶装置へ直接入れたが、同時にオシロスコープによって反応を肉眼的に観察した。

## 結果

**CO結合反応.** 還元型Hb Aおよび還元型Hb Hiroshimaの一酸化炭素との反応の動態を図1に示した。pH 7.0, 0.1Mの燐酸カリウム緩衝液中の血色素の混合前の濃度は24  $\mu$ M (ヘム)であった。一酸化炭素溶液の調製には、1気圧で緩衝液に純粋なCOを通し、酸素を含まない、pH 7.0, 0.1M燐酸カリウム緩衝液で希釈した。混合後の一酸化炭素の最終濃度は1  $\mu$ 当たり97.5  $\mu$ Mであった。還元型血色素溶液およびCO燐酸緩衝液に亜二チオン酸塩を加えた後、断続流動装置内でそれぞれ等量ずつ混合した。反応は450 m $\mu$ で観察した。この実験は22Cで行なった。Hb Aに対する二次元恒数は $1.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ , Hb Hiroshimaでは $3.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ であった。

**酸化型血色素と亜二チオン酸塩との反応.** Hb AおよびHb Hiroshimaの溶液の混合前の濃度は、pH 7.0, 0.1

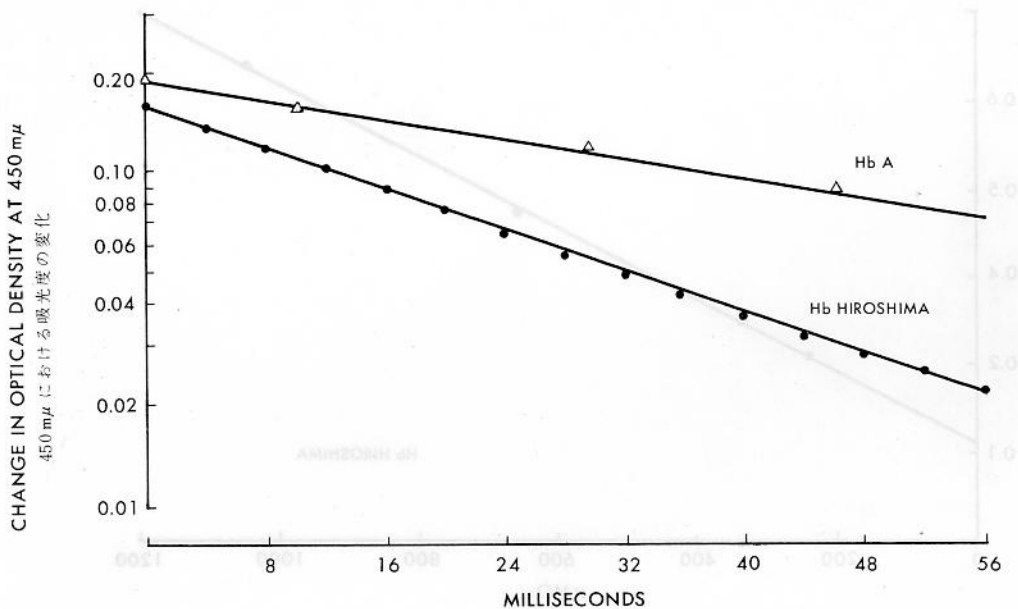


Figure 1 Kinetics of the combination reaction between carbon monoxide & Hb A & Hb Hiroshima, determined by stopped flow method. Temperature: 22 C; 0.1M potassium phosphate buffer, pH 7.0. Hemoglobin concentration: 24  $\mu$ M (heme) before mixing. CO concentration: 97.5  $\mu$ M after mixing.

図1 断続流動法で測定した Hb A および Hb Hiroshima の一酸化炭素結合反応の動態。温度：22C；0.1 M 磷酸カリウム緩衝液，pH 7.0。血色素濃度：混合前に 24  $\mu$ M (ヘム)。CO 濃度：97.5  $\mu$ M (混合後)。

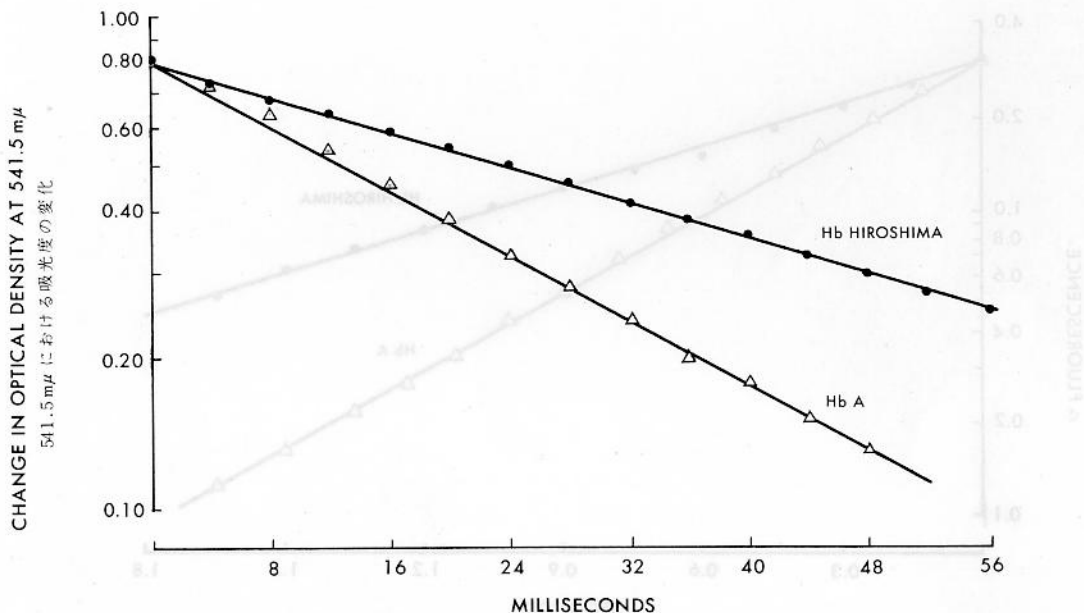


Figure 2 Kinetics of the reaction of oxy Hb A & Hb Hiroshima with dithionite. Temperature: 22 C; 0.1M potassium phosphate buffer. Hemoglobin concentration: 24  $\mu$ M (heme) before mixing.

図2 酸化型の Hb A および Hb Hiroshima の亜二チオン酸塩との反応の動態。温度：22C；0.1 M 磷酸カリウム緩衝液，血色素濃度：混合前に 24  $\mu$ M (ヘム)。



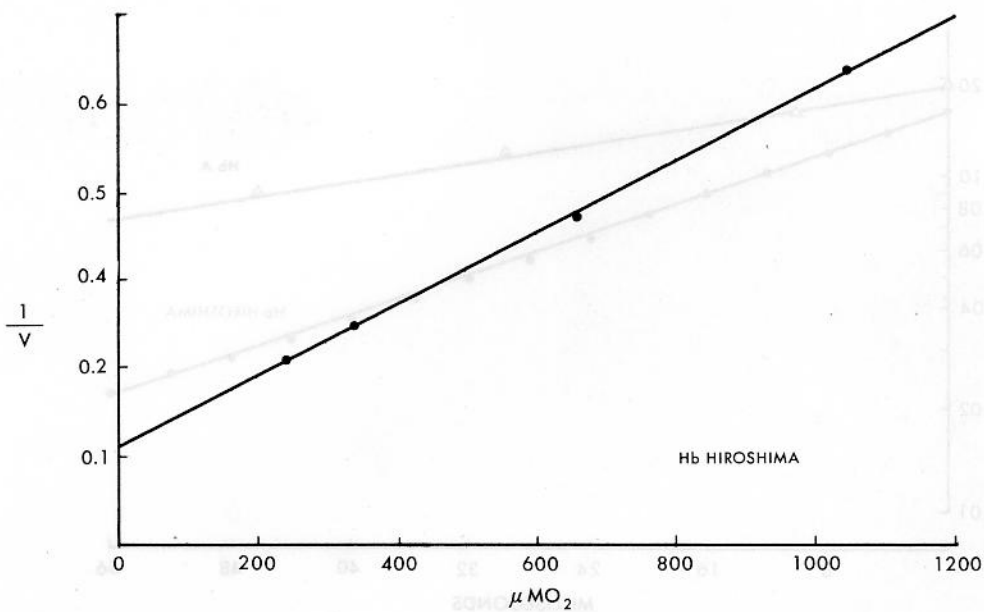


Figure 3 Kinetics of the replacement of  $O_2$  bound to Hb Hiroshima by carbon monoxide at different  $O_2$  concentrations. Plot of the reciprocal rate constant of the replacement reaction vs  $O_2$  concentration before mixing. Temperature: 22°C; 0.1M potassium phosphate buffer, pH 7.0

図3 異なる  $O_2$  濃度下における Hb Hiroshima の結合  $O_2$  の一酸化炭素による置換。置換反応の速度恒数の逆数を混合前の  $O_2$  濃度に対して図示した。温度: 22°C; 0.1 M 磷酸カリウム緩衝液, pH 7.0.

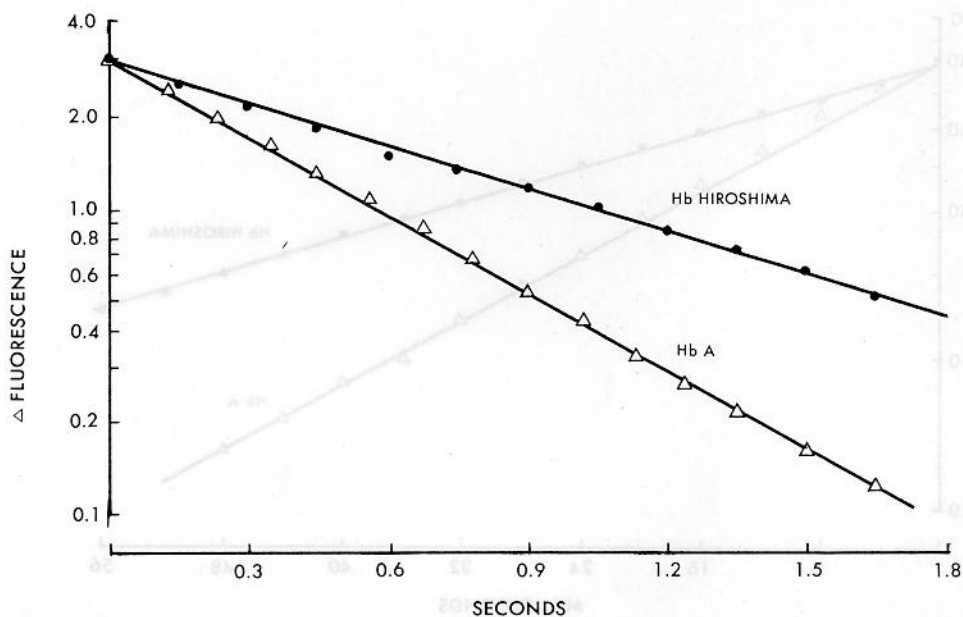
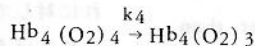


Figure 4 Combination rate of haptoglobin with Hb A & Hb Hiroshima, studied by fluorescence quenching. Haptoglobin solution: 3.05  $\mu$ M; Hb A, 25  $\mu$ M (heme); Hb Hiroshima, 25  $\mu$ M (heme). All solutions in 0.1M potassium phosphate, pH 7.0. Temperature: 22°C; concentrations before mixing.

図4 蛍光消退に基づいて検査した Hb A および Hb Hiroshima とのハプトグロビン結合速度。ハプトグロビン溶液: 3.05  $\mu$ M; Hb A, 25  $\mu$ M (ヘム), Hb Hiroshima, 25  $\mu$ M (ヘム)。いずれも pH 7.0 の 0.1 M 磷酸カリウムを混合した溶液。温度: 22°C; 濃度は混合前のもの。

24 $\mu$ M (before mixing) and in 0.1M potassium phosphate buffer, pH7.0. These solutions were mixed with a 0.2% dithionite solution in a stopped flow apparatus. The reaction was followed at 541.5m $\mu$  and at 22C, and the results are shown in Figure 2. The k obtained for Hb A was 35 sec<sup>-1</sup> and for hemoglobin Hiroshima was 20 sec<sup>-1</sup>.

**The Replacement of Oxygen by Carbon Monoxide.** The displacement reaction of O<sub>2</sub> from oxy Hb by CO was studied in the stopped flow apparatus and the results are shown in Figure 3. One syringe contained Hb Hiroshima diluted with a 0.1M potassium buffer, pH7, equilibrated with different concentrations of O<sub>2</sub>. The other syringe contained the same buffer saturated with CO. The reciprocal of the observed rate of replacement of oxygen by carbon monoxide, expressed as a rate constant vs the O<sub>2</sub> concentration, is depicted in Figure 3. The intercept in this case is 4/k<sub>4</sub>, as demonstrated by Gibson and Roughton.<sup>8</sup> The dissociation velocity constant, k<sub>4</sub>, corresponds to



In the case of Hb Hiroshima, k<sub>4</sub> is 33 sec<sup>-1</sup> as compared with 55 sec<sup>-1</sup> for Hb A under similar conditions.

**The Binding of Hemoglobin by Haptoglobin.** This reaction was studied with a stopped flow apparatus provided with a fluorescence attachment. The reaction was followed by utilizing the fluorescence quenching of the 350m $\mu$  emission of haptoglobin by the hemes of hemoglobin. Solutions of Hb A and Hb Hiroshima, 25 $\mu$ M (heme), in 0.1M potassium phosphate buffer, pH7.0, were mixed with a 3.05 $\mu$ M solution of haptoglobin at 22C. The results are shown in Figure 4. The pseudo first order combination rate is 1.1 sec<sup>-1</sup> for Hb A and 1.9 sec<sup>-1</sup> for Hb Hiroshima.

## DISCUSSION

Hemoglobin Hiroshima was initially described as having a substitution of aspartic acid for the  $\beta$ -143 (H21) histidine, but recent X-ray diffraction crystallography of the deoxy form, confirmed by independent chemical analysis, shows that, in fact, the amino acid substitution of aspartate for histidine is at the carboxy terminal of the beta chain at position  $\beta$ -146 (HC3).<sup>9</sup>

Hemoglobin Hiroshima has been shown to exhibit an increased affinity for oxygen.<sup>1,10</sup> At pH7.0, the purified solution of Hb Hiroshima has a P<sub>50</sub> (pressure of O<sub>2</sub> at 50% saturation) which is

M 燐酸カリウム緩衝液中で24 $\mu$ Mであった。これらの溶液は、断続流動装置内で0.2%亜二チオン酸塩溶液と混合した。反応は、541.5m $\mu$ 、22Cで観察し、その結果は図2に示した。Hb A に対して求められたkの値は35 sec<sup>-1</sup>、Hb Hiroshima に対してのそれは20 sec<sup>-1</sup>であった。

一酸化炭素による酸素置換反応。酸化型血色素に対するCOのO<sub>2</sub>排除作用は断続流動装置を用いて検査し、その結果を図3に示した。一方の円筒には、種々の濃度のO<sub>2</sub>で平衡したHb HiroshimaをpH 7.0、0.1M燐酸カリウム緩衝液で希釈して入れた。他方の円筒には、CO飽和の同種緩衝液を入れた。観察された一酸化炭素による酸素置換率の逆数を、速度恒数とO<sub>2</sub>濃度との関係の形で、図3に示した。この場合の縦軸との交点は、GibsonおよびRoughton<sup>8</sup>が示したように、4/k<sub>4</sub>である。解離速度恒数k<sub>4</sub>は、次に相当する。

Hb Hiroshimaの場合のk<sub>4</sub>は33 sec<sup>-1</sup>であり、これに対して同じ条件のもとにおけるHb Aでは55 sec<sup>-1</sup>である。

ハプトグロビンとの血色素結合反応。この反応は、蛍光光度計を取りつけた断続流動装置を用いて検査した。ハプトグロビンの350m $\mu$ における蛍光発光が血色素のヘムによって消滅することを利用して反応の観察を行なった。pH 7.0、0.1Mの燐酸カリウム緩衝液中の25 $\mu$ M (ヘム)のHb AおよびHb Hiroshimaを22Cで3.05 $\mu$ Mのハプトグロビン溶液と混合させた。その結果を図4に示した。疑似第一次元の結合速度はHb Aが1.1 sec<sup>-1</sup>、Hb Hiroshimaが1.9 sec<sup>-1</sup>であった。

## 考 察

Hb Hiroshimaでは、 $\beta$ -143 (H21) ヒスチジンのアスパラギン酸による置換があると初め報告されたが、その還元型についてのX線回折結晶学的検査およびこれとは別に行なわれた化学的分析の結果、ヒスチジンのアスパラギン酸塩によるアミノ酸置換の位置が実は $\beta$ -146 (HC3)における $\beta$ 鎖のカルボキシ基末端に存在することが最近確認された。<sup>9</sup>

Hb Hiroshimaは、酸素親和性の増強を示すことが認められている。<sup>1,10</sup> pH 7.0における精製Hb Hiroshima溶液のP<sub>50</sub> (半飽和における酸素分圧)がHb Aの4倍も高

4 times higher than that of a solution of Hb A. The Bohr effect (the variation of oxygen affinity with pH) is considerably reduced in this variant: The  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$  ratio is reduced by half in the range between pH 7.4 and 7.0.<sup>1</sup>

Another interesting feature of the oxygen equilibria of Hb Hiroshima is the presence of moderately decreased heme-heme interaction. The Hill equation<sup>11</sup> describes empirically the oxygen equilibria of Hb:

$$\log / s(1-s) = n \log p + \log k$$

where  $s$  represents the fractional saturation with oxygen,  $p$  is the partial pressure of oxygen and  $n$  becomes a constant representing in a general way the stabilizing interactions between the oxygen binding sites. An  $n$  value of 1 represents no heme-heme interaction and  $n=4$  represents the maximal possible interaction in a tetrameric molecule that contains 4 binding sites.

In Hb Hiroshima, at pH 7.0,  $n=2.0$ , rather than 2.7-3.0 as classically found in Hb A. Furthermore, the  $n$  value varies with pH and increases to 2.6 at pH 7.8. This is in contrast with the behaviour of  $n$  in Hb A, which is invariant with pH. An intriguing feature of the oxygen equilibria of Hb Hiroshima has been observed: At low pH, the curve is biphasic.<sup>1,10</sup>

The data presented here show that the increased ligand affinity is probably due to changes in both binding and dissociation reactions, though our measurements have so far involved different ligands for the two types of kinetic reactions which can most accurately and easily be studied using carbon monoxide for binding, and oxygen for dissociation.

It has been recently demonstrated that most of the cooperativity between hemes in hemoglobin is due to changes in the dissociation constants.<sup>12,13</sup> Hence, a difference in rates should be observed between the dissociation velocity constant  $k_4$  of the first site in a fully liganded molecule and the dissociation velocity constant obtained with dithionite, which is greatly influenced by the dissociation of the rest of the ligands in the tetramer.

In Hb Hiroshima the ratio between  $k_4/4$  ( $8.25 \text{ sec}^{-1}$ ) and the dissociation rate measured by dithionite ( $20 \text{ sec}^{-1}$ ) is slightly lower than that of Hb A:  $13 \text{ sec}^{-1}$  and  $40 \text{ sec}^{-1}$ , respectively. This demonstrates the presence of apparent differences in the dissociation constants for each of the

い. この変異型血色素の Bohr 効果(酸素親和性の pH による変化)はかなり低下している: pH 7.4-7.0 の範囲では,  $\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$  の比は半分に減少している.<sup>1</sup>

Hb Hiroshima の酸素平衡における興味ある今一つの特徴は, ヘム間相互作用が中等度に減少していることである. 血色素の酸素平衡は, Hill の等式<sup>11</sup> によって経験的に次のように示される.

ここで  $s$  は酸素による分別飽和,  $p$  は酸素分圧,  $n$  は各酸素結合部位の間の安定化作用の概要を示す常数である.  $n$  が 1 であれば, ヘム間相互作用がないことを示し,  $n=4$  は, 四つの結合部位を有する 4 価の分子に起こりうる最大の相互作用を示す.

Hb Hiroshima では, pH 7.0 において  $n=2.0$  であり, これに対して Hb A では通常 2.7-3.0 であることが認められている. なお,  $n$  の値は pH によって変化し, pH 7.8 では 2.6 に増加する. このことは, Hb A における  $n$  が pH によって変化しないことと対照的である. Hb Hiroshima の酸素平衡には, 極めて興味深い特徴が認められている. すなわち, pH が低い場合に曲線は 2 相性である.<sup>1,10</sup>

ここに記述した資料によれば, 配位子親和性の増強は, おそらく結合反応と解離反応のいずれにも変化があるためであろう. ただし, われわれの今までの測定は, この 2 種類の力学的反応に対してそれぞれ異なる配位子を検討したものであり, 結合反応は一酸化炭素を使用して, また解離反応は酸素を使用してきたため正確に, かつ, 容易に追究できる.

血色素におけるヘム間の協同作用の大部分は, 解離恒数の変化に起因することが, 最近証明された.<sup>12,13</sup> したがって, 配位子を完全に有する分子における第 1 番目の部位の解離速度恒数  $k_4$  と亜二チオン酸塩によって求められる解離速度恒数との間に差が認められるはずであり, これは, 四量体における他の配位子の解離によって非常に左右される.

Hb Hiroshima では,  $k_4/4$  ( $8.25 \text{ sec}^{-1}$ ) と亜二チオン酸塩によって測定した酸素解離速度 ( $20 \text{ sec}^{-1}$ ) との比率は, Hb A よりやや低い. すなわち, それぞれ  $13 \text{ sec}^{-1}$  および  $40 \text{ sec}^{-1}$  である. このことは, それぞれのヘムに対する解離恒数に明らかな差があることを示し, 結合部位

hemes, implying cooperativity between binding sites, a phenomenon which has classically been referred to as "heme-heme interaction."

The variation of  $n$  with pH and the biphasic character of the oxygen equilibrium curve at low pH, can not be explained with the available data and further work is in progress to resolve this problem.

The moderate decrease in heme-heme interaction cannot be fully explained with the present data. Nevertheless, a substitution in the C terminal portion of the H helix, which interferes with heme-heme interaction, is consistent with an important role for Tyr HC2(145) $\beta$  in the underlying mechanism of cooperativity. Early suggestions of the participation of this residue in the heme-heme interaction mechanism<sup>14</sup> have been further developed and supported by the findings of Moffat<sup>15</sup> and Perutz.<sup>16</sup>

Since the binding between hemoglobin and haptoglobin occurs exclusively via the hemoglobin dimer in the micromolar level of concentration,<sup>17</sup> the slight increase in the rate of the binding observed with Hb Hiroshima may be due to a small increase in the dissociability of this hemoglobin variant or a modification of the binding site by the substitution.

間の協同作用, すなわち, 古典的に「ヘム間相互作用」と呼ばれている現象があることを示唆する。

$n$  の pH による変化および pH が低い場合の酸素平衡曲線の 2 相性は, 現在入手されている資料では説明が不可能であり, その究明のためさらに研究が行なわれている。

現在の資料では, ヘム間相互作用の中等度の低下は完全には説明できない。しかし, H helix C 末端部の置換のためにヘム間相互作用に干渉が生ずることは, 協同作用の基礎的機構における Tyr HC 2 (145) $\beta$  の役割の重要性を示す。この残基がヘム間相互作用に関与するという以前の示唆<sup>14</sup> は, その後さらに発展し, Moffat<sup>15</sup> および Perutz<sup>16</sup> の所見で裏づけられている。

血色素とハプトグロビンとの結合は, マイクロモル領域の濃度の血色素 2 量体を經由してもっぱら行なわれるので,<sup>17</sup> Hb Hiroshima にみられる結合速度の軽度の増加は, この変異型血色素の解離能の軽度の増加, あるいは, 置換による結合部位の修飾に起因するものであるかもしれない。

## REFERENCES

### 参考文献

1. HAMILTON HB, IUCHI I, MIYAJI T, SHIBATA S: Hemoglobin Hiroshima ( $\beta^{143}$  Histidine  $\rightarrow$  aspartic acid): A newly identified fast moving beta chain variant associated with increased oxygen affinity and compensatory erythremia. *J Clin Invest* 48:525, 1969
2. DRABKIN DL: Spectrophotometric studies. 14. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. *J Biol Chem* 164:703, 1946
3. KUNKEL HG, CEPELLINI R, MULLER-EBERHARD V, WOLF J: Observations on the minor basic hemoglobin component in the blood of normal individuals and patients with thalassemia. *J Clin Invest* 36:1615, 1957
4. SMITHIES O: An improved procedure for starch gel electrophoresis. *Biochem J* 71:585, 1959
5. NAGEL RL, GIBSON QH: Kinetics and mechanism of complex formation between hemoglobin and haptoglobin. *J Biol Chem* 242:3428, 1967
6. GIBSON QH, MILNES L: Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry. *Biochem J* 91:161, 1964
7. DESA RJ, GIBSON QH: A practical automatic data acquisition system for stopped-flow spectrophotometry. *Comput Biomed Res* 2:494, 1969
8. GIBSON QH, ROUGHTON FJW: The kinetics of dissociation of the first oxygen molecule from fully saturated oxyhaemoglobin in sheep blood solutions. *Proc Roy Soc B* 143:310, 1955
9. PERUTZ MF, DEL PULSINELLI P, TEN EYCK L, KILMARTIN JF, SHIBATA S, MIYAJI Y, IUCHI I, HAMILTON HB: Haemoglobin Hiroshima and the mechanism of the alkaline Bohr effect. *Nature New Biology* 234:147-9, 1971
10. IMAI K: Oxygen equilibrium characteristics of abnormal hemoglobin Hiroshima ( $\alpha_2\beta_2^{143Asp}$ ). *Arch Biochem Biophys* 127:543, 1968
11. HILL AV, BANCROFT J: The nature of oxyhaemoglobin with special reference on its molecular weight. *J Physiol* 40:411, 1910
12. GIBSON WH: The reaction of oxygen with hemoglobin and the kinetic basis of the effect of salt on binding of oxygen. *J Biol Chem* 245:3285, 1970
13. ANTONINI E, BRUNORI M: Kinetics of the reaction of hemoglobin with ethylisocyanide. Interpretation of the results within a dimer model. *J Biol Chem* 245:5412, 1970
14. NAGEL RL, RANNEY HM, KUCINSKIS LL: Tyrosine ionization in human carbon monoxide and deoxyhemoglobins. *Biochemistry* 5:1934, 1966
15. MOFFAT JK: *J Mol Biol* (in press)
16. PERUTZ MF: Stereochemistry of cooperative affects in haemoglobin. *Nature* 228:726, 1970
17. NAGEL RL, GIBSON QH: The binding of hemoglobin to haptoglobin and its relation to subunit dissociation of hemoglobin. *J Biol Chem* 246:1, 1971