

HEMOGLOBIN HIROSHIMA AND THE MECHANISM OF THE ALKALINE BOHR EFFECT

Hemoglobin Hiroshima とアルカリ性 Bohr 効果の機序

MAX F. PERUTZ, Ph.D., Dr. Phil., D.Sc.

PHILLIP del PULSINELLI

LYNN TEN EYCK

J.V. KILMARTIN

SUSUMU SHIBATA, M.D. 柴田 進

IWAO IUCHI, M.D. 井内岩夫

TAKAOKI MIYAJI, M.D. 宮地隆興

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。

HEMOGLOBIN HIROSHIMA AND THE MECHANISM OF THE ALKALINE BOHR EFFECT

Hemoglobin Hiroshima とアルカリ性 Bohr 効果の機序

MAX F. PERUTZ, Ph.D., Dr. Phil., D.Sc.
PHILLIP del PULSINELLI
LYNN TEN EYCK
J.V. KILMARTIN
SUSUMU SHIBATA, M.D. 柴田 進
IWAO IUCHI, M.D. 井内岩夫
TAKAOKI MIYAJI, M.D. 宮地隆興
HOWARD B. HAMILTON, M.D.



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

米原子力委員会、厚生省国立予防衛生研究所および米国民衆衛生局の研究費による

HEMOGLOBIN HIROSHIMA
AND THE MECHANISM OF THE ALKALINE BOHR EFFECT

Hemoglobin-Hiroshima: A Bohr Effect of the Alkaline Bohr Effect

MAX C. PERUTZ, Ph.D., Dr. Phil., D.Sc.
PHILIP D. FOSTER, Ph.D.
LYNN TEN EYCK
J. V. KILMARTIN
SHIGEMITSU SHIBATA, M.D., Ph.D.
IKAO ISEKI, M.D.
TAKAOKI MIYAI, M.D.
HOWARD B. HAMILTON, M.D.



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した。

Nature New Biology 232(31): 147-9, 1971

国立衛生研究所
1971年

本報告は、1971年10月15日付の「Nature New Biology」に発表された。この報告は、Hiroshima型ヘモグロビンのアルカリ性Bohr効果のメカニズムに関するものである。この研究は、Perutz博士らによって行われ、その結果は、ヘモグロビンの構造と機能に関する重要な知見をもたらした。

CONTENTS

目次

Summary	要約	1	
Introduction	緒言	1	
Methods and Results	方法および結果	2	
Discussion	考察	5	
References	参考文献	7	
Figure	1. Difference electron density map	差電子密度分布図	3
図	2. Structure of the C-termini of the β subunits in hemoglobins A ^S and Hiroshima	Hb A ^S および Hb Hiroshima の β subunit C 末端の構造	4

Approved 承認 1 July 1971

HEMOGLOBIN HIROSHIMA AND THE MECHANISM OF THE ALKALINE BOHR EFFECT

Hemoglobin Hiroshima とアルカリ性 Bohr 効果の機序

MAX F. PERUTZ, Ph.D., Dr. Phil., D.Sc.¹; PHILLIP del PULSINELLI¹;
 LYNN TEN EYCK¹; J.V. KILMARTIN¹; SUSUMU SHIBATA, M.D.(柴田進)²;
 IWAO IUCHI, M.D.(井内岩夫)³; TAKAOKI MIYAJI, M.D.(宮地隆興)⁴; HOWARD B. HAMILTON, M.D.⁵

SUMMARY

X-ray diffraction crystallography of hemoglobin Hiroshima, confirmed by independent chemical analysis shows that the amino acid substitution, aspartate for histidine, originally reported to be at beta 143 (H21), is at the carboxy terminal, at beta 146 (HC3). The unusual properties of hemoglobin Hiroshima, such as its diminished Bohr effect, its hyperbolic oxygen equilibrium curve in the absence of phosphates, and its reduced heme-heme interaction are now satisfactorily explained.

INTRODUCTION

Hemoglobin Hiroshima is a variant discovered in a Japanese family which has interesting physiological properties.^{1,2} Its Bohr effect (response to pH) is halved, its oxygen affinity increased about 3 fold, but heme-heme interaction* is only somewhat reduced. In solutions initially stripped of phosphate,

要約

Hemoglobin (Hb) Hiroshima 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によると、以前に β 143 (H21) にあると報告された histidine の aspartate によるアミノ酸置換の位置が β 146 (HC3) の carboxy 末端に存在することが確認される。Bohr 効果の低下、リン酸塩が欠如する場合の酸素平衡曲線の双曲形、およびヘム間相互作用の低下といったような Hb Hiroshima における特異的な性質が今や十分に説明される。

緒言

Hemoglobin (Hb) Hiroshima は、日本人の 1 家系に発見された変異型血色素で、興味深い生理学的特性を示す。^{1,2} その Bohr 効果 (pH に対する反応) は半減し、酸素親和性は 3 倍に増強しているが、ヘム間相互作用* はわずかに低下しているにすぎない。あらかじめリン酸塩を除去した

*Heme-heme interaction refers to the intra-molecular cooperative reactions between the four subunits in hemoglobin during oxygenation. These cooperative interactions operate so that when the first subunit takes up oxygen, the reactivity of the remaining subunits is enhanced and oxygenation is accelerated.

ヘム間相互作用とは、酸素化の際における血色素内の四つの subunit 間の分子内協同反応をさす。この協同相互作用では、最初の subunit が酸素を取り込めば残りの subunit の反応性が増強して酸素化が促進される。

Keywords: Hemoglobin Hiroshima; Bohr Effect; Heme-heme Interactions

Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England¹; Department of Medicine, Kawasaki Medical College, Kurashiki and Senior Consultant to ABCC²; Department of Biochemistry, Kawasaki Medical College³; Department of Medicine, Yamaguchi University School of Medicine, Ube⁴; and Department of Clinical Laboratories, ABCC⁵

英国医学研究協議会分子生物学研究所, Cambridge¹; 川崎医科大学内科学教室および ABCC 顧問²; 川崎医科大学生化学教室³; 山口大学医学部内科学教室⁴; ABCC 臨床検査部⁵

2,3-diphosphoglycerate (DPG) diminishes the oxygen affinity as in Hemoglobin A.^{3,4} The amino acid substitution originally deduced for this abnormal hemoglobin was histidine 143 (H21) $\beta \rightarrow$ aspartate.¹ It was possible to conceive of a mechanism which accounted for the diminished Bohr effect,⁵ but the apparently normal response to DPG was inconsistent with the proposed role of histidine 143 β in DPG binding by hemoglobin.^{6,7} An X-ray crystallographic study of deoxyhemoglobin Hiroshima has now revealed that the replacement occurs not in position 143 β but at 146 β . This was confirmed by chemical methods, and the physiological properties of this hemoglobin are now satisfactorily accounted for. The results support the role of histidine 146 β in the alkaline Bohr effect.⁸

METHODS AND RESULTS

Crystals of deoxyhemoglobin Hiroshima* were prepared by precipitation with ammonium sulphate buffered with ammonium phosphate to pH 6.5.⁹ Their solubility and unit of cell dimensions did not differ significantly from those of deoxyhemoglobin A.¹⁰ The intensities of about 14,000 reflexions within a limiting sphere of 3.5 \AA^{-1} were measured on a Crystalign four-circle diffractometer. A difference Fourier synthesis was calculated using $|F|_{\text{Hb Hiroshima}} - |F|_{\text{Hb A}}$ as coefficients together with the phase angles determined for Deoxyhemoglobin A by Muirhead and Greer.¹¹

The difference electron density map is shown in Figure 1. It is featureless in the region of histidine 143 β , but shows a deep negative peak superimposed on the imidazole side chain of histidine 146 β , together with a positive peak showing the new position of the aspartate side chain. There is no change in the region of the α -carboxyl group. In order to build an accurate model of the mutant residue we adopted the following method. Crystals of human deoxyhemoglobin A from which histidine 146 β had been specifically removed¹² (A Des His 146 β) proved to be isomorphous with

溶液では、Hb Aと同様に、2, 3-diphosphoglycerate (DPG)により酸素親和性が低下する。^{3,4} 初めは、この異常血色素におけるアミノ酸置換は histidine 143 (H21) $\beta \rightarrow$ aspartate であると考えられていた。¹ Bohr 効果の低下をもたらしていた機序は推定できたが、⁵ DPG に対する反応が明らかに正常であったことは、血色素による DPG 結合において histidine 143 β が果たすと考えられる役割とは一致しなかった。^{6,7} 還元型 Hb Hiroshima についての X 線結晶学的研究により、置換の位置は 143 β ではなく 146 β であることが明らかになった。このことは、化学的分析によって確認され、この血色素の生理学的特性は今や十分に説明できるようになった。この結果は、アルカリ性 Bohr 効果における histidine 146 β の役割を支持するものである。⁸

方法および結果

還元型 Hb Hiroshima の結晶*は、燐酸アンモニウムで pH 6.5 に補整された硫酸アンモニウムを用いて沈降させて調製した。⁹ その溶解度および単位格子の大きさには還元型 Hb A のそれらと比べて有意な差は認められなかった。¹⁰ 3.5 \AA^{-1} の限定範囲内の約14,000の反射の強さを Crystalign 4 サークル回折計により測定した。差 Fourier 合成は、係数として $|F|_{\text{Hb Hiroshima}} - |F|_{\text{Hb A}}$ を、Muirhead および Greer¹¹ が還元型 Hb A について求めた位相角とともに用いて計算した。

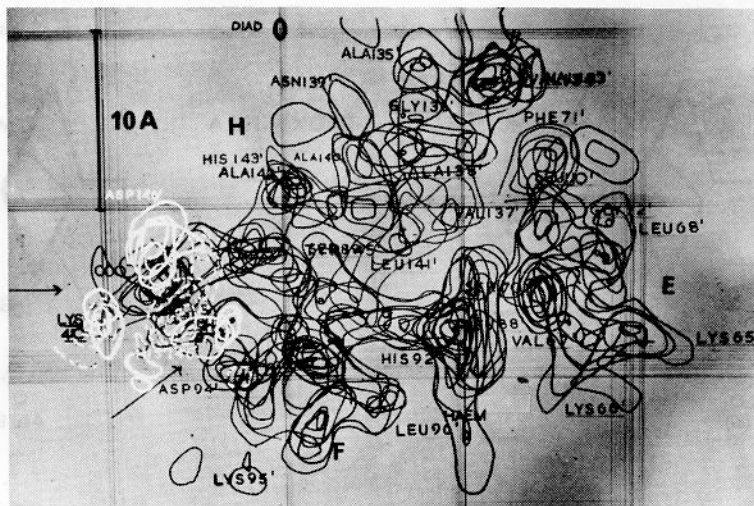
差電子密度分布図を図1に示した。histidine 143 β の部位には特徴はないが、histidine 146 β の imidazole 側鎖の上に深い負のピークが重なって認められるとともに、aspartate 側鎖の新しい位置を示す正のピークも認められる。 α -carboxyl 基の部分には変化は認められない。この変異型残基の正確なモデルを作るため、次の方法を採用した。histidine 146 β を選択的に除去した¹² ヒト還元型 Hb A (A Des His 146 β) の結晶は Hb A および Hb Hiroshima の結晶と同形であることが認められている。そ

*A blood sample containing hemoglobin Hiroshima was obtained from the index case (II-10, see Table 1, Reference 1) during her regularly scheduled visit to the ABCC outpatient clinic. The iced blood sample was sent to Yamaguchi University Medical School where purified hemoglobin Hiroshima was prepared by Dr. Shibata and his group. The purified sample was sent to the Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England, where the crystallographic and biochemical studies were performed by Dr. Perutz and his co-workers.

Hb Hiroshima を含有する血液試料は、ABCC 外来における定期検診の際に指標例 (II-10, 参考文献 1 の表 1 参照) から採取した。冷蔵血液試料は山口大学医学部に送り、同大学の柴田博士とその共同研究者により Hb Hiroshima の精製が行われた。精製 Hb Hiroshima は英国 Cambridge 市の英国医学研究協議会分子生物学研究所に送り、同研究所の Dr. Perutz および共同研究者により、結晶学的および生化学的研究が行われた。

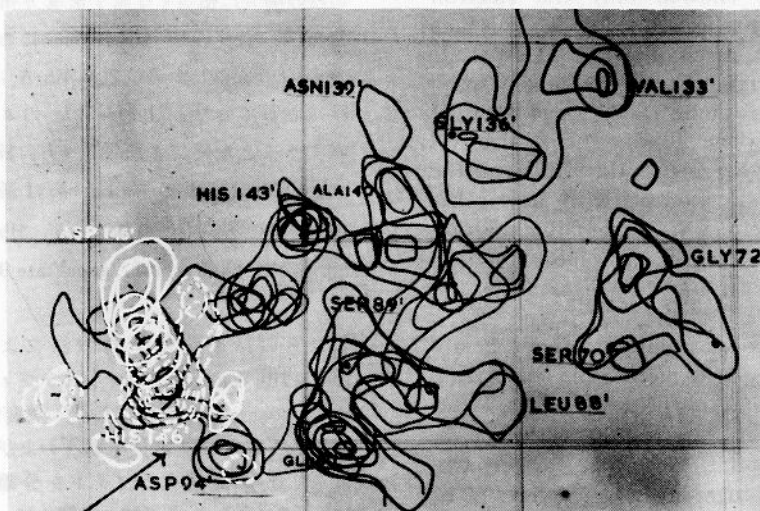
FIGURE 1 DIFFERENCE ELECTRON DENSITY MAP
(Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology)

図1 差電子密度分布図 (医学研究協議会分子生物学研究所)



A. Black contours: electron density maps of part of the β subunit, comprising parts of the heme group and of helices E, F and H (sections $y = -7$ to -18 \AA). White contours: difference maps of hemoglobins Hiroshima - A. Full contours are positive, broken ones negative.

A. 黒輪郭線: ヘム基およびヘリックスE, FおよびHの一部を構成する β subunitの一部についての電子密度分布図(切片 $y = -7 \sim -18 \text{ \AA}$). 白輪郭線: Hb Hiroshima - Hb Aの差分布図. 実線は正, 点線は負を示す.

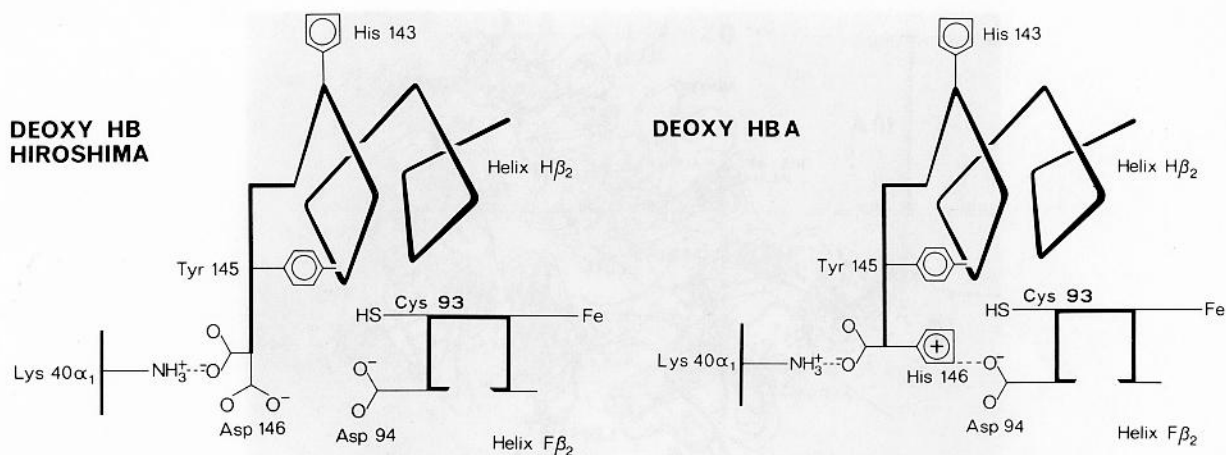


B. Lower portion of the same set of maps shown for greater clarity (sections -13 to -18 \AA). Note the large negative peak due to the removal of the imidazole and the large positive one immediately above, due to the new aspartate side chain. The smaller peaks in the immediate vicinity may be spurious. Note that the difference map is featureless in the rest of the β subunit, showing its structure to be undisturbed by the substitution. The black arrow points at the salt bridge between histidine 146 β and aspartate 94 β .

B. よりいっそう簡潔にするため上図の下の部分を示す(切片 $-13 \sim -18 \text{ \AA}$). imidazoleの除去による大きな負のピーク, およびそのすぐ上部に, 新しい aspartate 側鎖による大きな正のピークがみられる. その周囲にみられる小さなピークはみかけ上のものと思われる. この β subunitの他の部分は, 差分布図に特徴がないので, 置換による構造上の変化はないことがわかる. 黒い矢印は histidine 146 β と aspartate 94 β との間の塩橋を示す.

FIGURE 2 STRUCTURE OF THE C-TERMINI OF THE β SUBUNITS IN HEMOGLOBINS A AND HIROSHIMA

図2 Hb A および Hb Hiroshima の β subunit C末端の構造



those of hemoglobins A and Hiroshima. X-ray data were collected from these crystals as described above and a difference electron density map of hemoglobin Hiroshima minus A Des His 146 β was calculated. It showed only the electron density corresponding to aspartate 146 β . This map confirmed that the α -carboxyl group of aspartate 146 β in Hb Hiroshima maintains the same position as in hemoglobin A, forming a salt bridge with the ϵ -amino group of lysine 40 α . The γ -carboxyl group of aspartate 146 β in Hb Hiroshima, on the other hand, does not interact with any other residue, but floats freely in the surrounding solution whereas the γ -carboxyl of histidine 146 β in Hb A interacts with aspartate 94 β (Figure 2).

To check these results by chemical methods, hemoglobin Hiroshima was purified from the hemolysate by chromatography on Amberlite Cg-50.¹³ After heat denaturation,¹⁴ it was digested with trypsin, and the tryptic peptides separated by electrophoresis and chromatography.¹⁵ Peptides β 14 (residues 133-144) and β 15 (residues 145-146) were missing and a new tyrosine-positive peptide appeared whose amino acid composition was as previously reported,¹ indicating that it contained residues 133-146 and had aspartic acid substituted for either histidine 143 or 146. On more prolonged digestion of hemoglobin Hiroshima with trypsin (enzyme to substrate ratio 1:50, 12 hours at 37C) a tyrosine positive acidic peptide containing tyrosine and aspartic acid in equal amounts appeared to-

これらの結晶について、前記の方法でX線資料を集め、Hb Hiroshima から A Des His 146 β を除いた差電子密度分布図を計算して求めた。これによって、aspartate 146 β のみの場合に相当する電子密度分布が得られた。この密度分布図により、Hb Hiroshima における aspartate 146 β の α -carboxyl 基の位置は Hb A におけると同じ位置に維持されており、lysine 40 α の ϵ -amino 基と塩橋を形成することが確認された。一方、Hb Hiroshima における aspartate 146 β の γ -carboxyl 基は他の残基とは反応せず周囲の溶液中に遊離するが、Hb A における histidine 146 β の γ -carboxyl は、aspartate 94 β と反応する(図2)。

これらの結果を化学的方法によって確認するため、Amberlite Cg-50クロマトグラフィーにより溶血液から Hb Hiroshima を精製した。¹³ 熱変性¹⁴の後、trypsin で消化し、さらに、電気泳動法およびクロマトグラフィーにより、trypsin 消化ペプチドを分離した。¹⁵ β 14(残基 133-144)および β 15(残基 145-146)ペプチドは消失していたが、新しく tyrosine 陽性のペプチドが出現しており、そのアミノ酸組成は以前に報告されたもの¹と同様であった。このことは、このペプチドは残基 133-146を有し、これにより histidine 143あるいは histidine 146がアスパラギン酸に置換されたことを示している。さらに長時間にわたって Hb Hiroshima を trypsin で消化すると(酵素と基質比 1:50, 37C で12時間)、tyrosine およびアスパラギン酸を等量に含有する tyrosine 陽性酸性

ther with the normal hemoglobin peptide $\beta 14$, showing the substitution to be histidine 146 β \rightarrow aspartic acid.

Digestion of hemoglobin Hiroshima with carboxypeptidase A under the conditions used for the complete removal of tyrosine 145 β and histidine 146 β from hemoglobin A¹⁶ released no amino acids, but more vigorous digestion¹⁷ (enzyme to substrate ratio 1:1, 6 hours at 25C) released 0.7 aspartic acid, 0.8 tyrosine, and 0.1 histidine per β -chain; 0.2 residues of serine, valine, threonine, and leucine were also found, but these also appeared in a digest of hemoglobin A under the same conditions, indicating that these residues and the small amounts of histidine released may be due to autolysis of the enzyme or a small amount of proteolytic cleavage of the hemoglobin with subsequent digestions at these points by carboxypeptidase A. These results confirm that aspartic acid is the C-terminal residue in hemoglobin Hiroshima. Fingerprints of carboxypeptidase A-digested hemoglobins A and Hiroshima, done after removal of the enzyme,¹² were identical, which confirmed that histidine 143 β remains unchanged.

DISCUSSION

Our results confirm that half the Bohr effect is due to the salt bridge between the imidazole side chain of histidine 146 β and the γ -carboxyl side chain of aspartate 94 β ⁸; the substitution leaves the interior of the molecule undisturbed and causes no changes in the deoxy structure other than the breaking of that salt bridge. The normal response of the oxygen affinity of hemoglobin Hiroshima to 2,3-DPG shows that histidine 146 β plays no part in the binding of 2,3-DPG. The absence of the salt bridge between histidine 146 β and aspartate 94 β suggests that the reactivity of the sulphhydryl groups of cysteine 93 β in deoxyhemoglobin Hiroshima should be higher than in deoxyhemoglobin A; in oxyhemoglobin there should be little difference.

The extent of heme-heme interaction of hemoglobin Hiroshima depends on the concentrations of 2,3-DPG and neutral electrolytes. In 0.1 M NaCl, 0.05 M Tris HCl buffer of pH 7.2, 20C and a concentration of hemoglobin tetramer of 0.02 mM, Hill's constant decreases from a maximum of 2.5 at 1.0 mM 2,3-DPG to 2.3 in its absence. Under the same conditions, Hill's constant decreases in hemoglobin A from 3.0 to 2.9.⁴

ペプチドおよび正常血色素 $\beta 14$ ペプチドが出現し、このことは、histidine 146 β のアスパラギン酸による置換があることを示す。

Hb A から tyrosine 145 β および histidine 146 β を完全に除去する際に用いたと同じ条件¹⁶のもとで Hb Hiroshima の carboxypeptidase A 消化を行なうとアミノ酸の離脱は認められなかったが、さらに強力な消化¹⁷ (酵素と基質比 1:1, 25C で 6 時間) では、 β 鎖からアスパラギン酸 0.7, tyrosine 0.8, および histidine 0.1 が離脱した。また、serine, valine, threonine および leucine などの残基 0.2 が認められたが、これらは、同じ条件における Hb A の消化でも認められたため、これらの残基および少量の histidine は、carboxypeptidase A による消化を続けた時にこれらの点において生じる酵素の自己分解あるいは血色素の軽度の蛋白質分解のためであるかもしれない。これらの結果により、Hb Hiroshima における C 末端残基がアスパラギン酸であることが確認された。carboxypeptidase A で消化した Hb A および Hb Hiroshima からこの酵素を除去¹²した後に求めた両者のフィンガープリントは一致していたため、histidine 143 β に変化がないことが確認された。

考 察

本研究の結果により、Bohr 効果の半分は histidine 146 β の imidazole 側鎖および aspartate 94 β の γ -carboxyl 側鎖の間の塩橋によることが確認された⁸；置換によって分子内部に変化は生じないし、塩橋の切断以外には還元型の構造に変化を生じない。2,3-DPG に対して Hb Hiroshima の酸素親和性が正常な反応を示すことは、histidine 146 β が 2,3-DPG 結合になら関与しないことを示すものである。histidine 146 β と aspartate 94 β との間に塩橋が存在しないことは、還元型 Hb Hiroshima における cysteine 93 β の sulphhydryl 基の反応性が、還元型 Hb A よりも高いはずであることを示唆するものである；酸化型血色素では差はほとんどないはずである。

Hb Hiroshima のヘム間相互作用は、2,3-DPG および中性電解質の濃度に左右される。0.1 M NaCl, 20C で pH 7.2 の 0.05 M Tris HCl 緩衝液および 0.02 mM の血色素 4 量体濃度における Hill 常数は、2,3-DPG が 1.0 mM の時の最大値 2.5 から、2,3-DPG が欠如する場合の 2.3 に減少する。同じ条件における Hb A の Hill 常数は 3.0 から 2.9 に減少する。⁴

In the absence of NaCl in 0.01 M Tris HCl buffer of pH 7.0, 20C and a concentration of hemoglobin tetramer of 0.015 mM, Hill's constant decreases from a maximum of 1.9 at 0.3 mM 2,3-DPG to 1.1 in its absence. Under the same conditions, Hill's constant decreases in hemoglobin A from 2.5 to 2.4.³

These data show that heme-heme interaction in hemoglobin Hiroshima is always less than in hemoglobin A. The difference is small in the presence of NaCl or 2,3-DPG, but in their absence Hill's constant is reduced to near unity when that of hemoglobin A is 2.4. This behaviour is in accord with the stereochemical mechanism of the cooperative effects proposed by Perutz.⁷ One of the constraints holding the hemoglobin tetramer in the quaternary deoxy structure is the salt bridge between the alpha carboxyl group of histidine 146 β and the \ominus -amino acid group of lysine 40 α (Figure 2). The additional salt bridge of the imidazole with aspartate 94 β , which is responsible for half the alkaline Bohr effect, also holds the alpha carboxyl group rigid, thus cementing its bond with the lysine; furthermore it opposes the expulsion of tyrosine 145 β , thereby lowering the oxygen affinity of the β -subunits. Removal of the imidazole would therefore be expected to loosen the quaternary deoxy structure as well as the tertiary deoxy structure of the β -subunits. This must be the stereochemical explanation for the diminished heme-heme interaction and increased oxygen affinity. It shows that it is not possible to inhibit part of the Bohr effect without also reducing heme-heme interaction. It also leads to the prediction that the equilibrium constant for the first oxygen to combine with hemoglobin Hiroshima (K_1) should be much increased, while that for the fourth oxygen (K_4) should be about the same as in hemoglobin A.

NaCl が欠如する場合の、20C で pH 7.0 の 0.001 M Tris HCl 緩衝液および 0.015 mM の血色素 4 量体濃度における Hill 常数は、2, 3-DPG が 0.3 mM の時の最大値 1.9 から、2, 3-DPG が存在しない場合の 1.1 に減少する。同じ条件における Hb A の Hill 常数は 2.5 から 2.4 に減少する。³

これらの資料により、Hb Hiroshima のヘム間相互作用は常に Hb A より小さいことがわかる。その差異は、NaCl あるいは 2, 3-DPG 存在下のほうが小さく、これらが存在しない場合は、Hb Hiroshima の Hill 常数がほぼ 1 に減少するのに対し、Hb A では 2.4 になる。この動態は、Perutz がこの協同効果に関して提示した立体化学的機序と一致するものである。⁷ 血色素 4 量体が 4 次の還元型構造を維持している原因の一つは、histidine 146 β の α -carboxyl 基と lysine 40 α の ϵ -アミノ酸基との間の塩橋にある (図 2)。imidazole と aspartate 94 β との間の余分の塩橋は、アルカリ性 Bohr 効果の半分をもたらすとともに、 α -carboxyl 基を固定化し、そのため、lysine との結合が強められる；さらに、tyrosine 145 β の解離を妨害するため、 β subunit の酸素親和性が低下する。したがって、imidazole を除去することにより、 β subunit の 3 次の還元型構造ばかりでなく、その 4 次の還元型構造をも減弱するものと考えられる。これが、ヘム間相互作用の低下および酸素親和性の増強をもたらす立体化学的機序であると思われる。このことは、Bohr 効果の一部を抑制すれば必ずヘム間相互作用が低下することを示している。さらに、最初の酸素が Hb Hiroshima と結合する際の平衡常数 (K_1) は非常に増加しなければならないのに対し、第 4 番目の酸素の場合の平衡常数 (K_4) は Hb A の場合とほぼ等しくなくてはならないものと推測される。

REFERENCES

参考文献

1. HAMILTON HB, IUCHI I, MIYAJI T, SHIBATA S: Hemoglobin Hiroshima (β^{143} Histidine \rightarrow Aspartic Acid): a newly identified fast moving beta chain variant associated with increased oxygen affinity and compensatory erythremia. *J Clin Invest* 48:525-35, 1969
2. IMAI K: Oxygen equilibrium characteristics of abnormal hemoglobin Hiroshima ($\alpha_2\beta_2^{143}$ asp). *Arch Biochem Biophys* 127:543-7, 1968
3. HAMILTON HB, IMAI K, SHIBATA S: Physico-chemical studies of hemoglobin Hiroshima. 8th International Congress of Biochemistry. Lucerne, Switzerland, 3-9 September, 1970
4. BUNN HF: Residues responsible for the binding of 2,3-diphosphoglycerate. 8th International Congress of Biochemistry, Lucerne, Switzerland, 3-9 September 1970
5. PERUTZ MF: Suggested interpretation of diminished Bohr effect in haemoglobin Hiroshima. *Nature* 224:269, 1969
6. BUNN HF, BRIEHL RW: The interaction of 2,3-diphosphoglycerate with various human hemoglobins. *J Clin Invest* 49:1088-95, 1970
7. PERUTZ MF: Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 228:726-34, 1970
8. PERUTZ MF, MUIRHEAD H, MAZZARELLA L, CROWTHER RA, GREER J, KILMARTIN JV: Identification of residues responsible for the alkaline Bohr effect in haemoglobin. *Nature* 222:1240-6, 1969
9. PERUTZ MF: Separation of haemoglobin crystals. *J Cryst Growth* 2: 55-6, 1968
10. MUIRHEAD H, COX JM, MAZZARELLA L, PERUTZ MF: Structure and function of haemoglobin. 3. A three dimensional Fourier synthesis of human deoxyhaemoglobin at 5.5 Å resolution. *J Mol Biol* 28:117-50, 1967
11. MUIRHEAD H, GREER J: Three dimensional Fourier synthesis of human deoxy-haemoglobin at 3.5 Å resolution. *Nature* 228:516-9, 1970
12. KILMARTIN JV, WOOTTON JF: Inhibition of Bohr effect after removal of C-terminal histidines from haemoglobin β chains. *Nature* 228:766-7, 1970
13. CLEGG MD, SCHROEDER WA: A chromatographic study of the minor components of normal adult human hemoglobin including a comparison of hemoglobin from normal and phenylketonuric individuals. *J Am Chem Soc* 81:6065-9, 1959
14. INGRAM VA: Abnormal human haemoglobins. 1. The comparison of normal and sicklecell haemoglobins by "fingerprinting". *Biochim Biophys Acta* 28:539-45, 1958
15. KILMARTIN JV, CLEGG JB: Amino acid replacements in horse haemoglobin. *Nature* 213:269-71, 1967
16. ANTONINI E, WYMAN J, ZITO R, ROSSI-FANELLI A, CAPUTO A: Studies on carboxypeptidase digests of human hemoglobins. *J Biol Chem* 236:PC60-63, 1961
17. AMBLER RP: Carboxypeptidases A and B In *Methods in Enzymology*. Vol. 11, ed by HIRS CHW. New York, Academic Press, 1967, pp 436-45
18. ELMORE DT: Peptides and Proteins. Cambridge, England. Cambridge University Press, 1968. p 31