

PHYSICO-CHEMICAL STUDIES OF THE RELATION BETWEEN STRUCTURE
AND FUNCTION IN HEMOGLOBIN HIROSHIMA
(HC3 β , HISTIDINE \rightarrow ASPARTATE)

ヘモグロビン Hiroshima (HC3 β , Histidine \rightarrow Aspartate) に
おける構造と機能との関係に関する物理化学的研究

KIYOHIRO IMAI, M.D. 今井清博

HOWARD B. HAMILTON, M.D.

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。

PHYSICO-CHEMICAL STUDIES OF THE RELATION BETWEEN STRUCTURE
AND FUNCTION IN HEMOGLOBIN HIROSHIMA
(HC3 β , HISTIDINE \rightarrow ASPARTATE)

ヘモグロビン Hiroshima (HC3 β , Histidine \rightarrow Aspartate) に
おける構造と機能との関係に関する物理化学的研究

KIYOHIRO IMAI, M.D. 今井清博

HOWARD B. HAMILTON, M.D.

TAKAOKI MIYAJI, M.D. 宮地隆興

SUSUMU SHIBATA, M.D. 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

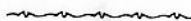
PHYSICO-CHEMICAL STUDIES OF THE RELATION BETWEEN STRUCTURE
AND FUNCTION IN HEMOGLOBIN HIROSHIMA
(HC9 β , HISTIDINE \rightarrow ASPARTATE)
ヘチロロヒロシマ (HC9 β , Histidine \rightarrow Aspartate) に
おける構造と機能との関係に関する物理化学的研究

ACKNOWLEDGMENT

謝 辞

The authors express their gratitude to Professor Ichiro Tyuma, Dr. Akira Hayashi and Dr. Tomokazu Suzuki for their helpful comments. We also thank Dr. K. Shiga for his kind advice on the techniques for the electron paramagnetic resonance measurements.

著者らは、多くの有益な助言をいただいた中馬一郎教授ならびに林 昭博士および鈴木友和博士に深く感謝する。EPR測定技術について助言を下された志賀 健博士にも感謝の意を表したい。



This paper was presented in part at the Eighth International Congress of Biochemistry, Interlaken, Switzerland, 3-9 September 1970.

本論文の一部は、1970年9月3日から9日にかけてスイスのInterlakenで開催された第8回国際生化学会で発表した。

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。

Biochemistry 11:114-21, 1972

CONTENTS

目次

Summary	要約	1
Introduction	緒言	2
Materials and Methods	材料および方法	3
Results	結果	5
Discussion	考察	14
References	参考文献	19

Table 1	The effect of DPG on oxygen equilibrium 表 酸素平衡に対する DPG の影響	7
2	Apparent first order rate constants for the reaction of 4 PDS with sulfhydryl groups of Hb Hiroshima & Hb A Hb Hiroshima および Hb A の SH 基と 4-PDS との見かけ上の一次速度定数	12

Figure 1	Effect of DPG on the oxygen equilibrium curves of Hb Hiroshima & Hb A 図 Hb Hiroshima および Hb A の酸素平衡曲線に対する DPG の影響	5
2	The dependence of the oxygen affinities of Hb Hiroshima & Hb A on the concentration of DPG Hb Hiroshima および Hb A の酸素親和性の DPG 濃度依存性	6
3	Scatchard plots of the data shown in Figure 1 図 1 に示したデータの Scatchard プロット	8
4	Ultraviolet difference spectra of CO Hb Hiroshima & CO Hb A, pH 10.7 vs 8.4 CO Hb Hiroshima および CO Hb A の pH 8.4 に対する pH 10.7 の紫外域差スペクトル	9
5	Ultraviolet difference spectra of oxyhemoglobin vs deoxyhemoglobin at pH 8.4 & pH 10.3 pH 8.4 および pH 10.3 におけるデオキシ Hb に対するオキシ Hb の紫外域差スペクトル	10
6	Ultraviolet difference spectra of oxyhemoglobin vs deoxyhemoglobin in the absence of DPG & in the presence of 0.3 mM DPG DPG なしおよび 0.3 mM DPG 存在下におけるデオキシ Hb に対するオキシ Hb の紫外域差スペクトル	11
7	Pseudo first order rate plots of the reactions of the reactive sulfhydryl groups of oxyhemoglobin & deoxyhemoglobin with 4,4'-dipyridinedisulfide オキシ Hb およびデオキシ Hb の反応性 SH 基と、4, 4'-dipyridinedisulfide との反応の偽似一次反応プロット	13
8	Electron paramagnetic resonance spectra of nitric oxide derivatives of Hb Hiroshima & Hb A Hb Hiroshima および Hb A の一酸化窒素誘導体の常磁性共鳴スペクトル	14

Approved 承認 15 July 1971

PHYSICO-CHEMICAL STUDIES OF THE RELATION BETWEEN STRUCTURE AND FUNCTION IN HEMOGLOBIN HIROSHIMA (HC3 β , HISTIDINE \rightarrow ASPARTATE)

ヘモグロビン Hiroshima (HC3 β , Histidine \rightarrow Aspartate) に
おける構造と機能との関係に関する物理化学的研究

KIYOHIRO IMAI, M.D. (今井清博)¹; HOWARD B. HAMILTON, M.D.²; TAKAOKI MIYAJI, M.D. (宮地隆興)³
SUSUMU SHIBATA, M.D. (柴田進)⁴

SUMMARY

Various physicochemical properties of Hemoglobin Hiroshima (HC3 β , histidine \rightarrow aspartate) were studied to clarify the mechanism for the altered oxygen equilibrium functions of the hemoglobin and the role of the C-terminal histidine residues of the β chains. The cooperativity in oxygen binding of Hb Hiroshima is markedly diminished by stripping it of 2,3-diphosphoglycerate (DPG). The effect of DPG on the oxygen equilibrium of Hb Hiroshima is, however, apparently normal because its overall oxygen affinity exhibits the same dependence on the concentration of DPG as that of Hb A and the overall free energy of interaction among the binding sites of oxygen of Hb Hiroshima increases on the addition of DPG by an extent similar to that of Hb A. Ultraviolet difference spectra suggest that the conformational changes of the $\alpha_1\beta_2$ contacts that occur during oxygenation are impaired in Hb Hiroshima corresponding to its diminished cooperativity and that the penultimate tyrosine residues of the β chains in Hb Hiroshima undergo environmental changes similar to those which occur in Hb A during oxygenation. The intrinsic microscopic equilibrium constant for the 4th stage of oxygenation, k_4 , for Hb Hiroshima is insensitive to the

要約

ヘモグロビン (Hb) Hiroshima (HC3 β , histidine \rightarrow aspartate) の種々の物理化学的性質を明らかにするための実験を行ない、この Hb における酸素平衡機能異常の機序および β 鎖の C 末端 histidine 残基の役割の解明を試みた。Hb Hiroshima では、酸素結合における協同現象の大きさが 2, 3-diphosphoglycerate (DPG) の除去によって著しく減少した。しかし、Hb Hiroshima の酸素平衡に対する DPG の効果は、明らかに正常であるといえる。なぜなら、Hb Hiroshima の overall の酸素親和性は、Hb A と同様の DPG 濃度依存性を示し、さらに DPG の添加によって Hb Hiroshima における酸素結合部位間の相互作用の総自由エネルギーは、Hb A の場合と同程度に増加したからである。紫外域差スペクトルによれば、Hb Hiroshima では、酸素化の際に起こる $\alpha_1\beta_2$ 接触面の構造変化が、その協同現象の大きさの減少度に対応して阻害されていること、また、Hb Hiroshima の β 鎖における C 末端から 2 番目の tyrosine 残基が、酸素化の際に Hb A と同様の環境的变化をこうむることが示唆された。Hb Hiroshima では、酸素化の第 4 段階における真性微視的平衡定数 k_4 は、DPG 濃度により左右されず、Hb A の

Keywords: Hemoglobin Hiroshima; Bohr Effect; Oxygen Equilibrium; Heme-Heme Interactions; Structure-Function in Hemoglobin

Department of Biophysical Engineering, Faculty of Engineering Science, Osaka University¹; Department of Clinical Laboratories, ABCC²; Third Division of Internal Medicine, Yamaguchi University School of Medicine³; Department of Medicine, Kawasaki Medical College Hospital⁴

大阪大学基礎工学部生物工学科,¹ ABCC 臨床検査部,² 山口大学医学部第 3 内科教室,³
および川崎医科大学病院内科⁴

concentration of DPG and nearly equal to that for Hb A, whereas the constant for the first stage of oxygenation, k_1 , decreases on the addition of DPG and is always larger than that of Hb A, irrespective of DPG concentration, indicating that deoxy-Hb Hiroshima probably assumes a more unconstrained form than deoxy-Hb A. The reaction rates of 4,4'-dipyridinedisulfide with the sulfhydryl groups of oxy- and deoxy-Hb Hiroshima were more rapid than for Hb A, particularly that of the deoxy form. Electron paramagnetic resonance spectra of NO Hb (nitric oxide derivative of hemoglobin) Hiroshima are identical with those of NO Hb A.

INTRODUCTION

Hemoglobin Hiroshima is a mutant hemoglobin with greatly altered oxygen equilibrium functions: it has an oxygen affinity 5-fold higher than that of Hb A at pH 6.5, a decreased Bohr effect about half that of Hb A, and reduced heme-heme interaction (Hill's constant, 2.0 to 2.6 compared to 3.0 for Hb A).¹ The carriers of this hemoglobin have no apparent clinical symptoms save a mild erythrocytosis in compensation for its less efficient oxygen-transport function.²

Recent X-ray crystallographic studies of deoxy-hemoglobin Hiroshima at 3.5 Å resolution and confirmatory chemical examination³ showed that the amino acid substitution in Hb Hiroshima is at HC3 (146) β^* (i.e., the C-terminal residue of the β chain).

Recently some evidence has been obtained suggesting that residues at or near the C-terminal of the β chain (i.e., HC3 histidine, HC2 tyrosine, and H21 histidine) play important roles in oxygen-linked protonation,⁴ in triggering cooperative conformational changes,⁵ and in binding DPG^{5,6} respectively. Thus it would appear that further studies of Hb Hiroshima might yield more detailed information on the contribution of the C-terminal of the β chain to these reactions. We report here results of the following studies: the effect of DPG on oxygen equilibrium; ultraviolet (UV) difference spectra; reactivity of sulfhydryl groups; and electron paramagnetic resonance (EPR) spectra of NO Hb derivatives. In

それとほぼ等しいのに対して、酸素化の第1段階における平衡定数 k_1 は、DPGの添加によって減少し、DPGのいかなる濃度においてもHb AよりもHb Hiroshimaの k_1 が常に大きい。このことは、デオキシHb HiroshimaがデオキシHb Aよりもより束縛のゆるい状態にあることを示す。オキシおよびデオキシHb Hiroshimaの反応性SH基と4, 4'-dipyridinedisulfideとの反応速度は、Hb A、特にデオキシHb Aのそれに比べて速い。Hbの一酸化窒素誘導体(NO Hb) Hiroshimaの常磁性共鳴スペクトルは、NO Hb Aのそれと等しい。

緒言

Hb Hiroshimaは、酸素平衡機能の著しい変化を示す異常Hbである。すなわちpH 6.5におけるその酸素親和性はHb Aのその5倍もあり、そのBohr効果はHb Aの約半分であり、ヘム間相互作用も減少している(そのHillの定数は、Hb Aの3.0に比べて2.0ないし2.6である)。¹ このHbの保有者は、その酸素運搬機能の低下を代償する軽度の赤血球増加症を示す以外、目だった臨床症状はない。²

最近、デオキシHb Hiroshimaの3.5 Å分解能のX線結晶学的研究および化学的解析の結果、³ Hb Hiroshimaにおけるアミノ酸置換がHC3(146) β^* 、すなわち、 β 鎖のC末端残基にあることが証明された。

β 鎖のC末端残基およびその近傍の残基、すなわち、HC3 histidine, HC2 tyrosine およびH21 histidineが、酸素化と連係したプロトン解離⁴や、協同的構造変化の誘発⁵や、DPGの結合^{5,6}においてそれぞれ重要な役割を果たすことを示す知見が最近得られている。そこで、Hb Hiroshimaのより進んだ研究を通じて、この種の反応における β 鎖C末端部の寄与に関するより詳細な情報が得られるのではないかと考えられる。本論文では、酸素平衡に対するDPGの影響や、紫外域差スペクトルや、SH基の反応性ならびにNO Hb誘導体の常磁性共鳴(EPR)

*The location of an amino acid residue (e.g., H21(143) β) is given according to Perutz's system that specifies its position within a segment of the chain and permits comparison of homologous sections of myoglobin, and the alpha, beta, and gamma chains.⁷ The figure in parentheses is the residue's position numbered from the amino terminal.

アミノ酸の位置を表わすための記号、たとえば、H21(143) β は、Perutzの方式に従って示したものであり、これによって、各鎖のそれぞれのセグメント内における位置が指定できるので、ミオグロビンやアルファ、ベータおよびガンマ鎖の類似部分の比較が可能になる。⁷ かつこの数字は、末端アミノ酸から数えた時のその残基の位置である。

the light of these results we discuss the relation between the functional and structural abnormalities of this mutant hemoglobin, and also the role of the C-terminal residues of the β chain in the oxygen-binding functions of hemoglobin.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Hemoglobins. Hb Hiroshima and Hb A as control were obtained from the same hemolysate in oxygenated form. The hemoglobins were separated from each other by two methods: column chromatography, and starch-block electrophoresis. The hemolysate containing Hb Hiroshima was put on a CM-Sephadex column equilibrated with 0.05M phosphate buffer (pH 6.0), and Hb F followed by Hb Hiroshima were eluted with 50 mM Na^+ ; Hb A and Hb A₂ were eluted together with 100 mM Na^+ . Hb A was separated from Hb A₂ on a DEAE-Sephadex column equilibrated with 0.05M Tris-HCl buffer having a pH gradient of 8.6 to 7.0. Starch-block electrophoresis was employed using Tris-EDTA-borate buffer (pH 8.6). The purities of the separated hemoglobins were tested by agar-gel electrophoresis. No significant contamination could be detected for either Hb A separated by column chromatography, or for Hb Hiroshima. Hb A separated by electrophoresis, however, was contaminated with a small amount of Hb F (less than 3%). Hemoglobins separated by column chromatography were used for oxygen equilibrium and UV difference spectra, and hemoglobins separated by electrophoresis for reactivity of the sulfhydryl groups and EPR of nitric oxide derivative experiments. Hemoglobins, stripped of DPG as described previously by Benesch et al,⁸ contained no detectable DPG when assayed by the method of Ames and Dubin.⁹ Hemoglobin concentrations were determined by spectroscopy of pyridine hemochromogen derivatives,¹⁰ and are given on heme basis unless otherwise stated. DPG concentration was determined by an alkali titration method.¹¹ DPG was obtained as the pentacyclohexylammonium salt tetrahydrate (Calbiochem, Los Angeles) and converted into the free acid with Dowex 50; 2,2-bis-(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrioltriethanol (Bis-Tris) and 4,4'-dipyridinedisulfide (4-PDS) were used without further treatment (Aldrich Chemical Co., Milwaukee).

UV Difference Spectra. Deoxyhemoglobin as reference for difference spectra of oxy- vs deoxy-hemoglobin in 0.1M glycine-NaOH buffer was prepared in a 200 ml cylindrical tonometer with a square fused silica cuvet of 10 mm light path.

スペクトルの実験結果について報告し、これらの結果に基づいて、この異常 Hb における機能異常と構造異常との関係を検討するとともに、Hb の酸素結合機能における β 鎖 C 末端残基の役割についても考察する。

材料および方法

Hb の調製. Hb Hiroshima と対照としての Hb A は、同一の溶血液からオキシ型として得た。両 Hb は、カラム・クロマトグラフィーおよび澱粉ブロック電気泳動法のいずれかの方法によって分離した。0.05M 磷酸緩衝液 (pH 6.0) と平衡した CM-Sephadex カラムに Hb Hiroshima を含む溶血液を流すと、50mM Na^+ によりまず Hb F、次いで Hb Hiroshima が溶出した。次いで 100 mM Na^+ を流すと、Hb A と Hb A₂ が一緒に溶出した。Hb A と Hb A₂ は、pH 勾配が 8.6 から 7.0 の 0.05M Tris-HCl 緩衝液と平衡した DEAE-Sephadex カラムで分離した。澱粉ブロック電気泳動法は Tris-EDTA-硼酸緩衝液 (pH 8.6) を用いて行なった。分離した Hb の純度は、寒天ゲル電気泳動法で検査した。カラム・クロマトグラフィーで分離した Hb A にも、また、Hb Hiroshima にも有意な混在物は検出できなかった。しかし、電気泳動法で分離した Hb A には少量の Hb F が混入していた (3% 以下)。カラム・クロマトグラフィーで分離した Hb は酸素平衡と紫外域差スペクトルの実験に、また、電気泳動法で分離した Hb は SH 基の反応性と一酸化窒素誘導体の EPR の実験に用いた。Benesch ら⁸ の記述した方法に従って DPG を除去した Hb は、Ames および Dubin⁹ の方法で分析して DPG が含まれていないことを確認した。Hb 濃度は pyridine hemochromogen 誘導体の分光測定¹⁰ によって求め、特に記載がないかぎり、ヘム当たり濃度で表現してある。DPG 濃度はアルカリ滴定法によって測定した。¹¹ DPG は pentacyclohexylammonium salt tetrahydrate として入手し (Los Angeles 市 Calbiochem 社製)、Dowex 50 で遊離酸に変換した。2, 2-bis-(hydroxymethyl)-2, 2', 2''-nitrioltriethanol (Bis-Tris) および 4, 4'-dipyridinedisulfide (4-PDS) はそのまま使用した (Milwaukee 市 Aldrich Chemical 社製)。

紫外域差スペクトル. 0.1 M glycine-Na OH 緩衝液中の Hb のデオキシ型に対するオキシ型の差スペクトル測定に用いた対照用のデオキシ Hb は、光路長 10mm の角型石英キュベットを有する 200 ml 柱状トノメーターの中で

Deoxyhemoglobin as reference for UV difference spectra of oxy- vs deoxyhemoglobin in the presence and absence of DPG was prepared in Benesch's versatile tonometer¹² which contained stripped hemoglobin solutions without and with DPG in the cuvet and reservoir, respectively. The UV difference spectrum in the absence of DPG was determined using the deoxyhemoglobin solution in the cuvet and the spectrum in the presence of DPG by mixing the solutions in the cuvet and reservoir. In each instance, deoxygenation was performed by repeated alternate evacuations and flushings with pure nitrogen gas (99.999%), accompanied by mild shaking of the tonometer. The concentration of oxyhemoglobin was adjusted to that of reference deoxyhemoglobin by using an isosbestic point of 548 m μ . The difference spectra were recorded by a Hitachi Model 124 spectrophotometer (Hitachi Ltd., Tokyo) with a fixed slit width and servo control of photomultiplier voltage. The band width of the incident light was constantly 1 m μ over the entire range of wave length used for the determination. UV absorption spectra between 240 and 350 m μ of oxyhemoglobin and of reoxygenated hemoglobin previously used for the reference coincided with each other within 2%. Methemoglobin content, determined as described by Benesch et al,¹² was less than 8% of total hemoglobin after the determination except in the case of stripped hemoglobin where the content amounted to 15%.

Reactivity of the Sulfhydryl Groups with 4-PDS.

The rate of reaction of the reactive sulfhydryl groups of hemoglobin with 4-PDS was determined as described by Ampulski et al,¹³ with minor modifications. For the reaction of 4-PDS with deoxyhemoglobin Benesch's versatile tonometer was used. Oxyhemoglobin and 4-PDS solutions put into the cuvet and the reservoir of the tonometer, respectively, were deoxygenated and the reaction was started by mixing them with each other. The change of optical density at 324 m μ over time was recorded by a Hitachi Model 124 spectrophotometer.

Oxygen Equilibrium. Oxygen equilibrium curves of hemoglobin in the absence or the presence of DPG were determined by the automatic recording apparatus of Imai et al.¹⁴ Methemoglobin content¹² was 11% and 15% of total hemoglobin, respectively, before and after determination of oxygen equilibrium.

EPR Spectra of NO Hb. EPR spectra of NO Hb were measured as described by Shiga et al,¹⁵ using a Varian Model E12 EPR spectrometer (Varian Associates, Palo Alto, California).

調製した。DPGの存在または非存在下における、Hbのデオキシ型に対するオキシ型の紫外域差スペクトル測定に用いた対照用のデオキシHbは、Beneschの万能型トノメーター¹²の中で調製した。その場合の脱酸素化は燐酸塩を除去してDPGを含まないHb溶液をキュベットに、DPGを添加したHb溶液を液溜に入れて行なった。DPGの非存在下における紫外域差スペクトル測定にはキュベット内に調製したデオキシHb溶液を用い、DPG存在下のスペクトル測定にはキュベットと液溜の溶液を混合した溶液を用いた。いずれの場合も、トノメーター内部の脱酸素化は純粋な窒素ガス(99.999%)の注入と脱気を交互に何回も行なうとともに、トノメーターを軽く振りながら行なった。オキシHbの濃度は、548 m μ の等吸収点を使用して対照用のデオキシHbの濃度に合わせた。差スペクトルは固定幅のスリットと光電子増倍管電圧のservo制御機構を有する、日立製124型分光光度計を使用して記録した。測定の全波長域にわたり、入射光のバンド幅は常に1 m μ であった。オキシHbおよび対照として使用した後に再酸素化したHbについての240から350 m μ における紫外域差スペクトルは、2%の範囲内で互いによく一致した。測定完了後に、Beneschら¹²の記述した方法に従ってメトHb含有量を求めたところ、総Hb量の8%以下であった。ただし、燐酸塩を除去したHbでは、その含有量は15%に達した。

SH基の4-PDSとの反応性. Hbの反応性SH基と4-PDSとの反応速度は、Ampulskiら¹³の記述した方法に若干の変更を加えた方法によって測定した。4-PDSとデオキシHbとの反応には、Beneschの万能型トノメーターを用いた。その際、オキシHbと4-PDS溶液をそれぞれトノメーターのキュベットと液溜に入れ、脱酸素化の後に混合して反応させた。324 m μ における吸光度の時間的变化は、日立製124型分光光度計を用いて記録した。

酸素平衡. Hbの酸素平衡曲線は、Imaiら¹⁴の自動記録装置を用いてDPGの存在下または非存在下において測定した。酸素平衡測定の前後に求めたメトHb含有量¹²は、それぞれ総Hb量の11%および15%であった。

NO HbのEPRスペクトル. NO HbのEPRスペクトルは、Shigaら¹⁵の記述した方法に従ってVarian製E12型EPR分光計(California州Palo Alto市Varian Associates社)を使用して測定した。

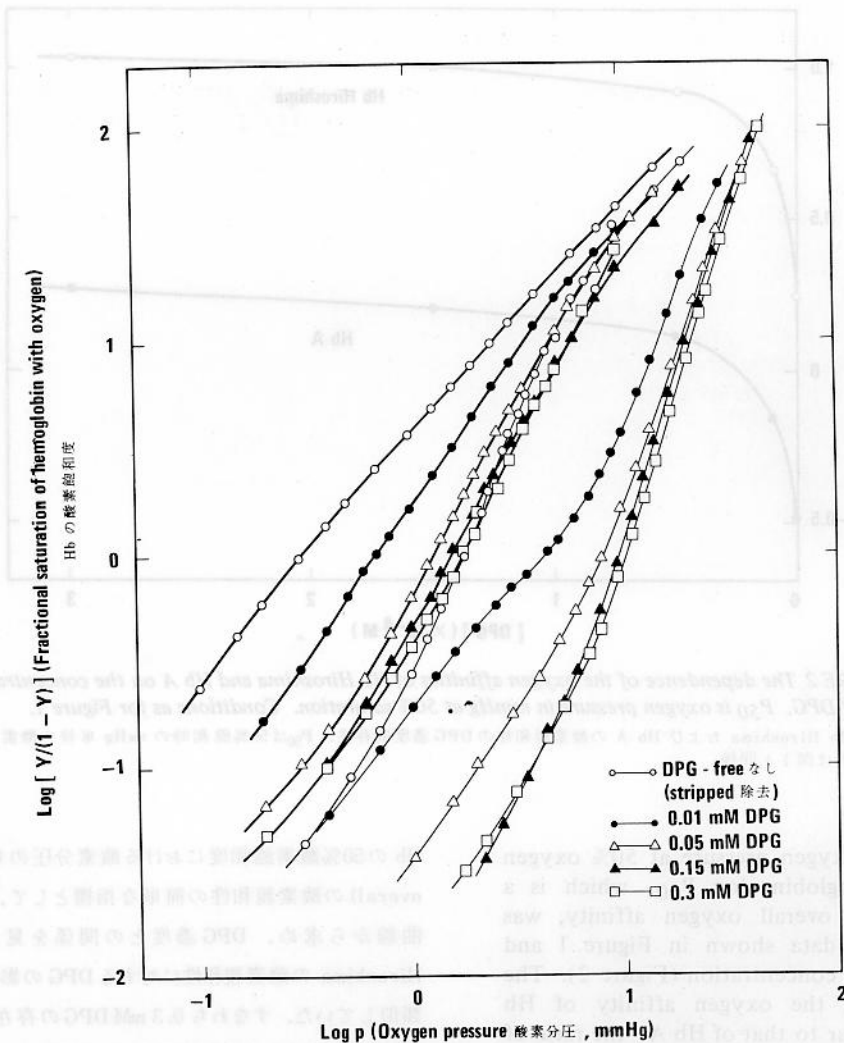


FIGURE 1 Effect of DPG on the oxygen equilibrium curves of Hb Hiroshima and Hb A. Bold and fine lines are for Hb Hiroshima and Hb A, respectively. Hb concentration, 6×10^{-5} M; in 0.01 M Tris-HCl buffer; pH 7.0; temperature, 20 C.

図1 Hb Hiroshima および Hb A の酸素平衡曲線に対する DPG の影響。太い線と細い線はそれぞれ Hb Hiroshima および Hb A。Hb 濃度 6×10^{-5} M; 0.01M Tris-HCl 緩衝液中; pH 7.0; 温度 20C。

RESULTS

The Effect of DPG on Oxygen Equilibrium Curves. Oxygen equilibrium curves of Hb Hiroshima and Hb A in the absence (i.e., stripped) or in the presence of various amounts of DPG are shown in Figure 1, where they are represented by Hill plots.¹⁶ The plot was biphasic as reported previously;^{8,14} for Hb A in 0.01 mM DPG where the hemoglobin was not saturated with DPG.

結果

酸素平衡曲線に対する DPG の影響。DPG が存在しない場合(すなわち、除去された場合)と DPG が種々の濃度に存在する場合の Hb Hiroshima と Hb A の酸素平衡曲線を求め、その Hill プロット¹⁶ を図 1 に示した。0.01 mM DPG 溶液中の Hb A は、Hb が DPG で飽和されていない状態にあり、すでに報告されているように、^{8,14} 曲線は二相性であった。

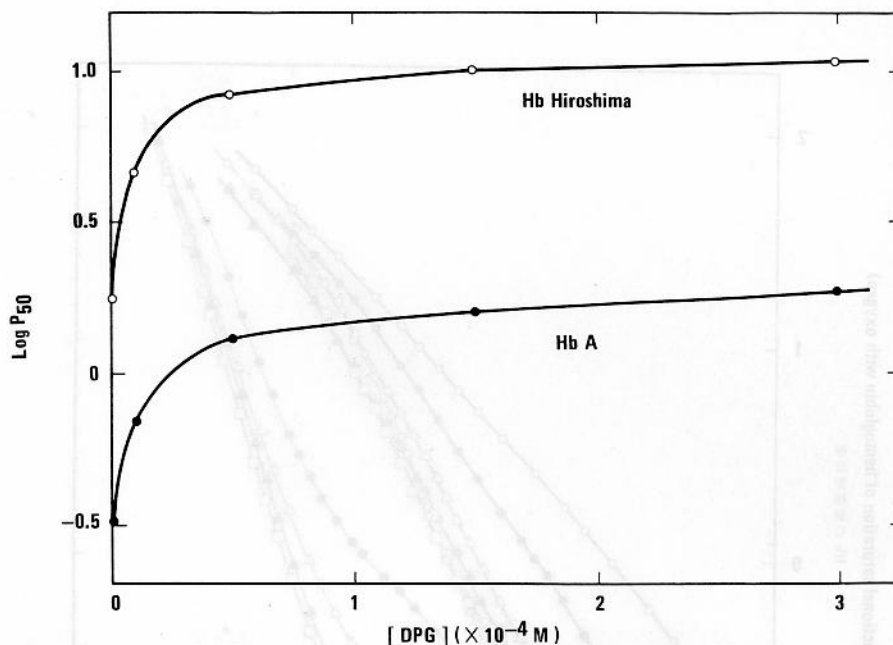


FIGURE 2 The dependence of the oxygen affinities of Hb Hiroshima and Hb A on the concentration of DPG. P_{50} is oxygen pressure in mmHg at 50% saturation. Conditions as for Figure 1.

図2 Hb Hiroshima および Hb A の酸素親和性の DPG 濃度依存性. P_{50} は 50% 飽和時の mmHg 単位の酸素分圧. 条件は図1と同様.

The logarithm of oxygen pressure at 50% oxygen saturation of hemoglobin, $\log P_{50}$, which is a simple measure of overall oxygen affinity, was obtained from the data shown in Figure 1 and plotted against DPG concentration (Figure 2). The effect of DPG on the oxygen affinity of Hb Hiroshima was similar to that of Hb A: the ratio of P_{50} in the presence of 0.3 mM DPG to p_{50} in the absence of DPG was 5.94 for Hb Hiroshima and 5.91 for Hb A. Contrary to the normal dependence of oxygen affinity of Hb Hiroshima on DPG, the cooperativity in oxygen-binding of Hb Hiroshima showed a different dependence on DPG from that of Hb A: the cooperativity of Hb Hiroshima was diminished markedly by the stripping of DPG while that of Hb A was diminished only slightly. Hill's constant, n , which is regarded as an empirical measure of cooperativity, in Hb Hiroshima was decreased from 1.9 in 0.3 mM DPG to 1.1 by stripping, yielding an almost hyperbolic oxygen equilibrium curve, while that of Hb A decreased slightly from 2.8 to 2.4 without altering appreciably the shape of the curve. These results are summarized in Table 1. The values of n , 1.9 and 2.8, are somewhat smaller than those which were previously obtained for Hb Hiroshima and Hb A in 0.1 M

Hb の 50% 酸素飽和度における酸素分圧の対数 $\log P_{50}$ を, overall の酸素親和性の簡単な指標として, 図1に示した曲線から求め, DPG 濃度との関係を見た(図2). Hb Hiroshima の酸素親和性に対する DPG の影響は, Hb A に類似していた. すなわち 0.3 mM DPG の存在下における P_{50} と DPG の存在しない場合の P_{50} との比率は, Hb Hiroshima が 5.94, Hb A が 5.91 であった. Hb Hiroshima の酸素親和性の DPG に対する依存性が正常であるのに対して, Hb Hiroshima の酸素結合における協同現象の大きさに対する DPG の影響は Hb A とは異なる. すなわち DPG の除去により, Hb Hiroshima の協同現象の大きさが著しく減少したのに対し, Hb A のそれはわずかに減少したにすぎない. 協同現象の大きさの経験的指標と考えられている Hill の定数 n は, Hb Hiroshima では, 0.3 mM DPG 存在下において 1.9 であったものが, DPG 除去により 1.1 に減少して酸素平衡曲線がほとんど双曲線型を呈したのに対し, Hb A では, 2.8 から 2.4 にわずかに減少し, 曲線の形状にはあまり変化はなかった. これらの結果は, 表1に要約した. この n の値 1.9 および 2.8 は, 0.1 M

TABLE 1 THE EFFECT OF DPG ON OXYGEN EQUILIBRIUM

表1 酸素平衡に対する DPG の影響

		Hb Hiroshima		Hb A		Remarks 注
DPG	mM	0 (stripped)	0.3	0 (stripped)	0.3	
P ₅₀	mmHg	0.31	1.84	1.18	10.7	Oxygen pressure at 50% saturation. 50%飽和時の酸素分圧
P ₅₀ ^{DPG} / P ₅₀ st		5.94		5.91		P ₅₀ ^{DPG} & P ₅₀ st in the presence of 0.3 mM DPG & in its absence (stripped). 0.3 mM DPG の存在下および非存在下(除去)の場合の P ₅₀ ^{DPG} および P ₅₀ st .
n		1.1	1.9	2.4	2.8	The Hill constant. Hill の定数
K ₁	mmHg ⁻¹	2.0	0.22	0.11	0.011	Intrinsic microscopic equilibrium constant for the first stage of oxygenation. 酸素化の第1段階における真性微視的平衡定数.
K ₄	mmHg ⁻¹	4.3	4.3	3.7	4.6	Intrinsic microscopic equilibrium constant for fourth stage of oxygenation. 酸素化の第4段階における真性微視的平衡定数.
Δ F _I	cal/mol/site	450	1710	2040	3580	Overall free energy of interaction due to addition of DPG. DPG の添加による相互作用総自由エネルギー.
Δ(Δ F _I)	cal/mol/site	1260		1540		Increment of free energy due to addition of DPG. DPG の添加による自由エネルギーの増加.

phosphate buffer (pH 7.0) (i.e., 2.2 and 3.0, respectively).¹ This may be due to the larger amount of methemoglobin in the samples used for the present studies (15%) than in those of the previous studies (3%). The upper ends of all the Hill plots in Figure 1 apparently converge towards a common asymptote while the lower ends diverge from one another. Scatchard plots¹⁷ of the data demonstrate this feature more clearly (Figure 3). The extrapolation of the Scatchard plots to $4Y \rightarrow 4(p \rightarrow \infty)$ yielded intercepts around 0.6 on the right coordinate irrespective of the kind of hemoglobin and concentration of DPG. This shows that Hb Hiroshima and A have similar intrinsic microscopic equilibrium constants for the 4th stage of oxygenation, k_4 , in Adair's equation for successive oxygenation,¹⁸ and that k_4 is almost independent of DPG concentration (Table 1). On the other hand the intercepts on the left coordinate, which corresponded to the equilibrium constant for the 1st stage, k_1 , differed from each other depending on the kind of hemoglobin and the concentration of DPG. The values of k_1 for both Hb Hiroshima and Hb A increased by about 10-fold by stripping of 0.3 mM DPG, but those for Hb Hiroshima were always larger than those for Hb A irrespective of the concentra-

tion. Phosphate buffer (pH 7.0) 中の Hb Hiroshima および Hb A について以前に求められた値の 2.2 と 3.0 よりもやや低い。¹ これは、今回の研究に使用した試料のメト Hb 含有量 (15%) が、以前の研究における試料 (3%) より多いことのためであるかもしれない。図 1 に示した Hill プロットの上端はいずれも共通の漸近線に収斂するようであるが、下端は互いに離散している。このデータの Scatchard プロット¹⁷ は、この特徴をいっそう明瞭に示している (図 3)。この Scatchard プロットを $4Y \rightarrow 4(p \rightarrow \infty)$ に延長すると、Hb の種類または DPG の濃度に関係なく、右側の座標と約 0.6 の点で交わる。このことは、段階的酸素結合反応に関する Adair の式¹⁸ における酸素化の第 4 段階に対する真性微視的平衡定数 k_4 が Hb Hiroshima および Hb A において類似しており、かつ、 k_4 が DPG 濃度にはほとんど依存しないことを示している (表 1)。他方、酸素化の第 1 段階における平衡定数 k_1 に対応する左側の座標との交点は、Hb の種類や DPG 濃度に応じてそれぞれ異なっていた。Hb Hiroshima および Hb A ともに 0.3 mM DPG の除去によって k_1 の値が約 10 倍も高くなったが、DPG 濃度に関係なく Hb A に比べて Hb Hiroshima の k_1

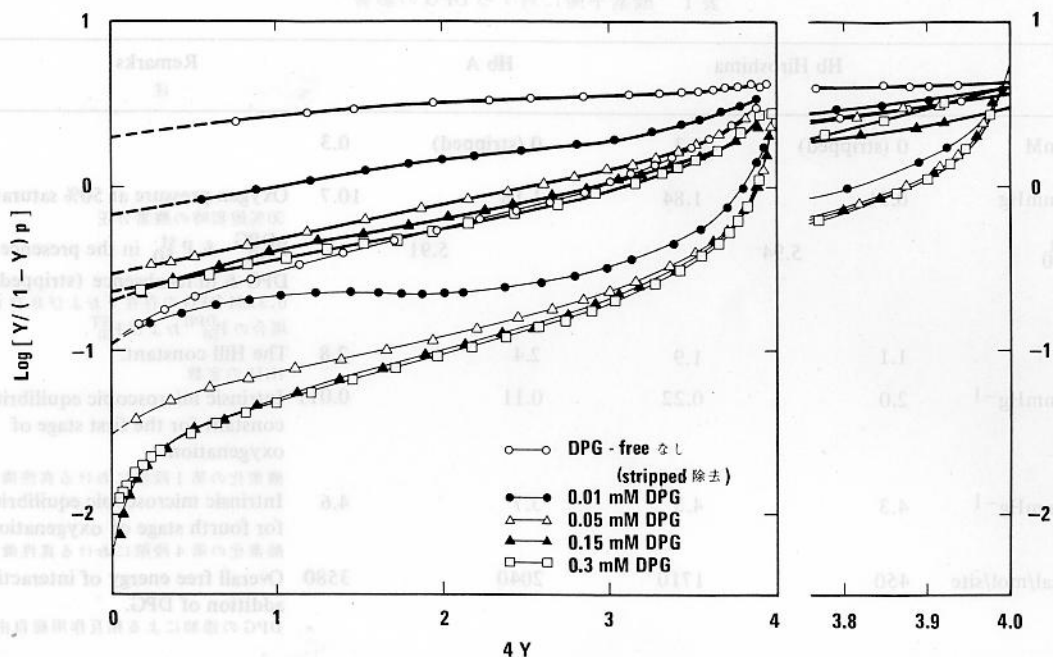


FIGURE 3 Scatchard plots of the data shown in Figure 1. In the portion on the right hand the scale of abscissa is expanded.

図3 図1に示したデータの Scatchard プロット。記号は図1と同様。右側の部分では、横軸の目盛を拡大してある。

tion of DPG (Table 1). From the values of k_1 and k_4 , a free energy of interaction, ΔF_I , which is involved in the cooperative interaction among hemes as defined by Wyman,¹⁶ was estimated as previously described.¹⁹ The ΔF_I was increased by the addition of DPG both for Hb Hiroshima and Hb A, but the value for Hb Hiroshima was smaller than that for Hb A whether in the presence or absence of DPG, indicating a parallel dependence of ΔF_I to Hill's constant, n (Table 1). The increment of ΔF_I due to the addition of 0.3 mM DPG was 1260 and 1540 cal/mol per site for Hb Hiroshima and Hb A, respectively, but the discrepancy between these values is probably not significant and may be ascribable to experimental error. The effects of DPG on oxygen equilibrium of Hb A described above coincide well with those reported previously.¹⁹

UV Difference Spectra. Figure 4 shows the UV difference spectra of carbonmonoxyhemoglobin Hiroshima and A, pH 10.7 vs 8.4. Both the hemoglobins had almost identical change in optical density (ΔOD) at 245 $m\mu$. Figure 5 shows the UV difference spectra of oxy- vs deoxyhemoglobin. The ΔOD at 242 $m\mu$ for Hb A was very close to zero at

が常に大であった(表1)。この k_1 および k_4 の値に基づいて、Wyman¹⁶ の定義したヘム間の協同的相互作用における相互作用自由エネルギー ΔF_I を以前に報告した方法¹⁹ に従って概算した。この ΔF_I は Hb Hiroshima および Hb A のいずれにおいても DPG の添加によって増加したが、DPG の有無にかかわらず、Hb A に比べて Hb Hiroshima の ΔF_I のほうが常に小さく、このことは ΔF_I と Hill の常数との間の平行的依存性があることを意味している(表1)。0.3 mM DPG の添加による ΔF_I の増加は、Hb Hiroshima および Hb A においてそれぞれ1部位当たり1260および1540 cal/molであったが、この差はおそらく有意ではなく、実験誤差に起因するものであろう。上記の Hb A の酸素平衡に対する DPG の影響は、以前に Tyuma ら¹⁹ の報告した知見とよく一致する。

紫外域差スペクトル。一酸化炭素 Hb Hiroshima および Hb A の pH 8.4 に対する pH 10.7 の紫外域差スペクトルを図4に示した。両 Hb の 245 $m\mu$ における光学的濃度の変化 (ΔOD) はほとんど同じである。デオキシ Hb に対するオキシ Hb の紫外域差スペクトルを図5に示した。Hb A の 242 $m\mu$ における ΔOD は pH 8.4 でゼロに近い

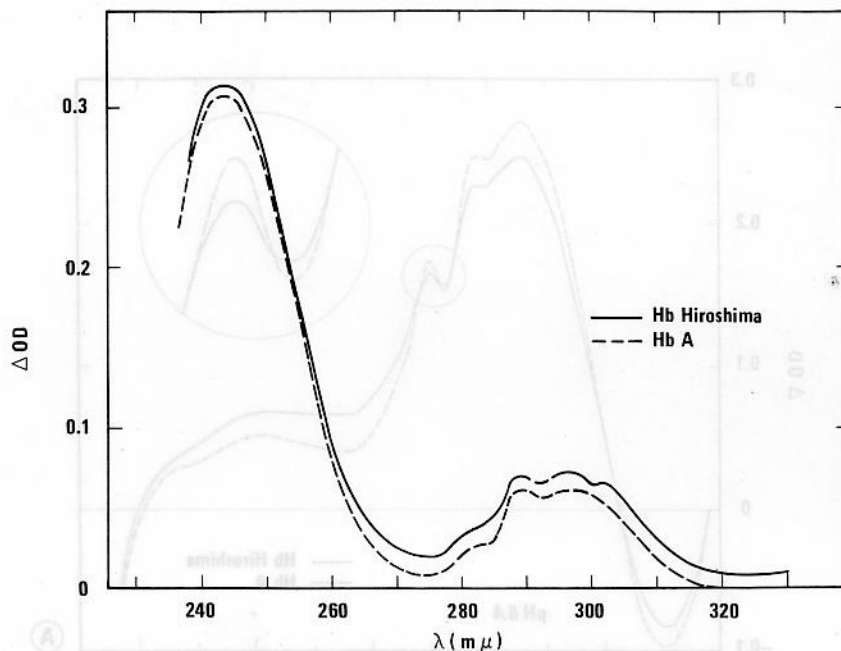


FIGURE 4 Ultraviolet difference spectra of CO Hb Hiroshima and CO Hb A, pH 10.7 vs 8.4. Hb concentration, 3×10^{-5} M; in 0.1 M glycine-NaOH buffer.

図4 CO Hb Hiroshima および CO Hb A の pH 8.4 に対する pH 10.7 の紫外域差スペクトル。Hb 濃度 3×10^{-5} M; 0.1 M glycine-NaOH 緩衝液中。

pH 8.4 but increased toward positive at pH 10.3 probably because of environmental changes around the HC2 β tyrosine residues following their ionization. The ΔOD at 242 m μ of Hb Hiroshima exhibited a dependence on pH similar to that of Hb A.

Slight but significant discrepancies were, however, found between the difference spectra of oxy- vs deoxyhemoglobin Hiroshima and A in the range of 280 to 295 m μ . Narrow banded spectra with two maxima at 283 and 291 m μ and one minimum at 288 m μ , superposed on a broad band with a peak at 275 m μ , appeared in the difference spectra of Hb Hiroshima and A, but those for the former were somewhat diminished compared to those for the latter, both at pH 8.4 and 10.3 (Figure 5).

The narrow banded spectra of stripped Hb Hiroshima was considerably diminished corresponding to its greatly impaired cooperativity ($n=1.1$) (Figure 6A), but returned to approximately the same magnitude as that in 0.1 M glycine-NaOH buffer (compare Figure 5) on the addition of 0.3 mM DPG, when cooperativity was intermediate ($n=1.9$). On the other hand the narrow banded spectra of Hb A was

が、pH 10.3で正の方向へ増加した。これは、イオン化後における HC2 β tyrosine 残基の近傍の環境変化に基づくものであろう。Hb Hiroshima の 242 m μ における ΔOD も、Hb A と同様の pH 依存性を示した。

しかし、280 から 295 m μ の範囲における Hb Hiroshima および Hb A のデオキシ型に対するオキシ型の差スペクトルにはわずかではあるが有意な差が認められた。Hb Hiroshima および Hb A でも、その差スペクトルにおいて 283 m μ および 291 m μ に二つの極大と 288 m μ に一つの極小を有する狭帯域のスペクトルが、275 m μ に一つのピークを有する広い吸収帯に重なって現われたが、pH 8.4 および 10.3 のいずれにおいても、Hb Hiroshima のそれは Hb A よりやや小さい(図 5)。

磷酸塩を除去した Hb Hiroshima では、この狭帯域スペクトルは、その協同現象の著しい阻害 ($n=1.1$) に対応してかなりの弱まりを示したが(図 6A)、0.3 mM DPG の添加によって協同現象が中等度 ($n=1.9$) になると、0.1 M glycine-NaOH 緩衝液における場合とほぼ同程度にまで回復する(図 5 と比較)。一方、Hb A では、この狭

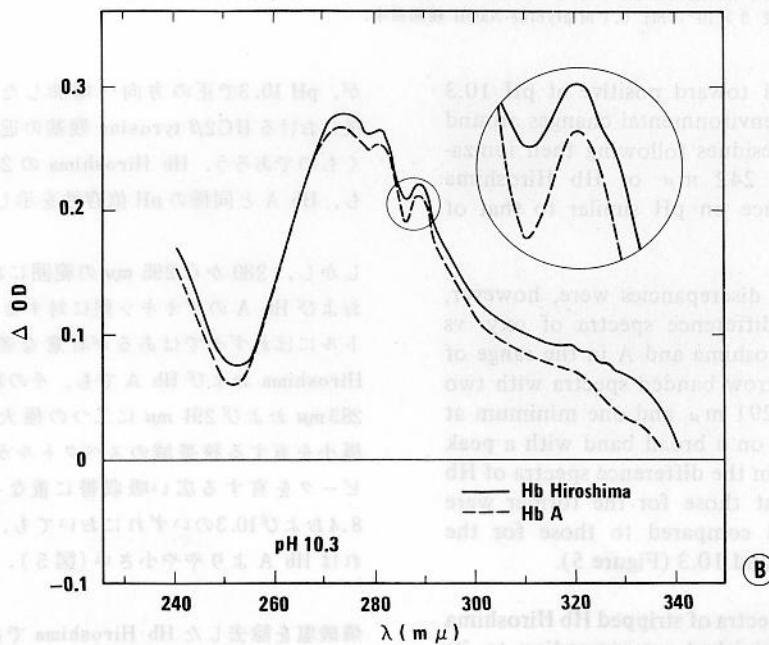
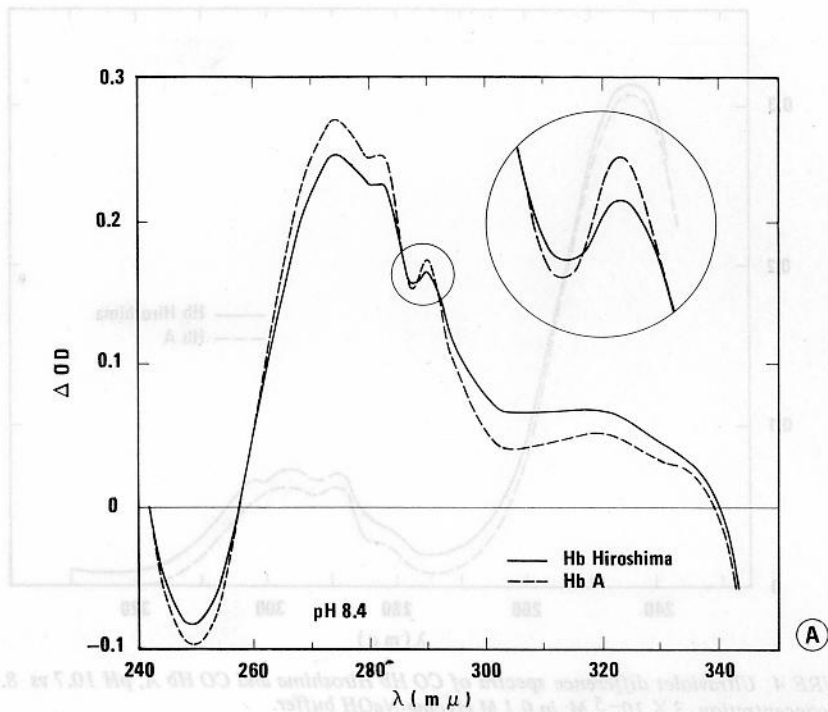


FIGURE 5 Ultraviolet difference spectra of oxyhemoglobin vs deoxyhemoglobin at pH 8.4 (A), and pH 10.3 (B). Hb concentration, 6×10^{-5} M; in 0.1 M glycine-NaOH buffer. Narrow banded spectra around $291 \text{ m}\mu$ in the circle are enlarged 4-fold.

図5 デオキシHbに対するオキシHbの紫外域差スペクトル。pH 8.4(A)およびpH 10.3(B)。Hb濃度 6×10^{-5} M; 0.1 M glycine-NaOH 緩衝液中。円内は、 $291 \text{ m}\mu$ 付近の狭帯域スペクトルを4倍に拡大したものの。

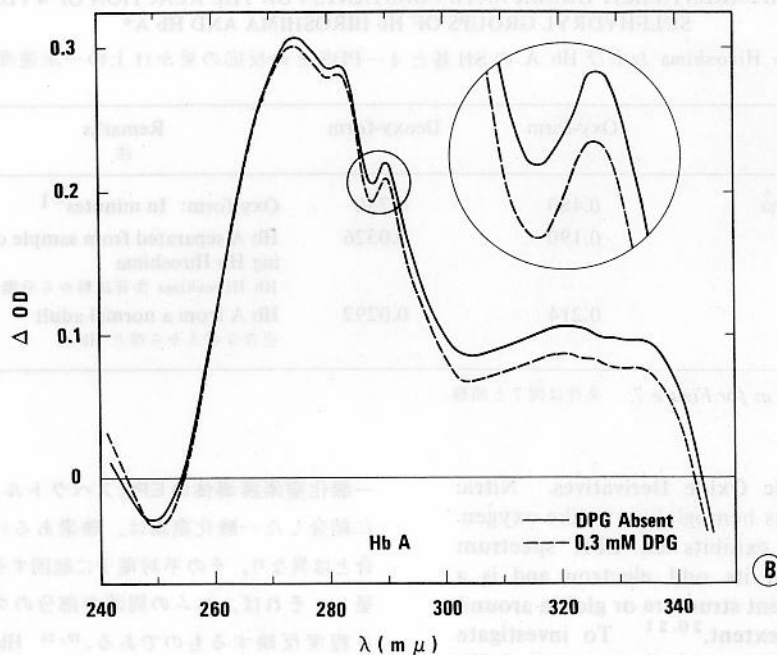
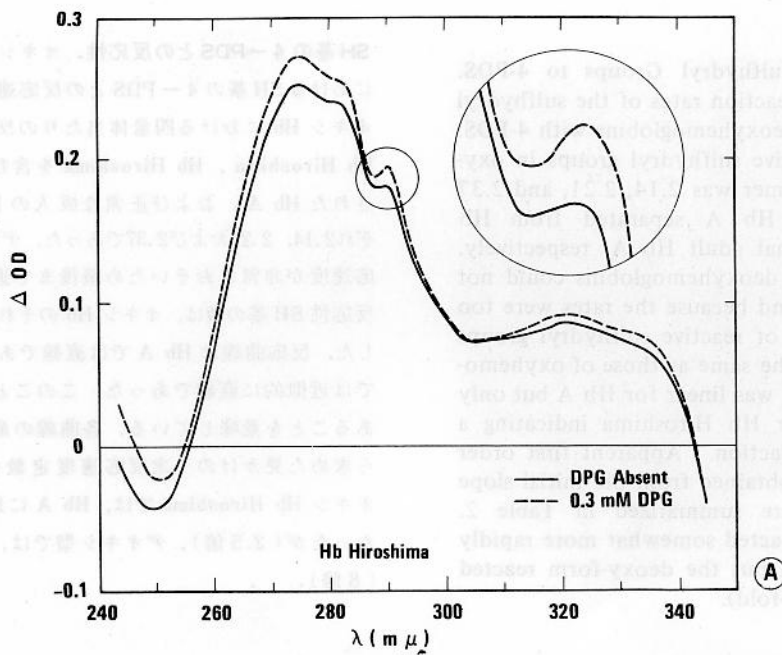


FIGURE 6 Ultraviolet difference spectra of oxyhemoglobin vs deoxyhemoglobin in the absence of DPG and in the presence of 0.3 mM DPG. Hb Hiroshima (A); Hb A (B). Hb concentration, 6×10^{-5} M; in 0.01 M Bis-Tris buffer; pH 7.0. Narrow banded spectra around 291 $m\mu$ in the circle are enlarged 4-fold.

図6 DPGなしおよび0.3 mM DPG存在下におけるデオキシ Hb に対するオキシ Hb の紫外域差スペクトル。Hb 濃度 6×10^{-5} M; 0.01M Bis-Tris 緩衝液中; pH 7.0。円内は、291 $m\mu$ 付近の狭帯域スペクトルを4倍に拡大したもの。

not affected significantly by the addition of DPG and it exhibited only a small change of n (Figure 6B and Table 1).

Reactivity of the Sulfhydryl Groups to 4-PDS. Figure 7 shows the reaction rates of the sulfhydryl groups in oxy- and deoxyhemoglobins with 4-PDS. The number of reactive sulfhydryl groups in oxyhemoglobin per tetramer was 2.14, 2.21, and 2.37 for Hb Hiroshima, Hb A separated from Hb Hiroshima, and normal adult Hb A, respectively. The reactions of the deoxyhemoglobins could not be followed to the end because the rates were too low but the number of reactive sulfhydryl groups were assumed to be the same as those of oxyhemoglobin. The rate plot was linear for Hb A but only approximately so for Hb Hiroshima indicating a pseudo first order reaction. Apparent first order rate constants were obtained from the initial slope of each plot and are summarized in Table 2. Oxy-Hb Hiroshima reacted somewhat more rapidly (2.5-fold) than Hb A but the deoxy-form reacted much more rapidly (8-fold).

帯域スペクトルはDPGの添加により有意な影響は受けず、 n はわずかに変化したにすぎない(図6Bおよび表1)。

SH基の4-PDSとの反応性. オキシおよびデオキシHbにおけるSH基の4-PDSとの反応速度を図7に示した. オキシHbにおける四量体当たりの反応性SH基の数は, Hb Hiroshima, Hb Hiroshimaを含む血液標本から分離されたHb A, および正常な成人のHb Aにおいてそれぞれ2.14, 2.21および2.37であった. デオキシHbでは, 反応速度が非常におそいため最後まで追跡できなかったが, 反応性SH基の数は, オキシHbのそれと等しいものと仮定した. 反応曲線はHb Aでは直線であり, Hb Hiroshimaでは近似的に直線であった. このことは偽似一次反応であることを意味している. 各曲線の最初の部分の勾配から求めた見かけの一次反応速度定数を表2に要約した. オキシHb Hiroshimaでは, Hb Aに比べて反応がやや速かったが(2.5倍), デオキシ型では, はるかに速かった(8倍).

TABLE 2 APPARENT FIRST ORDER RATE CONSTANTS FOR THE REACTION OF 4 PDS WITH SULFHYDRYL GROUPS OF Hb HIROSHIMA AND Hb A*

表2 Hb Hiroshima および Hb A の SH 基と 4-PDS との反応の見かけ上の一次速度定数*

	Oxy-form	Deoxy-form	Remarks 注
Hb Hiroshima	0.480	0.250	Oxy-form: In minutes ⁻¹
Hb A	0.190	0.0326	Hb A separated from sample containing Hb Hiroshima
Hb A	0.214	0.0292	Hb Hiroshima 含有試料から分離した Hb A Hb A from a normal adult 正常な成人から得た Hb A

*Conditions as for Figure 7. 条件は図7と同様

EPR Spectra of Nitric Oxide Derivatives. Nitric oxide bound to ferrous hemoglobin, unlike oxygen or carbonmonoxide, exhibits an EPR spectrum which originates from its odd electron and is a reflection of the ambient structure or globin around the hemes to some extent.^{20,21} To investigate whether the structure around the hemes of Hb Hiroshima is affected by the amino acid substitution, we compared the EPR spectra of NO Hb Hiroshima and Hb A. The spectra obtained at room temperature are shown in Figure 8: there were no significant differences at this temperature, or at +5, -20, -50, -70, -100 and -160 C between the spectra of Hb Hiroshima and Hb A.

一酸化窒素誘導体のEPRスペクトル. 二価鉄をもつHbに結合した一酸化窒素は, 酸素あるいは一酸化炭素の場合とは異なり, その不対電子に起因するEPRスペクトルを呈し, それは, ヘムの周囲の部分のグロビンの構造をある程度反映するものである.^{20,21} Hb Hiroshimaのヘムの周囲構造がアミノ酸置換の影響を受けているか否かを解明するため, NO Hb HiroshimaとNO Hb AのEPRスペクトルとを比較した. 室温で求めたスペクトルを図8に示したところ, 室温においても, また, +5, -20, -50, -70, -100および-160 Cにおいても, Hb HiroshimaとHb Aとの間にスペクトルの有意な差はなかった.

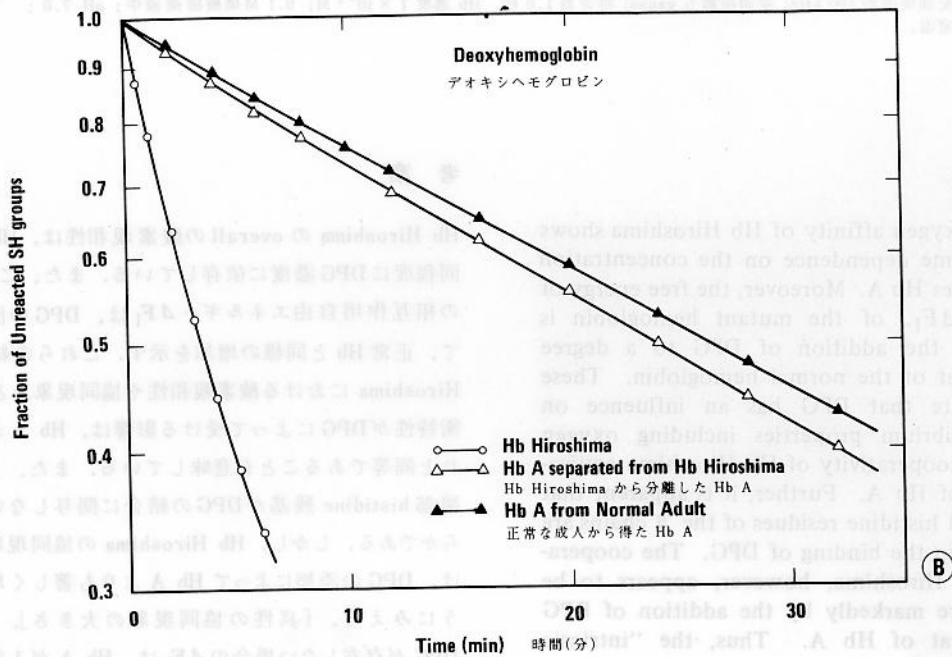
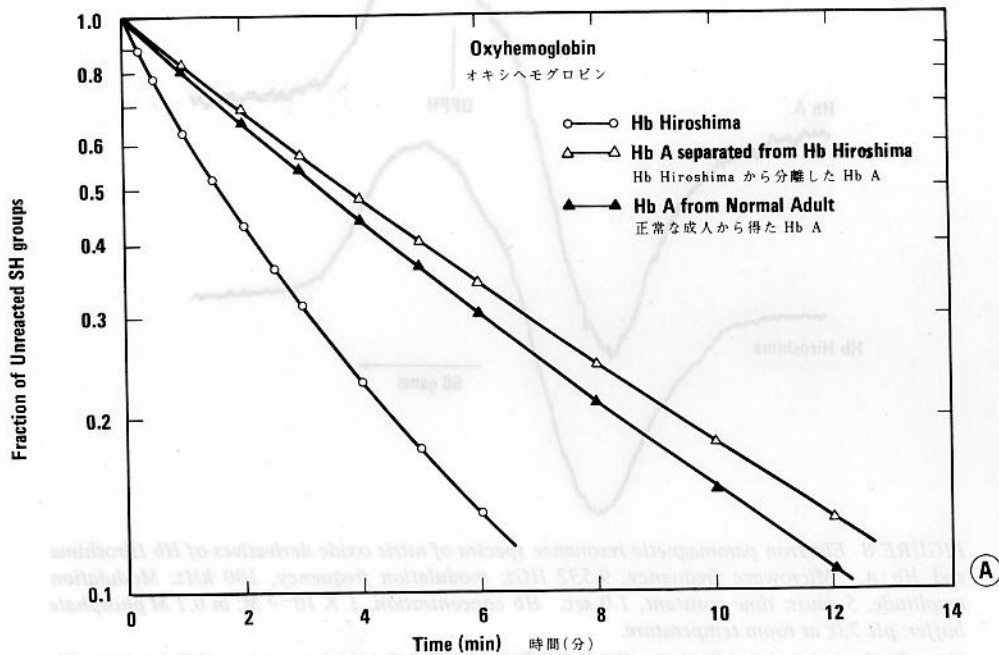


FIGURE 7 Pseudo first order rate plots of the reactions of the reactive sulfhydryl groups of oxyhemoglobin (A) and deoxyhemoglobin (B) with 4, 4'-dipyridinedisulfide (4-PDS). Hb concentration, 4×10^{-5} M; initial concentration of 4-PDS, 1.6×10^{-4} M for oxyhemoglobin and 1.7×10^{-3} M for deoxyhemoglobin; in 0.1 M phosphate buffer; pH 7.0; temperature, 20 C.

図7 オキシ Hb (A) およびデオキシ Hb (B) の反応性 SH 基と、4, 4'-dipyridinedisulfide (4-PDS) との反応の偽似一次反応プロット。Hb 濃度 4×10^{-5} M; 4-PDS の初期濃度は、オキシ Hb の場合が 1.6×10^{-4} M, デオキシ Hb の場合が 1.7×10^{-3} M; 0.1 M 磷酸塩緩衝液中; pH 7.0; 温度 20 C.

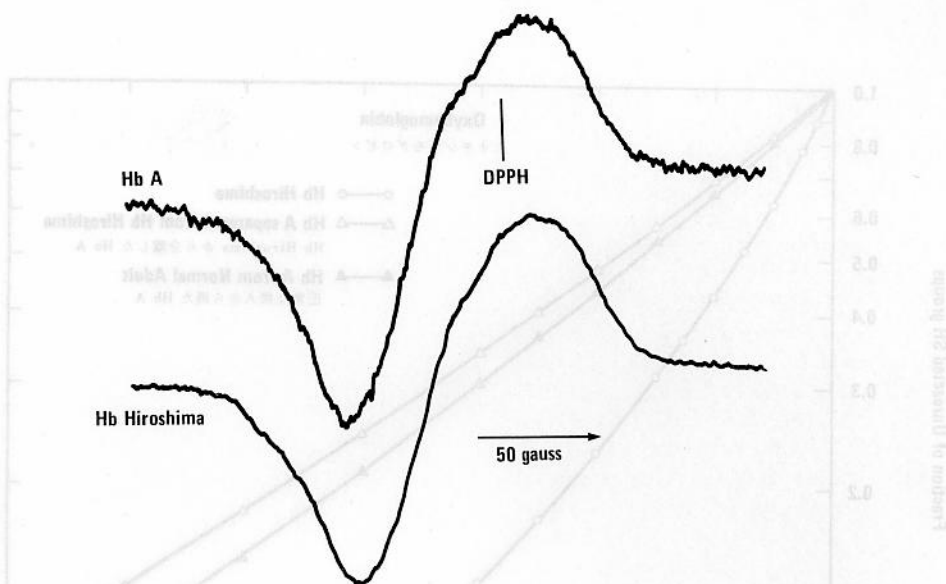


FIGURE 8 Electron paramagnetic resonance spectra of nitric oxide derivatives of Hb Hiroshima and Hb A. Microwave frequency, 9.532 HGz; modulation frequency, 100 kHz; Modulation amplitude, 5 gauss; time constant, 1.0 sec. Hb concentration, 1×10^{-3} M; in 0.1 M phosphate buffer; pH 7.0; at room temperature.

図8 Hb Hiroshima および Hb A の一酸化窒素誘導体の常磁性共鳴スペクトル。マイクロ波周波数 9.532 GHz; 変調周波数 100 kHz; 変調振幅 5 gauss; 時定数 1.0 秒。Hb 濃度 1×10^{-3} M; 0.1 M 燐酸緩衝液中; pH 7.0; 室温。

DISCUSSION

The overall oxygen affinity of Hb Hiroshima shows almost the same dependence on the concentration of DPG as does Hb A. Moreover, the free energy of interaction, ΔF_1 , of the mutant hemoglobin is increased by the addition of DPG to a degree similar to that of the normal hemoglobin. These results indicate that DPG has an influence on oxygen equilibrium properties including oxygen affinity and cooperativity of Hb Hiroshima equivalent to that of Hb A. Further, it is apparent that the C-terminal histidine residues of the β chains are not involved in the binding of DPG. The cooperativity of Hb Hiroshima, however, appears to be increased more markedly by the addition of DPG than does that of Hb A. Thus, the "intrinsic cooperativity" (i.e., the ΔF_1 in the absence of DPG) is only 450 cal/mol per site for Hb Hiroshima compared to 2040 cal/mol per site for Hb A. Consequently, the cooperativity is increased 3.8 fold for Hb Hiroshima but only 1.8 fold for Hb A by the addition of 0.3 mM DPG, although the absolute value of the increment $\Delta(\Delta F_1)$ is similar for the two hemoglobins (Table 1). Thus, it might be anticipated that the cooperativity of a hemoglo-

考 察

Hb Hiroshima の overall の酸素親和性は、Hb A とほぼ同程度に DPG 濃度に依存している。また、この異常 Hb の相互作用自由エネルギー ΔF_1 は、DPG の添加によって、正常 Hb と同様の増加を示す。これらの結果は、Hb Hiroshima における酸素親和性や協同現象などの酸素平衡特性が DPG によって受ける影響は、Hb A が受けるそれと同等であることを意味している。また、 β 鎖の C 末端部 histidine 残基が DPG の結合に関与しないことも明らかである。しかし、Hb Hiroshima の協同現象の大きさは、DPG の添加によって Hb A よりも著しく増加するように見える。「真性の協同現象の大きさ」、すなわち、DPG が存在しない場合の ΔF_1 は、Hb A が 1 部位当たり 2040 cal/mol であるのに対して、Hb Hiroshima では 450 cal/mol にすぎない。したがって、0.3 mM DPG の添加による協同現象の増強の絶対値 $\Delta(\Delta F_1)$ は両 Hb において類似しているが、Hb Hiroshima でこれは 3.8 倍の増加に相当し、Hb A では 1.8 倍の増加にすぎない(表 1)。そこで、中程度のヘム間相互作用を示す Hb では、その

bin with intermediate heme-heme interaction would be strongly affected by DPG since the ratio of its "intrinsic" ΔF_1 to the increment of ΔF_1 appended by DPG is small. This has in fact been observed for N-ethylsuccinimide hemoglobin with an intermediate cooperativity ($n=2$),^{22,23} that appears to be markedly diminished by stripping, though again, the decrement, $\Delta(\Delta F_1)$, is similar to that of unmodified hemoglobin A (Imai, unpublished observations).

H. F. Bunn (personal communication) found that the oxygen affinity of Hb Hiroshima in 0.05 M Bis-Tris buffer (pH 7.2) containing 0.1 M NaCl was decreased by DPG in the same manner as that of Hb A, but Hill's constant for Hb Hiroshima was increased slightly from 2.3 to 2.5 by the addition of 1 mM DPG, in contrast to our results where n decreased almost to 1. This is probably due to differences in experimental conditions. According to Benesch et al.,¹¹ chloride can also reduce oxygen affinity although the extent of the effect is not as marked as DPG; further, DPG no longer exerts an effect on oxygen affinity in the presence of 0.5 M NaCl. Apparently 0.1 M NaCl masks the effect of DPG on oxygen equilibrium by weakening the specific bonds between DPG and hemoglobin. Thus the insensitivity of Hill's constant to DPG in the presence of 0.1 M NaCl reported by Bunn is probably due to the large ionic strength of the solvent and his results are compatible with ours.

The "full cooperativity" of Hb Hiroshima (i.e., that in the presence of DPG), even though increased to a greater extent over the stripped form than Hb A, is still less than normal. Briehl and Hobbs²⁴ showed that the narrow banded UV spectra in the range from 280 to 295 $m\mu$ are form-dependent, being attributable to perturbations of aromatic chromophores, and suggested that the tryptophans at C3 β were probably involved. Bolton and Perutz²⁵ demonstrated from their analysis of X-ray data that these C3 β residues have contacts with five residues of the partner α chains in oxyhemoglobin which decrease to four in deoxyhemoglobin. Chemically modified Hb A from which two residues, the penultimate tyrosine and the C-terminal histidine of the β chain are removed, has no heme-heme interaction²⁶ and its form-dependent spectra are greatly diminished.²⁷ Genetically modified Hb Bethesda (HC2 β , tyrosine \rightarrow histidine) has reduced heme-heme interaction²⁸ and its form-dependent spectra is likewise diminished (Imai, unpublished observations). This evidence strongly suggests that the form-dependent spectra are related to the conformational changes at the $\alpha_1\beta_2$ contacts

「真性の」 ΔF_1 の, DPG でもたらされる ΔF_1 の増加分に対する比率が小さいため, その協同現象が DPG の著しい影響を受けるものと想像される. 実際, このようなことは中程度の協同現象 ($n=2$)^{22,23} をもつ N-エチルマレイミドで処理した Hb にも認められており, その協同現象は燐酸塩除去によって著しく減少するようにみえるが, この場合も, その減少分 $\Delta(\Delta F_1)$ は未処理の Hb A におけると同様である (今井, 未発表の観察結果).

H. F. Bunn によれば, 0.1 M NaCl を含む 0.05 M Bis-Tris 緩衝液 (pH 7.2) 中の Hb Hiroshima では, DPG の添加によって酸素親和性が Hb A の場合と同様に低下するが, 1 mM DPG の添加によって Hb Hiroshima の Hill の常数は 2.3 から 2.5 にわずかに増加する (私信). これに対し, われわれの結果では, n はほとんど 1 まで減少した. これは, おそらく実験条件の違いのためであろう. Benesch ら¹¹ によれば, 塩化物も酸素親和性の減少をもたらすが, その効果の程度は DPG ほど著しくない. さらに, 0.5 M NaCl の存在のもとでは, DPG の酸素親和性に対する影響は消失する. 0.1 M NaCl は, DPG と Hb との特異的な結合を弱めることによって, DPG の酸素平衡に対する影響を遮蔽するのであろう. したがって, 0.1 M NaCl の存在下において Hill の定数が DPG に対して鈍感であるという Bunn の報告は, おそらく溶媒のイオン強度が大きいことのためであり, われわれの所見と矛盾するものではない.

Hb A に比べると Hb Hiroshima の「最大協同現象」, すなわち, DPG が存在する場合の協同現象は, 燐酸塩除去の場合よりも著しく増加しているとはいえ, やはり正常値よりも低下している. Briehl および Hobbs²⁴ は, 紫外域スペクトルの 280 から 295 $m\mu$ の範囲にみられる狭帯域は, 芳香族発色基の摂動のために生じ, 酸素化依存性があることを証明しており, C3 β におけるトリプトファン残基がおそらく関与しているであろうと示唆した. Bolton および Perutz²⁵ は, X 線データの解析に基づき, これらの C3 β 残基と接触する相手側の α 鎖残基数がオキシ Hb では 5 個であるのに対し, デオキシ Hb では 4 個に減少することを明らかにした. β 鎖の C 末端から 2 番目のチロシンと C 末端のヒスチジンの二つの残基を除去して化学修飾を施した Hb A にはヘム間相互作用はなく²⁶ その酸素化依存性のスペクトルは著しく減少する.²⁷ 遺伝的に修飾された Hb Bethesda (HC2 β , tyrosine \rightarrow histidine) は, ヘム間相互作用の低下を示し²⁸ その酸素化依存性スペクトルも減少している (今井, 未発表の観察結果). この知見は, 酸素化依存性スペクトルと, 協同的酸素結合に伴って起こる $\alpha_1\beta_2$ 接触面の構造変化との間に関係が

which accompany the cooperative reactions of oxygen binding. The diminished narrow banded spectra of Hb Hiroshima imply that the conformational change at the $\alpha_1\beta_2$ contact during oxygenation is impaired, resulting in turn in the impaired cooperativity of oxygen binding of Hb Hiroshima.

The proposed mechanism to explain impaired cooperativity of hemoglobin variants such as Hb Chesapeake,²⁹ Yakima,³⁰ Kempsey,³¹ and Kansas,³² which have amino acid substitutions at the sites of $\alpha_1\beta_2$ contacts, is a direct inhibition of the conformational changes at the $\alpha_1\beta_2$ contacts which are essential for rearrangement of the subunits in cooperative oxygen-binding. In Hb Hiroshima the inhibition would probably be indirect because the amino acid substitution is remote from the region of $\alpha_1\beta_2$ contacts. According to Perutz's stereo-chemical model⁵ the C-terminal histidine residues of the β chains are free to rotate in oxyhemoglobin but in the deoxy form the histidine's imidazol side chain and α -carboxyl group form salt bridges with γ -carboxyl groups of FGI aspartates of the same β chains and with the ϵ -amino groups of the C5 lysines of the partner α chains, respectively, thereby tending to constrain the quaternary structure in the deoxy-conformation. A plausible explanation for the diminished cooperativity of Hb Hiroshima was recently suggested³: Hb Hiroshima, with an aspartate replacing the β terminal histidine, has no salt bridges between the C β termini and the FGI β aspartates, as a consequence of which the salt bridges with the C5 α lysines are probably rendered unstable, resulting in an impaired interaction between the α_1 and β_2 subunits.

Other findings reported here are likewise explicable in terms of the loss of the salt bridges between the C β termini and the FGI β aspartates in Hb Hiroshima, and were predicted recently.³ Thus, Hb Hiroshima and Hb A have similar intrinsic microscopic equilibrium constants, k_4 , for the fourth stage of oxygenation, but the constant for the first stage, k_1 , for Hb Hiroshima is much larger than for Hb A. The former finding suggests that Hb Hiroshima and Hb A assume similar conformations after binding the third oxygen molecule. During oxygenation the C-terminal histidine residues of the β chains in Hb A are freed by rupture of their salt bridges, the constraints maintaining the molecule in the deoxy-form are lost, and the molecule assumes the oxy-form.⁵ During oxygenation the salt bridges with C5 α lysines in Hb Hiroshima will be ruptured and the C-termini freed as in Hb A. Thus, Hb Hiroshima will assume an unconstrained

あることを強く示唆する。Hb Hiroshima における狭帯域スペクトルが減少していることは、酸素化の際の $\alpha_1\beta_2$ 接触面の構造変化が阻害されていること、また、その結果として Hb Hiroshima における酸素結合における協同現象が阻害されていることを示唆している。

$\alpha_1\beta_2$ 接触部にアミノ酸置換を有する Hb Chesapeake,²⁹ Yakima,³⁰ Kempsey³¹ や Kansas³² などの異常 Hb にみられる協同現象の阻害に関しては、協同的酸素結合反応の際のサブユニットの再配列に本質的に必要な $\alpha_1\beta_2$ 接触面の構造変化が直接的に阻害されていることがその機序として挙げられている。Hb Hiroshima では、アミノ酸置換が $\alpha_1\beta_2$ 接触部より遠隔の部分にあるので、この阻害はおそらく間接的なものであろう。Perutz の立体化学的モデル⁵ によれば、オキシ Hb の β 鎖における C 末端ヒスチジン残基は回転する自由度をもつが、デオキシ Hb では、そのヒスチジンのイミダゾール側鎖と α -カルボキシル基はそれぞれ同じ β 鎖の FG1 アスパラギン酸の γ -カルボキシル基および相手側 α 鎖の C5 リジンの ϵ -アミノ基とそれぞれ塩橋を形成することによってデオキシ型の四次構造を束縛する傾向がある。Hb Hiroshima における協同現象の低下について Perutz ら³ は可能性のある説明を最近示唆した。すなわち β 末端ヒスチジンがアスパラギン酸で置換されている Hb Hiroshima では、 β 鎖 C 末端と FG1 β アスパラギン酸との間に塩橋がなく、その結果として C5 α リジンとの塩橋がおそらく不安定となるため、 α_1 および β_2 サブユニット間の相互作用が弱められるのであろう。

ここに報告したその他の所見も、Hb Hiroshima で β 鎖 C 末端と FG1 β アスパラギン酸との間の塩橋の欠如によって説明できるし、Perutz ら³ はそのことを最近予測していたという。このような訳で酸素化反応の第 4 段階における真性微視的平衡定数 k_4 は、Hb Hiroshima のと Hb A のとは類似しているが、第 1 段階における定数 k_1 は、Hb Hiroshima が常に Hb A よりもはるかに大きい。 k_4 についての所見は、第 3 番目の酸素分子の結合後では Hb Hiroshima と Hb A の構造が類似していることを示す。Hb A では、酸素化の際に β 鎖 C 末端のヒスチジン残基はそれらの塩橋の切断によって自由になり、分子をデオキシ型に固定していた束縛が失われるために分子はオキシ型となる。⁵ Hb Hiroshima では、酸素化の際に C5 α リジンとの塩橋が切断され、Hb A と同様に C 末端が自由

conformation similar to that of Hb A. EPR spectroscopy of NO Hb Hiroshima showed that no detectable distortion of globin around the hemes of the β chains occurs. This is consistent with the observation that the k_4 for Hb Hiroshima and Hb A are similar, and with the proposal that the 4th oxygen molecule probably binds to the heme of one of the β chains,⁵ an assumption supported by other data.¹⁹ That k_1 for Hb Hiroshima was much larger than for Hb A, is probably because, as discussed above, the deoxy-form of Hb Hiroshima is less constrained than deoxy A, due to the absence of the salt bridges between the residues HC3 β and FG1 β . This tends to shift the equilibrium between the oxy- and deoxy-conformations towards the oxy-form, thereby increasing the oxygen affinity of Hb Hiroshima.

Almost all sulfhydryl reactivity of hemoglobin is attributable to the sulfhydryl groups of the F9 β cysteines. The reactivity of the sulfhydryl groups of Hb A is greatly decreased by deoxygenation (Table 2). This is accounted for by the salt bridge, described above, between HC3 β and FG1 β (94 β), which limits accessibility to the adjacent F9 β (93 β) cysteine.⁵ The reactivity of the sulfhydryl groups of the F9 β cysteines of Hb Hiroshima is somewhat increased in the oxy-form, but is much greater than Hb A in the deoxy-form. There is no salt bridge in Hb Hiroshima to inhibit the SH-reagent from reacting with the sulfhydryl groups. Similarly, the absence of this same salt bridge which, in Hb A, is responsible for half of the alkaline Bohr effect,⁴ clearly accounts for the halved Bohr effect of Hb Hiroshima.³

Nagel et al²⁷ suggested on the basis of experimental evidence from spectrophotometric titration and UV difference spectra that oxy- and carbonmonoxy-hemoglobin A have eight 'normal' tyrosine residues with pK's of 10.6 which decrease to six on deoxygenation, probably because of environmental changes around the HC2(145) β tyrosine residues. This is supported by Perutz's⁵ stereochemical model of hemoglobin. That the UV difference spectra of carbonmonoxy-Hb Hiroshima and A have almost identical ΔOD at 245 m μ suggests that they have an equal number of normal tyrosine residues (i.e., eight), when they are in the carbonmonoxy- and also probably in the oxy-form. Further, the similarity of the pH dependent ΔOD at 242 m μ may be taken to indicate that the Hb Hiroshima HC2 β tyrosine residues adjacent to the substituted aspartates at the C-termini undergo environmental changes similar to those which occur in Hb A during oxygenation.

になる。そうすることによって Hb Hiroshima は、Hb A と同様の束縛されない構造になる。NO Hb Hiroshima の EPR スペクトル測定では、 β 鎖におけるヘムの周囲にあるグロビンに検出できるほどの歪は起こらないことが示された。このことは、Hb Hiroshima および Hb A のもつ k_4 が類似しているという見解に一致し、また、第 4 番目の酸素分子はおそらくどちらかの β 鎖のヘムと結合するであろうという仮定⁵とも一致する。他のデータ¹⁹は、この仮定を支持している。Hb Hiroshima の k_1 が Hb A に比べてはるかに大きいことは、前述のごとく、デオキシ Hb Hiroshima では、HC3 β と FG1 β 残基間の塩橋が存在しないために Hb A よりも束縛がゆるいことに起因するのであろう。このために、オキシ型構造とデオキシ型構造との間の平衡がオキシ型へ移動する傾向があり、したがって、Hb Hiroshima の酸素親性が高まる。

Hb の SH 基反応性のほとんどは、F9 β システインの SH 基に起因している。Hb A における SH 基の反応性は、脱酸素化によって著しく減少する(表 2)。これは、前記の HC3 β と FG1 β (94 β) との間の塩橋によって隣接する F9 β (93 β) システインとの反応が制限されるためである。⁵ オキシ型の Hb Hiroshima では、F9 β システインの SH 基の反応性がやや増大しているが、デオキシ型では、Hb A に比べて著しく増大している。これは、Hb Hiroshima では SH 試薬と SH 基との反応を阻害すべき塩橋がないためである。Hb A におけるアルカリ性 Bohr 効果の半分は、この塩橋に起因している。⁴ Hb Hiroshima では、その塩橋が欠如するために Bohr 効果が半減している。³

Nagel ら²⁷ は、分光学的滴定および紫外域差スペクトルの実験証拠に基づいて、オキシ型および一酸化炭素型の Hb A では、pK が 10.6 の「正常」なチロシン残基が 8 個あるのに対し、脱酸素化により、おそらく HC2 (145) β チロシン残基近傍の環境変化のためにその数が 6 個に減少することを示唆した。Perutz⁵ によるヘモグロビンの立体化学的モデルは、これを支持する。一酸化炭素型の Hb Hiroshima と Hb A との紫外域差スペクトルで 245 m μ における ΔOD がほとんど等しいことは、その一酸化炭素型そして多分オキシ型における正常なチロシン残基数が同数(すなわち、8 個)であることを示唆している。さらに、pH 依存性をもつ 242 m μ における ΔOD が両ヘモグロビンで類似していることは、Hb Hiroshima では、置換された C 末端のアスパラギン酸に隣接する HC2 β チロシン残基が、酸素化の際に Hb A におけると同様の環境変化

From this it follows that the expulsion of the penultimate tyrosine residues from the pockets between the F and H helices of the β chains during oxygenation⁵ is probably not inhibited in Hb Hiroshima. On the other hand, the expulsion of the penultimate tyrosines seems to be inhibited in Hb Chesapeake²⁹ which is almost noncooperative, and moreover, hemoglobins which have lost the penultimate tyrosine residues, such as Des-His (146 β)-Tyr (145 β) hemoglobin,²⁶ Hb Rainier (HC2 β , tyrosine \rightarrow cysteine),²⁸ and Hb Bethesda (HC2 β , tyrosine \rightarrow histidine)²⁸ exhibit almost completely diminished cooperativity (Hayashi, 1971, personal communication). These data indicate that expulsion of the penultimate tyrosine seems to be essential to cooperative oxygen-binding. That the cooperativity of Hb Hiroshima is not diminished completely may be attributed in part to the lack of any apparent constraints on the movement of the penultimate tyrosine.

It is worth noting that the oxygen equilibrium functions of Hb Hiroshima are quite similar to those of N-ethylsuccinimide hemoglobin^{22,23} and Des-His (HC3 β) hemoglobin³³ with regard to increased oxygen affinity, halved Bohr effect and intermediate cooperativity. The similarities seem to result from interference with the formation of, in the case of N-ethylsuccinimide hemoglobin, or in the absence of the salt bridges between the γ -carboxyl groups of the FG1 β aspartates and the C β termini in Des-His hemoglobin and Hb Hiroshima. These three hemoglobins, two man-made, the other a naturally occurring mutant, aptly illustrate the importance of the beta terminal in the allosteric functions of hemoglobin and offer convincing support for Perutz's stereochemical model of hemoglobin.

をこうむることを示すと考えられる。このことから、酸素飽和の際における β 鎖のFおよびHヘリックスの間の空洞からの、C末端から2番目のチロシン残基の放出⁵は、Hb Hiroshimaではおそらく阻害されないであろうといえる。他方、協同現象をほとんど示さないHb Chesapeake²⁹では、C末端から2番目のチロシンの放出が抑制されているようであり、さらに、そのチロシン残基を失っているHb、たとえば、脱-His (146 β)-Tyr (145 β)Hb,²⁶ Hb Rainier (HC2 β , tyrosine \rightarrow cysteine)²⁸あるいはHb Bethesda (HC2 β , tyrosine \rightarrow histidine)²⁸では、協同現象がほとんど消失している (Hayashi, 1971年, 私信)。このことは、C末端から2番目のチロシンの放出が協同的酸素結合にとって不可欠であることを示す。Hb Hiroshimaにおける協同現象が完全に消失していないことは、このチロシンの運動に対してはっきりした抑制が働かないことに一部起因しているであろう。

酸素親和性増加、Bohr効果の半減および中間的な協同現象の点では、Hb Hiroshimaの酸素平衡機能は、N-エチルサクシニミド・Hb^{22,23}および脱-His (HC3 β)Hb³³のそれと非常に類似していることを指摘したい。この類似性は、N-エチルサクシニミド・Hbでは、FG1 β アスパラギン酸の γ -カルボキシル基と β 鎖C末端との塩橋形成に障害があること、脱-His HbおよびHb Hiroshimaでは、その塩橋が欠如していることに起因していると思われる。これらの3種のHbのうちの一つは人工的なものであり、一つは自然発生の変異型であるが、これらは、Hbのアロステリック機能における β 鎖C末端の重要性を十分に示しており、PerutzのHbの立体化学的モデルを十分に支持する。

REFERENCES

参考文献

1. IMAI K: Oxygen equilibrium characteristics of abnormal hemoglobin Hiroshima $\alpha_2\beta_2^{143}$ asp. Arch Biochem Biophys 127:543-7, 1968
2. 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
3. PERUTZ MF, del PULSINELLI P, TEN EYCK L, KILMARTIN JV, MIYAJI T, IUCHI I, SHIBATA S, HAMILTON HB: Haemoglobin Hiroshima and the mechanism of the alkaline Bohr effect. Nature New Biol 232:147-9, 1970
4. PERUTZ MF, MUIRHEAD H, MAZZARELLA L, CROWTHER RA, GREER J, KILMARTIN JV: Identification of residues responsible for the alkaline Bohr effect. Nature 222:1240-43, 1969
5. PERUTZ MF: Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. Nature 228:726-39, 1970
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: Structure and function of haemoglobin. 1. A tentative model of horse hemoglobin. J Mol Biol 13:646-78, 1965
8. BENESCH R, BENESCH RE, YU CI: Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate by human hemoglobin. Proc Natl Acad Sci USA 59:526-32, 1968
9. AMES BM, DUBIN DT: The role of polyamines in the neutralization of bacteriophage deoxyribonucleic acid. J Biol Chem 235:769-75, 1960
10. PAUL KG, THEORELL H, ÅKESON Å: The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen). Acta Chem Scand 7:1284-7, 1953
11. BENESCH RE, BENESCH R, YU CI: The oxygenation of hemoglobin in the presence of 2,3-diphosphoglycerate. Effect of temperature, pH, ionic strength, and hemoglobin concentration. Biochemistry 8:2567-71, 1969
12. BENESCH R, MACDUFF G, BENESCH RE: Determination of oxygen equilibria with a versatile new tonometer. Anal Biochem 11:81-7, 1965
13. AMPULSKI RS, AYERS VE, MORELL SA: Changes in the 4-PDS-reactive -SH groups of hemoglobin associated with the binding of phosphates and ligands. Anal Biochem 32:163-9, 1969
14. IMAI K, MORIMOTO H, KOTANI M, WATARI H, HIRATA W, KURODA M: An improved method for automatic measurement of oxygen equilibrium curves of haemoglobin. Biochim Biophys Acta 200:189-96, 1970
15. SHIGA T, HWANG K-J, TYUMA I: An electron paramagnetic resonance study of nitric oxide derivatives. Arch Biochem Biophys 123:203-5, 1968
16. WYMAN J: Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. Adv Protein Chem 19:223-86, 1964
17. EDSALL JT, FELSENFELD G, GOODMAN DS, GURDS FRN: The association of imidazole with ions of zinc and copper. J Am Chem Soc 76:3054-61, 1954
18. ADAIR GS: The hemoglobin system. VI The oxygen dissociation curve of hemoglobin. J Biol Chem 63:529-45, 1925
19. TYUMA I, SHIMIZU K, IMAI K: Effect of 2,3-diphosphoglycerate on the cooperativity in oxygen binding of human adult hemoglobin. Biochem Biophys Res Commun 43:423-8, 1971
20. GORDY W, REXROAD HN: Electron paramagnetic resonance studies of cytochrome and hemoglobin (irradiated and unirradiated). In *Free Radicals in Biological Systems*, ed by BLOIS Jr MS, BROWN HW, LEMMON RM, LINDBLOM RO, WEISSBLUTH M. New York, Academic Press, 1961. pp 263-77

21. SHIGA T, HWANG K-J, TYUMA I: Electron paramagnetic resonance studies of nitric oxide hemoglobin derivatives. I. Human hemoglobin subunits. *Biochemistry* 8:378-83, 1969
22. BENESCH R, BENESCH RE: The chemistry of the Bohr effect. 1. The reaction of N-ethylmaleimide with the oxygen linked acid groups of hemoglobin. *J Biol Chem* 236:405-10, 1961
23. RIGGS A: The binding of N-ethylmaleimide by human hemoglobin and its effect on oxygen equilibrium. *J Biol Chem* 236:1948-54, 1961
24. BRIEHL RW, HOBBS JF: Ultraviolet difference spectra in human hemoglobins. 1. Difference spectra in hemoglobin A and their relation to the function of hemoglobin. *J Biol Chem* 245:544-554, 1970
25. BOLTON W, PERUTZ MF: Three dimensional Fourier synthesis of horse deoxyhemoglobin at 2.8 Å resolution. *Nature* 228:551-2, 1970
26. ANTONINI E, WYMAN J, ZITO R, ROSSI-FANELLI A, CAPUTO A: Studies on carboxypeptidase digests of human hemoglobin. *J Biol Chem* 236:PC60-3, 1961
27. NAGEL RL, RANNEY HM, KUCINSKIS LL: Tyrosine ionization in human carbon monoxide and deoxyhemoglobins. *Biochemistry* 5:1934-42, 1966
28. HAYASHI A, STAMATOYANNOPOULOS G, YOSHIDA A, ADAMSON J: Haemoglobin Rainier: β 145(HC2) tyrosine \rightarrow cysteine and haemoglobin Bethesda: β 145(HC2) tyrosine \rightarrow histidine. *Nature New Biol* 230: 264-7, 1971
29. NAGEL RL, GIBSON OH, CHARACHE S: Relation between structure and function in hemoglobin Chesapeake. *Biochemistry* 6:2395-402, 1967
30. NOVY MJ, EDWARDS MJ, METCALF J: Hemoglobin Yakima: 2: High blood oxygen affinity associated with compensatory erythrocytosis and normal hemodynamics. *J Clin Invest* 46:1848-54, 1967
31. REED CS, HAMPSON R, GORDON S, JONES RT, NOVY MJ, BRIMHALL G, EDWARDS MJ, KOLER RD: Erythrocytosis secondary to increased oxygen affinity of a mutant hemoglobin, hemoglobin Kempsey. *Blood* 31: 623-32, 1968
32. BONAVENTURA J, RIGGS A: Hemoglobin Kansas, a human hemoglobin with a neutral amino acid substitution and an abnormal oxygen equilibrium. *J Biol Chem* 243:980-91, 1968
33. KILMARTIN JV, WOOTTON JF: Inhibition of Bohr effect after removal of C-terminal histidines from haemoglobin β chains. *Nature* 228:766-7, 1970