

THE LIGAND BINDING PROPERTIES OF
HEMOGLOBIN HIROSHIMA ($\alpha_2\beta_2^{146asp}$)

ヘモグロビン Hiroshima ($\alpha_2\beta_2^{146asp}$) の配位結合動態

JOHN S. OLSON

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

RONALD L. NAGEL, M.D.

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 groups, 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の日米専門職員、顧問、諮問機関ならびに政府および民間の関係諸団体の要求に応ずるための日英両語による公式報告記録であって、業績報告書集は決して通例の誌上発表論文に代わるものではない。

THE LIGAND BINDING PROPERTIES OF
HEMOGLOBIN HIROSHIMA ($\alpha_2\beta_2^{146\text{asp}}$)

ヘモグロビン Hiroshima ($\alpha_2\beta_2^{146\text{asp}}$) の配位結合動態

JOHN S. OLSON

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

RONALD L. NAGEL, M.D.

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
U.S.A. NATIONAL CANCER INSTITUTE
U.S.A. NATIONAL HEART AND LUNG INSTITUTE
U.S.A. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH

原 爆 傷 害 調 査 委 員 会
広島および長崎

米国学士院—学術会議と日本国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, 米国癌研究所, 米国心臓・肺臓研究所
米国環境保護庁および日本国厚生省国立予防衛生研究所
の研究費による

THE LIGAND BINDING PROPERTIES OF
HEMOGLOBIN HIROSHIMA ($\alpha_2\beta_2$)ヘモグロビン・ヒロシマ ($\alpha_2\beta_2$) の配位結合特性

JOHN S. OLSON

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

RONALD T. NAGEL, M.D.

HOWARD R. 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された。

Journal of Biological Chemistry 247:7485-93, 1972

ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION
HISORING AND KASAGAKI, JAPANA Cooperative Research Agency of
U.S.A. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES—NATIONAL RESEARCH COUNCILand
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFAREU.S.A. ATOMIC ENERGY COMMISSION
U.S.A. NATIONAL CANCER INSTITUTE
U.S.A. NATIONAL HEART AND LUNG INSTITUTE
U.S.A. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH

英 国 製 薬 業

英 国 製 薬 業

英 国 製 薬 業

CONTENTS

目 次

Summary	要 約	1
Introduction	緒 言	2
Methods	方 法	3
Results	結 果	4
Discussion	考 察	9
References	参考文献	27
Table		
表	1. Replacement of oxygen from saturated oxyhemoglobin by carbon monoxide 酸素飽和のヘモグロビンにおける酸素の一酸化炭素との置換	17
	2. The reaction of stripped deoxyhemoglobin with co in the absence & presence of inositol hexaphosphate Inositol hexaphosphate の欠如および混在下におけるリン酸塩除去還元型ヘモグロビンと CO との結合反応	17
	3. Equilibrium properties of the reaction of n-butyl isocyanide with hemoglobin ヘモグロビンと n-butyl isocyanide との結合反応の平衡に関する動態	18
	4. The binding of the last molecule of n-butyl isocyanide to hemoglobin in 0.1 MP _i , pH 7.0, 20° 0.1 MP _i , pH 7.0, 20°におけるヘモグロビンと最後の n-butyl isocyanide との結合	18
Figure		
図	1. Normalized time courses for the reaction of oxyhemoglobin with excess dithionite in the absence & presence of inositol hexaphosphate Inositol hexaphosphate の欠如および混在下における酸化型ヘモグロビンと過剰添加した dithionite との反応の正規化時間的経過	19
	2. Normalized time courses for the reactions of stripped hemoglobin A, Hiroshima, & Bethesda with carbon monoxide in 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20° 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20°におけるリン酸塩除去ヘモグロビン A, ヘモグロビン Hiroshima およびヘモグロビン Bethesda と一酸化炭素との反応の 正規化時間的経過	20
	3. Normalized time courses for the reaction of stripped hemoglobin Hiroshima with carbon monoxide in the absence & presence of inositol hexaphosphate at 20° Inositol hexaphosphate の欠如および混在下での20°におけるリン酸塩除去ヘモグロビン Hiroshima と一酸化炭素との正規化時間的経過	21
	4. Normalized time courses for the reaction of hemoglobin with n-butyl isocyanide at 20° 20°におけるヘモグロビンと n-butyl isocyanide との反応の正規化時間的経過	22
	5. The effect of inositol hexaphosphate on the reaction of carbon monoxide with stripped deoxyhemoglobin Hiroshima at 20° 20°におけるリン酸塩除去還元型ヘモグロビン Hiroshima と一酸化炭素との反応に対して inositol hexaphosphate の及ぼす影響	23

6. Static difference spectra observed on mixing inositol hexaphosphate with stripped deoxy-hemoglobin Hiroshima	
リン酸塩除去還元型ヘモグロビン Hiroshima と inositol hexaphosphate 混合後にみられる静力学的差スペクトル	24
7. The effect of ligand concentration on the normalized time course for carbon monoxide binding to stripped deoxyhemoglobin Hiroshima in 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20°	
0.05 M bis - tris, pH 7.0, 20°におけるリン酸塩除去還元型ヘモグロビン Hiroshima と一酸化炭素との結合の正規化時間的経過に対して配位子濃度の及ぼす影響	25
8. The effect of ligand concentration on the normalized time courses for n-butyl isocyanide binding to stripped deoxyhemoglobin Hiroshima in 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20°	
0.05 M bis - tris, pH 7.0, 20°におけるリン酸塩除去還元型ヘモグロビン Hiroshima と n - butyl isocyanide との結合の正規化時間的経過に対して 配位子濃度の及ぼす影響	26

Approved 承認 14 September 1972

THE LIGAND BINDING PROPERTIES OF HEMOGLOBIN HIROSHIMA ($\alpha_2\beta_2^{146\text{ asp}}$)ヘモグロビン Hiroshima ($\alpha_2\beta_2^{146\text{ asp}}$) の配位結合動態JOHN S. OLSON^{1*}; QUENTIN H. GIBSON, M.D., Ph.D, D.Sc.^{1**}; RONALD L. NAGEL, M.D.^{2†}; HOWARD B. HAMILTON, M.D.³Section of Biochemistry and Molecular Biology, Cornell University¹; Department of Medicine, Albert Einstein College of Medicine²; Department of Clinical Laboratories, ABCC³Cornell 大学生化学分子生物学教室¹; Albert Einstein 医科大学内科学教室²; ABCC 臨床検査部³

SUMMARY

Hemoglobin Hiroshima is a β chain variant of human hemoglobin in which aspartate is substituted for histidine at position 146. From chemical and crystallographic studies, it has been postulated that the histidine normally found at this position stabilizes the deoxy conformation by both inter- and intra-chain salt linkages and releases Bohr protons during ligand binding. Previous equilibrium studies had shown that hemoglobin Hiroshima does exhibit an increased oxygen affinity and a reduced alkaline Bohr effect. Kinetic studies of the carbon monoxide and n-butyl isocyanide binding reaction show that deoxyhemoglobin Hiroshima in low ionic strength buffers exhibits behavior intermediate between that of the isolated chains and that of deoxyhemoglobin A at neutral pH. At pH 7.0, the time course of both of these reactions exhibited little or no wavelength dependence, suggesting that the α and β chains within deoxyhemoglobin Hiroshima react with ligands at similar apparent association rates. This result is in contrast to previous studies both with isolated chains and with deoxyhemoglobin A at this pH. However, similar

要 約

ヘモグロビン Hiroshima は、ヒト・ヘモグロビンの β 鎖 146 位の histidine が aspartate に置換された変異型である。化学的および結晶解析の研究から、通常この位置にある histidine は、鎖内および鎖間を塩結合して還元型構造を安定にし、また、配位結合の際に Bohr 陽子を放出するものと推測されている。以前に行なわれた酸素解離平衡に関する研究によれば、ヘモグロビン Hiroshima は、酸素親和性の増強とアルカリ性域で Bohr 効果の低下を示すことが認められている。一酸化炭素および n-butyl isocyanide との配位結合に関する反応速度論的研究の結果、イオン強度の低い緩衝液中のヘモグロビン Hiroshima は、中性の pH では単離された鎖と還元型ヘモグロビン A との中間域的な動態を示すことが認められた。すなわち、pH 7.0 で両者との配位結合の時間的経過を調べてみると、波長依存性はほとんどないか、全くないかであった。このことから、還元型ヘモグロビン Hiroshima の α 鎖および β 鎖は、見かけ上類似の会合比で配位子と結合するものと考えられる。この結果は、単離した鎖および還元型ヘモグロビン A の両者をこの pH で研究した以

*Supported by a National Science Foundation Predoctoral Fellowship

**Supported by U.S. Public Health Service Grant GM 14276-07

†Career Scientist of the Health Research Council of the City of New York. Supported by U.S. Public Health Service Grant AM 15053, AM 13430, and Contract No. NIH-NHLI-72-2920-B

New York 市保健研究会常勤科学者。米国公衆衛生局助成金 AM 15053, AM 13430, および契約 NIH-NHL-1-72-2920-B による

behavior has been observed for deoxyhemoglobin A at pH 9.1 and des (his 146 β) deoxyhemoglobin at pH 7.0. Further analysis of the available kinetic and spectral data indicates that the intermediate ligand binding behavior of deoxyhemoglobin Hiroshima is not a result of an equilibrium distribution of deoxy A-like and liganded A-like conformations, but rather represents the properties of a new and distinct protein conformation which results from the disruption of the salt linkages at the COOH-terminus of the β chains by either deprotonating, physically removing, or substituting aspartate for histidine 146 β .

INTRODUCTION

Recently Perutz^{1,2} has proposed a specific stereochemical mechanism for ligand binding* to hemoglobin which includes a detailed description of those regions of hemoglobin structure which are necessary for the expression of cooperativity and its various linked functions. Of particular importance in his model is the C-terminal residue of the β chains, histidine 146, which appears to stabilize the deoxy conformation through the formation of salt linkages with lysine 40 α by its carboxy group and with aspartate 94 β by its imidazole side chain. The fact that both of these linkages are missing in liganded hemoglobin led to the suggestion that the pK of the imidazole should be a function of the degree of ligand saturation. This, in turn, led Perutz and co-workers^{1,2} to postulate that histidine 146 β contributes to the alkaline Bohr effect, an idea which is supported by the reduced Bohr effect of des (his 146 β) hemoglobin A.³ This conclusion is further supported by the fact that hemoglobin Hiroshima ($\alpha_2\beta_2^{146\text{ asp}}$),⁴⁻⁷ in which the aspartate residue prevents an intra-subunit bond to asp 94 β , also exhibits a substantially reduced Bohr effect and an increased oxygen affinity, these two effects being necessarily linked.

While from a qualitative standpoint, an explanation, in terms of structure, of the functional properties of hemoglobin Hiroshima is evident from Perutz's model, several important questions remain concerning the dynamics of ligand binding. If, as Perutz postulates, the various salt linkages which help to stabilize the deoxy structure are successively broken

前の結果と対照的である。しかし、還元型ヘモグロビン A は pH 9.1 で、また、脱 (his 146 β) 還元型ヘモグロビンは pH 7.0 でこれと同様の態度を示すことが認められている。入手されている反応速度論的および分光学的の資料をさらに検討した結果、還元型ヘモグロビン Hiroshima の示す中間的な配位結合動態は、還元型 A 様の構造と配位結合型 A 様の構造の平衡分布の結果ではなく、むしろ、新しい独特なタンパク構造の特性を反映するものであり、それは histidine 146 β の脱陽子、その物理的除去あるいは aspartate 置換によって β 鎖の COOH 末端における塩結合が破壊されたことに起因すると考えられる。

緒言

最近 Perutz^{1,2} は、ヘモグロビンと配位子*との結合について具体的な立体化学的機序を提案し、それには協同性とそれに関連した諸機能の発現に関与するヘモグロビン構造上の各部位についての詳細な記述も含まれている。そのモデルで特に重要な部位が β 鎖の C 末端残基、すなわち、histidine 146 であり、この残基の carboxy 基は lysine 40 α を塩結合し、また、その imidazole 側鎖は aspartate 94 β を塩結合して還元型構造を安定にすると推定されている。一方、配位結合型のヘモグロビンでは、この結合が両者とも欠如していると認められているので、imidazole の pK は配位子濃度の関数であろうということが示唆されている。このことから、Perutz およびその共同研究者^{1,2} は、histidine 146 β がアルカリ性域での Bohr 効果に関与するのであると推測しているが、脱 (his 146 β) ヘモグロビン A で Bohr 効果の低下がみられることはこの推論を支持するものである。³ さらに、ヘモグロビン Hiroshima ($\alpha_2\beta_2^{146\text{ asp}}$) では、その aspartate 残基が aspartate 94 β のサブユニット内結合を阻止しているが、そのヘモグロビン Hiroshima もまた、相互に必然的に関連しているところの Bohr 効果の大幅な低下と酸素親和性の増強とを示すという事実は、上記の結論をさらに支持するものである。⁴⁻⁷

Perutz のモデルによって構造の面からヘモグロビン Hiroshima の機能的特性について定性的見地での説明が明白になったとはいえ、その配位結合の動態についてはいくつかの重要な疑問が残っている。Perutz の推測するように、還元型構造の安定に関与する塩結合が配位結合の

*Ligand: Gerund of ligare, to bind or tie. A group, ion or molecule coordinated to the central atom in a coordination complex. In this report, the ligands are oxygen, carbon monoxide, n-butyl isocyanide etc. The central atom is the iron attached to the heme of hemoglobin.

配位子 (ligand: ligare の動名詞、結ぶまたはつなぐの意): 配位化合物の中心原子と配位結合するイオンや分子の総称。本報告書における配位子は酸素、一酸化炭素、n-butyl isocyanide 等である。中心原子はヘモグロビンのヘムに付着している鉄である。

during ligand binding, hemoglobin Hiroshima should represent, or at least be analogous to, those intermediates which are generated during the saturation of hemoglobin A. However, it is impossible to judge from Perutz's model alone the extent to which the substitution of aspartate for histidine 146 β would influence the intrinsic properties of the α and β chains, and, similarly, the extent to which this mutation would alter the overall quaternary transition from the deoxy to the liganded structure during ligand binding. Since hemoglobins A and Hiroshima are chemically distinct, analogies between the two compounds require careful examination, and therefore, an attempt has been made to compare, in detail, their ligand binding properties. A preliminary account of part of this work has already appeared.⁷

Purified hemoglobin Hiroshima was prepared by column chromatography using Bio-Rad 70 equilibrated with 0.005 M ammonium phosphate buffer, pH 7.0. Hemoglobin Hiroshima was readily eluted with the same buffer while hemoglobin A remained attached to the column. Samples were desalted by the procedure of Benesch et al.⁸ Hemoglobin A was prepared as previously described.⁹ Concentrations in terms of heme were determined spectrophotometrically by converting the hemoglobin samples to the CO form and then using the extinction coefficients of Banerjee et al.¹⁰ Solutions of *n*-butyl isocyanide (Aldrich), CO (Matheson), O₂ (Matheson), and deoxyhemoglobin were obtained and prepared as previously described.¹¹ IHP*, DPG, and bis-tris were obtained from Sigma, Calbiochem, and Aldrich, respectively. The Manox brand of sodium dithionite was a gift from Holdman and Harden, Miles Platting, Manchester, England.

METHODS

All static measurements were made with a Cary 14 spectrophotometer, and equilibrium titrations were performed using the techniques described by Olson and Gibson.¹¹ All rapid mixing experiments were made using the stopped flow apparatus and data collection system described by Gibson et al.^{12,13} Partial photolysis measurements were carried out in the flash apparatus described by Gray.¹⁴ Analysis of the CO binding data in terms of two independent

際に順次切断されるのであれば、ヘモグロビン Hiroshima は、ヘモグロビン A の飽和される途中に発生する中間成生物を代表するか、少なくともそれに相似したものであるかに違いない。しかし、histidine 146 β に aspartate が置換されたために α 鎖や β 鎖の特性にどの程度の影響があるか、また、この突然変異のために配位結合の際の還元型構造から配位結合型構造への四段階変換全体がどの程度に変化を受けるかは、Perutz のモデルだけでは判断が不可能である。ヘモグロビン A とヘモグロビン Hiroshima は化学的に異質のものであるので、両者の相似点の注意深い検討が必要であり、そのために両者の配位結合動態の詳細な比較を試みた。この研究の一部についてはすでに予報が発表されている。⁷

ヘモグロビン Hiroshima は、pH 7.0 の 0.005 M リン酸アンモニウム緩衝液で平衡した Bio Rad 70 を用いてカラムクロマトグラフィー法で精製した。同緩衝液でヘモグロビン Hiroshima は容易に溶出され、ヘモグロビン A はカラムに吸着して残存する。試料の塩類除去は Benesch の方法に従った。⁸ ヘモグロビン A は既報の方法で調製した。⁹ ヘム当たりのヘモグロビン濃度は、CO 結合型に変換した後に分光測定してから Banerjee ら¹⁰ の吸光係数をあてはめて求めた。*n*-butyl isocyanide (Aldrich 社製)、CO (Matheson 社製)、O₂ (Matheson 社製) および還元型ヘモグロビンを既報の方法で調製した。¹¹ IHP,* DPG および bis-tris は、それぞれ Sigma 社、Calbiochem 社および Aldrich 社から入手した。商品名 Manox の sodium dithionite は、英国 Manchester, Miles Platting の Holdman and Harden 社から寄贈された。

方法

すべての静力学的測定は Cary 社製 14 型分光光度計で行ない、平衡滴定は Olson および Gibson¹¹ の記述した方法に従った。すべての急速混合実験は Gibson ら^{12,13} の記述した断続流体装置と情報収集方式を用いて行なった。部分的光分解測定は Gray¹⁴ の記述した閃光装置の中で行なった。CO との配位結合の時間的経過を調べ、二つの指数関数の和として表わされる次式にその資料をあて

*The nonstandard abbreviations used are IHP, inositol hexaphosphate; Hb, an unliganded heme site; Hb₄, tetrameric hemoglobin; bis-tris, 2,2-bis (hydroxymethyl)-2,2',2''-nitriloethanol; DPG, 2,3-diphosphoglycerate.

ここに使用した非標準的略語: IHP, inositol hexaphosphate; Hb, 非配位結合のヘム部位; Hb₄, 四量体構造のヘモグロビン; bis-tris, 2,2-bis (hydroxy-methyl)-2,2',2''-nitriloethanol; DPG, 2,3-diphosphoglycerate.

components was obtained by fitting the observed time courses to the sum of two exponentials,

$$y = A_f e^{-k_f t} + A_s e^{-k_s t} \quad (1)$$

Under conditions where the concentration of ligand approached that of the heme concentration, the data were corrected for the depletion of ligand by calculating the integral of the ligand concentration versus time, $\int (X) dt$, and using the resultant values as the abscissa in the kinetic plots. In effect, this procedure normalizes the time scale so that comparisons can be made between reactions whose absolute velocities are quite different (for example, see Figures 7, 8).

RESULTS

Oxygen Dissociation. Previous work has already shown that detailed analysis of the time course for the replacement of oxygen from saturated hemoglobin A by carbon monoxide requires the recognition of differences between the α and β chains.¹⁵ The same is true for the reaction of oxyhemoglobin Hiroshima with CO since again wave length dependence of the progress curves was observed, the rates of the absorbance changes at 572 nm being slower than those observed at 570 nm. Following the experimental and computing procedures of Olson et al.,¹⁵ the CO replacement reaction was used to determine the rate constants for the dissociation of the first oxygen molecule from the α and β chains within tetrameric oxyhemoglobin Hiroshima, and the results are compared in Table 1 with those previously determined for hemoglobin A. In contrast to hemoglobin A, the time courses of the replacement reactions carried out in 0.05 M borate, pH 9.1, were identical to those measured at pH 7.0 so that the parameters determined at pH 7.0 also apply to the dissociation reaction at higher pH. At pH 7.0 the rates of oxygen release from both chains within oxyhemoglobin Hiroshima are significantly smaller than those of hemoglobin A (Table 1). At pH 9.1, the α chain rate is similar to the corresponding rate for hemoglobin A, but the β chain rate is still smaller than that of hemoglobin A. Although small, these differences do suggest that the substitution of aspartate for histidine 146 β does exert a measurable influence on the behavior of the heme sites within the liganded conformation. This result contrasts that found for hemoglobin Bethesda ($\alpha_2\beta_2^{145 \text{ his}}$),¹⁶ in which the substitution of histidine for tyrosine 145 β had no influence on the CO replacement reaction.

はめて二つの独立した成分の観点から分析を行なった。

配位子濃度がヘム濃度に近いという条件のもとで、時間に対する配位子の濃度の積分 $\int (X) dt$ を計算し、その結果を反応速度曲線の横座標とすることによって配位子の消耗を補正した。この方法は、時間目盛りを正規化する効果があり、絶対速度の全く異なる反応の間の比較を可能にする（その例として図7および8を参照）。

結 果

酸素解離. 飽和型ヘモグロビンAにおける酸素のCOとの置換の時間的経過を詳細に分析するためには、 α 、 β 鎖間の違いを知る必要のあることが以前の研究から判明している。¹⁵ 酸化型ヘモグロビン Hiroshima とCOとの反応の場合にも、反応曲線が波長依存性を示して572nmでの吸光度の変化の割合が570nmにおけるよりも低いことが認められたので、上記と同様のことがいえる。Olsonら¹⁵の実験方法と計算法を用いて四量体構造の酸化型ヘモグロビン Hiroshima における α 、 β 鎖の第1番目の酸素分子の解離速度定数をCO置換反応から求めた。その結果とヘモグロビンAについて以前に求められた結果との比較を表1に示した。0.05Mホウ酸、pH 9.1における置換反応の時間的経過がpH 7.0におけるものと全く同じで、pH 7.0で測定したパラメーターがそれ以上のpHでの解離反応にもあてはまることが認められたことは、ヘモグロビンAと対照的である。pH 7.0では、酸化型ヘモグロビン Hiroshima の α 、 β 両鎖の酸素解離速度はヘモグロビンAに比べて有意に低い（表1）。pH 9.1では、 α 鎖の解離速度はヘモグロビンAのそれに近くなるが、 β 鎖の解離速度はヘモグロビンAに比べて依然として小さい。これらの差は小さいとはいえ、histidine 146 β の aspartate 置換によって配位結合型構造中のヘム部位の動態に測定しうる影響が及ぼされることを示す。この結果は、ヘモグロビン Bethesda ($\alpha_2\beta_2^{145 \text{ his}}$)¹⁶ における tyrosine 145 β の histidine 置換がCO置換反応に影響を及ぼさないことが認められたのとは対照的である。

The reactions of oxyhemoglobins A and Hiroshima with dithionite are shown in Figure 1. Since the oxygen concentration is kept at zero by the presence of excess dithionite, the observed time courses reflect the rates and the mechanism of the sequential dissociation of all four oxygen molecules from tetrameric hemoglobin. If this reaction, $\text{Hb}_4(\text{O}_2)_4 \rightarrow \text{Hb}_4 + 4\text{O}_2$, exhibits non-cooperative behavior, the time course will be described by the sum of two exponentials (Equation 1) in which the amplitudes will be equal and the exponents will be defined by the values of k_a and k_β given in Table 1. Such behavior is observed for hemoglobin Bethesda,¹⁶ which in all its other reactions also fails to show subunit interaction. If, on the other hand, the hemoglobin does exhibit cooperative oxygen release, early in the dithionite reaction the rate will be greater than the average of the two chain rates. In the limiting case where the rates of dissociation from all the partially saturated intermediates are much greater than the rates of dissociation from fully saturated oxyhemoglobin, the initial rate will be $2(k_a + k_\beta)$ and the amplitudes of the two components will be $k_\beta/(k_a + k_\beta)$ and $k_a/(k_a + k_\beta)$. As shown in Figure 1 somewhat intermediate behavior is observed for both hemoglobins A and Hiroshima. In agreement with the CO replacement results (Table 1), the overall rate for Hiroshima is less than that observed for hemoglobin A but still significantly greater than the rate predicted for non-cooperative oxygen release (Figure 1A).

It is of interest to note that unlike hemoglobin A, the reaction of oxyhemoglobin Hiroshima with dithionite is only weakly influenced by phosphates (Figure 1). The rates observed early in the reaction in the absence of phosphates, presence of 0.1 M P_i (these data were presented elsewhere⁷), and presence of inositol hexaphosphate were 16, 20 and 19 sec^{-1} , respectively, for hemoglobin Hiroshima and 24, 35 and 84 sec^{-1} , respectively, for hemoglobin A. Thus, while oxyhemoglobin Hiroshima does exhibit cooperative oxygen release, as one would predict from previous equilibrium studies,⁴⁻⁶ the characteristics as well as the absolute rates of this dissociation reaction are quite different from those of hemoglobin A.

Carbon Monoxide Binding. A comparison of the time course of carbon monoxide binding to hemoglobins A, Hiroshima and Bethesda in 0.05 M bis-tris, pH 7.0, is shown in Figure 2. The data for hemoglobins A and Bethesda were obtained previously,¹⁶ and represent extremes of kinetic behavior. The CO reaction with hemoglobin A, which represents normal, highly cooperative be-

酸化型のヘモグロビン A およびヘモグロビン Hiroshima と dithionite との反応を図 1 に示した。過剰の dithionite によって酸素濃度がゼロに押えられているので、観察された時間的経過は、四量体ヘモグロビンから 4 個の酸素分子のすべてが順次解離される率と機序とを反映している。この反応 $\text{Hb}_4(\text{O}_2)_4 \rightarrow \text{Hb}_4 + 4\text{O}_2$ が非協同的動態を呈するならば、振幅が等しく、かつ、表 1 に示した k_a と k_β の値で定義される指数をもつ 2 つの指数関数の和 (1 式) としてその時間的経過を記述できる。ヘモグロビン Bethesda は、このような動態を示しており、その他の反応にもサブユニット間の相互作用は認められていない。¹⁶ 他方、ヘモグロビンが協同的な酸素放出を示す場合には、dithionite との反応の初期速度は両鎖の反応速度の平均よりも高いであろう。不完全飽和状態にある中間生成物は、完全酸素飽和のヘモグロビンに比べて解離速度が著しく高いが、そのような状態に限定してみた場合、初期速度は $2(k_a + k_\beta)$ 、両成分の振幅はそれぞれ $k_\beta/(k_a + k_\beta)$ および $k_a/(k_a + k_\beta)$ になる。図 1 にみられるように、ヘモグロビン A およびヘモグロビン Hiroshima はともにやや中間域的な動態を示した。ヘモグロビン Hiroshima の全反応速度がヘモグロビン A より低いことは CO 置換反応の成績 (表 1) と一致しているが、非協同的な酸素放出を仮定した場合の予想反応速度 (図 1A の太線) よりも有意に高い。

ヘモグロビン A の場合とは異なり、酸化型ヘモグロビン Hiroshima の dithionite との反応がリン酸塩でわずかに影響されるにすぎないことが注目される (図 1)。リン酸塩が欠如している場合、0.1 M P_i が存在する場合 (この資料は別に報告した⁷) および IHP が存在する場合の反応の初期速度は、ヘモグロビン Hiroshima でそれぞれ 16, 20 および 19 sec^{-1} 、ヘモグロビン A でそれぞれ 24, 35 および 84 sec^{-1} であった。したがって、以前に行なった酸素解離平衡試験⁴⁻⁶ から予想できたように、酸化型ヘモグロビン Hiroshima は確かに協同的な酸素放出を呈したが、その解離反応の特性も絶対速度もヘモグロビン A と全く異なっている。

一酸化炭素結合。 図 2 には、0.05 M bis-tris, pH 7.0 におけるヘモグロビン A、ヘモグロビン Hiroshima およびヘモグロビン Bethesda と一酸化炭素との配位結合の時間的経過の比較を示した。ヘモグロビン A およびヘモグロビン Bethesda の資料は以前に行なった研究によって求められたもので、¹⁶ それぞれ反応速度論的動態の両極端を代表している。正常なきわめて協同的な動態の代表

havior, exhibits a slightly accelerating time course with an initial rate of about $0.2 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$. On the other hand, the CO reaction with hemoglobin Bethesda, which represents non-cooperative, chain-like behavior,¹⁶ exhibits a decelerating time course with an initial rate of about $4.0 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$. The progress curves for hemoglobin A are independent of the wave length of observation, but the two components observed for hemoglobin Bethesda can be isolated spectrally and are presumed to represent the behavior of the individual α and β chains.¹⁶ As shown in Figure 2, hemoglobin Hiroshima exhibits characteristics which are intermediate between those of A and Bethesda. While the time course for CO binding is decelerating, the initial rate of the reaction, $0.8 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$, is half way between that observed for hemoglobins A and Bethesda, and the progress curves exhibit no wavelength dependence even in regions near the 424 nm isosbestic point. The above discussion is of results obtained in bis-tris at pH 7.0, but it is interesting to note that the time course of CO binding to hemoglobin Hiroshima under these conditions bears a strong resemblance to that seen with hemoglobin A in 0.05 M borate at pH 9.1, where again deceleration, an intermediate initial rate ($0.5 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$), and an absence of spectral heterogeneity is observed.¹⁷

The pH dependence of the time course of CO binding to stripped and IHP treated hemoglobin Hiroshima is shown in Figure 3. Unlike hemoglobins A or Bethesda,¹⁶⁻¹⁸ the time course for CO binding to stripped deoxyhemoglobin Hiroshima exhibits a rather complex pH dependence. At all three pH values shown, the progress curves decelerate with initial rates equal to 0.8, 0.8 and $1.1 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ at pH 6, 7, and 8, respectively. Although an empirical procedure, especially in view of the lack of spectral heterogeneity, these time courses were fitted to the sum of two exponentials in order to estimate the rates of the fast and slow phases. However, as shown in Table 2, there do not appear to be any systematic changes in either the rates or the amplitudes as the pH is raised. It is clear from these data that, at pH 6 and 7, inositol hexaphosphate is converting deoxyhemoglobin Hiroshima to a species whose carbon monoxide binding characteristics are similar to those of deoxyhemoglobin A. Further, at these pH values, the rate of the slow phase in the absence of phosphates is similar to the rate of CO binding to hemoglobin A, and the rate of the fast phase is intermediate between that observed for rapidly reacting hemoglobins (Hb_4X_3 ,¹⁹ isolated chains,²⁰ hemoglobin Bethesda,¹⁶ and deoxy dimers²¹) and normal deoxyhemoglobin.

としてのヘモグロビン A の CO との結合の時間的経過はやや加速的で、その初期速度は約 $0.2 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ である。他方、非協同的、鎖状の動態の代表としてのヘモグロビン Bethesda¹⁶ の CO との結合の時間的経過は減速的で、その初期速度は約 $4.0 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ である。ヘモグロビン A の反応曲線は波長依存性を示さないのに対して、ヘモグロビン Bethesda にみられた二つの成分は分光学的に分離可能で、それぞれ α 鎖および β 鎖の動態を代表するであろうと推測されている。¹⁶ 図 2 にみられるように、ヘモグロビン Hiroshima は、ヘモグロビン A とヘモグロビン Bethesda との中間的な動態を示した。その CO 結合の時間的経過は減速的であるが、その反応の初期速度 $0.8 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ はヘモグロビン A とヘモグロビン Bethesda との中間であり、424 nm の等吸収点付近においてさえも反応曲線は波長依存性を示さない。上記の考察は pH 7.0 における bis-tris についての成績に関するものであるが、この条件下のヘモグロビン Hiroshima と CO との結合の時間的経過は、pH 9.1 の際の 0.05 M ホウ酸におけるヘモグロビン A についての成績ときわめてよく類似していることが注目される。すなわち、その場合にも反応が減速的で、その初期速度が中間的 ($0.5 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$) であって分光学的異質性のないことが認められている。¹⁷

リン酸塩除去および IHP 処理のヘモグロビン Hiroshima と CO との結合の時間的経過の pH 依存性を図 3 に示した。ヘモグロビン A やヘモグロビン Bethesda の場合とは異なり、¹⁶⁻¹⁸ リン酸塩除去還元型ヘモグロビン Hiroshima と CO との結合の時間的経過はかなり複雑な pH 依存性を示す。ここに示した三つの pH 値で反応曲線はいずれも減速的であり、その初期速度は pH 6, 7, および 8 でそれぞれ 0.8 , 0.8 , および $1.1 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ に相当する。次に、経験的な方法であるとはいえ、特に分光学的異質性の欠如の見地からとはいえ、これらの時間的経過を二つの指数関数の和で表わされる式にあてはめて急速期および緩除期における反応速度の推定を試みた。しかし、表 2 に示すように、pH 値の増加によって反応速度にも振幅にも系統的な変化は生じないようである。これらの資料によれば、pH 6 および 7 では、IHP は還元型ヘモグロビン Hiroshima を変形して還元型ヘモグロビン A に類似する CO 結合動態をもつ種類のものになっていることが明らかである。そのうえ、この pH では、リン酸塩欠如下における緩除期の反応速度はヘモグロビン A の CO 結合速度に近いが、その急速期の反応速度は反応の急速な各種のヘモグロビン (Hb_4X_3 ,¹⁹ 単離鎖,²⁰ ヘモグロビン Bethesda¹⁶ および還元型二量体²¹) と正常な還元型ヘモグロビンとの中間である。

At pH 8.0, the forms of the progress curves are altered (Table 2), and even in the presence of excess IHP some rapid phase is still observed. While at pH 6 and 7 the progress curves appear to be independent of the wavelength of observation, the time courses measured at pH 8.0 are not. A fast component is observed at 423.8 nm and a slow component at 424.8 nm.

Partial photolysis experiments were carried out in an attempt to measure the rate of binding of the last carbon monoxide to hemoglobin Hiroshima (which is usually designated as 1_4). The theory behind and procedures used in these types of experiments have been discussed at length by Gibson and co-workers.^{11,19} With less than 10% photolytic breakdown, the rate of recombination with CO was the same for both hemoglobins A and Hiroshima and, in agreement with previous results, equal to about $6.5 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ at pH 7.0, 20°.

n-Butyl Isocyanide Binding. A number of authors⁴⁻⁶ have studied the oxygen equilibrium with hemoglobin Hiroshima and have found that for this mutant hemoglobin the concentration of O_2 at 50% saturation is four times less and the Hill coefficient is somewhat smaller than that of hemoglobin A. Qualitatively similar results were obtained when the n-butyl isocyanide equilibrium was studied under conditions compatible with the kinetic experiments presented in this report (Table 3). Although these results represent only single experiments because of sample limitations, they do serve to point out the equilibrium differences between hemoglobins A and Hiroshima. As expected, hemoglobin Hiroshima consistently exhibits a higher affinity and less cooperativity under all conditions. Again, it is interesting to note that the binding properties of stripped hemoglobin Hiroshima at pH 7.0 are similar to those of hemoglobin A at pH 9.1.

The kinetic parameters involved in the binding of the last isocyanide molecule to hemoglobin Hiroshima were determined using procedures identical to those described by Olson and Gibson,¹¹ and the results are compared in Table 4 with those obtained previously for hemoglobin A. As with A, the rate constants observed for hemoglobin Hiroshima appear to apply at both pH 7.0 and 9.1. A direct comparison of the values for the association constants, i'_a and i'_β , of each protein is difficult since the experiments were carried out at different temperatures (Table 4). However, it is clear that the rate of dissociation of the first n-butyl isocyanide molecule from the β chains within liganded hemo-

pH 8.0で反応曲線の形状が変化し(表2), 過剰 IHP の存在下においても若干の急速期が依然として認められる。pH 6 および 7 での反応曲線は波長依存性を示さないが, pH 8 で測定した時間的経過には波長依存性があるようであり, 423.8nm において早い成分が, また 424.8nm においては遅い成分が認められる。

部分的な光分解実験を行なってヘモグロビン Hiroshima と最後の一酸化炭素分子との結合速度(これは通常 1_4 と表わされる)の決定を試みた。この種の実験の原理と方法の詳細については Gibson およびその共同研究者¹¹⁻¹⁹ の記述がある。光分解の崩壊が10%以下であり, ヘモグロビン A およびヘモグロビン Hiroshima の CO との再結合速度が同じであることが認められ, 以前に行なわれた研究の成績と同様に, pH 7.0, 20° において約 $6.5 \mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ に相当していた。

n-Butyl Isocyanide 結合. ヘモグロビン Hiroshima における酸素解離平衡状態については数多くの研究があり,⁴⁻⁶ この変異型ヘモグロビンの50%飽和時の O_2 濃度はヘモグロビン A に比べて4分の1で, Hill 係数もやや低いことが認められている。本報告で記述した速度論的実験と同条件のもとで n-butyl isocyanide 平衡を検討したが, 質的には同様の結果が得られた(表3)。試料が限られているために実験を1回行なったにすぎないが, その結果はヘモグロビン A とヘモグロビン Hiroshima との間における平衡状態の差を示している。予想されたように, ヘモグロビン Hiroshima はいずれの条件のもとでも一貫して親和性の増強と協同性の低下とを示した。この場合も, pH 7.0 におけるリン酸塩除去ヘモグロビン Hiroshima の結合特性は pH 9.1 におけるヘモグロビン A のそれと類似していることが注目される。

ヘモグロビン Hiroshima と最後の isocyanide 分子との結合に関与する速度論的パラメーターを Olson および Gibson¹¹ の記述した方法に従って決定し, その結果とヘモグロビン A について以前に求めた結果との比較を表4に示した。ヘモグロビン A の場合と同様に, ヘモグロビン Hiroshima に観察された速度定数は pH 7.0 および 9.1 のいずれにも適用できるようである。実験の温度が異なるため, 両蛋白の会合定数 i'_a と i'_β を直接比較することは困難である(表4)。しかし, 配位結合型ヘモグロビン Hiroshima の β 鎖における第1番目の n-butyl isocyanide

globin Hiroshima is significantly less, about two times, than the corresponding rate for hemoglobin A. This result is qualitatively similar to that observed for oxygen dissociation (Table 1).

A summary of the kinetic features of the reaction of *n*-butyl isocyanide with deoxyhemoglobin Hiroshima is shown in Figure 4. In the case of hemoglobins A (open circles in Figure 4A) and Bethesda (dotted line in Figure 4B) at pH 7.0, the time course for the *n*-butyl isocyanide reaction is biphasic, and the two kinetic components can be isolated spectrally and identified with the properties of the α and β chains.^{16,22} However, as seen in Figure 4A (closed circles), the time course for *n*-butyl isocyanide binding to stripped deoxyhemoglobin Hiroshima is almost exponential, the interval rate constants decreasing from 24 sec⁻¹ initially to 16 sec⁻¹ after 80% of the reaction was complete. When high concentrations of isocyanide were used, spectral heterogeneity could not be demonstrated at either the 421 nm or 434 nm isosbestic point. At very low ligand concentrations, of the order of 10-20 μ M which give rise to incomplete saturation, the rates of the progress curves at 422 and 434 nm were slightly greater than those observed at 418 and 436 nm, but this spectral heterogeneity was by no means as clear cut as the analogous heterogeneity observed with hemoglobin A.²² Although the absolute rates of the reaction were faster, the shapes of the progress curves for deoxyhemoglobin Hiroshima at pH 9.1 were similar to those obtained at pH 7.0. Again, a striking similarity can be seen between the time course for the isocyanide reaction with deoxyhemoglobin Hiroshima at pH 7.0 and that for the isocyanide reaction with hemoglobin A at pH 9.1 (Figure 4A).

The effect of phosphates on the reaction of *n*-butyl isocyanide with deoxyhemoglobin Hiroshima at pH 7.0 is shown in Figures 4B, 4C. In the presence of 0.1 M inorganic phosphate, the time course becomes biphasic and wave length dependent. Similar results (not shown) were obtained when 2,3-diphosphoglycerate was added to deoxyhemoglobin Hiroshima in 0.05 M bis-tris, pH 7.0. As expected, inositol hexaphosphate exerts the greatest effect. This organic phosphate produces a slow phase whose rate is smaller than that seen for stripped deoxyhemoglobin A (Figures 4A, 4B).

The Properties of Deoxyhemoglobin Hiroshima
In previous work with hemoglobin Bethesda, the effect of inositol hexaphosphate on the time course of the CO reaction depended on whether or not this anion was added directly to the hemoglobin

分子の解離速度は、ヘモグロビンAより有意に低く、約半分にすぎないことが明らかである。この結果は、酸素解離における成績と質的に類似している(表1)。

還元型ヘモグロビン Hiroshima と *n*-butyl isocyanide との結合の速度論的特性の要約を図4に示した。pH 7.0におけるヘモグロビンA(図4Aの白丸)およびヘモグロビン Bethesda(図4Bの点線)と *n*-butyl isocyanide との結合の時間的経過が二相性であり、両速度論的成分は分光学的に分離可能で、それぞれ α 、 β 鎖の特性と同定されているが、^{16,22} 図4A(黒丸)にみられるように、リン酸塩除去の還元型ヘモグロビン Hiroshima と *n*-butyl isocyanide との結合の時間的経過はほとんど指数関数的であり、反応の80%完了時における中間速度定数は、初期の24 sec⁻¹ から16 sec⁻¹ に低下している。高濃度のisocyanideを使用した場合、421 nmまたは434 nmのいずれの等吸収点でも分光学的異質性を証明できなかった。10-20 μ M程度の、不完全飽和をもたらすような非常に低い配位子濃度では、422 nmおよび434 nmにおける反応曲線の反応速度は418 nmおよび436 nmにおけるものよりやや高いが、この分光学的異質性は、ヘモグロビンAにおいて同じく観察された異質性のようには明瞭なものでは決していない。²² pH 9.1における還元型ヘモグロビン Hiroshima の反応曲線の形状は、反応の絶対速度がもっと早いこと以外は、pH 7.0の場合と同様であった。ここでも、pH 7.0における還元型ヘモグロビン Hiroshima と isocyanide との結合反応は、pH 9.1におけるヘモグロビンA と isocyanide との結合反応に著しく類似した時間的経過を示すことが認められた(図4A)。

pH 7.0における還元型ヘモグロビン Hiroshima と *n*-butyl isocyanide との結合反応に対してリン酸塩の及ぼす影響を図4Bおよび4Cに示した。0.1 M無機リン酸塩の存在下における反応の時間的経過は二相性となり、波長依存性を示す。0.05 M bis-tris, pH 7.0における還元型ヘモグロビン Hiroshima に DPG を加えた場合にも同様の結果が得られた(ここには示されていない)。予想したように、IHPの影響が最も著しいものと認められた。リン酸塩除去の還元型ヘモグロビンAの場合の反応速度よりも遅い反応速度をもつ緩徐期がこの有機リン酸塩によって生じる(図4A, 4B)。

還元型ヘモグロビン Hiroshima の特性。ヘモグロビン Bethesda についての以前の研究によれば、IHPのCO反応の時間的経過に及ぼす影響は、この陰イオンがヘモグロビン溶液に直接加えられたか、または、混合前のCO溶

solution or was present only in the CO solution before mixing.¹⁶ This phenomenon led to the discovery that deoxyhemoglobin Bethesda exists in solution in a conformation whose kinetic, subunit dissociation, and absorption properties are comparable to those of liganded hemoglobin A. Similar carbon monoxide binding experiments were performed with hemoglobin Hiroshima, and as shown in Figure 5, only at pH 8.0 is the effect of IHP not instantaneous by comparison with the rate of CO binding. At pH 6.0 and 7.0, this organic phosphate exerts its influence on deoxyhemoglobin within, at maximum, 2 milliseconds after mixing. Gray and Gibson²³ found the same to be true for hemoglobin A.

As shown in Figure 6, even at pH 8.0 the IHP treated versus stripped deoxyhemoglobin difference spectrum was much smaller than that observed previously for hemoglobin Bethesda and only slightly greater than that often observed for highly purified stripped hemoglobin A.¹⁶ A variety of other experiments were performed in an attempt to observe changes in the Soret absorption spectrum of deoxyhemoglobin Hiroshima which could be correlated with a change from rapidly reacting behavior to that characteristic of normal, slowly reacting deoxyhemoglobin A. However, in no case was a significant change analogous to that seen with hemoglobin Bethesda observed. Thus, it would appear that ligand binding to deoxyhemoglobin Hiroshima cannot be readily explained in terms of a pre-existing equilibrium between a rapidly reacting (defined in this sense as a liganded or chainlike conformation²⁴) and a slowly reacting deoxy form.

DISCUSSION

On the basis of crystallographic studies in the absence and presence of ligands, hemoglobin may be considered to exist in at least two distinct conformational states which are normally designated as the deoxy and the liganded structures.^{1,2} Since there is at present no generally acceptable model for hemoglobin-ligand interaction, it is convenient, for purposes of comparison, to assign those parameters which describe the binding of the first ligand molecule ($\text{Hb}_4 + \text{X} \rightleftharpoons \text{Hb}_4\text{X}$) to the deoxy structure and those which describe the binding of the last molecule ($\text{Hb}_4\text{X}_3 + \text{X} \rightleftharpoons \text{Hb}_4\text{X}_4$) to the liganded structure.^{16,22} The results in Tables 1 and 3 show that the kinetic properties of fully liganded hemoglobin are modified by the substitution of aspartate for histidine 146 β . This effect is exhibited primarily as a reduction in the rate of

液のみに存在していたかによって左右されることが認められている。¹⁶ この現象によって、溶液中における還元型ヘモグロビン Bethesda の構造は、配位結合型ヘモグロビン A に類似する速度論的特性、サブユニット解離特性および吸光特性を示すことが発見されるようになった。ヘモグロビン Hiroshima と一酸化炭素との結合について同様の実験を行なった結果、図 5 に示すように、CO 結合速度と比較することによって IHP の効果が瞬間的に現われないのは pH 8.0 においてのみであることがわかる。pH 6.0 および 7.0 では、この有機リン酸塩の還元型ヘモグロビンに対する影響は、混合から最高 2 msec 後に現われる。Gray および Gibson²³ は、ヘモグロビン A について同様の結果を認めている。

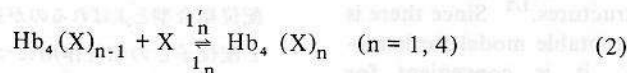
図 6 に示すように、IHP 処理—リン酸塩除去還元型ヘモグロビン差スペクトルは、pH 8.0 においてさえもヘモグロビン Bethesda について以前に観察されたよりもはるかに小さく、また、高度精製のリン酸塩除去ヘモグロビン A についてしばしば観察されている¹⁶ よりも、わずかに大きいことが認められた。そのほか種々の実験を行なって、反応速度の早い態度から正常な還元型ヘモグロビン A の示すような反応速度の遅い態度への変換と関係のあるような Soret 吸収スペクトルの変化が還元型ヘモグロビン Hiroshima に検出できるか否かを検討した。ところが、ヘモグロビン Bethesda に認められるような有意な変化は全くなかった。したがって、還元型ヘモグロビン Hiroshima の配位結合は、反応速度の早い還元型構造（これは配位結合型または鎖状構造を指す²⁴）と反応速度の遅い還元型構造の平衡分布によって説明が困難であると思われる。

考 察

配位子の欠如および存在下における結晶解析の研究によれば、ヘモグロビンは少なくとも 2 種類の明確な構造状態の形で存在すると考えられ、それぞれ還元型および配位結合型とよばれるのが通常である。^{1,2} ヘモグロビンと配位子との相互作用について一般的に認められるようなモデルがまだないので、比較の目的のためには、第 1 番目の配位子分子の結合 ($\text{Hb}_4 + \text{X} \rightleftharpoons \text{Hb}_4\text{X}$) を説明するパラメーターを還元型構造にあてはめ、また、最後の分子の結合 ($\text{Hb}_4\text{X}_3 + \text{X} \rightleftharpoons \text{Hb}_4\text{X}_4$) を説明するパラメーターを配位結合型構造にあてはめると便利である。^{16,22} 表 1 および表 3 における結果は、完全に配位結合したヘモグロビンの速度論的特性が histidine 146 β の aspartate 置換によって修飾されることを示す。その影響は、配位結合

dissociation of the first oxygen or *n*-butyl isocyanide molecule from the β -chains within the liganded tetramer. In the case of oxygen at pH 7.0, the α chain dissociation rate for hemoglobin Hiroshima also appears to be smaller than that observed for hemoglobin A (Table 1). In contrast, the rates of the reaction of the last carbon monoxide or *n*-butyl isocyanide molecule with hemoglobin Hiroshima are either equal to or greater than the rates observed in similar partial photolysis experiments with hemoglobin A. These results suggest that the equilibrium constant for the binding of the fourth ligand molecule to hemoglobin Hiroshima is at least two times greater than that for hemoglobin A. This contrasts with previous results with hemoglobin Bethesda, which when fully liganded, exhibits properties that are identical to those of hemoglobin A. Thus, while the mutation from histidine to aspartate 146 β does affect the ligand binding properties of liganded hemoglobin, the change from tyrosine to histidine 145 β (Bethesda) does not. This finding is not readily explicable in terms of atomic structure since these C-terminal residues are not visible even in high resolution electron density maps of oxy-hemoglobin.¹ However, the difference between liganded hemoglobins A and Hiroshima is small in comparison with the dramatic effect this mutation has on the properties of deoxyhemoglobin.

In contrast to the last step in ligand binding, the first step, $\text{Hb}_4 + \text{X} \rightleftharpoons \text{Hb}_4\text{X}$, is not readily obtained by direct experiment since the remaining three steps inevitably influence the time course for the binding of ligands to deoxyhemoglobin. When deoxy-hemoglobin is mixed with ligands, the initial rate must primarily represent the first association reaction, but an exact determination of the appropriate kinetic parameters requires the use of curve fitting procedures. In the absence of a specific model, the usual procedure is to account for the results in terms of a 4-step Adair¹⁸ scheme,



in which the kinetic parameters for the combination of the first three ligand molecules are allowed to vary and those for the last ligand molecule are fixed independently by CO replacement and partial photolysis experiments.^{9, 11, 15, 18, 19, 22} Recently the application of such statistical schemes to the reactions of hemoglobin with oxygen,⁹ carbon monoxide,¹⁸ and *n*-butyl isocyanide²² has met with

型四量体中における β 鎖の第1番目の酸素分子または *n*-butyl isocyanide 分子の解離速度の低下として現われる。pH 7.0におけるヘモグロビン Hiroshima の α 鎖の酸素解離速度はヘモグロビン A に比べて遅いようである(表1)。一方、ヘモグロビン Hiroshima と最後の一酸化炭素分子あるいは *n*-butyl isocyanide 分子との反応速度は、同様の部分的光分解実験でヘモグロビン A について認められている反応速度に等しいか、または、大である。これらの結果から、ヘモグロビン Hiroshima と第4番目の配位子との結合の平衡定数はヘモグロビン A に比べて少なくとも2倍であることが示唆される。このことは、完全に配位結合した時の特性がヘモグロビン A に等しいと認められているヘモグロビン Bethesda についての以前の結果と対照的である。したがって、 β 鎖146位の histidine が aspartate に突然変異すると配位結合型ヘモグロビンの配位結合動態に影響を及ぼすのに対して、 β 鎖145位の tyrosine が histidine に変わった場合(ヘモグロビン Bethesda)には影響は及ぼさないようである。これらのC末端残基は酸化型ヘモグロビンの高分解能電子密度分布図においてさえも現われないので、¹ この所見については原子構造の見地からは説明が困難である。しかし、配位結合型のヘモグロビン A とヘモグロビン Hiroshima との間の差異は、還元型ヘモグロビンに対してこの突然変異が及ぼす劇的な影響に比べると小さい。

配位結合の最終段階の場合とは異なり、その第1段階 $\text{Hb}_4 + \text{X} \rightleftharpoons \text{Hb}_4\text{X}$ を実験から直接求めることは困難である。すなわち、残りの3段階は必然的に還元型ヘモグロビンの配位結合の時間的経過を左右するからである。還元型ヘモグロビンと配位子を混合した時の初期反応速度は主として第1番目の配位子分子との会合反応を反映しているに違いないであろうが、適当な速度論的パラメーターの厳密な決定には曲線あてはめ処理の使用を必要とする。特異的なモデルがないので、次の Adair¹⁸ の4段階図式に基づいて結果の説明を行なうことが通例の方法になっている。

これでは、最初の三つの配位子分子の結合に関する速度論的パラメーターは変化するが、最後の配位子分子に関するパラメーターは CO 置換や部分的光分解実験に基づいて独立に固定される。^{9, 11, 15, 18, 19, 22} 最近、酸素、⁹ 一酸化炭素¹⁸ あるいは *n*-butyl isocyanide²² とヘモグロビンとの反応にこの種の統計的図式を応用してある程度の

some degree of success. Unfortunately, the reactions of CO and *n*-butyl isocyanide with deoxyhemoglobin Hiroshima exhibit time courses which are so markedly different from those observed for deoxyhemoglobin A that an appropriate starting point for such curve fitting procedures was not evident. For example, at pH 7 carbon monoxide binding to deoxyhemoglobin A exhibits an accelerating time course, but carbon monoxide binding to deoxyhemoglobin Hiroshima exhibits a decelerating time course in spite of the fact that the value of $1'_4$ (defined by Equation 2) is the same for both compounds.

The fact that the normalized progress curves for CO binding to deoxyhemoglobin Hiroshima are independent of the wavelength of observation would appear to rule out the possibility of α - β chain differences. The biphasic kinetic behavior could be attributed to the presence of two or more deoxy conformers which interconvert at rates which are slow with respect to the rate of CO binding. Cassoly and Gibson* have demonstrated the presence of such behavior for one of the cyanomet valence hybrids by measuring the time course of CO binding to these compounds as a function of ligand concentration. They found that the rates in the progress curves for $(\beta^{\text{III}} \text{CN}\alpha^{\text{II}})_2$ decreased less than proportionately as the CO concentration was lowered. Analogous experiments with hemoglobin Hiroshima are shown in Figure 7. If two slowly equilibrating deoxy species are present, the second order rates observed in the progress curves, particularly toward the end of the reaction, should increase as the concentration of CO and, therefore, the absolute velocity of the reaction is lowered. As shown in Figure 7, the normalized time course for CO binding to deoxyhemoglobin Hiroshima is independent of ligand concentration over the range 3-46 μM . This result does not rule out the possibility of two or more deoxy conformers, but if they do exist, their rate of interconversion is extremely slow, less than 0.1 sec^{-1} .

In view of the recent work of MacQuarrie and Gibson,¹⁸ there is yet another explanation of the decelerating CO binding time course. They found that the rate of binding of the first CO molecule to deoxyhemoglobin A is more dependent on pH than the rate of binding of the next two ligand molecules. At alkaline pH values, the intrinsic value of $1'_4$ (taking statistical factors into account)

成功をおさめている。残念ながら、還元型ヘモグロビン Hiroshima と CO あるいは *n*-butyl isocyanide との結合反応の時間的経過がヘモグロビン A と著しく異なるため、この種の曲線あてはめ処理の適当な出発点が判然としなかった。たとえば、両化合物の $1'_4$ (式 2 で定義されている) の値が同じであるにもかかわらず、pH 7 における還元型ヘモグロビン A と CO との結合が加速的な時間的経過を示すのに対し、還元型ヘモグロビン Hiroshima と CO との結合は減速的な時間的経過を示している。

還元型ヘモグロビン Hiroshima と CO との結合の正規化反応曲線が波長依存性を示さないことは、 α 、 β 鎖間に差異がある可能性を否定しているように思われる。速度論的動態が 2 相性を示すことは、CO 結合に関して相互転化速度の遅い還元型構造が 2 種類またはそれ以上存在することによって説明できるかもしれない。Cassoly および Gibson* は、シアンメト化した valence 雑種ヘモグロビンと CO との結合の時間的経過を配位子濃度の関数として測定し、その一種がこのような態度を示すことを明らかにした。かれらは、 $(\beta^{\text{III}} \text{CN}\alpha^{\text{II}})_2$ で反応曲線の反応速度の減少が CO 濃度の低下に比べて少ないことを認めた。ヘモグロビン Hiroshima を用いて同様な実験を行なった結果を図 7 に示した。徐々に平衡状態に達する還元型構造が 2 種類存在するならば、反応曲線における 2 次反応速度は、特に反応の終わりごろでは、CO の濃度とともに増加するはずであり、したがって、反応の絶対速度も低下するであろう。図 7 に示したように、還元型ヘモグロビン Hiroshima と CO との結合の正規化した時間的経過は、3-46 μM の範囲では配位子濃度とは独立である。この結果は還元型構造が 2 種類以上存在する可能性を否定するものではなく、存在するならば、その相互転化の速度が非常に遅く、 0.1 sec^{-1} 以下であることを示している。

MacQuarrie および Gibson¹⁸ の最近の研究によれば、CO 結合の時間的経過が減速的であることに對して今一つの説明が考えられる。かれらは、還元型ヘモグロビン A と第 1 番目の CO 分子との結合速度は、その次の二つの配位子分子との結合速度に比べて pH 依存性が強いことを認めた。アルカリ性域の pH では、(統計的因子を考慮し

*Cassoly, R. and Gibson, Q.H., manuscript in preparation.

actually becomes larger than the value of l'_3 , and the value of l'_2 is found to be greater than either l'_1 or l'_3 at each pH studied.¹⁸ As they suggested, an extension of their results could account for the decelerating behavior that has been reported for hemoglobin A at pH 9.1.¹⁷ In effect, the first two CO molecules are bound at fairly high rates while the rate of binding of the third molecule is slower, accounting for the deceleration observed near the end of the reaction. An effect of this sort could also explain the behavior of deoxyhemoglobin Hiroshima since, as noted before, the progress curves for CO binding to this mutant hemoglobin at pH 7 are very similar to those observed for CO binding to deoxyhemoglobin A at pH 9.1. For example, when the series of curves shown in Figure 8 were fitted to Equation 2 using the procedures of MacQuarrie and Gibson,¹⁸ the following rate constants (expressed in units of $\mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$) were obtained: $l'_1 = 3.068 \pm 0.292$, $l'_2 = 4.972 \pm 1.21$, $l'_3 = 0.6067 \pm 0.016$, l'_4 was fixed at 6.0 and the mean residual for 114 data points was ± 0.003 absorbance units for total observed changes of the order of 0.250. An interpretation of these fitted results requires that those species to which two ligands are bound, Hb_4X_2 , react more slowly with carbon monoxide than deoxyhemoglobin. Such a result is not immediately explicable in terms of Perutz's stereochemical mechanism¹ and contradicts the predictions made by the Monod-Wyman-Changeux model^{24,25} which requires a monotonic increase in the four intrinsic rate constants.* The

た場合の) l'_1 の真性値が実は l'_3 の値よりも高くなり、また、実験の行なわれたいずれの pH においても、 l'_2 の値が l'_1 および l'_3 より高いものと認められた。¹⁸ かれらが示唆したように、これらの結果を延長することによって、ヘモグロビン A が pH 9.1 で示す減速的な動態が説明できるかもしれない。¹⁷ つまり、最初の二つの CO 分子の結合速度がかなり早いのにに対して第 3 番目の分子の結合速度が遅いことによって、反応の終わりごろにみられる減速が説明できるであろう。還元型ヘモグロビン Hiroshima の示す動態もこれと同様の影響によって説明できるかもしれない。すなわち、前述のように、この変異型ヘモグロビンの pH 7.0 での CO 結合の反応曲線が pH 9.1 における還元型ヘモグロビン A と CO との結合反応に非常に類似しているからである。たとえば、図 8 に示した一連の曲線を MacQuarrie および Gibson¹⁸ の方法に従って 2 式にあてはめると次の反応速度定数 (単位は $\mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$) が得られた: $l'_1 = 3.068 \pm 0.292$, $l'_2 = 4.972 \pm 1.21$, $l'_3 = 0.6067 \pm 0.016$. なお、 l'_4 は 6.0 に固定した。また、観察された 0.250 程度の全変動に対して 114 か所の資料点の平均残差は ± 0.003 吸光度単位であった。このようなあてはめから求めた結果の解釈では、2 個の配位子と結合した型、 Hb_4X_2 の CO との結合反応が還元型ヘモグロビンに比べて遅いものと考えなければならない。この結果は Perutz の立体化学的機構¹ からただちに説明できないし、また、四つの真性の反応速度定数が単調な増加を示すことを前提とする Monod-Wyman-Changeux のモデル^{24,25} から予想される結果とも一致しない。* これに代わる説明としては、相互転化が非常に遅い還元型構

*The rate constants given in the text for a description of carbon monoxide binding to deoxyhemoglobin Hiroshima are defined as second order binding constants for the tetrameric species shown in Equation 2. In order to convert these numbers to the values of the intrinsic rate constants, which are defined on a per heme basis, they must be divided by the number of unoccupied heme sites in the tetrameric species on the left hand side of Equation 2. Thus, the intrinsic CO association rate constants for the intermediates Hb_4 , $\text{Hb}_4(\text{CO})$, $\text{Hb}_4(\text{CO})_2$ and $\text{Hb}_4(\text{CO})_3$ are 0.767 ± 0.073 ($l'_1/4$), 1.657 ± 0.406 ($l'_2/3$), 0.303 ± 0.008 ($l'_3/2$) and 6.0 (l'_4) $\mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$, respectively. Any type of two state allosteric model which assumes that the T to R transition is rapid with respect to the rate of ligand binding, requires a monotonic increase in these parameters. The exact relationship is fixed by the values of L , l'_T and l'_R where l'_T and l'_R are the CO binding rate constants of the T and R states and L is the isomerization constant for the T to R transition. Such a model predicts that the time course of the reaction will always exhibit acceleration except when L is extremely large or extremely small, in which cases the time courses will be exponential with half times equal to either $\ln 2/l'_T$ or $\ln 2/l'_R$, respectively. Thus, this model can only accommodate the decelerating behavior shown in Figure 8, if either the α or β chains are not equivalent or the R and T states interconvert very slowly. The former condition is ruled out by the lack of wavelength heterogeneity, and the latter condition cannot, at present, be demonstrated.

本文で還元型ヘモグロビン Hiroshima と一酸化炭素との結合を記述するために用いた速度定数は、式 2 における四量体構造に対する二次反応結合定数であると定義する。これからヘム当たりの真性の速度定数を求めるためには、それを式 2 の左辺における四量体構造中の未結合ヘム部位の数で割らなければならない。したがって、中間段階の Hb_4 , $\text{Hb}_4(\text{CO})$, $\text{Hb}_4(\text{CO})_2$ および $\text{Hb}_4(\text{CO})_3$ の真性の CO 会合速度定数は、それぞれ 0.767 ± 0.073 ($l'_1/4$), 1.657 ± 0.406 ($l'_2/3$), 0.303 ± 0.008 ($l'_3/2$) および 6.0 (l'_4) $\mu\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$ である。配位結合速度の点に関して、T から R への変換が急速であることを前提とするところのいかなる二状態アロステリックモデルも、これらのパラメーターにおける単調的増加を必要とする。その厳密な関係は L , l'_T および l'_R の値で決まる。ここで、 l'_T および l'_R はそれぞれ T および R 様態の CO 結合速度定数であり、 L は T から R への変換の異性化定数である。このようなモデルでは、反応の時間的経過が常に加速的であることが予想される。ただし、 L が非常に高値、または、非常に低値である場合には、その時間的経過は指数関数的で、半減期は $\ln 2/l'_T$ または $\ln 2/l'_R$ に等しい。したがって、 α , β 鎖が同等でないか、R および T 様態の相互転化が非常に遅いならば、このモデルは図 8 に示した減速的動態のみを満足させる。前者の状態は波長異種性がないことによって否定され、後者の状態は現在のところ証明されていない。

only alternative to this explanation is the presence of substantial populations of two or more deoxy conformations which interconvert extremely slowly, and this idea is equally, if not more incompatible with present models of hemoglobin-ligand interaction. Further, if the idea of two or more slowly interconverting conformations is accepted, at least one of these forms must be distinct from the postulated deoxy and liganded states of hemoglobin A^{24,25} since, as shown in Table 2, the rate of the fast component observed for carbon monoxide binding is intermediate between that seen in the partial photolysis experiments and the rate of CO binding to deoxyhemoglobin A.

The kinetic properties of the *n*-butyl isocyanide reaction with deoxyhemoglobin Hiroshima are even more puzzling. At pH 7.0 in the absence of phosphates, hemoglobins A and Bethesda represent extremes of kinetic behavior, the former exhibiting a high degree of cooperativity and the latter none.¹⁶ In both of these cases, the time courses for *n*-butyl isocyanide binding are biphasic and spectrally heterogeneous, with the two kinetic components being identifiable with the α and β chains.^{16,22} In contrast, the time courses for *n*-butyl isocyanide binding to deoxyhemoglobin Hiroshima are almost exponential and exhibit little or no spectral heterogeneity. Evidently the α and β chains within deoxyhemoglobin Hiroshima react with this ligand at similar apparent rates. Further, the observed second order rates, about $18 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ in 0.05 M bis-tris, pH 7.0, are not directly comparable to any of the rates that have been reported for the chains within hemoglobin A.²² Under identical conditions, the β chain association rate for the binding of the first three isocyanide molecules to hemoglobin A has been reported to be $44 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. The β chain association rate for the last molecule is $240 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Table 4). The corresponding α chain association rates have been designated as $0.4 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ for the binding of the first two isocyanide molecules, $3.8 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ for the third, and $35 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ for the last. Thus, the rates of *n*-butyl isocyanide binding to both chains within deoxyhemoglobin must be modified by the substitution of aspartate for histidine 146 β .

In contrast to previous work with hemoglobin A,²² the shapes of the progress curves for *n*-butyl isocyanide binding are independent of ligand concentration as long as complete saturation is achieved (Figure 8). At lower ligand concentrations, the apparent second order rates become smaller indicating some degree of subunit interaction as one would expect from the equilibrium results shown in

造が2種類以上あって、かなりの集団を形成して存在するものと考えられる以外はないが、この考え方も、上記のものと同様に、ヘモグロビン-配位子相互作用に関する現在のモデルと矛盾している。なお、相互転化の遅い構造が2種類以上あるという考えを容認するならば、その少なくとも1種類は、ヘモグロビンAの還元型および配位結合型について現在推測されている構造とは異なる状態にあるに違いないであろう。^{24,25} すなわち、表2に示したように、CO結合でみられた早い成分の反応速度は、部分的光分解実験における結果と還元型ヘモグロビンAについて認められたCO結合速度との中間にある。

還元型ヘモグロビン Hiroshima と *n*-butyl isocyanide との結合反応の速度論的特性はまさに難題である。pH 7.0においてリン酸塩除去の場合にはヘモグロビンAとヘモグロビン Bethesda の動態は、両極端を示し、前者は高度の協同性を示すのに対して後者は協同性を全く示さない。¹⁶ 両者とも、*n*-butyl isocyanide との結合反応の時間的経過は二相性で、分光学的にも異質性を示し、その二つの速度論的成分は α および β 鎖と同定される。^{16,22} これに対して、還元型ヘモグロビン Hiroshima と *n*-butyl isocyanide との結合反応の時間的経過はほぼ指数関数的で、分光学的に異質性がほとんど、または、全く認められない。還元型ヘモグロビン Hiroshima における α および β 鎖とこの配位子との結合反応速度は見かけ上類似していることが明らかである。そのうえ、0.05 M bis-tris, pH 7.0で観察された約 $18 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ の二次反応速度は、ヘモグロビンAの両鎖について報告されているいずれの反応速度とも直接比較ができない。²² 同条件下におけるヘモグロビンAと最初の三つの isocyanide 分子との β 鎖会合速度は $44 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ であると報告されている。最後の分子との β 鎖会合速度は $240 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ である(表4)。これに対応する α 鎖会合速度は、最初の二つの isocyanide 分子との結合が $0.4 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、第3番目の分子が $3.8 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、最後のそれが $35 \text{ mM}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ であるとされている。したがって、還元型ヘモグロビンにおける両鎖と *n*-butyl isocyanide との結合速度は、histidine 146 β の aspartate 置換によって修飾されたに違いないであろう。

n-butyl isocyanide との結合においては、完全飽和が達成される限り、その反応曲線の形が配位子濃度とは無関係であると認められたことは、ヘモグロビンAに関する以前の研究の結果²²とは対照的である(図8)。配位子濃度が低い場合、見かけ上の二次反応速度は小さくなり、表3に示した平衡試験の結果からも予想されるように、

Table 3. The results in Figure 8 also indicate that the dissociation velocity constants must be small ($1-2 \text{ sec}^{-1}$ or less) since proportionality with ligand concentration is observed over a 30-fold range during the initial stages of the reaction. This is in contrast with data reported for stripped hemoglobin A at pH 7.0 in which a 10 sec^{-1} dissociation constant attributable to β chains can be demonstrated. As shown in Figure 8, there is no evidence for two slowly interconverting deoxy forms, but again, this negative result does not rule out the possibility of such a situation.

In spite of the fact that, at present, no satisfactory quantitative interpretation of both the CO and the n-butyl isocyanide binding results has been found, certain positive statements can be made. It is quite clear from the results in Figures 2 and 4 that phosphates are able to convert stripped deoxy-hemoglobin Hiroshima into a conformer whose kinetic properties are similar to those of hemoglobin A. This ability of phosphates, especially inositol hexaphosphate, to produce kinetic behavior characteristics of native hemoglobin, is shown by several high affinity hemoglobins and is observed even for hemoglobin Bethesda which exhibits the highest affinity for oxygen of any mutant hemoglobin so far examined. In terms of Perutz's model,¹ phosphates are thought to stabilize the deoxy structure by forming additional salt linkages between the positively charged amino acid residues present in the cavity between the two β subunits. Indeed, in the cases of des (his 146 β) hemoglobin,* hemoglobin Bethesda, and hemoglobin Hiroshima, these organic phosphates appear to be able to make up for the loss of the salt linkages at the C-termini of the β chains, and produce deoxy species whose kinetic and equilibrium properties resemble those of native hemoglobin A.

The properties of the CO and n-butyl isocyanide binding reactions shown in Figures 7 and 8 are not unique to stripped hemoglobin Hiroshima but seem to represent a general phenomenon which is characteristic of hemoglobin samples whose affinities for oxygen are intermediate between those of the isolated chains and that of stripped hemoglobin A at pH 7.0. Virtually identical kinetic behavior has been observed for des (his 146 β) hemoglobin* in 0.05 M bis-tris, pH 7.0, des (arg 141 α) hemoglobin** in 0.1 M P_i , pH 7.0, and stripped hemoglobin A in

ある程度のサブユニット相互作用があることが示唆される。また、図8の結果も反応の初期に30倍希釈までの範囲の配位子濃度と比例関係を示すので、解離速度定数は小さいに違いないと推測される ($1-2 \text{ sec}^{-1}$ 以下)。これに対し、既報の資料によれば、pH 7.0でリン酸塩除去ヘモグロビンAにおける β 鎖に起因する解離速度定数は 10 sec^{-1} であることが認められている。図8に示したように、相互転化の緩慢な還元型構造が2種類あるという証拠はみられないが、この場合にも、この陰性の結果によってそのような状態の存在する可能性が否定されるものではない。

COあるいはn-butyl isocyanideとの結合に関する結果について満足すべき定量的解釈がまだ見いだされていないにもかかわらず、いくつかの結論を導くことはできる。図2および図4に示した結果から明らかなように、リン酸塩除去の還元型ヘモグロビン Hiroshima は、リン酸塩添加によってヘモグロビンAに類似する速度論的特性をもつ構造に変換される。そのほかに数種の酸素親和性の高いヘモグロビンもリン酸塩、特に IHP の添加によって正常なヘモグロビンと同様の速度論的特性を示すようになることが認められており、現在までに研究された変異型ヘモグロビンの中で酸素親和性が最も高いヘモグロビン Bethesda においてもその効果が認められている。Perutz のモデル¹の観点からすれば、リン酸塩は、両 β 鎖サブユニット間の空洞内に存在する陽性荷電のアミノ酸残基の間にさらに塩結合を形成することによって還元型を安定化するものと推測される。この種の有機リン酸塩が脱(his 146 β)ヘモグロビン、*ヘモグロビン Bethesda およびヘモグロビン Hiroshima の β 鎖C末端における塩結合を補って、正常のヘモグロビンAに類似した速度論的特性および平衡特性をもつ還元型構造が形成されることは確かである。

図7および図8に示したCOとn-butyl isocyanideとの結合反応の特性は、リン酸塩除去ヘモグロビン Hiroshima に特有なものではなく、pH 7.0において単離鎖とリン酸塩除去ヘモグロビンAとの中間の酸素親和性を示すヘモグロビン標本に特徴的な一般的現象であるように思われる。0.05 M bis-tris, pH 7.0における脱(his 146 β)ヘモグロビン、* 0.1 M P_i , pH 7.0における脱(arg 141 α)ヘモグロビン** および0.05 M 硼酸塩, pH 9.1におけるリン酸塩除去ヘモグロビンA^{17,22}は、ほぼ等しい速度論的動態を示すことが認められている。したがって、この

*Olson, J.S., Moffat, J.K., Kilmartin, J. and Gibson, Q.H., unpublished results.

**J.A. Hewitt, Q.H. Gibson, unpublished results.

0.05 M borate, pH 9.1.^{17,22} Thus, chemical heterogeneity appears to be ruled out as a cause for this anomalous behavior since it is highly unlikely that the above similarities are merely a coincidence.

MacQuarrie and Gibson¹⁸ have used the fluorescent compound 8-hydroxy-1, 3, 6-pyrene trisulfonate as an analogue of 2, 3-diphosphoglycerate to study anion release during carbon monoxide binding. This release occurs late in the reaction with hemoglobin A at pH 6.0, presumably after three carbon monoxide molecules have been bound, and begins to occur earlier as the pH is raised.¹⁸ Perutz¹ has suggested that 2, 3-diphosphoglycerate, and therefore presumably this analogue, is bound to the N-termini of the β chains within deoxyhemoglobin and is released when these groups move farther apart during the quaternary change to the liganded conformation. This observation led MacQuarrie and Gibson¹⁸ to postulate that the release of the fluorescent analogue reflects the overall quaternary change during ligand binding. Their observation of approximate proportionality between CO binding and anion release at high pH suggested that the point at which the major change from a deoxy to a liganded structure occurs relatively early during the reaction, probably after two ligand molecules are bound.¹⁸

Similar proportionalities between ligand binding and anion release were observed for des (his 146 β) hemoglobin and hemoglobin Hiroshima.¹⁸ These results are readily explained by Perutz's model. Either the deprotonation at high pH or the removal of histidine 146 β should cause the disruption of the salt linkage to asp 94 β and thereby destabilize the deoxy structure, allowing the transition to the liganded structure to occur after fewer molecules have been bound. Although quantitative correlations between the kinetic results and the structural model are not possible at present, it is important to note that Perutz's model also predicts that the detailed kinetic features of ligand binding to hemoglobin Hiroshima, des (his 146 β) hemoglobin, and hemoglobin A at high pH should also be similar since the structural effects of these modifications are thought to be the same,¹ and indeed this is found to be true.

Perhaps the most interesting consequence of the kinetic results presented here is that they suggest the existence of a hemoglobin conformation which is distinct from that of either deoxy or liganded hemoglobin A. The relatively rapid initial rate of CO binding to stripped deoxyhemoglobin Hiroshima at pH 7.0 cannot be explained solely in terms of an

近似性が偶然にすぎないという可能性は非常に少ないので、この異常動態が化学的異質性に起因する可能性が否定されるであろう。

MacQuarrie および Gibson¹⁸ は、DPG の同族体として蛍光物質である 8-hydroxy-1, 3, 6-pyrene trisulfonate を用いて一酸化炭素結合の際の陰イオン放出を検討した。pH 6.0 では、ヘモグロビン A との反応の後期、すなわち、おそらく三つの一酸化炭素分子との結合が完了した後にこの陰イオン放出が起こり、これは pH が高くなるにつれて早くなる。¹⁸ Perutz¹ によれば、DPG およびこの同族体も還元型ヘモグロビンにおける β 鎖の N 末端と結合するものであり、配位結合型構造への 4 段階変換の際に両群が互いに離れた時に放出されるものと推測される。このことから、MacQuarrie および Gibson¹⁸ は、この蛍光性同族体の放出が配位結合の際の 4 段階変換全体を反映しているであろうと推論した。pH が高い場合に CO 結合と陰イオン放出との間にほぼ比例的な関係が認められたことは、還元型から配位結合型構造へのおもな変換が反応の比較的早い時期に起こるものであり、それはおそらく配位子が 2 分子結合した後に起こるのであるということを示唆している。¹⁸

脱 (his 146 β) ヘモグロビンおよびヘモグロビン Hiroshima においても配位子の結合と陰イオン放出との間に同様な比例関係が認められている。¹⁸ これらの結果は Perutz のモデルで容易に説明できる。高い pH における脱陽子あるいは histidine 146 β 除去のいずれでも aspartate 94 β の塩結合の破壊が起こるはずであり、それは還元型構造を不安定にし、もっと少数の分子と結合した時に配位結合型構造への変換が起こるようになる。現在はこれらの速度論的な成績と構造モデルとの定量的な相関関係を決定できないが、Perutz のモデルによれば、この種の修飾の構造的影響が同じであると考えられるので、¹ ヘモグロビン Hiroshima, 脱 (his 146 β) ヘモグロビンおよび高い pH におけるヘモグロビン A と配位子との結合反応の細かい速度論的特性も同じであろうと予想され、事実はそのとおりであることが認められている。

ここに報告した速度論的成績の最も興味ある点は、還元型あるいは配位結合型ヘモグロビン A とは明確に異なるヘモグロビン構造の存在を示唆していることであろう。pH 7.0 におけるリン酸塩除去還元型ヘモグロビン Hiroshima と CO との結合反応の初期速度が比較的早いことは、配位

equilibrium population of liganded and deoxy-hemoglobin A-like conformations (defined, in this case, in a manner analogous to the R and T states of the two-state allosteric model^{24,25}) chiefly because of the high degree of cooperativity observed in the equilibrium binding results (Table 3) and the lack of evidence for deoxy species which exhibit a depressed Soret absorption spectrum (Figure 6). The apparent absence of α - β chain differences in the n-butyl isocyanide reaction is further evidence for a new conformation since such differences are readily demonstrable in both deoxy and liganded hemoglobin A. These arguments do not require a quantitative interpretation of the kinetic results, and hold even if there are populations of slowly interconverting deoxy conformers.

結合型と還元型ヘモグロビンA様構造(ここでは、二様態アロステリックモデルにおけるRおよびTに類似したものとする^{24,25})の平衡分布だけでは説明できない。すなわち、平衡結合に関する成績は高度の協同性を示し(表3)、また、Soret 吸光スペクトルの低下を示す還元型構造が存在する証拠がないからである(図6)。n-butyl isocyanide との結合反応に α - β 鎖間の差が明らかに認められないことは新しい構造に対するいっそうの証拠である。なぜならば、還元型あるいは配位結合型ヘモグロビンAでも、この種の差が容易に証明できるからである。これらの議論は、速度論的成績の定量的解釈を必要とするものではなく、かつ、緩慢な相互転化の還元型構造が分布している場合にでもなりたつものである。

Further proportionality between ligand binding and amino release was observed for the 140 (b) hemoglobin and hemoglobin thiosheme.¹⁹ These results are readily explained by Fanta's model. Higher the deprotonation at high pH or the removal of binding 140 (b) should cause the disruption of the salt linkage to sp 33 and thereby destabilize the deoxy structure, allowing the transition to the liganded structure to occur after fewer protons have been bound. Although quantitative correlations between the kinetic results and the structural model are not possible at present, it is important to note that Fanta's model also predicts that the detailed kinetic features of ligand binding to hemoglobin thiosheme (his 140 (b) hemoglobin and hemoglobin A at high pH should also be similar since the structural effects of these modifications are thought to be the same, and indeed this is found to be true.

Perhaps the most interesting consequence of the kinetic results presented here is that they suggest the existence of a hemoglobin conformation which is distinct from that of either deoxy or liganded hemoglobin A. The relatively rapid initial rate of CO binding to stripped deoxy hemoglobin thiosheme at pH 7.0 cannot be explained solely in terms of an

TABLE 1 REPLACEMENT OF OXYGEN FROM SATURATED OXYHEMOGLOBIN BY CARBON MONOXIDE

表1 酸素飽和のヘモグロビンにおける酸素の一酸化炭素との置換

The rate constants for the dissociation of oxygen from saturated oxyhemoglobin were calculated using the procedures described by Olson et al.¹⁵ The values for Hb A are taken from Reference.¹⁵ The reaction conditions for both types of hemoglobin were either 0.05 M P_i , pH 7.0, or 0.05 M borate, pH 9.1, both at 20°. The time courses for the replacement reactions of oxyhemoglobin Hiroshima at pH 7 and 9 were identical so that the values of the rate constants obtained at pH 7.0 also apply at pH 9.0.

酸素飽和ヘモグロビンにおける酸素の解離速度定数は Olson ら¹⁵ の記述した方法を用いて計算した。Hb A の値は文献から求めた。¹⁵ 反応の条件は両ヘモグロビンとも 0.05 MP_i, pH 7.0 または 0.05 M ホウ酸, pH 9.1 で、ともに 20° における反応であった。酸化型ヘモグロビン Hiroshima の置換反応の時間的経過は pH 7 でも pH 9 でも全く同じであったので、pH 7.0 で計算した速度定数は pH 9.0 にもあてはまる。

Hemoglobin	pH	k_a	$1'_a / k'_a$	k_β	$1'_\beta / k'_\beta$
Hb A	7	13.1 ± 0.80	0.15 ± 0.010	21.1 ± 1.40	0.15 ± 0.010
	9	6.4 ± 0.10	0.25 ± 0.006	16.7 ± 0.59	0.17 ± 0.007
Hb-Hiroshima	7	5.1 ± 0.50	0.43 ± 0.070	11.0 ± 1.90	0.24 ± 0.060

TABLE 2 THE REACTION OF STRIPPED DEOXYHEMOGLOBIN WITH CO IN THE ABSENCE AND PRESENCE OF INOSITOL HEXAPHOSPHATE

表2 Inositol hexaphosphate の欠如および混在下におけるリン酸塩除去還元型ヘモグロビンと CO との結合反応

The values shown represent apparent second order rate constants. In those reactions which exhibited accelerating time courses, the initial rates are given. In those which exhibited biphasic time courses, the data were fitted to Equation 1, and the resultant values of the exponents are shown. The values for Hb A were taken from Reference 11 and the values for Hb-Hiroshima from Figure 3. The reaction conditions are given in the legend to Figure 3.

ここに示した値は見かけ上の 2 次反応速度定数である。加速度的な時間的経過を呈した反応では、初期反応速度を示した。二相性の時間的経過を呈したものでは、資料を式 1 にあてはめて指数関数から求めた値を示した。Hb A の値は文献 11 から入手したものであり、Hb Hiroshima の値は図 3 から求めた。反応の条件は図 3 の凡例に示した。

Hemoglobin	Condition	Components	% fast	$1'_{fast}$ $\times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	$1'_{slow}$ sec^{-1}
Hb A	pH 7.0	1	—	—	2.1
	pH 7.0, IHP	1	—	—	1.0
Hb-Hiroshima	pH 6.0	2	69	11.6	3.0
	pH 6.0, IHP	1	—	—	1.3
	pH 7.0	2	70	10.7	2.3
	pH 7.0, IHP	1	—	—	1.3
	pH 8.0	2	35	27.6	3.9
	pH 8.0, IHP	2	12	8.0	1.0

TABLE 3 EQUILIBRIUM PROPERTIES OF THE REACTION OF N-BUTYL ISOCYANIDE WITH HEMOGLOBIN

表3 ヘモグロビンと n-butyl isocyanide との結合反応の平衡に関する動態

The values of the maximum Hill coefficient, n , and the concentration of free n-butyl isocyanide (BIC) at half-saturation for hemoglobin A were taken from Reference 22. The values for Hb-Hiroshima were obtained under analogous conditions by static titrations using the procedure of Olson and Gibson,¹¹ and represent only single experiments.

ヘモグロビン A における半飽和時の Hill 係数の最大値 n および遊離 n-butyl isocyanide (BIC) 濃度は文献22から求めた。Hb Hiroshima の値は、同条件のもとで Olson および Gibson¹¹ の方法を用いて行なった静力学的滴定法で求めたが、これはわずか1回の実験に基づくものである。

Condition	Hb A		Hb-Hiroshima	
	(BIC) Y=50%	n	(BIC) Y=50%	n
1. Stripped 0.05 M borate, pH 9.1	0.033 mM	1.8	0.013 mM	~1.4
2. Stripped 0.05 M bis-tris, pH 7.0	0.096 mM	2.3	0.025 mM	~1.5
3. Stripped 0.1 M P_i pH 7.0	0.280 mM	2.3	0.050 mM	~2.0
4. Stripped 0.05 M bis-tris, pH 7.0 + IHP	2.34 mM	1.0	0.80 mM	~1.0

TABLE 4 THE BINDING OF THE LAST MOLECULE OF N-BUTYL ISOCYANIDE TO HEMOGLOBIN IN 0.1 M P_i , pH 7.0, 20°表4 0.1 M P_i , pH 7.0, 20°におけるヘモグロビンと最後の n-butyl isocyanide との結合

The values of the rate constants for the dissociation of the first molecule of n-butyl isocyanide from saturated hemoglobin (i'_a and i'_β) were obtained from CO replacement experiments analogous to those described by Olson et al.¹¹ The values of the association constants for the binding of the fourth isocyanide molecule (i_a and i_β) were obtained from partial photolysis experiments.¹¹ The parameters for hemoglobin A were taken from Reference 9. Similar experiments for Hb-Hiroshima were carried out in 0.05 M borate, pH 9.1, and the results showed that, in agreement with the data for Hb A, the values of i'_a , i_a , i'_β and i_β for Hb-Hiroshima appear to be independent of pH. The various rate constants are given as intrinsic constants which are defined on a per heme basis.^{11,22}

飽和状態下のヘモグロビンにおける第1番目の n-butyl isocyanide 分子の解離速度定数 (i'_a および i'_β) は、Olson ら¹¹ と同様の CO 置換反応実験から求めた。第4番目の isocyanide 分子との結合の会合定数 (i_a および i_β) は部分的な光分解実験¹¹ から求めた。ヘモグロビン A に関するパラメーターは文献9から入手したものである。それと同様の実験を Hb Hiroshima について0.05Mホウ酸、pH 9.1において行なった結果、Hb Aの場合と同様、Hb Hiroshima における i'_a , i_a , i'_β および i_β の値は pH と無関係であった。各速度定数は、ヘム当たりとして定義した真性の定数を示した。^{11,12}

Hemoglobin	i'_a (mM ⁻¹ sec ⁻¹)	i_a (sec ⁻¹)	i'_β (mM ⁻¹ sec ⁻¹)	i_β (sec ⁻¹)
Hb A	35	0.16	240	2.00
Hb-Hiroshima	45*	0.16	500*	1.00

*Actual measurements were performed at 25°. The values shown were corrected to 20° by assuming an activation energy of -13.5 Kcal/mole¹⁹ and therefore only represent estimates of i'_a and i'_β for hemoglobin Hiroshima at 20°.

実際の測定は25°で行なった。ここに示した値は、活性化エネルギーを -13.5 Kcal/mole¹⁹ と仮定して20°に補正したものであり、したがって、ヘモグロビン Hiroshima の20°における i'_a および i'_β は推定値を示したにすぎない。

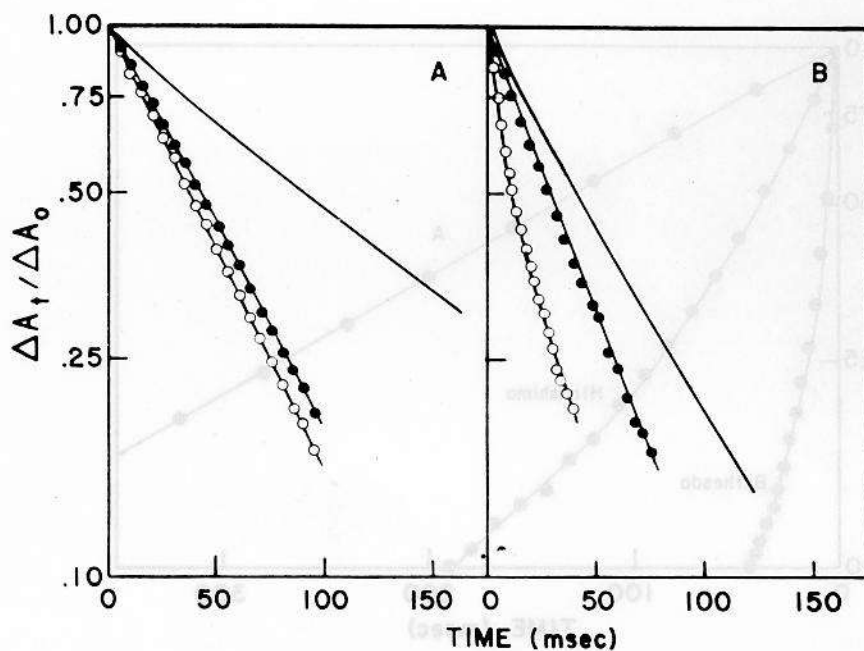


FIGURE 1. Normalized time courses for the reaction of oxyhemoglobin with excess dithionite in the absence and presence of inositol hexaphosphate. Observations were made at 440 nm through a 2 cm path length cell in the stopped flow apparatus. All reactions were carried out with stripped hemoglobin (20 μ M before mixing) in 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20°. Symbols: ●, stripped Hb; ○, stripped Hb plus 60 μ M IHP. The solid lines represent time courses which would be expected if the release of oxygen were noncooperative. A, data for Hb-Hiroshima; B, data for Hb A.

図1. Inositol hexaphosphate の欠如および混在下における酸化型ヘモグロビンと過剰添加した dithionite との反応の正規化時間的経過。観察は断続流体装置の光路長 2 cm のセルを通して 440 nm で行なった。すべての反応は、リン酸塩除去ヘモグロビン（混合前濃度 20 μ M）を用いて 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20° で行なった。記号：●, リン酸塩除去 Hb；○, リン酸塩除去 Hb と 60 μ M IHP。太線は酸素放出が非協同的である場合に予想される時間的経過を示す。A, Hb Hiroshima の資料；B, Hb A の資料。

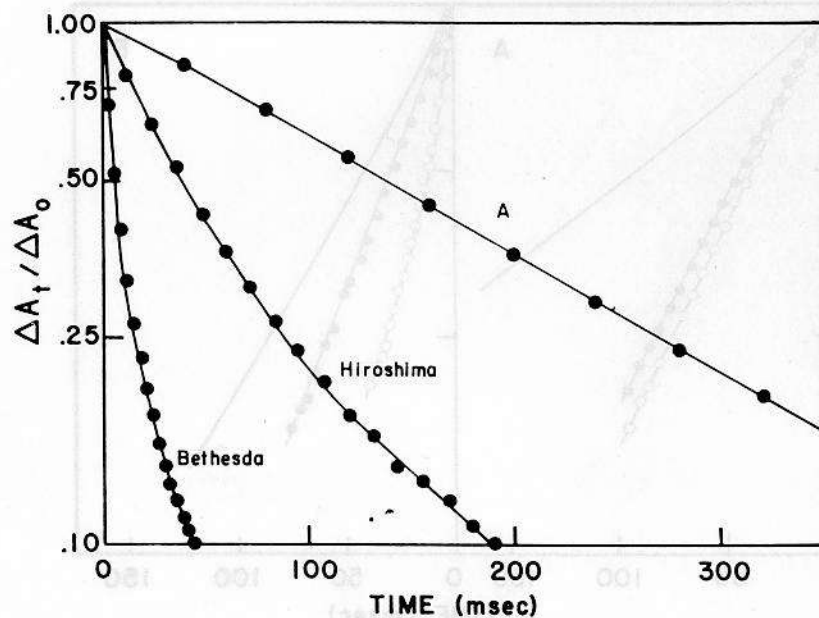


FIGURE 2. Normalized time courses for the reactions of stripped hemoglobins A, Hiroshima, and Bethesda with carbon monoxide in 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20°. Concentrations after mixing were 23 μ M CO and 4 μ M Hb, and observations were made through a 2 cm path length cell at 432 nm.

図2. 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20°におけるリン酸塩除去ヘモグロビンA, ヘモグロビン Hiroshima およびヘモグロビン Bethesda と一酸化炭素との反応の正規化時間的経過. 混合後の濃度は23 μ M CO および 4 μ M Hb. 観察は光路長 2 cm のセルを通して 432 nm で行なった.

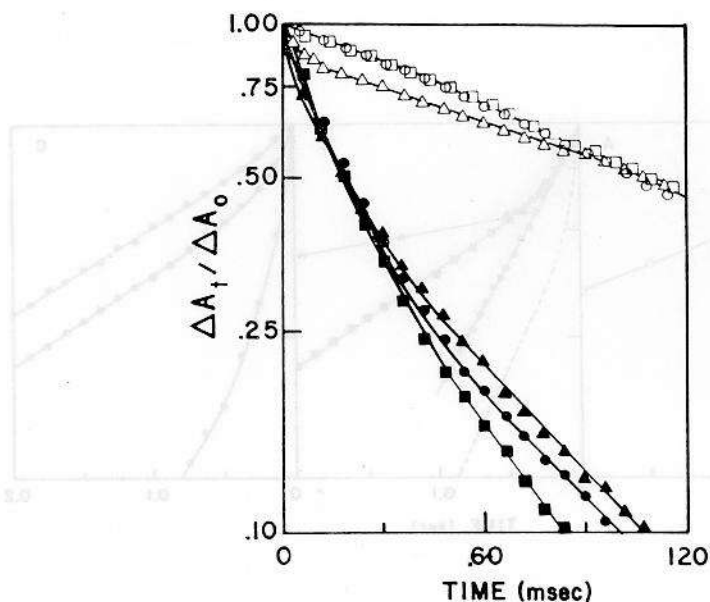


FIGURE 3. Normalized time courses for the reaction of stripped hemoglobin Hiroshima with carbon monoxide in the absence and presence of inositol hexaphosphate at 20°. Concentrations after mixing were 23 μ M CO and 4 μ M Hb, and observations were made through a 2 cm path length cell at 432 nm. $\circ, \triangle, \square$ represent data obtained with 60 μ M IHP added to the hemoglobin solution, while $\bullet, \blacktriangle, \blacksquare$ represent data obtained for stripped hemoglobin Hiroshima in the absence of phosphates. Conditions: \square, \blacksquare , 0.05 M bis-tris, pH 6.0; \circ, \bullet , 0.05 M bis-tris, pH 7.0; $\triangle, \blacktriangle$, 0.05 M tris, pH 8.0.

図3. Inositol hexaphosphate の欠如および混在下での20°におけるリン酸塩除去ヘモグロビン Hiroshima と一酸化炭素との正規化時間経過。混合後の濃度は23 μ M CO および 4 μ M Hb。観察は光路長2 cmのセルを通して432 nmで行なった。 $\circ, \triangle, \square$ はヘモグロビン溶液に60 μ M IHPを加えて求めた資料を示し、 $\bullet, \blacktriangle, \blacksquare$ はリン酸塩除去ヘモグロビン Hiroshima にリン酸塩を加えないで求めた資料を示す。条件： \square, \blacksquare , 0.05 M bis-tris, pH 6.0; \circ, \bullet , 0.05 M bis-tris, pH 7.0; $\triangle, \blacktriangle$, 0.05 M tris, pH 8.0。

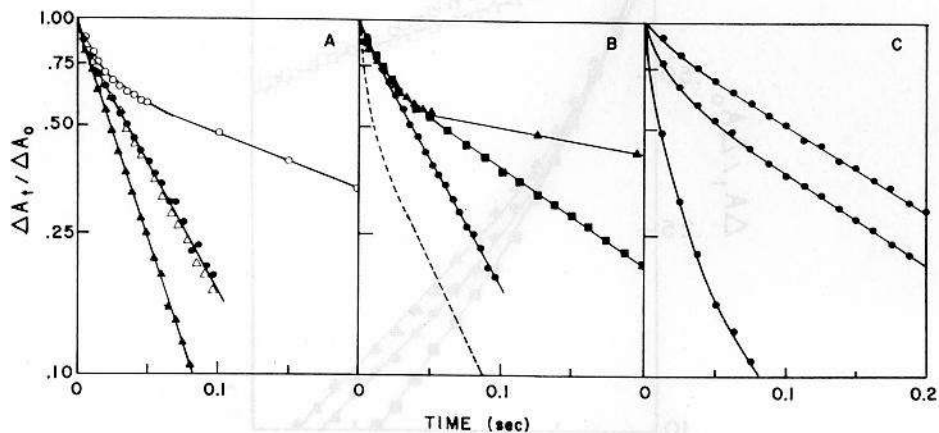


FIGURE 4. Normalized time courses for the reaction of hemoglobin with *n*-butyl isocyanide at 20°. Concentrations after mixing were 1.15 mM *n*-butyl isocyanide and 4 μM Hb, and observations were made through a 2 cm path length cell. Panel A, the reaction of *n*-butyl isocyanide with stripped deoxyhemoglobins A and Hiroshima at pH 7.0 and 9.1: ○, Hb A in 0.05 M bis-tris pH 7.0; △, Hb A in 0.05 M borate, pH 9.1; ●, Hb-Hiroshima in 0.05 M bis-tris pH 7.0; ▲, Hb-Hiroshima in 0.05 M borate, pH 9.1. All observations were made at 428 nm. Panel B, the effect of phosphates on the reaction of *n*-butyl isocyanide with stripped Hb-Hiroshima. Observations were made at 428 nm. The dotted line represents the time course of *n*-butyl isocyanide binding to stripped Hb-Bethesda in 0.05 M bis-tris, pH 7.0.¹⁶ Conditions: ●, stripped Hb-Hiroshima in 0.05 M bis-tris, pH 7.0; ■, stripped Hb-Hiroshima in 0.1 M P_i, pH 7.0; ▲, stripped Hb-Hiroshima in 0.1 M P_i, pH 7.0 with 60 μM IHP added to the hemoglobin solution. Panel C, the wavelength dependence of the time course for the reaction of *n*-butyl isocyanide with Hb-Hiroshima in 0.1 M P_i, pH 7.0. Wavelengths of observation: upper curve, 420 nm; middle curve, 428 nm; lower curve, 423 nm.

図4. 20°におけるヘモグロビンと*n*-butyl isocyanideとの反応の正規化時間的経過。混合後の濃度は1.15 mM *n*-butyl isocyanide および 4 μM Hb。観察は光路長 2 cm のセルを通して行なった。区画A, pH 7.0および pH 9.1 におけるリン酸塩除去還元型ヘモグロビンAおよびヘモグロビン Hiroshima と *n*-butyl isocyanide との反応: ○, 0.05 M bis-tris, pH 7.0におけるHb A; △, 0.05 M ホウ酸, pH 9.1におけるHb A; ●, 0.05 M bis-tris, pH 7.0におけるHb Hiroshima; ▲, 0.05 M ホウ酸, pH 9.1におけるHb Hiroshima。すべての観察は428 nmで行なった。区画B, リン酸塩除去Hb Hiroshima と *n*-butyl isocyanide との反応に及ぼすリン酸塩の影響。観察は428 nmで行なった。点線は0.05 M bis-tris, pH 7.0におけるリン酸塩除去Hb Bethesda と *n*-butyl isocyanide との結合の時間的経過を示す。¹⁶ 条件: ●, 0.05 M bis-tris, pH 7.0におけるリン酸塩除去Hb Hiroshima; ■, 0.1 M P_i, pH 7.0におけるリン酸塩除去Hb Hiroshima; ▲, 0.1 M P_i, pH 7.0におけるリン酸塩除去Hb Hiroshima に60 μM IHP をヘモグロビン溶液に添加。区画C, 0.1 M P_i, pH 7.0におけるHb Hiroshima と *n*-butyl isocyanide との反応の時間的経過の波長依存性。観察の波長: 上の線, 420 nm; 中の線, 428 nm; 下の線, 423 nm。

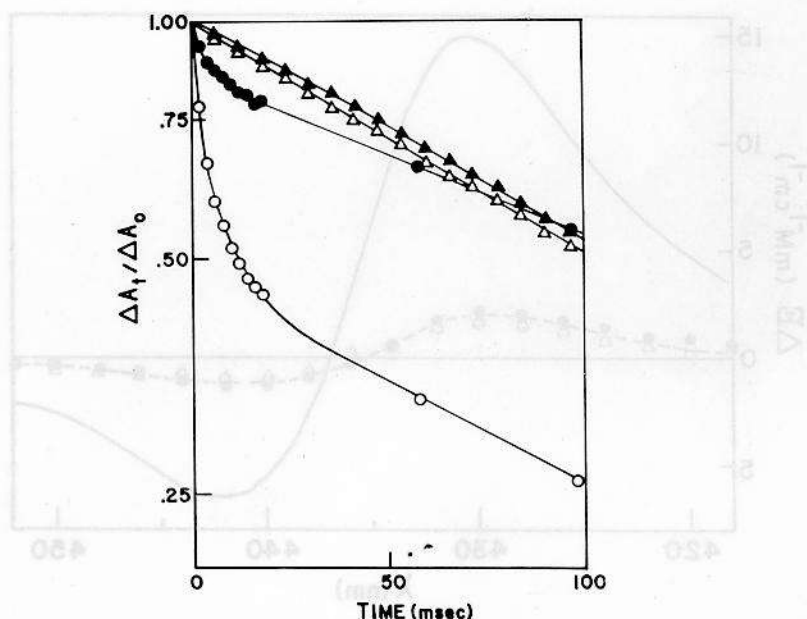


FIGURE 5. The effect of inositol hexaphosphate on the reaction of carbon monoxide with stripped deoxyhemoglobin Hiroshima at 20°. Concentrations after mixing were 4 μ M Hb and 46 μ M CO, and observations were made at 432 nm through a 2 cm path length cell. Δ , \blacktriangle represent reactions carried out in 0.05 M bis-tris, pH 7.0. \circ , \bullet represent reactions carried out in 0.05 M tris, pH 8.0. Δ , \circ represent reactions carried out with 60 μ M IHP present in the CO solution only. \blacktriangle , \bullet represent reactions carried out with 60 μ M IHP present in both the CO and hemoglobin solutions. It should be noted that in all cases the IHP is present in great excess to the tetramer concentration.

図5. 20°におけるリン酸塩除去還元型ヘモグロビン Hiroshima と一酸化炭素との反応に対して inositol hexaphosphate の及ぼす影響。混合後の濃度は 4 μ M Hb および 46 μ M CO。観察は光路長 2 cm のセルを通して 432 nm で行なった。 Δ , \blacktriangle , 0.05 M bis-tris, pH 7.0 における反応； \circ , \bullet , 0.05 M tris, pH 8.0 における反応； Δ , \circ , CO 溶液のみに 60 μ M IHP が存在する場合の反応； \blacktriangle , \bullet , CO 溶液およびヘモグロビン溶液とも 60 μ M IHP が存在する場合の反応。いずれの場合も四量体濃度に比べて IHP が非常に過剰に存在することを指摘したい。

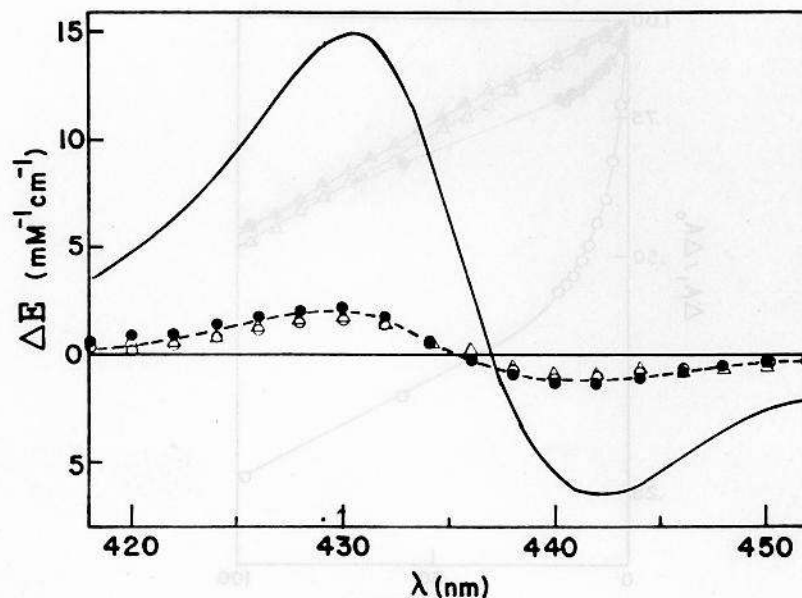


FIGURE 6. Static difference spectra observed on mixing inositol hexaphosphate with stripped deoxyhemoglobin Hiroshima. The millimolar extinction difference between IHP treated Hb-Hiroshima and stripped Hb-Hiroshima is plotted versus wave length. Two identical solutions of Hb-Hiroshima were placed in matched cuvettes. After measuring a baseline, a small volume of a concentrated IHP solution was added to the sample cuvette and the Hb (IHP) versus Hb difference spectrum was recorded. The concentrations of heme and IHP were 8.5 and 85 μ M, respectively. Further additions of IHP produced no effect. Solvent conditions at 20° were: ○, 0.05 M bis-tris, pH 7.0; △, 0.05 M bis-tris, pH 6.0; ●, 0.05 M tris, pH 8.0. The solid line represents the observed difference spectrum reported for deoxyhemoglobin Bethesda.¹⁶

図6. リン酸塩除去還元型ヘモグロビン Hiroshima と inositol hexaphosphate 混合後にみられる静力学的差スペクトル。IHP 処理 Hb Hiroshima とリン酸塩除去 Hb Hiroshima との間のミリモル吸光度差を波長別に図示した。Hb Hiroshima の同一溶液を対応するキュベットに容れ、基線決定後に濃縮 IHP 溶液少量をサンプル・キュベットに加え、Hb (IHP) 対 Hb 差スペクトルを記録した。ヘムおよび IHP の濃度はそれぞれ 8.5 および 85 μ M であった。IHP をそれ以上加えても影響はなかった。20°における溶媒の条件: ○, 0.05 M bis-tris, pH 7.0; △, 0.05 M bis-tris, pH 6.0; ●, 0.05 M tris, pH 8.0。太線は還元型ヘモグロビン Bethesda に観察されたと報告されている差スペクトルを示す。

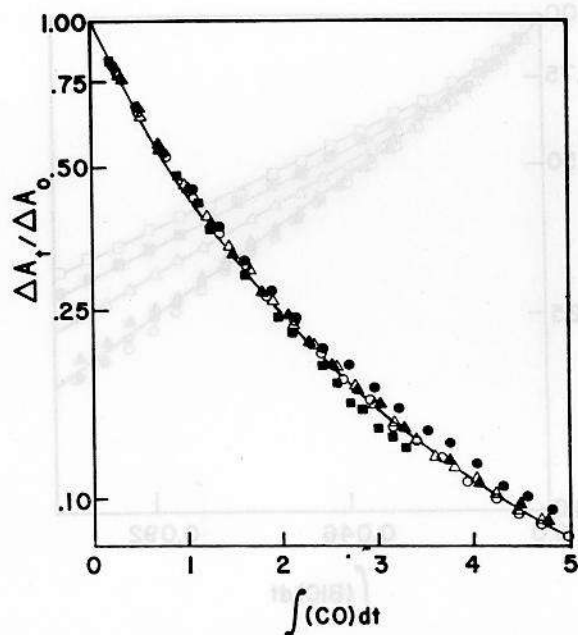


FIGURE 7. The effect of ligand concentration on the normalized time course for carbon monoxide binding to stripped deoxyhemoglobin Hiroshima in 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20°. The normalized absorbance change at 432 nm is plotted versus the integral of the ligand concentration versus time. The values of $\int (CO) dt$ were calculated by assuming that the concentration of CO at any time is given by $(CO)_T - Y (Hb)_T$ where $(CO)_T$ and $(Hb)_T$ are the total concentrations of CO and Hb present and Y is $1.00 - \Delta A_t / \Delta A_0$. The numerical integration was then carried out using a trapezoidal approximation for the area between the observed data points. The concentration of heme before mixing was 5.6 μM . The concentrations of CO after mixing were \bullet , 46 μM ; \circ , 23 μM ; \blacktriangle , 11.5 μM ; \triangle , 5.75 μM ; \blacksquare , 2.88 μM .

図7. 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20°におけるリン酸塩除去還元型ヘモグロビン Hiroshima と一酸化炭素との結合の正規化時間経過に対して配位子濃度の及ぼす影響. 432 nmにおける正規化吸光度変化と時間に対する配位子濃度の積分との関係を図示した. いずれの時間におけるCO濃度も $(CO)_T - Y (Hb)_T$ で与えられると仮定して $\int (CO) dt$ を計算した. ここで $(CO)_T$ および $(Hb)_T$ はCOおよびHbの総濃度であり, Y は $1.00 - \Delta A_t / \Delta A_0$ である. 次に, 各観察点間の面積に対して台形近似値を用いて数値積分を行なった. 混合前のヘム濃度は5.6 μM であった. 混合後のCO濃度: \bullet , 46 μM ; \circ , 23 μM ; \blacktriangle , 11.5 μM ; \triangle , 5.75 μM ; \blacksquare , 2.88 μM .

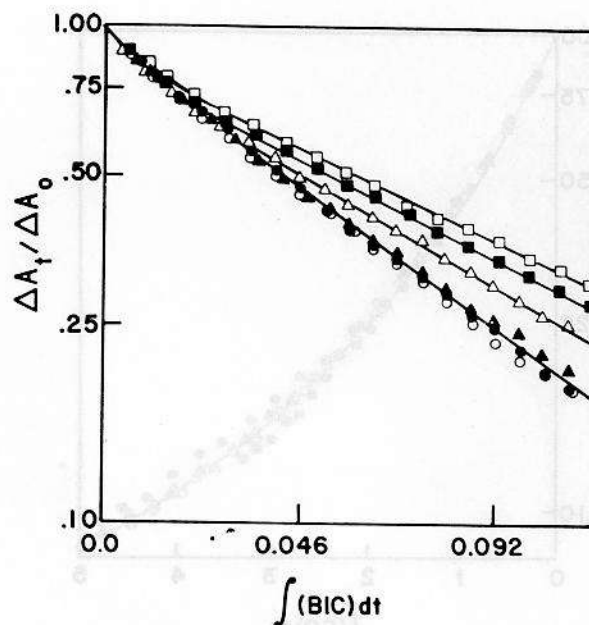


FIGURE 8. The effect of ligand concentration on the normalized time courses for *n*-butyl isocyanide binding to stripped deoxyhemoglobin Hiroshima in 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20°. The values of $\int(BIC) dt$ were calculated as described in the legend to Figure 7, and observations were made at 428 nm. The concentration of heme before mixing was 8 μ M. The concentrations of *n*-butyl isocyanide after mixing and the fractional degree of heme saturation achieved (defined as the total absorbance change observed at given isocyanide concentrations, ΔA_∞ , divided by maximum possible change for the given heme concentration) were: ●, 1.15 mM, 1.00; ○, 0.58 mM, 1.00; ▲, 0.28 mM, 1.00; △, 0.14 mM, 0.95; ■, 0.072 mM, 0.85; □, 0.036 mM, 0.67.

図8. 0.05 M bis-tris, pH 7.0, 20°におけるリン酸塩除去還元型ヘモグロビン Hiroshima と *n*-butyl isocyanide との結合の正規化時間的経過に対して配位子濃度の及ぼす影響. 図7の凡例で説明した方法で $\int(BIC) dt$ を計算した. 観察は 428 nm で行なった. 混合前のヘム濃度は 8 μ M であった. 混合後の *n*-butyl isocyanide 濃度ならびに得られたヘム飽和度の分数的関係(すなわち, 与えられたある isocyanide 濃度で観察された吸光度の総変化 ΔA_∞ を, そのヘム濃度で起こりうる変化の最大値で割ったもの)は次のとおり: ●, 1.15 mM, 1.00; ○, 0.58 mM, 1.00; ▲, 0.28 mM, 1.00; △, 0.14 mM, 0.95; ■, 0.072 mM, 0.85; □, 0.036 mM, 0.67.

REFERENCES

参考文献

1. PERUTZ MF: Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature* 228:726-39, 1970
2. PERUTZ MF, TENNEYCK LF: Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 36:295-310, 1972
3. KILMARTIN JV, HEWITT JA: The effect of removal of C-terminal residues on cooperative interactions in hemoglobin. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 36:311-4, 1972
4. IMAI K: Oxygen equilibrium characteristics of abnormal hemoglobin Hiroshima ($\alpha_2\beta_2$ ¹⁴³ Asp). *Arch Biochem Biophys* 127:543, 1968
5. HAMILTON HB, IUCHI I, MIYAJI T, SHIBATA S: Hemoglobin Hiroshima (β ¹⁴³ histidine 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 (ABCC TR 10-68)
6. PERUTZ MF, DEL PULSINELLI P, TENNEYCK LF, KILMARTIN JV, SHIBATA S, IUCHI I, MIYAJI T, HAMILTON HB: Haemoglobin Hiroshima and the mechanism of the Alkaline Bohr effect. *Nature New Biol* 232: 147-9, 1971 (ABCC TR 20-71)
7. NAGEL RL, GIBSON QH, HAMILTON HB: Ligand kinetics in Hemoglobin Hiroshima. *J Clin Invest* 50:1772-5, 1971 (ABCC TR 3-71)
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. GIBSON QH: The reaction of oxygen with hemoglobin and the kinetic basis of the effect of salt on binding of oxygen. *J Biol Chem* 245:3285-8, 1970
10. BANERJEE R, ALPERT Y, LETERRIER F, WILLIAMS RJP: Visible absorption and electron resonance spectra of the isolated chains of human hemoglobin. Discussion of chain-mediated heme-heme interaction. *Biochemistry* 8: 2862-7, 1969
11. OLSON JS, GIBSON QH: The reaction of n-Butyl isocyanide with human hemoglobin. *J Biol Chem* 246:5241-53, 1971
12. DESA RJ, GIBSON QH: A practical automatic data acquisition system for stopped-flow spectrophotometry. *Comput Biomed Res* 2:494, 1969
13. GIBSON QH, MILNES L: Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry. *Biochem J* 91:161, 1964
14. GRAY RD: The kinetics of the alkaline Bohr effect of human hemoglobin. *J Biol Chem* 245:2914-21, 1970
15. OLSON JS, ANDERSON ME, GIBSON QH: The dissociation of the first oxygen molecule from some mammalian oxyhemoglobins. *J Biol Chem* 246:5919-23, 1971
16. OLSON JS, GIBSON QH: The functional properties of hemoglobin Bethesda. *J Biol Chem* 247:3662-70, 1972
17. GRAY RD, GIBSON QH: The binding of carbon monoxide to α and β chains in tetrameric mammalian hemoglobin. *J Biol Chem* 246:5176-8, 1971

18. MACQUARRIE R, GIBSON QH: Ligand bindings and release of an analogue of 2,3-diphosphoglycerate from human hemoglobin. *J Biol Chem* 247:5686-94, 1972
19. GIBSON QH: The kinetic of reactions between haemoglobin and gases. *Progr Biophys Biophys Chem* 9:1-53, 1959
20. GERACI G (Giuseppe), PARKHURST LJ, GIBSON QH: Preparation and properties of α - and β - chains from human hemoglobin. *J Biol Chem* 244:4664-7, 1969
21. ANDERSON ME, MOFFAT JK, GIBSON QH: The kinetics of ligand binding and of the association-dissociation reactions of human hemoglobin. *J Biol Chem* 246:2796-807, 1971
22. OLSON JS, GIBSON QH: The reaction of n-Butyl isocyanide with human hemoglobin. 2. The ligand-binding properties of the α and β chains within deoxyhemoglobin. *J Biol Chem* 247:1713-26, 1972
23. GRAY RD, GIBSON QH: The effect of inositol hexaphosphate on the kinetics of CO and O₂ binding by human hemoglobin. *J Biol Chem* 246:7168-74, 1971
24. EDELSTEIN SJ: Extensions of the allosteric model for haemoglobin. *Nature* 230:224-7, 1971
25. HOPFIELD JJ, SHULMAN RG, OGAWA S: An allosteric model of hemoglobin: 1. Kinetics. *J Mol Biol* 61:425-43, 1971