

へムたんぱく—ガス状リガンド結合の反応速度論

II. グリコシル化微量ヘモグロビン, Hb A_{1c}, A_{1b}, A_{1a2}, A_{1a1}, および Hb Hope, β 136(H 14)Gly \rightarrow Asp, について

奈良県立医科大学第2生理学教室

松村 一 仁

KINETICS OF THE REACTIONS OF HEME PROTEINS WITH GASEOUS LIGANDS—STUDIES WITH STOPPED-FLOW SPECTROPHOTOMETRY

II. THE REACTION OF HUMAN GLYCOSYLATED MINOR HEMOGLOBINS, HB A_{1c}, A_{1b}, A_{1a2}, A_{1a1}, AND HB HOPE, β 136(H 14)GLY \rightarrow ASP, WITH OXYGEN AND CARBON MONOXIDE

KAZUHITO MATSUMURA

Second Department of Physiology, Nara Medical University

Received July 27, 1992

Summary: The kinetics of the ligand binding to the glycosylated minor components of human adult hemoglobin (Hb A_{1c}, A_{1b}, A_{1a2} and A_{1a1}) and a variant hemoglobin, Hb Hope, were studied with the stopped-flow method. The rate constants of O₂ dissociation and CO association for the minor hemoglobins were less affected by 2, 3-diphosphoglycerate (DPG) or inositol hexaphosphate (IHP) than for the major component, Hb A₀. The rate constants for Hb A_{1a1} and A_{1a2} were practically unaffected by these organic phosphates. As for Hb Hope, the effects of DPG and IHP were reduced on the CO association rate constant (I'), but not on the O₂ dissociation rate constant (k). These results were consistent with the O₂ equilibrium findings. Hb A_{1a1} and A_{1a2}, and Hb Hope exhibited biphasic O₂ dissociation kinetic profiles. The rate constants for the slow phase were in good agreement with that of O₂ dissociation from the isolated α chain of normal human adult hemoglobin (Hb A₀). The rate constant of O₂ dissociation from the isolated β chain of Hb Hope was approximately 4 times larger than that from the β chain of Hb A₀. It is highly probable that the biphasic O₂ dissociation kinetics reflect the large difference in reactivity to the ligand between α and β chains. I discuss the structure-function relationship of these β -variant hemoglobins from a kinetic standpoint.

Index Terms

glycosylated minor hemoglobins, Hb Hope, ligand binding kinetics, oxygen equilibrium, stopped-flow spectrophotometer

ま え お き

1958年, Allenらは陽イオン交換樹脂 Amberlite IRC-50を用いたカラム・クロマト法により, ヒト成人ヘモグロビン(Hb A)には主成分 Hb A₀の他に, Hb A_{1a}, A_{1b}, A_{1c}等の微量成分が数%含まれることを報告した¹⁾. これら微量成分の中, Hb A_{1c}は血糖値の上昇を忠実に反映して増量することがその後明らかにされ, 糖尿病患者の診断, 治療効果の判定などの目的で必須の測定項目の一つとなっている. その後, McDonaldらによって Hb A_{1a}はさらに Hb A_{1a1}, Hb A_{1a2}に分離され²⁾, また, これら微量成分がそのたんぱく一次構造に関しては相互に何の差もなく, ただβ鎖N末端に糖あるいは糖リン酸化化合物の共有結合したグリコシル化Hb(glycosylated Hbs)であることが明らかになった³⁾. 一方, これらグリコシル化Hbは, 主成分Hb A₀とはO₂平衡機能の面でかなり異なることが知られている⁴⁾. すなわち, O₂親和性や協同性(cooperativity)の低下のほか, 2, 3-diphosphoglycerate (DPG)~inositol hexaphosphate (IHP)効果, Bohr効果, アニオン(Cl⁻)効果など, いわゆるヘテロトロピックなアロステリック効果(heterotropic effects)の低下が, 程度の差こそあれこれら各微量成分を通じてみられる. とりわけ, DPG効果およびIHP効果の低下は著しく, Hb A_{1a1}, Hb A_{1a2}においては, これら有機リン酸はほとんどO₂親和性低下効果を示さない. 微量成分の構造についていえば, Hb A_{1c}ではβ鎖N末端のα-アミノ基とグルコースがまずSchiff塩基を形成して結合し, ついでAmadori転位により安定なケトアミン型結合となることが明らかにされているが³⁾, その他の成分についてはその構造の詳細は今なお不明である. Hb A_{1a1}, A_{1a2}にはそれぞれ2リン酸, 1リン酸化化合物の結合していることが実証されているものの, その実体は明らかにされておらず, またHb A_{1b}については, β鎖N末端に糖ではなくビルビン酸が結合しているとの最近の報告もある⁵⁾. 機能的観点からみた場合, これらグリコシル化Hbでは, DPG結合部位の一つであるβ鎖N末端に糖あるいは糖リン酸化化合物が共有結合するため, DPG結合部位がブロックされる結果となる. また, 糖リン酸化化合物の結合する場合には, DPGが永続的にHbに結合したかのような効果を示し, O₂親和性の低下, DPGおよびIHP効果の低下などの機能変化が起こるのではないかと考えられる.

従来グリコシル化Hbの機能に関する研究はO₂平衡に関するものが中心で, 速度論的な観点からの検討はほとんどなされていないのが現状である^{4,6,7)}. 以上の点に

かんがみ, 今回, ヒト血液からnativeなグリコシル化Hb各成分を分離, 精製し, そのO₂平衡特性をみると共に, ストップフロー(stopped-flow)法により, 各微量成分についてガス状リガンド(O₂やCO)結合の反応速度に対する各種エフェクターの効果を検討した.

さらに当教室において, 最近たまたま遭遇した一異常Hb(Hb Hope)⁸⁾についても, 同様な検討を試みた. Hb Hopeの構造異常はβ鎖にあり, β136のGly残基がAsp残基に置換されている(β136(H14)Gly→Asp). 機能的には, O₂平衡面でO₂親和性の低下, DPG効果, アニオン効果, Bohr効果の低下などの特性を有する⁸⁾. グリコシル化Hbは一種の化学修飾(chemically modified)Hb, Hb Hopeは異常Hbと違いはあるが, 両Hbとも, β鎖に構造修飾を有し, それに伴うO₂平衡機能上の変化にも類似点が多い. このような観点から, Hb Hopeのリガンド結合速度論についても, グリコシル化Hbの速度論と平行して検討を加えた.

試料および実験方法

1. グリコシル化Hbの分離, 精製

検査不合格になった可及的新鮮なヒト保存血(濃厚赤血球液)を生理的食塩水で洗浄した後, 等量の脱イオン水と0.4量のトルエンを添加して振り混ぜ溶血させ, 冷却高速遠沈(14,000 rpm, 20 min, 0℃)によりストローマを除去, Hb溶液を作成した. Hb溶液はCO型として氷冷保存し, カラム添加に先立って十分量の所定緩衝液(CO飽和)に1夜透析(4℃)した後, クロマト分離した.

グリコシル化Hb各成分の分離, 精製はMcDonaldらの方法²⁾にほぼ準拠し, カチオン交換樹脂Bio-Rex 70(Bio-Rad Lab., 200~400 mesh)を担体とする2段階イオン交換クロマトグラフィー法により行った. まず第1段階として, CO飽和リン酸ナトリウム緩衝液(0.0625 M Na⁺, pH 7.18)⁹⁾と平衡したBio-Rex 70カラム(8.5 x 38 cm)に10% Hb溶液(総量約16 g)を添加, 同緩衝液で溶出し, Hb A_{1a+b}画分とA_{1c}画分を得た. カラム上部に吸着した主成分Hb A₀は1 M NaClで溶出した. 第2段階は, CO飽和0.05 M リン酸カリウム緩衝液(pH 6.60)と平衡させた別のBio-Rex 70カラム(3 x 50 cm)にA_{1a+b}画分またはA_{1c}画分を添加し, さらに分画した. A_{1a+b}を添加した場合は, CO飽和0.05 M リン酸カリウム緩衝液(pH 6.60)で溶出を開始, A_{1a1}次いでA_{1a2}画分が溶出した後, 0~0.1 M NaCl直線濃度勾配でA_{1b}を溶出した(Fig. 1 a). A_{1c}添加カラムの場合は, CO飽和した0.1 M NaCl含0.05 M リン酸カリウム緩衝液(pH 6.60)で溶出した(Fig. 1 b).

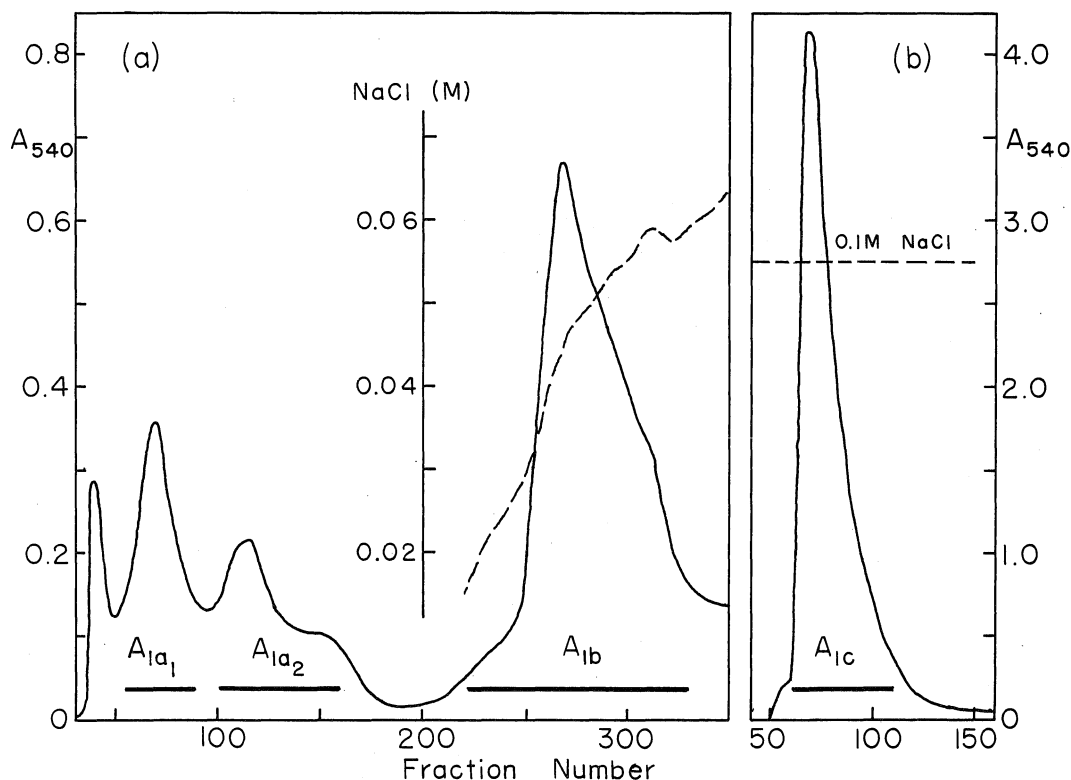


Fig. 1. Cation-exchange chromatographic separation of the human glycosylated minor hemoglobins on Bio-Rex 70 column. (a) Hb A_{1a+b} was resolved into Hbs A_{1a1}, A_{1a2} and A_{1b} by isocratic elution. Hb A_{1b} was eluted with a linear gradient of 0-0.1 M NaCl (---). NaCl concentration was monitored by conductivity measurement of the effluents. The fraction size was 5.3 ml. (b) Hb A_{1c} was eluted with the buffer containing 0.1 M NaCl. The fraction size was 9.0 ml.

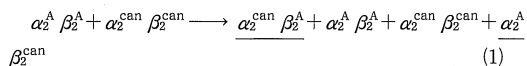
得られたグリコシル化 Hb 各微量成分および主成分 Hb A₀ は、CO 飽和脱イオン水に対し一夜透析した後 (4°C), 混合床イオン交換樹脂 AG 501-X 8(D) (Bio-Rad Lab., 20-50 mesh) カラム (0.9 x 40 cm) で脱塩 (stripping) した。最終標品について、灰化後 Ames & Dubin の方法¹⁰⁾ でりんの定量を行ったところ、Hb A₀, Hb A_{1c}, Hb A_{1b} についてはほぼ完全にりんの除去されていることを確認した。最終標品は、限外濾過による濃縮、CO 通気後、液体窒素中に滴下して凍結し、冷凍保存 (-90°C), 用に臨んで必要量を取り出し、実験に供した。

以上の分離操作は全て CO 飽和条件下、氷室中 (4°C) で行った。

2. 電気泳動

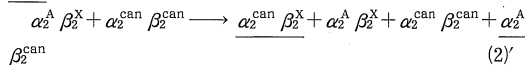
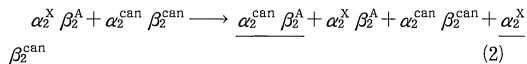
Tris-EDTA-Borate (pH 8.6) 緩衝液を用い、自家製のデンプン・ゲルを担体として氷冷中で行った。acid hybridization による化学修飾鎖の検出には、Singer らの方法¹¹⁾ に従いイヌ Hb をパートナーとして行った。そ

の原理は、ヒト Hb A₀ (α₂^A β₂^A) とイヌ Hb (α₂^{can} β₂^{can}) 混合試料を酸性条件下 (pH 4.6) に一定時間放置し、各 Hb を構成サブユニットに解裂させた後、中性条件に戻せば、各サブユニットはランダムに再結合して 2 種類の hybrid Hb (アンダーライン) を形成する。



反応混合物を電気泳動 (pH 8.6) すれば、(1) 式の右辺に示される順に陽極側から各分子種が分離される (Fig. 2)。

同様に、被検試料 Hb X (α₂^X β₂^A または α₂^A β₂^X) については、



となる。すなわち、修飾が α 鎖にあれば (2), もっとも易動度の遅いバンドが (1) と異なるはずであり、逆に β 鎖に

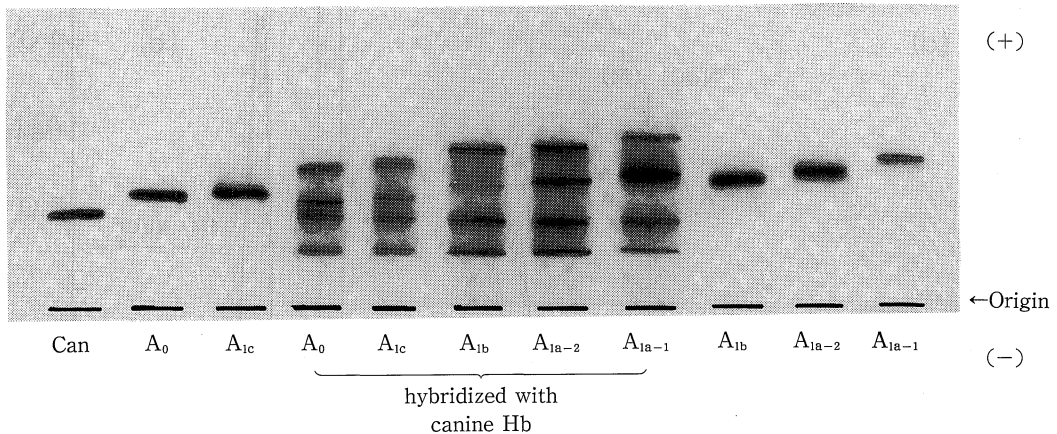


Fig. 2. Starch gel electrophoresis of human glycosylated minor hemoglobins (A_{1c} , A_{1b} , A_{1a2} and A_{1a1}) and their hybrids with canine hemoglobin. Tris-EDTA-Borate buffer (pH 8.6) and Amido Black 10B stain. See text for the explanation. A_0 : Hb A_0 and Can: canine Hb.

修飾のある場合(2)には、もっとも陽極側のバンドの易動度が(1)とは異なるはずである。

3. Hb Hope および単離 β 鎖 (β^{Hope}) の調製

Hb Hope は Bio-Rex 70 カチオン交換クロマトグラフィークロマトフォーカス法⁸⁾により分離、精製した。クロマトフォーカス法による分離に際し、試料中に混入、残存するポリバッファー PB 96 (Pharmacia) は、80% 飽和一硫酸で Hb を塩析後、同溶液で 3 回洗浄、遠沈を反復し、除去した。さらに脱イオン水に対し透析後、上記の混合床イオン交換カラムにより脱塩し、液体 N_2 凍結、冷凍保存 (-90°C) した。 β^{Hope} の単離は酸性下 p-chloromercuribenzoate (PCMB) を用いる Bucci-Fronticelli 法¹²⁾ により行い、 β -メルカプトエタノールおよびゲルろ過クロマト法 (Sephadex G-10)¹³⁾ により PCMB を除去した後、SH 滴定¹⁴⁾ により Hg が完全に除去されたことを確認した。最終標品は、限外ろ過器およびコロジオンバッグで濃縮、CO 型とし、密栓して氷冷保存 (4°C) した。以上の操作は全て、CO 飽和条件下、氷冷中 (4°C) で行った。

4. ストップフロー法による速度論測定

ストップフロー分光光度計 RA-401 (ユニオン技研) を使用した¹⁵⁾。光路長 10 mm または 2 mm の観測セルを用い、不感時間 (dead time) はそれぞれ駆動圧 6 および 7 kg/cm^2 下、約 2 ms, 0.9 ms であった。Hb 試料は、全て変性、自酸化を避けるため CO 型として保存してあるので、測定に先立ってまずこれを oxy 型に変換する必要がある。この目的には、氷室内で至近距離から強光 (100 W) を照射しつつ、水蒸気飽和 100% O_2 を試料液面

上に通気した。

1) Hb 試料の場合、

(1) O_2 解離反応: oxyHb 溶液 (16~20 μM へム当量) を N_2 飽和 dithionite 溶液 (12 mM) と急速混合、415 nm における吸光度変化を測定した。

(2) O_2 -CO 置換反応: oxyHb 溶液 (16~20 μM へム当量) を CO 飽和 dithionite 溶液 (12 mM) と急速混合し、420 nm における吸光度変化を測定した。

(3) CO 結合反応: deoxyHb 溶液 (約 10 μM へム当量) を CO 溶液 (約 200 μM) と急速に混合して、420 nm における吸光度変化を追跡した。deoxyHb 溶液は、 N_2 飽和緩衝液で oxyHb 試料を希釈し、これに極微量の dithionite を添加して作製した。

2) Hb 単離鎖 (β^{Hope} , β^A) の場合、

O_2 解離反応は、oxyHb 溶液 (約 7 μM) と N_2 飽和 dithionite 溶液 (12 mM)、 O_2 結合反応は、deoxyHb 溶液 (約 8 μM) と O_2 溶液 (88 μM) を急速混合し、それぞれ 415, 430 nm において測定した。

deoxyHb 溶液の作製に当たっては、先の論文¹⁵⁾ で述べたのと同様、dithionite, Sephadex G-25 (Pharmacia Fine Chem.) カラムおよび脱気- N_2 通気による方法を用い、deoxy 化の完了は 555 nm と 540 nm での吸光度比が 1.24 以上であることを目安として確認した。

3) 緩衝液: グリコシル化 Hb 微量成分および Hb Hope については 0.05 M Bis-tris を、単離鎖については 0.1 M リン酸 (pH 7.0) を緩衝液として用いた。 O_2 -CO 溶液は、空気~CO と平衡させた緩衝液を N_2 飽和緩衝液で希釈して作製した。 O_2 , CO 濃度は、水溶液に対する溶解

度係数^{16,17)}により算出した。

以上のストップフロー測定は20°Cにおいて行い、一次反応プロットから各速度定数を求めた。

5. Hb-O₂ 平衡の測定

セル付トノメータを用いる分光学的方法¹⁸⁾により、Hb濃度 3 mg/ml, 20°C下にて測定した。

試薬は市販特級規格のものを用いた。DPG(Calbiochem. pentacyclohexylammonium 塩)は、所定量を脱イオン水に溶した後、過剰量のカチオン交換樹脂Dowex 50 WX 8(Dow Chemicals, 200~400 mesh, H⁺型)を加えてよく振り混ぜ、遊離酸型に変換、ついで濃NaOH液によりpHを7.2に調整し、りん定量結果¹⁰⁾を基に20 mM溶液とした後、氷室中に保存した。IHP(Sigma)は、Na塩をそのまま水溶液として用いた。

結 果

1. グリコシル化Hb各成分およびHb Hopeの分離とO₂平衡

1) 試料Hbの単離・純化

Fig. 2は、Bio-Rex 70カラム・クロマト法(Fig. 1)により単離した各Hb微量成分のゲル電気泳動結果である。各成分が互いにごく僅少な易動度差ながら、満足すべき程度に単離、純化されていることがわかる。さらに、いわゆるacid hybridization法¹¹⁾により、各微量成分におけるHb A₀との荷電差(化学修飾)の所在を検討したところ、各成分とも化学修飾はβ鎖に局限して存在することが明らかになった(Fig. 2)。Hb Hopeの単離純化については、既に報告した通りである⁸⁾。

2) O₂平衡

単離した各Hb微量成分(stripped)の、0.05 M Bis-tris緩衝液(pH 7.3)中でのO₂平衡曲線(20.0°C)をFig. 3に示す。Bis-tris(bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane)緩衝液中には、pH調整に用いたHClに由来する微量(0.009 M)のCl⁻以外には、Hb-O₂平衡に影響するallosteric effectorは無い。したがって、ここにみるO₂平衡特性は、Hbのintrinsicな特性を反映するものと考えることができる。Hb A₀に比べ、Hb A_{1c}, A_{1b}, A_{1a2}, A_{1a1}の順に平衡曲線の右偏(P₅₀の上昇=O₂親和性の低下)がみられるだけでなく、曲線の扁平化(Hill定数'n'の低下=協同性(cooperativity)の低下)が同時にみられる。協同性の低下は、さらに多数例についても確かめられた(Table 1)。O₂親和性および協同性の低下に加えて、さらに一連のヘテロトロピックな相互作用に関しても低下がみられた。Fig. 4 aはアニオン(Cl⁻)効果に関し、Hb A_{1c}およびA_{1a2}を主成分Hb A₀

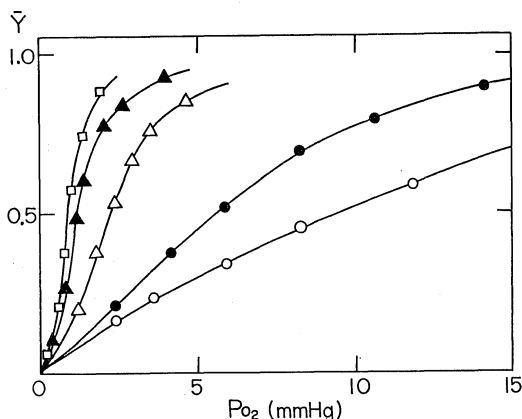


Fig. 3. Intrinsic oxygen equilibrium curves of the glycosylated minor hemoglobins and the major component, Hb A₀. Hb A₀ (□), Hb A_{1c} (▲), Hb A_{1b} (△), Hb A_{1a2} (●), Hb A_{1a1} (○). 0.05 M Bis-tris, pH 7.30, 0.009M Cl⁻, 20°C.

Table 1. Decreased cooperativity in oxygen equilibria of human glycosylated minor hemoglobins

Hemoglobins	Cooperativity as expressed by Hill's exponent 'n'
A ₀	2.89±0.14 (9)
A _{1c}	2.63±0.09(10)
A _{1b}	2.19±0.09 (5)
A _{1a2}	1.82±0.03 (6)
A _{1a1}	1.51±0.11 (6)

Figures in parentheses are number of determinations.

と比較した結果で、Cl⁻によるO₂親和性低下効果(アニオン効果)は明らかにHb A₀, A_{1c}, A_{1a2}の順に低下していることがわかる。Fig.4bはDPG効果についての比較で、Hb A₀, A_{1c}, A_{1a1}の順に減弱がみられ、特にA_{1a1}においては当該効果の完全な欠損が観察された。Hb HopeのO₂平衡特性に関しては既に報告したように⁸⁾, intrinsicなO₂親和性の低下のほか一連のエフェクター(H⁺, Cl⁻, DPG, CO₂)とのヘテロトロピックな相互作用にも多かれ少なかれ低下を認めた。しかし、協同性に関しては全く変化がみられなかった(Hill定数'n'=2.8~2.9)。

2. グリコシル化Hb各成分とHb Hopeの酸素化、脱酸素化反応速度

1) O₂解離反応

oxy HbとN₂飽和dithioniteを用い、ストップフロー法によりO₂解離反応



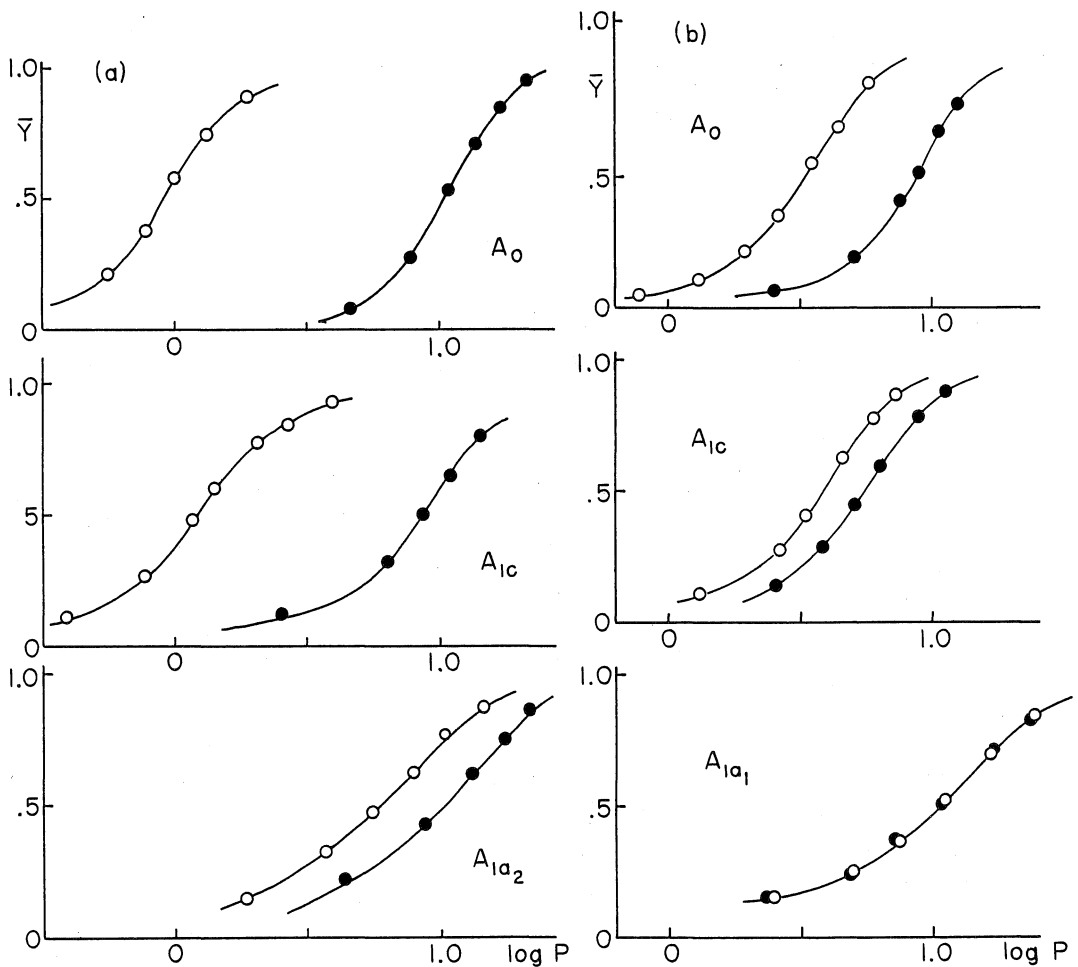
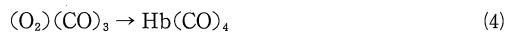
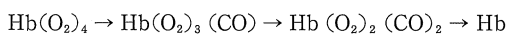


Fig. 4. Oxygen equilibrium curves of human glycosylated minor hemoglobins in the presence and absence of Cl^- or DPG, as compared with those of Hb A_0 . (a) $\circ-\circ$: 0.05M Bis-tris (pH 7.3), $\bullet-\bullet$: 0.05M Bis-tris-1.0M NaCl (pH 7.3), (b) $\circ-\circ$: 0.05M Bis-tris-0.1M NaCl (pH 7.3), $\bullet-\bullet$: 0.05M Bis-tris-0.1M NaCl-1mM DPG (pH 7.3). $[\text{Hb}]$: $4.7 \times 10^{-5}\text{M}$, 20.0°C . Note the marked reduction of the Cl^- or DPG effect in the minor hemoglobins.

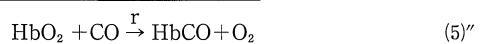
の overall な速度定数(k)を求めた。一次反応プロットした反応経過からみて、Hb A_0 , A_{1c} , A_{1b} については一次反応に近似して扱うことができたが、Hb A_{1a2} , A_{1a1} および Hb Hope では明らかに 2 相性の反応経過を示した(Fig. 5)。2 相性の反応曲線については、2 つの減少性指数関数の和として解析し、速い相(fast phase)と遅い相(slow phase)の速度定数をそれぞれ求めた(Tables 2, 3, 4)。

2) O_2 -CO 交換反応

oxyHb を CO 飽和 dithionite と混合すると、4 個のヘムは順次 O_2 を解離し、速やかに CO と再結合、置換される。



個々のヘムについてみると、 O_2 -CO 置換反応は、 O_2 解離と CO 結合が接続した 2 段階反応



であるが、 O_2 解離に比べ CO 結合は非常に速いので、 O_2 -CO 置換反応は O_2 解離によって律速され、その速度定数 r は O_2 解離速度定数 k に近似的に等しい ($r \approx k$)¹⁹⁾。したがって、 O_2 -CO 置換反応を一次反応プロットし、そ

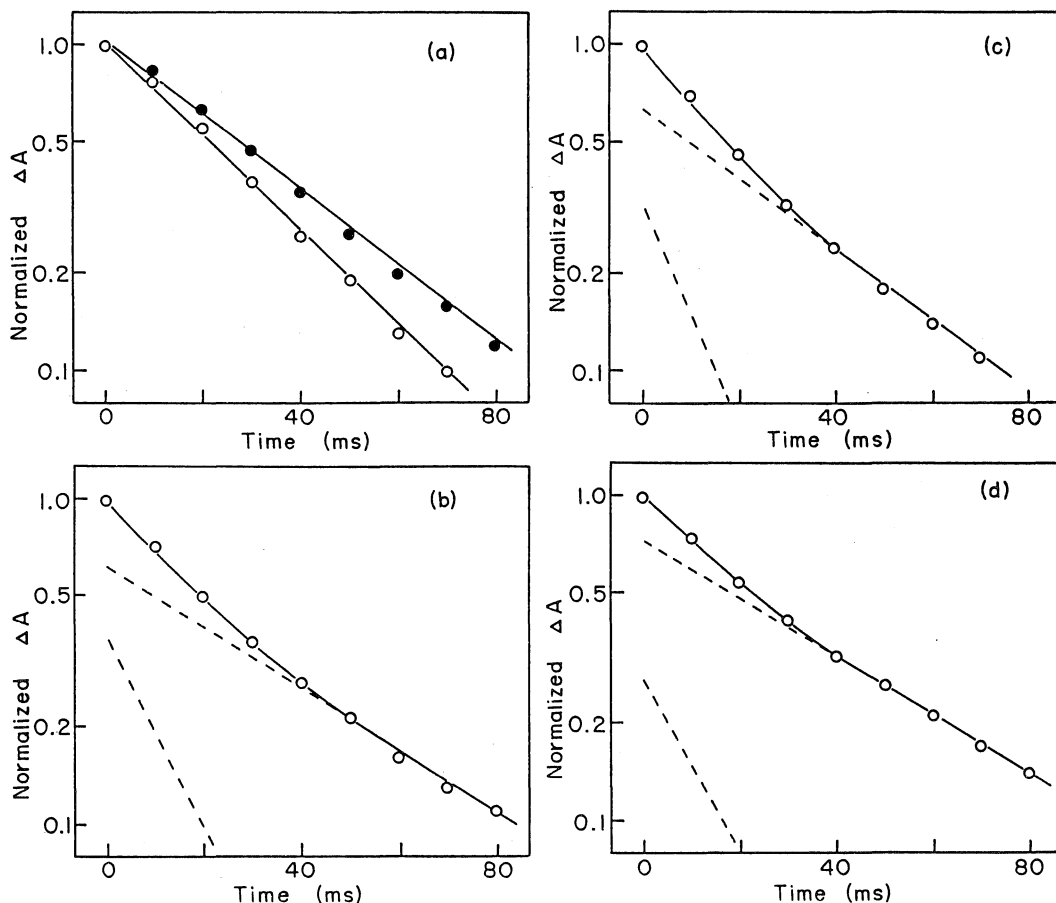
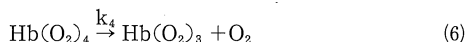


Fig. 5. First-order plots of O₂ dissociation from (a) Hbs A₀ (○), A_{1c} (●), (b) A_{1a1}, (c) A_{1a2} and (d) Hb Hope. 0.05M Bis-tris, pH 7.20, 0.1M Cl⁻, 20°C. After mixing, [HbO₂]: 8~9μM and [Na₂S₂O₄]: 6mM. Observed at 415nm. Dashed lines in (b), (c) and (d) are slow phase (upper) and fast phase (lower).

の初期過程の勾配より oxyHb から最初の O₂ 分子の解離



の速度定数(k₄)を求めた(Tables 2, 3, 4).

3) CO 結合反応

CO 結合反応



は、今回の実験条件下では全て擬一次反応として扱うことができた(Fig. 6). 一次反応プロットの勾配より擬一次速度定数を求め、これを [CO] で除すれば overall CO 結合速度定数(l')が求められる(Tables 2, 3, 4).

3. 速度定数に対する DPG の効果

速度定数 k, k₄, l' に対する DPG の効果を、各 Hb について測定、Table 2 に一括、比較した。

まず、DPG 非存在下における k についてみると、Hb A_{1c}, A_{1b} は主成分 Hb A₀ とほぼ同様の値を示したが、Hb A_{1a1}, A_{1a2} および Hb Hope は 2 相性を呈し、速い相の k 値は前 3 者のそれに比し明らかな高値を示した。DPG の添加により、主成分 Hb A₀ および Hb Hope の速い相において軽度ながら k の増大がみられたが、グリコシル化 Hb 各成分については、みるべき変化はなかった。

k₄ についてみると、DPG 非存在下において、Hb A_{1a1}, A_{1a2} は主成分 Hb A₀ に比べ、大きな値を示した。一方、全 Hb を通じ、k₄ に対する DPG 効果は、ほとんど認められなかった。

l' に関しては、DPG 非存在下において Hb A_{1a1}, Hb Hope の値は、主成分 Hb A₀ の約 2/3 であった。DPG の添加により、主成分 Hb A₀ の l' 値は約 60% に低下した。これに対し、グリコシル化 Hb では l' に対する DPG 効

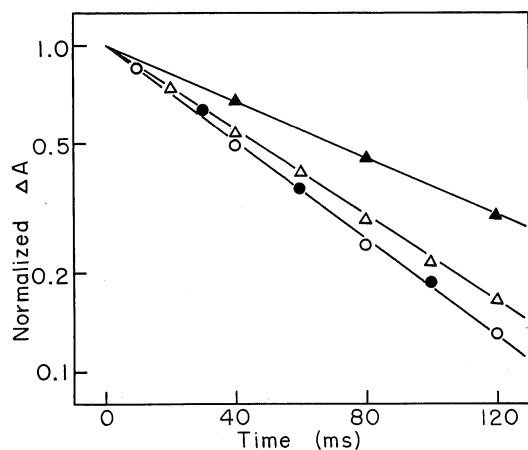


Fig. 6. First-order plots of CO association to Hb A_{1a2} (○, ●) and Hb A₀ (△, ▲). Open symbols: without DPG, closed symbols: with 500 μM DPG. 0.05M Bis-tris, pH 7.20, 0.1M Cl⁻, 20° C. [Hb]: 5~6 μM and [CO]: ~100 μM after mixing. Observed at 420nm.

果は明らかに減弱しており、A_{1c}で若干の効果がみられるが、A_{1b}, A_{1a2}, A_{1a1}においてはほとんど認められなかった。また、Hb Hopeにおいても、I'に対するDPG効果の減弱がみられた。Fig. 6に、Hb A₀およびA_{1a2}におけるCO結合反応の時間経過を一次プロットにより示す。Hb A₀において強いDPG効果が認められるのに対し、A_{1a2}ではほとんどみられない。

4. 速度定数に対するIHPの効果

各Hbの速度定数k, k₄, I'に対するIHPの効果はTable 3に一括、比較した。IHP非存在下における値は、Table 2のDPG非存在下における値と同一のものである。

まずkについてみると、IHPの添加により、主成分Hb A₀では2倍弱の増大がみられたのに対し、A_{1c}では若干の増大に止まり、A_{1b}, A_{1a2}, A_{1a1}ではほとんど変化がなかった。A_{1a1}, A_{1a2}における2相性反応は、すでに3.においてみたところと同様である。Hb Hopeについては、速い相における増大はみられるものの、主成分Hb A₀に比べると、IHP効果は減弱している。

Table 2. Effect of 2, 3-diphosphoglycerate (DPG) on the ligation rate constants of human glycosylated minor hemoglobins (A_{1c}, A_{1b}, A_{1a2}, A_{1a1}) and a variant hemoglobin (Hb Hope)

Hemoglobins	No DPG			500 μM DPG		
	k (s ⁻¹)	k ₄ (s ⁻¹)	I' (μM ⁻¹ s ⁻¹)	k (s ⁻¹)	k ₄ (s ⁻¹)	I' (μM ⁻¹ s ⁻¹)
A _{1a1}	97, 23*	23	0.10	97, 23*	23	0.11
A _{1a2}	95, 26*	23	0.18	93, 24*	22	0.18
A _{1b}	33	19	0.20	32	17	0.19
A _{1c}	29	15	0.25	29	13	0.20
A ₀	34	18	0.15	43	19	0.091
Hb Hope	77, 21*	21	0.11	85, 20*	22	0.085

*: biphasic. k: the O₂ dissociation rate constant, k₄: the rate constant of O₂ dissociation with CO replacement and I': the CO association rate constant. 0.05M Bis-Tris, pH 7.20, 0.1M Cl⁻, 20°C.

Table 3. Effect of inositol hexaphosphate (IHP) on the ligation rate constants of human glycosylated minor hemoglobins (A_{1c}, A_{1b}, A_{1a2}, A_{1a1}) and a variant hemoglobin (Hb Hope)

Hemoglobins	No IHP			500 μM IHP		
	k (s ⁻¹)	k ₄ (s ⁻¹)	I' (μM ⁻¹ s ⁻¹)	k (s ⁻¹)	k ₄ (s ⁻¹)	I' (μM ⁻¹ s ⁻¹)
A _{1a1}	97, 23*	23	0.10	96, 24*	23	0.10
A _{1a2}	95, 26*	23	0.18	94, 24*	24	0.17
A _{1b}	33	19	0.20	34	19	0.15
A _{1c}	29	15	0.25	35	17	0.11
A ₀	34	18	0.15	65	25	0.058
Hb Hope	77, 21*	21	0.11	90, 19*	23	0.076

*: biphasic. k, k₄ and I' are as for Table 2. 0.05M Bis-Tris, pH 7.20, 0.1M Cl⁻, 20°C.

k_4 については、主成分 Hb A₀ において、IHP 効果が著明であるのに対し、グリコシル化 Hb 各成分および Hb Hope ではほとんど効果が認められなかった。

l' については、IHP 添加により、主成分 Hb A₀ では約 40% にまで低下した。Hb A_{1c} においても、ほぼ同様の効果がみられたが、A_{1b} では明らかに減弱し、A_{1a2}、A_{1a1} においては、ほとんど効果が認められなかった。Hb Hope については、IHP 添加により l' は約 70% に低下したが、主成分 Hb A₀ に比べると IHP 効果は明らかに減弱している。Hb A₀ および A_{1a1} における CO 結合反応に対する IHP 効果を、一次反応プロットにより比較したのが Fig. 7 である。Hb A₀ で著明な IHP 効果がみられるのに対し、A_{1a1} ではほとんどこれを認めない。

5. 速度定数に対する pH の効果

pH 7.20 および pH 7.60 における各 Hb の速度定数

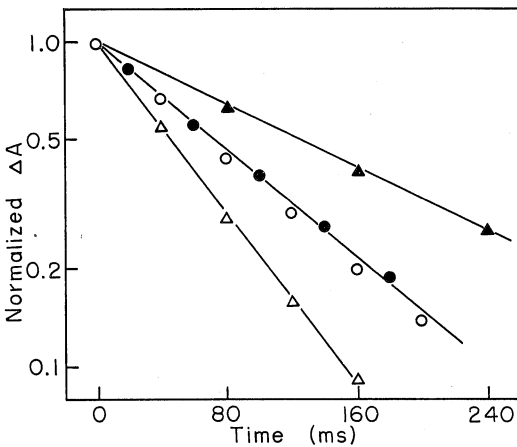


Fig. 7. First-order plots of CO association to Hb A_{1a1} (○, ●) and Hb A₀ (△, ▲). Open symbols: without IHP, closed symbols: with 500 μM IHP. 0.05M Bis-tris, pH 7.20, 0.1M Cl⁻, 20°C. After mixing, [Hb]: 5~6 μM and [CO]: 96~100 μM. Observed at 420nm.

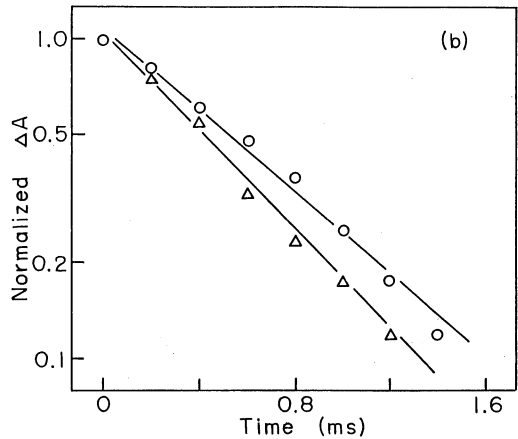
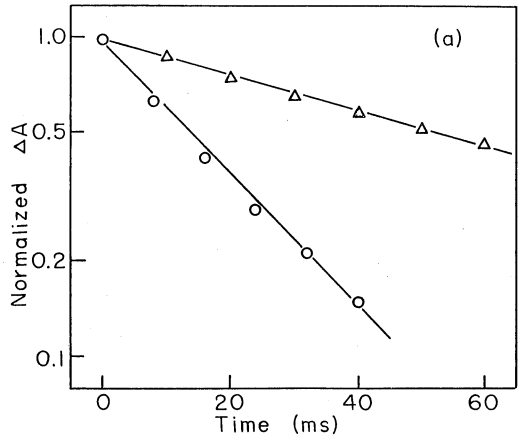


Fig. 8. First-order plots of (a) O₂ dissociation from and (b) O₂ association to β^{Hope} (○) and β^A (△). 0.1M phosphate, pH 7.0, 20°C. (a) [Hb]: ~3 μM and [Na₂S₂O₄]: 6mM after mixing. Observed at 415nm. (b) [Hb]: 3~4 μM and [O₂]: 44 μM after mixing. Observed at 430nm.

Table 4. Effect of pH on the ligation rate constants of human glycosylated minor hemoglobins (A_{1c}, A_{1b}, A_{1a2}, A_{1a1}) and a variant hemoglobin (Hb Hope)

Hemoglobins	pH 7.20			pH 7.60		
	k (s ⁻¹)	k ₄ (s ⁻¹)	l' (μM ⁻¹ s ⁻¹)	k (s ⁻¹)	k ₄ (s ⁻¹)	l' (μM ⁻¹ s ⁻¹)
A _{1a1}	97, 23*	23	0.10	85, 23*	21	0.12
A _{1a2}	95, 26*	23	0.18	80, 25*	22	0.18
A _{1b}	33	19	0.20	28	15	0.23
A _{1c}	29	15	0.25	23	11	0.27
A ₀	34	18	0.15	24	12	0.20
Hb Hope	77, 21*	21	0.11	63, 18*	17	0.13

*: biphasic. k, k₄ and l' are as for Table 2. 0.05M Bis-Tris, pH 7.20, 0.1M Cl⁻, 20°C.

k , k_4 , l' を Table 4 に一括, 比較した.

pH の上昇により, 各 Hb とも k の低下がみられた. Hb A_{1a1} , A_{1a2} , Hb Hope については, 速い相における k の低下がみられたが, 遅い相においてはほとんど変化が認められなかった. また pH の上昇により, 各 Hb を通じ k_4 の低下がみられた. pH の上昇は, 各 Hb における l' を増大させたが, pH 効果の程度は, 主成分 Hb A_0 に比べ, グリコシル化 Hb, Hb Hope ともやや低下した.

6. β^A および β^{Hope} の O_2 解離~結合速度

β^A および β^{Hope} の O_2 解離~結合反応の一次反応プロットを Fig. 8 に示す. β^{Hope} の O_2 解離速度が β^A に比し, 非常に速いものに対し (Fig. 8 a), O_2 結合速度に関しては, 両 β 鎖間に目立った差異はみられなかった (Fig. 8 b).

α^A , β^A , β^{Hope} について, O_2 解離速度定数 k , O_2 結合速度定数 k' , 前報と同様, k および k' より算出した P_{50} の値を Table 5 に一括, 比較した. k' については, β^A および β^{Hope} で大差は認めないが, β^{Hope} の k は 47.6 s^{-1} で, β^A での値 (12.3 s^{-1}) の 4 倍弱であった. したがって, β^{Hope} の低 O_2 親和性⁹⁾ は主として k の高値に起因していることが明らかになった.

考 察

Hb には, 平衡論的観点からみて, 組織への O_2 運搬を効率的にするいくつかの優れた機能特性 (ヘム間相互作用, Bohr (H^+) 効果など) が具わっている²⁰⁾. 一方, Hb ($\alpha_2\beta_2$) を構成する 2 種類のポリペプチド鎖 (α および β 鎖) には, これら諸特性がみられない^{20,21)}. このような '無から有' を生ずる現象が, どのようなメカニズムによって可能となるのか, この点についてさまざまな仮説はあるものの²⁰⁾, 確実なことは必ずしも明らかではない.

今回, β 鎖に特異的な構造修飾をもつ 5 種類の Hb (Hb A_{1c} , A_{1b} , A_{1a2} , A_{1a1} と Hb Hope) について, 従来, あまり精査されていない速度論的な観点から, この問題へのアプローチを試みた.

1. 測定に供した Hb 試料について

グリコシル化微量 Hb 成分の分離と命名は, McDonald ら²⁾ に依った (Fig. 1). クロマト挙動からみた場合, 各成分の中には (特に Hb A_{1a1} および A_{1a2}) なお不均質性を思わせるものもないではないが (Fig. 1), ゲル電気泳動でみる限り, 満足すべき単離, 純化標品がえられたと考えるとよい (Fig. 2). Acid hybridization 法により, これら微量成分における構造修飾は β 鎖に局限して存在し (Fig. 2), また Hb A_{1a1} , A_{1a2} にあっては, 1 分子 (4 量体) あたりそれぞれ 2 および 1 原子のりんが検出された.

Table 5. The rate constants for the reaction with oxygen of the isolated chains from Hb A and Hb Hope and P_{50} calculated therefrom

Chain	k (s^{-1})	$k' \times 10^{-6}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	P_{50} (mmHg)
α^{A*}	19.3	38	0.28
β^{A*}	12.3	42	0.16
β^{Hope}	47.6	36	0.73

k : the O_2 dissociation rate constant, k' : the O_2 association rate constant.

0.1M phosphate (pH 7.0), 20°C . *: results from the preceding paper¹⁵⁾.

P_{50} calculated from the rate constants, k and k' .

2. O_2 平衡特性と O_2 反応速度特性との対比

グリコシル化 Hb (A_{1a1} , A_{1a2} , A_{1b} , A_{1c}) は主成分 Hb A_0 に比べ, 協同性 (ヘム間相互作用) と O_2 親和性の低下, IHP 効果や Bohr 効果等ヘテロトロピック効果の減弱などの O_2 平衡機能変化を示す (Figs. 3 & 4, Table 1)⁴⁾. なかでも, DPG~IHP 効果の減弱は著しく, Hb A_{1a1} および Hb A_{1a2} ではほとんど認められない. 今回の速度論の結果と対比してみると, Hb A_0 では DPG~IHP により CO 結合速度定数 (l') の低下と O_2 解離速度定数 (k) の上昇がみられたのに対し, グリコシル化 Hb では l' に対する効果, k に対する効果ともに減弱している (Figs. 6 & 7, Tables 2 & 3). 特に Hb A_{1a1} , A_{1a2} においては, 両効果とも完全に消失していることがわかった. これらの結果は, O_2 平衡に関してえられた結果とよく一致する. pH の効果についてみると, pH 上昇に伴い, Hb A_0 においては k の低下と l' の上昇がみられるが, 各微量成分では k の低下は同様にみられたもの (ただし, Hb A_{1a1} , A_{1a2} にあっては fast phase についてのみ), l' に対する効果に軽度ながら減弱がみられた (Table 4). この結果も, Bohr 効果についてえられた平衡論的知見 (Enoki ら: 未発表) とよく一致する. Hb Hope については, DPG~IHP の存在下, Hb A_0 の場合に比し l' に対する効果に減弱をみたのは上記と同様であるが, グリコシル化 Hb とは異なり, k に関しては Hb A_0 と同様な上昇を示した.

今回測定に用いた Hb は, Hb A_0 に比べ, 程度はさまざまなが何れも O_2 親和性の低下を示した. 特に, Hb A_{1a1} および A_{1a2} (Fig. 3), Hb Hope⁹⁾ においては著明な低下が認められた. これを今回の速度論的測定結果に照らしみるに, この 3 者に限ってみれば k 値 (fast phase) の増大が平衡論的にみた O_2 親和性低下の主な原因であると思われる (Fig. 5, Table 2).

3. Hb A_{1a1}, Hb A_{1a2}, Hb Hope の O₂ 解離反応における 2 相性

Hb A_{1a1}, A_{1a2} においては 2 相性の O₂ 解離反応が観測され、速い相と遅い相の O₂ 解離速度定数 k (pH 7.2) はそれぞれ $94 \sim 97 \text{ s}^{-1}$, $23 \sim 26 \text{ s}^{-1}$ となり、両 Hb ではほぼ同じ値を示した (Fig. 5, Tables 2, 3, 4). この値は、DPG ~ IHP の有無により変化しないが、pH の上昇により明らかに低下した (Table 4). Chiou ら⁹⁾ は Hb A₀ を glucose-6-phosphate (G6P) と孵置して合成グリコシル化 Hb (G6P-Hb) を作成し、その O₂ 解離反応が 2 相性で、速い相の $k = 87 \text{ s}^{-1}$ 、遅い相の $k = 27 \text{ s}^{-1}$ との結果を得ており、今回の結果とはよく類似する。さらに各相の実体に関し、異なる 2 つの波長 (584 と 587 nm) で観測される反応経過がそれぞれ 1 相性となり、かつそれらの k 値が速い相、遅い相の k とほぼ一致することから、速い相、遅い相は、それぞれ β 鎖、 α 鎖の反応経過に対応すると結論している。以上のことから、今回の Hb A_{1a1} および A_{1a2} における速い相、遅い相はそれぞれ β 鎖、 α 鎖に対応し、両鎖の k における大きな差を反映して 2 相性が生ずると考えることができる。因みに、Chiou らによれば、Hb A_{1a2} の実体は、G6P-Hb ではないかという⁹⁾。

Hb Hope の O₂ 解離反応も 2 相性を呈した (Fig. 5)。一方、その単離 β 鎖 (β^{Hope}) の k は 47.6 s^{-1} で β^A での約 4 倍となり、かつ単相の反応経過を示した (Fig. 8, Table 5)。Hb Hope の α 鎖は Hb A₀ のそれと同じであるから、 k は α^A と同じ 19.3 s^{-1} であり、Hb Hope における遅い相の $k \approx 20 \text{ s}^{-1}$ と一致している。以上、Hb A_{1a1}, A_{1a2}, Hb Hope および β^{Hope} についての結果から、以下のように推論することができる。すなわち、1) Hb A₀ ($\alpha^A \beta^A$) にあっては、構成サブユニット α^A, β^A の k 値に大差がないため (Table 5)、Hb A₀ に組みこまれた状態下でも反応経過は 1 相性となる。2) Hb A_{1a1} ($\alpha^A \beta^{\text{A1a1}}$), A_{1a2} ($\alpha^A \beta^{\text{A1a2}}$), Hb Hope ($\alpha^A \beta^{\text{Hope}}$) の場合、 β 鎖における構造修飾の結果、構成サブユニットの k 値間に β^{Hope} で実証したように大差が生じ、反応経過は 2 相性となる。3) β^{Hope} の k (47.6 s^{-1}) と Hb Hope での k ($60 \sim 90 \text{ s}^{-1}$) との比較から、ヘテロテトラマー構造への組みこみにより、両サブユニット (α, β) 間の機能特性差は、単離状態におけるよりさらに増強される。

4. グリコシル化 Hb および Hb Hope における構造-機能連関

グリコシル化 Hb は、たんぱく一次構造に関し主成分 Hb A₀ と全く同じであるが、 β 鎖 N 末 α -アミノ基に糖あるいは糖リン酸化合物が共有結合した化学修飾 Hb であるとされている^{2,22)}。Hb A_{1c} では、 β 鎖 N 末 α -アミノ

基がグルコースと Schiff 塩基を形成し、さらに Amadori 転位 (Amadori rearrangement) を経て共有結合を形成する⁹⁾。Hb A_{1b}, A_{1a2}, A_{1a1} の構造についてはなお未確定と言わざるをえないが、いずれも糖が β 鎖 N 末端に共有結合した構造が想定されている^{2,3,22)}。Hb A_{1a2}, A_{1a1} にはそれぞれ 1 リン酸、2 リン酸化合物の結合がみられ²⁾、今回の標品についてもりん定量によりこれを実証しえた。ごく最近、Hb A_{1b} について、付加しているのが糖ではなくピルビン酸であるとの報告もあるが²³⁾、 β 鎖 N 末 α -アミノ基ブロックの事実については変更がない。

β 鎖 N 末端のブロックによって、DPG 結合部位 (β 1 Val, β 2 His, β 82 Lys, β 143 His)²³⁾ への DPG や IHP の結合が阻害され、DPG ~ IHP 効果の低下が期待される。今回、O₂ 平衡 (Fig. 4) のみならず、反応速度論的にえた結果 (Tables 2 & 3) も、全てこの予想の正しいことを立証した。さらに、また、上記の DPG 結合部位を構成する 4 アミノ酸残基は全て陽荷電を有し、Hb 分子内では dyad 軸を中心に両 β 鎖の当該荷電が対称配置されている。このため両鎖間に静電斥力が生じ、Hb 分子が全体として弛んだ構造 (R state) をとる場合、促進的に働く、との仮説がある²⁴⁾。N 末ブロックは、このような陽荷電を消去する結果をもたらす。グリコシル化 Hb にみられる O₂ 親和性低下 (Fig. 3) の原因の少なくとも一半は、この点にあると思われる。グリコシル化 Hb における IHP 効果の低減と T 構造の安定化 (R 構造の不安定化) については、常磁性共鳴 (EPR) 法によっても既の実証されている²⁵⁾。また Hb A_{1a1}, A_{1a2} では、N 末に共有結合したりん酸化合物が、あたかも永続的に DPG が結合したのと同じ効果をもたらし⁴⁾、 β 鎖自身の k 増大を招くと共に α - β 鎖間の差を増大させ、その結果 2 相性の O₂ 解離反応を生ぜしめるとの解釈も可能である。各微量成分を通じ、程度の差こそあれ認められる協同性の低下 (Hill 定数 'n' の低下) は、T 構造の安定化による R-T swing の減弱によっても説明できるが、反応経過の 2 相性化に基づく O₂ 平衡平低下の可能性も否定できない。

Hb Hope は、 β 鎖にアミノ酸置換を有する異常 Hb である (β 136 Gly \rightarrow Asp)^{8,26)}。 β 鎖におけるこのアミノ酸置換が β 鎖 k 値の増大、 α - β 鎖間の k 差をもたらし、2 相性 O₂ 解離反応の原因になることは明らかである (Fig. 5, Tables 2 & 5)。置換部位は β 136 で、DPG その他のアロステリック・エフェクター結合部位と直接の関係はなく、また Hb の機能発現に重要な関わりをもつとされる $\alpha_1 \beta_1$ ないし $\alpha_1 \beta_2$ 接触部位²¹⁾ にも関与していない。おそらく β 136 Asp の COO⁻ 基と β 1 Val の α -NH₃⁺

基が塩橋を形成することにより、 β 鎖N末のブロックと同様の結果をもたらすのではないかと考えられる^{8,27,28}。また β 1 ValはDPG結合部位²³⁾であるとともにBohr効果にも寄与しているとの報告²⁹⁾からみて、 β 136位でのこの置換がDPG~IHP効果のみならず、pH効果の低下(Table 4)に関与している可能性も考えられる。

グリコシル化Hbは糖による化学修飾Hb、一方、Hb Hopeは異常Hbであるが、両者とも β 鎖に構造変化を有する広義の修飾Hbといえる。その機能変化における類似点は、上述のように構造的観点からもよく説明できる。Hbにおける構造と機能連関の問題の解明に、同様な構造修飾Hbをモデルとした反応速度論的アプローチは、今後おおいに有用であると思われる。

結 語

ヒトのグリコシル化微少ヘモグロビン(Hb A_{1a1}, A_{1a2}, A_{1b}, A_{1c})について、O₂平衡機能特性をみるとともに、ストップフロー法により、ガス状リガンド(O₂およびCO)結合-解離反応を速度論的に検討した。また、Hb Hope(β 136(H14)Gly → Asp)のリガンド結合速度論についても、同様に検討した。

(1) 単離したグリコシル化微少Hb各成分は電気泳動上均一で、acid hybridization法により、各微少成分の構造修飾は β 鎖に限局していることを明らかにした。

(2) 微少Hb成分のO₂平衡は、A_{1c}, A_{1b}, A_{1a2}, A_{1a1}の順に、協同性、O₂親和性ならびにヘテロトロピック効果(アオン効果、DPG効果など)の低下を示した。とりわけ、A_{1a1}およびA_{1a2}においては、DPG効果がほとんど消失していた。

(3) 微少Hb成分のO₂解離速度定数(k)およびCO結合速度定数(l')に対するDPG~IHP効果は、主成分Hb A₀に比し、明らかに減弱しており、特に、Hb A_{1a1}、Hb A_{1a2}においてはほとんど認められなかった。また、Hb Hopeでは、l'に対するDPG~IHP効果が明らかに低下していた。

(4) Hb A_{1a1}、Hb A_{1a2}、Hb HopeのO₂解離反応は2相性を示し、遅い相のk値は、各Hbとも、ヒト成人ヘモグロビン(Hb A)の単離 α 鎖(α^A)での値とほぼ一致した。また、Hb Hopeの単離 β 鎖(β^{Hope})のk値はHb Aの単離 β 鎖(β^A)での値の4倍弱であった。

(5) 以上の結果から、ともに β 鎖に構造修飾を有する、グリコシル化微少HbおよびHb Hopeの機能-構造連関について考察を加えた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただきました榎泰義教授に深甚の謝意を表します。また、終始、御援助、御助言をいただきました教室諸兄姉に深謝いたします。

本論文の要旨は、第68回日本生理学会大会(1991年3月、京都)において発表した。

文 献

- Allen, D. W., Schroeder, W. A. and Balog, J. : J. Am. Chem. Soc. 80 : 1628-1634, 1958.
- McDonald, M. J., Shapiro, R., Bleichman, M., Solway, J. and Bunn, H. F. : J. Biol. Chem. 253 : 2327-2332, 1978.
- Bunn, H. F., Haney, D. N., Gabbay, K. H. and Gallop, P. M. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 67 : 103-109, 1975.
- McDonald, M. J., Bleichman, M. and Bunn, H. F. : J. Biol. Chem. 254 : 702-707, 1979.
- Prome, D., Blouquit, Y., Ponthus, C., Prome, J. -C. and Rosa, J. : J. Biol. Chem. 266 : 13050-13054, 1991.
- Chiou, S. -H., Garrick, L. M. and McDonald, M. J. : Biochemistry 21 : 13-20, 1982.
- Imagawa, S., Makino, N., Abe, T. and Sugita, Y. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 107 : 1355-1360, 1982.
- Enoki, Y., Ohga, Y., Furukawa, K., Takaya, A., Sakata, S., Kohzuki, H., Shimizu, S. and Tsujii, T. : HEMOGLOBIN 13 : 17-32, 1989.
- Jonxis, J. H. P. and Huisman, T. H. J. : A laboratory manual on abnormal haemoglobin. 2nd ed., Blackwell Scientific Publ., Oxford, p41, 1968.
- Ames, B. N. and Dubin, D. T. : J. Biol. Chem. 235 : 769-775, 1960.
- Singer, S. J. and Itano, H. A. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 45 : 174-184, 1958.
- Bucci, E. and Fronticelli, C. : J. Biol. Chem. 240 : PC551-552, 1965.
- Enoki, Y., Ochiai, T., Ohga, Y., Kohzuki, H. and Sakata, S. : Biochim. Biophys. Acta 744 : 71-75, 1983.
- Boyer, P. D. : J. Am. Chem. Soc. 76 : 4331-4337, 1954.
- 松村一仁 : 奈医誌. 43 : 332-340, 1992.

- 16) **Altman, P. L.** and **Dittmer, D. S.** : Respiration and Circulation. Federation of American Societies for Experimental Biology. p16-17, 1973.
- 17) 化学便覧(新版). 日本化学会編, 丸善, 東京, p571-572, 1958.
- 18) 榎 泰義 : 奈医誌. **10** : 345-355, 1959.
- 19) **Gibson, Q. H.** and **Roughton, F. J. W.** : J. Physiol. **145** : 32P, 1959.
- 20) **Antonini, E.** and **Brunori, M.** : Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands. North-Holland, Amsterdam, 1971.
- 21) **Benesch, R. E., Ranney, H. M., Benesch, R.** and **Smith, G. M.** : J. Biol. Chem. **236** : 2926-2929, 1961.
- 22) **Bunn, H. F., Haney, D. N., Kamin, S., Gabbay, K. H.** and **Gallop, P. M.** : J. Clin. Invest. **57** : 1652-1659, 1976.
- 23) **Arnone, A.** : Nature **237** : 146-149, 1972.
- 24) **Bonaventura, C.** and **Bonaventura, J.** : *in* Biochemical and Clinical Aspects of Hemoglobin Abnormalities (Caughey, W. S., ed.). Academic Press, New York, p647, 1978.
- 25) **Nagai, K., Enoki, Y., Kaneko, A.** and **Hori, H.** : Biochim. Biophys. Acta **623** : 376-380, 1980.
- 26) **Minnich, V., Hill, R. J., Khuri, P. D.** and **Anderson, M. E.** : Blood **25** : 830-838, 1965.
- 27) **Thillet, J., Caburi, J., Brun, B., Cohen-Solal, M., Garel, M. C., N'Go Minii, M.** and **Rosa, J.** : FEBS Lett. **47** : 47-52, 1974.
- 28) **Dintzis, H. M.** and **Battison, D.** : *in* Atlas of Molecular Structures in Biology. 2. Haemoglobin and Myoglobin (Fermi, G. and Perutz, M. F., eds.). Clarendon Press, Oxford, p93, 1981.
- 29) **Perutz, M. F., Kilmartin, J. V., Nishikura, K., Fogg, J. H., Butler, P. J. G.** and **Rollema, H. S.** : J. Mol. Biol. **138** : 649-670, 1980.