

# へムたんぱく—ガス状リガンド結合の反応速度論

## I. ミオグロビンおよびヘモグロビン単離鎖のO<sub>2</sub>結合反応

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 I. THE REACTION OF MYOGLOBIN AND THE ISOLATED HEMOGLOBIN CHAINS WITH OXYGEN

KAZUHIITO MATSUMURA

Second Department of Physiology, Nara Medical University

Received July 27, 1992

*Summary*: A simple procedure for the determination of the dead time of the stopped-flow spectrophotometer was developed using the reducing reaction of 2, 6-dichlorophenolindophenol (DCIP) by L-ascorbic acid. The use of this simple irreversible reaction system made it possible to measure the dead time by a simple graphical analysis. Two other methods reported previously were also employed for the measurement. The values determined by the present method were in good agreement with those by the previous methods. Since the isolated hemoglobin chains as well as myoglobin exhibit no cooperativity in the O<sub>2</sub> equilibria, their reactions with O<sub>2</sub> are expected to be described by a single-step reaction mode. The kinetics of the reaction with O<sub>2</sub> of freshly prepared myoglobin from chicken gizzard and isolated chains from human adult hemoglobin ( $\alpha^A$  and  $\beta^A$ ) were studied with the stopped-flow method. The rate constants of O<sub>2</sub> association and dissociation were determined and the O<sub>2</sub> affinity, expressed as the O<sub>2</sub> pressure at half-saturation (P<sub>50</sub>), was calculated therefrom. The values of P<sub>50</sub> calculated from the rate constants agree well with those obtained directly from the O<sub>2</sub> equilibrium measurements. I conclude that the reaction with O<sub>2</sub> of myoglobin and isolated hemoglobin chains is a single-step reaction.

#### Index Terms

dead time, stopped-flow spectrophotometer, myoglobin, isolated hemoglobin chains, kinetics

#### まえおき

ヘモグロビン(Hb)やミオグロビン(Mb)はO<sub>2</sub>やCOのようなガス状リガンドと可逆的に結合することができる。このようなリガンド結合反応に関する研究は、ただに血液によるO<sub>2</sub>運搬や筋におけるO<sub>2</sub>の効率の利用といった生理機能の解明に重要なだけでなく、ひろく機能た

んぱくの働きを理解する上でも重要である。ところで、リガンド結合反応に対するアプローチとしては平衡論的立場からのものが大半で、速度論的視点からのアプローチは比較的少ないのが現状である。

Hb, Mbのリガンド結合反応は非常に速い反応なので、このような高速反応の速度論的研究には、ストップフロー(stopped-flow)法<sup>1)</sup>、温度ジャンプ(T-jump)

法<sup>2)</sup>, フラッシュフォトリシス (flash photolysis) 法<sup>3)</sup> など特殊な手法が必要となる。なかでもストップフロー法は最も取り扱いが簡便で、適用範囲も広い一般的な高速反応測定法である。その原理は簡単で、2つの反応試料溶液を高圧 N<sub>2</sub> ガスで高速に駆出して混合することにより反応を開始し、その反応経過を吸光度や蛍光などで連続的に検出、記録するものである。ただこの場合、混合された試料溶液が混合点から観測セルに至るまでの間 (不感時間 dead time) に進行した反応は観測されないという制約がある。不感時間 (t<sub>d</sub>) は装置によって異なり、また同じ装置についても、観測セルの光路長や駆動圧によって異なるので、実験に使用する装置の t<sub>d</sub> を正確に評価することは、反応を解析する際にきわめて重要である。ストップフロー装置の t<sub>d</sub> 測定法については、これまでにいくつかの報告がある<sup>4-10)</sup>。最近、Brissette ら<sup>10)</sup> は、Mg<sup>2+</sup> と 8-hydroxyquinoline のキレート生成反応を用いた t<sub>d</sub> の測定法を報告しているが、この反応は可逆反応であるため、測定結果の解析がやや複雑となる点で難がある。そこで、今回、テスト反応として、単純な不可逆反応である L-アスコルビン酸による 2, 6-dichlorophenolindophenol (DCIP) の還元反応を用いることにより、Brissette らの方法<sup>10)</sup> の簡便化を図った。

Mb は単量体のへムたんぱくで、1分子の O<sub>2</sub>~CO と可逆的に結合する。O<sub>2</sub> 平衡曲線は直角双曲線 (rectangular hyperbola) となり、Hb の場合にみられる協同性 (cooperativity) はない。Mb と O<sub>2</sub> の結合平衡は単純な一段階の反応式で表わされ、平衡定数は、結合速度定数と解離速度定数の比として与えられる。Hb, Mb の O<sub>2</sub> 親和性は通常、50%飽和時の O<sub>2</sub> 分圧 (P<sub>50</sub>) で表わすが、協同性がない Mb の場合、これは解離平衡定数に相当する。そこで、速度論実験で速度定数が得られれば、これから P<sub>50</sub> が求められ、平衡実験で直接得られる P<sub>50</sub> と一致することが期待される。単量体ではないが、単離した Hb 構成鎖もガス状リガンドとの結合反応に関しては同様な挙動を示すことが報告されている<sup>11)</sup>。

Mb および Hb 単離鎖のリガンド結合に関する速度論的研究はこれまでも報告されているが<sup>12-16)</sup>、速度定数から計算した平衡定数と、平衡実験で直接求めた平衡定数の間には大きな食い違いがみられる。この食い違いの原因としては、実際の反応機構が当初予想された反応式よりも複雑なもので、二分子の結合過程に続いて、おそらくは分子内コンフォメーション変化が生ずるためではないか、との考えが提出されている<sup>12,14)</sup>。しかし、これらの実験では主として、市販の Mb 標品 (一般にかなり不純物と変性 Mb を含む) がそのまま測定に供されている

点からみて、Mb 標品の質に原因の一半を求めることも可能である。

そこで今回、ニワトリ砂囊平滑筋から抽出、純化した新鮮な Mb および Hb A (α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>) から単離した新鮮な α<sup>A</sup> および β<sup>A</sup> 鎖について、ストップフロー法により O<sub>2</sub> 結合反応の速度論的測定を行い、速度定数から P<sub>50</sub> を求めたところ、平衡実験で直接求めた P<sub>50</sub> とよく一致することが確認された。

### 試料および実験方法

- (1) ストップフロー分光光度計の t<sub>d</sub> の測定
- 1) ストップフロー装置の t<sub>d</sub>

Fig. 1 は、ストップフロー法の原理と不感時間の概念を模式的に示したものである。別々のリザーバー (溶液だめ) に入れた 2 種類の試料溶液 A, B を高圧の N<sub>2</sub> ガス (駆動圧: 5~8 kg/cm<sup>2</sup>) により急速にミキシング・チェンバー内で混合し、反応を開始させる (M 点)。流れを急速停止させた後、観測セル内 (O 点) で進行する反応を吸光度 (その他の物理量) の経時変化として検出、記録す

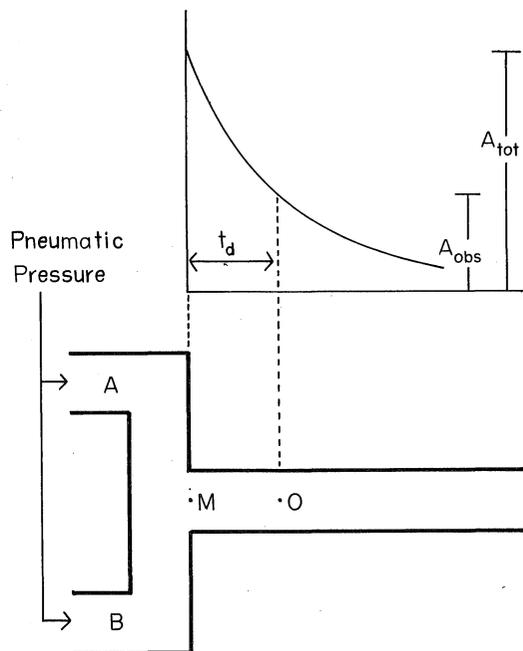


Fig. 1. Schematic representation of the stopped-flow apparatus and its dead time (t<sub>d</sub>). Two solutions of reactants (A and B) are rapidly mixed in the mixing chamber (M) and the reaction is followed in the observation cell (O). A<sub>obs</sub> and A<sub>tot</sub> denote the actually observed and total potential absorbance changes, respectively. See text for details.

る。ここで問題となるのが  $t_d$  である。試料溶液 A, B が M 点で混合されると同時に反応は始まるが、混合液が観測セル(O 点)に達するまでの間に既に反応は進行しており、この間に進行した反応は観測することができない。混合液が混合点(M 点)から観測セル(O 点)に達するのに要する時間を不感時間と呼び、 $t_d$  と表わす。実際に観測されるのは  $t_d$  以後の反応( $A_{obs}$ )である。いま、速度定数  $k_{app}$  の一次反応を不感時間  $t_d$  の装置で観測する場合を考える。実際に観測される吸光度変化を  $A_{obs}$ 、反応により生ずべき全吸光度変化を  $A_{tot}$  とすると、一次反応に関する速度式から次の関係が成り立つ。

$$k_{app} \cdot t_d = 2.303 \log(A_{tot}/A_{obs}) \quad (1)$$

これから明らかなように、 $t_d$  が小さいほど、全反応量のうち実際に観測される反応量の割合  $A_{obs}/A_{tot}$  が大きく、したがって、不感時間をできる限り短縮することが装置の性能の向上につながることになる。

## 2) $t_d$ の測定

L-アスコルビン酸による 2, 6-dichlorophenolindophenol(DICP)の還元反応を用いて、ストップフロー分光光度計 RA-401(ユニオン技研)の  $t_d$  を測定した。0.1 mM の DCIP 溶液を種々の濃度(2.5-20 mM)の L-アスコルビン酸溶液と急速に混合し、DCIP が還元されてその濃青色が消失する過程を、524 nm における吸光度で追跡した。吸光度の経時変化は接続したコンピュータ(SORD SYSTEM-77)に入力、記憶させると同時にブラウン管オシロスコープ(ユニオン技研 RA-453)に映し出した後、随時 X-Y レコーダ(ユニオン技研 RA-452)に描記させた。L-アスコルビン酸の濃度は DCIP の 20 倍モル過量以上とし、反応は擬一次反応として取り扱った。装置に接続したコンピュータにより、反応曲線から擬一次速度定数を求めた。測定にあたっては光路長 10 mm および 2 mm の観測セルを用い、駆動圧は接続した  $N_2$  ボンベ(住友精化: zero-A)により 5 ~ 8 kg/cm<sup>2</sup> とした。恒温槽から恒温水を循環させ、観測セル部の温度を 25°C に保った。DCIP はまず少量のブタノールに溶解した後、脱イオン水を加えて 0.1 mM 溶液とした。また L-アスコルビン酸に濃塩酸を加えて DCIP 溶液と混合後の pH が 2.0 になるよう pH を調整した。試料溶液は必ず実験の直前に新しく調製した。

## (2) Mb および Hb A 構成鎖の調製

Mb は新鮮なニワトリ筋骨平滑筋から、熱変性-ゲル濾過(Sephadex G-75)-クロマトフォーカス法<sup>17)</sup>により単離、純化し、主成分(Mb I)を用いた。Hb A の構成鎖( $\alpha^A$  と  $\beta^A$ )の単離は、酸性下 p-chloromercuribenzoate(PCMB)を用いる Bucci-Fronticelli 法<sup>18)</sup>により、また

$\beta$ -メルカプトエタノールおよびゲル濾過クロマト法(Sephadex G-10)により単離鎖から PCMB を除去した<sup>19)</sup>。試料 Mb,  $\alpha^A$ ,  $\beta^A$  の純度はゲル電気泳動により、Hb A 構成鎖からの PCMB 除去は Boyer 法<sup>20)</sup>による SH 滴定によりそれぞれ確認した。単離は CO 飽和条件下、氷室中(4°C)で行った。

## (3) Mb および Hb 単離鎖の O<sub>2</sub> 結合~解離速度の測定

速度論実験は前述のストップフロー分光光度計 RA-401 を使用して行った。ニワトリ砂囊 Mb I の O<sub>2</sub> 解離反応測定には光路長 10 mm の観測セルを用い、他のストップフロー実験では光路長 2 mm の観測セルを用いた。駆動圧は 7 kg/cm<sup>2</sup> とした。 $t_d$  は光路長 2 mm, 10 mm のとき、それぞれ 0.9 msec, 1.9 msec であった。測定に先立ち、CO 型で水冷保存された試料溶液は、氷室内で蛍光灯照射下に O<sub>2</sub> 通気し、オキシ型に変換した。

O<sub>2</sub> 結合反応は、Mb,  $\alpha^A$  鎖,  $\beta^A$  鎖のデオキシ型の溶液を O<sub>2</sub> 溶液(80~140  $\mu$ M)と急速に混合し、波長 430 nm において観測した。各試料のデオキシ型溶液は次のようにして作製した。 $N_2$  (住友精化: zero-A)で飽和した 0.1 M 燐酸緩衝液と平衡させた Sephadex G-25 カラム(0.9 x 25 cm)にヘムあたり約 10 倍モル過量の dithionite 溶液を 0.5 ml 添加し、沈入後に試料のオキシ型溶液を添加、 $N_2$  で飽和した緩衝液で溶出した。溶出した試料溶液は、特製の脱気-ガス平衡装置によりさらに数回の脱気と  $N_2$  ガスの通気-平衡を反復し、デオキシ化の完結したことを分光学的に確認した後、空気と接触することなく測定セル内へ注入した。O<sub>2</sub> 溶液の作製にあたっては、空気と平衡した緩衝液を  $N_2$  平衡緩衝液で適宜希釈した。溶存 O<sub>2</sub> 量は、水溶液に対する O<sub>2</sub> の溶解度係数<sup>21)</sup>から算出した。

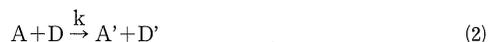
O<sub>2</sub> 解離反応は、オキシ型の試料溶液を 12 mM dithionite 溶液と急速混合し、波長 415 nm で観測した。

試料溶液の濃度はニワトリ砂囊 Mb で約 10  $\mu$ M(混合後)、 $\alpha^A$  鎖および  $\beta^A$  鎖で 2 ~ 3  $\mu$ M(混合後)とした。実験は 0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.0), 20°C の条件で行った。

## 結 果

### (1) ストップフロー分光光度計の不感時間の測定

L-アスコルビン酸(A)と DCIP(D)の反応は次のように表わされる。



ただし、k は二次速度定数、A', D' は反応生成物を示す。

DCIP に比べ、L-アスコルビン酸が大過剰に存在するとき  $[A] \gg [D]$ , 反応は擬一次反応として取り扱うことができ、見かけの一次速度定数  $k_{app}$  は L-アスコルビン酸の濃度  $[A]$  に比例する。

$$k_{app} = k[A] \quad (3)$$

$k_{app}$  を  $[A]$  に対してプロットすると Fig. 2 a に示すように直線が得られ、その勾配として二次速度定数  $k$  が求められる。(3)式を用いて(1)式を書き直すと

$$\log A_{obs} = -(kt_d/2.303)[A] + \log A_{tot} \quad (4)$$

を得る。L-アスコルビン酸と DCIP の反応は(2)式に示すように不可逆反応なので、 $A_{tot}$  は DCIP の濃度によってのみ決まる。つまり、DCIP の濃度を一定に保つ限り、 $[A]$  を変えても  $A_{tot}$  は一定である。したがって、(4)式より、 $\log A_{obs}$  を  $[A]$  に対してプロットすれば直線が得ら

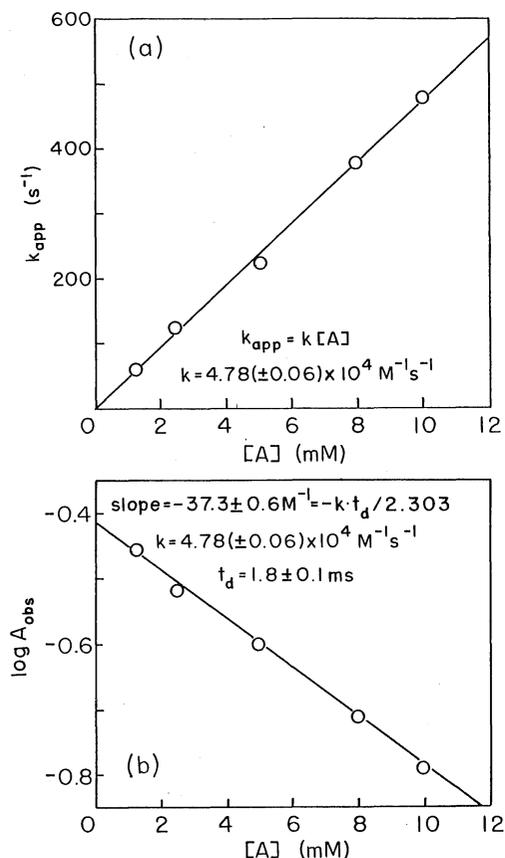


Fig. 2. Reducing reaction of 0.1 mM 2, 6-dichlorophenolindophenol (DCIP) by ascorbic acid (A). Plots of  $k_{app}$  (a) and  $\log A_{obs}$  (b) against  $[A]$ . Experiments were carried out at pH 2.0 and 25°C. Driving pressure: 7 kg/cm<sup>2</sup>, Optical path length: 10 mm.

れ、その勾配  $-(kt_d/2.303)$  と Fig. 2 a から得られた  $k$  の値から  $t_d$  を求めることができる。Fig. 2 b に  $\log A_{obs}$  と  $[A]$  の関係を示す。光路長 10 mm の観測セルを使用し、駆動圧 7 kg/cm<sup>2</sup> のときの  $t_d$  は 1.8 msec と算出された。さらに、駆動圧および観測セルの光路長を変えて  $t_d$  を測定した。その結果を Table 1 に示す。駆動圧が大きくなり、観測セルの光路長が短いほど、不感時間は短くなる。光路長 2 mm の観測セルを使用し、駆動圧 7 kg/cm<sup>2</sup> のとき  $t_d$  は 0.9 ms まで短縮することができた。

上述の  $\log A_{obs}$  vs.  $[A]$  プロットに加え、従来から報告されている以下の 2 つの方法による  $t_d$  測定を試みた。1) 反応曲線から得た  $k_{app}$ ,  $A_{obs}$  と別途静的な測定から得た  $A_{tot}$  を用いて、(1)式より  $t_d = (2.303/k_{app}) \log(A_{tot}/A_{obs})$  として  $t_d$  を計算した<sup>4,6)</sup>。2)  $[A]$  を変えたときの反応曲線の一次反応プロットを  $t = 0$  以前に外挿すると一点で交差し、これは反応開始時刻に相当する。この交点

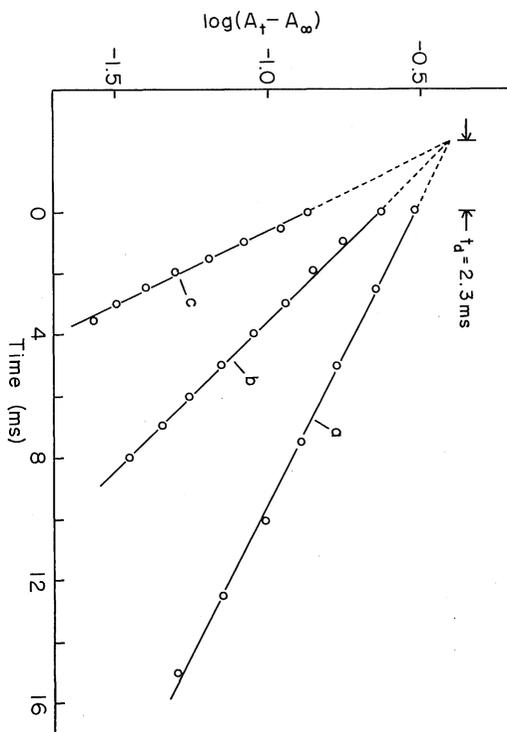


Fig. 3. First-order plots of reduction of DCIP at various concentrations of ascorbic acid. The concentrations employed were: (a) 2.5 mM, (b) 5 mM, and (c) 10 mM.  $(A_t - A_{\infty})$  represent the difference between the absorbance at time  $t$  and the final one. All experiments were carried out at pH 2.0 and 25°C. Driving pressure: 5 kg/cm<sup>2</sup>, Optical path length: 10 mm. See text for explanations.

と観測開始点(t = 0)の時間間隔がt<sub>d</sub>に当たる<sup>5,9)</sup>(Fig. 3).

本論文で述べた log A<sub>obs</sub> vs. [A] プロット法および上述の2つの方法で測定した t<sub>d</sub>の値を Table 1 に一括, 比較した. 三者の間にはよい一致がみられた.

(2) Mb および Hb 構成鎖 O<sub>2</sub> 結合の速度論

今回の実験で用いたニワトリ砂囊平滑筋から分離した Mb I は, ゲル電気泳動上均質で不純物は全くみられない (Fig. 4). また, Hb A から Bucci-Fronticelli 法<sup>19)</sup>で分離, 脱 Hg<sup>20)</sup>した α<sup>A</sup>鎖, β<sup>A</sup>鎖での SH タイターは, それぞれ 1.15 SH/chain, 1.89 SH/chain となり, ほぼ完

Table 1. Values of the dead time at various pneumatic pressures determined by different methods

Pneumatic Pressure (kg/cm <sup>2</sup> )	Dead time (ms)		
	a	b	c
5	2.3±0.1	2.3	2.3±0.2
6	1.9±0.1	2.3	2.0±0.2
7	1.8±0.1	1.7	1.9±0.2
	0.9±0.1*		
8	1.7±0.1	1.8	1.8±0.1

a : a plot of log A<sub>obs</sub> vs. [A]  
 b : extrapolation of first-order plots  
 c : (2.303/k<sub>app</sub>) log (A<sub>tot</sub>/A<sub>obs</sub>)  
 \* : Optical path length : 2 mm. The other measurements with the path length of 10 mm.

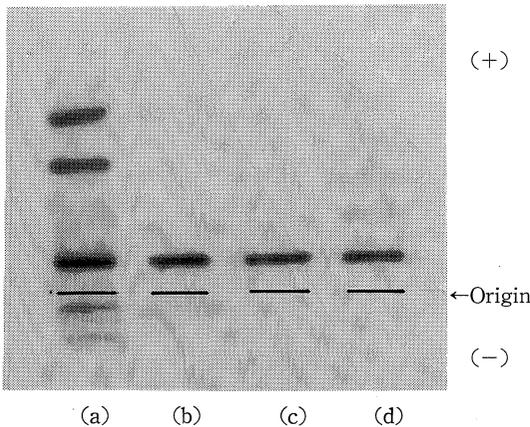
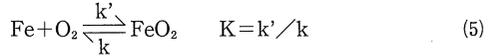


Fig. 4. Starch gel electrophoresis of chicken myoglobin. Main myoglobin component (Mb I) from the skeletal muscle (b) and gizzard (c). The raw myoglobin preparations from the skeletal muscle (a) and gizzard (d) are also shown. Tris-EDTA-Borate buffer system (pH 8.6) and Amido Black 10B stain were used.

全に脱 Hg されていることが確認された.

Fig. 5 に, 今回ストップフロー法により観測したニワトリ筋胃 Mb I における O<sub>2</sub> 一結合ならびに一解離反応経過の実例を示す.

Mb および Hb 構成鎖と O<sub>2</sub> の反応は次のように表わされる.



ここで, k', k はそれぞれ結合および解離速度定数, K は結合平衡定数, Fe は各ヘム蛋白である. デオキシ型の試料溶液と O<sub>2</sub> 溶液を混合したときの反応の速度式は,

$$-d[Fe]/dt = k'[Fe][O_2] - k[FeO_2] \quad (6)$$

となり, Fe に比べて O<sub>2</sub> が大過剰の場合, 擬一次反応として扱うことができる. また, k に比べて k' は十分大きく, [O<sub>2</sub>] も十分大きいので, k [FeO<sub>2</sub>] の項は事実上無視でき, (6)式は

$$-d \ln [Fe] / dt = k_{app} = k'[O_2] \quad (7)$$

と書ける. 一次反応プロットの勾配から見かけの一次速度定数 k<sub>app</sub> が得られ, これと [O<sub>2</sub>] から k' を求めることができる. Fig. 6 a は, ニワトリ砂囊 Mb I と O<sub>2</sub> (70 μM)

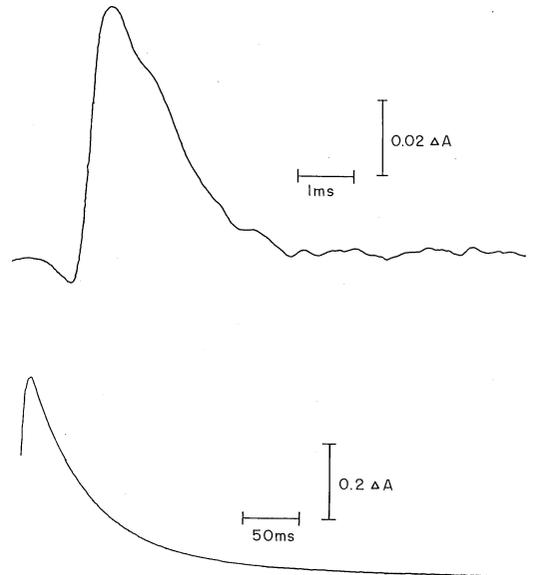


Fig. 5. Reaction traces of O<sub>2</sub> association (upper) to and O<sub>2</sub> dissociation (lower) from chicken gizzard myoglobin I (main component). O<sub>2</sub> association : [Mb] 13 μM, [O<sub>2</sub>] 70 μM, observed at 430 nm. O<sub>2</sub> dissociation : [MbO<sub>2</sub>] 11 μM, [Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>] 6 mM, observed at 415 nm. Both experiments were made in 0.1 M phosphate (pH 7.0), at 20°C.

との結合反応の一次反応プロットである。反応の初期部分は $t_d$ のため観測できなかったが、速度定数を求めるのに十分な吸光度変化は検出でき(Fig. 5), (7)式の擬一次反応速度式に従ったほぼ直線の一次反応プロットが得ら

れた。この勾配から $k_{app}$ を求め、 $[O_2]=70 \mu M$ から、 $O_2$ 結合速度定数 $k'=18 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ が得られた。

オキシ型試料溶液を dithionite 溶液と混合すると、遊離の溶存 $O_2$ は dithionite によって速やかに除去されるので、解離方向のみの不可逆反応



となり、一次反応の速度式

$$-d \ln [FeO_2] / dt = k \quad (9)$$

で表わされる。したがって、一次反応プロットをとれば、その勾配から $k$ が求められる。ニワトリ砂囊 Mb I について、 $MbO_2$  ( $22 \mu M$ )を dithionite ( $12 mM$ )と混合したときの $O_2$ 解離反応の一次反応プロットを Fig. 6 b に示す。(9)式に従った直線の一次反応プロットが得られ、この勾配から $O_2$ 解離速度定数は $k=18 s^{-1}$ と算出された。

以上のようにして得られたニワトリ砂囊平滑筋 Mb I および $\alpha^A$ ,  $\beta^A$ 鎖の速度定数 $k'$ ,  $k$ の値を Table 2 に一括した。

Mb は単量体で、協同作用(ヘム間相互作用)がないので、 $O_2$ 親和性を表わす $P_{50}$ ( $O_2$ 平衡曲線における50%飽和時の $O_2$ 分圧)は解離平衡定数に相当し、解離平衡定数と結合平衡定数 $K$ は互いに逆数の関係にある。したがって、速度定数の比 $k/k'$ として $P_{50}$ を算出することができる。

$$P_{50} = 1/K = k/k'(M) \quad (10)$$

$P_{50}$ ,  $k/k'$ はともに濃度の次元をもつ。ふつう $P_{50}$ は $O_2$ 分圧(mmHg)で表わされるので、 $P_{50}$ の算出にさいしては、 $20^\circ C$ における $O_2$ の溶解度係数 $0.03102 ml/ml/760 mmHg^{21)}$ を用い、 $1 mmHg \equiv 1.82 \mu M$ として換算した。

ニワトリ砂囊 Mb I について、速度定数から計算した $P_{50}$ の値と、同条件下 $O_2$ 平衡実験で直接求めた $P_{50}$ の値<sup>17)</sup>はそれぞれ平均 $0.54 mmHg$ と $0.50 mmHg$ と良好な一致を示した(Table 2)。また、速度定数から求めた $P_{50} = 0.54 mmHg$ を用い計算によって得た $O_2$ 平衡曲線を、実

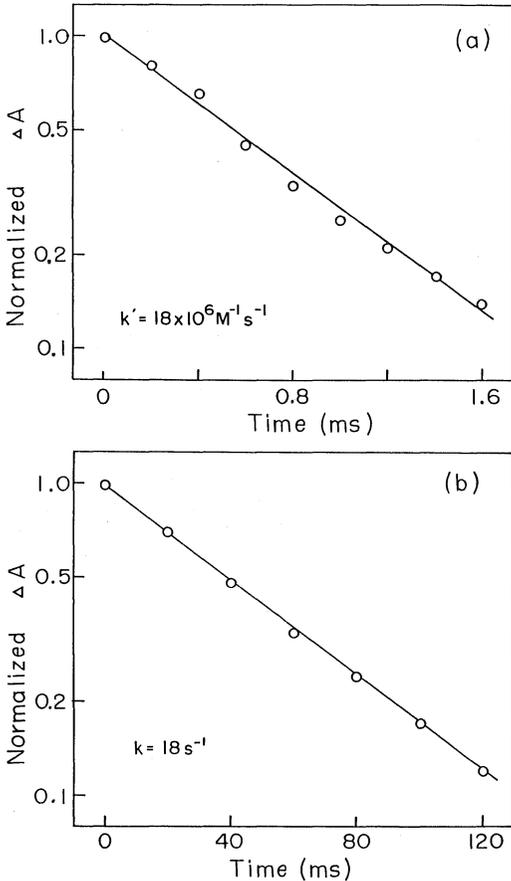


Fig. 6. First-order plots of  $O_2$  association (a) to and  $O_2$  dissociation (b) from chicken gizzard myoglobin I. Experimental conditions are the same as in Fig. 5.

Table 2. The kinetic constants and  $P_{50}$  calculated therefrom as compared with  $P_{50}$  determined by oxygen equilibria. Chicken myoglobin and isolated subunits of Hb A

	Kinetic		Equilibria	
	$k'$ ( $\times 10^{-6} \cdot M^{-1} \cdot s^{-1}$ )	$k$ ( $s^{-1}$ )	$P_{50}$ (mmHg)	$P_{50}$ (mmHg)
Chicken Gizzard Myoglobin I*	$18 \pm 1.3(6)$	$18 \pm 0.4(6)$	$0.54 \pm 0.04(10)$	$0.50 \pm 0.01(9)^{17)}$
$\alpha^A$	$38 \pm 5(6)$	$19.3 \pm 1.5(6)$	$0.28 \pm 0.04(10)$	$0.33 \pm 0.01(7)^{22)}$
$\beta^A$	$42 \pm 4(6)$	$12.3 \pm 0.4(6)$	$0.16 \pm 0.01(10)$	$0.16 \pm 0.01(11)^{22)}$

\* ; the main component. 0.1 M potassium phosphate (pH 7.0),  $20^\circ C$ . Figures in parentheses are no. of determinations.

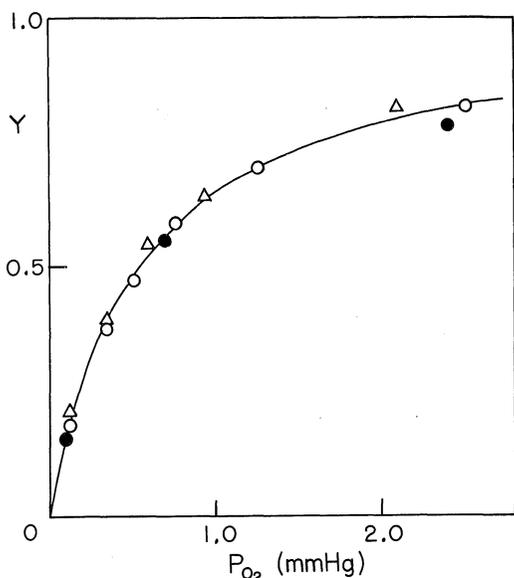


Fig. 7.  $O_2$  equilibrium curve for chicken gizzard myoglobin (Mb I) calculated from kinetically determined  $P_{50}$  as compared with the equilibrium data actually obtained. The curve was drawn using the  $P_{50}$  value of 0.54 mmHg. Equilibrium experiments: 0.1 M Tris-HCl-0 M  $Cl^-$  (○), -0.5 M  $Cl^-$  (●), pH 7.5 and 0.1 M potassium phosphate, pH 7.6 (△), 20°C, [Mb]  $1.7 \times 10^{-4}$  M.

験的に得た  $O_2$  平衡データと比較すると両者は互によく一致した (Fig. 7).

Mb とは異なり Hb A 構成鎖  $\alpha^A$ ,  $\beta^A$  は、単離状態下、単量体ではなくそれぞれ単量体~2量体の平衡状態および4量体として存在することが知られている<sup>11)</sup>。しかしながら、ガス状リガンドとの反応に関しては、協同作用その他のアロステリック機能を全く示さないなど、Mb と同様な挙動をとることが報告されている<sup>11)</sup>。したがって、上記 Mb の場合と全く同様に、速度定数から  $P_{50}$  を算出することができる。Table 2 から明らかなように、 $\alpha^A$  鎖については速度法で平均 0.28 mmHg、平衡法で 0.33 mmHg、 $\beta^A$  鎖については 0.16 mmHg と 0.16 mmHg<sup>22)</sup> と両法間で満足すべき一致が得られた。また、 $\beta^A$  鎖について速度定数から理論計算により描記した  $O_2$  平衡曲線は、平衡実験から実際に得た結果とよく一致した (Fig. 8)。

## 考 察

### (1) ストップフロー装置の不感時間の測定

試料溶液を急速に混合して反応を開始し、その時間経

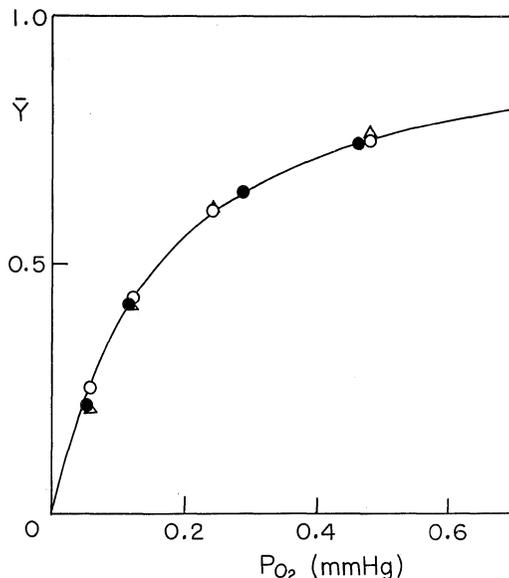


Fig. 8.  $O_2$  equilibrium curve for the isolated subunit  $\beta^A$  of hemoglobin A ( $\alpha_2^A \beta_2^A$ ) calculated from kinetically determined  $P_{50}$  as compared with the equilibrium data actually determined. The curve was drawn using the  $P_{50}$  value of 0.16 mmHg. Equilibrium experiments: 0.05 M Bis-tris-0 M  $Cl^-$  (○), -0.4 M  $Cl^-$  (●), and -0.7 M  $Cl^-$  (△), pH 7.3, 20°C, [Hb]  $1.7 \times 10^{-4}$  M.

過を追跡するストップフロー法は、高速反応の速度論的研究においては極めて有用な研究法で、広い分野で用いられている。ただ、方法の節でも述べたように、混合によって反応を開始するため、観測できる反応量は不感時間 ( $t_d$ ) という「空白の時間」によって制約される。(1)式から明らかなように、 $t_d$  が短いほど、その間に失われる反応量は少なくなるので、 $t_d$  はできる限り短くすることが望ましい。

不感時間を短くするためには、駆動圧を上げて流速を速くするか、観測セルの光路長を短くして流路の容積を小さくすればよいが、駆動圧が高すぎるといわゆるキャビテーション (cavitation) が生じて混合能率が低下したり、観測に際してノイズが増大する等の不都合が生ずる。また、光路長が短かすぎると高濃度試料が必要になることと相まって、流路の低抗が増し混合能率の低下を招く。通常の市販装置では光路長 2 mm、駆動圧 7~8 kg/cm<sup>2</sup> が限界である。今回使用したストップフロー分光光度計については、光路長 2 mm の観測セル、駆動圧 7 kg/cm<sup>2</sup> のとき、 $t_d$  は 0.9 ms であった。

$t_d$  の測定法については、これまでにいくつか報告され

ている<sup>4-10)</sup>。Brissette ら<sup>10)</sup>の  $Mg^{2+}$  と 8-hydroxy-quinoline のキレート生成反応を用いた  $t_d$  測定法は、(4)式と同様の考え方による方法であるが、可逆反応であるため  $Mg^{2+}$  の濃度に依存して  $A_{tot}$  が変化し、 $\log A_{obs}$  を  $[Mg^{2+}]$  に対してプロットしたとき直線が得られない。そこで、直線プロットを得るためには(4)式をさらに変形しなければならない。 $\log(A_{obs}/A_{tot})$  を  $[Mg^{2+}]$  に対してプロットすれば直線が得られ、その勾配から  $t_d$  を求めることができるが、この場合  $A_{tot}$  を別途に測定しなければならない。この点を考慮し、今回、L-アスコルビン酸による DCIP 還元反応を用いて Brissette らの方法<sup>10)</sup>の改良を図った。L-アスコルビン酸と DCIP の反応は不可逆反応であるから、DCIP の濃度を一定にすればアスコルビン酸の濃度  $[A]$  とは無関係に  $A_{tot}$  は一定である。そこで(4)式から、 $\log A_{obs}$  を  $[A]$  に対してプロットすると直線が得られる。その勾配から  $t_d$  が求められ  $A_{tot}$  の測定は不要である。また、L-アスコルビン酸、DCIP は容易に入手でき、取り扱いが簡単な点においても、 $t_d$  の測定法として、より実用的であるといえる。

従来から報告されている  $t_d$  の測定法  $-t_d = (2.303/k_{app}) \log(A_{tot}/A_{obs})$  として計算する方法と<sup>4,6)</sup>、一次反応プロットの外挿から求める方法<sup>5,8)</sup>により  $t_d$  を求め、今回述べた  $\log A_{obs}$  vs.  $[A]$  プロット法で求めた  $t_d$  と比較すると、これらの値は互いによく一致し、本法の有用性が示された (Table 1)。

## (2) Mb, Hb A 単離鎖の $O_2$ 結合速度論

Mb および Hb 単離鎖は、その  $O_2$  平衡において協同性、Bohr 効果、アニオン効果等のホモトロピックならびにヘテロトロピックなアロステリック機能を示さず、(5)式のような 1 段階 2 分子反応で反応を記述することができる。このとき、結合平衡定数  $K$  と速度定数  $k'$ ,  $k$  は  $K = k'/k$  で関係づけられる。ヘモグロビン、ミオグロビンの  $O_2$  親和性は一般に、50%飽和時の  $O_2$  分圧 ( $P_{50}$ ) で表わすが、Mb および Hb 単離鎖ではヘム間相互作用がないので、ただ 1 個の平衡定数で反応を記述することができ、その  $P_{50}$  は解離平衡定数 (すなわち結合平衡定数の逆数) に相当する。したがって、速度定数から  $k/k'$  として計算した  $P_{50}$  は平衡論的な実験で直接求めた  $P_{50}$  と一致することが期待される。

今回、Hb A の  $\alpha^A$  鎖、 $\beta^A$  鎖、ニワトリ砂囊平滑筋の Mb 主成分 (Mb D) について速度定数から計算した  $P_{50}$  と平衡論的に求めた  $P_{50}$  はよく一致した (Figs. 7 & 8, Table 2)。Mb, Hb 単離鎖における  $O_2$  結合の速度論的研究については、ストップフロー法、フラッシュフォトリス法、温度ジャンプ法等によりこれまでも報告されて

いるが<sup>12-16)</sup>、速度定数から計算した平衡定数 ( $=k'/k$ ) と平衡論的に直接求めた平衡定数  $K$  ではかなりの相違がみられる。すなわち、軟体動物の一種であるアメフラシ (*Aplysia*) Mb<sup>13)</sup> については、速度論と平衡論の結果は互いに一致しているが、ウマ Mb<sup>12-14)</sup>、マッコウクジラ Mb<sup>15)</sup> では  $k'/k$  から求めた値が  $K$  の約 1.5 倍の値を示している。 $\alpha^A$  鎖、 $\beta^A$  鎖<sup>14-16)</sup> についても、 $k'/k$  値は  $K$  値に比べ、約 1.5 倍および 2~3 倍の値となっている。速度論と平衡論による結果の相違については、反応中間体の存在やコンフォメーション変化などとの関連が論議されているが<sup>12,14)</sup> 十分納得できる説明とはいえず、実証的根拠が示されているわけでもない。また Brunori らによる温度ジャンプ法の結果は<sup>15)</sup>、Mb, Hb 単離鎖と  $O_2$  の結合が単純な一段階二分子反応で、これ以外の一分子過程は存在しないことを示している。今回のストップフロー測定の結果に関する限り、 $\alpha^A$  鎖、 $\beta^A$  鎖およびニワトリ砂囊 Mb I で、速度定数から算出した  $P_{50}$  と平衡論的に直接求めた  $P_{50}$  はよく一致しており、これらヘムたんぱくとガス状リガンドとの反応は単純な一段階二分子反応であると結論することができる。従来の諸報告における不一致の原因は不明であるが、Mb に関していえば不純物ないしは変性たんぱくをかなり含む市販品をそのまま使用していることが、すくなくとも一つの理由としてあげられる。今回の結果は、新鮮筋から抽出、純化した native な新鮮標品を用いて得られたものである。また、Hb 単離鎖についての既報での不一致は、おそらく単離鎖からの PCMB 除去不完全がその原因の一半をなすものと思われる。今回の測定においては、SH 滴定により Hg がほぼ完全 (95~115%) に除去されていることを確認しえた新鮮標品を実験に供した。

## 結 語

ストップフロー装置不感時間の簡便な測定法を考案した。また、ストップフロー法により、リガンド結合平衡において協同効果を示さないミオグロビンおよびヘモグロビン単離  $\alpha$  鎖、 $\beta$  鎖の  $O_2$  結合反応を速度論的観点から検討した。

(1) 単純な不可逆反応である、L-アスコルビン酸による DCIP の還元反応を用いることにより、Brissette らによる不感時間の測定法<sup>10)</sup>を改良、より簡便なものとした。従来から報告されている他の測定法との比較により、本法の有用性が示された。

(2) ニワトリ筋骨平滑筋から単離したミオグロビン、Hb A から単離した  $\alpha^A$  鎖、 $\beta^A$  鎖の新鮮標品を用いて、これらヘムたんぱくの  $O_2$  解離および結合速度定数をスト

ップトフロー法により求めた。速度定数から算出した  $P_{50}$  と  $O_2$  平衡より直接求めた  $P_{50}$  はよく一致し、これらへムたんばくと  $O_2$  の結合反応は、単純な一段階二分子反応であることを確認した。

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78回近畿生理学談話会(1990年2月、京都)、第80回近畿生理学談話会(1991年2月、和歌山)において発表した。

### 文 献

- 1) Chance, B. : J. Franklin Inst. 229 : 455, 613, 737, 1940.
- 2) Eigen, M. and DeMaeyer, L. : in Technique of Organic Chemistry (Weissberger, A., ed.). vol. 8, part 2, John Wiley & Sons, New York, London, p 895, 1963.
- 3) Gibson, Q. H. : J. Physiol. 134 : 112-122, 1956.
- 4) Hiromi, K., Ono, S., Itoh, S. and Nagamura, T. : J. Biochem. 64 : 897-900, 1968.
- 5) Hoa, G. H. B. and Douzou, P. : Anal. Biochem. 51 : 127-136, 1973.
- 6) 広海啓太郎 : 酵素反応解析の実際. 講談社, 東京, p197, 1977.
- 7) Tonomura, B., Nakatani, H., Ohnishi, M., Yamaguchi-Ito, J. and Hiromi, K. : Anal. Biochem. 84 : 370-383, 1978.
- 8) Peterman, B. F. : Anal. Biochem. 93 : 442-444, 1979.
- 9) Nakatani, H. and Hiromi, K. : J. Biochem. 87 : 1805-1810, 1980.
- 10) Brissette, P., Ballou, D. P. and Massey, V. : Anal. Biochem. 181 : 234-238, 1989.
- 11) Antonini, E. and Brunori, M. : Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. North-Holland, Amsterdam, London, 1971.
- 12) Antonini, E. : Physiol. Rev. 45 : 123-170, 1965.
- 13) Wittenberg, B. A., Brunori, M., Antonini, E., Wittenberg, J. B. and Wyman, J. : Arch. Biochem. Biophys. 111 : 576-579, 1965.
- 14) Brunori, M., Noble, R. W., Antonini, E. and Wyman, J. : J. Biol. Chem. 241 : 5238-5243, 1966.
- 15) Brunori, M. and Schuster, T. M. : J. Biol. Chem. 244 : 4046-4053, 1969.
- 16) Noble, R. W., Gibson, Q. H., Brunori, M., Antonini, E. and Wyman, J. : J. Biol. Chem. 244 : 3905-3908, 1969.
- 17) Enoki, Y., Ohga, Y., Kawase, M. and Nakatani, A. : Biochim. Biophys. Acta 789 : 334-341, 1984.
- 18) Bucci, E. and Fronticelli, C. : J. Biol. Chem. 240 : PC 551-552, 1965.
- 19) Enoki, Y., Ochiai, T., Ohga, Y., Kohzuki, H. and Sakata, S. : Biochim. Biophys. Acta 744 : 71-75, 1983.
- 20) Boyer, P. D. : J. Am. Chem. Soc. 76 : 4331-4337, 1954.
- 21) Altman, P. L. and Dittmer, D. S. : Respiration and Circulation. Federation of American Societies for Experimental Biology. p 16-17, 1973.
- 22) Enoki, Y., Ohga, Y., Furukawa, K., Takaya, A., Sakata, S., Kohzuki, H., Shimizu, S. and Tsujii, T. : HEMOGLOBIN 13 : 17-32, 1989.