

物理化学的手法による Hemoglobin/Poly(ethylene glycol)複合体モデルに関する検討

日大生産工(院) 本多 卓也

日大生産工 高橋 大輔, 和泉 剛

【緒言】

近年,少子高齢化の進行とともに輸血用血液の不足が懸念されている。一般に輸血用血液は3週間程度の保存しかできない。このため常に献血をつのらなくてはならない。

また,エイズウイルスなどの感染症の問題や,災害対策のための膨大な血液需要など輸血用血液は様々な問題点を抱えている。

このような問題点を解決するために,血液成分の機能を担う代替物の総称である人工血液の研究開発が盛んに進められている。

現在,人工血液の開発の中で主流になっているのは血液内で酸素運搬を行う人工赤血球である。この研究には,献血から時間がたつて期限切れになった血液から取り出したヘモグロビン(Hemoglobin,以下 Hb, Fig.1), ウシ Hb, 遺伝子組み換え Hb などが使用されている¹⁾。

これらに代表される Hb は,非常に複雑な高次構造を有している。このため様々な因子の影響により Hb の高次構造が変化し,酸素運搬を行えなくなってしまう。したがって人工赤血球として Hb を利用するためには Hb 構造の安定化がまず求められる。

これまで本研究室ではタンパク質と高分子の複合化による,タンパク質の高機能化,安定化を目的として研究を行ってきた²⁾。なかでも,ヒト血清アルブミンと生体適応性高分子のポリエチレングリコール (poly (ethylene glycol), 以下 PEG, Fig.2) を用いた複合体に関する研究では,複合体中のアルブミンの構造が安定化し,活性が向上することが明らかとなった。この時,形成された複合体は水素結合性複合体 (Hydrogen bonded complex,以下 HB complex)であり, Fig3 のような分子内複合体であることを報告している。

しかしながら,臨床学的な分野において, Hb を用いた HB complex は Fig.4 に示された複合体モデルであることが報告されている。しかしながら,この複合体の詳細な構造・機能は未知の部分が多い。

そこで本研究は,HB complex 形成に影響を与



Fig.1 Structure of Hemoglobin

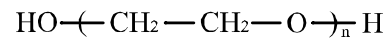


Fig.2 Structure of poly(ethylene glycol)

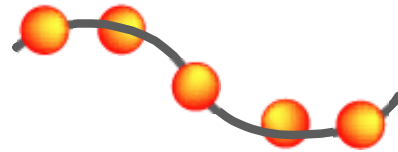


Fig.3 Structure of HB complex A

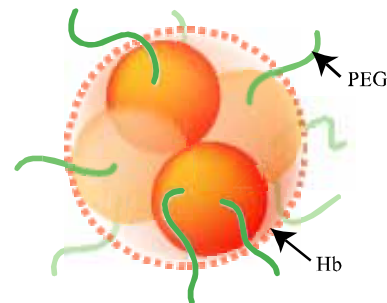


Fig.4 Structure of HB complex B

える因子を明確にすることを目的とし,高分子との相互作用の検討を行う。

【実験】

Hb 試料として,イムノプローブ社製ウサギ

由来血液から精製した Hb を使用した。高分子モデルとして和光純薬工業社製の PEG を使用した。Hb 溶液および PEG 溶液は、それぞれリン酸緩衝液(pH = 7.0, I = 0.1 mol/dm³)で調製した。

【測定】

<血液精製 Hb 溶液の調製³⁾>

抗凝固剤を含むウサギ由来血液を、1,500 rpm で遠心分離し、血漿層、白血球層、赤血球(Red blood cell,R.B.C)層に分離した。R.B.C 層のみを取り出し、1%グルコースを含む生理食塩水で 3 回洗浄した。洗浄後、取り出した R.B.C 層に超音波をあて、再び 1,500 rpm で遠心分離を行い、赤血球膜層と Hb 溶液に分離した。Hb 溶液のみを取り出し、これを血液精製 Hb 溶液とした。

各実験では血液精製 Hb を緩衝溶液で希釈し使用した。この時、市販の凍結乾燥 Hb を用いて血色素由来の波長である 415 nm で検量線を作成し、この検量線で 0.6 g/dm³ になるように調製した。

【結果および考察】

Fig.5 に尿素非存在下、尿素存在下での Hb, PEG, Hb/PEG 混合溶液それぞれの粒径分布の結果を示した。尿素非存在下では Hb, PEG それぞれの粒径は 8nm,16nm であることがわかった。そして、それぞれを Rm 1(Mixing Rate, [PEG]/[Hb] (-))で混合すると、210nm の大きな粒子が形成することが明らかとなった。しかしながら、尿素存在下では、Hb, PEG に起因する粒径のほかに、Hb/PEG 混合溶液中に存在した大きな粒子を観察することができなかった。

以上の結果から、PEG と Hb の混合により Hb/PEG 複合体が形成されることが明らかとなった。また、水素結合を阻害する尿素存在下で複合体形成が確認できないことから、HB complex であることが明らかとなった。

蛍光測定において、Hb/PEG 混合溶液では蛍光極大波長のブルーシフトが観察された。これは Hb の Trp,Tyr,Phe 残基が PEG 分子により水分子から遮蔽され、疎水環境に変化したためと考えられる。このブルーシフトは、尿素存在下では観察することはできなかった。

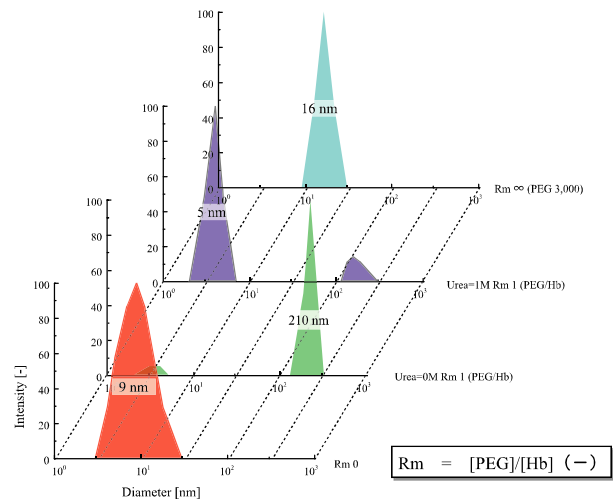


Fig.5 Each diameter distribution in the existence and the non-existence of urea

Table.1 Concentration of PEG and Hb in the outside and inside solution after Equilibrium Dialysis

	Outside solution	Inside solution
[Hb](mol)	—	9.14×10^{-8}
[PEG](mol)	2.37×10^{-3}	8.38×10^{-7}

平衡透析実験により、複合体の結合定数を決定した。平衡透析は、内液を Hb/PEG 複合体溶液とし、72 時間透析を行い結合に関与していない PEG を外液に分離した。透析後、外液中の PEG 濃度を化学的酸素要求量測定により定量した。結果を Table.1 に示す。この結果、Hb1 分子に対し、PEG 分子が 9.16 個結合していることが明らかとなった。

本講演では、物理化学的手法、分光光学的手法を用い、さらに詳細な Hb/PEG 複合体モデルに関して議論する。

【参考文献】

- 1) 岩下雄二,化学,43(7),1988,440- 441
- 2) Shinji Azegami et al,Langmuir, 15, 1999, 940-947
- 3) 日本生化学会編,基礎生化学実験法 2 「生体試料」,東京化学同人,2000,41-46