

Polyethylene glycol添加系におけるHemoglobinの構造

日大生産工（院） ○本多 卓也

日大生産工 高橋 大輔, 和泉 剛

【緒言】

血液は、酸素を運ぶ赤血球、免疫を担う白血球とグロブリン、血を固まらせる血小板や血液凝固因子、栄養分などを運ぶアルブミンなどから成っている。現在、こうした血液成分の機能を担う代替物として人工血液の研究開発が盛んに進められている。人工血液は一般に1年程度の保存が可能で、血液型によらず使用できるとして期待が高まっている。

こうした研究が活発化している背景には、エイズウィルスや脳組織がスポンジ状になってしまうプリオン病など輸血や血液成分を介して発病する感染症の問題があるからであり、また、災害対策の面から、膨大な輸血需要や血液の保存期間の問題などの理由から、人工血液の重要性が指摘されている。

現在、人工血液の開発の中で主流になっているのは人工赤血球である。この研究で用いられるヘモグロビン(Hemoglobin,Hb)には、献血から時間がたって期限切れになった血液から取り出したHb、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、酸素分子一つが結合することのできるヘム環を一つ持つミオグロビン(Mioglobin,Mb)が四個結合した四量体構造である。Hb特有の機能はそれぞれのMbの相互作用により保たれており、非常に複雑な高次構造を有している。このため様々な外的因子の影響により高次構造が変化してしまう。したがって人工赤血球として応用するためには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との相互作用により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⁾。そこでこれまでの研究で得た知見を応用し、Hb構造の安定化を目的として高分子との相互作用の検討を行う。

本研究では、生体適合性のある高分子を

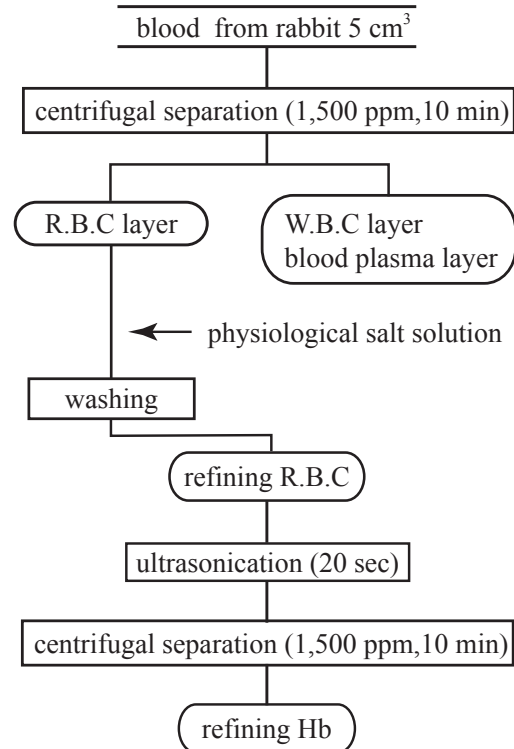


Fig.1 Refining scheme of Hb from rabbit blood

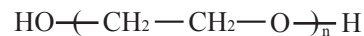


Fig.2 Structure of polyethylene glycol

用いて、高分子添加系におけるHb構造の検討を行う。

【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と、フナコシ社製凍結乾燥オキシヘモグロビン(Oxyhemoglobin,OxyHb)を使用した。生体適合性高分子として和光純薬工業社製のポリエチレングリコール (Polyethylene glycol,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。

【測定方法】

<血液精製Hb溶液の調製³⁾>血液からのHb精製は、次の様に行った。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(White blood cell,W.B.C)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。

<Hb構造の確認>それぞれのHb溶液にHbの酸素親和性を低下させるCO₂を15分間通気し、Hb溶液内の酸素と置換した。

置換前後の吸収スペクトルの測定によりHbの四次構造変化の確認を行った。

【結果および考察】

<Hb構造の確認>すでに述べたようにHbの高次構造は外的因子により変化する。したがって市販品のHb試料は凍結乾燥などのさまざまな操作により高次構造が変化している可能性がある。そこで、市販品凍結乾燥Hbと血液精製Hbとの比較により凍結乾燥によるHb構造への影響について検討した。

測定の結果をFig.3, Fig.4に示す。Fig.3から凍結乾燥Hbは置換前後において540nm,577nmに吸収帯を持つことが確認された。酸素付加状態のOxyHbと酸素未付加状態のデオキシヘモグロビン(Deoxyhemoglobin,DeoxyHb)は吸収スペクトルに明らかな違いがあることが報告されており、OxyHbは2本の吸収体(540nm,577nm)を、またDeoxyHbは1本の吸収体(555nm)を持つことが分かっている。しかしながら、置換後の吸収スペクトルには変化が見られない。したがって、この構造変化は、Hb内のヘム環に結合しているいくつかの酸素が放出され、四個のMbの相互作用が微小に変化しただけであると考えられる。

Fig.4から血液精製Hbは置換前後で、540nm,577nmから555nmへの吸収帯の変化が確認された。したがってCO₂により、OxyHb

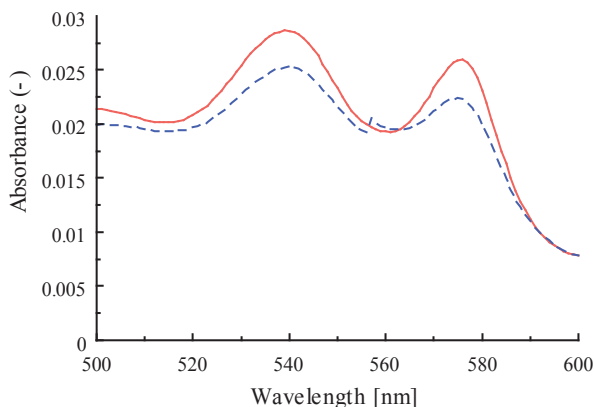


Fig.3 Absorption spectra of freeze drying Hb after displacement of CO₂
Time (min) — 0 min - - 15 min

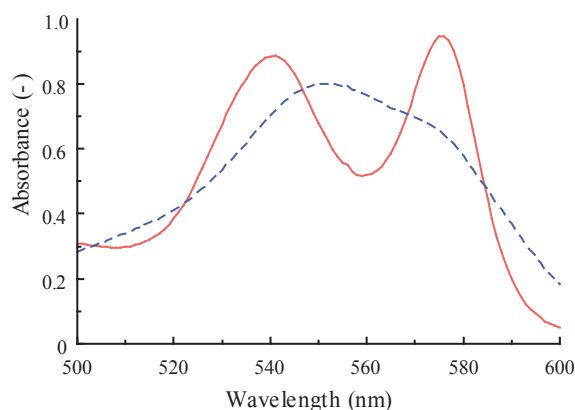


Fig.4 Absorption spectra of blood refined Hb after displacement of CO₂
Time (min) — 0 min - - 15 min

内の四つのヘム環から全ての酸素が放出され、DeoxyHbに還元されたと考えられる。この吸収スペクトルの変化は、酸素の放出によりヘム環の中心に存在するFe²⁺の電子状態が変化し、Hb内の四個のMbの相互作用が変化したために起こったと考えられる。

したがって、PEG添加系におけるHb構造への影響の検討には血液精製Hbを用いて構造解析を行うのが望ましいことが示唆された。

本講演ではPEG添加によるHb構造への影響についても報告を行う予定である。

【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