

# ヘモグロビンの酸化に対する紫外線照射の影響 Effect of Ultraviolet Irradiation on Hemoglobin Oxidation

富 岡 和 久

Summary: The autoxidation of hemoglobin was markedly increased when the solution of hemoglobin was irradiated by ultraviolet (UV) ray under aerobic conditions. The oxidation of hemoglobin was not observed when hemoglobin was irradiated with UV ray under anaerobic conditions. The UV ray induced oxidation of oxyhemoglobin was accelerated in the presence of inositol hexaphosphate, a strong allosteric effector of the protein, but was inhibited by the addition of catalase, and superoxide dismutase. The rate of oxidation of oxyhemoglobin induced by UV irradiation was dependent on the changes in pH, i.e., it was accelerated at acidic pHs.

The result suggested that active oxygens produced by UV irradiation may be involved in the oxidation of hemoglobin.

**KEY WORDS:** hemoglobin, oxydation, UV ray, IHP, SOD, catalase,  $O_2^-$

赤血球は生体内での酸素および二酸化炭素の運搬体である。特に赤血球中に大量に存在するヘモグロビンは、その酸素運搬機能の担い手である。ヘモグロビンは赤血球内ではオキシヘモグロビン (2価鉄ヘモグロビン; oxyHb)<sup>注1</sup>として存在している。これが酸化されると、暗褐色のメトヘモグロビン (metHb) に変わり酸素結合能を失う。ヘモグロビンを酸化させる物質としては、フェリシアンカリ、亜硝酸、過酸化水素、パラアミノフェノール、オルトアミノフェノール、アスコルビン酸、メナジオン、ヒドロキシルアミンなど数多くが知られている<sup>2)</sup>。

紫外線は日常屋外で大量に浴びている物であり、また電気・電子機器からも大量に放射され、人体にとって少なからぬ影響を与えている。また一方では、未熟児の黄疸治療に利用されている。

そこで、本稿では紫外線照射によるヘモグロビンの酸化について、1) タンパク質の強いアロステリック・エフェクターであるイノシトールヘキサリン酸の添加による影響、2) 緩衝液の pH の影響、3) 嫌気的条件下での影響、4) 抗酸化剤の影響、そして5) 紫外線の波長の違いによる影響について検討した。

注1: 断わらない限り“ヘモグロビン”とはこれを言う。

## 材料および実験方法

### I. 材 料

イノシトールヘキサリン酸 [inositol hexaphosphoric acid; IHP]、スーパーオキシドジスムターゼ [superoxide dismutase; SOD] およびカタラーゼ (catalase) は SIGMA 社 (St. Louis, Missouri, 米国) 製を使用した。Sephadex G-25 (couse) と CM Sephadex C-50 は Pharmacia 社 (Uppsala, スウェーデン) 製を使用した。

### II. ヘモグロビンの精製

ヘモグロビンは日本赤十字社より供与されたヒト ACD 保存血 (採血後 3 日) を氷冷生理食塩水で 3 回遠心洗浄し、10 倍量の蒸留水にて溶血させた。つぎに 4°C、10,000 rpm にて 15 分間遠心分離しゴーストを取り除いた。この溶血液を予め 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.2) で平衡化した Sephadex G-25 (couse) カラムによりヘモグロビン画分とヘモグロビン非含有画分に分離した<sup>2)</sup>。次に Banerjee と Cassoly の方法<sup>3)</sup> によりヘモグロビンを精製した。すなわち、上記ヘモグロビン画分を予め 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化した CM Sephadex C-50 カラムを用い、10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) と 20 mM  $K_2HPO_4$  の 2 液で密度勾配をかけてオキシヘモグロビンをさらに分離した。

### III. 実 験

#### 実験 1 : IHP 添加時のヘモグロビンに及ぼす紫外線の影響

oxyHb 溶液 (pH 7.0、最終濃度 : ヘム量として 100  $\mu$ M) 2.2 ml に IHP を添加 (最終濃度 1 mM)、これをプラスチックセルに入れ、マナセル化学工業株式会社製マナセル・ライトを用い 365 nm の紫外線を照射した。光源と試料の距離は 2.7 cm とした。反応環境温度は 25°C とした。反応後のヘモグロビンの酸化は試料液のスペクトロフォトメリーにより 450~650 nm 範囲での吸光度を測定し行なった。

#### 実験 2 : 種々の pH におけるヘモグロビンに及ぼす紫外線の影響

100  $\mu$ M oxyHb を含む溶液の pH を 6.8、7.0、7.4、7.8 の 4 段階に調整し、実験 1 と同様に IHP を添加後紫外線を照射、吸光度を測定した。

#### 実験 3 : 嫌氣的条件下でのヘモグロビンに及ぼす紫外線の影響

oxyHb 溶液 (pH 7.0、最終濃度 : ヘム量として 100  $\mu$ M) に実験 1 と同様 IHP を添加、これをツンベルグ型石英セルに移し、空気を Q ガスで置換して、deoxyHb とし、紫外線を照射後、吸光度を測定した。

#### 実験 4 : 抗酸化剤添加時のヘモグロビンに及ぼす紫外線の影響

oxyHb 溶液 (pH 7.0、最終濃度 : ヘム量として 100  $\mu$ M) に実験 1 と同様 IHP を添加、さらに抗酸化剤としてタカララーゼ (25 units)、SOD (150 units) を添加、またタカララーゼと SOD を同時に添加して、紫外線を照射、吸光度を測定した。

実験 5 : 照射紫外線の波長の違いによるヘモグロビンに及ぼす影響

実験 1 における照射紫外線の波長を 365 nm と 254 nm の 2 種類とし、他の条件は同じにして実験を行なった。

結果および考察

IHP 添加、あるいは無添加ヘモグロビンに紫外線を照射した際の、ヘモグロビンの酸化を metHb の生成の経時的变化によって見た (図 1)。IHP 添加、無添加いずれの場合も紫外線を照射した方が無照射の方より、すみやかに metHb が生成した。51 時間後の酸化の割合は、IHP 添加の場合紫外線照射により無照射に対し 3 倍、IHP 無添加の場合 4.9 倍となった。これにより紫外線がヘモグロビンの酸化を促進することがわかった。また、IHP 添加で紫外線無照射の場合に対し IHP 無添加で紫外線添加の場合に酸化の比が 2 倍となっている。ヘモグロビンに種々の酸化物質を反応させた際、IHP を添加すると酸化が促進される<sup>4)</sup>。これは IHP がヘモグロビンに結合してヘモグロビンの高次構造変化を引き起こすためである。紫外線を照射した場合も IHP は同様の効果を示したと思われる。

次に buffer の pH を変えて同様の実験をした。IHP 添加ヘモグロビンに紫外線を照射した場合、酸性側でより酸化されやすかった (図 2-A)。IHP 無添加のヘモグロビンに紫外線を照射した場合には IHP 添加ヘモグロビンに見られるほどではなかったが酸性側ほど酸化されやすい傾向が見られた (図 2-B)。IHP 添加ヘモグロビンに紫外線を照射しない場合、IHP 添加ヘモグロビン

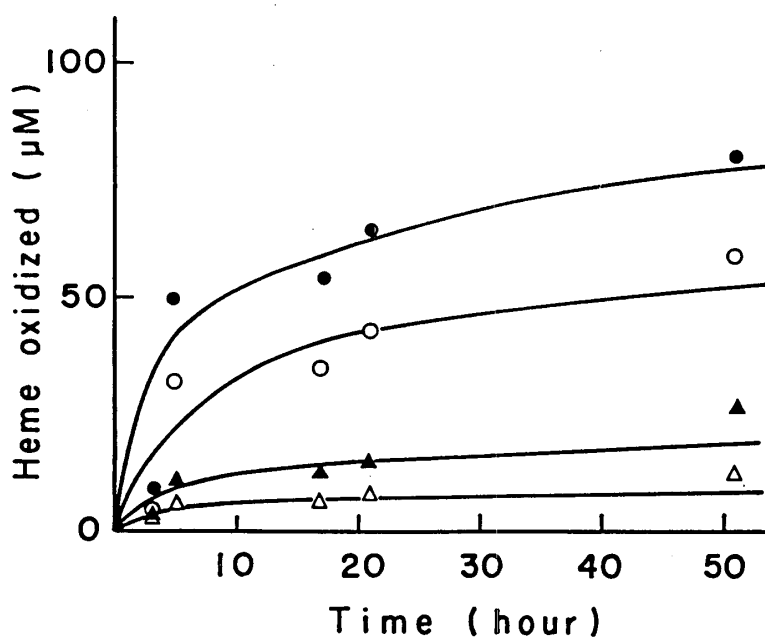


図 1 ヘモグロビンの酸化に及ぼす紫外線照射の影響  
 ● : 紫外線 (365 nm) 照射、IHP 添加 (最終濃度 1 mM)  
 ○ : 紫外線 (365 nm) 照射、IHP 無添加  
 ▲ : 紫外線未照射、IHP 添加 (最終濃度 1 mM)  
 △ : 紫外線未照射、IHP 無添加

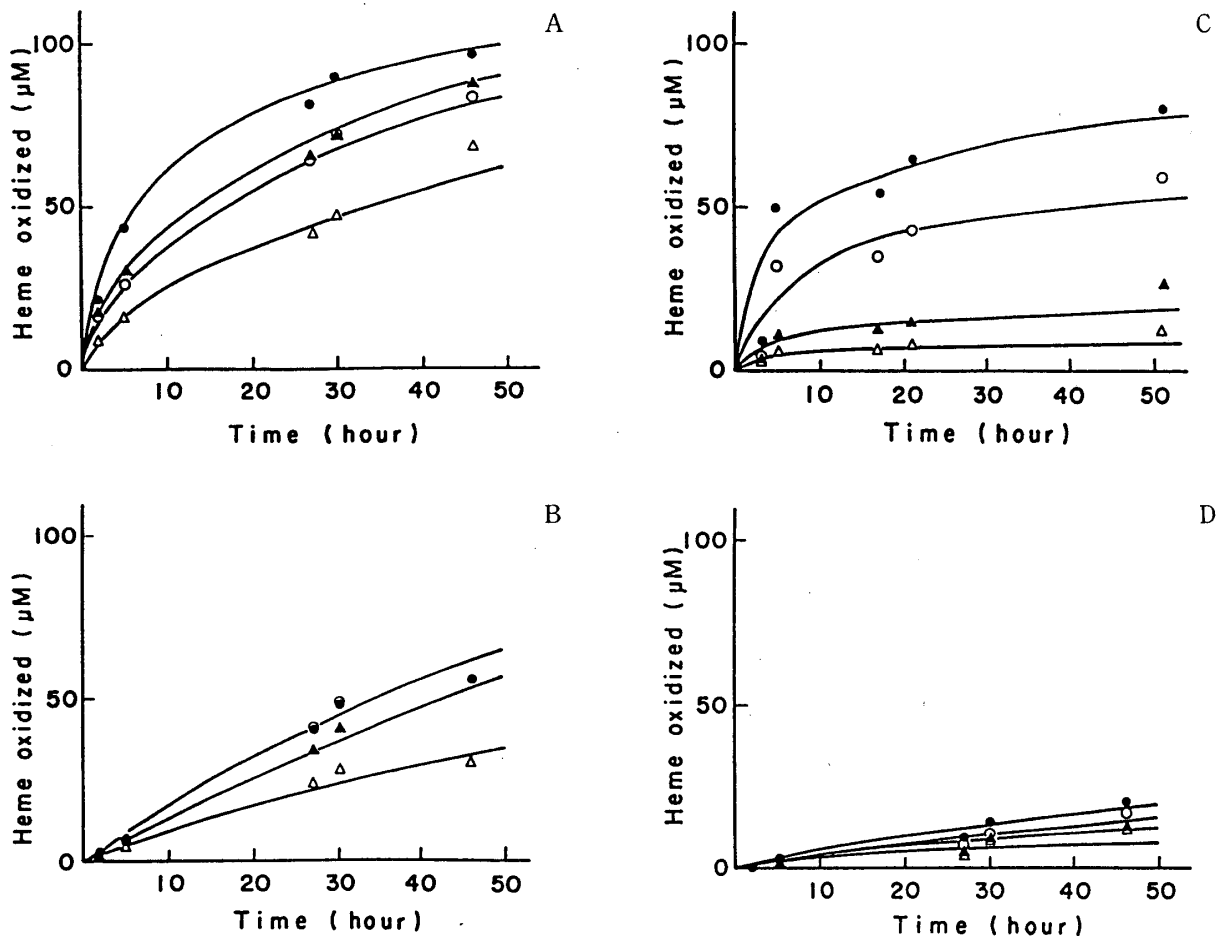


図2 紫外線照射によるヘモグロビンの酸化に与える pH の影響  
 A) 紫外線 (365 nm) 照射、IHP 添加 (最終濃度 1 mM)  
 ● : pH 6.8、○ : pH 7.0、▲ : pH 7.4、△ : pH 8.0  
 B) 紫外線 (365 nm) 照射、IHP 無添加  
 記号は図 2-A に同じ  
 C) 紫外線未照射、IHP 添加 (最終濃度 1 mM)  
 記号は図 2-A に同じ  
 D) 紫外線未照射、IHP 無添加  
 記号は図 2-A に同じ

に紫外線を照射した場合と同様、pH が酸性側に近づくにしながらより酸化された (図 2-C)。これに対し、IHP 無添加ヘモグロビンで紫外線を照射しない場合、ヘモグロビンの酸化はほとんど見られなかった (図 2-D)。以上から紫外線がヘモグロビンの酸化に関与する一方、この反応に pH が影響していることがわかる。このことは、pH の変化によるヘモグロビンの立体構造の変化によるものと示唆される。

次に、紫外線照射によるヘモグロビンの酸化に、酸素が関与しているか見るために、嫌気的条件下で紫外線を照射した。IHP 添加、無添加いずれの場合も、ヘモグロビンの酸化は見られなかった (未発表データ)。このことより、ヘモグロビンの酸化に酸素が関与していることがわかる。

そこで、紫外線の照射によるヘモグロビンの酸化に酸素がどのように作用しているかを調べるために、活性酸素種であるスーパーオキシドアニオン ( $O_2^{\cdot-}$ ) を過酸化水素に変える SOD およ

ヘモグロビンの酸化に対する紫外線照射の影響

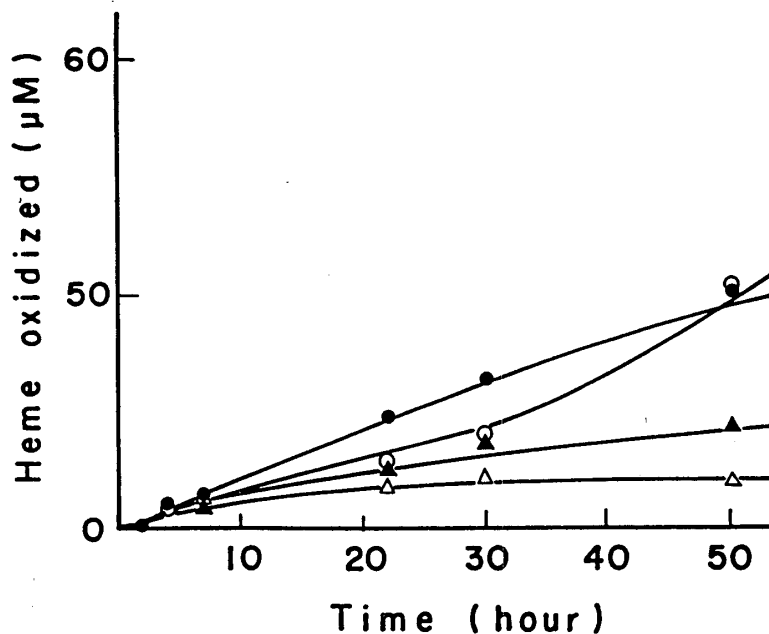
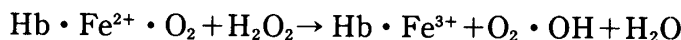
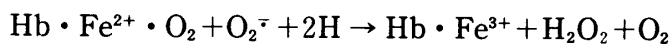


図3 紫外線照射によるヘモグロビンの酸化に与えるスーパーオキシドジスムターゼおよびカタラーゼの影響

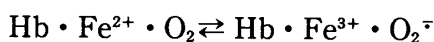
紫外線 (365 nm) 照射

- : +SOD (最終濃度25ユニット)
- ▲ : +カタラーゼ (最終濃度150ユニット)
- △ : +SOD、+カタラーゼ
- : -SOD、-カタラーゼ

び、過酸化水素を分解するカタラーゼをヘモグロビンに添加して、紫外線を照射した。図3に見られるように、SODの添加により酸化は促進された、一方カタラーゼの添加により酸化は抑制された。また、SODとカタラーゼの同時添加は、カタラーゼの単独添加と同様の抑制効果を示した。赤血球での活性酸素種生成については oxyHb は次式に示すように SOD 作用があり、また過酸化水素が oxyHb と反応し、OH を生じる可能性の高いことを Koppenol が示している<sup>5)</sup>。



また次式に示す平衡関係が成立することから  $\text{Hb} \cdot \text{Fe}^{3+} \cdot \text{O}_2^-$  に紫外線が作用し  $\text{O}_2^-$  を切り離す。



この  $\text{O}_2^-$  が遊離した他の  $\text{O}_2^-$  と反応し過酸化水素を生成する。さらに、過酸化水素は metHb より oxyHb との反応性が高いので、metHb と oxyHb の平衡状態が崩れ、より酸化が進むことが示唆される。すなわち、紫外線の照射により発生した  $\text{O}_2^-$  は SOD により過酸化水素に変えられた。この過酸化水素は、ヘモグロビンの酸化作用が大きいため SOD を添加した時のほうがより早く酸化が進んだ。そこで、過酸化水素を消去するカタラーゼを添加することにより酸化は抑制された。という、一連の反応過程が示唆される。

紫外線は波長によって短波長、中波長、長波長紫外線に分類される。そこで波長の違いによるヘモグロビンの酸化を見た (図4)。IHP 添加、無添加いずれの場合も、短波長紫外線 (254 nm)

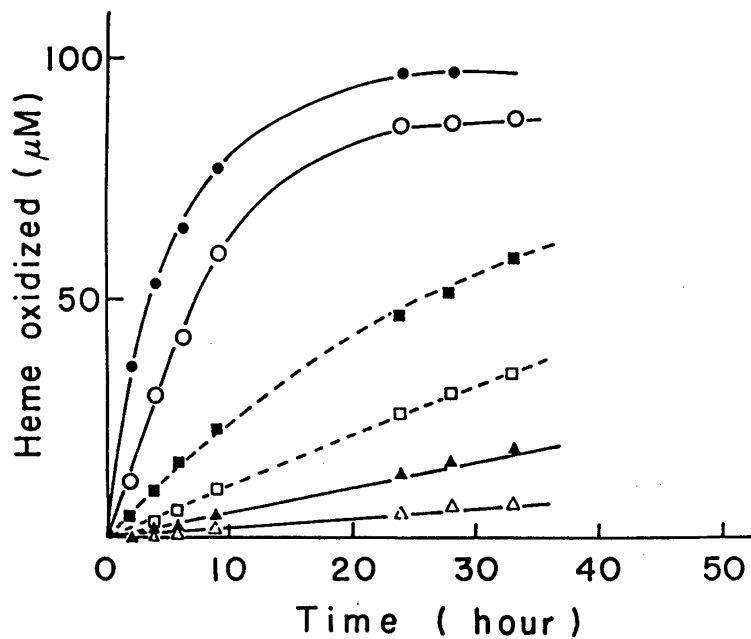


図4 照射紫外線の波長の違いによるヘモグロビンの酸化に与える影響  
 ●：紫外線 (254 nm) 照射、IHP 添加 (最終濃度 1 mM)  
 ○：紫外線 (254 nm) 照射、IHP 無添加  
 ■：紫外線 (365 nm) 照射、IHP 添加 (最終濃度 1 mM)  
 □：紫外線 (365 nm) 照射、IHP 無添加  
 ▲：紫外線未照射、IHP 添加 (最終濃度 1 mM)  
 △：紫外線未照射、IHP 無添加

を照射したほうが、長波長紫外線を照射したほうよりヘモグロビンの酸化を速めた。波長が短いほどエネルギー順位が高いので短波長ほど酸素を励起しやすいと考えられる。

ま と め

ヘモグロビンの自動酸化は、ヘモグロビン溶液に紫外線を照射した時あきらかに促進された。ヘモグロビンの酸化は、嫌氣的条件下で紫外線を照射した時には観察されなかった。紫外線照射により誘導されるヘモグロビンの酸化の度合は、pH の変化に依存した。すなわち、酸性側で酸化は促進した。紫外線によって誘導されるヘモグロビンの酸化はイノシトールヘキサリン酸の存在により促進された。しかし、カタラーゼとスーパーオキシドジスムターゼの同時添加により阻害された。また、照射する紫外線の波長が短いほど、ヘモグロビンの酸化が促進された。

これらの結果は、紫外線の照射により生成される活性酸素が、ヘモグロビンの酸化に影響している可能性を示唆している。

謝 辞

稿を終えるに臨み、研究の場を提供していただいた金沢大学医学部第一生化学教室の米山良昌教授に深甚の謝意を表わします。また、本研究遂行に際し、終始御指導、御教授を賜わった友田燁夫助教授にも合わせて深甚の謝意を表わします。

文 献

- 1) Kiese, M. : in Methemoglobinemia, A comprehensive treatise, CRC Press Inc., Cleveland (1974).
- 2) Tomoda, A., Shigeru, M., Masazumi, T., Yoshimasa, Y. : J. Biol. Chem. **251**(23), 7494-7498 (1976).
- 3) Banerjee, R. and Cassoly, R. : J. Mol. Biol. **42**, 351-361 (1969).
- 4) 友田燁夫、米山良昌 : 蛋白質・核酸・酵素、**32**(6), 842-853 (1987).
- 5) Koppenol, W. h. : Thermodynamics of the Fenton-driven Haber-Weiss and related reaction. In : Oxy Radical and Their Scavenger Systems (Green wald, R. A., Cohen, G., eds.) Elsevier Biomedical, **1**, 84-88 (1983).