

総合科学研究会報

第3号（2006年1月）

『総合科学研究会報』について

私たちは1昨年、誰もが自由に参加できる研究会として「総合科学研究会」を発足させました。昨年度は都合4回の勉強会を開きましたが、今年度はこれまでに3回の勉強会を開きました。

この『総合科学研究会報』第3号は今年度開いた最初の2回分の記録です。

第5回（2005年6月23日）：中山 仁氏（看護学部総合科学部門 外国語）、「言語コミュニケーションの背景 語用論（プラグマティクス）と関連性理論の可能性」

第6回（2005年9月27日）：松岡有樹氏（医学部生物学講座）、「ヒト・ヘモグロビンの自動酸化反応について」

なお、第7回の勉強会は看護学部総合科学部門（心理学）の志賀令明氏をお招きして、昨年1月21日に開催しました。来る3月には医学部外国語講座の清水研明氏をお招きして、第8回の勉強会を開催する予定です。その様子は、次号で御報告いたします。

言語コミュニケーションの背景

福島県立医科大学
看護学部総合科学部門
中山 仁

1. 言葉はなぜ通じるのか

言語はコミュニケーションの道具とよく言われるが、言葉によって何が伝えられるのか、言葉はどのようにして伝えられるのか、そして、その発せられた言葉が聞き手によってどのように理解されるのか、という点について体系的かつ包括的に説明を与えるとすると、従来の言語学（音韻論、統語論、意味論）のレベルでは十分に捉えることができない。というのも、実際の言語コミュニケーション（発話）のプロセスには、言語を構成する（音韻・統語・論理形式に関わる）規則の集合体だけでなく、話し手の意図や文脈、聞き手の能力や興味などが関与しており、これらが複合的に作用していると考えられるからである。例えて言えば、「道具」の仕組みは分かっているとしても、それをいつ、どのような場で、どのようにして使うかという点は別の問題になるわけである。

そこで、言語の哲学的・心理学的考察を背景に、比較的最近になって実際の言語使用について研究する「語用論」が展開されるようになってきた。実際の言語使用といっても、その目的は「実用英語」のような言語教育的、規範的側面とは異なる。語用論の対象とするものはあくまでも話し手、聞き手、あるいは両者が暗黙のうちに従っているコミュニケーションの原則についてである。したがって、語法上正しいかとか、どう使うべきかという視点から検討を加える性質のものではない。

以下では語用論の課題について簡単に解説した上で、最近著しい発展を遂げている関連性理論について概観する。

2. 語用論の課題

言語コミュニケーションはどうして成立するのか、ということを理解するためには、話し手の意図と聞き手の解釈の関係を明らかにする必要があることは既に述べた通りである。とりわけ、伝達が成功すると見なされるのは、話し手の意図したことが聞き手によって正しく解釈された場合であるため、聞き手の発話理解に必要な能力が何であるかを特定することは語用論において重要な課題となる。

音韻・統語・意味情報が過不足なく満たされていることを前提とした場合、発話理解のための重要な要素となるのは文脈であることは間違いないだろう。文脈は主に（１）言語的文脈、（２）状況的文脈、（３）百科事典的知識の３つに分けることができる。言語的文脈とは、例えば「君それどういう意味か自分で言ってみて分かってるの？」という発話において「それ」が指す先行発話（の一部）などを言う。また、状況的文脈とは、いたずらをしようとしている子供に向かって

「だめ」と言うような場合に暗示している、その場で予測される子供の行為を指して言う。百科辞典的知識 (encyclopedic knowledge) とは、自分の持っている限りの (発話以前に得られた) 知識、経験、記憶などを指す。

発話理解において文脈が決め手の一つということに異論はないであろうが、問題はその文脈がどのように引き出されるかである。そこでグライス (P. Grice) を始めとする一部の哲学者、語用論研究者はここで重要な役割を果たすのが人間の推論能力であると考え、「聞き手はどのような文脈に基づいて、どのような推論をして話し手の発話を解釈するのか」という観点から、推論モデルによる発話の意味解釈の解明を目指す。グライスは「発話は人間の意図的・理性的行動の一種である」という仮説を立て、発話は正しい推論を導くためのより明確な証拠と捉える。つまり、何らかの意図的行動によって相手に何かを伝えたい場合、言語を使えばその行動によって意図された内容を理解するために行われる推論がより正確に行われるというものである。文脈と推論との関係の詳細を見る前に、発話解釈において推論がどのように関与しているかについてグライスの推論についての考え方について概観する。

3. グライスの会話の理論と問題点

グライスの取った基本的な立場は「会話は協同作業である」というもので、「協調の原理」に沿った以下の4つの格率 (maxims) を設定する。

- (1) a. 量の格率 (聞き手にとって適切な情報量を盛り込め)
- b. 質の格率 (嘘をつくな)
- c. 関連性の格率 (関連のあることを話せ)
- d. 方法の格率 (分かりやすく表現せよ)

ここで重要なのは、格率の内容自体よりも、これに基づいて説明される発話解釈のプロセスにある。グライスは、話し手による格率違反があった場合、それを例外として排除するのではなく、「あくまでも協調の原理と格率に従って発話がなされているのだ」という聞き手側の前提に基づいて解釈がなされるというプロセスを仮定する。話し手の格率違反を重要視する根拠は、「話し手は文字通りの意味を伝えているわけではない」という事実にある。グライスは、格率違反が生じるのは文字通りの意味に基づいて何らかの情報が追加されているからであると捉え、この追加情報によって文字通りの意味からだけでは理解できない、聞き手に伝えたかった意味が表されると考える。この聞き手に伝えたかった意味をグライスは「推意」 (conversational implicature) と呼ぶ。例えば以下のような会話の場合、

(2) A: 昨日のドラマ見た?

 B: テレビは嫌いなんだ。

話し手 A の問いの形式が求めている答えは「見た」か「見なかった」かである。そうでなければ (1c) 「関連性の格率」 (この例の場合、「Yes/No 疑問文の質問に対して関連性のある答えは Yes/No によるもの」という前提) に違反する。しかし、「会話は協同作業である」という大前提にしたがって会話がなされることから、聞き手は「伝達をしているからには何か別の追加情報が

あるはず」と判断し、次のような推論が働く。「テレビが嫌いな人はテレビを見ない（あるいは、持っていない）。テレビを見なければ（あるいは、持っていなければ）ドラマを見ることはできない。ゆえに、Bは昨日のドラマを見なかった」と。その結果、最終的には(1c)「関連性の格率」にも(1a)「量の格率」に従った形で「ドラマを見なかった」という（結論づけられた）推論を導き出すことができる。

グライスの理論の問題点は以下の通りである（Sperber and Wilson 1986/95）。

- (3) a. 協調の原理と格率の根拠があいまい
- b. 用語の定義が厳密でない（e.g. 「関連性」）
- c. 明確な解釈プロセスを提示していない（聞き手が選択するはずのない解釈を排除できない）
- d. 解釈プロセスは必ずしも意識的ではない
- e. 解釈プロセスが複雑（子供が意識的にそのような推論をすることは不可能）

スペルベルとウィルソン（Sperber and Wilson 1986/95、以下 S & W）によれば、会話が「協同作業」であるという仮定は現実を正しく反映していない。グライスの仮定している発話のプロセスはいわば理想状態にある会話については適用できるかもしれないが、話し手が聞き手に対して嘘をついている場合や聞き手が誤解する場合のプロセスについては説明できていない。そもそもグライスはこの原則および格率の存在理由については明言していないし、格率の数も4つで十分であるかどうか不明である。また、グライスは協調の原理は一見尤もに見えることから、（格率と合わせて）言語に普遍的と捉えているが、社会言語学の立場から見るとこの原則にそぐわない言語や文化があることが指摘されており、容易に受け入れられる考えではない。(3b)にあるように、格率に表現されたそれぞれの用語の定義があいまいであることから多くの問題が派生される。

(3c-e)は発話プロセスについてさらに突っ込んだ問題である。(3c)では多義的な解釈が存在する場合の解釈の選択についての説明ができないこと、(3d)では上記の原則や格率が聞き手によって意識された上で推論に基づく解釈が行われるという考え方に対する批判である。発話内容について後になって理詰めであれこれと考えることはあるが、その場の発話解釈は一瞬にして遂行される。発話解釈は、いわば人間が任意の刺激に対して生理機能が無意識に反応するのと同様に、何らかの情報処理機能によって無意識のうちに解釈処理が行われると考えた方が現実的であろう。また、(3e)にあるように、発話解釈は子供も難なくこなしていることから、グライスのあげるような意識的で複雑な推論作業をやっているのは極めて不自然であるという問題も出てくる。

4. 関連性理論

グライスの理論には多くの疑問点が残されたが、発話解釈における推論の役割を重視したという点では高く評価されてしかるべきであろう。事実、グライス以後、推論モデルの語用論は著しく発展し、特に、グライスを批判検討することによって提案された関連性理論はその後の語用論

のみならず、言語学全体にも少なからず影響を及ぼすことになった。

関連性理論は、グライスの格率について詳細に検討した結果、4つの格率のうち特に「関連性の格率」に注目し、「関連性」の概念を人間の意図明示的伝達の特徴と整合する形で精密化したものである。関連性理論はグライスの理論から発展した理論として位置づけることができるが、両者はアプローチの点で異なる。S & W は人間の認知システムとの関わりで話し手の意味を解明する認知論的アプローチを取る。彼らはまず、言語伝達はコミュニケーションの一形態にすぎないと考え、言語は意図明示的刺激の一部であると捉える。意図明示的刺激としての情報が人間によってどのように処理されるかは、人間の認知システム全体に関わる問題である。

S & W は、人間は自己の「認知環境」を改善されることを求める存在であると位置づける。認知環境とは概略、人間が持つ様々な想定（知覚した情報、知識、信念など）の集合体を指す。人間の情報処理の観点から見た場合、人間は新たな刺激（知覚した情報、知識、信念など；＝新情報）が入力されると、それを証拠として、それまでに頭の中にあった想定（＝旧情報、既存情報）に基づいて推論を働かせ、何らかの解釈を得るというプロセスをたどる。より具体的に言えば、新情報の入力によって、それまで不確かであった考えがより確かなものになったり、ある考えが間違いであることに気づいたり、新情報をきっかけに新しい考えが思い浮かんだりすることによって、想定が拡大するのである。認知環境の改善には（1）既存情報の強化、（2）訂正、（3）帰結の導出という3つのプロセスがあるとS & W は主張する。そして、新情報と旧情報（文脈）との相互作用を「認知効果」と呼び、この場合の新情報はこの文脈において「関連性がある」という。その上で、S & W は以下のような関連性の原理を提案する。

（4）認知能力に関する関連性の原理

人間の認知システムは関連性を最大化するように働く傾向がある

（5）伝達一般に関わる関連性の原理

意図明示的刺激は最適な関連性を見込みを生み出す

「最適な関連性を見込みがある」とは、以下のような場合である。

（6）a. 意図明示的刺激には少なくとも処理に見合うだけの関連性がある

b. 意図明示的刺激は伝達者の能力と伝えたいだけの情報量（preference）に矛盾しない、最も関連性の高いものである

意図明示的刺激の一種である発話においては、まず話し手には伝えたいこと（聞き手にとって関連性のある情報）があり、話し手はそれを聞き手に分かるような形で（関連性を見込みを生み出すような形で）伝えようとしていると考えられる。一方、聞き手は、話し手が関連性のある情報を伝えているはずであるという前提で（関連性を見込みをもって）、文脈を頼りに話し手の伝えたい意味を理解するということになる。これはグライスの「協同作業」とは異なる立場である。グライスは話し手と聞き手が協調して会話をを行うために、話し手側に格率にしたがうことを仮定したが、S & W は伝達の成否は基本的に聞き手にゆだねられるという立場を取っている。というのも、話し手の意図がどうあれ、その場で結局どのような解釈がされるかは聞き手が自己の想定との相互作用によって判断することだからである。個々の人間は知識や経験の点で千差万別で

あり、発話の場で話し手と聞き手が共有知識として保障されているのは、厳密に言えば、発話の時点と場と、competenceとしての言語能力（生得的に備わった文法）にすぎないのである。したがって、発話理解を成功させるために話し手ができることは、自分の意図を聞き手に理解してもらえる形で伝達を行おうとするという形を取るだけである。もし聞き手に正しく伝わらなかったら？ それは誤解を招くか、会話が成立しないということであり、現実の発話ではよくあることである。つまり、関連性理論の立場を取ることによって、（グライスの理論では説明できない）誤解や会話の不成立といったごく自然な発話に関する現象についても説明を与えることができるのである。

5. 文脈とは？

関連性理論を言語（語用論）を対象にして展開するにあたり、S & W はまず発話解釈の状況とそれに関わる概念をより明確にしている。中でも文脈について厳密に定義した点が重要である。新情報である発話が認知効果を生み出すのは既知情報である文脈との相互作用の結果であるが、その文脈とは何なのかこれまではあいまいにされてきた。関連性理論では文脈を概略次のように定義する。

（7）発話解釈の時点で実際に利用されている、聞き手の中に心的に表示された想定集合

「想定」とはそれまでに頭の中にあった情報・知識・（正しい／間違った）考えなどを指す。重要なのは文脈が心理的構築物であるという点である。従来文脈とは物理的、言語的事実と漠然と捉えられてきたが、聞き手はそれ以外の情報として、記憶、知覚情報、推論によって得られた想定なども利用しているのも事実であり、これらも文脈として含まれなくてはならないのは当然である。また、物理的、言語的事実も聞き手によって認知されなければ情報処理の対象にはなりえないから、結局のところ文脈とは聞き手の想定として選択されたものしか対象とはならないのである。これは、視覚によって得られた映像、聴覚によって得られた音のすべてが認知されるわけではないことと似ている。また、文脈は発話以前に与えられているのではなく、発話時点において聞き手が選択するものであるという点にも注意したい。

6. 発話解釈のプロセス

では、発話された文に対して聞き手はどのようにして文脈を構築するのだろうか。ここで「伝達に関わる関連性の原理」が関わってくる。この原理により、発話是最適な関連性を見込みを生み出す、すなわち、発話には少なくとも処理に見合うだけの関連性があり、また発話は話し手の能力と伝えたいだけの情報量に矛盾しない、最も関連性の高いものである。しかも、人間の認知システムは関連性を最大化するように働く傾向がある（認知能力に関する関連性の原理）から、聞き手は最小の労力（情報処理の労力）で認知効果を引き出すような文脈の選択を行う（自分にとってよりよく分かった状態になるような情報の選択、推論を行う）のである。より具体的には、アクセスしやすい順に文脈を選択し解釈を進め、関連性を見込みが満たされた（あるいは）破棄された時点で解釈を終了するというプロセスである。

この間、最適な関連性を目指す話し手は少なくとも以下の2つを行っていると考えられる。

(8) a. 処理に値する十分な認知効果を達成しようとする

b. 上記を行うために聞き手が無駄な労力を使わないようにする

これと、先の聞き手の解釈との関係から、(1) 最初に得られた満足な（関連性の見込みが満たされた）解釈が唯一の満足な解釈である、(2) 余分な処理労力は、追加される（さらに別の）認知効果によって相殺される、というより具体的な解釈手順が導き出される。

6. グライスの理論における問題点はどのように克服されたか

まず、協調の原理と格率の必要性であるが、関連性理論によれば発話には関連性の見込みが無意識的、自動的に含まれるので、わざわざ協調の原理のようなものを設定する必要はなくなる。また、解釈プロセスについては、発話解釈の状況を明確にした上で用語上の定義を行い、関連性に基づく発話解釈手順によって一つの解釈を特定できるという点で、グライスの陥った「聞き手が選択するはずのない解釈を排除できない」という問題を克服している。

理論の適用範囲もグライスより拡大されている。グライスが主に扱ってきたのは含意の伝達であり、明示的伝達についての指摘はほとんどない。一方、関連性理論では関連性に基づく理解手順により、含意、明示的内容、文脈のいずれにも適用できる。さらに、関連性に基づく理解手順は、不完全な発話や非言語伝達についても説明可能となる。

最後に解釈プロセスの複雑さと子供の語用論能力との関係であるが、関連性理論ではグライスと異なり、解釈を無意識的、自動的なプロセスと捉えるので、子供であっても負担となることはない。また、語用論能力の発達は段階的であると考えられることから、語用論能力は子供の成長に応じて発達すると仮定するという点も現実に沿ったもので、グライスより説得力があるといえよう。

7. 最後に

今回は関連性理論の背景と中心概念の概説に留め、具体的な分析については触れなかった。ただ、中心概念の基盤となる心のモジュール性と各モジュールとの関係、想定を表す概念表示の構成、想定へのアクセス可能性など、情報処理に関する説明が不十分なため、分かりにくい（あるいは誤解を招きやすい）解説になってしまったかもしれない。これらについては、関連性理論に関わるその他の重要な概念（表意と推意、概念的意味と手続き的意味、言語使用の記述的側面と解釈的側面など）と含めて別の機会に紹介したい。

参考文献

- Sperber, D & Wilson, D. 1986/95. *Relevance: Communication and Cognition*. Blackwell.
今井邦彦. 2001. 『語用論への招待』大修館.

ヒト・ヘモグロビンの自動酸化反応

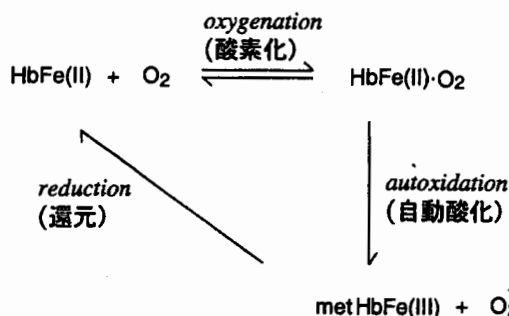
福島県立医科大学医学部生物学講座 松岡 有樹

ヘモグロビン (Hb) には二種類の「 $\alpha\beta$ 接触面」が存在する。一つは $\alpha_1\beta_1$ 二量体と $\alpha_2\beta_2$ 二量体の間の接触面 (sliding contact) であり、酸素の結合過程において重要な役割を果たしている。もう一つは $\alpha_1\beta_2$ と $\alpha_2\beta_1$ の間の接触面 (packing contact) であるが、酸素の結合に際してほとんど構造変化を生じないため、その役割は不明であった。今回、ヒト・ヘモグロビンの自動酸化反応の速度論的解析を行った結果、HbA では packing contact を介して β 鎖の遠位ヒスチジン残基の「傾き」が生じ、これが酸性領域における β 鎖の自動酸化の抑制を引き起こしていることが明らかとなった。

1. はじめに

ヘモグロビン (Hb) は、赤血球中に存在するヘムタンパク質で、肺で受け取った酸素分子を末梢組織に運搬することによって、生体内の好氣的代謝の維持に重要な役目を果たしている。ヘモグロビン研究の歴史は古く、酸素結合過程におけるアロステリック相互作用や分子病の概念を生んだ鎌状赤血球貧血症など数多くの発見がなされてきた。ヘモグロビンは、同じグロビン族に属するミオグロビンと並んで、最も詳細にその構造や性質が調べられたタンパク質であると言っても過言ではない¹⁾。

さて、ヘモグロビンやミオグロビンが酸素分子を可逆的に結合できるのは、そのヘム鉄の原子価が 2 価の時だけである。しかし、結合した酸素分子の強い酸化力でヘム鉄は容易に酸化され、スーパーオキサイドアニオン O_2^- の放出を伴って原子価が 3 価のメト型となってしまう。このメト型はもはや酸素を結合できないので生理的には不活性である。そこで、生体内にはメト型のヘモグロビンを還元する系 (NADH 依存性メトヘモグロビン還元酵素及びチトクロム b_5) が存在し、生じたメトヘモグロビンをデオキシ型へと戻している。このようにヘモグロビンは、赤血球の中で酸素化 (oxygenation) - 酸化 (oxidation) - 還元 (reduction) のサイクルをつねに繰り返していることになる。



このようなヘム鉄の酸化は、ミオグロビンやヘモグロビンの自動酸化 (autoxidation) として古くから注目されてきたが、その反応機構が極めて複雑であるために、現在でも活発な研究が続けられている^{2,3)}。

本レポートでは、酸化力の強い酸素分子を安定に結合するために、ヒト・ヘモグロビンが有する巧妙

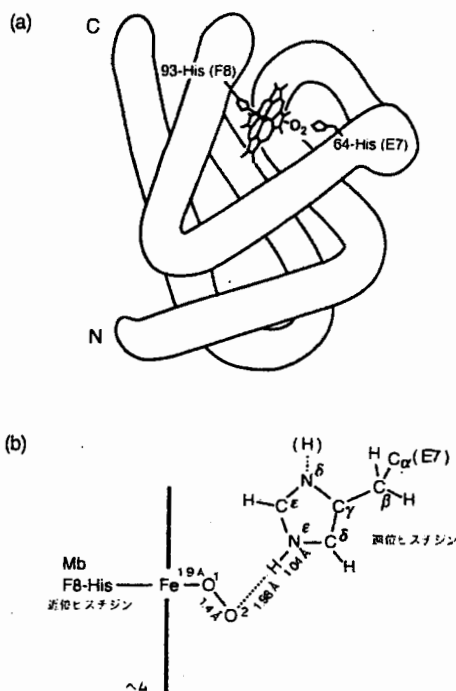


図1 グロビン分子の基本構造 (a) マッコウクジラ・ミオグロビンの立体構造 (b) 酸素分子の結合状態図

な分子機構について、最近の知見を中心に紹介する。

2. ヘモグロビン分子の基本構造

図1(a) は、ミオグロビン (Mb) やヘモグロビンの構造解析のプロトタイプとして長い間用いられてきたマッコウクジラのミオグロビンの立体構造を模式的に表したものである。マッコウクジラのミオグロビンは 153 個のアミノ酸残基からなり、その折りたたみ (フォールディング) 構造は 8 つの α -ヘリックスからなり、中央に疎水性の裂け目 (ヘムポケットともいう) を形成して、ヘム鉄がそこに埋もれている。各ヘリックスには、N 末端側より A から H までの名前が付けられている。一方、個々の残基には、それらが構成するヘリックスまたはコーナーの N 末端側から、順次番号が付けられている。

ここには酸素の結合に直接関与している 2 つの His 残基を特に強調して書いてある。その 1 つはヘ

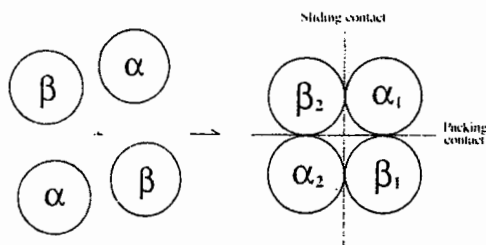


図2 HbAに存在する2種類の $\alpha\beta$ 接触面

ムをタンパク質に結合するために必須な93番目のHisでこれを近位HisまたはF8-His(Fヘリックス内では8番目に位置する)と呼ぶ。近位Hisはこれまで発見されたすべてのミオグロビンやヘモグロビン分子に存在し、非常に強く保存されている残基である。もう1つは64番目のHisで、遠位His残基またはE7-Hisと呼ばれ、ヘム鉄に結合した酸素分子と水素結合を形成することによって、ちょうど酸素を挟み込むような形で安定化させている。この遠位His残基もほとんどのミオグロビンやヘモグロビンに保存されている。ヘムの2つの側面は、それぞれ近位(またはHis F8)側、および遠位(またはHis E7)側と呼ばれ、後者には O_2 、 H_2O 、 OH^- などの配位子が結合する。図1(b)は、PhillipsとSchoenbornがマッコウクジラのオキシ型ミオグロビン(MbO_2)を用いて行ったX線および中性子線解析の結果である。ヘム鉄に約 120° の角度で結合した二原子酸素は遠位Hisとの間に水素結合を形成し、ちょうど挟み込まれるような位置で安定化されている⁴⁾。さらに遠位ヒスチジン残基は、ヘムポケットに配位子が進入するときのゲート、あるいはスイングドアとして作動することや、水素結合の形成によって分子状酸素を安定させることが知られている^{2,4,5)}。このようなミオグロビンの基本構造は、ヘモグロビン分子の各サブユニットに対しても全く同様に当てはまる。

ヒト成人のヘモグロビンは、アミノ酸残基数141個の α 鎖2本と146個の β 鎖2本が集合した四量体を形成しており、HbA($\alpha_2\beta_2$)と表す(図2)。 α 鎖と β 鎖はいずれも上記のミオグロビンと良く似たグロビンフォールドを取っており、それぞれ酸素分子を可逆的に結合するので、ヘモグロビンは最大で1分子当たり4個の酸素を結合することが可能である。いま、ヘモグロビンの四量体のサブユニットをそれぞれ α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 と名付けると、各々のサブユニット間には2種類の「 $\alpha\beta$ 接触面」が存在する。一つは $\alpha_1\beta_1$ 二量体と $\alpha_2\beta_2$ 二量体の間の接触面(sliding contact)で、もう一つは $\alpha_1\beta_2$ と $\alpha_2\beta_1$ の間の接触面(packing contact)である。ヘモグロビンに酸素分子が結合する際、 $\alpha_1\beta_1$ 二量体と $\alpha_2\beta_2$ 二量体は、その接触面であるsliding contactにおいて約 12° から 15° ほど回転し、さらに1オングストローム程度横にすべることがわかっている。この構造変化は、ヘモグロビンの協同的な酸素結合と密接な関係があると考えられている¹⁾。一方、ヘモグロビン分子を希釈すると $\alpha_1\beta_1$ 二量体と $\alpha_2\beta_2$ 二量体との2個のダイマー

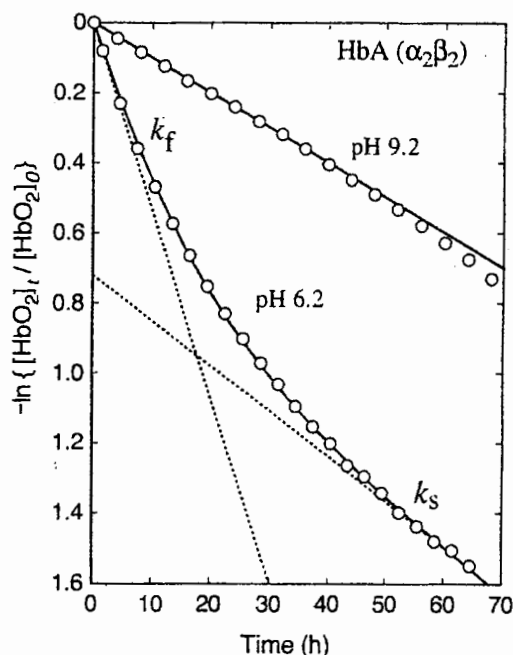
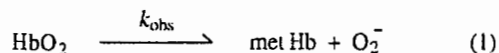


図3 HbAの自動酸化反応の一次プロット 測定条件は、 35°C 、 0.1M 緩衝液中である。

に解裂することから、packing contactは比較的強い結合であることが知られていたが、酸素の結合に際してほとんど構造変化を生じないため、その生理学的機能は不明であった。

3. ヘモグロビンの自動酸化反応にみられる二相性

先ほども述べたように、 HbO_2 は容易に酸化され、 O_2^- の生成を伴ってメトヘモグロビンとなる⁶⁾



その際、ある一定のpHで観測される一次反応速度定数を k_{obs} とすると、オキシヘモグロビンの自動酸化速度は次式で与えられる。

$$-\frac{d[HbO_2]}{dt} = k_{obs} \cdot [HbO_2] \quad (2)$$

ここで k_{obs} 値は、オキシヘモグロビンの残存率を吸収スペクトル変化から求め、その自然対数値 $-\ln([HbO_2]_t/[HbO_2]_0)$ を時間 t に対して一次プロットすることから求めることができる。

図3は、HbAの自動酸化反応を異なる2つのpH条件下で測定し、上記の一次プロットを行って比較を行った一例である。酸性(pH 6.2)の場合、その一次プロットは顕著な二相性を示すことがわかる。このような二相性は、単量体であるMbの場合には全く観察されないものである。そこで、速い成分の速度定数を k_f 、遅い成分の速度定数を k_s とし、次の式による解析を試みた。

$$\frac{[\text{HbO}_2]_t}{[\text{HbO}_2]_0} = P \cdot \exp(-k_f \cdot t) + (1-P) \cdot \exp(-k_s \cdot t) \quad (3)$$

ここで k_f と k_s は、ある一定の pH で観測される一次反応速度定数、 P は速い成分のモル分率を、残りの $(1-P)$ は遅い成分のモル分率を示している。コンピュータを用いて、最小自乗法による curve-fitting を繰り返し行い、 k_f 、 k_s および P の各パラメータを決定したところ、 $P=0.48$ のとき $k_f=0.78 \times 10^{-1} \text{h}^{-1}$ 、 $k_s = 0.11 \times 10^{-1} \text{h}^{-1}$ で最も良い適合曲線が得られた (図3) 7)。

オキシヘモグロビンを部分的に自動酸化させた後、電気泳動法によって α 鎖と β 鎖を分離し、それぞれの鎖の酸化割合を調べた結果から、 α 鎖の方が β 鎖よりもずっとメト型になりやすいことが分かっている 8) 。従って、ヘモグロビンの自動酸化反応に見られる k_f は α 鎖の、 k_s は β 鎖の自動酸化速度に対応するものと結論される。

4. 自動酸化反応速度の pH 依存性

HbA の自動酸化反応を pH 5 から 11 までの広い領域に渡って詳細に検討し、そこから得られる k_f 値と k_s 値を pH の関数としてプロットしたのが図4である 7,9) 。まず k_f (α 鎖) の場合、 HbO_2 から metHb への自動酸化速度は水素イオン濃度の増加と共に急激に早くなる。その傾きは -1 に近いことから、この領域における酸触媒の関与が予想される。また、その速度は pH 8.5 付近で極小となるものの、それよりも更にアルカリ側では、今度は OH^- イオンの増加と共に速度は再び増大する。さらに pH 6 付近には変曲点のようなものが現れて、解離基の関与が示唆される。

一方、 k_s (β 鎖) の pH 依存性を見てみると、 α 鎖と同様に酸性領域で速度は増大するが、その勾配は -0.6 程度であり、自動酸化反応におけるプロトンの作用機序が α 鎖と β 鎖では異なっていることを示唆している。pH 8 以上のアルカリ領域では、 k_f と k_s の値はほぼ一致し、二相性が消失していることが図4から明らかである。

ところで、このような自動酸化反応の実体はきわめて複雑で、 HbO_2 から O_2^- が自発的に解離するというような単純なものではない。すなわち、周囲の溶媒からヘムポケット内に侵入してきた H_2O 分子や OH^- イオンが、 FeO_2 中心を求核的に攻撃して、結合酸素を O_2^- の形で放出する。その結果、ヘム鉄の原子価は 3 価 (ferric) となり、第 6 配位座は H_2O 分子あるいは OH^- イオンに置き換わって、結局は aqua-metHb あるいは hydroxide-metHb となるのである。したがって、 HbO_2 や MbO_2 の自動酸化反応は、基本的には次の三つのタイプの素反応過程からなり、いずれも $\text{S}_{\text{N}}2$ タイプの求核性置換反応 (nucleophilic displacement) として書き表わされるこ

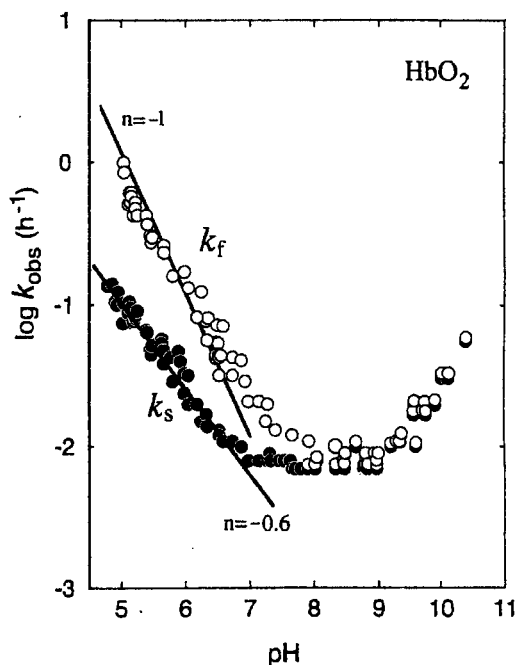
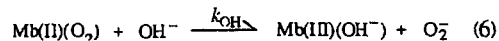
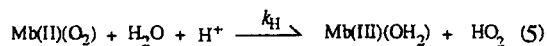
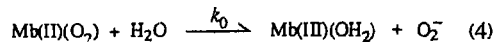


図4 HbA の自動酸化反応にみられる二相性と
その pH 依存性 35°C、0.1M 緩衝液中で自動酸化
反応を測定し、得られた k_f と k_s をプロットした。

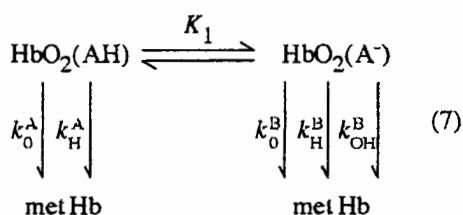
とが分かってきた 2,3)。



上記3種の素反応過程のうち、式(5)と式(6)は、その速度が H^+ や OH^- イオンの増加と共に増大するので、自動酸化反応の k_{obs} 値に放物線状の強い pH 依存性を与える主な要因となっている。一方、式(4)は極小値付近の速度に対応している。

5. pH 依存曲線の数値解析

HbO_2 の k_f 値 (α 鎖) の pH-依存曲線は、次のような「酸触媒性二状態モデル」によって最も良く定式化できる 7) 。このモデルでは、ある解離基 ($\text{p}K_1$ をもつ AH) が何らかの形で反応に関与すると仮定しているので、 AH 基の解離によって、 HbO_2 には2つの状態 A (AH) と B (A^-) が生じ、それらはモル分率 Φ および $\Psi (=1-\Phi)$ で平衡化していることになる。そして A、B いずれの状態にある HbO_2 も、それぞれ固有の速度で自動酸化されて metHb となる。



したがって、 k_f 値 (α 鎖) の自動酸化速度は次式で与えられる。

$$k_{\text{obs}}^{\alpha} = \{k_0^A[\text{H}_2\text{O}] + k_H^A[\text{H}_2\text{O}][\text{H}^+]\}(\Phi) + \{k_0^B[\text{H}_2\text{O}] + k_H^B[\text{H}_2\text{O}][\text{H}^+] + k_{\text{OH}}^B[\text{OH}^-]\}(\Psi) \quad (8)$$

ここで

$$\Phi = \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_1} \quad (9)$$

$$\Psi = (1 - \Phi) = \frac{K_1}{[\text{H}^+] + K_1}$$

このようにして、式 (7) に基づく curve-fitting から、 k_f 値 (α 鎖) の自動酸化反応に含まれる各素反応過程の速度定数と AH 基の解離定数は、35°C、0.1 M 緩衝液中で次のように求められた^{9,10)}。

$$\begin{aligned}
 k_0^A &= 0.25 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}\text{M}^{-1}, k_H^A = 0.14 \times 10^4 \text{ h}^{-1}\text{M}^{-2}, \\
 k_0^B &= 0.11 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}\text{M}^{-1}, k_H^B = 0.34 \times 10^4 \text{ h}^{-1}\text{M}^{-2}, \\
 k_{\text{OH}}^B &= 0.20 \times 10^3 \text{ h}^{-1}\text{M}^{-1}, pK_1 = 6.2
 \end{aligned}$$

この結果は、 HbO_2 が A、B いずれの状態であっても、プロトンによって触媒される素過程 (k_H) が自動酸化反応の大部分を推し進めていることを示している。実際、この過程で触媒性のプロトンは 1 モル当たり 10^7 倍も、水分子による置換過程 (k_0) を促進させている計算となる。一方、この酸触媒過程には、64 番目の遠位 His 残基 ($pK_1 = 6.2$ をもつ AH 基) がプロトン・リレー機構を介して作動していることも明らかとなった^{2,11)}。図 1(b)を用いてこの反応機構を説明すると、まず溶媒中のプロトンがヘムポケット内に侵入してきて、遠位 His の窒素 (N^δ) に結合する。すると反対側の窒素 (N^ϵ) は、水素結合に関与しているプロトンを遊離するので、そのプロトンはマイナスに分極気味の結合酸素の方へさらに接近する。このような活性化状態が、ヘム鉄 (II) から結合酸素 O_2 への 1 電子移動をさらに容易ならしめるものと考えられる (式 (5))。

一方、 k_s 値 (β 鎖) の pH-依存曲線は、 α 鎖で観測された $n = -1$ の傾きを示す強い「酸触媒過程」は全く含まれておらず、酸性領域での速度増大にはむしろ飽和性がみられる。実際に数値解析をしてみると、 k_s 値 (β 鎖) の pH-依存曲線は、式 (8) から二つの酸触媒項を取り除いた式 (10) で最も良い適合が得られた^{9,10)}。

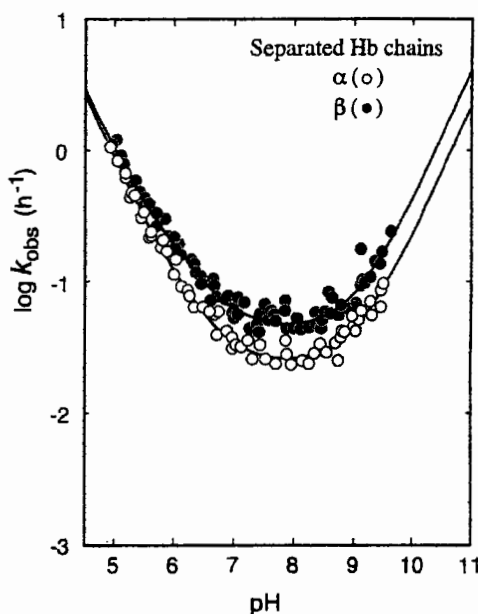


図5 単離した α 鎖と β 鎖の自動酸化反応にみられる pH 依存性 測定条件は、35°C、0.1M 緩衝液中である。

$$k_s = \{k_0^B[\text{H}_2\text{O}]\}(\Phi) + \{k_0^B[\text{H}_2\text{O}] + k_{\text{OH}}^B[\text{OH}^-]\}(\Psi) \quad (10)$$

6. 単離 α 鎖と β 鎖の自動酸化性

前節で明らかになった α 鎖と β 鎖の自動酸化性の違いは、果たしてそれぞれのサブユニットが intrinsic に有している性質なのだろうか？それともヘモグロビンが四量体を形成することによって初めて発現する性質なのだろうか？この問題に答えるために、我々はヘモグロビンの α 鎖と β 鎖を pMB (Para hydroxy mercuri benzoate) 試薬を用いて完全に分離させ、それぞれをイオン交換カラムに通して精製した。このようにして得た単離 α 鎖と単離 β 鎖について、同様に自動酸化性を測定した結果が図5である⁷⁾。この図から明らかのように、単離鎖 α 鎖と β 鎖はいずれも、四量体の場合と比べると非常に不安定で、容易に自動酸化してメト型になってしまうことがわかる。さらに、両鎖は共に強い「酸触媒過程」を示し、その pH-依存曲線に差異は認められない。このことは、四量体で見いだされた α 鎖と β 鎖の差異が、単離鎖では失われてしまうことを意味している。従って四量体中では、 β 鎖の自動酸化反応が抑制されることによって、ヘモグロビンの安定性が増していることになる。

ところで、ヘモグロビン溶液が希釈されると、解裂して $\alpha_1\beta_1$ と $\alpha_2\beta_2$ の二量体になることが知られているが、この二量体の自動酸化反応を測定したところ、四量体の場合と同様に強い二相性を示し、 β 鎖での自動酸化の抑制が生じていた⁸⁾。従って、 α_1

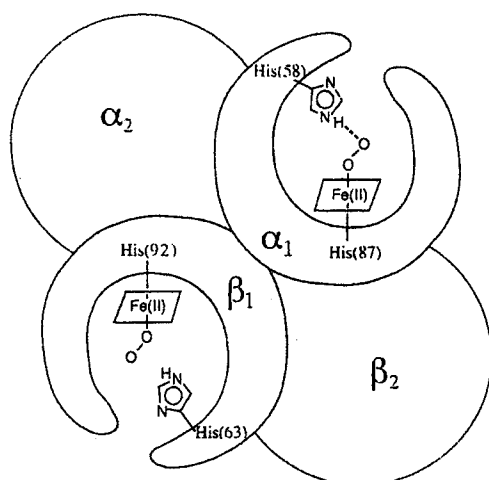


図6 ヘモグロビンの四量体構造と、 β 鎖に生じる遠位ヒスチジン残基の傾き

と β_1 の間に存在する packing contact さえあれば、両鎖の自動酸化性が抑制され、さらに β 鎖の酸触媒性が失われることが分かった。

これらのことから、 α 鎖と β 鎖が混合して $\alpha_1\beta_1$ (あるいは $\alpha_2\beta_2$) -contact が形成されると、まず β 鎖に立体的な構造変化が誘起されて、遠位ヒスチジンと結合酸素との間の水素結合が切断される (図6)。その結果、遠位ヒスチジン残基を介してのプロトンリレー機構は発現されず、 β 鎖の自動酸化速度は著しく抑えられるものと考えられた^{7,10}。実際、ヒトヘモグロビンのオキシ型の単結晶X線構造解析によれば、 α 鎖では遠位ヒスチジンの ϵ 位の窒素と、末端酸素原子との距離は2.7 Åと求められており、ミオグロбинの場合と同様に水素結合可能な距離にある。ところが、 β 鎖ではその距離は3.4 Åとあり、正常な水素結合を形成することは困難であると考えられる¹²。

なお、酸性領域でみられた自動酸化速度の二相性は、pH 8 以上のアルカリ側になると完全に消失し、両鎖の酸化速度に差異は認められなくなる。これは式(6)に示すように、 OH^- という最も強力な求核性イオンがヘム鉄の酸化を推し進める形になるからであると考えられる。

7. おわりに

成人血のHbAは、141個のアミノ酸残基からなる α 鎖と146個のアミノ酸残基からなる β 鎖とが、それぞれ2個ずつ会合して四量体を形成している。そして、各サブユニットに対する酸素分子の結合過程が顕著な協同性を示すことから、その構造と機能相関の解明は、長い間、現代生物学の中心課題の一つとなってきた。

今回、我々はヘモグロビンの自動酸化反応の測定から、packing contact を介して β 鎖の遠位ヒスチジ

ン残基の傾きが生じ、これが酸性領域における β 鎖の自動酸化の抑制を引き起こしていることを明らかにした。ヘモグロビン分子は、二種類のサブユニット接触を上手に使い分けて、非常に巧妙に酸素を運搬しているのである。今後は、 β 鎖の代わりに γ 鎖を有する胎児ヘモグロビンHbF ($\alpha_2\gamma_2$) における結合酸素の安定性などを調べることによって、ヘモグロビン分子全体の生理機能をさらに総合的に理解していきたいと考えている。

謝辞

本研究はPHP研究所の四釜慶治博士 (東北大学名誉教授) のご指導のもと、敦賀美恵博士、安田潤平修士との共同研究で行われたものである。ここに記して謝意を表したい。

参考文献

- 1) Dickerson, R. E. and Geis, I. (1983) *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology*. The Benjamin / Cummings Publishing Co., Inc. Menlo Park, California.
- 2) Shikama, K. (1988) *Coordination Chem. Rev.*, **83**, 73-91.
- 3) Wazawa, T., Matsuoka, A., Tajima, G., Sugawara, Y., Nakamura, K. and Shikama, K. (1992) *Biophys. J.*, **63**, 544-550.
- 4) Phillips, S. E. V. and Schoenborn, B. P. (1981) *Nature (London)*, **292**, 81-82.
- 5) Brantley, R. E., Jr., Smerdon, S. J., Wilkinson, A. J., Singleton, E. W. and Olson, J. S. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 6995-7010.
- 6) Gotoh, T. and Shikama, K. (1976) *J. Biochem. (Tokyo)*, **80**, 397-399.
- 7) Tsuruga, M., Matsuoka, A., Hachimori, A., Sugawara, Y. and Shikama, K. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 8607-8615.
- 8) Tsuruga, M. and Shikama, K. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1337**, 96-104.
- 9) Yasuda, J., Ichikawa, T., Tsuruga, M., Matsuoka, A., Sugawara, Y. and Shikama, K. (2002) *Eur. J. Biol.*, **269**, 202-211.
- 10) Shikama, K. and Matsuoka, A. (2003) *Eur. J. Biol.*, **270**, 4041-4051.
- 11) Shikama, K. and Matsuoka, A. (1994) *Biol. Rev. (Cambridge)*, **69**, 233-251.
- 12) Shaanan, B. (1982) *Nature (London)*, **296**, 683-684.

編集後記

『総合科学研究会報』の第3号が出来ました。今回は今年度最初の2回分の記録を掲載いたしました。今年度残り2回分の記録は『会報』第4号でお届け致します。

これからも、年4回を目安に勉強会を開いてゆくつもりでおります。どなたでも参加御自由の研究会です。会での話題提供の御希望は随時受け付けておりますので、下記連絡先までお気軽にお申し出ください。

総合科学研究会報 第3号

2006年1月吉日発行

編集・発行 福島県立医科大学総合科学研究会
〒960-1295 福島県福島市光が丘1番地
福島県立医科大学医学部人文社会科学講座内