

ヒト血清アルブミン，ビリルビン相互作用の物理化学的研究

(分担研究： 核黄疸の予防に関する研究)

曾我美 勝* 恵良 聖一* 桑田 一夫*

要 約

ヒト血清アルブミン (HSA) は、Cys-34に1個のSH基をもつメルカプトアルブミン (HMA) 及びSH基がシスティン、グルタチオンなどと混合ジスルフィド結合を形成したノンメルカプトアルブミン (HNA (CYS), HNA (GSH)), さらにS-S結合以上に酸化されたノンメルカプトアルブミン (HNA (OXI)) の混合物である。(1)中性pH域において、HSAはN→B転移 (pH 7.0→9.0)を示す。HMA, HNA (0.10 M NaCl) はN→B転移において二次構造変化 (α ヘリックス, β 構造等) が殆ど無いことを見いだした。精製HMA, HNAとビリルビン (BR) の結合 (複合体) の誘起CD ($[\theta]_{405}$, $[\theta]_{460}$) はN→B転移において絶対値が増加し、しかもHNA-BR_{2.0}の誘起CDの絶対値は、HMA-BR 2.0の約2倍であった。この結果はHNAがHMAよりも強くBRと結合することを示唆した (図1)。また、 $[\theta]_{405}$, $[\theta]_{460}$ がそれぞれ負及び正であることは、結合BRが右回りコンフォーマであることを示唆した。(2)HSAのN→B転移における動的構造変化をNMRを用いて研究した。交差緩和時間 ($T_{1\rho}$) は、N型に比しB型で約1.5倍延長した。N→B転移により、分子の「構造のゆらぎ」が増加した。

見出し語： ヒト・メルカプトアルブミン，ヒト・ノンメルカプトアルブミン，ビリルビン結合能，N→B転移。

研究 方 法

市販HSA (Calbiochem Behring社, Lot 701507) をSogamiらの方法(8)により脱脂した後、HMA, HNAの合成に用いた。即ち、HSAにグルタチオン (GSH) をモル比でGSH/HSA = 2/1に加え、25°C, 7時間反応させ、ついで充分量の蒸溜水により透析してHMAを精製した(2)。しかしながら、HNA (OXI) はSH化合物により還元不可能なため、後述の高速液体クロマト

グラフィ (HPLC) によりHNA (OXI) を求め(2)、各種の測定値のHNAの寄与を補正した。また、HSAにシスルチン (Cys Cys) をモル比でCys Cys/HSA = 2/1に加え、35°C, 132時間反応させ、ついで充分量の蒸溜水により透析して、HNAを合成した(2)。BRはSigma社 (Lot 65F-0250) より購入した。HPLCはAsahipak ES-502Nを用いた(2)。CD測定は、日本分光社製J-40円二色分散計を用い、蛋白質の二次構造

* 岐阜大学・医学部・第2生理

解析には200~250 nmにわたって測定し(3), HSA-BR複合体の誘起CDは350~550 nmにわたって測定した。¹H-NMR測定はBruker社WM360wb型を用いた。スピン・エコー¹H-NMRスペクトルは〔90°C-(τ-180°C-τ)n〕スピン・エコーパルス系列を用いた(τ=0.001 s, n=5または10; 0.010 sまたは0.020 s CPMGスペクトル)。交差緩和時間(T_{IS})はAkasakaの方法(4, 5, 6)を用い, 7.13, 4.72, 0.40または-2.45 p. p. m. を20~107 Hz (τ H₂/2π単位)でf₂照射して求めた。

結果と考察

〔N→B転移における二次構造変化〕0.10 M NaClのN→B転移(pH 7.0→9.0)において, HMAの二次構造は, f(α); 0.68→0.67, f(β); 0.15→0.15, HNAは, F(α); 0.70→0.68, f(β); 0.14→0.15と殆ど変化しなかった。しかしながら, 無加塩の状態では, N→B転移において, HMA, HNAのf(α)は, それぞれ, 0.69→0.64, 0.70→0.66と変化した。

〔結合BRの誘起CD〕HMA-BR_{2.0}, HNA-BR_{2.0}の誘起CDは, 図1に示すように, [θ]₄₀₅(●, ▲), [θ]₄₆₀(○, △)の絶対値はN→B転移において増加する。しかも, HNA-BR_{2.0}の誘起CD(●, ○)の絶対値はHMA-BR_{2.0}(▲, △)の約2倍であった。この結果は, HNAがHMAよりも強くBRと結合することを示唆している。BRの結合は2-AB subdomainにあるが(7), Cys-34のSH基の修飾により, 結合能の増加することは非常に興味ある問題である。

[θ]₄₀₅, [θ]₄₆₀がそれぞれ負及び正であることは, 結合BRが左回りコンフォーマにあることを示唆している(8)。

〔N→B転移におけるHSA動的構造変化〕血清アルブミンの薬物, 代謝産物などに対する異常に高い結合能は血清アルブミン分子の configurational adaptability の大きいためであると報告されている(8, 9)。HSA(0.10 M NaCl)のN

→B転移(pH 7.0→9.0)において, 二次構造変化が殆ど観測されないため, N→B転移における動的構造変化を¹H-NMR(360 MHz)を用い, T_{IS}, 0.010 sまたは0.020 s CPMGスペクトルを用いて研究した。20~107 Hz (τ H₂/2π単位)で, 7.13, 0.40, -2.45 p. p. m.の何れかをf₂照射して求めたT_{IS}値は, 図2(左側)に示すようにB型で約1.5倍延長した。しかしながら, 側鎖の動きを示唆するCPMGスペクトルはN→B転移で変化しなかった(図2)。即ち, HSAはN→B転移において, 分子容は増加せず, αヘリックス含量も減少せず, しかも分子内部の「ゆらぎ」が増加した。B型はPtitsynら(1981)により最初に報告された「molten-globule state」と呼ばれる構造(10, 11, 12)に近い状態にあり, この状態がBR等に対する結合能増加に寄与するのだろう。

文献

1. Sogami, M. & Foster, J. F. (1968) *Biochemistry* **7**, 2172-2182
2. Era, S., Hamaguchi, T., Sogami, M., Kuwata, K., Suzuki, E., Miura, K., Kawai, K., Kitazawa, Y., Okabe, H., Noma, A. & Miyata, S. (1988) *Int. J. Peptide Protein Res.* **31**, 435-442
3. Era, S., Ashida, H., Nagaoka, S., Inouye, H. & Sogami, M. (1983) *Int. J. Peptide Protein Res.* **22**, 333-340
4. Akasaka, K. (1981) *J. Magn. Resonance* **45**, 337-343
5. Akasaka, K. (1983) *J. Magn. Resonance* **51**, 14-25
6. Era, S., Sogami, M., Kuwata, K., Fujii, H., Suzuki, E., Miura, K., Kato, K. & Watari, H. (1989) *Int. J. Peptide Protein Res.* (in press)
7. Brown, J. R. & Shockley, P. (1982) in *Lipid-Protein Interaction* (Jost, P. C. &

- Griffith, O. H., eds.) vol. 1, pp. 25 - 68,
John Wiley & Sons, New York
8. Blauer, G. & Wagniere, G. (1975) J.
Am. Chem. Soc. 97, 1949 - 1954
 9. Karush, F. (1950) J. Am. Chem. Soc.
72, 2705 - 2713
 10. Dolgikh, D. A., Gilmanskin, R. I.,
Brazhnikoo, E. V., Bychova, V. E.,
Semistonov, G. V., Venyaminov, S. Y. &
Ptitsyn, O. B. (1981) FEBS Lett. 136,
311 - 315
 11. Ohgushi, M. & Wada, A. (1983) FEBS
Lett 164, 21 - 24
 12. Era, S., Nagaoka, S., Sogami, M.,
Watari, H. & Akasaka, K. (1985) Int.
J. Peptide Protein Res. 26, 21 - 32

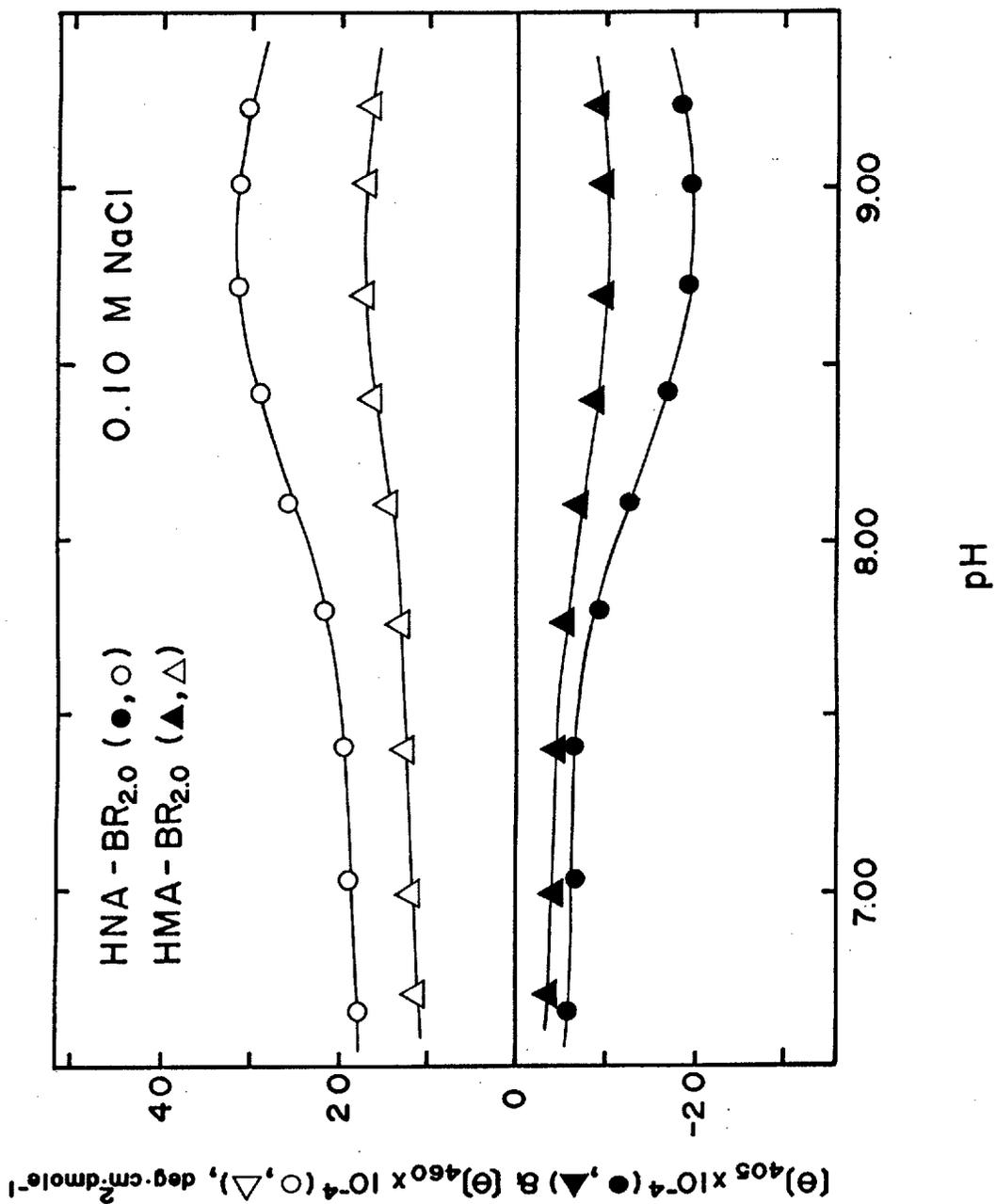


图1.

0.010 SEC CPMG SPECTRA
N-B TRANSITION (HSA)

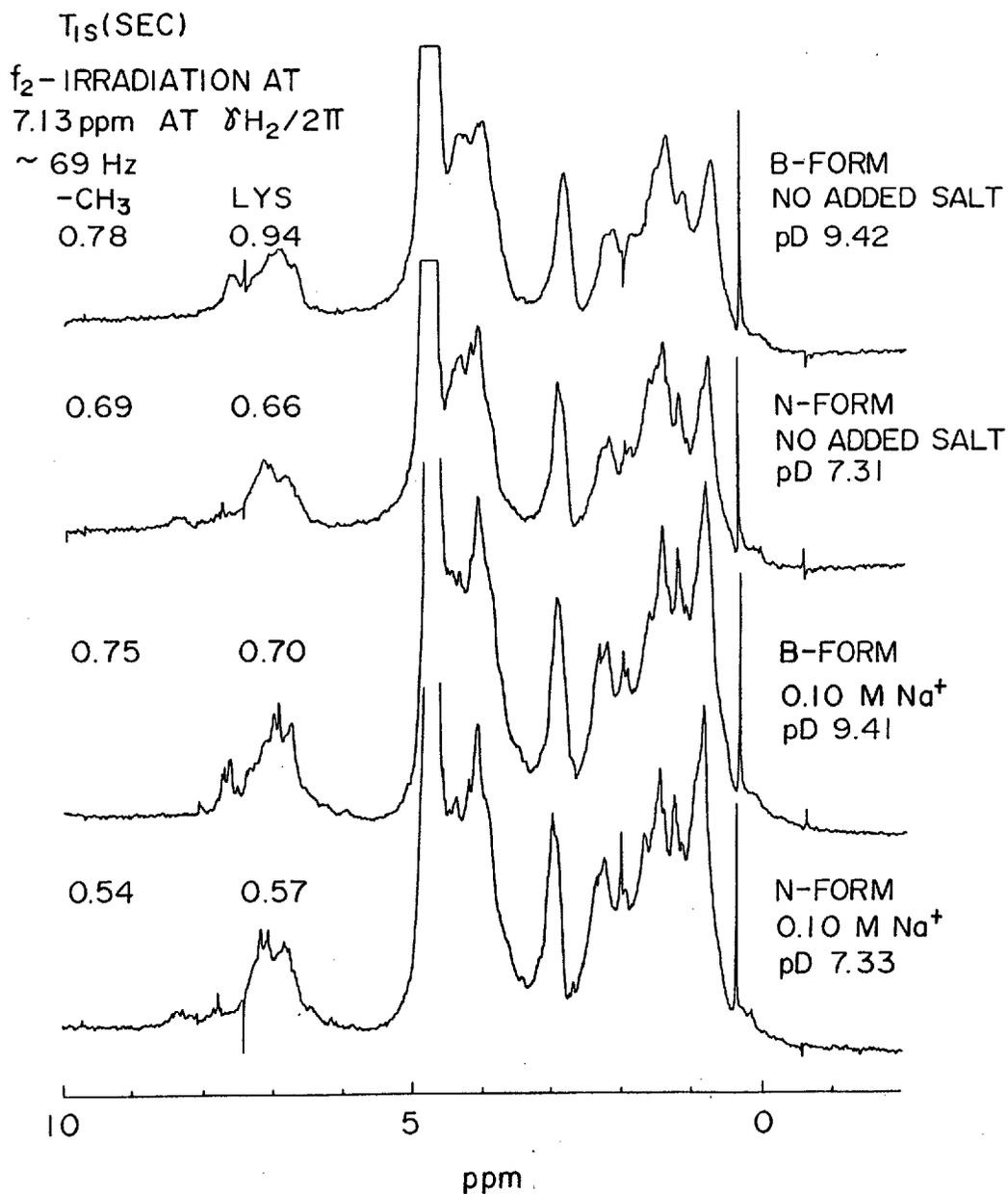
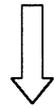


图2.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約

ヒト血清アルブミン(HSA)は,Cys-34に1個のSH基をもつメルカプトアルブミン(HMA)及びSH基がシステイン,グルタチオンなどと混合ジスルフィド結合を形成したノンメルカプトアルブミン(HNA(CYS),HNA(GSH)),さらにS-S結合以上に酸化されたノンメルカプトアルブミン(HNA(OXI))の混合物である。〔1〕中性pH域において,HSAはN→B転移(pH7.0-9.0)を示す。HMA,HNA(0.10M NaCl)はN→B転移において二次構造変化(ヘリックス,構造等)が殆ど無いことを見いだした。精製HMA,HNAとビリルビン(BR)の結合(複合体)の誘起CD([θ]405,[θ]460)はN→B転移において絶対値が増加し,しかもHNA-BR2.0の誘起CDの絶対値は,HMA-BR2.0の約2倍であった。この結果はHNAがHMAよりも強くBRと結合することを示唆した(図1)。また,[θ]405,[θ]460がそれぞれ負及び正であることは,結合BRが右回りコンフォーマであることを示唆した。(2)HSAのN→B転移における動的構造変化をNMRを用いて研究した。交差緩和時間(T_{is})は,N型に比しB型で約1.5倍延長した。N→B転移により,分子の「構造のゆらぎ」が増加した。