

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

岐阜大学医学部第2生理学教室

曾我美 勝, 恵 良 聖 一
桑 田 一 夫

ビリルビンと血清アルブミン相互作用は、主として、結合数、吸収スペクトル、蛍光スペクトル測定などを用いて進められている。これらの測定では、ヒト血清アルブミン(HSA)とウシ血清アルブミン(BSA)の間に大きな差はないが、円二色分散(CD)測定において、HSAとBSAの結合ビリルビン(BR)による誘起コットン効果の符号が全く異なることが報告され(1, 2), ついで結合BRの構造と誘起コットン効果の符号についての理論解析が報告された(3)。また、BRとBSA結合定数は脂肪酸/BSAモル比が1~5の間で大きくなり、5以上では、減少することが報告されている(4)。BSAはCys-34にSH基をもつメルカプトアルブミン(BMA)とSH基がシステイン(Cys), グルタチオン(GSH)などとS-S結合を作ったノンメルカプトアルブミン(BNA)の混合物であり、脂肪酸はBMAよりもBNAと、より強く結合すると報告されている(5, 6)。上述の理由のため、BNAが脂肪酸と結合しやすく、そのためBRとの結合性の大きくなる可能性がある。HSAの場合も、BSAと同様にメルカプトアルブミン(HMA)とノンメルカプトアルブミン(HNA)の混合物であり、特に市販のHSAの大部分はHNAに変化している(7とその引用文参照)。このため、BRとHSA相互作用研究に、市販HSAをそのまま使用することは、かなり問題がある。HMAとHNAは、特殊なカラムを使用した高速液体クロマトグラフィ(HPLC)により比較的簡単に分離定量できる(7)。HSAとBRの相互作用の半定量的研究に、セフアデックスカラムが使用されてきた。しかしながらBRとHSAの結合定数より判断すると、かなりの部分がカラム通過中に解離していると考えられ

る(8)。このため筆者らは、HPLCなどによるBRとHMA, HNAの相互作用の測定を行わず、HMA, HNAを分離精製した後、BRとの相互作用を研究することを計画し、まず市販HSA中のHMA, HNA組成をHPLCを用いて研究した。

筆者らは、Asahipak GS-520H〔(0.75×25 cm)×8カラム, カラム温度28℃〕を用いて0.03 Mリン酸緩衝液, 0.15 M Na₂SO₄, pH 6.87 (sulfate buffer), 流速0.80 ml/minにて、HSAをHMAとHNAに分離分析してきた(7とその引用文献参照)。市販HSAのHMA/(HMA+HNA)の比率、f(HMA)は0.40~0.65、正常成人男子のf(HMA)の平均値、 \bar{f} (HMA)は0.75±0.025(n=28)であった(7)。抗原抗体反応により純度99%以上のHSA(Calbiochem Behring社)もGS-520H HPLCにより少なくとも4成分が観察される。図1に、別のHPLCシステムによるHSAの分析結果を示しているが、これら市販HSAのなかで、肝炎ウイルス予防のために熱処理(安定剤共存のもとに、60℃, 10時間)をしていないHSAは、AB KABI社(図1, KABI)のもののみである。60℃の熱処理により、HSA分子中に約30個あるアミド側鎖は多数分解され、-COO-に変化する(9)。しかも、熱処理してないAB KABI社のHSAは製造中止になり、入手は困難な状態にある。このため、正常人血清より、HSAを分離する必要がある。GS-520Hを用いたHPLCにより、慢性腎不全、慢性腎不全人工透析、肝疾患、ネフローゼ症候群などにおいて、f(HMA)が変化(減少)することを見出した(7)。しかしながら、Asahipak GS-520H(sulfate buffer)を使用した際には分

析時間約90分を必要とするため分析法を改良し分析時間の短縮を試みた。Asahipak ES-502N (0.76×10cm; DEAE型樹脂; HPLC分析条件図1参照)を用いて、より短時間で、図1に示すように、HSAをHMA、2種類のHNAに明瞭に分離分析することができた。図1は4社のHSAの分析結果を示している。KABI, CALBIO, NY, KKのHSAは、それぞれAB KABI社(無熱処理製品)、Cabiocem Behring社、日本製薬社、化学及び血清療法研究所のHSAである。このように、市販HSAは非常にf(HMA)の低いことがわかった。このES-502Nカラムを使用して、55人の血清を分析したが、f(HMA)は殆どGS-520Hカラム8本(sulfate buffer)の結果と同じであった。

図1のHSA(NY), HSA(KK), HSA(KABI)の最初に溶出されるシャープなピークは微量含まれるグロブリン分画に対応している。ついでHMA, HNA(2成分)が溶出される。図1において、先に溶出されるHNAピークは、Cys, GSHとmixed disulfideを作ったHNAよりなっている。図2に示すように、シスチン、酸化型グルタチオン(GSSG)を用いて合成したHNAはこの場所に溶出される。しかも、これらのHNAは、GSH, dithiothreitolなどにより容易に還元され、簡単に、HNA→HMAに変化する(図2参照)。しかしながら、最後に溶出されるHNAは、上述の還元剤により、還元されない。このHNAは、Cys-34のSH基がS-S(HNA)以上に、酸化された成分、即ち酸素と反応したものであろう。BSAでは、酸素と反応した酸化型について多数報告があり、その機序について検討されている(5,

6, 10, 11)。HSAについては、このような報告はないが、BSAと同様に、S-S以上に酸化されたものが存在するのだろう。今後、分取用HPLCを用い、HMA, HNAなどの細分画を分離精製し、BRとの結合についてCD測定などを用いて研究する。

文 献

1. Lavie, E. & Blauer, G. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **193**, 191-203
2. Beaven, G.H., d'Albis, A. & Glatzer, W.B. (1973) *Eur. J. Biochem.* **33**, 500-510
3. Blauer, G. & Wagnier, G. (1975) *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1949-1954
4. Reed, R.G. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 7483-7487
5. Noel, J.K.F. & Hunter, J.F. (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 7391-7406
6. Takabayashi, K., Imada, T., Saito, Y. & Inada, Y. (1983) *Eur. J. Biochem.* **136**, 291-295
7. Sogami, M., Era, S., Nagaoka, S., Kuwata, K., Kida, K., Miura, K., Suzuki, E., Muto, Y., Tomita, E., Hayano, S., Sawada, S., Noguchi, K. & Miyata, S. (1985) *J. Chromatog.* **332**, 19-27
8. Bennett, J.P. Jr. (1978) in *Neurotransmitter Receptor Binding* (Yamamura, H.I., Enna, S.J. & Kuhar, M.J., eds) pp. 58-90, Raven Press, New York
9. Flatmark, T. (1966) *Acta Chem. Scand.* **20**, 1487-1496
10. Janatoba, J., Fuller, J.K. & Hunter, M.J. (1968) *J. Biol. Chem.* **243**, 3612-3622
11. Wallevik, K. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **420**, 42-56

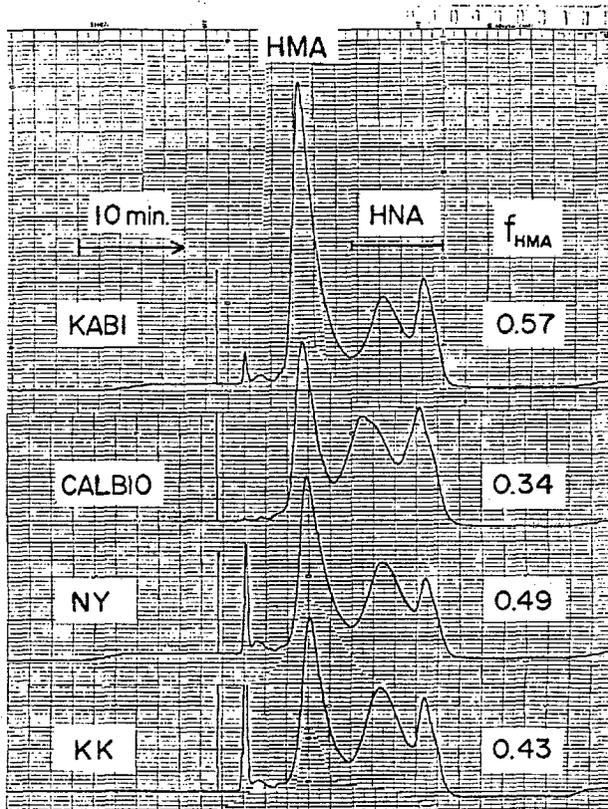


Fig.1 Ion-exchange HPLC profiles (excitation wavelength, 280 nm ; emission wavelength, 340 nm) of HSA (KABI, AB KABI), HSA (CALB, Calbiochem Behring Corp.), HSA (NY, Nippon Seiyaku Co.) and HSA (KK, Chemo-Sero-Therapeutic Res. Inst.). Ion-exchange HPLC on Asahipak ES-502N (0.76×10 cm, column temperature 35°C) was carried out by 3-step linear gradient elution with increasing ethanol concentration from 0 to 10 % (0-5 min. 0 %, 5-9 min. from 0 to 1 %, 9-13 min. from 1 to 3 % and 13-17 min. from 3 to 10 %) in 0.05 M sodium acetate, 0.40 M Na₂SO₄ (pH 4.80) at a flow rate of 1.00 ml/min. HMA, HNA and f_{HMA} indicate human mercaptalbumin, human nonmercaptalbumin and fraction of HMA, respectively.

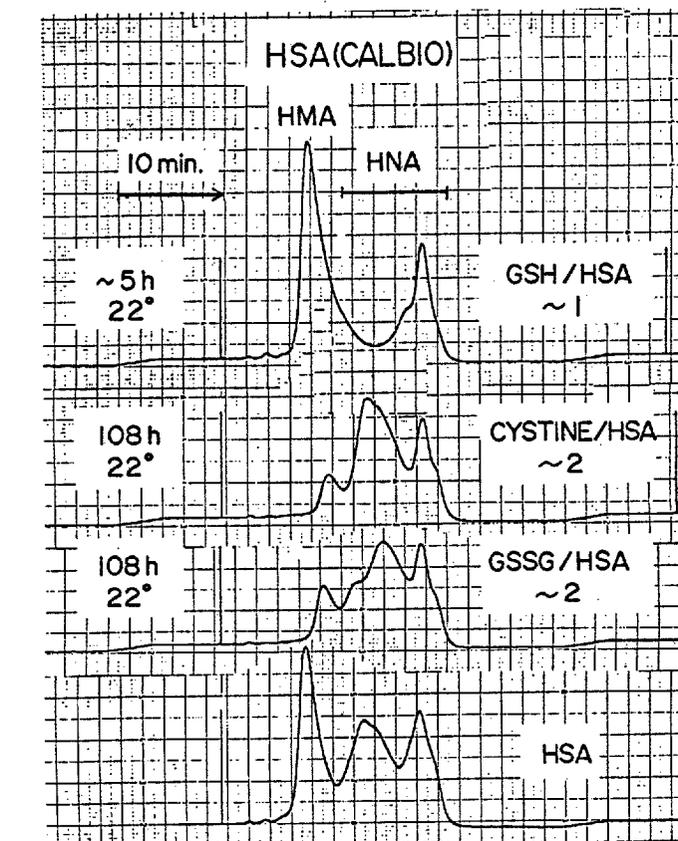
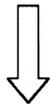


Fig.2 Ion-exchange HPLC profiles of HSA (Cabochem Behring Corp.) and modified HSA preparations with glutathione (GSH ; molar ratio of added GSH to HSA, GSH/HSA~1; reduction for 5 hours at 22° at pH 6.85), cystine (cystine/HSA~2 ; mixed disulfide formation for 108 hours at 22° at pH 6.85) and glutathione disulfide (GSSG/HSA~2 ; mixed disulfide formation for 108 hours at 22° at pH 6.85). See Fig.1 on ion-exchange HPLC.



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



ビリルビンと血清アルブミン相互作用は、主として、結合数、吸収スペクトル、蛍光スペクトル測定などを用いて進められている。これらの測定では、ヒト血清アルブミン(HSA)とウシ血清アルブミン(BSA)の間に大きな差はないが、円二色分散(CD)測定において、HSAとBSAの結合ビリルビン(BR)による誘起コットン効果の符号が全く異なることが報告され(1.2)、ついで結合 BR の構造と誘起コットン効果の符号についての理論解析が報告された(3)。また、BRとBSA結合定数は脂肪酸/BSAモル比が1~5の間で大きくなり、5以上では、減少することが報告されている(4)。