

## 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

(1) 中性pH域におけるヒト・血清アルブミン—ビリルビン(HSA・BR)複合体の誘起CDは、結合BRが右回りコンフォーマーの構造であることを示唆した。また、N→B転移(pH 7→9)において、BR誘起CDが増加した。(2) ヒト・メルカプトアルブミン(HMA)より、ヒト・ノンメルカプトアルブミン(HNA)とBR複合体の誘起CDの絶対値がpH 9 (B型構造)において大であった。

見出し語： ヒト・血清アルブミン—ビリルビン複合体，ビリルビン誘起CD，ヒト・ノンメルカプトアルブミン，N→B転移。

### 材 料 と 方 法

市販HSA (Calbiochem Behring社, Lot 701507)を, Sogamiらの方法(1)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 = 10/1に加え, 25°, 7時間反応させ, ついで充分量の蒸留水に対して透析しHMAを精製した(2)。また, HSAにシスチン(Cys-Cys)をモル比でCys-Cys/HSA = 2/1に加え, 35°, 132時間反応させ, ついで充分量の蒸留水により透析してHNAを合成した(2)。Ellman (1959)のDTNB法により求めた合成HMA, HNA及びHSAのSH価は1分子当たりそれぞれ, 0.71, ~0.34となり, Asahipak ES-520Nカラムを用いた高速液体クロマトグラフィによる結果(2)と良い一致を示した。BRはSigma社(Lot 65F-0250)より購入した。CD測定は, 日本分光社製J-40S

円二色性分散計を用い, 蛋白質の二次構造解析にはDPモードで200~250nm, 結合BR誘起CDはノーマルモードで350~550nmにわたって測定した。なお, Blauer & Wagnière (3)による結合BR誘起CDの理論解析と比較検討するため, HSA-BR複合体のHSA/BRモル比は酸性pH域では5.0, 中性pH域では2.0とした。

### 結 果 と 考 察

[HSAの二次構造] 市販HSAの酸性pH域における二次構造( $\alpha$ -ヘリックス,  $f(\alpha)$ ;  $\beta$ -構造,  $f(\beta)$ )を解析した。N→F転移で $f(\alpha)$ , 0.70→0.55,  $f(\beta)$ , 0.14→0.24と変化し, N→F転移pH域はBSA (pH 4.40→3.80, 0.10M KCl)と異なり, Wallevikの報告(4)のようにpH 4.5→3.4であった。

[結合BRの誘起CD] Fig. 1Aに酸性pH域でのHSA-BR複合体(HSA-BR<sub>5.0</sub>, 0.10M

\* 岐阜大学医学部第2生理学教室

NaCl)のN型(pH 5.98)と、N-F転移中点pH付近(pH 3.78)での結合BRの誘起CDスペクトルを示す。N型では、405nmに負の誘起CD帯、460nmに正の誘起CD帯をもつが、pHの低下につれ両CD帯の符号は逆転し、分子橢円率、 $[\theta]_{405}$ 、 $[\theta]_{460}$ はN→F転移前半で、それぞれ極大、極小値を示した。次に、中性pH域でHSA-BR<sub>2.0</sub>(0.10 M NaCl)のN型(pH 7.03)とB型(pH 9.03)の誘起CDスペクトルをFig. 1Bに示す。N型の結合BR誘起CD帯の符号(405nm, 負; 460nm, 正)はN→F転移の場合とは異なり、N→B転移で変化せず、Fig. 1Bに示すように、B型になると $[\theta]_{405}$ 、 $[\theta]_{460}$ の絶対値は増加した。このような、pHによる結合BR誘起CD帯の変化はBeavenら(5)の結果と一致するが、酸性pH域での $[\theta]$ の変化は、0.10 M KCl中におけるBSA-ANS複合体のANS蛍光のpHプロファイル(6, 7)に良く似ている。このことは、HSA分子内で、BRの結合部位(サブドメイン2 AB)とANSの結合部位(サブドメイン1 CZ)(8)が立体構造上近接し、これらの部位がN→F転移とともに構造変化を起している可能性を示唆している。Blauer & Wagnière (3)は、BRのラクタム五員環B, C間の一重結合の角度( $\delta_1$ ,  $\delta_2$ )のみを変化させて分子軌道法により、結合BRの立体構造に対するCD波長と旋光強度を理論解析している。即ち、 $0 < \delta_1$ ,  $\delta_2 < 90^\circ$ の場合を右回りコンフォーマー、 $-90^\circ < \delta_1$ ,  $\delta_2 < 0$ の場合を左回りコンフォーマー(文献(3)のFig. 5参照)と彼らは呼んでいるが、実測誘起CD帯の符号等の結果(Figs. 1A & 1B)より、HSAに結合したBRは、酸性pH域では左回り、中性pH域では右回りコンフォーマーになっていると考えられる。さらに、 $[\theta]_{405}$ 、 $[\theta]_{460}$ の変化より、中性pH域では、BRの右回りコンフォーマーの割合は、N型よりもB型の時の方が大きい。HSA分子のB型構造はN型に比べ、二次構造含量に殆ど変化なく、S-S結合の二面角は若干変化し、ヒンジ部分を介

してドメイン、サブドメイン間の揺らぎが増加した状態(9)であり、このためB型では、結合BRの増加のみでなく結合BRの右回り不整性(右回りコンフォーマーの割合)が増大している可能性がある。

[HMAとHNAのBR結合に対する差異] Fig. 2に、中性pH域でのHMA-BR<sub>2.0</sub>、HNA-BR<sub>2.0</sub>(0.10 M NaCl)の $[\theta]_{405}$ 、 $[\theta]_{460}$ のpHプロファイルを示す。HSAの場合と同様、 $[\theta]_{405}$ 、 $[\theta]_{460}$ の変化はN型よりもB型の方が大きい、その変化はHNA-BR<sub>2.0</sub>の場合の方がより大きい。このことは、結合BRの右回り不整性は、N型では、HMA、HNAは同程度であるが、B型構造になるとHMAよりHNAの方が大きく、BR結合部位近傍におけるHMA、HNAの構造差を反映している可能性がある。いずれにせよ、HSAに結合したBRの構造は、生理的pH域では左回りコンフォーマーは取り得ず、右回りコンフォーマーであると考えられる。このことは、BRがHSAと結合した場合、BRの分子内水素結合形成はみられず、水素結合はアルブミン分子とのみ形成している(10)という共鳴ラマン測定の結果と矛盾するものではない。

## 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.* (in press)
3. Blauer, G. & Wagnière, G. (1975) *J. Am. Chem. Soc.* **97**, 1949-1954
4. Wallevik, K. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 2650-2655
5. Beaven, G. H., d'Albis, A. & Gratzer, W. B. (1973) *Eur. J. Biochem.* **33**, 500-510

6. Chen, R. F. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 173-181
7. Era, S., Kuwata, K., Kida, K., Sogami, M. & Yoshida, A. (1985) *Int. J. Peptide Protein Res.* 26, 575-583
8. Brown, J. R. & Shockley, P. (1982) in *Lipid-Protein Interaction* (Jost, P. C. & Griffith, O.H., eds.) pp. 25-68 John Wiley & Sons, New York
9. Era, S., Kuwata, K., Sogami, M. & Watari, H. (1987) *Int. Meet. on Biochem.*, Beijing, China, Abstract, 38
10. Hsieh, Y.-Z. & Morris, M.D. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 62-67

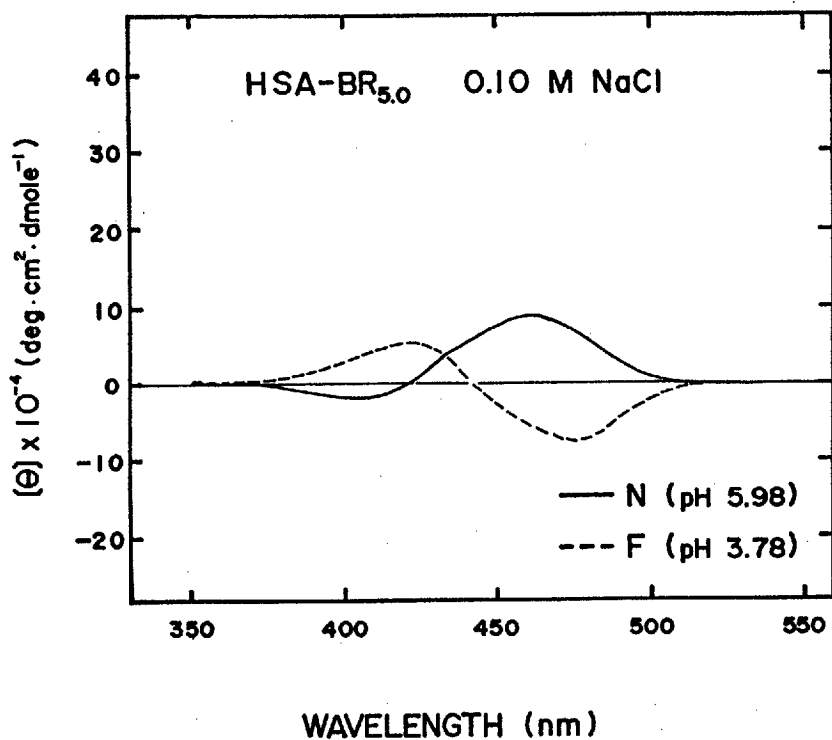


Fig. 1A CD spectra of HSA-BR<sub>5.0</sub> complex (molar ratio of HSA to BR=5/1) in 0.10 M NaCl at pH 5.98 (the N-form; —) and pH 3.78 (mid-point of the N→F transition; ----). HSA and BR indicate human serum albumin and bilirubin, respectively.

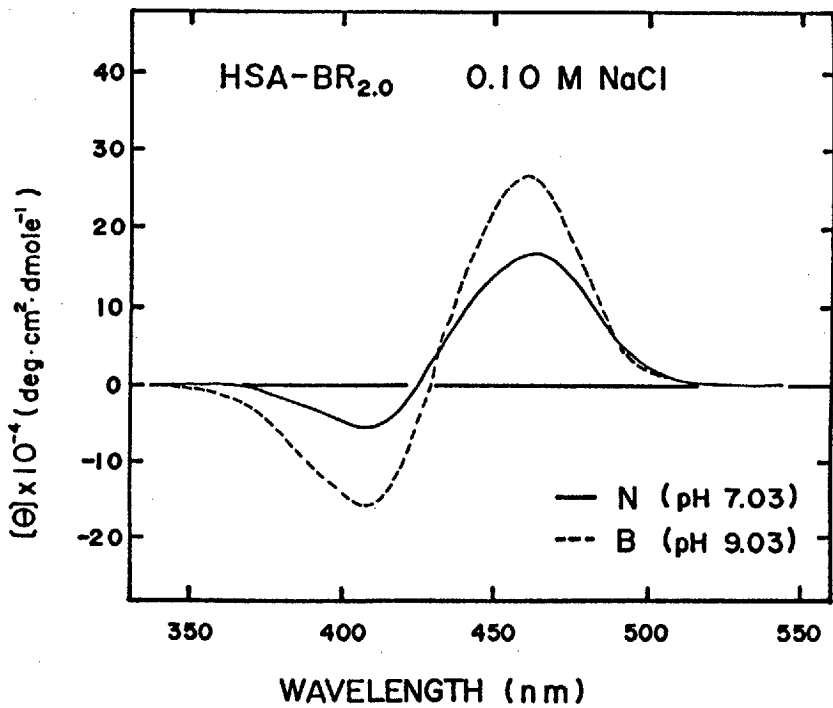


Fig. 1B CD spectra of HSA-BR<sub>2.0</sub> complex (molar ratio of HSA to BR=2/1) in 0.10 M NaCl at pH 7.03 (the N-form; —) and pH 9.03 (the B-form; - - -).

See Fig. 1A on HSA and BR.

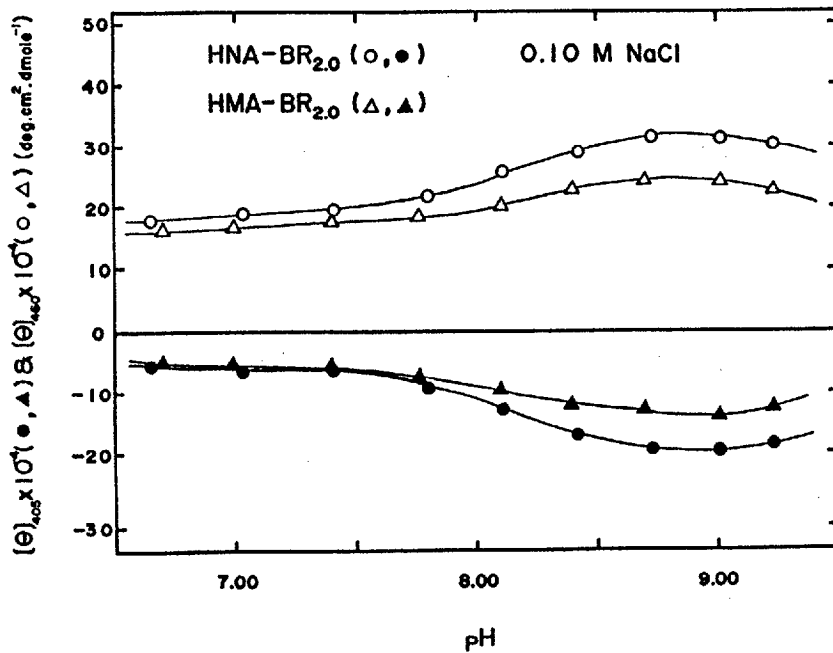


Fig. 2 pH-profiles of  $[\theta]_{405}$  (●, ▲) and  $[\theta]_{460}$  (○, △) of HMA-BR<sub>2.0</sub> (△, ▲) and HNA-BR<sub>2.0</sub> (○, ●) complexes (molar ratio of HMA or HNA to BR=2/1) in 0.10 M NaCl. HMA and HNA indicate human mercapt- and nonmercaptalbumin, respectively. See Fig. 1A on BR.



## 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

(1)中性 pH 域におけるヒト・血清アルブミン - ビリルビン(HSA・BR)複合体の誘起 CD は、結合 BR が右回りコンフォーマーの構造であることを示唆した。また、N B 転移(pH7 9)において、BR 誘起 CD が増力した。(2)ヒト・メルカプトアルブミン(HMA)より、ヒト・ノンメルカプトアルブミン(HNA)と BR 複合体の誘起 CD の絶対値が pH9(B 型構造)において大であった。