

# ラット肝細胞質内有機アニオン 結合蛋白 Y, Z の性状と役割

CHARACTERIZATION OF ORGANIC ANION-BINDING PROTEIN,  
Y AND Z IN RAT LIVER AND THEIR ROLE  
IN THE HEPATIC UPTAKE OF ORGANIC ANIONS

杉山 雄一

*Yuichi Sugiyama*

## 謝 辞

本研究に関して、終始有益な御助言と、御批判を賜わりました花野 学教授、及び、粟津 荘司助教授に深謝致します。また、本研究を行なうにあたり、種々の御便宜をおはかり下さいました伊賀 立二助手に感謝いたします。

この研究は、横田雅之氏、朝野芳郎氏、安由美子さん、安西英隆氏、佐々木雅啓氏の御協力を得て今日に到ったものであります。どうもありがとうございました。

修士在学時の私に、研究者としての考え亦、蛋白化学の基礎を、身をもって教えて下さいました現、杏林製薬、内田 広先生に、心から感謝いたします。

最後に、本研究を行なうにあたり種々の励まし、及び、論文のまとめに協力してくれた妻、京子に、感謝します。

## <目次>

### 第一章 序論 (1)

1. はじめに (1)
2.  $\gamma$ - $\delta$ -分画と有機アニオン  
肝移行との関係 (8)
3.  $\gamma$ - $\delta$ -蛋白についてのこれまでの研究 (15)
  - 1).  $\gamma$ -蛋白について (15)
    - (i) 精製 (15)
    - (ii) 性状 (16)
    - (iii) 臓器特異性 (16)
    - (iv) 他の蛋白との関係 (17)
  - 2).  $\delta$ -蛋白について (19)
    - (i) 精製 (19)
    - (ii) 性状 (20)

(iii) 臓器特異性 (21)

(iv) 他の蛋白との関係 (21)

#### 4. 今後の問題点と本研究の意義 (23)

### 第二章 結合蛋白 Y. 8 の精製と その性質 (27)

#### 1. Y. 8 - 分画の Characterization (27)

##### 1). セフデックス G-75 ゲル透過パターン (27)

(i) 方法 (27)

上清の調整 (27)

セフデックス G-75 ゲル透過 (28)

(ii) 結果 (28)

##### 2). 平衡透析法による Y. 8 - 分画と

BSP の結合 (30)

(i) 方法 (30)

Y. 8 - 分画の調整 (30)



(iii)

Y, Z-分画の蛋白濃度の測定(30)

平衡透析法(31)

低濃度 BSP の定量(33)

(ii) 結果(35)

3). けい光 probe, ANS との反応(38)

(i) 方法(38)

X, Y, Z-分画の調整(38)

けい光測定(39)

けい光 titration(39)

けい光 data より, 結合型 ANS  
濃度の算出(40)

(ii) 結果と考察(41)

けい光スペクトル(41)

最大けい光強度(42)

けい光法による ANS binding(42)

ANS と Z-分画及び BSA への binding(45)

2. Y-蛋白の分離精製及びその性質(50)

(iv)

1). 工程 (50)

(i) 上清の調整 (50)

(ii) セファデックス G-75 ゲルろ過 (50)

(iii) セファデックス G-75 ゲルろ過 (51)

(iv) DEAE-セファデックス クロマトグラフィー (51)

(v) CM-セファデックス クロマトグラフィー (52)

(vi) セファデックス G-75 ゲルろ過 (54)

2). 均一性と分子量決定 (55)

(i) 方法 (55)

ゲルろ過法 (55)

電気泳動法 (55)

(ii) 結果 (56)

3). BSPとの結合 Kinetics (57)

(i) 方法 (57)

平衡透析法 (57)

(ii) 結果

BSPとの binding (58)

## 4). 精製まとめ (61)

5). 精製蛋白と BSP, RB との結合  
- PH, イオン強度の影響 (62)

## (i) 方法 (62)

a). BSP binding 及びトリフトファンけい光に  
及ぼす PH の影響 (62)b). 蛋白中トリフトファンとのけい光消光法に  
よる結合解析法 (65)

## (ii) 結果

a). BSP binding 及びトリフトファンけい光に  
及ぼす PH の効果 (68)b). けい光消光法による BSP 結合解析  
及び PH, イオン強度の影響 (72)

c). RB binding 及び GSH の影響 (75)

## 6). 考察 (78)

3.  $\gamma$ -蛋白の分離・精製及びその性質(85)

## 1). 工程(85)

(i) 上清の調整(85)

(ii) セファデックス G-75 ゲルろ過(85)

(iii) セファデックス G-75 ゲルろ過(86)

(iv) DEAE-セファデックス クロマトグラフィー(86)

(v) CM-セファデックス クロマトグラフィー(88)

## 2). 均一性と分子量決定(89)

(i) 方法(89)

(ii) 結果(89)

## 3). BSPとの結合 Kinetics (90)

(i) 方法(90)

(ii) 結果(91)

## 4). 精製まとめ(92)

## 5). 考察(93)

#### 4. 結合蛋白質群の有機アニオン結合特異性 (97) <sup>(vii)</sup>

##### 1). 方法 (98)

(i) Binding constant ( $K_c$ ) の算出 (98)

(ii) 競合実験法 (102)

(iii) RB と  $\Sigma$ -分画の binding (分光学的な方法) (103)

##### 2). 結果 (104)

(i) ANS と  $\gamma$ -蛋白質群の binding (104)

(ii) RB と  $\Sigma$  の binding (106)

(iii) 競合法による各種有機アニオンの  
結合定数 (107)

第三章 肝臓, 腎臓のY, Z-分画の比較 (109)

1. ゲル透過 pattern 及び Y, Z-分画の BSP 結合の比較 (19)

1). 方法 (109)

(i) セファデックス G-75 ゲル透過 (109)

(ii) 平衡透析法による Y, Z-分画と BSP の結合 (109)

2). 結果 (109)

2. Y-分画の内容の比較 (111)

1). 方法 (111)

2). 結果 (112)

3. Z-分画の内容の比較 (115)

1). 方法 (115)

2). 結果 (116)

4. 考察及びまとめ (119)

第四章 Y, Z-蛋白の機能 (123)

1. 有機アニオンの胆汁排泄と  
X, Y, Z-分画への結合 (123)

1). 方法 (126)

(i) 血清中の色素の分配 (126)

(ii) X, Y, Z-分画への色素の結合 (126)

(iii) Bile canaliculi 側 rich な  
膜の調整 (127)

2). 結果 (129)

- (i) 血清への分布の比較 (129)
- (ii) X, Y, Z-分画への結合の比較 (129)
- (iii) Bile canaliculi 側の rich な細胞膜への結合 (131)

3). 考察及びまとめ (134)

2. BSPの肝への Net uptake と、  
Y, Z-分画への結合 —  $CCl_4$  による  
慢性肝硬変ラットを用いた研究 (136)

1). 方法 (136)

2). 結果 (137)

- (i)  $CCl_4$  による慢性肝硬変 rat での patho-physiological な変化 (137)
- (ii) Pharmacokinetics of BSP (137)
- (iii) Intoxication による Y, Z-分画への BSP 結合の比較 (137)



- 3) Physiological Model による解析 (140)
- (i) Rowland らの perfusion-limited model による考察 (142)
  - (ii) Model のくみたちをみる為の考察
    - a) 肝以外の臓器への分布 (143)
    - b) perfusion-limited の仮定について (144)
  - (iii) physiological model の構築 (147)
    - a) パラメーターの設定 (147)
      - 臓器 Mass (147)
      - 臓器血流 (147)
      - 分配係数 (148)
      - 肝における分配係数 (148)
      - 速度パラメーター (152)
    - b) Computer Analysis (153)
    - c) 計算結果 (153)
      - c)-1 血中消失 curve の Simulation (153)
      - c)-2 パラメーター変化に対する sensitivity (153)

- C)-3  $CCl_4$ , phenobarbital 処理に伴う Initial plasma disappearance rate の変化 (155)
  - C)-4 細胞質蛋白結合, 肝血流の影響 (157)
  - C)-5 肝における分配率の Intoxication による変化 (158)
  - C)-6 細胞質蛋白結合によって BSP の血中消失における dose dependency は説明できるか? (159)
  - C)-7 胆汁排泄の Simulation (160)
- 

< Reference > (163)

< Chemical Structure > (176)

< Appendix >

[1] 蛋白結合の解析 program (177)

[2] Physiological model の  
解析 program (179)

# 第一章 序論

## 1. はじめに

肝臓は多くの薬物を血液中からたやすくとり込み、代謝・排泄をおこなう器官として知られている。とりわけ、BSP, ICG, RB等の有機アニオンは、血中消失速度パラメータ $\alpha$ \*が、人で、それぞれ、BSP( $0.115 \sim 0.188 \text{ min}^{-1}$ ) ICG ( $0.180 \sim 0.259 \text{ min}^{-1}$ ) RB ( $0.15 \text{ min}^{-1}$ )という、非常に速い、かつ、濃縮的な肝へのとり込みを利用して、肝機能検査薬として、利用できる事が、1920年の半ば頃からわかっていた(1)。しかしながら、これら有機アニオンに対する肝の選択性

直接的に何を意味しているかについては、種々問題のある所であるが、一応血中消失カーブを  $C_p = A \cdot \exp(-\alpha t) + B \cdot \exp(-\beta t)$  で表現した時の fast phaseの、指数係数 $\alpha$ で示しておく。

が何に由来するかについては、何もわかっていなかった。この選択性の原因を明らかにする事は、肝障害の内容を明らかにする事にもつながり、多くの研究者のめざす所であった。

そこで、今までに有機アニオンの肝への移行において、わかっている現象を整理してみよう。まず、診断薬として最も繁用されてきた BSP について述べる。BSP の血中から胆汁への transport もは、次の3つのステップに分けて考える事ができる。

(1). 血中では、主にアルブミンと結合して存在しているが、このアルブミンから解離して肝実質細胞にとりこまれるステップ。

(2). 肝実質細胞中で代謝されるステップ。この代謝は、主に、グルタチオン抱合体になる反応である事が知られている(2, 3, 4, 5)。

(3). 未変化体、及び抱合体ともに、bile canaliculi へと排泄されるステップ。

この血中から bile への overall な transport の中では、(2)か(3)のステップが、律速段階に

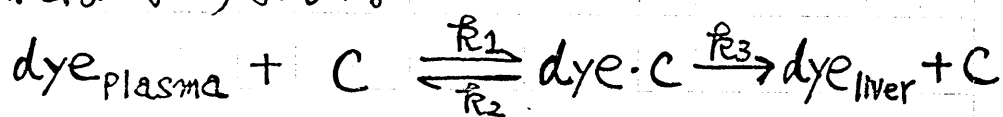
なっていると考えられているが、どちらが主な律速段階であるかについては、種々、論争中である(5, 6, 7.)。例えば、ラットの例だと、(1)のステップのみかけの半減期は約3分。又、(3)のステップでは、約15分と、いうように、はるかに、(3)のステップの方が遅い事が、当教室、Igaらによって見出されている(8)。その他の有機アニオンにおいても、この傾向は、顕著にみられる(8)。現在まで、この様に多くの研究が有機アニオンの肝胆系へのtransportについて行なわれてきているが、上記の各ステップを分離していない例が大部分で、その事が結果の解釈を困難にしている。

又これらの各ステップに特殊なtransportが関係していると思われる幾つかの事実が、みつけられている。

(1)、transport速度と、doseとの間にlinearな関係がないという事、即ち、飽和現象である。ステップ(1)の飽和現象については、BSP(9, 10, 11), ICG(10, 12, 13, 15), Bilirubin(14, 15),

などで知られているが、Goresky (10) らの報告を除いては、真の意味での、血中から肝への取り込み初速度が求められているとは、言い難い。<sup>\*</sup> Goresky らは、multiple indicator dilution 法を使って、犬における BSP とり込みに関して詳細な検討を行っている。この報告は、静注後 20 秒以内のデータ解析を可能にしている。その結果、取り込みに関して、 $K_m = 0.72 \text{ mM}$ ,  $V_{max} = 36 \text{ mg.BSP} \times 100 \text{ g.liver}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  を得ている。ステップ(3)の胆汁排泄過程にも、飽和過程のある事が、種々の有機アニオンで報告されている(16,17)。

<sup>\*</sup> ほとんどの研究者が、酵素反応における Lineweaver-Burk plot を行って解析をしている。という事は、次の様なモデルを考えているわけで、この式を使う為には、正しくとり込み初速度が測定されなければならない。



$$v(\text{初速度}) = \frac{k_3 \cdot [C] \cdot \text{dye}_{\text{plasma}}}{K_d + \text{dye}_{\text{plasma}}}$$

$K_d$ : Michaelis 定数

(色素が、肝細胞の carrier ある、→は特定の部位 C と結合したのちに、細胞内に輸送されると考える)

(2) 有機アニオン相互間で、transport を阻害する。ステップ(1)については、ICG によって BSP のとり込みが阻害される事 (11, 15)、又、ビリルビンによる ICG のとり込み阻害 (11, 12, 15, 18)、BSP による ICG のとり込み阻害 (11, 15) 更には、flavaspidic acid や, bunamiodyl による、BSP やビリルビンのとり込み阻害 (19, 20) が知られている。又、ステップ(3)についてもこれら有機アニオン類の、相互阻害についての報告がされている。(16, 17)。

(3) ステップ(1)ないし、ステップ(3)は、濃縮過程である。この事に関する殆んどの研究は、plasma と bile との濃度比を調べたものであり、確かに plasma から bile への transport 機構のどこかに濃縮過程の存在する事は示唆されるであろう。(16, 17)

各ステップを分離して濃縮性を調べた例は、少ないが、ステップ(1)において、fluorescein, RB, BSP、の場合、濃縮のおこる事がみられている (21, 22, 23, 24)、ステップ(3)につ

いて、即ち、肝臓中と bile 中の濃度比を調べた例はあまり数多くないが、Takada らによる bromthymol blue, BPB, AM 等の非代謝性有機アニオンでの研究を挙げておこう(25)。いずれも、かなりの濃縮性がみられている。この様に、ステップ(1), (3) 両者ともに、何らかの濃縮過程の存在する事は、明らかである。

この様にステップ(1), (3)の両者ともに、飽和現象、有機アニオン間の阻害現象、濃度勾配に逆らった移行、等の現象より、何か特別な移行 system が存在するのではないかという予想がなされていたが、その内容については、全くわかっていなかった。そんな機会、1969年、Levi らによって、肝細胞質内に存在して、BSP やビリルビンと非常によく結合する蛋白の存在が明らかにされた。(26)

彼らは、これら蛋白を、セフテックスG-75による溶出の順番に、X, Y, Z一分画と命名した。この中でも、特に、Y, Z一分画が



BSP, ビリルビンとよく結合する事が見出され、これら有機アニオンに対する肝の選択性を担う一候補として登録された。

## 2. Y, Z-分画と

### 有機アニオン肝移行との関係

Leviらの発表以後、主に、I.M. Ariasグループの研究により、これら蛋白(Y, Z)が有機アニオンの肝移行に、重要な役割を果たしている可能性が示された。この事は、以下に述べる事実により、推定された。(27, 38)

(1). Y, Z-蛋白の臓器分布——dye-binding method\*を使って、Y, Z-蛋白の臓器分布性を調べると、主に肝臓にのみ見出された。

\* Ariasらグループは、Y, Z-蛋白の量を、セフテックス G-75 カラムを使ったゲル濾過法を使って測定している。即ち、同一サイズのカラムを使い、蛋白量として同一量の上清を一定のBSPと共にアプライする。Buffer組成、elution rate, 温度を一定にしておけば、結果に再現性があり、各分画(Y, Z)に結合したBSPの量を、triangulationにより計算する事により、各蛋白の定量が可能であると述べている。(26, 28).

Y-蛋白質は肝臓の他に、十二指腸の粘膜にも見出された。(26)。その他の臓器には (bile, plasma も含めて)、この方法では検出されなかった。その後、免疫学的方法で測定すると、Y-蛋白質が腎、小腸粘膜の上清にも存在する事が検出され、又 Z-蛋白質は、比較的臓器特異性が少なく、肝、小腸粘膜以外にも、骨格筋、心筋、脂肪組織、脳などにも存在する事が、確かめられた。(28, 29)。しかしながら、Z-蛋白質が小腸粘膜にもかなり多量に存在する事を除けば、Y、Z-蛋白質ともに、全臓器中のうち有機アニオンの透過性の最も顕著な肝臓に圧倒的に多く存在しているのである。

(2). In vivo 及び、In vitro での競合現象の相関 —— 既に述べたように、多くの有機アニオン相互間で肝への移行が阻害される現象がみられている。一方、Y、Z-蛋白質への BSP, ビリルビンの in vitro での結合が、多くの薬物によって阻害を受ける事がたしかめられた (26, 30, 31)。又、Gunn ラット

(UDP-グルクロニルトランスフェラーゼが先天性に欠損しているラット)では、血清及び、肝細胞内のビリルビン濃度が異常に高い。このラットでは、BSPの血中よりの消失が非常に遅れる。この原因として、肝内に高濃度にあるビリルビンとBSPが、 $\gamma$ - $\delta$ -蛋白を競合する可能性が考えられている(34)。

(3). 薬剤による $\gamma$ -蛋白の誘導(32, 33).

— Phenobarbital, Allylisopropylacetamide (AIA), dieldrin, Trichloro-p-chlorophenylethane (DDT)や Benzpyrene をラットに投与する事によって、 $\gamma$ -蛋白の肝中濃度が増加する。しかし、 $\delta$ -蛋白の濃度は変化しない。そして、この $\gamma$ -蛋白の量の増加に相関して、BSP, ICG, ビリルビンの plasmaからの初期消失<sup>\*</sup>が速くなる。

\* Arias らのグループは、初期血中消失速度定数( $k_1$ )を、静注後、ス〜7分間で求めている。この時間内では、肝から血中への back flux も無視する事は出来ないと考えられるので、一応、彼らの言う“初期消失速度定数”は、“net uptake (正味の取りこみ)”の目安となるものと考えて、以後は、“net uptake”と呼ぶことにする。

又、これは、有機アニオン投与5 min 後の、肝中  
有機アニオン level が増加している事からも、  
Y-蛋白の誘導によって、Net uptake が増え  
た事がわかる。

(4). Y, Z-蛋白含有量の減少(33) ——  
ラットに、bile duct ligation (胆管閉塞)  
を行ったり、或いは、ethinyl estradiol の  
注入を行なうと、肝細胞内のY, Z-蛋白の量が減  
少する。それに伴って、“net uptake”も減少  
している。

(5). 個体発生学的検討。(35, 36). ——  
モルモットの胎児では妊娠前期は結合蛋白はほ  
んど存在しないが、後期になると蛋白が増加  
して、adult とほぼ同じ値になる。Y-蛋白は、  
妊娠後期でもまだ低く、生後徐々に増加し、3週  
間めで adult の約75%になる。サルについて  
も同様な事が行なわれており、Y-蛋白の生後  
に増加する傾向とともに、BSPの肝への“net  
uptake”が増加する。

(6). 系統発生学的検討(37) — 約30種の哺乳類, 鳥類, 爬虫類, 両生類, 魚類について肝上清中の結合蛋白の存否を *dye-binding method* (P8 参照) によって調べ、更に、それぞれの動物について、BSPの“*net uptake*”をみると、結合蛋白の全く存在しない魚類では、“*net uptake*”が明らかに少なくなる。

以上の事実より、肝内結合蛋白 $\gamma$ ,  $\delta$ が有機アニオンの肝での“*Net uptake*”に重要な役割を果たす事が推定されたが、この蛋白のみでは説明できない事実も、幾つかみっかっている。たとえば、

(1). *Mutant Southdown sheep* (先天性間接ビリルビン血症のヒツジ)では、BSPをはじめとする有機アニオンの血中からのとり込みが非常に遅れるにもかかわらず、(39)、肝内結合蛋白は存在し、セフテックスG-75によるBSP共存下での *Elution pattern* が正常である。即ち、 $\gamma$ ,  $\delta$ -蛋白の結合能にも変化がみられない。(26)。

(2). エバンス ブルーは、BSPと同程度の結合力で、 $\gamma$ 、 $\alpha$ -蛋白と結合するが、この肝へのとり込みは、非常に遅く、これら蛋白では説明が見つからない。(26, 30)。

(3). Arias グループ以外の研究者は、新生児モルモットにおいても、adult と比べて、静注後の BSP の肝肉量が減少しない事を示している。(40)。一方、既に述べたように、新生児においては、 $\gamma$ 、 $\alpha$ -蛋白の量が少ないという報告があり(35, 36)、これら蛋白では説明が見つからない。

(4). 下垂体ないし甲状腺切除ラットでは、 $\gamma$ -蛋白の増量が、*dye-binding method* (P8に記す)により、認められているが、BSP の "Net uptake" はコントロールより遅い。(33)。

(5). *Marine elasmobranchs* (小サメや小エイ) を使った研究によると、 $\gamma$ 、 $\alpha$ -蛋白の量が少ないにもかかわらず、BSP の選択的とり込みがおきている(41, 42)。

この様に、肝内結合蛋白のみでは説明でき

ない事実も幾つかみつかっているが、これには、後に述べるように、肝細胞の選択性という観点から考えてゆく必要がある。いずれにしても、有機アニオンの肝移行に対して、 $\gamma$ -E-蛋白が、何らかの役割を果たしている事は確かであろう。



### 3. $\gamma$ -Z-蛋白についての、これまでの研究

#### 1) $\gamma$ -蛋白について

(i). 精製—— Arias グループによって、TEAE 陰イオン交換クロマトと、セファデックス G-75 ゲルろ過法によって、分離・精製されたと述べられているが (28, 43)、その詳細については、報告がない。その後、Kamisaka, Kirsch ら (30, 43) によって、もう少し詳しい発表がなされた。即ち、TEAE カラム (PH 8.8, 0.01M トリス)、セファデックス G-75 カラム (PH 7.4, 0.01M リン酸) QAE-セファデックス A-50 カラム (PH 8.8, 0.01M トリス) を用いる方法である。しかしながら、この方法では、活性のある蛋白分画を、精製各ステップでとる方法として、BSP binding をみる他に Anti- $\gamma$  蛋白-IgG を用いての immunodiffusion 法を用いている。

もともと、 $\gamma$ -蛋白がみつけ出されたのが、BSP, ビリルビンに対する結合活性であったという事を考えると、彼らの様に、抗体を用いる活性分取法ではなくて、有機アニオン結合で活性を追う事が必要と思われる。

(ii) 性状 —— Arias グループにより、精製品について、次の様な性質が調べられている(44,30)  
 分子量 ----- 44000 (ゲル過法), 22000 (SDS電気泳動)      等電点 ----- 8.7 ~ 8.9

アミノ酸分析 ----- Asp 34, Thr 11, Ser 13, Glu 39, Pro 16, Gly 18, Ala 26, Val 17, Met 14, Leu 46, Ileu 19, Tyr 12, Phe 17, Lys 33, His 5, Arg 21, Try 2, Cys 4.

二次構造 -----  $\alpha$ -ヘソックス 40%,  $\beta$ 構造 15%  
 ランダムコイル 45%

(iii) 臓器特異性 —— 初期の項は, dye-binding method\* によって臓器特異性が調べられたが(26). 後に, Fleischner らによって、抗体がつくられ、immunodiffusion 法によって臓器特

\* P.8 参照

の量が測定された(28)。その結果、肝では上清総蛋白中4.5%、腎では2%、小腸でも2%の割合で存在する事がわかり、その他、bile, serum を含む16の組織にはみっからなかった。又、興味あることに、dye-binding method では確かに結合蛋白が存在するにもかかわらずこのratの $\gamma$ -蛋白に対する抗体を使う方法では、他の20種属(人間を含む)の肝上清には、 $\gamma$ -蛋白がみっからなかった。

(iv)他の蛋白との関係——Kettererら(44)によって、ラット肝上清より、azocarcinogenやその代謝物と結合する三種の蛋白がみっかりそれぞれ、A-, B-, そしてC-ABP (Azodye Binding Protein) と名づけられた。その後1967年、A, B protein の精製も行なわれ、性状も明らかになった。(45, 46)

一方、Litwackら(47)は、1969年、corticosteroidの肝細胞内での分布を調べている間に、radioactive cortisol をラットに投与後、細胞質中の四つの蛋白分画に結合してい

る事を見出し、それぞれ、Binders I, II, III, IV  
と名づけた。最も大きなピークが、Binder I  
と命名されたのであるが、それには、陰イオン  
性の代謝物が結合していた。Binder I, II は精  
製され、性状も明らかになった。(47, 48, 49)。

Arias らのいう  $\gamma$ -蛋白, Ketterer らの B-蛋白  
そして Litwack らの Binder I が、その物  
理化学的性質(沈降定数、分子量、等電点、  
アミノ酸分析値)が似ている事より、3つの研  
究室からもちより、免疫化学的同一性を調べた  
所、同一蛋白である事が明らかとなり、この  
蛋白が種々の Ligand と結合する性質を持  
つ事に、“LIGANDIN” と命名された(50)。  
最近、この LIGANDIN が、グルタチオントラ  
ンスフェラーゼ酵素活性を持っている事が明ら  
かとなり、Habig らによって分離された(51)  
グルタチオントランスフェラーゼ群(A, B, C, E)  
の中の、B と、同一である事が、免疫反応を  
含む種々の方法より明らかとなった(52)。

## 2) $\gamma$ -蛋白について

(i). 精製 —— Arias グループによって、セファデックス G-75, DEAE イオン交換, CMC イオン交換によって分離、精製されたと述べられているが (53), その詳細については、報告がない。その後、Arias グループのひとりの Kamisaka らによって、次の様な報告がされた (54)。即ち、G-75 ゲル透過 (0.01M リン酸 buffer, PH 7.4), DEAE-Sephadex A-25 カラム (1mM リン酸 buffer, PH 7.0) を用いる方法である。そして purity の確認を、電気泳動、anti- $\gamma$ -IgG を用いる immunoprecipitation 法などで調べている。しかしながら、もともと  $\gamma$ -蛋白がみつかったのが、有機アニオンに対する結合活性であった事を考えると、この活性が精製中のどの分画にどのように分布しているかの情報が必要と思われる。その後、Warner ら (55). によってヘキサクロ

ロフェンへの結合をメルクマールとして、 $\Sigma$ -  
 蛋白の精製が報告された。この方法は、G75  
 ゲル透過、DEAE-Sephadex A-50 カラム  
 (30 mM リン酸 buffer, pH 7.4) を用い、その  
 buffer 中に 20% グリセリン (v/v) を含んでいる。

(ii) 性状——Arias グループにより、次の  
 様な性質が調べられている (38, 54)。

分子量 ----- 12000, 等電点 ----- 5.5

二次構造 -----  $\alpha$ -ヘリックス 14%,  $\beta$  構造 39%  
 ランダムコイル 44%。

アミノ酸分析値は、Arias グループによっては  
 報告されていないが、 $\Sigma$ -protein との同一性  
 が示された (後述) 1.6S aminoazodye-binding  
 protein A について Ketterer らによって分析  
 された (56)。

Gly 12, Ala 2, Val 10, Leu 6, Ileu 7,  
 Phe 6, Try 0, Tyr 2, Pro 2, Met 6,  
 Cys 2, Ser 6, Thr 13, Asp 12, Glu 19,  
 His 2, Lys 18, Arg 2.

(iii) 臓器特異性 —— 初期の項は dye binding method\* によって臓器特異性が調べられたが(26)、その方法によると、肝臓、小腸粘膜の細胞質にのみ検出された。後に、Ocknerらに(57)よって、小腸より $\alpha$ -proteinが精製され、その抗体を使って各臓器中の $\alpha$ -蛋白質が同定された。その結果、 $\alpha$ -蛋白質は、 $\gamma$ -蛋白質と比べて、臓器特異性が少なく、肝臓、小腸の他に、脂肪組織、心筋、骨格筋、脳などにも含有されている。しかし、腎には、免疫反応ではみっからなかった。

(iv) 他の蛋白質との関係 —— Kettererらによってみつけ出された agocarcinogen 結合蛋白質のうち、A蛋白質が1967年、最初に精製された(45)。この蛋白質に関する詳細な報告が最近追加された(55)。又、Ocknerらによっても1972年(58)、小腸粘膜に存在して、脂肪酸と結合する蛋白質(脂肪酸結合蛋白質、Fatty acid Binding Protein (FABP) と呼ばれる)の存在が明らかになり、更に詳細な研究もなされている(57,59)。又、Mishkin

\* P 8 参照

らによって、fatty acyl-CoA 誘導体に結合する事もいわれている(60, 61, 62)。これら $\alpha$ -蛋白、Azocarcinogen 結合蛋白A, FABP等は、その分子量、或いは種々の基質との結合性の類似性より、同一蛋白である事が示唆されてきた(60, 55, 56)。しかしながら、KettererらのA蛋白のうち最も結合活性の強い蛋白の等電点が7.4であるのに比べ(56)、Ariasらの $\alpha$ -蛋白が約5.5(38)、Ocknerらの小腸のFABPが約5.55の等電点を持っている事を考えると、必ずしも同一蛋白ではないのかもしれない。又、Litwackら(63)によって1972年、Cortisol類と結合し、280nmに比べ260nmでの吸光度の高いヌクレオチド含有の認められる蛋白(分子量5000~7000)の存在が明らかにされ、 $\alpha$ -蛋白との類似性が示唆されたが、 $\alpha$ -蛋白よりも分子量がかなり小さい点等から、この同一性については否定的と考えられる。



#### 4. 今後の問題点と本研究の意義

以上で述べて来た様に、 $\gamma$ - $\text{G}$ -蛋白に関して幾つかのこうした研究があるにもかかわらず、多くの問題が不明確なまま、残されていると思われる。

1). Arias らは、ラット肝より $\gamma$ - $\text{G}$ -蛋白を精製したと述べているが(28, 30, 43)、その工程における活性分画の分取に、免疫的方法を採用している為に、精製蛋白が唯一の活性を持つ蛋白であるかどうかについて疑問が残る。(又、研究者によっては精製蛋白、或いは、未精製蛋白を使つての Discussion が入り乱れて行なわれている。従つて本研究においては、有機アニオンの肝への移行の重要決定因子としてのこれら蛋白の役割を明らかにすべく、有機アニオンへの結合を活性のメルクマールとして精製を押し進めてみる事にする。更に、精製に伴う蛋白の性質の変化の有無についても、

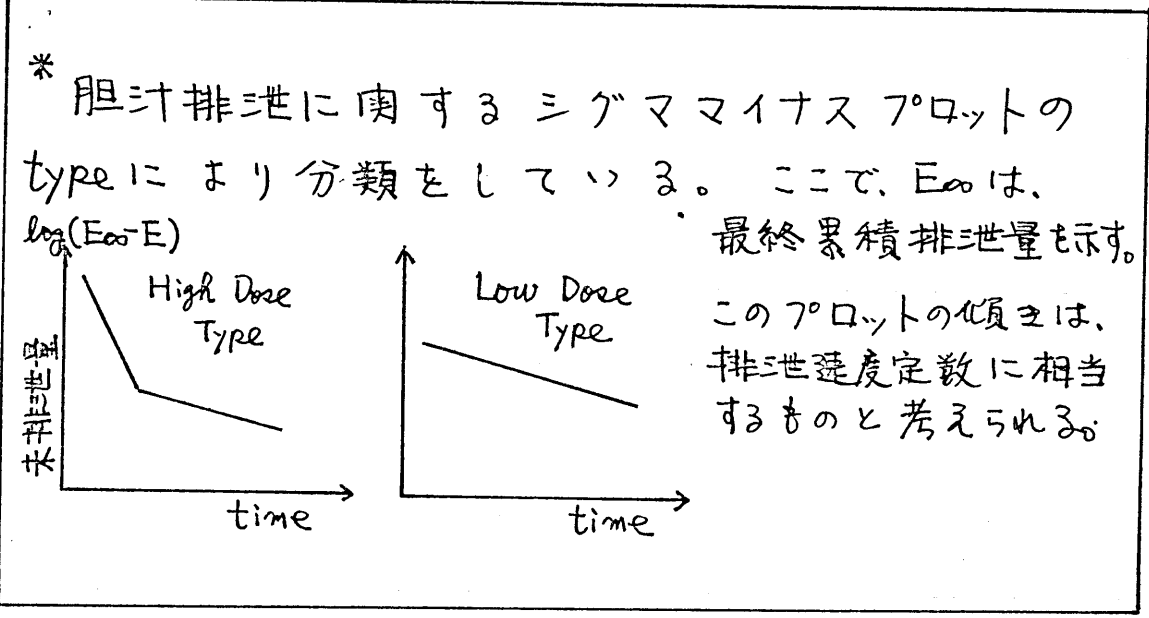
調べる事にする。又、これら蛋白の有機アニオン結合の性質及び基質特異性についても、言及してゆこうと思う。

2). もう一つの重要排泄器官である腎にも、 $\gamma$ 、 $\alpha$ -蛋白の存在する事が言われている\* (38, 43, 28)。一方腎には BSP, ICG, RB 等の、肝機能診断に用いられる薬の取り込みの選択性がない事がわかっている。もし、 $\gamma$ 、 $\alpha$ -蛋白が、有機アニオンの臓器移行に重要な役割を果しているとするならば、肝と腎の選択性の違いは、単に臓器の $\gamma$ 、 $\alpha$ -蛋白の量の違いと考えればならず、少し無理があるように思われる。そこで、肝、腎の $\gamma$ 、 $\alpha$ -蛋白に何らかの質的な差があるのではないかという疑問が生まれる。この事についても言及してみたい。

\* 腎の $\alpha$ -蛋白の存在については、二通りの説があるようで、Ariao グループ (38, 54) によっては肯定的であるが、Ocknerら (57) が、ラット小腸の FABP に対する抗体を使った実験によると否定的結果が出されている。

3).  $\gamma$ ,  $\alpha$ -蛋白の機能については、前述のよ  
うに、“有機アニオンの肝への“Net Uptake”  
に何らかの役割を果たしている事が示唆され  
ているがそれ以外の役割については、わかって  
いない。しかし、その役の研究の中には、有機  
アニオンの胆汁排泄にも影響を及ぼすとの前提  
にたった様な文献もみかけられる (64)。

一方、当教室、伊賀ら(8)が、胆汁排泄される有  
機アニオンの中で、初期に速い排泄のみられる  
Type (High Dose Type \*) と、そうでない  
Type (Low Dose Type \*) のある事を示したが、  
この様な Type の違い、即ち、肝細胞中にと



りこまれて以後の、胆汁排泄の容易さを決める要因に、 $\gamma$ ,  $\alpha$ -蛋白が、なり得るかどうかについても定量的に考察してみたいと思う。

4).  $\gamma$ ,  $\alpha$ -蛋白の機能としては、“有機アニオンの肝への Net Uptake” に役立つと考えられているが、その具体的説明はされていない。そこで、本研究においては、具体的に、肝内でのこれら蛋白への結合変化が、BSPの血中消失挙動にどのような変化を起こしうるかについて、*Physiological Pharmacokinetics* による解析を導入して考察する事にする。この際、 $\text{CCl}_4$  による慢性肝硬変ラットを作り、人為的に細胞質蛋白  $\gamma$ ,  $\alpha$  の量、性質を変化させて、蛋白の機能解明の補助手段とする。

## 第二章 結合蛋白 $\gamma$ , $\delta$ の 精製とその性質

### 1. $\gamma$ , $\delta$ -分画の Characterization.

#### 1). セファデックス G-75 ゲルコロムパターン

(i) 方法-----上清の調整。雄 Donryu 系ラット (260 ~ 320 g) を、軽いエーテル麻酔下で、冷たい生理食塩水を門脈からかん流し、血液を洗い流す。肝をとり出した後、0.25 M sucrose - 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) で50%のホモジネートを、テフロン硝子電動式ホモジナイザーによって作成する。次いで、10000 g で30分遠心分離し、その上清を粗く集め、更に105000 g で2.5時間超遠心し、その上清を、パスツールピペットないしは、注射筒で注意深く集める。すぐにご使用するか、 $-20^{\circ}\text{C}$  に保存しておく。以上の操作は、全て、氷上下ないしは、 $4^{\circ}\text{C}$  (冷凍室) にて行なう。

セファデックス G-75 ゲルろ過。50%上清 2 ml に、4 mM BSP 0.5 ml を加え、4°C で1hr 放置後、セファデックス G-75 カラム にアプライする (4°C)。カラムは、0.05 M Tris-HCl buffer、pH 7.4 (標準 buffer と呼ぶ) で平衡化してあるものを使う。溶出分画をフラクションコレクターで集め、280 nm の吸光度と、10 N-NaOH でアルカリ後の 580 nm の吸光度を測定する (Hitachi 124 型分光光度計を使用)。その他の条件は、Fig. 1 に記す。

(ii) 結果-----ゲルろ過の結果を Fig. 1 に示した。Levi らの報告 (26) にある様に、蛋白は 33 本目の tube に大きなピークがあり、次第に減少してゆくが、蛋白結合した BSP は、3 つのピークを示し、溶出の順序に従って、蛋白量の多いにもかゝらず BSP 結合の少ない X-分画、蛋白量が少ないにもかゝらず、BSP 結合の多い Y-分画、及び Z-分画が認められる。同一カラムを使い、マーカー蛋白を流す事により X-分画は、ブルーデキストランと同一位置、

即ち Void Volume に、Y-分画は、Egg Albumin とほぼ同一位置(分子量約45000)、Z-分画は、Cytochrome C よりや、前の位置(分子量約13000)である事がわかった。

Table Iには、このゲル透過法を用いて、よく肝臓に移行する有機アニオン類がどのような結合パターンを示すものかをまとめたものである。研究者によって、アプライした有機アニオンの量、肝上清の量及び、ゲル透過の条件等が、かなり違ふ為に、定量的な比較は無理だと思われるが、“どの分画に結合が多い”という定性的比較は可能であろう。その結果、RB, PB, BB 等の例外はあるものゝ、一般的にいて、蛋白量が少ないにもかゝらず、Y, Z-蛋白への結合が優勢である事が傾向としてつかめる。勿論、これだけで、X-分画を不要のものとして捨てるわけにはいかないが、本研究においては、主に、Y, Z-分画の内容について調べてゆく。

(F-1)

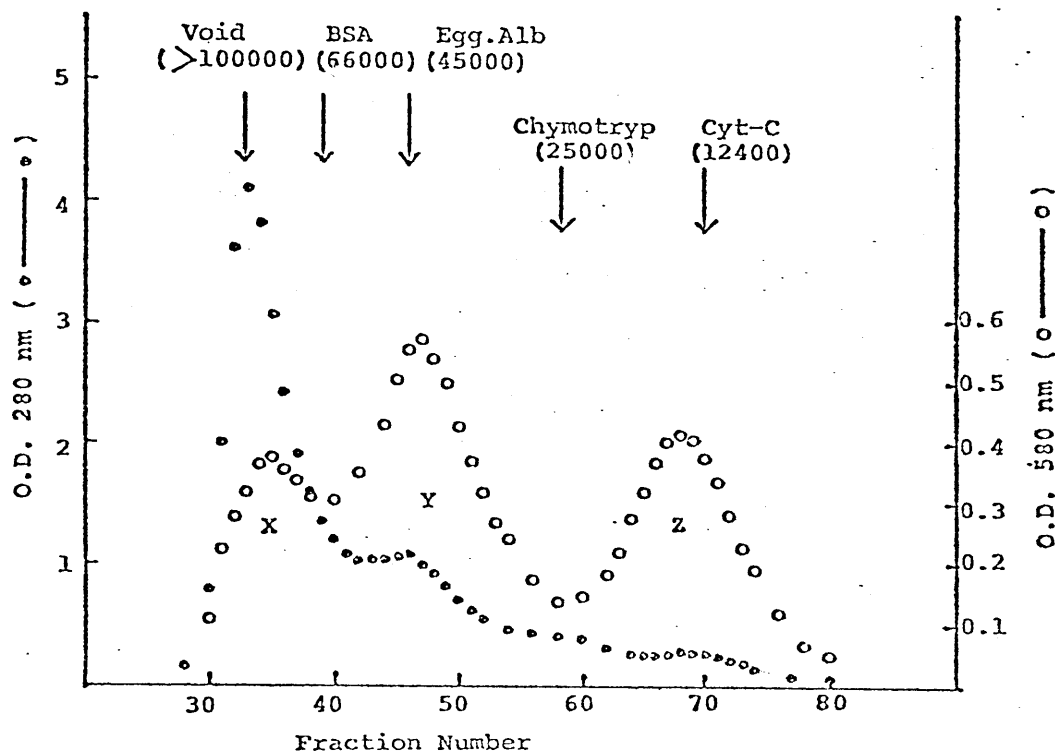


Fig.1 The X,Y and Z BSP-binding protein fractions from 105000g supernate(2 ml, 50%) from rat liver with 2 umole BSP added in vitro and eluted from a column of Sephadex G-75(3.2cm x 50cm) at a flow rate of 25 ml/hr. Collections were 2.95 ml/tube. Optical density at 280 nm indicates protein and at 580 nm after alkalization indicates BSP.



Table.I

 BINDING SPECIFICITY OF BINDING PROTEIN FRACTIONS(X,Y,Z)  
 AS DETERMINED THROUGH G-75 GEL FILTRATION

SUBSTRATES *	X	Y	Z	AUTHOR
BSP	+	+++	+++	I.M.Arias(1969) <sup>26)</sup>
Bilirubin	+	+++	+++	
BPB	+	+++	+++	K.TAKADA(1974) <sup>25)</sup>
BTB	+	+++	++	
Azo dyes(AM,TZ,NC)	+	+++	-	
ICG	++	++	+	Our Laboratory
RB	+++	+++	+++	
PB	+++	+++	+++	
BB	++	-	++	
Oleic acid	+	++	+++	S.Mishkin(1975) <sup>65)</sup>
Iopanoic acid **	+	+++	++	J.Sokoloff(1973) <sup>66)</sup>
Iodipamide	-	++	+++	

\* 正式名及び化学構造式は、F 89に記す。

\*\* Sokoloffらは、胆のう造影剤である *iopanoic acid* と、*iodipamide* は、Y、Z 蛋白に結合し、  
 一糸尿管造影剤である *iothalamate* は、  
 結合しない事を述べている。

## 2). 平衡透析法による $\gamma$ , $\delta$ -分画と BSP の結合.

ゲルろ過法によって、どの分画に何%ぐらいの有機アズオンが結合するかという大まかな事がわかった。次には、いったいどの程度の強さで結合するかを定量的にみる為に、BSP と  $\gamma$ ,  $\delta$ -分画の結合を平衡透析法で調べてみた。

(i) 方法-----  $\gamma$ ,  $\delta$ -分画の調整, 肝50%上清 5 ml をセファデックス G-75 カラム (5.4 cm x 85 cm) にアプライし、45 ml/hr の速度で流出する。10 ml/tube, フラクционコレクターでとる。

前述の命名どおり、各ピークの前後を、それぞれ約 50 ml 分取して、 $\gamma$ ,  $\delta$ -分画とする。

$\gamma$ ,  $\delta$ -分画の蛋白濃度の測定. 上記の方法で得られた  $\gamma$ ,  $\delta$ -分画の蛋白濃度は、Bovine serum albumin (BSA) を標準として Lowry 法により定めた。BSA は、 $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 6.67$  を用いて濃度を決めた。標準 buffer の条件、即ち Tris 濃度 50 mM では、Lowry 法による発色

がかなり阻害されるので、BSAのスタンダードも標準 buffer に溶かして、検量線をかきように注意する。この様にして別々の個体よりとった Y, Z-蛋白分画のみかけの分子吸光係数(1%の吸光度)は、平均値±標準偏差(例数)で表現すると、Y-分画で、 $12.60 \pm 0.57$  ( $n=5$ ), Z-分画で、 $7.83 \pm 1.01$  ( $n=5$ ) が得られた。従って以後は、この値を使って蛋白濃度を定めた。

BSPの濃度は、日本薬局方の記載に従い、アルカリ化したあと  $580 \text{ nm}$  における分子吸光係数  $73800 \text{ M}^{-1}$  を用いて定めた。

平衡透析法、ゲルろ過後、得られた Y, Z-分画を標準 buffer で希釈し、Y-分画濃度約  $150 \mu\text{g/ml}$  ( $280 \text{ nm}$  O.D. 約  $0.19$ )、Z-分画濃度約  $100 \mu\text{g/ml}$  ( $280 \text{ nm}$  O.D. 約  $0.08$ ) になるようにする。

BSPは、 $0.6 \mu\text{M} \sim 15 \mu\text{M}$  の範囲で、変化させる。平衡透析器は Fig. 2 に図示してあるような形のアクリル製のものである。1つのセルは5つのコンパートメントよりなり、セルの間に Visking 膜 (Type: 18/32) をはさみ、できるだけしゆゆで

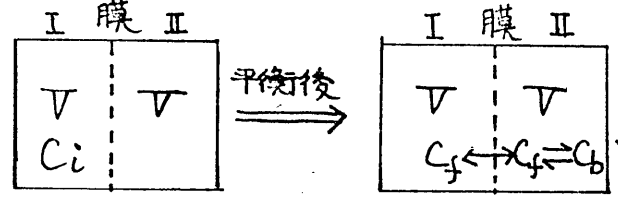
きないようにして、蝶ネジでしめる\*  
 膜は、蒸留水、bufferで洗った後、よく水分をと  
 ってから使用する(両側を紙やカーゼで軽くお  
 さえする)。膜をはさんだ片側には蛋白溶液を  
 3ml, 反対側には BSP 溶液(標準bufferにと  
 かしてある)を3ml入れる。セル及び、Visking  
 膜への BSP の吸着を調べる意のコントロール  
 実験として、蛋白溶液の代わりに buffer を入れて  
 同時に行なう。Cold room (4°C) で 85hr ~  
 95hr ゆるやかに振とうした後、\*\*最初に BSP  
 を入れた側の BSP 濃度を定量する。コントロール実  
 験の結果 (Fig 3) より、この時間で充分平衡に達して  
 いる事が確認でき、又、膜の両側の BSP の濃度を側  
 定する事により、最初に入れた BSP の 97% が回収

\*  
 しかりとネジをしめておけば、特別にグリース等  
 を塗らなくても、漏れる事はない。

\*\*  
 BSP が低濃度条件 (0.6  $\mu$ M ~ 3  $\mu$ M) では、70hr  
 で充分平衡に達するが、10  $\mu$ M 以上になると、約90hr  
 を要する。勿論、平衡に達する時間は基質よって異なる  
 ので、それぞれの場合でチェックする必要がある。

される事がわかり、膜、セルへの吸着は3%であった。  
 従って、この吸着ぶんを補正して、計算を行った\*。  
低濃度 BSP の定量 ----- 以上の条件で平衡透  
 析を行った後の BSP free 濃度は、約 0.07 ~ 12 μM 位  
 となり、少なくとも 0.07 程度の BSP が充分の精  
 度で測定されなければならない。この為、BSP  
 を 10N - NaOH でアルカリ化後、日立 356 型 2 波  
 長分光光度計を用いて、Range A 0.03 (即ち、  
 Absorbance 0.03 フルスケール) で測定した。

より高濃度の BSP は Range を変えて測定した。  
 λ<sub>1</sub> = 650 nm (吸光度がほとんど 0 の波長)、  
 λ<sub>2</sub> = 580 nm (最大吸収を示す波長) にセットし、  
 17 のサンプルを定量するたびに、必ずベースラインの

\* 

$V$ : Volume (3ml)  
 $C_i$ : BSP 初濃度  
 $C_f$ : 平衡後のコンパートメント I での BSP 濃度、即ち free の BSP 濃度  
 $C_b$ : bound BSP の濃度

Visking 膜及びセルへの吸着が全体の 3% 存在するので、

$$V \cdot C_f + V(C_f + C_b) = V \cdot C_i \times 0.97$$

$$\therefore C_b = 0.97 \cdot C_i - 2 \cdot C_f$$

チェックを行った。<sup>\*</sup> その結果、Fig. 3に示す様に<sup>34</sup>  
A 0.03の感度でも非常にきれいな検量線を書く  
事が出来た。

<sup>\*</sup> A 0.1, A 0.03の高感度になると測定中にベースライン  
が変化する事がある。この意に、あらかじめセルを2つ  
準備し、1つのセルには標準 buffer を入れておき、測定  
ごとに、ベースラインのチェックが必要である。

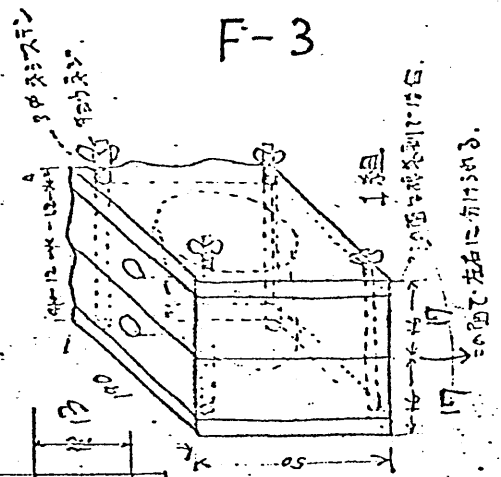
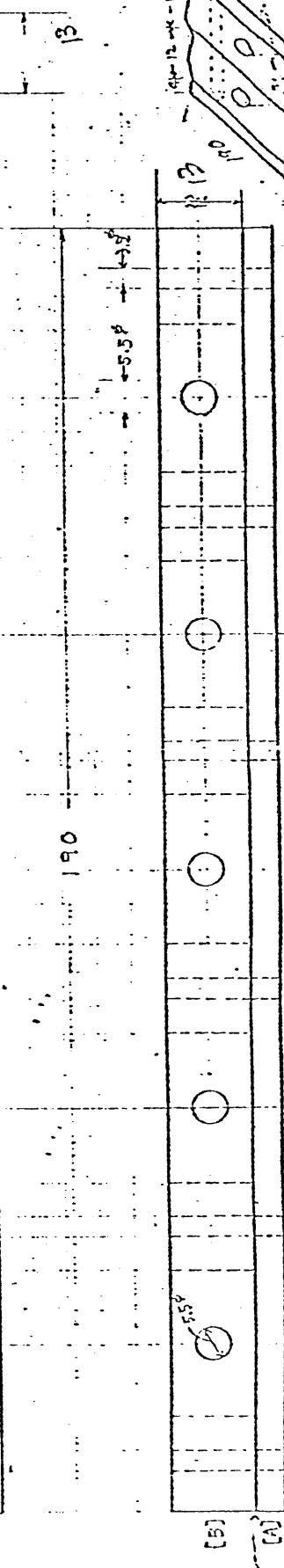
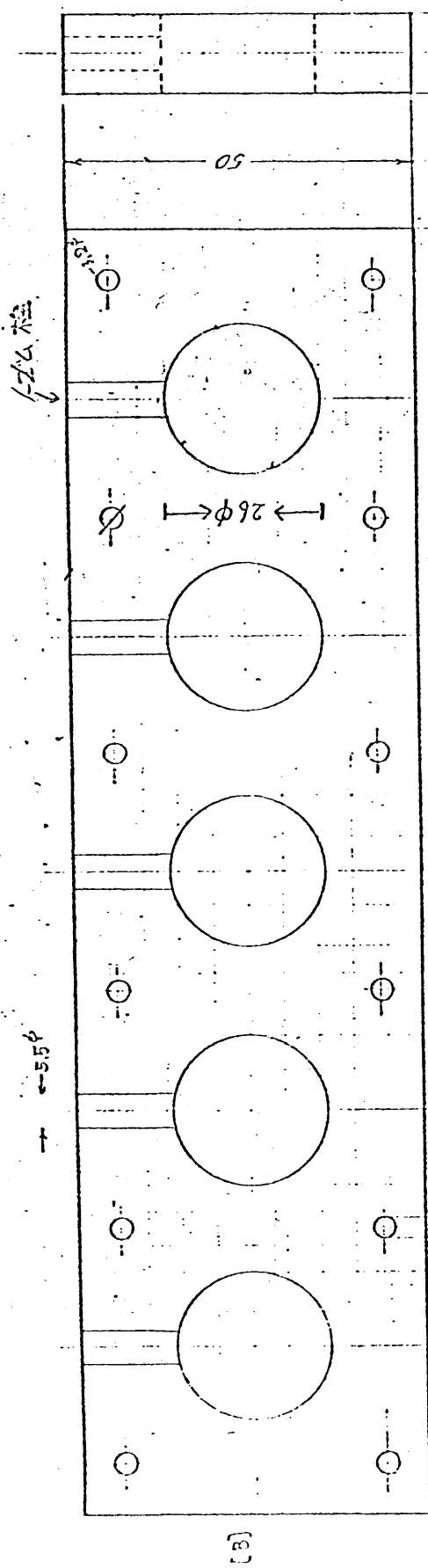
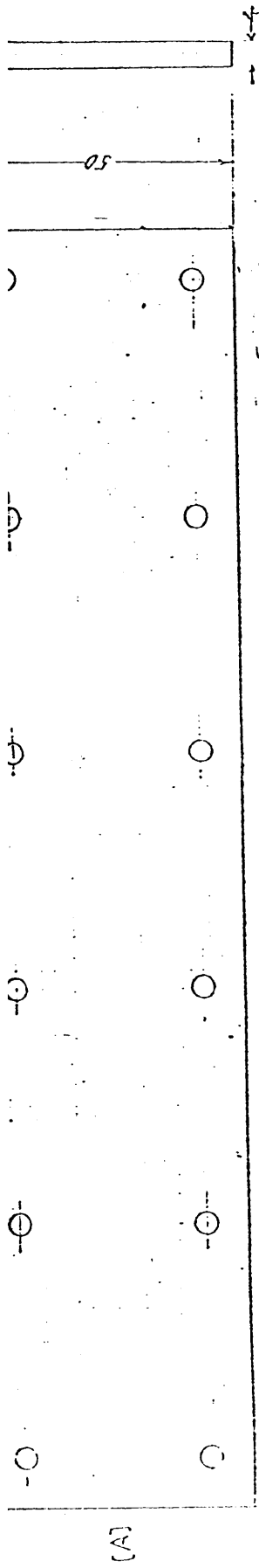


Fig. 2  
平衡透析用セル  
「マクリル製セル」

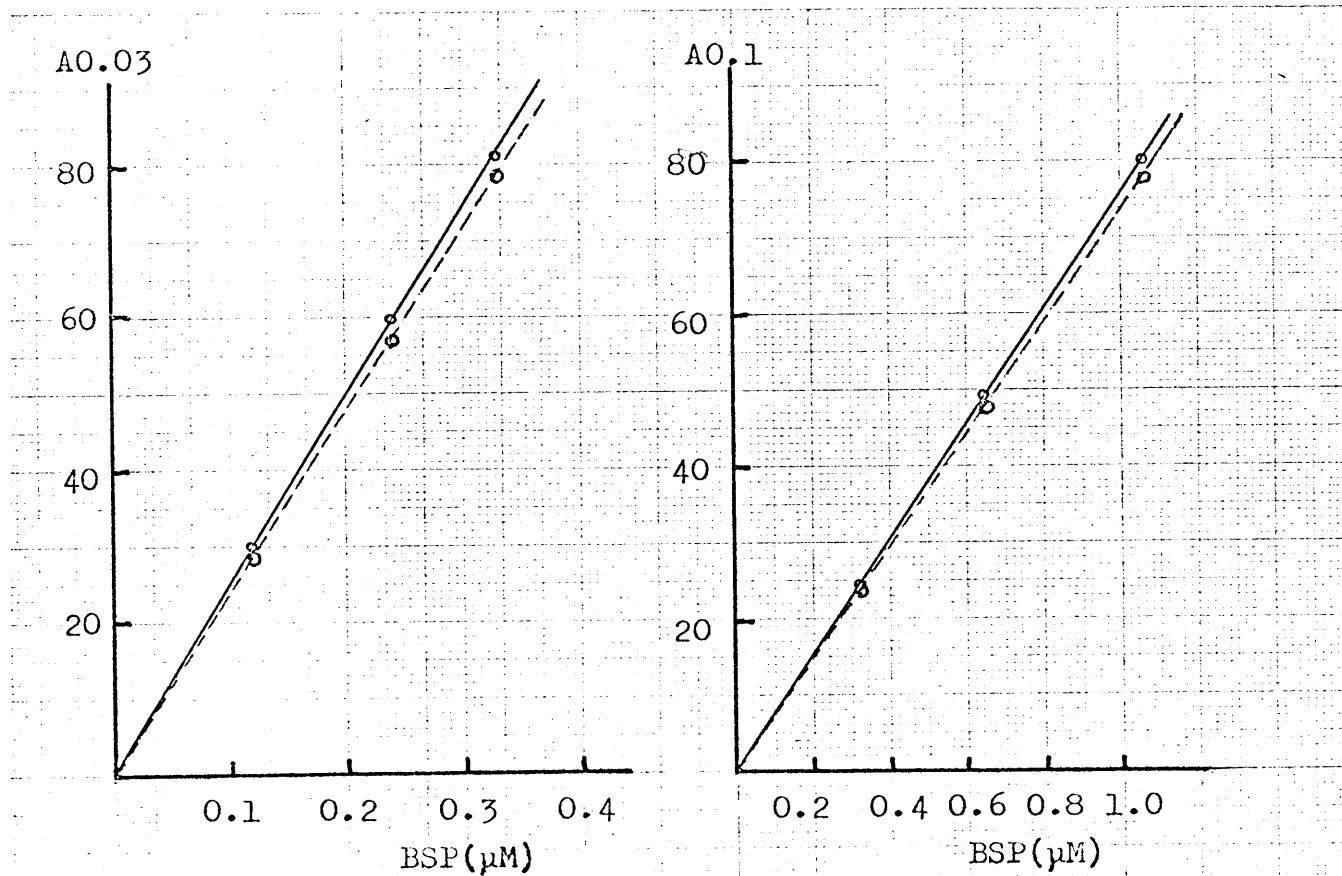


Fig.3 BSP STANDARD CURVE AND ADSORPTION TO VISKING MEMBRANE  
 (Hitachi 356 dual-type spectrophotometer  
 $\lambda_1 = 650 \text{ nm}$ ,  $\lambda_2 = 580 \text{ nm}$  )

————— working curve  
 - - - - - 平衡透析器を用い、横軸に示した2倍の濃度のBSPを片側に入れ、平衡に達した後の吸光度のよみ



(ii)結果 Fig. 4に Y, Z-分画を用いての BSP との結合を平衡透析法(4°C)で調べた結果を Scatchard plot で示してある。BSP 低濃度での plot を直線とみなし、引いた直線より、大きい結合定数を持った部位へのみかけた上の結合定数を算出した。Y-分画に対する結合定数約  $7 \times 10^6 M^{-1}$  Z-分画に対する結合定数約  $25 \times 10^6 M^{-1}$  が得られた。又、みかけ上の結合部位の数(1 molecule あたりの BSP 最大結合量 ( $\mu mole$ )) は Z-分画が、Y-分画の約二倍であった。又、これら蛋白が、肝中にどれくらい存在するかを調べる為に、Fig. 1 のゲル透過の結果より、BSP 結合活性を有する分画について、面積法によって概略値を求めた所、Y-分画については、 $9.1 mg/g. liver$ , Z-分画については、 $23 mg/g. liver$ , という値が得られた。( \* 次頁の脚注を参照。 )

勿論、このようにして得られた値は、あくまでも概略値ではあるが、以下の議論には、さしつかえないと思われる。この様にして得られたみかけ上の結合パラメータ ( $n_1, K_1$ ) 及び蛋白濃度

( $(P)_y$ ,  $(P)_z$ ) を用いて、肝中の全 BSP 濃度の関数として、各蛋白分画に結合する BSP 量を計算した結果を Fig. 5 の右図に示す。

一方、Arias らは (26)、25mg の上清蛋白に種々の量の BSP を加えて一定サイズ ( $3.2 \times 51.5 \text{ cm}$ ) のカラムでゲル濾過をした結果を示している。(Fig. 5 左) Y-分画への結合の方がはやく飽和を示し、Z-分画はみかけ上、シグモイド型の結合を示す。

\* Fig. 1 の elution pattern でわかるように、結合した BSP は、ほぼ対称的なピークを示すので、BSP 結合活性のある蛋白についても、対称的分布をしていると考え、作図をし求めらる。

肝上清中の BSP 濃度 ( $C_t$ ) と、free BSP 濃度 ( $C_f$ ) の間には、次式の関係が考えらる (X-分画の結合を無視している)。

$$C_t = C_f + C_{by} + C_{bz}$$

$$\text{但し、 } C_{by} = \frac{n_y \cdot K_y \cdot (P)_y \cdot C_f}{1 + K_y \cdot C_f}, \quad C_{bz} = \frac{n_z \cdot K_z \cdot (P)_z \cdot C_f}{1 + K_z \cdot C_f}$$

この関係式より、各  $C_t$  の関数として、各蛋白量あたりの BSP 結合量  $C_{by}/(P)_y$ ,  $C_{bz}/(P)_z$  を計算して、その結果をプロットした。

そして、飽和結合量は、Y-分画で  $0.012 \mu\text{mole}/\text{mg. Protein}$ , X-分画で  $0.03 \mu\text{mole}/\text{mg. protein}$  である。私の得たシミュレーションカーブでも、ほぼ同様の傾向が得られ、又飽和結合量もほぼ同じ値が得られた。この様にして、Y-分画の方が、早く BSP 結合が飽和する原因として、X-分画に比べて、Y-分画のより強い結合定数と、又約半分の結合部位の数を持つ事が示されたわけである。

SCATCHARD PLOT OF BSP BINDING TO Y & Z FRACTION.

Fig. 4

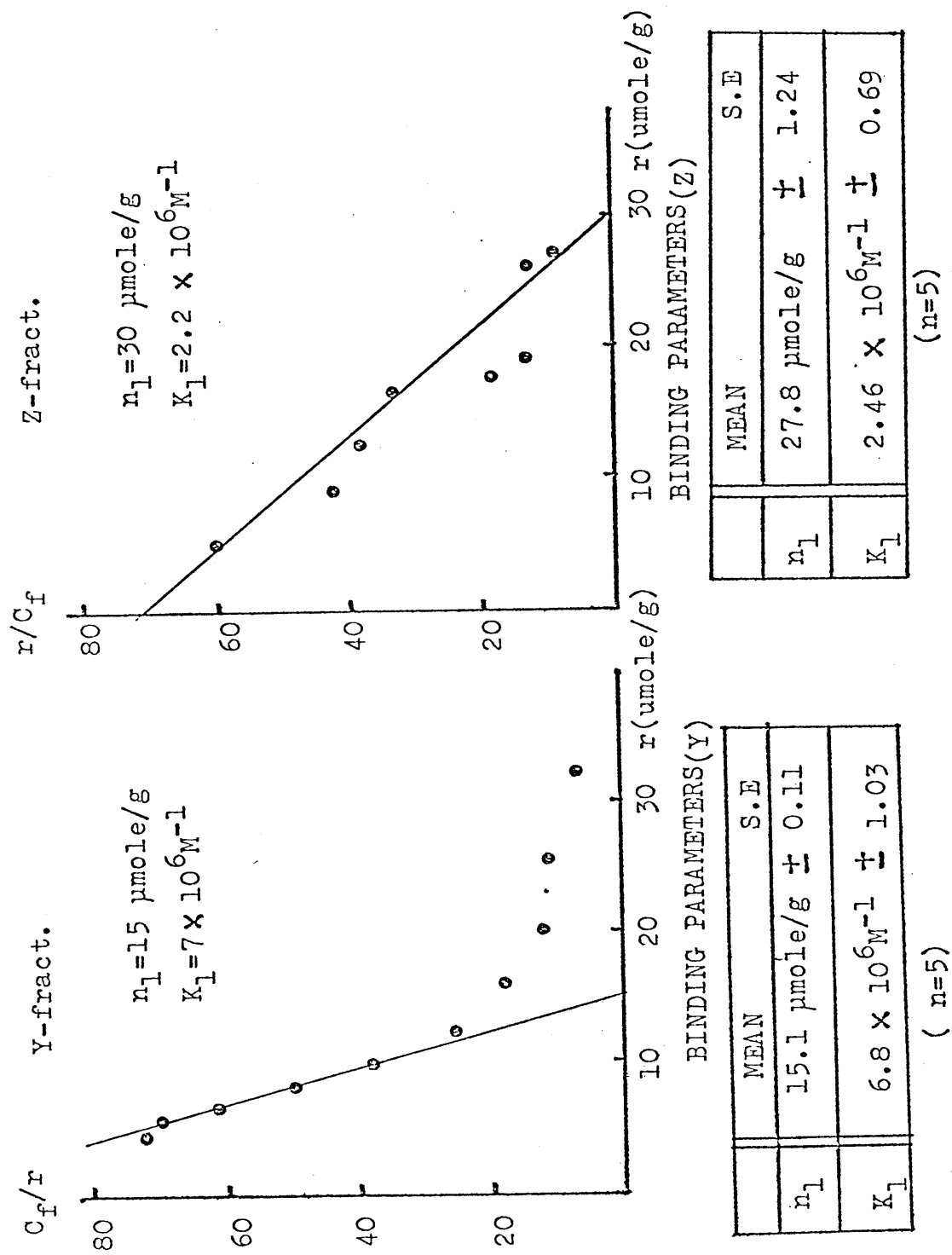
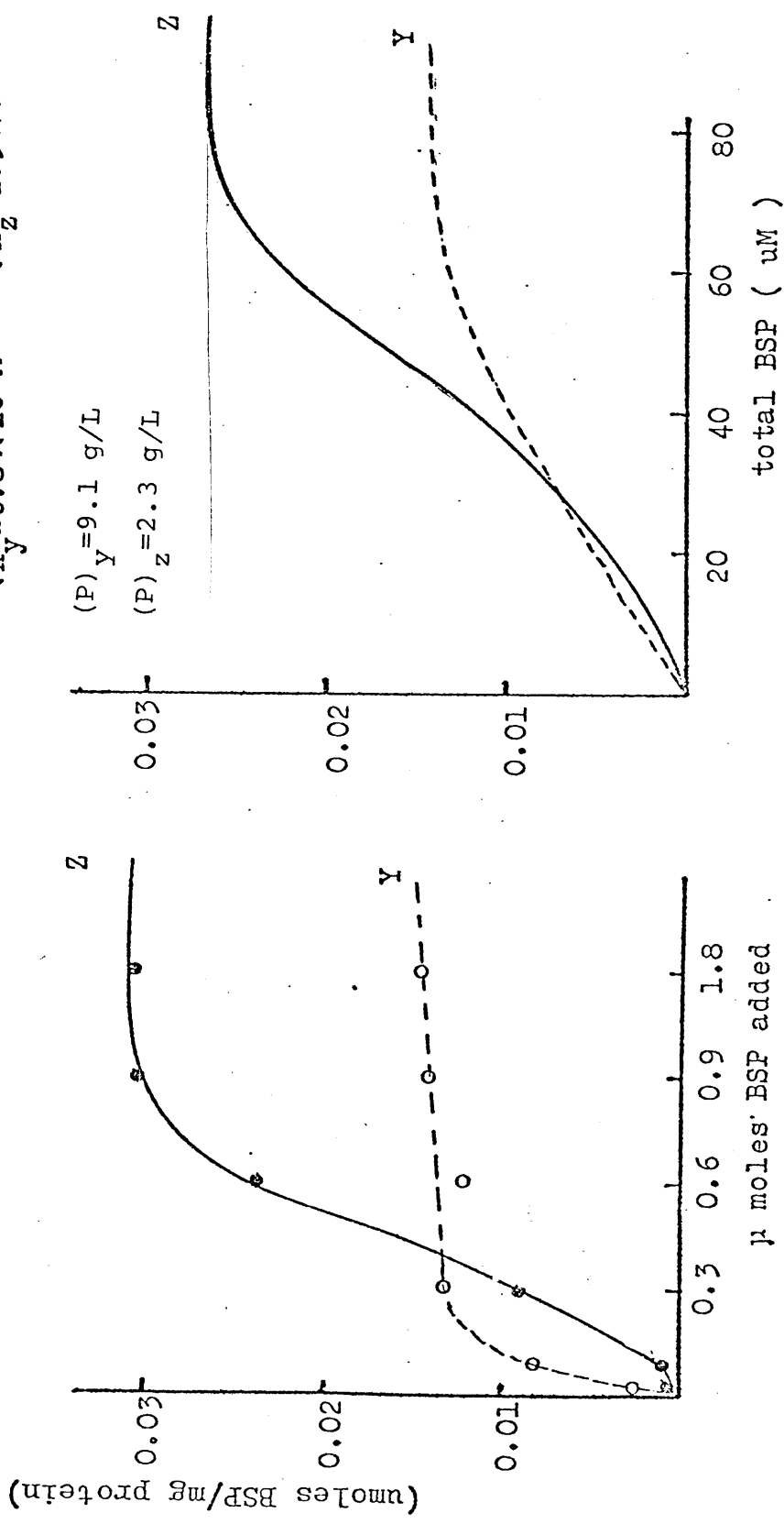


Fig. 5

BSP bound per milligram protein in the peak tubes of the Y & Z fract. after G-75 gel filtration. (I.M.Arias, J.Clin.Inv.48,2156~('69))

BSP binding features calculated from binding parameters.

$$\left( \begin{array}{l} n_Y = 15 \text{ } \mu\text{mole/g} \\ K_Y = 6.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \end{array} \right) \left( \begin{array}{l} n_Z = 28 \text{ } \mu\text{mole/g} \\ K_Z = 2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \end{array} \right)$$



### 3). けい光 Probe ANS との反応

細胞質結合蛋白の Organic Anion との結合の性質を明らかにする為の一手段として、ANS との反応を見てみる。けい光 probe ANS は、そのけい光 maximum ( $\lambda_{max}$ ) と量子収率が蛋白質中の Active site の polarity を敏感に反映できるものとして知られて来たものである。(67, 68, 69)。又、Bovine serum albumin (BSA) は、小分子、特に organic anion と非常に強く結合する事の知られて来た蛋白質であり(70, 71)、その結合メカニズムもかなり明らかとなっている(72, 73)。従って、ここでは細胞質蛋白のANS結合を、BSAと比較対象によって、その結合の性質にアプローチしてみる。

#### (i) 方法-----X, Y, Z-分画の調整

ラットの肝上清よりの調整は前述の通り(P27)。G-75 カラムを用いるゲル濾過法による。一度ゲル濾過をしたあと、更にX-分画は、セフテックス G-200 を、Y-分画はフア テックス G-75、Z-分画 (40x58cm) (2.0x65cm)

画はセファテックス G-50 カラム<sup>(2.2x65cm)</sup>を通して、分子量的には均一な画分とする。又一分画は、1度について5~6匹のラットから調整して、それを3回行った。そして、それぞれを Preparation 1, 2, 3 と名づけた。

けい光測定 けい光測定は、特別の指示がない限り、標準 buffer 中、室温(26~29°C)で Hitachi MPF-4 型のけい光光度計を用いて行なった。必要な時は、既に報告されている硫酸キニネ(in 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)のスペクトルと比較する事により、補正をした(74)。この様にして得られた BSA と結合した型の ANS の入  $m_{\text{max}}$  は、Turner ら(67)の報告とよく一致した。

けい光 titration. けい光量子収率に比例する値と考える事のできる最大けい光強度は次に述べるようなけい光 titration 法で求めた。5  $\mu\text{M}$  の ANS 溶液 3 ml を、けい光セルにとり、そこに、蛋白溶液(ANS を 5  $\mu\text{M}$  含む)をマイクロシリンジで加えてゆく。微ッのスターラーバーで攪拌をした後、380 nm で励起をし、480 nm での

けい光強度を讀んでゆく。いつも  $10\mu\text{M}$  の ANS を MeOH 中にとかしたものを標準とする。

この様にして得られたけい光強度は、必要ならば

Chignell (75) らの方法によって内部口過効果の補正を行なう。(Fig. 6)

こうした titration は、最大けい光強度に達するまで続けることの出来ない場合がある。即ち、

次の様な場合である。① おそらく会合しやすい為だと思われるが、高い濃度の蛋白溶液をつくる事が出来ない。(X-分画の場合)

② 蛋白溶液が  $380\text{nm}$  か  $480\text{nm}$  に高い吸収を示す為には、内部口過効果による誤差が大きくなり過ぎる。(Y-分画の場合)

③ ANS に対する蛋白の affinity が余り大きくない為には、titration curve がプラトーに達する為には非常に高い蛋白濃度を要する場合(X, Y-分画, そして, Z-分画の Preparation 1, 2 の場合)。

この様な時には、最大けい光強度を定める為には両逆数プロットを行なった(76, 77)。

けい光 data より, 結合型 ANS 濃度の算出



結合型 ANS 濃度は次の式により計算した。

$$\text{ANS}_{\text{bound}} = (5 \times F_{\text{obs}}/F_{\text{bound}}) \mu\text{M} \text{ --- Eq. (1)}$$

ここで、 $\text{ANS}_{\text{bound}}$  は、結合型 ANS の濃度。  
 $F_{\text{obs}}$  は観察したけい光強度、 $F_{\text{bound}}$  は、5  $\mu\text{M}$  ANS が過剰量の蛋白存在下で出すけい光強度である。(即ち、前述のけい光 titration の data より求める)。

## (ii) 結果と考察

けい光スペクトル。 Fig. 7 は、ANS の各種蛋白存在下での補正けい光スペクトルを示す。この条件下では、非結合型の ANS のけい光強度は、結合型のそれと比べて、無視する事が出来るので、これらのスペクトルは、全て、各種蛋白と結合した ANS のスペクトルとみなせる。

Buffer 溶液中では ANS のけい光は非常に低く 550 nm に入  $m\text{eA}$  を持つが、蛋白類と結合すると、大きくけい光強度が増加し、入  $m\text{eA}$  も、BSA の場合 482 nm, X-分画の場合 494 nm, Y-分画の場合 500 nm, 又、Z-分画の場合

480 nmへと shift する。

最大けい光強度 . Fig. 8 左図は、最大けい光強度を得る為の titration curve である。又、右図は、titration をプラトーが得られるまで続ける事の出来ない場合、その最大けい光強度を得る意に行った逆数プロットを示している。この様にして得られた最大けい光強度は、BSA<sup>\*</sup>において 97 (0.75<sup>\*</sup>)、X-分画において 14 (0.11)、Y-分画において 13 (0.10<sup>\*</sup>)、Z-分画において、3つの preparation の平均値として 113 (0.87<sup>\*</sup>)であった。

\* ( )内は、けい光量子収率を示す。BSAの場合の G. Weber らの文献値 (78) より量子収率 0.75 を用いて、その他の蛋白における量子収率を計算した。

又、BSP 存在下、Z-分画での titration をみると、最大けい光強度は変化させないが、途中のけい光強度を低下させる事がわかる。

けい光法による ANS binding. X, Y, Z-各分画と ANS との結合の強さを調べる為、蛋白濃度を一定にしておき ANS 濃度を変化させて

( $2\mu\text{M} \sim 40\mu\text{M}$ ) そのけい光強度を測定した。  
 buffer 中の ANS けい光強度を blank 値として  
 差し引き、更に内部口過効果による補正も行った。  
 同時に、 $4.6\mu\text{M}$  の BSP 存在下でも同様の実験  
 を行って、ANS binding における BSP の影響を  
 調べた。結果を Wang-Edelman ら (79) の  
 方法に従って、逆数 plot\* で示した。  
 結果を Fig. 9 に示す。X, Y, Z, いずれの分画の  
 結果をみても、BSP 存在下において、Y-切片を

\* 次のモデルを考える。  $E + F \xrightleftharpoons{K} C_F$  (1)  
 ここで、 $K$  は解離定数。  $C_F$  のみが、けい光を出すと考え  
 すると、次式が成立する  $\frac{I}{I_{\text{max}}} = \frac{\phi C_F}{\phi n E_0} = \frac{C_F}{n E_0}$  (2).  
 ここで、 $E_0$  は全蛋白濃度である。  $I$  は、観察されたけい光強度、  
 $I_{\text{max}}$  は、色素濃度が無限に大きくなった時のけい光強度である  
 又、 $\phi$  は、 $C_F$  と、 $I$  の間の比例定数で、けい光子量子収率に相当する。  
 Mass action と、Mass balance により、(3)式が成立する  
 $\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{\text{max}}} + \left(\frac{K}{I_{\text{max}}}\right) \left(\frac{1}{F}\right)$  (3)  
 $F_0 \gg E_0$  の条件、即ち、 $F \approx F_0$  においては、 $\frac{1}{I}$  versus  $\frac{1}{F_0}$  のグラフは  
 直線を示し、その Y 切片より  $K$  が求まる。  
 競合阻害剤  $i$  がはまっている場合は、 $E + i \xrightleftharpoons{K_i} C_i$  である  
 ここで、 $C_i$  は、けい光を持たないのであるから、同様と考えると、  
 $\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{\text{max}}} + \frac{K}{I_{\text{max}}} \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) \cdot \left(\frac{1}{F}\right)$  が成立する  
 即ち、このプロットにおいて、Y 切片は変化しないはずである。

変化させず、傾きのみを変化させる事がわかる。即ち、ANSとBSPは蛋白上の同一siteを競合する事が、どの蛋白においても示されたわけである。ANSとZ-分画の結合において、BSPが競合阻害をおこす事は Fig. 8での最大けい光強度が変化しない事よりも明らかである。又、みかけ上のANSと蛋白との解離定数は、X-分画で200  $\mu\text{M}$ 、Y-分画で10  $\mu\text{M}$ 、Z-分画で20  $\mu\text{M}$ である事が示された。

以上の結果をまとめたものが、table IIである。結合部位の疎水性の指標である  $\ln m_{\text{max}}$ 、量子収率  $\phi$  から判断すると、圧倒的に、Z-分画が疎水的部位を持つ蛋白である。Y-分画に対しては、解離定数10  $\mu\text{M}$  というかなりの親和性を持ち、かつ  $n$  の値が4.7  $\mu\text{mole/g}$  と小さい事より、特異的結合部位を持つ事が想像出来る。又、X-分画は、 $n$  の大きさ、 $K_d$  の大きさより判断して、非特異的な吸着をする蛋白である事が考えられる。又、YとZを比較すると、 $K_d$  は2倍ほどしか違わないのに、その疎水性が大きく異なる。これは、後にも

議論する様に、 $\alpha$ は、結合 force として、主に疎水的 force が、 $\gamma$ は、主にイオンの force が働いていると考えたと、説明出来るものと考えられる。

### ANS と $\alpha$ -分画及び BSA への Binding

以上の議論によって三つの細胞質結合蛋白のうち、 $\alpha$ -分画が圧倒的に疎水的な結合部位を持つ蛋白であり、その性質ゆえに、ANS が結合した時に増加するけい光強度が、他の蛋白よりもはるかに大きい事が示された。結合部位の疎水性は、BSA とほぼ同じ位である事が示された。そこで、これら蛋白と ANS の結合をより厳密に調べる事にする。さて方法の項で述べた様にけい光の data より、結合型及び非結合型の ANS 濃度を求める為には、Eq. (1) において  $F_{bound}$  が一定でなければならない。即ち、“ANS は、蛋白上のどの site に結合しても、同一のけい光強度を示す”という条件が満足されてなければならない。この条件は、BSA と ANS の結合においては、成立する事が示され

ている(80)が、 $\Sigma$ -分画においては、特にその不均一さ故に不確かである。その仮定の正しさを調べる為に、Fig. 10 の様な実験を行なった。即ち、 $\Sigma$ -分画濃度を一定にしおき、ANS濃度を変化させて、280nmで励起した時のけい光スペクトルを測定した。ANSの濃度が増加するにつれて、310nmにおける蛋白のけい光減少と、それに伴う460nmでの結合型ANSのけい光の増加がみられる。又、460nmに、*isoemissive point* がみられる。この事は、この実験で cover された範囲において、結合型ANSの  $F_{bound}$  が、結合部位によらず一定である事を示している\*。

\* 今仮に、2種類の結合部位があるものとして、ANSと蛋白の *mixture* の波長( $\lambda$ )のけい光強度を  $I(\lambda)$  とすると、次式が成立する。

$$I(\lambda) = P_{b1} \cdot \phi_1(\lambda) + P_{b2} \cdot \phi_2(\lambda) + P_{b12} \cdot \phi_{12}(\lambda) + P_f \cdot \phi_f(\lambda)$$

ここで、 $P_{b1}$  は、site 1 がANSと結合している蛋白、 $P_{b2}$  は site 2 がANSと結合している蛋白、 $P_{b12}$  は、site 1, site 2 がともにANSと結合している蛋白、又、 $P_f$  は、ANSと結合していない蛋白の、それぞれの濃度を示す。 $\phi$  は、それぞれの分子種のけい光量子収率を示す。 $P_{b1} + P_{b2} + P_{b12} + P_f = P_t$  (一定) 対し、

$$I(\lambda) = P_{b1} (\phi_1(\lambda) - \phi_f(\lambda)) + P_{b2} (\phi_2(\lambda) - \phi_f(\lambda)) + P_{b12} (\phi_{12}(\lambda) - \phi_f(\lambda)) + P_t \cdot \phi_f(\lambda)$$

従って、*isoemissive point* が存在するといふ事は、ある波長( $\lambda$ )において、

$$\phi_1(\lambda) = \phi_2(\lambda) = \phi_{12}(\lambda) = \phi_f(\lambda) \text{ という事であり、結合部位によらず、}$$

量子収率が一定である事を示す。

又、RBを、ANS、 $\alpha$ -分画の混液に加えると、  
*isoemissive point* がこわれるが、これは、  
 $\alpha$ -分画、 $\alpha$ -分画—ANS complexという二つの  
 分子種(けい光を出しうる)の他に、 $\alpha$ -分画—RB  
 complexという新たな分子種が加わった意と考え  
 られる。この様に、 $F_{bound}$  が一定である事が、一  
 応、確かめられたので、計算をすゝめ、その結果を  
*scatchard plot* として示したのが、Fig. 11  
 である。左は、 $\alpha$ -分画とANSの結合を示してい  
 るが、 $n = 18 \mu\text{mole/g. protein}$ , 結合定数  $K = 0.62 \times 10^6 \text{M}^{-1}$   
 が求まった。5  $\mu\text{M}$  のBSA存在下においては、  
 $n$ の値は変化しなかったが、 $K = 0.17 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ と約半  
 に低下した。同様の方法で行なったBSAとの結  
 合の結果を右図に示す。電子計算機を使い、  
 最小二乗法による解析結果(巻末に示す)に  
 よると、収束値が得られ、 $n_1 = 2$ ,  $n_2 = 3$ ,  
 $K_1 = 4.9 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ ,  $K_2 = 1.8 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ が求まった。

この様に、 $\alpha$ -分画はBSAとほぼ同様の疎水的  
 な結合部位を持つにもかゝらず、ANSに対  
 する結合定数は、BSAの場合の約  $\frac{1}{5}$  であった。

一方、血清アルブミンは、小分子、特に有機アニオンとその有機アニオンの疎水的性質が増加するにつれて強く結合する事が知られてきた(70, 71, 81)。従って、血清アルブミン上の結合部位は、疎水的であり、かつ、Cationicな側鎖より成るものと、一般的に考えられて来た。近年、人の血清アルブミンにおいて、Klotzら(73)は、結合部位として、 $Lys^+$ ,  $Arg^+$  という二つの Cationic なアミノ酸残基のクラスターをみつけ出し\*、それが、主なるアニオン結合部位である事を示している。BSAにおいても又同様の結果が, Jonas & Weber (82) によって得ら

\* 文献的知識により、有機アニオンの binding site の近辺にトリプトファンが存在する事が知られていた。又、HSAは、トリプトファンを1個しか持たない事がわかっていた。この事実より、彼らは(キモトリプシン及びトリプシンによる分解を利用して)トリプトファンの近くの一次構造を求めた。

その結果、 $Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg$  という構造がわかり、カチオン性アミノ酸に囲まれた疎水性クラスターの存在が明らかとなった。



れている。従って、 $\alpha$ -分画が、BSAと同様の疎水性を持つにもかかわらず、ANSに対する親和性が低いのは、おそらく $\alpha$ -分画上のANS結合部位の近辺に、アルブミンにおいてみられる様な、Cationicなアミノ酸残基が不足している為であろうと考えられている。即ち、有機アニオンと $\alpha$ との結合においては、主に疎水結合力が働いているであろう。この事は、有機アニオンの結合を考えると、 $\alpha$ -分画よりも、BSAの方が、より適した結合部位を持っている事を示している。これは、BSP、RBという、ANS以外の有機アニオンの場合にも、あてはまっている。即ち、BSPの場合、BSAへの結合定数は、 $1.7 \times 10^7 M^{-1}$  (83)であり、 $\alpha$ への結合定数は、 $2.5 \times 10^6 M^{-1}$  (Fig. 4)である。又、RBにおいても、Spectrophotometricに調べると、(後述)、BSAに対しては、 $1.2 \times 10^8 M^{-1}$ 、 $\alpha$ に対しては、 $1.6 \times 10^7 M^{-1}$ であり、いずれの場合も、BSAの方がはるかに強い親和性を示している。

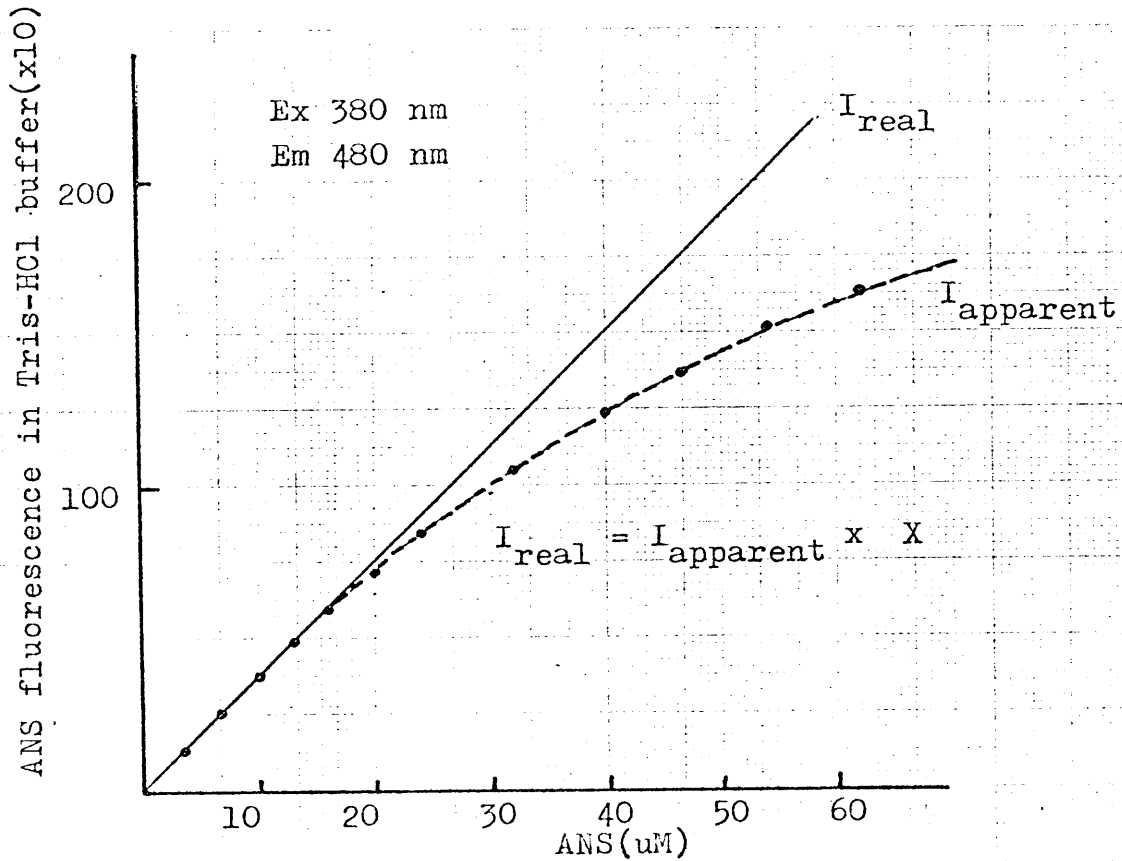


Fig.6 CORRECTION FOR THE "INNER FILTER" EFFECT

Chignell ら (75) の方法により、内部口過補正 factor  $X$  を求める

$$X = \text{antilog} \frac{Abs_{(ex)} + Abs_{(em)}}{2}$$

ここで、 $Abs_{(ex)}$ 、 $Abs_{(em)}$  は、それぞれ励起、検出光波長での吸光度である

$I_{real}$  の直線は、内部口過効果の無視できる低濃度条件でのデータを用いて引いたものである。ANS は 380nm にのみ、吸収を持つ (100 $\mu$ M で 0.480 の吸光度) ので、上式によって、 $I_{real}$  を補正したものを実線で示す。実測値とよくあっており、この補正法の正しさがわかる。

縦軸の検出光強度は、10 $\mu$ M ANS in MeOH を  $\times 0.1$  の感度で 80 目盛にあわした時のよみである

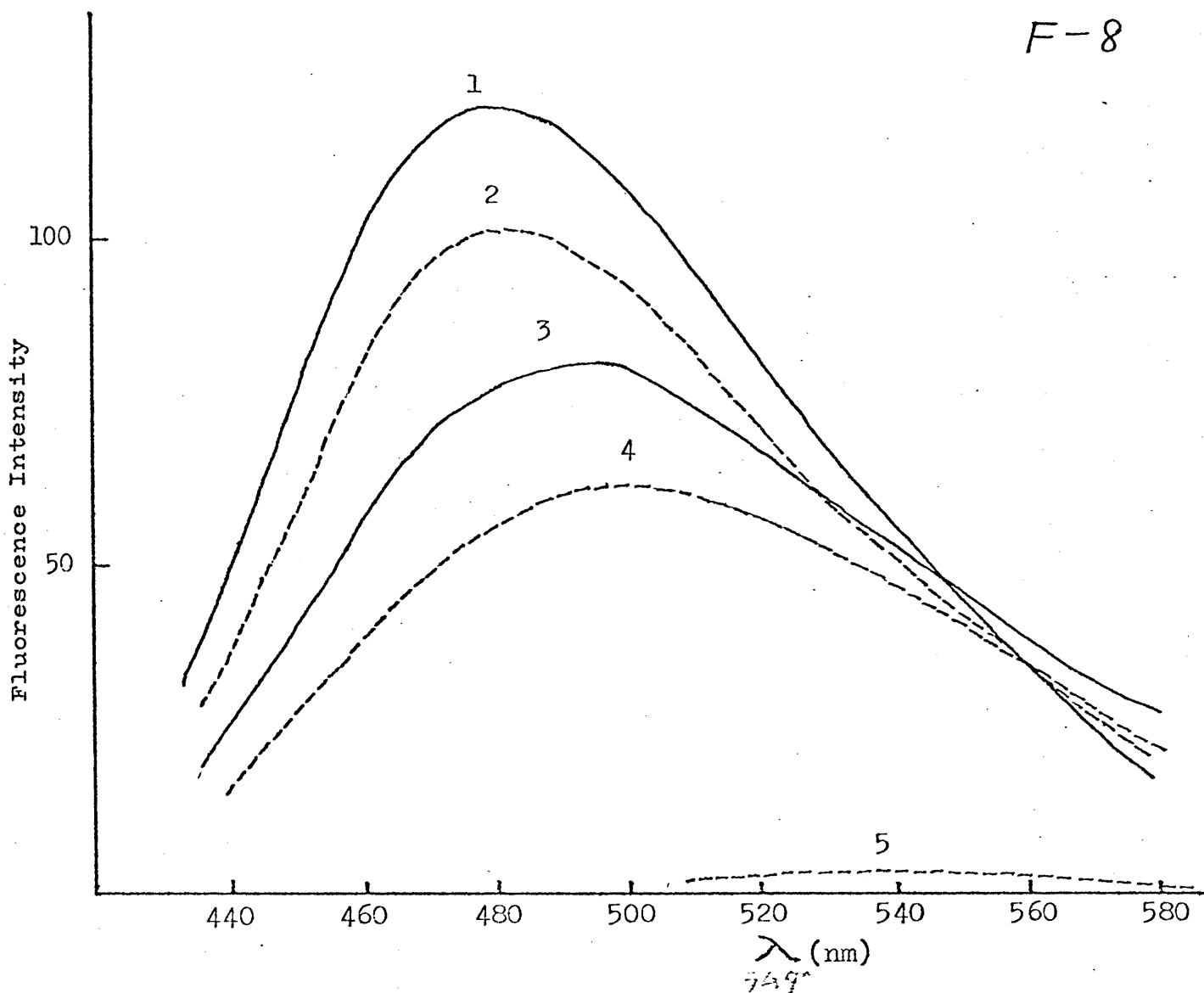


Fig. 7. Corrected Fluorescence Emission Spectra of ANS in the Presence of BSA and Cytoplasmic Fractions.

Each solution contains 20  $\mu\text{M}$  ANS, and the excitation wavelength is 380 nm. Curve 1, ANS + 320  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Z-fraction; Curve 2, ANS + 170  $\mu\text{g}/\text{ml}$  BSA; Curve 3, ANS + 350  $\mu\text{g}/\text{ml}$  X-fraction; Curve 4, ANS + 330  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Y-fraction; Curve 5, ANS only. Curve 3 and 4 are at a sensitivity of six times greater than 1, 2 and 5.

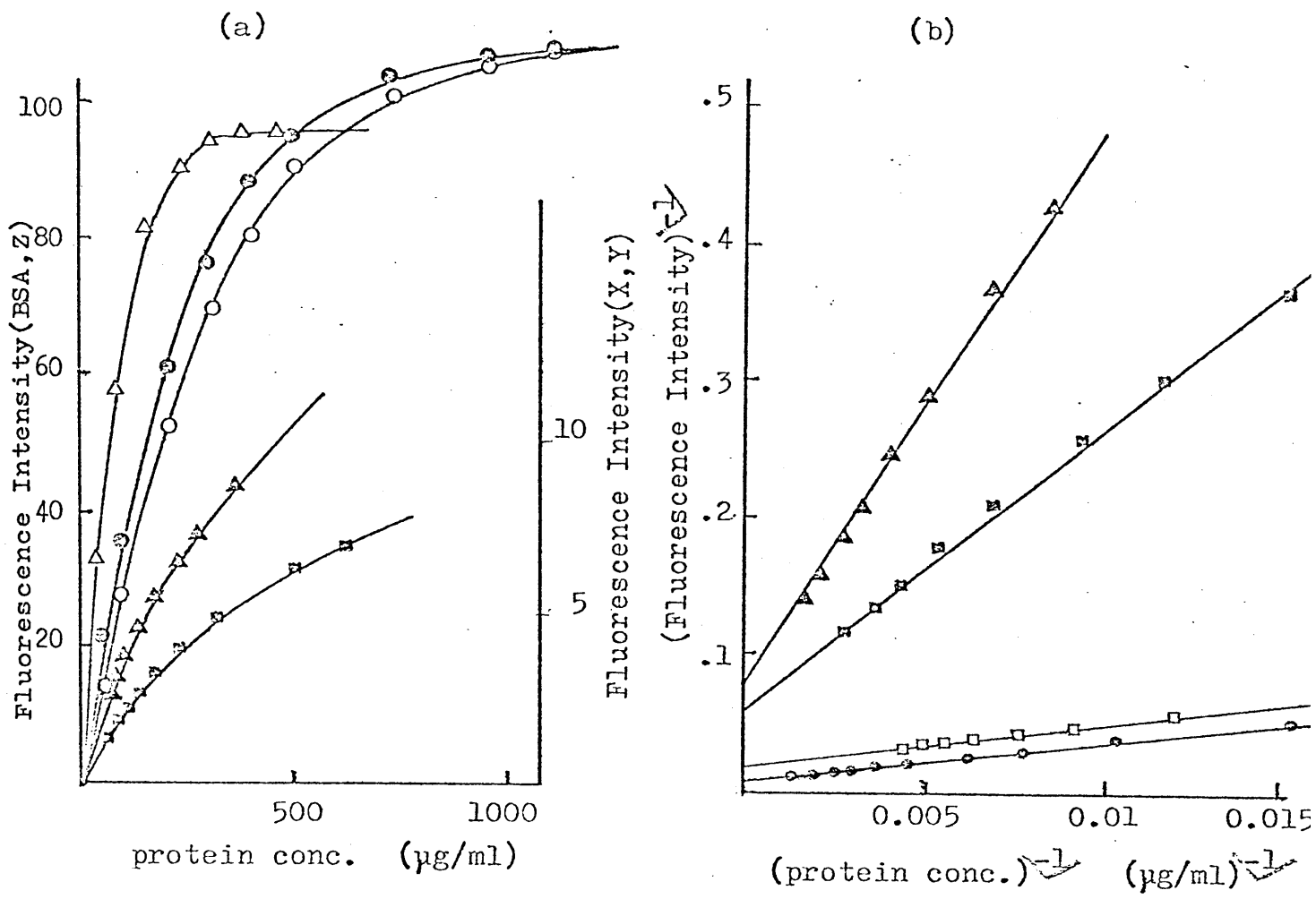


Fig. 8. Fluorometric Titration Curves of 5  $\mu\text{M}$  ANS with BSA and Cytoplasmic Fractions to Obtain the Infinite Intensities

The excitation wavelength is 380 nm, and the emission wavelength is 480 nm. In the case of X and Y-fractions, the intensities are corrected for "inner filter" effect.

(a) The fluorescence intensity of ANS as a function of protein concentration. ( $\Delta$ ), BSA; ( $\odot$ ), Z-fraction (preparation 3); ( $\circ$ ), Z-fraction (preparation 3) with 5  $\mu\text{M}$  BSP; ( $\Delta$ ), X-fraction; ( $\square$ ), Y-fraction. In the experiment with BSP, both ANS solution and Z-fraction solution contain 5  $\mu\text{M}$  BSP.

(b) Double reciprocal plots when the infinite intensities cannot be obtained directly. ( $\Delta$ ), X-fraction; ( $\square$ ), Y-fraction; ( $\odot$ ), Z-fraction (preparation 2); ( $\square$ ), Z-fraction from  $\text{CCl}_4$  chronically intoxicated rats.

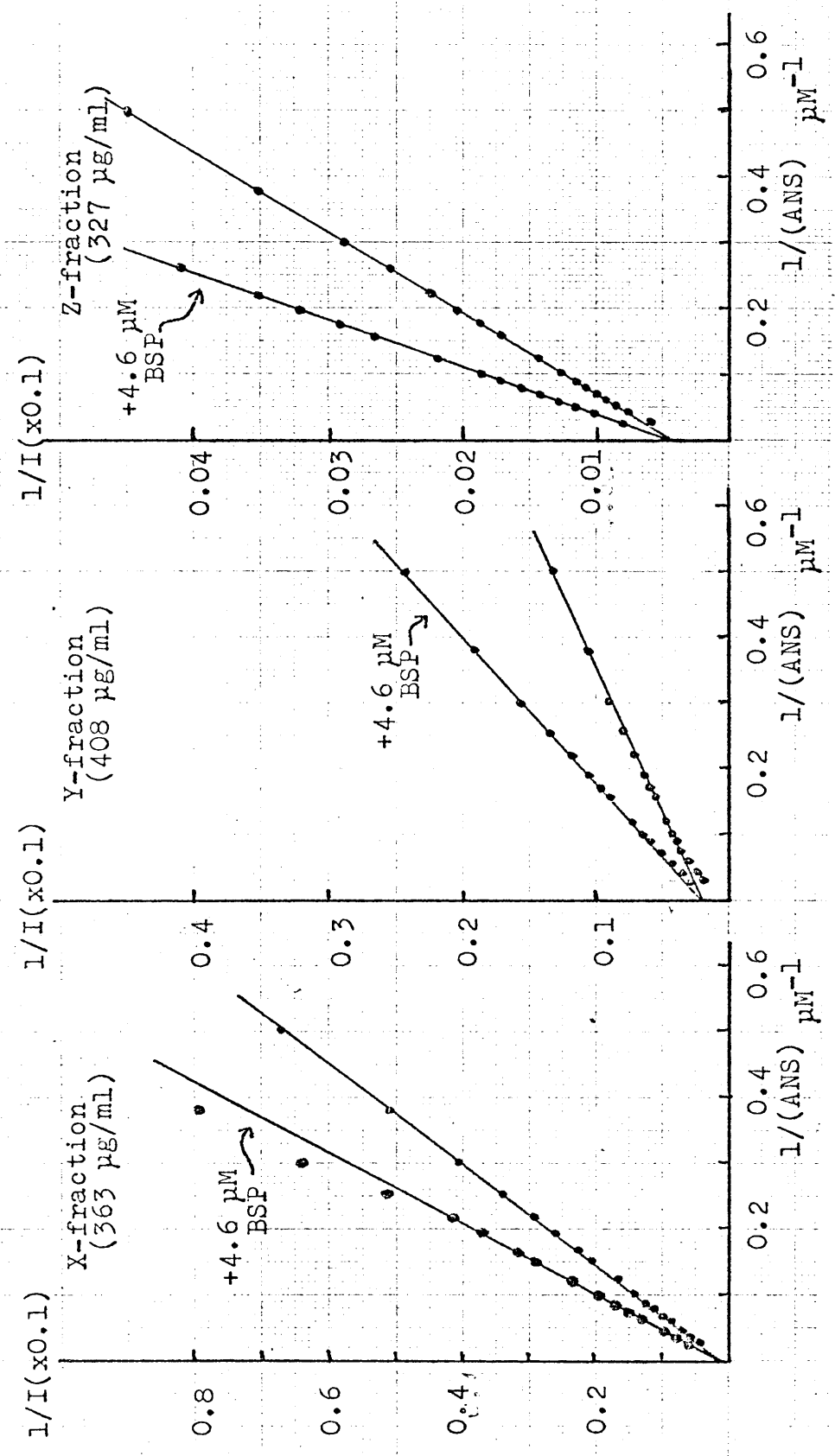


Fig.9 THE RECIPROCAL OF THE CHANGE IN FLUORESCENCE(1/I) PLOTTED AGAINST THE RECIPROCAL OF ANS CONCENTRATION IN THE PRESENCE AND ABSENCE OF BSP

Table II ANS BINDING TO CYTOPLASMIC FRACTIONS BY  
FLUORESCENCE TITRATION

	max (nm)	quantum yield	* $K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	** $n$ ( $\mu\text{mole/g-protein}$ )
X	494	0.11	200	98
Y	500	0.10	10	4.7
Z	480	0.87	20	34
Buffer	550	0.002		

\* Fig. 8 に示す最大けつ光強度より計算した。

\*\* Fig. 9 より Wang-Edelman ら (79) の方法により求めた。

\*\*\* P42 の脚注の Eq. 2, 3 より, 両逆数 plot (Fig. 9) で得られる  $I_{max}$  は,  $\varphi \cdot n \cdot E_0$  であらわされる事がある。従って,  $n = \frac{I_{max}}{\varphi \cdot E_0}$  である。ここで,  $\varphi$  は, Fig. 8 より得られる。 $E_0$  は, 使用した蛋白濃度である ( $\mu\text{g/ml}$ )。又,  $\varphi$  の dimension は, この場合, [けつ光強度/ $\mu\text{M}$ ] である。

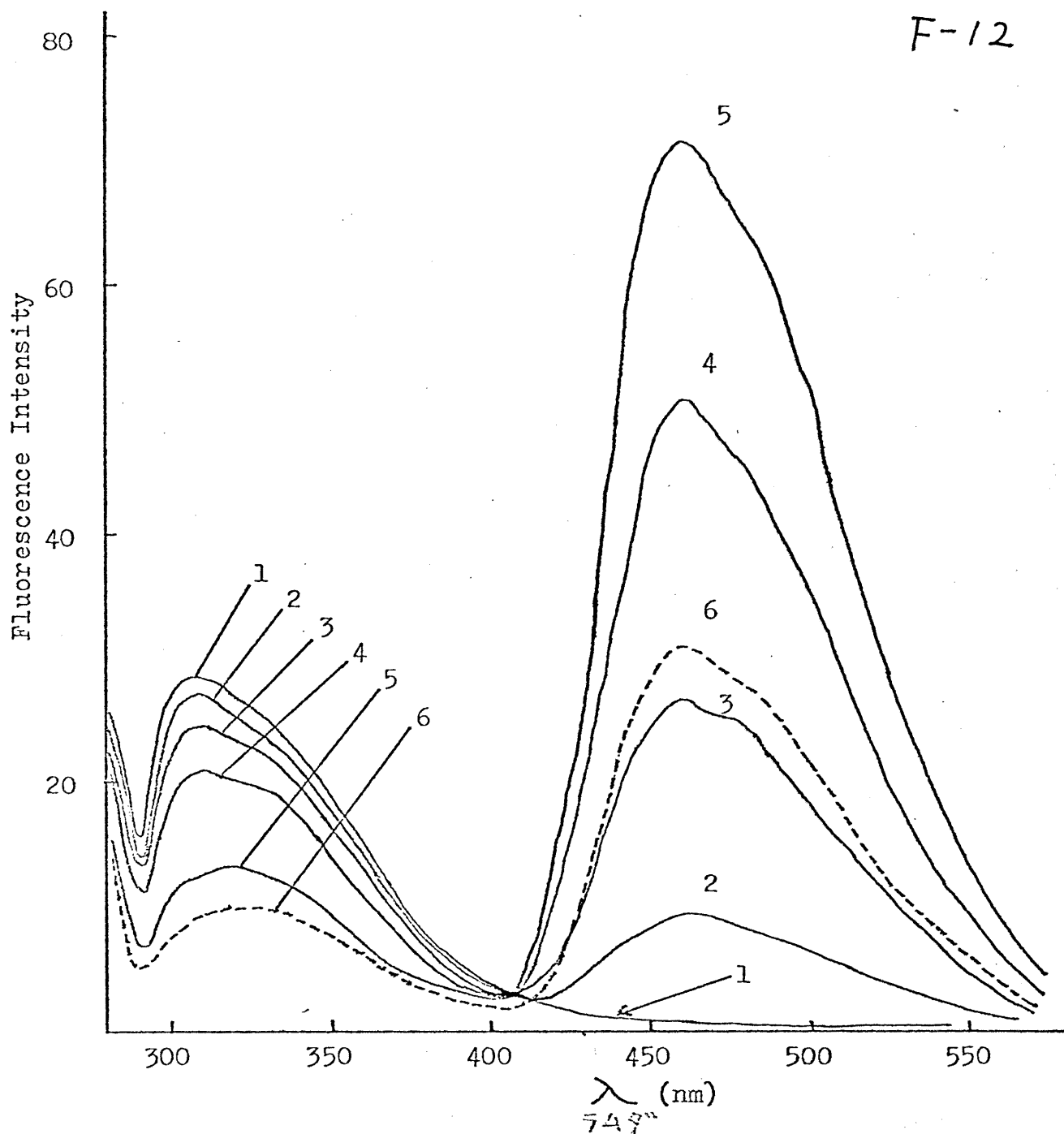


Fig. 10 Observed Fluorescence Emission Spectra of ANS and Z-fraction Mixture as a Function of ANS Concentration

The excitation wavelength is 280 nm. The concentration of Z-fraction (preparation 3) is 388  $\mu\text{g/ml}$ , and the ANS concentrations are as follow. (1), 0  $\mu\text{M}$ ; (2), 1.0  $\mu\text{M}$ ; (3), 3.32  $\mu\text{M}$ ; (4), 8.26  $\mu\text{M}$ ; (5), 26.0  $\mu\text{M}$ ; (6), 26.0  $\mu\text{M}$  with 6.62  $\mu\text{M}$  rose bengal (RB).

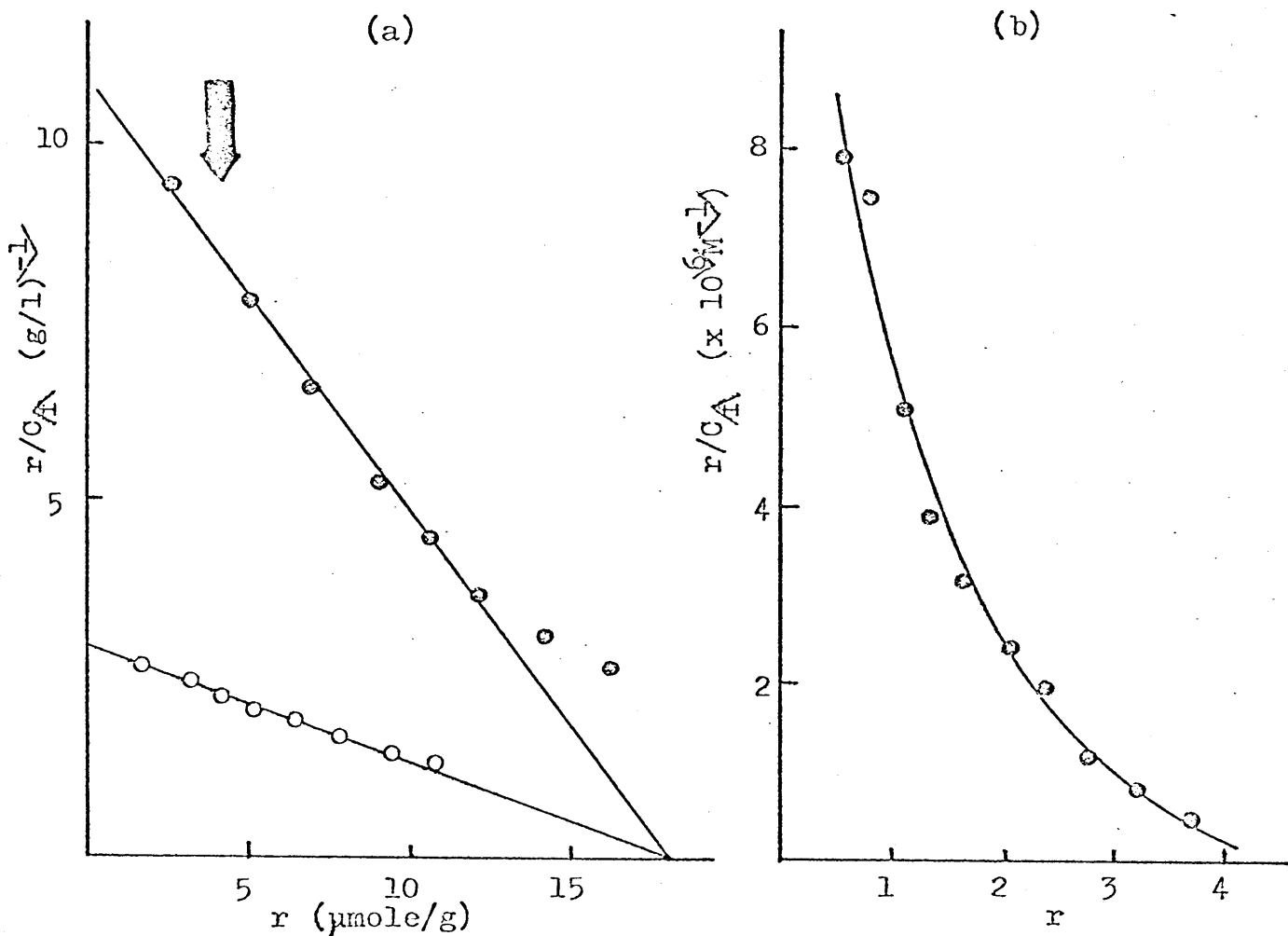


Fig.// Scatchard Plot of ANS Binding to Z-fraction(preparation 3) in the Presence and Absence of BSP, and that to BSA

(a) ANS binding to Z-fraction. The data points are calculated from Fig.4. (○), without BSP; (○), with 5 μM BSP. The arrow shows the condition used in the competitive study described in Fig.6.

(b) ANS binding to BSA. r is expressed in moles ANS bound per mole BSA, regarding BSA molecular weight as 66000. The solid line is a theoretical curve computed using  $n_{1A}=2$ ,  $n_{2A}=3$ ,  $K_{1A}=4.9 \times 10^{6} M^{-1}$  and  $K_{2A}=1.8 \times 10^{5} M^{-1}$ .



## 2. Y-蛋白の分離精製及びその性質

Y-蛋白の精製を、BSPへの *binding* を指標として行なった。何回か行なったが、そのうちの代表的結果を示す。

1). 工程. すべての操作は、氷上、或いは、Cold room (4°C) で行なった。

i) 上清の調整 (step. 1) ----- 7匹のratより、77gの肝を使い、50%の homogenate を作り、100000 gの上清を、既述の方法で調整する。

ii) セファテックス G-75 ゲルろ過 (step. 2)

ステップ 1 より約 55 ml の上清がとれる。それを、あらかじめ標準 buffer (pH 7.4, 50 mM Tris-HCl buffer) で平衡化したセファテックス G-75 カラム (5.4 cm x 85 cm) にアプライする。ペリスターポンプを用いて、45 ml/hr の速度で、ろ出を行なう。10 ml/tube ずつ、フラクションコレクターで集める。蛋白濃度を、280 nm の吸光度でチェックする。Y-分画を集める。なお、Y-分画の同定は、Fig. 12 に示す様に、あらかじめ

め、同一カラムで、BSP存在下で上清のゲル口過を行なう事により決めておく。

(iii) セファデックス G-75 ゲル口過 (step 3)

step 2より得られたY-分画140mlを、蒸留水に対して透析した後に、凍結乾燥\*により、20mlに濃縮する。これを、step 2と同一のセファデックス G-75カラムにアプライし、同一条件で溶出する。Y-分画のピーク遊出を約70ml集める。

(iv) DEAE-Sephadex chromatography (step 4)

step 3で得たY-分画を凍結乾燥\*により、20mlに濃縮した後に、標準bufferに対して24hr以上(2L×2)透析を行なう。サンプルをあらかじめ、充分標準bufferで平衡化したDEAE Sephadex A-50 454 (1.5cm×17cm) にアプライする。約200mlの標準bufferを用い、12ml/hrの速度で溶出する。3.5mlおつ、フラクションコレクターで集める。

\* 濃縮方法は、この他にも、限外口過法(ABCOR膜、HFA-180(分画分子量15000)を使用)、硫酸分画(90%飽和、溶液100mlに7.5g硫酸66g)も行ってみたが分離精製結果は、ほぼ同様であった。

この段階で、全アプライ蛋白のうち、約55%の蛋白が溶出される。この分画を DV-分画と呼ぶ。カラム内に吸着された蛋白を、0.5M-NaClを含む標準 buffer で溶出し、これを、DNaCl-分画と呼ぶ。こうして得られた DV、及び DNaCl-分画と BSP の結合を平衡透析法で調べた。蛋白濃度は、

(DV) =  $100 \mu\text{g/ml}$ , (DNaCl) =  $250 \mu\text{g/ml}$  で行なった。結果を Scatcherd plot の形で、Fig. 13-1 に示す。みかけの結合定数(親和性の高い site に対する)は、DV-分画において  $12 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ , DNaCl において、 $2 \times 10^6 \text{M}^{-1}$  であった(3回の実験の平均値)。この事より、DV-分画の方に、BSP に対してより強い結合 Affinity を持つ蛋白の存在する事が示されたので、以後の精製は、この DV-分画を用いる事にした。

#### (V) CM-Sephadex chromatography (Step 5)

step 4 で得られた DV-分画約 70ml を、Abcor HFA-180 膜を用いる限外ろ過法により、13ml に濃縮した後、50mM の酢酸-酢酸ナトリウム buffer, PH 6.0 (buffer A) に対して、24 瓶以上

(2.2 × 2) 透析する。このサンプルをあらかじめ buffer A で平衡化した CM-Sephadex C-50 カラム (1.25 cm × 11.5 cm) にアプライする。このカラムを、まず、150 ml の buffer A で溶出した後に、200 ml の buffer A と 200 ml の 0.5 M-NaCl を含む buffer A より成る linear gradient をかけて、溶出を行なう。ペリスターポンプにより 12 ml/分 の速度を保ち、4 ml ずつフラクションクターで集める。Fig. 14 に結果を示す。各ピーク分画より、horizontal bar で示された範囲の分画をとって集め、それぞれ、C<sub>V</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>-分画と名づけた。

前記の C<sub>V</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>-分画にかなりの BSP 結合活性が存在する事は、次の様な予備的実験により同様の方法で、D<sub>V</sub>-分画を調整し、それを CM-Sephadex カラムにかけた結果が、Fig. 13-2 に示してある。各 tube を 3 ml ずつ集めた後に、標準 buffer に対して、それぞれを透析する。透析後すべての aliquots を 8/32 の type の Visking 膜に 2 ml ずつ取り、500 ml の

ビーカー中に入れた 500ml の  $0.2 \mu\text{M}$  BSP に対し  
て平衡透析をする。ビーカー内を stirrer で  
攪拌し、80 分後、平衡に達したあとで、ビーカー  
内溶液中の BSP 濃度 (この場合  $0.19 \mu\text{M}$  であった)  
と、各 Visking 膜内の BSP 全濃度を測定する。  
各 aliquots における結合型 BSP の濃度は、  
BSP 全濃度より、非結合型 BSP 濃度 (この場合  $0.19$   
 $\mu\text{M}$ \*) を差し引いて求める。この様にして得ら  
れた結果を、Fig. 13-2 中で示してある。

BSP-binding 活性のある 4 つのピークが存在し、  
それは、 $280 \text{ nm}$  でみた蛋白のピークと一致している。

#### (vi). Sephadex G-75 ゲルろ過 (step 6)

$C_0$ ,  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ -分画を、それぞれ、限外ろ過法  
によって 3ml に濃縮した後、Sephadex G-75  
カラム ( $28 \text{ cm} \times 54 \text{ cm}$ ) にアプライした。標準 buffer  
を用い、 $12 \text{ ml/hr}$  で溶出し、3ml が、集めた。

\* この実験において、 $\text{BSP}_{\text{free}} = 0.19 \mu\text{M}$  という低い  
濃度を設定したのは、BSP に対して高い親和性を持つ  
蛋白分画に着目したかったためである。

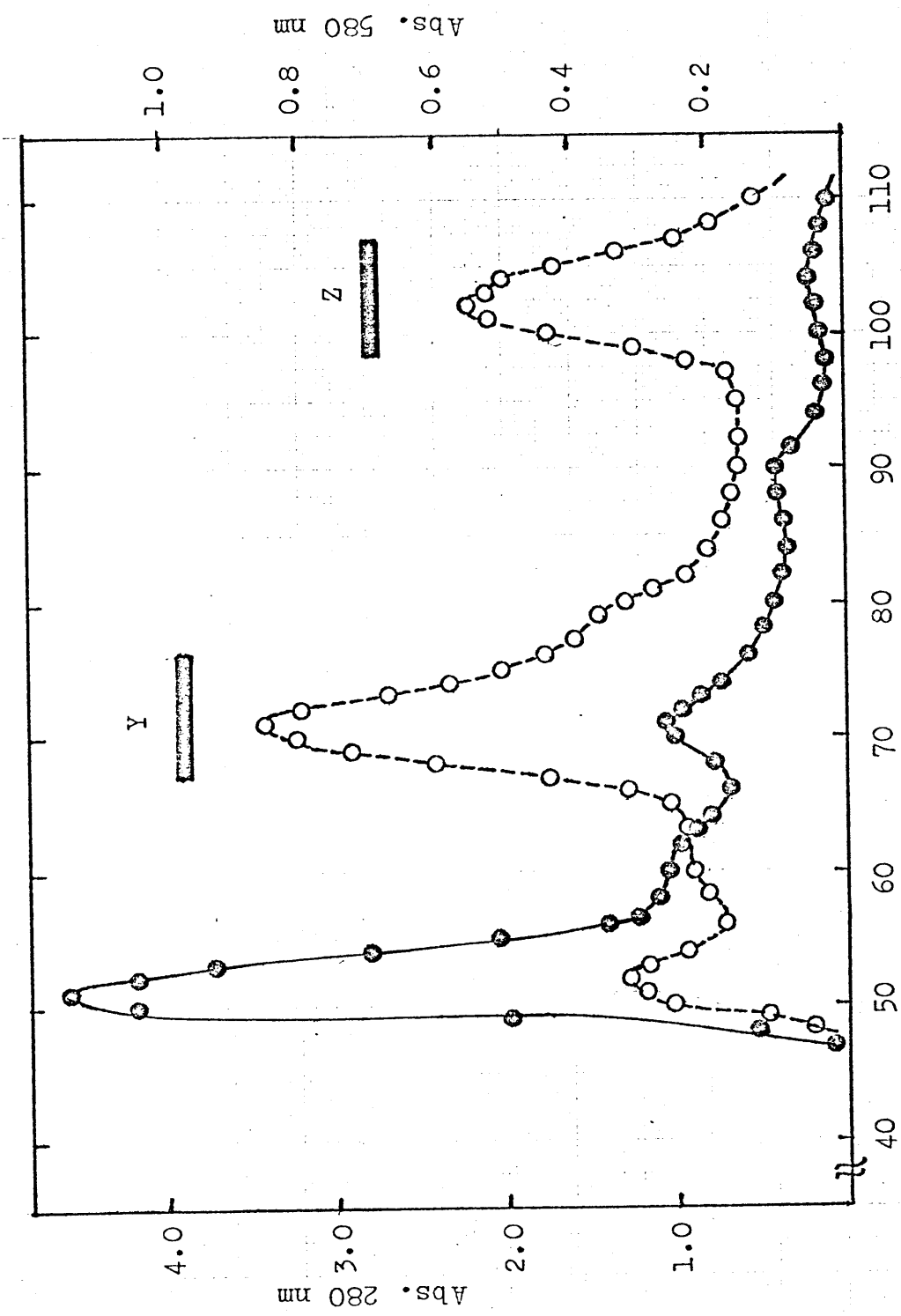


Fig. 12 PRELIMINARY SEPHADEX-G-75 GEL FILTRATION

A 10 ml of 50% supernatant was mixed with 10 umole of BSP, and chromatographed on Sephadex G-75 column. (column size, 5.4x85 cm; elution rate, 45 ml/hr; aliquot, 10ml)

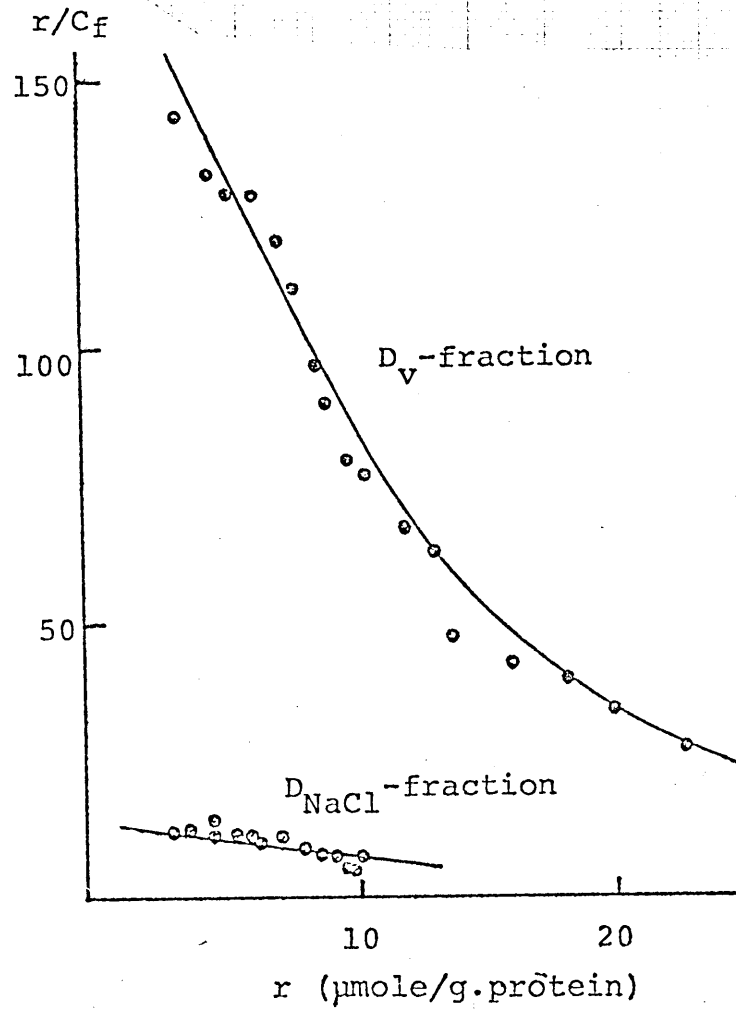


Fig.13-1 SCATCHARD PLOT OF BSP BINDING TO  $D_v$  AND  $D_{NaCl}$  AFTER DEAE-SEPHADEX CHROMATOGRAPHY

Fig.13-2 ELUTION PATTERN OF PROTEIN AND BSP BINDING ACTIVITY FROM CM-SEPHADEX COLUMN

( column size, 1.3 x 9.5 cm; elution rate, 12 ml/hr;  
 aliquot, 3 ml; load, 35mg of  $D_V$ -fraction )

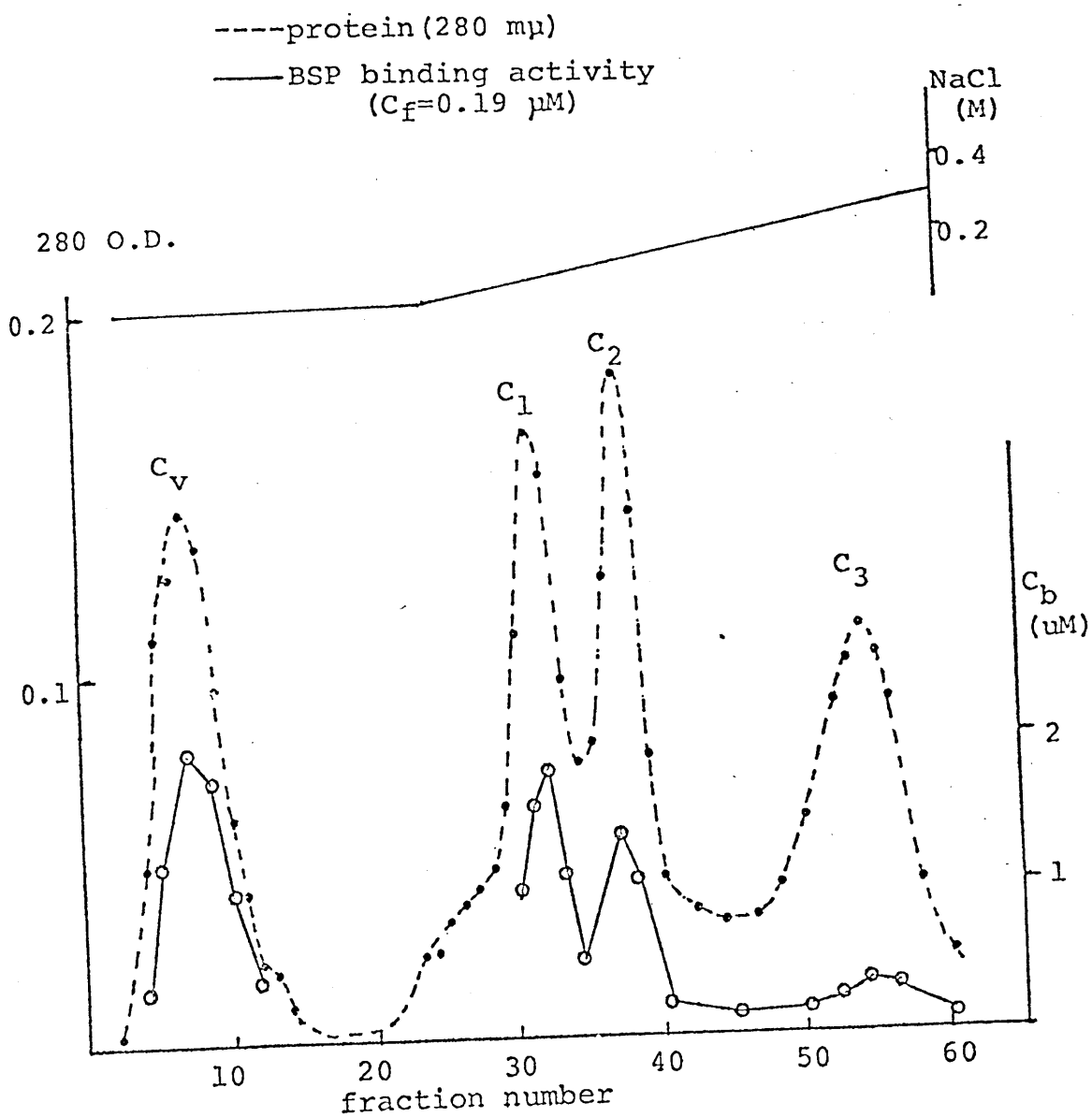
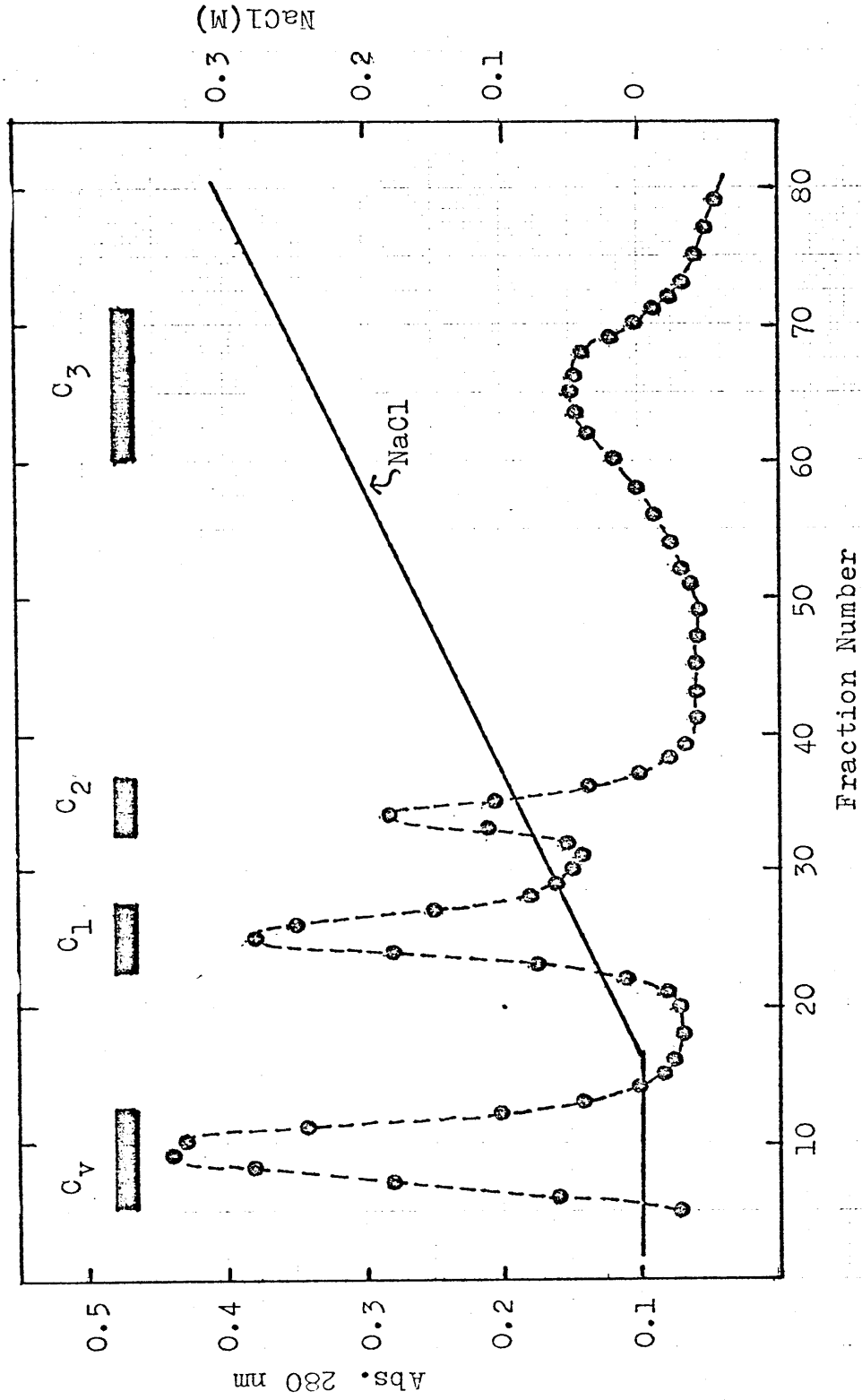




Fig. 14 CM-SEPHADEX CHROMATOGRAPHY OF D<sub>V</sub>-FRACTION

see details in the text  
(column size, 1.25 x 11.5 cm; elution rate, 12 ml/hr;  
aliquot, 4ml; load, 83 mg of D<sub>V</sub>-fraction)



## 2). 均一性と分子量決定

## (i) 方法

a). ゲル透過法-----精製工程の第6 step で、分離を兼ねて、分子量決定を行なった。即ち、Cytochrome C (12500), Chymotrypsinogen (25000), hen egg albumin (45000), BSA (67000), を標準蛋白として同一カラムで流して、常法により決めた。Void Volume はブルーデキストランで決めた。

b). 電気泳動法 ① ディスクゲル電気泳動は、Davis (84) の方法で行なった。電解槽中の buffer は、5mM-tris - 30mM-glycine (PH 8.3) を、又、アクリルアミド濃度は、7.5%を用いた。泳動は、3mA/gel で、tracking dye である BPB が、ゲルの末端に泳動されるまで続けた。カラム1本当り約 100 $\mu$ g の蛋白をアプライした。ゲルの染色は、アミドブラック 10B で行なった。

② SDS ディスクゲル電気泳動は、Weber & Osborn (85) の方法に従った。泳動する前に、蛋白を1%

のメルカプトエタノールで 15~20時間(室温)処理した。約20μgの蛋白をカラムにアプライし、1カラム当り4mAで6時間泳動した。アクリルアミド濃度は、10%で行なった。泳動後50%のTCAで固定し、Coomassie brilliant blue (0.25%の色素を20%のTCA中にとかしたもの)で染色した。同時にゲル透過法の項であげた4種の蛋白以外に、myoglobin(17000)を、標準蛋白として泳動し、蛋白のsubunit分子量の決定を行った。

(ii)結果、 Fig. 15に、電気泳動の結果を示す。左のディスク電気泳動の場合、C<sub>V</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>とCM-Sephadexカラムであとの方に溶出されるにつれて、泳動距離が短かくなっている。C<sub>3</sub>蛋白の結果は示していないが、この場合、試料、濃縮用ゲルの中に停まったままで泳動されない。右のSDS電気泳動においては、C<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>蛋白ともに、ほぼ1つのbandのみがみられ、(C<sub>3</sub>の結果は、こゝには示していない)、しかも全て同一泳動距離を示す。 Fig. 16には、

ゲル透過法, SDS電気泳動法による分子量決定<sup>57</sup>  
定を示してある。4種の蛋白( $C_1, C_2, C_3$ )  
全て、両方法ともに、同一位置を示しており、  
少なくともこれらの方法では、分子量的な区別  
は出来ない。<sup>\*</sup> ゲル透過法では、分子量46000、  
SDS電気泳動では、25000という値が得られ、  
この事から、これら蛋白は、同一分子量(約23000~  
25000)の二つの subunit より成る事がわかる。

### 3). BSPとの結合 kinetics.

#### (i) 方法

平衡透析法-----既に述べた方法(P.31)  
によるが、使用した蛋白濃度は、すべて約 $100\mu\text{g/ml}$   
である。

<sup>\*</sup> 四種蛋白を混合して、SDS電気泳動を行ってみた  
が、1つの bandを示した。又、四種の蛋白を混合し、  
BSP存在下で行ったゲル透過の結果でも、BSP結合  
活性 patternは、ほぼ symmetricであった。

## (ii) 結果

BSP との Binding (平衡透析法)

BSP とこれら四種の蛋白との結合を平衡透析法 (4°C) で調べ、結果を Scatchard plot で示したのが、Fig. 17 である。四種の蛋白の中、 $C_1$  蛋白が約  $1.8 \times 10^7 M^{-1}$  と最も大きい結合定数を持つ事がわかった。又、 $C_0$ ,  $C_2$  蛋白も約  $3 \sim 4 \times 10^6 M^{-1}$  の結合定数を持ち、BSP に対してかなり大きな親和性のある蛋白といえるであろう。 $C_0$ ,  $C_2$ , というほぼ pure と考えられる蛋白については、分子量を 45000 と考えて、電子計算機を用い、結合の stoichiometry を調べてみた (巻末 Appendix 参照)。その結果、Table III に示す様に、両蛋白ともに  $n_1 = 1$  の時に、最も誤差平方和が小さくなった。更に、stepwise 結合定数を求めても、 $C_0$  蛋白において、 $K_1 \approx 60 K_2$ ,  $C_2$  蛋白において、 $K_1 \approx 14 K_2$  であり、これら蛋白上には、BSP に対する特異的な結合部位が、唯一個存在する事が明らかである。最も大きな結合定数を持つ  $C_1$  蛋白については、 $n_1 \approx 0.7$  が

得られる。これは、この蛋白が少なくとも SDS 電気泳動では、単一蛋白である事を考えると、おそらく、同一分子量ではあるが結合活性を持たない蛋白が混在している為と考えられる。従ってこの蛋白においても stoichiometry は、1 と考えるのが妥当であろう。C<sub>3</sub>蛋白は BSP binding において、いわゆる "Positive Cooperativity" を示している。これは、この蛋白が、subunit より成る蛋白である事を考えると興味深い。実際の機能上どんな役割を担っているかは、今の所わかりにくい。この様に、C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> 蛋白と、BSP の Primary 結合の stoichiometry は 1 である事が示されたが、一方、これら蛋白が、少なくとも分子量的には全く同一の subunit 二個より成る蛋白である事を併せ考えると、いわゆる "Half of the site reactivity" \* を示すわけに興味深い。しかしこの性質が、Koshland の提唱する四つの Mechanism \* のうち、どれに由来するかどうかについては、更に検討を要する所である。

---

\* 次頁脚注参照

\* オリゴマー酵素の中で、サブユニットの数よりも、リガントが結合できる部位の数がちょうど半分程少ないという事が知られているものがあるが、このような性質を、D.E.Koshlandら(89)は、半減的反応性 (*half of the sites reactivity*) と呼んだ。この現象が生じるメカニズムとして、下の模式図で示す4つを提唱した。

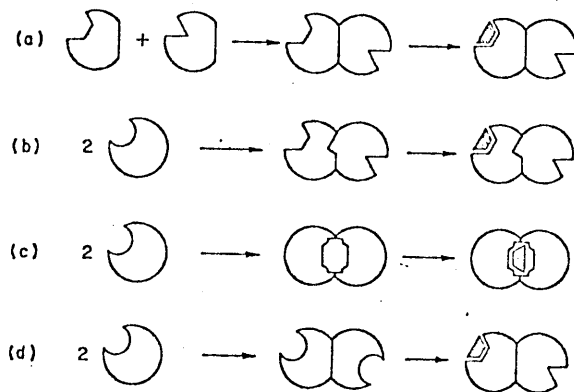


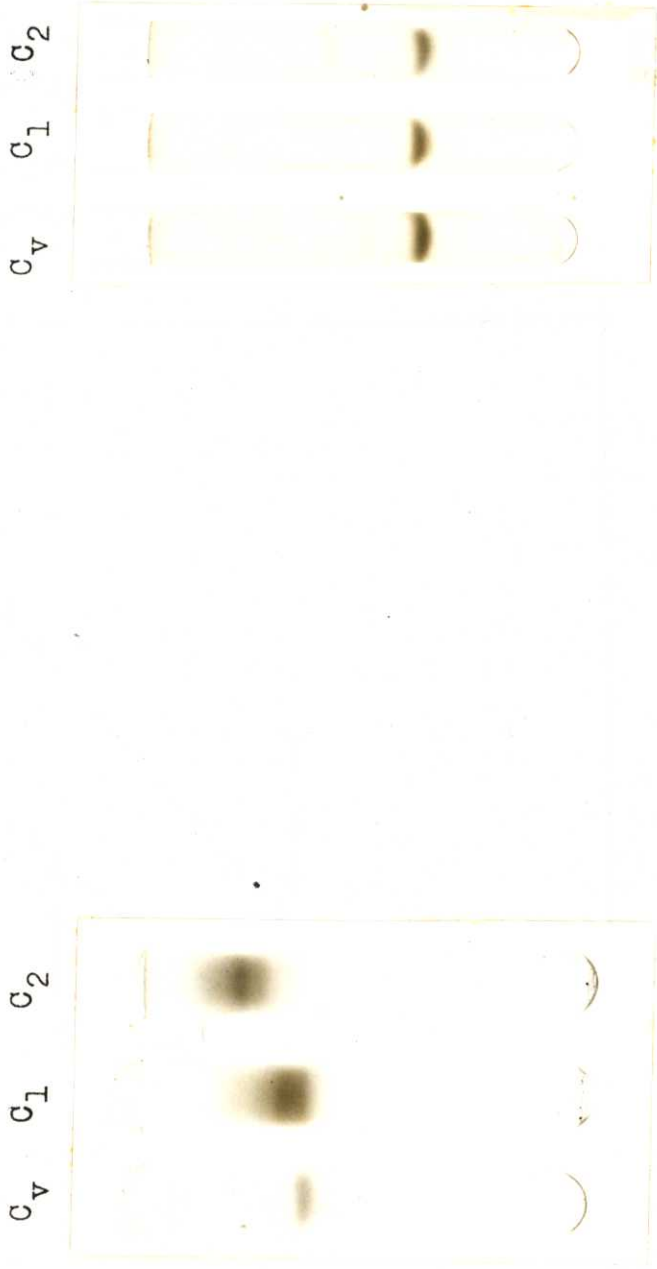
FIGURE 5: Possible sources for the half-of-the-site reactivity. (a) Nonidentical subunits with different sites. (b) Subunits are identical, but upon an asymmetric association to form a dimer one of the sites is deformed. (c) Two sites are adjacent and the first substrate molecule sterically blocks the second molecule. (d) The binding of one ligand induces a conformational change which alters the vacant site so that it cannot bind substrate.

Fig. 15

Polyacrylamide disk gel  
electrophoresis.

Tris-glycine buffer, pH 8.3.

Disk gel-electrophoresis  
in 0.1 % SDS.



F-18



$$0.301 : 1 = x : 3.7$$

$$\log (1 \times 10^4) = \varphi$$

$$\log 7 = 0$$

$$\log 2 = 0.301$$

$$3.7 : 0.301 = 1.3 : \textcircled{0}$$

$$x = 0.1058$$

$$\log x = 1.351$$

$$\therefore 0.301 : 1 =$$

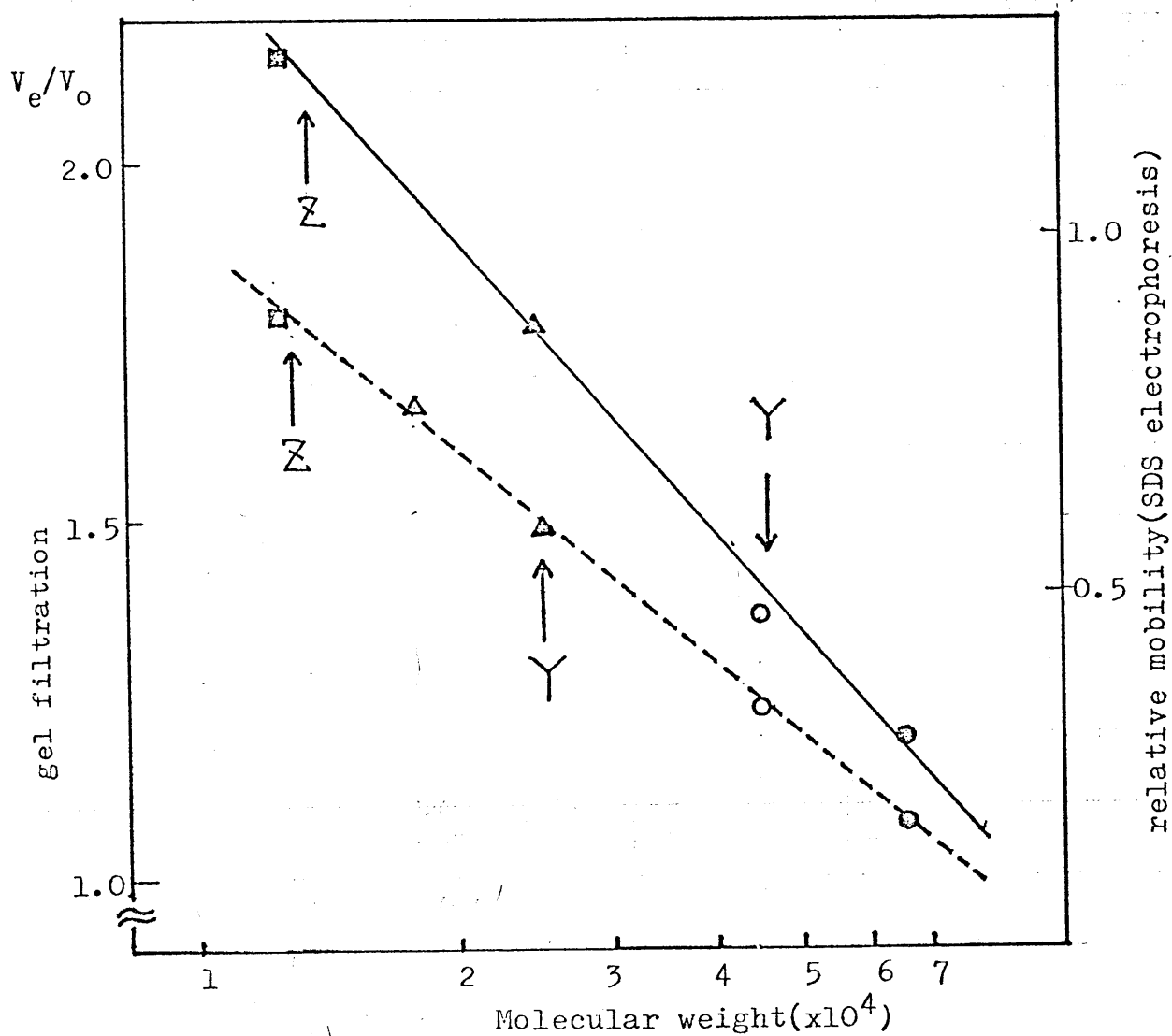
Fig.16 ESTIMATION OF MOLECULAR WEIGHT OF BINDING PROTEINS

Marker proteins

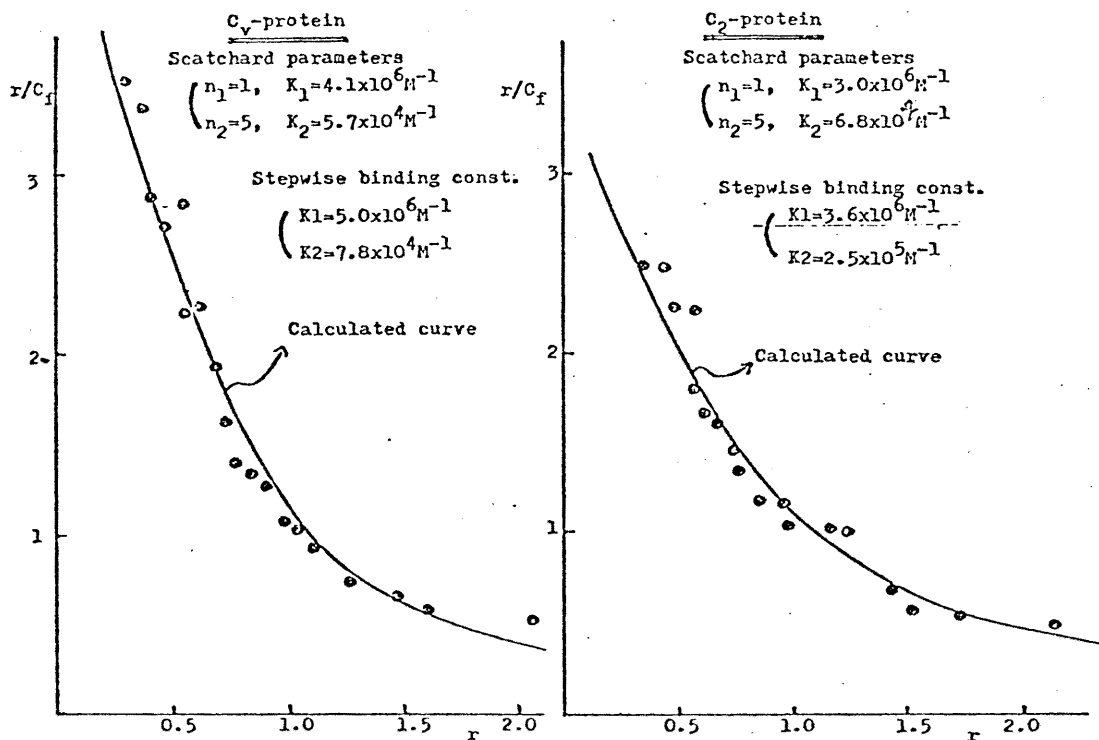
● BSA, ○ Hen egg albumin, ▲ Chymotrypsinogen,  
 △ Myoglobin, ■ Cytochrome C

— G-75 gel filtration(2.8 x 54 cm)

- - - SDS gel electrophoresis



SCATCHARD PLOT OF BSP BINDING TO PURIFIED C<sub>v</sub> & C<sub>2</sub> PROTEIN.  
 (Molecular weights of these proteins are assumed to be 45000)



SCATCHARD PLOT OF BSP BINDING TO C<sub>1</sub> & C<sub>3</sub> PROTEIN FRACTION.

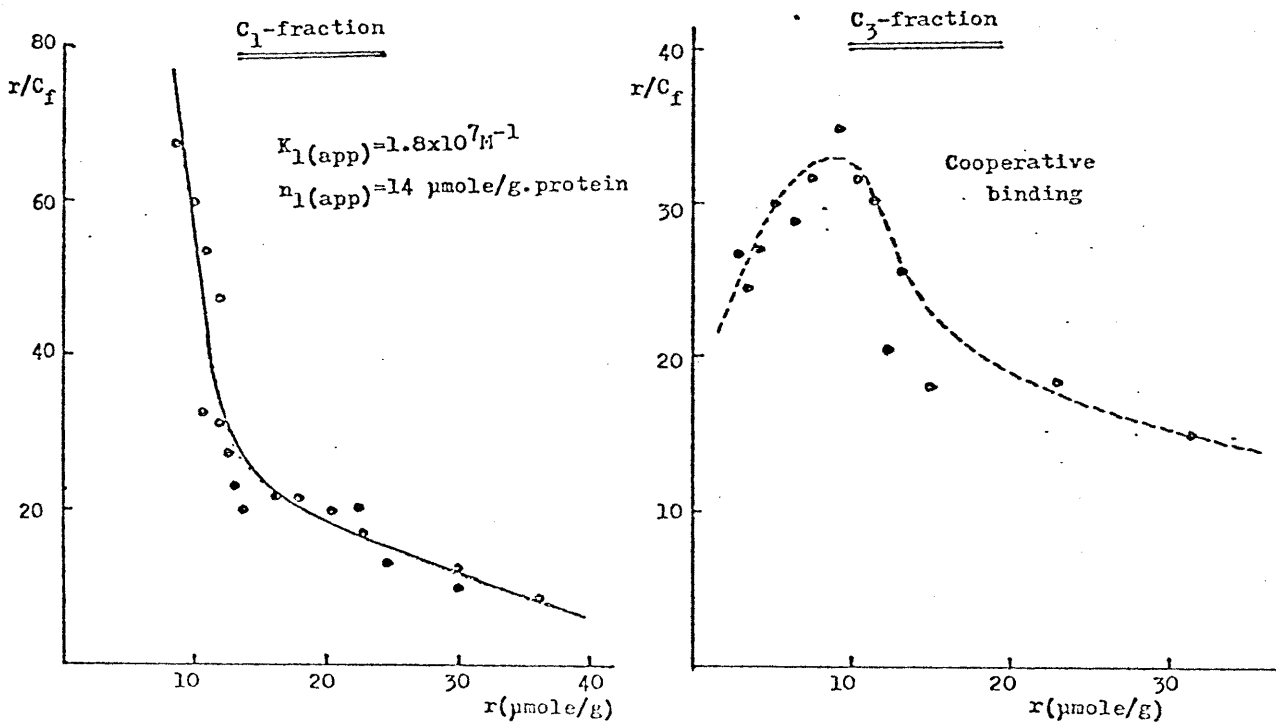


Table III ANALYSIS OF BSP BINDING TO C<sub>v</sub>-PROTEIN  
BY COMPUTER

Appendix に示した フローチャート に従って 解析した 結果を示す。

Scatchard Model

n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	K <sub>1</sub> (x10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> (x10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup> )	Sum of squares (x10 <sup>-2</sup> )	Multiple Correlation Coefficient
1	3	3.99	1.03	8.568	0.9860
2	3	1.47	0.04	38.467	0.9451
3	3	0.88	0.00	62.395	0.9648
1	4	4.04	0.73	7.053	0.9894
2	4	1.47	0.03	38.451	0.9453
3	4	0.88	0.00	62.395	0.9648
⊙ 1	5	4.08	0.57	6.240	0.9911
2	5	1.46	0.03	38.442	0.9455
3	5	0.88	0.00	62.395	0.9648

最もよくあてはまる n<sub>1</sub>=7, n<sub>2</sub>=5 での結果を次に示す。

TABLE OF CALCULATED DATA

	FREE (x10 <sup>-6</sup> M)	OBS MIU	CAL MIU
1	8.23000050E-02	2.90000000E-01	2.74572816E-01
2	1.06000016E-01	3.58000000E-01	3.31514418E-01
3	1.40999987E-01	4.04000000E-01	4.04232075E-01
4	1.70000021E-01	4.62000000E-01	4.56525213E-01
5	1.88999991E-01	5.38000000E-01	4.88526619E-01
6	2.45000024E-01	5.45000000E-01	5.67978680E-01
7	2.68999997E-01	6.11000000E-01	5.97913682E-01
8	3.51999972E-01	6.79000000E-01	6.26839581E-01
9	4.47999980E-01	7.24000000E-01	7.69643009E-01
10	5.51000028E-01	7.55000000E-01	8.42933178E-01
11	6.24999984E-01	8.40000000E-01	8.88710141E-01
12	7.11999974E-01	9.01000000E-01	9.27148631E-01
13	9.10999972E-01	9.77000000E-01	1.03264999E 00
14	1.00099987E 00	1.03200000E 00	1.07085800E 00
15	1.20200002E 00	1.10400000E 00	1.14852238E 00
16	1.71699958E 00	1.26100000E 00	1.31720257E 00
17	2.20699985E 00	1.46400000E 00	1.45438385E 00
18	2.73800015E 00	1.59100000E 00	1.58770561E 00
19	3.68000019E 00	2.06800000E 00	1.79824543E 00
20	5.87999986E 00	2.43700000E 00	2.20092921E 00

ITERATION= 5  
 SUM OF SQUARE OF DEVIATION BETWEEN CALCULATED AND OBSERVED= 6.24038242E-02  
 MULTIPLE CORRELATION COEFFICIENT= 0.99110317E-01

ADJUSTMENT OF STEPWISE BINDING PARAMETER

(SUBR. DINVI) THE GIVEN MATRIX IS SINGULAR.

PARAMETER NO.	INITIAL PARAMETER	*ADJUSTED	ADJUSTED PARAMETER	SQUARE	ROOT OF STANDARD ERROR
K 1	4.35932255E 00	**	4.40633461E 00	+	2.05777355E-01
K 2	2.71546052E-01		1.01575053E-01	+	7.62324549E-02
K 3	1.11489121E-01		4.12779342E-01	+	8.34767978E-01
K 4	5.61201839E-02		1.81534225E-01	+	5.79862438E-01
K 5	2.81367111E-02		0.00000000E-01	+	1.37285681E-01
K 6	1.12700765E-02	F	1.12700760E-02	+	0.00000000E-01

TABLE OF CALCULATED DATA

	FREE	OBS MIU	CAL MIU
1	8.23000050E-02	2.90000000E-01	2.91976213E-01
2	1.0600010E-01	3.58000000E-01	3.48358025E-01
3	1.40999997E-01	4.04000000E-01	4.19080675E-01
4	1.70000021E-01	4.62000000E-01	4.68250275E-01
5	1.98999991E-01	5.38000000E-01	4.96912599E-01
6	2.45000024E-01	5.45000000E-01	5.68869174E-01
7	2.68999997E-01	6.11000000E-01	5.95204890E-01
8	3.51999972E-01	6.79000000E-01	6.71736658E-01
9	4.47999983E-01	7.24000000E-01	7.41373522E-01
10	5.51000028E-01	7.55000000E-01	8.02302837E-01
11	6.24999984E-01	8.40000000E-01	8.40668131E-01
12	7.11999974E-01	9.01000000E-01	8.81969094E-01
13	9.10999972E-01	9.77000000E-01	9.67322528E-01
14	1.00099987E 00	1.03200000E 00	1.00368118E 00
15	1.2020002E 00	1.10400000E 00	1.08300304E 00
16	1.71699958E 00	1.26100000E 00	1.28757763E 00
17	2.20699985E 00	1.46400000E 00	1.49029922E 00
18	2.73800015E 00	1.59100000E 00	1.71361923E 00
19	3.6800019E 00	2.06800000E 00	2.09076118E 00
20	5.87999966E 00	2.43700000E 00	2.75072479E 00

\* Scatterband binding constant F1 訂算した Stepwise binding constant. この値を初期値にして、収束値を求めろ。  
 \*\* Fは、収束した場合、Fは、収束しない場合

ITERATION=200  
 SUM OF SQUARE OF DEVIATION BETWEEN CALCULATED AND OBSERVED= 1.67356841E-02  
 MULTIPLE CORRELATION COEFFICIENT= 9.96181667E-01

## 4). 精製まとめ

分離精製各ステップ後のサンプルについて、BSP結合を結合を比較した。結果をFig. 18に Scatchard plotで示している。Y(平均結合率)の小さい部分を使いその直線より primaryな結合部位へのみかけ上の結合定数  $K_1$  と、結合部位の数  $n_1$  を求めた。その結果、どのステップにおいても、みかけ上の  $K_1$  は変わらない事がわかる。この事は、おそらく、肝上清  $\rightarrow C_1$  と精製が進むにつれて、離れるであろう Cofactor (金属塩、その他の低分子) 等の影響をBSP結合がうけない事、更には、精製に伴うこの primaryな結合部位の性質の変化がおこらない事を示すものであろう。又、table IVには、Y-蛋白群の精製 table を示してある。一般に酵素等の精製における“比活性”をみる時は、一定基質濃度(ふつうは過剰量)での酵素活性を測定する。しかし、この結合蛋白の場合は、Fig. 18の Scatchard plot をみてもわかるように、必ずしも単一蛋白が結合活性を持っているわけではなく、結合 affinity

の異なる種々の蛋白(或いは部位)からなる系である。この中から、特異的結合蛋白(部位)に着目して、活性の上昇をみる必要がある。この爲に基質濃度を変化させて、結合を調べ、BSPに対して High affinity の結合部位のみを抽出した。即ち、scatchard plot の X 切片より得られた  $n_1$  値(みかけ上の結合部位の数)が High affinity site に関するいわゆる“比活性”に相当するものと考えられる。この様にして、table IV は作成した。肝上清から C<sub>1</sub> 蛋白へと約 5 倍の比活性の上昇がみられる。

### 5). 精製蛋白と BSP, RB との結合 —— PH, イオン強度の影響.

#### (i) 方法

#### a) BSP binding, トリプトファンけい光に及ぼす PH の影響

BSP binding の PH 効果は、Buffer を用いて調べた。PH 3 ~ PH 5.8 の範囲は、0.05M

Fig. 18

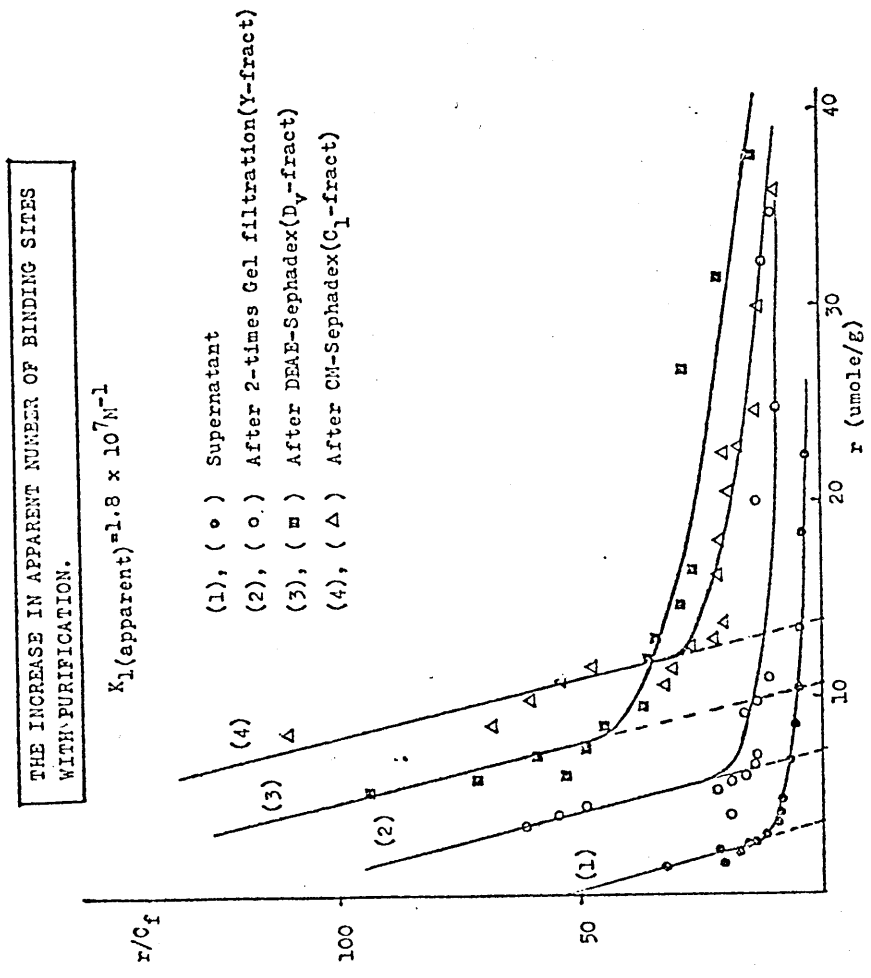




Table IV

PURIFICATION OF ORGANIC ANION BINDING PROTEIN IN Y-fraction.

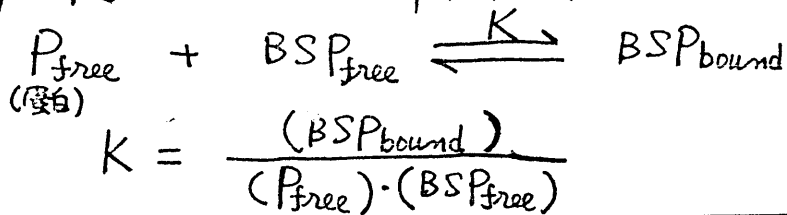
Fraction	Total 1) protein (mg)	Num. specific 2) binding site (umole BSP/mg)	Yield (%)	Binding constant ( $\times 10^6 M^{-1}$ )
Supernatant	2650	3.0	100	
G-75 Gel-Fil (Y-fract)	155	6.8	13	
DEAE-Sephadex (D <sub>y</sub> -fract)	83	10.0	10	18
CM-Sephadex pool				
C <sub>1</sub>	11	14.0	1.9	
C <sub>1</sub>	20	22.0		4.0
C <sub>2</sub>	7	20.0		3.5
C <sub>3</sub>	10	22.0		2.7 *

1) Determined by the Lowry method

2) Measured by a equilibrium dialysis

\* Positive cooperative binding

$\text{CH}_3\text{COOH}-\text{CH}_3\text{COONa}$  buffer,  
 PH 6.7~PH 9.8の範囲は, 0.05M tris HCl buffer,  
 PH 10.8~PH 11.5の範囲は, 0.05M  $\text{Na}_2\text{CO}_3-\text{NaHCO}_3$   
 buffer を用いた。方法は, 平衡透析法(P31  
 参照)を用いた。37 $\mu\text{M}$ の蛋白溶液(CV, C1  
 蛋白)を調整し, その100 $\mu\text{l}$ をとり, 所定のbuffer  
 3mlで希釈をし, 平衡透析セルのコンパートメン  
 トII (P33参照)に入れる。又, コンパートメントIに  
 は, 300 $\mu\text{M}$ のBSP 10 $\mu\text{l}$ と, 所定のbuffer  
 3mlを入れた。平衡後, 両コンパートメント  
 中のBSP濃度を, アルカリ化する事によって,  
 定量する。\*このdataより, 結合定数(K)の計算は  
 次の様に行った。次の平衡式を考える。



\* PH 7.4の条件であると, 前述の様に, コンパートメントI  
 のみの定量でよいのだが, PHが下がると, 膜への吸着  
 が多くなり, 両コンパートメントの定量が必要となる。例えば,  
 PH 5.3で10%, PH 4.2で15%, PH 3.5で20%が膜に吸着する。

後に述べる様に、PHが変化しても、 $n=1$ と考えるも  
よいとすると、 $(P_{free}) = (P_{initial}) - (BSP_{bound})$   
であるから、

$$K = \frac{(BSP_{bound})}{\{(P_{initial}) - (BSP_{bound})\} \cdot (BSP_{free})}$$

より計算できる。

本実験においては、

$$(P_{initial}) = 1.2 \mu M, \text{又、 } BSP_{bound}, BSP_{free}$$

は、定量の結果求まる値である。

蛋白中のトリプトファンのけい光は、蛋白濃度と  
して  $0.8 \mu M$  (in  $0.05M$  tris-Hcl buffer) の  
ものに、 $0.1N$ -Hcl, 或いは  $1N$ -NaOHを滴定  
してゆき PHを変化させて測定した。

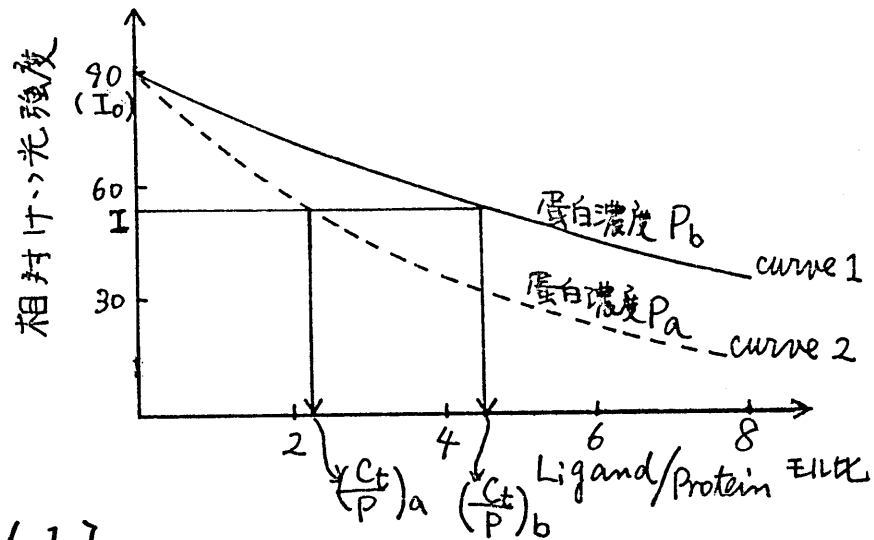
標準として、PH 7.4の蛋白を用い、けい光強度  
90にセットして測定した。励起波長  $275nm$ ,  
けい光波長  $350nm$  で測定をし、けい光側に、  
フィルター No29 をそう入する。この実験は、buffer  
を用いる事により PHを変化させても行って見たが  
ほぼ同様の結果が得られた。

## Ⓒ) 蛋白中トリプトファンのけい光消光法による結合解析法

CV及びC<sub>1</sub>蛋白を用いて、BSP<sub>1</sub>への結合を、けい光法で調べた(室温)。実験法は、P.39で述べた様に、titration法によった。即ち、一定濃度の蛋白溶液\*(0.28 $\mu$ M or 1.4 $\mu$ M) 3ml中には、BSP溶液(100 $\mu$ M or 500 $\mu$ M)を、マイクロシリンジで titrate してゆく(2 $\mu$ l $\sim$ 40 $\mu$ l)。290nmで励起して、330nmでのけい光を測定する。けい光側にフィルター No.29を使用する。このけい光は、主に蛋白中のトリプトファンに由来する蛋白固有のものであるが、BSPが結合すると消光をおこす。この現象を利用して、結合の強さを調べた。まず、横軸に、BSP濃度/蛋白濃度を取り、縦軸に相対けい光強度をとって\*\*プロットする。この時、BSPの存在しない蛋白のみのけい光強度を一定値(例えば90)にセットする。この様な実験で得られる結果の概念図を次頁

\* 実験前に、0.22 $\mu$ Mのトリポアフィルターを通して、ごみを取りのぞく  
 \*\* 必要ならば、内部口過効果の補正を行なう。

に示す。



[Method 1]

もしも、けい光の減少割合と、蛋白の結合の割合との間の関係が蛋白濃度によらない<sup>\*</sup>という仮定が成立するならば、上図において、次式が成立するはずである(86)。

$$r = \frac{(C_t/p)_a - \frac{P_b}{P_a} \cdot (C_t/p)_b}{1 - \frac{P_b}{P_a}} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$C_f = \frac{P_a \cdot P_b}{P_a - P_b} [(C_t/p)_b - (C_t/p)_a] \quad \text{Eq. (2)}$$

<sup>\*</sup> わかりやすく述べると、例えば「10 $\mu$ Mの蛋白のうち3 $\mu$ Mの蛋白が結合した時に、けい光が10%減少したとするならば、1 $\mu$ Mの蛋白のうち0.3 $\mu$ Mの蛋白が結合しても同様に、けい光が10%減少する」という仮定。

ここで、 $r$  は平均結合率  $C_f$  は、遊離型薬物濃度である。各けい光強度  $I$  の大きさに対応して、 $\epsilon_g(1)$  と  $\epsilon_g(2)$  より、 $C_f, r$  が求まる事になる。この様にして、蛋白濃度の異なる場合の二つの curve を解析する事により、いく組かの  $C_f, r$  が求まり、Scatchard plot による解析が可能となる。

### [Method 2]

Ketlay ら (87) は、けい光 quenching の data から、次の様に簡便に結合 affinity が求まると述べている。即ち、けい光変化の割合 (前頁の図における  $(I_0 - I)/I_0$ ) の逆数と、Ligand 濃度の逆数をプロットし、 $x$  切片の逆数より、解離定数  $K_D$  を求める。この場合、勿論、蛋白に比べて、過剰量の基質が存在している事が必要\*であるので、低濃度蛋白の条件 (この場合  $0.28 \mu M$ ) での data を用い、計算した。

\* 即ち、加えた ligand 濃度  $\approx$  遊離型 ligand 濃度

## (ii) 結果

a). BSP. binding 及びトリプトファン  
けい光に及ぼす PH の効果

これら精製蛋白質群のうち、C<sub>v</sub>, C<sub>1</sub> 蛋白質を用いて、その BSP への結合に及ぼす PH の影響を調べた。同時に蛋白質中のトリプトファンのけい光に及ぼす PH の効果も調べた結果を Fig. 19 に示す。BSP 結合もトリプトファンけい光も共に、両蛋白質は非常に似た PH-profile を示す事がわかる。PH が 6 より下り始めると、BSP 結合が急上昇しはじめ、PH 4.5 で最大結合を示した。又、トリプトファンのけい光も、BSP 結合同様、PH 6 を境にして上昇する。一般的に蛋白質中のトリプトファンのけい光は、それが疎水域に存在するのかわ、或いは水に接しているのかわという事、又、まわりの種々のアミノ酸残基によって消光<sup>\*</sup>されているかどうか等によって変化する (88)。即ち

\* トリプトファン基が消光される状態としては、次の4つの場合が考えられる。①水和したペプチドのカルボニル基によって消光を受ける。②ジスルフィド基により消光される。③イオン化したチロシン残基によって消光される。④塩基性アミノ酸残基との電荷移動相互作用により消光される。

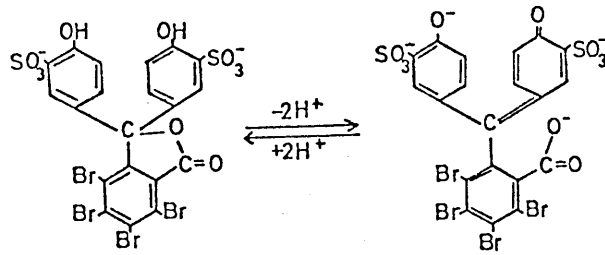
けい光強度(量子収率), 最大波長の違いは, トリプトファンが存在するミクロ環境の違いの反映と考えられる。このような観点から, トリプトファンのけい光の PH-profile をみたわけである。PHがより低下するに従ってのけい光増加は, 先ほど示した消光作用を持つ各種アミノ酸残基との距離を遠くするような Conformation 変化がおこったのではないかと想像される。Fig. 中には示していないが, 最大波長( $\lambda_{max}$ )はPH4.2~9では, 330nmに存在しており, PH4以下になると, 334nmへと shift した。このような変化は, しばしばトリプトファン残基の存在する疎水性と関連づけられる(88)。即ち, PH4以下になると, 第2の Conformation 変化が生じ, トリプトファン残基が疎水域から溶媒に接する様になった為であろう\*。トリプトファンの

\*血清アルブミンは, PH4付近でいわゆる N→F 転移という有名な Conformation 変化を起こす事が知られているが, この際, トリプトファンのけい光最大波長は大きく減少し, 又, けい光強度の減少もみられる。最大波長の減少は, より剛硬な形になった F 型では, トリプトファン残基がフレキシブルとなり疎水域に引き込まれたと解釈されている(89)。



けい光変化と、平衡透析で測定した BSP 結合の pH-profile を比べる事により、けい光強度の増加で示される牙 I の Conformation 変化 (<PH6) により BSP 結合の大きな増加が生じ、けい光最大波長の長波長 shift で示される牙 II の Conformation 変化 (<PH4) により、再び BSP 結合活性が低下するのではないかと想像できる。勿論、PH6 以下の結合増加は、蛋白中のカルボキシル基の protonation によって、結合部位への接近が容易になった (即ち、PHが6以上では、COO<sup>-</sup>が結合部位の近辺に存在している為、BSP の結合が邪魔されていた)。と云う事も否定しきれない。

アルカリ側 (>PH8) でのけい光減少は、普通の蛋白でかなり一般的にみられる現象であるが、これは、おそらく、チロシン残基の OH の解離により、トリプトファン → チロシン<sup>⊖</sup> への energy transfer がおきやすくなる為と考えられる (88)。BSP 結合も PH7.4 以上で減少する。これは、BSP 自身の解離と関連づけられるだろう。即ち、BSP は次の様な解離をする。(次頁の図に示す)



Formula 1. Structure of bromosulphophthalein. In acidic solution bromosulphophthalein has two anionic charges. The opening of the lactonic ring in alkaline solution ( $pK=8.5$ ) brings about two more charges

図でわかるように BSP のラクトン ring の開裂 ( $pK=8.5$ ) によって, negative charge が 2 個ふえる。この configuration の変化、或いは、電荷の変化によって結合が起きにくくなったのであろう。

Kamisaka らは、Ligandin とビリルビンの結合において生じる CD スペクトルの ellipticity の大きさより、この結合における至適 pH は約 7.5 であり、pH 6 以下、pH 10 以上では、ほとんど結合がおこらないと述べている(90)。しかし、この方法でとらえられたものが、結合の大小であるのか、或いは、結合した Ligand による Conformation change の大小であるかを明らかにしていない。従って、我々の結果との違い

が、どのような原因によっているかは、更に検討を要するであろう。

b) けい光消光法によるBSP結合解析及び、PH, イオン強度の影響

BSPとCv, CL蛋白との結合のpH-profileより、PHがより下るにつれてBSP結合が増加する事が見出された。この結合をより詳細に調べる為に、微量の蛋白の使用で実験が可能な“蛋白中のトリプトファン”のけい光消光法を用いた。Fig. 20に、Cv蛋白を用いて、BSPとの結合を、PH 6.0, PH 7.4, PH 8.9で調べた結果を示している。

Fig. 20-1は、Method 2による解析結果を、Fig. 20-2はMethod 1による解析結果を、Scatchard Plotで示している。PHが低くなるにつれて、両Methodより算出した結合定数Kの違いが著しくなる。これは、PHが下るにつれ、結合 affinity が強くなる為に加えた、BSPのうち結合型の割合が増えて、Method 2を用いる前提条件である“加えたLigand濃度

— 遊離型 Ligand 濃度”が成立しなくなった為と考えられる。従って、一般的には Method 1 の結果で Discussion をする方が better と考えられるが、実験目的によっては Method 2 でも充分であろう(例えば、単に結合強さを定性的に比較する場合や、前提条件が成立していると思われる場合での解析)。

さて、Method 1 の結果をみると、 $K_1$  は、このいずれの PH 条件でも、1.0 ~ 1.3 であるが、 $K_2$  は、PH 8.9 で  $1 \times 10^6 M^{-1}$  であったものが、PH 6.0 で  $12 \times 10^6 M^{-1}$  と約 12 倍に増加している。PH 7.4 での結合パラメーターを、平衡透析による結果 (Fig. 17) と比較すると、ほぼ一致し、この方法の正当性をいえるものと思う。平衡透析法によってほぼ最大の結合を示すと思われた PH 4.7 の条件でも、同様の実験を行ってみたが、解析不可能であった。<sup>\*</sup> 即ち、脚注<sup>\*</sup>の図にあるように、蛋白のうど  $0.28 \mu M$  と、 $14 \mu M$  の条件での quenching curve が一致した為である。

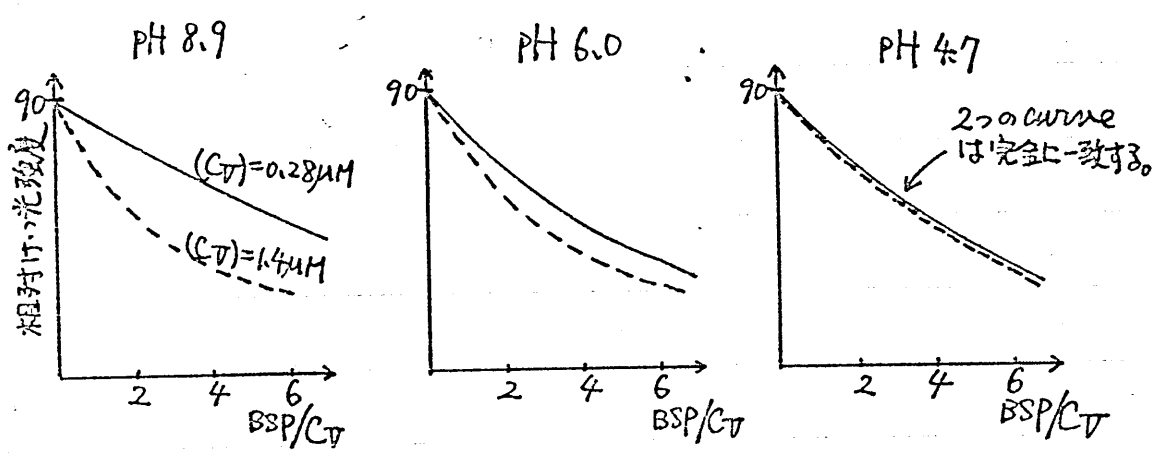
これは、この条件では解析困難な程結合

(<sup>\*</sup>次頁参照)

定数が大きい急であるか (おそらく  $K > 1 \times 10^8 M^{-1}$ )  
 或いは、前に述べた仮定 (P 66 脚注参照) が  
 成立しなくなったかのいずれかであろうが、事実  
 PH 4.7での平衡透析の結果 (Fig. 19) より、結  
 合が非常に大きい事を考えると、前者の原因と  
 みなすのが妥当であろう。

PHが低下しても  $\theta$  の値は変化しないであろ  
 うという事が Fig. 20より見当つけられたの  
 で、この仮定のもとに、Fig. 19の平衡透析の  
 dataより計算した結合定数 (対数で表現) を  
 縦軸にとりなおして plot したのが、Fig. 21-1  
 である。Method 1の結果も、ほぼこの PH-  
 Profile 上にある。PH 4.1では、約  $4 \times 10^8 M^{-1}$  と

\* 下記の plot は、P66の概念図に相当する。



いう非常に大きな結合定数が得られる。次に、PH 7.4 の条件でイオン強度の影響をみたのが、Fig. 21-スである。イオン強度が増加するにつれて結合定数(K)が低下し、2M NaCl 存在下では、約半になる事がわかる。この事は、おそらく、この結合が主にイオンの力によっている事を示唆していると思われる。これは、ANSを用いて推論した結果(P44~45)ともよくあっている。

### C) RB binding 及び GSH の影響

Ketley ら(87)により、Ligandin (Glutathione S-transferase B) と IC $\alpha$  の結合の解離定数(K<sub>d</sub>)は、13 $\mu$ M であり、1mM の GSH 存在下で K<sub>d</sub> は 2.8 $\mu$ M となる事がいわれている。又、GSH の代わりに、dithiothreitol を用いても、K<sub>d</sub> は 2.6 $\mu$ M である事から Ligandin と IC $\alpha$  の結合に必要なものは、特に GSH に限るというわけではなくて、mercaptan であろうと述べている。私も、この事を調べる為に、CV 蛋白と RB の結合を調べた\*。Fig. 22-1 には、Method 1

\* CV 蛋白も、Glutathione S-transferase 活性を持ち、GSH 存在下では、BSP を結合する為に使う事が出来なかった。

によって得た結果を Scatchard Plot で示した。  $n=1.1$  と、 BSP の場合と同じ Stoichiometry が得られた。  $K=1 \times 10^7 M^{-1}$  であった。そこで  $1 mM$  の GSH 存在下で、結合がどう変化するかを、調べたのが Fig. 22-2 である。 Method 2 による結果を示した。むしろ  $1 mM$  GSH 存在下では、結合が低下する傾向がみられた (結合定数にして約  $\frac{1}{2}$  になる)。又、この現象が、mercaptan 一般にみられるのかを調べる為に、メルカプトエタノール  $1 mM$  存在下で同様の実験を行ってみたが、何も存在しない条件での結果と全く同じであった。即ちこの現象は、GSH に特有の作用である。この様に Ketley ら (87) が、Ligandin, ICG の系で調べた結果とは、逆の現象がみられたが、この原因が Ligandin と、CV 蛋白の違いによるものかどうかは、更に検討を要する所である。

## 6). 考察

今回の実験によって、少くとも四種類の分子量的に同一の、 $\gamma$ -subunit より成る蛋白 (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>) の存在が明らかになり、しかもいずれの蛋白も BSP に対して高い親和性 ( $K = (3 \sim 15) \times 10^6 M^{-1}$ ) を持っていた。一方、Arias らは、 $\gamma$ -分画の中で Ligandin のみが BSP 結合にあずかっている事を次の様な事実より示している (27, 28)\*。即ち、セファデックス G-75 により分取した。 $\gamma$ -分画中に、Anti-Ligandin IgG を入れ、生じた沈殿を遠心によって除き、その上清に BSP を加え、再びゲルコロムをすると、もとの  $\gamma$ -分画の位置には、BSP

\*

Fleischner, G.  
et al. (28) より,

ここで、Anti- $\gamma$  IgG は  
Anti-Ligandin IgG  
のことをいっている

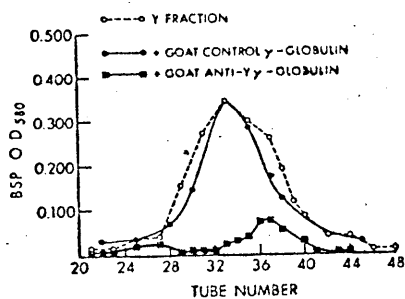


FIGURE 4 Inhibition of the BSP-binding by anti-Y IgG is demonstrated. BSP-binding by Y fraction (5.72 mg/ml),  $\circ$ --- $\circ$ ; BSP-binding by Y+anti-Y IgG (21 mg/ml)  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , and BSP-binding by Y and normal IgG (24 mg/ml)  $\bullet$ — $\bullet$ .



結合活性はみられなかった。又、生じた沈殿を、  
SDSによって可溶化し、SDS電気泳動を行った所、  
Ligandin と同一位置に泳動された。この事より  
彼らは、Anti-Ligandin IgG と反応した蛋白は、確  
かに Ligandin であり、かつ、Ligandin のな  
くなった反応後の上清は、BSP binding 力の無  
くなった事より、Ligandin のみが唯一の結合蛋白で  
ある事を示した。この様な彼らの結果との違いは  
どうして生じたのであろうか？ 又、彼らのいう  
Ligandin は、今回の四種の蛋白のうち、どれに相  
当するのだろうか？ 後者の疑問については、断  
定的な事は云えないが、一応 C<sub>3</sub>蛋白だろうと考  
えている。即ち、Kiroch, Kamisaka ら (30, 43) は、  
Ligandin を精製するのに、ゲルろ過法の他に  
TEAE-セルロース (pH 8.8, 10mM Tris) を用い、その  
未吸着部分を用いているが、この事より、Ligandin  
は、最も塩基性の蛋白である可能性が強い。  
この性質は、CM-Sephadex の溶出からいえば、最も  
後に溶出されるものであろう。この観測からい  
えば C<sub>3</sub>蛋白に相当するのではないかと思われ  
る。この

事は、Ligandin の  $pK_1$  が <sup>約</sup> 8.9 (30,44,50) である事、  
 又、Fig. 15 で即ち述べた様に PH 8.3 buffer 中  
 の条件での電気泳動において、 $C_3$  蛋白のみが、  
 泳動しなかった(試料濃縮用ゲル中に停まる)事よりも  
 妥当と考えられる\*。しかしこの点に関しては、あいま  
 いな実も多いので、今後の同定が必要である。

前者の疑問、即ち、Arias group との不一致  
 の原因については、いくつかの可能性が考えられる。

(1). 彼らの作った Anti-Ligandin に対して、他の  
 蛋白(例えば、私のいう  $C_V, C_1, C_2$  等)が、Cross  
 reaction をする可能性 → 彼らは、この抗  
 原、抗体反応の特異性をいう為、沈殿を SDS  
 電気泳動にかけて調べているが、相手が私の  
 $C_V, C_1, C_2, C_3$  蛋白の様に、SDS 電気泳動では  
 同一位置に泳動される蛋白の場合は、特異性の  
 証明になり得ない。この事をはっきりと証明する為  
 には、Ligandin の抗体を作製し、\* これら四種の  
 蛋白と反応させてみる必要があるが、今後の問  
 題である。

\* 次頁脚注参照,

(2). 蛋白の分離精製中に, Ligandinが何らかの  
変化をうけて, この四種の蛋白への多様性を生じた.  
可能性 → この様な多様性蛋白群が, 真の  
意味のアイソザイム (即ち, 遺伝子レベルで生じた  
場合) であるのか, 或いは, 抽出・精製中の  
人工産物によるものかを区別する事は大変に  
難しい。しかしながら, freshな肝臓をとって  
すばやくゲル口過をかけたγ-分画中にも disk  
ゲル電気泳動で, C<sub>v</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> 蛋白の存在が認  
められる事。又, しばしば脱アミド化による多様  
性を産む原因といわれている(91)凍結融解  
をさける意に, 凍結乾燥の代りに, 限外口過  
を濃縮法として用い迅速に分離してみたが,  
やはり, CM-sephadex 多様性がみられた事

\* この目的の為に, Kirsch, Kamisaka らの方法  
(30, 43) で, Ligandin の精製を追試したが, 我々の  
研究室では成功しなかった (即ち, これだけの手段では,  
単一蛋白が得られなかった)。これは, 精製各 step に  
おける活性を有する分画を取るのに, 彼らは, Anti-  
Ligandin を使っている事と考えられる。

などから、単なる artifact とは考えにくい。

最近、Habig らは、(51, 92) ラット及び人の肝上清より、Glutathione S-transferase 群を分離し、この多様性を述べると共に、その中の Glutathione S-transferase B が Ligandin と同一であることを示している (52)。そして、この多様性について種々検討した結果 Robinson によっていわれているように (93) ナトクロールや、rabbit muscle aldolase にみられる様な、in vivo における蛋白の aging の結果おこる脱アミド化によるものではないかと推定している (92)。

私の分離した蛋白群が、Ligandin の microheterogeneity によって生じたものか、或いは、

Glutathione S-transferase 群のように免疫性の異なる蛋白群であるのか、また不明な点が多々ある。しかしながら、Arias グループが述べるように (38, 28, 27, 30),  $\gamma$ -画 (Mw 46000 の画) で BSP 結合活性を持つ唯一の蛋白 (少くとも全活性の 80% 以上を担う)

が、Ligandin であり、しかも、これが、アクリル  
アミドゲル電気泳動法、SDS 電気泳動法、等  
電点分画法などの手段で、single component で  
あったという報告には、懐疑的にならざるを得ない。もともと有機アニオン(BSP, bilirubin) 結合活性を持つ蛋白として見つけられた  
Ligandin を、BSP 結合活性をマルクマール  
として精製していった私の結果は、同一分子  
量の4種の蛋白の存在を明らかにしたが、  
1978に述べた免疫法によるFleischner ら(28)  
の結果と、あい入れる事のできる解釈は、  
“私達の蛋白(C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>)が、ligandin の  
heterogeneity によるものであって、全て、Anti-  
Ligandin IgG<sub>1</sub>に対して反応する事が出来る”  
という事であろう。最近、Listowski ら(93)  
による ligandin を1M urea 中で等電点分  
画すると、PI 7.3 ~ 10.3 までの6種の蛋白に  
分離されたという報告や、Ketterer ら(94)  
による、アミノアザ色素を結合した Ligandin  
を CM-Sephadex カラムに通すと、3つの

ピークにわかれたという報告の様に、上述の推察を支持する結果が出されているが、更に詳細な検討を要すると思われる。

Fig. 19

PH DEPENDENCY OF PROTEIN FLUORESCENCE AND BSP BINDING

(BSP)<sub>t</sub> = 1.0 μM  
(Protein)<sub>t</sub> = 1.2 μM

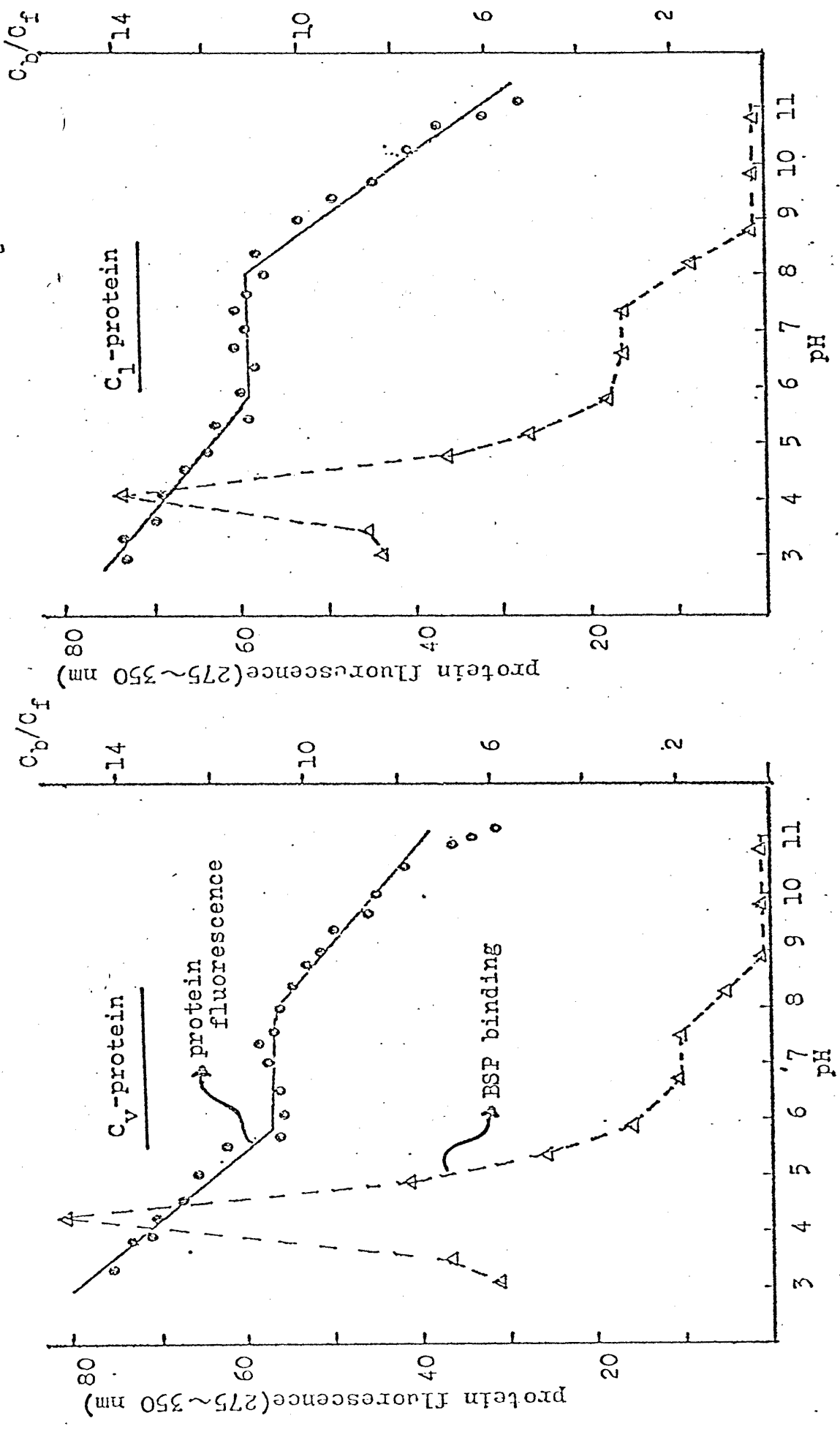


Fig. 20-2

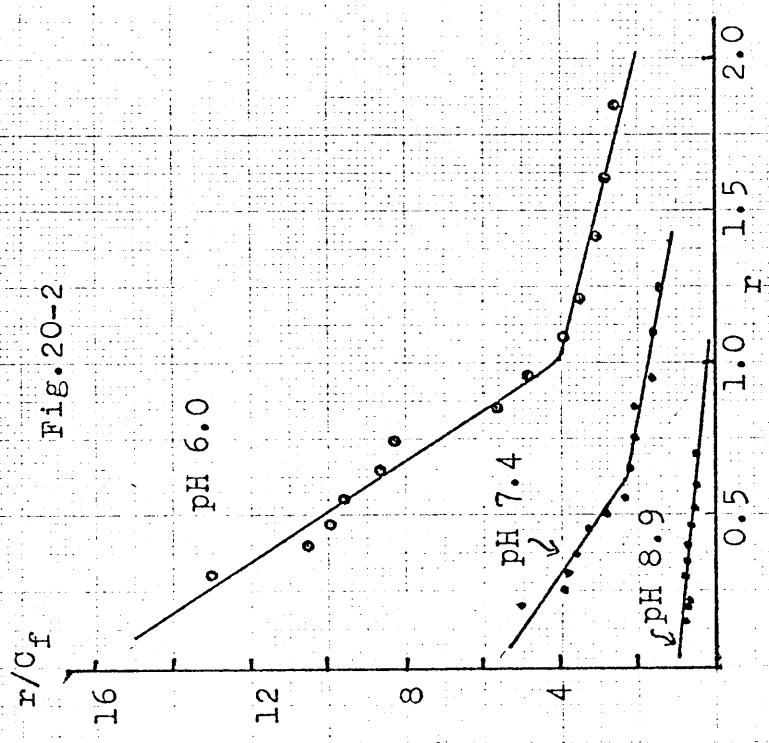


Fig. 20-1

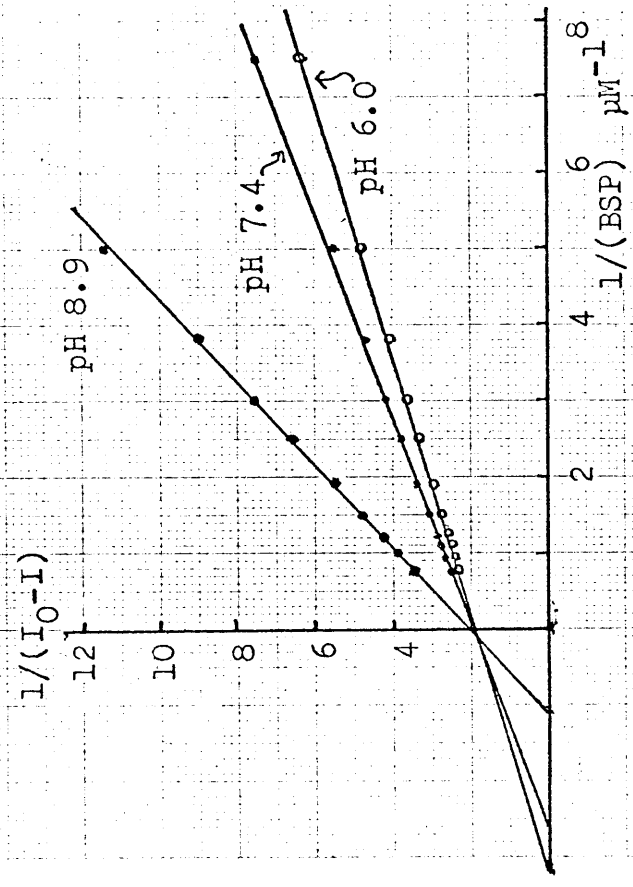


Fig. 20 COMPARISON OF BSP BINDING CONSTANTS TO C<sub>v</sub>-protein BETWEEN TWO METHODS BASED ON THE QUENCHING OF INTRINSIC FLUORESCENCE OF TRYPTOPHAN

20-1 Method 2

$(C_v) = 0.28 \mu M$

Binding constant (K)	
pH 8.9	$K = 1 \times 10^6 M^{-1}$
pH 7.4	$K = 2.5 \times 10^6 M^{-1}$
pH 6.0	$K = 3.0 \times 10^6 M^{-1}$

20-2 Method 1

$(C_v) = 0.28 \mu M, 1.4 \mu M$

Binding constant (K)	
pH 8.9	$K = 1 \times 10^6 M^{-1}$
pH 7.4	$K = 5.5 \times 10^6 M^{-1}$
pH 6.0	$K = 1.2 \times 10^7 M^{-1}$



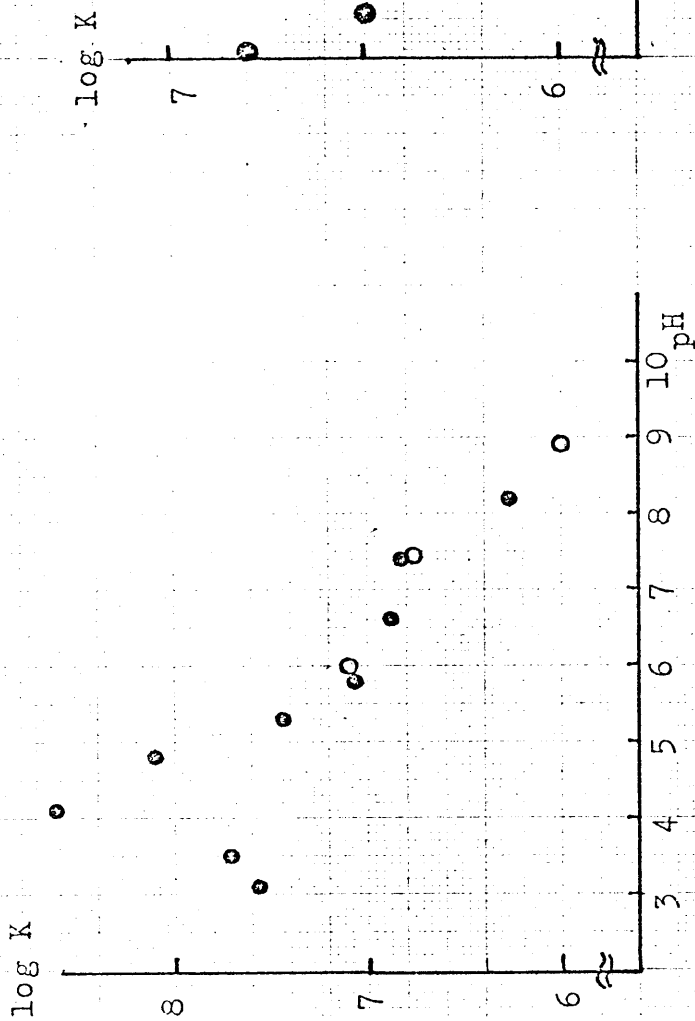


Fig. 21 EFFECT OF pH AND IONIC STRENGTH ON BSP BINDING TO C<sub>V</sub>-protein

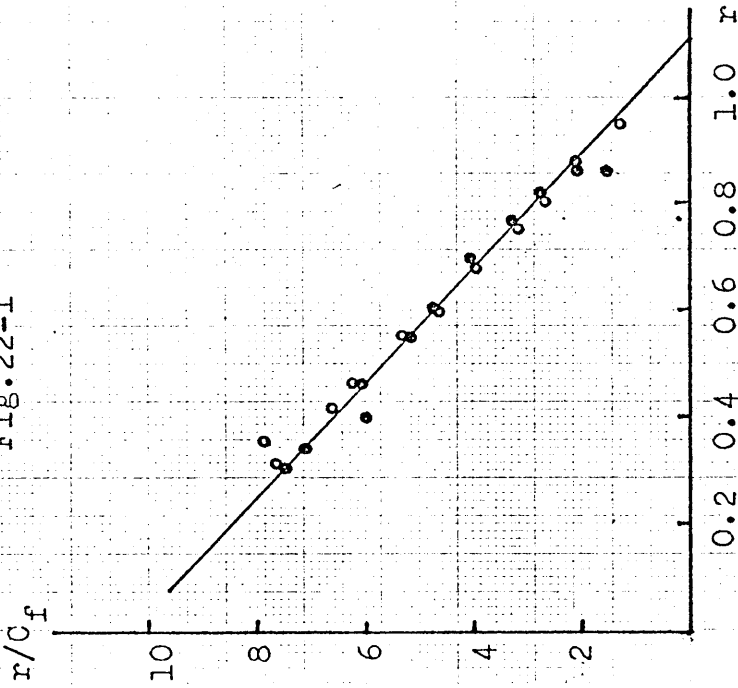
21-1 Effect of pH

- by equilibrium dialysis  
(C<sub>V</sub>)=1.2 μM, (BSP)=1.0 μM
- by fluorescence method (Method 1)  
(C<sub>V</sub>)=0.28 μM, 1.4 μM

21-2 Effect of ionic strength

- by equilibrium dialysis  
(C<sub>V</sub>)=1.2 μM, (BSP)=1.0 μM

Fig. 22-1



22-1 Scatchard plot (by Method 1)

- $(C_V) = 1.54 \mu\text{M}, 0.22 \mu\text{M}$
- $(C_V) = 3.07 \mu\text{M}, 0.22 \mu\text{M}$

Fig. 22-2

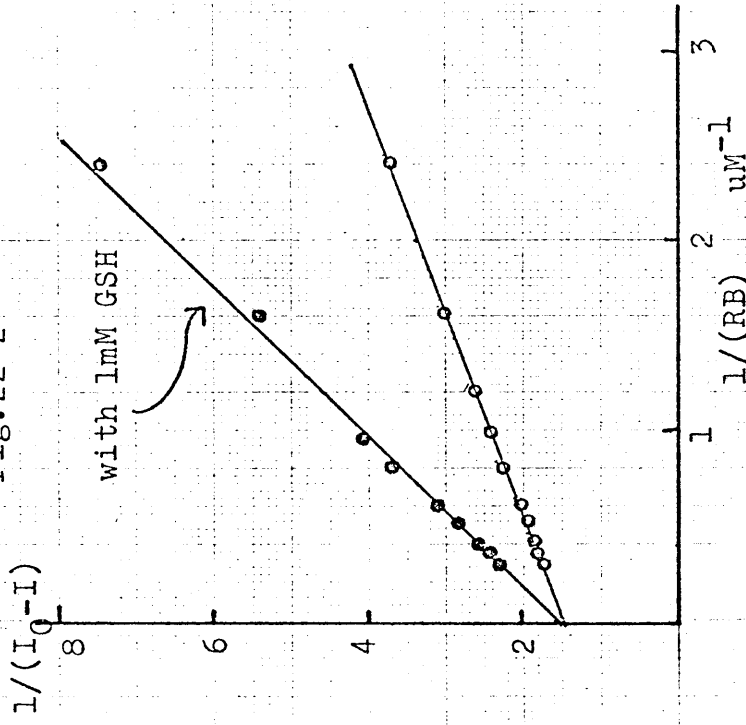


Fig. 22 Rose-bengal BINDING TO  $C_V$ -protein AND GSH EFFECT ON IT

22-2 GSH effect (by Method 2)

$(C_V) = 0.77 \mu\text{M}$

### 3. $\alpha$ -蛋白の分離・精製及びその性質.

$\alpha$ 蛋白についてすでにいくつかの性質を述べたが、最も大きな特徴は、“ANSと結合して出す”  
 けい光の量子収率は、 $\alpha$ 、 $\gamma$ -分画のそれの、約8倍  
 である。という事である。しかも $\alpha$ 上のANS結合  
 部位を、BSPが競合するので、ANSのけい光強度  
 増加として扱えられる $\alpha$ とANSの binding は、今  
 問題にしているBSP等の有機アニオンに対する $\alpha$ 上  
 の結合をみている事になる。この観点から、 $\alpha$ -蛋白  
 を精製してゆく際の、活性チェック法としては、ANS  
 の binding をけい光法でみる事を主な方法とした。

#### 1). 工程

(i) 上清の調整 (Step 1) 18匹のラット  
 より、約200gの肝を用いた。後は、 $\gamma$ の時と同じ。

#### (ii) セフデックス G-75 ゲル 通過 (Step 2)

ステップ1より約140 mlの上清がとれる。70ml  
 ずつあらかじめ標準 buffer で平衡化したセフ  
 デックス G-75 カラム (54cm x 85cm) にアプライする。  
 45me/rt で溶出し、10me/tube ずつあつめる。

この二度のゲル口過で集めた  $\alpha$ -分画を一諸にまとめる。なお、 $\alpha$ -分画の同定は、Fig. 12の如くあらかじめ、同一カラムで、BSP存在下でのゲル口過を行なう事によりきめておく。

(iii) セフデックス G-75ゲル口過 (step 3)

step 3より得られた  $\alpha$ -分画約 250mlを、蒸留水に対し透析した後に、凍結乾燥\*により、20mlに濃縮する。これを step 2と同一のセフデックス G-75カラムにアプライし、同一条件で溶出する。 $\alpha$ -分画のピーク近辺を 120ml 集める。

(iv). DEAE-Sephadex chromatography

(step 4) step 3で得た  $\alpha$ -分画を、凍結乾燥により、20mlに濃縮した後、PH 8.2, 10mM-tris-Hcl buffer buffer B に対して、24hr以上 (2lx2) 透析する。この透析後のサンプルを、

\* 濃縮方法は、この他にも限外口過(ダイヤルター G-05 T Membrane を使用)も行ってみたが、分離結果は、ほぼ同様であった。 $\alpha$ -蛋白の濃縮に、硫酸分画 (90% 飽和の条件、66g/100ml) は用いる事が出来なかった (沈澱として活性がおちてこなかった)。

10000 rpm で 30 min 遠心を行い、不溶性物質を除いた後、あらかじめ充分、buffer B で平衡化した DEAE-Sephadex A-50 カラム (1.4 cm x 21 cm) にアプライする。約 160 ml の buffer B を用い、12 ml/hr の速度で溶出し、4 ml/tube ずつ集める。このあと、150 ml の buffer B と、150 ml の 0.5M NaCl を含む buffer B より成る linear gradient をかけて、溶出を行なう。この結果を、Fig. 23 に示す。各ピーク分画より、horizontal bar で示された範囲の分画をとって集め、それぞれ、D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, D<sub>5</sub>, D<sub>6</sub> と名づけた。この各分画の活性を調べる意にまわ、ANS との結合を、けい光でみた。各分画の濃度を、280 nm の吸光度として 0.13 にし、ANS 濃度 32 μM とし、その時のけい光強度 (arbitrary units) を、棒グラフで示している。D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub> に強い ANS けい光増加活性が存在していた。そこで、ANS 濃度を変化させて (65 μM, 40 μM)、この三分画について、けい光測定を行った。結果を、逆数 plot (P. 43 参照) で表わし、Fig. 24 に示した。みかけ上の解離定

数は、 $D_2$ が、 $20\mu\text{M}$ 、 $D_3$ が、 $55\mu\text{M}$ 、 $D_4$ が $55\mu\text{M}$ であった。この様に、 $D_2$ が、ANSに対して最も高い親和性を示し、又、ゲル口過後の $D_2$ -分画が持っていた解離定数(P 44 参照)を保持していたが、 $D_3$ 、 $D_4$ 分画もある程度の親和性を示した。そこで更にBSPへの結合の強さを、この三つの分画で比較してみた。BSP濃度を、 $2\mu\text{M}$ ~ $15\mu\text{M}$ まで変化させて、蛋白濃度約 $400\mu\text{g/ml}$ で、平衡透析を行った。その結果を、Scatchard plotの形で、Fig. 25に示す。

$D_2$ 分画が、 $D_3$ 、 $D_4$ 分画のそれぞれ、4倍、6倍の結合定数を示す事が明らかとなった。この様にANS、BSP結合のaffinityともに、 $D_2$ -分画が最も強い事が明らかとなったので、この分画について更に、精製をす、める事にする。

(V). CM-Sephadex chromatography (Step 5)  
step 4より得られた $D_2$ -分画、約 $25\text{ml}$ を、限外口過法により約 $8\text{ml}$ に濃縮し、buffer A (P 52 参照)に対して充分透析をす。(1L X 2)。透析後、あらかじめbuffer Aで充分平衡化したCM-Sephadex

C-50 カラム (1.4 × 15cm) にアプライする。このカラムを、200 ml の buffer A で溶出したあと、カラム内に残った蛋白を 0.5M-NaCl を含む buffer A で溶出する。ANS のけい光増加活性を、前述の方法で調べると、最初にカラムを通過した分画の方にのみ、活性が存在した。この分画を、C $\alpha$  protein と呼ぶ事にする。

## 2). 均一性と分子量決定

(i) 方法——ゲル透過法、電気泳動法ともに、 $\gamma$ 蛋白の項で述べた方法と同じ

(ii) 結果——Fig. 26 に電気泳動の結果を示す。二度ゲル透過済みの 8-分画の段階で、SDS 電気泳動では、ほぼ単一 band になっている事がわかる。又、この 8-分画の disk 電気泳動像をみると Major band として、二つのものが明らかである。一つは、D<sub>2</sub> に、一つは D<sub>3</sub> に相当している。<sup>\*</sup>最も活性の強い C $\alpha$  protein は、両電気泳動の結果ともに、ほぼ pure である事がわかる。

<sup>\*</sup>次頁脚注参照

分子量測定の結果は、Fig. 16に示してあるが、 $\gamma$ -蛋白群とちがって、ゲル透過法 SDS電気泳動での結果がほぼ一致しており、約13000~14000という値が得られた。即ち、この蛋白は、単一のポリペプチドから成る蛋白であると考えられる。

DEAE・セファデックスにアプライ後の、 $D_2, D_3, D_4$ -分画のUV吸収スペクトルをとると、いずれも非常に良く似た形を示した。代表例として  $D_2$ -分画のスペクトルを Fig. 27に示す。大きな特徴として 250~270nmの範囲に微細な構造を持つスペクトルを示す事、又、284nm近辺に明確な shoulder を示す事が挙げられる。この 284nm の shoulder は蛋白が精製されるにつれて非常に明確になってくる。又、 $(280\text{nmの吸光度}) / (260\text{nmの吸光度})$  の比は、1.35であった。この比は、蛋白の精製がす

\*  $D_1$ -分画には、明らかに多量、存在している  $D_1$  の band がみえない。これは、この条件では泳動しないのか、或いは、染色性が非常に悪いのか、のどちらかと考えられるが、未確認である。



むにつれて小さくなる ( $\alpha$ -分画での値は、1.48であった)。Fig. 27 中に示してある  $\gamma$ -蛋白群の吸収スペクトルと比較すると、特徴がよくわかる。(280nmの吸光度)/(260nmの吸光度)の比も、 $\gamma$ -蛋白群では、1.80を示した。この  $\alpha$ -蛋白の吸収スペクトルは、何から生じているのか、私は、まだ調べていない。しかし、Kettererら(56)のアミノ酸分析の結果によると、芳香族アミノ酸であるトリプトファンは0、チロシンは2、フェニルアラニンは6(それぞれ、蛋白1moleあたりの残基数で示している)という値が得られている。

### 3) BSPとの結合 Kinetics.

#### (i) 方法

既に述べた平衡透析法によつた(P31)、最終標品のC $\alpha$ 蛋白を118 $\mu$ g/mlの濃度で用いた( $M_w=13000$ と仮定すると9.08 $\mu$ Mに相当する)。BSP濃度を2 $\mu$ M $\sim$ 17 $\mu$ Mの範囲で変化させた。

(ii) 結果 結果を Scatchard plot で、  
 Fig. 28 に示した。curvature を示す事より、  
 二種類の結合部位を持つ事がわかる。電算  
 機を用いる最小二乗法で、解析した結果、  
 $n = 0.44$ ,  $K_1 = 2.7 \times 10^6 M^{-1}$  が最もよく fit した。  
 この様に、1 mole の BSP が 2 mole の  $\alpha$ -蛋白に  
 結合しているという結果が得られたが、同様  
 の事が、CD スペクトルによって、ビリルビンと  $\alpha$ -  
 蛋白の結合解析をした Kamisaka ら (54)  
 によって、みつけられている。この原因としては、  
 ① 精製中に、活性を有する半分の蛋白が、

不活性化された可能性 ② 結合実験にお  
 ける蛋白の会合の可能性の二つが考えられる。  
 最近、Warner ら (55) によって、hexachlorophen  
 への結合活性をメルクマルとして  $\alpha$ -蛋白が  
 精製された。彼らは、 $\alpha$ -蛋白の aggregation  
 を防ぐ為に、20% glycerol 存在下で精製  
 を行ったが、その結果、精製蛋白と hexachlorophen  
 の結合 stoichiometry として 1 を得ている。  
 この事実を併せ考えると、おそらく、②の可能

性が強いと思われるが、更に検討を要すると  
思われる

#### 4) 精製まとめ

分離精製の各 step 後のサンプル(区-分画,  
D<sub>2</sub>, C<sub>V</sub>)について、ANS 結合をけい光法でみ  
てみた。Fig. 29のANSによる titration  
curve に示される様に、精製が進むにつれ  
て、けい光強度の増加が観察される。この  
titration は一定濃度の蛋白(280nmの吸  
光度にして0.13)を用いている事、又、少くとも  
区-分画に含まれる蛋白についてはANSがど  
の結合部位に結合してもけい光量子収率はほ  
ぼ同程度である事(P46参照)を併せ考えると  
この titration curve のプラト-値、即ち、ANS  
が過剰量条件で、結合部位が全部ANSで占め  
られた時に出すけい光強度は、一定の蛋白量  
あたりの全ANS結合部位の数に相当するも  
ので、いわゆる結合比活性定義出来る値で  
ある。そして、区-分画を用いた場合にくらべ、  
最終C<sub>V</sub>蛋白を用いた場合では、約3倍の値

であり、この事から3倍の精製度が得られている事がわかる。Fig. 30にはFig. 29の titration curve の両逆数plotをとり、Wang-Edelmanの方法(P43参照)により解析した所、精製がすすむにつれて、Y-切片のみ変化して、X-切片は程んど変化がない。これは、ANS結合を担う主蛋白質が、少なくとも $\alpha$ -分画以後の精製において、ANSとの結合親和性を変化する事が無かった、即ち、結合部位の性質の変化がなかった事を示すものであろう。この様なANSを使う方法で比活性を求めた $\alpha$ -蛋白質の精製例をTable Vに示す。100,000g上清から、CV蛋白質に至るまで、約70倍に精製されている事がわかる。

### 5) 考察

$\alpha$ -分画の分離精製においても、 $\gamma$ -分画同様に度ゲル通過を行って分子量的にはほぼ均一になった $\alpha$ -分画の中に、有機アニオンに対する結合活性を持つ蛋白質が3種類( $D_2, D_3, D_4$ )

存在する事がわかった。D<sub>2</sub>分画が量的にも多い事。又、D<sub>3</sub>、D<sub>4</sub>分画に比べて、有機アニオンに対する(ANS, BSP とともに)結合定数が約3~5倍である事から、本研究においては、D<sub>2</sub>分画に着目した。又、図には示さなかったが、2度ゲル口過すみの3分画を等電点分画した所、ANSに対する結合活性の最も強い分画は、PH7.5近辺に得られた。

最近、Kettererら(56)によっても、ラット肝上清より、等電点分画法によって、同一分子量(14000)で、かつAzob-dye結合活性を持つ3つの蛋白(PI, 5.0, 5.9, 7.6)が分離された。彼らも、有機アニオンとの結合活性は、最もbasicな蛋白(PI=7.6)が最も強いと述べている。これは、我々の等電点分画の結果及び、DEAE-sephadex chromatographyで最も早く溶出される分画に最も大きい活性があるという今回の結果と、よく一致している。しかしながら、Amiasグループ(38, 54)によるα-蛋白は、等電点(PI)が5.5, 又、Fatty-

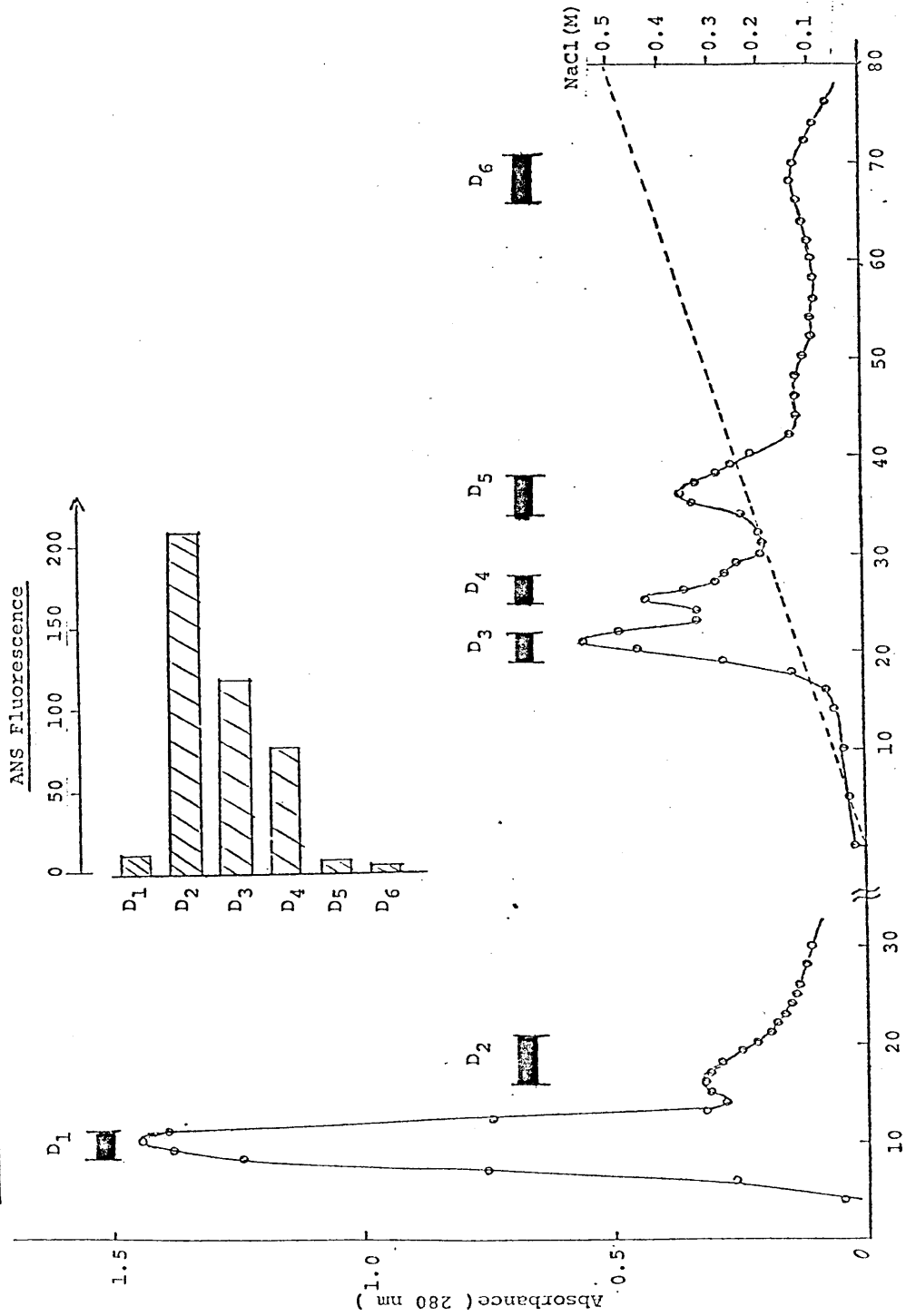
acid に対する結合蛋白として小腸より, Ockner  
ら(29)によって分離された蛋白\*は PIが5.55  
と報告されており, 我々及び Ketterらの分離  
したやや basic な蛋白との違いがある。  
Arias, Ockner らのいう acidic な蛋白は,  
おそらく,  $D_3$  or  $D_4$  蛋白と関連づけられる  
ものと思うが, 更に詳細な検討を要するだ  
ろう。さて, この様に, 同一分子量であるが,  
電気的性質の異なる蛋白の多様性が何故  
生じたのか, 又, この多様性が *in vivo* に  
おいてどのような生理学的役割を果している  
のかは, わからない。私の結果によると, 分  
画と最終精製品について, ANS に対する  
結合 affinity (Fig. 30), BSP に対する結  
合 affinity (Fig. 28) とともに, あまり変化  
しない事がわかった。その意味では, 少なくとも

\* 彼らは, 分子量 12000 の分画の中に, 5種  
の FABP を見出し, それらが PI 5.1 ~ 5.7 の範囲  
であり, 特に PI 5.55 の蛋白が, 強い脂肪酸  
結合力を持つ事を示した。

とも $\alpha$ -分画から最終品までの精製途中では、結合に必要な低分子物質の loss 等は考えられない。しかしながら、Kettererら(56)によると、Crude 蛋白と精製蛋白の有機アニオンに対する結合 affinity が違い、しかもこの loss は透析のみによって生じるという報告がされている。我々の実験においても、 $\alpha$ -分画は、 $\gamma$ -分画に比べて、BSP 結合のばらつきが、調整品によって非常に大きいという結果が、得られている。これは BSP 存在下での上清のゲル透過でも、又分離した $\alpha$ -分画を用いる平衡透析の結果でも観察される。これは、上記の Ketterer らの suggestion と何か関係している可能性も強く、更に詳細な検討をする必要がある。おそらく、我々の方法で $\alpha$ -分画を調整する(2度ゲル透過をする)までに、調整法の微妙な違いにより、Cofactor 様のものが失われるのかもしれない。

Fig. 23

DEAE-Sephadex A-50 CHROMATOGRAPHY OF Z-fraction AFTER TWO TIMES GEL FILTRATION  
(pH 8.2, 10 mM Tris-HCl buffer, Column size 1.4 x 20 cm)





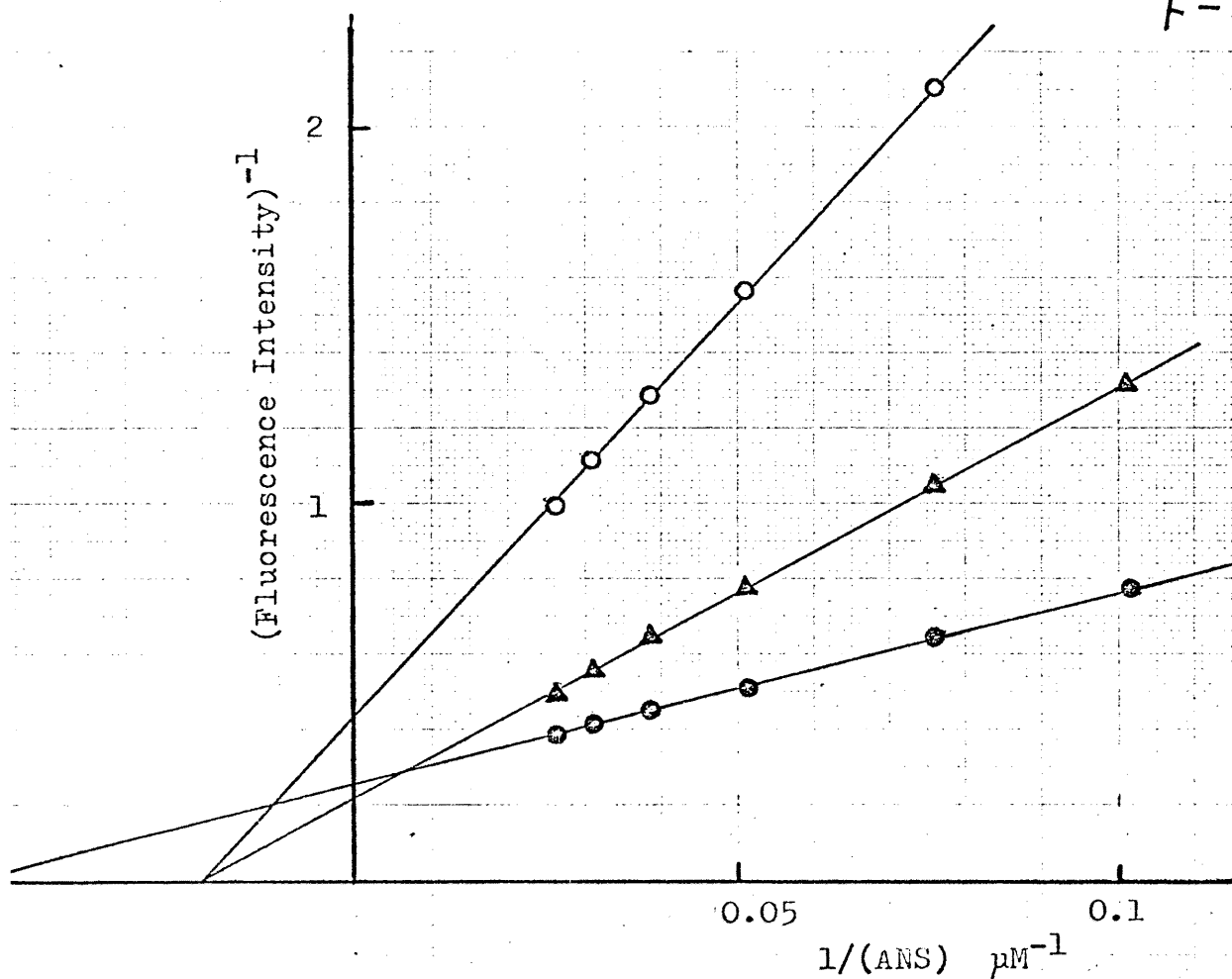


Fig.24 DOUBLE RECIPROCAL PLOT OF ANS BINDING TO  
D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, and D<sub>4</sub> FRACTION.

(●) D<sub>2</sub>-fraction, (▲) D<sub>3</sub>-fraction, (○) D<sub>4</sub>-fraction

Protein concentration of each protein is made equal (0.13 absorbance at 280 nm).

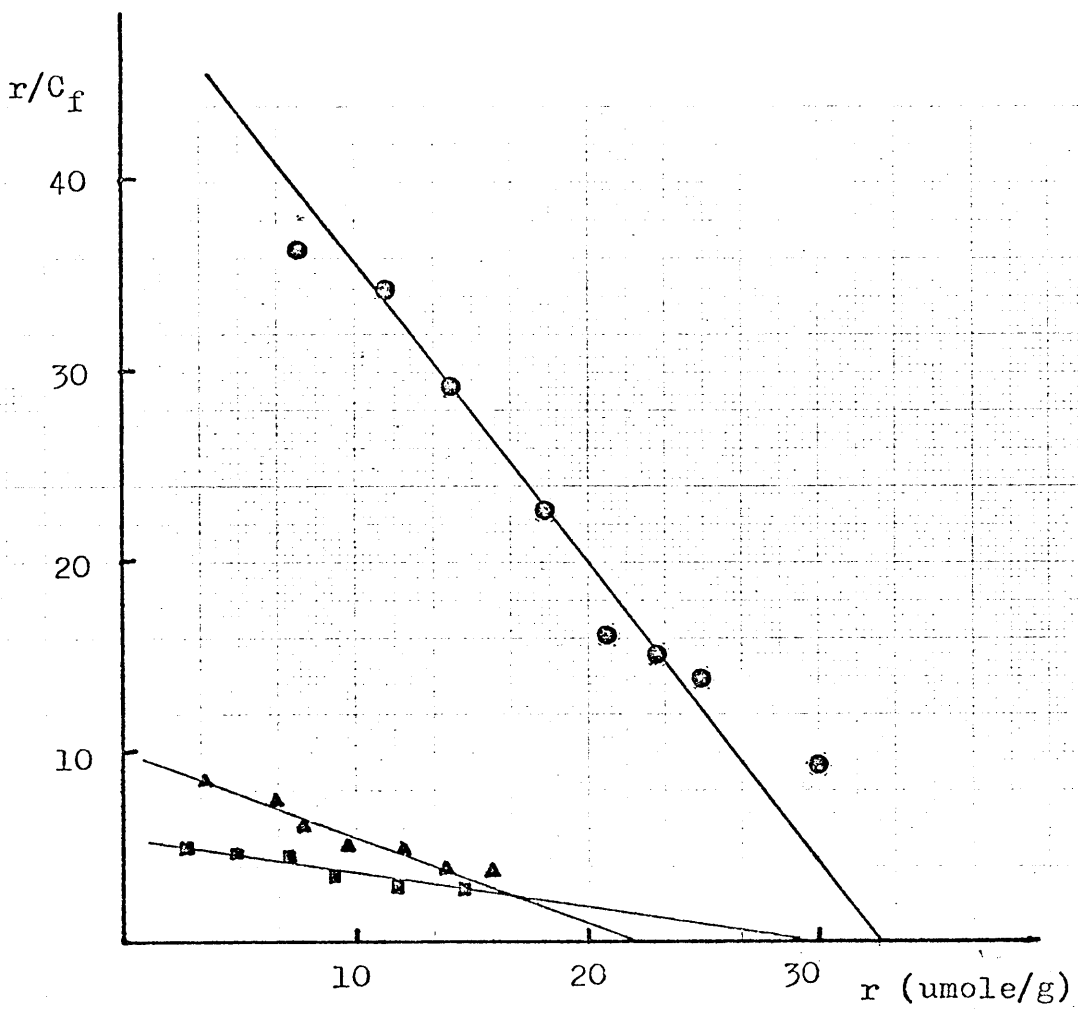


Fig.25 SCATCHARD PLOT OF BSP BINDING TO D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> AND D<sub>4</sub> FRACTION BY EQUILIBRIUM DIALYSIS.

(○) D<sub>2</sub>-fraction, (▲) D<sub>3</sub>-fraction, (□) D<sub>4</sub>-fraction

Protein concentration:

D<sub>2</sub> 350 μg/ml, D<sub>3</sub> 400 μg/ml, D<sub>4</sub> 410 μg/ml

Fig. 27 UV ABSORPTION SPECTRUM

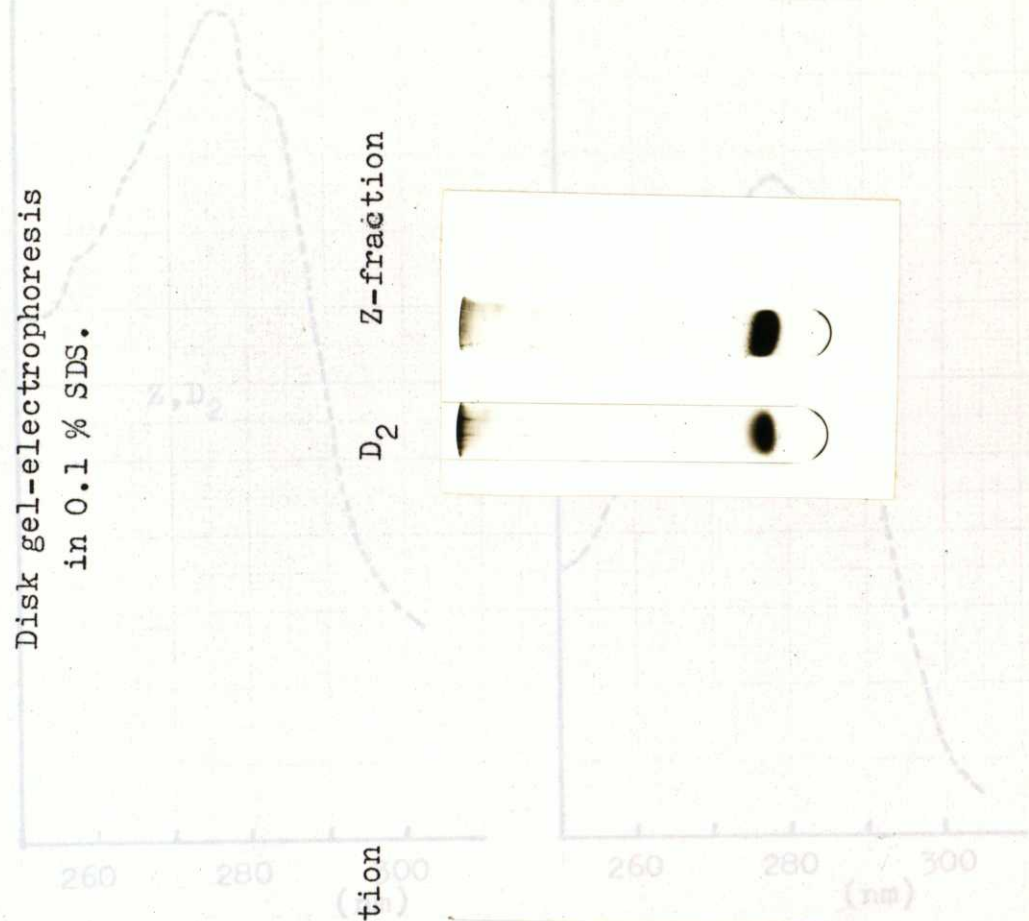
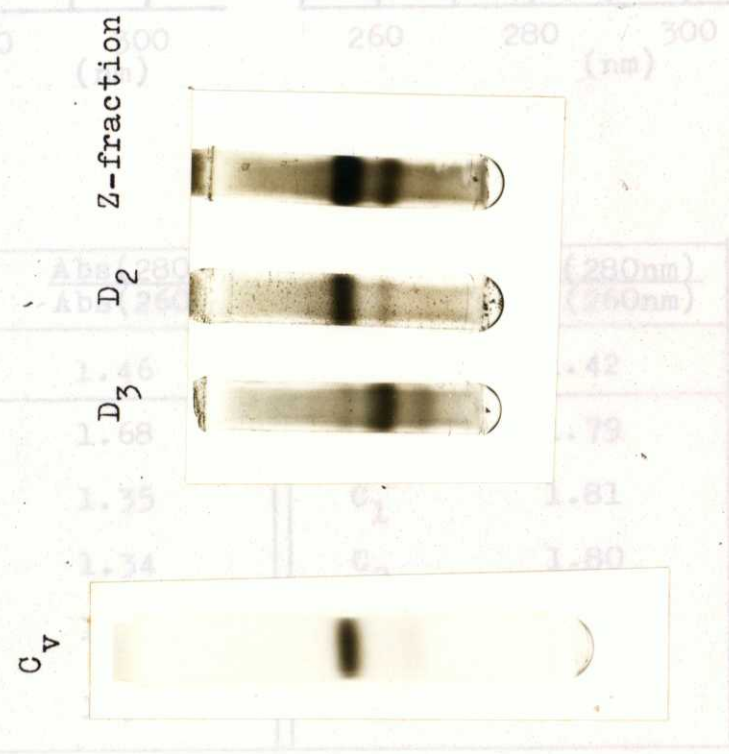


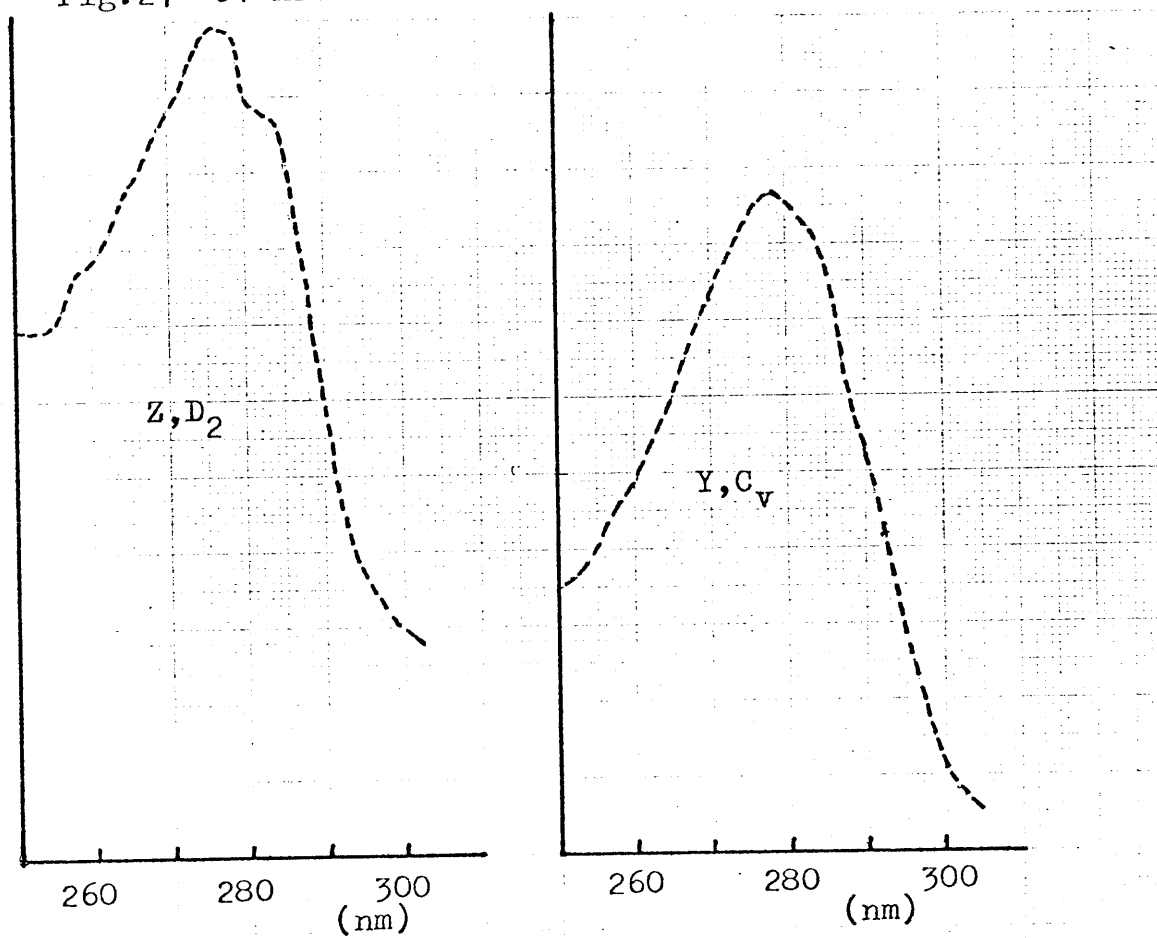
Fig. 26

Polyacrylamide disk gel electrophoresis. Tris-glycine buffer, pH8.3



\* C<sub>v</sub> contains a heme-like substance having absorption maximum at 407 nm.

Fig.27 UV ABSORPTION SPECTRUM



Z		Y	
	$\frac{\text{Abs}(280\text{nm})}{\text{Abs}(260\text{nm})}$		$\frac{\text{Abs}(280\text{nm})}{\text{Abs}(260\text{nm})}$
Z-fract.	1.46	Y-fract.	1.42
D <sub>1</sub>	1.68	C <sub>v</sub>	1.79
D <sub>2</sub>	1.35	C <sub>1</sub>	1.81
D <sub>3</sub>	1.34	C <sub>2</sub>	1.80
D <sub>4</sub>	1.34	C <sub>3</sub>	1.22*
C <sub>v</sub>	1.32		

\* C<sub>3</sub> contains a heme-like substance having absorption maximum at 407 nm.

Fig. 28 Scatchard plot of BSP binding to the purified Z-protein by equilibrium dialysis at 4°C. Z-protein concentration is 9.08 μM, and the total BSP concentration changes from 2 μM to 17 μM. r is expressed in moles BSP bound per mole Z-protein regarding molecular weight of Z-protein as 13000. The solid line is a theoretical curve computed using  $n_1=0.44$ ,  $K_1=2.71 \times 10^6 M^{-1}$ ,  $n_2=2.45$  and  $K_2=1.07 \times 10^5 M^{-1}$ .

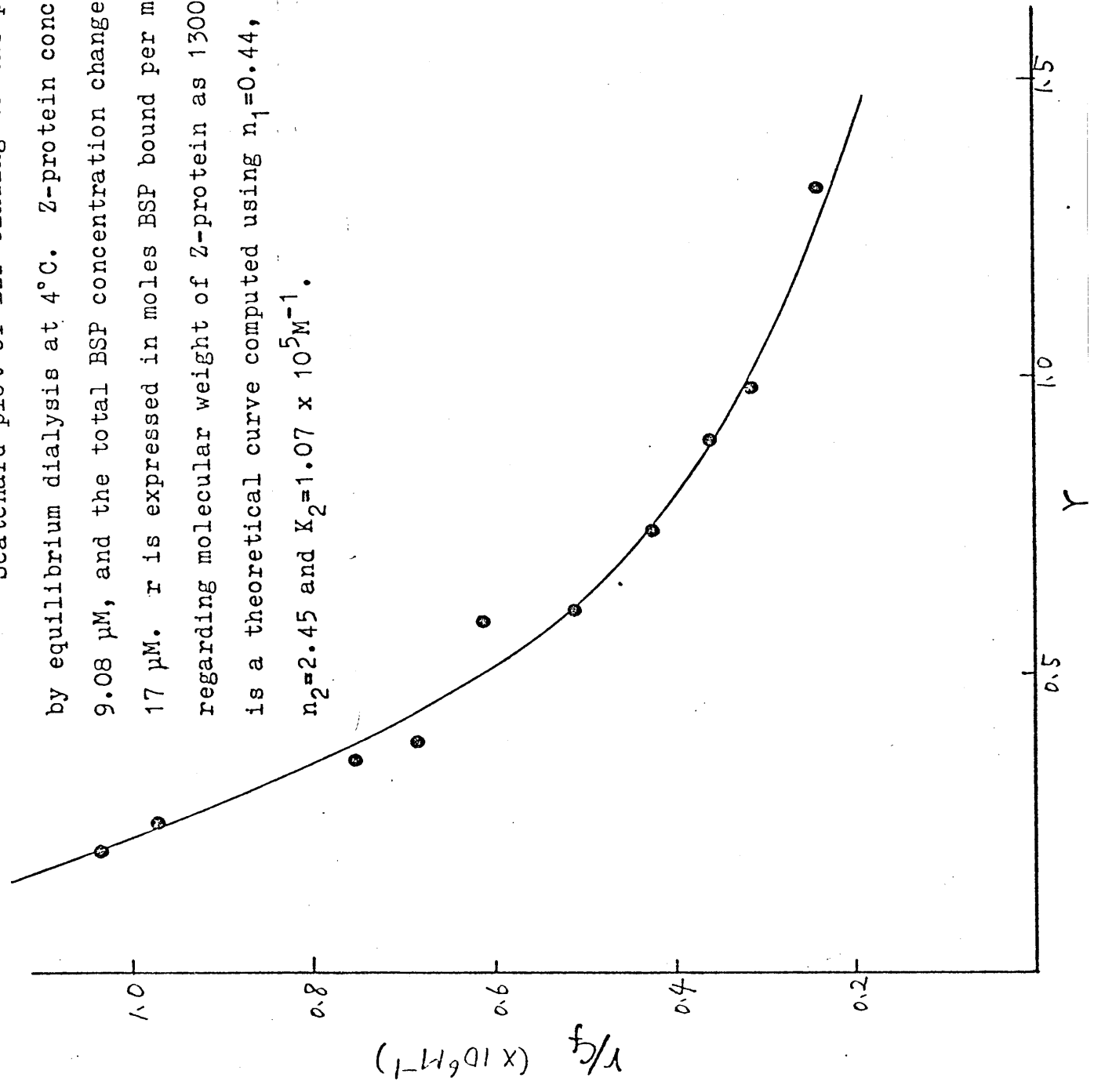
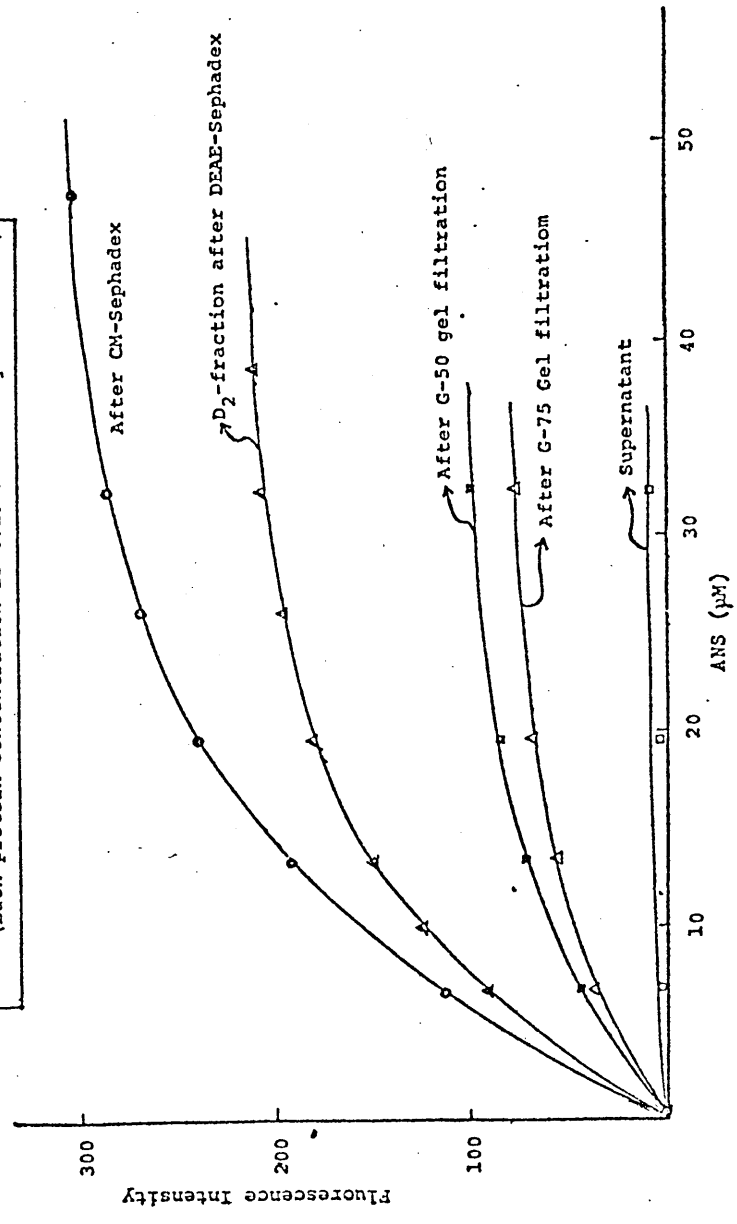


Fig. 29

TITRATION OF Z-FRACTION WITH ANS IN EACH PURIFICATION STEP  
(Each protein concentration is 0.13 absorbancy at 280 nm)



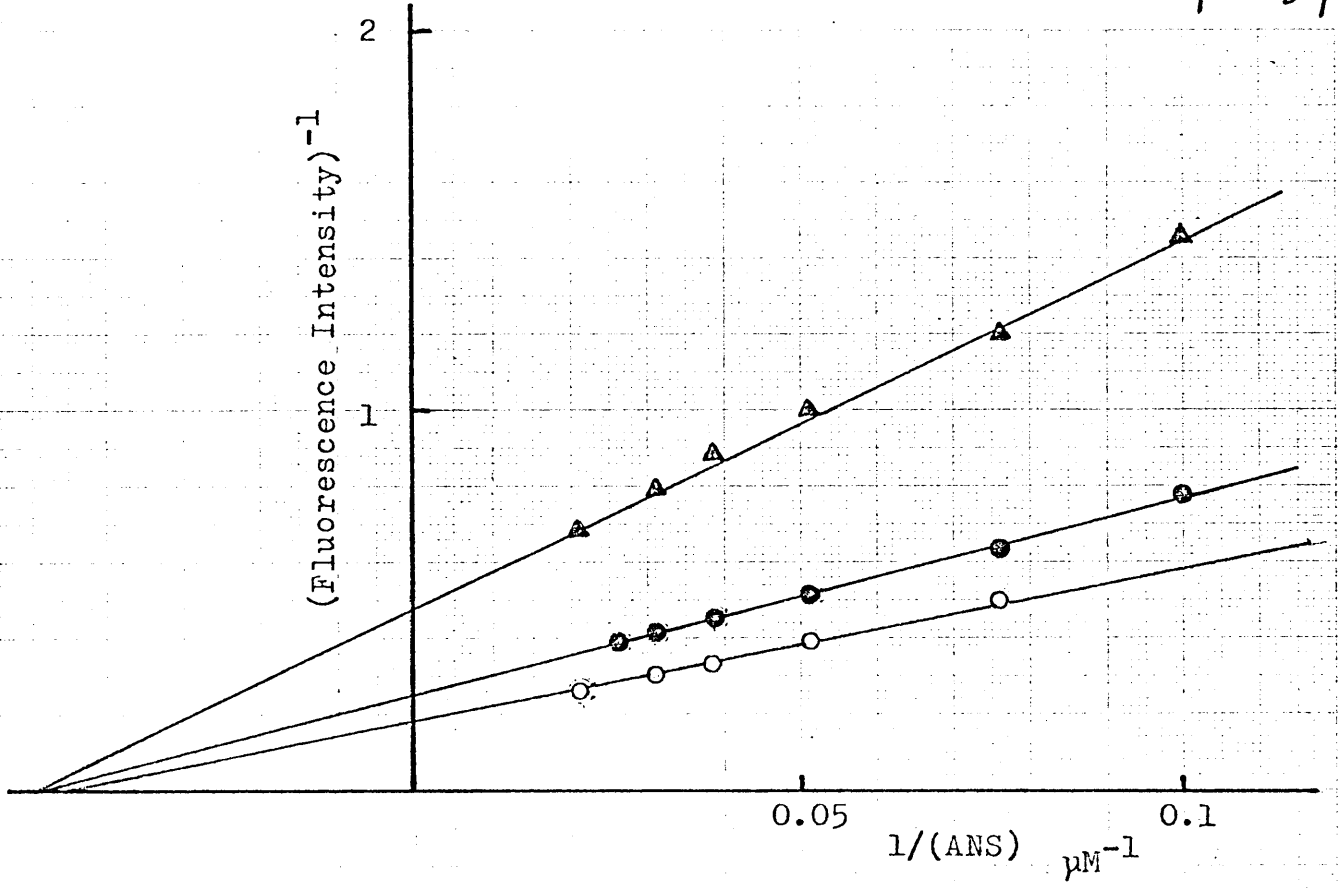


Fig.30 DOUBLE RECIPROCAL PLOT OF ANS BINDING TO Z-fraction, D<sub>2</sub>-fraction and C<sub>v</sub>-protein.

( $\Delta$ ) Z-fraction, ( $\odot$ ) D<sub>2</sub>-fraction, ( $\circ$ ) C<sub>v</sub>-protein

Protein concentration of each protein is made equal. (0.13 absorbance at 280 nm)

# Table V

## PURIFICATION OF ANION BINDING PROTEIN IN Z-fraction

Fraction	Total protein (mg)	Specific intensity (units/mg)	Total intensity (units)	Yield (%)	Purity (%)
Supernatant	2380	3.6	8570	100	1.5
G-75 Gel-Fil	86	62	5332	62	26
G-50 Gel-Fil (Z-fract)	55	74	4070	47	32
DEAE-Sephad (D <sub>2</sub> -fract)	3.4	162	551	6.4	69
CM-Sephadex (C <sub>v</sub> -protein)	2.2	234	515	6.0	100

1) Estimated from the optical density at 280 nm.

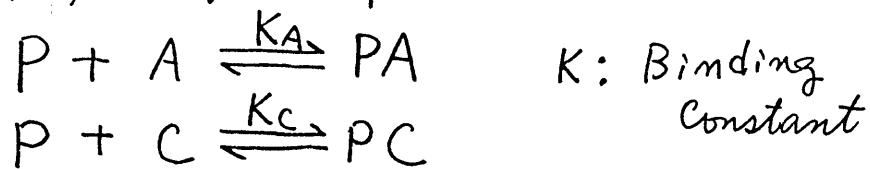


#### 4. 結合蛋白質群の有機アニオン結合特異性

今まで $\gamma$ ,  $\delta$ -蛋白質群を分離精製し、 $\gamma$ ,  $\delta$ -蛋白質群がそれぞれ、有機アニオン結合活性を持つ hetero な系より成る事を示した。このような heterogeneity が何故生じたのか、どんな意味を持つのかについては、今の所わからないが、それら蛋白質がどのような有機アニオン結合特異性を持つかを調べる事は必要と思われる。方法論としては crude な蛋白質 $\gamma$ ,  $\delta$ -分画の系において、BSP と競合的に結合することのわかった (P44, P47) けい光 probe ANS を用いて、競合の程度より間接的に、種々の有機アニオンの結合定数を求める事にした。 $\delta$ については、分離した分画が充分量得られなかった為、主なる結合蛋白質 (CT protein) の結合挙動を反映しうる (P95~96) と思われる $\delta$ -分画 (二度ゲル口過をしたあとの sample) を使う事にした。又、これら $\gamma$ ,  $\delta$ -蛋白質群の結果と、血中の主なる有機アニオン結合蛋白質であるラットアルブミン

を用いての結果をくらべてみる。

(1) 方法----- Binding Constant ( $K_c$ ) の算出  
 蛋白上に存在する  $n$  個の独立した結合部位を。  
 2つの ligand, 即ち ANS (A) と Competitor  
 (C) が競合すると考えた平衡式を次に示す。



ここで A, C はそれぞれ非結合型の ANS, Competitor, PA, PC は、それぞれ結合型の ANS, Competitor, 又 P は、ANS 及び Competitor によって占められていない結合部位を示す。

Mass balance より

$$P + PA + PC = n \cdot P_t \quad \text{Eq. 1}$$

が成立する。ここで  $P_t$  は全蛋白濃度である。  
 又、結合定数の定義より、

$$K_A = \frac{PA}{P \cdot A} \quad \text{Eq. 2}$$

ここで平均結合率  $\gamma$  を、蛋白 1 モル当りに結合した ligand のモル数と定義すると、

$$Y_A = \frac{PA}{P_t} \rightarrow P_t = \frac{PA}{Y_A} \quad \text{Eq. 3} \quad 99$$

$$Y_C = \frac{PC}{P_t} \rightarrow PC = Y_C \cdot P_t = \frac{Y_C}{Y_A} \cdot PA \quad \text{Eq. 4}$$

Eq. 1, 2, 3, 4より

$$K_A = \frac{PA}{P \cdot A} = \frac{Y_A}{A \cdot (n - Y_A - Y_C)} \quad \text{Eq. 5}$$

同様に考えると、

$$K_C = \frac{Y_C}{C \cdot (n - Y_C - Y_A)} \quad \text{Eq. 6}$$

Eq. 5を並べかえると

$$Y_C = n - Y_A - \frac{Y_A}{K_A \cdot A} \quad \text{Eq. 7}$$

Eq. 5とEq. 6より、

$$K_C = \frac{Y_C \cdot K_A \cdot A}{Y_A \cdot C} \quad \text{Eq. 8}$$

ここで、 $n$ と $K_A$ はわかっており、 $Y_A$ と $A$ は、実際に測定できる\*ものであるから、Eq. 7より、 $Y_C$ の計算が可能である。そうすると、全Competitor濃度(既知)から $PC$ を引くと、 $C$ の計算ができる。以上で、 $Y_C, C, A, K_A$ がわかるので、

\* (次頁参照)

Eq. 8より,  $K_C$ の値が計算できるのである。  
 以上の方法により, ある既知濃度の Competitor  
 存在下でのけい光強度の減少量より,  $K_C$ の計算  
 ができる事がわかった。

そこで, もし,  $K_A$ ,  $K_C$ ,  $n$ の値が最初に加え  
 られるならば, Eq. 5 ~ Eq. 8を使い, 競合効果  
 を予測する事ができる。即ち, けい光強度を,  
 ある値にまで減少させるには, どれぐらいの濃  
 度の total competitor が必要であるのかとい  
 う計算をする。----- 以下に考え方を示す。

\* この実験系でのけい光強度  $I$  は, 次式で与えられる。  
 $I = \phi \cdot PA$ . 何故ならば, 存在する5つの分子種のうち  
 で, けい光を出すものは,  $PA$ のみと考えてよいからであ  
 る。従って観察されるけい光強度は, 量子収率  $\phi$  が  
 一定ならば,  $PA$ と比例する。Competitorの存在は, 単  
 に,  $PA$ を,  $PC$ におきかえるのみで, 結合部位の  
 Conformation changeをおこすとは考えないので,  $\phi$ は,  
 一定である。従って,  $\phi$ を測定しておけば, Competitor存在  
 下での  $I$  の変化より,  $PA$ の計算が出来るわけである。

$$A_t = Y_A \cdot P_t + A \quad \underline{\text{Eq. 9}}$$

$$C_t = Y_C \cdot P_t + C \quad \underline{\text{Eq. 10}}$$

Eq. 7 と Eq. 9 より

$$Y_C = n - Y_A - \frac{Y_A}{K_A(A_t - Y_A \cdot P_t)} \quad \underline{\text{Eq. 11}}$$

Eq. 8, Eq. 9 と Eq. 11 より

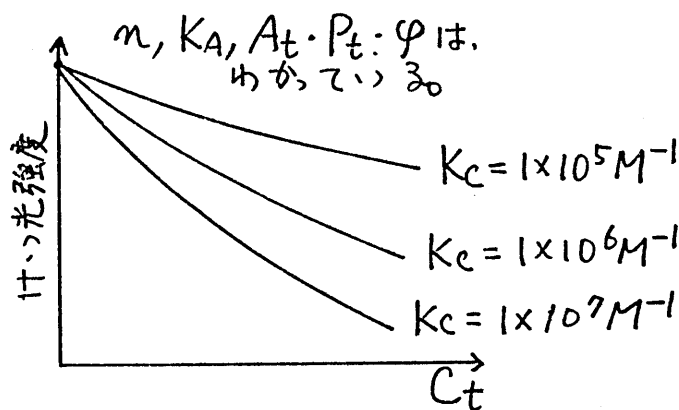
$$C = \left\{ n - Y_A - \frac{Y_A}{K_A(A_t - Y_A \cdot P_t)} \right\} \times \left\{ \frac{K_A(A_t - Y_A \cdot P_t)}{Y_A \cdot K_C} \right\} \quad \underline{\text{Eq. 12}}$$

Eq. 10, Eq. 11 と Eq. 12 より.

$$C_t = \left\{ n - Y_A - \frac{Y_A}{K_A(A_t - Y_A \cdot P_t)} \right\} \times \left\{ P_t + \frac{K_A(A_t - Y_A \cdot P_t)}{Y_A \cdot K_C} \right\} \quad \underline{\text{Eq. 13}}$$

従って、あるけい光強度が与えられると、量子収率  $\phi$  が既知であるから、 $Y_A$  がわかる。Eq. 13 より、それに相当する  $C_t$  が計算される。即ち、 $n$ ,  $K_A$  がわかっており、全 ANS 濃度  $A_t$  と、全量

白濃度  $P_t$  を、ある一定値を用いた時、 $K_c$  の大きさによって、 $Y_A$  (けい光強度に比例する) と、 $C_t$  の値にどのような関係があるのかという下記に示す様な simulation curve を書く事が可能である。



こうして種々の  $K_c$  の値を使って得た simulation curve と、実際の data を比較する事によって、広い  $C_t$  濃度範囲における  $K_c$  の概算値を推定する事ができる。

競合実験法 蛋白と ANS の混液 3ml の中に高濃度の Competitor ( $100 \mu M$  or  $250 \mu M$ ) をマイクロシリンジで titrate する。400nm で励起して、480nm でのけい光を測定する。 $10 \mu M$  の ANS を MeOH 中にとかしたものを standard とする。必要な時 (Competitor が 400nm か 480

nmに吸収を持つ時)は内部通過効果による補正を行なう\* 蛋白とANSの濃度条件は次のように設定した。ラットアルブミンでの実験-----  
 アルブミン,  $2\mu\text{M}$ , ANS,  $2\mu\text{M}$ ,  $\gamma$ -蛋白群  
 ( $C_1, C_2, C_3$ )での実験-----蛋白,  $0.79\mu\text{M}$   
 ANS,  $10\mu\text{M}$   $\delta$ -分画-----( $\delta$ -分画) =  $388\mu\text{g/ml}$ ,  
 ANS  $12\mu\text{M}$

RBと $\delta$ -分画の結合(分光学的方法) 非結合型のRBは:  $548\text{nm}$ に吸収maximumを持つが、 $\delta$ -分画と結合すると、 $562\text{nm}$ にmaximumがshiftする。この事を利用して、結合を調べた。① $\delta$ -分画の存在しない時、  
 ①少量存在する時( $19.4\mu\text{g/ml}$ ,  $38.8\mu\text{g/ml}$ ,  $129\mu\text{g/ml}$ )  
 ②過剰量存在する時( $150\mu\text{g/ml}$ )の各条件で、RBの濃度を、 $0.6\mu\text{M}$ ~ $4\mu\text{M}$ まで変化させて、 $562\text{nm}$ での吸光度を、日立356型分光光度計で測定した。  
 ③の結果より、 $E_{\text{free}}$  ①の結果より、 $E_{\text{obs}}$ , ②の結果より  $E_{\text{bound}}$  が求まる。  $E_{\text{free}}$ ,  $E_{\text{obs}}$ ,  $E_{\text{bound}}$  はそれぞれ、非結合型RBの分子吸光係数、みかけの分子吸光係数、結合型RBの分子吸光係

\*P40参照

数を表わし、得られた吸光度を、totalのRB濃度で割って求める。次式より、結合型RB boundが求められる。

$$RB_{bound} = RB_{total} \times (E_{obs} - E_{free}) / (E_{bound} - E_{free})$$

### (2) 結果

競合法で、上記の様に Competitor の結合定数を算出する為には、まず各蛋白と ANS との結合定数を知る必要がある。既に  $\gamma$  と ANS についてはわかっているのので (P47 参照)、Y-蛋白群、ラット アルブミン と ANS の結合を調べた。更に、この様に間接的な方法で計算した結合定数の妥当性をみる為、他の方法、即ち、RB と  $\gamma$ -分画の結合を分光学的に調べ、比較してみた。

### ANS と Y-蛋白群の binding ----- 代表例

として CV-蛋白 を使った結果を次に示す。Fig. 31-2 には、蛋白濃度一定 ( $0.79 \mu M$ ) の逆数 plot (P43 参照) を、BSP の存在下 と 非存在下 で示した。Y-切片が一致する事より、ANS と BSP



はC $\alpha$ 蛋白質上の同一部位を競合する事がわかる。  
 又、Fig. 31-1には、この逆数 plot が、蛋白濃度によってどう変化するかをみたものである。  
 どの蛋白濃度においても、みかけ上の解離定数は、ほぼ同一であり、 $I_{max}$ <sup>\*</sup>のみが、変化している事がわかる。図左上の小図には蛋白濃度 vs.  $I_{max}$  の plot を示すが、これは原点を通る直線である。この傾きより量子収率が得られる<sup>\*\*</sup>。  
 従って、結合 ANS 濃度、非結合 ANS 濃度の計算が可能となり、この様にして得に scatchard plot を、Fig. 32-1 に示す。どの蛋白濃度を用いた結

<sup>\*</sup> Y 軸との切片の値である。即ち、ANS が無限大のけい光強度を示す。これは、蛋白上の結合部位が全て ANS で占められた時のけい光強度である。

<sup>\*\*</sup>  $I_{max} = \varphi \cdot n \cdot (P_t)$  の関係がある。ここで、 $n$  は結合部位の数、 $(P_t)$  は全蛋白濃度、 $\varphi$  は量子収率である。ここで、BSP と ANS は結合部位を競合すること、BSP に対する  $n$  は 1 であること (Fig-17, 20)、及び後に示すように (Fig. 34)、BSP によって、ANS と C $\alpha$ -蛋白の complex のけい光がほぼ 100% 低下することより、ANS に対する  $n$  も 1 だと仮定した。

果もひとつの scatchard plot 上にある。これより、 $K = 6 \times 10^4 M^{-1}$ 、 $n \approx 1.2$  が得られた。他の蛋白 ( $C_1, C_2, C_3$ ) でも同様の実験を行った。結果はのちにまとめる。Fig. 32-2 は、ラットアルブミンと ANS の結合を、同じくけい光によって調べた結果である。first site に関しては、 $n \approx 1$ 、 $K = 1.1 \times 10^7 M^{-1}$  が得られ、非常に強く結合する事がわかる。

RB と  $\Sigma$  の binding ----- Fig. 33-1 に示す様に、RB 濃度を一定にし、 $\Sigma$ -分画の濃度を変化させて、吸収スペクトルをとると、556nm に等吸収点が存在する。この事から、P104 の式による解析が可能となり、その結果を first site についてのみ\* scatchard plot をすると、Fig. 33-2 のようになる(95)。 $K = 1.6 \times 10^7 M^{-1}$  が得られた。

\* この結合を詳細に解析すると、 $r = \frac{nK \cdot C_f}{1 + K \cdot C_f} + n'K' \cdot C_f$  の式に最もよくあてはまる事がわかった(95)。従って、 $n'K' \cdot C_f$  の項で示される非特異的結合を差し引いて plot したものである。

## 競合法による各種有機アニオンの結合定数

Fig. 34には、代表例として、ラットアルブミン、 $\gamma$ -CV蛋白を用いたの結果を示してある。実線を示す各 simulation curve をひくのに使ったパラメータは、次の如くである。(Eq. 13参照)

ラットアルブミンの場合 ----  $n=1$ ,  $(A_t)=2\mu M$ ,  
 $(P_t)=2\mu M$ ,  $K_A=1.1 \times 10^7 M^{-1}$ ;  $\gamma$ -CVの場合 ----

----  $n=1$ ,  $(A_t)=10\mu M$ ,  $(P_t)=0.79\mu M$

$$K_A = 6 \times 10^4 M^{-1}$$

この様に得られた結合定数, 更に, ANSと結合して出すけい光量子収率を, まとめたのが table VIである。この方法で得られた BSPと $\gamma$ -蛋群及び $\gamma$ -分画への結合定数は, 平衡透析による結果(Fig. 17, 4)と, 又, RBの $\gamma$ -分画への結合定数は, 分光学的方法による結果(Fig. 33)とほぼ合致しており, この方法が利用できる事が示された。

全般的にみればアルブミンは, これら細胞質蛋白群( $\gamma$ ,  $\delta$ )にくらべて, ほぼ 1-order 大きい結合定数を持っている (BSP, ICGを除いて)。

又、細胞質蛋白間では、種々の有機アニオンに対する明確な結合定数の差はみかけられず、どの蛋白もかなり類似した広範囲の有機アニオン結合性を持っていた。この様に、 $\gamma$ -蛋白群は既に示した様な分子的性状のみならず、基質特異性も非常に似ている事がわかった。更に、これら蛋白上の結合部位の疎水性をANSを用いて調べると、アルブミンと区がほぼ同じ(けい光量子収率約0.9)、又、 $\gamma$ -蛋白群はかなり低い値(約0.2かそれ以下)であった。それは、既に論議したように(P44~49)有機アニオンとアルブミンの結合が、イオン力、疎水力の両方が寄与しているのくらべ、区では主に疎水力が、 $\gamma$ -蛋白群では主にイオン力が働いている事を示すものである。

Fig. 31

Fluorimetric titration of  $C_V$  protein with ANS to obtain the binding parameters and quantum yield of bound ANS.

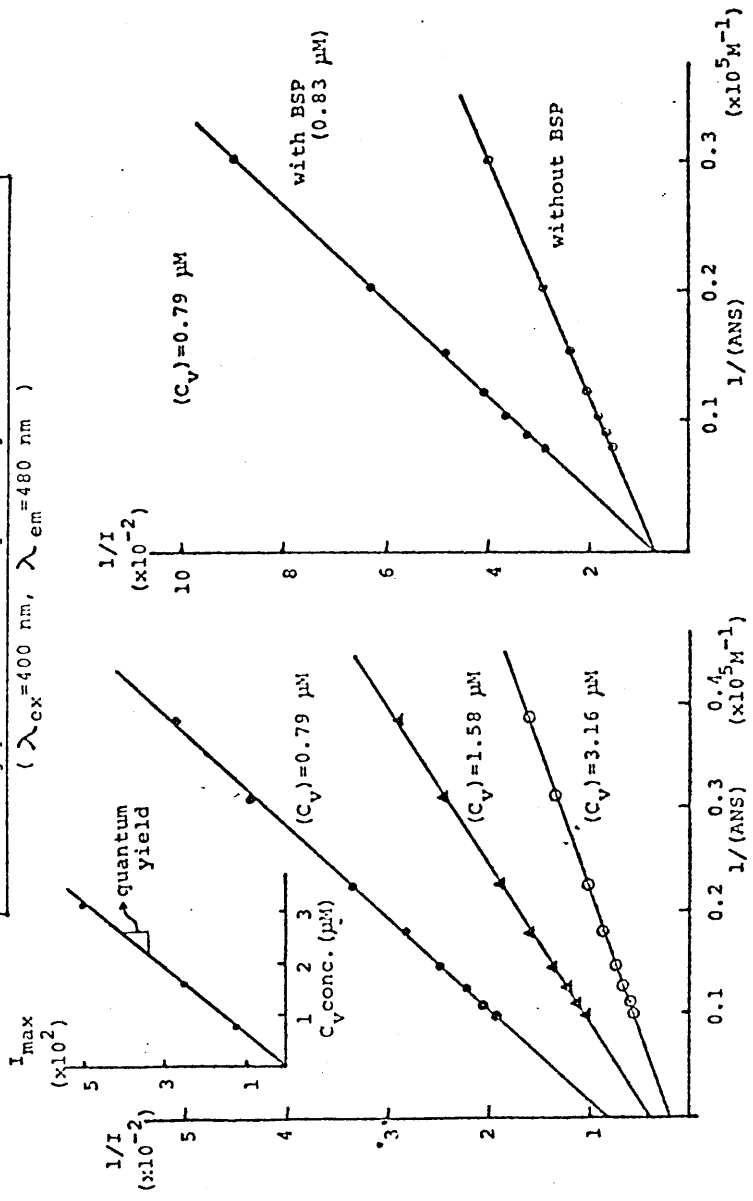


Fig. 31-1

Fig. 31-2

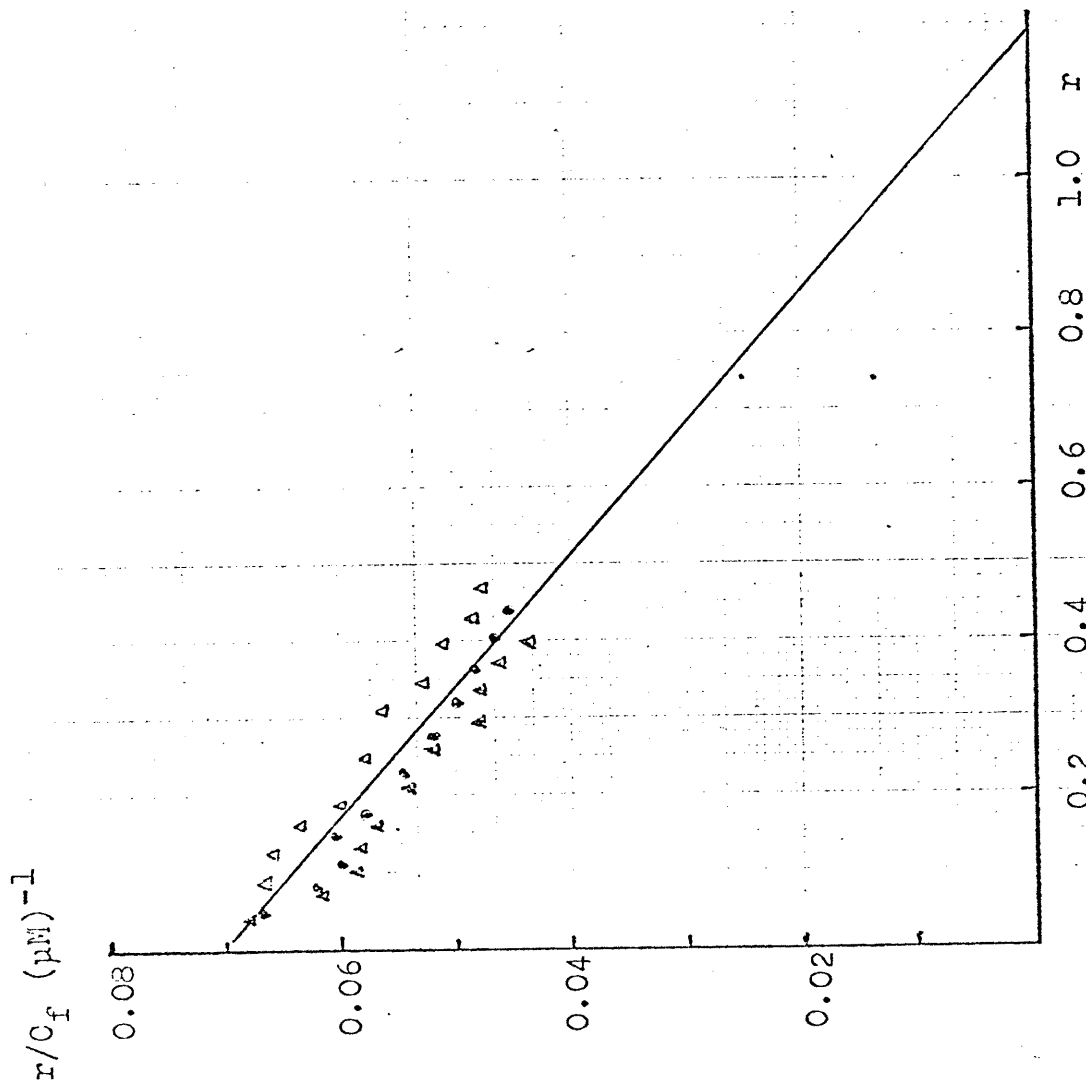


Fig. 32-1 SCATCHARD PLOT OF ANS BINDING TO C $\gamma$ -PROTEIN.

Protein concentration;

( $\Delta$ ) 0.79  $\mu\text{M}$ , ( $\circ$ ) 1.58  $\mu\text{M}$ , ( $\triangle$ ) 3.16  $\mu\text{M}$

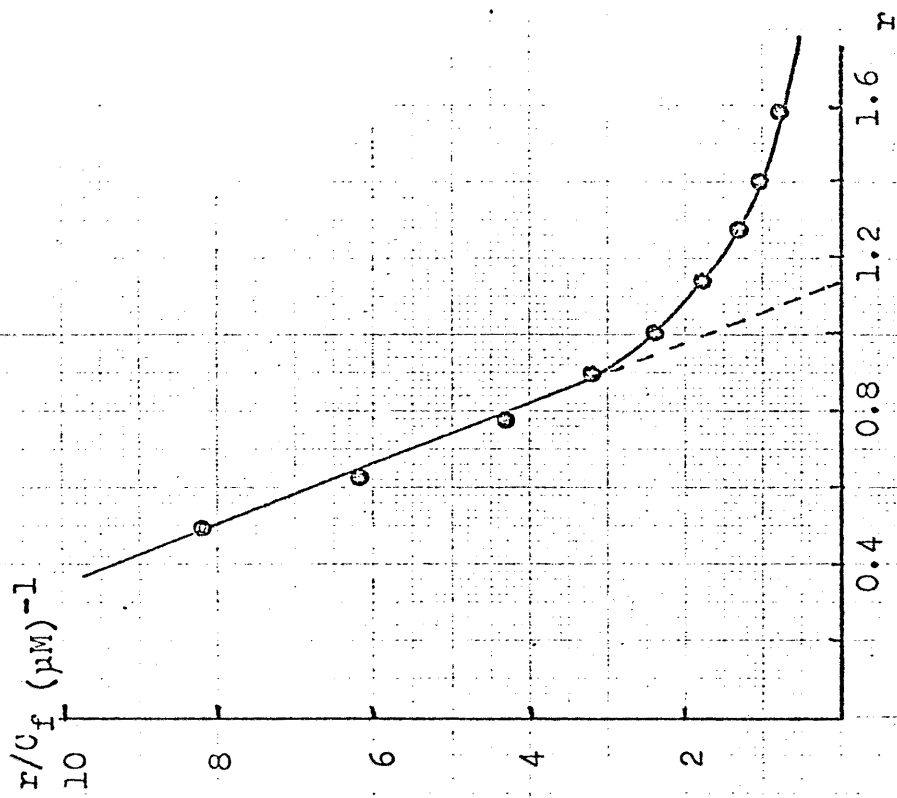


Fig. 32-2 SCATCHARD PLOT OF ANS BINDING TO RAT ALBUMIN

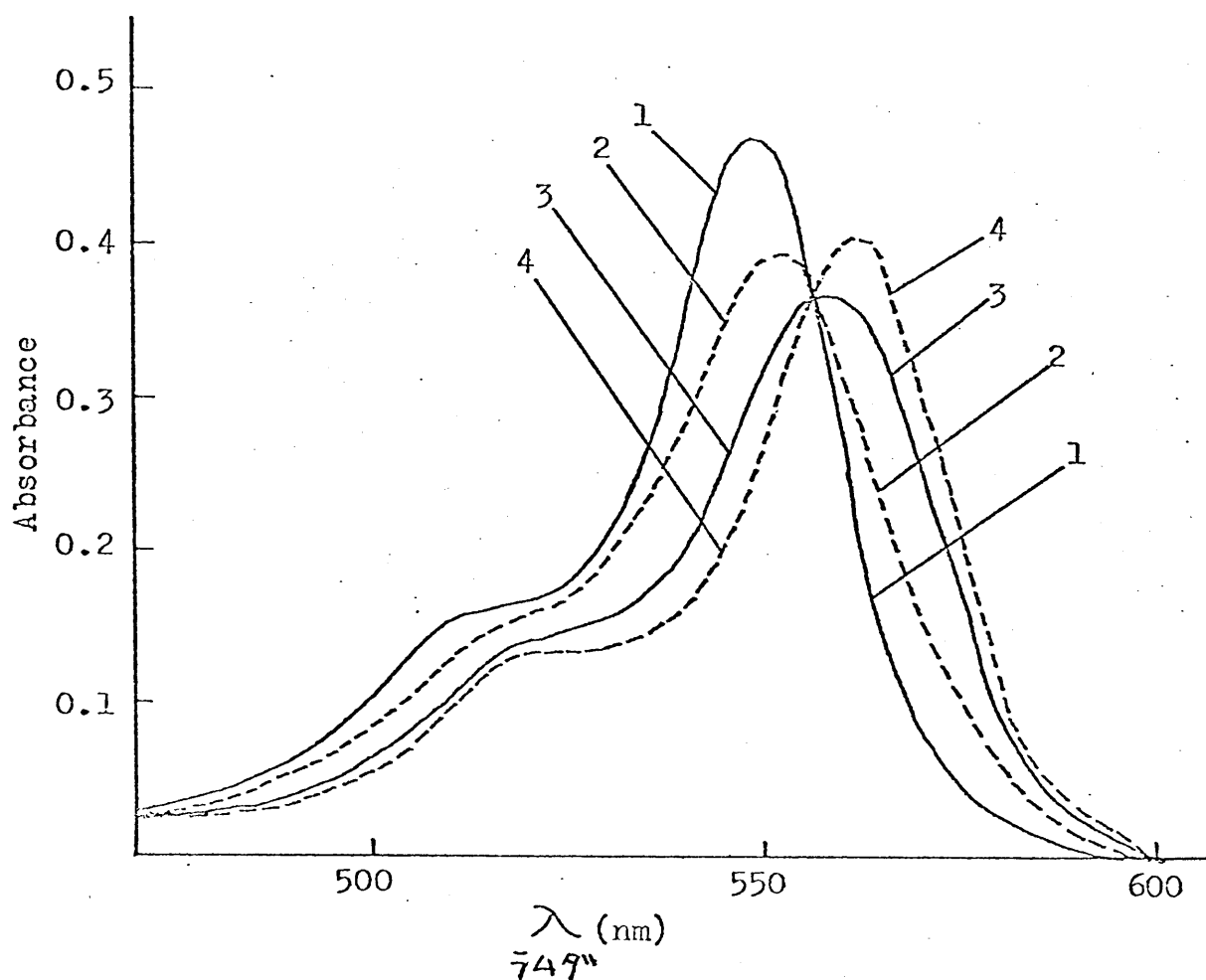


Fig.33-1

Absorption Spectra of RB as a Function of Z-fraction  
Concentration

Each solution contains  $5 \mu\text{M}$  RB. The concentration of  
Z-fraction is as follows. (1), 0; (2), 35  $\mu\text{g/ml}$ ;  
(3), 82  $\mu\text{g/ml}$ ; (4), 370  $\mu\text{g/ml}$ .

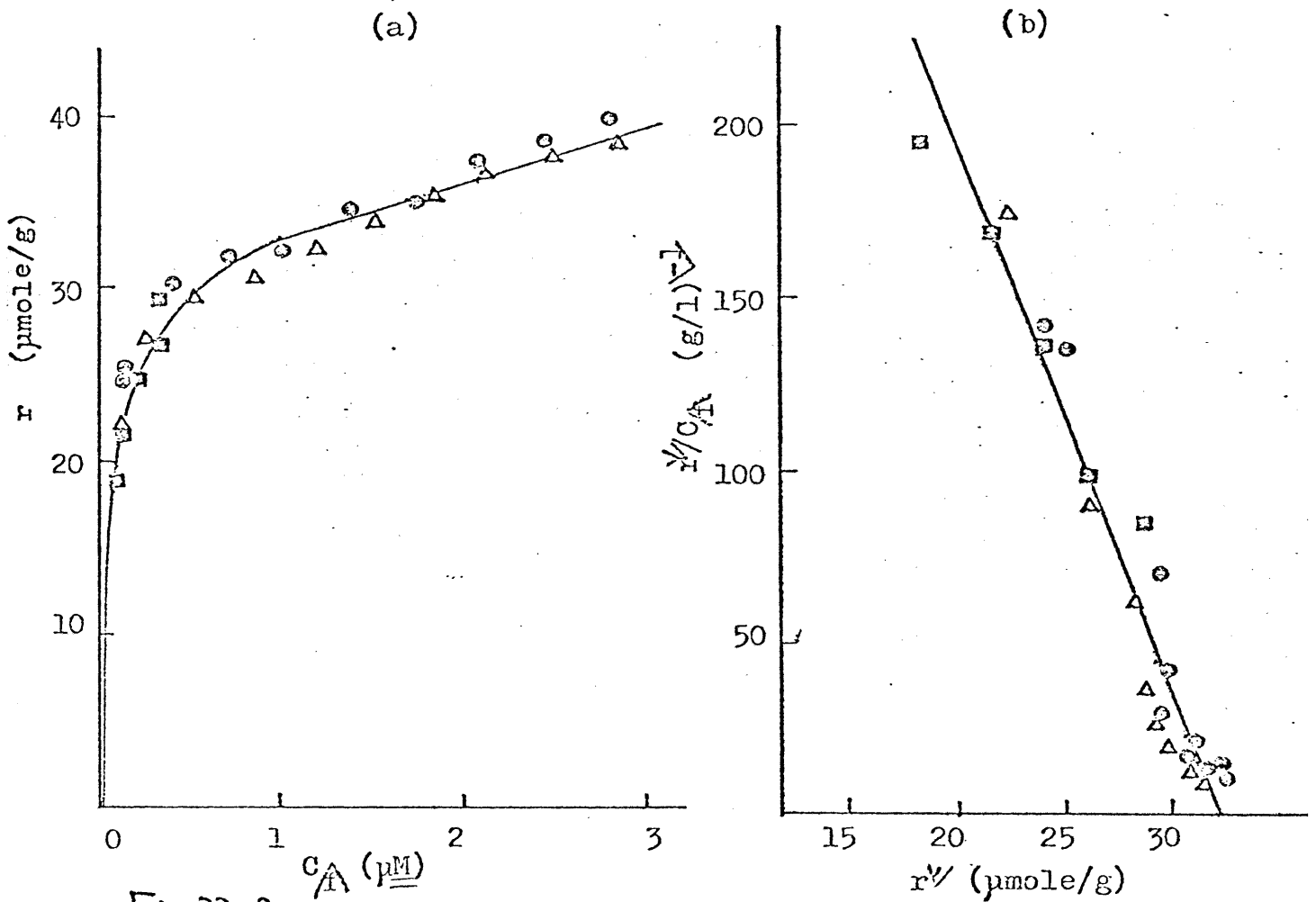


Fig.33-2

The Binding of RB to Z-fraction Determined by Spectrophotometric Titration

The concentration of Z-fraction(preparation 3) is, (⊙),19.4 μg/ml; (Δ),38.8 μg/ml; (⊠),129 μg/ml.

(a) Binding curve. The solid line is a theoretical curve computed using  $n=32 \mu\text{mole/g}$ ,  $K=1.62 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , and  $n^v K^v=2.57 (\text{g/l})^v$  in Eq.4.

(b) The Scatchard plot of RB binding to the tight binding sites.  $r^v$  is obtained by dividing RB concentration bound to the tight binding sites by Z-fraction concentration.(see details in the text).



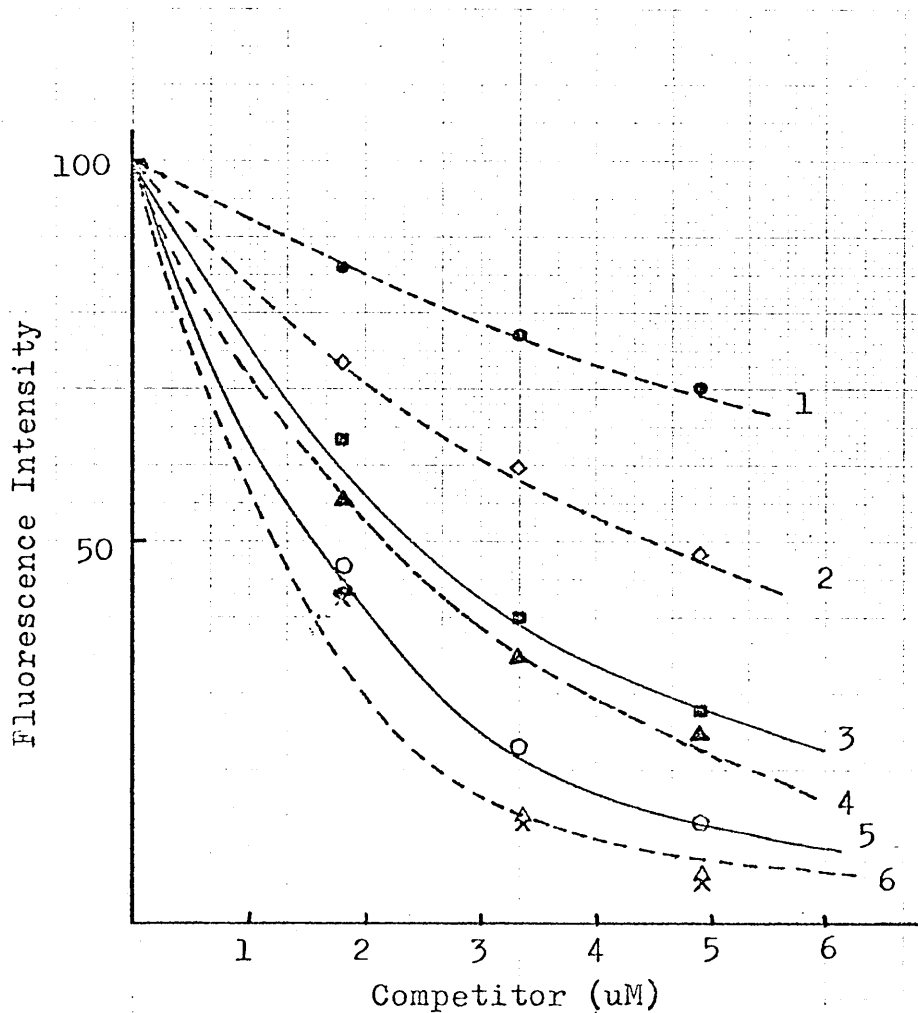


Fig.34-1 THE COMPETITION OF VARIOUS ORGANIC ANIONS WITH ANS FOR THE BINDING SITES ON RAT ALBUMIN

Competitors: ( $\odot$ )PSP, ( $\diamond$ )BSP, ( $\blacksquare$ )ICG, ( $\blacktriangle$ )AM,  
 ( $\circ$ )BPB, ( $\triangle$ )RB, ( $\times$ )Bilirubin

The solid lines are theoretical curves calculated on the basis of  $K_a = 1.0 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ ,  $n=1$ ,  $(\text{ANS})_t = 2 \text{uM}$ , and  $(\text{Protein}) = 2 \text{uM}$ , and  $K_c =$ ,

- (1)  $1.5 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ , (2)  $5 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ , (3)  $1.5 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ ,  
 (4)  $2.0 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ , (5)  $5 \times 10^7 \text{M}^{-1}$ , (6)  $1.0 \times 10^8 \text{M}^{-1}$

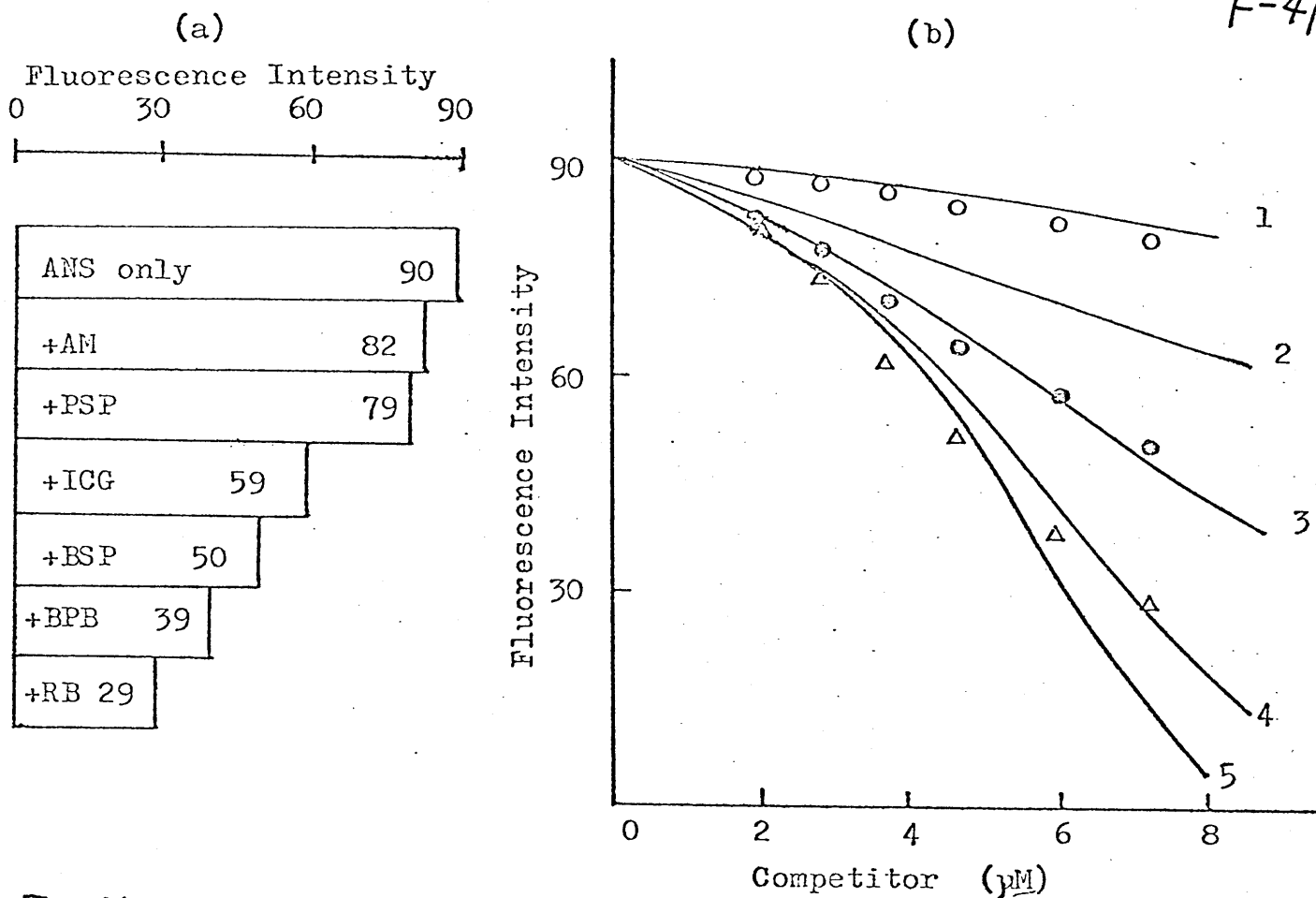


Fig. 34-2

The Competition of Various Organic Anions with ANS for the Binding Sites on Z-fraction

The concentration of Z-fraction and ANS is 388  $\mu\text{g/ml}$  and 2  $\mu\text{M}$ , respectively. Under these conditions, about 80 % of added ANS is bound and that to the first binding sites (see the arrow in Fig. 11 ).

(a) The decrease of fluorescence intensities by adding various competitors. Each competitor concentration is 7.2  $\mu\text{M}$ .

(b) The titration of ANS and Z-fraction mixture with PSP(O), BSP( $\odot$ ) and RB( $\Delta$ ). The solid lines are theoretical curves

calculated on the basis of  $K_a = 0.62 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ ,  $n = 18 \text{ umole/g}$  and  $K_c =$ , (1)  $1 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ , (2)  $5 \times 10^5 \text{M}^{-1}$ , (3)  $2 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ , (4)  $1 \times 10^7 \text{M}^{-1}$   
(5)  $5 \times 10^7 \text{M}^{-1}$

Fig. 34-3

Competition of various organic anions with ANS for binding site on  $C_v$  protein in  $\gamma$ -fraction.

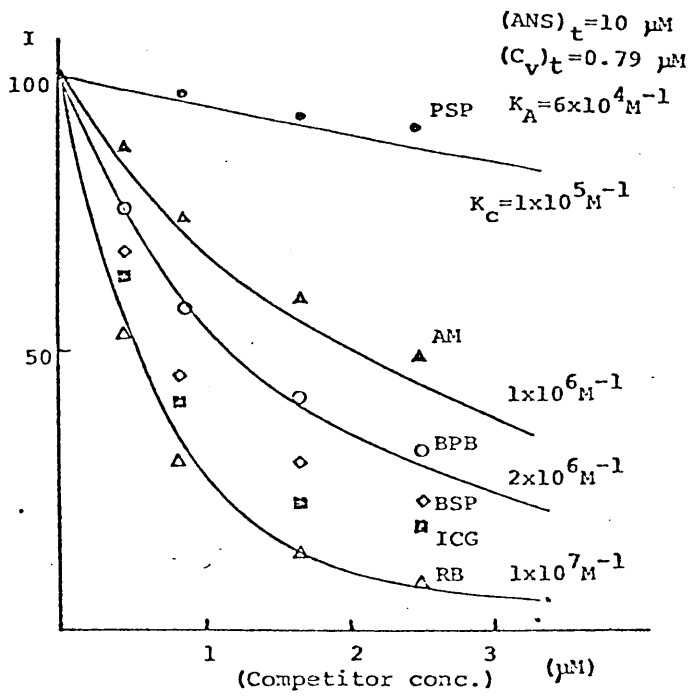


Table VI

	quantum yield <sup>*</sup>	n <sub>1</sub>	Binding Constant ( x 10 <sup>6</sup> M <sup>-1</sup> )							
			ANS	BSP	ICG	AM	BPB	Biliru.	RB	PSP
Rat Albumin	0.93	1	11	5	15	20	50	100	100	1.5
Y, C <sub>v</sub>	0.2	1	0.06	5	7	1	2	3	10	0.1
Y, C <sub>1</sub>	0.16	1	0.04	8	10	2	5	5	10	0.1
Y Y, C <sub>2</sub>	0.14	1 <sup>**</sup>	0.04	3	10	0.5	3	1	10	0.1
Y, C <sub>3</sub>	0.12		0.03	2	6	0.5	3	1	6	0.1
Z	0.87	0:5	0.6	2	1	0.1	4		10	0.1

Binding parameters of various organic anions to Y and Z proteins.

\* The quantum yield of ANS bound to BSA is assumed to be 0.75.  
 ( Weber, G., J. Biol. Chem. 239(1964), 1415 )

\*\* This value is not conclusive because of the imperfect purification.

### 第三章 肝臓・腎臓のY・Z-分画 の比較

109

#### 1. ゲル口過 pattern 及び Y・Z-分画の BSP 結合の比較

##### (1) 方法-----セファテックス G-75ゲル口過

P. 28に記したものと基本的には同じである。

その他の条件は、Fig. 35中に示してある。

平衡透析法によるY・Z-分画とBSPの結合

P. 30~P. 34に記してある方法と同じ。

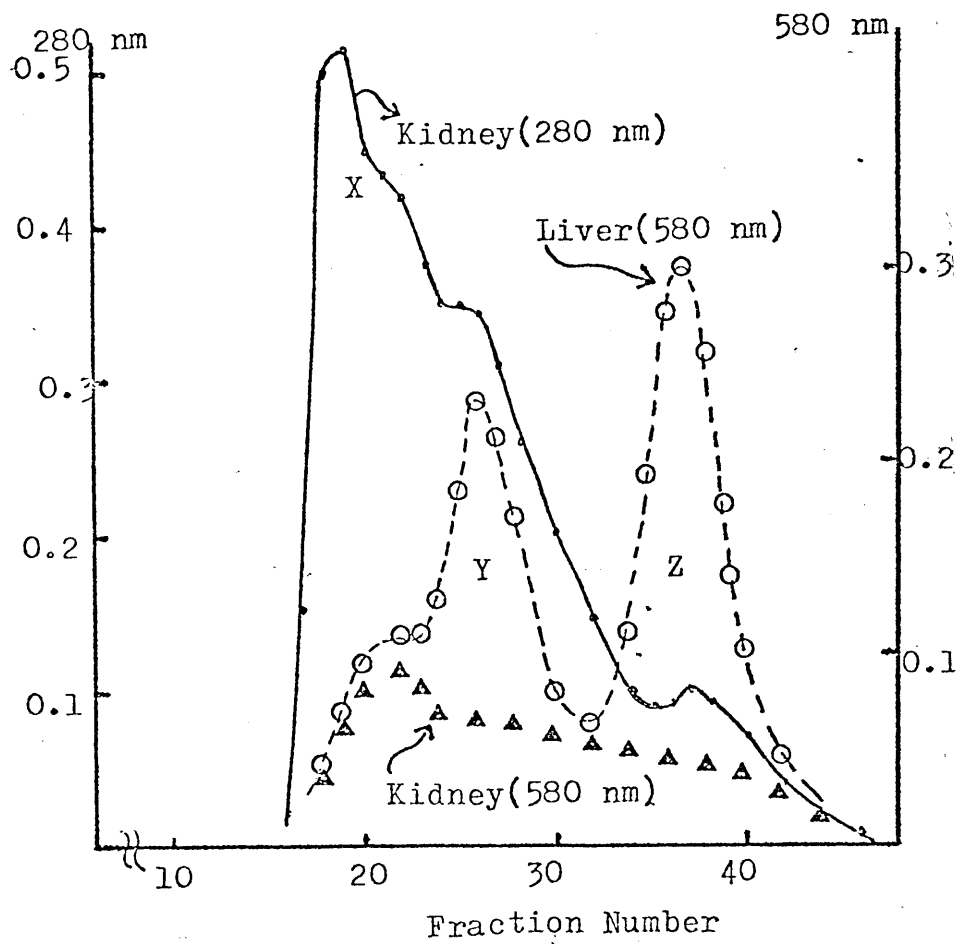
(2) 結果-----Fig. 35-1に同一群のラットより  
とった肝・腎の上清を用いてBSP存在下でゲル  
口過をした代表的結果を示している。腎の  
pattern には、Y・Z-分画の位置に、明確な  
BSP結合がみられない。腎においては、アル  
ブミンの位置に、BSP結合ピークがみられる  
のみである。別の例では、Yの位置にBSPの  
shoulder がみられるが、程んどの場合、ア

ルブリンによる BSP 結合に隠れて、認める事ができない。一方、この様に、肝臓でのゲル透過パターンと比較する事によって分取した腎の Y. 区-分画を、濃縮してもう一度ゲル透過をすると、Fig. 35-2 に示す様に、肝の Y. 区-分画と同一の位置(即ち、分子量的には同一)に、Y. 区-分画の存在する事がわかった。そこで、腎の Y. 区-分画の存在にもかかわらず、何故、BSP に対する結合が小さいかをみよる為に、平衡透析法によって BSP 結合を調べてみた。Fig. 36 には、肝・腎の Y. 区-分画の BSP 結合の比較を、Scatchard plot で示している。みかけの結合定数( $K_1$ )は、Y-分画で、腎は肝の約  $\frac{1}{10}$  以下である事がわかる。又、区-分画は、腎においては、程んど BSP との結合がみられない事がわかった。

以上によつて、腎にも、肝と同様、分子量的には、約 46000, 13000 と、Y. 区-分画の位置に溶出される蛋白が存在するにもかかわらず、BSP に対する結合定数は、肝に比べて

Fig. 35-1

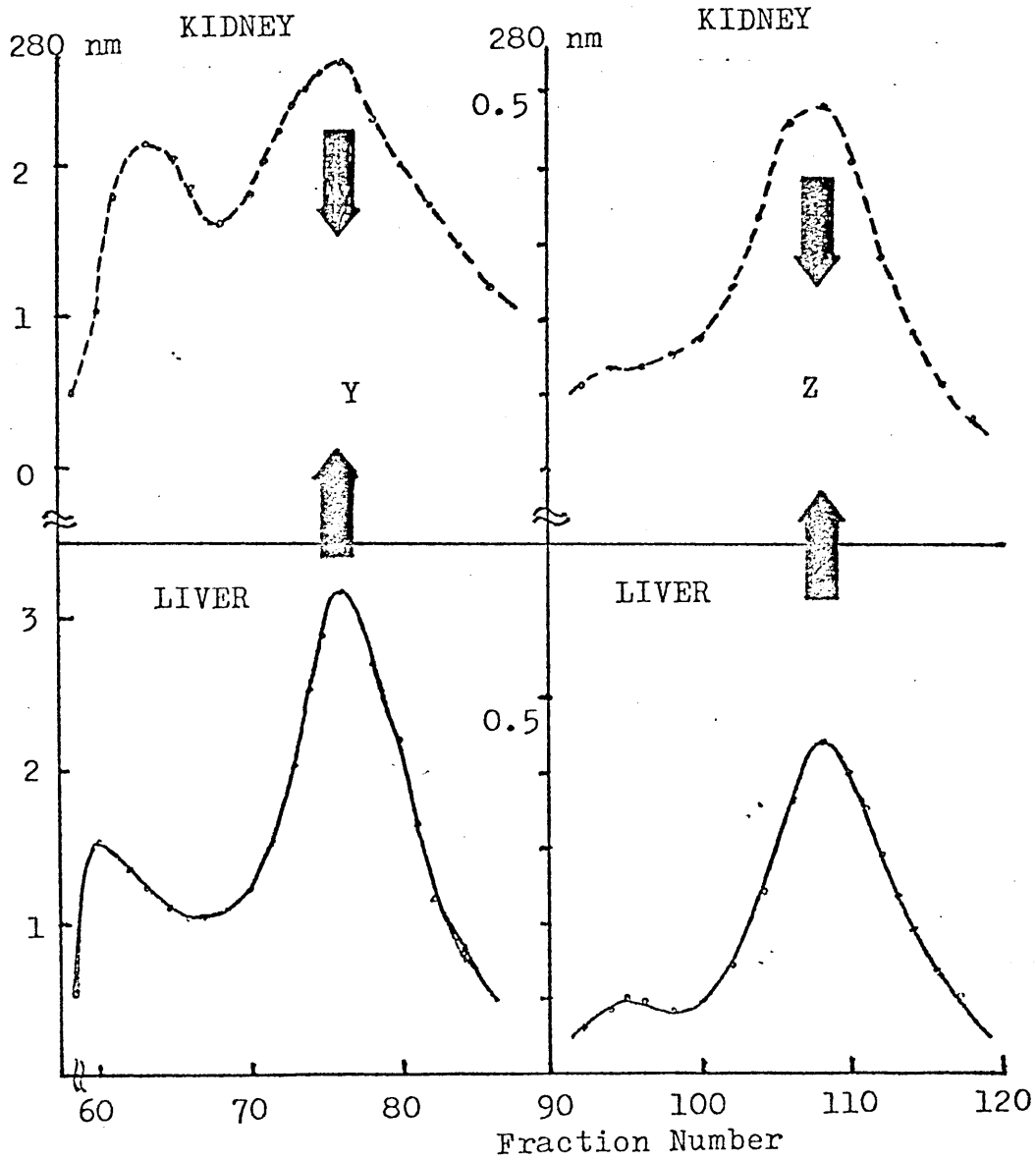
SEPHADEX ELUTION PROFILE OF KIDNEY SUP(50%, 1 ml) WITH ADDED 1 umole BSP.



\*\* Column size, 3.0 x 50 cm  
Elution rate, 13 ml/hr  
One fraction, 4.5 ml

Fig.35-2

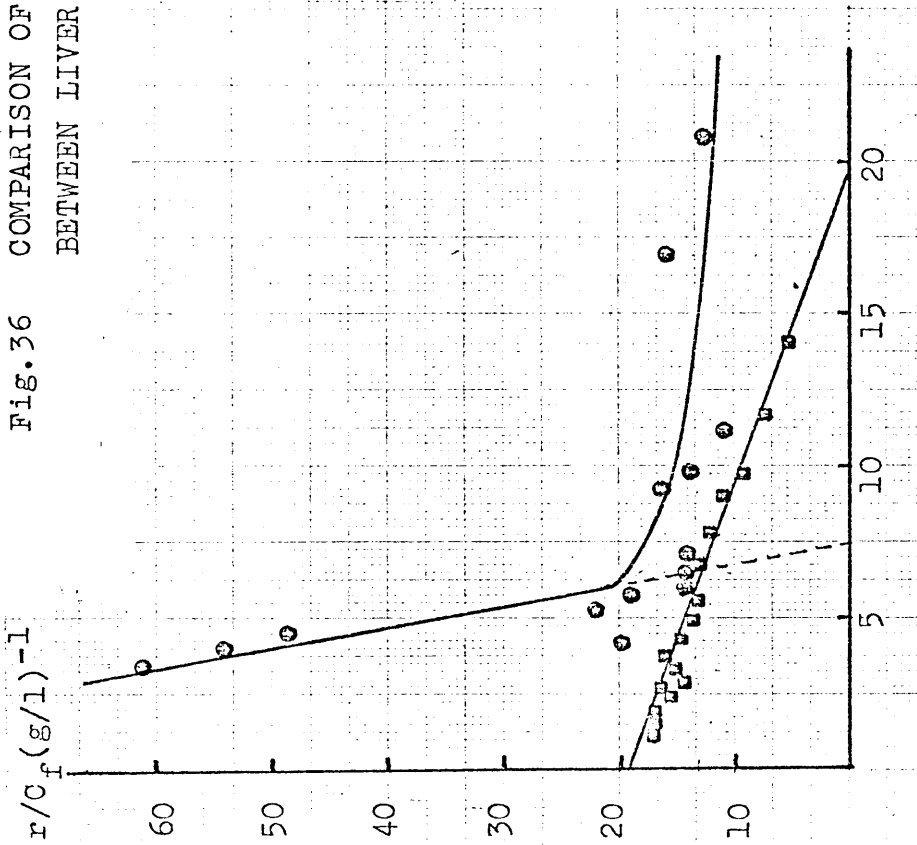
THE 2-nd G-75 Gel-filtration



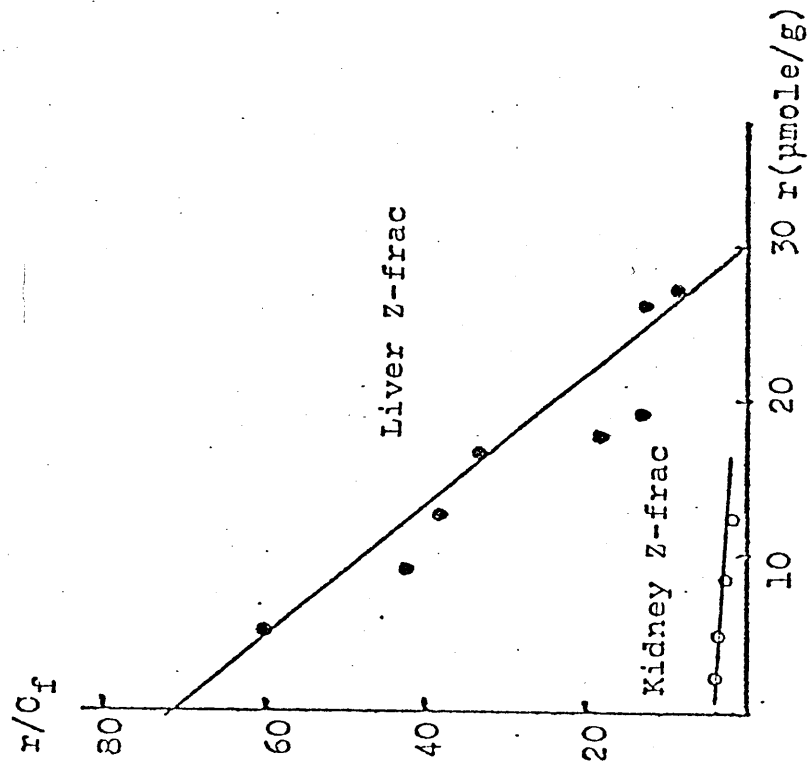
\*\* Column size, 4.4 x 87 cm; Elution rate, 45 ml/hr  
 One fraction, 11 ml



Fig. 36 COMPARISON OF BSP BINDING TO Y AND Z FRACTION  
BETWEEN LIVER AND KIDNEY



- Liver Y-fraction 0.06~1.5 μM(C<sub>free</sub>)  
(140 μg/ml) 0.6~6.0 μM(C<sub>total</sub>)
- Kidney Y-fraction 0.07~1.7 μM(C<sub>free</sub>)  
(144 μg/ml) 0.3~5.0 μM(C<sub>total</sub>)

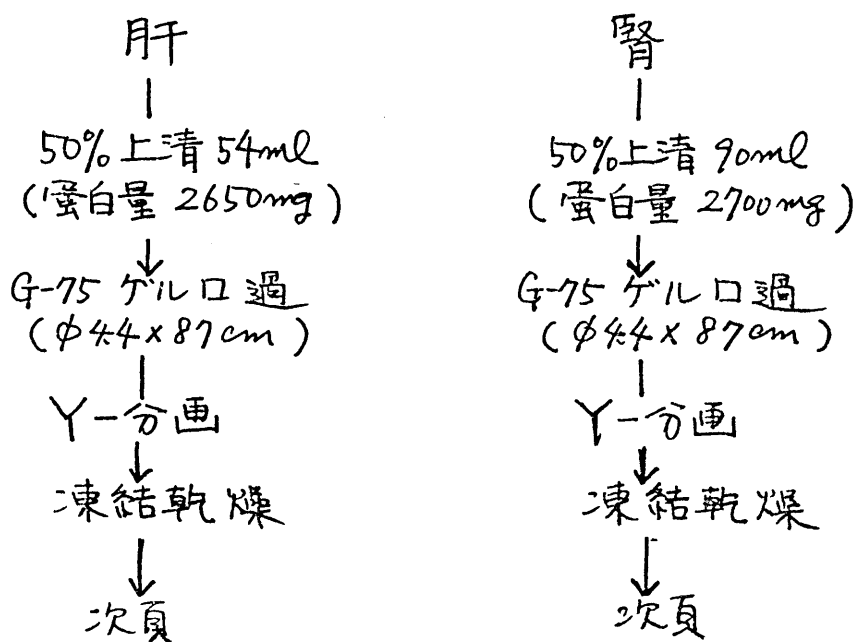


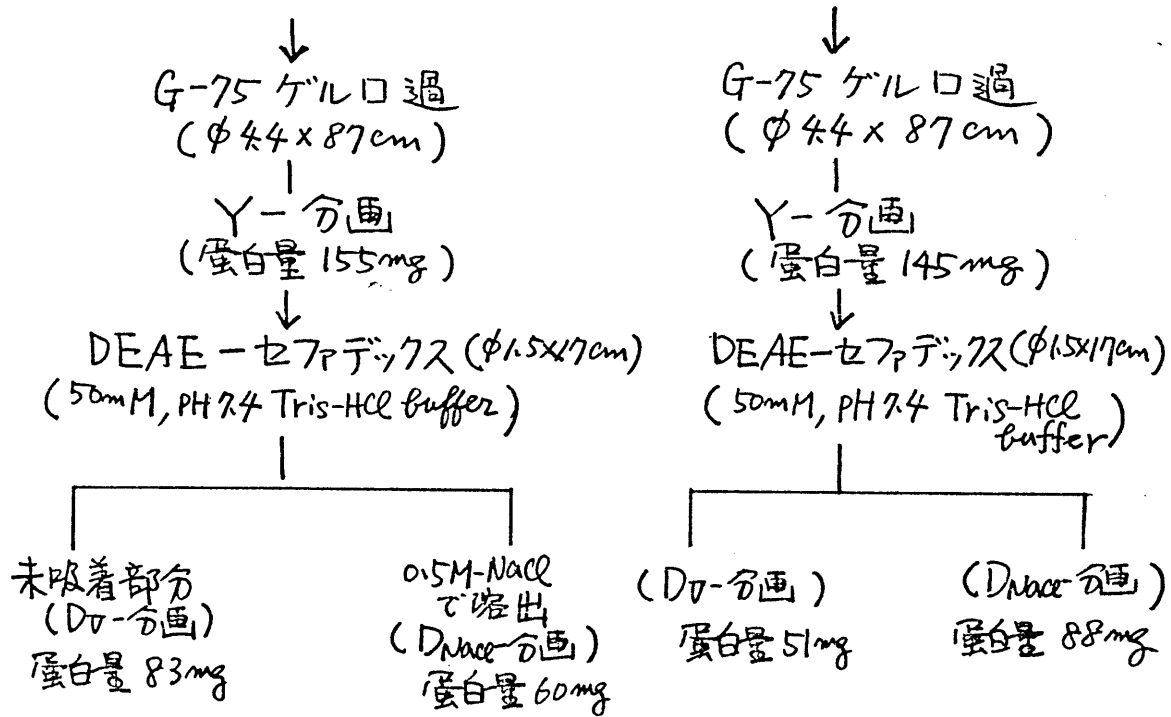
- Liver Z-fraction 1.0~12 μM(C<sub>total</sub>)  
(140 μg/ml)
- Kidney Z-fraction 1.0~12 μM(C<sub>total</sub>)

非常に小さい事が認められた。一方、今までの研究により、Y-分画は、分子量が同一の蛋白群から成る事がわかっているのです。その内容が腎において、どの様に異なるのかを検討してみた。

## 2. Y-分画の内容の比較

(1) 方法 ----- 既に、P.50 ~ P.53に述べた方法で分離していった。概略を下に、肝・腎について比較しながら記す。(同一ラット群で行なう)。





(2)結果 -----肝での分離結果によると、DEAE-セファデックスにアプライ後は、未吸着部分(Dv-分画)に主なる結合蛋白群が存在する事がわかっている。そこで、二度ゲル口過おきのY-分画を、肝、腎の場合、ともに蛋白量にして約150mgを、17ml DEAE-セファデックス カラム(φ1.5cm x 17cm)にアプライすると、肝の場合は、アプライ量の約54%が、腎の場合は35%が未吸着部分に溶出され、肝の方が、Dv-分画の占める割合が大きい事がわかった。

肝の $\gamma$ -蛋白の分離における各段階で、BSPとの結合を調べた結果は、既にFig. 18に示した。腎の分離の各段階での結果を、Fig. 37に示す。肝の場合 (Fig. 18) と比べて大きく異なるのは肝の場合は、上清からD<sub>2</sub>-分画に精製が進むにつれて、みかけの結合定数は約  $1.8 \times 10^7 M^{-1}$  と変化しないが、腎の場合は、上清が約  $3 \times 10^6 M^{-1}$  の結合定数を持つのに比べ、 $\gamma$ , D<sub>2</sub>-分画では、約  $1 \times 10^6 M^{-1}$  と、精製段階が進むと結合が小さくなっている事である。これは、精製によって、Cofactor<sup>2</sup>等が除かれた為というよりも、むしろ、腎上清<sup>\*</sup>には、ある程度量のAlbuminが存在していてこの蛋白のBSPに対する影響が効いている為と考える方が、Fig. 35-1のゲル透過パターンをみても、妥当であろう。もうひとつ、肝の場合 (Fig. 13-1) と異なる点は、肝の場合に、D<sub>2</sub>-

<sup>\*</sup> 臓器を、ラット個体からとり出す時に、生食で灌流して血液をとり除く。この際、肝にくらべ腎では血液のとり除かれ方が悪いであろう。

分画と、Dnacc - 分画のBSP結合を較べると、約6倍以上の結合定数をD $\alpha$ -分画が持つが腎の場合、この二つの分画の結合定数はほとんど変わらないという事である。この様に肝臓は分子量46000のY-分画の中でも DEAE-セフデックス による分離によって、特異的な結合蛋白が精製されてくるのに反し、腎では、特異的な結合蛋白が精製されてこない。しかしながら、この様に結合定数のみで論議をする意には、実験条件として、蛋白濃度、BSP濃度を揃えるだけでは不十分である。そのうえに、非結合型BSP濃度を揃え解析をする必要がある。この事に気をつけ、Fig. 38では、肝・腎のD $\alpha$ -分画のBSP結合を比較してみた。左図は、Binding curve を示したものである。ともに、非結合型BSPの濃度範囲として、 $5 \times 10^{-8} M \sim 4 \times 10^{-6} M$ での結合をみている。右図はこの範囲での data を scatchard plot したものである。明らかに、腎においては、結合定数約  $1.8 \times 10^8 M^{-1}$  で示される特異的な結合蛋白の欠損している事がわかる。Fig. 39には、肝D $\alpha$ 、腎D $\alpha$ -分画の

$r/C_f \text{ (g/l)}^{-1}$

Fig.37 THE INCREASE IN APPARENT NUMBER OF BINDING SITES WITH PURIFICATION OF KIDNEY Y

BSP concentration 0.5 ~ 10  $\mu\text{M}$

- supernatant 1200  $\mu\text{g/ml}$
- Y-fraction 144  $\mu\text{g/ml}$
- $D_v$ -fraction 95  $\mu\text{g/ml}$
- x  $D_{\text{nacl}}$ -fraction 250  $\mu\text{g/ml}$

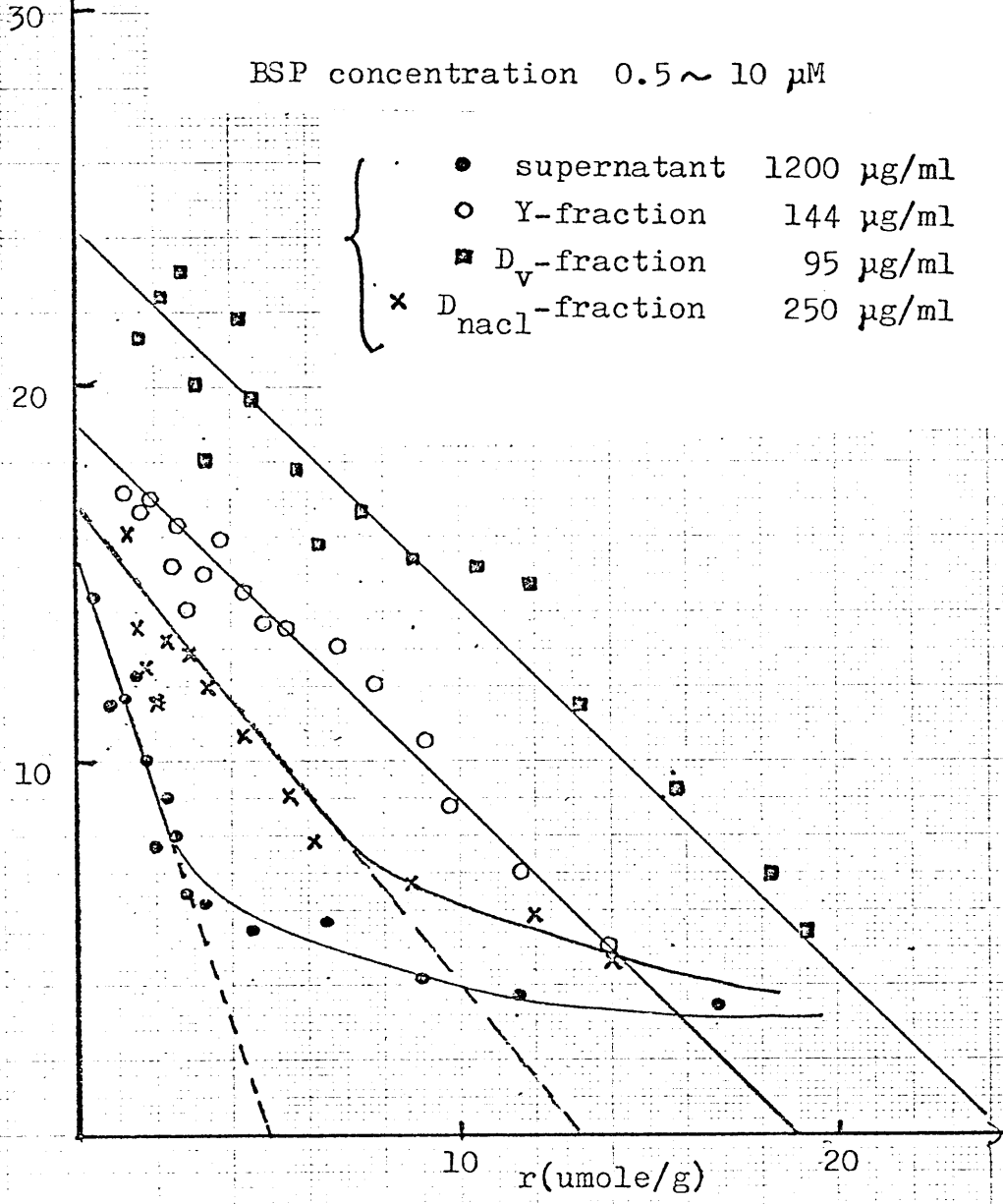
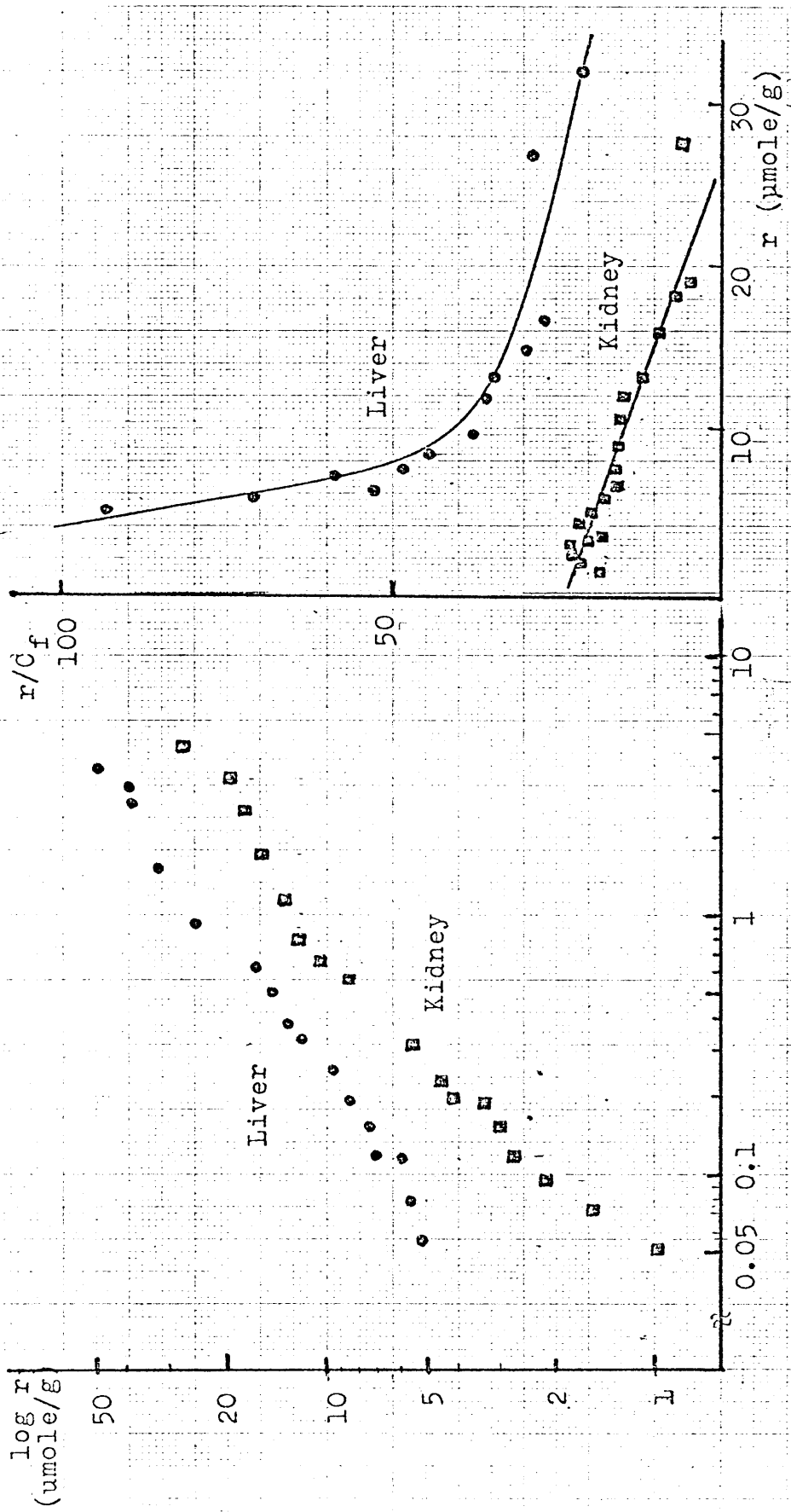
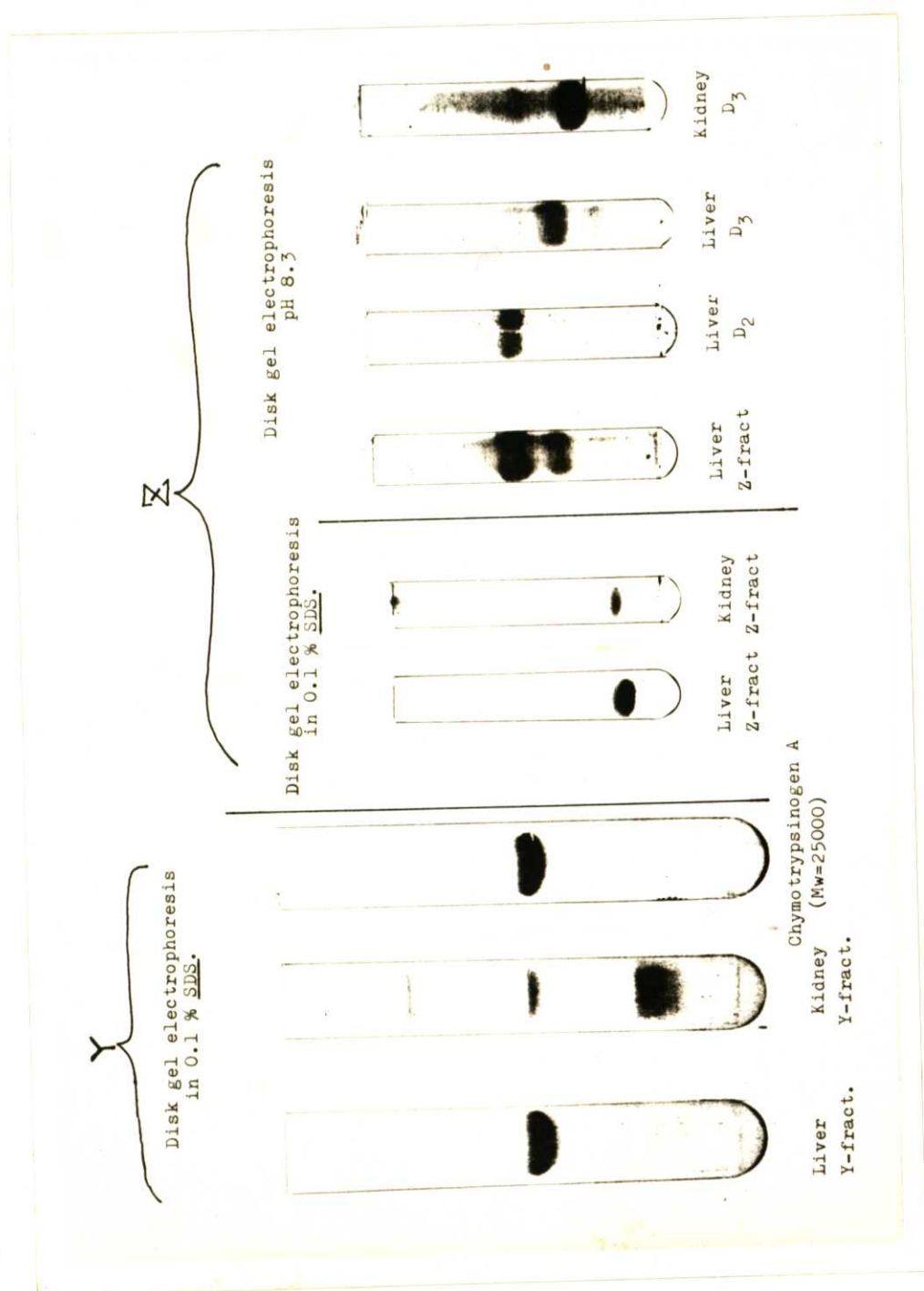


Fig. 38 COMPARISON OF BSP BINDING TO  $D_v$ -FRACTION BETWEEN LIVER AND KIDNEY



F-47

Fig. 39

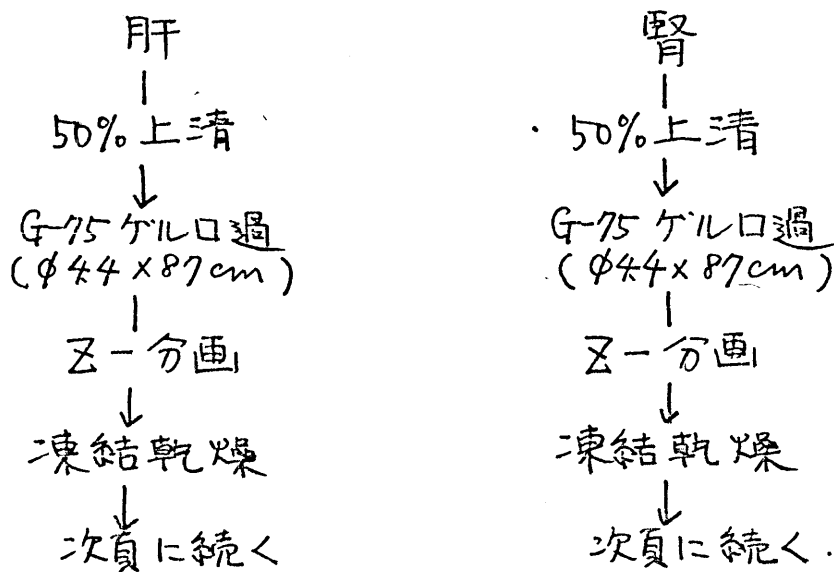


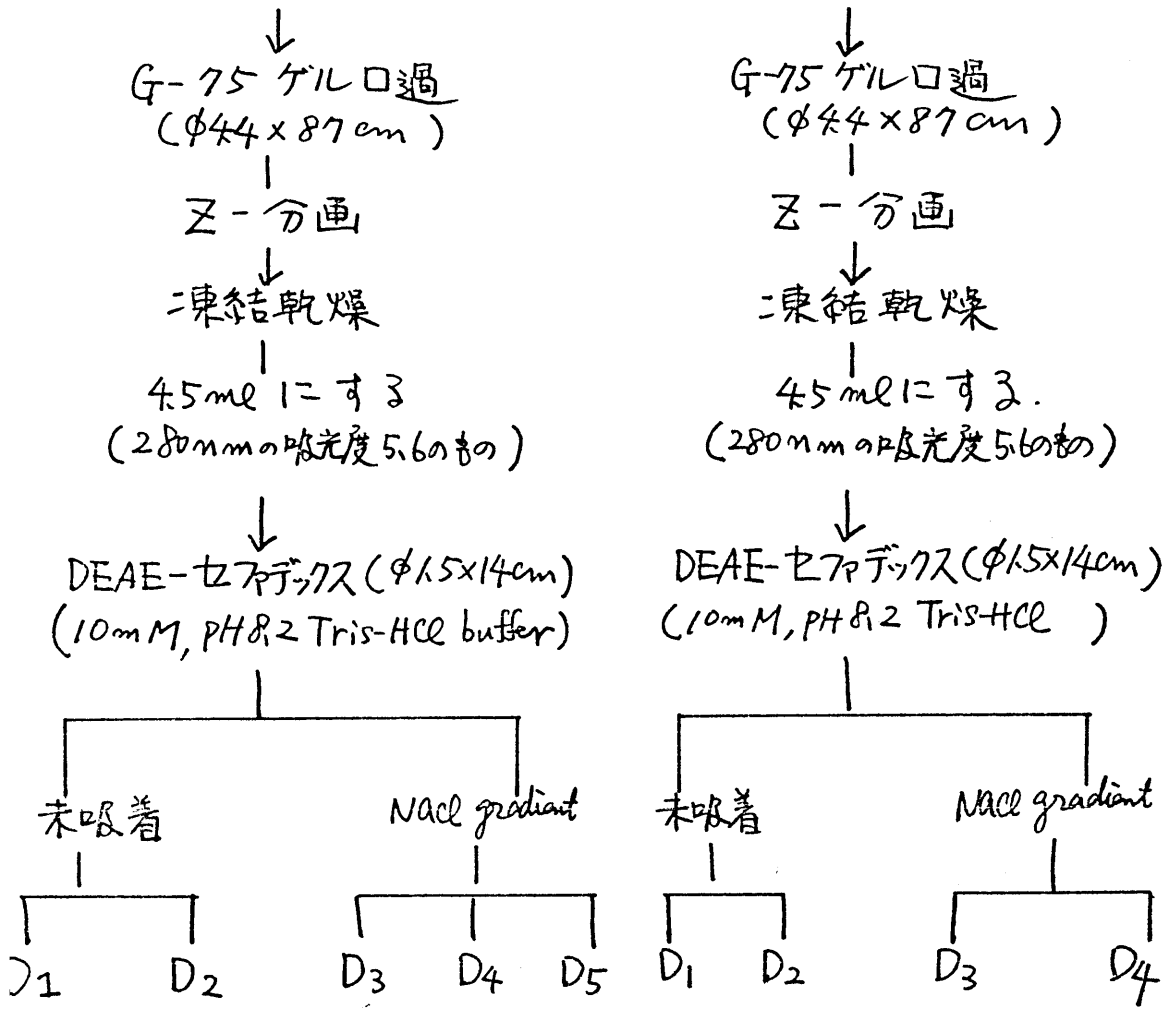


SDS電気泳動の結果である。腎にも分子量25000のbandがみられる事より、確かに、 $\alpha$ -subunit より成る蛋白の存在する事がわかる。腎においては更に、分子量の小さい(約13000) bandがみられるが、この内容については、今の所、不明である。

### 3. $\alpha$ -分画の内容の比較

(1)方法 ----- P.85~89に述べた方法で分離していった。概略を下に、肝、腎について比較しながら記す。





(2) 結果-----二度ゲルろ過をして分子量的にはほぼ均一になった区-分画を用いて、ANSと結合して出すけい光量子収率を比較してみた。

一定濃度のANSが、すべて蛋白と結合して出す  
 けい光強度を率める為に、大過剰量の蛋白溶  
 液を、ANSでtitrateし、このcurveが、原  
 点を通る直線である範囲を用いた。Fig. 40  
 がその結果である。肝と腎の場合で、けい光の  
 機器のsensitivityが異なる事に気をつけてみると、  
 肝の場合、 $94 \text{ units}/\mu\text{M}\cdot\text{ANS}$ 、腎の場合 $4.2$   
 $\text{units}/\mu\text{M}\cdot\text{ANS}$  という値が得られ、腎の $\alpha$ -分  
 画は、肝のそれに較べ、ANSの結合部位が  
 はるかにpolarである事がわかった。又、  
 結合定数の違いを率める為に、低濃度の  
 蛋白溶液をANSでtitrateし、p41のEq.(1)  
 による解析を行なったものが、Fig. 41である。  
 腎の場合、肝に較べ、ANSの結合定数が約  
 1/20である事がわかった。

Fig. 42は、二度ゲルロ過すみの $\alpha$ -分画  
 を、全く同一条件(アプライ蛋白量, PH, イオン  
 強度, カラムの大きさ, 流速)で、DEAE-  
 セファテックスにアプライした結果である。肝と  
 腎の大きな違いとして、肝での活性分画である

D<sub>2</sub>-分画が、腎においては蛋白質にして程んど存在しない事がわかる。腎における D<sub>2</sub>-分画の欠損は蛋白質においてのみではなく、後に述べるように、ANS 結合活性面でもみられる。次に腎の各分画での、ANS との結合をけい光法でみたものを\*、Fig. 42-3 に示す。主な活性は、D<sub>3</sub> に存在している。このけい光 titration のデータを、Wang-Edelman の方法 (P43 参照) により、逆数 plot したものが Fig. 43 である。肝臓においては、 $\gamma$ -分画と、D<sub>2</sub>-分画の場合の逆数 plot のス切片が一致する事により、既に述べた様に、 $\gamma$ -分画中の主な結合蛋白質が D<sub>2</sub>-分画中にある事がわかる。腎においては、同様に、考えて、D<sub>3</sub>-分画中に主な結合蛋白質の存在する事が示された。

写真-1 に、電気泳動による比較を示している。二度アルコ過すみの  $\gamma$ -分画を、SDS 電気泳

\* 肝での結果は、既に示した Fig. 24 と程んど同じであるので、改めては示さなかった。

動にかけると、ほぼ単一の band が得られ、肝、腎ともに同一位置に泳動された。これは、Fig. 35-2 のゲル透過の結果ともよく一致しており、肝、腎の  $\gamma$ -分画ともに同一の分子量である事を示す。又、PH 8.3, 標準ゲルの条件下での disk 電気泳動法により、腎の主結合蛋白を含む、 $D_3$ -分画中の主蛋白は、肝の  $D_2$ ,  $D_3$ -分画とは、別の蛋白である事がわかる。

4. 考察及びまとめ----- 今回の研究により、腎にも  $\gamma$ ,  $\delta$ -分画と呼ばれる (分子量がそれぞれ 46000, 13000) 蛋白分画の存在する事、及び BSP に対する結合 affinity は、 $\gamma$ ,  $\delta$ -分画ともに腎の方がゆるやかに小さい事が明らかになった。又、その内容について調べると、 $\gamma$ -分画には、腎においても、 $\alpha$ -subunits より成る蛋白が存在する事がわかったが、肝においてみられる BSP に対する結合定数約  $10^7 M^{-1}$  の結合蛋白は、厳密な結合実験においても

(Fig. 38) 検出する事ができなかった。又、 $\alpha$ -分画  
画については、ANSを用いるけい光法で結合  
活性を追った所、肝において最も活性の大きい  
 $D_2$ -分画の主蛋白が、腎においては欠損して  
いる事がわかった。腎の $\alpha$ -分画では、 $D_3$ -分画  
にANS結合活性が存在したが、肝の主蛋白  
( $D_2$ )にくらべると、けい光量子収率は、 $\frac{1}{20}$ 以下  
であり、はるかに結合部位の疎水性は小さい  
事がわかった。又、腎におけるこの $D_3$ -蛋白は、  
肝の $D_2$ ,  $D_3$ 蛋白とは、*dieck* 電気泳動により  
別のものである事が判明した。この様に、 $\gamma$ 、 $\alpha$ -  
分画ともに、結合活性の面で肝、腎で大きな違  
いのある事が明らかであるが、一方、Ligandinが  
腎にも存在して、腎への有機アニオン(フェノールスル  
フトアライン、ペニシリン、 $p$ -アミノ馬尿酸)移行  
に関係しているというKirschら(43)の報告及  
び、Fleischnerら(28)の免疫法による報告もある。  
従って、我々との結果の違いを考えるには、現在  
の所、腎の $\gamma$ -分画中のLigandinは、何らかの  
原因によって不活性化されている可能性、或

いは、Y-分画中の主 BSP 結合蛋白が Ligandin 以外の蛋白である可能性と、その事が考えられるが、このどちらが、主原因であるかを定める為には、更に、免疫学的検討を含む詳細な研究が必要であろう。Z-蛋白についても、Arias グループ (38, 54) は、腎にも存在する事をいっているが Ockner ら (57) は、ラット小腸の FABP (P21 参照) としてとった Z-蛋白に対する抗体をつくり、この蛋白と免疫学的に反応する蛋白が肝には存在するが、腎には存在しない事を述べている。Ockner らの結果は、我々の腎の Z-分画には、肝の主活性蛋白である D<sub>2</sub>-分画が欠除している”という結果とよく一致しているが、彼らの FABP の PI が 5.5 であるのにくらべ、我々の主 D<sub>2</sub>-分画の中の主蛋白の PI が約 7.5 であるなど更に細かい検討を要する点もある。いづれにせよ、もし、Kirsch, Kamisaka (43) らの言う様に、腎の Ligandin が、肝同様、有機アニオンの Net のとり込みに関係しているのならば、何故、BSP, ICG,

RB等が肝に選択的に集まり、PSP、PAHA等  
が腎に選択的に集まるのかの説明が出来ない。  
何故ならば、同一蛋白 Ligandin が有機アニオン  
の区別を有する事は出来ないからである。

私の今回の研究により、肝、腎の有機アニオンの  
Net uptakeの違いは、細胞質結合蛋白群  
(Y、Zともに)への affinity の違いが原因  
である可能性が示された。



Fig. 40

Titration of excess Z-fraction (from Kidney and Liver) with ANS

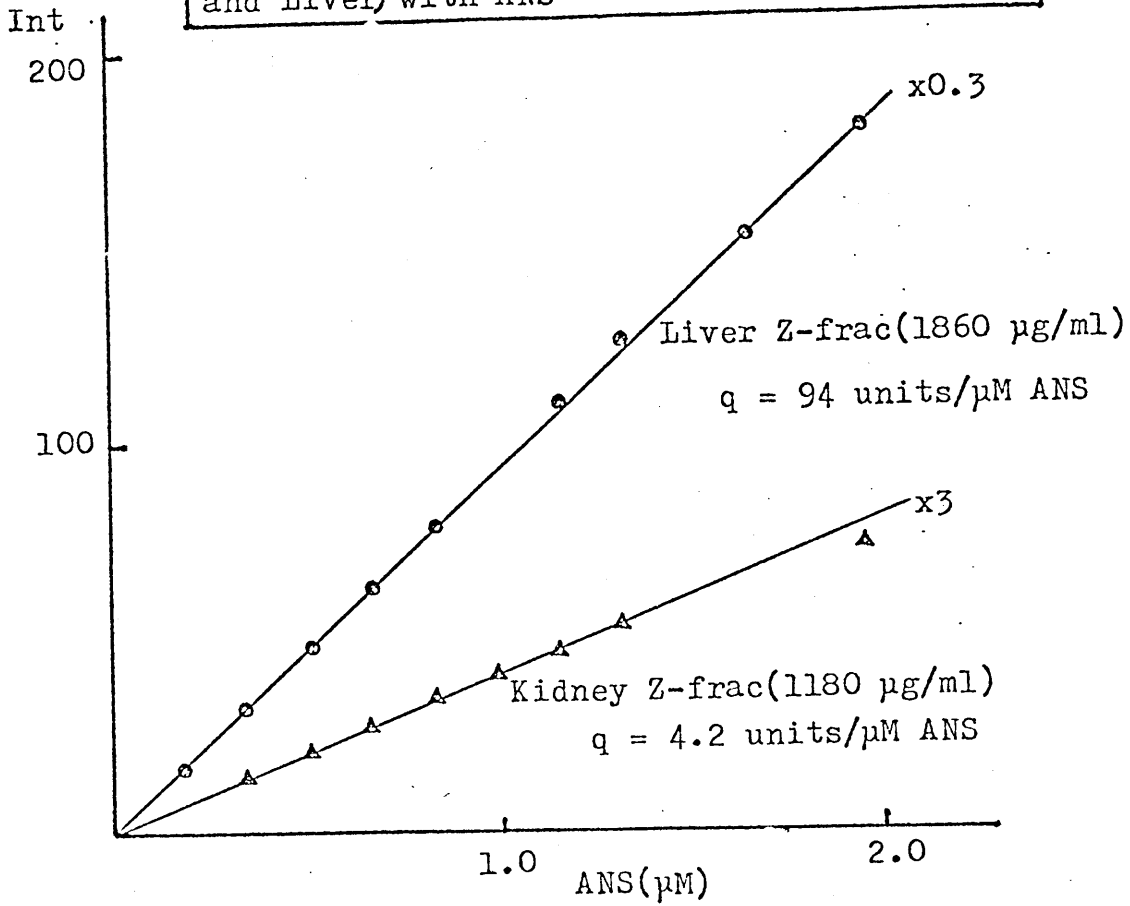
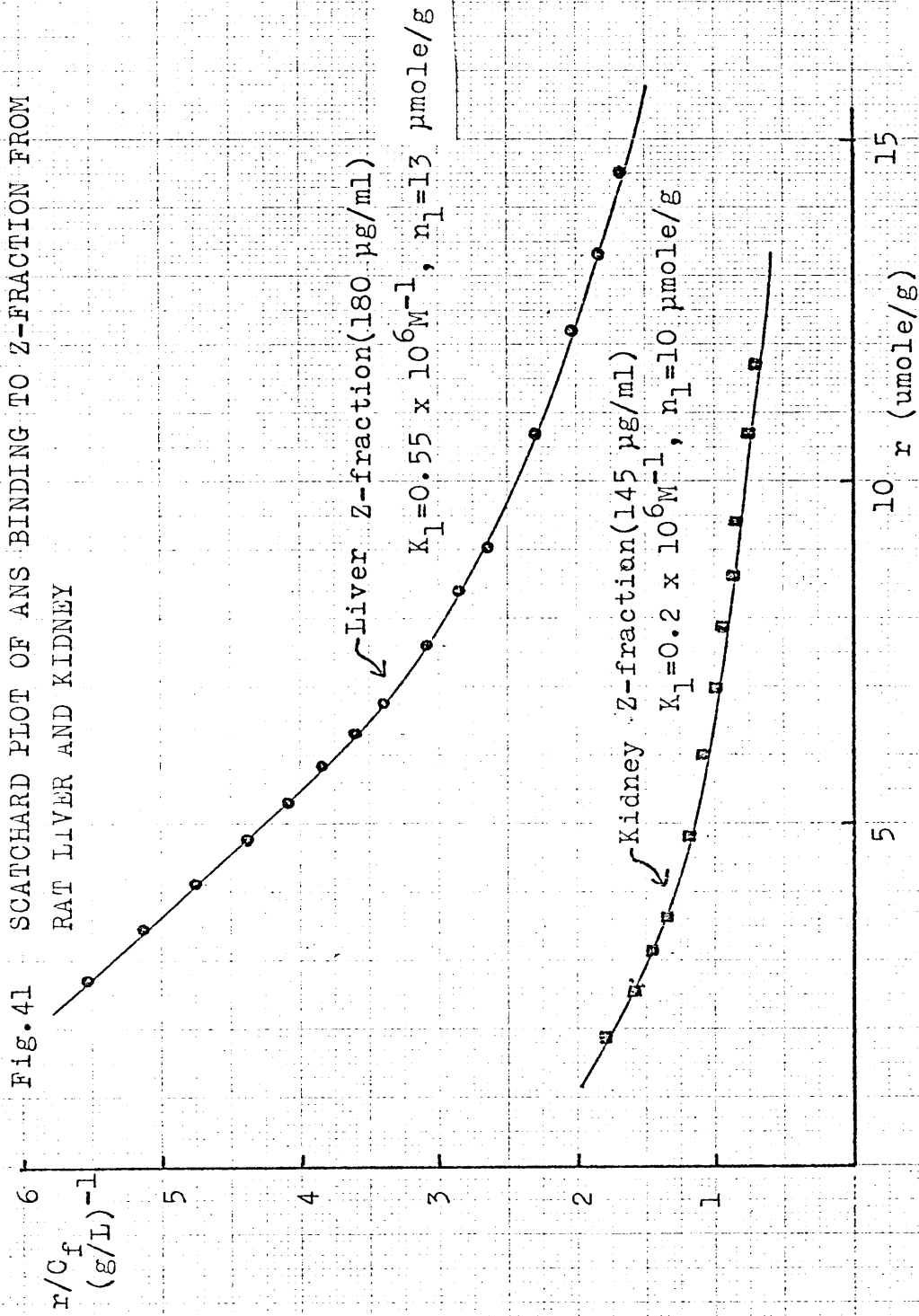


Fig. 41 SCATCHARD PLOT OF ANS BINDING TO Z-FRACTION FROM  
RAT LIVER AND KIDNEY



F-50

Fig. 42

DEAE-Sephadex A-50 chromatography of Z-fraction after 2-times Gel-filtration.  
(pH 8.2, 10 mM Tris-HCl buffer, 1.5x14 cm, Load 0.D. 25 in 280 nm Abs)

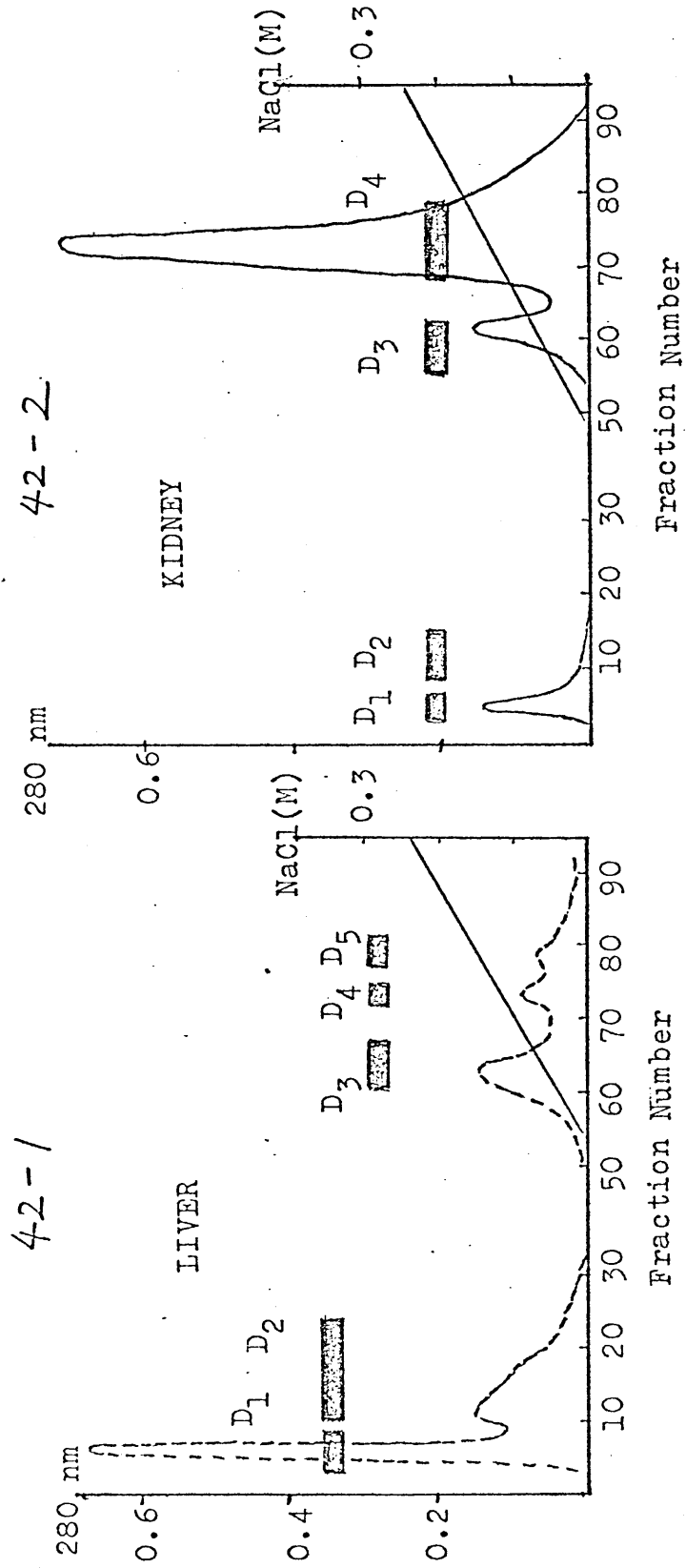


Fig. 42-3 FLUORESCENCE ENHANCEMENT OF ANS BOUND TO PROTEINS IN Z-FRACTION

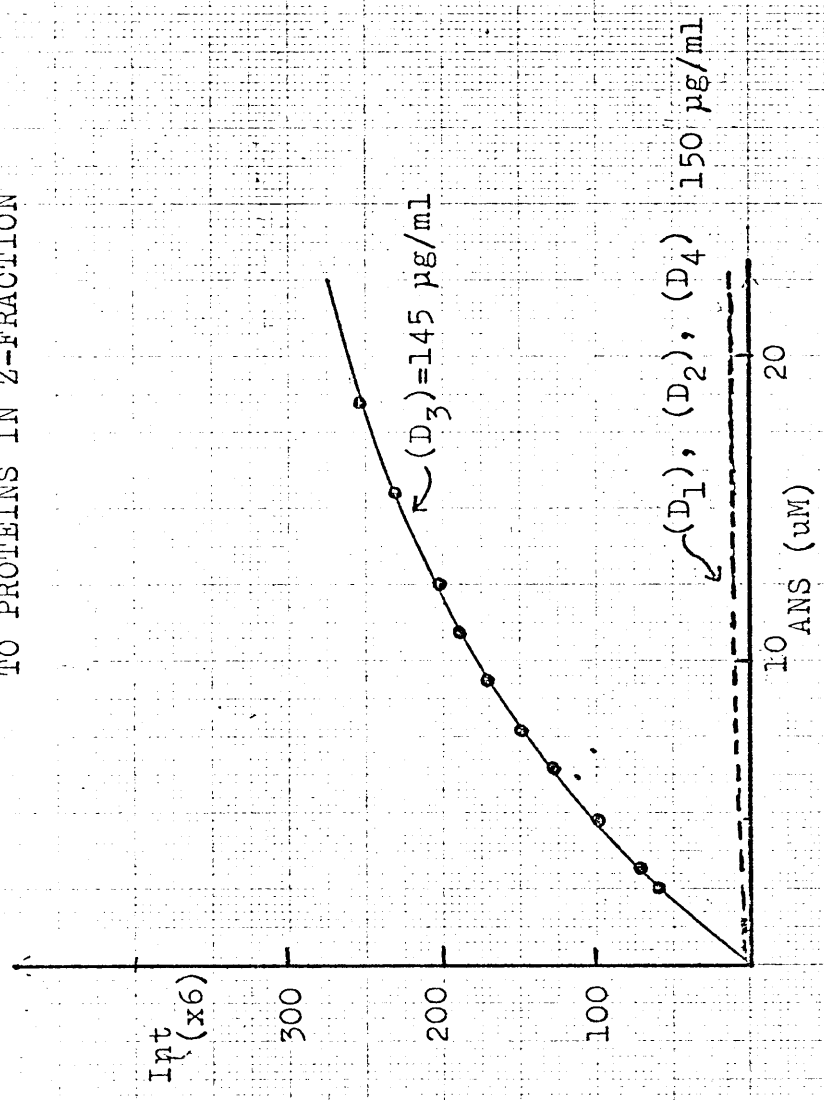
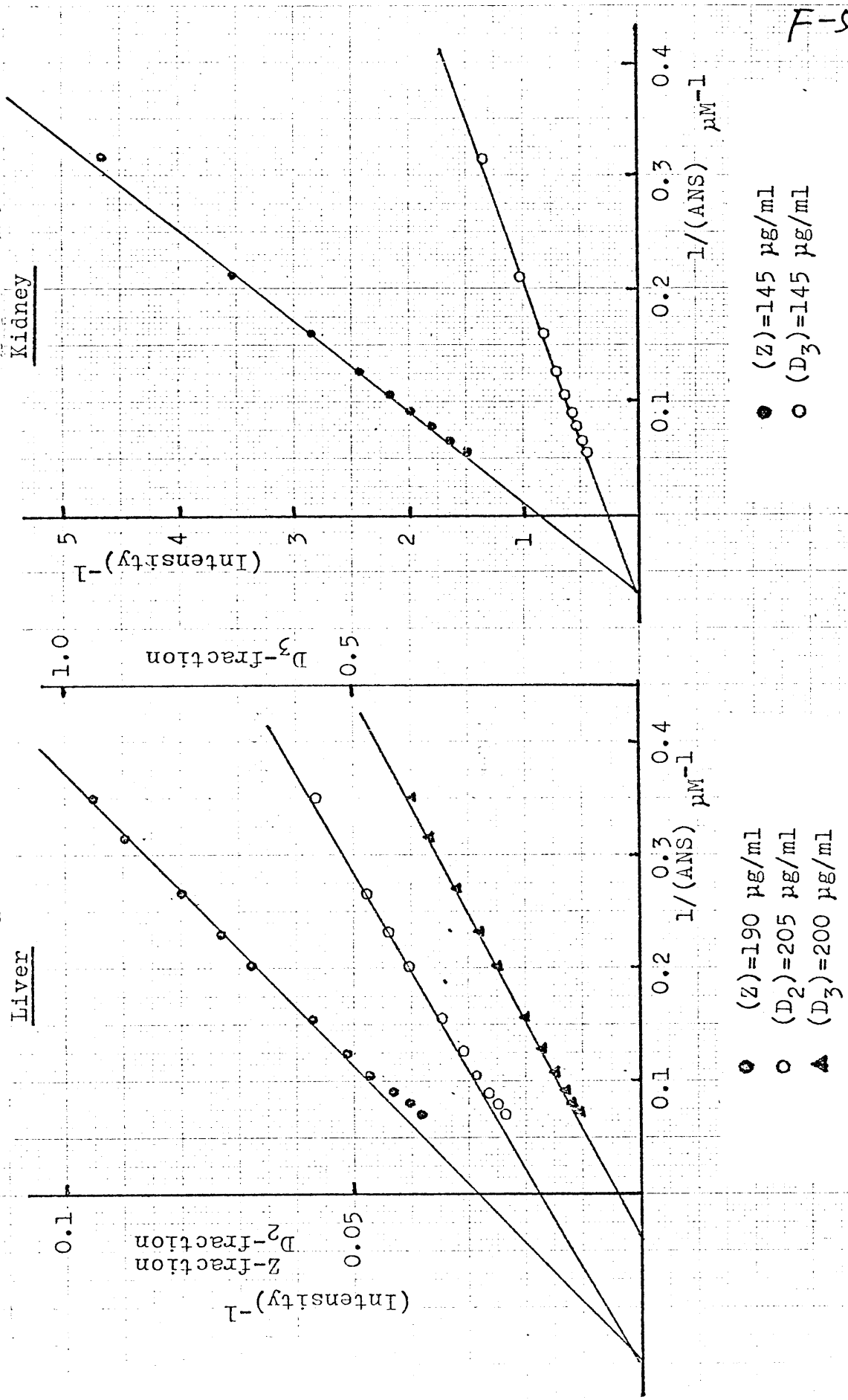


Fig. 43 DOUBLE RECIPROCAL PLOT OF ANS BINDING TO PROTEINS  
IN Z-FRACTION FROM RAT LIVER AND KIDNEY



F-53