

尿毒症物質の血清蛋白結合の特性に関する研究

*† 高村 徳人 * 徳永 仁 * 緒方 賢次 * 古屋 弓子 * 本屋 敏郎 * 松岡 俊和 * 平井 正巳
** 西尾 豊隆 ** 川井 恵一 *** 有森 和彦

Mode of Interaction of Uremic Toxins with Human Serum Albumin and Characterization of Each Binding Site

*†Norito TAKAMURA *Jin TOKUNAGA *Kenji OGATA *Yumiko FURUYA *Toshiro MOTOYA
*Toshikazu MATSUOKA *Masami Hirai **Toyotaka NISHIO **Keiichi Kawai ***Kazuhiko ARIMORI

Abstract

The interaction of uremic toxins, indoxyl sulfate (IS), indoleacetic acid (IA) 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF), with human serum albumin (HSA) was investigated by ultrafiltration and spectroscopic methods including ultra violet and fluorescence probe method. The primary binding site of IA and IS was designated site II, and the CMPF binding site was site I on the HSA molecule, as indicated by displacement experiments using different site-selective probes. Tyrosine (Tyr) and lysine (Lys) amino acid residues were probably involved in the binding sites of uremic toxins (IS, IA, CMPF) to HSA. Both hydrophobic and electrostatic interactions were found to play a role in the binding of uremic toxins to HSA. Binding of CMPF was sensitive to the N-B transition of HSA. It is suggested that the binding sites consist of a cationic site on the surface of the HSA molecule with a hydrophobic crevice to accommodate the aromatic ring of the uremic toxins. The results obtained in this study will be useful for the exact understanding of the characteristics of protein binding sites of uremic toxins.

Key words : uremic toxin, human serum albumin, electrostatic interaction, N-B transition, binding site

キーワード : 尿毒症物質、ヒト血清アルブミン、静電的相互作用、N-B 転移、結合サイト

2006. 1. 18 受理

緒言

慢性腎不全患者は腎機能が極端に低下しているため、高濃度の尿毒症物質の蓄積が生じる。透析により一時的に尿毒症物質を除去できたとしても、48 時間後にはもとの戻ってしまい、再度透析を施行せねばならない。つまり、患者は高濃度の尿毒症物質に一生涯暴露されつづけることになる。これらの尿毒症物質の中にはヒト血清

アルブミン (HSA) と結合するものも多く存在する。その中でも、indoxyl sulfate (IS)、indoleacetic acid (IA) および 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid (CMPF) は比較的 HSA への結合が強く高濃度になることが報告されている¹⁾。ここで、化合物が HSA に対しさまざまな影響を及ぼす条件は、1) HSA に対する結合が強いこと、2) 血中濃度が高いこと、である。この条件に尿毒症物質は当てはまる場合が多い。それに

* 九州保健福祉大学薬学部 〒 882-8508 宮崎県延岡市吉野町 1714 - 1

School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University of Health and Welfare, 1714-1 Yoshino, Nobeoka City, Miyazaki 882-8508, Japan

** 金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻 〒 920-0942 金沢市小立野 5 - 11 - 80

Graduated School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Kanazawa University, 5-11-80 Kodatsuno, Kanazawa 920-0942, Japan

*** 宮崎大学医学部附属病院薬剤部 〒 889-1692 宮崎県宮崎郡清武町大字木原 5200

Department of Pharmacy, Miyazaki Medical College Hospital, 5200 Kihara, Kiyotake-cho, Miyazaki-gun, Miyazaki 889-1692, Japan

† 通信著者 Corresponding Author

対し、薬物は少量で効果を発現するため、一般に血中濃度は低い。したがって、薬物の HSA への影響より尿毒症物質による HSA への影響の方が著しく大きい。このことは、薬物の HSA 結合よりも尿毒症物質の HSA 結合に注目すべきであることを暗示させる。しかしながら、これまで、薬物の HSA 結合部位における結合様式やコンフォメーション変化に関する報告²⁻⁴⁾は多数あるものの、いくつかの尿毒症物質について系統的に比較した研究は行われていない。本研究は IS、IA および CMPF の HSA 分子上の結合部位における結合特性（結合様式およびコンフォメーション変化）について限外ろ過法及び種々の分光学的方法により検討したので報告する。

材料と方法

1) 材料

ヒト血清アルブミン (HSA)、ワルファリン、ポリオキシエチレンラウリルエーテル (PLE)、イムノグロブリン G (IgG) は SIGMA 社より購入した。インドール酢酸 (IA)、インドキシル硫酸 (IS) はナカライテスク (株) より、ダンシル-L-プロリン (DNSP)、ラウリル硫酸ナトリウム (SLS)、セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) は東京化成工業 (株) より入手した。3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロパノン酸 (CMPF) は第一薬科大学薬学部高館明教授から恵与されたものを使用した。アミノ酸修飾 HSA は熊本大学薬学部薬物動態制御学研究室 (小田切優樹教授) で作製されたものを用いた。限外ろ過器は ULTRACENT-10 を東ソー (株) より購入した。その他、試薬、溶媒類は全て市販特級品を使用し、溶媒としての水は蒸留水を使用した。緩衝液は 1/15mol/L リン酸緩衝液を使用した。

2) 方法

蛍光プローブ置換実験⁵⁾：

蛍光プローブの併用尿毒症物質による置換を蛍光強度の減少で測定する場合、尿毒症物質非存在下の蛍光強度に対する尿毒症物質存在下の蛍光強度の相対値として測定した。また、置換率 (p) は次式に従って算出した。

$$p(\%) = \frac{F_1 - F_2}{F_1} \times 100$$

(p は fluorescence as % of initial を示す)

ここで F 1 及び F 2 は尿毒症物質非存在下および存在下

における蛍光強度を示す。

限外濾過法：

限外濾過器はウルトラセント-10 (東ソー社製) を使用して行った。試料溶液 0.5ml を限外濾過器に充填し、25℃、3000rpm で 15 分間遠心分離した後、HPLC により尿毒症物質を測定した。ろ液中の尿毒症物質を遊離尿毒症物質の濃度 (Cf) として、次式 (1) にしたがって結合尿毒症物質の濃度 (Cb) を算出した。

結合尿毒症物質の濃度 (Cb) = 総尿毒症物質の濃度 (Ct) - ろ液中の尿毒症物質の濃度 (Cf) (1)

1/15mol/L リン酸緩衝液に種々の濃度の尿毒症物質を限外濾過し、これらを検量線として使用した。

尿毒症物質の結合率 (fb) は次式 (2) から算出した。

$$fb = Cb / (Cf + Cb) \quad (2)$$

さらに、尿毒症物質の HSA とアミノ酸修飾 HSA への結合性の評価は以下の (3) 式で行った。

$$\text{uremic toxin free fraction as \% of initial} = \frac{C_f \text{ modified HSA}}{C_f \text{ native HSA}} \times 100 \quad (3)$$

尿毒症物質の定量：

尿毒症物質の定量は下記の HPLC の条件でおこなった。
 カラム：LiChrosorb RP-18 (7 μm) (Cica Merk)
 ポンプ：島津 SPD-6A 型ポンプ
 検出器：島津 LC-6A 型可変波長 UV モニター
 移動相：IA 用として、アセトニトリル：0.2M 酢酸緩衝液 (pH4.5) (v/v) = 35 : 65
 IS 用として、アセトニトリル：0.2M 酢酸緩衝液 (pH4.5) (v/v) = 10 : 90
 CMPF 用として、アセトニトリル：0.2M 酢酸緩衝液 (pH4.5)：酢酸 (v/v) = 40 : 60 : 0.5
 測定波長：UV モニター
 IA、IS (285nm) および CMPF (261nm)
 流速：1.0ml/min

UV 吸収差スペクトル：

HSA 濃度および尿毒症物質濃度 (20 μmol/L)、界面活性剤の濃度 (2 mmol/L) として UV 吸収スペクトル (250-400nm) を測定した。差スペクトル (absorbance difference) は、尿毒症物質-HSA 系あるいは尿毒症物質-界面活性剤系の UV スペクトルから各成分単独の UV スペクトルを差し引いて表した。

結果と考察

本研究に使用した比較的蛋白結合が強いと言われている尿毒症物質 (IS、IA および CMPF) の構造式を示す (Figure 1)。

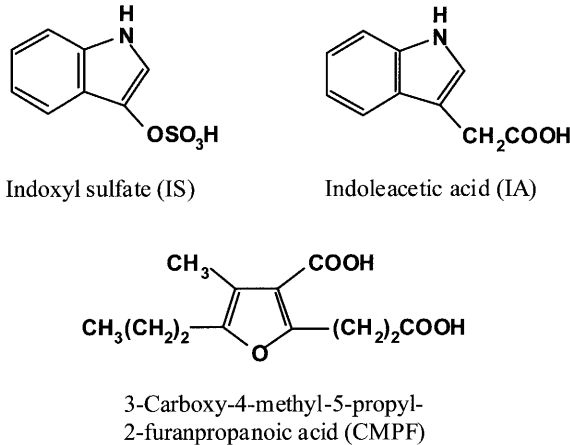


Figure1. Chemical structures of some uremic toxins

Figure 2 は各結合サイト識別用蛍光プローブを用いて、尿毒症物質の HSA 分子上における結合サイトの識別を試みたものである。CMPF の添加により、サイト I 蛍光プローブであるワルファリンの蛍光強度は急激に減少したが、サイト II 蛍光プローブであるダンシル-L-プロロリンの蛍光強度は [CMPF] / [HSA] = 1 までは変化はなく、その後わずかに低下した。一方、IS、IA の添加により、サイト II 蛍光プローブであるダンシル-L-プロロリンの蛍光強度を急激に減少させたが、サイト I 蛍光プローブであるワルファリンの蛍光強度はほとんど変化しなかった。したがって、CMPF は HSA 分子上のサイト I 近傍に、IS、IA は HSA 分子上のサイト II 近傍に結合することが明らかとなった。

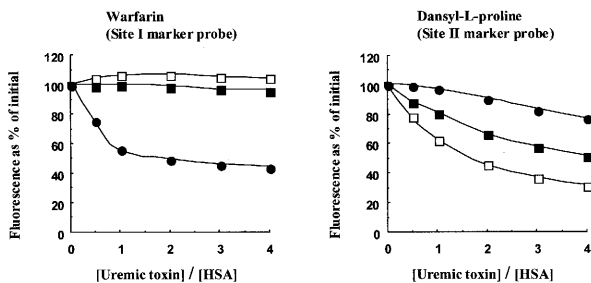


Figure 2. Displacement of probes from HSA by uremic toxins at pH7.4 and 25°C

□ : IS, ■ : IA, ● : CMPF

[Probe] = 2 μmol/L, [HSA] = 10 μmol/L

ところで、リガンドが HSA と結合する場合、その結合サイトにおいて、どのようなアミノ酸残基が結合に関

与しているかを検討することができる。それは、HSA のアミノ酸残基を特異的に化学修飾して、薬物の結合性を評価する方法である。その結果を Figure 3 に示す。

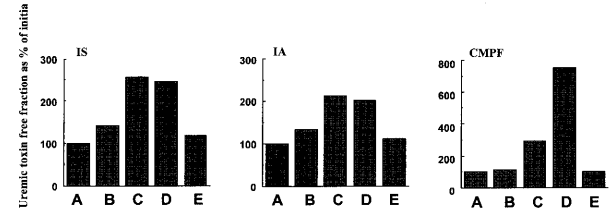


Figure 3. Binding of uremic toxins to native and modified HSA at pH 7.4 and 25°C

A: Native HSA, B: Trp modified HSA, C: Tyr modified HSA, D: Lys modified HSA, E: His modified HSA

[uremic toxins] = [modified HSA] = 20 μmol/L

これは限外ろ過法による未修飾 HSA と修飾 HSA に対する尿毒症物質の相対遊離濃度の変化を示す。IS および IA は未修飾 HSA に比べ修飾 Tyr および修飾 Lys-HSA により同程度結合性が低下することより、IS および IA は HSA 分子上の Tyr および Lys 残基の関与が考えられる。このことはサイト II への結合には 411 番目の Tyr (Tyr⁴¹¹) および 195 番目の Lys 残基 (Lys¹⁹⁵) が関与するという Fehske et al の報告⁶⁾ に一致している。一方、CMPF も Lys および Tyr 残基の修飾により結合性が顕著に低下したものの、その程度には著しい差異がみられ、Lys 残基による影響ははるかに大きかった。サイト I の代表薬物であるワルファリンの HSA 結合は 214 番目の Trp (Trp²¹⁴) 残基が大きく関与していることが報告されているが⁶⁾、本研究による CMPF 結合の結果はこれと一致しないことから、ワルファリンの結合部位 (Trp²¹⁴ 残基) とは一致していないものと考えられる。しかしながら、ワルファリンを蛍光プローブに用いた先の実験結果より、CMPF の結合部位はサイト I 近傍であることは間違いのないものと考えられる。そこで、ワルファリン結合領域近傍に位置する他の代表的な結合領域を調べてみるとピリルビン結合領域が存在する。この領域は 240 番目の Lys 残基 (Lys²⁴⁰) が大きくかかわっている。したがって、CMPF はこの領域に結合しているものと推察された。サイト I 領域は少なくとも 3 つの領域から成り立っていることと⁷⁾、以前の我々の研究においてサイト I に確実に分類されるフロセミドと CMPF は競合置換したことより¹⁾、CMPF は Trp²¹⁴ 残基に関与しないサイト I 領域に結合し、その領域は一部ピリルビンの結合領域にオーバーラップしているものと仮定すると理解しやすいと考えられる。また、CMPF と修飾 His-HSA との結合において変化はみられなかった。

次に結合サイトの性質に関する基礎的知見を得る目的で結合様式についての検討を加えた。Figure 4は尿毒症物質-HSA系、尿毒症物質-陽イオン性界面活性剤セチルトリメチルアンモニウムブロミド (CTAB) 系ならびに非イオン性界面活性剤ポリオキシエチレンラウリルエーテル (PLE) 系のUV吸収差スペクトルを示す。

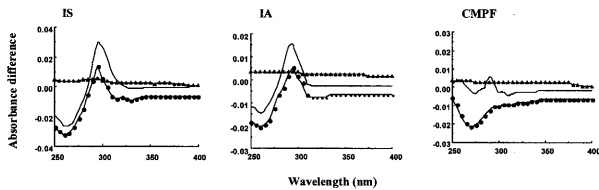


Figure 4. Difference UV absorption spectra of uremic toxins bound to HSA and detergents at pH 7.4 and 25°C

—: Ligand-HSA System, ●: Ligand-CTAB System,

▲: Ligand-PLE System

[HSA] = [CMPF] = [IS] = [IA] = 20 μ mol/L

[Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)] = [Polyoxyethylene lauryl ether (PLE)] = 2 mmol/L

ISあるいはIA-HSA系のスペクトルはCTABのものと同様一致しており、CMPF-HSA系のスペクトルもCTABとのずれはあるものの類似の傾向を示した。しかしながら、PLEではスペクトル変化を生じず一致しなかった。さらに陰イオン性界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) や、CMC以下の濃度ではこれらのスペクトル変化は見られなかった (data not shown)。これらの結果より、IS、IAおよびCMPFの結合サイトの微環境はCTABミセル内に取り込まれている場合と類似しているものと考えられ、それぞれの尿毒症物質の芳香環を包み込む疎水性面 (疎水性相互作用) とその面上に存在する陽電荷 (静電的相互作用) から構成されているものと思われる。

HSAはpH 7からpH 9の領域でN-B転移と呼ばれるコンフォメーション変化を引き起こすことが知られている^{8,9)}。そこで、このpH領域における、IS、IAおよびCMPFとHSAの結合性の変化について調べた (Figure 5)。その結果、CMPFの結合性はpHの上昇とともに著しい減少が観察された。一方、ISおよびIAではpHの増加による結合性の変化はごくわずかであった。一般にワルファリンと同一結合部位であればN-B転移の影響を受けると結合性が著しく上昇するが⁴⁾、CMPFの結合性は顕著に低下していた。この事実は、CMPFの結合するアミノ酸残基とワルファリンの結合するそれとが異なっていたことから裏付けられる。これまで、我々はフロセミド (サイトIに分類) のHSA結合における

N-B転移の関与は、Lys残基によるところが大きいことを報告している³⁾。このことと、CMPF結合がLys残基と大きく関与しているという今回の結果が一致したことは非常に興味深い。一般に、HSAのコンフォメーション変化にはpHによるN-B転移のみならず遊離脂肪酸の影響¹⁰⁾も大きく関与していることが知られている。したがって、CMPFのHSA結合性は、遊離脂肪酸の増加により引き起こされるHSAのコンフォメーション変化によっても何らかの影響を受ける可能性が高いと推察される。

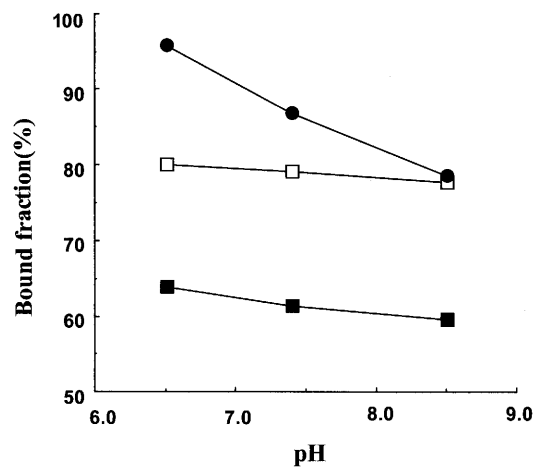


Figure 5. Effects of pH on binding of uremic toxins bound to HSA by ultrafiltration at 25°C

□: IS, ■: IA, ●: CMPF

まとめ

本研究の結果より、ISとIAの高親和性サイトはサイトII領域であり、Tyr¹¹¹およびLys¹⁹⁵残基が関与しており、結合様式としては、疎水性相互作用に加え静電的相互作用の関与が示唆された。一方、CMPFの高親和性サイトはサイトI近傍であり、Lys²⁴⁰残基が特に関与しており、サイトI領域で重要といわれるTrpおよびN-B転移に大きく寄与するといわれるHis残基の影響はないものと考えられる。さらに結合様式としては、疎水性相互作用および静電的相互作用の関与が示唆された。またCMPFのHSA結合はN-B転移に敏感でありLys残基の関与が推察された。

参考文献

1. Takamura N, Maruyama T and Otagiri M: Effects of uremic toxins and fatty acids on serum protein binding of furosemide: Possible mechanism of the

- binding defect in uremia. *Clin. Chem.*, 43: 2274-2280, 1997.
2. Takamura N, Rahman MH, Yamasaki K, Tsuruoka M and Otagiri M: Interaction of benzothiadiazines with human serum albumin studied by dialysis and spectroscopic methods. *Pharm. Res.*, 11: 1452-1457, 1994.
 3. Takamura N, Haruta A, Kodama H, Tsuruoka M, Yamasaki K, Suenaga A and Otagiri M: Mode of interaction of loop diuretics with human serum albumin and characterization of binding site. *Pharm. Res.*, 13: 1015-1019, 1996.
 4. Wilting J, van der Giesen WF, Janssen LHM, Weideman MM, Otagiri M, and Perring JH: Effect of albumin conformation on the binding of warfarin to human serum albumin on the hydrogen, calcium and chloride ion concentration as studied by circular dichroism, fluorescence and equilibrium dialysis. *J. Biol.Chem.*, 255: 3032-3037, 1980.
 5. Sudlow G, Birkett DJ and Wade DN: Further characterization of two specific binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.*, 12: 1052-1061, 1976.
 6. Fehske KJ, Muller WE, Wollert U: The location of drug binding sites in human serum albumin. *Biochem. Pharmacol.*, 30: 687-692, 1981.
 7. Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M.: Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochim Biophys Acta.*, 1295(2):147-157, 1996.
 8. Leonard WJ Jr., Vijai KK, Foster JF: A structural transformation in bovine and human plasma albumins in alkaline solution as revealed by rotary dispersion studies. *J. Biol. Chem.*, 238: 1984-1988, 1963.
 9. Labro JF, Janssen LH: A proton nuclear magnetic resonance study of human serum albumin in the neutral pH region. *Biochim Biophys Acta.*, 873(2):267-278, 1986.
 10. Wilding G, Feldhoff RC, Vesell ES: Concentration-dependent effects of fatty acids on warfarin binding to albumin. *Biochem Pharmacol.*, 26(12):1143-1146, 1977.