

## バナジウムおよび銅と血清アルブミンとの相互作用

九里 泰生, 田和理市, 桜井 弘  
(京都薬科大学・代謝分析学教室\*)

### Interaction of vanadium and copper with serum albumin

Yasuo KUNORI, Riichi TAWA and Hiromu SAKURAI  
*Department of Analytical and Bioinorganic Chemistry*  
*Kyoto Pharmaceutical University*

The interactions of  $V^{4+}$  and  $Cu^{2+}$  with bovine serum albumin (BSA) were studied by means of circular dichroism (CD), UV, electron spin resonance (ESR) and fluorescence spectroscopy. The CD measurements showed that the interactions of BSA with  $V^{4+}$  were not influenced to both pH and temperature, and  $V^{4+}$  were changed to  $V^{5+}$  by the reaction with BSA at pH 7.4 and 37°C. The titration of  $V^{4+}$  effected to the  $Cu^{2+}$  second binding site (Cys 34) of BSA, but did not to the strongly  $Cu^{2+}$  binding site (N-terminal site) of BSA. These results suggest that  $V^{4+}$  has a high affinity to Cys 34 of BSA.

薬物はいかなる経路で投与しても、最終的には循環血流を介して体内の各組織に運ばれるため、薬物と血清タンパク質との結合は薬物の各組織への分布や薬理効果に影響する重要な因子となる。薬物と結合する血清タンパク質としては、アルブミンやトランスフェリンなどが知られている。アルブミンには薬物との結合部位が複数存在し、また、薬物の種類により結合部位が異なることも報告されている<sup>1)</sup>。近年、4価バナジウム ( $V^{4+}$ ) イオンおよびその錯体がインスリン様作用を示すことが見出された<sup>2)</sup>。本研究では、アルブミンとの結合についてより詳細に研究されている2価銅 ( $Cu^{2+}$ ) イオンと比較しながら、 $V^{4+}$  イオンとアルブミンとの相互作用についてUVスペクトル、円二色性 (CD) スペクトル、蛍光スペクトルおよびESR分光法を用いて検討した。

---

\* 所在地：京都市山科区御陵中内町5 (〒607-8414)

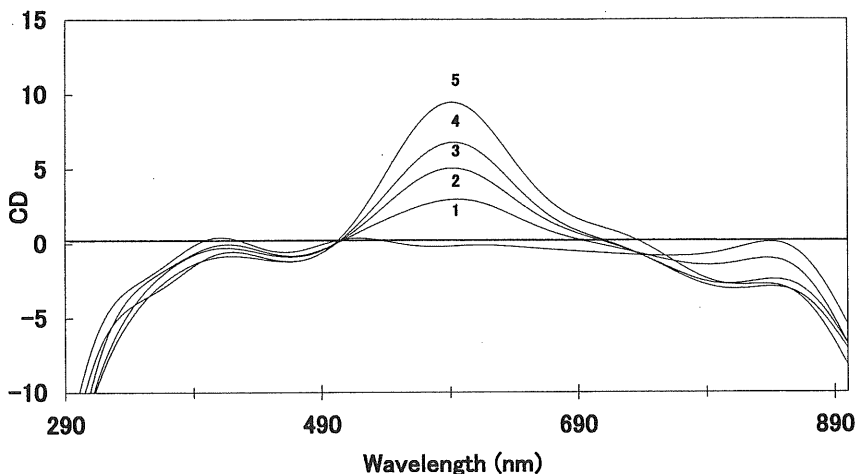
## 実験方法

試料として、Vanadium (IV) Oxysulfate ( $\text{VOSO}_4$ ; nacalai tesque), Vanadium (III) Chloride ( $\text{VCl}_3$ ; 和光純薬), Copper (II) Chloride Dihydrate ( $\text{CuCl}_2$ ; nacalai tesque) を使用した。牛血清アルブミンとして、Albumin bovine fraction V (BSA, Sigma) を使用した。BSAに含まれる脂肪酸の除去は、Chenの方法で行った<sup>3)</sup>。BSA濃度は、UV 279 nmにおける比吸光度 ( $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 6.67$ ) から算出した<sup>4)</sup>。0.1M  $\text{NaClO}_4$  (pH 7.4) に溶解して0.5 mMに調節したBSAに、金属イオン溶液を加えて混合した後、温度、pH、時間及び濃度比を変化させながら、CDスペクトル (JASCO J-720), UVスペクトル (Shimadzu Multispec-1500), 蛍光スペクトル (Shimadzu RF-540型), 及びESRスペクトル (JEOL JES-E3X) を用いて測定した。

## 結果・考察

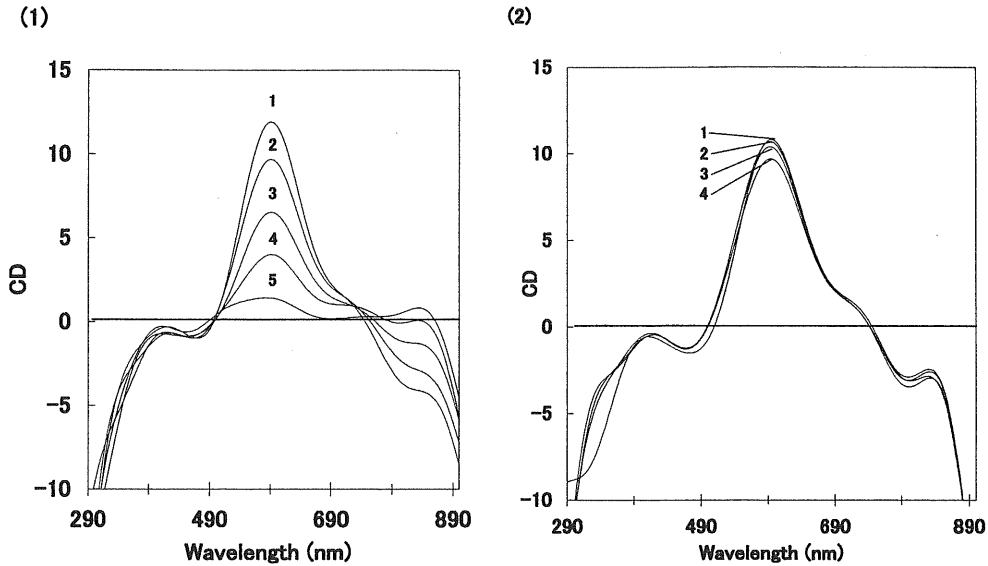
BSAに $\text{V}^{4+}$ イオンを滴下すると、CDスペクトルの590nm付近に、濃度比が1以上においても $\text{V}^{4+}$ イオン濃度に比例した正のピークの増大が見られた (Fig. 1)。同様に、UVスペクトルの250nm付近においても、 $\text{V}^{4+}$ イオンの濃度に依存的な吸光度の増大が見られた。これらの結果から、 $\text{V}^{4+}$ イオンがBSAへ結合する部位が複数存在することが示唆された。しかし、pHや温度の影響によるCDスペクトル変化は認められなかった。

BSAと $\text{V}^{4+}$ イオンを含む溶液のCDスペクトルは、経時的に変化した。特に、590nm付近における正のピークの減少が顕著であった (Fig. 2 (1))。しかし、このピークの減少は、窒素置換して反応液中の溶解酸素を少なくした場合には認められなかった (Fig. 2 (2))。一方、BSAと $\text{V}^{3+}$ イオンの混合液も時間



**Fig.1** CD spectral changes of 0.5mM BSA (bovine serum albumin) in 0.1 M  $\text{NaClO}_4$  (pH 7.4) by titration of  $\text{VOSO}_4$  at 37 °C.

1:0mM  $\text{VOSO}_4$ ; 2:0.5mM  $\text{VOSO}_4$ ; 3:0.75mM  $\text{VOSO}_4$ ; 4:1.0mM  $\text{VOSO}_4$ ; 5:1.5mM  $\text{VOSO}_4$



**Fig.2** Time-dependent CD spectral change of BSA-VOSO<sub>4</sub> (1:3) mixture.

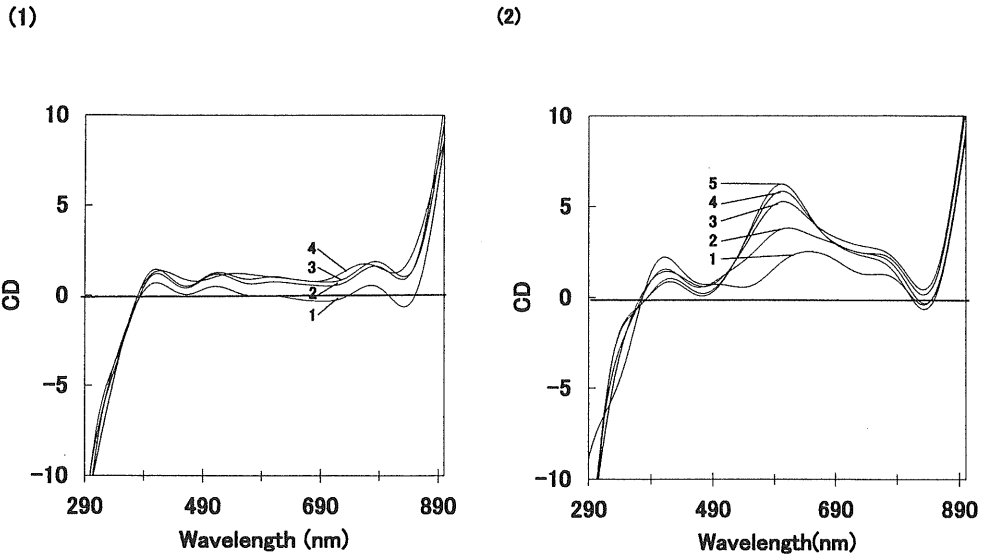
CD was measured in 0.1M NaClO<sub>4</sub> (pH 7.4) at 37 °C under air (1) and N<sub>2</sub> atmosphere (2).

(1) 1:0min ; 2:10min ; 3:20min ; 4:30min ; 5:60min

(2) 1:0min ; 2:20min ; 3:30min ; 4:60min

的なCDスペクトル変化を示し、V<sup>5+</sup>イオンの場合には変化が見られなかった。これらのCDスペクトル変化は、バナジウムイオンが+3から+4、さらには、+4から+5へ酸化されることを示すものと考えた (Fig. 3)。また、同条件下におけるV<sup>4+</sup>イオンのESRシグナル強度が時間とともに減少したことから、および、V<sup>3+</sup>イオンの場合には+3→+4→+5の酸化過程を示すESRシグナルの変化が観察されたことから、V<sup>4+</sup>イオンは、BSAと結合する際にV<sup>5+</sup>に酸化されることが示唆された。

次に、BSAとCu<sup>2+</sup>イオンの混合液にV<sup>4+</sup>イオンを加えた場合にCDスペクトルが変化すること (Fig. 4)、ならびにCu<sup>2+</sup>イオンあるいはV<sup>4+</sup>イオンとの結合によって、BSAのトリプトファン残基の蛍光が消失することを利用して、BSAとV<sup>4+</sup>イオンとの結合部位について検討した。Fig. 4に示すように、Cu<sup>2+</sup>イオンがBSAのN末端3位のHis残基へ結合することによる450nm付近のCDスペクトル<sup>5)</sup>の変化は、認められなかった。一方、Cu<sup>2+</sup>イオンのBSA 34位のCys残基へ結合することによる700nm付近のCDスペクトル<sup>1,5)</sup>において、わずかな変化が観察された。また、BSAのTrp残基の蛍光消失の強度については、Cu<sup>2+</sup>イオンとV<sup>4+</sup>イオンの場合で異なっていた。このことから、Cu<sup>2+</sup>イオンに比べて、V<sup>4+</sup>イオンはBSAのTrp残基付近では相互作用しないことが示唆された。以上の結果から、V<sup>4+</sup>イオンはBSAとの結合において、Cu<sup>2+</sup>イオンと異なる結合部位をもち、特に、BSA 34位のCys残基がV<sup>4+</sup>イオンとの結合に強く関与することが推察された。

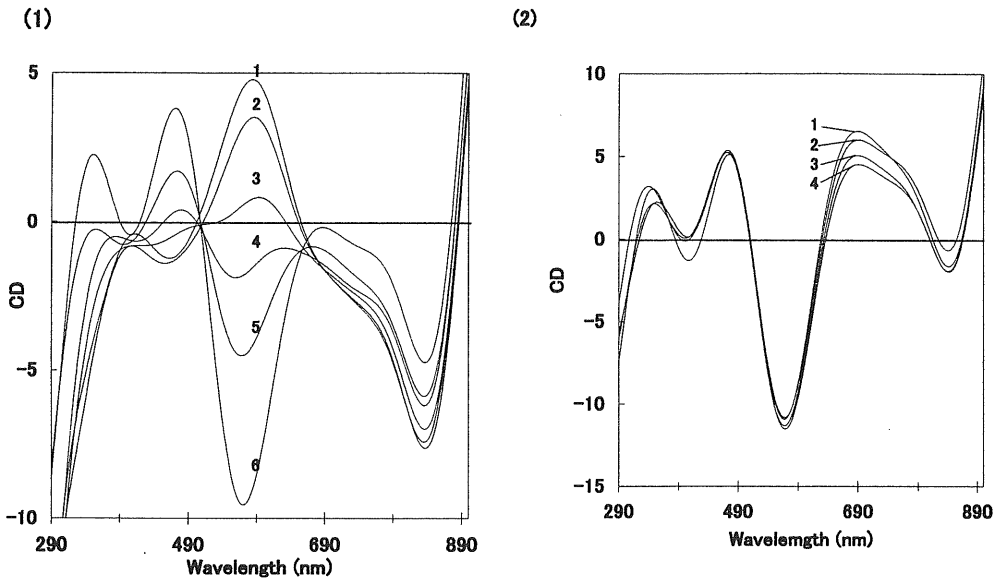


**Fig.3** Time-dependent CD spectral change of (1) BSA- $\text{NaVO}_3$  (1 : 3) mixture and (2) BSA- $\text{VCl}_3$  (1 : 3) mixture.

CD was measured in 0.1M  $\text{NaClO}_4$  (pH 7.4) at 37 °C.

(1) 1: 0min ; 2: 30min ; 3: 60min ; 4: 90min

(2) 1: 0min ; 2: 30min ; 3: 60min ; 4: 120min ; 5: 180min



**Fig.4** CD spectral changes of (1) 0.5 mM BSA- $\text{VOSO}_4$  (1 : 3) mixture in 0.1 M  $\text{NaClO}_4$  (pH 7.4) by titration of  $\text{CuCl}_2$  and (2) 0.5 mM BSA- $\text{CuCl}_2$  (1 : 3) mixture in 0.1 M  $\text{NaClO}_4$  (pH 7.4) by titration of  $\text{VOSO}_4$  at 37 °C.

(1) 1: 0mM  $\text{CuCl}_2$  ; 2: 0.2mM  $\text{CuCl}_2$  ; 3: 0.5mM  $\text{CuCl}_2$  ; 4: 0.75mM  $\text{CuCl}_2$  ; 5: 1.0mM  $\text{CuCl}_2$  ;

6: 1.5mM  $\text{CuCl}_2$

(2) 1: 0mM  $\text{VOSO}_4$  ; 2: 0.5mM  $\text{VOSO}_4$  ; 3: 1.0mM  $\text{VOSO}_4$  ; 4: 1.5mM  $\text{VOSO}_4$

参 考 文 献

- 1) Peters, T. Jr. (1985) : Serum albumin, Adv. Protein Chem., 37 : 161
- 2) Sakurai, H., Fujii, K., Watanabe, H. and Tamura, H. (1995) : Orally active and long-term acting insulin-mimetic vanadyl complex:bis (picolinato) oxovanadium (IV). Biochem. Biophys. Res Commun, 214 : 1095
- 3) Chen, R.F. (1967) : Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment, J. Bio. Chem. 25 : 173
- 4) 長谷川順一, 中山 環, 野崎正勝, 藤村 一 (1984) : Suprofenと血清アルブミンの相互作用, 日薬理誌 83 : 85
- 5) Wojciech, B., John, C., Peter, J. S., Alan, T. (1988) : Multi-metal binding site of serum albumin, J. Inorg. Bio. Chem.70 : 33