報 文

ステロイドホルモンと血清タンパクとの結合及び
タンパク－ホルモン結合に与える脂肪酸の影響

渡辺貞夫*・谷 孝之*・渡辺重信*・妹尾 学**

*神奈川県衛生研究所（〒241 横浜市旭区中尾町 52-2）

**東京大学生産技術研究所（〒106 東京都港区六本木 7-22-1）

Binding of Steroidhormones with Bovine Serum Proteins and Effect
of Fatty Acids on Binding of Hormone with Protein

Sadao WATANABE*, Takayuki TANI*, Shigenobu WATANABE*, and Manabu SENŌ**

*Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory

(52-2, Nakao-cho, Asahi-ku, Yokohama-shi, 〒241)

**Institute of Industrial Science, University of Tokyo

(7-22-1, Roppongi, Minato-ku, Tokyo, 〒106)

The binding of steroidhormones to bovine serum proteins was examined so as to explain the transport behavior of steroidhormones by proteins in serum. The affinities of bovine serum proteins prepared by Cohn's separation method¹²⁾ with six kinds of steroidhormones (α -estradiol, ethynylestradiol, progesterone, androsterone, dehydroisoandrosterone and testosterone) were measured from partition experimental results. The affinity of Cohn's fraction III with hormones was not observed, but binding to fraction IV-1 and V (albumin) was clearly evident. When these hormones were added exogenously, binding coefficients K (protein-binding form/free form) in 3.5% bovine serum albumin (BSA) solution were 40~80% of those noted in bovine serum containing the same amount of albumin.

The effect of the binding of free fatty acid (FFA : $C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$ and $C_{18:2}$) with BSA on the affinity of BSA to steroidhormones was also investigated. Change in affinity could not be clearly detected for α -estradiol, ethynylestradiol or dehydroisoandrosterone, but a distinct increase was observed for progesterone, androsterone and testosterone following the addition of FFA. The binding coefficients of the latter three hormones increased by 50~60% beyond that of the repeated control without the addition of FFA.

1 緒 言

血しょう中のタンパク質であるアルブミン及びリポタンパクなどは不溶性のトリグリセリドあるいはコレステロール、コレステロールエステルなどと結合して親水性タンパク質複合体を形成し、これら脂質の輸送及び代謝に重要な役割を果たしている¹⁾。このほかにも、ステロイドホルモンなども血液中では遊離形で存在するのみでなく、主に性ステロイド結合グロブリンやアルブミンと結合した形で存在し、ともに移送されている²⁾。一方、薬物を投与する場合、一般的には血しょうタンパクと結合していない薬物のみが薬理的有効性をもつ場合が多

く、血しょうタンパク（主として牛血清アルブミンについて）との結合性を調べた報告がある^{3), 4)}。最近、遊離脂肪酸⁵⁾、胆汁酸及びローズベンガル⁶⁾でアルブミン結合型の肝臓内への促進的取り込みが報告されているが、アルブミン等の血しょうタンパクの輸送特性はまだ充分には明らかにされていない。著者らは、水-ヘキサン2相系で構成される液膜系で、ステロイドホルモン⁷⁾、カルバメート系農薬⁸⁾について、牛血清アルブミン(BSA)を担体とした液膜輸送実験を行い、ホルモンにおいてまた農薬においても水-ヘキサン2相系への分配係数が、この系での輸送挙動を支配する最も重要な要因であることを述べた。本報では、血清の輸送挙動を解明するため

の基礎的検討として、ステロイドホルモンと血清中の輸送タンパクであるアルブミン及びグロブリン^{2),9)}との結合性を調べ、血清と比較した。また、血清中のアルブミンは遊離脂肪酸 (FFA) を結合して存在している¹⁰⁾が、BSA への脂肪酸結合が BSA とステロイドホルモンとの結合性を低下させるとの報告¹¹⁾がある。そこで、BSA とステロイドホルモンの結合性に、結合脂肪酸がどの程度影響を与えるかを調べた。

2 実 験

2.1 試 薬

BSA はシグマ社製 (Cohn の低温エタノール分画法¹²⁾のフラクション V A-8022) を、またアルブミン以外の血清タンパクとして Cohn のフラクション III (シグマ G-4633, 主として β -グロブリン及び γ -グロブリン)、フラクション IV-1 (シグマ G-8512, 主として α -グロブリン)、フラクション IV-4 (シグマ G-8637, 主として α -グロブリン、 β -グロブリン及びアルブミン) 及びフラクション II (シグマ G-5009, γ -グロブリン純度 99%) を使用した。アンドロステロン (3 α -hydroxy-5 α -androst-17-one), デヒドロイソアンドロステロン (3 β -hydroxyandrost-5-en-17-one), テストステロン (17 β -hydroxyandrost-4-en-3-one) は (株) 和光純薬製, エチニルエストラジオール (19-nor-17 α -pregna-1, 3, 5 (10)-trien-20-yne-3, 17-diol) は (株) 東京化成製を, プロゲステロン (pregn-4-ene-3, 20-dione) 及び α -エストラジオール [estra-1, 3, 5(10)-trien-3, 17 α -diol] はシグマ社製を使用した。ミリスチン酸 (C_{14:0}), パルミチン酸 (C_{16:0}), ステアリン酸 (C_{18:0}), オレイン酸 (C_{18:1}) 及びリノール酸 (C_{18:2}) はシグマ社製を使用した。

2.2 分析機器及び測定条件

試料中のステロイドホルモン濃度は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。使用機種は (株) 島津製作所製 LC-4 A [紫外分光光度計 (UV) 検出器 LPD-2 AS 及び蛍光検出器 RF-500 LC 付き] で、 α -エストラジオール及びエチニルエストラジオールは蛍光検出器 (Ex 285 nm, Em 305 nm), プロゲステロン及びテストステロンは UV 240 nm, アンドロステロン及びデヒドロイソアンドロステロンは UV 295 nm で測定した。測定条件は、既報⁷⁾の分析条件を改良し、カラムは LiChrospher 100, RP-18(4.0×250 mm) を使用し、移動相はアセトニトリル:水(65:35)で溶離した。

2.3 血清タンパクの構成

牛血清の Cohn のフラクション III 画分 (F_{III}) 及びフラクション IV-1 画分 (F_{IV-1}) として得られたタンパクをセルロースアセテート膜 (Gelman Sci. Inc. の Sepra-

phore III) を使った電気泳動を行い、タンパクの構成割合を求め、別に総タンパク量は Biuret 法¹³⁾, アルブミン量は HABA 法¹⁴⁾ で求めた結果と合わせて、各分画中のアルブミン、 α -、 β -及び γ -グロブリン含量を求めた。なおフラクション IV-4 画分 (F_{IV-4}) は、Cohn の分画過程で変性するためか、リン酸緩衝液に一部不溶性のため測定しなかった。牛血清は神奈川県食肉衛生検査所で採取した牛の鮮血を、直ちに遠心分離し、採取したものを同様にタンパク構成を測定した。なお、血清は冷蔵保存し、短期間で使用した。

2.4 血清タンパクとステロイドホルモンの結合実験

1/15 M リン酸緩衝液 (0.012 M KH₂PO₄ 及び 0.055 M Na₂HPO₄, pH は 7.4 に調整) に BSA 3.5%, F_{III} 1.2% あるいは F_{IV-1} 1.2% 溶解した液 50 mL を共栓付き三角フラスコに入れ、ステロイドホルモンを溶解したヘキサン 10 mL を積層し、25℃で水相をスターラーでかくはんしながら、15 h 後にヘキサン相を分取し、風乾後アセトニトリルに溶かし HPLC でステロイドホルモン濃度を測定した。同様の方法で、牛血清 50 mL について実験を行った。なお、予備試験で、いずれのステロイドホルモンも、水-ヘキサン 2 相系で 15 h 後にはホルモンのこの 2 相系への分配は平衡状態に達していることは確認した。

別に、血清タンパクを加えないリン酸緩衝液についても同様の測定を行い、ヘキサン相及び計算により求められる水相中のホルモン量について検量線を作成した。この検量線を用いてステロイドホルモンの水中残量 (これを水相中の遊離形ホルモン量とした) を求め、さらに血清タンパクを加えた場合の結果を用いて、水相中で血清タンパクと結合しているホルモン量を求めた。

3 結果及び考察

3.1 血清タンパクのタンパク構成

セルロースアセテート膜を使った電気泳動で、F_{III} 及び F_{IV-1} のタンパク構成を Table-1 に、また牛血清について同じ条件下で測定された結果を同表に示した。F_{III} の主要タンパクは β -グロブリンで、 α -グロブリン 10% 及び γ -グロブリン 21% が含まれ、F_{IV-1} は α -グロブリンが主であるが、 β -グロブリン 24% 及びアルブミンが 15% 含まれていた。なお F_{II}, F_{III}, F_{IV-1}, F_{IV-4} 及び F_V は、エタノール濃度や pH を変えて沈殿させる Cohn の分画法により、牛血清から順次得られたもので (フラクション I は大部分フィブリノーゲンで、血しょうには含まれるが血清では除かれる)、シグマの製品では血清中の総タンパク量のうち F_{II}+F_{III} 画分が 26.5%, F_{IV-1} 画分が 6.7%, F_{IV-4} 画分が 7.4%, F_V 画分が 58.2%, その他が 1.2% であった。

3.2 血清タンパクとステロイドホルモンの結合

Table-1 Composition of bovine serum protein by the electrophoresis on a cellulose acetate membrane.

	Albumin (%)	α -Globulin (%)	β -Globulin (%)	γ -Globulin (%)
F _{III}	—	10	69	21
F _{IV-1}	15	60	24	—
Bovine serum	3.5*	0.69*	0.73*	2.2*

*grams in 100 mL of serum

F_{III}, bovine serum protein obtained as Cohn fraction III ;F_{IV-1}, bovine serum protein obtained as Cohn fraction IV-1

ここで使用した牛血清のタンパク構成は、Table-1 に示したように血清 100 mL 中の含有量は重量でアルブミン 3.5%、 α -グロブリン 0.69%、 β -グロブリン 0.73%、 γ -グロブリン 2.2% で、その他のタンパクは微量であった。そこで、3.5% BSA 水溶液、1.2% F_{III} 水溶液 (β -グロブリンの含量は 0.83%) 及び 1.2% F_{IV-1} (α -グロブリンの含量は 0.72%) 水溶液をそれぞれ調製した。それらの水溶液 50 mL に、ステロイドホルモンを溶解したヘキサン 10 mL を加え、充分かくはんして平衡状態に達した時、ヘキサン相に残るホルモンの量を測定し、結果を Table-2 に示した。1.2% F_{III} 溶液ではヘキサン相中のホルモン濃度はコントロール (リン酸緩衝液) と有意な差はなく、表には示さなかったが、1.2% F_{IV-1} あるいは 2.2% F_{II} (γ -グロブリン) 水溶液を用いた場合にも、コントロールと有意な差はなかった。しかし、1.2% F_{IV-1} 溶液の場合はコントロールに比べ、有意にヘキサン相のホルモン濃度の低下が認められた。

本実験では、水相中のホルモンのタンパク結合を直接に測定するのではなく、水相でホルモンのタンパクの結合が生じた結果として、タンパクと結合していないホルモンの濃度が低下し、水-ヘキサン 2 相系ではヘキサン相中から水相へホルモンが移行する。このヘキサン相のホ

ルモン濃度低下を、タンパクを加えた場合と比較して測定した。しかし、血清の場合は、仮に血清中でホルモンが酵素等により分解を受けると、結合実験と異なった結果を与える。そこで、2 相間でホルモン分配が平衡に達した時の分配比を求めた後、血清部分だけを取り出し、再度ヘキサンを加え 2 相間のホルモンの分配比を求めたところ、両者はほぼ同じ値が得られた。このことより、ヘキサン相から血清中に移行したホルモンは分解

を受けず、またタンパクとの結合は可逆的であることが分かった。もちろん、血清中にはこれらホルモンが内因的に存在するが、結合実験を行った濃度ははるかに高く、内在ホルモンは妨害にはならなかった。

濃度を変えてステロイドホルモンの水 (リン酸緩衝液)-ヘキサン 2 相系への分配について実験を行った結果、ヘキサン相 (10 mL) のホルモン濃度は総量で 1000~2000 μ g の範囲まで原点を通る直線となった。このことはタンパクを加えない場合、2 相へのホルモン分配比が一定であることを示している。ここで、ステロイドホルモンのヘキサン相、水相 (リン酸緩衝液) 中の濃度をそれぞれ $[S]_h^0$ 、 $[S]_w^0$ 、血清タンパクを加えた場合 $[S]_h$ 、 $[S]_w$ とすると、血清タンパクの存在しない場合と存在する場合の 2 相へのステロイドホルモンの分配係数 P^0 、 P はそれぞれ

$$P^0 = [S]_w^0 / [S]_h^0$$

$$P = [S]_w / [S]_h$$

と表される。血清タンパクがある場合、水相中のホルモンはタンパク結合型、遊離型に区分すると

$$[S]_w = [S]_b + [S]_f$$

($[S]_b$: 水相中のタンパク結合型ホルモン濃度、 $[S]_f$: 水相中の遊離型ホルモン濃度) と表される。水相中の結

Table-2 Equilibrium transfer of steroidhormones dissolved in 10 mL hexane into 50 mL of bovine serum protein solution and bovine serum.

	Initial hormone concentration in hexane (μ g/mL)	Remaining amount in hexane phase (%)				
		Control (phosphate buffer)	3.5% BSA solution	1.2% F _{III} solution	1.2% F _{IV-1} solution	Bovine serum
α -Estradiol	3.6	18 $\pm$ 0.5	0.35 $\pm$ 0.05	17	2.2	0.20 $\pm$ 0.05
Ethynylestradiol	22	28 $\pm$ 1	0.30 $\pm$ 0.1	26	1.6	0.15 $\pm$ 0.1
Progesterone	200	98 $\pm$ 0.5	74 $\pm$ 2	98	86	53 $\pm$ 2
Androsterone	200	92 $\pm$ 1	28 $\pm$ 1	91	58	19 $\pm$ 2
Dehydroisoandrosterone	200	80 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	78	46	8.0 $\pm$ 0.5
Testosterone	200	43 $\pm$ 1	6.1 $\pm$ 0.5	42	24	3.5 $\pm$ 0.4

F_{III}, bovine serum protein obtained as Cohn fraction III ;F_{IV-1}, bovine serum protein obtained as Cohn fraction IV-1

Table-3 Comparison of binding coefficient of bovine serum protein and bovine serum.

	Binding coefficient $K=[S]_b/[S]_f$		
	3.5% BSA solution	1.2% F_{IV-1} solution*	bovine serum
α -Estradiol	61.5**	6.1	109**
Ethinylestradiol	129**	18.6	260**
Progesterone	16.1	5.0	42.9
Androsterone	29.2	5.7	49.0
Dehydroisoandrosterone	35.0	2.2	45.0
Testosterone	10.7	1.1	19.8

$[S]_b$, concentration of hormone of protein-binding form in water phase;

$[S]_f$, concentration of free-form hormone in water phase

*Subtracting the contribution of binding of steroidhormones to albumin (0.18%) containing in the solution (binding coefficient-binding coefficient of 0.18% BSA solution)

**The results are somewhat inexact because the residual concentration of hormone in hexane phase is too low.

合型ホルモン / 遊離型ホルモン濃度を結合係数 K と定義すると

$$K=[S]_b/[S]_f$$

である。水相にタンパクを加えた場合、水-ヘキサン2相系で平衡状態では水相の遊離型ホルモン濃度 / ヘキサン相のホルモン濃度がコントロール (タンパクを加えない場合) と同じであるから、 $[S]_f/[S]_b=P^0$ である。これらの式から、結合係数は次式より求まる。

$$K=(P/P^0)-1$$

Table-2 で求めた結果にこの式をあてはめて、3.5% BSA 水溶液、1.2% F_{IV-1} 水溶液 (アルブミンが 0.18% 含まれるので、 K を求める式を用い 1.2% F_{IV-1} 水溶液で求められた結合係数 K から 0.18% BSA 水溶液で求められた結合係数 K を差し引き、アルブミンとの結合による寄与を除いた) 及び血清中の各ホルモンの結合係数 K を計算し、Table-3 に示した。

これらの結合係数を比較すると、3.5% BSA 水溶液における値は血清に対する値の 40~80% に相当し、血清中に移行した各ホルモンは、総結合型 (主として血清タンパクと結合していると思われる) のうち 40~80% が BSA 結合型であることが分かった。また、 F_{IV-1} にはアルブミン以外にホルモン結合性を有するタンパクが存在していることが分かる。ステロイドホルモンに対する結合タンパクとして、ヒトではアルブミン以外に性ステロイド結合グロブリン (SBG) などが報告されている^{2), 9), 15~17)}。しかし、今回試験した市販の血清タンパクについてステロイドホルモンとの結合性を調べた結果だけでは、血清の持つステロイドホルモン結合能を再構成するには至らなかった。

3.3 ステロイドホルモン-BSA 結合に及ぼす FFA の影響

通常、血清中のアルブミンは FFA を結合しており、アルブミンへの脂肪酸結合はステロイドホルモンに対する親和性を減少すると報告されている¹⁰⁾。そこで、結合脂肪酸が、BSA とステロイドホルモンとの親和性に影響を与えるかを試験した。BSA は製品によりかなり FFA の結合量が異なり BSA 1 mol 当たり FFA が < 0.1~2 mol 結合して存在し¹⁰⁾、1 mol 当たり最大 6~13 mol の FFA を結合すると報告¹⁸⁾ されている。本実験で使用した BSA の結合脂肪酸量は、BSA 1 mol 当たり 0.01 mol であることを先に報告した⁷⁾。再度、ロットの違いなども考慮して分析した結果、BSA 1 mol 当たり 0.01~0.04 mol であった。血清中の FFA (ほぼアルブミンに結合して存在している¹⁹⁾) は、Chen¹⁰⁾ の方法に準じ、イソプロピルアルコール-イソオクタン-1 N 硫酸 (40 : 10 : 1) で FFA を抽出し、ジアゾメタンでメチル化後、ガスクロマトグラフィーで分析した。分析結果は、主としてミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸及びリノール酸が検出され、1 mol の BSA に結合していた総 FFA 量は 0.6 mol であった。

そこで、BSA-ホルモン結合能への結合脂肪酸の影響をみる実験とし、上記 5 種類の FFA を対象として、BSA 1 mol に対し FFA 0.2 ないし 2 mol を結合させて行った。BSA への FFA 結合は次のようにして行った。3.5% BSA 溶液 50 mL (2.65×10^{-5} mol) に、 2.65×10^{-4} あるいは 2.65×10^{-5} mol/mL の濃度で FFA をメタノールに溶解したものを 0.2 mL (1 mol の BSA に対し、2 あるいは 0.2 mol の FFA) 加え、幾分激しく 6 h かくはんした。最初は、加えた脂肪酸は水相表面及び水中で懸濁しているが、水相に BSA があると時間とともに透明になった。その後、ヘキサンに溶解したステロイ

Table-4 Binding of steroidhormones to FFA-free BSA and FFA-bound BSA; experimental conditions are the same as in **Table-2**

Moles of bound FFA per mole of BSA	BSA solution (%)	Remaining amount in hexane phase (%)										
		BSA solution (FFA free)	C _{14:0}		C _{16:0}		C _{18:0}		C _{18:1}		C _{18:2}	
			0.2	2	0.2	2	0.2	2	0.2	2	0.2	2
α -Estradiol	1.0	3.0	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	—	—	—	—
Ethinylestradiol	0.35	3.3	3.2	3.1	3.2	3.1	3.2	3.1	—	—	—	—
Progesterone	3.5	74	73	63	72	64	73	62	73	60	73	60
Androsterone	3.5	28	28	23	26	21	27	23	27	20	27	22
Dehydroisoandrosterone	3.5	10	10	10	9.9	9.5	10	9.5	10	9.5	10	9.5
Testosterone	3.5	6.2	5.9	4.2	5.7	4.3	5.5	3.5	5.8	3.7	5.5	3.8

C_{14:0}, myristic acid; C_{16:0}, palmitic acid; C_{18:0}, stearic acidC_{18:1}, oleic acid; C_{18:2}, linoleic acid

ドホルモン 10 mL を積層し、25℃でスターラーで水相をかくはんし、15 h 後にヘキサン相のステロイドホルモン及び FFA 濃度を測定した。その結果を **Table-4** に示した。表には示さなかったが、5 種類の FFA はいずれも、ヘキサン相には検出されなかった。このことから、ホルモンの場合と同様に FFA は水相中で遊離型ではなく、BSA と結合して存在していると考えられる。このように FFA を結合した BSA が水相に存在する場合には、ヘキサン相のステロイドホルモン残留量がコントロール (FFA を加えない 3.5% BSA 水溶液) に比べて低減した。1 mol の BSA に FFA 2 mol 結合した場合、コントロールに比べてヘキサン相のホルモン濃度では、プロゲステロンで 14~19%、アンドロステロンで 18~29%、テストステロンで 30~44% ほど低減した。 α -エストラジオール、エチニルエストラジオール及びデヒドロアンドロステロンの場合は、BSA の FFA 結合によ

る効果は明りょうには表れなかった。これら 6 種類のステロイドホルモンのヘキサン-水 (リン酸緩衝液) 2 相系への分配係数はプロゲステロン<アンドロステロン<デヒドロイソアンドロステロン<テストステロン<エチニルエストラジオール< α -エストラジオールの順であり、デヒドロアンドロステロンを除いて分配係数の低いホルモンに対して、FFA の添加により、BSA に対するホルモンの親和性が増した。BSA にパルミチン酸を結合させた時を例として、水-ヘキサン 2 相への分配係数及び水相中の結合係数を **Table-5** に示した。プロゲステロン、アンドロステロン及びテストステロンで、1 mol の BSA に対し FFA 0.2 mol 結合させた場合、ホルモンに対する結合係数が 10% 程度、FFA 2 mol で 50~60% 高まることが認められた。水相に BSA を加えないで、FFA を添加して同様の実験を行ったところ、ヘキサン相中のホルモン濃度はコントロール (リン

Table-5 Partition coefficients of steroidhormones between 50 mL of palmitic acid-bound 3.5% BSA solution and 10 mL of hexane and binding coefficients, free form/BSA-binding form of hormones, in the water phase.

	BSA solution (%)	Partition coefficient $[S]_w/[S]_h$			Binding coefficient $[S]_b/[S]_f$		
		Moles of bound FFA per mol of BSA			Moles of bound FFA per mol of BSA		
		0	0.2	2	0	0.2	2
α -Estradiol	1.0	6.5	6.7	6.7	6.1	6.4	6.4
Ethinylestradiol	0.35	5.9	6.1	6.3	10.5	10.9	11.3
Progesterone	3.5	0.070	0.078	0.11	16.1	18.0	26.6
Androsterone	3.5	0.51	0.57	0.75	29.2	32.5	43.1
Dehydroisoandrosterone	3.5	1.8	1.8	1.9	35.0	35.4	37.2
Testosterone	3.5	3.0	3.3	4.5	10.7	11.5	15.8

 $[S]_w$, total concentrations of hormones in water phase; $[S]_h$, concentrations in hexane phase; $[S]_b$, concentrations of BSA-binding form in water phase; $[S]_f$, concentrations of free-form in water phase

Fig.-1 Effect of FFA (free fatty acid) addition (2 mol of FFA per 1 mol of BSA) to BSA on equilibrium partition of progesterone between 50 mL of 3.5% BSA solution and 10 mL of hexane.

Fig.-2 Effect of FFA (free fatty acid) addition (2 mol of FFA per 1 mol of BSA) to BSA on equilibrium partition of testosterone between 50 mL of 3.5% BSA solution and 10 mL of hexane.

酸緩衝液)と比較して有意な差は認められなかった。また、初めにヘキサン-3.5% BSA 溶液 2 相間でホルモンの分配が平衡状態に達した後、FFA を加えた場合を、Fig.-1 にプロゲステロン、Fig.-2 にテストステロンについて示した。3 種類の FFA は、いずれの場合もコントロール(FFA を加えない)に比べて、ヘキサン相のホルモン濃度を低下させた。最終的に低下する場合は、ミリスチン酸、パルミチン酸及びステアリン酸で大差はないが、特にステアリン酸は他の 2 種類の FFA の場合に比べて、ヘキサン相のホルモン濃度の低下が遅れて生

じるが、これはステアリン酸の水に対する溶解が遅く、従って BSA-FFA 結合の生ずるのが遅いためと考えられる。このように、FFA の添加は水-ヘキサン 2 相系で平衡状態に達したホルモンの分配平衡を変え、ヘキサン相から水相へのホルモン移行を増大させた。

以上の結果は、FFA を結合した BSA は、BSA そのものよりもステロイドホルモンに対する親和性が増大したことを示している。この結果は従来報告されていた知見¹¹⁾と異なる。一般的に、1-オクタノール/水分分配係数は化合物の疎水性の尺度として広く使われており、種々の化合物の BSA 結合定数と分配係数の対数値との間に、相関性があることが多数報告されている^{3), 20), 21)}。しかし、単に疎水性があるといっても BSA と結合性を有するのではなく、結合する部位を有することが必要である。前報で、8 種類のカルバメート系農薬では共通に有する-NHCOO-基が BSA との結合に関与することを報告した⁸⁾。また、BSA に対する FFA の結合は、FFA のカルボニル基とタンパクのカチオンサイトの静電的結合とともに、FFA の炭化水素鎖末端とタンパクの非極性側鎖との結合として考えられ、BSA は FFA を結合する 6 か所の結合定数の高いサイトといくつもの弱いサイトを有している¹⁸⁾。ステロイドホルモンの場合を考えると、分子内のカルボニル基あるいはヒドロキシル基が BSA との結合に関与するのではないかと考えられる。基本骨格としてプロゲステロンのような黄体ホルモンはステロイド骨格の C-3 位がカルボニル基であり、 α -エストラジオール及びエチニルエストラジオールのような女性ホルモンは C-3 位にヒドロキシル基を有している。テストステロン、アンドロステロン及びデヒドロイソアンドロステロンのような男性ホルモンは規定の部位へのこれらの官能基はない²²⁾。しかし、これらのホルモンはいずれも分子内の C-17 及び C-3 位がカルボニル基あるいはヒドロキシル基で修飾されている。そこで、おおまかではあるが、これらの官能基の種類と数で分類すると、カルボニル基を 2 つ有するプロゲステロンは、水-ヘキサン 2 相系への分配係数が最も低く、ヒドロキシル基を 2 つ有する α -エストラジオール及びエチニルエストラジオールが、最も高く、ヒドロキシル基とカルボニル基を 1 つずつ有するテストステロン、アンドロステロン及びデヒドロイソアンドロステロンは分配係数がこの中間に位置する。本実験結果から、1 mol の BSA に対し 2 mol の FFA が結合しても、6 種類のステロイドホルモンはいずれも BSA に対する親和性が低下しないということは、これらのホルモンと FFA では BSA に対する結合サイトが異なるのではないかと考えられる。さらに、プロゲステロン、テストステロン及びアンドロステロンの場合には、BSA へ結合した FFA が、新たにホルモンに対する結合サイトを生じ、コント

ロール (BSA 水溶液に FFA を加えない) に比べ、ホルモンの BSA に対する結合係数 K を増大させたのではないかと推測する。結合係数を増大させたのは、官能基で比べると、カルボニル基を 2 つ有するプロゲステロンであり、カルボニル基とヒドロキシル基を 1 つずつ有する場合には、アンドロステロン及びテストステロンのように増大させる場合と、デヒドロアンドロステロンのように明りょうには表れない場合があるのではないかと考えられる。

4 総 括

血清中のタンパクによるステロイドホルモンの輸送挙動を解明するための基礎データとして、次のような検討を行った。

Cohn の低温エタノール分画法¹²⁾ で得られた牛血清タンパクと 6 種類のステロイドホルモン (α -エストラジオール, エチニルエストラジオール, プロゲステロン, アンドロステロン, デヒドロイソアンドロステロン及びテストステロン) との親和性を調べた。ホルモンとタンパクの親和性は, Cohn のフラクションⅢ画分ではほとんど認めず, フラクションⅣ-1 及びⅤ (アルブミン) 画分で認めた。外因的にホルモンを加えた場合のホルモンの結合係数 (水相中でのタンパク結合型/遊離型) を求めた。BSA の 3.5% 溶液 (牛血清中のアルブミン含量と同じ) で求められた値は, 牛血清中での結合係数の値の 40~80% で, この数値は血清中の総結合型ホルモンのうち, BSA 結合型の比率を示している。

BSA への FFA ($C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{18:1}$ 及び $C_{18:2}$) 結合が, ホルモンとの親和性に影響を与えるかを調べた。結合 FFA/BSA (モル比 2:1) で, α -エストラジオール, エチニルエストラジオール及びデヒドロイソアンドロステロンでは, 親和性に大きな変化は認められなかったが, プロゲステロン, アンドロステロン及びテストステロンでは, 有意に親和性が増加し, 水相中での結合係数は 50~60% 増大した。

[平成元年 (1989) 4 月 22 日受理]

文 献

- 1) 原 一郎, 化学総説, 6, 197 (1974)
- 2) 山川民夫編, “生化学データブック [I]”, 東京化学同人, 東京, (1979), p. 1371
- 3) 後藤 茂, 吉富博則, 岸 征恵, 薬誌, 97, 1219 (1977)
- 4) J. Nishijo, N. Morita, S. Asada, H. Nakae, E. Iwamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 2648 (1985)
- 5) R. Weisier, J. Gollan, R. Ockner, *Science*, 211, 1048 (1981)
- 6)a) E.L. Forker, B.A. Luxon, *J. Clin. Inv.*, 67, 1517 (1981)
b) E.L. Forker, B.A. Luxon, *J. Clin. Inv.*, 72, 1764 (1983)
- 7) 渡辺貞夫, 谷 孝之, 渡辺重信, 妹尾 学, 薬誌, 109, 12 (1989)
- 8) 渡辺貞夫, 谷 孝之, 渡辺重信, 妹尾 学, 油化学, 38, 421 (1989)
- 9) 山川民夫編, “生化学データブック [2]”, 東京化学同人, 東京, (1979) p. 641
- 10) R.F. Chen, *J. Biol. Chem.*, 242, 173 (1967)
- 11) 山川民夫編, “生化学実験講座 16 ホルモン上”, 東京化学同人, 東京, (1977) p. 269
- 12) 黒田嘉一郎等編, “血液化学”, 朝倉書店, 東京, (1963) p. 508
- 13) A.G. Gornall, C.S. Bardawill, M.M. David, *J. Biol. Chem.*, 117, 751 (1949)
- 14) D.D. Rutstein, E.F. Ingenito, W.E. Reynolds, *J. Clin. Invest.*, 33, 211 (1954)
- 15) R.M. Burton, G.B. Harding, N. Rust, U. Westphal, *Steroids*, 17, 1 (1971)
- 16) A. Vermaulen, L. Verdonck, *Steroids*, 11, 609 (1968)
- 17) K.B. Eik-Nes, J.A. Schellman, R. Lumry, L.T. Samuels, *J. Biol. Chem.*, 206, 411 (1954)
- 18) A.A. Spector, K. John, J.E. Fletcher, *J. Lipid Res.*, 10, 56 (1969)
- 19) 馬場茂明, 奥田 清編, “医化学実験法講座第 3 巻 B<臨床化学Ⅱ>”, 中山書店, 東京, (1973) p. 162
- 20) J. Kriegstein, W. Meiler, J. Staab, *Biochem. Pharmacol.*, 21, 985 (1972)
- 21) Y.W. Chien, H.J. Lambert, T.K. Lin, *J. Pharm. Sci.*, 64, 961 (1975)
- 22) 吉岡政七, 遠藤克己著, “新生化学ガイドブック”, 南江堂, 東京, (1969) p. 233

〈新刊図書案内〉

題 目 : Food Uses of Whole Oil and Protein Seeds
著 者 : Edmund W. Lucas, D.R. Erickson, W-K. Nip
書 式 : 6"×9" (A 5 版), 401 ページ (24 Chapters)
発 行 所 : American Oil Chemists' Society
P.O. Box 3489, Champaign, IL 61826-3489 U.S.A.
定 価 : US \$ 80 (AOCS 会員価格 \$ 60)
発 行 年 : 1989