

Bilirubin と蛋白との結合に関する研究

第 2 編

Bilirubin と globin との結合に就いて

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂教授)

大 月 昌 之 助

〔昭和 34 年 8 月 28 日受稿〕

緒 言

Hijmans van den Bergh¹⁾ は直接 bilirubin は遊離型であり, 間接 bilirubin は蛋白或は類脂体に結合していると主張したが, Levi-Craile²⁾ は間接 bilirubin は globin と結合しているとし, 後に Fiessinger³⁾ 及び Polonovski⁴⁾ の直接 bilirubin に globin を加えて放置すると, chloroform に抽出可能になるとの実験を根拠に, C. J. Watson⁵⁾ により, 直接 bilirubin は natrium-bilirubinate であり, 間接 bilirubin は bilirubin-globin であるとした。

教室正岡⁶⁾ は globin の抗血清を調製し, 血清学的に, C. J. Watson の説を否定すると共に, 電気泳動法によつても, Robscheit-Robbins⁷⁾ が健康及び溶血性黄疸血清中の間接 bilirubin と結合した globin 分画を証明したとの報告を否定した。なお Pederson & Waldenström⁸⁾ も電気泳動法により, 強く反対した。

然しながら C. J. Watson の説は現在なお依然として一般に信じられているので, 改めて E. M. Jope⁹⁾ の方法により, native な globin を調製して, bilirubin-globin の本態に検討を加えることにした。

実 験 方 法

1. 実験材料

1. 1. Globin

E. M. Jope の方法により調製した。M. L. Anson & A. F. Mirsky¹⁰⁾ の方法では globin は一部分は変性を免かれ得ないので, Jope の変法を採用した。即ち牛血球を 4 ~ 5 回 0.85% 食塩水で洗った後, 同量の aminacream (ammonium 明礬の 1% 溶液に

室温で僅かに過剰の 1% ammonia 水を加える。蒸溜水で数回洗滌の上用いる) 及び全容量の 1/4 の toluol とを大型遠沈管内で混合し, 1 夜氷室に放置する。翌朝管底の透明な濃厚 hemoglobin 溶液層をサイフォンで取り出し, 吸引濾過する。次にこの hemoglobin 溶液によく洗った石炭 gas を通じて, 一酸化炭素 hemoglobin となし, その 10 cc につき 4°C 以下に冷却しながら 1.5% に塩酸を含む 15°C の aseton 200 cc をゆつくり (約 40 ~ 50 分かけて) 加えると, heme を離した globin が沈殿する。これを集めて更に冷却した acetone で洗い, 後には炭酸 barium を加えた acetone (軽く浮遊する程度) で洗う。この globin を 15% 程度の水溶液となし, M/30 第 2 磷酸 kalium 溶液にて透析する。沈殿は氷室中で濾別する。清澄濾液を硫酸 ammonium で半飽和すると更に沈殿を生ずるから, これも同様に濾別し去る。濾液は全く native な globin 溶液であり, これを冷凍乾燥して用に供した。

1. 2. Albumin

第 1 編のものと同じく人血清より P. Howe¹¹⁾ の塩析法により, 分離製成し, 冷凍乾燥したものを使用した。

1. 3. Bilirubin

独逸 Merck 会社製の結晶 bilirubin を用いた。

2. Paper chromatography 及び濾紙電気泳動法

Paper chromatography は一次元上昇法で行い, 濾紙は Schleicher & Schüll 製 No. 2043 a を, また展開剤には 2% 蔗糖溶液を使用した。濾紙電気泳動法は小林式装置を用い, この際の濾紙は paper chromatography のそれと等しく, 電解液には veronal 緩衝液 $\mu = 0.045$ を使用した。

paper chromatography の展開に当つては, 試料を濾紙の先端より 5 cm の処に直径 1 cm の斑点と

して、毛細管 pipette で附着させ、展開は原点から 12cm の高さまで行つた。濾紙電気泳動では、試料 0.02 cc を巾 1 cm につき、0.5 mA の割で 8 時間泳動した。なお実験は凡て室温で行つた。

3. 蛋白検定法

濾紙上の蛋白を検定するに当り、濾紙を乾燥するには、paper chromatography のものは室温、濾紙電気泳動後のものは、110°C の乾燥器中で 10 分位加熱して乾燥した。蛋白の検定には bromphenol blue を用いたが、これは bromphenol blue 0.25 g と昇汞 5 g 及び氷酢酸 10 cc とを混じ、蒸留水にて 2 l としたもので、これに乾燥した濾紙を約 10 分間浸した後取り出し、洗滌液 2~3 回取り換えながら 2% 醋酸溶液で 30 分位洗つた。

4. 吸光曲線

吸光曲線の描写には D-K 型 Beckman 自記分光光度計を用いた。

5. pH の測定

東洋濾紙製の pH 試験紙を用いた。

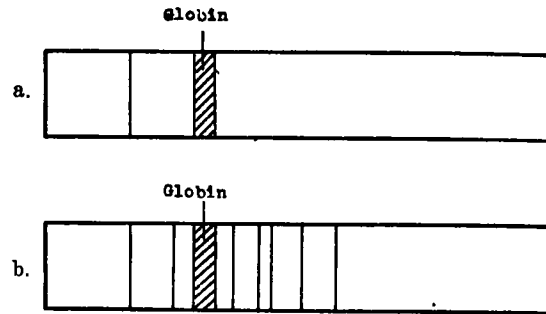
実験成績並に考按

結晶 bilirubin 5 mg に *l*-ascorbin 酸 125 mg を加え、これを 1/10 規定苛性ソーダ溶液 5 cc を溶解して、pH を 7.2~8.5 に調整して、20 mg% bilirubin-Na 塩溶液としたものと、これに 1/10 規定塩酸を適当量加えて、中和させ、直接 diazo 反応が陰性となる pH=6.8 の bilirubin 溶液との globin の結合について検討を加えた。この際、bilirubin 1 mg について、globin 250 mg の割合に加え、実験を行つた。

l-ascorbin 酸を加えたのは、bilirubin がアルカリ性溶液中では、数時間で一部が酸化されて biliverdin になるのを防ぐためで、又教室向井¹²⁾の成績によれば、diazo 試薬 0.25 cc に対して *l*-ascorbin 酸 0.5 mg 以下では、diazo 反応を阻止しないので、本実験では bilirubin 1 に対して *l*-ascorbin 酸 20 の重量比に加えて行い、直接 diazo 反応を行う時は、bilirubin は 2 mg% の液を用い、diazo 試薬は反応液と同量を加えることとしたから *l*-ascorbin 酸のために diazo 反応が阻止されることはない。

Globin 50 mg を pH=7.2 磷酸塩緩衝液 2 cc に溶解し、人血清を対照としたもの及び人血清 2 cc に globin 50 mg を加えた溶液を濾紙電気泳動法により、泳動して見ると、図 1 に見る如く、globin 単独に於ても又、人血清に溶解された globin も、人

Fig. 1



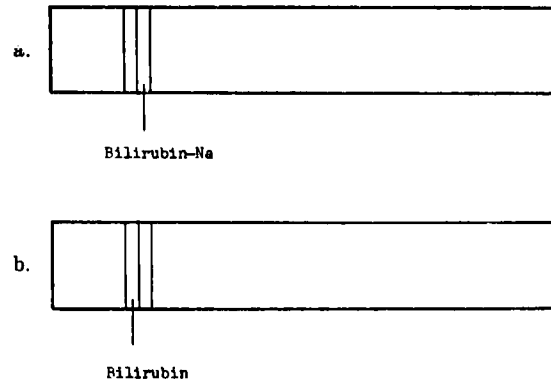
Sample : a. 2.5% glabin solution in M/15 phosphate buffer (pH 7.2)
b. 2.5% globin solution in human serum.

Developer : Cataphoresis.

血清の β -globulin と γ -globulin との間に位置して泳動される。このことは既に教室正岡¹³⁾が Anson & Mirsky の globin を用いて実験し、指摘している通りである。

次で 20 mg% bilirubin-Na 塩溶液 (pH=7.5~8.5) 及び 20 mg% bilirubin 溶液 (pH=6.8) を濾紙電気泳動法にて、泳動して見ると、図 2 に見る如く、原点に止まつて全然泳動されない。このことも既に教室後藤¹⁴⁾が指摘している。

Fig. 2



Sample a. 20 mg% bilirubin-Na solution in M/15 Phosphate buffer (pH 7.5-8.5)
b. 20 mg% bilirubin solution in M/15 Phosphate buffe (pH6.8)

Developer Cataphoresis.

次で 20 mg% bilirubin-Na 塩溶液に globin を加えた溶液 (上記の如く bilirubin 1 mg に globin 250 mg の割合) は pH=7.5~8.5 に於て、図 3 の如く bilirubin-Na 塩は globin と共に泳動される。又 pH=6.8 の 20 mg% bilirubin 溶液に globin を

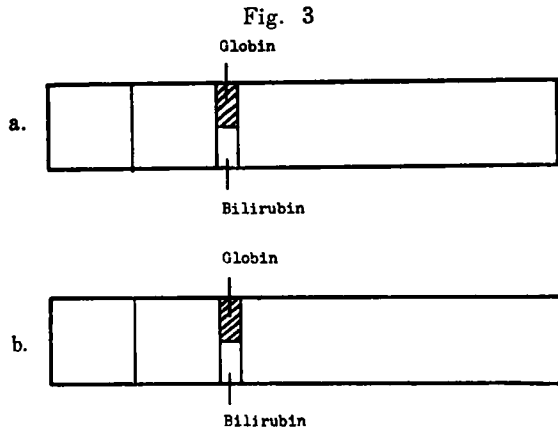


Fig. 3
 a. 20 mg % bilirubin-Na + 2.5 % globin solution in M/15 phosphate buffer (pH 7.5-8.5).
 b. 20 mg % bilirubin + 2.5 % globin solution in M/15 phosphate buffer (pH 6.8).
 Developer: Cataphoresis.

上記と同じ割合に加えた溶液に於ても、図3の如く bilirubin は globin と共に泳動される。

濾紙電気泳動法により、bilirubin-Na 塩溶液と直接 diazo 反応陰性の二塩基酸 bilirubin 溶液は単独では共に全然泳動されず、これに globin を加えた場合には、globin と同一の箇所にも泳動される。このことは bilirubin は直接型ビリルビンの bilirubin-

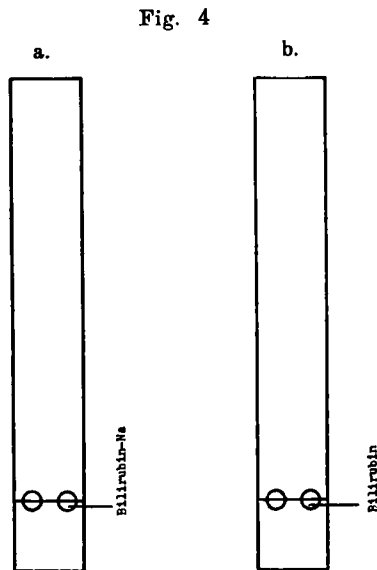


Fig. 4
 a. 20mg bilirubin-Na solution in M/15 phosphate buffer (pH 7.5-8.5).
 b. 20 mg % bilirubin solution in M/15 phosphate buffer (pH 6.8).
 Developer: 2 % sucrose aqueous solution.

Na 塩も、間接型ビリルビンの二塩基酸ビリルビンも、共に globin と電気的に同一荷電状態となつて結合していることを示すものである。

次で、濾紙電気泳動法の場合と全く同一の材料を用いて、paper chromatography を行い、bilirubin と globin との関係を検討して見ることにした。展開剤は教室後藤¹⁵⁾と同じく、2%蔗糖液を用いることにした。そして凡て一次元上昇法を行つた。先づ図4に見る如く、pH=7.5~8.5 の bilirubin-Na 塩溶液及び pH=6.8 の bilirubin 溶液は原点に止まり、全然上昇されない。このことは既に教室¹⁶⁾が指摘している通りである。

一方 globin の方は、これを pH=7.2 の磷酸塩緩衝液に溶解したのも、又人血清に加えた場合も、何れも図5に示す如く展開前線近くに紡錘型を示して spot を作り止まる。また図の如くこの paper chromatogramm では人血清蛋白と globin との分離は濾紙電気泳動に於る如く、明確に分離されない。

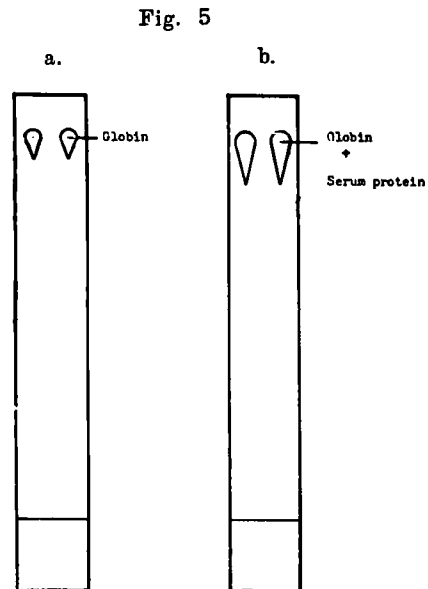
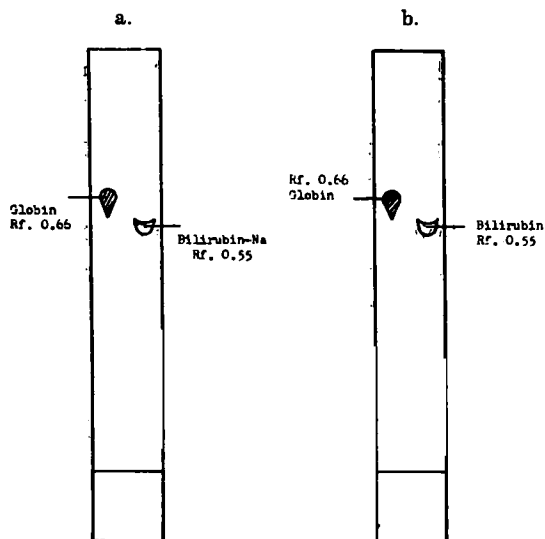


Fig. 5
 a. 2.5% globin solution in M/15 phosphate buffer (pH 7.2).
 b. 2.5% globin solution in human serum.
 Developer: 2 % sucrose aqueous solution.

次で 20 mg % bilirubin-Na + globin 溶液 (両者の割合は濾紙電気泳動法に於ける場合と同じく、bilirubin 1 mg に対して、globin 250 mg の割合) 及び 20 mg % bilirubin + globin 溶液 (両者の比は前に同じく 1 : 250 の重量比) も、前者は pH=7.5 ~ 8.5 に於いて、後者は pH=6.8 に於いて、図6に

示す如く globin は globin 単独で展開した場合より低く、 $R_f=0.66$ の位置を中心に紡錘状の spot を作る。bilirubin-Na 塩及び二塩基酸 bilirubin はこの場合図6の如く globin の spot に接するかのようにして $R_f=0.55$ の位置に spot を作る。

Fig. 6



Sample : a. 20 mg % bilirubin-Na-2.5 % globin solution in M/15 phosphate buffer (pH 7.5—8.5).
b. 20 mg % bilirubin-2.5 % globin solution in M/15 phosphate buffer (pH 6.8).

Developer : 2 % sucrose aqueous solution.

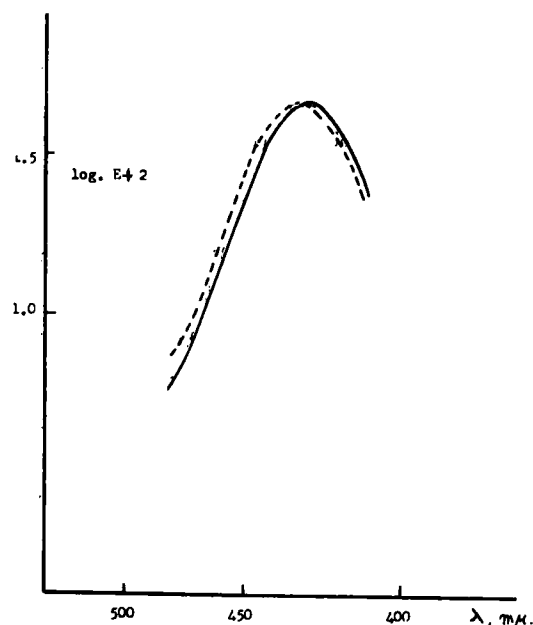
以上の paper chromatography により、直接型 bilirubin としての bilirubin-Na 塩も間接型 bilirubin としての二塩基酸 bilirubin も、同一の行動を取ると、両者とも 2 % 蔗糖溶液を展開剤とした場合、単独では全然原点より動かず、globin を加えると、globin に接するようにして上昇する。又一方 globin は globin 単独の場合より、bilirubin (直接、間接型の何れの場合も) を加えた場合は展開が小さい。

この paper chromatography による所見も上述の濾紙電気泳動法の所見と同様である。

次に bilirubin-globin 溶液の diazo 反応に対する態度を検討してみると、先づ濾紙電気泳動法及び paper chromatography に用いた 20 mg % bilirubin-Na 塩+globin 溶液を更に M/15 磷酸塩緩衝液にて10倍に稀釈して 2 mg % bilirubin-Na 塩+globin 溶液 (bilirubin と globin との重量比は前と同じく 1 : 250) とし pH=7.5~8.5 としたものを用いた。pH=7.5~8.5 の 2 mg % bilirubin-Na 塩磷酸塩緩

衝溶液の吸収曲線を描いて見ると、図7に示す如く、bilirubin-Na 塩溶液は 430 m μ に吸収の極大を示す。これは教室木村¹⁶⁾が既に指摘しているし、又教室坂本¹⁷⁾等の言う天然塩型 bilirubin のそれと一致する。次で同じく図7に示す如く、bilirubin-Na 塩+globin 溶液の吸収曲線は bilirubin-Na 塩溶液の吸収の極大と殆んど変りなく、430 m μ に極大を示すが、吸収曲線はやや長波長側に移行するような傾向を認められた。

Fig. 7



Absorption spectra of bilirubin-Na alone and in presence of excess globin.

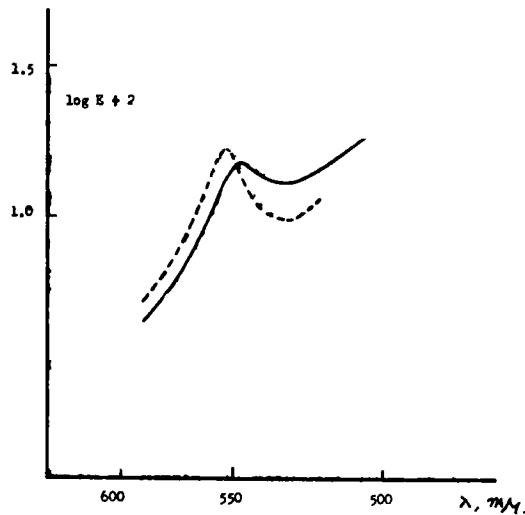
Solid line : bilirubin-Na in pH 7.5—8.5 M/15 phosphate buffer.

Dashed line : Same in presence of globin.

次でこの bilirubin-Na 塩溶液及び bilirubin-Na 塩+globin 溶液に同量の diazo 試薬を加えて、直接 diazo 反応を行つて見ると、図8に示す如く、前者は 545~550 m μ に吸収の極大を示し、直接 diazo 反応陽性であり、塩酸を加えると著明に紫色の色調を増し、560 m μ に吸収の極大を示すようになる。後者に同じく同量の diazo 試薬を加えて、直接 diazo 反応を行つて見ると、前者と全く同一の吸収曲線となり、azo 色素は 545~550 m μ に、塩酸を加えると著明に紫色の色調を増し、吸収の極大は 560 m μ に示す。

又一方濾紙電気泳動及び paper chromatography に用いた pH=6.8 の 20 mg % bilirubin 溶液及び

Fig. 8



Absorption spectra of diazo reaction of bilirubin-Na alone and in presence of excess globin.

Solid line: Azo-pigment of bilirubin-Na and same in presence of globin.

Dashed line: Hel-azo-pigment of bilirubin-Na and same in presence of globin.

これに globin を加えた pH=6.8 の 20 mg bilirubin + globin 溶液 (bilirubin と globin との重量比は前と同じく 1:250) を M/15 磷酸塩緩衝液にて 10 倍に希釈した pH=6.8 の 2 mg% bilirubin 磷酸塩緩衝溶液及び 2 mg% bilirubin + globin 磷酸塩緩衝溶液の直接 diazo 反応につき検討を加えた。前者の吸収曲線は教室木村¹⁸⁾ が指摘している如く、430 mμ に吸収の極大を有し、直接 diazo 反応は勿論陰性である。後者に於ても 430 mμ と吸収の極大に変化は無く、直接 diazo 反応は陰性である。

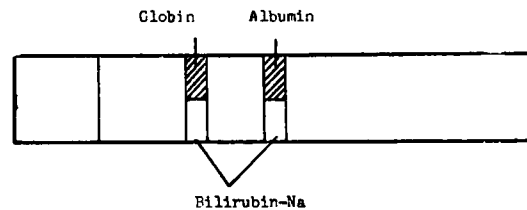
以上の実験より、bilirubin と globin との関係を考察して見ると、直接 bilirubin たる natrium bilirubinate は globin と或種の形で結合し、濾紙電気泳動では同一箇所泳動されることより、少くとも電気的には同一荷電状態である事が推定される。又 bilirubin-Na 塩-globin 溶液の直接 diazo 反応は bilirubin-Na 塩溶液と同じく陽性であり、globin が結合したために、bilirubin-Na 塩の diazo 反応の態度が変化するとは考えられない。又一方直接 diazo 反応が陰性となつた pH=6.8 の間接 bilirubin たる二塩基酸 bilirubin も globin と或種の形で結合し、濾紙電気泳動より、少くとも電気的に同一荷電状態であることが、同一箇所泳動される事より考えられ、従つて diazo 反応に対する態度は、

globin が結合する場合と否とに拘わらず直接反応陰性である。

以上により bilirubin-Na 塩及び二塩基酸 bilirubin は共に globin と結合するが、直接 diazo 反応に対する態度は globin 結合前後と変りなく、bilirubin の直接、間接性を globin との結合が支配するものではないと考えられ、C. J. Watson¹⁹⁾ の言う直接 bilirubin は natrium bilirubinate であり、間接 bilirubin は bilirubin-globin であるとの説は妥当性が少いと考えられる。

次いで pH=7.5~8.5 の 20 mg% bilirubin-Na 塩磷酸緩衝溶液に albumin と globin とを同量加えて (bilirubin との比は夫々 1:250 の重量比) 濾紙電気泳動を行つて見た。この場合は図 9 に示す如く、bilirubin は albumin とともに、globin とともに泳動しているのが認められるが、bilirubin-Na 塩溶液のみを泳動する場合は前記の如く、原点に止まり全く泳動されない。

Fig. 9



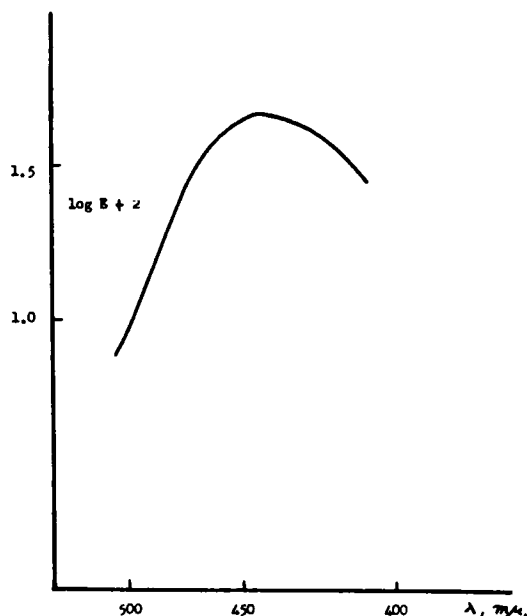
Sample: 20 mg % bilirubin-Na + 2.5 % globin solution and 2.5 % albumin solution in M/15 phosphate buffer (pH 7.5-8.5)

Developer Cataphoresis

又 20 mg% bilirubin-Na 塩+albumin+globin 溶液 (重量比は前に同じ) を M/15 磷酸塩緩衝溶液を加えて 10 倍に希釈して 2 mg% bilirubin-Na 塩+albumin+globin 溶液として pH=7.5~8.5 に於て、吸収曲線を描いて見ると、図 10 に示す如く、450 mμ から 430 mμ にかけて平坦な山を描く、又直接 diazo 反応は陽性で、吸収曲線は図 8 の塩型 bilirubin としての bilirubin-Na 塩と同じく、545~550 mμ に吸収の極大を示し、塩酸を加えると 560 mμ に吸収の極大を示し、紫色の色調が増大する。

以上より bilirubin-Na 塩は albumin と globin に同時に結合する能力のある事を示す。又同時に結合した場合でも albumin 及び globin が結合したために、diazo 反応が間接反応を示すに至るとは考え

Fig. 10



Absorption spectra of bilirubin-Na in presence of excess globin and albumin.

られない。

結 論

Bilirubin と globin との結合及び bilirubin と globin+albumin との結合を検討する目的で pH=8.5 の veronal 緩衝液を電解液とする濾紙電気泳動法及び 2% 蔗糖溶液を展開剤とする一次元上昇法での paper chromatography 及び D-K 型 Beckman 自記分光光度計を用いての吸光曲線の測定等を行い、次の結果を得た。

1. 直接 bilirubin たる bilirubin-Na 塩も間接 bilirubin たる二塩基酸 bilirubin も、何れも globin と結合する能力がある。

2. これらの bilirubin と globin との結合は bilirubin の diazo 反応に対する態度を支配するものではない。

3. Bilirubin-Na 塩を globin と albumin との混合液に溶解すると、globin と albumin の何れも結合する。而してこの際の diazo 反応の態度も、bilirubin-Na 塩の態度と変わりなく、直接反応を示し、間接反応に変わることはなかつた。

参 考 文 献

- 1) Van den Bergh, A. A. H.: *Biochem. Z.* **77**, 90 (1916).
- 2) Levi-Craillsheim, P.: *Klin. Wschr.* **2**, 305 (1923).
- 3) Fiessinger, N., Gajdos, A., Polonovski, M.: *Comptes rend. Soc. Biol.* **135**, 1572 (1941).
- 4) Polovski, M., Fiessinger, N., Gajdos, A.: *Bull. Soc. chim. Biol.* **24**, 221 (1942).
- 5), 19) Watson, C. J.: *Blood* **1**, 99 (1946).
- 6), 13) 正岡: *医学研究*, **23**, 1722 (1953).
- 7) Robschheit-Robbins, F. S. & C.: *J. exper. Med.* **83**, 355 (1946).
- 8) Pedersen, K. O. & Waldenström, J.: *Z. phys. chem.* **245**, 152 (1937).
- 9) Jope, E. M.: *Nature*. **164**, 622 (1949).
- 10) Anson, M. L. & Mirsky, A. F.: *J. general Physiol.* **13**, 469 (1930).
- 11) Howe, P. E.: *J. Biol. Chem.* **49**, 93, 109 (1921).
- 12) 向井: *医学研究*, **22**, 1095 (1952).
- 14), 15) 後藤: *医学研究*, **25**, 1998 (1956).
- 16), 18) 木村: *医学研究*, **25**, 859 (1955).
- 17) 坂本: *Acta medicinae Okayama.* **10**, 30 (1956).

Studies on the Combination of Bilirubin with Proteins

Part 2. A Study on the Combination of Bilirubin with Globin

By

Masanosuke Ohtsuki

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School
(Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

In order to study the combination of bilirubin with globin and also the combination of bilirubin with globin+albumin, the author estimated the absorption curves by means of paper electrophoresis using veronal buffer solution at pH 8.5 as the electrolyte and by paper chromatography at the first dimension using a 2% cane sugar solution as a developer, as well as by D-K type Beckman's autospectrophotometer; and obtained the following results.

1. Sodium bilirubinate that is a direct bilirubin and dibasic acid bilirubin, an indirect bilirubin, both have the capacity to combine with globin.

2. Such combinations of bilirubins and globin do not control the mode of bilirubin to the diazo reaction.

3. When sodium bilirubinate is dissolved in the mixed solution of globin and albumin, it will combine with either one, namely, with globin and with albumin. Moreover, in this instance the mode of the proteins just as in the mode of sodium bilirubinate, shows a direct response to the diazo reaction but never an indirect response.
