

ヒト血清アルブミンへの薬物結合に及ぼす測定条件の影響

—高感度型等温滴定型熱量計VP-ITCを用いた検討—

Influence of Measurement Conditions on Drug - Plasma Protein Binding Using Sensitive Isothermal Titration Calorimeter VP-ITC

大高 泰靖¹⁾・塚本 美樹²⁾・内藤 大介²⁾・杉本 幹治¹⁾・澁川 明正²⁾

Hiroyasu OHTAKA, Miki TSUKAMOTO, Daisuke NAITOU, Kanji SUGIMOTO
and Akimasa SHIBUKAWA

血漿タンパク質は医薬品や内因性物質と血液中で可逆的に結合するため、医薬品などの薬理効果発現や体内動態に影響を与える。そのため血漿タンパク質の大部分を占めるヒト血清アルブミン (HSA) に対する薬物の結合定数の測定は重要である。しかしながら、論文等で報告されている薬物の結合定数には、大きなばらつきがあり、比較することが難しい。この要因の1つとして、測定条件が統一されていないことが挙げられる。本研究では、近年新薬開発における標的タンパク質—治療薬候補薬物の結合定数決定に用いられている高感度型等温滴定型熱量計 (Isothermal Titration Calorimeter, ITC) により、HSA と非ステロイド性抗炎症薬である flurbiprofen との結合定数へ及ぼす温度、緩衝液濃度、緩衝液の種類、HSA 濃度といった測定条件の影響を調査し、測定条件により結合定数が2~3倍変化することを明らかにした。

1. 序論

血漿タンパク質は医薬品や内因性物質と血液中で可逆的に結合する。非結合型物質は血管壁を通して組織中の活性発現部位に到達し、活性発現に関与するが、結合型物質は組織に移行できない。また、非結合型物質のみが肝臓での代謝や腎臓での糸球体濾過を受け、体内動態に影響する¹⁻²⁾。したがって、医薬品や内因性生理活性物質の薬理効果発現や体内動態を検討して安全で効果的な医療に結び付けるには、血漿タンパク質と薬物との結合

定数が重要である。特に、血漿タンパク質の大部分を占めるヒト血清アルブミン (HSA) に対する結合定数が重要である。

これらの結合定数は、平衡透析法や限外濾過法などのいろいろな測定法により調査され、論文等で報告されている。しかしながら、平衡透析法や限外濾過法では膜への薬物吸着や膜の破損による測定誤差が生じる問題がある。また、用いられている測定条件も異なる場合があり、測定結果を比較することが容易ではない。例えば、非ステロイド系消炎鎮痛剤である ibuprofen は、水に対する溶解度が高く測定し易いこともあり、多くの報告があるが、HSA に対する結合定数は $2.4 \times 10^4 \sim 3.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と大きくばらつきがある³⁻⁸⁾。HSA には主な結合サイトが3か所、そしてそれら以外にも結合サイトがあることが知られており^{4, 6-13)}、複数の結合サイトの存在がばらつきの原因と考えられる。

熱量計は200年以上前から使用されている測定機器であるが、1990年代後半に超高感度化が達成され、飛躍

連絡先：大高 泰靖 hohtaka@cis.ac.jp

1) 千葉科学大学薬学部薬学科

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

2) 千葉科学大学薬学部生命薬科学科

Department of Pharmaceutical and Life Science, Faculty of Pharmacy, Chiba Institute of Science

(2016年9月26日受付, 2016年12月28日受理)

的に測定感度が上がった。その熱量計の1つである高感度型等温滴定型熱量計 (MicroCal社 VP-ITC) では、超微量な熱量を発生させるタンパク質-化合物結合の測定も可能となり、結合定数を高い精度で得ることができるようになってきている (測定ノイズは0.5ncal/secまで低下)。現在では、新薬開発における標的タンパク質-治療候補薬物の結合定数決定方法の1つとして等温滴定型熱量計 (Isothermal Titration Calorimeter, ITC) が用いられている。

本研究では、複雑な結合様式をもつHSAに対する薬物の結合解析に、高感度で精度の高い測定が可能である高感度型等温滴定型熱量計を適用し、測定温度、緩衝液濃度、緩衝液の種類、HSA濃度といった測定条件が結合定数に与える影響について検討した。

2. ITCによる結合定数測定原理

試料タンパク質溶液を満たしたサンプルセルに、滴定シリンジから試料薬物溶液を滴下すると、セル内にあるタンパク質と滴下した薬物が結合し、非常に微量な結合熱が発生する (図1)。測定される結合熱は、薬物結合量に比例するため、繰り返し滴下すると、徐々に薬物濃度が高くなり、結合量の増加に応じた結合熱の大きさの変化を測定できる (図2a)。この結合熱の大きさの変化から薬物の結合定数を算出することができる (図2b)。さらに、結合に伴うエンタルピー変化 (結合熱) も測定できる。結合定数の測定を1回の実験操作で得られることから、精度が高い結果を得ることができる¹⁴⁾。

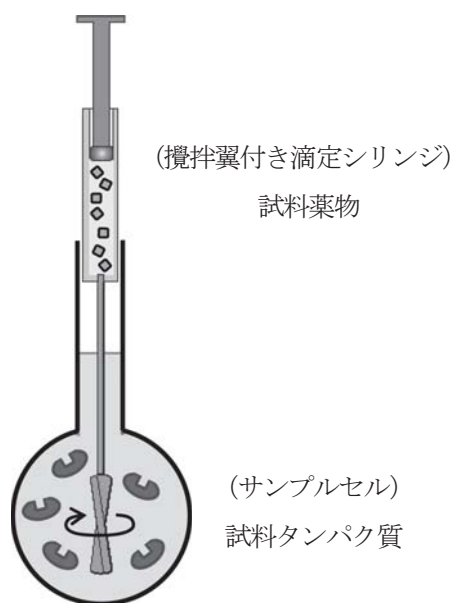


図1 ITC装置の模式図

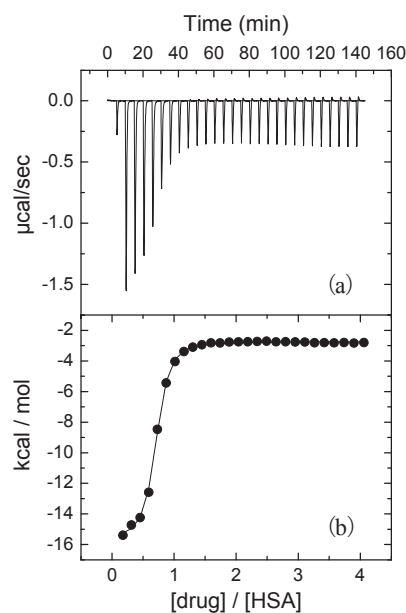


図2 薬物 (S)-flurbiprofen の ITC 測定結果

(a) 滴定曲線、(b) 反応熱の積分曲線。

実線はフィット曲線を示す。

3. 機器・試薬と実験方法

【測定機器】

等温滴定型熱量計 (ITC) として、超高感度等温滴定型熱量計 (MicroCal社 VP-ITC)¹⁴⁾ を用いた (サンプルセル体積: 1.429mL)。測定試料調製装置として、マイクロ天秤 (Sartorius社 ME5) を用いた。

【試薬】

試料タンパク質として、ヒト血清アルブミン (HSA、Sigma-Aldrich社、脂肪酸フリー、Lot #090M7001V) を用いた。試料薬物として、(S)-flurbiprofen、(R)-flurbiprofen (cayman chemical社、 $\geq 99\%$) を用いた。緩衝液調製試薬として、リン酸二水素ナトリウム二水和物 (和光純薬工業株式会社、特級)、N-(2-acetamido)-2-amino-ethanesulfonic acid (ACES、同仁化学研究所、 $\geq 99.5\%$)、2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris-HCl、和光純薬工業株式会社、特級)、水酸化ナトリウム (和光純薬工業株式会社、特級) を用いた。試料を調製する際に用いた精製水は、純水製造装置 (Millipore社 Milli-Q Gradient A10、Elix UV5) で作製した。

【測定試料の調製】

リン酸緩衝液 (5mM、20mM、65mM)、ACES緩衝液 (20mM)、Tris-HCl緩衝液 (20mM) は、水酸化ナトリウムでpH 7.4に調整した後、メンブレンフィルター (孔径0.2 μm) を用いて減圧濾過して作製した。試料タンパク質溶液 (20 μM)、試料薬物溶液 (約300 μM) は、マイクロ天秤で試料を秤量し、測定緩衝液に溶解させ作製した。

【ITC測定の測定条件】

セル体積が1.429mLのサンプルセルに、300秒間隔で28回、試料薬物溶液を10 μ Lずつ滴定した。試料溶液の攪拌速度を302rpmとした。測定温度は15.00 \pm 0.05 $^{\circ}$ C、24.00 \pm 0.05 $^{\circ}$ C、37.00 \pm 0.05 $^{\circ}$ Cとした。

【データ解析】

タンパク質-薬物結合に伴う結合定数 K_a と結合エンタルピー変化 ΔH を測定結果(図2b)から得るため、測定データを装置付属のプログラム(MicroCal社 Origin)で解析した。フィット関数として、1種類の結合様式を示す場合の関数(1成分解析)を用いた。

4. ITCによるHSAへの薬物結合測定

flurbiprofenを試料薬物としてHSAとの薬物結合を測定した(測定温度24.00 $^{\circ}$ C)。flurbiprofenには光学異性体(S体、R体)が存在するため、混合物ではなく、それぞれについて測定した。

図2bのように1成分解析でよくフィットでき、結合定数 K_a と ΔH が得られた。R体についてもS体と同様に1成分解析でよくフィットできた。S体とR体では ΔH に違いがあるものの、結合定数はほぼ等しかった(表1)。得られた結合定数は、報告されている結果に近い結果であった¹⁵⁾。

次に、式(1)と式(2)を用いてギブスエネルギー変化 ΔG 、エンタルピー変化 ΔS を計算した(表1)。

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (1)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

表1より本薬物結合はエンタルピー駆動反応であることが示された($\Delta H < -T\Delta S$)。大きなエンタルピー変化(負に大きい)は分子間に強い相互作用が生じたことを表すため、本薬物結合ではHSAとflurbiprofenとの間に強い相互作用が生じたと考えられる。

また、本薬物結合では $\Delta S < 0$ と得られたことから、構造の自由度(乱雑さ)が小さくなった。つまり、薬物を含む結合部位の構造が固くなったことが推測される。

表1 HSA-flurbiprofenの薬物結合に関する結合定数と熱力学的パラメーター[†]

flurbiprofen	S体	R体
$K_a / 10^6 M^{-1}$	4.01 \pm 0.40	3.84 \pm 0.13
$\Delta H / kJ mol^{-1}$	-51.2 \pm 1.3	-40.1 \pm 0.1
$\Delta G / kJ mol^{-1}$	-37.6 \pm 3.7	-37.5 \pm 1.3
$-T\Delta S / kJ mol^{-1}$	13.7 \pm 5.0	2.7 \pm 1.4
$\Delta S / J mol^{-1} K^{-1}$	-46 \pm 13	-9.1 \pm 4.2

[†] 測定条件: [HSA]=20 μ M、20mM リン酸緩衝液(pH 7.4)、24.00 $^{\circ}$ C

このように本測定から、HSAとflurbiprofen(S体、R体)との結合に関する相互作用の大きさ(エンタルピー変化から)と構造自由度の知見(エンタルピー変化から)が得られた。

5. HSAの薬物結合に及ぼす測定条件の影響

序論でも述べたように、報告されている結合定数には大きなばらつきがあり³⁻⁸⁾、この要因の1つとして、測定条件の違いによる影響と考えられる。そこで、4つの測定条件(温度、緩衝液濃度、緩衝液の種類、試料タンパク質濃度)を変更することで、結合定数にどのような影響が出るかを検討した。

5.1 測定温度の影響

測定温度による影響を検討するため、15.00 \pm 0.05 $^{\circ}$ C、24.00 \pm 0.05 $^{\circ}$ C、37.00 \pm 0.05 $^{\circ}$ Cで測定した。表2に示すように、温度上昇と共に結合定数は減少した。測定結果からファンツ・ホッフプロットを作成したところ(図3)、

表2 結合定数の温度依存性[†]

flurbiprofen	S体	R体	
K_a	15.00 $^{\circ}$ C	4.63 \pm 0.10	6.31 \pm 0.72
$/ 10^6 M^{-1}$	24.00 $^{\circ}$ C	4.01 \pm 0.40	3.84 \pm 0.13
	37.00 $^{\circ}$ C	2.70 \pm 0.47	2.16 \pm 0.17
$\Delta H^{\circ} / kJ mol^{-1}$		-18.5 \pm 2.8	-36.1 \pm 2.6
$\Delta S^{\circ} / J mol^{-1}$		64 \pm 9	5 \pm 6
$\Delta C_p / cal K^{-1} mol^{-1}$		-665 \pm 27	-858 \pm 102

[†] 測定条件: [HSA]=20 μ M、20mM リン酸緩衝液(pH 7.4)

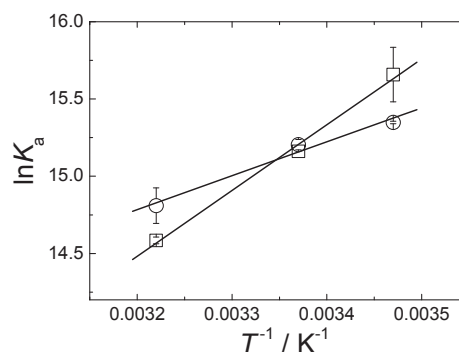


図3 ファンツ・ホッフプロット

○: (S)-flurbiprofen; □: (R)-flurbiprofen
直線はそれぞれの近似直線である。

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^{\circ}}{RT} + \frac{\Delta S^{\circ}}{R} \quad (3)$$

グラフは正の傾きを示し、発熱反応であることが示された ($\Delta H < 0$)。図3に示す測定点の近似直線の傾きと切片からファント・ホッフ式(式(3))を用いて標準エンタルピー変化 ΔH° と標準エントロピー変化 ΔS° をそれぞれ計算した(表2)。得られた ΔH° はファント・ホッフエンタルピー変化ともいい、タンパク質(HSA)の熱変性機構を含む熱量であり、表1に示す ΔH と表2に示す ΔH° は直接比較できない¹⁶⁾。

また、得られた ΔH を温度に対してにプロットし(図4)、式(4)を用いて傾きから定圧熱容量 ΔC_p を算出した(表2)。この値は、薬物結合に伴い溶媒分子が接触できなくなる部分の表面積、つまり薬物の結合部位の表面積を反映する¹⁴⁾。一般的なタンパク質と化合物結合反応では、 $< 1000 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ の値を取ることが知られており、本測定結果もこの範囲に入ったため、一般的なタンパク質-薬物結合反応であると考えられる。

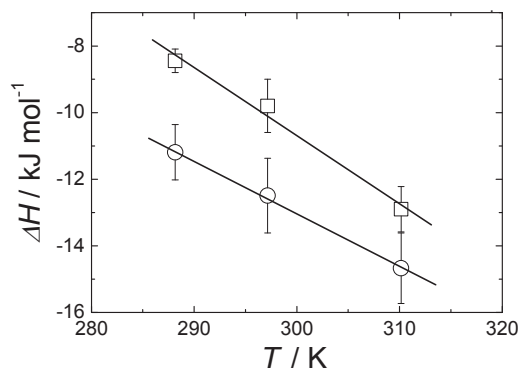


図4 結合エンタルピー変化の温度依存性

○: (S)-flurbiprofen; □: (R)-flurbiprofen
直線はそれぞれの近似直線である。

$$\Delta C_p = \left(\frac{\partial \Delta H}{\partial T} \right)_p \quad (4)$$

5. 2 緩衝液濃度の影響

測定に用いる緩衝液の濃度による影響を検討するため、5mM、20mM、65mMリン酸緩衝液で測定を行った(測定温度 $24.00 \pm 0.05^\circ\text{C}$)。表3に示すように、緩衝液濃度の上昇と共に結合定数は減少した。緩衝液濃度の増大に伴い、溶液のイオン強度が増大し(緩衝液濃度5mM、20mM、65mMのときのイオン強度はそれぞれ0.011、0.049、0.168)、HSAと薬物との間に働く分子間相互作用に影響したものと考えられる。

$$\log k = \log k^0 + 2A z_{\text{protein}} \cdot z_{\text{drug}} \sqrt{I} \quad (5)$$

式(5)のようにイオン間の反応の速度定数は、溶液のイオン強度で変化すること(速度論的塩効果)が知られている(図5)。ここで、 k^0 は電荷の影響がない場合の速度定数、 A は定数($= 0.509 \text{ (mol/L)}^{-0.5}$)、 z_{protein} はタンパク質の電荷、 z_{drug} は薬物の電荷である。溶液のイオン強度が増大すると、物質間に働く分子間相互作用が弱くなる。そのため、異符号間に働いていた静電引力はイオン強度の増大と共に弱くなり、反応速度定数は減少する(図5 I)。一方、同符号間に働いていた静電反発力はイオン強度の増大と共に弱くなり、反応速度定数は増大する(図5 III)。

本測定結果の場合、イオン強度の増加と共に結合定数が減少することから、HSAとflurbiprofenは異符号の組み合わせで両者の間に静電引力が働いていることが示された。

表3 結合定数の緩衝液濃度依存性[†]

	flurbiprofen	S体	R体
K_a	5mM PBS	4.95 ± 1.13	4.43 ± 0.35
$/ 10^6 \text{ M}^{-1}$	20mM PBS	4.01 ± 0.40	3.84 ± 0.13
	65mM PBS	3.31 ± 0.44	3.33 ± 0.35

[†] 測定条件: [HSA] = 20 μM 、リン酸緩衝液 (pH 7.4)、24.00 $^\circ\text{C}$

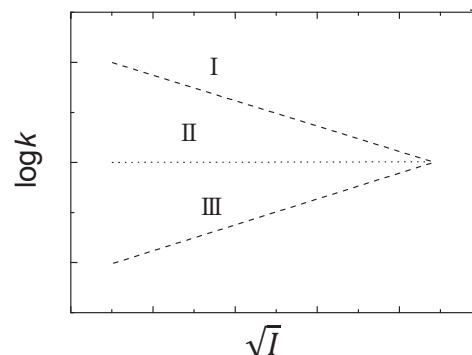


図5 タンパク質-薬物結合に及ぼすイオン強度の影響

I: 異符号の組み合わせの場合、II: 電荷がない場合、
III: 同符号の組み合わせの場合

5. 3 緩衝液の種類の影響

一般に、タンパク質への薬物結合に伴って、タンパク質の結合部位の表面電荷が変化するため、薬物だけでなくプロトン移動も発生し、プロトン移動に伴う結合熱(解離熱)も発生することが知られている¹⁴⁾。したがって、通常測定される ΔH は、薬物による結合熱だけを反映するのではなく、薬物による結合熱とプロトンの出入りによる結合熱(解離熱)との総和になるため、以下の式(6)が導かれている¹⁴⁾。

$$\Delta H = \Delta H_{\text{bind}} + N_{\text{H}} \times \Delta H_{\text{ionization}} \quad (6)$$

ここで、 ΔH は測定されるエンタルピー変化、 ΔH_{bind} は薬物結合に伴うエンタルピー変化、 $\Delta H_{\text{ionization}}$ は緩衝液のイオン化エンタルピー、 N_{H} は結合に伴い出入りするプロトンの数である。イオン化エンタルピーとは、例えば、酢酸の場合、 H^+ が解離する際に必要なエンタルピーの大きさを示す。

本節では、緩衝液の種類による結合定数への影響を検討するため、これまでに用いたリン酸緩衝液 ($\Delta H_{\text{ionization}} : 5.12 \text{ kJ/mol}$) と異なるイオン化エンタルピーをもつ ACES 緩衝液 ($\Delta H_{\text{ionization}} : 31.41 \text{ kJ/mol}$)、Tris-HCl 緩衝液 ($\Delta H_{\text{ionization}} : 47.44 \text{ kJ/mol}$) を用いた¹⁷⁻¹⁹⁾。これらの緩衝液は、リン酸緩衝液と同様に濃度 20mM、pH 7.4 に調整した。

測定温度 $24.00 \pm 0.05^\circ\text{C}$ で測定した結果を表 4 に示す。溶液のイオン化エンタルピーの上昇に伴って結合定数は減少した。式 (6) に基づき、 $\Delta H_{\text{ionization}}$ に対して ΔH をプロットしたところ、図 6 のような関係を示した。得られたプロットにおいて $\Delta H_{\text{ionization}} = 0$ とすることで緩衝液の影響を受けない場合の結合熱 ΔH_{bind} を算出した (表 5)。また、近似直線の傾きから N_{H} を計算した。得られた N_{H} の値が正であることから flurbiprofen が HSA に結合する際には、プロトンが僅かに結合することが示された²⁰⁾。

次に、 $\Delta H_{\text{ionization}}$ に対する K_{a} の変化をプロットすることで (図 7)、緩衝液の影響を受けない場合の結合定数

表 4 結合定数への緩衝液の種類の影響[†]

flurbiprofen		S 体	R 体
K_{a} / 10^6 M^{-1}	リン酸	4.01 ± 0.40	3.84 ± 0.13
	ACES	2.85 ± 1.07	2.81 ± 0.12
	Tris-HCl	1.58 ± 0.10	2.09 ± 0.06
ΔH / kJ mol^{-1}	リン酸	-51.2 ± 1.3	-40.2 ± 0.1
	ACES	-57.8 ± 12.0	-34.5 ± 1.4
	Tris-HCl	-37.4 ± 0.5	-21.2 ± 0.4

[†] 測定条件: [HSA]=20 μM 、20mM 緩衝液 (pH 7.4)、24.00 $^\circ\text{C}$
 $\Delta H_{\text{ionization}}$ (kJ mol^{-1}): リン酸は 5.12、ACES は 31.41、Tris-HCl は 47.44

表 5 緩衝液の影響を受けない場合の薬物の結合定数と結合熱、薬物結合に伴い出入りするプロトンの数[†]

flurbiprofen	S 体	R 体
N_{H}	0.27 ± 0.40	0.43 ± 0.16
$\Delta H_{\text{bind}} / \text{kJ mol}^{-1}$	-56.2 ± 13.4	-43.8 ± 5.4
$K_{\text{a-act}} / 10^6 \text{ M}^{-1}$	4.38 ± 0.30	4.08 ± 0.04

[†] 測定条件: [HSA]=20 μM 、20mM 緩衝液 (pH 7.4)、24.00 $^\circ\text{C}$

$K_{\text{a-act}}$ を算出した (表 5)。 $K_{\text{a-act}}$ はリン酸緩衝液の結果と近い値を示した。リン酸緩衝液における結果は、緩衝液の影響を受けない場合の結合定数に近い値を示した。したがって、 $\Delta H_{\text{ionization}}$ の小さいリン酸緩衝液において結合定数測定を行うことが最も望ましいと考えられる。

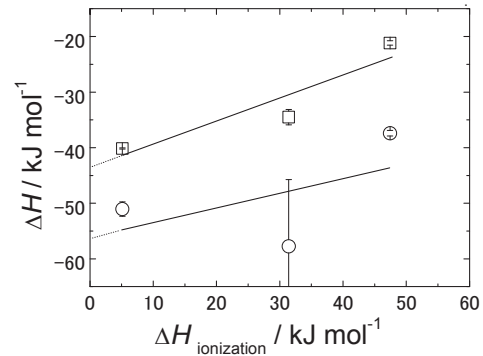


図 6 結合熱への緩衝液がもつ $\Delta H_{\text{ionization}}$ の影響

○: (S)-flurbiprofen; □: (R)-flurbiprofen
 直線はそれぞれの近似直線である。

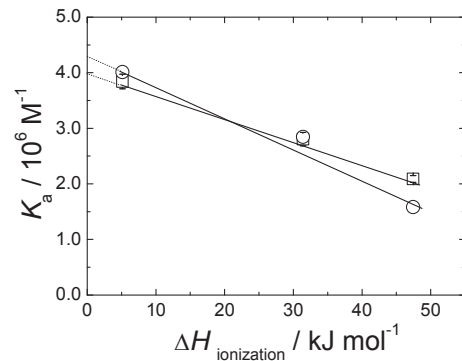


図 7 結合定数への緩衝液がもつ $\Delta H_{\text{ionization}}$ の影響

○: (S)-flurbiprofen; □: (R)-flurbiprofen
 直線はそれぞれの近似直線である。

5. 4 緩衝液を混合させた場合の影響

前節において緩衝液のイオン化エンタルピーによって結合定数が異なることが示された。人体のような生体内では、複数の緩衝液が混在した状態であり、緩衝液を混合した際の影響も検討する必要がある。そこで、リン酸緩衝液と ACES 緩衝液の混合緩衝液を用いて (R)-flurbiprofen の HSA に対する結合への影響を観察した。

混合緩衝液は、20mM リン酸緩衝液と 20mM ACES 緩衝液 (いずれも pH 7.4) をそれぞれ調製した後、リン酸: ACES が 1:0、1:1、2:8、0:1 の体積比となるよう混合して測定した (測定温度 $24.00 \pm 0.05^\circ\text{C}$)。

図8に示されるように、結合定数はACES緩衝液の体積割合が0.5まではほとんど変化せず、その後、割合の増加と共に急激に低下した。これは、リン酸緩衝液のイオン化エンタルピーがACES緩衝液のものより小さいため、イオン化しやすいリン酸緩衝液の影響を強く受けていると考えられる。

これらの結果から、生体内のようにいろいろな物質が混在する環境では、プロトンはイオン化エンタルピーが最も小さい物質(緩衝液)から供給され、必要なイオン化エンタルピーは0に近い値を取ると考えられる。したがって、測定を行う際には、イオン化エンタルピーが小さい緩衝液、つまり、pH 7.4付近の測定ではリン酸緩衝液を用いることが適切であると考えられる。また、その他のpHでは、pH 4.7付近では酢酸緩衝液(pKa = 4.70)、pH 3.7付近ではギ酸緩衝液(pKa = 3.75)のイオン化エンタルピーが小さく、測定に適した緩衝液と考えられる¹⁷⁾。

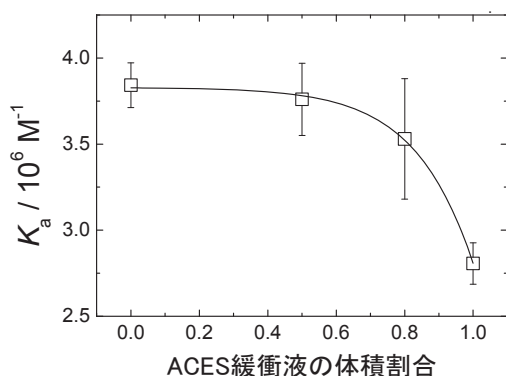


図8 リン酸緩衝液とACES緩衝液の混合による(R)-flurbiprofenの結合定数変化[†]

[†]測定条件:[HSA] = 20 μM 、20mM 緩衝液(pH 7.4)、24.00 $^{\circ}\text{C}$

5. 5 試料タンパク質濃度の影響

試料タンパク質濃度を変化させると、タンパク質同士の相互作用により結合定数が変化する可能性があるため、タンパク質濃度の結合定数への影響を検討した。

HSA濃度による結合定数への影響を検討するため、HSA濃度を5 μM 、10 μM 、20 μM 、30 μM 、40 μM として測定した。その際、試料薬物として(R)-flurbiprofenを用い、薬物濃度はそれぞれ75 μM 、150 μM 、300 μM 、450 μM 、600 μM とした(ITC法では、試料タンパク質溶液と試料薬物溶液の濃度比1:15が最適であるため濃度を調整した¹⁴⁾)。

測定温度24.00 \pm 0.05 $^{\circ}\text{C}$ で測定した結果を図9、図10に示す。HSA濃度の増大と共に K_a は減少し(図9)、 ΔH は増大した(図10)。これは、HSAの濃度に伴って増加

した溶媒粘度やHSAがもつ大きな電荷が影響したものと考えられる。

生体内でのHSA濃度は約600 μM であり、さらに高濃度領域で測定する必要があるが、ITC法ではこの領域での測定が難しい。HSA濃度の上昇と共に薬物濃度も上昇させる必要があるが、病気治療に用いられる薬物(経口薬)は脂溶性のものが多く、薬物を1000 μM 以上の高濃度にすることが困難であるからである。

このようにITC法では、生体環境に近いHSAの高濃度領域の測定は困難であると考えられるが、図9に示されるようにHSA濃度増加に伴う結合定数の減少は濃度と共に緩やかになる傾向がある。

ITCでは結合熱の大きさや(エンタルピー変化)や薬物の溶解度を考慮すると、HSA濃度を20 μM 、薬物濃度を300 μM とすることが最適な測定条件と考えられる。

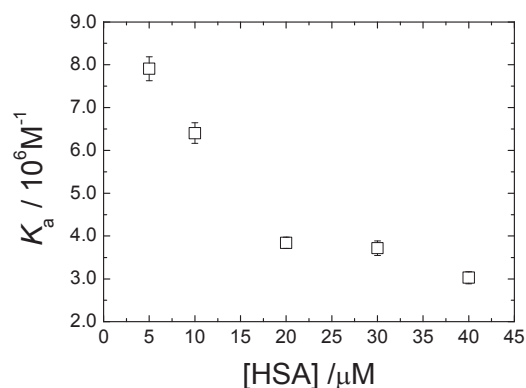


図9 (R)-flurbiprofenの結合定数のHSA濃度依存性[†]

[†]測定条件:20mM リン酸緩衝液(pH 7.4)、24.00 $^{\circ}\text{C}$

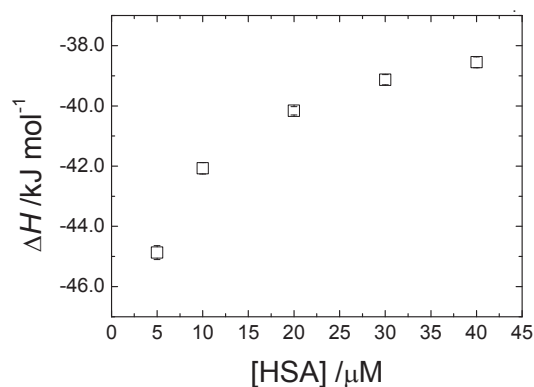


図10 (R)-flurbiprofenの結合熱のHSA濃度依存性[†]

[†]測定条件:20mM リン酸緩衝液(pH 7.4)、24.00 $^{\circ}\text{C}$

6. まとめ

ヒト血清アルブミン (HSA) に対する flurbiprofen (*S*体、*R*体) の薬物結合の結合定数と熱力学的パラメーターを等温滴定型熱量計 (ITC) により明らかにした。そして、測定温度の上昇、緩衝液濃度の増大や HSA 濃度の増大に伴い、結合定数が 2~3 倍減少したことが示された。また測定に用いる緩衝液の種類にも影響があることが示された。

報告されている結合定数³⁻⁸⁾は、測定条件だけでなく、測定法も異なることからより大きな違いに繋がったと考えられる。したがって、より正確な薬物の結合定数を得るためには、測定条件を揃えて測定することが望ましく、特に、タンパク質-薬物結合を測定する場合、標的タンパク質の生体中での存在条件に近い条件で測定することの必要性を改めて示している。

HSA については、血液中に存在するタンパク質であるため、血液の環境である pH 7.4、イオン強度 0.17 (リン酸緩衝液では 65mM)、37.0°C に測定条件を調整することが望ましい。また、論文等で報告されている結合定数を引用する際には、測定条件を確認する必要があると考えられる。

参考文献・補足資料

- 1) Hardy J, and Hardy KG (1998) *Science*. 282, 1075-1079.
- 2) Price DL, Sisodia SS, and Borchelt DR (1998) *Science*. 282, 1079-1083.
- 3) Itoh T, Saura Y, and Tsuda Y. (1997) *Chirality*. 9, 643-649.
- 4) Hage DS, Noctor TA, and Wainer IW (1995) *J Chromatogr A*. 1995, 23-32.
- 5) Yamasaki K, Rahman MH, Tsutsumi Y, Maruyama T, Ahmed S, Kragh-Hansen U, and Otagiri M. (2000) *AAPS PharmSciTech*. 1, E12.
- 6) Li ZM, Wei CW, Zhang Y, Wang DS, and Liu YN (2011) *J Chromatogr B*. 879, 1934-1938.
- 7) Barri T, Trtic-Petrovic T, Karlsson M, and Jonsson JA (2008) *J Pharm Biomed Anal*. 10, 49-56.
- 8) Ràfols C, Zarza S, and Bosch E. (2014) *Talanta*. 130, 241-250.
- 9) Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, and Curry S. (2005) *J Mol Biol*. 353, 38-52.
- 10) Fehske KJ, Müller WE, Wollert U. (1981) *Biochem Pharmacol*. 30, 687-692.
- 11) Ascenzi P, Cao Y, Tundo GR, Coletta M, Fanali G, Fasano M. (2011) *Biochem Biophys Res Commun*. 411, 185-189.
- 12) Takamura N, Tokunaga J, Arimori K. (2007) *Yakugaku Zasshi*. 127, 231-236.
- 13) Petitpas I, Grune T, Bhattacharya AA, and Curry S. (2001) *J Mol Biol*. 314, 955-960.
- 14) Velázquez-Campoy A, Ohtaka H, Nezami A, Muzammil S, and Freire E (2004) *Curr Protoc Cell Biol*. 47, 627-639.
- 15) Ràfols C, Zarza S, and Bosch E (2014) *Talanta*. 130, 241-250.
- 16) 杉本華幸 (2011) 新大農研報, 64, 80-85.
- 17) Christensen JJ, Hansen LD, and Izatt RM (1976) . "Handbook of protonionization heats and related thermodynamic quantities" New York, John Wiley and Sons.
- 18) Velazquez-Campoy A, Luque I, Todd MJ, Milutinovich M, Kiso Y, and Freire E, (2000) *Protein Sci*. 9,1801-1809.
- 19) Ohtaka H, Velázquez-Campoy A, Xie D, and Freire E. *Protein Sci*. (2002) 11, 1908-1916.
- 20) 得られる N_H の値は整数とは限らない。その理由は、試料タンパク質と薬物は緩衝液と酸塩基平衡により帯電することに由来する。薬物が結合していない状態では、試料タンパク質や薬物は緩衝液と酸塩基平衡により電荷をもち、連続的な価数である。一方、薬物結合が生じると、試料タンパク質の結合サイトと薬物との間に最適な水素結合、ファンデルワールス相互作用等が形成されるため、結合サイトと薬物は最適な電荷状態 (陽イオン・陰イオン・電荷なし) に変化する。したがって、試料タンパク質と薬物は薬物結合に伴い、緩衝液と平衡状態 (連続的な価数) から結合に最適な状態 (とびとびの価数「+、-、0」) に変化するため、プロトンの移動個数は小数となることが多い。