

## ヒト血清中 Zinc, Calcium, Magnesium, および Albumin の 緩衝液濃度に依存した Sephadex カラムからの溶出

菅原 千枝子 菅原 直毅

札幌医科大学公衆衛生学講座 (主任 三宅浩次 教授)

斉藤 利和

札幌医科大学神経精神学講座 (主任 高畑直彦 教授)

### Behaviour of Human Serum Zinc, Calcium, Magnesium and Albumin on Sephadex Column depending on Buffer Concentrations

Chieko SUGAWARA and Naoki SUGAWARA

*Department of Public Health, Sapporo Medical College*

(Chief : Prof. H. Miyake)

Toshikazu SAITO

*Department of Neuropsychiatry, Sapporo Medical College*

(Chief : Prof. N. Takahata)

To estimate the level of physiologically active type metals; zinc (Zn), calcium (Ca) and magnesium (Mg) in human serum, the proportions bound with proteins were determined using either a Sephadex G-100 or G-150 column.

#### (1) Zinc

Serum was eluted with 0.15M KCl-1mM Tris HCl buffer pH 8.5 or Tris HCl buffer pH 8.5 in concentrations from 100mM to 1mM. With all the buffer solutions mentioned above, the elution profiles comprised two peaks. The second peak contained albumin. The proportion of Zn in the second peak was 60-70% with 100mM and 10mM Tris buffer as well as with 0.15M KCl-1mM Tris buffer pH 8.5. The elution profile with 1mM Tris buffer pH 8.5 showed a second peak which was complicated. The second peak may have contained plural Zn binding proteins.

#### (2) Calcium and magnesium

Ca and Mg were bound very loosely with albumin and were dissociated from the protein in 0.15M KCl-1mM Tris buffer pH 8.5 or Tris buffer pH 8.5 in concentrations from 100mM to 1mM. In 1mM Tris buffer, it was, however, possible to determine metals bound to albumin because the dissociation progressed slowly in the Sephadex column. An attempt was made to determine the metals bound to albumin from the sera of 16 healthy adults. The proportion of albumin bound type was  $42.4 \pm 6.2$  (M $\pm$ SD)% for Ca and  $40.5 \pm 5.4$ % for Mg.

#### (3) Albumin

With 0.15M-1mM Tris buffer pH 8.5, the elution volume of serum albumin was adequate for its molecular weight of  $6.9 \times 10^4$ . With 1mM Tris buffer pH 8.5, the elution of albumin was clearly delayed as compared to the elution with 0.15M KCl. This delay was confirmed with authentic albumin, crystallized and lyophilized human serum albumin (Sigma Chemicals). Two peaks were observed with this albumin in elutions with 0.15M KCl-1mM Tris buffer and 1mM Tris buffer by monitoring the absorbance at 280nm. The first one ranged to a molecular weight region higher than  $10^5$ . A part of this sample may aggregate to dimer, etc.

(Received October 22, 1981 and accepted November 17, 1981)

## 1 緒 言

近年、原子吸光光度計の普及により、金属元素の測定が容易となった。微量金属についても多くの知見がえられ、各種疾患の患者におけるこれら金属の動態、およびその意味について論議がなされている。<sup>1,2)</sup>

今回、患者血清中の zinc (Zn), calcium (Ca) および magnesium (Mg) の蛋白との結合比について検討する機会があり、予備実験として、健康人血清中のこれら金属を Sephadex カラムで同時に分離定量することを試みたので報告する。

## 2 方 法

健康人(男 10 名, 女 6 名, 年齢 47±9 歳)よりプラスチック注射筒で上腕静脈より採血し、遠心分離した血清を同日内に Sephadex カラムにかけた。ガラス器具はすべて、10 倍希釈した硝酸で洗浄後、使用した。十分に膨潤させた Sephadex (medium, Pharmacia 製) G-100 あるいは G-150 を 1.8×62.0 cm のカラムにつめ、溶出用緩衝液 (0.15 M KCl-1 mM Tris 塩酸緩衝液 pH 8.5 または 100 mM, 10 mM, 1 mM Tris 塩酸緩衝液 pH 8.5) で一日洗浄した後、血清あるいは各種の蛋白質溶液 2.0 ml をカラムにのせた。溶出液は Sephadex G-100 の場合 2.0 ml, G-150 の場合 3.1 ml に分けて集めた。

溶出液中の calcium (Ca), magnesium (Mg) は最終濃度 0.5% の strontium 共存下で、また zinc (Zn) と copper (Cu) は特別の処理なしに原子吸光光度計 (日立 208 型) で測定した。使用波長はそれぞれ、422.6 nm, 284.9 nm, 213.9 nm, 324.2 nm であった。

溶出液中の albumin は cellulose acetate 膜による電気泳動で検出した。また albumin の流出位置について検討を加えるため、G-100 カラムで分子量測定用蛋白 (myoglobin, ovalbumin, globulin; Schwartzmann 社), sucrose, blue dextran で検量線を作成し、精製された albumin (結晶化, 凍結乾燥したヒト血清 albumin, Sigma Chemicals 社) の溶出を試みた。

## 3 成績および考察

### 3-1 Zinc

各栄養素の充足度は、その血中濃度から評価されることが多く、金属もその例外ではない。多くの疾患について Zn の欠乏は、血清 Zn の低下として確認されているが、<sup>2,3)</sup> 血清 Zn の存在状態と疾患の関係を検討した

例<sup>4)</sup>は非常に少ない。一般に血清 Zn のおよそ 2/3 は albumin にゆるく結合し、1/3 は  $\alpha_2$ -macroglobulin に強く結合しているとされており、<sup>4)</sup> 各疾患における血清 Zn の存在状態を吟味することは、Zn の欠乏を考察する上で重要と思われる。

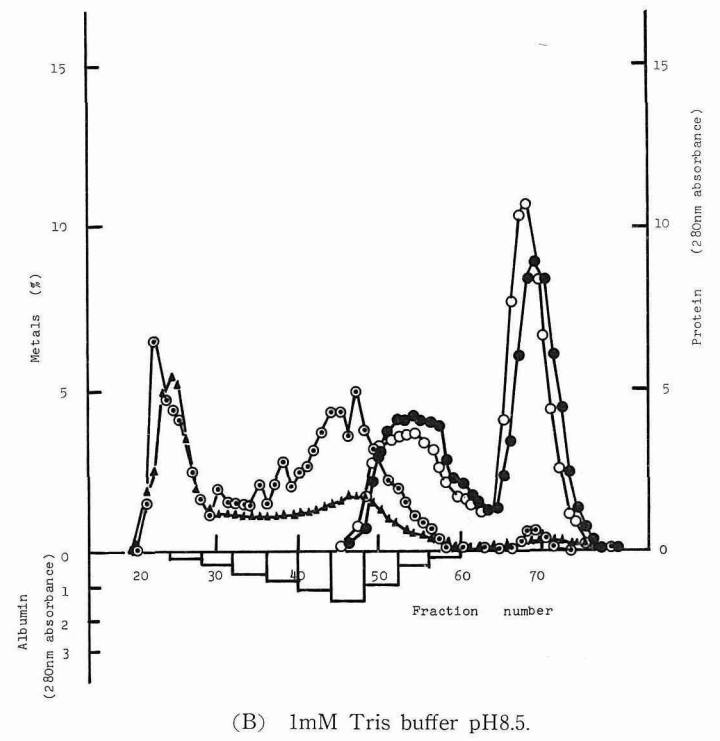
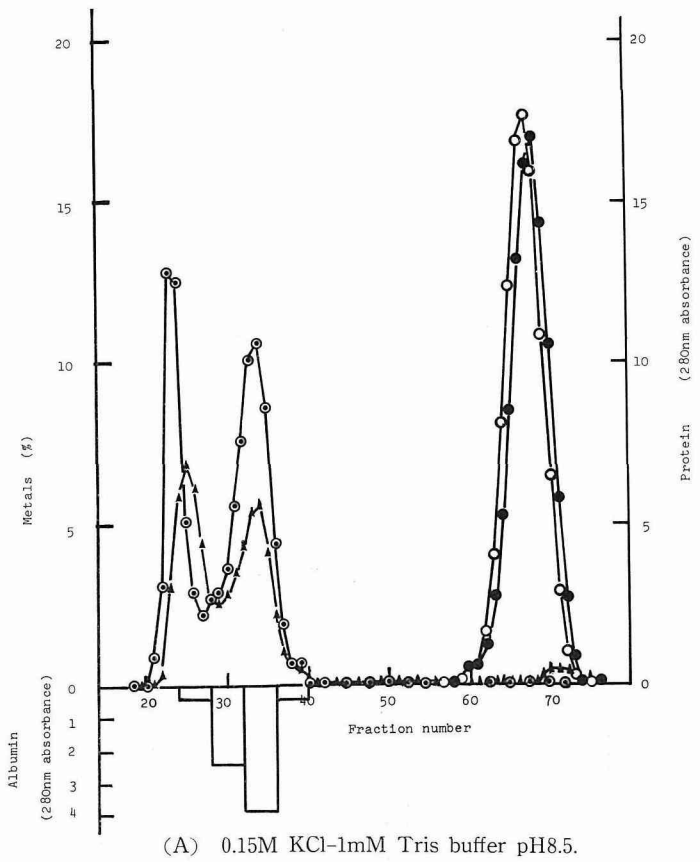
今回の予備実験では、まず蛋白分子量の決定に際し広く使われている<sup>5)</sup> 0.15 M KCl-1 mM Tris 緩衝液 pH 8.5 で血清蛋白の分画を試みた (Fig. 1A)。Zn の溶出パターンは、280 nm における吸光度と一致した二峰性を示し、溶出液を電気泳動にかけたところ、一番目のピークに albumin はほとんど認められず、二番目のピークは大部分が albumin であった。

次に 1 mM Tris 緩衝液 pH 8.5 を溶出液とした時 (Fig. 1B)、Zn-II ピークは流出がおくれ、かつピーク幅が広がって単純なピークとはならなかったが、この場合も Zn-II ピークの蛋白質はほとんどが albumin であった。Zn-II ピークの遅れを Sephadex G-150 カラムで Tris 緩衝液濃度を変えて検討してみたが、いずれの場合も Zn は二峰性であり、Zn-I ピークと Zn-II ピークの間の緩衝液所要量は、100 mM (Fig. 2A) で 28 ml, 10 mM (Fig. 2B) で 46 ml, 1 mM (Fig. 2C) で 62 ml となった。なお、この実験でピーク I と II の間に認められた小さなピークは、Cu のピークと一致し、この部分の Zn は Cu 蛋白である ceruloplasmin に結合している可能性がある。

Parisi and Vallee<sup>6)</sup> は、透析可能な Zn を除去した後、Sephadex G-100, 100 mM Tris 緩衝液 pH 8.5 を使い、血清 Zn のおよそ 30~40% が  $\alpha_2$ -macroglobulin 中に metalloprotein として存在し、残りの大部分が albumin と complex を形成するとしている。今回、健康人血清を 100 mM, 10 mM Tris 緩衝液で分画した例でも、albumin を含むピーク II の Zn は 60~70% となった。しかし、澱粉ゲル電気泳動や cellulose acetate 膜による電気泳動で各分画中の Zn の定量を試みた例<sup>7,8)</sup> では、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  globulin の各分画にもかなりの量の Zn が認められている。1 mM Tris 緩衝液で溶出した Fig. 1-B の図中で、Zn の溶出パターンが複雑になったのは、albumin,  $\alpha_2$ -macroglobulin の他に複数の Zn 結合蛋白が存在することを示すものと思われる。

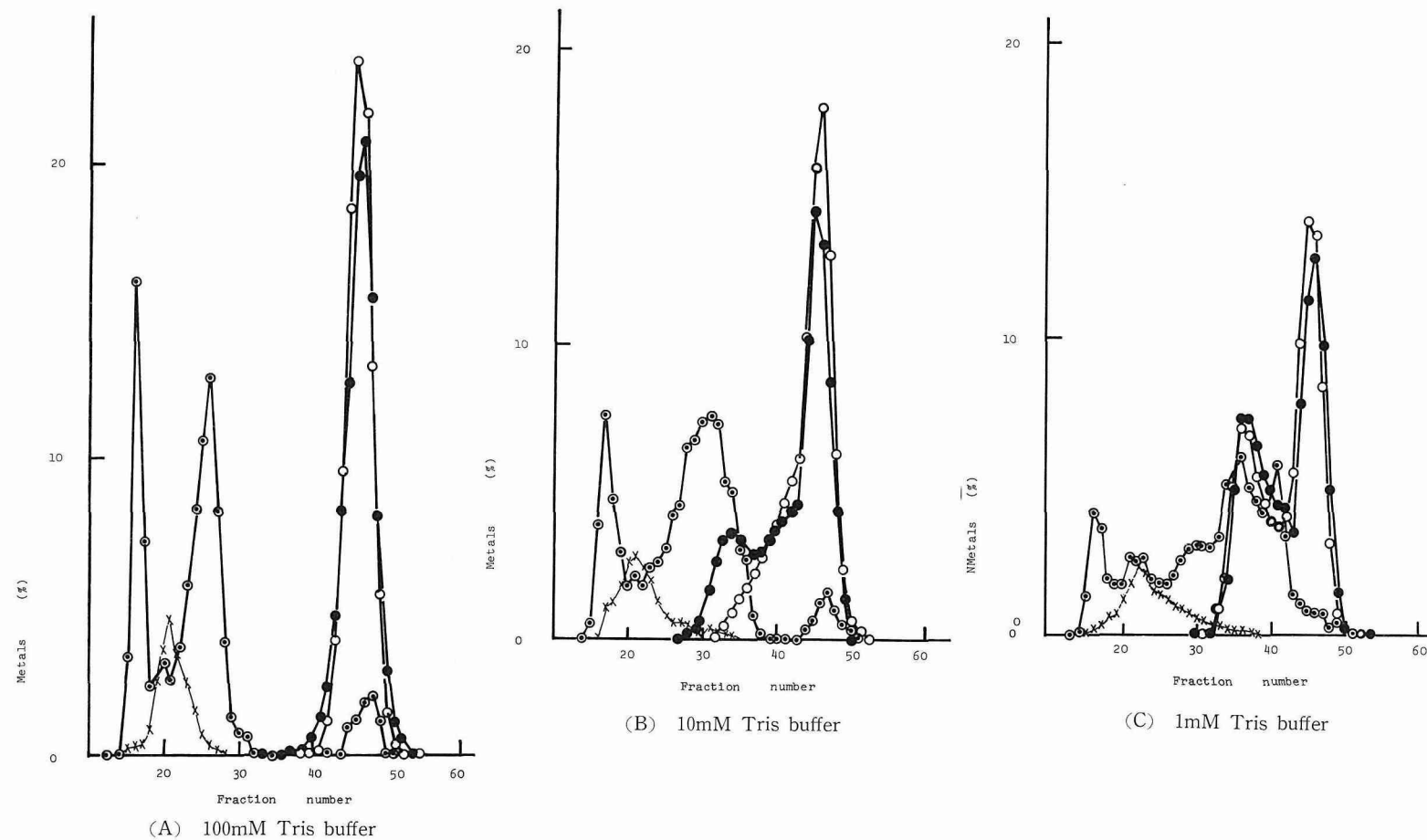
### 3-2 Calcium と Magnesium

血清中の Ca と Mg については長い研究の歴史があり、半透膜や超遠心分離を利用した実験例から、30~40% が albumin に結合し、生理活性があるのは非結合型であることが知られている。<sup>9)</sup> 今回の実験で 0.15 M KCl-1



Symbol (▲) represents the absorbance at 280nm. Ca (●), Mg (○) and Zn (⊙) contents of each fraction are represented as percentage (%) to total amount recovered from the column. Four fractions were pooled and the albumin of this sample was calculated as (280nm absorbance)×(albumin content, estimated by cellulose acetate electrophoresis). Column conditions were described in methods.

Fig. 1 Elution profiles of human serum metals with a Sephadex G-100 column.



Ca (●), Mg (○), Zn (⊙) and Cu (×) contents of each fraction are represented as percentage (%) to total amount recovered from the column. The scale of the ordinate for Cu is 1/5, compared to the other metals. Column conditions were described in methods.

Fig. 2 Changes in elution profiles of serum metals on a Sephadex G-150 column depending on the concentration of Tris buffer pH8.5

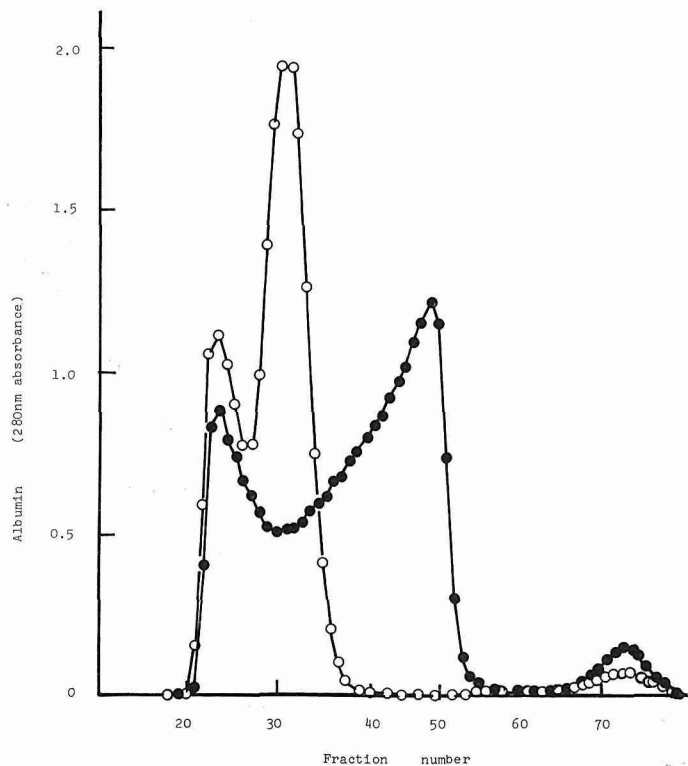
mM Tris 緩衝液 pH 8.5 を溶出液とした場合, Ca と Mg は albumin から解離し, すべて非結合型として単純なピークを示した(Fig. 1A), Ca の albumin に対する親和性(解離定数  $K: 7.8 \times 10^{-3} M^{9)}$  は Zn ( $K: 10^{-7} M^{10}$ )より小さく, イオン強度の高い環境では解離するものと思われる. このことは Tris 緩衝液濃度を変えて血清蛋白を流した実験で確認された. すなわち, 100 mM Tris 緩衝液 pH 8.5 (Fig. 2A) で Ca と Mg は完全に非結合型の一つのピークとなり, 1 mM Tris 緩衝液 pH 8.5 (Fig. 2C) で二つのピークに分かれ, 中間の 10 mM Tris 緩衝液 pH 8.5 (Fig. 2B) ではこれらパターンに移行型が確認された.

1 mM Tris 緩衝液 (Fig. 1A) の場合にも Ca と Mg の一番目のピークは Zn-II ピークより明らかに遅れ, albumin から解離していることが, 280 nm の吸収曲線, および電気泳動の結果から明らかとなったが, この解離はカラム流下中にゆっくりおこるものと思われる.

健康人血清 16 例を Sephadex G-100 カラム, 1 mM Tris 緩衝液 pH 8.5 で分画したところ, Ca-I ピークは  $42.4 \pm 6.2$  (M $\pm$ SD)%, Mg-I ピークは  $40.5 \pm 5.4$ % となり, 従来の報告と考え合せ<sup>9)</sup> ピーク I の Ca と Mg は albumin 結合性と思われる.

### 3.3 Albumin

今回の実験では, albumin の溶出位置も注目される. Tris 緩衝液濃度が, 100 mM から 10 mM, 1 mM と低くなるにつれ, Zn-I ピークと Zn-II ピークの間隔が広がり, albumin の溶出が遅れて, 標準蛋白による検量線から大きくずれることであった. この点を, 精製されたヒト血清 albumin を使って確認した. すなわち, 結晶化された albumin を血清中と同程度の濃度 (40 mg/ml) に調整し, 血清の場合と同量の 2.0 ml を Sephadex G-100 カラムにかけた(Fig. 3). 280 nm の吸光度で追跡して 0.15 M KCl-1 mM Tris 緩衝液 pH 8.5 での溶出パターンは二つのピークを示し, 後方



Crystallized and lyophilized human serum albumin (Sigma Chemicals) was dissolved in a concentration of 40mg/ml with 0.15M KCl-1mM Tris buffer pH8.5 (○) or 1mM Tris buffer pH8.5 (●) and was eluted with each buffer, respectively. Column conditions were described in methods.

**Fig. 3** Delayed elution of serum albumin from a Sephadex G-100 column with 1mM Tris buffer pH8.5

のピークは標準蛋白による検量線から分子量  $6.9 \times 10^4$  の位置として妥当であった。前方のピークは分子量  $10^5$  以上であり、albumin が重合している可能性がある。

1 mM Tris 緩衝液を使用した場合も、280 nm の吸収曲線は二峰性を示し、後方のピークは、0.15 M KCl-1 mM Tris 緩衝液の場合より 34 ml 分遅れた位置に溶出したが、ピーク I, blue dextran, sucrose の流出位置は KCl の存在に関係なく一定であった。なお、結晶 albumin を 1 mM Tris 緩衝液に溶かし polyacrylamide ゲルで電気泳動した場合には、3 本のバンドが認められた。

Sephadex ゲルはカルボキシル基を含むため、荷電溶質とゲルの相互作用を抑えるには、イオン強度 0.02 以上の溶媒を使う必要がある、低イオン強度の環境では負に荷電した溶質の流出は早まり、正に荷電した溶質では遅れるとされている。<sup>11)</sup> pH 8.5 の条件で albumin は負に荷電しているはずであるが、実際には、0.15 MKCl が共存する場合に比べて 1 mM Tris 緩衝液単独では流出が遅れ、上記原則での説明は困難と思われる。

#### 4 結 論

ヒト血清中の Zn, Ca, Mg と蛋白質との結合割合を同時に知るために、Sephadex G-100, G-150 によるゲルろ過を試みた。

##### 4-1 Zinc

0.15 M KCl-1 mM Tris 緩衝液 pH 8.5 と 100 mM, 10 mM の Tris 緩衝液 pH 8.5 いずれの条件でも、Zn の溶出パターンは二峰性となり、後方のピークは albumin に一致した。この albumin を含む分画への Zn の分布は 60~70% であった。1 mM Tris 緩衝液での溶出パターンは単純でなく、Zn-II ピークは複数の Zn 結合蛋白に分離される可能性を示した。

##### 4-2 Calcium と Magnesium

上記いずれの緩衝液を使用した場合にも、albumin と Ca, Mg の結合が切れてしまうことがわかった。しかし、1 mM Tris 緩衝液中では解離がゆっくり進むため、albumin 結合型、非結合型に分離でき、健康人 16 例の血清を分析したところ結合型 Ca が  $42.4 \pm 6.2$  (M $\pm$ SD)%, 結合型 Mg が  $40.5 \pm 5.4$ % となった。

##### 4-3 Albumin

血清を 0.15 M KCl-1 mM Tris 緩衝液 pH 8.5 で溶出すると、分子量  $6.9 \times 10^4$  に相応した位置に流出す

るが、1 mM Tris 緩衝液 pH 8.5 では流出が遅れる。この遅れは、結晶化したヒト血清 albumin でも確認された。また、結晶 albumin の場合、重合体と思われる位置に 280 nm の吸収が観察された。

#### 文 献

- Underwood, E. J. (日本化学会誌): 微量元素・栄養と毒性. 1~477. 丸善, 東京 (1975).
- Sullivan, J. F., Blotcky, A. J., Jetton, M. M., Hahn, H. K. J. and Burch, R. E.: Serum levels of selenium, calcium, copper, magnesium, manganese and zinc in various human diseases. *J. Nutr.* **109**, 1432-1437 (1979).
- Prasad, A. S.: Clinical, biochemical and pharmacological role of zinc. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**, 393-426 (1979).
- Solomons, N. W.: On the assessment of zinc and copper nutriture in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**, 856-871 (1979).
- Andrews, P.: The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**, 595-606 (1965).
- Parisi, A. F. and Vallee, B. L.: Isolation of a zinc  $\alpha_2$ -macroglobulin from human serum. *Biochemistry* **9**, 2421-2426 (1970).
- Prasad, A. S. and Oberleas, D.: Binding of zinc to amino acids and serum proteins in vitro. *J. Lab. Clin. Med.* **76**, 416-425 (1970).
- 中野栄二, 熊坂一成, 永野圭蔵, 蓮沼進, 河野均也, 土屋俊夫, 武元聡, 関口光夫: 亜鉛代謝の臨床病理学的研究. 第1報: フレームレス AAS 測定法による血清蛋白分画中の亜鉛分布に関する検討. *臨床病理* **23** (補冊), 216 (1975).
- Marshall, R. W.: Plasma fractions. Nordin, B. E. C. ed.: Calcium, Phosphate and Magnesium Metabolism. 162-185, Churchill Livingstone, Edinburgh London and New York (1976).
- Giroux, E. L. and Henkin, R. I.: Competition for zinc among serum albumin and amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* **273**, 64-72 (1972).
- Pharmacia Fine Chemicals: Gel Filtration; Theory and Practice. ファルマシア・ジャパン株式会社, 東京 (1980).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学公衆衛生学講座 菅原千枝子