

藥物과 生體 高分子間的 相互作用(Ⅲ)

螢光測定法에 의한 1-Anilinonaphthalene-8-sulfonate와 Bovine
Serum Albumin間的 結合에 관한 研究

金鍾國 · 安海英 · 楊智善 · 金良培 · 俞炳高

서울대학교 藥學大學

(Received January 26, 1982)

Chong-Kook Kim, Hae Young Ahn, Ji Sun Yang, Yang Bae Kim and Byung Sul Yu
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Drug-Biomacromolecule Interaction (III)

1-Anilinonaphthalene-8-sulfonate Binding to Bovine Serum Albumin by Fluorescence

Abstract—The binding of the 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate(ANS) to bovine serum albumin was studied by fluorescence spectroscopy. The effect of pH, ionic strength, and protein concentration on the binding of ANS to protein were compared. The binding between ANS and protein was dependent on pH and ionic strength. It seems that both hydrophobic binding and some electrostatic forces are involved in the binding of ANS to protein. The binding constants for ANS increased with increasing protein concentration. This suggests the possibility of a sharing of one ANS molecule by more than one protein molecule at relatively high protein concentration.

藥物과 血漿蛋白質間的 結合은 藥物의 効能, 生體利用率, 吸收, 排泄 等に 크게 影響을 미치는 因子로서 알려져 있다.¹⁻⁴⁾ 即, 血液中에서 遊離狀態로 存在하는 藥物만이 作用部位에서 藥物效果를 나타내는데 寄與한다.⁵⁾ 따라서 藥物의 bioequivalence 및 有効性을 推定하는 間接的인 指標로서 遊離狀態로 存在하는 藥物의 濃度를 豫測하기 爲하여 血清蛋白質 그 中에서도 albumin과 結合하는 樣狀을 糾明하는 것이 重要한 研究課題로 되어 있다.⁶⁻⁷⁾ 藥物과 albumin 間的 結合定數 및 結合部位의 數를 測定하는데는 UV spectrophotometry^{8,9)}, UV difference spectrophotometry^{9,10)}, fluorescence quenching^{11,12)}, fluorescence probe technique^{13,14)}, CD-ORD¹⁵⁾, PMR^{16,17)}, NMR^{18, 19)}, ESR^{20,21)} 等 分光學的 方法을 使用한 研究가 많이 進行되고 있으나 最近에는 fluorescence probe technique에 많은 關心이 集中되어 있다.

Fluorescence probe로는 水溶液中에서 遊離狀態로 存在할 境遇에는 螢光을 거의 나타내지 않으나 蛋白質과 같은 巨大分子와 結合할 경우에는 이 分子의 主위환경이 變함에 따라서 螢光 spectrum의 性質 即 最大螢光波長 및 螢光強度가 變하는 化合物을 使用한다.²²⁾ Fluorescence probe technique은 藥物과 probe가 albumin의 同一한 結合部位에 相競的으로 結合한다는 假定아래 probe가 高濃度 및 低濃度 albumin 溶液에 各各 結合할 때 나타내는 螢光 spectrum의 變化를 測定하여

結合定數를 計算하는 것으로서 이 方法은 比較的 迅速하고 簡便하며 試料가 적게 든다는 利點 때문에 現在 많이 利用되고 있기는 하나 probe의 結合定數 測定時 일의의 低濃度 albumin 溶液을 使用함으로써 濃度選定에 따라서 實驗結果에 差異를 나타내므로 이에 對한 더욱 많은 檢討가 要望된다. 또한 最近 藥物 或은 fluorescence probe와 蛋白質과의 結合特性은 化合物의 hydrophobicity와 pK_a에 영향을 받는다고 報告된 바 있다.²³⁾ 그런데 hydrophobic force 뿐만 아니라 electrostatic force에 의한 影響도 檢討할 必要가 있다.

Fluorescence probe로 naphthalene sulfonate 誘導體들이 使用되고 있으며 그 中에서도 1-anilinonaphthalene 8 sulfonate(ANS)가 特別 藥物과 albumin間的 結合을 研究하는데 흔히 使用되고 있다.²⁴⁾ 그러나 結合에 影響을 미칠수 있는 因子에 對한 構體的인 檢討가 되어있지 않은 狀態에서 단지 結合력이 強하다는 理由만으로 probe로 使用함으로써 探擇한 方法이나 實驗條件에 따라서 서로 相異한 結果를 나타내는 問題點과 分光學的 data를 解析하는 問題點이 있다. 따라서 本 研究에서는 ANS와 bovine serum albumin(BSA)의 結合樣狀을 螢光分光光度計를 使用하여 測定할 때 pH, 이온強度 및 BSA의 濃度가 變함에 따라서 分光學的 特性에 미치는 影響을 研究함으로써 ANS를 probe로 使用할 경우 實驗條件을 確立시키고자 하는데 本 研究의 目的이 있다.

實驗 方法

實驗材料—本 實驗에서는 Sigma Co. 製品인 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate(ANS)와 bovine serum albumin, fraction V(BSA)를 使用하였다. BSA의 濃度는 280 nm에서 紫外線 吸光度를 測定하여 몰濃度를 $E_{1\%}^{1cm} = 6.67$ 를 基準으로하여 決定하였으며 이때 BSA의 分子量은 69,000으로 計算하였다. 그외에 使用한 試藥은 市販하는 特級品을 精製하지 않고 그대로 使用하였다.

實機器驗—螢光測定은 Baird-Automic spectrophotometer Model FC 100을 使用하였으며 Bryans Model 2500 X-Y recorder를 使用하여 記錄하였다.

測定方法—BSA의 濃度變化에 따른 影響을 測定하기 爲하여 高濃度 BSA溶液($7.25 \times 10^{-6}M$)과 低濃度 BSA溶液($5.8 \times 10^{-7}M$, $7.25 \times 10^{-7}M$, $8.7 \times 10^{-7}M$)을 pH 7.4 磷酸鹽 緩衝液(0.05M)으로 調製한 후 各各의 BSA溶液을 3 ml씩 取하고 ANS를 methanol에 溶解시켜 만든 溶液($1 \times 10^{-3}M$)을 順次的으로 滴定하면서 勵起波長 375 nm, 螢光波長 470 nm에서 螢光強度를 測定하였다.

pH의 變化에 따른 影響을 測定하기 爲하여 BSA를 pH 6.5, 7.0, 7.4, 8.0의 磷酸鹽 緩衝液(0.05M, 이온強度 0.2)에 各各 溶解시켜 $7.25 \times 10^{-6}M$ 및 $7.25 \times 10^{-7}M$ 이 되도록 調製한 후 上記와 同一한 方法으로 ANS溶液으로 滴定하여 螢光強度를 測定하였다.

이온強度에 의한 影響을 考察하기 爲하여 pH 7.4 磷酸鹽 緩衝液에 NaCl을 添加하여 이온強度가 0.2, 0.4, 0.6, 0.8이 되도록 磷酸鹽 緩衝液을 調節한후 BSA를 各各의 緩衝液에 溶解시켜 高濃度($7.25 \times 10^{-6}M$) 및 低濃度($7.25 \times 10^{-7}M$) BSA溶液을 만든 후 ANS溶液으로 上記와 同一한 方法으로 滴定하면서 螢光強度를 測定하였다. 모든 滴定은 Hemilton microsyringe로 行하였으며 螢光滴定後 螢光強度는 ANS의 濃度에 對한 函數로 表示하였다.

Data 處理—螢光強度를 測定하여 ANS와 BSA間的 結合에 關한 結合定數 및 結合部位의 數는 다음과 같은 方法으로 算出하였다. 螢光強度를 測定한 data에서 BSA에 結合한 ANS의 結合分率(X)와 遊離狀態로 存在하는 分率(1-X)을 다음의 式을 利用하여 計算한다.²⁵⁾

$$X = \frac{I_0/I_f - 1}{I_0/I_f - 1} \dots\dots\dots (1)$$

여기서

I_0 는 低濃度 BSA의 螢光強度이다. I_b 는 高濃度 BSA의 螢光強度이다. I_f 는 BSA가 存在하지 않는 緩衝液의 螢光強度이다. 滴定曲線의 各點에서 X 값을 求한 다음 ANS의 結合定數 및 結合部位의 數를 다음과 같이 Scatchard 方程式을 使用하여 求하였다.²⁶⁾

$$\frac{V}{A} = nK_a - K_a V \dots\dots\dots (2)$$

이 式에서 V 는 BSA 分子當 結合된 ANS의 分子數이며 總 ANS 濃도에 結合分率(X)를 곱하고 이것을 低濃度 BSA濃度로 나누어서 求한 값이다.

A 는 遊離ANS의 濃度이다. n 은 ANS가 結合할 수 있는 結合部位의 數이며 K_a 는 結合定數이다. ANS로 滴定하여 求한 各 data로 부터 V/A 와 V 를 計算하여 Scatchard plot하면 直線으로 나타나며 이 graph에서 K_a 와 n 을 求한다.

實驗 結果 및 考察

BSA 濃度에 依한 影響—Figure 1은 pH 7.4 磷酸鹽緩衝液에 BSA가 存在할때와 存在하지 않을 때 ANS의 螢光 spectra를 圖示한 것이다. BSA를 加하였을 경우에는 spectrum이 移動하여 最大螢光波長이 520 nm에서 470 nm로 移動하였으며 同時에 螢光強度도 상당히 增大하였다. Ma 等은¹⁴⁾ 이러한 spectrum의 變化는 藥物과 albumin이 hydrophobic stacking interaction을 일으키는 데 起因한다고 說明하고 있다.

Figure 2는 ANS와 BSA의 結合에 對한 螢光滴定曲線을 나타낸 것으로서 高濃度 albumin 溶液의 경우에는 結合部位의 數가 많으므로 螢光強度는 ANS의 濃도에 直線으로 比例하며 各各의

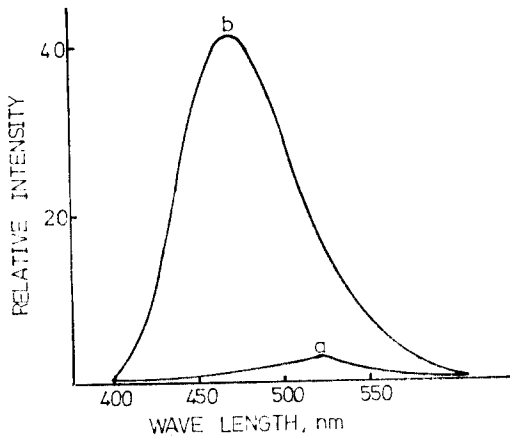


Fig. 1—Fluorescence emission spectra of ANS in the absence (curve a) and in the presence of BSA (curve b) in pH 7.4 phosphate buffer.

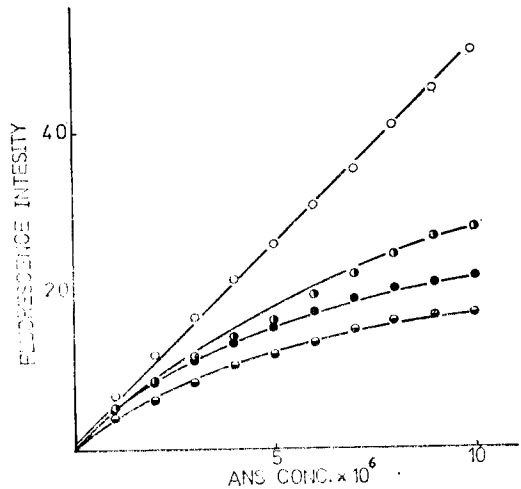


Fig. 2—Effect of BSA concentration on fluorescence titration curves.

- , at high concentration of BSA $7.25 \times 10^{-6}M$.
- , ●, ●, at low concentration of BSA concentration, 5×10^{-7} , 7.25×10^{-7} , $8.7 \times 10^{-7}M$ respectively.

低濃度 albumin 溶液에서는 ANS 分子가 albumin의 結合部位에 飽和됨을 알 수 있다.

Figure 3은 ANS가 BSA에 結合하는 樣狀을 Scatchard plot 한것으로서 X축 切片에서 結合部位의 數, 기울기에서 結合定數를 求하여 그 結果를 Table I에 表示하였다. Table I에 나타난 것처럼 ANS가 磷酸鹽緩衝液 中에서 BSA와 結合할 경우에 BSA의 濃度에 關係없이 結合部位의 數는 거의 一定하지만 結合定數의 測定值(observed binding constant, K_a^{obs})는 BSA의 濃度가 稀釋될수록 減少된다. True binding constant가 一定하다고 假定할때 observed binding constant가 變하는 것은 ANS와 BSA의 物比가 달라짐에 따라서 ANS 1分子가 1分子 以上の BSA 分子와 結合하거나²⁷⁾ 또는 磷酸鹽緩衝液의 構成成分 自體가 ANS와 BSA의 同一한 結合部位에 相競적으로 結合하여²⁸⁾ 分光學의 特性을 變化시킴으로서 나타난 結果라고 推定할 수 있다.

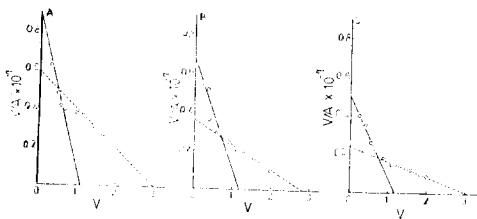


Fig. 3—Effect of BSA concentration on Scatchard plots of the binding of ANS to BSA.

8.7×10^{-7} M(A), 7.25×10^{-7} M(B), and 5.8×10^{-7} M(C) of BSA concentration.

Table I—Effect of BSA concentration on the binding constant and the number of binding sites of ANS binding to BSA.

Binding parameter	Concentration of BSA (M)		
	8.7×10^{-7}	7.25×10^{-7}	5.8×10^{-7}
n_1	1.1	1.2	1.2
n_2	3.0	2.9	3.1
$K_{a1}^{obs}(M^{-1})$	8.05×10^5	5.67×10^6	4.14×10^6
$K_{a2}^{obs}(M^{-1})$	1.98×10^6	1.29×10^6	0.78×10^6

n_1 and n_2 are the number of primary and secondary binding sites, respectively.

K_{a1}^{obs} and K_{a2}^{obs} are the observed primary and secondary binding constants, respectively.

pH에 의한 影響—Figure 4는 pH가 ANS와 BSA의 結合에 미치는 影響을 圖示한 것으로서 pH가 7에서 8로 增加할 때 螢光強度는 順次的으로 增加되며 pH가 7에서 6.5로 減少할때도 增加하는 現象을 나타낸다. pH가 螢光強度에 미치는 影響을 考察하여 볼 때 藥物과 蛋白質間의 相互作用에서 hydrophobic 結合이 重要な 役割을 한다고 報告된 바 있으나¹⁴⁾ Penzer²⁹⁾가 發表한것처럼 ANS는 amphipatic compound로서 BSA 分子中에서 positive charge를 갖는 amino-acid 附近에 結合할 경우에는 이온間의 相互作用도 分光學의 特性을 變化시키는데 크게 影響을 미친다. 따라서 pH가 變함으로서 ANS 및 BSA의 이온化 程度가 結合에 미치는 程度를 figure 4의 data를 Scatchard plot하여 Table II에 表示하였다. 各各의 pH에서 non-specific binding site, 즉 이온結合에 關與하는 結合部位數(n_2) 및 結合定數의 測定值(K_{a2}^{obs})를 比較한것으로서 pH가 7에서 8로 增加할 때 n_2 는 거의 一定하나 K_{a2}^{obs} 는 alkali性에서 增加되었다. 이것은 alkali性에서 BSA의 positive charge 部分은 增加되지 않으나 ANS의 解離度가 增加되어 BSA의 positive charge를 갖고있는 部分과 이온結合이 增加되었음을 意味한다. pH 6.5에서 n_2 및 K_{a2}^{obs} 값이 약간 上昇하는 것은 Terada³⁰⁾ 등이 報告한것 처럼 酸性領域에서 BSA에 positive charge 部分이 增加 되는데 원인이 있다고 思慮된다.

이온強度에 의한 影響—Figure 5는 pH 7.4 磷酸鹽緩衝液中에서 ANS가 BSA에 結合할 때에 이온強度가 ANS BSA complex의 螢光強度에 미치는 影響을 나타낸것으로 NaCl는 螢光強度에 많은 影響을 미치고 있다. 따라서 이온強度가 ANS와 BSA의 結合에 미치는 程度를 測定하고자 figure

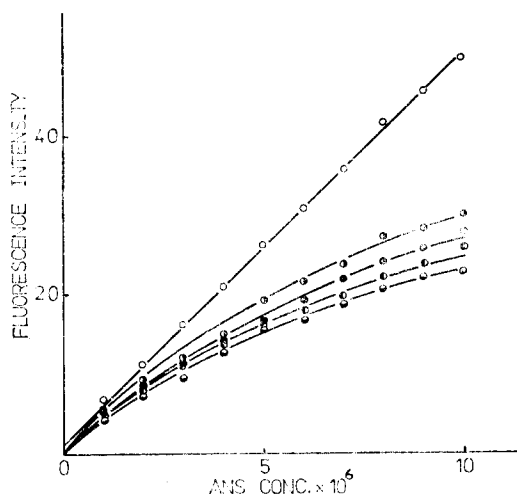


Fig. 4—Fluorescence titration curves of BSA (8.7×10^{-7} M) with ANS at pH 6.5 (○), 7.0 (◐), 7.4 (◑), and 8.0 (◒).
○, at high protein concentration, 7.25×10^{-6} M of BSA concentration.

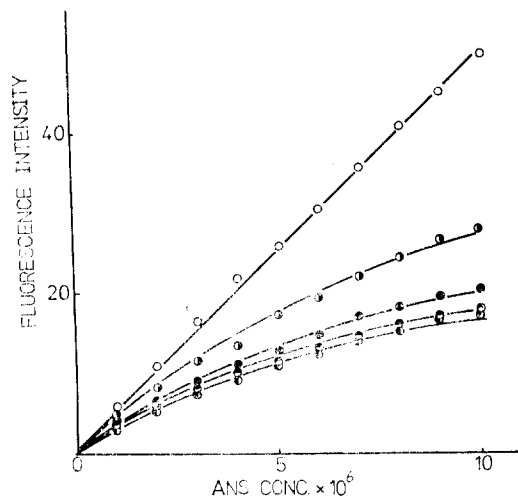


Fig. 5—Fluorescence titration curves of BSA with ANS at ionic strength 0.2 (○), 0.4 (●), 0.6 (◐), and 0.8 (◑).
○, at high protein concentration, 7.25×10^{-6} M of BSA concentration.

Table II—Effect of pH on the binding constant and the number of binding sites of ANS binding to BSA.

Binding parameter	pH			
	6.5	7.0	7.4	8.0
n_1			1.1	1.3
n_2	3.3	3.15	3.15	3.2
$K_{a1}^{obs} (M^{-1})$			8.05×10^6	7.63×10^6
$K_{a2}^{obs} (M^{-1})$	1.0×10^6	0.8×10^6	1.98×10^6	1.99×10^6

Table III—Effect of ionic strength on the binding constant and the number of binding sites of ANS binding to BSA.

Binding parameter	Ionic strength			
	0.2	0.4	0.6	0.8
$K_{a2}^{obs} (M^{-1})$	1.98×10^6	0.8×10^6	0.6×10^6	0.5×10^6
n_2	3.05	2.65	2.5	2.3

5의 data를 Scatchard plot하여 이온결합에 관련된 n_2 및 K_{a2}^{obs} 를求하여 Table III에 要約하였다.

Table III에서 보는바와 같이 이온强度가 增加함에 따라서 BSA의 n_2 및 K_{a2}^{obs} 는 同時に 減少된다. n_2 가 減少하는 것은 ANS와 結合하는 BSA의 positive charge를 갖춘 部分이 이온强度가 增加할수록 減少되는 것으로서 Wilting³¹⁾ 등의 假說처럼 Cl^- ion이 ANS와 置換作用을 하는 경우와 BSA의 positive charge를 갖고 있는 部分 即 α -amino group, ϵ -amino group 및 guanidino group의 解離가 抑制되는데 起因한다고 생각된다. K_{a2}^{obs} 가 減少되는것은 鹽의 濃度가 增加함으로써 溶液內의 internal pressure가 增加됨으로 ANS의 activity가 減少되고, 동시에 BSA의 positive charge 部分의 이온化가 抑制되는데 起因한다고 생각된다.

結 論

ANS를 probe로 使用하여 螢光分光光度計로 藥物과 albumin間的 結合狀態를 測定하고자 할때

는 다음과 같은 點을 考慮하여야 한다.

1) ANS와 albumin의 물비에 따라서 結合定數의 測定値가 달라지므로 差異의 幅이 작은 濃度 範圍를 選定할 必要가 있다.

2) pH가 變함에 따라서 이온화에 크게 影響을 받는 non-specific binding의 경우 結合部位의 數 및 結合定數의 測定値가 달라지므로 藥物에 依하여 pH가 變하지 않도록 buffer capacity를 選定 하여야 하며 緩衡液의 構成成分이 ANS와 相統적으로 BSA에 結合할 경우를 생각하여 buffer system의 成分에 대한 考察이 必要하다.

3) 이온強度에 따라서 ANS 및 BSA의 解離度가 달라져서 ANS-BSA가 나타내는 分光學的 性質이 變함으로서 結合部位의 數 및 結合定數의 測定値가 달라지므로 藥物을 加할경우 藥物의 濃度 및 測定溶液의 이온強度를 補正하면서 實驗을 實施하여야 한다.

本 研究는 1982年度 韓國科學財團의 支援 研究費에 依한 研究結果의 一部分이다.

文 獻

1. S.M. Singhvi, A.F. Heald and M.A. Leitz, *J. Lab. Clin. Med.*, **89**, 44 (1977).
2. S.I. Oraszlan and G.D. Davis, *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 1203 (1962).
3. C.K. Kim and H.Y. Ahn, *Arch. Pharm. Res.*, **4**, 99 (1981).
4. J.H. Perrin and D.A. Nelson, *J. Pharm. Pharmacol.*, **25**, 125 (1973).
5. M. Gibaldi, *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*, 2nd Ed., Lea & Fetiger, p.89 (1977).
6. J.J. Vallner, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 447 (1977).
7. M.C. Meyer and D.E. Guttman, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 895 (1968).
8. I.M. Klotz, *et al.*, *JACS.*, **70**, 2935 (1948).
9. S.R. Byrn and G.D. Dolch, *J. Pharm. Sci.*, **67**, 691 (1978).
10. P.C. Huang and S. Gafay, *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 957 (1974).
11. R.F. Steiner, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **241**, 560 (1966).
12. N.A. Attallah and G.E. Lata, *Biochem. Biophys. Acta.*, **168**, 321 (1968).
13. S.M. Aloj, *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 478 (1973).
14. J.K.H. Ma, P.P. Fu and L.A. Luzzi, *J. Pharm. Sci.*, **66**, 209 (1977).
15. A.L. Thakker, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 1841 (1972).
16. M.R. Schweizer, *et al.*, *JACS.*, **90**, 1042 (1968).
17. J.H. Griffin, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 507 (1975).
18. G. Kata, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 489 (1975).
19. P. Taylor, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 501 (1975).
20. C.F. Chignell, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 513 (1975).
21. K.W. Butler, *J. Pharm. Sci.*, **64**, 497 (1975).
22. H.W. Jun and P.C. Ruenitz, *J. Pharm. Sci.*, **67**, 861 (1978).
23. T. Sakurai, S. Tsuchiya and H. Matsumaru, *Chem. Pharm. Bull.* **28**(2), 508 (1980).
24. H.W. Jun and L.A. Luzzi, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 1431 (1971).
25. S. Ozeki and K. Tejima, *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 638 (1979).
26. G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**, 660 (1949).
27. J.K.H. Ma, H.W. Jun and L.A. Luzzi, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1261 (1973).
28. K. Tokada, O. Narumiya and S. Muranisch, *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 675 (1978).
29. G.R. Penzer, *Eur. J. Biochem.* **25**, 218 (1972).
30. H. Terada, K. Maeda, K. Funakoshi and F. Kametani, *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 355 (1971).
31. J. Wilting, W.F. Vander Giesen, L.H.M. Janssen, M.M. Weideman, *J. Biol. Chem.*, **255**, 3032 (1980).