

デルタビリルビンにおけるビリルビン・アルブミン 共有結合部位の検討

村田 尚美

近畿大学医学部第2内科学教室

Covalent binding site of bilirubin to albumin molecule
in serum delta bilirubin

Naomi Murata

Second Department of Internal Medicine, Kinki University
School of Medicine, Osaka, Japan

ABSTRACT

Delta bilirubin ($B\delta$) is a covalently albumin-bound bilirubin. A bilirubin binding amino acid residue of human albumin was identified using a large amount of $B\delta$ fraction prepared from pooled icteric human serum. Bilirubin in pooled icteric human serum was first changed to an azoderivative by the addition of a diazo reagent to protect it from degradation. The azo-derivative of $B\delta$ ($azoB\delta$) was prepared by affinity chromatography and high performance liquid chromatography (HPLC) using a preparative Micronex RP30 column. The BrCN-treated $azoB\delta$ was digested with *Achromobacter* protease I and with *Staphylococcal* serine proteinase, sequentially. The fragmented peptides were fractionated by reversed phase HPLC using a μ Bondasphere column. A fraction which showed absorbance peaks both at 530 nm and at 215 nm was obtained and analyzed by a protein/peptide sequencer and an analyzer. The finally obtained peptide fraction was composed of amino acid residues 18 to 38 of human serum albumin. The detected molar amount of lysine 20 was about one third of that of the other amino acids which suggested the covalent bonding of bilirubin to lysine 20 of human serum albumin.

Key words : delta bilirubin, lysine, amino acid residue covalent bonding

緒 言

血清ビリルビンは Malloy-Evelyn 法¹ により、総ビリルビン (以下ビリルビン) 測定とジアゾ反応 直接型と 間接型に分画されてきた。

1966年 Kuenzle ら² はカラムクロマトグラフィーを行い α (unconjugated bilirubin, Bu), β (bilirubin monoglucuronide, BMG), γ (bilirubin diglucuronide, BDG) の他に δ の4分画を得、 δ 分画はアルブミンに強固に結合

したビリルビンである事を見いだした。

1981年 Lauff ら^{3,4} は血清アルブミン分画を前処理時に残し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を行う事により、 δ 分画をアルブミン共有結合ビリルビンと考え、この分画を δ ビリルビン ($B\delta$) と命名した。 $B\delta$ はアルブミン共有結合ビリルビンで、生体内ではビリルビンとしてよりアルブミンと同様の代謝を受ける特殊な血清ビリルビン分画である。

Weiss ら⁵, 足立ら⁶ は黄疸の診断上 $B\delta$ の測定の重要性を示唆したが、その構造については未知である。

今回 $B\delta$ のアルブミンの共有結合部位について、ethyl anthranil azo 試薬⁷ を用いヒト血清中のビリルビンをアゾ化して安定化の後、アルブミンと親和性を持つアフィニティークロマトグラフィーを用いてアルブミン分画を分取し、さらに逆相 HPLC にてアゾジピロール・アルブミン共有結合物 (アゾ $B\delta$) の分取を行った。化学的、酵素的分解法を用いてペプチドに切断し、ペプチドの吸収波長の 215 nm とアゾ化したビリルビンの吸収波長の 530 nm の両波長の吸収を持つペプチド分画を分取した。

このペプチドが、 $B\delta$ のビリルビンのアルブミン共有結合部位を含むペプチドであるとみなし、アミノ酸分析を行い、 $B\delta$ におけるビリルビン共有結合部位について検討をおこなった。

方法 (Fig. 1)

1. 測定方法

1.1. 分析機器

HPLC 装置のポンプは M600 (Waters' Associates, Milford, MA, USA), 検出器は、490型 (Waters' Associates), data 処理は790型 (Waters' Associates) を用いた。また、2波長の吸光度を同時に記録するために Pantos Unicorder U-228 (日本電子科学, 京都) を用いた。カラムは Micronex RP30 (分取用, 積水化学工業, 大阪), μ Bondasphere 5 μ C4-300Å (Waters' Associates) を用いた。血清からアルブミン及び $B\delta$ の分離には Blue

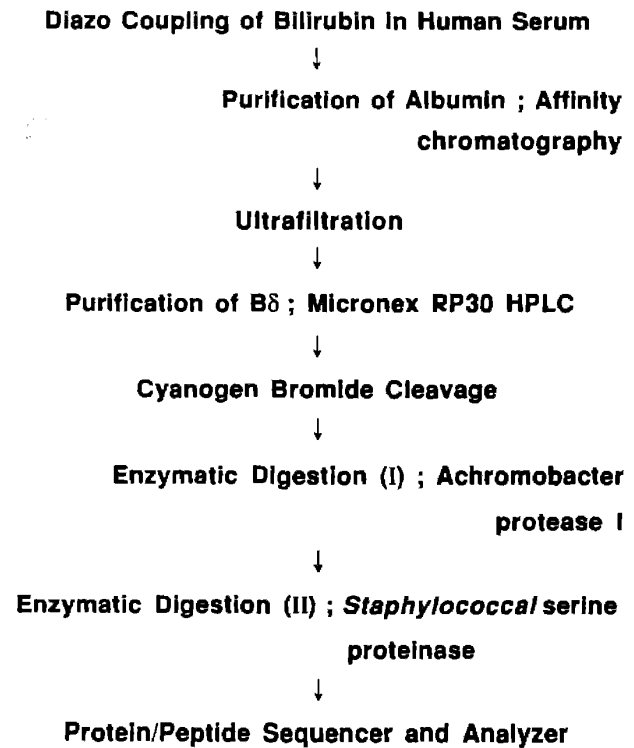


Fig. 1 Method

Sepharose CL-6B (Pharmacia, Uppsala, Sweden), 限外ろ過にはミニタンプレート, 30,000NMWL, ポリスルホン (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) を, 電気泳動には SDS-アクリルアミドゲルを用いた。アミノ酸配列分析には Model 477A Protein/Peptide Sequencer 及び Model 120A PTH Analyzer (Applied Biosystems, Foster, California, USA) を用いた。

1.2. 試薬

蒸留水, アセトニトリルは HPLC grade (和光純薬, 大阪) を用いた。ethyl anthranilate, sodium nitrite, ammonium sulphamate, trifluoroacetic acid (TFA) は特級試薬 (和光純薬), cyanogen bromide (BrCN) (和光純薬) を使用した。lysyl endopeptidase (Achromobacter protease I), V8 protease (Staphylococcal serine proteinase) は生化学用 (和光純薬) を使用した。

2. $B\delta$ の分取

2.1. $B\delta$ を含むアルブミン分画の精製

肝疾患黄疸患者 (総ビリルビン > 20 mg/dl)

より遮光下に採血後、血清分離を行い、分析するまで液体窒素中で保存した。血清に ethyl anthranil azo 試薬 (0.1 ml ethyl anthranilate と 10 ml 0.15 M HCl を混和し、0.3 ml 0.5% sodium nitrite を加え、5分後に 0.1 ml ammonium sulphamate を加えて使用) を加え、室温、暗所で30分間放置してアゾ化した⁷。

アゾ化を行った血清を 0.1 M KCl を含む 0.05 M Tris HCl (pH 7.0) に溶解し、同 buffer で平衡化した Blue Sepharose CL-6B (Pharmacia) を充填した XK26 カラム (Pharmacia) に添加して affinity chromatography を行った。アルブミン分画は 1.5 M KCl を含む 0.05 M Tris HCl (pH 7.0) で溶出し、ミニタンプレート、30,000NMWL、ポリスルホンを用いて脱塩、濃縮を行なった⁸。

2.2. HPLC によるアゾ B δ の分離

0.1% TFA に溶解したアゾ B δ を含むアルブミン分画は 0.45 μ m の filter で濾過した後 HPLC にて精製した。カラムは Micronex RP30 (分取用、積水化学) を用いた⁹。移動相には 0.1% TFA を 5分間流した後、gradient をかけ、30分間で 0.1% TFA : 0.1% TFA-100% アセトニトリル (50 : 50) まで変化させ、その後、30分間で 0.1% TFA-100% アセトニトリル 100% として、これを更に 10分間維持した。流量は 5 ml/min とし、アゾ B δ (アルブミンを含む) は 530 nm と 280 nm の吸光度を用いて検出、分取した。

3. アゾ B δ の化学的切断

アゾ B δ を 70% ギ酸に溶解し、500倍モル量の BrCN を加え、37°C で 24時間反応させ分解した。BrCN 分解は、メチオニル結合に対する選択性と反応収率 (>90%) が高い¹⁰。反応液は蒸留水で希釈後、凍結乾燥して過剰試薬を除いた。

4. アゾ B δ の酵素的切断法

BrCN にて化学的切断を行ったアゾ B δ を 0.01 M Tris HCl (pH 9.0) に溶解した。同 buffer に溶かした lysyl endopeptidase を基

質の 1/400 mol 量加え 30°C、6時間分解を行った¹¹⁻¹³。消化終了後、直ちに凍結し反応を停止させた。断片ペプチドを C4 μ Bondasphere 5 μ 300 Å カラムを用いる逆相 HPLC で分画した。移動相は A 液 : 0.1% TFA, B 液 : 0.1% TFA-アセトニトリル 100% とし、初期条件 A : B = 90% : 10% よりいづれも linear gradient にて 50分間で 50% : 50%、以後 30分間で 20% : 80% とし、その後 10分間維持した。流量は 0.7 ml/min とした。

溶出液から 215 nm と 530 nm の両波長の吸収を持つ 2 個のペプチド分画を分取し凍結乾燥を行った。得られた各々のペプチド分画は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) に溶解し、同緩衝液に溶かした V8 protease を基質の 1/50 mol 量加え、30°C、24時間さらにペプチド分解を行った^{13,14}。断片ペプチドは再度同じ逆相 HPLC にて分離し、215 nm と 530 nm の両波長の吸収を持つペプチド分画を分取した。

5. Protein/Peptide Sequencer, PTH Analyzer について

エドマン分解法に基づいてアミノ酸分析を行った^{15,16} (Fig. 2)。

まず、アルカリ条件下でフェニールイソチオシアネート (PITC) をペプチド鎖の N 末端アミノ基にカップリングさせ、強酸下で PITC の結合した N 末端アミノ酸を切断した。生じるアニリノチアゾリノン (ATZ) アミノ酸誘導体は 25% TFA によって安定なフェニールチオヒダントイン (PTH) アミノ誘導体に転換させ同定した。Protein Sequencer (Model 477 A) から生成した PTH アミノ酸を 120 A PTH Analyzer (Model 120 A) はオンラインで自動分析、検出をした。最終的に Model 120 A より得られたクロマトグラフィデータは Model 477 A のコンピューターに転送保存され、データ処理アルゴリズムに従ってアミノ酸配列の形に自動的に翻訳された。

結 果

1. B δ の安定化

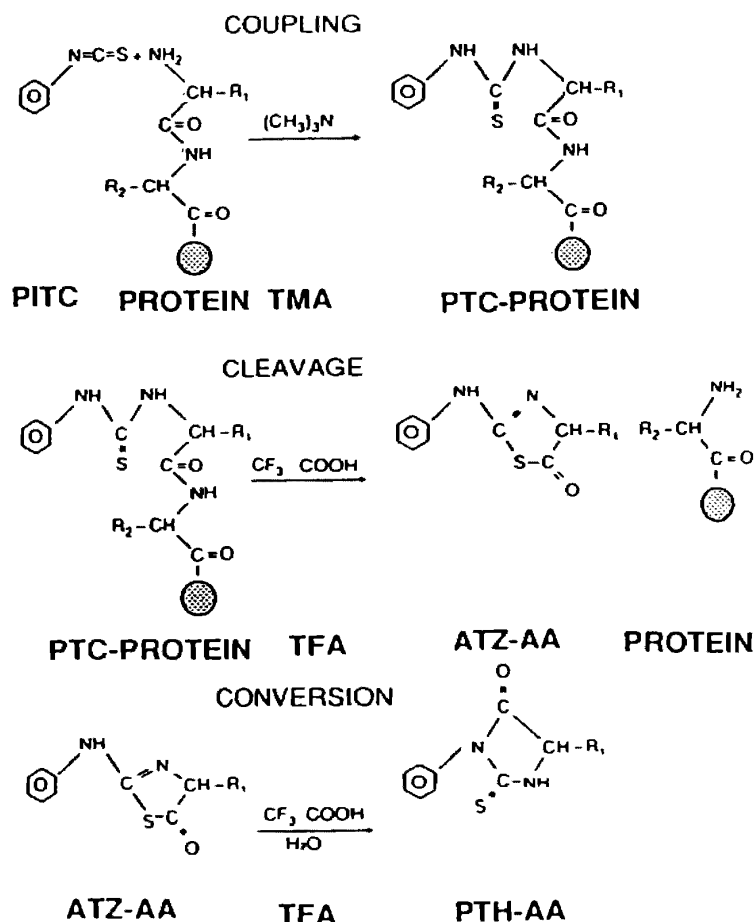


Fig. 2 Scheme of Edman degradation

Amino acid composition of each peptide obtained by chemical cleavage with CNBr and by sequential enzymatic digestion with lysyl endopeptidase (*Achromobacter* protease 1) and V8 Protease (*Staphylococcal* serine proteinase), showing absorbance peaks at both 530nm and 215nm was analyzed by a protein/peptide sequencer and an analyzer. Amino acid sequences were determined by the Edman degradation method using a gas phase sequencer.

The steps of the Edman degradation method are presented schematically.

無処理黄疸血清に BrCN (70%ギ酸) を加え、24時間、37°Cで反応させると、肉眼的にも黄色から青色に変化しており、HPLCのクロマトグラムから90%以上のビリルビンの分解が認められた。一方、ethyl anthranilate azo 試薬を加えアゾ化した血清 530 nm の吸光度は上記処理を行っても維持された。

2. アゾ B δ の分取

Blue Sepharose CL-6B を用いたアフィニティークロマトグラフィーにて、溶出されたアルブミン分画を分取し、ミニタンプレートで脱塩、濃縮を行い、凍結乾燥の後、Micronex RP 30 (分取用) を用いた逆相 HPLC にて δ 分

画を分取した (Fig. 3)。

このアゾ B δ を Protein/Peptide Sequencer, PTH Analyzer にて N 末端より 20 のアミノ酸をチェックしたところ、アルブミンのアミノ酸配列と一致した。

3. アゾ B δ の化学的分解

アゾ B δ を BrCN (70%ギ酸) で化学的分解後 SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行ったところ、主に分子量 15,000~20,000, 30,000 の位置にバンドが出現し、化学的分解が起きている事が明らかであった。

4. アゾ B δ の酵素的分解

BrCN (70%ギ酸) で変性させた後、リジン

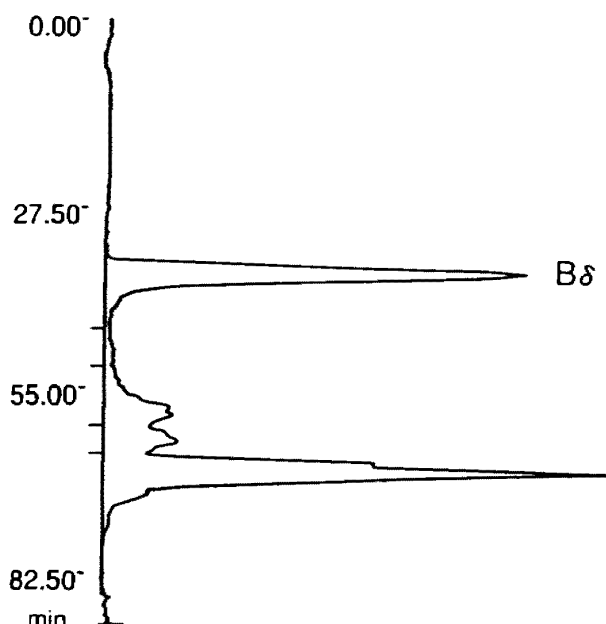


Fig. 3 Purification of B δ
 Column: Micronex RP30 (3.0×27cm, Sekisui Chemical Co.)
 Mobile phase: 100% H₂O/0.1% TFA, 5 min
 0-100% CH₃CN/0.1% TFA, linear gradient, 70min
 Flow Rate: 5ml/min
 Detection: 530nm

(Lys) のカルボキシル基のペプチドを切断する lysyl endopeptidase を用いて酵素的分解を行ったクロマトグラムを Figure 4 に示す. 215 nm と 530 nm の両波長の吸収を持つ 2 つの分画 (AP-1, AP-2) を各々分取した.

分取した各々のペプチド分画 (AP-1, AP-2) を凍結乾燥し, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) に溶解, グルタミン酸及びアスパラギン酸のカルボキシル基を含む結合を切断する V8 protease を加えペプチドを分解した. 断片ペプチドは C4 μ Bondasphere 5 μ 300 Å カラムを用いた逆相 HPLC で分離し, 530 nm と 215 nm の両波長の吸収を持つ各々 1 つのペプチドピーク, AP-1 から SSP-1, AP-2 から SSP-2 を分取した (Fig. 5, 6).

5. Protein/Peptide Sequencer and PTH Analyzer による SSP-1, SSP-2 の分析
 最終的に得られた各々のペプチド (SSP-1, SSP-2) のアミノ酸配列は両者ともアルブミン

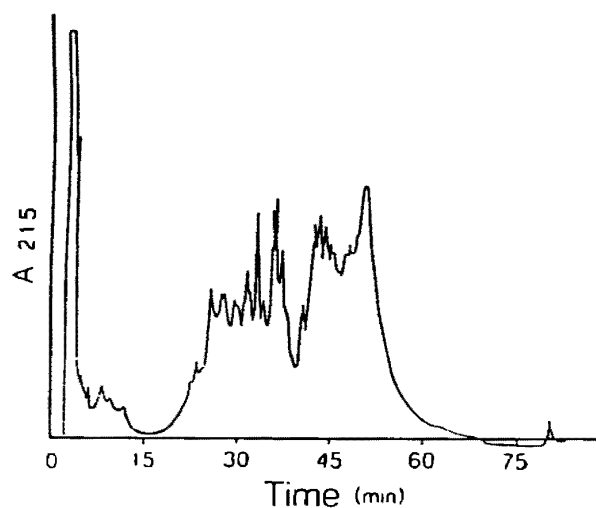
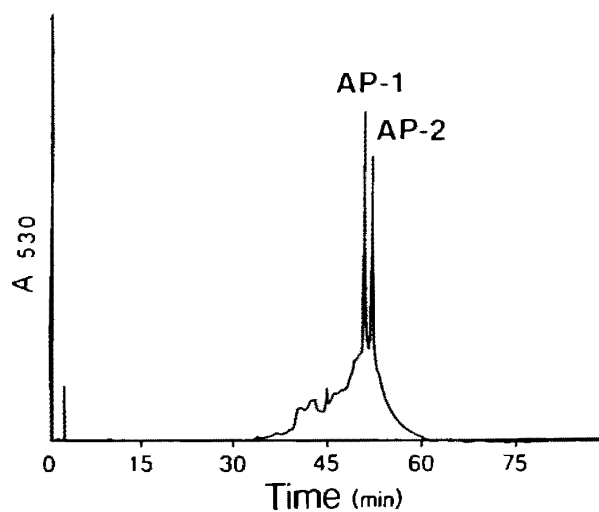


Fig. 4 Digestion of the cyanogen bromide-treated B δ with lysyl endopeptidase
 Column: μ Bondasphere 5 μ 300Å
 Mobile phase: (A) H₂O / 0.1% TFA (B) CH₃CN/0.1% TFA
 10-90% B, 80min, linear gradient
 Flow Rate: 0.7ml/min
 Detection: 215nm and 530nm
 Each fraction (AP-1 or AP-2) which showed absorbance peaks at both 215 nm and 530nm was collected.

の18位~38位に一致した (Fig. 7). 同プール血清からは同一結果を数回得られ, 再現性は良好であった (Fig. 8).

考 察

アルブミンの機能には, 血漿の膠質浸透圧の保持, 生体内における物質 (金属イオン, 胆汁

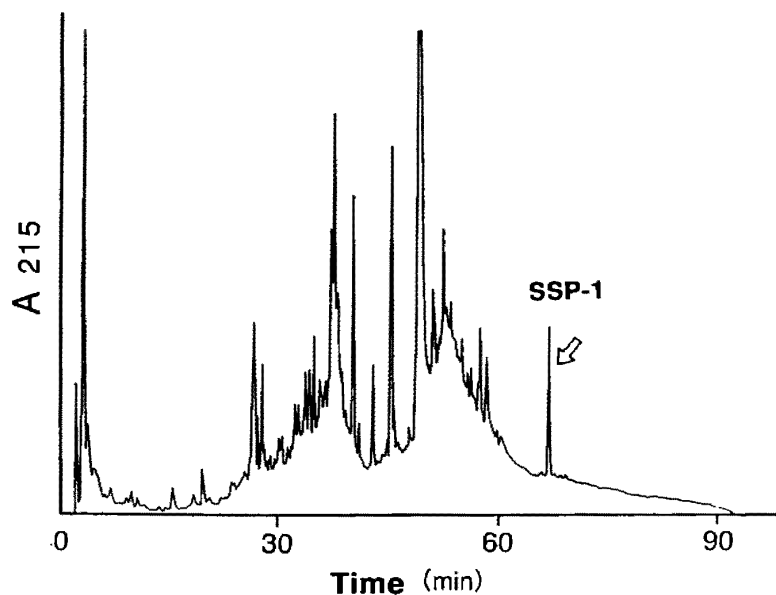


Fig. 5 Further digestion of fraction AP-1 (Fig. 4) with V8 protease
The condition was the same as that in the legend of Fig. 4.
A fraction, named SSP-1, which showed absorbance peaks at both 215nm and 530nm was obtained.

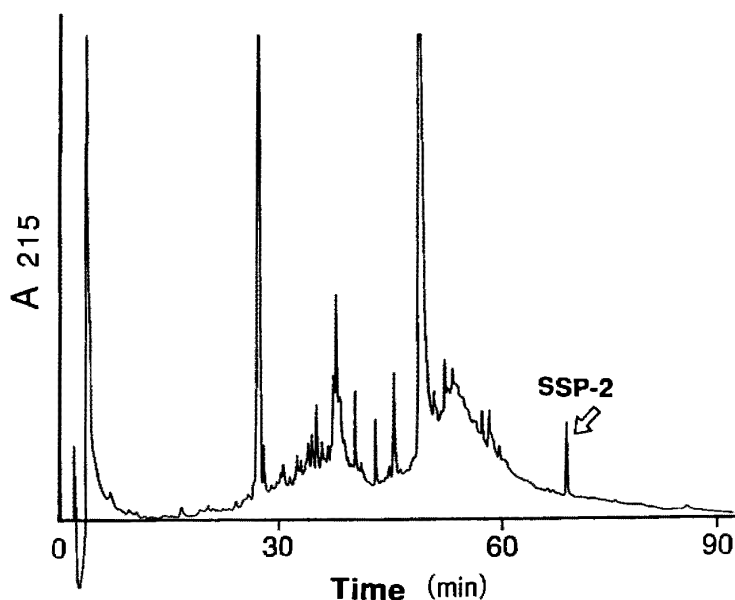


Fig. 6 Further digestion of fraction AP-2 (Fig. 4) with V8 protease
The condition was the same as that in the legend of Fig. 4.
A fraction, named SSP-2, which showed absorbances peaks at both 215nm and 530nm was obtained.

酸、脂肪酸、ビタミン、ホルモン、薬物)の輸送、生体内における予備アミノ酸としての働きがある。特に生体内の物質の輸送に関しては、アルブミンは多様な結合能を持つが、各種ビリルビンもアルブミンに結合して輸送されている。アルブミン分子中の結合部位は各物質で差

を認め、一部競合するものもある¹⁷。

老廃赤血球に由来するヘモグロビン、ヘム蛋白の分解過程で生成された非抱合型ビリルビンは疎水性であるが、アルブミンと結合し親水性となり、血流中を肝まで運搬されるが、尿中には排泄されない。抱合型ビリルビンは非抱合型

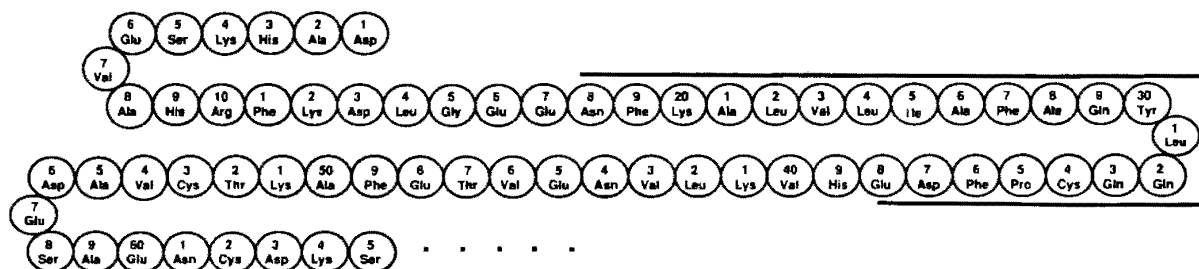


Fig. 7 Amino acid composition of peptide fractions (SSP-1, SSP-2) analyzed by a protein/peptides equencer and an analyzer
Both of the finally obtained peptide fractions (SSP-1 and SSP-2) were composed of amino acid residues 18 to 38 of human serum albumin.

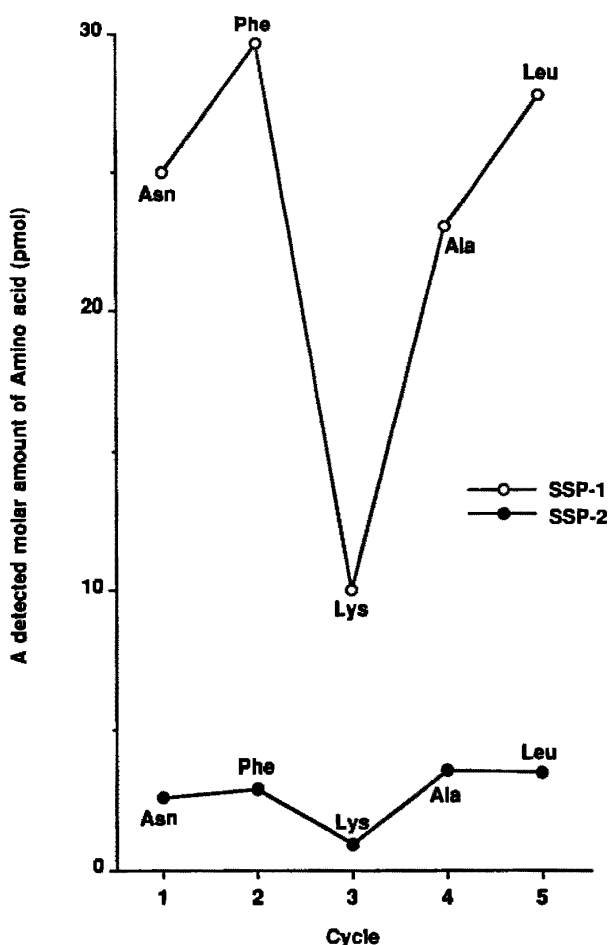


Fig. 8 Amino acid composition of peptide fractions (SSP-1, SSP-2)
Asn=asparagine, Phe=phenylalanine, Lys=lysine, Ala=alanine, Leu=leucine.
Sixty pmol of SSP-1 and 5pmol of SSP-2 were analyzed for amino acid composition by using a protein/peptide sequencer and analyzer.
A detected molar amount of lysine 20 was less than that of the other amino acids.

に比べアルブミンとの結合は弱く、非結合のビリルビン分子は尿中へ排泄される。B δ は特殊なアルブミン共有結合ビリルビンで、肝でのビリルビン代謝はうけず、尿中には排泄されない。非抱合型ビリルビンは主としてジアゾ間接型に、抱合型ビリルビン及び B δ は主として直接型の反応をする。

B δ の代謝はアルブミンと共になされ、他の分画の半減期は数10分の単位であるのに、B δ のみは2-3週間を要する⁹。アルブミンの代謝は現在のところ明確ではなく、肝臓での異化は生体内アルブミンの異化の10-15%にすぎないと考えられているが、詳細は明らかではない¹⁷。B δ は高直接ビリルビン血症で BMG, BDG とともに上昇する⁶。B δ は健常人では認められないが、高間接ビリルビン血症では時に微量認められることもある¹⁶。B δ の直接ビリルビンに対する割合は急性肝炎の回復期、閉塞性黄疸の閉塞解除後の経過良好例では上昇し、黄疸が増悪する経過不良例でこの割合が減少する事が認められている^{6,9}。

Wu ら¹⁹はアルブミン結合ビリルビン、特に B δ は活性酸素の消去作用を有し、有効な circulating cytoprotector であると報告している。

B δ の由来に関しては、血中で抱合ビリルビンと血清蛋白によって形成されると考えられているが^{20,21}、Hutchinson らはビリルビン・アルブミン溶解液の光照射でビリルビン・アルブミン共有結合物が生成されることを報告してい

る^{22,23}。また、神戸²⁴ はアルブミンと BDG のインキュベートにおいて B δ の生成が最も多く、大部分が BDG 由来と考えたが、その構造については未知である。

アルブミンとビリルビンの生理的な結合に際して強い結合定数を持つ binding site²⁵ がある。アルブミンは 1, 2, 3 の 3 つの domain と 1-AB, 1-C, 2-AB, 2-C, 3-AB, 3-C の subdomain に分けられるが、1-C と 2-AB で first class binding site, 2-C と 3-AB で second class binding site を形成している²⁶。

アルブミンは血清中のビリルビン濃度が低く、細胞外液、特に血管内に保持されている間は、1 番目の結合部位にビリルビンを結合し生体にとって有益な抗酸化作用を有するビリルビンを光による分解から保護する。しかし、黄疸が増強するか、ビリルビンをアルブミンから遊離させる内因性、外因性の物質により、ビリルビンが 1 番目の結合部位から 2 番目の結合部位に移行するようになる²⁷。

ビリルビンのヒト血清アルブミン (HSA) との結合部位に関しては、Jacobsen²⁸ は HSA の 240 位の Lys との結合及びヒスチジン (His), リジン (Lys), アルギニン (Arg), チロジン (Tyr) がビリルビンに高い親和性を持つ事を報告²⁹ している。また、ビリルビンが 195 位の Lys, 222 位の Arg との結合の可能性を指摘しているものもある³⁰。これらはアルブミンと結合したビリルビンのうち非抱合型ビリルビンを主体にのべたもので、現在までに B δ におけるビリルビンのアルブミンとの共有結合についての報告はない。今回、肝疾患黄疸患者のプール血清を用いて、B δ の構造解明を試みた。予備的検討として足立法⁹ を用いて、今回の報告とは順序を逆にして、まず B δ を分取した後、ビリルビン安定化の為にアゾ化を行った場合、化学的、酵素的分解後の逆相 HPLC は本法に比べ全体に親水性側に移動が見られた。この理由として、移動相内のカウンターイオンがアルブミンと結合するなど何らかの影響を与え、アミノ酸分析の障害になった可能性が考えられた。

従って本研究ではまず全血清に ethyl anthranil azo 試薬を加えてから、アフィニティークロマトグラフィーと Micronex RP30 を用いてアゾ B δ 分画を分取した。このアゾ B δ 分画にはビリルビン非結合アルブミンも含まれている。

lysyl endopeptidase がリジルペプチド結合に厳密な特異性を示す酵素であり、同様に V8 protease も基質特異性が極めて厳密であるため、今回の酵素的分解には 2 つの酵素を用いた。

ペプチドの吸収波長の 215 nm とアゾ化したビリルビンの吸収波長の 530 nm の両波長の吸収をもつペプチド分画を分取し、Protein/Peptide Sequencer および PTH Analyzer を用いてアミノ酸 1 次構造を決定した。2 波長の吸収を持つペプチドはアルブミンのアミノ酸 18 位～38 位のペプチドであった。

このペプチドはアゾ B δ の吸収波長である 530 nm の吸収をもつ。lysyl endopeptidase は基質特異性の高い酵素であるが、このペプチドは 20 位の Lys のカルボキシル基側で切断されていない。アゾジピロールは疎水性が強く、Figure 5, Figure 6 で示した様に、アゾジピロールを含むペプチドは他のペプチドと比較して疎水側に溶出されている。Figure 8 に示したように 20 位の Lys は他のアミノ酸の mol 数に比較し少ない。この事は、ビリルビンが結合しているアミノ酸は本来のアミノ酸とは認識されず、データ上 blank として解析されるはずである³¹。しかし、アミノ酸分析装置内のアルカリ条件下で PITC をアミノ基にカップリングさせた後、強酸下で PITC の結合した N 末端アミノ酸を切断する際、Lys に結合していたビリルビンが一部切断され、free となった Lys が認識されたものと考えた。そして、Lys はビリルビンに高い親和性を持つ²⁹。

以上の理由より、20 位の Lys が δ ビリルビンにおけるビリルビン・アルブミンの共有結合部位と考えられた。

アルブミンのアミノ酸 20 位の Lys と bind-

ing site との関係については、以下の事が考えられる。第1は first または second class binding site にビリルビンの一方の carboxyl 基が結合し、もう一方の pyrrole 環の carboxyl 基はビリルビンの分子間距離の許容範囲内の特定のアミノ酸、特にビリルビンと親和性を持つ Lys, Arg 等と結合する場合。第2は first または second class binding site にビリルビンの一方の carboxyl 基が結合し、もう一方は非特異的にアミノ酸と結合する場合。第3は binding site には無関係に結合する場合で、この場合ビリルビンと親和性のあるアミノ酸と結合する場合と非特異的にアミノ酸に結合する場合が考えられる。

ビリルビンがアルブミンの first または second class binding site に結合した位置とアミノ酸20位に結合した位置との距離が、立体構造上ビリルビンの分子長とどのように関連するか否かは現在のところ不明である。Carter ら^{32,33} はヒト血清アルブミンが立体構造上心臓の形をしており、アルブミンのN末端からC末端の距離が約 8.2 nm。形状的に心尖にあたる部位からN末端及びC末端の距離が各々 8.3 nm, 7.0 nm と報告しているが、アミノ酸20位から240位の距離はビリルビンの立体的分子長と共に現在のところ不明である。

なお、Bu・アルブミンのモル比が1を越えた時 Bu のアルブミンに対する粗な結合が増し³⁴、Bu・アルブミンのモル比が2:1の時、光照射時の B δ 生成量が増加したとの報告²⁴がある。これは B δ 生成に関して second class binding site に共有結合する可能性を示唆するものであったが、今回の実験において B δ におけるビリルビンのアルブミン共有結合部位と second class binding site は異なることが明らかになった。

ただし、筆者が別のプール血清を今回とは異なった化学的、酵素的分解法を用いて逆相 HPLC を行い 215 nm と 530 nm の両波長を持つペプチドに精製し、アミノ酸分析を行ったところ、今回とは異なったペプチドを得、ビリ

ルビンが共有結合しているであろうアミノ酸 (Lys) は blank として解析されている。従って B δ のビリルビンは今回得られた個所の他の位置にあるアミノ酸 (Lys) に結合する可能性はある。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究に御指導、御校閲を賜りました 恩師山本俊夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究を遂行するにあたり、終始懇切なる御指導、御助言をいただきました足立幸彦助教授、大阪大学蛋白質研究所蛋白質化学構造部門、綱沢 進助教授に心から感謝申し上げます。さらに本研究に御協力いただきました第2内科学教室員各位にも感謝致します。

文 献

1. Malloy HT, Evelyn KA. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J Biol Chem* 1937; 19: 481-490.
2. Kuenzle CC, Sommerhalder M, Ruttner JR, Maier C. Separation and quantitative estimation of four bilirubin fractions from serum and of three bilirubin fractions from bile. *J Lab & Clin Med* 1966; 67: 282-293.
3. Lauff JJ, Kasper ME, Wu TW, Ambrose RT. Isolation and preliminary characterization of a fraction of bilirubin in serum that is firmly bound to protein. *Clin Chem* 1982; 28: 629-637.
4. Lauff JJ, Kasper ME, Ambrose RT. Separation of bilirubin species in serum and bile by high-performance reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatography* 1981; 226: 391-402.
5. Weiss JS, Gautam A, Lauff JJ, et al. The clinical importance of a protein bound fraction of serum bilirubin in patients with hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 1983; 309: 147-156.
6. Adachi Y, Inufusa H, Yamashita M et al. Human serum bilirubin fractionation in various hepatobiliary disease by the newly developed high performance liquid chromatography. *Gastroenterol Jpn* 1988; 23: 268-272.
7. Piper RF, Hargreaves TH. The measurement of bilirubin in liver. *Clin Chim Acta* 1975; 60: 215-218.
8. Travis J, Bowen J, Tewksbury D, Johnson D,

- Pannell R. Isolation of albumin from whole human plasma and fractionation of albumin-depleted plasma. *Biochem J* 1976; 157: 301-306.
9. 加藤裕子. 血清ビリルビン分画の臨床的意義. 近畿大医誌 1989; 14: 97-112.
10. Mcmenamy RH, Dintzis HM, Watson F. Cyanogen bromide fragments of human serum albumin. *J Biol Chem* 1971; 246: 4744-4750.
11. 副島正美, 正木武治. リジルエンドペプチダーゼ. 蛋白質 核酸 酵素 1984; 29: 1532-1537.
12. 網沢 進, 正木武治, 広瀬正明, 副島正美, 崎山文夫. リジルエンドペプチダーゼ(続). 蛋白質 核酸 酵素 1986; 31: 629-634.
13. 今堀和友, 崎山文夫, 鈴木絃一編. 続生化学実験講座2 タンパク質の化学(上). 東京: 東京化学同人, 1987; 260-270.
14. Takahashi K. The amino acid sequence of ribonuclease N₁, a guanine-specific ribonuclease from the fungus *Neurospora crassa*. *J Biochem* 1988; 104: 375-382.
15. Hewick RM, Hunkapiller MW, Hood LE, Dreyer WJ. A gasliquid solid phase peptide and protein sequenator. *The J Biol Chem* 1981; 256: 7990-7997.
16. 平野 久. アミノ酸配列分析装置. ぶんせき 1987; 8: 52-59.
17. 右田俊介, 平山千里編. 血漿タンパク質. 東京: 医歯薬出版, 1979.
18. Adachi Y, Katoh H, Fuchi I, Yamamoto T. Serum bilirubin fractions in healthy subjects and patients with unconjugated hyperbilirubinemia. *Clin Biochem* 1990; 23: 247-251.
19. WU TW, Wu J, Li R, Mickle D, Carey D. Albumin-bound bilirubins protect human ventricular myocytes against oxyradical damage. *Biochem Cell Biol* 1991; 69: 683-688.
20. Gautam A, Seligson H, Gordon ER, Seligson D, Boyer JL. Irreversible binding of conjugated bilirubin to albumin in cholestatic rat. *J Clin Invest* 1984; 73: 873-877.
21. McDonagh AF, Palma LA, Lauff JJ, Wu TW. Origin of mammalian biliprotein and rearrangement of bilirubin glucuronides in vivo in the rats. *J Clin Invest* 1984; 74: 763-770.
22. Hutchinson DW, Mutopo DS. Photoactivated covalent binding of [³H] bilirubin to human serum albumin. *Biochem J* 1979; 181: 779-781.
23. Jori G, Rossi E, Rubaltelli FF. Phototherapy-induced covalent binding of bilirubin to serum albumin. *Pediatr Res* 1980; 14: 1363-1366.
24. 神戸 章. デルタビリルビン生成に関する研究. 近畿大医誌 1989; 14: 389-401.
25. Brown JR, Shockley P. Serum albumin: structure and characterization of its ligand binding sites. In: Jost PC, Griffith OH, eds. *Lipid-protein interaction Volume 1: USA: A Wiley-Interscience Publication*, 1982; 25-68.
26. Bordersen R. Binding of bilirubin to albumin. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1979; 11: 305-399.
27. 大西鐘壽, 伊藤 進, 磯辺健一, 越智三起子, 近藤昌敏. ビリルビン, 周生期の活性酸素防御機構における新生児黄疸の意義. 蛋白質核酸酵素 1988; 33: 3005-3016.
28. Jacobsen C. Lysine residue 240 of human serum albumin is involved in high-affinity binding of bilirubin. *Biochem J* 1978; 171: 453-459.
29. Jacobsen C. chemical modification of the high-affinity bilirubin-binding site of human-serum albumin. *Eur J Biochem* 1972; 27: 513-519.
30. Peters TJR. Serum albumin. *Adv Protein Chem* 1985; 37: 161-245.
31. 今堀和友, 崎山文夫, 鈴木絃一編. 続生化学実験講座2 タンパク質の化学(上). 東京: 東京化学同人, 1987; 313-373.
32. Carter DC, He X, Munson SH, et al. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* 1989; 244: 1195-1198.
33. Carter DC, HE X. Structure of human serum albumin. *Science* 1990; 249: 302-303.
34. Kamisaka K, Listowsky I, Betheil JJ, AriasIM. Competitive binding of bilirubin, sulfobromophthalein, indocyanine green and human and bovine serum albumin. *Biochim Biophys Acta* 1974; 365: 169-180.