

ウシヘモグロビンおよびアルブミンへの 3-Hydroxy[³H]benzo[a]pyrene の結合

杉原成美、Margaret O. James *

J BIOCHEM MOLECULAR TOXICOLOGY, 17(4), 239-247(2003)

Binding of 3-Hydroxybenzo[a]pyrene to Bovine Hemoglobin and Albumin

Narumi Sugihara , Margaret O. James*

ABSTRACT : Previous studies examined the bioavailability and first-pass biotransformation of 3-hydroxy[³H]benzo[a]pyrene ([³H]-3-OHBaP) in an isolated perfused catfish intestinal model. This work showed that 3-OHBaP, or a metabolite formed in intestine, bound covalently to blood protein. In this study, the blood adducts were characterized in vitro by incubating bovine ferric hemoglobin or albumin with [³H]-3OHBaP under various conditions. Incubation of 2μM [³H]-3-OHBaP with hemoglobin for 1 h resulted in 7.49 pmol bound/mg protein, while albumin binding was 1.37 pmol/mg protein. Mild acid hydrolysis released only 5% of the radioactivity from 3-OHBaP-hemoglobin adducts. After gel filtration, the 3-OHBaP-hemoglobin adducts were examined by HPLC analysis. A single peak of radioactivity was detected at the same retention time as the heme component of hemoglobin. Unbound 3-OHBaP was oxidized to BaP-3,6-dione during incubation with ferric hemoglobin. Treatment of hemoglobin with ascorbic acid decreased the formation of hemoglobin adducts by 33%, while hydrogen peroxide treatment increased adduct formation by 44%. Incubation of [³H]-BaP- 3-β-D-glucuronide (BaP-3G) with hemoglobin and β-glucuronidase resulted in greater binding to hemoglobin than incubation with [³H]-3-OHBaP alone. The hemoglobin adduct obtained from [³H]-BaP-3G also co-migrated with heme. These results indicate that an oxidative process is involved in formation of the heme adduct and that 3-OHBaP or BaP-3G might be a precursor of the bound metabolite.

抄録 前報において、ナマズの摘出腸管灌流モデルを用いて、3-Hydroxy[³H]benzo[a]pyrene ([³H]-3-OHBaP)のバイオアベイラビリティおよび抱合化反応について報告した。今回の研究では、3-OHBaPあるいは腸管内で生成した代謝物が血清蛋白に共有結合することを明らかにした。この血液共有結合体は、様々なin vitro条件下で[³H]-3-OHBaPとヘモグロビン(Fe(III))あるいはアルブミンと共にインキュベーションすることによりその性状が調べられた。2μMの3-OHBaPをヘモグロビンと共に1時間インキュベーションすると7.49pmol/mg proteinの結合物が形成され、アルブミンでは1.37pmol/mg proteinの結合物が形成された。酸加水分解処理によって、3-OHBaP-ヘモグロビン結合体から5%の放射

活性しか遊離してこなかった。ゲルろ過をした後、その3-OHBaP-ヘモグロビン結合体のHPLC分析をおこなった。放射活性を示す単一ピークが、ヘモグロビンのヘム成分と同じリテンションタイムで検出された。遊離の3-OHBaPは、ヘモグロビン(Fe(III))と共にインキュベーションされている間にBaP-3,6-dioneに酸化された。ヘモグロビンをアスコルビン酸で処理するとヘモグロビン共有結合体の割合は33%減少し、一方、過酸化水素で処理するとその割合は44%増加した。 ^3H -BaP-3- β -D-glucuronide (BaP-3G)をヘモグロビンおよび β -グルクロニダーゼと共にインキュベーションすると、 ^3H -BaP-3-OHからの結合体形成量に比べ、より多くのヘモグロビン共有結合体が形成された。 ^3H -BaP-3Gより得られたヘモグロビン共有結合体の放射活性もまた同様に、ヘム成分と同じリテンションタイムで検出された。これらの結果は、酸化のプロセスがヘム結合体の形成に関与しており、さらに3-OHBaPあるいはBaP-3Gが血液共有結合体の前駆体であることを示唆するものである。

* Department of Medicinal Chemistry, University of Florida
フロリダ大学薬学部