

# The Binding of 5-Iodopyrimidines by Human serum albumin

李 鍾 珍

(서울대학교 文理科大學 化學科)

## (5-Iodopyrimidines와 Human serum albumin과의 結合)

최근 有機 ion과 蛋白質間的 結合에 關하여 많은 研究가 發表되고 있다.

I.M.Klotz, E.J. Cohn, W.L. Hughes, 그밖에 F.W. Putman, H.Neururath, 등의 研究者들은 Organic azo dye등의 有機 ion 및 銅, 錫등의 無機 金屬 ion과 蛋白質과의 結合에 關하여 많은 實驗을 하였다. 그런데 그것들의 結合機構는 蛋白質 分子 自體의 構造가 正確히 밝혀져있지 않음으로서 確固한 結論을 내리지 못하고 있다.<sup>(1-6)</sup>

한편 이와같은 有機 ion과 蛋白質間的 結合에 關한 研究는 生化學的인 部面에 많은 도움을 주고 있다. 그 例로서 Congo red와 같은 organic dye는 體內 脾臟이나 肝臟등에 축적되어 만성 염증을 일으키는 protein amyloid와 쉽게 結合 함으로서 臨床學的으로 이러한 amyloid-sis 진단에 利用되고 있다. 그밖에 甲狀腺 Hormon인 Thyroxine, TIT(triiodotyronine) 등과 같은 tyronine derivatives도 蛋白質 globlin과 結合함으로서 thyrogloblin의 形態로 血液中에 分泌 된다. 따라서 이와같은 事實은 甲狀腺 Hormon의 分泌率測定 實驗에도 利用될 수 있다.

이러한 見地에서 本實驗에서는 iodinated Pyrimidines와 Human Serum albumin과의 結合 機構를 研究 함으로써 Iodinated pyrimidines 分子內 Introducing group의 種類와 PH등의 物理條件이 變함에 따라 Human serum albumin과의 結合量이 如何히 變하는가를 調査하여, 從前의 많은 研究結果와 比較하였다.

## 實 驗

### (1) 試 料

**Human serum albumin:** International Committee of Red cross로 부터 入手한 Fraction V의 純粹한 Crystalline Sample이다. 이것을 증류수에 녹여 투석시킨後 Optical absorbancy를 측정해본 結果 別다른 不純物이 없었다. 따라서 이 Sample을 그대로 0.1-M Sörensen phosphate buffer에 녹여 使用 하였다.

5-Iodopyrimidines ; 美國 University of Kansas, Department of Biochemistry 實驗 室에서 筆者가 合成한 試料로서 그 種類는 다음과 같다.

5-Iodouracil

5-Iodo-6-methyluracil

- 5-Iodo-2-thiouracil
- 5-Iodo-2-methylthiouracil
- 5-Iodo-2-benzylthiouracil
- 5-Iodo-2,6-dimethyl thiouracil

以上の各種 pyrimidines 역시 0.1-M Sørensen phosphate buffer 溶液에 녹여 使用하였다.

**Cellophane tubing** ; 美製 Visking seamless cellulose tubing 直徑 15.9mm, 길이 100mm. 의 것들을 使用하였다. 使用하기 前에 Cellophane tubing 表面에 부착되어 있는 不純物을 除去 시키고, 그것의 porosity를 증가 시키기 爲하여, 이것을 10% NaOH 溶液에서 24 時間 放置 시키고, 다시 묽은 NaOH 溶液으로 여러번 씻었다. 이것을 다시 증류수로서 여러번 잘 씻은後 끝으로 진한 Aqueous Acetone 溶液으로 잘 씻어 使用하였다.

(2). 豫備 實驗 : 투석 실험들 實施하기에 앞서 5-Iodopyrimidines와 Human serum albumin이 結合을 하는가의 興否를 高찰하기 爲하여 豫備實驗을 하였다. 即 5-Iodopyrimidines 溶液 各各 10ml에 Human serum albumin 溶液 5ml 씩을 직접 混合한 後 즉시 Optical absorbancy를 측정하고, 이것을 다시  $5^{\circ} \pm 1^{\circ}c$ 의 냉장고에서, 72時間 放置시킨後 다시 Optical absorbancy를 측정하여 Optical absorbancy의 變化를 調査하였다.

(3). 透析 實驗 : 투석실험용 容器로서는 15cm×2.5cm의 pyrex試驗管을 使用 하였다. 各 試驗管에는 서로 다른 5-Iodopyrimidines溶液 20ml씩을 넣었으며, 한편 各 Cellophane Sac에는 0.2% Human serum albumin 溶液 10ml씩으로 채운후, 이것들을 5-Iodopyrimidines 溶液이 들어 있는 試驗管에 담겨  $5^{\circ} \pm 1^{\circ}c$ 의 냉장고에서 72時間 放置시킴으로서 Donnan equilibrium state에 이르도록 하였다. 한편 이러한 實驗과 병행하여, Control실험을 하였다. 이경우 各各 5-Iodopyrimidines 溶液이 들어있는 試驗管에 0.2% Human serum albumin 溶液代身, 該當하는 PH의 0.1-M phosphate buffer 溶液만으로서 채워진 Cellophane Sac를 담그어 위와 같은 條件下에서 實驗을 하였다.

이러한 Control 實驗의 目的은 Cellophane Sac에 5-Iodopyrimidines가 흡착 됨으로써 일어나는 誤差와, Cellophane Sac을 투입시킬때 그속에 들어있는 Albumin buffer 溶液에 依한 5-Iodopyrimidines의 농도감소등 誤差를 除去하기 爲함이다. 이러한 一聯의 實驗을 PH 5.5, 6.8 및 8.1에서 各各 實施하였다.

以上の 透析實驗에서 72時間 放置後 各各의 試驗管內에 들어 있는 Cellophane sacs를 꺼내고 나머지 溶液의 optical absorbancy를 maximum peak를 갖는 wave length에서 測定함으로써, 5-Iodopyrimidines 溶液의 농도감소를 Lambert-Beer's Law에 依해서 求하였다.

Optical absorbancy; 各 物質 溶液의 optical absorbancy는 Beckman Spectrophotometer Model D.U.로서, 測定하였다.

### 實驗 結果와 考察

(1). **Optical Absorption Curve Change와 Complex formation** ; 진한 5-Iodopyrimidines 및 有機染料等의 溶液은 Lambert-Beer's Law에 벗어 나고 있지만 묽은 溶液에서는

Fig 1에 보인바와 같이 Lambert-Beer's Law에 Obey하고 있다. 즉  $10^{-4}$  mole/l의 농도 이하의 묽은 溶液농도 영역에서는 5-Iodopyrimidines 溶液의 Optical absorbancy가 농도에 직접 比例하고 있음을 알수 있다.

따라서 本實驗에 使用한 5-Iodopyrimidines 溶液의 농도는  $5 \times 10^{-5} \sim 9 \times 10^{-5}$  mole/l 범위 內를 取하였으며, 各 파장에서 optical absorbancy를 測定하여 maximum peak에서의 Extinction coefficient를 Table 1에 나타냈다.

Table 1 Extinction coefficients of 5-Iodopyrimidines

5-Iodopyrimidines	pH	wave length(m $\mu$ )	conc.(mole/l)	Extinction coeff.
5-Iodo uracil	5.5	280	$7.568 \times 10^{-5}$	$6.05 \times 10^{-8}$
	6.8	280	8.273	6.02
	8.1	285	7.975	6.15
-2-thionracil	5.5	275	8.756	6.12
	6.8	275	8.545	6.45
	8.1	280	9.394	6.24
-6-methyluracil	5.5	270	8.563	6.38
	6.8	275	8.478	6.75
	8.1	275	7.894	6.99
-2-benzylthiouracil	5.5	245	6.275	7.07
	6.8	250	7.997	7.08
	8.1	250	8.782	7.13
-2-methylthiouracil	5.5	250	5.878	9.41
	6.8	250	6.263	9.82
	8.1	255	6.094	$1.05 \times 10^4$
-2,6-dimethylthio uracil	5.5	250	5.523	1.21
	6.8	250	5.457	1.28
	8.1	250	5.882	1.32

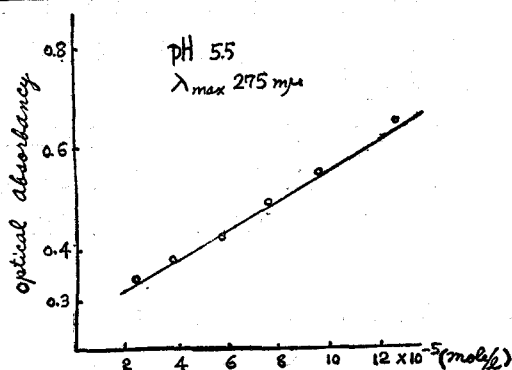


Fig. 1 The Relation of Concentration and optical absorbancy for 5-Iodo-2-thiouracil

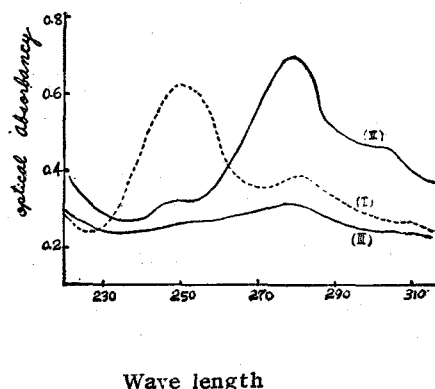
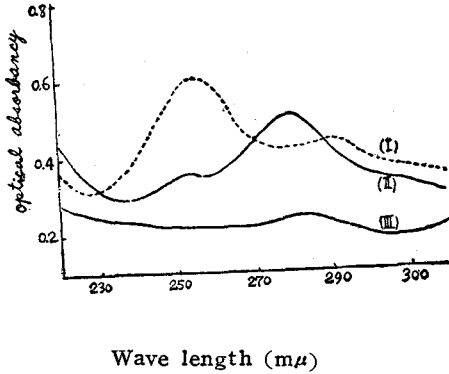


Fig. 2 The Absorption Curve when 5-Iodo-2-methylthiouracil and albumin were directly mixed at pH 5.5 (I: Standard curve of 5-Iodo-2-methylthiouracil. II: Immediately after mixing, III: After 72 hours.)



Wave length (m $\mu$ )  
 Fig. 3 The absorption Curve when 5-Iodo-2-methylthiouracil and albumin were directly mixed at pH 8.1

였으리라고는 생각되지 않으며, 단지 두 물질이 相互結合 및 Complex를 形成함에 基因되는 것이라고 생각 된다.

(2) 5-Iodopyrimidines 分子內 Introducing group가 結合力에 미치는 영향; Cellophane Sac를 使用하여 透析實驗을 하고 72時間後 5-Iodopyrimidines 溶液의 optical absorbancy의 變化값은 Table 2와 같다.

Table 2. After 72 hrs., the optical absorbancy for 5-Iodopyrimidines

5-Iodopyrimidines,	pH,	wave length <sup>0</sup> (m $\mu$ )	optical absorbancy reading		
			with albumin,	without albumin,	net
5-Iodo-uracil	5.5	230	0.439	0.451	0.012
	6.8	280	0.459	0.478	0.019
	8.1	235	0.457	0.481	0.024
-2-thiouracil	5.5	275	0.491	0.519	0.028
	6.8	275	0.494	0.530	0.036
	8.1	280	0.521	0.567	0.046
-6-methyluracil	5.5	270	0.487	0.528	0.041
	6.8	275	0.489	0.551	0.062
	8.1	275	0.465	0.538	0.073
-2-benzylthiouracil	5.5	245	0.361	0.422	0.061
	6.8	250	0.464	0.540	0.076
	8.1	250	0.514	0.622	0.108
-2-methylthiouracil	5.5	250	0.385	0.484	0.099
	6.8	250	0.486	0.596	0.110
	8.1	255	0.448	0.618	0.170
-2,6-dimethylthiouracil	5.5	250	0.376	0.668	0.292
	6.8	250	0.351	0.682	0.331
	8.1	250	0.388	0.752	0.364

5-Iodopyrimidines와 Human serum albumin間의 結合量의 定量的인 計算을 5-Iodopyrimidines 溶液의 初期농도와 末期농도間의 差로서 求할수 있는데, 이때의 5-Iodopyrimidines

의 농도 감소량이 Human serum albumin과의 결합 및 Complex 形成에 該當되는 결합량인 것이다. 한편 5-Iodopyrimidines의 末期농도는 Table 1에 보인 Extinction Coefficient와 Table 2에 나타낸 optical absorbancy의 變化값으로 부터 Lambert-Beer's Law에 依하여 求하였다.

Table 3은 5-Iodo-2-methylthiouracil과 Human serum albumin間の 결합량을 計算한 例이다. 이와같은 方法으로 各 5-Iodopyrimidines와 Human serum albumin 間の 결합량을 求하였으며, Table 4는 이들 各結合량을 比較한 Data이다.

Table 3 The typical differential dialysis experiment (at pH 5.5)

	albumin tube		control tube	
	out side	in side	out side	in side
Vol. of soln.(ml)	20	10	20	10
conc. of 5-Iodouracil (mole/d)	$7.568 \times 10^{-5}$	.....	$7.568 \times 10^{-5}$	.....
moles of Human serum albumin *	.....	$2.86 \times 10^{-5}$	.....	.....
After 72 hrs., conc. of 5-Iodouracil (mole/l)	$7.264 \times 10^{-5}$	.....	$7.454 \times 10^{-5}$	
moes bound 5-Iodouracil**	$2.11 \times 10^{-6}$			
bound pyrimidine per total protein	7.39			

※ Calculated on assumption of molecular weight of 70,000

※※ Under the conditions of the present experiments, particularly with such low protein concentrations, the influence of the Donnan effect on the 5-Iodopyrimidines distribution is negligible.

Table 4. Moles of 5-Iodopyrimidines bound by 10 ml. of 0.2% Human serum albumin

5-Iodopyrimidines	pH 5.5	6.8	8.1
5-Iodouracil	$2.11 \times 10^{-3}$	$2.52 \times 10^{-6}$	$3.83 \times 10^{-6}$
-2-thiouracil	4.62	5.58	7.38
-6-methyluracil	6.41	9.23	$1.03 \times 10^{-5}$
-2-benzylthiouracil	8.63	$1.08 \times 10^{-5}$	1.57
-2-methylthiouracil	$1.05 \times 10^{-5}$	1.13	1.62
-2,6-dimethylthiouracil	2.35	2.58	2.67

Table 4에 나타낸 모든 값은 0.2% Human serum albumin 10ml 당 결합하고 있는 5-Iodopyrimidines의 mole數를 나타낸 것인데 이들 값을 比較해 보면, 5-Iodopyrimidines 分子內 Iodine에 對한 Introducing group이 變함에 따라 結合량이 變하고 있음을 알수있다. 이러한 傾向은 주로 5-Iodopyrimidines 分子內 Iodine을 除外한 部分에 electron donating force가 증가함에 따라 分子속에서 極性化(polarization)을 이르게, pyrimidine 分子의 5位에

있는 Iodine 쪽으로 electron의 shift가 일어 남으므로, Iodine 部分은 強한 electronegativity를 갖게 될수 있기 때문이라고 생각된다. 그 結果로서 이部分과 Human serum albumin 分子의 cationic site間에는 보다 더 強한 結合을 이루게 되어 結合量의 증가가 있을것으로 생각 된다. 한편 Human serum albumin 分子가 5-Iodopyrimidines와 結合함에 있어 Cationic site가 보다 우세하게 作用할것이라는 理由는 I.M. Klotz의 研究結果로서 說明 할 수 있다. (7.9.10) 즉 同氏에 依하면 Serum albumin 分子內 各 Amino酸 殘基의 -OH group,  $\equiv\text{NH}^+$ ,  $-\text{COO}^-$  등의 residues中 -OH group는  $-\text{OH}\sim\text{O}$  結合 Energy와  $-\text{O}\sim\text{NH}$  結合 Energy間의 強弱의 差로 因하여  $\equiv\text{NH}^+$  residue보다는  $-\text{COO}^-$  residue와 우세한 結合을 이룬다고 한다. 한편 Human serum albumin 分子內에는 大略 同等數의 -OH group와  $-\text{COO}^-$  residues가 있을 것이라는 것이 알려짐에 따라 結果적으로 Human serum albumin 分子內의 大部分의  $-\text{COO}^-$  residues는 -OH group과 수소결합을 하게 될것이고 Cationic site인  $\equiv\text{NH}^+$  residues만이 남게 되어, 5-Iodopyrimidines의 強한 electronegativity를 갖는 部分과 結合을 이룰것이라고 생각된다.

Table 4에 依하면 同一한 PH에서는 5-Iodopyrimidines 分子內 Iodine에 對한 electron donating force가 센 group이 存在케 됨에 따라 Human serum albumin과의 結合量이 더 한층 증가 됨을 알수 있으며, Uracil 치환체 보다는 Thiouracil 치환체의 경우 結合量이 더 증가되고 있음을 알수 있다. 한편 實驗 結果로 볼때 5-Iodo-2,6-dimethylthiouracil의 경우는 다른 pyrimidines에 比하여 훨씬 큰 結合量을 보여 주고 있다. 이는 部分的이나마 分子內에  $-\text{CH}_3$  group 같은 electron donating group에 依한 Van der Waas's force 증가에 基因한다고 생각 된다.

(3) 結合量에 미치는 PH의 영향 ; Table 4에 依하면 PH가 증가함에 따라서 結合量이 증가되고 있음을 볼수 있다. 이러한 現象은 PH 증가에 따라 Human serum albumin 分子 自體內의 Configuration이 變하게 되어 外部의 Anion에 對한 새로운 結合部位가 증가되기 때문이라고 생각된다. 한편 Methyl orange와 serum albumin間의 結合機構에 對한 I.. Klotz의 見解도 이와비슷함을 볼수 있다. (10.11)

Human serum albumin 分子內에 존재하는 염기성 residues中 Histidine은 pk value가 5.6~7.0임으로 alkali性 溶液에서는 有用한 Free Nitrogen의 존재 可能性이 희박해 질것으로 생각되며, 한편 lysine의 e-amino group와 arginine의 guanidine group 등은 pk value가 9.4~12.0임으로 적어도 PH 9以下에서는 이들 group中에서 4개의 Free Nitrogen이 보다 더 유리하게 positive charge를 나타내어 Cationic site로 作用하게 되리라 생각된다.

따라서 Human serum albumin이 5-Iodopyrimidines의 anionice site와 結合 할때 主로 electrostatic interaction으로 結合하게 된다. 그러나 PH 증가에 따라 Human Serum albumin 分子內 Configuration의 變化를 갖어 음으로서, Lysine이나 Arginine의 鹽基性 group에 依한 electrostatic repulsion으로 새로운 結合 結位이 점차 증가하게 될것이며, 이러한 새로운 結合部位에서의 複合體 形成으로서 두 物質의 結合量은 한층더 PH 증가에 따라 증가케 될것이라고 생각 된다.

## 要 約

5-Iodopyrimidines와 Human serum albumin間的 結合에 있어 이들의 結合量은 첫째 5-Iodopyrimidines 分子內 Iodine에 對한 Introducing group이 變함에 따라 變하게 된다. 다시 말해서 結合量은 5-Iodopyrimidines 分子內 보다 強한 electron donating group이 存在 함에 따라 한층 더 증가하게 된다고 말할수 있다. 둘째 이들 두物質間的 結合量은 또한 PH 증가에 따라서도 증가 한다고 말할수 있는데 이는 PH 증가에 따라 Human serum albumin 分子自體內의 Configuration이 變하게 됨으로서 分子內 electrostatic repulsion에 依한 새로운 結合部分이 증가될것이며, 이 部分에서의 復合體를 形成함에 基因한다고 생각된다. 이러한 實驗的 結果를 토대로 하여 5-Iodopyrimidines가 antithyroid action과 어떠한 關係를 갖고 있는가의 實驗을 함으로서 結合量에 따른 antithyroid activity 序列을 決定할 수도 있을 것이다.

本實驗을 끝까지 도와준 서울大學校 化學科 大學院生 李賢宰君에게 감사를 표한다.

## ABSTRACT

Studing the binding of the 5-Iodopyrimidines by human serum albumin we obtained the following conclusions; 1. The more strong electron donating groups in the molecule of 5-Iodopyrimidines, the larger the binding force with human serum albumin. This trend seems to be attributed by increase of polarization of the electron donating groups in 5-Iodopyrimidines molecule. 2. The binding force of 5-Iodopyrimidines by human serum albumin is increased with the pH increasing could be occurred the configurational changes of human albumin molecule, and this new binding sites of human serum albumin molecule would form the intermolecular complex with 5-Iodopyrimidines molecule more strongly.

## LITERATURE REFERENCE

- 1) I.M.Klotz and Janet Ayers; J.of Am.Chem.Soc., vol. 68, 1486 (1946)
- 2) E.J.Cohn and W.L.Hughes; *ibid* 69, 1735 (1947)
- 3) H.W.Barrett and R.AWest; *ibid* 78, 1612 (1953)
- 4) I.M.Klotz, F.W.Walker; J. Am. Chem.Soc. 69, 1609 (1947)
- 5) I.M.Klotz and F.M.Walker; *ibid* 70, 939 (1948)  
943 (1948)
- 6) F.W.Neurath, H.Putman; *ibid* 66, 692, 1992(1944)
- 7) L.M.Klotz, et al.; *ibid* 68, 2299 (1946)
- 8) G.B.Elion, W.S.Ide and G.H.Hitchings; *ibid* 68, 2137 (1946)
- 9) I.M.Klotz, E.W.Gelewitz and J.M.Urquhart; *ibid* 74, 202 (1952)
- 10) R.K.Burkhardt, I.M.Klotz and J.M.Urquhart; *ibid* 74, 4209 (1952)
- 11) I.M.Klotz and J.M.Urquhart; Phys. colloid. chem., 53, 100 (1949)
- 12) F.Haurowitz; Chem. and Biology of Proteins, chap. 10, Academ. Press ING. Publishers, New York, 1950