

# 抗酸化能を有する組換えアルブミンの創剤設計

(課題番号 H11-血液-001)

平成11年度厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）研究報告書

平成12年3月

主任研究者 小田切 優樹  
(熊本大学薬学部教授)

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）  
分担研究報告書

## 抗酸化能を有する組換えアルブミンの創剤設計

主任研究者 小田切 優樹 熊本大学薬学部 教授

## 研究要旨

現在、臨床において、アルブミンは様々な疾患時に汎用されているものの、投与したアルブミンの消失が速いため、頻繁な投与を必要とする。この原因の一つとして、疾病による酸化ストレス条件下でアルブミンが酸化され、消失が促進していることが挙げられる。このことは、ラジカル酸化を受けにくいアルブミンを遺伝子組換え法で作製することができれば、投与回数を減らすことができ、臨床効果だけでなく、ファーマコエコノミクスな観点からも重要な効果をもたらすことができることが予想される。そこで本研究では、安全性ならびに有効性に優れた抗酸化能アルブミンの創製を最終目標に、実用レベルへの外挿が可能な組換えアルブミンの効率的な精製法の確立を試み、さらに抗酸化能アルブミン分子設計上の基礎をなす、酸化アルブミンの構造と機能について検討を加えた。まず、*Pichia pastoris*を用いたHSAの大量調製法を確立した。調製された組換え型アルブミンの構造特性及び機能性は血漿由来のものと同等であった。さらに、これらの技術により変異体も調製できることが判明した。また、化学的処理した種々のアルブミンを調製し、その構造と機能について検討したところ、Met残基が抗酸化剤として重要な役割を担っていることが強く示唆された。これらの知見は、次年度に向けて、酸化によりダメージを受ける部位あるいはその近傍にMet残基を導入し、抗酸化能に富んだ血中滞留型アルブミンを設計する上での有用な基礎資料になるものと考えられる。

## 分担研究者

棚瀬 純男	熊本大学医学部	助教授
山口 一成	熊本大学医学部附属病院	講師
庄司 省三	熊本大学薬学部	教授
福沢 健治	徳島大学薬学部	教授

## A. 研究目的

アルブミン製剤は出血性や外傷性ショック時の循環血漿量の是正、また熱傷やネフローゼ症候群などのアルブミン漏失亢進および肝硬変などのアルブミン合成能低下に伴う低アルブミン血症時の膠質浸透圧の改善をはじめとする種々の疾患に繁用されており、その使用量は増加傾向にある。一方、国民医療費が高騰していることより、アルブミン製剤の消費量の削減も叫ばれている。また、アルブミン製剤は血液を原料とするため、HIVやクロイツフェルトヤコブ病等のウィルスやプリオン混入の危険性の問題があり、近年、血液に頼らないアルブミンの創製が望まれている。このため、有効性と安全性の確保はもとより、経済性に優れたアルブミン製剤の開発は急務の課題である。

ところで、体内におけるアルブミンの寿命は酸化反応などによるアルブミンの特異的修飾が引金となるものと考えられている。このことは、特異的アミノ酸残基が部位特異的変異法により他のアミノ酸残基に置換され得るなら、その血中半減期は大いに遅延され、有効性が著しく増大する可能性が考えられる。

蛋白質の酸化的修飾は、活性酸素種と生体の抗酸化作用のバランスが崩れることにより起こる。スーパーオキシドをはじめとする活性酸素種は、脳浮腫、膠原病、内質性肺炎など多くの原因不明の疾患や憎悪因子となっている可能性がある。このため、 $O_2$ の代謝酵素であるスーパーオキシドジスムターゼや抗酸化化合物による治療が検討されているが、十分な効果が得られているとは言い難い。この主因として、治療薬の低い血中滞留性を反映した生体内からの速い消失が挙げられる。このことは、生体内に高濃度に存在しているアルブミンが、

本来の浸透圧維持作用に加え、抗酸化作用が付与されるなら、その有効性が著しく増大し、新しいアルブミン製剤の治療薬の道を拓くものと考えられる。

このような背景の下、本研究は、安全性ならびに有効性に優れた抗酸化能アルブミン製剤の開発を最終目標とし、3年計画の最初となる本年度は、目標達成のための重要な基礎情報となる、組換えアルブミンの効率的な精製法の確立と酸化アルブミンの構造と機能評価について実施した。

## B. 研究方法

本研究は、主任研究者の小田切と、それぞれの分担研究者が直接討議あるいはメール等で情報交換しながら、遂行された。すなわち、組み換えアルブミンの大量調製法は棚瀬により確立された。また、酸化アルブミンは庄司により調製され、各種スペクトル法、熱分析法および生物学的試験によりこれらアルブミンの純度検定、構造特性が評価された。加えて、山口により組換えアルブミンの薬物結合能、エステラーゼ活性、生体内挙動などが調べられ、血漿由来のアルブミンと比較検討された。また、福沢により酸化アルブミンの動態特性や抗酸化能が評価され、nativeアルブミンと比較検討された。

## C. 研究結果

### 1. 組換えアルブミンの調製と構造特性

*Pichia pastoris*を用いたHSAの大量調製法を確立した。得られた組換え型アルブミンについて、遠紫外領域CDスペクトル、 $^1H$ -NMRスペクトル、抗HSAポリクローナル抗体を用いて検討した結果、二次構造、三次構造及び抗体の認識性にrHSAとpHSAの間で有意な差は観察されなかった。

化学的安定性、熱安定性についての各パラメータはrHSA、pHSAともに同様の値を示し、両者に有意な差は観察されなかった。また、熱変性時の転移過程においても両者間に差異はないものと思われた。

## 2. 組換えアルブミンの機能性評価

rHSAの薬物結合特性について検討した結果、rHSA分子上の薬物結合サイトの存在様式はpHSAとほぼ同様である可能性が示唆された。また、両HSAは同程度のエステラーゼ類似作用を示し、その活性残基とされている411位のチロシン残基周辺の環境は両者の間で差異はないものと推察された。

<sup>125</sup>I-rHSA及び<sup>125</sup>I-pHSAのラットでの体内動態について検討した結果、血漿中濃度推移は2相性を示し、消失相(β相)から算出した半減期(t<sub>1/2</sub>)は約30時間であった。また、投与96時間後の各組織へ分布や尿及び糞中への放射能の累積排泄率より、両HSAはいずれの臓器にもほとんど蓄積せず、血中から速やかに尿中へ排泄されることが明らかとなった。

## 3. 酸化アルブミンの調製と構造特性

酸化HSAの遠紫外及び近紫外領域におけるCDスペクトルを測定した。その結果、MCO-及びCT-HSAでは遠紫外領域におけるコットン効果は、未変化体に比べわずかに減少していた。一方、近紫外領域の負のコットン効果は、著しく減弱化していた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAでは、これらの酸化HSAとは対照的に、コットン効果に大きな変化が生じていないことから、酸化に伴う立体構造変化はほとんど生じていないものと推察された。

未処理及び酸化HSAのDSC測定を行い、両者の熱変性の違いを調べた結果、未処理HSAやH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAの熱変性は単一ピークにより特徴づけられ、協同的な熱変性パターンを示した。しかし、MCO-及びCT-HSAの場

合、熱変性に伴う吸熱ピークはブロード化し、転移エンタルピーの減少が観察された。先のCD結果と合わせ、これら酸化HSAに大きな立体構造変化が引き起こされていることがさらに強く示唆された。さらに、酸化修飾に伴うHSA分子表面の疎水性変化を評価した。その結果、bis-ANSの蛍光強度はMCO-及びCT-HSAで増加していた。対照的に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAで観察された蛍光スペクトルは、未処理HSAのものとはほぼ等しいものであった。

## 4. 酸化アルブミンの機能性評価

酸化反応に伴うHSAの機能変化を評価した。サイトIへのリガンド結合性は、いずれの酸化HSAにおいても影響を受けなかった。しかし、サイトIIに関しては、MCO-HSA及びCT-HSAにおいて著しい結合性の低下が観察された。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAでは薬物結合性及びエステラーゼ様活性に低下は認められなかった。

HSAの生体内挙動に及ぼす酸化の影響を検討するために、<sup>125</sup>Iでラベル化した酸化HSAをラットに投与したところ、MCO-HSA及びCT-HSAの消失半減期は、未処理HSAに比べ約半分に短縮された。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAでは未処理HSAと類似した挙動を示した。

## D. 考察

### 1. 組換えアルブミンの調製と構造特性

*Pichia pastoris*を用いてアルブミン大量精製法の確立に成功した。精製したrHSAの構造特性や安定性について検討した結果、rHSAはpHSAとの間に有意な差は認められなかった。また、脂肪酸(オレイン酸、パルミチン酸)及びアルブミン製剤に安定化剤として添加されているOctNa、N-Ac-L-Trpの安定性に及ぼす影響について検討したところ、それらの添加時において、

化学的安定性、熱安定性の増大が観察された。また、いずれのHSAも低温殺菌により安定性を大きく失うことが確認されたが、この安定性の低下は両HSAともにOctNa、N-Ac-L-Trp添加により改善された。従って、立体構造を形成する分子内相互作用やドメイン間相互作用等においても、両HSAの同等性を示すものと考えられた。

## 2. 組換えアルブミンの機能性評価

rHSAの薬物結合特性及びエステラーゼ類似作用に関する検討結果から、rHSA分子上の薬物結合サイトの存在様式はpHSAとほぼ同様である可能性が示唆された。加えて、エステラーゼ活性残基と言われている411位のチロシン残基周辺的环境は両者の間で差異はないものと推察された。さらに、rHSAの生体内挙動はpHSAとの間には差異は認められず、rHSAの安全性が裏付けられた。

## 3. 酸化アルブミンの調製と構造特性

酸化に伴うHSAの立体構造変化を評価した結果、MCO-HSA及びCT-HSAの立体構造はネイティブな二次構造の大部分は保持されているが、三次構造は崩れた状態にあると推察された。対照的にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAでは、酸化に伴う立体構造変化は生じていないと思われた。また、DSC測定の結果、分子内ドメイン間相互作用の減弱化が示唆された。さらに、MCO-HSA及びCT-HSAでは、ネイティブ構造で内部に埋もれていた疎水領域が分子表面に露出している可能性が示唆された。

## 4. 酸化アルブミンの機能性評価

酸化アルブミンに対するリガンド結合性の結果をX線結晶構造解析モデルに基づいて考察したところ、サイトIを取り囲むようにMet残基が存在し、一方サイトII近傍にはこのようなMet残基の配置は見られない。このことは、これらのMet残基の存在の有

無が、両サイトの酸化反応に伴う機能変化に違いが生じた原因なのかもしれない。同様な傾向がサイトIIの有するエステラーゼ様活性においても認められた。しかしながら、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAの場合、このようなサイトIIにおける機能低下は見いだされなかった。

In vivo評価系において、未処理及び酸化HSAの生体内挙動を比較検討するため、これらの蛋白質を<sup>125</sup>Iでラベル化し、ラットに投与したところ、MCO-HSAの消失半減期は未処理HSAに比べ約半分に短縮していた。同様な消失の促進がCT-HSAでも観察された。このような消失の促進は、これまでの研究結果から、肝表面に存在する翻訳後修飾蛋白質を認識するスカベンジャー受容体に認識され、血中より肝臓中へ促進的に取り込まれるようになったのかもしれない。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAの場合は未処理HSAと類似した挙動を示し、生体内挙動に影響を及ぼさないことが明らかとなった。先の構造特性と関連づけて、アルブミンにおいてMetは抗酸化剤として、機能と構造を維持する役割を果たしている可能性が示唆された。

## E. 結論

本研究では、3年計画のスタートとして、遺伝子工学手法により組換えアルブミンの効率的な精製法を試みたところ、*Pichia pastoris*を用いて大量精製法の確率に成功するとともに、組換えアルブミンが未処理アルブミンと全く同等の機能性を保持していることを確認した。また、三種類の酸化アルブミンを調製し、その構造特性と機能性を調べたところ、過酸化水素による酸化は、動態特性に全く影響を与えず、Met残基抗酸化剤として重要な役割を演じていることが示唆された。また、予備的知見ながら、アルブミンの分子表面に存在する322-Alaおよび528-AlaをMet残基に置換した

変異体が、変異に伴う構造変化を惹起せず、抗酸化作用の増強傾向が観察された。次年度は、これらの知見を基に、最終目標の抗酸化的アルブミン製剤の開発への諸を開く成果を挙げるべき鋭意努力する所存である。

## F.研究発表

### 1.発表論文

Y.Imamura, T.Migita, M.Anraku, M.Otagiri. Inhibition of rabbit heart carbonyl reductase by fatty acids. *Biol. Pharm. Bull.* 22:731-733, 1999

Y.Imamura, M.Kaneko, Y.Mori, M.Otagiri. Sex-dependent pharmacokinetics and in vitro reductive metabolism of acetohexamide in Wistar-Imamichi rats. *Biol. Pharm. Bull.* 22:435-438, 1999

K.Inoue, T.Akaike, Y.Miyamoto, T.Okamoto, T.Sawa, M.Otagiri, S.Suzuki, T.Yoshimura, H.Maeda. Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin. Implication for cytoprotective mechanism in vivo. *J. Biol. Chem.* 274:27069-27075, 1999

Y.Tsutsumi, T.Maruyama, A.Takadate, M.Goto, H.Matsunaga, M.Otagiri. Interaction between two dicarboxylate endogenous substances, bilirubin and an uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, on human serum albumin. *Pharm.Res.* 16:916-923, 1999

K.Yamasaki, T.Maruyama, K.Yoshimoto, Y.Tsutsumi, R.Narazaki, A.Fukuhara, U.Kragh-Hansen, M Otagiri. Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect of the neutral-to-base transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1432(2):313-323, 1999

ChuangVTG, A.Kuniyasu, H.Nakayama, Y.Matsushita, S.Hirono, M.Otagiri. Helix 6 of subdomain III A of human serum albumin is the region primarily photolabeled by ketoprofen, an arylpropionic acid NSAID containing a benzophenone moiety. *Biochim. Biophys. Acta* 1434:18-30, 1999

T.Imai, M.Taketani, T.Suzu, K.Kusube, M.Otagiri. In vitro identification of the human cytochrome P-450 enzymes involved in the N-demethylation of azelastine. *Drug Metab. Disp.* 27:942-946, 1999

M.Otagiri, T.Imai, A.Fukuhara. Improving the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of a drug by chemical conversion to a chimera drug. *J. Control. Release* 62:223-229, 1999

T.Sakai, T.Maruyama, T.Sako, S.Ahmed, X.Zuidema, S.Fujiyama, M Otagiri. Stereoselective serum protein binding of ketoprofen in liver diseases. *Enantiomer* 4:477-482, 1999

T.Imai, S.Shiraishi, M.Otagiri.

A Strategy for the immediate-release of indomethacin from a sustained-release preparation using a chitosan hydrolysate

S.T.P. Pharm.Sci., 10,57-62,2000

C.Kawasaki, R.Nsihi, S.Uekihara, S.Hayano, M.Otagiri.

Charcoal hemoperfusion in the treatment of phenytoin overdose

Am.J.Kidney Dis., 35(2), 323-326,2000

小田切優樹、今井輝子

新・ドラッグデリバリーシステム 永井恒司（監） pp123-135

シーエムシー、 2000.1

H. Nomiya, S. Fukuda, M. Ito, S. Tanase, R. Miura, O. Yoshie

Organization of the chemokine gene cluster on human chromosome 17q11.2

containing the genes for CC chemokine MPIF-1, HCC-2, HCC-1, LEC, and RANTES.

J. Interferon & Cytokine Res. 19: 227-234 1999

H. Nishiura, S. Tanase, Y. Sibuya, T. Nishimura, T. Yamamoto

Determination of the cross-linked residues in homo-dimerization of S19 ribosomal protein concomitant with exhibition of monocyte chemotactic activity.

Lab. Investigation 79(8): 915-923 1999

K.Etoh, K.Yamaguchi, S.Tokudome, T.Watanabe, A.Okayama, S.Stuver, N.Mueller, K.Takatsuki, M.Matsuoka.

Rapid quantification of HTLV-I provirus load: detection of monoclonal proliferation of HTLV-I infected cells among blood donors.

Int.J.Cancer 81,859-864, 1999

K. Yamaguchi, T.Sawada, T.Naraki, R.Igata, Y.Horii, K.Ikeda, N.Asou,

H.Okabe, M.Mochizuki, K.Takahashi, S.Yamada, K.Kubo, S.Yashiki, R.Waltrip, K.Carbone.

Detection of Borna Disease Virus-reactive antibodies from patients with psychiatric disorders and from horses by electrochemiluminescence immunoassay.

Clin.Diag.Labo.Immuno. 6,696-700, 1999

N.Seki, K.Yamaguchi, A.Yamada, S.Kamizono, S.Sugita, C.Taguchi,



M.Matsuoka, H.Matsumoto, S.Nishizaka, K.Itoh, M.Mochizuki.  
Polymorphism of the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor  
(TNF)-alpha gene and susceptibility to human T-cell lymphotropic virus type  
I (HTLV-I) uveitis.  
J.Inf.Dis. 180,880-883,1999.

K.Yamaguchi, T.Sawada, S.Yamane, S.Haga, K.Ikeda, R.Igata, K.Yoshiki,  
M.Matsuoka, H.Okabe, Y. Horii, Y.Nawa, RW.Waltrip, K.Carbhone.  
Synthetic peptide-based electrochemiluminescence immunoassay for measuring  
of  
anti-Borna Disease Virus p40 and p24 antibody in rats and horse sera.  
Annals Clin. Biochemistry. in press 2000.

武本重毅, 山口一成 HTLV-IとATL 血液フロンティア 9: 11-16, 1999

山口一成 輸血の副作用. 臨床と研究 76: 46-49, 1999

山口一成 ヒトTリンパ向性ウイルスI型  
広範囲 血液 尿化学検査 免疫学的検査—その数値をどう読み込むか—  
日本臨床 増刊 第5版 369-371 1999

山口一成 各種造血器腫瘍治療におけるインターフェロン療法の役割  
成人T細胞白血病 リンパ腫  
血液.腫瘍科 39: 278-283, 1999

山口一成 輸血により感染する主要な感染性合併症  
輸血による感染を血液センターへ通知する必要性 輸血医学 金芳堂  
p173-177、2000

山口一成 HTLV-I抗体 これだけは知っておきたい検査のポイント (第6集)  
Medicina 36: 520-523, 1999.

山口一成、松岡雅雄 成人T細胞白血病／リンパ腫  
悪性リンパ腫—疾患単位の確立と層別化治療  
別冊医学のあゆみ 医歯薬出版 112-115、2000

N. Takamune, S. Misumi, K. Furuishi, and S. Shoji  
Blockage of HIV-1 production through inhibition of proviral DNA synthesis by  
N,O-didecanoyl serinal dimethylacetal.

*IUBMB Life*, **48**: 1-5 (1999)

H Terazaki , Y Ando, S Misumi , M Nakamura , E Ando , N Matsunaga , S Shoji ,  
M Okuyama , H Ideta , K Nakagawa, T Ishizaki , M Ando , MJ Saraiva MJ  
A novel compound heterozygote (FAP ATTR Arg104His/ATTR Val30Met) with  
high serum transthyretin (TTR) and retinol binding protein (RBP) levels.  
*Biochem Biophys Res Commun*, **264**(2), 365-70 (1999).

S. Misumi, M. Tomonaga, K.oukma, K.Kuroki, and S. Shoji.  
Suicide-inhibition of HIV-1 protease (PR) by its final processing p2 peptide is an  
important means of self-defense against the decay of viral particle.  
6th CCGH Symposium, Abstracts, 98 (1999).

K.Fukuzawa ,Y.Inokami , J. Terao Membrane localizations of carotenoids and a-tocopherol and  
their antioxidant properties for singlet oxygen. In "Phytochemicals and phytopharmaceuticals" (eds.  
Shahidi F., and Ho C. -T.) 175-184 (1999).

K. Fukuzawa Singlet oxygen scavenging in phospholipid membranes. *Methods in Enzymology*  
"Singlet oxygen, UV-A and ozone" (eds. Packer L., and Sies H.) 319, 101-110 (2000).

## 2.学会発表

今井輝子、井上勝央、小田切優樹  
エーテル結合挿入による2-フェニルプロピオン酸の立体選択的体内動態の変化  
「モレキュラー・キラリティー1999」 1999.5 仙台

M. Otagiri, K. Fujii, T. Imai  
Pharmacokinetic Study on Reduction of Nephrotoxicity of Cisplatin by Alginate Complexation  
2nd Refrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference 1999.5 Florida

渡邊博志、棚瀬純男、丸山徹、小田切優樹  
部位特異的変異法によるヒト血清アルブミン分子上の薬物結合サイトのトポロジー解析：  
Arg-410、Try-411の機能検索  
第50回蛋白質構造討論会 第11回日本蛋白工学会年会 1999.6 横浜

Chuang Tuan Giam、國安明彦、中山仁、松下泰男、広野修一、小田切優樹  
光アフィニティーラベル法によるヒト血清アルブミン分子上のケトプロフェン結合部位  
のトポロジー解析  
第50回蛋白質構造討論会 第11回日本蛋白工学会年会 1999.6 横浜

川崎知世、西玲子、小田切優樹

薬物中毒における血液浄化法（活性炭吸着法）の治療効果：蛋白結合率と分布容積を指標として

第14回日本薬物動態学会年会 1999.10 浜松

下石一樹、甲斐広文、加峰弘毅、小森高文、小田切優樹

免疫抑制剤タクロリムス（FK506）の $\alpha$ 1-酸性糖蛋白質誘導に関する遺伝子制御機構

第14回日本薬物動態学会 1999.10 浜松

高田英宣、神園涼香、今村順茂、小田切優樹

ラットに存在する20 $\beta$ -hydroxysteroid Dehydrogenaseのケトン薬物の還元的代謝への関与

第14回日本薬物動態学会 1999.10 浜松

松元一明、今井輝子、小田切優樹

Caco-2細胞単層膜およびIn vivo小腸における吸収促進剤としての胆汁酸の効果

第14回日本薬物動態学会 1999.10 浜松

堤泰寛、出口恒夫、丸山徹、高館明、小田切優樹

尿毒症物質 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid(CMPF) の臓器分布と取り込み阻害能について

第14回日本薬物動態学会 1999.10 浜松

Chuang Tuan Giam、國安明彦、中山仁、小田切優樹

光アフィニティラベル法によるヒト血清アルブミン上の薬物結合部位のマイクロ環境解析

第27回構造活性相関シンポジウム 1999.11 米沢

渡邊博志、棚瀬純男、丸山徹、小田切優樹

部位特異的変異法によるヒト血清アルブミン分子上の薬物結合サイトのトポロジー解析：Arg-410及びTyr-411の機能検索

第21回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 1999.11 岡山

安楽誠、山崎啓之、丸山徹、小田切優樹

ヒト血清アルブミンの構造と機能に及ぼす酸化の影響II：種々の酸化処理法による比較検討

第21回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 1999.11 岡山

西弘二、小嶺嘉男、丸山徹、小田切優樹

$\alpha_1$ -酸性糖蛋白質 (AGP) の構造特性に及ぼす各種アルコールの影響  
第21回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 1999.11 岡山

河合恵一、高村徳人、西井龍一、横田崇、陣之内正史、長町茂樹、有森和彦、田村正三、  
小田切優樹

蛋白結合置換による放射性医薬品の動態制御 (6) 脳機能診断薬<sup>123</sup>I-IMPに関する検討  
日本薬学会第120年会 2000.3 岐阜

小田切優樹、渡邊博志、松下貞治、西弘二、末永綾香、倉田徳章、小林智  
新規抗癌剤UCN-01のヒト  $\alpha_1$ -酸性糖蛋白質分子上の結合サイとの同定  
日本薬学会第120年会 2000.3 岐阜

中城圭介、渡邊博志、棚瀬純夫、丸山徹、小田切優樹  
ヒト血清アルブミン上の薬物結合サイとのトポロジー解析II.サイトIについて  
日本薬学会第120年会 2000.3 岐阜

原田大輔、内藤真策、原田久美子、小田切優樹  
In vitroにおけるN-アセチル-L-システインと血漿アルブミンの共有結合に関する速度論的  
解析  
日本薬学会第120年会 2000.3 岐阜

瓜生幸恵、堤泰寛、高村徳人、丸山徹、小田切優樹  
フロセミドの体内動態に及ぼすブコロームの影響  
日本薬学会第120年会 2000.3 岐阜

中村三喜雄、堤泰寛、丸山徹、小田切優樹  
尿毒症物質Indoxyl sulfateの腎臓への取り込みに硫酸基は関与するか？  
日本薬学会第120年会 2000.3 岐阜

堤泰寛、出口恒夫、末永綾香、小田切優樹  
尿毒症物質 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid(CMPF)は有機酸輸送系阻害  
剤として作用するか？  
日本薬学会第120年会 2000.3 岐阜

今村隆孝、棚瀬純男、林 泉  
好中球エラスターゼがキニノーゲンから産生するペプチドE-キニンの血管透過性亢  
進及び血圧効果作用とその機序  
生化学、71(8):1077 1999 (第72回日本生化学会大会)

西浦弘志、棚瀬純男、渋谷陽子、山本哲郎  
血漿中でプロトンピンと結合している S19 リボソーム蛋白  
生化学、71(8):1078 1999 (第72回日本生化学会大会)

渡邊 博志、棚瀬純男、丸山徹、小田切優樹  
部位特異的変異法によるヒト血清アルブミン分子上の薬物結合サイトのトポロジー解析；  
Arg-410,Tyr-411の機能検索  
蛋白工学会年会、1999 (第50回タンパク質構造討論会)

小岩 司、長井正江、山口一成、松岡 雅雄、渡邊 俊樹  
HTLVの潜伏感染におけるLTR のCpG メチル化の意義  
第58回日本癌学会総会 1999.9.29～10.1 広島

Ali Khan, 宮田 博規, 日野 茂男, 山口 一成  
Donryu ラットのボルナウイルス病抵抗性  
第47回日本ウイルス学会総会, 1989.11.7～9, 横浜

福本理作, 小岩 司, 松岡 雅雄, 山口一成, 渡邊 俊樹  
HTLV-I tax 不死化Tリンパ球のプログレーションにおけるPKC  $\beta$ ?の役割  
第47回日本ウイルス学会総会, 1999.11.7～9, 横浜

山口 一成, 沢田 高志, 榎木 徹, 井形るり子, 堀井洋一郎  
ヒト, 動物におけるボルナ病ウイルス (BDV) 感染-ECLIA法による血清疫学  
第47回日本ウイルス学会総会, 1999.11.7～9, 横浜

山口 一成, 沢田 高志, 榎木 徹  
ヒトにおけるボルナ病ウイルス (BDV) 感染  
-リコンビナント抗原を用いたECLIA法による血清診断の確立-  
第46回日本臨床病理学学会総会, 1999.11.10～12, 熊本

古石和親, 庄司省三  
HIV-1 gag タンパク質N-Myristoyl化のウイルスライフサイクルにおける役割  
日本生化学会九州支部例会プログラム抄録集, 42 (1999).

山口雅典, 三隅将吾, 橋岡臣, 加藤英夫, 古石和親, 松下修三, 向井鎌三  
郎, 庄司省三  
o, o'-Bismyristoyl thiamine disulfideのHIV-1 Tatに対する作用  
生化学, 71, 978 (1999). (第72回日本生化学会)

高宗暢暁, 三隅将吾, 古石和親, 庄司省三  
Zinc dithiocarbamate derivatives によるHIV-1感染阻害  
生化学, 71, 978 (1999). (第72回日本生化学会)

高宗暢暁, 朝長充則, 庄司省三  
HIV-1 p2 peptideによるHIV-1proteaseの自殺阻害機構に関する研究  
生化学, 71, 978 (1999). (第72回日本生化学会)

大隈浩一, 武内宏樹, 三隅将吾, 古石和親, 庄司省三  
抗HIV-1 p2 peptide単クローン抗体を用いたHIV-1 proteaseの自殺阻害機構の  
解析  
生化学, 71, 979 (1999). (第72回日本生化学会)

黒木一浩, 三隅将吾, 庄司省三  
レーザーマスを駆使したHIV-1ウイルス粒子中のタンパク分布  
生化学, 71, 978 (1999). (第72回日本生化学会)

菅原英輝, 古石和親, 三隅将吾, 庄司省三  
新しいN-myristoyltransferase (NMT)の活性測定法の検討  
生化学, 71, 1087 (1999). (第72回日本生化学会)

山口雅典, 鰐口和也, 三隅将吾, 橘園臣, 加藤英夫, 猪井俊敬, 松下修三,  
向井鎌三郎, 庄司省三  
チアミンジスルフィド化合物の抗HIV-1 活性及びHIV-1 Tatに対する作用  
第13回日本エイズ学会総会抄録集, 194 (1999)

大隈浩一, 三隅将吾, 朝長充則, 庄司省三  
HIV-1 proteaseの自殺阻害機構を基にした新規プロテアーゼ阻害剤の検索  
第13回日本エイズ学会総会抄録集, 195 (1999)

高宗暢暁, 林振一郎, 中島玲奈, 三隅将吾, 庄司省三  
Zinc dithiocarbamate derivativesによるHIV-1感染阻害とその作用機構の検討  
第13回日本エイズ学会総会抄録集, 194 (1999)

黒木一浩, 三隅将吾, 庄司省三  
HIV-1ウイルス粒子内タンパク質の質量分析  
第47回日本ウイルス学会学術集会総会抄録集, 243 (1999)

三隅将吾, 朝長充則, 大隈浩一, 庄司省三  
HIV-1 proteaseを自殺的に阻害する自己p2 peptideの酵素阻害作用  
第47回日本ウイルス学会学術集会総会抄録集, 270 (1999)

中島玲奈, 林振一郎, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三  
HIV-1 coreceptorに対する抗体作製のための基礎研究  
第16回日本薬学会九州支部大会講演要旨集, 41 (1999)

林振一郎, 中島玲奈, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三  
HIV-1 coreceptorの抗環状ドデカペプチド抗体の調製  
第16回日本薬学会九州支部大会講演要旨集, 42 (1999)

鰐口和也, 山口雅典, 三隅将吾, 庄司省三  
HIV-1 Tatをターゲットとした抗HIV剤の開発  
第16回日本薬学会九州支部大会講演要旨集, 48 (1999)

庄司省三, 林振一郎, 中島玲奈, 三隅将吾, 高宗暢暁, 遠藤昌文, 淵上貴  
司, 向井鎌三郎, 猪井俊敬, 橘囀臣, 加藤英夫  
HIV-1 coreceptor, CXCR4・CCR5, -based vaccineの開発  
第120回日本薬学会講演要旨集, (2000)

福澤健治, 井神靖季, 小暮健太郎, 徳村 彰, 寺尾純二, 鈴木 旭: リポソーム膜にお  
ける $\alpha$ -トコフェロールの存在様態と一重項酸素脱活性化: 第10回ビタミンE研究会 (札  
幌, 1999, 1)

福澤健治, 小暮健太郎, 徳村 彰, 柴田 瑩, 向井和男: スーパーオキシド依存性リポ  
ソーム膜脂質過酸化反応: 発ガン性鉄錯体Fe<sup>3+</sup>-NTAおよびFe<sup>3+</sup>-EDDAの過酸化誘導特  
性と膜荷電: 日本薬学会第119年会 (徳島, 1999, 3)

福澤健治, 小暮健太郎, 徳村 彰, 土屋浩一郎, 堤下靖之, 丹羽峰雄: LPSによるマウ  
スNO合成酵素の誘導に対する食餌性ビタミンEの影響: 日本薬学会第119年会 (徳島,  
1999, 3)

福澤健治, 小暮健太郎, 徳村 彰, 土屋浩一郎, 堤下靖之, 丹羽峰雄: 食餌性ビタミン  
EはLPSによるマウス肝NO合成酵素の誘導を増大する: 日本ビタミン学会第51回大会  
(静岡, 1999, 6)

小暮健太郎, 森田元喜, 真鍋華子, 徳村 彰, 福澤健治: コハク酸トコフェロールによ  
る血管平滑筋細胞死の機構解析: 第72回日本生化学会大会 (横浜, 1999, 10)

森田元喜、小暮健太郎、真鍋華子、徳村 彰、福澤健治：ラット血管平滑筋細胞におけるNO産生に対するビタミンEコハク酸誘導体の影響：第72回日本生化学会大会（横浜，1999，10）

徳村彰、四宮淳也、小暮健太郎、田中保、里内清 福澤健治：高度不飽和脂肪酸を有するリゾホスファチジン酸及びそのアセチル化物の血小板凝集活性：第72回日本生化学会大会（横浜，1999，10）

松島明美、松本満、小暮健太郎、福澤健治、吉村哲郎：PTIOの吸収スペクトルを利用した新たなNOの定量法：第72回日本生化学会大会（横浜，1999，10）

千川隆志、井形高明、加藤真介、浜田佳孝、小暮健太郎、福澤健治：ラット急性脊髄損傷後のNeurotrophin-3の発現動態と抗酸化剤の効果：第34回日本パラプレジア医学会（北九州，1999，11）

福澤健治： $\alpha$ -トコフェロール（ビタミンE）の膜内存在様態と抗酸化ダイナミクス：日本化学会中国四国支部第31回化学懇談会（徳島，1999，12）

Kenji Fukuzawa, Kentaro Kogure, Motoki Morita, Hanako Manabe, Akira Tokumura : Effect of vitamin E on inducible nitric oxide synthase expression in vivo and in vitro : 2nd International conference on food factors (Kyoto, 1999, 12)

Kentaro Kogure, Motoki Morita, Hanako Manabe, Akira Tokumura, Kenji Fukuzawa : Effect of vitamin E succinate on generation of nitric oxide in rat vascular smooth muscle cells stimulated with lipopolysaccharide and interferon-g : 2nd International conference on food factors (Kyoto, 1999, 12)

Akira Tokumura, Tuneki Sumida, Masaoki Toujima, Kentaro Kogure, Kenji Fukuzawa : Platelet-activating factor(PAF)-like oxidized phospholipids: relevance to atherosclerosis : 2nd International conference on food factors (Kyoto, 1999, 12)

福澤健治、小暮健太郎、真鍋華子、徳村 彰、土屋浩一郎、堤下靖之、丹羽峰雄：LPS投与によるマウス肝NO合成酵素誘導に対する食餌生ビタミンEの影響：第11回ビタミンE研究会（倉敷，2000，1）

徳村 彰、富永恭子、安田勝彦、小暮健太郎、福澤健治：卵巣癌患者血清リゾホスホリパーゼDによる生理活性リン脂質リゾホスファチジン酸の産生：第9回臨床生理活性脂質研究会（東京，2000，2）



小暮健太朗、森田元喜、真鍋華子、徳村 彰、福澤健治：トコフェロールコハク酸エステルによるアポトーシス誘導機構の解析：日本薬学会第120年会（岐阜, 2000, 3）

金谷由美、徳村 彰、小暮健太朗、北原真樹、田中作彌、福澤健治：高コレステロール食を与えたウサギの血清リゾホスホリパーゼD活性の変動：生理活性リン脂質リゾホスファチジン酸の産生亢進：日本薬学会第 120年会（岐阜, 2000, 3）

## **G.知的所有権の取得状況**

### **1.特許取得**

なし

### **2.実用新案登録**

なし

### **3.その他**

なし

厚生科学研究費補助金（高度先端医療研究事業）  
分担研究報告書

抗酸化能を有する組換えアルブミンの創剤設計  
—組換えアルブミンの調製と構造特性—

分担研究者 棚瀬 純男 熊本大学医学部 助教授

### 研究要旨

ヒト血清アルブミン(HSA)は出血性及び外傷性ショック時の循環血流量の是正、また肝硬変などのアルブミン合成能低下に伴う低アルブミン血症時の膠質浸透圧の改善をはじめとする種々の疾患に汎用されており、近代医療にとって欠かせない医薬品となっている。しかしながら、近年の血液不足及びHIV、クロイツフェルトヤコブ病等のウイルスやプリオン混入の危険性の問題から、血液に頼らない新しい生産法の確立が望まれている。本研究では、*Pichia pastoris*を用いたHSAの大量調製法を検討するとともに、作製したrHSAの構造特性について血漿由来のアルブミン(pHSA)と比較した。

### A.研究目的

近年、輸液や血液製剤によるHIV感染者や肝炎感染者等が増加しており、社会的にも大きな衝撃を与えている。血液製剤の中でも、ヒト血清アルブミン(HSA)は出血性及び外傷性ショック時の循環血流量の是正、また熱傷やネフローゼ症候群などのアルブミン漏失亢進及び肝硬変などのアルブミン合成能低下に伴う低アルブミン血症時の膠質浸透圧の改善等、種々の疾患に汎用されており、近代医療にとって欠かせない医薬品となっている。

元来、アルブミン製剤は原料血漿からの精製収率は高いものの、近年における国内献血量の減少を考えあわせると、現時点でのアルブミン製剤の国内自給の達成は極めて困難であると考えられる。また、アルブミン製剤は血液を原料とするため、HIV、肝炎及びクロイツフェルトヤコブ病原物質をはじめとする未知の有害なウイルスや夾

雑蛋白質の混入する可能性がきまとう。このような血液不足やウイルス混入等の危険性の問題を解決するために、現在、血液に頼らない新しい生産法の確立が望まれている。そこで本研究では、血漿由来のアルブミン(pHSA)に替わり得る、有効性と安全性を兼ね備えた組換えアルブミン(rHSA)の開発を最終目標とし、本研究ではrHSAを作製し、その基礎的検討を行った。

### B.研究方法

#### 1.組換え型HSAの発現ベクターの構築と精製

*Pichia pastoris*を用いたHSAの大量調製法を確立した。発現ベクターpHIL-D2のアルコールオキシダーゼ(AOX1)プロモーター下流にシグナル配列を含むHSAcDNAを挿入し構築した(pHIL-D2-HSA)。このベクターをメタノール資化能を有するピキア酵母GS115株の染色体上に挿入し、酵母を形質

転換後、96時間培養を行った。この系では、シグナル配列の働きにより培地上清に組換え型HSAが、高発現かつ高純度に分泌することが確認できた(Fig.1)。更に培地上清より60%の硫酸アンモニウム分画(pH 4.4)により濃縮、粗精製を行い、その後、ブルーセファロースCL-6Bに付し、最後に疎水性リガンドの除去のために活性炭による脱脂処理を行い精製を行った。SDS-PAGEによる結果から、組換え型HSAは天然型と同一の分子量で単一バンドを示した。

## 2. SDS-PAGE

SDS-PAGEは、10% (w/v) ポリアクリルアミドゲルを用いLaemmli法にしたがって行った。蛋白質の染色にはクマジーブリリアントブルーR-250を使用した。分子量マーカーとしては下記の蛋白質を用いた。 $\alpha$ -ラクトアルブミン (M.W. 14400)、ダイズトリプシンインヒビター (M.W. 20100)、カルボニックアンヒドラーゼ (M.W. 30000)、卵白アルブミン (M.W. 43000)、ウシ血清アルブミン (M.W. 67000)、ホスホリラーゼb (M.W. 94000) を用いた。

## 3. 組換え型HSAの構造及び構造安定性

### 3-1 CDスペクトル法

装置と方法-CDスペクトル測定は日本分光製J-720分光偏光計を使用して行ったモル楕円率( $[\theta]$ )はCD強度として現れる見かけの楕円率( $[\theta_{obs}]$ )と平均残基モル濃度(C)を用いて算出した。

### 3-2 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

各HSAを0.1Mリン酸緩衝液pH6.8に溶解後、凍結乾燥と重水への溶解を繰り返すことにより重水素置換した。 $^1\text{H}$ 共鳴周波数は500MHzで測定した。

### 3-3 免疫交差性(ELISA法)

Nunc社製のイムノプレートにpH7.4リン酸緩衝液に溶解した50mMのrHSA、pHSA溶液を50 $\mu\text{l}$ ずつ添加し4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩吸着させ

た。このプレートを50mM、pH7.4のトリス-塩酸緩衝液(TBS)で3回洗浄し、100 $\mu\text{l}$ の2%スキムミルク溶液(TBSに溶解)を添加後、2時間室温でインキュベートし、抗体の非特異的な吸着を防止した。0.1%のTween20を含有したTBS(Tween20-TBS)で3回洗浄し、Tween20-TBSで希釈した抗HSA抗血清(ウサギで作製)を50 $\mu\text{l}$ ずつ添加した。室温で2時間インキュベート後、Tween20-TBSで洗浄し、Tween20-TBSで5000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ウサギIgG抗体50 $\mu\text{l}$ を添加した。室温で1時間インキュベート後、50 $\mu\text{l}$ の基質溶液(400mg/ml o-フェニレンジアミン二塩酸塩、0.1%過酸化水素含有0.15Mクエン酸緩衝液(pH5.0))を添加し、室温で1時間インキュベートした。酵素反応の停止には2Mの硫酸を50 $\mu\text{l}$ 添加した。各サンプルは吸光度490nmで日本インターメッド社製のイムノミニNJ-2300を用いて測定した。

### 3-4 塩酸グアニジンによる安定性評価

塩酸グアニジン(GdnCl)を用いた変性実験においては、HSAが"all or none"型の変性を受けるものと仮定した。

### 3-5 示差走査熱量測定法(DSC法)

DSC法はMicroCal社MC-2示差走査熱量計を用いて行った。

## C. 研究結果

### 1. 組換え型HSAの構造特性

rHSAとpHSAの構造の同等性を証明するために、種々の手法を組み合わせて構造解析を試みた。高次構造の比較にはCDスペクトル、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル及び抗HSAポリクローナル抗体による免疫交差性を検討した。

#### 1-1 二次構造

Fig.2に今回作製したrHSAの遠紫外領域におけるCDスペクトルを示す。この領域のCDスペクトルは蛋白質の二次構造を反

映するものである。この図から明らかなようにrHSA、pHSAともにスペクトルは良く一致しており、rHSAはpHSAと同様の二次構造を保持しているものと思われた。

### 1-2 <sup>1</sup>H-NMRスペクトル

さらに、<sup>1</sup>H-NMRにより各々のHSAの立体構造特性の差異について検討した。Fig.3に示すように、両者は極めて類似したスペクトルパターンを示し、高次構造もほぼ同等であるものと推察された。

### 1-3 免疫交差性

抗HSAポリクローナル抗体による免疫交叉性をELISA法により評価した。Fig.4から明らかなように、rHSA、pHSAともに抗体濃度に依存した吸光度の減少が観察され、両者に差異は認められなかったことから、抗体の認識性、すなわち抗体認識部位における両者の構造はほぼ同様であるものと思われた。

## 2. 組換え型HSAの構造安定性

現在、pHSAはウイルス混入防止のために低温殺菌が行われていることに加え、保存性向上のためにオクタン酸ナトリウムやN-アセチル-L-トリプトファン等の安定化剤が添加されている。事実、熱量計等を用いた検討から、in vitroにおいてHSAは脂肪酸により安定化されることが知られている。従って、rHSAの臨床応用を考えた場合、生物学的、化学的性質に加え、安定性等の物理化学的特性の評価も必須と考えられる。上述のような観点に加え安定性の評価は、蛋白質のマクロな立体構造評価に汎用されており、近年、高感度かつ高性能な熱量計の登場により、示差走査熱量計(DSC)による構造評価は蛋白質化学の分野において急速に普及している。ここでは変性剤・塩酸グアニジンを用いた化学的変性とDSCを用いた熱変性を評価することにより、rHSAの構造安定性について検討を行った。

### 2-1 グアニジン変性による化学的安定性の評価

Table1には塩酸グアニジン(GdnCl)を用い $\alpha$ ヘリックスに起因する222nmのCDスペクトルをモニターすることにより化学的安定性の評価を行った結果を示す。GdnClは蛋白質の変性剤として汎用されており、蛋白質分子内で生じる水素結合の解除により、蛋白質分子内に埋もれている疎水性領域の露出度を増大させる。Fig.5に示すように、rHSAにおけるCD強度は、GdnCl濃度が1.5M付近から減少する"all or none"型を示し、GdnClによる変性過程は、二状態転移であることが示された。そこで、変性における自由エネルギー変化 $\Delta G$ を算出したところ、この $\Delta G$ とGdnCl濃度の間に良好な直線が得られ、この直線のy切片と傾きからそれぞれ $\Delta GH_0$ 及びmを算出した。ここで、mは未変性から変性状態への転移における無極性アミノ酸残基の溶媒への露出の程度、 $\Delta GH_0$ は純水中における未変性と変性状態の平衡における自由エネルギー変化、 $[GdnCl]_{1/2}$ は変性中点におけるGdnCl濃度を表す。rHSA、pHSAはともにいずれのパラメーターにおいても同様の値を示した。一般に、球状蛋白質の $\Delta GH_0$ は5~15kcal/mol程度と言われており、両HSAともに、その化学的安定性はやや低いながら、この範疇に入っており、化学的安定性の見地から、両者の分子内相互作用を主体とする立体構造に差異はないものと考えられる。

### 2-2 示差走査熱量計(DSC)による熱安定性の評価

DSCを用いた熱測定により、蛋白質変性に伴う熱の吸収を直接測定することで、蛋白質の"かたち"、すなわちドメイン構造、オリゴマー形成状態及びリガンド結合によるそれらの変化等に関する知見が得られる。