

このように熱測定は複雑な構造を持つ物質のマクロな立体構造の安定性、相互作用及びコンフォメーションについての多くの情報が得られるため、近年、その構造-機能相関の解明における重要性が認識され、急速に発展している方法である。そこで、DSCを用いてrHSA、pHSAの熱安定性の評価を試みた。その結果、約60°Cにシャープな単一のピークが観察された。Table2には、このピークから算出した各熱力学的パラメータを示す。熱転移温度 T_m 、およびDSCサーモグラム曲線下面積から算出される転移エンタルピー変化(ΔH_{cal})はrHSA、pHSAともに同様の値を示し、両者の熱安定性に差異はないものと思われた。

さらに転移過程の指標として用いられるvan't Hoffのエンタルピー変化(ΔH_vH)と ΔH_{cal} の比($\Delta H_vH/\Delta H_{cal}$)について検討した。一般に、 $\Delta H_vH/\Delta H_{cal}=1$ の時は分子全体が一挙に変性状態へ転移する二状態転移であることを意味し、 $\Delta H_vH/\Delta H_{cal}>1$ の時は転移挙動が一個の分子に止まらず他分子にも及んでいるもので、多量体のまま転移する場合等に見られる。一方、 $\Delta H_vH/\Delta H_{cal}<1$ の時は一種あるいはそれ以上の中間状態を含む多状態の転移を表し、ドメイン構造を持つ分子が各ドメインごとに異なった転移挙動を示す場合にこのような値が示される。Table 2に示すように、 $\Delta H_vH/\Delta H_{cal}$ 値はrHSA、pHSAともに3つのドメインが一挙に変性状態へ転移する二状態転移に近い値を示し、さらに両者の間に差異は観察されなかったことから、両者の熱変性の過程にも差異はないものと思われた。

このように、熱変性から算出したrHSA、pHSAの熱力学的パラメータは、両者ではほぼ等しく、立体構造を形成する分子内相互作用、疎水性等に差異はないものと推察された。さらに、両者の熱安定性の過程にお

いても差異はなく、両者のドメイン間相互作用は同様の形態をとり、かつコンパクトな構造を有しているものと思われた。

2-3 安定性に及ぼす脂肪酸の影響

次に脂肪酸及びアルブミン製剤で行われている低温殺菌の影響について検討を行った。脂肪酸は生体内においてHSAにより可溶化及び運搬されていると言われており、その結合定数の大きさから、生体内の脂肪酸はほとんどがHSAに結合しているものと思われる。生体内の脂肪酸は、主に長鎖脂肪酸であり、その存在比率は、オレイン酸、パルミチン酸、リノール酸、ステアリン酸の順である。さらに、脂肪酸は疾患時にその量が増加し、HSAに対して最高で5倍量にも増加すると言われている。Fig.6には化学的安定性についてのパラメータを示す。HSAに対しパルミチン酸ナトリウム及びオレイン酸ナトリウムを添加すると各パラメーターの上昇が見られ、化学的安定性の増大が観察された。さらに、現在アルブミン製剤に安定化剤として添加されているオクタン酸ナトリウム(OctNa)及びN-アセチル-L-トリプトファン(N-Ac-L-Trp)を添加すると、 ΔGH_{50} で約2倍の上昇が観察された。図には示していないが、HSAの安定性に対し、N-Ac-L-Trpはほとんど影響を与えておらず、このOctNaとN-Ac-L-Trp添加による安定性の上昇はOctNaに起因するものと思われた。一方、60°Cで10時間低温殺菌を行った場合、いずれのHSAも安定性を大きく失った状態にあることが確認されたものの、OctNa、N-Ac-L-Trp添加時においては、低温殺菌後も低温殺菌前の安定性を維持していることが示された。以上の結果はrHSA、pHSA双方で同様の挙動を示したことから、脂肪酸並びに低温殺菌による化学的安定性の変化に両者で差異はないものと思われた。さらに熱安定性について同様の検討を行った

(Fig.7)。脂肪酸の添加時において、 T_m 、 ΔH_{cal} ともに有意な上昇が観察された。また化学的安定性と同様、低温殺菌により、いずれのHSAも安定性を大きく失っていることが確認され、OctNa、N-Ac-L-Trp添加時においては、低温殺菌後も低温殺菌前の安定性を維持していることが示された。このように熱安定性に関しても、化学的安定性と同様、rHSA、pHSA双方で同様の挙動が観察された。

以上、低温殺菌による安定性の低下及び脂肪酸による安定性の向上が両HSAで同様の挙動を示したことは、脂肪酸の結合に伴う安定性向上を促すような構造変化においても、両者が同等の性質を有することを示唆しているものと思われる。

D. 考察

*Pichia pastoris*を用いたHSAの大量調製法を確立した。精製したrHSAの構造特性について、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。その結果、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。

rHSAの構造安定性について検討した結果、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。さらに、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。

以上、今回作製したrHSAの構造及び物理化学的特性は、ほぼpHSAと同一であることが確認され、rHSAはヒト肝細胞より分泌されたpHSAと同等な立体構造を形成することが強く示唆された。

E. 結論

*Pichia pastoris*を用いたHSAの大量調製法を確立した。精製したrHSAの構造特性について、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。その結果、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。また、化学的安定性、熱安定性についても、rHSA、pHSAともに同様の挙動を示し、両者に有意な差は観察されなかった。

F.研究発表

1.発表論文

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

2.学会発表

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
血漿中でプロトロンビンと結合している 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)

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

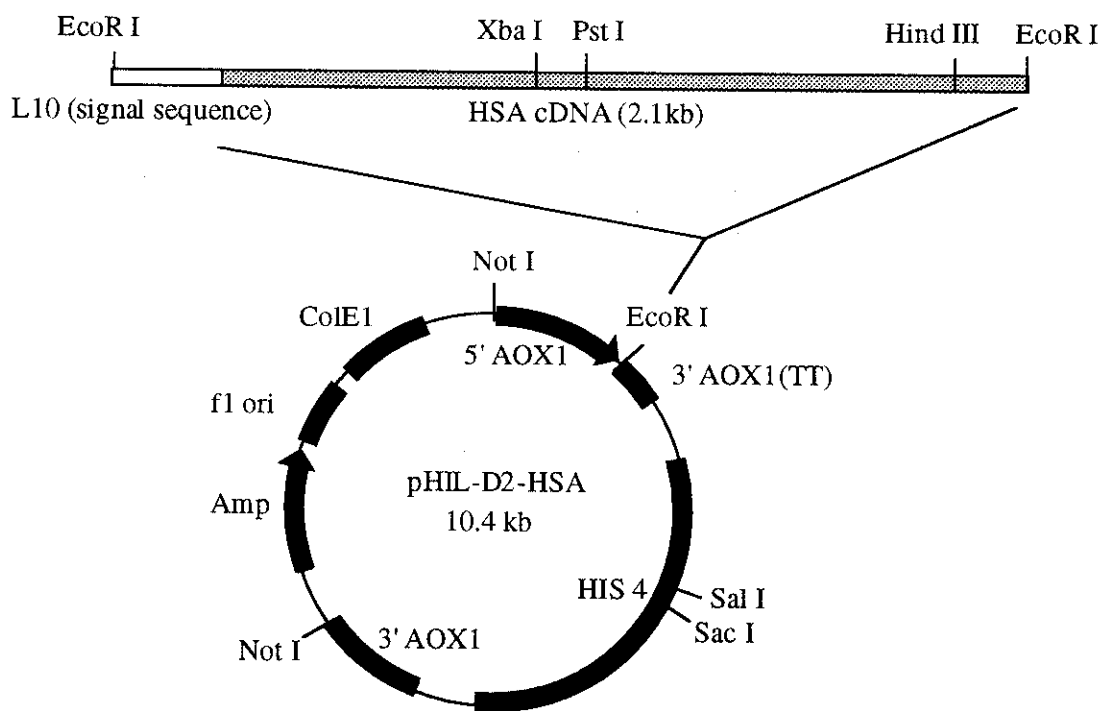


Fig. 1. Expression construct for the recombinant production of wild type and mutant HSA in *Pichia pastoris*

The hatched box indicates cDNA coding mature form HSA and the white box indicates a L10 signal sequence.

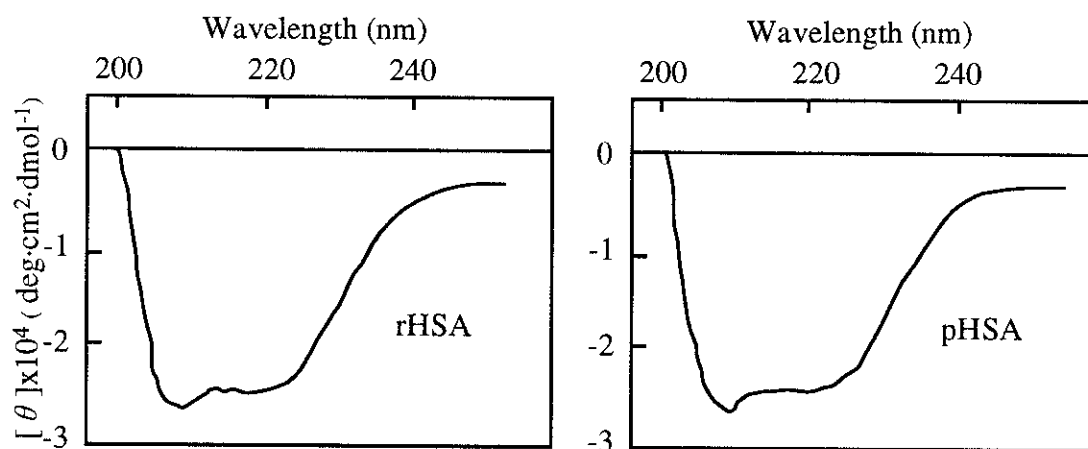


Fig.2. Far CD spectra of rHSA and pHSA in 0.067M phosphate buffer (pH7.4 and 25°C)

The following concentrations were used; [rHSA]=1μM, [pHSA]=1μM

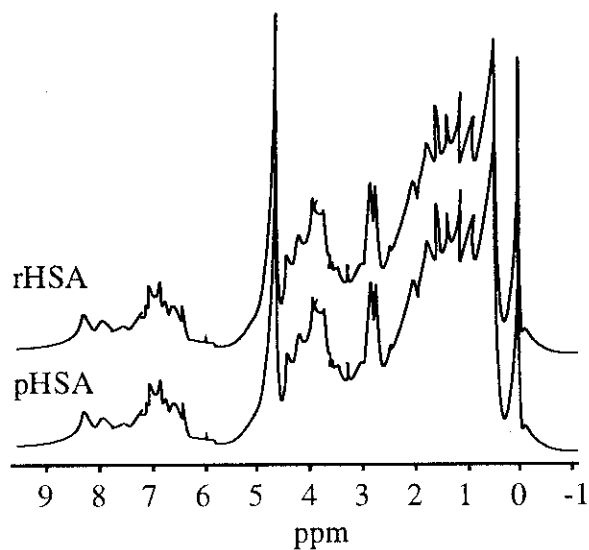


Fig.3. 500MHz ¹H-NMR spectra of rHSA and pHSA

Conditions for 1D spectra were: pulse width 30°(45μs), relaxation delay 2.0s, acquisition time 2.490s, spectral width 12ppm, data points 32K, 128transients, temperature 298K

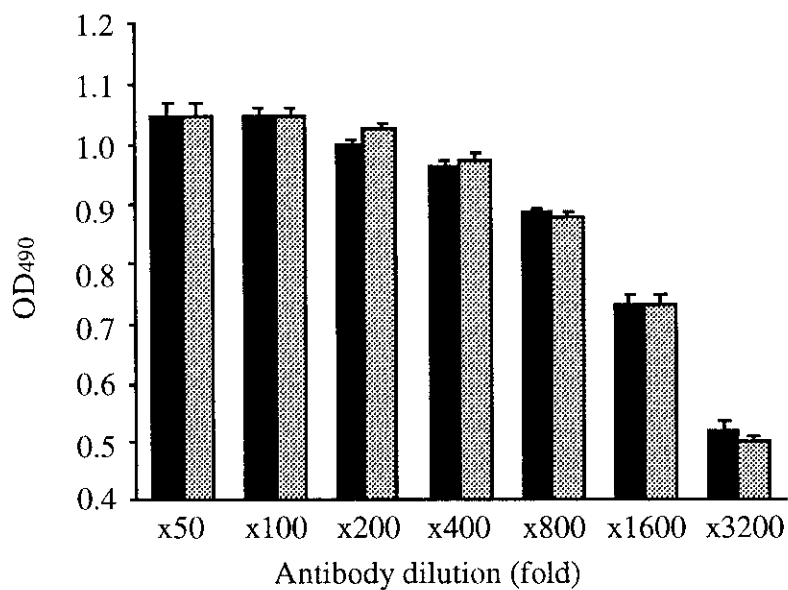


Fig.4. Cross reactivity of the anti-HSA polyclonal antibody with rHSA and pHSA

■ ; rHSA, ▨ ; pHSA
All values are mean ± SD(N=3).

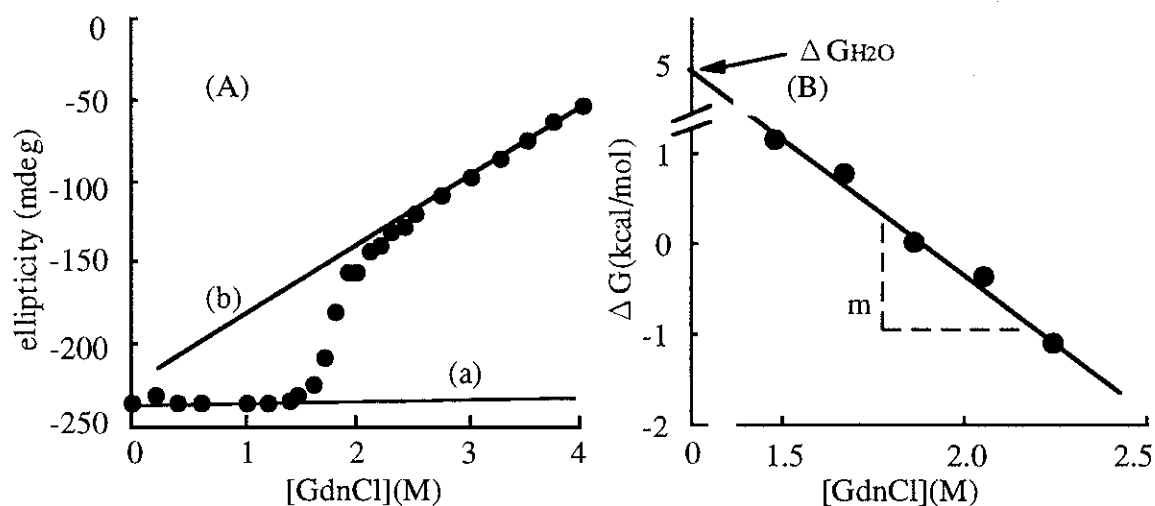


Fig.5. Effect of GdnCl on the ellipticity of rHSA(A) and Gibbs free energy change (ΔG) (B) in GdnCl induced denaturation

(a) and (b) were CD intensities in transition region of native and denatured rHSA, respectively

ΔG_{H_2O} and the slope of linear denaturation plot(m) were calculated from the intercept and slope of graph (B), respectively

Table 1. Thermodynamic parameters estimated by CD for the guanidium hydrochloride denaturation of rHSA and pHSA at pH 7.4 and 25°C

	m (kcal/mol/M)	ΔG_{H_2O} (kcal/mol)	$[GdnCl]_{1/2}$ (M)
rHSA	2.47 ± 0.09	5.24 ± 0.26	2.08 ± 0.08
pHSA	2.63 ± 0.12	5.03 ± 0.19	1.92 ± 0.11

All values are mean \pm SD(N=3).

Table 2. Thermodynamic parameters estimated by DSC for the thermal denaturation of rHSA and pHSA at pH 7.4 and 25°C

	T _m (°C)	ΔHcal(x10 ⁵) (cal/mol)	$\frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H_{cal}}$
rHSA	59.7 ± 0.08	1.48 ± 0.01	0.67 ± 0.03
pHSA	59.7 ± 0.09	1.51 ± 0.01	0.68 ± 0.05

All values are mean ± SD(N=3).

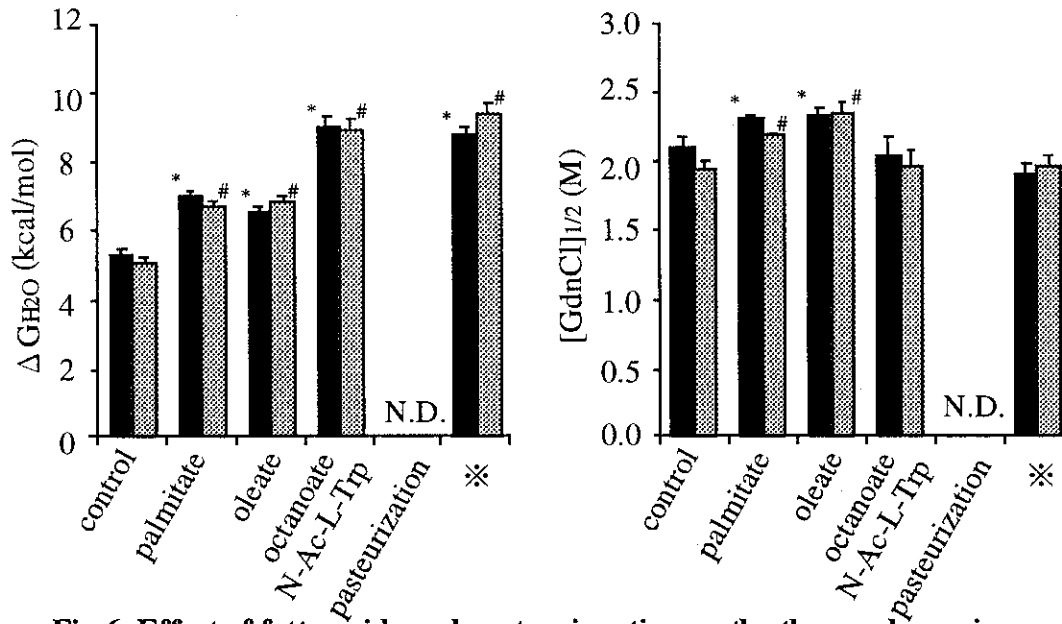


Fig.6. Effect of fatty acids and pasteurization on the thermodynamic parameters estimated by CD for the guanidium hydrochloride denaturation of rHSA and pHSA

■ ;rHSA ▨ ;pHSA , Pasteurization; 60°C 10hours incubation

N.D.; not detected. Significantly different vs. each control *p<0.001; #p<0.001

※; Octanoate and N-Ac-L-Trp were added before pasteurization

All values are mean ± SD(N=3).

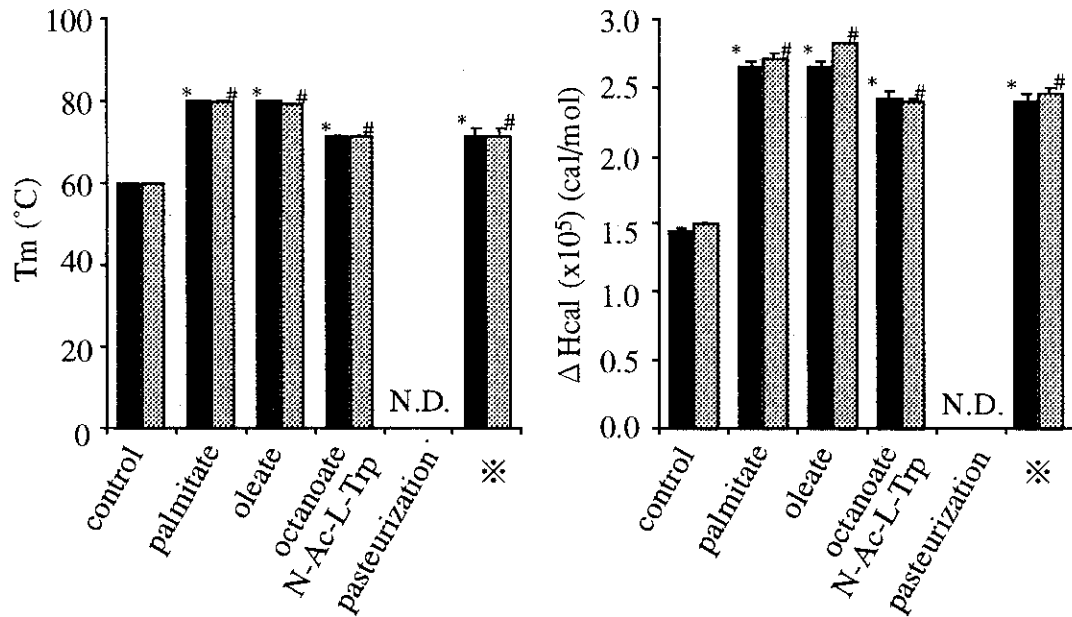


Fig.7. Effect of fatty acids and pasteurization on the thermodynamic parameters estimated by DSC for the thermal denaturation of rHSA and pHSA

■ ; rHSA ▨ ; pHSA , Pasteurization; 60°C 10hours incubation
 N.D.; not detected. Significantly different vs. each control *p<0.001; #p<0.001
 ※; Octanoate and N-Ac-L-Trp were added before pasteurization
 All values are mean ± SD(N=3).

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機能性評価—

分担研究者 山口 一成 熊本大学医学部付属病院 講師

研究要旨

ヒト血清アルブミン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、近年の血液不足及びHIV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。そこで本研究では、遺伝子組換え技術により作製したrHSAについて、薬物結合特性、エステラーゼ類似作用、さらに、¹²⁵Iラベル体を用いたラットでの動態特性をpHSAと比較し、rHSAの機能特性を評価した。

A.研究目的

現在、血漿由来のアルブミン(以下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安定化剤が添加されている。このため、組換え型アルブミン(以下rHSA)の臨床応用を考えた時、生物学的、化学的性質の評価は必須と考えられる。そこで今回我々は、遺伝子組換え手法により精製したrHSAについて薬物結合特性及び¹²⁵I-rHSAのラットでの体内動態についてpHSAと比較検討した。

B.研究方法

1. 組換え型HSAの薬物結合特性 (蛍光スペクトル法)

装置と方法—蛍光スペクトルは日本分光製FP-770型分光蛍光光度計を用いて、励起側、発光側の分光器のスリット幅は実験条件に応じて5nm、10nmに設定して測定した。スペクトルの補正は和光純薬工業社製分光蛍光光度用ローダミンB試薬を使用して行った。また、プローブの蛍光スペクトルは以

下の条件で測定した。

励起波長：ワルファリン(320nm), DNSA及びDNSS(350nm) 蛍光波長：ワルファリン(350～450nm), DNSA及びDNSS(400～600nm)

2. エステラーゼ類似作用

(p-ニトロフェニルアセテートの加水分解)

p-ニトロフェニルアセテートの加水分解速度定数(kobs)は加水分解後に生成するp-ニトロフェノールを400nmの吸光度でモニターすることに擬一次速度定数として、直線の傾きから算出した。

3.HSAの体内動態

3-1 HSAの¹²⁵I-ラベル化法(クロラミンT法)

HSA(1mg/ml)5μlに、0.4Mリン酸緩衝液pH7.5を85μl、Na¹²⁵I10μl(1mCi)加えインキュベート後、30秒毎に3回に分けて3.8mMクロラミンTを10μlずつ添加した。90秒後に2.5mMNa₂S₂O₅を100μl添加し反応を停止した。反応液は直ちにセファデックスG-25カラムにのせ、ゲル濾過によってヨウ素標識

HSAと未反応の Na^{125}I とを分離した。比活性は、約 $200 \times 10^6 \text{cpm}/\mu\text{g}$ であった。

3-2 HSAの動態

ラットに ^{125}I -rHSA及び ^{125}I -pHSAを約 $500 \times 10^6 \text{cpm}/\text{匹}$ (HSAとして $20 \text{mg}/\text{kg}$)頸動脈内投与した。ヘパリン処理した毛細管で規定時間毎に尾静脈から $20 \mu\text{l}$ 採血し、 3000rpm で10分遠心分離し、血漿 $10 \mu\text{l}$ を採取し、その放射活性をオートウェルガンマーカウンター(アロカ製、ARC-2000)にて測定した。最終サンプリング時間では、下大静脈を切断し放血致死させ、組織を摘出した後重量を秤量し、各組織の放射活性をオートウェルガンマーカウンター(アロカ製、ARC-2000)にて測定した。

C. 研究結果

1. 組換え型HSAの薬物結合特性及びエステラーゼ類似作用

生体内において、HSAは多くの内因性及び外因性のリガンドと結合して、それらの輸送担体として機能している。HSA分子上のサイトIやサイトIIと言われるような薬物結合サイトの存在は、薬物間相互作用と言う観点からも非常に重要である。また、不斉炭素を持つ薬物によっては、立体選択的な結合特性を示すものがあることから、アルブミン結合の立体選択性は、薬物動態学的にも重要である。HSAが持つその他の機能として、エステラーゼ類似作用がある。これまでの化学修飾等による検討から、このエステラーゼ類似作用の活性残基はサイトIIに位置する411位のチロシン残基であると言われている。未だその生理学的な意義は不透明であるが、HSAのもつこのような機能は、興味深いものである。ここでは、rHSA及びpHSAの薬物結合特性について、蛍光プローブを用いた蛍光置換実験、立体選択性及びN-B転移の影響を比較検討し、

結合サイトの微環境についての評価も行った。また、エステラーゼ類似作用についても比較検討した。

1-1 蛍光置換実験

HSA分子上のサイトIに特異的に結合する蛍光プローブとしてワルファリン、サイトIIに特異的に結合する蛍光プローブとしてダンシルサルコシンを用いrHSAの薬物結合特性についての検討を行なった(Fig.1)。図に示すように、ワルファリンは同じサイトI結合薬物であるフェニルブタゾン、アセノクマリンによって置換され、またダンシルサルコシンはサイトII結合薬物であるイブプロフェン、ジアゼパムによって置換された。この結果はpHSAと同様であり、rHSA分子上の薬物結合サイトの存在様式はpHSAと同様である可能性が示唆された。

1-2 立体選択性

次に、立体選択的な薬物結合特性について、これまでにHSAとの結合に立体選択性があることが知られているワルファリン、フェンプロクマン、プラノプロフェン、イブプロフェンを用いて検討を行った(Fig.2)。図から明らかのように、rHSA、pHSAともに同様の立体選択性を示し、薬物結合の立体選択性にも、両者の間に差異はないものと思われた。この結果からも、両HSA間での結合サイトの同等性が推察された。

1-3 結合サイトの疎水性評価

生体高分子のリガンド結合サイトの疎水性を評価する場合、しばしばその尺度としてKosowerの提唱したZ値が利用される。仮に、リガンドと血清蛋白質分子の疎水領域との相互作用の程度が、単純にリガンドの水相と疎水相との分配にのみ依存するとすれば、蛋白質分子上の薬物結合領域について、その疎水性の程度をZ値を用いて表現することが可能となる。Turnerらは種々の溶媒中での1-アニリノナフタレン-7-スルホ

ン酸(1,7-ANS)の蛍光極大波長(λ_{\max})のシフトが溶媒のZ値で示した極性度にかなりよく依存する現象に着目し、20種類の蛋白質の1,7-ANS結合サイトのZ値を見積もっている。今回、この評価法をHSAに適用して、ダンシル-L-アスパラギン(DNSA:サイトI蛍光プローブ)とダンシルサルコシン(DNSS:サイトII蛍光プローブ)結合サイトの疎水性を評価した。まず、各種有機溶媒、緩衝液及びHSA溶液の蛍光スペクトルを測定した後、これら溶液中における蛍光プローブの λ_{\max} を溶液のZ値に対してプロットした。その結果、Fig.3に示すようにDNSAの種々の溶媒中における蛍光極大波長の疎水性の尺度であるZ値と λ_{\max} の間に良好な相関性が認められた。そこで、rHSA、pHSA分子上のDNSAのZ値を見積もったところ、いずれも71となり、DNSAはアセトニトリルと同程度の疎水性を保持した結合領域に結合していることが推察された。同様な検討をDNSSを用いて行い、それらの結果をTable1にまとめた。表から明らかのように、2種類のプローブから算出したZ値はそれぞれ異なったことから、各プローブの結合領域の疎水性環境は異なる可能性が示唆された。このZ値はrHSA、pHSA間に有意な差異が観察されなかったことから、各結合サイトにおける各プローブの結合様式は同様であると思われた。

1-4 結合サイトの微粘性

各種生体膜の流動性及び秩序性の比較は、膜に取り込んだ蛍光プローブの蛍光偏光度を微粘性というパラメーターに変換し、この比較によって行われている。Fig.4に示すように、DNSAを用いた場合、蛍光偏光度と粘度の間には良好な相関性が認められた。図には示していないが、DNSSにおいても良好な相関が観察された。これを回帰直線として、HSA結合サイトの微粘性(η)を見

積もった。得られた結果をTable 2に示す。その結果、rHSAのサイトI、サイトIIにおける微粘性は、pHSAに比べ若干の減少が観察された。この結果は、rHSA、pHSA間での結合サイトの微環境の若干の違いを示唆しているものと考えられる。すなわち、rHSAではプローブ分子の運動性が若干増大するような、結合ポケット内のわずかな立体構造上の差異が存在する可能性が示唆された。

1-5 薬物結合特性に及ぼすN-B転移の影響

pHSAはpH6~9にかけてpH依存性のコンフォメーション変化、いわゆるN-B転移を引き起こすことが知られている。一般に、このコンフォメーション変化に伴い、サイトIにおけるリガンドの結合性は大きく変化することから、その結合サイトの構造は柔軟(flexible)であると考えられる。一方、サイトIIにおいて、pH変化に伴うリガンド結合性の変化は小さいことから、その構造は堅固(rigid)であると推察されている。従って、結合性に及ぼすpHの影響について検討することは、その結合サイトのマイクロ環境解析につながるものと考えられる。そこで、rHSAのN-B転移に伴う薬物結合性の変化をワルファリンとダンシルサルコシンを用いて検討した(Fig.5)。この図から明らかのように、rHSAとpHSAの各pHにおける結合率はワルファリン、ダンシルサルコシンともに傾きが1の良好な相関性を示し、薬物結合サイトに及ぼすN-B転移の影響に両者の間で差異はないものと思われる。一般にN-B転移は、ヒスチジン残基のプロトンの解離によって引き起こされると考えられており、今回示した結果は、これらN-B転移を引き起こす諸因子においても、両者に差異がない可能性を示唆している。

1-6 エステラーゼ類似作用

Table3にHSAが保持する機能の一つであるエステラーゼ類似作用について、p-ニトロフェニルアセテート(NPA)を基質として検討した結果を示す。NPAの加水分解はScheme 2に示す反応式に従い進行する。HSA非存在下での加水分解速度定数(k_0 ; $2.29 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$)に対し、rHSA並びにpHSA存在時における加水分解速度定数(k_{obs})はそれぞれ約104倍(rHSA; $1.39 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$, pHSA; $1.41 \times 10^{-1} \text{s}^{-1}$)であった。この結果に両者での差異はほとんど観察されなかったことから、活性残基と言われているサイトII内の411位のチロシン残基周辺の環境に両者の間で差異はないものと思われた。

2. 組換え型HSAの動態学的特性

rHSAの臨床応用を考えた場合、その体内動態の検討は必須である。ここでは ^{125}I 標識したrHSAをラットに静脈内急速投与し、血漿中濃度推移、分布、排泄をpHSAを対照に検討した。

2-1 ^{125}I -ラベル体の体内動態

Fig.6に ^{125}I -rHSA及び ^{125}I -pHSAをラットに静注後の投与量に対する比放射活性の血漿中濃度推移を示す。図に示すように、その減衰過程はrHSA、pHSAともに2相性を示し、消失相(β 相)から算出した半減期($t_{1/2}$)は各々約30時間であった。Table4には ^{125}I -rHSA及び ^{125}I -pHSAを投与96時間後の各組織の K_p 値を示す。また、96時間後の尿及び糞中への放射能の累積排泄率をTable5に示す。全ての組織中で K_p 値は1を下回っており、どの臓器にもほとんど分布せず、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。なお、これらの結果は、対照のpHSAと有意な差は観察されなかった。

D. 考察

rHSAの薬物結合特性及びエステラーゼ

類似作用について検討した。結合サイトの微粘性において若干の違いは観察されたものの、蛍光置換実験、立体選択性及びN-B転移に伴う結合特性の結果から、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。また、エステラーゼ類似作用について、両HSAがともに同程度の活性を示したことから、その活性残基と言われている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。加えて、二つのHSAの動態特性は全く同じであり、組換え型アルブミンの安定性が裏付けられたものと考えられる。

E. 結論

以上、今回作製したrHSAの機能は、ほぼpHSAと同一であることが確認された。本研究で構築された遺伝子組換え技術を基に、その主要酸化部位と考えられるArg-218、521及びHis-146、242のミュータントを作製し、その抗原性、動態特性等を検討することが、医学的有効性に優れたアルブミン製剤の開発につながるものと考えられ、今後、これらの課題に取り組む予定である。

F.参考文献

1.論文発表

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.Carbhone.

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, R.W.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
悪性リンパ腫一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

2.学会発表

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ッションにおけるPKC β ?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回日本臨床病理学会総会, 1999.11.10~12, 熊本

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

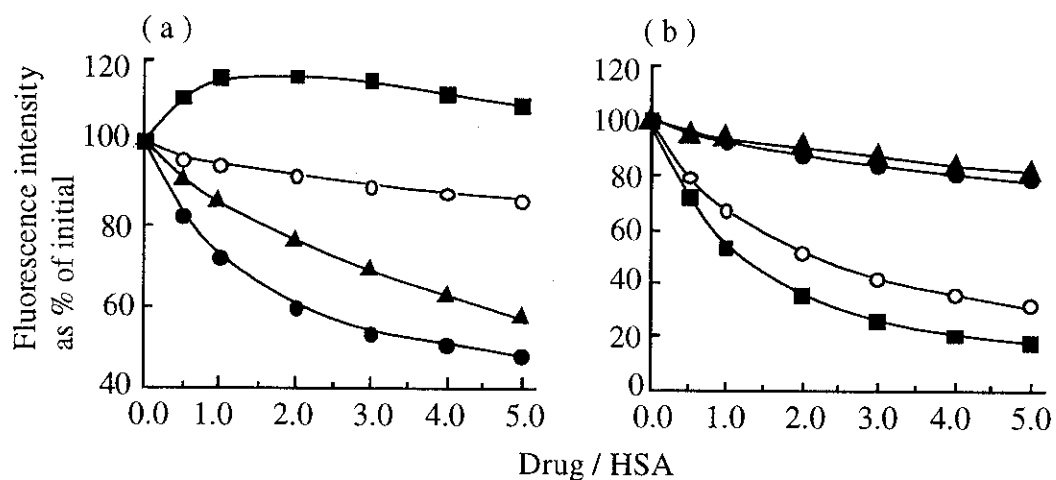


Fig.1. Effect of displacing drugs on fluorescence of rHSA-warfarin (a), -dansylsarcosine (b) systems at pH 7.4 and 25°C

The displacing drugs used in this experiment were phenylbutazone (●), acenocoumarin (▲), ibuprofen (■), diazepam (○).

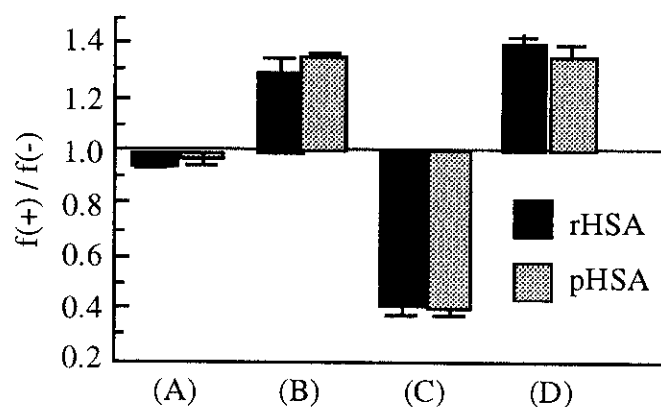


Fig.2. Enantiometric free fraction ratios ($f(+)/f(-)$) of warfarin (A), phenprocoumon (B), pranoprofen (C), ibuprofen (D) to rHSA and pHSA

All values are mean \pm SD (N=3).

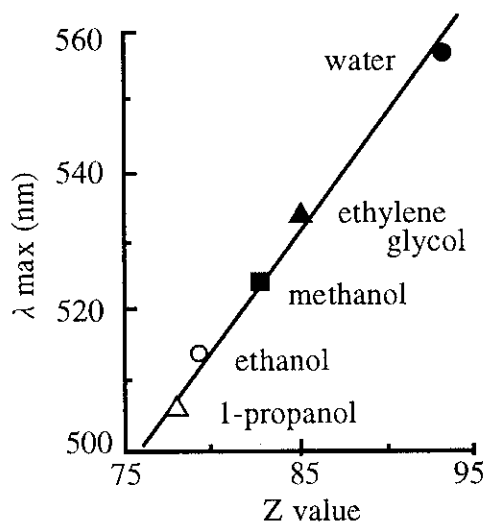


Fig.3. Relationship between Z value and the maximum emission wavelength of DNSA in various solvents

Table 1. Z value of binding sites of rHSA and pHSA as determined by different probes at pH 7.4

probe	Z value	
	rHSA	pHSA
DNSA ^(a) (site I)	71.0 ± 0.1	71.0 ± 0.1
DNSS ^(b) (site II)	66.3 ± 0.3	65.8 ± 0.4

(a) dansyl-L-asparagine

(b) dansylsarcosine

All values are mean ± SD(N=3).

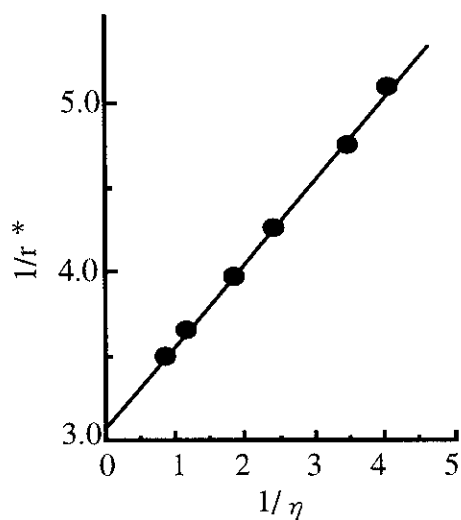


Fig.4. Correlation between medium viscosity (η) and DNSA fluorescence anisotropy (r) in glycerin

*

fluorescence anisotropy

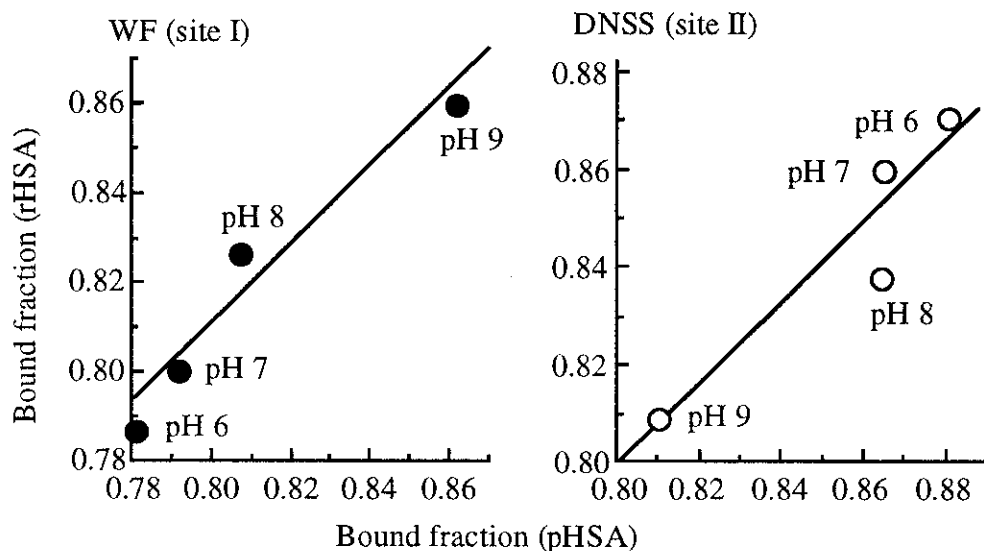
Table 2. Microviscosity of binding sites of rHSA and pHSA as determined by different probes at pH 7.4

probe	$\bar{\eta}$ (cp)	
	rHSA	pHSA
DNSA ^(a) (site I)	282.3 ± 5.3	300.6 ± 6.1
DNSS ^(b) (site II)	264.9 ± 3.5	285.1 ± 2.8

(a) dansyl-L-asparagine

(b) dansylsarcosine

All values are mean ± SD(N=3).



WF (site I) : $BF_{rHSA} = 1.0388 \times BF_{pHSA} - 0.0409$ ($r = 0.9424$)

DNSS (site II) : $BF_{rHSA} = 1.0582 \times BF_{pHSA} - 0.0375$ ($r = 0.9348$)

Fig.5. Correlation between bound fractions of different probes to pHSA and rHSA at various pH

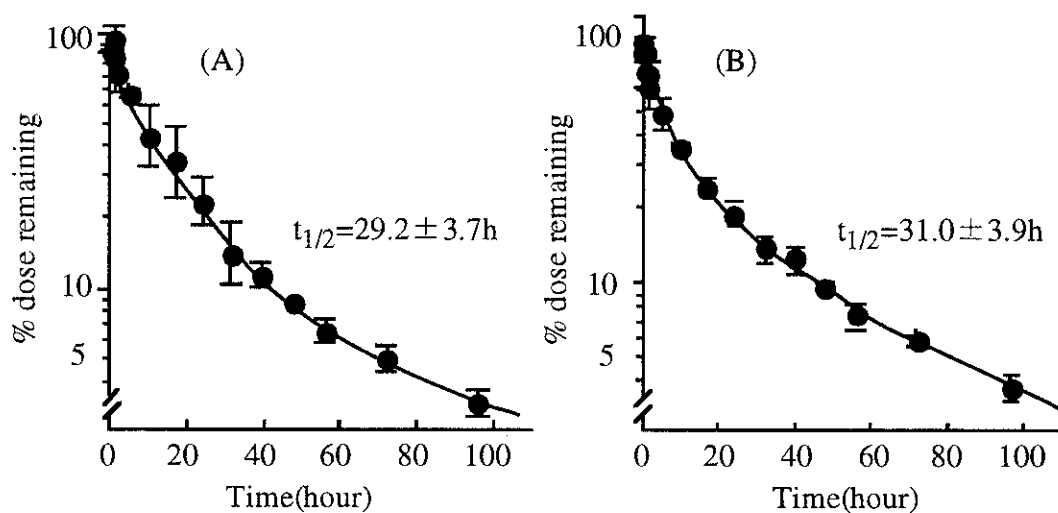
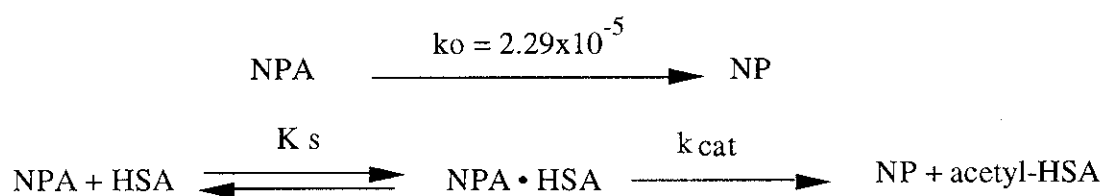


Fig.6. Plasma levels of ^{125}I -rHSA (A) and ^{125}I -pHSA (B) after IV administration to rats

Rats were injected with either ^{125}I -rHSA or ^{125}I -pHSA (5.0×10^6 cpm, 20mg/kg)
All values are mean \pm SD(N=3).



Scheme 1. Reaction mechanism of *p*-nitrophenylacetate(NPA) with HSA

Table 3. First order hydrolysis rate constants (k_{obs}) of NPA at pH 7.4 and 25°C

	$k_{\text{obs}} (\times 10^{-1} \text{ sec}^{-1})$
rHSA	1.39 ± 0.05
pHSA	1.41 ± 0.06

All values are mean \pm SD(N=3).

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
—酸化アルブミンの調製と構造特性—

分担研究者 庄司 省三 熊本大学薬学部 教授

研究要旨

酸化的ストレス、加齢、種々の病態下において、活性酸素種産生と生体の抗酸化作用のバランスが崩れることにより、生体内高分子が酸化的修飾を受け、構造と機能に変化が生じて生体内寿命が短縮されることが知られている。ヒト血清アルブミン（HSA）もまた、フリーラジカル酸素による酸化が報告されている。したがって、疾病や老化に伴い、HSAの酸化反応が進行すると、自身の体内挙動が影響を受けるだけでなく、キャリアー蛋白としての機能の変化に伴い結合リガンドの体内動態にも大きな影響を及ぼすことが予想される。そこで、HSAを金属触媒酸化(MCO-HSA)に加え、クロラミン-T(CT-HSA)及び過酸化水素(H₂O₂-HSA)処理により酸化し、調製した三種の酸化HSAの構造特性を未処理HSAと比較検討した。酸化HSAの修飾特性について検討した結果、H₂O₂-HSA及びCT-HSAではメチオニン残基(Met)の効率的な酸化が示唆された。また、MCO-HSA及びCT-HSAでは、アルギニン(Arg)やヒスチジン(His)のような塩基性アミノ酸残基に加え、トリプトファン(Trp)の修飾が示唆された。酸化に伴うHSAの立体構造変化を評価した。CDスペクトル測定の結果、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H₂O₂-HSAではコットン効果に大きな変化は見られず、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、未処理HSA及びH₂O₂-HSAでは協同的な熱変性パターンを示したが、MCO-HSA及びCT-HSAでは転移エンタルピーの減少が観察されることより、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。

A. 研究目的

O₂依存性のアミノ酸の酸化は酸化の方法、すなわち、発生してくるラジカルの種類やアミノ酸の性質によって異なってくる。最近では、それら酸化生成物の構造特性も明らかにされてきている。例えば、酸素分子

存在下、Argは、OHにより、5-ヒドロキシ-2-アミノバレリル酸へ、TrpやHisはOHにより、それぞれN-フォルミルキヌレニンや2-オキシヒスチジンへ変換されることが報告されている。また、ウシ血清アルブミン(BSA)、ヘモグロビン、ミオグロビンでは、