

OHにより、プロリン(Pro)が酸化され、ペプチド鎖のフラグメント化を生じることも知られている。In vitroで蛋白質を酸化する際、放射線照射で蛋白質を酸化させる方法や、アスコルビン酸、酸素存在下、過量の銅や鉄など遷移金属の触媒で発生したラジカル酸素で蛋白質を酸化させる金属酸化法はよく知られている。ところが、これらの方法は蛋白質を過度に酸化する結果、蛋白の断片化や多量体化を引き起こす。しかしながら、in vivoにおける酸化反応の律速はこれらの高次な酸化過程ではなく、より初期の段階における反応過程であると考えられる。

そこで、我々は緩和な条件下で三種の酸化HSA(MCO-、CT-、 $H_2O_2$ -HSA)を調製し、その修飾特性を各種手法を用いて検討した。また、種々の蛋白質において、酸化修飾に伴い構造変化が生じることが報告されている。例えば、in vitroにおいてHuman relaxinのHisやMetが酸化される結果、この蛋白質の凝集及び沈殿が起こる。またin vivoにおいても老化ラットから単離したCalmodulinではMetの酸化により大きく構造が変化することが知られている。しかしながら、酸化蛋白質の構造変化に関する系統だった検討はあまり行われておらず、ましてやその機構については殆ど明らかにされていない。このような現状のもと、酸化に伴うHSAの構造変化を詳細に検討するために、種々の手法を組み合わせることで構造解析を試みた。高次構造の比較にはCDスペクトル、示差走査熱量計(DSC)、抗HSAポリクロナール抗体による免疫交差性を検討した。また、構造変化に伴う分子表面の疎水性の露出度は疎水領域検索蛍光プローブを用いて評価した。

## B.研究方法

### 1.試料

HSAは化学及血清療法研究所から恵与されたものをChenらの方法にしたがって脂肪酸を除いた。脱脂後透析し、SDS-PAGEで単一バンドであることを確認した後に使用した。その平均分子量は66,500と仮定した。

### 2.HSAの酸化

金属触媒酸化HSAの調製はMeucciらの方法(ascorbate/oxygen/trace metal系)にしたがって調製した。すなわち、0.3mM脱脂HSAと100mMアスコルビン酸を50mM Tris緩衝液(アジ化ナトリウム含有)に溶解後、好氣的条件下、37°Cで6、12、24、48、72、108、144hrインキュベートした。各時間反応後のサンプルを1mM DTPA(diethyl-enetriaminepentaacetic acid)で処理後、50mM Tris緩衝液及びイオン交換水で透析後、凍結乾燥を行った。クロラミン-T処理酸化HSAの調製はGarnerらの方法に準じて以下のように行った。0.3mM脱脂HSAと10mMクロラミン-Tを1/15Mリン酸緩衝液に溶解後、好氣的条件下、37°Cで15min、30min、1、5、10hrインキュベートした。各時間反応後のサンプルを $Na_2S_2O_3$ で処理後、1/15mMリン酸緩衝液及びイオン交換水で透析後、凍結乾燥を行った。過酸化水素処理酸化HSAの調製はGarnerらの方法に準じて行った。0.3mM脱脂HSAと200mM過酸化水素を1/15Mリン酸緩衝液に溶解後、好氣的条件下、37°Cで1、6、12、24インキュベートした。各時間反応後のサンプルをアセトンで処理後、1/15mMリン酸緩衝液及びイオン交換水で透析後、凍結乾燥を行った。いずれの反応時間のHSAもSDS-PAGE上単一バンドであることが確かめられた。

### 3.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。

#### 4 酸化の程度 (カルボニル含量の算出)

カルボニル含量はClimentらの方法にしたがって行った。カルボニル呈色試薬 Fluoresceinamineの蛋白質当たりの修飾量として表した。

#### 5.酸化体の修飾特性

##### 5-1.酸化HSAのメチオニン修飾

臭化シアンがMet残基特異的に切断することを利用し、Native-及び酸化HSAをDTT (ジチオスレオール) でジスルフィド結合を切断し、Met: CNBr=1:200の比で24hr反応させ、SDS-PAGEで評価した。

##### 5-2.酸化HSAの塩基性アミノ酸残基修飾

キャピラリー電気泳動法は、日本分光製 CE990/990-10型キャピラリー電気泳動ユニットを用い測定を行った。

##### 5-3.酸化HSAのトリプトファン修飾

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、励起波長を275nm および295nmに設定し、300~400nmにおける蛍光を測定した。

#### 6.酸化HSAの構造特性

##### 6-1 CDスペクトル

CDスペクトルは日本分光製 J-600分光偏光計を使用して測定した。なお、誘起CDスペクトルはアルブミン-リガンド結合系のスペクトルから、アルブミン固有スペクトルを差し引いた、差スペクトルとして評価した。また、モル楕円率 ( $[\theta]$ ) はCD強

度として現れる見かけの楕円率 ( $\theta_{obs}$ ) と結合濃度 (C) を用いて以下の式にしたがって算出した。

##### 6-2 示差走査熱量測定法 (DSC法)

DSCは、MicroCal社製MC-2示差走査熱量計を使用して測定した。

##### 6-3 疎水領域検索蛍光プローブによるHSA分子表面の疎水性評価

疎水領域検索蛍光プローブである1,1-ビス-4-アニリノ-ナフタレン-5,5-ジスルホン酸(Bis-ANS)を用いて酸化HSAの表面における疎水性の評価を試みた。Bis-ANSの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、励起波長を394nmに設定し、400~600nmにおける蛍光を測定した。

##### 6-4 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native-、酸化HSAを50 $\mu$ Mずつ添加し4°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 $\mu$ 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 $\mu$ lずつ添加した。室温で2時間インキュベーション後、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 $\mu$ lを添加した。室温で1時間インキュベーション後、50 $\mu$ lの基質溶液 (400MG/ml o-フェニレンジアミン2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時間インキュベーションした。酵素反応の停止には2Mの硫酸を50 $\mu$ 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。

## C. 研究結果

### 1. 酸化HSAのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

三種酸化HSAに対するSDS-PAGEの実験結果から、いずれの酸化体においても67kDa付近に単一バンドが認められた。このことから、いずれのサンプルにおいても断片化及び多量体化は起こっていないことが確かめられた (Fig.1)。

### 2. 酸化の程度

多くの場合、蛋白質の酸化はカルボニル含量の増大を伴う。そこで、本実験条件で調製されたHSAがどの程度酸化されているのか確認するために、まずカルボニル含量を測定した。MCO-HSA及びCT-HSAでは、酸化時間に伴って著しいカルボニル含量の増大が認められた。対照的に $H_2O_2$ -HSAではカルボニル含量の有意な増大は観察されなかった (Fig.2)。

### 3. 酸化体のアミノ酸修飾特性

#### 3-1 メチオニン(Met)残基の酸化

Met残基もまた酸化を受ける代表的なアミノ酸の一つである。このMet残基の酸化の度合いは、臭化シアンがMet残基で特異的に切断するが、メチオニンスルホキサイド(Metsox)では切断できない性質を利用して調べた(Scheme 1)。各酸化HSAの結果をFig.3に示す。 $H_2O_2$ -HSA及びCT-HSAでは未修飾HSAに比べ断片化が抑えられていた。このことは、これら二種の酸化体においてMetsoxが生成されていること、すなわち、Met残基が効率的に酸化していることを意味している。一方、MCO-HSAの場合は未修飾-HSAと類似した反応性を示していた。したがって、MCO-HSAでは他の二種とは異なり、Met残基の酸化の可能性は低いも

のと考えられる。

#### 3-2 塩基性アミノ酸残基の酸化

三種の酸化HSAの分子表面の荷電状態をキャピラリー電気泳動法 (CE法) を用いて検討した。その結果、未修飾HSAに比べて、MCO-HSA及びCT-HSAにおいてはCEの移動度は遅延していた(Fig.4)。このことは、酸化に伴いMCO-HSA及びCT-HSAにおいて、アルブミンの分子表面の実効電荷がより負に帯電したためと解釈される。すなわち、分子表面の実効電荷が負に帯電する場合、負の電荷を有するアミノ酸残基が分子表面に増える場合と逆にアミノ酸の陽電荷が消失する可能性が考えられる。酸化によりアニオン化するアミノ酸は今のところ同定されていないことと、すでに報告されている酸化タンパク質のアミノ酸修飾の結果を考え合わせると、MCO-HSA及びCT-HSAで観察された実効電荷の負への帯電はArg、His等の塩基性アミノ酸残基が酸化され陽電荷を失ったためと推察された。対照的に $H_2O_2$ -HSAでは未修飾HSAと同様の移動度を示したことから、電荷を有するアミノ酸残基は $H_2O_2$ 処理であまり大きな影響を受けていないものと思われた。

#### 3-3 トリプトファン(Trp)残基の酸化

HSAはその分子中の214番目に唯一のTrpを有している。このTrpもまた酸化されやすいアミノ酸残基のひとつであることから、Trp214の酸化を、HSA固有の蛍光をモニターして調べた。その結果、MCO-HSA及びCT-HSAにおいて、Trp214の蛍光は極大波長を短波長シフトし減少した (Fig.5)。この結果は、Trp自身が酸化されているか、もしくはそれを取り巻くマイクロ環境が変化し、Trpが発蛍光性を示しにくい環境に置かれているためと解釈される。時間分解蛍光スペクトル法によりTrp214の蛍光特性は異なった寿命を有する二つの成分によって

近似されることが知られている。したがって、酸化に伴うTrp由来の固有蛍光変化は長い寿命を有する蛍光成分の選択的消光に起因しているのかもしれない。このことを明らかにするためにも、今後、時間分割蛍光法を用いた検討が必要である。一方、 $H_2O_2$ -HSAでは、固有蛍光スペクトルの変化はほとんど認められていないことから、酸化反応によるTrp自身あるいはそれを取り巻く微環境変化の可能性は低いものと思われる。

#### 4. 酸化HSAの構造特性

##### 4-1 CDスペクトルによる測定

まず、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、二次構造及び三次構造変化を調べた。その結果、MCO-HSA及びCT-HSAの遠紫外領域で観察されたコットン効果は未修飾HSAのそれに比べ若干減少していたものの、完全変性状態とは明らかに異なり、かなりの部分の $\alpha$ ヘリックスを保持していることが明らかとなった。一方、近紫外領域の負のコットン効果は未変性状態に比べ、著しく減弱化し、変性状態のそれと類似していた(Fig.6)。このことから、MCO-HSA及びCT-HSAの立体構造はネイティブな二次構造が部分的に保持されているものの、三次構造は崩れた状態にあるものと推察された。興味深いことに、これら酸化HSAの構造特性はHiroseらが報告しているジスルフィド結合還元BSAや膜水相界面で観察されたBSAのそれ、すなわち、モルテングロビュール様状態における構造特性と類似していた。対照的に、 $H_2O_2$ -HSAの場合は、未修飾HSAと類似したCDスペクトルを示し、大きな構造変化が生じていないことが判明した。

##### 4-2 示差走査熱量計 (DSC)

蛋白質の変性に伴う熱吸収は蛋白質分子の高次構造破壊時の熱変化である。したがっ

て、変性における熱量を直接測定できるDSCは蛋白質分子の立体構造を予測する上で、熱力学量を直接測定できるため、蛋白質の構造研究に極めて重要な知見を与えるものと考えられている。そこで、本研究においてもHSAの各種酸化体のDSCを測定し、それらの立体構造を熱力学的観点から検討した。Fig.7に酸化HSA及び未修飾HSAのDSCサーモグラムを、またTable 1にそれより得られた熱力学的パラメータを示す。DSCでは変性が起こる温度付近では、変性反応に要する熱を蛋白質が余分に吸収するため、比熱が通常よりも大きくなる。その結果、HSAのように秩序だった立体構造を有する場合にはシャープな単一の吸熱ピークを示す。ところが、MCO-HSA及びCT-HSAの場合、未修飾HSAに比べ熱転移温度( $T_m$ )が若干減少した上、吸熱ピークの著しいブロード化が生じていた。また、ピーク面積から算出される転移エンタルピー変化も減少していた(Table 1)。このことから、これら二つの修飾体では酸化反応により秩序だった立体構造が崩壊し、不安定な状態になっていることが示唆された。一方、 $H_2O_2$ -HSAでは、吸熱ピークのピーク高が若干の減少しているものの、基本的には未処理HSAのサーモグラムと同様なパターンを示した。さらに、転移状態の指標となるvan 't Hoffのエンタルピー変化(DHvH)とDHcalの比(DHvH/DHcal)を検討したところ、Table 1に示すように $H_2O_2$ -HSAでは未処理HSAと類似した値が算出された。対照的に、MCO-HSA及びCT-HSAにおいてDHvH/DHcalが減少していることが明らかになった。一般に、DHvH/DHcal=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、DHvH/DHcal>1は転移挙動が1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ようなケースに認められる。対照的にDHvH/DHcal<1の場合は1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観察されることがある。したがって、MCO-HSA及びCT-HSAで観察されたDHvH/DHcalの減少は酸化に伴いHSAの立体構造に大きな変化が生じ、ドメインごとに熱転移を起こすようになったためと推察された。しかしながら、本実験で調製したMCO-HSA及びCT-HSAは、酸化の程度が異なる分子種も若干混在していることから、この影響がDHvH/DHcal比の減少につながった可能性も否定できないものと考えられた。

## 5.酸化HSAの疎水性評価

一般に、蛋白質が酸化されると、初期の段階ではカルボニル含量が増加するためか、一般に親水性が増加する傾向にある。ところが、さらに酸化反応が進行していくと、構造変化により、分子内部に埋もれていた疎水領域が分子表面に露出してくるようになる。前述した実験結果から、MCO-HSA及び、CT-HSAにおいてもHSA分子内部の疎水領域が表面に露出している可能性が示唆された。そこで、疎水領域検索蛍光プローブである1,1-ビス-4-アニリノ-ナフタレン-5,5-ジスルホン酸（以下bis-ANS）を用いて酸化HSAの表面における疎水性の評価を試みた。Fig.8から明らかなように、MCO-HSA及びCT-HSAにおけるbis-ANSの蛍光スペクトルは極大波長の短波長シフトを伴い増大した。このことから、MCO-HSA及びCT-HSAの分子表面の疎水性は未修飾体に比較して増加しているものと推察された。また、酸化に伴う蛍光特性の変化から、HSAの酸化は、bis-ANS結合の増加のみならず、各結合サイトの疎水性増大にまで関与している可能性が示唆された。

対照的に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAにおいてはこれまでの構造変化の検討結果と同様、疎水性の増大は観察されなかった

## 6.免疫交差性

蛋白質の立体構造変化を評価する方法の一つとして抗体による認識性が汎用されている。これまでの実験結果から、MCO-HSA及びCT-HSAでは立体構造変化が生じている可能性が高いことから、抗体認識性においても未修飾HSAと異なることが予想される。そこで、抗HSAポリクロナール抗体を用いて酸化HSAの免疫交叉性をELISA法により評価した。Fig.9から明らかなように、未修飾HSA及び酸化HSAともに抗体濃度に依存した吸光度の減少が観察された。また予想に反し両者間に有意な差異が認められなかったことから、抗体認識部位の構造はあまり酸化による影響を受けていないものと思われた。今後、この点に関してはさらに認識部位の異なった種々のモノクロナール抗体を用いた検討が必要である。

## D.考察

本研究結果から、MCO-HSA及びCT-HSAにおいて、酸化反応に伴う立体構造の変化が判明した。まず、CDスペクトルの測定結果から、未修飾HSAに比べこれら酸化HSAの二次構造は多くの部分が保持されているものの、三次構造は崩れた状態にあることが推察された。熱変性挙動や疎水領域検索プローブに対する反応性の増大から、これら酸化体では酸化反応に伴い内部に埋もれていた疎水領域が溶媒に露出し、生体膜あるいはレセプターとの相互作用に好都合なものと考えられた。現段階では、酸化に伴いどのアミノ酸残基が溶媒に露出ようになったのか、あるいはどの $\alpha$ ヘリックスが露出するようになるのかは明らかで

はない。この点に関しては、今後、疎水領域に対するアフィニティラベル化を行ったり、部位特異的変位法により各 $\alpha$ ヘリックスにTrpを転移させたミュータントをそれぞれ作製し、その蛍光特性変化を調べることにより同定されてくるものと思われる。

X線結晶構造解析の結果から明らかなように、アルブミン分子は $\alpha$ ヘリックスセグメントがセグメント間で相互作用し、サブドメインを構成単位としてさらに三つのドメインが形成されている。ネイティブ状態ではこれら三つのドメインがパッキングしてheart-shaped構造をとり、ドメイン同士が機能発現の際コミュニケーションをとっていると考えられている。これらの知見をもとに、MCO-HSA及びCT-HSAの立体構造を推測すると、各酸化HSAでも $\alpha$ ヘリックスセグメント単位での構造ユニットは保護されているものの、ドメイン間あるいはサブドメイン間のパッキング力が減弱化し、分子状態がほぐれた状態にあるものと思われた(Scheme 2)。対照的にH202-HSAではこのような構造変化は生じていないことが強く推察された。このことを先のアミノ酸の修飾特性の結果と考え合わせると、アルブミン分子の場合、他の蛋白質での報告とは異なり、メチオニン残基の選択的酸化はこのようなドラマチックな構造変化を伴わない可能性が示唆された。この差異について、これらの限られた情報では明らかにすることはできないが、一つの原因としてはアミノ酸残基の酸化修飾の違いに起因しているかもしれない。

## E. 結論

各種分光学的方法や熱分析法などを駆使して、酸化に伴うHSAの立体構造変化を評価した。MCO-及びCT-HSAの立体構造はネイティブな二次構造の大部分が保持されて

いるものの、三次構造は崩れた特殊な状態にあるものと推察された。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。また、MCO-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された。

## F.研究発表

### 1.論文発表

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 CGGH Symposium, Abstracts, 98 (1999).

古石和親, 庄司省三

HIV-1 gagタンパク質N-Myrisyol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, 橋園臣, 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, 橘圀臣, 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)

## 2.学会発表

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, 橘園臣, 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)

## **G.知的所有権の取得状況**

### **1.特許取得**

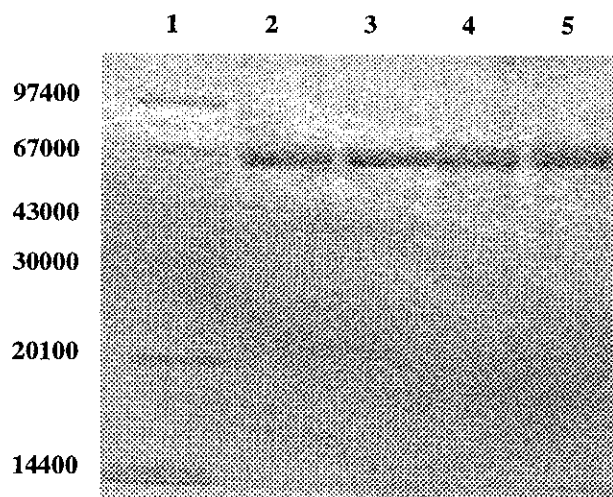
なし

### **2.実用新案登録**

なし

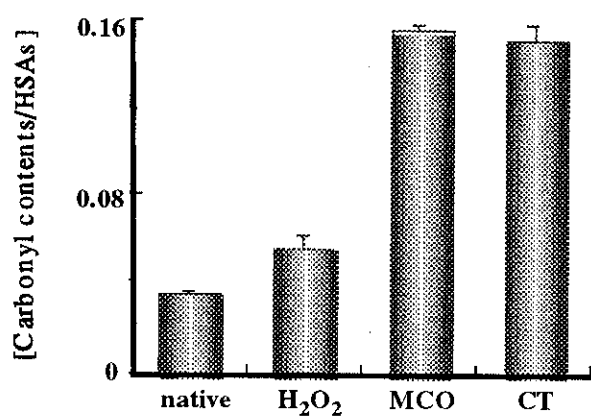
### **3.その他**

なし



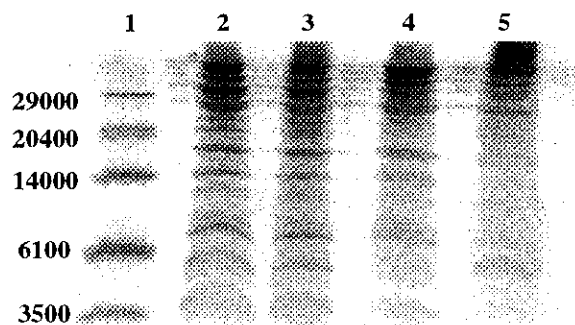
**Fig.1 SDS-PAGE of native and oxidized HSAs**

1, molecular marker; 2, native-HSA; 3, HSA treated with metal catalyzed oxidation for 144hr; 4, HSA treated with chloramine-T for 10hr; 5, HSA treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12hr.



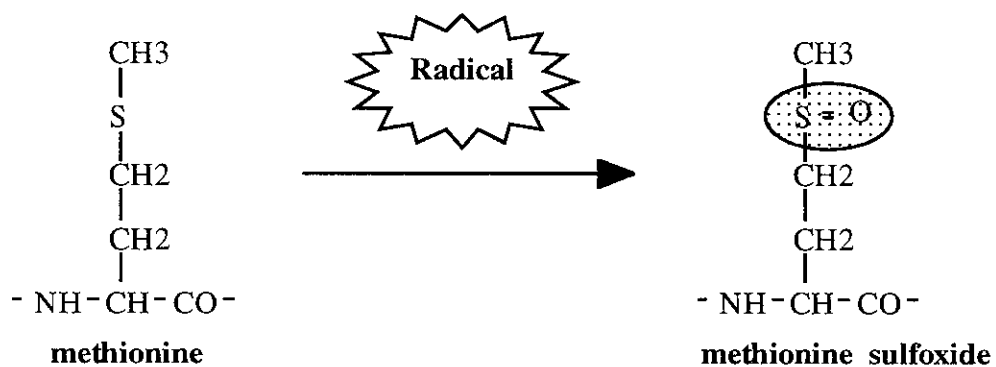
**Fig.2 Change in carbonyl contents of HSA by oxidants**

MCO; HSA treated with metal catalyzed oxidation for 144hr, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; HSA treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12hr, CT; HSA treated with chloramine-T for 10hr.

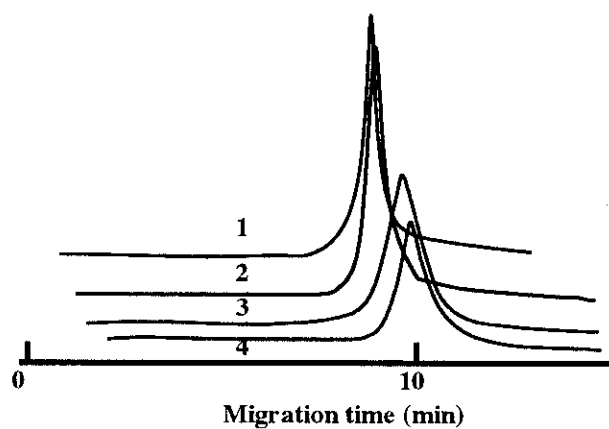


**Fig.3 Cleavage of HSA treated with oxidants by CNBr**

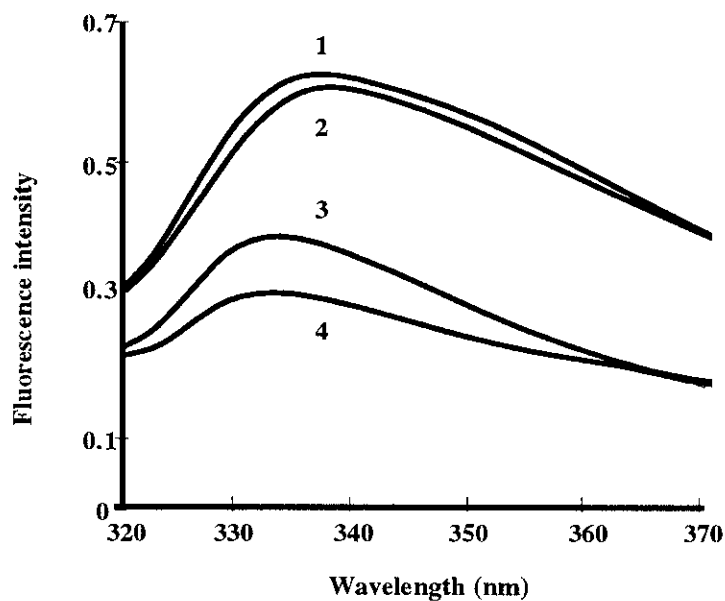
1, molecular marker; 2, native-HSA; 3, HSA treated with metal catalyzed oxidation for 144hr; 4, HSA treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12hr; 5, HSA treated with chloramine-T for 10hr.



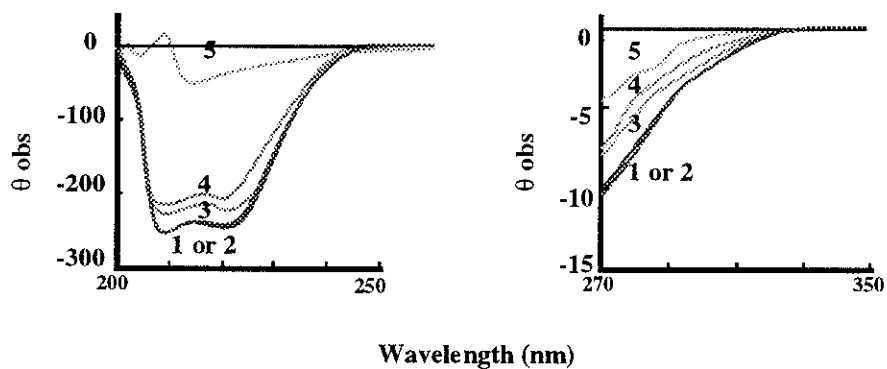
**Scheme 1 Oxidation of methionine residues**



**Fig.4 Electrophoretograms of native and oxidized HSAs**  
 1, native-HSA; 2, HSA treated with  $H_2O_2$  for 12hr ;3, HSA treated with metal catalyzed oxidation for 144hr ; 4, HSA treated with chloramine-T for 10hr.



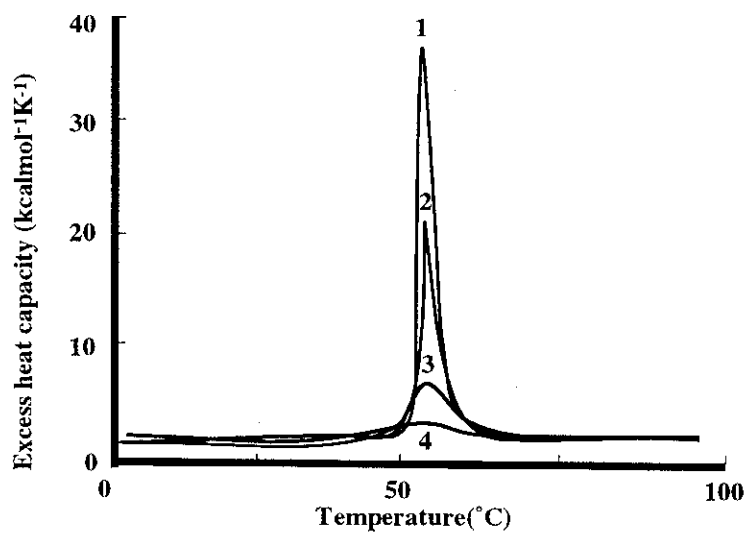
**Fig.5 Intrinsic fluorescence spectra of native and oxidized HSAs**  
 1, HSA treated with  $H_2O_2$  for 12hr; 2, native-HSA; 3, HSA treated with metal catalyzed oxidation for 144hr ; 4, HSA treated with chloramine-T for 10hr.  
 The following concentrations were used: [native and oxidized HSAs]= $2\mu M$ .



**Fig.6 Far- and near-UV spectra of native and oxidized HSAs**

1, native-HSA; 2, HSA treated with  $H_2O_2$  for 12hr; 3, HSA treated with metal catalyzed oxidation for 144hr; 4, HSA treated with chloramine-T for 10hr; 5, denature states treated with guanidine 6M.

The following concentrations were used: [native and oxidized HSAs]=20 $\mu$ M.

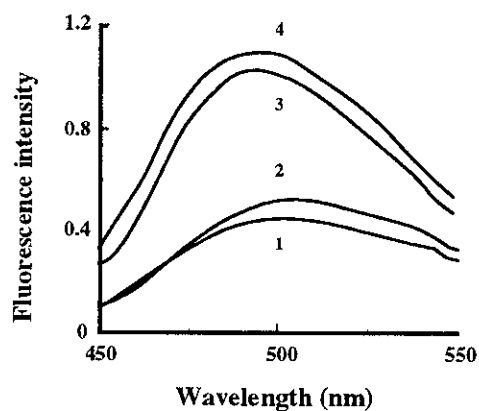


**Fig.7 Effect of oxidation on thermal stability of HSAs**

Scanning rate is 1K/min. Concentration of all samples is 100mM(1/15M phosphate buffer, pH7.4). 1, native-HSA; 2, HSA treated with  $H_2O_2$  for 12hr; 3, HSA treated with chloramine-T for 10hr; 4, HSA treated with metal catalyzed oxidation for 144hr.

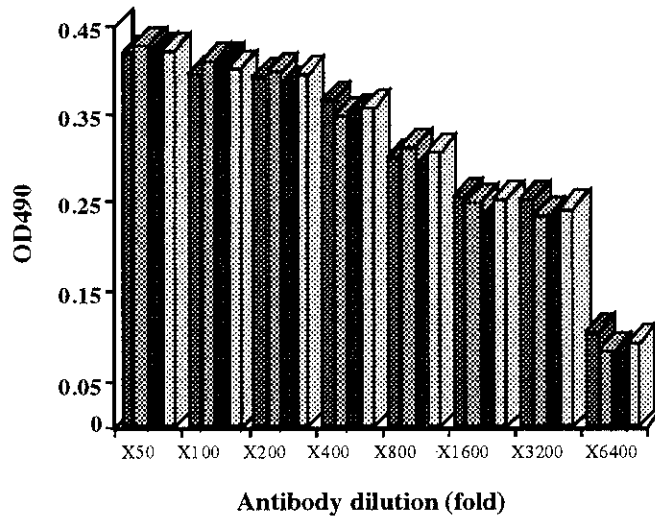
**Table 1** Thermodynamic parameters of native and oxidized HSAs

Treatment Time(hr)	T <sub>m</sub> (°C)	ΔHcal(10 <sup>5</sup> )	ΔH <sub>v</sub> H/ΔHcal
Native- HSA	59.58	1.66	0.686
MCO-144hr	58.10	0.75	0.380
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -12hr	59.45	1.23	0.651
CT-10hr	58.25	0.97	0.420



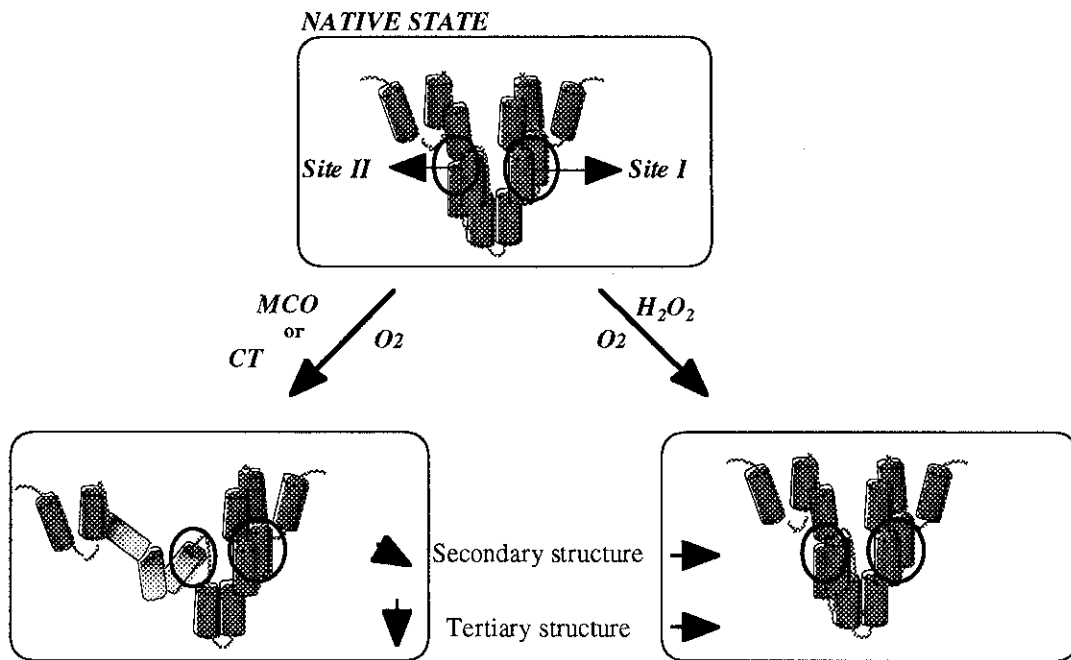
**Fig.8** Evaluation of surface hydrophobicity of native and oxidized HSAs using bis-ANS

Bis-ANS: 1,1'-bis (4-anilino) naphthalene-5,5-disulfonic acid. The following concentrations were used: [bis-ANS]=10μM,[MCO-,Native-HSAs]=1μM.1, native-HSA; 2, HSA treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12hr; 3, HSA treated with chloramine-T for 10hr ; 4, HSA treated with metal catalyzed oxidation for 144hr.



**Fig.9 Cross reactivity of anti-HSA polyclonal antibody with native-,and oxidized HSAs**

■ native-HSA; ▨ HSA treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12hr; ■ HSA treated with chloramine-T for 10hr  
 ▩ HSA treated with metal catalyzed oxidation .



**Scheme 2 Structural change of HSA induced by various oxidants**

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  
－酸化アルブミンの機能性評価－

分担研究者 福沢 健治 徳島大学薬学部 教授

### 研究要旨

酸化反応に伴う人血清アルブミン(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、 $H_2O_2$ -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。これらの結果をX線結晶構造解析モデルと比較検討したところ、サイトIには取り囲むようにMet残基が存在するが、サイトIIにはこのような存在が見られないことから、このMet残基の有無が両サイトでの酸化反応に伴う機能変化に違いが生じた原因である可能性が示唆された。また、HSAの生体内挙動に及ぼす酸化の影響を検討するために、 $^{125}I$ 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、 $H_2O_2$ -HSAでは未処理HSAと類似した挙動を示した。さらにジヒドロローダミン(DHR)による抗酸化能を比較検討したところ、MCO-HSA及び $H_2O_2$ -HSAではHSAの抗酸化能が低下していたのに対しMCO-HSAでは未処理HSAと同様な挙動を示していた。

### A.研究目的

蛋白質が酸化されると、機能の変化を伴うことは古くから知られている現象である。これまでの研究結果をまとめみると、酸化により機能変化を引き起こす機構として次の三つが考えられている。すなわち、①メタロプロテインのように機能発現に金属イオンの結合が必須な蛋白質で、その結合に関与するアミノ酸残基（例えば、Arg,His,Cys）が酸化され、金属イオンの結合性が低下した場合、②活性サイトにおける触媒残基や基質結合部位に関与している

アミノ酸残基が直接酸化された場合、

③②とは逆に活性に必須なアミノ酸残基は直接酸化されないものの、他の残基の酸化が引き金になり分子全体あるいは局所的なコンフォメーション変化が引き起こされ、それに伴い活性サイトの構造や機能やマイクロ環境が変化する場合、あるいは①②③の機構が複数に絡み合ったケースが挙げられる。ところで、アルブミンの場合は、金属イオンの結合は認められるものの、通常、非特異的でありメタロプロテインのように高い親和性を示さず、また金属イオンは、



機能発現に必須な因子ではないことから、①の機構による機能変化はあまり現実的でない。しかしながら、先述したように、MCO-HSA及びCT-HSAではグローバル及び局所的な構造変化が引き起こされていることから、②やその機構に基づいた機能変化が期待される。そこで、本研究ではHSAの機能に及ぼす各酸化方法の影響を調べ、その機構について考察した。また、MCO-HSA及びCT-HSAで酸化に伴うアルブミンの生体内運命にどのような影響を及ぼすのかについて明らかにすることは興味深い。一般に、生体は酸化体を”一種の異物”として認識することから、これら蛋白質では生体内消失が亢進すると考えられている。ところが最近、酸化LDLやアミロイド-β-蛋白質のように酸化によって蓄積し、疾患状態を進行させる原因になっている場合も見いだされている。そこで、<sup>125</sup>Iでラベル標識した酸化HSA及び未処理HSAをラットに静脈内に急速投与し、それらの血漿中濃度推移を調べ、生体内挙動について考察した。

## B. 研究方法

### 1. 酸化HSAのリガンド結合性

限外ろ過法を用い、HPLCによりリガンドのfree fractionの割合を求めた。限外ろ過及び平衡透析法におけるリガンドの定量はHPLCにて行った。

### 2. 酸化HSAのエステラーゼ様活性

p-ニトロフェニルアセテートの加水分解速度定数(k)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より擬一次速度定数として、直線の傾きから算出した。

### 3. 酸化HSAの抗酸化能評価

DRHを各種酸化HSAに加えることにより、DRHからローダミン(RD)になる速度を酸化剤(AAPH)を添加し測定した。

## 4. HSAの体内動態

ラットに<sup>125</sup>I-native-HSA及び<sup>125</sup>I-酸化HSAを約500X10<sup>6</sup>cpm/匹(HSAとして20mg/kg)頸動脈内投与した。ヘパリン処理した100μlの注射筒で規定時間毎に微静脈から20μl採血し、300rpmで10分遠心分離し、血漿10μlをTCA(トリフルオロ酢酸)で沈殿させ、採取し、その放射活性をオートウェルガンマカウンター(アロカ製、ARC-2000)にて測定した。

## C. 研究結果

### 1 HSAのリガンド結合性に及ぼす酸化の影響

酸化に伴うHSAのキャリア蛋白としての機能変化はリガンドの結合性をモニターすることにより評価した。HSA分子は先述したようにサイトI及びサイトIIと呼ばれる二つのリガンド結合サイトを有していることから、これら二つの結合サイトに対する薬物のフリーフラクションを未修飾蛋白質と比較検討した。サイトI及びサイトIIマーカーリガンドとしてはワルファリン及びケトプロフェンを選択した(Fig.1)。MCO-HSA及びCT-HSAでは、サイトIへのリガンド結合性は酸化の影響を受けにくいのに対して、サイトIIへの結合能は著しく低下した。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAでは、いずれのサイトにおいても酸化反応のリガンド結合に及ぼす影響は認められなかった。

### 2 HSAのエステラーゼ様活性に及ぼす酸化の影響

HSAのサイトIIはエステラーゼ様活性を有していることが知られている。そこで、各種酸化反応に伴い、このエステラーゼ様活性がどのような影響を受けるのか検討した。Fig.2にp-ニトロフェニルアセテートを基質としたときの、未処理及び酸化HSAの加水分解定数を示す。図から明らかかなよう

に、MCO-HSA及びCT-HSAでは加水分解活性が低下していた。対照的にH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAでは酸化による影響は認められなかった。

### 3.HSAの抗酸化能に及ぼす酸化の影響

Fig.3に示すようにH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSA及びCT-HSAでHSAの抗酸化能の低下が観察された。一方、MCO-HSAでは未処理HSAとほぼ同様な抗酸化能を示した。

### 4.酸化HSAの体内動態

Fig.4に<sup>125</sup>I-酸化HSA及び<sup>125</sup>I-未処理HSAをラットに静注後の血漿中濃度推移を示す。図に示すように、酸化HSA及び、未処理HSAともに、血中消失過程は2相性を示した。興味深いことには、MCO-HSA及びCT-HSAでは未修飾体に比べ血中濃度の低下が著しかった。未修飾HSAでは遅い消失相(β相)から見積もった半減期が約30hrであり、ラットにおけるこれまでの報告とよく一致していた。このことから、異種蛋白質を用いた実験系ではあるものの消失系を評価する上では大きな問題ではないと思われた。そこで、MCO-HSA及びCT-HSAの消失半減期を求めたところ、約12時間及び約13時間と未処理HSAの消失半減期に比べ約半分に短縮していた(Table 1)。

## D.考察

### 1.HSAの機能に及ぼす酸化の影響

MCO-HSA及びCT-HSAでサイトIIの機能であるエステラーゼ様活性やリガンド結合能の著しい低下が認められた。各種化学修飾HSAを用いた実験結果から、HSAのエステラーゼ様活性の触媒中心として、Tyr-411の水酸基が重要視されている。興味深いことに、このTyr残基のフェノール性水酸基のpKaは8.7と見積もられており、他のHSAのTyr残基に比べ非常に高い親核置換基反応性を有している。この理由として、セリンプロテアーゼの触媒三つ組

(Ser-Arg-Asp)で認められるような触媒残基近傍に位置する陽電荷の存在が提案されている。CarterらによるX線結晶構造解析モデルでは、Arg-410のグアニジノ基がTyr-411の水酸基の酸素原子から4Å離れた位置に存在し、両者が静電的に相互作用していることが示されている。このことから、Tyr-411の反応性が亢進している原因としてArg-410の存在が重要視されている。

また、Curryらによって明らかにされたHSA-ミリスチン酸複合体の結晶解析モデルからArg-410とTyr-411の側鎖はともにサブドメインIIIaの疎水ポケットの中心に向かって配向しており(Scheme 1)、ミリスチン酸のカルボニルイオンと静電的相互作用を行っていることが判明している。これらの知見から、サイトIIにおける機能発現にはArg-410とTyr-411が決定的役割を果たしていることは間違いないものと思われる。言い換えれば、サイトIIにおける機能低下はこれらアミノ酸残基の反応性が変化したためと考えられる。

ところで、これらのアミノ酸残基はともに酸化可能なアミノ酸である。庄司らが論じたように、MCO-HSA及びCT-HSAでは塩基性及び芳香族アミノ酸残基が酸化されている可能性が高いことから、これらの酸化HSAで惹起されたサイトIIの機能低下はArg-410、Tyr-411あるいは、両者ともが直接酸化されたことに起因しているのかもしれない。これとは別に、Arg-410やTyr-411は酸化されていないものの、他の残基の酸化によりサブドメインIIIaあるいは、よりグローバルなコンフォメーション変化が引き起こされ、Arg-410やTyr-411を取り巻く構造やマイクロ環境が変化した場合もまたサイトIIの機能低下を引き起こすことが可能であろう。事実、先に述べたように、MCO-HSA及びCT-HSAは構造変化が惹起さ

れていることから、この機構に基づく機能変化の可能性も十分に考えられる。哺乳類由来のアルブミンにおいて高度に保存されているアミノ酸残基のうち、サブドメイン IIIAで酸化をうける可能性のあるアミノ酸残基としてTyr(-370、-401、-411)、Pro(-384、-416、-421、-441、-447、-468、-486)、Arg(-410、-416、-445、-484、-485)、His-464が挙げられる。MCO-HSA及びCT-HSAではPro残基に関しては不明だがTyr、His、Arg残基が酸化されている可能性が高いこと、また一般に、種をこえて保存されているアミノ酸残基は構造の維持や機能の発現に必須である場合が多いことから、これらのアミノ酸残基のいくつかは、酸化されることにより、Arg-410及びTyr-411の反応性の低下を導びくような構造やミクロ環境変化が惹起されているのかもしれない。

MCO-HSA及びCT-HSAとは対照的に、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAではMet残基が酸化されている可能性が高いにも関わらず、明らかな構造や機能変化が生じていなかった。現段階では、どこのMet残基が酸化されているのか明らかではないが、HSAではMet残基は、HSAの構造特性や機能発現に必須な残基でない可能性が強く示唆された。では、蛋白質におけるMet残基の存在価値は何であろうか。最近までこの点に関する検討はほとんど行われていなかったため、Met残基の生理的役割は明らかにされていなかった。ところが、ここ数年来、Met残基の蛋白質における抗酸化剤としての役割が注目されてきている。

蛋白質の酸化においてグルタミン合成酵素は最も良く調べられている蛋白質である。Stadtmanらは、抗酸化能を有するMet残基がグルタミン合成酵素の活性サイトの入り口に位置していることから注目し、活性サイ

トにおいて機能発現や構造維持に重要なアミノ酸残基のラジカルによるダメージを防ぐスカベンジャーとして働いている可能性を示した。好都合なことには、Metの酸化体であるメチオニンスルフォキシド (MSOX) は細胞内に存在するMSOX還元酵素によりもとのMetへ変換される。したがって、Metは細胞内ではこのサイクルにより半永久的に抗酸化剤として働くことも可能である。また、*in vivo*においても老化ラットから単離したグルタミン合成酵素の分子表面の疎水性とMet残基の酸化の程度が良好な正の相関を示していたことから、Metの抗酸化能としての役割が考えられている。

そこで、これらの観点から、HSA分子中のMet残基を再評価してみた。HSAはその分子中にメチオニン残基を、6個有している (Met-87、-123、-298、-329、-446、-548)。ここで、Met-87、-123、-298はサイトIを取り囲むように存在している。なかでも、Met-298はサブドメインIIAのヘリックス6と7をつなぐhinge領域に位置している。hinge領域は柔軟性に富んでいることから、HSAの特徴であるリガンドの構造適合性やコンフォメーション変化といったダイナミズムにおいて重要な役割を果たしていると考えられている。また、このMet-298の近傍には、Trp-214が存在している。この残基はサイトIに含まれていて、リガンド結合性に関与しているだけでなく、HSAの構造を構成する二つのハープ部分の境界面の安定性にも寄与していると考えられている。したがって、Trp-214の酸化はサイトIの機能やダイナミクスに影響を及ぼすことが推察される。これらのことはMet-298がTrp-214をはじめとするサイトIのアミノ酸残基に対し抗酸化剤として働いている可能性を示唆している (Scheme 2)。また、他の

Met-87,-123の近傍にもHis-247やArg-186といった残基が存在していることから、これらMet残基もサイトIにおいて抗酸化能を発揮しているかもしれない。

一方、サイトIIでは、Met-446が含まれているものの、サイトIのMet-298に対応するMet残基は存在していない(Scheme 3)。したがって、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の違いを生じさせた原因なのかもしれない。この推論はMet残基が酸化されていると推察されるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSA及びCT-HSAの抗酸化能の実験からも顕著であることから、これらの推論を強く支持するものと思われる。

## 2. 生体内動態に及ぼす酸化の影響

これまでの研究結果から、肝表面には翻訳後修飾蛋白質を認識するスカベンジャー受容体の存在が証明されている。このことから、MCO-HSAやCT-HSAは、この受容体に認識され、血中より肝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。このスカベンジャー受容体は複数の異なったタイプの受容体グループではあるが、いずれのタイプも共通してリジン残基に富み、正に帯電した部位と疎水領域を有することが知られている。先述したように(庄司ら)、MCO-HSA及びCT-HSAでは分子表面の疎水性が増大している上、CE法で観察されたように分子表面電荷がより負に帯電するような構造変化が引き起こされている。このことから明らかのように、酸化HSAの物性とスカベンジャー受容体の認識特性はよく対応している(Scheme 4)。このことは、酸化HSAの消失促進がスカベンジャー受容体の認識能の増大に起因しているという先の仮説の妥当性を支持するものと思われた。一方H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-HSAでは、他の酸化HSAのような構造変化が認められないことから、この受容体への認識能は低い可能性が強く示唆

された。しかしながら、今回の限られたデータから、MCO-HSA及びCT-HSAがどのタイプのスカベンジャー受容体に認識されているのかを明らかにすることは不可能と言わざるをえない。今後、この点について、各タイプのスカベンジャー受容体を発現させた細胞系を用いて、*in vitro*で詳細に検討していく必要がある。

## E. 結論

酸化反応に伴うHSAの機能変化を評価した結果、Met残基の存在の有無が、薬物結合性やエステラーゼ様活性などのアルブミンが保持する機能性に影響を与えないものと考えられる。また、酸化反応がアルブミンの寿命に影響を及ぼすことが明らかとなった。生体内からの消失の促進は、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。今後、これらの評価法についても確立する必要があると考えられる。