

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12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13年3月

主任研究者 小田切 優樹
(熊本大学薬学部教授)

別添2

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

本研究は、当研究室において構築された遺伝子技術を基に、アルブミン本来の役割である浸透圧作用に加え、抗酸化作用が付与された、安全性及び有効性に優れたアルブミンを開発することを目的として実施された。すなわち、前年度の結果に基づき、まず、HSAの構造と機能に及ぼす酸化の影響を詳細に検討した。次いで、HSA分子の199-,525-Lys, 218-ArgをMetに置換した変異体を作製し、その構造と機能について検討を加えた。また、現在、アルブミン製剤中に添加されているN-アセチル-L-トリプトファンの抗酸化作用について検討した。その結果、今回作製した変異体は所期の目的は達せず、マルチプルな変異体についての検討が今後の検討課題となった。

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
福沢 健治	徳島大学薬学部	教授
丸山 徹	熊本大学薬学部	研究員

(ヒューマンサイエンス リサーチレジデント)

A. 研究目的

抗酸化能アルブミンは、抗酸化作用を主目的として使用されるのではなく、アルブミンを必要とする患者に対し、活性酸素種が多く疾患の増悪因子となっていることからアルブミンを使用しながら、併せて多くの疾患の併発を防ぐとともに、治療期間の短縮を図るものである。したがって、抗酸化能アルブミンを用いることにより、アルブミン本来の役割である浸透圧維持作用に加え、新しい機能の付与により、多くの疾患の治療や再発防止に有効性が期待されるとともに、アルブミン製剤の使用量は明らかに低下すると期待され、医療関係上の意義は大きいものと考えられる。

そこで、本研究では、アルブミン本来の浸透圧維持作用を損なうことなく、血中滞留性に優れ、かつ抗酸化能を有した、医学的有効性に優れたアルブミン製剤の開発を目的として以下の検討を行なった。

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、アルブミン変異体は棚瀬により作製された。また、酸化アルブミンは福澤により調製され、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、機能、動態特性が評価された。加えて、山口によりアルブミン変異体の薬物結合能、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、丸山によりアルブミン製剤中の添加剤の抗酸化能が評価された。

C. 研究結果

1. 組換えアルブミンの構造特性

*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。

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カプリル酸(CapI)の安定性に及ぼす影響について検討したところ、化学的安定性、熱安定性の増大が観察された。

2. 組換えアルブミンの機能性評価

野生型とK525Mでは結合定数に大きな差異は観察されなかったものの、K199Mでは野生型に比べ約2倍増加し、R218Mでは約3倍減少した。アルブミンの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、すべての変異体ではその活性が低下していた。

¹²⁵I-rHSA及び¹²⁵I-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($t_{1/2}$)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、機能特性

酸化HSAのカルボニル含量は、酸化剤高濃度(10, 50mM)で急激に増大し、それに伴い、CD測定での構造変化、蛍光測定でのTrp近傍の構造変化が観察された。また、機能性においては、薬物結合の低下ならびに、エステラーゼ様活性の低下が観察された。また、酸化剤低濃度(0.1, 1mM)での添加濃度時でのCNBrによる切断結果から、

Met残基の選択的修飾は観察されたものの、構造及び機能は変化しないことが明らかとなった。また、体内動態特性については、In-111を用いた検討結果から、生体内半減期の短縮と共に肝特異的取り込みが観察された。

4. N-アセチル-L-トリプトファンの抗酸化効果

AAPHのHSAに対する酸化反応に及ぼす添加剤の影響をカルボニル含量、NATIVE-PAGE及びメルカプト分率を測定することにより評価した。その結果、CapIはAAPHのHSAに対する酸化を抑制しなかったものの、CapIとN-AcTrpの併用は、酸化を明らかに抑制した。しかしながら、抗酸化作用を有するといわれているN-AcCysでは、全く抑制効果は認められなかった。

D. 考察

1. 組換えアルブミンの構造特性

*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。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カプリル酸(CapI)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CapI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

変異体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的环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。

3. 酸化アルブミンの調製と構造、機能特性

各種分光学的方法などを駆使して、酸化に伴うHSAの構造、機能、動態変化を評価した。高濃度の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。また、この時の機能変化を評価した結果、従来のCys残基に続き、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の保持に重要な役割を担っていることが強く示唆された。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。

4. N-アセチル-L-トリプトファンの抗酸化効果

アルブミン製剤に安定化剤として添加されているCapIとN-AcTrpの役割について、N-AcTrpのインドール骨格が持つ抗酸化作用に着目し検討した結果、CapIでは、抗酸化効果は観察されないものの、CapIにN-AcTrpを併用させると、有意な抗酸化効果が観察された。

E. 結論

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、酸化アルブミンを調製し、その構造特性と機能、動態特性を調べたところ、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ため、HSA分子の199-,525-Lys, 218-ArgをMetに置換した変異体を作製し、その構造と機能について検討を加えた結果、シングルミュータントでは所期の目的は達せず、今後マルチプルな変異体についての検討が必要と考えられる。また、アルブミン製剤中に添加されているN-アセチル-L-トリプトファンの抗酸化作用について検討した結果、Cap1では、抗酸化効果は観察されないものの、Cap1にN-AcTrpを併用させると、有意な抗酸化効果が初めて観察された。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

Kawasaki C. Nishi R. Otagiri M.

Charcoal hemoperfusion in the treatment of phenytoin overdose.

American Kidney Diseases. **35**(2):323-326, 2000

Zhang JS, Imai T, Otagiri M.

Effects of a cisplatin-chondroitin sulfate A complex in reducing the nephrotoxicity of cisplatin.

Arch Toxicol. **74**(6):300-7, 2000

Imai T. Shiraishi S. Otagiri M.

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

S.T.P. Pharma Sciences. **10**(1):57-62, 2000

Imai T. Kawasaki C. Otagiri M.

Comparison of the pharmaceutical properties of sustained-release gel beads prepared by alginate having different molecular size with commercial sustained release tablet.

Pharmazie. **55**(3):218-222, 2000

Takada H. Kamizono R. Otagiri M.

Further studies on 20beta-hydroxysteroid dehydrogenase with carbonyl reductase-like activity present in liver microsomes of male rats.

Life Sci. **67**(17):2075-82, 2000

Imamura Y. Uriu Y. Otagiri M.

Inhibitory effects of flavonoids on rabbit heart carbonyl reductase.

Journal of Biochemistry. **127**(4): 653-658, 2000

H. Watanabe, S. Tanase, M.Otagiri

Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity.

Biochem J. **349**: 813-9 2000

Chuang VT. Otagiri M.

Flunitrazepam, a 7-nitro-1,4benzodiazepine that is unable to bind to the indole-benzodiazepine site of human serum albumin.

Biochim. Biophys. Acta. **1546**:337-345, 2001

Naito S. Kawauchi Y. Otagiri M.

Determination of reduced, protein-unbound, and total concentrations of N-acetyl-L-cysteine and L-cysteine in rat plasma by postcolumn ligand substitution high-performance liquid chromatography.

Anal. Biochem. **290**(2):251-9, 2001

Sakai T. Yamasaki K. Otagiri M.

Interaction mechanism between indoxyl sulfate, a typical uremic toxin bound to site II, and ligands bound to site I of human serum albumin.

Pharm Res. in press 2001

H. Watanabe, S. Tanase, M. Otagiri

Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants.

Biochem. J. **358** in press 2001

T. Imamura, S. Tanase, T. Hamamoto

Activation of Blood Coagulation Factor IX by gingipains R, arginine-specific cysteine proteinases from *Porphyromonas gingivalis*.

Biochem. J. **353**: 325-331 2001

Y. Tanggo, SP. Gulton, T. Simanjuntak, WH. Sibuea, H. Matsuzaki, K. Yamaguchi

Human T lymphotropic virus I in Indonesia.

Intervirology **43**: 77-79 2000

M. Khan, K. Yamaguchi, H. Miyata, A. Kazi, T. Kamahara, S. Hino

Prevalence of anti-Borna disease virus antibody in horses and their caretakers in Bangladesh.

Yonago Acta Medica **43**: 59-67 2000

K. Yamaguchi

Declining trends of HTLV-I prevalence among blood donors in Japan.

Internal Medicine **40**(1): 1-2 2001

K. Fukuda, K. Takahashi, Y. Iwata, N. Mori, K. Gonda, T. Ogawa, K. Osonoe, M. Sato,

S. Ogata, T. Horimoto, T. Sawada, M. Tashiro, K. Yamaguchi, S. Niwa, S. Shigeta

Immunological and PCR analyses for Borna disease virus in psychiatric patients and blood donors in Japan.

J Clin Microbiol. 39(2): 419-29, 2001

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. Carbone

A.Okayama, S. Stuver, M.Iga, M.Okamoto, N.Mueller, M.Matsuoka, K.Yamaguchi, N.Tachibana, H.Tsubouchi

Sequential change of viral markers in seroconverters with community acquired infection of human T-lymphotropic virus type I.

J.Infect.Dis. in press, 2001

Synthetic peptide-based electrochemiluminescence immunoassay for measuring anti-Borna disease virus p40 and p24 antibodies in rat and horse sera.

Annals of Clinical Biochemistry in press, 2001

F.Rybakowski, T.Sawada, K.Yamaguchi

Borna Disease Virus-Reactive Antibodies and Recent Onset Psychiatric Disorders.

European Psychiatry in press, 2001

大場 隆、岡村 均、山口一成：抗HTLV-I抗体 産婦人科の実際 49(11): 1723-1729, 2000

山口一成、米村雄士、清川哲志、河野文夫、鈴島 仁：ベッドサイドで白血球除去 フィルターは必要か？ Japanese Journal of Transfusion Medicine 46(6):517-520、2000

米村雄士、山口一成：腎透析患者の輸血 日本醫事新報 3993: 90, 2000

武本重毅、山口一成：HTLV-Iとリンパ増殖性疾患 炎症と免疫 8: 61-67, 2000

山口一成：輸血により感染する主要な感染性合併症 輸血医学
Kinpodo 173-177, 2000

山口一成：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
Kinpodo 177-178, 2000

山口一成、松岡雅雄：成人T細胞白血病／リンパ腫 別冊医学のあゆみ 悪性リンパ腫一疾患単位の確立と層別化治療
医歯薬出版 112-115、2000

山口一成：成人T細胞白血病 今日の治療指針 2000版

医学書院 550-551, 2000

福吉葉子、米村雄士、原田美保、笹田景子、中満三容子、山口一成、岡部紘明、熊谷崇、松野文彦：末梢血幹細胞を適切な時期に効率よく採取する方法
日本検査血液学会雑誌 2(1)63-69,2001

K.Fukuzawa, A.Tokumura, K.Kogure, M.Iemura, N.Gondoh, M.Fujii, S.Ueno, A,Shibata
A comparative study of the ability of ferric nitrilotriacetate and other iron chelators to assist membrane lipid peroxidation by superoxide radicals.
Chemistry Physics Lipids in press 2001

Tsutsumi Y. Maruyama T. Otagiri M.
Decreased bilirubin-binding capacity in uremic serum caused by an accumulation of furan dicarboxylic acid. *Nephron*. 85(1):60-64, 2000

Yamasaki K. Maruyama T. Otagiri M.
Circular dichroism simulation shows a Site-II-to-Site-I displacement of human serum albumin-bound diclofenac by ibuprofen.
AAPS PharmSciTech, 2000: 1(2) article 12 (<http://www.pharmscitech.com>)

Anraku M. Yamasaki K. Maruyama T. Otagiri M.
Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin
Pharm Res. 18 in press 2001

2.学会発表

学会発表

M.Otagiri and N.Takamura
Quantitative analysis of drug-protein interaction in renal disease state and a dosage plan using displacement of protein binding
日本薬剤学会第15年会 April 15-16, 2000 San Francisco

K.Matsumoto, T.Imai, M.Otagiri
IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF THE ENHANCING ACTIVITY OF BILE ACIDS ON THE INTESTINAL ABSORPTION
MILLENNIAL WORLD CONGRESS of PHARMACEUTICAL SCIENCES
April 16-20, 2000 San Francisco

Jingshi Zhang, Teruko Imai, Masaki Otagiri.

EFFECTS OF CISPLATIN-CHONDROITIN SURFATE A COMPLEX ON REDUCING THE NEPHROTOXICITY OF CISPLATIN

MILLENNIAL WORLD CONGRESS of PHARMACEUTICAL SCIENCES

April 16-20, 2000 San Francisco

V.T.G.Chuang, A.Kuniyasu, H.Nakayama, M.Otagiri.

TOPOROGY ANALYSIS OF DRUG BINDING SITES ON HUMAN SERUM ALBUMIN USING PHOTOAFFINITY LABELING TECHNIQUES

MILLENNIAL WORLD CONGRESS of PHARMACEUTICAL SCIENCES

April 16-20, 2000 San Francisco

Teruko Imai, Horita Akira, Masaki Otagiri.

PRODRUG ACTIVATION VIA CATALYTIC ANTIBODIES

MILLENNIAL WORLD CONGRESS of PHARMACEUTICAL SCIENCES

April 16-20, 2000 San Francisco

Daisuke Harada, Sinsuke Naito, Isao Hiraoka, Masaki Otagiri.

EVALUATION OF COVALENT BINDING OF N-ACETYL-L-CYSTEIN, AN SH DRUG, TO PLASMA PROTEIN AFTER INTRAVENOUS ADMINISTRATION TO RATS

MILLENNIAL WORLD CONGRESS of PHARMACEUTICAL SCIENCES

April 16-20, 2000 San Francisco

H.Watanabe, S.Tanase, K.Nakajou, T. Maruyama, U.Kragh-Hansen, M.Otagiri.

ROLE OF Arg410 AND Tyr411 IN HUMAN SERUM ALBUMIN FOR LIGAND BINDING AND ESTERASE-LIKE ACTIVITY

MILLENNIAL WORLD CONGRESS of PHARMACEUTICAL SCIENCES

April 16-20, 2000 San Francisco

C.Kawasaki, R. Nishi, M.Otagiri.

PREDICTION OF THE EFFECTIVENESS OF CHARCOAL DIRECT HEMOPERFUSION TREATMENT IN DRUG OVERDOSE: A GUIDELINE BASED ON THE PROTEIN BINDING PERCENTAGE OF THE DRUG

MILLENNIAL WORLD CONGRESS of PHARMACEUTICAL SCIENCES

April 16-20, 2000 San Francisco

V.T.G.Chuang, A.Kuniyasu, H.Nakayama and M.Otagiri.

TOPOROGY ANALYSIS OF KETOPROFEN BINDING SITES ON HUMAN SERUM ALBUMIN USING PHOTOAFFINITY LABELING TECHNIQUES

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID

GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

D. Harada, S. Naito, I. Hiraoka, K.Harada M. Otagiri.

COVALENT BINDING OF N-ACETYL-L-CYSTEIN, AN SH DRUG, TO SERUM ALBUMIN
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID

GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

K. Kawai, N. Takamura, R. Nishii, S. jinnouchi, S. Nagamachi, S. Tamura, K. Arimori and M. Otagiri.

IMPROVEMENT OF ^{99m}Tc -MAG3 RENOGRAPHY BY MEANS OF COMPETITIVE
DISPLACEMENT OF SERUM PROTEIN BINDING
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID

GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

R. Nishii, K. Kawai, N. Takamura, S. jinnouchi, S. Nagamachi, S. Tamura, K. Arimori and M. Otagiri.

COMPETITIVE DISPLACEMENT OF SERUM PROTEIN BINDING TO REGULATE ^{123}I -IMP
PHARMACOKINETICS

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID

GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

N. Takamura, K. Kawai, R. Nishii, S. jinnouchi, K.Ogata, S. Nagamachi, S. Tamura, K. Arimori and M. Otagiri.

DISPLACEMENT MECHANISM OF ^{123}I -IMP SERUM PROTEIN BINDING
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID

GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

U.Kragh-Hansen, M.Otagiri.

CHARACTERIZATION OF WARFARIN BINDING SITE ON HUMAN SERUM ALBUMIN
USING SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID

GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

C. Kawasaki, R. Nishi, S. Uekihara, S. Hayano and M.Otagiri.

EFFECTIVENESS AND ITS PREDICTION OF CHARCOAL HEMOPERFUSION
TREATMENT IN DRUG OVERDOSE -A GUIDELINE BASED ON THE PROTEIN BINDING
PERCENTAGE OF THE DRUG-INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN &

α_1 -ACID GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

川井恵一、高村徳人、西井龍一、陣之内正史、長町茂樹、田村正三、有森和彦、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(8) 脳血流診断薬における体内動態変化
第15回日本薬物動態年会 2000.10.11~13 福岡

出口恒夫、堤 泰寛、中村三喜雄、小田切優樹

尿毒症物質Indoxyl sulfate(IS)の腎取り込み機序について
第15回日本薬物動態年会 2000.10.11~13 福岡

張 敬石、馬 鎮豊、小谷 明、後藤正文、今井輝子、末永綾香、小田切優樹

シスプラチンとコンドロイチン硫酸との複合体形成について
日本薬剤学会第16年会 2001.3.22~24 東京

渡邊博志、棚瀬純男、丸山徹、小田切優樹

ヒト血清アルブミンの薬物輸送性及びエステラーゼ様活性に対するArg-410、Tyr-411の
機能検索

蛋白合同年会 東京2000 2000.6.7~10、東京

中城圭介、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(サイトI)のトポロ
ジー解析

蛋白合同年会 東京2000 2000.6.7~10、東京

渡邊博志、棚瀬純男、中城圭介、岩尾康範、御手洗万希、丸山徹、Ulrich Kragh-Hansen、
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
第15回日本薬物動態年会 2000.10.11~13 福岡

渡邊博志、Ulrich Kragh-Hansen、Anders Overgaard Pederson、中城圭介、岩尾康範、丸山
徹、棚瀬純男、小田切優樹

ヒト血清アルブミン分子上の脂肪酸結合サイトのトポロジー解析

日本薬学会 第121年会 札幌2001 2001.3.28~30 札幌

中城圭介、渡邊博志、棚瀬純男、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非酵素的糖付加反応(グリケーション)の影
響

日本薬学会 第121年会 札幌2001 2001.3.28~30 札幌

米村雄士、松野文彦、福吉葉子、中満三容子、笹田景子、山口一成、岡部紘明

末梢血幹細胞を適切な時期に効率よく採取する方法

第1回日本検査血液学会学術集会 2000.7.22~23, 東京

福吉葉子、米村雄士、原田美保、笹田景子、中満三容子、山口一成、岡部紘明、熊谷崇、松野文彦

当院における末梢血幹細胞採取の実績と採取に影響を及ぼす因子の検討

第42回日本臨床血液学会総会 2000.11.8~10, 倉敷

山口一成

第6回血球貪食症候群

Heterophil研究会 2000.9.1, 熊本

渡邊俊樹、石田尚臣、小岩 司、古賀 震、山口一成、上平 憲

外来ゲノムによる細胞増殖制御異常としてのウイルス発がん

第59回日本癌学会総会 2000.10.4~6, 横浜

渡辺卓郎、鐘ヶ江裕美、石田尚臣、古賀 震、山口一成、堀江良一、東原正明、斉藤泉、渡邊俊樹

組み換えアデノウイルスを用いた成人T細胞白血病の遺伝子治療の基礎的検討

第59回日本癌学会総会 2000.10.4~6, 横浜

山口一成

HTLV-Iとボルナ病ウイルス

高知医大大学院公開セミナー 2000.2.10, 南国

山口一成、沢田高志、楢木 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の血清疫学と今後の課題

第6回ボルナ病ウイルス研究会 2000.2.15, 東京

小岩 司、石田尚臣、渡邊俊樹、山口一成、松岡雅雄

ATL細胞におけるHTLV-LTRのCpGメチル化とウイルス遺伝子発現

第62回日本血液学会総会 2000.3.16~18, 福岡

渡邊俊樹、福本理作、小岩 司、渡辺卓郎、東原正明、堀江良一、山口一成、松岡雅雄

ATL多段階発癌におけるPKC β II- β -catenin/TCF系の関与

第62回日本血液学会総会 2000.3.16~18, 福岡

渡辺卓郎、渡邊俊樹、堀江良一、福本理作、東原正明、松岡雅雄、山口一成

ウイルスベクターを用いたATLの細胞特異的 分子標的遺伝子治療の基礎

第62回日本血液学会総会 2000.3.16~18, 福岡

K.Yamaguchi

Borna disease virus and psychiatric disorders.

Pittsburgh University Seminar. 2000.Nov.21

福澤健治、徳村 彰、小暮健太郎、柴田 瑩

発ガン性鉄ニトリロ三酢酸(Fe-NTA)のO₂-依存性膜脂質過酸化誘導特性

第42回脂質生化学研究会講演要旨集、201-204 (2000)

福澤健治、徳村 彰、小暮健太郎、柴田 瑩

水溶性の鉄錯体が膜疎水部の脂質過酸化を誘導する機構と発ガン性鉄ニトリロ三酢酸(Fe-NTA)にのみ見られる特性

第24回鉄代謝研究会抄録集、46-47(2000)

K.Fukuzawa, A.Tokumura, K.Kogure, A,Shibata

Iron-chelate/superoxide-dependent lipid peroxidation in liposomes: prooxidative characteristics of carcinogen ferric-nitrilotriacetate.

10th Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International. Book of Abstracts, 65 (2000)

K.Fukuzawa

Active oxygens and antioxidants in phospholipid membranes.

Invited lecture in Exchange Program between Seoul National University (College of Pharmacy) and University of Tokushima (Faculty of Pharmaceutical Sciences), Nov. 1-3 (2000)

福澤健治

膜・活性酸素・脂質過酸化そしてビタミンE

芝浦工大学術セミナー (特別講演) 2月9日(2001)

M.Anraku, K.Yamazaki, T.Maruyama, M.Otagiri.

EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON STRUCTURE AND FUNCTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN

MILLENNIAL WORLD CONGRESS of PHARMACEUTICAL SCIENCES

April 16-20, 2000 San Francisco

西 弘二、丸山 徹、小田切優樹、半田哲朗

脂質二重膜との相互作用に伴う α_1 -酸性糖蛋白質の構造特性と薬物結合能の変化

蛋白合同年会 東京2000 2000.6.7~10、東京

T.Maruyama, M.Otagiri.

Topology Analysis of SiteII, a Major Drug Binding Region on Human Serum Albumin
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID
GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

M.Anraku, K.Yamazaki, T.Maruyama, U.Kragh-Hansen, A. Suenaga and M.Otagiri.
EFFECT OF OXIDATIVE STRESS ON STRUCTURE AND FUNCTION OF HUMAN SERUM
ALBUMIN
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID
GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

Y.Uryu, Y.Tsutsumi, N.Takamura, T. Maruyama, A.Suenaga and M.Otagiri.
AN ATTEMPT TO OVERCOME DIURETIC RESISTANCE TO FUROSEMIDE IN PATIENTS
WITH NEPHROTIC SYNDROME BY COADMINISTRATION OF BUCOLOME
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID
GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

T. Komori, H. Kai, K.Shimoishi, A. Nonaka, T. Maruyama and M.Otagiri.
CLARITHROMYSIN UP-REGULATE α_1 -ACID GLYCOPROTEIN EXPRESSION IN LIVER
AND CULTURED HAPATOCYTES
INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID
GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

櫻井裕治、脇岡基樹、渡邊博志、丸山 徹、黒野幸久、小田切優樹
血清アルブミンのエステラーゼ様活性の種差と構造化学的検討
第15回日本薬物動態年会 2000.10.11~13 福岡

鶴崎泰史、渡邊博志、御手洗万希、丸山 徹、末永綾香、小田切優樹
ヒト血清アルブミンの安定性に及ぼす中鎖脂肪酸と芳香族アミノ酸の影響
日本薬剤学会第16年会 2001.3.22~24 東京

瓜生幸恵、堤 泰寛、高村徳人、丸山 徹、小田切優樹
ブコローム併用投与によるフロセミド利尿耐性の克服の可能性
日本薬剤学会第16年会 2001.3.22~24 東京

安楽 誠、山崎啓之、丸山 徹、高倉喜信、小田切優樹
酸化ヒト血清アルブミンの体内動態特性
日本薬学会 第121年会 札幌2001 2001.3.28~30 札幌

小田切優樹、櫻井裕治、肱岡基樹、渡邊博志、丸山 徹、黒野幸久、
アルブミンのエステラーゼ様活性の種差に関する構造化学的考察
日本薬学会 第121年会 札幌2001 2001.3.28～30 札幌

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

組換えDNA技術を基に異種蛋白質発現宿主として*Pichia pastoris*を用いて変異体を作製した。SDS-PAGE、抗HSAモノクローナル抗体、各種スペクトル法により純度、構造特性について調べた結果、血漿由来のHSAと同等であることが判明した。さらに化学的安定性、熱安定性もHSAと何ら変わらないことが明らかとなった。

A.研究目的

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つきまとう。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の開発を最終目標とし、変異体を作製し、その構造特性を評価した。

B.研究方法

1.変異体の作製

タカラ社製site-directed mutagenesisキット (Mutan-Super Express Km) に従って行った。すなわち、シグナル配列を含むHSAcDNAを変異導入ベクター (pKF19k) に接続した。その後PCRにより変異導入を行い、シーケンス解析 (ABI Prism 310 Genetic Analyzer: パーキンエルマー・アプ

ライドバイオシステムズ) により変異導入を確認した。その後、変異を導入したHSAcDNAを発現ベクターであるpHIL-D2のアルコールオキシダーゼプロモーター下流に接続した。

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。 α -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.変異型HSAの構造特性

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。

C. 研究結果

1. SDS-PAGE

SDS-PAGEの結果(Fig.1), すべての変異体の分子量が野生型と同一であったことから, C末端でのアミノ酸の付加や欠落はないものと推察された。

2. 組換え型HSAの構造特性

野生型及び変異体の構造の同等性を証明するために, CDスペクトル法を用いて検討を行った。Fig.2に野生型及び今回作製した変異体の近紫外及び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及び三次構造を反映するものである。この図から明らかのように野生型、変異体ともにスペクトルは良く一致しており、変異体は野生型と同様の構造を保持しているものと思われた。

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変異体とpHSAの間で有意な差は観察されなかった。

変異体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pHSAと同様の値を示し、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カプリル酸(Cap1)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Cap1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、今回作製した変異体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。精製した変異体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. Watanabe, S. Tanase, M.Otagiri

Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity.
Biochem J. 349: 813-9 2000

T. Imamura, S.Tanase, T.Hamamoto

Activation of Blood Coagulation Factor IX by gingipains R, arginine- specific cystein proteinases from porphyromonas gingivalis.
Biochem. J. 353: 325-331 2001

H. Watanabe, S. Tanase, M. Otagiri

Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants.
Biochem. J. 358: 2001 in press.

2.学会発表

H.Watanabe, S.Tanase, K.Nakajou, T. Maruyama, U.Kragh-Hansen, M.Otagiri.

ROLE OF Arg410 AND Tyr411 IN HUMAN SERUM ALBUMIN FOR LIGAND BINDING
AND ESTERASE-LIKE ACTIVITY
MILLENNIAL WORLD CONGRESS of PHARMACEUTICAL SCIENCES
April 16-20, 2000 San Francisco

渡邊博志、棚瀬純男、丸山徹、小田切優樹

ヒト血清アルブミンの薬物輸送性及びエステラーゼ様活性に対するArg-410、Tyr-411の
機能検索

蛋白合同年会 東京2000 2000.6.7~10、東京

中城圭介、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(サイトD)のトポロ
ジー解析

蛋白合同年会 東京2000 2000.6.7~10、東京

H.Watanabe, S.Tanase, K.Nakajou, Y.Iwao, M.Mitarai, T. Maruyama,

U.Kragh-Hansen, M.Otagiri.

CHARACTERIZATION OF WARFARIN BINDING SITE ON HUMAN SERUM ALBUMIN
USING SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SERUM ALBUMIN & α_1 -ACID

GLYCOPROTEIN October 3-6,2000,Kumamoto, Japan

渡邊博志、棚瀬純男、中城圭介、岩尾康範、御手洗万希、丸山徹、Ulrich Kragh-Hansen、
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
第15回日本薬物動態年会 2000.10.11~13 福岡

渡邊博志、Ulrich Kragh-Hansen、Anders Overgaard Pederson、中城圭介、岩尾康範、丸山
徹、棚瀬純男、小田切優樹

ヒト血清アルブミン分子上の脂肪酸結合サイトのトポロジー解析
日本薬学会 第121年会 札幌2001 2001.3.28~30 札幌

中城圭介、渡邊博志、棚瀬純男、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非酵素的糖付加反応(グリケーション)の影
響

日本薬学会 第121年会 札幌2001 2001.3.28~30 札幌

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