

Fig. 1. SDS-PAGE of native and mutant HSAs

Lane 1, molecular mass markers

Lane 2, wild type rHSA; Lane 3, mutant K199M; Lane 3, mutant R218M; Lane 4, mutant R410M

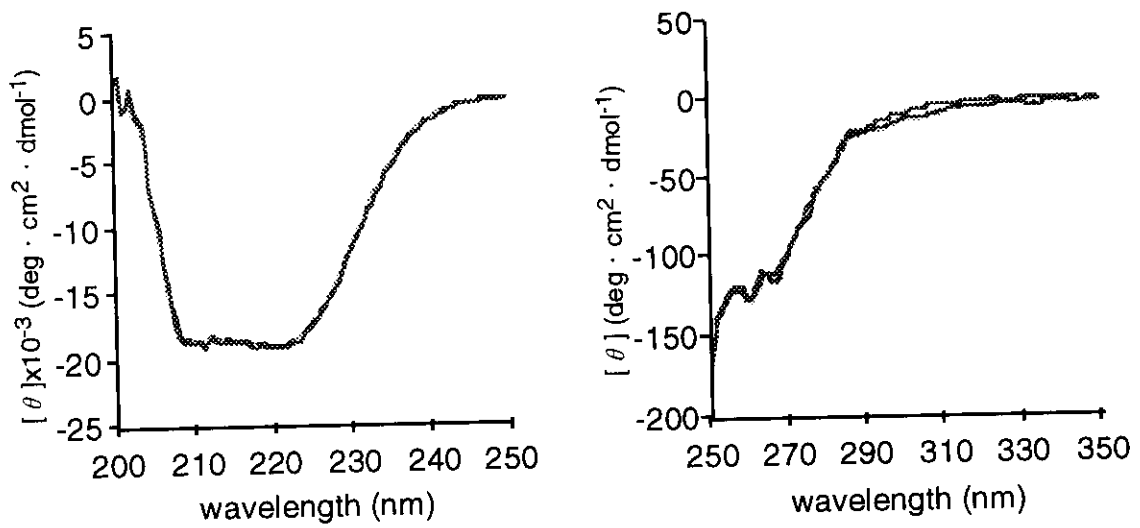


Fig. 2. Far-UV and near-UV CD spectra of rHSAs

The protein concentration was 1.5 μM in 67mM sodium phosphate buffer (pH7.4).

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 熊本大学医学部附属病院 講師
(研究協力者 丸山 徹 ヒューマンサイエンス リサーチレジデント)

研究要旨

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。本研究では、遺伝子組換え技術により作製した変異体について、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変異体について薬物結合特性及び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),

DNSS(350nm)蛍光波長：ワルファリン(350~450nm), 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Na¹²⁵Iとを分離した。比活性は、約200x10⁶cpm/μgであった。

3-2 HSAの動態

ラットに変異体及び¹²⁵I-pHSAを約500x10⁶cpm/匹(HSAとして20mg/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 μ l採血し、3000rpmで10分遠心分離し、血漿10 μ 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。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、野生型及び変異体の薬物結合特性について、蛍光プローブを用いた結合実験を行った。また、エステラーゼ類似作用についても検討した。

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変異体の薬物結合特性についての検討を行なった(Fig.1)。Table1に示すように、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。K199及びR218はワルファリンの主要結合部位であるサイトIに位置しているため、変異によってその結合性に影響が生じたものと考えられた。またダンシルサルコシンはすべての変異体において結合性の減少を示した。これは、おそらくHSAの立体構造維持に不可欠なK199、R218、K525の変異により引き起こされるHSAの構造変化がサイトIIにまで及んだ結果、サイトIIの構造やマイクロ環境がリガンドや基質の結合にとって好ましくない環境へと変化したためと考えられる。

1-2 エステラーゼ類似作用

Table2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 1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、野生型における加水分解速度定数(k_{obs})は約395倍($9.05 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$)であった。野生型と変異体を比較したところ、野生型に比べすべての変異体ではその活性が低下していた。この結果から、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おいて、変異による構造変化が生じたものと思われた。

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.1に野生型及び変異体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、その減衰過程は野生型、変異体ともに2相性を示し、消失相(β 相)から算出した半減期($t_{1/2}$)はそれぞれ約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Kp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Kp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。

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。

D. 考察

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、今回作製した変異体の機能は、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

F.研究発表

1.論文発表

Y.Tanggo, SP. Gulton, T.Simanjuntak, WH. Sibuea, H.Matsuzaki, K.Yamaguchi
Human T lymphotropic virus I in Indonesia.
Intervirolgy 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

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

K.Yamaguchi
Declining trends of HTLV-I prevalence among blood donors in Japan.
Internal Medicine 40(1): 1-2 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
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

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

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—
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

2.学会発表

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、齊藤泉、
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、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

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

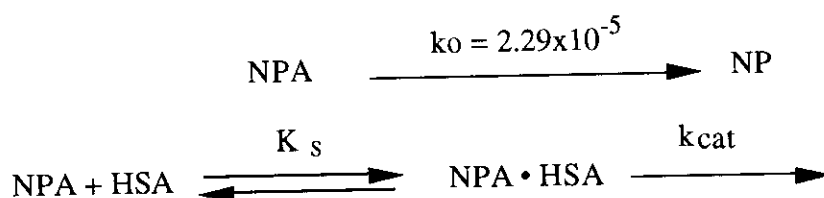
なし

3.その他

なし

Table 1. Binding parameters of site marker probes bound to wild type and mutant HSAs at pH 7.4 and 25°C.

	Association constant (10^5 M^{-1})	
	Warfarin (site I)	DNSS (site II)
wild type	7.99 ± 0.11	12.99 ± 0.33
K199M	15.90 ± 0.40	3.59 ± 0.47
R218M	2.59 ± 0.36	3.26 ± 0.58
K525M	7.59 ± 0.21	2.49 ± 0.25



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

Table 2. Hydrolysis rate constants (k_{obs}) for *p*-nitrophenyl acetate

	$10^3 \times k_{obs} \text{ (s}^{-1}\text{)}$
wild-type	9.05 ± 0.26
K199M	4.61 ± 0.18
R218M	5.12 ± 0.13
K525M	3.72 ± 0.09

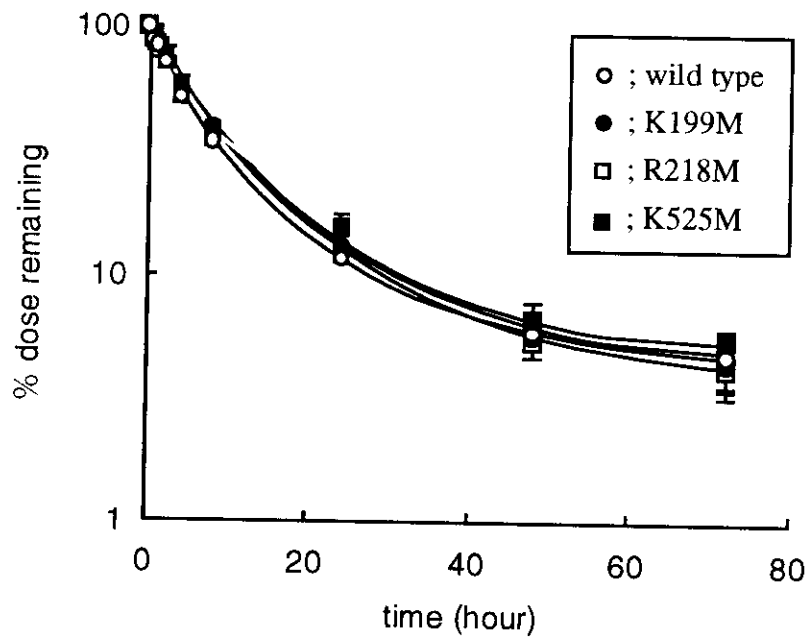


Fig. 1. Plasma level of wild type and mutant ¹²⁵I-HSAs after IV administration to Rats
All values are mean ± SE

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、機能特性—

分担研究者 福澤 健治 徳島大学薬学部 教授

研究要旨

ヒト血清アルブミン (HSA) は、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、前年報告したクロラミン-T(CT-HSA)処理による酸化をより詳細に検討するため、クロラミン-T(CT-HSA)各濃度処理(0.1, 1, 10, 50mM)の酸化HSAの構造、機能、動態特性を未処理HSAと比較検討した。酸化HSAのカルボニル含量は、酸化剤濃度10mM以上で急激に増大し、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、クロラミン-T 1mM以下の添加濃度時での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。このことから、Met残基の抗酸化能の可能性が示唆された。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、構造変化を引き起こす10mM濃度以上のクロラミン-T処理時、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。

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。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濃度依存性的酸化HSA(CT-HSA)を調製し、その修飾特性、構造、機能特性を未処理HSAと比較検討した。また、高濃度CT-HSAでは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、

¹¹¹Inでラベル標識した酸化HSA及び未処理HSAをマウス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. 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

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0.1, 1, 10, 50mM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℃で1hrインキュベートした。各時間反応後のサンプルを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。

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のシステイン修飾

HSAと5,5'-ジチオビス (2-ニトロ安息香酸) (DTNB)との反応性に対する酸化HSAの影響を検討した。SH基定量試薬のDTNBは遊離のSH基とSH/SS交換反応を起こし、412nmに特異的な吸光度を有するチオビス (2-ニトロ安息香酸) TNBを遊離する。この見かけの反応定数より求めた。

5-2. 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。

5-3. 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。

5-4. 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

CDスペクトルを用いて日本分光製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 (θ_{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。

7. 酸化HSAの機能特性

7-1. 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。

7-2. 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。

8. HSAの体内動態

マウスに¹¹¹In-native-HSA及び¹¹¹In-酸化HSAを約500X10⁶cpm/匹(HSAとして20mg/kg)尾静脈内投与した。単位時間毎に血清、臓器を採取し、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。

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。CT-HSAでは、濃度依存的に著しいカルボニル含量の増大が認められた。対照的に低濃度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 システイン(Cys)残基の酸化

一般的に抗酸化能を有することが知られているCys残基についてDTNBとの反応性について評価した。低濃度の酸化剤では他

の残基より速やかにCys残基が酸化されることが明らかになった(Fig.3)。

3-2 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。各濃度酸化HSAの結果をFig.4に示す。1mM以上のCT-HSAでは未修飾HSAに比べ断片化が抑えられていた。これは、これら高濃度の酸化体において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、0.1mM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、0.1mMではCys残基のみの酸化の可能性が考えられる。

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、10mM以上の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ミクロ環境が変化し、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。一方、1mM以下では、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。

3-4 塩基性アミノ酸残基の酸化

各濃度酸化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、50mMのCT-HSAにおいてはCEの移動度は

遅延していた(Fig.6)。このことは、酸化に伴い50mM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、50mM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10mM以下では未修飾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あまり大きな影響を受けていないものと思われた。

4.酸化HSAの構造特性

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、10mM以上の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 α 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.7)。このことから、10mM以上の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、低濃

度の場合は、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。

5.酸化HSAの機能特性

5-1.酸化HSAのリガンド結合性

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ジアゼパムを選択した(Fig.8)。各濃度の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への結合性は著しく低下した。一方、低濃度では、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。

5-2.酸化HSAのエステラーゼ様活性

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、各濃度酸化反応に伴い、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.9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。図から明らかのように、10mM以上のCT-HSAでは加水分解活性が低下していた。対照的に1mM以下では酸化による影響は認められなかった。

6.酸化HSAの体内動態

Fig.10に ^{111}In -酸化HSA及び ^{111}In -未処理HSAをマウスに静注後の血漿中濃度推移、及び臓器分布を示す。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、50mMの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9minであった。そこで、50mMのCT-HSAの消失半減期を求めたところ、約4minと未処理HSAの消失半減期に比べ約半分に短縮していた。また、この時の肝臓への取り込みが約10倍増加していた(Table 1)。

D. 考察

本研究結果から、10mM以上のCT-HSAにおいて、酸化反応に伴う立体構造の変化及びエステラーゼ様活性の低下が判明した。高濃度(50mM)の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、高濃度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。対照的に1mM以下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、システイン、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。すなわち、高濃度CT-HSAとは対照的に、低濃度CT-HSAではCys, 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。最近までMet残基に関する検討はほとんど行われていなかったため、そ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

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ブ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 1)。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 1)。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、高濃度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。事実、前年報告した各種酸化体の消失半減期の短縮はこのことに依存しているかもしれない。今回は、¹¹¹Inを用いることにより、短時間での臓器分布が明らかとなり、肝の取り込みが50mMのCT-HSAで、10倍増加したことから、このスカベンジャー受容体への取り込みが強く示唆される。この受容体グループでは、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。一方、低濃度CT-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。すなわち、Cys, Met残基が先に酸化されることで、HSAの構造及び機能を保持するための抗酸化剤として働いていることが強く示唆された。

E. 結論

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(10, 50mM)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。生体内からの消失の促進は、肝臓のみの取り込みの増大から、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ことが強く示唆された。今後、これらの評価法についても肝スカベンジャーレセプターを発現させた細胞系を用いて詳細に検討する必要があると考えられる。また、部位特異的変異法を駆使して、Cys, Metのミュータントを作製し、抗酸化能の評価も同時に行っていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

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 (2001) 印刷中

2. 学会発表・学術講演

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 O_2^- -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)

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

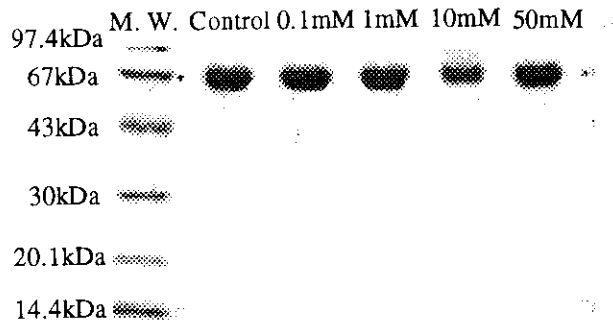


Fig. 1 SDS-PAGE of native and oxidized HSAs

M.W., molecular marker; 0.1mM, HSA treated with 0.1mM of chloramine-T; 1mM, HSA treated with 1mM of chloramine-T; 10mM, HSA treated with 10mM of chloramine-T; 50mM, HSA treated with 50mM of chloramine-T

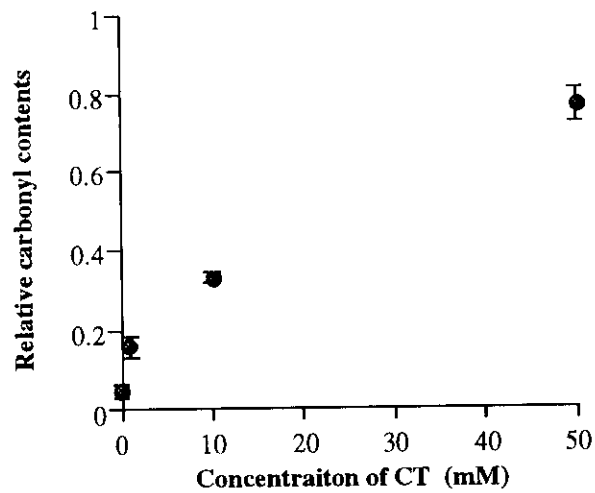


Fig.2 Carbonyl content of oxidized HSAs

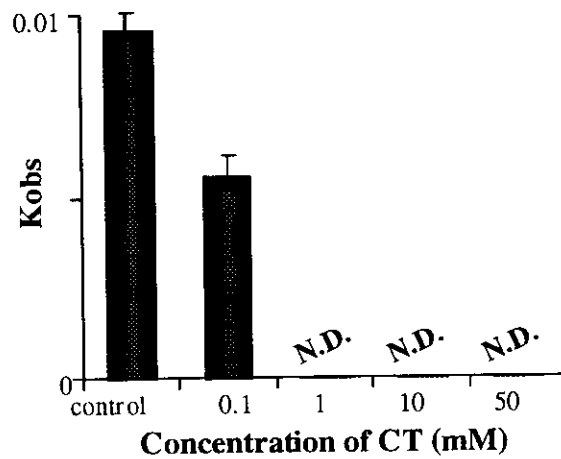


Fig.3 Constants(Kobs) of HSAs treated with CT by DTNB

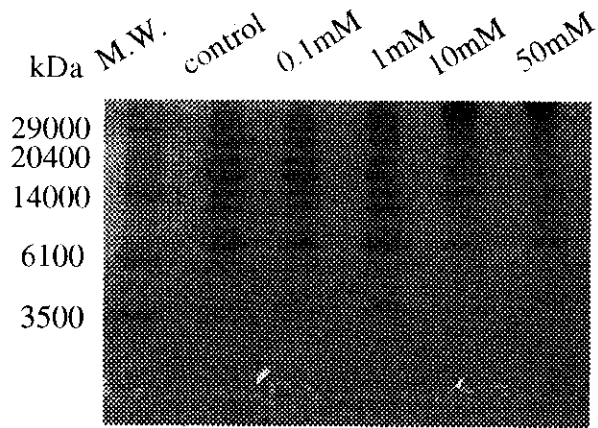


Fig.4 Cleavage of HSAs treated with CT by CNBr

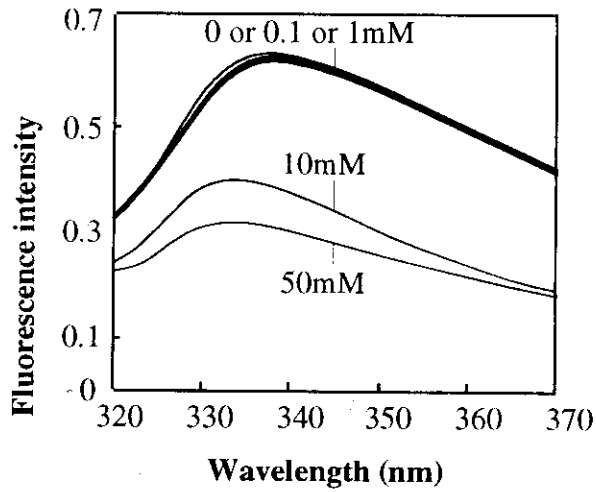


Fig.5 Intrinsic fluorescence spectra of native and oxidized HSAs

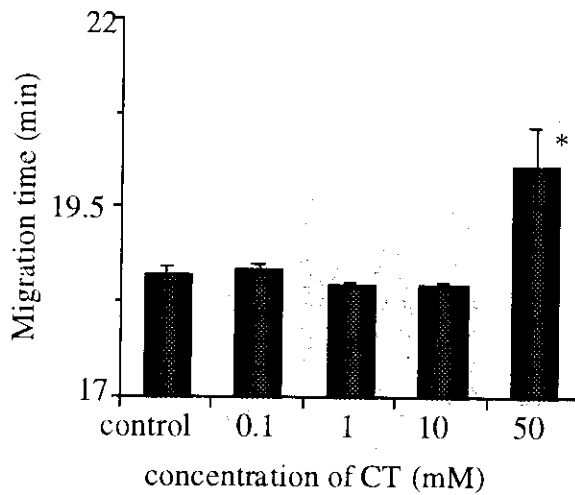


Fig.6 Migration time of native and oxidized HSAs on C.E.

* $p < 0.001$ compared with control