

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32641

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20699

研究課題名(和文)アロステリック人工酸素運搬体(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーの創製

研究課題名(英文)Synthesis of Allosteric Artificial Oxygen Carrier (Hemoglobin-Albumin) Trimmers

研究代表者

森田 能次(Morita, Yoshitsugu)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：40795308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球の代替物となる人工酸素運搬体の実現は次世代医療の最重要課題である。本研究は、赤血球の酸素運搬能を完全に維持したアロステリック人工酸素運搬体として、(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーを合成し、その酸素結合特性を明らかにした。さらに、中心ヘモグロビンへの部位特異的アミノ酸置換および化学修飾により、酸素親和性の制御を行った。最終的には、赤血球よりも優れた酸素運搬効率を有する人工酸素運搬体の創製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本是世界最高レベルの献血輸血システムを備えているが、少子高齢化により献血者層人口が減少すると、充分量の輸血液を確保できない状況に陥る可能性がある。このような背景から、血液型に関係なくいつでもどこでも使用できる人工酸素運搬体の実現が強く望まれている。赤血球よりも優れた酸素運搬効率を有する(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーは、輸血治療の概念を変革する新しい化合物となり、我が国の持続的成長と発展を支える基盤医療技術の一つとなり得る。

研究成果の概要(英文)：The realization of an artificial oxygen carrier as a red blood cell (RBC) substitute is the most important issue for next-generation medicine. In this study, (hemoglobin-albumin)trimmers have been synthesized as allosteric artificial oxygen carriers that maintained the oxygen transport efficiency of RBCs, and the oxygen binding ability has been clarified. The oxygen affinity was controlled by site-directed mutagenesis and chemical modifications. Finally, we have succeeded in the synthesis of artificial oxygen carriers with superior oxygen transport efficiency compared with that of RBCs.

研究分野：タンパク質化学、生体高分子化学、生物無機化学

キーワード：タンパク質 アロステリック効果 協同性 ヘモグロビン アルブミン 人工酸素運搬体 赤血球代替物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

赤血球中に存在するヘモグロビン(Hb)は、2種類のサブユニット( $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖)からなる四量体構造であり、酸素の結合・解離に伴い四次構造が変化する。そのため、酸素分圧の高い肺では酸素を結合しやすく、酸素分圧の低い末梢組織では酸素を解離しやすい(協同効果)。さらに、赤血球中には、2,3-ジホスホグリセリン酸(DPG)が高濃度に存在し、酸素放出能を上昇させる働きがある(DPG効果)。これら2つの効果により、赤血球内部ではHbの酸素放出能が巧みに調節され、優れた酸素輸送能が発現する。一方、日本は世界最高レベルの献血輸血システムを備えているが、少子高齢化により献血者層人口が減少すると、充分量の輸血液を確保できない状況に陥る可能性がある。これまでも国内外において、期限切れ赤血球製剤から精製したヒトHbに化学修飾を施した人工酸素運搬体(PEG-Hb、高分子化Hb、分子内架橋Hbなど)が合成されてきた(*Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 1560.)。特にHbの分子表面にヒト血清アルブミン(HSA)を共有結合した(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターは、調製の簡便性、安全性、有効性の点から、実用化に近い人工酸素運搬体として注目されている(*Sci Rep.* **2015**, *5*, 12778, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, S621.)。しかし、化学修飾によりHbの四次構造変化が抑制され、酸素結合に見られるアロステリック効果と酸素放出能が共に減少し、肺-末梢組織間における酸素運搬効率が低下してしまう欠点があった。そのため、赤血球の酸素運搬能(アロステリック効果と酸素放出能)を完全に維持した理想的な人工酸素運搬体の合成が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究は、赤血球の酸素運搬能を完全に維持したアロステリック人工酸素運搬体の合成を目的とした。具体的には、協同性に影響しないHbのアミノ酸残基(Cys- $\beta$ 120)を架橋点としてHSAを結合したrHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーを合成し、その酸素結合特性を明らかにするとともに(図1)、中心Hbへの部位特異的アミノ酸置換および化学修飾により酸素親和性の制御に取り組んだ。最終的には赤血球と同等の酸素運搬効率を有する人工酸素運搬体の創製に挑戦した。

## 3. 研究の方法

### (1) rHb(C $\beta$ 120)変異体の調製

協同性に影響しないアミノ酸残基として、Hb表面の対称位置にあるLys- $\beta$ 120を選定した(図1A)。ヒトHbの遺伝子配列をコードしたrHb発現ベクターを鋳型とし、部位特異的アミノ酸置換法により、Lys- $\beta$ 120をCysに置換したrHb(C $\beta$ 120)発現ベクターを作成した。ピキア酵母(*Pichia pastoris* GS115)を形質転換し、7日間BMMY培地中で振盪培養した。菌体の破碎上清を陽イオン交換クロマトグラフィー(CEC)、陰イオン交換クロマトグラフィー(AEC)に通し、rHb(C $\beta$ 120)を精製した。SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)測定から、rHb(C $\beta$ 120)の純度を確認した。4,4'-dithiodipyridine(4-DTP)との反応により、rHb(C $\beta$ 120)のチオール基数を算出した。

### (2) rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーの合成

HSAのCys-34に1,6-bis(maleimido)hexane(BMH)を反応させ、マレイミド活性化HSA(MA-HSA)を合成した(図1B)。得られたMA-HSA溶液とrHb(C $\beta$ 120)溶液を混合し、24時間反応させた(図1C)。AECおよびゲルろ過クロマトグラフィー(GFC)によりrHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーを単離し、Native-PAGE、SEC測定により純度を確認した。タンパク質定量およびヘム定量から、HSAの結合数を算出した。CDスペクトルからrHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーの二次構造を評価した。

### (3) rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーの酸素結合能評価

UV-visスペクトルおよびCDスペクトルにより、rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーのoxy体とdeoxy体の四次構造を解析した。酸素解離曲線自動測定装置(Hemox-Analyzer)を用いて、協同効果の指標であるHill係数( $n$ )、酸素親和性の指標である50%酸素飽和分圧( $p_{50}$ )を決定した。また、アロステリック因子であるDPGを含む緩衝液や低pH条件でも酸素解離曲線を測定し、アロステリック因子効果およびBohr効果を検証した。

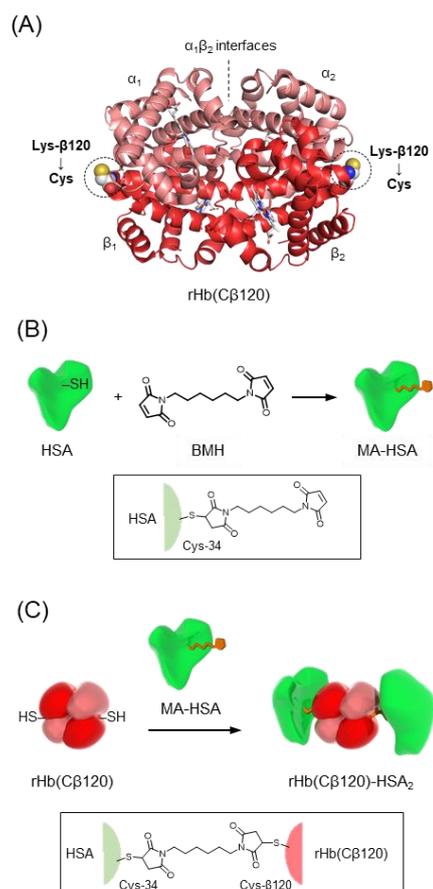


図1. (A) rHb(C $\beta$ 120)の構造および(B)マレイミド活性化HSA (MA-HSA)と(C) rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーの合成

#### (4) 変異導入および化学修飾による酸素親和性制御

部位特異アミノ酸置換法により、変異導入した rHb(C $\beta$ 120/X)を調製し、変異 rHb(C $\beta$ 120/X)-HSA<sub>2</sub>トリマーを合成した(X = T $\beta$ 66, K $\beta$ 108, F $\beta$ 28)。また、rHb(C $\beta$ 120)の Lys- $\alpha$ 99 をアセチル化およびフマル酸で架橋した化学修飾 rHb(C $\beta$ 120/X)-HSA<sub>2</sub>トリマー(X = XL $\alpha$ 99, Ac $\alpha$ 99)も合成した。得られた rHb(C $\beta$ 120/X)-HSA<sub>2</sub>トリマーの Hill 係数および  $p_{50}$  を決定した。

#### (5) ハプトグロビンに捕捉されない人工酸素運搬体の合成

赤血球から漏出した遊離 Hb は血液中のハプトグロビン(Hp)と結合し、体外に排出される。そこで、rHb の  $\alpha$  鎖同士を遺伝子組換え技術により連結した rHb(di- $\alpha$ /C $\beta$ 120)を調製し、分子内架橋 rHb(di- $\alpha$ /C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーを合成した。得られた rHb(di- $\alpha$ /C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマー溶液に Hp を添加し、SEC 測定により、複合体形成の有無を確認した。また、酸素親和性を適度に下げするため、rHb(di- $\alpha$ /C $\beta$ 120)に Asn- $\beta$ 108 $\rightarrow$ Lys 変異を導入し、Hill 係数および  $p_{50}$  を決定した。

### 4. 研究成果

#### (1) rHb(C $\beta$ 120)変異体の調製

*Pichia* 酵母を用いて rHb(C $\beta$ 120)を産生し、AEC および CEC により精製を行った。SDS-PAGE には、天然 Hb と同じ位置に  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖に由来する 2 つのバンドのみが観測され、rHb(C $\beta$ 120)が純度高く単離できた。さらに、rHb(C $\beta$ 120)の SEC 曲線は天然 Hb のものと一致し、rHb(C $\beta$ 120)は天然 Hb と同様の四量体構造であることが明らかとなった(図 2A)。メルカプト基定量から求めた rHb(C $\beta$ 120)のメルカプト基数は 4.0 であり、Lys- $\beta$ 120 $\rightarrow$ Cys の変異導入を確認した。

#### (2) rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーの合成

合成した MA-HSA のメルカプト分率は 0%であり、全ての Cys-34 に BMH が結合していることを確認した。次に、MA-HSA と rHb(C $\beta$ 120)を反応させ、SEC 測定を行った。反応混合物の SEC 曲線には、MA-HSA のピーク(1.7 mL)よりも高分子量側に新たなピークが現れた(図 2B)。AEC および GFC 後の SEC 曲線は単一のピークとなり、rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーの単離を確認した。タンパク質量およびヘム定量から求めた HSA の結合数は 2.0 であった。CD スペクトル測定から、rHb(C $\beta$ 120)に HSA が結合してもそれぞれの構成ユニットの二次構造には変化が見られないことが明らかとなった(図 2C)。

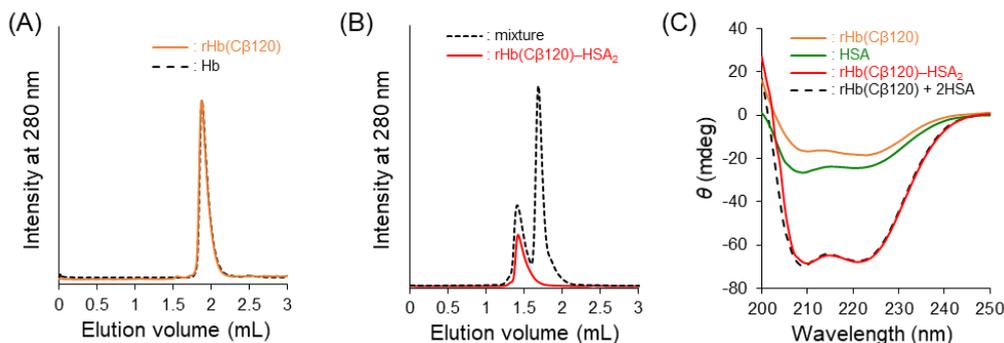


図 2. (A) rHb(C $\beta$ 120)と(B) rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>の SEC 曲線. (C) rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>の CD スペクトル.

#### (3) rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーの酸素結合能評価

UV-vis スペクトルおよび CD スペクトル測定から、rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーは天然 Hb と同様に四次構造が変化することが明らかとなった。rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーの酸素解離曲線を測定すると、天然 Hb と同じ協同効果( $n = 2.4$ )、酸素親和性( $p_{50} = 12$  Torr)を示す(図 3A)。さらに、pH を 6.2 に下げると、

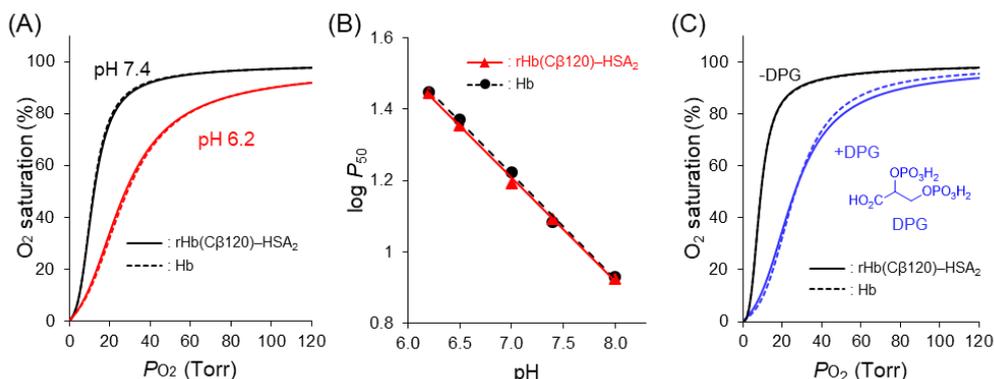


図 3. (A) 天然 Hb と rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub> の酸素解離曲線(PBS, 37 °C, pH 7.4, 6.2)と(B) Bohr プロット. (C) DPG 添加時の酸素解離曲線(Tris-HCl 緩衝液, 37 °C, pH 7.4, [DPG] = 1 mM).

酸素親和性が低下し、Bohr プロットの傾きは天然 Hb のものと一致した (図 3B,  $-\Delta\log(p_{50})/\Delta\text{pH} = 0.29$ )。また、赤血球中に存在するアロステリック因子である DPG を添加すると、Hb と同程度に酸素親和性が低下した (図 3C,  $p_{50} = 26$  Torr)。以上の結果から、rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーは Hb と同じアロステリック効果 (協同効果、Bohr 効果、DPG 効果) を有する初めての人工酸素運搬体であることが明らかとなった。

#### (4) 変異導入および化学修飾による酸素親和性制御

血漿中の DPG 濃度は赤血球中より低いいため、赤血球と比べて rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーの酸素親和性は高くなる。中心 rHb(C $\beta$ 120)に変異導入および化学修飾を行うと、協同効果を維持しつつ、適度に酸素親和性が低下した (図 4)。中でも、rHb(C $\beta$ 120/X)-HSA<sub>2</sub>トリマー (X = T $\beta$ 66, A $\alpha$ 99) は、赤血球と同等の酸素結合能を示し、rHb(C $\beta$ 120/X)-HSA<sub>2</sub>トリマー (X = F $\beta$ 28, XLa99) は赤血球よりも高い酸素運搬効率を有することがわかった。つまり、変異導入および化学修飾された rHb(C $\beta$ 120/X)-HSA<sub>2</sub>トリマーは優れた酸素運搬効率を有する人工酸素運搬体となることが明らかとなった。

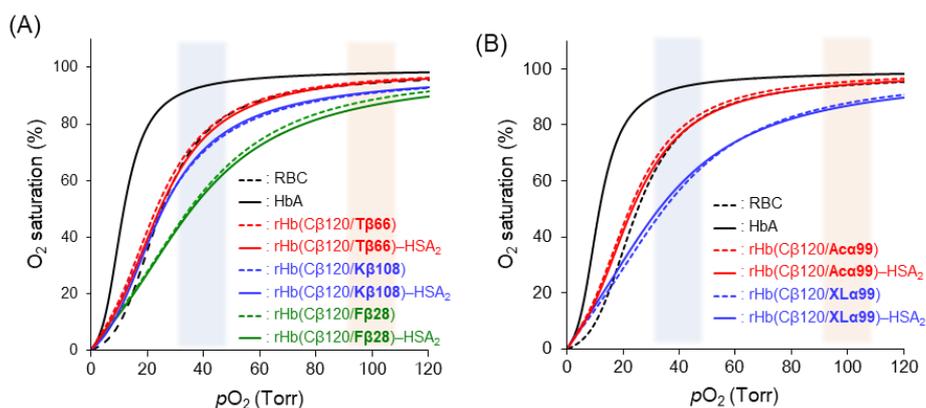


図 4. (A) 赤血球、天然 Hb と変異 rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub> (X = T $\beta$ 66, K $\beta$ 108, F $\beta$ 28) および (B) 化学修飾 rHb(C $\beta$ 120/X)-HSA<sub>2</sub> (X = A $\alpha$ 99, XLa99) の酸素解離曲線 (PBS, 37 °C, pH 7.4)。

#### (5) ハプトグロビンに捕捉されない人工酸素運搬体の合成

Hb の  $\alpha_1$  鎖の C 末端と  $\alpha_2$  鎖の N 末端をグリシンで架橋した rHb(di- $\alpha$ / $\beta$ C120)を原料として、分子内架橋 rHb(di- $\alpha$ / $\beta$ C120)-HSA<sub>2</sub>トリマーを合成した (図 5A)。SEC 測定から希薄条件でも  $\alpha\beta$  二量体に解離しないことを確認した。未架橋の rHb( $\beta$ C120)-HSA<sub>2</sub>トリマーと Hp を混合した溶液の SEC 曲線には、高分子量側に新たなピークが観測され、複合体の形成が示唆された (図 5B)。一方、分子内架橋 rHb(di- $\alpha$ / $\beta$ C120)-HSA<sub>2</sub>トリマーでは、Hp 複合体の形成は見られなかった (図 5C)。また、Asn- $\beta$ 108→Lys 変異導入により、適度に酸素親和性を下げることができた。rHb の  $\alpha$  鎖同士を連結した分子内架橋 rHb-HSA<sub>2</sub>トリマーは Hp に捕捉されない優れた人工酸素運搬体であることが明らかとなった。

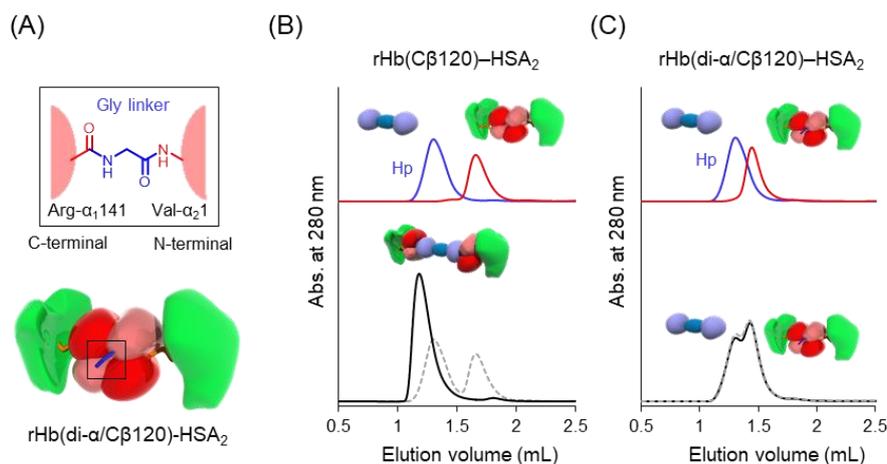


図 5. (A) 分子内架橋 rHb(di- $\alpha$ / $\beta$ C120)-HSA<sub>2</sub> の構造。 (B) 未架橋の rHb( $\beta$ C120)-HSA<sub>2</sub> および (C) rHb(di- $\alpha$ / $\beta$ C120)-HSA<sub>2</sub> と Hp の混合溶液の SEC 曲線。

以上の結果を総合し、rHb(C $\beta$ 120)-HSA<sub>2</sub>トリマーおよびその類縁体が、赤血球と同等の酸素運搬効率を有する優れた人工酸素運搬体となることを実証した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morita Yoshitsugu, Shindo Yuki, Komatsu Teruyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Protein Triad Comprising Genetically Fused Hemoglobin and Human Serum Albumins as an Artificial O <sub>2</sub> Carrier Resistant to Haptoglobin Binding	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2011～2014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/cl.210549	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morita Yoshitsugu, Takada Ryoya, Saito Asuka, Komatsu Teruyuki	4. 巻 57
2. 論文標題 Genetically and chemically tuned haemoglobin-albumin trimers with superior O <sub>2</sub> transport efficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 9144～9147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1CC03684J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Morita Yoshitsugu, Saito Asuka, Yamaguchi Jun, Komatsu Teruyuki	4. 巻 1
2. 論文標題 Haemoglobin( K120C)-albumin trimer as an artificial O <sub>2</sub> carrier with sufficient haemoglobin allostery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 128～136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0CB00056F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Y. Morita, K. Igarashi, R. Funaki, T. Komatsu	4. 巻 20
2. 論文標題 Hemoglobin( C93A)-Albumin Cluster: Mutation of Cysteine- 93 to Alanine Allows Moderate Reduction of O <sub>2</sub> Affinity by Inositol Hexaphosphate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1684 - 1687
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201900079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 森田 能次、小松 晃之
2. 発表標題 協同効果を有する人工酸素運搬体（ヘモグロビン-アルブミン）トリマーの合成と酸素親和性制御
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田 諒也、森田 能次、小松 晃之
2. 発表標題 アルブミン - ミオグロビン融合タンパク質の合成
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ2021 2021年10月20日
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshitsugu Morita, Teruyuki Komatsu
2. 発表標題 Recombinant Hemoglobin( K120C)-Albumin Heterotrimer: Artificial O <sub>2</sub> Carriers with Hemoglobin Allostery
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 船本 瑞稀、高田 諒也、森田 能次、小松晃之
2. 発表標題 光線力学療法のためのアルブミン-ミオグロビン融合タンパク質の合成
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田能次、高田諒也、齊藤飛鳥、小松晃之
2. 発表標題 アロステリック効果を有する組換えヘモグロビン-アルブミントリマーの合成
3. 学会等名 第27回日本血液代替物学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田瑠佳、齊藤飛鳥、森田能次、小松晃之
2. 発表標題 Lys- 99置換ヘモグロビン変異体の合成と酸素親和性
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田能次、大熊千夏、小松晃之
2. 発表標題 酸素結合解離に応答して構造が変化するヘモグロビンオリゴマーの合成
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林樹広、岡本航、長谷川舞、森田能次、小松晃之
2. 発表標題 組換えヒトヘモグロビンナノ粒子の合成と酸素結合能
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高田諒也、齊藤飛鳥、森田能次、小松晃之
2. 発表標題 協同的酸素結合能を有する(ヘモグロビン(K120C)アルブミン)トリマーの合成
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田能次、齊藤飛鳥、小松晃之
2. 発表標題 協同的酸素結合能を有する(ヘモグロビン-アルブミン)トリマーの合成
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤飛鳥、森田能次、小松晃之、
2. 発表標題 協同性を保持した(ヘモグロビン(K120C)-アルブミン)トリマーの合成と酸素結合能
3. 学会等名 錯体化学会第68回討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤飛鳥、森田能次、小松晃之
2. 発表標題 アロステリック効果を有する(ヘモグロビン(K120C)-アルブミン)トリマーの合成と酸素結合パラメーター
3. 学会等名 第9回CSJ化学フェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Morita, Y. Shindo, T. Komatsu
2. 発表標題 Synthesis and O <sub>2</sub> Binding Property of Recombinant Cross-Linked Hemoglobin-Albumin Trimer with Cooperativity
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤飛鳥、森田能次、小松晃之
2. 発表標題 化学修飾による（組換えヘモグロビン-アルブミン）トリマーの酸素親和性制御
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田諒也、齋藤飛鳥、森田能次、小松晃之
2. 発表標題 変異導入による（組換えヘモグロビン-アルブミン）トリマーの酸素親和性制御
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田能次
2. 発表標題 アロステリック効果を有する人工酸素運搬体の開発
3. 学会等名 第32回生物無機化学夏季セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Morita, T. Komatsu
2. 発表標題 Synthesis and Oxygen Binding Property of Recombinant Hemoglobin( C93A)-Albumin Cluster “HemoAct™” with Allosteric Effect of Inositol Hexaphosphate
3. 学会等名 The 17th International Symposium on Blood Substitutes and Oxygen Therapeutics (XVII-ISBS-2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Morita, T. Komatsu
2. 発表標題 O2-Binding Property of Recombinant Hemoglobin( C93A)-Albumin Cluster as a Red Blood Cell Substitute
3. 学会等名 15th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC-15) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Morita, T. Komatsu
2. 発表標題 Hemoglobin ( C93A)-Albumin Cluster with Moderate Allosteric Effect by Inositol Hexaphosphate
3. 学会等名 19th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ISBIC-19) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------