

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 24 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390028

研究課題名(和文) 機能性ヒト血清アルブミンの創製と薬物認識機構に関する研究

研究課題名(英文) Development of functional human serum albumin (HSA) mutants and studies of their
ABT recognition mechanisms

研究代表者

森岡 弘志 (MORIOKA, HIROSHI)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬学系)・教授

研究者番号：20230097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HSAのBR結合サイトを含むドメインII領域に着目し、分子進化工学的な手法によって、BRに対して高親和性を示す機能性アルブミン分子の開発研究を進めた。得られた一つの変異体(F211R、R218L)は、SPR解析の結果、結合様式がtwo state reactionモデルに変化し、野生型に比べて約7倍BR結合活性の向上が見られた。BRの誘起CD測定とMOEによるモデリングの解析から、R218Lの変異により、BRが結合ポケットの奥深くに入り込み、BR結合性が増加すると考えられた。高BR血症マウスにドメインII変異体を静脈内投与したところ、血中のBR除去効果が見られた。

研究成果の概要(英文)：We have obtained several recombinant human serum albumin (HSA) domain II mutant proteins with high bilirubin (BR) binding affinity by phage display technology. The BR binding affinity of RWLR mutant was found to be 7 times higher than that of WT (FWRR). The results of docking simulation studies and induced CD spectra analyses of BR bound to HSA domain II protein (WT and RWLR mutant) showed that the entrance of BR-binding pocket in RWLR mutant has expanded by the replacement of Arg with Leu at position 218, suggesting that BR could enter the binding pocket more deeply as compared with WT (FWRR). Administration of RWLR mutant reduced serum BR level and increased its urinary excretion in the disease model mice as compared to WT (FWRR) treatment.

研究分野：創薬化学

キーワード：薬物認識 ヒト血清アルブミン ビリルビン タンパク質工学 分子進化工学 ファージディスプレイ
ランダム変異 ビリルビン排泄促進剤

1. 研究開始当初の背景

血液中に存在する低分子量の水溶性毒素は、血液透析療法により効率的に除去される。しかし一方で、血中タンパク質であるアルブミンに対して高い結合性を示すビリルビン (BR) 等の不溶性毒素の除去は、現状の血液透析療法では非常に困難である。BRをはじめとするアルブミン結合毒素 (ABT) を除去する新しい血液浄化療法として、透析液中に血清由来のアルブミンを添加し、結合毒素を透析液中に引き抜くアルブミン循環透析法 (ECAD) が注目されている。しかしながら、血清由来のアルブミンを用いる現状の方法では、ABT除去能が十分でないため、臨床効果が不十分であるという問題を抱えていた。

2. 研究の目的

(1) ヒト血清アルブミン (HSA) の薬物結合ドメインを M13 繊維状ファージの表面に提示させ、分子進化工学的手法により薬物結合活性を向上させ、ABT を捕獲する小型アルブミン分子の開発とその ABT 認識機構の解明、さらには、得られたタンパク質分子の構造と機能のデータを解析し、さらに合理的な ABT 捕獲分子の設計と調製法の確立を目的とした研究を行う。

(2) ターゲットとする ABT として BR を選択し、得られた BR 高捕獲型アルブミンドメイン分子を高ビリルビン血症マウスに投与して、尿中への BR 排泄能を測定・比較することで、ECAD への応用の可能性を見出すことを研究目的とする。

3. 研究の方法

これまでに、HSA のドメイン [薬物結合サイト 領域 (BR の主要結合部位) を含む] を M13 ファージ表面へ提示させることを試みており、抗 HSA 抗体を用いた実験から、HSA ドメイン がファージ表面に提示されていることが確認された。次に、BR と HSA との結合に BR のカルボニル基 (負電荷) が関与するという報告をもとに、サイト領域近傍に存在する 12 残基の塩基性アミノ酸部位 (正電荷) に、4 種類のアミノ酸 [Ala (中性)、Glu (酸性)、Lys または Arg (塩基性)] をランダムに変異導入した後、BR をセファロース樹脂に固定化させたものをリガンドとして、BR に結合するファージ分子のスクリーニング (バイオパニング) を行ったところ、Lys195 および Lys199 の 2 残基が BR への結合に重要であることが分かった。これら 2 残基は、別の研究グループにより、BR 結合への関与が示唆されていたことから、アルブミンのファージディスプレイ系の信頼性を確認することができた。

(1) アルブミンの薬物結合サイト 領域は、

4 本の α -ヘリックスとそれらを支える 1 本の短い裏打ち型 β -ヘリックスに囲まれた領域 (Helix 1~Helix 5) で、化合物が入る位置を包み込むようなポケットを形成している。前述した Lys195 および Lys199 は、同じ α -ヘリックス (Helix 1) 上で、ポケットの内側を向くように配置されている。各 α -ヘリックスからポケットの内側に、16 残基の各種のアミノ酸 (Lys195、Lys199、Phe211、Trp214、Arg218、Arg222、Leu234、Leu238、His242、Arg257、Leu260、Ile264、Leu284、Ser287、Ile290、Glu292) がその側鎖を向けている。Lys195 と Lys199 は BR との結合に不可欠であるので、残りの 14 残基を標的として、20 種類すべてのアミノ酸残基にランダム変異を導入したファージライブラリーを作製し、様々な条件検討 (結合および洗浄条件、温度、塩濃度、界面活性剤濃度等) を行いながら、バイオパニングによるスクリーニング操作を進め、より結合活性の高いファージクローンを獲得する。

(2) 得られたファージクローンから遺伝子配列の解析を行い、次に大腸菌発現ベクターに導入して、HSA ドメイン 変異体タンパク質の調製を行う。組換え型アルブミンの調製にはピキア酵母を用いる方法が一般的であるが、分子進化工学的手法により得られるファージクローン数、実験効率、構造機能相関の解析を進めること等を考慮して、大腸菌による変異体タンパク質調製法を確立する。

(3) Biacore T100 を用いて、HSA ドメイン 変異体の BR 結合活性を評価する。BR をセンサーチップに固定化し、変異体タンパク質をアナライトとして、速度論的解析 (k_{on} 、 k_{off} 、 K_d 測定) を行う。また、BR をセンサーチップ表面に固定化する方法の改良を試みる。

(4) HSA の立体構造情報に基づき、得られたアミノ酸配列情報を解析して、BR 結合領域を推察する。統合計算化学システム MOE を用いて分子モデリングを行い、BR と相互作用する HSA 分子内のアミノ酸残基を予想する。さらに、得られた HSA ドメイン 変異体クローンのアミノ酸配列との比較検討を行う。

(5) BR は、溶液中において Ridge-Tile form (P 型構造、M 型構造) という 2 つのコンフォーマー間で平衡状態を保っている。HSA と BR 複合体の誘起 CD スペクトルを測定すると、460 nm 付近に正のコットン効果を示すため、BR は HSA との結合の際に、P 型構造を取ることが知られている。このような誘起 CD スペクトルを観察することで、HSA ドメイン 変異体の BR 結合様式を解析する。

(6) 胆管結紮によって引き起こされた高

BR 血症マウスに、得られた HSA ドメイン変異体を急速静脈内投与して、血中 BR 量と尿中 BR 量を測定し、BR 除去効果を検討する。

4. 研究成果

(1) コンピナトリアル・バイオエンジニアリング技術を用いたファージディスプレイ法により、Helix 2 に存在する 4 残基 (野生型 Phe211, Trp214, Arg218, Arg222; FWRR) にランダムな変異を導入した HSA ドメイン変異体ライブラリーから、BR をアミンカップリング法により EAH Sepharose 4E に固定化したゲルを用いてバイオパニングを行い、野生型 (FWRR) に比べて、有意に BR 高親和性を示す 2 種類のクローン F211R-R218L (RWLR) および F211L-R218S-R222W (LWSW) を得た。

(2) HSA ドメイン変異体の調製は、発現ベクターとして pET-28b(+) プラスミドを用い、大腸菌株 BL21-CodonPlus(DE3)-RIL に形質転換した後、タンパク質を封入体として発現させた。塩酸グアニジン溶液にて可溶化後 Ni アフィニティークロマトグラフィーにより精製した後、酢酸緩衝液により沈殿させた。その後、尿素溶液に可溶化し、透析により段階的に尿素の濃度を下げてリフォールディングを行った。さらにブルーセファロースカラム、ゲル濾過クロマトグラフィーを行った。酢酸緩衝液による沈殿、リフォールディングの 2 点を改良したことで、これまでより収量が上昇し高純度の HSA ドメイン変異体タンパク質を得ることができた。このような HSA ドメインタンパク質の精製方法は、他の遺伝子組換え型タンパク質の調製の際にも応用することが可能であった。

(3) HSA ドメイン変異体 F211R-R218L (RWLR) に関して、BR 結合活性を、Biacore T100 による速度論的な解析を行ったところ、結合様式が two state reaction モデルに変化し、野生型 HSA ドメイン (FWRR) に比べて約 7 倍 BR 結合活性の向上が見られた。

(4) SPR を用いた評価法の改良を目指して、金の薄膜上に 5% Amino-EG6-undecan thiol, hydrochloride と 95% Hydroxy-EG3-undecan thiol で構成された自己組織化単分子膜 (SAMs) を作製した。次にビリルビンを EDC と NHS により活性化した後、SAMs 上のアミノ基に結合させた。さらに、未反応のアミノ基を無水酢酸を用いてブロッキングした。その後、HSA ドメインタンパク質およびその変異体とビリルビンの結合を Biacore 2000 を用いて測定した。この結果、野生型 HSA ドメインタンパク質の濃度依存的な結合がみられた。さらにファージディスプレイ法により得られた BR との親和性の高い HSA ドメイン変異体 F211L

-R218S-R222W (LWSW) は、野生型 HSA ドメインより高い結合が見られた。以上ことから SAMs を用いてビリルビンを固定化する方法において、HSA ドメインの結合評価が可能であることが明らかとなった。

(5) HSA ドメイン変異体 F211R-R218L (RWLR) および F211L-R218S-R222W (LWSW) に対する BR 立体選択結合性を誘起 CD スペクトルによって評価した。その結果、いずれの変異体においてもスペクトルの反転が観察され、BR の立体選択性が P-form から M-form へとシフトしていた。以上のことから、これらの HSA ドメイン変異体における BR 結合サイトの立体構造は、野生型 HSA とは異なっていることが推察された。

(6) HSA ドメイン変異体 [F211R-R218L (RWLR)] に対する BR の結合様式を推察するために、複合体の構造を分子モデリング (MOE) によって解析した。その際に、リガンドの座標ファイルは、PDB に情報が存在する 4Z, 15E-BR を用いた。野生型ドメイン (FWRR) では、結合ポケットの入り口が正に帯電しており、結合している BR の構造が一部表面に露出していた。一方、HSA ドメイン変異体 [F211R-R218L (RWLR)] では、R218L の変異により結合ポケットの入り口が広がり、BR が奥に入りやすい構造へと変化していたことから、BR が疎水性ポケットでフィットし易い環境に置かれている可能性が示唆された。ポケット内部の正電荷領域は保持されていたことから、BR のカルボキシル基との静電的相互作用は維持されているものと推察された。

(7) BR の誘起 CD 測定結果と MOE によるモデリング解析から、R218L の変異により、BR が結合ポケットの奥深くに入り込み、BR 結合性が増加すると考えられた。

(8) 胆管結紮によって引き起こされた高 BR 血症マウスに、上記のドメイン II 変異体を急速静脈内投与して、BR 除去効果を検討した。Saline 投与群では、病態の進行に伴い血中 BR 濃度が上昇した。また、野生型ドメイン II 投与群では、BR の血中濃度の上昇を抑制するにとどまったが、上記のドメイン II 変異体投与群では、尿中排泄の増加に伴い、血中 BR 濃度を有意に低下させた。すなわち、本研究により得られたドメイン II 変異体は BR 血症に対する侵襲性の低い新規尿中排泄促進剤としての有用性が示唆された。

現在、さらにクローンの解析を進め、より優れた HSA 変異体の探索を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

Taguchi K, Chuang VT, Yamasaki K, Urata

Y, Tanaka R, Anraku M, Seo H, Kawai K, Maruyama T, Komatsu T, Otagiri M, Cross-linked human serum albumin dimer has the potential for use as a plasma-retaining agent for the fatty acid-conjugated antidiabetic drugs., J Pharm Pharmacol, 査読有、2015、Vol.67、255-263
DOI:10.1111/jphp.12335

Miyata K, Takagi M, Sato S, Morioka H, Shiba K, Minamisawa T, Takami M, Fujita N, Suppression of Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and pulmonary metastasis by a single-chain antibody variable region fragment., Cancer Med, 査読有、2014、vol.3、1595-1604
DOI:10.1002/cam4.320

Sasao A, Suwa Y, Aso T, Kohmatsu H, Ohtsu Y, Mishima S, Yonemitsu K, Morioka H, Nishitani Y, Single-chain variable fragment technology in forensic toxicological analysis: production of an antibody to fluvoxamine., Forensic Toxicol, 査読有、2013、vol.31、62-66
DOI:10.1007/s11419-012-0163-4

Minomo A, Ishima Y, Chuang VT, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T, Morioka H, Maruyama T, Otagiri M, Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment.、Biochim Biophys Acta-General Subjects, 査読有、2013、vol.1830、2917-2923
DOI:10.1016/j.bbagen.2013.01.006

Taguchi K, Jono H, Kugimiya-Taguchi T, Nagao S, Su Y, Yamasaki K, Mizuguchi M, Maruyama T, Ando Y, Otagiri M, Effect of albumin on transthyretin and amyloidogenic transthyretin Val30Met disposition and tissue deposition in familial amyloidotic polyneuropathy., Life Sci, 査読有、2013、vol.93、1017-1022
DOI:10.1016/j.lfs.2013.10.031

Ogura, K, Kobashigawa, Y, Saio, T, Kumeta, H, Torikai S, Inagaki F, Practical applications of hydrostatic pressure to refold proteins from inclusion bodies for NMR structural studies., Protein Eng Des Sol, 査読有、2013、vol.26、409-416
DOI:10.1093/protein/gzt012

〔学会発表〕(計5件)

Maruyama, T, Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment., The 5th Asian Arden Conference, 2013/8/6、Aichi Gakuin University (Nagoya)

笠毛映理子、SPRによる自己組織化膜(SAMs)上に固定化されたビリルビンとヒト血清アルブミンドメインの結合評価、BMAS2012 / 第25回バイオメディカル分析科学シンポジウム、2012/8/9、慶応義塾大学薬学部・芝共立キャンパス(東京)

西村知晃、ビリルビン尿中排泄作用を促進したヒト血清アルブミンドメインII変異体による低侵襲性血液浄化療法の開発、医療薬学フォーラム2012 / 第20回クリニカルファーマーシンポジウム、2012/7/15、福岡国際会議場(福岡)

小田切優樹、ヒト血清アルブミンドメインIIによるビリルビン尿中排泄促進作用、第28回日本DDS学会学術集会、2012/7/5、札幌コンベンションセンター2-C-10(札幌)

西村知晃、ファージディスプレイ法を用いた尿毒症物質3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2furan(CMPF)高親和性アルブミン変異体の設計、日本薬剤学会第27年会、2012/5/26、神戸国際会議場(神戸)

〔図書〕(計1件)

Kobashigawa Y, Fukuda N, Nakahara Y, Morioka H, Springer, Advanced Methods in Structural Biology (Surface Plasmon Resonance)、2015、15、印刷中

〔その他〕
ホームページ等

新たな治療法を求めて ～血液透析法に一石を～
<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/bunseki/research.html>

ヒト血清アルブミン(HSA)の生体内動態制御機構および組換え型HAS製剤の臨床応用に関する研究
<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/Yakuzai/research/index.html>

新たな抗体分子をつくり医療につなげよう
～新薬を創る・病気の状態を調べる・治療法
を開発する～

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/center/souyaku/project/morioka.html>

6．研究組織

(1) 研究代表者

森岡 弘志 (MORIOKA HIROSHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20230097

(2) 研究分担者

小田切 優樹 (OTAGIRI MASAKI)
崇城大学・薬学部・教授
研究者番号：80120145

小橋川 敬博 (KOBASHIGAWA YOSHIHIRO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：90455600
(平成 25 年度～平成 26 年度)

諏訪 喜昭 (SUWA YOSHIAKI)
熊本大学・薬学部・特任助教
研究者番号：50516127
(平成 24 年度)