

崇城大学学位論文

アルブミン製剤における *N*-アセチル-L-メチオニンの  
安定化剤としての有用性評価

平成 27 年度

河野 陽介

アルブミン製剤における *N*-アセチル-L-メチオニンの  
安定化剤としての有用性評価

**March, 2016**

河野 陽介

**The role of *N*-acetyl-L-methionine as a new stabilizer  
on the albumin products**

**Yousuke Kouno**

## The role of *N*-acetyl-L-methionine as a new stabilizer on the albumin products

Yousuke Kouno

Albumin products are widely used in treating a variety of diseases, including improving circulating blood flow during hemorrhagic and traumatic shock, maintaining colloid osmotic pressure during hypoalbuminemia due to a decrease in the ability of the liver to synthesize albumin. As the only source of human serum albumin (HSA) for clinical application is from donated human blood, which involves a risk of transmitting pathogenic viral diseases, such as hepatitis, human immunodeficiency virus (HIV), and as yet unidentified diseases. HSA is pasteurized by heating at 60°C for several hours with sodium octanoate (Oct) and *N*-acetyl-L-tryptophan (N-AcTrp), commonly used stabilizers, a process that usually destroys the viruses present. We have previously shown that Oct has the greatest stabilizing effect against heat, while N-AcTrp diminishes the oxidation of HSA. However, N-AcTrp has a possible side effect of intracerebral disease. In order to provide a new, safer stabilizer for albumin products without the risk of side effects instead of N-AcTrp, we investigated the usefulness of *N*-acetyl-L-methionine (N-AcMet) in comparison with N-AcTrp for long-term stability, including photo-irradiation and the oxidation of albumin products.

### 1) The effect of N-AcMet on the oxidation and thermal stability of HSA

The effect of N-AcMet on oxidation was examined using 2,2'-Azobis (2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) as an oxidizing agent. The carbonyl content in the presence of N-AcMet and both Oct and N-AcMet were significantly decreased. The effect of AAPH on the oxidative status of Cys34 on HSA was also studied by HPLC. N-AcMet exerted a substantial protective effect on the sulfhydryl group. Further, N-AcMet was found to be a superior radical scavenger to N-AcTrp using 1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals. The thermal stability of both Oct and N-AcMet was manifested as an increase in the denaturation temperature and calorimetric enthalpy, as determined by differential scanning calorimetry (DSC). Thus, N-AcMet can be considered to be sufficiently strong to act as a stabilizing agent having the same or more antioxidant activity with respect to HSA compared to the N-AcTrp.

### 2) The validation of N-AcMet in comparison with N-AcTrp for photo-stability of HSA

The protective effect of N-AcMet and N-AcTrp on the photo-irradiation of HSA was investigated. We first investigated the stabilizing effect of N-AcMet and N-AcTrp after the photo-irradiation by circular dichroism (CD) spectra and DSC. The stabilizing effect of Oct was also found to be superior to that of N-AcMet and N-AcTrp, as evidenced by the  $\alpha$ -helical content of HSA and thermal stability after photo-irradiation. In contrast to N-AcMet, N-AcTrp abolished the positive effect of Oct when the two compounds are used together. Thus, N-AcTrp is not able to protect the structure of HSA during photo-irradiation. Next, the hydroxyl radical ( $\cdot$ OH) scavenging activity of HSA with additives after photo-irradiation was examined. N-AcMet was found to be superior to N-AcTrp in scavenging  $\cdot$ OH

and in protecting HSA both against  $\cdot\text{OH}$  and prolonged exposure to light. The extent of oxidation of HSA after photo-irradiation was also evaluated by measuring the content of carbonyl groups in the molecule. The photo-irradiation of HSA in the presence of N-AcTrp resulted in an increased formation of carbonyl groups. By contrast, N-AcMet diminished the content of carbonyl groups. Thus, N-AcMet is superior to N-AcTrp, because exposure to light photo-degrades the latter to produce potentially toxic compounds which promotes the photo-oxidative damage of albumin. Therefore, compared to N-AcTrp, N-AcMet is a safe and risk-free stabilizer of albumin during photo-irradiation.

### **3) Binding mode of N-AcMet and Oct on the HSA molecule**

The binding capacity of the N-AcMet, Oct was investigated using an ultrafiltration method. The binding constants of Oct and N-AcMet was found to be  $1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  and  $5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , respectively. In addition, a HSA-N-AcMet-Oct ternary complex was prepared and subjected to X-ray crystallography. The overall structure of the HSA-N-AcMet-Oct complex is composed of a heart-shaped structure, the binding site of the N-AcMet appear to be subdomain IIA, otherwise major binding sites of Oct appear to be a subdomain IIIA. In detail, the carboxyl group of N-AcMet bound to subdomain IIA was presumed to form hydrogen bonding with the side chain of Lys195 and Arg222. Interestingly, this binding site was clearly different from N-AcTrp bound to the subdomain IIIA. These data suggest that N-AcMet effectively exerts antioxidant activity than N-AcTrp.

### **4) The validation of N-AcMet in comparison with N-AcTrp for the oxidative modification of HSA**

The protective effect of N-AcMet and N-AcTrp on the oxidative modification of HSA was investigated. Chloramine-T (CT) was used as a model compound for mimicking oxidative stress. The treatment of HSA with CT resulted in the formation of a pronounced number of advanced oxidation protein products (AOPP) and carbonyl groups. Oxidation in the presence of N-AcMet or N-AcTrp results in a decreased amount of AOPP and carbonyl groups. In particular, the protective effect of N-AcMet is pronounced, because the AOPP and carbonyl groups formed in its presence is lower than the amount formed in the presence of N-AcTrp and much lower than that formed in the absence of an additive. In addition, CT-HSA with N-AcMet is superior for scavenging peroxynitrite and  $\cdot\text{OH}$  compared to CT-HSA with N-AcTrp. Finally, in an attempt to evaluate whether the CT-induced oxidations without and with additives had any effect on the biological fate of HSA, plasma half-lives and the bio-distribution of the HSAs in mice was determined. CT-HSA with N-AcMet showed longer half-lives as compared with that of CT-HSA with N-AcTrp and non-additive CT-HSA. Furthermore, the liver uptake of CT-HSA with N-AcTrp were much more pronounced than that of CT-HSA with N-AcMet. These results reveal that N-AcMet has a superior protective effect on HSA against post-translational oxidation compared to N-AcTrp.

In conclusion, the above findings strongly suggest that N-AcMet functions as a stabilizing agent and that it is a more effective antioxidant of albumin products compared to N-AcTrp. The results obtained in this study may lead to basic data that can be useful for developing albumin products that are more efficacious and safer than the currently used products.

## 本論文で使用した略号一覧

AGE	最終糖化産物	advanced glycation end products
AOPP	タンパク質過酸化物	advanced oxidized protein products
CD	円二色性	circular dichroism
CD36		cluster of differentiation 36
CT	クロラミン T	chloramine T
DNSS	ダンシルサルコシン	dansylsarcosine
DPPH	1,1'-ジフェニル-2-ピクリルヒドラジル	1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl
DSC	断熱型示差走査熱量計	differential scanning calorimetry
ESR	電子スピン共鳴	electron spin resonance
HMA	ヒト還元型アルブミン	human mercaptalbumin
HNA-1	ヒト酸化型アルブミン-1	human nonmercaptalbumin (disulfide)
HNA-2	ヒト酸化型アルブミン-2	human nonmercaptalbumin (oxidized)
HSA	ヒト血清アルブミン	human serum albumin
ICG	インドシアニングリーン	indocyanine green
MPD	2-メチル-2,4-ペンタンジオール	2-methyl-2,4-pentanediol
N-AcCys	<i>N</i> -アセチル-L-システイン	<i>N</i> -acetyl-L-cysteine
N-AcMet	<i>N</i> -アセチル-L-メチオニン	<i>N</i> -acetyl-L-methionine
N-AcTrp	<i>N</i> -アセチル-L-トリプトファン	<i>N</i> -acetyl-L-tryptophan
Oct	オクタン酸ナトリウム	sodium n-octanoate
PDB	蛋白質構造データバンク	protein data bank
r.m.s.d.	平均二乗偏差	root mean square deviation
ROS	活性酸素種	reactive oxygen species
WF	ワルファリン	warfarin

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

- (1) The role of *N*-acetyl-methioninate as a new stabilizer for albumin products  
International Journal of Pharmaceutics, 329, 19-24 (2007)  
Anraku M, Kouno Y, Kai T, Tsurusaki Y, Yamasaki K, and Otagiri M.
  
- (2) *N*-acetyl-L-methionine is a superior protectant of human serum albumin against photo-oxidation and reactive oxygen species compared to *N*-acetyl-L-tryptophan  
Biochimica et Biophysica Acta, 1840(9), 2806-2812 (2014)  
Kouno Y, Anraku M, Yamasaki K, Okayama Y, Iohara D, Ishima Y, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Hirayama F, and Otagiri M.
  
- (3) *N*-acetyl-L-methionine is a superior protectant of human serum albumin against post-translational oxidation as compared to *N*-acetyl-L-tryptophan  
Biochemistry and Biophysics Reports, submitted for publication.  
Kouno Y, Anraku M, Yamasaki K, Okayama Y, Iohara D, Nakamura H, Maruyama T, Hirayama F, Kragh-Hansen U, and Otagiri M.

## 目次

第1章 緒言.....	1
第2章 アルブミン製剤の添加剤としての <i>N</i> -アセチル-L-メチオニン ( <i>N</i> -AcMet) の機能性評価..	6
第1節 序.....	6
第2節 Human serum albumin (HSA) に及ぼす <i>N</i> -AcMet の抗酸化評価.....	6
2-1 カルボニル含量.....	6
2-2メルカプト分率.....	7
2-3 1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去能.....	9
第3節 HSA に及ぼす <i>N</i> -AcMet の熱安定性評価.....	10
3-1 断熱型示差走査熱量計 (DSC).....	10
第4節 考察.....	12
第5節 小括.....	13
第3章 アルブミン製剤の光安定性に対する <i>N</i> -アセチル-L-メチオニンと <i>N</i> -アセチル-L-トリプトファン ( <i>N</i> -AcTrp) の比較検討.....	15
第1節 序.....	15
第2節 光照射 HSA の構造安定性.....	16
2-1 円二色性 (CD) スペクトル.....	16
2-2 DSC.....	17
第3節 光照射 HSA の抗酸化効果.....	19
3-1 電子スピン共鳴 (ESR) スピントラップ法.....	19
3-2 カルボニル含量.....	21
第4節 考察.....	23
第5節 小括.....	25
第4章 HSA 分子上における <i>N</i> -アセチル-L-メチオニンとオクタン酸ナトリウム (Oct) の結合様式	26
第1節 序.....	26
第2節 HSA と <i>N</i> -AcMet 及び Oct との相互作用.....	27
2-1 HSA に対する <i>N</i> -AcMet と Oct の結合の定量的評価.....	27
2-2 HSA 分子上における <i>N</i> -AcMet と Oct の結合部位の識別.....	27

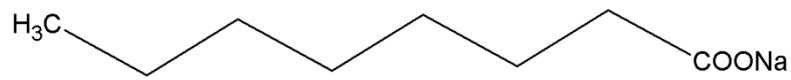
第3節 HSA と N-AcMet 及び Oct 三元複合体の X 線結晶構造解析. . . . .	29
3-1 HSA-N-AcMet-Oct 複合体の結晶化. . . . .	29
3-2 HSA-N-AcMet-Oct 複合体の全体構造. . . . .	32
3-3 HSA 分子上の N-AcMet の結合様式. . . . .	34
3-4 HSA 分子上の Oct の結合様式. . . . .	35
第4節 考察. . . . .	38
第5節 小括. . . . .	41
第5章 アルブミン製剤の酸化修飾に対する <i>N</i> -アセチル-L-メチオニンと <i>N</i> -アセチル-L-トリプトファン の有用性評価. . . . .	43
第1節 序. . . . .	43
第2節 酸化修飾モデル HSA の抗酸化能. . . . .	44
2-1 クロラミン T による酸化修飾モデル HSA の調製. . . . .	44
2-2 カルボニル含量. . . . .	45
2-3 ペルオキシナイトライト消去能及びヒドロキシルラジカル消去能. . . . .	46
第3節 酸化修飾モデル HSA の構造安定性. . . . .	48
3-1 SDS-PAGE. . . . .	48
3-2 DSC. . . . .	48
3-3 CD スペクトル. . . . .	50
3-4 蛍光スペクトル. . . . .	51
第4節 酸化修飾モデル HSA の体内動態特性. . . . .	52
4-1 Indocyanine green (ICG) 標識酸化修飾モデル HSA の血漿中濃度推移及び 臓器移行性. . . . .	52
第5節 考察. . . . .	54
第6節 小括. . . . .	57
第6章 総括. . . . .	58
実験の部. . . . .	62
謝辞. . . . .	72
参考文献. . . . .	74



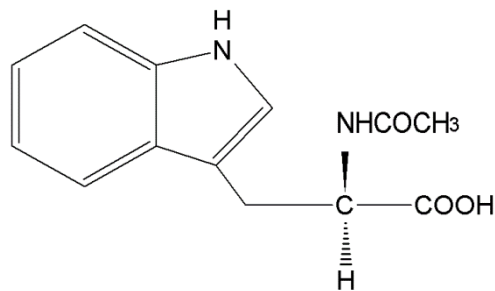
## 第1章 緒言

アルブミン製剤は、急性の低アルブミン血症や管理困難な慢性低アルブミン血症に基づく疾病に対し、その補充によって病態の改善を図るものである。具体的には、出血性及び外傷性ショック時の循環血漿量の是正や浮腫の改善、肝硬変、ネフローゼ症候群をはじめとして種々の疾患で汎用されており、近代医療にとって欠かせない医薬品となっている<sup>1, 2)</sup>。事実、世界のアルブミン製剤の需要は平均で毎年 1.5% の増加が認められており、その需要は 500 トンを超えている<sup>3)</sup>。また、我が国のアルブミン製剤の使用量は諸外国と比較して多く、その国内自給率は約 60% 程度であり、多くを海外からの輸入に頼っている現状にある。このように、アルブミン製剤は、ヒトの血液を原料とすること、また原料血液を海外に依存しているため、Human immunodeficiency virus (HIV)、肝炎ウイルス及び未知の有害なウイルスや、プリオンをはじめとする夾雑タンパク質が混入する可能性を否定できない。

現在、アルブミン製剤の製造現場では、有害で熱に不安定なウイルス、タンパク質等の混入を防ぐために、低温殺菌法 (60°C, 10 時間) が用いられており、その際、アルブミンの熱変性及び凝集を防ぐ目的で オクタン酸ナトリウム (Oct) と *N*-アセチル-L-トリプトファン (*N*-AcTrp) の 2 種の添加剤が、ヒト血清アルブミン (HSA) に対して約 5 倍の濃度で加えられている (Fig. 1, Table 1)<sup>4)</sup>。しかしながら、アルブミン製剤中の添加剤は経験的に選択されたものであり、その安定化機序などについては長年明らかにされていなかった。近年、当研究室では、アルブミン製剤に安定化剤として添加されている Oct と *N*-AcTrp の役割、さらには、処方 の 妥 当 性 について、各種スペクトル法、断熱型示差走査熱量計 (DSC) 及び NATIVE-PAGE を用いて検討した。その結果、Oct などの中鎖脂肪酸は、安定化剤に加え、保存剤としての役割を果たす一方、*N*-AcTrp は、二次構造を不安定化させるものの、抗酸化作用を示すことを明らかにした。特に両者の併用は、アルブミンの安定化と酸化防止に重要な寄与をしていることが明らかとなり、現在、アルブミン製剤に添加されている Oct と *N*-AcTrp の添加剤としての妥当性を証明する結果となった<sup>5)</sup>。



Sodium n-octanoate (Oct)



*N*-acetyl-L-tryptophan (N-AcTrp)

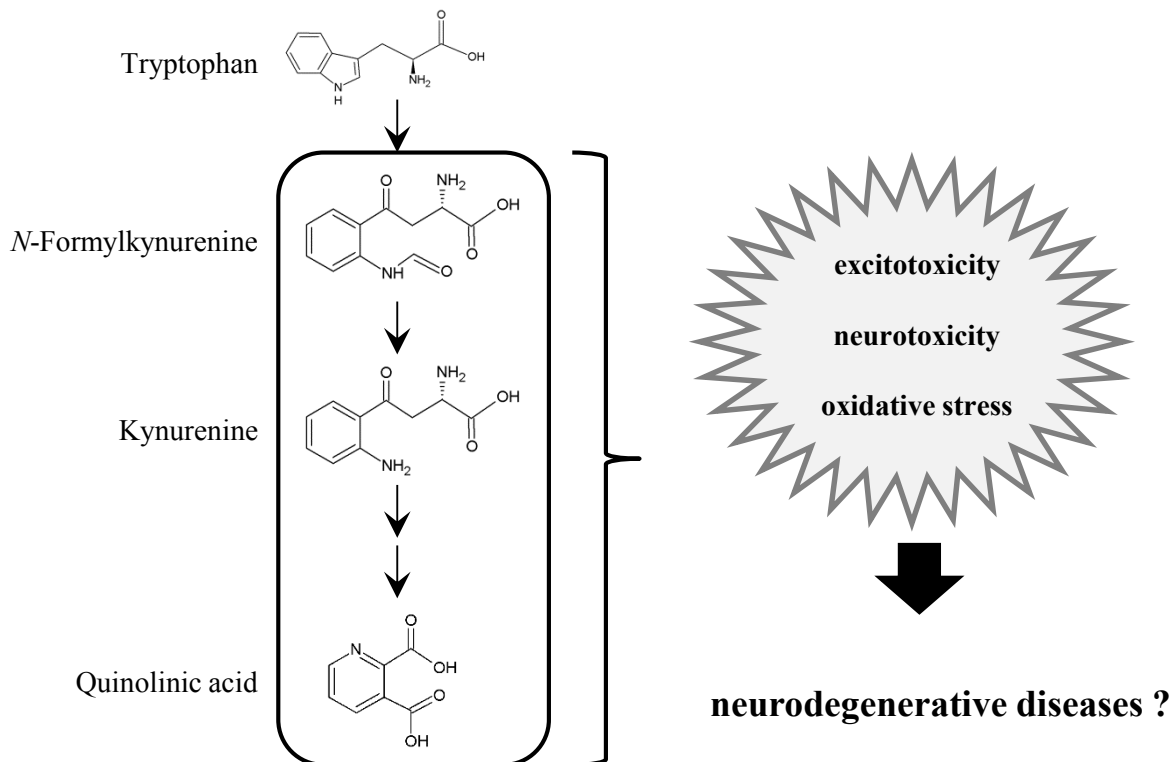
**Fig. 1** Chemical structures of sodium n-octanoate (Oct) and *N*-acetyl-L-tryptophan (N-AcTrp).

**Table 1. Pharmaceutical component of albumin products**

		20 mL product	50 mL product
Main component	HSA	4 g (3.05 mM)	10 g (3.05 mM)
Additives (Stabilizers)	Oct	54.0 mg (16.2 mM)	135 mg (16.2 mM)
	N-AcTrp	85.6 mg (17.4 mM)	214 mg (17.4 mM)

添加剤の一つ Trp は光に対して不安定なアミノ酸であり、光分解で生成される *N*-Formylkynurenine, Kynurenine 及び Quinolinic acid は神経毒性を有し、様々な疾患との関連性が報告されている<sup>6-8)</sup> (Fig. 2). また Trp は、過剰摂取により脳内セロトニン濃度の上昇に伴うセロトニン症候群のリスクが懸念される<sup>9)</sup>. 実際、近年うつ病の治療で主に使用される選択的セロトニン再取り

込み阻害薬 (SSRI) やセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) は、セロトニン症候群の発症を懸念して Trp 含有製品との併用に注意が必要とされている<sup>10)</sup>。さらに近年、アルブミン製剤中に 2 つの N-AcTrp の分解生成物を認め、これら分解物の生体内影響が危惧される現状にある<sup>11)</sup>。これらの報告を考慮すると、これまでに N-AcTrp は、長年アルブミン製剤の添加剤として使用されてきたが、安全かつ有効性の高いアルブミン製剤を構築する上で、アルブミン製剤中に含まれている添加物の種類や添加量など、いわゆるアルブミン製剤の処方について再検討することは、医薬品の有効性と安全性の確保という観点からも意義深いものと思われる。



**Fig. 2. The relationships between tryptophan (Trp) metabolism pathway and its toxicity.**

HSA は血清中に 600  $\mu\text{M}$  存在しており、全血清タンパク質のほぼ 60% を占めている。HSA は生体内において血漿膠質浸透圧の調節、ビリルビン、脂肪酸、尿毒症物質を始めとする内因性物質及び薬物などの外因性物質に対する輸送担体能、エステラーゼ様作用など多様な機能を併せ持つが、最近では、新たな機能として抗酸化作用が重要視されるようになってきた<sup>12, 13)</sup>。HSA の抗酸化効果が注目されている理由は、細胞内に比べて細胞外、特に血清中では Superoxide dismutase (SOD)、カタラーゼなどの抗酸化酵素やグルタチオンなどの抗酸化物質が少なく、これらの代わりに血清タンパク質が抗酸化防御系として機能しているためである<sup>14)</sup>。なかでも、HSA は 34 番目に遊離のチオール (SH) 基を持つシステイン (Cys) 残基 (Cys34) と 6 個のメチオニン (Met) 残基を保持しており、他のタンパク質に比べて含硫黄アミノ酸残基を多く保有している。実際、Cys34 は血清中における総 SH 基の約 80% を占めており、抗酸化防御系において非常に重要ではないかと考えられている<sup>15, 16)</sup>。これまでに当研究室では、HSA の抗酸化能における含硫黄アミノ酸残基 (Cys34 と Met 全 6 残基) の役割を明らかにする目的で、部位特異的変異法を駆使して、Cys34 をアラニン (Ala) に置換した C34A あるいは Met 6 残基全てを Ala に置換した六重変異体、さらに Cys34 と Met 6 残基を全て Ala に変異させた七重変異体を用いて、種々の活性酸素の存在下、Cys34 及び Met の抗酸化効果を定量的に評価した。その結果、スーパーオキシドアニオン ( $\text{O}_2^-$ ) に対する Cys34 の抗酸化活性寄与率は HSA 全体の約 60% であり、Met 6 個は約 30% であった。他方、hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) に対しては、Cys34 は約 70%、Met 6 個は約 60% とほぼ同等に寄与しており、両者共に重要な役割を果たしている可能性が強く示唆された。また、ヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ )、一酸化窒素 (NO) に対する抗酸化活性の寄与率を算出した結果、Cys34 の場合、 $\cdot\text{OH}$  に対しては約 40%、NO に対しては約 50% であったものの、Met 6 個の場合、 $\cdot\text{OH}$ 、NO に対してほとんど寄与していないことが示唆された。したがって、Cys34 は多様な活性酸素種に対して優れたスカベンジ能を有するユニバーサルな抗酸化残基として機能しており、他方、Met は補助的な役割を果たしている可能性が強く示唆された<sup>17)</sup>。

そこで当研究室では、アルブミン製剤の新たな添加剤として、*N*-アセチル-L-システイン (N-AcCys) に着目し、アルブミン製剤への抗酸化効果について N-AcTrp との比較検討を行った。そ

の結果, N-AcCys の抗酸化効果は, N-AcTrp よりも顕著に弱いものであった<sup>5)</sup>. この原因として, 過剰量の N-AcCys は, HSA 分子中 Cys34 と共有結合を形成して, アルブミン自身の Cys34 による抗酸化効果を減少させる一方, N-AcCys 自身もまた Cys34 とジスルフィド結合を形成することから, 抗酸化剤としての機能を失うことが示唆された<sup>18-20)</sup>. そこで, 遊離の SH 基を持たない含硫黄アミノ酸残基である Met に新たな添加剤として着目した. 事実, Bourdon らもまた, Met 残基の抗酸化効果について検討しており, Met 残基をクロラミン T によって同時に化学修飾した HSA の抗酸化能を評価した結果, HSA の抗酸化活性におけるこれら残基の寄与率を分子全体の約 40~80% 程度ではないかと推察している<sup>21)</sup>. この結果は, 先の変異体を用いた当研究室の結果の妥当性をさらに支持するものであった. これらの知見は, HSA 製剤に対しても遊離の SH 基を持たない含硫黄アミノ酸である Met が抗酸化剤として機能する可能性を十分に示唆するものである<sup>22)</sup>.

このような背景の下, 本研究ではアルブミン製剤の添加剤としての *N*-アセチル-L-メチオニン (N-AcMet) の有用性を評価するために, 第 2 章において, 抗酸化作用を有すると考えられている N-AcMet のアルブミン製剤における熱安定化及び抗酸化効果について検討した (Fig. 3). 次いで, 第 3 章では, アルブミン製剤の N-AcMet の添加剤としての有用性を評価するため, 光安定性に及ぼす影響を N-AcTrp と比較検討した. また第 4 章では, 限外濾過法及び蛍光プローブ実験により結合性を定量的に評価するとともに, 結合位置を識別し, さらに HSA-N-AcMet-Oct の複合体を調製し, X 線結晶構造解析を行い, N-AcMet の安定化機序について構造化学的考察を行った. さらに第 5 章では, 生体内の酸化ストレスを考慮したアルブミン製剤に対する抗酸化剤としての N-AcMet と N-AcTrp の役割を比較検討し, N-AcMet の優れた抗酸化作用を明らかにした. 第 6 章では, これらの知見を総括した. 以下に得られた知見を詳述する.

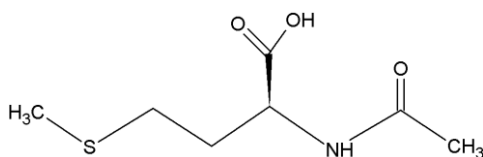


Fig. 3. Chemical structure of *N*-acetyl-L-methionine (N-AcMet).

## 第2章 アルブミン製剤の添加剤としての *N*-アセチル-L-メチオニンの機能性評価

### 第1節 序

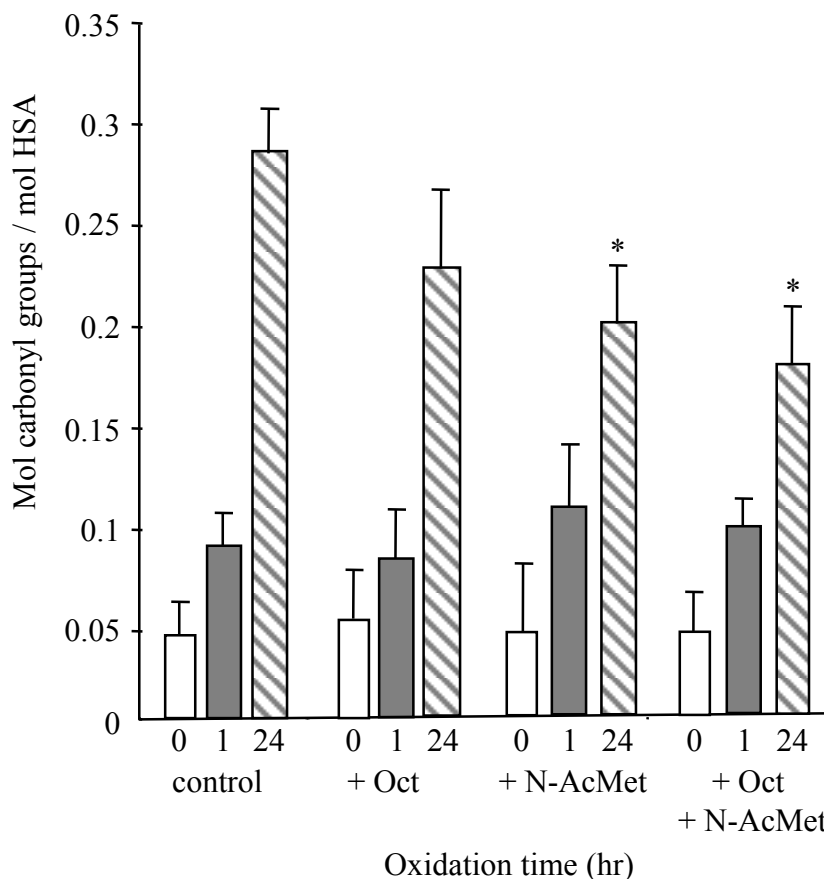
これまでに当研究室では、アルブミン製剤に安定化剤として添加されている Oct と *N*-AcTrp の役割として、Oct は熱に対して安定化剤として働き、*N*-AcTrp は HSA の酸化を防ぐ抗酸化剤として機能していることを見出した<sup>5)</sup>。しかしながら Trp の副作用として、その過剰摂取によるセロトニン症候群のリスク上昇の懸念や、代謝物による神経毒性などが報告されている<sup>7-9)</sup>。これらの報告を考慮すると、アルブミン製剤中に含まれている *N*-AcTrp に代わるアミノ酸を再検討することは、医薬品の有効性と安全性の確保という観点からも意義深い。これまでに当研究室では、HSA 分子中の Cys34 は多様な活性酸素種に対して優れたスカベンジ能を有するユニバーサルな抗酸化残基として機能する一方、Met は補助的な役割を果たしている可能性を報告してきた<sup>17)</sup>。Stadtman らもまた、グルタミン合成酵素において、Met 残基が酸化されることにより、それ自身に対する抗酸化能を持つことを報告している<sup>23)</sup>。さらに、当研究室では添加剤としての *N*-AcCys は、HSA 分子中の Cys34 と時間依存的に共有結合を形成して、抗酸化剤としての機能を失うことから<sup>18-20)</sup>、遊離の SH 基を持たない含硫黄アミノ酸残基である Met が新たな添加剤として機能する可能性を予測してきた。そこで本章では、抗酸化作用を有すると考えられている *N*-AcMet のアルブミン製剤における熱安定化及び抗酸化効果について検討した。

### 第2節 HSA に及ぼす *N*-AcMet の抗酸化評価

#### 2-1 カルボニル含量

まず、HSA に対し、酸化剤の 2,2'-アゾビス (2 アミジノプロパン) 二塩酸塩 (AAPH) を加え、HSA

を酸化させた後の HSA のカルボニル含量の時間依存性から、抗酸化作用について評価を行った<sup>24)</sup> (Fig. 4). その結果, N-AcMet 単独添加においては, 未添加時と比較して有意なカルボニル含量の減少が観察された. また興味深いことに, Oct についても弱いながら抗酸化作用を示した.



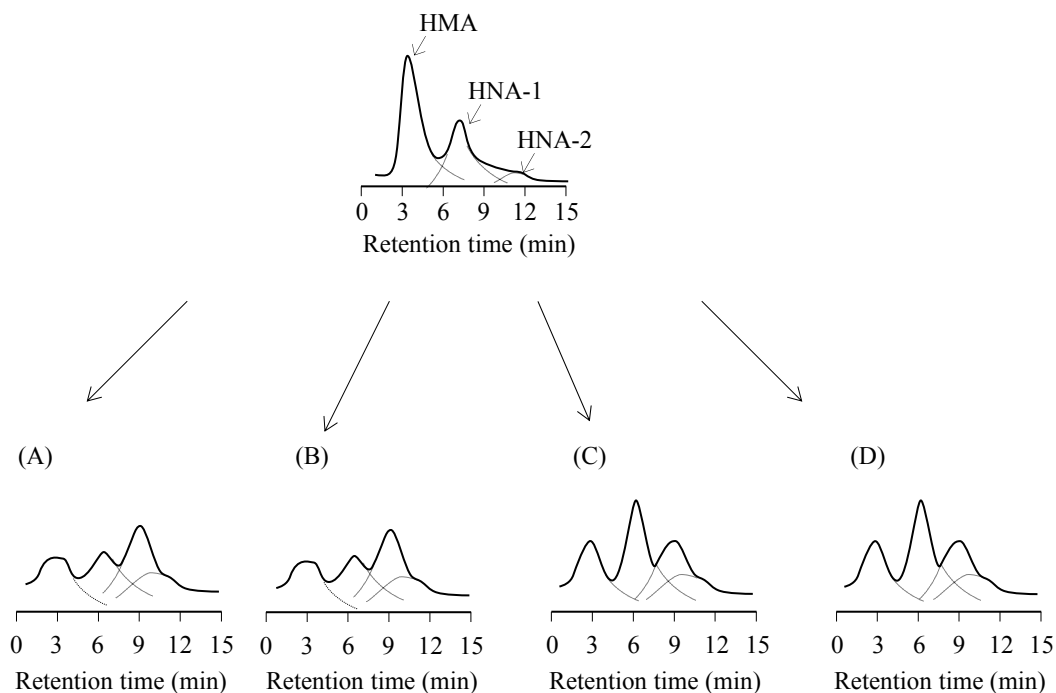
**Fig. 4. AAPH-induced oxidation of HSA alone (control) and in the presence of ligands.**

The values are means  $\pm$  SD (n=4). \*  $P < 0.01$  as compared with control.

## 2-2メルカプト分率

HSA はその構造中 35 個の Cys を含んでいるが, このうち 17 対 (34 個) は分子内ジスルフィド結合を形成し, 3 つのドメインと 9 つのループの構築及び立体構造の保持に重要な役割を担っている. 一方, Cys34 は唯一ジスルフィド結合を形成せず遊離形として存在している. この Cys34 は生体内ではそのまま SH 基が遊離している状態と, Cys やグルタチオン (GSH) と可逆的に共有結合し

ている状態, またスルフィノシステインやシステイン酸に不可逆的に酸化された状態で存在している。Cys34 のSH 基が遊離しているものは, メルカプトアルブミンと言われ, SH 基がマスクされているノンメルカプトアルブミンと区別されている<sup>25-28)</sup>。そこで酸化 HSA における, Cys34 の存在状態について検討を行うため, 安定化剤添加時の HSA の分子種の分離を杉井らが開発した 4-VP-Me カラムを用いて検討した<sup>6)</sup>。Fig. 5 に示す第 1 のピークはメルカプト型 (HMA), 第 2 のピークはシステインやグルタチオンとジスルフィド結合を形成しているノンメルカプト型 (HNA-1), 第 3 のピークはスルフィノシステインやシステイン酸に酸化された酸化型 (HNA-2) を表す。AAPH により酸化した HSA では, メルカプト型の減少とノンメルカプト型の増大が認められた (Fig. 5A)。HSA のメルカプトとノンメルカプトの存在率の変化は, Oct を添加しても効果は認められなかった (Fig. 5B)。しかしながら, N-AcMet 単独あるいは N-AcMet と Oct を併用した場合 (Fig. 5C, D), メルカプト型のピーク (HMA) の増大と酸化型ピーク (HNA-2) の減少が観察された (Table 2)。



**Fig. 5. HPLC chromatograms of HSA before (upper curves) and after AAPH-induced oxidation (lower curves).**

(A) Oxidation of albumin in absence of ligands, (B) Oxidation in the presence of Oct, (C) Oxidation in the presence of N-AcMet, (D) Oxidation in the presence of N-AcMet and Oct. Peaks correspond to HMA, HNA-1 and HNA-2. Data shown are from representative experiments.



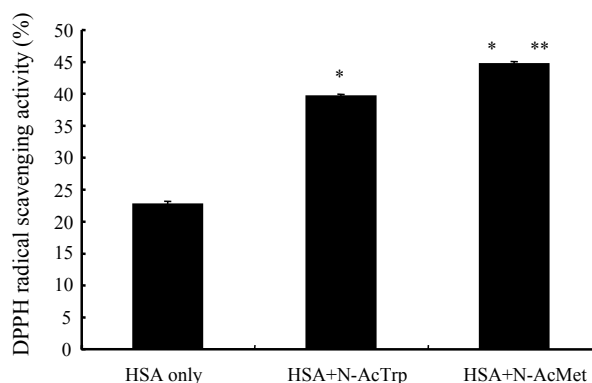
**Table 2. Relative fractions of HMA, HNA-1 and HNA-2 (%) before and after AAPH- induced oxidation<sup>a</sup>**

		HSA alone	+ Oct	+ N-AcMet	+ Oct + N-AcMet
Before oxidation	HMA	65.1 ± 2.3	66.1 ± 2.9	65.3 ± 2.5	65.3 ± 2.5
	HNA-1	22.8 ± 2.5	23.4 ± 4.2	21.5 ± 3.5	22.5 ± 3.7
	HNA-2	10.6 ± 5.3	10.8 ± 4.5	11.6 ± 4.5	11.5 ± 5.4
After oxidation	HMA	22.3 ± 2.8	22.3 ± 2.5	39.3 ± 2.3 *	39.2 ± 2.6 *
	HNA-1	51.4 ± 2.5	51.3 ± 4.2	46.3 ± 3.2 *	45.6 ± 3.4 *
	HNA-2	26.7 ± 5.3	26.5 ± 4.5	12.4 ± 4.5 *	15.5 ± 5.5 *

<sup>a</sup> The concentration of HSA was 50 μM, and that of AAPH and the ligands was 10 mM and 250 μM, respectively. The results are average values ± SD for three experiments. \*  $P < 0.05$  as compared with HSA alone.

### 2-3 1,1'-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去能

N-AcMet 及び N-AcTrp の抗酸化能を, 合成ラジカル種であり, 様々な物質の抗酸化能評価に汎用されている DPPH 由来のラジカルに対する消去能により評価した<sup>29)</sup>. その結果, N-AcMet 及び N-AcTrp は, 未添加時と比較して有意な DPPH ラジカル消去能を有していた (Fig. 6). また, N-AcMet は既存の添加剤である N-AcTrp と比較しても有意なラジカル消去能を有することが明らかとなった. さらにこれら添加剤に Oct を併用した場合, これらの変化に有意な差は観察されなかった (Data not shown).



**Fig. 6. DPPH radical scavenging activity of HSA with ligands.**

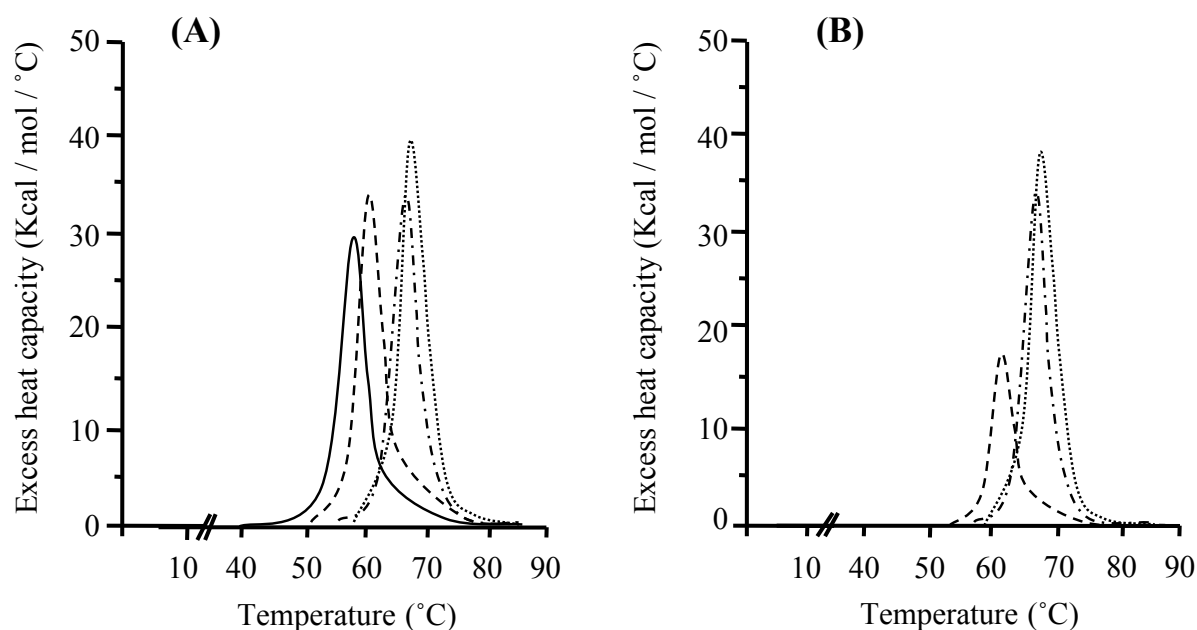
The values are means ± SD (n=4). \*  $P < 0.05$ , compared with HSA only. \*\*  $P < 0.05$ , compared with HSA + N-AcTrp.

### 第3節 HSA に及ぼす N-AcMet の熱安定性評価

#### 3-1 断熱型示差走査熱量計 (DSC)

タンパク質は、熱により分子内水素結合などの破壊を伴い変性を起こす。すなわち、タンパク質の変性に伴う熱吸収はタンパク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高感度で測定できる DSC はタンパク質分子の熱力学量を直接測定できるため、タンパク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、N-AcMet 及び Oct 添加時の HSA の熱安定性について DSC を用いて測定し、熱力学的観点から評価した。

Fig. 7A 及び Fig. 7B に、Oct ならびに N-AcMet 未添加時及び添加時の HSA の加熱処理前と加熱処理後における DSC サーモグラムを示す。また、これらの結果から解析した熱力学的パラメータを Table 3 に示す。加熱処理前の Oct 添加群は、添加剤なしの HSA に比べ熱転移温度 ( $T_m$ ) がいずれも増加した。また、サーモグラム曲線下面積から得られる転移エンタルピー変化 ( $\Delta H_{cal}$ ) も増加していた。N-AcMet 単独添加時においてもわずかな  $T_m$  と  $\Delta H_{cal}$  の増加が観察された。加熱処理後、添加剤なしの HSA の吸熱ピークは得られなかった。一方 N-AcMet 単独添加時では、Oct 単独添加時よりも小さいものの吸熱ピークが観察され、 $T_m$  も増加していた。さらに、Oct 及び N-AcMet 併用添加時の熱力学パラメータは加熱処理前後でほとんど変化がなかったことから、HSA の秩序だった構造を保持している可能性が示唆された。



**Fig. 7. Effect of Oct and N-AcMet on the thermogram of HSA obtained by DSC.** (A) Curves for samples that were not preheated. (B) Curves for samples which have been preheated for 30 min at 60°C. Results are shown for HSA alone (—), HSA with N-AcMet (- - -), HSA with Oct (· · ·), and HSA with both ligands (- · - ·). Data are averages of three experiments.

**Table 3. Thermodynamic data obtained from DSC of different HSA samples at pH 7.4<sup>a</sup>**

Protein samples		$T_m$ (°C)	$\Delta H_{cal}$ ( $\times 10^2$ kcal/mol)	$\Delta H_v/\Delta H_{cal}$ ( $\times 10^2$ kcal/mol)
Without preheating	HSA	$59.50 \pm 0.06$	$1.64 \pm 0.11$	$0.7 \pm 0.01$
	HSA + Oct	$66.83 \pm 2.10$	$2.10 \pm 0.15$	$0.7 \pm 0.01$
	HSA + N-AcMet	$60.06 \pm 0.10$	$1.71 \pm 0.05$	$0.7 \pm 0.03$
	HSA + Oct + N-AcMet	$66.51 \pm 0.15$	$2.03 \pm 0.09$	$0.7 \pm 0.01$
With preheating <sup>b</sup>	HSA	ND <sup>c</sup>	ND	ND
	HSA + Oct	$66.80 \pm 0.04$	$2.10 \pm 0.19$	$0.7 \pm 0.01$
	HSA + N-AcMet	$61.58 \pm 0.06$	$0.91 \pm 0.25$	$1.9 \pm 0.01$
	HSA + Oct + AcN-Met	$66.46 \pm 0.05$	$1.96 \pm 0.25$	$0.8 \pm 0.02$

<sup>a</sup> The concentration of HSA was 0.1 mM, and that of the ligands was 0.5 mM. The results are average values  $\pm$  SD for three experiments.

<sup>b</sup> Preheating was incubation at 60°C for 30 min.

<sup>c</sup> No normal thermogram could be detected.

## 第4節 考察

Trp の過剰摂取によるセロトニン症候群のリスク上昇の懸念や、代謝物による神経毒性などの報告を考慮すると、アルブミン製剤中に含まれている N-AcTrp に代わるアミノ酸を再検討することは、医薬品の有効性と安全性の確保という観点からも意義深い。そこで本章では、抗酸化作用を有すると考えられている N-AcMet のアルブミン製剤における熱安定化及び抗酸化効果について検討した。AAPH による HSA を酸化させた後の HSA のカルボニル含量の時間依存性から、N-AcMet は、未添加時と比較して有意なカルボニル含量の減少が観察された (Fig. 4)。多くの場合、老化や病態の亢進による HSA などのタンパク質酸化はカルボニル含量の増大を伴うことから、有意なカルボニル含量の減少は N-AcMet の顕著な抗酸化作用を示している<sup>30)</sup>。また、メルカプト分率を用いた解析においても、N-AcMet 添加群において、未添加時と比較して有意な酸化型のピークの減少が観察された (Fig. 5)。興味深いことに、Oct と N-AcMet の併用群においてさらなる抗酸化作用が観察された。Nalini らは、脂肪酸は HSA と結合することにより金属触媒による酸化に対し、抗酸化作用を示すことを報告している<sup>31)</sup>。金属触媒酸化及び AAPH の場合もその機序は未だ明らかではないが、脂肪酸結合に伴う構造変化によって HSA の酸化が抑制されているのかもしれない。事実、Kousa らは、Oct 添加による各種差アルブミンの熱安定性の検討から、ドメイン III への Oct の結合のみならず、HSA の C 末端領域の“tighting”による HSA の構造のさらなる安定化を示唆していることから、併用による酸化抑制の向上には Oct への構造安定化が大きく寄与するものと考えられる<sup>32)</sup>。したがって、この併用による HSA の酸化抑制現象は、Oct 自身の抗酸化作用というより、Oct の HSA 分子上のドメイン III への結合による構造的安定化と N-AcMet の抗酸化作用が相加的に働き、結果として、酸化抑制現象が認められたものと推察される。さらに、N-AcMet 及び N-AcTrp の DPPH ラジカルに対する消去能を直接比較検討したところ、N-AcMet は N-AcTrp と比較して有意な DPPH ラジカル消去能を有していた (Fig. 6)。このことから、N-AcMet は、N-AcTrp と比較し、HSA に対して同等あるいはそれ以上の抗酸化能を有する添加剤である可能性が強く示唆された。

また、N-AcMet 及び Oct との併用が HSA の熱安定性に及ぼす影響を DSC を用いて測

定した。一般に、van 't Hoff のエンタルピー変化 ( $\Delta H_v$ ) と  $\Delta H_{cal}$  の比 ( $\Delta H_v / \Delta H_{cal}$ ) は、タンパク質の熱変性過程における転移状態を表す指標と考えられており、この値が 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、1 より大きい時は、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。1 より小さい時は、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<sup>33-37)</sup>。加熱処理後、添加剤非存在時においては、HSA の協同性が崩れ、全く吸熱ピークが観察されなかった。N-AcMet 単独添加時では、 $\Delta H_v / \Delta H_{cal}$  の比が 1 以上となり、凝集体の形成が示唆された (Table 3)。一方、N-AcMet 及び Oct 共存時は、 $\Delta H_v / \Delta H_{cal}$  の比が 1 未満であり、多状態転移が観察され、HSA の構造を保持していた。N-AcTrp 及び Oct 共存時でも同等の効果が観察された<sup>5)</sup>。

今回の知見により、Trp の過剰摂取によるセロトニン症候群のリスク上昇の懸念や、その代謝物による神経毒性などを考え合わせると、N-AcMet はアルブミン製剤の添加剤において、既存の添加剤である N-AcTrp に代わる有用な添加剤である可能性が強く示唆された。

## 第5節 小括

本章では、N-AcMet の HSA に対する抗酸化作用及び熱安定性を詳細に検討した。以下に得られた結果を要約する。

1) 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、Oct は AAPH の HSA に対する酸化を抑制しなかったものの、Oct と N-AcMet の併用は、酸化を明らかに抑制した。これらの結果は、Oct によるドメイン III の構造的安定化と N-AcMet の抗酸化作用が相加的に働いたものと考えられる。

2) N-AcMet 及び N-AcTrp の DPPH ラジカルに対する消去能を測定したところ, N-AcMet は既存の添加剤である N-AcTrp と比較して顕著なラジカル消去能を有していた.

3) N-AcMet 及び Oct 添加時の HSA の熱安定性について DSC を用いて評価したところ, N-AcMet と Oct の併用は, 顕著に HSA の立体構造を安定化させた.

以上の結果から N-AcTrp の副作用等を考慮すると, N-AcMet は N-AcTrp と比較し, HSA に対して優れた抗酸化能を有する添加剤であることが強く示唆された.

### 第3章 アルブミン製剤の光安定性に対する *N*-アセチル-*L*-メチオニンと *N*-アセチル-*L*-トリプトファンの比較検討

#### 第1節 序

前章の検討により, *N*-AcMet が *N*-AcTrp に比べ, 優れた抗酸化能を有することが明らかとなり, *N*-AcTrp に代わる有用な添加剤になる可能性が強く示唆された. 一般に医薬品は, 製造されてから患者が服用するまでの過程, たとえば倉庫内での保管, 配送, 病院や薬局における保存などの過程において, その品質が保たれることが重要な条件となる. したがって, アルブミン製剤においてもまたその品質が, 温度や湿度, 光などの環境因子の影響を受けてどのような変化をするかを, *N*-AcMet と *N*-AcTrp のそれぞれの添加剤において, 明らかにすることは必要不可欠である.

厚生労働省は, 日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use : ICH) により定められた「安定性試験ガイドライン」に基づき, 医療用医薬品の新有効成分含有医薬品の安定性試験を行うこととしている. このガイドラインの安定性試験としては, 長期保存試験, 加速試験, 苛酷試験, 光安定性試験をはじめ, 多くの試験が含まれている. Trp は, 光照射により *N*-Formylkynurenine, Kynurenine などの Kynurenine 誘導体に代謝され, その代謝過程で Reactive oxygen species (ROS) を発生し, タンパク質のアミノ酸残基の酸化修飾を亢進する可能性が示唆され, HSA の構造に悪影響を与えることが危惧される<sup>38)</sup>. また, Trp の代謝産物である *N*-Formylkynurenine, Kynurenine 及び Quinolinic acid は神経毒性を有し, 生体内でミトコンドリアにダメージを与え, 代謝障害を引き起こす可能性も予測される<sup>7, 8, 39)</sup>. これまでに *N*-AcTrp は, 長年アルブミン製剤の添加剤として使用されてきたが, これらの報告を考慮すると, 光安定性試験などを実施し, HSA の構造や機能を保持することができる添加剤であるか否かについて再検討する必要がある.

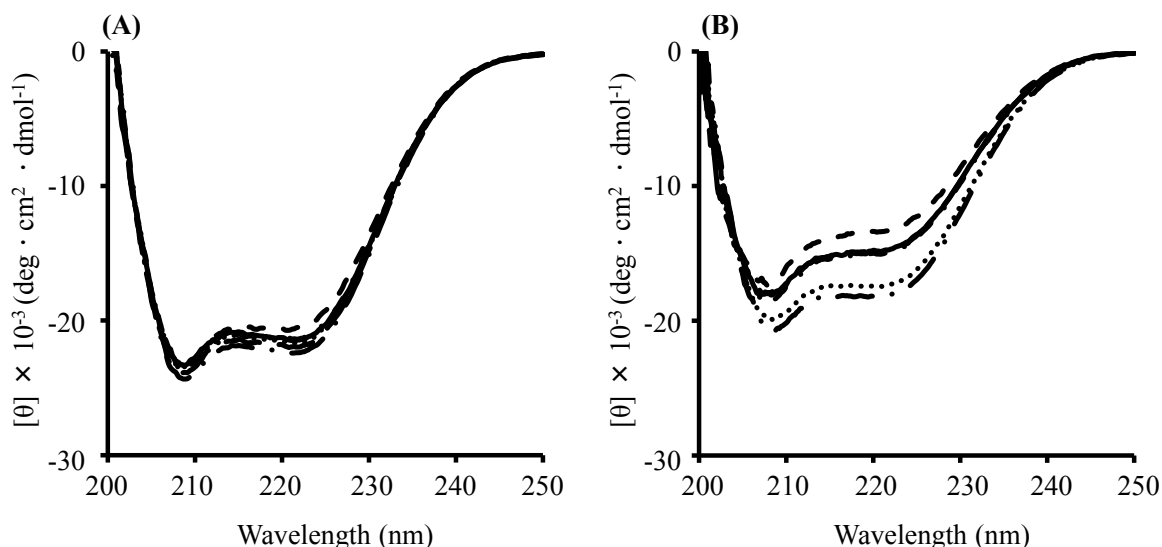
本章では, 光安定性試験装置を用いて, 「安定性試験ガイドライン」の規定曝光量である 120 万 lx・hr 以上に相当するよう総照度を設定し, 添加剤の抗酸化効果と HSA の構造安定性がどのように

変化するかを調べ、アルブミン製剤の光安定性に及ぼす N-AcMet の有用性を N-AcTrp と比較検討した。

## 第2節 光照射 HSA の構造安定性

### 2-1 円二色性 (CD) スペクトル

光照射処理前後の HSA の遠紫外領域における CD スペクトルを測定し、その二次構造の変化について各種添加剤の有無により比較検討した。その結果、光照射処理前における HSA の CD スペクトルは、各種添加剤の有無による大きな違いはみられなかった (Fig. 8A)。また、光照射処理後、Oct と N-AcMet 併用添加時と Oct 単独添加時の CD スペクトルは、ほぼ同様のスペクトルを示し、光照射処理前と光照射処理後の  $\alpha$ -ヘリックス含量の差が約 14% と最も小さく、光照射の影響を最小限にしていた (Fig. 8B, Table 4)。一方、N-AcTrp 単独、Oct と N-AcTrp 併用添加時の場合、光照射処理前後の  $\alpha$ -ヘリックス含量の差は、それぞれ 23.8%、21.5% であり、光照射により HSA の二次構造含量を大きく低下させていた。



**Fig. 8. Effects of additives on the far-UV CD spectrum of HSA.**

(A) Before photo-irradiation. (B) After photo-irradiation for 4 weeks. Results are shown for HSA alone ( — ), HSA + Oct ( ..... ), HSA + N-AcMet ( — — — ), HSA + N-AcTrp ( - - - - ), HSA + Oct + N-AcMet ( — · — · — ) and HSA + Oct + N-AcTrp ( - · - · - ). The concentration of HSA was 10  $\mu\text{M}$  and that of each additive was 50  $\mu\text{M}$ .



**Table 4. Alpha helical content of different HSA preparations calculated from CD spectra before and after photo-irradiation<sup>a</sup>**

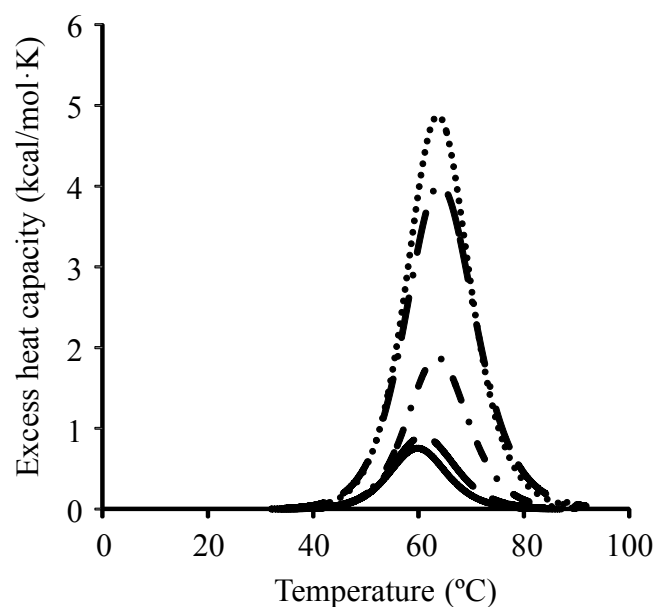
Protein samples	HSA alone	HSA + Oct	HSA + N-AcMet	HSA + N-AcTrp	HSA + Oct + N-AcMet	HSA + Oct + N-AcTrp
(A) Before photo-irradiation (%)	78.5±1.9	79.1±2.0	80.2±1.8	75.3±2.1	81.6±1.5	78.2±2.4
(B) After photo-irradiation (%)	56.2±2.4	64.8±2.0	56.3±1.9	51.6±1.9	67.4±1.6	56.7±1.8
(A) - (B) (%)	22.3±1.2	14.2±1.3	23.9±2.3	23.8±2.1	14.2±1.1	21.5±2.2

<sup>a</sup> The concentration of HSA was 10  $\mu$ M and that of each additive was 50  $\mu$ M. The results are means  $\pm$  SD (n = 3).

## 2-2 DSC

次に、光照射に対し各添加剤が HSA の熱安定性に及ぼす影響を DSC を用いて評価した。

Fig. 9 は光照射処理後における DSC サーモグラムであり、これらの結果から解析した熱力学的パラメータを Table 5 に示す。Oct 添加群は、HSA 単独に比べ熱転移温度 ( $T_m$ ) がいずれも増加していた。Oct 及び N-AcMet 併用添加時の転移エンタルピー変化  $\Delta H_{cal}$  は、Oct 単独添加時とほぼ同じ値を示したことから、光照射処理後 HSA の熱安定性を保持していた。一方で、Oct 及び N-AcTrp 併用添加時の  $\Delta H_{cal}$  は Oct 及び N-AcMet 併用添加時と比較し顕著に減少し、熱安定性の低下が示唆された。また、Oct 非添加群においても同様に、N-AcTrp 添加時に  $\Delta H_{cal}$  の減少が観察された。



**Fig. 9. Effects of additives on the thermogram of HSA obtained by DSC after photo-irradiation for 4 weeks.**

Results are shown for HSA alone ( — ), HSA + Oct ( ..... ), HSA + N-AcMet ( — — ), HSA + Oct + N-AcMet ( — - — ) and HSA + Oct + N-AcTrp ( - . - . ). The concentration of HSA was 20  $\mu$ M and that of each additive was 100  $\mu$ M.

**Table 5. Thermodynamic data obtained from DSC of different HSA samples after photo-irradiation<sup>a</sup>**

Protein samples	$T_m$ ( $^{\circ}$ C)	$\Delta H_{cal}$ (kcal/mol)	$\Delta H_v/\Delta H_{cal}$
HSA alone	$59.1 \pm 0.05$	$10.1 \pm 1.0$	$6.0 \pm 0.10$
HSA + Oct	$64.3 \pm 0.09$	$73.7 \pm 1.5$	$0.2 \pm 0.05$
HSA + N-AcMet	$59.7 \pm 0.07$	$13.6 \pm 4.9$	$4.2 \pm 0.08$
HSA + N-AcTrp	ND <sup>b</sup>	ND	ND
HSA + Oct + N-AcMet	$65.0 \pm 0.10$	$67.4 \pm 1.2$	$0.8 \pm 0.05$
HSA + Oct + N-AcTrp	$65.0 \pm 0.11$	$27.0 \pm 1.1$	$2.2 \pm 0.09$

<sup>a</sup> The concentration of HSA was 20  $\mu$ M and that of each additive was 100  $\mu$ M. The results are means  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

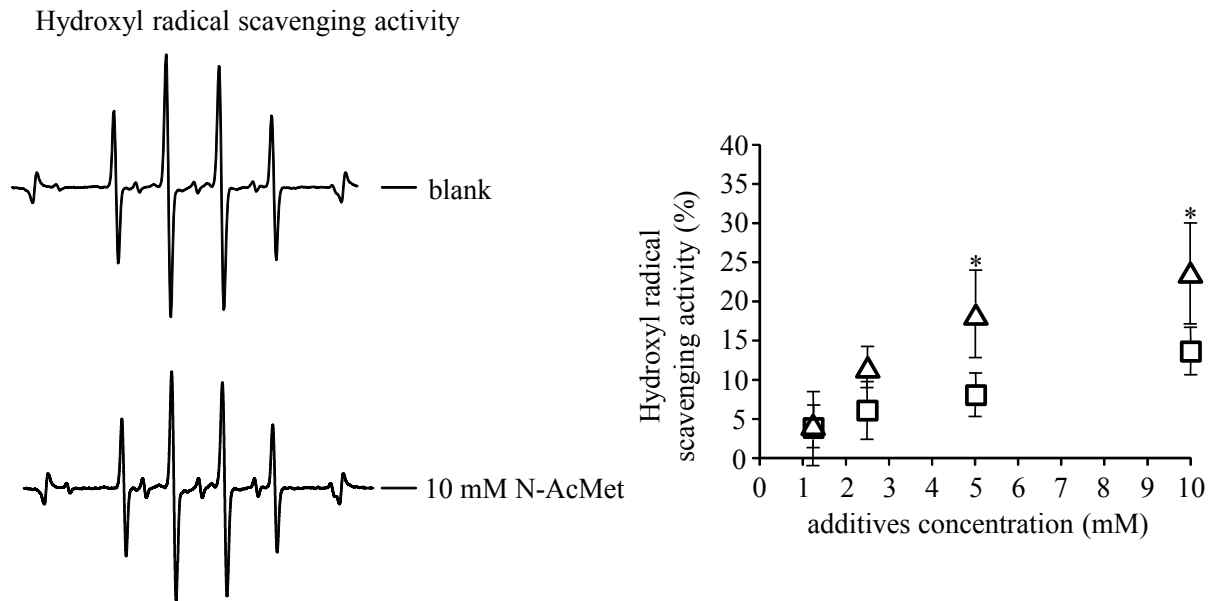
<sup>b</sup> No normal thermogram could be detected.

### 第3節 光照射 HSA の抗酸化効果

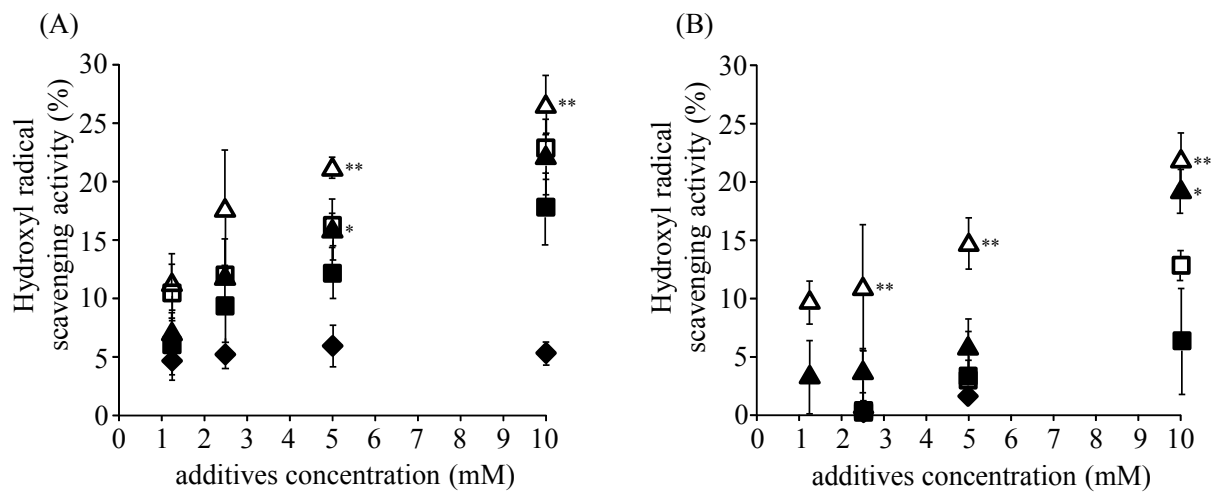
#### 3-1 電子スピン共鳴 (ESR) スピントラップ法

ESR スピントラップ法は、寿命が短く直接検出することが困難な ROS を種々のプローブと反応させ、より長寿命で検出しやすい化学種に変換させて ESR スペクトルを測定する方法である。今回は、フェントン反応により発生させた $\cdot\text{OH}$  を、スピントラップ剤の DMPO (5,5'-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) と反応させ、ESR により検出し、各添加剤の $\cdot\text{OH}$  に対するスカベンジ作用を評価した。まず、HSA 非存在下で N-AcMet と N-AcTrp の $\cdot\text{OH}$  消去能を評価した。その結果、濃度依存的なラジカル消去能が観察され、5 mM と 10 mM において N-AcMet は N-AcTrp と比較し有意なラジカル消去能を示した (Fig. 10)。

次に、HSA 存在下において各添加剤のラジカル消去能を評価した。その結果、光照射処理前、Oct 単独添加時は濃度依存性が観察されず、そのラジカル消去能は低値であった。一方、N-AcMet あるいは N-AcTrp 添加群においては、濃度依存的なラジカル消去能が観察され、特に N-AcMet 添加時で有意なラジカル消去能が観察された (Fig. 11A)。この結果は、先の DPPH ラジカル消去能の結果を反映しており、N-AcMet の有用性をさらに示唆した (Fig. 6)。光照射処理後においても、N-AcMet 添加群は濃度依存的なラジカル消去能が観察されたが、N-AcTrp 添加群のラジカル消去能は光照射処理前と比較し顕著に減少していた (Fig. 11B)。このことから、光照射処理前後において、N-AcMet は N-AcTrp と比較して優れた $\cdot\text{OH}$  消去能を有する添加剤であることが確認された。



**Fig. 10.** Relative hydroxyl radical scavenging activities of different concentrations of N-AcMet ( $\Delta$ ) and N-AcTrp ( $\square$ ). The left part shows representative spectra without and with N-AcMet. Each point in the right part represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*  $P < 0.05$ , compared with N-AcTrp.



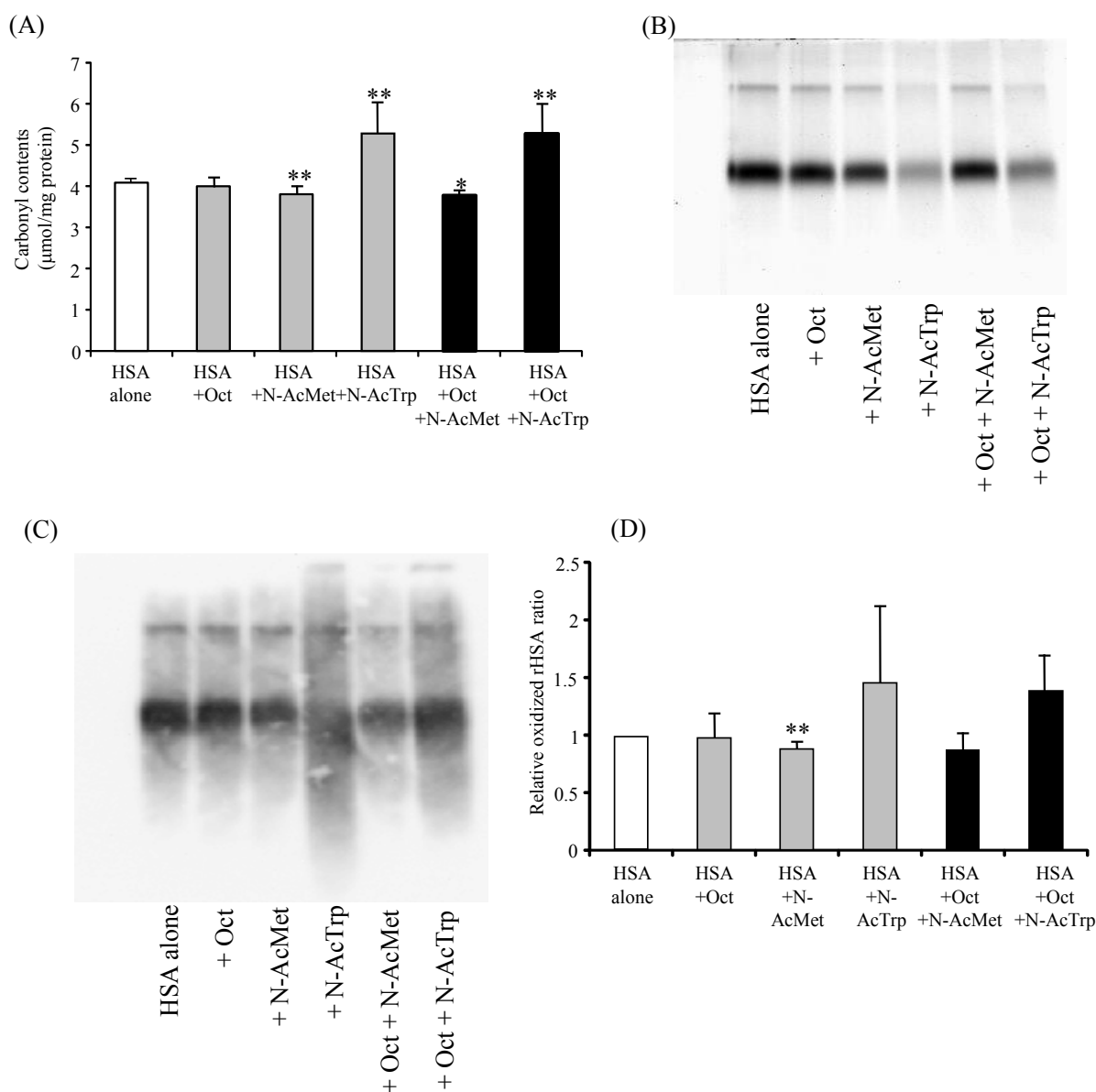
**Fig. 11.** Relative hydroxyl radical scavenging activity of HSA in the presence of different concentrations of Oct ( $\blacklozenge$ ), N-AcMet ( $\Delta$ ), N-AcTrp ( $\square$ ), Oct + N-AcMet ( $\blacktriangle$ ) and Oct + N-AcTrp ( $\blacksquare$ ) before (A) and after (B) photo-irradiation for 4 weeks.

The scavenging activity of HSA alone was  $5.5 \pm 1.1\%$  before photo-irradiation but very small after photo-irradiation. The concentration of HSA was  $20 \mu\text{M}$ . Each point represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \*  $P < 0.05$ , compared with HSA + N-AcTrp + Oct. \*\*  $P < 0.05$ , compared with HSA + N-AcTrp.

### 3-2 カルボニル含量

次に光照射処理後のサンプルを酸化の指標であるカルボニル含量を測定し、各添加剤が HSA に及ぼす抗酸化作用を評価した。その結果、N-AcTrp は単独及び N-AcTrp と Oct 共存下において、HSA の酸化を抑制することができず、カルボニル含量を顕著に増加させていた (Fig. 12A)。一方、N-AcMet の場合、単独及び Oct 共存下において、未添加時と比較して有意なカルボニル含量の減少が観察された。また、Oct 添加によるカルボニル含量の影響はみられなかった。

次に、光照射処理後のサンプルのカルボニル型をジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) により誘導し、SDS-PAGE によって泳動後、抗 DNP 抗体を用いた western blot 法により、サンプル中のカルボニル型を発色させて抗酸化能を評価した。各添加剤の安定化効果を SDS-PAGE によって評価したところ、N-AcTrp は単独及び Oct 共存下両方においてバンドは薄くなり、N-AcTrp の添加と光照射により、HSA の変性を促進している可能性が示唆された (Fig. 12B)。一方、N-AcMet 添加群及び Oct 単独添加時においては、鮮明なバンドが観察され、HSA の変性は促進されていないことが推察された。次に抗 DNP 抗体を用いた western blot 法により得られた結果を基に、添加剤未添加時の HSA 単独を基準としたカルボニル含量の比を算出したところ、N-AcTrp 添加群においては相対的に HSA の酸化率を促進させる一方、N-AcMet 添加群においては酸化率の減少が観察され、先のカルボニル含量測定の結果を支持するものであった (Fig. 12C, D)。



**Fig. 12. Evaluation of oxidation of HSA which had been photo-irradiated in the absence (control) or in the presence of additives.**

(A) Carbonyl contents of the HSA preparations. The protein concentration was 20 μM and that of each additive was 100 μM. (B) SDS-PAGE electrophoresis. The concentration of HSA was 20 μM and that of each additive was 100 μM. (C) Western blots and staining with Oxyblot Kit reagents. (D) Carbonyl formation of oxidized HSA was determined as densitometry ratio of DNP area and protein area. Each column in (A) and (D) represents the mean ± SD (n = 3–4). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with HSA in the absence of additives.

## 第4節 考察

アルブミン製剤の添加剤である N-AcTrp 及び Oct は経験的に選択されており、安定化機序などについては未だ十分な情報が揃っていないのが現状である。また、Trp は光に対して脆弱性があり、光分解の過程で ROS を発生すること、光酸化による代謝物は神経毒性を有することが報告されている<sup>7,38)</sup>。このような背景の下、より添加剤として優れたアミノ酸を検索したところ、含硫黄アミノ酸であり、高い抗酸化作用を有する N-AcMet が N-AcTrp と同等、あるいはそれ以上の抗酸化能を有することが前章で明らかとなった。しかしながら、これまでに N-AcMet と N-AcTrp を直接比較した長期安定性評価実験や光安定性試験は行われていない。本章では、光安定性試験装置を用いて 4 週間光照射を行い、添加剤の抗酸化効果と HSA の構造安定性がどのように変化するかを調べ、アルブミン製剤の光安定性に及ぼす N-AcMet の有用性を N-AcTrp と比較検討した。

光照射によって発生した $\cdot\text{OH}$  や  $\text{O}_2^-$  は、タンパク質のアミノ酸残基にダメージを与え、カルボニル含量の増大やタンパク質分子表面の疎水性の変化ならびにコンフォメーション変化を引き起こすことが知られている<sup>40)</sup>。ESR スピントラップ法を用いて光照射処理後の各添加剤及び HSA の $\cdot\text{OH}$  に対するスカベンジ作用を評価したところ、N-AcTrp 添加群の $\cdot\text{OH}$  消去能は光照射処理前と比較し顕著に減少していた (Fig. 11B)。一方、光照射処理後において、N-AcMet 添加群は濃度依存的なラジカル消去能を保持していた。また、カルボニル含量試験においても、N-AcTrp は単独及び Oct 共存下において、カルボニル含量を顕著に増加させていた一方、N-AcMet 添加時では、未添加時と比較して有意にカルボニル含量を減少させていた (Fig. 12A)。これらの結果から、光照射処理後、N-AcTrp を添加することにより、ラジカル消去能の低下ならびに HSA の酸化の促進が引き起こされていることが示唆された。本研究の光照射と同条件で N-AcMet と N-AcTrp 溶液を光照射処理後、質量分析 (MS) にて物性解析したところ、Trp の分解経路の最終産物である Picolinic acid が検出された (Data not shown)。通常、Picolinic acid を経るまでに光分解で生成される N-Formylkynurenine, Kynurenine などの中間代謝物が得られる。Quinolinic acid を含めたこれら分解物は神経毒性を有し、様々な疾患との関連性が報告されている<sup>7,8)</sup> (Fig. 2)。一方、N-AcMet の光

分解物は検出されなかった. 光照射により N-AcTrp が光分解された現象は, 安定化剤というより, むしろ酸化促進的に作用することにより, 抗酸化能力の低下, さらには分解過程で生じた分解物によって発生した ROS による HSA の酸化修飾の促進が引き起こされている可能性を示唆しているものと解釈される. 前章で用いた酸化剤の AAPH は, タンパク質のヒスチジン (His), Trp, チロシン (Tyr), Met 残基を酸化することが知られており, HSA の酸化を促進する可能性が考えられる<sup>4)</sup>. N-AcTrp は, AAPH の酸化に対しては抗酸化力を発揮し, HSA の酸化を抑制していたが<sup>5)</sup>, 本章での光照射実験においては HSA の酸化を促進させる結果となった. 事実, N-AcTrp 溶液を AAPH 酸化処理後, MS にて物性解析したところ, Picolinic acid などの光分解物は検出されなかったことから, 光酸化と AAPH 酸化では異なるラジカル種の発生に基づく機序の差異の可能性が示唆された. 一方, N-AcMet は, AAPH での酸化と光照射による酸化の両者において抗酸化効果を示し, N-AcMet は N-AcTrp と比較して優れた抗酸化剤として機能することが強く示唆された.

さらに, HSA の構造安定性及び熱安定性に及ぼす添加剤の影響を CD スペクトル及び DSC を用いて評価した (Fig. 8, Fig. 9). その結果, 光照射処理前において Oct 及び N-AcMet 併用添加時では, Oct 及び N-AcTrp 併用添加時と同程度の安定化効果を示した. 加えて光照射処理後においても Oct 及び N-AcMet 併用添加時は, HSA の二次構造含量及び熱安定性を保持していた. その一方, Oct 及び N-AcTrp 併用添加時では, Oct 及び N-AcMet 添加時と比較し顕著な二次構造含量及び熱安定性の低下が観察された. これまでに Oct は, HSA の構造安定性と熱安定性を増大させる添加剤であることが報告されている<sup>5)</sup>. Oct の結合サイトは, HSA のドメイン IIIA 近傍の疎水性ポケットの中に存在しており, この部位への Oct の結合が HSA 分子に構造変化を引き起こしていることが示唆されている<sup>32)</sup>. すなわち, HSA 分子の C 末端領域の分子構造を引き締め, 構造安定性の著しい向上を促しているものと考えられている. 今回の結果では, 光照射処理後, N-AcTrp 添加時は Oct 共存下においても HSA の構造安定性の低下が観察された. これは, 前述したように Trp の光酸化による Picolinic acid のような分解物が HSA に対して酸化促進的に働き, Oct と N-AcTrp の協奏的による安定化と抗酸化効果の機構を崩壊させている可能性が示唆された. 以上の結果より, N-AcMet は N-AcTrp と比較し, HSA に対して優れた光安定性を有する添加剤であることが示唆さ



れた。今回の知見は、アルブミン製剤の光安定性において既存の添加剤である N-AcTrp の脆弱性と N-AcMet の有効性を初めて明らかにしたものであり、今後安全かつ有効なアルブミン製剤の開発に向けた重要な基礎資料となると思われる。

## 第5節 小括

本章では、光安定性試験装置を用いて光照射を行い、添加剤の抗酸化効果と HSA の構造安定性がどのように変化するかを調べ、アルブミン製剤の光安定性に及ぼす N-AcMet の有用性を N-AcTrp と比較検討した。以下に得られた結果を要約する。

1) HSA の構造安定性を CD スペクトルにより検討した結果、光照射処理後 N-AcTrp 及び Oct 併用添加時では顕著な  $\alpha$ -ヘリックス含量の減少が観察された。一方、N-AcMet 及び Oct 併用添加時と Oct 単独添加時では、光照射処理前の構造をほぼ保持していた。

2) 光照射処理後、HSA に対する熱安定性を DSC により評価した結果、N-AcTrp 添加時と比較して、N-AcMet 添加時の HSA の顕著な熱安定化効果が観察された。

3) 添加剤のラジカル消去能を ESR スピントラップ法により検討した結果、光照射処理前後において N-AcMet は N-AcTrp と比較して顕著なラジカル消去能が観察された。

4) 光照射処理後、HSA のカルボニル含量は、N-AcTrp 添加群において増大していた。一方、N-AcMet 添加群においては有意に減少していた。

以上の結果から N-AcMet は、N-AcTrp と比較し HSA に対して優れた光安定性を有する添加剤であることが示唆された。

## 第4章 HSA 分子上における *N*-アセチル-*L*-メチオニンとオクタン酸ナトリウムの結合様式

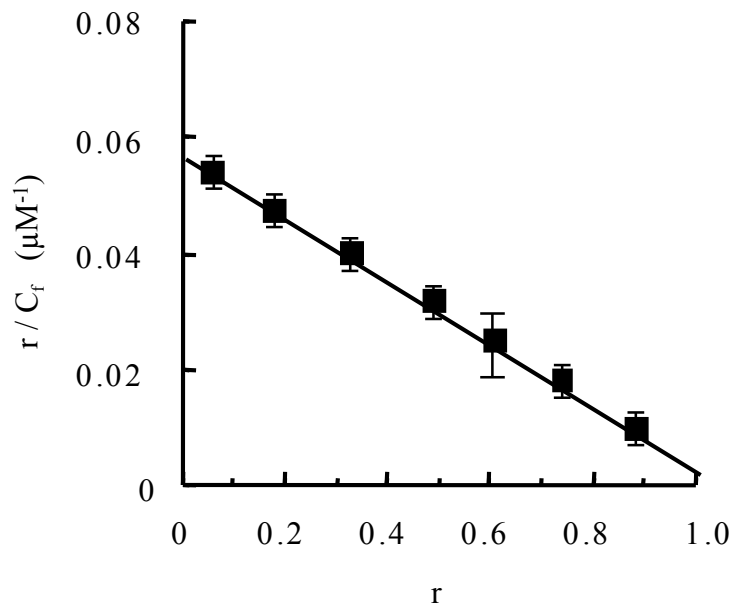
### 第1節 序

HSA 分子上には、サイト I (ワルファリン結合サイト) 及びサイト II (ベンゾジアゼピン結合サイト) の少なくとも 2 つの薬物結合サイトが存在する<sup>42-44)</sup>。X 線結晶構造解析より、主要薬物結合サイトであるサイト I 及びサイト II は、それぞれサブドメイン IIA (アミノ酸番号 197-297) と IIIA (アミノ酸番号 384-497) に位置することが明らかとされている<sup>45, 46)</sup>。現在、アルブミン製剤に安定化剤として添加されている Oct と *N*-AcTrp の HSA 分子上での結合様式として、Oct と *N*-AcTrp は、HSA 分子上のサイト II の同一サイトに結合することが示唆されている<sup>5)</sup>。すなわち、これまでに中鎖脂肪酸の高親和性結合サイトが、サイト II であることが明らかにされているが<sup>47-52)</sup>、この結果は、二つのリガンドが HSA 分子上のサイト II を結合サイトとして共有していることを示している。前章までの結果から、*N*-AcMet は既存の添加剤である *N*-AcTrp と比較して優れた抗酸化作用を有する添加剤であることが示唆されたが、Oct と *N*-AcMet の HSA 分子上における結合部位や 2 つのリガンド位置関係など、いわゆる HSA 分子上の結合様式についてはほとんど明らかにされていない。そこで本章では、まず限外濾過法を用いて、*N*-AcMet の HSA に対する結合親和力を定量的に評価し、次いで蛍光プローブ置換実験より *N*-AcMet と Oct の結合部位を識別し、さらに HSA, *N*-AcMet, Oct の三元複合体の結晶を調製して、HSA-*N*-AcMet-Oct 複合体の X 線結晶構造解析を行った。これらの結果に基づき、HSA に対する *N*-AcMet の優れた抗酸化能の機序を構造化学的に考察した。

## 第2節 HSA と N-AcMet 及び Oct との相互作用

### 2-1 HSA に対する N-AcMet と Oct の結合の定量的評価

HSA に対する N-AcMet の結合定数を算出した。Fig. 13 には、Scatchard プロットを示す。これらのプロットにより得られた HSA に対する N-AcMet の結合定数は  $5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  と、Oct-HSA 複合体の結合定数 ( $1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) に比べ<sup>5)</sup>、約 1/20 小さく、2 つのリガンドの親和性が顕著に異なることが明らかとなった。

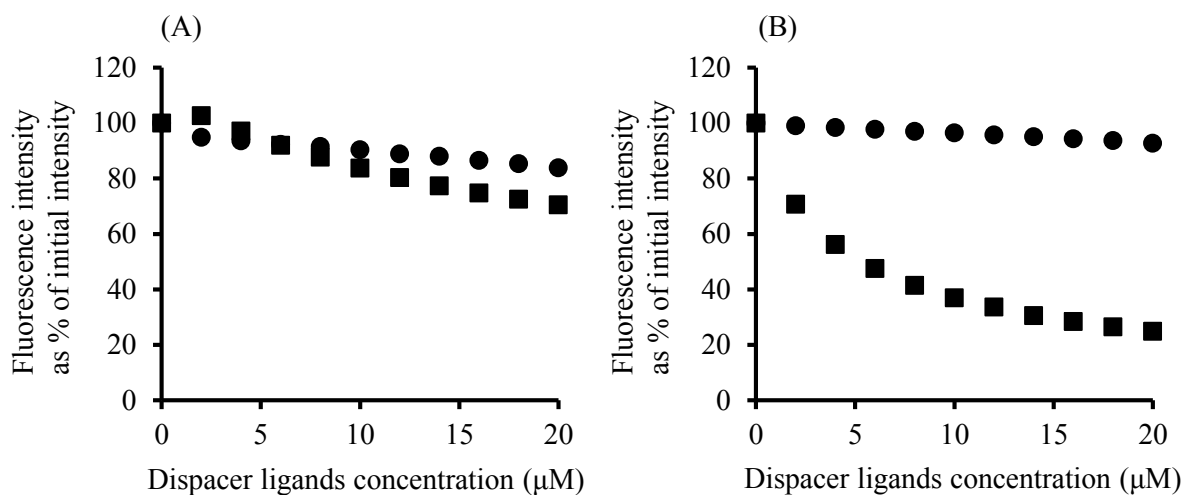


**Fig. 13.** Scatchard plot of the binding of N-AcMet to HSA as determined by ultrafiltration. Each point represents the mean  $\pm$  SD ( $n = 4$ ).

### 2-2 HSA 分子上における N-AcMet と Oct の結合部位の識別

上述したように、HSA 分子上には 2 つの特異的リガンド部位が存在することが明らかにされていた。そこで代表的な蛍光プローブであるワルファリン (WF) とダンシルサルコシン (DNSS) を用いて、

N-AcMet 及び Oct の結合部位の識別実験を遂行した. Fig. 14 に示すように, サイト I に特異的結合する蛍光プローブである WF に対しては, N-AcMet あるいは Oct は, WF の蛍光強度をわずかに減少させた. 一方, サイト II プローブ DNSS に対しては, Oct は顕著に DNSS の蛍光強度を低下させたが, N-AcMet は全く影響を及ぼさなかった. Oct がサイト II プローブの蛍光強度を著しく減少させた現象は, Oct がサイト II 結合領域に位置していることを示唆している. 一方, サイト I プローブのわずかな蛍光強度の減少は, Oct の低親和性サイトがサイト I 近傍に位置しているものと推察される. さらに, N-AcMet によるサイト I プローブのわずかな減少は, WF ( $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ )<sup>2</sup> と N-AcMet ( $5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) との結合定数の差異に基づくものと考えられる. したがって, Oct の高親和性サイトはサイト II に, N-AcMet の高親和性サイトはサイト I に結合するものと推察される. 事実, Oct と N-AcMet の濃度を HSA に対し, 1:1 のモル比に設定した場合, 両者ともフリー濃度の変化は認められなかった. この結合実験の結果は, HSA 分子上の Oct と N-AcMet の結合部位が異なることを明瞭に示しているものと考えられる.



**Fig. 14. Effects of displacer ligands on the fluorescence intensity of warfarin (A) and dansylsarcosine (B).**

The displacer drugs used in this experiment were N-AcMet (●), Oct (■).  
The concentrations of HSA, warfarin and dansylsarcosine were 2 μM.

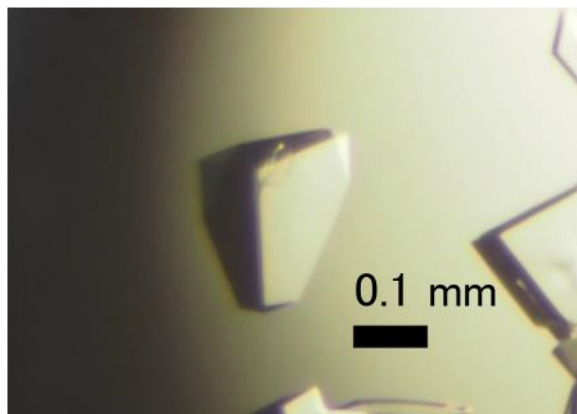
### 第3節 HSA と N-AcMet 及び Oct 三元複合体の X 線結晶構造解析

第2節の結果から、N-AcMet と Oct の結合部位が異なっていることが強く示唆されたことより、HSA、N-AcMet 及び Oct との三元複合体の形成の有無を明らかにすると共に、2つのリガンドの位置関係を証明することを目的に、HSA-N-AcMet-Oct の複合体の結晶構造解析を試みた。

#### 3-1 HSA-N-AcMet-Oct 複合体の結晶化

HSA-N-AcMet-Oct 複合体の共結晶を得るため、N-AcMet 及び Oct の混合条件を検討した。まず、市販アルブミン製剤の添加剤量に合わせ、添加剤の量を HSA のモル濃度の 5 倍量に設定し、共結晶化を試みたが、構造解析が可能な単結晶を得ることが出来なかった。上述したように、N-AcMet の結合定数は  $5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 、Oct の結合定数は  $1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  と結合能が約 20 倍異なることより、結合の弱い N-AcMet は HSA のモル濃度に対して 10 倍量を増やし、再度共結晶化を試みた。この条件では結晶が得られたものの、この結晶は脆く、ドロップ内の濃度変化や温度変化、さらにカバーガラスを結晶化プレートから剥がす振動で割れてしまうものもあった。放射光を用いた X 線回折実験では、高輝度 X 線による損傷を抑えるため低温で測定することが望ましい。そのためには結晶をガラス状に凍結させる必要があることから、HSA-N-AcMet-Oct 複合体の共結晶は結晶化剤と不凍剤の両方を兼ね備えた条件で析出し、さらに振動で割れない結晶として作製できる条件を探索することが必須となった。そこで結晶化温度、沈殿剤の種類や濃度など種々の条件下で検討を重ねた結果、従来から使用されていた沈殿剤の PEG3350 に加え、MPD を終濃度 10% となるように設定することで結晶を得、且つ、ガラス状に凍結することができる条件を見出すことに成功した。この結晶化条件で得られる結晶は依然割れてしまうものも多かったが、割れずに残った結晶を用いることで X 線回折データの収集、構造決定に成功し、N-AcMet 結合部位を同定することができた。しかし、Oct に対応すると考えられる電子密度は観察されず、その結合部位を同定することは出来なかった。そこで、Oct の混合量を 6~10 倍量まで増やし、再度共結晶化を試みたところ、Oct を 6~9 倍量加えた

条件では Fig. 15 に示したような結晶が得られたが, Oct を 10 倍量加えた条件では単結晶を得ることができなかった. また, Oct を 9 倍量加えた条件で得られる結晶を用いて X 線回折実験を行うと最大分解能が 3 Å 程度であった. よって, HSA のモル濃度に対して N-AcMet を 10 倍量, Oct を 8 倍量加えた条件で得られる結晶を用いて, X 線回折データを収集し, 構造解析を行った.



**Fig. 15. HSA-N-AcMet-Oct crystals.**

The best co-crystals of the HSA-N-AcMet-Oct complex were obtained in 2 weeks at 288 K by the streak seeding into drops that had been allowed to equilibrate for 3 days.

**Table 6. Data-collection and refinement statistics**

Values in parentheses are for the highest resolution shell

<b>Data-collection</b>	
Source	SPring-8 BL44XU
wavelength (Å)	0.9000
Space group	$P2_1$
Unit-cell parameters	
length (Å)	$a = 58.9, b = 181.4, c = 59.8,$
angle (°)	$\beta = 104.6$
Resolution range (Å)	50.0 – 2.60 (2.64 – 2.60)
No. of observed reflections	140,636
No. of unique reflections	37,447
Multiplicity	3.8 (3.9)
Completeness (%)	98.7 (100)
$R_{\text{merge}}(\%)^a$	7.0 (64.2)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	32.3 (2.5)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	36.3 – 2.60 (2.67 – 2.60)
Reflection used	36,735 (2,821)
$R_{\text{work}}(\%)^b$	23.4 (31.1)
$R_{\text{free}}(\%)^c$	28.3 (42.0)
Completeness (%)	98.7 (99.6)
Number of non-hydrogen atoms	8,088
Protein	7,994
Ligands	88
Water	6
r.m.s.d. from ideality	
bond length (Å)	0.001
bond angle (°)	0.413
Average. $B$ -factor	101.1
Protein	101.1
Ligands	103.7
Water	78.7
Ramachandran plot	
favored region (%)	96.1
allowed region (%)	3.9
outlier region (%)	0.0
Clashscore	2.5

<sup>a</sup>  $R_{\text{merge}} = 100 \times \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ , where  $\langle I(hkl) \rangle$  is the mean value of  $I(hkl)$ .

<sup>b</sup>  $R_{\text{work}} = 100 \times \sum_{hkl} | |F_o| | - |F_c| | / \sum_{hkl} |F_o|$ , where  $F_o$  and  $F_c$  the observed and calculated structure factors, respectively. <sup>c</sup>  $R_{\text{free}}$  is calculated as for  $R_{\text{work}}$ , but for the test set comprising 5% reflections not used in refinement.

### 3-2 HSA-N-AcMet-Oct 複合体の全体構造

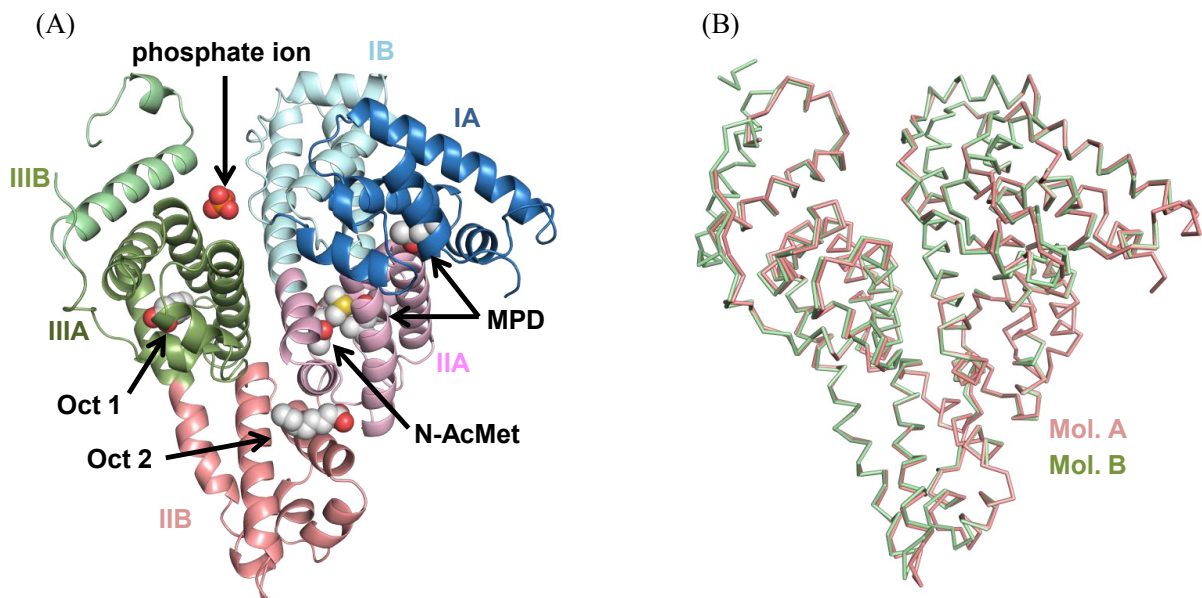
SPring-8 BL44XU での X 線回折実験の結果, 本研究で作製した HSA-N-AcMet-Oct 複合体の結晶は, 空間群  $P2_1$  に属し, 格子定数は  $a=58.9 \text{ \AA}$ ,  $b=181.4 \text{ \AA}$ ,  $c=59.8 \text{ \AA}$ ,  $\beta=104.6^\circ$  であることが明らかになった. この結晶を用いて X 線回折データセットを収集して構造解析を実施した結果, HSA-N-AcMet-Oct 複合体の立体構造を  $2.6 \text{ \AA}$  分解能で決定することができた (Fig. 16). その他の X 線回折データならびに構造精密化の統計値は Table 6 に記す. また, この HSA-N-AcMet-Oct 複合体の結晶内の非対称単位中には 2 分子の HSA (分子 A と分子 B) が含まれている. そして, この HSA 分子 A と分子 B の全体構造を重ね合わせると, 対応する 498 アミノ酸残基の  $C\alpha$  原子間の r.m.s.d. 値は  $0.54 \text{ \AA}$  と計算され, 両者の全体構造に大きな違いは観察されなかった (Fig. 16B).

HSA の全体構造は, これまでに報告されていた HSA の構造と同様にハート型を形成していて, この構造は $\alpha$ -ヘリックスに富んだ相同性の高い 3 つのドメイン (I, II, III) で構成され, さらに, これらのドメインは, それぞれサブドメイン A とサブドメイン B に細分化される (Fig. 16A). Curry らは中鎖飽和脂肪酸 (炭素数:10~18) と HSA の複合体構造解析を行い, 脂肪酸が結合することでサブドメイン構造の配向が変わり, HSA の全体構造に変化が生じることを報告している<sup>53, 54</sup>. そこで, Oct (炭素数:8) の炭素数と同程度であるデカン酸 (炭素数:10) が結合した HSA の構造 (PDB code 1e7e<sup>54</sup>) と重ねあわせると, 対応する 476 アミノ酸残基の  $C\alpha$  原子間の r.m.s.d. 値は  $2.98 \text{ \AA}$  となった. 一方, HSA-N-AcMet-Oct 複合体の立体構造を化合物が結合していない状態の HSA 構造 (PDB code 1ao6<sup>55</sup>) と重ねあわせると, 対応する 532 アミノ酸残基の  $C\alpha$  原子間の r.m.s.d. 値は  $0.70 \text{ \AA}$  となり, 本研究で決定した HSA-N-AcMet-Oct 複合体の全体構造は, 脂肪酸が結合していない HSA の構造に類似していることが明らかになった. この傾向は, Dali サーバー<sup>56</sup>)を用いて HSA-N-AcMet-Oct 複合体と他の HSA の立体構造を比較した場合にもみられ, HSA とフシジン酸複合体 (PDB code 2vuf<sup>57</sup>), r.m.s.d.値= $0.85 \text{ \AA}$ , 515 アミノ酸残基), HSA とインドキシル硫酸複合体 (PDB code 2bxh<sup>58</sup>), r.m.s.d.値= $0.89 \text{ \AA}$ , 528 アミノ酸残基) や, HSA とダンシル-L-ノルバリン複合体 (PDB code 2xw1<sup>59</sup>),



r.m.s.d.値=0.98 Å, 534 アミノ酸残基) など, 脂肪酸が結合していない HSA の構造との類似性の高い結果となった.

N-AcMet の結合部位はサブドメイン IIA に存在していて, これは Sudlow らによって提唱された薬物結合部位のサイト I と一致している (Fig. 16A)<sup>43)</sup>. 一方, Oct の結合部位は, サブドメイン IIIA (Oct 1) 及びサブドメイン IIA と IIB (アミノ酸番号 298-383) の間 (Oct 2) の 2 ヶ所が確認され, これらは Curry らによって同定されていた 7 つの脂肪酸結合部位の中でも, 脂肪酸結合部位 3 と 4 (サブドメイン IIIA) 及び脂肪酸結合部位 6 (サブドメイン IIA と IIB の間) に類似している (Fig. 16A)<sup>53)</sup>. そして, これら添加した化合物の直線距離は, Oct 1 と Oct 2 が約 25 Å, Oct 1 と N-AcMet が約 20 Å, Oct 2 と N-AcMet が約 15 Å であった (Fig. 16A). さらに, 結晶化剤として用いた MPD がサブドメイン IA (アミノ酸番号 5-107) とサブドメイン IIA の 2 ヶ所に結合していて, また, リン酸イオンがサブドメイン IB (アミノ酸番号 108-196) とサブドメイン IIIB (アミノ酸番号 498-582) の間に結合していることが確認できた (Fig. 16A).

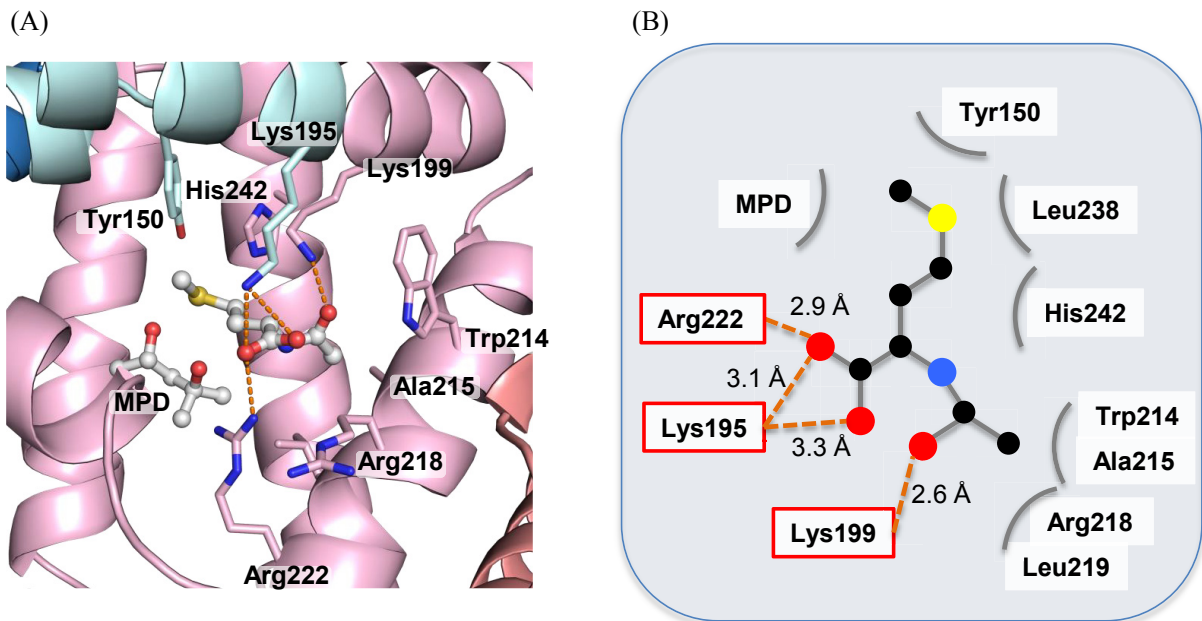


**Fig. 16. Structure of the HSA-N-AcMet-Oct complex.**

(A) Overall structure. The HSA is shown as cartoon representations, and the subdomain structures are colored in blue (IA), cyan (IB), pink (IIA), red (IIB), green (IIIA), and palegreen (IIIB). The ligand molecules are shown as CPK representations. (B) Comparison of the HSA structures in the asymmetric unit.

### 3-3 HSA 分子上の N-AcMet の結合様式

N-AcMet はサブドメイン IIA に結合していて、N-AcMet のカルボキシル基は Lys195 や Arg222 の側鎖と水素結合を形成していた (Fig. 17). また、N-AcMet のアセチル基の酸素原子は Lys199 の側鎖と水素結合を形成し、炭素原子は Trp214, Ala215, Arg218, Leu219 とファンデルワールス相互作用を形成していた。そして、N-AcMet の側鎖部分は、Tyr150, Leu238, His242 などのアミノ酸残基で形成されたポケットに収まっているが、ここには結晶化剤として使用した MPD の存在も確認できた。そして、この MPD の存在によりポケット内の空間が狭くなったことで、N-AcMet 側鎖は固定されているように考えられた。従って、MPD が存在しなければ、N-AcMet は MPD が占めている空間にも側鎖を向けることが可能なため、N-AcMet の側鎖部分はマルチコンフォメーションで存在していることが推測される。また、これまでに解析された HSA と薬物結合部位サイト I に結合する化合物との複合体構造解析の結果から、サイト I に結合する多くの化合物は、結合ポケット内部に形成された 3 つのチャンバーに自身の構造を合致させるような相互作用を形成することで HSA へ結合していることが報告されている<sup>58)</sup>。そこで、サイト I へ結合する化合物の代表例であるワルファリンの結合様式と N-AcMet の結合様式を比較すると、ワルファリンは自身の構造中に有している芳香環を結合ポケット内部の 2 つのチャンバーに収めた際に形成される相互作用が主となっているのに対し、N-AcMet は結合ポケットの入口付近での静電的な相互作用が主となっていて、この主となる相互作用の違いがそれぞれの結合定数 (N-AcMet:  $5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , warfarin:  $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) に反映しているものと解釈される。



**Fig. 17. N-AcMet binding site.**

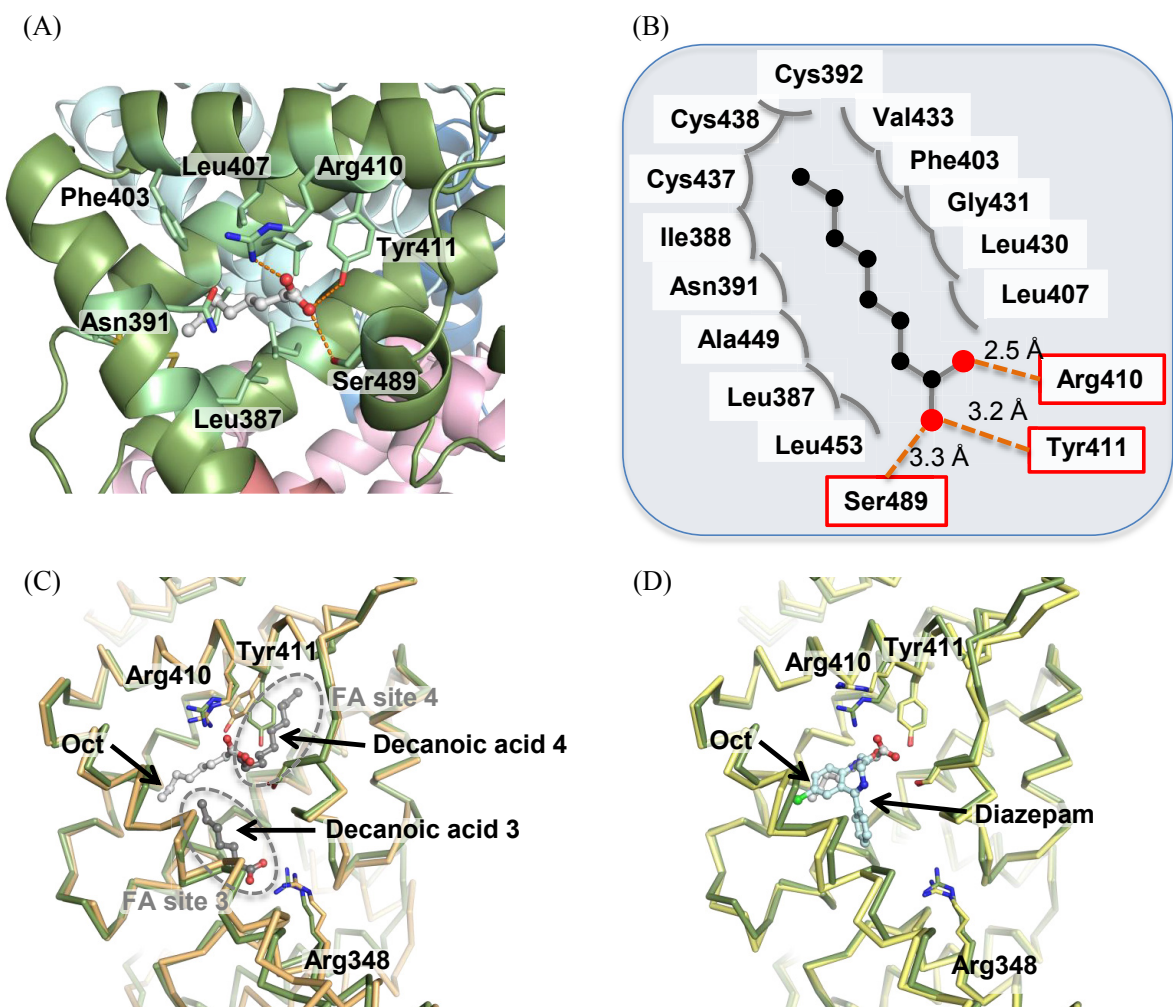
(A) Close-up view of the N-AcMet binding site. The N-AcMet and MPD molecules are shown as ball-and-stick representations. Hydrogen bonds are shown as orange dashed lines. (B) The schematic diagram of the N-AcMet binding site. The amino acid residues involved in hydrogen bonds are surrounded by red boxes.

### 3-4 HSA 分子上の Oct の結合様式

Oct の結合部位は、サブドメイン IIIA 及びサブドメイン IIA と IIB の間の 2 ヶ所に存在している (Fig. 18A). まず、サブドメイン IIIA では、Leu387, Ile388, Asn391, Cys392, Phe403, Leu407, Arg410, Tyr411, Leu430, Gly431, Val433, Cys437, Cys438, Ala449, 及び Leu453 で形成されたポケットの内部に、Oct がアルキル基部分を直鎖状に伸ばした状態で結合していて、周りのアミノ酸残基とファンデルワールス相互作用を形成していた (Fig. 18A, B). 加えて、Oct のカルボキシル基部分は Arg410 や Tyr411, Ser489 の側鎖と水素結合を形成していた. このサブドメイン IIIA における HSA と Oct の相互作用は、結晶内に含まれる非対称単位中の HSA 分子 A 及び分子 B の両方で同様に観察された. また、サブドメイン IIIA での Oct の結合様式とデカン酸の結合様式 (PDB code 1e7e<sup>54</sup>) を比較すると、Oct のカルボキシル基部分は、脂肪酸結合部位 4 に結合したデカン酸と同じ

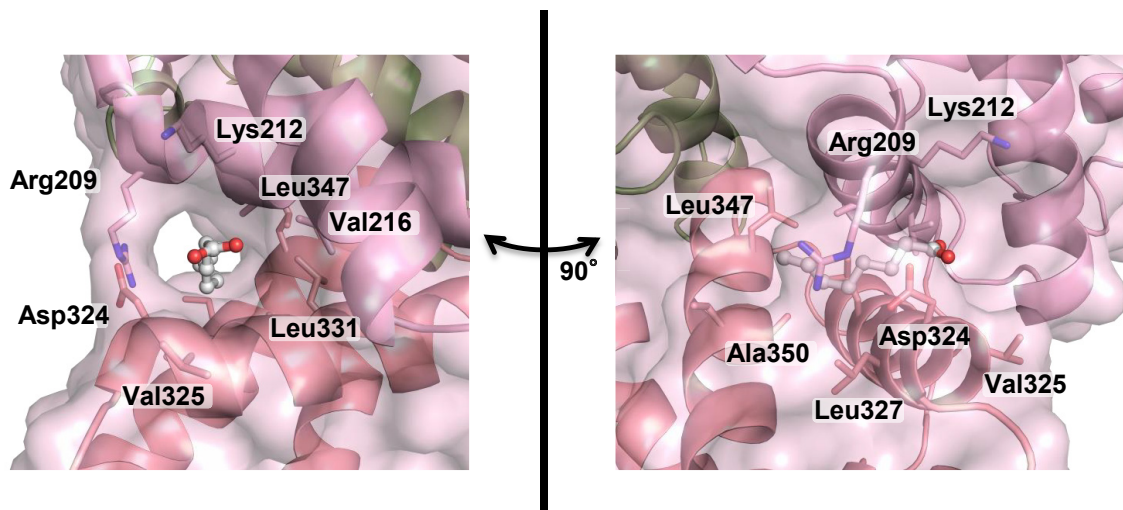
位置を占めているが、アルキル基部分はいずれのデカン酸とも異なる向きに結合していることが明らかになった (Fig. 18C). また、この脂肪酸結合部位 3 と 4 は Sudlow らが提唱している薬物結合サイト II とも領域が重複している. そこで、Oct の結合様式を薬物結合サイト II に結合する代表的な化合物であるジアゼパムの結合様式 (PDB code 2bxf<sup>68</sup>) と比較すると、デカン酸の時よりそれぞれの化合物が重なる範囲が広がった (Fig. 18D). このことから、サブドメイン IIIA における Oct の結合様式は、薬物結合サイト II に結合する化合物により類似することが示唆された.

一方で、サブドメイン IIA と IIB の間には、Arg209, Lys212, Ala213, Val216, Asp324, Val325, Leu327, Gly328, Leu331, Leu347, Ala350, Lys351 によって小さなトンネル状の間隙が形成されていて、その間隙を埋めるように Oct は結合し、周りのアミノ酸残基とファンデルワールス相互作用を形成していた (Fig. 19). また、このサブドメイン IIA と IIB の間に結合する Oct は、結晶内の非対称単位中に存在する HSA 分子 A のみで観察された. よって、非対称単位中に存在する HSA 分子 A と分子 B の両方で Oct の結合を確認できたことから、サブドメイン IIIA に存在する Oct の結合部位がプライマリーな結合部位だと推測される.



**Fig. 18. Oct binding site in the subdomain IIIA.**

(A) Close-up view of the Oct binding site in the subdomain IIIA. The Oct molecule is shown as a ball-and-stick representation. Hydrogen bonds are shown as orange dashed lines. (B) The schematic diagram of the Oct binding site in the subdomain IIIA. The amino acid residues involved in hydrogen bonds are surrounded by red boxes. (C, D) Comparisons of the binding sites of Oct, decanoic acid, and diazepam. The subdomain IIIA structures of the HSA-decanoic acid complex (PDB code 1e7e<sup>54</sup>) and the HSA-diazepam complex (PDB code 2bxf<sup>58</sup>) are superimposed on the HSA-N-AcMet-Oct complex. The structures of the HSA-N-AcMet-Oct complex, the HSA-decanoic acid complex, and the HSA-diazepam complex are shown as ribbon representations colored green, orange, and yellow, respectively. The Oct, decanoic acid, and diazepam molecules are shown as ball-and-stick representations, and their carbon atoms are colored white, gray, and cyan, respectively. Fatty acid binding site (FA site) 3 and 4 are surrounded by gray dashed line circles.



**Fig. 19. Oct binding site between the subdomain IIA and IIB.**

Close-up view of the Oct binding site between the subdomain IIA and IIB. The Oct molecule is shown as a ball-and-stick representation.

#### 第4節 考察

HSA の安定性を向上させる N-AcMet と Oct の結合部位ならびにその結合様式を解明するため、限外濾過法により N-AcMet や Oct の結合親和力を定量的に評価するとともに、2 つのリガンドの結合位置関係を明らかにし、さらには X 線結晶構造解析法により HSA-N-AcMet-Oct 複合体の立体構造を決定した。その結果、N-AcMet の結合定数は Oct のそれに比べ、1/20 ほど小さく、加えて 2 つの結合部位は異なり、N-AcMet と Oct は HSA 分子上で独立して結合していることが明らかとなった。また、N-AcMet の結合部位はサブドメイン IIA に、Oct の結合部位はサブドメイン IIIA 及びサブドメイン IIA と IIB の間の 2 ヶ所に結合することが明らかになった。当研究室が先に実施した研究では、N-AcTrp ならびに Oct は、共にサブドメイン IIIA へ結合するという、いわゆる競合的に結合するという結果が得られている<sup>5)</sup>。結合部位の差異が N-AcMet と N-AcTrp との抗酸化能の違いを反映している要因の1つかもしれない。また、N-AcMet 自身も酸化を受け易く、N-アセチルメチオニンスルホキシドや N-アセチルメチオニンスルホンへと変化することが知られている。そして、HSA に結合した N-AcMet の側鎖部分は固定されておらず、さらに酸化を受けやすい硫黄原子周辺の空間には余裕

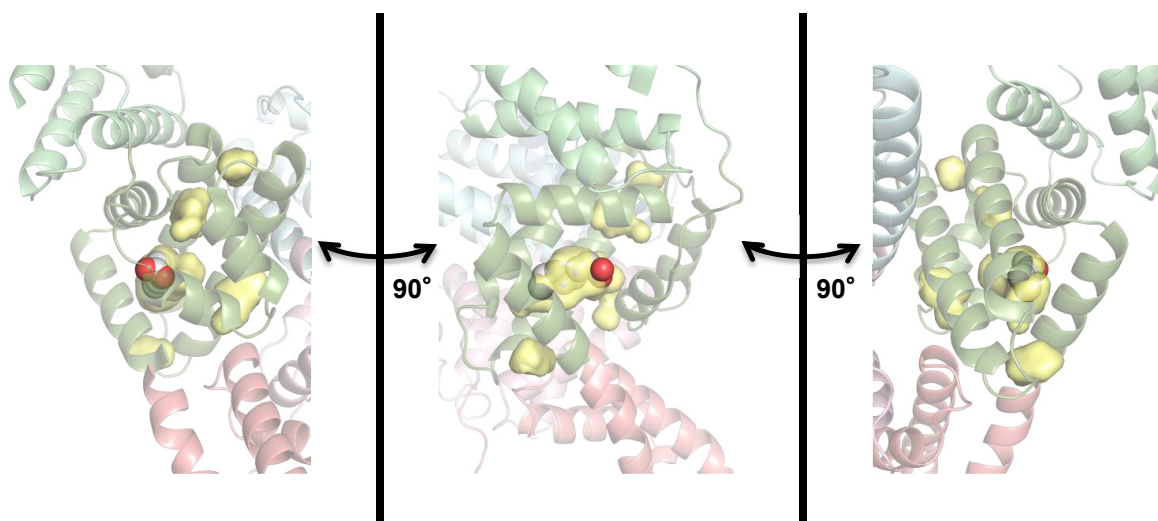
がみられるため、N-AcMet がN-アセチルメチオニンスルホキシドやN-アセチルメチオニンスルホンに変化したとしても薬物結合サイト I に結合できるのではないかと推測される。このことから、N-AcMet は HSA に結合していないものは自身が酸化されることで ROS を消費し、さらに結合した N-AcMet は酸化物も含め、薬物結合サイト I 内部のアミノ酸残基を保護することによって HSA 全体の構造変化を防ぎ、抗酸化能を発揮しているのではないかと考えられる。

今回解析した HSA-N-AcMet-Oct 複合体の立体構造から確認された Oct の結合部位は 2 ヶ所のみで、全体構造としては脂肪酸が結合していない HSA に類似していることが明らかになった。この結果は、本研究では市販されているアルブミン製剤に添加されている脂肪酸塩（オクタン酸ナトリウム）を用いて結晶化試料を調製したことが影響していると考えている。これまでに解析された HSA と脂肪酸の複合体構造は、水への溶解度が低い脂肪酸の状態のものを用いて結晶化試料を調製していた。そのため、結晶化試料中の脂肪酸の濃度は、ほぼ飽和に達していて、HSA に結合した脂肪酸の解離は少なかったと予想される。しかし、本研究で用いた脂肪酸塩は水への溶解度が高いため、結晶化試料中の脂肪酸塩の濃度では飽和まで余裕があったことから HSA との結合が弱い部位では Oct が解離した状態のものが多かったと推測される。また、過去に実施された HSA と Oct の結合実験において、Arg410 や Tyr411 に変異を導入した HSA では Oct の結合能が著しく低下することが示されていた<sup>60)</sup>。この結果は、Oct と HSA 間に観察された水素結合の消失によるものであると本研究結果から説明することができ、本研究で観察された 1 分子の Oct がサブドメイン IIIA に結合した状態が大多数を占めていたため、HSA の変異体では著しく結合能が低下したものと考えられる。このことから、サブドメイン IIIA での Oct の結合は、これまでに報告されていた脂肪酸結合部位 3 や 4 の様式とは異なっているものの、本研究で明らかにした HSA-N-AcMet-Oct 複合体の構造は、Oct が脂肪酸塩の状態で見られる結合様式の 1 つであると考えている。

HSA の安定性に関する研究は古くから実施され、多くの知見が蓄積されている。Flora らは HSA の Cys34 をアクリロゲンでラベルし、加えて HSA の Trp214 と共にそれぞれの蛍光強度変化を測定することで、HSA のドメイン I と II の熱変性過程における構造変化について研究を実施している<sup>61)</sup>。この結果、HSA は 50°C 付近で可逆的なドメイン I とドメイン II の分離が起こり、70°C までにドメイン

II の不可逆的な変性, 70°C 以上でドメイン I の不可逆的な変性が起こることが示された. また, Galantini らは塩酸グアニジンの添加によって HSA が変性する過程の構造変化を X 線小角散乱で追跡する研究を実施している<sup>62)</sup>. そして, この研究によって, 脂肪酸の結合していない HSA では, ドメイン III →ドメイン II →ドメイン I の順に変性することが明らかになった. さらに, 脂肪酸の結合した HSA では, ドメイン III の中でも, まずサブドメイン IIIB の変性が起こり, 次にサブドメイン IIIA の変性とドメイン I と II の分離が起こった後, 最終的にドメイン I とドメイン II の変性が起こることが示めされ, 脂肪酸はサブドメイン IIIA とドメイン II の安定性に影響していることが示唆された. これらの研究結果を踏まえると, HSA の変性過程では, サブドメイン IIIA の変性が引き金となり, ドメイン I とドメイン II の分離, そしてドメイン II の変性, ドメイン I の変性の順に進むと推測される. 全般的なタンパク質の安定性については未だ不明な点は多いが, 分子内の水素結合の数や疎水的な相互作用面の面積が大きいほど安定性が向上する傾向にあることが知られている. そこで, 化合物の結合していない状態で, HSA のサブドメイン IIIA に存在する分子内の空洞を描いてみると Fig. 20 のようになり, この中で最も体積の大きな空洞は薬物結合サイト II に対応する部分であった. よって, Oct などの中鎖脂肪酸はこの空洞の大きさに合致していることから, 中鎖脂肪酸が薬物結合サイト II に結合することでサブドメイン IIIA 内部の空洞を埋め, 分子内の疎水的な相互作用面の面積を増加させることが HSA の熱安定性を向上させる要因の 1 つだと考えられる. また, ドメイン II も同様に, Oct がサブドメイン IIA と IIB の接する面に存在する間隙を埋めることで, サブドメイン間の相互作用面を増やし, HSA の熱安定性に寄与しているものと考えられる.





**Fig. 20. Intra-cavities of the subdomain IIIA.**

This figure is drawn with the HSA free-form coordinate (PDB code 1ao6). The subdomain IIIA structure is shown as a transparent green cartoon representation. The intra-cavities of the subdomain IIIA are shown as transparent yellow surface representations. The Oct molecule is shown as a CPK representation and is modeled by superimposing the subdomain IIIA structure of the HSA-N-AcMet-Oct complex on HSA free-form.

## 第5節 小括

本章では、HSA の安定性を向上させる N-AcMet と Oct の結合部位ならびにその結合様式を解明するため、限外濾過法により N-AcMet の結合定数を算出し、次いで蛍光プローブ置換実験より結合部位を予測し、さらには X 線結晶構造解析法により HSA-N-AcMet-Oct 複合体の立体構造を決定した。以下に得られた結果を要約する。

1) 限外濾過法を用いて、Oct と N-AcTrp の HSA への結合性を定量的に評価した。Scatchard 解析の結果から、Oct の結合定数は  $1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、N-AcMet は  $5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  であり、Oct は N-AcMet よりも結合定数が約 20 倍大きいことが明らかとなった。

2) 蛍光プローブを用いて N-AcMet 及び Oct による置換現象を調べたところ, N-AcMet はサイト I 領域 (サブドメイン IIA) に, Oct はサイト II 領域 (サブドメイン IIIA) に結合することが判明した.

3) HSA-N-AcMet-Oct 複合体の共結晶を得るため, N-AcMet 及び Oct の混合条件を検討した結果, HSA のモル濃度に対して N-AcMet を 10 倍量, Oct を 8 倍量加えた条件で最も適切な結晶が得られた.

4) N-AcMet はサブドメイン IIA に結合していて, N-AcMet のカルボキシル基は Lys195 や Arg222 の側鎖と水素結合を形成した. また, N-AcMet のアセチル基の酸素原子は Lys199 の側鎖と水素結合を形成し, 炭素原子は Trp214, Ala215, Arg218, Leu219 とファンデルワールス相互作用を形成していた.

5) サブドメイン IIIA における Oct の結合様式は, 薬物結合サイト II に結合する化合物により類似することが示唆された.

6) N-AcMet が N-AcTrp より効果的に抗酸化能を発揮している要因の 1 つとして, N-AcMet と Oct の結合部位が異なっている点が考えられた.

以上の結果から, N-AcMet と N-AcTrp の抗酸化能の違いや N-AcMet と Oct の HSA に対する結合様式の差異に基づき N-AcMet は, アルブミン製剤において優れた抗酸化及び安定化効果を発揮しているものと推察された.

## 第5章 アルブミン製剤の酸化修飾に対する *N*-アセチル-L-メチオニンと *N*-アセチル-L-トリプトファンの有用性評価

### 第1節 序

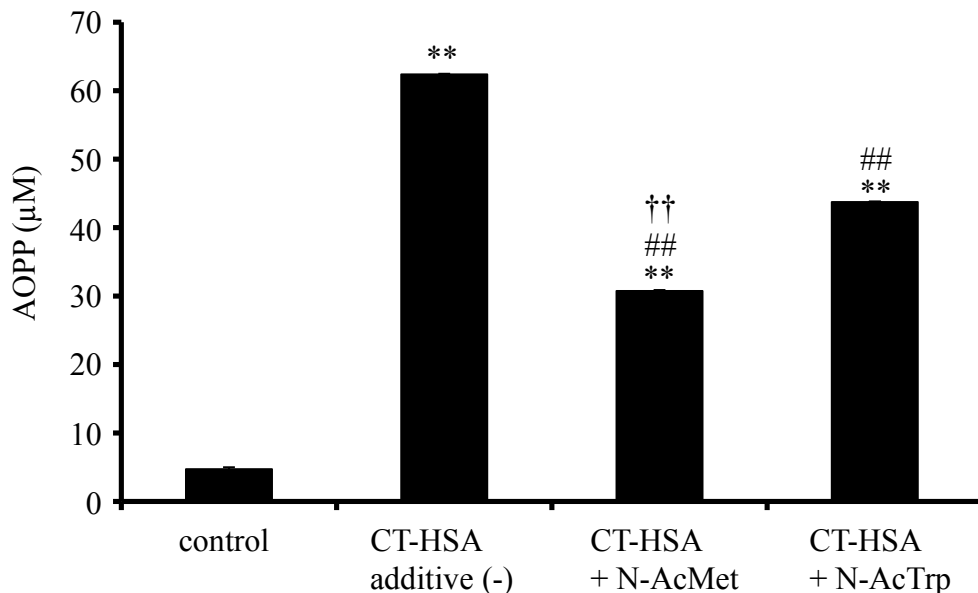
前章までの結果から、*N*-AcMet は既存の添加剤である *N*-AcTrp と比較して優れた抗酸化作用を有する添加剤となる可能性が示唆されたが、実際の生体内投与を想定した検討は行われていない。アルブミン製剤の対象疾患の一つとして、ネフローゼ症候群が挙げられるが、近年、ネフローゼ症候群患者において、ペルオキシナイトライト (ONOO<sup>•</sup>), <sup>•</sup>OH, 次亜塩素酸 (HOCl) などの活性酸素の増加により、酸化ストレスが亢進し、病態の進展への関連性が示唆されている<sup>63-65)</sup>。この病態進展の関連物質として、血中の HOCl などにより過度に酸化修飾を受けた HSA の凝集体である AOPP (Advanced oxidation protein products) の存在が明らかにされている。AOPP は、クレアチニンクリアランスと良好な相関を示すことから慢性腎不全時における有用なマーカーとなるだけでなく、血中で単球や好中球を活性化する炎症メディエーターとして機能し、心血管系疾患の亢進因子としても位置付けられている<sup>66-68)</sup>。したがって、酸化ストレスが亢進している病態へのアルブミン製剤の投与において、HSA の構造や抗酸化能を保つことのできる添加剤を活用した安定な HSA 製剤の投与が望ましいことが考えられる。

そこで本章では、実際の生体内酸化を想定した腎不全の進行に関与するクロロミン T を用いた HSA の酸化モデルを構築し、*N*-AcMet 及び *N*-AcTrp 添加時、非添加時における HSA の構造及び機能変化について比較検討した。

## 第2節 酸化修飾モデル HSA の抗酸化能

### 2-1 クロラミン T による酸化修飾モデル HSA の調製

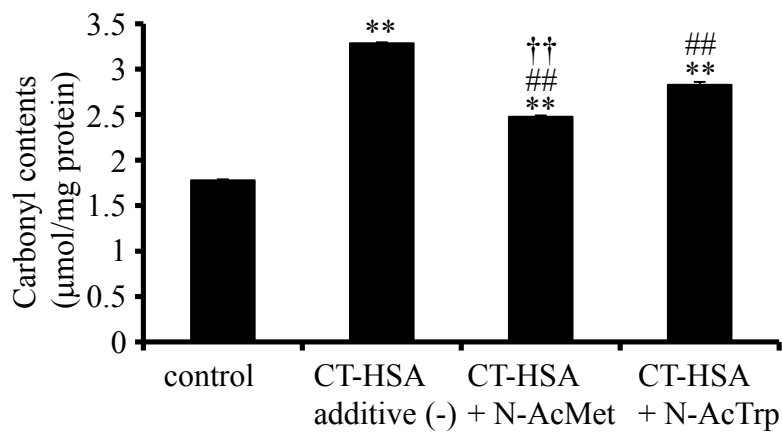
今回、非常に酸化能力が高く、生体成分に対する反応性は非常に多彩である HOCl から生じ、腎不全の進行に関与するクロラミン T を用い、300  $\mu$ M HSA にクロラミン T 5 mM を添加し、1 時間、インキュベートし、透析・凍結乾燥後のサンプルを酸化 HSA (CT-HSA) とした。まず、CT-HSA の酸化の程度を調べるため、慢性腎不全の酸化ストレスマーカーである AOPP 含量を測定した。その結果、添加剤なしの CT-HSA でクロラミン T 処理を行っていない HSA (以下 control) と比較し、顕著な AOPP 含量の増加が観察された (Fig. 21)。さらに、調製した CT-HSA の AOPP 含量は約 60  $\mu$ M と、実際の腎不全患者血中の AOPP 含量 50 - 200  $\mu$ M<sup>66)</sup> の範囲内であったことより、生体内の酸化の程度を十分反映するモデルになり得ることが示唆された。一方 N-AcMet 添加時では、添加剤なしよりも顕著に AOPP 含量の増加を抑制し、その抑制効果は N-AcTrp よりも高く、強い抗酸化作用を示した。



**Fig. 21. AOPP content of non-treated HSA (control) and HSA treated with chloramine T.** The concentration of HSA was 100  $\mu$ M. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n = 4). \*\*  $P < 0.01$ , compared with control. ##  $P < 0.01$ , compared with CT-HSA additive (-). ††  $P < 0.01$ , compared with CT-HSA + N-AcTrp.

## 2-2 カルボニル含量

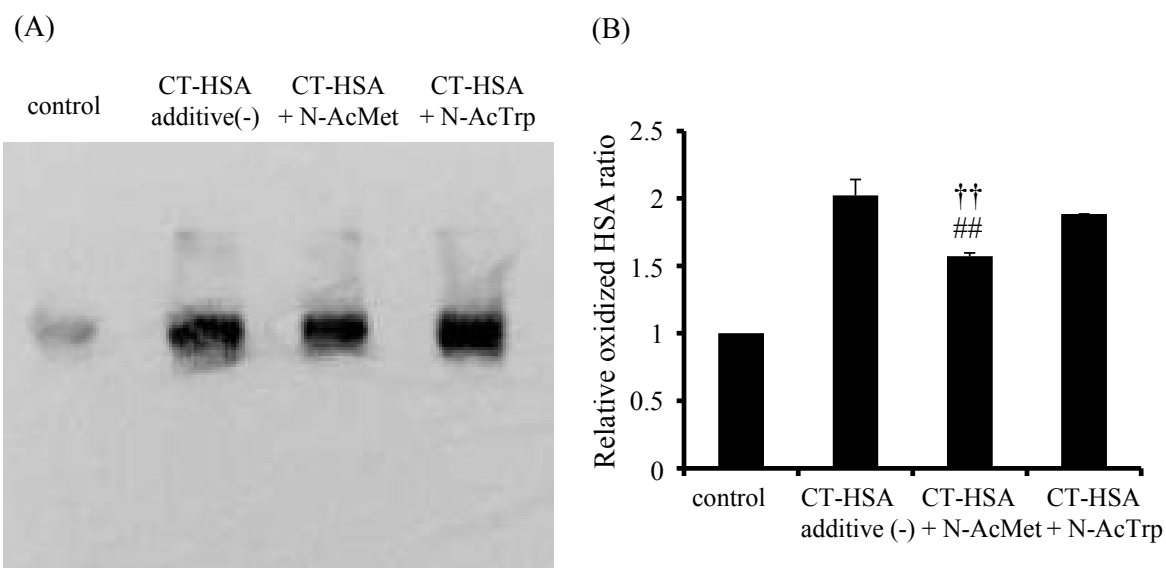
次に、酸化の指標であるカルボニル含量を測定し、各添加剤がHSA に及ぼす抗酸化作用を評価した。その結果、添加剤なしの CT-HSA のカルボニル含量は、顕著に増加していた。一方 N-AcMet 添加時では、添加剤なしよりも顕著にカルボニル含量の増加を抑制していた。また、N-AcMet 添加時のカルボニル含量の抑制効果は N-AcTrp 添加時よりも有意に高かった (Fig. 22)。



**Fig. 22. Carbonyl contents of non-treated HSA (control) and oxidized HSAs.**

The concentration of HSA was 0.2 mM and that of each additive was 1 mM. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\*  $P < 0.01$ , compared with control. ##  $P < 0.01$ , compared with CT-HSA additive (-). ††  $P < 0.01$ , compared with CT-HSA + N-AcTrp.

また、抗 DNP 抗体を用いた western blot 法により、control を基準としたカルボニル含量の比を算出したところ、N-AcMet 添加時では、添加剤なしの CT-HSA と N-AcTrp 添加時と比較し、相対的な HSA の酸化率を有意に減少させていた (Fig. 23A, B)。よって、N-AcTrp 添加時と比較して N-AcMet 添加時では、HSA のクロラミン T による酸化修飾を有意に抑制していることが判明した。

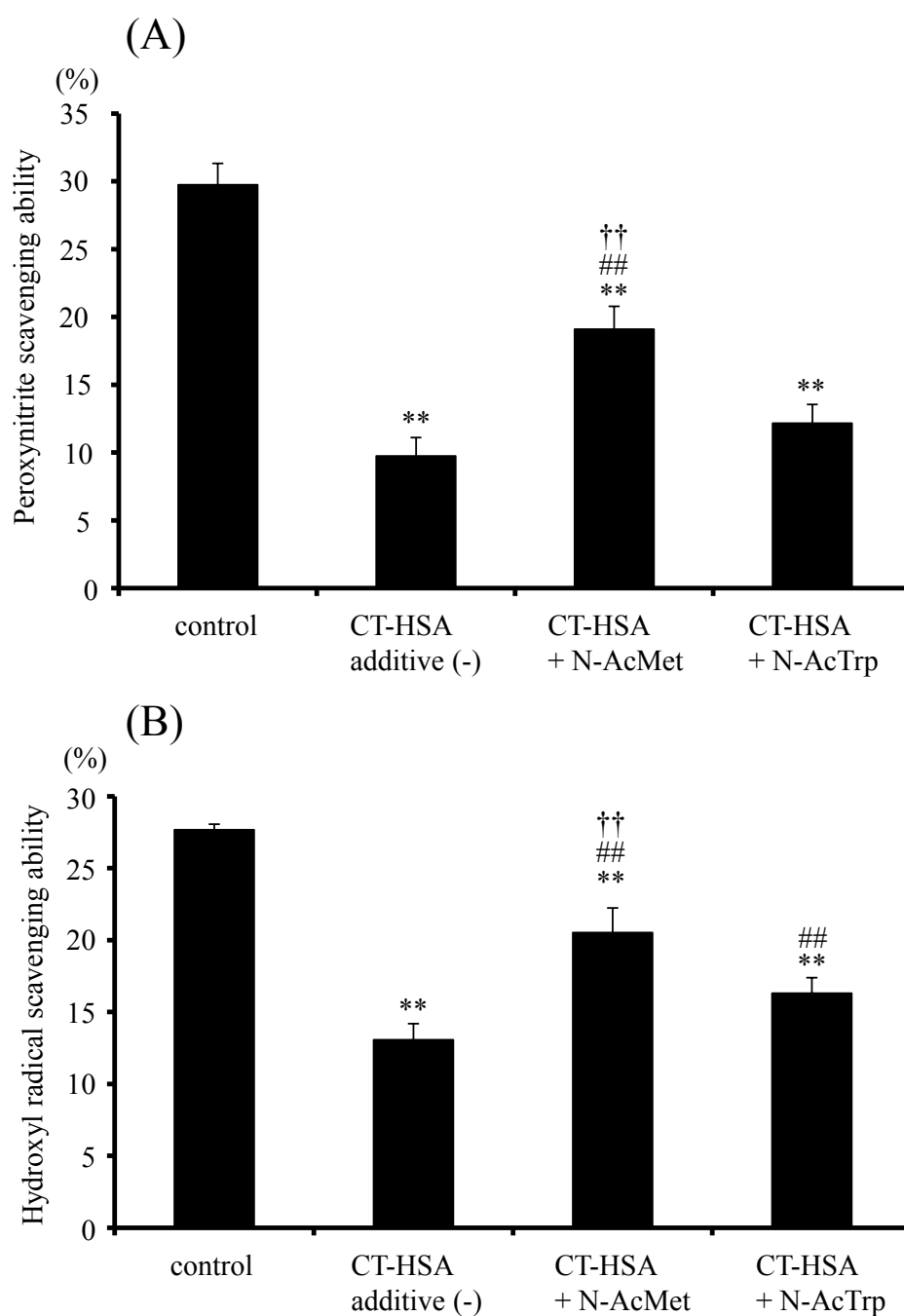


**Fig. 23. Evaluation of oxidation of non-treated HSA (control) and oxidized HSAs.** (A) Western blots and staining with Oxyblot Kit reagents. (B) Carbonyl formation of oxidized HSA were determined as densitometry ratio of DNP area and protein area. Each point represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). ##  $P < 0.01$ , compared with CT-HSA additive (-). ††  $P < 0.01$ , compared with CT-HSA + N-AcTrp.

### 2-3 ペルオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) 消去能及びヒドロキシルラジカル ( $\cdot$ OH) 消去能

次に、CT-HSA の ONOO<sup>-</sup> 消去能を評価した。ジヒドロローダミン 123 は、酸化物質である ONOO<sup>-</sup> と反応し、蛍光を発するローダミンに酸化される。よって、CT-HSA の ONOO<sup>-</sup> 消去能を、ローダミンの蛍光強度を測定し評価した。その結果、添加剤なしの CT-HSA の ONOO<sup>-</sup> 消去能は control と比較し大きく減少していた。一方 N-AcMet 添加時では、添加剤なしの CT-HSA と比較して大きな ONOO<sup>-</sup> 消去能を保持しており、N-AcTrp 添加時と比較しても有意に高かった (Fig. 24A)。

次に、フェントン反応により発生させた $\cdot$ OH を、スピントラップ剤の DMPO と反応させ、ESR スピントラップ法により検出し、CT-HSA の $\cdot$ OH に対するスカベンジ作用を評価した。その結果、N-AcMet 添加時では、添加剤なしの CT-HSA と比較して大きなラジカル消去能を保持しており、N-AcTrp と比較しても有意に高く、ONOO<sup>-</sup> 消去能と同じ傾向が観察された (Fig. 24B)。これらの結果から、酸化処理後、N-AcTrp 添加時と比較して N-AcMet 添加時において、ONOO<sup>-</sup> 消去能及び $\cdot$ OH 消去能を保持していることが示唆された。



**Fig. 24. Relative peroxynitrite scavenging activity (A) and hydroxyl radical scavenging activity (B) of non-treated HSA (control) and oxidized HSAs.**

(A) The concentration of HSA was 25  $\mu$ M. (B) The concentration of HSA was 50  $\mu$ M.

Each point represents the mean  $\pm$  SD (n = 3). \*\*  $P < 0.01$ , compared with control. ##  $P < 0.01$ , compared with CT-HSA additive (-). ††  $P < 0.01$ , compared with CT-HSA + N-AcTrp.

### 第3節 酸化修飾モデル HSA の構造安定性

#### 3-1 SDS-PAGE

SDS-PAGE を用いて酸化による HSA の構造特性を評価した。その結果、添加剤なしの CT-HSA と N-AcTrp 添加時の CT-HSA は、バンドのブロード化とわずかな低分子側への移動が観察された (Fig. 25)。一方で、N-AcMet 添加時の CT-HSA は、バンドのブロード化と低分子側への移動は観察されず、control とほぼ同様な泳動パターンを示した。

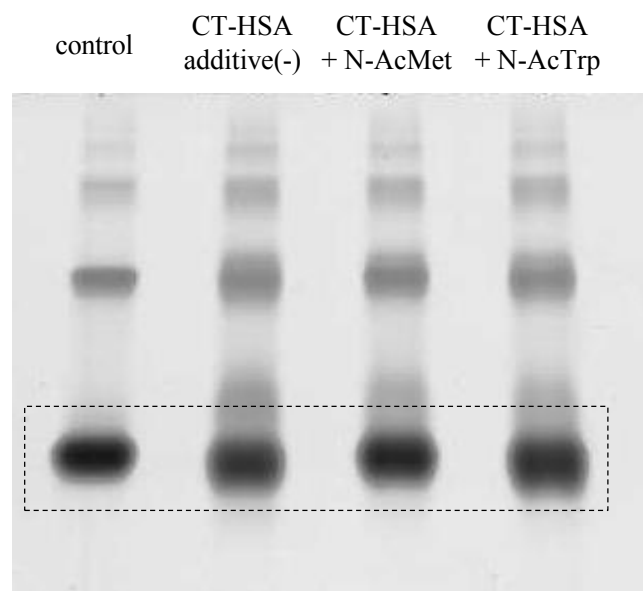


Fig. 25. SDS-PAGE electrophoresis of non-treated HSA (control) and oxidized HSAs.

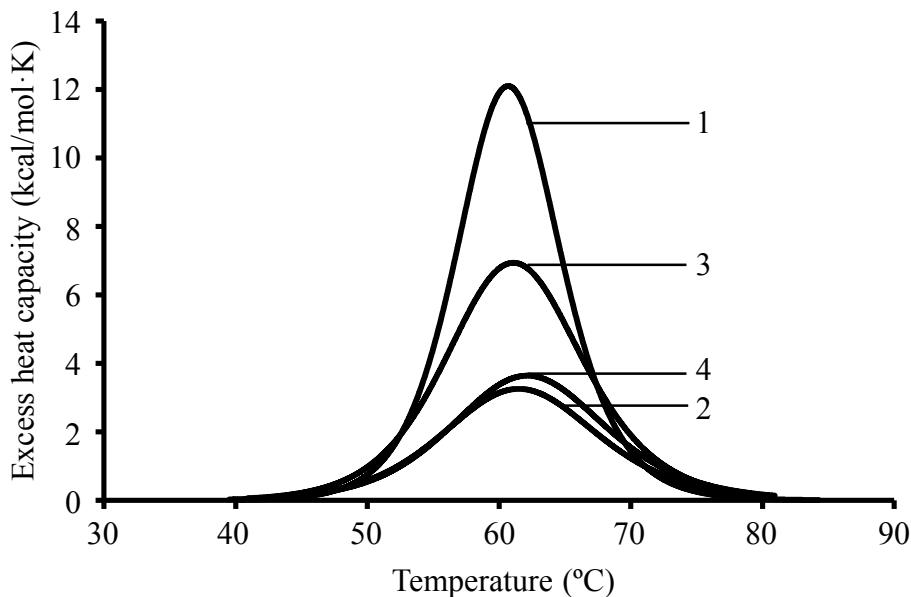
#### 3-2 DSC

次に DSC を用いて、各添加剤が及ぼす CT-HSA の熱安定性について評価した。その結果、N-AcTrp 添加時には添加剤なしの CT-HSA とほぼ同じピークを示したのに対し、N-AcMet 添加時には明らかに大きな吸熱ピークが観察された (Fig. 26)。また、DSC サーモグラムより解析した熱力学パラメータを Table 7 に示す。control と N-AcMet 添加時の  $\Delta H_v$  と  $\Delta H_{cal}$  の比は、1 未満



であり、ドメイン毎に異なった転移挙動を示し、構造を保持している可能性が示唆された。一方、添加剤非存在下あるいは N-AcTrp 添加時の $\Delta H_v$  と $\Delta H_{cal}$  の比は、1 を超えており、凝集体の形成が示唆された。

よって、酸化処理後において、N-AcTrp 添加時と比較して N-AcMet 添加時の HSA の顕著な熱安定性が示唆された。



**Fig. 26. Thermogram of non-treated HSA (control) and oxidized HSAs obtained by DSC.** (1) control, (2) CT-HSA additive (-), (3) CT-HSA + N-AcMet, (4) CT-HSA + N-AcTrp dissolved in sodium phosphate buffer, pH 7.4. The protein concentration was 20  $\mu$ M.

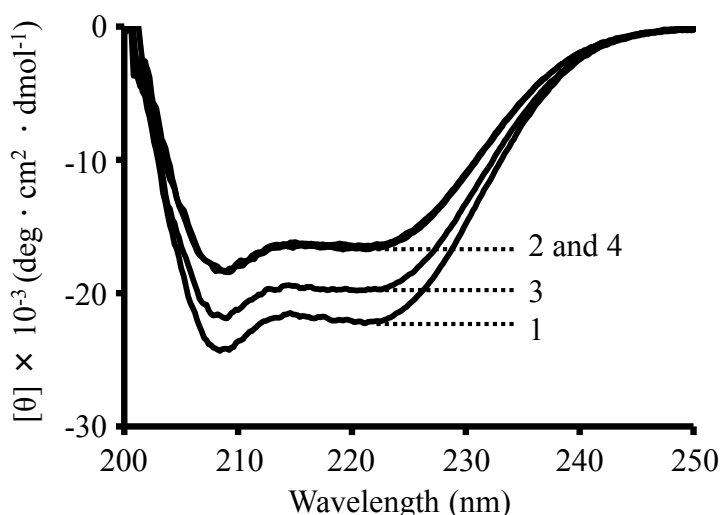
**Table 7. Thermodynamic data obtained from DSC of different HSA samples after CT induced oxidation<sup>a</sup>**

Protein samples	$T_m$ ( $^{\circ}$ C)	$\Delta H_{cal}$ (kcal/mol)	$\Delta H_v/\Delta H_{cal}$
control	$60.8 \pm 0.09$	$126 \pm 3.0$	$0.66 \pm 0.20$
CT-HSA additives (-)	$61.7 \pm 0.07$	$56.9 \pm 2.5$	$1.18 \pm 0.10$
CT-HSA + N-AcMet	$61.2 \pm 0.05$	$64.1 \pm 2.9$	$0.70 \pm 0.18$
CT-HSA + N-AcTrp	$62.3 \pm 0.10$	$57.4 \pm 1.9$	$1.06 \pm 2.9$

The concentration of HSA was 20  $\mu$ M and that of each additive was 100  $\mu$ M. The results are means  $\pm$  SD (n = 3).

### 3-3 CD スペクトル

次に酸化処理後、各添加剤の安定化効果について、HSA の二次構造を反映する遠紫外領域の CD スペクトルを測定した。その結果、クロラミン T 処理群の中で N-AcMet 添加時が最も  $\alpha$ -ヘリックス含量が高く、酸化の影響を最小限にしていた (Fig. 27, Table 8)。一方 N-AcTrp 添加時では、添加剤なしとほぼ同様のスペクトルを示したことから、クロラミン T の酸化の影響を受け、顕著な二次構造含量の低下が観察された。このことから、N-AcMet はクロラミン T による酸化に対し、HSA の構造を守る有用な添加剤である可能性が示唆された。



**Fig. 27. Far-UV CD spectra of non-treated HSA (control) and oxidized HSAs.** (1) control, (2) CT-HSA additive (-), (3) CT-HSA + N-AcMet, (4) CT-HSA + N-AcTrp dissolved in sodium phosphate buffer, pH 7.4. The protein concentration was 10  $\mu$ M.

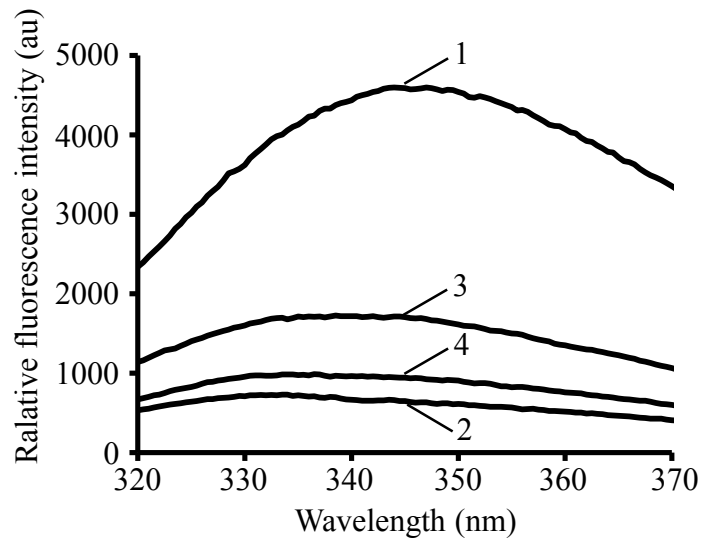
**Table 8. Alpha helical content of non-treated HSA (control) and oxidized HSAs calculated from CD spectra<sup>a</sup>**

Protein samples	Alpha helical content (%)
control	80.7 $\pm$ 1.18
CT-HSA additives (-)	61.7 $\pm$ 2.90
CT-HSA + N-AcMet	72.6 $\pm$ 3.21
CT-HSA + N-AcTrp	62.4 $\pm$ 2.35

<sup>a</sup> The protein concentration was 10  $\mu$ M. The results are means  $\pm$  SD (n = 3).

### 3-4 蛍光スペクトル

HSA に唯一存在する Trp214 由来の蛍光スペクトルを測定した. 通常, タンパク質は 280 nm 付近に吸収帯をもつが, この波長域の光を吸収するとタンパク質は一般に 340 nm 近傍に蛍光を発する (タンパク質の自然蛍光). この吸収帯 (特に 295 nm で励起させた場合) に寄与している芳香族アミノ酸のうち, この自然蛍光に寄与しているのは Trp であり, その蛍光強度の減少から Trp の酸化の程度を推測できる<sup>69-71)</sup>. その結果, Fig. 28 に示すように, クロラミン T による酸化処理群において蛍光の減少が観察されたが, N-AcMet 添加時では, 添加剤非存在下と N-AcTrp 添加時と比較して蛍光の消失が少なかった. このことから, N-AcMet は Trp214 の酸化修飾を軽減していることが示唆された.

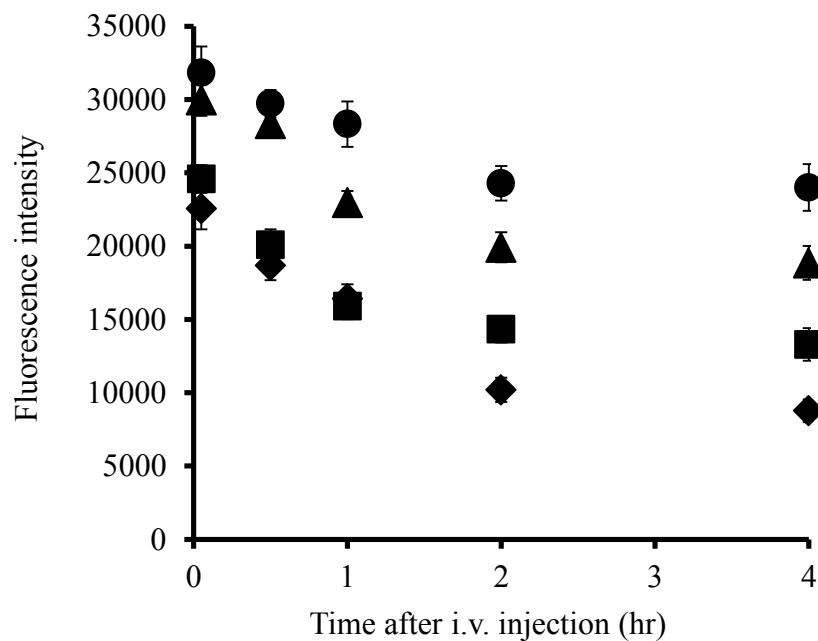


**Fig. 28. Intrinsic fluorescence spectra of non-treated HSA (control) and oxidized HSAs.** (1) control, (2) CT-HSA additive (-), (3) CT-HSA + N-AcMet, (4) CT-HSA + N-AcTrp dissolved in sodium phosphate buffer, pH 7.4. The protein concentration was 2  $\mu$ M.

#### 第4節 酸化修飾モデル HSA の体内動態特性

##### 4-1 Indocyanine green (ICG) 標識酸化修飾モデル HSA の血漿中濃度推移及び臓器移行性

前節で、今回調製した CT-HSA が臨床に比較的近い妥当なモデルであることが確認できた。そこで、この CT-HSA を ICG 標識し、健常マウスにおけるその体内動態特性について検討した。その結果、添加剤非存在下の CT-HSA は control と比較し、消失半減期の顕著な減少が観察された (Fig. 29, Table 9)。一方、N-AcMet 及び N-AcTrp 添加群では、非添加剤群に比べ半減期の減少は少なく、特に N-AcMet 添加時ではその影響が著しく小さかった。



**Fig. 29. Relative plasma concentrations of ICG-labeled HSAs (control (●), CT-HSA additive (◆), CT-HSA + N-AcMet (▲), CT-HSA + N-AcTrp (■)) after intravenous administration in mice.**

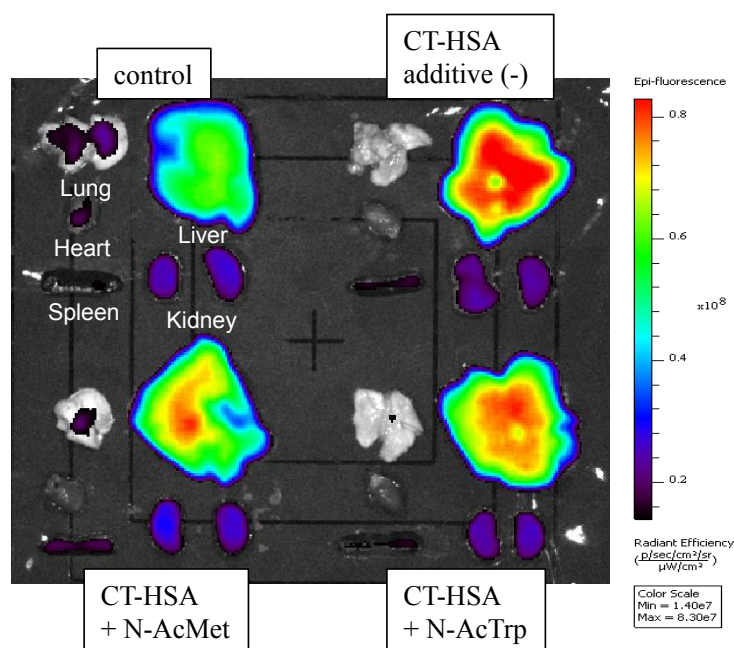
The bars represent SD (n = 3-4).

**Table 9. Half-life of ICG-labeled HSAs**

Protein samples	Half-life (hr)
control	9.65 ± 0.46
CT-HSA additives (-)	2.86 ± 0.40
CT-HSA + N-AcMet	5.87 ± 0.20 <sup>**</sup> , <sup>##</sup> , <sup>††</sup>
CT-HSA + N-AcTrp	4.98 ± 0.27 <sup>**</sup> , <sup>##</sup>

The data are average values of three or four experiments ( $\pm$  SD). <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , compared with control. <sup>##</sup>  $P < 0.01$ , compared with CT-HSA additive (-). <sup>††</sup>  $P < 0.01$ , compared with CT-HSA + N-AcTrp.

また Fig. 30 に、投与 2 時間後の肝臓、肺、腎臓、心臓、脾臓の臓器の蛍光イメージングの結果を示す。その結果、添加剤なしの CT-HSA は主要代謝臓器である肝臓へ蓄積し、control と比較し顕著な蛍光強度の増大が観察された。一方 N-AcMet 添加時では、N-AcTrp 添加時よりも蛍光強度の増加が少なく、消失半減期の結果を反映していた。このことから N-AcMet は、*in vivo* においても N-AcTrp 以上の HSA に対する抗酸化作用と安定化作用を有することが示唆された。



**Fig. 30. *In vivo* fluorescence imaging of control and oxidized HSAs labeled with ICG.** Dissected tissues of mice under fluorescent light, with images obtained at 2 hr after i.v. injection.

## 第5節 考察

本章では、アルブミン製剤の生体内投与を考慮する際、生体内酸化に対してより安定な添加剤としての N-AcMet の有用性について、N-AcTrp と比較検討した。今回、生体内酸化モデルの酸化剤として、HOCl から生じる強力な酸化促進物質であるクロラミンに着目した。クロラミンとは結合塩素化合物の総称であり、慢性腎不全時、血中で大量に発生する HOCl が、尿毒症物質である methylguanidine (MG) などと反応することで生成する<sup>72)</sup>。この MG-クロラミン反応産物は、HOCl よりも酸化能力としては劣るものの、半減期が長いこと血中で安定した酸化力を発揮する<sup>73)</sup>。従って、クロラミンは HOCl と同様に、病態の進行に関与する有力な酸化促進物質の 1 つと考えられている。そこで、その類似物質であるクロラミン T を用いて、CT-HSA の作製を行った。今回酸化処理に用いたクロラミン T は、HSA の Trp, Met, Tyr, アルギニン (Arg), リシン (Lys) を酸化修飾することが知られている<sup>74)</sup>。本研究においても、クロラミン T の酸化により、これらのアミノ酸残基が酸化修飾され、AOPP 及びカルボニル含量の顕著な増加が観察された (Fig. 21, Fig. 22)。この時、N-AcMet と N-AcTrp の抗酸化効果を比較したところ、N-AcMet 添加時でこれらの酸化ストレスマーカーの増大を最も効果的に抑制していた。アルブミン製剤が適用されるネフローゼ症候群をはじめとした慢性腎不全では、その長期化に伴う合併症、特に動脈硬化や心不全をはじめとした心血管系疾患 (Cardiovascular Disease : CVD) の進展が問題視されている。最近、血液透析患者の CVD 発症機序の一つとして、AOPP による免疫系細胞の異常亢進が注目されている。事実、Witko-Sarsat らは、血液透析患者血清中において、AOPP 化が増大していること、また、*in vitro* で調製した AOPP が好中球の活性化を誘導し、活性酸素の産生亢進を引き起こすことを報告した<sup>75, 76)</sup>。加えて、血液透析患者の血中 AOPP レベルは TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインと良好な相関性を示すことが見い出されており<sup>66, 67)</sup>、また AOPP などの修飾タンパク質が炎症性メディエータとして働き、その結果、血液透析患者における CVD 発症の誘導を惹起し<sup>75, 76)</sup>、血中の AOPP 含量をいかに減らすかが、慢性腎不全治療の重要課題となっている。したがって、添加剤としての N-AcMet はアルブミン自身の酸化を抑制するだけでなく、腎不全患者に対する合併症発症リスクの軽減にもつながる可能性が示唆さ

れた。さらに、N-AcMet 添加時の CT-HSA は、N-AcTrp 添加時よりも高い ONOO<sup>-</sup> 消去能及び $\cdot$ OH 消去能を有することが明らかとなった (Fig. 24A, B)。以上の結果より、N-AcMet は既存の添加剤である N-AcTrp より優れた抗酸化能を有する添加剤として生体内投与後も機能する可能性が示唆された。

次に、N-AcMet の構造的な安定化効果を検証するため、DSC を用いてクロラミン T の酸化に対する安定化効果を検討したところ、酸化処理群の中で最も N-AcMet 添加時の CT-HSA の吸熱ピークが大きく、 $\Delta$ Hcal の値も高かった (Fig. 26, Table 7)。さらに、非添加剤群と N-AcTrp 添加時の CT-HSA の $\Delta$ Hv と $\Delta$ Hcal の比は 1 を超え、凝集体の形成が示唆された。一方、control と N-AcMet 添加時での $\Delta$ Hv と $\Delta$ Hcal の比は 1 未満であり、HSA の秩序だった構造を保持している可能性が示唆され、両添加剤の安定化効果の違いが更に一層明確となった。加えてより詳細な構造安定性を評価するため、HSA の二次構造を反映する遠紫外領域の CD スペクトルと立体構造を反映する蛍光スペクトルを用いて両添加剤の安定化効果を評価したところ、N-AcMet を添加することにより HSA の酸化修飾が軽減し、構造安定化に寄与していることが明らかとなった (Fig. 27, Fig. 28)。

ICG 標識した CT-HSA の血漿中濃度推移及び臓器移行性を検討したところ、酸化の程度に依存して生体内から速やかに消失し、主要代謝臓器である肝臓への明らかな蓄積が観察された (Fig. 29, Fig. 30, Table 9)。この理由としては、酸化により HSA の構造変化が起こり、結果として体内動態特性が変化したことが考えられる。Iwao らは、CT-HSA の  $\alpha$ -ヘリックス含量の低下及びアミノ酸残基の酸化と、*in vivo* 条件下での消失分解の関連性を報告している<sup>7)</sup>。彼らは、CT-HSA は、二次構造の変化が惹起され、Trp, Arg, Tyr, Lys, Met が顕著に酸化修飾を受け、さらに架橋形成していることを見出ししている。また、今回算出された CT-HSA の  $\alpha$ -ヘリックス含量は、(CT-HSA additive(-)) ( $61.7 \pm 2.9\%$ ) < CT-HSA + N-AcTrp ( $62.4 \pm 2.35\%$ ) < CT-HSA + N-AcMet ( $72.6 \pm 3.21\%$ ) < control ( $80.7 \pm 1.18\%$ ) であり、本研究においても消失半減期の結果と一致した。加えて、消失半減期と  $\alpha$ -ヘリックス含量において良好な相関が認められた ( $r=0.874$ ,  $p<0.01$ )。これまで、酸化アルブミンやアルブミン糖化最終産物 (advanced glycation end products : AGE) などを含めた修飾アルブミンを静注すると、非実質細胞、特に肝内皮細胞及びクッパー細胞での、レセプター介在性エンドサイトーシスによって速

やかに肝臓へ蓄積することが報告されている<sup>78, 79)</sup>。従って、今回調製した CT-HSA も肝臓の非実質細胞のレセプター介在性エンドサイトーシスによって取り込まれることが予想される。事実、肝内皮細胞においていくつかのレセプターの関与が報告されている。例えば、酸化 LDL のレセプターである SR-A (scavenger receptor class A)<sup>80, 81)</sup>、酸化 LDL や AGE のレセプターである CD36 や SR-B1 (scavenger receptor class B)<sup>82, 83)</sup>、内皮細胞に高発現が認められる修飾 LDL のレセプターである SREC (scavenger receptor class F)<sup>84)</sup>、AGE のレセプターである FEEL-1 及び FEEL-2<sup>85, 86)</sup>、化学修飾された酸化アルブミンのレセプターである gp-18 や gp30<sup>87, 88)</sup> などが肝内皮細胞のエンドサイトーシスに関与することが言われている。今後、初代培養及びレセプターを高発現させた細胞を用いて、さらなる解析が必要であると思われる。また、腎臓にも少なからず酸化 HSA の時間依存的な蓄積が認められた。通常、HSA は糸球体ろ過を受けた後、尿細管に局在するメガリン・キューブリンにより再吸収される<sup>89-91)</sup>。一方、AOPP はメガリン・キューブリンではなく、ヒト近位尿細管細胞 (HK-2 細胞) に存在するスカベンジャー受容体の一種である CD34 により細胞内に取り込まれること、その際、活性酸素の産生を誘導し、これが引き金となって腎線維化因子である TGF- $\beta$  の産生を亢進することが報告されている<sup>92)</sup>。すなわち、酸化修飾された HSA は pro-oxidant になることで、新たな腎不全増悪因子になる可能性が示唆されている。したがって、実際の臨床においても HSA の酸化を最小限に抑えるような抗酸化剤の投与が求められる。特に、腎障害患者へのアルブミン製剤の投与は、原疾患の治療のみならず、CVD 等、酸化ストレス関連合併症の軽減も考慮した投与設計を構築する必要があるかもしれない。本章の結果より、N-AcMet は N-AcTrp と比較し、アルブミン製剤においてより有効な抗酸化及び安定化効果を示す添加剤である可能性が示唆された。今回得られた知見は、さらに有効性及び安全性に優れたアルブミン製剤を開発するための有用な基礎資料となり得ると考えられる。



## 第6節 小括

本章では, HOCl から生じ, 腎不全の進行に関与するクロラミン T を用いて HSA に対して酸化処理を行い, N-AcMet 及び N-AcTrp 添加時, 非添加時における HSA の構造及び機能変化について比較検討した. 以下に得られた結果を要約する.

1) クロラミン T を用いて酸化 HSA (CT-HSA) を調製した結果, その酸化の程度は実際の腎不全患者血中の AOPP 含量の範囲内であったことより, 生体内の酸化の程度を十分反映するモデルになり得ることが示唆された.

2) クロラミン T による HSA の酸化は, N-AcMet 添加時では N-AcTrp 添加時に比べて, 各種抗酸化評価系において有意に減少させた.

3) CT-HSA の構造安定性を種々の分光的手法及び DSC により評価した結果, N-AcTrp 添加時と比較して, N-AcMet 添加時の HSA の顕著な構造及び熱安定性が観察された.

4) CT-HSA の体内動態特性を *in vivo* イメージングにより評価した結果, N-AcMet 添加時では未添加時及び N-AcTrp 添加時と比較して, 消失の遅延が観察され, N-AcMet 添加時の HSA の顕著な体内動態安定性が観察された.

以上の結果から N-AcMet は, アルブミン製剤においてより有効な抗酸化及び安定化効果を示す添加剤である可能性が強く示唆された.

## 第6章 総括

アルブミン製剤は安定化剤として Oct と N-AcTrp が添加されているが、Oct は熱に対して安定化剤として働き、N-AcTrp は HSA の酸化を防ぐ抗酸化剤として機能している。しかしながら Trp の副作用として、その過剰摂取によるセロトニン症候群のリスク上昇や、光酸化による代謝物の神経毒性の影響が懸念される。そこで本研究では、抗酸化作用を有すると考えられている N-AcMet に着目し、アルブミン製剤の安定化剤としての有用性を N-AcTrp と比較検討した。

まず第 2 章では、N-AcMet のアルブミン製剤における熱安定化及び抗酸化効果について検討した。次いで第 3 章では、N-AcMet の光安定性に及ぼす影響を N-AcTrp と比較検討した。また第 4 章では、N-AcMet の安定化機序を解明するため、HSA 分子上における N-AcMet と Oct の結合様式について構造化学的考察を加えた。さらに、第 5 章では、生体内の酸化ストレスを考慮したアルブミン製剤に対する抗酸化剤としての N-AcMet の役割を *in vitro* ならびに *in vivo* 実験で調べ、N-AcTrp と比較した。以下に本研究で得られた知見を総括する。

### 1) アルブミン製剤の添加剤としての N-AcMet の機能性評価 (第2章)

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及びメルカプト分率を測定することにより評価した結果、Oct は AAPH の HSA に対する酸化を抑制しなかったものの、Oct と N-AcMet の併用は、酸化を明らかに抑制した。N-AcMet 及び N-AcTrp の DPPH ラジカルに対する消去能を測定したところ、N-AcMet は既存の添加剤である N-AcTrp と比較して顕著なラジカル消去能を有していた。N-AcMet 及び Oct 添加時の HSA の熱安定性について DSC を用いて測定したところ、N-AcMet 単独添加時においてその効果は小さいものの HSA に対する熱安定化効果を有する可能性が示唆された。加えて、Oct と N-AcMet の併用は、顕著に HSA の立体構造を安定化させた。以上の結果から N-AcMet は、N-AcTrp と比較し、HSA に対して同等あるいはそれ以

上の抗酸化能を有する添加剤である可能性が強く示唆された。

## 2) アルブミン製剤の光安定性に対する N-AcMet と N-AcTrp の有用性評価 (第3章)

HSA の構造安定性を CD スペクトルにより検討した結果、光照射処理後 N-AcTrp 添加群では顕著な  $\alpha$ -ヘリックス含量の減少が観察された。一方、N-AcMet 添加群及び Oct 単独添加時では、光照射処理前の構造をほぼ保持していた。HSA に対する熱安定性を DSC により評価した結果、N-AcTrp 添加時と比較して、N-AcMet 添加時の HSA の顕著な熱安定化効果が観察された。添加剤のラジカル消去能を ESR スピントラップ法により検討した結果、光照射処理前後において N-AcMet 添加群では N-AcTrp 添加時のそれと比較して顕著なラジカル消去能が観察された。光照射処理後、HSA のカルボニル含量は、N-AcTrp 添加群において増大していた。一方、N-AcMet 添加群においては有意に減少していた。今回行った光安定性実験により、N-AcTrp の光酸化分解物が HSA に対して酸化促進的に働き、Oct と N-AcTrp は安定化と抗酸化効果を協奏的に低下させている可能性が示唆された。以上の結果より、N-AcMet は N-AcTrp と比べ、HSA に対して優れた光安定性を有する添加剤であることが示唆された。

## 3) HSA 分子上における N-AcMet と Oct の結合様式 (第4章)

HSA の安定性を向上させる N-AcMet と Oct の結合様式を解明するため、限外濾過法により HSA に対する N-AcMet の結合を定量的に評価するとともに、蛍光プローブ実験により HSA 分子上の結合位置を識別した。さらに HSA-N-AcMet-Oct の三元複合体を調製して X 線結晶構造解析を行った。その結果、限外濾過法を用いて、Oct と N-AcTrp の HSA への結合性を定量的に評価したところ、Oct の結合定数は  $1.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、N-AcMet は、 $5.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  であり、Oct は N-AcMet よりも結合定数が約 20 倍大きいことが明らかとなった。蛍光プローブを用いた置換実験の結果から、N-AcMet はサイト I、Oct はサイト II が主要結合部位であることが判明した。X 線結晶構造解析の結

果から、HSA-N-AcMet-Oct 複合体の全体構造はハート型構造を構築し、N-AcMet の結合部位はサブドメイン IIA であることが確認できた。また、Oct の結合部位はサブドメイン IIIA とサブドメイン IIA と IIB の間の2ヶ所であるものの、主要結合部位はサブドメイン IIIA であることが示唆された。サブドメイン IIA に結合した N-AcMet のカルボキシル基は、Lys195 や Arg222 の側鎖と水素結合を形成し、N-AcMet のアセチル基の酸素原子は Lys199 の側鎖と水素結合を形成し、炭素原子は Trp214, Ala215, Arg218, Leu219 とファンデルワールス相互作用を形成していた。一方、サブドメイン IIIA に結合した Oct のカルボキシル基は、Arg410 や Tyr411, Ser489 の側鎖と水素結合を形成していた。また、アルキル基部分は、主要薬物結合サイトII 内のアミノ酸残基とファンデルワールス相互作用を形成していた。また、サブドメイン IIA と IIB の間に結合した低親和力 Oct は、サブドメイン間に形成された小さなトンネル状の間隙を埋めるように結合し、トンネル周辺のアミノ酸残基とファンデルワールス相互作用を形成していた。これらの結果から、N-AcMet が N-AcTrp より効果的に抗酸化能を発揮している要因の1つとして、N-AcMet と N-AcTrp の結合部位の差異によるものと推察された。

#### 4) アルブミン製剤の酸化修飾に対する N-AcMet と N-AcTrp の有用性評価 (第5章)

HOCl から生じ、腎不全の進行に関与するクロラミン T を用いて HSA に対して酸化処理を行い、酸化修飾 HSA (CT-HSA) を作製し、N-AcMet 及び N-AcTrp 添加時、非添加時における HSA の構造及び機能変化について比較検討した。CT-HSA の酸化の程度は、実際の腎不全患者血中の AOPP 含量の範囲内であり、生体内の酸化の程度を十分反映するモデルになり得ることが示唆された。この時、N-AcMet と N-AcTrp の抗酸化効果を比較したところ、N-AcMet 添加時が最も AOPP 含量及びカルボニル含量の増大を抑制していた。さらに、N-AcMet 添加時の CT-HSA は、N-AcTrp 添加時よりも高い ONOO<sup>-</sup> 消去能及び・OH 消去能を有していた。さらに DSC, CD スペクトル及び蛍光スペクトルを用いて両添加剤の安定化効果を評価したところ、N-AcMet を添加することにより HSA の酸化修飾を軽減し、構造安定化に寄与していることが明らかとなり、その効果は N-AcTrp よりも優

れていた。ICG 標識した CT-HSA をマウスに静脈内投与後、血漿中濃度推移及び臓器移行性を検討したところ、N-AcMet は未添加時及び N-AcTrp と比較して、消失の遅延が観察された。また、添加剤なしの CT-HSA は主要代謝臓器である肝臓へ明らかに蓄積し、control と比較し顕著な蛍光強度の増大が観察された。一方 N-AcMet 添加時では、N-AcTrp 添加時よりも蛍光強度の増加が少なく、消失半減期の結果を反映していた。以上の結果から、N-AcMet は N-AcTrp と比較して、アルブミン製剤において *in vitro* 及び *in vivo* でより有効な抗酸化及び安定化効果を示す添加剤である可能性が強く示唆された。

以上述べてきたように、N-AcMet は N-AcTrp と比較し、アルブミン製剤においてより有効な抗酸化及び安定化効果を示す添加剤であることが示唆された。特に、光照射による N-AcTrp の分解物が HSA に対して酸化促進的に働き、HSA の構造と抗酸化能に悪影響を与えていることが明らかとなり、長年アルブミン製剤の添加剤として使用されてきた処方について再検討の必要性が示唆された。今回得られた知見は、今後リコンビナント HSA 製剤をはじめ、HSA を利用したドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発する上での有用な基盤データになるものと考えられる。

## 実験の部

### 実験試料

HSA (遺伝子組換え) はニプロ株式会社から恵与されたものを Chen の方法<sup>93)</sup>に従って脂肪酸の除去 (脱脂) を行い, 透析, 凍結乾燥を行った後に実験に使用した. 平均分子量は 66,500 とした. N-AcTrp, クロラミン T はナカライテスクより購入した. N-AcMet, Oct は BP Biomedicals (Solon, OH, USA) より購入した. [Methyl-<sup>3</sup>H]-N-AcMet は Moravek Biochemicals (Brea, CA, USA) より購入した. カルボニル含量測定試薬 (Oxyblot Kit) は, ケミコム社より購入した. ICG Labeling Kit-NH<sub>2</sub> は同仁化学研究所より購入した. その他, 試薬, 溶媒類はすべて市販特級品を使用し, 溶媒としての水はイオン交換水またはミリ Q 水を使用した.

### 統計解析

実験データは平均値±標準偏差で示した. 有意差検定は 2 群間においては Student の t-検定を用いて行った. 危険値が 0.05 以下であるとき, 統計学的に有意差があると評価した. 3 群間以上のデータについては Scheffe 法による多重比較検定を行い, 危険値が 0.05 以下であるとき, 統計学的に有意であると評価した.

## 第2章に関する実験

### 1. カルボニル含量の算出

50  $\mu$ M HSA (添加剤濃度は 250  $\mu$ M) を 10 mM AAPH と 67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で, 37°C, 1 時間もしくは 24 時間インキュベート後, Climent らの方法によって HSA のカルボニル含量を測定した<sup>94)</sup>.

## 2. メルカプト分率 (HPLC 条件)

HPLC は、グラジエント装置を装備した島津 LC-4A に島津 SPD-2ASUV 検出器及び島津 C-R2AX クロマトグラフィー用データ処理装置を接続したものをを用いた。試料の溶離は、(A) 0.05M トリス-酢酸液 (pH7,0) から、(B) 0.5M 酢酸ナトリウムを含む 0.05M トリス-酢酸緩衝液 (pH7,0) への 30 分間の直線グラジエント法を用いて流速 0.5mL/min で行った<sup>26)</sup>。試料の検出は UV 波長 280 nm の吸収を利用し操作はすべて室温で行った。

## 3. DPPH ラジカル測定

DPPH ラジカル消去能は Sassa らの報告に準じて行った<sup>95)</sup>。DPPH 溶液は、0.25 mM DPPH 溶液 (in EtOH) と 50 mM 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid buffer (pH 5.5) 溶液を混合して調製した。DPPH 溶液に、HSA 及び添加剤の濃度をそれぞれ 50  $\mu$ M, 250  $\mu$ M となるように添加し、25°C, 20 分間インキュベート後、マイクロプレートリーダーで 540 nm における吸光度を測定した。

## 4. DSC

DSC は、MicroCal 社製 MC-2 示差走査熱量計を使用して測定した。  
測定条件は次の通りである。

走査速度 : 1 K/min  
アルブミン濃度 : 100  $\mu$ M  
添加剤濃度 : 500  $\mu$ M  
溶媒 : 67 mM リン酸緩衝液 (pH7.4)

熱変性の可逆性は、初回の測定後のアルブミン溶液を冷却後、再び加熱して確かめた。その結果、85°C 以下までの加熱であれば、アルブミンは不可逆的な変性を惹起することなく、可逆的な熱転移を起こすことが明らかになった。得られたサーモグラムは非線形フィッティングアルゴリズム "Using

Origin™ scientific plotting software"を用い、フィッティングを行い、その結果得られた過剰熱容量曲線を用いて解析した。

## 第3章に関する実験

### 1. 試験溶液の調製

HSA 濃度を 100  $\mu\text{M}$ 、各添加剤の濃度を 500  $\mu\text{M}$  となるよう 67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 4 mL に調製し、透明容器に充填した。日本医化器械製作所社製光安定性試験器 (PTH-400NC-D) の回転試料台に設置し、照度 7,000 lx、温度 40°C に設定し、4 週間放置した。光源は、光安定性試験ガイドライン規定の D65 昼光色光源を用いた。

### 2. CD スペクトル

JascoJ-720 型分光偏光計を用いた。遠紫外領域の CD スペクトルは、HSA 濃度を 10  $\mu\text{M}$  (67 mM リン酸緩衝液 pH 7.4) に調製し、1 mm セルを用いて行った。測定条件は以下の通りである。

測定波長 : 250~200 nm  
Sensitivity : 500 mdeg  
Scan speed : 5 nm/min  
Time constant : 8 sec  
Step resolution : 0.5 nm  
Accumulation : 1

平均残基分子楕円率 (Mean residue ellipticity :  $[\theta]$ ) は次式 (1) により算出した。

$$[\theta] = \frac{\theta}{10cl} \quad (1)$$



ここで、 $\theta$  はモル楕円率、 $l$  はセル長 (cm)、 $c$  は平均残基モル濃度であり、次式 (2) で示される。

$$c = nC_p \quad (2)$$

ここで、 $n$  は構成残基数、 $C_p$  はモル濃度である。

### **3. DSC**

DSC は、TA Instruments 社製 Nano-DSC を使用して測定した。

測定条件は次の通りである。

走査速度 : 1 K/min

アルブミン濃度 : 20  $\mu$ M

溶媒 : 67 mM リン酸緩衝液 (pH7.4)

熱変性の可逆性は、初回の測定後のアルブミン溶液を冷却後、再び加熱して確かめた。その結果、85 °C 以下までの加熱であれば、アルブミンは不可逆的な変性を惹起することなく、可逆的な熱転移を起こすことが明らかになった。得られたサーモグラムは非線形フィッティングアルゴリズム "NanoAnalyze" を用い、フィッティングを行い、その結果得られた過剰熱容量曲線を用いて解析した。

### **4. ヒドロキシルラジカルの測定 (ESR スピントラップ法)**

日本電子 (株) 製 X-Band 電子スピン共鳴装置 JES-FA100 ESR spectrometer を用いて、ESR スピントラップ法により以下の装置条件で測定した。

Microwave frequency : 9416.9 MHz

Microwave power : 8.0 mT

Field modulation : 0.1 mT at 100 kHz

Sweep time : 2 min  
Amplitude : 800  
Time constant : 0.03 sec

ヒドロキシラジカルの測定は DMPO を用いたスピントラップ法で検討した. すなわち, 4 mM 過酸化水素水 40  $\mu$ L と 0.5 mM 硫酸第一鉄溶液 40  $\mu$ L, DMPO 20  $\mu$ L, サンプル溶液 100  $\mu$ L を加え攪拌後, 混合溶液を石英フラットセルに充填し, ESR 装置を用いて測定した.

## 5. DNP 抗体を用いたカルボニル含量の算出

光照射後 HSA のカルボニル形成の比較は, 第 2 章と同様に Climent らの方法及び Himmelfarb らの方法によって測定した<sup>96)</sup>. 67 mM リン酸緩衝液溶液を用いて HSA 濃度を約 5 mg/mL に調製後, サンプル中のカルボニル型を OxyBlot Kit を用いて DNPH により誘導し, 15  $\mu$ L を SDS-PAGE によって 12 mA 150 分で泳動後, PVDF 膜に 60V 60 分で転写し, 抗 DNP 抗体を用いた western blot 法により, サンプル中のカルボニル型を発色させた. また, 発色後 PBS で膜を洗い CBB によって sample 中のタンパク質を染色した. 解析は ATTO Densito によって行った.

## 第4章に関する実験

### 1. 限外濾過法

限外濾過は Ultrafree-CL 遠心式フィルターユニット (30,000NMWL, Millipore 社) を使用して行った. HSA の濃度は 20  $\mu$ M とし, [<sup>3</sup>H] N-AcMet は無視できるほど非常に低い濃度であり, cold N-AcMet により 1~100  $\mu$ M に補正した. 試料溶液 400  $\mu$ L をキットに充填し, 4000rpm, 25°C で 20 分間遠心分離した後, 300  $\mu$ L の濾液を 4 mL シンチレーションカクテルに加え, 液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloka) でリガンド濃度を測定した. 濾液中のリガンド濃度を遊離リガンド濃

度 ( $C_u$ ), タンパク質 1 分子に結合している薬物の分子数を( $r$ ), タンパク質 1 分子当りに結合する薬物の結合サイト数を ( $n$ ), 結合定数を ( $K_a$ ) とし (3) 式の Scatchard プロットにより解析した.

$$\frac{r}{C_u} = nK_a - K_a r \quad (3)$$

## 2. 蛍光プローブ法

HSA の濃度を 2  $\mu$ M となるよう 67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 2 mL に調製し, 最終濃度が 2 ~20 $\mu$ M になるよう蛍光プローブ (WF, DNSS) を 25 $^{\circ}$ C で滴下, 混合し, 蛍光スペクトルを測定した. 蛍光スペクトルは HITACHI 製 F-2500 形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 5~20 nm に設定して測定した. 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 : WF (320 nm), DNSS (350 nm)

蛍光波長 : WF (350~450 nm), DNSS (400~600 nm)

蛍光プローブの併用リガンドによる置換を蛍光強度の減少で測定する場合, 置換リガンド非存在下の蛍光強度に対する置換リガンド存在下の蛍光強度の相対値としてモニターした. また, 置換率 ( $p$ ) は次式 (4) にしたがって算出した.

$$p (\%) = \frac{F_1 - F_2}{F_1} \times 100 \quad (4)$$

ここで  $F_1$  及び  $F_2$  は置換リガンド非存在下及び存在下における蛍光強度を示す.

## 3. 結晶化用 HSA 溶液の調製, HSA-N-AcMet-Oct 複合体の共結晶化

HSA-N-AcMet-Oct 複合体の共結晶化は過去の報告<sup>58)</sup>を参考に実施した.

結晶化に使用する HSA 溶液は, -80 $^{\circ}$ C に保存した脱脂済みの HSA 凍結乾燥品を秤量し, ゲルろ過精製用溶液 (50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.0, 150 mM KCl) で約 20 mg/mL となるように溶解した. その後, 2 量体の HSA を除去するため, Hiload 16/60 Superdex 75pg カラムを用いて精製した.

精製した HSA は, Vivaspin 15 (分画分子量:10,000) と 50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.0 を用いて, 濃縮と希釈を繰り返すことで脱塩処理を行い, 最終的に HSA の濃度が約 200 mg/mL になるまで濃縮した. 濃縮した HSA 溶液は結晶化に使用するまで-80°C で保存した.

HSA-N-AcMet-Oct 複合体の共結晶化は, ハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行った. 結晶化の手順は, Table 10 に記した初期結晶化条件で HSA-N-AcMet-Oct 複合体を結晶化し, 約 1 ヶ月静置することで粗結晶を得た. そして, この得られた粗結晶を用いて, ストリークシーディング法により結晶化条件を最適化した. 最終的に構造解析可能な HSA-N-AcMet-Oct 複合体の共結晶は, Table 6 に記した最適化後の結晶化条件で, 作製後 3 日間静置したドロプレット溶液に, 結晶の核を移植し, 約 2 週間静置することで得られた.

**Table 10. Crystallization conditions of the HSA-N-AcMet-Oct complex**

Condition (initial)		
Droplet :	Total	2.0 $\mu$ L
	HSA-N-AcMet-Oct mixture <sup>#1</sup>	1.0 $\mu$ L
	Reservoir solution	1.0 $\mu$ L
Reservoir :	Total	0.5 mL
	24%(w/v) PEG3350	
	50 mM K phosphate buffer pH7.0	
Temperature :		4°C
<sup>#1</sup> contained 2.0 mM HSA, 10.0 mM N-AcMet, 10.0 mM Oct, and 50 mM K phosphate buffer pH7.0.		
Condition (after optimization)		
Droplet :	Total	3.0 $\mu$ L
	HSA-N-AcMet-Oct mixture <sup>#2</sup>	1.5 $\mu$ L
	reservoir solution	1.5 $\mu$ L
Reservoir :	Total	0.4 mL
	28%(w/v) PEG3350	
	10%(v/v) MPD	
	50 mM K phosphate buffer pH7.0	
Temperature :		15°C

<sup>#2</sup> contained 1.4 mM HSA, 14.0 mM N-AcMet, 11.2 mM Oct, and 50 mM K phosphate buffer pH7.0.

#### 4. X線回折データの収集, 構造解析, 構造精密化

得られた HSA-N-AcMet-Oct 複合体の共結晶は, クライオループですくい, そのまま液体窒素に浸すことでガラス状に凍結した. この凍結した結晶は液体窒素中に保存した状態で, PF (BL-1A, BL-17A, NW12A) や SPring-8 (BL44XU) へ輸送し, Table 11 に記した測定波長, 温度, 検出器を用いて X 線回折実験を実施した. 得られた X 線回折データの処理はプログラムパッケージ *HKL2000*<sup>97)</sup>を用いた.

構造決定は分子置換法で行った. サーチモデルに HSA の結晶構造 (PDB code 2vuf<sup>57)</sup>) を用いて, 回転及び並進探索の計算にはプログラムパッケージ CCP4<sup>98)</sup> 内のプログラム *Molrep*<sup>99)</sup> を使用した. 構造精密化は, プログラムパッケージ *PHENIX*<sup>100)</sup> 内のプログラム *phenix.refine*<sup>101)</sup> を用いて行い, TLS (Translation Libration Screw-rotation) グループの設定はプログラムパッケージ *PHENIX* 内のプログラム *phenix.find\_tls\_groups* を使用した. 分子モデルの構築及び修正はプログラム *COOT*<sup>102)</sup> を使用した. また, 最終構造の妥当性はプログラム *MolProbity*<sup>103)</sup> を用いて確認し, 分子構造図の作成はプログラム *PyMOL*<sup>104)</sup> を使用した.

**Table 11. Conditions of the X-ray crystallographic analysis**

Beamline	PF BL-1A	PF BL-17A	PF-AR NW12A	SPring-8 BL44XU
X-ray wavelength (Å)	1.1000	0.9800	1.0000	0.9000
Temperature (K)	100	100	100	100
Detector	Pilatus 2M-F (DECTRIS)	Pilatus3 S6M (DECTRIS)	Quantum 270 (ADSC)	MX-300HE (Rayonix)

## 第5章に関する実験

### 1. クロラミン T による酸化修飾モデル HSA の調製

脱脂した 300  $\mu$ M HSA を N-AcTrp 及び N-AcMet 添加群と非添加群の 3 群に対して, 5 mM のクロラミン T と 67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で好氣的条件下, 37°C, 1 時間インキュベートし, 3 種の酸化 HSA (CT-HSA) を調製した<sup>105)</sup>. インキュベート後, イオン交換水で透析することで酸化反応を止めた後, 凍結乾燥を行いサンプルとした. サンプルは使用するまで, -80°C で保存した.

### 2. カルボニル含量の算出

第 2 章と同様に Climent らの方法によってカルボニル含量を測定した.

### 3. タンパク質過酸化物 (AOPP) の定量

AOPP の測定は Witko-Sarsat らの方法<sup>66)</sup>により測定した. 20  $\mu$ M の normal-HSA 及び CT-HSA 400  $\mu$ L に 1.16 M ヨウ化カリウム 10  $\mu$ L, 酢酸 20  $\mu$ L を 25°C で混和し, 340 nm における吸光度を測定した. 0~100  $\mu$ M のクロラミン T 溶液 400  $\mu$ L に 1.16 M ヨウ化カリウム 10  $\mu$ L, 酢酸 20  $\mu$ L を混和し測定したものを検量線とし, AOPP 濃度を算出した.

### 4. ペルオキシナイトライト (ONOO<sup>-</sup>) 消去能

100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.4), 0.3 mg/mL ゼラチン, 25  $\mu$ M ジヒドロローダミン, 25  $\mu$ M HSA を反応液として作製し, 0.3 N NaOH を用いて調製した 0.56 mM ONOO<sup>-</sup> 溶液と 3:1 で混合した. 37°C で 5 分間静置後, 励起波長 485 nm, 蛍光波長 535 nm で蛍光強度を測定した.

### 5. SDS-PAGE

SDS-PAGE は, 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて行った. タンパク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, 下記のタンパク質を用いた.

ウシ血清アルブミン (分子量:66,000), 乳酸デヒドロゲナーゼ (分子量:140,000), カタラーゼ (分子量:232,000), フェリチン (分子量:440,000), サイログロブリン (分子量:669,000).

## **6. 蛍光スペクトルによる HSA の構造変化の測定**

Trp 残基近傍の構造変化は, 蛍光スペクトルをモニターすることにより検討した. 蛍光スペクトルは HITACHI 製 F-2500 形分光蛍光光度計を用いて, 励起波長を 295 nm に設定し, 300~400 nm における蛍光を測定した. HSA 濃度を 2  $\mu$ M (67 mM リン酸緩衝液) に調製して行った.

## **7. 酸化修飾モデル HSA の体内動態特性**

### **7-1. ICG ラベル化法**

ICG Labeling Kit-NH<sub>2</sub> を用いて, HSA を標識した<sup>106)</sup>. また, HSA に対する ICG の標識率を確認し, 各投与液を調製した.

### **7-2. 使用動物**

SD 系雄性マウス (7 週齢) を九動より購入し, 1 週間の予備飼育後, 8 週齢 (20~23g) で実験に使用した.

### **7-3. 投与及び採血方法, 放射活性の測定・分析**

マウスに非絶食下で ICG 標識 HSA を 2.5  $\mu$ g/g の用量で尾静脈内投与した. ヘパリン処理した注射筒を用いて, 規定時間ごとに下大静脈から約 1 mL 採血を行い, 6000 rpm で 5 分間遠心分離し, 血漿 100  $\mu$ L を採取し, その濃度は蛍光強度 (Ex.774 nm, Em.805 nm) より定量した. ICG 標識 HSA 投与 3 分, 30 分, 1 時間, 2 時間, 4 時間後に尾静脈からの採血を行った. また, 投与後 2 時間後の臓器 (肝臓, 肺, 腎臓, 心臓, 脾臓) を摘出し, 各臓器の蛍光強度を, 蛍光イメージング装置 (IVIS XR, Caliper life science) を用いて (Ex.774 nm, Em.805 nm) に条件設定し, 撮影した.

## 謝辞

本研究を行うに際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました崇城大学薬学部 薬物動態学研究室 小田切 優樹 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました崇城大学薬学部 薬学科 安楽 誠 准教授、同 山崎 啓之 教授、同 平山 文俊 教授ならびに同 庵原 大輔 助教に心から感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言と御校閲を賜りました崇城大学薬学部 薬学科 原武 衛 教授、同 大栗 誉敏 准教授に心から感謝いたします。

本研究を行うにあたり、多大なる御助力を賜りました熊本大学薬学部 薬剤学分野 丸山 徹 教授、同 渡邊 博志 准教授、同 末永 綾香 特任講師、同 異島 優 助教ならびに崇城大学薬学部 薬学科 田口 和明 助教に心より感謝いたします。

本研究の X 線結晶構造解析に際し、ご協力いただきました崇城大学薬学部 薬学科 河合 聡人 助教に感謝いたします。また、本論文の結果は、大阪大学蛋白質研究所の共同利用実験課題(課題番号:2015A6999)として実施した SPring-8 BL44XU での実験で得られました。御協力いただいた実験施設の皆様に深く感謝いたします。

本研究の *in vivo* 評価実験に際し、ご協力いただきました崇城大学薬学部 薬学科 中村 秀明 助教に感謝いたします。



本研究のアミノ酸の質量分析に際し、ご協力いただきました崇城大学薬学部 薬学科 宮下 裕幸  
講師に感謝いたします。

本研究に際し、遺伝子組換えアルブミンを提供していただきましたニプロ株式会社に心より御礼申  
し上げます。

本研究に際し、多大なる御協力いただきました崇城大学薬学部 薬物動態学研究室の諸氏に心  
から感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、御協力と御理解をいただきました株式会社ファーマダイワ 岡山 善郎  
代表取締役社長ならびに社員の皆様に深い感謝の意を表します。

最後に、私を支えてくれた愛媛の家族と熊本の家族に心より感謝いたします。

平成 28 年 3 月  
河野 陽介

## 参考文献

1. Peter T. Jr., " *The Plasma Proteins*", Academic Press, New York. 1975 133-81.
2. Otagiri M, Chuang VTG, Maruyama T, Kragh-Hansen U, (Eds.), "*Human Serum Albumin*", Sojo University Publishing Center, Kumamoto Japan. 2013.
3. 血液製剤調査機構だより No.100, 財団法人 血液製剤調査機構. 2007
4. Boyer PD, Lum FG, The combination of fatty acids and related compounds with serum albumin; stabilization against heat denaturation. *J Biol Chem*. 1946;162:181-98.
5. Anraku M, Tsurusaki Y, Watanabe H, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M, Stabilizing mechanisms in commercial albumin preparations: octanoate and *N*-acetyl-L-tryptophanate protect human serum albumin against heat and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1702(1):9-17.
6. Ehrenshaft M, Silva SO, Perdivara I, Bilski P, Sik RH, Chignell CF, Tomer KB, Mason RP, Immunological detection of *N*-formylkynurenine in oxidized proteins. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(9):1260-6.
7. Topczewska-Bruns J, Pawlak D, Tankiewicz A, Chabielska E, Buczko W, Kynurenine metabolism in central nervous system in experimental chronic renal failure. *Adv Exp Med Biol*. 2003;527:177-82.
8. Pérez-De La Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A, Quinolinic Acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *Int J Tryptophan Res*. 2012;5:1-8.
9. Aguilera A, Selgas R, Diéz JJ, Bajo MA, Codoceo R, Alvarez V, Anorexia in end-stage renal disease: pathophysiology and treatment. *Expert Opin Pharmacother*. 2001;2(11):1825-38.
10. パキシル錠<sup>®</sup>インタビューフォーム, サインバルタカプセル<sup>®</sup>インタビューフォーム
11. Fang L, Parti R, Hu P, Characterization of *N*-acetyltryptophan degradation products in concentrated human serum albumin solutions and development of an automated high performance liquid chromatography-mass spectrometry method for their quantitation. *J Chromatogr A*. 2011;1218(41):7316-24.
12. Watanabe H, Tanase S, Nakajou K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M, Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem J*. 2000;349 Pt 3:813-9.
13. Anraku M, Chuang VT, Maruyama T, Otagiri M, Redox properties of serum albumin. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(12):5465-72.
14. Levine RL, Mosoni L, Berlett BS, Stadtman ER, Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(26):15036-40.
15. Soriani M, Pietraforte D, Minetti M, Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Arch Biochem Biophys*. 1994;312(1):180-8.

16. Carballal S, Alvarez B, Turell L, Botti H, Freeman BA, Radi R, Sulfenic acid in human serum albumin. *Amino Acids*. 2007;32(4):543-51.
17. Iwao Y, Ishima Y, Yamada J, Noguchi T, Kragh-Hansen U, Mera K, Honda D, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M, Quantitative evaluation of the role of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin using recombinant mutants. *IUBMB Life*. 2012;64(5):450-4.
18. Harada D, Naito S, Kawauchi Y, Ishikawa K, Koshitani O, Hiraoka I, 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*. 2001;290(2):251-9.
19. Harada D, Naito S, Hiraoka I, Otagiri M, In vivo kinetic analysis of covalent binding between *N*-acetyl-L-cysteine and plasma protein through the formation of mixed disulfide in rats. *Pharm Res*. 2002;19(5):615-20.
20. Harada D, Naito S, Otagiri M, Kinetic analysis of covalent binding between *N*-acetyl-L-cysteine and albumin through the formation of mixed disulfides in human and rat serum in vitro. *Pharm Res*. 2002;19(11):1648-54.
21. Bourdon E, Loreau N, Lagrost L, Blache D, Differential effects of cysteine and methionine residues in the antioxidant activity of human serum albumin. *Free Radic Res*. 2005;39(1):15-20.
22. Drazic A, Winter J, The physiological role of reversible methionine oxidation. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1844(8):1367-82.
23. Stadtman ER, Moskovitz J, Levine RL, Oxidation of methionine residues of proteins: biological consequences. *Antioxid Redox Signal*. 2003;5(5):577-82.
24. Niki E, Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids*. 1987;44(2-4):227-53.
25. Nishimura K, Harada K, Masuda S, Sugii A, High-performance liquid chromatography of serum albumins on an N-methylpyridinium polymer-based column. *J Chromatogr*. 1990;525(1):176-82.
26. Sugii A, Harada K, Nishimura K, Hanaoka R, Masuda S, High-performance liquid chromatography of proteins on N-methylpyridinium polymer columns. *J Chromatogr*. 1989;472(2):357-64.
27. Sogami M, Nagoka S, Era S, Honda M, Noguchi K, Resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin by high-performance liquid chromatography. *Int J Pept Protein Res*. 1984;24(2):96-103.
28. Narazaki R, Hamada M, Harada K, Otagiri M, Covalent binding between bucillamine derivatives and human serum albumin. *Pharm Res*. 1996;13(9):1317-21.
29. Kogure K, Goto S, Abe K, Ohiwa C, Akasu M, Terada H, Potent antiperoxidation activity of the bisbenzylisoquinoline alkaloid cepharanthine: the amine moiety is responsible for its

- pH-dependent radical scavenge activity. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1426(1):133-42.
30. Pantke U, Volk T, Schmutzler M, Kox WJ, Sitte N, Grune T, Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9-10):1080-6.
  31. Nalini S, Balasubramanian KA, Albumin bound nonesterified fatty acids inhibit in vitro lipid peroxidation. *Indian J Biochem Biophys*. 1989;26(6):357-60.
  32. Kosa T, Maruyama T, Otagiri M, Species differences of serum albumins: II. Chemical and thermal stability. *Pharm Res*. 1998;15(3):449-54.
  33. "蛋白質の時代, 構造・物性・機能研究の新局面", *蛋白質核酸酵素臨時増刊*. 1994.
  34. 高橋克忠, "生体高分子の熱転移", *蛋白質核酸酵素*. 1994;33, 337.
  35. Privalov PL, Potekhin SA, Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol*. 1986;131:4-51.
  36. 田中晶善, "熱測定でみる蛋白質の高次構造, 化学と生物". 1993;31, 439-446.
  37. 城所俊一, "熱容量関数解析法の進歩", *蛋白質核酸酵素*. 1988;33, 4.
  38. Igarashi N, Onoue S, Tsuda Y, Photoreactivity of amino acids: tryptophan-induced photochemical events via reactive oxygen species generation. *Anal Sci*. 2007;23(8):943-8.
  39. Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L, Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci*. 2007;257(1-2):221-39.
  40. Pattison DI, Rahmanto AS, Davies MJ, Photo-oxidation of proteins. *Photochem Photobiol Sci*. 2012;11(1):38-53.
  41. Ma YS, Chao CC, Stadtman ER, Oxidative modification of glutamine synthetase by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride. *Arch Biochem Biophys*. 1999;363(1):129-34.
  42. Sjöholm I, Ekman B, Kober A, Ljungstedt-Påhlman I, Seiving B, Sjödin T, Binding of drugs to human serum albumin: XI. The specificity of three binding sites as studied with albumin immobilized in microparticles. *Mol Pharmacol*. 1979;16(3):767-77.
  43. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN, The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*. 1975;11(6):824-32.
  44. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN, Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*. 1976;12(6):1052-61.
  45. He XM, Carter DC, Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. 1992;358(6383):209-15.
  46. Curry S, Brick P, Franks NP, Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1441(2-3):131-40.
  47. Lee IY, McMenamy RH, Location of the medium chain fatty acid site on human serum albumin. Residues involved and relationship to the indole site. *J Biol Chem*. 1980;255(13):6121-7.
  48. Doody MC, Gotto AM Jr, Smith LC, 5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonic acid, a fluorescent probe of the medium chain fatty acid binding site of serum albumin. *Biochemistry*.

- 1982;21(1):28-33.
49. Kragh-Hansen U, Octanoate binding to the indole- and benzodiazepine-binding region of human serum albumin. *Biochem J.* 1991;273 ( Pt 3):641-4.
  50. Koh SW, Means GE, Characterization of a small apolar anion binding site of human serum albumin. *Arch Biochem Biophys.* 1979;192(1):73-9.
  51. Ahmad N, Qasim MA, Fatty acid binding to bovine serum albumin prevents formation of intermediate during denaturation. *Eur J Biochem.* 1995;227(1-2):563-5.
  52. Wanwimolruk S, Birkett DJ, Brooks PM, Structural requirements for drug binding to site II on human serum albumin. *Mol Pharmacol.* 1983;24(3):458-63.
  53. Curry S, Mandelkow H, Brick P, Franks N, Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol.* 1998;5(9):827-35.
  54. Bhattacharya AA, Grüne T, Curry S, Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol.* 2000;303(5):721-32.
  55. Sugio S, Kashima A, Mochizuki S, Noda M, Kobayashi K, Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Eng.* 1999;12(6):439-46.
  56. Holm L, Rosenström P, Dali server: conservation mapping in 3D. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:W545-9.
  57. Zunszain PA, Ghuman J, McDonagh AF, Curry S, Crystallographic analysis of human serum albumin complexed with 4Z,15E-bilirubin-IXalpha, *J Mol Biol.* 2008;381(2):394-406.
  58. Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S, Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol.* 2005;353(1):38-52.
  59. Ryan AJ, Ghuman J, Zunszain PA, Chung CW, Curry S, Structural basis of binding of fluorescent, site-specific dansylated amino acids to human serum albumin. *J Struct Biol.* 2011;174(1):84-91.
  60. Kragh-Hansen U, Watanabe H, Nakajou K, Iwao Y, Otagiri M, Chain length-dependent binding of fatty acid anions to human serum albumin studied by site-directed mutagenesis. *J Mol Biol.* 2006;363(3):702-12.
  61. Flora K, Brennan JD, Baker GA, Doody MA, Bright FV, Unfolding of acrylodan-labeled human serum albumin probed by steady-state and time-resolved fluorescence methods. *Biophys J.* 1998;75(2):1084-96.
  62. Galantini L, Leggio C, Pavel NV, Human serum albumin unfolding: a small-angle X-ray scattering and light scattering study. *J Phys Chem B.* 2008;112(48):15460-9.
  63. Ghodake SR, Suryakar AN, Ankush RD, Katkam RV, Shaikh K, Katta AV, Role of free radicals and antioxidant status in childhood nephrotic syndrome. *Indian J Nephrol.* 2011;21(1):37-40.
  64. Begenik H, Soyoral YU, Erkoç R, Emre H, Taskın A, Tasdemir M, Aslan M, Serum

- malondialdehyde levels, myeloperoxidase and catalase activities in patients with nephrotic syndrome. *Redox Rep.* 2013;18(3):107-12.
65. Fan A, Jiang X, Mo Y, Tan H, Jiang M, Li J, Plasma levels of oxidative stress in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome and their predictive value for relapse frequency. *Pediatr Nephrol.* 2016;31(1):83-8.
  66. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B, Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304-13.
  67. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B, Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.* 1998;161(5):2524-32.
  68. Witko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, Touam M, Drüeke T, Santangelo F, Descamps-Latscha B, AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for *N*-acetylcysteine treatment in dialysis patients. *Kidney Int.* 2003;64(1):82-91.
  69. Feldman I, Young D, McGuire R, Static and dynamic quenching of protein fluorescence. I. Bovine serum albumin. *Biopolymers.* 1975;14(2):335-51.
  70. Yamasaki K, Maruyama T, Yoshimoto K, Tsutsumi Y, Narazaki R, Fukuhara A, Kragh-Hansen U, Otagiri M, Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect of the neutral-to-base transition. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1432(2):313-23.
  71. Watanabe H, Kragh-Hansen U, Tanase S, Nakajou K, Mitarai M, Iwao Y, Maruyama T, Otagiri M, Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants. *Biochem J.* 2001;357(Pt 1):269-74.
  72. Winterbourn CC, Kettle AJ, Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(5):403-9.
  73. 青柳一正, 成田光陽, 活性酸素は腎不全の進展因子か. *腎と透析*, 1988;441-444
  74. Shechter Y, Burstein Y, Patchornik A, Selective oxidation of methionine residues in proteins. *Biochemistry.* 1975;14(20):4497-503.
  75. Malle E, Hazell L, Stocker R, Sattler W, Esterbauer H, Waeg G, Immunologic detection and measurement of hypochlorite-modified LDL with specific monoclonal antibodies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(7):982-9.
  76. Malle E, Woenckhaus C, Waeg G, Esterbauer H, Gröne EF, Gröne HJ, Immunological evidence for hypochlorite-modified proteins in human kidney. *Am J Pathol.* 1997;150(2):603-15.
  77. Iwao Y, Anraku M, Hiraike M, Kawai K, Nakajou K, Kai T, Suenaga A, Otagiri M, The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced

- oxidation protein products (AOPP). *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;21(2):140-6.
78. Matsumoto K, Sano H, Nagai R, Suzuki H, Kodama T, Yoshida M, Ueda S, Smedsrød B, Horiuchi S, Endocytic uptake of advanced glycation end products by mouse liver sinusoidal endothelial cells is mediated by a scavenger receptor distinct from the macrophage scavenger receptor class A. *Biochem J.* 2000;352 Pt 1:233-40.
79. Smedsrød B, Melkko J, Araki N, Sano H, Horiuchi S, Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal Kupffer and endothelial cells. *Biochem J.* 1997;322 ( Pt 2):567-73.
80. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M, Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature.* 1990;343(6258):531-5.
81. Nagelkerke JF, Barto KP, van Berkel TJ, In vivo and in vitro uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein by rat liver endothelial, Kupffer, and parenchymal cells. *J Biol Chem.* 1983;258(20):12221-7.
82. Malerød L, Juvet K, Gjøen T, Berg T, The expression of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and caveolin-1 in parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Cell Tissue Res.* 2002;307(2):173-80.
83. Duryee MJ, Freeman TL, Willis MS, Hunter CD, Hamilton BC 3rd, Suzuki H, Tuma DJ, Klassen LW, Thiele GM, Scavenger receptors on sinusoidal liver endothelial cells are involved in the uptake of aldehyde-modified proteins. *Mol Pharmacol.* 2005;68(5):1423-30.
84. Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K, Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1997;272(50):31217-20.
85. Hansen B, Longati P, Elvevold K, Nedredal GI, Schledzewski K, Olsen R, Falkowski M, Kzhyshkowska J, Carlsson F, Johansson S, Smedsrød B, Goerdts S, Johansson S, McCourt P, Stabilin-1 and stabilin-2 are both directed into the early endocytic pathway in hepatic sinusoidal endothelium via interactions with clathrin/AP-2, independent of ligand binding. *Exp Cell Res.* 2005;303(1):160-73.
86. Tamura Y, Adachi H, Osuga J, Ohashi K, Yahagi N, Sekiya M, Okazaki H, Tomita S, Iizuka Y, Shimano H, Nagai R, Kimura S, Tsujimoto M, Ishibashi S, FEEL-1 and FEEL-2 are endocytic receptors for advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2003;278(15):12613-7.
87. Bito R, Hino S, Baba A, Tanaka M, Watabe H, Kawabata H, Degradation of oxidative stress-induced denatured albumin in rat liver endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;289(3):C531-42.
88. Schnitzer JE, Bravo J, High affinity binding, endocytosis, and degradation of conformationally modified albumins. Potential role of gp30 and gp18 as novel scavenger receptors. *J Biol Chem.* 1993;268(10):7562-70.
89. Zhai XY, Nielsen R, Birn H, Drumm K, Mildenerger S, Freudinger R, Moestrup SK,

- Verroust PJ, Christensen EI, Gekle M, Cubilin- and megalin-mediated uptake of albumin in cultured proximal tubule cells of opossum kidney. *Kidney Int.* 2000;58(4):1523-33.
90. Birn H, Fyfe JC, Jacobsen C, Mounier F, Verroust PJ, Orskov H, Willnow TE, Moestrup SK, Christensen EI, Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *J Clin Invest.* 2000;105(10):1353-61.
  91. Christensen EI, Birn H, Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280(4):F562-73.
  92. Stephan JP, Mao W, Filvaroff E, Cai L, Rabkin R, Pan G, Albumin stimulates the accumulation of extracellular matrix in renal tubular epithelial cells. *Am J Nephrol.* 2004;24(1):14-9.
  93. Chen RF, Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J Biol Chem.* 1967;242(2):173-81.
  94. Climent I, Tsai L, Levine RL, Derivatization of gamma-glutamyl semialdehyde residues in oxidized proteins by fluoresceinamine. *Anal Biochem.* 1989;182(2):226-32.
  95. Sassa H, Takaishi Y, Terada H, The triterpene celastrol as a very potent inhibitor of lipid peroxidation in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;172(2):890-7.
  96. Himmelfarb J, McMonagle E, Albumin is the major plasma protein target of oxidant stress in uremia. *Kidney Int.* 2001;60(1):358-63.
  97. Otwinowski Z, Minor W, Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods Enzymol.* 1997;276, 307–326.
  98. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AG, McCoy A, McNicholas SJ, Murshudov GN, Pannu NS, Potterton EA, Powell HR, Read RJ, Vagin A, Wilson KS, Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2011;67(Pt 4):235-42.
  99. Vagin A, Teplyakov A, MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Crystallogr.* 1997;30, 1022–1025.
  100. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung LW, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, McCoy AJ, Moriarty NW, Oeffner R, Read RJ, Richardson DC, Richardson JS, Terwilliger TC, Zwart PH, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66(Pt 2):213-21.
  101. Afonine PV, Grosse-Kunstleve RW, Echols N, Headd JJ, Moriarty NW, Mustyakimov M, Terwilliger TC, Urzhumtsev A, Zwart PH, Adams PD, Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2012;68(Pt 4):352-67.
  102. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K, Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010;66(Pt 4):486-501.
  103. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, Murray LW, Arendall WB



- 3rd, Snoeyink J, Richardson JS, Richardson DC, MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:W375-83.
104. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.7.2.1 Schrödinger, LLC.
105. Garner B, Witting PK, Waldeck AR, Christison JK, Raftery M, Stocker R, Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol. *J Biol Chem.* 1998;273(11):6080-7.
106. Ogawa M, Kosaka N, Choyke PL, Kobayashi H, In vivo molecular imaging of cancer with a quenching near-infrared fluorescent probe using conjugates of monoclonal antibodies and indocyanine green. *Cancer Res.* 2009;69(4):1268-72.