

4-フェニル酪酸ナトリウムの血清アルブミン
結合に関する構造化学的研究

2017

榎田 泰介

**Study of structural-chemistry of
sodium 4-phenylbutyrate on its binding to
serum albumin**

Taisuke Enokida

Study of structural-chemistry of sodium 4-phenylbutyrate on its binding to serum albumin

Taisuke Enokida

Sodium 4-phenylbutyrate (PB) is a phenyl-substituted fatty acid derivative that is clinically used for the treatment of urea cycle disorders by its ammonium scavenging activity. PB has many pharmacological activities as an inhibitor of endoplasmic reticulum (ER) stress and histone deacetylases (HDACs) and as a regulator of the hepatocanicular transporter, therefore extending its clinical use to the treatment of a wider variety of diseases. However, our knowledge of the binding of PB to plasma proteins is not extensive. Furthermore at the stage of development of PB as a drug to treat described diseases, data from preclinical testing using experimental animals will be necessary to verify its efficacy and safety before human use.

In this study, we characterized the binding of PB to human serum and investigated its differences to other species.

1) Characterization of PB binding to human serum albumin (HSA)

Binding experiments showed that PB mainly binds to HSA in plasma. PB was also found to bind to a single site on HSA, which was identified as site II by fluorescent probe displacement experiment. Furthermore, an appropriate alkyl chain length and a carboxylic group in the PB structure were required for PB binding to HSA, suggesting that hydrophobic (and van der Waals) and electrostatic interactions are involved as binding modes. The contributions of hydrogen bonding and/or van der Waals interactions were also indicated by thermodynamic analyses. Tyr411 and Arg410 were identified as being involved in the binding of PB to site II, based on binding experiments using chemically modified- and mutant-HSA preparations. These findings were confirmed to be certain by X-ray crystallography. It became clear that PB binds to the same binding site as ibuprofen, a typical site II binding drugs and interact with competitive binding in site II. In addition, binding of PB is affected by the presence of

endogenous compounds (e. g. fatty acid, bilirubin or uremic toxin) suggested that the effect must be considered in the diseased state.

2) Binding properties of PB to mammals serum albumin

PB mainly binds to albumin in plasma for all species. PB was also found to interact with one high affinity site, which corresponds to site II of human albumin and several number of low affinity binding sites in all albumins. The association constants of PB to human and bovine albumins were relatively high, compared with those to rabbit and rat albumins, and those to rabbit albumin is lowest. Experiments using site probe and structurally related compounds, and molecular modeling study suggested that such a species differences in the affinities is due to the differences in the structure of binding site (e.g. charge, hydrophobicity or size). Furthermore PB and structurally related compounds also interact with Tyr411 and Arg410 in albumin species as human. In conclusion, microenvironmental analysis of site II suggested that bovine is most similar to human serum albumin.

The results obtained in this study provide useful informations for understanding the mechanism of PB and its derivatives binding to human serum albumin and other species.

本論文で使用した略語一覧

AAG	α_1 -酸性糖タンパク質	α_1 -Acid glycoprotein
ER	小胞体	Endoplasmic reticulum
HDACs	ヒストン脱アセチル化酵素	Histone deacetylases
HNB	2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブ ロミド	2-Hydroxy-5-nitrobenzyl bromide
HSA	ヒト血清アルブミン	Human serum albumin
M-PB	フェニル酪酸メチル	Methyl 4-phenylbutyrate
MPD	2-メチル-2, 4-ペンタンジオール	2-methyl-2, 4-pentanediol
MRP-2	多剤耐性タンパク質 2	Multidrug resistance-associated protein 2
N-AcMet	N-アセチル-L-メチオニン	N-acetyl-L-methionine
NPA	アントラニル酸 4-ニトロフェニル	4-nitrophenyl anthranilate
OCT	オクタン酸ナトリウム	Sodium octanoate
PA	フェニル酢酸	Phenylacetic acid
PB	フェニル酪酸ナトリウム	Sodium 4-phenylbutyrate
PC	フェニルカプロン酸	6-Phenylcaproic acid
PG	フェニルアセチルグルタミン	Phenylacetylglutamine
PH	フェニルヘプタン酸	7-Phenylheptanoic acid
PP	フェニルプロピオン酸	3-Phenylpropionic acid
PV	フェニル吉草酸	5-Phenylvaleric acid
SDS-PAGE	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気 泳動	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide-gel electrophoresis

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) Tyrosine411 and Arginine410 of Human Serum Albumin Play an Important Role in the Binding of Sodium 4-Phenylbutyrate to Site II
Journal of Pharmaceutical Sciences, 105, 1987-1994 (2016)
Enokida T, Yamasaki K, Okamoto Y, Taguchi K, Ishiguro T, Maruyama T, Seo H, and Otagiri M

- 2) Species Differences in the Binding of Sodium 4-Phenylbutyrate to Serum Albumin
Journal of Pharmaceutical Sciences, 106, 2860-2867 (2017)
Yamasaki K, Enokida T, Taguchi K, Miyamura S, Kawai A, Miyamoto S, Maruyama T, Seo H, and Otagiri M

目次

第 1 章 緒論.....	1
第 2 章 ヒト血清アルブミン (HSA) における 4-フェニル酢酸ナトリウム (PB) の結合サイトの微環境解析.....	5
第 1 節 序.....	5
第 2 節 ヒト血漿における PB の結合タンパク種の同定.....	6
2-1 限外濾過法.....	6
第 3 節 PB 及び代謝物, 関連構造化合物の結合パラメータ.....	7
3-1 限外濾過法.....	7
3-2 蛍光プローブ置換実験.....	10
第 4 節 HSA-PB の結合特性評価.....	12
4-1 熱力学的解析.....	12
4-2 界面活性剤及び電解質の影響.....	13
4-3 サイト II 結合リガンドと PB 間の相互作用.....	14
4-4 化学修飾体における結合.....	15
4-5 部位特異的変異体における結合.....	17
4-6 HSA-PB 複合体の結晶化, 構造解析.....	19
4-7 HSA-PB 複合体の全体構造及び相互作用様式.....	22
第 5 節 PB の結合におけるリガンドの影響.....	26
5-1 内因性物質と PB 間の相互作用.....	26
第 6 節 考察.....	28
第 7 節 小括.....	31

第 3 章 動物種アルブミンにおける PB の結合解析.....	32
第 1 節 序.....	32
第 2 節 動物種血漿における PB の結合タンパク種の同定.....	32
2-1 限外濾過法.....	32
第 3 節 PB, その代謝物及び関連構造化合物の結合パラメータ.....	33
3-1 限外濾過法.....	33
3-2 蛍光プローブ置換実験.....	38
3-3 ドッキングシミュレーション.....	41
第 4 節 考察.....	44
第 5 節 小括.....	48
第 4 章 総括.....	49
実験の部.....	52
謝辞.....	64
参考文献.....	65

第1章 緒論

4-フェニル酪酸ナトリウム (PB) は、臨床において残余窒素を排泄するというその薬効から尿素サイクル異常症治療に用いられている。その作用機序は、PB が β 酸化を受けてフェニル酢酸 (PA) へと代謝された後、グルタミン抱合を受けてフェニルアセチルグルタミン (PG) となり尿中排泄されるというものであり、このとき 2 分子のアンモニアが取り込まれることで高アンモニア血症を改善させる (Fig. 1) ^{1,2)}。

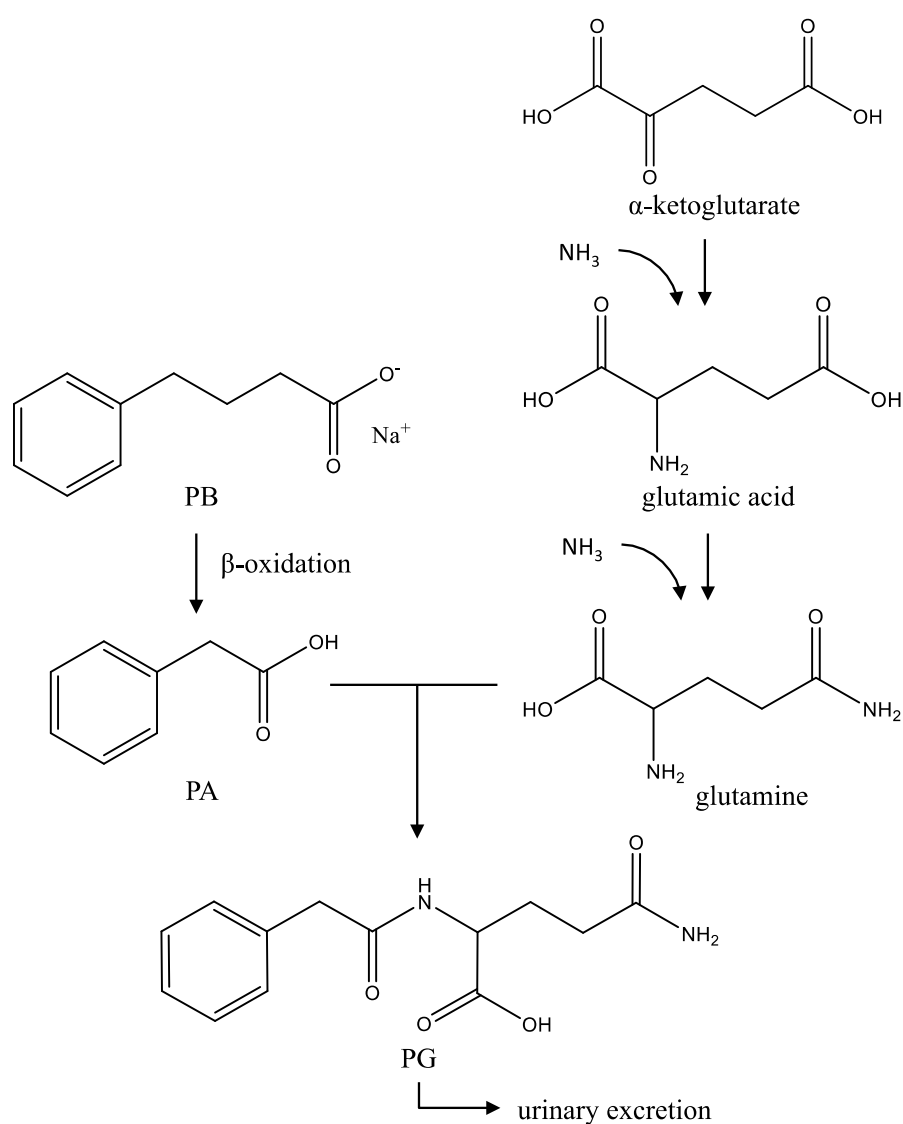


Fig. 1. Scheme of metabolic pathway of PB.

最近ではこのアンモニア排泄作用に加えて、小胞体ストレスによるミスフォールディングの抑制^{3,4}やヒストン脱アセチル化酵素（HDACs）の阻害作用^{5,6}（Fig. 2），さらに、肝毛細胆管側膜トランスポーターの調節^{7,8}などの新たな機能も報告されている。

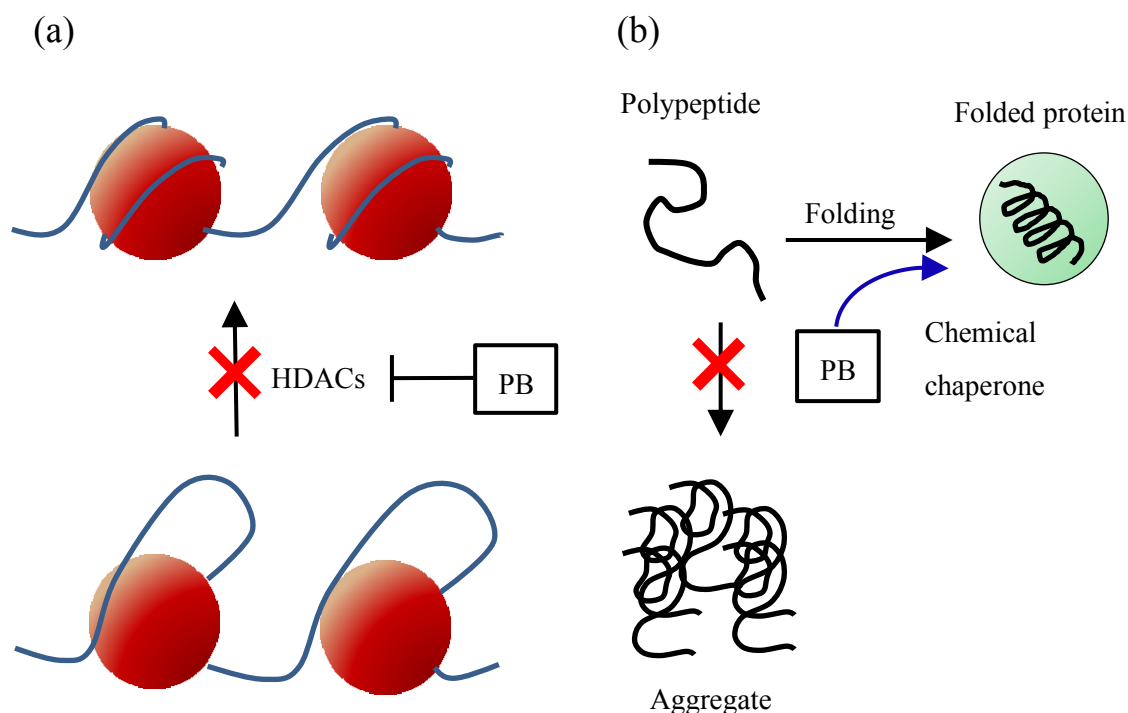


Fig. 2. Scheme of role of PB as HDACs inhibitor (a) and chemical chaperone (b).

小胞体ストレスは低酸素症、栄養失調及びアシドーシスなど様々な状態から引き起こされ、小胞体におけるタンパク質のフォールディング機構を破綻させる⁹。不可逆的に遷延する小胞体ストレスはアポトーシスや細胞機能を消失させ、神経変性病変、炎症反応、がん及びウイルス感染など多様な疾患の誘因となる^{9,10}。PBは分子シャペロンとして機能することで正常なタンパク質のフォールディングを補助し、小胞体ストレスを軽減させる^{3,4,11,12}。また、PBは前立腺がん、大腸がん、肝細胞がん及び神経膠腫細胞などのがん細胞において、分化やアポトーシスを誘導させるHDACs阻害剤としても機能する⁵。既に、PBはHDACs阻害薬として再発悪性神経膠腫治療の臨床試験が試みられており^{13,14}、さらに、ハンチントン病や

脊髄性筋萎縮症における神経保護効果も、PBのHDACs阻害に基づく作用であることが示唆されている^{15,16}。Hayashiらは、PBに胆管トランスポーターの調節作用があることを報告している⁷。すなわち、PBは肝毛細胆管側膜において、トランスポーターである多剤耐性タンパク質(MRP-2)の発現を増加させ、胆汁酸塩排泄ポンプから抱合型ビリルビン及び胆汁酸塩の排泄を促すことが明らかにされている^{7,8}。このことは、PBが高ビリルビン血症や進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の有効な治療薬になり得る可能性を示唆している。以上のようにPBの多様な薬理効果のため、尿素サイクル異常症のみならず、他の様々な疾患に対する治療薬としての臨床応用が期待されている。

ヒト血清アルブミン(HSA)は、585個のアミノ酸残基からなる分子量約66,500Daの単体のタンパク質である¹⁷。HSAは、全血清タンパク質のうち約60%を占める主要な血漿タンパク質であり、膠質浸透圧の調節や抗酸化作用、また、脂肪酸、ホルモン並びに胆汁酸、ビリルビン及び尿毒症物質のような毒性代謝物など様々な内因性物質の輸送において重要な役割を果たしている¹⁸。さらに、HSAは、多数の薬物とも結合し、このことが薬物動態や薬理効果に重大な影響を与える¹⁹。HSAには、2つの独立した主要な薬物結合部位として、サイトIとサイトIIが存在し^{20,21}、それぞれサブドメインIIAとIIIAに位置することがX線結晶構造解析によって示されている²²⁻²⁴。Yamasakiらは、サイトIが少なくとも3つのサブサイトIa、Ib及びIcから成り立つ幅広い領域であることを報告している²⁵。一般的に、サイトIはビリルビン及びワルファリンの高親和性結合サイトであり、サイトIIは中鎖脂肪酸、イブプロフェン及びジアゼパムの高親和性結合サイトであることが知られている^{18,26}。あるサイトへの薬物の結合は、併用される薬物や疾患時に変動する内因性物質の結合の影響を受ける¹⁹。従って、薬物結合サイトの同定及びその特性解明は薬物動態及び治療効果を予測することにつながる。しかしながら、PBのタンパク結合、特に結合様式に関する情報は少なく、薬物間相互作用を含むPBの薬物動態を予測するためには、さらなる詳細な検討が必須である。

ところで、哺乳動物のアルブミン分子は、ヒトアルブミンと比較して高い配列同一性(72~82%)及び類似性(83~88%)を有し²⁷、それらのドメイン構造はヒトアルブミンと類似していることが示唆されている^{28,29}。さらにウシ、イヌ、ウマ及びヒツジ由来のアルブミンには、ヒトアルブミンのサイトI及びIIに相当する結合部位が存在し、ラットアルブミン

の結合部位が他のアルブミンの結合部位とは異なることが示されている³⁰⁾。また、ヒト、ウシ、イヌ、ウサギ及びラットにおける結合部位の構造的差異についてもこれまでに報告されている³¹⁾。一般的に、上市される全ての医薬品は、前臨床試験として行われる動物実験のデータをヒトへ外挿し、その有効性と安全性を予測することで臨床試験への移行が可能となる。つまり、前臨床試験で用いる動物の薬物動態における種差の解明が不十分な場合は、ヒトにおける体内動態や薬理作用の予測を誤る恐れがあるため、薬物動態における種差を解明することは必須であると考えられる。既に上市されているPBについては、いくつかの疾患への適応拡大を視野に入れ、各種病態動物を用いた検討が行われているにも関わらず、PBのタンパク結合に関する情報に加えて種差に関する情報は非常に限られている。

このような背景の下、本研究では、詳細な検討が行われていないPBの血清タンパク質、特にHSAとの結合を解明することを目的とした。まず、第2章において、限外濾過法や平衡透析法を用いてPBのHSAにおける結合特性を評価し、アルブミン化学修飾体や部位特異的変異体を利用することでアルブミン分子上のPBの結合部位の同定を行なった。第3章では、ヒトアルブミン同様、これまで研究が盛んに行われてきたウシアルブミンに加えて、実験動物として利用されることの多いラット、ウサギを選択し、これらの動物種アルブミンにおけるPBの結合特性評価を試みた。以下に得られた知見を詳述する。

第2章 HSAにおけるPBの結合サイトの微環境解析

第1節 序

ヒト血清中で薬物結合を担っている主要タンパク質は、HSA、 α_1 -酸性糖タンパク質 (AAG)、リポタンパク質及びグロブリンである²⁶⁾。なかでもHSAは、血清中に最も多く存在することや多くの酸性薬物がこのタンパク質に結合することから、PBのような酸性薬物の結合タンパク種である可能性が考えられる。事実、Boudoulasらは、HSA及びAAGへのPBの結合を評価し、PBがHSAに強く結合することを報告している³²⁾。一方、炎症や感染症等によってその量が大きく変動するAAGやグロブリンが、PBの結合にどの程度影響するかについて詳細には検討されていない。さらに、主要結合分子種と想定されるHSAについても、PBがどのような様式でこのタンパク質に結合するのかに関する報告は少ない。特に、PBのHSAへの結合に関しては、平衡透析法や限外濾過法を用いた直接的な結合親和性の評価、結合サイトや関与するアミノ酸残基の同定は行われていない。さらに、HSAとPBのX線結晶構造に基づく結合様式の解明も行われていない。例えば、HSA上の同一結合サイトを有する薬物間においては、競合置換を引き起こして遊離型濃度の増大による薬効及び副作用発現に重大な影響を与える³³⁾。その影響は薬物間のみならず、疾患時に変動する内因性物質においても同様であり、例をあげると、肝疾患時の血漿ビリルビン増加や尿毒症物質の増加、心不全あるいは交感神経系の緊張による遊離脂肪酸の増加などは、薬物の結合親和性を低下させることが知られている^{34,35)}。また、HSAの結合サイト特異的に薬物の結合を変動させる疾患も知られている³⁶⁻³⁸⁾。このように、各種疾患に伴うPBの薬物動態並びに薬理効果の変動を予測するうえで、結合サイトの同定をはじめとするPBのHSAへの結合様式の解明は重要な意義を有する。そこで本章では、PBの血清中における各種タンパク質への結合を評価するとともにHSAへの結合様式の解明を試みた。

第2節 ヒト血漿におけるPBの結合タンパク種の同定

2-1 限外濾過法

PBのヒト血漿中での結合タンパク種を同定するため、代表的な血漿タンパクであるHSA、AAG及び γ -グロブリンへのPBの結合をヒト血漿における結合と比較した (Fig. 3)。限外濾過法によって得られたHSAにおけるPBの遊離型分率は、ヒト血漿中のものと同等であった³⁹⁾。一方、AAG及び γ -グロブリンにおける遊離型分率は高く、ヒト血漿においてPBは主にHSAに結合していることが明らかとなった。

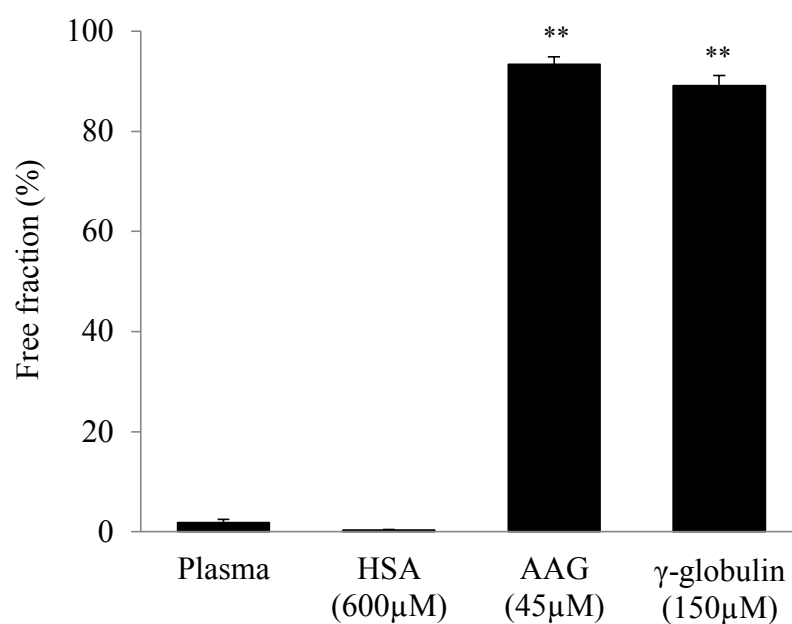


Fig. 3. Binding of PB to human plasma, HSA, AAG and γ -globlins examined by ultrafiltration at 25 °C.

The concentrations of HSA, AAG and γ -globlins in pH 7.4 buffer were 600 μ M, 45 μ M and 150 μ M, respectively, corresponding to the concentrations in human plasma. The concentration of PB was 100 μ M. Values are expressed as means \pm S.D. (n=3). **, P < 0.01 in comparison with plasma or HSA.

第3節 PB, その代謝物及び関連構造化合物の結合パラメータ

3-1 限外濾過法

PBは代謝物としてPA及びPGを生成する. まず, これらのHSAに対する親和性を確認するため結合定数を算出することとした. 次に, PBの結合様式や結合サイトの構造特性を構造活性相関的な観点から考察するため, PBの関連構造化合物の結合定数についても算出した. Fig. 4にPB, その代謝物及びアルキル側鎖の異なる関連構造化合物の構造を示す.

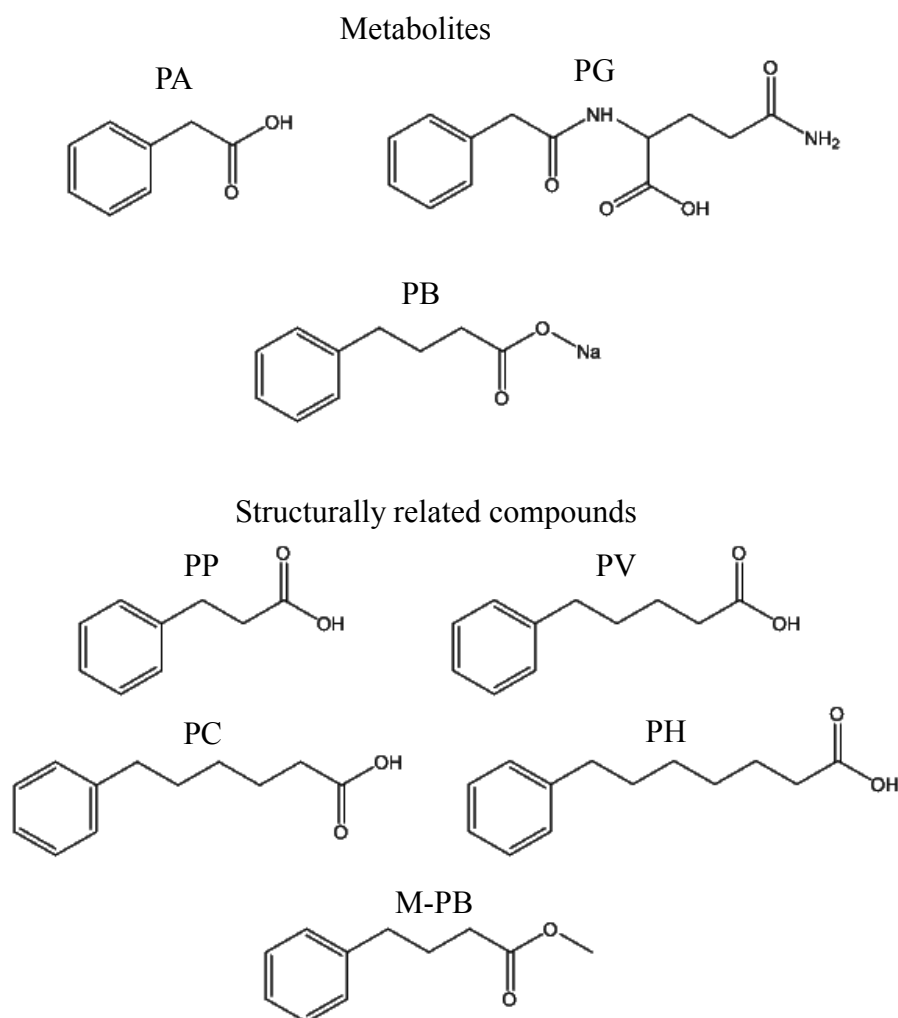


Fig. 4. Chemical structures of PB, its metabolites (PA and PG) and structurally related compounds (PP, PV, PC, PH and M-PB).

HSA における PB, その代謝物及び関連構造化合物の結合パラメータの算出には限外濾過法を用いた。得られた高親和性サイトにおける結合サイト数 n 及び結合定数 K を Table 1 及び 2 に示す。PB 及び PA の結合サイト数は 1 であったが、代謝物である PA 及び PG の HSA における結合は低く、特に PG については結合定数の算出ができなかった。また、PA の結合定数は PB の約 25 分の 1 に低下していた。

Table 1. Binding parameters obtained by ultrafiltration for binding of PB and its metabolites to HSA at pH 7.4 and 25 °C.

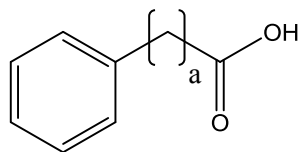
Parameters	PB	Metabolites	
		PA	PG
$K(\times 10^5 \text{ M}^{-1})$	13.7±2.12	0.53±0.35	— [#]
n	0.87±0.03	1.11±0.35	— [#]

The affinity to HSA is too low to determine the binding parameters.
The results are means ± S.D. (n=3).

Table 2. Binding parameters obtained by ultrafiltration for binding of PB and structurally related compounds to HSA at pH 7.4 and 25 °C.

Parameters	Structurally related compounds				
	PP	PV	PC	PH	M-PB
$K(\times 10^5 \text{ M}^{-1})$	4.86±0.64	20.1±6.93	29.9±1.73	25.8±0.44	0.52±0.22
n	1.09±0.12	0.90±0.08	1.30±0.10	0.91±0.03	1.08±0.18

The results are means ± S.D. (n=3).



Number of methylene (a)

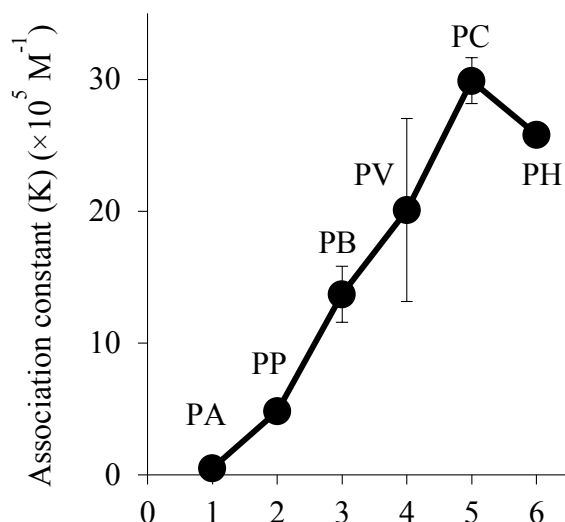


Fig. 5. Effect of number of methylene in PB and its structurally related compounds on their association constants (K) for binding to HSA.

Association constants are the value at pH 7.4 and 25 °C. Each point represents the mean \pm S.D. (n=3).

一方で、PB の関連構造化合物の結果より、PB よりもアルキル側鎖の短い PP 及び PB のカルボキシル基をメチル化した M-PB の結合定数は PB と比較し極めて低く、PB の結合には、末端のカルボキシル基の存在の重要性が示唆された。PB よりもアルキル側鎖の長い PV、PC 及び PH の結合定数は PB と比較して高かった。さらに、アルキル側鎖数に着目して、PA、PP、PB、PV、PC 及び PH の結合定数を比較すると、これらの化合物の親和性はフェニル基とカルボキシル基間のアルキル側鎖のメチレン数に依存しており、最も親和性が高かったのはメチレン数が 5 の PC であった (Fig. 5)。PH は今回用いた化合物において、最も長いアルキル側鎖を有するにも関わらず、PC よりも低い結合定数を示した。

3-2 蛍光プローブ置換実験

Sudlow ら²¹⁾が提唱したワルファリン (サイト I プローブ) 及びダンシルサルコシン (サイト II プローブ) を蛍光プローブとして利用し、これらの蛍光プローブ置換実験から PB の結合サイトの推定を行った。Fig. 6 に示すように PB の添加量の増加に伴いダンシルサルコシンの蛍光強度は低下したものの、ワルファリンの蛍光強度はわずかに増加した。この結果 PB は HSA のサイト II へ結合することが示唆された。

PB の代謝物及び関連構造化合物である PA, PP, PV, PC 及び PH においては、ダンシルサルコシンの蛍光強度を低下させており (Figs. 6b 及び 6d) , これらの化合物も同様に HSA のサイト II へ結合していることが示唆された。PG 及び M-PB において蛍光強度はほとんど変化しておらず、その親和性の低さからダンシルサルコシンを置換しなかったと考えられた。さらに、PA, PG, PP, PV 及び M-PB において、ワルファリンの蛍光強度は変化がないか、あるいは微増したが (Figs. 6a 及び 6c) , 特に PH においては顕著に蛍光強度が増加しており、ワルファリンの結合しているサイト I に対して、PH がアロステリックな影響を及ぼしていることが示唆された (Figs. 6a 及び 6c) .

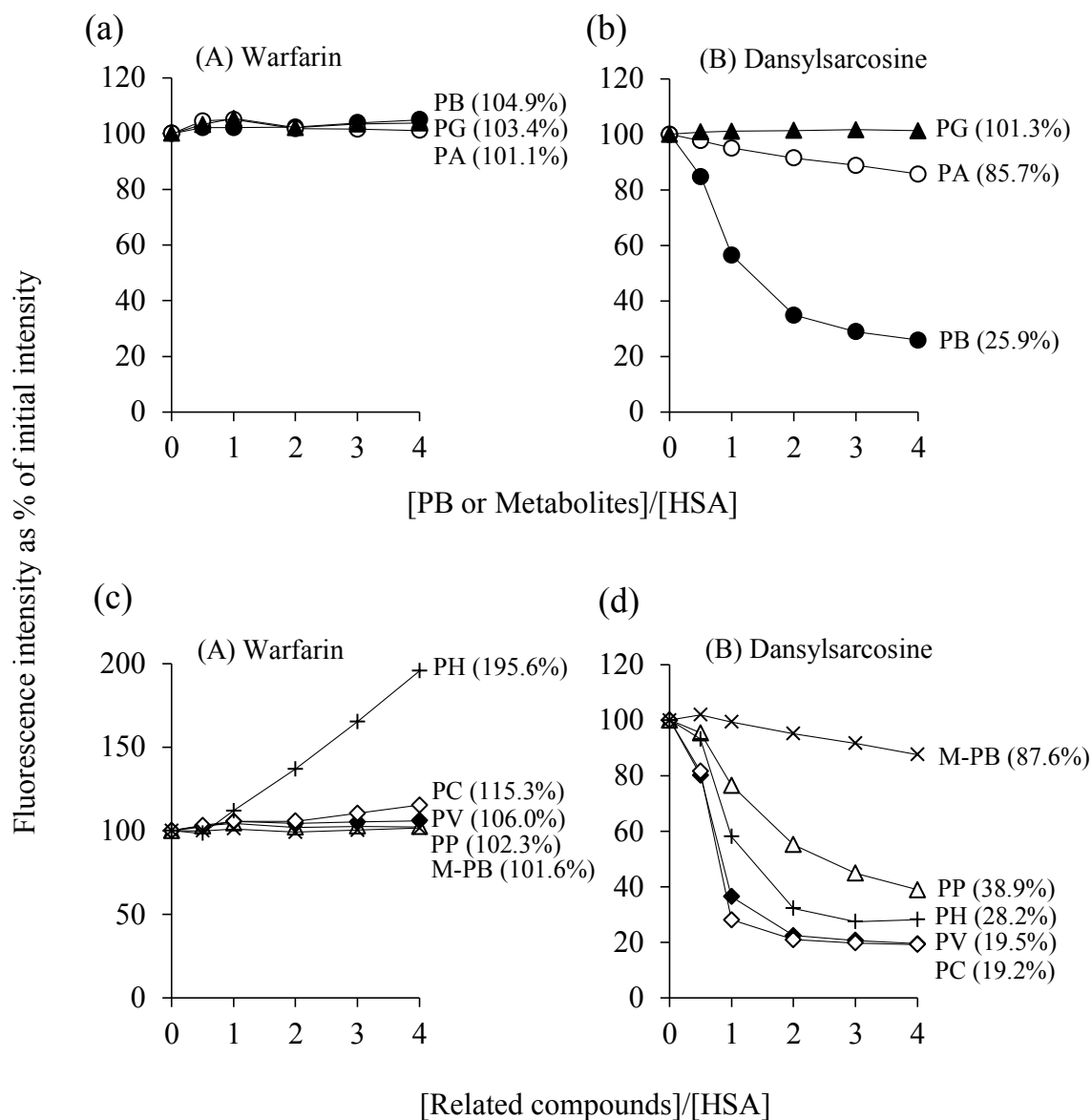


Fig. 6. Effects of PB, its metabolites and structurally related compounds on the fluorescence intensity of warfarin (A) and dansylsarcosine (B) bound to HSA at pH 7.4 and 25 °C.

Displacer used are PB (●) and its metabolites, PA (○) and PG (▲), and structurally related compounds, PP (△), PV (◆), PC (◇), PH (+) and M-PB (×). The following concentrations were used: HSA, 20 μM, warfarin, 2 μM and dansylsarcosine, 2 μM. The percentages in parentheses indicate the values at displacers to HSA molar ratio of 4.

第4節 HSA-PBの結合特性評価

4-1 熱力学的解析

HSA-PBの相互作用様式を解明するため、平衡透析法により、各温度において算出した結合パラメータを用いて熱力学的解析を行った。ln Kに対して1/Tをプロットしvan't Hoffプロットを作成し(Fig. 7)、この直線の傾きと切片から各々 ΔH 及び ΔS を算出して得た値をTable 3に示す。PBの熱力学的解析の結果、HSA-PB複合体の形成は、発熱反応及びエントロピーが支配的であることが明らかとなった(Fig. 7)。

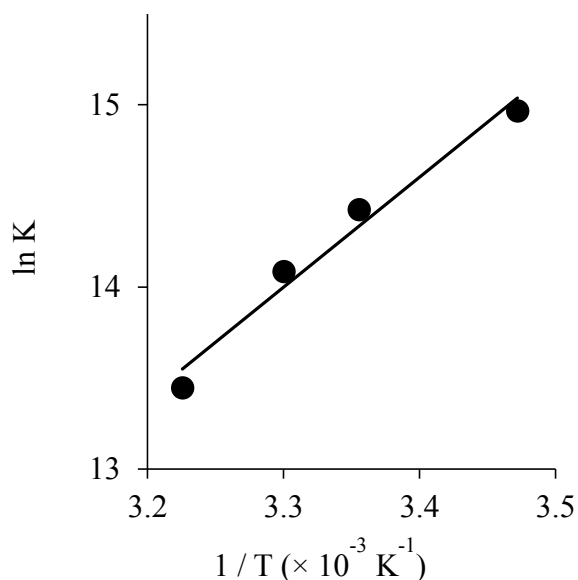


Fig. 7. van't Hoff plot for binding of PB to HSA.

算出されたすべての熱力学的パラメータ (ΔG , ΔH 及び ΔS) は負の値を示し、 ΔS は他と比較してより小さな値であった (Table 3)。これまでに報告されている相互作用と熱力学的パラメータの関係によると⁴⁰⁾、疎水性相互作用に関しては ΔH 及び ΔS は共に正の値を示すが、van der Waals 相互作用の場合、 ΔH 及び ΔS は共に負の値となる。一方、静電的相互作用は、正の ΔS 並びに負または小さな正の ΔH を示す。さらに、結合の際にその結合部位の立体構造

が変化するような場合は、大きな正の ΔS を示す. HSA-PB の相互作用でみられた大きな負の ΔH と負の小さな ΔS の値は、一般的に van der Waals 力や水素結合により形成されるものと解釈される^{40,41)}.

Table 3. Thermodynamic parameters for HSA-PB interaction at pH 7.4.

Temperature (K)	ΔG (kJ \cdot mol ⁻¹)	ΔH (kJ \cdot mol ⁻¹)	ΔS (kJ \cdot K ⁻¹ \cdot mol ⁻¹)
293	- 34.8 \pm 0.3		
298	- 34.2 \pm 0.4		
303	- 34.0 \pm 0.4	- 58.6 \pm 5.5	- 0.08 \pm 0.02
310	- 33.6 \pm 0.4		

The results are means \pm S.D. (n=3).

4-2 界面活性剤及び電解質の影響

HSA とリガンドとの相互作用に及ぼす、界面活性剤や電解質添加の影響を検討することにより、リガンドが結合するサイトの微環境が推定できる^{42,43)}. PB のサイト II への結合について確認するため、非イオン性界面活性剤としてポリオキシエチレンラウリルエーテル (PLE) 及び電解質として NaCl を用いて検討を行った. PB の結合は PLE により低下し (Fig. 8a)、また、NaCl 存在下においても低下することが明らかとなった (Fig. 8b). このことから、PB の結合に疎水性相互作用及び静電的相互作用が関与している可能性が示唆された.

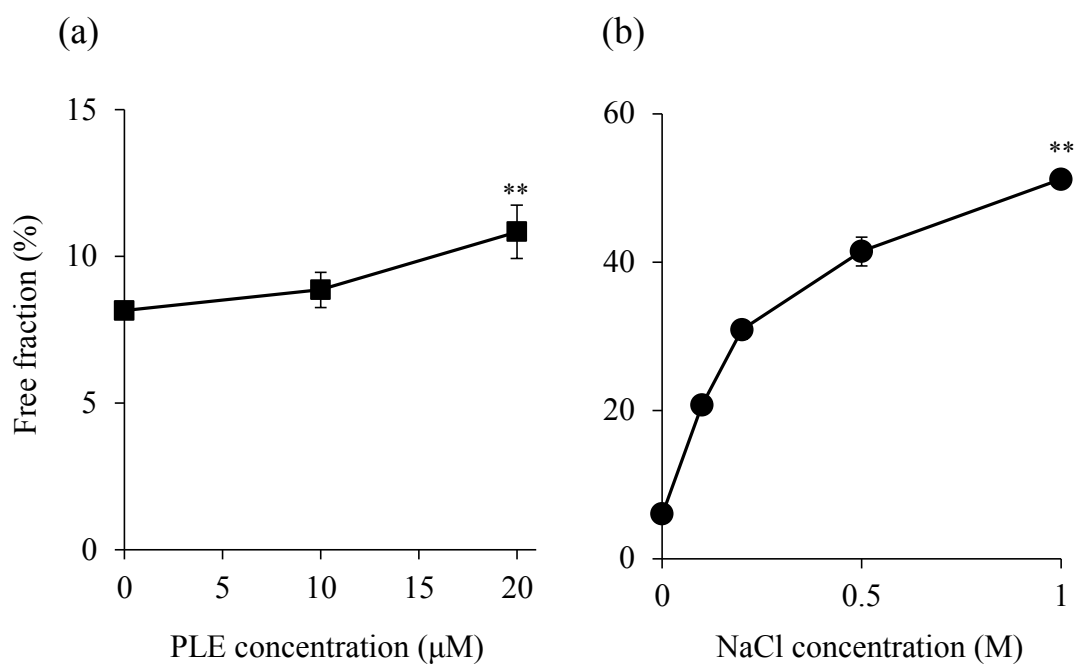


Fig. 8. Effect of PLE(■) and NaCl(●) in PB binding to HSA at pH 7.4 and 25 °C.

Each point represents the mean±S.D. (n=3). **, P < 0.01 in comparison with ligands 0μM.

4-3 サイト II 結合リガンドと PB 間の相互作用

PB のサイト II における結合様式を解明するため、代表的サイト II 結合薬物として知られるイブプロフェンを用いて、三成分系（タンパク質、リガンド A、リガンド B）の相互作用を Kragh-Hansen が提唱したモデルに従って解析を行った（実験の部参照）^{44,45}。このモデルはリガンド A と B のタンパク分子上での相互作用様式を定量的に解析するものであり、独立及び競合を仮定した理論曲線と実験値の比較並びに相互作用の指標となるカップリング定数 (χ) の算出及び評価により相互作用を解析するものである。 $\chi=1$ 及び $\chi=0$ は独立及び競合結合を意味し、また、 $\chi>1$ 及び $1>\chi>0$ の場合は各々正の協同的及び負の協同的結合であり、2 種のリガンドが異なる部位へ結合しその間のアロステリックな相互作用を意味している。

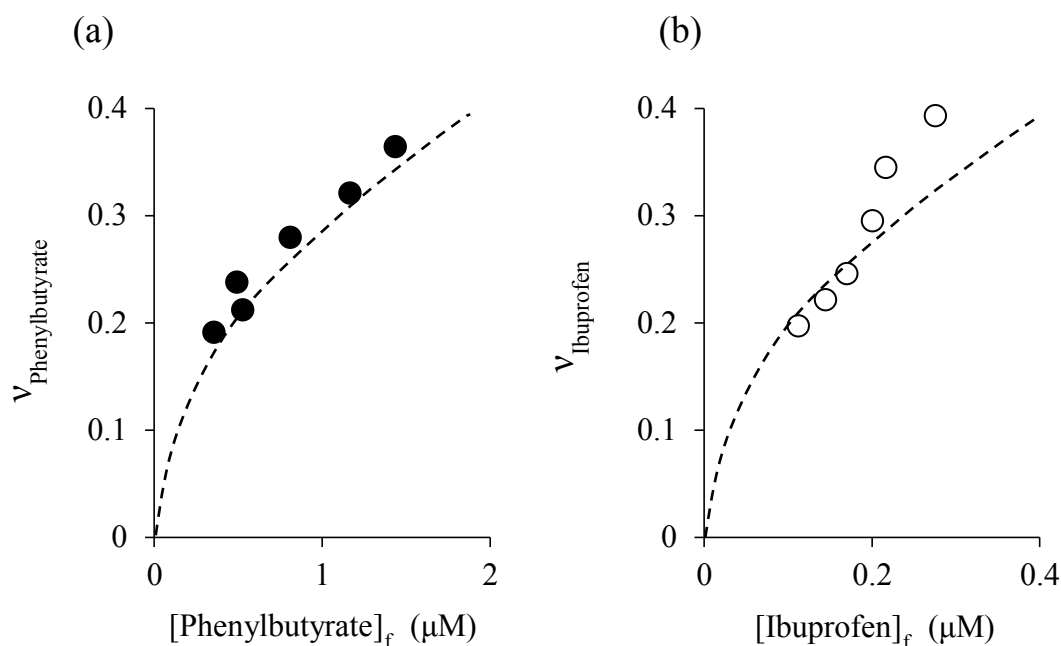


Fig. 9. Binding of PB (8-16 μM) (a) and ibuprofen (8-16 μM) (b) to HSA (40 μM) in the presence of the other ligands at pH 7.4 and 25 °C.

(a), in the presence of ibuprofen (16 μM) (●); (b), in the presence of PB (16 μM) (○); - - -, theoretical curves assuming competitive binding between PB and ibuprofen($\chi=0$).

Fig. 9で示したようにPB及びイブプロフェンは互いの結合を阻害し、この結合の阻害は競合を仮定した理論曲線 ($\chi=0$) と一致し、PB とイブプロフェンはサイト II 内の同一領域に結合することが示唆された。

4-4 化学修飾体における結合

Fehske らは、これまでに HSA 化学修飾体を用いた研究により、 ^{214}Trp 及び ^{411}Tyr が各々サイト I 及びサイト II に位置することを明らかにしている^{46,47}。そこで本研究においては、 ^{214}Trp 及び ^{411}Tyr 修飾体をそれぞれ 2-ヒドロキシ-5-ニトロベンジルブロミド (HNB) 及びアントラニル酸 4-ニトロフェニル (NPA) により作成し (実験の部参照)^{46,48}、その遊離型

分率を限外濾過法によって解析し, HSA との比較を行った(Fig. 10). その結果, ^{411}Tyr 修飾体は PB の結合を有意に阻害したが, ^{214}Trp 修飾体における結合は変化がなかった. これらの結果より, PB がサイト II 領域の ^{411}Tyr と相互作用していることが示唆された.

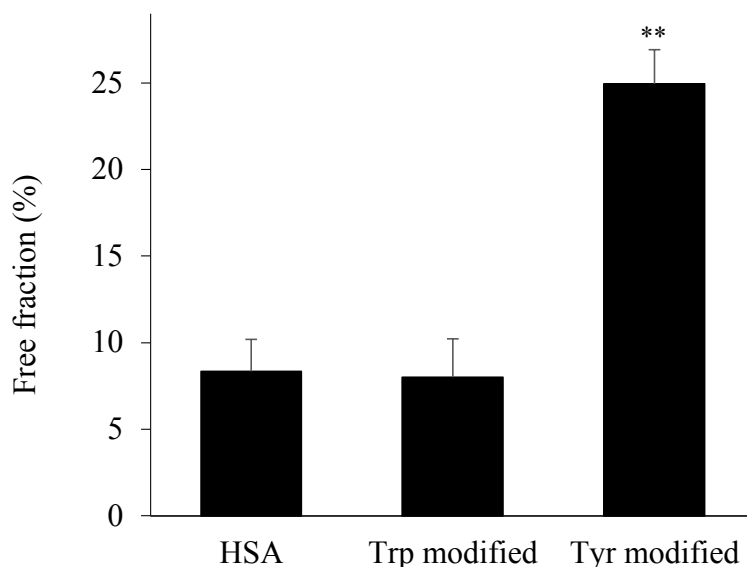


Fig. 10. Binding of PB to native, Trp- and Tyr- modified HSAs examined by ultrafiltration at pH 7.4 and 25 °C.

The concentration of HSA and modified HSAs was 20 μM , and PB concentration was 10 μM . Values are expressed as means \pm S.D. (n=3). **, P < 0.01 in comparison with native HSA.

また, サイト I 及びサイト II に特異的に結合するリガンドを用いて同様の検討を行ったところ, サイト I リガンドであるワルファリンの遊離型分率は ^{214}Trp 化学修飾体により 3.1 倍増加したが, ^{411}Tyr 化学修飾体においては変化しなかった (Fig. 11a). これと比較して, サイト II リガンドであるイブプロフェンの遊離型分率は, ^{411}Tyr 化学修飾体によって 4.1 倍増加したが, ^{214}Trp 化学修飾体においてはわずか 1.2 倍の増加であった (Fig. 11b). このことから, PB はイブプロフェンと類似の結合様式でサイト II へ結合していることが示唆された.

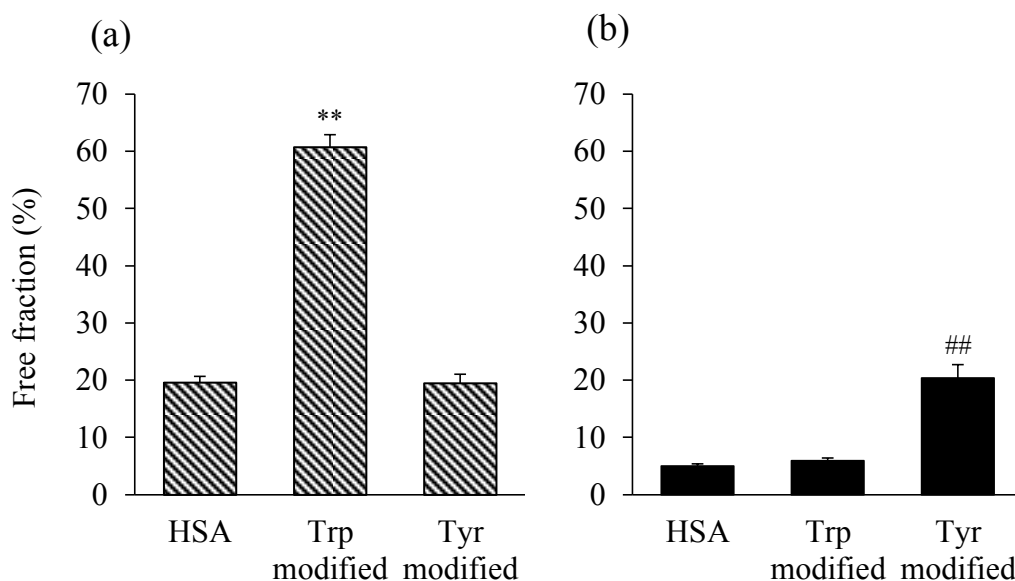


Fig. 11. Binding of warfarin (a) and ibuprofen (b) to native, Trp- and Tyr-modified HSAs examined by ultrafiltration at pH 7.4 and 25 °C.

The concentration of HSA and modified HSAs was 20 μ M, and warfarin and ibuprofen concentration was 10 μ M. Values are expressed as means \pm S.D. (n=3). **, P < 0.01 in comparison with binding of warfarin to native HSA. ##, P < 0.01 in comparison with binding of ibuprofen to native HSA.

4-5 部位特異的変異体における結合

サイト II 領域へのリガンド結合には、前項で示した ^{411}Tyr に加えて、 ^{410}Arg が重要な役割を果たしていることが報告されている^{49,50}。そこで、これまでの蛍光プローブ置換実験及び HSA 化学修飾体における結合の結果を確認するため、HSA 部位特異的変異体 (Y411A 及び R410A) を作製し、PB の結合についてさらなる検討を行った (Fig. 12)。 ^{411}Tyr 及び ^{410}Arg をアラニンへ置換した部位特異的変異体、それぞれ Y411A 及び R410A において、PB の結合は低下した。その結果、PB がサイト II 領域に位置する ^{411}Tyr 及び ^{410}Arg と相互作用していることが強く示唆された。

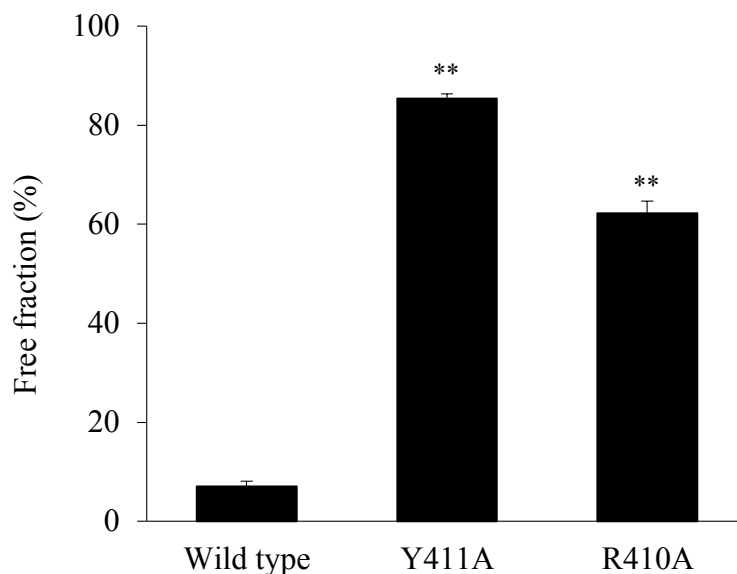


Fig. 12. Binding of PB to wild-type HSA and mutant-HSAs (Y411A and R410A) examined by ultrafiltration at pH 7.4 and 25 °C.

The concentration of HSAs was 20 μ M, and PB concentration was 10 μ M. Values are expressed as means \pm S.D. (n=3). **, P < 0.01 in comparison with wild-type HSA.

また、代表的サイト II 結合薬物であるイブプロフェンの Y411A 及び R410A における結合について確認したところ、Y411A 及び R410A いずれにおいても HSA と比較して結合が低下しており、イブプロフェンも PB と同様に ^{411}Tyr 及び ^{410}Arg 相互作用し、サイト II へ結合していることが示唆された (Fig. 13)。イブプロフェンの Y411A 及び R410A における遊離型分率の増加は、PB と比較して少ない。これは HSA における遊離型分率からも明らかなように、イブプロフェンの HSA への親和性は PB と比較して高い。このことから、 ^{411}Tyr 及び ^{410}Arg との静電的相互作用以外にも、PB との構造的差異による疎水性相互作用や van der Waals 力などが大きく影響しているものと考えられた。

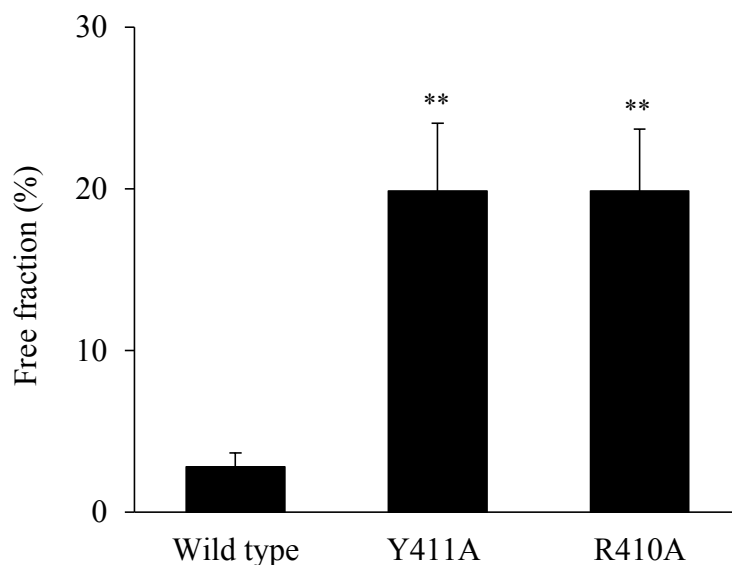


Fig. 13. Binding of ibuprofen to wild-type HSA and mutant-HSAs (Y411A and R410A) examined by ultrafiltration at pH 7.4 and 25 °C.

The concentration of HSAs was 20 μ M, and ibuprofen concentration was 10 μ M. Values are expressed as means \pm S.D. (n=3). **, P < 0.01 in comparison with wild-type HSA.

4-6 HSA-PB 複合体の結晶化, 構造解析

前項までの結果から, PB が HSA のサイト II 領域に結合することが強く示唆されたため, その立体配置についてより詳細に解明すべく, 結晶構造解析を試みた. 構造解析を目的とした HSA の単結晶は, 結晶化剤として PEG3350 とリン酸緩衝液を用いた条件で得られることが多い⁵¹⁾. また, Kouno らは HSA とオクタン酸ナトリウム (Oct) , N-アセチル-L-メチオニン (N-AcMet) の共結晶化の際に従来の結晶化条件に 2-メチル-2,4-ペンタンジオール (MPD) を添加した条件で X 線回折実験が可能な単結晶を得ることに成功した⁵²⁾. そこで, HSA-PB 複合体の共結晶化は, 多くの HSA の単結晶が得られている PEG3350 とリン酸緩衝液を用いた条件に加えて, MPD を添加した条件を並行して検討した結果, いずれの結晶化条件におい

ても結晶が得られ (Fig. 14) , これらの結晶について PF BL17A で X 線回折実験を行い, 構造解析を実施したところ, 両者とも PB 由来と考えられる電子密度が観察できた. しかしながら, 従来の結晶化条件で得られた結晶は最大分解能が 3.0 \AA だったのに対し, MPD を添加した結晶化条件では最大分解能 2.65 \AA を示し, 構造解析を目的とした HSA-PB 複合体の共結晶化には MPD を添加した結晶化条件の方が適しているように考えられた. 従って, 本論文では最大分解能が高い MPD を添加した結晶化条件で得られた結晶について構造解析した結果を記す.

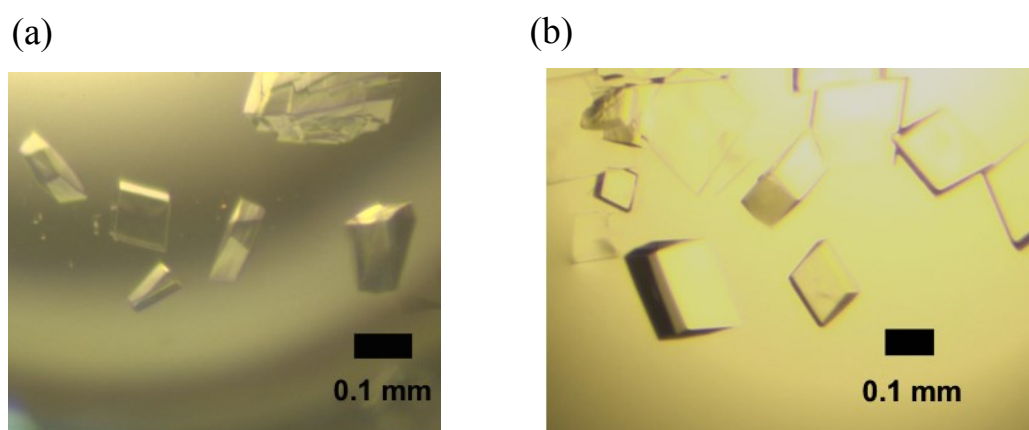


Fig. 14. HSA-PB complex crystals.

The best crystals of the HSA-PB complex. Crystals were obtained in the reservoir condition; (a) 32%(w/v) PEG3350 and 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0. (b) 28%(w/v) PEG3350, 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 10%(v/v) MPD.

Table 4. Data-collection and refinement statistics.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Data-collection	
Source	PF BL17A
wavelength (Å)	0.9800
Space group	$P2_1$
Unit-cell parameters	
length (Å)	$a = 58.5, b = 181.9, c = 59.5,$
angle (°)	$\beta = 105.2$
Resolution range (Å)	50.0 – 2.65 (2.70 – 2.65)
No. of observed reflections	232,151
No. of unique reflections	34,871
Multiplicity	6.7 (6.4)
Completeness (%)	99.9(100)
$R_{\text{merge}}(\%)^a$	10.3 (68.8)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	35.7 (2.8)
Refinement	
Resolution (Å)	45.3 – 2.64 (2.71 – 2.64)
Reflection used	34,833 (2,547)
$R_{\text{work}}(\%)^b$	23.3 (28.1)
$R_{\text{free}}(\%)^c$	25.6 (28.5)
Completeness (%)	99.5 (95.1)
Number of non-hydrogen atoms	8,441
Protein	8,407
Ligands	34
r.m.s.d. from ideality	
bond length (Å)	0.002
bond angle (°)	0.418
Average. B -factor	86.1
Protein	86.1
Ligands	79.7
Ramachandran plot	
favored region (%)	96.2
allowed region (%)	3.8
outlier region (%)	0.0
Clashscore	3.2

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

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

4-7 HSA-PB 複合体の全体構造および相互作用様式

本研究で作製した HSA-PB 複合体結晶の X 線回折データおよび構造精密化の統計値を Table 4 に記す. 本研究で作製した HSA-PB 複合体の結晶は, 空間群 $P2_1$ に属し, 格子定数は $a=58.5 \text{ \AA}$, $b=181.9 \text{ \AA}$, $c=59.5 \text{ \AA}$, $\beta = 105.2^\circ$ であることが明らかになった. また, 得られた結晶の最大分解能は 2.65 \AA で, 結晶内の非対称単位中には 2 分子の HSA (分子 A と分子 B) が含まれていた (Fig. 15). 非対称単位中に含まれる 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 557 アミノ酸残基の $C\alpha$ 原子間の *r.m.s.d.* 値は 0.63 \AA と計算され, 両者の全体構造に違いはないことが確認された (Fig. 15b). HSA の全体構造は, これまでの報告同様, α ヘリックスで形成される相同性の高い 3 つのドメイン (I, II, III) から構成されていて, それぞれのドメインは, サブドメイン A とサブドメイン B に細分化されていた (Fig. 15a). PB の結合サイトはサブドメイン IIIA に存在し, この結合サイトは Sudlow らによって提唱されたサイト II と一致していた (Fig. 15a)²⁰. PB と HSA の詳細な相互作用様式を観察すると, PB のカルボキシル基は ⁴¹⁰Arg, ⁴¹¹Tyr 及び ⁴⁸⁹Ser の側鎖と静電的相互作用し, フェニル基を含むアルキル側鎖は, ³⁸⁷Leu, ³⁸⁸Ile, ³⁹¹Asn, ³⁹²Cys, ⁴⁰³Phe, ⁴⁰⁷Leu, ⁴¹⁰Arg, ⁴¹¹Tyr, ⁴³⁰Leu, ⁴³¹Gly, ⁴³³Val, ⁴³⁷Cys, ⁴³⁸Cys, ⁴⁴⁹Ala, 及び ⁴⁵³Leu で形成された疎水性ポケットに van der Waals 相互作用を介して収まっていることが明らかになった (Fig. 16). この相互作用様式は, HSA と Oct の相互作用様式と一致しており (Fig. 17a)⁵², PB と Oct が結合した HSA の全体構造を比較しても, 対応する 555 アミノ酸残基の $C\alpha$ 原子間の *r.m.s.d.* 値が 0.63 \AA を示し, 両者の全体構造はよく似ていることが明らかになった. また, これまでに HSA と脂肪酸が結合すると, HSA ドメイン構造の配向変化を惹起することが報告されていたが^{53,54}, Oct ではその構造変化が観察されなかったことから^{52,55}, 脂肪酸の HSA への結合数や脂肪酸が有するアルキル鎖の長さがドメイン構造の配向変化に関与していることが推測された⁵¹⁻⁵⁴. PB は

構造中にフェニル基が存在するため、Oct と比較して少しかさ高い構造となっている。よって、本研究結果は、脂肪酸結合による HSA の構造変化に、フェニル基のかさ高い構造の影響も少ないことを示し、これまで推察されていた通り、脂肪酸のアルキル鎖の長さや HSA への脂肪酸の結合数が重要であることを支持する結果となった。さらに、サイト II 結合薬物として知られるジアゼパム (Fig. 17b) 及びイブプロフェン (Fig. 17c) の結合様式を比較すると、いずれもサイト II において PB と類似の結合様式を示すことが明らかとなった。

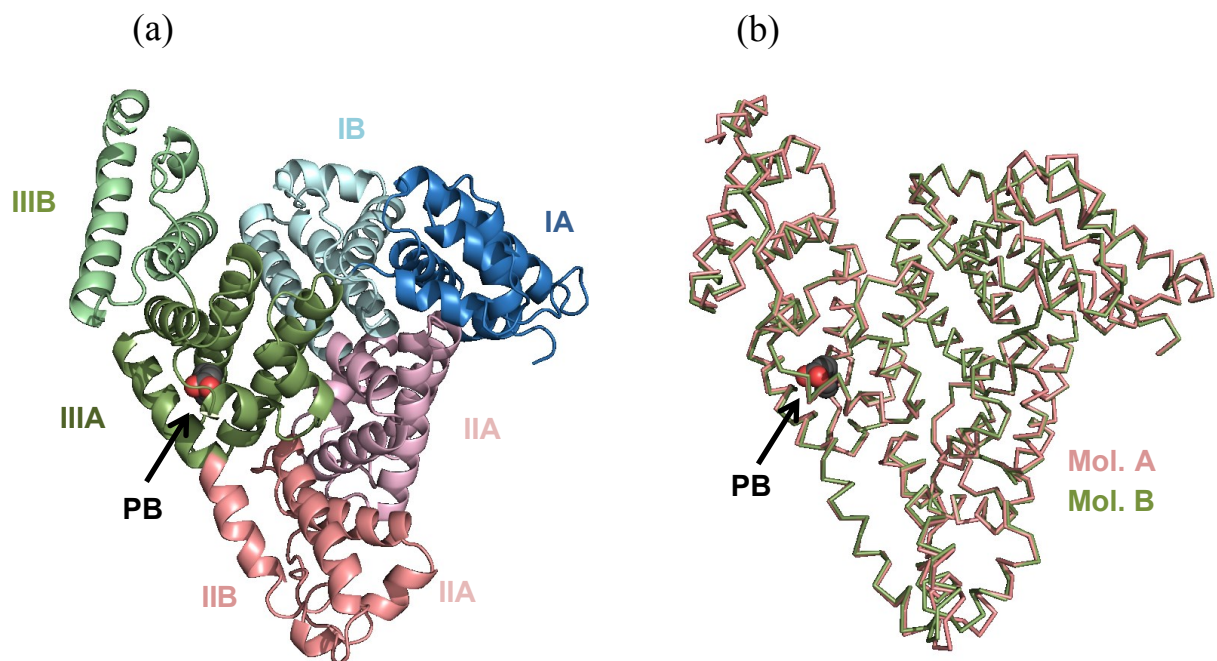


Fig. 15. Overall structure of the HSA-PB complex.

(a) 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 PB molecule is shown as CPK representations. (b) Comparison of the HSA structures in the asymmetric unit.

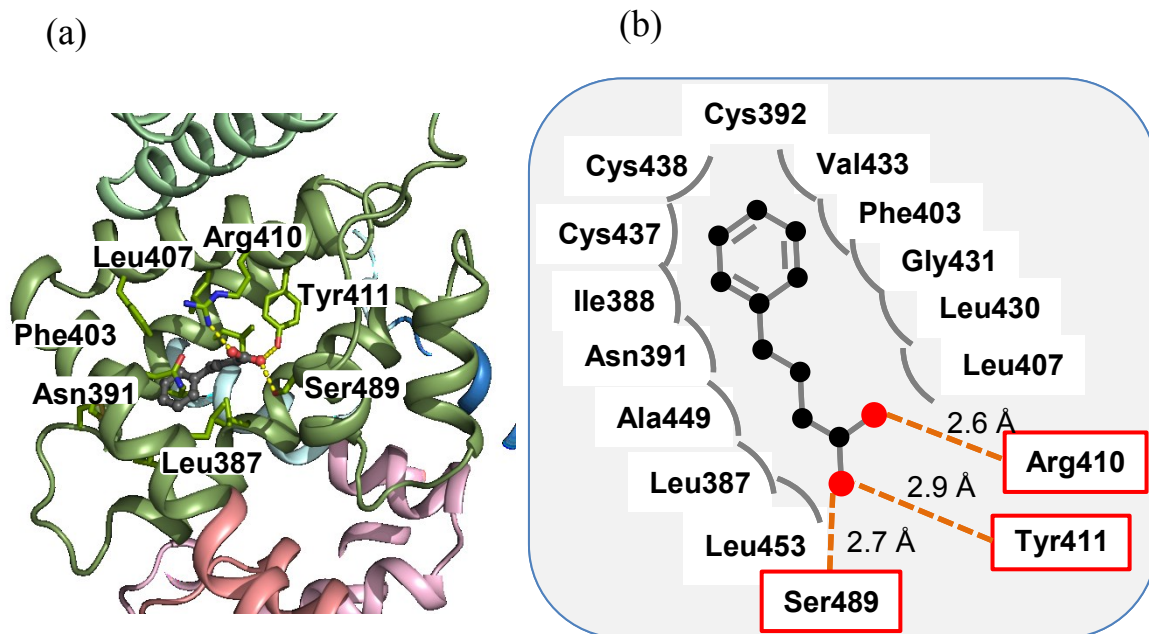


Fig. 16. PB binding at site II.

(a) Close-up view of PB binding at site II. The PB molecule is shown as a ball-and-stick representation. Hydrogen bonds are shown as yellow dashed lines. (b) The schematic diagram of the PB binding site at drug site II. The amino acid residues involved in hydrogen bonds are surrounded by red boxes.

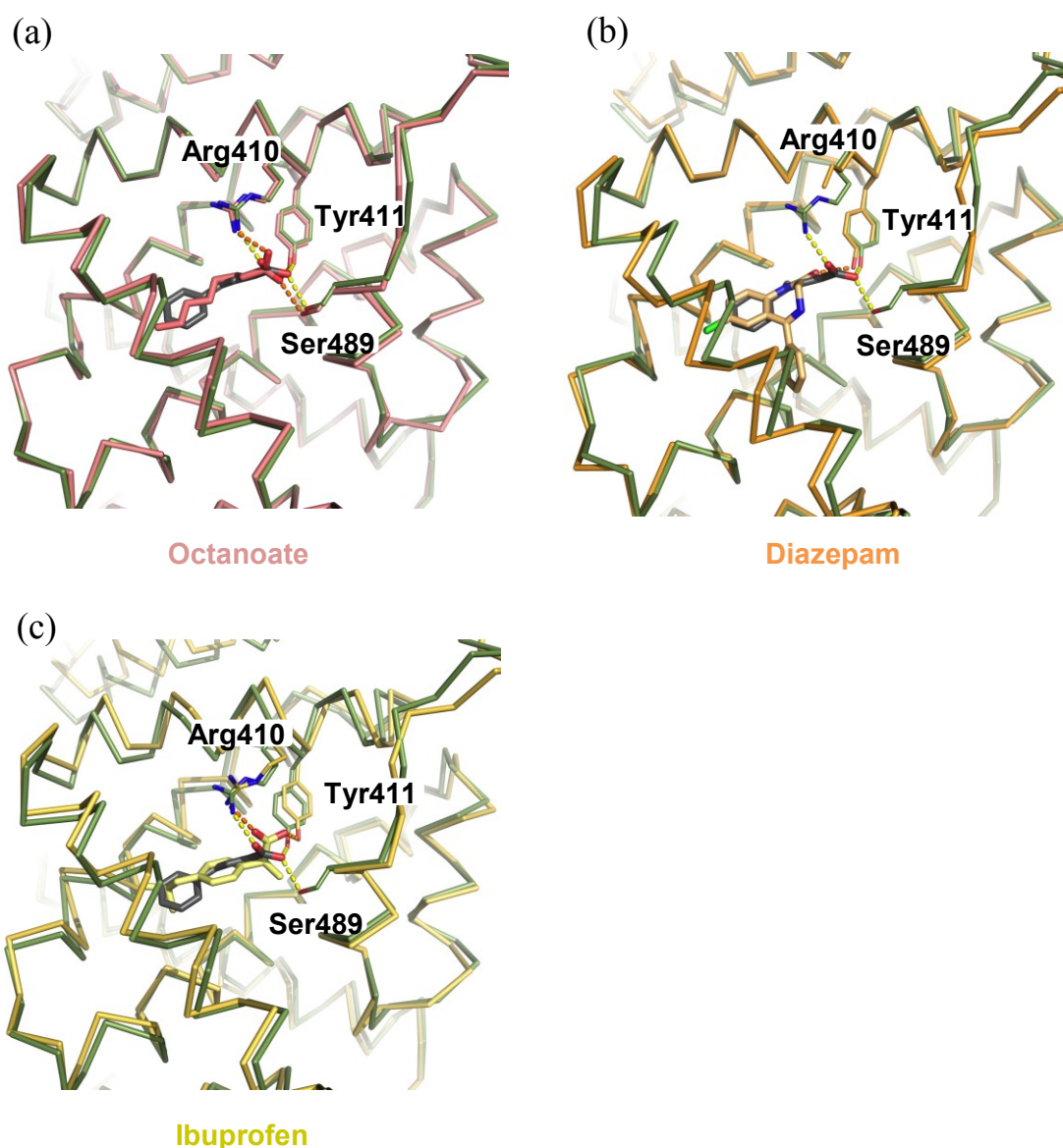


Fig. 17. Comparisons of the binding sites of Oct, diazepam and ibuprofen.

The structures of the HSA-Oct-N-AcMet complex (a, PDB code 5x52⁵⁵), the HSA-diazepam complex (b, PDB code 2bxf⁵⁶) and the HSA-ibuprofen complex (c, PDB code 2bxg⁵⁶) are superimposed on the HSA-PB complex. The HSA-PB complex, the HSA-Oct-N-AcMet complex, the HSA-diazepam complex and the HSA-ibuprofen complex structures are shown as ribbon representations colored green, pink, orange, and yellow, respectively. The PB, Oct, diazepam and ibuprofen molecules are shown as stick representations, and their carbon atoms are colored gray, pink, orange and yellow, respectively. Hydrogen bonds are shown as yellow (between HSA and PB) or orange (between HSA and the other ligands) dashed lines.

第 5 節 PB の結合におけるリガンドの影響

5-1 内因性物質と PB 間の相互作用

血漿中の HSA 濃度は、肝疾患、ネフローゼ及び慢性腎臓病などの病態時には減少し¹⁷⁾、遊離脂肪酸、ビリルビン及び尿毒症物質などは増加する。このような状況下では、PB の HSA への結合性が変化し、薬物動態並びに薬理効果が変動する可能性が考えられる。そこで内因性物質として脂肪酸、ビリルビン及び尿毒症物質として知られるインドキシル硫酸について、PB の HSA への結合に与える影響を検討した。

中鎖脂肪酸であるオクタン酸は、PB の結合を低濃度から阻害したのに対して、長鎖脂肪酸であるミリスチン酸及びオレイン酸は、低濃度における阻害作用がオクタン酸と比較して低く、濃度上昇に伴い PB の結合を阻害することが明らかとなった (Fig. 18)。これは X 線結晶構造解析からも明らかのように、中鎖脂肪酸であるオクタン酸がサイト II に結合し、PB の結合を競合的に阻害しているのに対して (Fig. 17a)、長鎖脂肪酸は、サイト I 及びサイト II 以外の脂肪酸結合サイトに優先的に結合することで^{57,58)}、HSA のコンフォメーション変化を惹起して結合サイトの微環境に影響を及ぼすためと考えられる^{59,60)}。また、ビリルビンは高濃度において PB の結合を阻害し (Fig. 19a)、尿毒症物質であるインドキシル硫酸についても PB の結合を阻害した (Fig. 19b)。これらの結果より、病態時においては、内因性物質の増加により PB の遊離型分率が変化し、その結合特性に変化を及ぼす可能性が示唆された。

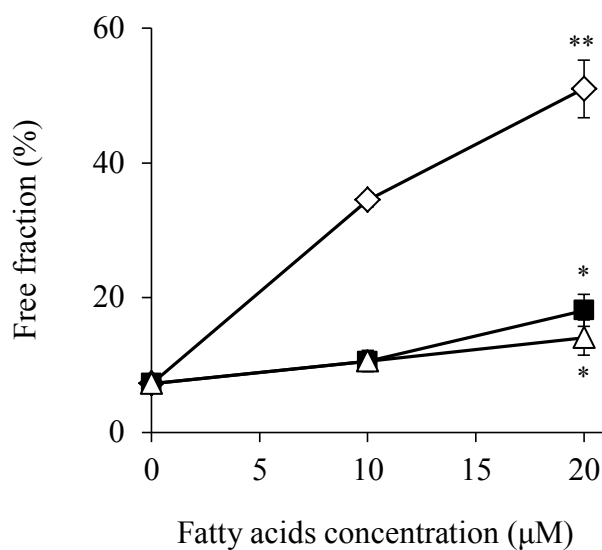


Fig. 18. Effect of octanoic acid (◇), oleic acid (△) and myristic acid (■) in PB binding to HSA at pH 7.4 and 25 °C.

Each point represents the mean±S.D. (n=3). *, P < 0.05 in comparison with ligands 0µM. **, P < 0.01 in comparison with ligands 0µM.

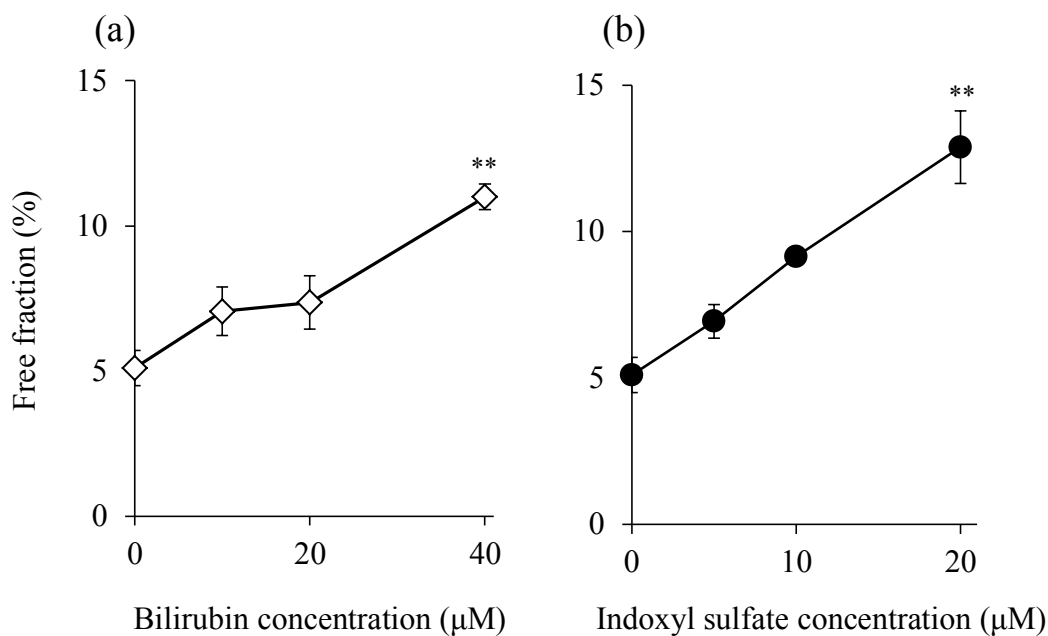


Fig. 19. Effect of bilirubin (◇) and indoxyl sulfate (●) in PB binding to HSA at pH 7.4 and 25 °C.

Each point represents the mean±S.D. (n=3). **, P < 0.01 in comparison with ligands 0µM.

第6節 考察

ヒト血清中での薬物結合を担っている主要タンパク質である HSA は、血清中に最も多く存在し、主に酸性薬物を結合することから、PB の結合タンパク種である可能性が考えられる。しかし、主要結合分子種と想定される HSA において、PB がどのような様式で結合するののかに関する報告は少なく、結合サイトの同定をはじめとする PB の HSA への結合様式の解明は、PB の薬物動態並びに薬理効果を検討するうえで意義深い。そこで本章では、PB の血清中における各種タンパク質への結合を評価するとともに HSA への結合様式の解明を行った。ヒト血漿及びその主要タンパク質を用いた結果より、PB は AAG や γ -グロブリンではなく HSA に結合していることが示された (Fig. 3)。これらのデータは Boudalas らの報告と一致しており³²⁾、 γ -グロブリンの寄与については新たな知見であった。PB は HSA と高い親和性で 1 : 1 の複合体を形成していることが明らかとなった。一方、PA は主に HSA へ結合していたが、その結合は低く、PG はいずれのタンパク質へも結合していなかった (Table 1)。PB は PA に代謝された後、グルタミンと結合して PG となり、残余窒素の排泄が可能となる (Fig. 1)。それ故に PA 及び PG の低い親和性はグルタミン抱合体の形成やその排泄につながり、PB の尿素サイクル異常症に対する薬理効果に寄与しているのかもしれない。

蛍光プローブ置換実験より、PB は HSA のサイト II に結合していると考えられた。この結合様式並びに結合サイトの構造を明らかにするために、まず、PB の関連構造化合物を用いた検討を行った。その結果、M-PB において結合が低下したことから、結合には PB のカルボキシル基の静電的相互作用の関与が示唆された。また、PB のフェニル基とカルボキシル基間のアルキル側鎖数に応じて、結合定数が明らかに変化し、さらに、アルキル側鎖のメチレン数を 5 (PC) まで増加させるとそれに伴い結合定数も増加していた (Tables 1, 2 及び Fig. 5)。アルキル側鎖の長さは、分子サイズ及び分子の疎水性と密接に関係している。従って、PB のサイト II への結合には、疎水性相互作用または及び van der Waals 力が関与していること、さらには、サイト II が PC に相当するサイズの分子を許容する至適サイズを持ち合わせていることが示唆された。これらの結果は、Wanwimolruk らが、脂肪酸を用いた実験に基づいて報告した知見とよく一致している⁵⁷⁾。Roy らは、分光学的及び分子動力学的手法を使用して、PB

のサイト II への結合は、サイト I 近傍に存在する ^{214}Trp 周辺の疎水性を増加させることを報告している⁶¹⁾。今回の研究においては、サイト I に結合するワルファリンの蛍光強度が PC 及び PH ほどではないが、PB 添加時に増大していた (Fig. 6c)。このことから、PB、PC 及び PH のサイト II への結合は、サイト I に結合するリガンド近傍の環境を変化させるという、アロステリックな影響が示唆された。以上のように、PB の結合によって HSA における結合部位の構造変化が引き起こされ、また、その結合には、複数の相互作用が関与しており、水素結合、van der Waals 力、疎水性相互作用及び静電的相互作用などが寄与していると推察された。さらに、これらの相互作用に関与している HSA 分子上のアミノ酸残基を特定するため、化学修飾体や部位特異的変異体を用いた検討を行った結果、PB はサイト II の ^{410}Arg 及び ^{411}Tyr と相互作用していることが示唆された。HSA の構造において、サイト II はその大半が無極性のポケットであり、 ^{410}Arg 及び ^{411}Tyr の側鎖が極性部分としてポケットの入り口付近に存在している⁵¹⁾。PB の構造とサイト II 領域の構築から推定すると、PB のカルボキシル基のカルボニル部分は ^{411}Tyr のフェノール性水酸基と水素結合を形成し、カルボキシル基のイオン化酸素は ^{410}Arg のグアニジノ部分と静電的に相互作用しているものと考えられた。一方、PB のフェニル基及びアルキル側鎖はサイト II の非極性領域に疎水性相互作用や van der Waals 力により配位していると考えられたが、この推論は、HSA-PB 複合体の X 線結晶構造解析により実証された。(Figs. 16a 及び b)。また、サイト II に結合することが知られるジアゼパムと相互作用様式を比較すると、PB のフェニル基はジアゼパムのベンゾジアゼピン骨格の六員環部分と重なっていた (Fig. 17b)。同様に、サイト II に結合するイブプロフェンと相互作用様式を比較すると、PB とイブプロフェンに存在するカルボキシル基は、共に ^{410}Arg と ^{411}Tyr に水素結合しており、さらにアルキル側鎖もほぼ同じ部位に結合していた (Fig. 17c)。よって、PB は、これまでに報告されているサイト II 結合薬物、特にイブプロフェンと同様の相互作用様式で HSA に結合していることが明らかとなった。

以上のようなサイト II への PB の特異的結合は、併用薬や各種疾患時に蓄積された内因性物質あるいはタンパク質修飾に影響される。イブプロフェン、ジクロフェナク、ジアゼパム及びクロフィブラートは、いずれもサイト II に強く結合し¹⁹⁾、PB を置換する可能性がある。特にイブプロフェンは、本研究でもサイト II において、PB の結合を競合的に阻害することが

明らかとなった (Figs. 9a 及び b) . また, 腎疾患患者の体内に蓄積した複数の尿毒症物質及び遊離脂肪酸も, サイト II へのリガンドの結合阻害作用を示す^{57,62,63}. 本研究において, PB の結合に対するこれらの阻害作用が明らかとなった (Figs. 18 及び 19) . なかでも脂肪酸における検討では, PB の結合阻害の様式が脂肪酸のアルキル側鎖数により異なっていた (Fig. 18) . 脂肪酸結合サイトは, HSA 分子上に複数存在している. 中鎖脂肪酸は, PB が結合するサブドメイン IIIA の高親和性サイトへ優先的に結合するが, 長鎖脂肪酸は, HSA に対して 2 倍量の濃度まではサブドメイン IIIA 以外に高親和性サイトを有していることが知られている⁶⁴. 従って, 長鎖脂肪酸による PB の結合の阻害は, 長鎖脂肪酸が主にドメイン I に存在する脂肪酸結合サイトへ結合することによるアロステリックなものであると考えられる⁶⁵. 生体内にはオレイン酸, パルミチン酸などの長鎖脂肪酸が主に存在している⁶⁶. 一般に, 血中で HSA に対して 0.1~2.0 倍量のモル濃度で存在している脂肪酸は⁶⁷, 過度な運動, 糖尿病や循環器系疾患によって 6 倍程度にまで上昇することが知られている⁶⁸⁻⁷¹. また, ビリルビンは肝炎や胆汁うっ滞症により血中濃度が上昇し, 特に先天性疾患である Crigler-Najjar 症候群においては, 非抱合型ビリルビン濃度が約 100 倍まで上昇する^{72,73}. ビリルビンの高親和性サイトはサイト I であるが⁷⁴, 長鎖脂肪酸同様, 高濃度において, PB の結合を阻害することが本章の結果より明らかとなった (Fig. 19a) . 一方, 透析患者においては, インドキシル硫酸の血中濃度が 60 倍程度まで上昇することが報告されており⁷⁵, これらによって, PB の血清タンパク結合が影響を受ける可能性は十分に考えられる. 以上のようなリガンドによる影響に加えて, HSA の変化による影響も考慮する必要がある. 例えば, 透析患者では, HSA の酸化によるサイト II 薬物の結合の低下³⁶や肝障害患者においても, サイト II へのリガンド結合に対して顕著な阻害が報告されている^{37,38}. さらに, 疾患に伴う血漿タンパク質の濃度変化によっても PB のタンパク結合は変化する. AAG は血漿中における PB のタンパク結合への寄与は, さほど大きくないが (Fig. 4) , 全身的な組織障害, 炎症あるいは感染状態の場合は AAG の血漿中濃度が正常値と比較して 10 倍にまで上昇するため^{76,77}, このような状態においては, HSA のみならず AAG に対する結合についても検討が必要となる. このように, 今回得られた PB のヒト血漿タンパク結合に関する知見は, 様々な臨床状態における PB の薬物動態及び薬理学的な影響の解明に有用であると考えられる.

第7節 小括

本章では, HSA における PB, その代謝物及び関連構造化合物の結合特性を限外濾過法, 蛍光プローブ置換実験及び X 線結晶構造解析により解析し, 臨床応用の際に重要な相互作用についても検討を行った. 以下に得られた結果を要約する.

- 1) ヒト血漿において PB の主要結合タンパク分子種はアルブミンであった. PB, その代謝物及び関連構造化合物は, HSA においてサイト II へ特異的に結合しており, その親和性はフェニル基とカルボキシル基間のアルキル側鎖長に依存し, また, 結合には至適サイズの存在が判明した.
- 2) HSA-PB 結合は, 発熱的でエンタルピーの寄与が大きく, 水素結合や van der Waals 相互作用が重要な役割を果たしていると推察された.
- 3) PB の結合は, 非イオン性界面活性剤である PLE 及び NaCl 存在下で阻害されることから疎水性相互作用及び静電的相互作用の関与が示唆された.
- 4) PB のカルボキシル基は HSA におけるサイト II 領域の ⁴¹¹Tyr, ⁴¹⁰Arg 及び ⁴⁸⁹Ser の側鎖と静電的相互作用し, フェニル基及びアルキル側鎖は疎水性ポケットと van der Waals 相互作用しており, また, イブプロフェンと類似の様式で結合していることが明らかとなった.
- 5) PB の結合は, 脂肪酸, ビリルビン及びインドキシル硫酸によって阻害され, 病態時における PB の薬物動態及び薬理効果に影響を及ぼす可能性が示唆された.

以上の結果から PB の結合サイトの微環境が解明され, 各種疾患に対する臨床応用の際, 薬効及び副作用発現について検討する基礎的情報が示された.

第3章 動物種アルブミンにおけるPBの結合解析

第1節 序

前章では、PBのヒト血漿における結合特性を詳細に検討し、PBがサイトIIに結合することやその結果、各種疾患において、PBの薬物動態及び薬理効果が変動する可能性が示唆された。前述の通り、PBは、その多様な薬効から様々な疾患への臨床応用が期待されている^{5,14)}。今後、PBを新たな疾患に適応する場合、ヒトにおける基礎データのみならず、各種病態動物を用いた検討が必要になり、その際には、薬物動態を考慮した開発が必要である。哺乳動物のアルブミンには、ヒトアルブミンのサイトI及びサイトIIに相当する結合部位の存在が示唆されている³⁰⁾。しかしながら、動物種によって結合部位の構造的差異も報告されており³¹⁾、ヒトにおける結合特性のみではなく、利用する動物種毎の検討が不可欠である。

そこで本章では、ウシ、ウサギ及びラット由来のアルブミンにおけるPBの結合特性を評価し、さらに、ドッキングシミュレーションを用いて、PB結合部位における相互作用様式を確認し、PBの結合における種差の解明を試みた。

第2節 哺乳動物の血漿におけるPBの結合タンパク種の同定

2-1 限外濾過法

前章の検討と同様に、今回用いたウシ、ウサギ及びラットの血漿において、PBの結合タンパク種がアルブミンであるかを限外濾過法により確認した。各動物の血漿及びアルブミンに対するPBの結合率を、前章にて得られたヒトアルブミンにおけるものと比較した(Table 5)。その結果、いずれの動物種においてもPBは、血漿中で主にアルブミンに結合していると考えられた。

Table 5. Binding of PB to plasma and albumin at pH 7.4 and 25 °C.

The concentration of albumin in the pH 7.4 buffer was 600 μ M, corresponding to the concentration in plasma.

Species	Bound fraction (%)	
	Plasma	Albumin
Human	98.15 \pm 1.20	99.68 \pm 0.60
Bovine	98.57 \pm 0.08	99.65 \pm 0.05
Rabbit	98.43 \pm 0.02	99.60 \pm 0.04
Rat	97.52 \pm 0.25	99.65 \pm 0.13

The results are means \pm S.D. (n=3).

第3節 PB, その代謝物及び関連構造化合物の結合パラメータ

3-1 限外濾過法

動物種アルブミンにおける PB の結合パラメータを算出するために Scatchard 解析を行った (Fig. 20) . 本章では, 高親和性及び低親和性サイトの両方について検討し, その結果を Table 6 に示した. PB の高親和性サイト数 (n_1) は, すべての動物種アルブミンにおいて 1 であり, 低親和性サイト数 (n_2) は, 動物種間で差異がみられた. ヒト及びウシにおける高親和性サイトに対する結合定数 (K_1) は, ウサギ及びラットアルブミンと比較して高く, また, ウサギアルブミンが最も低値を示した. このように, PB のアルブミンへの結合において種差の存在が示唆された.

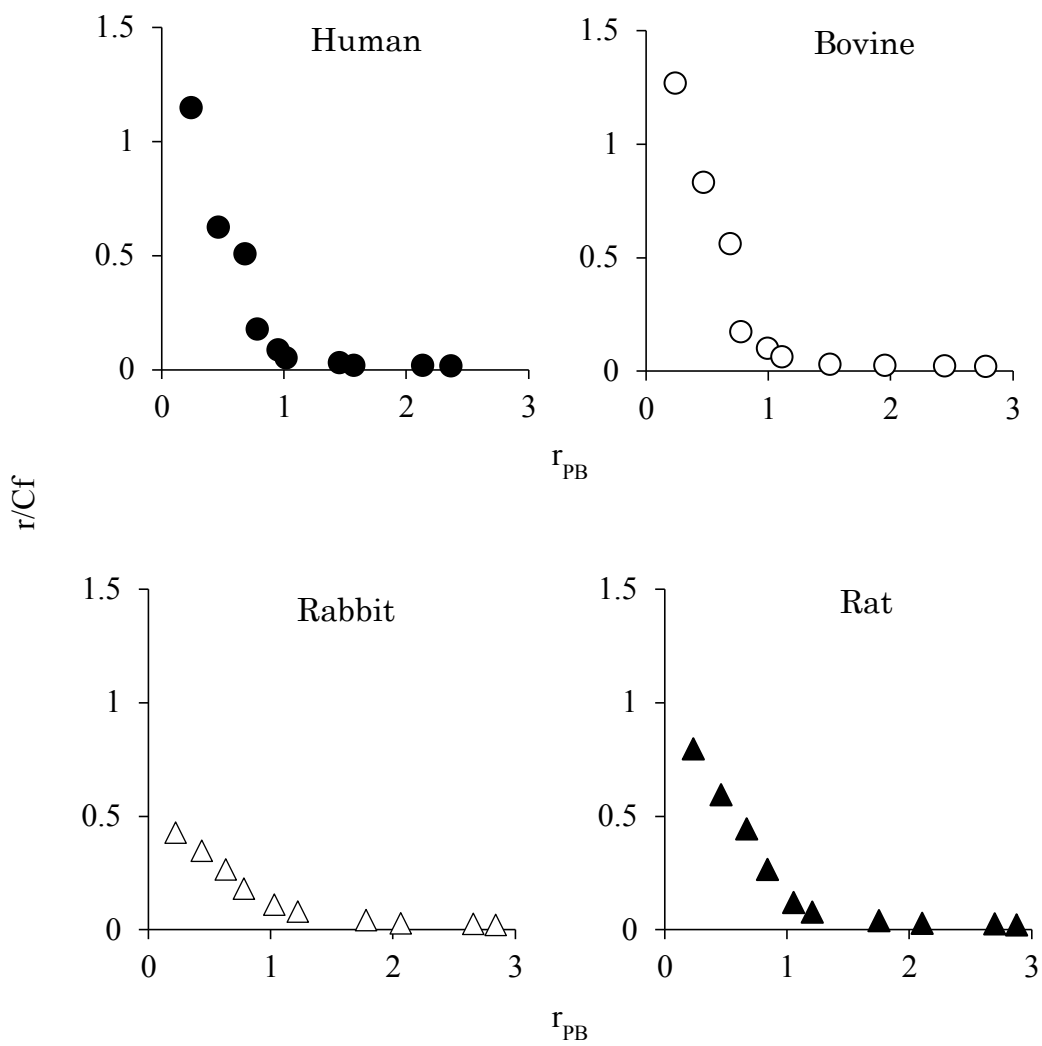


Fig. 20. Scatchard plots of the binding of PB to human (●), bovine (○), rabbit (△) and rat (▲) albumins at pH 7.4 and 25 °C (20 μM).

Table 6. Binding parameters of PB to albumins at pH 7.4 and 25 °C.

Species	n_1	K_1 ($\times 10^5 M^{-1}$)	n_2	K_2 ($\times 10^3 M^{-1}$)
Human	1.00±0.04	13.9±0.7	4.49±0.83	8.15±2.35
Bovine	1.02±0.03	12.8±1.7	5.74±0.58	6.45±1.07
Rabbit	1.26±0.05	4.11±0.72	5.38±0.58	8.33±1.59
Rat	1.16±0.05	8.94±2.15	6.18±0.25	6.93±0.29

The results are means \pm S.D. (n=3).

さらに、動物種アルブミンにおける PB, その代謝物及び関連構造化合物の高親和性サイトの結合パラメータについても確認を行った。代謝物である PG は、前章のヒトアルブミン同様に、いずれの動物種アルブミンにおいても親和性が低く、結合定数の算出が不可能であったため、PG 以外について比較を行った (Table 7) 。その結果、これらの化合物は、いずれの動物種アルブミンにおいても PB 同様、高親和性サイト数は 1 であることが確認された。一方、アルブミンへの親和性は各々異なり、PA, PP 及び M-PB は、PB よりも低い結合定数を示したが、PV, PC 及び PH は、PB より高い結合定数を示した。PA, PP, PB, PV, PC 及び PH における結合定数を比較すると、ヒトアルブミン同様に分子のフェニル基とカルボキシル基間のメチレン数に依存しており、疎水性相互作用の関与が示唆された。また、ヒト及びウシアルブミンにおいて結合定数が最も高かったのは、メチレン数が 5 の PC であったが (Fig. 21) , ウサギ及びラットアルブミンにおいては、このような明確な値の違いは確認できなかった。M-PB は、いずれの動物種アルブミンにおいても PB より親和性が著しく低下していたことから、ヒトアルブミン同様に、PB のカルボキシル基が静電的相互作用していることが示唆された (Table 7) 。

Table 7. Binding parameters of PB and structurally related compounds to HSA at pH 7.4 and 25 °C.

	Parameters	Human	Bovine	Rabbit	Rat
PB	n_1	0.87±0.03	1.02±0.10	1.17±0.04	1.20±0.10
	$K_1(\times 10^5 M^{-1})$	13.7±2.1	13.2±1.5	4.01±0.70	8.42±2.05
PA	n_1	1.11±0.35	1.12±0.11	1.03±0.18	1.05±0.18
	$K_1(\times 10^5 M^{-1})$	0.53±0.35	0.45±0.17	0.42±0.12	0.49±0.27
PP	n_1	1.09±0.12	1.17±0.05	1.04±0.20	1.16±0.04
	$K_1(\times 10^5 M^{-1})$	4.86±0.64	3.91±0.56	3.01±0.18	4.76±0.31
PV	n_1	0.90±0.08	0.94±0.02	1.24±0.10	0.96±0.09
	$K_1(\times 10^5 M^{-1})$	20.1±6.9	16.4±1.36	12.1±1.9	16.1±3.9
PC	n_1	1.30±0.10	1.16±0.05	1.26±0.03	1.21±0.03
	$K_1(\times 10^5 M^{-1})$	29.9±1.7	26.9±2.3	18.3±1.3	20.2±2.0
PH	n_1	0.91±0.03	1.22±0.10	1.25±0.09	1.28±0.17
	$K_1(\times 10^5 M^{-1})$	25.8±0.4	21.8±2.9	17.6±1.3	18.4±1.8
M-PB	n_1	1.08±0.18	1.12±0.15	1.11±0.21	1.10±0.13
	$K_1(\times 10^5 M^{-1})$	0.52±0.22	0.44±0.17	0.46±0.19	0.34±0.15

The results are means ± S.D. (n=3).

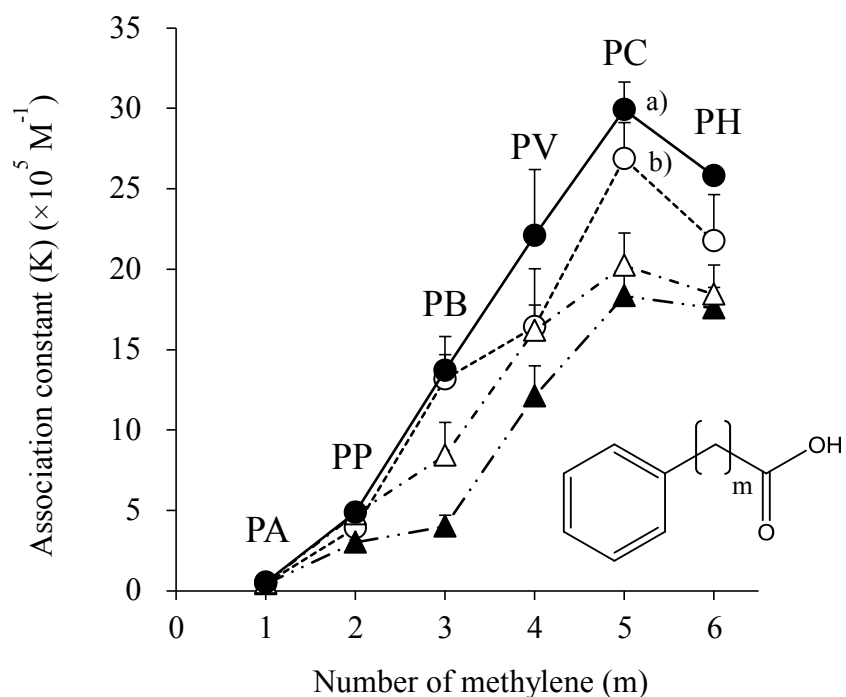


Fig. 21. Effect of the number of methylene units in PB and its structurally related compounds on their association constants (K) for binding to human (●), bovine (○), rabbit (▲) and rat (△) albumins.

Association constants are the value at pH 7.4 and 25 °C. Each point represents the mean \pm S.D. (n=3). [#] PB was used in the form of the sodium salt. ^{a)} $p < 0.05$ and 0.01 in comparison with PV and PH, respectively. ^{b)} $p < 0.01$ and 0.05 in comparison with PV and PH, respectively.

3-2 蛍光プローブ置換実験

これまでの研究から動物種アルブミンにおいて、ワルファリン及びダンシルサルコシンは、それぞれヒトアルブミンにおけるサイト I 及びサイト II に相当する部位への結合が確認されている^{30,31,78}。前章のヒトアルブミンにおける検討と同様に、これらを蛍光プローブとして利用し、動物種アルブミンにおける PB, その代謝物及び関連構造化合物の結合サイトの比較を行った (Figs. 22 及び 23)。

PB は、いずれの動物種アルブミンにおいてもダンシルサルコシンの蛍光強度を減少させる一方で、ワルファリンの蛍光強度は、わずかに増加あるいは変化させなかった。これより、ウシ、ウサギ及びラットアルブミンにおける PB の結合部位は、ヒトアルブミンにおけるサイト II に相当する領域であることが示唆された。PB の関連構造化合物である PA, PP, PV, PC 及び PH もいずれの動物種アルブミンにおいて、ダンシルサルコシンの蛍光強度を減少させており (Fig. 22), これらの化合物もヒトアルブミンにおけるサイト II に相当する部位への結合が示唆された。また、ダンシルサルコシンの蛍光強度減少の程度は、ヒトとウシアルブミン、ウサギとラットアルブミンがそれぞれ類似していた。PA, PP, PB, PV 及び PC の場合、動物種アルブミンにおけるワルファリンの蛍光強度は微増あるいは変化がなかった。一方、PH はヒト及びウシアルブミンにおいて、ワルファリンの蛍光強度を著しく増加させており (Figs. 23A 及び B), PH の結合によりアルブミンの広範囲な構造変化によるものと推察された。また、PB の結合特性は、ウシアルブミンが最もヒトアルブミンに類似していることが示された。

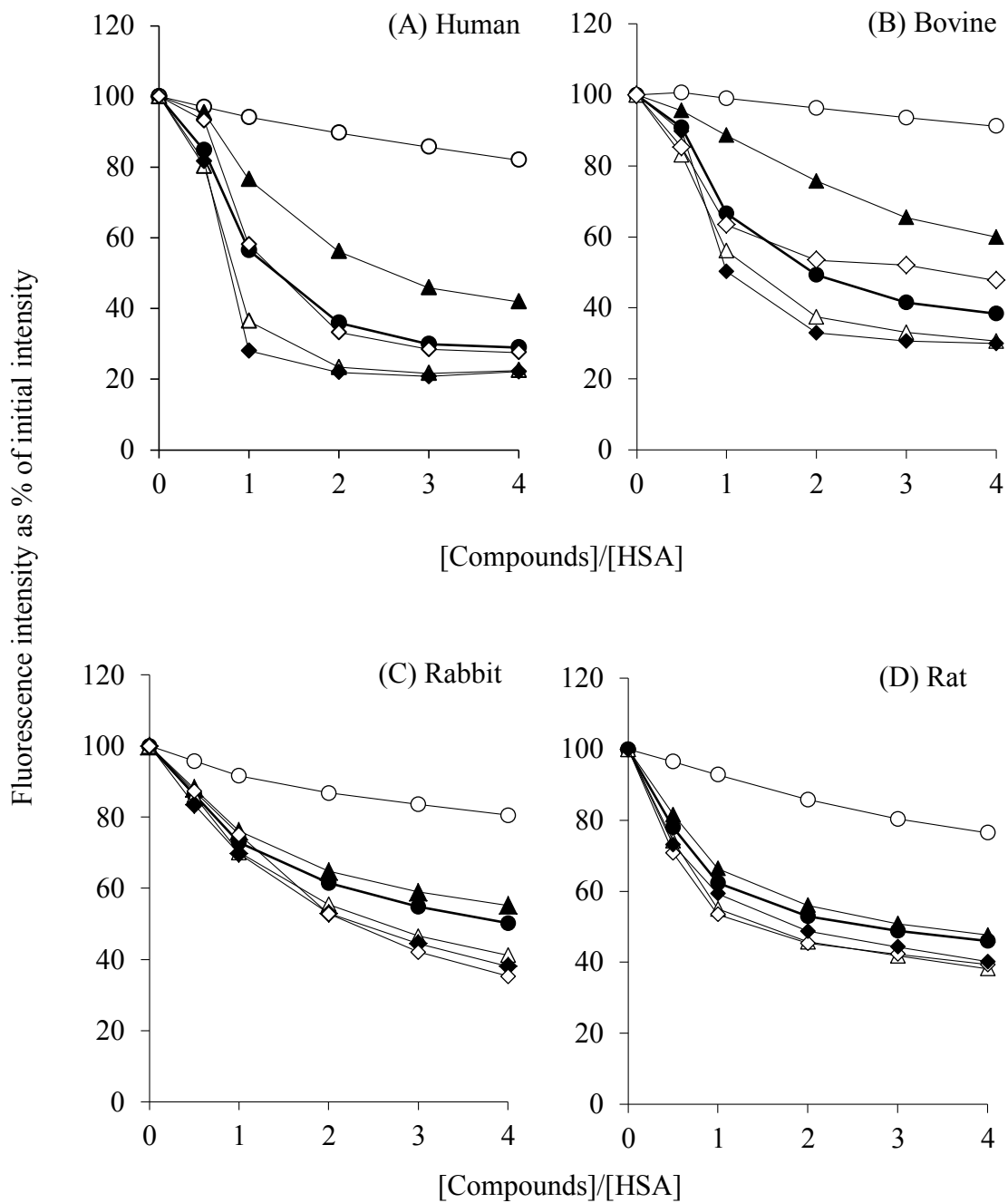


Fig. 22. Effects of PB and structurally related compounds on the fluorescence intensity of dansylsarcosine bound to human (A), bovine (B), rabbit (C), rat (D) albumins at pH 7.4 and 25 °C.

Displacers used were PB (●), PA (○), PP (▲), PV (△), PC (◆) and PH (◇). The following concentrations were used: albumin, 20 μ M and dansylsarcosine, 2 μ M.

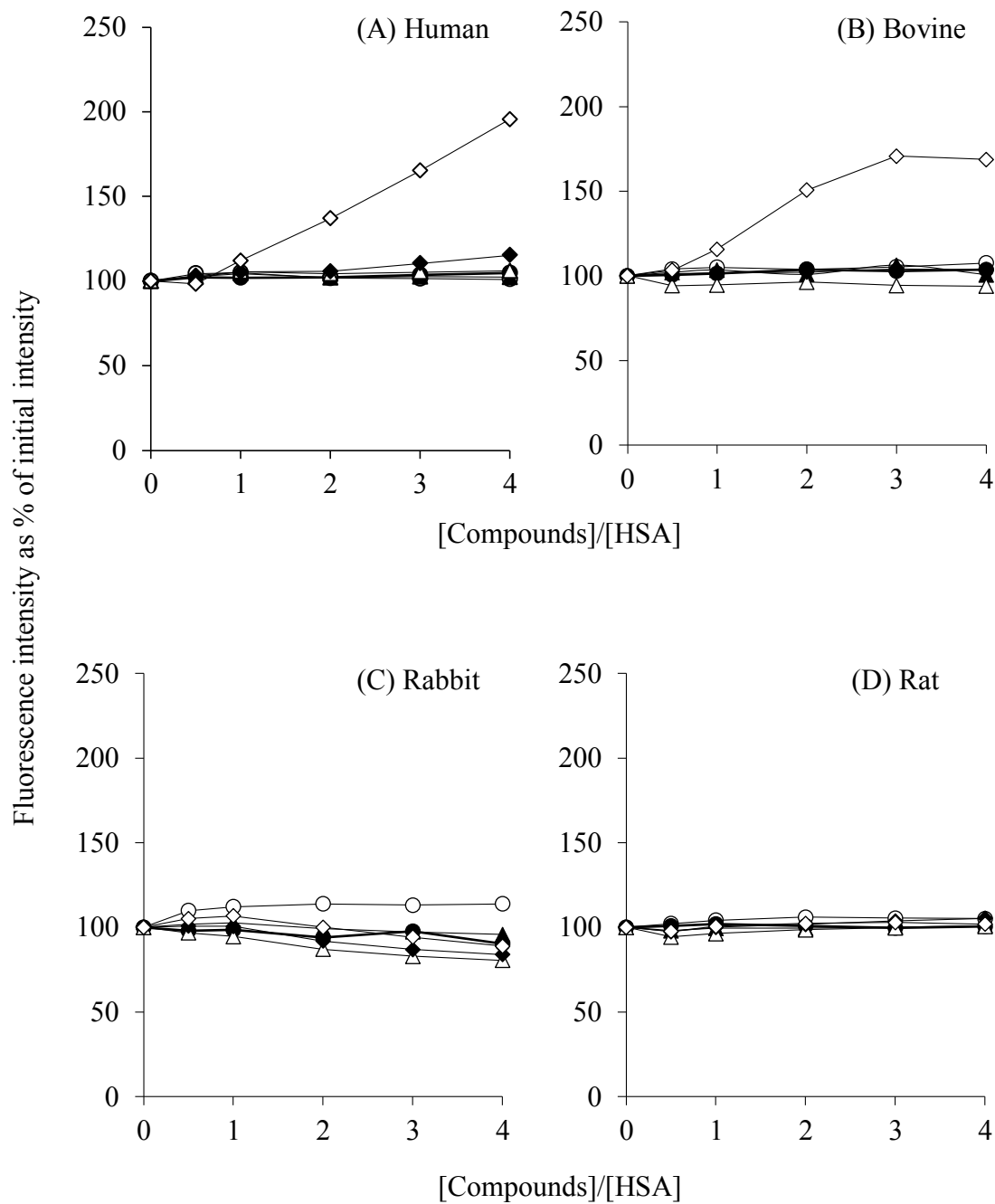


Fig. 23. Effects of PB and structurally related compounds on the fluorescence intensity of warfarin bound to human (A), bovine (B), rabbit (C), rat (D) albumins at pH 7.4 and 25 °C.

Displacers used were PB (●), PA (○), PP (▲), PV (△), PC (◆) and PH (◇). The following concentrations were used: albumin, 20 μ M and warfarin, 2 μ M.

3-3 ドッキングシミュレーション

分子ドッキングシミュレーションにより、アルブミン-リガンド複合体の結合部位における相互作用に関する情報を得ることができる⁷⁹⁾。今回用いた動物種アルブミンのなかで、ラットアルブミンの X 線結晶構造は明らかとなっていないため、X 線結晶構造が解明されているヒト、ウシ及びウサギ由来のアルブミンを用いて検討を行った。また、蛍光プローブ置換実験の結果より、いずれの動物種アルブミンにおいても PB, その代謝物及び関連構造化合物は、ヒトアルブミンのサイト II に相当する特定部位へ結合していることが示されたことから、サイト II の位置するサブドメイン IIIA の結合領域におけるドッキングシミュレーションを行った (Fig. 24)。

得られたドッキングポーズより、いずれの動物種アルブミンにおいても PB のフェニル基及びアルキル側鎖は, Leu, Ile, Phe 及び Val など構成された疎水性領域に位置しており, PB のカルボキシル基は, 疎水性ポケット入口の Arg や Tyr, Lys 付近に位置していた。前章の HSA-PB 複合体から得られた X 線結晶構造解析の結果同様に, ヒトアルブミンにおいて PB のカルボキシル基は, ⁴¹⁰Arg/⁴¹¹Tyr に近接していた (Fig. 24A)。ウシ及びウサギアルブミンにおいて, PB のカルボキシル基はそれぞれ ⁴⁰⁹Arg/⁴¹⁰Tyr/⁴²²Lys 及び ⁴¹⁰Arg/⁴¹⁴Lys に隣接していた (Figs. 24B 及び C)。関連構造化合物である PA, PP, PV, PC 及び PH のカルボキシル基の位置は, PB のカルボキシル基の位置と類似していたが, 一方で, 側鎖の延長に伴いアルキル側鎖並びにフェニル基は, PB とは異なる位置で相互作用していることが明らかとなった。また, PC 及び PH のようなアルキル側鎖の長い化合物においては, その構造に著しいねじれがみられた。

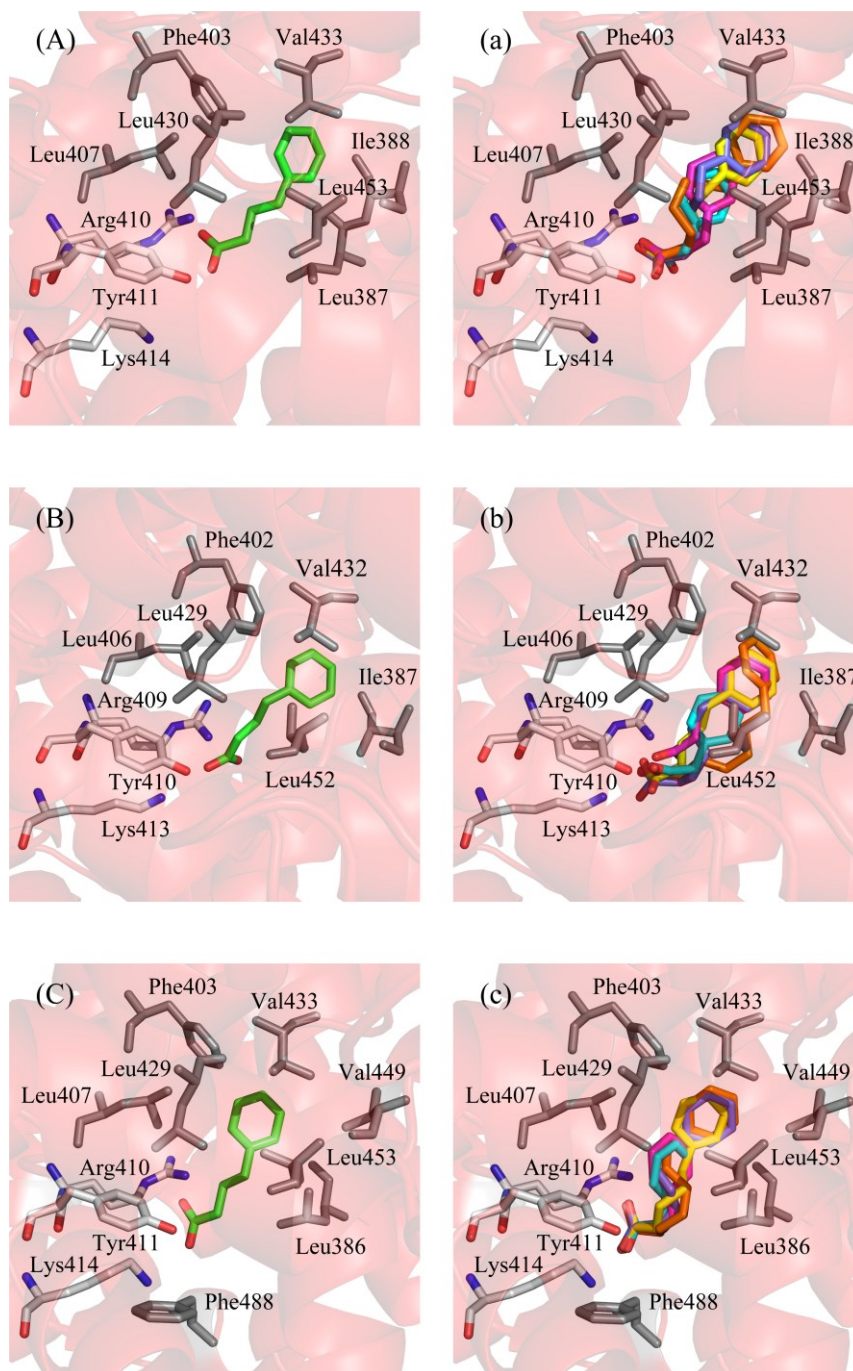


Fig. 24. Molecular docking of PB and structurally related compounds at the site in subdomain IIIA.

Albumin species are shown human (A, a), bovine (B, b) and rabbit (C, c). Docking poses of PB (green stick) and structurally related compounds (PA; cyan, PP; magenta, PV; yellow, PC; slate, PH; orange) are shown in A-C and a-c, respectively. Hydrophilic and hydrophobic amino acid residues mentioned were depicted in white and gray sticks, respectively. Oxygen and nitrogen atoms of the ligands and hydrophilic residues are color-coded in red and blue, respectively. The illustrations were made by Pymol.

Fig. 25 に、得られたドッキングエネルギーの結果を示す。化合物間のドッキングエネルギーは、アルキル側鎖数に依存していた。ヒト及びウシアルブミンにおいて、最もエネルギーが低く安定な構造を示していたのは、メチレン数 4 の PV であり、よりアルキル側鎖の長い PC 及び PH のドッキングエネルギーは、PV と比較して明らかに増加していた。また、ウサギアルブミンにおいては、このような明確なドッキングエネルギーの変化は確認できなかった。さらに、ドッキングエネルギーを動物種アルブミン間で比較すると、ウサギアルブミンが最も高く、ヒトとウシアルブミンの値が類似しており、これは、ウサギアルブミンへの PB の親和性が、ウシ及びヒトアルブミンへの親和性よりも低いという限外濾過法の結果と一致していた。

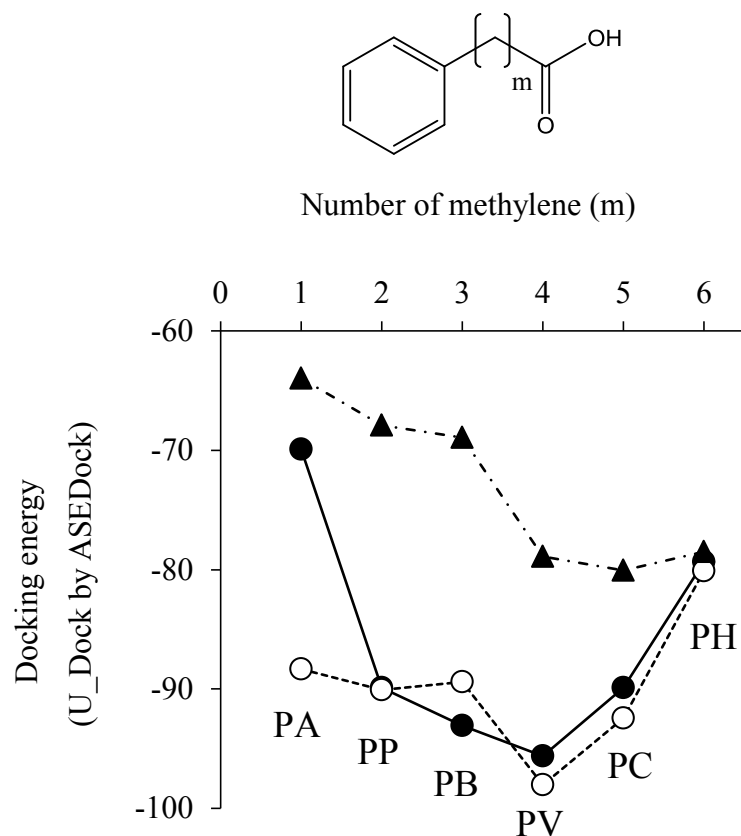


Fig. 25. Effect of the number of methylene units in PB and structurally related compounds on their docking energy for binding to human (●), bovine (○) and rabbit (▲) albumins.

第4節 考察

各動物種アルブミンは、高い相同性や類似性があるにも関わらず²⁷⁾、その薬物結合特性には種差が報告されている^{30,31,80)}。このようなタンパク結合における動物種間の差異は、薬物動態において種差を引き起こす要因になり得る。前章では、PBのヒトアルブミンにおける結合特性を解明した。PBは、その多様な薬理作用が細胞及び動物レベルで確認されている。各種疾患へのPBの臨床応用を視野に入れた場合、動物におけるデータを薬物動態と関連付けて解釈する必要性が生じる。そこで本章では、PBのタンパク結合における種差について詳細な検討を行った。ヒトアルブミン同様に、PBは今回用いた各動物種の血漿中でアルブミンに結合しており (Table 5) 、いずれの動物種アルブミンも高親和性サイトと、複数の低親和性サイトを有していることが示唆された。高親和性サイトにおける結合定数は、ヒトに次いでウシアルブミンが高く、ウサギアルブミンが最も低かった。さらに蛍光プローブ置換実験より、ウシ、ウサギ及びラットアルブミンにおけるPBの高親和性サイトは、ヒトアルブミンにおけるサイトIIに相当することが示唆された。Kosaらは、これまでに5つの動物種アルブミン (ヒト、ウシ、イヌ、ウサギ及びラット) へのサイトII薬物であるイブプロフェン及びジアゼパムの結合について報告している (Fig. 26)³¹⁾。

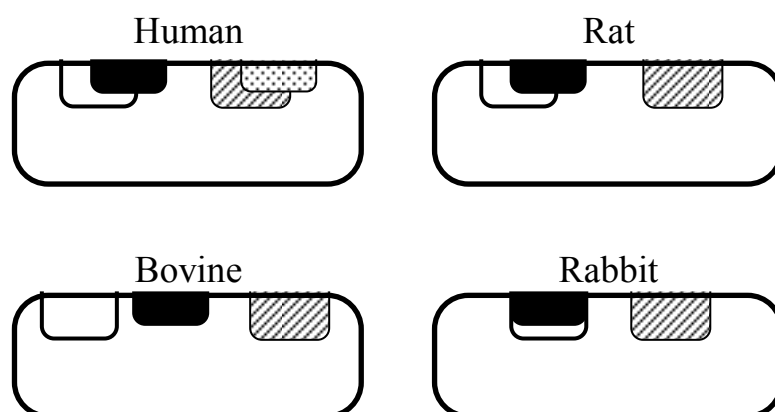


Fig. 26. Proposed model of drug binding sites on different albumins modified from Kosa *et al.* (1997).

□; warfarin binding site, ■; phenylbutazone binding site, ▨; ibuprofen binding site, ▩; diazepam binding site.

彼らは、サイト II に相当するイブプロフェンの高親和性サイトは、すべてのアルブミンに存在しているが、ジアゼパムの高親和性サイトは、ウシ、ウサギ及びラットアルブミンにおいて欠落していることを見出している³¹⁾。今回の検討で、いずれの動物種アルブミンも PB の高親和性サイトを有しており、前章の X 線結晶構造解析の結果を踏まえると、すべての動物種アルブミンにおいて、PB はイブプロフェンと同様に、ヒトアルブミンのサイト II に相当するサイトで⁴¹¹Tyr 及び⁴¹⁰Arg と相互作用していると推察された。

ところで、ウシ、ウサギ及びラットアルブミンのヒトアルブミンとの相同性は、それぞれ 75.6%、74.2%及び 73.2%であり²⁷⁾、PB の結合部位が位置するサブドメイン IIIA 領域（ヒト、ウサギ及びラットでは 384-485 位、ウシでは 383-484 位）におけるウシ、ウサギ及びラットの相同性は、それぞれ 82%、85%及び 77%と高い (Table 8) 。

Table 8. Alignment of the amino acid sequences of subdomain IIIA of albumin species.
The identity of rabbit, rat and bovine to human albumin is 85, 77 and 82%, respectively.
Data was analyzed using the BLAST.

	384		410
Human	P Q N L I K Q N C E L F E Q L G E	Y K F Q N A L L V R	
Rabbit	P K N L V K Q N C E L Y E Q L G D	Y N F Q N A L L V R	
Rat	P K N L V K T N C E L Y E K L G E	Y G F Q N A V L V R	
	383		409
Bovine	P Q N L I K Q N C D Q F E K L G E	Y G F Q N A L I V R	
	411		440
	Y T K K V P Q V S T P T L V E V S R N L	G K V G S K C C K H	
	Y T K K V P Q V S T P T L V E I S R S L	G K V G S K C C K H	
	Y T Q K A P Q V S T P T L V E A A R N L	G R V G T K C C T L	
	410		439
	Y T R K V P Q V S T P T L V E V S R S L	G K V G T R C C T K	
	441		460
	P E A K R M P C A E D Y L S V V L N Q L	D Y L S V V L N Q L	
	P E A E R L P C V E D Y L S V V L N R L	D Y L S V V L N R L	
	P E A Q R L P C V E D Y L S A I L N R L	D Y L S A I L N R L	
	440		459
	P E S E R M P C T E D Y L S L I L N R L	D Y L S L I L N R L	
	471		500
	D R V T K C C T E S L V N R R P C F S A	L E V D E T Y V P K	
	E K V T K C C S E S L V D R R P C F S A	L G P D E T Y V P K	
	E K V T K C C S G S L V E R R P C F S A	L T V D E T Y V P K	
	470		499
	E K V T K C C T E S L V N R R P C F S A	L T P D E T Y V P K	

従って、PBのアルブミンへの結合における種差を、結合サイトの一次構造のみを基に解釈することは困難であり、結合部位の立体構造を踏まえた解釈が必要と考えられた。そこで、分子ドッキングシミュレーションによる検討を行った結果、PBのカルボキシル基は、ヒト、ウシ及びウサギアルブミンのいずれにおいても Arg, Tyr 及び Lys 付近に位置し、これらのアミノ酸残基と静電的相互作用していることが示唆された (Figs. 24A, B 及び C)。一方、相互作用しているアミノ酸残基の組み合わせは、ヒト、ウシ及びウサギアルブミン各々で異なっており、それぞれ $^{410}\text{Arg}/^{411}\text{Tyr}$, $^{409}\text{Arg}/^{410}\text{Tyr}/^{413}\text{Lys}$ 及び $^{410}\text{Arg}/^{414}\text{Lys}$ であった。また、PBのフェニル基及びアルキル側鎖は Leu, Ile, Phe 及び Val で構成される疎水性領域に位置しているが、動物種によってその立体構造には違いが確認された。以上のことから、カルボキシル基と相互作用するアミノ酸残基の組み合わせや疎水性ポケットの立体構造の差異が、PBの結合における種差を引き起こしていると考えられた。ドッキングエネルギーは、アルキル側鎖の増加に伴い低下したが、特に PC 及び PH において、ドッキングエネルギーは増大した (Fig. 25)。これは、分子のねじれを表す U_{strain} が、ドッキングエネルギーにネガティブな寄与をしたためと考えられた。すなわち、PC や PH のような大きな分子が、あるサイズを有するポケットに結合しようとする際に生じる分子のねじれが原因と考えられる。この考察に基づけば、ヒト及びウシアルブミン上の PB 結合サイトは、PV に相当するサイズの分子を許容するサイズを有すると考えられた。一方、Fig. 24 で確認できるように、ウサギアルブミンにおける結合部位の空間的範囲は、他のアルブミンよりも明らかに狭く、このため、比較的低分子であっても分子のねじれが生じ、ドッキングエネルギーがヒト及びウシアルブミンよりも高くなったものと推察された。ラットアルブミンの X 線結晶構造は未だ得られておらず、本研究ではドッキングシミュレーションを行うことができなかった。しかしながら、動物種間における PB 及び関連構造化合物の結合定数に基づいて考察すれば、ウシ及びウサギアルブミンの中間であり (Fig. 21)、ラットアルブミンの PB 結合部位は、ウシ及びウサギアルブミンの中間のサイズを有しているかもしれない。本章の検討で、アルブミンへの親和性が最も高い関連構造化合物は、結合定数及びドッキングエネルギーで比較するとそれぞれ PC 及び PV と異なった結果となった (Figs. 21 及び 25)。これは、多くの機能性タンパク質は、ドッキングシミュレーションにおける解析とは異なり、リガンドが結合する際に立体構造の変化

を伴うような柔軟な構造を有しているためであると考えられる⁸¹⁾。

本章での検討から、ヒト及びウシアルブミンへの PB の結合における親和性並びに結合部位の構造的特徴に関する類似性が明らかとなった。また、今回得られた PB のアルブミン結合における種差のデータに基づけば、PB の薬物動態学的及び薬力学的データをウサギ及びラットを用いて取得した場合、そのデータの解釈には、ウサギ及びラットアルブミンに対するその結合特性の差異を考慮する必要があると考えられる。第 2 章でも述べた通り、ヒトアルブミンにおいて、腎及び肝不全並びに酸化ストレスに関連する疾患の場合、サイト II の結合へ特異的影響を及ぼすいくつかの因子が同定されている^{36-38,62,63)}。従って、各種病態動物を用いた薬物動態学的及び薬力学的解析を行う場合は、このような結合部位に特異的な因子の存在に関する問題を考慮しなければならない。さらに最近では、PB のみならず、その誘導体の薬理効果に関する研究も報告されている。Entin-Meer らは、一連の PB プロドラッグの中でも (ブチルオキシ) メチル PB が神経膠腫細胞株において、強力な抗腫瘍活性を有することを明らかにした⁸²⁾。また、Mimori らは、PB 誘導体としてフェニル基の代わりに異なるアルキル側鎖数、*p*-置換体及びナフタレンを有する化合物を使用している^{12,83,84)}。彼らは、PB 誘導体が主にその化学シャペロン活性によって、神経細胞死を誘発する ER ストレスを軽減させ、ナフタレン誘導体は、PB よりも強い活性を有することを報告している。以上のことから、PB 同様に各種疾患治療の可能性を有する候補として、これらの誘導体を用いて病態動物における研究及び開発が進められると予想される。その際に、本研究で得られた PB 及びその関連構造化合物 (PA, PP, PV, PC, PH 及び M-PB) のタンパク結合特性並びに種差に関する知見は、当然のことながら、有用な基礎データになり得るだろう。

第5節 小括

本章では、PB 及び関連構造化合物の動物種アルブミンにおける結合特性について詳細な検討を行った。以下に得られた結果を要約する。

- 1) PB は哺乳動物（ウシ、ウサギ及びラット）の血漿において、ヒト血漿中と同様にアルブミンが主要結合タンパク質であることが明らかとなった。
- 2) PB 及び関連構造化合物は、すべての動物種アルブミンにおいて、ヒトアルブミン分子上のサイト II に相当する部位へ結合しており、ヒトアルブミン同様に疎水性相互作用及び静電的相互作用が関与していることが示唆された。また、その親和性はヒトとウシ、ウサギとラットアルブミンが、それぞれ類似していることが判明した。
- 3) ドッキングポーズから PB のカルボキシル基は、Arg, Tyr 及び Lys と相互作用していたが、その組み合わせは動物種により異なっていた。また、アルキル側鎖及びフェニル基は、Leu, Ile, Phe 及び Val で構成される疎水性領域に位置しており、その立体構造には動物種により差異が確認された。
- 4) ヒト及びウシアルブミンにおいては、結合定数及びドッキングエネルギーから明確な結合サイトの至適サイズの存在が示唆された。また、動物種アルブミンの結合サイトにおけるサイズや電荷、疎水性などの微環境が PB の結合の種差の要因であると推察された。

以上より、PB のアルブミン結合には種差の存在が認められ、本研究で用いた動物種においてはウシアルブミンが、構造及びタンパク結合の点で最もヒトアルブミンに類似していると推察された。

第4章 総括

PB は現在、尿素サイクル異常症の治療に用いられているが、HDACs 阻害作用や小胞体ストレスの改善など多様な薬効により、さらなる臨床応用が期待されている。しかしながら、そのタンパク結合に関する情報は少なく、PB のヒトにおける薬物動態及び薬効・副作用との関係を考えるうえで、また、各種実験動物における薬物動態学的及び薬力学的データをヒトに外挿するうえで、タンパク結合の詳細を把握しておくことが重要となる。そこで本研究では、PB の HSA における結合特性並びに結合サイト構造の解明を行い、各種病態時に変動する内因性物質が PB の結合に及ぼす影響についても検討した。さらに、PB の動物種アルブミンにおける結合について検討し、その種差の解明を行った。以下に得られた知見を総括する。

1) HSA における PB の結合サイトの微環境解析 (第2章)

ヒト血漿における PB の主要結合タンパク種を検討した結果、PB は主に HSA に結合しており、他の血漿タンパク質への結合はほとんど確認できなかった。PB、その代謝物及び関連構造化合物を用いた検討より、いずれも HSA において、サイト II へ特異的に結合しており、その親和性は、フェニル基とカルボキシル基間のアルキル側鎖長に依存していた。また、サイト II の構造には、許容できる分子の至適サイズが存在していることが判明した。HSA における PB の結合特性を解明するため、熱力学的解析や関連構造化合物、界面活性剤及び電解質を用いた検討の結果、PB の結合には複数の相互作用が関与しており、水素結合、van der Waals 力、疎水性相互作用及び静電的相互作用などが寄与していると推察された。これらに関与しているアミノ酸残基を特定するため、HSA 化学修飾体及び部位特異的変異体を用いた検討の結果、⁴¹¹Tyr 及び ⁴¹⁰Arg が重要であることが明らかとなった。さらに HSA-PB 複合体の X 線結晶構造解析の結果より、PB のカルボキシル基は HSA におけるサイト II 領域の ⁴¹¹Tyr、⁴¹⁰Arg 及び ⁴⁸⁹Ser の側鎖と静電的相互作用し、フェニル基及びアルキル側鎖は疎水性ポケットと van der Waals 相互作用しており、イブプロフェンやジアゼパムと類似の様式で結合していることが明らかとなった。特にイブプロフェンは、相互作用様式の検討から PB の結合を

競合阻害することが明らかとなった。さらに、腎及び肝疾患時に変動する内因性物質である脂肪酸（特に中鎖脂肪酸）、ビリルビン及びインドキシル硫酸によっても PB の結合が阻害されることが判明した。以上の結果より、PB の HSA における結合特性並びに結合サイトの構造が解明された。また、疾患状態や併用薬などによって PB の遊離型分率が上昇し、その薬物動態に影響を及ぼす可能性が示唆された。

2) 動物種アルブミンにおける PB の結合解析（第 3 章）

PB の哺乳動物（ウシ、ウサギ及びラット）の血漿における結合タンパク分子種の同定を行った結果、ヒト血漿中と同様に いずれの動物種においてもアルブミンが主要結合タンパク質であることが明らかとなった。限外濾過法及び蛍光プローブ置換実験の結果より、PB 及び関連構造化合物は、すべての動物種アルブミンでヒトアルブミン分子上のサイト II に相当する部位へ結合しており、ヒトアルブミン同様に、疎水性相互作用及び静電的相互作用が関与していることが示唆された。また、その親和性は、ヒトとウシ、ウサギとラットアルブミンがそれぞれ類似していることが判明した。PB のドッキングポーズから、カルボキシル基は、Arg, Tyr 及び Lys と相互作用していたが、その組み合わせは動物種により異なっていた。また、アルキル側鎖及びフェニル基は、Leu, Ile, Phe 及び Val で構成される疎水性領域に位置していた。ヒト及びウシアルブミンにおいては、結合定数及びドッキングエネルギーより、明確な結合サイトの至適サイズの存在が示唆された。これらの結果から、動物種アルブミンにおける結合サイトのサイズや電荷、疎水性など、いわゆるマイクロ環境の差異が、PB の結合における種差の要因であると推察された。以上の結果より、PB のアルブミン結合には種差の存在が認められ、本研究で用いた動物種においては、PB の結合するサイトの構造やタンパク結合の観点から、ウシアルブミンが最もヒトアルブミンに類似していることが示唆された。

以上のように、アルブミンのサイト II における PB の結合様式、さらにその結合特性を含む”静的及び動的情報”が本研究によって解明された。また、PB のタンパク結合における種差についても明らかとなり、適応拡大を視野に入れた動物実験データの解釈やヒトへの外挿の際に有益な情報を得ることができた。しかしながら、PB の代謝における種差や PB 誘導体の

代謝経路についての情報は限られており、これらに関する新たな知見が得られれば、PB 及びその誘導体の臨床応用の可能性がより広がるであろう。本研究は、多様な薬効を有する PB 及びその誘導体のヒトにおける薬物動態及び薬理効果の理解という点で、様々な疾患治療へ臨床応用される際の有用な基礎資料になると考えられる。

実験の部

実験試料

ヒト, ウシ, ウサギ及びラット血清アルブミン, AAG, γ -グロブリン, ワルファリン, ダンシルサルコシン, ビリルビン及び HNB は, Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した. Chen⁸⁵⁾が報告した方法を改変した手順を用いて, アルブミンを 0°C で活性炭を加え, H₂SO₄ で pH3 に調整して脂肪酸除去 (脱脂) した溶液を透析後, 凍結乾燥させた. 脱脂したアルブミンは, SDS-PAGE において単一のバンドが得られ, それらの分子量はモル濃度計算により 66kDa と想定された. インドキシル硫酸及び PLE は, ナカライテスク株式会社より入手した. PB は, LKT Laboratories 社 (St. Paul, MN, U.S.A.) から入手した. PA, PP, オクタン酸, オレイン酸, ミリスチン酸及びイブプロフェンは, 和光ケミカルより購入した. M-PB は, Frinton Laboratories 社 (Hainesport, NJ, U.S.A.) から入手した. PV, PC 及び NPA は, 東京化成工業株式会社より購入した. PH は, Santa Cruz Biotechnology 社 (Dallas, TX, U.S.A.) より入手した. ヒト及びウシ血清は, それぞれ Interstate Blood Bank 社 (Memphis, TN, U.S.A.) 及びダード株式会社より購入した. ウサギ及びラット血漿は, 雄のそれぞれ日本白色種及び SD ラットから採血して遠心分離したものを使用した. その他, 試薬, 溶媒類は市販特級品を使用し, 溶媒としての水はイオン交換水を使用した. タンパク結合実験においては 67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 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. 有意差検定については一方向分散分析後の複数比較のための Dunnett's 検定を用いて行った. 危険値が 0.05 以下であるときに統計学的に有意であると評価した.

限外濾過法及び平衡透析法

限外濾過は Ultracel®-30 を遠心式フィルターユニットとして備えた Amicon® Ultra-0.5 mL (Merck Millipore 社) を使用した. 500 μ L のサンプルを 25°C, 2,500g で 5 分間遠心分離

し、濾液中の遊離型リガンド濃度 (C_f) を HPLC により測定した。

平衡透析実験は、2mL の Sanko プラスチック透析セルを用いて行った。2つのセル分画を Visking セルローズ膜で分離した。サンプルに対して等量 (1.5mL) のリン酸緩衝液を用いて 12 時間平衡透析を行い、その後、リン酸緩衝液区分の遊離型リガンド濃度を HPLC で測定した。アルブミン非存在下での限外濾過及び平衡透析実験においては、膜または器具へのリガンドの吸着は無視できるほどの低濃度であった。さらに、平衡透析後の体積シフトは Giacomini らの方法⁸⁶⁾に従って補正した。

結合データ解析

限外濾過法により得られたデータから下記の (1) 式を用いて遊離型分率を算出した。また、結合率 (Bound fraction) は、100 から (1) 式で得られた値を引くことにより算出した。

$$\text{free fraction (\%)} = \frac{C_f}{C_b + C_f} \times 100 \quad (1)$$

C_f は HPLC により算出された遊離型濃度である。 C_b は結合型濃度であり、限外濾過前の総リガンド濃度 (C_t) から C_f を引くことにより、また、平衡透析では平衡透析前の総リガンド濃度 (C_t) から $2 \times C_f$ を引くことにより C_b を求めた。限外濾過及び平衡透析のデータを用いてリガンドのアルブミンにおける結合パラメータを算出した。実験データは、GraphPad PRISM® Version 4 (GraphPad Software 社) を用いて (2) 式により解析した。

$$r = \frac{C_b}{P_t} = \sum_{i=1}^m \frac{n_i K_i C_f}{1 + K_i C_f} \quad (2)$$

ここで、 r はタンパク質 1 モルあたりに結合するリガンドのモル数であり、 P_t はタンパク質濃度である。 n_i は i 番目の結合成分における結合サイト数、 K_i は i 番目の結合成分における結

合定数である。高親和性及び低親和性サイトへの結合は、 $m=2$ を用いて分析を行った。高親和性サイトに対する結合についての実験及び解析は、低親和性サイトへのリガンド結合を最小にするために $r<0.4$ となる条件で行い、この場合は $m=1$ を用いた。

熱力学的解析

熱力学的パラメータは、 15°C 、 25°C 、 30°C 及び 37°C の 4 つの温度における測定値により van't Hoff プロットを使用して Pederson らの方法⁸⁷⁾によって算出した。本実験では恒温振盪装置を用いて平衡透析を行った。平衡透析から得られた 25°C における PB の結合パラメータは、限外濾過実験で得られた値と同一であることを確認した。平衡透析によって得られた結合定数の温度依存性から結合過程に關与する熱力学的パラメータを算出することが可能である。エンタルピー変化 ΔH が実験温度範囲において大きく変化しない場合、 ΔH とエントロピー変化 ΔS は、以下の van't Hoff 式 (3) によって求めることができる。

$$\ln K = - \frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

K は温度 T (絶対温度) における結合定数であり、 R は気体定数である。 ΔH および ΔS は算出された結合定数をプロットすることによって得られ、自由エネルギー変化 ΔG は、以下の (4) 式から計算された。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

HPLC 測定条件

本研究において HPLC は HITACHI 製 D-2000 Elite HPLC system を使用した。YMCPACKODS AM-303 (粒径 5-mm, 長さ 250 mm×内径 4.6 mm, YMC 社) を固定相として使用し温度は 40°C で設定した。溶媒 A (50mM リン酸二水素ナトリウム) 及び溶媒 B (50mM リン酸二水素ナトリウム及びアセトニトリル, 30 : 70vol / vol) の 2 つの溶媒を移動相として使用した。ピークの分離のために利用したグラジエントは化合物毎に下記に示す通

りである。PB, PA, PG, PP 及び M-PB: 0-7 分 (30%-100%B) , 7-10 分 (100%B) , 10-15 分 (100%-30%B) , および 15-20 分 (30%B) . PV, PC 及び PH: 0-6 分 (50-100%B) , 6-10 分 (100%B) , 10-15 分 (100-50%B) 及び 15-20 分 (50%B) . 移動相の流速は 0.9mL /分 で一定とし, 検出波長は 210nm に固定して各サンプルについて 20 分間測定した.

蛍光プローブ置換実験

HSA のサイト I 及びサイト II の蛍光プローブとしてワルファリン及びダンシルサルコシンを各々用いた. 蛍光強度は HITACHI 製 F-2500 蛍光分光光度計にて測定した. 25°C において励起及び放出スリット幅は 5nm とし, ワルファリン及びダンシルサルコシンの励起波長は各々 320 nm 及び 350nm に設定した. 蛍光強度はワルファリン及びダンシルサルコシン各々 350-450 nm 及び 400-600 nm の範囲の最大ピークを測定した. また, 蛍光プローブの非特異的結合の影響を最小限にするため, プローブ-アルブミン比を 1 : 10 に維持し, PB 及び関連構造化合物をその溶液へ添加して測定を行った. 蛍光プローブの置換の程度は以下の (5) 式を用いて評価した.

$$\frac{F_2}{F_1} \times 100 \quad (5)$$

F₁ 及び F₂ は, 蛍光プローブとアルブミンのみ及びそれに置換物質を添加した場合に測定された蛍光強度を各々示している.

リガンド間の相互作用の検討

2種のリガンド間のタンパク分子上における相互作用の検討は Kragh-Hansen のモデルに従って行った⁴⁴⁾⁴⁵⁾。リガンド A 及び B がタンパク質 P に結合する場合、その平衡系は Fig. 27 に示すモデルで表わされる。

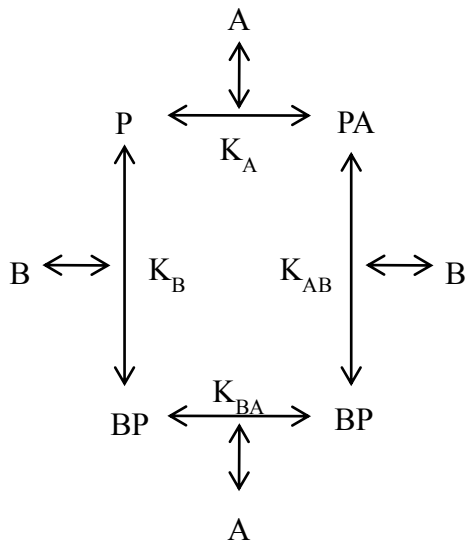


Fig. 27. Scheme of interaction models

P: protein; A, B: ligands; K: association constant of ligand.

リガンド A 及び B が蛋白分子上に結合すると過程すると

$$K_A = \frac{[PA]}{[P_f][A_f]} \quad (6)$$

$$K_B = \frac{[BP]}{[P_f][B_f]} \quad (7)$$

$$K_{BA} = \frac{[BPA]}{[BP][A_f]} \quad (8)$$

$$K_{AB} = \frac{[BPA]}{[AP][B_f]} \quad (9)$$

$$[P_t] = [P_f] + [PA] + [PB] + [BPA] \quad (10)$$

ここで、総タンパク濃度当たりの結合リガンド濃度は次式で示すことができる。

$$v_A = \frac{[PA] + [BPA]}{[P_t]} \quad (11)$$

$$v_B = \frac{[BP] + [BPA]}{[P_t]} \quad (12)$$

このようなモデルで示される平衡系においては

$$\chi = \frac{K_{BA}}{K_A} = \frac{K_{AB}}{K_B} \quad (13)$$

の関係が成立する。ここで χ の値はカップリング定数と呼ばれるものである。この関係を用いると次式で表すことができる。

$$v_A = \frac{K_A[A_f] + \chi K_A K_B [A_f][B_f]}{1 + K_A[A_f] + K_B[B_f] + \chi K_A K_B [A_f][B_f]} \quad (14)$$

$$v_B = \frac{K_B[B_f] + \chi K_A K_B [A_f][B_f]}{1 + K_A[A_f] + K_B[B_f] + \chi K_A K_B [A_f][B_f]} \quad (15)$$

χ の値はその相互作用を評価するために重要な値であり、 $\chi=1$ 及び $\chi=0$ は独立及び競合結合を各々意味し、また、 $\chi>1$ 及び $1>\chi>0$ の場合は正の協同的及び負の協同的結合であり、異なる結合サイトに結合した 2 種のリガンド間のアロステリックな相互作用を意味する。なお、低親

和性サイトの影響を最小限にするため, Kragh-Hansen の実験・解析法に基づきリガンド結合濃度は $v < 0.4$ で実験を行った^{44,45)}.

HSA の化学修飾

HSA に唯一存在する ²¹⁴Trp は, Fehske らの方法⁴⁶⁾に従って修飾された. 1g の HSA を 10M 尿素溶液 200mL に溶解し, 酢酸を添加し pH4.4 に調整した. 次いで, HNB のメタノール溶液 25mL を添加し, 得られた溶液を攪拌しながら 2 時間反応させた後, 上清を水に対して 60 時間透析して凍結乾燥した. 分光光度的⁴⁶⁾に求めた ²¹⁴Trp の修飾率は 93% であり, HSA における ²¹⁴Trp はほぼ完全に修飾されていると考えられた. HSA の ⁴¹¹Tyr の選択的修飾は, Hagag らの方法⁴⁸⁾を改変して行った. アセトニトリルを溶媒として調整した 20mM NPA 375mL を 0.1M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH8.0) に溶解した 100mM HSA 溶液 60mL へ連続的に添加しながら攪拌した. 7 時間反応させた溶液を水に対して 60 時間透析し, 凍結乾燥した. この方法では, アントラニロイル構造が HSA の ⁴¹¹Tyr に選択的に取り込まれることが知られている⁴⁸⁾. 分光光度形を用いて修飾率を測定したところ⁴⁸⁾, Tyr の 5.7% が修飾されていることが示された. これにより, HSA の 18 個の Tyr のうちの約 1 個, つまり, ⁴¹¹Tyr の修飾が示唆された.

HSA コード領域への突然変異の導入

組換え野生型 HSA (WT-HSA) 並びに単一残基変異体 Y411A 及び R410A を合成するために Watanabe らの方法に従い作成した^{49,50)}. シグナル配列 (L10) を含む HSAcDNA を *EcoRI* で処理された pKF19k ベクター (TakaraShuzo Co.) のアルコールオキシダーゼ 1 (*AOXI*) プロモーター下流に接続して変異導入を行った. R410A 及び Y411A の変異導入の際に用いたプライマーは下記の通りである (下線はミスマッチを示す).

5'-CTATTAGTTGCTTACACCAAG-3' for R410A

5'-CTATTAGTTCGTGCCACCAAG-3' for Y411A

この変異導入は、Perkin-Elmer ABI Prism 310 Genetic Analyzer を用いて、HSA コード領域全体の DNA 配列決定によって確認した。野生型及び突然変異誘発された挿入物を放出させ、メタノール誘導性 pHIL-D2 ベクター (Invitrogen) に再クローニングして HSA 発現ベクター-pHIL-D2-HSA を構築した。

rHSA の発現

特定のrHSA突然変異体をコードするpHIL-D2-HSA発現ベクターを、塩化リチウム法により *Pichia* 酵母 (GS115株) に導入した。それぞれ染色体DNAに安定して組み込まれた発現カセットを含む酵母クローンを単離した。100mLのbuffered glycerol-complex medium (BMGY) (growth phase) で培養を行い、その後、誘導炭素源であるメタノールを含む1Lのbuffered methanol-complex medium (BMMY) (induction phase) に再懸濁し、細胞をさらに96時間増殖させた。発現の誘導を維持するために、メタノールを最終濃度が0.5%となるよう24時間毎に添加した。

rHSA の精製

分泌された rHSA を増殖培地から以下のように単離した。培地を 60%飽和させ、硫酸アンモニウムで室温にした。次いで、温度を 4°C に下げて HSA の等電点である pH4.4 に調整した⁸⁸⁾。沈殿したタンパク質を遠心分離 (10000g, 20 分, 4°C) により回収し、蒸留水中に再懸濁させ、4°C で 48 時間透析行った。続いて 200mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) でさらに 24 時間攪拌した。その後、ブルーセファロース CL-6B (アマシャムファルマシア社) のカラムに添加し、カラムを約 10°C で洗浄した。200mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.5) で洗浄し、1M NaCl 及び 10% (v/v) エタノールを含む 20mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH6.5 で rHSA を溶出した。溶出された rHSA を脱イオン化し、Chen の方法に従い活性炭処理にて脱脂した⁸⁹⁾。得られたタンパク質は、SDS-PAGE 上に単一のバンドを示した。試料純度は、SDS-PAGE 上のクマシーブリリアントブルー染色タンパク質バンドの密度分析により推定した。各タンパク質サンプルは純度 97% であった。タンパク質の N 末端アミノ酸配列を Perkin-Elmer ABI 477A タンパク質シーケンサーで決定した。

結晶化用 HSA 溶液の調製, HSA-PB 複合体の共結晶化

結晶化に使用する HSA 溶液は、 -80°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 とするよう溶解した。その後、2 量体の HSA を除去するため、Hiload 16/60 Superdex 75pg カラム（GE Healthcare）を用いて精製した。精製した HSA は、Vivaspin 15（Sartorius, 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-PB 複合体の共結晶化は、Table 9 に記した結晶化条件でハンギングドロップ蒸気拡散法を用いて行い、ストリークシーディング法により結晶化を促進することで HSA-PB 複合体の単結晶を析出させることに成功した。

X 線回折データの収集, 構造解析, 構造精密化

Table 9 condition 1 で得られた HSA-PB 複合体の共結晶は、結晶化溶液にグリセロールを終濃度が 10%になるように加えた。この溶液中から HSA-PB 複合体の共結晶をクライオロープですくい、そのまま液体窒素に浸すことでガラス状に凍結した。Table 9 condition 2 で得られた HSA-PB 複合体の共結晶は、結晶が得られた溶液からクライオロープで結晶をすくい、そのまま液体窒素中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-17A へ輸送し、波長 0.9800 \AA 、温度 100 K の条件で、Pilatus 3 S6M 検出器（DECTRIS）を用いて X 線回折データを収集した。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*⁸⁹⁾を使用した。

構造決定は分子置換法で行った。サーチモデルには河野らが解析した HSA-Oct-N-AcMet 複合体の結晶構造⁵²⁾を用いて、回転および並進探索の計算にはプログラムパッケージ *CCP4*

⁹⁰⁾内のプログラム *Molrep* ⁹¹⁾を使用した。構造精密化、及び、TLS (Translation Libration Screw-rotation) グループの設定は、プログラムパッケージ *PHENIX* ⁹²⁾内のプログラム *phenix.refine* ⁹³⁾、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* ⁹⁴⁾を使用した。また、最終構造の妥当性はプログラム *MolProbity* ⁹⁵⁾ を用いて確認し、分子構造図の作成はプログラム *PyMOL* ⁹⁶⁾を使用した。

Table 9. Crystallization conditions of the HSA-PB complex

Condition 1		
Droplet:	Total	3.0 μ L
	HSA-PB mixture ^{#1}	1.5 μ L
	Reservoir solution	1.5 μ L
Reservoir:	Total	0.4 mL
	32%(w/v) PEG3350	
	50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0	
Temperature:		4°C
Condition 2		
Droplet:	Total	3.0 μ L
	HSA-PB mixture ^{#1}	1.5 μ L
	reservoir solution	1.5 μ L
Reservoir:	Total	0.4 mL
	28%(w/v) PEG3350	
	10%(v/v) MPD	
	50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0	
Temperature:		15°C

^{#1} contained 1.4 mM HSA, 14 mM PB, and 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0.

ドッキングシミュレーション

PB 及び関連構造化合物の動物種アルブミンへの分子ドッキングは、分子設計支援ソフトウェア MOE (Chemical Computing Group 社) の ASEDock⁹⁷⁾を用いて行った。MMFF94 力場をエネルギー最小化に使用した。ヒト、ウシ及びウサギアルブミン (PDB entry code 1E7A, 3V03 及び 3V09) の結晶構造を Protein Data Bank から入手し、分子ドッキングに使用した^{29,98)}。ドッキングシミュレーションため、PDB 構造中のすべての水分子及びリガンド分子を排除し、水素原子を付加した。MOE の Alpha Site Finder を用いてアルブミン構造の可能性のある結合部位を探索した後、各アルブミン構造のサブドメイン IIIA において、ヒトアルブミンのサイト II に相当する最適な結合部位を選択した。選択された部位へのリガンド

のドッキングは、パラメータのデフォルト値を用いて行った。ドッキングスコアは、静電相互作用 (U_{ele}) , van der Waals 相互作用 (U_{vdw}) またはリガンドの歪みエネルギー (U_{strain}) の総和であるパラメータ (U_{dock}) によってランク付けした。最適なドッキングポーズとして最も高いドッキングスコア (すなわち、最も低い U_{dock}) を有するポーズを選択し、さらなる分析のために使用した。

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 山崎 啓之 教授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 平山 文俊 教授, 同 門脇 大介 教授, 同 大栗 誉敏 准教授に心から感謝致します。

本研究のドッキングシミュレーションを行うに際し、御助力賜りました崇城大学薬学部 薬学科 宮本 秀一 教授に感謝致します。

本研究の X 線結晶構造解析に際し、御協力いただきました崇城大学薬学部 薬学科 河合 聡人 助教に感謝致します。

私の研究への道を開いていただき、本研究においても御助力を賜りました崇城大学薬学部 薬学科 田口 和明 助教に心より感謝致します。

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致します。

本研究を行うにあたり、御協力と御理解をいただきました泗水中央薬局グループ 稲葉 一郎 代表取締役, エーピー薬局グループ 小林 祐司 代表取締役並びに職員の皆様に感謝の意を表します。

最後に、留守を預かり支えてくれた家族並びに海浜総合薬局職員に感謝致します。

平成 29 年 9 月

榎田 泰介

参考文献

1. Brusilow SW, Maestri NE, Urea cycle disorders: diagnosis, pathophysiology, and therapy. *Adv. Pediatr.* **43**, 127–170 (1996).
2. Iannitti T, Palmieri B, Clinical and experimental applications of sodium phenylbutyrate. *Drugs R. D.* **11**, 227–249 (2011).
3. Basseri S, Lhoták S, Sharma AM, Austin RC, The chemical chaperone 4-phenylbutyrate inhibits adipogenesis by modulating the unfolded protein response. *J. Lipid Res.* **50**, 2486–2501 (2009).
4. Yam GH-F, Gaplovska-Kysela K, Zuber C, Roth J, Sodium 4-phenylbutyrate acts as a chemical chaperone on misfolded myocilin to rescue cells from endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 1683–1690 (2007).
5. Kusaczuk M, Bartoszewicz M, Cechowska-Pasko M, Phenylbutyric acid: simple structure - multiple effects. *Curr. Pharm. Des.* **21**, 2147–2166 (2015).
6. Miller AC, Cohen S, Stewart M, Rivas R, Lison P, Radioprotection by the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate. *Radiat. Environ. Biophys.* **50**, 585–596 (2011).
7. Hayashi H, Mizuno T, Horikawa R, Nagasaka H, Yabuki T, Takikawa H, Sugiyama Y, 4-Phenylbutyrate modulates ubiquitination of hepatocanicular MRP2 and reduces serum total bilirubin concentration. *J. Hepatol.* **56**, 1136–1144 (2012).
8. Naoi S, Hayashi H, Inoue T, Tanikawa K, Igarashi K, Nagasaka H, Kage M, Takikawa H, Sugiyama Y, Inui A, Nagai T, Kusuhara H, Improved liver function and relieved pruritus after 4-phenylbutyrate therapy in a patient with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *J. Pediatr.* **164**, 1219–1227.e3 (2014).
9. Sano R, Reed JC, ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1833**, 3460–3470 (2013).
10. Yang L, Zhao D, Ren J, Yang J, Endoplasmic reticulum stress and protein quality control in diabetic cardiomyopathy. *Biochim. Biophys. Acta.* **1852**, 209–218 (2015).
11. Kolb PS, Ayaub EA, Zhou W, Yum V, Dickhout JG, Ask K, The therapeutic effects of 4-phenylbutyric acid in maintaining proteostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **61**, 45–52 (2015).
12. Mimori S, Okuma Y, Kaneko M, Kawada K, Hosoi T, Ozawa K, Nomura Y, Hamana H, Protective effects of 4-phenylbutyrate derivatives on the neuronal cell death and

- endoplasmic reticulum stress. *Biol. Pharm. Bull.* **35**, 84–90 (2012).
13. Phuphanich S, Baker SD, Grossman SA, Carson KA, Gilbert MR, Fisher JD, Carducci MA, Oral sodium phenylbutyrate in patients with recurrent malignant gliomas: a dose escalation and pharmacologic study. *Neuro. Oncol.* **7**, 177–182 (2005).
 14. Camacho LH, Olson J, Tong WP, Young CW, Spriggs DR, Malkin MG, Phase I dose escalation clinical trial of phenylbutyrate sodium administered twice daily to patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs.* **25**, 131–138 (2007).
 15. Gardian G, Browne SE, Choi D-K, Klivenyi P, Gregorio J, Kubilus JK, Ryu H, Langley B, Ratan RR, Ferrante RJ, Beal MF, Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Biol. Chem.* **280**, 556–563 (2005).
 16. Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C, Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy. *Eur. J. Hum. Genet.* **12**, 59–65 (2004).
 17. Peters T, *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. San Diego, CA: Academic Press. (1995).
 18. Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M, Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 695–704 (2002).
 19. Yamasaki K, Chuang VTG, Maruyama T, Otagiri M, Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim. Biophys. Acta.* **1830**, 5435–5443 (2013).
 20. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN, The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* **11**, 824–832 (1975).
 21. Sudlow G, Birkett DJ, Wade DN, Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* **12**, 1052–1061 (1976).
 22. He XM, Carter DC, Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature.* **358**, 209–215 (1992).
 23. Carter DC, Ho JX, Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* **45**, 153–203 (1994).
 24. Petitpas I, Bhattacharya AA, Twine S, East M, Curry S, Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. *J. Biol. Chem.* **276**, 22804–22809 (2001).

25. Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M, Characterization of site I on human serum albumin: concept about the structure of a drug binding site. *Biochim. Biophys. Acta.* **1295**, 147–157 (1996).
26. Kragh-Hansen U, Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol. Rev.* **33**, 17–53 (1981).
27. Chruszcz M, Mikolajczak K, Mank N, Majorek KA, Porebski PJ, Minor W, Serum albumins-unusual allergens. *Biochim. Biophys. Acta.* **1830**, 5375–5381 (2013).
28. Bujacz A, Structures of bovine, equine and leporine serum albumin. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **68**, 1278–1289 (2012).
29. Majorek KA, Porebski PJ, Dayal A, Zimmerman MD, Jablonska K, Stewart AJ, Chruszcz M, Minor W, Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **52**, 174–182 (2012).
30. Panjehshahin MR, Yates MS, Bowmer CJ, A comparison of drug binding sites on mammalian albumins. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 873–879 (1992).
31. Kosa T, Maruyama T, Otagiri M, Species differences of serum albumins: I. Drug binding sites. *Pharm. Res.* **14**, 1607–1612 (1997).
32. Boudoulas S, Lush RM, McCall NA, Samid D, Reed E, Figg WD, Plasma protein binding of phenylacetate and phenylbutyrate, two novel antineoplastic agents. *Ther. Drug Monit.* **18**, 714–720 (1996).
33. Müller WE, Wollert U, Human serum albumin as a ‘silent receptor’ for drugs and endogenous substances. *Pharmacology.* **19**, 59–67 (1979).
34. Naranjo CA, Sellers EM, Khouw V, Fatty acids modulation of meal-induced variations in diazepam free fraction. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **10**, 308–310 (1980).
35. Gulyassy PF, Depner TA, Impaired binding of drugs and endogenous ligands in renal diseases. *Am. J. Kidney Dis.* **2**, 578–601 (1983).
36. Mera K, Anraku M, Kitamura K, Nakajou K, Maruyama T, Otagiri M, The structure and function of oxidized albumin in hemodialysis patients: Its role in elevated oxidative stress via neutrophil burst. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 1322–1328 (2005).
37. Kober A, Jenner A, Sjöholm I, Differentiated effects of liver cirrhosis on the albumin binding sites for diazepam, salicylic acid and warfarin. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 2729–2735 (1978).
38. Klammt S, Mitzner SR, Stange J, Loock J, Heemann U, Emmrich J, Reisinger EC, Schmidt R, Improvement of impaired albumin binding capacity in acute-on-chronic

- liver failure by albumin dialysis. *Liver Transpl.* **14**, 1333–1339 (2008).
39. Lee B, Rhead W, Diaz GA, Scharschmidt BF, Mian A, Shchelochkov O, Marier JF, Beliveau M, Mauney J, Dickinson K, Martinez A, Gargosky S, Mokhtarani M, Berry SA, Phase 2 comparison of a novel ammonia scavenging agent with sodium phenylbutyrate in patients with urea cycle disorders: safety, pharmacokinetics and ammonia control. *Mol. Genet. Metab.* **100**, 221–228 (2010).
 40. Ross PD, Subramanian S, Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry.* **20**, 3096–3102 (1981).
 41. Jacobsen J, Studies of the affinity of human serum albumin for binding of bilirubin at different temperatures and ionic strength. *Int. J. Pept. Protein Res.* **9**, 235–239 (1977).
 42. Chignell CF, Optical studies of drug-protein complexes. 3. Interaction of flufenamic acid and other N-arylanthranilates with serum albumin. *Mol. Pharmacol.* **5**, 455–462 (1969).
 43. Maruyama T, Lin CC, Yamasaki K, Miyoshi T, Imai T, Yamasaki M, Otagiri M, Binding of suprofen to human serum albumin. Role of the suprofen carboxyl group. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1017–1026 (1993).
 44. Kragh-Hansen U, Relations between high-affinity binding sites for L-tryptophan, diazepam, salicylate and phenol red on human serum albumin. *Biochem. J.* **209**, 135–142 (1983).
 45. Kragh-Hansen U, Evidence for a large and flexible region of human serum albumin possessing high affinity binding sites for salicylate, warfarin, and other ligands. *Mol. Pharmacol.* **34**, 160–171 (1988).
 46. Fehske KJ, Müller WE, Wollert U, The modification of the lone tryptophan residue in human serum albumin by 2-hydroxy-5-nitrobenzyl bromide. Characterization of the modified protein and the binding of L-tryptophan and benzodiazepines to the tryptophan-modified albumin. *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **359**, 709–717 (1978).
 47. Fehske KJ, Müller WE, Wollert U, A highly reactive tyrosine residue as part of the indole and benzodiazepine binding site of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta.* **577**, 346–359 (1979).
 48. Hagag N, Birnbaum ER, Darnall DW, Resonance energy transfer between cysteine-34, tryptophan-214, and tyrosine-411 of human serum albumin. *Biochemistry.* **22**, 2420–2427 (1983).

49. 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.* **357**, 269–274 (2001).
50. 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.* **349 Pt 3**, 813–819 (2000).
51. Curry S, Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **24**, 342–357 (2009).
52. 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. 崇城大学 博士学位論文 (2016).
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.* **5**, 827–835 (1998).
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.* **303**, 721–732 (2000).
55. Kawai A, Chuang VTG, Kouno Y, Yamasaki K, Miyamoto S, Anraku M, Otagiri M, Crystallographic analysis of the ternary complex of octanoate and N-acetyl-l-methionine with human serum albumin reveals the mode of their stabilizing interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1865**, 979–984 (2017).
56. 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.* **353**, 38–52 (2005).
57. Wanwimolruk S, Birkett DJ, Brooks PM, Structural requirements for drug binding to site II on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* **24**, 458–463 (1983).
58. Cunningham VJ, Hay L, Stoner HB, The binding of L-tryptophan to serum albumins in the presence of non-esterified fatty acids. *Biochem. J.* **146**, 653–658 (1975).
59. Chakrabarti SK, Cooperativity of warfarin binding with human serum albumin induced by free fatty acid anion. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 739–743 (1978).
60. Fujiwara S-I, Amisaki T, Molecular dynamics study of conformational changes in human serum albumin by binding of fatty acids. *Proteins.* **64**, 730–739 (2006).
61. Roy D, Kumar V, James J, Shihabudeen MS, Kulshrestha S, Goel V, Thirumurugan

- K, Evidence that chemical chaperone 4-phenylbutyric acid binds to human serum albumin at fatty acid binding sites. *PLoS One*. **10**, e0133012 (2015).
62. Sakai T, Takadate A, Otagiri M, Characterization of binding site of uremic toxins on human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1755–1761 (1995).
 63. Watanabe H, Noguchi T, Miyamoto Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Miyamura S, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T, Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 1423–1428 (2012).
 64. Krenzel ES, Chen Z, Hamilton JA, Correspondence of fatty acid and drug binding sites on human serum albumin: a two-dimensional nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*. **52**, 1559–1567 (2013).
 65. Chuang VTG, Otagiri M, How do fatty acids cause allosteric binding of drugs to human serum albumin? *Pharm. Res.* **19**, 1458–1464 (2002).
 66. Peterson DB, Fisher K, Carter RD, Mann J, Fatty acid composition of erythrocytes and plasma triglyceride and cardiovascular risk in Asian diabetic patients. *Lancet (London, England)*. **343**, 1528–1530 (1994).
 67. Fredrickson DS, Gordon RS, The metabolism of albumin-bound C14-labeled unesterified fatty acids in normal human subjects. *J. Clin. Invest.* **37**, 1504–1515 (1958).
 68. Brodersen R, Andersen S, Vorum H, Nielsen SU, Pedersen AO, Multiple fatty acid binding to albumin in human blood plasma. *Eur. J. Biochem.* **189**, 343–349 (1990).
 69. Bahr R, Høstmark AT, Newsholme EA, Grønnerød O, Sejersted OM, Effect of exercise on recovery changes in plasma levels of FFA, glycerol, glucose and catecholamines. *Acta Physiol. Scand.* **143**, 105–115 (1991).
 70. Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard B V, Ravussin E, A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia*. **38**, 1213–1217 (1995).
 71. Kurien VA, Oliver MF, Free fatty acids during acute myocardial infarction. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **13**, 361–373 (1971).
 72. Levitt DG, Levitt MD, Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **7**, 307–328 (2014).
 73. 丸尾 良浩, 27章 体質性黄疸. 小児栄養消化器肝臓病学 494–496 (2014).
 74. Minomo A, Ishima Y, Chuang VTG, Suwa Y, Kragh-Hansen U, Narisoko T,

- Morioka H, Maruyama T, Otagiri M, Albumin domain II mutant with high bilirubin binding affinity has a great potential as serum bilirubin excretion enhancer for hyperbilirubinemia treatment. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 2917–2923 (2013).
75. Niwa T, Takeda N, Tatematsu A, Maeda K, Accumulation of indoxyl sulfate, an inhibitor of drug-binding, in uremic serum as demonstrated by internal-surface reversed-phase liquid chromatography. *Clin. Chem.* **34**, 2264–2267 (1988).
 76. Kremer JM, Wilting J, Janssen LH, Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **40**, 1–47 (1988).
 77. Chuang V, Otagiri M, Photoaffinity labeling of plasma proteins. *Molecules.* **18**, 13831–13859 (2013).
 78. Kosa T, Nishi K, Maruyama T, Sakai N, Yonemura N, Watanabe H, Suenaga A, Otagiri M, Structural and ligand-binding properties of serum albumin species interacting with a biomembrane interface. *J. Pharm. Sci.* **96**, 3117–3124 (2007).
 79. Gokara M, Sudhamalla B, Amooru DG, Subramanyam R, Molecular interaction studies of trimethoxy flavone with human serum albumin. *PLoS One.* **5**, e8834 (2010).
 80. Kaneko K, Fukuda H, Chuang VTG, Yamasaki K, Kawahara K, Nakayama H, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M, Subdomain IIIA of dog albumin contains a binding site similar to site II of human albumin. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 81–86 (2008).
 81. Najmanovich R, Kuttner J, Sobolev V, Edelman M, Side-chain flexibility in proteins upon ligand binding. *Proteins.* **39**, 261–268 (2000).
 82. Entin-Meer M, Rephaeli A, Yang X, Nudelman A, Nudelman A, Haas-Kogan DA, AN-113, a novel prodrug of 4-phenylbutyrate with increased anti-neoplastic activity in glioma cell lines. *Cancer Lett.* **253**, 205–214 (2007).
 83. Mimori S, Koshikawa Y, Mashima Y, Mitsunaga K, Kawada K, Kaneko M, Okuma Y, Nomura Y, Murakami Y, Kanzaki T, Hamana H, Evaluation of synthetic naphthalene derivatives as novel chemical chaperones that mimic 4-phenylbutyric acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **25**, 811–814 (2015).
 84. Mimori S, Ohtaka H, Koshikawa Y, Kawada K, Kaneko M, Okuma Y, Nomura Y, Murakami Y, Hamana H, 4-Phenylbutyric acid protects against neuronal cell death by primarily acting as a chemical chaperone rather than histone deacetylase inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 6015–6018 (2013).

85. Chen RF, Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J. Biol. Chem.* **242**, 173–181 (1967).
86. Giacomini KM, Wong FM, Tozer TN, Correction for volume shift during equilibrium dialysis by measurement of protein concentration. *Pharm. Res.* **1**, 179–181 (1984).
87. Pedersen AO, Honoré B, Brodersen R, Thermodynamic parameters for binding of fatty acids to human serum albumin. *Eur. J. Biochem.* **190**, 497–502 (1990).
88. Petersen CE, Ha CE, Harohalli K, Park D, Bhagavan N V, Mutagenesis studies of thyroxine binding to human serum albumin define an important structural characteristic of subdomain 2A. *Biochemistry.* **36**, 7012–7017 (1997).
89. Otwinowski Z, Minor W, Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307–326 (1997).
90. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, Keegan RM, Krissinel EB, Leslie AGW, 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.* **67**, 235–242 (2011).
91. Vagin A, Teplyakov A, MOLREP : An automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022–1025 (1997).
92. Adams PD, Afonine P V, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung L-W, 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.* **66**, 213–221 (2010).
93. 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.* **68**, 352–367 (2012).
94. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K, Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 486–501 (2010).
95. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, Murray LW, Arendall WB, Snoeyink J, Richardson JS, Richardson DC, MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **35**, W375-383 (2007).
96. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. Schrödinger, LLC

97. Goto J, Kataoka R, Muta H, Hirayama N, ASEDock-docking based on alpha spheres and excluded volumes. *J. Chem. Inf. Model.* **48**, 583–590 (2008).
98. Bhattacharya AA, Curry S, Franks NP, Binding of the general anesthetics propofol and halothane to human serum albumin. High resolution crystal structures. *J. Biol. Chem.* **275**, 38731–38738 (2000).