

アリピプラゾールのヒト血清アルブミン
結合に関する構造化学的研究

2019

櫻間 啓基

Study of structural-chemistry of
aripiprazole on its binding to
human serum albumin

Keiki Sakurama

Study of structural-chemistry of aripiprazole on its binding to human serum albumin

Keiki Sakurama

Aripiprazole (ARP) is a novel antipsychotics agent with quinolinone derivative. It has been used worldwide since its launch, and its use is expected to increase even in the future. Because ARP is taken by a wide age group and for the long term, patients who take ARP may be affected by multiple diseases. However, information regarding the plasma protein binding of ARP is limited, therefore, it is difficult to expect its pharmacokinetics, pharmacodynamics and side effects in certain disease based on information of protein binding. In this study, we characterized the ARP binding to human serum albumin (HSA) and evaluated the effects of post-translational modification of HSA and change in the concentration of endogenous substances on ARP binding to HSA.

1) Characterization of ARP binding to HSA

The binding parameters obtained by an equilibrium dialysis experiment indicated that ARP strongly binds to a single site on HSA. Investigation using the main metabolite and derivatives of ARP suggested that the chlorine atom on the dichlorophenyl-piperazine ring in the ARP molecule plays an important role in the binding of ARP to HSA. CD spectroscopic study also revealed that the chlorine atom at 3-position of ARP is a factor to determine the orientation of ARP in the binding site. In addition, isothermal titration calorimetry (ITC) data suggested that hydrophobic interaction contributes to the binding of ARP to HSA.

2) Microenvironmental analysis of ARP binding site on the HSA molecule

Competitive binding experiments using fluorescence displacement and equilibrium dialysis indicated that ARP binds to site II on HSA. In addition, a study using mutants of HSA suggested ARP binds to the region closed to ⁴¹¹Tyr at site II. Species differences in binding of ARP to albumin were very similar to those in diazepam which also possesses a chlorine atom, suggesting that chlorine atoms may be responsible for the strong binding to HSA and the

species differences. X-ray crystallographic analysis of the APR-HSA complex clearly revealed the structure of ARP at site II. ARP was surrounded by hydrophobic amino acid residues in site, and the phenyl group on dihydroquinolinone ring of ARP was suggested to form $\pi - \pi$ interactions with phenyl group of ⁴¹¹Tyr. The distance between the chlorine atom at the 3-position of the dichlorophenylpiperazine ring of ARP and the sulfur atom of ³⁹²Cys in the HSA molecule indicated the formation of halogen bond interaction.

3) Effect of post-translational modifications of HSA and endogenous substances on HSA-ARP binding

Binding of ARP to HSA was decreased by the post-translational modifications of HSA (Oxidized HSA, and glycated HSA) and the increased concentrations of endogenous substances (indoxyl sulfate, bilirubin, octanoic acid and myristic acid) *in vitro*, suggesting that in chronic disease conditions such as renal disease, liver disease and diabetes mellitus, free ARP might be increased. Bilirubin and myristic acid were found to allosterically inhibit ARP binding by binding to a different site from ARP, whereas indoxyl sulfate and octanoic acid which bind to site II strongly displaced ARP due to competitive inhibition. Thus, the accumulation of uremic toxins and fatty acids as well as the post-translational modifications of HSA in renal failures might significantly reduce the plasma protein binding of ARP, resulting in the changes of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and side effects of ARP.

In the present study, we clarified the mechanism of ARP binding to HSA, and the effects of post-translational modification and endogenous compounds on ARP binding to HSA. The data obtained herein provide useful information to understand pharmacokinetics, pharmacodynamics and side effects of ARP in the patients. In addition, the data based on the structures of ARP and its related compounds could be used to predict protein binding characteristics of certain drugs which are not only on market but in preclinical stage.

本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
ARP	アリピプラゾール	Aripiprazole
CD	円二色性	Circular dichroism
CT	クロラミンT	Chloramine T
FA	脂肪酸	Fatty acid
HSA	ヒト血清アルブミン	Human serum albumin
K_a	結合定数	Binding constant
MCO	金属触媒酸化	Metal catalyzed oxidation
n	結合サイト数	Number of binding sites

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) Analysis of the Binding of Aripiprazole to Human Serum Albumin: The Importance of a Chloro-Group in the Chemical Structure.
ACS Omega, *3*, 13790–13797. (2018).
Sakurama, K., Kawai, A., Tuan Giam Chuang, V., Kanamori, Y., Osa, M., Taguchi, K., Otagiri, M.

- 2) Further Evidence Regarding the Important Role of Chlorine Atoms of Aripiprazole on Binding to the Site II Area of Human Albumin.
Journal of Pharmaceutical Sciences, *108*, 1890–1895. (2019).
Sakurama, K., Nishi, K., Imoto, S., Hashimoto, M., Komatsu, T., Morita, Y., Otagiri, M., Yamasaki, K.

- 3) Interaction of Aripiprazole with Human α 1-Acid Glycoprotein.
Journal of Pharmaceutical Sciences, *108*, 3911–3916. (2019).
Nishi, K., Sakurama, K., Kobashigawa, Y., Morioka, H., Udo, N., Hashimoto, M., Otagiri, M.

- 4) Effects of Oxidation of Human Serum Albumin on the Binding of Aripiprazole.
Sakurama, K., Nishi, K., Tuan Giam Chuang, V., Hashimoto, M., Yamasaki, K., Otagiri, M.
Biol. Pharm. Bull, under submission.

目次

第1章	緒論	1
第2章	ARP の HSA への結合特性評価	5
第1節	序	5
第2節	ARP 代謝物および誘導体の結合パラメータ	6
第1項	平衡透析法を用いた結合パラメータの算出	6
第2項	誘起 CD スペクトル法を用いた結合状態の評価	8
第3項	等温滴定熱量測定(ITC)	11
第3節	考察	14
第4節	小括	17
第3章	HSA 分子上の ARP 結合サイトのマイクロ環境解析	18
第1節	序	18
第2節	ARP の結合サイトの同定	19
第1項	蛍光プローブ置換実験による結合サイトの推定	19
第2項	競合阻害実験による結合サイトの確認	20
第3項	部位特異的変異体 HSA への ARP の結合サイトの確認	24
第3節	動物種アルブミンにおける ARP 及び deschloro-ARP の結合特性	25
第1項	平衡透析法を用いた結合パラメータの算出	25
第2項	誘起 CD スペクトル法を用いた配向性の評価	26
第4節	HSA-ARP 複合体の X 線結晶構造解析	29
第5節	考察	34

第6節	小括	38
第4章	HSA-ARP 結合に及ぼす病態時各種変動因子の影響	39
第1節	序	39
第2節	酸化および糖化 HSA の構造特性評価	40
第1項	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法	40
第2項	カルボニル含量測定	42
第3項	CD スペクトル法を用いた二次・三次構造の評価	43
第4項	トリプトファン残基の固有蛍光を用いた構造評価	45
第3節	酸化および糖化 HSA の薬物結合性評価	46
第1項	平衡透析法を用いた結合性評価	47
第2項	誘起 CD スペクトルを用いた ARP の配向性の評価	49
第4節	内因性物質の影響	50
第1項	インドキシル硫酸およびビリルビンの影響	50
第2項	中鎖および長鎖脂肪酸の影響	52
第5節	考察	55
第6節	小括	60
第5章	総括	61
実験の部	64
謝辞	72
参考文献	74

第1章 緒論

アリピプラゾール (ARP) (7-(4-(4-(2,3-dichlorophenyl)-1-piperazinyl)butoxy)-3,4-dihydro-2-(1H)-quinolinone) (Fig. 1)は、構造中にキノリノン骨格を有し、他の抗精神病薬とは異なる薬理学的作用を示す新規抗精神病薬である¹⁻³⁾。

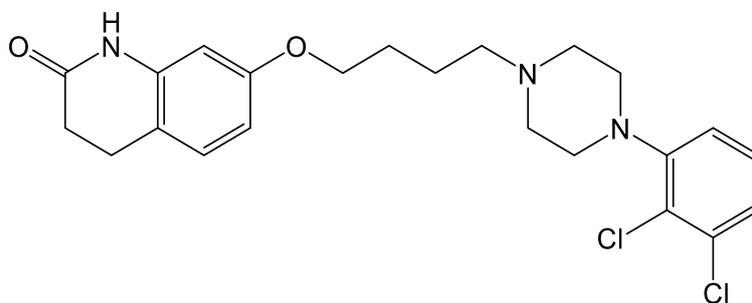


Fig. 1. Chemical structure of ARP

ARP は、ドパミン D₂ および 5-HT_{1A} 受容体に対して強力なアンタゴニスト活性を有するが、一方で、ドパミン D₂ 受容体のアゴニストとしても作用する。さらに、5-HT_{2A} 受容体に対するアンタゴニスト活性を有し、このことからドパミン - セロトニン系の抗精神病薬に分類されている¹⁾。

ARP は、2002 年の上市以来、世界中で広く使用され、2011 年の全世界における売り上げは 4100 億円にもものぼる。国内でも、後発医薬品を含む使用量は依然多く^{4, 5)} 今後も、うつ病や気分障害を含むメンタルヘルス関連疾患への罹患の増加に伴い⁶⁾、臨床における ARP の使用頻度は増加すると予想される。

ARP は、ヒトチトクローム P450 (CYP) 酵素のうち、CYP 2D6 と CYP 3A4 により酸化的代謝を受け、主に dehydro-ARP を生成する^{1-3, 7)}。この主代謝物である

dehydro-ARP の血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）は、ARP の約 40 %にも相当し ARP と同程度の薬理活性を有していることから、代謝後も薬効の持続や副作用に注意する必要がある¹⁻⁴⁾。また、治療薬物濃度域においては、ARP および dehydro-ARP の 99 %が血漿タンパク質に結合することが知られており、ARP については、主にヒト血清アルブミン（HSA）に結合することが報告されている⁸⁾。

ヒト血清アルブミン（HSA）は、585 個のアミノ酸残基から構成され 17 個のジスルフィド結合を有する分子量約 66.5kDa の単量体のタンパク質である⁹⁾。HSA は、全血清タンパク質の約 60 %を占め、膠質浸透圧の調整作用や抗酸化作用を有し、さらに、遊離脂肪酸、胆汁酸、ビリルビンおよび尿毒症物質などの内因性物質の輸送にも関与している¹⁰⁾。また、HSA は、多数の薬物とも結合し、薬物の体内動態や薬理作用に影響を与えることが知られている¹¹⁾。X 線結晶構造解析の結果、HSA は 3 つのドメイン（ドメイン I、II、III）から成る構造を有することが知られている (Fig. 2)¹²⁾。それぞれのドメインは、2 つのサブドメイン（サブドメイン A、B）より構成されており、サブドメイン II A と III A には、2 つの主要な薬物結合サイト（それぞれサイト I とサイト II）が存在することが明らかにされている^{13, 14)}。サイト I は、その幅広い疎水性ポケットに、ワルファリン、フロセミド等の比較的嵩高い構造の化合物を結合することが知られている。一方で、サイト II は至適サイズを有する疎水性ポケットを保持し、そのポケットの入り口付近には塩基性アミノ酸残基が存在している。一般的には、サイト II には疎水性構造と負電荷を併せ持つ化合物が結合することが知られており、カプ릴酸等の中鎖脂肪酸やインドキシル硫酸等の尿毒症物質、さらにはイブプロフェンやジアゼパムなどの薬物が結合することが報告されている¹³⁾。

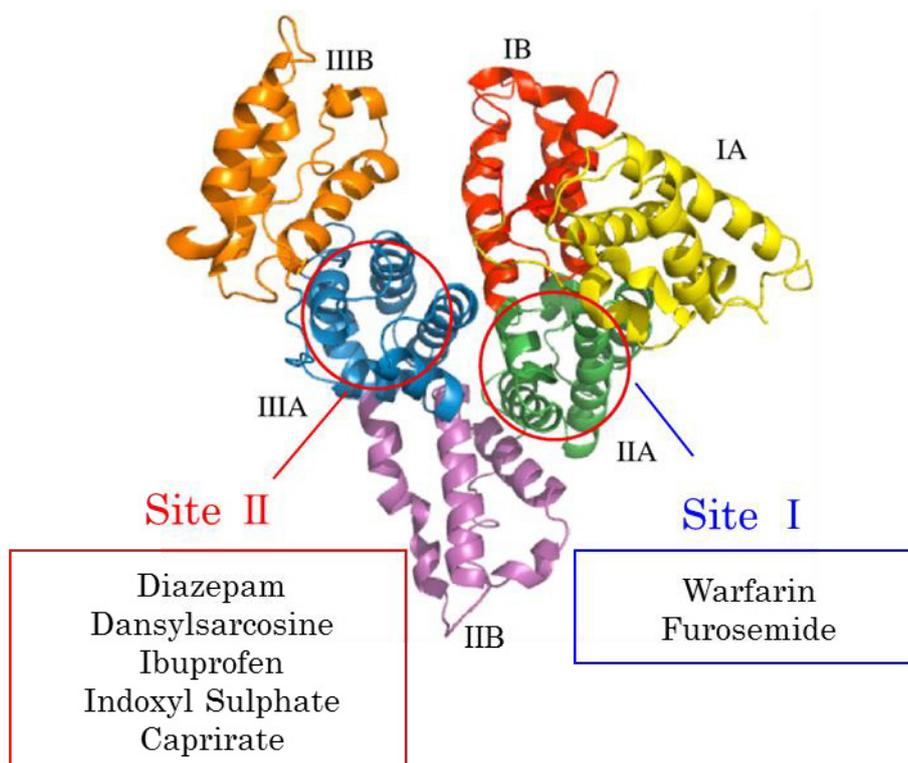


Fig. 2. Crystal structure of rHSA. The subdivision of rHSA into domains (I-III) and subdomains (A and B) is indicated, and the approximate locations of site I and site II are also shown. Atomic coordinates were taken from the PDB entry 1UOR¹²⁾. The illustration was made with *PyMOL*. This figure includes main binding ligands for each site.

当然ながら、これら結合サイトに特異的に結合した薬物は、同一の結合サイトを有する併用薬物や内因性物質により置換を受けることとなる。また、疾患時には HSA が翻訳後修飾を受けることも知られており、このような HSA の構造変化が各サイトに結合した薬物の結合性に影響を与えることも知られている。これらの影響による薬物の HSA に対する結合性の変化は、薬物の体内動態や薬効の変動につながる可能性がある¹⁵⁻¹⁷⁾。

ARP は、様々な精神疾患の治療に広く使用されており、また、その服用は長期にわたる¹⁸⁾。さらに、服用している患者の年齢層が幅広いこと¹⁹⁾を考えると、

ARP 服用者が複数疾患に罹患している可能性も考えられる。一方で、ARP のタンパク結合特性はもちろんのこと、疾患時におけるタンパク結合の変動については詳細に検討されていない状況である。

そこで本研究では、ARP のタンパク結合、特に HSA への結合特性について詳細に解析した。まず、第 2 章では、平衡透析法、誘起 CD スペクトル法により ARP の HSA における結合特性を評価するとともに、等温滴定量測定法 (ITC) を用いて ARP の HSA における結合様式を解析した。第 3 章では、結合サイト特異的なリガンドとの阻害実験により ARP の HSA 分子上における結合サイトの同定を行い、さらに部位特異的変異体と動物種アルブミンを用いた検討ならびに X 線結晶構造解析により、ARP 結合サイトのマイクロ環境を推定した。第 4 章では、病態時における HSA の翻訳後修飾や内因性物質濃度の変動が HSA への ARP の結合性に及ぼす影響について評価し、病態下におけるタンパク結合の変化について推定した。

以下に得られた知見を詳述する。

第2章 ARP の HSA への結合特性評価

第1節 序

ARP の血漿タンパク結合率は 99 %以上と高く、主に HSA に結合することが知られているが²⁰⁾、ARP がどのような様式で HSA に結合するのかといった結合特性に関する報告は非常に少ない。例えば、薬物のタンパク結合特性のなかでも基本的事項である HSA への結合パラメータ（結合定数 K_a 、結合サイト数 n ）でさえ ARP については評価されていないのが現状である。このため、ARP については、HSA にどの程度の親和性で結合するのか、あるいは、結合サイトでの併用薬との競合置換は起きるのかといった薬物動態的考察は不可能である。

そこで本章では、まず平衡透析法を用いて ARP の HSA への結合特性のうち結合パラメータの算出を試みた。さらに、ARP の代謝物ならびに各種誘導体を用いた検討により、結合に関与する ARP 分子上の特徴についての構造化学的に考察した。また、円二色性 (CD) スペクトル法ならびに等温滴定熱量測定法 (ITC) により、HSA と ARP の結合様式の詳細を解明した。

第 2 節 ARP 代謝物および誘導体の結合パラメータ

第 1 項 平衡透析法を用いた結合パラメータの算出

まず、ARP の HSA に対する基本的な結合特性として結合パラメータを算出した。次に、ARP の主代謝物である dehydro-ARP の HSA に対する結合性を評価した。さらに、ARP の HSA への結合様式を構造活性相関的な観点から推察するために、ARP 分子上の塩素原子の置換位置と置換度の異なる 3 種の deschloro 体 (deschloro-ARP, 2-deschloro-ARP, 3-deschloro-ARP) ならびに塩素原子をメチル基に置換した dimethyl-ARP 誘導体についても、HSA への結合パラメータを算出した。Fig. 3 には、検討に用いた ARP とその代謝物ならびに ARP 誘導体の構造式を示す。

平衡透析法を用いて算出した結合パラメータを Table 1 に示す。ARP の HSA への結合定数 (K_a) は $7.51 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、結合サイト数 (n) はほぼ 1 であったことから、ARP は HSA に非常に強く結合し、1:1 の複合体を形成することが明らかとなった。さらに、ARP の代謝物ならびに誘導体についても、結合サイト数はほぼ 1 であることから、ARP 同様、HSA と 1:1 の複合体を形成していると考えられた。一方、HSA への結合親和性 ($n \cdot K_a$) を比較した結果、代謝物 (dehydro-ARP) の HSA に対する親和性は ARP と同等であったが、ARP 誘導体の親和性は、ARP とその代謝物に比較して顕著に低く、特に、塩素原子が ARP 分子上に存在しない deschloro-ARP の親和性は最も低かった。

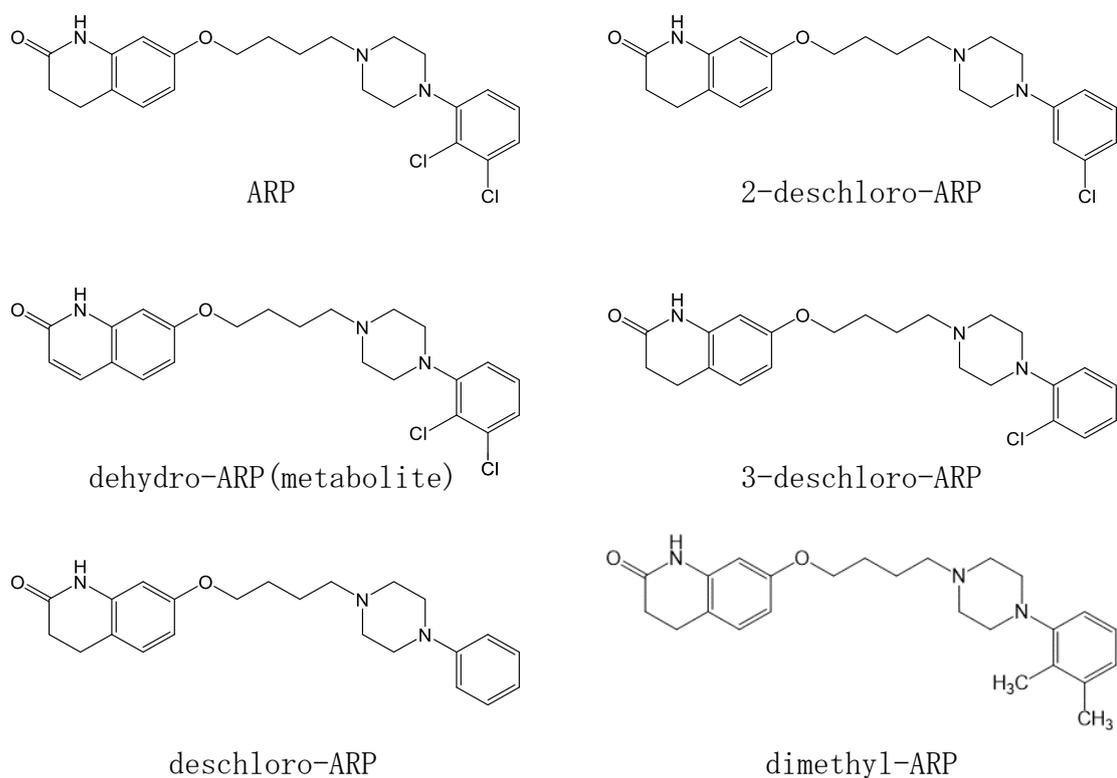


Fig. 3. Chemical structures of ARP, its metabolite (dehydro-ARP), and structurally related compounds (deschloro-, 2-deschloro-, 3-deschloro- and dimethyl-ARP).

Table 1. Binding parameters of ARP, its metabolite, and structurally related compounds to HSA at pH 7.4 and 25 °C

	K_a ($\times 10^6$ M ⁻¹)	n	nK_a ($\times 10^6$ M ⁻¹)
ARP	7.51 \pm 1.36	0.80 \pm 0.05	5.94 \pm 0.79
dehydro-ARP (ARP's metabolite)	3.19 \pm 0.55	0.98 \pm 0.10	3.08 \pm 0.27
deschloro-ARP	0.17 \pm 0.01	0.63 \pm 0.03	0.10 \pm 0.01
2-deschloro-ARP	0.65 \pm 0.22	0.97 \pm 0.16	0.61 \pm 0.11
3-deschloro-ARP	1.55 \pm 0.09	0.84 \pm 0.02	1.30 \pm 0.07
dimethyl-ARP	0.45 \pm 0.02	1.16 \pm 0.03	0.53 \pm 0.02

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

第2項 誘起 CD スペクトル法を用いた結合状態の評価

タンパク質に結合したリガンドは、結合部位の不斉場に置かれることにより、リガンド自身が有していないコットン効果を誘起することがある。これは、結合サイトにおけるリガンドの発色団の不斉的摂動によるとされている。この誘起コットン効果の強度や波長依存性 (CD スペクトル) の解析は、リガンドの結合量や結合部位での空間的配置を反映することから、結合特性解析に有用である。そこで、HSA-ARP 混合系で観察される誘起 CD スペクトルを確認するとともに、ARP の代謝物と誘導体の結果と比較した。

ARP 自身は、250 nm より長波長の領域では、CD スペクトルを有しないが、HSA と結合することで、265 nm 付近に正のコットン効果、300 nm 付近に負のコットン効果が誘起することが明らかとなった (Fig. 4)。また、これら正負のコットン効果の強度は、ARP の濃度依存的に増加し、282 nm 付近には等吸収点が観察されたことから、ARP が HSA と 1 : 1 の複合体を形成していると考えられた。

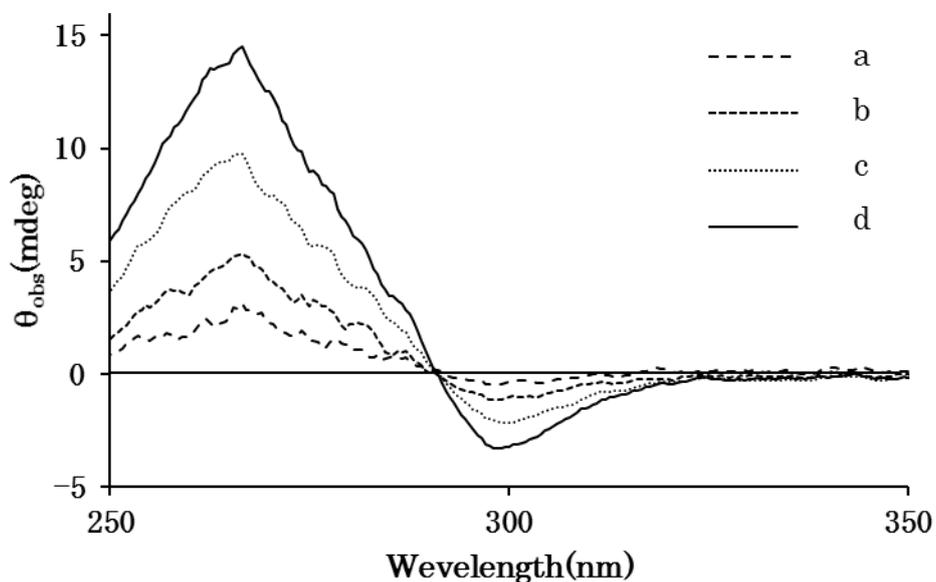


Fig. 4. CD spectra of ARP-HSA systems at pH 7.4 and 25 °C.

The concentrations of HSA 40 μM , and ARP concentrations were 5 (a), 10 (b), 20 (c), and 40 μM (d).

次に、ARP の代謝物ならびに誘導体についても同様に、HSA との結合により誘起される CD スペクトルを測定した。その結果、deschloro-ARP、3-deschloro-ARP および dimethyl-ARP では、ARP の場合とは異なる誘起 CD スペクトルが観察された。一方、dehydro-ARP および 2-deschloro-ARP は、265 nm 付近にピークを有し、ARP の場合と類似のスペクトルを示した (Fig. 5)。このことから、HSA 上の結合部位における ARP、dehydro-ARP および 2-deschloro-ARP の配向性は類似している可能性が示唆された。

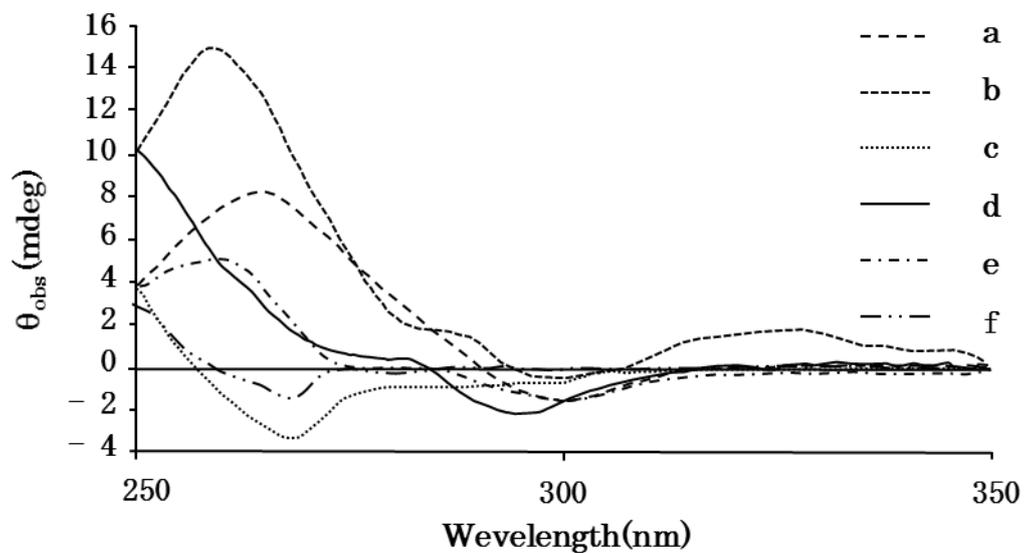


Fig. 5. CD spectra for the interaction of ARP derivatives with HSA at pH 7.4 and 25 °C.

The concentrations of HSA and ligands were 40 and 20 μM , respectively. (a-f) ARP, dehydro-ARP, deschloro-ARP, 3-deschloro-ARP, 2-deschloro-ARP, dimethyl-ARP.

第3項 等温滴定熱量測定 (ITC)

タンパク質とリガンドが結合する際には、その相互作用に伴い熱量変化が生じる。ITCはこの熱量を測定することで、熱力学的パラメータおよび結合パラメータを算出できることから、相互作用様式の解明に広く利用されている。そこで、ARPのHSAに対する結合様式をより詳細に解明することを目的に、ARP-HSAならびにARP誘導体-HSA混合系でのITC測定を行い、結果を比較した。なお、deschloro-ARPについては、HSAとの相互作用に伴い熱量変化が小さかったことから、測定対象から除外した。

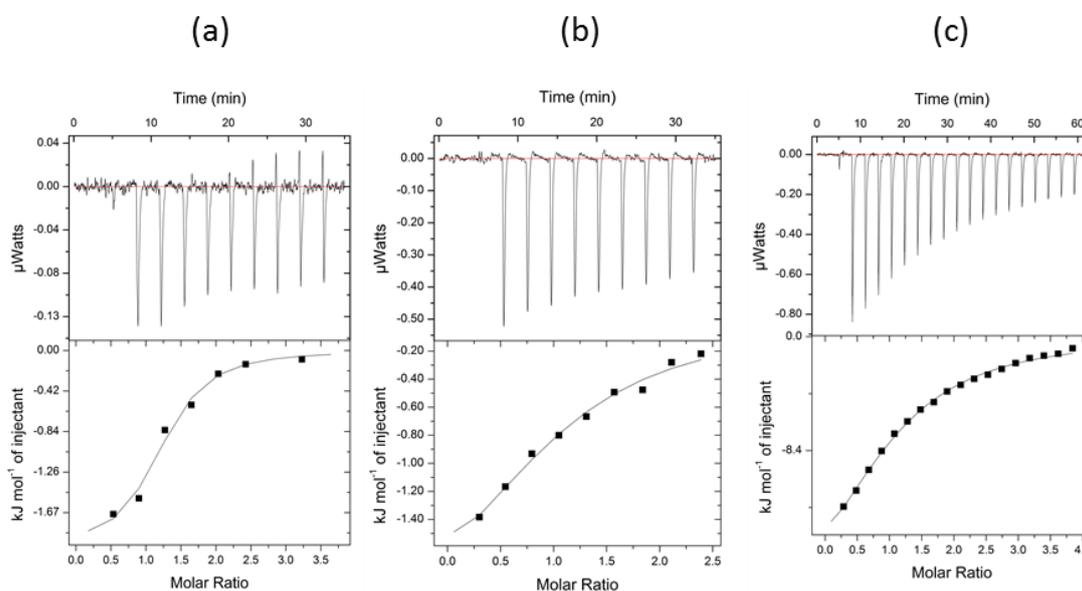


Fig. 6. Thermodynamic analysis of interaction between HSA and ARP, and its derivatives (2-deschloro-ARP, or 3-deschloro-ARP). ITC measurements were performed in the presence of HSA by titrating with ARP (a), 2-deschloro-ARP (b), or 3-deschloro-ARP (c)-HSA at pH 6.0 and 35 °C.

Fig. 6には、それぞれの系で観測されたサーモグラム（上段図）および結合

等温線（下段図）を示す。いずれのサーモグラムも熱量変化を表すピークが下向きであることから、その相互作用が発熱反応であることが明らかとなった。次に、得られた結合等温線を解析し、HSA への ARP および誘導体の結合パラメータならびに熱力学的パラメータを算出した（Table 2）。

Table 2. Thermodynamic parameters for the binding of ARP and its derivatives to HSA

Compounds	$K_d (\times 10^{-6} \text{ M})$	n	ΔH (kJ/mol)	$-T \Delta S$ (kJ/mol)
ARP	1.6 ± 0.8	0.96 ± 0.15	-2.3 ± 0.2	-34.9 ± 1.3
2-deschloro-ARP	16.8 ± 6.9	1.06 ± 0.03	-2.1 ± 0.6	-28.4 ± 1.2
3-deschloro-ARP	16.1 ± 2.4	1.01 ± 0.04	-26.5 ± 7.0	-2.1 ± 7.6

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

Table 2 に示す通り、得られた結合サイト数 n は、ほぼ 1 であったことから、ARP および誘導体はいずれも HSA と 1:1 で結合していることが明らかとなった。また、解離定数 K_d の比較から、ARP は HSA に強く結合するが、ARP 誘導体の HSA に対する結合性は ARP と比較して低いことが示された。結合パラメータに関するこれらの結果は、先に示した平衡透析法を用いて算出した結果と同様の傾向であった。次に、熱力学的パラメータについては、いずれの系においてもエンタルピー変化 (ΔH) は負、エントロピー変化 (ΔS) は正であることから、自発的に起こる反応であった。さらに、HSA への結合は、ARP および 2-deschloro-ARP については主にエントロピー項の寄与が大きかったが、3-deschloro-ARP ではエンタルピー項の寄与が大きく、このことから、ARP および 2-deschloro-ARP と HSA の結合様式は類似しており、3-deschloro-ARP はこれらとは異なる結合様式である可能性が示唆された。

なお、Table 1 と Table 2 を比較するとわかるが、ITC で得られた結合定数 (=1/解離定数) が、平衡透析法で得られた結合定数の約 100 分の 1 であった。この差異は、測定方法、溶媒の違いなどの実験条件の違いによるものと考えられた。事実、平衡透析法における溶媒の種類や pH を ITC の測定条件の pH 6.0 で (の結果) に設定したところ、結合定数の低下が観測された (Table 3)。

Table 3. Binding constants (K_a values) evaluated by equilibrium dialysis for the interaction of ARP with HSA at pH 6.0 and pH 7.4 and 25 °C.

$K_a (\times 10^6 \text{ M}^{-1})$	
pH 6.0	pH 7.4
0.094 ± 0.015^a	7.51 ± 1.36^b

^a These values were obtained from the experiment performed in the presence of 2 %(w/v) DMSO at pH 6.0, which is the same conditions as ITC measurement.

^b This value was according to Sakurama et al²¹⁾

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

第3節 考察

ARP の血漿タンパク結合率は 99 %以上と高く、主に HSA に結合することが知られているが²⁰⁾、ARP がどのような様式で HSA に結合するのかといった結合特性に関する報告は非常に少ない。このため、実臨床で起きる薬物動態や薬効の変動や副作用の発現の原因を考察する際に、タンパク結合に関する情報を十分利用できていない現状である。そこで本章ではまず、HSA への ARP の結合特性のなかでも基本的特性である、結合パラメータの算出を試みた。

平衡透析法により算出された ARP の HSA への結合定数は $7.51 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であり (Table 1)、HSA が血清中の主要タンパク質であることを考え合わせると、これまでに報告されている ARP の高い血漿タンパク結合率 (99 %以上)²⁰⁾ は、HSA への結合により説明可能と考えられた。さらに、結合サイト数は 1 であることが確認され、ARP は HSA と 1 : 1 複合体を形成することが示された (Table 1)。

次に、ARP と HSA との強い結合の推進力を考察する目的で、ARP の主要代謝物である dehydro-ARP 及び誘導体 (deschloro-ARP, 2-deschloro-ARP, 3-deschloro-ARP, dimethyl-ARP) についても検討を行った (Table 1)。dehydro-ARP は HSA に対して ARP と同等の結合親和性を示したものの、誘導体の結合親和性は顕著に低く、特に、塩素原子が分子上に存在しない deschloro-ARP の親和性は最も低かった。このことから、ARP 分子上の塩素原子が HSA の結合に重要な役割を果たしていると考えられた。なお、活性代謝物である dehydro-ARP が ARP と同等の結合親和性を示したことは、代謝物の体内動態や薬効の持続性に HSA への結合が関与している可能性があることを示唆するものであり興味深い。

ARP は HSA との結合により正 (265 nm 付近)、負 (300 nm 付近) のコットン効果

果を誘起した (Fig 4)。また、これら正負のコットン効果の強度は、ARP の濃度依存的に増加し、282 nm 付近に等吸収点が観察されたことから、ARP が HSA と 1 : 1 の複合体を形成することが改めて確認された。このような、誘起 CD スペクトルは dehydro-ARP 及び誘導体 (deschloro-ARP, 2-deschloro-ARP, 3-deschloro-ARP, dimethyl-ARP) でも確認できたことから、これらの比較により HSA 分子上での結合状態を推察した (Fig 5)。dehydro-ARP および 2-deschloro-ARP では、ARP で観察される誘起 CD スペクトルと類似のスペクトルを示した。このことから、結合部位における ARP、dehydro-ARP および 2-deschloro-ARP の配向性は類似している可能性が示唆され、特にこれらの分子に共通して存在するジクロロフェニルピペラジン基 3 位の塩素原子が配向性を決定づけているものと考えられた。

ARP の HSA に対する結合様式をより詳細に検討することを目的にして、ARP-HSA ならびに ARP 誘導体-HSA 混合系で ITC を用いた評価を加えた。ITC を用いて結合パラメータを算出した結果 (Table 2)、平衡透析法と同様に、ARP が HSA と 1 : 1 の複合体を形成し、その結合には塩素原子が重要な役割を果たしていることが示唆された。これまでに報告されている分子間相互作用と熱力学的パラメータの関係によると、疎水性相互作用ではエントロピー項の寄与が大きく、一方、水素結合や van der Waals 結合に関してはエンタルピー項の寄与が大きくなるといわれている²²⁾。ARP, 2-deschloro-ARP と HSA との結合においては、エントロピー項の寄与が大きく、疎水性相互作用が結合の推進力になっている可能性が示唆された。一方、3-deschloro-ARP と HSA との結合では、エンタルピー項の寄与が大きく、水素結合やファンデルワールス力の関与も示唆された。これらの結果は、ARP の構造中のジクロロフェニルピペラジン基 3 位の塩素原子が結合様式を決定づけている可能性も示しており、CD スペクトルにより評価した配向性

の決定因子と一致していた。

以上の結果は、薬物分子上の塩素原子の位置や数がタンパク質との相互作用における、結合親和性、配向、結合様式などに影響することを示しており、構造化学的に興味深い知見と考えられる。

第4節 小括

- 1) 平衡透析法を用いた検討により、ARP は HSA に強く結合し、1 : 1 の複合体を形成することが明らかとなった。さらに、その結合には ARP 分子上の塩素原子が重要な役割をはたしていることが明らかになった。
- 2) CD スペクトル法を用いた検討より、HSA 分子上における ARP の結合状態は、ARP 構造中のジクロロフェニルピペラジン基 3 位の塩素原子が決定づけている可能性が示唆された。
- 3) ITC を用いた検討により ARP の HSA への結合には、疎水性相互作用が関与していると考えられた。また、相互作用様式の決定因子として、ARP 構造中のジクロロフェニルピペラジン基 3 位の塩素原子の関与が示唆された。

第3章 HSA 分子上の ARP 結合サイトのマイクロ環境解析

第1節 序

前章では、ARP が HSA と 1 : 1 の複合体を形成することが明らかになり、HSA 上に ARP の特異的な結合サイトが存在することが示された。さらに、ARP 構造中のジクロロフェニルピペラジン基 3 位の塩素原子が HSA への結合に重要な役割を果たしていることが示唆された。HSA 分子上にはサイト I ならびにサイト II と呼ばれる 2 つの主要薬物結合サイトが存在することが知られているが、ARP がこのいずれかに結合するのか、あるいは、これらとは異なるサイトに結合するのかについては明確ではない。また、ARP 分子あるいは 3 位の塩素原子が、結合サイトにおいてどのようなアミノ酸残基と相互作用しているのかについても解明されていない。

薬物-HSA 複合体の X 線結晶構造解析が行われていない段階での結合サイトの同定には、通常、サイト I、II に特異的に結合するリガンドとの阻害実験が行われる。また、相互作用に関与するアミノ酸残基の推定には、アミノ酸を化学修飾した HSA への結合性評価が有用であるが、より確実に検証するには部位特異的の変異体 HSA を用いた方法が用いられる。さらには、動物種間ではアルブミン上の結合サイトを構成するアミノ酸残基が一部異なることから、動物種間で結合性を比較することも、薬物が結合している領域の環境（マイクロ環境）を推定する上で有用である。

そこで、本章では、まずサイト I およびサイト II に特異的に結合するリガンドとの阻害実験を通して、HSA 分子上における ARP の結合サイトの同定を試みた。

次に、同定されたサイトに存在する代表的なアミノ酸残基をアラニンに変異させた部位特異的変異体、ならびに動物種アルブミンへの ARP の結合を評価することで、ARP 結合サイトのマイクロ環境を推定した。併せて、薬物-HSA 複合体の X 線結晶構造解析を試み、推定した ARP 結合サイトのマイクロ環境の妥当性を検証した。

第 2 節 ARP の結合サイトの同定

第 1 項 蛍光プローブ置換実験による結合サイトの推定

HSA 分子上における ARP の結合サイトを推定するために、蛍光プローブ置換実験を行った^{23, 24)}。蛍光プローブとしては、ワルファリン (サイト I プローブ)、およびダンシルサルコシン (サイト II プローブ) を用いた。

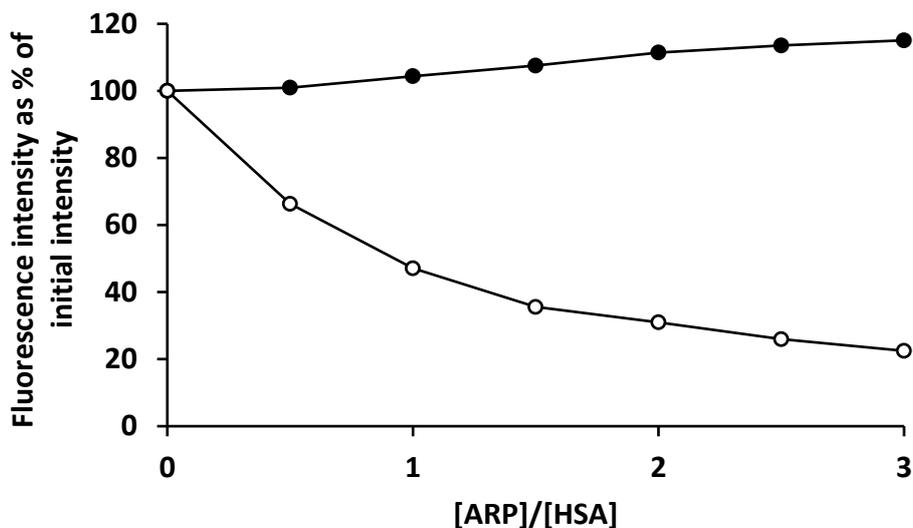


Fig. 7. Effects of ARP on the fluorescence of warfarin and dansylsarcosine when bound to HSA.

The concentration of HSA, warfarin, and dansylsarcosine was 2 μ M.

Closed and open circles are the effects on the fluorescence of warfarin and dansylsarcosine, respectively.

Fig. 7 に示すように、ARP 存在下で、HSA-ワルファリン混合系で誘起された蛍光には変化が認められなかったが、HSA-ダンシルサルコシン混合系では蛍光強度の著しい低下が確認された。このことから、ARP がサイト II に結合したダンシルサルコシンを置換していると推察され、ARP はサイト II に結合するものと考えられた。

第 2 項 競合阻害実験による結合サイトの確認

先の蛍光プローブ置換実験における推定を直接確認する目的で、平衡透析法を用いた阻害実験を行った。サイト I の代表的な薬物であるワルファリン、サイト II の代表的な薬物であるイブプロフェン並びにジアゼパムの結合²⁵⁾を、ARP

の存在、非存在下で評価した (Fig. 8)。

ワルファリンにおける Scatchard プロットは、ARP の存在、非存在下で違いは認められなかった。一方、イブプロフェンおよびジアゼパムの場合は、ARP の存在下でプロットの傾きが緩やかになり結合定数 (K_a) の低下が確認された (Fig. 8、Table 4)。一方、X 軸切片 (結合サイト数 n) は、ARP の存在、非存在下で一致した。阻害剤存在下において、薬物の結合サイト数が変わらず、結合定数が低下した場合、その薬物と阻害剤は競合していると考えられる。したがって、ARP とイブプロフェンおよびジアゼパムとは HSA 分子上で競合していることが示され、ARP がサイト II に結合することが明らかとなった。

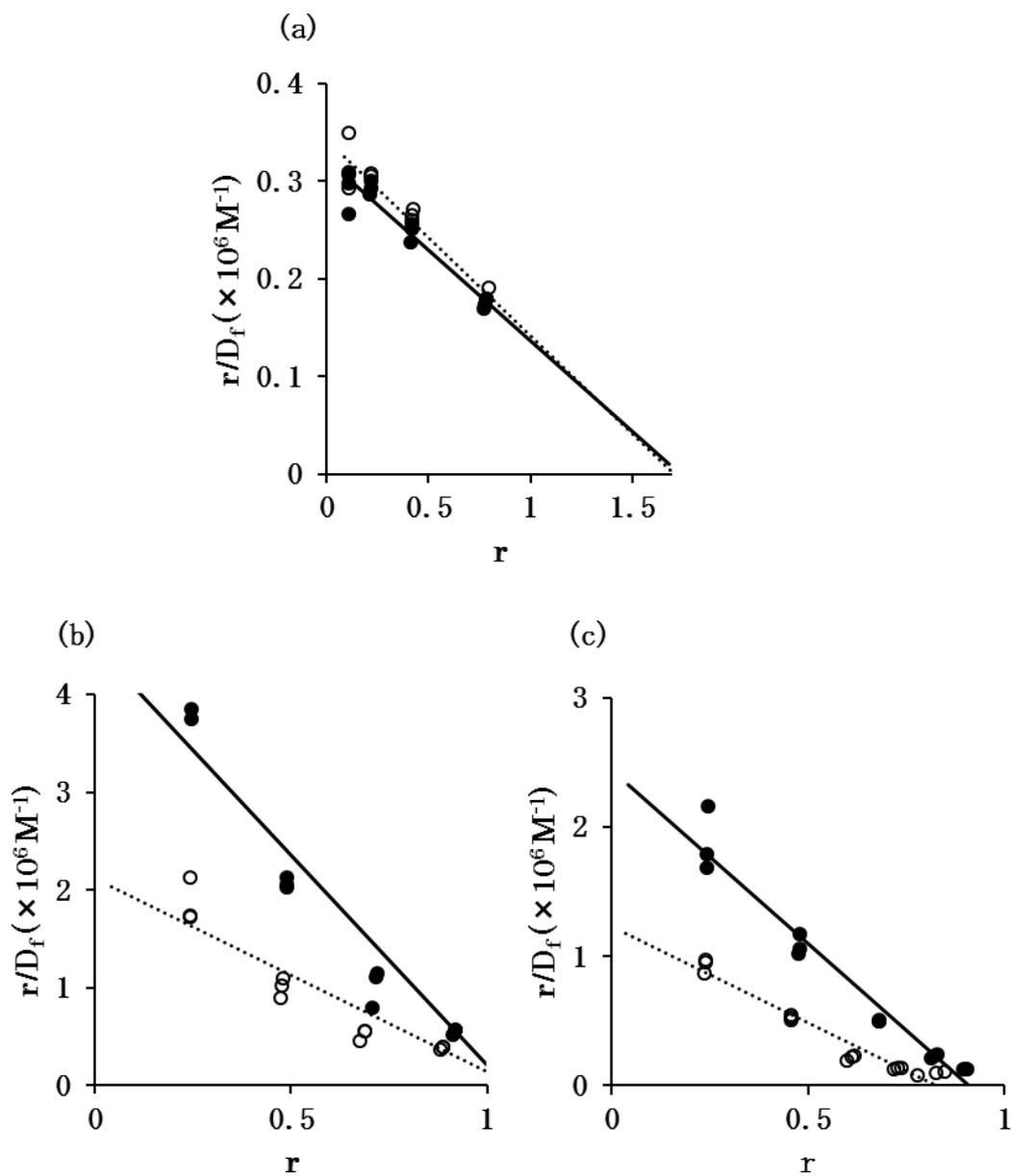


Fig. 8. Scatchard plots for bindings of warfarin (a), ibuprofen (b) and diazepam (c) to HSA in the absence (closed circle) and presence (open circle) of ARP at pH 7.4 and 25 °C. The concentrations of HSA and ARP were 40 μ M and 10 μ M, respectively.

The concentrations of warfarin, ibuprofen and diazepam were 2.5-40 μ M and 10-40 μ M, respectively.

Table 4. Binding parameters for bindings of warfarin, ibuprofen and diazepam to HSA in the absence and presence of ARP at pH 7.4 and 25 °C.

Ligands	ARP (inhibitor)	K_a ($\times 10^6$ M ⁻¹)	n
warfarin	without ARP	0.19 \pm 0.03	1.76 \pm 0.23
	with ARP	0.20 \pm 0.04	1.74 \pm 0.23
ibuprofen	without ARP	4.30 \pm 0.13	1.05 \pm 0.02
	with ARP	1.99 \pm 0.22	1.07 \pm 0.02
diazepam	without ARP	2.69 \pm 0.32	0.91 \pm 0.01
	with ARP	1.49 \pm 0.13	0.83 \pm 0.03

The concentrations of warfarin, ibuprofen and diazepam were 2.5-40 μ M and 10-40 μ M, respectively.

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

第3項 部位特異的変異体 HSA への ARP の結合サイトの確認

これまでに、サイト I、サイト II 近傍には、それぞれ ^{214}Trp 、 ^{411}Tyr が存在していることが明らかになっている^{26, 27)}。そこで、 ^{214}Trp および ^{411}Tyr をアラニンに変異させた部位特異的変異体（それぞれ W214A および Y411A）を用いて ARP の結合性を評価した。変異体の調製量は極めて少量であったことから、結合性の評価には CD スペクトル法を用いた。

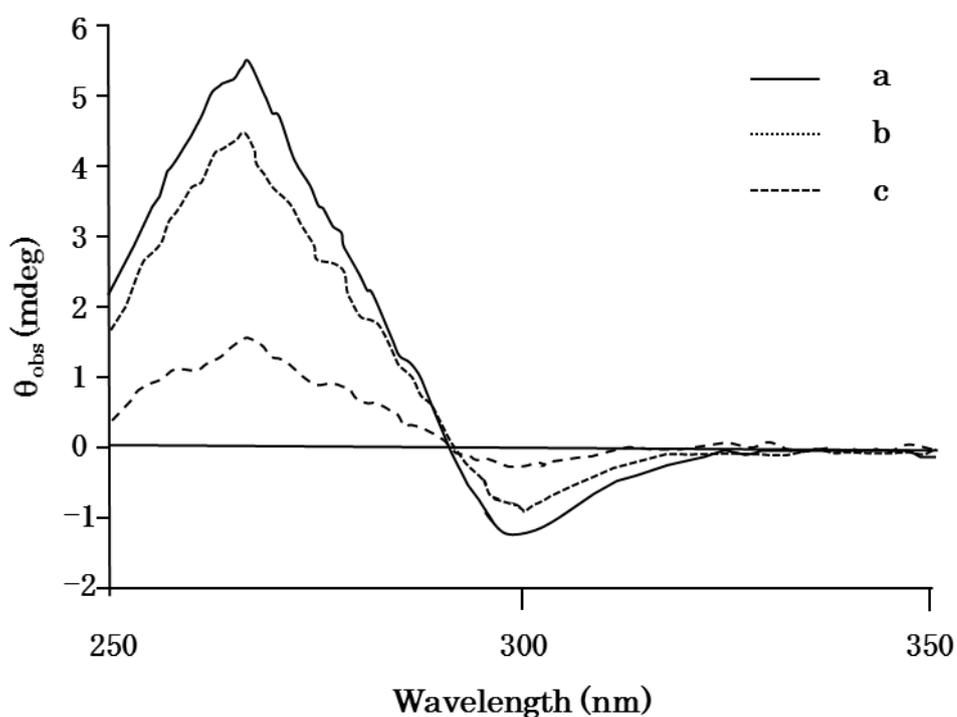


Fig. 9. CD spectra for the interactions of ARP with HSA (a), W214A (b), and Y411A (c) at pH 7.4 and 25 °C.

The concentrations of albumins and ARP were 40 μM and 20 μM , respectively.

Fig. 9 示すように、アルブミン-ARP 混合系で観察される誘起 CD スペクトル

は、W214A においては HSA の場合と大きな違いは確認されなかったが、Y411A においては CD 強度の顕著な低下が確認された。以上の結果より、ARP がサイト II の ⁴¹¹Tyr 近傍に結合している可能性が示唆された。

第 3 節 動物種アルブミンにおける ARP 及び deschloro-ARP の結合特性

第 1 項 平衡透析法を用いた結合パラメータの算出

哺乳動物の血清アルブミンは、アミノ酸配列に関して非常に高い相同性（約 80 %）を示す²⁸⁾。一方、動物種間ではアルブミン上の結合サイトを構成するアミノ酸残基が一部異なり、このようなマイクロ環境の違いを反映して、薬物の結合性に種差が示される場合がある²⁹⁻³¹⁾。そこで、ウシ、ウサギ、ラットおよびイヌアルブミンに対する ARP および deschloro-ARP の結合パラメータを平衡透析法により算出し、HSA の場合と比較した。

Table 5. Parameters for interaction ARP and deschloro-ARP with mammalian albumins

Albumin Species	Binding Parameters			
	ARP		deschloro-ARP	
	$K_a (\times 10^6 \text{ M}^{-1})$	n	$K_a (\times 10^6 \text{ M}^{-1})$	n
Human	7.51 ± 1.36	0.80 ± 0.05	0.15 ± 0.01	0.73 ± 0.03
Bovine	0.69 ± 0.39	0.85 ± 0.38	0.10 ± 0.04	0.70 ± 0.05
Rabbit	0.89 ± 0.08	0.92 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.83 ± 0.24
Rat	0.57 ± 0.53	1.23 ± 0.62	0.03 ± 0.01	1.01 ± 0.28
Dog	4.36 ± 2.61	0.70 ± 0.06	0.05 ± 0.01	0.69 ± 0.03

The results are means ± S.D. (n=3).

Table 5 に示すように、いずれの動物種アルブミンにおいても ARP と deschloro-ARP の結合サイト数 n は、ほぼ 1 であったことから、1 : 1 の複合体を形成していると推察された。また、ARP において、HSA やイヌアルブミンの結合定数が他の動物種アルブミンと比較して高値を示しているように、ARP のアルブミンへの結合には種差が存在することが明らかとなった。また、deschloro-ARP の結合定数は、いずれの動物種においても ARP より低値を示し、特に HSA やイヌアルブミンでは顕著に低下した。このことから、HSA やイヌアルブミンへの ARP の結合には塩素原子が特に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

第 2 項 誘起 CD スペクトル法を用いた配向性の評価

次に、動物種アルブミン上の結合サイトにおける ARP ならびに deschloro-ARP の結合状態を推察する目的で、動物種アルブミンとの混合系で観察される誘起 CD スペクトルを比較した。

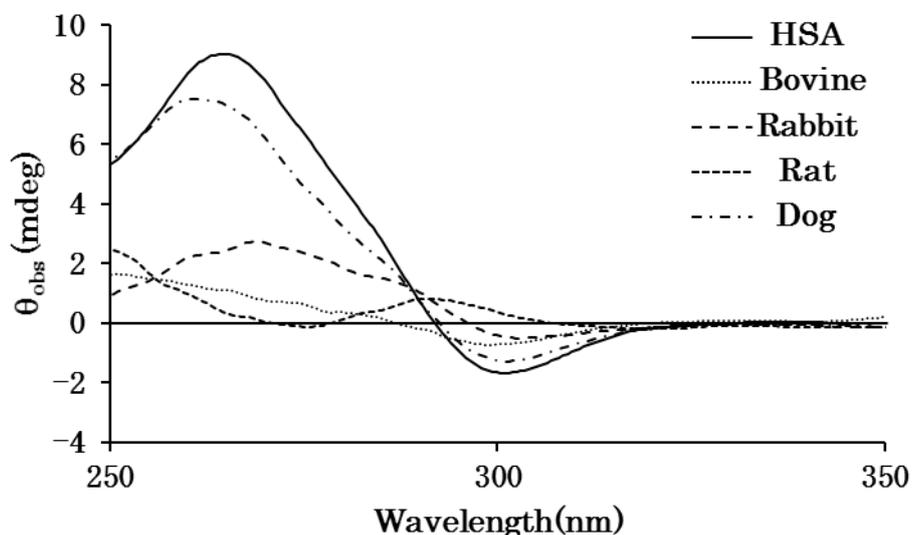


Fig. 10. CD spectra of ARP bound to various albumin molecules at pH 7.4 at 25 °C. The concentration of albumin was 40 μ M and ARP concentration was 20 μ M, respectively.

Fig. 10 に示すとおり、イヌアルブミンにおける誘起 CD スペクトルは、強度、形状共に HSA の結果と類似しており、結合親和性および結合サイトでの配向性は HSA に類似しているものと考えられた。また、ウサギアルブミンにおいては、HSA の場合と比較して、強度の低下が確認されたが、その形状は類似していたことから、結合親和性は低下するものの、結合サイトでの配向性は HSA に類似していると考えられた。一方、ウシとラットアルブミンの場合、誘起 CD スペクトルは強度、形状共に HSA とは異なっており、HSA とは異なる結合状態である可能性が示された。

Fig. 11 は、各動物種アルブミン-deschloro-ARP 混合系で観測される誘起 CD スペクトルを示す。いずれの CD スペクトル強度も、ARP の場合 (Fig. 10) と比較すると小さく、さらに形状も異なったことから、deschloro-ARP は結合親和性ならびに配向性ともに ARP とは異なるものと考えられた。このように、いずれの動物種においても、ARP 分子上の塩素原子が結合親和性とともに配向性を決定づけるうえで重要な役割を果たしていることが示唆された。

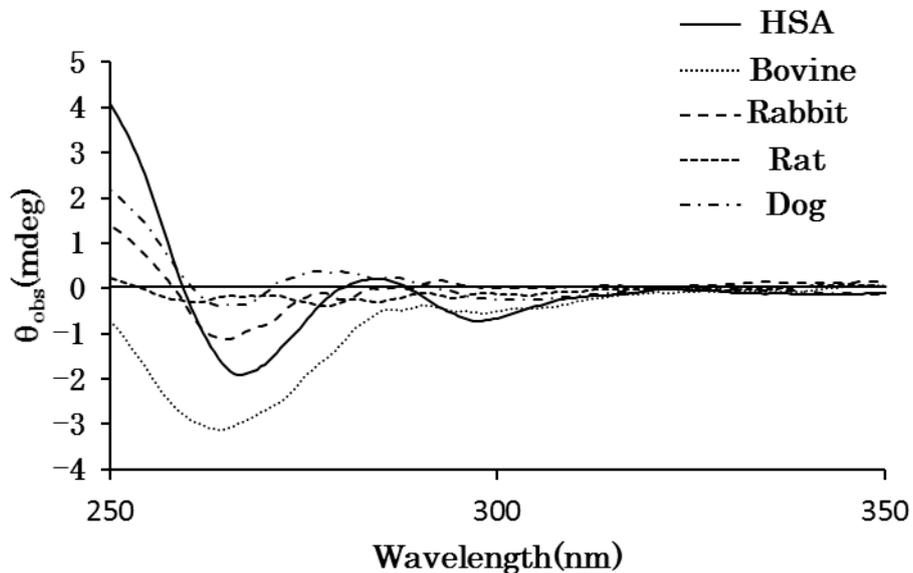


Fig. 11. CD spectra of deschloro-ARP bound to various albumin molecules at pH 7.4 at 25 °C. The concentration of albumin was 40 μM and deschloro-ARP concentration was 20 μM .

第 4 節 HSA-ARP 複合体の X 線結晶構造解析

これまでの結果から、ARP は HSA 分子上のサイト II の ⁴¹¹Tyr 近傍に結合することが明らかとなった。そこで本項では、これらの結果を検証し、その立体構造を詳細に解明するために、HSA-ARP 複合体の X 線結晶構造解析を行った。

本研究で調製した HSA-ARP 複合体結晶の X 線解析データおよび構造精密化の統計値を Table 6 に記す。HSA-ARP 複合体の結晶は、空間群 P21 に属し、格子定数は $a=59.2 \text{ \AA}$ 、 $b=184.9 \text{ \AA}$ 、 $c=59.3 \text{ \AA}$ 、 $\beta=106.7^\circ$ であった。また、得られた結晶の最大分解能は 2.28 \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。HSA の全体構造は、これまでの報告と同様に、 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. 12a)。

Table 6. Data-Collection and Structure Refinement Statistics

Values in parentheses denote the highest resolution shell

Data set	ARP-HSA complex
Data-collection	
Source	Photon Factory BL-17A
wavelength (Å)	0.9800
Space group	$P2_1$
Unit-cell parameters	
length (Å)	$a = 59.2, b = 184.9, c = 59.3,$
angle (°)	$\beta = 106.7$
Resolution range (Å)	50.0 – 2.28 (2.42 – 2.28)
No. of observed reflections	361 307 (58 618)
No. of unique reflections	54 292 (8 793)
Multiplicity	6.7 (6.7)
Completeness (%)	97.7 (99.1)
$R_{\text{merge}}(\%)^a$	8.3 (46.8)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	14.2 (3.3)
Refinement	
Resolution (Å)	48.4 – 2.28 (2.32 – 2.28)
Reflection used	54 291 (2 793)
$R_{\text{work}}(\%)^b$	20.7 (27.3)
$R_{\text{free}}(\%)^c$	25.5 (35.2)
Completeness (%)	97.8 (94.0)
No. of non-hydrogen atoms	8 920
Protein	8 466
Ligands	80
Solvent	374
<i>r.m.s.d.</i> from ideality	
bond length (Å)	0.002
bond angle (°)	0.424
Average <i>B</i> -factor	51.1
Protein	51.7
Ligands	44.9
Solvent	38.7
Ramachandran plot	
favoured region (%)	93.63
allowed region (%)	6.28
outlier region (%)	0.09
Clashscore	7.0
Twin operators	($l, -k, h$)
Twin fractions	0.48

^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. R_{free} is calculated as for R_{work} , but for the test set comprising 5% reflections not used in refinement.

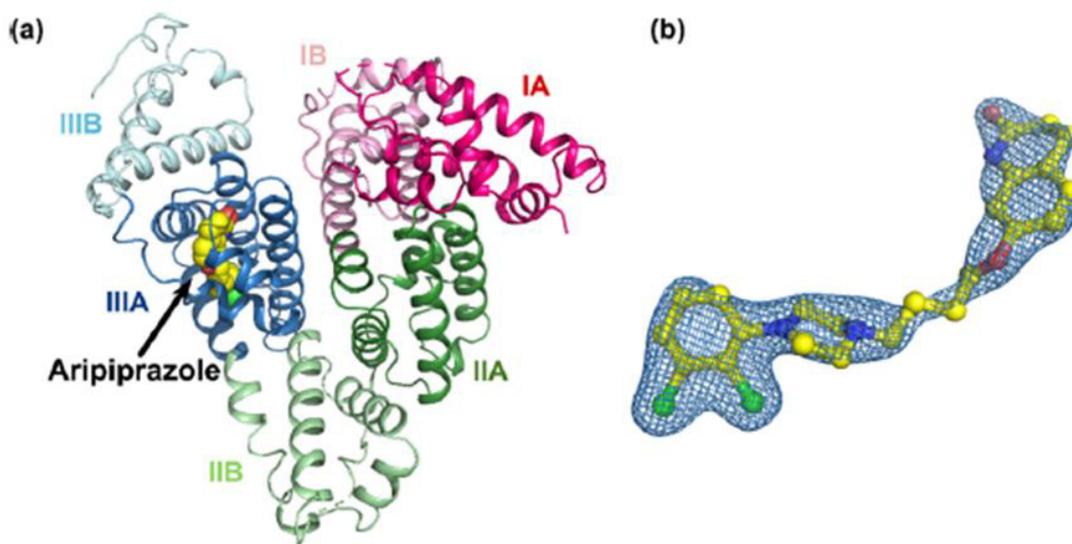


Fig. 12. Overall structure of the ARP-HSA complex. (a) Overall structures of the ARP-HSA complex (PDB: 6A7P)²¹. The HSA molecule is shown as a cartoon representation, and the sub-domain structures are colored in magenta (IA), pink (IB), green (IIA), palegreen (IIB), blue (IIIA), and cyan (IIIB). The ARP molecule (yellow) is shown as a CPK (Corey-Pauling-Koltun) representation. (b) $2mF_o - DF_c$ electron density map of ARP is shown as a blue mesh control at 1.5σ .

HSA-ARP 複合体の結晶構造では、ARP の結合部位はサブドメイン IIIA に存在していて、この部位に ARP 分子由来の明瞭な電子密度を観察することができた。HSA のサブドメイン IIIA には、サイト II ならびに脂肪酸結合サイト (FA 結合サイト) 3 および 4 と呼ばれる 3 つのリガンド結合部位が同定されている^{32, 33})。ARP 結合部位は、サイト II および FA サイト 4 の両方を含んでいて、PISA プログラム³⁴) で計算すると HSA と ARP の接触面積は 513 \AA^2 であった。

ARP と HSA の詳細な相互作用様式を観察すると、ARP のジクロロフェニルピ

ペラジン基は、³⁸⁷Leu, ³⁸⁸Ile, ³⁹¹Asn, ³⁹²Cys, ³⁹⁵Phe, ⁴⁰³Phe, ⁴¹¹Tyr, ⁴³⁰Leu, ⁴³³Val, ⁴³⁴Gly, ⁴³⁸Cys, ⁴⁴⁹Ala, ⁴⁵³Leu, ⁴⁸⁵Arg および ⁴⁸⁹Ser で囲まれていた (Fig. 13a)。

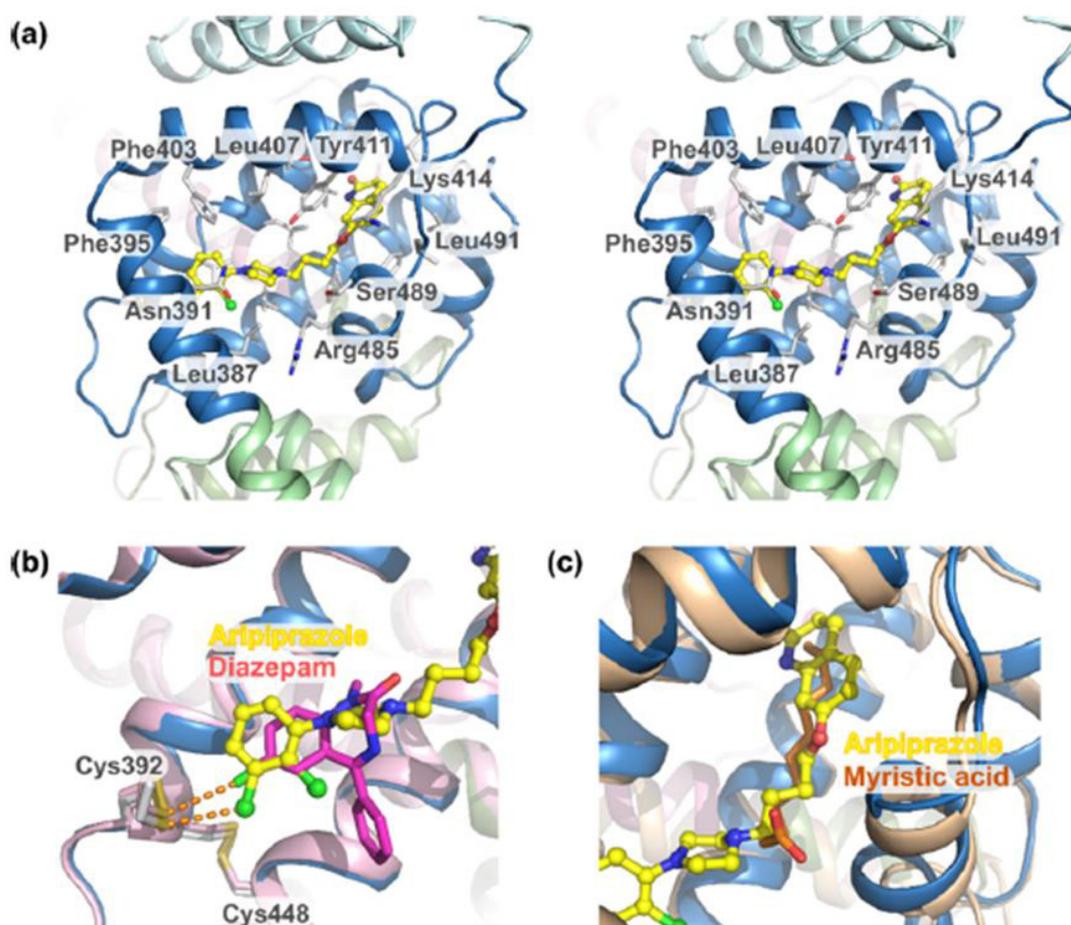


Fig. 13. ARP binding at subdomain IIIA in HSA. (a) Stereo-view of the binding of ARP at subdomain IIIA. The ARP molecule (yellow) is shown as a ball-and-stick representation. (b) Comparison of the binding position of ARP (yellow) with that of diazepam (magenta stick, PDB: 2BXF)¹⁷⁾ at drug site II. Chlorine atoms are colored in green and hydrogen bonds are shown as orange dashed lines. (c) Comparison of the position of binding of ARP (yellow) with myristic acid (orange stick, PDB: 1BJ9)³²⁾ at FA site 4.

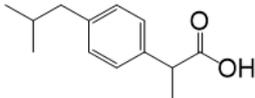
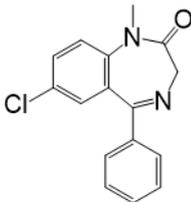
さらに、ARP のジクロロフェニルピペラジン基は、サイト II ポケットの奥に位置していて、3 位の塩素原子と HSA の ³⁹²Cys の硫黄原子の距離は 3.4-3.6 Å であった (Fig. 13b)。この結果から、ARP のジクロロフェニルピペラジン基の 3 位の塩素原子と HSA の ³⁹²Cys 残基の硫黄原子はハロゲン結合を介して相互作用していることが示唆された。なお、同様なハロゲン結合は、ジアゼパムの塩素原子と HSA の間でも観察されている^{33, 35)}。ARP のジヒドロキノリノン部位と butoxy リンカー部位は、⁴¹¹Tyr, ⁴¹⁴Lys, ⁴¹⁵Val, ⁴¹⁸Val, ⁴²³Leu, ⁴²⁷Ser, ⁴³⁰Leu, ⁴⁶⁰Leu, ⁴⁸⁸Phe, および ⁴¹⁹Leu に囲まれていた。また、ARP のジヒドロキノリノン部位は、HSA 分子の ⁴¹¹Tyr 残基のフェニル基に近接するように存在することから、分子運動によって結合位置にゆらぎが起きれば π - π 相互作用を形成するタイミングも存在することが予想された。

第5節 考察

前章では、ARP が HSA と 1 : 1 の複合体を形成し、その結合には、ARP 構造中のジクロロフェニルピペラジン基 3 位の塩素原子が重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方、ARP が HSA 分子上のどの部位に結合しているのか、また、ARP 分子あるいは 3 位の塩素原子が、結合サイトにおいてどのようなアミノ酸残基と相互作用しているのか等の詳細については解明されていない。

そこで、本章ではまず、結合サイトの同定を目的として、結合サイトに特異的に結合するリガンドとの阻害実験を行った。蛍光プローブ置換実験 (Fig. 7) および平衡透析法を用いた阻害実験 (Fig. 8) により、ARP がサイト II に結合することが明らかとなった。イブプロフェンやジアゼパムのようなサイト II に結合する薬物とは競合阻害を引き起こすことから、これらの薬物を併用時には ARP の薬物動態、薬効の変動や副作用の発現に注意する必要があると考えられた。次に、部位特異的変異体 HSA (それぞれ W214A および Y411A) を用いた検討 (Fig. 9) により、ARP がサイト II の ⁴¹¹Tyr 残基近傍に結合している可能性があるという結合状態の詳細が示された。アルブミンへの薬物の結合性には、しばしば種差が認められる。ARP については、HSA およびイヌアルブミンには同程度の親和性で結合するが、ウシ、ウサギ、ラットアルブミンへの親和性はこれらに比較して顕著に低いことが明らかとなった (Table 5)。Kosa らは、今回我々が検討した同じ動物種アルブミン (ヒト、ウシ、ウサギ、ラットおよびイヌアルブミン) を用いて、サイト II の代表的なリガンドであるイブプロフェンおよびジアゼパムの結合性を評価している (Table 7) ²⁹⁾。

Table 7. Binding parameters of ibuprofen and diazepam (site II drugs) to different serum albumins estimated by equilibrium dialysis at pH 7.4 and 25 °C from Kosa *et al.* (1997)

Primary binding parameters				
	ibuprofen		diazepam	
				
Albumin species	$K_1 (\times 10^6 \text{ M}^{-1})$	n_1	$K_1 (\times 10^6 \text{ M}^{-1})$	n_1
Human	3.56 ± 0.325	1	1.75 ± 0.626	1
Dog	3.15 ± 0.176	1	0.81 ± 0.057	1
Bovine	2.25 ± 0.154	1	N.D	N.D
Rabbit	1.59 ± 0.238	1	N.D	N.D
Rat	1.09 ± 0.067	1	N.D	N.D

The results are means \pm S.D. (n=3) N.D; Not determined.

本検討によれば、イブプロフェンはすべての動物種のアルブミンに高い親和性で結合する。一方で、ジアゼパムはヒトおよびイヌアルブミンには強く結合するが、ウシ、ウサギ、ラットアルブミンへの結合性は著しく低いことが明らかになっている。興味深いことに、今回 ARP のアルブミンへの結合性評価で示された種差 (Table 5) は、ジアゼパムにおける種差と類似していた (Table 7)。ジアゼパムが ARP 同様、構造中に塩素原子を有することを考えると、ジアゼパムと ARP の HSA への強い結合性や種差の要因に塩素原子の存在が重要な役割を果たしていると考えられる。事実、塩素原子が存在しない deschloro-ARP の結合性は、いずれの動物種アルブミンでも ARP に比較して低下した (Table 5) が、その低下の程度は、特に HSA およびイヌアルブミンで顕著であり、先の推論の妥当性が示された。これら平衡透析法で得られた結果と同様に、ARP-HSA 及び ARP-

イヌアルブミンにおける誘起 CD スペクトルの形状ならびに強度は類似 (Fig. 10) しており、結合サイトで同様の配向をとっている可能性も示唆された。さらに、いずれの動物種でも deschloro-ARP の誘起 CD スペクトル (Fig. 11) は、ARP の場合 (Fig. 10) とは異なっており、塩素原子が、結合サイトにおける ARP の配向を決定づけていると推察され、特に 3 位の塩素原子の存在は HSA 及びイヌアルブミンに関しては配向の類似性につながる因子にもなっていると考えられた。

今回我々は、HSA-ARP 複合体の X 線結晶構造解析に成功し、さらに詳細な結合様式を解明できた (Fig. 12)。先の蛍光プローブ置換実験、平衡透析法を用いた阻害実験では ARP は HSA 分子上のサイト II に結合することを明らかにしたが、X 線結晶構造によると、その結合部位は、確かにサイト II および FA 結合サイト 4 の両方を含む広範囲に及ぶことが明らかになった (Fig. 13c)。さらに、ARP は、結合ポケット内に存在する疎水性アミノ酸残基に囲まれており (Fig. 13a)、前章で推察した疎水性相互作用の関与が確認された。ARP のジヒドロキノリノン部位は、HSA 分子の ⁴¹¹Tyr 残基のフェニル基と π - π 相互作用することが示唆され、この相互作用によってコットン効果が誘起された可能性が示された。加えて、ARP 構造中のジクロロフェニルピペラジン基 3 位の塩素原子と HSA 分子上 ³⁹²Cys の硫黄原子との距離は 3.4-3.6 Å で、ハロゲン結合の形成が示唆され、前章ならびに本章において推察した、結合および結合サイトでの配向における 3 位の塩素原子の関与が確認された (Fig. 13b)。

同様のハロゲン結合を介した相互作用は、HSA とジアゼパムの塩素原子との間の相互作用においても観察 (Fig. 13b) されており^{33, 35)}、ARP はサイト II にジアゼパムと類似の様式で結合し、このことにより同様の動物種アルブミンへの結合パターンを示したものと考えられる。ところで、前章の ITC を用いた熱力学的解析 (Table 2) においては、ARP, 2-deschloro-ARP と HSA との結合におい

では、エンタルピー項の反映される可能性があるハロゲン結合等の静電的相互作用の関与は示されていない。これは、ITC を用いた熱力学的解析と X 線結晶構造解析で実験系の違いもあると考えられるが、エンタルピー項に反映されていない 1 つの可能性として水分子との相互作用が考えられる。今回得られた結果を考えると、ARP と HSA の結合には、疎水性相互作用と静電的相互作用が複合的に関与していると考えるのが妥当であると思われる。

第6節 小括

- 1) 蛍光プローブ置換実験および平衡透析法を用いた阻害実験により、ARP が サイトⅡに結合することが確認された。
- 2) 部位特異的変異体 HSA (それぞれ W214A および Y411A) を用いた検討により、ARP が サイトⅡの ⁴¹¹Tyr 残基近傍に結合している可能性があるとして推定された。
- 3) 動物種アルブミンを用いた ARP の結合部位のマイクロ環境推定において、ARP の HSA への強い結合性や種差の要因に塩素原子の存在が重要な役割を果たしているとして示唆された。また、ARP は、HSA とイヌアルブミンの結合サイトにおいて同様の配向をとっている可能性があるとして推察された。
- 4) 推定した ARP 結合サイトのマイクロ環境の妥当性を X 線結晶構造解析により検証した結果、ARP は、サイトⅡにおいて疎水性のアミノ酸残基に囲まれており、ARP のジヒドロキノリノン部位は、HSA 分子の ⁴¹¹Tyr 残基のフェニル基と π - π 相互作用することが示唆された。さらに ARP 構造中のジクロロフェニルピペラジン基 3 位の塩素原子は、HSA 分子上の ³⁹²Cys の硫黄原子とハロゲン結合を形成しているものと推察された。

以上のように、HSA 分子上の ARP 結合サイトのマイクロ環境が解明され、他薬併用時の ARP の体内動態や薬効の変動を検討する上でも有用な基礎的情報が示された。

第4章 HSA-ARP 結合に及ぼす病態時各種変動因子の影響

第1節 序

腎疾患、肝疾患や糖尿病等の病態下では、HSA への薬物の結合性が変化することが知られている^{25, 36)}。これらの疾患では、生成した活性酸素種 (ROS) や増加したグルコースにより HSA は酸化や糖化を受ける³⁷⁾。このような翻訳後修飾による HSA は構造変化^{17, 38)} や病態下での尿毒症物質、ビリルビンや遊離脂肪酸などの内因性物質の増加により、結合サイト特異的に薬物の結合性が影響を受ける^{17, 39-41)}。これらの疾患時の各種要因に伴う遊離型薬物濃度の変化は、薬物動態や薬効の変動につながる可能性がある。

先述の通り、ARP の服用は長期にわたり、また、幅広い年齢層で服用されていること^{18, 19)} を考えると、ARP 服用者が複数の疾患を罹患し、血清中の HSA の構造変化や内因性物質濃度の増大により、そのタンパク結合性が変動する可能性は十分ある。しかしながら、疾患時の ARP の血漿タンパク結合に関する情報はほぼ存在しない状況にある。

そこで本章では、各種疾患時における ARP のタンパク結合性の変化を推察することを目的に、まず、酸化ならびに糖化 HSA を調製し、これらの翻訳後修飾に伴う HSA の構造変化が ARP の結合性にどのように影響するかを評価した。さらに、尿毒症物質、ビリルビンや遊離脂肪酸のような内因性物質による結合性の変化についても評価した。

第 2 節 酸化および糖化 HSA の構造特性評価

酸化 HSA は、クロラミン T および金属触媒による酸化により調製し（それぞれ、CT-HSA および MCO-HSA）、糖化 HSA は、グルコースを HSA とともに振盪させることで調製した（Glycated-HSA）。本節では、これらの調製した酸化および糖化 HSA の構造を各種手法により評価した。

第 1 項 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

まず、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を用いて、酸化および糖化に伴う HSA の構造変化について評価した。Fig. 14 に示す通り、酸化および糖化 HSA のバンドは、HSA と同じ位置に単一のバンドとして確認されたことから、酸化および糖化に伴い多量体化、断片化のような大きな構造変化は起きていないものと考えられた。

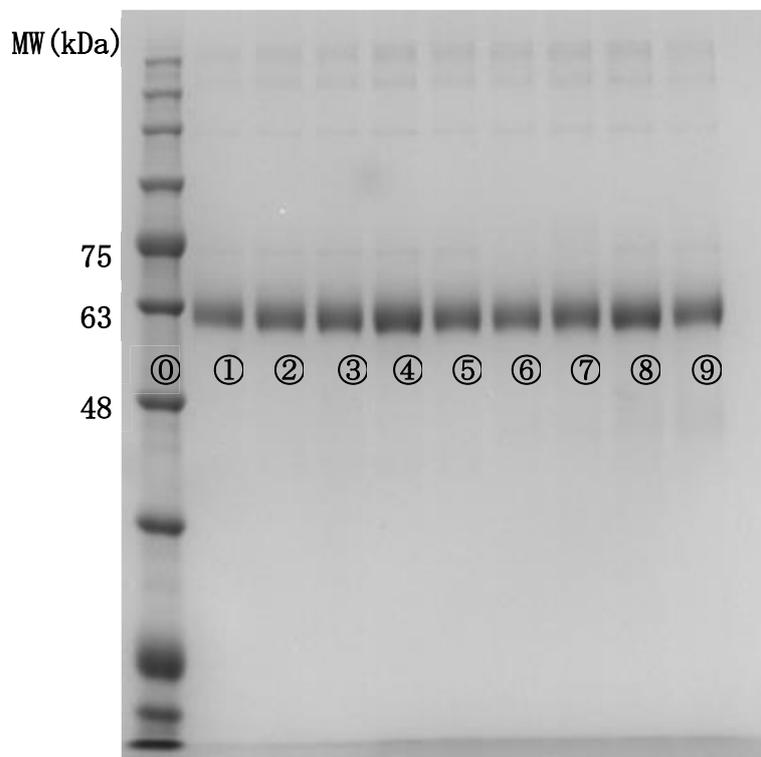


Fig. 14. SDS-polyacrylamide gel electrolysis in the presence of β -mercaptoethanol of HSA samples. Protein samples (0.5 μ g per lane) were loaded onto 10% polyacrylamide gel.

Lanes: ① molecular weight markers; ① HSA; ② $CT_{1mM-1hr}$ -HSA; ③ $CT_{1mM-2hr}$ -HSA; ④ $CT_{10mM-1hr}$ -HSA; ⑤ $CT_{10mM-2hr}$ -HSA; ⑥ control (without glucose) HSA; ⑦ Glycated HSA; ⑧ MCO_{12hr} -HSA; ⑨ MCO_{24hr} -HSA

CT -HSA was prepared by mixing 300 μ M of HSA with 1 mM or 10 mM of CT in phosphate buffer for 1 or 2 hours at 37 $^{\circ}$ C.

MCO -HSA was prepared by mixing 300 μ M of HSA with 10 μ M of $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ with 100 mM of ascorbic acid in 50 mM Tris buffer (pH 7.4) for 12 or 24 hours.

Glycated HSA was prepared by mixing HSA (5 mg/ml) with 50 mM glucose at 37 $^{\circ}$ C for 30 days.

第2項 カルボニル含量測定

タンパク質の酸化や過度な糖化は、カルボニル含量の増大を伴うことが知られている^{42, 43)}。そこで、調製したHSAの酸化および糖化の程度を評価するために、カルボニル含量を測定した。

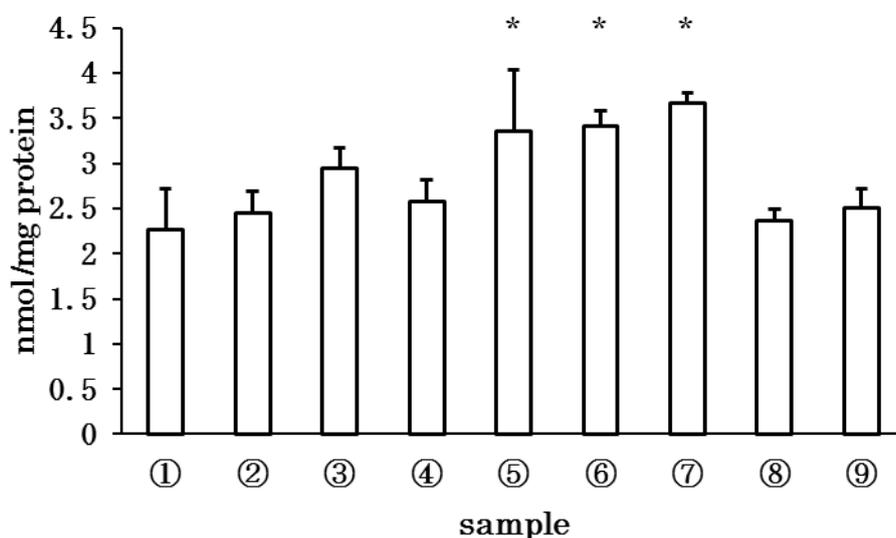


Fig. 15. Carbonyl Contents of HSAs

①HSA; ② CT_{1mM-1hr}-HSA; ③ CT_{1mM-2hr}-HSA; ④ CT_{10mM-2hr}-HSA; ⑤ CT_{10mM-2hr}-HSA; ⑥ MCO_{12hr}-HSA; ⑦ MCO_{24hr}-HSA ⑧ HSA incubated for 30 days without glucose; ⑨ Glycated HSA
means ± S.D. (n=3). *, p<0.05 as compared with HSA

Fig. 15 に示すように、HSA と比較して、酸化 HSA のカルボニル含有量は増加した。また、カルボニル含量は、クロラミン T の濃度と反応時間に依存して高い値を示した。特に、10 mM のクロラミン T 濃度で 2 時間反応させ調製した HSA (CT_{10mM-2hr}-HSA) では有意に高いカルボニル含量が示された。12 および 24 時間反応させた金属触媒酸化 HSA (MCO_{12hr}-HSA および MCO_{24hr}-HSA) においては、反応

時間に関係なく高いカルボニル含量が示された。一方、糖化 HSA についてはコントロールと比較して、カルボニル含量の増大は認められなかった。このように、クロラミン T および金属触媒による酸化ではカルボニル含量の変化を伴う HSA の構造変化が起きていることが確認された。

第 3 項 CD スペクトル法を用いた二次・三次構造の評価

タンパク質の固有 CD スペクトルを遠紫外および近紫外領域で測定することで、その二次構造ならびに三次構造を推定することが可能である。そこで、前項でカルボニル含量の増大が確認された酸化 HSA (CT_{10mM-2hr}-、MCO_{24hr}-HSA) と糖化 HSA (Glycated-HSA) の CD スペクトルを遠紫外および近紫外領域で測定し、HSA の結果と比較した (Fig. 16a, b)。その結果、いずれの測定領域においても、酸化、糖化に伴う CD スペクトルの変化はわずかであった。このことから、酸化および糖化に伴う二次、三次構造の変化は小さいと考えられた。

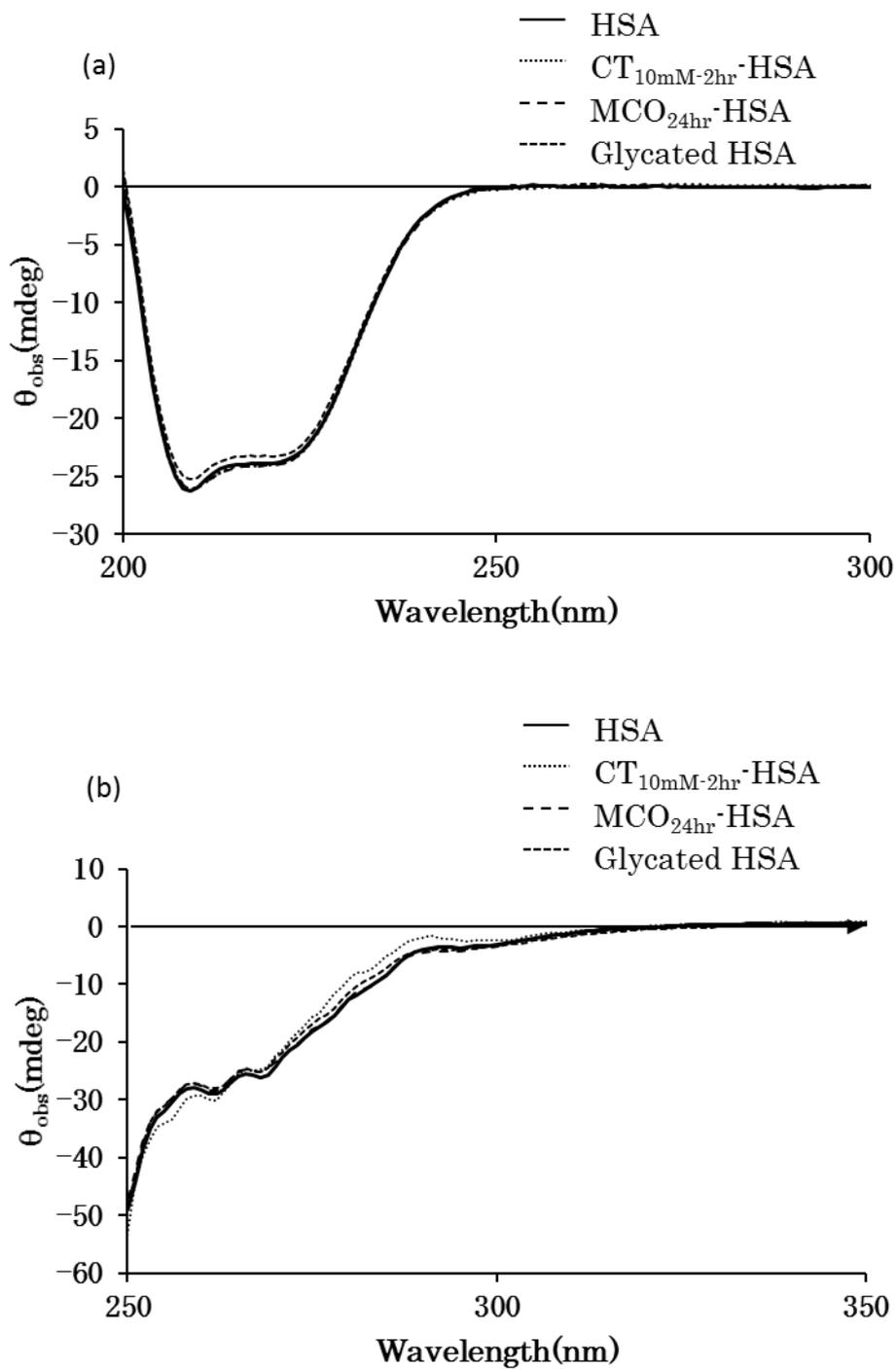


Fig. 16. CD spectra of HSAs at 25°C. (a) was Far-UV CD. (b) was Near-UV CD.

The proteins concentration of (a) and (b) were 2 μ M and 40 μ M, respectively. Spectra were shown for HSA, CT_{10mM-2hr}-HSA, MCO_{24hr}-HSA, Glycated HSA.

第4項 トリプトファン残基の固有蛍光を用いた構造評価

HSA 分子上に唯一存在する 214 番目のトリプトファン残基 (^{214}Trp) の蛍光は、この残基周辺のマイクロ環境の変化に反映することから、しばしば HSA の構造変化を推定する指標として用いられている。また、トリプトファン残基は酸化されやすい特性を有することから、 ^{214}Trp 蛍光の変化を評価し、HSA の酸化ならびに糖化に伴う構造変化を推定した (Fig. 17)。その結果、HSA と比較して、酸化および糖化 HSA の ^{214}Trp の蛍光強度はわずかに減少した。このことから、酸化に伴い ^{214}Trp 周辺のマイクロ環境は変化していると考えられるが、その程度はわずかであると考えられた。

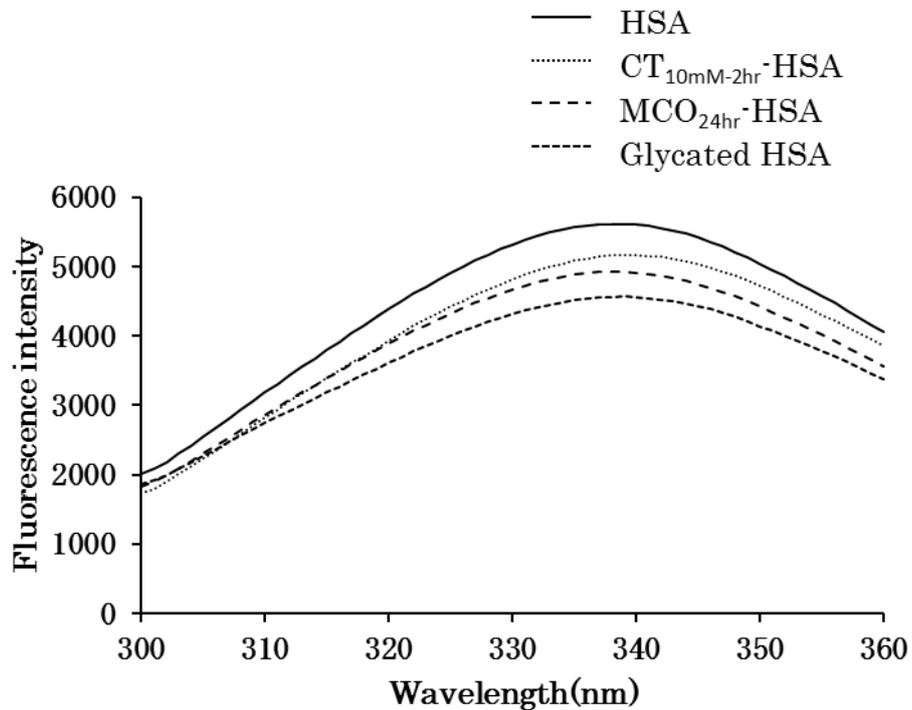


Fig. 17. Tryptophan fluorescence emission spectra of HSA, CT-HSA, Glycated HSA, MCO-HSA at 25 °C.

The proteins' concentrations were 20 μ M. Spectra was excited at 285 nm. Spectra were shown for native HSA, CT_{10mM-2hr}-HSA, MCO_{24hr}-HSA, Glycated HSA.

第3節 酸化および糖化 HSA の薬物結合性評価

前節において確認された、酸化、糖化にともなう HSA のわずかな構造変化が ARP の結合性にどのように影響するかを評価した。

第1項 平衡透析法を用いた結合性評価

まず、平衡透析法を用いて酸化および糖化 HSA に対する ARP の結合性を評価し、HSA の結果と比較した。相対的な評価をより精度良く行うために、対照群（酸化 HSA の場合は HSA、糖化 HSA の場合は control HSA に対する酸化あるいは糖化 HSA での ARP 非結合率の比（非結合率比）を用いて評価した。その結果、酸化および糖化 HSA いずれにおいても、非結合率比の増加すなわち結合が低下することが確認された（Fig. 18）。

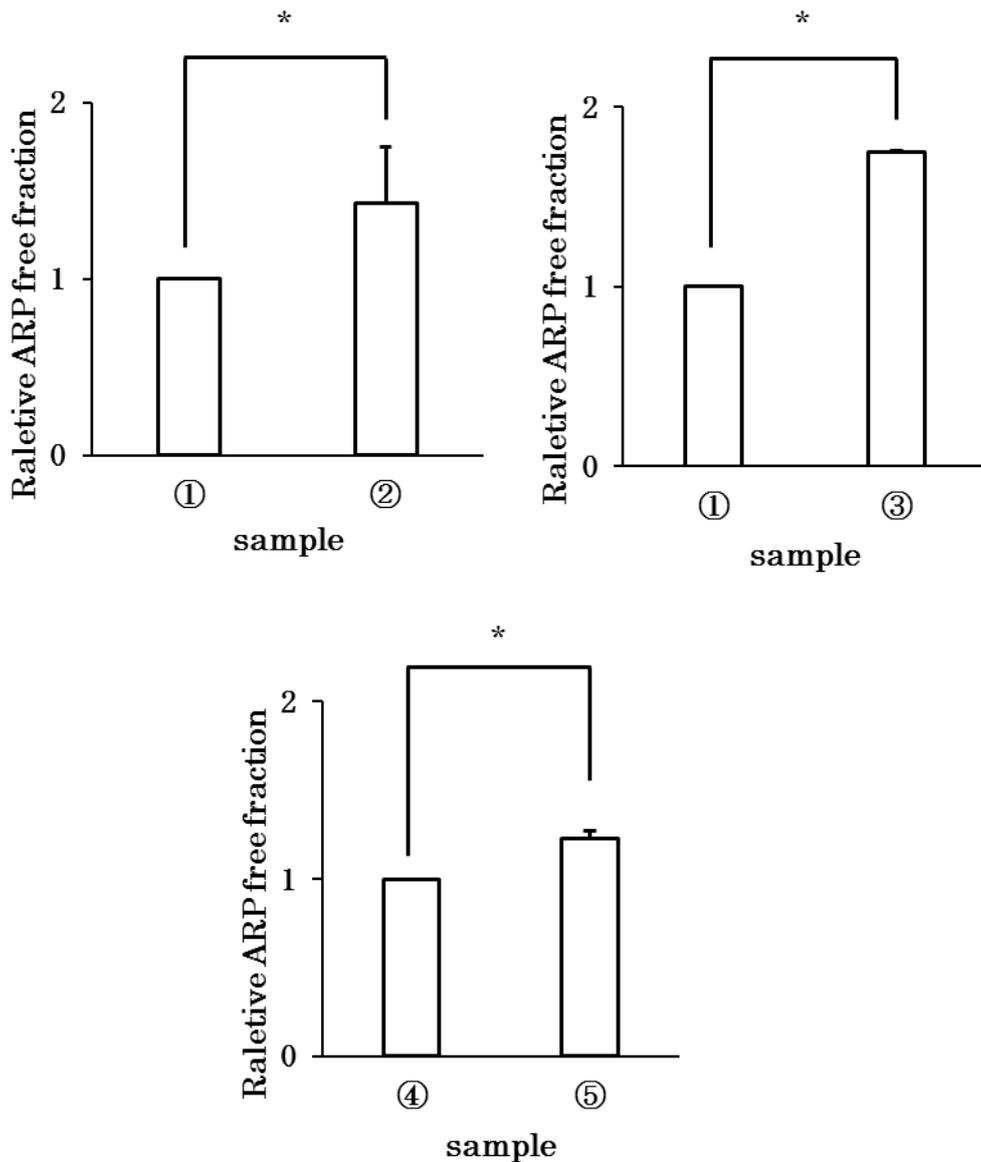


Fig. 18. Relative ARP free fraction for binding to native and modified HSAs estimated by equilibrium dialysis at 25°C. The concentrations of ARP and HSAs were 20 μ M and 40 μ M, respectively.

① HSA, ② CT_{10mM-2hr} - HSA, ③ MCO_{24hr} - HSA, ④ control (without glucose) HSA, ⑤ Glycated HSA

means \pm S.D. (n=3). *, p<0.05 as compared with control HSA

第2項 誘起 CD スペクトルを用いた ARP の配向性の評価

酸化および糖化 HSA 分子上における ARP の結合状態を確認するため、誘起 CD スペクトルを測定した。Fig. 19 に示す通り、酸化および糖化 HSA では、CD の強度が若干低下したが、スペクトルの形状は類似していた。前項に示す通り、酸化、糖化に伴い ARP の結合性が低下することを考えると、CD 強度の低下はこの結合性の低下を反映していると考えられ、従って、ARP は酸化および糖化 HSA 分子上で、HSA 分子上と同様の配向をとっていると推察された。

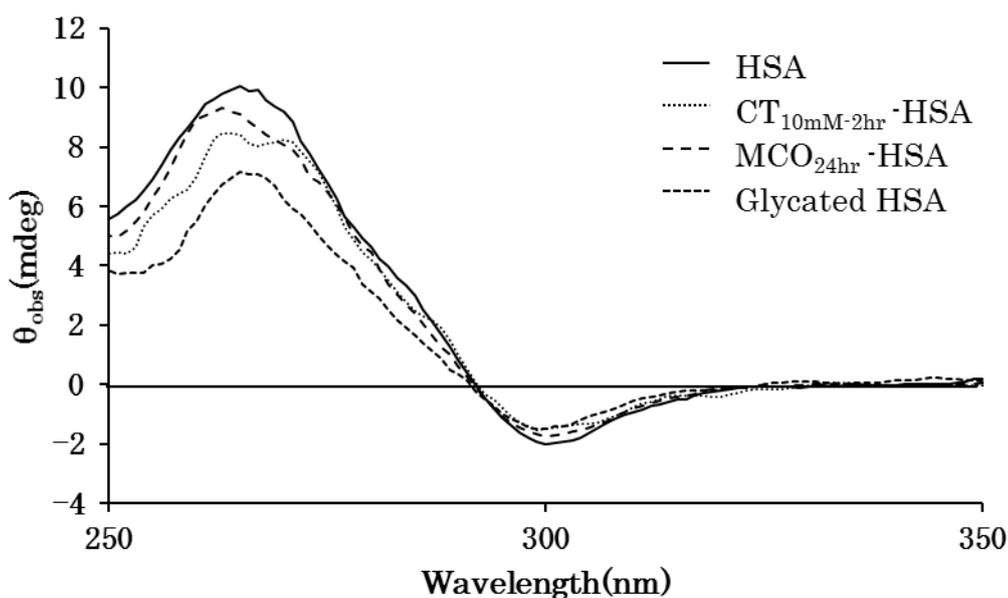


Fig. 19. Induced CD spectra of ARP-HSAs at pH7.4 and 25°C. The concentration of ARP and albumin were 20 μ M and 40 μ M, respectively. Spectra were shown for HSA, CT_{10mM-2hr}-HSA, MCO_{24hr}-HSA, Glycated HSA.

第4節 内因性物質の影響

疾患時には前節で検討した HSA の構造変化に加えて、内因性物質の濃度の増加も ARP のタンパク結合が変動する要因となりうる。そこで、内因性物質として、尿毒症物質、ビリルビンおよび遊離脂肪酸の存在下で、HSA に対する ARP の結合性がどのように変化するかを検討した。

第1項 インドキシル硫酸およびビリルビンの影響

まず、透析患者を含む腎疾患患者で増加する尿毒症物質の一種であるインドキシル硫酸ならびに肝障害時に増大するビリルビンについて、ARP の HSA 結合に対する影響を検討した。Fig. 20a, b に示す通り、インドキシル硫酸、ビリルビンいずれにおいても、その濃度の増加に伴い ARP の非結合率が上昇することが明らかとなり、その程度はインドキシル硫酸で顕著であった。インドキシル硫酸はサイトⅡに結合^{41, 44)}し、ビリルビンはサブドメインⅠBに結合する⁴⁰⁾というこれまでの報告を考えると、インドキシル硫酸は競合的にサイトⅡに結合した ARP を置換し、一方、ビリルビンはその結合に伴う HSA のコンフォメーション変化等を介してアロステリックに ARP の結合を阻害していると推察された。

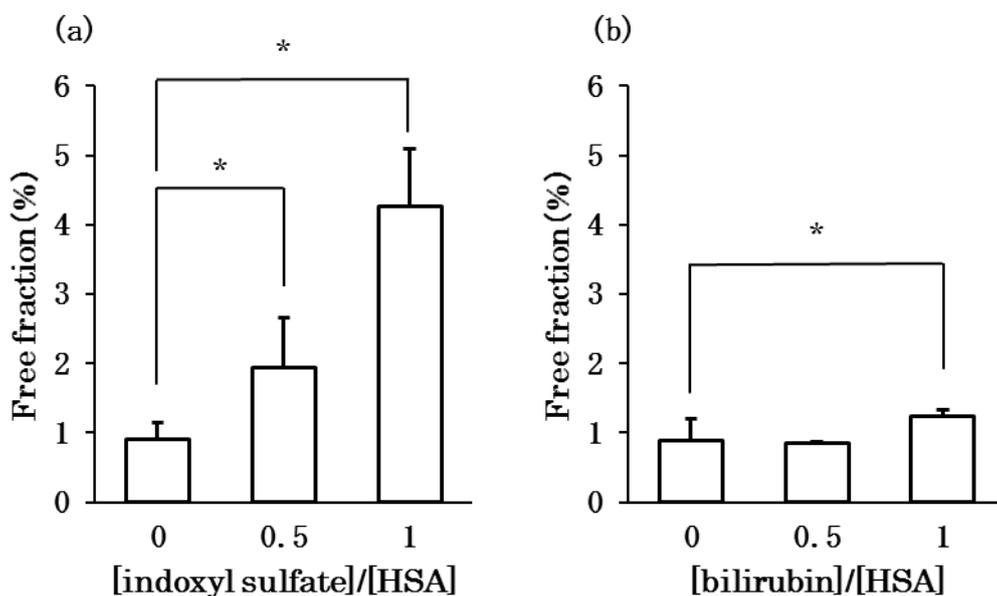


Fig. 20. Effect of indoxyl sulfate (a) and bilirubin (b) on ARP binding to HSAs at pH 7.4 and 25 °C.

① control (in the absence of toxin); ② in the presence of indoxyl sulfate (20 μM); ③ in the presence of indoxyl sulfate (40 μM); ④ in the presence of bilirubin (20 μM); ⑤ in the presence of bilirubin (40 μM) means \pm S.D. (n=3).*, p<0.05 as compared with ligands 0 μM

第2項 中鎖および長鎖脂肪酸の影響

次に腎疾患患者で増加する遊離脂肪酸について、ARP の HSA 結合に対する影響を検討した。中鎖脂肪酸であるオクタン酸、長鎖脂肪酸であるミリスチン酸では、いずれも、その濃度の増加に伴い ARP の非結合率が上昇することが明らかとなったが、その程度はオクタン酸で顕著であった (Fig. 21)。

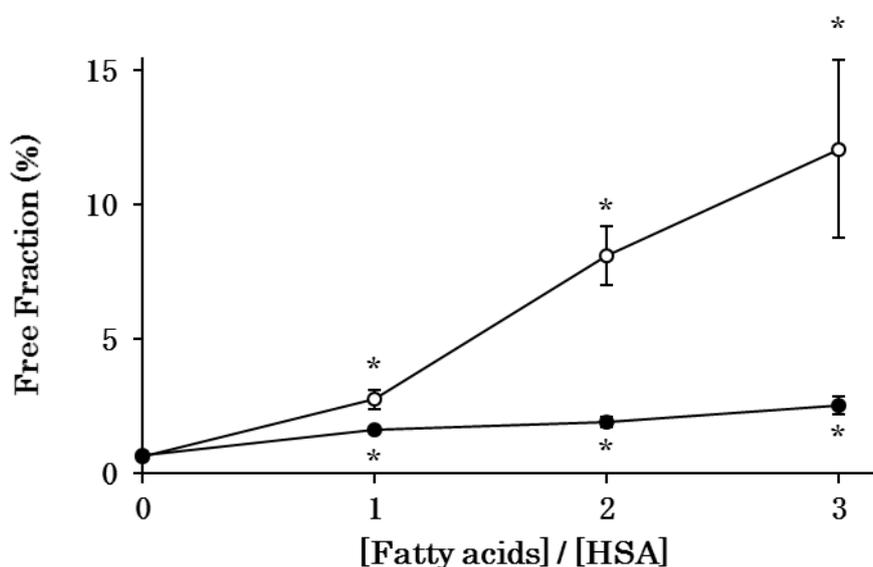


Fig. 21. Effect of octanoic acid (○) and myristic acid (●) in ARP binding to HSA at pH7.4 and 25°C.

The concentrations of HSA, ARP, and octanoic acids and myristic acids were 40 μ M, and 20 μ M ARP, and 0, 40, 80, 120 μ M, respectively. means \pm S.D. (n=3).*, p<0.05 in comparison with 0 μ M fatty acids.

これらの遊離脂肪酸は、HSA との結合によりコットン効果を誘起しないことから、ARP-HSA 混合系における誘起 CD スペクトルへの影響を検討した。Fig. 22a に示す通り、オクタン酸の添加に伴い、正負の誘起コットン効果は等吸収点を対称としていずれも減少したが、Fig. 22b のミリスチン酸の場合、265 nm の正の

コットン効果は消失し、255 nm 付近に新たに負のコットン効果が誘起されることが測定された。オクタン酸はサイト II を高親和性結合サイトとすることが知られており⁴⁵⁾、ARP の配向の変化を引き起こすことなく、ARP を競合的に置換したことで正負の誘起コットン効果の均等な低下を引き起こしたものと推察される。一方、ミリスチン酸では、サイト II 以外の脂肪酸結合サイトに優先的に結合し、HSA にコンフォメーション変化を惹起すること^{46, 47)}が知られていることから、ARP の結合量の大きな変化を伴うことなく、サイト II における ARP の配向を変化させたものと考えられた。

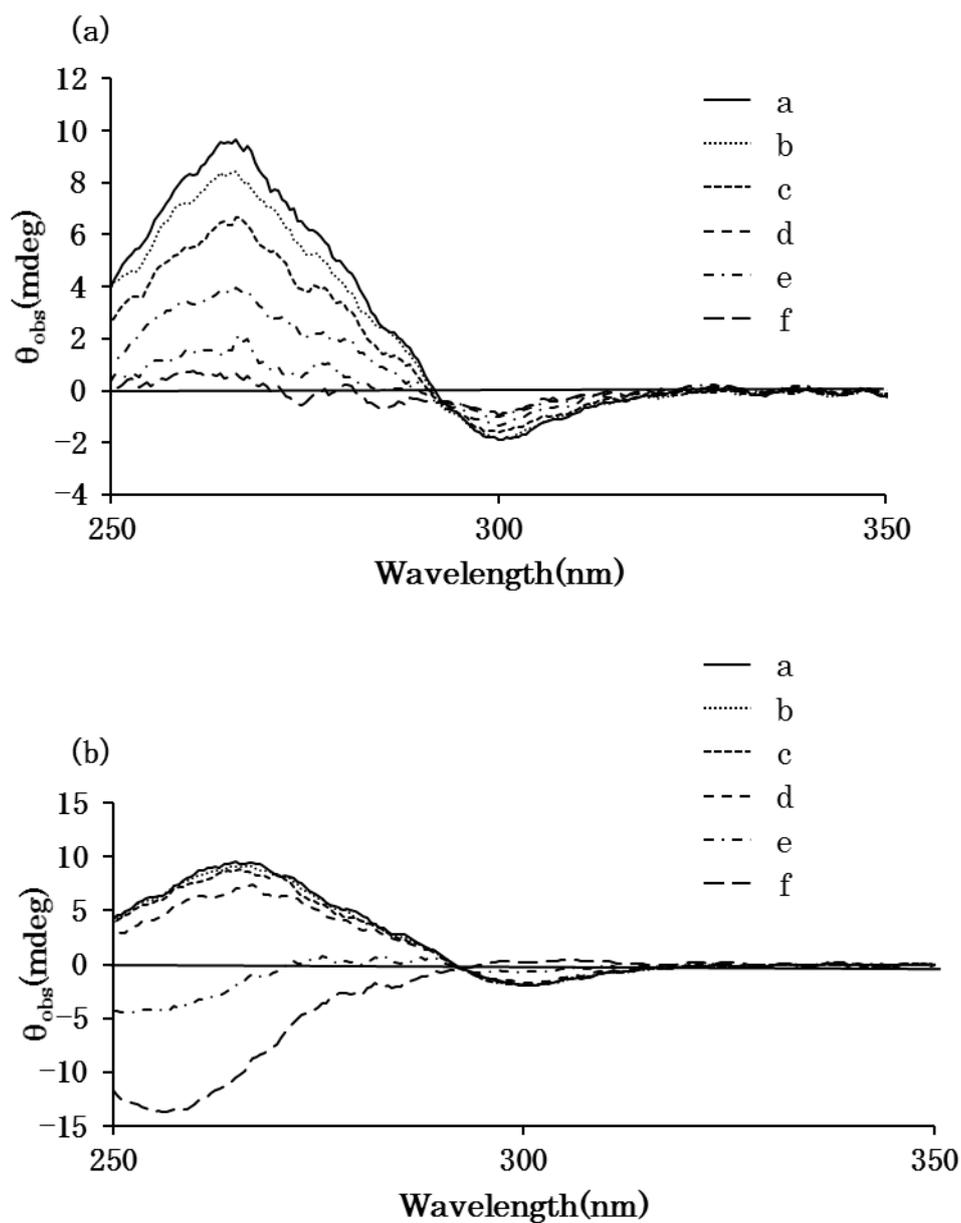


Fig. 22. Effects of octanoic acids (a) and myristic acids (b) on CD spectra for the interactions of ARP with HSA at pH 7.4 and 25 °C.

The concentrations of HSA, ARP, and octanoic acids and myristic acids (a)-(f) were 40 μ M, and 20 μ M ARP, and 0, 10, 20, 40, 80, 120 μ M, respectively.

第5節 考察

腎疾患、肝疾患や糖尿病等の病態下では、HSA の構造変化や内因性物質量の増加により薬物のタンパク結合が変化することが知られている^{48,49)}。疾患時の ARP の薬物動態や薬効の変動、あるいは副作用発現の原因を考察するうえで、疾患時を想定した状態における ARP の HSA への結合性の評価は有用である。そこで本章では、腎疾患、肝疾患や糖尿病下において想定される、代表的な翻訳後修飾である酸化、糖化を受けた HSA への ARP のタンパク結合性を評価した。また、これらの疾患での増加が報告されている内因性物質として、尿毒症物質、ビリルビンや遊離脂肪酸の影響についても評価した。

タンパク質の酸化においては、リジンやアルギニンおよびプロリン残基がセミアルデヒドへと構造変化を受けること等によりカルボニル含量が増大することが知られている⁴²⁾。また、過度なタンパク質の糖化でも、リジンやアルギニン残基がピラリンやイミダゾロンに構造変化することで、同様にカルボニル含量が増大することが報告されている⁴²⁾。今回、クロラミン T ならびに金属触媒により調製した HSA (CT-HSA, MCO-HSA) は、カルボニル含量の増大を伴っており、HSA は酸化されていると考えられた (Fig. 15 ⑤, ⑥, ⑦)。一方、グルコースを用いて調製した糖化 HSA (Glycated-HSA) のカルボニル含量は HSA と同等であり、過度な糖化は起きていないものと考えられた (Fig. 15 ⑧, ⑨)。調製した酸化および糖化 HSA では、SDS-PAGE (Fig. 14) や固有 CD スペクトル (Fig. 16) に反映されるような大きな構造変化も認められず、²¹⁴Trp の固有蛍光 (Fig. 17) の若干の減少に反映されるような小さな、あるいは局所的な構造変化が起きているものと考えられた。ところで、Mera らは、腎透析患者における HSA のカ

ルボニル含量は 2.86 ± 0.45 nmol/mg protein であり、健常者における 2.13 ± 0.14 nmol/mg protein と比較して増加していることを報告⁵⁰⁾ しており、この変化が、血漿タンパク質全体のカルボニル含量の増加に匹敵することを示している。今回の *in vitro* での酸化に伴い、カルボニル含量は HSA の 2.26 ± 0.46 nmol/mg protein から、クロラミン T 酸化 HSA の 3.36 ± 0.68 nmol/mg protein に変化していたこと (Fig. 15⑤) から、調製した酸化 HSA は、腎透析をはじめとする疾患時に生体に存在する HSA の特性を反映しているものと考えられた。一方、今回 *in vitro* で調製した糖化 HSA では、カルボニル含量は変化していない (Fig. 15⑨) が、糖尿病患者において有意なカルボニル含量の変化は確認されないという Baraka-Vidot らの報告³⁷⁾ を考慮すると、調製した糖化 HSA は、糖尿病患者における HSA の特性を反映していると考えられた。

次に、調製した酸化および糖化 HSA に対する ARP 結合性を評価した結果 (Fig. 18)、いずれも低下することが明らかになった。Annibal らによると、HSA 分子上のシステイン、メチオニン、トリプトファン、チロシン残基が酸化されやすいとされている⁵¹⁾。また、Iwao らは、クロラミン T による酸化では、これに加えアルギニンおよびリジンの顕著な酸化を報告している^{52, 53)}。さらに、Ugur らによると、金属触媒による酸化で、アルギニンおよびリジン、トレオニン、プロリン、ヒスチジンが優先的に酸化を受けるとされている⁵⁴⁾。これらを考えると、サイト I では²¹⁴Trp 残基、サイト II ではポケット入り口付近に存在する⁴¹¹Tyr や⁴¹⁴Lys 等のアミノ酸残基が酸化され、この局所的な変化により ARP のサイト II への結合が妨げられた可能性が考えられる。一方、HSA の糖化では、リジン、アルギニン、システイン (34 位) 残基が糖化されることが知られている⁵⁵⁾。また、サイト II においては⁴¹⁰Arg 残基の糖化⁵⁶⁾ が指摘されている。したがって、サイト I では²¹⁴Trp 残基周辺のリジンやアルギニン残基が糖化され、サイト II では⁴¹⁰Arg

や ⁴¹⁴Lys のようなアミノ酸残基の糖化により、サイト II への ARP の結合が低下したと推察できる。このようなアミノ酸残基レベルの局所的な構造変化が起きた場合、ARP は結合サイトでの配向変化によって結合状態を維持することも可能であると考えられる。しかしながら、誘起 CD スペクトル測定の結果 (Fig. 19) からわかるとおり、酸化や糖化による小さなあるいは局所的な構造変化であって、ARP-HSA 結合への寄与が、塩素原子-³⁹²Cys 相互作用 (ハロゲン結合) ほど大きくない部分の変化では、ARP の配向変化を伴わず、結合性のみ変化することがありうるものが併せて推察された。以上のように、疾患時には、酸化および糖化に伴う HSA の構造変化は小さく、局所的なものであっても、ARP 結合性が低下することが明らかとなった。

腎疾患、肝疾患や糖尿病の病態下では、インドキシル硫酸、ビリルビンおよび遊離脂肪酸などの内因性物質が体内に蓄積する。腎透析患者においては、インドキシル硫酸の血中濃度は約 60 倍程度まで上昇することが報告されている⁵⁷⁾。また、ビリルビンは、肝炎や先天性胆道閉鎖症においてはその濃度が約 100 倍まで上昇する⁵⁸⁾。また、遊離脂肪酸は、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が⁵⁹⁾、過度な運動や糖尿病や循環器系の疾患では約 6 倍程度まで上昇することが知られている⁶⁰⁻⁶³⁾。これらの内因性物質の蓄積は、HSA への薬物結合に影響を与えることが報告されている^{25, 36, 45)}。本研究において、ARP の結合に対するこれらの影響が明らかとなった。インドキシル硫酸やオクタン酸 (中鎖脂肪酸) はサイト II に結合することが知られている^{41, 44, 45)} が、同一サイトに結合する ARP の結合を競合阻害することで、HSA への ARP の結合が顕著に低下することが明らかとなった。一方、ビリルビンやミリスチン酸 (長鎖脂肪酸) による阻害は、インドキシル硫酸やオクタン酸ほど強力ではなかった (Fig. 21)。これは、ARP とは異なるサイトに結合したビリルビン (サブドメイン IB に結合)

や長鎖脂肪酸 (HSA に対して 2 倍量のモル濃度まではサイト II 以外の脂肪酸サイトに結合⁶⁴⁾) がアロステリックに ARP の結合を阻害したためであると考えられた。この推論の妥当性は、HSA-ARP 混合系で観測される誘起 CD スペクトルへの脂肪酸の影響を検討した際に確認された (Fig. 22)。すなわち、オクタン酸の添加時には、正負の誘起コットン効果が均等に低下していることから、ARP が競合阻害を受け、結合量のみが低下していることが確認できる (Fig. 23)。一方、ミリスチン酸では、265 nm の正のコットン効果の消失にともなう、255nm 付近の負のコットン効果の誘起が確認され、ARP の配向の変化が推察された (Fig. 24)。ミリスチン酸は HSA にコンフォメーション変化を惹起すること^{46, 47)} が知られていることから、コンフォメーション変化を介したアロステリックな影響により、サイト II における ARP の配向や結合性を変化させたものと考えられた。以上のように内因性物質の影響により ARP の結合性が低下することが明らかとなった。本来、疾患時における血漿タンパク結合の変化については、HSA に加えて、 α_1 -酸性糖タンパク質 (AAG) への結合についても考慮する必要がある。AAG は血漿中に HSA の 60 分の 1 程度の濃度しか存在しない⁶⁵⁾ が、全身的な組織障害、炎症あるいは感染状態等の病態時には血漿中濃度が正常値の 10 倍にまで上昇することがある^{66, 67)}。さらに、塩基性薬物を強く結合することも知られており⁶⁸⁾、塩基性薬物である ARP の結合タンパク種として無視はできない。これまで、ARP の AAG への結合については、検討されて来なかったが、最近、我々は ARP が AAG に対して HSA 以上に強く結合することを見出した (平衡透析法による K_a : $24.28 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$)⁶⁹⁾。今後、本研究で HSA について明らかにしたように、AAG への結合についても詳細に検討することにより、疾患時における ARP の血漿タンパク結合の全貌が明らかになると期待される。以上、本章では、生体内を想定した条件における検討により、病態時における ARP の HSA への結合が変化する可能性を明

らかにした。特に腎疾患時においては、HSA の構造変化に加え、尿毒症物質や遊離脂肪酸の蓄積に伴い、ARP の HSA への結合が顕著に低下することから、ARP の体内動態や薬効の変化、副作用の発現につながる可能性があることを考慮する必要がある。ARP は長期に服用され、幅広い年齢層の患者が服用することから、今回得られた ARP の病態下における HSA への結合に関する知見は、高齢者を含む様々な年齢層および様々な臨床状態における ARP の薬物動態および薬理効果の変動の予測や解明に有用であると考えられる。

第6節 小括

- 1) 腎疾患、肝疾患や糖尿病等の病態下では、HSA の酸化や糖化に伴う小さな、あるいは局所的な構造変化によって、ARP の結合性が低下する可能性が示された。
- 2) 病態時に増加することが報告されている内因性物質により、ARP の HSA への結合性が影響を受けることが明らかとなった。
- 3) 特に腎疾患時においては、HSA の構造変化に加え、尿毒症物質や遊離脂肪酸の蓄積に伴い、ARP の血漿タンパク結合が顕著に低下することから、ARP の体内動態や薬効の変化、副作用の発現につながる可能性を考慮する必要があることが示された。

以上のように、病態時において、HSA の構造変化や内因性物質濃度の増大により、ARP のタンパク結合性が変動することが明らかにされ、実臨床における薬物動態や薬効、副作用を予測する上で有用な基礎情報が得られたものと考えられる。

第5章 総括

ARP は新規の抗精神病薬として上市後約 20 年経過するが、依然、世界中で広く使用されている。また、ARP は、長期に、かつ、幅広い年齢層で服用されており、今後も使用量の増加が予測されている。一方、ARP の血漿タンパク結合に関する情報は限られており、疾患時あるいは他薬の併用時の薬物動態、薬効の変動や副作用の発現をタンパク結合に関する知見に基づいて理解することは困難である。

このような背景のもと、本研究では、ARP の HSA への結合特性の解明を行うことを目的とした。さらに、結合特性の詳細を明らかにするために、結合サイトの同定ならびに結合サイトのマイクロ環境を推定した。また、病態時における HSA の翻訳後修飾や内因性物質濃度の変動が ARP の結合性に及ぼす影響について評価した。以下に得られた知見を総括する。

1) ARP の HSA への結合特性評価 (第2章)

HSA への ARP の結合特性を検討した結果、結合パラメータは、平衡透析法を用いた検討より結合定数は $7.51 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ という高い値を示し、強く結合することが明らかとなった。また、結合サイト数は 1 であることから、ARP は HSA と 1 : 1 の複合体を形成することが示された。ARP の主代謝物や誘導体を用いた検討により、ARP 分子上のジクロロフェニルピペラジン基の塩素原子が HSA の結合に重要な役割を果たしていると考えられた。さらに、CD スペクトル法を用いた検討により、ジクロロフェニルピペラジン基 3 位の塩素原子は結合部位での ARP の配向を決定づける因子となっていることも明らかとなった。ITC を用いた検討か

ら、HSA への ARP の結合においては、疎水性相互作用が重要な役割を果たしている可能性が示された。

2) HSA 分子上の ARP 結合サイトのマイクロ環境解析 (第 3 章)

HSA 分子上における ARP の結合サイトの同定を目的として、蛍光プローブ置換実験ならびに平衡透析法を用いた阻害実験を行った結果、ARP はサイト II に結合することが明らかとなった。さらに、部位特異的変異体を用いた検討により、ARP がサイト II の ⁴¹¹Tyr 残基近傍に結合している可能性が推察された。ARP のアルブミンへの結合における種差は、同じく塩素原子を有するジアゼパムの場合と類似していたことから、ARP の HSA への強い結合性や種差の要因に塩素原子が関与している可能性が示された。以上の結果の妥当性を検討する目的で、X 線結晶構造解析を行った結果、ARP は、サイト II において疎水性のアミノ酸残基に囲まれており、ARP のジヒドロキノリノン部位のフェニル基は、HSA 分子の ⁴¹¹Tyr 残基のフェニル基と π - π 相互作用することが示唆された。また、ARP のジクロロフェニルピペラジン基の 3 位の塩素原子と HSA 分子上の ³⁹²Cys の硫黄原子とハロゲン結合の形成が示唆された。

3) ARP の HSA への結合に及ぼす病態時各種変動因子の影響 (第 4 章)

腎疾患、肝疾患や糖尿病等の病態下における HSA の構造変化 (HSA の酸化、糖化) ならびに内因性物質 (インドキシル硫酸、ビリルビン、オクタン酸、ミリスチン酸) の変化が、ARP の HSA への結合性に及ぼす影響を検討した。いずれの場合も ARP の結合性は低下することが明らかとなったが、特に ARP と同様の結合サイトを有するインドキシル硫酸およびオクタン酸は競合阻害により、顕著に ARP の結合を低下させた。一方、ビリルビンやミリスチン酸では ARP とは異

なるサイトに結合することにより、アロステリックに ARP の結合を阻害しているものと考えられた。以上の結果より、病態時において ARP の血漿タンパク結合が変化する可能性を明らかにした。特に腎疾患時においては HSA の構造変化に加え、尿毒症物質や脂肪酸の蓄積が ARP の血漿タンパク結合を顕著に低下させ、ARP の体内動態や薬効の変化、副作用の発現につながる可能性が示された。

以上のように、ARP のタンパク結合、特に HSA への結合特性や結合サイトのミクロ環境について詳細に解明し、さらに疾患時における ARP のタンパク結合性についての知見も得られた。ARP は、長期に服用され、幅広い年齢層で服用されることから、複数疾患への罹患の可能性も考えられるが、現在、添付文書あるいはインタビューフォームにおける併用薬や病態時服用の注意事項は少ない。このため、本研究で得られた知見は、実臨床において ARP の薬物動態や薬効の変動および副作用を予測する上で有用な基礎資料になると考えられる。さらに、サイトⅡに結合する薬物の構造上の特徴や種差の要因が解明されたことから、本知見は、市販薬に限らず、開発段階における薬物のタンパク結合特性の予測にもつながる貴重な情報になるであろう。

実験の部

実験試料

Recombinant human albumin は、ニプロ株式会社より提供されたものを使用した。Chen⁷⁰⁾が報告した方法を改変した手順を用いて、アルブミンを低温で活性炭を加え、塩酸で pH 3.0 に調整して脂肪酸を吸着除去（脱脂）した。その後、水酸化ナトリウムで pH 7.4 に調整してろ過し、超純水に対して透析後、凍結乾燥させた。得られた脱脂 HSA は、SDS-PAGE において単一のバンドが確認され、分子量は 66.5 kDa と規定された。Recombinant dog albumin は、中央大学において既報⁷¹⁾に従って作成されたものを脱脂して用いた。部位特異的変異体 HSA である W214A および Y411A は、熊本大学において既報⁷²⁾に従って作成されたものを脱脂して用いた。ヒト、ウシ、ウサギおよびラット血清アルブミンは、Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) より脱脂済みのものを購入した。ARP は東京化成より入手した。ワルファリンとダンシルサルコシンは Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) より購入した。オクタン酸、ミリスチン酸、ジアゼパムおよびイブプロフェンは、株式会社和光ケミカルより入手した。ARP の代謝物 dehydro-ARP は、Zeidan らの方法⁷³⁾に従って合成した。2-deschloro-ARP は、Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) から購入した。deschloro-ARP は Banno らの方法⁷⁴⁾で作成し、3-deschloro-ARP および dimethyl-ARP は、Oshiro らの方法⁷⁵⁾で作成した。その他、試薬、溶媒類は市販特級品を使用し、溶媒としての水は超純水を使用した。タンパク結合実験においては 67 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4 または 6.0) 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元配置分散分析後に、多重比較のために Dunnett's 検定を用いて行った。危険値が 0.05 以下であるときには統計学的に有意であると評価した。

平衡透析法

平衡透析実験は、2 mL 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。サンプル溶液 (アルブミンおよびリガンド含有) に対して等量 (0.5 mL) の緩衝液 (溶媒) を用いて 24 時間平衡透析を行い、その後、緩衝液側の遊離型リガンド濃度 (C_f) およびサンプル溶液側のリガンド濃度 (遊離型リガンド濃度+結合型リガンド濃度; C_f+C_b) を HPLC で測定した。

結合データ解析

両側のセル中の薬物濃度を測定し、(1)、(2)式を用いて結合率を算出した。また、遊離型分率は、100 から (2) 式で得られた値を引くことにより算出した。

$$\begin{aligned} \text{結合リガンド濃度 } (C_b) \\ &= \text{サンプル溶液側のリガンド濃度 } (C_f+C_b) \\ &\quad - \text{リン酸緩衝液側のリガンド濃度 } (C_f) \end{aligned} \quad (1)$$

$$\text{結合率 } (\%) = C_b / (C_b + C_f) \times 100 \quad (2)$$

結合パラメーターは、Scatchard 式 (3) に従って r / C_f vs r プロットが

直線になることを確認後、式(4)に基づいて算出した。実験データは、GraphPad PRISM®Version4 (GraphPad Software 社)を用いて解析した。

$$r / C_f = n \cdot K_a - r \cdot K_a \quad (3)$$

$$r = C_b / P_t = n \cdot K_a \cdot C_f / (1 + K_a \cdot C_f) \quad (4)$$

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 はタンパク質のモル濃度である。 n は結合サイト数、 K_a は結合定数である。

HPLC 測定条件

本研究において HPLC は、日立ハイテクサイエンス社製 D-2000 Elite HPLC system を使用した。YMC-PACK ODS AM303 (粒子径 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 に設定した。溶媒 A (50 mM リン酸二水素ナトリウム) および溶媒 B (50 mM リン酸二水素ナトリウムおよびアセトニトリル, 30 : 70 vol / vol) の 2 つの溶媒を移動相として使用した。ピーク分離のために利用したグラジエントは次に示す通りである。0-7 分 (30 %-100 %B)、7-10 分 (100 %B)、10-15 分 (100 %-30 %B)、15-20 分 (30 %B)。移動相の流速は 1.0 mL/分で一定とし、検出波長は 210 nm に固定して各サンプルについて 20 分間測定した。

CD スペクトル法

CD スペクトルは、日本分光株式会社製 J-720 型円二色性分散計を使用して測定した。なお、誘起 CD スペクトルはアルブミン-リガンド結合系のスペクトルから、アルブミン固有のスペクトルを差し引いた、差スペクトルとして評価した。測定には、セル長 1 cm の石英セルを用い、CD 強度は、みかけの楕円率 (θ_{obs}) として表した。

蛍光プローブ置換実験

HSA のサイト I およびサイト II の蛍光プローブとしてワルファリンおよびダンシルサルコシンを用いた。蛍光強度は HITACHI 製 F-2500 蛍光分光光度計にて測定した。25 °C において励起および放出スリット幅は 10 nm として、ワルファリンおよびダンシルサルコシンの励起波長は、それぞれ 320 nm および 350 nm に設定した。蛍光強度は、ワルファリンおよびダンシルサルコシンで、それぞれ 350-450 および 400-600 nm の波長におけるピーク値とした。なお、プローブ : HSA のモル濃度比は 1 : 1 に維持し測定を行った。蛍光プローブの置換の程度は以下の式 (6) を用いて評価した。

$$F_2 / F_1 \times 100 \quad (6)$$

F_1 は蛍光プローブ-アルブミン混合系で観測される蛍光強度、 F_2 はこれに置換物質を添加した場合に観測される蛍光強度を示す。

熱力学的パラメータ

熱力学的パラメータはマルバーン社製 MicroCal iTC200 にて測定した。測定データは、ソフトウェア MicroCal の Origin を使用し、One-Set-of-Sites モデルで解析を行った。A 液; 2 % (v/v) Dimethyl sulfoxide を含む 50 mM pH 6.0 NaH_2PO_4 溶液及び 150 mM NaCl 溶液を使用し 40 μM HSA 作成した。B 液; Dimethyl sulfoxide で溶解した ARP を 50 mM pH 6.0 NaH_2PO_4 溶液及び 150 mM NaCl 溶液で希釈して 400 μM ARP 作成した。A 液をサンプルセルに入れ、B 液を滴定シリンジから滴下し 35 °C で測定を行った。

翻訳後修飾アルブミンの調製

酸化 HSA の調製

クロラミン T により酸化したアルブミン (CT-HSA) は、Anraku らの方法に若干の変更を加え調製した⁴⁸⁾。すなわち、リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 300 μM の HSA を 1 mM または 10 mM のクロラミン T と混合後、1 または 2 時間反応させ調製した。金属触媒により酸化した HSA (MCO-HSA) は、Meucci らの方法に若干の変更を加え調製した⁷⁶⁾。詳細には、50 μM Tris 緩衝液 (pH 7.4) で、300 μM の HSA を 10 μM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ および 100 mM アスコルビン酸と混合後、12 または 24 時間反応させて作成した。

糖化 HSA の調製

糖化 HSA (Glycated-HSA) は、Nakajo らの方法に従い調製した⁷⁷⁾。pH 7.4 の 67 mM リン酸ナトリウム緩衝液中で、HSA (5 mg / mL) を 50 mM グルコースと 30 日間反応させ調製した。糖化 HSA 調製におけるコントロールとして、HSA のみ

(グルコース非存在) の条件においても反応を行い、Control-HSA を併せて調製した。

SDS-PAGE

SDS-PAGE は、10 % ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。なお、分子量マーカーは WIDE VIEW Prestained protein site marker III を使用した。

カルボニル含量測定

HSA、酸化および糖化 HSA のカルボニル含量の測定は、Levine らの方法に従って行った⁷⁸⁾。まず、サンプルに 10 mM の 2, 4-dinitrophenylhydrazine と 2 M HCl を加えて振盪後、トリクロロ酢酸水溶液を加えて、遠心分離した。溶媒を取り除き、6 M グアニジン溶液 (グアニジン塩酸塩に KH_2PO_4 水溶液を加えた後、トリフルオロ酢酸を用いて pH 2.3 に調整) を加えた。さらに、遠心分離を行い、上清を採取して 6 M グアニジン溶液をリファレンスとして、UV / VIS 分光計 (Jasco V-550 UV/VIS Spectrophotometer) で測定した 280, 360 nm の吸光度を用いて算出した。

トリプトファン蛍光強度測定

HSA のトリプトファン残基の蛍光強度は、日立ハイテクサイエンス社製の Fluorescence Spectrophotometer F-2500 を用い、285 nm を励起波長とし、300-360 nm の蛍光波長を測定した。

結晶化用 HSA 溶液の調製、HSA-ARP 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 pH 7.0、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（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 pH 7.0 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。

結晶化に使用する ARP のストック溶液は、DMSO を用いて 50 mM となるように溶解した。ARP-HSA 複合体は、50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.0 および 10 % (v/v) DMSO で HSA と ARP を 1 : 5 のモル比となるように混合し、その後、一晩 20°C に静置することで ARP-HSA 複合体を形成させた。未結合および不溶性 ARP は遠心分離（20° C で 20,400×g で 1 時間）により除去し、50 mM リン酸カリウム緩衝 pH 7.0 と Vivaspin 500（Sartorius, 分画分子量：10,000）を用いて、DMSO 濃度が 1% 以下となるようにバッファー交換を行い、最終的に 1.4 mM の HSA 濃度となるように ARP-HSA 複合体溶液を濃縮した。

HSA-ARP 複合体の共結晶化は、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 ARP-HSA 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 で得られた HSA-ARP 複合体の共結晶は、クライオルーブですくい、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 Photon Factory BL-17A（筑波、日本）へ輸送し、波長 0.9800 Å、温度-173° C 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 *XDS*⁷⁹⁾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 PDB: 5YOQ⁸⁰⁾ 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 *CCP*⁸¹⁾内のプログラム *Molrep*⁸²⁾を使用した。構造精密化、および、TLS (Translation Libration Screw-rotation) グループの設定は、プログラムパッケージ *PHENIX* 内のプログラム *phenix.refine*、プログラム *phenix.find_tls_groups* を使用した⁸³⁾。分子モデルの構築および修正はプログラム *COOT*⁸⁴⁾を使用した。また、最終構造の妥当性はプログラム *MolProbity*⁸⁵⁾を用いて確認し、分子構造図の作成はプログラム *PyMOL*⁸⁶⁾を使用した。

Table Crystallization conditions of the HSA-ARP complex

condition		
Droplet:	Total	3.0 μL
	HSA-ARP mixture ^{#1}	1.5 μL
	Reservoir solution	1.5 μL
Reservoir:	Total	0.4 mL
	32%(w/v)PEG3350	
	50mM potassium phosphate buffer pH 7.0	
	7.0	
Temperature:		4°C

^{#1}containing 1.4 mM HSA, 7 mM ARP, and 50mM potassium phosphate buffer pH 7.0.

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 山崎 啓之 教授、西 弘二 准教授、崇城大学先端DDS 講座 小田切 優樹 特任教授に深甚なる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物理化学研究室 下野 和美 教授、同医療薬剤学研究室 門脇 大介 教授、同生化学研究室 大栗 誉敏 准教授に心から感謝の意を表します。

本研究の実施に際し、ARP 誘導体を合成及び提供いただきました崇城大学薬学部薬化学研究室 井本 修平 准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藤田医科大学医学部・微生物学講座 河合 聡人 助教に感謝致します。また、本研究で実施した Photon Factory や SPring-8 における放射光を利用した X 線回折実験は、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory の共同利用実験課題（課題番号：2017G554）並びに大阪大学蛋白質研究所の共同利用実験課題（課題番号：2017A6715、2018B6812、2019A6911）として実施致しました。御協力いただいた各実験施設の皆さまに深く感謝申し上げます。

本研究の等温滴定量測定に際し、御協力いただきました熊本大学大学院生命科学研究部生命分析化学分野 森岡 弘志 教授、同 小橋川 敬博 准教授に感謝致します。

本研究の実施に際して、部位特異的変異体 HSA を作成及び提供いただき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 准教授に感謝致します。

本研究の実施に際して、イヌアルブミン（リコンビナント体）を作成及び提供いただきました中央大学理工学部応用化学科生命分子化学研究室 小松 晃之 教授、同 森田 能次 助教に感謝致します。

本研究を行うに際して、有用な御助言と御協力を賜りました慶應義塾大学薬学部薬学科薬効解析学講座 田口 和明 専任講師に深く感謝の意を表します。

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医療薬剤学研究室 瀬尾 量 教授、株式会社ハートフェルト 稲葉 一郎 代表取締役に関心から感謝致します。

本研究を行うに際し、多大なる御協力を頂きました豊岡 真希 氏、橋本 麻衣 研究員をはじめ、崇城大学薬学部薬物動態学研究室の諸氏に関心から感謝致します。

最後にここまで見守ってくれた家族、友人に関心より感謝致します。

令和2年3月
櫻間 啓基

参考文献

1. Kevin D. Burris, Thaddeus F. Molski, Cen Xu, Elaine Ryan, Katsura Tottori, T. K. & Frank D. Yocca, A. P. B. M. Aripiprazole, a Novel Antipsychotic, Is a High-Affinity Partial Agonist at Human Dopamine D2 Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **302**, 381–389 (2002).
2. Mallikaarjun, S., Salazar, D. E. & Bramer, S. L. Pharmacokinetics, Tolerability, and Safety of Aripiprazole following Multiple Oral Dosing in Normal Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **44**, 179–187 (2004).
3. Zuo, X. C., Liu, S. K., Yi, Z. Y., Xie, Z. hong & Li, H. De. Steady-state pharmacokinetic properties of aripiprazole 10 mg PO q12h in Han Chinese adults with schizophrenia: A prospective, open-label, pilot study. *Curr. Ther. Res. - Clin. Exp.* **67**, 258–269 (2006).
4. Andersen, S. E., Johansson, M. & Manniche, C. The prescribing pattern of a new antipsychotic: A descriptive study of aripiprazole for psychiatric in-patients. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **103**, 75–81 (2008).
5. Cosgrove, L., Cristea, I. A., Shaughnessy, A. F., Mintzes, B. & Naudet, F. Digital aripiprazole or digital evergreening? A systematic review of the evidence and its dissemination in the scientific literature and in the media. *BMJ Evidence-Based Med.* bmjebm-2019-111204 (2019). doi:10.1136/bmjebm-2019-111204
6. Sistik, P. *et al.* Quantification of selected antidepressants and antipsychotics in clinical samples using chromatographic methods combined with mass spectrometry: A review (2006-2015). *Biomed. Pap.* **160**, 39–53 (2016).
7. Harrison, T. S. & Perry, C. M. Aripiprazole: A review of its use in schizophrenia and schizoaffective disorder. *Drugs* **64**, 1715–1736 (2004).
8. FDA 2002 a. See full prescribing information for complete boxed warning. *Interactions* **50**, 1–25 (2002).
9. All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications - Theodore Peters, Jr.
10. Krach-Hansen, U., Chuang, V. T. G. & Otagiri, M. Practical aspects of

- the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 695–704 (2002).
11. Yamasaki, K., Chuang, V. T. G., Maruyama, T. & Otagiri, M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 5435–5443 (2013).
 12. He, X. M. & Carter, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* **358**, 209–215 (1992).
 13. Kragh-Hansen, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol. Rev.* **33**, 17-53(1981).
 14. Kragh-Hansen, U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. *Danish medical bulletin* **37**, 57–84 (1990).
 15. Sakai, T., Maruyama, T., Imamura, H., Shimada, H. & Otagiri, M. Mechanism of stereoselective serum binding of ketoprofen after hemodialysis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **278**, (1996).
 16. Sakai, T. *et al.* Interaction Mechanism Between Indoxyl Sulfate, a Typical Uremic Toxin Bound to Site II, and Ligands Bound to Site I of Human Serum Albumin. (2001).
 17. Ghuman, J. *et al.* Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.* **353**, 38–52 (2005).
 18. Berman, R. M. *et al.* Long-term safety and tolerability of open-label aripiprazole augmentation of antidepressant therapy in major depressive disorder. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **7**, 303–312 (2011).
 19. Travis, M. J. *et al.* Aripiprazole in schizophrenia: Consensus guidelines. *Int. J. Clin. Pract.* **59**, 485–495 (2005).
 20. Abilify (Aripiprazole): Uses, Dosage, Side Effects, Interactions, Warning. Available at: <https://www.rxlist.com/abilify-drug.htm>.
 21. Sakurama, K. *et al.* Analysis of the Binding of Aripiprazole to Human Serum Albumin: The Importance of a Chloro-Group in the Chemical Structure. *ACS Omega* **3**, 13790–13797 (2018).
 22. Ross, P. D. & Subramanian, S. Thermodynamics of Protein Association Reactions: Forces Contributing to Stability. *Biochemistry* **20**, 3096–3102 (1981).
 23. Sudlow, G., Birkett, D, J. & Wade, D. N. The Characterization of Two Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Mol. Pharmacol.* **11**,824-832 (1975).
 24. Sudlow, G., Birkett, D, J.& Wade, D. N. Further Characterization of

- Specific Drug Binding Sites on Human Serum Albumin. *Mol. Pharmacol.* **12**, 1052-1061(1976).
25. Yamasaki, K., Chuang, V. T. G., Maruyama, T. & Otagiri, M. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 5435–5443 (2013).
 26. Fehske, K. J., Müller, W. E. & 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 site. Fehske KJ, Müller WE, Wollert U. A highly reactive tyrosine residue as part of the indole ring. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 709–17 (1978).
 27. Fehske, K. J., Müller, W. E. & Wollert, U. A highly reactive tyrosine residue as part of the indole and benzodiazepine binding site of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta* **577**, 346–59 (1979).
 28. Chruszcz, M. *et al.* Serum albumins - Unusual allergens. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 5375–5381 (2013).
 29. Kosa, T., Maruyama, T. & Otagiri, M. Species differences of serum albumins: I. Drug binding sites. *Pharmaceutical Research* **14**, 1607–1612 (1997).
 30. Panjehshahin, M. R., Yates, M. S. & Bowmer, C. J. A comparison of drug binding sites on mammalian albumins. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 873–879 (1992).
 31. Kaneko, K. I. *et al.* Subdomain IIIA of dog albumin contains a binding site similar to site II of human albumin. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 81–86 (2008).
 32. 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).
 33. Bhattacharya, A. A., 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).
 34. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797 (2007).
 35. Parisini, E., Metrangolo, P., Pilati, T., Resnati, G. & Terraneo, G. Halogen bonding in halocarbon-protein complexes: A structural

- survey. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 2267–2278 (2011).
36. Gulyassy, P. F. & Depner, T. A. Impaired Binding of Drugs and Endogenous Ligands in Renal Diseases. *Am. J. Kidney Dis.* **2**, 578–601 (1983).
 37. Baraka-Vidot, J., Guerin-Dubourg, A., Bourdon, E. & Rondeau, P. Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin. *Biochimie* **94**, 1960–1967 (2012).
 38. Mcquaid, K. E. & Keenan, A. K. Physiological Society Symposium: Impaired Endothelial and Smooth Muscle Cell Function in Oxidative Stress Endothelial Barrier Dysfunction and Oxidative Stress: Roles for Nitric Oxide *Exp. Physiol.* 369–376 (1997).
 39. Sakai, T. *et al.* Interaction mechanism between indoxyl sulfate, a typical uremic toxin bound to site II, and ligands bound to site I of human serum albumin. *Pharm. Res.* **18**, 520–524 (2001).
 40. Zunszain, P. A., Ghuman, J., McDonagh, A. F. & Curry, S. Crystallographic Analysis of Human Serum Albumin Complexed with 4Z,15E-Bilirubin-IX α . *J. Mol. Biol.* **381**, 394–406 (2008).
 41. Toshiaki Sakai, Akira Takadate, and M. O. Characterization of Binding site of Uremic Toxins on human serum albumin. *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 1755–1761 (1995).
 42. Maria Fedorova, Bollineni, R. C. & Hoffmann, Ar. Protein Carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33*, 79–97 221–235 (2011). doi:10.1002/mas
 43. 安楽誠. 安楽誠 ヒト血清アルブミンの構造と機能に及ぼす酸化の影響. 熊本大学博士学位論文 (2003).
 44. Watanabe, H. *et al.* 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).
 45. Wanwimolruk, S., Birkett, D. J. & Brooks, P. M. Structural requirements for drug binding to site II on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.* **24**, 458-63(1983).
 46. Chakrabarti, S. K. Cooperativity of warfarin binding with human serum albumin induced by free fatty acid anion. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 739–743 (1978).
 47. Fujiwara, S. I. & Amisaki, T. Fatty acid binding to serum albumin:

- Molecular simulation approaches. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1830**, 5427–5434 (2013).
48. Anraku, M., Yamasaki, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U. & Otagiri, M. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharm. Res.* **18**, 632–639 (2001).
 49. Anraku, M. *et al.* Validation of the chloramine-T induced oxidation of human serum albumin as a model for oxidative damage in vivo. *Pharm. Res.* **20**, 684–692 (2003).
 50. Mera, K. *et al.* 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).
 51. Annibal, A. *et al.* Identification of dityrosine cross-linked sites in oxidized human serum albumin. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1019**, 147–155 (2016).
 52. Iwao, Y. *et al.* Oxidation of Arg-410 promotes the elimination of human serum albumin. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1764**, 743–749 (2006).
 53. 岩尾康範. 岩尾康範 酸化修飾ヒト血清アルブミンの動態特性に関する研究. 熊本大学 博士学位論文 (2006).
 54. Woalder. HHS Public Access. *Physiol. Behav.* **176**, 139–148 (2017).
 55. Guerin-Dubourg, A., Catan, A., Bourdon, E. & Rondeau, P. Structural modifications of human albumin in diabetes. *Diabetes Metab.* **38**, 171–178 (2012).
 56. Ahmed, N., Dobler, D., Dean, M. & Thornalley, P. J. Peptide mapping identifies hotspot site of modification in human serum albumin by methylglyoxal involved in ligand binding and esterase activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 5724–5732 (2005).
 57. 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).
 58. Levitt, D. G. & Levitt, M. D. Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **7**, 307–328 (2014).
 59. Fredrickson, D.S. & Gordon, R. S. The metabolism of albumin-bound

- C14-labeled unesterified fatty acids in normal human subjects. *J. Clin. Invest.* **37**, 1504–1515 (1958).
60. Brodrsen, R., Andersen, S., Vorum, H., Nielsen, S. U. & Pedersen, A. O. Multiple fatty acid binding to albumin in human blood plasma. *Eur. J. Biochem.* **189**, 343–349 (1990).
 61. Bahr, R., Høstmark, A. T., Newsholme, E. A., Grønnerød, O. & Sejersted, O. M. Effect of exercise on recovery changes in plasma levels of FFA, glycerol, glucose and catecholamines. *Acta Physiol. Scand.* **143**, 105–115 (1991).
 62. A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. - PubMed - NCBI.
 63. Kurien, V. A. & Oliver, M. F. Free fatty acids during acute myocardial infarction. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **13**, 361–373 (1971).
 64. Krenznel, E. S., Chen, Z. & Hamilton, J. A. 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. B.T.H. Veering, A. G. L. Burm, J. H. M. Souverijn, J. M. P. S. & J. S. The effect of age on serum concentrations of albumin and α 1-acid glycoprotein. *Br. J. clin. Pharmacol* **29**, 201–206 (1990).
 66. Kremer, J. M. H., Wilting, J. & Janssen, L. H. M. Drug binding to human α 1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacological Reviews* **40**, 1–47 (1988).
 67. Chuang, V. T. G. & Otagiri, M. Photoaffinity labeling of plasma proteins. *Molecules* **18**, 13831–13859 (2013).
 68. Otagiri, M. A molecular functional study on the interactions of drugs with plasma proteins. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **20**, 309–323 (2005).
 69. Nishi, K. *et al.* Interaction of Aripiprazole with Human α 1-Acid Glycoprotein. *J. Pharm. Sci.* (2019). doi:10.1016/j.xphs.2019.09.003
 70. Chen, R. F. Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment. *J. Biol. Chem.* **242**, 173–181 (1967).
 71. Yamada, K. *et al.* Artificial Blood for Dogs. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
 72. Watanabe, H. *et al.* Conformational stability and warfarin-binding properties of human serum albumin studied by recombinant mutants. *Biochem. J.* **357**, 269–274 (2001).

73. Zeidan, T. A. *et al.* Polymorphism of dehydro-aripiprazole, the active metabolite of the antipsychotic drug aripiprazole (abilify). *Cryst. Growth Des.* **13**, 2036–2046 (2013).
74. Banno, Kazuo. FUJIOKA, TAKAFUMI. KIKUCHI, T. K. & Yasuo, O. Studies on 2 (1H) -Quinolinone Derivatives as Neuroleptic Agents . I . Synthesis and Biological Activities of (4-Pheny1-1-piperaziny1) - Derivatives. *Chem.Pharm.Bull.* **36**, 4377–4388 (1988).
75. Oshiro, Y. *et al.* Novel Antipsychotic Agents with Dopamine Autoreceptor Agonist Properties: Synthesis and Pharmacology of 7-[4-(4-Phenyl-1-piperazinyl)butoxy]-3,4-dihydro-2(1 H)-quinolinone Derivatives. *J. Med. Chem.* **41**, 658–667 (1998).
76. Meucci, E., Mordente, A. & Martorana, G. E. Metal-catalyzed oxidation of human serum albumin: Conformational and functional changes: Implications in protein aging. *J. Biol. Chem.* **266**, 4692–4699 (1991).
77. Nakajou, K., Watanabe, H., Kragh-Hansen, U., Maruyama, T. & Otagiri, M. The effect of glycation on the structure, function and biological fate of human serum albumin as revealed by recombinant mutants. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1623**, 88–97 (2003).
78. Rodney L. Levine, Donita Garland, Cynthia N. Oliver, Adolfo Amici, Isabel Climent, Anke-G. Lenz, Bong-Whan Ahn, Shmuel Shaltiel, & E. R. S. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzym.* **186**, 464–78. (1990).
79. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132.(2010)
80. Kawai, A., Yamasaki, K., Enokida, T., Miyamoto, S., & Otagiri, M. Crystal structure analysis of human serum albumin complexed with sodium 4-phenylbutyrate. *Biochemistry and Biophysics Reports*, **13**(January), 78–82. (2018).
81. Winn, M.D.,Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J., Emsley, P., Evans, P. R., Keegan, R. M., Krissinel, E. B., Leskie, A. G.W., McCoy, A., et al. Overview of the CC4 Suite and Current Developments. *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.***67**, 235-242 (2011)
82. Vagin, A., Teplyakov, A. MOLPER: An Automated Program for Molecular Replacement. *J.Appl. Crystallogr.* **30**, 1022-1025(1977)
83. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W.,

- Echols, N., Zwart, P. H. (2010). PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(2), 213–221. (2010).
84. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., Cowtan, K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallor., Sect. D: Biol. Crystallor.* 66, 486–501(2010)
85. Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Richardson, D. C. (2007). MolProbity: All-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 35 (SUPPL.2), 375–383. (2007).
86. *The PyMOL Molecular Graphics System*, version 2.0.4; Schrödinger, LLC, 2017