

博士（薬 学） 武 田 晴 治

学 位 論 文 題 名

ATP のウシ血清アルブミンへの吸着および
吸着部位に関する研究

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【序論】

血清には6~8%のタンパク質が含まれている。その50~60%がアルブミンである。生体内でアルブミンは、多くの生体内成分を吸着しそれらの体内平衡を維持する機能を持っている。

アルブミンのそれら物質吸着部位は、大きく分類して次のように6箇所報告されている¹⁾。すなわち、I) ワルファリン吸着部位(サイト I)、II) ベンゾジアゼピン吸着部位(サイト II)、III) ジギトキシン吸着部位(サイト III)、IV) 長鎖脂肪酸吸着部位(C16~C18)、V) 中鎖脂肪酸吸着部位(C8~C10、トリプトファン等)、VI) Cu⁺⁺、Ni⁺⁺ 吸着部位である。ここでジギトキシンはサイト I に吸着するという報告もある。1994年、Carterらによりヒト血清アルブミン(HSA)の立体構造がX線結晶解析により明らかにされた²⁾。この立体構造をもとに、多くの薬物吸着部位が立体構造上どの位置にあるのかが推定されている。しかし、詳細な吸着機構について判明している部位はごく少数である。

近年ATP依存系やATPase活性がBSAの存在により影響を受けることが報告されていることより^{3, 4)}、ATPのBSAへの吸着の可能性が考えられる。ATPのBSAへの吸着に関しては、Bauerらにより報告されている⁵⁾。しかし、彼らはESRで解析するために大きなプローブをATPに導入している。そのため、導入したプローブが吸着に影響を与える可能性があり、また、詳細検討も行われていない。そこで、ATPのBSAへの吸着について限外濾過法、³¹P-NMR等を用いて詳細な検討を行い、次に吸着部位と吸着機構について光親和性標識法等を用いて検討を行った。

【結果および考察】

まず、限外濾過法、³¹P-NMR法によりATPが吸着するかについて検討した。その結果、吸着にはpH依存性があり、サイト I 吸着物質により非競合的阻害され、Cl⁻により競合的に阻害されることが明らかになった。吸着部位数はpH依存性がなく1であることがわかった。また、サイト II 吸着物質、脂肪酸等は、吸着を阻害しないことより、ATPはサイト I の新たなサブサイトに吸着する可能性があることが示唆された。サイト I 質吸着部位は、多くの薬物を吸着することより、薬物相互作用が報告され数多くの研究が行われているが、サブサイトを考慮した吸着の機構およびそのドメインの性質については不明な点が多い。また、X線結晶解析で得られた"静的情報"だけでは、吸着の機構及び薬物間相互作用を論じることはできない。そ

ここでATPのBSAへの吸着部位及びその吸着機構を明らかにすることにより、サイトIに関する新たな情報を得ることができると考えた。そこで、吸着の熱力学量を等温滴定型カロリメトリ- (ITC)を用いて測定し吸着機構について検討を行い、光親和性標識法を用いてATPのBSAへの吸着部位について検討を行った。

ITCを用いて8~37°Cの等温条件下、pH 5.5またはpH 7.4で吸着による微量熱の測定を行なった。この結果ATPの吸着はエンタルピー駆動型であり、pH 5.5では $\Delta G^\circ_{\text{cal}}$ 、 $\Delta S^\circ_{\text{cal}}$ 、 $\Delta H^\circ_{\text{cal}}$ の温度依存性が見られた。また、 $\Delta G^\circ_{\text{cal}}$ の温度依存性は、 $\Delta S^\circ_{\text{cal}}$ 、 $\Delta H^\circ_{\text{cal}}$ の温度依存性より小さいことが判明した。吸着は、エンタルピーとエントロピーの補償効果によると考えられる。20~35°Cでは ΔC_p が負で疎水結合等が吸着に関与している可能性が示唆された。このことにより、吸着機構は、20°C付近を境に変化し、異なった相互作用をしている可能性があることが示唆された。一方、pH 7.4では $\Delta H^\circ_{\text{cal}}$ の温度依存性がほとんど見られなかった。

pH 5.5で5、20、35°Cで320nmの波長の光により光親和性標識を行ったところ温度によりピーク強度が変化するものと変化しないものがあることがわかった。このことよりATPの吸着部位は、温度により構造変化しないサブメインIcと温度により構造変化をするサイトIにあることが判明した。各温度で標識された強度を比較すると、ATPは、温度により標識量が変化するサイトIに多く標識されることがわかり、サイトIに対する親和性が強いことが示唆された。また、限外濾過法によるATPの吸着部位は1つ、光親和性標識法では2つとなる理由として吸着が逐次反応であることが考えられる。サイトIに吸着するワルファリン、及びアザプロバゾンともにATPの吸着を非競合的に阻害することより、ATPの吸着部位はサイトIの新たなサブサイトであることが明らかとなった。また、光親和性標識法により酸性(pH 5.5)でサイトIの微細構造が温度により変化していることが示唆された。一方、中性(pH 7.4)でpH 5.5の時と同様に検討したところ、pH 5.5と同じピークがみられるが、温度によるピーク強度の変化はなく吸着部位の構造は温度により影響を受けないことが判明した。さらに、中性でのサイトIの構造は、pH 5.5の35°Cとほぼ同じ構造をしていると考えられる。pH 5.5とpH 7.4でこのような構造特性が異なる理由としてサイトI近傍にあるヒスチジンが関与している可能性が考えられる。以上、pH 5.5及びpH 7.4での光親和性標識法により得られた結果は、ITC測定により得られた熱力学量の温度依存性の結果と一致する。また、ATPがサブメインIc及びサイトIに吸着したとき予想されるATPの配位のしかたについても検討を行った。

ATPがBSAに吸着することの生理的意義として、アルブミンが細胞外で一時的に上昇したATP遊離体の濃度を減少させ細胞死を抑制している等が考えられるがこれは今後の課題である。吸着の機構及び吸着部位の構造特性について詳細な検討を行った結果、ATP吸着の機構及びサイトI吸着部位の構造特性についてX線結晶解析では得られない"動的情報"が得られ、今後サイトI領域の薬物吸着及び相互作用を研究する上で重要な基礎データとなると思われる。

【参考文献】

- 1) Ulrich Kragh-Hansen (1981) *Pharm. Rev.*, 33, 17-53
- 2) X. M. He, D.C. Carter (1992) *Nature*, 358, 209
- 3) James Driscoll, Alfred.L.Goldberg (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 787-791
- 4) Marta E. Vazquez-memije et all (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, 260, 67-74
- 5) M. Bauer, J. Baumann, W. E. Trommer (1992) *FEBS Lett.*, 313, 288

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　加　茂　直　樹
副　查　教　授　栗　原　堅　三
副　查　助教授　宮　内　正　二
副　查　助教授　柏　柳　　誠

学　位　論　文　題　名

ATP のウシ血清アルブミンへの吸着および 吸着部位に関する研究

アルブミンは血清に含まれる主要タンパク質である。このタンパク質は生体内物質や外来物質を吸着し血流によって輸送する機能を持つ。同時に、多くの生体成分を吸着し、それらの体内平衡を維持する機能を持っている。アルブミンの吸着部位に関する研究は多くなされ、大きく分類して次の6カ所が報告されている。すなわち、1) ワルファリン吸着部位（サイトI）、2) ベンゾジアゼピン吸着部位（サイトII）、3) ジギトキシン吸着部位（サイトIII）、4) 長鎖脂肪酸吸着部位、5) 中鎖脂肪酸吸着部位、6) Cu^{++} 、 Ni^{++} 吸着部位である。サイトI吸着部位は大きなドメインから形成されていると考えられ、近年さらに二つのサブサイトが存在していると考えれるようになった。

アルブミンはATPとは相互作用をしない「不活性」なタンパクと考えられている。しかし、ATP依存系やATPase活性が血清アルブミンの存在によって影響を受けることが報告されている。ATPがアルブミンに吸着すると考えられ、実際それを示した報告もされている。しかし、ESRを用いているので、NOラジカルを持った疎水性のプローブの部分がアルブミンと相互作用している可能性がある。（実際、申請者の研究の結果を考えると、この報告はATPの正しい吸着を観測していないと結論出来る。）そこで、ATPが血清アルブミンに吸着することを限外ろ過法およびNMRにより示した。

pH依存性、イオン強度依存性について詳細な検討を加えている。NMRのデータから、ATPのどの部分がタンパクと相互作用しているかを明らかにしている。

滴定型カロリメトリーを用いて、吸着における ΔH° 、 ΔG° 、 ΔS° を5°C～35°Cで求め、吸着の熱力学的性質について検討している。

photo-affinity labelingによって、ATPのアルブミンの吸着部位を推定している。ラベルされるペプチド断片を申請者は3種類のラベル剤を合成し、8-N3-εATPが最適であることを見いだしている。このラベル剤を用いて、ATPの結合部位を明らかにした。その結果、サイトIの近傍であることを明らかにしている。サイトI結合物質がATPのアルブミンへの結合をnon-competitiveに阻害することは、この結論を支持する。photo-affinityの実験データの詳細な検討により、2カ所の吸着部位が推定されたが、結合実験からは結合部位数は1であり、一見矛盾する結果となるが、申請者は、2カ所の吸着部位が直列的につながっていると推定し、報告されているアルブミンの結晶構造から、この推定は妥当であると推論している。この吸着部位内の1つは、CIの結合部位であることを明らかにした。

ATPのアルブミンへの吸着の生理的意義も議論している。

このように、申請者は、初めてATPがアルブミンに吸着することを明らかにし、吸着部位を推定したものであり、薬学博士を授与するに値すると認めた。