

学 位 論 文 題 名

 α -1酸性糖蛋白質不均一性体の薬物結合性に関する研究

学位論文内容の要旨

α 1-酸性糖蛋白質 (AAG) は 181 残基のアミノ酸から成るペプチド部分と 5 つの N 結合型複合型糖鎖から成る糖鎖部分とで構成される分子量約 40,000 の糖蛋白質であり、その糖鎖部分は分子量全体の約 45% におよぶ非常に高い割合を占めている。AAG にはアミノ酸配列の異なる 2 つの遺伝的不均一性体 (FIS variant と A variant) が存在する。近年、variant 間で薬物結合の特異性に大きな違いがあることが明らかとなってきた。また、AAG には糖鎖構造の異なる微視的不均一性体も存在する。最近、AAG の薬物結合に糖鎖部分が関与することも明らかとなってきた。以上のことから、本研究においては、安全かつ有用な薬物投与設計に資する一助とすることを目的に、AAG の薬物結合におよぼすペプチド部分 (variant) と糖鎖部分の影響について検討を行った。また、具体的な疾患として生体部分肝移植を想定し、部分肝切除後の肝再生期における AAG の糖鎖構造変化についても検討を行った。

1. AAG variant に対する立体選択的な薬物結合

AAG に対する光学異性体薬物の結合がその異性体間で異なる要因について検討するため、AAG に対して親和性が高く、立体選択的に結合するジソピラミド (DP)、プロプラノロール (PRO)、ワルファリン (WR) について各異性体間の結合パラメータを比較した。その結果、いずれの薬物においても、結合部位数 (N) に有意な違いは認められなかったのに対して、解離定数 (Kd) には有意な違いが認められた。この結果から AAG に対する立体選択的な結合は、異性体間の親和性の違いに起因していることが明らかとなった。

次に AAG の有する立体選択性が 2 つの variant に共通の性質であるか検討するため、上記薬物について各 variant ごとに同様の検討を行った。その結果、FIS variant に対しては、WR のみが立体選択的に結合し、DP と PRO は立体選択的に結合しないことが明らかとなった。逆に A variant に対しては、DP と PRO が立体選択的に結合し、WR は立体選択的には結合しなかった。これらのことから AAG の variant は薬物個々に特異的な立体選択性を有していることが明らかとなった。

2. AAG の立体選択的な薬物結合におよぼすシアル酸の影響

AAG の薬物結合におよぼすシアル酸の影響について検討するため、DP と PRO を用いて、アシアロ体とネイティブ体の結合パラメータの比較を行った。その結果、アシアロ体に対する DP の結合パラメータはネイティブ体とほぼ同様の値を示し、ジソピラミドの結合にシアル酸は関与していないことが明らかとなった。一方、PRO に関しては、シアル酸を除去することによって S 体の解離定数が R 体と同程度まで増大したため、ネイティブ体においてみられた立体選択性がアシアロ体では消失していることが明らかとなった。

次に各 variant ごと同様の検討を行った。DP はアシアロ体においてもネイティブ体と同様に立体選択的な結合は A variant に対してのみ認められた。また、2 つの variant いず

れにおいてもネイティブ体とアシアロ体の間で結合パラメータに有意な違いは認められず、DP の結合にシアル酸は関与していないことが明らかとなった。一方、PRO は各 variant においてシアル酸の影響が異なっていた。F1S variant との結合にシアル酸は関与していなかったのに対して、A variant においては、S 体の解離定数がシアル酸を除去することにより増大していることが明らかとなった。この結果から、AAG の有する PRO への立体選択性は、A variant 上のシアル酸が S-PRO との親和性を増大させることにより生じていることが明らかとなった。また、 $\alpha 2-3$ アシアロ体の K_d 値がすべてのシアル酸を除去したときとほぼ同様の値を示したことから、S-PRO との結合に関与する A variant 上のシアル酸は $\alpha 2-3$ 結合型のシアル酸であることが示唆された。

シアル酸除去による AAG の立体構造への影響はないことが報告されており、シアル酸の存在により S-PRO の親和性が増大したのは、シアル酸と S-PRO が直接相互作用したためと考えられる。したがって、 $\alpha 2-3$ 結合型のシアル酸が A variant の薬物結合部位の近くに存在し、結合部位の構成要素となっていることが新たに示唆された。

3. AAG の薬物結合におよぼす糖鎖分岐度の影響

AAG の薬物結合におよぼす糖鎖分岐度の影響について検討するために、2 本鎖糖鎖を特異的に認識するレクチンであるコンカナバリン A を用いて AAG を分岐度の大きな非吸着画分と分岐度の小さな吸着画分に分離し、各画分に対する DP の結合パラメータを算出した。その結果、画分間で解離定数に有意な違いが認められ、DP は分岐度の大きな非吸着画分に対して高い親和性を有していることが明らかとなった。この親和性の違いがシアル酸による電荷の違いに起因しているか否かを検討するため、シアル酸を除去したアシアロ体を用いて同様の検討を行った。その結果、両画分ともにネイティブ体とアシアロ体で K_d 値に有意な違いは認められなかった。これらのことから糖鎖分岐度の違いが DP の結合親和性に及ぼす影響は、シアル酸による電荷の違いに起因しているのではないことが明らかとなった。またこの結果から、糖鎖分岐度が DP の結合親和性におよぼす影響は、分岐の違いによる AAG の立体構造の変化に起因していることが示唆された。

4. ラット肝再生期における AAG の糖鎖構造変化

部分肝切除後の肝再生期における AAG の糖鎖構造変化について検討するため、レクチンプロット解析を行った。その結果、SSA ($\alpha 2-6$ 結合型のシアル酸を認識) は、術後 3 日目まで減少し、その後増加する傾向を示しており、部分肝切除後のアシアロレセプター量の推移とほぼ同様の傾向を示した。したがって肝再生期におけるシアル酸量の減少は、アシアロレセプター量が減少することにより AAG の肝臓からの取り込みが抑制され、アシアロ体の割合が増加したためだと考えられる。糖鎖分岐度に関しては、ConA (2 本鎖糖鎖を認識) が術前に比べて減少しているのに対し、L-PHA ($\beta 1-6$ GlcNAc を認識) は術後 1 日目をピークに増加していた。これらの結果から、肝再生期における AAG の糖鎖の分岐度は増大することが明らかとなった。また、E-PHA (バイセクティング構造を認識) について検討した結果、肝再生期において AAG 糖鎖上のバイセクティング構造は変化しないことが明らかとなった。

AAG の糖鎖構造変化が肝再生の指標となり得るか否かについて検討するため、肝重量推移との相関を調べた結果、L-PHA において有意な相関が認められ、AAG 糖鎖上の $\beta 1-6$ GlcNAc 量が肝再生の指標となり得ることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	宮 崎 勝 巳
副 査	助教授	菅 原 満
副 査	教 授	井 関 健
副 査	教 授	原 島 秀 吉

学 位 論 文 題 名

α -1酸性糖蛋白質不均一性体の薬物結合性に関する研究

α 1-酸性糖蛋白質 (AAG) には、アミノ酸配列の異なる2つの遺伝的不均一性体 (F1S variant と A variant) が存在する。近年、variant 間で薬物結合の特異性に大きな違いがあることが明らかとなってきた。また、AAG には糖鎖構造の異なる微視的不均一性体も存在する。最近、AAG の薬物結合に糖鎖部分が関与することも明らかとなってきた。以上のことから、本研究は AAG の薬物結合におよぼすペプチド部分 (variant) と糖鎖部分の影響について検討した。

AAG の有する立体選択性が2つの variant に共通の性質であるか検討するため、AAG に対して親和性が高く、立体選択的に結合するジソピラミド (DP)、プロプラノロール (PRO) およびワルファリン (WR) を用いて、各 variant ごとに立体選択的な結合性について検討した結果、DP と PRO は A variant、WR は F1S variant に対してのみ立体選択的に結合することを示し、AAG の variant は薬物個々に特異的な立体選択性を有していることを明らかにした。

糖鎖部分の影響に関しては、A variant に対する PRO の立体選択的な結合が α 2-3 結合型のシアル酸の存在により (S)-PRO の親和性が増大するために生じることを明らかにし、糖鎖末端に位置するシアル酸が AAG の立体選択的な薬物結合に影響をおよぼすことを明らかにした。また、クロルブロマジンにおいても A variant に対する結合に α 2-3 結合型のシアル酸が関与することを明らかにし、 α 2-3 結合型のシアル酸が A variant の薬物結合部位を構成する要素となる可能性を示唆した。糖鎖の分岐度に関しては、AAG を2本鎖糖鎖の有無により分離し、DP が2本鎖糖鎖を含まない高

分岐な AAG に対して親和性が高いことを明らかにし、糖鎖の分岐度は AAG の立体構造を変化させることにより薬物結合に影響を与えることを示唆した。

ラット肝再生期における AAG の糖鎖構造変化に関しても検討を行い、部分肝切除後の肝再生期には、AAG のシアル酸含有量は低下し、糖鎖の分岐度は増加することを明らかにした。また、肝重量変化と β 1-6 GlcNAc を認識する L-PHA の推移が有意な相関を示したことから、AAG 糖鎖上の β 1-6 GlcNAc 量が肝再生の指標となり得ることを示唆した。

口頭発表に際し、板垣助手からシアル酸と薬物の直接的な相互作用を証明する手法と現在用いられている肝再生のバイオマーカーに関する質問がなされた。ついで、平野助手より A variant の薬物結合部位とシアル酸の位置関係に関する質問がなされた。また、紙谷助教授から、variant の組成変化に関する質問がなされた。最後に井関教授から、variant と薬物相互作用の関係に関する質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、概ね妥当な回答を行った。

AAG の各 variant が薬物個々に特異的な立体選択性を有すること、 α 2-3 結合型のシアル酸や糖鎖の分岐度が AAG の薬物結合に影響を及ぼすことを明らかにし、また、AAG の糖鎖構造が肝再生の指標となり得ることを示唆した本研究の意義は大きく、審査員一同協議の結果、本論文は博士（薬学）の学位授与に値するものと判定した。