12S3-07

部位特異的変異法によるヒト血清アルブミン分子上の
薬物結合サイトのトポロジー解析

○渡邊博志¹⁾、棚瀬純男²⁾、中城圭介¹⁾、岩尾康範¹⁾、御手洗万希¹⁾、
丸山 徹¹⁾、Ulrich Kragh-Hansen³⁾、小田切優樹¹⁾
¹⁾熊本大・薬・薬剤学、²⁾熊本大・医・第二生化学、
³⁾Dept. of Med. Biochemistry, Univ. of Aarhus

TOPOLOGY ANALYSIS OF DRUG BINDING SITES ON HUMAN SERUM ALBUMIN
USING SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

Hiroshi WATANABE¹⁾, Sumio TANASE²⁾, Keisuke NAKAJOU¹⁾, Yasunori IWAOKI¹⁾,
Maki MITARAI¹⁾, Toru MARUYAMA¹⁾, Ulrich KRAGH-HANSEN³⁾ and Masaki OTAGIRI¹⁾

¹⁾Dept. of Pharmaceutics, Fac. of Pharm. Sci, Kumamoto Univ.

²⁾Dept. of Biochemistry, School of Medicine, Kumamoto Univ.

³⁾Dept. of Med. Biochemistry, Univ. of Aarhus

【目的】ヒト血清アルブミン(HSA)分子上には大きく分けてサイトIとサイトIIの二つのリガンド結合サイトが存在する。なかでもサイトIは、種々の構造の異なる薬物分子を受け入れる構造適応性(configurational adaptability)を有しており、複数のサブサイト(Ia, Ib, Ic)から形成されることが明らかとされてきた。また、サイトIIに結合するリガンドは一般に疎水性構造から離れた位置にカルボン酸等の負の電荷が局在する構造を有しており、その結合領域は比較的rigidである。さらに、このサイトIIはHSAが有するエステラーゼ様活性の活性部位であることが示唆されている。

ところで、HSAはpH6~9で構造変化(Neutral(N)-Base(B)転移)を惹起し、このN-B転移に伴い薬物結合性が変化し、特にサイトI結合型薬物はB型においてその結合性が増大する¹⁾。

このような背景の下、上述したリガンド結合サイトのトポロジー解析を目的として、化学修飾並びにX線結晶構造解析等のデータから変異の標的アミノ酸としてサイトIとサイトIIに位置する¹⁹⁹Lys, ²¹⁴Trp, ²¹⁸Arg, ²⁴²His及び⁴¹⁰Arg, ⁴¹¹Tyrを選択した。*Pichia*酵母を宿主として変異型HSA(K199A, W214A, R214H, H242Q, R410A, Y411A, Y411S, Y411F, R410A/Y411A)を作製し、HSAの機能におけるそれらアミノ酸残基の役割について考察した。

【実験方法】変異体は*Pichia pastoris*を宿主とした発現系により作製した。結合実験には代表的サイトIリガンドとしてワルファリンを用いた。またサイトIIリガンドとしてはケトプロフェンとジアゼパムを用いた。エステラーゼ様活性については酢酸p-ニトロフェニルを基質とした。加水分解後に生成するp-ニトロフェノールの増加で測定し、擬一次

速度定数として見かけの加水分解速度定数を算出することにより検討を行った。

【結果と考察】サイトIIに位置する⁴¹⁰Argと⁴¹¹Tyrの機能検索：サイトII表面に位置する⁴¹⁰Argと⁴¹¹Tyrの側鎖がリガンドとの結合過程にどの程度関与しているかを検討するため、限外濾過法により解析した。その結果ケトプロフェンの場合、その結合過程にはケトプロフェンのカルボン酸と⁴¹⁰Argとの静電的相互作用に加え、ケトン基と⁴¹¹Tyrの水酸基との水素結合及び芳香環同士の特異的相互作用が重要であることが推察された。また、ジアゼパムの結合過程には、ケトン基と⁴¹¹Tyrの水酸基との水素結合及び芳香環同士の特異的相互作用が大変重要であるものの、⁴¹⁰Argはその結合には関与していないことが示唆された。

エステラーゼ様活性について検討した結果、⁴¹¹Tyrの変異により活性が完全に消失したことから、その活性中心は⁴¹¹Tyrの水酸基であると推察された。また⁴¹⁰Argの変異により大きく活性の減少が認められたことから、その反応性には⁴¹⁰Argのグアニジノ側鎖が大きく関与していることが確認された²⁾。

サイトIのトポロジー解析：近年 Familial disalbuminemic hyperthyroxinemia患者の血中チロキシン濃度の増大が、HSAの変異(R218H, R218P)によるチロキシンのHSAへの親和性の増大に起因することが確認された。また、この患者のHSAとワルファリンとの結合親和性は約5倍低下していることが報告されている。そこでX線結晶構造解析データを基に、サイトI結合ポケットに側鎖を伸ばしているアミノ酸残基を選び、K199A, W214A, R218H及びH242Q変異体を作製し以下の検討を行った(Table 1)。その結果、pH7.4でのワルファリンの結

合性は K199A, H242Qにおいて各々4及び6倍増大し、W214A, R218Hでは各々2及び3倍結合定数の減少が観察された。従って、²¹⁴Trp, ²¹⁸Argの側鎖はワルファリンの結合にとってpositiveに働いており、逆に¹⁹⁹Lys, ²⁴²Hisの側鎖はその結合においてnegativeに機能していることが明らかとなった。しかしながら、今回の結果ではワルファリンの結合親和性を大きく低下させるようなアミノ酸変異を見出すことはできなかった。

上述したように、HSAのpH依存コンフォメーション変化、N-B転移に伴いサイトIリガンドの結合性は顕著に変化することから、その結合サイトの構造はflexibleであると考えられる。そこで、サイトIリガンド、ワルファリンの結合性に及ぼすpHの影響について検討した結果、W214A及びR218HではpH上昇に伴う結合性増大の程度は他の変異体に比べ小さかった(Table 1)。一方、K199A及びH242Qは野生型に比べてN-B転移の影響をより受け易くなることが明らかとなった。X線結晶構造解析によると、²¹⁴Trpと²¹⁸Arg及び¹⁹⁹Lysと²⁴²Hisは各々3~4Åの距離にあり非常に近くに位置することが分かっている。ワルファリン結合領域のトポロジーについて考察すると、本来、ワルファリンの結合にとって妨げ

となっている¹⁹⁹Lysや²⁴²His近傍のポケットの広がり(揺らぎ)が、B型におけるワルファリンの結合親和性の増大の原因となっている可能性が示唆された。加えて、²¹⁴Trpや²¹⁸Arg近傍にはN-B転移によるサイトIのミクロ環境変化を引き起こす引き金となるようなアミノ酸残基の存在が推察された。

以上のように、部位特異的変異法を用いて、HSA分子上の今回ターゲットとして選択した全てのアミノ酸残基がリガンドとの結合過程や、エステラーゼ様作用に大きく寄与していることが明らかとなった。

Table 1 Binding of warfarin to wild-type or mutant rHSA at 25 °C

	association constant (x 10 ⁵ M ⁻¹)		
	pH 6.5	pH 7.4	pH 8.2
Wild-type	2.08±0.16	3.63±0.22	10.56±0.15
K199A	3.70±0.10	15.90±0.75	31.06±1.02
W214A	1.47±0.23	1.71±0.13	4.18±0.95
R218H	0.80±0.11	1.13±0.23	3.49±0.16
H242Q	5.22±0.31	22.17±0.86	35.96±1.26

[Abstract]

Recombinant wild-type and mutant human serum albumins were produced using a yeast expression system. We investigated, by ultrafiltration, the high affinity binding of two representative site II-ligands, namely ketoprofen (KP) and diazepam (DZ). According to the crystal structure of HSA, the residues of ⁴¹⁰Arg and ⁴¹¹Tyr protrude into the center of site II (in subdomain 3A), and the binding results showed that the guanidino moiety of ⁴¹⁰Arg, the phenolic oxygen and the aromatic ring of ⁴¹¹Tyr are important for KP binding. The guanidino moiety probably interacts electrostatically with the carboxyl group of KP, the phenolic oxygen could make a hydrogen-bond to the ketogroup of the ligand, and the aromatic ring may participate in a specific stacking interaction with one of or both of the aromatic rings of KP. By contrast, ⁴¹⁰Arg is not important for DZ binding. In addition to its unique ligand binding properties, HSA also possesses an esterase-like activity, and studies with *p*-nitrophenyl acetate as a substrate showed that although ⁴¹⁰Arg is important, the enzymatic activity of albumin is much more dependent on the presence of ⁴¹¹Tyr. In order to characterize the warfarin (WF) binding site, ¹⁹⁹Lys, ²¹⁴Trp, ²¹⁸Arg and ²⁴²His were mutated. At pH 7.4, the affinity of H242Q and K199A were found to be about 6 and 4 times higher as compared to that of wild-type HSA, respectively. However, the affinity of R218H and W214A for WF were about 3 and 2 times reduced. These results show that the side chain of ²¹⁴Trp and ²¹⁸Arg are important for WF binding. In contrast, the side chains of ¹⁹⁹Lys and ²⁴²His interfere with binding. Finally, the effect of the N-B transition on WF binding will be discussed.

[References]

- 1) Peters, T. Jr. *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press, San Diego, California, 1996.
- 2) H. Watanabe et al. *Biochem. J.*, **349**, 813-819 (2000).