

人工酸素運搬体の構造生物学的研究 Structural Basis of Artificial O₂-Carrier

木平清人^{1*}, 山田佳奈², 篠原隆一², 横幕恭子², 山田 貢¹,
岩田茂美¹, 松本邦裕¹, 秋山元英², 小松晃之²

¹国立研究開発法人 宇宙航空研究開発機構 有人宇宙技術部門 きぼう利用センター
〒305-8505 茨城県つくば市千現 2-1-1

²中央大学理工学部応用化学科, 〒112-8551 東京都文京区春日 1-13-27

Kiyohito Kihira^{1,*}, Kana Yamada², Ryuichi Shinohara², Yokomaku Kyoko², Mitsugu Yamada¹,
Momi Iwata¹, Kunihiro Matsumoto¹, Motofusa Akiyama² and Teruyuki Komatsu²

¹JEM Utilization Center, Human Spaceflight Technology Directorate,

Japan Aerospace Exploration Agency, 2-1-1 Sengen, Tsukuba-shi, Ibaraki, 305-8505, Japan

²Dept. of Applied Chemistry, Chuo University, 1-13-27 Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8551, Japan

1 はじめに

日本赤十字社の推計によると、ケガや病気の治療に使われる輸血用血液の量は年々減り続け、2027年（平成39年）には約85万人分が不足すると予測されている。こうした状況のもと、大震災などの大規模災害が発生した場合、輸血を必要とする人が急増し、一気に血液不足に陥る恐れがある。そのため、輸血液の代替物となる人工酸素運搬体の実現は、次世代医療における最重要課題の一つとして位置づけられている。血液型を選ばず、いつでも誰にでも使用できる人工酸素運搬体の安定した供給体制の構築が、危機管理の重要施策として設定されている。

これまで欧米を中心に、赤血球内にある酸素輸送タンパク質“ヘモグロビン”を化学修飾したいわゆる修飾ヘモグロビン製剤が精力的に開発されてきた。特にヘモグロビンをグルタルアルデヒドで架橋したヘモグロビン重合体は、輸血液の代替物として1990年代から研究が始まり、今世紀に入ると、米国Northfield社のPolyHeme、Biopure社のHemopureが臨床試験Phase III（第三相試験）まで進んだ。しかし、不均一な構造、血圧上昇などの副作用の問題が解決できず、2002年から一時期、南アフリカで使用された以外は認可された製剤はない。

そこで研究代表者らはごく最近、副作用がなく、生体内で十分量の酸素を輸送できる新しい人工酸素運搬体を設計・開発した。具体的には、ヘモグロビンの分子表面に架橋剤を介して3個の血清タンパク質“アルブミン”を結合させた（ヘモグロビン-アルブミン）クラスター『ヘモアクト』（図1）を合成し、それがきわめて安定な酸素錯体を形成することを見出した[1]-[3]。

現在、薬学・医学分野の共同研究者と動物実験を進めており、現在までに、上記した副作用（血圧上昇）が見られないことを確認している。さらに酸素親和性を向上させる改良型の作成にも成功した[4]。

一方、動物用人工血液の開発にも着手している。動物には人間のように輸血用血液を備蓄・供給する制度がない。そのため、動物用輸血液を確保することすら非常に難しく、輸血できなかったために多くの命が失われている現状がある。

そこで、研究代表者らはイヌまたはネコのアルブミン遺伝子を組み込んだ酵母を作成し、遺伝子組み換えイヌ血清アルブミンおよび遺伝子組み換えネコ血清アルブミンの大量発現系を構築した。またヒト用と同じ方法で、イヌ用およびネコ用の（ヘモグロビン-アルブミン）クラスターを調製し、2015年10月に発表した（『ヘモアクト-C』、『ヘモアクト-F』）。

ヘモアクト、ヘモアクト-C、ヘモアクト-Fのいずれにおいても、クラスター自身およびその構成要素であるタンパク質の精密な化学構造情報は、製剤化において、特に安全性を保證するデータとして非常に重要であることは明白である。その構造情報を取得することを目的に、本人工酸素運搬体およびその構成要素の結晶化を行い、PF構造生物学ビームラインNW12Aを用いてX線回折強度データ収集を行った。

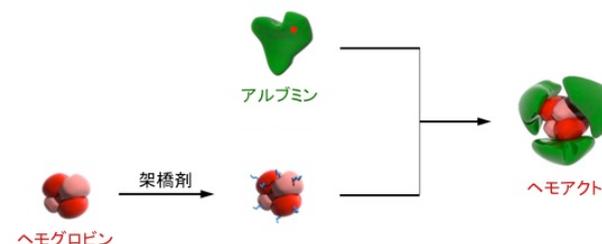


図1 ヘモアクトの合成方法

2 実験

ヒトヘモグロビン (HHb), ヒト血清アルブミン (HSA) を用いて, 既報に従いヘモアクトを調製した[1]-[3]. 得られたヘモアクトについて, 市販の結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化条件の探索を行った結果, 沈殿剤として PEG を含む複数の条件で微小結晶を得たため, 回折実験に供した.

既報に従い, 東京芝浦臓器(株)より購入した牛血(新鮮血)からウシヘモグロビンを精製した[1]. また, イヌ血清アルブミン (rCSA) およびネコ血清アルブミン (rFSA) を, 作成した酵母大量発現系より調製した.

既報に従いウシヘモグロビンの Cys-93(β)間を架橋し, 高酸素親和性ウシヘモグロビン (XLBHb) を調製した[4].

得られた rCSA, rFSA, XLBHb について市販の結晶化スクリーニングキットを用いて結晶化条件の探索を行った結果, 沈殿剤として PEG を含む複数の条件で結晶を得たため, 回折実験に供した.

3 結果および考察

得られたヘモアクト結晶を用いて回折実験を行ったが, 回折点は確認できたものの, 構造解析可能なフルデータセットを取得することが出来なかった. 結晶サイズおよび結晶品質の不足が原因であると考えられるため, 結晶化条件の最適化を進めたい.

得られた rCSA 結晶を用いて回折実験を行ったところ, 3.0 Å 分解能の回折強度データセットを得ることが出来た(表1).

表1 : Crystallographic Summary (rCSA)

Data Collection	
Wavelength (Å)	1.00000
Resolution range (Å)	50.00 - 3.0 (3.05 - 3.0)
Space group	P 1 21 1
Unit cell	46.72 118.4 58.33 90 114.82 90
Total reflections	77559
Unique reflections	11596(577)
Multiplicity	6.7(6.0)
Completeness (%)	99.9 (99.8)
Mean I/sigma(I)	30.3 (6.6)
B-factor (Å ²)	48.12
R-merge	0.110(0.453)
Mosaicity Range (°)	1.25 - 1.98

括弧内は最外殻の値を示す.

得られた XLBHb 結晶を用いて回折実験を行ったところ, 2.0 Å 分解能の回折強度データセットを得ることが出来た(表2).

表2 : Crystallographic Summary (XLBHb)

Data Collection	
Wavelength (Å)	1.00000
Resolution range (Å)	50.00 - 2.0 (2.03 - 2.0)
Space group	P 212121
Unit cell	62.78 72.54 128.95 90 90 90
Total reflections	227366
Unique reflections	40277 (1991)
Multiplicity	5.6 (5.7)
Completeness (%)	99.1 (99.9)
Mean I/sigma(I)	18.2 (3.1)
B-factor (Å ²)	22.74
R-merge	0.172 (0.896)
Mosaicity Range (°)	0.51 - 0.65

括弧内は最外殻の値を示す.

得られた rFSA 結晶を用いて回折実験を行ったが, 回折点は確認できたものの, 構造解析可能なフルデータセットを取得することが出来なかった. 結晶サイズおよび結晶品質の不足が原因であると考えられるため, 結晶化条件の最適化を進めたい.

4 まとめ

ヘモアクト, rCSA, rFSA, XLBHb を結晶化し, NW12A において X 線回折強度データ収集を行った. ヘモアクト, rFSA については構造解析可能なデータセットを取得できなかったため, 引き続き, 結晶化条件の最適化を進める. rCSA, XLBHb については必要なデータセットを収集することができた. 構造解析を実施次第, 必要な情報をまとめ, 論文投稿を実施する予定である.

謝辞

ビームラインスタッフの方々には大変お世話になりました. ここに感謝申し上げます.

参考文献

- [1] *Biomacromolecules* **2013**, 14, 1816-1825.
- [2] 特願 2011-44207
- [3] *PLoS One* **2014**, 9, e0110541.
- [4] *PLoS One* **2016**, 11, e0149526.

成果

【受賞】

第 22 回日本血液代替物学会年次大会 学生講演賞、山田佳奈、小松晃之 (2015.10.21, 熊本)

【論文】

構造情報については未発表であるが, 課題期間中に以下の論文発表を行った.

1. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 12778:1-9.
2. *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 6157-6164.
3. *PLoS One* **2016**, 11, e0149526:1-15.

* kihira.kiyohito@jaxa.jp