

氏名 (本籍)	南 武 志 (愛知県)
学位の種類	博 士 (医学)
学位授与番号	甲第 978 号
学位授与日付	平成 27 年 3 月 25 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Comparative studies on the heterogeneity of plasma-derived and recombinant human albumins in laboratory use
審査委員	(主査) 教授 小 澤 修 (副査) 教授 伊 藤 善 規 教授 森 田 啓 之

論文内容の要旨

アルブミンは、17 個の S-S 結合と N 末端より 34 番目に反応性の高い SH 基 (Cys-34) を有する単純タンパク質で、血漿や間質液などの細胞外液中に豊富に存在し、血漿膠質浸透圧の維持や種々の物質の搬送体タンパク質としての機能を有している。また、Cys-34 がフリーの状態のものを還元型アルブミン (human mercaptalbumin, HMA)、その SH 基が血中の含硫アミノ酸などと S-S 結合を形成したものを酸化型アルブミン (human non-mercaptalbumin, HNA) と呼び、細胞外液中の酸化還元緩衝機構の一翼を担っている。そのようなアルブミンは、現在、多量のプール血清より抽出精製されて、ヒト血清アルブミン (HSA) 製品 (plasma-derived HSA, pHSA) として市販されている。さらに近年では、遺伝子工学的手法によって遺伝子組み換え体 HSA (recombinant HSA, rHSA) も市販され、それらの市販品は主に種々の分析法における標準タンパク質として、あるいは細胞培養実験における添加剤として汎用されている。

本研究は、市販 HSA 製品の SH 基の酸化還元状態や二次、三次構造、熱安定性及び細胞増殖能に与える影響を解析することによって、HSA 製品の構造的並びに機能的な分子不均一性を比較検討した。

【対象と方法】

市販 pHSA と rHSA 製品は、現在世界中で広く使用されている Sigma 社の製品 (pHSA は A1653, A9511, A1887, A8763, A3782 の 5 種の製品, rHSA は A9731 及び A9986 の 2 種の製品) を対象とした (ロット総数は 22)。SH 基の含量は DTNB 試薬による Ellman 法によって、酸化還元状態とダイマー含量は HPLC 法によって、二次、三次構造解析と熱変性曲線 (20~90℃) からの熱力学的パラメーター (T_m 及び ΔG) は円二色性 (CD) 分散計によって測定した。HSA が細胞増殖に与える影響の検討には、ヒト単球系の細胞株である U937 及び THP-1 において添加 HSA 濃度を変化させて培養し、細胞増殖試薬 WST-1 を用いて解析した。ただし、熱安定性の解析及び培養細胞系の増殖能の解析には、代表して A1653 (pHSA), A3782 (pHSA), A9731 (rHSA) の三製品を検討した。統計学的解析は StatView5.0 を用いて、Student's *t*-test により、 $P < 0.05$ の場合を統計学的有意差ありと判定した。

【結果】

SH 基及びダイマー含量 (n = 22): Ellman 法による SH 基含量は 0.213~0.394, HPLC 法による HMA (%) 値は 19.9~38.5% となり、対象製品間に有意差は認められなかった。またダイマー含量 (%) は 1.5~15.7% となり、いずれの HSA 製品にもダイマーの存在が確認された。

CD スペクトルによる二次、三次構造解析: いずれの製品も同様の CD スペクトル像が得られ、 α -

ヘリックス含量も多かった (48.6~66.6%, n = 22) が, 製品間に有意差は認められなかった。

熱変性曲線による熱力学的パラメーターの算出: $[\theta]_{222}$ 値における熱変性曲線を A1653, A3782, A9731 の三製品で比較した。その曲線から算出した変性中点 T_m 値はそれぞれ 74.1, 66.2, 77.2°C, ΔG 値はそれぞれ 18.2, 15.6, 20.1 kJ/mol となり, 3 種の製品間で有意差が認められた ($P < 0.05$)。

U937 及び THP-1 細胞株系における細胞増殖能に与える影響の検討: U937 細胞株においては, A9731 は低濃度で有意に細胞増殖能を亢進させたが, A3782 は有意に低下させた。一方, A1653 は何ら影響を及ぼさなかった。また THP-1 細胞株においては, A9731 は低濃度で亢進させたが, 高濃度では抑制した。A1653 及び A3782 は有意に低下させた。

【考察】

HSA 製品の SH 基含量は, 先行研究で得られている健康成人男子の含量 (73.2%) より著しく低い値であった。またいずれの製品にもダイマーの存在が認められた。通常のヒト血清中にはみられないことから, pHSA では多量のプール血清からの大規模調製及び貯蔵プロセスの間に生じていることが, また rHSA でも製品調整中に生じていることが示唆された。熱安定性及び培養細胞系の実験に代表として用いた A1653 (pHSA の初期粗精製品), A3782 (pHSA の最終精製品), A9731 (イネ胚芽による rHSA) の三製品の二次, 三次構造に有意差がみられなかったことから, 立体構造はほぼ同一であることが示唆された。しかし熱安定性には有意差が認められた (熱安定性の順: A9731 > A1653 > A3782)。U937 及び THP-1 細胞株系の細胞増殖活性に対し, 三製品間で異なる挙動を示した。

アルブミンは血中で搬送体タンパク質として機能しているが, 重要なリガンドの一つに脂肪酸がある。A1653 は粗精製品で結合脂肪酸は生体内と同レベルだが, A3782 は最終精製品で脂肪酸フリーと報告されている。また, 脂肪酸は HSA の熱安定性に影響を与えることも報告されている。脱脂と未脱脂の A1653 の U937 細胞株における細胞増殖実験 (予備実験) では, 脂肪酸結合の有無が細胞増殖能に影響を及ぼす結果が得られた。これらのことから, 今回得られた HSA の熱安定性及び細胞増殖能に及ぼす作用には結合脂肪酸の関与が示唆された。

【結論】

Sigma 社の HSA 製品は通常のヒト血清に比べて, より酸化状態にあり, かつダイマーが存在していた。製品間で二次, 三次構造に有意差は認められなかったが, 熱安定性には有意差が認められた。さらに, 細胞増殖に対する作用においても有意差が認められた。このような市販 HSA 製品を使用して細胞培養の実験を行う際には, 精製方法やロットの相違が実験系に影響を与えるかどうかの検討の必要性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 南 武志は, 現在研究用として広く市販されているヒト血清アルブミン製品の分子不均一性を比較検討した。その結果, 市販製品間で熱安定性および細胞増殖能に及ぼす影響が異なることを明らかとした。本研究の成果は, アルブミンの分子構造と生理機能の関連に新たな知見をもたらし, タンパク質科学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Takeshi Minami, Tomoyoshi Terada, Teppei Takahashi, Hajime Arikawa, Yukie Matsuyama, Kazuha Kizaki, Seiichi Era: Comparative studies on the heterogeneity of plasma-derived and recombinant human albumins in laboratory use

Int J Biol Macromol 69, 79-87 (2014).