

212 遺伝子組換え融合蛋白質からなる人工酸素運搬体の創製	森田 能次
-------------------------------	-------

**【目的】** 日本は少子高齢化の影響により、献血者層人口が減少すると、輸血液の安定供給に支障をきたす恐れがある。そのため、赤血球代替物として機能する人工酸素運搬体の実現が望まれている。これまでも国内外において、期限切れ赤血球製剤から精製したヘモグロビン (Hb) に化学修飾を施した人工酸素運搬体 (PEG-Hb、高分子化 Hb、分子内架橋 Hb など) が合成されてきた。我々は、Hb にヒト血清アルブミン (HSA) を連結した Hb-HAS<sub>3</sub> クラスタを合成し、それが安全性の高い人工酸素運搬体として機能することを明らかにした。しかし、修飾 Hb に共通の課題は、献血液由来のヒト Hb を原料としていることであり、恒久的な Hb の安定確保ができなければ、製剤の供給は難しい。本研究は、遺伝子組換え技術を用いて、HSA と酸素結合蛋白質である Hb やミオグロビン (Mb) を連結した融合蛋白質 (rHSA-rHb、rHSA-rMb) の発現系を構築し、発現量を比較するとともに、酸素結合能を明らかにする。

**【方法】** HSA のアミノ酸配列をコードする塩基配列と、Hb あるいは Mb のアミノ酸配列をコードする塩基配列を連結したプラスミドベクターをそれぞれ構築した。まず、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により、組換え Hb (rHb)、組換え Mb (rMb) をコードした DNA フラグメントを合成した。次に、In Fusion 反応により、それぞれの DNA フラグメントを組換え HSA (rHSA) 発現プラスミドベクターに挿入し、融合蛋白質を発現するプラスミドベクターを合成した。得られたプラスミドベクターをエレクトロポレーション法によりピキア酵母に挿入し、融合蛋白質発現ピキア酵母を作製した。発現誘導剤であるメタノールを含む培養液 (BMMY 培地) で 20°C、5 日間、振盪培養し、融合蛋白質を発現した。培養液の蛋白質定量を行い、融合蛋白質の産生量を求めた後、培養液を遠心分離し、菌体を除去した。上清を透析により脱塩し、アフィニティークロマトグラフィー (AC)、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により、融合蛋白質を精製した。電気泳動、SEC から融合蛋白質の同定を行い、円偏光二色性 (CD) スペクトルから蛋白質の二次構造を評価した。自動酸素解離曲線測定装置 (HEMOX Analyzer) により、生理条件 (リン酸緩衝生理食塩水、pH 7.4、37°C) での融合蛋白質の酸素親和性を明らかにした。

**【結果】** 遺伝子組換え技術により、rHSA-rHb と rHSA-rMb の発現プラスミドベクターを合成した。次に、形質転換したピキア酵母を BMMY 培地で培養し、それぞれの融合蛋白質を産生した。rHSA-rMb の発現量は 0.3 g/BMMY-1L であるのに対して、rHSA-rHb の発現量は 0.04 g/BMMY-1L と著しく低いことがわかった。発現量の比較から、Hb の α鎖やβ鎖が単独では不安定であるため、rHSA-rHb の発現量が低下することが示唆された。rHSA-rMb の SDS-PAGE には、分子量 80 kDa 付近に単一のバンドが現れた。また、SEC 曲線にも HSA より高分子量側に単一のピークが観測され、目的の融合蛋白質が純度高く単離できたことがわかった。rHSA-rMb の CD スペクトルは、HSA と Mb のスペクトルの和と一致し、rHSA-rMb の各蛋白質ユニットの二次構造は保持されていることがわかった。また、rHSA-rMb の酸素親和性は天然 Mb と一致した。つまり、rHSA-rMb は天然 Mb と同等の酸素親和性を有する優れた人工酸素運搬体であることが明らかとなった。

遺伝子組換え融合蛋白質からなる人工酸素運搬体 (rHSA-rHb、rHSA-rMb) の調製方法

