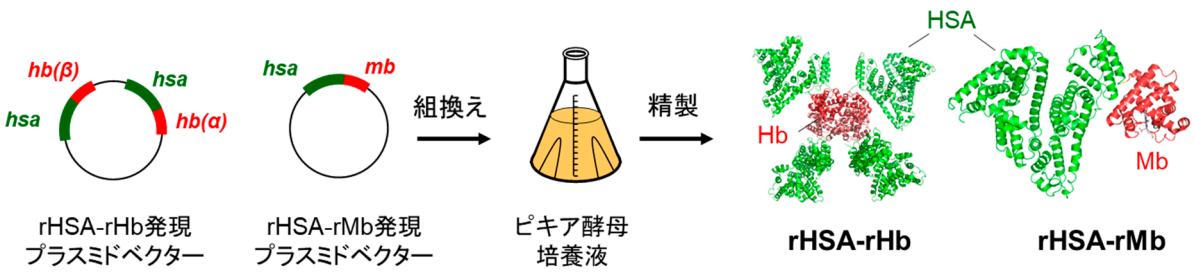
| 212　遺伝子組換え融合蛋白質からなる人工酸素運搬体の創製 | 森田　能次 |
|---|---|

**【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。これまでにも国内外において、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$_3$クラスターを合成し、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℃、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、融合体蛋白質を精製した。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℃）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 付近に単一なバンドが現れた。また、SEC 曲線にも HSA より高分子量側に単一なピークが観測され、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



# 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

中央大学 理工学部 応用化学科 生命分子化学研究室

Key words：人工酸素運搬体，ヒト血清アルブミン，ヘモグロビン，ミオグロビン，融合蛋白質

## 緒　言

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。さらに、赤血球製剤の有効期限は採血後 21 日間と短く、血液型の確認が必要であり、未知のウイルスに対する感染リスクも完全には排除できない。これらの問題を解決する一つの方策は、赤血球代替物となる人工酸素運搬体の実現である。これまでにも国内外において、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［1］。しかし、副作用を完全に回避することができず未だ実用化には至っていない。我々は、Hb にヒト血清アルブミン（HSA）を連結した Hb-$HSA_3$ クラスターを合成し、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［2〜3］。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。本研究で提案する組換え融合蛋白質を量産することができれば、人工酸素運搬体の原料に献血液は一切不要となる。このような背景のもと、最近、我々はピキア酵母を宿主とする組換え Hb（rHb）発現系を構築し、rHb と組換え HSA（rHSA）を原料とした完全合成型製剤の開発に成功した［4〜6］。しかし、現在の合成方法では rHb と rHSA を個別に発現し、架橋剤により蛋白質を連結するため、多段階の化学修飾反応と精製を行う必要がある。その点から見ると、人工酸素運搬体の実現には調製方法のさらなる改善が求められている。そこで本研究では、遺伝子組換え技術を用いて、HSA と Hb を連結した融合蛋白質（rHSA-rHb）の発現系を構築する（図 1）。さらに、Hb よりも安定な単量体構造であるミオグロビン（Mb）との融合蛋白質（rHSA-rMb）の発現系も構築し、発現量を比較するとともに、酸素結合能および構造を明らかにする。

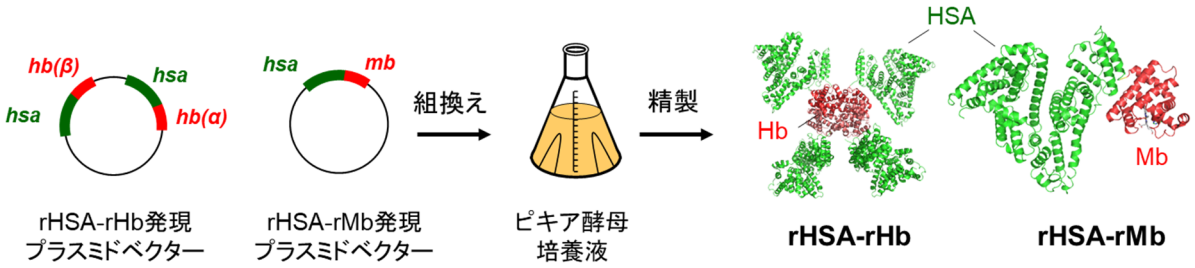



図 1. 遺伝子組換え融合蛋白質からなる人工酸素運搬体（rHSA-rHb、rHSA-rMb）の調製方法

## 方　法

### 1.　rHSA-rHb と rHSA-rMb の発現プラスミドベクターの調製

HSA の N 末端側には分泌シグナルがあり、C 末端の領域はループ構造であるため、HSA の C 末端と Hb の N 末端を直接連結した rHSA-rHb を設計した。まず、HSA がコードされたプラスミドベクター（pHIL-D2-rHSA）の HSA 塩基配列の下流末端をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法により切断し、In Fusion 反応により Hb のα鎖（Hb（α））

またはβ鎖（Hb（β））をコードしたDNA断片を挿入し、rHSA-rHb（α）およびrHSA-rHb（β）の発現プラスミドベクターを調製した（図2）。次に、制限酵素により rHSA-rHb（α）発現プラスミドベクターを線状化し、そこにIn Fusion反応を用いてrHSA-rHb（β）DNA断片を挿入した。電気泳動および塩基配列分析から目的のrHSA-rHb発現プラスミドベクターを同定した。同様の手順により、rHSA-rMb発現プラスミドベクターも調製した。

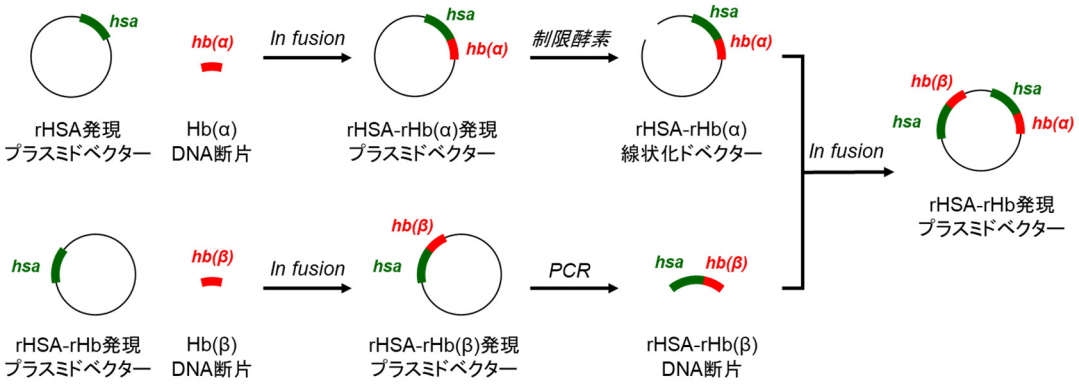



図2. rHSA-rHb発現プラスミドベクターの調製方法

**2. rHSA-rHbとrHSA-rMbの調製と同定**

エレクトロポレーション法により、線状化したrHSA-rHb発現プラスミドベクターをピキア酵母（GS115株）に挿入した。形質転換されたピキア酵母をBMGY培地で30℃、2日間振盪培養した後、メタノールとヘミンを含むBMMY培地に置換し、さらに20℃、3～5日間振盪培養することで、rHSA-rHbを発現した。培養液を遠心分離し、菌体を除去後、透析により培養上清の脱塩を行った。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、融合体蛋白質を精製した。rHSA-rMbについても同じ手順で調製した。発現量は蛋白質定量により求め、SDS-PAGEおよびSEC測定からそれぞれの融合蛋白質を同定した。

**3. rHSA-rMbの構造と酸素結合能の評価**

円偏光二色性（CD）スペクトル測定により、rHSA-rMbの二次構造を評価した。rHSA-rMbのDeoxy体、Oxy体、Carbonyl体を調製し、UV-vis吸収スペクトルを測定した。次に、自動酸素解離曲線測定装置（HEMOX Analyzer）により、rHSA-rMbの生理条件（リン酸緩衝生理食塩水pH 7.4、37℃）での酸素親和性を示す$P_{50}$および協同性を示す指標であるHill係数を求めた。

## 結果および考察

**1. rHSA-rHbとrHSA-rMb発現プラスミドベクターの調製**

調製したプラスミドベクターは、アガロース電気泳動により同定した。rHSA-rHbおよびrHSA-rMb発現プラスミドベクターはそれぞれ、8 kbpおよび6 kbpの位置にバンドを示した。さらに、塩基配列分析から目的のプラスミドベクターが調製できていることを確認した。

**2. rHSA-rHbとrHSA-rMbの調製と同定**

AC精製後のSDS-PAGEでは、rHSA-rHb（α）およびrHSA-rHb（β）の分子量に相当する80 kDa付近にバンドが見られた（図3A）。また、SEC精製により、夾雑蛋白質が除去できていることが確認された。精製後の収量は0.04 g/BMMY-1Lであった。SEC測定から、溶液中においてrHSA-rHb（α）とrHSA-rHb（β）は会合し、二量体を形成していることが示唆された（図3B）。次に、rHSA-rMbについても同様の手順で調製した。SDS-PAGEでは80 kDaに単一なバンドが見られ、純度高くrHSA-rMbが得られたことがわかった（図3C）。収量は0.3 g/BMGY-1Lであった。SEC曲線から、rHSA-rMbは安定な単量体構造であることが明らかとなった（図3D）。発現量の比較から、Hbのα鎖やβ鎖は単独では不安定であるため、rHSA-rHbの発現量が低下したことが示唆された。

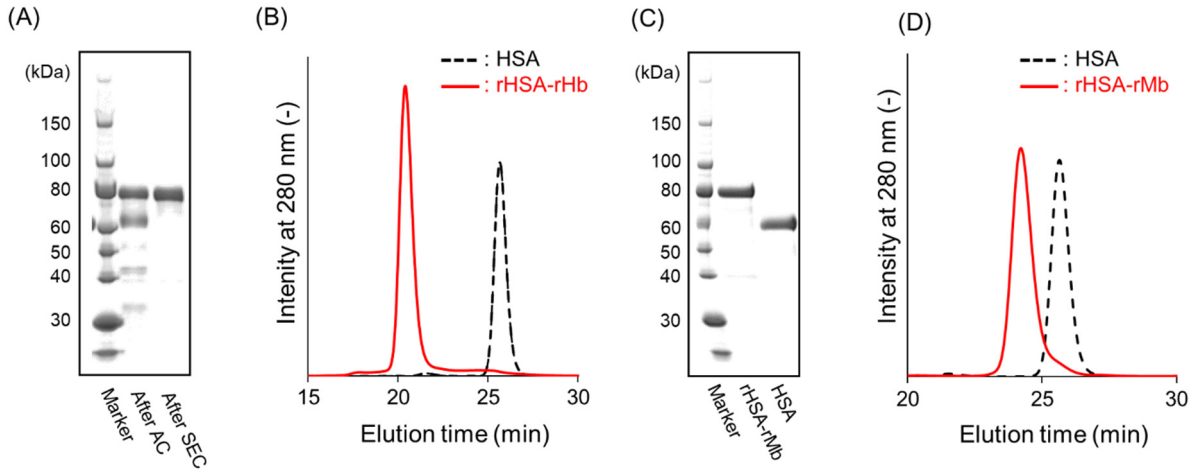



図 3. rHSA-rHb と rHSA-rMb の同定

A) AEC、SEC 精製後の rHSA-rHb の SDS-PAGE。

B) HSA-rHb、HSA の SEC 曲線。

C) 精製後の rHSA-rMb、HSA の SDS-PAGE。

D) HSA-rMb、HSA の SEC 曲線。

### 3. rHSA-rMb の構造と酸素結合能の評価

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（図 4A)。また、rHSA-rMb の Deoxy 体、Oxy 体、Carbonyl 体の吸収スペクトルパターンは、Mb のものと同等であり、HSA と Mb を融合してもヘムの電子状態に影響がないことがわかった(図 4B)。rHSA-rMb の酸素解離曲線（OEC）から $P_{50}$は 2.4 Torr、Hill 係数は 1.0 であり（図 4C)、天然 Mb と同じ値を示した。つまり、rHSA-rMb は天然 Mb と同等の酸素結合能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。

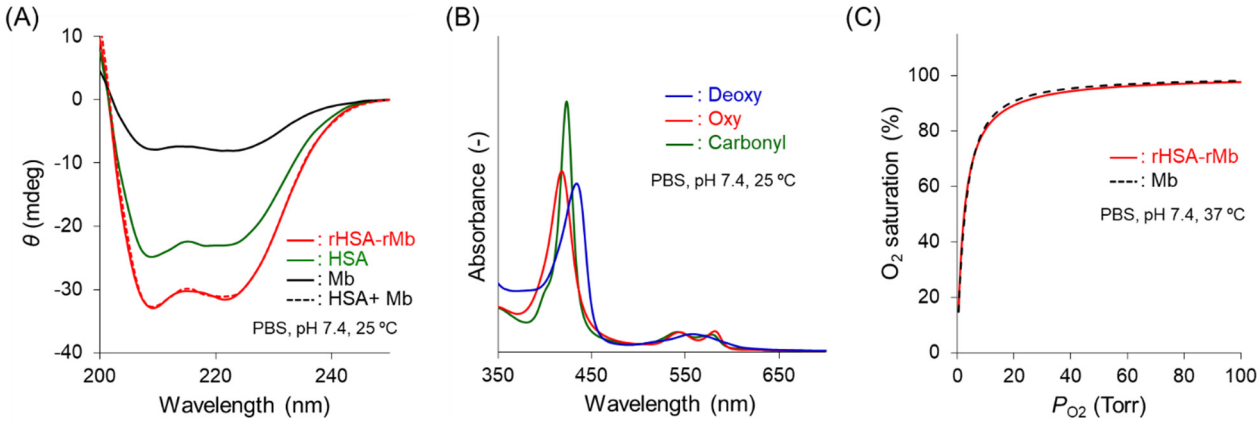



図 4. rHSA-rMb の構造と酸素結合能評価

A) rHSA-rMb、HSA、Mb、HSA+Mb の CD スペクトル。

B) Deoxy、Oxy、Carbonly rHSA-rMb の UV-vis スペクトル。

C) rHSA-rMb、Mb の OEC 曲線。

## 共同研究者・謝辞

本研究は、中央大学理工学部生命分子化学研究室の小松晃之教授のご協力により実施された。

## 文　献

1） Meng F, Kassa T, Jana S, Wood F, Zhang X, Jia Y, D'Agnillo F, Alayash AI. Comprehensive Biochemical and Biophysical Characterization of Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Therapeutics: All HBOCs Are Not Created Equally. Bioconjug Chem. 2018 May 16;29(5):1560-1575. Epub 2018 Apr 2. PMID: 29570272. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00093.

2） Haruki R, Kimura T, Iwasaki H, Yamada K, Kamiyama I, Kohno M, Taguchi K, Nagao S, Maruyama T, Otagiri M, Komatsu T. Safety Evaluation of Hemoglobin-Albumin Cluster "HemoAct" as a Red Blood Cell Substitute. Sci Rep. 2015 Jul 29;5:12778. PMID: 26220366. DOI: 10.1038/srep12778.

3） Okamoto W, Hasegawa M, Usui T, Kashima T, Sakata S, Hamano T, Onozawa H, Hashimoto R, Iwazaki M, Kohno M, Komatsu T. Hemoglobin-albumin clusters as an artificial $O_2$ carrier: Physicochemical properties and resuscitation from hemorrhagic shock in rats. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2022 Feb 22. Epub ahead of print. PMID: 35191606. DOI: 10.1002/jbm.b.35040.

4） Funaki R, Okamoto W, Endo C, Morita Y, Kihira K, Komatsu T. Genetically engineered haemoglobin wrapped covalently with human serum albumins as an artificial $O_2$ carrier. J Mater Chem B. 2020 Feb 14;8(6):1139-1145. Epub 2019 Dec 16. PMID: 31840728. DOI: 10.1039/c9tb02184a.

5） Morita Y, Saito A, Yamaguchi J, Komatsu T. Haemoglobin(βK120C)-albumin trimer as an artificial $O_2$ carrier with sufficient haemoglobin allostery. RSC Chem Biol. 2020 Jul 13;1(3):128-136. PMID: 34458753. DOI: 10.1039/d0cb00056f.

6） Morita Y, Takada R, Saito A, Komatsu T. Genetically and chemically tuned haemoglobin-albumin trimers with superior $O_2$ transport efficiency. Chem Commun (Camb). 2021 Sep 9;57(72):9144-9147. PMID: 34498647. DOI: 10.1039/d1cc03684j.