

# Synthesis of Hemoglobin–Albumin Clusters as an Artificial O<sub>2</sub>-Carrier

## 人工酸素運搬体としての(ヘモグロビン–アルブミン)クラスターの合成

Department of Applied Chemistry, Ryosuke Funaki  
応用化学専攻 船木 亮佑

### 1. 緒言

少子高齢化が進む先進国においては、近い将来必ず直面する“輸血液不足”が深刻な社会問題となっている。また、日本は世界屈指の自然災害大国であるため、震災時に必要充分量の血液を確保できない状況に陥る危険性がある。このような背景から、安定供給可能で長期保存のできる人工酸素運搬体(赤血球代替物)の実現が強く望まれている。1980年代からヘモグロビン(Hb)を用いた様々な製剤が開発されてきたが、血圧上昇などの副作用もあり、実用化には至っていない。一方、小松らはHbの分子表面に3個のヒト血清アルブミン(HSA)を結合した(ヘモグロビン–アルブミン)クラスター(Hb–HSA<sub>3</sub>)を合成し、それが安全な人工酸素運搬体として機能することを明らかにしている<sup>1,2)</sup>。

本研究は、Hb–HSA<sub>3</sub>の実用化に向けた評価試験を実施するため、効率高い調製法の確立を第一の目的とした。さらに、組換えヒトHb(rHbA)の産生、それと組換えHSA(rHSA)からなる完全合成型組換え(ヘモグロビン–アルブミン)クラスター(rHbA–rHSA<sub>3</sub>)の調製、および変異導入による酸素親和性の制御を第二の目的とした。以下に研究成果の詳細を記す。

### 2. (ヘモグロビン–アルブミン)クラスターの合成

従来のHb–HSA<sub>3</sub>は、Hbの表面Lys残基とHSAの還元型Cys(Cys-34)を二官能性架橋剤*N*-succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)で共有結合している<sup>1,2)</sup>。この調製法では、1) SMCCの水溶性が低いこと、2) 精製法にゲルろ過クロマトグラフィー(GFC)を用いることから、スケールアップが難しい。そこで、架橋剤をスペーサー長が短く、水溶性の高い*N*-succinimidyl 3-maleimidopropionate (SMP)に変更した。これにより既法の10倍濃度のウシHb(HbBv)と反応させることができ、HbBv–HSA<sub>3</sub>の高濃度合成が可能となった(Figure 1)。

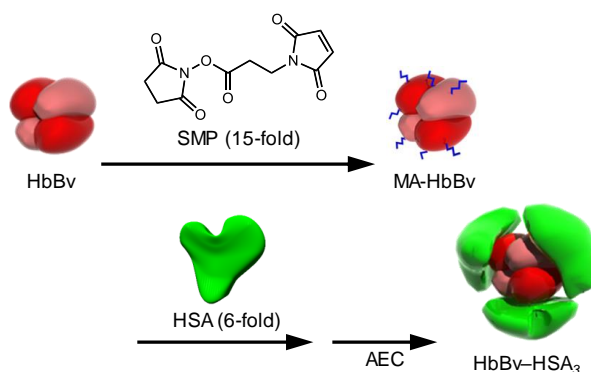


Figure 1 Synthetic scheme of the HbBv–HSA<sub>3</sub> cluster.

さらに陰イオン交換クロマトグラフィー(AEC)で精製することにより、HbBv–HSA<sub>3</sub>と未反応HSAを再現性よく分離できるようになった(Figure 2A)。蛋白質/Hb定量およびCDスペクトル測定より、HbBv–HSA<sub>3</sub>の平均HSA結合数が3.0であることを明らかにした。また、HbBv–HSA<sub>3</sub>のoxy, deoxy, carbonyl体の吸収スペクトルパターンおよび極大吸収波長は、従来のHbBv–HSA<sub>3</sub>(SMCC)と同等であった(Figure 2B)。酸素結合パラメーター( $P_{50}$ ,  $n$ )も9 Torr, 1.4と同値を示した。

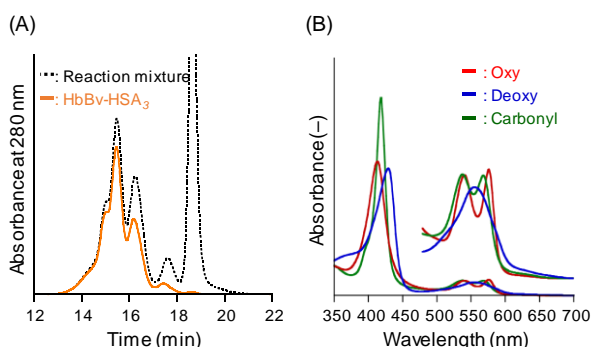
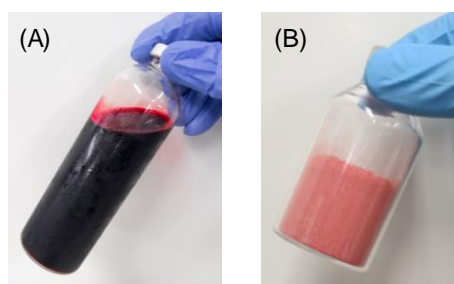


Figure 2 (A) SEC profiles of reaction mixture and HbBv–HSA<sub>3</sub>. (B) Visible absorption spectral changes of the HbBv–HSA<sub>3</sub>.

架橋剤の変更とAECを用いた精製により、効率高いHbBv–HSA<sub>3</sub>製剤([HbBv unit] = 5 g/dL)の調製法を確

立した (Figure 3A)。本法は数 10 L 規模の合成スケールにも拡張可能な方法である。

HbBv-HSA<sub>3</sub> を長期保存する上で、コア Hb 内ヘム鉄の酸化 (met 化) を抑制することは重要である。凍結乾燥は蛋白質の構造、機能を保持したまま安定に長期保存する方法として広く用いられている。そこで HbBv-HSA<sub>3</sub> 製剤の凍結乾燥粉末を調製した (Figure 3B)。



**Figure 3** (A) HbBv-HSA<sub>3</sub> solution ([HbBv unit] = 5 g/dL) in 100 mL bottle. (B) Lyophilized HbBv-HSA<sub>3</sub> powder containing sucrose 0.75 (g/g) in 30 mL bottle.

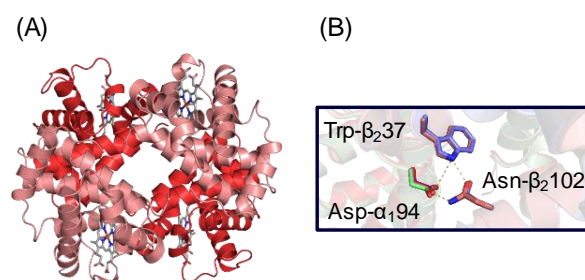
非還元性二糖類である Sucrose および Trehalose を HbBv-HSA<sub>3</sub> に添加した凍結乾燥粉末では、met 化が顕著に抑制された。特に Sucrose 0.75 (g/g) 添加群は、冷蔵下で 2 年間安定であることがわかった。2 年保存後の HbBv-HSA<sub>3</sub> 粉末に水を加えると、望みの濃度に調整可能な人工酸素運搬体として再生された。

### 3. 組換えヒトヘモグロビン A (Wild-Type) の産生および組換え (ヘモグロビン-アルブミン) クラスターの合成

上記調製法は、ヒト Hb (HbA) を用いた HbA-HSA<sub>3</sub> の合成にも適用できた。しかし、HbA-HSA<sub>3</sub> は、ヒト血液由来の HbA を使うため、今後安定した原料確保が難しくなる懸念がある。もし組換え蛋白質のみでクラスターが合成できれば、ヒト血液に一切依存しない完全合成型の人工酸素運搬体となる。そこでまず、*Pichia pastoris* (*Pichia* 酵母) を用いた rHbA 産生法の確立に取り組んだ。大腸菌を宿主とした rHbA の例は多数存在するが<sup>3)</sup>、ファースト Met が切断されない、大腸菌細胞壁に存在する内毒素 (エンドキシン: LPS) の混入が避けられないなどの欠点があった。一方、*Pichia* 酵母の発現系はファースト Met が切断可能であることから、赤血球から精製した HbA と全く同じ構造の rHbA が得られる。また、LPS 混入の心配もない。

HbA の遺伝子配列を導入したプラスミドベクター (pHIL-D2-HbA) を用いてエレクトロポレーション法により *Pichia* 酵母を形質転換し、rHbA (wt) 発現株を樹立した。7 日間の培養後、酵母を破碎し、上清を陽イオン交換クロマトグラフィー (CEC) および AEC にかけて、rHbA (wt) を単離した (収率 90%、収量 200 mg/培地 1 L、metHb 0%)。SDS-PAGE には、16 kDa 付近に  $\alpha$ 、 $\beta$  鎖に由来する 2 つのバンドのみが現れ、高純度 (99% 以上) であることがわかった。

rHbA (wt) (carbonyl 体) の結晶生成は、JAXA 協力のもと、国際宇宙ステーション 日本実験棟「きぼう」にて行い、良質な結晶 (分解能: 2.3 Å) を得た。rHbA (wt) の構造は、CD スペクトル測定、MALDI-TOFMS 測定、X 線結晶構造解析より、赤血球由来の HbA と同一構造であることを明らかにした (Figure 4)。また、rHbA (wt) の oxy、deoxy、carbonyl 体の吸収スペクトルパターンおよび酸素結合パラメーター ( $P_{50}$ ,  $n$ ) も赤血球由来の HbA と同等であることを確認した (Table 1)。



**Figure 4** (A) The X-ray crystallography of carbonyl rHbA(wt) (PDB ID: 6KYE). (B) Salt bridges in the triads of carbonyl rHbA(wt) and HbA, which stabilize the R-state conformation.

**Table 1** O<sub>2</sub>-binding parameters of hemoproteins in PBS (pH 7.4) at 37 °C.

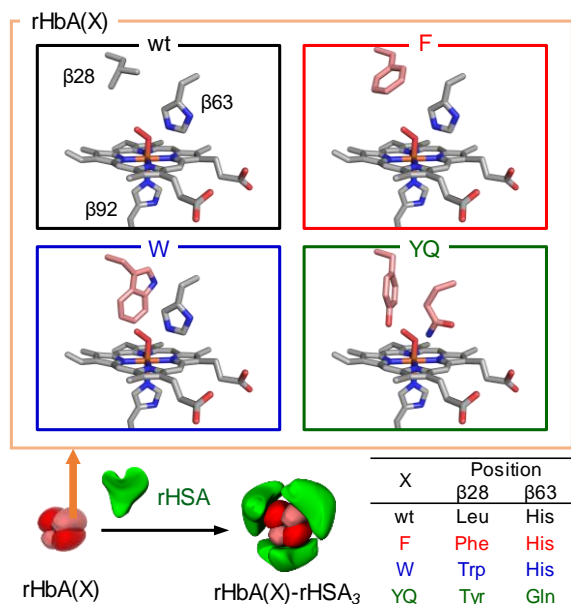
Sample	$P_{50}$ (Torr)	$n$ (-)
HbA <sup>2)</sup>	12	2.4
HbA-HSA <sub>3</sub> <sup>2)</sup>	8	1.4
rHbA(wt)	11	2.3
rHbA(wt)-rHSA <sub>3</sub>	8	1.4

rHbA(wt)-rHSA<sub>3</sub> の合成は、**2** と同様の方法で行った (収率 58%)。蛋白質/Hb 定量、CD スペクトル測定より、平均 rHSA 結合数 3.0 を確認した。rHbA(wt)-rHSA<sub>3</sub>

の oxy, deoxy, carbonyl 体の吸収スペクトルパターンおよび酸素結合パラメーター ( $P_{50}$ ,  $n$ ) は、既報の HbA-rHSA<sub>3</sub> と一致した (Table 1)<sup>2)</sup>。rHbA (wt)-rHSA<sub>3</sub> は、ヒト血液に一切依存せず、安定供給可能な完全合成型の人工酸素運搬体となった。

#### 4. 遺伝子工学的に改変したヘムポケットを有する組換え(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの合成

rHbA (wt)-rHSA<sub>3</sub> の  $P_{50}$  は 8 Torr であり、赤血球の値 ( $P_{50} = 25$  Torr) よりも低い (酸素親和性は高い)。もし、クラスターの酸素親和性を適度に下げることができれば、応用範囲はさらに広がると期待される。Hb の酸素親和性を下げる方法は 2 通りある。1) 配位酸素分子と相互作用するヘムポケット内アミノ酸を改変する方法<sup>4)</sup>。2) Hb の R 状態 (高酸素親和性) を安定化している塩橋を変異導入で切断し、T 状態 (低酸素親和性) を有利にする方法。しかし、rHbA-rHSA<sub>3</sub> は carbonyl 体 (R 状態) で合成するため、方法 2 による酸素親和性制御は難しい。そこで、まずヘムポケット内アミノ酸である Leu- $\beta$ 28 を嵩高いアミノ酸 (Phe, Trp, Tyr) に置換した 3 つの rHbA (X) 変異体 [X =  $\beta$ L28F (F),  $\beta$ L28W (W),  $\beta$ L28Y/ $\beta$ H63Q (YQ)] の産生に取り組んだ (Figure 5)。



**Figure 5** Schematic illustration of rHbA(X)-rHSA<sub>3</sub> cluster and the mutated position of the heme pocket in  $\beta$ -globin (prepared from oxy HbA, PDB ID: 2DN1). Abbreviations of the mutants are presented in the table.

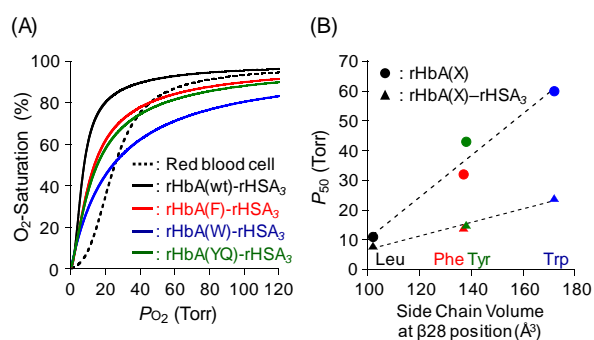
各 rHbA (X) 発現ベクターは pHIL-D2-HbA (wt) を鋳型として部位特異的変異導入法により調製した。Pichia 酵母の形質転換および rHbA (X) の産生・精製は rHbA (wt) と同様の手順で行った。SDS-PAGE より、rHbA (X) の純度が 99% 以上であることを確認した。また、MALDI-TOFMS 測定より、目的アミノ酸が導入されていることを明らかにした。Leu- $\beta$ 28 はヘム遠位側に存在しており、これを嵩高いアミノ酸に置換すると、酸素配位の立体障害となるため、酸素親和性が低下 ( $P_{50}$  値が増大) する<sup>4)</sup>。実際に rHbA (X) の  $P_{50}$  値は、rHbA (F) が 32 Torr、rHbA (W) が 60 Torr、rHbA (YQ) が 43 Torr で、いずれも rHbA (wt) ( $P_{50} = 11$  Torr) よりも高い値 (低酸素親和性) となった (Table 2)。

**Table 2** O<sub>2</sub>-binding parameters of rHbA(X) mutants and its clusters in PBS (pH 7.4) at 37 °C.

Sample	Naked rHbA(X)		rHbA(X)-rHSA <sub>3</sub>	
	$P_{50}$ (Torr)	$n$ (-)	$P_{50}$ (Torr)	$n$ (-)
Red blood cell	25	2.5	-	-
rHbA(F)	32	1.8	14	1.2
rHbA(W)	60	1.5	24	1.0
rHbA(YQ)	43	1.5	15	1.1

次に、rHbA (X) を用いて変異体クラスターを合成した。各 rHbA (X)-rHSA<sub>3</sub> (X = F, W, YQ) の  $P_{50}$  値は、それぞれ 14 Torr、24 Torr、15 Torr であり、rHbA (wt)-rHSA<sub>3</sub> ( $P_{50} = 8$  Torr) よりも高い値となった (Figure 6A, Table 2)。これは、原料 rHbA (X) の酸素親和性が rHbA (wt) よりも低いいため、クラスターの酸素親和性も適度に低下したことを意味している。一方、すべてのクラスターの  $P_{50}$  値は、原料 rHbA (X) よりも低値を示した。これは、rHbA (X) の四次構造が酸素親和性の高い R 状態に固定化されているためである。rHbA (X) の  $P_{50}$  値は、 $\beta$ 28 位置のアミノ酸側鎖体積に比例して増大し (Figure 6B)、同じく rHbA (X)-rHSA<sub>3</sub> の傾きも同様の傾向が見られた。つまり、rHbA (X)-rHSA<sub>3</sub> の  $P_{50}$  値の増加 (酸素親和性の低下) は、 $\beta$ 28 位置アミノ酸の立体障害によることが裏付けられた。特に rHbA (W)-rHSA<sub>3</sub> は、赤血球 ( $P_{50} = 25$  Torr) と同等の酸素親和性 ( $P_{50} = 24$  Torr) を有し、肺-末梢組織 (100-40 Torr) 間における酸素運搬効率は 18% と見

積もられた。これは赤血球と同値である。



**Figure 6** (A) O<sub>2</sub>-dissociation curves of rHbA(X)-rHSA<sub>3</sub> (X = wt, F, W, and YQ) and red blood cell. (B) Dependence of P<sub>50</sub> values on the β28 side chain volume.<sup>5)</sup>

## 5. 動物実験による(ヘモグロビン-アルブミン)クラスターの評価

HbBv-HSA<sub>3</sub>の合成法が改良され、動物実験に必要な製剤量が提供できるようになった。そこで、ラット 20% 血液交換モデルによる安全性評価ならびにビーグル犬における血中滞留時間測定を行った。ラットの循環血液量の 20% (約 3 mL) を脱血後、同量の HbBv-HSA<sub>3</sub> を投与し、6 時間後まで経時的に循環パラメーターおよび血液ガスパラメーターを測定した。ヘマトクリット値は血液交換に伴い、初期値の 78% に減少した後、6 時間後まで変化はなかった。また、その他のパラメーターも、コントロール(非脱血)群と同様の推移を示し、血圧上昇などの副作用は一切見られなかった。

蛍光色素(Cyanine5.5)修飾 HbBv-HSA<sub>3</sub> をビーグル犬に投与し、経時的に血清中の蛍光強度を測定することで血中滞留時間を測定した。血中半減期(τ<sub>50</sub>)は 46.9 ± 1.9 h であり、長い血中滞留性を示した。HSA の結合による分子量の増大と、負の表面電荷を有していることに起因すると考えられる。

さらに、脳梗塞モデルラットを用いて、HbBv-HSA<sub>3</sub> の脳保護効果を実証した<sup>9)</sup>。

## 6. 結論と将来展望

架橋剤の変更と AEC を用いた精製により、効率高い HbBv-HSA<sub>3</sub> の調製法を確立した。また、HbBv-HSA<sub>3</sub> の凍結乾燥粉末が冷蔵 (4 °C) 下で 2 年間保存できることを実証した。さらに、*Pichia* 酵母を宿主として rHbA (wt) を産生し、赤血球から精製した HbA と同じ構造であるこ

とを明らかにした。組換え蛋白質のみで合成した rHbA-rHSA<sub>3</sub> は、ヒト血液に依存しない完全合成型の人工酸素運搬体となった。さらに、コア rHbA の Leu-β28 を高いアミノ酸に置換した 3 つの rHbA (X)-rHSA<sub>3</sub> が適度に低い酸素親和性を有することを明らかにした。特に、rHbA (W)-rHSA<sub>3</sub> は赤血球と同等の酸素親和性を示した。また、動物実験より、HbBv-HSA<sub>3</sub> の安全性を評価した。今後、さらなる安全性、有効性試験を重ねることにより、赤血球代替物や酸素治療薬として実用化できるものと確信している。

## 発表論文(学位論文に含む論文)

- Funaki, R.; Kashima, T.; Okamoto, W.; Sakata, S.; Morita, Y.; Sakata, M.; Komatsu, T. *ACS Omega* **2019**, *4*, 3228. (Chapter 2)
- Funaki, R.; Iwasaki, H.; Kashima, T.; Komatsu, T. *Polym. Adv. Technol.* **2020**, *31*, in press. (Chapter 2)
- Funaki, R.; Okamoto, W.; Endo, C.; Morita, Y.; Kihira, K.; Komatsu, T. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 1139. (Chapter 3, 4)
- Iwasaki, H.; Yokomaku, K.; Kureishi, M.; Igarashi, K.; Hashimoto, R.; Kohno, M.; Iwazaki, M.; Haruki, R.; Akiyama, M.; Asai, K.; Nakamura, Y.; Funaki, R.; Morita, Y.; Komatsu, T. *Artif. Cells, Nanomed., Biotechnol.* **2018**, *46*, S621. (Chapter 5)

## 発表論文(学位論文に含まない論文)

- Gekka, M.; Abumiya, T.; Komatsu, T.; Funaki, R.; Kurisu, K.; Shimbo, D.; Kawabori, M.; Osanai, T.; Nakayama, N.; Kazumata, K.; Houkin, K. *Stroke* **2018**, *49*, 1960.
- Morita, Y.; Igarashi, K.; Funaki, R.; Komatsu, T. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1684

## 参考文献

- Komatsu, T. *et al.*, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1816.; *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12778.
- Komatsu, T. *et al.*, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *6*, 6157.
- Nagai, K.; Thøgersen, H. C. *Nature* **1984**, *309*, 810; Olson, J. S. *et al.*, *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 2314.
- Ho, C. *et al.*, *Biochemistry* **2005**, *44*, 7207.; Brunori, M. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **1999**, *290*, 515.
- Chothia, C. *Nature* **1975**, *254*, 304.
- Abumiya, T. *et al.*, *Stroke* **2018**, *49*, 1960.