

A-15

## ヒト血清アルブミン-金属錯体のペルオキシダーゼ活性と二量体形成

## Peroxidase Activity and Dimer Formation of Human Serum Albumin-Metal Complexes

応用化学専攻 石川 夏樹

ISHIKAWA Natsuki

## 【目的】

ヒト血清アルブミン(HSA, Mw: 66.5 kDa)は血漿蛋白質の約60%を占める単純蛋白質であり、その高い光・熱安定性や、遺伝子組換え体の量産法が確立していることからバイオマテリアルのビルディングブロックとして期待されている。我々は組換え HSA のサブドメイン IB に Fe-プロトポルフィリン IX (heme) を結合させた組換え HSA-heme 錯体が、O<sub>2</sub> を吸脱着できるヘモグロビンモデルとなることなどを明らかにしてきた。本研究は、酸化酵素であるペルオキシダーゼの活性を有する組換え HSA-heme 錯体(Fig. 1)を合成し、ヘムポケット構造と酵素活性の相関を明らかにすることを第一の目的とした。

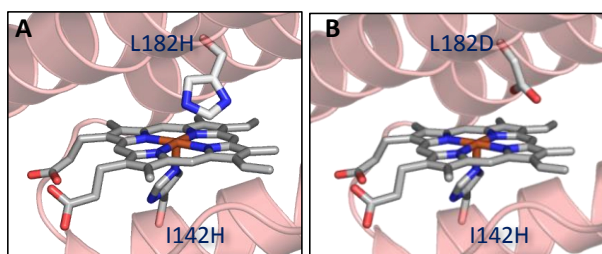
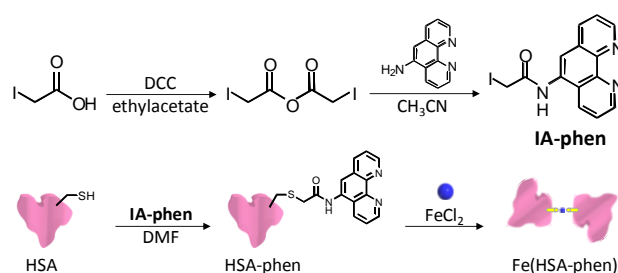


Fig. 1 Hemepocket structures of (A) HSA (HLH)-heme and (B) HSA (HLD)-heme.

また近年、配位結合でつないだ蛋白質組織体が注目を集めている。しかし、そのほとんどは分子量の小さな蛋白質が結晶中で形成する構造体に限られていた<sup>1)</sup>。高い水溶性を持ち、分子量66.5 kDaの大きなHSAを配位結合でつなぐことができれば、水中で安定に存在する蛋白質超構造体となり、新しいバイオマテリアルの創製に発展すると考えられる。そこで本研究は、フェナントロリン配位子を有するヒト血清アルブミン(HSA-Phen)を合成し、Fe<sup>2+</sup>イオンとの配位結合でつないだHSA二量体を合成することを第二の目的とした(Scheme 1)。



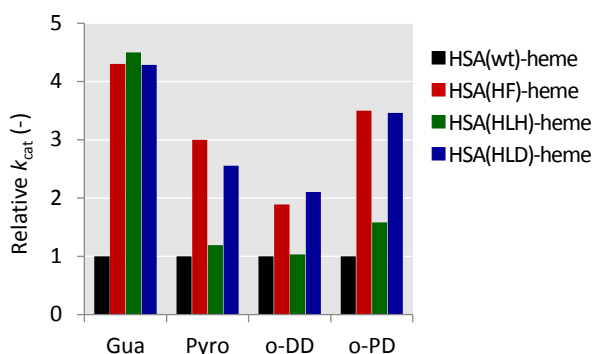
Scheme 1 Synthesis of IA-phen and Fe(HSA-phen)<sub>2</sub>.

## 【結果および考察】

## 1. HSA-heme のペルオキシダーゼ活性

Ile-142 を His (近位塩基) に、Tyr-161 を Phe に変換した二重変異体 HSA (HF)、さらには Leu-182 を His または Asn (遠位塩基) に変換した三重変異体 HSA (HLH)、HSA (HLD) を産生した。得られた HSA に heme を 1 : 1.1 (モル比) で混合し、計 4 種類の HSA-heme 錯体を得た。各 HSA-heme (1.0 μM) のリン酸緩衝水 (PB) 溶液 (pH 7.0) に、基質 (guaiacol (Gua)、pyrogallol (Pyro)、*o*-phenylenediamine (*o*-PD)、または *o*-dianisidine (*o*-DD))、さらに H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) を添加した後、生成物の吸光度変化から反応初速度 (v<sub>0</sub>) を算出し Lineweaver-Burk plots を作成、酵素パラメータ (K<sub>m</sub>、k<sub>cat</sub>) を決定した。

軸配位子を Tyr から His に変換した HSA (HF)-heme は、いずれの基質に対しても HSA (wt)-heme に比べ大きな k<sub>cat</sub> を示した (Fig. 2)。これは His の電子供与性が heme の活性を上昇させたためである。さらに、ヘムポケット内に遠位 His を導入したものの [HSA (HLH)-heme]、Gua 以外については k<sub>cat</sub> が低下した。一方、遠位 Asp を導入した HSA (HLD)-heme では、HSA (HF)-heme と同等の酵素活性が見られた。His-182 は基質の接近を阻害する立体障害になっているものと考えられる。



**Fig. 2** Relative  $k_{cat}$  of recombinant HSA-heme complexes to HSA (wt)-heme complex for oxidation reaction.

## 2. 架橋配位子 IA-phen の合成

Iodoacetic acid の酢酸エチル溶液に、dicyclohexylcarbodiimide を加え、遮光下で 3 時間攪拌し、沈殿として生じた DC urea を除去することで、iodoacetic anhydride を得た。これを  $\text{CH}_3\text{CN}$  に溶解させ、5 等量の 5-amino-1,10-phenanthroline 溶液を加え、室温で 1 晩回転攪拌した。得られた黄色沈殿を氷冷した 5%  $\text{NaHCO}_3$  水溶液、および純水で洗浄し、5-iodoacetamide-1,10-phenanthroline (IA-phen)<sup>1)</sup> を得た。

**IA-phen;**  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  (ppm) 3.44 (s, 2H), 7.01 (d, 1H), 7.81 (m, 1H), 7.91 (m, 1H), 8.51 (d, 1H), 8.68 (q, 1H), 9.07 (d, 1H), 9.17 (d, 1H); **ESI-MS:**  $m/z$ : calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{IN}_3\text{O}$  363.15; found: 364.5 [ $\text{M}+\text{H}^+$ ]; **IR** (selected bands):  $3326\text{ cm}^{-1}$   $\nu$ (N-H),  $2923$ ,  $2856\text{ cm}^{-1}$   $\nu$ (C-H),  $1622\text{ cm}^{-1}$   $\nu$ (C=O),  $1573\text{ cm}^{-1}$   $\delta$ (NH); **UV-vis.** ( $\text{DMSO}$ )  $\lambda_{\text{max}}$ : 267 nm.

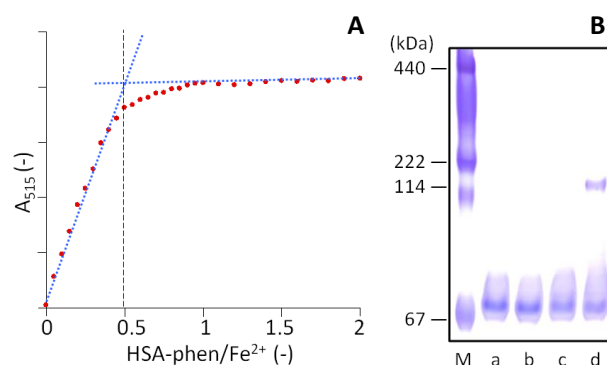
## 3. フェナントロリン基を有する HSA-phen の合成

HSA の PB 溶液 (pH 7.0) に、還元剤 dithiothreitol (DTT) を 3 等量加え 1 時間攪拌後、未反応の DTT を限外ろ過により除去し、Cys-34 還元 HSA を得た。これに IA-phen の DMF 溶液を 4 等量加え、一晩回転攪拌した。未反応の IA-phen を限外ろ過により除去することで、HSA-phen を得た。

HSA-phen の可視吸収吸収スペクトルは、同濃度の HSA と 5-chloro-1,10-phenanthroline のスペクトルの和と良く一致した。また、還元型のチオール基と反応して 343 nm に特異的な吸収を示す 2,2'-dithio-dipyridine を用いて、HSA への IA-phen の導入率が 100 % であることを確認した。

## 4. $\text{Fe}(\text{HSA-phen})_2$ の合成

得られた HSA-phen の PB 溶液に  $\text{FeCl}_2$  を徐々に添加し、 $\text{Fe}^{2+}$  フェナントロリン錯体に基づく 515 nm の吸収変化を観測した。吸光度は  $\text{HSA-phen}:\text{Fe}^{2+} = 2:1$  で一定となり、 $\text{HSA-phen}:\text{Fe}$  の 2:1 錯体の形成が示唆された (**Fig. 3 A**)。また、Native-PAGE 測定では、HSA-phen に  $\text{Fe}^{2+}$  を加えた試料にのみ HSA 二量体のバンドが出現した (**Fig. 3 B**)。さらに、MALDI-MS 測定においては、HSA 二量体の分子イオンピークが観測された。以上の結果から、HSA-phen を  $\text{Fe}^{2+}$  の配位結合で連結した HSA 二量体の形成を明らかにした。



**Fig. 3** (A) UV-vis. absorption change of HSA-phen by adding  $\text{Fe}^{2+}$  and (B) Native-PAGE of (a) HSA, (b)  $\text{HSA}+\text{Fe}^{2+}$ , (c) HSA-phen, (d)  $\text{HSA-phen}+\text{Fe}^{2+}$ .

## 【結論】

- 1) ペルオキシダーゼ活性を有する HSA-heme 錯体を合成した。
- 2) ヘムポケット内 182 位置のアミノ酸が His の場合、酵素活性は低下し、Leu または Asp の場合、酵素活性は増大することがわかった。
- 3) HSA の Cys-34 にフェナントロリン基を有する HSA-phen を合成した。
- 4) HSA-phen に  $\text{Fe}^{2+}$  イオンを添加することで、配位結合を介した HSA 二量体が形成されることを明らかにした。

## 参考文献

- 1) F. A. Tezcan, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9136.

## 発表リスト

錯体化学会第 62 回討論会

Human Serum Albumin-Based Peroxidase Having an Iron Protoporphyrin IX in Artificial Heme Pocket., *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 2534.