

ヘルスケア分野における緊急かつ最優先な課題の1つに、肝炎や肝硬変を含む肝不全の有効な治療法の開発が挙げられる。肝不全の発症因子や病態生理学的なメカニズムは様々であるものの、その臨床像には、肝性脳症や肝腎症候群、循環器機能の変化など、多くの共通した症状を呈することが知られている。これらの病因であるビリルビン (BR) などの内因性毒素の除去は、有効な治療法の1つであり、現在までに血液透析に代表される血液浄化療法が広く施行されてきた。しかし、既存の血液浄化療法では、分子量 1 kDa 以下の低分子物質や水溶性毒素の除去は可能であるが、タンパク質結合性毒素や疎水性毒素については除去が困難である。特に、BR に代表されるアルブミン結合性毒素 (ABT) は、血液透析によって除去が困難とされる代表的な毒素である。また、既存の血液浄化法は侵襲性が高く患者の負担が大きいいため、より侵襲性の低い治療法の開発が切望されている。ヒト血清アルブミン (HSA) ドメインは、分子サイズの減少に伴う糸球体濾過により、リガンドを結合したまま尿中に排泄され易くなるため、侵襲性の低い新たな血液浄化法としての可能性を秘めている。これらの背景の下、本研究では標的分子を BR に絞り込み、BR 捕獲型 HSA ドメインの設計と新規 BR 除去療法としての有用性を評価した。

以下に、本研究にて得られた知見を要約する。

#### 1) HSA 分子上の BR 結合部位の同定

BR との結合に関与する HSA ドメイン II を M13KO7 ファージに提示させることに初めて成功した。次に、サブドメイン IIA に存在する塩基性アミノ酸 (<sup>190</sup>Lys, <sup>195</sup>Lys, <sup>197</sup>Arg, <sup>199</sup>Lys, <sup>205</sup>Lys, <sup>209</sup>Arg, <sup>212</sup>Lys, <sup>218</sup>Arg, <sup>222</sup>Arg, <sup>225</sup>Lys, <sup>233</sup>Lys, <sup>240</sup>Lys) 計 12 残基を、側鎖の電荷が異なる Lys, Arg, Gly, Glu の 4 残基のいずれかに変異を導入した、チャージ変異 HSA ドメイン II ファージライブラリーを構築した。そのファージライブラリーから、BR に特異的に結合するファージのみをスクリーニングするバイオパンニングを用い、選択された 7 クローンの配列全てにおいて、正電荷が保存されていた残基である <sup>195</sup>Lys および <sup>199</sup>Lys が BR 結合に重要であることが推察された。バイオパンニングにより選択されたクローンである No.3, 5 および 107 は、いずれも WT ドメイン II と同等の BR 結合活性をタンパク質レベルにおいても保持していた。加えて、HSA およびドメイン II の部位特異的変異体 (K195A, K199A) において、WT に比べて BR 結合活性が有意に低下していたことを HRP 法にて証明した。さらに、一残基変異体に関して蛍光スペクトル法によっても結合定数を算出したところ、HSA 変異体では 5 倍、ドメイン II 変異体では 6 倍から 10 倍低下していたことから、<sup>195</sup>Lys および <sup>199</sup>Lys が BR 結合に関与していることが強く示唆された。以上のことから、進化工学的手法であるファージディスプレイ法によるランダムスクリーニングにより、HSA 分子上における BR 結合に関わる残基が <sup>195</sup>Lys および <sup>199</sup>Lys であること、特に <sup>199</sup>Lys は BR 結合にお

ける立体選択性に関与していることを初めて明らかにした。

## 2) BR 高親和性 HSA ドメイン II 変異体の探索と BR 除去効果の検討

ドメイン II を 6 つの領域に分け、各ヘリックスをカセット式に入れ替えられるよう、各領域間の遺伝子上に制限酵素サイトを導入した 4 カセットドメイン II/pCANTAB 5E を作製した。1) で得られた知見を活かし、さらにファージライブラリーの多様性を考慮し、frag2 (206Phe-231Val) に存在する 4 残基 (211Phe, 214Trp, 218Arg, 222Arg) が全 20 アミノ酸残基のいずれかに変異した、4 残基変異ドメイン II ファージライブラリーを構築した。短時間でのタンパク質発現・精製を可能にするため、大腸菌株 BL21-Codonplus (DE3)-RIL によるドメイン II 変異体タンパク質発現系を構築した。

4 残基変異ドメイン II ファージライブラリーを用いたバイオパンニングにより、BR 高親和性ドメイン II 変異体をスクリーニングした。ラウンド 3 で得られた pan3\_3-13 (211Arg, 214Trp, 218Leu, 222Arg) およびラウンド 6 で得られた pan6\_4 (211Leu, 214Trp, 218Ser, 222Trp) は、WT ドメイン II と比べて BR 結合活性が有意に高かった。中でも pan3\_3-13 は、WT ドメイン II と比較し約 7 倍高い BR 結合活性を有していることが Biacore® による評価にて明らかとなった。加えて、pan3\_3-13 および WT ドメイン II に対する BR 結合の詳細を分子モデリングによって解析した。WT ドメイン II では、結合している BR の構造が一部表面に露出していたが、pan3\_3-13 では、218Arg→Leu への変異により、結合ポケットの入り口が広がる結果、BR が奥に潜り込み易くよりフィットし易い構造に変化していた。さらに、ポケット内部の正電荷の広がりも保存されているため、BR のカルボキシル基との静電的相互作用は維持されていると推察された。したがって、pan3\_3-13 では、疎水性相互作用やファンデルワールス力の増大により、BR の親和性が増大したものと推察された。

最後に、BR 結合活性が有意に高かったドメイン II 変異体である pan3\_3-13 を用い、胆管結紮による高 BR 血症マウスにて BR 除去効果を評価した。Saline, WT ドメイン II, pan3\_3-13 投与群の 3 群間で、血中 BR 減少効果を比較したところ、pan3\_3-13 > WT ドメイン II > saline 投与群の順であった。他方、BR の尿中排泄量は、saline < WT ドメイン II < pan3\_3-13 投与群の順に増加していたことから、pan3\_3-13 が BR の尿中排泄促進剤として機能していることが実証された。これらの知見から、新たなバイオパンニングで設計された pan3\_3-13 は、*in vitro*, *in vivo* 両系において、WT ドメイン II よりも高い BR 結合能を示したことから、優れた BR 除去治療薬として適用できる可能性が示された。

以上述べてきたように、進化工学的手法であるファージディスプレイ法を駆使することで、 $1.6 \times 10^7$  個の変異体の中から BR の詳細な結合部位の同定を可能にし、さらに  $1.6 \times 10^5$  個の変異体の中から BR 高親和性 HSA ドメイン II 変異体を拾い上げることに成功した。本手法は、様々な低分子に対する高親和性 HSA 変異体の効率的な設計に応用可能である。また、今回作製した新規 BR 尿中排泄促進剤 pan3\_3-13 は、抗体製剤よりも製造コストが低く、従来の血液浄化法の基盤を成す血液透析に替わり、侵襲性の低い新たな血液浄化方法の道を拓くことが大いに期待される。