

| | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名 | 黒田 幸弘 |
| 学位(専攻分野) | 博士(薬学) |
| 学位記番号 | 論薬博第 672 号 |
| 学位授与の日付 | 平成 14 年 5 月 23 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当 |
| 学位論文題目 | Development of microanalytical system for investigation of chiral selective drug bindings of plasma proteins (血漿タンパク質のキラル選択的薬物結合研究のための微量分析システムの開発) (主査) |
| 論文調査委員 | 教授 中川 照真 教授 半田 哲郎 教授 川 寄 敏 祐 |

論 文 内 容 の 要 旨

ヒト血清アルブミン、 α_1 -酸性糖タンパク質 (AGP)、低密度リポタンパク質 (LDL) は薬物の血漿タンパク結合に関与する主要なタンパク質であり、これらのタンパク結合は薬物の体内動態や薬理効果の発現に大きな影響を及ぼす。AGP や LDL には構造的に異なるいくつかのサブタイプが存在し、それらの血漿中濃度は病態時に変動する。例えば AGP には多数の glycoform やペプチド配列が異なる遺伝的変異体 (variant) が存在し、LDL は病態時に酸化修飾を受ける。従って、このような構造多様性が薬物の血漿タンパク結合に及ぼす影響を解明する必要がある。ところがこれらのタンパク質は微量または不安定であるため平衡透析法などの従来法では結合研究を行うことが不可能あるいは困難であった。そこで著者は超微量試料 (約 100nL) による結合分析が可能な高性能先端分析/キャピラリー電気泳動 (HPFA/CE) 法を開発し、血漿タンパク質の構造多様性が薬物結合に及ぼす影響を研究した。

第 1 章 塩基性薬物のキラル選択的タンパク結合におけるヒト α_1 -酸性糖タンパク質のシアル酸残基および二本鎖糖鎖の役割

AGP は塩基性薬物の血漿タンパク結合に関与するタンパク質であり、二本鎖、三本鎖、四本鎖を含む 5 つの複合型糖鎖を持つ。糖鎖末端に存在するシアル酸残基が静電相互作用により塩基性薬物との結合に寄与する可能性がある。また、AGP 糖鎖のうち二本鎖糖鎖は AGP 分子上の薬物結合部位近傍に局在する。そこで著者は HPFA/CE 法を用いて AGP と塩基性薬物 (propranolol (PRO), verapamil (VER)) とのキラル選択的結合に与えるシアル酸残基並びに二本鎖糖鎖の影響を検討した。シアル酸残基を持つ native AGP とシアル酸残基を除去した asialo AGP 共に (R)-PRO の結合親和性はほぼ同等であり、シアル酸残基は (R)-PRO の結合に影響しないことが判明した。ところが (S)-PRO との結合は、アシアロ化に伴い有意に減少した。さらに asialo AGP に対して (R)-, (S)-PRO はほぼ同等の結合性を示した。以上の結果からシアル酸残基の負電荷は (S)-PRO との結合にのみ関与し、AGP の PRO に対するキラル選択性の原因であると考えられる。一方 VER の場合、アシアロ化に伴う結合性の変化は見られずシアル酸残基は VER の立体選択的結合に影響しないことが判明した。続いて二本鎖糖鎖に親和性を有する concanavalin A 固定化カラムを用いて、二本鎖糖鎖を持つ AGP (R-AGP) と二本鎖糖鎖を持たない AGP (UR-AGP) を調製し、上記モデル薬物との結合性を比較した。その結果、UR-および R-AGP 共に PRO および VER と同等のキラル選択的結合を示し、二本鎖糖鎖構造はキラル選択的タンパク結合にほとんど影響しないことが判明した。

第 2 章 塩基性光学異性体薬物のキラル選択的タンパク結合におけるヒト α_1 -酸性糖タンパク質遺伝的変異体の役割

AGP には F1, S, A の 3 つの主要な variant が存在し、その分布には個人差があると共に病態によって変動する。そこで著者は HPFA/CE 法を用いて塩基性光学異性体薬物 (VER および disopyramide (DP)) と AGP variant とのキラル選択的結合性を調べた。F1 variant と S variant の混合溶液 (FIS variants 溶液) 中における両薬物の非結合型濃度は A variant 溶液中におけるそれより約 1.3 倍以上高く、両薬物は A variant に選択的に結合することが判明した。また DP 両異性体の非結合型濃度は FIS variants 溶液中ではほぼ同等であったが、A variant 溶液中では (R)-DP の非結合型濃度が (S)-DP の

それより約2.4倍大きく、このことから AGP の DP に対する立体選択性は主に A variant によるものであることが判明した。ところが VER の場合では variant 間で非結合型濃度に変化はなく、variant 間のアミノ酸配列の差異は VER のキラル認識には関与しないことが判明した。

第3章 塩基性および疎水性薬物のタンパク結合におけるヒト低密度リポタンパク質酸化の影響

LDL は血漿中で主に塩基性または疎水性薬物と結合する。LDL は病態時にマクロファージなどによって酸化修飾を受け、血管内皮細胞に際限なく取り込まれるなど正常 LDL とは異なる体内挙動を示す。また、酸化によって LDL の薬物結合性が增大するが、LDL 酸化過程は複雑であり結合性増大のメカニズムは不明である。そこで著者は HPFA/CE 法を用いて LDL 酸化程度変化に伴う薬物結合性変化を調査した。モデル薬物として塩基性薬物である VER および中性薬物である nilvadipine (NV) を用い、LDL の酸化法として生体内酸化のモデルとして汎用されている銅(II)イオンによる酸化法を用いた。LDL 酸化時間が2時間までの穏やかな酸化では VER, NV とともに結合性が増大した。酸化時間を12時間に延長すると両薬物ともにさらに結合性が増大したが、その程度は2時間までの酸化の時ほど大きくはなかった。一方、LDL 酸化に伴い二重結合数の変化や炭素鎖長の減少、リゾリン脂質含量および負電荷数の増加などが観測される。これらが薬物結合性に与える影響を個別に評価する目的で、モデルリン脂質リポソームと塩基性薬物である VER, PRO の結合親和性を評価した。極性基に負電荷を持つ 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol (POPG) を添加したりリポソームの結合性麗負電荷を持たない 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine の場合より約3.7倍以上増大した。一方、POPG の結合親和性と 1-palmitoyl-2-linoleoyl-phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-3-phosphocholine および dilauoyl-phosphatidylcholine の結合親和性の違いは POPG の場合ほどは大きくなく、いずれも2倍以下であった。このことから LDL 酸化に伴う負電荷の増加が結合性増大の主要な要因であると考えられた。

以上、著者はタンパクの構造多様性がキラル選択的薬物結合性に及ぼす影響を解明するための分析化学的研究を行い、AGP glycoform, variant および酸化 LDL がキラル選択的薬物結合性に与える影響を明らかにした。本法は血漿タンパク質にとどまらず、他の生体タンパク質—リガンド間相互作用の構造化学的研究に貢献するものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は、従来法による分析が困難であった微量血漿タンパクの立体選択的薬物結合を評価するために必要な分析システムを、高性能先端分析/キャピラリー電気泳動 (HPFA/CE) 法を利用することにより開発し、それを用いて病態変動に伴う血漿タンパクの構造差異が薬物結合性に与える影響を評価したものである。

α_1 -酸性糖タンパク質 (AGP) は二〜四本鎖を含む5つの複合型糖鎖を持ち、その末端には負電荷を持つシアル酸が存在する。このシアル酸残基が静電相互作用により塩基性薬物との結合に寄与する可能性がある。また、AGP 糖鎖のうち二本鎖糖鎖は AGP 分子上の薬物結合部位近傍に局在する。そこで HPFA/CE 法を用いて、まず AGP と塩基性薬物である propranolol (PRO), verapamil (VER) との立体選択的結合に与えるシアル酸残基並びに二本鎖糖鎖の影響を検討した。その結果、シアル酸残基は VER の立体選択的結合に影響を与えないが、一方 PRO の結合においては (R)-PRO との結合には関与しないものの (S)-PRO の結合性を増大させ、PRO の立体選択的結合の原因となっていることが明らかとなった。ところが、二本鎖糖鎖を持つ AGP および二本鎖糖鎖を持たない AGP の間では PRO および VER は共にほぼ同等の立体選択的結合を示し、二本鎖糖鎖構造は立体選択的タンパク結合にほとんど影響しないことが判明した。

AGP には遺伝的にアミノ酸配列の異なる3つの主要な variant (F1, S, A) が存在するが、それぞれの variant で薬物結合部位近傍の立体構造差異が見られ、その結果 variant ごとに異なる薬物結合性を示す可能性がある。また variant の存在比には個人差があると共に病態によって変動する。そこで次に、HPFA/CE 法を用いて AGP variant と塩基性光学異性体薬物である VER および disopyramide (DP) との立体選択的結合性を調べた。その結果、両モデル薬物は F1 variant と Svariant の混合画分よりむしろ A variant に選択的に結合することが判明した。また AGP の DP に対する立体選択性は主に Avariant によるが、VER に対する立体選択性に variant 間のアミノ酸配列の差異は関与しないことが判明した。

LDL は病態時に血管内皮細胞などによって酸化修飾を受け、マクロファージに際限なく取り込まれるなど正常 LDL とは異なる体内挙動を示す。また、酸化によって LDL の薬物結合性が增大するが、LDL 酸化過程は複雑であり結合性増大

のメカニズムは不明である。そこで続いて HPFA/CE 法を用いて LDL 酸化程度変化に伴う薬物結合性変化を調査した。その結果、LDL 酸化時間が2時間までの穏やかな酸化では塩基性薬物 VER, 中性薬物 nilvadipine (NV) とともに結合性が増大した。酸化時間を12時間に延長すると両薬物ともにさらに結合性が増大したが、その程度は2時間までの酸化の時ほど大きくはなかった。一方、LDL 酸化に伴い LDL 表面に存在するリン脂質の二重結合数の変化や炭素鎖長の減少、リゾリン脂質含量および負電荷数の増加などが観測される。これらが薬物結合性に与える影響を個別に評価する目的で、モデルリン脂質リポソームと塩基性薬物 VER, PRO の結合親和性を評価した。その結果、極性基に負電荷を持つ 1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylglycerol を添加したリポソームの結合性が、負電荷を持たない他のリポソーム場合より著しく増大した。このことから LDL 酸化に伴う負電荷の増加が結合性増大の主要な要因であることが判明した。

以上、本研究は微量血漿タンパクの立体選択的薬物結合を評価するために必要な分析システムを開発するとともに、タンパクの構造多様性がキラル選択的薬物結合性に及ぼす影響を解明するための分析化学的研究を行ったものであり、血漿タンパク質にとどまらず、他の生体タンパク質—リガンド間相互作用の構造化学的研究に大きく貢献するものである。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに平成14年4月16日論文内容とそれに関連した事項につき諮問を行った結果優秀と認定した。