

# 30CG-am10

ファージディスプレイ法を用いた HSA 分子上の BR 結合部位の探索

○蓑毛 藍<sup>1</sup>, 異島 優<sup>1</sup>, 内田 真希代<sup>1</sup>, 諏訪 喜昭<sup>1</sup>, 末永 綾香<sup>1</sup>, 丸山 徹<sup>1</sup>, 森岡 弘志<sup>1</sup>, 小田切 優樹<sup>1</sup>(<sup>1</sup>熊本大院薬)

【目的】近年、アルブミン結合性毒素 (ABT) を効率的に除去するアルブミン透析という新しい血液浄化療法が開発された。しかし、この方法では ABT の一つである核黄疸等を引き起こすビリルビン (BR) の劇的な除去効果が得られないため、BR をより効率的に除去するアルブミン透析の開発が望まれている。そこで本研究では、高 BR 捕獲型アルブミン変異体を用いた透析液の開発を最終目的とし、ファージディスプレイ法を用いたランダムスクリーニングによるヒト血清アルブミン (HSA) 分子上の BR 結合部位の探索を試みた。

【方法】ヒト血清アルブミン (HSA) において、BR 結合に関与すると報告のある HSA-domain II に存在する Lys、Arg の 12 残基が Lys、Arg、Glu、Gly という側鎖の電荷が異なる 4 残基へランダムに変異が導入された、domain II ディスプレイファージライブラリーを作製した。その中から BR に結合したファージのみの回収・増幅を繰り返すことでスクリーニングを行った。

【結果・考察】ランダムに拾った 111 クローンの内 WT に比べて高い BR 結合能を有していた 8 クローンのシーケンス解析を行った。その結果 7 クローンの <sup>195</sup>Lys、さらに 8 クローン全てにおける <sup>199</sup>Lys が塩基性アミノ酸に保持されていた。さらに、一残基変異体である K195A 及び K199A の BR に対する結合定数はそれぞれ  $K_a = 11.02 \pm 3.18 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、 $K_a = 10.08 \pm 1.53 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  であり、いずれとも WT ( $K_a = 50.34 \pm 5.25 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) と比べ有意に低下した。これらの結果は HSA 分子上の BR 結合部位が <sup>195</sup>Lys、<sup>199</sup>Lys であることを示唆し、高 BR 捕獲型アルブミン変異体を作製するためには、これら残基を保持した上で周りのマイクロ環境を変化させる必要があることを提示した。