

カルセインの漏洩が無視できるように、外水相に塩化コバルト(1mM)を添加した。膜融合率(%)は、 $(I_0 - I_1) \times 100 / I_1$ (I_0 : リポソーム内水相でのカルセインの蛍光強度; I_1 : リポソームを可溶化(2mM Triton X-100)した時のカルセインの最大蛍光強度(100%); I_0 : タンパク質/ポリマー未添加時のリポソーム内水相でのカルセインの蛍光強度)と定義した。5~10分程度で膜融合率が飽和値に達したため、本研究では30分後の融合率を用いた。

B-6. 固定化リポソームクロマトグラフィー

1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-phospho-choline / egg phosphatidylethanolamine (POPC/EPE = 96:4(モル比))から成るリポソームは前報(Yoshimoto *et al.*, 1998)と同様の方法を用いて調製した。得られたリポソームは、ゲル担体(TSKG6000PW ゲル, Tosho 製(Tokyo, Japan))に固定化(Wilcheck and Moron., 1982)し、5.5cm × 0.5cm ガラスカラム(HR5/5, Amersham, Pharmacia Biotech 製)に充填した。これを中圧液体クロマトグラフィーシステム(AKTA Purifier, Amersham Pharmacia Biotech 製)に接続し、各種条件(25~55°C, pH2.5~8.0)において溶出実験を行なった。対象物質-リポソーム間相互作用の強さは、刺激の負荷に伴う対象物質本来の溶出体積(V_0 [ml])からの遅れ($V_r - V_0$ [ml])を固定化脂質量(M' [μmol])で基準化した量($(V_r - V_0) / M'$, すなわち, Capacity factor, k_s)から解析した(Beigi *et al.*, 1995; Yoshimoto *et al.*, 1998, Yoshimoto and Kuboi, 1999)。

B-7. Na^+/K^+ -ATPase 活性の測定

上述のプロテオリポソームと ATP を混合し、各時間にサンプリングして ATP の加水分解量を測定した。ATP 加水分解量は、遊離するリン酸由来のモリブデン錯塩形成量から評価した

(Chifflet *et al.*, 1988)。 Na^+/K^+ -ATPase 活性は、ATP 加水分解量の経時変化から得られる初期勾配を Na^+/K^+ -ATPase 量で除した値で定義した。

C. 研究結果

C-1. 各種刺激条件下におけるリポソームの凝集・膜融合挙動に及ぼす生体・合成高分子の共存効果

これまでに、チトクロムcなどのタンパク質(Walter *et al.*, 1986; Lee and Kim, 1989; Yoshimoto and Kuboi, 1999)あるいは刺激応答性高分子(Poly(NIPA-co-MAA) (Meyer *et al.*, 1998; Kono *et al.*, 1999)の共存下においてリポソーム膜融合現象が促進される事が報告されている。本研究では、各種刺激条件(熱・pH)下における α -CT あるいは Poly(NIPA-co-MAA)による中性のPOPCリポソームの凝集および膜融合挙動を、動的光散乱法(DLS)およびコバルト-カルセイン法(Kendall and MacDonald, 1982)を用いて解析した。

α -CT を添加した POPC リポソーム溶液に、熱刺激(25~60°C, pH 8.0)を負荷し、リポソームの粒径および膜融合率を測定した。図 C-1(a)に、 α -CT 共存下におけるリポソームの粒径の温度依存性を示す。30°C以下ではリポソームの粒径に殆ど変化が見られないものの、30°C以上では粒径が増加し、45°Cで最大になった。以上の様に、 α -CT が共存する場合、特定の熱刺激条件下(37°C以上)で POPC リポソームの凝集が促進される事が分かった。図 C-1(b)に、 α -CT 共存下におけるリポソームの膜融合率の温度依存性を示す。40°C以上で膜融合が生じ、45°Cで膜融合率が最大になったが、さらに高温では膜融合率は逆に減少した。特に、37°Cではリポソームの粒径変化が見られるものの(図 C-1(a))、膜融合率の増加は見られない(図 C-1(b))。これらの結果は、膜融合プロセスは、

膜の凝集, および, 膜融合の二つのプロセスを含む事を示唆しており, 従来の知見とも一致している (Fraley *et al.*, 1980). 一方, 電気泳動による分子量の解析結果および色素結合法による N 末端分子数の解析結果から, α -CT の自己分解は, 本実験条件の範囲ではほぼ無視できる事は確認している (data not shown). これまで, 既報 (Yoshimoto *et al.*, 1998; Yoshimoto and Kuboi, 1999)

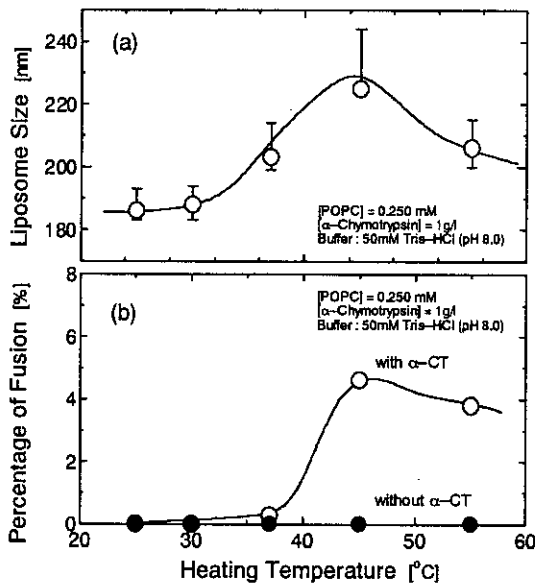


図 C-1 α -CT 共存下での膜融合の温度依存性

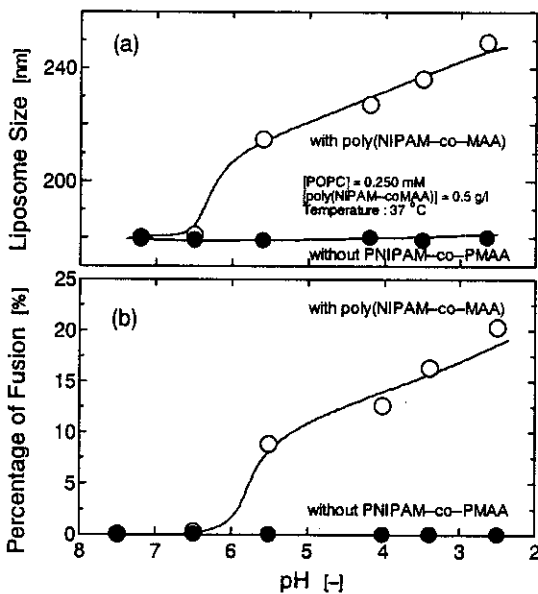


図 C-2 NIPAM-co-MAA 共存下での膜融合の pH 依存性

では, 塩酸グアニジンにより変性させた CAB

および Lysozyme 共存下における膜融合について検討されており, タンパク質の中間状態 (Molten Globule 状態) がリポソームの凝集・膜融合において重要な構造状態である事を示している. 本実験範囲でも, 膜融合率の増加する条件において, α -CT の構造変化に伴う局所的疎水性の増加が見られており (data not shown), 前報の知見 (Yoshimoto and Kuboi, 1999) と一致している. 各種 pH 条件で poly(NIPAM-co-MAA) 共存下におけるリポソームの粒径変化および膜融合率を測定した結果を図 C-2 に示す (37°C). 酸性条件 (pH6 以下) でリポソームの粒径が増加しており, リポソーム間で凝集が生じた事が示された (図 C-2(a)). 図 C-2(b) に膜融合率の pH 依存性を示す. pH6 以上になると膜融合を促進しないが pH6 以下では pH の減少とともに膜融合率が増加した. 刺激条件下での膜融合現象は刺激応答性ポリマーの pH 相転移挙動 (Kono *et al.*, 1999) と一致している. 以上の結果から, 刺激応答性高分子が相転移が誘導される pH 条件下ではリポソームとの疎水性相互作用が高くなるため, 刺激応答性高分子を介したリポソーム膜間相互作用が誘起され, 凝集・膜融合を促進したものと考えられる.

C-2. 固定化リポソームクロマトグラフィーによる α -CT あるいは Poly(NIPAM-co-MAA) 共存下におけるリポソーム間相互作用の評価.

固定化リポソームクロマトグラフィーは, タンパク質やリポソーム, 細胞等のストレス応答を評価するのに優れた解析ツールである. リポソーム固定化カラムにサンプル導入後の対象分子 (タンパク質等) - リポソーム間に相互作用が生じる場合, 溶出挙動に遅れが検出される (Yoshimoto *et al.*, 1998). 一例として, α -CT 共存下におけるリポソームの溶出挙動の解析結果を図 C-3(a) に示す. 25°C における POPC

リポソームの溶出と比較して、熱刺激 (45°C) を負荷した場合の溶出体積に変化は見られなかった。同様に、通常の条件 (25°C) において α -CT を添加した場合も溶出ピークの遅れは見られなかった ($V_e=0.86$ ml)。

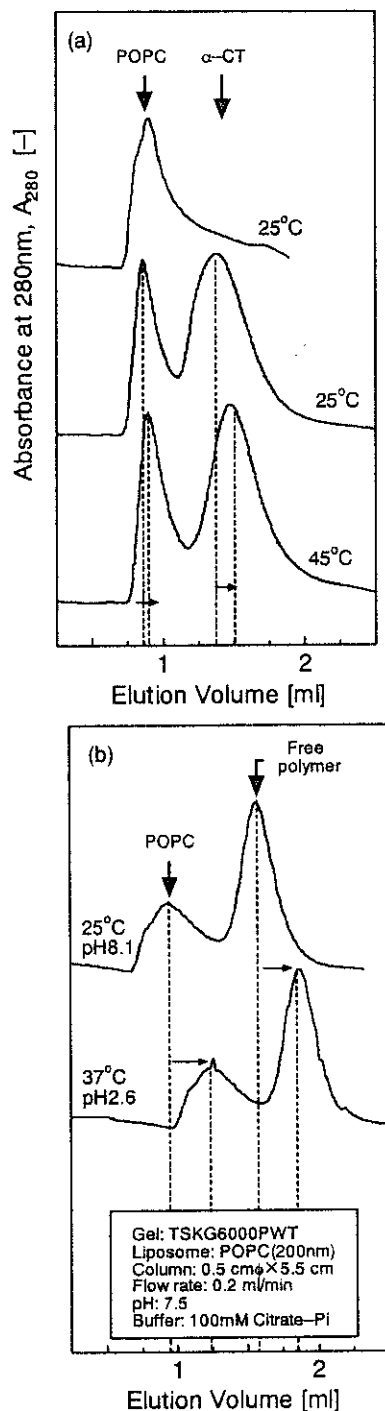


図 C-3 熱ストレス負荷条件下における POPC リポソームと α -CT 混合溶液の ILC 溶出挙動
一方、 α -CT 共存下で、45°C の熱刺激を負荷すると、POPC リポソームの溶出ピークの遅れが

見られた ($V_e=0.89$ ml)。刺激応答性ポリマー (スマートポリマー) は生体由来タンパク質と同様、外部環境の変化にตอบสนองして特性を変化させる事が知られている。poly(NIPA-co-MAA) 共存下でもリポソーム-固定化リポソーム膜間相互作用を解析した (図 C-3 (b))。25°C, pH8.1 では POPC リポソームの溶出ピークは $V_e=0.94$ ml であった。しかしながら、37°C, pH2.6 の条件下で POPC リポソームの溶出ピーク ($V_e=1.26$ ml) の遅れが見られた。また図 C-3 (a) (b) に示した様に、刺激条件負荷時において、サンプル溶液中に共存する α -CT および poly(NIPA-co-MAA) の溶出ピークの遅れも観察された。上述の POPC リポソームの溶出ピークの遅れは、刺激条件によって表面特性の変化した α -CT や poly(NIPA-co-MAA) を介して、リポソームおよび固定化リポソームの膜流動性 (局所的疎水性) が増加し、両者の相互作用が誘起された事に起因するものと考えられる。以上の結果より、タンパク質-固定化リポソーム間相互作用を解析する場合 (Yoshimoto *et al.*, 1998) と同様に、ILC におけるリポソームの溶出の遅れから、リポソーム-固定化リポソーム間相互作用を定量的に評価できる事を示した。

C-3. 膜融合と Capacity factor の関連性

図 C-3 で得られた溶出曲線よりリポソームの Capacity factor, k_s を解析した。図 C-4 は刺激条件下・ α -CT および poly(NIPA-co-MAA) 共存下におけるリポソームの k_s 値とリポソームの粒径 (図 C-4 (a)) および膜融合率 (図 C-4 (b)) との関係を示す。図 C-4 (a) に示したように、 k_s 値の増加に伴ってリポソームの粒径は増加し、リポソームの凝集が促進されている事がわかる。また、刺激条件下において k_s 値の増加とともに膜融合率が直線的に増加する事がわかる (図 C-4 (b))。前報において、 k_s 値は、

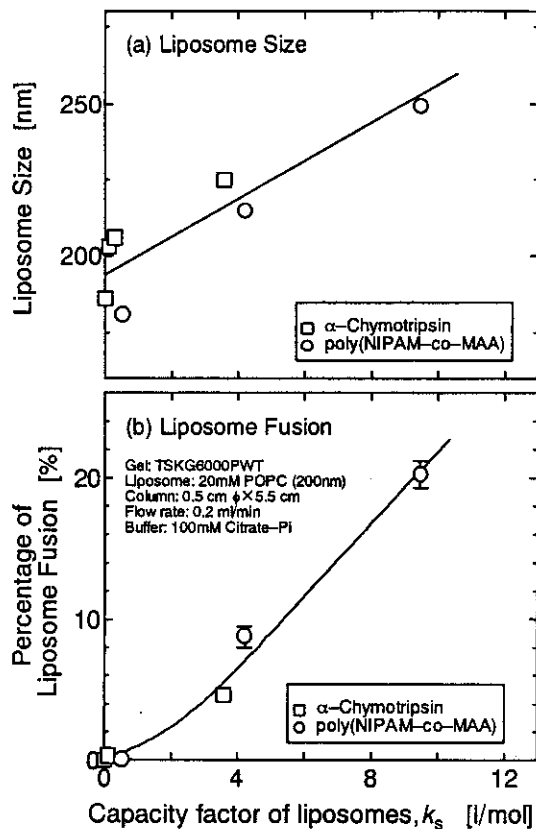


図 C-4 膜融合と溶出挙動の関係

刺激条件下におけるタンパク質と固定化リポソーム間の疎水性相互作用の強さを表す指標である事を示しており (Yoshimoto *et al.*, 1998; Yoshimoto and Kuboi, 1999; Shimanouchi *et al.*, 2000), 上記の実験結果とも併せて考察すると, リポソーム間相互作用は構造変化したタンパク質/刺激応答性高分子を介してリポソーム膜の流動性(局所的疎水性)が増加し, 両者の疎水的相互作用により誘起されている事が示唆される。

以上の様に, リポソームの溶出挙動から解析される k_s 値は, 膜融合現象との良好な対応が見られ, ILC は, 膜-膜間相互作用の解析ツールとして有効である事が示された。

C-4. タンパク質・合成高分子のリポソームへの配向

ストレス条件下において天然高分子(タンパク質)や合成高分子(スマートポリマー)は図 C-5 のように構造変化し, 疎水核を形成してか

らリポソーム膜と相互作用することが考えられる。この機構に基づき, 機能性リガンドや膜タンパク質を適切な刺激条件下において外部から導入し, リポソームを機能化することが容易になると期待される。

そこで, 次節では, 合成・生体高分子組み込みの際のリポソーム膜特性, さらには, リン脂質分子の運動性の変化をオンライン解析できる誘電分散解析法を用いて解析した結果を示す。

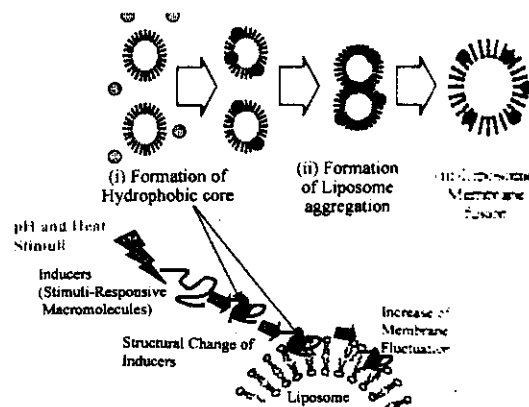


図 C-5 タンパク質・スマートポリマーの脂質膜への配向のモデル

C-5. 誘電分散解析による脂質膜の動的特性の評価

リポソーム・タンパク質共存溶液の誘電スペクトルは, リポソーム界面の特性ならびに運動性を強く反映することが知られている。これらのスペクトルを解析するために, 物理的モデルに基づく fitting 式について議論する必要がある。以下では Cole-Cole 式, ならびに Debye 式の特徴について議論する。

Cole-Cole 式は, 簡便に表面状態をモニタリングするための式であり, 単一緩和を仮定するため, 緩和周波数に分布がある。

$$\epsilon' - \epsilon_{\infty} = \Delta\epsilon \left[\frac{1 + (f/f_c)^{(1-\alpha)} \sin(\alpha\pi/2)}{1 + 2(f/f_c)^{(1-\alpha)} \sin(\alpha\pi/2) + (f/f_c)^{2(1-\alpha)}} \right] \dots (2)$$

ここで, α は分布の広がりを表すパラメータで

あり、Cole-Cole 式から評価される $\Delta\epsilon$ は、いくつかの膜特性（サイズ、電荷、脂質濃度など）に基づく誘電率緩和を反映し、物理化学的解釈を抽出するのは難しい。しかし、前報で、 $\Delta\epsilon$ が脂質膜-タンパク質間相互作用と関係付ける事が出来たのは、 $\Delta\epsilon$ 自身が静電膜容量を表す示量変数だからである。一方、 f_c は示強変数であり、分子運動の変化を議論できる可能性あるが、Cole-Cole 式の f_c は、複数の緩和周波数を単一とみなしているため、物理化学的特性とは単純に結びつける事は出来ない。

一方、Debye 式 (B-3 の式(1)を見よ) は、本実験のように、スペクトルに複数の緩和過程が見られる場合、各緩和過程に分解して解析できる点で有効である (図 C-6)。一般に、脂質膜-タンパク質間相互作用は膜流動性と関連していることが知られている。蛍光プローブ 1-(4-trimethylammonium-phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH) は膜流動性の指標であり、高周波側のリン脂質の軸回転運動 (f_{c2}) は、TMA-DPH の異方性に対応する。したがって、 f_{c2} の減少は脂質膜-タンパク質間相互作用の強さに比例するものと考えられる。

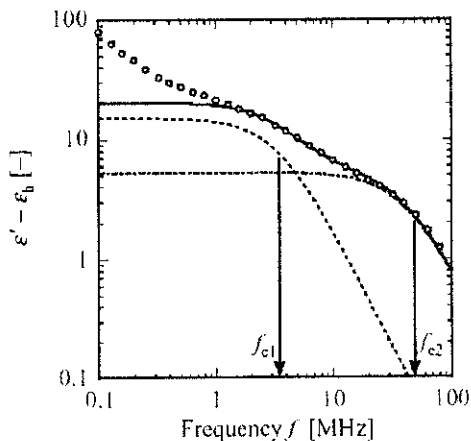


図 C-6 リポソームの誘電分散

ゆえに、Debye 式における f_{c2} は、対象分子と膜が相互作用した場合における分子の運動性の評価パラメータになりうると予想される。

C-6. 誘電分散解析による脂質膜-タンパク質間相互作用の評価

タンパク質の膜透過は、脂質膜中へのタンパク質の挿入によるリン脂質の運動の低下、つまり、 f_{c2} の減少を示す (図 C-7)。しかし、 $\Delta\epsilon_{1,2}$ はあまり関連しない。図 C-8 に示すように $\Delta\epsilon(\text{Cole-Cole}) \propto f_{c2}(\text{Debye})$ が成立し、熱ストレス条件誘導型膜透過現象に限って言えば、示強変数でのモニタリングが可能であり、膜界面のダイナミクスの評価につながることを示唆している。

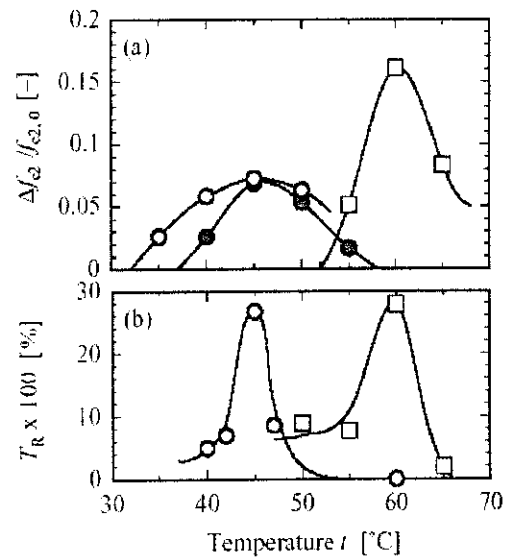


図 C-7 誘電パラメータとタンパク質の膜透過量の温度依存性

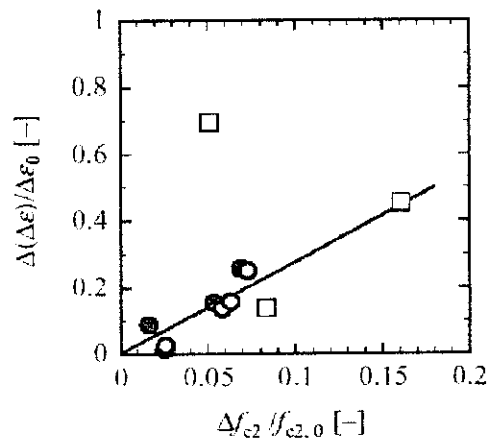


図 C-8 Cole-Cole 式および Debye 式より得られる誘電パラメータの相互関係

C-7. プロテオリポソームの機能評価

プロテオリポソームの機能評価として、モデ

ル膜タンパク質であるNa⁺/K⁺-ATPaseを用いた。活性はATP加水分解量から決定した(Table C-1)。ATPase:lipidモル比が1:19000のときはATPase活性は検出できなかったが、1:4200にATPase含量を増加させると0.208mol/mol-ATPaseの活性が検出された。界面活性剤C₁₂E₈(1.8 mM)で処理し、Na⁺/K⁺-ATPaseの活性部位を全て外水相に配向させた場合の活性値(0.241 mol/mol-ATPase)を基準にすると、今回得たプロテオリポソームでNa⁺/K⁺-ATPaseは86%が外向きに配向していることがわかった。

Na⁺/K⁺-ATPaseと同じファミリーに属しているMDRタンパク質のATP加水分解活性を評価すると、0.172nmol/mg-MDRであった。MDRの精製ならびにリポソームへの組み込みを詳細に検討することにより、活性の向上が期待される。

【参考文献】

- Beigi, F., Q. Yang and P. Lundahl: *J. Chromatogr. A*, 704, 315-321(1995)
- Chifflet, S. et al., *Anal. Biochem.*, 168, 1-4(1988)
- Fraley, R., J. Wilschut., N. Duzgunes., C. Smith and D. Papahadjopoulos: *Biochemistry*, 19, 6021-6029(1980)
- Kendall, D. A. and R.C MacDonald: *J. Biol. Chem.*, 257, 13892-13895(1982)
- Kono, K; A. Henmi, H. Yamashita, H. Hayashi, T. Takagishi: *J. Contrl. Rel.*, 59, 63-75(1999)
- Lee, S. and H. Kim: *Arch. Biochem. Biophys.*, 217, 188-199 (1989)
- Meyer, O., D. Papahadjopoulos, and J.C Lerroux: *FEBS Lett.*, 421, 61-64(1998)
- Shimanouchi, T., S. Morita, H. Umakoshi and R. Kuboi: *J.Chromatogr. B*, 743, 85-91(2000)
- Walter, A., D. Margolis, R. Mohan and R. Blumenthal: *Membr.Biochem.*, 6, 217-237(1986)
- Yoshimoto, M., R. Kuboi, Q. Yang and J. Miyake:

J.Chromatogr. B, 712, 59-71(1998)

Yoshimoto, M. and R. Kuboi, *Biotechnol. Progr.*, 15, 480-487(1999)

D. 考察

ストレス条件を適切に選択すると、天然・合成高分子の構造状態を制御できる。界面での構造変化は、各種高分子をリポソーム膜に安定に取り込む可能性を示唆している(図 C-5)。誘電分散解析で得られる脂質分子の軸回転運動の指標(f_c)は、タンパク質の膜透過が促進されるストレス条件で減少し、リン脂質分子の運動性の低下を示した。タンパク質の膜透過現象と膜タンパク質の脂質膜での再構成が、構造変化したタンパク質の膜への挿入という点で類似していると考えられるならば、再構成過程における脂質膜特性の変化を誘電分散解析で、*in situ*で評価可能であると期待される。

本実験系では、用いたタンパク質・スマートポリマーは、リポソームの膜融合能を促進した。

Table C-1 Na⁺/K⁺-ATPaseのプロテオリポソームの配向性

	ATPase:lipid [mol/mol]	Protein [nmol]	活性 [mol/mol-pr]	配向性
Proteoliposome	1:19000	0.18	N.D.	N.D.
1.8mM C ₁₂ E ₈ 処理後	1:19000	0.18	N.D.	
Proteoliposome	1:4200	0.50	0.208	86%*
1.8mM C ₁₂ E ₈ 処理後	1:4200	0.50	0.241	(外向き)
ATPase-TritonX-100		0.63	0.233	
MDR		0.172**	578***	

*)配向性は、C₁₂E₈処理後の活性を100%の配向性と考えたときの相対活性で定義される。 **mg *** nmol/mg-pr

しかし、利用するタンパク質やリガンドを選択することで、リポソームに与えられる機能が異なる。プロテオリポソームの機能化には、リガンドとしてのタンパク質とリポソームの表面特性をデータベース化し、得られるプロテオリポソームの機能(活性・物質輸送など)との関連性を議論すべきであると考えられる。

E. 結論

ストレスにより誘起される天然高分子(タンパク質)や合成高分子(スマートポリマー)の構造変化を利用してリポソームの高機能化(膜融合の促進)が達成できた。誘電分散解析

(Debye 式)から得られる f_{c2} を指標とした脂質分子のダイナミクスのモニタリングにより、脂質膜-タンパク質間相互作用の評価が可能であることを示した。本手法に基づき、膜タンパク質のリポソームへの組み込みを評価できる可能性を示した。Na⁺/K⁺-ATPase や MDR 活性を評価した結果より、膜タンパク質の配向性を制御して、調製したプロテオリポソームの機能を評価できることを示した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Menayame, M. F., *et al.*, Characterization and Control of Stimuli-Induced Membrane Fusion of Liposomes in the Presence of Proteins and Stimuli Responsive Polymers, *Biochem. Eng. J.*, 12, 7-19, 2002
- (2) Menayame, M. F., *et al.*, Evaluation and Control of Interaction between Liposome Membranes Induced by the Stimuli Responsive Polymers and Proteins, *J. Biosci. Bioeng.*, 93(5), 498-501, 2002
- (3) Menayame, M. F., *et al.*, 刺激応答型リポソーム膜融合現象の評価, *化学工学論文集*, 28(4), 481-484, 2002
- (4) Morita, S. *et al.*, Detection of Heat Stress Mediated Interaction between Protein and Phospholipid Membrane Using Dielectric Measurement, *J. Biosci.*

Bioeng. in press

2. 学会発表

- (1) (阪大院基礎工) (正) 島内寿徳・○(学) 佐々木勝司(阪大院基礎工) (正) 馬越大・(正) 久保井亮一*・(和歌山高専) (正) 森田誠一, 誘電分散解析による \square -キモトリプシンの自己分解過程のモニタリング, 化学工学会秋季大会, 神戸大学, 2002 年 9 月
- (2) (阪大院基礎工) ○(学) 鄭浩燮 (正) 島内寿徳 (和歌山高専) (正) 森田誠一(阪大院基礎工)(正) 久保井亮一*, 導電性有機感応膜を利用したタンパク質の構造変化の測定, 化学工学会秋季大会, 神戸大学, 2002 年 9 月
- (3) (阪大院基礎工) (正) 島内寿徳・○(学) 川崎英典(阪大院基礎工) (学) 布施誠・(正) 馬越大・(正) 久保井亮一*, ホスホリパーゼ C によるストレス誘導型膜融合, 化学工学会秋季大会, 神戸大学, 2002 年 9 月
- (4) Stress-Mediated Preparation of Proteoliposome and Its Characterization, ○ Masashi Sasaki, Toshinori Shimanouchi, Hiroshi Umakoshi and Ryoichi Kuboi*, COEIEC I, P039, Osaka, Feb.2003
- (5) Application of Novel Stress Sensor Systems for Stress-Responsive Bioproduction Process, ○Ho-Sup Jung, Se-Young Son, Hiroshi Umakoshi, Toshinori Shimanouchi, and Ryoichi Kuboi*, COEIEC I, P040, Osaka, Feb.2003
- (6) Development of Oxidative Stress Responsive-Artificial SOD Using Liposome, ○Hideto Nagami, Takenori Kitaura, Toshinori Shimanouchi, Hiroshi Umakoshi and Ryoichi Kuboi*, COEIEC

I, P041, Osaka, Feb.2003

(7) Interactions of Amyloid- β -Protein with Various Fatty Acids-Containing Phospholipid Membranes, ○Bong-Kuk Lee, Hiroshi Umakoshi, Toshinori Shimanouchi and Ryoichi Kuboi*, COEIEC I, P042, Osaka, Feb.2003

(8) Characterization of Cross-Linking Reaction of Protein on Liposome Membrane Using Transglutaminase under Stress Condition, ○ Hiroshi Umakoshi, Yuichi Nakashima, Bong-Kuk Lee and Ryoichi Kuboi*, COEIEC I, P043, Osaka, Feb.2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究

薬物代謝機能発現環境の最適化

分担研究者 大政健史 大阪大学大学院工学研究科 応用生物工学専攻 助手

研究要旨：本研究では、ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究を目指し、肝解毒機能を持たせた細胞を構築し、構築した薬物代謝の機能発現にかかる発現環境について検討した。ヒトにおける薬物代謝は、一連の第Ⅰ相反応と第Ⅱ相反応から成り、多くの薬物は第一相反応で水酸基などの小さな極性基が導入された後、第Ⅱ相反応でより大きな極性基であるグルクロン酸などを付加され、排泄しやすい形へと変化する。本年度はこのⅠ,Ⅱ相反応を担うモデル細胞の構築を試みた。

A. 研究目的

日本において、ウイルス性肝炎を始めとする急性肝不全患者は数多い。急性肝不全は、急激な肝細胞壊死あるいは肝細胞機能不全により、肝性脳症・黄疸・腹水・出血傾向・腎不全などを呈す。これらに対して、血液濾過透析（持続的血液濾過透析 Continuous Hemodia Dia Filtration：CHDF）や血漿交換（plasma exchange：PE）を組み合わせた肝機能補助療法が、現在最も臨床に應用されている。これは、肝臓により解毒・代謝されるべき物質を血液から濾過するか、または血漿と共に除去して不足分をヒト正常血漿により補充する方法である。しかし、多種にわたる肝機能の全てを代替できないため、十分な治療成績をおさめるには至っていない。

劇症肝炎等の末期肝不全の根治療法として肝移植が一般的に行われているが、ドナ

ー不足など様々な問題点が残されている。そこで、脳死肝移植以外の治療法として、またドナー肝が移植されるまでの緊急対応 (bridge-use)として、肝不全に陥った生体の肝機能を補助できる肝機能補助装置の開発が重要な課題である。現在では、肝機能補助装置として、バイオリクター（物理的材料）に動物細胞（生物的材料）を充填した血液浄化システム（バイオ人工肝）（下記図）が多数開発されてきている。

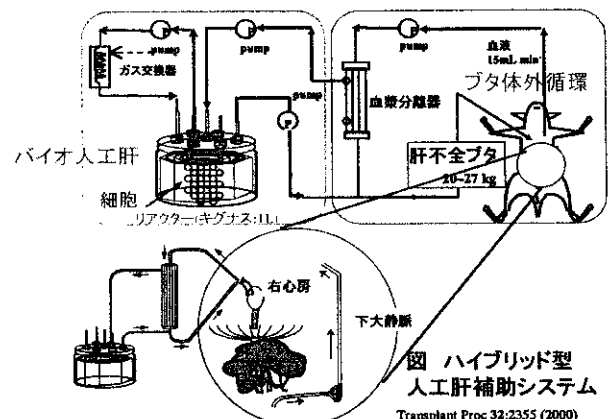


図 ハイブリッド型バイオ人工肝補助システム

肝細胞は、非常に旺盛な再生能力を有することから、急性肝不全に陥った肝臓が再生し機能を回復するまでの期間、このような肝機能補助装置を用いて肝機能を補助することの重要性は高い。バイオ人工肝に代表される血液浄化システムにおいて肝機能を担う細胞は、大きく二つに分類される。1つはブタなどの異種動物由来の初代肝細胞を用いるものである。これらの細胞は高い肝機能を有しているものの、急速に肝機能が低下するため、その機能を長期間維持することは難しく、必要となるたびに調達しなければならない。また異種動物であるため、免疫拒絶反応・未知のウイルス感染等の危険性が指摘されている。

これらに対峙する形で用いられているものが、HepG2などのヒト由来細胞株である。これらの細胞は無限増殖能を有するため長期にわたって維持できるという特性があるものの、肝機能が失われているという問題点がある。

本研究ではこれらの肝機能を失っているが無限増殖能を有するヒト肝由来細胞株に遺伝子組換えの手法を用いて肝機能を組み込み、血液浄化システムに適した遺伝子組換え動物細胞の開発を行い、さらにこれを解析し、薬物代謝機能の最適化を行うことを考えた。肝機能は多岐に及んでおり、血液浄化システムが、生体の肝機能すべてを担うことは困難である。そこで特定の肝機能（肝細胞特有のアンモニア代謝能・薬物代謝能など）を有する血液浄化システムを開発すれば、肝細胞が自己再生するまでの補助として、また肝移植までの緊急対応 (Bridge-use) として用いること

ができると考えた。そこで、以前の研究では、ヒト肝由来細胞株 HepG2 細胞に、毒性物質のひとつであるアンモニアの除去能を付与させることを考えた。アンモニアは肝性脳症の主原因であり、アンモニアを代謝することで大きな治療効果が期待できる。

そこで、総アンモニアの 1/3 を代謝する Glutamine Synthetase (GS) 遺伝子を HepG2 細胞に導入し、さらにこの遺伝子の増幅現象を利用することによりアンモニア代謝細胞の構築を行った。その結果、アンモニア添加培養において、HepG2 細胞ではアンモニアが産生される一方、構築した細胞はアンモニアを代謝することが確認された。さらに、この細胞を用いたハイブリッド型人工肝臓を肝不全モデルブタに適用した生体実験において、延命効果を得ることができた。

そこで、次なるターゲットとして、血液浄化システムの機能としてさらに必要とされている薬物代謝能をヒト肝由来細胞株 HepG2 に付与させることにより、毒性物質の選択的除去システムとしての血液浄化システムを構築することを考えた。またこれらの薬物代謝能を有する動物細胞は肝不全治療目的以外にも、ヒト肝における薬物代謝研究のモデル (薬物の毒性試験や代謝経路の特定などのモデル) としての利用も考えられる。

実際の肝臓における薬物代謝反応は第 I 相反応と第 II 相反応から成る。第一相反応は、酸化・還元・加水分解などによって、水酸基・カルボキシル基・アミノ基などの比較的小さな極性基が生成、導入される反

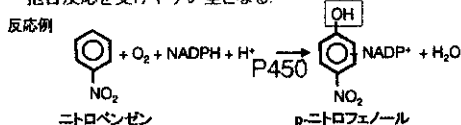
応である。第二相反応は、グルクロン酸・硫酸・グルタチオンなど第一相反応よりも大きな置換基が導入される抱合反応である。

多くの薬物は第一相反応で水酸基などの小さな極性基が導入された後、第II相反応でより大きな極性基が付加され、排泄しやすい形へと変化し、尿中などに排泄されるI, II相反応の模式図を下記に示す。

他の主たる肝機能・・・肝臓における薬物代謝

第一相反応(酸化・還元・加水分解等の反応)

OH基・NH₂基・COOH基などが生成され、極性を生じると共に抱合反応を受けやすい型となる。



第二相反応(抱合反応)

抱合反応により極性がさらに増大し、より排泄されやすい型となる。

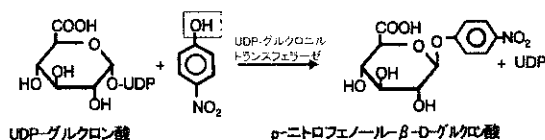
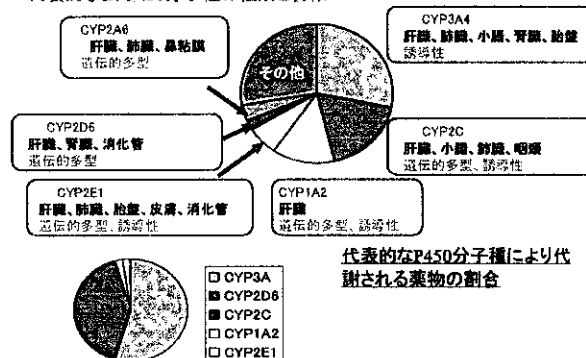


図 肝臓における薬物代謝反応

ヒトにおいては、薬物代謝の約80%を第I相反応を担う薬物代謝酵素 cytochrome P450 が担っている。劇症肝炎患者においては、特にこの第I相反応の代謝能力が低下していると言われている。またP450は基質特異性が低いという特徴があり、P450の分子種であるP450 3Aの場合、臨床で使用されている医薬品のおよそ半分を代謝することができる。さらに、P450 3A4はP450全体の約30%の発現量を占めていることが知られている(下記図)。

代表的なヒトP450分子種の組成と特徴



代表的なP450分子種により代謝される薬物の割合

月刊薬事 42: 109 (2000)

図 P450 分子種と発現様式

そこで、広範囲の薬物を代謝させるために、このP450 3A4の遺伝子(CYP3A4)をHepG2細胞に導入し、人工肝に応用可能な薬物代謝動物細胞の構築を試みた。さらに得られた細胞株について詳細な機能評価を行い、薬物代謝機能発現環境の最適化について考察し、非細胞性代謝機能代替デバイスに応用可能な知見を得ることを目的とした。

B.研究方法

宿主動物細胞として、理化学研究所細胞バンク RCB0459株であるヒト由来HepG2株を用いた。本細胞はhuman hepatocellular carcinoma由来であり、増殖形態はepithelial-likeである。

培地として、RDF(HO)培地(日本製薬010406)にグルタミンを添加した培地(RDF(Gln+))もしくは、代わりにアンモニアを添加した培地(RDF(Gln-))に、牛胎児血清(fetal bovine serum (FBS)を10%となるように添加したものをを用いた。なお、用いるベクターによってGS-3A4-HepG2細胞の継代時にはZeocin(invitrogen; R250-01)を200

$\mu\text{g/ml}$ となるように添加した。細胞培養容器としては、T-フラスコ (MS-20050 (底面積 25 cm^2 , 容量 50 mL), MS-21250 (75 cm^2 , 250 mL), MS-20800 (225 cm^2 , 800 mL); 住友ベークライト), 100 mm dish (25020; Corning), または 96-well プレート (FALCON; 353072) を用いた。

本細胞株に組み込む P450 発現プラスミドは pBudCE4 (invitrogen ; V532-20) を用いて構築した。これは、multicloning site (MCS) を 2ヶ所有しており、それぞれの MCS の上流に human cytomegalovirus (CMV) immediate-early promoter 及び human elongation 1a-subunit (EF-1a) promoter を有する。マーカー遺伝子として、大腸菌及び動物細胞では Zeocin で選択可能である。本プラスミドの MCS に、CYP3A4 遺伝子およびグルタミン合成酵素遺伝子(GS)を組み込むことにより 3A4 発現プラスミドを構築した。構築したプラスミドの構造を下記の図に示す。

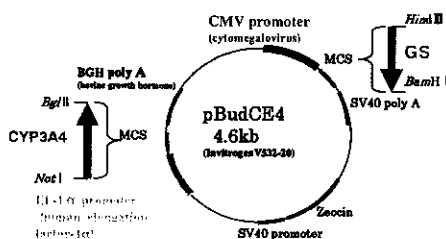


図 3A4発現プラスミド

本プラスミドを用いて、リポソーム法 (TaKaRa, Trans IT Polyamine Transfection Reagents) により HepG2 に transfection を行った。導入するベクターは、Wizard PureFfection Plasmid DNA Purification System (Promega; A2160, エンドトキシン等を除

いた後、マグネットに DNA を吸着させて高純度のプラスミド DNA を回収) を用いて調製した。

構築した GS-3A4-HepG2 細胞について、培養を行い、そのアンモニア、薬物代謝能について検証した。アンモニア代謝に関しては、RDF (Gln-) 培地 (NH_4Cl 1mM) に 10% 透析血清を加えたものを用いて検討した。初発細胞濃度は 1×10^5 個/mL を用いた。各時間毎に得られたサンプルの細胞濃度は、写真法および色素排除法を用いて計測した。また、培地中のアンモニア濃度はアンモニア濃度は、F-キット アンモニア (Boehringer Mannheim 社) を用いて測定した。写真撮影による細胞濃度測定は、T-フラスコ内の細胞を顕微鏡下で写真撮影を行い、細胞数を測定した。培養終了後、すなわち培養開始後 108 時間後に、色素排除法による生細胞の計数を行い、写真撮影法のデータを補正した。色素排除法は以下の手順で行った。まず、トリパンブルー水溶液 0.2% (w/v) と NaCl 水溶液 4.25% (w/v) を 4:1 の割合で混合し、この液に細胞浮遊液を等量混合し、Burker-Turk 型血球計算板 (ERMA 4296) に一滴 (約 $15\ \mu\text{L}$) のせ、ただちに検鏡して生細胞濃度、全細胞濃度を計測した。

これらの実験における各細胞の比増殖速度 μ (h^{-1}) およびアンモニア比消費速度 $?_{\text{Amm}}$ ($\text{mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) を次の様に算出した。回分培養時における、培養時間 t (h) に対する全細胞濃度 X_t ($\text{cells} \cdot \text{L}^{-1}$)、生細胞濃度 X_v ($\text{cells} \cdot \text{L}^{-1}$) およびアンモニア濃度 Amm ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) についてのそれぞれの物質収支は (1)~(3) 式で与えられる。

$$\frac{dX_t}{dt} = \mu X_v \quad (1)$$

$$\frac{dX_v}{dt} = (\mu - K_d)X_v \quad (2)$$

$$-\frac{dA_{mm}}{dt} = \nu_{Amm}X_v \quad (3)$$

μ , ν_{Amm} および比死滅定数 K_d (1/h) を一定として, (1) から (3) を t について積分すれば, 次のようになる。

$$\ln\left(\frac{X_t}{X_o}\right) = \mu \int_0^t \frac{X_v}{X_t} dt + \ln(X_t)_o \quad (4)$$

$$\ln(X_v) = (\mu - K_d)t + \ln(X_v)_o \quad (5)$$

$$A_{mm} = -\nu_{Amm} \int_0^t X_v dt + A_{mm}_o \quad (6)$$

注) 添字 o は初期値を示す。

これらの式の下線部をプロットすることによって各比速度を算出した。

構築した細胞株の薬物代謝能は下記の手法を用いて検証した。まず、P450 3A4 特異的代謝に関しては、testosterone 代謝活性 (P450 3A4 活性) を用いて測定した。これは P450 3A4 のみによって代謝されるホルモン物質 testosterone (第一化学薬品; UC-339) を基質とし、代謝物である 6 β -hydroxytestosterone (第一化学薬品; UC-282) を HPLC で測定することにより薬物代謝活性 (P450 3A4 活性) を評価する手法である(下図)。

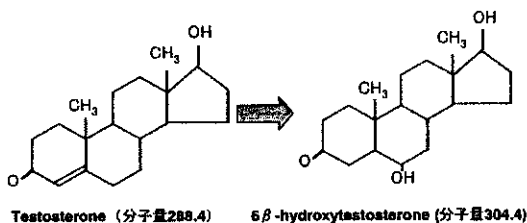
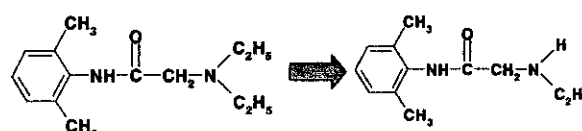


図 Testosterone代謝

複数の薬物代謝酵素によって非特異的に

代謝される lidocaine (Wako; 120-02691) の代謝活性については、主な代謝物である monoethylglycylxyloside (MEGX)を HPLC で測定することにより薬物代謝活性を評価した。Lidocaine はバイオ人工肝の薬物代謝能を評価する際に汎用されており、肝不全時の臨床指標としても用いられている。



Lidocaine (分子量234.3) Monoethylglycylxyloside (MEGX) (分子量206.3)

図 Lidocaine代謝

薬物代謝活性は、一般的にタンパク量当り、時間当りの代謝物量または基質減少量で表される。そこで活性測定のための培養後、細胞を超音波破碎し、総タンパク量を BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce ; 23225) を用いて測定した。培養液から細胞を遠心分離後、5 sec 超音波処理, 1min 氷冷, を4回繰り返し細胞を破碎した。破碎した上清を用いて BCA アッセイを行った。

(倫理面への配慮)

ここで用いた研究手法は、すでに既知(公表済)の細胞株および遺伝子を用いており、特に倫理面への配慮は必要としない。

C.研究結果

薬物代謝能向上細胞の構築を目指して、グルタミン合成酵素遺伝子と薬物代謝酵素遺伝子ヒト CYP3A4 遺伝子を含むベクタ

一を構築し、これを用いて、肝由来の HepG2 細胞株を形質転換し、細胞株を構築した。構築した細胞株の testosterone 6 β -hydroxylation 活性を測定した結果、430 pmol min⁻¹ mg-protein⁻¹ となり、ヒト初代肝と同等の活性を持たせることが可能であった。さらに、構築した細胞株は長期間(80日間)継代培養後にも 426 pmol min⁻¹ mg-protein⁻¹ と高い活性レベルを維持していた。

次に、構築した細胞株のアンモニア代謝活性を測定した。初発アンモニア濃度 1mM で 120 時間ほど回分培養を行い、細胞によるアンモニア代謝について検討した。なお、アンモニア代謝能の算出にあたっては、前述計算方法に加えて、培地の自然分解によるアンモニア算出、培地サンプリングによる培養液量減少の両効果を考慮に入れて算出した。その結果、構築した GS-3A4-HepG2 細胞のアンモニア代謝能力は増殖期間にある 50~90 時間において、0.051 [$\times 10^{-13}$ mol · cell⁻¹ · h⁻¹] と算出された。

次に、GS-3A4-HepG2 細胞の testosterone 代謝についてさらに詳しく検討するために、様々な testosterone 濃度下における testosterone 6 β -hydroxylation 活性を測定した。用いた testosterone 濃度は、25, 50, 100, 200, 400 μ M である。代謝活性測定結果を下記の表に示す。なお、代謝活性は細胞蛋白質あたりで評価している。

表 GS-3A4-HepG2 の testosterone 6 β -hydroxylation 活性

基質濃度 (μ M)	P450 3A4 活性 (pmol · min ⁻¹ · mg-protein ⁻¹)
400	881 / 873
200	874
100	830 / 678
50	520 / 483
25	350 / 330

同様に、GS-3A4-HepG2 細胞の lidocaine 代謝活性について、生産物である MEGX 生成によって評価した。用いた lidocaine 濃度は、460-7000 μ M の範囲の濃度である。代謝活性測定結果を下記の表に示す。なお、これも同様に代謝活性は細胞蛋白質あたりで評価している。

表 GS-3A4-HepG2 の MEGX 生成活性

基質濃度 (μ M)	P450 3A4 活性 (pmol · min ⁻¹ · mg-protein ⁻¹)
7000	2000
4100	1900
3900	2600
1600	1400 / 1500
1000	860
580	470
520	480
480	490
460	370

D. 考察

以前に、GS 遺伝子を HepG2 細胞に導入し GS 遺伝子の増幅現象 (GS 阻害剤の MSX (Methionine sulfoximine) を添加することにより GS 遺伝子が増幅する。) を利用することにより構築した GS- HepG2 (MSX 300 μ M 耐性) 細胞を肝不全ブタモデルに適用した際、延命効果が確認された。今回構築した GS-3A4-HepG2 細胞のアンモニア比消費速度は、この GS- HepG2 (MSX 300 μ M 耐性) 細胞の 22% 程度であった。

得られた testosterone 6 β -hydroxylation 活性の測定結果に基づいて、Lineweaver-Burk plot を構築し、細胞あたりの K_m 値および V_m 値を算出した。Lineweaver-Burk plot の結果を下記に示す。

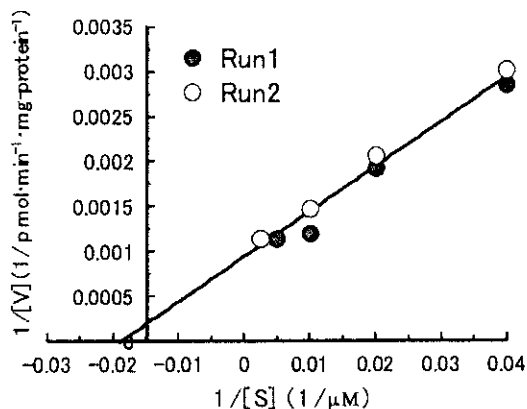


図 GS-3A4-HepG2 細胞の testosterone 6 β -hydroxylation における Lineweaver-Burk plot

本結果に基づいて算出した K_m 値および V_m 値を下記の表に比較して示す。表に示される様に、ヒト初代肝に比較して K_m 値および V_m 値はそれぞれ 1/4、2 倍となった。すなわち、構築した細胞株は、ヒト初代肝に比較して、より低濃度で高活性に薬物代謝を行うことが可能な細胞であった。

表 testosterone 6 β -hydroxylation 活性の比較

	K_m [μM]	V_m [$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg-protein}^{-1}$]	P450 活性 [$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg-protein}^{-1}$] (S= 100 μM)
GS-3A4	55 \pm 16	1100 \pm	694
-HepG2		170	
HepG2	-	-	0.6
ヒト初代肝*	206	611	200

* Sy et al., Eur. J. Clin. Pharm.58: 357(2002)

次に、得られた MEGX 生成活性について

も同様に、Lineweaver-Burk plot を構築し、細胞あたりの K_m 値および V_m 値を算出した。Lineweaver-Burk plot の結果を下記に示す。

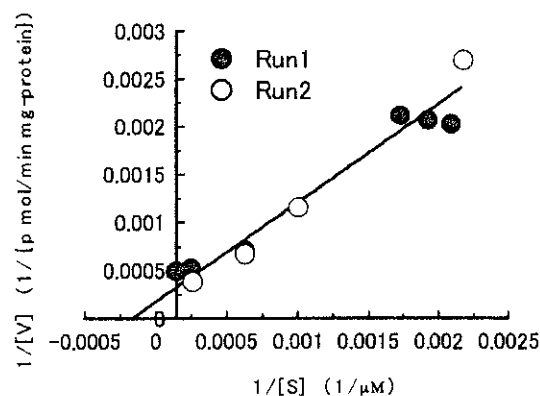


図 GS-3A4-HepG2 細胞の MEGX 生成活性における Lineweaver-Burk plot

表 MEGX 生成活性の比較

	K_m [μM]	V_m [$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg-protein}^{-1}$]	P450 活性 [$\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg-protein}^{-1}$] (S= 100 μM)
GS-3A4	6000 \pm	5700 \pm	81
-HepG2	3400	3200	
HepG2	-	-	<0.1
ヒト初代肝*	65	1470	890

** (Hoener et al, Biopharm. Drug Disposition 15: 295 (1994))

GS-3A4-HepG2 細胞は、ヒト初代肝細胞と比較して V_m 値が高いが K_m 値も高いため、同じ基質濃度 100 μM で比較した場合、ヒト初代肝細胞の 1/10 程度の P450 3A4 活性となる。ヒト初代肝細胞の 3 倍程度の活性 (100 μM) を示した testosterone 代謝活性測定結果とは異なり、ヒト初代肝により低い値となっている。これについてはいくつか理由が考えられるが、先に基質として用いた testosterone は P450 3A4 によって特異的に代謝されるが、lidocaine は P450 1A2 など複数の薬物代謝酵素によって代謝されるためと考えられる。

E. 結論

グルタミン合成酵素と CYP3A4 遺伝子を組み込んだ肝由来 HepG2 細胞を構築することができた。本細胞は、アンモニア代謝能として $0.051 [\times 10^{-13} \text{ mol} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$ の値を示した。さらに、構築した細胞の薬物代謝能について詳細に解析した結果、導入した P450 3A4 特異的代謝に関しては、ヒト初代肝以上の活性を持つ細胞を構築できた。ヒト初代肝細胞は単離後急激に活性が低下してゆくということを考慮に入れると、活性を長期に渡って安定に維持できる非常に有効な細胞であると言える。

F. 健康危険情報

該当する情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takeshi Omasa

“Gene amplification and its application in cell and tissue engineering” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94: 600-605 (2002)

2) Takeshi Omasa, Yi-Guang Chen, Athanassios Mantalaris, Ying-Chuech Ysai, and J.H. David Wu

“Molecular cloning and sequencing of the human heme-regulated eukaryotic initiation factor-2 alpha (eIF-2 alpha) kinase from bone marrow culture.” *DNA Sequence* 13:133-137 (2002)

3) 大政健史、絵野沢伸

“ストレスバイオテクノロジーは人工臓器に応用可能か バイオ人工肝/腎をめぐる

最近の動向と将来” *ケミカルエンジニアリング* 47: 766-770 (2002)

2. 学会発表

1) 金和美、平松慎也、大政健史、片倉啓雄、岸本通雅、高木睦、吉田敏臣、絵野沢伸

“薬物代謝細胞の構築と血液浄化システムへの応用” 日本生物工学会、平成 14 年度大会、1143、講演要旨集、p.209 10/28-30、大阪国際会議場、大阪 (2002)

2) Shin Enosawa and Takeshi Omasa

“Construction of liver model with genetically engineered human HepG2 cells” In: The fifteenth annual and international meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT '02) S1-5, abstract p.14 Nov. 11-15, 2002, Fuchu, Tokyo, Japan (2002)

3) Takeshi Omasa

“Tissue engineering and biochemical engineering in KANSAI area”

In: Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2002, To golden era of biochemical engineering PP-A2, Nov. 10-12, Taipei, Taiwan, Abstract p.39 (2002)

4) Takeshi Omasa, Kazumi Kim, Shin-ya Hiramatsu, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Ken-ichi Suga, Kiichi Fukui

“Construction and evaluation of liver functional HepG2 cell line for hybrid bioartificial liver support system” In: Engineering Foundation: Cell Culture Engineering VIII, Session Stem cells /

Cell Therapies / Tissue Engineering, No. I-7, April 1-6, 2002, Snowmass village, Colorado, USA (2002)

5) Takeshi Omasa, Kazumi Kim, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Mutsumi Takagi, Yoshiomi Yoshida, and Shin Enosawa

“Evaluation and design for bio-artificial liver support system using drug-metabolizing HepG2 cell line” In the 5th International meeting of Tissue Engineering Society international (TESi) PP-155

Dec. 8-10, Kobe Hyogo JAPAN

Tissue Engineering, vol.8, No.6, p.1229 (2002)

6) Takeshi Omasa, Kazumi Kim, Shin-ya Hiramatsu, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Ken-ichi Suga, Kiichi Fukui

“Construction and evaluation of liver functional HepG2 cell line for hybrid bioartificial liver support system”

In The 6th AEARU (Association of East Asia Research Universities) workshop “Molecular Biology and Biotechnology” P20

Nov.21-22, Suita, Osaka Japan abstract book p.42 (2002)

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし

III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究

薬物トランスポーター機能発現環境の最適化

分担研究者 藤村昭夫 自治医科大学臨床薬理学教室 教授

研究要旨：ナノテクノロジーを応用した非細胞性代謝機能代替デバイスとしての、新しいタイプの人工肝臓作成に向けて、抱合型ビリルビンを効率よく輸送する新規膜蛋白 ABCA8 をクローニングし、その機能解析を行った。この蛋白は、肝、腎などの臓器に多く分布し、急性高ビリルビン血症モデルマウスにおいて、肝におけるその発現が急激に増加した。よって、この蛋白は病態生理学的にも高ビリルビン血症時のビリルビン排泄蛋白として重要であることが判明した。今後は、非細胞性代謝機能代替デバイスへのこの蛋白の導入が急務である。

A. 研究目的

今までに様々なタイプの肝不全治療のための人工肝臓が考案されている。これらの一部は既に臨床応用され始めており、肝不全患者の救命に貢献しつつある。しかし、これらの人工臓器には抱合型ビリルビンの除去が困難であるという共通した欠点があり、このため人工肝臓を長期間使用することができなかった。一方近年の分子生物学の進歩により、ビリルビンを含めた、様々な薬物の体内からの排泄機序が明らかとなりつつある。そこで、本研究ではナノテクノロジーを応用した非細胞性代謝機能代替デバイスとしての新しいタイプの人工肝臓作成に向けて、抱合型ビリルビンを効率よく輸送する新規膜蛋白 ABCA8 をクローニングした。そしてさらに、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、

その機能解析を行った。また、この膜蛋白の生理的意義を明らかにするために、マウスにおける遺伝子もクローニングし、病態動物マウスモデルにおける遺伝子発現の変化の様子を検討した。

B. 研究方法

ATP 結合ドメインを持った膜蛋白に共通する塩基配列を手がかりに、今までに報告のない遺伝子の部分塩基配列を見つけ、さらにそのヒト・マウスのライブラリーから完全長 cDNA をクローニングした。この遺伝子の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、48 時間後にラジオアイソトープをラベルした、基質となりうる様々な物質の輸送能を評価した。更に輸送基質に対する K_m , V_{max} など基本的パラメータを求めた。また、ヒトにおける mRNA の臓器分

布について、ノーザンプロット法を用いて検討した。

さらに、病態生理学的意義を明らかにするために、マウス遺伝子をクローニングし直した。その上で、基質の一つである抱合型ビリルビンおよびジゴキシンを急性に負荷し、正常時において遺伝子発現の多かった肝、腎、心に対して、その mRNA 発現変化を、ノーザンプロット法を用いて、経時的に検討した。

C. 研究結果

ATP 結合カセットをもった新規膜蛋白 ABCA8 をクローニングし、その塩基数はヒト・マウスとも約 6000bp であった。多くの ATP 結合部位を持った膜蛋白と同様に 2 組の ATP 結合部位があると推定された。ヒトとマウスを比較してみると、アミノ酸レベルでの相同性は約 97% であった。基質としては、estradiol-glucuronide をはじめとするグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体およびジゴキシンが判明した (図 1)。

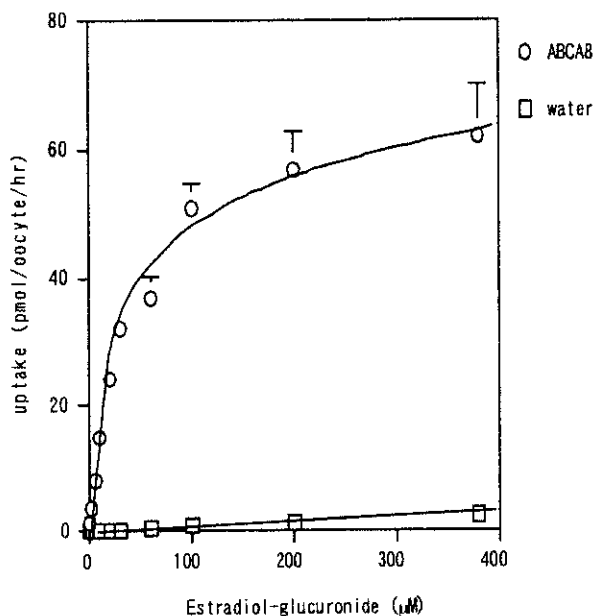


図 1. Oocyte における Estradiol-glucuronide 輸送能

また、各種薬物による輸送阻害効果を検討したが、それは既報の有機アニオン輸送体、殊に胆管に存在する抱合型ビリルビン輸送体 ABCC2 に対する阻害効果と近似していた (図 2)。

表 各種基質に対する Km, Vmax 値

Substrates	Km	Vmax
LTC4	0.1 μM	61 fmol/egg/h
Taurocholate	10.3 μM	11.0 fmol/egg/h
PAH	5.0 μM	79 fmol/egg/h
Estrone sulfate	0.5 μM	1.7 pmol/egg/h
Ochratoxin A	0.4 μM	2.1 pmol/egg/h

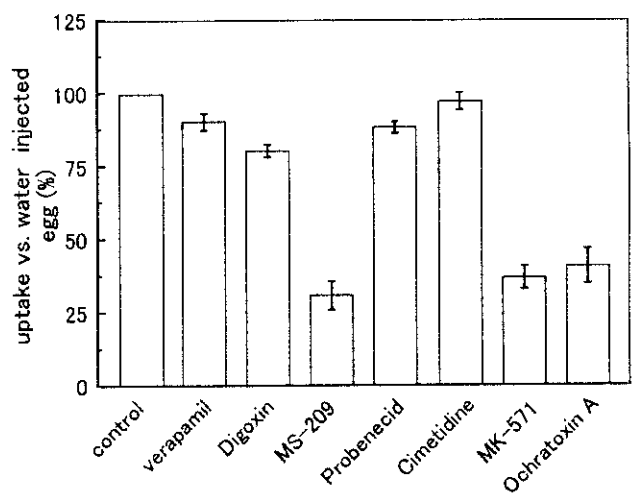


図 2. Estradiol-glucuronide 輸送阻害に対する各種薬物の効果

また、グルクロン酸抱合体の一つである、抱合型ビリルビンを添加すると estradiol-glucuronide の取り込み能は用量依存的に抑制されることから、抱合型ビリルビンもその基質であることが示唆された (図 3)。

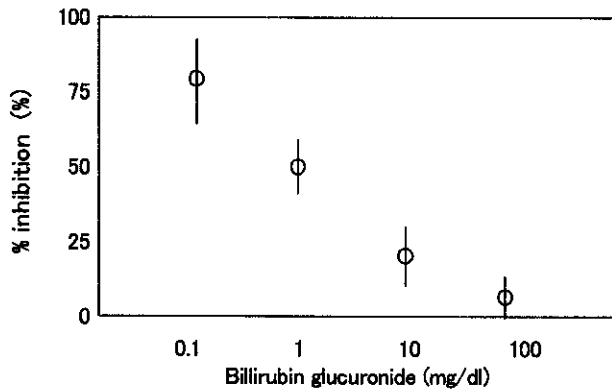


図3. Estradiol-glucuronide 輸送に対する抱合型ビリルビンの影響

次にヒト各種臓器における mRNA 分布をノーザンブロットにより検討した。それによると、この遺伝子は広い臓器分布を示したが、特に肝、腎、心、性腺に豊富であった (図4)。

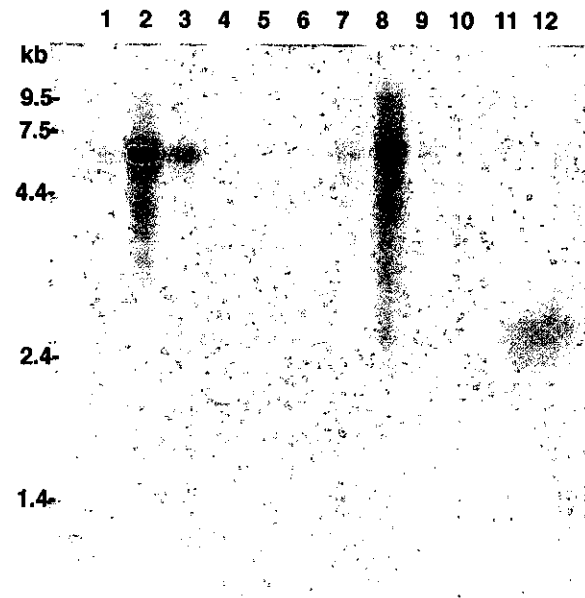


図4. ヒト臓器での mRNA 発現分布

1, brain; 2, heart; 3, skeletal muscle; 4, colon; 5, thymus; 6, spleen; 7, kidney; 8, liver; 9, small intestine; 10, placenta; 11, lung; 12, peripheral blood leukocytes.

次にこの遺伝子の病態生理学的意義を検討すべく、マウスにジゴキシンを急性負荷した。これによると、薬物負荷後 6-12 時間をピークに肝、腎での ABCA8 mRNA 発現量が一過性に増加した。しかし、心においてはあまり変化がなかった。また、抱合型ビリルビンを急性に負荷すると、肝での mRNA 発現量が 6 時間をピークに増加したが、心、腎での発現には有意な変化はなかった (図4)。

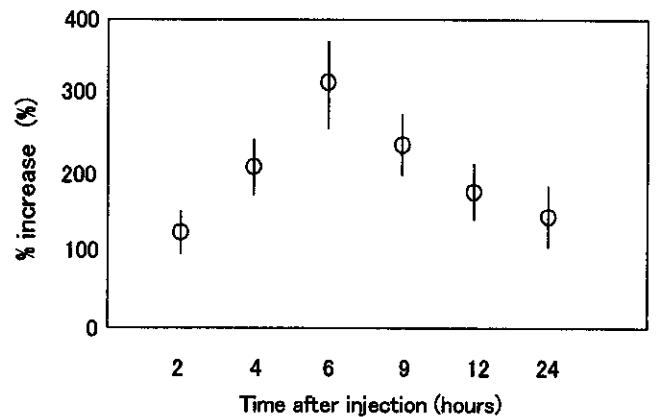


図4. マウス急性ジゴキシシン負荷モデルの腎における ABCA8 mRNA 発現変化の推移

D. 考察

以上示したように、我々は抱合型ビリルビンを輸送する新しい蛋白 ABCA8 をクローニングした。アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた機能解析によると、この蛋白は、肝以外にも局在するにもかかわらず、胆管細胞にある既存の抱合型ビリルビン輸送蛋白 ABCC2 とほぼ同等の K_m 、 V_{max} 値を示した。また、各種阻害薬による輸送阻害効果も ABCC2 のものとほぼ同様の傾向を示した。

一方、急性のビリルビン負荷時には、比較的短時間で mRNA 発現増加を示したことより、この蛋白は正常時だけでなく、閉塞性黄