

β 2-M を除去する目的でハイパフォーマンス透析や透析液の工夫などがなされているが、その効果は十分ではない。そこで本研究の目的の一つに β 2-M- Megalin 系も加え、生体タンパクのアフィニティーを利用した非細胞性代替デバイスを構築したいと考えている。

この研究における一つの障害は β 2-M も Megalin も人工臓器研究に必要な量を得ることが難しい点である。そこで、両者のリコンビナントタンパクの作成に着手した。まずは基礎実験の行いやすいラットに由来する両タンパク質の発現系を試みた。Glutathione-S- transferase (GST) gene fusion system を用いた。tac プロモーター、アンピシリン耐性遺伝子および GST を含んだ環状プラスミド pGEX-6P-1 (4.9kb) の tac プロモーターの下流に、ラット β 2-M アミノ酸をコードする DNA を組み込むことにより大量発現系を作製した。培地中に Isopropyl-1-thio-beta-D-galactoside (IPTG) を加えることにより、tac プロモーターを負に制御している lac リプレッサーが外れ、そこに RNA ポリメラーゼが結合し、tac プロモーターはその下流に位置する β 2-M 遺伝子の発現を強く活性化し、タンパク質を大量産生した。また、このプラスミドはアンピシリン耐性遺伝子を含んでいるため、アンピシリンを含む培地中ではこのプラスミドが組み込まれた菌体だけを選択的に培養できた。また、GST 融合タンパク質は、グルタチオンをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより細胞破碎液から精製することができる。GST-

β 2-M 融合タンパク質はこのアフィニティー担体に結合し、不純物は洗浄によって担体から除去され、結合した GST- β 2-M 融合タンパク質は、変性剤を使わない穏和な条件下で還元型グルタチオンを用いて溶出された。プロテアーゼの認識配列が pGEX ベクターのマルチクロニングサイトの上流側に組み込まれているため、切断部位特異的なプロテアーゼを用いて GST から β 2-M タンパク質を切り出す条件を検討している。現在すでにある程度の産物は得ているが、まだ融合タンパクに比べ β 2-M 本体の量が少ない。もともと β 2-M はアミロイド化しやすいことでもわかるように取り扱いの途中で変性し、酵素による切断部位が変化してしまっている可能性が考えられ、現在、精製から切断までの条件を種々検討している。

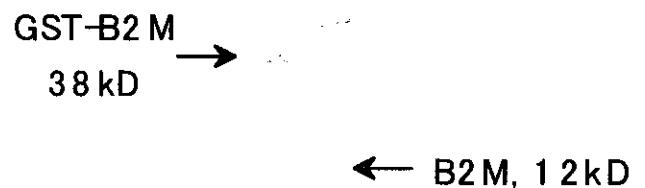


図6 リコンビナント β 2-M のゲル電気泳動像

一方、膜結合タンパクである Megalin は大腸菌での大量発現は困難である。そこで、バキュロウイルスを用いたタンパク質発現系の構築を試みた。バキュロウイルスのポリヘドリン遺伝子は、感染の後期に非常に高い発現を示すが、培養細胞の系では、

ウイルスの増殖には必須ではない。このために、この遺伝子のプロモーターの下流に他の遺伝子を挿入して、他のタンパク質を大量に発現させることができる。バキュロウイルスを使ったタンパク質発現は、トランスファーベクターへのサブクロニング、組換え体ウイルスの産生、タンパク質の発現、の3つのステップに分けられる。現在、トランスファーベクター pBlueBacHis2 に Megalin の cluster II 領域のアミノ酸をコードする DNA を組み込んだ。制限酵素切断によってトランスファーベクタープラスミドに Megalin 配列があることを確認した。今後、この Megalin 配列を含むトランスファーベクタープラスミドを用いて組換え体ウイルスを産生し、plaque assay で確認した後、大量増幅し、タンパク質を発現する予定である。

D. 考 察

リポソームは脂質 2 分子膜からなる閉鎖小胞体で、脂質の 2 分子膜構造をとっているといわれる天然の生体膜と類似の構造をとっている。細胞膜との高い親和性を有することからドラッグキャリアとしての高い能力が期待されてきた。近年、Drug delivery system を目指したリポソーム製剤の開発が、医薬品分野だけでなく、化粧品分野においても進められ、種々の製法が開発されている。例えば、一般的なりポソームの製造方法として(1)脂質を適当な有機溶媒(たとえば、クロロホルム、エーテル等)に溶解させ、減圧下にこれらの溶媒を留去し、一旦脂質薄膜を形成させ

た後、この脂質薄膜を機械的攪拌手段により水に水和(または膨潤)させる方法(2)脂質をエーテルあるいはエタノール等の有機溶媒に溶解させ、この溶液を高温に暖めた水中にシリンジあるいはノズル等より、加圧下、一定速度で注入し、注入とともに有機溶媒が留去あるいは希釈されることにより脂質が二重層を形成し、リポソームが調製される方法、(3)脂質をコール酸あるいはデオキシコール酸などの界面活性剤とともに水溶液中で混合ミセルを形成させ、該ミセル溶液を透析あるいはゲル濾過等の操作によりコール酸あるいはデオキシコール酸などの界面活性剤を除去し、リポソームを調製する方法、(4)脂質を溶解した有機溶媒を水相に加え、超音波処理し、一旦W/O型エマルジョンを形成し、ついで有機溶媒を除去することによりゲル化させ、このゲルを機械的攪拌により転相させリポソームを調製する方法等が挙げられる。これらは有機溶媒を用いるものと界面活性剤を用いるものに大別される。前者は工業生産には向くが有機溶媒の残留の問題が回避できず、医療への利用にはあまり適さないとされる。今回我々が開発した方法は有機溶媒を使わずに、脂質を界面活性剤の作用によって水性媒体中に溶解させたリポソーム形成用組成物を調製し、これを中空子透析カラムを用いて透析することにより、粒子径が小さく、均質なりポソームを極めて効率的かつ簡便に調製できる、というものである。

今までに、中空糸を用いたものがなかったわけではなく、Rhoden らはホスファチ

ジルコリンとコール酸とを用いて混合液とし、中空糸型透析器によりこの混合液からコール酸を除去し、リポソームを調製したと報告している (Rhoden V, Goldin SM. Formation of unilamellar lipid vesicles of controllable dimensions by detergent dialysis. American Chemical Society, USA, 18(19); 4173-6, 1979)。しかしながら、彼らの場合は通常の透析膜の代わりに限外膜の細管を用いたままであり、我々が開発したように連続的な大量調製を目的としたものではない。

我々のデバイス開発において、特にリポソーム調製の「連続性」という点が重要であると考えている。これは、界面活性剤を利用した他の系、例えばゲル濾過法や透析チューブ利用のバッチ法では達成しえない利点である。我々が計画しているデバイス構造としては図7に示すように、当初計画しているのは透析外液中に機能性プロテオリポソームを加えることによって限外膜を介して拡散しただけの血中低分子の中で標的とする毒性物質をリポソーム中に封じ込めて除去しようというものである。もちろん、透析外液を廃棄してもいいが、コスト的には再利用の方が望ましいと考えている。従って、透析カラム側に連続して、リポソームの分解-低分子毒性物質の除去-リポソームの再構築という経路を構築することを考えている。今回開発したリポソーム作成系はこの最終段階のリポソーム再構築に適すると考えられる。

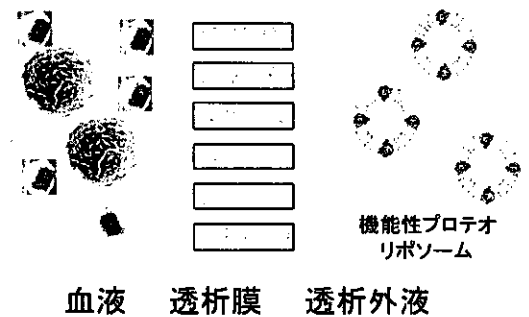


図7 現在目標としているナノ代謝代替デバイスの概念図。通常の透析外液側も機能性プロテオリポソームを存在させることにより能動的選択的低分子異物除去を目指す。

上述したように、再利用系では、リポソーム再構築の前にリポソームの分解と低分子毒性物質の除去が必要である。また、さらに細かく述べるとまず使用後リポソームの分離が必要である。この点についてもリポソームの性質を利用した分離方法を現在検討している。

このような仲介担体を利用した透析システムとしては既に臨床に用いられているMALS (Molecular absorbent recycling system) がある (Stange J, Mitzner SR, Risler T, et al. Molecular absorbent recycling system (MALS): Clinical results of a new membrane-based blood purification system for bioartificial liver support. Artif Organs 23(4); 319-330, 1999)。MALSは担体としてアルブミンを利用し、肝不全患者血中の脂溶性物質を除去している。透析液内にアルブミンが含まれ、脂溶性物質と結合したアルブミンが対側のカラムシステムによって再び脂溶性物質を遊離して再利用されるというものである。我々の系とよく似たものであるが、いくつかの点で異なっている。

まず開発過程であるが、我々は細胞を利用したバイオ人工肝から不要な部分を極限状態にまで削除しようという発想から出発している。また、効果としてもトランスポーターなどを用

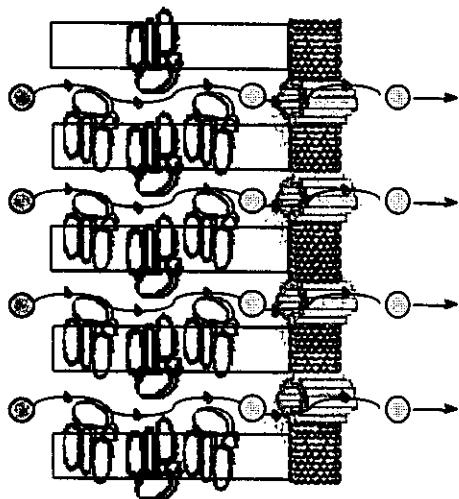


図8 ハイブリッド機能性膜利用ナノ代謝デバイス

いることによりピンポイント的な毒性物質除去をねらっている。さらに、先に挙げたりポソーム含有透析外液のシステム(図7)は過渡的と考え、将来的には図8に示すように生体高分子を融合させた機能性膜の構築をめざしている。

MDR1を組み込んだプロテオリポソームでは、ATP水解能から見て80%以上が内向きに配位していることがわかった。生理的にはこれらのトランスポーターは細胞内からの低分子異物の排出を行っているため外向きに配位している。今回定量的に示されたように人工的に脂質小胞に埋め込んだ場合、ほぼすべての分子が内向きに配位したのは偶然ではなく、おそらく

MDR1の分子構造によると考えられる。すなわちMDR1は比較的大きな細胞内ドメインを有していることから、人工的な再構成では、その大きな親水性ドメインが内側には配位しにくいと考えられる。このことは放射性Digoxinの取り込みによっても確認されている。

今後解決すべき問題は、リポソームリサイクル系で記したものの他、トランスポーターや酵素を駆動するためのエネルギー供給である。トランスポーターの場合、ATPがそのエネルギー源である。ATPは医薬品として使われ、化学的に安定、かつ安価であることから、透析外液中に存在させてトランスポーター活性を維持することが可能と考えている。一方、本研究のもう一つの目的となっている代謝機能を担う薬物代謝酵素チトクロムP450の場合はNADPHを供与体とする電子伝達系である。NADPHは科学的に不安定かつ高価であるため、固定化するなどして分子レベルのリサイクルが必要と考えられる。

最後に研究分担者相互の関係についても俯瞰してみたい。基本的には昨年度に続き本年度も研究班として融合的な進展が達成できたと考えている。その最も顕著な成果として、絵野沢分担責任者と久保井分担者のグループが協力して開発した透析カラム利用リポソーム作成法の特許出願がある。久保井グループはかねてよりリポソーム領域で先進的な業績を挙げてきた。一方、絵野沢は臨床をめざした場合のデバイス構造や構成材料の必要量についての経験を持っていた。そこで両者の知見を合

わせた結果、特許出願に至ったものである。また、ここから派生し三枝分担者が新しい固定法によるリポソームの透過電子顕微鏡撮影に成功し、従来の方法と新しい方法で作られたリポソームの構造の差違を視覚化することができた。プロテオリポソーム開発では、植田分担者が確立した MDR1 タンパクの大量発現系を絵野沢分担責任者が導入し、相互に協力して同タンパクの安定供給ができるようになった。また、精製 MDR1 タンパクを久保井分担者がプロテオリポソーム化し、久保井、絵野沢両グループでその評価を行うという班研究ならではの協調体制ができている。その他、大政分担者、藤村分担者、植田分担者は、本研究班の基本構想である非細胞性代謝代替デバイスの次の切り札となる薬物代謝酵素、抱合型ピリルピントランスポーター、トランスポーター機能発現の分子機構についての研究を鋭意行っている。次年度は本年度の成果を発展させるとともに、これら基礎検討が応用へ向かって進み出せるようさらに一層の連携を構築して往きたい。

E. 結 論

分画分子量に依存した限外膜利用の血液浄化法に替わり細胞が有する能動性や選択性を人工細胞として構築した新しい形態のハイブリッド人工肝を検討している。まず、臨床的な透析治療に利用可能な量と再利用可能な形態を兼ね備えた中空糸カラム利用リポソーム製造法を開発した。本法によると界面活性剤とリン脂質で

調製した混合ミセルから既存の方法と同様な 100~200 nm 径のリポソームが簡易にまた連続的に作成できた。また本構想における機能単位の基本構造のひとつとしてリポソームに ABC トランスポータータンパクである MDR1 を組み込んだプロテオリポソームを構築し、その生物学的効果を評価した。MDR1 の配向性は ATP 水解能で調べると 80%以上が生理的状态とは反対に内向きに配位していることが確認された。さらに MDR1 の代表的基質である放射性ジゴキシンは ATP 依存的にリポソーム内に取り込まれた。以上より生理的にはトランスポーターは細胞内から低分子異物を排除するものであるが、今回人工的に構築したプロテオリポソームでは内側への取り込みが可能であることがわかり、毒性物質の選択的除去を行うハイブリッド素材として応用可能であると考えられた。また、生理学的アフィニティーを利用した系として megalin による β 2-M 除去システムの構築に向けた両タンパクのリコンビナント生産系の確立を行った。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyashita T, Enosawa S, Tanaka H, Tamura A, Amemiya H, Aoki T, Koyanagi Y, Suzuki S. Standardization of ischemic hepatic failure in pigs as a model for bioartificial liver

assessment. Surg Today 33(10):743-50, 2003

2) Haga S, Terui K, Zhang HQ, Enosawa S, Ogawa W, Inoue H, Okuyama T, Takeda K, Akira S, Ogino T, Irani K, Ozaki M. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. J Clin Invest 112: 989-998, 2003

3) 絵野沢 伸. 肝臓の中に腎臓を作る-透析アミロイドーシス克服に向けた再生医療からのアプローチ-. 腎と透析. 55(4): 631-635. 2003

4) 若林 恵、絵野沢 伸. 小児腎の生理学的特徴と移植医療におけるドナーソースとしての可能性. Organ Biol 10(3): 189-198, 2003

5) 絵野沢 伸. 血液浄化法におけるバイオの力の応用可能性-OFF-LINE 人工肝による自己肝再生促進-ICU と CCU 27; S9-10, 2003

6) 尾崎倫孝、絵野沢 伸、鈴木盛一. 肝臓を対象とした再生医療. 日本臨床 3 月号特集「再生医療」 61(3): 498-503, 2003

2. 学会発表

1) Omasa T, Kawase M, Enosawa S. Reactor evaluation for bioartificial support system -BAL clearance and AHP analysis-. In, Cell culture engineering IX, Session Tissue engineering, P.I.D.5, Cancun, Mexico (2004)

2) Omasa T, Enosawa S. Artificial mimicking of human drug metabolism for a bio-hemofiltration system. In, Engineering Conference International: Biochemical Engineering XIII (2003), Session Tissue

engineering, No.II-4-1, Boulder, Colorado, USA

3) Omasa T, Enosawa S. Reconstruction of human-drug metabolism by co-culture of recombinant HepG2 cells. In; Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC) 2003, Biochemical Engineering Toward Global Biosociety, PP-D11, Jeju Island, Korea

4) Omasa T, Kim K, Katakura Y, Kishimoto M, Takagi M, Yoshida T, Enosawa S. Engineering design for bioartificial liver support system. In the Engineering Tissue Growth 2003 (ETG2003), Pittsburgh, USA

5) 絵野沢 伸. 長期透析症候群への新たな治療戦略-肝内尿細管組織再生への実験的検討-. シンポジウム 3. 再生医療と透析医療の接点をさぐる. 第 48 回日本透析医学会学術集会 平成 15 年 6 月 20-22 日、大阪国際会議場、大阪

6) 橋本忠明、門脇洋平、金和美、片倉啓雄、岸本通雅、菅健一、高木睦、吉田敏臣、塩谷捨明、絵野沢 伸、大政健史. 肝由来細胞株共培養による薬物代謝システムの構築. 日本生物工学会、平成 15 年度大会 2C16-1

7) 橋本忠明、大西真亮、門脇洋平、金和美、片倉啓雄、岸本通雅、菅健一、高木睦、吉田敏臣、塩谷捨明、絵野沢 伸、大政健史. 肝薬物代謝システム再構築を目指した肝由来細胞共培養系の開発. 2003 年度日本動物細胞工学会大会(JAACT2003)、Po-4 (ポスターセッション表彰 応用基礎部門第三位)

8) 大政健史、金 和美、門脇洋平、片倉啓雄、高木 睦、吉田俊臣、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。第10回HAB研究機構学術年会、O-4、2003年

9) 大政健史、金 和美、門脇洋平、片倉啓雄、岸本通雅、高木 睦、吉田敏臣、絵野沢 伸。代謝系臓器再構築にかかる工学的設計基準。シンポジウム4)再生医療のためのセルプロセッシング工学。第2回日本再生医療学会(神戸)平成15年3月11-12日

10) 門脇洋平、金 和美、大政健史、片倉啓雄、岸本通雅、中嶋幹男、高木 睦、吉田敏臣、絵野沢 伸。共培養系を用いた肝薬物代謝システム再構築の試み。第2回日本再生医療学会(神戸)平成15年3月11-12日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 絵野沢 伸、林 美都子、島内寿徳、久保井亮一。中空糸透析カラムを利用したりポソームの製造方法。特願 2004-033439
平成16年2月10日出願

厚生労働省科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
平成15年度分担研究報告書

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発
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
機能性プロテオリポソームの開発

分担研究者 久保井 亮一（大阪大学基礎工学研究科 教授）

研究要旨：

誘電分散解析法により膜タンパク質を可溶化する界面活性剤の選択指標を選定することができた。例えば、 Na^+/K^+ -ATPase の場合、非イオン性界面活性剤で可溶化すると、最も活性残存率が高かった。逆に、イオン性界面活性剤で可溶化した場合、正、負いずれの電荷を有する場合でも Na^+/K^+ -ATPase 活性の低下が確認された。同じ ATPase 活性を有する MDR1 の可溶化の問題にも適用可能であり、非イオン性 β -ドデシルマルトシドで可溶化することで活性を保持できた。膜タンパク質可溶化ミセルをリポソームと混合・透析する過程を誘電分散解析法でモニタリングすると、混合ミセルからリポソームに変化する過程が観察でき、誘電分散解析法の有効性が示された。透析温度を高く設定すると最終 ATPase 活性は低下したが、透析時間は短縮できた。さらに、薬物輸送膜タンパク質 MDR1 (ATPase 活性あり) を組み込んだプロテオリポソームにおいて、薬物結合部位が内側に向いており、毒物除去のためのプロテオリポソームとして利用可能であることが示唆された。

A. 研究目的

A-1. 背景

肝・腎不全や敗血症、薬物中毒症の治療において透析・濾過と輸液・血漿輸血を組み合わせた血液浄化治療により死亡率を低下させることができた。しかし、長期透析治療による弊害も指摘されており、新鮮血漿の大量消費や血漿性ウイルス感染、ならびに透析アミロイドーシスは克服すべき課題として残っている。一つの模索として、細胞を利用したバイオ人工肝の開発が行なわれているが、装置の煩雑さ、細胞性感染に関する潜在的危険性は否定できない。そこで、細胞の機能から必要なものだけを抽出、再構築した人工細胞膜(プロテオリポソーム)を構築することにより、現在の血液浄

化法の有する限界・問題点を克服できると期待される。

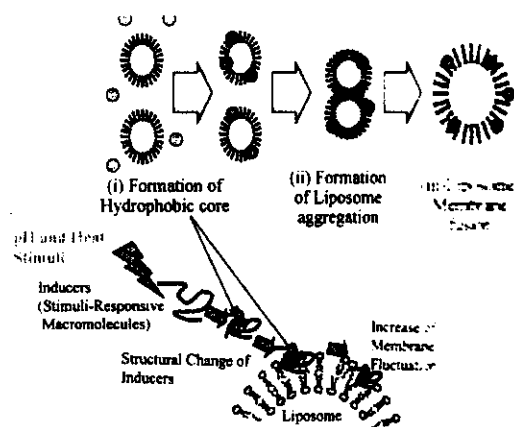


図 A-1 タンパク質・スマートポリマーの脂質膜への配向のモデル

前年度において、我々は、プロテオリポソーム調製の基礎的検討として、天然高分

子(タンパク質)や合成高分子(スマートポリマー)を用いたモデル細胞膜(リポソーム)との相互作用の解析に取り組んだ。ストレス条件下においてタンパク質やスマートポリマーは図 A-1 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示唆された。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ストレス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、今回は、リポソーム膜への膜タンパク質組込みにおける膜タンパク質可溶化ミセルの調製において重要な界面活性剤の選択、ならびに機能評価を行った。次に、ATPase 活性などの観点から、調製したプロテオリポソームの機能評価を行なった。

B. 研究方法

B-1. 試薬

中性リン脂質として、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC), 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC)を用いた。また、Egg phosphatidylcholine (EPC)は Avanti Polar Lipids 製を用いた。Na⁺/K⁺-ATPase は SIGMA から、その他の特級試薬は和光純薬(Osaka, Japan)から購入した。また、膜タンパク質 MDR1 は絵野沢らより提供して頂いた。

B-2. リポソームの調製

B-2-1. 一般的なリポソームの調製

リポソームは下記のプロトコールで調製した。リン脂質をクロロホルムで溶解させた溶液をナス型フラスコに入れ、エバポレータにより溶媒を留去すると脂質薄膜が得られる。これを一昼夜、デシケータにて溶媒を蒸発させる。これを適当な水溶液で水

和し、一時間振とうさせると多重層リポソーム (MLVs) が生成する。脂質の相転移温度以下の温度(ここでは-80℃, 15分)で急速に冷却すると MLVs 溶液はゲル状態で凍結される。その後、相転移温度以上(37℃, 15分)で解凍すると、冷却により崩壊した脂質膜どうしが融合してより大きな MLVs を得ることが出来る。この操作を凍結融解法と呼び、今回は5サイクル行なった。この後、50-200nm の細孔径を有するポリカーボネートフィルターで MLVs 溶液を押し出すとフィルターの細孔径に一致する均一な粒径分布を持ったリポソーム溶液を得る事ができる。この手法(extrusion法)により、今回は粒径100nmのリポソームを調製した。詳細は、既報(Yoshimoto *et al.*, 1998)を参照されたい。

B-2-2. プロテオリポソームの調製

調製法の詳細は既報記載の通りである(Chifflet *et al.*, 1988)。中性リン脂質 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC)の脂質薄膜を水和し、凍結融解法、および extrusion 法によってリポソーム(粒径100nm)を調製した。ここでは、非イオン性界面活性剤(C₁₂E₈)で可溶化した Na⁺/K⁺-ATPase 溶液と POPC リポソーム溶液を混合し、ゲルろ過でプロテオリポソームの画分を回収した。

B-2-3. プロテオリポソームの活性評価

上述のプロテオリポソームと ATP を混合し、時間ごと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。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 の質量で除した値で定義した。

B-3. 誘電分散解析

詳細は既報(Morita et al., 2003)を参考されたい。各種添加物質とリポソームとを所定の濃度比で混合した溶液を測定用セルに充填し、インピーダンスアナライザー(Agilent Technologies, 4291B)を用いて各種周波数における比誘電率を測定した。1MHz から 100MHz の範囲のものについて以下に示す Debye の式 (二段緩和)

$$\epsilon' - \epsilon_h = \frac{\Delta\epsilon_1}{1 + (f/f_{c1})^2} + \frac{\Delta\epsilon_2}{1 + (f/f_{c2})^2} \dots (1)$$

$$\epsilon'' - \epsilon_h'' = \frac{(f/f_{c1})\Delta\epsilon_1}{1 + (f/f_{c1})^2} + \frac{(f/f_{c2})\Delta\epsilon_2}{1 + (f/f_{c2})^2} \dots (2)$$

を用いてフィッティング解析を行い、緩和幅 $\Delta\epsilon_1$, $\Delta\epsilon_2$ および緩和周波数 f_{c1} , f_{c2} を求めた。

B-4 リポソームの各種特性の検討

リポソームの脂質濃度の定量は、リン脂質濃度定量キット(商標名:リン脂質テストワコーC)を用いて行なった。リポソーム粒径の確認は動的光散乱法を用いて行なった。膜流動性については、疎水性蛍光プローブ(TMA)-DPHを用い、分極率の逆数(1/P)を膜流動性と定義した。

B-5. 固定化リポソームクロマトグラフィー

1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-phosphocholine / 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℃, 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_e [ml])からの遅れ($V_r - V_e$ [ml])を固定化脂質量(M [μmol])で基準化した量($(V_r - V_e)/M$, すなわち, Capacity factor, k_f)から解析した(Beigi et al., 1995; Yoshimoto et al., 1998, Yoshimoto and Kuboi, 1999)。

C. 研究結果

図 C-1 にプロテオリポソーム調製法を示した。プロテオリポソームの調製には、(i)界面活性剤の選択、(ii)調製時間、などの種々の操作因子が関連している。そこで、各段階を詳細に検討することにした。

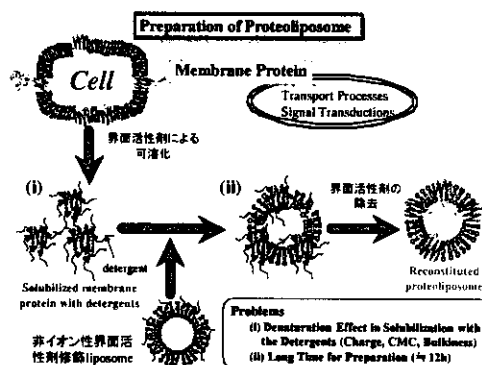


図 C-1 プロテオリポソームの調製法

C-1. 膜タンパク質可溶化界面活性剤の選択

C-1-1. 膜タンパク質可溶化ミセルの誘電分散解析

まずミセルの誘電特性を検討した。図 C-2 に CTAB(Cetyltrimethylammonium bromide)

の誘電分散スペクトルを示す。従来の報告 (Shikata and Imai, 1998) と一致しており、我々の実験値が妥当であることがわかる。

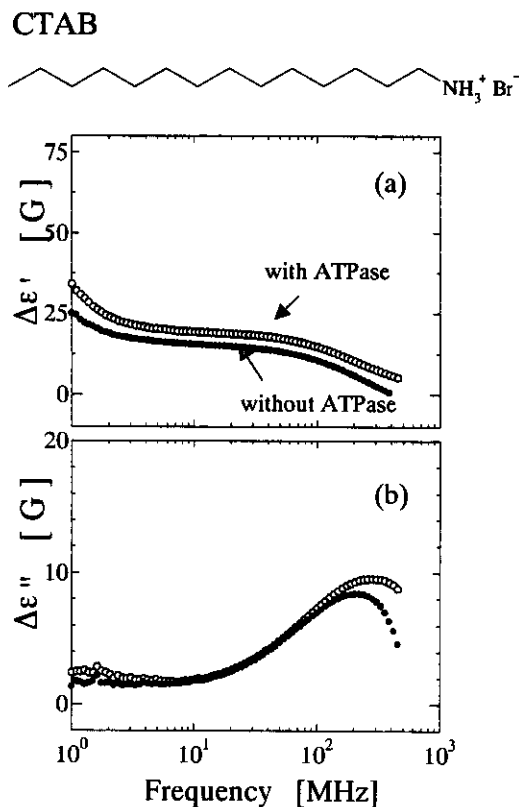


図 C-2 CTAB 及び CTAB 可溶化 Na^+/K^+ -ATPase の誘電分散スペクトル

さらに、膜タンパク質を可溶化したミセルの誘電分散スペクトルは対照系と差が見られた。したがって、本手法で膜タンパク質可溶化の効果を検討できる可能性が示唆された。そこで、式(1)、(2)を用いて、特性周波数ならびに緩和幅を算出し、その結果を図 C-3 に示した。Shikata らによれば、300MHz 付近で観察される f_{c2} は、界面活性剤分子が持つ双極子モーメントの回転ブラウン運動に対応する。図 C-3 の結果より、 f_{c2} の減少は、膜タンパク質の可溶化による界面活性剤分子の運動の抑制と考えられる。

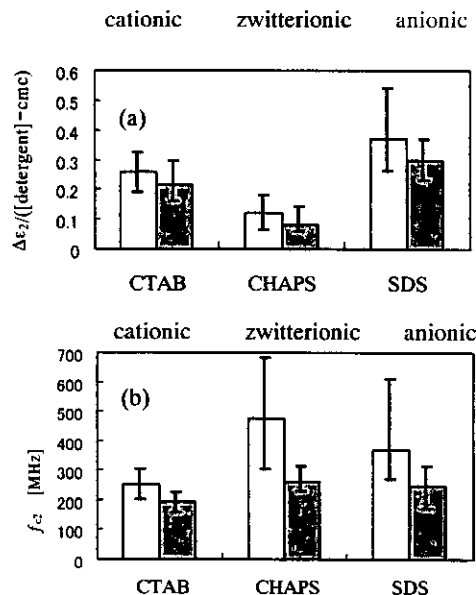


図 C-3 各種界面活性剤への膜タンパク質の可溶化による誘電パラメータに対する影響

減少幅 Δf_{c2} は zwitterionic な界面活性剤において最も大きな値を示している。これは、可溶化前のミセルが示す緩和周波数が電荷密度の影響を受け、負電荷の SDS や正電荷の CTAB の f_{c2} が比較的低い値を示すのに対して、zwitterionic な CHAPS の場合、ミセル界面での静電反発が小さいことに関連している。一方、緩和幅 $\Delta\epsilon_2$ に着目すると、可溶化前のミセルが示す $\Delta\epsilon_2$ は各界面活性剤で固有の値を示すが、膜タンパク質の可溶化により $\Delta\epsilon_2$ は一様に同程度の減少幅を示している。

C-1-2. ミセルの誘電特性に基づく活性相関

膜タンパク質の可溶化においてどのような界面活性剤を選択すべきかについては、可溶化後の膜タンパク質の活性残存率を指標にすべきである。そこで、選択すべき界面活性剤が形成するミセルの緩和幅と可溶化後の ATPase 活性を比較した。

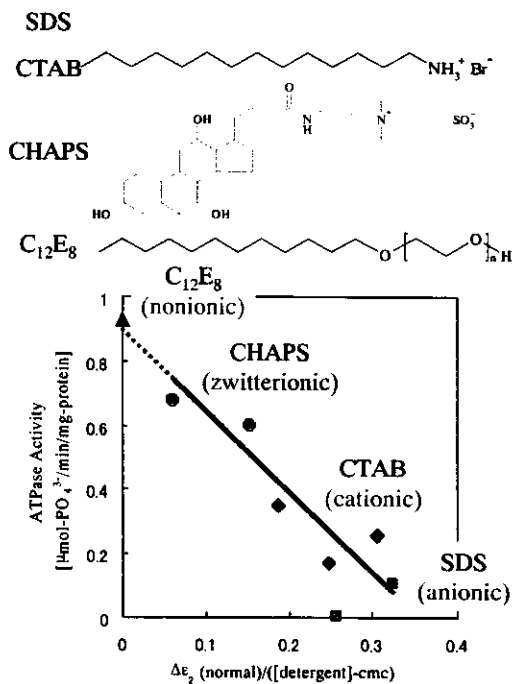


図 C-4 各種界面活性剤による膜タンパク質の可溶化と ATPase 活性残存率との関係

まず、可溶化前のミセルが示す誘電分散特性(300MHz 付近で現われる緩和幅 $\Delta\epsilon_2$)は、界面活性剤濃度に依存する。そこで、臨界ミセル濃度 cmc と用いている界面活性剤濃度との差([detergent]-cmc)がミセル濃度に対応すると考え、この値で基準化した緩和幅 $\Delta\epsilon_2/([detergent]-cmc)$ とミセルに可溶化した膜タンパク質の ATPase 活性との相関性について検討した(図 C-4)。低い $\Delta\epsilon_2$ を示す界面活性剤を用いた場合に ATPase 活性は増加する傾向が観察された。SDS や CTAB などの荷電性界面活性剤の場合、 $\Delta\epsilon_2$ は大きな値を示す傾向にある。この相関関係から、非イオン性界面活性剤である C₁₂E₈ が $\Delta\epsilon_2 \rightarrow 0$ の場合に相当すると考えると、高い ATPase 活性を説明する事ができる。実際、非イオン性界面活性剤 β -ドデシルマルトシドが MDR1 の可溶化に最も適しているとい

う結果(絵野沢ら)が得られており、誘電分散解析より得られるミセルの特性パラメータ $\Delta\epsilon_2$ が界面活性剤の選択指標として用いることができることを示唆している。

そこで、以下の検討では、可溶化に適すると考えられる CHAPS を用いて Na⁺/K⁺-ATPase を、また、 β -ドデシルマルトシドを用いて MDR1 を可溶化した。

C-2 プロテオリポソーム調製過程のモニタリング

Na⁺/K⁺-ATPase を組み込んだプロテオリポソームの調製を試みた。膜タンパク質可溶化ミセルをリポソームと混合し、18hr の間透析を行い、ATPase 活性を測定した。

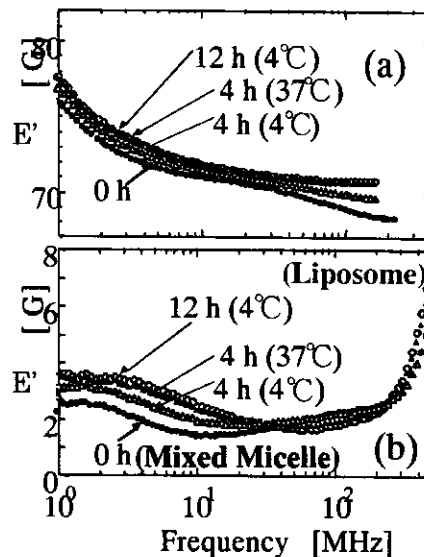


図 C-5 プロテオリポソーム調製における透析過程のモニタリング

まず、透析過程を誘電分散解析でモニタリングした結果を図 C-5 に示す。4°C で透析した場合、12 時間でほぼリポソームと同じスペクトルになったのに対して、37°C で透析した場合、最初の 4 時間でスペクトルがリポソームと類似のものに変化した。温度の増加により一般に zwitterionic な界面活性

剤の cmc (バルク相)は増大する.したがって,バルク相と平衡にある脂質膜中の界面活性剤濃度が減少することが予想され,透析が速やかに進行したものと考えられる.

そこで,透析後の ATPase 活性を測定し,透析温度に対してプロットした結果,4℃で活性が最大であった(図 C-6).したがって,一概に界面活性剤除去のみを考えるだけでは,高活性のプロテオリポソーム調製は実現しにくいと考えられる.

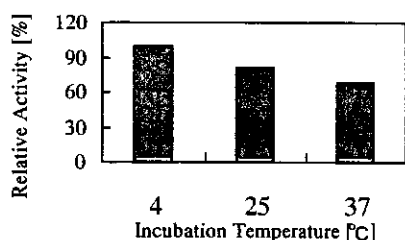


図 C-6 最終活性に与える透析温度の影響

C-3 ATPase 活性に及ぼす脂質組成

ATPase 活性に及ぼすリポソームの脂質組成の影響を,相転移温度,電荷,コレステロール含有率の観点から検討した(図 C-7).DMPC に比べて POPC や EggPC のような液晶相を示す脂質の方が比較的高い ATPase 活性を示した.また,PG10mol%,コレステロール 20mol%の含有率のとき,高い ATPase 活性を得た.また,Table C-1 に挙げたように,いずれの場合も MDR1 は,ATPase 活性部位

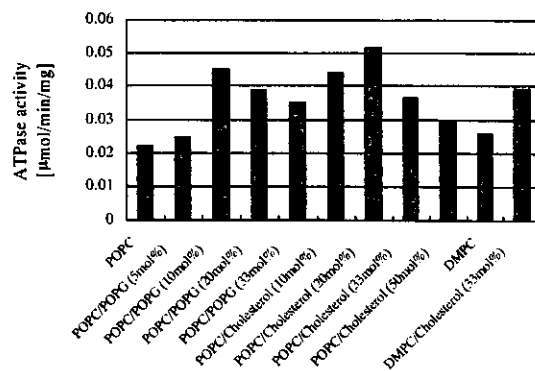


図 C-7 各種脂質組成でのプロテオリポソームの ATPase 活性

の 83-89%が外向きの配向性を示しており,リポソーム内部に薬物を保持するという目的に適ったプロテオリポソームが調製でき

	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 POPC		0.172**	578***	83%
MDR POPC/POPG				89%
MDR DMPC/Chol				86% (外向き)

*)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

Table C-1 プロテオリポソームの機能評価

ていることが分かった.そこで,組込みに用いるリポソームの流動性に対して ATPase 活性をプロットした結果,両者の相関性はあまり認められなかった(図 C-8).これは,膜タンパク質の再構成がリポソームへの組込み過程だけでなく界面活性剤除去過程(図 C-1 の(ii))にも依存していることを示唆している.

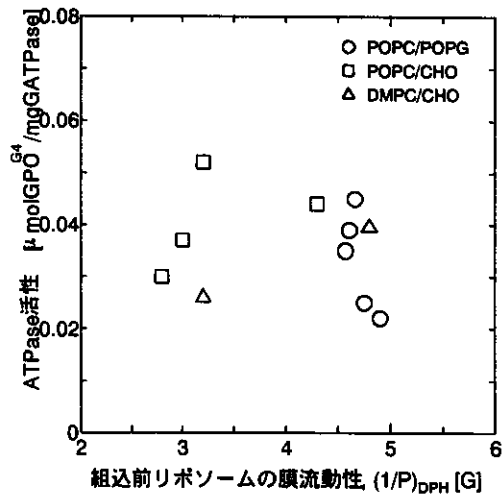


図 C-8 膜流動性と ATPase 活性との関係

C-4 プロテオリポソームへの添加物質の影響

次に、プロテオリポソームへの各種添加物質の効果を検討した。使用した物質は、タウリン (Tau)、ビタミン B6 (VB6)、そしてナイアシンアミド (NA) である。上記の物質が共存している条件での ATP 加水分解量の経時変化を測定した (図 C-9)。VB6 と NA 共存下では ATP 加水分解量は減少したが、Tau の場合、加水分解を促進した。これは、従

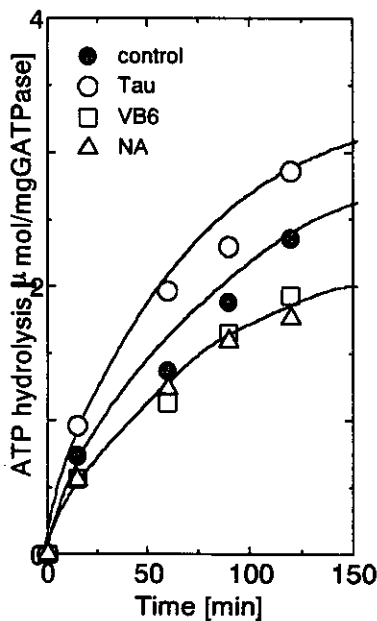


図 C-9 ATPase 活性に対する各種添加物質の影響

来の知見とも一致する。そこで、各種物質のプロテオリポソームへの配向性を検討するために、誘電分散解析を行ない、 f_{c2} の共存物質濃度依存性を検討した (図 C-10)。VB6 と NA の場合、濃度の増大とともに f_{c2} が減少することが分かった。 f_{c2} は膜流動性に対応するパラメータであることを考慮すると、VB6 と NA は脂質膜内部に配向し、流動性を低下させる働きをしていることが示唆される。一方、Tau 共存下では、 f_{c2} が変化しなかったことから、脂質膜への配向性は低いと考えられる。

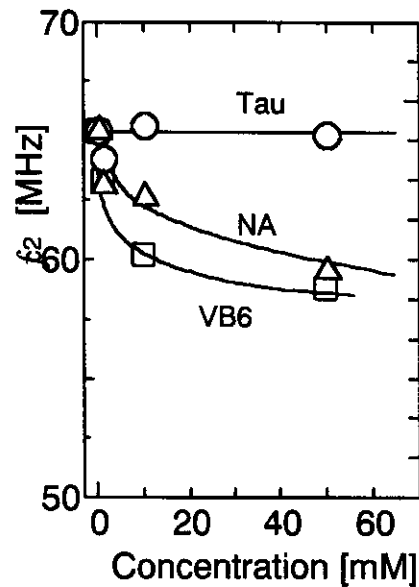


図 C-10 各種添加物質共存下でのプロテオリポソームの誘電特性

さらに、各種物質の脂質膜への配向性を検討するため、固定化リポソームクロマトグラフィー (ILC) を用いた。ILC は、リポソームをゲル担体に固定化したカラムに物質を充填し、溶出挙動の遅れに基づいて対象物質—脂質膜間相互作用を定量的に検討することができる、優れたツールである。概念図を図 C-11 に示した。詳細については文献 4 を参照されたい。

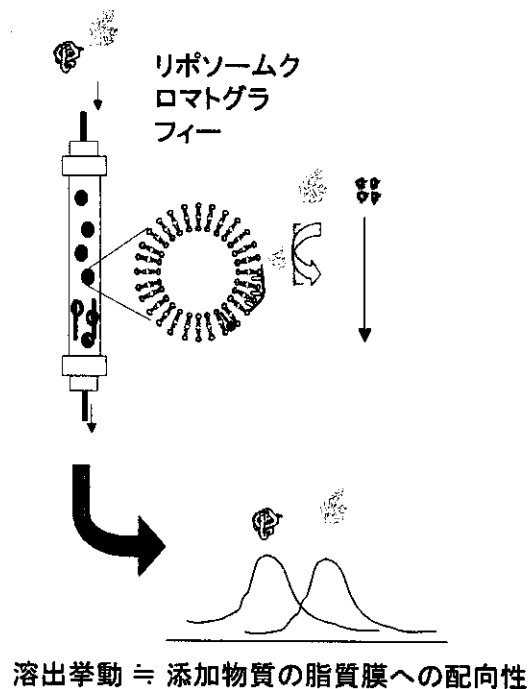


図 C-11 固定化リポソームクロマトグラフィー (ILC) の概念図

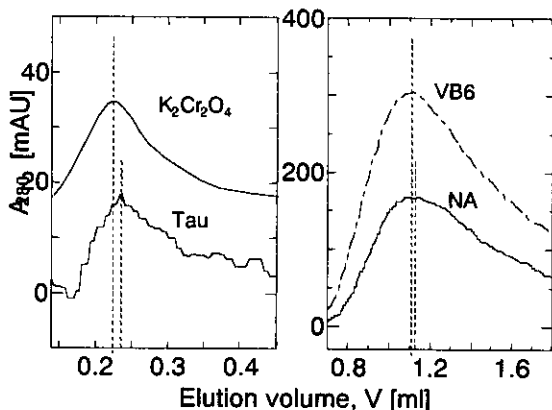


図 C-12 固定化リポソームクロマトグラフィー (ILC) での各種物質の溶出挙動

基準物質として親水性物質である二クロム酸カリウムを用いた。各種物質の溶出プロファイルを図 C-12 に示した。VB6 と NA の溶出体積が 1.2ml 付近であり、基準物質の溶出体積 (0.22ml) より大きく遅れていることから、VB6 と NA は脂質膜への配向性が強い物質であると判断できる。一方、Tau

の溶出体積 (0.23ml) はほとんど基準物質と同じであり、脂質膜との相互作用は非常に弱いものと推測できる。

【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)
- 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)
- Morita S., *J. Biosci. Bioeng.*, **95**, 252-256 (2003)
- Shikata et al., *Langmuir*, **14**, 6804-6808 (1998)

D. 考察

図 C-8 に見られるように、調製前のリポソームの膜流動性とプロテオリポソームの ATPase 活性との間には有意な相関性は見られなかった。これは、組み込み過程での膜タンパク質の構造状態や界面活性剤の除去過程など複雑な因子が絡み合っているため、見かけ上の関係が薄いという結果になっていると考えられる。しかし、図 C-1 に示したように、膜タンパク質可溶化ミセルとリポソーム膜間の相互作用が大きいと、膜タンパク質の組み込みに有利と考えられる。この点については更なる検討が必要である。

一方、脂質膜への分子の配向による膜流動性の低下がプロテオリポソームの ATPase 活性の低下を招いていることから、膜タンパク質周辺の脂質膜の構造状態が活性に影響を与えているのは確かであると考えられる。

E. 結論

プロテオリポソームの調製において膜タンパク質の可溶化プロセスは重要な段階である。可溶化のための界面活性剤の選択指標として誘電分散解析で得られるパラメータが有用であることが示唆された。また、膜タンパク質可溶化ミセルをリポソームと混合・透析する過程を誘電分散解析法でモニタリングすると、従来の透析温度(4℃)では12時間を要する。透析温度を高く設定すると透析時間は短縮できるが、最終ATPase活性は低下した。したがって、高活性プロテオリポソームの調製のためには、膜タンパク可溶化ミセルとリポソーム膜間相互作用と界面活性剤除去、ならびに膜タンパク質の変性を考慮しなければならないことが分かった。調製したプロテオリポソームの活性促進のためには、脂質膜への配向性の低い物質の添加が有効であるといえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文

1. Characterization of the surface properties of chitosanase under heat stress condition using aqueous two-phase systems and an immobilized-liposome sensor system. Jung H.-S., Umakoshi H., Son S.-Y., Shimanouchi T., Kuboi R. Solv. Extr. Res. Dev. Japan. 10: 123-132, 2003
2. Artificial chaperone-assisted refolding of bovine carbonic anhydrase using molecular assemblies of stimuli-responsive polymers. Yoshimoto N., Hashimoto

T., Matundu M.F., Umakoshi H., Kuboi R. Biomacromolecules. 4: 1530-1538, 2003

3. Novel fabrication of conducting polymers contained micro-array gas sensitive films using a micromanipulation method. Jung H.-S., Shimanouchi T., Morita S., Kuboi R. Electroanalysis. 15(18): 1453-1459, 2003
4. 固定化リポソームクロマトグラフィーによる生理活性物質の分離・分析. 久保井 亮一, 馬越 大, 島内 寿徳, 森田 誠一, ぶんせき.11: 636-643, 2003

G-2. 学会発表

1. Liposome dielectric dispersion to monitor protein dynamics on membrane under stress condition. Sasaki M., Miyagawa K., Shimanouchi T., Kuboi R., COEIEC III. Osaka (2003. 1. 23-24)
2. 脂質膜-タンパク質間相互作用に基づいたタンパク質安定性の評価. (阪大院・基礎工) 島内 寿徳, 邊見 匡史, 馬越 大, 久保井 亮一, (和歌山高専) 森田 誠一, 温井 美帆, 化学工学会秋季大会, 東北大学, 2003年9月
3. Phospholipase C 誘導型リポソーム膜融合を利用した薬物送達システムの設計. (阪大院・基礎工) 島内 寿徳, 川崎 英典, 馬越 大, 久保井 亮一, 化学工学会秋季大会, 東北大学, 2003年9月
4. Evaluation and monitoring of protein-liposome interaction using

dielectric measurement. Sasaki M.,
Shimanouchi T., Umakoshi H., Kuboi
R., COEIEC II. Hyogo, Awaji
(2003.7.18-19)

G-3. 新聞報道

なし

H. 知的所有権の取得状況

絵野沢、林、島内、久保井

中空糸透析カラムを利用したリポソームの
製造方法 特願 2004-033439 平成 16 年 2
月 10 日出願

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、構築した薬物代謝の機能発現にかかる機能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Ⅰ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、薬物の体外への排泄を促すために、第Ⅱ相反応を行うUDP-グルクロン酸転移酵素 (UDPGT) を導入した細胞の構築を行った。さらに、第Ⅰ相反応を行う細胞と第Ⅱ相反応を行う細胞とを共培養することにより、生体肝で行われている一連の薬物代謝反応を行う系の再構築を試み、薬物代謝環境の最適化について考察した。

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 hemodiafiltration：CHDF）や血漿交換（plasma exchange：PE）を組み合わせた肝機能補助療法が、現在最も臨床に応用されている。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、

バイオリアクター（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）が多数開発されてきている。

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充分に能力をもった遺伝子組換え細胞の開発を行い、これを用いた薬物代謝機能発現環境を解析することにより、非細胞系における薬物代謝機能発現環境の最適化を行うことを考えた。

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 I 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。

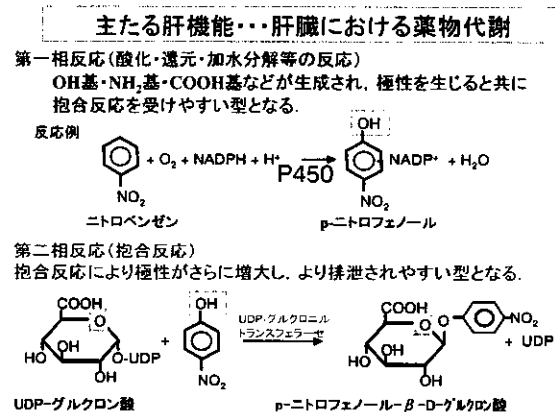


図 肝臓における薬物代謝反応

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)。

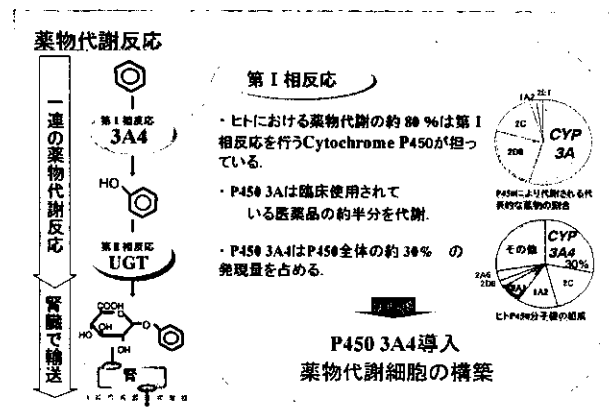


図 P450 分子種と発現様式

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、第二相反応として、最も広範囲の活性をもつ、グルクロン酸抱合反応を組み込んだ細胞を構築した。また、得られた細胞株について共培養系を用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システム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 μ g/ml となるように UDPGT 1A1-HepG2 細胞の継代時には Hygromycin B (invitrogen; A5662) を 150 μ 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 cm², 容量 50 mL), MS-21250 (75 cm², 250 mL), MS-20800 (225 cm², 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。

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。

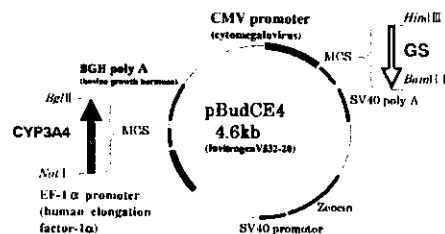


図 3A4発現プラスミド

また、UDPGT 1A1-HepG2 発現細胞の構築には下記の発現ベクターpCAGGS-UDPGTを用いた。

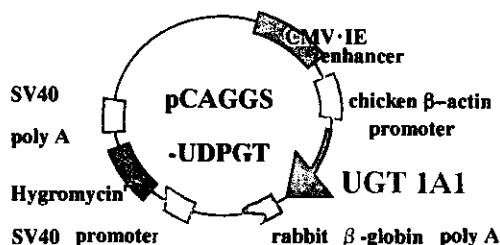


図 UDPGT 発現プラスミド

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 purefection 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