

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

薬剤輸送トランスポーターのメカニズム解析とバイオ人工肝開発に向けた研究

分担研究者 植田 和光（京都大学大学院農学研究科 教授）

研究要旨：

薬剤輸送トランスポーターMDR1を精製し、それらを人工リン脂質膜に埋め込んだプロテオリポソームを用いてバイオ人工肝を開発するためには、それら薬剤輸送トランスポーターをどのようにして活性を保ったまま精製し、効率よくリポソームに再構成し、安定性を保つかが重要な課題である。そのためには、薬剤輸送トランスポーターの作用メカニズムを理解するとともに、膜からの可溶化条件、精製条件、再構成条件などの最適化が必要である。本年度は、人工リポソームに再構成したMDR1とさまざまな薬剤との相互作用、および最大の活性を発揮させるためのリポソームの脂質構成を検討するためのアッセイ系を確立した。

A. 研究目的

A-1. 背景

MDR1とMRP2はABC（ATP binding cassette）蛋白質ファミリーに属しており、体内の有害物を体外へ排出すると同時に、環境中の有害物が体内へ吸収されるのを防いでいる。ABC蛋白質は、よく保存されたヌクレオチド結合領域（nucleotide binding fold：NBF）を持つ膜蛋白質であり、ヒト染色体上に49のABC蛋白質遺伝子がコードされている。MDR1とMRP2はどちらもATP加水分解のエネルギーを用いてさまざまな脂溶性の有害物を輸送するトランスポーターとして機能する。

MDR1は、12の膜貫通セグメントによって膜に埋め込まれ、分子内に存在する2つのATP結合領域が交互にATP加水分解を繰り返すことによって構造変化を繰り返し、薬

剤を輸送している。ATP加水分解によって生じるMDR1のダイナミックな構造変化が物質の輸送と共役していると考えられる。それゆえ、これらトランスポーターを精製し、それらを人工リン脂質膜に埋め込んだプロテオリポソームを用いてバイオ人工肝を開発するためには、薬剤輸送トランスポーターをどのようにして活性を保ったまま精製し、効率よくリポソームに再構成し、安定性を保つかが重要な課題である。そのためには、薬剤輸送トランスポーターの作用メカニズムを理解するとともに、膜からの可溶化条件、精製条件、再構成条件などの最適化が必要である。

ヒトの染色体上には49のABCタンパク質遺伝子がコードされているが、それらのメンバーの多くが体内の脂質恒常性に関係していることが明らかになりつつある。たとえば、ABCA1はコレステロールとリン脂質

をアポ A-I 蛋白質に移すことで高密度リポタンパク質 (HDL) を形成する。また、ABCG5/ABCG8 は肝臓から胆汁中に植物性ステロールを排出する。肝臓中でコレステロールから酵素的に変換され合成された胆汁酸は ABCB11 (BSEP) によって分泌される。また、MDR1 と高いアミノ酸相同性をもつ MDR2 は胆管中へホスファチジルコリンを分泌し胆汁酸をミセル状態にすることによって、胆汁酸の界面活性作用から胆管を護っている。MDR1 自身も、ステロイド骨格をもつエストリオールやアルドステロンを輸送するとともに脂質二重層中のコレステロールと相互作用することが示唆されている。本年度は、人工リポソーム中のコレステロールと精製 MDR1 の相互作用を検討し、再構成条件の最適化を図ることも試みた。

B. 研究方法

B-1. ヒト MDR1 の精製

ヒト MDR1 の C 末端に Thrombin 切断部位とヒスチジンタグを融合した蛋白質をバキュロウイルスベクターに組み込み、昆虫細胞 Sf9 細胞に感染させた。発現量は、感染開始後 48 時間から 72 時間で最大となり、全膜蛋白質の約 1% 程度であった。膜画分を 0.8% (w/v) のドデシルマルトシドによって可溶化し、可溶性画分中の MDR1 を Ni-NTA アガロースに吸着させ、イミダゾールによって溶出することによって精製した。

B-2. 酸化チタンカラムを用いた ATP 加水分解マイクロアッセイ系の確立

精製 MDR1 を人工リポソームに再構成し、基質の添加によって誘導される ATP 加水分解量を測定することによって、MDR1 の活性を検出した。現行の ATP 加水分解測定系で

は、多量の精製蛋白質を必要とする、そこで新規な ATP 加水分解測定系を確立するために、酸化チタンカラムの有効性を検討した。酸化チタンカラムを HPLC につなぎアデニンヌクレオチドの分離能を確かめた。

B-3. 精製 MDR1 再構成系の最適化

さまざまな濃度のコレステロールを含む人工リポソーム (PC : PE : PS = 4 : 4 : 2) を調製した。精製 MDR1 をそれらの人工リポソームに再構成し、輸送基質によって誘導される ATP 加水分解を測定することによって、再構成条件の最適化を検討した。

C. 研究結果と考察

C-1. マイクロアッセイ系を用いた精製 MDR1 の ATP 加水分解活性の測定

ヒト MDR1 の C 末端に Thrombin 切断部位とヒスチジンタグを融合した蛋白質をバキュロウイルスベクターを用いて、Sf9 細胞で大量発現し、Ni-NTA アガロースによって 90% 以上の純度で精製した。

精製 MDR1 を活性を保ったまま人工リポソームに再構成し機能させるためには、再構成条件の最適化が必要である。そこで、再構成した MDR1 の輸送基質によって誘導される ATP 加水分解活性を測定することによって、最適化条件を検討することにした。先ず初めに、精製 MDR1 の ATP 加水分解測定系の確立を試みた。現行の ATP 加水分解測定系では、多量の精製蛋白質を必要とする。そこで感度の高い ATP 加水分解測定系を確立するために、酸化チタンカラムの有効性を検討した。酸化チタンカラムを HPLC につなぎアデニンヌクレオチドの分離能を検討し、1 サンプル当たり 3 分以内で ATP と ADP を分離できる条件を確立した (図 1)。

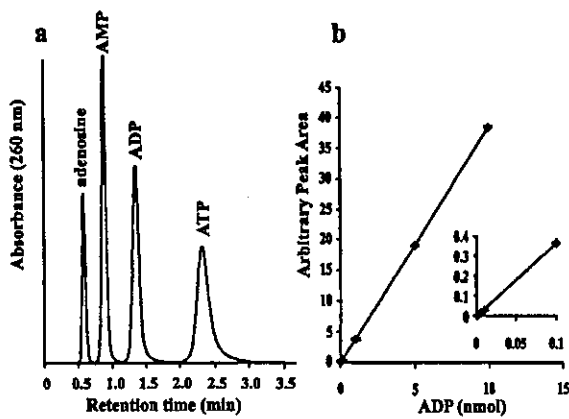


図1. 酸化チタンカラムによるADPの分離

本検出系は、ADP に対して5 pmol から10nmol まで直線性を示し、幅広いダイナミックレンジで測定可能であることがわかった。オートサンプラーを装着することによって、MDR1 のATP加水分解を1サンプル3分で自動的に測定できるようため、大量のサンプルの測定にも適していることがわかった。

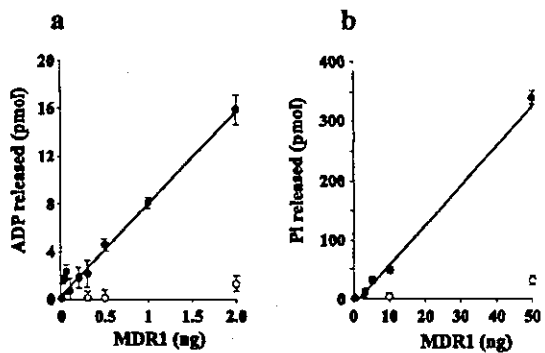


図2. 酸化チタンカラム法(a)とリン酸モリブデン法(b)によるATP加水分解の感度

従来用いられているリン酸モリブデン法によってATP加水分解生じる遊離リン酸を測定する方法では、MDR1の輸送基質によって誘導されるATP加水分解活性を検出するためには10 ngの精製MDR1を必要としたのに対し、今回確立した酸化チタンカラムを

用いる方法では0.5 ngで十分であり、感度が約20倍高いことが明らかになった(図2)。

C-2. MDR1と薬剤の相互作用の検討

精製MDR1を人工リポソーム(PC:PE:PS=4:4:2)に再構成し、さまざまな薬剤で誘導されるATP加水分解活性を酸化チタンカラム法を用いて測定した。その結果、ローダミン123とベラパミルによって誘導されるATP加水分解活性が典型的なベル型の濃度依存性を示した(図3)。それぞれ125 μMと30 μMで最大を示し、それ以上の高濃度ではATP加水分解は抑制された。

ビンブラスチンは10 μM以下の濃度ではATP加水分解を促進したが、高濃度では阻害作用を示し、200 μM以上においては輸送基質を外から加えない状態以下に抑制した。また、コルヒチンは濃度依存的に徐々にATP加水分解を促進したが、2 mMにおいても最大にはならなかった。

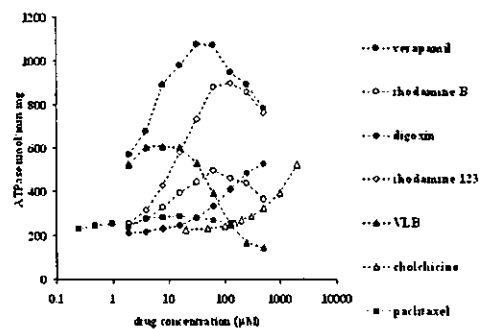


図3. MDR1のATP加水分解の基質濃度依存性

C-3. 精製 MDR1 再構成系の最適化の検討

最近多くの ABC 蛋白質が体内のコレステロール恒常性に維持しており、ABCA1、ABCG5/ABCG8 などがコレステロールを細胞外へ排出していることが示唆されている。さらに、MDR1 も脂質 2 重層中のコレステロールと相互作用することも示唆されている。そこで、さまざまな濃度のコレステロールを含有する人工リポソームを調製し、そこに精製 MDR1 を再構成した。そして、コレステロール濃度が MDR1 の ATP 加水分解活性に影響するかどうか検討した結果、コレステロール濃度が 30% まで濃度に依存して ATP 加水分解活性を増大させることが明らかになった。

D. 結論

酸化チタンカラムを装着した HPLC を用いてリポソームに再構成した精製 MDR1 の活性を測定するマイクロアッセイ系が確立できた。本法を用いることによって、MDR1 を活性を保ったまま安定にリポソームに保持する条件のスクリーニングが可能になった。

Sf9 細胞に大量発現させ精製したヒト MDR1 の ATP 加水分解活性は、輸送される基質であるこれまで報告されたさまざまな構造の薬剤によって促進された。この MDR1 の ATP 加水分解活性の促進は濃度依存的であり、多くの薬剤は高濃度で ATP 加水分解活性を抑制するベル型の濃度依存曲線を示した。このような MDR1 の ATP 加水分解活性の特性は、これまで報告されている性質と一致しており、今回精製したヒト MDR1 が本来の活性を保持したのものであることが明らかになった。

本年度の実験から、人工リポソームに含まれるコレステロールによって MDR1 の ATP

加水分解活性が影響を受けることが明らかになった。17 年度は、精製 MDR1 を再構成する人工リポソームに関して、ステロール成分に特に注目して、最適条件を検討する必要があると思われる。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

G-1.論文

Kimura, Y., Shibasaki, S., Morisato, K., Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Matsuo, M., Amachi, T., Ueda, M. and Ueda, K. Microanalysis for MDR1 ATPase by high-performance liquid chromatography with a titanium dioxide column. **Anal. Biochem** 326, 262-266 (2004).

Kimura, Y., Matsuo, M., Takahashi, K., Saeki, T., Kioka, N., Amachi, T., and Ueda, K. ATP hydrolysis-dependent multidrug efflux transporter, MDR1/P-glycoprotein. **Current Drug Metabolism**, 5(1), 1-10 (2004)

Nagata, K., Yamamoto, A., Ban, N., Tanaka, A.R., Matsuo, M., Kioka, N., Inagaki, N., and Ueda, K. Human ABCA3, a product of a responsible gene for *abca3* for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles, **Biochem Biophys Res Commun**, 324, 262-268 (2004)

Fujise, H., Sasawatari, S., Annoura, T., Ikeda, T. and Ueda, K. 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl inhibits drug efflux through P-glycoprotein in KB-3 cells expressing mutant human P-glycoprotein. **J. Biomed. Biotech** 2004,137-142 (2004)

Munehira, Y., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Furuya, A., Shitara, K., Imamura, M., Yokota, T., Takeda, S.i., Amachi, T., Matsuo, M., Kioka, N. and Ueda, K. α 1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. *J Biol Chem* 279, 15091-15095 (2004)

Abe-Dohmae, S., Ikeda, Y., Matsuo, M., Hayashi, M., Okuhira, K. I., Ueda, K., and Yokoyama, S. Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate HDL. *J Biol Chem* 279(1), 604-11 (2004)

Sasawatari, S., Toki, M., Horie, T., Nakano, Y., Ikeda, T., Ueda, K., and Fujise, H. Effect of PCB-126 on intracellular accumulation and transepithelial transport of vinblastine in LLC-PK1 and its transformant cells expressing human P-glycoprotein. *J Vet Med Sci* 66, 1079-1085 (2004)

植田和光、稲垣暢也、酒井寿郎 序リポネットワーク 生化学 76, 501-502 (2004)

植田和光 脂質ホメオスタシスにかかわる ABC タンパク質 生化学 76, 525-531 (2004)

高橋 圭、永田 紅、松尾道憲、植田和光 脂質輸送の分子メカニズム研究の黎明 化学 59 (6), 72-73 (2004)

植田和光 創薬ターゲットとしての ABC 蛋白質 細胞 36, 172-174 (2004)

植田和光 ABC タンパク質とアルカロイド アルカロイド研究会会誌 29, 1-4

(2004)

植田和光 体内のコレステロールをコントロールする一脂質トランスポートに関する ABC 蛋白質. 化学と生物 42, 6-8 (2004)

G-2.学会発表

ABCA3 and other ABC proteins involved in lipid transport and intracellular lipid dynamics The 2004 HDL Workshop Crete, Greece (2005.9.3)

抗がん剤耐性から生活習慣病まで シンポジウム「ABC 蛋白質の多機能性と生命維持機構」秋田大学 (2005.3.5)

抗がん剤耐性から生活習慣病まで 第 77 回日本薬理学会年会シンポジウム 大阪国際会議場 (2005.3.9)

肺胞 II 型細胞と急性骨髄性白血病由来の細胞株で高発現する ABCA3 の機能解析 第 8 回癌分子標的治療研究会総会 (2005.5.13)

ABC Proteins: Multidrug resistance and lipid homeostasis 第 2 4 回札幌がんセミナー (2005.6.21)

Microanalysis for MDR1 ATPase by high-performance liquid chromatography with a titanium dioxide column 第 2 4 回札幌がんセミナー (2005.6.21)

生体異物と生体内脂質を輸送する ABC 蛋白質ファミリー 構造活性フォーラム 2004 (2005.6.25)

ABC proteins involved in lipid transport
and intracellular lipid dynamics

第 77 回日本生化学会ワークショップ
(2005.10.14)

G-3.新聞報道

なし

H.知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）
平成16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機能代替デバイスの開発研究
リポソーム微細構造観察法の開発

分担研究者 三枝順三（独立行政法人産業医学総合研究所 部長）

研究要旨：リポソームの微細形態、薬物代謝酵素等の機能性タンパクを組み込んだ機能性プロテオリポソームの微細形態や組込みタンパクの部位を検索するためには透過電子顕微鏡による観察が必須である。従ってリポソーム試料の形態を損なわずにしかも透過電子顕微鏡に適した標本作製法を開発しなければならない。昨年度は血液を支持体とするリポソーム試料の永久電子顕微鏡標本作製法の開発に成功した。同方法でリポソームを観察したところ、直径60～250ナノメートルで2～6層の膜を有する中空円形構造あるいはタマネギ状の形態を呈していた。本年度は同方法を用いてプロテオリポソームを観察したところ、中空円形あるいはタマネギ状で直径50～150ナノメートルとリポソームと同様の形態であるが、層状構造に電子密度の高い微粒子が附着しているような膜構造を有していた。タンパク質を組み込むことにより膜構造が変化したと考えられるが、免疫電顕法による同定が必要である。一方、タンニン酸は脂質に親和性が高いことに着目し固定液にタンニン酸を加えてリポソームやプロテオリポソームを固定する試料作製法の開発にも着手した。基礎的な実験から、タンニン酸を用いると脂質膜とタンパク質をより明確に観察できる可能性が示唆された。

A.研究目的

人工リポソームおよび機能性タンパクを組み込んだプロテオリポソームの微細構造を透過電子顕微鏡的に観察する方法を開発する。開発された方法を駆使して機能的プロテオリポソームの機能と微細構造の相関を検討する。

B.研究方法

平成14年度はリポソーム試料封入のための支持体としてゼラチンや寒天を試みたが、試料の消失が多く、僅かに観察されたリポソーム様構造も説得力が

あるものではなかった。

平成15年度は人工リポソームを生体内と同様の環境中に留置すれば通常の電子顕微鏡標本の作製が可能になると考え、リポソームを組織内にあるいは血管内に注入した後に通常の電子顕微鏡標本を作製し観察したところ、血管内注入標本でリポソームの微細形態観察に成功した。

そこで平成16年度はプロテオリポソームの微細構造を血管内注入法によって観察した。加えて、タンニン酸添加固定液を用いて、新たな試料作製方法の

開発にも着手した。

1) 血管内注入法によるプロテオリポソームの観察

- ① マウスの腹部大動・静脈を露出する。
- ② 手術用絹糸で静脈の一部を袋状に結紮し、そこへプロテオリポソーム懸濁液を注入 (図 1)



図 1. 静脈内への人工リポソーム懸濁液注入

試料を注入した袋状血管を採取し(図 2)、4%グルタルアルデヒド(0.1M カコジル酸緩衝液)で固定(図 3)

- ③ 0.1M カコジル酸緩衝液で洗浄
- ④ 1%オスミウム酸(0.1M カコジル酸緩衝液、6%ショ糖含有)で後固定
- ⑤ エチルアルコール系列により脱水
- ⑥ エチルアルコールから酸化プロピレンへの置換
- ⑦ 酸化プロピレンからエポキシ樹脂への置換
- ⑧ エポキシ樹脂へ包埋
- ⑨ エポキシ樹脂の重合



図 2. 袋状血管の採取

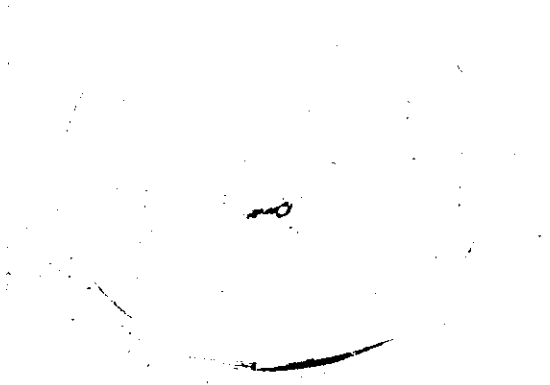


図 3. 4%グルタルアルデヒドによる袋状血管の固定

- 2) タンニン酸を含んだ固定液によるリポソームおよびプロテオリポソームの観察
- ① 2.5%グルタルアルデヒド+4%パラフォルムアルデヒド+1.5%タンニン酸(0.1M カコジル酸緩衝液)混合固定液を作製。
- ② 1500 μ l のサンプルチューブに上記固定液を 1000 μ l ずつ入れその中にリポソームあるいはプロテオリポソーム懸濁液試料を 60 μ l 注入後混和し、室温で 24 時間静置固定。
- ③ 遠心 (Micro-Centrifuge Fisher Science 社) 後、3%ショ糖含有 0.1M カコジル酸緩衝液で洗浄 (2 回)。
- ④ 1%オスミウム酸(0.1M カコジル

酸緩衝液、6%ショ糖含有)で後固定90分。

- ⑤ エチルアルコール系列により脱水
- ⑥ エチルアルコールから酸化プロピレンへの置換。
- ⑦ 酸化プロピレンからエポキシ樹脂への置換。
- ⑧ エポキシ樹脂へ包埋
- ⑨ エポキシ樹脂の重合

それぞれの方法で作製したエポキシ樹脂包埋試料を糸鋸で切り出し、トリミング後ウルトラトーム (Leica 社) で1 μ mの厚切り切片を作製し、トルイジン青で染色したのち光学顕微鏡下で鏡検し電顕での観察部位を特定した。特定部位をブロック上でトリミングした後、20~50ナノメートル厚の超薄切片を作製し、酢酸ウランと硝酸鉛で電子染色したのち、広視野電子顕微鏡 (LEM-2000 トプコン) および大型電子顕微鏡 (H-8000、日立製作所) で観察した。

C. 研究結果

1) 血管内注入法によるプロテオリポソーム観察

大阪大学由来のプロテオリポソーム標本では血漿内に60~150ナノメートルの中空あるいはタマネギ状の円形構造を認めた。リポソームと同様の形態であるが、リポソームでは電子密度の高低の明瞭な2重構造の2~6層の膜を有していたのに対し、プロテオリポソームのそれは不明瞭な層状構造に電子密度の

高い微粒子が付着しているような膜様構造を呈していた。(図4)。

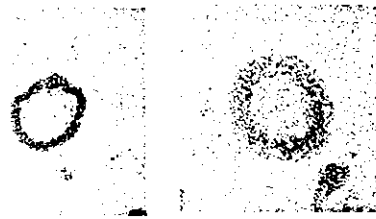


図4. プロテオリポソーム

2) タンニン酸を含んだ固定液によるリポソームおよびプロテオリポソーム観察

国立成育医療センター由来のカラム調整リポソームおよび大阪大学由来プロテオリポソームの2種類を観察した。リポソーム懸濁液は固定液に浸漬した段階でも懸濁状態であったが、1%オスミウム酸で後固定した段階で試料はサンプルチューブの壁に付着した。そのまま脱水・透徹処理を続行し、最終的に壁から試料を掻き取り、エポキシ樹脂包埋標本作製した。一方、プロテオリポソーム懸濁液は固定液に注入。混和した段階で上清が透明となった(図5)。

この時点でプロテオリポソームは損傷され損傷残物が凝集し沈殿したと考えられたが、その後の固定・脱水・透徹処理を継続してエポキシ樹脂包埋標本作製した。

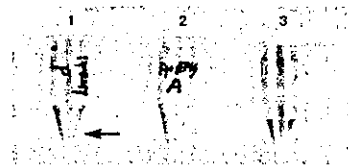


図5. 1:プロテオリポソーム(固定後の沈殿(矢印))、2:リポソーム、3:緩衝液。

超薄切後電子顕微鏡で観察すると、リポ

ソームおよびプロテオリポソームは崩壊し全くその形状は保たれていなかった。リポソーム標本は不整形塊あるいは球として認識され、それらは電子密度の濃淡の層が交互に繰り返す明瞭な多層構造を呈していた(図6)。



図6. リポソームのタンニン酸含有固定液試料。不整形塊(上)は多層構造(下)を呈する。

プロテオリポソーム標本は不整形団塊あるいは絡まった糸屑状構造として観察され、明瞭な2~10数層の膜様帯状構造と比較的電子密度の低い不定形な網目紋様とが混在していた(図7)。これらの結果から、本方法を用いるとリポソームおよびプロテオリポソームの脂質膜は電子密度の濃淡の層が交互に繰り返す明瞭な多層構造として、タンパク質は電子密度の低い不定形な網目紋様として観察できる可能性が示唆された。



図7. プロテオリポソームのタンニン酸含有固定液試料。不整形団塊(上)は多層帯状構造と電子密度の低い不定形な網目紋様(下)で構成されている。

D. 考察

昨年度に開発した血管内に封入する方法を用いると、プロテオリポソームの微細構造も容易に観察でき、本方法の有用性が高いことを確認できた。

今回の観察ではプロテオリポソームは本質的にリポソームと同様な構造を呈したが、リポソームの膜が明瞭な層状構造を呈するのに対し、プロテオリポソームのそれは不明瞭な層状構造に電子密度の高い微粒子が付着しているような膜様構造を呈していた。タンパク質を組み込むことによって膜の構造が変化するのには容易に推測でき、今回観察した

像は層状の脂質膜にタンパク質が組み込まれた結果とも考えられるが、あくまでも推論にすぎない。1 サンプルのみの観察から結論することは出来ず、更なる検索が必要である。今後も同様な方法で検索を続行し、プロテオリポソーム膜の微細構造の詳細を明らかにするとともに、免疫電顕法観察によって組み込んだタンパク質の膜上での局在を証明する必要がある。

タンニン酸は脂質との親和性が高いことに着目して、膜構造をより明確に観察できる可能性を探り、タンニン酸を含有する固定液を用いてリポソームおよびプロテオリポソームを固定した。結果的には各懸濁液と固定液を混合した段階で、あるいは各種処理中に試料を損傷してしまい試みは失敗に終わった。この原因はリポソームを直接固定液に曝したためと考えられ、何らかの支持体あるいは保護媒体の必要性を改めて認識した。一方、損傷した試料を電子顕微鏡で観察するとリポソームの膜は通常の方法と比較して明瞭に観察され、リポソーム膜の微細構造を詳細に検討するうえでタンニン酸含有固定液は有用性が高いことが示唆された。また、標本上でタンパク質と脂質膜とが明瞭に区別されることも示唆された。従って、プロテオリポソーム試料を血管内に封入した後、タンニン酸含有固定液で固定すれば明瞭な成績が得られると期待できる。

今回の実験成績からタンニン酸含有固定液を用いるとリポソームおよびプロテオリポソームの膜構造および組み込まれたタンパク質の局在がより詳細に

観察できると期待される。一方、免疫電顕法により組み込んだタンパク質の証明の際にタンニン酸による抗原性の不活化が問題となる。微細形態の保持と抗原性保持との背反する要求を同時に満足するための固定法及び試料処理法の開発が必要であり、次年度に検討を続行する。

E. 結論

プロテオリポソームは本質的にリポソームと同様な微細構造を呈しているが、リポソームが電子密度の高低の明瞭な2重構造膜を有していたのに対し、プロテオリポソームのそれは不明瞭な層状膜様構造を呈し、タンパク質が組み込まれることにより膜構造が変化することが示唆された。タンニン酸を含有する固定液を使用すると脂質とタンパク質の判別がより明瞭になる事が示唆された。従って、血管内封入法とタンニン酸含有固定液を併用することにより更に明確な微細構造観察が可能となることが期待される。

F. 健康危険情報

該当すること無し

G-1.論文発表

- 1) Ji-Youn Jung, Junzo Segusa, Hiroyuki Nakayama and Kunio Doi(2004) Comparative study on picryl chloride (PCL)-induced contact dermatitis in female IQI/Jic and BALB/c mice. *Exp. Anim.* 53, 89-96.
- 2) Katsumi Ohtani, Shigeru Yamazaki, Hisayo Kubota, Muneyuki Miyagawa and Junzo Saegusa (2004) Comparative

investigation of several sperm analysis methods for evaluation of spermatotoxicity of industrial chemical: 2-bromopropane as an example. *Ind. Health* 42, 219-225.

- 3) Yasuaki Ogikubo, Mari Norimatsu, Yoshimasa Sasaki, Akinori Yasuda, Junzo Saegusa and Yutaka Tamura (2004) Effect of lipopolysaccharide (LPS) injection on the immune responses of LPS-sensitive mice. *J.Vet.Med.Sci.* 66,1189-1193

G-2.学会発表

- 1) Junzo Saegusa, Katsumi Ohtani, Kenichi Kobayashi, Hisayo Kubota (2004) Effects of 50Hz Electromagnetic Fields on Reproduction in Mice. A Three Generation Study. Proceedings of 3rd International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields.p971-973
- 2) Katsumi Ohtani, Kenichi Kobayashi, Hisayo Kubota, Junzo Saegusa (2004) Evaluation of toxic effect on sperm of halogenized propans using Tetrazolium Salt, SQA and CASA methods in rats. *J Tox Sci* 29, 425.
- 3) 久保田久代, 酒井俊男, 絵野沢伸, 三枝順三 (2004) 人工リポソーム微細構造観察のための試料作製法. 第36回日本臨床電子顕微鏡学会講演予稿集, p140.
- 4) 三枝順三, 小林健一, 久保田久代, 大谷勝己 (2004) IQI/Jic マウス固有病変への性ホルモンの関与. 日本実験動物科学・技術 ながさき 2004 講演要旨集 p185
- 5) 小林健一, 久保田久代, 大谷勝己, 三枝順三 (2004) IQI/Jic マウスに見られた精

巢異常. 日本実験動物科学・技術 ながさき 2004 講演要旨集 p185

- 6) 三枝順三, 小林健一, 久保田久代 (2004) IQI/Jic マウス固有病変への性ホルモンの関与. 第21回日本疾患モデル学会 講演要旨集 p55
- 7) 大谷勝己, 小林健一, 久保田久代, 三枝順三 (2004) ハロゲン化プロパン類のラット精子への影響. 日本薬学会第124年会要旨集-3, p185
- 8) 大谷勝己, 小林健一, 久保田久代, 三枝順三 (2004) 1,2-ジクロロプロパンのラット精子への影響. 日本実験動物科学・技術 ながさき 2004 講演要旨集 p191
- 9) 大谷勝己, 小林健一, 久保田久代, 三枝順三 (2004) ハロゲン化炭化水素の精子への影響. 第9回精子形成・精巣毒性研究会 講演要旨 p5
- 10) 大谷勝己, 小林健一, 久保田久代, 三枝順三 (2004) ジプロモクロロプロパンおよび関連化合物の雄性生殖毒性. 第75回日本衛生学会総会
- 11) 大谷勝己, 小林健一, 久保田久代, 三枝順三 (2004) テトラゾリウム塩発色法を利用した 1,2-ジクロロプロパンのラット精子への影響の検出. 第7回環境ホルモン学会

G. 知的所有権の出願・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 の機能解析を継続した。マウスにおける様々な病態モデル（ジゴキシン負荷、胆管欠紮、高コレステロール負荷）を用いてマウス ABCA8 mRNA および近縁遺伝子 mRNA 発現の変化を比較検討した。これにより、ABCA8 mRNA と近縁遺伝子は構造が類似するものの、病態における変化は異なり、特に ABCA8 は抱合型ビリルビンの上昇するモデルにおいてのみ、その発現増加が確認された。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。

昨年までに研究者らは本研究において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、その機能解析と mRNA 発現の変化の検討を行った。本年度はこれを更にすすめ、マ

ウス ABCA8 蛋白の様々な正常組織における詳細な局在および、病態動物マウスモデルにおける遺伝子および蛋白発現の変化の様子を検討した。

B. 研究方法

昨年度までの研究で得られたマウス ABCA8 遺伝子配列をもとに作成されたプローブを利用して各種正常臓器での ABCA8 mRNA 発現を Real time PCR (Taqman) 法により検討した。臓器としては、肝・腎などのようにビリルビン・外因性薬物の排泄に関わる臓器だけではなく、脂溶性ステロイドホルモンの体内動態に関わる様々な内分泌臓器をも検討した。この際、ABCA8 に構造の類似した ABCA5,7,9 の mRNA 発現量も同時に検討比較することにより、ABCA8 の生理的・病態生理学的意義を、より明らかにした。更に、基質の一つである抱合型ビ

リルビン（胆管閉鎖による）、ジゴキシンを急性に負荷し、正常時において蛋白発現の多かった肝・心における蛋白発現変化についても同法で検討した。また、高コレステロール負荷食を慢性に負荷した際の影響も検討した。

また、昨年までの検討で得られたポリクローナル抗体を用いての免疫組織化学による検討も継続して行った。

C. 研究結果

1. Real time PCR による正常組織における ABCA8 および近縁遺伝子の発現

近縁遺伝子として ABCA5,7,9mRNA の発現を同時に検討した。昨年までの検討どおり ABCA8 は肝、腎、心、筋などに発現していたが、これ以外にも性腺、副腎、膵臓にも中等度の発現が確認された。また、これらの臓器ではすべて少量ながらも ABCA5,7,9mRNA も同時に発現していた。

2. ジゴキシン負荷時の発現変化

ジゴキシン負荷時の mRNA 発現を各種臓器で比較検討した。それによると、肝においては A8 以外にも A5,7,9mRNA の発現が有意に低下した（図 1）。

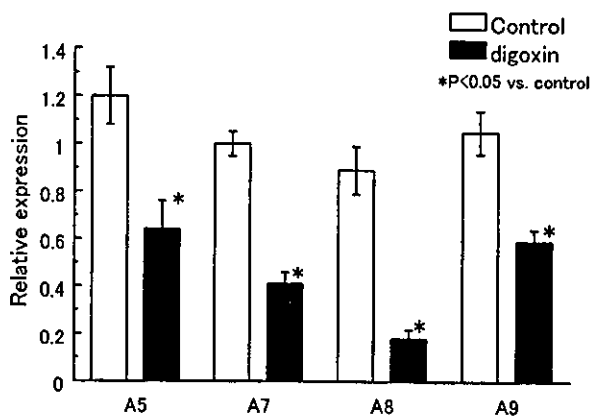


図 1 ジゴキシン負荷マウス肝における ABCA 遺伝子群発現の変化

一方、同マウスモデルの腎、心筋における発現変化のパターンは肝におけるものとは異なっていた。すなわち、腎においては A8 の有意な減少はあるものの、他の遺伝子では有意な変化は見られなかった（図 2）。

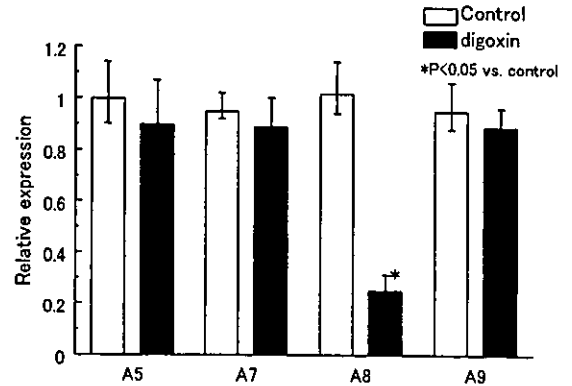


図 2 ジゴキシン負荷マウス腎における ABCA 遺伝子群発現の変化

また、心筋においては A8 の有意な現象だけでなく、A7 も中等度減少していた（図 3）。

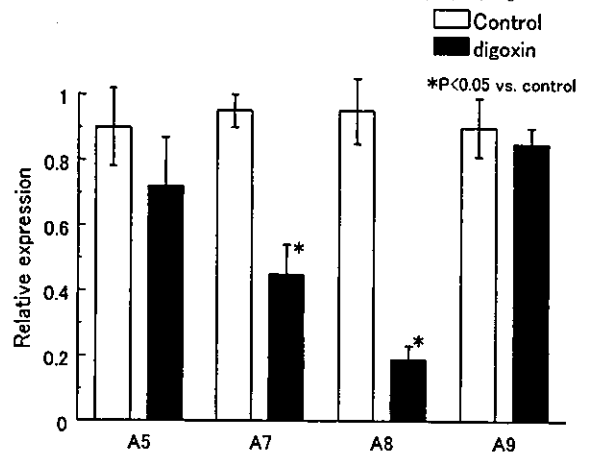


図 3 ジゴキシン負荷マウス心筋における ABCA 遺伝子群発現の変化

3. 胆管閉鎖時の発現変化

胆管閉鎖時の mRNA 発現を各種臓器で比較検討した。それによると、肝においては A8 以外にも A5,7,9mRNA の発現が有意に増加した（図 4）。また、この変化は蛋白レベルでも確認する

ことができた。

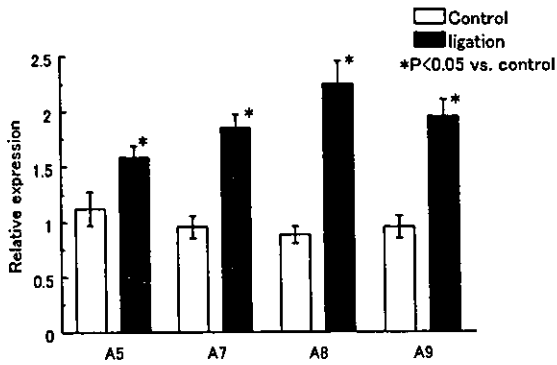


図4 胆管結紮モデル肝における ABCA 遺伝子群発現の変化

4. 高コレステロール食負荷時の発現変化

胆管閉塞を含めた閉塞性黄疸時には血中においては抱合型ビリルビンだけではなく、胆汁酸、総コレステロール濃度も上昇するため、胆管閉塞時に観察できた発現変化が抱合型ビリルビン自体によるものか、それ以外に随伴する因子によるものか判断できない面がある。そのため、血中胆汁酸、総コレステロール濃度が上昇し、かつ抱合型ビリルビン濃度の変化しないモデルの一つとして、14日間の高コレステロール食負荷後における ABCA 群遺伝子発現の変化を検討した。それによると肝においては A7, A9 の有意な変化はあるものの、A8 は有意な上昇は見られなかった (図5)。

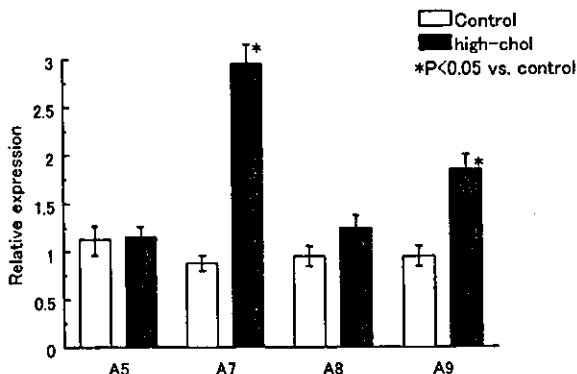


図5 高コレステロール負荷モデル肝における ABCA 遺伝子群発現の変化

また、同モデルにおける精巣での発現変化も検討した。これによると、ABCA 群遺伝子発現は肝における変化とは異なり、A7, A8 mRNA の有意な減少が見られた (図6)。

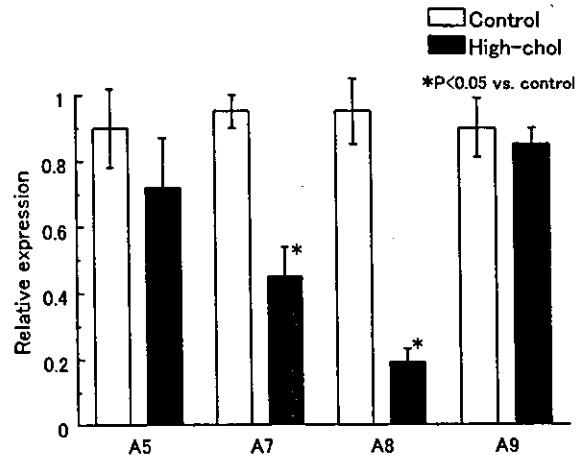


図6 高コレステロール負荷モデル精巣における ABCA 遺伝子群発現の変化

また、これらの発現変化はこの変化は蛋白レベルでも確認することができた。

D. 考察

昨年までに我々は、抱合型ビリルビンを輸送する新しい遺伝子 ABCA8 をクローニングした。今年度は主にその mRNA 発現を近縁遺伝子の発現変化と比較しながら研究を継続した。これによると、マウスにおいても肝・心を中心に広く分布していることが判明し、これは昨年までのヒトにおける検討結果とほぼ合致していた。

胆管欠紮モデルにおいては ABCA8 のみならず、A5, 7, 9 mRNA も中等度増加することが明らかになった。胆管閉塞を含めた閉塞性黄疸時には血中においては抱合型ビリルビンだけではなく、胆汁酸、総コレステロール濃度も上昇するため、胆管閉塞時に観察できた発現変化が抱合型ビリルビン自体によるものか、それ以外に随伴する因子によるものか

判断できない面がある。そのため、抱合型ビリルビン以外の胆汁酸、総コレステロールの影響を明らかにするために、高コレステロール食負荷モデルにおける変化を検討した。これによると ABCA7,9 は有意な増加を示したが、A8 の増加はむしろ少なかった。以上から、A8 の mRNA 発現変化は胆汁酸、総コレステロール以外のものによる可能性が高いことが示唆された。ABCA8 蛋白は基質として胆汁酸、コレステロールに対する親和性は抱合型ビリルビンに対するそれよりも低く、このことが発現変化の相違に影響している可能性がある。今後はこの蛋白を高発現させた細胞を大量作成、さらに精製し、非細胞系代謝機能付与デバイスに応用する予定である。これにより、現行の人工肝臓よりも機能の高いものが開発可能であると考えられ、肝不全治療が大きく進歩するものと期待される。

E. 結論

抱合型ビリルビンをはじめとする異物排泄に関与する新しい膜蛋白 ABCA8 の mRNA・蛋白発現を、近縁遺伝子群の発現と比較しながら検討した。胆管閉塞モデルにおいては、ABCA8 および近縁遺伝子 mRNA の発現が増加した。しかし、高コレステロール負荷モデルにおいては近縁遺伝子 mRNA は増加するものの ABCA8 mRNA 発現は変化しなかった。これらにより、黄疸などの高ビリルビン血症をはじめとした病態においても、この蛋白が重要な役割を果たすことが明らかになった。

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) Tsuruoka S, Wakaumi M, Yamamoto H, Fujimura A. Chronopharmacology of oxacalcitriol in rat model of osteoporosis. *Eur J Pharmacol.* 468:239-245, 2004.
- 2) Tsuruoka S, Nishiki K, Wakaumi M, Wang N, Yamamoto H, Ando H, Imai M, Fujimura A. Treatment of digoxin intoxication model by hybrid kidney with hollowfiber module for clinical hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 19(5):1339-40, 2004.
- 3) Tsuruoka S, Wakaumi M, Nishiki K, Araki N, Harada K, Sugimoto K, Fujimura A. Subclinical alteration of taste sensitivity induced by candesartan in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 57:807-812, 2004.
- 4) Tsuruoka S, Nishiki K, Wakaumi M, Yamamoto H, Ando H, Wang N, Fujimura A. Chronopharmacology of oxacalcitriol in 5/6 nephrectomized rats. *Life Sci.* 75: 809-822, 2004.
- 5) Tsuruoka S, Wakaumi M, Yamamoto H, Ando H, Saito A, Fujimura A. β 2-microglobulin adsorption column reduces digoxin trough level during hemodialysis: 3 case reports. *Ther. Drug Monit.* 26: 450-452, 2004.
- 6) Kawaguchi A, Ohmori O, Tsuruoka S, Nishiki N, Harada H, Miyamori I, Yano R, Nakamura T, Masada M, Fujimura A. Drug interaction between St John's Wort and quazepam. *Br J Clin Pharmacol*, 58:403-10, 2004.
- 7) Ando H, Tsuruoka S, Yamamoto H, Takamura

T, Kaneko S, Fujimura A. Effects of Pravastatin on mRNA Expression Levels of ATP-binding Cassette Transporter A1. *J Pharmacol Exp Ther* 311:420-5, 2004.

8) Tsuruoka S, Yamamoto H, Wakaumi M, Ando H, Saito T, Fujimura A. Adsorption of oxalcalcitriol by polysulfone hemodialyzer in patients with secondary hyperparathyroidism. *Br J Clin Pharmacol*. 58:488-95, 2004.

9) Tsuruoka S. Development of artificial "hybrid-kidney" with MDR-overexpressing cells. In "Regenerative medicine in kidney diseases: current status and issues. ed. by Gejyo F and Oite T. pp 60-71, Koko-do, Niigata, Japan. 2004.

10) 鶴岡秀一。薬物中毒とハイブリッド型人工臓器。臨床医薬 20(9):919-924, 2004。

11) 鶴岡秀一、井岡 崇、山本 尚史。細胞生物学講座：ハイブリッド型人工腎臓。細胞 36: 557-560, 2004。

2. 学会発表

1) 安藤仁、鶴岡秀一、藤村昭夫。ABC A1 mRNA発現に及ぼすプラバスタチンの影響。第8回日本適応医学会。2004年6月26日、福島。

2) Fujimura A, Sugimoto K, Araki N, Ohmori M, Cui Y, Tsuruoka S, Kawaguchi A. Interaction between grapefruit juice and hypnotic drugs: comparison of triazolam and quazepam. 2004 Annual Meeting, American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics, Washington DC,

3) 鶴岡秀一、山本尚史、安藤仁、若海美智、

杉本孝一、斎藤鉄男、藤村昭夫。活性型ビタミンDの時間治療—2次性副甲状腺機能亢進症治療における検討—。第101回日本内科学会総会。2004年4月7-9日、東京(日内会誌 93:187, 2004)。

4) 鶴岡秀一、若海美智、山本尚史、藤村昭夫。シクロスポリンA(CsA)によるラット遠位尿管性アシドーシス(dRTA)におけるNOの関与。第47回日本腎臓学会学術総会。2003年5月20-22日、宇都宮。

5) 鶴岡秀一、錦健太、山本尚史、藤村昭夫。臨床血液透析用ホロファイバーモジュール(H)を用いたハイブリッド型人工腎臓によるジゴキシン(D)除去能の検討。第49回日本透析医学会学術集会・総会。2004年6月18-20日神戸。

6) 鶴岡秀一、若海美智、山本尚史、安藤仁、井岡崇、杉本孝一、斎藤鉄男、藤村昭夫。オキサカルシトリエールのポリスルフォン透析膜への吸着性についての検討。第25回日本臨床薬理学会年会。2004年9月17-19日、静岡

7) 若海美智、鶴岡 秀一、藤村昭夫。健常人における塩酸ピルジカイニドの乳汁移行に関する検討—ジソピラミド、塩酸プロパフェノンとの比較—。第25回日本臨床薬理学会年会。2004年9月17-19日、静岡(*Jpn J Clin Pharmacol Ther* 35: S-150, 2005)

8) 鶴岡秀一、山本尚史、井岡崇、藤村昭夫。血液透析用ホロファイバー型モジュール(H)を用いたハイブリッド型人工腎臓。第42回日本人工臓器学会、シンポジウム「ハイブリッド型人工臓器の現状と未来」。2004年10月5-7日、東京(人工臓器 33(2)S-56, 2004)。

9) Tsuruoka S, Watanabe S, Fujimura A, Schwartz GJ. Nitric Oxide/Endothelin Play

a Key Role in the Adaptation of the Cortical Collecting Duct to Metabolic Acidosis. 37th American Society of Nephrology Annual Meeting. St Louis, MO. Oct 30–Nov 3, 2004. (J. Am. Soc. Nephrol 15: 69A, 2004 in abstract form)

10) Muto S, Hata M, Taniguchi J, Tsuruoka S, Saitou M, Furuse K, Sasaki H, Furuse M, Fujimura A, Imai M, Kusano E, Tsukita SI. Disruption of claudin 2 gene converts from

leaky to a tight epithelium in mouse proximal tubule, leading to an inhibition of NaCl reabsorption. 37th American Society of Nephrology Annual Meeting. St Louis, MO. Oct 30–Nov 3, 2004. (J. Am. Soc. Nephrol 15: 4A, 2004 in abstract form)

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

ATP再生システムの検討

分担研究者 黒田 章夫 広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教授

研究要旨： 正の自由エネルギー変化を示す生体反応の多くはATPを要求する。タンパク質-人工基材が複合した機能性膜を動かすためにもATPの供給が必須である。ポリリン酸はリン酸が高エネルギーリン酸結合により直鎖状に結合した無機ポリマーである。ポリリン酸はリン酸を加熱すると合成できることから最も安価で安定なリン酸供与体である。本年度はATPの供給源としてポリリン酸を利用するための基盤研究を行った。ポリリン酸の形態には可溶性と不溶性のポリリン酸塩が存在する。特に生体が過剰のポリリン酸を蓄積した際には不溶性のポリリン酸の顆粒が観察される。生体から調整したポリリン酸顆粒はマグネシウムやカルシウムと結合していた。試験管内でも数十程度のリン酸が結合したポリリン酸はマグネシウムやカルシウムが存在すると不溶性の顆粒を形成した。ポリリン酸キナーゼは可溶性のポリリン酸とADPからATPを作ることができることから、可溶性ポリリン酸はATPの供給源になりうる。しかし、不溶性のポリリン酸顆粒をつかってATPを再生することができるかどうかは今まで示されていなかった。不溶性のポリリン酸塩は半透膜を通り抜けることがないので、タンパク質-人工基材が複合した機能性膜を動かすために可溶性ポリリン酸よりも有効であると思われた。そこで、不溶性のポリリン酸-マグネシウム-カルシウム顆粒を使ってATPを供給する系の確立を目指した。具体的にはグルコースとグルコースキナーゼを組み合わせたATP消費系に於いて、不溶性のポリリン酸-マグネシウム-カルシウム顆粒とポリリン酸キナーゼが連続的にATPを供給するかどうかを検討した。その結果、ポリリン酸-マグネシウム-カルシウム顆粒は可溶性のポリリン酸に比べて速度は1/3に低下するものの、ATPを供給するエネルギー源になりえることがわかった。不溶性のポリリン酸顆粒が生体エネルギーとして利用されることを初めて示した。

A. 研究目的

生体反応の多くは正の自由エネルギー変化を示し、その多くはATPの加水分解と共役して起こる。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におけるタンパク質-人工基材が複合した機能性膜を動かすためにもATPの供給が必須である。絵野沢グルー

プでは細胞表面に存在し細胞内外の物質輸送を行うチャンネルタンパク分子を人工膜に固定化するという新規な発想を展開している。薬物代謝酵素系や細胞膜上のチャンネルタンパク質は分子種群をなし、新しい分子が続々と遺伝子レベルで同定されている。これらの機能性タンパク質は、それぞれ異なった基質

特異性を有するので肝・腎不全の病態を改善するために必要な分子種を選び出すことができる。こうして再構成された人工合成膜であるナノ代謝代替デバイスに生きた細胞のように統合した選択的・能動輸送を行わせ、人工透析を行うことを目標としている。

現在行われている血液濾過透析や血漿交換を組み合わせた血液浄化法は、劇症肝炎をはじめ様々な疾患に対する治療法の基幹といえる。しかしながら、ひとりの患者に対し大量の血漿が必要であることや亜急性劇症肝炎では昏睡からの一時的な覚醒効果はみられるものの最終的な救命率の向上は得られないなど問題点も多い。この血液浄化法の限界の背景には、中空糸カラムによる血中物質の除去が単に膜の孔径にのみ依存し、生体にとって要不要の別なく排除してしまうという原因が考えられる。病期の体液には為害性物質だけでなく疾患に反応して治癒を促す物質も存在し、これらも透析・濾過によって排除されてしまう。絵野沢グループの研究では理想的な血液浄化は生体が行っているように毒性物質のみを選択的に取り除くシステムであるという発想の元に計画されたものである。

さて、ATP 供給系は実際今までに幾つか確立されている。しかしながらそれらは非常に高価な高エネルギーリン酸結合の化合物を利用しており、しかも不安定な低分子である。ポリリン酸はATPと同様の高エネルギーリン酸結合によって結合した無機ポリマーである(図1)。ポリリン酸はリン酸を加熱すると合成できる最も単純で、非常に安価な高エネルギーリン酸化合物である。ポリリン酸は多くの生物から検出されるものの、長い間分子生物学的な解析は行われてこなかった。しかし

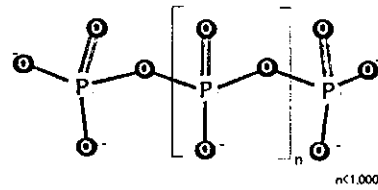


図1. ポリリン酸の構造

1990年代に入って、ポリリン酸合成酵素の遺伝子(*ppk*)がスタンフォード大学の Arthur Kornberg 研究室でクローニングされ、分子生物学的な解析が進みだした。その結果、ポリリン酸を作れない大腸菌変異株は、定常期に死滅しやすかったり、また緑膿菌の *ppk* 変異株では、運動性が悪く、感染力が低下することが分かってきた。ポリリン酸は、特にバクテリアが過酷な環境になった時に必要であることが分かってきた。ポリリン酸は生命エネルギーの塊でもあることから、うまくすれば非常に安価なATPの代替として働かせることができる魅力的な分子でもある。大腸菌のポリリン酸合成酵素は、ATPの末端のリン酸基をポリリン酸に転移して約700個のリン酸がつながったポリリン酸を合成する。また逆に過剰のポリリン酸とADPが存在すると、大腸菌のポリリン酸合成酵素はATPを生産する(図2)。

ポリリン酸の形態には可溶性と不溶性のポリリン酸塩が存在する。特に数十から100個程度のリン酸が結合したポリマーのポリリン酸はマグネシウムやカルシウムが存在すると不溶性の顆粒を作る。ポリリン酸キナーゼは可溶性のポリリン酸とADPからATPを作ることができることから、可溶性ポリリン酸はATPの供給源になりうる。しかし、不溶性の