

7) 大政健史 “バイオ人工肝臓の評価は如何にあるべきか？” 第 21 回医工学治療学会学術大会 ワークショップ4 「生物化学工学からの再生医療への取り組み」 W-4-1 要旨集: 医工学治療 vol.17 supplement 2005, p.139, 2005 年 5/13-15, 東京

8) 奥田 伸哉、広常 正人、池本 毅、大政 健史、大竹 久夫 “清酒濃縮物がヒト肝由来 HepG2 細胞に及ぼす影響” 日本農芸化学会 2005 年度大会、30E181a、要旨集 p.284 2005 年 3/28-30、札幌

4.その他

受賞 : 11th Symposium of Young Asia Biochemical Engineering Community 2005, Beijing China 平成 17 年 10 月 25 日 Most excellent poster presentation award

Takeshi Omasa, Tetsuji Hayashi, Shinsuke Onishi, Tadaaki Hashimoto, Michimasa Kishimoto, Tomohiro Yoshikawa, Masato Miyake, Hisao Ohtake "Construction of suitable cell line and system for cell based simulator for drug evaluation"

H.知的財産権の出願・登録状況

1) 大政健史、大竹久夫

” 組換えヒト細胞、ならびにその組換えヒト細胞を用いてヒト薬物代謝酵素 の誘導および薬物代謝の少なくとも一方を評価する方法” 特開 2005-229967

2) 大政健史、吉田敏臣、高木睦、片倉啓雄、應田豊雄、小林薫、三木秀夫

“糖鎖修飾制御法” 特開 2005-058111

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。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にコレステロールが重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、コレステロールと相互作用することが予想されている他のABCタンパク質に関しても、MDR1と同様に精製して機能解析することを試みた。

A. 研究目的

A-1. 背景

MDR1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は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(図1)。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

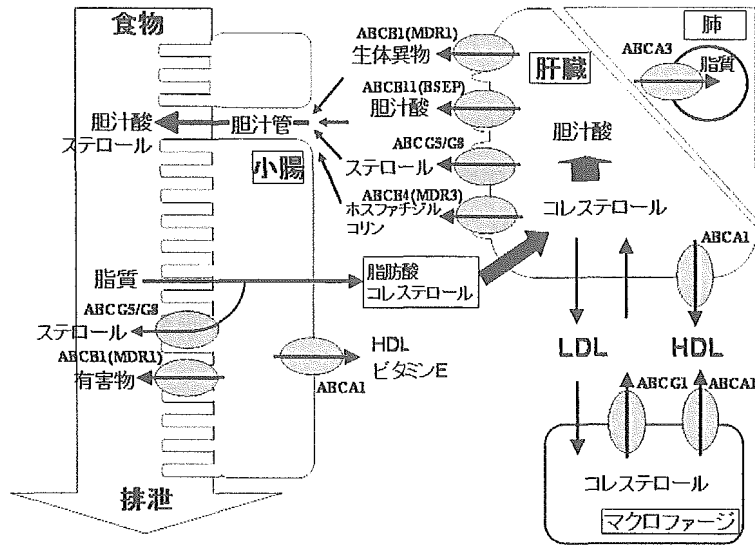


図1 生体内では49のABC蛋白質が健康維持にとって重要な役割を果たしている

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ロ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を試みた。MDR1 とコレステロールの相互作用が MDR1 の基質認識に重要な役割を果たしていることが示唆されたので、コレステロールと相互作用することが提唱されている他の ABC タンパク質に関しても、MDR1 と同様に精製して機能解析することを試みた。

B. 研究方法

B-1. 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

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。

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。MDR1 の ATP 加水分解活性を測定するにあたっては、前年度に確立した方法である酸化チタンカラムを装着した HPLC を用いて ADP 量を測定することによって行った。

B-2. 精製 MDR1 再構成系の最適化

コレステロール (0~40%) を含む人工リポ

ソーム(PC:PE:PS = 4:2)に精製MDR1を再構成し、さまざまな薬基質によって誘導されるATP加水分解を測定した。

B-3. ヒト ABCA1 の精製

ヒト ABCA1 の C 末端にヒスチ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。膜画分を 0.6~0.8% (w/v) のドデシル硫酸によって可溶化し、可溶性画分中の ABCA1 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を試みた。

C. 研究結果と考察

C-1. ヒト MDR1 の ATP 加水分解活性の基質依存性

ヒト MDR1 の C 末端に Thrombin 切断部位とヒスチ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 アガロースを用いて 90% 以上の純度で精製した。

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2)。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。

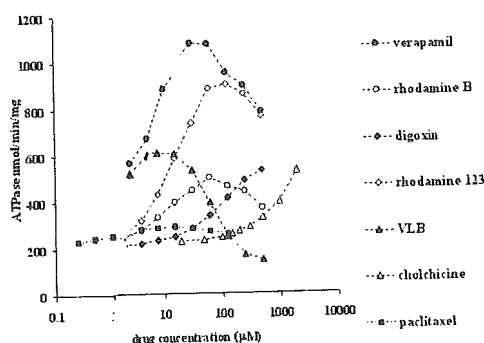


図2. MDR1 の ATP 加水分解の基質濃度依存性

C-2. 精製 MDR1 再構成系の最適化の検討

最も多くの 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 は脂質 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。

コレステロールは分子量が 500 以下の薬剤に対する親和性を一律に向上させた。一方コレステロールは分子量が 800 から 900 の薬剤に対する親和性には影響せず、分子量が 1000 を超える大きな輸送基質に対する親和性を減少させた。これらの結果から、MDR1 は分子量 800 から 900 の化合物を最も効率よく認識する基質結合部位を持つことが示唆された。コレステロールは MDR1 が小さな化合物を認識

する場合、輸送基質と同時に基質結合部位に結合し、余剰の空間を充填することでより効率よく基質の認識を可能にすることが示唆された。

C-3. ヒト ABCA1 の精製と ATP 加水分解活性の測定

ヒト ABCA1 の C 末端にヒスチジンタグを融合させた ABCA1 を Sf9 で発現させた。ABCA1 を 0.8%ドデシルマルトシドによって可溶化し、第1段階に Ni-NTA アガロース、第2段階に DE52 カラムを用いることによって、95%以上の純度で精製することに成功した。精製 ABCA1 をいろいろな種類のリン脂質によって作成した人工リポソームに再構成し、ATP 加水分解活性を測定した。その結果、ホスファチジルコリンを用いて作成したリポソームに再構成した時に、一番高い ATP 加水分解活性を示すことが明らかになった。

D. 結論

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とこれまでに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、20%程度コレステロールを含むリポソームを用いることによって MDR1 が高い活性を示すことが明らかになった。さらに、ヒト ABCA1 を大量発現し、

活性を保ったまま精製することに成功した。

18年度は MDR1 と ABCA1 を比較しながら研究することによって、これらの ABC タンパク質のコレステロールとの相互作用の詳細を明らかにし、MDR1 を機能させるために最適条件を見出すことができると期待される。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

G-1.論文

Toda, Y., Aoki, R., Ikeda, Y., Azuma, Y., Kioka, N., Matsuo, M., Sakamoto, M., Mori, S., Fukumoto, M., and Ueda, K. Detection of ABCA7-positive cells in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *Pathol. Int.* 55, 639-643 (2005)

Takahashi, H., Mitsushima, M., Okada, N., Ito, T., Aizawa, S., Akahane, R., Umemoto, T., Ueda, K., and Kioka, N. Role of interaction with vinculin in recruitment of vinexins to focal adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 239-246 (2005)

Ban, N., Sasaki, M., Sakai, H., Ueda, K., and Inagaki, N. Cloning of ABCA17, a novel, rodent sperm-specific ATP-binding cassette (ABC) transporter that regulates intracellular lipid metabolism. *Biochem J* 389, 577-585(2005)

Hayashi, M., Abe-Dohmae, S., Okazaki, M., Ueda, K., and Yokoyama, S. Heterogeneity of High Density Lipoprotein Generated by ABCA1 and ABCA7. *J Lipid Res* 46, 1703-1711 (2005)

Arakawa, R., Tamehiro, N., Nishimaki-Mogami,

T., Ueda, K., and Yokoyama, S. Fenofibric acid, an active form of fenofibrate, increases apo-lipoprotein A-I-mediated high-density lipoprotein biogenesis by enhancing transcription of ATP-binding cassette transporter A1 gene in a liver X receptor- dependent manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1193-1197 (2005)

Takahashi, K., Kimura, Y., Nagata, K., Yamamoto, A., Matsuo, M. and Ueda, K. ABC proteins, key molecules for lipid homeostasis, *Medical Molecular Morphology* 38, 2-12 (2005)

Matsuo, M., Kimura, Y., and Ueda, K. K_{ATP} channel interaction with adenine nucleotides. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 907-916(2005)

松尾道憲 植田和光 抗がん剤耐性から生活習慣病まで 植田和光編 ABC 蛋白質 学会出版センター 東京 219-244 (2005)

木村泰久、松尾道憲、植田和光 ABC トランスポーター研究の動向 - ABC 蛋白質の進化と多剤耐性 *癌治療と宿主* 17, 105-109 (2005)

小林 綾、木村泰久、松尾道憲、植田和光 創薬ターゲットとしての ABC タンパク質 *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Japan)* 125, 185-193 (2005)

植田和光、高橋 圭、小林 綾、松尾道憲 脂質輸送と ABC タンパク質 *実験医学* 23, 842-846 (2005)

G-2.学会発表

Modulation of Drug-Stimulated ATP Human MDR1/P-Glycoprotein By Cholesterol
Gordon Reseach Conference, Molecular and Cellular Biology (2005.07.25)

ABC Proteins: xenobiotic transport and lipid

transport - cholesterol and substrate recognition
International Symposium on Biogical Membrane Transport (2005.08.08)

ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Disease
1st FEBS Special Meeting on ABC Proteins
Plenary Talk (2006.3.7)

コレステロール恒常性と ABC 蛋白質
日本農芸化学会 シンポジウム (2005. 3. 29)

脂質恒常性に関わる ABC 蛋白質
第 5 9 回日本栄養食糧学会大会シンポジウム
(2005. 5. 13)

脂質トランスポートに関わる ABC 蛋白質の分子メカニズム
第 82 回日本生理学会大会シンポジウム
(2005. 05. 18)

多剤排出ポンプ MDR1 の基質認識のコレステロールによる調節
第 64 回日本癌学会学術総会
(2005. 9. 14)

抗癌剤排出ポンプ MDR1 の機能のコレステロールによる調節
第 12 回日本臓器保存生物医学会総会
(2005. 11. 25)

G-3.新聞報道
なし

H.知的所有権の取得状況

なし

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み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。平成16年度までに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、同方法でリポソームおよびプロテオリポソームを観察すると、いずれも直径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。平成17年度は、同一試料をトモグラフィ法を用いて3次元構造を検索したところ、予想通りリポソームは中空の球状を呈することを証明できた。一方、プロテオリポソームはタンパク質を組み込むことにより膜構造が変化すると推定されるので、脂質に親和性が高いタンニン酸を固定液に加えてリポソームとプロテオリポソームを区別する固定法の開発に着手し比較検討したが、明瞭に区別することはできなかった。また、今回観察した試料ではリポソームおよびプロテオリポソームの損傷がしばしば認められたので、試料作製時の物理的・化学的ストレスに対して更なる検討が必要と考える。

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14～15年度はリポソームを血管内に注入した後に通常の電子顕微鏡標

本を作製する方法を開発し、リポソームの永久標本の作製と超微細形態観察とに成功した。そこで平成16年度は開発した方法を用いてプロテオリポソームの微細構造を観察したが、リポソームとプロテオリポソームの形態学的差異は明らかにできなかった。また、タンニン酸は脂質に親和性が高いことに着目して固定液にタンニン酸を加える固定法を試みたところ、脂質膜をより鮮明に観察できる可能性が示唆された。

平成17年度は、まず、最新のトモグ

ラフ技術を用いてリポソームの 3 次元構造解析を試みた。次いで、タンニン酸添加固定液を 2 種類作製し、固定および得られる電顕像の良否を検討し、リポソームおよびプロテオリポソームの形態学的差異を検索した。なお、リポソームおよびプロテオリポソームは国立成育医療センター研究所絵野沢伸先生から提供していただいた。

1) 血管内注入法によるリポソームおよびプロテオリポソームの観察

- ①マウスの腹部大動・静脈を露出し、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)

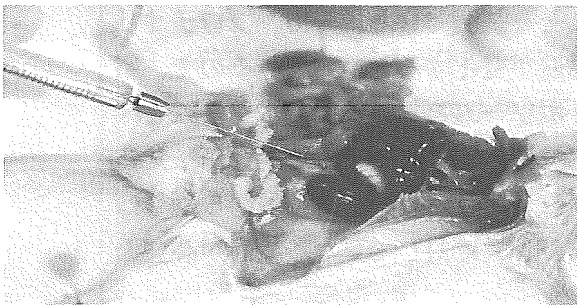


図 1. 静脈内への人工リポソーム懸濁液注入

- ②試料を注入した袋状血管を採取し、氷上で後述の固定液にて固定 (図 2)



図 2. 袋状血管の採取と固定

- 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後、樹脂を重合

2) 固定液

I. 4% グルタルアルデヒド (0.1M カコジル酸緩衝液)

※本研究で開発した標本作製法で用いた固定液で、いわゆる基準の固定液 (固定時間: 約 2.5 時間)

II. 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 (固定時間: 約 26 時間)

※平成 16 年度に試み、良結果が期待される固定液

III. 2.5% グルタルアルデヒド + 1% タンニン酸 (0.1M カコジル酸緩衝液) 混合固定液 (固定時間: 約 26 時間)

※上記②の固定液は比較的長い固定時間を要し、標本の硬度を増すので改良案として検討した固定液

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、トリミングした。試料ブロックをウルトラトーム (Leica 社) で薄切し、1 μ m の厚切り切片を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

リミングした後に 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。また、トモグラフ用には 80 ナノメートル厚の超薄切片を作製し、電子染色したのち大型電子顕微鏡 (TECNAI, Philips) を用いて連続撮影し、画像解析ソフトにより 3次元構造を構築した。

C. 研究結果

1) トモグラフ

昨年度作成したカラムリポソーム標本ブロックから比較的厚めの約 80 ナノメートル厚の超薄切片を作製し、試料の電子線に対する傾斜角 -50° ~ 70° (総傾斜角 120°)の範囲で回転させながら連続的画像を採取した。透過微細形態像から予想された通り、カラムリポソームは直径 100~150nm で、数層の膜から構成される中空の球状構造を有することが確認できた(図 3)。

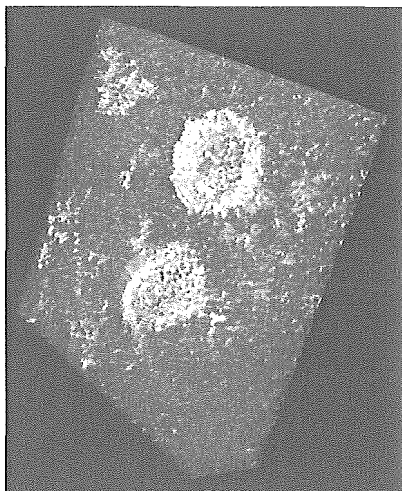


図 3. カラムリポソームのトモグラフ像

2) タンニン酸含有固定液の比較

今回観察したリポソームおよびプロテオリポソームは昨年度までに観察したものと同様に 60~150 ナノメートルの中空の円形構造を呈した。但し、タンニン酸添加固定液を使用して作製した試料のみならず標準方法で作製した試料においても、観察されたりポソームおよびプロテオリポソームは膜が破断したものや、破損後再構築されたと思われる巨大構造がしばしば観察された(図 4~7)。

損傷されている頻度はプロテオリポソームでより高率である傾向が見られた。また、固定液 II はその他の固定液に比べて損傷の度合いが高かった。

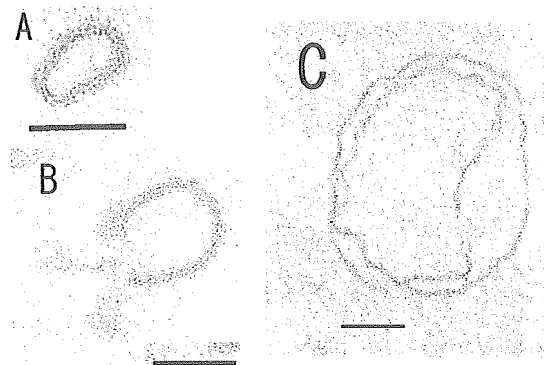


図 4. 固定液 I リポソーム。正形(A)に混じて一部破断(B)や再構築されたと思われる像もみられる(C) (Bar=100nm)

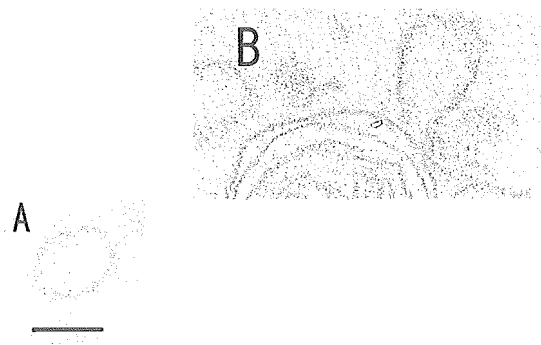


図 5. 固定液 I プロテオリポソーム。正形(A)と破損後再構築されたと思われる巨大構造(B) (Bar=100nm)



図6. 固定液Ⅱリボソーム。正形(A)と破損後再構築されたとと思われる巨大構造(B) (Bar=100nm)

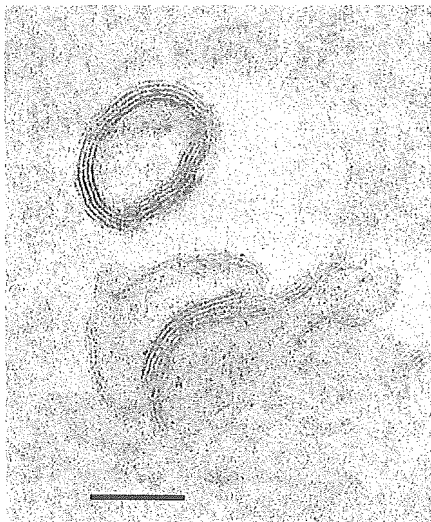


図7. 固定液Ⅱプロテオリボソーム。正形(上)と破損(下)が混在している (Bar=100nm)

標準固定液Ⅰによって作製した標本

に比べ、1.5%タンニン酸添加固定液Ⅱで固定した標本ではリボソームおよびプロテオリボソームの膜構造はより鮮明であった。一方、1.0%タンニン酸含有固定液Ⅲで作製した標本の膜構造は固定液Ⅰよりは明瞭であるが、固定液Ⅱほどは鮮明ではなかった。

リボソームとプロテオリボソームの微細構造を慎重に比較検討したが、今回使用したいずれの固定液でもその差異は明らかではなかった。

D. 考察

昨年度までに開発・確立した血管内に封入する方法を用いると、リボソームおよびプロテオリボソームの永久標本作製でき、本方法の有用性が高いことを示したが、今回はこのように作製した永久標本から超薄切片を作製し、トモグラフィ的観察が行えることを実証でき、本方法が有用性の高いことを更に確認できた。

トモグラフィ観察結果を3次元的に再構築することにより、リボソームの立体構造を画像として捉えることができた。予想通り、リボソームは中空の球状を呈する事を証明できたことは本年度の大きな成果である。

今回は由来及び作成方法が異なる試料を観察すると厳密な意味でリボソームおよびプロテオリボソームの形態比較とならないと考え、同一方法で作製したリボソームおよびプロテオリボソームの観察を試みた。昨年度までと同様の試料作成方法を実施したにもかかわらず、今までに経験しなかつたりボソームおよびプロテオリボソームの損傷を高

頻度に認められた。その原因として、①用いた試料が以前使用したものよりも脆弱である、②血管に注入する際に物理的ストレスを掛けてしまった、③固定液にタンニン酸を混合することにより浸透性変化などの化学的ストレスに起因する等が推定される。しかしながら、従来と同一の基準的方法においてもリポソームおよびプロテオリポソームの損傷が認められたことから③は考えにくい。現在のところ原因を指摘できていないので、更なる解明が待たれる。なお、リポソームよりもプロテオリポソームにおいて高率に損傷が見られる傾向にあったが、タンパク質を組み込むことにより膜が脆弱化することが示唆された。事実、プロテオリポソームを取り扱う際は慎重かつ迅速に処置しなければならないとされている（大阪大学、島内先生、私信）。

昨年度の成績から、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を鮮明に表現でき、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をより詳細に観察できると期待された。確かに膜構造をより鮮明に観察できたが、残念ながら両者の微細形態的差異を明らかにすることはできなかった。プロテオリポソームは①少量のタンパク質を組み込んでも形態が変化するに至らない、②組み込まれたタンパク質が破損によって遊離してしまったためリポソームと同様な構造を呈する、などが推測されるが、破損のほとんど無い2者を比較しても形態的な差異は明らかでない。その原因として後者は考えにくい。今後の大きな課題として残され、

更なる検索が必要である。

今回も用いた1.5%タンニン酸含有固定液Ⅱは最も鮮明に膜を表現できたが、反面試料の破壊が最も著しかった。タンニン酸の浸透を促進するために4%のパラフォルムアルデヒドを加えたので試料の破壊に至った可能性も否定できない。しかし、パラフォルムアルデヒドを含まずタンニン酸濃度が1%の固定液Ⅲでも試料の損傷があったことを考慮すると、パラフォルムアルデヒドの存在によって試料が破壊されたとは考えにくい。むしろ、固定液ⅡとⅢを用いた場合固定に長時間を要するので、固定される前に試料の損傷が生じる可能性が高い。

組み込んだタンパク質を免疫電顕法により証明する必要があるが、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

リポソームは中空の球状構造を呈することをトモグラフィーによって証明できた。リポソームとプロテオリポソームは同様な微細構造を呈していた。プロテオリポソームはタンパク質を組み込まれることにより膜構造がリポソームと異なると推定されるが証明できなかった。タンニン酸を含有する固定液を使用すると膜構造がより明瞭になる事が確認できた。血管内封入法とタンニン酸含有固定液を併用する方法を用いて更なる微細構造観察が必要である。

F. 健康危険情報

該当すること無し

G-1. 論文発表

- 1) Suzuki K, Wang R, Kubota H, Shibuya H, Saegusa J, Sato T. (2005) Kinetics of biglycan, decorin and thrombospondin-1 in mercuric chloride-induced renal tubulointerstitial fibrosis. *Exp Mol Pathol.* 79, 68-73.
- 2) Kim JS, Kubota H, Sakai T, Doi K, Saegusa J (2005) Electron microscopic study of subcapsular cell hyperplasia in the adrenal glands of IQI/Jic mice. *Exp Anim.*, 54, 107-10.

G-2. 学会発表

- 1) Ohtani K, Kubota H and Saegusa J (2005) Comparative Investigation of Several Sperm Analysis Methods for Evaluation of Spermatotoxicity of 2-bromopropane. Annual Meeting of European Society of Toxicology 2005, *Toxicology Letters* 158, S128-129.
- 2) 三枝順三、小林健一、大谷勝己、久保田久代 (2005) 50Hz 超低周波磁場の生殖に及ぼす影響 -マウスの3世代試験- 第140回日本獣医学会学術集会講演要旨集 226頁
- 3) 大谷勝己、小林健一、久保田久代、三枝順三 (2005) ジブロモク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, *日本衛生学雑誌* 60, 241.
- 4) Katsumi Ohtani, Hisayo Kubota, Kenichi Kobayashi, Junzo Saegusa (2005) Evaluation of Spermatotoxicity of Industrial Chemicals by utilizing of Mitochondrial metabolism in Sperm. 第78回日本生化学会大会, *生化学* 77, 1078.
- 5) 大谷勝己、小林健一、久保田久代、三枝

順三 (2005) ミトコンドリア代謝能を利用したジブロモクロプロパンのラット精子への影響解析. フォーラム 2005 衛生薬学・環境トキシコロジー, *Journal of Health Science* 51 (Suppl.) S108

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 を肝臓において高発現させる条件について、マウスを用いて検討した。チトクローム P450 酵素を誘導する phenobarbital、carbamazepin、rifampicin を反復投与したあとで、胆管欠紮により抱合型ビリルビンを負荷すると、無処置の約 9 倍までマウス肝臓における同遺伝子および蛋白発現が増加した。また、この増加は欠紮後 7 2 時間まで持続した。これらの知見により、更に本蛋白を多量に肝細胞から得ることが可能となったと考えられる。

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。非細胞性代謝機能代替デバイス

を作成するには、より多くの蛋白を得ることが必要だが、現時点では本遺伝子を安定発現させた培養細胞系は確立されていない。そのため、この蛋白を内在する臓器・細胞から、蛋白を効率よく抽出し使用する必要がある。昨年までに研究者らは、胆管閉塞モデルの肝臓において、この遺伝子発現が一過性ではあるが約 2.5 倍に増加することを明らかにした。しかし、デバイスへの転用のためには、更に発現量を安定して増加させる必要がある。一方、ヒト・動物においては、併用することで薬物代謝酵素・薬物輸送体活性を著明に変化させる薬物があり、これらの併用時には注意を要する組み合わせがあるということは、広く知られている。このような知識を利用して、マウス肝臓における ABCA8 遺伝子および蛋白発現に対して影響する様々な薬剤を明らかにすることを今年度の目的として、以下の検

討を行った。

B.研究方法

ABCA8 mRNA 発現については、昨年度までの研究で得られたマウス ABCA 8 遺伝子配列をもとに作成されたプローブを利用し Real time PCR(Taqman)法により検討した。また、一部には RNA protection assay も行った。蛋白発現についても、昨年度までの研究でマウス ABCA 8 蛋白に対するポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った。これらを用いて、正常および各種モデルマウスにおいて、遺伝子・蛋白発現の変化を検討した。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いくつかの内分泌臓器をも検討した。病態マウスモデルとしては、昨年度までに遺伝子レベルでの増加を確認している、胆管閉鎖（抱合型ビリルビン増加）モデルを用いた。反復併用薬物としては、薬物代謝酵素発現を誘導させることの知られている抗てんかん薬 (phenobarbital; 75mg/kg/day, carbamazepine; 50mg/kg/day)、抗結核薬 rifampicin(6mg/kg/day)、また酵素阻害薬として知られる itraconazole(25mg/kg/day)を用いた。これらをそれぞれ前もって1週間全身投与しておいたのちに胆管欠紮を行い、組織を取り出して解析に供した。

C.研究結果

1. 抗てんかん薬 (phenobarbital, carbamazepine) 前処置時の胆管欠紮後 ABCA8 遺伝子・蛋白の発現の変化

昨年までに明らかにしたように、胆管欠紮処置により、肝における遺伝子発現は24時間を

ピークに増加した。Phenobarbital 反復投与後に胆管欠紮を行うことで、vehicle 投与と比較して、更に3-4倍の遺伝子発現の増加が確認された(図1)。しかもこの前処置により、発現上昇は欠紮後6時間から72時間まで持続した。

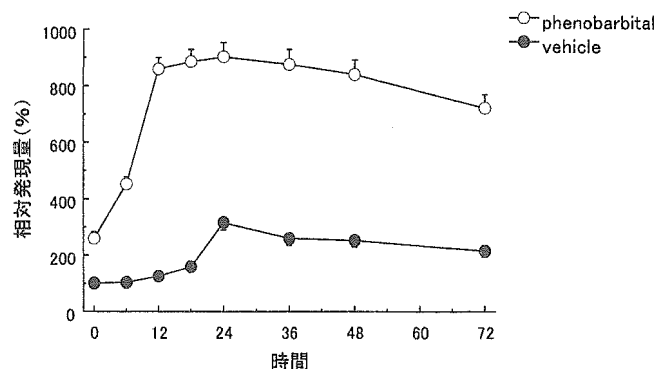


図1 phenobarbital 前処置後の胆管欠紮時 ABCA8 遺伝子の発現の変化

蛋白レベルで検討しても、発現量は vehicle 群の約3倍(欠紮前の約9倍)までに増加していた(図2)。

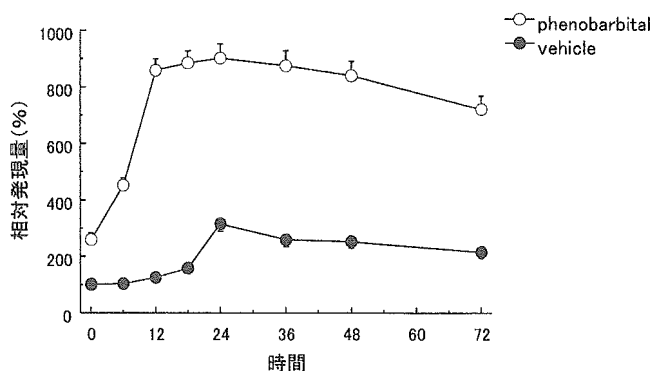


図2 phenobarbital 前処置後の胆管欠紮時 ABCA8 蛋白の発現の変化

carbamazepine 前処置時にもほぼ同様の結果を得た。しかし、蛋白発現量は vehicle 群の約2.5倍(欠紮前の約7倍)までの増加と、その増加程度は phenobarbital に比較してやや小さかつ

た (図 3、4)。

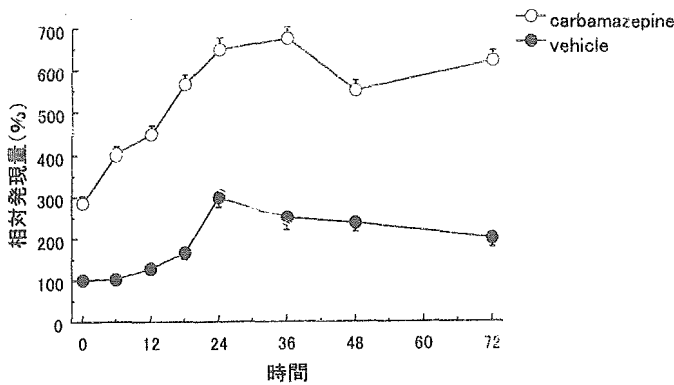


図 3 carbamazepine 前処置後の胆管欠紮時 ABCA8 遺伝子の発現の変化

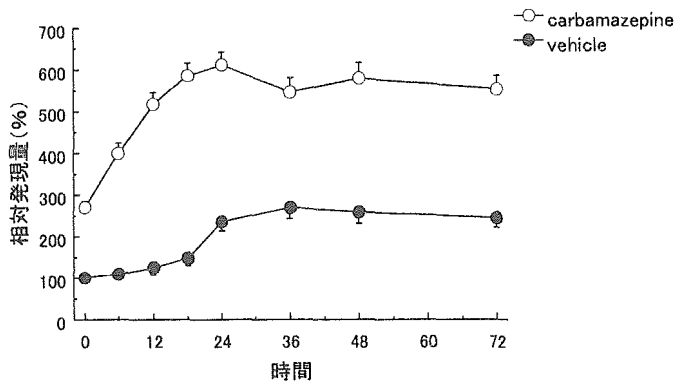


図 4 carbamazepine 前処置後の胆管欠紮時 ABCA8 蛋白の発現の変化

2. 抗結核薬 rifampicin 前処置時の胆管欠紮後 ABCA8 遺伝子・蛋白の発現の変化

rifampicin 反復投与後に胆管欠紮を行った場合にも、phenobarbital 反復投与の場合と同様の結果を得た。すなわち、vehicle 投与と比較して、更に約 2 倍の遺伝子発現の増加が確認され (図 5)、しかも発現上昇は欠紮後 6 時間から 72 時間まで持続した。

蛋白レベルで検討しても、発現量は vehicle 群の約 2 倍 (欠紮前の約 4 倍) までに増加していた (図 6)。

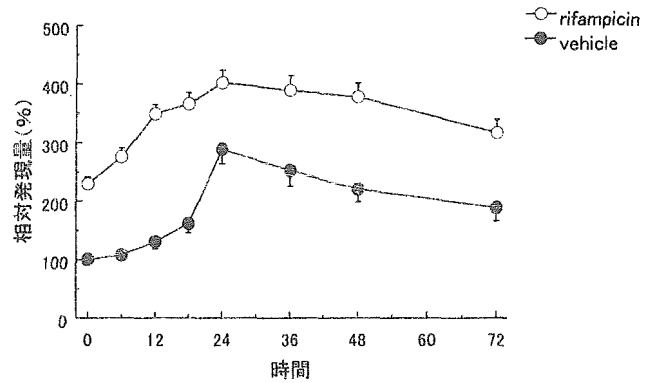


図 5 rifampicin 前処置後の胆管欠紮時 ABCA8 遺伝子の発現の変化

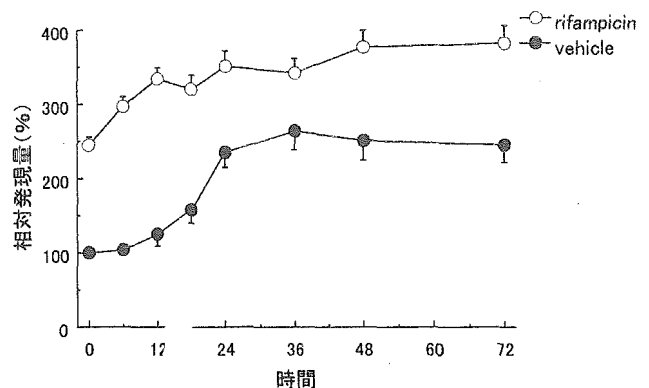


図 6 rifampicin 前処置後の胆管欠紮時 ABCA8 蛋白の発現の変化

3. 酵素阻害薬 itraconazole 前処置時の胆管欠紮後 ABCA8 遺伝子・蛋白の発現の変化

itraconazole 前処置により、遺伝子発現は有意に減少し、その後の胆管欠紮によっても発現の増加は見られなかった (図 7)。

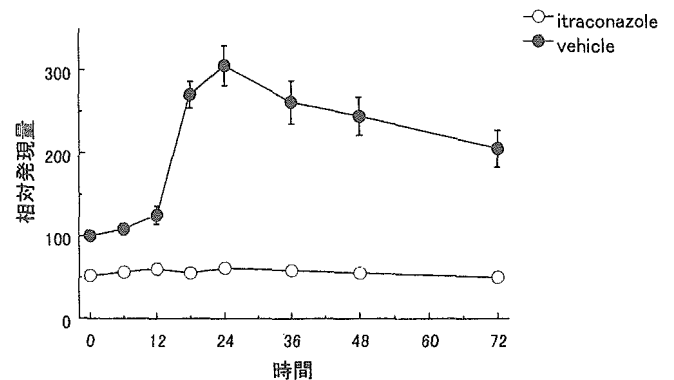


図 7 rifampicin 前処置後の胆管欠紮時 ABCA8 遺伝子の発現の変化

これは蛋白レベルでも同様であった(図8)。

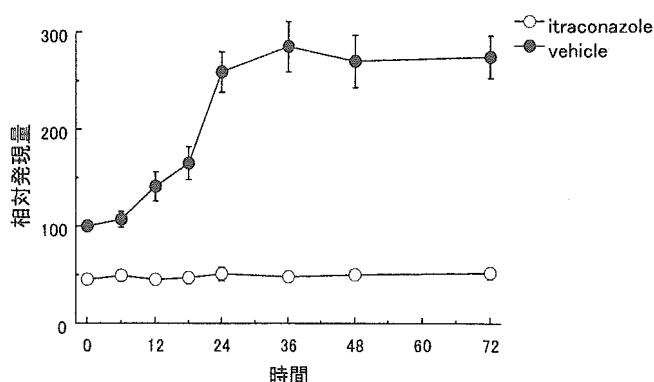


図8 rifampicin 前処置後の胆管欠紮時 ABCA8 蛋白の発現の変化

D. 考察

抱合型ビリルビンを効率よく輸送する非細胞性代謝機能代替デバイスに、この新規蛋白 ABCA8 を用いるには、蛋白を大量に得ることが必要である。しかし、現時点では本遺伝子を安定発現させた培養細胞系は確立されていない。そのため、この蛋白を内在する臓器・細胞から、蛋白を効率よく抽出し使用する必要がある。そのための条件の一つとして、肝臓の主要な薬物代謝酵素であるチトクローム P450 の誘導薬として知られる phenobarbital、carbamazepin、rifampicin を前処置することにより、胆管欠紮時よりも更に RNA、蛋白量が増加することを明らかにした。また、チトクローム P450 の阻害薬である itraconazole 投与により胆管欠紮時の発現増加が軽減されることも明らかになった。

一方このような現象の機序については、現時点では不明である。phenobarbital、carbamazepin、rifampicin は P450 遺伝子の転写調節領域に結合することで、その発現を亢進させることが知られている。本遺伝子の上

流領域についての解析は全く行われていないが、同様の機序である可能性もある。また、本蛋白と同じ ABC transporter に属する ABCA1 については、転写調節領域内に抗てんかん薬や副腎皮質ホルモンの結合する部位が同定されており、これらによる発現調節を受けていることも、近年明らかになってきている。他方、Itraconazole はチトクローム P450 蛋白に直接結合することで酵素機能を阻害することが知られており、この薬剤のチトクローム P450 遺伝子量への影響はごく軽度とされる。一方近年、薬物輸送体の一部において、Itraconazole による発現抑制を受けるものが報告されつつある。本遺伝子についても、詳細は不明ながら、同様の制御を受けている可能性がある。

今回はマウスを動物モデルとして用いたおり、ヒト由来細胞を用いた解析は行えなかった。個体としての前投与は不可能であるが、ヒト由来培養細胞においてもこれらの薬剤によるチトクローム P450 の誘導は起こることから、ヒト由来培養細胞を今後利用して、同じ手法により蛋白をより多く得ることが十分可能であろうと考えられる。

E. 結論

マウス肝臓を用いて、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・蛋白の発現をより増加させる条件を検討した。チトクローム P450 酵素を誘導する phenobarbital、carbamazepin、rifampicin を前処置したのちに、胆管欠紮により抱合型ビリルビンを負荷すると、無処置マウスの約9倍まで更に遺伝子・蛋白発現が増加することを明らかにした。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、肝不全治療法が大きく進歩するものと期待される。

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) Wakaumi M, Tsuruoka S, Sakamoto K, Shiga T, Fujimura A. Pilsicainide in breastmilk from a mother: comparison with two other anti-arrhythmic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 59:120-122, 2005.
- (2) Watanabe S, Tsuruoka S, Vijayakumar S, Fischer G, Zhang Y, Fujimura A, Al-Awqati Q, Schwartz GJ. Cyclosporin produces distal renal tubular acidosis by blocking peptidyl cis-trans prolyl isomerase activity of cyclophilin. *Am J Physiol Renal Physiol*. 288(1):F40-7, 2005.
- (3) Ando H, Tsuruoka S, Yamamoto H, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A. Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase mRNA expression in C57BL/6 mice fed an atherogenic diet. *Atherosclerosis*. 178(2):265-9, 2005
- (4) Tsuruoka S, Schwartz GJ, Ioka T, Yamamoto H, Ando H, Fujimura A. Citrate reverses Cyclosporin A-induced metabolic acidosis and bone resorption in rat. *Am J Nephrol*. 25(3):233-239, 2005.
- (5) Tsuruoka S, Wakaumi M, Ioka T, Yamamoto H, Ando H, Sugimoto K, Fujimura A. Angiotensin II receptor blocker-induced blunted taste sensitivity: comparison of candesartan and valsartan. *Br J Clin Pharmacol*, 60:204-207, 2005.
- (6) Wang N, Tsuruoka S, Yamamoto H, Enosawa S, Omasa T, Sata N, Matsumura T, Nagai H, Fujimura A. The bioreactor with CYP3A4- and glutamine synthetase-introduced HepG2 cells: Treatment of hepatic failure dog with diazepam overdose. *Artif Org.* 29:681-4, 2005.
- (7) Ando H, Yanagihara H, Hayashi Y, Obi Y, Tsuruoka S, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A. Rhythmic mRNA expression of clock genes and adipocytokines in mouse visceral adipose tissue. *Endocrinology*. 146(12):5631-5636, 2005.
- (8) Ando H, Tsuruoka S, Yanagihara H, Sugimoto K, Miyata M, Yamazoe Y, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A. Effects of grapefruit juice on the pharmacokinetics of pitavastatin and atorvastatin. *Br J Clin Pharmacol*. 60(4):494-497, 2005.
- (9) Tsuruoka S, Wakaumi M, Araki N, Ioka T, Sugimoto K, Fujimura A. Comparative study of taste disturbance by losartan and perindopril in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 45:1319-1323, 2005.
- (10) Wakaumi M, Ishibashi K, Ando H, Kasanuki H, Tsuruoka S. Acute digoxin loading reduces ABCA8 mRNA expression in mouse. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 32:1034-41, 2005.

2. 学会発表

- (1) 鶴岡秀一、錦健太、山本尚史、井岡崇、安藤仁、藤村昭夫。5/6 腎摘ラットにおけるオキサカルシトリオール(OCT)投与時刻の影響。第 48 回日本腎臓学会学術総会。2005 年 6 月 23-25 日、横浜。(日腎誌 47 : 252、2005)。
- (2) 渡辺聖二、鶴岡秀一、朝山光太郎、白幡聡、藤村昭夫、Al-Awqati Q、Schwartz GJ。Cyclosporin A(CsA)は Cyclophilin の Peptidyl Prolyl cis-trans Isomerase(PPIase) 活性を阻害し dRTA を生じる。第 48 回日本腎臓学会学術総会。2005 年 6 月 23-25 日、横浜。(日腎誌 47 : 298、2005)。
- (3) 山本尚史、鶴岡秀一、井岡崇、藤村昭夫、浅野泰、草野英二。ラット血管平滑筋細胞増殖に対するインドキシル硫酸の影響。第 48 回日本腎臓学会学術総会。2005 年 6 月 23-25 日、横浜。(日腎誌 47 : 282、2005)。
- (4) 鶴岡秀一、山本尚史、井岡崇、早坂常江、斎藤鉄男、藤村昭夫。オキサカルシトリオ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 50 回日本透析医学会学術集会・総会。2005 年 6 月 23-25 日、横浜。(透析会誌 38:Suppl 988, 205)
- (5) 鶴岡秀一、山本尚史、草野英二、藤村昭夫。ハイブリッド型人工腎臓を用いた薬物の除去。(ワークショップ・透析医療をめぐる新科学技術開発)。第 50 回日本透析医学会学術集会・総会。2005 年 6 月 23-25 日、横浜。(透析会誌 38:Suppl 606, 205)
- (6) 鶴岡秀一、若海美智、藤村昭夫、石橋賢一。抱合型ビリルビンを基質とする新規薬物輸送体 ABCA8 について。2005 年日本臓器保存生物医学会総会。ワークショップ「薬物体内動態、代謝酵素とトランスポーター」。2005 年 11 月 14-16 日、筑波。
- (7) Tsuruoka S, Swenson ER, Ioka T, Fujimura A, Imai M. Preventive effect of carbonic anhydrase (CA) inhibitors on cadmium (Cd)-induced tubulopathy: role of luminal membrane-bound CA in the mechanism of inhibition of Na-glucose cotransport in isolated perfused rabbit proximal tubule cells. 38th American Society of Nephrology Annual Meeting. Philadelphia, PA. Nov 3-8, 2005. (J.Am.Soc.Nephrol 16: 622A, 2005 in abstract form)
- (8) Yamamoto H, Tsuruoka S, Ioka T, Ando H, Ito C, Akimoto T, Fujimura A, Asano Y, Kano E. Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. 38th American Society of Nephrology Annual Meeting. Philadelphia, PA. Nov 3-8, 2005. (J.Am.Soc.Nephrol 16: 383A, 2005 in abstract form)
- (9) 鶴岡秀一、杉本孝一、藤村昭夫、松原茂樹、鈴木光明、伊藤真也。自治医科大学臨床薬理センターにおける妊娠中の服薬に関する質問事例の検討。第 26 回日本臨床薬理学会年会。2005 年 12 月 3-5 日、大分 (Jpn J Clin Pharmacol Ther 35: S-282, 2006)。
- (10) 安藤仁、柳原勇人、鶴岡秀一、杉本孝一、宮田昌明、山添康、篁俊成、金子周一、藤村昭夫。ピタバスタチンの薬物動態におよぼすグレープフルーツジュースの影響。第 26 回日本臨床薬理学会年会。2005 年 12 月 3-5 日、大分 (Jpn J Clin Pharmacol Ther 35: S-271, 2006)。

なし

H.知的財産権の出願・登録状況

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

装置化へ向けた各種素材および基盤技術の統合

分担責任者 黒田 章夫 広島大学・大学院先端物質科学研究科・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顆粒を安定に存在させるための基盤研究を行った。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直径数マイクロmの顆粒を形成する。昨年度の研究でこのポリリン酸顆粒が ATP の供給源になりうるということがわかった。また、このポリリン酸顆粒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の ATP の供給源になり得ると思われた。しかし、試験管内で調整したポリリン酸顆粒はすぐに可溶性のポリリン酸となって流出してしまうことから、安定した ATP 供給が出来ない恐れがある。一方、大腸菌などから単離したポリリン酸顆粒は水を加えてもほとんど溶出せずに安定に存在する。そこで、本研究では生体内で調整される安定なポリリン酸顆粒をモデルにして、試験管内でより安定なポリリン酸顆粒を調整する系の確立を目指した。具体的には大腸菌から単離されたポリリン酸顆粒と同様の組成のポリリン酸顆粒を試験管内で調整し、そこに大腸菌の細胞内で顆粒の安定化に関与していると思われる物質を添加してその効果を検討した。その結果、生体内に多量に存在する塩基性物質であるポリアミンがポリリン酸顆粒の安定化に非常に効果があることが明らかとなった。またその効果は大腸菌内にフリーに存在するといわれているポリアミン濃度でも十分に見られた。ポリアミンによるポリリン酸顆粒の安定化効果が生体内でも起こり得ることを初めて示した。

A. 研究目的

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、