

を利用する場合がある。本項目では、特に細胞を中心に宿主としての動物資源について解説する。

(a) 細胞培養の始まりと培地開発<sup>1)~3)</sup> 動物細胞の利用は、細胞を生体外に取り出し、これを培養する手法が出発点となっている。1800年代後半から、動物の組織から細胞を取り出すことは試されていたが、実際に動物細胞を *in vitro* で培養する技術は1907年に R. G. Harrison によって行われたオタマジャクシの脊索から取り出した細胞を培養する実験にて本格的に始められたと考えられる<sup>4)</sup>。

これをもとにして、生体由来の抽出液や血清を用いた生体外細胞培養の研究が本格的に開始された。つぎの大きなステップは、NIHの W. R. Earle や H. Eagle らのグループによって1950年代になってさかんに研究された生体必須アミノ酸の研究と、それに伴って開発された合成培地である。これは、血清中のアミノ酸組成を基準にして血清を補う役目として、多種のアミノ酸、ビタミンなどから合成されている。

しかし、これらの培地はあくまでも血清を補うために開発されたものであり、細胞培養には血清が必要とされた。しかし、血清は試料ごとに細胞増殖能が異なり、さらにその組成もはっきりとは解明されていないことなどから、組成不明の血清を既知の物質で置き換えて培養する無血清培養がさまざまに考案されてきた。

1970年代後半から本格的に始まる無血清培地の開発は、G. H. Sato による血清の主要な機能は成長因子

(growth factor) の供給にあるという考えに基づいて、彼およびそのグループによって長足の進歩を遂げた。なかには成長因子といってもタンパク質ではなく、必須元素や栄養源としての分類が適当なものもあったが、明らかに血清の代替としての機能を果たす多数の物質が解明された。この考え方に基づき、村上らは、ハイブリドーマの培養に必要な細胞成長因子としてエタノールアミンを見出し、現在でもハイブリドーマの無血清培養に有効な RDF-ITES 培地を考案した。これは、合成培地の混合物 (RPMI1640, Dulbecco 改変 Eagle's minimum essential medium, Ham's F12 培地の 2:1:1 混合物) に成長因子 ITES (insulin, transferrin, ethanolamine, selenium) を添加したものである。

現在、さまざまな細胞培養分野にて用いられている培地は、前述のアミノ酸などの合成培地に血清を添加した血清培地と、合成培地に上記に代表されるような成長因子を添加した無血清培地と大きく二つに分類することができる。表 1.20 に、よく知られている無血清培地である eRDF-ITES 培地の組成を示す。

細胞培養培地の特徴は、培地中に含まれている  $\text{NaHCO}_3$  にある。すなわち、気相中の炭酸ガス (通常 5%) との緩衝作用により、培養中の pH を一定に保つ働きをしている。また、培地には pH 指示薬のフェノールレッドが添加され、培養中の pH 変化を視覚的にモニターし、培地交換のタイミングや雑菌汚染、細胞増殖把握に利用されている。

表 1.20 eRDF-ITES 無血清培地の組成 [mg/l]

種 類	濃度	種 類	濃度	種 類	濃度
アラニン	7	チロシン	87	ビルビン酸	110
アルギニン・HCl	582	バリン	109	チミジン	5.72
アスパラギン	83	ピオチン	0.1	グルコース	3420
アスパラギン酸	40	葉酸	1.8	フェノールレッド	5
システイン・HCl・H <sub>2</sub> O	106	リボ酸	0.05	HEPES	1190
グルタミン酸	40	ニコチンアミド	1.5	NaCl	6430
グルタミン	999	p-アミノ安息香酸	0.51	KCl	373
グルシン	43	パントテン酸	0.59	CaCl <sub>2</sub>	109
ヒスチジン・HCl・H <sub>2</sub> O	75	ピリドキサル・HCl	1.0	MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	66.2
ヒドロキシプロリン	31	ピリドキシン・HCl	0.51	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	4915
イソロイシン	157	リボフラビン	0.13	NaHCO <sub>3</sub>	1050
ロイシン	165	チアミン・HCl	1.59	CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	7.5 × 10 <sup>-4</sup>
リジン・HCl	197	ビタミン B <sub>12</sub>	0.34	FeSO <sub>4</sub> ・9H <sub>2</sub> O	0.25
メチオニン	49	コリン・HCl	12.3	ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.23
フェニルアラニン	74	iイノシトール	46.8	インスリン	10
プロリン	55	グルタチオン	0.49	トランスフェリン	20
セリン	85	ヒポキサンチン	1.02	エタノールアミン	2 μl
スレオニン	111	リノール酸	0.02	セレンウム	1.7 × 10 <sup>-5</sup>
トリプトファン	18	プトレッシン・HCl	0.04		

(b) 初代細胞と細胞株 上記に述べたように、細胞培養技術の発展に伴って、生体外細胞培養が可能となった。通常、生体内においては、細胞は単独にて存在するのではなく、複数の種類の細胞と一緒に混在し、組織・器官を形成している。初期の生体外培養は、これら組織・器官から生体片を取り出し、培養することで実現した。やがて、20世紀前半にかけて、トリプシン、コラゲナーゼなどの酵素を用いて細胞を個々ばらばらに分散させ、種類の同じ細胞を取り出して培養し、その機能について研究する手法が確立された。これは微生物の純粋培養に相当する手法であり、独立した細胞を取り扱うことにより、生体内での細胞の機能を生体外にて、個々に独立した形で検討することが可能となった。

生体外に取り出した細胞は、十分な栄養源、環境条件下において継代を繰り返しても、ある程度細胞分裂を繰り返すとそれ以降は分裂増殖を繰り返すことができない(有限寿命)。ところが、継代した初代細胞中の一部細胞や、がん細胞などは無限増殖能を獲得し(株化)、生体外において無限に分裂増殖を繰り返すことができる。通常、その場合は、生体内にて維持していた機能の一部が低下もしくは欠損している場合が多い。また、取り出した細胞は血球系由来細胞を除き、増殖には接着面を必要とする。このようにして樹立した細胞株を用いることにより、実験室内において、長期培養や繰り返し実験を再現よく行うことが可能となった。さらに、細胞凍結保存技術の発達により、いったん樹立した細胞株をいつでもどこでも利用することが可能となり、資源としての有効性が確立された。

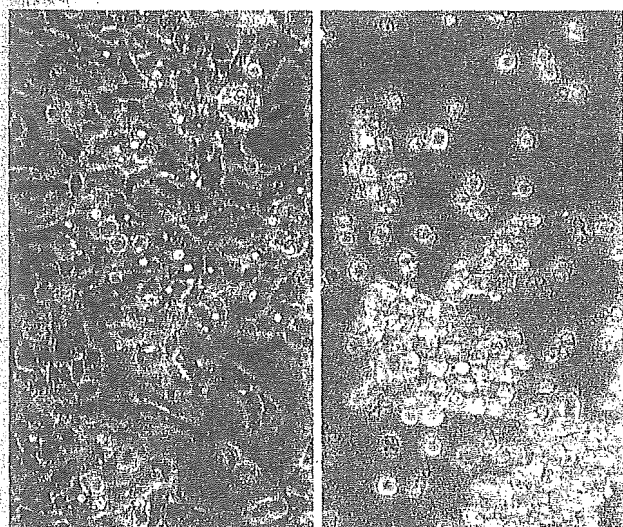
(c) 細胞培養の産業応用：物質生産 細胞培養技術の発展に伴い、細胞自身を産業応用しようとする試みもさかんに行われるようになってきた。細胞自身を産業応用する場合には、組換え微生物のように物質生産の媒体(場)として利用する場合と、細胞自身を利用対象として、評価系や医療等に直接利用するという大きく二つの視点からの産業応用がある。

細胞培養を物質生産に利用しようとする試みは、エリスロポエチン、インターフェロン、ウロキナーゼ、モノクローナル抗体に代表されるような生体由来の生理活性物質の解明とともに、広がってきた。一方で、本分野の大きな発展は、後にノーベル賞を受賞した1949年のJ. F. Endersによるポリオウイルスの培養細胞を用いた増殖の成功である<sup>5)</sup>。これによって、動物ウイルスを人為的条件下で取り扱え、ワクチン開発・生産への利用が広がった。1950年代後半になると、微生物発酵の技術を応用して、ジャーファーメンターを用いた動物細胞培養、いわゆる通気攪拌培養がさかに行われるようになった。また、CHO(チャイニーズハムスター卵巣細胞株)やBHK(ベイビーハムスター腎臓細胞株)などが遺伝子組換えに適した宿主細胞株としてさかんに利用されるようになってきた。現在では培養法として連続灌流を組み合わせた高度生産まで行われ、高密度流加(回分)培養では8~15 k/l規模、連続灌流培養では500 l規模の濃度では最大5 g/lのレベル(流加培養)の組換えバイオ医薬品大量生産培養が行われている。また、宿主としての動物細胞の利点は、原核生物、下等真核生物、植物と異なり、本来のヒトに近い翻訳後修飾が可能である点にある。これら翻訳後修飾、特に糖鎖修飾は細胞内酵素反応によって行われるため、培養条件によって変化し、これを厳密に制御する品質管理技術が求められている。

わが国では2001年時点で動物細胞培養によるバイオ医薬品生産の売上は2500億円程度にまで達しており、全世界でのアミノ酸生産(2000億円程度)と比較しても遜色のないレベルにまで拡大している<sup>6)</sup>。また、海外では、日本同様の生理活性物質生産のみならず、ワクチン生産にも大規模に応用されている。

(d) 細胞培養の産業応用：評価系、医療応用<sup>7)~9)</sup>

動物細胞の産業応用は上述のようにバイオ医薬品生産の宿主としての発展が大きいが、細胞を用いた評価系や、近年になってさかんに研究されている細胞自身の医療応用の分野での応用も活発になってきている。細胞自身を評価系に用いる場合は、生理活性物質の探索と単離、食品成分の機能評価、細部毒性試験を用いた環境汚染物質の評価、各種医薬品の機能評価、安全性試験やアレルギー検定などに用いられている。また、



(a) 接着性細胞(ヒト肝由来 HepG2) (b) 浮遊性細胞(ヒト白血球由来 MTA)

図1.21 接着性細胞と浮遊性細胞

近年では動物実験代替法として医薬品・化粧品の毒性試験や安全性試験にも用いられている<sup>1)</sup>。

また、細胞療法/再生医療として細胞自身を治療手段・医薬品として用いる試みも近年さかんになされるようになってきている。細胞自身を治療の手段として利用する試みは、近年になって始まったものではなく、そのルーツは古く輸血等の治療法にたどることができる。近年の再生医療/ティッシュエンジニアリングと総称される手法での最初の例は、1970年代後半から1980年代初頭にかけてのH. Greenら<sup>10)</sup> 3グループによる皮膚の再生にさかのぼることができる。彼らは、生体外培養を利用して、細胞もしくはマトリックスを足場として、その上に皮膚組織構造を再生するという手法にて人工皮膚を開発した。ティッシュエンジニアリングという学問分野の名称はR. LangerおよびJ. P. Vacantiによって1993年に発表された耳の形をした軟骨再生の報告によって大いに広まった<sup>11)</sup>。こちらは生体外での培養を利用せずに、マウス生体内に再建した足場を利用した再生手法である。

現在の再生医療/ティッシュエンジニアリングを支える大きな要素技術は、治療に利用可能なさまざまな幹細胞と呼ばれる細胞種概念が提唱され、発見されたことに由来する。幹細胞は自己増殖する能力とさまざまな機能を持つ細胞に分化する能力をあわせ持つ細胞と定義づけられ、これを用いることによりさまざまな器官のもととなる細胞源を供給することが可能となる。すなわち、幹細胞を生体より分離し、これを生体外にて培養・分化させて生体外にて細胞/組織/器官を再生させ、これを生体内に戻すという治療法の可能性が再生医工学/ティッシュエンジニアリングという分野の現在の発展につながっている<sup>12)</sup>。

(e) 宿主としての動物個体 1981年にM. J. EvansおよびM. H. Kaufmanによって樹立されたマウスES細胞(胚性幹細胞)(embryonic stem cell)株の樹立と、このES細胞株に対する遺伝子導入技術の開発により<sup>13)</sup>、細胞レベルでの知見が、一気に動物個体レベルへの知見に展開することが可能となった。すなわち、目的とする遺伝子を組み込み/破壊したES細胞を初期胚に導入してキメラマウスを作成してさらに交配させることにより、目的の遺伝子を欠損/改変したマウスを構築することが可能となる。ES細胞を用いる以外に、マイクロインジェクションや体細胞核移植を用いることによりトランスジェニック動物を作成する技術も開発されてきており、作成された個体は疾患モデル動物のみならず、移植用代替臓器としての利用や、動物工場としての医薬品生産の可能性についても検討されているが、実際の産業応用への道のりは

まだ遠い。これらのトランスジェニック動物作成には通常、個体発生と同じ程度の長い時間が必要とされ、開発スピードの観点から、生産系というよりは、医薬品開発のためのツールとしての利用が有望視されている。

#### 1.4.2 保存方法

(a) 凍結保存法の発見と凍結保存の原理<sup>14)</sup> 細胞株の凍結保存法が開発されるまで、実験室レベルで細胞を保存するためには、無限増殖能を持つ細胞を、ひたすら継代を繰り返して維持するしか手段はなかった。したがって、有限寿命の初代細胞については生体より分離した後、ただちに行う実験のみ可能であった。

1940年代後半のC. Polgeらのニワトリ精子に対するグリセリンの凍害防御効果の発見<sup>15)</sup>について、1959年のJ. E. LovelockおよびM. W. H. BishopによるDMSO(dimethylsulfoxide)の凍害防御作用<sup>16)</sup>が明らかになり、動物細胞の凍結による傷害を防止しながら、長期間細胞を保護する手法が確立された。現在では、主としてDMSOを用いて、液体窒素下にて凍結保存を行うことにより、通常数年、場合によっては10年以上の長期保存が可能となっている。凍結による細胞障害のメカニズムは詳しく解明されていない点も多々あるが、いくつかの点から、細胞個々の固有の凍結保存に適した冷却速度が存在することが知られている。

細胞を凍結する際に起こる傷害としては、細胞を急速に冷却した際の傷害と、ゆっくり冷却した際に生じる傷害の2種類がある。すなわち、最適の冷却速度は両者のバランスのうえに成り立っている。

細胞を急速に冷却すると、細胞内の水の多くが細胞内に過冷却の状態が存在し、凍らないままの状態となる。この状態で細胞内になんらかの因子やショックを与えられると、植氷され、細胞内凍結を引き起こし、細胞内に氷晶を形成する。この氷晶形成が、細胞内小器官、構造の破壊を引き起こし、細胞に対して傷害となる。通常、凍結保護剤を添加しない場合、 $-10 \sim -20^{\circ}\text{C}$ で細胞内凍結を引き起こしてしまう。一方、さらに冷却速度を上げていくと、細胞内に形成される氷晶は小さくなり、非常に高い冷却速度(毎秒 $1000^{\circ}\text{C}$ 以上)においては、細胞内の水がガラス化(ビトリフィケーション)し、細胞の構造は生きたまま保たれる。

一方、ゆっくりと冷却した場合の細胞障害は、主として細胞外凍結によるものと考えられている。すなわち、ゆっくり凍結する際には細胞内の水は脱水収縮された形をしており、氷晶は見受けられない。細胞外凍

結による傷害の機構は諸説あるが、細胞外凍結によって生じる溶液効果（細胞内外の溶液の濃縮）、脱水収縮の行き過ぎによる細胞傷害、未凍結部位の氷晶、細胞相互による機械的ストレスなどが挙げられる。

一般的に凍結保護防止剤の効果としては溶液の水点を下げて凍結温度での氷晶形成を少なくさせ、さらに細胞内外の塩の濃縮を抑える、すなわち前述の凍結保存に適した冷却速度の範囲を広げる効果がある。グリセリンやDMSOは細胞膜透過型凍結防御剤であり、細胞膜を透して細胞内に拡散することにより、上記の効果を担う。これらの凍結保護剤を添加して、ゆっくり凍結することにより、過冷却の状態が維持され、防御剤の濃縮効果によってガラス転移温度も上昇し、氷晶核を形成することなく、ガラス状態に移行し、安定保存が可能となる。原理から考えると、凍結保護剤の濃度が高いほど防御効果は高くなるが、多くの保護剤は高濃度で細胞に毒性を示すため、動物細胞においては、凍結保護剤の至適濃度は10～15%程度に限られている。通常、動物細胞の保存には-80℃で1年程度、ガラス化状態を保つ液体窒素(-196℃)中では10年以上の長期保存が可能である。融解時においては、昇温過程において脱ガラス化、氷晶形成、再結晶が起こり、この場合においてもこれらの現象の起こる温度域をすみやかに通過させる必要がある。

(b) 実際の凍結保存/解凍操作 (a)項で説明したように、細胞を凍結保存する場合には最適な凍結速度を保つ必要がある。動物細胞は、微生物に比較して細胞傷害を受けやすく、厳密な保存にはプログラムフリーザーを利用した凍結保存法が利用されているが、近年ではこれに代わる予備凍結容器（例えばBICELL（日本フリーザー））を用いて-80℃にていったん予備凍結を行った後に液体窒素中にて保存する簡便な凍結保存法が一般に用いられている。

細胞凍結時のポイントは、凍結保存を行う前の細胞の状態をいかによい状態に保っているかにある。実際には対数増殖中期から後期の状態の細胞を利用するのが好ましい。凍結保護剤としてはDMSOの利用が一般的であるが、細胞株によりその至適濃度（通常10～15%）、細胞凍結濃度（通常 $1\sim 5 \times 10^6$  cells/ml）、凍結に用いる培地組成（血清濃度等）が異なるため、あらかじめ予備実験にて条件を検討しておく必要がある。近年では、氷晶をほとんど形成させないガラス化による受精卵の凍結保存法も一般に利用されてきている<sup>17), 18)</sup>。

### 1.4.3 保存機関

宿主としての動物資源を保存している機関として

は、系統実験動物、遺伝子操作動物など、いわゆる個体としての動物資源を保存している機関から、ヒトを含む個体から得られた細胞を保存している機関まで存在する。また、運営母体に関しても、研究を目的とした公的機関から、治療を目的とした細胞バンク、さらには、営利企業まで存在する。本項目では、個体から得られた動物細胞を保存分譲する、いわゆる研究を目的とした細胞バンクについて、国内外の保存機関を紹介する。

(a) 国内動物細胞バンク<sup>19)</sup> 国内において細胞を提供可能な機関は下記のもの挙げられる。詳細は各バンクのホームページを参照していただきたい。URLアドレスなど、掲載情報は2004年12月現在のものである。

(1) 理化学研究所バイオリソースセンター（つくば市）

[<http://www.brc.riken.jp/>]

動物、ヒト由来などの約650種類の細胞株を提供可能な細胞銀行。細胞の供給のみならず、細胞銀行への細胞株の寄託と第三者への配布、構築した細胞の保護預かり制度なども充実している。

(2) JCRB細胞バンク（2005年4月より（株）医薬基盤研究所）

[<http://jcrb.nihs.go.jp/>]

厚生労働省対がん10カ年計画のもとで、細胞バンク事業として1984年に設立された国内で最も古い細胞バンク。分与可能な細胞株についての情報のみならず、細胞培養や倫理問題に関する詳しい情報提供も行っている。

(3) ヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSRRB)（泉南市）

[<http://www.jhsf.or.jp/bank/intro.html>]

JCRB細胞バンクが分譲する細胞株は現在、本バンクを通して分譲されている。本バンクには、高等動物細胞バンク、ヒト組織バンク、動物胚バンクの三つの細胞バンクが存在している。なお、ヒト組織利用に関しては倫理審査委員会の審査を経る必要がある。

なお、上記(1)～(3)にて分譲可能な細胞株に関しては、それぞれのバンク以外に下記のページにて検索可能である。

科学技術振興事業団 生物系研究資材共有データベース [<http://bio.tokyo.jst.go.jp/biores/>]

(4) 東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター（仙台市）

[<http://www.idac.tohoku.ac.jp/dep/ccr/>]

がん細胞株の管理、供給の必要性の声をを受けて発足したがん細胞に特化した細胞バンク。日本で維持され

ている可移植性腫瘍株一覧も掲載されている。現在ではがん細胞だけでなく、ハイブリドーマなど多種類の細胞を分与している。

(5) (株)林原生物化学研究所 藤崎細胞センター (岡山市)

[<http://jcrb.nihs.go.jp/jtca/book/hayashibara.htm>]

藤崎細胞センターにて分与可能な血球由来細胞中心の細胞株一覧(約600種類)が上記ページにて確認できる。

(6) (独)産業技術総合研究所特許生物寄託センター(つくば市)

[<http://unit.aist.go.jp/ipod/index.html>]

特許生物の寄託制度に基づいて受精卵を含む特許動物細胞が寄託され、必要に応じて第三者に分与している。

(7) NPO 法人エイチ・エー・ビー研究機構(文京区)

[<http://www.hab.or.jp/>]

米国 National Disease Research Interchange (NDRI) と協定を行い、研究試料としてのヒト由来組織の供給を行っている。現在、供給はエイチ・エー・ビー研究機構会員に限られている。供給にあたっては研究倫理審査が必要とされる。

(b) 海外動物細胞バンク<sup>1)</sup> 国外において細胞を提供可能な機関は多数にわたる。ここでは代表的なものをいくつか紹介する。なお、網羅的な検索に関しては、培養生物世界データセンター [<http://wdcm.nig.ac.jp/>] が微生物や培養細胞を系統保存している系統保存機関の網羅的ディレクトリーとして培養生物材料のデータベースのゲートウェイとなっているので、これを利用するとよい。

(1) ATCC (American type culture collection)

[<http://www.atcc.org/>]

1925年に創立された米国細胞・微生物・遺伝子バンク。約4000種類の細胞、1200種以上のハイブリドーマなどを取り扱っている。日本国内で利用する場合には代理店である住商ファーマインターナショナル(株) [<http://www.summitpharma.co.jp/>] 経由で分譲依頼を行う。なお、輸入にあたっては、動物検疫所ならびに植物防疫所からの確認が必要となる。また、細胞の寄託に関しては代理店では受け付けておらず、直接ATCCとコンタクトをとる必要がある。

(2) ECACC (European collection of cell cultures)

[<http://www.ecacc.org.uk/>]

欧州細胞バンク。一般細胞900種類以上、ハイブリドーマ400種類以上などについて取り扱っている。

(3) Korean Cell Line Bank

[<http://cellbank.snu.ac.kr/>]

1982年から運営されている韓国細胞バンク。

(c) 資源としての組織・細胞：倫理的な側面から

近年の生物工学分野の広がりから、生物工学者が動物資源としてのヒト由来組織・細胞を取り扱うケースも非常に増えてきた。動物由来の組織・細胞を取り扱う場合と、ヒト由来の組織・細胞を取り扱う場合、その両者に技術的な相違点は特にない。ところが、ヒトは人であるがゆえに、ヒト由来組織・細胞を取り扱う場合にはたとえ公的なバンクや民間企業を経て利用するにしても、倫理面での配慮・意識がつねに必要とされる。ヒト由来組織・細胞の取扱いに関しては、現在のところもさまざまな議論の対象であり、ここですべてを網羅することは不可能である。そこで、細胞・組織を利用する側としての面から絞って紹介する。なお、実験動物の取扱いに関しても、さまざまな倫理的側面があるが、これに関しては関連法規、関連学会等をご参照いただきたい<sup>20), 21)</sup>。

まず、ヒト由来組織・細胞を取り扱い、培養し、なんらかの生物工学的研究を行うという場合を想定する。この場合、実験結果を解析するためには、対象とする組織・細胞の生化学的、分子生物学的な解析が当然のごとく利用される。ところが、対象とする組織・細胞の生化学的、分子生物学的な解析を行うということは当然のことながら、それを提供したドナーである人個人の遺伝子を解析することにほかならない。すなわちこれはヒトゲノム・遺伝子解析研究となり、2001年3月29日に告示されたいわゆる三省ゲノム指針「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準じた取扱いが求められる<sup>22)~24)</sup>。

本指針の中身はまず第1において、研究現場において遵守されるべき本指針の基本方針および適応範囲をきちんと定義づけている。第2においては、すべての研究者、研究責任者、研究機関の長の責務を明確にし、個人情報管理者の責務および倫理審査委員会の責務と構成についても定義している。第3においては、提供者に対する基本姿勢を明確にし、第4においては、試料の取扱い、保存、廃棄の方法について述べられている。用語の定義は第6において行われている。ここで扱っている「試料」とは、血液、組織、細胞、体液、排泄物およびこれらから抽出したDNAなどの人の体の一部ならびに提供者の診療情報(死者から提供されたものを含む)となっているが、学術的な価値が定まり、実績が十分に認められ、研究用に広く一般に利用され入手可能なものは含まれない。また、日本組織培養学会倫理問題検討委員会では「非医療分野」におけるヒト組織・細胞の取扱いについてのレポートをまと

められている<sup>25)</sup>。本報告はヒト組織・細胞を取り扱う実務者としての遵守事項と参考事項の紹介を行っている。基本的留意事項として、①専門家と一般社会人との倫理的同等性、②人体とそれ以外の物体との相違の認識、③社会受容性の認識、④安全の基本を掲げ、自主ルーチ構築のための参考事項について詳しく述べている。細胞バンクに登録された組織・細胞は通常、無償で提供されている。無償で提供されたヒト由来物から発生するさまざまな知的所有権（特許所属）についても十分に考慮する必要がある<sup>26), 27)</sup>。(大政)

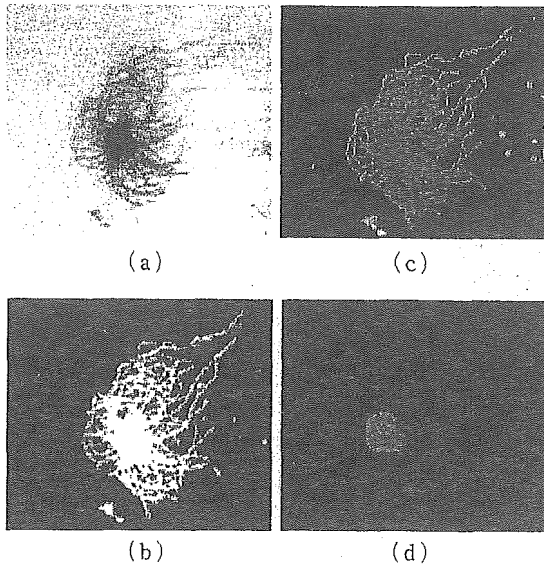
### 引用・参考文献

- 1) 日本動物細胞工学会編：動物細胞工学ハンドブック，朝倉書店（2000）。〔動物細胞工学に関するあらゆる事例を丁寧に解説したハンドブック〕
- 2) 杉野幸夫編：細胞培養技術，講談社サイエンティフィック（1985）。〔動物細胞培養黎明期において，細胞培養の歴史的成り立ちから始まって，産業応用にまで詳しく解説した成書〕
- 3) 日本組織培養学会編：組織培養の技術 第三版（基礎編，応用編），朝倉書店（1996）。〔組織培養に利用される技術的手法の原理から実際の操作まで詳しく解説した実用書。基礎テクニックについて解説した基礎編と，最新のテクニックについて紹介した応用編に分かれる〕
- 4) Harrison, R. G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **4**, 140-143 (1907).
- 5) Enders, J. F., Weller, T. H. and Robbins, F. C.: *Science*, **109**, 85 (1949).
- 6) 日経バイオビジネス, **10**, 50-54 (2002).
- 7) 浅島 誠, 岩田博夫, 上田 実, 中辻憲夫編：再生医学と生命科学, 蛋白質 核酸 酵素, **45**, 13, 1996-2362, 共立出版 (2000).
- 8) 筏 義人編：再生医工学, 化学同人 (2001).
- 9) 室田誠逸編：再生医学・再生医療, 東京化学同人 (2002)。〔7～9〕は再生医療に関する最新の成果をわかりやすく紹介した特集本〕
- 10) Green, H., Kehinde, O. and Thomas, J.: *Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5665-5668 (1979).
- 11) Langer, R. and Vacanti, J. P.: *Science*, **260**, 920-926 (1993).
- 12) 日本生物工学会セル&ティッシュエンジニアリング研究部会編：再生医療実用化にむけた生物工学研究, 三恵社 (2003).
- 13) Evans, M. J. and Kaufman, M. H.: *Nature*, **292**, 154-156 (1981).
- 14) 酒井 昭編：凍結保存——動物・植物・微生物——, 朝倉書店 (1987)。〔原理から方法までを詳細に解説した書〕
- 15) Polge, C., Smith, S. U. and Parkes, A. S.: *Nature*, **164**, 666 (1949).
- 16) Lovelock, J. E., Bishop, M. W. H.: *Nature*, **183**, 1394-1395 (1959).
- 17) 酒井 昭：組織培養, **22**, 345-347 (1996).
- 18) 葛西孫三郎：組織培養工学, **26**, 40-43 (2000).
- 19) 日本組織培養学会細胞バンク委員会編：細胞バンク・遺伝子バンク——情報検索と研究資源の入手法——, 共立出版 (1998).
- 20) 動物の愛護及び管理に関する法律 等
- 21) 日本実験動物学会：<http://www.soc.nii.ac.jp/jalas/> (2004年12月現在), 日本動物実験代替法学会, 日本実験動物協会：<http://www.soc.nii.ac.jp/jsaae/> (2004年12月現在) 他
- 22) 丸山英二：ジュリスト, **1247**, 37-48 (2003).
- 23) 増井 徹, 林 真, 田辺秀三, 水澤 博：国立医薬品食品衛生研究所報告, **119**, 40-46 (2001).
- 24) 文部科学省研究振興局長, 厚生労働省大臣官房厚生科学課長及び経済産業省製造産業局長 ヒトゲノム・遺伝子解析研究にかかる倫理指針 2001年3月39日告示〔例えば本文は<http://www.meti.go.jp/policy/bio/rinri-shishin/shishin-tsuchi.html> (2004年12月現在) やヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針ホームページ[http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/genomeshishin/index.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/genomeshishin/index.htm) (2004年12月現在) において閲覧可能〕
- 25) 日本組織培養学会倫理問題検討委員会：非医療分野におけるヒト組織・細胞の取り扱い。〔[http://jtca.umin.jp/sosiki\\_](http://jtca.umin.jp/sosiki_) (2004年12月現在) において閲覧可能〕
- 26) 宇都木伸, 菅野純夫, 角田政芳, 恒松由記子, 増井 徹：ジュリスト, **1247**, 6-28 (2003).
- 27) 増井 徹：現代思想, **30**, 194-210 (2002).

### 1.5 生物多様性条約

工業の発展などによる地球上の自然破壊に伴い、生物の多様性を保持することの重要性が認識され、開発と生物資源の保存との共存の必要性が、1990年になり強く認識されることとなった。この認識のうえに立ち、1992年に開催された地球サミット（ブラジル、リオネジャネイロ）において、国際条約である「生物多様性条約」<sup>4)</sup>（Convention on Biological Diversity：CBD）が採択された。CBDは1993年に発行し、2003年までに日本を含む183カ国が締結している。

CBDは地球上の生物の多様性保全、その構成要素の持続可能な利用、および遺伝資源の利用から生ずる利益の公正な配分の実現を目的とする条約である。CBDは、生物工学に携わるものが持っていた生物資源へのアクセスに関するそれまでの考え方を大きく変えることとなった。それまでは比較的自由であった生



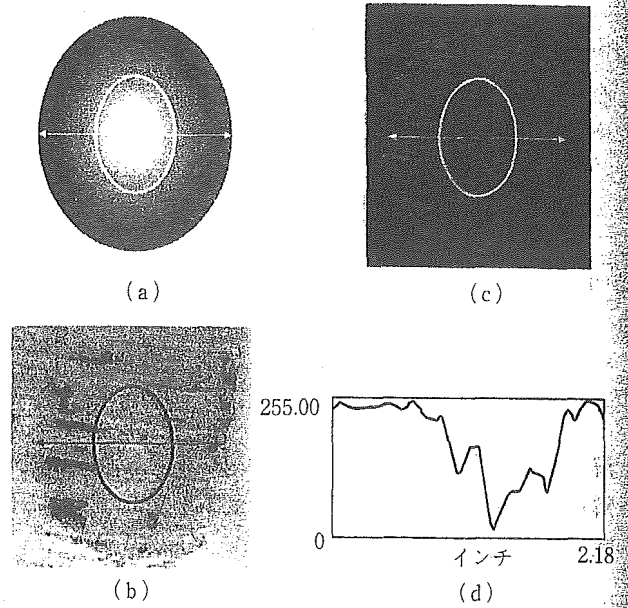
*Sreptomyces fradiae* の菌糸形態を顕微鏡で撮り (a), 2 値化を行い (b), 解析を行うターゲットを決め (c), しきい値を調節してペレットコア (d) を抽出する。ペレットコアの面積および菌体全部の面積を求め、フィラメント部分の割合を調べることができる。

図 4.36 ペレット形態の面積

い菌糸の蛍光染色を行った。波長 520 nm で画像を撮影することによって菌糸の蛍光密度を知ることができる。ペレットを FITC で染色を行った後、グルタルアルデヒドで固定した。その後、エポキシ樹脂に固定し、厚さ 450 nm の切片を作製した。蛍光顕微鏡でペレット切片の断面画像を撮り、IPLab (Solution Systems Co. Ltd.) と NIH 画像ソフトウェアを用いて解析を行った。ペレット内 FITC 蛍光の強度をそれぞれ図 4.37 (c) に示し、蛍光強度の分布のヒストグラムを図 4.37 (d) に示す。両蛍光強度は中心に近づくほど薄くなっていることが確認できる。これは、ペレットの中心部は空洞の状態であることを示唆している。FITC 画像から蛍光強度を解析することにより、ペレット内部の平面空洞率を算出することができる。ペレットの内部に菌糸が均一に分布した場合の平均蛍光強度を  $I_{\text{pellet}}$  とすると、ペレット断面の平均蛍光強度 ( $I_{\text{avg}}$ ) は以下のように表現できる。

$$I_{\text{avg}} = \frac{1}{D} \int_0^D f(I) dl \quad (4.13)$$

$D$ ,  $f(I)$  および  $I$  はペレットの直径、蛍光強度分布およびペレット断面の距離である。 $I_{\text{avg}}$  の値は  $I_{\text{pellet}}$  に比べて小さく、その割合  $I_{\text{avg}}/I_{\text{pellet}}$  は、1 より小さい。この値はペレット断面全体の蛍光強度に比べ、ペレット中心断面の弱い蛍光強度を示すので、この値をペレットの平面空洞率と定義することができる。もちろん誤差を最低限にするため、多数の画像から解析を行う



画像 (a) はペレット断面の模型図、(b) はペレット断面の光学顕微鏡画像、(c) はペレット断面の FITC 画像、(d) は画像 (c) の断面の蛍光強度分布である。矢印はペレットの直径を、楕円は蛍光密度の境目を示す。

図 4.37 *Mortierella alpina* ペレット断面の画像

必要がある。

最近、さまざまな解析ソフトウェアが開発され、画像解析はほとんどの学問分野において強力なツールとして用いられている。DNA や RNA 解析、プロテインの画像解析はおもに画像の濃度分布 (density slice) を土台に定量化を行うものである。また、平面画像を重ねて三次元画像の構築等による立体のモデル化など、分子生物学分野において欠かせない道具として定着している。現在、ゲルイメージアナライザー、IP オートラジオグラフィシステム、生物画像解析システム、およびコロニーカウンターには画像解析を行うプログラムが組み込まれ、結果を定量的に処理することができるようになった。今後、生物工学分野における培養をはじめ、組織学的な研究、細胞の生理学的解析などさまざまな分野の研究のために、画像情報を定量化できる画像解析手法は、欠かせない道具となっている。(朴)

#### 4.2.6 フローサイトメトリーとその利用

生物を用いる研究者にとって、対象である生物の最小構成単位である細胞一つひとつの性質を追うことのできる計測技術は非常に興味深い。フローサイトメトリー (flow cytometry) は、まさに細胞個々の性質を解析するための計測技術であるといえよう。

(a) 歴史と原理 細胞の性質を細胞集団から細

細胞個々に分割して測定する手法は、そのルーツを、1940年代後半においてW. H. Coulterにより考案された電気抵抗を利用したCoulter原理の発明にまでさかのぼることができる。これは電解質溶液に浮遊した絶縁体とみなせる粒子（すなわち、細胞がこれにあたる）が、細孔を通過する際に細孔領域での電気伝導度が変化することを利用したもので、この電気抵抗の変化は絶縁体の体積に比例する。この原理を用いた「コールターカウンター」は、溶液中の細胞の数、また、個々の細胞の体積を測定することができ、細胞集団から細胞個々の解析が可能となった。同原理を用いた血球数（粒子数）測定器も、「コールターカウンター」と呼ばれ、現在でも溶液中の細胞（粒子）のサイズ、数（濃度）を測定する装置として用いられている。

1965年にFulwylerは、コールターカウンターを改造して、ノズルに超音波をかけて振動させて液滴を発生させ、落下する液滴に荷電をつけて分離する装置を開発した<sup>28)</sup>。これが細胞を分取するセルソーター（cell sorter）の原型と考えられる。一方、同年、Kamentskyらは顕微鏡を改造した細胞個々のDNA含量を吸光度で高速に測定する装置を開発し、細胞個別の光を用いた高速分析手法を考案した<sup>29)</sup>。細胞個々をレーザーを用いて解析し、分取することのできる現在のFACS（fluorescence activated cell sorter）はこの二つの装置にルーツをたどることができる。

現在のフローサイトメトリーは、細く絞った液体の流れ（フロー）の中に、粒子（細胞、染色体、ウイルスなど）を懸濁した溶液を流し、この溶液にレーザー光線を当てて発生する散乱光や蛍光を測定することにより、個々の粒子の性質を測定する手法を指す。この装置の原理を支えているのが「流体力学」、「レーザーによる散乱光・蛍光励起測定」である。

**(b) 装置の概要** 図4.38に高速細胞分取が可能なセルソーターの一般的な構造を示す。セルソーターは、細胞を含む懸濁液から細胞を個別に分けて解析・分取する液体系、流れにレーザーを照射してその散乱・励起光を測定する光学系、さらに得られた情報を解析する電気系の大きく三つのシステムから構成される。図4.38は液体系と光学系を中心に記載している。

まず、液体系であるが、細胞を高速かつ個別に解析するためには、細胞を多数含む懸濁液から、細胞を個別にバラバラにする技術が必要となる。通常用いられているのが、層流を用いた手法である。細胞を個別にする部分はフローチャンバーと呼ばれ、細胞懸濁液が内側に、外側にはシース液と呼ばれる液が円筒状に流れる構造となっている。この流れを急激に細く絞り込

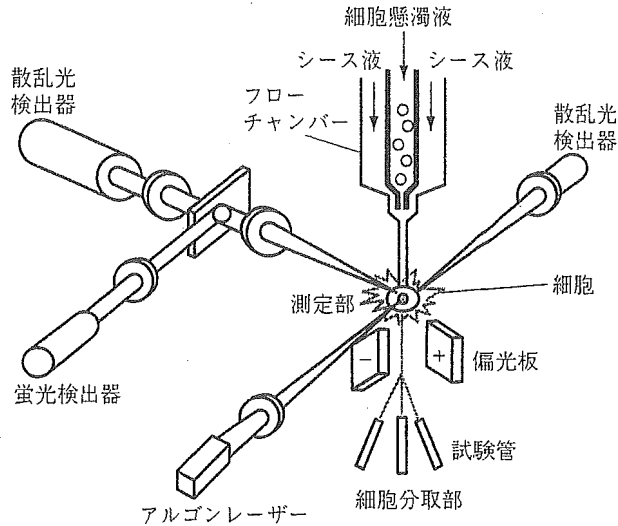


図4.38 一般的なセルソーターの構造

むことによって層流を実現し、細胞懸濁液がシース液でできた液のトンネルを非常に細い流れでシース液と混合することなくレーザー照射部に流れ込む。さらに、このシース液の流れに超音波振動をかけることによって、水流を縦方向に振動させ、最終的には細胞1個を含む液滴にまで分割する。さらに、測定パラメーターに応じた+または-の電荷を水柱にかけることにより、分割された液滴に個別に荷電することができる。荷電された水滴はその荷電に応じて細胞分取部に集められる。

光学系においては、層流中においてバラバラになった細胞個々に光を照射して得られる散乱光もしくは蛍光を測定する。細胞の大きさは数 $\mu\text{m}$ から数十 $\mu\text{m}$ であり、試料液中の細胞に対して個別に光を照射するためには、ビーム径が小さく、焦点深度が深いレーザー光が用いられる。レーザー光は、試料液に直角になるように照射され、発生する散乱光や蛍光を測定する。図4.39に、レーザー光の細胞への照射の模式図を示す。

試料液水柱に対して直角に照射されたレーザー光は、細胞に当たり、細胞内の核、顆粒などの構造体によって散乱される。これらの微小構造体によって散乱された光を測定したものが側方散乱光であり、細胞内

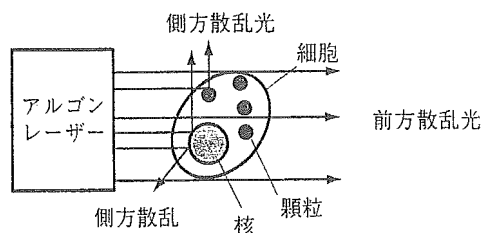


図4.39 散乱光の原理



の複雑さを代表する測定値である。一方、照射レーザー光に対して、直進方向に散乱された光が前方散乱光である。これは細胞の大きさに依存して変化するパラメータであり、この二つを用いることにより、細胞の大きさ、複雑さを「相対的に」評価することが可能である。また、レーザーによって励起されて細胞自身の発する自家蛍光や、DNA、RNAを染色する蛍光色素、細胞表面抗原や、細胞内抗原に対する蛍光標識抗体を用いることにより、個々の細胞のさまざまなパラメータを測定することができる。さらに、Hoechst33342に代表されるような、生細胞の状態での細胞内蛍光標識可能な蛍光色素を用いて解析すれば、生きたままで目的の細胞内部を染色し、それに基づいて分取することも可能である。

セルソーターを支えるシステムのなかで、近年最も進歩が著しいのが電気系（データ測定・処理）である。レーザーを当てて得られる蛍光は、バンドパスフィルターと呼ばれる特定の幅の波長の光を透過フィルターによって分解され、波長ごとの測定データが検出器によって集められ、解析される。この光の強さは装置の状態やサンプルの状態によって異なり、絶対値で比較することができない。そこで、光の強度を例えば1024階調のチャンネルナンバーに分割し、この値をもって強度の相対値を表す。近年では、測定に際して数種類の蛍光物質を利用する場合も増え、一つの粒子（細胞）について、前方、側方散乱光、数種類の蛍光強度、得られた光強度の時間変化や積分値など、非常に多くのデータを同時に、しかも最大数万個/分のオーダーで得ることができる。

得られた大量のデータはそのままで利用できるわけではない。例えば多重蛍光染色の場合には compensation と呼ばれる励起波長の重なり除去、また測定条件によっては、2個の細胞が同時に測定（ダブルレット）される場合もあり、光強度の積分値、散乱光が観測された時間等のデータから、ダブルレットデータ除去操作が必要となる。

(c) 応用例 フローサイトメトリーの応用は動物、植物、微生物と多岐にわたっている。下記に代表的なものを紹介する。

(1) 細胞周期解析 今日ではフローサイトメーターを用いない細胞周期の解析は考えられない。通常フローサイトメーターに用いられている空冷アルゴンレーザーは488 nmの青色光を発する。そこで、488 nmで励起され、測定可能なDNA結合性蛍光色素 propidium iodide (PI) が最も一般的な測定に用いられる。PIは二重鎖核酸に結合することにより蛍光量が10倍になる。サンプルとなる細胞集団をエタノール

処理で固定し、これにPIを取り込ませ、RNaseで処理することにより、サンプルを調製する。得られた細胞集団の蛍光量はそのDNA含量に基づいて分布し、 $G_0/G_1$ , S,  $G_2/M$ 期の3期に分類することができる。より詳細な解析にはBrdU (bromodeoxyuridine) を蛍光標識抗BrdU抗体およびPIを用いた二重染色が用いられる。

(2) 細胞表面抗原解析 細胞の表面に存在する cluster of differentiation (CD) 抗原は、細胞の分化に伴ってその発現が変化する。CD抗原は現在、国際的に定義、分類が行われており、蛍光標識抗CD抗体を用いることにより、末梢血等に存在する血液細胞の分類や疾患診断等に應用されている<sup>30), 31)</sup>。

(3) その他 DNA含量に基づく植物融合体の解析<sup>31)</sup>や、ワイン中の酵母とバクテリアの解析<sup>32)</sup>、染色体解析・分取<sup>31)</sup>等、多くの種類の細胞や微小粒子の解析・分取に用いることが可能である。(大政)

#### 4.2.7 蛍光, りん光, 分光法とその利用

分光法の本質は、光と分子との相互作用により起こる現象を観測することにある。その現象は、大まかに分類してつぎの3つがある。まず、一つ目は、最も単純なケースであるが、照射された光が分子によって吸収または散乱される現象である。この現象は、紫外線、可視光線、赤外線など種々の吸収スペクトル、弾性光散乱などで観測される。二つ目は、照射光が分子により吸収された後、分子が照射光の波長とは異なる波長の光を放出する現象である。この現象は、蛍光, りん光, ラマン散乱, 非弾性光散乱などで観測される。そして、最後は、光の強度や波長の変化だけでなく、偏光の種類や程度などが変化する現象であり、旋光分散, 円二色性, 蛍光偏光解消などで観測される。量子的過程である光と分子との相互作用の本質的理解には量子力学的記述が必要であるが、ここでは、蛍光, りん光, 分光法を研究のツールの一つとして利用するユーザーを対象に、それらの分光法の基本原理を現象論的かつ定性的に説明する。

(a) 分子のエネルギー状態 光と分子との相互作用について考える前に、まず、分子を量子化学的観点から見てみよう。つまり、分子のエネルギー状態を理解するということである。通常存在する分子の状態は基底状態と呼ばれ、その状態の分子の立体構造は、私たちが分子模型などで目にする構造におおむね類似した構造であると考えられる。ただし、当然のことではあるが、サイズの違い以外に、両者は多くの点で決定的に異なっている。そのうちの一つは、分子を構成する原子は、熱運動のために平衡位置の付近

生物工程学ハンドブック  
Handbook of Biotechnology

© 社団法人 日本生物工学会 2005

2005年6月30日 初版第1刷発行

検印省略

編者 社団法人 日本生物工学会  
大阪府吹田市山田丘2番1号  
大阪大学工学部内

発行者 株式会社 コロナ社  
代表者 牛来辰巳

印刷所 三美印刷株式会社

112-0011 東京都文京区千石4-46-10  
発行所 株式会社 コロナ社  
CORONA PUBLISHING CO., LTD.

Tokyo Japan

振替00140-8-14844・電話(03)3941-3131(代)

ホームページ <http://www.coronasha.co.jp>

ISBN 4-339-06734-2 (大井) (製本: 愛千製本所)

Printed in Japan



無断複写・転載を禁ずる

落丁・乱丁本はお取替えいたします

## IV-5. 抗がん剤耐性から生活習慣病まで

松尾道憲, 植田和光

日本人の3大死因は、がん、脳血管疾患、心疾患であり、合わせると50%を超える。また、1,000万人以上が糖尿病の恐れがあるといわれており、実に日本人の十数人に1人が高血糖によって何らかの障害を受けている可能性がある。ゲルコース、コレステロールや脂肪酸は我々の体にとっては必須の栄養素であり、それらを外界から摂取し効率よく体内で利用できるように我々の体は進化してきたと思われる。先進国の今の豊かな食生活は生物の進化の上では、予想を超えた状態であり、我々の設計図であるゲノムにとって予期せぬ事態といえるだろう。

我々の体は、体内の過剰なグルコースやコレステロール、脂質、外界から摂取した有害物質や有害な代謝物に対して、さまざまな防御機構を用意しているが、近年多くのABC蛋白質が防御機構において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。本章では、ヒトの体で重要な役割を果たすABC蛋白質のうち、抗がん剤耐性に関わるMDR1、血糖値調節に関わるSUR、脂質恒常性に関わるABCA1を中心にABC蛋白質の生理的役割と分子メカニズムを概説する。

### 1. 抗がん剤耐性に関わるMDR1

#### 1.1 MDR1: 抗がん剤排出ポンプ

抗がん剤の発達によって、急性白血病、悪性リンパ腫などは治癒可能な病気となった。しかし、残念ながら多くの固形がんは抗がん剤に対して感受性が低い。また抗がん剤が有効ながんにおいても、治療中に効果が低下し、投与した抗がん剤に対して耐性になると同時に治療には用いない抗がん剤、しか

も作用機構や構造が異なる複数の薬剤に対しても耐性になることがしばしばある。これらの現象はがんの自然耐性あるいは獲得多剤耐性と呼ばれ、がんによる死亡の大半に関係している。MDR1遺伝子は、このがんの多剤耐性のメカニズムを解明し克服する方法を見つけようとする研究の過程で発見された。

まず、1976年にカナダのLing博士らによって、抗がん剤耐性を獲得した培養細胞の膜に約170 kDaの糖蛋白質が高発現していることが見いだされた<sup>2)</sup>。彼らは、この糖蛋白質が膜の薬剤透過性を変化させることによって細胞を多剤耐性に行っていると予想し、permeabilityのpにちなんでP糖蛋白質と名づけた(この予想は、後で大きくはずれていることが判明した)。一方、米国国立がん研究所のPastan博士の研究室において、秋山伸一博士(現鹿児島大学医学部教授)が樹立した多剤耐性ヒトがん細胞において、抗がん剤耐性が増すにつれて染色体の一部が増幅しコピー数の増えている遺伝子があることが見いだされた<sup>3)</sup>。筆者らはその遺伝子を単離し、多剤耐性 multidrug resistance にちなんでMDR1と名づけた。そして塩基配列からその遺伝子産物のアミノ酸配列を予想した。その結果、MDR1のコードする蛋白質が膜蛋白質であり、バクテリアがアミノ酸や糖などの栄養物を取り込むために機能しているATP依存トランスポーターと似ていることが判明したのである<sup>3)</sup>。

ちょうどその頃、Lingらが抗体を用いてハムスターのP糖蛋白質遺伝子の

一部と思われるDNA断片を単離しており、それらの比較からMDR1遺伝子がP糖蛋白質をコードしており、抗がん剤輸送ポンプ(バクテリアの場合とは輸送の方向は逆)として機能していることが示唆された。そして、実際にMDR1 cDNAを薬剤感受性細胞で発現させると、細胞は図1に示したような構造や作用点に類似性のない多くの薬剤に対して耐性になることが明らかになったのである<sup>3)</sup>。また、MDR1は多くのヒトの正常組織の細胞で発現しているだけでなく、がん細胞で高発現していることが示された<sup>3)</sup>。以上の結果から、MDR1はP糖蛋白質をコードする遺伝子であり、抗がん剤排出ポンプの実体であることが明らかになった。(近年、ABC蛋白質遺伝子の命名法を統一する方向で進んでおり、それに従うとMDR1はABCBIと記すべきであるが、MDR1はその表現系をよく表わしており、このままのほうが理解しやすいと思われる。ここでは旧命名法であるMDR1を用いることにする。)

## 1.2 MDR2: リン脂質フリッパーゼ

ヒトMDR1遺伝子は、28のエキソンをもち、100 kb以上の大きな遺伝子として第7染色体上に存在する。興味深いことに、MDR1遺伝子の隣には相同性の高い遺伝子MDR2(MDR3とも呼ばれる)が存在している。この遺伝子は1987年にオランダのグループによって肝臓で特異的に発現しているMDR1関連遺伝子として報告された<sup>4)</sup>。ヒトにおいてはMDR1相同遺伝子は、MDR1とMDR2の2つであるのに対して、マウスには $mdr1a$ ,  $mdr1b$ ,  $mdr2$ (ヒトMDR2に相当する)の3つの遺伝子が存在する。表1に示すように、歴史的に $mdr1a$ は $mdr3$ ,  $mdr1b$ は $mdr1$ とも呼ばれており混乱するので、ここではヒトの遺伝子に関しては、MDR1, MDR2の表記を用いることにする。

表1 ヒトとマウスのMDR遺伝子と機能

ヒト	マウス	機能
MDR1	$mdr1a$ ( $mdr3$ ) $mdr1b$ ( $mdr1$ )	生体異物排出 生体異物排出
MDR2 (MDR3)	$mdr2$	リン脂質の胆汁中への排出

ヒトのMDR遺伝子は大文字で、マウスの $mdr$ 遺伝子は小文字で表わすことが多い。ヒトのMDR2は、文献7では $mdr3$ と記載されている。

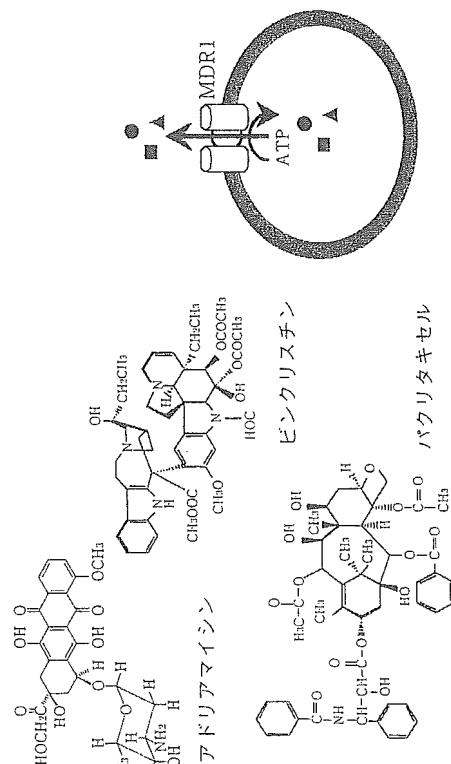


図1 MDR1が排出する代表的な抗がん剤とMDR1の輸送方向

1993年になって、*mdr2*遺伝子のノックアウトマウスが肝内胆汁うっ滞症になることが明らかになった<sup>9)</sup>。胆汁に含まれている胆汁酸は、非常に強力な界面活性作用をもっており、食物中の脂肪を乳化し小腸での脂肪の消化・吸収を促進させる。胆汁酸がもしそのまま肝臓から分泌されると、胆管はその界面活性作用によってすぐばらばらになってしまうほど強力である。それを防ぐため、胆汁中には大量のホスファチジルコリンが肝臓から分泌されており、胆汁酸をホスファチジルコリンのミセルの中に封じ込めている。MDR2は、その胆汁中へのホスファチジルコリンの分泌に関与している。*mdr2*のノックアウトマウスは、胆汁中にホスファチジルコリンを分泌できないため、胆汁酸で胆管がばらばらになり肝内胆汁うっ滞症になってしまったのである。

肝臓の細胞は、細胞内でホスファチジルコリンを大量に合成しており、脂質二重層の内層に運ばれてくる。MDR2はそのホスファチジルコリンを特異的に細胞外へ輸送しているらしい。その後、MDR1が短鎖脂肪酸をもったホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン、グルコシセラミドの類縁体を脂質二重層の内層から外層へ移動させる活性をもつことが明らかになった<sup>10)</sup>。しかし不思議なことに、MDR1はC<sub>16</sub>やC<sub>18</sub>の脂防酸をもつ生体膜中のホスファチジルコリンを基質とすることはできない。これらの結果は、*mdr2*のノックアウトマウスの胆汁管には*mdr1*は正常に発現しているにもかかわらず、*mdr2*の機能を代替できないこととつじつまがあう。しかし、MDR1はさまざまな構造の脂溶性物質を輸送する幅広い基質特異性をもつにもかかわらず、ホスファチジルコリンを輸送できないのはなぜだろうか。

ヒトMDR1とMDR2を酵母で発現させると、どちらも同じペプチド性抗真菌剤に対して耐性になり、その耐性はビンブラスチンやシクロスポリンなどで阻害される<sup>11)</sup>。したがって、MDR1とMDR2はよく似た基質結合部位をもっていると考えられる。MDR2が非常に弱いながら抗がん剤を輸送する活性もつことも報告されており<sup>12)</sup>、MDR2はMDR1に似た基質結合部位をもつが、ホスファチジルコリンに対する親和性が特に強いと思われる。逆に、MDR1は生体異物を基質とするように進化しており、膜の主要構成成分であるホスファチジルコリンに対する親和性が特に低いのだろう。

### 1.3 MDR1の特徴(I): 基質認識

MDR1の生理的役割、がんの抗がん剤耐性獲得との関連に関しては第IV-2章に詳しく述べられている。この章では、MDR1の機能の際立った特徴だけをまとめることにする。

MDR2がホスファチジルコリンに特化した輸送体であるのに対し、MDR1は非常に広い基質特異性をもっている。それがMDR1の一番の特徴であり、基質認識メカニズムはいまだ謎である。そのような基質特異性の広さゆえ、がん細胞にMDR1が発現すると、困ったことに、がん細胞はパクリタキセル、アンズラサイクリン、アクチノマイシンD、ビンカルカロイドなどといった、構造的にはあまり共通性がない(図1)多くの抗がん剤に対して同時に耐性を獲得してしまうことになる。

MDR1の基質は少なくとも分子の大きさと疎水性という2つの共通点をもっている。MDR1によって輸送される基質の分子量は、だいたい300から2,000の間である。最も小さい基質の一つであるコルヒチンの類縁体を用いた研究では、ある大きさ以下の類縁体は輸送されない<sup>13)</sup>。またペプチド性の物質では、輸送されるのは3~15アミノ酸の間である。ABC蛋白質の一種であり抗原ペプチド輸送に関与しているTAP1/TAP2が最も効果的に輸送するのは8~14アミノ酸のペプチドであり、基質の大きさがMDR1によって輸送されるための重要な因子の一つと考えられる。

MDR1の基質はほとんどが高い疎水性を示す。しかし、ステロイドなどの疎水性の高い物質がMDR1によって輸送されるかどうか検討した結果、ステロイドホルモンの中では最も疎水性の高いプロゲステロンは輸送されず、比較的疎水性の低いコルチゾール、アルドステロン、デキサメサゾンが輸送されることわかった<sup>14)</sup>。MDR1は適度な疎水性あるいは両親媒性をもつ物質を輸送していると考えられる。プロゲステロンはMDR1に対して高い親和性をもっており、おそらくMDR1からの放出がうまくいかないために、輸送されないのだと考えられる。MDR1によって輸送されるステロイド類は、荷電をもっていない。MDR1によって輸送される抗がん剤の多くが陽性荷電をもっているが、荷電の有無はMDR1の基質認識の条件ではないと思われる。

MDR1の基質認識機構に関してはいまだ不明である。これまでMDR1の基質特異性を変化させる多くのアミノ酸変異が同定されており、それらは多くの

膜貫通 $\alpha$ ヘリックスに散在している(図2)<sup>10)</sup>。それらのアミノ酸が基質と直接相互作用するのか、蛋白質全体の構造を変化させたために基質特異性が変化したのかを判別することは現時点では不可能である。特に、脂溶性の高い基質の認識に関しては、水素結合や静電的な相互作用ではなく疎水的な相互作用が主に働いていると予想される。MDR1の基質認識の謎を解くためには、三次元構造の解明が必須である。MDR1の三次元構造解明の試みに関しては第V章で述べられる。

#### 1.4 MDR1の特徴(II): 輸送機構

ABC蛋白質の中でMDR1と同様に生体異物を排出するトランスポーターとして機能することがわかっているMRP1とMRP2は、MDR1とは2つの点で異なっている。1番目の特徴は、ATPとの相互作用である。もちろん両者とも、基質結合によってATP加水分解が促進され、それと共役して基質が輸送される。しかし、MDR1の2つのATP結合領域(NBD:Nucleotide Binding Domain)は機能的に等価であり、両方ともATP加水分解活性をもち、どちらから一方のATP結合領域に変異を導入するとATP加水分解活性は完全に消失する<sup>15)</sup>。それに対し、MRP1、MRP2ではNBD2の変異が活性を完全に消失させるのに対し、NBD1の変異では消失せず、2つのNBDは等価ではない。ATP

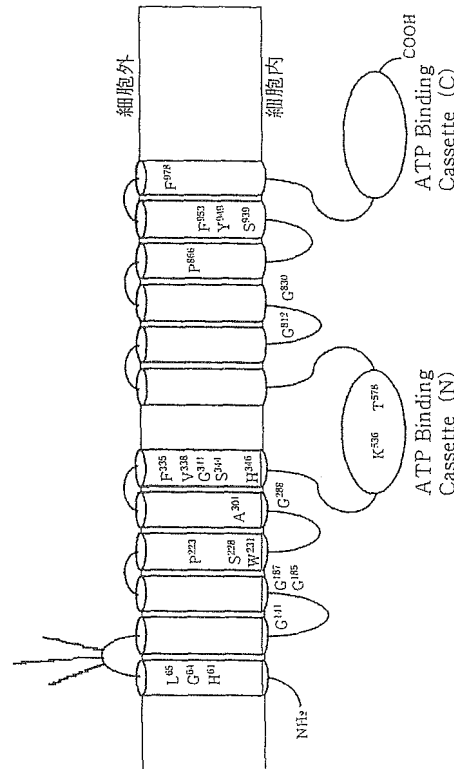


図2 MDR1の予想される二次構造と基質認識に影響するアミノ酸

はNBD2だけで加水分解されているのかもしれない<sup>16)</sup>。2番目の特徴は、MDR1が脂溶性生体異物そのものを基質として輸送するのに対し、MRP1、MRP2は生体異物が細胞内の解毒酵素によってグルタチオンやグルクロン酸付加を受け、水溶性の増した化合物を基質として輸送する点である。

MDR1では、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す、その構造変化が物質の輸送と共役していると考えられる。その場合、2つのモデルが考えられる(図3)。1つ目は2つのピストンをもつエンジンであり、2つのピストンは機能的にも機能的にも等価である。バクテリアのマルチコンポーネント型のABC蛋白質では、同じATP結合サブユニットが2つ含まれているものがあり、このモデルが考えやすい。片方のNBDでのATP加水分解によって基質を1分子輸送し、反対側のNBDでのATP加水分解によって次の基質を1分子輸送する。

2番目は水汲みポンプの棒の上と下にピストンをつけたようなモデルである。つまり、2つのピストンは機能的に等価ではない。片方のピストンは棒を引き上げるために働き、反対側は棒を押し下げするために働く。MDR1というと、片方のNBDでの加水分解による構造変化によって基質を細胞内から細胞外へ移動させ、反対側のNBDでの加水分解によって元の構造に戻る。このモデルでは、2分子のATP加水分解によって1分子の基質が輸送されることにな

る。2番目の特徴であるMDR1とMRPの基質の性質の違いは、ATP加水分解と基質輸送の共役機構の違いの原因かもしれない。つまり、水溶性化合物を膜の反対側に輸送するためには、輸送体は構造変化することによって、細胞内部を向いていた高親和性基質結合部位を細胞外へ向けると同時に、基質結合に関与

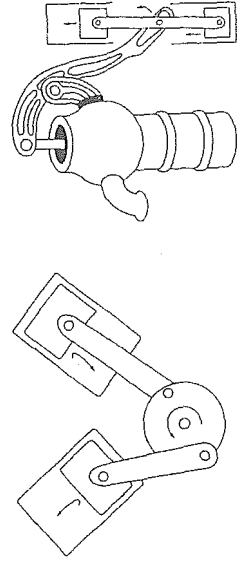


図3 MDR1のATP加水分解と輸送との共役の2つのモデル

しているアミノ酸を動かすことによって基質に対する親和性を大幅に低下させればよい。それで、基質は自動的に細胞外へ拡散していくことになる。しかし、基質が非常に脂溶性が高い場合、疎水的な相互作用で結合していた基質を拡散によって細胞外へ排出することはできない。脂溶性の基質を輸送するためには、親水性の基質を輸送する場合と比べて、よりたくさんさんのエネルギーが必要となると予想される。この仮説が正しいならば、MDRIは1つの基質を輸送するために2つATP加水分解を用いていることになり、水汲みポンプモデルが当てはまることになるが、それを実証するためには、さらに詳細な解析が必要である。

## 2. 血糖値調節に関わるSUR

IV-4章で述べられたように、1983年に野間（現京都大学教授）によって発見されたATP感受性 $K^+$ チャネル ( $K_{ATP}$ チャネル) は、さまざまな組織で重要な生理的役割を果たしている。最も研究が進んでいるのは $\beta$ 細胞膜上で働いている $K_{ATP}$ チャネルである。 $\beta$ 細胞 $K_{ATP}$ チャネルは、血中グルコースの濃度が上昇するとチャネル孔を閉鎖し、それによって膜電位が脱分極し、電位依存カルシウムチャネルが開く。そして、流入したカルシウムイオンによって $\beta$ 細胞からのインスリン分泌が引き起こされる。一方、心筋の $K_{ATP}$ チャネルは、普段は閉鎖しており、虚血時など酸素低下によって細胞内のエネルギーバランスに問題が生じたときに開口し、膜を過分極させることによって活動を停止させ、細胞死を免れる。つまり虚血などの非常事態に対する防御機構として働いていると思われている。この節では、これら $K_{ATP}$ チャネルの作用メカニズムについて概説する。

### 2.1 $K_{ATP}$ チャネルのサブユニットSUR

血中グルコースは細胞のエネルギー源としてだけでなく発達・成長にとって重要であり、それは新生児の持続性高インスリン性低血糖症 (PHHI) が中枢神経の発達異常をひき起こすことから明らかである。逆に、高血糖はさまざまな障害を全身でひき起こし、日本だけでも400万人以上が糖尿病で苦しんでいる。それゆえ、血中グルコース濃度はさまざまな機構で厳密に調節されてい

る。血糖値調節には複数のホルモンが関与し、中心的な役割を果たすホルモンの1つが、膵臓の $\beta$ 細胞から分泌されるインスリンである。ABC蛋白質の1つであるスルホニル尿素受容体 (SUR) は、 $K_{ATP}$ チャネルのサブユニットとしてインスリン分泌調節を通じて血中グルコース濃度調節に関与している。

$\beta$ 細胞では血糖値の上昇に反応してインスリンを分泌し、筋肉へのグルコースの取り込みを促進する。第IV-4章に詳しく述べられているように、 $\beta$ 細胞は血中のグルコース濃度の変化そのものを感知しているのではなく、細胞内に取り込まれたグルコースが代謝されATP濃度が増加することによって $K_{ATP}$ チャネルの開閉が調節されている。 $K_{ATP}$ チャネルは、ABCCサブファミリーに属するABCC8 (SUR1) またはABCC9 (SUR2) と内向き整流性カリウムチャネルファミリーに属するKir6.1またはKir6.2の4:4のヘテロ8量体であり、 $\beta$ 細胞の $K_{ATP}$ チャネルは4分子のSUR1と4分子のKir6.2から構成されている<sup>19</sup> (第IV-4章の図2)。 $K^+$ イオンを選択するポアを形成しているのは4分子のKir6.2であり、Kir6.2の2つの膜貫通セグメントには含まれた領域の5アミノ酸 (TVGYG) の主鎖が $K^+$ イオンを $Na^+$ イオンや他のイオンから選択している<sup>19</sup>。このような $K^+$ チャネルのイオン選択機構を、放線菌の $K^+$ チャネルであるKcsAの三次元構造解析に基づいて解明したMacKinnon博士に2003年度のノーベル化学賞が贈られたのである。

電気生理学的な解析から、Kir6.2にATPが結合してチャネルが閉鎖することが示唆されていたが、筆者らは光親和標識実験によって、Kir6.2がATPを直接結合することを実証した<sup>19</sup>。グルコースが代謝されて増加した細胞内のATPがKir6.2に結合することによって、チャネルが閉鎖すると思われる。では、SUR1は何をしているのだろうか？

### 2.2 SUR1とATP/ADPとの相互作用

$\beta$ 細胞の $K_{ATP}$ チャネルは、ATPによってチャネル活性が阻害され、MgADPによって活性化される。SUR1とKir6.2を細胞に発現させた場合も、同様の性質をもった $K^+$ チャネルが細胞膜上に出現する。 $K_{ATP}$ チャネルには、SUR1とKir6.2が正確にヘテロ8量体を形成した場合にのみ、ERから細胞膜へ移送されるように巧妙な品質管理機構が働いている<sup>20</sup>。そのため、Kir6.2を単独で発現させると小胞体に留まってしまいが、C末端に存在する小胞体残留

シグナルを削ると Kir 6.2 は細胞膜に移送され 4 量体を形成し  $K^+$  チャネル活性を示す。その場合、ATP によってチャネル活性が阻害されるだけでなく、MgADP によってもチャネルは阻害されてしまう。それ故、MgADP によるチャネルの活性化は SUR1 サブユニットを介している可能性があった。しかし、SUR1 の予想される二次構造はグルタチオン抱合解毒された異物を細胞外へ排出する MRP1 と非常によく似ており、SUR1 が細胞内の代謝状態の変化に伴って、何か内在性のリガンドを細胞外へ排出し、それが細胞の外から Kir 6.2 に作用しチャネルの閉鎖を調節している可能性もあった。

筆者らは、それまでに MDR1 や MRP1 のトランスポーター型 ABC 蛋白質の ATP との相互作用を解析し、それらの ATP 加水分解の輸送基質による促進を検出する感度よい方法を確立していた。そこで、SUR1 の ATP との相互作用を ATP 類似体である 8-azido-ATP を用いた光親和性標識実験で検討することによって、SUR1 の作用メカニズムを明らかにしようとした。その結果、SUR1 の 2 つの NBD の性質は MDR1 とは大きく異なっていることがわかった<sup>20</sup>。トランスポーターとして機能する MDR1 および MRP1 では、リン酸類似体であるバナジウム酸存在下でのみ 8-azido-ATP によって光親和性標識される。MDR1 および MRP1 では、加水分解後生成した ADP は速やかに遊離する。バナジウム酸 (Vi) 存在下では、ATP が加水分解された後、遊離した γ リン酸の代わりにバナジウム酸が結合し、ADP・Vi を結合した安定な阻害中間体が形成されたためであると考えられている。

一方、SUR1 の場合は、バナジウム酸非存在下であっても 8-azido-ATP を非常に強く結合し、その結合は Mg 非依存性であった。NBD 中の Walker A モチーフの変異体を用いた実験と、チオール修飾試薬 N-エチルマレイミドによる標識阻害実験やトリプシン分解後に特異抗体で沈降することによって、この高親和性 ATP 結合は NBD1 で起こることが明らかになった<sup>20,23</sup>。NBD1 は 8-azido-[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP、8-azido-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP いずれでも標識されるのに対し、NBD2 は 8-azido-[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP では標識されるが 8-azido-[ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP では標識されない。これは、NBD2 では 8-azido-ATP が加水分解されて γ 位のリン酸が解離したことを示している。つまり、SUR1 の NBD1 は ATP 加水分解活性がないか非常に低い活性しかもたず、NBD2 は加水分解活性をもつことがわかった。さらに、NBD1 に結合した ATP は、NBD2 に MgADP が結合することに

よって安定化されることが明らかになった<sup>20</sup>。以上の結果は、NBD1 と NBD2 間のヌクレオチド結合には協調性があり、NBD1 に ATP 結合が結合し NBD2 に MgADP が結合したときに SUR1 は大きく構造変化することを示唆している。

### 2.3 $K_{ATP}$ チャネル組織特異的な生理的作用と SUR のヌクレオチド結合性

膵 β 細胞型  $K_{ATP}$  チャネルと、心筋型、血管平滑筋型  $K_{ATP}$  チャネルでは、通常の代謝状態でそれぞれ開口、閉鎖している点で、生理的特性が異なる (図 4)。第 IV-2 章に詳しく述べられているように、それぞれの  $K_{ATP}$  チャネルを構成する Kir 6.2 は同じであるのに対して、SUR サブタイプが異なっていることから、SUR の違いがヌクレオチド結合特性の相違の原因であると思われる。そこで、SUR1, SUR2A, SUR2B の 2 つの ATP 結合領域のヌクレオチドとの相互作用を比較した<sup>20</sup>。その結果、基本的な性質はよく似ており、NBD1 は Mg 非依存的に ATP を結合し、ATP 加水分解活性が低い活性しかもたないが、NBD2 は ATP 加水分解活性をもっていた。しかし、ATP, ADP に対する親和性に関しては、SUR サブタイプ間で大きく異なることが明らかになった (表 2)。

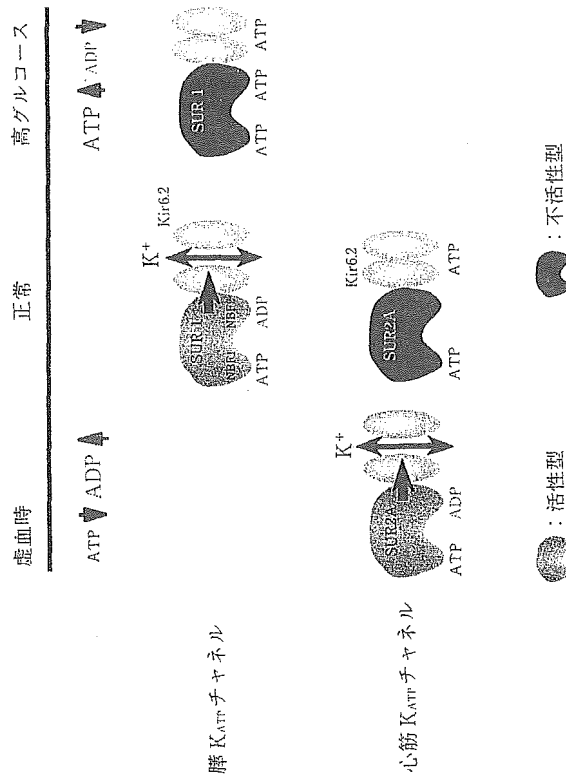


図 4 膵 β 細胞と心筋の  $K_{ATP}$  チャネルの生理的役割の違いとチャネル開閉の制御



表2 SUR サブタイプの ATP 結合性

SUR サブタイプ	NBD	K <sub>i</sub> ( $\mu$ M)ATP	K <sub>i</sub> ( $\mu$ M)ADP
SUR1	NBD1	4.4 $\pm$ 3.7	26 $\pm$ 8.6
	NBD2	60 $\pm$ 26	100 $\pm$ 26
SUR2A	NBD1	110 $\pm$ 41	86 $\pm$ 23
	NBD2	120 $\pm$ 39	170 $\pm$ 70
SUR2B	NBD1	51 $\pm$ 13	66 $\pm$ 7.5
	NBD2	38 $\pm$ 26	67 $\pm$ 40

SUR1 の NBD1 の ATP に対する親和性が非常に高く、ADP に対する親和性よりも高い。そして、SUR2A の NBD2 の ADP に対する親和性と NBD1 の ATP、ADP に対する親和性は、SUR1、SUR2B の場合よりも低いのである。再構成した SUR1/Kir 6.2、SUR2B/Kir 6.2 チャネルは SUR2A/Kir 6.2 チャネルよりも低い濃度の MgADP で活性化されるという報告<sup>20)</sup>は、上記の結果と一致する。SUR2A と SUR2B は C 末端 42 アミノ酸残基のみが異なる (第 IV-2 章を参照) ので、C 末端がヌクレオチド結合部位の一部となるか、またはアロステリックに結合部位に影響を及ぼす可能性がある。

日本人 PHHI の患者で同定された SUR1 の R1420C 変異によって、NBD2 の ATP、ADP に対する親和性が約 5 倍低下していた<sup>21)</sup>。このことから、NBD2 のヌクレオチドに対する親和性は、生理条件下でのチャネルの開閉に影響することが示唆された。したがって、 $\beta$  細胞型、心筋型、血管平滑筋型 K<sub>ATP</sub> チャネルの性質の相違の一部は、NBD のヌクレオチド結合に対する親和性の相違による可能性がある。電気生理学的解析では、再構成した SUR1/Kir 6.2 チャネルの K<sub>i</sub> 値は約 10  $\mu$ M、SUR2A/Kir 6.2 チャネルの K<sub>i</sub> 値は約 100  $\mu$ M であり、SUR1 と SUR2A の ATP 加水分解活性の違いがこのような差の原因である可能性もある。SUR1 と SUR2A、SUR2B の ATP 加水分解活性を定量的に測定・比較することは、今後の課題である。

#### 2.4 細胞内 ADP センサーモデル

一般に哺乳類細胞内の ATP 濃度は 3 ~ 5 mM、ADP 濃度は数十  $\mu$ M ~ 数百  $\mu$ M である。SUR の NBD1 の ATP、ADP に対する親和性は数  $\mu$ M ~ 約 100  $\mu$ M であること (表 2) から、NBD1 には主に ATP が結合すると考えられる。SUR1

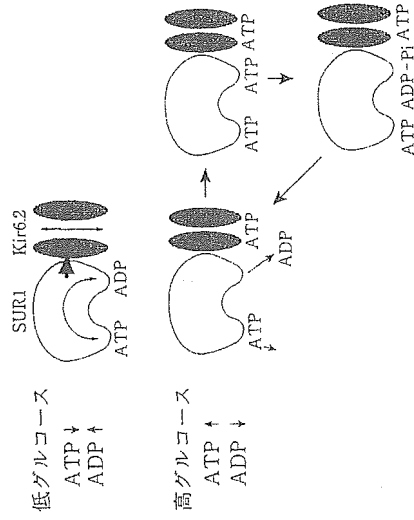


図5 SUR1 による Kir 6.2 チャネルの開閉制御モデル

細胞内の ATP 濃度が低いとき、SUR1 の NBD1 には ATP が結合し、NBD2 には ADP が結合する。そのとき SUR1 は大きく構造変化し、Kir 6.2 の構造変化をもたしてチャネルが開く。細胞内の ATP 濃度が高く ADP 濃度が低いとき、NBD2 に結合した ATP は加水分解されて ADP となったあとと遊離する。閉鎖状態の Kir 6.2 に ATP が結合し長期閉鎖状態となる。

の場合、ADP に対す親和性が約 5 倍高いことから特にこの傾向は強い。NBD1 は ATP 加水分解活性をもたないか、もっていても非常に低い。しかし、NBD2 は加水分解活性をもつため、NBD2 に結合した ATP は加水分解され ADP となる。NBD2 に ADP が結合した状態で NBD1 の ATP が非常に安定化されることから、SUR1 は大きく構造変化すると考えられる。電気生理学実験から、SUR に MgADP が作用して K<sub>ATP</sub> チャネルが開くことがわかっており、NBD1 に ATP、NBD2 に ADP が結合した形が SUR の活性型で、Kir 6.2 サブユニットに作用してチャネルポアを開口させるというモデルが考えられた (図 5)。ADP 濃度を変化させて NBD1 の ATP 結合の安定化を検討した結果、10  $\mu$ M から 500  $\mu$ M の間で直線的に比例することが明らかになった<sup>20)</sup>。細胞内の ADP 濃度は代謝状態によってちよつとこの範囲で変化すると考えられており、細胞内の代謝状態が悪いとき、つまり ATP 濃度が低く ADP 濃度が高いときは、平衡状態が NBD2 に ADP が結合した状態に傾くため、活性型の割合が多くなると予想される。SUR が活性型るとき、開口シグナルが Kir 6.2 に伝えられ、Kir 6.2 に ATP が結合できなためチャネルは閉鎖状態となる。逆に、細胞内の代謝状態のよいとき、つまり ATP 濃度が高く ADP 濃度が低い

ときは、NBD2からADPが解離しやすいため不活性型になり、Kir 6.2にATPが結合してチャネルは閉鎖する。これはちょうどGTP結合蛋白質がGTPを結合したときは活性型、GDPを結合したときは不活性型となり、他の蛋白質の機能を調節するスイッチとして機能するのに似ている。

このモデルの重要なところは、SUR1がGTP結合蛋白質のようにスイッチとして機能するだけでなく、ADPの濃度を感知するセンサーとして機能することである。GTP結合蛋白質は、GTP結合型が活性型でありGDP結合型が不活性型である。GDPを結合した不活性型GTP結合蛋白質は、GDP/GTP交換因子の働きでGDPを放出し、GTPを代わりに結合することによって活性型へと変換する。活性型GTP結合蛋白質は、GTPase促進因子の働きで潜在性加水分解活性が促進され、GTPをGDPに分解し不活性型に戻る。この反応は、Rasによる細胞増殖制御をはじめとして、さまざまなGTP結合蛋白質による生体反応の調節に関与している。しかし、GTP結合蛋白質は細胞内のGTPとGDPの濃度変化は感知しないし、そもそも細胞内のGTPとGDPの濃度が変化し、それが生体反応の調節に関与するとは考えられていない。SURはGTP結合蛋白質のようにスイッチとして機能するだけでなく、ADP濃度のセンサーとして働くことで $K_{ATP}$ チャネルの開閉を制御し、細胞の代謝レベルの監視役として機能すると考えられる。

### 3. 脂質恒常性に関与する ABCA1

#### 3.1 コレステロール恒常性と ABC 蛋白質

現在、日本人の約2千万人が高脂血症に冒されていると推定されている。高脂血症そのものには自覚症状がないが、放っておくと動脈硬化が進行し、狭心症や心筋梗塞などの心疾患や脳血栓・脳梗塞など脳血管疾患をひき起こす。心疾患と脳血管疾患を合わせた死亡率は、がんによる死亡率よりも高く、高脂血症は命にかかわる大問題である。高脂血症の約8割は高コレステロール血症であり、そのためコレステロールは現代人にとって毒のように思われてしまっている。しかし、コレステロールは細胞膜の構成成分として必須であるばかりでなく、ホルモン、脂溶性ビタミン、胆汁酸などの前駆体として我々の体にとつて非常に重要な物質であり、体重70kgの健康な人で約140gのコレステロール

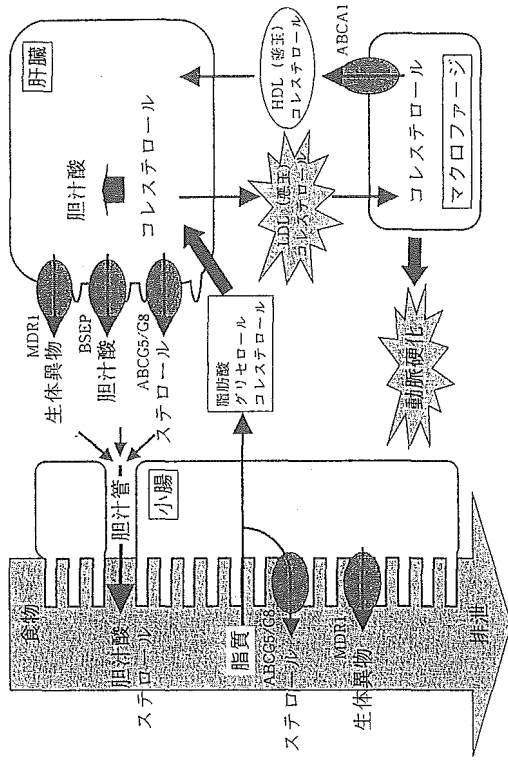


図6 脂質恒常性維持に関わる ABC 蛋白質のネットワーク

が体内のいろいろな場所に蓄積されている。

コレステロールは体内で合成されるが、それだけでは不十分であり、毎日の食事によって外界から摂取している。それゆえ、コレステロールの体内恒常性は合成酵素や代謝酵素の調節だけでなく、主な代謝の場である肝臓からそれぞれの脂質が機能する組織への輸送、それぞれの組織から肝臓への逆輸送、さらに小腸における外界からの吸収と排泄、肝臓から胆汁中への排泄、腎臓から尿中への排泄などが統合されたネットワークによって保たれている(図6)。最近、コレステロールの体内での輸送にATP加水分解に依存したトランスポーターであるABC蛋白質が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。

#### 3.2 タンジール病と ABCA1

体内のコレステロール輸送にABC蛋白質の一つであるABCA1が重要な役割を果たしていることが明らかになったのは、血中の高密度リポ蛋白質HDLが極端に減少する遺伝病であるタンジール病の原因遺伝子の解析がきっかけであった<sup>29-30</sup>。1999年のことである。それより以前に、ABC蛋白質の一つであ

る ABCB11 (BSEP) が、胆汁酸の肝臓からの排出に関与していること<sup>30)</sup>、その胆汁酸をミセル状態に保つために必要なホスファチジルコリンを MDR2 が分泌していることが知られていた<sup>8)</sup>。胆汁酸は強烈な界面活性作用をもっており、その作用から胆管を守るためにはホスファチジルコリンと一緒にミセルが形成されることが必要である。このように、コレステロール恒常性に ABC 蛋白質が関係していることは知られていた。しかし、一般には善玉コレステロールと呼ばれ、コレステロールの体内恒常性維持の鍵を握る高密度リポ蛋白質 (HDL) が血中から消えてしまうほどの直接的なそして大きな影響を ABC 蛋白質の異常が与えることは驚きであった。

タンジール病の最初の症例は、米国立衛生研究所の医師 Donald S. Fredrickson によって 1961 年に報告された。米国の首都ワシントン DC が臨むバージニア州チェサピーク湾に浮かぶ小さな島、タンジール島の 5 歳の少年がワシントン DC から車で 30 分ほど走った郊外の町ベセスダにある米国立衛生研究所で診察を受けたのであった。オレンジ色に腫れた扁桃腺をもつその少年は、血中 HDL が検出されず、全身に著しい脂質蓄積症状を呈しており、Fredrickson 博士によってタンジール病と名づけられた<sup>31)</sup>。タンジール病患者の数は多くはないが、1965 年にはケンタッキーで見つかった患者について家系分析が行われ、常染色体劣性遺伝病であることが報告されている。タンジール病の臨床症状としては、オレンジ色の扁桃腫大、肝脾腫、角膜混濁、末梢神経障害がみられ、虚血性心疾患の頻度が高い。ABCA1 にヘテロに変異をもつ人は、年齢とともに冠動脈壁の厚さの増加が正常人と比べて有意に大きいことが疫学調査からわかっている<sup>30)</sup>。

余談になるが、タンジール島は、独立戦争当時に英国政府がこの島に基地を置き、ジョージ・ワシントンを指揮者とする植民地軍の船を砲撃したという由緒ある島である。地理的に孤立したせいもあり、この島の多くの住人が 17 世紀後半に移住した英国人たちの子孫であり、劣性遺伝的疾患が発生しやすい環境にあったと思われる。

### 3.3 ABCA1 蛋白質

当初、ヒト ABCA1 遺伝子の全長 cDNA は 2,201 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 6,603 塩基のオープンリーディングフレームをもつと報告さ

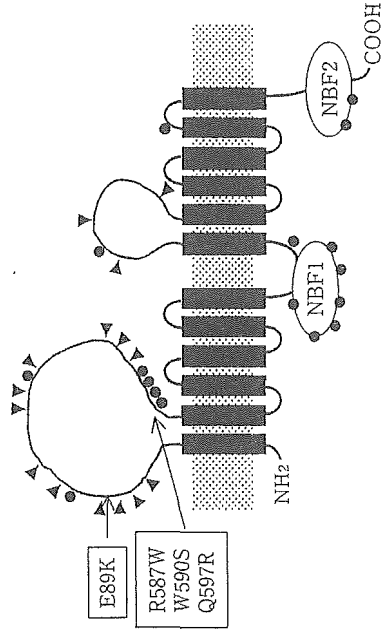


図7 ABCA1 の予想される二次構造

糖鎖付加予想部位を矢頭で、タンジール病および家族性低 HDL 血症で見つかった R587W、W590S、Q597R および WHAM ニワトリの ABCA1 遺伝子の変異 E89K の位置を矢印で示した。矢頭は、予想される N 型糖鎖付加部位。

れた<sup>30)</sup>。しかし筆者らは、報告されているヒト ABCA1 cDNA の第 1 メチオニンコドンの 180 塩基上流に新たなメチオニンコドンが存在しており、実際は 2,261 アミノ酸の膜蛋白質をコードしていることを明らかにした<sup>30)</sup>。筆者らの単離した ABCA1 を培養細胞に導入すると約 300 kDa の膜蛋白質として発現し、その大きさはマウスマクロファージ RAW264 の ABCA1 とほぼ同じ大きさであった。

二次構造をコンピュータ解析した結果、ABCA1 は 12 の膜貫通  $\alpha$  ヘリックスをもつ典型的な ABC 蛋白質の構造をしていた。しかし、ABCA1 には第 1 膜貫通  $\alpha$  ヘリックスの次に 600 アミノ酸に及ぶ親水性領域が存在し、多くの糖鎖付加部位をもつ細胞外ドメインを形成するという特徴的な構造をしていることが予想された<sup>30)</sup>。筆者らはそれを確かめるため、257 番目と 258 番目のアミノ酸の間にタグを挿入し蛍光免疫染色を行うとともに、そのドメインに対する抗体も作製し蛍光免疫染色を行った<sup>30)</sup>。さらに N 結合型糖鎖を切断する *N*-グリコシダーゼ F の実験も総合すると、ヒト ABCA1 のアミノ酸番号 45 から 641 の間の領域は、細胞外に突き出していて多くの N 結合型糖鎖付加を受けていると考えられる (図 7)。

### 3.4 小腸におけるABCA1の生理的役割

ABCA1は全身のさまざまな組織で発現しているが、特に小腸、肝臓、マクロファージでの発現が顕著である。ABCA1が発見されてすぐに作製されたABCA1KOマウスでは、小腸からのコレステロールの吸収が増加していると報告された<sup>33)</sup>。この結果から、ABCA1は小腸上皮細胞の管腔側膜に発現し、食餌中のコレステロールの小腸からの吸収を抑制していると考えられた<sup>34)</sup>。しかし、動物の進化上、そのようなことがありえるだろうか？動物にとつて動物性コレステロールを摂取するのは簡単な仕事ではない。アフリカの草原のライオン、あるいは獲物を追って猟に出た原始時代を考えれば納得できるだろう。細胞膜の必須構成成分であり、さまざまなホルモンの前駆体であるコレステロールの吸収を抑制するための機構を小腸上皮にもつ必要が動物にはあるだろうか？

筆者らはその点に疑問をもち、ヒトの腸由来の培養細胞であるCaco-2を用いてABCA1の発現場所を検討した。Caco-2を下面がフィルターになったカップに生やし、細胞の上と下の両面から培地と触れることができるTranswellと呼ばれる培養器で3週間培養すると、ちょうど小腸上皮のように極性をもち、細胞の上下面が頂端側膜と基底側膜に分化する。免疫染色実験の結果、ABCA1は細胞の側面と基底側の膜に発現していることが明らかになった<sup>35)</sup>。さらに、細胞膜を通過しない試薬で細胞表面の蛋白質をバイオチン化したところ、基底膜側から試薬を加えたときだけABCA1がバイオチン化された。大阪大学医学部の平野たちは、極性分化したCaco-2細胞の基底膜側にアポA-Iを加えたときにHDLが産生されることも見いだした<sup>36)</sup>。これらの結果は、小腸上皮においてはABCA1は基底側膜に局在し、コレステロールや脂溶性ビタミンを吸収する方向に発現していることを示している。しかし、実際にABCA1は小腸からのコレステロールの吸収にも関係しているのだろうか？

### 3.5 ニワトリでのABCA1の生理的役割

1981年に米国ウイソコンシン州マディソン大学において白い皮膚とくちばしをもつニワトリが発見され、WHAM (Wisconsin hypoalpha mutant) と名づけられた<sup>37)</sup>。それは血漿中にカロテノイドが含まれていないのが原因であり、血中にリポ蛋白質が存在しないためにカロテノイドが血中に保持されない

と予想された。遺伝解析の結果、そのニワトリのABCA1の89番目のアミノ酸がグルタミン酸からリジンに置換していた(図7)。このアミノ酸は第1細胞外ドメインの前半部に位置しており、このアミノ酸を含む第1細胞外ドメインのアミノ酸配列はフグからヒトまでほぼ完全に保存されていることがわかった。このことは、この領域がABCA1の機能にとつて重要であることを示唆すると同時に、ニワトリにおいても血中リポ蛋白質の形成にABCA1が重要な役割を果たしていることを示していた。

WHAMニワトリでは、食餌中のコレステロールが小腸からほとんど吸収されないことが明らかになった<sup>38)</sup>。哺乳類では、食物中の脂質成分はそのほとんどがカイロミクロンとして小腸から吸収され、まずリンパ液に入り、血液を介して肝臓へ運ばれると考えられている。それに対し、鳥類ではコレステロールは小腸から直接血中にHDLとして吸収され、即座に肝臓へと運ばれるのである。

以上の結果は、進化的にはABCA1は小腸からコレステロールを吸収する役割を担ってきており、ヒトにおいてもコレステロールはカイロミクロンを介した経路だけでなく、HDLとして血液中に直接吸収される経路が存在する可能性を示唆している。

### 3.6 植物ステロール排出ポンプABCG5/G8

ヒトは、毎日動物性コレステロールと同様にシトステロール(図8)を代表とする植物性ステロールなどの非動物性ステロールを摂取している。その量は300~500mgであり、動物性コレステロールとはほぼ同量である。しかし、摂取した動物性コレステロールの50~60%が小腸から吸収されるのとは対照的に、植物性ステロールは5%以下(20mg以下)しか吸収されない。植物や甲殻類のステロールは我々の体には必要ではなく、吸収しすぎると高シトステロール血症という病気になる。臍や皮下に結節性黄色腫を生じる。図8に示したように、コレステロールとシトステロールは構造的に非常に似ている。つまり、我々の体はその微妙な違いを見分けて、必要とするコレステロールだけを選択的に吸収するような仕組みができてきているのである。

その仕組みの中心はABCG5、ABCG8と呼ばれるABC蛋白質である。ABCA1が12の膜貫通領域と2つのATP結合ドメインをもつのに対して、