

B-2-3. 膜タンパク質配向リポソームの薬物排出機能評価

上述の MDR-1 配向リポソームによる薬物排出能(Q_{max})を測定した。これまでの検討より配向性は図 B-1 のように、ATP 結合部位が外水相に向いていると考えられる。そこで、ATP を外水相に添加することで、MDR-1 の ATP の加水分解量を測定した。ATP 加水分解量は、遊離するリン酸由来のモリブデン錯塩形成量から評価した (Chifflet et al., 1988)。MDR-1 の ATP 加水分解活性(ATPase 活性)は、ATP 加水分解量の経時変化から得られる初期勾配を MDR-1 の質量で除した値で定義した。

B-3. 固定化リポソームクロマトグラフィー

MDR1 組み込んだ DOPC/DOPE リポソームを前報(Yoshimoto et al., 1998)と同様の方法を用いてゲル担体に固定化した。活性化したゲル担体(Sephacryl S-1000 ゲル等)にリポソームを添加し、1 昼夜静かに攪拌することで固定化した。固定化の確認は脂質量とタンパク質量の定量により行った。得られたリポソーム固定化ゲルを 5.5cm×0.5cm ガラスカラム (HR5/5, Amersham, Pharmacia Biotech 製)に充填した。実験によってはカラム充填高さを適宜変えた。これをポンプ、ならびに透析ユニットに接続し、所定の条件(37°C, pH7.5)において透析操作を行なった。

B-4. 薬物排出の動学的評価

MDR1 と各種薬物分子との結合特性については、ローダミン B などのモデル薬物を MDR-1 配向リポソームに添加し、外水相におけるローダミン濃度の経時変化を測定した。対照系(MDR-1 を配向していないリポソーム)とプロテオリポソームとの差分を MDR1 による薬物排出量(Q)と定義した。前年度の検討から、 Q の経時変化は次式により議論できるこ

とが示されている。

$$Q = Q_{max} (1 - e^{-k_{app}t}) \dots \dots (1)$$

そこで、各種モデル薬物に関してみかけの排出速度係数 k_{app} と最大排出量(Q_{max})を求めた。

B-5. 誘電分散解析

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

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

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

C. 研究結果

図 C-1 に従来のプロテオリポソーム調製スキームを示す。膜タンパク質の機能発現における問題点は、ミセル可溶化過程における膜タンパク質の活性低下である。そこで、最初に同じ ATPase 活性を有する Na^+/K^+ -ATPase を用いてミセル可溶化過程を検討した。

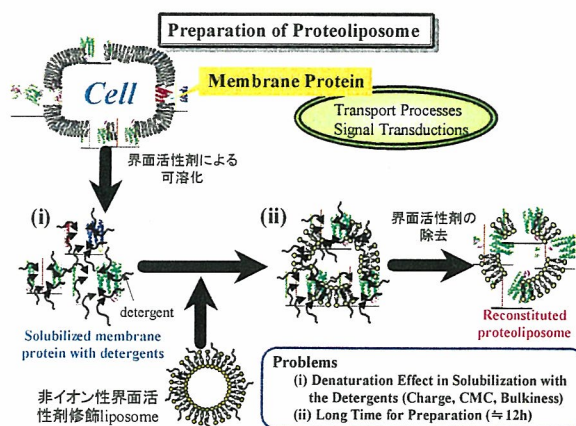


図 C-1 プロテオリポソームの調製法

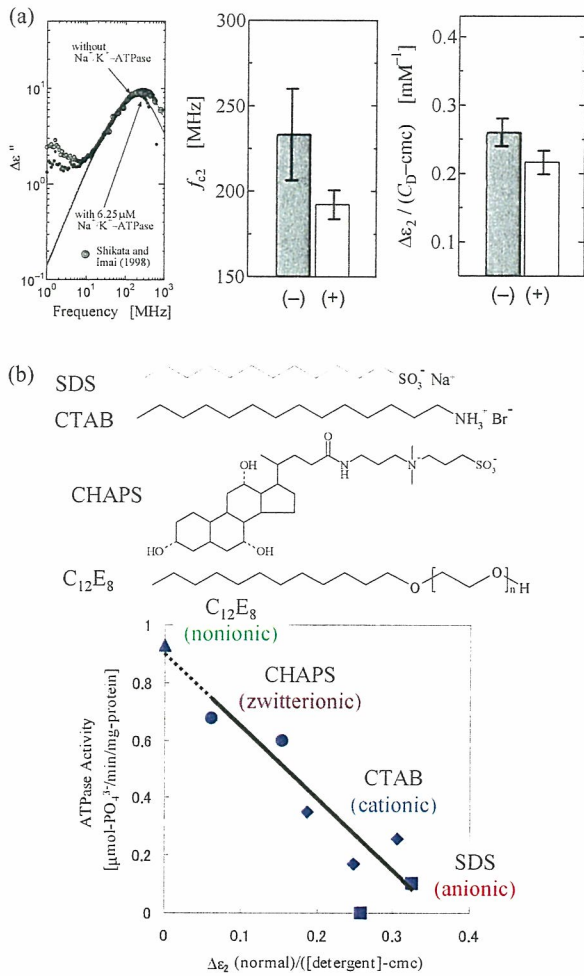


図 C-2 (a) CTAB ミセルと Na⁺/K⁺-ATPase 可溶化時の誘電スペクトル. (+), (-) は Na⁺/K⁺-ATPase の有無を表す. (b) 各種界面活性剤による膜タンパク質の可溶化と ATPase 活性残存率との関係

C-1. プロテオリポソームの調製

C-1-1. プロテオリポソームの機能評価(1)

-可溶化過程とミセルの誘電特性の検討-

CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) の誘電分散スペクトルを図 C-2(a) に示す. 従来の報告 (Shikata and Imai, 1998) と一致しており, 我々の実験値が妥当であることがわかる. さらに, 膜タンパク質を可溶化したミセルの誘電分散スペクトルは対照系と差が見られた. したがって, 本手法で膜タンパク質可溶化の

効果を検討できる可能性が示唆された. そこで, 式(1), (2)を用いて, 特性周波数ならびに緩和幅を算出し, その結果を図 C-2(a) に示した. Shikata らによれば, 300MHz 付近で観察される f_{c2} は, 界面活性剤分子が持つ双極子モーメントの回転ブラウン運動に対応する. したがって, f_{c2} の減少は, 膜タンパク質の可溶化による界面活性剤分子の運動の抑制と考えられる. 減少幅 Δf_{c2} は zwitterionic な界面活性剤において最も大きな値を示している. この理由に関する詳細な議論は割愛するが, 可溶化前のミセルが示す緩和周波数が電荷密度の影響を受け, 負電荷の SDS や正電荷の CTAB の f_{c2} が比較的低い値を示すのに対して, zwitterionic な CHAPS の場合, ミセル界面での静電反発が小さいことに関連している. 一方, 緩和幅 $\Delta\epsilon_2$ に着目すると, 可溶化前のミセルが示す $\Delta\epsilon_2$ は各界面活性剤で固有の値を示すが, 膜タンパク質の可溶化により $\Delta\epsilon_2$ は一様に同程度の減少幅を示している.

C-1-2. ミセルの誘電特性に基づく活性相関

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

まず, 可溶化前のミセルが示す誘電分散特性 (300MHz 付近で現われる緩和幅 $\Delta\epsilon_2$) は, 界面活性剤濃度に依存する. そこで, 臨界ミセル濃度 (cmc) と用いている界面活性剤濃度との差 ([detergent]-cmc) がミセル濃度に対応すると考え, この値で基準化した緩和幅 $\Delta\epsilon_2 / ([detergent]-\text{cmc})$ とミセルに可溶化した膜タンパク質の ATPase 活性との相関性について検討した (図 C-2(b)). 低い $\Delta\epsilon_2$ を示す界面

活性剤を用いた場合に ATPase 活性は増加する傾向が観察された。SDS や CTAB などの荷電性界面活性剤の場合、 $\Delta\epsilon_2$ は大きな値を示す傾向にある。この相関関係から、非イオン性界面活性剤である $C_{12}E_8$ が $\Delta\epsilon_2 \rightarrow 0$ の場合に相当すると考えると、高い ATPase 活性を説明する事ができる。実際、非イオン性界面活性剤 β -ドデシルマルトシドが MDR1 の可溶化に最も適しているという結果(絵野沢ら)が得られており、誘電分散解析より得られるミセルの特性パラメータ $\Delta\epsilon_2$ が界面活性剤の選択指標として用いることができることを示唆している。

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

C-1-3. プロテオリポソームの機能評価(2)

一般に、リポソームに配向させた膜タンパク質の ATP 結合部位の向きにより薬物の輸送方向が変化する。Table C-1 より、MDR-1 の配向性は粒径依存적であり、粒径が小さいほど外水相における ATP 加水分解活性が高く、ATP 結合部位が外向きに配向していることを示唆している。また、脂質組成の影響は小さいことがわかっている。これは、結合部位と排出部位が嵩高いため、限られた容積しかない内水相に配向するのはエントロピー的に不利であることを示唆している。この結果と MDR-1 の ATP 結合部位と輸送機構との関係を考慮すると、図 C-3 に示すように、薬物がリポソーム外水相から内水相に輸送されることが期待され、MDR-1 配向リポソームを薬物除去に利用できる可能性が示唆された。

Table C-1 MDR1 の配向性の評価

Lipid	Mean diameter [nm]*	Orientation [%]**
	78	93***
POPC	153	86
	381	68
POPC/POPG	139	84
DMPC/Chol	160	85

*Mean diameter was measured with dynamic light scattering method.

**The direction of ATP binding site facing to outer aqueous phase was defined 100%.

*** This proteoliposome was prepared with extrusion method by using a polycarbonate filter with 100 nm in pore size. The intrinsic activity of ATPase was quite low compared with those with the larger diameters

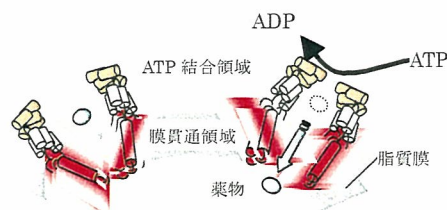


図 C-3 リポソームに組み込まれた MDR-1 の立体構造

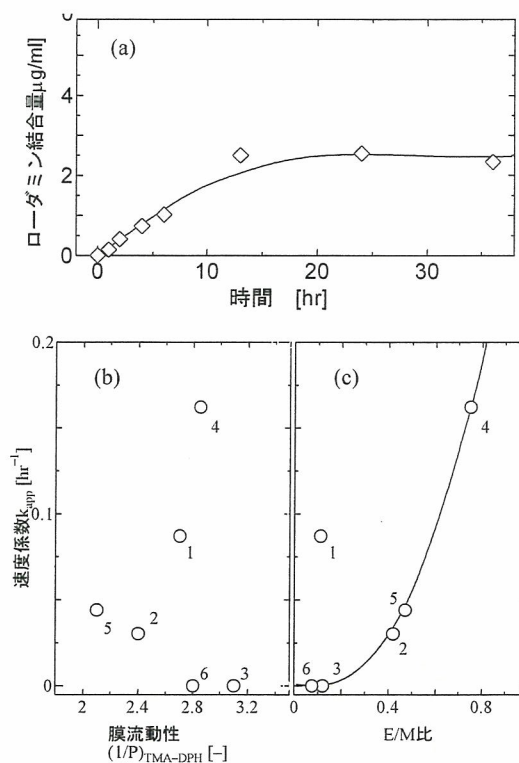


図 C-4 (a) ローダミン B 濃度の経時変化, (b) 膜流動性, (c) E/M 比と見かけの速度係数の関係 (1mol%ピレン脂肪酸). 各種脂質組成 1:EPC, 2:POPC/Chol, 3:DOPC, 4:DOPC/DOPE, 5:DOPC/DPPC/Chol, 6:DMPC

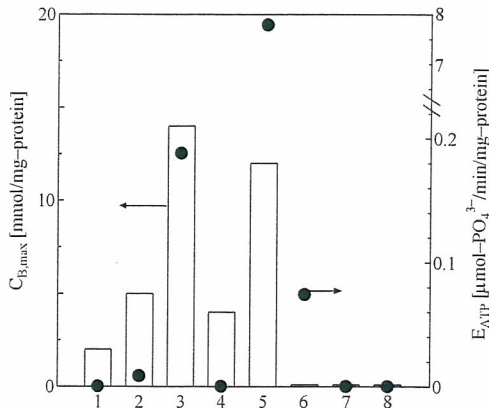


図 C-5 脂質組成を変化させたときの薬物除去能および ATPase 活性. 1:EPC, 2:POPC, 3:POPC/Chol, 4:DOPC, 5:DOPC/DOPE, 6:DOPC/DPPC/Chol, 7:DMPC, 8:DMPC/SA

次に, MDR1 による薬物排出特性を検討するため, ローダミン B をモデル薬物として, MDR1 への結合量の経時変化を検討した(図 C-4(a)). 式(1)より得られる速度論的パラメータ k_{app} は, MDR1 への薬物の結合速度定数の意味を持つ. 前年度の検討により, k_{app} は, 脂質膜上のクラスター形成挙動の指標である E/M 比(ピレンのエキシマー/モノマー蛍光強度比)とに対応していることが分かっている. この点からも, 高い E/M 比を示す DOPC/DOPE リポソーム系が本実験目的に合致する系であることが分かる(PE が相分離性であり, MDR1 の高活性発現のための境界脂質として必須). 実際, 膜タンパク質は生体膜上では, ラフトあるいはカベオラと呼ばれるマイクロドメインに存在していることを踏まえると, k_{app} は, 脂質膜の構造を考慮した膜タンパク質の速度論的指標として扱うことができる.

そこで, k_{app} 値を薬物濃度に対してプロットした結果, 図 C-6(a)のようにシグモイダル曲線を得た. k_{app} 値の最大値の 1/2 に対応する濃度を EC_{50} と定義すると, 薬物結合特性に関する量的指標を得ることができる. EC_{50} 値は従来報告されている MDR1 の基質との結合定数(K_D)(Sharom *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 1996)と

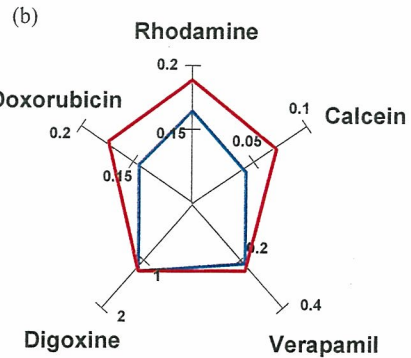
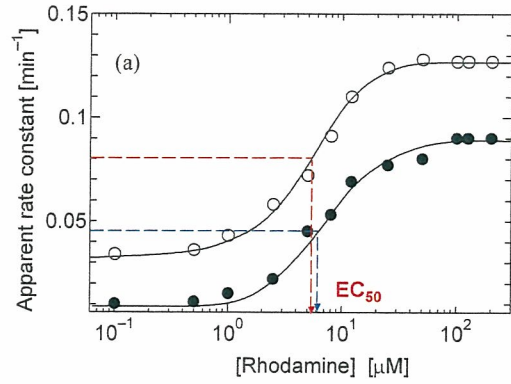


図 C-6 (a)ローダミン B の薬物結合特性. (○)DOPC/DOPE, (●)EPC. 縦軸は式(1)により得られる k_{app} 値である. (b) DOPC/DOPE と EPC における薬物除去能の MD プロファイル. MD($=1/EC_{50}$):多剤耐性. EC_{50} 値は図 C-1 より得た. 赤: DOPC/DOPE, 青: EPC.

対応していることが分かった(data not shown). EC_{50} 値が小さいほど, MDR1 による除去効率が低いことを示している. EC_{50} 値の逆数を MD(多剤耐性)と定義し, DOPC/DOPE と EPC 系について複数の薬物の MD プロファイルを示した(図 C-6(b)). 全体的に DOPC/DOPE 系が優れた多剤耐性を示している. 配向性が脂質組成によらないことを考慮すると, この結果は, DOPC/DOPE 系に存在するドメインが MDR1 の構造を安定化させたためであると考えられる.

C-2. プロテオリポソームの固定化

従来のバイオ人工肝などの透析システムでは, 肝臓由来細胞をシートに固定化する手法が技術開発の鍵になっている. 前年度までの

検討より、ゲル担体へのプロテオリポソームの固定化により透析システムへの応用が可能であることが示された。しかし、固定化法には、共有結合法、Avidin-Biotin 法、疎水結合法、立体的封じ込め法などがあり、それぞれ一長一短がある。本研究では、境界脂質として DOPE を用いているので、DOPE の頭部のエタノールアミン基を介した共有結合法を用いる(図 C-7(a))。以降において、プロテオリポソームをゲル担体に共有結合により固定化するための最適条件を探索した。

C-2-1. 固定化に及ぼす脂質組成の影響

まず、ゲル担体として Sephacryl S-1000, Sephadex 1000 や TSK 6000PW を選択し、プロテオリポソームの固定化量を検討した。プロテオリポソームは、DOPC/DOPE 組成を使用した。一般に、脂質のみの場合のゲル担体への固定化の方が優れており、プロテオリポソームの場合、全体的に $2 \mu\text{mol-lipid/mg-gel}$ 程度であった。今回用いた固定化法は共有結合法であり、脂質(PE)のアミノ基とゲル担体由来の活性化ヒドロキシル基との結合形成において、膜タンパク質が立体障害になっていることが、脂質組成によらない固定化量の低さの原因になっていると推測される。

C-2-2. 固定化に及ぼすゲル担体の影響

次に、固定化に及ぼすゲル担体の影響を検討した。プロテオリポソームの脂質組成は先述の DOPC/DOPE を用いた。図 C-7(b)に各種ゲル担体に対するプロテオリポソームの固定化量を示した。最も高い固定化量を与えるのは Sephacryl S-1000 であった。次いで Sephadex や TSK 6000PW の固定化量が高かった。これらは疎水性が高く、ゲル担体としても固めであるが、Sephacryl S-1000 のように柔らかいゲル担体への固定化は非常に効率が低かった。カ

ラムへの充填などの実用面を考えると、Sephadex S-1000 のような硬いゲル担体を用いるのが有効であることが示唆された。

C-2-3. カラム長さの影響

固定化プロテオリポソームカラムによる薬物や老廃物の除去プロセスの効率は、カラム長さ(充填高さ)に直接影響を受ける。そこで、カラム長さの効果を検討した。

プロテオリポソームの固定化量で基準化したローダミン除去量をカラム長さに対してプロットすると、ゲルの種類によらず両者は良好な相関性を示しており、期待通り、薬物除去能が、カラム長さに比例する固定化量に依存することが示された(data not shown)。

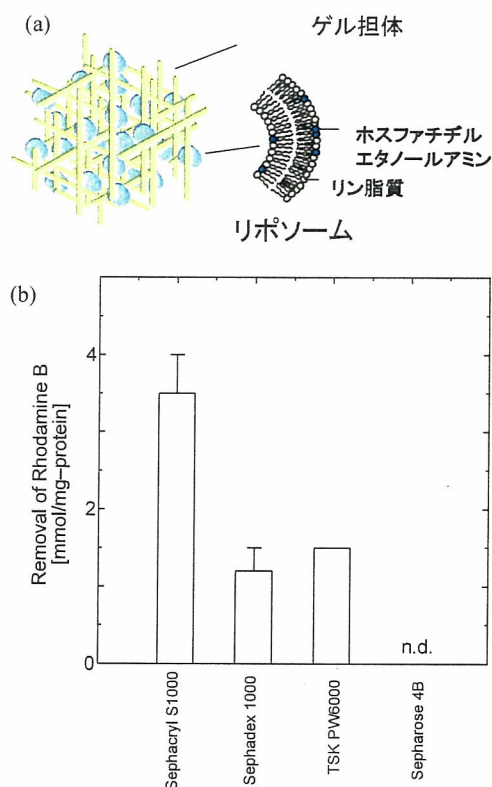


図 C-7 (a) ゲル担体へのリポソームの固定化の概念図, (b) 固定化に及ぼすゲル担体の影響. カラム径は 0.5cm, 流速: 0.25ml/min, 脂質系: DOPC/DOPE. N.d.: not detected

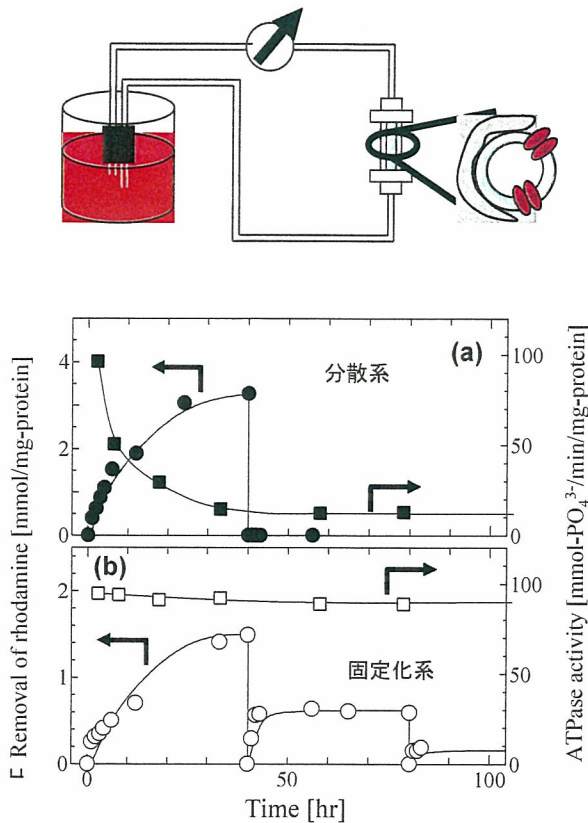


図 C-8 透析システムの概要と連続操作 (a)分散系, (b)固定化系. 脂質組成:DOPC/DOPE

C-3. プロテオリポソーム固定化カラムによる透析操作

C-3-1. 薬物除去の連続操作に及ぼす固定化の影響

次に、プロテオリポソーム固定化カラムによる透析操作を行うため、図 C-8 のような操作系を構築した。対照系として、まずプロテオリポソームをゲル担体に固定化していない(分散)系について、ATPase 活性とローダミン除去量の経時変化を測定した(図 C-8(a))。50hr 経過後、ATPase 活性はほとんど失われ、ローダミン除去能も消失していた。この原因がMDR1を疎水核とするプロテオリポソームの凝集機構であることが、蛍光共鳴エネルギー移動実験や凝集速度に関するATP濃度依存性の実験により推測される(data not shown)。

そこで、固定化系における透析操作を検討

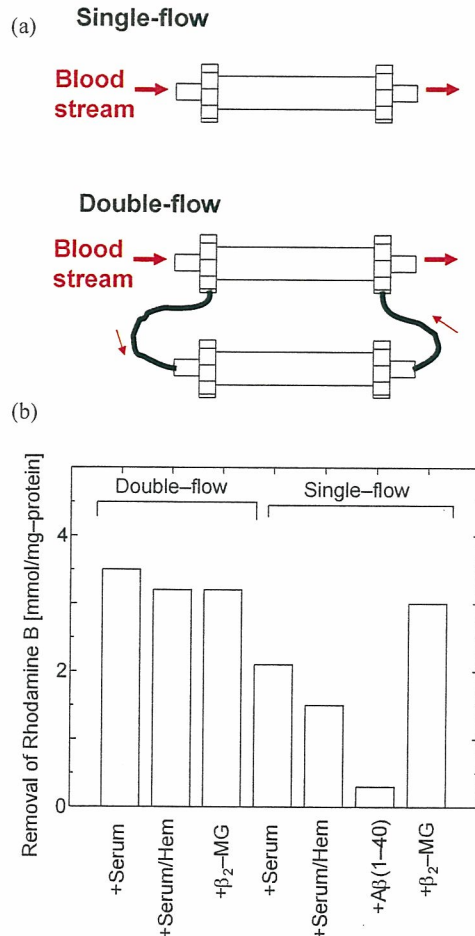


図 C-9 (a) 透析操作の概要, (b) Single-flow および Double-flow における模擬血流からのローダミン B 除去効率. 模擬血流には各種タンパク質(10 μM)を共存させた。

した結果を図 C-8(b)に示す。ATPase 活性は1週間以上ほぼ 100%に保たれ、ローダミン除去操作も最低 3 回の繰り返し操作が可能であった。ゲル担体へのプロテオリポソームの固定化による凝集抑制が効を奏したと考えられる。サイクル数が増大すると共に除去量が減少するのは、対象物質が蓄積する内水相空間が有限だからである。したがって、リポソーム内水相に蓄積するローダミン B を何らかの方法で化学的・酵素学的に分解、もしくはリポソーム外水相に排出する機能を導入する必要があることが示唆される。

C-3-2. 透析方式の検討

プロテオリポソーム固定化カラムによる透析操作を行うため、図 C-9(a)のような操作系を構築した。模擬血流としてローダミン B と各種共存物質を混合した溶液を用いた。ここで、プロテオリポソーム固定化カラムに直接模擬血流を流通させる方式を Single-flow 方式と呼び、図のように透析カラムにプロテオリポソームをつなぐ方式を Double-flow 方式と呼ぶ。

一般に血流には、除去対象とする老廃物(ここではモデル薬物と呼ぶ)だけでなく、多くの夾雑タンパク質や生理活性物質が存在している。MDR1 は疎水核として振舞うことを考慮すると、タンパク質などとの疎水性相互作用により、対象物質の除去効率が低減する可能性がある。そこで、各透析方式における模擬血流内共存タンパク質による除去効率の影響を検討した(図 C-9(b))。Single-flow 方式の場合、各種タンパク質を共存するとローダミン B の除去率が低下する。MDR1 を組み込んだリポソームの疎水性は大きいので、疎水性相互作用によりウシ血清タンパク質や β_2 -ミクログロブリンが結合し、輸送活性を低下させたと考えられる。一方、 $A\beta(1-40)$ は除去効率に対する顕著な低減効果を示しており、MDR1 の輸送基質になること (Lam *et al.*, 2001)との関連性が原因として考えられる。

Double-flow 方式の場合、模擬血流と除去系が直接接触していないので、第3成分が存在している場合でも除去効率の低下は Single-flow ほど顕著ではなかった。この結果はプロテオリポソーム固定化カラムが Double-flow 方式において効果的に機能を発現することを示している。

D. 考察

図 C-2(b)に示すように、非イオン性もしくは双性界面活性剤で可溶化した膜タンパク質は高い活性を保っている。従来のタンパク質の(リ)フォールディング研究では、タンパク質の構造安定化は次に挙げる種々の寄与のバランスで決まることが示唆されている (Creighton, 1984): (i)ペプチド鎖の折りたたみによるアミノ酸残基の充填過程で蓄積するエントロピー的不利や主鎖のねじれに起因する不安定化効果; (ii)静電相互作用/分子間力/疎水性相互作用/水素結合による安定化効果。これらの効果が複雑に積分された結果、高々10 kcal/mol というぎりぎりの安定性(marginal stability)を確保しているに過ぎない。しかし、一般には静電相互作用の安定化寄与は ~ 0 kcal/mol 程度に見積もられており、正味の寄与はないと考えられている。したがって、SDS や CTAB などの荷電性界面活性剤による可溶化は、膜タンパク質の立体構造形成過程における静電相互作用の項に大きな影響を与えることにより構造安定性の低下をもたらすのであろうと考えられる。逆に、CHAPS や $C_{12}E_8$, β -D-dodecylmaltoside などの非イオン性、双性界面活性剤の場合、静電相互作用の項に影響を与えないので、結果として活性が高く発現すると考えられる。

DOPC/DOPE 組成の場合、MDR1 の ATP 加水分解活性や除去量が高いことが本実験で示された(図 C-5)。従来、膜タンパク質の機能発現には、脂質膜中でのコンフォーメーションを維持するための境界脂質の存在が指摘されている。DOPE は単独ではヘキサゴナル相を構成し、脂質二分子膜を形成しないが、PC 系との混合により、マイクロドメインを形成する(図 C-4(c)の E/M 比を参照)。さらに、一部の膜タンパク質は、生体膜から分離精製したとき、PE を完全に除去することが不可能であり、膜タンパク質の境界脂質であると考えられている。それ故、本実験において MDR1 の

機能が強く発現したのも、DOPE が境界脂質として作用したからだと推察される。

一方、コレステロール含有リポソームの場合、除去量ならびに活性が非常に高いが、この理由として、コレステロールがMDR1の輸送基質になり得る可能性が指摘されている。図C-3に示す従来の輸送機構(vacuum cleaner 仮説)では、脂質膜中に存在するコレステロールの輸送は説明できない。他方、MDR1がATPを分解するとき生じるコンフォメーションの変化と周辺脂質の秩序の変化が密接に関連しているとする仮説(flippase 仮説)がある。詳細な検討が必要であるが、コレステロールの輸送の場合、この機構が有力であると推測される。

本研究においてリポソーム固定化手法として共有結合法を選択した理由は、用いた脂質組成(DOPC/DOPE)が共有結合に必須なエタノールアミン基を有するからである。しかし、全体的に対照系としての(MDR1を含まない)リポソームよりも固定化量が少なかった。MDR1が高高い部位(ATP結合部位や輸送部位)が外水相に向き、固定化部位となるDOPEがMDR1の周囲に存在するため、DOPEが有効にゲル担体と共有結合しにくい。Avidin-biotin法の場合、biotinのスペーサー長さを分子設計することで上記の問題点が克服できると考えられる。

β_2 -ミクログロブリンやA β はアミロイド性タンパク質として知られている。特に、透析分野においては、 β_2 -ミクログロブリンは透析アミロイドーシスの原因タンパク質として、分離対象として種々の分離カラムが開発されている。本研究においては、 β_2 -ミクログロブリンが共存する場合、Single-flowとDouble-flowのいずれの場合も目的物質の除去効率に影響を与えなかった(図C-9)。 β_2 -ミクログロブリンは分子内水素結合が不安定であり、脂質膜への吸着が強いことが分かっている(Fernandez *et al.*, 2003)。したがって、図C-9

の結果は、MDR1と β_2 -ミクログロブリンの相互作用がMDR1の輸送活性を妨げない様式に依ることが推定される。

MDR1に関する従来の輸送機構(vacuum cleaner 仮説)を図C-3に示す。前年度に検討した通り、MDR1を含むプロテオリポソームは24時間で凝集・沈殿、もしくは膜融合に至る。詳細な検討が必要であるが、 β_2 -ミクログロブリンは輸送部位周辺の嵩高いドメインに結合し、結果としてMDR1の輸送活性を妨げない形になっていると推測される。もしくは、MDR1の輸送活性が膜流動性には相関しない点を踏まえると、脂質膜に結合している可能性がある。

他方、A β は薬物除去効率の低減効果を示している。輸送機構はvacuum cleaner機構だけではなく、MDR1がATPを分解するとき生じるコンフォメーションの変化と周辺脂質の秩序の変化が密接に関連しているとする仮説(flippase 仮説)もある(Lam *et al.* 2001)。A β とローダミンBはいずれもMDR1の基質になり、それぞれの解離定数は $K_d = 12.5 \mu\text{M}$ (Lam *et al.*, 2001), $3.2 \mu\text{M}$ (Sharom *et al.*, 1996)である。MDR1に対するA β の結合部位は明確にされていないが、競争阻害効果の観点からは、A β が呈する除去効率の顕著な低下は説明できない。Lamら(2001)によれば、A β の輸送機構はvacuum cleaner機構よりもむしろflippase仮説に基づいて説明されるべきであるとしている。つまり、A β が示す薬物除去効率の低減効果は競争阻害によるものではなく、境界脂質であるDOPEが形成しているドメインにA β が結合することで、輸送活性発現過程におけるMDR1のコンフォメーション変化に必要な周辺脂質の秩序構造の変化を妨げることになると考えられる。

E. 結論

プロテオリポソーム調製は、膜タンパク質をミセルに可溶化する過程において、機能(例

えばATPase活性などをいかに高く維持するかが鍵である。誘電分散解析により、MDR1は β -dodecylmaltosideによる可溶化が適する事が示された。MDR1をモデル細胞膜(リポソーム)に組み込んだプロテオリポソームの配向性について検討した結果、ATP加水分解活性評価より、配向性が細胞膜における場合とは逆転することがわかった。したがって、MDR1の薬物排出能を利用して血液中の薬物をリポソーム内水相に除去が可能であることが示唆された。薬物排出能を速度論的に評価した結果、結合定数と排出量の最大値は脂質膜組成、特に膜流動性や脂質マイクロドメインの形成挙動の影響を受けており、適切な脂質組成の選択が重要であることが示唆された。MDR1を組み込んだモデル細胞膜(プロテオリポソーム)の多剤耐性について検討した結果、脂質に依存することが分かった。

さらに、共有結合法によるプロテオリポソームのゲル担体(Sephadex S-1000など)への固定化は効率は低いが、長時間安定であった。また、薬物除去効率は、ゲルの種類や充填量に依存する。ゲル担体への固定化は、MDR1を疎水核とする凝集機構を抑制でき、最低3回以上の連続透析操作が可能であった。プロテオリポソーム固定化カラムを透析カラムに接続する(Double-flowにする)ことで、模擬血流環境においても薬物除去効率が維持されることが見出された。

以上より、MDR1組込みリポソームを利用する新規な非細胞バイオ人工臓器(透析システム)の設計・開発の可能性を示せた。

【参考文献】

- Chifflet, S. et al., *Anal. Biochem.*, **168**, 1-4(1988)
Yoshimoto, M., R. Kuboi, Q. Yang and J. Miyake; *J.Chromatogr. B*, **712**, 59-71(1998)
Sharom, F.J., et al., *J. Biol. Chem.*, **270**, 10334-10341 (1995)
Shikata, T. and Imai, S., *Langmuir*, **14**, 6804-6810 (1998)
Liu and Sharom, F.J., *Biochemistry*, **35**, 11865-11873 (1996)
Fernandez, A. and Berry, R.S., *Proc. Natl. Acad. Soc. USA*, **100**, 2391-2396 (2003)

Lam F.C. et al., *J. Neurochem.*, **76**, 1121-1128 (2001)
Creighton, T.E., *Proteins. Structure and Molecular Properties*, W.H.Freeman and Company, New York (1984)

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

G-1.論文

1. T. Shimanouchi *et al.*, Proteoliposome as a functional material for the artificial organs, *Artificial organs*, to be submitted
2. 馬越 大, 森田誠一, 久保井亮一, リポソームの固定化(8章5節), リポソーム応用の新展開(エヌ・ティー・エス)
3. R. Kuboi *et al.*, Detection of protein conformation under stress conditions using liposomes as sensor materials, *Sensors and Materials*, **16(5)**, 241-254 (2004)
4. M. Sasaki *et al.*, Monitoring of Protein Dynamics on Membrane Under Stress Condition Using Dielectric Dispersion Analysis, *Proc. APCCHE 2004*
5. S. Morita *et al.*, Detection of Heat Stress Mediated Interaction between Protein and Phospholipid Membrane Using Dielectric Measurement, *J. Biosci. Bioeng.*, **95(3)**, 252-256 (2003)
6. M. F. Menayame *et al.*, Characterization and Control of Stimuli-Induced Membrane Fusion of Liposomes in the Presence of Proteins and Stimuli Responsive Polymers, *Biochem. Eng. J.*, **12**, 7-19 (2002)
7. M. F. Menayame *et al.*, Evaluation and Control of Interaction between Liposome Membranes Induced by the Stimuli Responsive Polymers and Proteins, *J. Biosci. Bioeng.*, **93(5)**, 498-501 (2002)
8. M. F. Menayame *et al.*, 刺激応答型リポソーム膜融合現象の評価, 化学工学論文集, **28(4)**, 481-484 (2002)

G-2.学会発表

1. 島内 寿徳, 馬越 大, 久保井 亮一, 分離機能を有するリポソームの調製と

- 膜分離システムへの応用, 分離技術会年会, 早稲田大学, 2006年6月
2. T.Shimanouchi, H. Umakoshi, R.Kuboi, Stress-Mediated Preparation of Liposome Incorporating Membrane Protein, 6th ESBES, Salzburg (2006.8.28)
 3. 島内 寿徳, 馬越 大, 久保井 亮一, 薬物排出タンパク質の多剤耐性に及ぼす不均一脂質膜構造の影響, 化学工学年会, 岡山大, 2005年9月
 4. M.Sasaki, T.Shimanouchi, R.Kuboi, S.Morita, Study on Stress Responsive Dynamics of Liposome Membranes and its Application, International conference on COEIEC IIV, Osaka (2005.12.20)
 5. T. Shimanouchi and R.Kuboi, Study on Stress Responsive Dynamics of Liposome Membranes and its Application ~Artificial organs using proteoliposomes~, Membrane 3rd Stress biotechnology Symposium 2005, Osaka (2005.11.3)
 6. 佐々木 勝司, 島内 寿徳, 久保井 亮一, プロテオリポソーム調製プロセスのモニタリングとストレス応答機能の評価, 化学工学年会, 大阪府大, 2004年4月
 7. M.Sasaki, T.Shimanouchi, R.Kuboi, S.Morita, Monitoring of protein dynamics on membrane under stress condition using dielectric dispersion analysis: The use of proteoliposome. COEIEC IV. Osaka (2004.8.30-31)
 8. T. Shimanouchi, M. Sasaki, B.-K. Lee, R. Kuboi, Nano-Artificial-Cell Membrane Based Sensor for Stress-Mediated Bioseparation, Bioseparation 2004, Fukuoka (2004.10.15-17)
 9. 佐々木 勝司, 李 奉局, 島内 寿徳, 森田 誠一, 久保井 亮一, リポソームによる新規なバイオセンサーの開発～水中ストレス成分のモニタリングへの応用～, 生物工学会, 名工大, 2004年9月
 10. 島内寿徳, 佐々木勝司, 馬越大, 久保井 亮一, 森田誠一, 誘電分散解析による α -キモトリプシンの自己分解過程のモニタリング, 化学工学会秋季大会, 神戸大学, 2002年9月
 11. 鄭浩燮, 島内寿徳, 森田誠一, 久保井 亮一, 導電性有機感応膜を利用したタンパク質の構造変化の測定, 化学工学会秋季大会, 神戸大学, 2002年9月
 12. 島内寿徳, 川崎英典, 布施誠, 馬越大, 久保井 亮一, ホスホリパーゼCによるストレス誘導型膜融合, 化学工学会秋季大会, 神戸大学, 2002年9月
 13. M. Sasaki, T. Shimanouchi, H. Umakoshi and R. Kuboi, Stress-Mediated Preparation of Proteoliposome and Its Characterization, COEIEC I, P039, Osaka, Feb.2003
 14. H.-S. Jung, S.-Y. Son, H. Umakoshi, T. Shimanouchi, and R. Kuboi, Application of Novel Stress Sensor Systems for Stress-Responsive Bioproduction Process, COEIEC I, P040, Osaka, Feb.2003
 15. H. Nagami, T. Kitaura, T. Shimanouchi, H. Umakoshi and R. Kuboi, Development of Oxidative Stress Responsive-Artificial SOD Using Liposome, COEIEC I, P041, Osaka, Feb.2003
 16. B.-K. Lee, H. Umakoshi, T. Shimanouchi and R. Kuboi, Interactions of Amyloid-b-Protein with Various Fatty Acids-Containing Phospholipid Membranes, COEIEC I, P042, Osaka, Feb.2003
 17. H. Umakoshi, Y. Nakashima, B.-K. Lee and R. Kuboi, Characterization of Cross-Linking Reaction of Protein on Liposome Membrane Using Transglutaminase under Stress Condition, COEIEC I, P043, Osaka, Feb.2003
- 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代謝機能代替デバイスの開発研究
薬物代謝機能発現環境の最適化

分担研究者 大政健史 大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻 助教授

研究要旨：本研究では、ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究を目指し、薬物代謝の機能発現にかかる環境について簡便に検討できるシステムを構築した。具体的には薬物代謝機能環境を評価できる評価細胞株の構築ならびに、生体血管内反応系を模倣することの可能なマイクロリアクタによる評価系を構築した。これにより、非細胞性代謝機能代替デバイス開発に必要な薬物代謝機能発現環境の最適化をはかることが可能となった。

A. 研究目的

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

劇症肝炎等の末期肝不全の根治療法として肝移植が一般的に行われているが、ドナー不足など様々な問題点が残されている。そこで、脳死肝移植以外の治療法として、またドナー肝が移植されるまでの緊急対応（bridge-use）として、肝不全に陥った生体の肝機能を補助できる肝機能補助装置の開発が重要な課題である。現在では、肝機能補助装置として、バイオリアクター（物

理的材料）に動物細胞（生物的材料）を充填した血液浄化システム（バイオ人工肝）（下記図）が多数開発されてきている。しかし、これらバイオ人工肝は細胞をデバイスの一つとして利用するために、利便性、保存性の面等、様々な制約を受けている。

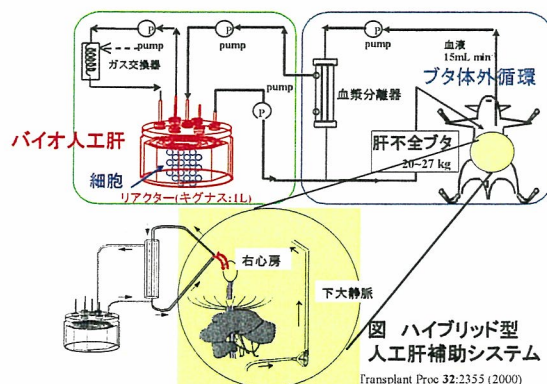


図 ハイブリッド型バイオ人工肝補助システム

そこで、本研究では細胞を用いないナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究を究極の目的として、肝臓による薬物代謝を生体外においてシミュレートでき、かつ非細胞性代謝機能代替デバイス開発に必要な薬物代謝機能発現環境の最適化に応用可能な知見を得ることのできる評価系構築を行った。

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

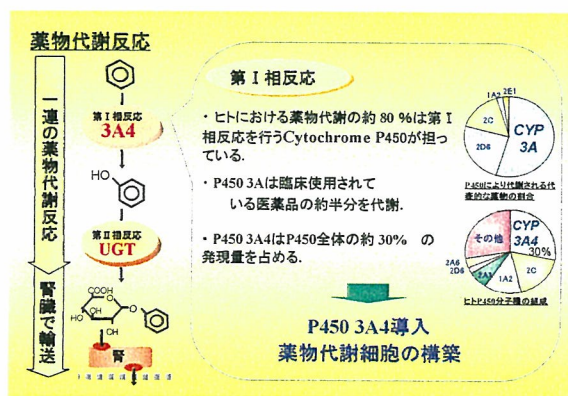


図 P450 分子種と発現様式

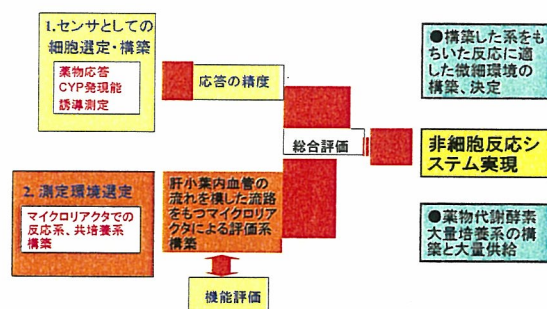
そこで、広範囲の薬物を代謝させるために、この P450 3A4 の遺伝子 (CYP3A4) を HepG2 細胞に導入し、薬物代謝機能発現環境を評価可能な薬物代謝動物細胞の構築を試みた。

次に、薬物代謝環境に密接に関連する薬物代謝反応場についてもマイクロチャンネルを用いた反応システムを構築した。生体内における薬物代謝反応場として、最もよく知られているのが、肝臓である。肝臓は、約 50 万の肝小葉から構築され、一つの肝小葉には 50 万個の肝細胞が放射状に規則正しく配置され、効率よく血液と接することにより、薬物代謝機能を発揮できる。生体内に吸収された薬物は、肝動脈を通して毛細血管を通じて肝細胞に供給され代謝される。内径 10 μm 程度の毛

細血管だと、血流量は 10⁻⁷ml/min 程度となり、まさにマイクロチャンネルと同様に、層流条件下での連続代謝反応が実現されている。

ヒト生体内薬物代謝の機能発現にかかる環境を解明する事柄は、医薬品の開発においては、避けては通れない必須の検討項目であり、現在様々な手段によって *in vitro* の実験からヒトにおける *in vivo* での代謝を予測する手法が開発されている。しかし、これらの評価系はできるだけ多数のサンプルの評価を同時にこなすために、回分反応を用いて行われており、生体内での連続代謝環境を完全に模しているとは言えない。そこで、本研究ではマイクロリアクターを用いて血管中の流れを模倣した評価システムを構築し、これを用いた薬物代謝環境整備を行うことを目標とした(下記図)。

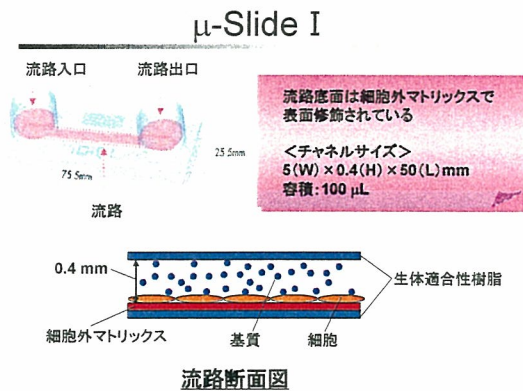
Cell-based screening system開発による微細環境迅速評価系



B.研究方法

実験材料としてグルタミン合成酵素遺伝子と薬物代謝酵素遺伝子ヒト CYP3A4 遺伝子を含むベクターを構築し、これを用いて、肝由来の HepG2 細胞株を形質転換して構築した GS-3A4-HepG2 細胞を用いた。本細胞株は、ヒト初代肝細胞と比較して遜色ない P450 3A4 活性を持つ。

先ほども述べたが、センサとしての細胞をもちいて測定系を構築するためには、細胞の測定環境の整備が欠かせない。そこで、連続代謝反応を実現する環境場として深さ 400 μm 、幅 4000 μm 、流路長 50mm のマイクロチャンネル型マイクロリアクター(容積 100 μL , μ -SlideI)を用いた(下記図)。



(倫理面への配慮)

ここで用いた研究手法は、すでに既知(公表済)の細胞株および遺伝子を用いており、また、ヒト初代肝細胞は、HAB 研究機構を通じて所定の倫理審査の元に入手したものである。

C.研究結果

薬物代謝能向上細胞の構築を目指して、グルタミン合成酵素遺伝子と薬物代謝酵素遺伝子ヒト CYP3A4 遺伝子を含むベクターを構築し、これを用いて、肝由来の HepG2 細胞株を形質転換し、細胞株を構築した。構築した細胞株の testosterone 6 β -hydroxylation 活性を下記に示す。

表 testosterone 6 β -hydroxylation 活性の比較

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

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

上記の様に、構築した細胞はヒト初代肝細胞と遜色ない活性を示し、評価細胞として十分に利用可能であった。

マイクロリアクターの操作因子として、もっとも重要なパラメータにリアクターへの薬物を導入する流速がある。そこで、実際に血管内の流れに近い流速値として、0.04cm/sec を目安として、流速の設定を行った。この流速で溶液を流すと、層流が実現可能である。

以上より、構築した細胞とマイクロリアクターを組み合わせ、薬物代謝反応を行った。連続反応系細胞培養容器 μ -Slide I (ibidi) に細胞を播種して接着させ、代謝反応の場とする。基質は P450 3A4 によって特異的に代謝されて蛍光物質 resorufin となる Vivid CYP3A4 Red Substrate を用いた。上記のマイクロリアクターおよび細胞を用いて、基質濃度 1 μM 、流入速度 3mL/h にて連続培養を行い、同じ基質濃度の回分反応と比較した結果を下記に示す。

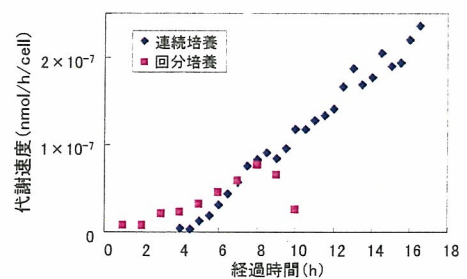


図 細胞あたりの代謝速度の経時変化

連続反応系においては、代謝活性が時間と共に上昇していくが、回分培養では 8 時間まで経過した後に活性が低下し、連続反応系での活性上昇がみられた。同様の実験を初代肝細胞を用いた系においても行った。実験条件として基質

濃度 25 mM, 300 mL/h の流速にて反応を行い、その代謝速度の経時変化を測定した。またその結果を回分培養と比較し、さらに、反応前後で細胞の接着を観察・比較した。その結果、肝細胞株とは異なり、ヒト初代肝細胞は、連続・回分どちらの反応系においても活性を維持していた。また、反応前後において、細胞の剥離などの接着面からの解離は見あたらず、安定に細胞が接着し、代謝反応を行うことが可能であった。

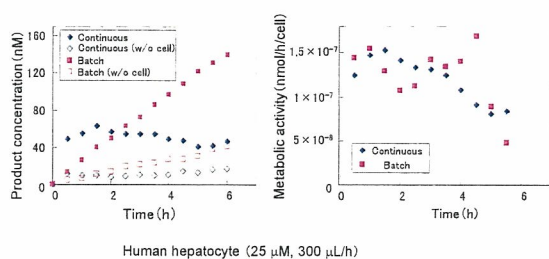


図 初代肝細胞による回分・連続反応

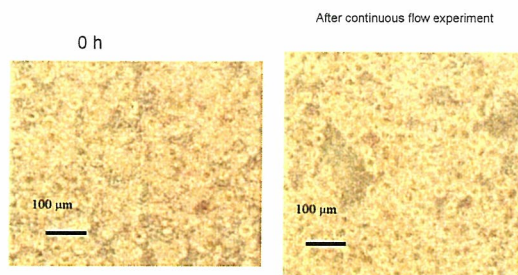


図 反応前後における細胞の形態変化

D. 考察および E. 結論

以上をまとめると、薬物代謝の機能発現にかかる環境について、生体内薬物代謝環境を忠実に再現する手段の候補の一つとして、薬物代謝細胞を構築し、さらにこれをマイクロリアクタによる代謝活性測定システムと組み

合わせた反応系を構築できた。実際の非細胞性代謝機能代替デバイスにおいては、連続反応系を用いることになり、本研究で得られたシステムが薬物代謝環境整備に十分なる貢献をなすことが期待できる。

F. 健康危険情報

該当する情報は無い。

G. 研究発表 (抜粋)

1. 論文発表

1) **Takeshi Omasa**, Michimasa Kishimoto, Masaya Kawase, Kiyohito Yagi "An attempt at decision making in tissue engineering: reactor evaluation using the analytic hierarchy process (AHP)" *Biochemical Eng. J.*, Vol. **20**, pp.173-179 (2004)

2) **Takeshi Omasa**, Mitsugu Yamanaka, Naoko Tanimura, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Ken-ichi Suga, and Shin Enosawa "Expression and amplification of glutamine synthetase gene endows HepG2 cells with ammonia-metabolizing activity for bioartificial liver support system" *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. **35**, pp.519-524 (2004)

3) **Takeshi Omasa**, Kazumi Kim, Shinya Hiramatsu, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Shin Enosawa and Hisao Ohtake "Construction and evaluation of drug-metabolizing cell line for bioartificial liver support system" *Biotechnology Progress*, Vol. **21**, pp.161-167 (2005)

4)大政健史 “バイオ人工肝臓の評価は如何にあるべきか?” 医工学治療 vol.17, No.4 pp.195-201 (2005)

2.著書

1)大政健史 「マイクロリアクタを用いた薬物代謝系の構築」 「マイクロリアクタテクノロジー -限りない可能性と課題-」 343-353 頁 エヌ・ティー・エス (2005)

3.学会発表

(国際学会)

1) Takeshi Omasa and Shin Enosawa “Artificial mimicking of human drug metabolism for a bio-hemofiltration system” In, Engineering Conference International: Biochemical Engineering XIII (2003), Session Tissue engineering, No.II-4-1, Boulder, Colorado, USA

2) Takeshi Omasa, Kazumi Kim, Yoshio Katakura, Michimasa Kishimoto, Mutsumi Takagi, Toshiomi Yoshida, and Shin Enosawa “ Engineering design for bioartificial liver support system” In the Engineering Tissue Growth 2003 (ETG2003), Pittsburgh, USA

3)Takeshi Omasa, “Tissue engineering and it’s application in Japan” In; Engineering Conference International: Cell Culture Engineering VIII, Workshop II D. Non-pharmaceutical applications of animal cell culture, March 7-12, Cancun, Mexico (2004)

4)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” In; 11th Young Asian Biochemical Engineers’ Community (YABEC) 2005, Beijing China, PP-33, Oct. 24-26, Abstract p.71 (2005)

(国内学会) (省略)

4.その他

受賞:

1)日本生物工学会 第 27 回 照井賞 平成 16 年度

2)11th Symposium of Young Asia Biochemical Engineering Community 2005, Beijing China Most excellent poster presentation award

新聞記事:

日経産業新聞 平成 18 年 11 月 16 日 薬品代謝生体に近く アテクトと阪大 評価装置開発へ

H.知的財産権の出願・登録状況 (抜粋)

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” 特願 2004-046675 号 特開 2005-229967

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。本研究によって、昆虫細胞を用いてヒトMDR1を活性を保ったまま定量に精製する条件が確立できた。さらに、20%程度コレステロールを含むリポソームに再構成することによってMDR1が高い活性を示すことが明らかになった。MDR1と高い相同性をもつMDR2は細胞膜中のPCを特異的に細胞外へ排出すること、PC輸送には胆汁酸が必要であることが明らかになった。さらにヒトABCA1の精製条件を確立し、ATP加水分解活性を測定することによってABCA1の輸送基質の同定を試みた。

A. 研究目的

A-1. 背景

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。

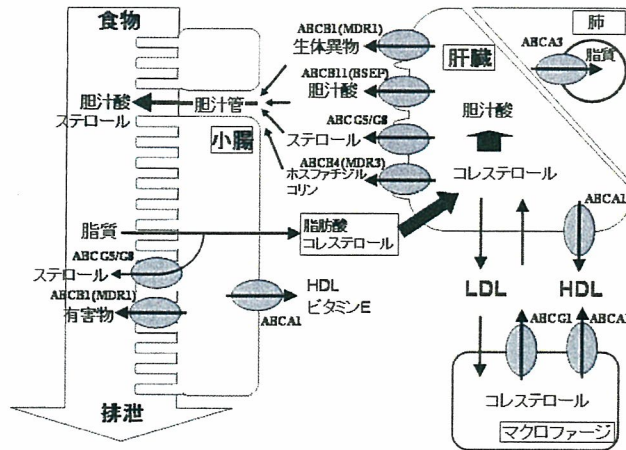


図1 生体内では49のABC蛋白質が健康維持にとって重要な役割を果たしている

本研究では、薬剤輸送トランスポーターMDR1の精製方法及び活性測定法をまず確立した。次に、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行なった。また、MDR1と高い相同性をもつMDR2との機能の比較を行なった。さらに、HDL形成に重要な役割を果たすABCA1についても、MDR1と同様に精製して機能解析した。

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。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、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。酸化チタンカラムをHPLCにつなぎアデニンヌクレオチドを分離能を検討することによって、ATP加水分解のマイクロアッセイ系を確立した。

B-3. 精製MDR1再構成系の最適化

ヒトMDR1を昆虫細胞Sf9細胞を用いて大量発現し精製した。精製MDR1をコレステロール(0~40%)を含む人工リポソーム(PC:PE:PS=4:4:2)に再構成し、さまざまな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、精製MDR1再構成系の最適化条件を検討した。

B-4. MDR1とMDR2の機能の比較

ヒトMDR2は、肝細胞の毛細胆管膜に発現しており、ホスファチジルコリン(PC)の胆汁中への排出に関わっていると考えられている。しかし、MDR2によるPC排出の関係について、細胞レベルでの研究は行われておらず、その機能に関しては不明な点が多く残されている。そこで、MDR2を安定発現するHEK293(HEK/MDR2)細胞を用い、胆汁酸存在下でのリン脂質排出について調べた。また、Mdr2ノックアウトマウスの胆汁中にはわずかなコレステロールしか含まれていないことが報告されていることから、HEK/MDR2細胞によるコレステロール排出についても検討を行った。

B-5. ヒトABCA1の精製

ヒトABCA1のC末端にヒスチジンタグを融合した蛋白質を昆虫細胞で大量発現し、精製した。精製ABCA1をさまざまな脂質で形成させた人工

リポソームに再構成し、ATP 加水分解を測定することによって ABCA1 の輸送脂質を明らかにすることを試みた。

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 末端にヒスチジンタグを融合した蛋白質を 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。

酸化チタンカラムを HPLC につなぎアデニンス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。本検出系は、ADP に対して 5 pmol から 10 nmol 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。

C-1. 精製 MDR1 再構成系の最適化の検討

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 (PC:PE:PS=4:4:2) 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 (図 2)。

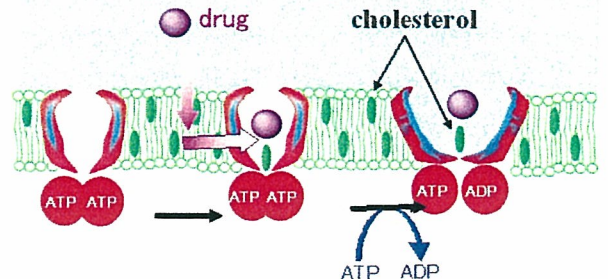


図 2. MDR1 による輸送のコレステロールによる調節

C-3. MDR1 と MDR2 の機能の比較

胆汁中でリン脂質やコレステロールは、胆汁酸と混合ミセルを形成している。そこで、胆汁酸による HEK/MDR2 細胞からのリン脂質とコレステロールの排出に対する影響について調べた。培地中に 0.02% BSA のみの条件では、HEK と HEK/MDR1、HEK/MDR2 細胞でリン脂質とコレステロール排出に差は見られなかった。しかし、0.5mM タウロコール酸存在下では、HEK/MDR2 細胞でリン脂質とコレステロール排出が大きく増加したのに対し、HEK と HEK/MDR1 細胞では変化が見られなかった。このとき、タウロコール酸存在下で MDR2 依存的に排出されたコレステロール/リン脂質のモル比は 1.1 であった。また、HEK/MDR2 細胞のリン脂質とコレステロールの排出に対する促進作用は、タウロコール酸>グリココール酸>コール酸の順となった。質量分析の結果、0.5mM タウロコール酸存在下で HEK/MDR2 細胞から排出されたリン脂質は、主に 16:0-18:1 PC であることが示された。これらのことから、胆汁酸、特にタウロコール酸は、MDR2 による細胞からの PC 排出のアクセプターとして働くことが明らかとなった。

タウロコール酸により促進される HEK/MDR2 細胞からのコレステロール排出は、MDR2 による能動的なものか、MDR2 により排出されたリン脂

質とタウロコール酸との集合体への拡散によるものかを確かめるために、PC リポソームを用いた実験を行った。その結果、HEK 細胞からのコレステロール排出は、PC リポソーム濃度依存的(50-200 μ M)に増加した。しかし、HEK/MDR2 細胞が排出する PC とほぼ同量の低濃度(2.5 μ M)PC と 0.5mM タウロコール酸の存在下では、HEK 細胞からのコレステロール排出量の増加は見られなかった。このことから、タウロコール酸存在下で、MDR2 は能動的にコレステロールの排出を行っていることが示唆される。

以上のことから、肝臓において MDR2 は胆管中へ PC とコレステロールを排出することで、胆汁形成における重要な役割を果たし、胆汁酸の毒性による肝障害を防いでいると考えられる。

C-4. 精製 ABCA1 を用いた輸送基質の検索

精製 ABCA1 は、界面活性剤による可溶化状態でも ATP 加水分解活性を示し、さらに大豆脂質の添加によって約 2 倍に増加した。脂質排出活性が損なわれる ATP 結合ドメイン変異体(K939M)では ATP 加水分解活性を示さず、また脂質による誘導も見られなかった。

次に、精製 ABCA1 を合成脂質だけで構築したリポソームに再構成した。その結果、ABCA1 はホスファチジルコリンを多く含んだリポソームに再構成すると最も強く ATP 加水分解活性が誘導されることが明らかになった。ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルグリセロールを含むリポソームで再構成すると、それらの含量が増えるにしたがって活性が減少した。また、脂肪酸鎖ではオレイン酸とパルミチン酸をもつホスファチジルコリンを含むリポソームに再構成したときに最も高い活性を示した。これは、ABCA1 によって細胞外へ排出される脂質を質量分析によって分析した時に、一番高濃度に検出される脂質であった。以上の結果は、ABCA1 がオレイン酸とパルミチン酸をもつホスファチジルコリンを最適な基質として認識し輸送していることを示唆し

ている。さらに、HDL 形成を阻害することが知られているグリベンクラミドによって ABCA1 の ATP 加水分解活性が一部阻害を受けることが明らかになった。しかし、コレステロールを含むリポソームに再構成すると ABCA1 の ATP 活性は抑制された。

D. 考察および E. 結論

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。MDR2 は薬剤は輸送しないが細胞膜中の PC を特異的に細胞外へ排出すること、そして PC 輸送には胆汁酸が必要であることが明らかになった。さらに精製 ABCA1 を用いた研究から ABCA1 は PC を輸送基質として最も好むこと、ABCA1 はコレステロールも基質として直接認識していることが示唆された。

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, AR.,

- 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)
- 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. KATP channel interaction with adenine nucleotides. **J. Mol. Cell. Cardiol.** 38, 907-916(2005)