

- Takahashi, K., Kimura, Y., Kioka, N., Matsuo, M. and Ueda, K. Purification and ATPase Activity of Human ABCA1. **J Biol Chem**, 281, 10760-10768 (2006)
- Matsumura Y, Ban N, Ueda K, Inagaki N. Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency. **J Biol Chem**. 281, 34503-34514 (2006)
- Nagao, S., Murao, K., Imachi, H., Cao, W. M., Yu, X., Li, J., Matsumoto, K., Nishiuchi, T., Ahmed, R. A., Wong, N. C., Ueda, K., Ishida, T. Platelet derived growth factor regulates ABCA1 expression in vascular smooth muscle cells. **FEBS Lett**, 580, 4371-4376 (2006)
- Mutoh K, Mitsunashi J, Kimura Y, Tsukahara S, Ishikawa E, Sai K, Ozawa S, Sawada J, Ueda K, Katayama K, Sugimoto Y. A T3587G germ-line mutation of the MDR1 gene encodes a nonfunctional P-glycoprotein. **Mol Cancer Ther**. 5, 877-84 (2006)
- Yazaki, K, Yamanaka, N., Masuno, T., Konagai, S., Shitan, N., Kaneko, S., Ueda K. and Sato, F. Heterologous Expression of a Mammalian ABC Transporter in Plant and its Application to Phytoremediation. **Plant Molecular Biology**, 61, 491-503 (2006)
- Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Hirata, T., Shimizu, Y., Misasa, K., Kioka, N., Arai, H., Ueda, K., and Matsuo, M. Efflux of sphingomyelin, cholesterol and phosphatidylcholine by ABCG1. **J Lipid Res**. 47, 1791-1802 (2006)
- Abe-Dohmae, S., Kato, K.H., Kumon, Y., Hu, W., Ishigami, H., Iwamoto, N., Okazaki, M., Wu, C.A., Tsujita, M., Ueda, K. and Yokoyama, S. Serum amyloid A generates high density lipoprotein with cellular lipid in an ABCA1- or ABCA7-dependent manner. **J Lipid Res**. 47, 1542-1550 (2006)
- Abe-Dohmae, S., Ueda, K. and Yokoyama, S. ABCA7, a molecule with unknown function, **FEBS Lett.**, 580, 1178-1182 (2006)
- Kimura, Y., Kioka, N., Kato, H., Matsuo, M., Ueda, K. Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol. **Biochem J**. 401, 597-605 (2007)
- Morita, S.-y. Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Kioka, N., Handa, T., Arai, H., Matsuo, M., Ueda, K. Bile Salt-Dependent Efflux of Cellular Phospholipids Mediated by ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). **Hepatology**, in press (2007)
- 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)
- 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 をクローニングし、その機能解析を行った。またこの蛋白を大量に取得するために、マウス肝臓において高発現させる条件検討した。慢性腎不全モデル・急性胆管欠紮処置を行うと、mRNA・蛋白発現が上昇することが判明した。更にバキュロウィルスを用いることで、蛋白の大量生成が可能となった。これらの知見により、非細胞性代謝機能代替デバイスへの大量の蛋白導入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。

そこで、本研究では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、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて、その機能解析を行った。またこの蛋白をデバイスに使用す

るには大量の精製蛋白が必要である。このために、第1には生理的に高発現しているマウス肝臓において、この発現をさらに高める条件を求め、ここからの蛋白抽出を試みた。第2にはさらに、バキュロウィルスを用いた蛋白安定発現系の確立を目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. ABCA8 mRNA のクローニング

ATP 結合ドメインを持った膜蛋白に共通する塩基配列を手がかりに、今までに報告のない遺伝子の部分塩基配列を見つけ、さらにそのヒト・マウスのライブラリーから完全長 cDNA をクローニングした。この遺伝子の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、48 時間後にラジオアイソトープをラベルした、基質となりうる様々な物質の輸送能を評価した。更に輸送基質に対する K_m , V_{max} など基本的パラメータを求め

た。また、ヒトにおける mRNA の臓器分布について、ノーザンブロット法を用いて検討した。

2. 各種病態モデルにおける ABCA8 の臓器発現変化

さらに、病態生理学的意義を明らかにするために、マウス遺伝子をクローニングし直した。その上で C57BL/6 マウスを用いて、急性胆管欠紮モデル、5/6 腎臓摘出慢性腎不全モデルおよびいくつかの肝臓代謝機能を亢進または抑制させる薬物（バルビタール、フェニトイン、リファンピシン、カルバマゼピン、ジゴキシンなど）を投与したモデルを作成し、ABCA8 mRNA・蛋白発現量の変化をリアルタイムPCR、ウェスタンブロットでそれぞれ検討した。

3. ヒト ABCA8 を組み入れたバキュロウィルスの作成および昆虫細胞への導入

また、ヒト ABCA8 を組み入れたバキュロウィルストランスファクター（Sapphire™ Baculovirus）を作成し、昆虫培養細胞 sf9 に感染させることで蛋白を発現させた。

C. 研究結果

1. ABCA8 mRNA のクローニング

ATP 結合カセットをもった新規膜蛋白 ABCA8 をクローニングし、その塩基数はヒト・マウスとも約 6000bp であった。2 組の ATP 結合部位があり、ヒトとマウスを比較してみると、アミノ酸レベルでの相同性は約 97% であった。基質としては、estradiol-glucuronide をはじめとするグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体およびジゴキシンが判明した（図 1、表 1）。

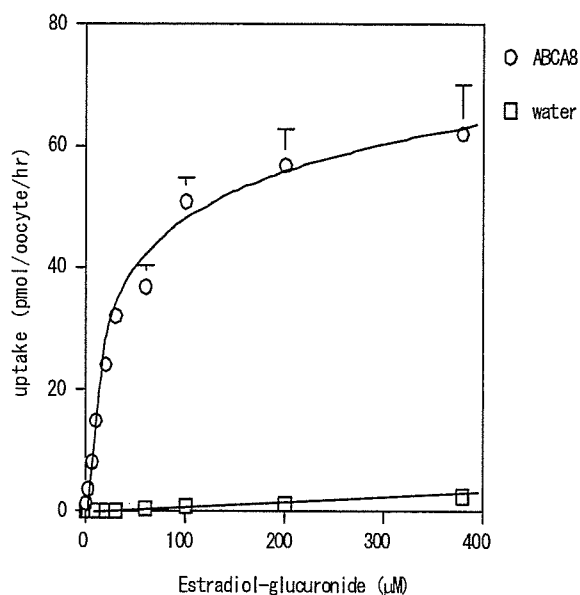


図 1. Oocyte における Estradiol-glucuronide 輸送能

また、各種薬物による輸送阻害効果を検討したが、それは既報の有機アニオン輸送体、殊に胆管に存在する抱合型ビリルビン輸送体 ABCC2 に対する阻害効果と近似していた（図 2）。

表 1 各種基質に対する Km, Vmax 値

Substrates	Km	Vmax
LTC4	0.1 μM	61 fmol/egg/h
Taurocholate	10.3 μM	11.0 fmol/egg/h
PAH	5.0 μM	79 fmol/egg/h
Estrone sulfate	0.5 μM	1.7 pmol/egg/h
Ochratoxin A	0.4 μM	2.1 pmol/egg/h

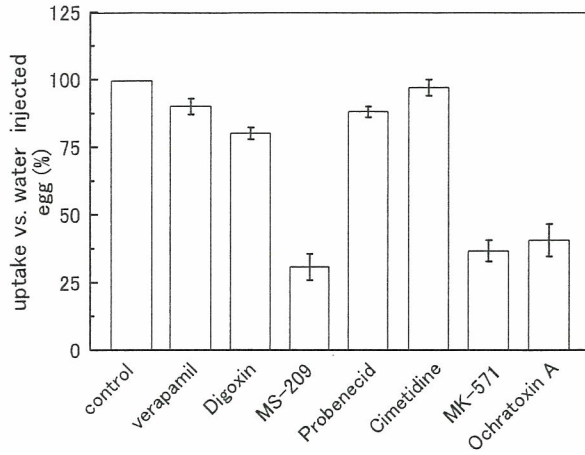


図 2. Estradiol-glucuronide 輸送阻害に対する各種薬物の効果

また、グルクロン酸抱合体の一つである、抱合型ビリルビンを添加すると estradiol-glucuronide の取り込み能は用量依存的に抑制されることから、抱合型ビリルビンもその基質であることが示唆された (図 3)。次にヒトおよびマウス各種臓器における mRNA 分布をノーザンブロットにより検討した。それによると、この遺伝子は広い臓器分布を示したが、特に肝、腎、心、性腺に豊富であった (図 4、5)。マウス肝臓においては、肝内胆管細胞管腔膜周囲に最も強い染色があり (図 6)、一部肝静脈周囲の肝実質細胞にも弱い染色が見られた。心においても弱い染色も見られた。

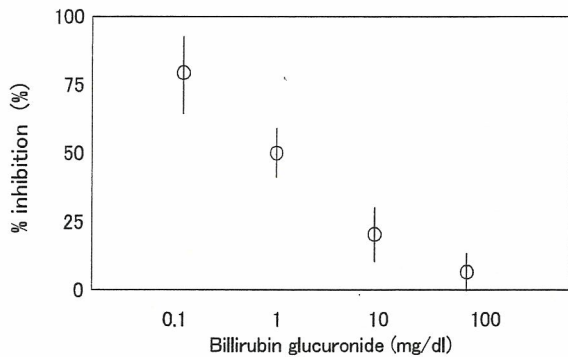


図 3. Estradiol-glucuronide 輸送に対する抱合型ビリルビンの影響

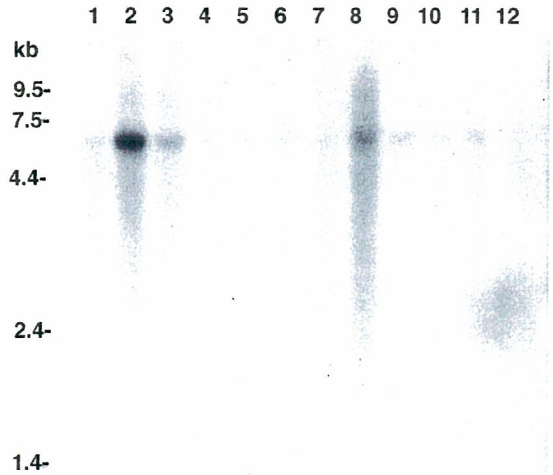


図 4. ヒト臓器での mRNA 発現分布

1, brain; 2, heart; 3, skeletal muscle; 4, colon; 5, thymus; 6, spleen; 7, kidney; 8, liver; 9, small intestine; 10, placenta; 11, lung; 12, peripheral blood leukocytes.

ノーザンブロット法によるマウスにおける組織分布

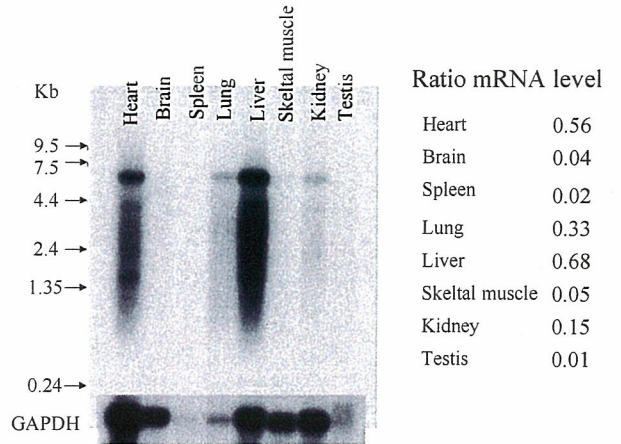


図 5 マウスにおける臓器分布

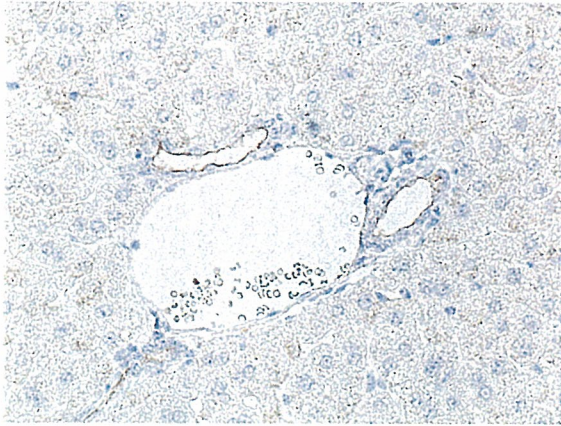


図6 マウス肝における ABCA 8 蛋白の局在

2. 各種病態モデルにおける ABCA 8 の臓器発現変化

マウスモデル肝臓における ABCA 8 発現量を亢進させる条件としては、急性胆管欠紮、慢性腎不全およびバルビタール投与などを検討した。急性胆管欠紮、慢性腎不全およびバルビタール投与はそれぞれ ABCA 8 mRNA および蛋白発現を有意に増加させた。これらの併用では、慢性腎不全モデルに急性胆管欠紮を行うと発現が 20 倍以上と最も上昇した (図 7、8、9)。一方、ジゴキシン投与や高コレステロール食付加を行うと、肝臓および精巢で発現が有意に減少することも判明した (図 10)。

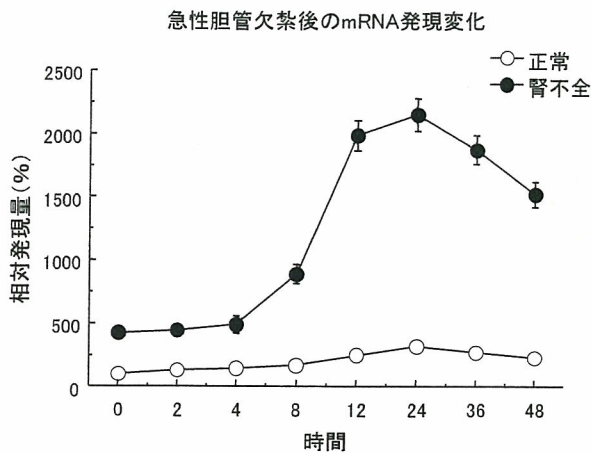


図7 腎不全モデルにおける急性胆管欠紮時肝臓における ABCA8mRNA の発現の変化

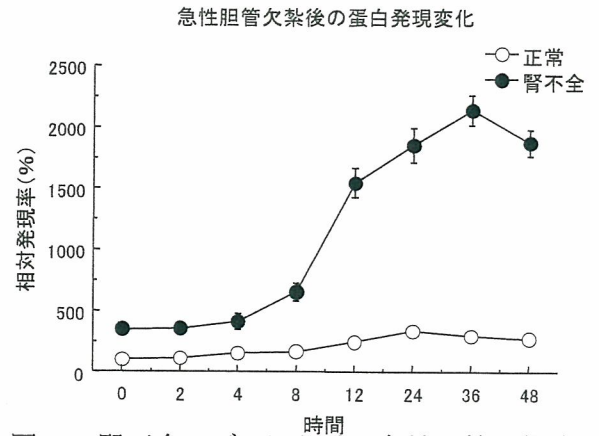


図8 腎不全モデルにおける急性胆管欠紮時肝臓における ABCA8 蛋白の発現の変化

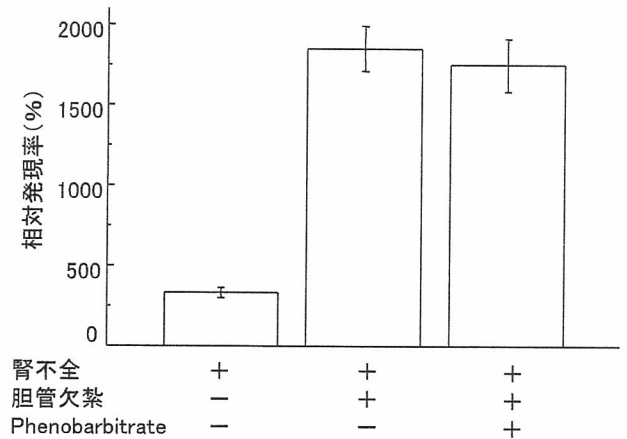


図9 Phenobarbital 反復投与後腎不全モデルにおける急性胆管欠紮時後 24 時間での ABCA8 蛋白発現量 (正常マウスでの発現を 100% とした)

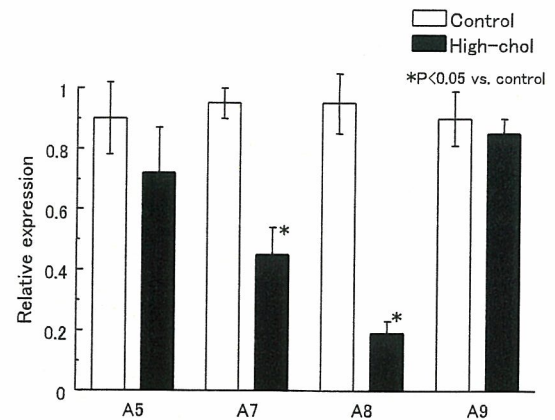


図10 高コレステロール負荷モデル精巣における ABCA 遺伝子群発現の変化

3. ヒト ABCA8 を組み入れたバキュロウイルスと昆虫培養細胞 sf9 を用いた蛋白質の大量作成

Sapphire™ Baculovirus に遺伝子を接続したウイルスを感染させることで、組み換え蛋白の精製が可能であった。SDS-PAGE および以前作成しておいた抗体を用いて、その発現を確認した。獲得できた蛋白量は最高 200mg/L であった (図 11)。

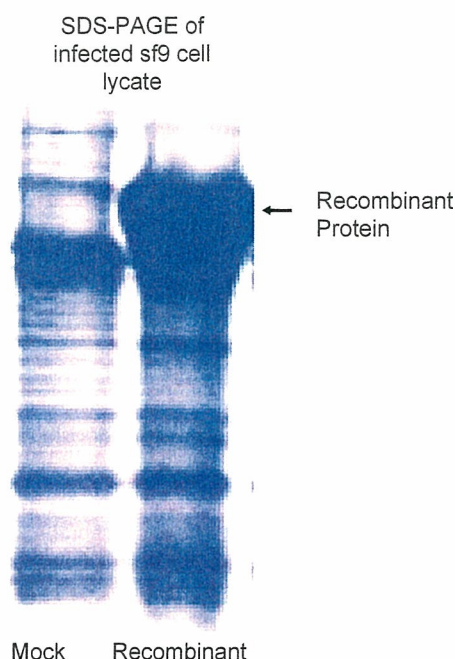


図 5 SDS-PAGE による組み換え蛋白

D. 考察

我々は抱合型ビリルビンを輸送する新しい蛋白 ABCA8 をクローニングし、その発現が亢進するような病態生理学的な変化を明らかにした。この蛋白の病態生理学的意義を検討するという事は基礎研究的なものである。しかし肝不全治療を念頭に置き、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作成にこの新規蛋白 ABCA8 を用いるには、蛋白を大量に得ることが必要である。そのための一つの手段として、

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と考え様々な方法を模索した。このため、本研究の成果は、デバイス開発という本来の目的以外に、基礎的研究という面からも有益であったと考えられる。

その結果、慢性腎不全としておくことがチトクローム P450 の誘導薬を前処置することよりも有意な発現増加を起こすことが明らかになった。腎機能障害時に代償性に肝・消化管機能が変化するということが、近年明らかになってきており、今回の結果もそのような考え方に沿うものと考えられる。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。他の膜蛋白においては遺伝子上流域にある pregnane X receptor の発現が腎不全において変化するという報告もあり、同様の機序が推定されるが、これについては今後の検討が必要であると考えられる。また腎不全で増加する様々な尿毒症性物質のうち、どれがこの誘導に関与するののかも不明であり、今後検討の余地がある。

一方様々なベクターを用いた結果、昆虫細胞を用いて、ヒト ABCA8 蛋白の精製が可能となった。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への応用はできなかったが、今後はこれを用いて様々な検討が可能となると考えられる。

E. 結論

抱合型ビリルビンをはじめとする異物排泄に関与する新しい膜蛋白 ABCA8 をクローニングし、その機能を検討した。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。慢性腎不全状態において更に胆管欠繋すると、発現が上昇することが明らかになった。また、この蛋白を高発現させた細胞を大量作成できる系を確立した。今後は非細胞系代謝機能付与デバイスに応用する予定であり、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) Tsuruoka S, Ishibashi K, Yamamoto H, Wakaumi M, Suzuki M, Schwartz GJ, Imai M, Fujimura A. Functional analysis of ABCA8, a new drug transporter *Biochem Biophys Res Comm* 298, 41-45, 2002.
- (2) Tsuruoka, S., Schwartz GJ, Wakaumi, M., Nishiki, K., Yamamoto H, Purkerson JM, Fujimura, A. Nitric oxide production modulates cyclosporine A-induced distal renal tubular acidosis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 305: 840-845, 2003.
- (3) 鶴岡秀一。ハイブリッド型人工腎臓の試み。腎と透析 54: 653-656, 2003
- (4) 鶴岡秀一、若海美智、山本尚史、安藤仁。ハイブリッド型人工腎臓。日内会誌 92: 2433-2438, 2003.
- (5) Tsuruoka S, Nishiki K, Wakaumi M, Wang N, Yamamoto H, Ando H, Imai M, Fujimura A. Treatment of digoxin intoxication model by hybrid kidney with hollowfiber module for clinical hemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 19(5):1339-40, 2004.
- (6) Tsuruoka S, Nishiki K, Wakaumi M, Yamamoto H, Ando H, Wang N, Fujimura A. Chronopharmacology of oxacalcitriol in 5/6 nephrectomized rats. *Life Sci.* 75: 809-822, 2004.
- (7) Tsuruoka S, Wakaumi M, Yamamoto H, Ando H, Saito A, Fujimura A. β 2-microglobulin adsorption column reduces digoxin trough level during hemodialysis: 3 case reports. *Ther. Drug Monit.* 26: 450-452, 2004.
- (8) Tsuruoka S, Yamamoto H, Wakaumi M, Ando H, Saito T, Fujimura A. Adsorption of oxacalcitriol by polysulfone hemodialyzer in patients with secondary hyperparathyroidism. *Br J Clin Pharmacol.* 58:488-95, 2004.
- (9) 鶴岡秀一。薬物中毒とハイブリッド型人工臓器。臨床医薬 20(9):919-924, 2004。
- (10) 鶴岡秀一、井岡 崇、山本 尚史。細胞生物学講座：ハイブリッド型人工腎臓。細胞 36: 557-560, 2004。
- (11) 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.

- (12) 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 H epG2 cells: Treatment of hepatic failure dog with diazepam overdose. *Artif Org.* 29:681-4, 2005.
- (13) 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.
- (14) 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.
- (15) Yamamoto H, Tsuruoka S, Ioka T, Ando H, Ito C, Akimoto T, Fujimura A, Asano Y, Kusano E. Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 69:1780-1785, 2006.
- (16) Tsuruoka S, Watanabe S, Purkerson JM, Fujimura A, Schwartz GJ. Endothelin and Nitric Oxide Mediate the Adaptation of the Cortical Collecting Duct to Metabolic Acidosis. *Am J Physiol Renal Physiology.* 291:F866-73, 2006.
- (17) Takahashi M, Sakurai M, Enosawa S, Endo M, Omasa T, Tsuruoka S, Matsumura T. A double-compartment cell culture apparatus: its construction and biochemical evaluation for bioartificial liver support system. *Cell Transplantation, Vol. 15,* pp. 945- 952, 2006.
- (18) Taniguchi J, Tsuruoka S, Mizuno A, Sato JI, Fujimura A, Suzuki M. TRPV4 as a flow sensor in the flow-dependent K⁺ secretion from the cortical collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiology.* In press.
- (19) Tsuruoka S, Kaneda T, Ioka T, Fujimura A. Dosing time-dependent variation of bone resorption by cyclosporin A in rats femurs. *Eur J Pharmacol.* In press.

2. 学会発表

- (1) 鶴岡秀一、石橋賢一、錦健太、若海美智、杉本孝一、鈴木誠、今井正、藤村昭夫。ABCファミリーに属する新規薬物輸送体 ABCA8 の機能解析。第45回日本腎臓学会学術総会。2002年5月23-25日、大阪。(日腎誌44:260、2002)
- (2) Tsuruoka S., Ishibashi K., Nishiki K., Suzuki M., Imai M., Fujimura A. Functional characterization of ABCA8, a new member of ABC-superfamily, as MRP-2 like drug transporter in xenopus oocyte expression system. ASN/ISN World congress of Nephrology, Oct 13-17, 2002, San Francisco, CA.
- (3) 鶴岡秀一。ハイブリッド型人工腎臓による薬物除去。第40回日本人工臓器学会、ワークショップ「埋込型人工腎臓開発のステップ、基礎から臨床へ」。2002年

- 10月2-4日、札幌。(人工臓器 31 : S-78, 2002)
- (4) 鶴岡秀一、山本尚史、錦健太、催一民、王寧、今井正、藤村昭夫。MDR 遺伝子高発現細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓によるジゴキシン (D) 中毒イヌの治療。第2回日本再生医療学会大会。2003年3月10-12日、神戸(日本再生医療学会雑誌 2: (suppl) 171, 2003)。
- (5) 鶴岡秀一、山本尚史、錦健太、催一民、王寧、今井正、藤村昭夫。MDR 遺伝子高発現細胞を用いたハイブリッド型人工腎臓によるジゴキシン (D) 中毒イヌの治療。第48回日本透析医学会学術集会・総会。2003年6月20-23日大阪。(透析会誌 36:770, 2003)
- (6) 鶴岡秀一、錦健太、山本尚史、王寧、安藤仁、今井正、藤村昭夫。臨床血液透析用ホロファイバー型モジュールを用いたハイブリッド型人工腎臓によるジゴキシン除去能の検討。第41回日本人工臓器学会。2003年10月30日-11月1日、仙台。
- (7) 鶴岡秀一。薬物中毒とハイブリッド型人工臓器。(シンポジウム・再生医療と臨床薬理)第24回日本臨床薬理学会年会。2003年12月11-12日、横浜。
- (8) 鶴岡秀一、錦健太、山本尚史、藤村昭夫。臨床血液透析用ホロファイバーモジュール (H) を用いたハイブリッド型人工腎臓によるジゴキシン (D) 除去能の検討。第49回日本透析医学会学術集会・総会。2004年6月18-20日神戸。
- (9) 鶴岡秀一、山本尚史、井岡崇、藤村昭夫。血液透析用ホロファイバー型モジュール (H) を用いたハイブリッド型人工腎臓。第42回日本人工臓器学会、シンポジウム「ハイブリッド型人工臓器の現状と未来」。2004年10月5-7日、東京(人工臓器 33(2)S-56, 2004)。
- (10) 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:Suppl1 606, 2005)
- (11) 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。
- (12) Yamamoto H, Tsuruoka S, Ioka T, Ando H, Ito C, Akimoto T, Fujimura A, Asano Y, Kusano 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)
- (13) 鶴岡秀一。人工腎臓の可能性。第141回日本獣医学会学術集会 日本比較薬理・毒性学会シンポジウム「基礎獣医学から腎臓を考えてみよう」2006年3月18-21日、つくば。

H. 知的財産権の出願・登録状況

Drug transporter and use thereof. 国際公開 2003年4月10日 (WO 03/029290)

厚生科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）

総合研究報告書

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発

III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究

装置化へ向けた各種素材および基盤技術の統合

分担研究者 黒田 章夫 広島大学・大学院先端物質科学研究科・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。本グループでは、ATP の供給源としてポリリン酸を利用するための基盤研究を行った。ポリリン酸の形態には可溶性と不溶性のポリリン酸塩が存在する。不溶性のポリリン酸塩は半透膜を通り抜けることがないので、タンパク質-人工基材が複合した機能性膜を動かすために可溶性ポリリン酸よりも有効であると思われた。そこで、不溶性のポリリン酸顆粒を使って連続的に ATP を供給する系の確立を目指した。その結果、ポリリン酸顆粒は可溶性のポリリン酸に比べて速度は 1/3 に低下するものの、ATP を供給するエネルギー源になりえることがわかった。さらに、ポリアミン分子を添加することで反応の際に問題となるポリリン酸顆粒の溶出を抑制できることを発見した。また、ポリリン酸やポリリン酸顆粒をチャンネルタンパク質により近い場所、すなわち機能性膜の基材に直接結合させることが出来れば、膜に固定されたチャンネルタンパク質に対してより安定かつ速やかに ATP を供給できると考えた。そこで、機能性膜としての利用が検討されているアノディスクにポリリン酸およびポリリン酸キナーゼを結合させ、ATP 再生系が働き得るか検討した。その結果、膜上で起こる ATP 消費反応に対して連続的に ATP を供給させることができた。ポリリン酸-ポリリン酸キナーゼ系を使うことで、機能性膜上に自律的な ATP の供給系を構築できることを示した。

A. 研究目的

生体反応の多くは正の自由エネルギー変化を示し、その多くは ATP の加水分解と共役して起こる。ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発におけるタンパク質-人工基材が複合した機能性膜を動かすためにも ATP の供給が必須である。絵野沢グループでは細胞表面に存在し細胞内外の物質輸送

を行うチャンネルタンパク分子を人工膜に固定化するという新規な発想を展開している。薬物代謝酵素系や細胞膜上のチャンネルタンパク質は分子種群をなし、新しい分子が続々と遺伝子レベルで同定されている。これらの機能性タンパク質は、それぞれ異なった基質特異性を有するので肝・腎不全の病態を改善するために必要な分子種を選び出すことがで

きる。こうして再構成された人工合成膜であるナノ代謝代替デバイスに生きた細胞のように統合した選択的・能動輸送を行わせ、人工透析を行うことを目標としている。

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

さて、ATP 供給系は実際今までに幾つか確立されている。しかしながらそれらは非常に高価な高エネルギーリン酸結合の化合物を利用しており、しかも不安定な低分子である。ポリリン酸は、ATP と同様の高エネルギーリン酸結合によって数百のリン酸が結合した無機ポリマーである（図 1）。ポリリン酸はリン酸を加熱すると合成できる最も単純で、非常に安価な高エネルギーリン酸化合物である。大腸菌のポリリン酸合成酵素（ポリリン酸キナーゼ）は、ATP の末端のリン酸基をポリリン酸に転移して約 700 個のリン酸がつながったポリリン酸を合成する。しかし過剰のポリ

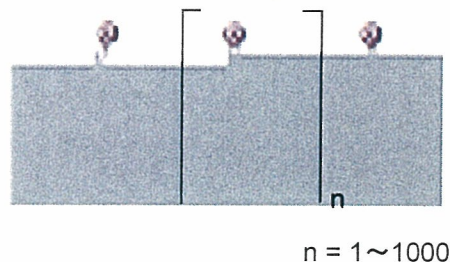


図 1, ポリリン酸の構造

リン酸と ADP が存在すると、逆反応により ATP を生産することが出来る（図 2）。ポリリン酸は、うまくすれば非常に安価な ATP の代替として働かせることができる魅力的な分子でもある。

ポリリン酸の形態には可溶性と不溶性のポリリン酸塩が存在する。特に数十から 100 個程度のリン酸が結合したポリマーのポリリン酸はマグネシウムやカルシウムが存在すると不溶性の顆粒を作る。ポリリン酸キナーゼは可溶性のポリリン酸と ADP から ATP を作ることができることから、可溶性ポリリン酸は ATP の供給源になりうる。しかし、不溶性のポリリン酸顆粒をつかって ATP を再生することができるかどうかは今まで示されていなかった。不溶性のポリリン酸塩は半透膜を通り抜けることがないので、タンパク質-人工基材が複合した機能性膜を動かすために可溶性ポリリン酸よりも有効であると思われた（図 3

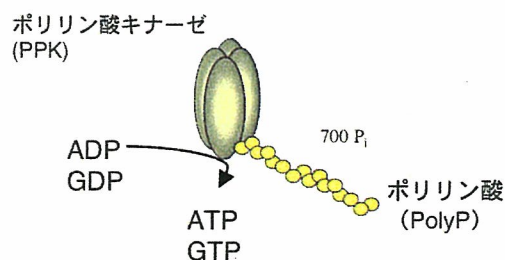


図 2, ポリリン酸合成酵素

-A)。さらに、このポリリン酸やポリリン酸顆粒をチャンネルタンパク質により近い場所、すなわち機能性膜の基材に直接結合させることが出来れば、膜に固定されたチャンネルタンパク質に対してより安定かつ速やかに ATP を供給できると考えられた (図 3-B)。そこで、本研究では不溶性のポリリン酸顆粒や機能性膜の基材に結合させたポリリン酸を使い、機能性膜上のチャンネルタンパク質に安定的かつ自律的に ATP を供給する系の構築を目指した。

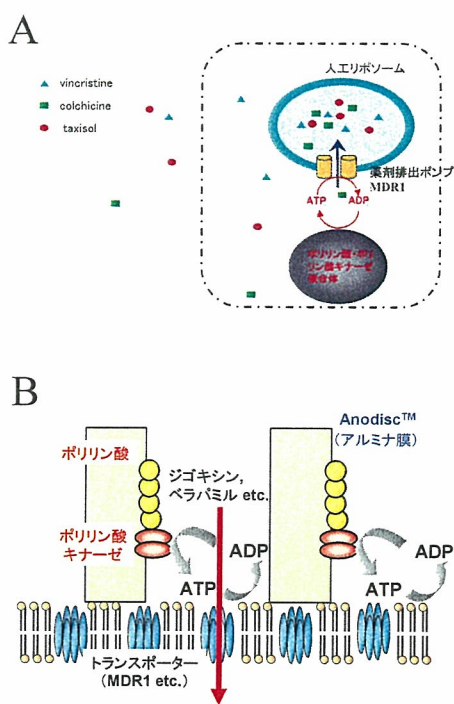


図 3. 本研究の目標の概念図

B. 研究方法

1) 生体内から単離したポリリン酸顆粒の分析と人工ポリリン酸顆粒の調製

生体内ポリリン酸顆粒は、ポリリン酸を過剰に蓄積する大腸菌 *phoU* 変異株から単離した。アミノ酸飢餓条件で培養した菌体を凍結

乾燥後、四塩化炭素に懸濁し、マイクロスマッシュ (トミー精工) にて破砕した。遠心分離して得られたポリリン酸顆粒は、X線分析装置 (JED-2200、日本電子) を用いて原子組成を明らかにした。

人工ポリリン酸顆粒は、50 mMの可溶性ポリリン酸 (平均鎖長 65、phosphate glass、シグマ社) と任意の濃度の KCl、MgCl₂ を混合し、遠心により沈殿させた。顆粒調製時と同じ濃度のカリウム-マグネシウム溶液で沈殿を3回洗浄し、X線分析装置を用いて原子組成を解析した。

2) ポリリン酸顆粒とポリリン酸キナーゼを用いた ATP 再生系の構築

1.9 mM ポリリン酸顆粒 (1.9 mM 相当のリン酸を含む)、0.1 mM ADP、1.0 mM グルコース、1.0 mM NADP、0.5 U ヘキサキナーゼ、0.5 U グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼを 4 mM MgCl₂、40 mM (NH₄)₂SO₄、50 mM HEPES-KOH (pH 7.2) 緩衝液中で反応させた。ポリリン酸キナーゼは最終 15 μg/ml の濃度で加えた。生成した NADPH は 340 nm の吸収波長で測定した。

3) 人工ポリリン酸顆粒を安定化する因子の探索

試験管内で調製したポリリン酸顆粒に、任意の濃度のポリアミンを含む 100 mM HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) を 30 μl 加えて室温で 10 分間静置した。上清に 2M 塩酸を加えて 100°C で 7 分間加熱し、溶出したポリリン酸をリン酸まで加水分解した。同様に溶け残ったポリリン酸顆粒もリン酸まで加水分解した。モリブデンブルー法によりそれぞれのリ

ン酸濃度を測定し、リン酸単位でのポリリン酸量を算出した。以下の式から溶出率を算出し、安定性を評価する指標とした。

$$\text{溶出率(\%)} = \frac{\text{溶出ポリリン酸}}{\text{溶出ポリリン酸} + \text{残存ポリリン酸顆粒}} \times 100$$

4) 機能性膜基材に結合させたポリリン酸 - ポリリン酸キナーゼによる ATP 再生

アノディスク（直径 25 mm、孔径 0.1 μm、Whatman 社）に、0.9 μmol のポリリン酸、0.3 ng のポリリン酸キナーゼを含む 100 mM のコハク酸-NaOH 緩衝液 (pH 5.7) 50 μl を添加し、4°C で 30 分間静置した。同緩衝液で洗浄して 500 μM の ADP を 10 μl 滴下した後、反応液 (50 mM コハク酸-NaOH 緩衝液 (pH 5.7)、40 mM (NH₄)₂SO₄、4 mM MgCl₂、1 mM グルコース、1 mM NADP、0.5 U ヘキソキナーゼ、0.5 U グルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ) 90 μl を添加して NADPH を合成した。また、発色反応は上記反応液に 1 mM のニトロブルーテトラゾリウムと 0.5 U ジアホラーゼを添加して行った。

C. 研究結果

1) 生体内から単離したポリリン酸顆粒の分析と人工ポリリン酸顆粒の調製

大腸菌の *phoU* 変異株はポリリン酸を顆粒状に蓄積する (図 4)。そこでこの変異株からポリリン酸顆粒を調製し、走査型電子顕微鏡と X 線分析装置により原子組成を検討した (図 5)。その結果、主成分はリン、カリウム、マグネシウムで、その存在比は 1 : 0.19 : 0.31 であった。このポリリン酸顆粒と組成が類似した顆粒を試験管内で調製するため、可

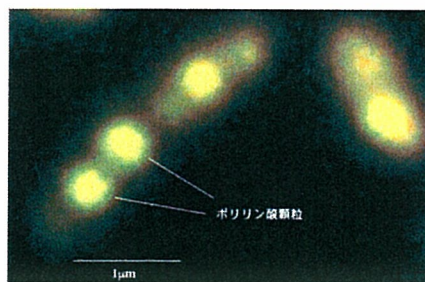


図 4, ポリリン酸を蓄積する大腸菌

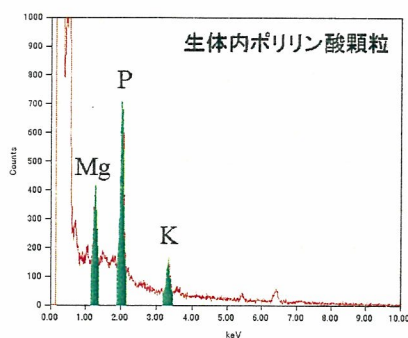


図 5, ポリリン酸顆粒の原子組成

溶性のポリリン酸と任意の濃度の KCl、MgCl₂ を混合してポリリン酸顆粒を調製した。その結果、57 mM KCl、39 mM MgCl₂ を混合したときに大腸菌から調製したポリリン酸顆粒と組成が類似することがわかった。

2) ポリリン酸顆粒とポリリン酸キナーゼを用いた ATP 再生系の構築

試験管内で調製したポリリン酸顆粒とポリリン酸キナーゼを使用して ATP 再生系を構築した。ATP を消費する系としてグルコース、ヘキソキナーゼを用いた。グルコースのリン酸化によって生じるグルコース 6-リン酸は直ちにデヒドロゲナーゼによってグルコン酸になり、生じた還元力によって NADPH が生成する。この系には ATP は入っていない。ADP が ATP に再生されない限りグルコースがリン酸化されず、NADPH も生産されない。NADPH

の定量をすることによって ATP が合成されているかを確認した (図 6)。その結果、ポリリン酸-マグネシウム-カルシウム顆粒は可溶性のポリリン酸に比べて速度は 1 / 3 に低下するものの、ATP を供給するエネルギー源になりえることがわかった。

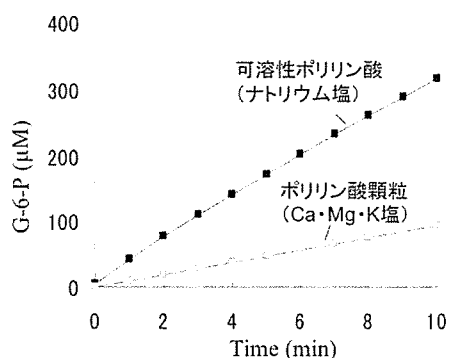


図 6, ポリリン酸顆粒による ATP 生産

3) 人工ポリリン酸顆粒を安定化する因子の探索

ポリリン酸顆粒を ATP の供給源として利用するためには、可溶性のポリリン酸として溶け出さない、より安定なポリリン酸顆粒が必要となる。しかし試験管内で調製したポリリン酸顆粒は非常に溶けやすく、すぐに可溶性のポリリン酸となって半透膜を通り抜けしまい、安定した ATP の供給が出来ない恐れがある。そこで、ポリリン酸顆粒を安定化させる因子を探索した。ポリアミンは生体内に多量に存在する塩基性の物質で、リン酸基を持つ化合物と強く結合する。そこで、ポリアミンを含む緩衝液をポリリン酸顆粒に添加してその安定化効果を検討した。添加するポリアミンとして大腸菌の細胞内で存在が確認されているプトレッシン、スペルミジン、カダベリンを用いた。その結果、いずれのポリアミンでも非常に強い安定化効果が見られた (図 7)。

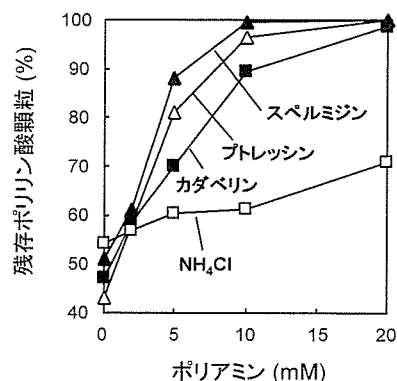


図 7, ポリアミンによるポリリン酸顆粒の安定化効果

4) 機能性膜基材に結合させたポリリン酸 - ポリリン酸キナーゼによる ATP 再生

ポリリン酸やポリリン酸顆粒をポリリン酸キナーゼと共に輸送タンパク質により近い場所、すなわち機能性膜の基材に直接結合させることが出来れば、膜に固定された輸送タンパク質に対してより安定かつ速やかな ATP の供給を行うことが出来ると考えられた。そこで、機能性膜の基材としての利用が検討されているアノディスク上にポリリン酸およびポリリン酸キナーゼを結合させ、ATP 再生系を構築した。ATP を消費する系としてポリリン酸顆粒の場合と同様にグルコース、ヘキソキナーゼを用いた。その結果、添加した ADP と等モルの ATP から生成される NADPH 量の 2 倍以上の NADPH が生成された。さらにこの反応系にジアホラーゼによる発色反応を共役させたところ、発色強度に明らかな違いが見られた (図 8)。また、このアノディスクを垂直方向に切断し、X 線分析装置を用いて孔内部の元素組成を調べたところ、ポリリン酸由来と思われるリンの分布が確認できた (図 9) ポリリン酸 - ポリリン酸キナーゼを結合したアノディスク上で ATP 再生系が機能することがわかった。

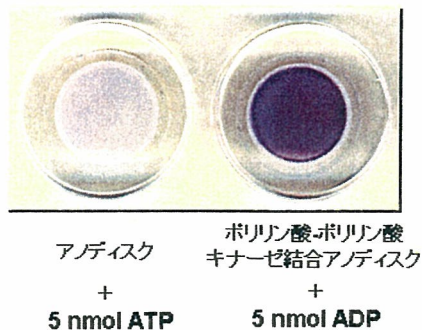


図8, アノディスク上のポリリン酸 - ポリリン酸キナーゼ系による ATP 再生

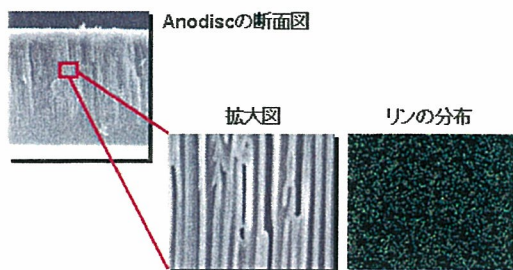


図9, アノディスク断面の電子顕微鏡写真とリンの分布

D. 考察およびE. 結論

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。本グループでは、ATP の供給源としてポリリン酸を利用するための基盤研究を行った。ポリリン酸の形態には可溶性と不溶性のポリリン酸塩が存在する。不溶性のポリリン酸塩は半透膜を通り抜けることがないので、タンパク質-人工基材が複合した機能性膜を動かすために可溶性ポリリン酸よりも有効であると思われた。そこで、不溶性のポリリン酸顆粒を使って連続的に ATP を供給する系の確立を目指した。その結果、ポリリン酸顆粒は可溶性のポリリン酸に比べて速度は 1 / 3 に低下するものの、ATP を供給するエネルギー源に

なりえることがわかった。さらに、ポリアミン分子を添加することで反応の際に問題となるポリリン酸顆粒の溶出を抑制できることを発見した。また、ポリリン酸やポリリン酸顆粒をチャンネルタンパク質により近い場所、すなわち機能性膜の基材に直接結合させることが出来れば、膜に固定されたチャンネルタンパク質に対してより安定かつ速やかに ATP を供給できると考えた。そこで、機能性膜としての利用が検討されているアノディスクにポリリン酸およびポリリン酸キナーゼを結合させ、ATP 再生系が働き得るか検討した。その結果、膜上で起こる ATP 消費反応に対して連続的に ATP を供給させることができた。ポリリン酸 - ポリリン酸キナーゼ系を使うことで、機能性膜上に自律的な ATP の供給系を構築できることを示した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Motomura, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kuroda, Polyamines affect polyphosphate accumulation in *Escherichia coli*, *J. Environ. Biotech.*, 6, 41-46 (2006).
- 2) K. Nomura, J. Kato, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kuroda, Inorganic polyphosphate stimulates Lon-mediated proteolysis of nucleoid proteins in *Escherichia coli*, *Cell. Mol. Biol.*, 52, 23-29 (2006).
- 3) 黒田章夫, 微生物のポリリン酸研究の新展開, *日本農芸化学会誌*, 78, 738-743 (2004).
- 4) T. Satoh, J. Kato, N. Takiguchi, H. Ohtake, A.

Kuroda, ATP amplification for ultrasensitive bioluminescence assay: detection of a single bacterial cell, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 68, 1216-1220 (2004).

5) K. Nomura, J. Kato, N. Takiguchi, H. Ohtake, A. Kuroda, Effects of inorganic polyphosphate on the proteolytic and DNA-binding activities of Lon in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 279, 34406-34410 (2004).

2. 学会発表

1) 黒田章夫、超高感度 ATP 検査試薬およびバイオによるアスベスト検出、日本生物工学会産学連携シンポジウム、平成 19 年 2 月 8 日

2) 黒田章夫、微生物ポリリン酸研究の新展開、日本農芸化学会、平成 16 年 3 月 28 日

3) 黒田章夫、微生物によるポリリン酸蓄積機構の解明と利用、さきがけライブ、平成 16 年 12 月 10 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(平成14年度)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T et al	Modulatory effects of ketamine on catecholamine efflux from in vivo cardiac sympathetic nerve endings in cats.	Neurosci Lett	324	232-236	2002
Noda T, Takaki H, Kurita T et al	Gene-specific response of dynamic ventricular repolarization to Sympathetic stimulation In LQT1, LQT2 and LQT3 forms of congenital long QT syndrome.	Eur Heart J	23	975-983	2002
Shimizu W, Tanabe Y, Aiba T et al	Differential effects of beta-blockade on dispersion of repolarization in the absence and presence of sympathetic stimulation between the LQT1 and LQT2 forms of congenital long QT syndrome.	J Am Coll Cardiol	39	1984-1991	2002
Kawada T, Nakayama Y, Zheng C et al	A novel photocurable insulator material for autonomic nerveactivity recording.	Biomaterials	23	3169-3174	2002
Sato T, Kawada T, Sugimachi M et al	Bionic technology revitalizes native baroreflex function in rats with baroreflex failure.	Circulation	106	730-734	2002
Morita S, Asou T, Kuboyama I et al	Inelastic vascular prosthesis for proximal aorta increases pulsatile arterial load and causes left ventricular hypertrophy in dogs.	J Thorac Cardiovasc Surg	124	768-774	2002
Uchida I, Takaki H, Kobayashi Y et al	O ₂ extraction during exercise determines training effect after cardiac rehabilitation in myocardial infarction.	Circ J	66	891-896	2002
Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T et al	Disruption of vagal efferent axon and nerve terminal function in the postischemic myocardium.	Am J Physiol	283	H2687-H2691	2002
Uemura K, Sugimachi M, Shishido T et al	Convenient automated conductance volumetric system.	Jpn J Physiol	52	497-503	2002

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kawada T, Zheng C, Yanagiya Y et al	High-cut characteristics of the baroreflex neural arc preserve baroreflex gain against pulsatile pressure.	Am J Physiol	282	H1149-H1156	2002
Kanzaki H, Nakatani S, Kawada T et al	Right ventricular dP/dt/P(max), not dP/dt(max), noninvasively derived from tricuspid regurgitation velocity is a useful index of right ventricular contractility.	J Am Soc Echocardiogr	15	136-142	2002
Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T et al	Effects of brief ischaemia on myocardial acetylcholine and noradrenaline levels in anaesthetized cats.	Auton Neurosci	95	37-42	2002
Kawada T, Shishido T, Inagaki M et al	Estimation of baroreflex gain using a baroreflex equilibrium diagram.	Jpn J Physiol	52	21-29	2002
杉町 勝, 砂川 賢二, 岡本浩嗣, 外 須美夫,	新しいオッシロメトリック法アルゴリズムによる心房細動症例での無侵襲自動血圧測定の検討	麻酔	51	784-790	2002
Kawada T, Yanagiya Y, Uemura K et al	Input-size dependence of the baroreflex neural arc transfer characteristics.	Am J Physiol	284	H404-H415	2003
Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T et al	Effects of ketamine on exocytotic and non-exocytotic noradrenaline release.	Neurochem Int	42	261-267	2003
Otsuka Y, Takaki H, Okano Y et al	Exercise training without ventricular remodeling in patients with moderate to severe left ventricular dysfunction early after acute myocardial infarction.	Int J Cardiol	87	237-244	2003
Takenaka K, Ai T, Shimizu W et al	Exercise stress test amplifies genotype-phenotype correlation in the LQT1 and LQT2 forms of the long-QT syndrome.	Circulation	107	838-844	2003
Shimizu W, Noda T, Takaki H et al	Epinephrine unmasks latent mutation carriers with LQT1 form of congenital long-QT syndrome.	J Am Coll Cardiol	41	633-642	2003
Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T et al	Effects of moderate hypothermia on norepinephrine release evoked by ouabain, tyramine and cyanide.	J Cardiovasc Pharmacol	41 Suppl	S111-S114	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tomita T, Takaki H, Hara Y et al	Attenuation of hypercapnic carbon dioxide chemosensitivity after postinfarction exercise training: possible contribution to the improvement in exercise hyperventilation.	Heart	89	404-410	2003
Miyamoto T, Kawada T, Takaki H et al	High plasma norepinephrine attenuates dynamic heart rate response to vagal stimulation.	Am J Physiol		In press	2003
Kawada T, Uemura K, Kashihara K et al	Uniformity in dynamic baroreflex regulation of left and right cardiac sympathetic nerve activities.	Am J Physiol		In press	2003
Sato T, Kawada T, Sugimachi M et al	Dynamics of sympathetic baroreflex control of arterial pressure in rats.	Am J Physiol		In press	2003
佐藤正知, ジュゼッペアブレウ, 河野隆二	超広帯域無線通信に適したアレーアンテナの構成方法に関する一検討	第25回情報理論とその応用シンポジウム		296-299	2002
箱崎正幸, 高橋富士信, 河野隆二	スペクトル拡散通信システムのための共用マルチモード端末における適応IF制御に関する一検討	第25回情報理論とその応用シンポジウム		399-402	2002
Uchikawa H, Umebayashi K, Kohno R.	Secure Download System Based on Software Defined Radio Composed of FPGAs.	IEICE TRANSACTIONS ON COMMUNICATIONS	E85-B	2601-2609	2002
内川浩典、梅林健太、 河野隆二	ソフトウェア無線のためのセキュアなダウンロードシステムにおける動作性能を考慮した際のセキュリティレベルの劣化についての一検討	電子情報通信学会基礎・境界ソサイエティ大会		135	2002
佐藤正知, 江島一樹, ジュゼッペアブレウ, 河野隆二	超広帯域無線通信に適したWavelet変換を用いて構成したアレーアンテナに関する一検討	電子情報通信学会基礎・境界ソサイエティ大会		374	2002
佐藤正知, ジュゼッペアブレウ, 河野隆二	UWB-IR に適した単一指向性を実現するアダプティブアレーアンテナの構成法に関する一検討	電子情報通信学会総合大会		163	2003

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
丸山将行 辻宏之 若菜弘允 大森慎吾 河野隆二	周波数の異なる信号入射時のアレーアンテナシステムの検討	電子情報通信学会総合大会		648	2003
奥池和幸、内川浩典、 池本健太郎、 梅林健太、河野隆二、	ソフトウェア無線におけるFPGAのコンフィギュレーションデータに特化した情報源符号化法の検討	TECHNICAL REPORT OF IEICE	SR02-03	15-21	2002
山菅宏之 河野隆二	Adaptive Array Antenna Using Array Antennas as Element Antennas.	IECE Trans commun	E85-B	1921-1926	2002
Giuseppe Abreu, 河野隆二	A Modified Dolph-Chebyshev Approach for synthesis of Low Sidelobe Beampatterns with Adjustable Beamwidth	IEEE		1-5	2003
Kokubo M, Shibahara Y, Aoki H et al	Low Supply Voltage and Low-Power 1-GHz PLL Frequency Synthesizer for Mobile Terminals.	IEICE TRANS ELECTRON	E-86-C	71-78	2003
Nakayama Y, Sudo M, Uchida K et al	Spatio-resolved hyperbranched graft: polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization.	Langmuir	18	2601-2606	2002
Sonoda H, Urayama S, Takamizawa K et al	Compliant design of artificial graft compliance determination by new digital x-ray imaging system-based method.	J Biomed Mater Res	60	191-195	2002
Okino H, Nakayama Y, Tanaka M et al	In situ hydrogelation of photocurable gelatin and drug release.	J Biomed Mater Res	59	233-245	2002
Yasuda S, Noguchi T, Gohda M et al	Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model.	Cardiovasc Res	53	481-486	2002
Brodbeck W.G., Patel J., Voskerician G. et al	Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates <i>in vivo</i> .	Proc Natl Acad Sci. USA	99	10287-10292	2002
Magoshi T, Ziani-Cherif H., Ohya S et al	Thermoresponsive heparin coating: heparin conjugated with poly (N-isopropylacrylamide) at one terminus.	Langmuir	18	4862-4872	2002