

令和元年6月17日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18963

研究課題名(和文) 脂肪酸結合タンパク質による細胞内薬物輸送の分子メカニズム解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism analysis of intracellular drug delivery by fatty acid-binding protein

研究代表者

山本 篤司 (Yamamoto, Atsushi)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手

研究者番号：90633991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：血液中における薬物結合タンパク質の研究は盛んに行われているのに対し、細胞内における薬物結合タンパク質の研究はほとんど進んでいない。本研究では、脂肪酸結合タンパク質(fatty acid-binding protein, FABP)が様々な疎水性薬物と結合することに着目し、大腸菌発現系や培養細胞を用いた解析を行った。その結果、新たにFABPに結合する薬物の同定、FABPアイソフォーム間における薬物結合の比較、培養細胞を用いた薬物取込能解析系の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの薬物は生体内では基本的にタンパク質と結合して運搬されており、この結合は薬効発現や副作用惹起と深く関わる。本研究では、脂肪酸結合タンパク質(FABP)が細胞内における薬物結合タンパク質としての役割を解明し、細胞内薬物動態学という新たな学術分野を切り開くとともに、薬物の作用発現や副作用惹起のメカニズムを解き明かすことを目指す。今回、FABPに結合する薬物の同定やその特徴付け、培養細胞を用いた解析を行い、FABPの薬物結合研究における基盤を築いた。

研究成果の概要(英文)：While the drug-binding proteins in blood plasma such as albumin and alpha1-acid glycoprotein have been investigated in detail, the proteins in cells have been hardly studied. In this study, we focused on that the fatty acid-binding protein (FABP) binds various hydrophobic drugs and analyzed using E. coli expression system and cultured cells. As a result, we succeeded in identifying a drug that newly binds to FABP, comparing drug binding abilities among FABP isoforms, and constructing a drug uptake assay using cultured cells.

研究分野：薬剤学、分子生物学

キーワード：脂肪酸結合タンパク質(FABP) 薬物結合 細胞内輸送 疎水性薬物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医療で使用される薬物の多くは水に溶けにくい性質を有するため、基本的に薬物単独では血液中や細胞内を自由に移動できない。血液中では、血清アルブミンや酸性糖タンパクなどの血漿タンパク質が様々な薬物と結合し、全身の細胞に送り届けている。これら血漿タンパク質と薬物との相互作用は、薬効発現や副作用発現などの薬物動態と深く関わっており、薬剤学のどの教科書にも記載されている。一方、細胞内において薬物がどのようなタンパク質と結合し、薬物動態にどのような影響を与えているのかについては研究事例が少なく、不明な点が多い。

脂肪酸結合タンパク質 (fatty acid-binding protein, FABP) は細胞内に豊富に存在する約 15 kDa の可溶性タンパク質である。FABP は、細胞内において脂肪酸やヘム、胆汁酸などの疎水性小分子の細胞内輸送を担っていると考えられている。また、FABP には哺乳類において 10 種のアイソフォームが同定されており (FABP1~9, 12)、個々のアイソフォームは特徴的な組織分布を示す。10 種の FABP アイソフォームは、アミノ酸配列の相同性が 14~67% と幅広い値を示すが、いずれのアイソフォームも 10 本のβストランドから成るβバレル構造と N 末端側に helix-turn-helix モチーフを有し、高次構造は非常に類似している。1995 年に、PPAR 受容体刺激薬であるベザフィブラートが FABP1 に結合することが報告され、2007 年には非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) やステロイド薬も FABP1 および FABP2 に結合することが報告されている。しかしながら、これらの薬物は細胞内タンパク質を標的とする薬物について焦点が当てられており、他の薬物について報告がない。また、10 種の FABP アイソフォームのうち薬物結合解析が進んでいるのは FABP1 および FABP2 のみであり、他のアイソフォームに関してはほとんど研究がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、FABP が細胞内で薬物と結合することによる薬物動態への影響を明らかにするため以下のような実験を行う。1) 大腸菌発現系により精製した FABP リコンビナントタンパク質を用いて様々な薬物との結合解析を行い、FABP の薬物結合メカニズムに重要な因子の探索を試みる、2) FABP の薬物結合についてアイソフォーム間の比較解析を行い、薬物結合に重要なアミノ酸残基の特定を試みる、3) 培養細胞に対して FABP を強制発現させ、薬物取り込み能への影響を解析する。

3. 研究の方法

FABP のリコンビナントタンパク質は、histidine タグを付加した FABP を大腸菌 BL21 (DE3) pLysS で発現させ、Ni カラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーおよびゲルろ過により精製した。精製した FABP の濃度は、ウシ血清アルブミンを標準試料としたピシニコニン酸法により決定した。FABP と薬物との結合解析には、FABP と結合することで蛍光を発する 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) の置換反応を利用した。すなわち、精製した FABP と ANS をあらかじめ混和した後、様々な薬物を添加した際の蛍光消失を解析した。

4. 研究成果

FABP1 に結合する薬物の探索

多くの薬物は細胞内の小胞体で代謝を受け、体外に排泄されやすい物質へと変換される。そのため、これらの薬物は細胞内を効率的に輸送される必要があるが、そのメカニズムは不明である。そこで、どのような薬物が FABP に結合するのかを明らかにするために、精製した FABP1 と 30 種以上の薬物を用いたスクリーニング解析を行った。その結果、アンジオテンシンII受容体拮抗薬 (ARB) であるロサルタンやバルサルタン、Ca チャネル拮抗薬 (CCB) であるニカルジピンやニフェジピンなど、これまで FABP に結合することが報告されていない薬物を複数見出した。さらに、ARB や CCB のアナログ解析を行い FABP1 との親和性を比較した結果、化合物の疎水性度が高い薬物ほど FABP1 との親和性が高い結果となった。このことから、FABP1 と薬物との結合には疎水性度が重要な因子と考えられる。また、解析に用いた薬物のうち、テルミサルタンは脂肪酸の一つオレイン酸に匹敵する極めて高い親和性を示したことから、FABP 阻害薬のリード化合物として有用であると考えられた。

FABP のアイソフォーム間における薬物結合能の比較

10 種の FABP アイソフォームのうち、FABP3 は心臓や骨格筋、FABP4 は脂肪組織、FABP5 は眼球や皮膚に高発現し、これらの組織は薬物動態の観点からも重要な組織である。そこで、大腸菌発現系を用いて FABP1~5 の 5 種を精製し、様々な薬物との結合能を比較した。その結果、薬物の結合プロファイルは FABP アイソフォーム間で大きく異なることが判明した。特に、FABP3~5 は比較的アミノ酸配列が似ているにも関わらず、結合する薬物に違いがみられた。そこで、FABP4 と 5 でアミノ酸配列が異なる 85 番目の Thr、96 番目の Qln、105 番目の Ser の 3 つに着目した。変異の導入は overlap extension 法を用い、FABP5 の T85S、Q96H、S105T を作成した。変異を導入した結果、薬物結合に大きな変化が認められなかったことから、これらアミノ酸残基以外の別の要因により薬物結合の選択性が生

じていると考えられた。

FABP1 を強制発現させた細胞における薬物取り込み能

FABP の発現が薬物動態に及ぼす影響を細胞レベルで解析するために、サル腎臓由来 COS7 細胞を用いた強制発現実験を行った。発現実験に先立ち、細胞に取り込ませた薬物量を評価するアッセイ系を構築した。まず、COS7 細胞にフェノフィブラートを添加した後、BSA を含む溶液で洗浄しメタノール抽出を行った。抽出物を HPLC に供し検出条件を検討した結果、10 ng ~ 1 µg を定量的に評価することに成功した。そこで、哺乳類発現ベクターに FABP1 をコードする cDNA を挿入し、リポフェクション法により細胞に導入した。発現の確認は Western blot により行った。FABP1 の強制発現に伴う薬物取込量の変化をアッセイした結果、1.3 に増加した。しかしながら、FABP1 を強制発現させた細胞と動物の小腸における FABP1 の発現を比較した結果、細胞での発現量は生体での発現量よりも著しく低かった。FABP の薬物動態に与える影響を正しく評価するために、より生体内での発現レベルに近づけた実験系を考える必要があると判断した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Yohei Tatematsu, Haruhi Fujita, Hiroki Hayashi, Atsushi Yamamoto, Atsushi Tabata, Hideaki Nagamune, Kazuto Ohkura. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory drug celecoxib on mitochondrial function. Biological and Pharmaceutical Bulletin 査読有 41, 2018, 319-325
DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.b17-00527>
2. Satoshi Fujita, Masaki Suyama, Kenji Matsumoto, Atsushi Yamamoto, Takenori Yamamoto, Yuka Hiroshima Takayuki Iwata, Arihiro Kano, Yasuo Shinohara, Mitsuru Shindo. Synthesis and evaluation of simplified functionalized bongkreikic acid analogs. Tetrahedron 査読有 74, 2018, 962-969
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2018.01.018>
3. Yohei Tatematsu, Hiroki Hayashi, Ryo Taguchi, Haruhi Fujita, Atsushi Yamamoto, and Kazuto Ohkura. Effect of N-phenylanthranilic acid scaffold nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the mitochondrial permeability transition. Biological and Pharmaceutical Bulletin 査読有 39, 2016, 278-284
DOI: <https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00717>

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 山本篤司, 服部奈々美, 江口昂佑, 田口裕基, 刀根淳貴, 大倉一人. 脂肪酸結合タンパク質 (FABP) のアイソフォーム間における薬物結合能の比較 日本薬学会 第 19 年会 (千葉), 千葉, 2019 年 3 月
2. 山本篤司, 立松洋平, 篠原康雄, 大倉一人. 蛍光物質との競合反応を利用した肝型脂肪酸結合タンパク質に結合する薬物の探索とその特徴解析 日本薬学会 第 137 年会 (仙台), 宮城, 2017 年 3 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.suzuka-u.ac.jp/academics/ps/ps>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

氏名：山本 篤司

ローマ字氏名：YAMAMOTO Atsushi

所属研究機関名：鈴鹿胃医療科学大学

部局名：薬学部 薬学科

職名：助手

研究者番号(8桁): 90633991