

研究課題名：タンパク質の発現系を用いた細胞内タンパク質に結合する薬物のスクリーニング系創生

研究代表者：山本 篤司

鹿児島医療科学大学 薬学部 薬剤製剤学分野 助手

### (背景と目的)

投与された薬物の体内動態を明らかにすることは、薬物治療を考える上で極めて重要である。細胞外すなわち、血液中において脂溶性薬物がどのようなタンパク質と結合して運搬されているのかについては古くから盛んに研究されているのに対し、細胞内における薬物結合タンパク質についてはほとんど研究が進んでいない。本研究では、近年、細胞内で脂溶性薬物と結合することが明らかになりつつある肝型脂肪酸結合タンパク質 (liver fatty acid-binding protein, FABP1) に焦点を当て、FABP1 に結合する薬物のスクリーニング解析を行うことで、細胞内における脂溶性薬物の動態研究へと発展させることを目的とする。

### (研究方法)

Human FABP1 をコードする cDNA の N 末端側に Histidine tag 配列を付加し、pET3a ベクターに挿入した発現プラスミドを構築した。次いで、構築したプラスミドを用いて大腸菌 BL21 (DE3) pLysS を形質転換し、リコンビナントタンパク質の発現を誘導した。誘導後の大腸菌から Ni beads を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより FABP1 を精製した。精製した FABP1 はゲルろ過カラムを用いて 10 mM sodium phosphate、1 mM

dithiothreitol、pH 7.4 に溶解させた。

### 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid

(ANS) は FABP の薬物結合サイトに結合して蛍光を生じる。そこでまず 1  $\mu$ M の精製した FABP1 と様々な濃度の ANS を混和し、励起波長 380 nm、測定波長 480 nm における蛍光強度を測定した。続いて、1  $\mu$ M の FABP1 と 40  $\mu$ M ANS を混和した後、10、100、500  $\mu$ M の様々な薬物を添加し、同様に蛍光強度を測定した。

### (結果および考察)

大腸菌発現系を用いて精製した FABP1 の品質を確かめるため、大腸菌ライセートおよび 1  $\mu$ g の精製した FABP1 を SDS-PAGE により分離した後、クーマシー染色を行った (図 1 左)。

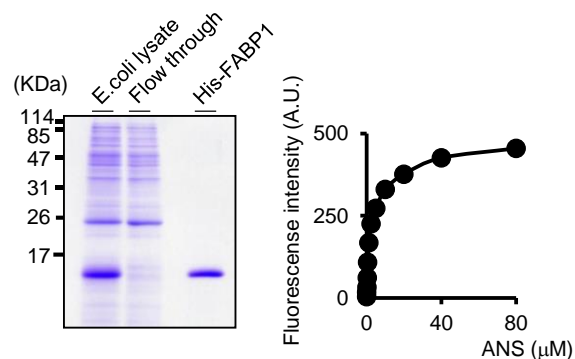


図1 発現・精製したFABP1のSDS-PAGE解析およびANSとの蛍光解析

その結果、15 kDa 付近に明瞭な単一のバンドが観察されたことから、精製が良好に行われていると考えられた。さらに、様々な濃度の ANS と混和した際の蛍光強度を測定した結果、過去の報告と同様の結果が得られた（図 1 右）。以上の結果から、精製した FABP1 は解析に適した品質であることが確認できた。続いて、ANS の置換反応を利用した FABP1 に結合する薬物のスクリーニング解析を行った。すなわち、精製した FABP1 にあらかじめ ANS を結合させておき蛍光を発する状態にする。そこに、図 2 に示す 35 種の様々な薬物を添加することで、添加した薬物が FABP1 に親和性を示す場合、ANS が置換され蛍光が消失するため、薬物添加に伴う ANS の置換率を算出した。

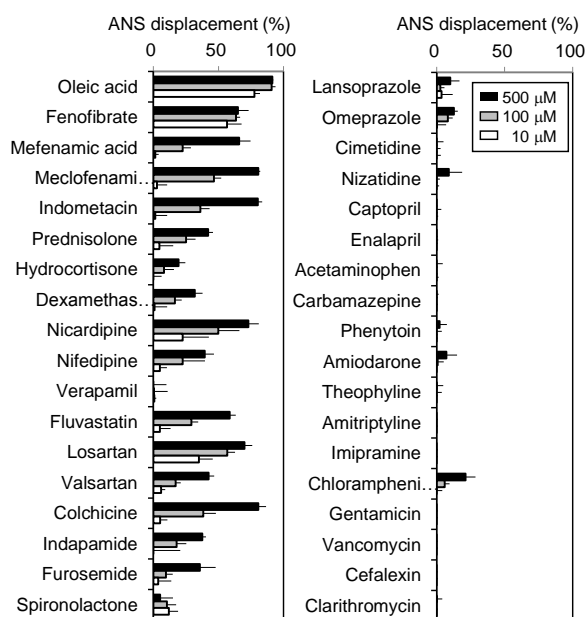


図2 ANSとの置換反応を利用したFABP1に結合する薬物のスクリーニング解析

Fenofibrate や Mefenamic acid などは既に FABP1 に結合することが報告されている化合物である。今回の実験において、これらの薬物により ANS の置換が引き起こされている

ことから、このスクリーニング系は有用であると考えられる。さらに、Ca 拮抗薬である Nicardipine、スタチン系である Fluvastatin、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬である Losartan などは、FABP1 に結合することがこれまでに報告されていない薬物であり、ANS の置換率から FABP1 に対して高い親和性が伺える。今後、FABP1 が存在することにより、これらの薬物の動態にどのような影響が及ぼされるのかを明らかにすることにより、“細胞内における薬物動態研究”という分野を切り開いていくことが期待できる。

#### 研究成果発表（論文・学会発表・特許等）

1 件

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）