

22P-am04

Xenopus laevis oocytes を用いた Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) 発現系の最適化

○八木 沙織¹, 梨本 俊亮², 佐藤 夕紀³, 鷺見 正人⁴, 武隈 洋⁴, 菅原 満⁴(¹北大薬, ²北大生命科学院, ³京大病院薬, ⁴北大院薬)

【目的】Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) は、cholesterol (chol) の細胞内への取り込みに関わるトランスポーターである。NPC1L1 基質輸送機構評価系としては主に培養細胞系が用いられているが、NPC1L1 単独の輸送特性の評価が困難である。一方 *Xenopus laevis* oocytes (oocyte) 発現系では一般に内在性の輸送活性が低く、分子レベルでの輸送特性の評価に有用である。本研究では oocyte に NPC1L1 を発現させた新規評価系を構築し、NPC1L1 の基質輸送機構解明の一助とすることを目的とした。【方法】*hNPC1L1* cRNA あるいは水 (control) を注入し、3-6 日間培養した oocyte を実験に使用した。NPC1L1 の発現はウエスタンブロッティングおよび免疫染色法により確認した。輸送活性の評価は放射性標識した chol (30 nM) を胆汁酸塩、リン脂質からなる混合ミセルに組み込み、25°C で一定時間 oocyte に取り込ませることにより行った。【結果・考察】ウエスタンブロッティングの結果より *hNPC1L1* cRNA を注入した oocyte において *hNPC1L1* の発現が確認された。また免疫染色法の結果より cRNA 注入後の培養日数を 3 日から 5, 6 日にしたところ、細胞膜上の *hNPC1L1* 発現量の大幅な増加が認められた。Chol 取り込み実験では、時間依存的な取り込み量の増加が認められ、取り込み時間 60 min のとき control 群との差が最大となった。またこの chol 取り込みは NPC1L1 選択的阻害剤であるエゼチミブ濃度依存的に阻害され、最大 50% 程度の減少が認められた。これら chol 取り込み実験の結果と培養細胞系による結果を比較したところ、control 群の取り込み量が抑えられ、oocyte 発現系ではより顕著な chol 取り込み量の差が認められた。これより oocyte を用いて NPC1L1 による chol 取り込みやエゼチミブによる阻害効果を評価する新たな系が確立された。