

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K03762

研究課題名(和文) 薬剤-膜相互作用の観点からコレステロールが祖先分子より物性的に進化したかを探る

研究課題名(英文) How the physical properties of cholesterol progressed from those of its ancestor molecules?

研究代表者

高橋 浩 (Takahashi, Hiroshi)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：80236314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜に含まれるコレステロールの生合成過程の前駆体であるラノステロールは、分子進化的観点からは、コレステロールの祖先分子であると考えられている。コレステロールは生体膜の物性を制御する分子である。その膜物性の制御を通して、生体膜の機能に影響する。薬剤代謝過程の中で薬剤が生体膜の脂質部分に取り込まれる必要があるが、この過程におけるステロールの影響を、コレステロールとラノステロールで比較した。その結果、ラノステロールの膜物性への影響は、コレステロールよりも弱いことが明らかになった。膜物性への影響の観点からもコレステロールの方がより、その祖先分子よりも洗練されて来ていると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の膜に含まれるコレステロールは、膜の柔らかさ等の膜の性質を調整する役割を果たす。体内で薬剤や毒を分解代謝する過程にも膜が関与し、コレステロールも関係する。生物進化の中で生体分子も進化する。コレステロールはラノステロールという分子から進化してきたとされる。本研究は、薬剤代謝の観点、および、その分子特性からみて、コレステロールがその祖先分子よりも洗練されていることを明かにした。本研究の成果は、薬剤代謝過程に関して、基礎的な知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Lanosterol is a precursor to the biosynthetic process of cholesterol found in biomembranes. From a molecular evolutionary perspective, it is considered the ancestor molecule of cholesterol. Cholesterol can regulate the physical properties of biomembranes. Through its regulation of membrane properties, it influences the function of biomembranes. In the drug metabolism process, drugs must be incorporated into the lipid bilayer portion of the biomembrane. The effect of sterols on this process was compared between cholesterol and lanosterol. It was found that the effect of lanosterol on the physical properties of model biomembranes was weaker than that of cholesterol. It is thought that cholesterol has become more sophisticated than its ancestor molecule in terms of its effect on the physical properties of biomembranes.

研究分野：生物物理学

キーワード：コレステロール ラノステロール モデル生体膜 薬剤代謝 リン脂質 リン脂質膜 生体物性

1. 研究開始当初の背景

本研究は、先の科学研究費助成事業・基盤(C)「生体膜のコレステロール含量の違いを機能から考察する」(16K05509)で実施された研究と同様な発想に基づき、それを発展させることを目指して計画された。研究動機の1つは、細胞内小器官の膜におけるコレステロール含量が、細胞内小器官の種類によって全脂質量に対して5 mol%から40 mol%と大きく異なる事実である。それぞれの細胞内小器官の機能に即して、膜の物理的性質を調節するためにコレステロール含量が異なっていると考えられる。具体的な機能との関連で注目したのは、小胞体膜に存在するシトクロム P450(CYP)の薬剤代謝機能であった。CYPは、役目を終えた薬剤や、毒物などの異物を酸化代謝する膜タンパク質である。2000年以降、CYPの結晶構造が解かれはじめた。また、その構造を基にした分子動力学的研究を進み、その結果、CYPの活性部位は、内部の疎水性領域に位置することが分かった。また、その活性部位に薬剤や毒を導くチャンネルが存在することも明らかになった。さらに、そのチャンネルの入り口は、脂質膜の疎水性部分に位置することが2010年頃までに知られるようになった。CYPによって代謝される薬剤は、まず、小胞体膜の脂質二重層膜の疎水性部分に薬剤や毒が侵入した後、チャンネルを通してCYPの活性部位に導かれ、酸化代謝される。酸化作用を受けて酸化された薬剤や毒は、別のチャンネルを通して細胞質へ放出される(以上、例えば総説[1]を参照)。酸化によって親水度が増加し、尿として速やかに体外に排出されるようになる。小胞体膜のコレステロール含有量は、約10 mol%と他の細胞内小器官の膜と比較するとかなり低い[2]。この低コレステロール含有量が、薬剤や毒等のCYP代謝対象分子を効率良く小胞体膜の脂質二重層膜に集めることに寄与しているとの仮説を立てた。16K05509の研究では、飽和と不飽和脂肪酸鎖を合わせ持つリン脂質POPCを主体とするモデル生体膜系の実験で、この仮説を支持する結果を得た[3]。

ところで、異物を酸化代謝する酵素CYPは、真核生物だけでなく、原核生物にも存在する。細胞内小器官を持たないため、当然ではあるが、原核生物のCYPは膜タンパク質ではなく、水溶性タンパク質である。真核生物が誕生したとされる25億年ほど前、地球の大気の酸素濃度が急上昇した。コレステロールの生合成過程の解明でノーベル賞を受賞したKonrad Blochは、スクワランからのコレステロール合成には、分子状酸素を必要とすることから、地球の大気の酸素濃度が急上昇した約25億年前から、コレステロール分子を生物が合成するようになった、つまり、真核生物の登場とコレステロールの登場は一致すると主張した[4]。Konrad Blochは、コレステロールの生合成過程の各段階は、分子進化の段階をなぞっているとも主張している[4]。このことを踏まえて、分子進化的観点からみてコレステロールの祖先分子にあたるラノステロールと、コレステロールで分子物性、特に、脂質膜に対する効果に差があるかに興味を持った。コレステロールという、その含有量によって膜の物性を調整することができる分子の登場によって、細胞内に機能分担する様々な器官を作り、各機関にそれぞれ固有な機能を割り振ることができたとの仮説を考えた。真核生物の登場には、コレステロールが不可欠であり、その祖先分子では、その役割を果たせなかったのではないかと考えた。

2. 研究の目的

コレステロールの前駆体の1つであるラノステロールが、コレステロールと同様な効果をリン脂質膜に及ぼすかどうかを明らかにすることを、研究の第一目的とした。またさらに、CYP基質薬剤として筋弛緩剤であるクロルゾキサゾン(CZX)を用いて、リン脂質膜+ステロールからなるモデル系の膜とCZXの相互作用を検討することも目的とした。

3. 研究の方法

リン脂質に対するステロールの効果は、熱測定による相転移挙動への影響、X線回折による膜構造への影響により調べた。X線回折による膜構造の分析では、重水を用いた浮沈法密度測定の結果より、算出した脂質二重層膜中での1分子あたりの見かけの占有分子体積と組み合わせ解析を行った。

薬剤の膜への侵入の評価は次のように行った。X線回折による膜構造の変化の程度と、透析法によって膜に取り込まれず水相に存在する薬剤を選別し、その濃度を分光法で測定し、その差し引きによって膜内に侵入した薬剤量を決定することから行った。

4. 研究成果

(1) リン脂質POPEモデル生体膜と薬剤の相互作用へのステロールの影響

先の科研費の研究16K05509では、コレステロール含量によって脂質膜へのCYP基質薬剤の侵入の程度は異なることをモデル系で検討した。そのモデル生体膜は、哺乳動物で最も多く見られるリン脂質ホスファイジルコリン(PC)で構成された。実際の生体膜が多種多様な脂質成分から構成されていることを考慮して、PC以外のリン脂質を用いてコレステロールの効果を再検討することを行った。PCと略されるホスファイジルコリンが哺乳動物では最も主要なリン

脂質である。動物細胞で2番目に多いリン脂質はPEと略されるホスファイジルエタノールアミンである。また、リン脂質の2本ある疎水鎖の一つが飽和で、もう一方が不飽和脂肪酸であるものが、2本とも同種の脂肪酸鎖であるものよりも生体膜では多く見いだされる。リン脂質POPCと同じく飽和と不飽和脂肪酸鎖を合わせ持つPE脂質のPOPEでモデル膜を作製して、このモデル膜と筋弛緩剤CZXの相互作用に対するコレステロールの効果を検討した。

はじめに、コレステロールが存在しない状況で、POPEモデル膜とCZXとの相互作用を検討した。POPEモデル膜は、約26°Cでゲル・流動相へ相転移する。転移後の流動相のPOPE二重層膜内へCZXは侵入するが、一方、低温相であるゲル相では、本実験の測定精度内では、CZXは一切、POPEモデル膜内部に侵入しなかった(図1)。流動相とゲル相を比較すると、脂質の分子パッキングがゲル相の方が密である。そのために、薬剤の侵入が阻まれると考えられる。

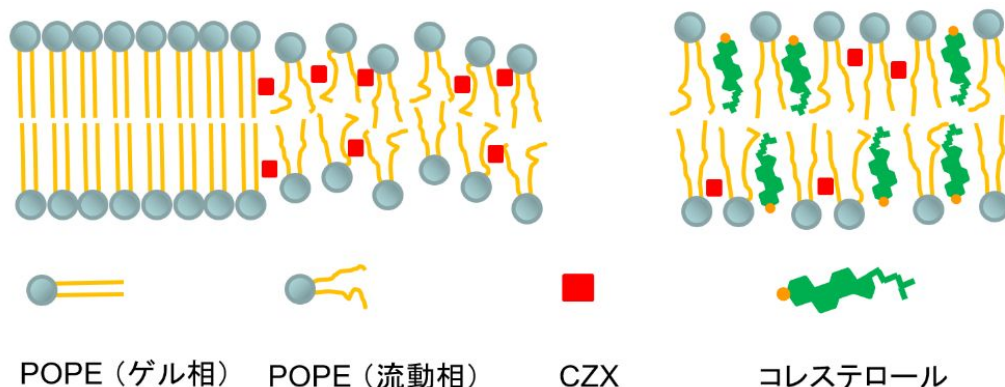


図1

コレステロールが存在する場合は、POPCモデル膜系と同じくコレステロール濃度の増加に伴いPOPEモデル膜への薬剤CZXの侵入量は減少した。少なくとも動物細胞の生体膜での第1位と第2位の主要リン脂質であるPCとPEからなるモデル系の実験で同様な結果となったことから、高コレステロール濃度は、細胞膜の脂質二重層部分への薬剤侵入を阻害する傾向があり、低コレステロール濃度の小胞体膜に薬剤が集まりやすくなっているという仮説がより強固に支持された。ゲル相のPOPE膜へCZXが侵入しなかったことから、二重層膜における分子パッキングが密になることは、薬剤が膜に侵入することに不利に働くと推定されると上で述べた。また、流動的な状態のリン脂質膜へのコレステロール添加は、脂質分子の分子パッキング密にさせる効果があることが既に知られている。高濃度のコレステロール濃度による薬剤の膜侵入阻害効果は、分子パッキングの観点から説明できるものと考えられる。以上の成果は、論文にまとめ発表した[5]。

(2) リン脂質モデル生体膜の膜厚に対するコレステロールとラノステロールの比較

上に述べた薬剤とリン脂質モデル膜の相互作用に関するコレステロールの効果の研究から、リン脂質膜の分子パッキングが密になるか否かが重要であることが分かった。そこで、コレステロールと分子進化的にその祖先分子であるラノステロールとで、リン脂質モデル膜の膜厚に対する影響を調べた。リン脂質にステロールを加えた場合、見かけの分子体積は大きくは変化しない。つまり、リン脂質・ステロール混合膜の体積は、リン脂質、ステロール単体の分子体積を足し合わせたものに、ほぼ等しい。体積が一定であるとする、脂質分子の分子パッキングが密になると、膜の側面方向(膜面に平行方向)は縮まるが、膜面の法線方向には伸びることになる。つまり、膜厚が厚くなる。そこで、膜厚をX線回折・散乱の手法で調べた結果、コレステロールと比較するとラノステロールの膜厚増加効果は弱いものであった。厳密に、密度測定による分子体積の変化を考慮しても同様な結論となった。また、モデル膜の流動性(運動性)を、蛍光プローブを使って調べた結果、ラノステロールを添加した時よりもコレステロールを添加した時の方が、流動性は抑えられた。この結果も、ラノステロールよりもコレステロールの方が膜内においてリン脂質分子を密にする、つまり、凝集させる効果が強いことを示唆している。以上の結果からは、ラノステロールでは高濃度であったとしても薬剤の膜内侵入を阻害する効果を持たないか、持つとしても弱いものと予想される。

興味深いことに、本研究に関連して行った酸化コレステロールによるモデル生体膜に対する効果の研究[6]では、酸化コレステロールは、ラノステロールと同様に弱い膜の凝集効果しか示さなかった。コレステロールは、ラノステロールを酸化することで生合成されるが、リン脂質膜の凝集効果という観点では、コレステロールが最適であり、さらに酸化が進む状況では、その効果は減ってしまう。このような観点からも長い進化の中で、コレステロールは生体膜の成分とし

て最適化されてきたと考えられる。以上の成果は、2022年8月に開催される国際会議 APPC15 (アジア太平洋物理会議) で発表予定である。

<引用文献>

- [1] M. Šrejber, V. Navrátilová, M. Paloncýová, V. Bazgier, K. Berka, P. Anzenbacher, M. Otyepka, Membrane-attached mammalian cytochromes P450: An overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners. *J. Inorg. Biochem.* **183** (2018) 117-136.
- [2] G. van Meer, A. I. de Kroon, Lipid map of the mammalian cell, *J. Cell. Sci.* **124** (2011) 5-8.
- [3] A. Yamada, N. Shimizu, T. Hikima, M. Takata, T. Kobayashi, H. Takahashi, Effect of cholesterol on the interaction of cytochrome P450 substrate drug chlorzoxazone with the phosphatidylcholine bilayer, *Biochemistry* **55** (2016) 3888-3898.
- [4] K. Bloch, *Blondes in Venetian Paintings, the Nine-Banded Armadillo, and Other Essays in Biochemistry*. Yale University Press, New Haven, 1994.
- [5] S. Kano, H. Takahashi, Cholesterol's inhibition effect on entering of chlorzoxazone into phosphatidylethanolamine bilayer: Relevance to cytochrome P450 drug metabolism at endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **1864** (2022) 183954.
- [6] H. Takahashi, T. Hoshino, A comparative study of the effects of 7 β -hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, and cholesterol on the structural and thermal phase behavior of multilamellar dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer vesicles. *Chem. Phys. Lipids* **227** (2020) 104872.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahashi Hiroshi, Watanabe Ryota, Nishimura Kenichi, Moriwaki Taro	4. 巻 69
2. 論文標題 Release of Ceramide Molecules from Ceramide-Containing UV-curable Acrylic Adhesive Gel Sheet Affixed to Human Skin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 1307 ~ 1315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess20095	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yokoyama Yasunori, Yano Shunsuke, Kurita Riku, Karasawa Morise, Tanaka Hikaru, Takahashi Hiroshi, Kikukawa Takashi, Sonoyama Masashi, Takenaka Koshi	4. 巻 129
2. 論文標題 Effects of salt and gel network structures on purple membrane stacking in hydrogels immobilized with poly(vinyl alcohol)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 014701 ~ 014701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0032546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchida Naoyuki, Takagi Toshiyuki, Takahashi Hiroshi, Yoshihara Toshitada, Tobita Seiji, Sonoyama Masashi	4. 巻 1863
2. 論文標題 Membrane properties of amacrocyclic tetraether bisphosphatidylcholine lipid: Effect of a single membrane-spanning polymethylene cross-linkage between two head groups of ditetradecylphosphatidylcholine membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183569 ~ 183569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2021.183569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takahashi Hiroshi, Hoshino Tatsuya	4. 巻 227
2. 論文標題 A comparative study of the effects of 7 -hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, and cholesterol on the structural and thermal phase behavior of multilamellar dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer vesicles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 104872(12pages)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemphyslip.2020.104872	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morita Kohei, Horikoshi Miki, Yanagi Tamami, Takagi Toshiyuki, Takahashi Hiroshi, Amii Hideki, Hasegawa Takeshi, Sonoyama Masashi	4. 巻 48
2. 論文標題 Thermotropic Transition Behaviors of Novel Partially Fluorinated Dimyristoylphosphatidylcholines with Different Perfluoroalkyl Chain Lengths	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1105 ~ 1108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190389	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kano Shosei, Takahashi Hiroshi	4. 巻 1864
2. 論文標題 Cholesterol's inhibition effect on entering of chlorzoxazone into phosphatidylethanolamine bilayer: Relevance to cytochrome P450 drug metabolism at endoplasmic reticulum membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183954 ~ 183954
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2022.183954	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋 浩、松本 旺
2. 発表標題 リン脂質二重層膜構造へのコレステロールとラノステロールによる影響の比較：中性・酸性リン脂質2成分混合系での検討
3. 学会等名 日本膜学会第42年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野達也、松本 旺、狩野勝星、高橋 浩
2. 発表標題 コレステロール、酸化コレステロール、ラノステロールの3種のステロールがリン脂質膜の膜厚に及ぼす影響の比較
3. 学会等名 日本物理学会 2020年秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本 旺、高橋 浩
2. 発表標題 Comparative study of the effects of cholesterol and lanosterol on the structure of model bio membrane formed by two phospholipid species 2種類のリン脂質種からなるモデル生体膜の構造に対するコレステロールとラノステロールの影響の比較
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 熊川恵理、高橋 浩
2. 発表標題 密度および熱測定による植物ポリフェノールクロロゲン酸とモデル生体膜の相互作用の検討
3. 学会等名 2019年 日本化学会関東支部群馬地区研究交流発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 浩、星野達也
2. 発表標題 On the condensing effects of 7 α -hydroxycholesterol, 25-hydroxycholesterol, and cholesterol on DPPC bilayers
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 旺、高橋 浩
2. 発表標題 コレステロールとラノステロールによるリン脂質膜構造への影響の比較：中性・酸性リン脂質2成分系での検討
3. 学会等名 2019年度量子ビームサイエンスフェスタ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋 浩、狩野勝星
2. 発表標題 コレステロールによる脂溶性薬剤のリン脂質膜への侵入阻害効果：POPE膜での検討
3. 学会等名 日本物理学会第76回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡山杏由美、高橋 浩
2. 発表標題 リン脂質の膜構造に対するコレステロールおよびラノステロールの効果
3. 学会等名 第 11回日本生物物理学会関東支部会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------