

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790053

研究課題名（和文） ABCB4 と PEMT による細胞膜胆汁酸耐性の獲得

研究課題名（英文） Bile salt resistance of cell membrane acquired by ABCB4 and PEMT

研究代表者

森田 真也（MORITA SHIN-YA）

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20449870

研究成果の概要（和文）：ホスファチジルコリン(PC)とホスファチジルエタノールアミン(PE)は、哺乳類の細胞膜を構成する主なリン脂質である。ホスファチジルエタノールアミンメチル基転移酵素(PEMT)は、アデノシルメチオニンを利用してPEをメチル化することによりPCを合成する。PEMTにより、細胞の抱合型胆汁酸に対する耐性が上昇した。よって、PEMTは、肝細胞の胆汁酸耐性獲得において重要な働きをしていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Phosphatidylethanolamine (PE) is converted to phosphatidylcholine (PC) in the liver by PE *N*-methyltransferase (PEMT). The expression of PEMT resulted in increased resistance to conjugated bile salts. PEMT may be important in the protection of hepatocytes from bile salts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：生物物理化学

## 1. 研究開始当初の背景

(1)ATP binding cassette (ABC)トランスポーターファミリーに属するABCB4は、肝細胞の毛細胆管膜に発現している。このABCB4の変異により胆汁鬱滞や胆石症が生じ、深刻な肝疾患となることが知られている。Abcb4ノックアウトマウスでは、リン脂質を胆汁中に排出せず、門脈炎症と胆管障害が生じ、コレステロール胆石形成を進行させる。これらの肝障害は、胆汁酸の肝細胞や胆管細胞に対する毒性によるものであり、リン脂質は、胆汁酸の界面活性作用から胆管上皮を保護し、過剰なコレステロールを可溶化すると考えら

れている。しかし、細胞レベルでのABCB4に関する研究は、まだ非常に少なく、その機能に関しては不明な点が多く残されている。

(2)ホスファチジルコリン(PC)とホスファチジルエタノールアミン(PE)は、哺乳類の細胞膜を構成する主なリン脂質である。PC分子はシリンダー型であり、二分子膜の形成を促進する。一方、PE分子は頭部基が小さなコーン型をしており、非二分子膜(ヘキサゴナル構造)の形成を促すことが知られている。肝臓細胞の小胞体膜に局在する、PEメチル基転移酵素(PEMT)は、アデノシルメチオニンを利用

したメチル化反応により、PE を PC へと変換する。*Pemt* ノックアウトマウスは、コリン欠乏食により、脂肪性肝炎を進行させ、肝不全へと導かれる。しかし、*Abcb4/Pemt* ダブルノックアウトマウスでは、肝不全を逃れることが、最近報告された。この原因として、PEMT か ABCB4 のいずれか一方のみの発現により、細胞膜における PC と PE のバランスが崩れることで、膜整合性が乱れ、細胞障害が生じている可能性が考えられている。

## 2. 研究の目的

胆汁酸は、界面活性作用を有し、消化管での脂質の消化吸収を助ける働きをする。肝細胞は、胆汁酸を毛細胆管中へ分泌し、毛細胆管中での胆汁酸濃度は臨界ミセル濃度 (cmc) 以上に達している。通常の哺乳類培養細胞は、cmc 以上の胆汁酸存在下では、細胞膜が崩壊してしまい、生存できない。また、何らかの異常があり、肝細胞が胆汁酸によりダメージを受けるようになると、深刻な肝炎へと導かれる。しかし、どのようにして、肝細胞が高濃度の胆汁酸に対する耐性を獲得しているのかは、いまだ解明されていない。本研究では、リン脂質トランスポーター ABCB4 とホスファチジルエタノールアミンメチル基転移酵素 PEMT による、胆汁酸界面活性作用の低下と細胞膜整合性の維持をその要因の一つに考え、ABCB4 および PEMT の機能と胆汁酸耐性との関係について、分子生物学的手法ならびに物理化学的手法を用いて調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) ABCB4 および PEMT 安定発現細胞株の樹立

ABCB4 および PEMT 遺伝子を、薬物耐性遺伝子をもつプラスミドに組み込み、HEK293 細胞や LLC-PK1 細胞などに導入する。薬物により細胞を選択することで、ABCB4 安定発現細胞株および PEMT 安定発現細胞株を樹立させる。発現はウエスタンブロット法によりモノクローナル抗体を用いて確認する。LLC-PK1 細胞は、頂側膜と側底膜の極性をもつ細胞に分化する特性をもつ。

### (2) リン脂質酵素蛍光定量法の開発

細胞内において、リン脂質分子種は、頭部基と脂肪酸鎖の組み合わせにより、無数に存在している。頭部基の違いにより、リン脂質は、PC・PE・ホスファチジルセリン(PS)・ホスファチジルイノシトール(PI)・ホスファチジン酸(PA)・スフィンゴミエリン(SM)というように名前が付けられている。リン脂質酵素蛍光定量法とは、頭部基に特異的な数種類の酵素と蛍光基質を組み合わせることにより、検出する方法である。

### (3) ABCB4 と PEMT によるリン脂質組成変化

新たに開発したリン脂質酵素蛍光定量法により、PEMT と ABCB4 による細胞内リン脂質組成変化を詳細に網羅的に検討する。デュラマイシンは、膜中の PE に特異的に結合し、膜を崩壊へと導くペプチド化合物である。デュラマイシンによる細胞膜透過性の増加から、細胞膜中の PE 含量を評価する。

### (4) PEMT による細胞膜胆汁酸耐性の調節

シリンダー型の PC 分子は、細胞膜を安定化させる構造をしている。そこで、PC を PEMT が補うことで細胞膜整合性が維持されることを予想し、PEMT 発現細胞における細胞膜胆汁酸耐性の検討を行う。細胞膜の胆汁酸耐性に関しては、細胞内酵素の漏出により評価する。

### (5) ABCB4 と PEMT が細胞膜微細構造に与える影響

頭部基が小さいコーン型の PE は、二分子膜を不安定化させる一方、曲率を持つ細胞膜微細構造の形成には必要となる。肝細胞の胆管側膜には、微絨毛が形成されており、この微絨毛形成が胆汁酸耐性と何らかの関係がある可能性が考えられる。LLC-PK1 細胞は、分化して、微絨毛を形成することが知られている。PEMT を安定発現させた LLC-PK1 細胞における微絨毛形成について、走査型電子顕微鏡観察により調べる。これにより、細胞膜中の脂質組成と微絨毛形成の関係を明らかにする。脂質ラフトは、細胞膜上のコレステロールと SM に富むマイクロドメインであり、界面活性剤トリトン X-100 不溶性画分として見出された。ABCB4 はリン脂質の排出とともにコレステロールの排出も促進しているため、ABCB4 の脂質排出活性がラフト構造に影響を受けていることは、十分に考えられる。ラフト構造が ABCB4 の活性にどのように影響しているのか、また逆に ABCB4 と PEMT による細胞膜脂質組成変化がラフト構造に影響を与えているのかについて検討を行う。

## 4. 研究成果

(1) まず、PEMT 発現による細胞内脂質量の変化について酵素定量法により検討を行ったところ、PEMT 発現により細胞内 PC 量が増加し、PE 量は減少した。また、ESI-MS/MS により PC および PE のアシル鎖分析を行ったところ、PEMT 発現により主に長鎖脂肪酸をもつ PC およびエーテル結合型 PC が形成されていた。デュラマイシンは、環状ペプチド化合物で、膜中の PE に結合し、膜を崩壊へと導くことが知られている。PEMT 安定発現細胞では、デュラマイシンに対する耐性が増加したことから、細胞膜の PE が減少していることが

確認された。また、走査型顕微鏡を用いて細胞表面の微絨毛観察を行ったところ、PEMT 発現により微絨毛が太くなっていることが明らかとなった。そして、PEMT が細胞膜の胆汁酸耐性に与える影響について調べたところ、PEMT 安定発現細胞では、非抱合型胆汁酸(コール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸)に対する耐性は低下したが、抱合型胆汁酸(タウロコール酸、グリココール酸、タウロデオキシコール酸、グリコデオキシコール酸、タウロケノデオキシコール酸、グリコケノデオキシコール酸)に対する耐性は上昇した。この原因として、PEMT 発現により、細胞表面のリン脂質組成ならびに微絨毛構造が変化したことが挙げられる。毛細胆管中の大半の胆汁酸が抱合型として存在しているため、PEMT は、肝細胞の胆汁酸耐性獲得において重要な働きをしていると考えられる。

(2) ABCB4 および ABCB1 は、ラフト画分に比べ、非ラフト画分に多く局在していた。ABCB4 の発現により、非ラフト画分では、PC・PE および SM が増加し、Chol は変化しなかった。一方、ラフト画分では、ABCB4 の発現によって SM と Chol が増加し、PC と PE は変化しなかった。ABCB1 発現では、ラフト画分の Chol のみわずかに増加したが、他の脂質に有意な変化はなかった。タウロコール酸により、ABCB4 発現細胞からの PC と Chol の排出が著しく促進され、PE と SM の排出もわずかだが有意に増加した。ABCB4 発現細胞からのこれらの脂質排出は、非ラフト画分に分布する BODIPY-ベラパミルの添加によって完全に阻害された。しかし、ABCB1 基質である BODIPY-ベラパミルの細胞内蓄積量に、ABCB4 発現は影響を与えなかった。以上の結果より、ABCB4 は、細胞膜脂質組成を変化させることでラフト形成に影響を与え、非ラフトに局在する ABCB4 が、脂質排出において主に機能していると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

① 森田真也

生体膜リン脂質研究による疾患発症メカニズム解明  
薬剤学 72, 101-105 (2012) 査読無

② Shin-ya Morita, Sachimi Shirakawa, Yukiko Kobayashi, Keiko Nakamura, Reiko Teraoka, Shuji Kitagawa, Tomohiro Terada  
Enzymatic measurement of phosphatidylserine in cultured cells

J. Lipid Res. 53, 325-330 (2012) 査読有

③ Shin-ya Morita, Noriaki Ikeda, Manami Horikami, Kuriko Soda, Kosuke Ishihara, Reiko Teraoka, Tomohiro Terada, Shuji Kitagawa

Effects of phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase on phospholipid composition, microvillus formation and bile salt resistance in LLC-PK1 cells  
FEBS J. 278, 4768-4781 (2011) 査読有

④ Shin-ya Morita, Atsushi Sakurai, Minoru Nakano, Shuji Kitagawa, Tetsuro Handa

Presence of apolipoprotein C-III attenuates apolipoprotein E-mediated cellular uptake of cholesterol-containing lipid particles by HepG2 cells  
Lipids 46, 323-332 (2011) 査読有

⑤ Shuji Kitagawa, Kenta Yoshii, Shin-ya Morita, Reiko Teraoka

Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage  
Chem. Pharm. Bull. 59, 793-796 (2011) 査読有

⑥ Shin-ya Morita, Atsuko Takeuchi, Shuji Kitagawa

Functional analysis of two isoforms of phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase  
Biochem. J. 432, 387-398 (2010) 査読有

⑦ Yasuhito Shirai, Takeshi Kouzuki, Kenichi Kakefuda, Shigeki Moriguchi, Atsushi Oyagi, Kyoji Horie, Shin-ya Morita, Masamitsu Shimazawa, Kohji Fukunaga, Junji Takeda, Naoaki Saito, Hideaki Hara

Essential role of neuron-enriched diacylglycerol kinase (DGK), DGKb in neurite spine formation, contributing to cognitive function  
PLoS ONE 5, 7 (2010) 査読有

⑧ Shuji Kitagawa, Kana Inoue, Reiko Teraoka, Shin-ya Morita

Enhanced skin delivery of genistein and other two isoflavones by microemulsion and prevention against UV  
Chem. Pharm. Bull. 58, 398-401 (2010)

査読有

〔学会発表〕(計26件)

- ① 濱田亮太、寺岡麗子、湯谷玲子、**森田真也**、北河修治  
カルバマゼピン Cocrystal の光安定性評価  
日本薬学会第132年会、2012年3月28日、北海道
- ② 北河修治、長谷川巧、久知佳、湯谷玲子、**森田真也**、寺岡麗子  
種々の抗酸化性薬物の皮膚取り込み及び経皮吸収とマイクロエマルジョンによる促進  
第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2011年11月24日、岡山
- ③ 湯谷玲子、川上健太、菊池武友、**森田真也**、寺岡麗子、北河修治  
エアロゾルOT マイクロエマルジョンを用いたポリフェノールの皮膚デリバリー—他の界面活性剤を用いたマイクロエマルジョンとの比較—  
第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2011年11月24日、岡山
- ④ **Shin-ya Morita**, Sachimi Shirakawa, Yukiko Kobayashi, Keiko Nakamura, Reiko Teraoka, Shuji Kitagawa, Tomohiro Terada  
New method for measuring phosphatidylserine  
iCeMS International Symposium ABC2011 in Kyoto、2011年11月16日、京都
- ⑤ **Shin-ya Morita**, Noriaki Ikeda, Kosuke Ishihara, Kuriko Soda, Reiko Teraoka, Tomohiro Terada, Shuji Kitagawa  
Effect of phosphatidylethanolamine *N*-methyltransferase on hepatocellular resistance to bile salts  
The Liver Meeting 2011、2011年11月4日、サンフランシスコ (アメリカ合衆国)
- ⑥ **森田真也**、白川祥実、小林由希子、中村恵子、寺岡麗子、寺田智祐、北河修治  
ホスファチジルセリン酵素定量法の開発  
フィジカルファーマフォーラム 2011、2011年9月12日、箱根
- ⑦ 熊谷純之介、寺岡麗子、**森田真也**、北河修治  
シクロデキストリン包接化によるクロロゲン酸の熱安定性の改善  
第28回シクロデキストリンシンポジウム、2011年9月8日、秋田
- ⑧ **森田真也**、津田忠典、堀上愛真、寺岡麗子、寺田智祐、北河修治  
非ラフト局在 ABCB4 による脂質排出  
第6回トランスポーター研究会年会、2011年6月11日、仙台
- ⑨ **森田真也**、池田憲亮、石原康佑、祖田久里子、寺岡麗子、北河修治  
ホスファチジルエタノールアミンメチル基転移酵素 (PEMT) による細胞膜胆汁酸耐性の獲得  
日本膜学会第33年会、2011年5月12日、東京
- ⑩ 石川かおり、脇村枝美、**森田真也**、寺岡麗子、北河修治  
マイクロエマルジョンと L-メントールによる (-)エピカテキンの皮膚デリバリーの改善  
日本薬学会第131年会、2011年3月29日、静岡
- ⑪ 津田忠典、**森田真也**、堀上愛真、寺岡麗子、北河修治  
MDR1 と MDR3 の脂質ラフト局在性と機能の関係  
日本薬学会第131年会、2011年3月29日、静岡
- ⑫ 白川祥実、**森田真也**、小林由希子、中村恵子、寺岡麗子、北河修治  
ホスファチジルセリン酵素定量法の開発  
日本薬学会第131年会、2011年3月29日、静岡
- ⑬ 浅田裕美子、寺岡麗子、都出千里、**森田真也**、北河修治  
 $\beta$ -シクロデキストリンおよびその誘導体の包接化による高湿度条件下での塩酸ラニチジンの安定性の改善  
日本薬学会第131年会、2011年3月29日、静岡
- ⑭ 長谷川巧、寺下美帆、**森田真也**、寺岡麗子、北河修治  
薬物の皮膚取り込みにおける分子量、疎水性への依存と皮膚中分布  
日本薬学会第131年会、2011年3月29日、静岡
- ⑮ 寺下美帆、長谷川巧、**森田真也**、寺岡麗子、北河修治  
Aerosol-OT マイクロエマルジョンによるコエンザイム Q10 の皮膚デリバリー  
日本薬学会第131年会、2011年3月29日、静岡

- ⑩ 脇村枝美、石川かおり、**森田真也**、寺岡麗子、北河修治  
Tween80、Aerosol-OT を用いたマイクロエマルジョンによるタンニン酸、(-)エピカテキンの皮膚デリバリー  
日本薬学会第131年会、2011年3月29日、静岡
- ⑪ **Shin-ya Morita**, Atsuko Takeuchi, Shuji Kitagawa  
Functions of PEMT analysed by novel enzymatic assays and mass spectrometry  
Biochemical Society Annual Symposium-Recent Advances in Membrane Biochemistry, 2011年1月5日、ケンブリッジ (イギリス)
- ⑫ 白川祥実、**森田真也**、小林由希子、中村恵子、寺岡麗子、北河修治  
ホスファチジルセリン酵素定量法の開発  
第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2010年11月29日、富山
- ⑬ 池田憲亮、**森田真也**、寺岡麗子、北河修治  
PEMT 発現による細胞膜胆汁酸耐性の変化  
第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2010年11月29日、富山
- ⑭ 津田忠典、**森田真也**、堀上愛真、寺岡麗子、北河修治  
MDR1 と MDR3 の脂質ラフト局在性と機能の関係  
第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2010年11月29日、富山
- ⑮ 浅田裕美子、寺岡麗子、**森田真也**、北河修治  
シクロデキストリン包接化による高湿度条件下での塩酸ラニチジンの安定性の改善  
第27回シクロデキストリンシンポジウム、2010年9月6日、金沢
- ⑯ 駒橋美妃、寺岡麗子、**森田真也**、北河修治  
錠剤の半錠分割精度に影響を及ぼす要因の検討  
第20回医療薬学会年会、2010年11月13日、幕張
- ⑰ 池田憲亮、**森田真也**、寺岡麗子、北河修治  
PEMT 発現による細胞膜胆汁酸耐性の変化  
日本薬学会第25年会、2010年5月12日、徳島
- ⑱ 津田忠典、**森田真也**、寺岡麗子、北河修治  
MDR1 と MDR3 の脂質ラフト局在性と機能の

関係

日本薬学会第25年会、2010年5月12日、徳島

- ⑲ Reiko Teraoka, Yumiko Asada, **Shin-ya Morita**, Shuji Kitagawa  
Effect of Cyclodextrin complexation on the chemical stability of ranitidine HCl in the solid state at humid condition  
15<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium, 2010年5月10日、ウィーン(オーストリア)

- ⑳ **森田真也**、北河修治  
リン脂質蛍光酵素定量法を用いた PEMT の機能解析  
第52回日本脂質生化学会、2010年6月14日、伊香保

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ホスファチジルセリンの定量方法及び定量用キット

発明者: **森田真也**

権利者: 国立大学法人滋賀医科大学

種類: PCT 国際出願

番号: PCT/JP2011/077049

出願年月日: 2011年11月24日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 真也 (MORITA SHIN-YA)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 20449870