

令和元年5月14日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05509

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) A model system study to explore the biological reason for the difference in cholesterol content of biological membranes

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体膜におけるコレステロール(Chol)含量は一定でなく、それぞれの膜ごとに違いがある。本研究では薬剤代謝プロセスに注目して、このChol含量差の意義を探求した。薬剤の多くは、肝細胞の小胞体膜に存在する膜タンパク質シトクロムP450(CYP)で代謝されが、先行研究は、薬剤が、小胞体膜の疎水性内部にまず侵入する必要性を報告している。本研究で、我々は、Chol含量が高いモデル生体膜は、小胞体膜を模倣したChol含量が低い膜と比較して、CYP基質薬剤クロルゾキサゾンの膜への結合・侵入を阻害することを見出した。この結果は、Chol含量差は薬剤代謝にとって意味がある可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の研究から、コレステロールは、脂質膜の力学的強度の増強や流動性を調整し、さらに、ラフト・ドメインと呼ばれる細胞内情報伝達で重要な役割を果たすと考えられている脂質ドメインの形成にとって不可欠であることが知られていた。これらのコレステロールの生体機能に加えて、本研究の結果は、シトクロムP450が関与する薬剤代謝過程においても、コレステロールが重要な役割を果たしている可能性が示めされた。このような指摘は本研究が初めてのものである。本研究から結果は、小胞体や形質膜に似せた膜を作り、それぞれの膜系へ薬の侵入度の測定から、新規薬物の副作用度を評価することが可能であることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Cholesterol (Chol) content in biological membranes is not constant, and there is a difference in each the membrane. In this study, we focused on the drug metabolism process and explored the significance of this Chol content difference. Although many of the drugs are metabolized by the membrane protein cytochrome P450 (CYP) present in the endoplasmic reticulum membrane of hepatocytes, previous studies have reported that the drug first needs to penetrate the hydrophobic interior of the endoplasmic reticulum membrane There is. In this study, we found that a model biomembrane with a high Chol content inhibits the binding and entry of the CYP substrate drug chlorzoxazone into the membrane, compared to a membrane with a low Chol content that mimics the endoplasmic reticulum membrane. This result suggests that Chol content difference may be meaningful for drug metabolism.

研究分野：生物物理学

キーワード：コレステロール リン脂質 膜物性 生体膜モデル系 ホスファチジルコリン 薬剤代謝

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

### 1. 研究開始当初の背景

生命の基本である細胞は生体膜から作られている。細胞を構成する、細胞膜、核などの細胞内小器官は、全て膜からなる。生体膜は、親水性の極性頭部と疎水性の炭化水素鎖からなる脂質分子が、その両親倍性の性質により水中で自己集合した結果、形成されるリン脂質二重層膜に、機能の直接の担い手である各種の膜タンパク質が組み合わさって出来上がっている。生体膜における脂質膜の役割は、内と外を分けるバリア機能と、膜タンパク質に対して適度な流動的な環境を与えることの2つがまず考えられる。

生物にとって、脂質膜の機能がこれだけで良いのであれば、それを実現するには、1種類ないしは数種類の化学種の脂質で十分である。しかし、実際の生体膜を構成する脂質の化学種の種類は、数多く、約10万種を超える(Yetukuri et al., *Mol. BioSyst.* 4 (2008) 121-127.)とも言われている。生物の長い進化の結果、これだけの化学種の分子が必要とされてきたのであろうが、人類は、まだ、それらが必要とされる理由の詳細を理解していない。脂質分子の多様性は生体膜の研究の最大の課題の1つである。

生体膜に含まれる脂質成分は、リン脂質、糖脂質、セラミドなどと、コレステロールなどのステロール類である。これらのうち、リン脂質、糖脂質、セラミドは、極性頭部と疎水鎖から成ることは共通していて、似た形の分子である。一方、ステロール類は、他の脂質とは分子形状、性質がかなり異なる。本研究では、コレステロールという異質の分子を生体膜が必要とした理由を理解したい。

従来の研究により、脂質膜の力学的強度の増強や流動性の調整に、コレステロールは重要な役割を果たしていることが分かっている。加えて、流動的な膜を漂う比較的流動性の低いラフト・ドメインと呼ばれる脂質ドメインの形成に、コレステロールが不可欠であるという事実が、最近注目されている。このテーマは、細胞内情報伝達への関連を含め、今日盛んに研究されている。

細胞内には、形質膜をはじめとして、様々な生体膜存在する。これらの各生体膜では、コレステロール含量が異なっている。具体的には、真核細胞において、コレステロール濃度は、ミトコンドリア膜および小胞体膜について、それぞれ約3~5 wt% (6~10 mol%) および約6~10 wt% (12~20 mol%) である。一方、原形質膜および他の細胞内オルガネラの生体膜については、コレステロール含有量は、約10~20 wt% (20~40 mol%) である。

この小胞体膜におけるコレステロールの低い含有量と、肝細胞中の小胞体膜で膜タンパク質シトクロム P450(CYP)行われる薬剤代謝との関連に注目する。

ミクロソームの CYP は、化合物を酸化することによって異物の化学物質や薬物の代謝に重要な役割を果たす。CYP による酸化は薬の極性の増加を引き起こし、その結果、酸化された薬は尿と共に容易に体外へ排泄される。CYP は、主に小胞体膜に局在している。

最近のいくつかの研究は、生体膜の脂質二重層膜も CYP に関連する薬物代謝プロセスに関与していることを示している。ミクロソーム CYP は貫通ヘリックスを有する膜タンパク質であり、そのヘリックスによって CYP は小胞体膜の脂質二重層に固定される。現在までに、様々な CYP の結晶構造が報告されている。その構造は、哺乳動物の CYP ではほぼ共通で保存されている。活性部位からタンパク質表面へ続く異なるトンネルが CYP 結晶構造中に認識されている。この知見から、活性部位への薬物のアクセスおよび活性部位からの酸化された薬物の放出は、それぞれ異なるトンネルが関与していることが提案された。これらのトンネルはチャンネルとも呼ばれている。最近の分子動力学シミュレーション研究は、薬剤を活性部位へ導くアクセスチャンネルの存在を示唆し、さらに、そのチャンネルの入口が脂質二重層の疎水性領域に位置することを推定している。

以上の研究から、CYP が関与する薬剤代謝に関して、次のようなプロセスが想定される。第一段階では、CYP 基質薬物は生体膜の脂質二重層膜の表面に結合し、そして第二段階では、薬物は脂質二重層膜の疎水性領域に侵入する。最終ステップでは、薬物はアクセスチャンネルを通じて活性部位に到達する。活性部位での酸化反応の後、酸化された薬物は他のチャンネル(溶媒チャンネル)を通してその部位から放出される。

### 2. 研究の目的

上記の研究は、生体膜の脂質膜も、また、CYP に関連する薬物代謝において役割を果たすことを示している。CYP による薬物の代謝は主に小胞体膜で起こるが、CYP 基質薬物が CYP を含有する小胞体膜に、効率的に導かれるための工夫を、長い進化の中で生物が洗練させていったことは当然予想される。

我々が注目したのは、各生体膜のコレステロール含有量の差である。小胞体膜の低いコレステロールレベル含有量が、CYP に関連する薬物代謝プロセスにおいて有利であると仮説を立てた。我々の研究の最終的な目標は、細胞系で実際の生体膜で実験を行い、上記の仮説を確認することである。しかし、実際の生体は極めて複雑である。本研究では、モデルシステムを使用して上記の仮説を検討することとした。すなわち、本研究の具体的な目的の1つは、リン脂質からなるモデル生体膜(脂質二重層膜)への CYP 基質薬物の結合または侵入に対するコレステロール濃度の影響を明らかにすることである。その結果をもとに、小胞体膜における低いコレステロール含量の意義について考える。

### 3. 研究の方法

この研究では、CYP 基質薬剤として、中枢作用型の筋弛緩薬で、肝臓に特異的な CYP2E1 で酸化代謝されるクロルゾキサゾン (CZX) を使用した。モデル膜のリン脂質成分として 1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルコリン (POPC) を選択した。ホスファチジルコリン (PC) は哺乳動物の生体膜の主要なリン脂質成分の 1 つであり、生体膜中の PC 分子は 1 つの不飽和脂肪酸アシル鎖を持つため、PC の中でも、特に、POPC を選択した。また、一部の実験では、哺乳動物の生体膜で 2 番目に多いリン脂質、ホスファチジルエタノールアミン (PE) も使用した。疎水鎖は、POPC と同じとし、そのため POPE を選択した。

【実験方法】CZX とリン脂質膜の結合に対する Chol 含量の影響は、遠心分離法と透析法で行った。CZX の濃度決定は紫外可視分光測定で行った。そのために、まず、CZX のモル吸光度係数の決定を行った。これらの測定では、CZX と膜の結合は評価できるが、CZX の膜への侵入の程度に関しては、なんらの情報も得られない。そこで、多重層膜ベシクル試料で得られた X 線回折強度データから、モデルを用いて電子密度分布を再構成して、CZX の膜の侵入割合を評価した。解析には、箱型関数にガウス関数を畳み込んで作製した電子密度分布モデルを使用した。データ点を稼ぐために、多重層膜ベシクル膜の水層の厚さを水溶性中性高分子ポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone、PVP) による浸透圧によって変化させた試料を複数用意した。それらの複数の試料が得られた回折強度データを一緒にしてデータ処理した。

### 4. 研究成果

(1) まず、CZX のモデル生体膜リン脂質膜の結合に対する Chol 含量の影響を、遠心分離法と透析法で調べた。遠心分離法では、リポソーム試料を遠心で沈殿させ、上澄み溶液中に残ったリポソームに結合しなかった CZX の量を、紫外可視分光測定で決定した。図 1 に結果を示した。リファレンス、つまり、リポソームのない系を基準に考えると、脂質成分として 30mol% の Chol の存在は、CZX が POPC 膜に結合する量を減少させることが分かった。

同様な実験を POPE/Chol 系に対して、透析法で調べた。通常のリポソームは通貨できないが、CZX 分子は通貨できる大きさのポアを持つ透析膜を使い、透析後の透析膜の外側の溶液にある紫外可視分光測定で調べ、リポソームに捕捉された CZX の割合を計算した。この結果は図 2 に示した。高濃度の Chol が POPE 膜への CZX の結合を阻害する傾向があることは、先の POPC の場合と同じであるが、興味深いことは、Chol 濃度に応じて、2 相性が示されたことである。つまり、10mol% 程度の低濃度の Chol の存在は、Chol が無しの場合と比較して、より CZX の捕捉量が高く、その後、Chol 濃度の上昇に伴い、捕捉量が低下する結果となった。

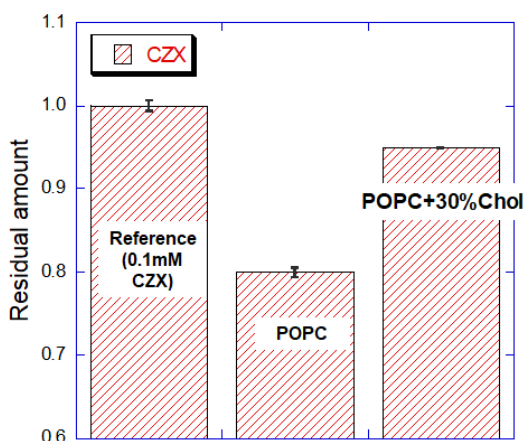


図 1 POPC 膜への CZX の結合に対する Chol の阻害。縦軸は、リファレンス系の吸光度 (CZX 濃度 0.1mM) を 1.0 に規格した時の purePOPC 系、POPC+30mol%Chol 系での上澄み溶液での吸光度。すなわち、ベシクルの結合しなかった CZX の量 (Residual amount) に対応。

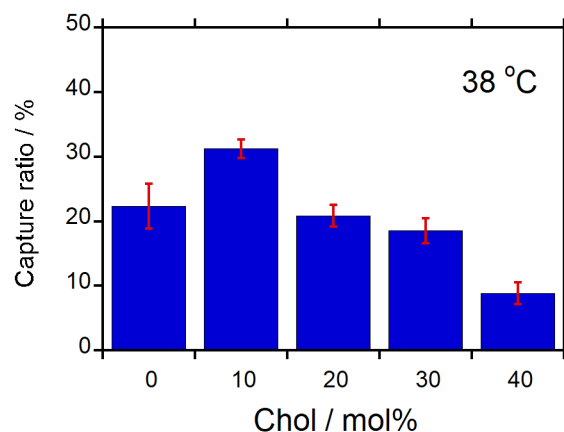


図 2 透析法で決定した POPE/Chol 多重層ベシクルの CZX の補足量の Chol 濃度依存性。捕捉率は、10mol% で最大となり、その後は、Chol 含量の増加に伴い、CZX の捕捉は減少した。明らかに、2 相性を示している。

上記の実験に、加えて X 線回折によって、別の角度から検討を進めた。図 3 には、purePOPC 系および Chol を含む POPC 系の中角から広角領域にかけての X 線回折パターンを示した。図 3 に示した全ての試料で、水含量および CZX 含量は同じである。また、脂質全体 (POPC + Chol) と CZX のモル比は全て 7:3 である。Chol を 30mol% 以上の高濃度で添加した系では、CZX の結晶由来の反射ピークが観察されている。一方、Chol 濃度が 10mol% 以下では、CZX の結晶反射は観察されない。リン脂質膜に取り込まれなかった CZX は、水中に存在することになるが、

CZX の溶解度は低く (約 1.5mM) ため、水が十分存在しない時は結晶として析出する。したがって、この結果は、先の遠心分離法や透析法で得られた結果と同じく、高濃度 (30mol% 以上) の Chol は、CZX が POPC 膜に結合・侵入を阻害すると解釈できる。

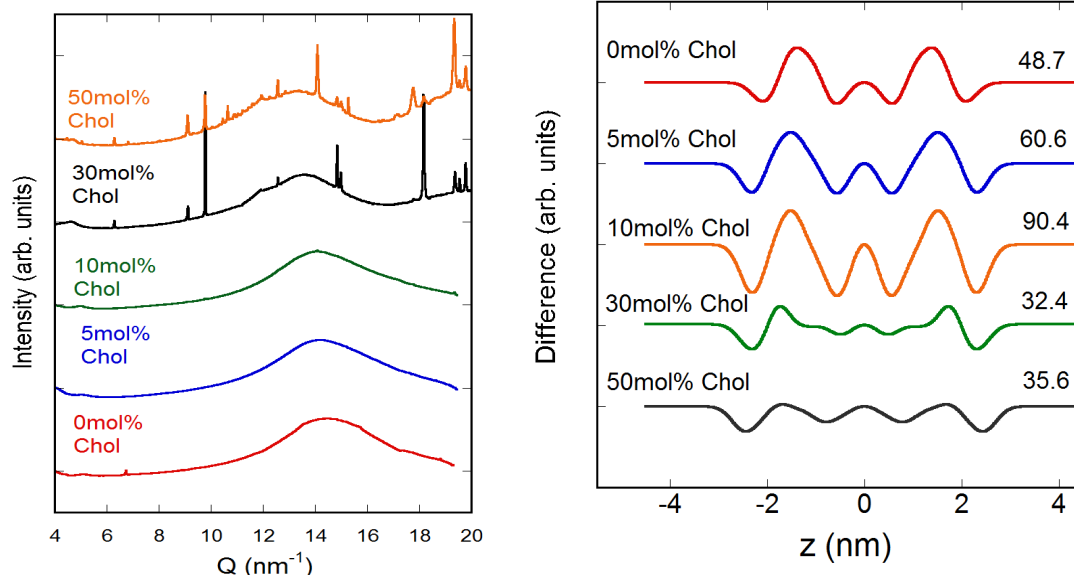


図 3 : POPC/Chol/CZX 系の広角 X 線回折像。Chol のモル濃度は図中に示した。

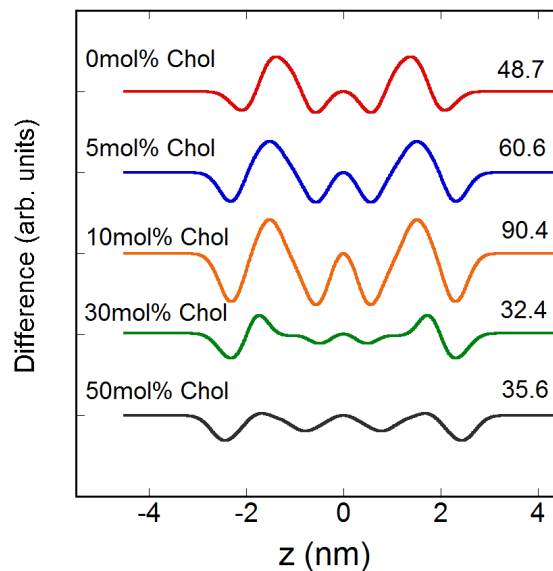


図 4 : POPC/Chol/CZX 系の電子密度分布から CZX を含まない POPC/Chol 系の電子密度分布を差し引いたプロファイル。Chol のモル濃度は各プロファイルの左側に示した。

このことをより詳しく解析するために、CZX を含む場合と CZX を含まない場合の両方で、膜面の法線方向の 1 次元電子密度分布を求めた。CZX を含む場合の電子密度からの CZX を含まない場合の電子密度分布を差し引いたものを図 4 に示した。CZX の存在によって、膜中における Chol の分布も変化する可能性があるため、図 4 に示した電子密度分布の差が直接的に CZX の膜内での分布状況を表す訳ではないが、差が大きいのことは、それだけ CZX が膜に大きな影響を与えた、つまり、より多くの CZX が POPC 膜に結合・侵入したことを示している。図 4 の各プロファイルの横に示した数字が、差の絶対値を積分した値である。この値が大きいのほど、CZX が膜中に存在することを示している、と解釈することができる。結果は、小胞体膜の Chol 濃度に近い、10mol% で最も大きな数字となっている。

モデル系での実験ではあるが、本研究の結果からは、小胞体膜の Chol 濃度 (5 - 10mol%) は、CYP の薬剤代謝のプロセスにとって最適なものになっている可能性が示唆される。今後、より生体に近い系で実験を行う必要がある。

(2) 本研究成果に関連して、本研究で洗練した X 線解析手法は、脂質分子集合体における重水効果の研究、および、部分フッ素化リン脂質と膜タンパク質の相互作用の研究においても、適用し成果を上げた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Hiroshi Takahashi, Masaru Yoshino, Kohei Morita, Toshiyuki Takagi, Yasunori Yokoyama, Takashi Kikukawa, Hideki Amii, Toshiyuki Kanamori, Masashi Sonoyama, Stability of the two-dimensional lattice of bacteriorhodopsin reconstituted in partially fluorinated phosphatidylcholine bilayers, *Biochimica Biophysica Acta - Biomembranes* Vol. 1861 (2019) 631-642 査読有

DOI:10.1016/j.bbamem.2018.12.015

Hiroshi Takahashi, Kotaro Jojiki, Water isotope effect on the lipidic cubic phase: Heavy water induced interfacial area reduction of monoolein-water system, *Chemistry and Physics of Lipids*, Vol.208 (2017) 52-57. 査読有

DOI:10.1016/j.chemphyslip.2017.09.001

Ayumi Yamada, Nobutaka Shimizu, Takaaki Hikima, Masaki Takata, Toshihide Kobayashi, Hiroshi Takahashi, Effect of Cholesterol on the Interaction of Cytochrome P450 Substrate Drug Chlorzoxazone with the Phosphatidylcholine Bilayer, *Biochemistry*, Vol.55 (2016) 3888-3898. 査読有

DOI:10.1021/acs.biochem.6b00286

[学会発表](計 9 件)

狩野勝星、高橋 浩、リン脂質膜による薬剤クロルゾキサゾン捕捉量とコレステロール濃度との相関、第 8 回日本生物物理学会関東支部会、2019 年

Hiroshi Takahashi, Shusei Kano, Phospholipid species dependence of cholesterol inhibition effect on the bind of chlorzoxazone to lipid membrane, The 56th Annual Meeting of The Biophysical Society of Japan, 2018 年

Masaru Yoshino, Hiroshi Takahashi, Yasunori Yokoyama, Toshiyuki Takagi, Hideki Amii, Toshiyuki Kanamori, Takashi Kikukawa, Masashi Sonoyama, Thermal Stability of the Hexagonal Lattice Packing Structure of Bacteriorhodopsin in Partially Fluorinated Phospholipid Bilayers, The 59th International Conference on the Bioscience of Lipids, 2018 年

高橋 浩、定直 高太郎、水和モノオレイン脂質立方相における重水置換による界面面積縮小現象、日本物理学会第 73 回年次大会、2018 年

Hiroshi Takahashi, Interaction between cholesterol-containing phosphatidylethanolamine bilayers and cytochrome P450 substrate drug chlorzoxazone, The 55th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2017 年

Hiroshi Takahashi, Cholesterol effect on the interaction between phospholipid bilayers and chlorzoxazone, The 58th International Conference on the Bioscience of Lipids, 2017 年

高橋 浩、シトクロム P450 基質薬剤と細胞膜内層主要リン脂質から成るモデル膜との相互作用、日本物理学会第 72 回年次大会 2017 年

山田安由美、清水伸隆、引間孝明、高田昌樹、小林俊秀、高橋 浩、高濃度コレステロールは薬剤クロルゾキサゾンのリン脂質膜への結合を阻害する、2016 年度量子ビームサイエンスフェスタ、2017 年

Hiroshi Takahashi, Interaction between cytochrome P450 substrate drug chlorzoxazone and phosphatidylethanolamine model membranes, The 54rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2016 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。