

コレステロールの存在による薬剤クロルゾキサゾンのリン脂質膜への結合・侵入阻害

High cholesterol concentration inhibits the binding and insertion of chlorzoxazone (muscle relaxant agent) to phospholipid bilayer membranes

山田安由美, 高橋 浩*

群馬大学大学院理工学府 理工学基盤部門, 〒371-8510 前橋市荒牧町 4-2

Ayumi Yamada and Hiroshi Takahashi*

Division of Pure and Applied Science, Graduate School of Science and Technology, Gunma University, 4-2 Aramaki, Maebashi, 371-8510, Japan

1 はじめに

多くの薬剤は、小胞体膜に存在するタンパク質・シトクロム P450 (CYP) によって酸化・代謝される。

膜結合部分を欠く CYP の結晶構造および、他の実験の結果から、CYP 全体は、 α ヘリックスから成る膜貫通部分と表面の半分が親水的で、疎水性内部に活性部位を持つ膜表面結合部から構成されることが分かっている。さらに、CYP の膜結合面から活性部位へ繋がる薬剤が通ることが出来るチャンネルと呼ばれる空隙と、活性部位から CYP 表面に繋がる酸化された薬剤が放出されるチャンネル (空隙) が存在することが明らかになってきている。薬剤を活性部位へ導くチャンネルの入口は、脂質二重層膜の親水・疎水部界面領域付近に存在すると分子動力学計算からは結論された[1]。この結果から、CYP で代謝される薬剤は、まず、小胞体膜の脂質二重層膜に結合し、膜の内に侵入し、その後、チャンネルを介して CYP の活性部位へ辿り着くというプロセスを経て代謝されると考えられている[1]。

CYP 基質薬剤の多くは疎水的性質が強いので、まず脂質膜に結合するという上記のプロセスは妥当なものである。しかし、CYP が存在しない小胞体膜以外の他の細胞膜小器官の膜に CYP 基質薬剤が結合すると、酸化代謝する酵素が、その膜には存在しないため、薬剤が膜に留まり続け、膜本来の機能を阻害すると考えられる。生物は進化の過程のなかで、CYP 基質薬剤を効率的に小胞体膜に結合させる仕組みを獲得したと思える。

その仕組みに関して、我々は膜におけるコレステロール (Chol) 含量が関連しているとの仮説を立てた[2]。それは次の事実に基づく。各細胞内小器官の膜の Chol 濃度の互いに異なっている。細胞膜をはじめとして、小胞体膜以外の細胞内小器官の膜の多くの Chol 濃度は 30–50mol% であるのに対して、小胞体膜は、5–10mol% と Chol 濃度が低いことが特徴である[3]。これら事実から、Chol 濃度が高い膜には、CYP 基質薬剤は、結合・侵入しにくいのではないかと考えたのである[2]。

この仮説を、最終的には、実際の細胞で確かめたいが、実際の細胞は極めて複雑なシステムであるために、本研究ではモデル系を使って実験することにした。具体的には、1 種類のリン脂質と Chol からなるモデル膜に、CYP 基質薬剤の 1 つであるクロルゾキサゾン (CZX) の結合・侵入が、Chol 濃度によって影響を受けるかを探ることにした。リン脂質には、動物細胞で最も多くみだされる 1 位に飽和脂肪酸鎖を、2 位に不飽和脂肪酸鎖を持つホスファチジルコリン (PC) の内で、パルミトイルオレオイル-PC (POPC) を使用することにした。

2 実験

リン脂質 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-*sn*-3-Glycero-Phosphocholine (POPC) は Avanti Polar Lipids 社及び日油 (株)、コレステロール (Chol) と Polyvinylpyrrolidone (PVP) (平均分子量 40000 g/mol) は Sigma-Aldrich 社、クロルゾキサゾン (CZX) は東京化成(株)から、それぞれ購入した。

POPC および Chol は、クロロホルムに 10 mM の濃度で溶解させ、CZX はクロロホルム：メタノール (2 : 1) に 5 mM で溶解させ、それぞれの貯蔵溶液を準備した。目的のモル比になるように、各貯蔵溶液を混合後、溶媒を蒸発させた。その後、乾燥した脂質フィルムに水を加え、室温で攪拌することで水和させ、マルチラメラベシクル (MLV) を調製した。ラメラ間に浸透圧を加えるために、PVP 水溶液に分散させた試料も用意した。PVP 水溶液の濃度は、0%、20%、30%、40%、50% の 5 種類とした。全ての試料において、脂質と水 (PVP 水溶液) の重量比は、1:3 に固定した。

X 線回折実験は、高エネルギー加速器研究機構・放射光科学研究施設 BL-10C および 6A で行った。カメラ長は 10C では約 0.5 m、6A で小角と広角同時測定を実施し、小角でのカメラ長は約 1m、広角では約 0.4m のカメラ長を使用した。波長は 1.5 Å、検出器は PILATUS2M、1M および 100K を用いた。ガウス関数で平滑化した箱型電子密度分布モデルを仮定

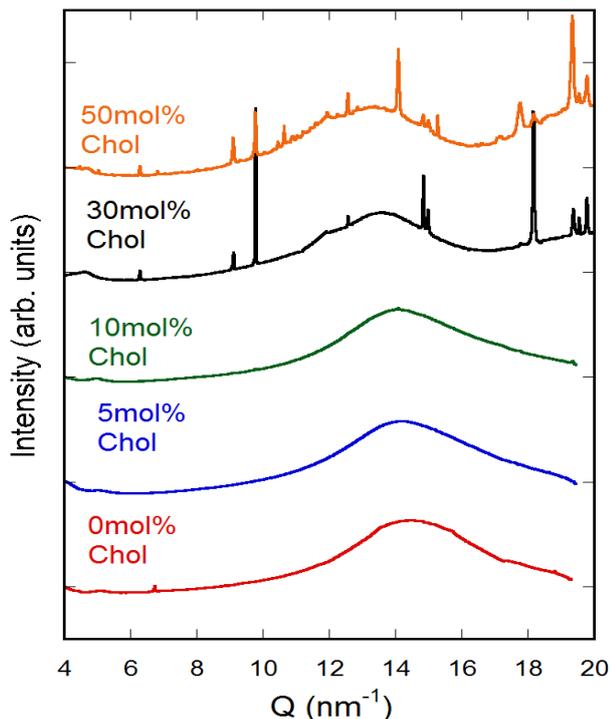


図1 : POPC/Chol/CZX系の広角 X線回折像。
Cholのモル濃度は図中に示した。

し、そのモデルから計算される強度を実測のものと比較して、最適モデル電子密度分布を求めた。その際、純水に分散した場合だけでなく、PVP水溶液に分散させ浸透圧を加えた MLV 試料のデータも含め解析を行った[2]。

3 結果および考察

図1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1に示した全ての試料で水含量、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、高濃度(30mol%以上)のCholが、CZXがPOPC膜に結合・侵入を阻害したと解釈できる。

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2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2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、

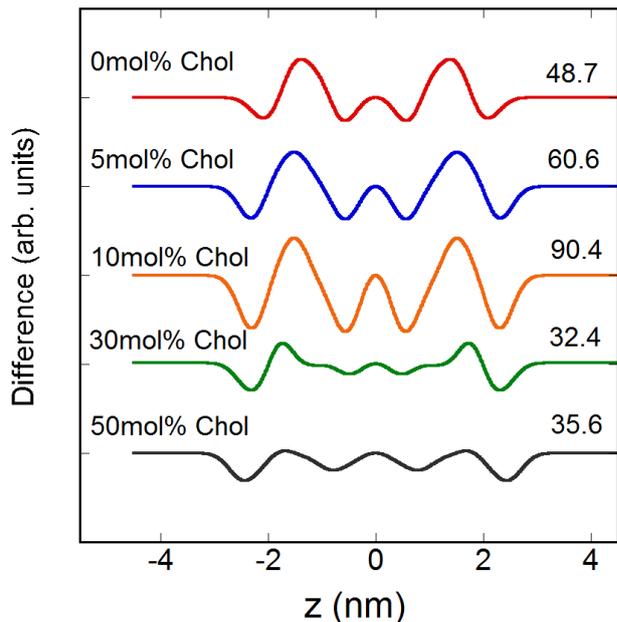


図2 : POPC/Chol/CZX系の電子密度分布からCZXを含まないPOPC/Chol系の電子密度分布を差し引いたプロファイル。Cholのモル濃度は各プロファイルの左側に示した。

差が大きいということは、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2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計画である。

謝辞 (オプショナル)

PFスタッフの方々、特に清水伸隆准教授、五十嵐准教授の光学系調整、検出系システムの改善があってこそ出来た研究結果です。ここに感謝致します。

参考文献

- [1] M. Paloncýová *et al.*, *J. Phys. Chem. B* **117**, 2403 (2013).
- [2] A. Yamada *et al.*, *Biochemistry* **55**, 3888 (2016).
- [3] G. van Meer & A.I. de Kroon, *J. Cell. Sci.* **124**, 5 (2011).

* hirotakahashi@gunma-u.ac.jp