

シトクロム P450 基質薬剤の脂質膜への侵入のコレステロールによる阻害：リン脂質ホスファチジルエタノールアミン膜での検討

Inhibition of cytochrome P450 substrate drug entry into lipid membranes by cholesterol: A study using phosphatidylethanolamine model biomembranes

狩野勝星¹, 高橋 浩¹

¹群馬大学 大学院 理工学府

〒371-8510 群馬県前橋市荒牧 4-2

Shosei KANO¹ and Hiroshi TAKAHASHI^{1,*}

¹ Division of Pure and Applied Science, Graduate School of Science and Technology,
Gunma University,

4-2 Aramaki, Maebashi, Gunma 371-8510, Japan

1 はじめに

薬物はその役目を終えた後、速やかに尿と一緒に体外に排泄される必要がある。薬物の多くが水溶性とは限らない。それらを尿として排泄させるためには、酵素で代謝し、親水性を高める必要がある。そのような酵素の一つがシトクロム P450 (CYP) である[1]。CYPは基質となる薬物を酸化代謝することで親水性を高める。結果、代謝物は水に溶けやすくなり、尿といっしょに体外に排出される。

薬物代謝を担う CYP は、小胞体 (ER) 膜の脂質二重層膜に結合する形で存在する。しかし、CYP の活性部位は、酵素の疎水部内部に埋もれた場所にある[2]。最近の研究により、CYP には基質となる薬物を活性部位に誘導する入口チャンネルと、活性部位から代謝物を外部に放出する出口チャンネルの2つが存在することが明らかになった[2]。ここで重要なのは、入口チャンネルの端が ER 膜の脂質二重層の疎水性部分に位置していることである。したがって、CYP 基質となる薬物が CYP 活性部位に到達するためには、まず脂質二重層の疎水性部分に入り込む必要がある。

CYP 基質薬剤が、小胞体膜ではなく、細胞内小器官の他の生体膜の脂質二重層の疎水性部分に入り込む可能性も考えられる。薬物の代謝効率の観点からは、CYP が存在する小胞体膜に薬物が入りやすく、他のオルガネラ膜には入りにくい機構がある方が生物にとって好都合である。生物が長い進化の過程で、このような機構を獲得してきた可能性が考えられる。我々は先に、コレステロール (Chol) 濃度の違いが、脂質二重層への薬物の入りやすさを制御しているのではないかと仮説を提唱した[3]。この仮説の状況証拠としては、小胞体膜の Chol 濃度 (6-10 mol%) が、形質膜など他の細胞内小器官の膜の Chol 濃度 (20-40 mol%) より低いという事実がある[4]。Chol 濃度が低いことで、CYP 基質薬剤が膜に侵入しやすくなっている可能性が考えられる。少なくとも、細胞内で最も高濃度のコレステロールを含む細胞膜は、

CYP 基質薬物が浸透しにくいのではないかと予想した。

我々は、以前に、この仮説をパルミトイル-オレオイル-ホスファチジルコリン (POPC) からなるモデル膜系で検討した[3]。CYP の基質薬剤には、クロルゾキサゾン (CZX) [5]を使用した。CZXは中枢神経系に作用する筋弛緩剤であり、CYP 活性のマーカーとしても広く用いられている。モデル膜のリン脂質成分として POPC を選択した理由は、(1) PCが哺乳類の生体膜に最も多く存在すること、(2) 哺乳類に見られるリン脂質の疎水性鎖 2本の組み合わせは、一般に一方が飽和、他方が不飽和であることを考慮したためであった。その結果、高 Chol 濃度 (30-50 mol%) では CZX の POPC/Chol 混合二重層への浸透が妨げられる傾向があること、POPC/Chol 混合二重層は Chol 濃度 5-10 mol% の条件で最大量の CZX を捕らえることを発見した。前者は細胞膜の Chol 濃度に、後者は小胞体膜に対応する条件である。

本研究[6]では、我々の仮説を *in vivo* で検証するという目標に向けた第二段階として、哺乳類の小胞体膜の第二の主要なリン脂質であるホスファチジルエタノールアミン (PE) からなるモデル系を用いて仮説を検証した。その前に、Chol を含まない系での PE と CZX の相互作用を知ることが前提条件となるが、我々が知る限り、CZX と PE の間の相互作用についての実験的報告はない。そこで、まず、示差走査熱量測定 (DSC) および X 線回折により、パルミトイル-オレオイル-ホスファチルエタノール (POPE) 二重層の相挙動および構造に対する CZX の影響を検討した。次に、Chol が CZX と POPE/Chol 二重層の相互作用を減少させるかどうかを透析解析と X 線構造解析により検討した。

2 実験

2.1 試料 POPE (>99%) の乾燥粉末試料は Avanti Polar Lipids. Chol (>99%) は Sigma-Aldrich から入手した。CZX (>98%) は、東京化成工業株式会社か

ら購入した。それらは、特に精製せず、そのまま使用した。

2.2 DSC 測定 試料の相挙動は、SEIKO DSC 6100-Exstar6000 示差走査熱量計を用いて検討した。温度とエンタルピー値の較正は、標準インジウム試料の融解転移を測定することによって行った。加熱スキャン速度は $2.0\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ であった。

2.3 透析分析 POPE 多重膜リポソームに捕捉された CZX の量は、SERVA Electrophoresis 社の透析キット Xpress Micro Dialyzer MD100 を用いて、分子量 50kDa のカットオフで透析することにより見積もった。CZX 分子は透析膜の対応する孔サイズに侵入できるが、POPE MLV は侵入できない。透析中、MSC-100 サーモシェーカーを用いて、攪拌および温度制御 (37°C) を行った。透析後、紫外可視測定を行い、外溶液の CZX 濃度を決定した。CZX が多層リポソームに全くトラップされないと仮定した時の理論上の最大値と実測値を比較することで、POPE 多層膜リポソームによる CZX のトラップ率を算出した。

2.4 X 線回折測定 高エネルギー加速器研究機構 (KEK) のフォトンファクトリー (PF) の BL-6A および BL-10C にて、放射光ビームを用いた X 線回折測定を実施した。X 線ビームの波長は BL-6A で 0.15 nm 、BL-10C で 0.10 nm であった。検出器から試料までの距離は、BL-6A では約 900 mm 、BL-10C では約 500 mm であった。

3 結果および考察

相挙動と膜構造の変化から、POPE 膜がゲル (L_{β}) 相状態にあると CZX は、POPE 膜内部には侵入することが出来ず、温度が上がって POPE 膜が相転移を起こし、疎水鎖が融解した流動 (L_{α}) 相の状態でない、CZX は膜内に侵入できないことが、まず示された。POPE 膜は L_{α} 相からさらに温度を上昇させると、非二重層膜構造をとる逆ヘキサゴナル (H_{II}) 相に転移する。POPE 膜への CZX の添加は、 L_{α} - H_{II} 相転移温度を低下させた。ただし、POPE に対して 30mol%以上 CZX を添加すると、 L_{α} - H_{II} 相転移温度の低下は飽和した。また、X 線回折強度から電子密度分布を算出した結果、温度 37°C の L_{α} 相状態の POPE 膜に CZX を添加すると、その膜厚が減少することが明らかになった。膜内部の疎水鎖部分に CZX が侵入すると、より疎水鎖が乱れた状態になり膜の側面方向に広がり、その結果として膜厚が減少したと考えられる。

次に、POPE 膜への CZX の侵入が、Chol の存在によってどう変化するかを調べた。図 1 に示したものは、透析法によって見積もった POPE 多重層リポソーム内にトラップされた CZX 量が、Chol の存在によってどう変化するかをグラフ化したものである。参考に、その図では POPC で実験したデータも示した。実験は、POPE、POPC とも流動的な L_{α} 相である温度 37°C で実施した。図 1 から分かるように、Chol 濃度の増加によって、CZX の補足量が低下した。

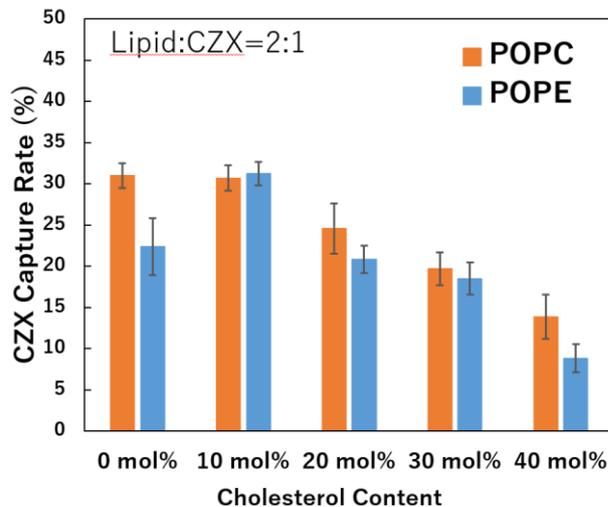


図 1 : POPE/Chol および POPC/Chol 多重層リポソームによる CZX 捕捉割合の Chol 濃度依存性。仕込み比は、脂質(POPE or POPC+Chol) : CZX = 2 : 1 であった。

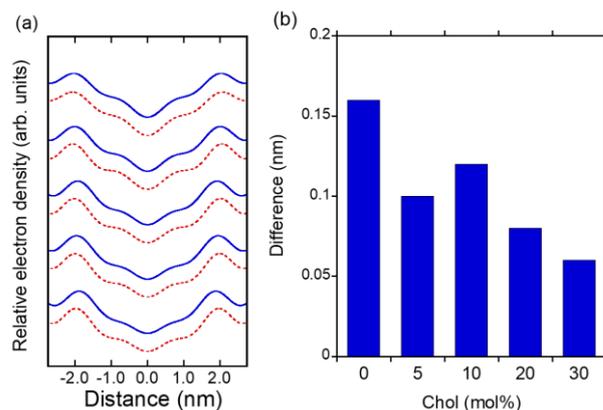


図 2 : (a) 温度 37°C における X 線回折強度データから計算した POPE/Chol (赤点線) および POPE/Chol/CZX (青実線) 系の相対的な電子密度分布プロファイル。Chol 濃度は、上から順に、30, 20, 10, 5, 0 mol% である。(b) CZX を添加した系と添加しない系における (a) に示した電子密度分布の最高ピーク位置の差を Chol 含量の関数として示した棒グラフ。これらの量は、膜厚の変化に対応する量と考えられる。

膜構造の変化の面からの検討も行った。図 2 (a) には、POPE/Chol 系と POPE/Chol/CZX 系の電子密度分布を示した。点線は、CZX を添加していない系を示している。電子密度分布の最高点は、極性頭部のリン原子位置に対応すると考えられる。したがって、このピーク間距離の変化は、膜厚の変化に対応する。CZX を添加すると、ピーク位置は変化し、いずれの場合も膜厚が減少する結果となった。ただ、その変

化量は、Chol 濃度に依存した。大きな傾向としては、Chol 濃度が高くなると、膜厚の変化は小さくなった。Chol 系を含まない先の実験の結果から、膜厚変化の程度は、CZX 膜への侵入度合に対応するものと分かったので、この結果は、透析による実験結果と同じく、Chol 濃度が高くなるにしたがって、POPE 膜に CZX が入り込み難くなっていることを示している。透析からの補足量の見積もりと完全には一致していないが、定性的には両者の結果は一致していると言える。

4 まとめ

POPCの既報例[3]に加え、POPEの本研究により、Chol濃度がCYP基質葉の脂質膜への侵入度を調節していることが明らかになった。高濃度のChol(20mol%以上)はCZXのPOPE二重膜への進入を阻害する傾向がある。今回[6]および以前[3]の研究から、CYPが存在するER膜のChol濃度が他のオルガネラ膜よりも低いことは、以下に説明するようにCYPに関連する薬物代謝にとって有利であるためと考えることができる。Chol濃度が低い膜は、Chol濃度が高い膜よりも薬物が入り込みやすい。その結果、薬物は小胞体膜に集まりやすくなる。このことは、薬物代謝が効率的に行われることを意味する。実際の生体膜の脂質種が多様で多成分であることを考慮すると、この推論をより強固に支持するためには、より現実の生体膜に近い2種類以上のリン脂質からなるモデル膜で同様の実験を行うことが必要である。これは今後の課題である。

謝辞

本研究は、清水伸隆教授をはじめとするPF小角散乱ビームラインスタッフによる光学系調整、検出系システムの改善があつてこそ出来た研究結果です。関係者に対して感謝申し上げます。

参考文献

- [1] F. P. Guengerich, *Chem. Res. Toxicol.* **21** 70 (2008).
- [2] M. Šrejber *et al.*, *J. Inorg. Biochem.* **183** 117 (2018).
- [3] A. Yamada *et al.*, *Biochemistry* **55**, 3888 (2016).
- [4] G. van Meer & A.I. de Kroon, *J. Cell. Sci.* **124**, 5 (2011).
- [5] Y.-C. Lin *et al.*, *Brain Res.* **959**, 86 (2003).
- [6] S. Kano & H. Takahashi, *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 183954 (2022).