

《若手研究者紹介》



生体膜リン脂質研究による疾患発症メカニズム解明

森 田 真 也* Shin-ya Morita

滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部

1. は じ め に

リン脂質とは、親水性のリン酸頭部基と疎水性のアシル鎖領域を持つ両親媒性化合物の総称であり、細胞膜の主要構成成分である。リン脂質二分子膜である細胞膜は、細胞外環境と細胞内環境を分け隔てる働きをし、細胞内オルガネラを形成するためにも必須であることから、細胞膜なくしては生命の誕生もあり得なかったと考えられる。また、哺乳類の血中に存在するリポタンパクでは、コレステロールやトリグリセライドを包み込むようにリン脂質単分子膜が表面を覆っている。リン脂質は、構造上、グリセロール骨格を持つグリセロリン脂質とスフィンゴシン骨格を持つスフィンゴリン脂質の2種類に大別される。グリセロリン脂質は、極性頭部基の種類によりホスファチジルコリン (PC)・ホスファチジルエタノールアミン (PE)・ホスファチジルセリン・ホスファチジン酸 (PA)・ホスファチジルイノシトール・ホスファチジルグリセロールなどのクラスに分別される。さらにこれらのリン脂質は、結合している2本のアシル鎖の炭素数および二重結合数の違いにより、分子種は数千種にもなる。また、結合しているアシル鎖が1本のみのリゾリン脂質も存在している。これらのリン脂質は、細胞膜を形成する構造的役割に加え、さまざまな膜タンパク質の活性や局在を調節する働きや、受容体のリガンドとして細胞内シグナル伝達において極めて重要な役割をして

いることが、近年しだいに明らかとなってきた。

筆者は、これまで5つの研究室において研究に従事してきたが、それぞれにおいてアプローチの方法は違えど、一貫して「生体膜」に関わる研究を行ってきた。本稿では、筆者のこれまでの研究について順を追って紹介させていただく。筆者が最初に研究生生活をスタートさせたのは、大学4年次に配属された京都大学医学部附属病院薬剤部研究室（医療薬学分野）において、乾賢一教授（現京都薬科大学学長）と矢野育子助手（現京都大学大学院薬学研究科准教授）の指導のもとであった。卒業研究では、抗癌薬シスプラチンによって惹起される腎毒性の有機アニオントランスポーターを介した薬物腎排泄に及ぼす影響に関する研究を行った。残念ながら1年間の研究では、シスプラチンがトランスポーターの機能を低下させるメカニズムを解明することはできなかったが、そのときに指導していただいた研究に対する姿勢や実験の組み立て方・データのまとめ方・論文の書き方といった研究の基礎となる部分は、現在においても研究活動の柱となっている。

2. リポタンパク中のスフィンゴミエリンと動脈硬化の発生¹⁾

大学卒業後、京都大学大学院薬学研究科に進学し、製剤機能解析学分野にて半田哲郎教授（現鈴鹿医療科学大学教授）の指導のもと、リポタンパク中のスフィンゴミエリン (SM) と高脂血症や動脈硬化の関係についての研究を、物理化学的手法を駆使して行った。

リポタンパクの構造として、トリグリセライドやコレステリルエステルで構成される疎水性コアを両親媒性のリン脂質や遊離コレステロールが取り囲み、その表面にさまざまなアポリポタンパクが結合

*2000年3月京都大学薬学部卒業。2005年3月京都大学大学院薬学研究科博士後期課程修了（薬学博士）。2004年4月～2006年9月日本学術振興会特別研究員。2006年10月神戸薬科大学助手。2007年4月同助教。2010年4月同講師。2011年4月滋賀医科大学医学部附属病院准教授。連絡先：〒520-2192 滋賀県大津市瀬田月輪町 E-mail: smorita@belle.shiga-med.ac.jp

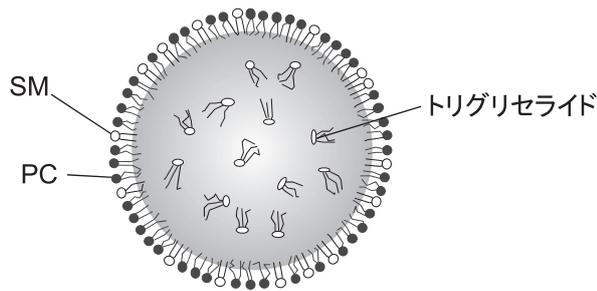


図1 脂質エマルション粒子の構造

疎水性のコア脂質（トリグリセライド）を、両親媒性のリン脂質であるホスファチジルコリン（PC）とスフィンゴミエリン（SM）により形成された単分子膜が取り囲んでいる。

している。疎水性のコア脂質と両親媒性の表面膜脂質で構成される脂質エマルション粒子は、リポタンパクのモデル粒子として用いられている（図1）。

スフィンゴリン脂質の一種であるSMは、PCとともにリポタンパク表面を形成する主要なリン脂質である。肝臓から分泌された超低密度リポタンパク（VLDL）は、血中を循環しているうちにリポタンパクリパーゼにより分解され、より小さいサイズの低密度リポタンパク（LDL）へと変化し、最終的には再び肝細胞へ取り込まれる。リポタンパク粒子表面に結合したアポリポタンパク E (apoE) は、細胞表面の LDL 受容体や LDL 受容体関連タンパク（LRP）、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）に結合し、リポタンパクの肝臓への取り込みを促進する。VLDL 中の SM は、血中のリポタンパクリパーゼで分解されないため、LDL 中で濃縮される。リポタンパク粒子中の SM の役割を明らかにするため、SM を含むエマルション粒子を調製し、肝癌細胞由来 HepG2 細胞への取り込みについて評価を行った。その結果、エマルション粒子表面の SM によって、apoE の結合が減少し、HSPG や LRP を介した細胞への取り込みが低下した。SM は、スフィンゴシン骨格の水素結合と飽和アシル鎖により粒子表面膜のパッキングを強め、水和度を低下させることにより、apoE の脂質粒子への結合を抑制し、細胞取り込みを減少させていることを明らかにした。以上のことから、リポタンパク粒子表面の SM は、リポタンパクの肝細胞への取り込みを減少させることにより血中からの消失を遅らせ、高脂血症を導くと考えられる。

スフィンゴミエリナーゼ（SMase）は、SM を分解し、セラミドを生成させる。動脈内皮下において、

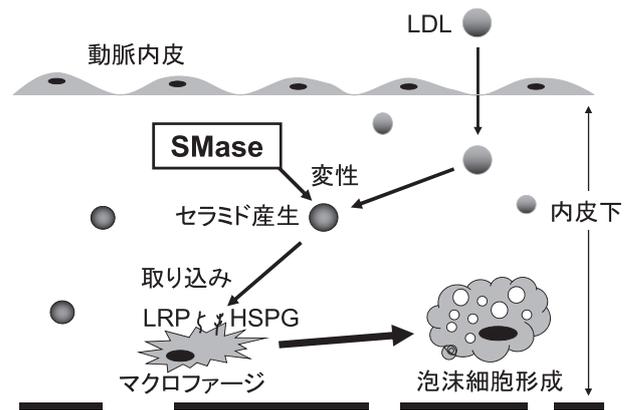


図2 SMaseによるマクロファージ泡沫細胞化

動脈内皮下において、スフィンゴミエリナーゼ（SMase）の作用により低密度リポタンパク（LDL）粒子中にセラミドが産生する。この変性した LDL を、マクロファージが LDL 受容体関連タンパク（LRP）とヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）を介して大量に取り込むことにより、泡沫細胞へと変化する。

SMase は、リポタンパク中の SM を加水分解し、リポタンパクの凝集とマクロファージの泡沫細胞化を促進することが知られていたが、詳細なメカニズムは分かっていなかった。そこで、エマルション粒子を用い、SMase が J774 マクロファージによる取り込みに与える影響を評価した。その結果、SMase が粒子中の SM を分解すると、アポリポタンパク非存在下でもエマルション粒子の HSPG と LRP を介したマクロファージへの取り込みが促進されることが示された。また、SMase が存在していなくても、エマルション粒子中にセラミドが含まれることでマクロファージへの取り込みが増加した。そして、セラミド含有エマルションでは、apoE の結合が増加することにより、マクロファージへの取り込みはさらに促進された。また、流動相あるいはゲル相に分布しやすい 2 種類の蛍光プローブ（BODIPY-PC、DiI-C₁₈）を含むエマルションの共焦点顕微鏡観察により、エマルション粒子中のセラミドは三次元のマイクロドメインを形成していることが明らかになった。これらのことから、SMase によるセラミドの産生は、リポタンパクの HSPG や LRP を介したマクロファージの取り込みを促進し、泡沫細胞形成に関わることが明らかとなった。そして、セラミドは、動脈硬化発生病分子として働くことを突き止めた（図2）。

これらの研究を通じて、リン脂質の物理化学的性質を学べたことが、現在の研究においても、細胞膜

で起こる現象を分子レベルで感覚的にイメージする際に、大いに役立っていると自分では認識している。

3. ABCB4 による胆汁酸依存的リン脂質排出²⁾

学位取得後、日本学術振興会特別研究員（ポストドク）として京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻細胞生化学分野において植田和光教授の指導のもと、トランスポーターABCB4によるリン脂質排出メカニズムに関する研究に携わった。

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おり、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。*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る。リン脂質は、胆汁酸と混合ミセルを形成することで、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。また、ABCB4は、多剤耐性トランスポーターであるABCB1（P糖タンパク）と非常に高いアミノ酸配列類似性（86%）を示すが、ABCB1とは異なり、ABCB4の発現では多剤耐性は生じない。また、ABCB1もABCB4の機能を代替できない。しかし、細胞レベルでのABCB4に関する研究は、非常に少なく、ABCB4によるリン脂質排出機構に関しては不明な点が多く残されていた。

そこで、筆者は、ABCB4あるいはABCB1を安定発現するHEK293細胞（HEK/ABCB4、HEK/ABCB1）を遺伝子導入により樹立し、ABCB4によるリン脂質排出について検討を行った。その結果、培地中へのリン脂質の排出は、HEK/ABCB4細胞とHEK293細胞やHEK/ABCB1細胞との差はなかった。しかし、0.5 mM（臨界ミセル濃度以下）のタウロコール酸により、HEK/ABCB4細胞からのリン脂質の排出が大きく増加した。一方、HEK293細胞とHEK/ABCB1細胞では、このようなタウロコール酸依存的なリン脂質の排出は見られなかった。他の胆汁酸に関しても調べたところ、HEK/ABCB4細胞からのリン脂質排出は、タウロコール酸>グリココール酸>コール酸の順であった。また、ABCB4のATP結合ドメインの変異体を用いた実験より、ABCB4によるリン脂質の排出には、ATP加水分解が必要で

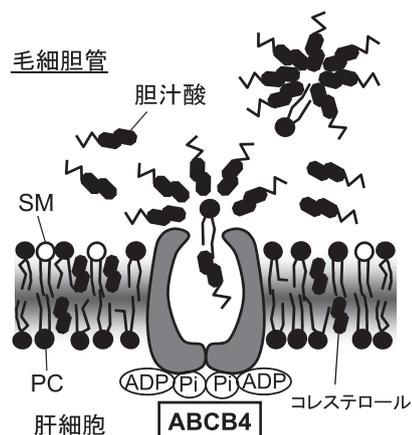


図3 ABCB4によるリン脂質排出メカニズム

モノマーの胆汁酸が、ABCB4の基質結合部位へ拡散し、PCと結合する。ATPが加水分解され、PCは、胆汁酸と相互作用しながら、毛細胆管側へ移動する。胆汁酸/PC混合ミセルが形成され、毛細胆管内へと排出される。胆汁酸により、ABCB4の基質結合部位から毛細胆管内へのPCの移動に必要な活性化エネルギーが減少する。

あることが示された。ABCB1の基質であるベラパミルが、ABCB4によるタウロコール酸依存的なリン脂質の排出を完全に阻害したことから、ABCB1とABCB4の基質結合ドメインは、類似していると考えられた。また、質量分析により、タウロコール酸存在下でABCB4は、SMよりもPCを優先的に排出していることが判明した。以上の知見から、図3に示したABCB4によるリン脂質排出モデルを構築した。これらのことから、ABCB4は、胆汁酸存在下で、肝細胞から毛細胆管中へのリン脂質の排出を行っており、胆汁形成ならびに脂質恒常性維持において重要な役割を果たしていることを明らかにした。

ポストドクとして研究に従事していた期間は、1年半であり、長くはなかった。しかし、この間、分子生物学を基礎からみっちり学ぶことができ、中身の濃い充実したものであった。

4. PEMTによる細胞膜胆汁酸耐性の獲得^{3,4)}

2006年10月に、北河修治教授が主宰する神戸薬科大学製剤学研究室に助手として着任した。ここでは、引き続きABCB4の脂質排出メカニズムの解明に取り組むとともに、ホスファチジルエタノールアミンメチル基転移酵素（PEMT）の機能に関する研究にも取りかかり始めた。

PCとPEは、哺乳類の細胞膜を構成する主要なり

ン脂質であり、PCは総リン脂質の40~50%、PEは20~50%を占めている。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。全ての真核細胞において、PCはCDP-コリン経路により生合成される。哺乳類肝臓では、PCは、PEMTによっても合成される。PEMTは、肝細胞の小胞体に局在し、アデノシルメチオニンからメチル基をPEへ付加させ、PCを産生する。*Pemt* ノックアウトマウスは、コリン欠乏食により肝不全へと導かれるが、*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報告されている。正常な肝臓では、*ABCB4*により減少するPCをPEMTが補うことで細胞膜整合性を保っていることが予想されるため、筆者がPEMTに着目するに至った。

筆者は、まず、PEMTのロングアイソフォーム(PEMT-L)あるいはショートアイソフォーム(PEMT-S)を安定発現するHEK293細胞を遺伝子導入により樹立し、PEMTの構造と機能に関する検討を行った。PEMT-Lは、PEMT-Sと比べて、N末端側が37アミノ酸残基長い。エンドグリコシダーゼH処理により、PEMT-LのN末端部位は、高マンノース型糖鎖が付加し、小胞体管腔内に位置していることが明らかとなった。また、PEMT-Sは、PEMT-Lよりも高い酵素活性を示した。次に、細胞内のPCとPE量を調べたところ、HEK/PEMT-LおよびHEK/PEMT-S細胞で細胞内PC量は大きく増加した。一方、細胞内PE量は、HEK/PEMT-L細胞では変化せず、HEK/PEMT-S細胞でわずかに減少しただけであった。さらに、質量分析を用いることにより、PEMT-Sは長鎖多価不飽和PCとエーテル結合型PCをより多く増加させ、PEMT-Lは短鎖エーテル結合型PCをより多く増加させていることが示された。これらの結果より、小胞体管腔内に局在するPEMTのN末端部位によって、酵素活性と基質アシル鎖特異性が調節されていることが示唆された(図4)。

次に、ヒト肝臓で発現量が多いPEMT-Sを安定発現するLLC-PK1細胞(LLC-PK1/PEMT)を遺伝子導入により樹立し、細胞の胆汁酸耐性に対するPEMT発現の影響を調べた。胆汁酸耐性には、頂側膜における微絨毛形成が重要であることから、LLC-

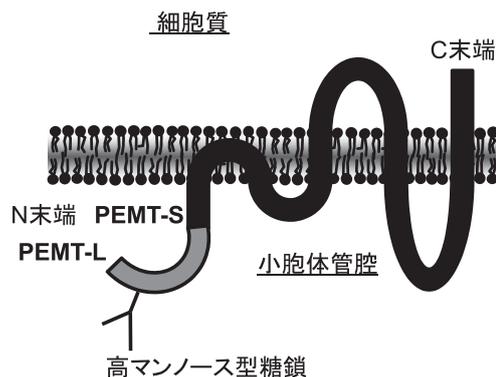


図4 PEMTの構造

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、小胞体膜に局在する3回膜貫通タンパクである。小胞体管腔内に存在し、高マンノース型糖鎖が付加しているN末端部位により、酵素活性と基質アシル鎖特異性が調節されている。

PK1細胞を用いた。まず、細胞膜の脂質組成について調べたところ、LLC-PK1/PEMT細胞の細胞表面膜においてPEとSMの割合が低下していることが確認された。また、走査型電子顕微鏡観察により、PEMT発現により細胞表面の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、LLC-PK1/PEMT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。

現在のところ、まだ、*ABCB4*とPEMTの機能を直接的に結びつける結果は得られていない。今後、肝細胞の胆汁酸耐性メカニズムを追究していくには、*ABCB4*とPEMTの両方が発現している細胞実験系を構築することが必要である。

5. リン脂質酵素蛍光定量法の開発^{3,5)}

筆者は、リン脂質と疾患の関係性についての研究を行ってきたが、これらの研究を遂行する際に、適切なリン脂質定量法が無いことを常に不便に感じ

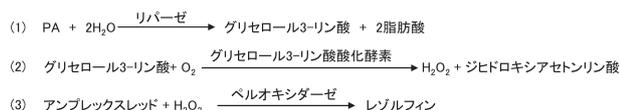


図5 PA 酵素蛍光定量法の原理

(1) ホスファチジン酸 (PA) のリパーゼによるグリセロール 3-リン酸と脂肪酸への分解. (2) グリセロール 3-リン酸酸化酵素による過酸化水素の発生. (3) アンプレックスレッドと過酸化水素の反応によるレゾルフィンの産生. 最終的に産生したレゾルフィンの蛍光強度測定により, PA の濃度を求めることができる.

ていた. そこで, リン脂質クラスごとに高感度・高精度かつハイスループットに定量できる方法を構築すれば, 脂質研究分野が飛躍的に発展するのではないかと考え, リン脂質クラスの酵素蛍光定量法の網羅的開発に着手した. 酵素蛍光定量法とは, 複数の酵素反応を組み合わせることで, 特定の分子から特異的に蛍光物質を生成させ, 蛍光強度測定により定量を行う方法である. 近年, 生体組織内に存在する脂質分子を網羅的に分析するリピドミクスと称する研究分野が世界中で急速に広がっている. そのリピドミクスの主流は質量分析によるもので, 微量成分の検出や分子種の定性的解析には非常に有効であるが, すべてのアシル鎖を区別してしまうため, 測定ごとに膨大なデータが生じ, リン脂質クラスごとの定量には不向きである. 一方, 酵素蛍光法は, アシル鎖の違いを検出することはできないが, 各リン脂質クラスを定量するのに適している. 酵素蛍光法と質量分析を組み合わせることで, リン脂質に関する完全な情報が得られることとなる.

これまでに, 筆者は, さまざまな酵素活性を調節するシグナル伝達物質である PA およびリゾホスファチジン酸の酵素蛍光定量法の開発に成功し (図5), 癌細胞の増殖に関わる PA 合成酵素ジアシルグリセロールキナーゼに対する阻害剤の探索に利用できることを実証した. 次に, PC と PE の酵素蛍光法による定量を可能にしたことで, PEMT や ABCB4 の機能に関する研究が大きく進展した. これらの酵素蛍光法は, 従来の方法と比べて非常に高感度 (検出限界 10~50 pmol) であり, 必要な操作は, ピペットによる試料と反応液のマイクロプレートへの分注が主で, 非常に簡便であり, 定量に要する時間は短時間で, ハイスループット定量が可能である. 現段階でとどまらず, 酵素蛍光定量法でリン脂質クラスの網羅的解析を可能にすることが, 脂質研究分野

の進歩につながると予想される.

6. おわりに

筆者は, 研究を始めてからこれまでに, 薬剤系・物理化学系・生化学系と異なる分野の研究室に身を置いてきた. 短期的な視点で見ると, 研究室が変わる際には, 前の研究室ではやり残した研究があり, 新しい研究室では慣れるのに時間が必要なため, データが出ない時期が少なからずとも生じてしまう. しかし, 異なる分野を経験することで, 実験手法を習得できただけでなく, 問題解決に対する考え方が柔軟となり, 研究テーマ設定の幅が広がったことが, 今後の活動における大きな利点となることを期待している. そして, 2011年4月より, 滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部において寺田智祐教授のもと, 准教授として薬剤業務・教育・研究に取り組んでいる. 基礎系研究室から臨床現場の近くで研究できるようになったことを活かして, これまでのリン脂質研究を臨床に応用できるような形で研究を進めていきたい.

本稿において紹介させていただきました研究は, 多くの関係者の皆様のご指導・ご協力のもと成果であり, この場をお借りして深謝申し上げます.

引用文献

- 1) S. Y. Morita, M. Kawabe, A. Sakurai, K. Okuhira, A. Vertut-Doi, M. Nakano, T. Handa, Ceramide in lipid particles enhances heparan sulfate proteoglycan and low density lipoprotein receptor-related protein-mediated uptake by macrophages, *J. Biol. Chem.*, **279**, 24355–24361 (2004).
- 2) S. Y. Morita, A. Kobayashi, Y. Takanezawa, N. Kikoka, T. Handa, H. Arai, M. Matsuo, K. Ueda, Bile salt-dependent efflux of cellular phospholipids mediated by ATP binding cassette protein B4, *Hepatology*, **46**, 188–199 (2007).
- 3) S. Y. Morita, A. Takeuchi, S. Kitagawa, Functional analysis of two isoforms of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, *Biochem. J.*, **432**, 387–398 (2010).
- 4) S. Y. Morita, N. Ikeda, M. Horikami, K. Soda, K. Ishihara, R. Teraoka, T. Terada, S. 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).
- 5) S. Y. Morita, K. Ueda, S. Kitagawa, Enzymatic measurement of phosphatidic acid in cultured cells, *J. Lipid Res.*, **50**, 1945–1952 (2009).