様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １３ 日現在

機関番号：１５１０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ０８２７７

研究課題名（和文）ニーマン・ピックC1ライク１依存性コレステロール輸送におけるORP10の役割

研究課題名（英文）Role of ORP10 in NPC1L1-dependent cholesterol transport

研究代表者
二宮　治明（Ninomiya, Haruaki）

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：８０２１２１２４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：Niemann-Pick C1 Like1 (NPC1L1) は小腸上皮細胞と肝細胞において、コレステロールの吸収を担う。HEK細胞での発現系において、ORP10はNPC1L1依存性のコレステロールの取り込みを増加させ、この効果は高LDL血症の危険因子となるORP10/D254アイソフォームでN254よりも顕著だった。ORP10はNPC1L1と蛋白質複合体を形成した。さらにFRETにより、ORP10/ D254はN254よりも“曲がりにくい”ことがわかった。この事は、NPC1L1の挙動に対する効果の違いが、D254が高LDL血症の危険因子となる理由である可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：In HEK cells stably expressing Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1)-YFP, overexpression of oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 10 (ORP10) increased the protein level of NPC1L1-YFP and enhanced cellular cholesterol uptake. The latter effect was more prominent with the ORP10 D254 isoform, which has been shown to predispose to hyper-LDL cholesterolemia, than with the N254 isoform. In reciprocal experiments, Co-immunoprecipitation (IP) assays showed that ORP10 interacted with both NPC1L1 and Numb via its N-terminal pleckstrin homology domain and C-terminal OSBP-related ligand-binding domain, respectively。Fluorescence resonance energy transfer (FRET) analyses revealed a clear difference in the intramolecular FRET efficacy between the two isoforms. These findings suggested that ORP10 regulates NPC1L1 internalization and that differential impact on NPC1L1-dependent cholesterol transport may underlie association of the D254 isoform with hyper-LDL cholesterolemia.

研究分野：生化学

キーワード：Niemann-Pick C1 Like1　ORP10　cholesterol

１．研究開始当初の背景

コレステロールの腸肝循環において、小腸上皮細胞・肝細胞は、各々消化管・胆管内の胆汁酸ミセルに含まれるコレステロールを取り込み、小胞体に輸送する。いずれの細胞においても、この輸送を担うのがコレステロール・トランスポーター Niemann-Pick C1 Like1 (NPC1L1)である。近年、このトランスポーターが高脂血症治療薬 ezetimibe の標的であることが判明して以来、NPC1L1 依存性コレステロール輸送は脂質輸送研究のホットトピックとなっている。

　NPC1L1 は複数の膜貫通部位を持つ膜蛋白質であり、それによる細胞内脂質輸送経路の特徴として、NPC1L1 自身がコレステロールに富む小胞に乗って細胞内を移動することが知られている。即ち、低コレステロール時には、NPC1L1 は細胞表面に局在する。細胞にコレステロールが負荷されると、NPC1L1 はコレステロールとともに輸送小胞を形成して細胞内に移動する。このような局在変化は NPC1L1 がコレステロール濃度依存性にクラスリン被覆小胞のアダプター蛋白質 Numb と結合・解離することによるが、コレステロール濃度を感受するしくみなど未解明な点が多く残されている。

　ORP ファミリーは、酸化ステロール結合蛋白質 OSBP（oxysterol-binding protein）と、そのホモログ（OSBP-related protein : ORP1-11）計 12 種類の蛋白質からなり、ORP5, 8 を除いてすべて細胞質の可溶性蛋白質である。共通する構造上の特徴として 2 つの脂質結合部位 PHD と ORD を持ち、その各々が細胞内の特定の場所で、特定の脂質のセンサーまたはキャリアーとして働くことが明らかになりつつある（図 1）。

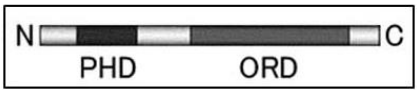

図 1.ORP 蛋白質の一般的な１次構造: ２つの脂質結合部位 PHD (pleckstrin homology domain) と ORD (OSBP-related domain) を持つ、細胞質の可溶性蛋白質である。

　われわれは、NPC1L1 によるコレステロール輸送に ORP が関与するのではないかと考え、まず、NPC1L1（YFP 標識）を恒常的に発現する HEK 細胞に各々の ORP（Xpress 標識）を発現させ、NPC1L1 の細胞内局在に対する効果を検討した。NPC1L1-YFP は、コレステロール濃度が低いときには細胞膜に、高いときにはエンドゾーム系に局在するが、ORP10 の発現により、NPC1L1-YFP のエンドゾーム系でのシグナルが増強した。逆に siRNA により ORP10 の発現を抑制すると、コレステロール負荷によるエンドゾーム系への移動が阻害された。さらに、HEK 細胞の一過性発現系で免疫沈降実験を行ったところ、ORP10-Xpress は NPC1L1-YFP と共免沈され、その結合は特に低コレステロール条件下で顕著だった。一連の結果は、ORP10 が NPC1L1 依存性コレステロール輸送に関与することを示唆しており、具体的な機序として ORP10 がコレステロールセンサーとして NPC1L1 と Numb の結合・解離を制御するという仮説を設定した。

　上記のようなわれわれの実験結果とは別に、ORP10 に関して注目すべき結果として、この遺伝子の複数の SNP (single-nucleotide polymorphism) が血清脂質異常症、動脈硬化性疾患と相関することがゲノムワイドスクリーニングにより判明している。特に、大阪大学のグループからの報告 (Koriyama et al., *Hypertens. Res.*, 33, 511, 2010) によれば、日本人高 LDL 血症患者のゲノムにおいて、254 番目がアスパラギン酸である ORP10/D254 をコードするアリールは、アスパラギンである N254 をコードするアリールよりも頻度が高い。

２．研究の目的

本研究では、NPC1L1 依存性コレステロール輸送における ORP10 の役割を解明することを目的とする。そのために、まず、内因性の NPC1L1 と ORP10 の間でコレステロール濃度依存性の相互作用が生じることを確かめる。これが確認され次第、ORP10 がコレステロールセンサーとして NPC1L1 と Numb の結合・解離を制御するという仮説を検証する。さらに、ORP10/D254 と N254 との機能的な違いを検討する。

３．研究の方法

主に HEK 細胞での発現系を用いて、NPC1L1 と ORP10 との相互作用を解析し、ORP10/ D254 アイソフォームと N254 アイソフォームの機能を比較する。

４．研究成果

(1)ORP10 は NPC1L1 と Numb をリンクする。

HepG2 細胞を用いて、内因性の NPC1L1 と ORP10 の間でコレステロール濃度依存性の相互作用が生じることを確認した。

HEK 細胞での発現系では、ORP10 はその PHD を介して NPC1L1 と蛋白質複合体を形成し、この形成は ORP10 の ORD にコレステロールが結合することで抑制された。この蛋白質複合体には、NPC1L1 と clathrin の間のアダプター蛋白質である Numb も含まれていた。ORP10 はその ORD を介して Numb と結合し、siRNA により ORP10 の発現を抑制すると、NPC1L1 と Numb との結合が抑制された。

これらの結果は、ORP10 が NPC1L1 と Numb をつなぐリンカーとして働き、コレステロール濃度依存性の挙動をコントロールすることを示している（図 2）。

(2)ORP10 は NPC1L1 によるコレステロールの取り込みを増強し、この効果は D254 アイソフォームのほうが N254 アイソフォームよりも顕著である。

NPC1L1-YFP 細胞に ORP10 を発現させると、NPC1L1 依存性のコレステロールの取り込み量が増加し、その増加は D254 アイソフォームのほうが N254 アイソフォームよりも顕著だった。D254 アイソフォームは、コレステロール負荷による NPC1L1-YFP の細胞内移行を遅延させた。NPC1L1、Numb との結合活性には D254 と N254 アイソフォームの間に明らかな違いは見いだせなかったが、FRET (fluorescence resonance energy transfer) により、ORP10/D254 アイソフォームは N254 アイソフォームよりも“曲がりにくい”ことがわかった。

これらの結果は、NPC1L1 の挙動に対する効果の違いが、D254 アイソフォームが高 LDL 血症の危険因子となる理由である可能性を示唆する。

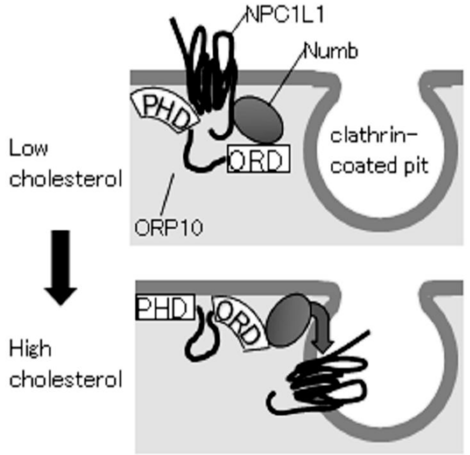

図２　ORP10 による NPC1L1 局在制御

コレステロール濃度が低いとき、ORP10 は NPC1L1 と Numb をリンクする。コレステロール濃度が上がると、ORP10 のコンフォーメーションが変化し、NPC1L1 は Numb からかい離し輸送小胞に入る。ORP10/D254 ではこのコンフォーメーションの変化が N254 に比較して生じにくいため、コレステロールが負荷されたときの NPC1L1 の細胞内移行が遅延し、その結果として取り込みが増加すると予想される。

５．主な発表論文等

〔学会発表〕（計６件）

Nakasone N., Ohnishi Y., Matsumoto K. and Ninomiya H. (2017) ORP10 as a regulator of NPC1L1 trafficking.（第90回日本生化学会大会）

Ohnishi Y., Nakasone N., Matsumoto K. and Ninomiya H. (2017) ORP11 as an effector of Rab9.（第90回日本生化学会大会）

Nakasone N., Morinaka Y., Ohnishi Y. and Ninomiya H. (2016) ORP10 as a regulator of NPC1L1 trafficking.（第89回日本生化学会大会）

Nakasone N., Morinaka Y., Ohnishi Y. and Ninomiya H. (2016) ORP11 as an effector of Rab9.（第89回日本生化学会大会）

森中芳枝、仲宗根眞恵、檜垣克美、二宮治明 (2015) ORP10はコレステロールセンサーとしてNPC1L1の挙動を制御する（小児脂質研究会）

Morinaka Y., Nakasone N., Higaki K. and Ninomiya H. (2015) ORP10 as a regulator of NPC1L1 trafficking.（第88回日本生化学会大会）

〔その他〕

URL:http://www.ninomiya.med.tottori-u.ac.jp/homepage/

６．研究組織

(1)研究代表者
二宮 治明（Ninomiya Haruaki）
鳥取大学・医学部・教授
研究者番号：80212124

(2)連携研究者
仲宗根 眞恵（Nakasone Naoe）
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：30632947