

令和元年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15171

研究課題名(和文)小胞輸送を司るRab11はコレステロールの非小胞性輸送に関与するか

研究課題名(英文)Is Rab11 involved in non-vesicular transport of cholesterol?

研究代表者

原田 彰宏 (Harada, Akihiro)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40251441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：個々の細胞の細胞膜の脂質の主な構成成分の1つにコレステロールがある。コレステロールは重要な脂質だが、コレステロールの輸送や利用経路の多くは未解明であった。我々は小胞輸送を司るRab11の新規結合タンパク質RELCHを同定し、Rab11とRELCHが脂質輸送タンパク質OSBPを介して小胞輸送に依存しない、細胞小器官間の直接接触によってコレステロールを輸送することを発見した。本研究は細胞生物学の国際的な一流誌であるJournal of Cell Biology誌に掲載され、2018年の10大論文として選ばれる栄誉を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は小胞輸送を司ると考えられてきたタンパク質Rab11の新規結合タンパク質RELCHを同定し、それが介する新規の輸送経路を明らかにした。この研究により、コレステロールの新たな輸送経路や分子機構が解明され、コレステロールの細胞内動態の全容解明の一端が明らかとなったため、これからの生命科学の発展に重要な役割を果たすと期待される。また、RELCHを欠損するマウスでは、肝臓や繊維芽細胞においてリソソームの増加やその中のコレステロールの増加がみられるため、脂肪肝やそれに起因する肝炎(NASH)の病態の解明に有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cholesterol is one of major constituent of plasma membrane lipids. Though it is physiologically very important, the route of its transport remains largely elusive. We identified RELCH as a novel binding protein of Rab11. RELCH, Rab11, and OSBP makes a complex which transfer cholesterol from the recycling endosome (RE) to the TGN by bridging between the RE and the TGN without using vesicular trafficking mechanism. This result was published in the Journal of Cell Biology and selected as one of the best article in 2018.

研究分野：細胞生物学

キーワード：RELCH Rab11 リサイクリングエンドソーム TGN OSBP

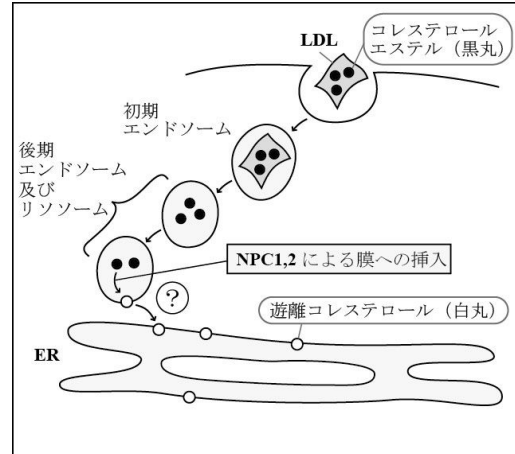
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コレステロールは細胞にとって必須である。細胞のコレステロール量は、細胞自身による合成と細胞外からの取り込みで維持されているが、後者の細胞外からの取り込みの経路は、LDL (エステル化コレステロールを有する) の細胞内へのエンドサイトーシス リソソームへの輸送 リソソーム内で脱エステル化された遊離コレステロールがリソソーム膜に挿入される

遊離コレステロールのリソソームから ER への輸送という経路をたどる (右図)。しかし、遊離コレステロールのリソソームから ER への輸送経路は、未だに確立されていない。

我々は以前細胞内の極性輸送に関与すると考えられる低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab11a の欠損マウスを作製したところ、頂上 (アピカル) 面への輸送異常を認めた (Biol. Open 4:86, 2014)。そこでその分子機構を解明するため、Rab11a 結合タンパク質として RELCH を同定した。RELCH は全身で発現する機能未知のタンパクであった。そこで、その機能をさらに解明するため、RELCH に結合するタンパクを更に探索し、OSBP (oxysterol binding protein) 1 を同定した。OSBP1 は TGN と ER の膜の間で小胞輸送非依存的に、コレステロールと PI4P の交換反応を促進することが知られていた (Cell 155: 830, 2013) ため、Rab11 や RELCH のコレステロールの輸送への関与が考えられた。実際 Rab11, RELCH, OSBP1 を knockdown (KD) した細胞では全てコレステロールのリソソームへの過剰な蓄積が見られた。Rab11 は recycling endosome (RE) に局在し、RELCH と OSBP1 は TGN に局在するため、実際には Rab11, RELCH と OSBP1 は RE から TGN の間でコレステロールの輸送を行っていると考えられた。



### 2. 研究の目的

Rab11, RELCH, OSBP1 が RE から TGN へのコレステロールの輸送に関与する可能性があるため、

- (1) リポソーム間の輸送系を用いて RE 膜と TGN 膜の間のコレステロールの輸送を明確に示す
- (2) 細胞内でこれらの分子が RE から TGN の間にあることを明らかにする
- (3) RELCH KO マウスの神経疾患モデルとしての有用性を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

RELCH と OSBP1 が、コレステロールの RE から TGN への輸送に重要なことを示すため、

- (1) 各種細胞内小器官におけるコレステロールの定量
- (2) リポソームを用いた RE 膜と TGN 膜の間のコレステロールの輸送の実証
- (3) In vivo において RE と TGN の間に Rab11a,b, RELCH, OSBP1 が存在することの形態学的証明

の 3 つの実験を行う。

また、RELCH の KO マウスが神経疾患のモデルになるかを探るため、

- (4) RELCH KO マウスの神経症状や神経の形態学的解析を行う。

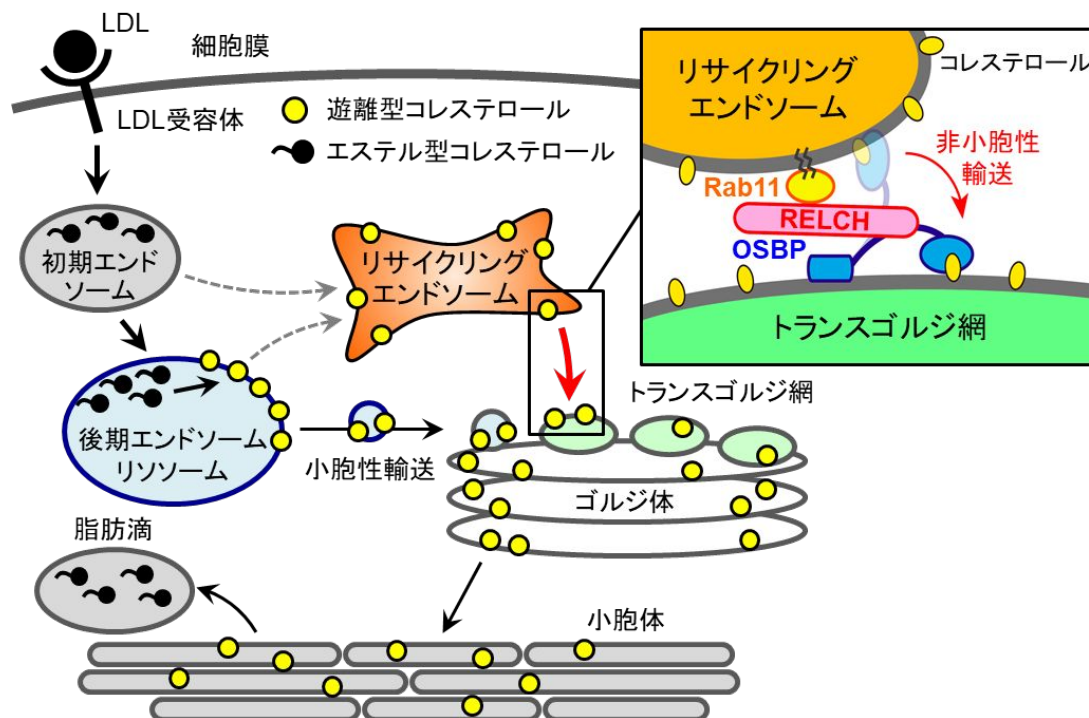
### 4. 研究成果

上記(1)~(4)について実験を行った。

- (1) 各種細胞内小器官におけるコレステロールの定量  
各種細胞内小器官に局在する分子に対する抗体を用いて、lysosome, TGN, ER を精製し、RELCH をノックダウンした場合、lysosome でのコレステロール値は上昇するが、TGN, ER では減少することを明らかにした。
- (2) リポソームを用いた RE 膜と TGN 膜の間のコレステロールの輸送の実証  
FRET を用いて RE 膜と TGN 膜間をコレステロールが輸送されることを示した。
- (3) In vivo で RE と TGN の間に Rab11, RELCH, OSBP1 が存在することの形態学的証明  
HeLa 細胞の超解像顕微鏡による観察によってこれらが RE と TGN の間に局在することを示した。
- (4) RELCH KO マウスの神経症状や神経の形態学的解析  
KO マウスはケージ内での若干の活動亢進が見られたが、神経系の形態学的観察では異常は認められなかった。しかし、肝臓の観察では lysosome の数の増加が認められた。

これらの結果から Rab11, RELCH, OSBP1 が lysosome から TGN への小胞輸送を介さない、直接接触によるコレステロール輸送に関与することが明らかとなった。この結果は、これまで不明な点が多かったコレステロール輸送の経路と分子機構の解明に寄与

すると共に、小胞輸送に関わることのみ知られていた Rab11 が小胞輸送を介さない直接接触による細胞小器官の間の輸送に関与することを始めて明らかにした（下図）。



我々はこれらの成果をまとめて Journal of Cell Biology 誌に発表し、当該論文は 2018 年度の Journal of Cell Biology 誌の 10 大論文として選ばれる栄誉を得た（<http://jcb.rupress.org/cc/the-year-in-cell-biology-2018> に紹介）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

The Rab11-binding protein RELCH/KIAA1468 controls intracellular cholesterol distribution. Sobajima T, Yoshimura SI, Maeda T, Miyata H, Miyoshi E, Harada A J Cell Biol 217:1777-1796. doi: 10.1083/jcb.201709123. (2018) (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

FASEB conference ‘Small GTPases in Membrane Processes: Trafficking, Autophagy and Disease’ (Sep.23-28, 2018, Leesburg, USA)  
Akihiro Harada (Short talk and poster)  
 Role of Rab11 in apical transport and non-vesicular cholesterol transport.

FEBS Golgi meeting (15-19 October, 2018, Sorrento, Italy)  
Akihiro Harada (Short talk and poster)  
 A novel contact by a novel protein complex supports cholesterol transport from the recycling endosome to the trans-Golgi network

Gordon Research Conference ‘Molecular Membrane Biology’ (July 19-20, 2017, Proctor Academy, USA)  
 Sobajima, Tomoaki, Shin-ichiro Yoshimura and Akihiro Harada (poster)  
 ‘Rab11a GTPase regulates apical protein localization and microvilli formation in the intestine.’

EMBO conference ‘Cell polarity and membrane dynamics’ (June 6, 2017, San Feliu de Guixols, Spain)  
Akihiro Harada (talk and poster)  
 The molecular mechanism of apical transport in the mouse intestinal epithelial cells: The role of Rabs and their binding proteins

FASEB conference 'GTPases in Trafficking, Autophagy and Disease' (Sep 18-23, 2016, West Palm Beach, USA)

Akihiro Harada (talk and poster)

Roles of Rab8, 10, and 11 for apical transport, ciliogenesis, and microvillus inclusion disease.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/acb/>

当該論文の内容について、2018年3月20日にプレスリリースを行った。

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: なし

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 吉村 信一郎(大阪大学医学系研究科細胞生物学教室講師)

ローマ字氏名: YOSHIMURA, Shin-ichiro

研究協力者氏名: 傍嶋 智明(大阪大学医学系研究科保健学専攻機能診断科学講座大学院生)

ローマ字氏名: SOBAJIMA, Tomoaki

研究協力者氏名: 三善 英知(大阪大学医学系研究科保健学専攻機能診断科学講座教授)

ローマ字氏名: MIYOSHI, Eichi

研究協力者氏名: 前田 知美(大阪大学医学系研究科保健学専攻機能診断科学講座大学院生)

ローマ字氏名: MAEDA, Tomomi

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。