

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：35409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860132

研究課題名(和文) 脂質異常症治療薬エゼチミブによるコレステロール吸収トランスポーター阻害機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the inhibition mechanism of cholesterol transporter NPC1L1 by ezetimibe

研究代表者

上敷領 淳 (KAMISHIKIRYOU, Jun)

福山大学・薬学部・講師

研究者番号：80600121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロール吸収トランスポーターNPC1L1に関して、阻害剤エゼチミブが効果を示さないことが報告されているV55L変異体の解析を行い、その影響の検討を行った。また、コレステロール以外の基質の認識および細胞内への取り込みに関して検討を行った。α-トコフェロールはNPC1L1によって吸収されるという報告があるが、我々の検討により、α-トコフェロールがNPC1L1によって認識され、さらに、コレステロールと同様のメカニズムによって細胞内に取り込まれることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：NPC1L1 is known as cholesterol transporter. Ezetimibe inhibits NPC1L1 and is used as cholesterol lowering drug. We analyzed the effects of NPC1L1 mutants. Although V55L mutant showed no effect on NPC1L1 function, we found that extracellular portion of NPC1L1 plays an important role on its function. Furthermore, we analyzed the substrate recognition mechanism of NPC1L1. We showed that NPC1L1 recognizes alpha-tocopherol as well as cholesterol.

研究分野：タンパク質科学

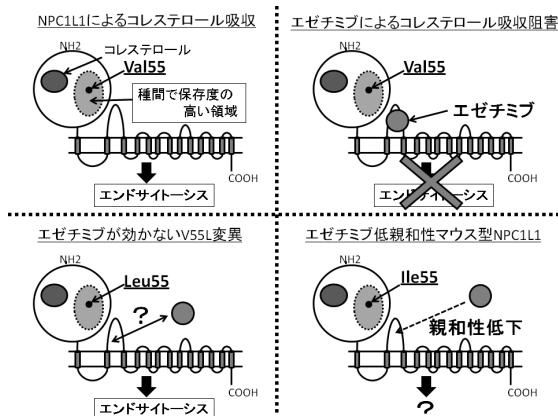
キーワード：コレステロール NPC1L1 エゼチミブ

1. 研究開始当初の背景

Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) トランスポーターは腸管においてコレステロールの吸収を担うタンパク質である。これまでに NPC1L1 に関して、N 末端の球状ドメインが単独でコレステロールに結合できる (Zhang et al. J Biol Chem 2011)、コレステロール吸収阻害薬として臨床で使用されているエゼチミブは細胞外にある大きなループ領域に特異的に結合する (Weinglass et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2008)、NPC1L1 はコレステロールに結合すると、エンドサイトーシスによりコレステロールと共に細胞内に取り込まれる (Ge et al. Cell Metab 2008) ということが明らかになっている。

NPC1L1 はヒト以外の哺乳類やげっ歯類などにも存在している。NPC1L1 阻害剤エゼチミブはイヌ、マウス、ラットなどの NPC1L1 に対しても効果を示すが、マウス NPC1L1 への効果は他の種のものへの効果に比べて 10 倍以上弱いことが確かめられている。エゼチミブの結合実験により、細胞外ループ領域のアミノ酸残基 2 残基の違いがエゼチミブへの結合を弱めていることがわかっている。

筆者は、NPC1L1V55L 変異をもつ人はエゼチミブが効果を示さないという報告に興味を持った。さらに、V55 周辺のアミノ酸配列に関してマウスを含めた様々な種と比較してみたところ、エゼチミブの効果が弱いマウスのみ、V55 がイソロイシンとなっていることに気付いた。NPC1L1 の N 末端球状ドメインの結晶構造をみると、V55 周辺には保存度の高いアミノ酸残基が集中しており、V55 の変異により立体構造に変化が生じると機能に影響がやすいのではないかと考えた。



そこで、筆者は V55 がある N 末端球状ドメインとエゼチミブが結合する細胞外ループ領域の間には相互作用があり、エゼチミブはその相互作用に影響を与えることで NPC1L1 のエンドサイトーシスを阻害するのではないかという考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、コレステロールトランスポーター (Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1)) について、NPC1L1 阻害剤エゼチミブが効果を示さない変異体 (V55L) に着目して、ドメイン間の相互作用に焦点を当てて機能解析を行う。これにより、エゼチミブの作用機構を明らかにするとともに、NPC1L1V55L に対して有効な新たな阻害剤開発の基盤を確立する。

コレステロールの過剰摂取は様々な疾患の原因となることから、生活習慣の中でコレステロールの摂取量をコントロールすることが重要となる。糖尿病患者などコレステロール吸収が高まっている人はさらに厳密にコレステロール摂取量をコントロールする必要がある。コレステロール吸収阻害薬としては、現在エゼチミブがすでに使用されているが、エゼチミブが効果を示さない変異 (V55L) が報告されている。エゼチミブがどのようにして NPC1L1 を阻害するのか、また、NPC1L1 V55L に対してエゼチミブが作用しない原因を明らかにすることができれば、NPC1L1 V55L に対して有効な新たな NPC1L1 阻害剤を開発するための基盤を確立することができる。これまで、エゼチミブは細胞外ループ領域にのみ結合し、NPC1L1 を阻害すると考えられてきた。しかし、N 末端球状ドメインに V55L 変異が存在することによってエゼチミブが作用しなくなることから、エゼチミブの作用は 1 つのドメインだけでなく、ドメイン間に及ぶものと考えられる。NPC1L1 においてアミノ酸残基レベルでドメイン間相互作用を明らかにすることができれば、エゼチミブと NPC1L1 との相互作用もアミノ酸残基レベルで捉えることができると期待される。そこで得られた情報を基に、NPC1L1 V55L 変異体の阻害剤に必要な骨格や置換基についても基盤となる情報を提供することができる。

NPC1L1 はコレステロールを認識し、細胞内への取り込みを行うが、N 末端球状ドメインはコレステロール以外にも植物性ステロールや酸化コレステロールを認識することができることが知られている。また、 α -トコフェロール (ビタミン E) を認識するという報告もある。このことから、NPC1L1 による基質認識にはある程度の幅があり、特定の置換基があれば基質として認識できる可能性が考えられる。基質によっては結合しても細胞内への取り込みが起らないものもあるため、認識に必要な置換基と取り込みに必要な置換基を明らかにすることができれば、ドメイン間相互作用を解析するための異なる視点からの取り組みが可能になると考えられる。したがって、V55L 変異体に着目したドメイン間相互作用とともに、コレステロール

以外の基質にも着目して NPC1L1 の基質取り込み機構を明らかにすることは有用であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) NPC1L1-GFP 発現細胞の作製

NPC1L1 遺伝子はヒト大腸がん由来培養細胞 (Caco-2 細胞) から得た total RNA を用いて PCR 法によりクローニングを行った。その後、NPC1L1 遺伝子の C 末端側に GFP 遺伝子を連結させ、NPC1L1-GFP として発現させるプラスミドを作製した。NPC1L1-GFP 遺伝子を発現させる細胞としてはラット肝がん細胞由来の CRL-1601 細胞を用いた。CRL-1601 細胞は NPC1L1 の細胞内局在変化を観察する実験などでよく使用されている細胞であり、遺伝子のトランスフェクション効率も高いことがその理由として挙げられる。

(2) NPC1L1 変異体の作製

NPC1L1 変異体の作製は東洋紡社の KOD Plus Mutagenesis Kit を用いて行った。

(3) NPC1L1 N 末端球状ドメインの作製

NPC1L1 の N 末端球状ドメインは Glutathione S-transferase (GST) を N 末端に融合させ、また、C 末端にヒスチジンタグ (His6) を融合させた状態で大腸菌を用いて発現させ、調製した。

(4) NPC1L1 細胞内局在変化の観察

NPC1L1-GFP の細胞内局在変化はコレステロール除去処理およびコレステロール添加処理を行った後に、共焦点顕微鏡を用いて行った。

(5) NPC1L1 N 末端球状ドメインを用いた競合阻害実験

大腸菌を用いて調製した NPC1L1 N 末端球状ドメインと [3H]-コレステロール、さらに非 RI ラベルコレステロールもしくは非 RI ラベル基質を共存させ、競合阻害実験を行った。

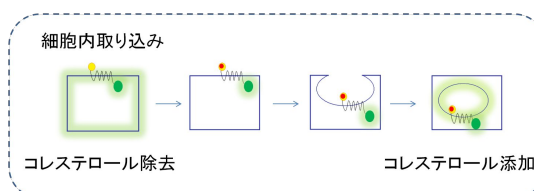
4. 研究成果

(1) NPC1L1 変異体を用いたコレステロール細胞内取り込み活性とエゼチミブによる阻害効果への影響

NPC1L1 変異体を作製し、コレステロール取り込みに与える影響およびエゼチミブによる阻害効果に与える影響を検討した。

NPC1L1 は通常の培養条件では細胞内のリサイクリングエンドソームに局在した状態で存在しているが、コレステロール除去処理により、細胞内のコレステロール量が不足すると細胞膜に局在するようになる。また、細胞膜に局在した状態で、培地中にコレステロ

ールを添加すると、NPC1L1 は細胞内に取り込まれ、再びリサイクリングエンドソームに局在するようになる。このことから、NPC1L1 各種変異体における局在の変化から、変異の影響の確認を行った。



これまでエゼチミブが効果を示さない人が持っている変異 (V55L) を作製し、その影響を確かめた。コレステロール除去処理を行うと、野生株と同様 NPC1L1 V55L 変異体は細胞膜へ局在し、また、コレステロールの投与を行うと再び細胞内に取り込まれることが確認された。そこで、エゼチミブ処理によって、NPC1L1 の細胞内への取り込み阻害が起こるか否かの検討を行った。野生株に関してはエゼチミブ処理によって NPC1L1 の細胞内への取り込みが阻害されることが確認された。NPC1L1 V55L に関しては、エゼチミブ処理によって NPC1L1 の細胞内への取り込みが阻害されず、細胞膜にとどまることが予想されたが、NPC1L1 V55L は野生株と同様に細胞内に取り込まれることが確認された。このことから、V55L 変異をもっていてエゼチミブが効果をしめさない人は NPC1L1 の機能変化によるものではなく、その他の原因によりエゼチミブが効果を示さなくなっていることが考えられる。

NPC1L1 N 末端球状ドメインにもアラニン変異体を作製し、局在変化に与える影響について検討を行った。コレステロール結合部位以外の部位にアラニン変異を入れ、その影響を検討したが、今回作製した N 末端球状ドメイン変異体では局在変化に影響を与える変異体を見出すことはできなかった。

細胞内ループ領域、細胞外ループ領域においても同様にアラニン変異体を作製し、その影響を検討した。細胞内ループ領域変異体に関しては、局在変化に影響を与える部位を見出すことはできなかったが、細胞外ループ領域において局在変化に影響を及ぼす部位を見出すことができた。細胞内領域に関しては、エンドサイトーシスに重要なアダプタータンパク質の認識配列が存在することが明らかとなっているが、今回変異による影響が見られた細胞外ループ領域はこれまで機能が全く明らかになっていない領域であり、NPC1L1 の機能発現に重要な役割を担っている可能性が高いと考えられる。今後さらなる解析を行うことで、変異の影響を確実なものとし、新たな機能ドメインの同定を行うことで阻害剤開発のターゲット部位となりうる

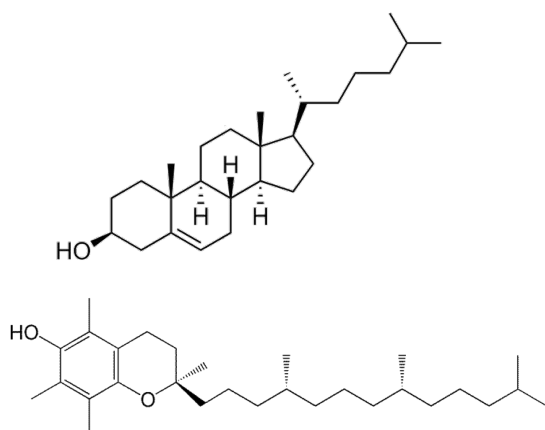
可能性を示すことができると考える。

(2) NPC1L1 N 末端球状ドメインを用いた基質競合阻害実験

NPC1L1 の N 末端球状ドメインにはコレステロールの他にもオキシステロールが結合できることが確認されている。また、 α -トコフェロール(ビタミン E)が NPC1L1 によって細胞内に取り込まれるという報告もあることから、 α -トコフェロールにおいても N 末端球状ドメインによって認識される可能性が極めて高い。そこで、NPC1L1 N 末端球状ドメインを用いて、 α -トコフェロールによるコレステロールの競合阻害の検討を行った。GST-NPC1L1 N 末端球状ドメインを用いて、 3 H-コレステロールの結合を α -トコフェロールが阻害するか否かを検討したところ、 α -トコフェロールが共存するとコレステロールの結合が阻害されることが確認された。このことから、NPC1L1 の N 末端球状ドメインはコレステロールだけでなく、 α -トコフェロールも同様に認識できることが示された。

(3) α -トコフェロール投与による NPC1L1 の局在変化

NPC1L1 の N 末端球状ドメインに α -トコフェロールが結合することが確認されたので、細胞レベルでも α -トコフェロールの効果が確認できるか否かを検討を行った。コレステロール除去処理後、培地に α -トコフェロールを添加すると、コレステロールを添加したときと同様に、NPC1L1 は細胞内に取り込まれることが確認された。このことから、 α -トコ



コレステロール(上)と α -トコフェロール(下)の構造式

フェロールはコレステロールと同様に、N 末端球状ドメインによって認識され、その後 NPC1L1 を介して細胞内に取り込まれることが強く示唆される。

コレステロールと α -トコフェロールの構造式を見ると両者に共通の構造を見出すことは難しく、NPC1L1 が主にどの部位を認識し

ているのかを明らかにすることができれば、NPC1L1 による基質認識機構へとつなげることができると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 2 件)

発表者: 榎原広恵、松本直也、上敷領淳、杉原成美、発表標題: コレステロールトランスポーター NPC1L1 の変異体を用いた機能解析、学会等名: 日本薬学会第 135 年会、発表年月日: 2015 年 3 月 28 日、発表場所: デザイン・クリエイティブセンター神戸(兵庫県・神戸市)

発表者: 原口美咲、中島俊輔、田坂友佳、榎原広恵、倉田沙織、上敷領淳、杉原成美、発表標題: コレステロールトランスポーター NPC1L1 による α -トコフェロールの細胞内取り込み、学会等名: 日本薬学会第 134 年会、発表年月日: 2014 年 3 月 30 日、発表場所: 熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)

[その他]

ホームページ等

福山大学薬学部生化学研究室 H P

<http://web.fukuyama-u.ac.jp/pharm/htmls/Labo/labs/biochem/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上敷領 淳 (KAMISHIKIRYOU, Jun)

福山大学・薬学部・講師

研究者番号: 80600121