

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22632

研究課題名(和文) PCSK9によるLDL受容体の細胞内輸送経路変更の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of alteration of intracellular traffic of LDL receptor by PCSK9

研究代表者

堀内 久徳(Horiuchi, Hisanori)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：90291426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：LDL受容体(LDLR)にPCSK9が細胞外に結合すると、LDLRがエンドソームから形質膜へリサイクルされず、リソソームへ運ばれ分解され、LDLR量が減少し、LDLの細胞内取り込み量が減少する。PCSK9の細胞内における分子機構についてはほとんど不明である。ラクダ科一重鎖免疫グロブリンであるナノボディライブラリーを発見させ、LDLの取り込みを指標として、PCSK9の機能阻害ナノボディのスクリーニング法の構築を進めた。さらに、いくつかの基底LDLR細胞質領域結合蛋白質を遺伝子操作にてLDLRの量への影響を順次解析してきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家族性高コレステロール血症の10%はPCSK9の遺伝子変異であり、またPCSK9阻害薬がコレステロール降下薬として診療現場で使われている。本研究は、PCSK9の細胞内での作用メカニズムを明らかにすることで薬剤の理解を深め、さらにこの経路での新規重要因子の発見は、新たな薬剤ターゲットとなろう。そのため、完成に向け、本プロジェクトを継続、発展させている。

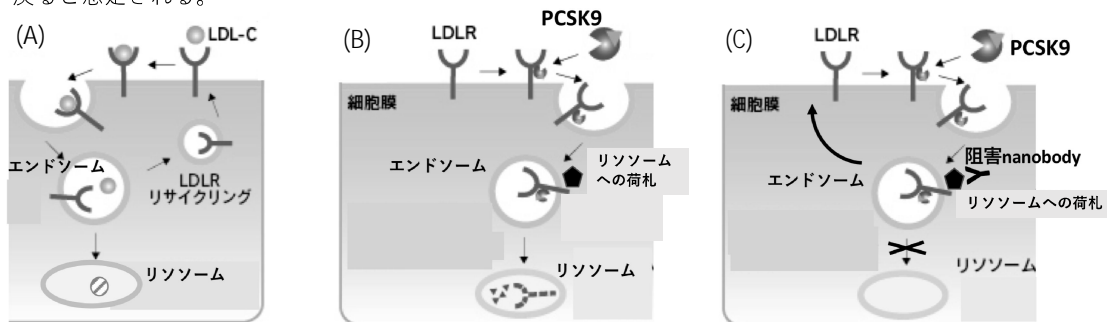
研究成果の概要(英文)：When PCSK9 binds LDL receptor (LDLR) extracellularly, LDLR receptor does not become recycle back to plasma membrane from endosome, but transported to lysosome, resulting in degradation in lysosome, decrease of cellular LDLR, and decrease incorporation of LDL into cethe cell. So far, the intracellular function of PCSK9 remains to be elucidated. In the study, we have tried to develop a experession cloning ssystem to find a nanobody, immnoglobulin of Camel consisting of one protein. Then, we tried to identify factors involved in the PCSK9 pathway by alteration of the expression levels of genes of already-known proteins, which have been demonstrated to bind to intracellular domain of LDLR. We are under improvement of these projects.

研究分野：生化学、内科学

キーワード：PCSK9 低比重リポ蛋白質受容体 家族性高コレステロール血症

**1. 研究開始当初の背景：** 低比重リポ蛋白質(LDL)の受容体(LDLR)の遺伝的欠損は家族性高コレステロール血症(FH)となり、血清LDL値が高値のため若年時より動脈硬化性疾患を来す。LDLが結合した細胞膜上のLDLRはエンドソームに小胞輸送される。エンドソームでLDLRとLDLは解離し、LDLRは形質膜にリサイクルされ、LDLはリソソームに運ばれ分解される(図1A)。PCSK9が細胞外でLDLRに結合すると、LDLRがエンドソームから形質膜へリサイクルされず、リソソームへ運ばれ分解される(図1B)。その結果、LDLR量が減少し、LDLの細胞内取り込み量が減少するため血清LDL値が上昇する。FHの約10%はPCSK9のgain of function変異が原因である。PCSK9阻害抗体が強力なLDL降下薬として診療現場で用いられている。このように臨床的に重要なPCSK9であるが、**LDLRの輸送をリサイクル経路からリソソーム経路に変更させる分子メカニズムについてはほとんど明らかになっていなかった。**

図1. LDL受容体の輸送とPCSK9の作用：(A) PCSK9がなければ、初期エンドソームでLDLRはLDLと解離し、LDLはリソソームに運ばれて分解される一方、LDLRは細胞膜にリサイクルされる。(B) PCSK9がLDLRに結合すると、LDLRはリソソームへ運ばれて分解される。PCSK9が結合することによってLDLRに構造変化が生じ、例えば、リソソーム輸送への‘荷札’がLDLRに結合すること等が想定される。(C) この荷札に、その活性を阻害するnanobodyが結合すれば、PCSK9の作用が阻害され、LDLRはリソソームへの輸送から、リサイクル系に戻ると想定される。



**2. 研究の目的：** 本研究ではこのPCSK9の作用機構を分子レベルで解明することを目的とした。

**3. 研究の方法：** 細胞内に取り込まれた分子は小胞輸送で輸送される。各小胞は決められた小器官に輸送される‘荷札’を持つ。細胞内でLDLRはPCSK9の結合によってリサイクリング小胞からリソソームへ輸送される小胞に乗り換えると考えられるが、本研究ではこのPCSK9の輸送経路乗り換えを担う分子を同定する。PCSK9は蛋白分解酵素としての活性を有するが、この蛋白質分解酵素活性はLDLRの輸送経路の変更には必要ないことが報告(*Nat Struct Mol Biol*, 2007)されている。PCSK9の結合により、LDLRに何らかの構造変化が生じてリソソーム輸送へ誘導する‘荷札’分子と結合することによって輸送小胞を乗り換える可能性等を想定している。あるいはPCSK9がそのような分子と結合することによって輸送小胞を乗り換えているのかもしれない。

本研究では以下の二つのアプローチをとった。

(1)細胞内発現 nanobody ライブラリースクリーニング:ラクダ科動物の免疫グロブリンは重鎖のみよりなる一本鎖であり、その抗原認識部位は nanobody と呼ばれる。我々は米国より  $10^8$  種類の人工 nanobody ライブラリーの供与を受け、細胞質に nanobody を発現させ、LDLRの分解を阻害する nanobody の同定を試みた。このような nanobody の中に、PCSK9の作用を担う因子を標的とするものがあると考えた。

(2)LDLR結合蛋白質の解析:報告されている十数個のLDLR結合分子の中にはLDLRのリサイクルに重要なsorting nexin 17(SNX17)やリソソームへの輸送に重要なinducible degrader of low-density lipoprotein receptor (IDOL)も含まれている。これらの遺伝子欠損あるいは減弱細胞を作製し、PCSK9のLDLRのリソソーム輸送に対する効果を解析する。減弱していればPCSK9の効果を担っている可能性があると考えた。

#### 4. 研究成果:

(1)細胞内発現阻害抗体スクリーニングによる責任分子の同定: nanobody ライブラリーから、特定の蛋白質の nanobody を作成する方法については確立できた。また、DiI-LDL 蛍光標識 LDL を用いて、細胞表面上の LDL 受容体量を FACS によって評価する系を構築することができた。ただ、nanobody ライブラリーの細胞質内発現については十分な効率を得られず、改良を重ねた。

(2) **LDLR 結合蛋白質の解析:** 報告されている LDLR 結合分子の中のいくつかを解析したが、PCSK9 の機能に影響を与えるものはなかった。さらに、他の LDLR 結合分子について、解析を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------