

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15066

研究課題名(和文) ORP11はどのようにしてNPC細胞のコレステロール蓄積を軽減するのか

研究課題名(英文) How does ORP11 ameliorate cholesterol accumulation in NPC cells?

研究代表者

仲宗根 真恵 (Naoe, Nakasone)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：30632947

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)：ニーマン・ピック病C型の原因遺伝子産物 NPC1は、エンドゾーム系からのコレステロールの排出に必要であり、欠損細胞ではエンドゾームにコレステロールが蓄積する。一方、ORP(OSBP-related protein)ファミリーは、OSBP(oxysterol-binding protein)とそのホモログ計12種類の蛋白質からなる。われわれは、NPC1欠損細胞にORP11を過剰発現するとコレステロールの蓄積が減少・消失することを発見した。本研究では、この効果の生化学的機序を解析し、ORP11がRab9と複合体を形成し、エンドゾームとゴルジ体との間のコレステロール輸送を促進することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニーマン・ピック病C型(NPC)の原因遺伝子産物 NPC1の欠損細胞では、エンドゾームにコレステロールが蓄積する。本研究では、NPC1欠損細胞にORP11を過剰発現するとコレステロールの蓄積が減少・消失すること、この効果には低分子量G蛋白質Rab9が必要であることを発見した。これらの結果は、ORP11がRab9の新規エフェクターでありNPC治療のターゲットとなる可能性を示唆しており、学術的価値は高い。

研究成果の概要(英文)：A CHO cell line that lacks Niemann-Pick C1 is characterized by an accumulation of cholesterol in the late endosome/lysosome (LE/Lys). Human oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein (ORP) family consists of 12 members, OSBP and ORP1-11. We found that overexpression of ORP11 could ameliorate cholesterol accumulation in CHO/NPC1(-) cells. The ORP11 effect was abolished by a dominant-negative form of Rab9. Co-immunoprecipitation of expressed proteins and in vitro binding assay of recombinant proteins demonstrated a physical interaction between Rab9 and ORP11. ORP11 also interacted with ORP9 and evidence was presented for the presence of a ternary complex that consisted of Rab9, ORP11 and ORP9. Finally, the ORP11 effect was abolished by a dominant-negative form of ORP9. These findings suggested the presence of an NPC1-independent, LE-to-Golgi lipid transport machinery that involved Rab9, ORP11 and ORP9.

研究分野：生化学

キーワード：ニーマンピック コレステロール

1. 研究開始当初の背景

ニーマン・ピック病C型 (Niemann-Pick disease type C: NPC)の原因遺伝子産物 NPC1は、エンドゾーム系からのコレステロールの排出に必要な膜蛋白質であり、欠損細胞では後期エンドゾーム・ライソゾーム (LE/Lys)にコレステロールが蓄積する。一方、ORP (OSBP-related protein)ファミリーは、OSBP (oxysterol-binding protein)とそのホモログ (ORP1~11)計12種類の蛋白質からなり、その各々が細胞の特定の場所で、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)。これまでに、NPC1欠損細胞にORP1を過剰発現すると、LE/Lysから endoplasmic reticulum への脂質輸送が亢進し、コレステロールの蓄積が減少・消失することが報告されている (Eden et al., 2016)。われわれはこれとは別に、NPC1欠損CHO細胞にORP11を過剰発現するとコレステロールの蓄積が減少・消失することを独自のスクリーニングにより発見し(図2)、さらにORP11は低分子量G蛋白質Rab9と複合体を形成することを見出した。



図1 ORP蛋白質の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、分子量 70-100 kDa の可溶性蛋白質である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ORP11 が LE/Lys からのコレステロール排出を促進する機序を明らかにすることである。この目的に向かって、ORP11 と Rab9 の結合様式をさらに詳細に検討し、結合に必要な ORP11 の配列部位を同定する。また、ORP11/Rab9 複合体に含まれる他の蛋白質を同定する。

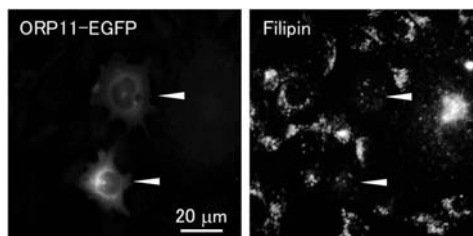


図2 NPC1欠損CHO細胞でのコレステロール蓄積に対するORP11過剰発現の効果: 発現した細胞(矢印)ではフィリピンのシグナルが減弱した。

3. 研究の方法

- (1) 培養細胞での発現蛋白質の共免沈実験により *in vivo* での相互作用を解析する。
- (2) GST (glutathione-S-transferase)融合蛋白質を用いた結合実験により *in vitro* での相互作用を解析する。
- (3) (各種蛋白質の細胞内局在を共焦点蛍光顕微鏡で観察する。Rab9-EGFP と DesRED-Golgi (ゴルジ体のマーカー)の co-localization について、Fuji-imageJ を用いて定量的に解析する。

4. 研究成果

- (1) Rab9 との結合に必要な ORP11 の配列部位を同定した。ORP11 は 2つの脂質結合部位 PHD と ORD をそれぞれ N 末端と C 末端に持つ。PHD と ORD に挟まれた 177 アミノ酸の配列を Midseq と呼ぶ。PHD, Midseq, ORD の各々を欠失するリコンビナントを作成し、GFP 標識 Rab9 との共免沈実験を行ったところ、Rab9 は Midseq に結合することが判明した。このことは Rab9 と ORP11 の結合が、ORP11 の脂質結合能に依存しないことを示唆する。

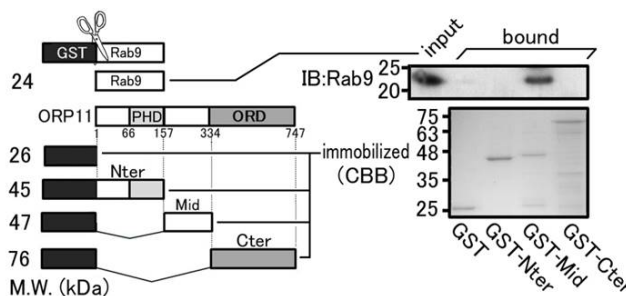


図3 GST融合蛋白質を用いた *in vitro* の結合実験の結果: 説明は本文参照

- (2) Rab9 と ORP11 の結合を GST 融合蛋白質を用いた *in vitro* の結合実験で証明した。共免沈実験の結果から予想された通り、Rab9-GST から切り出した Rab9 は、グルタチオン・ビーズに固相化した Midseq-GST に結合し、その N 端側、C 端側のフラグメントには結合しなかった(図3)。従って Rab9/ORP11 の結合は直接であり介在蛋白質は不要である。
- (3) ORP11/Rab9 複合体に ORP9 が含まれることがわかった。ORP9 も ORP11 の Midseq に直接結合するが、その結合部位は Rab9 の結合部位とは異なることを示した。共免沈実験、GST 融合蛋白質を用いた結合実験のいずれにおいても、Rab9/ORP11/ORP9 の 3 種類の蛋白質を含む複合体が存在することが示唆された。NPC1 欠損 CHO 細胞での ORP11 過剰発現の効果は、

ORP9 の dominant negative form で阻害され、ORP11 の効果はその下流の ORP9 に依存することがわかった。

- (4) NPC1 欠損 CHO 細胞ではコレステロール以外に糖脂質も LE/Lys に蓄積するが、ORP11 を過剰発現させることで、糖脂質(BODPY 標識ラクツシセラミド: BODPY-LacCer)の蓄積も軽減・消失し、正常にゴルジ体に輸送されることがわかった。これらの結果は ORP11 が LE/Lys からゴルジ体への脂質輸送を促進することを示唆する(図 4)。
- (5) CHO 細胞に Rab9-EGFP, DesRED-Golgi および ORP11-Xpress を発現させ、Rab9-EGFP と DesRED-Golgi の局在の一致に対する ORP11-Xpress の効果を解析したところ、ORP11-Xpress はこれらの蛋白質の共存を促進することがわかった。

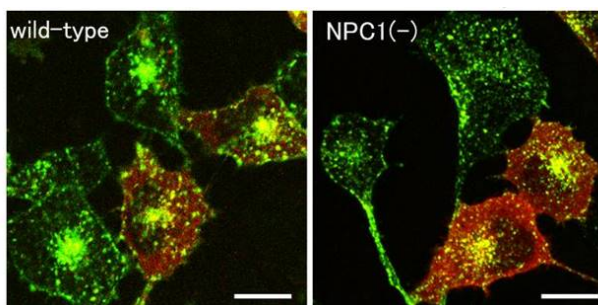


図 4 BODPY-LacCer の細胞内輸送に対する ORP11 の効果: 正常細胞(左)では BODPY-LacCer(緑)はゴルジ体に集積する。NPC1 欠損 CHO 細胞(右)では細胞質の LE/Lys にトラップされる。しかし、ORP11-mCherry (赤)を過剰発現した細胞では、正常細胞と同じようにゴルジ体に集積する。Bar:20μm

近年、異なる細胞内小器官による MCS (membrane contact site) の形成とそこでのコレステロールの移動に ORP 蛋白質が必須の役割を担うことが明らかになってきた。LE/Lys からのコレステロールの排出もその例外ではなく、この研究分野の顕著な進展として、LE/Lys と ER 間での MCS の形成・コレステロールの輸送に ORP1 が必須であることが明らかにされた。本研究の成果は、LE/Lys とゴルジ体間での MCS の形成・コレステロールの輸送に ORP11 が働くこと、その機序として Rab9, ORP9 の 2 種類の蛋白質が必要であることを示したものである(図 5)。これらの結果は、ORP11 が Rab9 の新規エフェクターであり、NPC 治療のターゲットとなる可能性を示唆しており、学術的および臨床的意義は大きい。

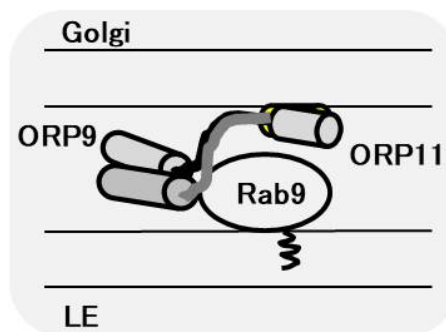


図 5 Rab9/ORP11/ORP9 蛋白質複合体は、LE/Golgi 間の MCS に存在する。

[文献]

Eden E. R., Sanchez-Heras E., Tsapara A., Sobota A., Levine T.P. and Futter C.E. (2016) Annexin a1 tethers membrane contact sites that mediate ER to endosome cholesterol transport. *Dev. Cell* **37**, 473-483.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Naoe Nakasone, Yuki Ohnishi, Haruaki Ninomiya
2. 発表標題 ORP11 bridges Rab9 to ORP9
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoe Nakasone, Yuki Ohnishi, Haruaki Ninomiya
2. 発表標題 ORP11 facilitates LE-to-Golgi lipid flow by tethering ORP9 and Rab9.
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------