

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590281

研究課題名（和文）NPC1-L1 蛋白質細胞内局在のコレステロールによる制御メカニズムの研究

研究課題名（英文）Cholesterol-dependent regulation of intracellular localization of NPC1-L1

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

研究成果の概要（和文）：

HEK293 細胞での発現系を用いて、NPC1-L1 のコレステロール濃度依存性の局在変化に關与する Rab 蛋白質を同定した。また、HepG2 細胞を用いて免疫化学的方法により内因性 NPC1-L1 の細胞内局在を検討した。その結果、内因性の NPC1-L1 も細胞膜のコレステロール濃度依存性にその局在が変化することが確かめられた。

研究成果の概要（英文）：

By using transient gene expression system in HEK293 cells, we identified Rab proteins that participate in cholesterol-dependent intracellular sorting of Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1-L1) protein. We also studied intracellular localization of endogenous NPC1-L1 in HepG2 cells and found that localization of the endogenous NPC1-L1 was also regulated in a cholesterol-dependent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ニーマンピック、コレステロール、Rab、NPC1-L1

1. 研究開始当初の背景

NPC1 は小児の遺伝性脂質蓄積症である Niemann-Pick 病 C 型の原因遺伝子として 1997 年に同定された。そのホモログである NPC1-L1 は小腸上皮細胞の細胞表面からのコレステロールの取り込みに必要であり、培養細胞の発現系ではコレステロール濃度依存性にその細胞内局在が変化することがわかっていた。

2. 研究の目的

(1) 細胞内局在の変化に關与する Rab 蛋白質

を同定すること。

(2) HepG2 細胞において、コレステロール濃度の増減により NPC1-L1 の細胞内局在が変化することを実証すること

3. 研究の方法

HEK293 細胞での発現系を用いて、NPC1-L1 のコレステロール濃度依存性の局在変化に關与する Rab 蛋白質を探索する。また、HepG2 細胞を用いて免疫化学的方法により内因性 NPC1-L1 の細胞内局在を検討する。

4. 研究成果

低分子量G蛋白質 Rab は輸送小胞の budding, fusion をコントロールするスイッチ分子として働く。NPC1-L1 の細胞内移動に関与する Rab を同定することを目的として、エンドゾーム系で働く想定されている 5 種類の Rab について、各々の

wild-type/dominant-negative

form/constitutive active form の 3 種類の cDNA コンストラクトを、NPC1-L1-YFP を安定に発現する HEK293 細胞に発現させ、NPC1-L1 のコレステロール濃度依存性の局在変化に対する効果を検討した。実際の観察には、共焦点レーザー顕微鏡を用いて Rab-GFP と NPC1-L1-YFP のシグナルを分離してリアルタイムで各々の蛋白質の局在をイメージングした。結果は以下の 3 点にまとめられる。(1) コレステロール負荷による NPC1-L1-YFP の internalization は、constitutive active form の Rab7, Rab9, Rab11 により阻害された。(2) dominant-negative form の Rab7, Rab9, Rab11 も同様の効果を示した。(3) Rab4, Rab5 の変異体の発現は効果がなかった。また、NPC1-L1-YFP を含む細胞内小胞は、蛍光標識トランスフェリンを含まず、Lamp2 に陽性であった。これらの結果は、HEK293 細胞では NPC1-L1-YFP は後期末期エンドゾームおよびライソゾームに局在することを示唆する。

培養細胞に発現させた NPC1-L1 の細胞内局在は細胞膜のコレステロール濃度依存性に変化する。すなわち、コレステロール濃度が低いときには細胞膜に局在し、それが高いときには細胞内小胞に局在する。このようなコレステロール濃度依存性の局在変化が内因性の蛋白質でも生じることを確認する目的で、HepG2 細胞を用いて免疫化学的検索を行った。

コレステロールを枯渇した状態では、NPC1-L1 は HepG2 細胞の細胞膜に局在した。これにコレステロールを負荷した標本では、NPC1-L1 は主に細胞内小胞に存在した。この小胞の一部は LAMP2、Rab7、Rab11 の抗原性が陽性であったことから、ライソゾームであると考えられた。Ezetimibe は NPC1-L1 に結合してその活性を阻害する薬物である。Ezetimibe の存在下では、このようなコレステロール濃度依存性の局在変化は起こらず、NPC1-L1 のほとんどは細胞膜に局在したままだった。

Ezetimibe はコレステロール負荷による細胞コレステロール濃度の上昇を部分的に阻害した。以上の結果から、内因性の NPC1-L1 も細胞膜のコレステロール濃度依存性にその局在が変化することが確かめられた。同様の変化が小腸上皮細胞でも認められるかどうか検討する予定である。

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)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Takamura A., Higaki K., Ninomiya H., Takai T., Matsuda J., Iida M., Ohno K., Suzuki Y. and Nanba E. (2011) Lysosomal accumulation of Trk protein in brain of GM1-gangliosidosis mouse and its restoration by chemical chaperone. *J. Neurochem.* in press 査読有
- ② Higaki K., Li L., Bahrudin U., Okuzawa S., Takamura A., Yamamoto K., Adachi K., Paraguison R. C., Takai T., Ikehata H., Tominaga L., Hisatome I., Iida M., Ogawa S., Matsuda J., Ninomiya H., Sakakibara Y., Ohno K., Suzuki Y. and Nanba E. (2011) Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant enzyme and cellular pathophysiology in β -galactosidase deficiency. *Human Mut.* in press 査読有
- ③ Ting Y., Morikawa K., Kurata Y., Li P., Bahrudin U., Mizuta E., Kato M., Miake J., Yamamoto Y., Yoshida A., Murata M., Inoue T., Nakai A., Shiota G., Higaki K., Nanba E., Ninomiya H., Shirayoshi Y. and Hisatome I. (2011) Transcriptional activation of the anchoring protein SAP97 by heat shock factor (HSF)-1 stabilizes K(v) 1.5 channels in HL-1 cells. *Br. J. Pharmacol.* in press 査読有
- ④ Yanagimoto C., Harada M., Kumemura H., Abe M., Koga H., Sakata M., Kawaguchi T., Terada K., Hanada S., Taniguchi E., Ninomiya H., Ueno T., Sugiyama T. and

- Sata M. (2011) Copper incorporation into ceruloplasmin is regulated by Niemann-Pick C1 protein. *Hepato Res.* 41, 484-491. 査読有
- ⑤ Li P., Ninomiya H., Kurata Y., Kato M., Miake J., Yamamoto Y., Igawa O., Nakai A., Higaki K., Toyoda F., Wu J., Horie M., Matsuura H., Yoshida A., Shirayoshi Y., Hiraoka M. and Hisatome I. (2011) Reciprocal control of hERG stability by Hsp70 and Hsc70 with implication for restoration of LQT2 mutant stability. *Cir. Res.* 108, 458-468. 査読有
- ⑥ Li L., Higaki K., Ninomiya H., Luan Z., Iida M., Ogawa S., Suzuki Y., Ohno K. and Nanba E. (2010) Chemical chaperone therapy: luciferase assay for screening of β -galactosidase mutations. *Mol. Genet. Metab.* 101, 364-369. 査読有
- ⑦ Luan Z., Higaki K., Aguilar-Moncayo M., Li L., Ninomiya H., Nanba E., Ohno K., García-Moreno M.I., Ortiz M.C., García Fernández J.M. and Suzuki Y. (2010) A fluorescent sp²-iminosugar with pharmacological chaperone activity for Gaucher disease: synthesis and intracellular distribution studies. *Chembiochem.* 11, 2453-2464. 査読有
- ⑧ Mizuta E., Shirai M., Arakawa K., Hidaka K., Miake J., Ninomiya H., Kato M., Shigemasa C., Shirayoshi Y., Hisatome I. and Morisaki T. (2010) Different distribution of Cav3.2 and Cav3.1 transcripts encoding T-type Ca(2+) channels in the embryonic heart of mice. *Biomed. Res.* 31, 301-305. 査読有
- ⑨ Luan Z., Ninomiya H., Ohno K., Ogawa S., Kubo T., Iida M. and Suzuki Y. (2010) The effect of *N*-octyl- β -valienamine on β -glucosidase activity in tissues of normal mice. *Brain Dev.* 32, 805-809. 査読有
- ⑩ Luan Z., Li L., Ninomiya H., Ohno K., Ogawa S., Kubo T., Iida M. and Suzuki Y. (2010) The pharmacological chaperone effect of *N*-octyl- β -valienamine on human mutant acid β -glucosidases. *Blood Cells Mol. Diseases* 44, 48-54. 査読有
- ⑪ Nindita Y., Hamada T., Bahrudin U., Hosoyamada M., Ichida K., Iwai C., Urashima S., Kuwabara N., Utami S.B., Mizuta E., Yamada K., Igawa O., Shigemasa C., Ninomiya H., Tsuchihashi T. and Hisatome I. (2010) Effect of losartan and benzbromarone on the level of human urate transporter 1 mRNA. *Arzneimittelforschung* 60, 186-188. 査読有
- ⑫ Hamada T., Mizuta E., Kondo T., Hirai M., Yamada K., Kato M., Shigemasa C., Yamamoto Y., Ninomiya H., Igawa O. and Hisatome I. (2010) Effects of a low-dose antihypertensive diuretic in combination with losartan, telmisartan, or candesartan on serum urate levels in hypertensive patients. *Arzneimittelforschung* 60, 71-75. 査読有
- ⑬ Luan Z., Higaki K., Aguilar-Moncayo M., Ninomiya H., Ohno K., García-Moreno M.I.,

Ortiz M.C., García Fernández J.M. and Suzuki Y. (2009) Chaperone activity of bicyclic nojirimycin analogues for Gaucher mutations in comparison with *N*-(n-nonyl)deoxynojirimycin. *Chembiochem.* 23, 2780-2792. 査読有

- ⑭ Yanagimoto C., Harada M., Kumemura H., Koga H., Kawaguchi T., Terada K., Hanada S., Taniguchi E., Koizumi Y., Koyota S., Ninomiya H., Ueno T., Sugiyama T. and Sata M. (2009) Niemann-Pick C1 protein transports copper to the secretory compartment from late endosomes where ATP7B resides. *Exp. Cell Res.* 315, 119-126. 査読有

[その他]

ホームページ等

<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

檜垣 克美 (HIGAKI KATUMI)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・准

教授

研究者番号：90294321