

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24790104

研究課題名(和文)細胞内コレステロール輸送に関わる分子の同定と解析

研究課題名(英文) Screening and evaluation for molecules involved in cholesterol transport

## 研究代表者

石塚 玲子 (Ishitsuka, Reiko)

国立研究開発法人理化学研究所・小林脂質生物学研究室・専任研究員

研究者番号：60342747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロールは、脂質ドメインの形成に必須な細胞膜の主要な脂質で、細胞内の量と分布が厳密に制御されている。本研究では、コレステロール結合プローブを用いて化合物ライブラリーのイメージスクリーニングを行った。その結果、コレステロールの小胞体から細胞膜への輸送を阻害する化合物や、コレステロールを後期エンドソームに蓄積させる化合物が得られた。また脂質膜に作用し、脂質ドメインの融合を引き起こすなど、ドメインを変化させる化合物を取得した。

研究成果の概要(英文)：Cholesterol is a major component of lipids on plasma membranes and plays an important role on the formation of lipid rafts. The cholesterol content and distribution in cells is properly regulated. To examine how intracellular cholesterol traffic and distribution are regulated, we screened chemical compounds involved in cholesterol traffic and distribution using a cholesterol-binding probe. We screened compounds that decrease the cholesterol probe-binding to the plasma membrane. We obtained compounds which inhibited cholesterol synthesis or cholesterol transport from the ER to the plasma membrane, or accumulated cholesterol in the late endosomes. We also got a compound which binds to liposomes and regulates the formation of the lipid domain.

研究分野：生物科学

キーワード：コレステロール

## 1. 研究開始当初の背景

コレステロールは細胞膜の主要成分で、シグナル伝達に関わる脂質ドメイン(ラフト)の形成と機能に重要な役割を果たすと考えられている。細胞のコレステロール量は厳密に制御されており、コレステロールの生合成や細胞外からの取り込みに対し、正/負のフィードバック制御がなされている。またコレステロールは細胞内で不均一に分布しており、小胞体には少なく、細胞膜に最も多く、次いでエンドソーム、ゴルジ体に多い。コレステロールは、オルガネラ間を適切に輸送され、細胞内のコレステロールホメオスタシスが維持されている。

このコレステロールの細胞内オルガネラ間の輸送は、小胞輸送の他、小胞を介さない非小胞輸送経路によることがわかってきている。小胞体から細胞膜への輸送は主に小胞輸送を介さずに行われると考えられているが、どのような分子が関与しているかは明らかでない。

これまでに申請者はコレステロールの代謝や分布を変化させる化合物を探索するために、コレステロール結合分子をプローブとして用い、全自動顕微鏡を利用するハイスループットスクリーニング系を構築した。この系を用いて化合物ライブラリーのパイロットスクリーニングを行い、細胞内コレステロールの代謝・分布を変化させる化合物が取得できることを示している(Ishitsuka, R. et al. J. Lipid Res. (2011))。

## 2. 研究の目的

上記のように、細胞内におけるコレステロールの分布・局在が厳密に制御されることは、コレステロールのホメオスタシスの維持やコレステロールの機能発現に重要であることから、本研究では、申請者が構築したスクリーニング系を利用して、コレステロールの細胞内輸送や分布に関与する分子をスクリーニングし、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。またコレステロールは脂質ラフトの形成に重要であるため、脂質ドメインに影響を与える化合物を取得し、脂質ドメインを操作するツールに応用することも目指した。

## 3. 研究の方法

(1)化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、(i)細胞内のコレステロール輸送を阻害する分子、(ii)細胞内コレステロール分布を変化させる分子、(iii)脂質ドメインに影響を与える分子を探索した。

コレステロールに結合するタンパク質・

トキシンをプローブとして用い、イメージスクリーニングを行った。トキシンは、コレステロールを豊富に含む膜に結合する性質を持つ。細胞染色には、毒性のないトキシシンC末端ドメイン(ドメイン4)にEGFPを融合させたタンパク質(EGFP-D4)を用いた。通常の細胞では、コレステロールは細胞膜に多く存在し、EGFP-D4で染色される。しかしコレステロールの細胞膜への輸送の阻害や、コレステロールの細胞内局在の変化によって、細胞表面コレステロールが減少すると、EGFP-D4は結合しなくなる。さらに脂質ドメインが異常な細胞にもこのプローブが結合しなくなると考えられる。

天然化合物および合成化合物ライブラリーを用い、18時間処理することで細胞膜のEGFP-D4染色を減少させる化合物を選択した。ヒット化合物について、下記 - のスクリーニングを行った。

細胞内コレステロール局在を指標にしたスクリーニング

コレステロール結合低分子・フィリピンを用いて細胞内コレステロールを染色し、コレステロールのオルガネラへの蓄積など、コレステロール局在の変化があるか、その局在部位を観察した。

コレステロール輸送活性を指標にしたスクリーニング

コレステロールの小胞体から細胞膜への輸送を調べるために、放射標識した生合成コレステロールを細胞膜に輸送させた後、コレステロール除去試薬により培地中に放出させ、コレステロール輸送量を測定した。この方法により細胞膜へのコレステロールの輸送が低下する細胞を選択した。

またあわせて生合成されたコレステロールの量を定量した。

および で変化がみられなかった化合物について、化合物処理時間を30分程度に短くした時に、細胞膜へのEGFP-D4の結合が減少するかを調べた。

(2)小胞体から細胞膜へのコレステロール輸送を阻害する化合物の解析

化合物の標的タンパク質の同定

(1) で得られた化合物のうち、 でフィリピンによる染色は変化させず、 で小胞体から細胞膜へのコレステロールの輸送を阻害する化合物の標的分子の同定を試みた。細胞抽出液から化合物ビーズに結合するタンパク質をアフィニティ精製し、質量分析を行った。

同定したタンパク質の発現をRNAiにより抑制し、スクリーニングの表現型が現れるかどうかを調べた。

脂質アナログ (BODIPY-スフィンゴミエリン) のエンドサイトーシスへの影響を調べた。

(3) 短時間処理で、EGFP-D4 の細胞膜への結合を阻害する化合物の解析

#### 人工膜を用いた実験

化合物が脂質膜にどのように作用するかを調べるために、人工膜を用いた結合試験を行った。また巨大リポソームに化合物を添加し、脂質ドメインの形成や状態の変化について顕微鏡観察を行った。

#### 細胞を用いた実験

細胞を化合物で処理したとき、他の脂質結合プローブによる細胞膜の染色が影響を受けるかを顕微鏡観察により調べた。さらに膜の環境依存性プローブを用いて、膜秩序が変化するかどうかを調べた。また脂質ラフトに関連するイベントへの化合物の関与を調べるために、脂質アナログ (BODIPY-ラクトシルセラミド) のエンドサイトーシスやアクチン骨格への影響を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 化合物ライブラリーを用いたスクリーニング

化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにより、細胞表面の EGFP-D4 による染色を減少させる化合物が得られた。得られた化合物の中には、コレステロールの生合成を阻害する化合物や後期エンドソームにコレステロールを蓄積させる化合物が含まれていた。またコレステロールの小胞体から細胞表面への輸送を阻害する化合物も得られた。

(2) 小胞体から細胞膜へのコレステロール輸送を阻害する化合物の解析

小胞体から細胞膜へコレステロールの輸送を阻害する化合物を得たため、標的分子を同定するために、化合物ビーズに結合するタンパク質をアフィニティ精製し、質量分析により数種の分子を得た。調製したリコンビナントタンパク質は化合物ビーズに結合したが、RNAi で細胞内での発現をノックダウンした際、小胞体から細胞膜へのコレステロール輸送は阻害されなかった。

細胞をこの化合物で処理し、タンパク質の小胞体から細胞膜への輸送への影響を調べたところ、化合物は影響を与えなかった。

細胞を化合物で処理し、蛍光スフィンゴミエリン (BODIPY-スフィンゴミエリン) を取り込ませ、エンドサイトーシスおよび細胞膜へのリサイクリングの様子を観察したとこ

ろ、得られた化合物は BODIPY-スフィンゴミエリンの細胞膜へのリサイクリングを遅延することがわかった。

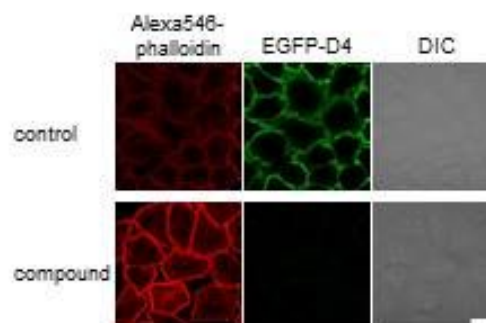
(3) 短時間処理で、EGFP-D4 の細胞膜への結合を阻害する化合物の解析

(1) のスクリーニング時には、化合物処理を 18 時間で行ったが、得られた化合物の中に、短時間処理 (30 分) で EGFP-D4 の細胞膜染色が減少するものがあることがわかった。

得られた化合物が脂質膜に作用するかを、人工膜を用いて調べたところ、リポソームに結合すること、単分子膜に挿入することが示された。また脂質ドメインが形成されている巨大リポソームに化合物を添加すると、脂質ドメインの融合が引き起こされた。

BODIPY-ラクトシルセラミドを細胞に取り込ませて、エンドサイトーシスを観察したところ、化合物の有無で差はみられなかった。

細胞を化合物で処理すると、膜秩序が変化し、アクチン重合が促進されることが明らかになった (下図)。



## 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 4 件)

Kishimoto T\*, Ishitsuka R\*, Kobayashi T. \* equally contributed (2016) Detectors for evaluating the cellular landscape of sphingomyelin- and cholesterol-rich membrane domains. *Biochim Biophys Acta. - Molecular and Cell Biology of Lipids*. In press 査読有  
doi: 10.1016/j.bbalip.2016.03.013.

Bhat HB\*, Ishitsuka R\*, Inaba T, Murate M, Abe M, Makino A, Kohyama-Koganeya A, Nagao K, Kurahashi A, Kishimoto T, Tahara M, Yamano A, Nagamune K, Hirabayashi Y,

Juni N, Umeda M, Fujimori F, Nishibori K, Yamaji-Hasegawa A, Greimel P, Kobayashi T. \* equally contributed (2015) Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. FASEB J. 29, 3920-3934. 査読有  
doi: 10.1096/fj.15-272112.

Arita Y, Nishimura S, Ishitsuka R, Kishimoto T, Ikenouchi J, Ishii K, Umeda M, Matsunaga S, Kobayashi T, Yoshida M. (2015) Targeting cholesterol in a liquid-disordered environment by theonellamides modulates cell membrane order and cell shape. Chem Biol. 22, 604-10. 査読有  
doi: 10.1016/j.chembiol.2015.04.011.

Bhat HB, Kishimoto T, Abe M, Makino A, Inaba T, Murate M, Dohmae N, Kurahashi A, Nishibori K, Fujimori F, Greimel P, Ishitsuka R, Kobayashi T. (2013) Binding of a pleurotolysin ortholog from *Pleurotus eryngii* to sphingomyelin and cholesterol-rich membrane domains. J Lipid Res 54, 2933-2943. 査読有  
doi: 10.1194/jlr.D041731.

〔学会発表〕(計 2 件)

石塚玲子、小林俊秀「脂質ドメインと膜秩序を変化させる化合物のスクリーニングと解析」BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 神戸ポートアイランド・神戸市・兵庫県、2015 年 12 月 1 日

石塚玲子、斎藤臣雄、長田裕之、岩下淑子、小林俊秀「細胞内コレステロール代謝や局在に関わる化合物のスクリーニング」第 86 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜・横浜市・神奈川県、2013 年 9 月 13 日

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石塚玲子 (ISHITSUKA Reiko)

国立研究開発法人理化学研究所

小林脂質生物学研究室・専任研究員

研究者番号：60342747

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし