

表 題 細胞内における Oxysterol-binding protein-related protein (ORP) 6 の局在と機能の解析

論文の区分 博士課程

著 者 名 望月 信弥

担当指導教員氏名 野田 泰子 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
人間生物学系 専攻
生体構造医学 分野
構造解析学 専攻科

2019年1月10日申請の学位論文

目次

略語	2
第 1 章 はじめに	4
第 2 章 実験材料と方法	8
第 3 章 結果	13
第 4 章 考察	38
謝辞	42
引用文献	43

略語

ALS: amyotrophic lateral sclerosis

ANK: ankyrin repeat

BCA: bicinchoninic acid

BCIP: 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate

BiFC: bimolecular fluorescent complementation

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

DIV: day in vitro

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EEA1: early endosome antigen 1

EGFP: enhanced green fluorescent protein

ER: endoplasmic reticulum

E-Syt2: extended-synaptotagmin 2

FBS: fetal bovine serum

FFAT: two phenylalanines in an acidic tract

FITC: fluorescent isothiocyanate

GaT: β 1,4-galactosyltransferase

HBSS: Hanks' balanced salt solution

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HRP: horseradish peroxidase

KDEL: lysine-aspartic acid-glutamic acid-leucine

MCS: membrane contact site

NBT: nitro blue tetrazolium chloride

ORD: OSBP-related ligand binding domain

OSBP: oxysterol binding protein

ORP: oxysterol binding protein-related protein

PH: pleckstrin homology

PA: phosphatidic acid

PBS: phosphate buffered salts

PCR: polymerase chain reaction

PI4P: phosphatidylinositol-4-phosphate

PI(3,4,5)P₃: phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate

PI(4,5)P₂: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PLC δ 1: phospholipase C delta 1

RFP: red fluorescent protein

RIPA: radioimmunoprecipitation assay

RNA: ribonucleic acid

RNAi: RNA interference

SSC: saline-sodium citrate

TBS-T: tris buffered saline with tween 20

TM: transmembrane domain

VAP: vesicle-associated membrane protein-associated protein

第1章 はじめに

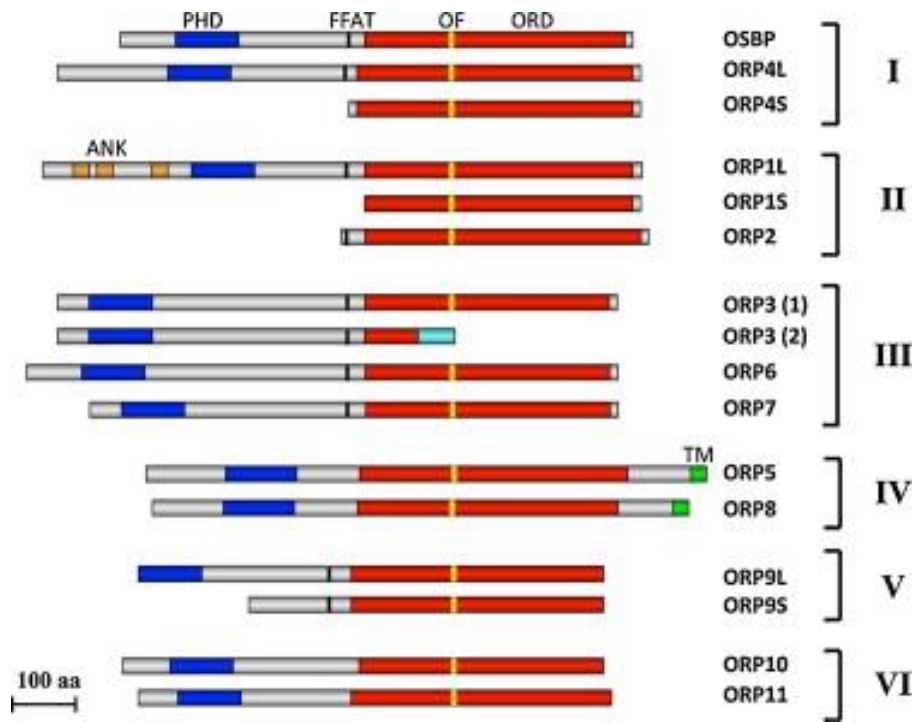
Oxysterol-binding protein (OSBP)-related proteins (ORPs)はコレステロールの一種であるオキシステロール結合タンパク群として発見され、C末側に共通の OSBP-related ligand binding domain (ORD)を有する。真核生物がもつ ORPs 分子は、哺乳類では、12 の ORP が I ~VIのサブファミリーに分類されている [1] (図 1A)。さらに、酵母を除くと、N末側に特異的なリン酸化イノシトール等と結合する pleckstrin homology (PH)ドメイン、中央寄りに vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP)との結合を介して小胞体膜につく two phenylalanines in an acidic tract (FFAT)モチーフなどの機能的なドメインを有するが、選択的スプライシングにより、PHドメインを欠いた短いバリエーションも存在する [2]。ORPs はこれらのドメインを介して、異なる膜小器官に結合し、それらが近接する様々な membrane contact site (MCS)にも局在し膜小器官の間での脂質輸送 [3]やシグナル伝達 [4]に関与することが明らかになった (図 1B)。最初に同定された OSBP は小胞体-ゴルジ MCS に、ORP3 は小胞体-細胞膜 MCS に、それぞれ局在する [5,6]。また、近年、サブファミリーIVに属する ORP5 と ORP8 は C末側に膜貫通ドメインを有し、小胞体-細胞膜 MCS や小胞体-ミトコンドリア MCS に、局在することが報告された [3,7]。

ORP6 が属するサブファミリーIIIは ORP3, ORP7 を含む。サブファミリーIIIの分子は、サブファミリーIと共にPHドメインとORDの間、FFATのN末側に、二量体を形成するとされる配列を有する。サブファミリーIIIでもっとも解明が進んでいる ORP3 は、小胞体及び細胞膜特に突起の先端に局在し、ORDを介して R-Ras と相互作用して細胞接着の調節に関与することが報告されている [8, 17]。ORP6 については、トランスクリプトーム解析によって *Orp6* mRNA が脳や筋肉に多く発現することや [9]、マクロファージにおいてマイクロRNAによる発現制御下でコレステロール輸送に寄与することが報告された [10]。さらに、ORP6 はアルツハイマー病の発症や、自閉症に関連する遺伝子としても同定された [11,12]。ORP6 は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) 8に関連ある変異型 VAPB を過剰発現する小胞体分画 [13]でも同定され、神経変性疾患に関与する可能性もでてきている。しかしながら、ORP6 の機能についてはまだ十分に知られていない。

本研究では、細胞内における ORP6 の機能を明らかにする目的で、はじめにマウス脳における ORP6 の発現様式を解析後、ORP6 を内在性に発現している小脳顆粒細胞の初代培養系において ORP6 を細胞内小器官に対するマーカーや他の ORPs と共発現させて ORP6 の局在を解析した。可視化に際してはデルタ

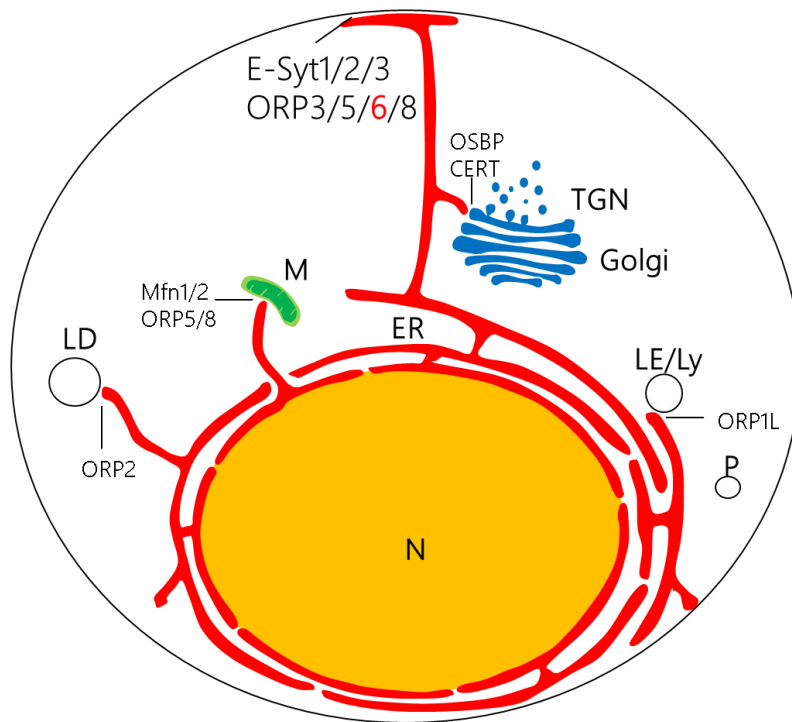
ビジョン蛍光顕微鏡を用い、より鮮明な画像を取得するためにデコンボリューションによる画像処理を行った。これらの検討により、**ORP6** は小脳顆粒細胞において小胞体及び小胞体-細胞膜 **MCS** に局在して、**ORP3** もしくは **ORP6** 自身と直接二量体を形成し、**phosphatidylinositol-4-phosphate (PI4P)**代謝に関与する可能性が示唆された。

A



[14]

B



[15]

図 1. 哺乳類 ORP サブファミリー分類とドメイン構成の比較 (A)と細胞内におけるタンパクの局在 (B)

(A) ORP ファミリーの特徴的な配列を、PH ドメイン (青)、ORD (赤)、FFAT モチーフ (黒)、OSBP 保存配列 (黄色)、ankyrin repeat (オレンジ)、膜貫通ドメイン (緑)、ORP3 スプライスバリエント 2 における ORD とは無関係な配列 (水色)、で示す。タンパクに表記されている”S”や”L”はそれぞれ”Short”と”Long”を示しており、右のローマ数字はサブファミリーを示す。

(B) 小胞体と他の異なる膜小器官の間の MCS に局在するタンパク。ER：小胞体、Golgi：ゴルジ体、LD：脂肪滴、LE/Ly：後期エンドソーム/ライソソーム、M：ミトコンドリア、N：核、P：ペルオキシソーム。E-Syt1/2/3：Extended-synaptotagmin 1/2/3, CERT：ceramide transfer protein, Mfn1/2：Mitofusin1/2

第2章 実験材料と方法

2-1. cDNA

ORP6 (NM_001290733.1) cDNA 全長クローンを、マウス脳 cDNA (8-12 週齢) ライブラリーから PCR で増幅後、配列確認した。ORP6 全長、ORP6 PH ドメイン (83-187 アミノ酸をコードする cDNA)、ORP6 中間領域 (184-594 アミノ酸をコードする cDNA) を pEGFP-N1 (Clontech, Mountain View, USA)、pEGFP-C1 (Clontech)、pTagRFP-N (Evrogen, Moscow, Russia)、pTagRFP-C (Evrogen)、HaloTag (Promega, Madison, USA) ベクターに挿入した。"N1" もしくは "N" ベクターでは、挿入配列は蛍光タンパクの N 末側に、"C1" もしくは "C" ベクターでは蛍光タンパクの C 末側について発現される。

Extended-synaptotagmin-2 (E-Syt2) (NM_028731.5) を pEGFP-C1 と pTagRFP-C ベクターに、ORP3 (NM_001347213.1) と ORP5 (NM_001199227) を pEGFP-C1、HaloTag ベクターに、phospholipase C delta 1 (PLC δ 1) PH ドメイン (AF_133125, 11-140 アミノ酸をコードする cDNA) と OSBP PH ドメイン (M86917, 87-189 アミノ酸をコードする cDNA) を pTagRFP-C ベクターに、それぞれクローニング後、挿入した。Cell-Light ER-RFP cDNA は Molecular Probes (Eugene, USA) から購入した。トランス・ゴルジマーカの β 1,4-galactosyltransferase (GalT, NM_022305, 1-81 アミノ酸をコードする cDNA) を pEGFP-N1、pTagRFP-N ベクターに、小胞体—ゴルジ中間区画マーカの Sec 23A を pTagRFP-N ベクターに、小胞体—ゴルジ間小胞マーカの Sec 22B (NM_0048920) を pEGFP-C1 ベクターに挿入した。

2-2. 細胞培養

HeLa 細胞と Neuro-2A 細胞を、それぞれ 10%FBS を含む DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) を用いて 37°C、5%二酸化炭素濃度下で培養した。小脳顆粒細胞の初代培養は、Stelmashook らの方法をもとに行った[16]。30%イソフルラン麻酔下において生後 7 日齢の ICR マウス (Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan) から小脳を採取し、0.05%トリプシン EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) に浸漬し室温で 7 分間静置した。HBSS (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) で 3 回液替え後、ポリ-L-リジンでコートした 4 分割のガラスボトムディッシュ (Greiner Bio-One, Kremsmunster, Austria) に 4×10^4 /ウェルの細胞を播種した。細胞は B27 supplement (Thermo Fisher

Scientific)を含む 0.5ml の Neurobasal 培地 (Thermo Fisher Scientific)を用いて 37°C、5%二酸化炭素濃度下で培養した。

2-3. 遺伝子導入および画像解析

Lipofectamine LTX and Plus 試薬 (Thermo Fisher Scientific)を用いて HeLa 細胞、Neuro-2A 細胞、培養 4 日目の小脳顆粒細胞に遺伝子導入を行った。遺伝子導入 14 時間後に、DeltaVision Elite 顕微鏡システム (GE Healthcare, Chicago, USA)もしくは FluoView FV1000 倒立共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan)を用いて画像を取得した。可溶性の ORP6 を除去する目的で行ったサポニン処理では、遺伝子導入 14 時間後の HeLa 細胞を 10%FBS を含む DMEM で 2 回液替え後、0.05%サポニンを含む DMEM を用いて 37°C、5%二酸化炭素濃度下で 10 分間静置し、10%FBS を含む DMEM で 2 回液替え後、観察した。ORP6 の発現抑制を目的として、ステルス RNAi (MSS235331, Thermo Fisher Scientific)を、同様の手法を用いて遺伝子導入した。FITC 蛍光ラベルをつけた oligo RNA (Block-it Fluorescent Oligo, Thermo Fisher Scientific)を陰性コントロールとした。

2-4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびウェスタンブロット

マウスの各臓器および細胞分画に対して、抗 ORP6 抗体 (ウサギ SAB2700968, Sigma-Aldrich)を用いて、ウェスタンブロットを行った。マウス臓器、胎生 18 日マウス脳、生後 1、7、14、21、28 日及び 8 週マウス脳、初代培養小脳顆粒細胞を、Complete EDTA-free プロテアーゼ阻害剤 (Roche, Basel, Switzerland) 入りの RIPA 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 0.5% deoxycholate, 1% NP-40)で溶解し BCA キット (Takara Bio, Shiga, Japan)を用いてタンパク質定量を行った。

細胞分画を得るため、Neuro-2A 細胞を HEPES 緩衝液 (20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM EDTA)に懸濁し、700G で 5 分間遠心後、P1 画分を回収した。その後上清を 10,000G で 30 分間遠心し、沈殿の P2 画分を回収し、さらに上清を 100,000G で 1 時間遠心後 P3 と S3 画分を回収した。10% ポリアクリルアミドゲルに各レーン 100 µg のタンパクを乗せ、電気泳動後 PVDF 膜 (GE Healthcare) に転写し、ウェスタンブロットを行った。

膜は、親水処理後、5%スキムミルク入り TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl)にて室温で 30 分間ブロッキングを行った。一次抗体を 37°C で 2 時間反応させ、TBS-T (0.1% Tween-40, TBS)で洗浄後、HRP 標識二次抗体を

37°Cで1時間反応させた。TBS-Tで洗浄後、ECL Prime Western blotting 検出試薬(GE Healthcare)を用いて化学発光させ、ImageQuant LAS 4000 Mini imager (GE Healthcare)で画像を取得した。Image-J software を用いて定量解析を行った。分画のコントロールとして、初期エンドソームと小胞体に対する抗体(抗 EEA1 抗体(マウス clone 14/EEA1, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, USA)、抗 KDEL 受容体抗体(マウス clone 10C3, sc-58774, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA))を用いた。二次抗体として、HRP 標識 抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare)、HRP 標識 抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare)を用いた。

2-5. *In situ* ハイブリダイゼーション

In situ ハイブリダイゼーション法に用いる ORP6 cDNA フラグメント (758-1555 bp)箇所のアンチセンスプローブとセンスプローブを、pBluescript II KS にクローニング後、digoxigenin-RNA mix (Roche)と T7 ポリメラーゼ、T3 ポリメラーゼを用いて digoxigenin でラベルした。4、もしくは8週齢 ICR マウスを30%イソフルラン麻酔下で、4%パラフォルムアルデヒド-PBS(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4)にて還流固定し、それぞれ小脳、大脳を採取した。同一溶液にて室温にて一晚浸漬固定し、エタノール脱水後、パラフィン (Paraplast, Thermo Fisher Scientific) に包埋した。回転式マイクロトーム(HM360, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)にて作製した7 µm厚の切片を、脱パラフィン後、SSC 緩衝液(0.75 M NaCl, 0.075 M sodium citrate)を用いて室温にて15分間洗浄し、ハイブリダイゼーション前溶液 (50%ホルムアミド、5×SSC、salmon sperm DNA 40 mg/ml)を用いて58°Cにて2時間反応させた。プローブを、80°Cで5分間変性後、400 ng/mlとなるよう付加し、58°Cで一晚ハイブリダイゼーションを行った。切片は、SSCを用いて58°Cで30分間3回洗浄後、溶液 1 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl)を用いて5分間平衡化し、アルカリフォスファターゼ 標識 抗 digoxigenin 抗体 (11175041910, Roche)を室温にて2時間反応させた。切片を、溶液 1 で15分間洗浄後、溶液 2 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)にて5分間平衡化を行い、NBT (nitro-blue tetrazolium, Roche)と BCIP (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate, Roche)を含む溶液 2 にて室温で一晚反応させ、シグナルを検出した。エオシンを用いて対比染色を行った。

2-6. タンパク質-脂質結合分析

Membrane Lipid Strips 膜 (Echelon Bioscience, Salt Lake City, USA)を用いて ORP6 の結合脂質を解析した。GFP を N 末につけた ORP6 PH ドメイン (87-183 アミノ酸をコードする cDNA)を pET21 ベクターに挿入し、BL21 (DE3) 細胞 (BioDynamics Laboratory Inc, Tokyo, Japan)内でヒスチジンタグ付きの組み換えタンパクとして発現させ、TALON beads (Clontech)を用いてタンパク精製を行った。精製したタンパクを、製造会社のプロトコールに従って Membrane Lipid Strips 膜と反応させた。GFP 融合 ORP6 PH ドメインの検出は、抗 GFP 抗体(ウサギ A6455, Life Technologies, Carlsbad, USA)と反応させ、PBS-0.1% Tween40 で洗浄後、ECL Prime Western blotting 検出試薬 を用いて化学発光させ、ImageQuant LAS 4000 Mini imager で画像を取得した。2 回の独立した実験を行った。

2-7. 免疫沈降法

Neuro-2A 細胞に、pEGFP-C1、pEGFP-ORP3、pEGFP-ORP5、pEGFP-ORP6 をそれぞれ単独で、もしくは HaloTag-ORP6 中間領域あるいは HaloTag ベクターと一緒に遺伝子導入した。Neuro-2A 細胞は、遺伝子導入 24 時間後に PBS で洗浄し、Complete EDTA-free プロテアーゼ阻害剤および Triton X-100 を含む溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100)に懸濁した。氷上で 30 分間静置後、4°Cにて 3000G で 15 分間遠心し、上清を protein A ビーズ (GE Healthcare) と protein G ビーズ (GE Healthcare)を用いて 4°Cで 30 分間反応させた。遠心後の上清を抗 GFP 抗体と 4°Cで 1 時間反応させた後、protein A ビーズを加えて 4°Cで 1 時間反応させた。遠心後に上清を捨て溶解液で 2 回洗浄し、SDS-PAGE loading 溶液に懸濁した。抗 ORP6 抗体、抗 GFP 抗体、抗 HaloTag 抗体 (マウス G928A, Promega)を用いてウェスタンブロット法にて解析を行った。3 回の独立した実験を行った。

2-8. 統計学的解析

HeLa 細胞に、RFP-E-Syt2 および GFP-ORP6 と、HaloTag-ORP6 中間領域もしくは HaloTag のみを遺伝子導入し、ORP6 の細胞内局在に基づいて 3 つのグループ：①点状の ORP6 が小胞体上に局在、②点状の ORP6 が小胞体と細胞膜上に局在、③ORP6 が細胞質内で拡散して発現に分類した。3 回の独立した実験を行い、細胞数は HaloTag 群が 63、HaloTag-ORP6 中間領域群が 71 であった。

初代培養小脳顆粒細胞に、RFP-OSBP PH ドメインと、GFP、GFP-ORP6 または GFP-ORP6 中間領域を遺伝子導入し、OSBP PH ドメインの細胞内局在に基づいて 3 つのグループ：①OSBP PH ドメインがゴルジ体に局在、②OSBP PH ドメインがゴルジ体と細胞膜に局在、③OSBP PH ドメインが細胞質内で拡散して発現に分類した。8 回の独立した実験を行い、細胞数は GFP 群が 79、GFP-ORP6 群が 77、GFP-ORP6 中間領域群が 77 であった。

初代培養小脳顆粒細胞に、RFP-OSBP PH ドメインと ORP6 に対する RNAi もしくはコントロール RNA を遺伝子導入し、上記の実験と同様に、OSBP PH ドメインの局在に基づいて 3 つのグループに分類した。5 回の独立した実験を行い、5 回試行の合計細胞数はコントロール群が 63、RNAi 群が 76 だった。

結果は、平均値±標準誤差で表示し Welch's t-test を用いて解析した。統計学的有意差は p 値< 0.05 とした。

2-9. 動物と組換え

本研究における動物実験および遺伝子組換え実験は自治医科大学学長の承認を得て施行した（動物実験承認番号は 17023-01、遺伝子組換え許可番号は 18-11）。

第3章 結果

3-1. ORP6 の発現臓器と発達期ごとの発現量

ORP6 タンパクの発現臓器を明らかにするために、ORP6 の C 末端領域 (872-934 アミノ酸) に対する市販抗体を用いてウェスタンブロット法を行った。抗体は、アミノ酸配列から予想される ORP6 の分子量である 108 kDa と、遺伝子導入した GFP タグ付きの ORP6 の約 140 kDa の大きさにバンドを検出した。内在性 ORP6 タンパクの発現は成熟マウス脳、小脳、脊髄、胎児マウス脳で認められ (図 2A)、マウス脳における ORP6 タンパクの発現量は発達期ごとに増加し、生後 28 日齢で成獣量に達した (図 2B)。さらに初代培養小脳顆粒細胞では、ORP6 タンパクの発現が DIV5 以降で認められた (図 2C)。細胞分画においては、内在性 ORP6 を小胞体マーカーである KDEL 受容体陽性の P2 画分や初期エンドソームマーカーである EEA1 陽性の P3 画分、可溶性細胞質画分の S3 で検出した (図 2D)。

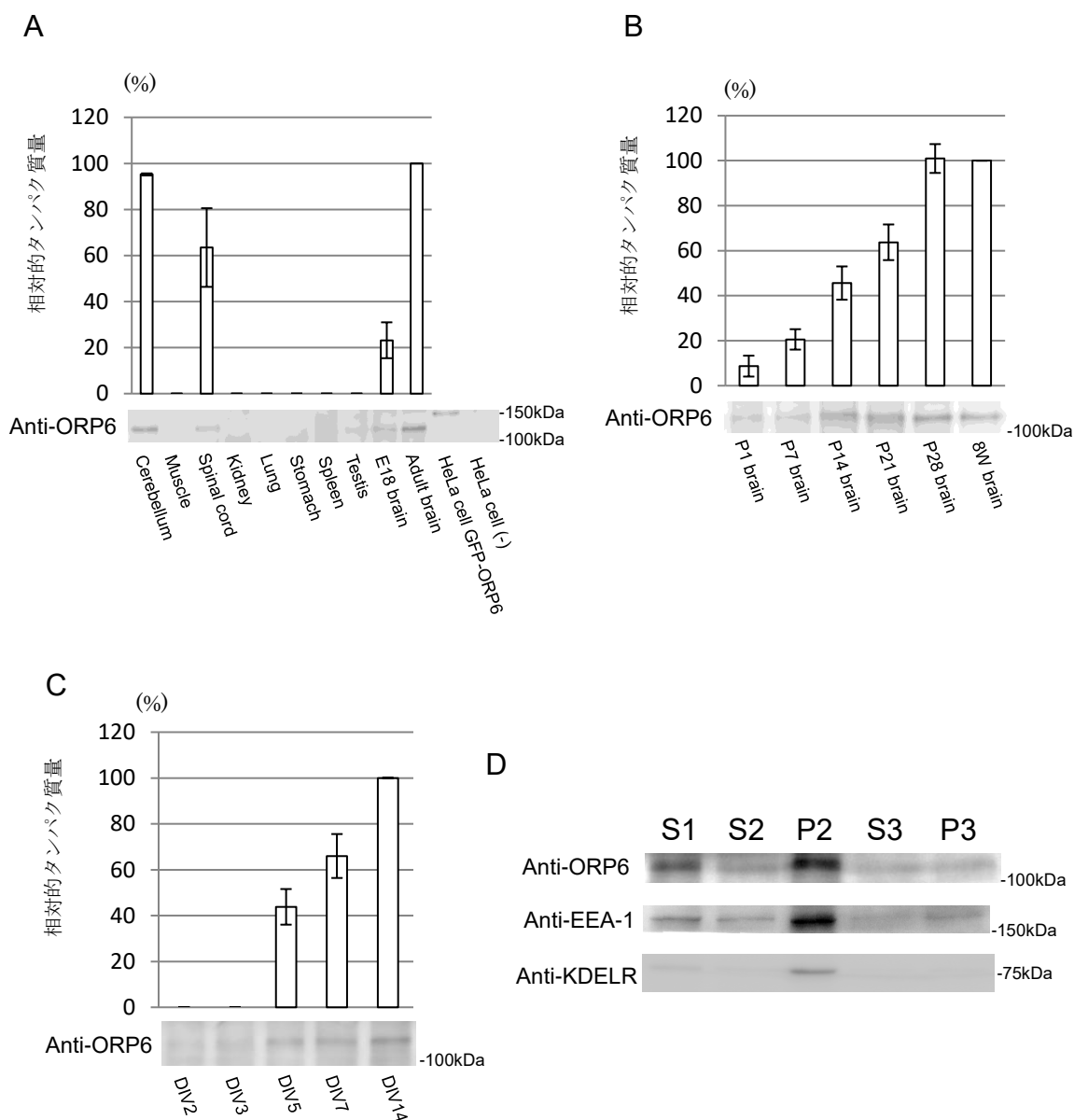


図 2. ORP6 タンパクはマウス成獣脳、小脳や脊髄に多く発現した (A) マウスにおける ORP6 タンパクの発現臓器。内在性 ORP6 の予想分子量である 108 kDa と GFP-ORP6 の 140 kDa の大きさにバンドを検出した。縦軸は ORP6 の、成獣の脳に対する相対的タンパク質量を示す。(B) マウス脳の発達に伴う ORP6 の発現。縦軸は ORP6 の、8 週齢のマウス脳に対する相対的タンパク質量を示す。(C) 初代培養小脳顆粒細胞における ORP6 の発現。縦軸は ORP6 の、DIV14 の初代培養小脳顆粒細胞に対する相対的タンパク質量を示す。(D) Neuro-2A 細胞の細胞分画。内在性 ORP6 を小胞体マーカー陽性の P2 画分や初期エンドソームマーカー陽性の P3 画分、可溶性細胞質画分の S3 画分で検出した。

3-2. 大脳、小脳における *Orp6* mRNA の発現領域

マウス脳における内在性 ORP6 の脳内での発現領域を確認するために、*in situ* ハイブリダイゼーション実験を行った。*Orp6* mRNA のシグナルは、生後 8 週齢の大脳皮質に発現し、海馬ではみられなかった (図 3 A,C)。生後 4 週齢の小脳では、*Orp6* mRNA の陽性反応の大部分が顆粒細胞層やプルキンエ細胞層で認められ、分子層にも *Orp6* mRNA のシグナルがみられた (図 4A)。これらの結果から、ORP6 は一部の領域を除く成獣脳の、特に神経細胞に発現していることがわかった。

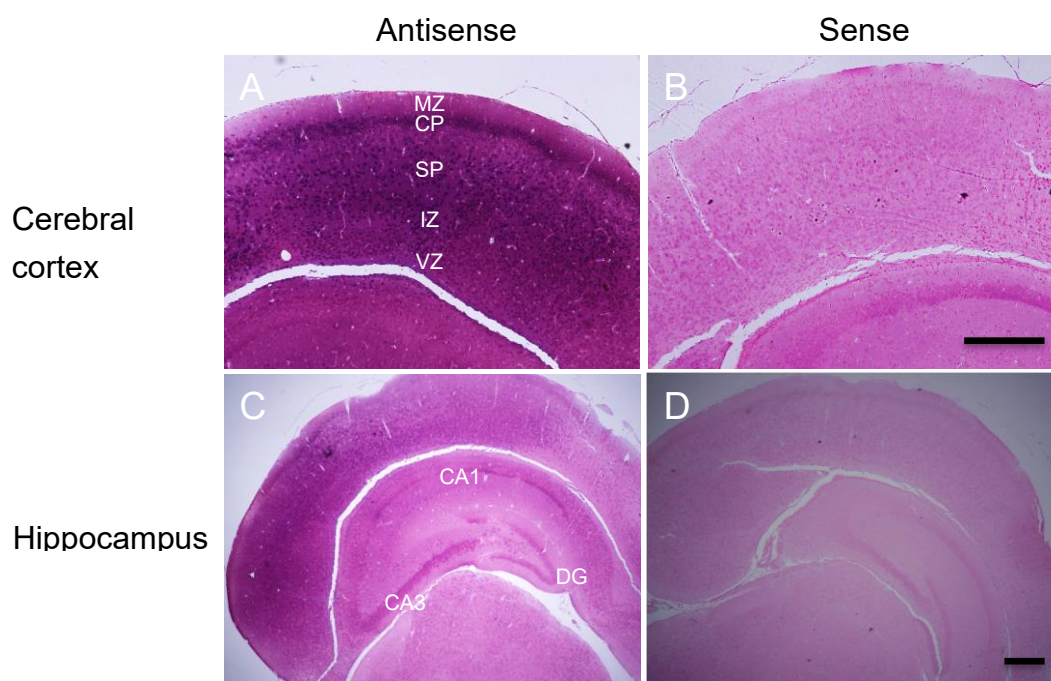


図 3. *Orp6* mRNA は大脳皮質の神経細胞に発現した
8 週齢マウスの大脳皮質 (A,B)と海馬 (C,D)における *in situ* ハイブリダイゼーション。*Orp6* アンチセンス鎖 (A,C)とセンス鎖 (B,D)を用い、切片はエオシン染色で対比染色を行った。*Orp6* mRNA のシグナルを大脳皮質で検出したが、海馬ではみられなかった。MZ: 辺縁帯 CP: 皮質板 SP: サブプレート IZ: 中間層 VZ: 脳室帯
スケールバー: 50 μ m

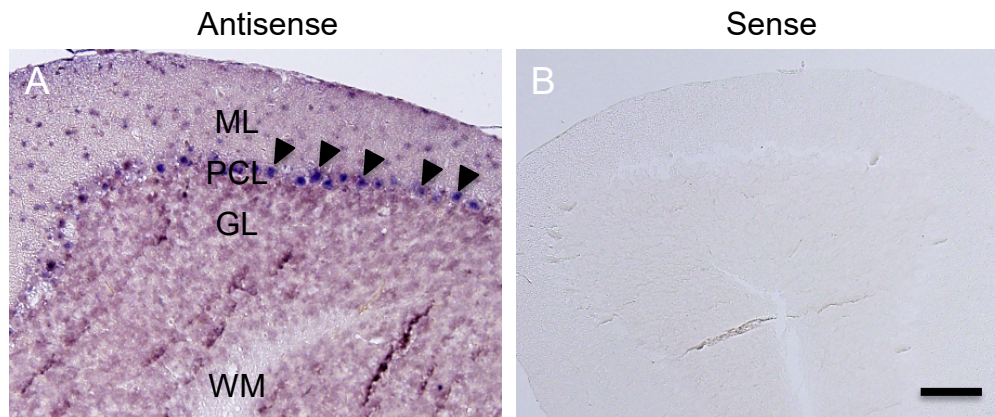


図 4. *Orp6* mRNA は小脳顆粒細胞やプルキンエ細胞に発現した 4 週齢マウスの小脳における *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。*Orp6* アンチセンス鎖 (A) と *Orp6* センス鎖 (B) を用いて標識した。ML: 分子層 PCL: プルキンエ細胞層 GL: 顆粒細胞層 WM: 白質 矢頭はプルキンエ細胞を示す。スケールバー : 50 μ m

3-3. HeLa 細胞における ORP6 の局在

ORP6 の細胞内における局在を明らかにするために、ORP6 と蛍光分子との融合タンパクを細胞内小器官に対するマーカーと一緒に HeLa 細胞に遺伝子導入する実験を行った。はじめに、蛍光分子の位置による ORP6 の発現様式への影響を確認するために、蛍光分子の N 末側に挿入した ORP6 (ORP6-GFP) と C 末側に挿入した ORP6 (GFP-ORP6) の発現様式を比較した。遺伝子導入 14 時間後において GFP-ORP6 を発現していた細胞の約半数では、点状の GFP-ORP6 を認め (図 5 B)、残りの細胞では細胞質内で拡散した。一方、ORP6-GFP では細胞質内で拡散して発現し (図 5 A)、サポニン処理を加えて可溶性の ORP6 を除去すると、点状の ORP6-GFP を認めた。この点状の ORP6-GFP は、RFP-ORP6 と共発現させた細胞では、両者で局在が一致した (図 5 C-E)。点状の ORP6-GFP のパターンは、単独発現と共発現とで変わらなかった。膜分画並びに細胞質への外来性 ORP6 の局在パターンは、これまでの細胞分画法で得られた内在性 ORP6 の局在結果 (図 2D) や、外来性 ORP6 での報告 [9,17] と一致した。以降の実験では、GFP-ORP6 を使用した。

細胞内小器官のマーカーとの共発現では、点状の ORP6 は小胞体マーカー (図 6 A-C 矢印) 上に局在し、小胞体-細胞膜 MCS のマーカーの E-Syt2 と共発現させると、細胞辺縁の点状 ORP6 の一部について、局在が E-Syt2 と一致した (図 6 D-F 矢印)。一方、ゴルジ体マーカーの GalT (図 6 G-I) や小胞体-ゴルジ中間区画マーカーの Sec 23A (図 6 J-L) とは異なる局在を示した。

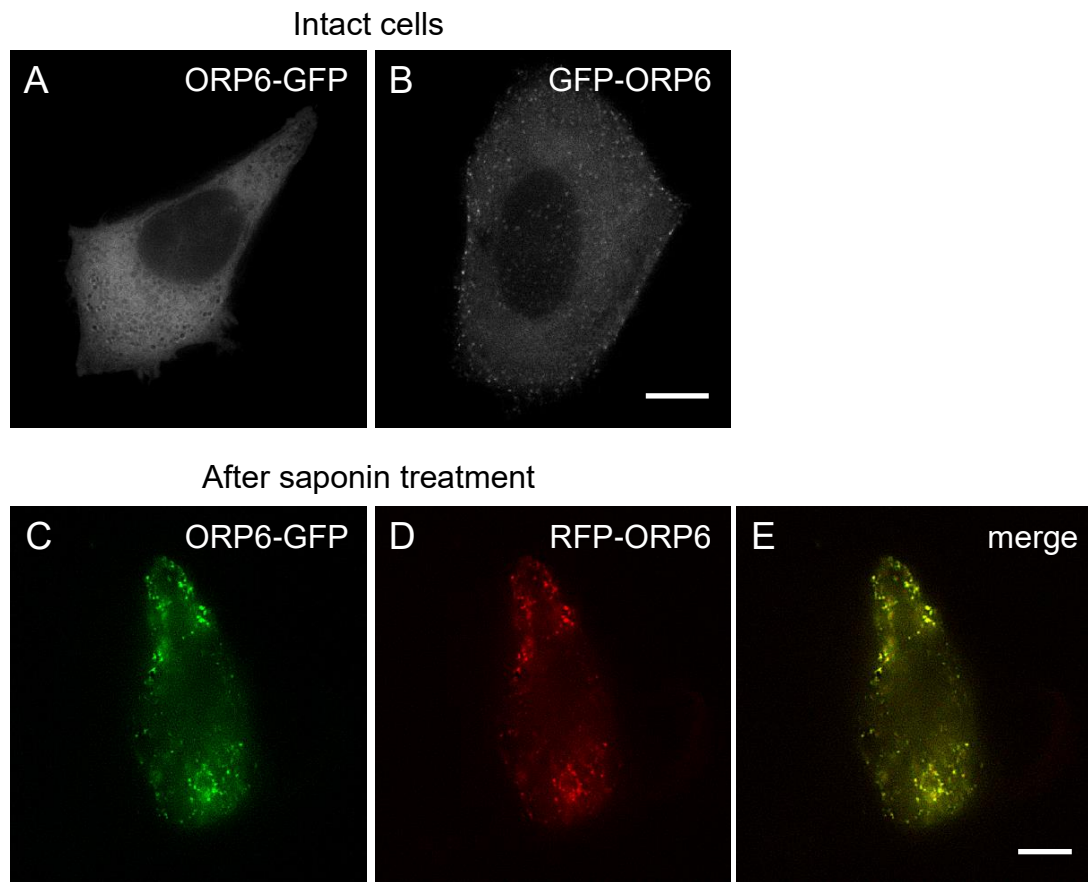


図 5. ORP6-GFP は拡散して発現し、GFP-ORP6 は約半数の細胞で点状に発現した

HeLa 細胞内に発現した ORP6-GFP (A) と、点状に発現した細胞での GFP-ORP6 (B)。サポニン処理後、点状の ORP6-GFP が残り (C)、GFP-ORP6 (D) と共局在した。スケールバー : 10 μm

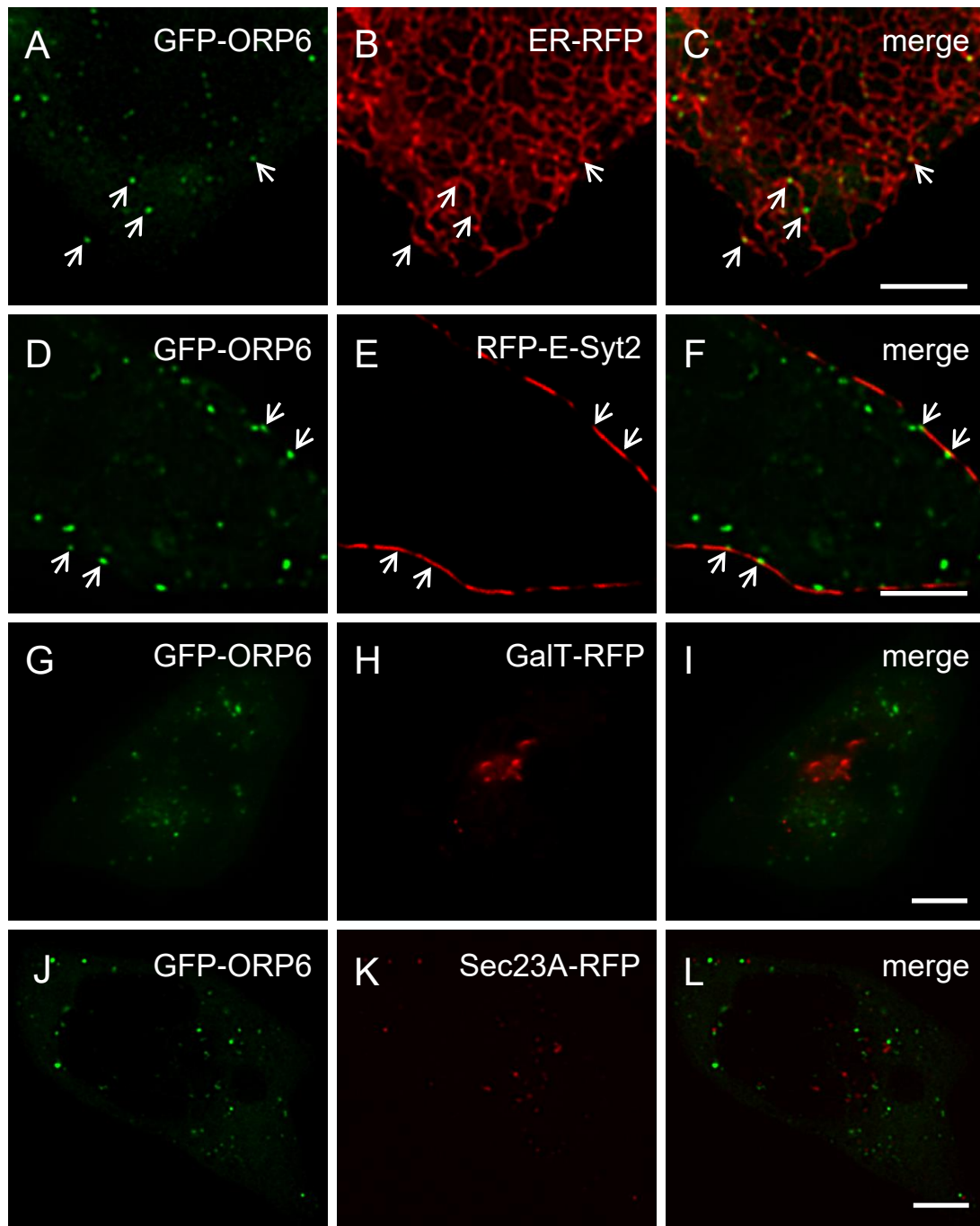


図 6. HeLa 細胞では ORP6 は小胞体もしくは小胞体-細胞膜 MCS に局在した
 (A-C) GFP-ORP6 (緑)と小胞体マーカー、ER-RFP (赤)を共発現した HeLa 細胞の蛍光画像。矢印は小胞体マーカー上に局在した ORP6 シグナルを示す。
 (D-F) GFP-ORP6 (緑)と小胞体-細胞膜 MCS マーカー、RFP-E-Syt2 (赤)を共発現した HeLa 細胞の蛍光画像。矢印は、細胞辺縁部の ORP6 が E-Syt2 と重なっている部位を示す。
 (G-I) GFP-ORP6 (緑)とゴルジ体マーカー、GalT-RFP (赤)を共発現した HeLa 細胞の蛍光画像。
 (J-L) GFP-ORP6 (緑)と小胞体-ゴルジ中間区画のマーカー、Sec23A-RFP (赤)を共発現した HeLa 細胞の蛍光画像。スケールバー：10 μ m

3-4. 小脳顆粒細胞における ORP6 の局在

次に、内在性の ORP6 を発現する初代培養小脳顆粒細胞 DIV5 において、ORP6 を遺伝子導入して細胞内局在を観察した。GFP-ORP6 は神経細胞の突起内へは入らず、細胞体のみを発現した (図 10 ABA'B')。細胞内小器官に対するマーカーと共発現すると、ORP6 は、小胞体マーカー上に局在し (図 7 A-C 矢印)、GalT (図 7 D-F) や Sec22B (図 7 G-I) とは局在が一致しなかった。細胞辺縁部の ORP6 の一部は E-Syt2 と共局在し (図 8 A-C 矢印)、HeLa 細胞における実験と同様の局在結果を得た。細胞膜上の共局在は、共焦点レーザー顕微鏡にても確認した。

ORP6 と同じサブファミリーⅢに属する ORP3 や、サブファミリーⅣに属する ORP5 を GFP-C1 ベクターで発現させたところ、細胞辺縁のシグナルの一部は E-Syt2 と共局在し (図 8 D-I 矢印)、細胞内のシグナルは小胞体マーカー上に認められた (図 9 矢印)。ORP3 では、細胞体だけでなく神経突起内にもシグナルがみられた (図 8 D-F 矢頭、9 A-C 矢頭、10 C'-F' 矢印)。これらの結果から、ORP6 は、これまで報告のあった ORP3、ORP5 と同様、小胞体および小胞体-細胞膜 MCS の一部に局在することが示唆された。

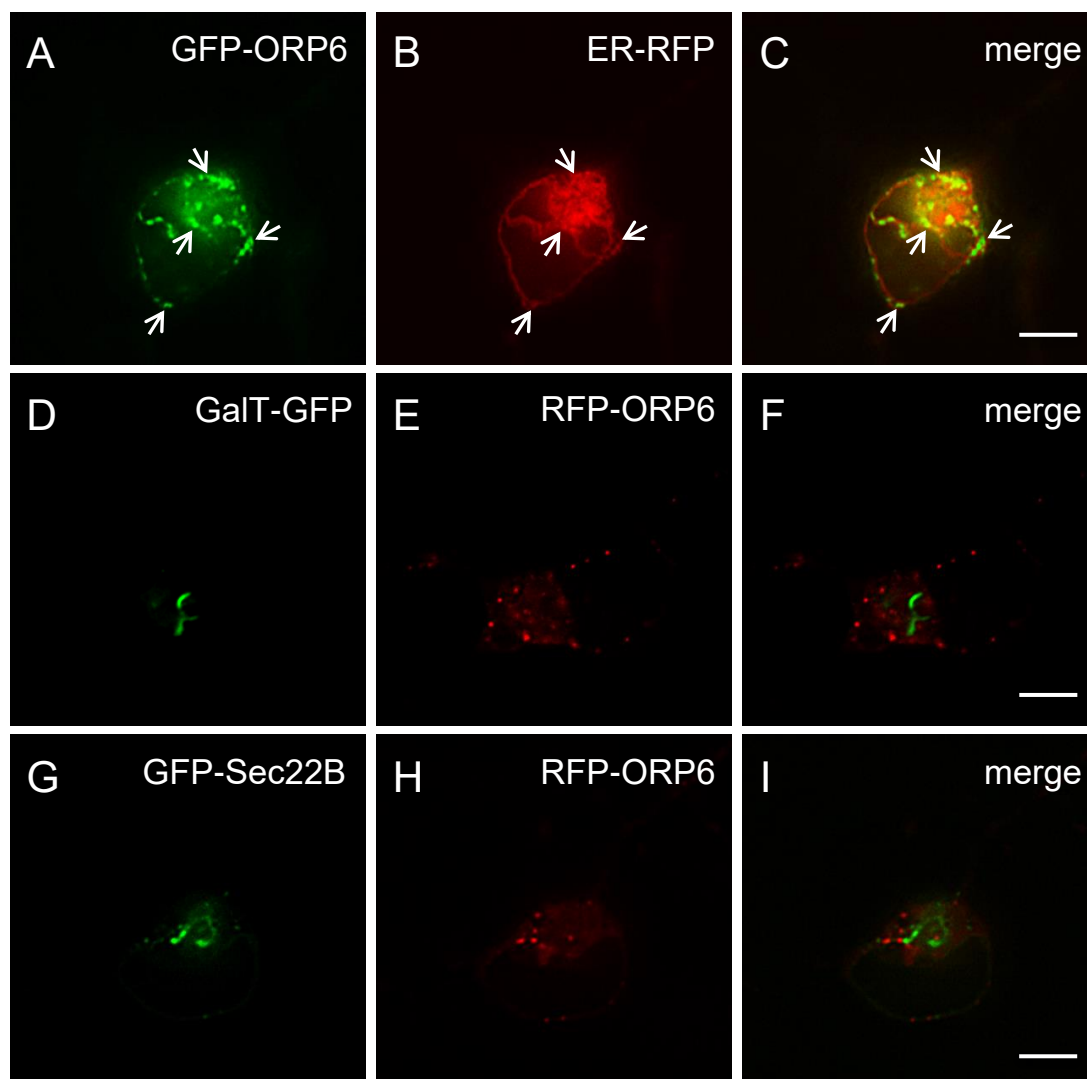


図 7. 小脳顆粒細胞では ORP6 は小胞体に局在し、ゴルジ体や小胞体ーゴルジ間小胞に局在しなかった

(A-C) GFP-ORP6 (緑)と ER-RFP (赤)を共発現した小脳顆粒細胞の蛍光画像。矢印は小胞体マーカ―上に局在した ORP6 のシグナルを示す。(D-F) GalT-GFP (緑)と RFP-ORP6 (赤) を共発現した小脳顆粒細胞の蛍光画像。(G-I) 小胞体ーゴルジ間小胞マーカ―、GFP-Sec22B (緑) と RFP-ORP6 (赤)を共発現した小脳顆粒細胞の蛍光画像。スケールバー : 10 μ m

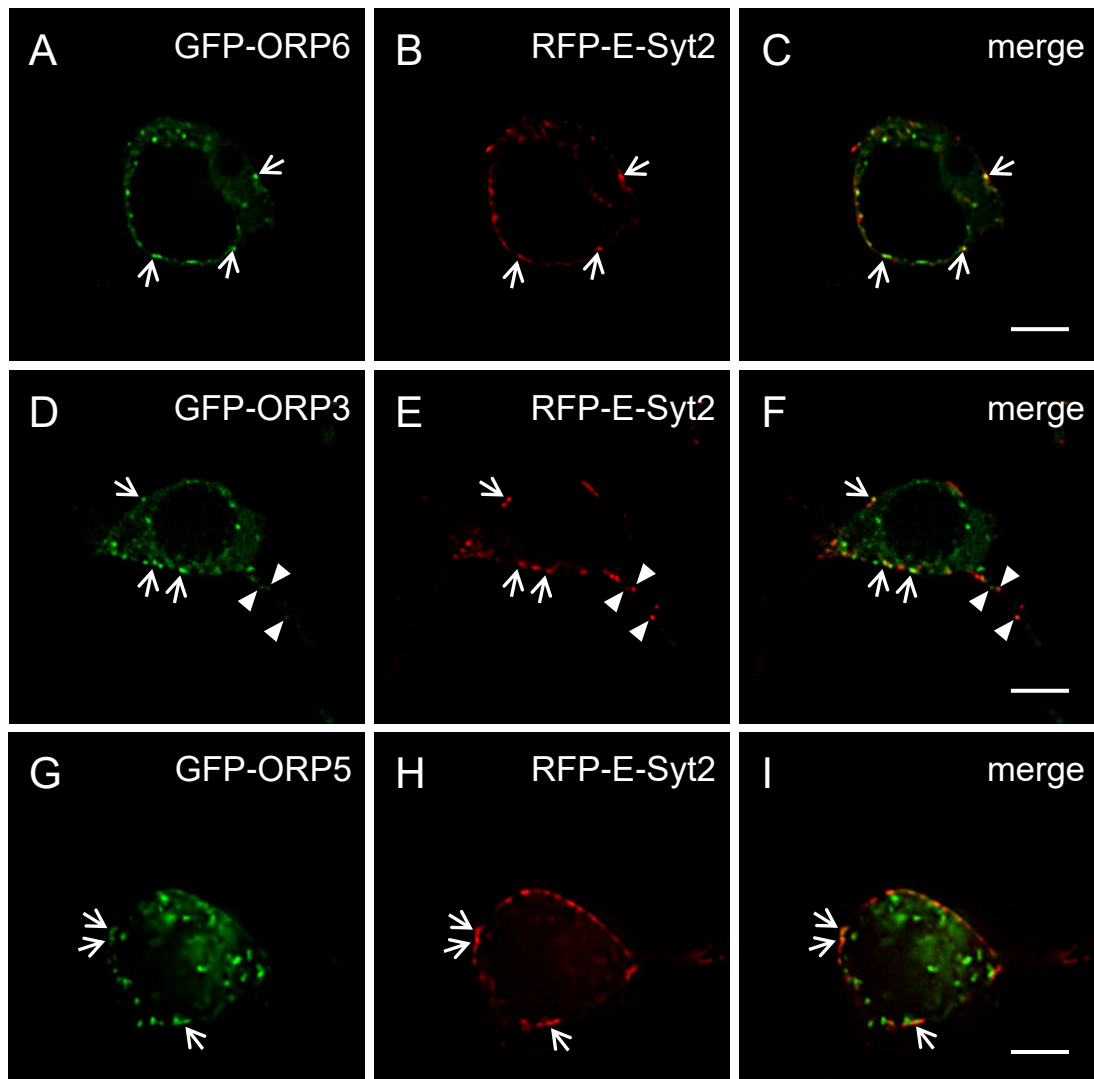


図 8. 小脳顆粒細胞における細胞辺縁部の ORP6, ORP3, ORP5 は、E-Syt2 の一部と共局在した
 (A-C) GFP-ORP6 (緑)と RFP-E-Syt2 (赤)を共発現した小脳顆粒細胞の蛍光画像。(D-F) GFP-ORP3 (緑)と RFP-E-Syt2 (赤)を共発現した小脳顆粒細胞の蛍光画像。(G-I) GFP-ORP5 (緑)と RFP-E-Syt2 (赤)を共発現した小脳顆粒細胞の蛍光画像。矢印は、細胞辺縁部の ORP6, ORP3, ORP5 と小胞体-細胞膜 MCS マーカーである E-Syt2 の一部との共局在を示す。矢頭は突起内の ORP3 と E-Syt2 との共局在を示す。スケールバー：10 μ m

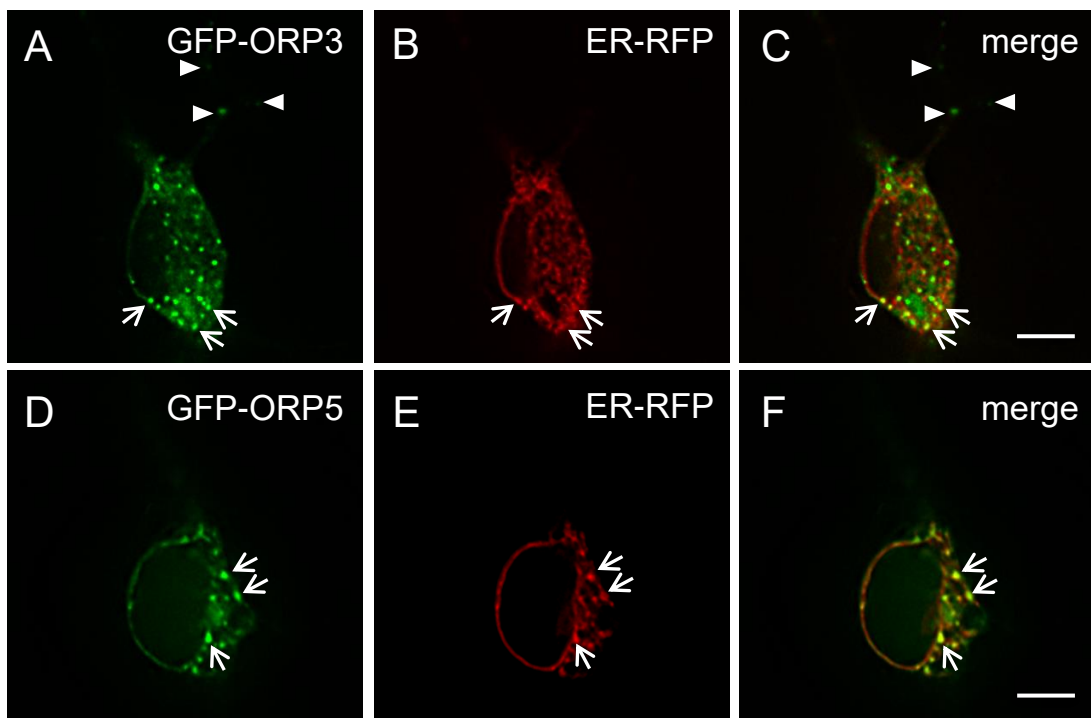


図 9. 小脳顆粒細胞における細胞内の ORP3 や ORP5 が小胞体マーカ一上に局在した

(A-C) GFP-ORP3 (緑)と ER-RFP (赤)を共発現した小脳顆粒細胞の蛍光画像。(D-F) GFP-ORP5 (緑)と ER-RFP (赤)を共発現した小脳顆粒細胞の蛍光画像。矢印は、小胞体マーカ一上に局在した ORP3 と ORP5 を示す。矢頭は、神経突起内の ORP3 を示す。スケールバー：10 μm

3-5. ORP6, ORP3, ORP5 の局在比較

E-Syt2 で標識された小胞体-細胞膜 MCS と ORP3, ORP5, ORP6 がそれぞれ共局在したことから、ORP 同士を共発現させて、3 者の局在を比較した。小脳顆粒細胞において GFP-ORP6 は単独で発現させると細胞体にのみ局在し (図 10 A, B)、突起内には入らなかった (図 10 A', B')。これに対し GFP-ORP3 と共発現させると、両者は細胞体内 (図 10 C-F 矢印) だけでなく突起内 (図 10 C'-F' 矢印) でも見られ、一部で局在の一致を認めた。一方、ORP5 は ORP6 とは異なる局在を示した (図 10 G-J)。

このことから E-Syt2 で標識された小胞体-細胞膜 MCS は単一ではなく少なくとも、ORP6 や ORP3 が局在する部位と ORP5 が局在する部位の 2 種類存在し、同じサブファミリーⅢの分子は、同じ小胞体-細胞膜 MCS に局在する可能性が示唆された。

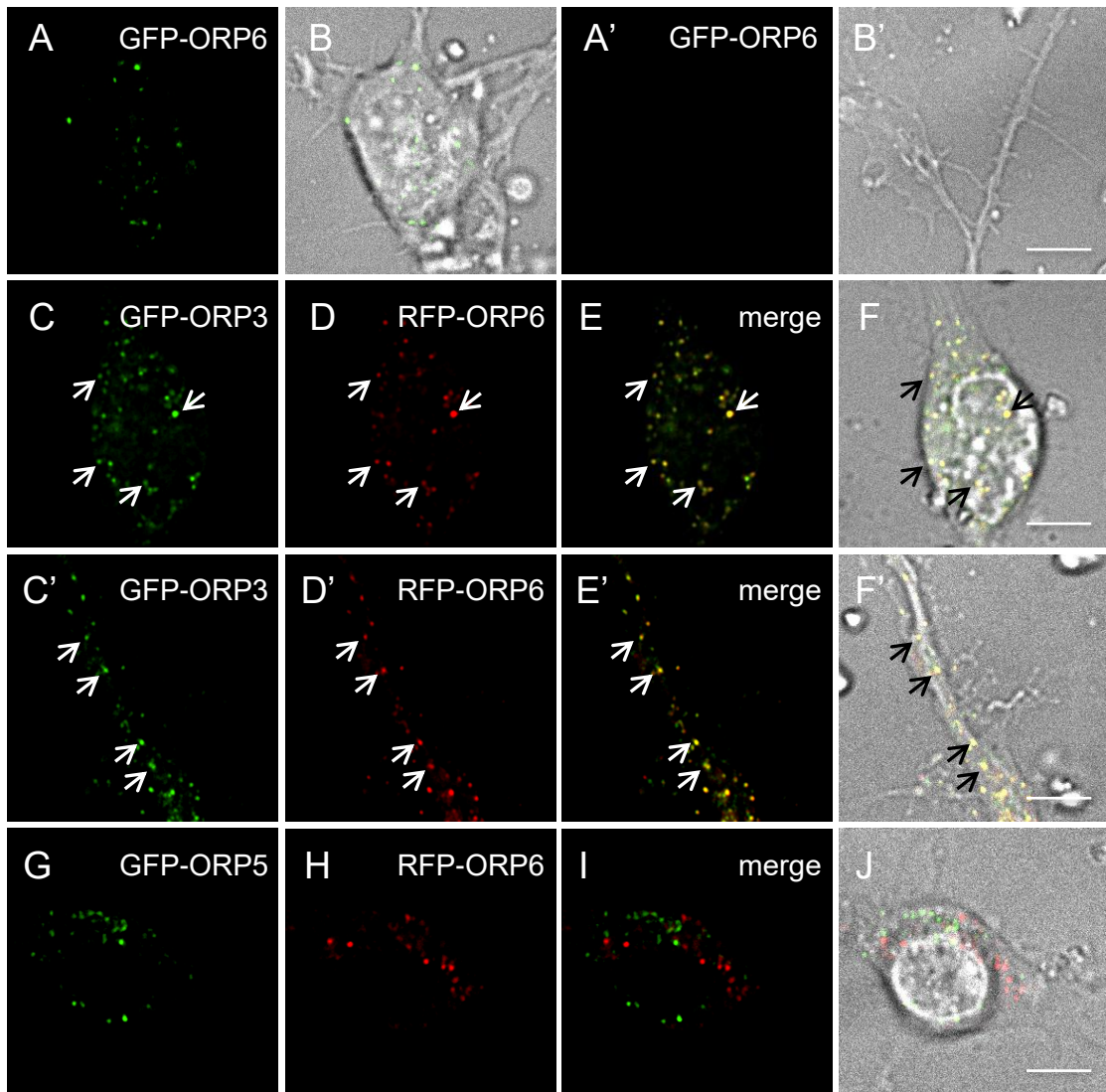


図 10. 小脳顆粒細胞では一部の ORP6 が ORP3 と共局在するが ORP5 との共局在はみられなかった

(A,B,A',B') GFP-ORP6 を遺伝子導入した小脳顆粒細胞の細胞体と神経突起の蛍光および明視野像。GFP-ORP3 (緑)と RFP-ORP6 (赤)を共発現した小脳顆粒細胞の細胞体 (C-F)と神経突起 (C'-F')における蛍光及び明視野像。矢印は細胞体と神経突起内での ORP6 と ORP3 との共局在を示す。(G-J) GFP-ORP5 (緑)と RFP-ORP6 (赤)を共発現した小脳顆粒細胞の細胞体における蛍光及び明視野像。スケールバー : 10 μ m

3-6. ORP6 中間領域を介した ORP6 同士もしくは ORP3 との相互作用

ORP6 が ORP3 と共発現させた細胞体内で一部が ORP3 と共局在し、さらには突起内へも局在が変化したことから、両者の相互作用が推測された。これを調べるために、内在性に ORP6 を発現する Neuro-2A 細胞に、外来性に GFP, GFP-ORP3, GFP-ORP5 もしくは GFP-ORP6 を発現させ、0.1% Triton X-100 処理にて膜から可溶化させた後、抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。免疫沈降した分画で、抗 ORP6 抗体を用いてウェスタンブロットをおこなった。内在性 ORP6 の 108 kDa の大きさのバンドが、GFP-ORP3 と GFP-ORP6 を発現した細胞由来の画分でのみ検出された (図 11 A、アスタリスク)。

次に、ORP6 の二量体形成領域を含む可能性が高いと予想される、PH ドメインと ORD の間のコイルドコイル配列を含む領域 (HaloTag-ORP6 中間領域) を発現するコンストラクトを作製し、Neuro-2A 細胞に GFP-ORP3 もしくは GFP-ORP6 と同時に遺伝子導入して、抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。陰性コントロールとして単独の HaloTag ベクターを用いた。抗 HaloTag 抗体を用いてウェスタンブロット法を行ったところ、HaloTag-ORP6 中間領域の大きさのバンドが GFP-ORP3 もしくは GFP-ORP6 を同時発現した細胞由来の画分で検出された (図 11 B、アスタリスク)。これらのことから、ORP6 はコイルドコイル配列を含む中間領域を介して ORP3 または ORP6 自身と直接多量体を形成する可能性が示唆された。

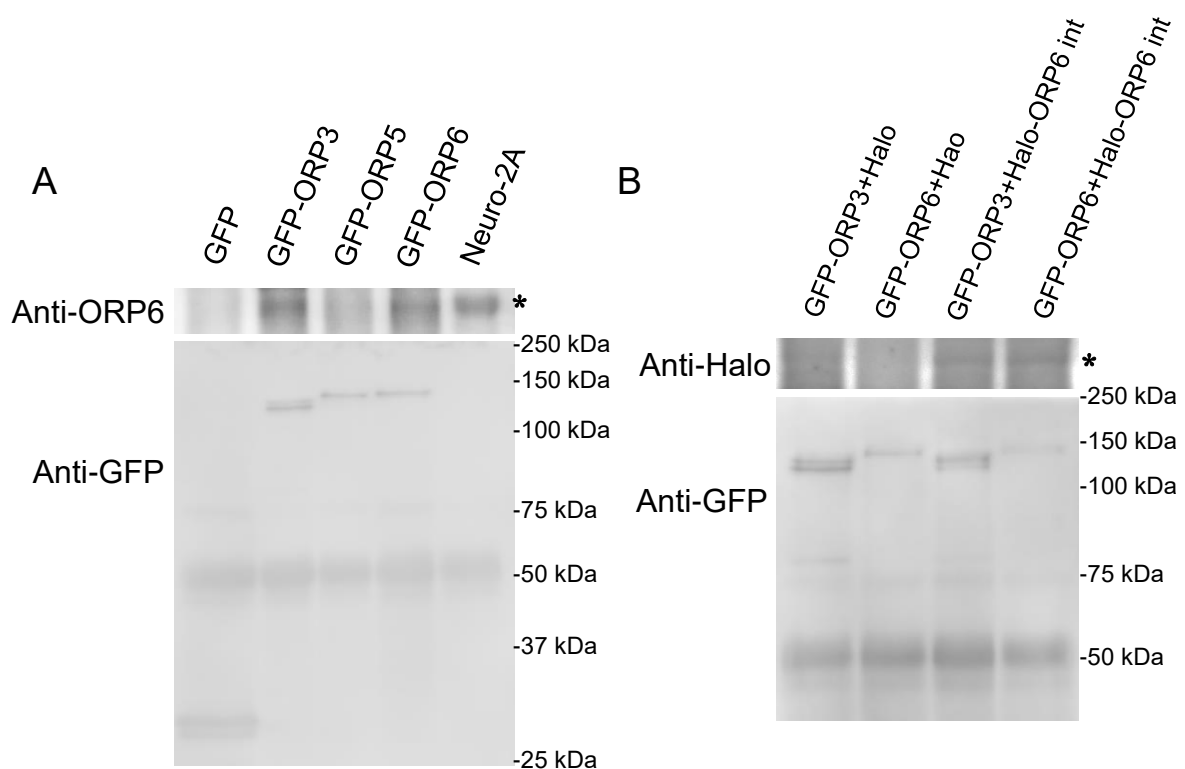
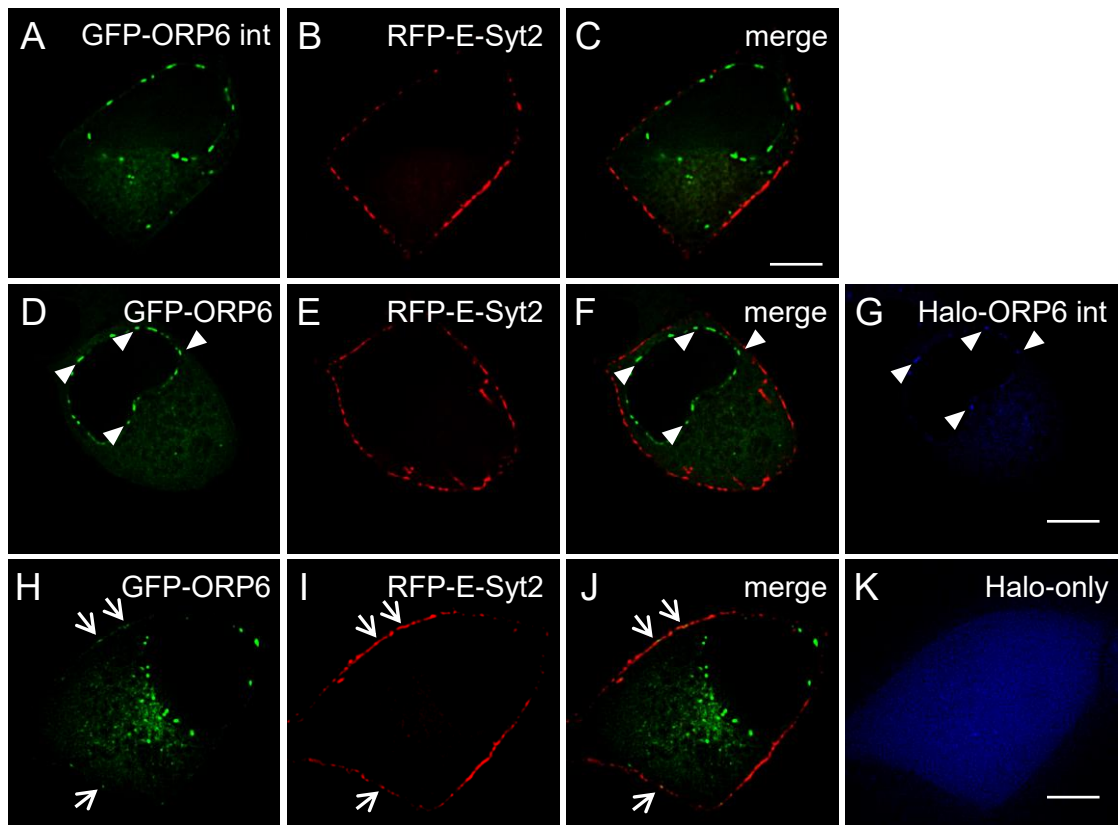


図 11. ORP6 は PH ドメインと ORD の間の中間領域を介して ORP3 もしくは ORP6 自身と多量体を形成した

(A) GFP タグ付きの ORP3, ORP5, ORP6 を遺伝子導入した Neuro-2A 細胞から、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降実験をおこなった分画のウェスタンブロット。内在性 ORP6 の 108kDa の大きさのバンド (アスタリスク) が GFP-ORP3 や GFP-ORP6 を遺伝子導入した細胞由来の画分でのみ検出され、GFP のみや GFP-ORP5 を遺伝子導入した細胞由来の画分では検出されなかった。(B) GFP-ORP3 もしくは GFP-ORP6 を Halo タグ付きの ORP6 中間領域 (int) と同時に遺伝子導入した Neuro-2A 細胞から、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降実験を行った分画のウェスタンブロット。HaloTag-ORP6 中間領域 (アスタリスク) が GFP-ORP3 や GFP-ORP6 を遺伝子導入した細胞由来の画分で検出された。

3-7. ORP6 の局在に対する ORP6 中間領域の影響

PH ドメインと ORD を欠失した ORP6 中間領域の、細胞内での局在を検討した。GFP-ORP6 中間領域は、E-Syt2 とのみ共発現させると、細胞辺縁から離れた細胞内に点状に局在し、E-Syt2 とは一致しなかった (図 12 A-C)。次に、HaloTag-ORP6 中間領域を ORP6 全長と E-Syt2 と共に HeLa 細胞に遺伝子導入した。陰性コントロールとして HaloTag ベクターを用いた。ORP6 全長の局在パターンを 3 種に分類した：①細胞内小胞体のみでの点状の局在、②小胞体と細胞膜への点状の局在、③細胞質に拡散して発現。HaloTag-ORP6 中間領域を共発現した細胞群と HaloTag を共発現したコントロールの細胞群とで、比較したところ、前者で ORP6 全長が細胞内小胞体のみで局在する細胞の割合が有意に増加し (図 12 D-G, L)、小胞体と細胞膜に局在する細胞の割合が HaloTag コントロールを発現させた細胞群 (図 12 H-K, L) に比し、有意に減少した。以上のことから、ORP6 中間領域は、ORP6 の小胞体-細胞膜 MCS への局在に対して、優性阻害を起こす可能性が示唆された。



L

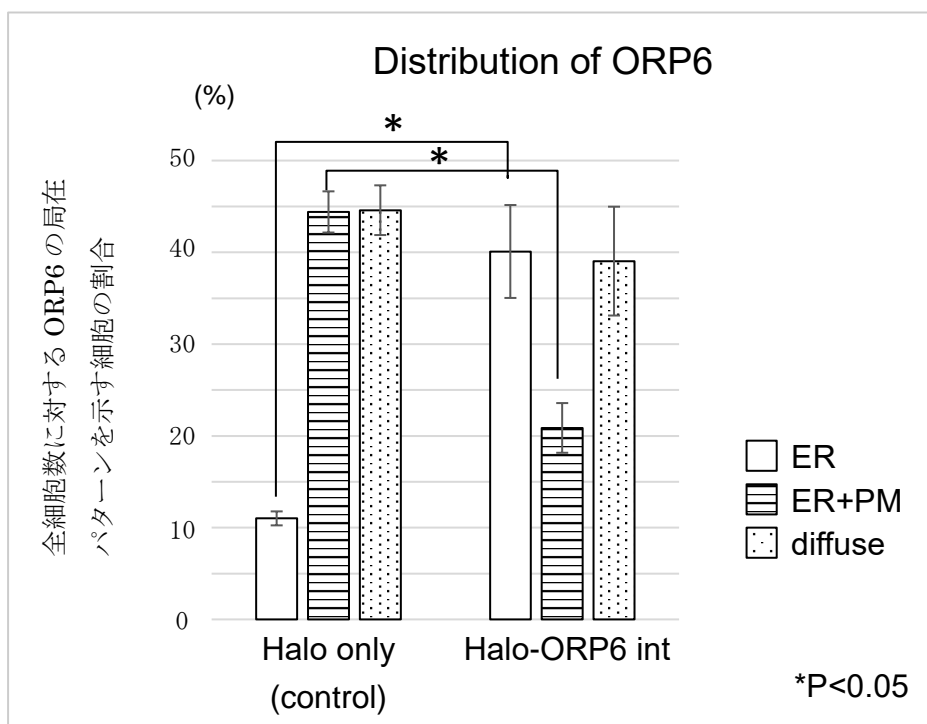


図 12. ORP6 中間領域の共発現により細胞膜に局在する ORP6 が減少した (A-C) GFP-ORP6 中間領域 (緑) と RFP-E-Syt2 (赤) を共発現した HeLa 細胞の蛍光画像。ORP6 中間領域は細胞質と小胞体に局在し、辺縁部の局在が少なかった。(D-G) Halo-ORP6 中間領域 (int) を発現した際に増加する小胞体のみ GFP-ORP6 が発現する細胞の蛍光画像。矢頭は小胞体上の ORP6 と ORP6 中間領域との共局在を示す。(H-K) HaloTag を共発現した際に GFP-ORP6 が小胞体と細胞膜に局在する細胞の蛍光画像。矢印は細胞辺縁の ORP6 と E-Syt2 との共局在を示す。スケールバー : 10 μ m (L) GFP-ORP6 の局在パターンの変化 : 3つのグループ : ①点状の ORP6 が小胞体上に局在 (白)、②点状の ORP6 が小胞体と細胞膜上に局在 (横線)、③ORP6 が細胞質に拡散して発現 (点模様)、に分類し、細胞の割合を平均値 \pm 標準誤差で示した。縦軸は全細胞数に対する ORP6 の局在パターンを示す細胞の割合を示す。ORP6 中間領域を発現した細胞群では、ORP6 が小胞体と細胞膜上に局在する細胞の有意な減少と、小胞体上のみ局在する細胞の有意な増加を認めた (*P < 0.05)。

3-8. ORP6 PH ドメインの結合脂質

ORP6 PH ドメインが ORP6 の細胞内局在に及ぼす影響を調べるために、Membrane Lipid Strips 膜を用いて ORP6-PH ドメインと結合する脂質の分析を行った。ヒスチジンタグ付きの GFP-ORP6 PH ドメイン、もしくは陰性コントロールとしてヒスチジンタグ付きの GFP を BL21 細胞に発現させ、精製したタンパクを Membrane Lipid Strips 膜上の脂質と反応させ、抗 GFP 抗体を用いて検出した。ORP6 PH ドメインは PI4P, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃ および phosphatidic acid (PA) と特異的に結合した (図 13)。これら 3 種のリン酸化イノシトールと PA は細胞膜や小胞体に分布することが知られている [18,19]。

さらに ORP6 PH ドメインの上流と下流にそれぞれ 4 アミノ酸をつけた領域と GFP の融合タンパクを HeLa 細胞で発現させたところ、細胞膜に局在し、これらの分子のいずれかが ORP6 の細胞膜への結合に関与することが示唆された (図 14)。

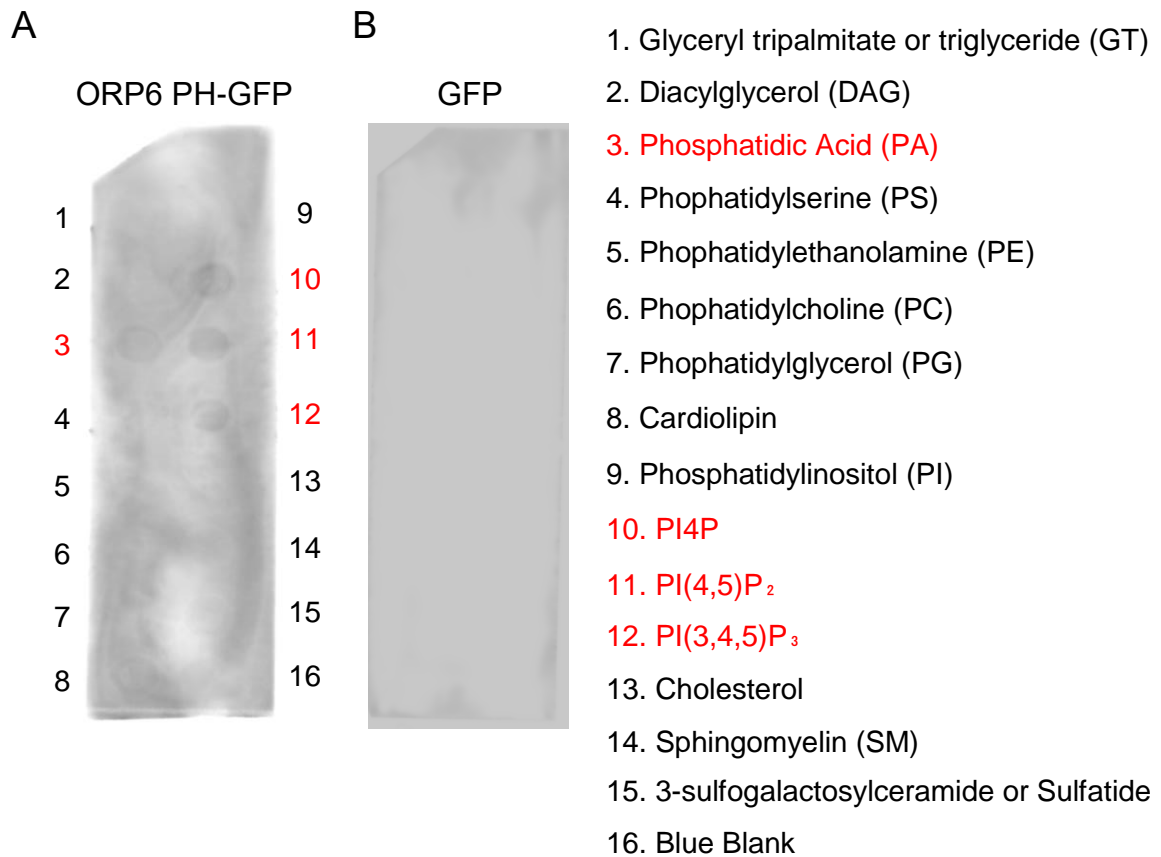


図 13. ORP6 PH ドメインは PI4P, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃ および PA と結合した

精製したヒスチジンタグ付きの ORP6 PH-GFP (A) もしくは陰性コントロールとしてヒスチジンタグ付きの GFP (B) を Membrane Lipid Strips 膜と反応させた。

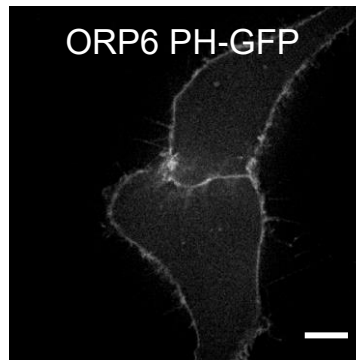


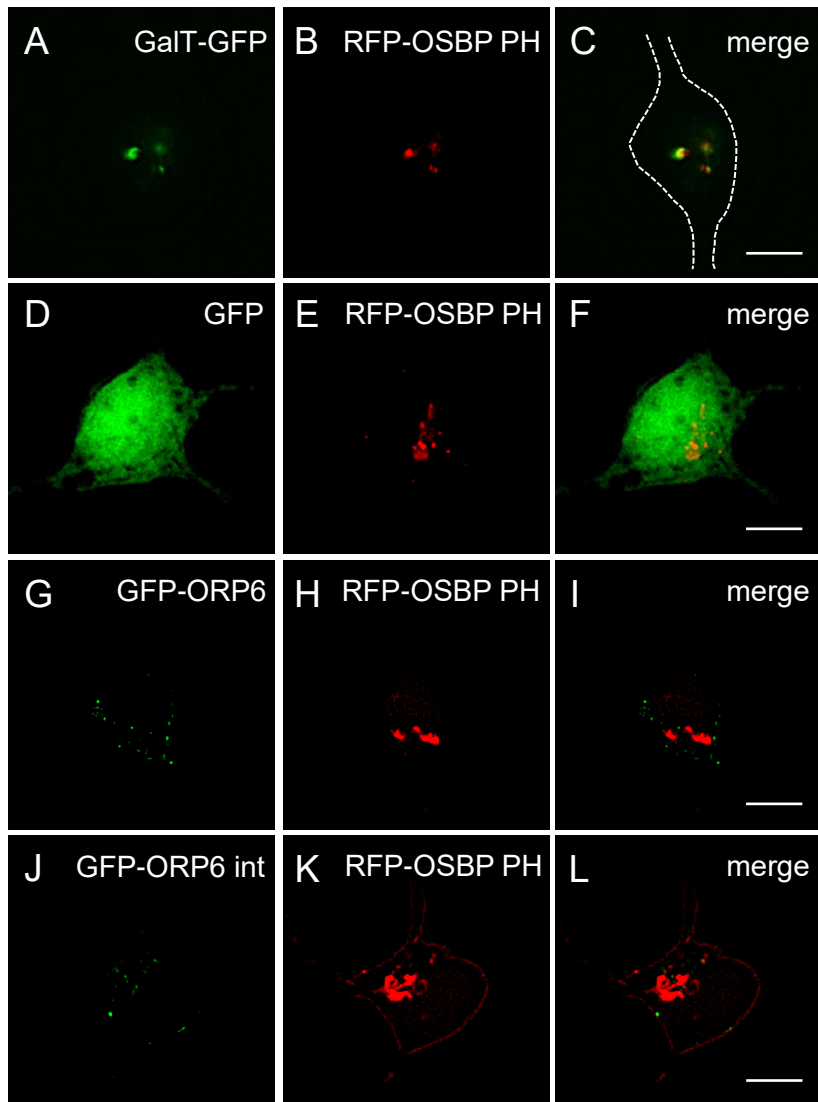
図 14. ORP6 PH ドメインは HeLa 細胞の細胞膜に局在した
N 末端側と C 末端側にそれぞれ 4 アミノ酸を付け加えた ORP6 PH ドメイン
(83-187 アミノ酸)-GFP を発現した HeLa 細胞の蛍光画像。スケールバー: 10
 μm

3-9. ORP6 優性阻害もしくは発現抑制による PI4P マーカーの局在変化

最後に、ORP6 の脂質輸送への関与を検討するため、ORP6 中間領域を強制発現した細胞での特異的な脂質マーカーの分布の変化を調べた。PI4P マーカーである OSBP PH ドメインや、PI(4,5)P₂ マーカーである PLC δ 1 PH ドメインを発現するコンストラクトを作成し、GFP-ORP6 中間領域または GFP-ORP6 全長と同時に小脳顆粒細胞に遺伝子導入した。コントロールとしては、GFP を用いた。PI4P マーカーは、これまでの報告通り [18]、ゴルジ体マーカーの GalT と共局在した (図 15 A-C)。PI4P マーカーは、GFP-ORP6 全長を発現した細胞では、GFP のみを発現させたコントロールと同様、核周囲のゴルジ体と思われる場所に局在した (図 15 D-F、G-I)。一方、ORP6 中間領域を発現した細胞では、PI4P マーカーがゴルジ体と細胞膜に局在する細胞の割合が増加し、統計的にも有意差が認められた (図 15 J-L, M)。PI(4,5)P₂ マーカーについては GFP、ORP6 全長、ORP6 中間領域の発現細胞で差はみられなかった。

この結果を受け、内在性 ORP6 の発現を RNAi で抑制した小脳顆粒細胞における、PI4P マーカーの局在を観察した。RNAi による発現抑制効果を評価するために、RNAi 導入 24 時間後と 48 時間後の Neuro-2A 細胞の内在性 ORP6 タンパクを、抗 ORP6 抗体を用いたウェスタンブロット法で検出し、Image J を用いて定量解析を行った。陰性コントロールには FITC 蛍光ラベルを付けた oligo RNA を使用した。内在性 ORP6 タンパクの発現量は、RNAi 導入 24 時間後に 12.0 ± 4.8%、48 時間後に 9.9 ± 8.8% となり (図 16 A)、有意な減少を認めた。ORP6 に対する RNAi を導入した小脳顆粒細胞において、PI4P マーカーの局在は、ゴルジ体と細胞膜に局在する細胞の割合が有意に増加し (図 16 C, D)、優性阻害コンストラクトを発現した細胞と同様の効果を認めた。

これらのことから、ORP6 の機能を抑制することで、ORP6 の小胞体-細胞膜 MCS への局在が減少すると同時に、細胞膜からの PI4P の移行が妨げられ、両者が関連する可能性が示唆された。



M

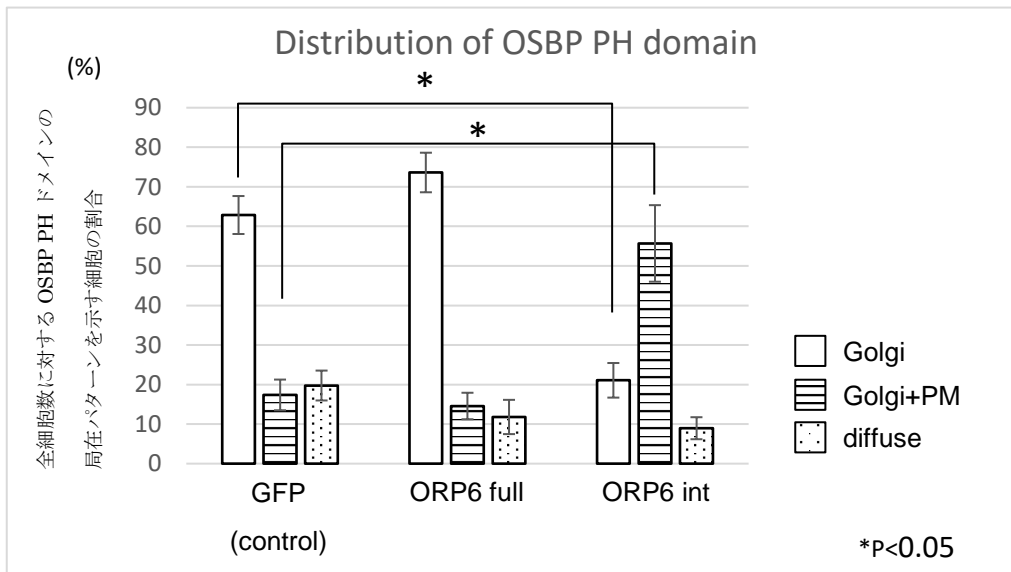
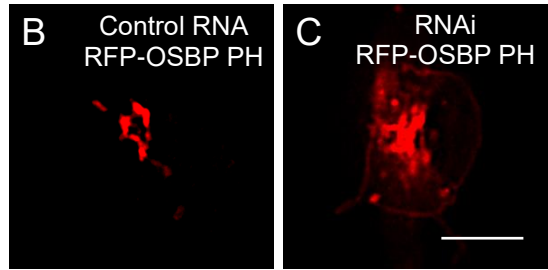
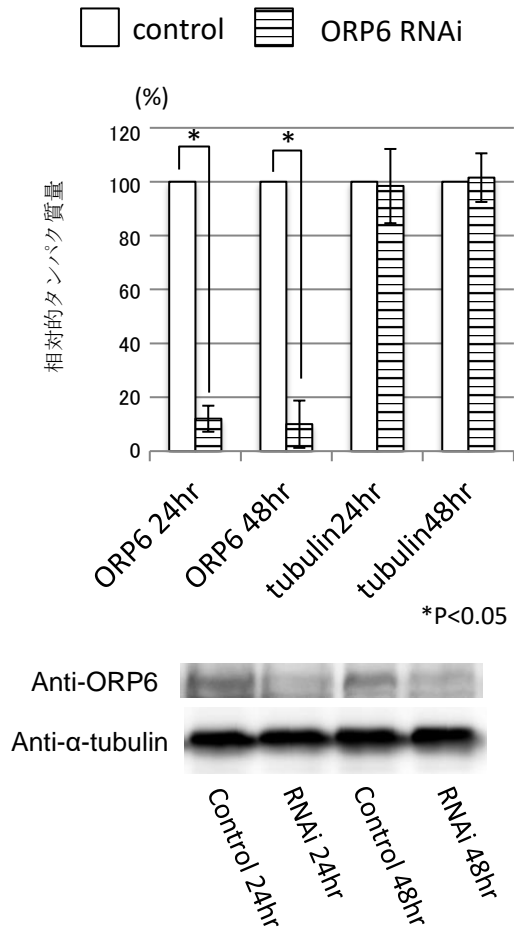


図 15. ORP6 中間領域の発現によって細胞内の PI4P マーカーの一部が細胞膜にも局在した

(A-C) ゴルジ体マーカーの GalT と PI4P マーカーの OSBP PH ドメインを共発現した小脳顆粒細胞の蛍光画像。OSBP PH ドメインは GalT と共局在した。OSBP PH ドメインを GFP のみ (D-F)、GFP-ORP6 (G-I)、もしくは GFP-ORP6 中間領域 (int、J-L) と共発現した小脳顆粒細胞の蛍光画像。ORP6 中間領域を発現した細胞で、OSBP PH ドメインの局在がゴルジ体と細胞膜に見られた。スケールバー：10 μm (M) OSBP PH ドメインの局在パターンの変化：3つのグループ① OSBP PH ドメインが核周囲のゴルジ体と思われる場所に局在 (白)、②ゴルジ体と細胞膜に局在 (横線)、③細胞質に拡散して発現(点模様) に分類し、細胞の割合を平均値 \pm 標準誤差で示した。縦軸は全細胞数に対する OSBP PH ドメインの局在パターンを示す細胞の割合を示す。ORP6 中間領域を発現した細胞群では、OSBP PH ドメインが、ゴルジ体と細胞膜に局在する細胞の有意な増加とゴルジ体のみに局在する細胞の有意な減少を認めた。(* $P < 0.05$)。

A

Expression of ORP6 and tubulin



D

Distribution of OSBP PH

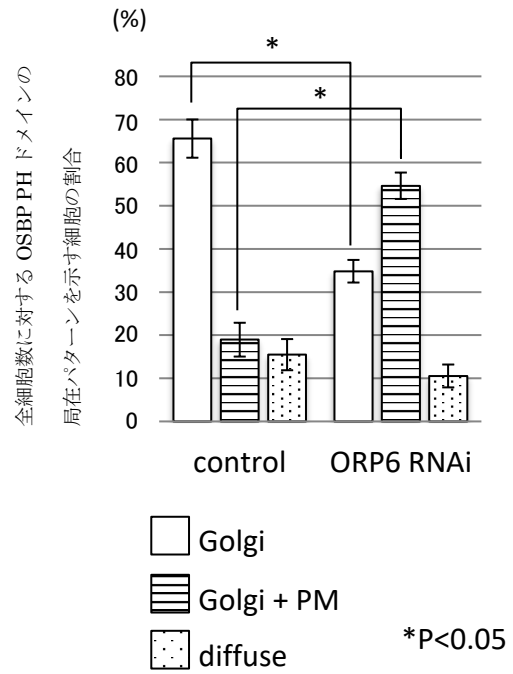


図 16. ORP6 の発現抑制により一部の PI4P マーカーの局在がゴルジ体から細胞膜へと変化した

(A) ORP6 に対する RNAi を遺伝子導入した Neuro-2A 細胞の内在性 ORP6 のウェスタンブロット。グラフの縦軸は ORP6 および α -チューブリンの、oligo RNA に対する RNAi 後の相対的タンパク質量を示す。ORP6 発現量の有意な減少を認めた。(B,C) oligo RNA、RNAi を遺伝子導入した小脳顆粒細胞における OSBP PH ドメインの蛍光画像。OSBP PH ドメインが、それぞれゴルジ体あるいはゴルジ体と細胞膜に局在した。スケールバー：10 μ m

(D) oligo RNA、RNAi を遺伝子導入した小脳顆粒細胞における OSBP PH ドメインの局在パターンの変化：3つのグループ①OSBP PH ドメインがゴルジ体に局在（白）、②ゴルジ体と細胞膜に局在（横線）、③細胞質に拡散して発現（点模様）に分類し、細胞の割合を平均値 \pm 標準誤差で表示した。縦軸は全細胞数に対する OSBP PH ドメインの局在パターンを示す細胞の割合を示す。ORP6 RNAi により、OSBP PH ドメインが、ゴルジ体と細胞膜に局在する細胞割合の有意な増加とゴルジ体に局在する細胞割合の有意な減少を認めた。（*P < 0.05）。

第4章 考察

本研究では、ORP6について以下の点を明らかにした。①ORP6は小脳や脊髄などの中枢神経系に多く存在すること、②HeLa細胞や初代培養小脳顆粒細胞では、ORP6は細胞体内の細胞質、小胞体もしくは小胞体-細胞膜 MCSに局在すること、③ORP6のPHドメインは、PI4P, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃そしてPAと結合しうること、④ORP6はPHドメインとORDの間のコイルドコイル配列を含む中間領域を介してORP6もしくはORP3と相互作用すること、⑤ORP3と共発現させると、ORP3と共局在し、神経突起内にも入ること、⑥ORP6の細胞辺縁部の局在は、ORP6中間領域との共発現により減少すること、⑦ORP6中間領域あるいはRNAiの発現によって、本来ゴルジ体に局在すべきPI4Pマーカーの一部が細胞膜に局在すること、の7点である。

ORPsのメンバーは、当初、25ヒドロキシコレステロールなどのオキシステロールと結合するORDを有するタンパク群として発見されたが、現在は、ORDは、生体内においてはオキシステロールよりもむしろコレステロールやリン酸化イノシトールと結合するとみられている。また、小胞体と他の膜小器官の間でMCSに局在することが明らかになり、膜の間でのコレステロールの輸送に関するとの報告もある [1,3,5]。

中枢神経系は、コレステロールやオキシステロールが豊富に存在する器官である。脳ではミエリン形成の盛んな幼若期にコレステロール合成が盛んに行われ、成熟期では低下する [20]。神経細胞内のコレステロール量は、厳密な制御下にあり、過剰なコレステロールは、コレステロール24ヒドロキシラーゼによってオキシステロールに変換され、細胞から血管へと排出される [19,21]。脳内の脂質代謝に関する脳に発現するORPsについての報告はこれまでない。OSBPの発現抑制により大脳皮質神経細胞の突起伸張が誘発されたり、ORP3が筋萎縮性側索硬化症関連変異型VAPBの作用を抑制するとの論文がある一方 [22,23]、脂質代謝についてはマクロファージにおいてORP6のRNAiがコレステロールの蓄積を誘発するとの報告がある [10]。神経系におけるORPsの機能についてはまだ十分には解明されていない。

本研究では、デコンボリューション顕微鏡を用いて、外来性のORP6の挙動を神経細胞内で観察した。これまでORPsの細胞内分布は、サポニンやBiFCシステムを用いて、膜結合画分を可視化し検出していたが、本研究では前処置なしにORP6が点状に観察され、小胞体や細胞膜に局在し (図7A-C, 8A-C)、これまでの報告と一致する結果を得た [6,17]。外来性ORP6の分布は、Cベクターに挿入したORP6を発現した細胞でのみ、約半数で点状となり (図5B)、残りの細胞では細胞質内で拡散した。Nベクターに挿入したORP6を発現した

細胞では、点状の局在はあるものの可溶性成分が多く、点状の ORP6 の可視化にはサポニン処理を要した。細胞分画実験において、内在性の ORP6 は、膜小器官画分 (図 2 D, P2) のみならず細胞質画分 (図 2 D, S3) でも検出された。これらのことから、C ベクターに挿入した ORP6 が内在性の局在を反映していると考え、このコンストラクトを実験に使用した。これまでの ORPs についての報告でも、OSBP や他の ORPs の脂質結合活性は弱く、膜小器官画分だけでなく細胞質画分にも存在することが報告されている [24,25]。

ORP3, ORP5, ORP6 をそれぞれ発現した細胞では、細胞辺縁にある点状の局在は、一部が小胞体-細胞膜 MCS のマーカーの E-Syt2 [26,27] と一致した。2 つの ORP を同時に発現した細胞では、ORP6 の一部が ORP3 と共局在し (図 10)、免疫沈降実験でも、ORP6 あるいは ORP6 の 中間領域が、ORP3 や ORP6 と共沈した (図 11)。ORP5 ではこれらの反応は見られなかった。これらのことから、ORP6 は ORP3 もしくは ORP6 自身と、中間領域を介して二量体を形成する可能性が示唆された。この結果は、ORP3 や ORP6 はコイルドコイル配列を有するが、ORP5 はもたないという事実と合致する [1]。一方で、これらの 3 つの分子がいずれも E-Syt2 のある小胞体-細胞膜 MCS に局在することは [1,28]、小胞体-細胞膜 MCS の多様性を示唆する。

ORP6 中間領域は、細胞辺縁に局在せず、共発現により ORP6 の細胞辺縁での局在も減少させた (図 12)。ORP6 PH ドメインは、一部が細胞膜への割合を異にして局在する PI4P, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃, PA と特異的に結合する [18,19] (図 13,14)。さらに、FFAT モチーフが小胞体に局在する VAP と結合することで、ORP6 は小胞体-細胞膜 MCS に局在することが可能となると考えられる。これは、既存の、他の ORP メンバーが PH ドメインによって特異的なリン脂質に結合することで MCS に局在するとの報告とも合致する [1,3,17]。また ORP6 中間領域が細胞中心部にのみ局在し ORP6 の局在も変化させることから、ORP6 の細胞膜での二量体形成は、ORP6 の小胞体-細胞膜 MCS の局在や機能に影響を及ぼす可能性も考えられる。中間領域のコイルドコイル配列の関与についても引き続き解析が必要である。

優性阻害作用を有する ORP6 中間領域の強制発現や RNAi による発現阻害によって、PI4P と PI(4,5)P₂ のマーカーの内、PI4P マーカーの局在に変化を認めた (図 15,16)。ORP6 が小胞体-細胞膜 MCS に局在しないことで、PI4P の挙動に影響を与え、細胞膜からの PI4P の移行が部分的に抑制された可能性がある。これまで OSBP, ORP1L, ORP4, ORP5, ORP9 については、PI4P と他の脂質を MCS にて交換輸送する事が報告されている [25,29,30]。このうち OSBP, ORP1L, ORP4, ORP9 では、PH ドメインと FFAT モチーフが MCS への局在に、ORD が輸送分子の結合に関与する。特に二量体を形成する OSBP では、PH ド

メインがトランスゴルジ膜上の PI4P と結合し、FFAT モチーフが小胞体に局在する VAPA と結合することで、小胞体ーゴルジ MCS に局在し、さらに2つの ORD がそれぞれコレステロールと PI4P に結合することで、コレステロールが小胞体からゴルジ体へ、PI4P がゴルジ体から小胞体へと対向輸送される [5]。ORP6 の PI4P 移動への関与は、OSBP のモデルから類推すると、PI4P の対向輸送分子が存在する可能性もあり、マクロファージでの、ORP6 に対する RNAi がコレステロールの蓄積を誘発する報告[10]がある。これらのことから、ORP6 が PI4P とコレステロールの交換に働く可能性も推測される (図 17)。本研究においては、PH ドメインと同様に、ヒスチジンタグ付きの GFP-ORD のコンストラクトを作製し、Membrane Lipid Strips 膜を用いたタンパク質ー脂質結合解析を試みたが、ORD の結合脂質を検出することはできなかった。ORPs のコレステロールの輸送に関するこれまでの研究手法では、小胞体ー後期末ソーム MCS に局在する ORP1L の発現抑制下で、エンドサイトーシスされたコレステロールの代謝障害をみた報告がある [31]。今後は、ORP6 に関しても、優性阻害コンストラクトや RNAi を用いて細胞内コレステロールの挙動や膜構造の動態を解析し、脂質移送における ORP6 の役割を明らかにしていく予定である。

初代培養小脳顆粒細胞において、単独発現の ORP6 は細胞体にのみに、ORP3 は細胞体と神経突起内に局在した。ORP6 を ORP3 と共発現させると、両者は細胞体だけでなく神経突起内でもみられた(図 10 C'-E')。小脳における ORP3 の発現量は脳全体や他の組織より低いことから [2]、外来性に単独に発現した ORP6 は内在性 ORP3 とヘテロ二量体形成するよりも、むしろホモ二量体を形成し、細胞体内に局在したと推測している。外来性 ORP3 との共発現では、細胞内での ORP3 の発現量の増加の結果、ORP3 とヘテロ二量体形成する ORP6 が増え、神経突起内にも ORP6 が局在した可能性が考えられる。ORP3 の発現抑制もしくは機能阻害によって、ORP6 の神経突起内への局在が阻害される所見を得ることができれば、ORP6 の局在は ORP3 の発現量によって変化することが示せる。ORP3 のリン酸化状態が自身の局在に影響を及ぼすことも知られているので、細胞内の内因性 ORP3 の挙動については、リン酸化の影響も否定できない [6]。ORP3 については、ORD が R-Ras と相互作用して細胞接着部位に局在し、マクロファージの突起形成に働くことが知られている。神経系での ORP3 の機能は不明だが、筋萎縮性側索硬化症を発症する変異 VAPB と相互作用したことが報告されている [8,13]。神経突起内での ORP6 と ORP3 の相互作用についても今後の研究が必要と考えられる。

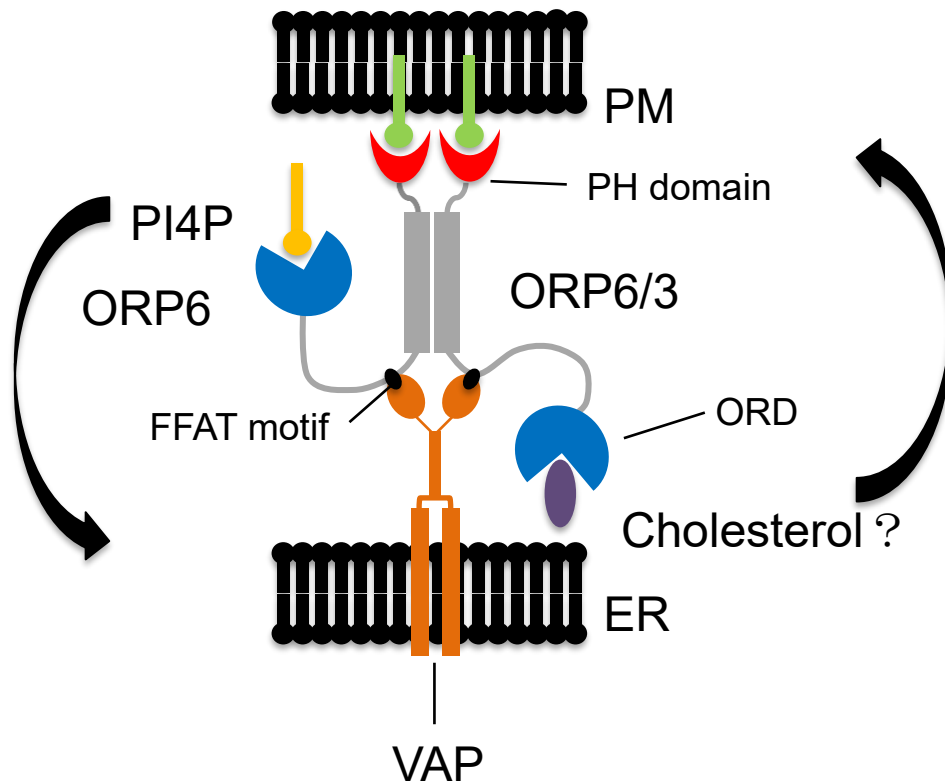


図 17 小胞体－細胞膜 MCS において予測される ORP6 の仮説モデル
 ORP6 は PH ドメインと ORD の間のコイルドコイル配列を介して ORP3 もしくは ORP6 自身と結合する。ORP6 は、PH ドメインを介して細胞膜に、FFAT モチーフと VAP との結合によって小胞体とつながり、小胞体－細胞膜 MCS に局在する。ORP6 による細胞膜上の PI4P の小胞体への移行には ORD との結合が推測される。対向輸送分子として小胞体のコレステロールが候補となる可能性がある。

謝辞

本研究を計画、遂行するにあたり終始、丁寧かつ熱心にご指導いただきました、解剖学講座解剖学部門教授 野田泰子先生に深謝の意を表します。また、日々の実験や考察において様々にご指導、有益なご助言、ご協力をいただきました解剖学講座解剖学部門の皆様、国際医療福祉大学分子生物学教授 西村渉先生、総合教育部門教授 菊地元史先生、ならびに解剖学講座組織学部門の先生方に心より感謝申し上げます。

引用文献

- [1] V. M. Olkkonen, OSBP-related protein family in lipid transport over membrane contact sites, *Lipid Insights*. 8 (2015) 1-9.
- [2] F. M. Collier, C. C. Gregorio-King, J. Apostolopoulos, K. Walder, M. A. Kirkland, ORP3 splice variants and their expression in human tissues and hematopoietic cells, *DNA Cell Biol*. 22 (2003) 1-9.
- [3] J. Chung, F. Torta, K. Masai, L. Lucast, H. Czapla, L. B. Tanner, P. Narayanaswamy, M. R. Wenk, F. Nakatsu, P. De Camilli, Intracellular transport. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts, *Science*. 349 (2015) 428-432.
- [4] Wang, P. Y. ;Weng, J. ; Anderson, R. G. OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation. *Science*. 307 (2005) 1472-1476.
- [5] B. Mesmin, J. Bigay, J. Moser von Filseck, S. Lacas-Gervais, G. Drin, B. Antonny, A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP, *Cell*. 155 (2013) 830-843.
- [6] M. Weber-Boyvat, H. Kentala, J. Lilja, T. Vihervaara, R. Hanninen, Y. Zhou, J. Peränen, T. A. Nyman, J. Ivaska, V. M. Olkkonen, OSBP-related protein 3 (ORP3) coupling with VAMP-associated protein A regulates R-Ras activity, *Exp Cell Res*. 331 (2015) 278-291.
- [7] R.Galmes, A.Houcine, A.R.van Vliet, P.Agostinis, C.L.Jackson and F.Giodano. ORP5/ORP8 localize to endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and are involved in mitochondrial function. *EMBO Rep*. 17 (2016) 800-810.
- [8] M. Lehto, M. I. Mäyränpää, T. Pellinen, P. Ihalmo, S. Lehtonen, P. T. Kovanen, P. H. Groop, J. Ivaska, V. M. Olkkonen, The R-Ras interaction partner ORP3 regulates cell adhesion, *J Cell Sci*. 121 (2008) 695-705.
- [9] M. Lehto, J. Tienari, S. Lehtonen, E. Lehtonen, V. M. Olkkonen, Subfamily III of mammalian oxysterol-binding protein (OSBP) homologues: the expression and intracellular localization of ORP3, ORP6, and ORP7, *Cell Tissue Res*. 315 (2004) 39-57.
- [10] M. Ouimet, E. J. Hennessy, C. van Solingen, G. J. Koelwyn, M. A. Hussein, B. Ramkhalawon, K. J. Rayner, R. E. Temel, L. Perisic, U. Hedin, L. Maegdefessel, M. J. Garabedian, L. M. Holdt, D. Teupser, K. J. Moore, miRNA targeting of oxysterol-binding protein-like 6 regulates cholesterol trafficking and efflux, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 36 (2016) 942-951.

- [11] C. Herold, B. V. Hooli, K. Mullin, T. Liu, J. T. Roehr, M. Mattheisen, A. R. Parrado, L. Bertram, C. Lange, R. E. Tanzi, Family-based association analyses of imputed genotypes reveal genome-wide significant association of Alzheimer's disease with OSBPL6, PTPRG, and PDCL3, *Mol Psychiatry*. 21 (2016) 1608-1612.
- [12] E. Maestrini, A. T. Pagnamenta, J. A. Lamb, E. Bacchelli, N. H. Sykes, I. Sousa, C. Toma, Barnby, G. Butler, H. L. Winchester, T. S. Scerri, F. Minopoli, J. Reichert, G. Cai, J. D. Buxbaum, O. Korvatska, G. D. Schellenberg, G. Dawson, A. de Bildt, R. B. Minderaa, E. J. Mulder, A. P. Morris, A. J. Bailey, A. P. Monaco, IMGSAC, High-density SNP association study and copy number variation analysis of the AUTS1 and AUTS5 loci implicate the IMMP2L-DOCK4 gene region in autism susceptibility, *Mol Psychiatry*. 15 (2010) 954-968.
- [13] M. Kuijpers, K.L. Yu, E. Terling, A. Akhmanova, D. Jaarsma and C.C. Hoogenraad. The ALS8 protein VAPB interact with the ER-Golgi recycling protein YIF1A and regulates membrane delivery into dendrites. *EMBO J* 32 (2013) 2056-2072.
- [14] Vihervaara, T. Jansen, M. Uronen, R. L. Ohsaki, Y. Ikonen, E. Olkkonen, V. M. Cytoplasmic oxysterol-binding proteins: sterol sensors or transporters? *Chem Phys Lipids*. 164 (2011) 443-50.
- [15] van der Schaar, H. M. ;Dorobantu, C. M. ;Albulescu, L. ;Strating, J. R. P.M ;van Kuppeveld, F. J. M, Fat(al) attraction: Picornaviruses Usurp Lipid Transfer at Membrane Contact Sites to Create Replication Organelles. *Trends Microbiol* 24 (2016) 535-546.
- [16] E. V. Stelmashook, N. K. Isaev, E. Y. Plotnikov, R. E. Uzbekov, I. B. Alieva, B. Arbeille, D. B. Zorov, Effect of transitory glucose deprivation on mitochondrial structure and functions in cultured cerebellar granule neurons, *Neurosci Lett*. 461 (2009) 140-144.
- [17] M. Lehto, R. Hynynen, K. Karjalainen, E. Kuismanen, K. Hyvärinen, V. M. Olkkonen, Targeting of OSBP-related protein 3 (ORP3) to endoplasmic reticulum and plasma membrane is controlled by multiple determinants, *Exp Cell Res*. 310 (2005) 445-462.
- [18] C. Ji, Y. Zhang, P. Xu, T. Xu, X Lou, Nanoscale Landscape of Phosphoinositides Revealed by Specific Pleckstrin Homology (PH) Domains Using Single-molecule Superresolution Imaging in the Plasma Membrane, *J Biol Chem*. 290(45) (2015) 26978-93.
- [19] D. Lütjohann, O. Breuer, G. Ahlborg, I. Nennesmo, A. Sidén, U. Diczfalusy, I. Björkhem, Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux

- of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93 (1996) 9799-9804.
- [20] Dietschy, J. M. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem*. 390 (2009) 287-93.
- [21] V. Leoni, Oxysterols as markers of neurological disease-a review, *Scand J Clin Lab Invest*. 69 (2009) 22-25.
- [22] X. Gu, A. Li, S. Liu, L. Lin, S. Xu, P. Zhang, S. Li, X. Li, B. Tian, X. Zhu, X. Wang, MicroRNA124 regulated neurite elongation by targeting OSBP, *Mol Neurobiol*. 53 (2016) 6388-6396.
- [23] A. Dabysyn, J.K. Ngsee. Oxysterol-binding protein ORP3 rescues the amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant VAPB phenotype. *Exp Cell Res*. 341 (2016) 18-31.
- [24] B. Antonny, J. Bigay, B. Mesmin, The oxysterol-binding protein cycle: burning off PI(4)P to transport cholesterol, *Annu Rev Biochem*. 87 (2018) 19.1-19.29.
- [25] N.D. Ridgway, P. A. Dawson, Y. K. Ho, M. S. Brown, J. L. Goldstein. Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J. Cell Biol*. 116 (1992) 307-319.
- [26] F. Giordano, Y. Saheki, O. Idevall-Hagren, S. F. Colombo, M. Pirruccello, I. Milosevic, E. O. Gracheva, S. N. Bagriantsev, N. Borgese, P. De Camilli, PI(4,5)P(2)-dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins, *Cell*. 153 (2013) 1494-1509.
- [27] Y. Saheki, X. Bian, C. M. Schauder, Y. Sawaki, M. A. Surma, C. Klose, F. Pincet, K. M. Reinisch, P. De Camilli, Control of plasma membrane lipid homeostasis by the extended synaptotagmins, *Nat Cell Biol*. 18 (2016) 504-515.
- [28] C. L. Chang, Y. J. Chen, J. Liou, ER-plasma membrane junctions: Why and how do we study them? *Biochim Biophys Acta*. 1864 (2017) 1494-1506.
- [29] K. Zhao, N. D. Ridway. Oxysterol-binding protein-related protein 1L regulates cholesterol egress from the endo-lysosome system. *Cell Rep*. 19 (2017) 1807-1818.
- [30] X. Liu, N. D. Ridway. Characterization of the sterol and phosphatidylinositol 4-phosphate binding properties of Golgi-associated OSBP-related protein 9 (ORP9). *PLoS One* 9 (2014) e108368.
- [31] Vihervaara, T. ;Uronen, R. L. ;Wohlfahrt, G. ;Bjorkhem, I. ;Ikonen, E. ;Olkkonen, V. M. Sterol binding by OSBP-related protein 1L regulates late endosome motility and function. *Cell Mol Life Sci* 68 (2011) 537-51