

氏名	望 ^{もち} 月 ^{づき} 信 ^{しん} 弥 ^や
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第 575 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 2 項該当
学位論文名	細胞内における Oxysterol-binding protein-related protein(ORP)6 の局在と機能の解析
論文審査委員	(委員長) 教授 川上 潔 (委員) 教授 浜本 敏郎 准教授 藤原 研

論文内容の要旨

1 研究目的

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への結合タンパク質群として発見され、C 末側に共通の OSBP-related ligand binding domain (ORD)配列を有する。哺乳類の ORPs 分子は 12 種類存在し、サブファミリー I ~VIに分類されている。ORPs は、N 末端側に特異的なフォスファチジルイノシトールと結合する 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ドメインを有する。ORPs はこれらのドメインを介して異なる膜小器官に結合することで、membrane contact site (MCS)に局在し、膜小器官の間での脂質輸送やシグナル伝達に関与することが明らかになってきた。ORP6 は、ORP3 や ORP7 と共にサブファミリー IIIに属するが、細胞内での過剰発現が難しく分子機能や生体機能に関する知見は少ない。多様な臓器に発現する他の ORPs に比し、*ORP6* mRNA は脳と筋肉に多く発現することや、マクロファージにおいてマイクロ RNA により発現が制御され、コレステロール輸送に寄与するとの報告がある。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同定されており、神経疾患への関与が予想されるが、病態解明の基盤となる細胞内での局在や機能については、十分に調べられていない。本研究の目的は神経系における細胞内の ORP6 の局在と機能を明らかにすることである。

2 研究方法

- ① ORP6 の発現臓器と発達時期における発現量変化を調べるために、C 末抗体を用いたウェスタンブロット法を行い、細胞分画実験により細胞内における ORP6 の分布を調べた。また *in situ* ハイブリダイゼーションによって脳における発現領域を調べた。
- ② クローニングしたマウス ORP6 遺伝子を、蛍光分子と融合させた形で発現ベクターに組み込み、内在性 ORP6 を発現する初代培養小脳顆粒細胞に発現させた。細胞内小器官に対するマーカーや他の ORPs と共発現させることで、ORP6 の細胞内局在を調べた。可視化に際してはデコンボリューションシステムを内蔵した蛍光顕微鏡を用いた。

- ③ 共局在がみられたタンパク質及びタンパク質領域との免疫沈降法による相互作用解析を行った。
- ④ ORP6 のドミナントネガティブコンストラクトとの共発現による ORP6 全長の細胞内局在に対する影響を観察した。
- ⑤ ORP6PH ドメインのタンパク質-脂質結合分析による結合脂質の解析を行った。同ドメインのみを発現させたときの細胞内局在も観察した。
- ⑥ ORP6 のドミナントネガティブ領域の過剰発現や RNAi による発現抑制下で、特定の脂質の局在変化を、マーカーを用いて観察した。

3 研究成果

ウェスタンブロット法によって、内在性 ORP6 の発現を小脳や脊髄で認め、生後発達に伴う内在性 ORP6 の発現量の増加を認めた。細胞分画実験において、内在性 ORP6 を P2、P3 画分および可溶性細胞質画分の S3 で検出した。*in situ* ハイブリダイゼーションによって、*ORP6*mRNA の発現を、4 週齢のマウス小脳における顆粒細胞層やプルキンエ細胞層や、8 週齢のマウス大脳皮質の神経細胞において認めた。小脳顆粒細胞の初代培養系において、外来性 ORP6 は細胞体のみ局在した。細胞内小器官に対するマーカーと共発現すると、細胞質では小胞体マーカーと共局在し、細胞辺縁の一部の ORP6 は、小胞体-細胞膜 MCS マーカーの Extended-synaptotagmin 2 (E-Syt2) と共局在した。小胞体や小胞体-細胞膜 MCS に局在することが知られた ORP3 や ORP5 を ORP6 と共発現させると、ORP6 は細胞体や神経突起内で ORP3 の一部と共局在したが、ORP5 とは異なる局在を示した。免疫沈降法によって、タグ付きの ORP6 や ORP3 と、内在性 ORP6 及び ORP6 のコイルドコイル配列を含む中間領域との相互作用が認められた。ORP6 中間領域は、単独で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、ORP6 全長との共発現では ORP6 全長の細胞辺縁での局在を減少させた。ORP6 PH ドメインは、タンパク質-脂質結合解析では PI4P, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃, PA と結合した。また、同ドメインを細胞内で単独で発現させると細胞膜に局在した。ORP6 中間領域の過剰発現や RNAi による ORP6 の発現抑制下では、一部の PI4P の細胞内局在がゴルジ体から細胞膜に変化した。

4 考察

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 ORP6 の挙動を神経細胞内で観察した。蛍光分子の C 末側に融合させた ORP6 を発現させると、約半数の細胞では点状の分布となり、残りの細胞では細胞質内で拡散した分布を示した。蛍光分子の N 末側に融合させた ORP6 を発現させると細胞質内で拡散した分布を示し、サポニン処理をすることによって点状の分布が観察された。細胞分画実験において、内在性 ORP6 は膜小器官画分のみならず細胞質画分でも検出された。これらのことから、蛍光分子の C 末側に融合させた 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以後の実験に使用した。

我々は、細胞辺縁に局在する ORP3, ORP5, ORP6 の一部と E-Syt2 との共局在を認めた。2 種類の ORP を共発現させた細胞では、ORP6 は ORP3 の一部と共局在し、免疫沈降実験でも、ORP6 あるいは ORP6 中間領域が ORP3 や ORP6 と共沈した。ORP5 と ORP6 の共発現では、共局在や共沈は見られなかった。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 にはコイルドコイル配列が存在しない事実と合致する。

ORP6 中間領域はそれ自体では細胞縁には局在せず、ORP6 と共発現させると ORP6 の細胞縁での局在を減少させた。ORP6 PH ドメインは、PI4P, PI(4,5)P₂, PI(3,4,5)P₃, PA と特異的に結合し、細胞内では細胞膜に局在した。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。また、ORP6 中間領域の過剰発現が ORP6 の局在を変化させたことから、ORP6 の細胞膜での二量体形成は、ORP6 の小胞体-細胞膜 MCS での局在に変化を誘発し、その結果、機能に影響を及ぼす可能性も考えられる。

ORP6 中間領域の過剰発現や RNAi による発現阻害によって、PI4P の局在変化を認めた。このことは ORP6 の小胞体-細胞膜 MCS への局在の減少が、PI4P の挙動に影響を与え、細胞膜から小胞体への PI4P の移行が抑制された可能性を示す。これまで、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 VAPA と結合することで、小胞体-ゴルジ MCS に局在し、2つの ORD と結合するコレステロールと PI4P を対向輸送することが報告されている。マクロファージでは、ORP6 の発現抑制によってコレステロールの蓄積が誘発されるという報告があり、これらのことから ORP6 は PI4P とコレステロールの交換輸送体として働く可能性が推測される。

5 結論

ORP6 は小脳顆粒細胞において小胞体や小胞体-細胞膜 MCS に局在し、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 自身と二量体を形成し、PI4P 代謝に関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本学位論文は、オキシステロール結合タンパク質関連タンパク質の一つ ORP6 について、① マウス体内での発現様式及び培養神経細胞での細胞内局在、② ORP3, ORP5 との相互作用、③ ORP6PH ドメインに対する結合脂質、④ ORP6 の発現阻害及びドミナントネガティブの過剰発現による細胞内脂質の局在変化を、解析したものである。これらの解析によって ORP6 が主に神経細胞内で発現し、細胞膜と小胞体膜の接触部位に局在すること、ORP6 の中間領域がホモ二量体及び ORP3 とのヘテロ二量体形成を担うこと、PI4P の細胞内局在を制御すること、を明らかにし、ORP6 が小胞体-細胞膜間の PI4P とコレステロールの交換輸送に関与する可能性を示した。

ORP6 の生体内機能はこれまでほとんど解析されておらず、本研究は ORP6 各ドメインの分子機能、細胞内局在、細胞内での脂質代謝に関する機能について初めての知見をもたらしたものとして、新規性及び独創性が認められる重要な研究であると評価できる。実験系は多岐に渡っており、生化学、細胞生物学、組織学の手法を適切に用い、実験結果の解釈についても適切になされている。この研究を基盤として、ORP6 の生体機能が解明されれば、細胞内脂質代謝の新たな制御機構の理解が進展し、ORP6 の変異を原因とする神経病の病態機序の解明にもつながることが

期待される。

論文要旨及び学位申請論文には、グラフの表示の不備や的確性を欠く表現のあること、結果及び考察に加筆が必要であること等が審査員より指摘された。申請者は全ての指摘に対して適切に対応し、論文要旨及び学位論文の訂正を行った。

以上により、本論文は学位論文としてふさわしい内容であり、審査員全員一致で合格と判断された。

最終試験の結果の要旨

申請者の発表は、研究目的や実験方法、実験結果及び考察について適切に行われた。実験は自ら遂行したと判断され、実験データの解釈やその限界についても適切に述べられた。

発表後、ORPファミリーの先行研究についての知見、実験方法及びORP6遺伝子発現パターンの解析結果の解釈や、内在性タンパク質の影響の有無等について審査員からいくつかの質問がなされたが、申請者の応答はいずれも的確になされた。PHドメインと脂質の親和性を評価するための実験や、タンパク質二量体形成の検出方法などの生化学的な質問にも概ね問題なく応答があった。自らの実験の特性や限界についても正しく把握しており、実験科学者としての素養を身につけていると判断された。

以上のことから、申請者は博士の学位に相応しい研究能力と科学に対する真摯な態度を有することが明らかとなり、合格と判断された。