

コレステロール欠乏による内臓逆位の発症機構

山口大学 大学院医学系研究科 分子細胞生理学講座

宮本 達雄

【研究背景】

繊毛は、細胞表面に発達する微小管性の突起構造であり、自律的な運動性をもつ「動繊毛」と多様なチャネルや受容体が集積する非運動性の「一次繊毛」に大別される。通常、発生初期に一過的に形成されるノードにおいて、ピット細胞の運動性繊毛が作り出す反時計回りの水流が遺伝子発現の左右非対称性を誘導する。この時、ノードの左側周縁部のクラウン細胞に発達する一次繊毛に局在する機械受容性 Ca^{2+} チャネル・Polycystin-2 がノード流を感知して、繊毛から流入する Ca^{2+} が遺伝子発現を制御する。

一次繊毛が細胞力覚能を発揮するために、一次繊毛を覆う細胞膜（繊毛膜）には、コレステロールが高度に濃縮しており、巨大な細胞膜ドメインを形成する。コレステロール合成阻害剤・Statin を処理した実験動物では、内臓逆位など先天奇形が生じるが、コレステロール量の低下が内臓逆位を引き起こす機構は不明である。クライオ電子顕微鏡による先行解析から、Polycystin-2 にはコレステロールが配位することが報告された¹⁾。重要なことに、常染色体優性多発性嚢胞腎の患者データベースには、Polycystin-2 のコレステロール配位を担うアミノ酸のミスセンス変異(PKD2 L517R)が検出される。これらの知見をもとに、我々は、PKD2 L517R(マウスではL515R)変異ノックインマウスを作製したところ、半数のホモ個体で内臓逆位を示した(図1)。



図1 コレステロール結合部位変異 Polycystin-2 マウスの心臓逆位 (RV:右室、LV:左室)

【研究目的】

本研究では、繊毛膜上に形成されるコレステロール・Polycystin-2 クラスターの「構造—活性」相関を評価して、コレステロール欠乏による内臓逆位の分子機構の解明を研究目的とした。本研究では、コレステロールが、① Polycystin-2 の Ca^{2+} イオンチャネル活性を「直接的」に制御するのか? (Polycystin-2 L517R 変異タンパク質の電気生理学的解析)、② 繊毛への局在または繊毛内でのクラスター化を介して「間接的」に Ca^{2+} イオンチャネル活性を制御するのか? (Polycystin-2 L517R 変異タンパク質の繊毛局在解析)を明らかにすることで、コレステロールの「臓器配置の左右非対称性の獲得機能」を評価した。

【研究結果】

① Polycystin-2 L517R 変異タンパク質は正常型タンパク質と同様のチャネル活性を示す:

Polycystin-2 L517R-EGFP 変異体を安定的発現した HEK293 細胞株において、膜電位固定—パッチクランプ法によりチャネル活性を計測したところ、野生型 Polycystin-2 と同様の電気生

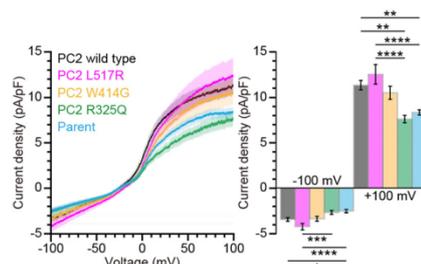


図2 Polycystin 変異体のチャネル活性

理学的特性を示した (図 2)⁴⁾。なお、既報のチャネル機能喪失型 Polycystin-2 R325Q 変異体をコントロールとした。すなわち、コレステロールは、Polycystin-2 のチャネル活性には必須でないことが示唆された。

② Polycystin-2 L517R 変異タンパク質は繊毛局在が障害される：

Polycystin-2 L517R(マウス

Polycystin-2 L515R) 変異ノックイン

mIMCD3 細胞株(マウス集合管細胞株)を免疫染色したところ、Polycystin-2 L515R

変異タンパク質は一次繊毛への局在が低下していた (図 3)⁴⁾。また、メチル-β-

シクロデキストリン (MβCD) でコレステロールを除去した mIMCD3 親細胞株において、正常型 Polycystin-2 の繊毛局在が障

害された (図 3)。MβCD 処理後の mIMCD3 細胞のタイムラプスイメージング解析より、

繊毛に存在していた Polycystin-2 が、繊毛膜から他の細胞膜へ側方拡散することが明らかになった (図 3)⁴⁾。すなわち、コレステロールは繊毛膜に Polycystin-2 を閉じ込める機能があることが示唆された。

先行研究より、一次繊毛膜へのコレステロール供給にはペルオキシソームは必須である²⁾。本研究では、ペルオキシソーム欠損症モデル mIMCD3 細胞株 (*Pex14* 欠損細胞株) の一次繊毛への Polycystin-2 の局在が阻害されていることを明らかにした (図 3)⁴⁾。さらに、水溶性コレステロールを処理した *Pex14* 欠損 mIMCD3 細胞株では、Polycystin-2 の繊毛局在の回復が確認された⁴⁾。一方で、Polycystin-2 L515R 変異ノックイン mIMCD3 細胞株の繊毛局在は水溶性コレステロール添加でも回復しなかった⁴⁾。以上のことから、コレステロールは、Polycystin-2 の繊毛局在制御を介して内臓配置の非対称性決定に必要であることが示された。

【考察】

本研究によって、コレステロールは Polycystin-2 のチャネル活性ではなく、一次繊毛への局在を制御することが明らかになった。本研究で着目した Polycystin-2 のコレステロール結合部位は、チャネルゲート付近に位置しているが、最近、これとは異なる場所でオキシステロールが Polycystin-2 と結合しており、チャネル活性に必要であることが報告された³⁾。コレステロール分子種によって、Polycystin-2 のイオンチャネル活性制御が異なっている可能性が示唆されるが、今後、コレステロール結合不全 Polycystin-2 変異体間の構造解明が重要であり、変異体の分子動力学やクライオ電子顕微鏡による単粒子解析などの解析が待たれる。

次に、コレステロールは、どのように Polycystin-2 を繊毛局在させるのか? について考察する。*Pex14* 欠損細胞株では、恒常的に繊毛膜のコレステロールが低下するために、有意に繊毛局在が低下しているが、わずかな量の Polycystin-2 タンパク質が繊毛膜上に観察される。興味深いことに、水溶性コレステロールを添加すると、Polycystin-2 タンパク質は、繊毛膜に集積することが明らかになった。また、本研究で実施した繊毛膜上の Polycystin-2 の分子挙動をライブイメージング解析から、コレステロールは、繊毛膜への Polycystin-2 タンパク質の移行には必須ではなく、繊毛膜での停留に必要であることが示された⁴⁾。以上のことから、内臓の非対称性決定において Polycystin-2 が機能を発揮するために、コレステロールは Polycystin-2 をクラウン細胞の一次繊毛膜に閉じ込める機能を有することが示唆された。

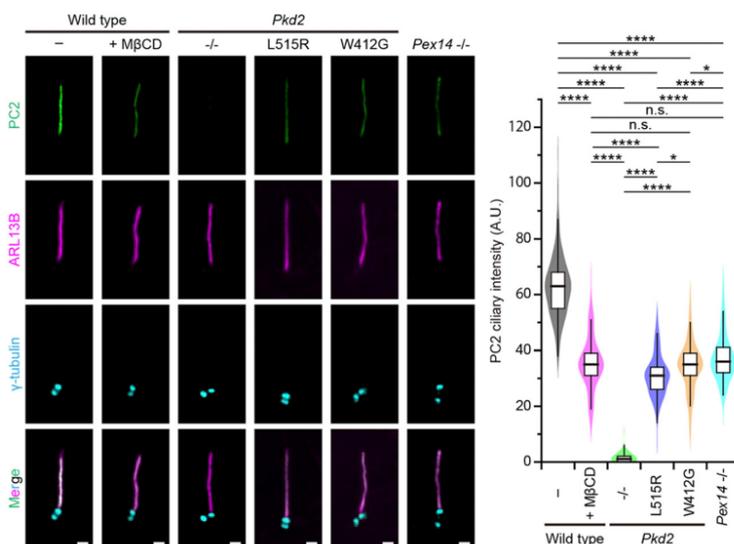


図 3 Polycystin 変異体の一次繊毛局在

