

モデル生物を利用したコレステロールの細胞内取り込みに働く 新規因子の探索と解析

群馬大学 生体調節研究所 細胞構造分野
佐藤 健

1. はじめに

低密度リポタンパク質 (LDL) は血中を循環し、コレステロールを細胞に送り届ける役割を担っているが、一方でコレステロールを豊富に含むため悪玉コレステロールとも呼ばれ、血中の量が過剰になると抗コレステロール血症や動脈硬化などの原因となる。通常は細胞表面にある LDL 受容体が血中の LDL を捕らえて何度も細胞内に取り込むことで血中 LDL 量が適切に保たれているが、この分子機構についてはいまだ未解明な点が多い。実はこの LDL を細胞内に取り込む仕組みは、線虫などのシンプルな動物からほ乳類まで驚くほどよく似ている。線虫 *C. elegans* の卵に多く含まれる卵黄成分は LDL と非常によく似た性質をしており、卵母細胞によって細胞外から取り込まれ、発生の際の栄養素として蓄えられる。この際、卵黄成分は卵母細胞膜にある LDL 受容体ホモログ(卵黄受容体)に捕捉され細胞内に取り込まれるが、細胞は卵黄受容体を再び細胞膜へ戻して何度も再利用している。本研究では、このヒトの LDL 取り込みに類似した線虫の卵黄成分の取り込みの分子メカニズムに注目し、LDL コレステロールを細胞内に取り込む際にはたらく新たな因子の発見および分子メカニズムの解明を目指している。本研究によって得られた知見は線虫における卵黄成分の取り込みメカニズムだけではなく、ほ乳類での LDL の取り込みの仕組みの解明や血中コレステロール量を調節する薬剤の開発などに活用できると期待される。

2. 方法

申請者らは *C. elegans* の卵黄タンパク質である YP170(ヒトApoB100ホモログ)に緑色蛍光タンパク質 (GFP) を結合し、この YP170-GFP の卵母細胞による取り込みに異常を示す *rme* 変異株とその原因遺伝子の解析を行っている。正常な線虫では YP170-GFP は腸細胞から体腔へと分泌され卵黄受容体を介して卵母細胞に取り込まれるが、*rme* 変異株では YP170-GFP が卵に取り込まれず、体腔に蓄積する。これまでの研究から、申請者らは *rme-5* 変異株の原因遺伝子の同定に成功し、この遺伝子がこれまでほとんど未解析であった低分子量 GTPase RAB-35をコードしていることを見出している(1)。Rab GTPase はGDP・GTP 交換因子により GDP 型から GTP 型へと変換され、活性化し、その後、エフェクター分子を介して小胞と標的膜の繫留、融合、小胞への積み荷の選別、オルガネラ輸送など様々な役割を担っていることが知られている。そこで、本研究計画ではこの Rab35 の活性を制御する因子である GDP・GTP 交換因子とエフェクター分子の探索を行う。また、得られた Rab35 関連因子についてマウスホモログを獲得し、解析を開始する。

3. 結果 研究成果

1) RAB-35 の活性制御因子およびエフェクター分子の探索と解析

まず活性化した RAB-35 が作用するエフェクター分子を探索するために、酵母ツーハイブリッド法により GTP 固定型優性変異を導入した RAB-35 と相互作用する新規因子のスクリーニングを行った。その結果、複数の RAB-35 エフェクター候補分子を同定した。これらのうちアクチン重合調節因子の一つである PFN-1 は、野生型 RAB-35 と GTP 固定型変異 RAB-35 とは相互作用するが、GDP 固定型変異 RAB-35 とは結合しないことが明らかとなった。そこで、YP170-GFP を発現する線虫株において PFN-1 遺伝子に対する RNAi ノックダウンを行ったところ、卵母細胞による卵黄の取り込みに異常が観察された。また、これらの線虫株は生育が悪く、一部胚性致死になることが明らかとなった。さらに、PFN-1 遺伝子破壊株においても卵母細胞による卵黄の取り込みに異常が観察された。これらのことから、活性化 RAB-35 は PFN-1 を介して、卵黄受容体の細胞膜へのリサイクリングに働くことが示唆された。現在、RAB-35 と PFN-1 の相互作用についてさらに生化学的に解析を進めている。また、RAB-35 と PFN-1 のマウスホモログを獲得し、これらの遺伝子産物の動物培養細胞内における細胞内局在性等について解析を進めている。

2) RAB-35 ノックアウトマウスの作製と解析

マウス ES 細胞において RAB-35 遺伝子が破壊された ES 細胞株を獲得し、キメラマウスの作製を行った。さらに、このキメラマウスを元にノックアウトマウスを作製し、現在返し交配を進めている。今後、RAB-35 遺伝子の破壊がマウスの発生、生育に及ぼす影響について解析し、血中 LDL やコレステロール量等に及ぼす影響について解析を行う予定である。

4. 考察 まとめ

本研究課題によって新規低分子量 GTPase RAB-35 のエフェクター候補としてアクチン重合調節因子である PFN-1 を同定することに成功した。申請者らは RAB-35 を LDL レセプターのリサイクリングに関わる因子として同定したが、その後、国内外の研究者から RAB-35 が免疫シナプスや神経突起伸長、ショウジョウバエの剛毛形成などに重要であることも次々と報告されてきている。特にショウジョウバエの剛毛形成においては、RAB-35 のエフェクターとしてアクチンフィラメントの束化を調節するファッシンが同定されてきている。今後、RAB-35 とアクチン系の相互関係についてさらに詳細な解析を進める必要がある。

5. 発表論文、参考文献

1. Miyuki Sato, **Ken Sato**, Willisa Liou, Saumya Pant S, Akihiro Harada, Barth Grant.

Regulation of endocytic recycling by *C. elegans* Rab35 and its regulator RME-4, a coated-pit protein.

EMBO J. 2008 Mar 20.