

**ステロール感受ドメインを持つ
新規 12 回膜貫通型タンパク質 (Patched-related) の
コレステロール動態調節における機能解明**

筑波大学大学院生命環境科学研究科
「次代を担う若手大学人育成イニシアティブ」
丹羽 隆介

1. 序論

多細胞生物において、コレステロールは細胞膜の成分として、またステロイドホルモンの原料として必須であり、その代謝調節が適切に行われることは生命活動の維持に必須である。そして、体内のコレステロール代謝の異常は、ヒトにおいては動脈硬化などの様々な疾患をもたらす。従って、生体内におけるコレステロール動態制御機構に関わる分子を発見してその生体内機能を解明することは、基礎と応用の両面から重要な課題である。

コレステロールおよび類縁のステロール、そしてステロールを抱合したタンパク質の動態を細胞内外で適切に制御するに当たっては、「ステロール感受ドメイン (sterol-sensing domain; SSD)」と呼ばれる特徴的なドメインを持つ一群のタンパク質が重要な役割を果たす。SSD は、5 回の膜貫通部位を持つタンパク質ドメイン構造であり、コレステロールとの結合性を有する。SSD を有するタンパク質には 7 つの主要なファミリーが存在する (Kuwabara and Labouesse, 2002)。このうち、Dispatched と Patched は、コレステロール修飾を受けるシグナル伝達分子 Hedgehog の受容体として機能する。また、SREBP cleavage activating protein (SCAP) と HGM-CoA 還元酵素 (HMGR) 、そして 7-dehydrocholesterol 還元酵素 (7DHC) ファミリーに属するタンパク質は、いずれもコレステロールの生合成およびコレステロール量の恒常性の制御に関わる。また、NPC ファミリーは、細胞内のコレステロールの輸送に関与する。これら一連のタンパク質の機能の異常はヒトの遺伝的疾患にも関わっている。具体的には、Patched、NPC、および 7DHC の機能的異常は、母斑基底細胞癌症候群、C 型ニーマン-ピック氏病、スミス-レムリー-オピッツ症候群と呼ばれる重篤な遺伝性疾患とそれぞれ連関する (Kuwabara and Labouesse, 2002)。

一方、近年のゲノムプロジェクトの進展によって、上記以外のもう 1 つの SSD タンパク質ファミリーとして、12 回膜貫通型タンパク質 Patched-related (PTR) ファミリーの存在が明らかにされている。PTR は、線虫からヒトまで動物種を越えて高度に保存されている (Kuwabara and Labouesse, 2002)。既存の SSD タンパク質の機能的な重要性を考え合わせると、PTR はコレステロール動態調節に必須の役割を担うことが予想される。しかしながら、PTR ファミリーの解析については、線虫 *Caenorhabditis elegans* の個体発生への関与についての報告が数例あるのみで (Bürting et al. 2005; Rohlfing et al. 2011)、PTR の細胞レベル・分子レベルでの生体内機能は未解明のままである。

生体内における遺伝子の機能を探究するに当たり、分子遺伝学的手法によって、その遺伝子の機能を低下させた個体の表現型を精査することは有効な研究アプローチである。そして、多細胞モデル生物であるショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、「ショウジョウバエ」) は、こうした分子遺伝学的手法を遂行するに当たって、多くのツールが整備されている優れた研究系である。そこで本研究では、分子遺伝学的手法の発達したショウジョウバエをモデル生物として利用し、PTR の生体内機能、特にコレステロール動態調節機構における役割を解明することを目標とした。

なお、本助成での研究を行っている期間中に、まったく同一のタンパク質をショウジョウバエで研究している兵庫医科大学の中野芳朗先生の知己を得たため、一連の研究は中野先生との共同研究として実施した。

2. 方法

ショウジョウバエ系統：前胸腺特異的な PTR の二重鎖干渉 (RNAi) の実現には、前胸腺特異的な GAL4 系統 (*phm-GAL4*) と、*Ptr* の配列に対応したヘアピン型 RNA を発現する UAS 系統 (*UAS-Ptr-IR*) を利用

した。*UAS-Ptr-IR* 系統は、国立遺伝学研究所 NIG-FLY (系統番号はそれぞれ 11212R-2 と 11212R-3、および Bloomington Drosophila Stock Center (系統番号 28973) を取り寄せて利用した。*Ptr* 遺伝子の一部分をゲノム上から欠損した系統 *Ptr^{ex101}* と *Ptr^{ex202}* の作出は、トランスポゾン P 因子の不正確な切り出しによって実現した。スターターとなる P 因子系統は京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センターから取り寄せた (系統番号 NP2732)。エクジソン摂食実験に用いた活性型エクジソン (20-hydroxyecdysone) は Sigma より購入した。

特異的抗体の作製：ショウジョウバエ PTR タンパク質内のアミノ酸配列 SHHNLQPNGKSSKYPP およびそのアミノ末端側にシステインを付加したペプチドを合成し、ウサギに免疫した。5 回の免疫の後、全血を採取した。

組織染色：ショウジョウバエ発生過程における *Ptr* 遺伝子の時間的および空間的発現を調べる際には、*Ptr* 遺伝子に対する RNA *in situ* hybridization および PTR タンパク質に対する抗血清を利用した抗体染色を行った。細胞内でのコレステロールを可視化するには、フィリピン (Sigma) を利用した。観察は共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Zeiss) で行った。

3. 結果

(i) ショウジョウバエ *Ptr* の機能をステロイドホルモン産生器官のみで低下させると、脱皮と変態に異常が生じる。

ショウジョウバエを含む昆虫類において、コレステロールは脱皮と変態を制御するステロイドホルモン「エクジソン」の原料として利用される。これまでの研究から、エクジソン生合成過程には、食餌から摂取されたコレステロールが「前胸腺」と呼ばれる内分泌器官に適切に取り込まれ、適切にされることが必須であることが明らかにされている (Niwa and Niwa, 2011)。コレステロールは昆虫発生を制御するエクジソンの原料であり、前胸腺におけるコレステロール代謝機能の欠損は脱皮および変態の異常という明確な表現型をもたらす。*Ptr* の機能はコレステロールの動態制御に関与すると強く予想されることから、*Ptr* の機能を前胸腺のみで低下させた際にどのような表現型が見られるのかを検討した。

前胸腺特異的なプロモーターの下流で、*Ptr* 遺伝子をターゲットするヘアピン型 RNA を発現する系統を作出したところ、幼虫期の脱皮、あるいは幼虫期から蛹期への変態の過程が顕著に阻害され、発育過程の進行が大きく乱れることが分かった。この表現型は、*Ptr* 遺伝子のまったく別の箇所をターゲットする独立の 2 種類の RNAi 系統において観察された。

続いて、この表現型が前胸腺でのエクジソン生合成の異常に依拠しているのか否かを検討するため、ショウジョウバエを飼育する培地に活性型エクジソンを添加して飼育した。その結果、エクジソンの添加によって RNAi 個体の脱皮と変態の異常は大幅にレスキューされた。具体的には、通常飼育下の RNAi 個体では 81% の個体が幼虫脱皮の異常を示したが、エクジソン添加時にはその異常は 20% にまで低下した (n>100)。以上の結果は、PTR が前胸腺でのエクジソン生合成に重要な役割を果たすことを強く示唆する。

(ii) ショウジョウバエ *Ptr* 機能欠損突然変異株は成長遅延の表現型を示す。

先述の表現型が独立した 2 系統の RNAi 個体において観察されたことは、我々が見出した脱皮と変態の表現型が、RNAi によるオフターゲット効果ではなく、*Ptr* の特異的な機能低下によるものであることを期待させる。一方、*Ptr* の機能的な重要性を真に証明するには、ゲノム上の *Ptr* 遺伝子に塩基レベルでの変異を持つ突然変異系統の分離が重要である。そこで、ショウジョウバエで用いられる「トランスポゾンの不正確な切り出し」法 (Imprecise jumping method) を利用し、*Ptr* 遺伝子構造の一部を欠損した系統の作出を行った。*Ptr* の 5' 上流にトランスポゾン P 因子が挿入した系統がすでにショウジョウバエのストックセンターに存在していたため、これをスターターとして P 因子のジャンピングを行った。その結果、*Ptr* 遺伝子領域の 5' UTR のほとんどの領域を欠損した独立の変異系統を 2 系統得た。ノザンプロット法によって遺伝子発現解析を行った結果、いずれの系統においても *Ptr* mRNA の量は検出限界以下にまで低下した。

この個体の表現型を観察したところ、コントロール個体では 3 齢幼虫にまで育つ時期まで発育させても、矮小な 1~2 齢幼虫に留まるものが 50% 近く観察された (n>100)。また、予備的結果ながら、この幼虫発育遅延の表現型は、先述の RNAi 個体と同様に、餌へのエクジソン添加によって救済される傾向が見られた。これらの結果は、*Ptr* 遺伝子のプライマリーな機能は、やはり前胸腺でのエクジソン生合成にあることを示唆している。現在、数を増やした実験を継続している。

この機能欠損個体を用いてコレステロール動態の異常を観察するために、コレステロールを可視化する蛍光試薬フィリピンを用いた組織染色実験も実施したが、現在までのところ、細胞内に蓄積するコレステロールの量的な変化は見出せなかった。

(iii)Ptrは発生時期を通じてユビキタスに発現している。

Ptrの発現およびその翻訳産物の挙動が発生過程を通じて時空間的に制御されているかを検討するために、RNA in situ hybridizationと特異的抗血清を用いた免疫組織化学染色を実施した。RNAiおよび機能欠損変異株で見られた表現型から、Ptrは前胸腺で強い発現が見られるものと期待していたが、予想に反してその発現は時期的および空間的にユビキタスであった。また、前胸腺では免疫組織化学染色の強いシグナルは得られなかったが、唾液腺と卵巣においては、プラズマ膜に濃縮したシグナルを観察した。一方で、細胞内小器官での濃縮した分布は観察されなかった。このことは、PTRがプラズマ膜上で機能する分子であることを示唆する。

4. 考察、まとめ

本研究では、新規SSDドメインタンパク質PTRの機能欠損個体の分離、およびその発育過程における表現型解析の先鞭を着けることが出来た。PTRの機能に迫るための解析系としてステロイドホルモン産生器官である前胸腺が有用であることを示した本研究の成果を生かし、今後、得られた材料を元に、PTRのコレステロール動態制御における真の意義に迫ることを希望している。

一方で、コレステロールの動態挙動を組織染色によって捉えることは、今回の研究期間内には成功しなかった。単純にコレステロールの量や局在といった部分に表現型は現れず、よりコレステロールのダイナミックな挙動に影響が見られるのかも知れない。今後のさらなる細胞生物学的な観察が必要である。また、コレステロールは全ての細胞の膜成分としても重要であり、またPTRの発現には特段の組織や時期の特異性が見られなかったことから、前胸腺以外の細胞でも重要な役割を持つ可能性がある。前胸腺でのコレステロール動態のみならず、個体全体における細胞膜成分の生化学的分析および細胞形態の観察を精緻に行う必要もある。

メタボリック症候群の急増に伴う社会的な要請もあり、代謝調節機構の研究は急速に発展している。近年、代謝調節に関与する遺伝子、経路および器官の多くが進化的に保存されていることが明らかになり、ショウジョウバエをモデルとして代謝研究を行うことの有効性が世界的に認識されつつある。例えば、糖尿病や肥満と深い関わり合いを持つインスリン経路やTOR経路の解析においては、ショウジョウバエが優れたモデル系として利用され、脊椎動物での作用機序の理解にも大きな貢献をもたらしている。しかしながら、その危険因子としての重要性にも関わらず、コレステロール代謝に関する昆虫を用いた研究はあまり例を見ない。今後、ショウジョウバエで得られたPTRの機能についての知見を生かし、脊椎動物を用いた研究に向けた基礎的知見を蓄積することが重要である。

5. 発表論文、参考文献

- Bürglin, T. R. and Kuwabara, P. E. (2006) Homologs of the Hh signalling network in *C. elegans*. *WormBook* 28: 1-14.
- Kuwabara, P. E. and Labouesse, M. (2002) The sterol-sensing domain: multiple families, a unique role? *Trends Genet.* 18: 193-201.
- Niwa, R. and Niwa Y. S. (2011) The Fruit Fly *Drosophila melanogaster* as a Model System to Study Cholesterol Metabolism and Homeostasis. *Cholesterol* 2011: Article ID 176802.
- Rohlfing, A. K., Miteva, Y., Moronetti, L, He, L. and Lamitina, T. (2011) The *Caenorhabditis elegans* mucin-like protein OSM-8 negatively regulates osmosensitive physiology via the transmembrane protein PTR-23. *PLoS Genet.* 7: e1001267.