



Title	ほ乳類新規RND型膜蛋白質による細胞内コレステロールの制御
Author(s)	橋本, 聡文
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49196">https://hdl.handle.net/11094/49196</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	橋本 聡 文
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 21951 号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	ほ乳類新規 RND 型膜蛋白質による細胞内コレステロールの制御
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人 (副査) 教授 前田 正知 教授 馬場 明道 教授 土井 健史

#### 論文内容の要旨

生物は外界とリン脂質を主成分とする脂質二重膜によって隔てられており、親水性物質の透過には種々のトランスポーターが関与している。一方疎水性の物質は自由に細胞膜を通過すると考えられており、その輸送機構の解析はあまり行われていなかった。各種の薬剤はこの疎水性の物性を利用して標的の細胞内へ取り込まれる。しかし大腸菌は、このような薬剤をトランスポーターを使い細胞外へ排出することで、薬剤に対する耐性を示すことが近年明らかとなってきた。大腸菌では、この多剤耐性に関わる最も重要なトランスポーターは RND ファミリーの AcrB である。これまでに我々の研究室では、大腸菌の RND 型トランスポーターである AcrB が細胞膜上で脂溶性物質を認識して細胞外へ輸送することを示してきた。一方、真核生物で最も解析が進んでいる RND 型蛋白質として NPC1 が挙げられるが、その詳細な機能に関してはまだ明らかになっていない。また多細胞生物では細胞間の情報伝達に種々の脂溶性物質を利用しているが、それらの物質の中にはどのようにして輸送されるのかについて明らかになっていないものが多く存在する。そこで私は大腸菌での RND 型輸送体の基質認識機構から、RND 型トランスポーターは哺乳類の生体内においても重要な脂溶性物質の輸送に関わっているのではないかと考えて哺乳類型の新規 RND 型トランスポーター遺伝子の同定を試みた。

まず私は脂溶性物質のトランスポーターの候補として哺乳動物においてこれまで明らかになっていない新しい RND 型膜蛋白質があるかどうかを調べた。私はマウス NPC1 アミノ酸配列の中でこれまで明らかになっている他のマウス RND 型蛋白質と相同性が高い部分配列を検索配列とし Psi BLAST に供した。その結果、私は新規遺伝子として 3 個配列を得、RNDEu-1、RNDEu-2、RNDEu-3 と命名した。

次に、これらの蛋白質の機能を明らかにするために各遺伝子がどの臓器に発現しているのかを半定量的 RT-PCR により調べた。その結果 RNDEu-1 はユビキタスに発現していたが腸での発現が特に高く、RNDEu-2 は精巣と脳で発現していたが特に脳での発現が高く、RNDEu-3 は精巣に特異的に発現していることが明らかとなった。さらに詳細に各遺伝子の発現量を調べるため、経時的な発現量の変化を定量的 real time PCR により調べた。その結果、まず RNDEu-1 の腸での発現は離乳後に上昇していた。このことから離乳後の食事に関する可能性があげられた。さらに 2004 年に Graziano らによって RNDEu-1 は小腸でコレステロールの吸収に関する蛋白質 NPC1L1 として報告された。次に RNDEu-2 の脳での発現は週齢に従って減少していた。この発現パターンはステロイドホルモンの合成酵素のひとつである 3 $\beta$ -HSD に酷似していた。近年、脳内でもステロイドホルモンが合成されていることが明らかとなり、新たな脳内の情報伝達物質として注目されていることから脳内でのステロイドホルモン合成酵素と同様に週齢に従って減少していることは大変興味深い結果となった。また、最後に RNDEu-3 の精巣での発現は週齢に応じて上

昇していた。このことは精巣の発達に関与を想定させる結果であった。

次に私はどのような細胞に発現しているのか、またその細胞内局在はどこであるのかを知ることは、これら蛋白質の機能を考える上で重要であると考えて各蛋白質の臓器内分布を調べた。RNDEu-1はNPC1L1として最近報告され、すでに小腸の上皮に発現することが報告されている。そこで私はRNDEu-2、3についても臓器内のどの細胞に発現しているのかを調べた。その結果、RNDEu-2の発現は脳の全体に観察され、特に神経細胞に発現が強くみられた。またRNDEu-3は精巣のセルトリ細胞に特異的に発現していた。次にRNDEu-2と3の細胞内局在を調べた結果、RNDEu-2は小胞体に、RNDEu-3に関してはリソソームに局在が観察された。

RNDEu-1、2、3はこのように特定の組織細胞に発現していることからそれら発現細胞での特異的な機能に関与していることが考えられた。すでに述べたようにNPC1は細胞内でのコレステロールの輸送に、NPC1L1も小腸でのコレステロールの取り込みに関与することが報告されている。そこで私はRNDEu-2および3もコレステロール輸送に係わるのではないかと考え、RNDEu-1、2、3を発現させた細胞を異なるコレステロール量の条件下におき、細胞内のコレステロール量に変化がおこるかをフィリピン染色により可視化した。まずRNDEu-1、2、3を一過的に発現させた細胞を正常の培養条件下で生育させた場合、細胞内コレステロール量に有意な変化は観察されなかった。次にRNDEu-1(NPC1L1)は細胞内のコレステロール量を減少させる処理によりコレステロールを積極的に細胞内に取り込むことが報告されていることから、RNDEu-1(NPC1L1)、RNDEu-2、RNDEu-3を発現させた細胞にコレステロール枯渇処理を行った。この処理を行った結果、RNDEu-1を発現させた細胞においては有意ではないが微かに細胞内コレステロール量の増加が観察されたが、RNDEu-2、3では変化が観察されなかった。またコレステロールを培地に大量に加え負荷処理を行うと、RNDEu-1は変化が見られなかったがRNDEu-2、3を発現させた細胞においてコレステロールの細胞内蓄積が約50%程度に減少していた。

RNDEu-1は小腸でコレステロール取り込みに関わる蛋白質NPC1L1であるとGrazianoらによって報告されたが、本研究では新たに新規のRNDファミリーに属する遺伝子RNDEu-2、3を発見し、これらがコレステロールに関与することを明らかとした。RNDEu-2はこれまでの実験より発達段階にある神経細胞内でコレステロールの小胞体への輸送に係わっていることが考えられる。小胞体には遊離コレステロールをコレステロールエステルへと変換する酵素であるACATが存在している。本実験で使用したfilipinは遊離コレステロールのみを染色することから、RNDEu-2が小胞体へ遊離コレステロールを移行させ、コレステロールエステルに変換させることで細胞内のfilipinによる染色が減ったとも考えられる。RNDEu-3は精巣の成熟に関与しているのではないかと考えられた。また遊離コレステロールはリソソームから形質膜へ輸送されることが報告されていることから、リソソームに発現が観察されるRNDEu-3はこの輸送に関与している可能性が考えられる。さらにこれらの発現が特定の臓器、細胞に限定されていることから、それら細胞に特異的に発現している物質の輸送に関与している可能性が考えられる。これらの可能性については今後解明していく必要がある。

## 論文審査の結果の要旨

橋本聡文君の博士論文「ほ乳類新規RND型膜蛋白質による細胞内コレステロールの制御」に関して審査を行った。RND型蛋白質はグラム陰性細菌において、主要な異物排出タンパクであり、生体防御機構を担っている。申請者の研究室で決定されたその分子構造によると、この排出タンパクは脂溶性の化合物(毒物・薬物)を脂質二重層中から取り入れて細胞外に排出している。最近、動物細胞でもRND型膜蛋白質ホモログの存在がわかってきた。橋本君は、動物細胞でRND型膜蛋白質がどのような働きをしているかに興味を持ち、マウスゲノムにおいてRND蛋白質ホモログの検索を行い、新規遺伝子としてRND-Eu1、2、3の3つを同定した。これらの臓器分布、細胞内局在などを詳しく調べると共に、クローニングして強制発現させた細胞における機能を調べた。この研究の過程で、他の研究者から、RND-Eu1については、NPC1-L1という名称で報告がなされ、コレステロールを細胞内に取り込む働きがあると報告された。橋本君は、これら3つのコレステロールとの関係を調べ、RND-Eu2、3は、Eu1とは逆に、コレステロール負荷条件下で細胞内コレステロール量を低下させる働きがあることを見いだした。本研究は、ポストゲノム解析において、オーファン輸送体の機能を決定する試みとして興味深い研究であり、大阪大学大学院薬学研究科博士の学位にふさわしいものと認められる。