

細胞内膜系の位置情報に基づく細胞極性形成シグナル統合機構 Signal integration mechanism in epithelium formation by positional information within cell endomembranes

研究代表者 岡崎国立共同研究機構 生理学研究所 助手 大橋 正人
Department of Molecular Physiology, National Institute for
Physiological Sciences, Assistant Professor, Masato Ohashi

細胞極性形成、増殖・分化シグナル制御でのコレステロールの役割が注目されている。コレステロールが細胞内膜系の位置情報の制御を行うことで、シグナル制御作用を発揮する仕組みを解明するため、コレステロール生合成系と後期エンドソームマルチベシキュラボディーでの選別輸送機能分子の細胞内分布を解析した。

コレステロール後期合成系酵素である **NAD(P)H** ステロイド脱水素酵素様蛋白質 (**Nsdhl**) が、後期エンドソームでの受容体選別機能蛋白質 **TIP47** とともに、哺乳動物細胞内の脂肪滴 (**LD**) 周囲に局在することを見いだした。一方、ヒト胎児発生異常である **CHILD** 症候群の原因となるミスセンス変異 **G205S** を持つ **Nsdhl** は、**LD** 上に局在できなかった。

以上より、**LD** 表面が、コレステロールと **TIP47** に依存する、後期エンドソームでのシグナル伝達分子の空間的差別化の機能ドメインとして働いている興味深い仮説が導かれた。

The importance of cholesterol biosynthesis in the regulation of cell polarity formation and developmental signaling has recently received much attention. Cholesterol has pivotal roles for the sorting of developmentally important receptors at late endosomal multi-vesicular bodies. Mammalian enzymes in late cholesterol biosynthesis have been localized uniformly over the endoplasmic reticulum. However, we have found that NAD(P)H steroid dehydrogenase-like protein (*Nsdhl*), a mammalian enzyme involved in late cholesterol biosynthesis, was localized on the surface of intracellular lipid droplets (LDs), together with TIP47, the cargo selection protein for a signaling receptor from late endosomes. *Nsdhl* with a missense mutation (G205S) causing a human embryonic developmental disorder, CHILD syndrome, could no longer be localized on LDs. These observations provide an interesting possibility that the LD surface functions as an interface between cholesterol biosynthesis and late endosomal sorting of signaling receptors.

1. 研究目的

コレステロール生合成系の細胞極性形成、増殖・分化・発生シグナリングにおける重要性は最近特に注目を集めているが、その詳細は明らかでない。われわれは、コレステロール生合成系の酵素である **NAD(P)H** ステロ

イド脱水素酵素様タンパク質 (**NSDHL**) の活性が、細胞内の動的な膜輸送系である **TGN**-エンドソーム膜系でのインスリン様成長因子 2 / マンノース 6-リン酸受容体輸送を制御する事を発見した。**NSDHL** は、ヒトの先天性の形成異常である **CHILD**

(congenital hemidysplasia-ichthyosiform erythroderma-limb defects) 症候群の原因遺伝子である。しかし、CHILD 症候群で見られる顕著な皮膚の異常や、骨格、内臓の形成異常がステロール合成系の異常とどう結びつくかは明らかになっていない。ステロール合成系の異常が、上皮形成異常とどう結びつくかを、モデル細胞レベルで明らかにすることをひとつの目標として、コレステロール合成系と細胞内膜系の動態の関連、そしてその上皮形成での役割を明らかにすべく、本研究を進めた。

コレステロールは細胞内のオルガネラに不均一に分布している。コレステロールの濃度は、小胞体で低く、分泌経路に従ってその濃度を増し、細胞膜には多くのコレステロールが含まれる。小胞体でコレステロールの濃度が低いことは機能的に重要であり、蛋白質の小胞体膜透過に対してコレステロールは阻害的に働く。また、細胞膜での高レベルのコレステロール量は、細胞膜の透過性を減少させるとともに、膜を厚くする。このことは、膜貫通部位の長い膜蛋白質を、細胞膜に選択的に分配させるのに寄与していると考えられる。コレステロールは、トランスゴルジや、エンドソーム膜にも存在し、これらのオルガネラ間を結ぶメンブラントラフィックを調節する。そうしてコレステロールは、機能分子の細胞内膜系での局在を調節して、その機能を制御可能であると考えられる。興味深い事に、sonic hedgehog 受容体である Patched や、ErbB チロシンキナーゼ、インスリン様成長因子 2/マンノース 6-リン酸受容体といった発生に重要なシグナル伝達受容体の機能は、エンドソーム膜系の輸送

と密接な関係があると最近提唱されており、エンドソーム-トランスゴルジ膜系でのこれらの受容体分子の選別輸送が、細胞の刺激に対するシグナル応答制御に関して重要な役割を担っていると思われ、そこでもコレステロールが関与した調節機構の存在が予想される。

オルガネラ特有の機能を維持するためには、コレステロールの細胞内での不均一な分布は厳密に制御されなくてはならない。しかし、コレステロール分布の制御のメカニズムは、よくわかっていない。そのメカニズムを明らかにするためには、細胞内でのコレステロール生合成とコレステロール輸送のトポロジーを明らかにすることが重要である。酵素学的な解析によれば哺乳類でのコレステロール生合成の後期段階は、小胞体に均一に分布しており、コレステロールは小胞体で合成されると一般に理解され教科書にも記述されている。しかし、コレステロール生合成後期段階の酵素のクローニングが進んだのは、ごく最近のことであり、それらの細胞内での分布が厳密にどうなっているかは、まだ決定されていない。

そこで、本研究ではコレステロール生合成系の細胞内での分布と後期エンドソームの選別機能分子の細胞内分布について解析した。

2. 研究経過

2-1 Nsdhl の脂肪滴への分布

Nsdhl はコレステロールの前駆体であるラノステロールのステロール骨格から、2つのC-4メチル基を除去する反応に関わる酵素である。Nsdhl が、細胞内で実際にどう分布しているかを解析した。その結果、マウス上皮

細胞株やCHO細胞において、NSDHLが、小胞体から生じると考えられているオルガネラである脂肪滴表面に濃縮して存在することを明らかにした（図1）。コレステロール合成系酵素が特定の領域に集中していることは、新たに生合成されたコレステロールが、小胞体は無分別に拡散してしまうことを防ぐのに有利であると考えられる。

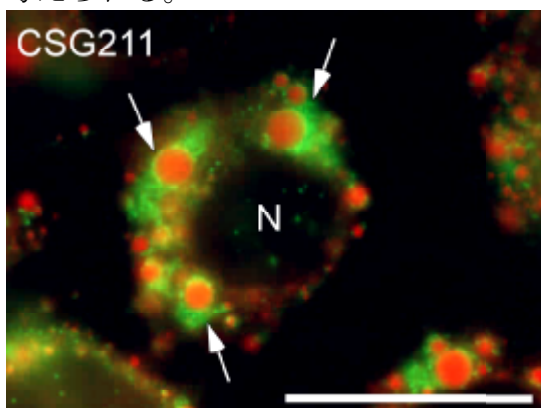


図1 マウス上皮性細胞株 CSG211の脂肪滴（赤）の周りに Nsdhl（緑）が観察される

さらに、CHILD 症候群の原因となるミスセンス変異（G205S）をもつ Nsdhl を作成したところ、この変異蛋白質は脂肪滴表面に局在できないことを明らかにした（図2）。また、Nsdhl は、C末端付近に1つの膜貫通ヘリックスをとると予想され、膜蛋白質として挙動する。この膜貫通部位を除いたNSDHLの発現解析から、予想される膜貫通ヘリックスは脂肪滴への局在のために必要あることがわかった。これらのCHILD 症候群ミスセンス変異をもつ Nsdhl および膜貫通部位を欠いた Nsdhl は Nsdhl に異常をもつ変異CHO株の機能を回復する活性を失っていた。以上の結果はNSDHLの脂肪滴への局在が、機能的な重要性を持っていることを示唆している。

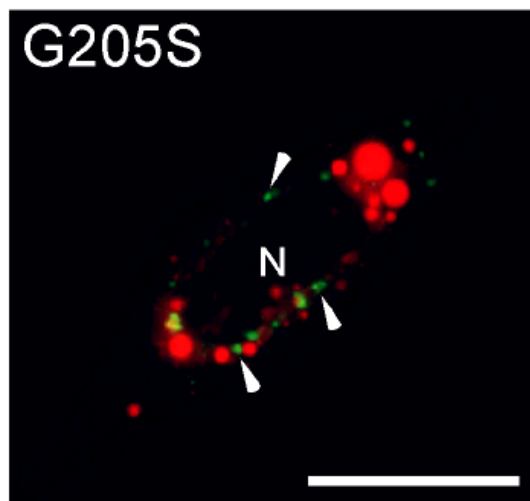


図2 CHILD 症候群の原因となるミスセンス変異（G205S）をもつ Nsdhl（緑）は、脂肪滴（赤）の周りに局在できない

2. 2 後期エンドソーム選別輸送と脂肪滴

一方、後期エンドソームからゴルジ体に向けてインスリン様成長因子2/マンノース6-リン酸受容体を選別する機能を持つと考えられている蛋白質であるTIP47が、NSDHLの存在する脂肪滴に共存していることを明らかにした（図3）。

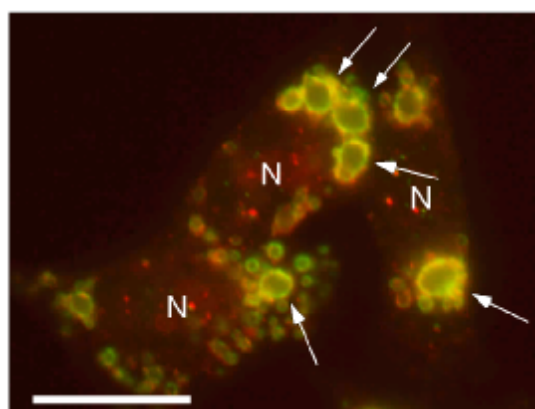


図3 TIP47（緑）が、Nsdhl（赤）とともに脂肪滴周囲に共局在する。共存しているところは黄色く観察される。

Nsdhl は、我々の樹立したエン

ドソーム後期過程のCHO変異株、LEX2細胞で異常となっている後期エンドソーム多胞体 (MVB) からトランスゴルジへのインスリン様成長因子2/マンノース6-リン酸受容体の輸送を回復することを明らかにしているので、この結果は、脂肪滴表面が、コレステロール生合成系と後期エンドソームでのシグナル分子受容体の位置情報制御のインターフェースとして働いているという興味深い可能性を示唆した (図4)。

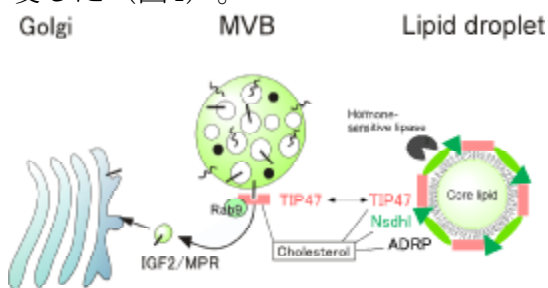


図4 脂肪滴 (Lipid droplet) 表面が、コレステロール生合成系 (Nsdh1) と後期エンドソーム多胞体 (MVB) でのシグナル分子受容体の位置情報制御分子 (TIP47) 間のインターフェースとして働き、シグナル分子 (IGF2/MPR) の位置情報を制御するという仮説。

3. 研究成果

脂肪滴表面が、コレステロール生合成系と後期エンドソームでのシグナル分子受容体の位置情報制御間のインターフェースとして働いているという予想しなかった仮説が得られた。

哺乳類コレステロール生合成の一連の後期反応が、小胞体で行われているのは教科書に記述されている事柄である。しかし、本研究では哺乳類でのコレステロール合成系酵素が小胞体に一様に分布するのではなく脂肪滴に偏在することを初めて明らかにした。

これまで脂肪滴は、単にコレステ

ロールなどの脂質の貯蔵庫として考えられることが多かったが、最近その表面が多くの生物機能と関わっていることが示唆され始めている。今回の結果もこうした考えに沿うものであり、脂肪滴がコレステロールの貯蔵だけでなく、その生合成や、細胞極性形成・分化・増殖シグナル伝達受容体の細胞内膜系での位置情報の制御、さらには胎児形成とその異常に関わっていることを示唆している。

4. 今後の課題と発展

仮説に基づき、受容体の輸送制御と脂肪滴表面の機能との関連について、細胞分化増殖・上皮形成シグナル制御について機能解析をさらに詳細に進め、その実態とメカニズムを明らかにしていく。

5. 発表論文リスト

1. エンドソーム: 分子とシグナルを選別する変幻自在のオルガネラ, *細胞工学* **2002** **21**, 866-876 大橋 正人, 吉森 保
2. Localization of mammalian NAD(P)H steroid dehydrogenase-like protein on lipid droplets. Ohashi, M., Mizushima, N., Kabeya, Y., Yoshimori, T. (投稿中)