

- 912.
- 10) Park, J.W., Parisky, K., Celotto, A.M., Reenan, R.A., & Graveley, B.R. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15974–15979.
  - 11) Ule, J., Stefani, G., Mele, A., Ruggiu, M., Wang, X., Taneri, B., Gaasterland, T., Blencowe, B.J., & Darnell, R.B. (2006) *Nature*, **444**, 580–586.
  - 12) Newman, E.A., Muh, S.J., Hovhannisyan, R.H., Warzecha, C. C., Jones, R.B., McKeehan, W.L., & Carstens, R.P. (2006) *RNA*, **12**, 1129–1141.
  - 13) Orengo, J.P., Bundman, D., & Cooper, T.A. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, e148.
  - 14) Stoilov, P., Lin, C.H., Damoiseaux, R., Nikolic, J., & Black, D. L. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11218–11223.
  - 15) Bonano, V.I., Oltean, S., Brazas, R.M., & Garcia-Blanco, M.A. (2006) *Rna*, **12**, 2073–2079.
  - 16) Goodman, S.J., Branda, C.S., Robinson, M.K., Burdine, R.D., & Stern, M.J. (2003) *Development*, **130**, 3757–3766.
  - 17) Kuroyanagi, H., Kobayashi, T., Mitani, S., & Hagiwara, M. (2006) *Nat. Methods*, **3**, 909–915.
  - 18) Kuroyanagi, H., Ohno, G., Mitani, S., & Hagiwara, M. (2007) *Mol. Cell Biol.*, **27**, 8612–8621.
  - 19) Baraniak, A.P., Chen, J.R., & Garcia-Blanco, M.A. (2006) *Mol. Cell Biol.*, **26**, 1209–1222.
  - 20) Ohno, G., Hagiwara, M., & Kuroyanagi, H. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 360–374.
  - 21) Caceres, J.F. & Kornblihtt, A.R. (2002) *Trends Genet.*, **18**, 186–193.

黒柳 秀人

(東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所,  
科学技術振興機構 さきがけ)

New approaches to decipher pre-mRNA splicing codes  
Hidehito Kuroyanagi (Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, 1–5–45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113–8510, Japan)

## LDL 由来コレステロールの細胞内輸送機構

### 1. はじめに

コレステロールは動物細胞にとって細胞膜を構成する重要な脂質分子であり、成長や生存に必須の成分である。コレステロールの代謝や生合成に関わる遺伝子の変異は、ニーマン・ピック病C型 (NPC) など先天性代謝異常の症状を示す。またコレステロール代謝は、高脂血症や動脈硬化、脳血管障害のみならず、近年ではアルツハイマー病や糖尿病にも深く関与する可能性が示唆されている。動物

細胞において、コレステロールは主に二つの供給源から獲得される。すなわち細胞内における生合成とリポタンパク質を介した細胞外からの取り込みである。なかでも低密度リポタンパク質 (LDL) によるコレステロールの輸送は、末梢組織へのコレステロールの供給源として重要な生理的役割を果たしている。これまで LDL 受容体による LDL 自体の細胞内への取り込みについては多くの研究がなされているが、LDL 中に含まれるコレステロールの細胞内輸送については未知な点が多い。筆者らは最近、soluble *N*-ethylmaleimide (NEM)-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) 複合体を介した小胞輸送が、LDL 由来コレステロールの細胞内輸送に関与することを報告した<sup>1)</sup>。本稿では、この報告を中心に LDL 由来コレステロールの細胞内輸送について概説する。

### 2. 細胞内の LDL 由来コレステロール代謝機構

LDL は細胞外から細胞膜上にある LDL 受容体を介してエンドサイトーシスにより取り込まれる<sup>2)</sup>。LDL に含まれるコレステロールは遊離型 (約 8%) に比べてエステル型 (約 37%) が多い。取り込まれたコレステロールエステルは、エンドソームにおいて酸性リパーゼにより加水分解を受け、遊離型のコレステロールとなる。その後、コレステロールは NPC 病の原因遺伝子産物である NPC1 や NPC2 を含むエンドソームに運ばれたのち、細胞膜や小胞体、ミトコンドリア等の各オルガネラに輸送されることが知られている (図 1)<sup>3,4)</sup>。NPC1 や NPC2 が欠損した細胞では、遊離型のコレステロールは後期エンドソーム/リソソームに蓄積する。コレステロールは細胞膜を構成する主要な脂質成分であるのに対し、小胞体には細胞中の総コレステロールのうち 1% 程度しか存在しない。しかし sterol regulatory element-binding protein (SREBP) や SREBP cleavage-activating protein (SCAP)、ヒドロキシメチルグルタリル CoA (HMG-CoA) 還元酵素など、細胞内のコレステロールホメオスタシスを担う重要な膜タンパク質が数多く存在する。また細胞にとって余分となったコレステロールをエステル化して、コレステロールエステルという貯蔵しやすい形に変換する酵素である acyl-CoA: cholesterol acyltransferase 1 (ACAT1) も小胞体に存在する<sup>5)</sup>。変換されたコレステロールエステルは脂肪滴に貯蔵される。このようにコレステロールの代謝は細胞内の様々な場所で行われるが、各オルガネラ間の LDL 由来コレステロールの細胞内輸送については、NPC1 が重要な役割を果たすこと以外は詳細な解析が遅れていた<sup>3,4)</sup>。

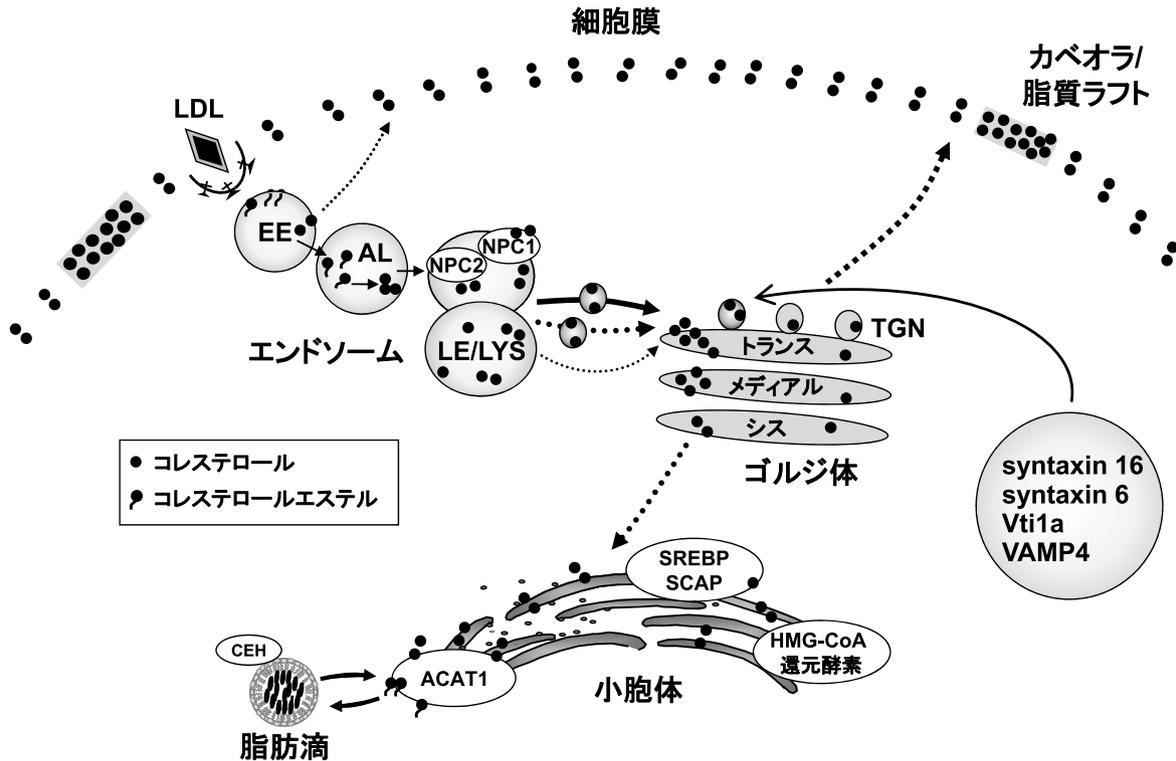


図1 LDL由来コレステロールの細胞内輸送のモデル図

LDL中のコレステロールエステルは加水分解を受け、NPC1を含むエンドソームに運ばれる。さらにエンドソームから、VAMP4/syntaxin 6/syntaxin 16/Vti1a複合体を介した小胞輸送により、TGNへと運ばれる。その後、TGNから小胞体や細胞膜へと移動すると思われる。またエンドソーム、ゴルジ体間の輸送にはさらに別の輸送形態の存在も考えられる。EE, 初期エンドソーム；AL, 酸性リパーゼ含有エンドソーム；LE/LYS, 後期エンドソーム/リソソーム；TGN, トランスゴルジネットワーク；CEH, コレステロールエステル加水分解酵素

### 3. LDL由来コレステロール輸送の解析

LDL由来コレステロールの細胞内輸送解析が困難な理由として、タンパク質と異なりGFPのような蛍光タグを用いた細胞内挙動の解析が難しいことが挙げられる。コレステロールの細胞内局在を検出する方法として、遊離型コレステロールと特異的に結合する蛍光試薬であるフィリピン (filipin) を用いた方法が良く取られるが、感度があまり高くはない。そのためLDL添加後長時間培養が必要となり、LDL由来コレステロールの細胞内輸送の解析で用いるには限界がある<sup>9)</sup>。そこで筆者らは放射性同位体である<sup>3</sup>Hで標識されたcholesteryl linoleate (CL)を取り込ませたLDL (<sup>3</sup>H-CL-LDL)を解析に利用した<sup>1)</sup>。CLはLDLに含まれる主要なコレステロールエステルである。細胞を<sup>3</sup>H-CL-LDLを含む培地で一定時間培養し(パルス)、培地交換後、さらに培養を続ける(チェイス)。細胞に入った<sup>3</sup>H-CLは加水分解を受け<sup>3</sup>H-コレステロールとなる。さ

らに<sup>3</sup>H-コレステロールは小胞体に輸送されるとACAT1により再エステル化を受け、主に<sup>3</sup>H-cholesteryl oleate (<sup>3</sup>H-CO)へと変換される。時間毎の各標識ステロールの割合を計測することで、LDL由来コレステロールの小胞体への輸送が解析できる。また細胞分画法と組み合わせることで、各オルガネラへの経時的な輸送も解析可能となった。これらの方法を用いた解析から、エンドソームで加水分解を受けたLDL由来コレステロール(<sup>3</sup>H-コレステロール)が、初期輸送段階ではトランスゴルジネットワーク(TGN)に観察されることを見出した<sup>1)</sup>。チェイス時間を長くすると、<sup>3</sup>H-コレステロールは小胞体や細胞膜にも観察され、時間の経過とともに再エステル化された<sup>3</sup>H-COが増加した。一方、NPC1が欠損した細胞では、<sup>3</sup>H-コレステロールのエンドソームへの蓄積が観察された。これらの結果から、LDL由来コレステロールはNPC1依存的にTGNへ輸送されると考えられた。

そこで細胞内コレステロール輸送のさらなる解析のため

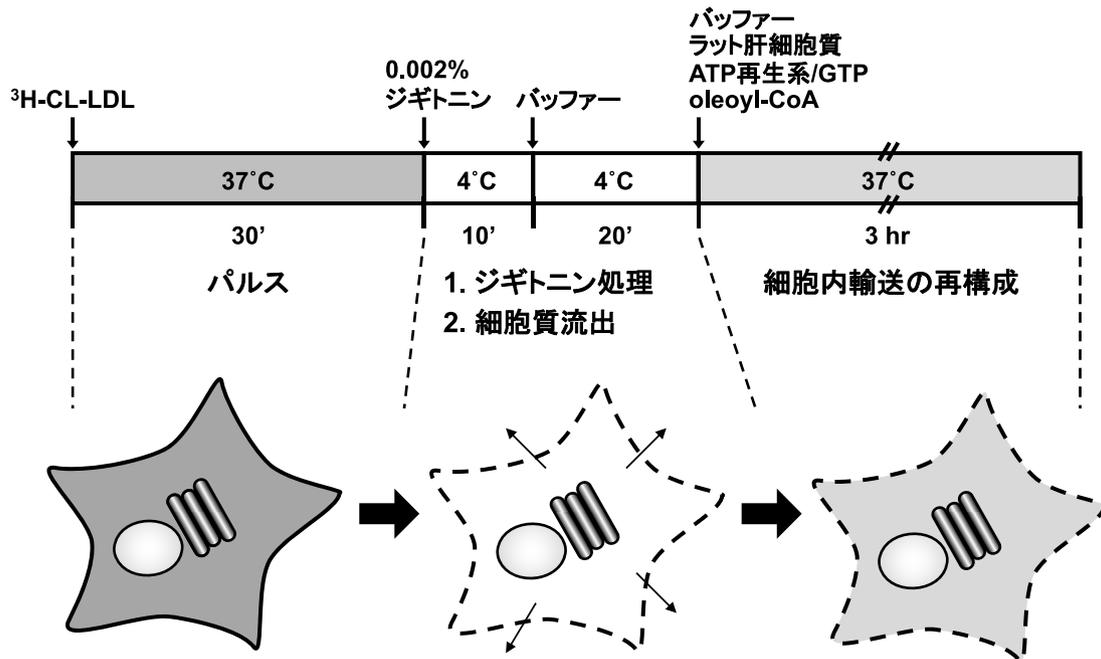


図2 セミインタクト細胞を用いた *in vitro* コレステロール輸送再構成系のモデル図

細胞を $^3\text{H-CL-LDL}$ でパルスした後、ジギトニンにより細胞膜に小孔を開け、細胞を透過性のあるセミインタクトの状態にする。細胞質を取り除いたこの細胞に、新たに外部からATP再生系やラット肝細胞質画分を添加し、 $37^\circ\text{C}$ で反応させると小胞輸送が再開される。

に、セミインタクト細胞を用いた *in vitro* のコレステロール輸送の再構成を試みた。これまで脂質の細胞内輸送を *in vitro* 再構成系を用いて解析した例として、小胞体からゴルジ体へのセラミド輸送の再構成系が知られている<sup>7)</sup>。このセラミド輸送に関わる分子として同定されたのが ceramide transport protein (CERT) であるが、CERT によるセラミドの輸送は、非小胞性輸送であることが明らかになっている。我々はエンドソーム、ゴルジ体間のタンパク質逆行輸送の再構成系<sup>8)</sup>を参考に、様々な方法を検討したところ、0.002% ジギトニンを用いてセミインタクト細胞を調製することで、TGN や小胞体への LDL 由来コレステロール逆行輸送の再構築系の樹立に成功した。この系では、図2に示すように $^3\text{H-CL-LDL}$ でパルス後の細胞に対して、界面活性剤の一種であるジギトニン処理により細胞膜に小孔を開け、細胞を透過性のあるセミインタクトの状態にする。細胞質を取り除いたこの細胞に、新たに外部からATP再生系やラット肝細胞質画分を添加し、 $37^\circ\text{C}$ で反応させると小胞輸送が再開される。小胞体への輸送は $^3\text{H-}$ コレステロールから $^3\text{H-CO}$ への再エステル化を指標とした。また $^3\text{H-}$ コレステロールのTGNへの輸送は、TGNのマーカである syntaxin 6 に対する抗体を用いた免疫共沈

降の応用により計測した。幸運なことに、この系では ACAT1 や NPC1 タンパク質依存的なコレステロールのTGNや小胞体への輸送、再エステル化といったインタクト細胞で観察される現象を良く再現した。この再構成系において、コレステロールの輸送はATP、細胞質依存的であり、ATPaseの阻害剤で小胞輸送を抑制することが知られている NEM で前処理した細胞質を用いた場合、再エステル化が抑えられていた。これらのことから LDL 由来コレステロールの細胞内輸送には、小胞輸送が含まれている可能性が考えられた。

#### 4. SNARE 複合体を介した小胞輸送

小胞輸送において、輸送小胞が正しい標的膜を選択して融合する際に働くタンパク質として、SNARE タンパク質が知られている<sup>9)</sup>。小胞が標的膜に近づくと、小胞側に存在する v-SNARE (vesicle-membrane SNARE) と標的膜側にある相補的な t-SNARE (target-membrane SNARE) が結合し、複合体を形成する。この SNARE 複合体の結合特異性が小胞の融合の特異性を決定しており、オルガネラ間の選択的な輸送に重要な役割を果たしている。再構成系の結果より、LDL 由来コレステロールの細胞内輸送に小胞輸

送が関与することが考えられたため、エンドソームから TGN へのタンパク質の逆行輸送に関わる SNARE 複合体である VAMP4/syntaxin 6/syntaxin 16/Vti1a<sup>8)</sup>に着目し、さらなる解析を進めた。VAMP4 (v-SNARE) や syntaxin 6, syntaxin 16 (t-SNARE) を siRNA によりそれぞれノックダウンさせると、インタクト細胞, *in vitro* 再構成系ともに LDL 由来コレステロールの再エステル化の減少が観察された。また TGN へのコレステロールの輸送も VAMP4 をノックダウンした細胞では減少していた。一方、興味深いことに細胞膜への輸送は抑制されていなかった。これらの結果から、NPC1 を含むエンドソームから小胞体までの LDL 由来コレステロールの細胞内輸送は TGN を経由し、その輸送の一部は SNARE 複合体である VAMP4/syntaxin 6/syntaxin 16/Vti1a を介して行われることが明らかとなった。

### 5. 小胞輸送と非小胞性輸送

我々の結果では、ノックダウンによる VAMP4/syntaxin 6/syntaxin 16/Vti1a 複合体経路の阻害により最大約 70% の再エステル化の減少が観察されたが、完全には再エステル化は抑制されなかった。これにはいくつかの可能性が考えられる。一つ目は別の小胞輸送経路の関与が挙げられる。NPC1 欠損細胞に低分子量 GTPase である Rab9 や Rab11 などを強制発現させると、エンドソームでのコレステロールの蓄積は一部回復することが報告されており<sup>4,10)</sup>、エンドソームからのコレステロールの輸送には、複数の経路が存在する可能性が考えられている。実際エンドソーム, TGN 間のタンパク質の逆行輸送には、syntaxin 6 複合体に加えて syntaxin 5 複合体<sup>11)</sup>や syntaxin 10 複合体<sup>12)</sup>の存在が報告されており、これらの複合体が脂質であるコレステロールの輸送にも関与しているかもしれない。二つ目はセラミド輸送における CERT のような、非小胞性輸送が存在する可能性である。その候補としてはステロールと高い親和性をもつ oxysterol-binding protein-related proteins (ORPs) や steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer (START) proteins 等が挙げられる。実際、酵母において ORPs のホモログが細胞膜から小胞体へのステロールの非小胞性輸送に関与していることが報告されており<sup>13)</sup>、哺乳類細胞においてもステロールの細胞内輸送に関与する可能性が指摘されている。また START proteins は START ドメインと呼ばれる脂質結合領域をもつタンパク質で、上述の CERT も START ドメインをもつことが知られている。ミトコンドリアにおいて、コレステロー

ルの外膜から内膜への転移に働くことが明らかになっている StAR も START proteins の一種である。そのほか、ゴルジ体を介さない輸送経路が存在する可能性も十分考えられ、今後の解析が期待される。

### 6. おわりに

以上、筆者らが現在考えている LDL 由来コレステロールの細胞内輸送モデルが図 1 である<sup>1)</sup>。LDL 中のコレステロールエステルは加水分解を受け、NPC1 を含むエンドソームに運ばれる。さらにエンドソームにおいてコレステロールを含む輸送小胞が形成され、VAMP4/syntaxin 6/syntaxin 16/Vti1a 複合体を介した小胞輸送により、TGN へと運ばれる。そして、LDL 由来コレステロールは TGN から小胞体や細胞膜へと移動すると考えられる。また別の SNARE 複合体を介した小胞輸送や、コレステロール結合タンパク質による非小胞性輸送の存在も考えられる。コレステロールの代謝は、多くの病態とも深く関わっていることから、これらのメカニズムの解析は創薬という観点からも大きな意義をもつと考える。筆者らが今回樹立した *in vitro* でのコレステロール輸送再構成系が、今後の解析に役立てば幸いである。

- 1) Urano, Y., Watanabe, H., Murphy, S.R., Shibuya, Y., Geng, Y., Peden, A.A., Chang, C.C., & Chang, T.Y. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **105**, 16513–16518.
- 2) Brown, M.S. & Goldstein, J.L. (1986) *Science*, **232**, 34–47.
- 3) Chang, T.Y., Chang, C.C., Ohgami, N., & Yamauchi, Y. (2006) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **22**, 129–157.
- 4) Ikonen, E. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 125–138.
- 5) Chang, T.Y., Li, B.L., Chang, C.C., & Urano, Y. (2009) *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297**, E1–9.
- 6) Coxey, R.A., Pentchev, R.G., Campbell, G., & Blanchette-Mackie, E.J. (1993) *J. Lipid Res.*, **34**, 1165–1176.
- 7) Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., & Nishijima, M. (2003) *Nature*, **426**, 803–809.
- 8) Mallard, F., Tang, B.L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B., & Johannes, L. (2002) *J. Cell Biol.*, **156**, 653–664.
- 9) Jahn, R. & Scheller, R.H. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 631–643.
- 10) Choudhury, A., Dominguez, M., Puri, V., Sharma, D.K., Narita, K., Wheatley, C.L., Marks, D.L., & Pagano, R.E. (2002) *J. Clin. Invest.*, **109**, 1541–1550.
- 11) Tai, G., Lu, L., Wang, T.L., Tang, B.L., Goud, B., Johannes, L., & Hong, W. (2004) *Mol. Biol. Cell*, **15**, 4011–4022.
- 12) Ganley, I.G., Espinosa, E., & Pfeffer, S.R. (2008) *J. Cell Biol.*, **180**, 159–172.
- 13) Raychaudhuri, S., Im, Y.J., Hurley, J.H., & Prinz, W.A. (2006) *J. Cell Biol.*, **173**, 107–119.

浦野 泰臣

(同志社大学生命医科学部医生命システム学科)

Intracellular transport of low-density lipoprotein-derived cholesterol

Yasuomi Urano (Department of Medical Life Systems, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, 1-3 Tatara Miyakodani, Kyotanabe, Kyoto 610-0394, Japan)

エンベロープウイルスの出芽と細胞質分裂

1. はじめに

細胞膜に存在する増殖因子受容体などの膜タンパク質は、リガンド結合によって活性化された後、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。これらの膜タン

パク質はいったんエンドソームに蓄積され、そこで選別を受け最終的にリソソームにて分解される。この選別過程で膜タンパク質はエンドソームの膜とともに内腔に取り込まれ、MVB (multivesicular bodies) と呼ばれるオルガネラが形成される (図1)。2001年、Emrらのグループによる酵母を用いた解析によって、これまで class E VPS (vacuolar protein sorting) と呼ばれていた18種類の遺伝子群がMVB形成に直接関与していることが明らかとなった<sup>1,2)</sup>。生化学的解析により、これら因子群は後にESCRT (endosomal sorting complex required for transport) と呼ばれる複合体群を形成することが明らかになった<sup>1,2)</sup>。ESCRT経路の発見とほぼ同時期に、レトロウイルスがこの経路を粒子形成に利用していることが報告された<sup>3)</sup>。レトロウイルスは感染後期過程で娘ウイルスを産生する際、Gagウイルスタンパク質が細胞膜内側でアッセムブリーし膜を通過することによって自身のエンベロープを獲得する。このウイルス粒子出芽過程でのESCRT因子の利用は、膜が細胞質の内側から外側へと湾曲し膜狭窄部位の内側にある因子によって切り離されるという膜ダイナミクスにおいて、MVB小胞形

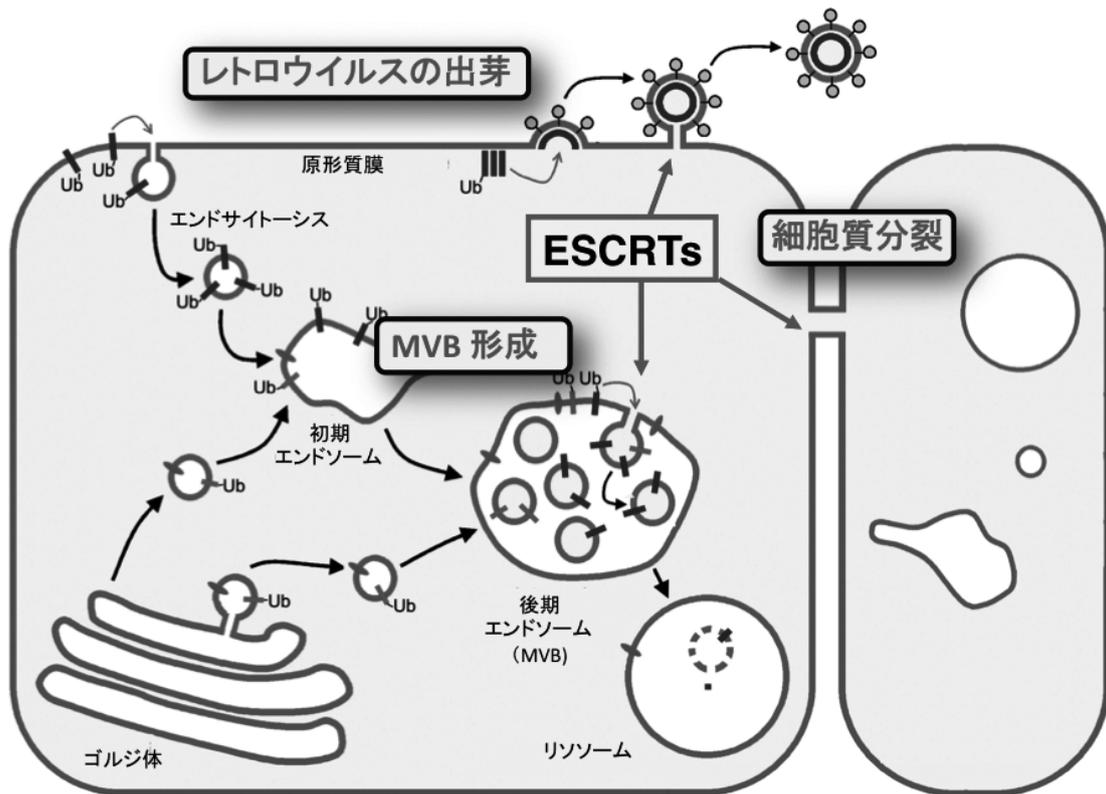


図1 ESCRT因子が関与する三つの生体膜切り離しの現象