

論文内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 14 年度博士課程 入学

氏 名 高橋 美和

指導教員 太田 明德

論文題目

細胞培養密度に依存するコレステロール細胞内輸送制御機構の研究

哺乳類の細胞においてコレステロールの分布はオルガネラ間で大きく異なる。細胞内のコレステロールプールである細胞形質膜は細胞全体のコレステロールの 60-80 %を含んでいる。次いで、エンドソームやトランスゴルジネットワークにも多くのコレステロールが分布している。一方、小胞体はコレステロール合成の場であり細胞のコレステロールセンサーの中心的役割を果たすが、そのコレステロール含量は全体の 0.5-1 %と非常に少ない。哺乳類の細胞において、コレステロールホメオスタシスは生合成、エステル化、低密度リポタンパク質 (LDL) を介した細胞内へのコレステロールの流入、高密度リポタンパク質 (HDL) を介した細胞外への流出の主に 4 つの要因によって制御されている。

コレステロールは胚形成に関与する Hedgehog シグナルに重要な機能を果たしている。また、コレステロール代謝異常は動脈硬化の直接的な原因であることや、幾つかの遺伝病の原因遺伝子がコレステロール代謝や動態を制御する因子であることも報告されている。コレステロールは細胞内のシグナル伝達や膜

輸送においても重要な機能を果たしており、細胞内のコレステロールバランスが崩れると様々な細胞機能が損なわれることも知られている。

このように、コレステロールは生体、細胞において重要な機能を担っているが、細胞内のコレステロール輸送経路や輸送制御のメカニズムは不明な点が多く残されている。そこで、本研究ではコレステロールの細胞内輸送機構の解明を目的とした。

1. 分裂細胞を用いたコレステロール細胞内輸送機構の解析

コレステロールは細胞形質膜から小胞体へと運ばれてエステル化される。コレステロールの細胞形質膜から小胞体への輸送機構を解明するために、これまでに阻害剤や輸送が欠損している変異体を用いた研究が行われてきた。それらの研究報告があるのにも関わらず、細胞形質膜から小胞体への輸送機構は未だ明らかとされていない。小胞輸送で輸送されるのか、輸送タンパク質が媒体するのか、細胞形質膜と小胞体膜が直接ドッキングするのかも分からないのが現状である。分裂期の細胞では小胞輸送が停止することが知られている。この分裂期の細胞の特性を利用して、様々な脂質の輸送機構が解明されている。そこで、私は分裂前期に同調した Chinese hamster ovary (CHO) 細胞を用いて、コレステロールの細胞形質膜から小胞体への輸送が小胞輸送に依存するかを検討した。

分裂前期に同調した細胞と分裂間期の細胞にコレステロールエステルの前駆体である $[^{14}\text{C}]$ オレイン酸または $[^{14}\text{C}]$ コレステロールを処理して $[^{14}\text{C}]$ コレステロールエステルの合成量を測定した。その結果、どちらの前駆体を使用した場合においても分裂細胞のコレステロールエステルの合成は間期の細胞と比べて10分の1以下と顕著に減少していた。また、分裂期の細胞と間期の細胞でコレステロール及び、コレステロールエステルを定量したところ、分裂期の細胞は間期の細胞と比べてコレステロール、コレステロールエステルともにやや少

なかった。しかし、その減少の程度はコレステロールエステル合成と比べると僅かなものであった。このことから分裂期の細胞でコレステロールエステルの合成が少ないのはコレステロールエステラーゼによってコレステロールエステルの加水分解が促進しているためではなく、コレステロールエステル合成の減少に起因すると考えられる。

LDL の取り込みによって細胞内のコレステロールレベルが上がると、コレステロールのエステル化が促進される。分裂期の細胞では小胞輸送が停止しているために、LDL を細胞内に取り込むことが出来ない。LDL を取り込めないことが分裂期の細胞でコレステロール合成が少ない原因であることも考えられる。そこで、LDL を含まない培地で間期の細胞に前処理を行った後に、コレステロールのエステル化を測定したところ、前処理を施すことによりコレステロールエステルの合成が半分ほどに減少した。しかし、分裂期の細胞ではコレステロールエステル合成が 1/10 以下にまで減少していたことから、分裂期の細胞でコレステロールエステル合成が減少しているのは、LDL の取り込みが阻害されていることの他にも原因があると考えられる。

G1 期の細胞では小胞輸送が再開することが知られている。G1 期に同調した細胞で Lucifer yellow の取り込みを検討したところ、Lucifer yellow は細胞内に取り込まれており、小胞輸送が正常に機能していることが確認できた。しかし、コレステロールのエステル化を測定したところ、コレステロールエステルの合成は G1 期の細胞でも回復していなかった。

以上の結果より、コレステロールのエステル化は細胞周期により変化するが、この変化は小胞輸送の有無ということでは説明出来ないことが明らかとなった。

2 . 細胞培養密度に依存したコレステロール細胞内輸送制御の解析

G1 期の細胞と間期の細胞の大きな違いは細胞同士の接触の有無である。細胞培養密度に依存して細胞増殖のシグナル伝達や、細胞の形、アドヘレンスジャ

ンクシヨンの形成など多くのことが変化することは広く知られているが、それらに加えてコレステロール代謝が大きく変化することも報告されている。また、1. の実験を行っている中で、コレステロールエステル合成が細胞培養密度の違いにより変化することを見出した。そこで、私は細胞培養密度に依存したコレステロールの細胞内動態の制御を解析することにした。

培養密度が低いとき (30-40 % confluency) と培養密度が高いとき (100 % confluency) のコレステロール、コレステロールエステルを定量したところ、コレステロール、コレステロールエステル含量ともに培養密度が高いときの方が多かった。続いて、コレステロールエステル合成を比較したところ、細胞培養密度が増えるにつれてコレステロールエステル合成が増加することが明らかとなった。更に、蛍光を有してステロールを認識する抗生物質である Filipin を用いて、細胞のコレステロールを染色したところ、培養密度が低い細胞ではゴルジ体と核近傍の部位に染色が見られた。一方、培養密度が高い細胞ではそれらに加えて細胞形質膜も強く染色されていた。Filipin の染色結果より、培養密度が高い細胞では培養密度が低い細胞に比べて細胞形質膜のコレステロール量が多いことが考えられたので、Streptolysin O (SLO) の感受性を調べることにより細胞形質膜のコレステロール量を比較した。SLO はコレステロール特異的に膜に結合して膜に穴を開ける毒素で、細胞形質膜のコレステロール量が多い程、細胞が死にやすくなり感受性が高くなる。培養密度が高い細胞では培養密度が低い細胞に比べて6倍程度 SLO の感受性が高く、細胞形質膜のコレステロール量が多いことが明らかとなった。また、LDL の取り込みやコレステロール合成の細胞培養密度の影響を調べたところ、どちらも細胞培養密度に依存した変化は見られなかった。

続いて、蛍光脂質アナログを用いて、脂質の細胞内取り込みが細胞培養密度に依存して変化するかを検討した。その結果、蛍光コレステロールアナログや蛍光スフィンゴミエリンアナログの細胞内への取り込みは細胞培養密度に依

存して変化するが、蛍光ラクトシルセラミドの取り込みは変化しないことが明らかとなった。培養密度が低い細胞では蛍光コレステロールや蛍光スフィンゴミエリンはリサイクリングエンドソームに分布するのに対して、培養密度が高い細胞では初期エンドソームに分布していた。更に、コレステロールホメオスタシスや細胞内輸送を制御するとされている低分子量 G タンパク質 Rab11 の局在も細胞培養密度に依存して変化することが明らかとなった。培養密度が低い細胞では Rab11 はゴルジ体に局在するのに対して、培養密度が高い細胞ではリサイクリングエンドソーム様の部位に局在した。一方、Rab 4 ではこのような細胞培養密度に依存した局在変化は観察されなかった。また、蛍光コレステロールあるいは蛍光スフィンゴミエリンの細胞内取り込みの変化や Rab11 の局在の変化は、methyl-beta-cyclodextrin (m β CD) 処理による細胞形質膜のコレステロールの減少やチロシンホスファターゼ阻害剤処理によっても引き起こされることを示した。更に、脂質がリサイクリングエンドソームから輸送されるのには Rab11 の GTP が GDP へと加水分解されることが必要であることも明らかとなった。

以上の結果から、Rab11 は自身の局在を変化させることによって細胞培養密度に依存する膜の輸送を制御しており、この制御はコレステロールやチロシン酸化によって調節されていることが示唆された。