

令和 3 年 11 月 15 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019 年度

受付番号 201960695

氏 名 内藤朋樹

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：シンガポール（国名：シンガポール共和国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
膜接着部位における細胞内コレステロール輸送機構の解明
3. 派遣期間：令和 元年 5 月 1 日 ~ 令和 3 年 10 月 31 日
(915 日間)
4. 受入機関名及び部局名
受入機関名： 南洋理工大学 (Nanyang Technological University)
部局名： 医学部 (Lee Kong Chian School of Medicine)
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**
【記載事項】
 - ・ 研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等
 - ・ 新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置のうち、国内採用開始・採用期間延長・翌年度渡航のいずれかの適用を受けた場合は、当該措置の適用による影響等(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

膜接着部位とは小胞体とその他のオルガネラおよび細胞膜との間で形成される、膜同士が膜融合せずに接着している極小部位を指し、特に脂質輸送の場として機能している。コレステロールは生体膜の形状維持、細胞内シグナル伝達やステロイドホルモンの産生の必須基質となるなど多岐の作用を持つ重要な脂質である。また生体膜中のコレステロールは外部の化合物やタンパク質によってアクセス可能かどうかで分類される。すなわち他のスフィンゴ脂質（主にスフィンゴミエリン）やリン脂質と複合体を形成することで外部から直接相互作用出来ない“アクセス不可”なもの、それらの複合体から解放された“アクセス可能”なものである。細胞内コレステロール量や分布を適切に保つため、“アクセス可能”なコレステロールは細胞内の様々な膜接着部位において輸送されていることが示唆されているが、その輸送メカニズムは不明な点が多い。本研究においては、新規タンパク質である GRAMD1 (GRAMD1a/1b/1c) に注目し、膜接着部位におけるコレステロール輸送の分子機構解明を目指している。近年細胞内ステロール輸送タンパク質として同定された酵母の LAM/Ltc タンパク質の動物細胞におけるホモログが GRAMD1 である。GRAMD1 タンパク質は脂質結合ドメインである GRAM ドメインと脂質輸送ドメインである StART-like ドメインをもつ一回膜貫通型タンパク質であるが、その基質や機能、生理的な役割に関しては未知であった。

1) 膜接着部位における GRAMD1 の局在とその制御機構の解明

これまでに、スピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いた解析により、動物細胞において GRAMD タンパク質が小胞体に局在すること、特に GRAMD1b は小胞体—リソソーム膜接着部位に局在することを突き止めていた。このことから当初は小胞体—リソソーム膜接着部位における GRAMD タンパク質の局在制御機構および機能解析を行うべく実験を進めていた。研究を進めている中で細胞にコレステロール添加を行うと GRAMD1 の局在が変化し、小胞体—細胞膜接着部位に集積することを新たに見出した。またスフィンゴミエリンを加水分解することで“アクセス可能”状態のコレステロールを増加させても同様に GRAMD1 が小胞体—細胞膜接着部位に集積したことから、GRAMD1 は特に細胞膜における“アクセス可能”状態のコレステロールを認識し、局在を変化させることが示された。さらに GRAM ドメインを欠いた変異体はコレステロール添加およびスフィンゴマイエリンの加水分解を行っても小胞体—細胞膜接着部位への集積がみられなかったことから、GRAMD タンパク質がコレステロールを認識し、細胞膜と相互作用するためには GRAM ドメインが重要であることが明らかになった。

膜接着部位で機能する脂質輸送タンパク質の多くはホモ/ヘテロ多量体を形成してはたらくことが報告されている。そこで GRAMD1 質同士が相互作用するかどうかを共免疫沈降法によって調べた。その結果、GRAMD1 (GRAMD1a/1b/1c) においてホモ、またはヘテロ間での強固な相互作用が認められた。また立体構造予測によって GRAMD1 は小胞体内腔側に両親媒性 α ヘリックスを持つ可能性が高いことが分かった。相互作用に必要な部位を調べるため、様々な変異体を用いて共免疫沈降実験を行ったところ、この内腔側両親媒性ヘリックスと膜貫通領域が相互作用に重要であることが分かった。次にホモ/ヘテロ多量体形成が GRAMD1 の小胞体—細胞膜接着部位への局在に寄与するかどうかを調べるため、細胞に多量体形成のできない変異体を発現させスフィンゴミエリンの加水分解を行い、GRAMD1 の細胞膜局在を全反射顕微鏡を用いて観察した。スフィンゴミエリンの加水分解は“アクセス可能”状態のコレステロールを細胞膜で増加させ、野生型の GRAMD1 を小胞体—細胞膜接着部位にリクルートするが、多量体形成能を欠失した変異体は細胞膜への局在が減少した。

次に GRAM ドメインが直接コレステロールと結合できるかどうかを調べるため *in vitro* リポソーム結合実験を行った（研究室内共同研究）。精製した GRAM ドメインは負電荷脂質存在時、リポソーム膜にコレステロール量に依存して結合した。よって GRAM ドメインが直接細胞膜のコレステロールと結合することで、GRAMD1 が小胞体—細胞膜接着部位することが強く示唆された。

そこで新規コレステロール結合ドメインとして見出した GRAM ドメインが、どのように脂質膜と相互作用するのかについて研究を展開した。GRAMD1b 遺伝子変異と知的障害との関連が報告されているが、この変異は GRAM ドメイン中のアミノ酸残基変異を引き起こしている (R189W)。研究室内の共同研究によって *in vitro* 系でこの遺伝子変異が GRAM ドメインのコレステロールへの結合能を著しく減少させることが分かったため、実際に細胞内でこの GRAMD1b 変異体を発現させ観察したところ、コレステロール増加による小胞体—細胞膜接着部位への GRAMD1b の局在が有意に減

少していた。さらにコレステロール結合能に関与するアミノ酸残基の探索を行ったところ R189 付近に存在する G187 をロイシンなどの疎水性アミノ酸残基に変異させるとコレステロールへの結合性が増すことを見出した。これらの結果より、GRAM ドメインが膜中コレステロールを認識する分子基盤の一端を突き止めた。

以上の結果により以下の点が明らかになった。

- GRAMD1 は細胞膜のコレステロールの増加または“アクセス可能”状態の増大によって小胞体—細胞膜接着部位に局在する。
- GRAMD1 は内腔側両親媒性ヘリックスと膜貫通領域の相互作用を介してホモ/ヘテロ多量体を形成することで効率的な小胞体—細胞膜接着部位への局在を助ける。
- 小胞体—細胞膜接着部位への局在は脂質結合ドメインである GRAM ドメインがコレステロールと結合することでなされる。
- 知的障害に関連する GRAM ドメイン中のアミノ酸変異 (R189W) はコレステロール結合能を減少させる。
- G187 への変異はコレステロール結合能と密接に関わる。

2) GRAMD1 の生体内での機能の解明

まず GRAMD1 の細胞内での機能を調べるため、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いて 3 種すべての GRAMD1 を欠損させた HeLa 細胞種 (GRAMD1-TKO 細胞) を樹立した。またコレステロールのバイオマーカーとして GRAMD1b の GRAM ドメインを用いてコレステロールの細胞内局在を観察することに成功した。まずスフィンゴミエリンを加水分解し細胞膜の“アクセス可能”なコレステロール量を増加させ、一定時間経過後にコントロール細胞と GRAMD-TKO 細胞を観察した。すると GRAMD-TKO 細胞ではコントロールに比べて GRAM ドメインが細胞膜に集積していた。これは“アクセス可能”なコレステロールの細胞膜からの輸送が GRAMD-TKO によって阻害されているためと考えられ、GRAMD1 が細胞膜コレステロールの恒常性維持に機能していることを示唆している。

StART-like ドメインは生体膜間の脂質輸送、特にコレステロール輸送を行う部位であることが示唆されてきた。そこで GRAMD1b の StART-like ドメインがコレステロール輸送活性があるかどうかを *in vitro* の系を用いて調べた (研究室内共同研究)。コレステロールの蛍光アナログである DHE をドナーリポソーム膜に組み込み、DHE のアクセプターリポソーム膜への移動を、蛍光ラベルした脂質との FRET により測定した。すると GRAMD1b の StART-like ドメイン依存的な DHE 輸送が観察された。このことから GRAMD1b の StART-like ドメインは生体膜間のコレステロール輸送活性を持つことが示された。

次に GRAMD1 が実際にコレステロールを細胞膜から小胞体膜へと輸送しているかどうかを調べた。“アクセス可能”なコレステロールは細胞膜から小胞体膜へと輸送され、コレステロール生合成のマスター転写因子である SREBP-2 の切断/活性化を抑制することが報告されているが、その分子機構は全く不明である。そこで GRAMD1 がこの輸送過程に関わっているかを調べるため、SREBP-2 の切断/活性化を GRAMD-TKO 細胞において観察した。コントロール細胞ではスフィンゴミエリンの加水分解によって SREBP-2 の切断/活性化が抑制されたのに対し、GRAMD-TKO 細胞ではこの抑制が減弱していた。つまり GRAMD1 は“アクセス可能”なコレステロールの細胞膜から小胞体膜への輸送に重要であることが明らかになった。

GRAMD-TKO 細胞の SREBP-2 の切断/活性化を抑制できない表現型は野生型の GRAMD1b の発現によってレスキューされたが、GRAM ドメインを欠いた変異体、StART-like ドメイン機能欠損変異体、ホモ/ヘテロ多量体化機能欠損変異体ではレスキュー出来なかった。これらのことから GRAMD タンパク質による細胞膜から小胞体へのコレステロール輸送には GRAM ドメインによる細胞膜のコレステロールへの結合、StART-like ドメインによる生体膜間のコレステロール輸送、ならびに多量体化のいずれも重要であることが分かった。

さらに知的障害と関連し GRAM ドメインのコレステロール結合能が減少している GRAMD1b R189W 変異体を GRAMD-TKO 細胞に発現させたが、SREBP-2 の切断/活性化を抑制できない表現型をレスキュー出来なかった。このことから GRAM ドメインによるコレステロール結合は GRAMD1b の機能に必須であり、R189W 変異によって GRAMD1b の正常な機能が阻害されること

で知的障害が引き起こされている可能性が示唆された。

GRAMD1 は小胞体膜に存在する膜タンパク質であること、細胞膜のコレステロールを感知して小胞体—細胞膜接着部位に局在することから、GRAMD1 の局在変化が細胞膜から小胞体へとコレステロールを輸送する機能に重要であると考えられる。そこで GRAMD1 を強制的に小胞体—細胞膜に局在させ細胞膜コレステロールの輸送を観察した。ここではラパマイシンによる FRB と FKBP モジュールの二量体形成を利用した。つまり GRAMD1 の GRAM ドメインを FKBP に置き換えた変異体と細胞膜局在化シグナルを付与した FRB モジュールを GRAMD-TKO 細胞に発現させ、ラパマイシンの添加下で細胞膜コレステロールを観察した。ラパマイシンの添加 (GRAMD1 小胞体—細胞膜接着部位への強制的な局在化) によって細胞膜コレステロールが輸送されたことから、GRAMD1 が実際に小胞体—細胞膜接着部位において機能していることが示された。

以上の実験により以下のことが明らかになった。

- GRAMD1 は小胞体—細胞膜接着部位においてコレステロールを細胞膜から小胞体へと輸送し細胞膜コレステロールの恒常性の維持をする。
- GRAMD1 によって輸送されたコレステロールは SREBP-2 の切断/活性化を抑制しコレステロールの生合成を調節する。
- GRAMD1 によるコレステロール輸送には GRAM ドメインによる細胞膜コレステロール結合、StART-like ドメインによる生体膜間コレステロール輸送、膜貫通領域と内腔側両親媒性ヘリックスによるホモ・ヘテロ多量体化のいずれも重要である。
- R189W 変異は GRAM ドメインのコレステロール結合能を減少させ、GRAMD1b による膜間コレステロール輸送を阻害する。

ここまでの 1) および 2) の研究成果は私を筆頭著者または共同筆頭著者とする 2 報の研究論文として専門誌に発表された。[研究発表欄 (1)-6) および 7)]

またこれらの成果を含めたレビューを 2 報、専門誌に掲載した [研究発表欄 (1)-4) および 5)]

3) その他の研究成果

GRAMD1 が持つ GRAM ドメインは生体膜中のコレステロールを感知できることから細胞内でコレステロールを可視化するツールとしても利用できる。実際、上記の研究成果を報告している論文中でも、蛍光タンパク質融合 GRAM ドメインを細胞内に発現させることで細胞膜のアクセス可能コレステロールの観察に成功している。さらに共同研究としてこのツールを提供し、Patched 1 という膜タンパク質が細胞膜内葉のアクセス可能コレステロールを増加させる機能があることを突き止めるのに貢献した。[研究発表欄 (1)-1)]

新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特別措置について

本研究は新型コロナウイルス感染症の拡大に伴いシンガポール政府の行った規制の影響を受けたため 6 ヶ月の期間延長を申請し、受理された。その期間、私は主に中間報告書に挙げた新規コレステロール輸送タンパク質の同定とその機能解析に従事し、進捗することができた。現在新規タンパク質がどのように細胞内コレステロール輸送に関わるかについてモデルをたて検証中の段階である。

またこの期間、私を主とする研究ではないものの、研究室内外の共同研究を行い貢献が評価されて 3 報の論文の共著者となっている。[研究発表欄 (1)-1), 2), および 3)]

その他国内の学会にもオンライン参加し、口頭発表の機会を得ることができた。[研究発表欄 (2)-1)]