

## 小胞体-細胞膜接着部位におけるコレステロール輸送

内藤 朋樹, 佐伯 恭範

### 1. 生体膜中のコレステロール

コレステロールは生体膜の主たる構成成分の一つであり, その細胞中の量は全脂質の20~25%に相当する. 特に細胞膜はコレステロールに富んでおり, 構成脂質のうち40~50%を占め, 細胞にもよるが, 多いものになると約90%のコレステロールが細胞膜に存在するとされている<sup>1)</sup>. 近年 Radhakrishnan らは, 他の脂質やタンパク質との相互作用の状態によって生体膜中のコレステロールを生化学的に二つのプールに大別した<sup>2)</sup>. すなわち, 細胞内の脂質輸送タンパク質等によって「アクセス可能な」(Accessible) コレステロールと, スフィンゴミエリンやリン脂質と複合体を形成していることにより, 「アクセス不可能な」(Inaccessible) コレステロールである (図1A). 定常時では, アクセス可能なコレステロールは少量しか存在していないが, その増加が感知され, オルガネラ間で輸送されることで, 細胞内コレステロールの恒常性維持に重要な役割を果たしている. たとえば細胞膜にてコレステロール量が一定量を超えると, アクセス可能なコレステロールが細胞膜から小胞体へと輸送される. すると, コレステロール生合成に関わる酵素群や外部からコレステロールを取り込むためのLDL受容体の発現をつかさどるSREBP-2 (sterol regulatory element-binding protein) 転写因子の活性が負に制御され, 細胞にコレステロールが過剰に蓄積するのを防ぐ<sup>3)</sup>. しかしながら, アクセス可能なコレステロールがどのようにして, 細胞によって感知され, 細胞膜から小胞体へと輸送されるのかは不明であった.

### 2. 膜接着部位と脂質輸送

小胞体は細胞内に張り巡らされた網目状の構造を持ち, タンパク質や脂質合成およびCa<sup>2+</sup>の貯蔵の場として機能

する一方, 他のオルガネラと膜接着部位を構成し, オルガネラ間のコミュニケーションをつかさどっている (図1A)<sup>4)</sup>. 膜接着部位は膜融合せずにオルガネラ膜どうしが10~30nmの距離で近接して存在する構造を指し, オルガネラの動態制御やオルガネラ間での脂質やイオンなどの輸送の場として機能している. 従来, 細胞内脂質輸送の主な経路として, 小胞を介した輸送が考えられてきたが, 脂質の種類に非選択的な小胞輸送に比べて, 小胞を介さない膜接着部位における脂質輸送タンパク質 (lipid transfer protein: LTP) を介した輸送は基質選択性/特異性が高いことが特徴である. 細胞内の脂質の恒常性維持には膜接着部位における非小胞的な輸送が重要であることが示唆され, 多くの研究者の注目を集めている. そして重要なことに, 膜接着部位の破綻は神経疾患や代謝疾患を引き起こすことが知られてきた.

#### 1) ORPファミリー

前述のように, 膜接着部位における脂質輸送にはLTPが重要な役割を担っている. LTPは脂質結合ドメインを持ち, 疎水性の脂質を親水性の環境から保護することでオルガネラ膜間の脂質輸送を可能にしている. 代表的なLTPの一つとして進化的に保存されたオキシステロール結合タンパク質 (oxysterol-binding protein: OSBP) 関連タンパク質 (OSBP related protein: ORP) ファミリーがあげられる. ORPはORDという脂質結合/輸送ドメインを共通して持つ他, 小胞体局在タンパク質VAPとの相互作用やPHドメインによる特異的なリン脂質との結合を介して選択的な膜接着部位に局在する<sup>5)</sup>. ヒトは11種のORPをコードする遺伝子を持ち, その多くのORDがコレステロールやPI4Pをはじめとするホスホイノシチド類と結合することが*in vitro*の実験系で示されている<sup>5)</sup>. 近年になって, OSBPやORP1, ORP2, ORP5などが, 細胞内の膜接着部位にてコレステロール輸送を含む脂質輸送を行うことが報告されてきている<sup>6-10)</sup>ものの, ORPが細胞内でどのように機能しているかについては, その全容は明らかになっていない. またコレステロールは細胞膜から小胞体へも輸送されるが, この経路を担うORPは発見されていない.

#### 2) StARDファミリーとGRAMD1/Lam6/Ltc1ファミリー 動物細胞におけるコレステロール輸送タンパク質とし

#### Movement of accessible cholesterol at endoplasmic reticulum (ER)-plasma membrane (PM) contact sites

Tomoki Naito and Yasunori Saheki (Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University, Singapore Cell Biology and Molecular Neuroscience Laboratory, Lee Kong Chian School of Medicine, 11 Mandalay Road, Singapore 308232)  
本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載.

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930157

© 2021 公益社団法人日本生化学会

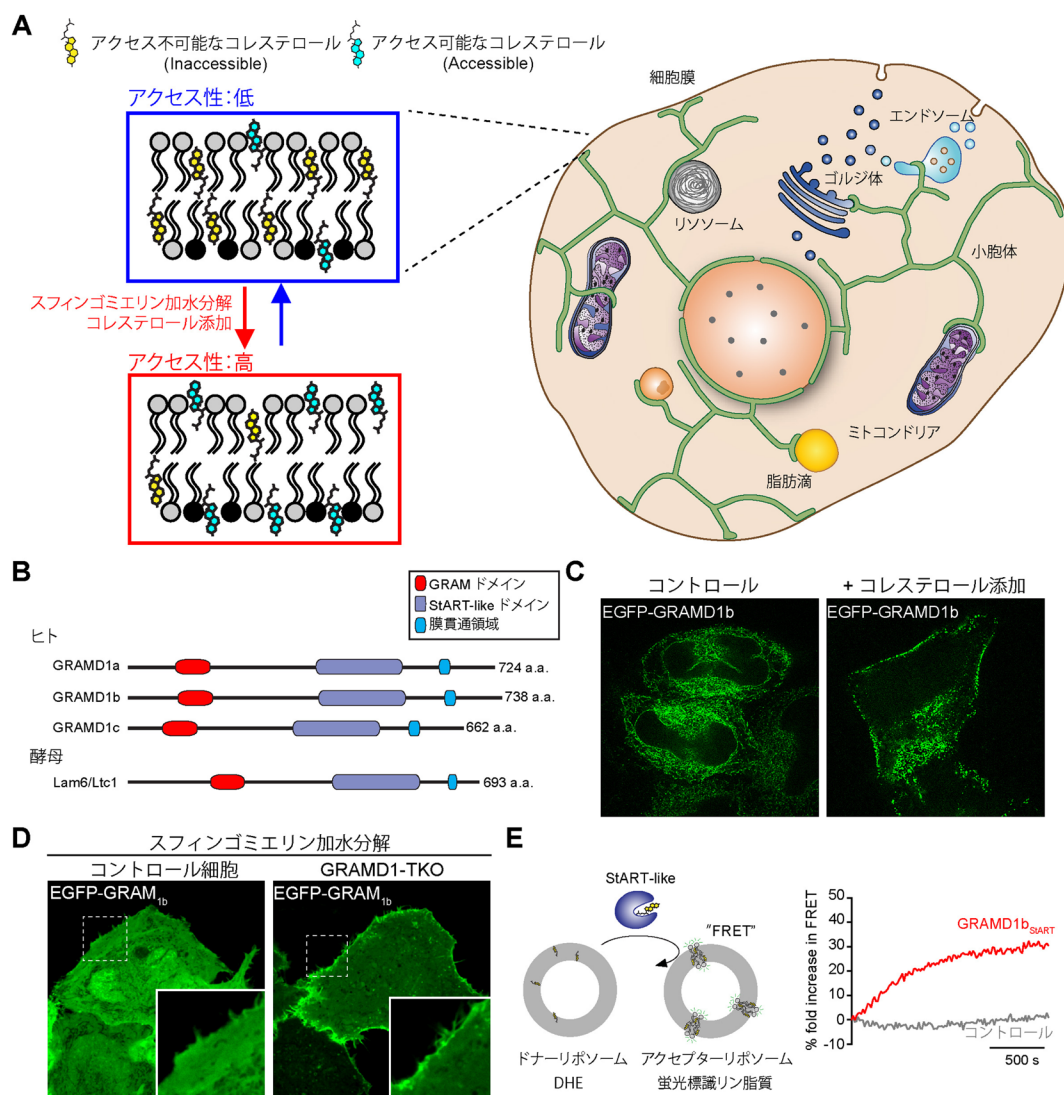


図1 膜接着部位とGRAMD1

(A) 左：生体膜中のコレステロールはアクセス可能なコレステロールとアクセス不可能なコレステロールに大別される。アクセス可能なコレステロールは脂質輸送タンパク質等に認識されることでオルガネラ間を輸送される（文献14より改変して引用）。右：小胞体は細胞質に張り巡らされた網目状の構造を持ち、他のオルガネラと膜接着部位を形成する。膜接着部位は膜融合を介さずにオルガネラ膜どうしがきわめて近接する構造で、オルガネラ間のコミュニケーションに重要な場である（文献4より改変して引用）。(B) GRAMD1と酵母におけるホモログのLam6/Ltc1は共通したドメイン構造を持つ。N末端のGRAMドメインはPHドメインに類似した膜脂質認識ドメインである。StART-likeドメインによって脂質を膜から引き抜き、オルガネラ間の脂質輸送を行う。またC末端の膜貫通領域によって小胞体膜に局在する。(C) 共焦点顕微鏡によるEGFPタグ融合GRAMD1bの生細胞内局在観察。定常状態では小胞体に広く存在するが、コレステロール添加によって小胞体-細胞膜接着部位に集積する（文献14より改変して引用）。(D) 共焦点顕微鏡によるEGFPタグ融合GRAMドメイン（EGFP-GRAM<sub>1b</sub>）のスフィンゴミエリン加水分解下（アクセス可能なコレステロール増加下）での生細胞内局在観察。コントロール細胞では増加したアクセス可能なコレステロールが細胞膜から直ちに輸送されるが、GRAMD1b-TKO細胞ではこの輸送が遅延しているため、コレステロールバイオマーカー（EGFP-GRAM<sub>1b</sub>）の細胞膜への集積が観察された（文献14より改変して引用）。(E) リポソームを用いたDHE（蛍光コレステロールアナログ）輸送実験。ドナーリポソームに含まれるDHEと、アクセプターリポソームに含まれる蛍光標識リン脂質間のFRETを測定することでDHE輸送を測定する。StART-likeドメインの添加によってFRETが増加、つまりDHEがアクセプターリポソームへと輸送された（文献14より改変して引用）。

て、StARTドメインを脂質結合／輸送ドメインとして持つStARDファミリーがある<sup>11)</sup>。しかしながらStARDファミリーは酵母には保存されていないことから、StARDファ

ミリーに関連する別の、より保存されたステロール輸送を行うタンパク質があるのではないかと考えられてきた。

LevineやNunnariらの酵母を用いた研究によって、LAM/

Ltcタンパク質がStARTドメインに似たStART-likeドメインを持ち、ステロール輸送を行うLTPであると示唆された<sup>12,13)</sup>。中でも、Lam6/Ltc1は、小胞体膜に局在する1回膜貫通型タンパク質で、リン脂質に結合すると考えられるPHドメイン様のGRAMドメインを持ち、小胞体-ミトコンドリアや、小胞体-液泡といった複数の膜接着部位に局在し、ステロール類の輸送を各オルガネラ間で行っていると考えられている(図1B)。StARDファミリーと異なり、Lam6/Ltc1は、進化的に保存されており、哺乳類でのホモログはGRAMD1 (GRAMD1a, GRAMD1b, GRAMD1c)である(図1B)。しかしながら哺乳類におけるGRAMD1についてはほとんど研究されておらず、その機能は未知であった。筆者らはGRAMD1が膜接着部位で働くコレステロール輸送タンパク質ではないかと仮説を立て研究を行った<sup>14)</sup>。

### 3. GRAMD1による細胞内コレステロールの恒常性維持

#### 1) 膜接着部位におけるGRAMD1の局在とその制御機構の解明

GRAMD1をHeLa細胞に発現させ、共焦点顕微鏡を用いて観察するとGRAMD1は網目状の小胞体に局在していた。ここ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見いだした(図1C)。またスフィンゴミエリンを加水分解することで細胞膜のアクセス可能な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は細胞膜におけるアクセス可能なコレステロールの増加を認識し、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、GRAMドメインが、細胞膜におけるアクセス可能なコレステロールの増加を認識していることがわかった。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*リボソーム結合実験を行った。精製したGRAMドメインはホスファチジルセリン(phosphatidylserine: PS)などの負電荷脂質存在時、リボ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ドメインが負電荷の脂質に富む細胞膜内膜にコレステロール依存的に結合することで、GRAMD1が小胞体-細胞膜接着部位に集積することが強く示唆された。

膜接着部位で機能するORPやextendedシナプトタグミン(E-Syt)といった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働くことが報告されている<sup>4)</sup>。そこで、GRAMD1が複合体を形成するかどうか調べるため共免疫沈降法を行った。その結果、GRAMD1a, GRAMD1b, GRAMD1cはホモ、またはヘテロ間で強固に相互作用し、多量体を形成することがわかった。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 $\alpha$ ヘリックスを持つ

可能性が示唆された。さまざま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複合体の形成に必須であることを突き止めた。さらに全反射顕微鏡を用いてスフィンゴミエリンの加水分解時の局在を観察すると、野生型のGRAMD1は小胞体-細胞膜接着部位に集積したが、多量体形成能を欠失した変異体は小胞体-細胞膜接着部位への局在が減少した。以上のことにより、GRAMD1は複合体を形成し、GRAMドメインを用いて細胞膜のアクセス可能なコレステロール量の増加を認識し、小胞体-細胞膜接着部位に集積することがわかった。

#### 2) GRAMD1の細胞内での機能の解明

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GRAMD1a, GRAMD1b, GRAMD1cをすべて欠損させたHeLa細胞[GRAMD1-triple knockout (TKO)細胞]を樹立した。アクセス可能なコレステロールのバイオマーカーとしてGRAMD1bのGRAMドメインを用いて細胞膜コレステロールを観察すると、スフィンゴミエリンの加水分解時、コントロール細胞に比べてGRAMD1-TKO細胞ではGRAMドメインが細胞膜に顕著に集積していた(図1D)。さらに定常状態においてもGRAMD1-TKO細胞では、アクセス可能なコレステロールが細胞膜において増加していることが、他のコレステロール結合タンパク質による細胞膜染色によってわかった。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GRAMD1の欠損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が示唆された。

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と考えられていた。*in vitro*の系を用いて調べたところGRAMD1bのStART-likeドメインが、コレステロールの蛍光アナログであるDHE (dehydroergosterol)を輸送できることがわかった(図1E)。次にGRAMD1が実際に細胞において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。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伴って細胞膜のアクセス可能なコレステロールが小胞体へと輸送され、SREBP-2の切断/活性化が抑制されたのに対し、GRAMD1-TKO細胞ではこの抑制が減弱していた。つまりGRAMD1タンパク質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。

この表現型は野生型の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できなかった。これらのことからGRAMD1による細胞膜から小胞体へのアクセス可能なコレステロール輸送にはGRAMドメインによるア



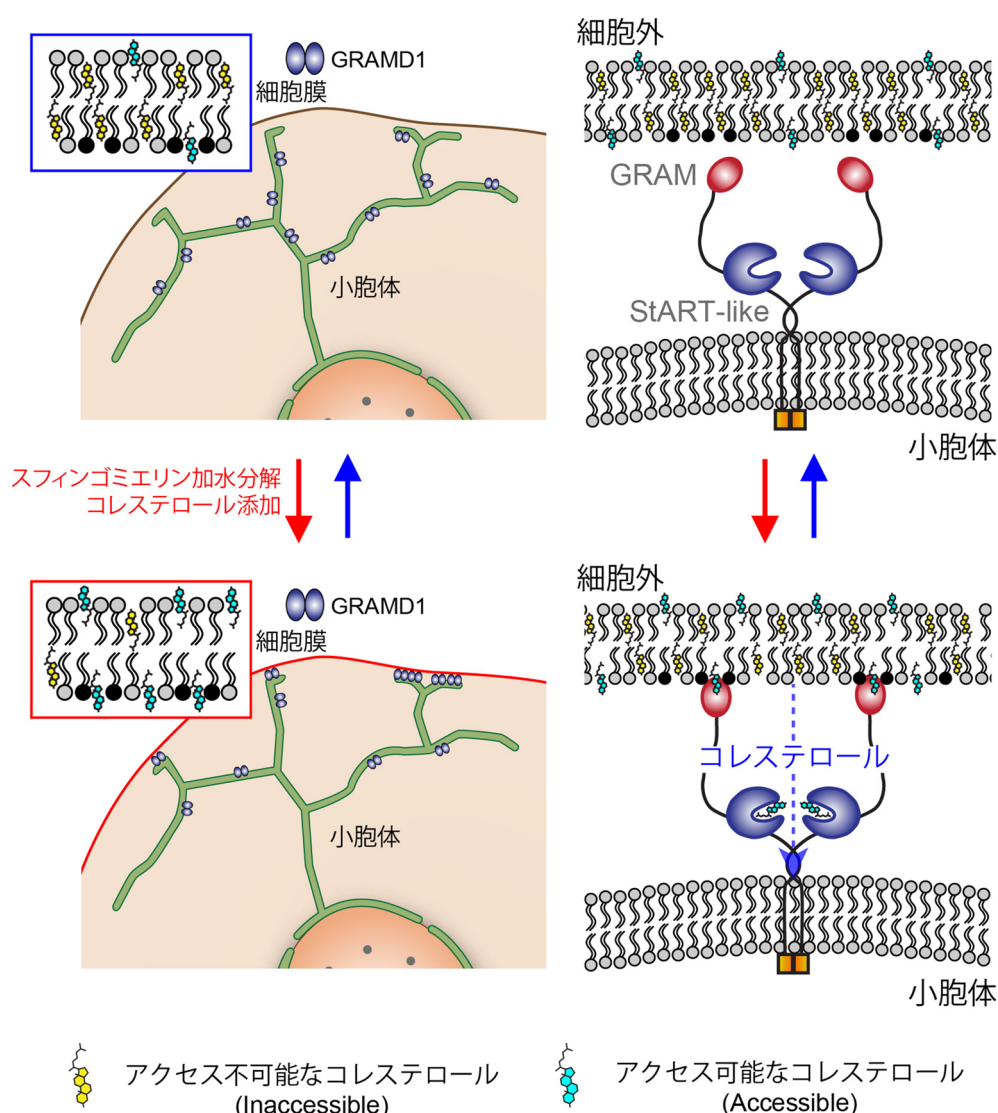


図2 小胞体-細胞膜接着部位における GRAMD1 による細胞膜から小胞体へのコレステロール輸送

GRAMD1はホモ／ヘテロ多量体を形成する小胞体膜タンパク質であり、定常状態では小胞体に広く存在する。細胞膜のアクセス可能コレステロールが増加する（例：コレステロール添加，スフィンゴミエリン加水分解）と，GRAMドメインによって細胞膜のアクセス可能なコレステロールの増加を認識，結合し，小胞体-膜接着部位へと集積する。そこでStART-likeドメインを用いて細胞膜から小胞体へのアクセス可能なコレステロールの輸送を行い，細胞膜のコレステロールの恒常性維持に貢献している（文献14より改変して引用）。

アクセス可能な細胞膜コレステロールの認識，StART-likeドメインによる生体膜間のコレステロール輸送，ならびに多量体化による膜接着部位への局在の促進のいずれも重要であることがわかった。

#### 4. おわりに

筆者らは膜接着部位における GRAMD1 の機能と分子基盤について注目して研究を行い，GRAMD1 が小胞体-細胞膜接着部位においてアクセス可能なコレステロール量の増加を検知し，細胞膜から小胞体へとアクセス可能なコ

レステロールを輸送することで，コレステロールの恒常性維持に貢献する重要なタンパク質であることを見いだした（図2）<sup>14)</sup>。最近GRAMD1はHDL由来のコレステロールを細胞膜から小胞体へと輸送すること，GRAMD1bを欠損したマウスは副腎においてコレステロールエステルの貯蔵が著しく減少したことがTontonozらのグループによって報告された<sup>15)</sup>。興味深いことに，GRAMD1は脳に多く発現している<sup>15)</sup>。これらのことからGRAMD1が副腎などのステロイドホルモンを産生する組織や中枢組織において生理的に重要であると考えられるが，その実態はいまだ不明である。

また，GRAMドメインがどのようにしてアクセス可能

なコレステロールを認識するのかといった分子メカニズムについてはまだ理解が進んでいない。筆者らは細胞内でGRAMドメインを発現させることで細胞膜のアクセス可能なコレステロールの増加を検出することに成功した。GRAMドメインの分子的な理解が今後進展すれば、GRAMD1の脳内での生理的な役割の解明に貢献できると考えている。

## 謝辞

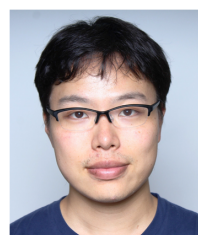
共同研究者である富澤一仁先生（熊本大学大学院生命科学研究部・総合医薬科学部門生体機能病態学・分子生理学）、魏范研先生（東北大学・加齢医学研究所・モドミクス医学分野）、そして佐伯研究室のメンバーである、Dr. Bilge Ercan, Dr. Logesvaran KrshnanおよびDylan (Hong Zheng) Kohには、GRAMD1の研究に関してさまざまな助言をいただいた。また、シンガポール国立大学・医学部のProf. Markus Wenk, Prof. Federico Tortaには、GRAMD1-TKO細胞の質量分析器を用いた脂質組成解析を行っていただいた。ここに謝意を表します。

## 文 献

- van Meer, G., Voelker, D.R., & Feigenson, G.W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 112–124.
- Das, A., Brown, M.S., Anderson, D.D., Goldstein, J.L., & Radhakrishnan, A. (2014) Three pools of plasma membrane cholesterol and their relation to cholesterol homeostasis. *eLife*, **3**, e02882.
- Infante, R.E. & Radhakrishnan, A. (2017) Continuous transport of a small fraction of plasma membrane cholesterol to endoplasmic reticulum regulates total cellular cholesterol. *eLife*, **6**, e25466.
- Saheki, Y. & De Camilli, P. (2017) Endoplasmic reticulum-plasma membrane contact sites. *Annu. Rev. Biochem.*, **86**, 659–684.
- Delfosse, V., Bourguet, W., & Drin, G. (2020) Structural and functional specialization of OSBP-related proteins. *Contact*, **3**, 1–30.
- Sobajima, T., Yoshimura, S.I., Maeda, T., Miyata, H., Miyoshi, E., & Harada, A. (2018) The Rab11-binding protein RELCH/KIAA1468 controls intracellular cholesterol distribution. *J. Cell Biol.*, **217**, 1777–1796.
- Wang, H., Ma, Q., Qi, Y., Dong, J., Du, X., Rae, J., Wang, J., Wu, W.F., Brown, A.J., Parton, R.G., et al. (2019) ORP2 delivers cholesterol to the plasma membrane in exchange for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>). *Mol. Cell*, **73**, 458–473.
- Mesmin, B., Bigay, J., Moser von Filseck, J., Lacas-Gervais, S., Drin, G., & Antonny, B. (2013) A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell*, **155**, 830–843.
- Du, X., Zhou, L., Aw, Y.C., Mak, H.Y., Xu, Y., Rae, J., Wang, W., Zadoorian, A., Hancock, S.E., Osborne, B., et al. (2020) ORP5 localizes to ER-lipid droplet contacts and regulates the level of PI(4)P on lipid droplets. *J. Cell Biol.*, **219**, e201905162.
- Dong, J., Du, X., Wang, H., Wang, J., Lu, C., Chen, X., Zhu, Z., Luo, Z., Yu, L., Brown, A.J., et al. (2019) Allosteric enhancement of ORP1-mediated cholesterol transport by PI(4,5)P<sub>2</sub>/PI(3,4)P<sub>2</sub>. *Nat. Commun.*, **10**, 829.
- Luo, J., Jiang, L.Y., Yang, H., & Song, B.L. (2019) Intracellular cholesterol transport by sterol transfer proteins at membrane contact sites. *Trends Biochem. Sci.*, **44**, 273–292.
- Gatta, A.T., Wong, L.H., Sere, Y.Y., Calderon-Norena, D.M., Cockcroft, S., Menon, A.K., & Levine, T.P. (2015) A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport. *eLife*, **4**, e07253.
- Murley, A., Sarsam, R.D., Toulmay, A., Yamada, J., Prinz, W.A., & Nunnari, J. (2015) Ltc1 is an ER-localized sterol transporter and a component of ER-mitochondria and ER-vacuole contacts. *J. Cell Biol.*, **209**, 539–548.
- Naito, T., Ercan, B., Krshnan, L., Triebel, A., Koh, D.H.Z., Wei, F.Y., Tomizawa, K., Torta, F.T., Wenk, M.R., & Saheki, Y. (2019) Movement of accessible plasma membrane cholesterol by the GRAMD1 lipid transfer protein complex. *eLife*, **8**, e51401.
- Sandhu, J., Li, S., Fairall, L., Pfisterer, S.G., Gurnett, J.E., Xiao, X., Weston, T.A., Vashi, D., Ferrari, A., Orozco, J.L., et al. (2018) Aster proteins facilitate nonvesicular plasma membrane to ER cholesterol transport in mammalian cells. *Cell*, **175**, 514–529.

## 著者寸描

### ●内藤 朋樹（ないとう ともき）



シンガポール南洋理工大学医学部ポストドクトラルフェロー、日本学術振興会海外特別研究員。博士（薬科学）。

■略歴 1989年山梨県に生まれる。2012年京都大学薬学部卒業、17年同大学院薬学研究科博士課程修了。16年から18年日本学術振興会特別研究員を経て18年より現職。19年より日本学術振興会海外特別研究員。

■研究テーマと抱負 細胞内の脂質輸送に興味がある。イメージング技術や生化学的な方法を駆使して、コレステロールやリン脂質といった脂質が細胞内を移動する方法やその調節、さらには生理的な役割を理解していきたい。

■ウェブサイト <https://www.thesahekilab.com/>

■趣味 剣道、オンライン飲み会。