

( 続紙 1 )

|  |   |    |         |
|--|---|----|---------|
| 京都大学   | 博士 ( 農 学 )  | 氏名 | 平 山 裕 士 |
| 論文題目   | Purification and functional analysis of cholesterol transporter<br>ABCG1 and ABCG4<br>(コレステロール輸送体 ABCG1 と ABCG4 の精製および機能解析) |    |         |
| (論文内容の要旨)  |   |    |         |
| <p>生体内のコレステロール恒常性の破たんは高脂血症へとつながり、日本人の主な死因のひとつである動脈硬化の原因となる。ABCG1 は末梢組織から過剰のコレステロールを除去する高密度リポタンパク質(HDL)の形成に関与することが報告されており、コレステロール恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられる。</p> <p>ABCG1 と ABCG4 が属する ABC タンパク質は、ATP に依存して物質輸送を行う膜タンパク質ファミリーである。ABCG1 が様々な組織で発現しているのに対し、ABCG4 は脳や造血組織など限られた組織でのみ発現している。ABCG1 は、血中の HDL を脂質アクセプターとしてコレステロールとスフィンゴミエリン (SM) を排出し、末梢細胞で過剰となったコレステロールを除去する。一方、Abcg4 ノックアウトマウスでは、巨核球前駆細胞においてコレステロールが蓄積するとともに、増殖が促進され、その結果血小板が増産されることが、近年報告された。血小板の増加は、血栓や動脈硬化巣の形成促進につながるため、ABCG4 も ABCG1 と同様にコレステロール恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられる。</p> <p>以上のように、ABCG1 と ABCG4 は生理的に重要な役割を果たしている。しかし、これら ABC タンパク質を生化学的に解析した研究はこれまでなく、ABCG1 と ABCG4 が実際に何を基質として輸送するかも不明である。本研究では、ABCG1 と ABCG4 の大量培養系、精製系、活性測定系を構築し、ATP 加水分解活性を指標に輸送基質を生化学的に明らかにすることを試みた。</p> <p>第一章では、浮遊状態で培養が可能なヒト培養細胞 (FreeStyle293-F 細胞) を用いて、まず ABCG1 発現系の構築を行った。さらに 3L で培養可能なバイオリアクタを用いて発現系の規模を拡大し、発現細胞を十分に供給する手法を確立した。</p> <p>膜タンパク質を精製するためには界面活性剤によって可溶化する必要がある。界面活性剤はタンパク質の構造を壊し失活させることから、膜タンパク質の可溶化には適切な界面活性剤を選ぶことが重要である。そこで本研究では、GFP 融合型の ABCG1 を用い、蛍光ゲルろ過法によって ABCG1 の機能単位である二量体構造に影響を与えない界面活性剤の探索を行った。その結果、ABCG1 は多くの界面活性剤中で安定な二量体構造を保持し、特に <i>n</i>-ドデシルマルトシド (DDM) が精製に適していることを明らかにした。そこで DDM を用いて細胞を可溶化し、カルボキシ末端に融合した Flag</p> |   |    |         |

タグを利用して精製を行った。その結果、純度 90%の精製標品を得ることに成功した。次に、ABCG1 をリポソームに再構成する手法の検討を行った結果、界面活性剤を吸着する多孔性ポリスチレンビーズを用いて再構成した場合に、ABCG1 の安定した活性測定が可能となることを見出した。

以上の手法を用いて精製し、卵黄由来脂質で作成したリポソームに再構成された ABCG1 は、約 150 nmol/min/mg の ATP 加水分解活性を示した。これはトランスポーター型として報告されている他の ABC タンパク質に匹敵する活性であり、ABCG1 が能動的なトランスポーターであることが示唆された。また再構成されていない状態では全く活性を示さなかったことから、ABCG1 の活性には脂質二重膜環境が必要であることが明らかとなった。

ABC タンパク質による基質輸送と ATP 加水分解活性は相関することが報告されている。そこで、ATP 加水分解活性を指標にして ABCG1 の輸送基質の特定を試みた。まず様々な組成のリポソームを用いて再構成を行ったところ、ホスファチジルセリン (PS) リポソームに再構成した ABCG1 の ATP 加水分解活性が低いことが観察され、PS は輸送基質ではないことが示唆された。そこで PS リポソームに他の脂質を加え、ABCG1 の ATP 加水分解活性に与える影響を検討した。コレステロール、SM、PC は濃度依存的に ABCG1 の ATP 加水分解活性を上昇させ、その EC<sub>50</sub> はそれぞれ、9.5%、8.3%、14%であった。コレステロールと SM が PC よりも効果的に ABCG1 の ATP 加水分解活性を上昇させたことから、ABCG1 はコレステロール、SM、PC を輸送するが、その中でもコレステロールと SM を好むことが示唆された。一方、ホスファチジルエタノールアミン (PE) は ATP 加水分解活性を促進しなかった。ABCG1 は、SM と PC が共通にもつコリン基を認識していると考えられる。さらに、SM が PC よりもよい基質になることから、SM の親水基と疎水基の境界にあるヒドロキシ基が ABCG1 の基質認識において重要であることが示唆された。

次に、ABCG1 が SM とコレステロールを同時に認識するかどうかを検討するため、SM 存在下、非存在下の条件で、ATP 加水分解活性促進に対するコレステロール濃度依存性を酵素化学的に解析した。その結果、SM 存在下において、コレステロールはより低濃度で ATP 加水分解活性を促進した。これは、SM が ABCG1 のコレステロールに対する親和性を上昇させたことを示唆している。以上より、SM とコレステロールが ABCG1 の異なる結合部位に結合し、両者の結合は協調的に ATP 加水分解活性を促進すると考えた。

第二章では ABCG1 の機能解析において確立した手法を応用し、ABCG4 の輸送基質の同定を試みた。ABCG1 と異なり、ABCG4 の二量体構造は不安定であり、様々な界面活性剤中で凝集体を形成した。検討した界面活性剤の中では、ジギトニンとフォスコリン - 14 で可溶化した場合にのみ安定な二量体構造を維持していた。フォスコリン

- 14 で可溶化した場合には、ABCG4 は ATP 加水分解活性を示さなかったため、精製にはジギトニンを用いることにした。精製 ABCG4 は、ABCG1 と同様にリポソームへの再構成に依存した ATP 加水分解活性を示し、卵黄由来脂質のリポソームに再構成した ABCG4 の ATP 加水分解活性は約 150 nmol/min/mg であった。この活性は ABCG1 と同等であり、ABCG4 も能動的なトランスポーターであることが示唆された。次に、ATP 加水分解活性を指標に輸送基質の探索を行った。コレステロールは濃度依存的に ABCG4 の ATP 加水分解活性を上昇させたが、SM、PC、PS、PE は活性を上昇させなかった。以上の結果から、ABCG4 は ABCG1 とは異なりリン脂質を輸送基質とせず、コレステロールのみを輸送基質とすることが示唆された。

本研究では、ABCG1 と ABCG4 の精製タンパク質を用いた生化学的解析によって、それぞれの輸送基質を初めて明らかにした。第一章の結果から、ABCG1 は SM とコレステロールを輸送基質として認識すること、そして SM とコレステロールは ABCG1 の異なる結合部位に結合し、両者の結合部位は協調的に作用するというモデルを提唱した。また第二章の結果より ABCG4 は ABCG1 と高い相同性を持つにもかかわらず、輸送基質選択性は異なり、コレステロールに対して特異性を示すことが明らかとなった。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせ

て、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

過剰なコレステロール蓄積による高脂血症などの疾病は近年日本でも患者数が増大しており、体内のコレステロール恒常性のメカニズムを理解することはこれらの疾病を予防する上でも重要である。ABCG1 は HDL 形成に関与すると考えられているタンパク質であるが、輸送基質は不明である。また ABCG4 は ABCG1 と高い相同性を持ち、コレステロール恒常性維持に関与すると考えられているが、その機能はほとんど解明されていない。本論文では、これら二種類のタンパク質について世界で初めて生化学的解析を行ったものであり、本論文の評価すべき点は以下のとおりである。

1. ヒト ABCG1 とヒト ABCG4 のヒト培養細胞での大量発現系、高純度精製系、再構成系、ATP 加水分解活性測定系を世界で初めて構築した。
2. ABCG1 はコレステロールとコリンリン脂質 (特に SM) を輸送基質として認識すること、ABCG1 は SM とコレステロールを異なる部位で結合し、両者を共輸送することを示唆した。
3. ABCG4 はコレステロールの輸送体であることを示唆した。

以上の通り、本論文はヒトのコレステロール恒常性にかかわる ABCG1 と ABCG4 の機能解析法を確立し、これらのタンパク質が特定の脂質を基質とすることを、初めて生化学的に明らかにしたものである。この研究は細胞生化学、細胞生物学、基礎生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 25 年 7 月 11 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から 3 ヶ月以内)