

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	石 神 正 登
論文題目	脂質輸送型 ABC タンパク質の特徴的なドメインの機能解析		
(論文内容の要旨)			
<p>ABC タンパク質ファミリーは、12 の膜貫通ヘリックスからなる膜貫通ドメインと、アミノ酸配列がよく保存された 2 つのヌクレオチド結合ドメインをもつ膜タンパク質ファミリーで、ATP 加水分解に依存してさまざまな物質を輸送する。ヒトには 48 種類の ABC タンパク質が存在し、がんの多剤耐性や嚢胞性線維症、痛風、糖尿病、アルツハイマー病などといったさまざまな疾患に関連している。ヒト ABC タンパク質には膜脂質を輸送基質とするものが多く存在しており、それらは生体内脂質恒常性の維持などに貢献している。本研究では、脂質輸送型 ABC タンパク質である MDR3 と ABCA1 がもつ特徴的なドメインの機能について生化学的解析を行った。</p> <p>MDR3(ABCB4)は、肝細胞の毛細胆管膜に特異的に発現し、胆汁中に含まれる胆汁酸をアクセプターとして、細胞膜中のホスファチジルコリン(PC)を排出する脂質輸送体である。PC を排出し胆汁酸との複合ミセルを形成させることで、胆汁酸の界面活性作用を弱め、胆汁酸に対して胆管膜を保護する役割を担う。これまで、MDR3 による脂質輸送機構の解明のために、精製タンパク質を用いた生化学的実験が試みられてきたが、MDR3 の ATP 加水分解活性が検出されたことはなかった。</p> <p>第一章では、キメラタンパク質を用いた手法により、MDR3 のヌクレオチド結合ドメイン(NBD)がもつ ATP 加水分解活性の解析を試みた。MDR1 の膜貫通ドメイン(TMD)と MDR3 由来の NBD をもつキメラタンパク質(MDR1/3)を作製し、その機能を解析した。その結果、MDR1/3 は、MDR1 と同様に、構造が異なるビンブラスチンとパクリタキセルに対する耐性を発現細胞に付与し、さらにカルセイン誘導体を輸送することが明らかになった。次に、MDR3 由来の NBD の性質をより詳細に解析するため、ヌクレオチドとの相互作用を ATP の光親和標識誘導体を用いて検討した。その結果、MDR1/3 がもつ MDR3 由来の NBD は、加水分解後の産物である ADP をバナジン酸存在下で強く結合し、それはベラパミルによって増強された。この性質は MDR1 由来の NBD と同じであった。さらに、FreeStyle293-F 細胞を宿主として発現させ精製した精製タンパク質を用いて、薬剤依存的な ATP 加水分解活性を解析した。ビンブラスチンとベラパミルは、MDR1 と MDR1/3 の ATP 加水分解活性を濃度依存的に誘導した。しかし、MDR1/3 の ATP 加水分解活性は MDR1 の活性の約 1/10 であった。一方、精製 MDR3 の ATP 加水分解活性は検出限界以下であった。これらの結果から、MDR1 の TMD に連結した MDR3 由来の NBD は、MDR1 由来 NBD と同様の機構で ATP を加水分解し、その活性は MDR1 由来 NBD の約 1/10 であるにもかかわらず、TMD の構造変化を起こさせ薬剤輸送を駆動できることが明らかになった。</p>			

ABCA1 は、末梢細胞で過剰に蓄積したコレステロールを、PC とともに血中の脂質アクセプターであるアポリポタンパク質 A-I (アポ A-I) に輸送し、善玉コレステロールとして知られる HDL の前駆体を産生する脂質輸送体である。ABCA1 は ABCA サブファミリーに特徴的な大きな 2 つの細胞外ドメインをもち、これらは HDL 産生過程において重要な役割を果たすことが知られている。さらに最近、全反射照明蛍光顕微鏡を用いた一分子観察手法により、ABCA1 が HDL 産生過程において一時的に二量体化すること、次に二量体化した ABCA1 にアポ A-I が結合すると、ABCA1 が単量体に解離することがわかった。また、ABCA1 の ATP 加水分解欠損変異体は二量体を形成しなかったことから、ABCA1 の二量体化には ATP 加水分解活性が必要であることがわかった。しかし、ABCA1 の二量体化に関わるドメインや二量体化の生理的意義は不明であった。

ABCA1 の細胞外ドメインは ATP 加水分解に伴って大きく構造変化することが知られているが、そのメカニズムは不明であった。第二章では、ABCA1 の細胞外ドメインの機能解析を行った。BHK/ABCA1 細胞にトリプシン処理を施したところ、PC とコレステロールが培地中に迅速に放出され、その放出のトリプシン処理時間依存性は細胞膜上の ABCA1 の細胞外ドメインの切断の時間依存性と一致していた。また、トリプシン処理による脂質の放出は ABCA1 の ATP 加水分解活性に依存的であった。さらに、ABCA1 と同様にコレステロールとコリンリン脂質を排出するが、大きな細胞外ドメインをもたない ABCG1 を発現した細胞は、トリプシン処理を施しても脂質を放出しなかった。本実験条件における細胞膜上の ABCA1 分子の数を概算したところ、およそ  $7.8 \times 10^5$  分子/cell ( $3.9 \times 10^{11}$  分子/well) であり、BHK/ABCA1 から放出された PC とコレステロールの量はウェル当たりそれぞれ 230 ng と 47 ng であった。以上の結果は、ABCA1 が輸送した脂質を一時的に細胞外ドメインに保持していることを示唆しており、ABCA1 一分子の細胞外ドメイン内には約 560 分子の PC と 230 分子のコレステロールが保持されていると計算された。この値は、これまでに報告されている円盤状の新生 HDL に含まれる脂質の量とおおよそ一致した。以上の結果から、ABCA1 が ATP 加水分解に依存して PC とコレステロールを輸送し、一時的に大きな細胞外ドメイン内に溜め込み、アポ A-I が細胞外ドメインに直接結合し、溜め込まれた脂質を受け取って新生 HDL として遊離するというモデルが示された。

第三章では、ABCA1 の二量体化に関わるモチーフの探索と、二量体化の生理的意義の解析を行った。全反射照明蛍光顕微鏡を用いた一分子観察手法により、ABCA1 と最も高いアミノ酸配列相同性をもつ ABCA7 は二量体化せず、常に単量体で細胞膜上を自由拡散することが明らかとなった。ABCA1 と ABCA7 のアミノ酸配列の比較から、ABCA1 の二量体化に関わるアミノ酸の候補として C 末端ドメインに存在する 3 つのロイシン残基に着目した。ABCA1 の C 末端ドメインに存在する 3 つのロイシン残基をアラニンに置換した ABCA1-3LA 変異体は、二量体化の効率が大幅に減少することが明らかになった。以上の結果から、L2187、L2194、L2201 の 3 つのロイシン残

基が、ABCA1 の二量体化に関与することが示唆された。産生される HDL のサイズを解析した結果、野生型 ABCA1 が粒径約 13.5 nm の大型 HDL と粒径約 11.0 nm の小型 HDL の 2 種類の HDL を産生したのに対して、ABCA1-3LA 変異体は大型 HDL の産生能が低く、主に小型 HDL のみを産生した。大型 HDL と小型 HDL を精製し、それぞれに含まれるアポ A-I 分子数を解析した結果、小型 HDL は主に 2 分子のアポ A-I を含んでいたのに対して、大型 HDL は主に 2 分子または 4 分子のアポ A-I を含んでいた。以上の結果から、ABCA1 の二量体化は、大型 HDL の産生に必要であることが示された。第二章と第三章の結果から、ABCA1 による HDL 形成モデルを以下のように提唱した。

1. ABCA1 は PC とコレステロールを細胞膜からタンパク質内部に取り込み、ATP 加水分解による構造変化によって外向きに輸送する。
2. 輸送された PC とコレステロールは、ABCA1 の細胞外ドメイン内部に一時的に保持される。
3. それによって ABCA1 の細胞外ドメインが大きく構造変化し、細胞外ドメインの表面にアポ A-I 結合部位が現れる。
4. それと同時に、ABCA1 の一部は二量体化する。
5. 血中のアポ A-I が ABCA1 の細胞外ドメインに直接結合し、細胞外ドメインに保持された PC とコレステロールがアポ A-I へ移動する。
6. 脂質をアポ A-I に渡した ABCA1 は単量体に解離し、細胞膜上を自由拡散しながら 1 からのステップを繰り返す。
7. ABCA1 は二量体化することによって、大型 HDL を産生する。

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)

ヒト ABC タンパク質は、がんの多剤耐性や嚢胞性線維症などのさまざまな疾患に関与している。ヒト ABC タンパク質には 10 以上の脂質輸送型 ABC タンパク質が存在し、それらは生体内脂質恒常性の維持などの役割をもつ。脂質輸送型 ABC タンパク質のひとつである MDR3 について、その脂質輸送機構を生化学的に解析するため、これまで精製タンパク質を用いた実験が行われてきたが、その ATP 加水分解活性が検出されたことはなかった。同じく脂質輸送型 ABC タンパク質である ABCA1 は、特徴的な大きな細胞外ドメインをもつ。細胞外ドメインは ATP 加水分解に伴って大きく構造変化することが知られていたが、そのメカニズムは不明であった。また、ABCA1 は HDL 産生過程において一時的に二量体化することが知られていたが、二量体化に関わるドメインや二量体化の生理的意義は不明であった。

本論文は、脂質輸送型 ABC タンパク質である MDR3 と ABCA1 の特徴的なドメインの機能を生化学・細胞生物学的に解析したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. MDR3 のヌクレオチド結合ドメインがもつ ATP 加水分解活性を初めて検出し、その ATP 加水分解の性質を明らかにした。
2. ABCA1 の細胞外ドメイン内に輸送された脂質が一時的に保持されることを示唆した。
3. ABCA1 の二量体化に C 末端ドメイン中の 3 つのロイシン残基が関わっている可能性を示した。
4. ABCA1 の二量体化はコレステロールを多く含む大型 HDL の産生に必要であることを示した。
5. ABCA1 による新規の HDL 産生モデルを提唱した。

以上のように、本論文はこれまで不明であった MDR3 と ABCA1 がもつ特徴的なドメインの機能を生化学的に明らかにし、ABCA1 による新規 HDL 産生モデルを提唱したものであり、分子細胞生物学、細胞生化学、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 27 年 7 月 9 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)