

氏名	たか 高	はし 橋	けい 圭
学位(専攻分野)	博士(農学)		
学位記番号	農博第1580号		
学位授与の日付	平成18年7月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻		
学位論文題目	Purification and functional analysis of ABC proteins involved in cellular phospholipids and cholesterol export (リン脂質とコレステロール輸送に関与するABCタンパク質の精製と機能解析)		
論文調査委員	(主査) 教授 植田和光	教授 加納健司	教授 阪井康能

### 論文内容の要旨

ABCタンパク質は、原核生物から高等生物に至るまでよく保存されたヌクレオチド結合領域(nucleotide binding fold: NBF)と、複数膜貫通領域を機能単位として持つ一群の膜タンパク質である。ヒトには49のABCタンパク質遺伝子が同定されており、近年の研究からそれぞれが生体で重要な働きを担い、それらの欠損によって疾患が引き起こされることが明らかとなってきている。ABCA1は、高密度リポタンパク質の消失をもたらすタンジール病の原因遺伝子として同定され、細胞からのリン脂質、コレステロールのアポリポタンパク質依存的な排出に関与する。また、肺に特異的に発現するABCA3は乳幼児呼吸窮迫症候群の原因遺伝子の一つとして同定され、肺サーファクタント分泌への関与が示唆されている。ABCタンパク質はATPとの結合、加水分解によって機能が制御、駆動されていることが考えられている。また、ABCタンパク質の多くがトランスポーターとして機能し、輸送基質に依存してATP加水分解活性が誘導されることが知られている。しかしながら、ABCA1とABCA3のATPとの相互作用メカニズムはほとんど不明である。

本研究では、脂質ホメオスタシスに関与すると考えられるABCA1とABCA3のATP加水分解機構を解明するために、ABCA1とABCA3を培養細胞に大量発現させ、高次構造を維持したまま精製し機能解析を行った。さらに、ABCA1とアポA-Iの相互作用とそれに共役して起こる現象について解析した。また、培養細胞内で起こるABCA3のプロセッシングについて考察した。本論文の主な内容は以下のとおりである。

細胞からのコレステロール排出に関与するヒトABCA1の直接的な機能を調べるためには、ATP加水分解活性の解析が有効である。第一章では、タンパク質の折りたたみが哺乳類に近いと期待できる昆虫細胞Sf9でABCA1を発現させ、非イオン性の界面活性剤で可溶化後に精製し、精製ABCA1を用いてATP加水分解活性の解析を行なった。トリプシン限定分解によってABCA1の構造を評価した結果、精製ABCA1ヒト繊維芽細胞の膜小胞上のABCA1と同様の構造を保持していることが明らかとなった。精製ABCA1のATP加水分解活性がリン脂質によって誘導されることを見いだした。さらにその活性が、リン脂質の種類によって大きく変動することから、ABCA1がリン脂質を選択して輸送することを初めて提唱した。また、ATP加水分解活性がコレステロールによって緩やかに減少したことから、ABCA1のリン脂質輸送の構造変化の際にコレステロールが負荷になっており、コレステロールがapoA-Iによって引き抜かれやすいように、ABCA1と複合体を形成するというモデルを提唱した。本研究の結果から高密度リポタンパク質形成が、ABCA1による選択的なリン脂質輸送によって起こることを明らかとした。これらの成果は、これまで困難とされてきた脂質輸送機構の解明への重要な基盤となり得る。

第二章では、ABCタンパク質の哺乳類培養細胞での大量発現条件及び精製条件を検討し、ABCA3のプロセッシング機構について解析した。哺乳類浮遊培養細胞293F-FreeStyleでABCA3を発現させると、HEK293単層培養細胞と同様に、膜画分に180kDaと150kDaのタンパク質が検出された。シヨ糖密度勾配遠心と翻訳阻害剤を用いた実験の結果から、ABCA3が180kDaのタンパク質として発現しリソソームで150kDaにプロセッシングされることを見いだした。さらに、

酸性 pH 依存的に ABCA3 自身がプロセッシングを受けることを明らかにした。また、293F-FreeStyle で一過的にまたは安定的に発現させた ABCA3 は容易に精製することができ、ABCA1 とは異なる様式の ATP 加水分解活性特性を持つことを明らかにした。本研究によって構築された大量発現技術は、ABC タンパク質を含む膜タンパク質の高次構造解析に応用できることが期待される。

ABC タンパク質は2つの ATP 結合モチーフを有し、ATP 結合 - 加水分解作用は基質輸送に必要であることが考えられている。第三章では、ABCA1 の ATP 結合、加水分解と脂質排出の関連性について調べるために、ABCA1 の ATP 結合モチーフ変異体をそれぞれ HEK293 で安定的に発現させ解析した。ABCA1 変異体は野生型と同様の細胞内局在を示したにもかかわらず、どちらか一方の ATP 結合モチーフに変異を入れることでリン脂質排出、コレステロール排出能は完全に消失することを明らかにした。また、光親和標識実験を行なうことによって ABCA1 の 2 つの NBF の ATP 結合 - 加水分解様式は非等価であるということを見いだした。精製タンパク質を用いた研究によって、ABCA1 は apoA-I と特異的に相互作用することを明らかとし、apoA-I の C 末端のヘリックスが ABCA1 との相互作用に重要であることを提唱した。さらに、ABCA1 と相互作用した apoA-I はコンホメーションが変わり、脂質の存在下で速やかに HDL へと変換されることを実証した。

### 論文審査の結果の要旨

高密度リポタンパク質 (HDL) は末梢の血管壁からコレステロールを引き抜き肝臓へと輸送する作用を有する。そのため、血中 HDL 濃度は動脈硬化発症と負に相関し、HDL は高脂血症予防のための重要な因子であると考えられている。しかし、HDL 新生は、ABCA1 を含んだ複数のタンパク質と脂質との反応であるために複雑で、その重要性にもかかわらず未だ充分には解明されていない。それに加え、ABCA1 は脳内でも高発現しており、遺伝子多型解析及び機能解析からアルツハイマー病との関係が指摘され注目されている。ABCA3 はヒト肺胞 II 型上皮細胞のラメラ体限界膜に特異的に発現し、肺サーファクタントの分泌に関与する可能性が考えられている。ABCA3 の変異は致死性の新生児呼吸窮迫症候群や若年性肺疾患と密接に関与しているために機能解析が急がれている。これらの ABC タンパク質は巨大な複数膜貫通型の膜タンパク質であるために実験操作が難しく機能解析の進展が遅れている。本論文では、ABCA1 と ABCA3 を大量発現する手法及び、高次構造を保ったまま精製する方法を樹立した。精製 ABCA1 の ATP 加水分解活性を測定することにより、リン脂質選択的な輸送メカニズムが存在することを明らかにし、リン脂質とコレステロールの共輸送モデルを提唱した。評価すべき点は以下のとおりである。

1. 昆虫細胞を用いた ABCA1 の大量発現系を構築し、高次構造を保ったまま ABCA1 を精製する条件を決定した。
2. 精製 ABCA1 を人工リポソームに再構成し ATP 加水分解活性を測定することによって、コリンリン脂質が ABCA1 の ATP 加水分解活性を特異的に促進することを明らかにした。
3. ABCA1 の ATP 加水分解活性は、コレステロールの存在下有意に低下することが認められ、ABCA1 のホスファチジルコリン輸送過程でコレステロールが負荷になる共輸送モデルを提唱した。
4. 293F-FreeStyle 浮遊培養細胞を用いて ABC タンパク質の大量発現系を構築した。
5. ABCA3 が酸性 pH に依存してプロセッシングされることを明らかにした。
6. ABCA1 の 2 つある ATP 結合ドメインのヌクレオチドに対する親和性の違いを明らかにし、両方の ATP 結合ドメインが ABCA1 依存的な脂質排出に必要であることを明らかにした。
7. ABCA1 は、HDL の主要な構成タンパク質成分である apoA-I と特異的に相互作用することを明らかにし、さらに相互作用によってお互いの構造が変化し、apoA-I が脂質を含んだ HDL 様粒子となることを明らかにした。

以上のとおり、本論文は、脂質輸送に関与する膜タンパク質 ABCA1、ABCA3 の精製と機能解析を行ない、未知の機能を明らかにしたものであり、細胞生化学、脂質生化学さらには構造生物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18年6月15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。