

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	川野邊 峻哲
論文題目	高密度リポタンパク質産生におけるABCA1とapoA-Iの相互作用メカニズムの解明		
(論文内容の要旨)			
<p>高密度リポタンパク質(HDL)は、コレステロールの血中輸送キャリアとしてヒト体内のコレステロール恒常性に関与することに加え、血管内皮に対する抗炎症作用や酸化作用など多様な機能を示すことが知られている。HDL産生不全は末梢血管におけるコレステロール沈着による動脈硬化症や、多くの循環器疾患を引き起こすことから、HDLの生理的重要性は明らかである。</p> <p>HDLは、末梢細胞に発現する脂質輸送型膜タンパク質ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)が血中のアポリポタンパク質apolipoprotein A-I(apoA-I)へ脂質を輸送することにより形成される。ABCA1は、特徴的な細胞外ドメイン(ECD)を2つ持つATP駆動型輸送体であり、リン脂質やコレステロールを輸送基質とする。HDL形成の初期反応については、ABCA1が細胞表面に作り出す特殊な膜構造にapoA-Iが相互作用し脂質を引き抜くとする「間接的な産生機構」と、ABCA1がapoA-Iに脂質を直接受け渡す「直接的な産生機構」が提唱されており、議論が分かれている。本研究では生化学的手法によって、ABCA1が第一細胞外領域(ECD1)を介してapoA-Iと直接相互作用することを明らかにした。本研究で得られた結果は、ABCA1による直接的なHDL産生機構を支持するものであり、HDL形成初期反応の理解に重要な知見となる。本論文の主な内容は以下のとおりである。</p> <p>本研究では、光反応性官能基でラベルされたapoA-Iを用いてABCA1のapoA-I結合領域を特異的に標識し、断片化したペプチドの標識を指標として結合部位の決定を行った。ABCA1におけるapoA-I結合領域を標識するため、まず光反応によって近傍のタンパク質をビオチン化標識できる化学架橋剤(sulfo-SBED)を付加したsulfo-SBED-apoA-Iを作製した。次に、sulfo-SBED-apoA-Iの機能性をABCA1発現細胞からのコレステロール排出実験、およびABCA1発現細胞への結合性を指標に評価した。その結果、ABCA1発現細胞からsulfo-SBED-apoA-Iに排出されるコレステロール量が非標識apoA-Iと差がなかった。さらに、ABCA1発現細胞へのapoA-Iの結合がsulfo-SBED-apoA-Iによって抑制されたことから、sulfo-SBED-apoA-Iは機能的にapoA-Iと同等であり、結合部位もapoA-Iと同一であることが確認された。次に、細胞膜上のABCA1がsulfo-SBED-apoA-Iによってビオチン化されるかどうかを検討した。ABCA1発現細胞にsulfo-SBED-apoA-Iを結合させ光反応を行ったところ、野生型ABCA1発現細胞からビオチン化されたABCA1が検出された。一方、ATPとの結合・加水分解活性部位のリシンをメチオニンに変異させた失活型変異体であるABCA1(MM)発現細胞では、ビオチン化されたABCA1(MM)が検出されなかった。これらの結果から、sulfo-SBED-apoA-Iは機能的なABCA1を特異的に標識できることが明らかとなった。しかし、ABCA1以外にも複数</p>			

のタンパク質がビオチン化されたことから、ABCA1のビオチン化領域を検討するためにはビオチン化ABCA1の精製が必要であることが判明した。

そこで、機能的なABCA1を高純度で精製する手法の確立を試みた。膜タンパク質であるABCA1の精製では適切な界面活性剤の選定が重要である。まず、GFP蛍光標識したABCA1発現細胞を11種類の界面活性剤によって可溶化し、可溶化されたABCA1を蛍光ゲルろ過法によって解析した。その結果、5種類（DDM, LMNG, CYMAL, C₁₂E₈, CHAPS）の界面活性剤を用いた場合に、ABCA1は溶液中で単量体構造を保持していることが確認できた。この5種類の界面活性剤を用いてABCA1を精製し、ATP加水分解活性によって機能性を評価した結果、CHAPSまたはLMNGを用いることで機能的なABCA1が精製できることが明らかとなった。

ApoA-I相互作用部位を特定するために、まずABCA1の中間部分にスロンビン切断サイトを導入し、N末端およびC末端部分に分割する事でどちらの領域が結合サイトを含むかを検討した。その結果、ビオチン化はN末端側半分に強く見られ、C末端側半分にはビオチン化のシグナルが見られなかったことから、ABCA1はN末端側半分に含まれるECD1でapoA-Iと相互作用することが示唆された。さらに、N末領域中の結合部位を絞り込むため、ビオチン化されたABCA1をタンパク質分解酵素処理によって断片化した。Glu-C エンドペプチダーゼによってビオチン化ABCA1を消化してペプチド断片を抽出した結果、ABCA1の細胞外ドメインECD1に対する抗体と反応する約15 kDaのビオチン化されたペプチド断片が取得できた。これらの結果から、apoA-IはABCA1のECD1と直接相互作用することが明らかとなった。

ABCA1とapoA-Iが直接結合することが判明したため、ABCA1との結合に必要なapoA-Iの領域を解析した。ApoA-IのN末側ドメインまたはC末側ドメインの α -ヘリックスを1つずつ欠損させた変異体9種類を作製した。これらのヘリックス欠損変異体apoA-IはいずれもABCA1発現細胞への結合活性やABCA1発現細胞からのコレステロール引き抜き活性を保持していた。これらの結果から、ABCA1との直接的な結合においてapoA-Iは単一のドメインではなく、複数のドメインが分子内で相補的に働くことによって結合に関与していることが示唆された。

本研究の結果から、高密度リポタンパク質産生過程においてABCA1はECD1を介してapoA-Iと直接相互作用することが明らかになった。また、apoA-IにおけるABCA1との結合領域はapoA-I分子内で相補的に機能し、結合に関与していることが示唆された。以上の結果は、ABCA1が結合したapoA-Iに直接脂質を載せるHDL産生機構を強く支持している。

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)

HDL産生は、末梢組織の過剰なコレステロールを除去する唯一の手段であり、生体内のコレステロール恒常性の維持に重要である。HDLは、ABCA1を介した脂質輸送によってリン脂質およびコレステロールと apoA-Iの複合体として産生されるが、その分子メカニズムの詳細はよくわかっていなかった。本論文は、ABCA1と apoA-Iの相互作用領域を光反応によって特異的に標識する手法を開発し、生化学的手法によってHDL形成機構を分子レベルで解析したものである。本論文で評価すべき点は以下のとおりである。

1. 光反応性官能基 Sulfo-SBED を付加した apoA-I を用いて、ABCA1 と apoA-I の直接的な結合を明らかにした。
2. 可溶化に用いる界面活性剤を幅広く探索し、機能性を維持した ABCA1 を精製する手法を確立した。
3. 各種エンドペプチダーゼを用いた断片化試験により、ABCA1 の第一細胞外領域 (ECD1)に apoA-I が直接結合することを明らかにした。
4. 各種 apoA-I 変異体を作製した結果、ABCA1 との結合には apoA-I の複数のドメインが相補的に機能している可能性を見出した。

以上のように本論文は、HDL産生におけるABCA1と apoA-Iの相互作用メカニズムを明らかにしたものであり、分子細胞生物学、細胞生化学および基礎生理学の発展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31年2月16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。

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）