

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

川野邊 峻哲

2019

目次

序論	-1
材料と方法	-5
結果	
ABCA1 における apoA-I 結合領域の同定	-13
ABCA1 との結合に必要な apoA-I の領域の解析	-29
考察	-33
結論	-37
参考論文	-39
文献リスト	-45
謝辞	-47

序論

コレステロールはヒトの細胞膜の主要な構成成分の 1 つであると同時に、生体機能を支えるビタミン D やステロイドホルモンなどの前駆体として重要な成分である。しかし過剰なコレステロールは生体にとって有害であり、末梢組織のマクロファージにコレステロールが蓄積することで、動脈硬化性疾患に繋がることが知られている(1)。そのため、コレステロールの合成・吸収・代謝が厳密に制御されることによってコレステロールの恒常性が保たれることが生体にとって重要となる。

血液中のコレステロールはアポリポタンパク質と呼ばれる脂質キャリアによってリン脂質やトリグリセリドと一緒に運搬されており、その粒子の形態によって、カイロミクロン・VLDL・LDL・HDL に大きく分類される。カイロミクロンは腸管から吸収されたコレステロールやトリグリセリドを肝臓へ輸送し、超低密度リポタンパク VLDL は肝臓からトリグリセリドを末梢組織に供給する。低密度リポタンパク質 LDL は肝臓から末梢組織へコレステロールを供給するため悪玉コレステロールと呼ばれるのに対し、高密度リポタンパク質 HDL は末梢組織から肝臓へコレステロールを回収する。この HDL によるコレステロールの輸送はコレステロール逆輸送経路として知られ、末梢の過剰なコレステロールを除去する唯一の経路である(Fig.1)。HDL は末梢組織のコレステロール量を減らすことや、血中 HDL 量と動脈硬化の発症リスクが逆相関することから善玉コレステロールとも呼ばれる。

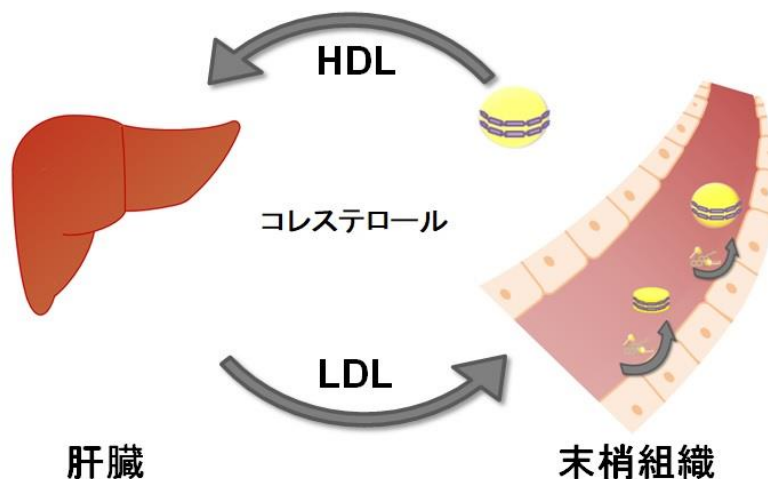


Fig.1 HDL を介したコレステロール逆輸送の概略図

末梢組織のコレステロールは血中の HDL により肝臓まで輸送される。肝臓でコレステロールは一部代謝されるが、コレステロールは新たに末梢組織へ LDL によって輸送される。

アポリポタンパク質は構造や機能により A~E にクラス分けされている(12)。その中でも肝臓や小腸で合成されるアポリポタンパク質(apo)A-I は、HDL の主要な構成タンパク質であり、コレステロール逆輸送経路など脂質代謝において重要なタンパク質である(12)。ApoA-I は両親媒性であるため脂質との親和性が高く、末梢組織において脂質輸送体(ABCA1、ABCG1)を介した脂質化を受け HDL となる(2)。血しょう中の apoA-I は lipid-free, lipid-poor, lipid-bound と呼ばれる形態をとっており、lipid-free/poor な apoA-I が脂質を受け取る能力が高い。ApoA-I は血中で 10-15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高濃度で存在し、半減期は 4 日間である(13-14)。ApoA-I の C 末側のドメインは特に脂質との親和性が高く、この C 末ドメインがないと新生 HDL の産生能が大きく下がる(39)。また、N 末側のドメインも脂質のクリアランスに関わっており、N 末ドメインがない apoA-I は脂質の引き抜き能力が低下する(40)。しかしながら、ApoA-I が脂質化を受けて HDL を形成するメカニズムは明らかになっていない。

HDL 形成に関与する脂質輸送体(ABCA1、ABCG1)はいずれも ATP-binding cassette (ABC) タンパク質ファミリーに属する。ABC タンパク質は、バクテリアからヒトに至るまで幅広く存在している輸送型の膜タンパク質である。ABC タンパク質はよく保存された ATP 結合ドメインと膜貫通ドメインを有しており、細胞内の ATP を利用して物質を選択的に細胞外に輸送している。ヒトには 48 種類の ABC タンパク質遺伝子が存在し、ATP 結合ドメインのアミノ酸配列の相同性から A~G のサブファミリーに分類されている(3-4)。ABC タンパク質は一部のサブファミリーを除いて ATP 結合ドメインと膜貫通ドメインという共通したドメインを有している。その中で ABCA サブファミリーに属する ABCA1 は共通する 2 つのドメインに加えて、細胞外に固有のドメインを持ち、血中の HDL が消失する疾患であるタンジール病の原因遺伝子として同定された (5-8)。ABCA1 はマクロファージを含む末梢組織に広く発現しており、過剰に蓄積したコレステロールを血中のアポリポタンパク質に対して排出して HDL を産生することで、過剰なコレステロールを肝臓に送り戻す役割を担っている(9-11)。このように生理的に重要な ABCA1 であるにも関わらず、詳細な HDL 産生の分子機構は明らかになっていない。

ABCA1 は 6 つの膜貫通ドメイン(TMD)とそれに続くヌクレオチド結合ドメイン(NBD) からなる構造が 2 回繰り返された構造をもつ。ABCA1 は 2 つの大きな特徴的な細胞外領域(extracellular domain; ECD)をもち、1 つは TM1 と TM2 の間、もう 1 つは TM7 と TM8 の間に存在する(22-25)。ECDs は 900 以上のアミノ酸残基からなり、ABCA1 分子のおよそ半分

を占める。ECDsの間には2つの分子内ジスルフィド結合が存在し、この結合は apoA-I の結合と HDL の産生にとって重要であることが知られている(26)。また、ABCA1 の ECD は輸送された脂質の受け皿となるアポリポタンパク質と相互作用部位し、HDL 形成に重要な役割を果たす(15)。

先行研究において、ABCA1 発現細胞が ABCA1 の ATP 加水分解依存的に apoA-I と結合し、HDL を産生することが明らかにされている(21)。また、ABCA1 の ECD にはコレステロールやリン脂質が蓄積されることも報告されている。HDL 形成の最初期反応については、「ABCA1 が作り出す細胞表面の特殊な脂質構造から apoA-I が脂質を引き抜くとする間接的な脂質輸送機構」(16-17)と「ABCA1 が apoA-I に直接脂質を受け渡す直接的な輸送機構」(18-19)が提唱されており(Fig.2)、ABCA1 を介した HDL 産生機構は統一した見解が得られていない(20)。

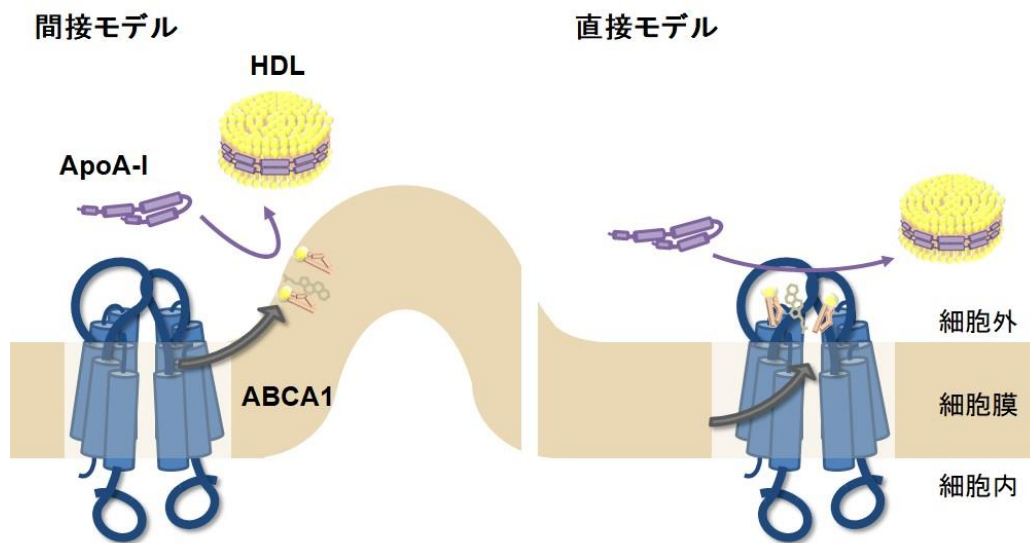


Fig.2 提唱されている2つのHDL産生モデル図

(左図) 間接モデル：ABCA1 は細胞膜中のリン脂質やコレステロールを輸送することで近傍に曲率の高い特殊な脂質ドメインを形成する。ApoA-I は脂質ドメインから脂質を引き抜くことで HDL を形成する。(右図) 直接モデル：ABCA1 は細胞膜中のリン脂質やコレステロールを細胞外ドメインに一時的に蓄積する。ApoA-I は ECD に蓄積した脂質を受け取ることで HDL を形成する。

本研究では「ABCA1 は apoA-I と直接結合する特定の領域を有する」ことを明らかにするため、ABCA1 と apoA-I の相互作用を、光反応官能基ラベルされた apoA-I を用いて ABCA1 と apoA-I のクロスリンク実験、および結合部位の解析により ABCA1 上の結合部位を同定した。また、結合部位の解析のために、高純度で機能的な ABCA1 を精製できる手法も合わせて条件検討した。次いで、ABCA1 との結合に必要な apoA-I の結合領域の解析を、apoA-I の N 末側のドメインと C 末ドメインに着目し、両端からドメインを欠損させた apoA-I を用いた生化学的な手法によって解析し、分子メカニズムの解明に迫った。

材料と方法

材料

Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Reagent は Thermo Fisher Scientific 社から購入した。FreeStyle293-F 細胞、FreeStyle293 Expression Medium は Invitrogen 社から購入した。ポリエチレンイミン(PEI MAX)は Polyscience 社から購入した。抗 FLAG-M2 アフィニティゲル, 1x FLAG peptide, 3x FLAG peptide は Sigma から購入した。CHAPS は同仁化学研究所から購入した。抗 ABCA1-ECD1 ポリクローナル抗体は、ヒト ECD1 の S41-S639 をパラレルヘリックスを融合した分泌タンパク質(29)として FreeStyle293-F 細胞に発現させて精製したものを免疫抗原としてウサギで作製した(MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO)。

タンパク質発現用プラスミド

ヒト ABCA1 の cDNA を pEGFP-N3 ベクターに挿入した。cDNA の 3'末端は、終止コドンを除き、TEV プロテアーゼ認識配列(ENLYFQG)、10His、3xFLAG(DYKDDDDK DYKDDDDK DYKDDDDK)、GFP、終止コドンを、リンカーを挟みながら順に配置した(5'-TCTAGAGGATC CCCGGCGGAAAACCTTGTACTTCCAAGGTCATCACCATCACCATCACCATCACCATCACGG GCGCCGCGGGAACAAGCGACTACAAAGACGACGACGACAAGGACTACAAAGACGACGA CGACAAGGACTACAAAGACGACGACGACAAGCCGGGATCCATCGCCACC ~ GFP ~ TAA-3')。また、207-208 番目のアミノ酸部位に HA タグ(YPYDVPDYA)、1272-1273 番目のアミノ酸部位にスロンビン切断サイト:THR(VPRGS)をそれぞれ挿入した。以下、このコンストラクトを ABCA1-THR-GFP と表記する。

細胞培養

ABCA1-GFP を安定発現する HEK293 細胞(19)、HEK293 細胞は、10 % FBS を含む DMEM 培地中で、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。浮遊細胞培養に馴化された HEK293 系細胞である FreeStyle293-F 細胞は、エルレンマイヤーフラスコ(CORNING 社) またはスピナーフラスコ(Bellco Glass 社)を用いて FreeStyle293 Expression Medium 中で、125 rpm, 37°C, 8% CO₂ 条件下で培養した。この細胞は、細胞密度が 0.5 x 10⁶ cells/ml ~ 2.0 x 10⁶ cells/ml となるよう

に維持した。

遺伝子導入

あらかじめ対数増殖期に入り、100 mm ディッシュに接着している HEK293 細胞に発現用プラスミドを Lipofectamine LTX(インビトロジェン)の標準プロトコルに従い遺伝子導入し、37°C, 5% CO₂ 条件下で 48 時間培養した。一方、浮遊細胞の場合は、対数増殖期にある FreeStyle293-F 細胞(細胞密度; 1.0 x 10⁶ cells/ml)に遺伝子導入を行った。発現用プラスミドと PEI MAX は Opti-MEM (Invitrogen 社)中で希釈および混合し、発現用プラスミドと PEI-MAX の終濃度がそれぞれ 1 µg/ml、5 µg/ml となるように細胞培養液に加え、125 rpm, 37°C, 8% CO₂ 条件下で 48 時間培養した(30)。

apoA-I の精製・sulfo-SBED 標識

N 末端に 6 ヒスチジンタグを付加したヒト apoA-I は pET15b ベクターにサブクローニングし、BL21 (DE3)大腸菌を用いて発現、精製した(31)。タンパク質の発現は 1 mM IPTG によって誘導し、IPTG 添加後 37°C, 5 時間培養した。大腸菌ペレットは、1%トリトン X-100 を含むリン酸緩衝液(20 mM リン酸: Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, pH 7.2)で超音波破碎した後(出力 7, 5 秒 ON, 30 秒 OFF の 24 サイクル, Misonix Inc.)、終濃度 6M 尿素を加えて氷上に 1 時間静置により apoA-I を変性・脱脂処理し、4°C, 30,000 g, 30 分間の遠心で夾雑物を除去した。この大腸菌破碎上清に、Ni-NTA agarose beads (QIAGEN)を加えて 4°Cで一晩転倒混和することによって apoA-I を結合させ、結合したタンパク質を 400 mM イミダゾールで溶出した。得られた apoA-I 溶液のタンパク質巻き戻し処理と溶媒交換のため、MWCO 3,500 Da の透析膜(Thermo Fisher Scientific)を用いて PBS(-)(7.8 mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl)に対して 3 日間透析を行った。精製した apoA-I と同質量の Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Reagent を暗所、室温、2 時間反応させた。反応は 0.1 M Tris で停止させ、PD-10 カラム(GE)を用いて溶媒を PBS(-)に置換した。

コレステロール排出活性測定

ABCA1-GFP を安定発現する HEK293 細胞をポリ L リジンコートされた 6 well プレートに 1.0 x 10⁶ cells の密度で播種した。24 時間後、0.02% BSA, 10 µg/mL apoA-I または 10 µg/mL sulfo-SBED apoA-I を含む DMEM 培地中で、37°C, 5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。培養

上清は反応溶液(0.15 mM Amplex red, 0.02% BSA, 1 U/mL HRP, 1 U/mL cholesterol oxidase)と混合し、37°C, 30 分間反応後、励起/蛍光波長=560 nm/610 nm で測定し、コレステロール量を定量した(32)。apoA-I 濃度依存的な実験データは、18)。実験データは、以下に示すミカエリス-メンテン式に回帰させた。 $v = V_{Amax}[S] / (K_m + [S]) + V_0$ ここで、 V_0 は基底状態のコレステロール排出活性、 V_{Amax} は apoA-I 依存的な最大のコレステロール排出活性、 $[S]$ は apoA-I 濃度を表す。適合はカレイダグラフソフトウェアを用いて行い、 V_0, V_{Amax}, K_m の値を抽出した。 V_{max} は、 V_0 と V_{Amax} の和で表した。

apoA-I 結合アッセイ

HEK293 細胞または ABCA1, ABCA1(MM)を発現する HEK293 細胞をポリ L リジンコートされたガラスボトムディッシュに播種し、0.02% BSA, 10 μ g/mL Alexa647 標識 apoA-I を含む DMEM 培地中で、37°C, 5% CO₂ 条件下で 10 分培養した。細胞を PBS(-)で洗浄、4%パラホルムアルデヒドで室温、30 分間固定後、EGFP と Alexa647 のフィルターセットを用いて顕微鏡で観察した[LSM700 with a Plan-Apochromat 63 \times /1.4 NA oil immersion objective lens; (Carl Zeiss)]。

光反応クロスリンク

あらかじめ対数増殖期に入った ABCA1-THR-GFP を一過的に発現した FreeStyle293-F 細胞を 2.0×10^7 cells/dish となるようにポリ L リジンコートされた 150 mm ディッシュに培養しておき、PEI MAX を用いて発現プラスミドを遺伝子導入した。48 時間の培養後、0.02% BSA, 10 μ g/mL sulfo-SBED 標識 apoA-I を含む DMEM 培地中で 37°C, 5% CO₂ 条件下で 10 分反応させ、すぐに室温、30 分間、368 nm 紫外線照射 (Ushio Blacklight Blue F15T8BLB, 出力 5.2 W, 高さ 10 cm)を行った。細胞は回収後に氷上 30 分間 10 mM DTT 処理を行うことでビオチンラベルのみをタンパク質上に残した。

ABCA1 膜画分の調製

細胞を等張緩衝液(10 mM HEPES pH7.4, 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1% プロテアーゼインヒビターカクテル)で懸濁後、窒素ガスキャビテーションによって細胞を破碎、20,000 g, 60 分間の遠心によって膜画分を回収した。

ウエスタンブロット・銀染色

細胞を 0.1% プロテアーゼインヒビターカクテル(Roche)を含む RIPA バッファー(20 mM トリス-HCl(pH7.5), 1%トリトン X-100, 0.1% SDS, 1%デオキシコール酸ナトリウム)で溶解した。サンプルを 10-20% グラジエントアクリルアミドゲル(ATTO)を用いて SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜に転写後、抗 HA モノクローナル抗体 F-7(Santa Cruz)、ストレプトアビジン HRP(Abcam)、抗 FLAG-M2 抗体(Sigma)、抗 ABCA1-ECD1 ポリクローナル抗体で検出した。また SDS-PAGE で分離後のゲルを、銀染色 II キット ワコー(和光純薬工業)を用いて銀染色を行った。

蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー解析

ABCA1-THR-GFP を発現した FreeStyle293-F 細胞を懸濁バッファー(50 mM Tris pH7.4, 0.15M NaCl, 10% glycerol, and 0.1%プロテアーゼインヒビターカクテル)に懸濁し、終濃度 1%となるように各種界面活性剤:[n-dodecyl- β -D-maltoside (DDM), Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG), 7-cyclohexyl-1-hexyl- β -D-maltoside (CYMAL7), Fos-choline-14 (FC14), Octaethylene Glycol Monododecyl Ether (C₁₂E₈), lauryldimethylamine-N-oxide (LDAO), TritonX-100, Tween20, 2% 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propane sulfonate (CHAPS), Digitonin, n-octyl- β -D-glucoside (OG) (Avanti polar lipid)]を加えて、4°C 一晩静置した。その後、これらの可溶化した細胞を 0.03% C12E8 を含む懸濁バッファーを移動相として Superose 6 12/300 GL(GE)を用いて分離した。

ビオチン化 ABCA1 の精製

ApoA-I をクロスリンクさせた細胞ペレットに 18 mM CHAPS を含む buffer A(50 mM HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% glycerol, and 0.1%プロテアーゼインヒビターカクテル)に懸濁し、4°C, で 45 分間、転倒混和した。不溶画分は 4°C, 10,000 g, 10 分間の遠心によって除いた。可溶画分に平衡化済みの抗 FLAG-M2 アフィニティゲルを加え、4°C, 16 時間転倒混和した。ゲルは 18 mM CHAPS および 10 mM CHAPS を含む buffer A で洗浄後、10 mM CHAPS, 150 μ g/mL 1 \times FLAG peptide, 150 μ g/mL 3 \times FLAG peptide を含む buffer A で溶出し、

0.22 μm のフィルターを過後に MWCO 50 kDa のアミコン(ミリポア)で濃縮して -80°C で保存した。

ABCA1 の脂質二重膜(リポソーム)への再構成

クロロホルムに溶解した 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC), cholesterol, 1-Palmitoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol(POPG)(Avanti polar lipid)をガラスチューブに採り、クロロホルムを減圧により蒸発させた後、反応バッファー[20 mM HEPES (pH7.4), 0.1 M NaCl]に終濃度約 2- 10 mg/mL になるように懸濁した。懸濁液をバスソニケーターで超音波処理、窒素ガス封入後、暗所で 4°C で保存しリポソームとした。1 μg の精製 ABCA1 を 100 μg のリポソームと混合し、混合溶液を 4°C で 20 分間静置し、9 倍量の反応バッファーによって希釈して ABCA1 を再構成させた。

MSP1E1 発現用プラスミド

pET15b ベクターに挿入した N 末端に 6 ヒスチジンタグを付加した apoA-I の 1-43 番目のアミノ酸を欠損させ、99-120 番目のアミノ酸(ヘリックス 4)を 120-121 番目の部位に追加挿入したものを MSP1E1 とした(31)。

MSP1E1 の精製

ApoA-I を BL21(DE3)で発現させた条件と同様に、MSP1E1 を BL21(DE3)で発現し、Ni-NTA アガロースゲルによって精製した。巻き戻し処理と溶媒交換のため PBS(-)に対して透析を行った。

ABCA1 のナノディスクへの再構成

クロロホルムに溶解した 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DOPC)や cholesterol などの脂質(Avanti polar lipid)をチューブに採り、クロロホルムを減圧蒸発させた後、50 μL のディスク形成バッファー[20 mM HEPES (pH7.4), 0.1 M NaCl, 4% CHAPS]に終濃度 4.8 mg/mL になるように懸濁した。50 μL の 1.2 mg/mL 精製 ABCA, 100 μL の 1.2 mg/mL 精製 MSP1E1 を加え、 4°C , 1 時間転倒混和した。再構成溶液から界面活性剤を除去することで自発的会合によるナノディスク形成を行うため、あらかじめ 70%エタノールで親水化およびディスク形

成バッファーによる平衡化を十分行った 120 mg の Biobeads SM2(Biorad)に ABCA1/脂質溶液を加えて、4°C で 4 時間、転倒混和して界面活性剤を除去し、ナノディスクに ABCA1 を再構成した。

ATP 加水分解活性の測定

プロテオリポソームまたは再構成したナノディスクに、終濃度 3 mM ATP, 5mM MgCl₂ を添加して 37°C, 30 分間反応させた。反応後、氷上に移し終濃度 5 mM となるように EDTA を添加した。ATP 加水分解活性は、Titansphere TiO カラム(GL サイエンス)を用いて ADP を HPLC によって分離して定量した(30)。

ABCA1 のスロンビン切断

0.3 µg の精製したビオチン化 ABCA1 に対して終濃度 10 mM DTT と 1 ユニットのスロンビン(GE)を添加して 28°C, 16 時間反応させた。

ABCA1 の限定分解・断片の免疫沈降

精製したビオチン化 ABCA1 を 10 mM DTT で 37°C で 20 分間還元、40 mM NEM で 37°C, 40 分間アルキル化した後、lysylendopeptidase (Lys-C), endoproteinase Asp-N, endoproteinase Glu-C を ABCA1/ペプチダーゼの質量比を 1/2000, 1/200, 1/20 として 37°C, 16 時間処理した。反応後、SDS と 2-ME を添加して反応と停止、tricine/SDS-PAGE (16.5%T/6%C)によってペプチド断片を分離した(33)。分離後の断片は Tris-Tricine バッファー(0.1 M Tris, 0.1 M Tricine, and 0.1 % SDS, pH 8.3)に浸して、ゲル片からバイオマッシャーでペプチド断片を抽出した。また、ペプチダーゼ処理後の ABCA1 断片の中からビオチン化断片を抽出するために、pAPMSF でペプチダーゼ反応を停止させ、モノメリックアビジンアガロース(Sigma)を用いてビオチン化ペプチド断片をプルダウンした。

変異体 apoA-I 発現用プラスミド

pET15b ベクターに挿入した N 末端に 6 ヒスチジンタグを付加した apoA-I の 190-243, 165-243, 143-243, 121-243, 99-243, 1-43, 44-65, 44-87, 44-98 番目のアミノ酸を欠損させた。

apoA-I の精製・標識

N 末端に 6 ヒスチジンタグを付加した種々の変異体 apoA-I は前述の apoA-I の精製方法と同じ手法を用いた。精製した種々の変異体 apoA-I と同質量の Alexa647-NHS(インビトロジェン)を暗所, 室温, 2 時間反応させた。反応は 0.1 M Tris で停止させ、PD-10 カラム(GE)を用いて溶媒を PBS(-)に置換した。

統計解析

値は平均値±標準偏差で示した。統計的有意差は対応のない t 検定によって検出した。

結果

ABCA1 における apoA-I 結合領域の同定

光反応官能基ラベルされた apoA-I の機能解析

先行研究により、ABCA1 は ATP 依存的に apoA-I と直接結合すること (44)、ECD は ABCA1 による ATP 加水分解に応じて構造変化し、この構造変化は apoA-I 結合と関連することが報告されている(19)。また、化学的架橋剤によって apoA-I と ABCA1 は架橋されるが、ABCA1 の ATP 加水分解活性欠損変異体は apoA-I と結合せず、化学的架橋もかからない(16, 23, 25, 27)。このように、ABCA1 と apoA-I が直接結合することを示唆する報告が多くあるものの、その具体的な領域に関しては明らかにされていない。本研究では、ABCA1 の apoA-I 相互作用部位を特異的に標識することで apoA-I の結合部位の解析を行った。

ABCA1 における apoA-I 結合領域を標識するため、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官能基(sulfo-SBED Biotin Label Transfer Reagent)を用いた。Sulfo-SBED はタンパク質の一級アミンと反応する N-ヒドロキシエステル(NHS) 基と光反応によってペプチドと共有結合を生じるアリルアジド基を持つ(Fig.3)。アリルアジド基にはビオチンが付加されており、NHS 基とアリルアジド基はジスルフィド結合で連結されているため、還元処理によりビオチンのみを目的タンパク質に残留させることができる。本研究では sulfo-SBED 標識された apoA-I を用いて ABCA1 上の apoA-I 相互作用領域を特異的にビオチン化する技術の構築を行った。精製ヒト apoA-I と Sulfo-SBED を混合し、apoA-I の一級アミンと NHS 基を反応させ、sulfo-SBED 標識 apoA-I を作製した。sulfo-SBED 標識された apoA-I が脂質受容体として機能的であるかを確認するため、標識 apoA-I に対する ABCA1 発現細胞からのコレステロール排出活性を評価した。ABCA1-GFP を安定発現する HEK293 細胞(19)に標識 apoA-I および未標識 apoA-I を添加し、培地中に排出されたコレステロールを定量した(Fig.4a)。その結果、標識 apoA-I に対しても濃度依存的にコレステロールが排出され、その活性は未標識 apoA-I に対する排出活性とほぼ同等であることが確認された。排出活性をミカエリス式にフィッティングし、 K_M と V_{MAX} を求めたところ、標識 apoA-I に対しては K_M : 1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (50 nM)、 V_{MAX} : 70 ng/mg protein と算出された。これは未標識 apoA-I に対して算出された値(K_M : 0.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (35 nM)、 V_{MAX} : 79 ng/mg protein)とほぼ同等であった。また、対照として用いた ABCA1 非発現細胞からのコレステロール排出は検出されなかった。

以上の結果から標識 apoA-I は非標識 apoA-I と同等に脂質受容体として機能する事が確認された。

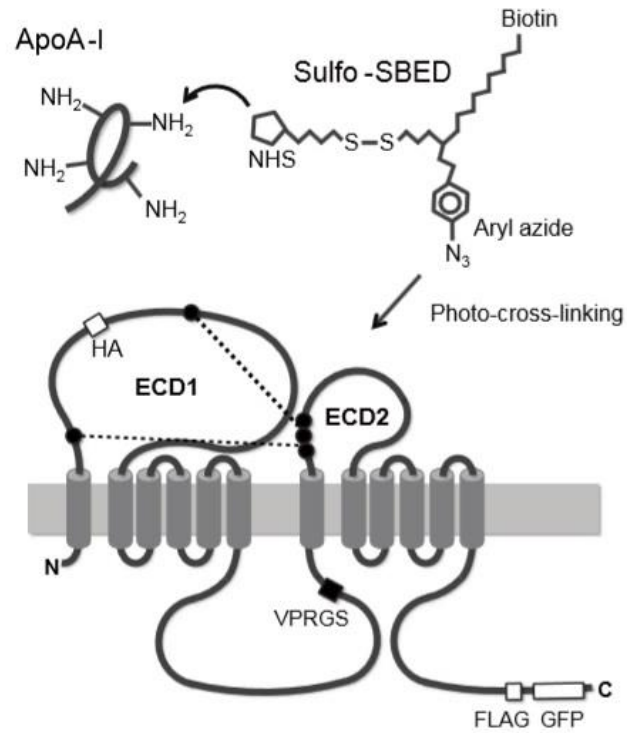


Fig.3 光架橋反応による apoA-I と ABCA1 の結合領域同定手法の概略図.

Sulfo-SBED を apoA-I へ標識する反応を上部に示した。Sulfo-SBED 標識 apoA-I を ABCA1 発現細胞へ結合させ、光反応によって apoA-I と ABCA1 を架橋する反応を下部に示した。下部の ABCA1 の 1 次構造には、207 番目に HA タグ・1272 番目にスロニン切断サイト(VPRGS 配列)・C 末端に FLAG タグおよび GFP(緑色蛍光タンパク質)タグを示した。

標識 apoA-I の ABCA1 発現細胞への特異的な結合活性

続いて、ABCA1 発現細胞への apoA-I の結合に対する sulfo-SBED 標識の影響を評価した。HEK293 細胞に野生型 ABCA1-THR-GFP と 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) -THR-GFP をそれぞれ一過性に発現させた HEK293 細胞を用い、これらの細胞に Alexa647 標識 apoA-I と sulfo-SBED 標識 apoA-I を添加し、結合を観察した。その結果、Alexa647 標識 apoA-I は野生型 ABCA1 発現細胞に結合し、コントロール細胞・ABCA1(MM)発現細胞には結合しないことが分かった。ABCA1 発現細胞に Alexa647 標識 apoA-I を結合させる際、5 倍量(モル比)の sulfo-SBED 標識 apoA-I を加えたところ、Alexa647 標識 apoA-I の ABCA1 発現細胞への結合が抑制された (Fig.4b)。この結果は、sulfo-SBED 標識 apoA-I が apoA-I と競合して ABCA1 発現細胞に結合していることを示している。以上の結果から、sulfo-SBED 標識は apoA-I の機能に影響を与えることはなく、未標識 apoA-I と sulfo-SBED 標識 apoA-I の ABCA1 における結合部位が同じであることが示された。

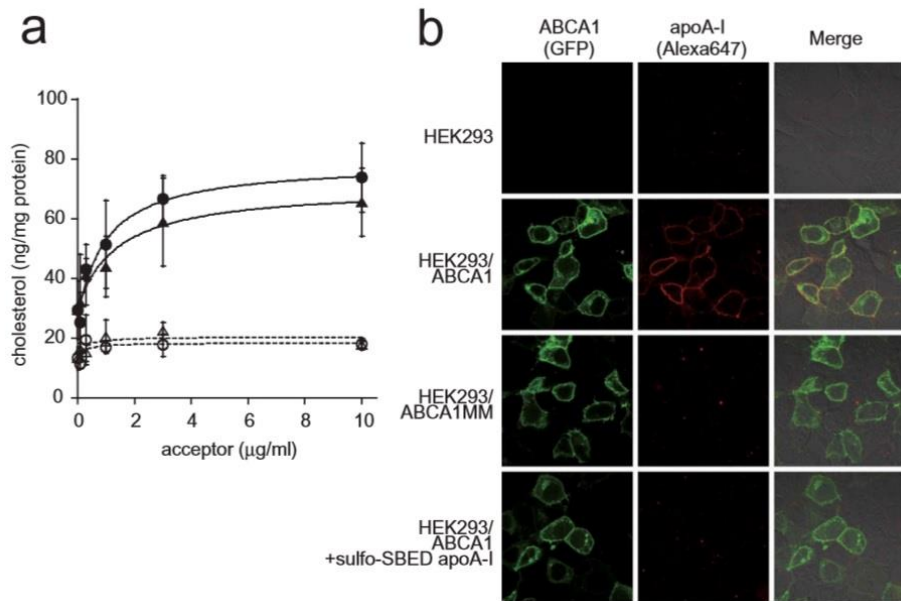


Fig.4 sulfo-SBED 標識 apoA-I の機能解析

(a)apoA-I を介したコレステロール排出活性 : ABCA1-GFP 安定発現 HEK293 細胞(黒塗り)、コントロール HEK293 細胞(白塗り)、未標識 apoA-I(丸)、sulfo-SBED 標識 apoA-I(三角)。実験は 3 連で行い、値は平均値 \pm 標準偏差で示した。(b)Alexa647 標識 apoA-I の ABCA1 発現細胞への結合活性: 10 $\mu\text{g/mL}$ の Alexa647 標識 apoA-I を野生型 ABCA1 または ABCA1(MM)変異体を一過性に発現した HEK293 細胞に結合させた。競合阻害のためには、50 $\mu\text{g/mL}$ の sulfo-SBED 標識 apoA-I を添加した。

Sulfo-SBED 標識 apoA-I による ABCA1 の標識

ABCA1-THR-GFP と ABCA1(MM)-THR-GFP を発現させた FreeStyle293-F 細胞を sulfo-SBED 標識 apoA-I と結合させ、光反応によって架橋させた。ApoA-I を細胞表面に結合させたままでは ABCA1 が可溶化できなかつたことから(データ非記載)、還元処理によって apoA-I を解離させてビオチンラベルのみをクロスリンクしたタンパクに残留させた。細胞表面上のタンパク質にビオチンラベルのみが架橋されている細胞から膜画分を調製し、ビオチン化されたタンパク質をウエスタンブロットによって検出した。HA によって検出された ABCA1(Fig.5a)と同一の泳動度の位置に、ビオチン化されたタンパク質が検出され、このバンドは ABCA1(MM)の膜画分には認められなかつた(Fig.5b)。この結果から、細胞表面上の機能的な ABCA1 に apoA-I が結合したことが示唆された。しかしながら、ABCA1 以外にも約 250kDa、130 kDa・70 kDa 付近に強いビオチンのシグナルが検出された。これらのシグナルは ABCA1 非発現細胞でも見られることから、細胞膜表面のタンパク質が ABCA1 非依存的に標識された産物であると推測された。そのため、ABCA1 のビオチン化領域を検討するためにはビオチン化された ABCA1 の精製が必要であることが判明した。

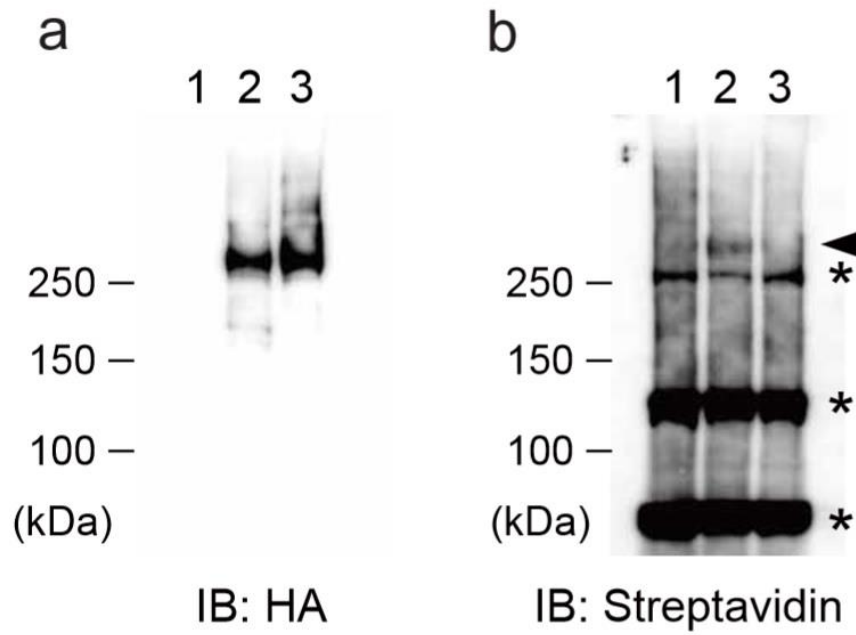


Fig.5 sulfo-SBED 標識 apoA-I と細胞表面のタンパク質のクロスリンク

Sulfo-SBED 標識 apoA-I とコントロール(親株)細胞, ABCA1-THR-GFP, ABCA1(MM)-THR-GFP を発現する FreeStyle293-F 細胞をクロスリンクし、膜画分を調製、SDS-PAGE によって分離した。(a)抗 HA 抗体で ABCA1 を検出、(b)ストレプトアビジン-HRP でビオチン化タンパク質を検出した。

ABCA1 の可溶化界面活性剤のスクリーニング

膜タンパク質である ABCA1 を機能的な状態、および高純度で精製するには界面活性剤の選抜が重要である。精製手法確立のため、まず蛍光ゲルろ過法によって界面活性剤のスクリーニングを行った(30)。蛍光ゲルろ過法は、蛍光標識した目的タンパク質をゲルろ過クロマトグラフィーによって分離することで、夾雑タンパク質が含まれる未精製の溶液中でも目的タンパク質の分子量や性状を解析できる(46)。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、GFP 蛍光ゲルろ過クロマトグラフィーによって、可溶化 ABCA1 の単分散性を評価した(Fig.6)。5 種類(DDM, LMNG, CYMAL, C₁₂E₈, CHAPS)の界面活性剤を用いて可溶化した場合に ABCA1 は界面活性剤溶液中できれいな単分散性を保持していることが確認できた。また分子量は約 560 kDa と推定された。膜タンパク質のゲルろ過クロマトグラフィーでは付着した界面活性剤によって分子量が大きめに溶出されることを考えると、ABCA1 はこれらの界面活性剤中では単量体として存在すると推測された。FC14 と tritonX-100 と用いた場合は ABCA1 の単分散性がやや不良であった。Tween20, digitonin を用いた場合は ABCA1 の可溶化効率が悪いことが示された。LDAO, OG を用いた場合は ABCA1 の単分散性が著しく不良であり、かつ凝集体も多く認められた。以上から他 6 種類の界面活性剤はきれいな単分散性を保持できない、凝集体が認められるなどの理由により精製には適していないことが示された。そこで良好な単量体構造を保持できる 5 種類の界面活性剤を用いて ABCA1 を精製した(Fig.7)。

精製 ABCA1 の ATP 加水分解活性

次いで、前述の 5 種類の界面活性剤を用いて精製した ABCA1 を人工脂質 2 重膜であるリポソームに再構成し、ABCA1 の ATP 加水分解活性の測定により各精製標品が機能的な構造を保持しているかを評価した。CHAPS または LMNG を用いて精製した ABCA1 は他の界面活性剤で精製した標品よりも高い ATP 加水分解活性を保持していた(Fig.8)。この結果から、CHAPS または LMNG を用いることでより機能的な ABCA1 が精製できることが明らかとなった。CHAPS はミセルサイズが小さいため実験的に除去しやすいこと、LMNG に比べて安価であったことから、本研究では CHAPS を以降の実験に用いた。CHAPS で精製した ABCA1 の機能性を確かめるため、ABCA1 の輸送基質ではないと考えられる POPG を土台として、ABCA1 の輸送基質と考えられているコレステロールを 0-60% (モル比)含むナノディスクに

ABCA1 を再構成し、コレステロールへの応答性を解析した。その結果、10-40%のコレステロール存在下で ABCA1 は活性化することが示された(Fig.9)。40%以上のコレステロール濃度はナノディスク上の ABCA1 の ATP 加水分解活性は抑制された。また、リン酸アナログであり ATP 加水分解後の ADP の解離を阻害するフッ化ベリリウムを ATP 加水分解活性阻害剤として用いた。ABCA1 を再構成したナノディスクに対してフッ化ベリリウムを添加するとコレステロール依存的な ABCA1 の活性は阻害され、ABCA1 が再構成されていない空のナノディスクと同等であった。以上から、CHAPS で ABCA1 を可溶化することで、機能を損なうことなく精製 ABCA1 を取得できることが明らかになった。

ビオチン化 ABCA1 の精製

ABCA1-THR-GFP を発現させた FreeStyle293-F 細胞を sulfo-SBED 標識 apoA-I と結合させ、光反応によって架橋させた。細胞を DTT 処理し、細胞表面上のタンパク質にビオチンラベルのみが架橋されている細胞を CHAPS を用いて可溶化、抗 FLAG-M2 抗体アフィニティゲルでビオチン化 ABCA1 を精製した。また、ABCA1 が特異的にビオチン化を受けていることを確認するために、sulfo-SBED 標識 apoA-I と ABCA1 発現細胞を結合させる際に 5 倍量の未標識 apoA-I を添加して同様に ABCA1 を精製した。精製した ABCA1 は SDS-PAGE によって分離後、銀染色によって高純度であること確認し(Fig.10a)、ABCA1 であることを抗 FLAG- M2 抗体によって検出した(Fig.10b)。さらに精製標品のビオチン化をストレプトアビジン-HRP によって確認した(Fig.10c)。過剰の未標識 apoA-I を添加し、架橋した細胞から精製した ABCA1 のビオチン化は抑制されていた(Fig.10c)、このことは、sulfo-SBED 標識 apoA-I が ABCA1 特異的に結合してビオチン化していること、(Fig.4b)と同様に sulfo-SBED 標識 apoA-I と未標識 apoA-I が ABCA1 の同一の結合部位に結合していることを示している。以上から、ビオチン化された ABCA1 を精製可能であることを示した。

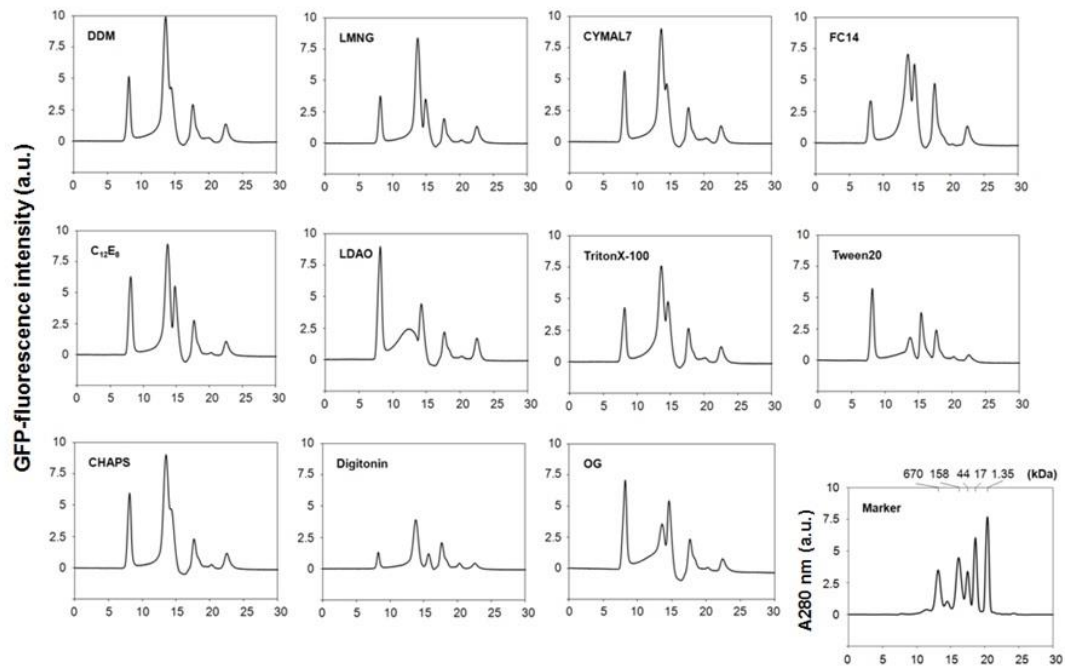


Fig.6 11種の界面活性剤による ABCA1 の可溶化プロファイル

ABCA1-THR-GFP を発現した FreeStyle293-F 細胞を終濃度 1%となる各種界面活性剤(DDM, LMNG, CYMAL7, FC14, C₁₂E₈, LDAO, TritonX-100, Tween20, CHAPS, Digitonin, OG)で可溶化、蛍光ゲルろ過クロマトグラフィーで ABCA1 のピークの分散性を確認した。マーカーは gel filtration standard(Biorad)を使用した。

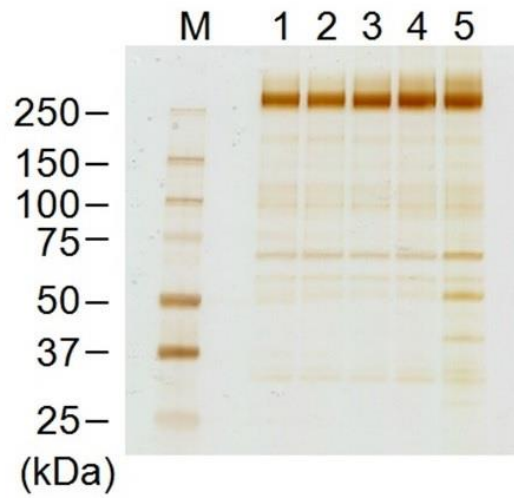


Fig.7 5種の界面活性剤を用いて精製した ABCA1 の銀染色像

5種類(1. DDM, 2. LMNG, 3. CYMAL, 4. C₁₂E₈, 5. CHAPS)の界面活性剤を用いて精製した ABCA1 を SDS-PAGE により分離後、ゲルを銀染色した。

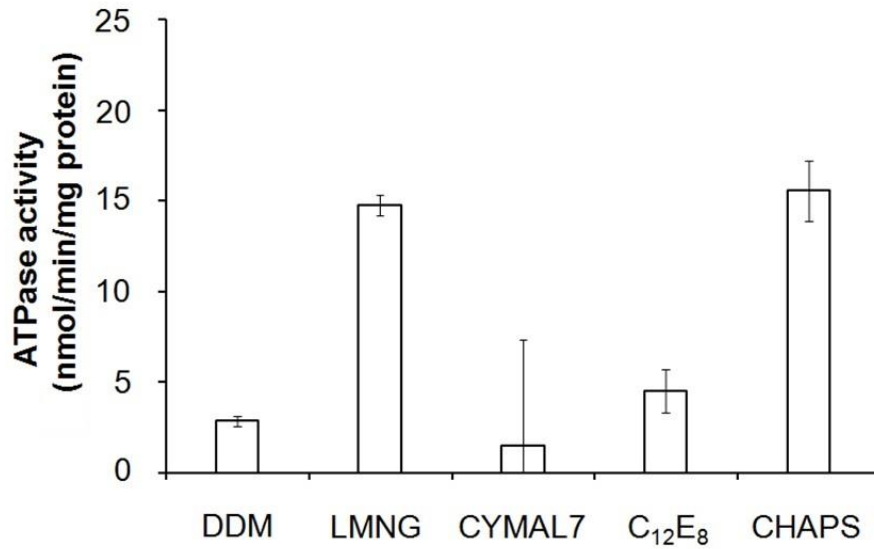


Fig.8 5種の界面活性剤を用いて精製した ABCA1 の ATP 加水分解活性

5種類の界面活性剤を用いて精製した ABCA1 を DOPC のリポソームに再構成して ATP 加水分解活性を測定した。実験は3連で行い、値は平均値±標準偏差で示した。

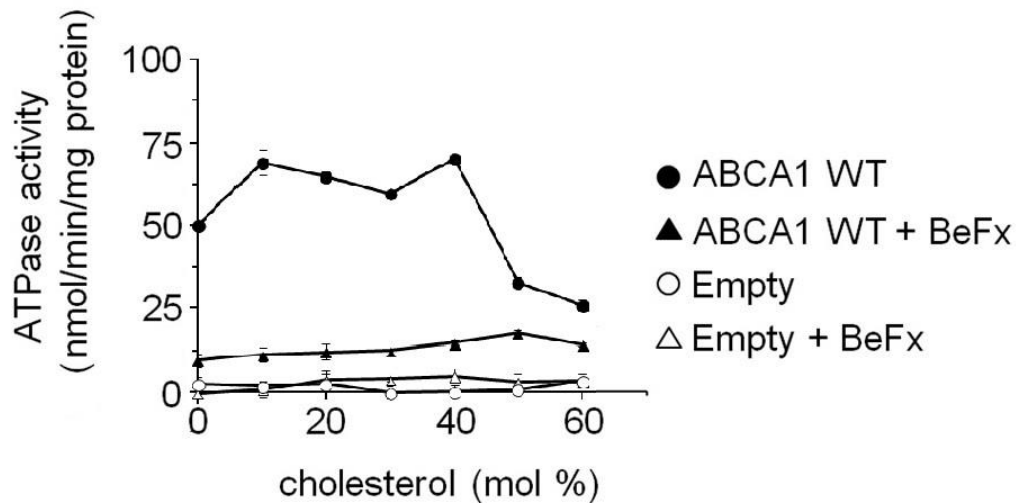


Fig.9 精製 ABCA1 のコレステロール依存的な ATP 加水分解活性

CHAPS を用いて精製した野生型 ABCA1 を DOPG/0-60%(mol) コレステロールのナノディスクに再構成して ATP 加水分解活性を測定した、コントロールとして ABCA1 を再構成していない空ナノディスク、ATPase 特異的阻害剤フッ化ベリリウムフロライド(BeFx)を 1 mM 添加した。実験は3連で行い、値は平均値±標準偏差で示した。

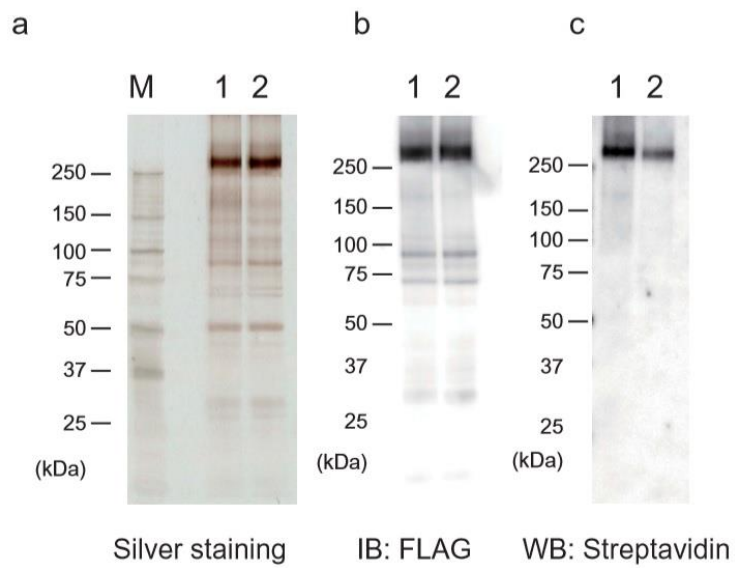


Fig.10 ビオチン化 ABCA1 の精製

Sulfo-SBED 標識 apoA-I によってビオチン化した ABCA1 を精製し、SDS-PAGE によって分離後銀染色(a)、抗 FLAG-M2 抗体によって ABCA1 を検出した(b)。さらにストレプトアビジン-HRP で精製標品のビオチン化量を検出した(c)。レーン1: Sulfo-SBED 標識 apoA-I を用いてビオチン化した ABCA1、レーン2: Sulfo-SBED 標識 apoA-I に加えて過剰な未標識 apoA-I を用いてビオチン化した ABCA1。

ApoA-I は ABCA1 の N 末側半分に結合する

ABCA1 には N 末端側、C 末端側にそれぞれ一つずつの大きな細胞外ドメイン(ECD1, ECD2)が存在する。ABCA1 はこれらのどちらかを介して用いて apoA-I と相互作用すると予想されたため、ECD1、2 のどちらがビオチン化されているかを検討した。全長 ABCA1 のほぼ半分に位置する 1272-1273 番目のアミノ酸部位にスロンビン切断サイト(Fig.1, VPRGS 配列)を導入し、精製したビオチン化 ABCA1(野生型、不活性型:MM)をスロンビンによって切断した。切断後、N 末側半分の断片を ECD1 に導入した HA タグ、C 末側半分の断片を FLAG タグでそれぞれ検出した。その結果、DTT 処理とスロンビン切断を行った条件において、N 末側半分の断片は約 160 kDa の断片として(Fig.11, 黒塗り矢頭)、C 末側半分の断片は約 140 kDa の断片として(Fig.11, 白塗り矢頭)検出され、ストレプトアビジンでビオチン化タンパク質を検出すると、N 末端側半分に一致する約 160 kDa に強いシグナルが見られ、C 末端側半分に一致する約 140 kDa にはビオチン化のシグナルがほとんど見られないことが明らかになった(Fig.11、レーン 4)。また、DTT を用いて還元処理しない場合には、バンドが高分子量側にシフトしたことから(Fig.11、レーン 3)、先行研究で確認されていたとおり、ABCA1 の N 末端側半分と C 末端側半分はジスルフィド結合によって架橋されていることが確認された。以上の結果から ABCA1 は N 末端側半分のいずれかの領域で apoA-I と相互作用することが明らかとなった。

ABCA1 のビオチン化領域の解析

続いて、ABCA1 の N 末領域中の apoA-I 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、ABCA1 の ECD1 に対する抗体との反応性により結合領域を解析した。ビオチン化 ABCA1 を 3 種類の分解酵素(Lys エンドペプチダーゼ、Asp エンドペプチダーゼ、Glu エンドペプチダーゼ)によってペプチダーゼと ABCA1 の質量比を 1:2000 から 1:20 において消化した。その結果、銀染色によってペプチダーゼの量依存的にビオチン化 ABCA1 の断片化が進んだことが検出された (Fig.12b)。ストレプトアビジンによるビオチン化断片の検出において、銀染色によって検出された断片と同一の泳動度の複数の断片がビオチン化されていた(Fig.12a)。また、ビオチン化 ABCA1 の断片化がある一定サイズのいくつかのペプチド断片に収束していることが分かった (Fig.12a, 図中の矢頭 1-6)。酵素がさらに多量である 1:20 以下の質量比(例えば 1:10)で行う

と、ABCA1 のペプチド断片がさらに細分化され(データ非掲載)、ペプチド断片の解析には適さないと考えられたため、ペプチダーゼと ABCA1 の質量比を 1:20 で固定し、ペプチダーゼ処理を行った。ビオチン化 ABCA1 を消化後、各ペプチド断片を SDS-PAGE 分離ゲルから抽出した結果、ABCA1 の ECD1 に対する抗体と反応する約 15 kDa のペプチド断片が取得できた(Fig.12c, レーン 3, レーン 5)。さらに、Glu-C を用いて消化したビオチン化 ABCA1 消化断片からアビジンビーズによって回収したペプチドに、ABCA1 の ECD1 に対する抗体と反応する約 15 kDa のペプチド断片が含まれることが明らかとなった(Fig.12d, 矢頭)。このペプチドは Fig.10b に矢頭 3 で示した断片と同一の断片であると推測され、抗 ABCA1-ECD1 抗体と反応する断片がビオチン化されていることが確認された。以上の結果から、ABCA1 の ECD1 上もしくはそのごく近傍にビオチン化された領域、すなわち apoA-I 結合領域があることが示された。

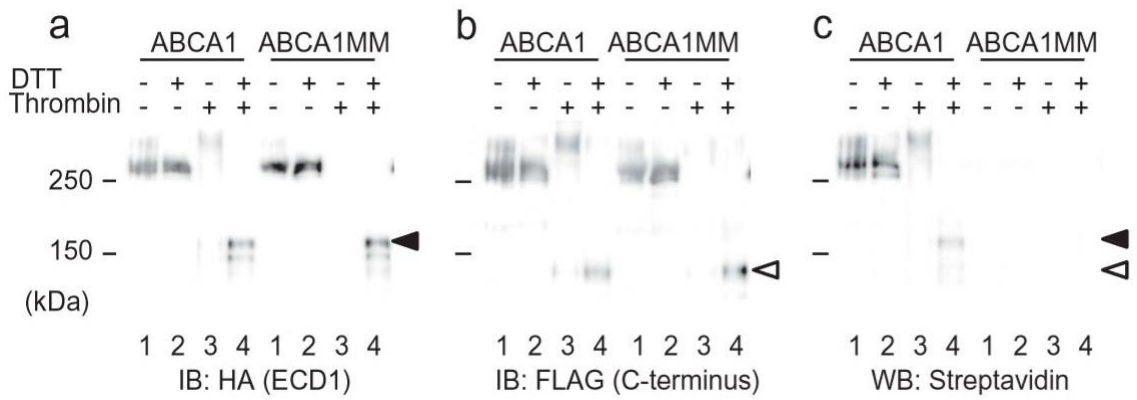


Fig.11 ビオチン化 ABCA1 のスロンビン処理

Sulfo-SBED 標識 apoA-I によってビオチン化した ABCA1 または ABCA1(MM)を精製し、スロンビン処理によって N 末側半分 1-1272 番目と C 末側半分 1273-2261 番目に切断、SDS-PAGE によって分離後抗 HA 抗体によって ABCA1 の N 末半分を検出(a)、抗 FLAG-M2 抗体によって ABCA1 の C 末半分を検出(b)、ストレプトアビジン-HRP でビオチン化を検出した(c)。

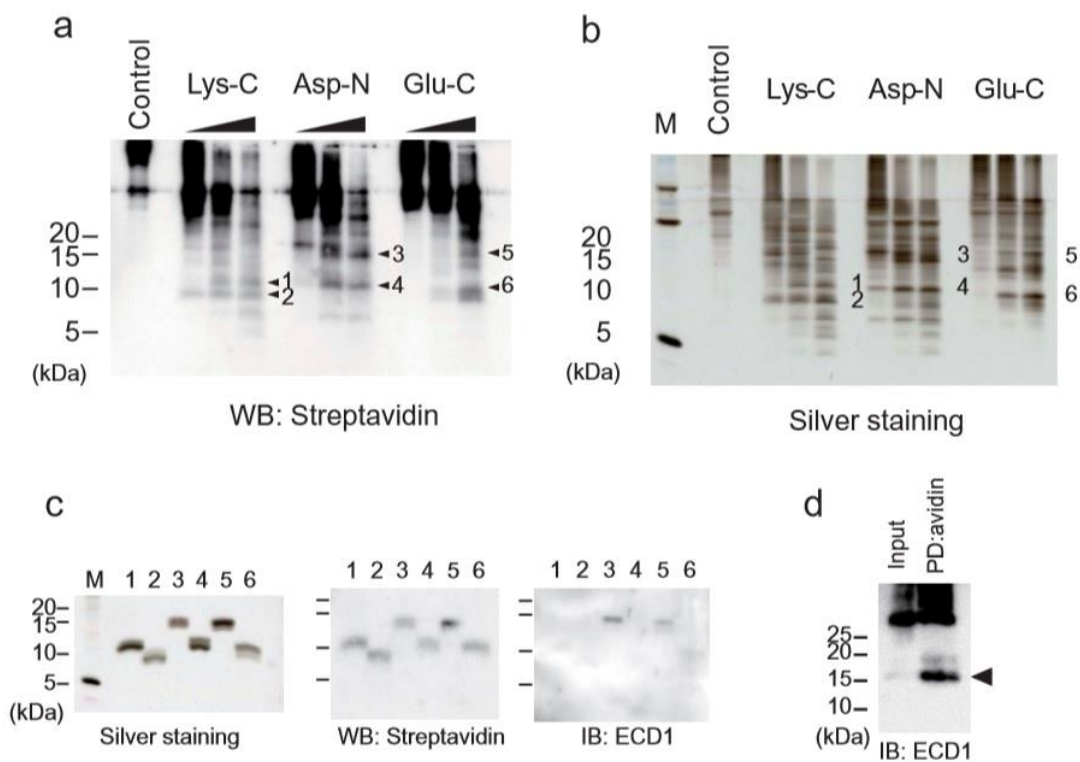


Fig.12 ビオチン化 ABCA1 のペプチド断片化

Sulfo-SBED 標識 apoA-I によってビオチン化した ABCA1 または ABCA1(MM)を精製し、Lys エンドペプチダーゼ、Asp エンドペプチダーゼ、Glu エンドペプチダーゼ処理によってそれぞれペプチド断片化した。SDS-PAGE 後にビオチン化断片をストレプトアビジン-HRP で検出(a)、銀染色によってペプチド断片を検出した(b)。(c)SDS-PAGE によって分離して得られた ABCA1 のペプチド断片のうち、(a,b)の図中に矢頭で示される断片 1-6 をゲルから抽出し、銀染色、ストレプトアビジン検出、ABCA1 の ECD1 に対する抗体を用いた検出を行った。(d)ABCA1 のペプチド断片からビオチン化断片をモノメリックアビジンビーズによって免疫沈降し、ABCA1 の ECD1 に対する抗体を用いた検出を行った。

ABCA1 との結合に必要な apoA-I の領域の解析

変異体 apoA-I の作製

ApoA-I は脂質と非常に高い親和性を持っており(37)、apoA-I 分子内の脂質高親和性ドメインと低親和性ドメインが協調的に働くことで、新生 HDL が産生されることが知られている(16-17, 38)。ただ、いずれのドメインも ABCA1 との直接的な相互作用は報告されておらず、ABCA1 を介した HDL 産生時にどのように機能しているかは不明である。

ApoA-I は N 末端および C 末端に、脂質と高親和性の特徴的な領域があり、その間を両親媒性のドメインが繋いでいる構造を持つ。ApoA-I は 1-43 番目に globular N-terminal ドメイン、C 末端付近に lipid binding C-terminal ドメインがあり、その間を 11 から 22 アミノ酸から構成される両親媒性の α ヘリックスが 10 本ある(Fig.11)。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 のドメインを解析した。結合領域を明らかにするために、apoA-I の N 末側のドメインまたは C 末側のドメインを部分的に欠損させた変異体 9 種類を作製した(Fig.13)。野生型 apoA-I と apoA-I 変異体 9 種類は大腸菌 BL21(DE3)株で発現、Ni-NTA 精製したものをを用いた(Fig.14)、ABCA1 発現細胞との結合アッセイには Alexa647 標識したものをを用いた。

変異体 apoA-I の機能

これらのドメイン欠損変異体 apoA-I の ABCA1 発現細胞に対する結合性を ABCA1-GFP を発現する HEK293 細胞を用いて解析した。その結果、野生型 apoA-I は細胞膜に発現する ABCA1 と共局在した(Fig.15)。9 種類のドメイン欠損変異体 apoA-I も野生型と同様に ABCA1 発現細胞へ結合することが明らかとなった(Fig.15)。99-243 番目や 44-98 番目を欠損する変異体など apoA-I の大部分を欠損する変異体は、ドット様の構造が観察された。また、99-243 番目や 44-98 番目を欠損する変異体はわずかに ABCA1 を発現しない細胞にも非特異的に結合していた。つづいて、9 種類のドメイン欠損変異体 apoA-I を用いて ABCA1 発現細胞からのコレステロール排出活性を解析した。その結果、いずれのドメイン欠損変異体 apoA-I に対しても ABCA1 発現細胞からのコレステロール排出活性が保持されていたことが明らかになった(Fig.16)。190-243 番目や 44-87 番目を欠損する apoA-I 変異体は野生型にくらべて若干のコレステロール排出活性の低下がみられた。ApoA-I 変異体によるコレステロール排出活性は、apoA-I 変異体の ABCA1 発現細胞への結合との相関はみられなかった。これらの

結果から、ABCA1 との結合において 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やコレステロール排出に関与していることが示唆された。

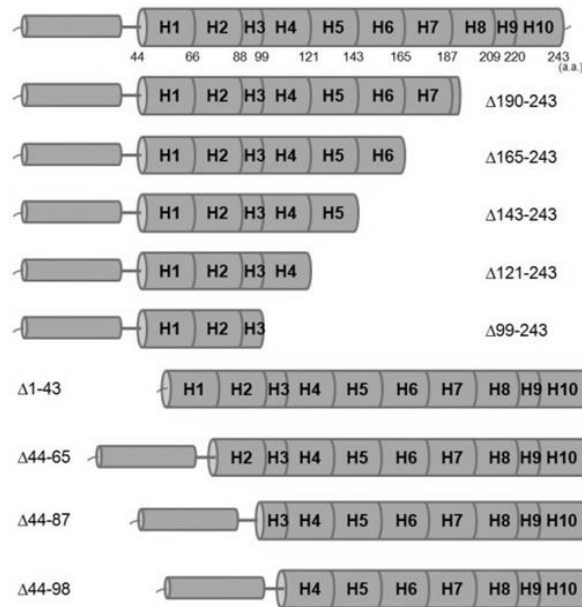


Fig.13 変異体 apoA-I の構造図

1 番上が野生型 apoA-I の構造、N 末側欠損と C 末側欠損変異体 9 種類を作製した。

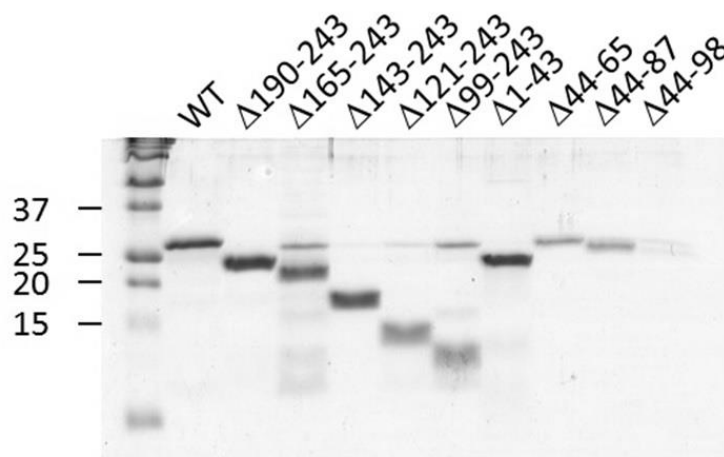


Fig.14 精製変異体 apoA-I

大腸菌 BL21(DE3)で発現、Ni-NTA アガロースゲルによって精製した各種変異体 apoA-I の CBB 染色像。

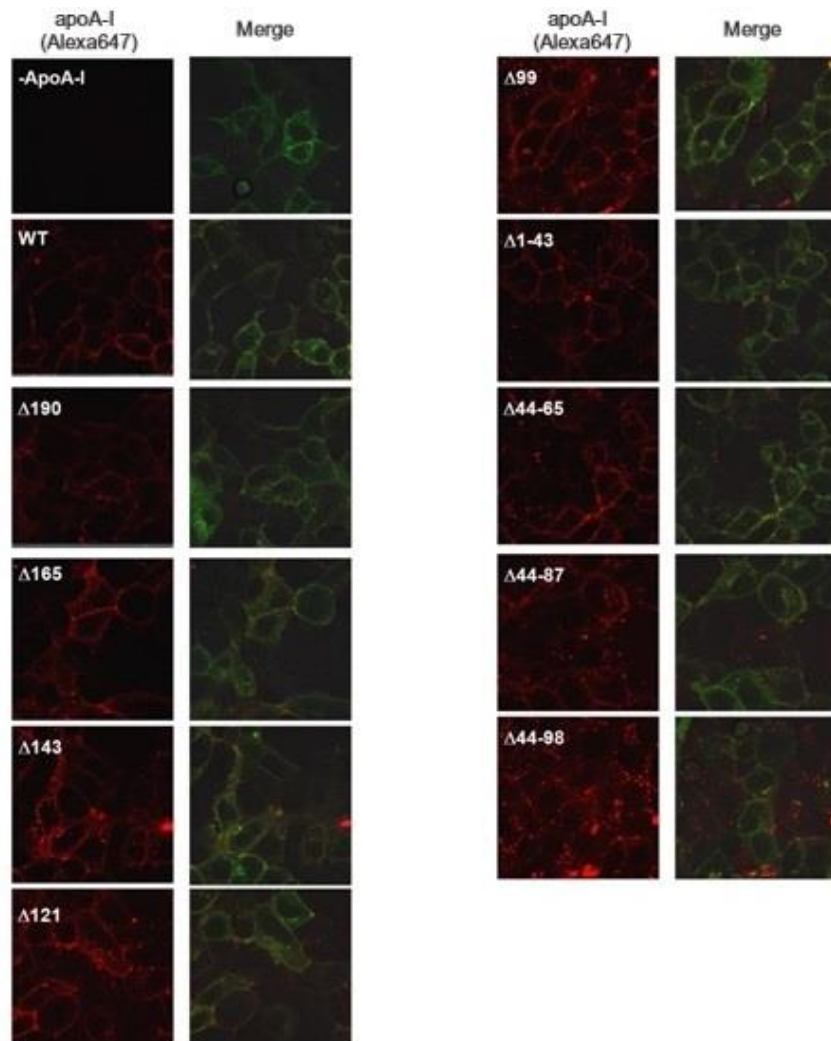


Fig.15 変異体 apoA-I の ABCA1 発現細胞への結合

Alexa647 標識した野生型 apoA-I と 9 種類の変異体 apoA-I の ABCA1-GFP 安定発現 HEK293 細胞への結合。

赤 : Alexa647 標識 apoA-I、緑 : ABCA1-GFP.

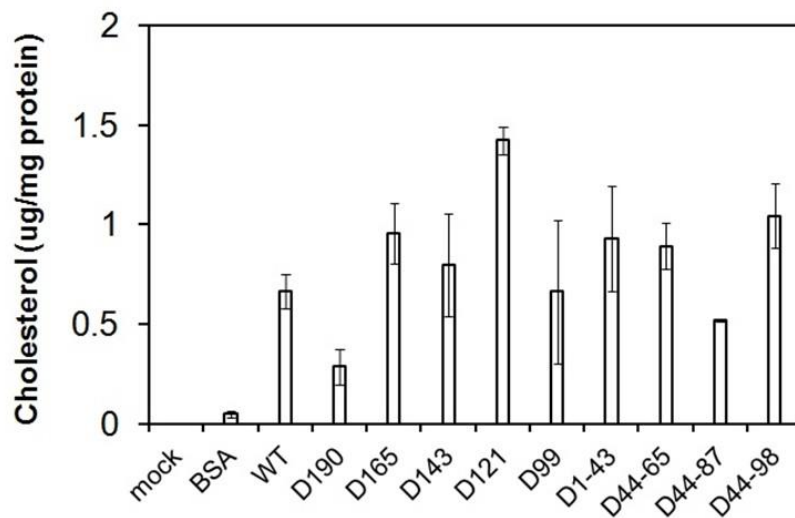


Fig.16 変異体 apoA-I のコレステロール排出活性

野生型 apoA-I と 9 種類の変異体 apoA-I を用いた ABCA1-GFP 安定発現 HEK293 細胞のコレステロール排出活性。mock : ABCA1-GFP 非発現細胞, apoA-I 非添加、BSA : ABCA1-GFP 安定発現細胞, apoA-I 非添加、WT: ABCA1-GFP 安定発現細胞, 野生型 apoA-I、D190, D165, D143, D121, D99, D1-43, D44-65, D44-87, D44-98: ABCA1-GFP 安定発現細胞, 各変異体 apoA-I。実験は 3 連で行い、値は平均値±標準偏差で示した。

考察

本研究では、未標識 apoA-I と同等に脂質アクセプターとして機能する sulfo-SBED 標識 apoA-I を用いて光反応クロスリンク実験を行った。ABCA1 に相当する 280 kDa のタンパク質の架橋は野生型 ABCA1 を発現する細胞上でのみ観察され、機能を持たない ABCA1(MM) 変異体を発現する細胞では観察されなかった(Fig.5)。これは、apoA-I が機能的な ABCA1 を発現する細胞には結合するが、ABCA1 非発現細胞や非機能的な ABCA1 発現細胞には結合しないという過去の報告と一致する(19, 34-35)。ABCA1 を発現する細胞への apoA-I の結合は sulfo-SBED 標識 apoA-I によって阻害され(Fig.4b)、sulfo-SBED 標識 apoA-I と ABCA1 のクロスリンクは未標識 apoA-I によって阻害された(Fig.10)。これらの結果は、apoA-I が細胞表面上の機能的な ABCA1 に結合していることを強く示唆している。

本研究では、ABCA1 を一過的に発現させた浮遊動物細胞 FreeStyle293-F 細胞から、LMNG または CHAPS を用いた可溶化によって高純度で機能的な ABCA1 を精製する手法を確立した(Fig.7, 8)。精製に用いる界面活性剤によっては膜タンパク質を可溶化できないばかりではなく(Fig.6)、特定の界面活性剤が膜タンパク質に影響し機能に影響を与えることが報告されている(30)。今回は、ABCA1 の機能を評価するために人口脂質二重層リポソームとナノディスクを用いた。リポソームは曲率を持つのに対して、ナノディスクは平面構造に ABCA1 を再構成できるため、より生体内に近い脂質環境を再現できると考えられる。ABCA1 の ATP 加水分解活性はコレステロールで促進されたが、高濃度のコレステロールを含有するナノディスク中で逆に抑制された。これは薬物輸送体が高濃度の輸送基質によって阻害される事象と類似しており(45)、コレステロールは ABCA1 の基質であることが示唆される。先行研究において Sf9 から精製した ABCA1 はコレステロールによる活性誘導をうけず、逆に弱く阻害されることが明らかにされている。(47)。コレステロールによる影響が本研究と先行研究で異なる理由として、再構成系の違いが原因である可能性が考えられる。本研究では ABCA1 を POPG とコレステロールによって構成される平面構造のナノディスクに再構成しているのに対して(Fig.9)、ABCA1 を POPC, POPS, コレステロールによって構成されるリポソームに再構成している(47)。脂質二重層の曲率や ABCA1 の基質である PC, PS が豊富に含まれている脂質環境の違いによって ABCA1 のコレステロールへの応答性が異なっている可能性が考えられる。

本研究では、ABCA1の中央に挿入したスロンピン切断サイトによりタンパク質を2つに分割することで、apoA-Iの結合部位がABCA1のN末半分に存在することを初めて明らかにした(Fig.11)。3種類のペプチダーゼによるABCA1の消化によって、抗ECD1抗体に反応するビオチン化断片が取得できたことから、apoA-Iの結合部位がABCA1のECD1またはその近傍の領域に存在することが示唆された(Fig.12)。ATP加水分解によるECD1の構造変化は、apoA-IがABCA1に結合することと関連が報告されており(21)、ABCA1によって輸送された脂質は一時的にECDに蓄積することも報告されている(18)。これらの結果を考慮すると、ABCA1のATP加水分解に依存したECD1の構造変化とECDへの脂質の蓄積によって、ECD1上にapoA-Iに対する特異的な結合部位が生み出される可能性があると考えられる。

最近、ヒトABCA1のATP非結合状態のクライオ電子顕微鏡の立体構造が報告された(36)。ECDの構造には脂質の一時的な蓄積を可能とする疎水性のトンネルを有するらせん状のドメインが存在し、ECDの上部は主にECD1で構成されている。ApoA-IはECD1に結合してECD2に結合しないと仮定すると(Fig.11)、apoA-IはECDの上部またはECD1によって形成される特定の表面に直接結合すると考えられる。一方、ECD2の変異がapoA-I結合に影響を与えるという報告もあるため(21)、apoA-Iの結合にはECD2も関与すると考えられる。ECD内部の疎水性のトンネルはECD1とECD2によって形成されている。ATP加水分解による構造変化はECD1とECD2を協調的に構造変化させることでapoA-I結合部位を形成させる可能性が考えられる。

ABCA1とapoA-Iの直接相互作用については過去の報告(16, 19, 21, 23)の実験結果からも示唆される。ABCA1とapoA-Iの変異型を用いた実験では、apoA-IのHDL形成活性とABCA1との結合活性が関連しているため(21)、ABCA1とapoA-Iの相互作用がHDL形成に重要であることが示唆される。また、これらの報告はABCA1がapoA-Iに直接リン脂質やコレステロールを受け渡すことを示唆しているが、HDL形成のメカニズムについては未だ統一見解ではなく、多くの研究者は間接モデルを支持している。間接モデルでのABCA1の役割は細胞膜上に高曲率な特殊な構造を作ることであり、apoA-Iはその部分から直接脂質を可溶化して新生HDL粒子を作る(24)。一方、本研究において示唆された、ABCA1がATP依存的にECD1にapoA-Iの結合部位を創出するという結果は、ABCA1が直接apoA-Iに脂質を

受け渡すモデルと良く合致する。さらに詳細な HDL 形成メカニズムの解明のためには、正確な apoA-I 結合部位を同定する必要があると考えられる。

また、本研究では、apoA-I の N 末側のドメインと C 末ドメインに着目し、両端からドメインを欠損させた apoA-I を用いて HDL 形成時における apoA-I の ABCA1 との結合部位を解析した。N 末側のドメインと C 末ドメインそれぞれ部分欠損させた apoA-I 変異体 9 種類について、いずれも ABCA1 発現細胞への結合・コレステロール排出活性を示した。190-243 番欠損変異体はややコレステロール排出活性が低く、これは過去に報告された apoA-I の C 末の重要性に関する報告と一致する(41)。いずれの変異体も機能をほとんど損なわなかったことは、意外な結果であるが、apoA-I は脂質結合ドメインと 10 本の両親媒性 α ヘリックスからなる構造をしているため、ある α ヘリックスを欠損させても分子内部で相補的に機能できた可能性が考えられる。また、ABCA1 発現細胞からのコレステロール排出活性に関しては、apoA-I を模倣した両親媒性ペプチドのみでコレステロール排出活性を示すことも報告されていることを考慮すると(42-43)、今回作製した apoA-I 変異体は、変異体内に残った両親媒性ヘリックスが両親媒性ペプチドとして作用してコレステロール排出活性を示したのかもしれない。そのため、本来の apoA-I と同じメカニズムで HDL が形成されていない可能性が考えられる。さらに詳細な HDL 形成メカニズムの解明のために、ABCA1 のドメインの解明と同時に apoA-I のドメインの役割を同時に明らかにしていく必要がある。

結論

本研究では、高密度リポタンパク質産生過程における ABCA1 と apoA-I の直接相互作用について検証し、ABCA1 と apoA-I は直接相互作用すること、その相互作用部位は ABCA1 の ECD1 上にあることを初めて明らかにした。また、ABCA1 の精製条件を検討した結果、機能的、高純度に精製可能な界面活性剤は CHAPS または LMNG であることを明らかにし、精製 ABCA1 をナノディスクに再構成することでコレステロール依存的な ABCA1 の活性誘導が起きることを明らかにした。

ApoA-I における ABCA1 との結合領域を解析するために、種々の部分欠損変異体 apoA-I を作製した。変異体 apoA-I はいずれも ABCA1 と結合しコレステロール排出活性を保持していることが明らかになったため、apoA-I は単一の領域が ABCA1 との結合に重要というわけではなく、apoA-I 分子内で相補的に機能し、ABCA1 との結合・HDL 形成に関与していることが示唆された。これらの研究結果は、ABCA1 が、直接結合した apoA-I に脂質を受け渡して脂質を蓄積する輸送機構を強く支持する結果となった。

以下、本研究で明らかとなったことの要約を示す。

- 1) 光反応官能基 Sulfo-SBED を用いた標識手法を確立し、ABCA1 と apoA-I の直接結合を明らかにした。
- 2) 機能的な ABCA1 を精製する手法を確立した。
- 3) 各種消化酵素を用いた断片化試験により、ABCA1 の ECD1 に apoA-I が結合することを明らかにした。
- 4) 各種 apoA-I 変異体を用いた結果、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が示唆された。
- 5) 以上の結果により、HDL 形成過程において apoA-I は ABCA1 の ECD1 へ結合していることが明らかとなり、ABCA1 により輸送されるコレステロールやリン脂質は直接 apoA-I に受け渡されていることが強く示唆された(Fig.17)。

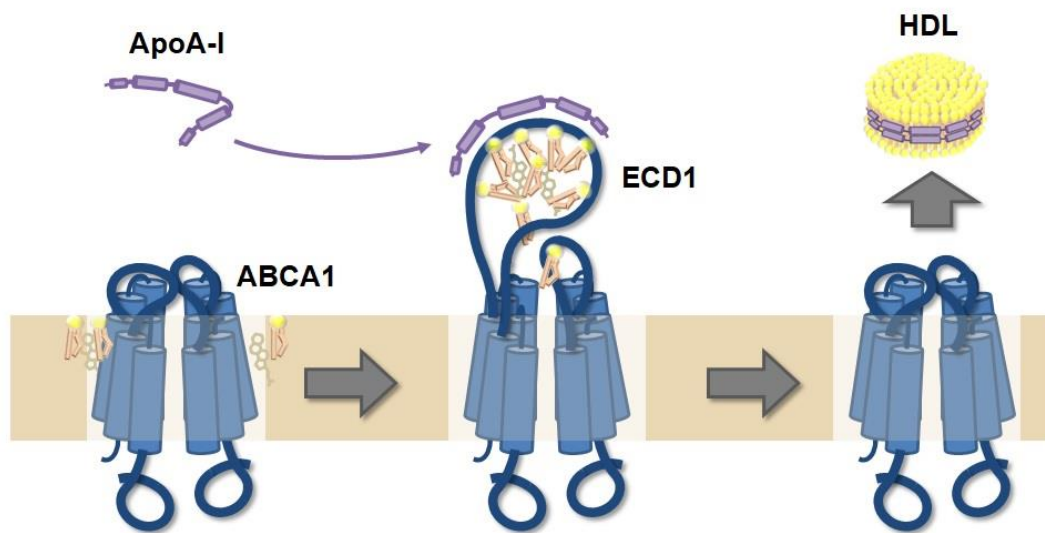


Fig.17 本研究結果から提唱される ABCA1 が直接 apoA-I を介して HDL を産生するモデル図.

ABCA1 は細胞膜のリン脂質やコレステロールを ECD1 に輸送し、蓄積する。ApoA-I は構造が変化した ECD1 に直接結合し、蓄積してある脂質を受け取ることで HDL を形成する。

参考文献

- [1] Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, French BC, Phillips JA, Mucksavage ML, Wilensky RL, Mohler ER, Rothblat GH, Rader DJ, Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011;364: 127-35.
- [2] Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W., ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Mar;26(3):534-40.
- [3] K. Ueda, ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 401-409 (2011).
- [4] M. Dean, R. Allikmets, Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev* 5, 779-785 (1995).
- [5] Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Ozçürümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G., The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature genetics*. 1999;22: 347-51.
- [6] Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J Jr, Hayden MR., Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nature genetics*. 1999;22: 336-45.
- [7] Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Denèfle P, Assmann G., Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nature genetics*. 1999;22: 352-5.
- [8] Hozoji M, Kimura Y, Kioka N, Ueda K., Formation of two intramolecular disulfide bonds is necessary for ApoA-I-dependent cholesterol efflux mediated by ABCA1. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284: 11293-300.
- [9] Jere P. Segrest, Martin K. Jones, Anthony E Klon, Christopher Sheldahl, Michael D Hellinger, H de Loof, Stephen C. Harvey, A detailed molecular belt model for apolipoprotein A-I in

- discoidal high density lipoprotein. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274: 31755-8.
- [10] Li Y, Kijac AZ, Sligar SG, Rienstra CM., Structural analysis of nanoscale self-assembled discoidal lipid bilayers by solid-state NMR spectroscopy. *Biophysical journal*. 2006;91: 3819-28.
- [11] Wu Z, Wagner MA, Zheng L, Parks JS, Shy JM 3rd, Smith JD, Gogonea V, Hazen SL., The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction. *Nature structural & molecular biology*. 2007;14: 861-8.
- [12] Mahley RW., Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984 Dec 1;25(12):1277-94.
- [13] Tajima S, Yokoyama S, Yamamoto A., Effect of Lipid Particle Size on Association of Apolipoproteins with Lipid. *J. Biol. Chem*. 1983;258, 10073–10082.
- [14] Dixon JL, Ginsberg HN. Hepatic synthesis of lipoproteins and apolipoproteins. *Semin Liver Dis*. 1992 Nov;12(4):364-72.
- [15] Oram, JF, Vaughan, AM, ATP-Binding cassette cholesterol transporters and cardiovascular disease. *Circulation research*. 2006;99: 1031-43.
- [16] Vedhachalam C, Ghering AB, Davidson WS, Lund-Katz S, Rothblat GH, Phillips MC., ABCA1-induced cell surface binding sites for ApoA-I. *Arterioscler Throm b Vasc Biol* 27, 1603-1609 (2007).
- [17] Hassan HH, Denis M, Lee DY, Iatan I, Nyholt D, Ruel I, Krimbou L, Genest J., Identification of an ABCA1-dependent phospholipid-rich plasma membrane apolipoprotein A-I binding site for nascent HDL formation: implications for current models of HDL biogenesis. *J Lipid Res* 48, 2428-2442 (2007).
- [18] Ishigami M, Ogasawara F, Nagao K, Hashimoto H, Kimura Y, Kioka N, and Ueda K, Temporary sequestration of cholesterol and phosphatidylcholine within extracellular domains of ABCA1 during nascent HDL generation. *Sci Rep*. 2018;8: 6170.
- [19] Nagata KO, Nakada C, Kasai RS, Kusumi A, Ueda K., ABCA1 dimer-monomer interconversion during HDL generation revealed by single-molecule imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5034-5039 (2013).
- [20] Phillips, MC, Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem*. 2014;289: 24020-9.

- [21] Nagao K, Takahasmhi K, Azuma Y, Takada M, Kimura Y, Matsuo M, Kioka N, Ueda K., ATP hydrolysis-dependent conformational changes in the extracellular domain of ABCA1 are associated with apoA-I binding. *J Lipid Res.* 2012;53: 126-36.
- [22] Tanaka AR, Ikeda Y, Abe-Dohmae S, Arakawa R, Sadanami K, Kidera A, Nakagawa S, Nagase T, Aoki R, Kioka N, Amachi T, Yokoyama S, Ueda K., Human ABCA1 contains a large amino-terminal extracellular domain homologous to an epitope of Sjogren's Syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;283: 1019-25.
- [23] Fitzgerald ML, Morris AL, Chroni A, Mendez AJ, Zannis VI, Freeman MW., ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 2004;45: 287-94.
- [24] Tanaka AR, Abe-Dohmae S, Ohnishi T, Aoki R, Morinaga G, Okuhira K, Ikeda Y, Kano F, Matsuo M, Kioka N, Amachi T, Murata M, Yokoyama S, Ueda K., Effects of mutations of ABCA1 in the first extracellular domain on subcellular trafficking and ATP binding/hydrolysis. *J Biol Chem* 278, 8815-8819 (2003).
- [25] Fitzgerald ML, Morris AL, Rhee JS, Andersson LP, Mendez AJ, Freeman MW., Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *The Journal of biological chemistry.* 2002;277: 33178-87.
- [26] Hozoji M, Kimura Y, Kioka N, Ueda K., Formation of two intramolecular disulfide bonds is necessary for ApoA-I-dependent cholesterol efflux mediated by ABCA1. *The Journal of biological chemistry.* 2009;284: 11293-300.
- [27] Chroni A, Liu T, Fitzgerald ML, Freeman MW, Zannis VI., Cross-linking and lipid efflux properties of apoA-I mutants suggest direct association between apoA-I helices and ABCA1. *Biochemistry.* 2004;43: 2126-39.
- [28] Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Saito H, Rothblat GH, Lund-Katz S, Phillips MC., Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282: 25123-30.
- [29] Deffieu, MS, Pfeffer, SR, Niemann-Pick type C 1 function requires luminal domain residues that mediate cholesterol-dependent NPC2 binding. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America. 2011;108: 18932-6.

- [30] Hirayama H1, Kimura Y, Kioka N, Matsuo M, Ueda K., ATPase activity of human ABCG1 is stimulated by cholesterol and sphingomyelin. *J Lipid Res.* 2013;54: 496-502.
- [31] Ritchie TK, Grinkova YV, Bayburt TH, Denisov IG, Zolnerciks JK, Atkins WM, Sligar SG., Chapter 11 - Reconstitution of membrane proteins in phospholipid bilayer nanodiscs. *Methods in enzymology.* 2009;464: 211-31.
- [32] Amundson, DM, Zhou, M, Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. *J Biochem Biophys Methods.* 1999;38: 43-52.
- [33] Nakanishi S, Abe M, Yamamoto S, Murai M, Miyoshi H., Bis-THF motif of acetogenin binds to the third matrix-side loop of ND1 subunit in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1807: 1170-6.
- [34] Favari E, Calabresi L, Adorni MP, Jessup W, Simonelli S, Franceschini G, Bernini F, Small discoidal pre-beta1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry.* 2009;48: 11067-74.
- [35] Nagao K, Zhao Y, Takahashi K, Kimura Y, Ueda K., Sodium taurocholate-dependent lipid efflux by ABCA1: effects of W590S mutation on lipid translocation and apolipoprotein A-I dissociation. *J Lipid Res.* 2009;50: 1165-72.
- [36] Qian H, Zhao X, Cao P, Lei J, Yan N, Gong X., Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1. *Cell.* 2017;169: 1228-1239 e10.
- [37] Zhu HL, Atkinson D. Conformation and lipid binding of a C-terminal (198-243) peptide of human apolipoprotein A-I. *Biochemistry.* 2007 Feb 13;46(6):1624-34.
- [38] Nagao K, Hata M, Tanaka K, Takechi Y, Nguyen D, Dhanasekaran P, Lund-Katz S, Phillips MC, Saito H., The roles of C-terminal helices of human apolipoprotein A-I in formation of high-density lipoprotein particles. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Jan;1841(1):80-7.
- [39] Mei X, Liu M, Herscovitz H, Atkinson D., Probing the C-terminal domain of lipid-free apoA-I demonstrates the vital role of the H10B sequence repeat in HDL formation. *J Lipid Res.* 2016 Aug;57(8):1507-17.
- [40] Chroni A, Liu T, Gorshkova I, Kan HY, Uehara Y, Von Eckardstein A, Zannis VI., The central helices of ApoA-I can promote ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)-mediated lipid

efflux. Amino acid residues 220-231 of the wild-type ApoA-I are required for lipid efflux in vitro and high density lipoprotein formation in vivo. *J Biol Chem.* 2003 Feb 28;278(9):6719-30.

[41] Daniil G, Zannis VI, Chroni A., Effect of apoA-I Mutations in the Capacity of Reconstituted HDL to Promote ABCG1-Mediated Cholesterol Efflux. *PLoS One.* 2013 Jun 27;8(6):e67993.

[42] Kono M, Tanaka T, Tanaka M, Vedhachalam C, S. Chetty P, Nguyen D, Dhanasekaran P, Lund-Katz S, Michael C. Phillips, and Saito H., Disruption of the C-terminal helix by single amino acid deletion is directly responsible for impaired cholesterol efflux ability of apolipoprotein A-I Nichinan. *J Lipid Res.* 2010 Apr; 51(4): 809–818.

[43] Uehara Y, Ando S, Yahiro E, Oniki K, Ayaori M, Abe S, Kawachi E, Zhang B, Shioi S, Tanigawa H, Imaizumi S, Miura S, Saku K., FAMP, a novel apoA-I mimetic peptide, suppresses aortic plaque formation through promotion of biological HDL function in ApoE-deficient mice. *J Am Heart Assoc.* 2013 May 24;2(3):e000048.

[44] Nagao K, Kimura Y, Ueda K., Lysine residues of ABCA1 are required for the interaction with apoA-I. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Mar;1821(3):530-5.

[45] Kimura Y, Kioka N, Kato H, Matsuo M, and Ueda K, Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol, *Biochem J.* 2007 Jan 15; 401(Pt 2): 597–605.

[46] Kawate T, Gouaux E. Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. *Structure.* 2006 Apr;14(4):673-81.

[47] Takahashi K, Kimura Y, Kioka N, Matsuo M, Ueda K. Purification and ATPase activity of human ABCA1. *J Biol Chem.* 2006 Apr 21;281(16):10760-8.

文献リスト

- A. **Takaaki Kawanobe, Naoko Shiranaga, Noriyuki Kioka, Yasuhisa Kimura & Kazumitsu Ueda**

Apolipoprotein A-I directly interacts with extracellular domain 1 of human ABCA1

Biosci Biotechnol Biochem. in press

謝辞

本研究と通じて、指導教官である京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻細胞生化学研究室 教授 植田和光先生には、研究の方針や手法、また書類作製の面など多岐にわたる面での確なご指導を賜りましたことを、心より感謝申し上げます。

同じく、准教授である木岡紀幸先生、助教である永田紅先生にも日頃より重要なお助言を頂きました。

また、直接ご指導を頂きました、助教 木村泰久先生には研究の方針や手法、その他多くの面において重要なお助言や有益な議論を行っていただきました。また、実験の追試など実務面においてもご助力だけまして、大変有難く思っている次第です。心より感謝申し上げます。

さらに、白永直子さんにも、実験面で多大なお助力、ご助言や有益な議論を行っていただきましたこと、心より感謝申し上げます。

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生物機能制御化学研究室 教授 三芳秀人先生、助教 安部真人先生には、実験の手法のご教示や議論、機器利用の面において、大変ご協力いただいております。心より感謝申し上げます。

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻細胞生化学研究室の平山裕士さん、市川尚文さん、石神正登さん、および他多くの研究室のメンバーの皆様には、日頃から暖かい激励や有益で楽しい議論をしていただいたことを深く感謝しております。

最後に、私の研究生生活をいつも見守ってくださっていた家族に、心より感謝いたします。

2019年1月

川野邊峻哲

