

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	小笠原 史彦
論文題目	ABCA1によるコレステロール輸送の生理的役割の解明		
(論文内容の要旨)			
<p>ATP binding cassette A1 (ABCA1)は、高密度リポタンパク質(HDL)産生に必須なタンパク質である。このことは、1999年に発表された血中HDL量が著しく減少するタンジール病の解析に端を発して、ABCA1ノックアウトマウスや培養細胞を用いた実験が多数行われたことによって確かなものとなった。現在でもABCA1に関する研究は年間200報以上報告され続けているが、その多くはABCA1がHDLを産生することを前提とした研究であり、ABCA1の輸送体としての機能に関する研究は少ない。しかし、最近ABCA1は細胞の増殖や炎症などの基本的な機能に影響を及ぼすことが報告されており、HDL産生だけではないABCA1の機能に対する関心が高まっている。そこで本研究では、ABCA1のコレステロール輸送活性に着目して培養細胞を用いた解析を行い、ABCA1が細胞内のコレステロール量の調節に重要な役割を果たすことを見出した。</p> <p>第一章では、ABCA1によるHDL産生速度とコレステロール輸送活性の関係を解析した。一般に酵素の反応速度は基質濃度の増加に伴って上昇する。ABCタンパク質においても同様であり、基質輸送速度は基質濃度依存的に上昇する。しかし、技術的な問題から、これまでABCA1がコレステロールを直接輸送するかどうかはわかっていなかった。ABCA1によるHDL産生機構に関しては議論が分かれており、著者らはABCA1がホスファチジルコリン(PC)とコレステロールを血中の脂質受容体であるアポリポタンパク質A-I (apoA-I)に輸送して直接HDLを産生するモデルを提唱している。そこで、このモデルから、ABCA1がコレステロール輸送活性をもつならば、細胞膜コレステロール濃度の上昇に伴ってHDL産生速度が増加するという仮説を立て、これを検証した。メチル-β-シクロデキストリン(MβCD)またはMβCD-コレステロールを用いて細胞膜コレステロール濃度を直接変化させ、短時間でABCA1によるapoA-I依存的な脂質排出を測定することによって、細胞膜コレステロール濃度依存的なABCA1による脂質排出の初速の変化を評価した。その結果、細胞膜コレステロール濃度の上昇に伴ってコレステロールだけではなくPCの排出速度も大きく増加することがわかった。このことから、ABCA1によるHDL産生速度が細胞膜コレステロール濃度の上昇に伴って増加することが明らかになった。このことは、ABCA1がコレステロール輸送活性をもっており、HDL産生においてコレステロールを直接的に輸送していることを示唆している。</p> <p>第二章では、細胞膜中のコレステロールの分布について解析した。細胞膜において、リン脂質は脂質二重膜内層と外層に非対称的に分布しており、その非対称性が生</p>			

理的に重要であることが知られている。最近、コレステロールについても細胞膜において非対称的に分布しており、細胞膜外層のコレステロール濃度は内層の約10倍高いことが報告された。その報告の中で、ABCA1は細胞膜においてコレステロールを内層から外層へフロップしており、細胞膜コレステロール非対称性を維持していることが示された。しかし、コレステロールは細胞膜内層に多いという結果も報告されており、議論が分かれている。そこで本章では、細胞膜コレステロール非対称性について、コレステロール依存性細菌毒素ストレプトリシンO (SLO)を用いて解析した。著者は、ABCA1発現細胞ではSLOによって細胞膜に孔が開かないことを発見し、その機構を解析した。その結果、ABCA1によるSLO孔形成の抑制はATPase活性依存的であること、またABCA1の発現によって膜画分のコレステロール量に変化はなく、SLOの結合量にも変化がないことがわかった。これらのことから、SLOは細胞膜内層のコレステロールに依存して孔を開けていることが考えられた。実際、コレステロール結合プローブを用いてフローサイトメトリーを行ったところ、ABCA1発現量依存的にプローブの結合量が増加し、ABCA1発現細胞では細胞膜外層のコレステロールが増加していることがわかった。さらに、細胞膜のスフィンゴミエリンを分解することによって細胞膜内層のコレステロールを増加させると、SLO孔形成が促進されることがわかった。これらの結果から、ABCA1は細胞膜において内層から外層へコレステロールをフロップしており、細胞膜内層のコレステロールを減少させていることが明らかになった。

第三章では、ABCA1が細胞膜内層のコレステロール濃度を低下させることの生理的意義について解析した。細胞においてコレステロールの多くは細胞膜に存在しているが、コレステロール量の調節に関わる多くのタンパク質は小胞体に存在しており、細胞膜のコレステロール濃度がどのように小胞体に伝えられているかは長らく謎であった。細胞内のコレステロールは、膜と膜が近接する領域（膜コンタクトサイト）に局在する脂質輸送体によって輸送されていると考えられている。このことから、細胞膜-小胞体コンタクトサイトにおいて細胞膜コレステロール濃度を小胞体に伝える機構が存在すると予想されるが、細胞膜コレステロール濃度は小胞体コレステロール濃度より5倍から10倍高く、どのようにしてこの濃度勾配を維持しているのかは全くわかっていなかった。そこで著者は、ABCA1が細胞膜内層のコレステロール濃度を低下させ、細胞膜-小胞体コンタクトサイトにおけるコレステロールの濃度勾配を調節することによって、細胞膜から小胞体へのコレステロール輸送を調節しているという仮説を立て、これを検証した。その結果、ABCA1発現細胞では、細胞膜コレステロール濃度の増加に伴った小胞体へのコレステロール輸送が抑制されることを示唆する結果が得られた。また、細胞膜のスフィンゴミエリンを分解し、細胞膜内層のコレステロールを増加させると小胞体へのコレステロール輸送が促進されることも示唆された。

以上の結果から、ABCA1はHDL産生とコレステロールのフロップという二つの活性を發揮することによって、細胞膜内層のコレステロールを低く維持し、細胞内のコレステロール量を調節しているという全く新しい概念が示唆された。この新たな概念は、細胞内コレステロール輸送に関わる多くの謎を解く鍵となると考えられる。

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)

ABCA1はHDL産生に必須なタンパク質であり、末梢組織で余剰となったコレステロールを排出する。しかし、HDL産生におけるABCA1の役割については議論が分かれており、ABCA1の輸送体としての機能は明らかになっていなかった。本論文は、ABCA1のコレステロール輸送活性に着目し、培養細胞を用いて解析したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. ABCA1によるHDL産生速度が、細胞膜コレステロール濃度の上昇に伴って増加することを明らかにした。
2. コレステロール依存性細菌毒素SLOが、細胞膜内層のコレステロールに依存して孔を開けることを示した。
3. SLOを用いた解析により、ABCA1が細胞膜においてコレステロールを内層から外層へフロップさせることにより、細胞膜内層のコレステロールを減少させることを明らかにした。
4. ABCA1が細胞膜内層のコレステロール濃度を低下させることによって、細胞膜から小胞体へのコレステロール輸送を調節していることを明らかにした。
5. ABCA1がHDL産生とコレステロールのフロップという二つの活性を発揮することによって、細胞内のコレステロール量を調節しているという新たな概念を提唱した。

以上のように、本論文はABCA1がコレステロール輸送活性をもつことを明らかにし、ABCA1による細胞内コレステロール量の調節という新規概念を提唱したものであり、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4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)