

## ABC 蛋白質の ATP 共役機構と新規生理的役割に関する研究

二股 良太

ATP-Binding Cassette (ABC)蛋白質は、ATP のエネルギーを利用して膜を介した物質の輸送を行う輸送酵素蛋白質ファミリーである。その機能単位は、6 回膜貫通ヘリックスから構成される膜貫通領域 (TMD)と細胞質側のヌクレオチド結合領域 (NBD)が交互に2回繰り返された構造を有する。ヒトでは 48 種類の遺伝子が同定されており、半分以上のメンバーが様々な疾患の発症と関連することが報告されている。しかし、未だ多くの ABC 蛋白質がどのような生理的役割を担っているか、それらの機能破綻がどのように疾患の発症と関連するかについては明らかになっていない。また、ABC 蛋白質の分子機構についても重要な点が解明されていない。構造生物学的解析から、ABC 蛋白質は ATP 加水分解依存的に分子全体を大きく構造変化することで基質を輸送することが明らかにされてきた。しかし、基質輸送に伴う構造変化において ATP が担う役割については議論が分かれている。そこで本研究では、ABC 蛋白質の分子機構の解明および生理的役割の探索を行った。

ABCB1 は、真核生物で最初に同定された ABC 蛋白質であり、ABC 蛋白質のモデルとして基質輸送機構を解明すべく数多くの研究が行われてきた。第一章では、ABCB1 を用いて基質輸送に伴う構造変化における ATP の役割を解析した。構造学的研究から、ABCB1 は TMD が細胞内側に開いて2つの NBD が解離した内向き構造と、TMD が閉じて NBD が二量体化した外向き構造を交互に繰り返すことで基質を輸送することが明らかにされてきた。しかし、基質輸送に伴う構造変化の駆動力となるのが、ATP の結合あるいは加水分解のどちらであるかは未だ議論が分かれている。従来の研究では、精製 ABCB1 を界面活性剤ミセルや人工脂質二重膜に再構成し、解析が行われてきた。しかし、これらの非生理的な膜環境中では生体膜上での ABCB1 とは異なる挙動を示す可能性があり、著者は、ATP 共役機構の解明には生理的な膜環境での検証が必要であると考えた。本章では、分子内蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)を用いて、生細胞膜中での ABCB1 の構造変化を評価することで、ABCB1 の構造変化における ATP の役割を解析した。ABCB1 の内向き構造と外向き構造では NBD 間の距離が大きく変化するため、2つの NBD の直後にそれぞれ異なる蛍光蛋白質を融合した FRET プローブ型 ABCB1 (ABCB1-FRET)を作製した。培養細胞に ABCB1-FRET を発現させたところ、輸送基質を添加していない条件では低い FRET 効率を示し、輸送基質の添加によって FRET 効率の上昇が認められた。この結果から、分子内 FRET を用いて生細胞膜中での ABCB1 の構造変化を検出できたことが示唆された。次に、ATP 結合あるいは ATP 加水分解ができない ABCB1-FRET 変異体を作製し、FRET 効率への影響を解析した結果、ATP 結合は内向き構造から外向き構造への構造変化を促進し、2 分子の ATP が加水分解されることによって元の内向き構造へ戻ることが示唆された。さらに、低濃度の細菌毒素で細胞膜に孔

を開けて細胞内 ATP を洗い流したセミインタクト細胞を用いて解析を行ったところ、変異体解析を支持する結果に加え、ATP 加水分解後に  $\gamma$ -リン酸が放出されることで外向き構造から内向き構造への構造変化が起こることが示唆された。

第二章では、コレステロール輸送型 ABC 蛋白質である ABCA1 の新規生理的役割の探索を行った。ABCA1 は、高密度リポタンパク質 (HDL) の産生に必須であることや血中 HDL 濃度が心血管系疾患の発症リスクと負に相関することから、心血管系疾患の予防因子として注目されてきた。しかし、近年になって ABCA1 の生理的役割が多岐にわたることが報告され、心血管系疾患の予防作用だけでなく ABCA1 の機能に対する関心が高まっている。そこで、本研究では脊椎動物のモデルとしてメダカを用いて ABCA1 の新規生理的役割の探索を行った。まず、メダカ ABCA1 の機能解析を行ったところ、*in vitro* および *in vivo* の両方でメダカ ABCA1 は哺乳類の ABCA1 と同様に HDL 産生活性を有することが示唆された。さらに、*Abca1* 遺伝子欠損 (*Abca1*<sup>-/-</sup>) メダカを樹立し、その表現型解析を行ったところ、排卵異常によって雌性不妊となることが示唆された。また、*Abca1*<sup>-/-</sup> メダカでは卵巣内の性ホルモン濃度は正常であったことから、性ホルモン非依存的に排卵異常が生じたことが示唆された。さらに、卵巣でコレステロールが過剰に蓄積することで排卵異常が惹起された可能性が示された。以上の結果は、脊椎動物において ABCA1 が排卵の制御に関与する可能性を示唆するものである。