

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	二股 良太
論文題目	ABC蛋白質のATP共役機構と新規生理的役割に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>ATP-Binding Cassette (ABC) 蛋白質は、ATP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の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ATP共役機構に着目した分子機構の解明、および新規生理的役割の探索を行った。</p> <p>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。構造生物学的研究から、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、分子機構の解析が行われてきたが、非生理的な膜環境中では、ABCB1が細胞膜中とは異なる挙動を示す可能性が懸念される。そこで本章では、生細胞膜中でのABCB1の構造変化を分子内蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いて評価することで、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C-末端側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を用いることで生細胞膜中でのABCB1の構造変化を検出できることがわかった。次に、ATPを結合できないABCB1-FRET変異体を作製し、FRET効率への影響を解析した。その結果、ATP非結合型変異体は低いFRET効率の状態で輸送サイクルが停止することが示された。以上の結果から、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することが強く示唆された。次に、ATP加水分解ができない変異体ABCB1-FRETを作製し、FRET効率への影響を解析した結果、高いFRET効率の状態で停止することが示された。さらに、2か所存在するATP結合部位のうち、片方でもATP結合ができないと高いFRET効率の状態で停止することが示され</p>			

た。以上の結果から、2分子のATP加水分解によってABCB1は外向き構造から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が担う新規生理的役割の探索を行った。ABCA1が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が担う新規生理的役割の探索を行った。メダカABCA1オルソログ *Abca1a*のcDNAをクローニングし、哺乳培養細胞での異種発現系により機能解析を行ったところ、哺乳類のABCA1と同様にHDL産生活性を有することが示された。さらに、*Abca1a* 遺伝子欠損 (*Abca1a*<sup>-/-</sup>)メダカを樹立したところ、血中総コレステロールおよびリン脂質濃度の低下が認められた。血中脂質濃度の低下は血中HDL濃度の低下に起因すると考えられ、メダカABCA1Aが *in vivo*においても哺乳類のABCA1と同様の機能を有することが示唆された。さらに、*Abca1a*<sup>-/-</sup>メダカの表現型を詳細に解析したところ、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、*Abca1a*<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、*Abca1a*<sup>-/-</sup>メダカの卵巣ではコレステロールの過剰蓄積が認められた。以上の結果から、ABCA1Aの欠損により卵巣内に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。これらの結果は、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。

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)

ABC蛋白質は、様々な疾患との関連が報告されている重要な蛋白質ファミリーであるが、基質輸送の分子機構について重要な点で議論が分かれている。また、多くのメンバーの生理的役割も未だ不明である。本論文は、分子内FRETを用いた生細胞でのABCB1のATP共役機構の解析、およびメダカを用いたABCA1の生理的役割の探索を行い、多角的な視点からABC蛋白質の謎に迫ったものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. 分子内FRETを用いることによって、生細胞膜中でABCB1の基質輸送に伴う構造変化を評価できる実験系を確立した。
2. 生細胞では、ATP結合が基質輸送を伴う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加水分解とそれに続く $\gamma$ -リン酸の放出によって外向き構造から内向き構造への構造変化が起こることを示した。
3. メダカABCA1Aが*in vitro*と*in vivo*の両方において、哺乳類のABCA1と同様の生理的役割を担っていることを示した。
4. *Abca1a*<sup>-/-</sup>メダカでは、卵巣内へのコレステロールの過剰蓄積により性ホルモンを介さない経路で排卵異常を惹起し雌性不妊となる可能性を示した。これにより、脊椎動物においてABCA1が排卵の制御に関与することが初めて示唆された。

以上のように、本論文は、ABCB1の基質輸送に伴う構造変化におけるATP共役機構を生細胞膜中で明らかにするとともに、脊椎動物においてABCA1が排卵の制御に関与することを初めて示したものであり、分子生物学、脂質生化学および生殖生物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、令和4年2月9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）