

## ヒト脂質輸送体 ABCA1 のコレステロール認識機構に関する生化学研究

坂田 和樹

高密度リポタンパク質 (HDL) は末梢組織の余剰なコレステロールを肝臓へと運ぶことでコレステロールの恒常性の維持に貢献しており、血中 HDL 濃度の減少は冠動脈疾患の発症リスクを増大させる。ATP-binding cassette A1 (ABCA1) はヒトに 48 ある ABC タンパク質の一つで、ATP の結合・加水分解のエネルギーを利用して HDL の前駆体である新生 HDL を産生する。新生 HDL は血中脂質受容体であるアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) が数百分子の脂質を取り囲んだディスク状の構造を持つ。コレステロールは新生 HDL の主要な脂質成分であるが、コレステロールが ABCA1 の輸送基質であるかどうかは明らかになっていない。ABC タンパク質の ATP 加水分解活性は輸送基質によって誘導されることが知られており、精製した ABC タンパク質を人工脂質粒子であるリポソームに再構成して ATP 加水分解活性を解析することで輸送基質を探索することができる。そこで本研究では、ABCA1 によるコレステロール認識機構を明らかにすることを目的として精製 ABCA1 を用いた生化学的解析を行った。

第一章では、コレステロールがヒト ABCA1 の ATP 加水分解活性に与える影響を解析した。まず精製 ABCA1 の ATP 加水分解活性測定系の最適化を目指し、lauryl maltose neopentyl glycol を用いて界面活性剤を限りなく排除した状態で ABCA1 を精製する手法を確立した。次いで、コレステロールが ABCA1 の脂質膜への再構成に与える影響を排除するため、ABCA1 を人工脂質粒子(リポソーム)に再構成した後にメチルβシクロデキストリン(MβCD)を用いてコレステロールをリポソームに添加する方法を用いて解析を行った。精製した ABCA1 を 1,2-ジオレオイルホスファチジルセリン (DOPS) からなるリポソームに再構成し、コレステロールをリポソームに添加したところ、ATP 加水分解活性の  $V_{max}$  の上昇がみられた。このことから、コレステロールは ABCA1 の ATP 加水分解の速度を上昇させることが示された。様々な脂質の影響を評価した結果、このコレステロールによる活性上昇には負電荷脂質が必要であることが明らかになった。哺乳類細胞内で最も豊富な負電荷脂質はホスファチジルセリン (PS) であるため、PS に着目して研究を進めた。ABCA1 の ATP 加水分解活性は DOPS 濃度依存的に上昇し、コレステロールによる活性上昇は DOPS だけでなく脳由来 PS 混合物、生理的に豊富な 1-パルミトイル-2-オレオイルホスファチジルセリン (POPS) など、幅広い PS 種で確認された。次いで ATP 加水分解活性の上昇が実際の輸送を反映しているかを検討した。POPS を BHK/ABCA1 細胞に添加すると apoA-I に対するコレステロール排出量が上昇したことから、PS はコレステロールの輸送活性を上昇させることが確認された。以上から、ABCA1 はコレステロールを輸送基質として認識すること、PS が ABCA1 による ATP 加水分解活性およびコレステロール排出活性を制御することが示唆

された。

第二章では ABCA1 によるステロール認識の詳細を明らかにするため、第一章で構築した ATP 加水分解活性測定系を用いて様々なステロールによる影響を解析した。M $\beta$ CD を用いてステロールを DOPS リポソームと混合したところ、複数のステロールがコレステロールと同程度リポソームに挿入できることが分かった。次いでこれらのステロールが ABCA1 の ATP 加水分解活性に与える影響を測定したところ、デスモステロールとチモステロールはコレステロールと同程度（約 2 倍）活性を誘導した。一方で、7-デヒドロコレステロールとラソステロールは約 1.2 倍の活性誘導に留まり、スティグマステロールとブラジカステロールは ATP 加水分解活性を上昇させなかった。また、コレステロール輸送体と考えられている ABCG1 と ABCG4 のステロールに対する応答は ABCA1 と大きく異なり、用いた全てのステロールでコレステロールと同等以上に ATP 加水分解活性を上昇させた。以上から、ABCA1 はコレステロールの側鎖と環構造を認識すること、基質として植物ステロールよりもコレステロールを好むこと、そして ABCA1 と ABCG1, ABCG4 ではコレステロール認識機構が異なっている可能性が示唆された。

本研究によって ABCA1 がコレステロールを輸送基質として認識すること、ABCA1 による認識にはコレステロールの側鎖と環構造の両方が重要であることが示唆された。これらは ABCA1 による HDL 産生機構を明らかにするための重要な知見である。