

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	坂田 和樹
論文題目	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		
(論文内容の要旨)			
<p>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血中脂質受容体であるアポリポタンパク質A-I (apoA-I) に脂質を輸送し、HDLの前駆体である新生HDLを産生する。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膜小胞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。本論文では、精製ABCA1を用いた生化学的解析を行うことで、新生HDL産生におけるコレステロールの輸送機構を明らかにすることを目的とした。</p> <p>精製ABCA1を用いて脂質による影響を解析した報告は2例あるが、これまでコレステロールによるATP加水分解活性の上昇は確認されていない。膜タンパク質において膜環境はその機能に重要であり、リン脂質による膜タンパク質の機能制御については多数報告がある。そのため、特定のリン脂質がABCA1によるコレステロール認識に影響している可能性が考えられる。第一章では、様々なリン脂質からなるリポソームを用いてコレステロールによるABCA1のATP加水分解活性への影響を評価した。まず精製ABCA1のATP加水分解活性測定系の最適化を目指し、臨界ミセル濃度が非常に低い界面活性剤を用い、界面活性剤をほぼ排除した状態でヒト細胞からヒトABCA1を精製する手法を構築した。また、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をリポソームに再構成した後にシクロデキストリンを用いてコレステロールをリポソームに添加する方法も開発した。これらの手法を用いた解析から、ヒトABCA1のATP加水分解活性がホスファチジルセリン (PS) リポソーム中でコレステロールによって上昇することが明らかになり、ABCA1がコレステロールを輸送基質として認識することが示唆された。次に、コレステロールによるATP加水分解活性誘導におけるリン脂質依存性について調べ、ホスファチジルコリン (PC) のみ、またはPCに加えホスファチジルエタノールアミンやスフィンゴミエリンを含むリポソーム中ではABCA1のATP加水分解活性は低く、コレステロール添加による活性上昇も見られない、あるいはごくわずかであることを明らかにした。一方で、負電荷脂質であるPSやホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロールを含む条件では高いATP加水分解活性を示し、コレステロールによって活性が2-3倍上昇した。この結果は、コレステロールによるATP加水分解活性の誘導には負電荷脂質が必要であることを示すものである。哺乳類細胞内で最も豊富な負電荷脂質はPSであるため、PSに着目して研究を進め、ABCA1のATP加水分解活性はPS濃度依存的に上昇し、コレステロールによる活性上昇は幅広いPS種で見られることを明らかにした。さらに、ATP加水分解活性の上昇が</p>			

実際の輸送活性を反映しているかについても検討し、PSをABCA1発現細胞に添加することでapoA-Iに対するコレステロール排出量が上昇する事も確認した。このことから、観察されたATP加水分解活性の上昇はABCA1による脂質輸送と相関していることが示唆された。第一章で得られた結果は、ABCA1がPS依存的にコレステロールを輸送基質として認識することを示唆した重要な発見である。

ABCA1がコレステロールを輸送基質として認識することを示唆する結果を第一章で得たが、ABCA1とコレステロールの相互作用機構は不明である。また、ABCA1がコレステロール以外のステロールを直接認識して輸送するのも未解明である。著者は第二章で、ABCA1によるコレステロール認識の詳細や、ABCA1によるステロール輸送の役割を明らかにするため、様々なステロール類によるATP加水分解活性への影響を解析した。シクロデキストリンを用いて様々なステロール類をPS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（2倍）の活性を誘導した。一方で、7-デヒドロコレステロールとラソステロールは1.2倍の活性誘導に留まり、植物ステロールである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いことが明らかになった。また、他のコレステロール輸送体である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加水分解活性の上昇が観察された。スティグマステロールとブラジカステロールはコレステロールとアルキル側鎖が異なり、7-デヒドロコレステロールとラソステロールはステロール環構造が異なることから、コレステロール側鎖と環構造の両方がABCA1による認識に重要であることが示唆された。また、ABCA1は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、ABCA1とABCG1、ABCG4では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。

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産生に必須のタンパク質であり、コレステロール恒常性において重要な役割を果たしているが、コレステロール輸送との直接的な関連性についてこれまで明確ではなかった。本論文は、精製ABCA1を用いてコレステロールによるATP加水分解活性への影響を詳細に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の精製方法の改良やシクロデキストリンを用いた活性測定系の確立によって、コレステロールによる影響を精密に評価できる実験系を構築した。
2. 様々なリン脂質を用いた解析によって、ABCA1のATP加水分解活性やコレステロールによる活性誘導にはホスファチジルセリンなどの負電荷脂質が重要であることを示した。
3. コレステロールと構造の近いステロール類がABCA1のATP加水分解活性に与える影響を解析することによって、ABCA1がコレステロールのアルキル側鎖と環構造の両方を認識すること、基質として植物ステロール類よりもコレステロールを好むことを示した。

以上のように、本論文はABCA1がコレステロールを直接認識することを初めて生化学的に示したことに加え、詳細なコレステロール認識機構の解明に迫ったものであり、細胞生化学や脂質生化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6年1月24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）