

(論文内容の要旨)

コレステロールは細胞膜の主な構成成分であるとともに、胆汁酸、各種ホルモン、ビタミン D などの前駆体として重要な役割を果たしている。食物由来のコレステロールは肝臓から低密度リポタンパク質 (LDL、いわゆる悪玉コレステロール) の形で末梢組織へと輸送される。末梢組織ではほとんどコレステロールを異化できないため末梢組織で余剰となったコレステロールは高密度リポタンパク質 (HDL、いわゆる善玉コレステロール) として再び肝臓へと送られる。ATP-binding-cassette transporter A 1 (ABCA1) は、細胞内のコレステロールを血液中のアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) を受け手として排出し、HDL を産生するトランスポーターである。ABCA1 遺伝子の変異により血漿中の HDL がほとんど消失してしまうタンジール病が引き起こされる。ABCA1 と apoA-I による HDL 形成は末梢組織に蓄積した過剰なコレステロールを排出する唯一の経路であり、HDL の減少により脳卒中、心筋梗塞などの動脈硬化を発症するリスクが上昇する。

HDL 形成において、まず apoA-I は細胞表面において ABCA1 と相互作用し、HDL は細胞膜上で形成されるとこれまで考えられてきた。しかし ABCA1 と apoA-I の細胞内動態に関して不明な点が多く、HDL 形成が細胞表面で起こるのか、細胞内の小胞上で起こるのか分かっていなかった。一方、細胞膜上で apoA-I が ABCA1 と相互作用するには ATP が ABCA1 に結合することが必要とされること、動脈硬化の病巣では ABCA1 がプロテアソームにより異常に分解されていることが報告されているが、これらの詳細なメカニズムは不明であった。

本研究では、HDL 形成に必須な ABCA1/apoA-I の細胞内動態、および ABCA1 のプロテアソームによる分解機構を解析した。本論文の主な内容は以下のとおりである

第一章では、ABCA1 と apoA-I の結合の ATP 依存性を解析した。細胞を sodium azide と 2-deoxy-D-glucose 存在下培養し細胞内 ATP を減少させると、apoA-I は ABCA1 と結合できなかった。それ故、apoA-I と ABCA1 の結合は細胞内の ATP に依存することが分かった。そこで、他の ABC タンパク質の結晶構造から ATP の結合および加水分解の各ステップに影響することが予想されるアミノ酸残基を置換した変異体を作製し、それら変異体の apoA-I との結合と apoA-I 依存的なコレステロール排出活性を調べた。その結果、いずれの変異体も apoA-I と結合しなかった。さらに apoA-I 依存的なコレステロール排出活性も示さなかった。以上の結果より、ABCA1 と apoA-I の結合には ATP が ABCA1 に結合するだけでなく、正常な加水分解サイクルが必要であることが分かった。

第二章では、ABCA1 と apoA-I の細胞内動態、および HDL 形成への寄与を解析した。ApoA-I は細胞膜上で ABCA1 と結合した後、ABCA1 のエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれた。次に、エンドサイトーシスされた ABCA1 が再び細胞表面にリサイ

クルするかどうかを調べた。まず細胞表面の ABCA1 を 1 次抗体で標識しエンドサイトーシスさせた後、細胞表面に残った抗体を酸性緩衝液で洗浄し、エンドサイトーシスした ABCA1 にのみ抗体を付加した。さらに、2 次抗体を含む培地で培養することで再び細胞表面に戻ってきた ABCA1 にのみ 2 次抗体を付加した。その結果、エンドサイトーシスされた ABCA1 の少なくとも 30% が再び細胞表面へリサイクルされることが分かった。また、ABCA1/apoA-I は Rab5 とクラスリンに依存した経路でエンドサイトーシスされ、Rab4 経路で細胞表面にリサイクルすることが分かった。ABCA1/apoA-I のエンドサイトーシスを阻害すると、通常のマクロファージでは apoA-I へのコレステロール排出が増加したが、脂質が蓄積したマクロファージでは減少した。つまり、通常培養条件下では HDL 形成は主に細胞表面で起こっているが、脂質が蓄積したマクロファージでは ABCA1/apoA-I のエンドサイトーシスーリサイクル経路が HDL 形成に重要な役割を果たしていることが分かった。

第三章では、ABCA1 のプロテアソームによる分解メカニズムを解析した。コレステロールが蓄積した初代培養のマウスマクロファージをプロテアソーム特異的な阻害剤 MG132 で処理すると ABCA1 量が増加したことから、コレステロールを蓄積したマクロファージでは、ABCA1 は主にプロテアソームによって分解されていることが分かった。ABCA1 のプロテアソームによる分解に関与する因子を探索したところ、タンパク質の脱ユビキチン化に関わる COP9 シグナロソーム (CSN) 複合体が示唆された。HEK293 細胞において、MG132 存在下、CSN 複合体のサブユニットである CSN5 と CSN2 が ABCA1 と共免疫沈降したことから、CSN 複合体がユビキチン化された ABCA1 と結合することが分かった。そこで、ABCA1 量に対する CSN 複合体の影響を検討した。CSN 複合体を過剰発現していない細胞では、MG132 を添加すると濃度依存的に ABCA1 量が増加した。CSN2 を過剰発現させた細胞では、ABCA1 量は増加し、MG132 添加はそれ以上の増加を引き起こさなかった。次に、CSN 複合体が ABCA1 のユビキチン化に与える影響を調べた。CSN 複合体を過剰発現していない細胞では、MG132 の添加によりユビキチン化された ABCA1 量が増加した。しかし、CSN2 を過剰発現させた細胞では、MG132 の添加はユビキチン化 ABCA1 量の増加を引き起こさなかった。以上の結果から、CSN 複合体はユビキチン化された ABCA1 に結合し、ユビキチンを解離させることで ABCA1 をプロテアソームによる分解から保護していることが明らかになった。

(論文審査の結果の要旨)

コレステロールは細胞膜の主な構成成分であるとともに、胆汁酸、各種ホルモン、ビタミン D などの前駆体として重要な役割を果たしている。食物由来のコレステロールは肝臓から低密度リポタンパク質 (LDL) の形で末梢組織へと輸送される。末梢組織ではほとんどコレステロールを異化できないため、末梢組織で余剰となったコレステロールは高密度リポタンパク質 (HDL) として再び肝臓へと送られる。ATP-binding-cassette transporter A 1 (ABCA1) は細胞内のコレステロールを血液中のアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) を受け手として排出し、HDL を形成するトランスポーターである。ABCA1 と apoA-I による HDL 形成は末梢組織に蓄積した過剰なコレステロールを排出する唯一の経路であり、HDL の減少により脳卒中、心筋梗塞などの動脈硬化を発症するリスクが上昇する。HDL を形成する際、まず apoA-I が細胞膜上で ABCA1 と結合することがわかっているが、その機構は不明であった。また、ABCA1 と apoA-I の細胞内動態も不明な点が多く、HDL 形成への寄与も分かっていなかった。さらに、動脈硬化の病巣では ABCA1 がプロテアソームにより異常に分解されていることが報告されているが、そのメカニズムは不明であった

本論文は、HDL 形成にとって重要な ABCA1/apoA-I の細胞内動態、および ABCA1 のプロテアソームによる分解機構を解析したものである。ABCA1 と apoA-I が細胞膜上で正常な ATP 加水分解サイクルを介して結合すること、また ABCA1/apoA-I のエンドサイトーシスーリサイクルを明らかにし、その経路はコレステロールが蓄積したマクロファージにおける HDL 形成に重要であること、さらに CSN 複合体が ABCA1 と結合してユビキチンを解離させることが初めて明らかになった。評価すべき点は以下の通りである。

1. 高密度リポタンパク質 (HDL) 形成の第一段階である ABCA1 と apoA-I の細胞膜上での結合は細胞内 ATP に依存することを明らかにした。
2. ABCA1 による ATP 加水分解サイクルが ABCA1 と apoA-I の結合にとって重要であることを明らかにした。
3. ABCA1/apoA-I 複合体は、Rab5 とクラスリンに依存した経路でエンドサイトーシスされ、そのうち少なくとも 30% が Rab4 経路で細胞膜へリサイクルすることを明らかにした。
4. 細胞内に脂質が蓄積したマクロファージからの HDL 形成には、ABCA1/apoA-I のエンドサイトーシスーリサイクル経路が大きく関与していることを明らかにした。
5. 一方、脂質を蓄積していない細胞では、細胞表面で HDL 形成が起こっていることを明らかにした。
6. CSN 複合体はユビキチン化された ABCA1 と相互作用し、ABCA1 からのユビキチンの解離を促進することによって、ABCA1 をプロテアソームによる分解から保護していることを明らかにした。

以上のとおり、本論文は、HDL 形成にとって重要な ABCA1/apoA-I の細胞内動態、お

よび ABCA1 のプロテアソーム分解保護機構を初めて明らかにしたものであり、生化学、分子生物学、細胞生物学、基礎生理学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 21 年 4 月 10 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。