

## (論文内容の要旨)

コレステロールは細胞膜の必須構成成分であり、胆汁酸やステロイドホルモンの前駆体としても重要である。食物中のコレステロールは小腸から吸収されると肝臓へ輸送され、肝臓で合成されたコレステロールとともに、低密度リポタンパク質 (LDL) の形で末梢細胞へと運ばれる。末梢細胞は部分的酸化やステロイド合成を除いてはコレステロールを異化できず、余剰のコレステロールは高密度リポタンパク質 (HDL) として血流中を肝臓へ逆転送され、一部は胆汁酸として排出される。過度に蓄積したコレステロールは末梢細胞のアポトーシスを引き起こし、さらに動脈硬化などのさまざまな疾病の原因となる。それ故、HDL 産生機構は、体内のコレステロール恒常性を維持するために重要である。

ATP-binding cassette (ABC) タンパク質ファミリーは、よく保存された ATP 結合領域と複数回の膜貫通領域を持つ膜タンパク質であり、その多くが生体内の脂質恒常性維持に関与する。ABC タンパク質の一つである ABCA1 は、ATP 加水分解エネルギーを利用し、細胞内リン脂質及びコレステロールを血漿中のアポリポタンパク質 (apoA-I、apoE など) を受け手として血中へ排出し HDL を産生する。細胞内コレステロール濃度を一定に保つためには ABCA1 の発現量や活性を厳密に制御する必要がある、ABCA1 は転写レベルおよび翻訳後レベルでさまざまな制御を受けている。

ABCA1 の転写は、核内転写因子 LXR (Liver X receptor) により制御される。細胞内コレステロールが増加すると、コレステロールの代謝中間産物であるオキシステロールがリガンドとして LXR に結合し、ABCA1 の転写を促進する。その結果、細胞内コレステロールは細胞外へ排出され、コレステロールは減少する。

一方で、細胞からコレステロールが排出されすぎないように、ABCA1 は半減期約 2 時間で迅速に分解される。このように ABCA1 は転写レベルだけでなく、厳密な翻訳後制御を受けていることが予想されるが、その詳細は不明であった。

本研究では ABCA1 の翻訳後修飾および制御機構を明らかにすることを目的とした。  
本論文の主な内容は以下のとおりである。

まず第 1 章では、ABCA1 の分子内ジスルフィド(S-S)結合について解析を行った。ABCA1 は、翻訳された後、2つの大きな細胞外領域 (ECD : Extracellular domain) の間に分子内ジスルフィド結合が形成されることが報告されていたが、生理的役割は不明であった。本研究ではまず、還元剤を用いて ABCA1 発現細胞表面のジスルフィド結合を切断すると apoA-I が ABCA1 に結合しなくなることを示し、ジスルフィド結合が apoA-I との結合に必須であることを明らかにした。次に、ABCA1 の ECD に存在する 16 個のシステイン残基 (Cys) をセリンに置換した 30 種以上の変異体を作製した。各変異体のコレステロール排出能を調べた結果、ECD1 の C75/C309 と ECD2 の C1463/C1465/C1477 の 5 つの Cys が ABCA1 の活性に重要な役割を果たすことを明らかにした。また、ABCA1 が細胞内領域の 2 箇所トリプシンにより限定分解されることを利用し、トリプシン限定分解産物の電気泳動パターンから、ABCA1 には 2 本の分子内ジスルフィド結合が形成されており、C1463 と C1465 は代替可能であることを明らかにした。変異体のコレステロール排出能を測定した結果から、ABCA1 の 2 本の分子内ジスルフィド結合がコレステロール排出に必須であることを示した。

第2章では、ABCA1の翻訳後制御に関与する結合タンパク質について解析を行った。培養細胞の膜画分を用いた結合実験から、ABCA1自身の転写因子であるLXR $\beta$ が細胞膜上のABCA1と直接結合することを明らかにした。LXR $\beta$ のリガンドを添加すると両者の結合は解離したことから、ABCA1とLXR $\beta$ は細胞内コレステロール濃度の低い時に結合することがわかった。さらに、ABCA1の半減期を測定した結果、LXR $\beta$ と結合したABCA1は細胞膜上で安定化されることを示した。一方、LXR $\beta$ とABCA1を共発現させた細胞からのコレステロール排出を測定したところ、LXR $\beta$ と結合したABCA1はコレステロール排出活性を持たないことが明らかになった。LXR $\beta$ はABCA1の転写を調節する核内受容体として機能するだけでなく、ABCA1に直接結合しABCA1の活性を制御することが示唆された。

さらに、LXR $\beta$ と相互作用するABCA1内の領域を検索した結果、2247～2251番目のアミノ酸配列“LTSFL”が重要であることを明らかにした。さらに、ABCA1/LXR $\beta$ 複合体にはapoA-Iが結合できないことを示し、LXR $\beta$ との結合によってABCA1の構造が変化すること、それによってコレステロール排出活性を失うことを明らかにした。

これらの結果から、「細胞内コレステロール濃度が低い時、ABCA1/LXR $\beta$ 複合体は不活性な状態で細胞膜上に待機しており、コレステロール濃度の急激な上昇に迅速に対応することを可能にしている」という新たな翻訳後制御機構を提唱した。

(論文審査の結果の要旨)

コレステロールの過剰摂取による脂質恒常性の破綻は様々な生活習慣病を引き起こすことから、現代人の大きな問題となっている。近年、多くの ABC (ATP-binding cassette) タンパク質が脂質の恒常性維持に関与することが明らかになりつつあり、ABC タンパク質の機能解明はますます重要性を増している。

コレステロールは細胞膜の主な構成成分であるだけでなく、胆汁酸や種々のホルモンの前駆体として必須である。コレステロールは細胞内で合成されると共に小腸から吸収されて肝臓に運ばれ、末梢細胞へと輸送される。過剰なコレステロールの蓄積は細胞毒性をもつため、体内の脂質恒常性は厳密に維持されている。ABCA1 はマクロファージを含む様々な組織で発現し、細胞で過剰になったコレステロールを細胞外へ排出し、一般に「善玉コレステロール」と呼ばれる高密度リポタンパク質 (HDL) を産生する。ABCA1 は転写レベルだけでなく、厳密な翻訳後制御を受けていることが予想されるが、その詳細は不明であった。

本論文は、体内の脂質恒常性維持において重要な役割を果たしているABCA1の翻訳後修飾および制御機構を解析したものであり、ABCA1の2本の分子内ジスルフィド結合がコレステロール排出活性に必須であること、ABCA1の転写因子であるLXR $\beta$ がABCA1に結合し、タンパク-タンパク間相互作用によりABCA1の活性を制御することを初めて明らかにした。評価すべき点は以下の通りである。

1. ABCA1の分子内に2本のジスルフィド結合が存在し、このジスルフィド結合には細胞外ドメインの5つのシステイン残基が関与することを明らかにした。
2. 細胞外ドメイン間で形成される2本の分子内ジスルフィド結合が、ABCA1のコレステロール排出活性に必須であることを明らかにした。
3. ABCA1の転写を制御する核内受容体LXR $\beta$ がABCA1と直接結合することを明らかにした。
4. ABCA1/LXR $\beta$ 複合体はタンパク質分解酵素による分解を受けにくく細胞膜上に安定に存在するが、複合体にはapoA-Iは結合せず、コレステロール排出活性を持たないことを明らかにした。
5. ABCA1のC末端領域に位置する2247～2251番目のアミノ酸配列“LTSFL”がLXR $\beta$ との結合に重要であることを明らかにした。
6. 細胞内コレステロール濃度が低い時、ABCA1/LXR $\beta$ 複合体は不活性な状態で細胞膜上に待機しており、コレステロール濃度の急激な上昇に迅速に対応することを可能にしているという新たな翻訳後制御機構を提唱した。

以上のとおり、本論文は、体内の脂質恒常性維持において重要な役割を果たしているABCA1の翻訳後修飾および制御機構を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。