

( 続紙 1 )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                        |    |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|------|
| 京都大学                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 博士（農学）                                                                                                                 | 氏名 | 平田 崇 |
| 論文題目                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Analysis of molecular mechanisms controlling subcellular localization of ABCG5 and ABCG8<br>(ABCG5とABCG8の細胞内局在制御機構の解析) |    |      |
| (論文内容の要旨)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                        |    |      |
| <p>食事に含まれるコレステロールの約50%は小腸から吸収される。一方、食事に含まれる植物由来のステロールはわずかししか吸収されず、吸収されたステロールも肝臓から速やかに排出される。この植物ステロールの吸収抑制と排出促進を担っているのが、小腸上皮細胞および肝臓の毛細胆管膜に発現するABCG5とABCG8である。これらはATP結合ドメインと6つの膜貫通<math>\alpha</math>-ヘリックスをもつハーフサイズのATP-binding cassette (ABC) タンパク質であり、ヘテロ二量体を形成して機能する。ABCG5とABCG8のどちらかに変異があると、体内に植物ステロールが蓄積するシトステロール血症が引き起こされる。さらに本疾患ではコレステロールの排出が減少し、若年性のアテローム性動脈硬化の危険性が高まることも報告されている。</p> <p>ヒトには5つのABCGサブファミリータンパク質が存在し、ABCG1は末梢組織から肝臓へのコレステロールを逆輸送する高密度リポタンパク質の形成に関与する。ABCG2はプリン代謝物である尿酸の腎臓からの排出に関与する。また、ABCG4は脳、脾臓、眼などに発現し、ステロール輸送に関与することが示唆されている。これら3種のABCGサブファミリータンパク質はホモ二量体として細胞膜に発現する。それに対し、ABCG5とABCG8はヘテロ二量体を形成した場合にのみ細胞膜に発現し、ABCG5またはABCG8のホモ二量体は小胞体に留まり、すぐに分解される。このようにABCG5とABCG8はホモ二量体とヘテロ二量体が選別され局在が制御されているが、どのような機構によりヘテロ二量体だけが選別され、細胞膜に発現するのかは不明である。</p> <p>本研究ではABCG5、ABCG8の二量体形成および選別に関与する領域を検討し、さらにその領域内でシグナル配列の探索をした。その結果、選別にはATP結合ドメインが重要であること、未知の小胞体残留モチーフまたは品質管理機構により細胞内局在が制御されていることを示唆した。本論文の主な内容は以下のとおりである。</p> <p>第一章では、ABCG1とABCG5、ABCG2とABCG8のキメラタンパク質の細胞内局在を解析し、ABCG5、ABCG8のホモ二量体とヘテロ二量体の選別に関与する領域を検討した。まず、ABCG1とABCG5のATP結合ドメインと膜貫通領域を組み換えたキメラタンパク質をHEK293細胞に発現させ、細胞膜非透過性ビオチン化試薬を用いて標識することで、キメラタンパク質の細胞膜上への発現を検討した。ABCG1のATP結合ドメインとABCG5の膜貫通領域をもつキメラタンパク質(ABCG1-5) はビオチン化されたことから、細胞膜上に発現することが分かった。</p> |                                                                                                                        |    |      |

また、ABCG5のATP結合ドメインとABCG1の膜貫通領域をもつキメラタンパク質(ABCG5-1)はビオチン化されず、細胞膜上には発現しないことが示唆された。さらに免疫蛍光染色法により細胞を観察したところ、ABCG1-5は細胞膜に、ABCG5-1は小胞体に局在することが明らかになった。

次に架橋剤を用いてキメラタンパク質の二量体形成について検討した。ABCG1-5は細胞膜非透過性架橋剤、細胞膜透過性架橋剤どちらを用いても、架橋剤を用いなかった場合と比べて電気泳動による見かけの分子サイズが約2倍に増加した。それに対し、ABCG5-1は細胞膜透過性架橋剤でのみ分子サイズの増加が見られた。この結果はABCG1-5、ABCG5-1はともにホモ二量体を形成しており、ABCG1-5が細胞膜に局在するのにに対しABCG5-1は小胞体に留まることを示している。以上より、ABCG5のATP結合ドメインを持つホモ二量体は小胞体に残留するのにに対し、ABCG1のATP結合ドメインを持つホモ二量体は細胞膜に発現することが明らかとなった。

同様の手法でABCG8とABCG2のキメラタンパク質の局在を解析した結果、ABCG8のATP結合ドメインを持つホモ二量体は小胞体に残留し、ABCG2のATP結合ドメインを持つホモ二量体は細胞膜に発現することが示唆された。以上より、ABCG5ホモ二量体およびABCG8ホモ二量体のATP結合ドメインを特異的に認識し、小胞体に留める機構が存在することが示唆された。

第二章ではABCG5とABCG8のATP結合ドメインに小胞体残留・逆送に関するシグナルが存在する可能性を検討した。ATP感受性カリウムチャネルなどの膜タンパク質複合体は、ATP結合ドメインにアルギニン-X-アルギニンのアミノ酸配列(RXRモチーフ)からなる小胞体逆送シグナルを持つ。複合体が正しく形成されないとこのモチーフが何らかの分子により認識され、膜タンパク質はゴルジ体から小胞体へ逆送されて小胞体に留められる。適切にタンパク質複合体が形成されると、RXRモチーフがタンパク質内部に隠れて認識されなくなるため、小胞体を脱出し細胞膜に発現する。ABCG5、ABCG8のATP結合ドメインを探索したところ、それぞれのATP結合ドメイン内にRXRモチーフ様配列が2箇所ずつ確認できた。そこで、この配列の変異体を細胞に発現させ、その働きを検討した。

ABCG5、ABCG8それぞれのRXRモチーフ様配列のアミノ酸をアラニンまたはリシンに置換した変異体をHEK293細胞に発現させ、免疫蛍光染色法により観察した。どの変異体も単独で発現させると小胞体に残留し、ABCG5またはABCG8と共発現させると細胞膜に発現した。変異体が野生型と同様の局在を示したことより、ABCG5およびABCG8のRXRモチーフ様配列は小胞体残留シグナルとしての働きを持たないことが示唆された。この配列以外には既知の小胞体残留・逆送に関与するモチーフ様配列は見出されなかったことから、ABCG5とABCG8の細胞内局在が既知の残留モチーフ以外の機構により制御されていることが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

体内のコレステロールや植物ステロール量が異常に増加すると、脳や心臓の血管障害の原因となる。通常、余剰なステロールは肝臓より体外へ排出されるが、その過程にはABCG5とABCG8が関与している。両者はヘテロ二量体を形成してステロール排出に関与する一方、それぞれのホモ二量体は小胞体に局在するため、ヘテロ二量体が選別されて細胞膜に輸送される機構が存在すると考えられるが、その機構は不明であった。本研究は、体内のステロール恒常性維持にとって重要なABCG5、ABCG8の局在制御機構を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. ABCG5、ABCG8 の小胞体残留にはそれぞれの ATP 結合ドメインが重要であることを明らかにした。
2. ABCG5、ABCG8 には小胞体残留に関与するシグナルとして働く既知のモチーフはなく、未知の小胞体残留モチーフまたは品質管理機構により細胞内局在が制御されていることを示唆した。

以上のとおり、本論文は、体内のステロール恒常性維持にとって重要なABCG5とABCG8の細胞内局在の制御機構を解析したものであり、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23年2月14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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開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