

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	長尾 耕治郎
論文題目	Mechanism of high-density lipoprotein formation by ABCA1 (ABCA1によるHDL形成機構)		
(論文内容の要旨)			
コレステロールは細胞の必須構成成分であり、細胞の増殖に必要である。一方、末梢組織における過剰蓄積は毒性を示し、脳梗塞や心筋梗塞の原因となる動脈硬化症を引き起こす。コレステロールは末梢組織において異化されず、末梢組織で過剰になったコレステロールは善玉コレステロールとして知られる高密度リポタンパク質(HDL)のかたちでコレステロールの異化器官である肝臓へと血液中を輸送される。このHDLの新生を行うのがATP-binding cassette (ABC)タンパク質ファミリーのひとつABCA1である。 ABCA1は細胞膜上で血中の脂質アクセプターapolipoprotein A-I (apoA-I)と相互作用し、細胞のコレステロールとリン脂質をapoA-Iへ受け渡し、未成熟なHDLであるpre-βHDLを形成する。ABCA1はHDL形成に必須であり、<i>ABCA1</i>遺伝子の変異により、血液中の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。このように、ABCA1は末梢組織から余剰なコレステロールを除去することによって、コレステロール恒常性維持のために重要な役割を果たしている。しかし、これまでのような機構でABCA1がHDLを形成するのか不明であった。 本研究では、まずABCA1によるHDL形成に対する細胞膜の脂質環境の影響を解析した。次に、HDL形成におけるABCA1の機能を、脂質トランスポーターとしての機能とapoA-I受容体として機能の二つに分け、それぞれを解析しABCA1によるHDL形成の新しいモデルを提唱した。本論文の主な内容は以下のとおりである。 第一章では、ABCA1によるHDL形成に対する細胞膜の脂質環境の影響を解析するために、ラフト領域を構成する細胞膜のスフィンゴミエリン(SM)の含量を変化させ、HDL形成活性への影響を検討した。Chinese hamster ovary (CHO)-K1細胞由来のLY-A株は、SM前駆体のセラミドをゴルジ体に輸送できないため、SMを合成することができない。LY-A株をスフィンゴ脂質不含有培地で48時間培養すると、LY-A株のSM含量は機能回復株LY-A/CERT株の約65%に低下した。LY-A株からのABCA1によるコレステロールとコリンリン脂質の排出量は、LY-A/CERT株と比べてそれぞれ1.65倍、1.51倍高い値を示した。細胞膜分画実験により、ABCA1が細胞膜のノンラフト領域に存在していること、LY-A株ではLY-A/CERT株よりも多くのコレステロールがノンラフト画分に存在することが示された。細胞膜のSM含量を減少させることによりABCA1が存在するノンラフト領域のコレステロールが増加し、ABCA1によるコレステロール排出活性が増加したと考えられる。以上の結果から、ABCA1はノンラフト領域において脂質をapoA-Iに受け渡すことが明らかになった。			

第二章では、ABCA1がHDL形成において脂質トランスポーターとapoA-I受容体としての二つの機能を果たしていると考え、これらの機能がどのようにして駆動され、どう関連するのか検討した。ABCA1の脂質トランスポーターとしての機能を解析するために、胆汁酸の一つであるタウロコール酸ナトリウム(NaTC)を使用した。ABCA1安定発現細胞の培地中にNaTCを添加すると、apoA-I存在下と同程度の効率でコレステロールとリン脂質が排出されることが明らかになり、NaTCを用いてABCA1の脂質トランスポーターとしての機能解析が可能であることがわかった。血中HDLが減少するタンジール病患者で見つかったABCA1の変異W590Sは、NaTCとapoA-Iのどちらをアクセプターとしても脂質の排出活性を大きく減少させ、W590S変異はABCA1の脂質トランスポーターとしての機能を損なうことが明らかになった。続いて、蛍光標識apoA-Iの細胞への結合を蛍光顕微鏡で観察することにより、W590S変異体に野生型ABCA1と同程度の強さでapoA-Iが結合することが明らかになった。このことから、脂質トランスポーターとしての機能とapoA-I受容体としての機能は互いに独立していることが示された。次に、apoA-IのABCA1からの解離を解析すると、W590S変異体からのapoA-Iの解離は野生型からよりも遅いことがわかった。W590S変異体ではapoA-Iに脂質を受け渡す効率が低いため、apoA-IのABCA1からの解離が遅れると考えられた。

以上の結果より、HDL形成機構として4段階モデルを提唱した。(Step 1) ABCA1とapoA-Iが直接相互作用する。(Step 2) ApoA-Iに依存せずにコレステロールとリン脂質を移動させる。(Step 3) 移動させた脂質をapoA-Iへ受け渡す。(Step 4) 脂質を受け取ったapoA-IがABCA1から解離する。このように、ABCA1はapoA-I受容体と脂質トランスポーターとしての二つの互いに独立した機能を果たし、両者がHDL形成に必須であることが明らかになった。

第三章では、ABCA1とapoA-Iの結合様式を解析した。ApoA-Iには負電荷のクラスターが存在することが結晶構造より示されているため、ABCA1の正電荷とapoA-Iの負電荷が静電相互作用により引き付けあうことによって結合するという仮説を立てた。負電荷を帯びたヘパリンおよび正電荷を帯びたポリ-L-リジンは、それぞれABCA1とapoA-Iの結合を濃度依存的に抑制した。また、ABCA1のリジン残基のN-hydroxysuccinimido (NHS)-Acetateによるアセチル化修飾または Sulfo-NHS-Biotinによるビオチン化修飾により、ABCA1とapoA-Iの結合が阻害された。これらの結果より、ABCA1のリジン残基からなる正電荷のクラスターとapoA-Iの負電荷のクラスターの間の静電相互作用がABCA1とapoA-Iの結合に関与することが示唆された。

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。

(論文審査の結果の要旨)

コレステロールは細胞の増殖に必須である。一方、コレステロール過剰蓄積は細胞毒性を示し、脳梗塞や心筋梗塞の原因となる動脈硬化症を引き起こす。高密度リポタンパク質(HDL)形成が末梢組織で過剰になったコレステロールを除去する唯一の経路であり、その過程にATP-binding cassette (ABC)タンパク質ファミリーの一つであるABCA1が関与していることがわかっているが、どのようなメカニズムでABCA1によってHDLが形成されるかは不明であった。本研究は、体内のコレステロール恒常性維持にとって重要なABCA1によるHDL形成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. ABCA1 は、細胞中のスフィンゴミエリン量が減少した時に高いコレステロール排出活性を示すことを明らかにした。
2. ABCA1 が細胞膜上のスフィンゴミエリンの少ないノンラフト領域で機能することを明らかにした。
3. ABCA1 が胆汁酸塩を脂質アクセプターとしてコレステロールを排出できることを示し、apoA-I 非存在下でも脂質を移動させる活性をもつことを明らかにした。
4. ABCA1 が、apoA-I を直接結合する受容体としての機能と、脂質トランスポーターとしての機能の二つの独立した機能をもち、両方の機能が HDL 形成に必須であることを明らかにした。
5. ABCA1 による HDL 形成が 4 つの段階に分けられることを示し、“4 段階モデル”を HDL 形成機構として提唱した。
6. ABCA1 の正電荷のクラスターと apoA-I の負電荷のクラスターの間の静電相互作用が ABCA1 と apoA-I の結合に関与することを示した。

以上のとおり、本論文は、体内のコレステロール恒常性維持にとって重要なABCA1によるHDL形成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22年2月12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