

氏 名	むね 宗 平 洋 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1651 号
学位授与の日付	平 成 19 年 5 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Transcriptional and post-translational regulation of ABC proteins involved in cellular cholesterol transport (コレステロール輸送を担う ABC タンパク質の転写および翻訳後制御機構の解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 植 田 和 光 教 授 阪 井 康 能 教 授 植 田 充 美

論 文 内 容 の 要 旨

ABC タンパク質はよく保存された ATP 結合ドメインと複数の膜貫通ドメインを持つ膜タンパク質ファミリーであり、脂質、薬剤、胆汁酸、ペプチドなど様々な基質を細胞質から細胞外へ、あるいは細胞小器官内へと輸送し、多くの組織で重要な機能を果たしている。ABCA1 は末梢細胞が蓄積したコレステロールを血漿中のアポリポタンパク質 apoA-I へと排出することで円盤状の高密度リポタンパク質 (pre β -HDL) を形成する。ABCG1 は ABCA1 により形成された pre β -HDL にコレステロールを排出することでコレステロールに富んだ球状の HDL を形成する。HDL は血中を肝臓へと運ばれ末梢細胞に蓄積したコレステロールは減少する。それ故、ABCA1 と ABCG1 の活性化は、血管内皮下における脂質蓄積を軽減し、動脈硬化を抑制すると期待されている。ABCA1 と ABCG1 の両遺伝子は、オキシステロールをリガンドとする転写因子 LXR により転写制御を受けており、細胞内コレステロールの上昇に伴って mRNA レベルでの発現量が増加する。しかし、ABCA1 は翻訳後半減期約 2 時間で速やかに分解されることから、転写だけではなく翻訳後も厳密な制御をうけていると考えられる。

本研究は、ABCA1 と ABCG1 の発現制御機構の解明を目的とし、ABCA1 の翻訳後制御に関わるタンパク質の同定およびタンパク質相互作用による ABCA1 の分解調節機構を解析した。また、ABCA1 および ABCG1 はコレステロールの排出を介して、LXR の転写活性をフィードバック抑制することが予想されたことから、ABCA1 と ABCG1 が転写因子 LXR の活性に与える影響を解析した。本論文の内容は以下のとおりである。

ABCA1 は C 末端に PDZ タンパク質結合モチーフを持つことから PDZ タンパク質との結合を介して翻訳後制御がなされていると考えた。そこで、第一章では ABCA1 の C 末端 120 アミノ酸と相互作用するタンパク質を、yeast two-hybrid 法によりスクリーニングし、PDZ タンパク質である α 1-syntrophin および Lin7 を ABCA1 と相互作用するタンパク質の候補として見出した。培養細胞を用いた生化学的解析から、両者は ABCA1 の PDZ タンパク質結合モチーフを介して ABCA1 と結合することを明らかとし、 α 1-syntrophin はマウスの脳内で ABCA1 と結合していることを明らかにした。さらに、 α 1-syntrophin との相互作用は ABCA1 の分解速度を約 1/5 に減少させ、ABCA1 を介したコレステロール排出を促進することを明らかにした。以上の結果より、ABCA1 の分解を抑制することで、コレステロール排出を促進できる可能性が示された。

ABCA1 はコレステロールを排出し細胞内コレステロールを減少させるため、コレステロールの代謝中間体であるオキシステロールをリガンドとする LXR の転写促進活性を抑制することが予想された。そこで第 2 章では ABCA1 の発現が LXR の転写活性に与える影響を、LXR 制御配列をつないだルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイにより検討した。その結果、ABCA1 はコレステロールの排出ではなく細胞内コレステロールの局在変化を介して LXR の転写活性を抑制することを明らかにした。さらに、ABCA1 は細胞内の LXR リガンドの減少を介さずに 25-hydroxycholesterol および 27-hydroxycholesterol による LXR の活性化を抑制する可能性を示した。LXR の転写活性に対する同様の抑制効果は Methyl-

β -cyclodextrin (M β CD) を用いた細胞膜コレステロールの引き抜きによっても観察された。コレステロール結合型の oxysterol binding protein (OSBP) は、脱リン酸化酵素と複合体を形成しており、M β CD 処理はコレステロールを OSBP から引き離すことでこの複合体を乖離させ、活性型 ERK1/2 量を増加させることが報告されている。ABCA1 の発現は M β CD 処理と同様に活性型 ERK1/2 量を増加させることを明らかにした。さらに、LXR のリガンド依存的な転写活性が活性型 ERK1/2 量の増加によって抑制されることを明らかにした。以上の結果より ABCA1 はシグナル伝達を介して LXR の転写活性を抑制することが示唆され、この経路にコレステロール結合タンパク質である OSBP が関わっている可能性が示された。

ABCG1 も ABCA1 と同様、細胞内コレステロールの局在変化を引き起こすことが報告されている。そこで第 3 章では ABCG1 が LXR の転写活性に与える影響を解析した。その結果、ABCG1 は ATP 加水分解活性に依存して LXR の転写活性を抑制することを明らかとした。この阻害は、ABCG1 による細胞内コレステロールおよびオキシステロールの局在変化により起こる可能性を示した。さらに ABCG1 はステロイド骨格を持たない LXR の合成リガンド TO901317 (TO) による LXR の活性化を非拮抗的に阻害することを明らかにした。この抑制には細胞内のメバロン酸あるいはその代謝物の減少が関わっていることを示し、LXR のリガンド依存的な活性がメバロン酸により増大することを明らかにした。以上の結果より、ABCG1 は細胞内の LXR リガンドを輸送するだけでなく、メバロン酸合成を抑制することで LXR の転写活性をフィードバック抑制する可能性を示した。後者の経路には HMG-CoA reductase が関与している可能性が考えられる。ABCG1 が肝実質細胞および肺胞 II 型細胞において重要な働きをしているという報告と合わせて考えると、ABCG1 がこれらのコレステロール産生細胞においてコレステロール合成を抑制すると同時に LXR の転写活性の抑制を介して脂肪酸合成を制御している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

コレステロールは細胞膜の流動性を決定するだけでなく、ステロイドの産生に必須であり、細胞レベルおよび個体レベルで生理的に重要な働きをしている。しかし、過剰なコレステロールの蓄積は膜タンパク質の機能低下やシグナル伝達の変化を引き起こし、最終的には細胞死を引き起こす。多くの細胞では受容体を介したコレステロールの取り込みが細胞内コレステロール量により制限されているためコレステロールの過剰な蓄積が起りにくいが、血管内皮下に浸潤したマクロファージなどにおいては、コレステロールの取り込みが制御できないため過剰な蓄積を生じ、動脈硬化の引き金となる。ABCA1 および ABCG1 を介したコレステロール排出は末梢組織におけるコレステロール蓄積を直接軽減する唯一の経路であるため、ABCA1 および ABCG1 遺伝子の発現制御が抗動脈硬化研究において注目されている。しかし、LXR リガンドによる両遺伝子の転写活性化は、同時に SREBP1c を介した脂肪酸合成の促進をもたらすため、LXR を標的とした動脈硬化治療薬の開発は容易ではない。

本論文では、ABCA1 の C 末端に結合する α 1-syntrophin が ABCA1 の分解を抑制することで細胞からのコレステロール排出を促進させることを示した。また、ABCA1 および ABCG1 はコレステロールの排出ではなく細胞内コレステロールの局在変化を介して LXR をフィードバック抑制することを明らかとし、ABCA1 による抑制経路にステロール結合タンパク質 OSBP が関与している可能性を、ABCG1 による抑制経路に HMG-CoA reductase が関与している可能性を示した。本論文で示した結果は、ABCA1 および ABCG1 を介した脂質恒常性維持の分子メカニズム解明に重要な知見を与えるものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. α 1-syntrophin は ABCA1 と相互作用することで分解を抑制し、ABCA1 によるコレステロール排出を促進することを明らかとした。
2. ABCA1 は細胞内コレステロールの排出ではなく局在変化を介して LXR の転写促進活性をフィードバック抑制することを明らかにした。
3. 25-hydroxycholesterol および 27-hydroxycholesterol は ERK のリン酸化を促進し、ABCA1 の発現は ERK の活性をさらに上昇させることを明らかにした。
4. ERK の活性化はリガンドによる LXR の転写促進活性を抑制することを明らかにした。

5. ABCG1は細胞内コレステロールおよびオキシステロールの局在変化を介してLXRをフィードバック抑制する可能性を示した。
6. メバロン酸はLXRの内因性リガンドの上昇を介さずにLXRの転写活性を上昇させることを示した。
7. ABCG1は細胞内のメバロン酸合成を抑制することでLXRの転写促進活性を抑制することを明らかにした。

以上のとおり、本論文はABCA1の翻訳後制御を介したコレステロール排出調節機構および、ABCA1およびABCG1による転写因子LXRに対するフィードバック制御を明らかとしたものであり、細胞生物学、生化学、分子生物学、基礎生理学に寄与するところが多い。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19年4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。