

氏 名	たなかあろう 田 中 亜 路
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 1401 号
学位授与の日付	平成 16 年 3 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	Studies on ABC proteins associated with lipid homeostasis in mammalian cells (哺乳動物細胞における脂質ホメオスタシスに関する ABC タンパク質の研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 植 田 和 光 教 授 加 藤 暢 夫 教 授 矢 崎 一 史

論 文 内 容 の 要 旨

ABC タンパク質は、原核生物から哺乳類までよく保存された ATP 結合領域 (ATP binding cassette) を持つタンパク質の総称である。ABC タンパク質の機能欠損はヒトにおいて重篤な疾患を招くことが明らかになっている。現在までに少なくとも 14 の ABC タンパク質遺伝子がヒト遺伝病の責任遺伝子として同定されており、興味深いことに、うち 9 つの疾患は脂質代謝異常が本態である。本論文では、ABC タンパク質のうちコレステロール代謝に関与するとされる ABCA1 の完全長 cDNA を単離し、予測二次構造を決定した。次に GFP との融合タンパク質を作成し、ABCA1 の細胞内輸送過程と分解過程を可視化解析した。一方、長鎖脂肪酸代謝に関与するとされるベルオキシソーム ABC タンパク質について ATP 結合・加水分解活性を検討し、その複雑な機能制御機構の一端を明らかにした。これらの研究の主な内容は次の通りである。

第一章では、ヒト cDNA ライブラリから完全長の ABCA1 cDNA を単離し、ABCA1 が当時考えられたものよりも 60 アミノ酸鎖長い 2261 アミノ酸鎖のタンパク質であることを示した。次に、ABCA1 のトポロジーを HA エピトープを挿入した ABCA1 の発現実験および領域特異的な抗体の作成による免疫染色実験によって決定した。その結果、ABCA1 は細胞外に約 600 アミノ酸鎖におよぶ大きなドメインを持つことがわかった。ABCA1 の変異は血中 HDL の欠損を招くが、同定された ABCA1 の変異の多くはこの細胞外ドメインに相当する領域に集中していることが判明した。さらに、この細胞外領域のアミノ酸配列は自己免疫疾患シェーグレン症候群の自己抗原のひとつとよく似ていることを見出し、ABCA1 のホモログ遺伝子 ABCA7 と自己免疫疾患シェーグレン症候群との関連性を指摘した。ついで、単離した ABCA1 を培養動物細胞に強制発現させ、培地中に脂質を含まない apoA-I を加えることにより、apoA-I を細胞外アクセプターとして細胞内コレステロールおよびリン脂質が細胞外へ排出されることを明らかにした。この結果は ABCA1 によるコレステロール排出には apoA-I が必要であることを示唆する。

第二章では、ABCA1 と GFP との融合タンパク質を恒常的に発現した HEK293 細胞株を樹立し、細胞内輸送を可視化・リアルタイム追跡の後、定量的に解析する系を開発した。この系により、野生型 ABCA1-GFP は形質膜に輸送されてリサイクリングされながら機能した後、エンドサイトーシスされ分解されるという ABCA1 のライフサイクルを明らかにした。また、この過程を阻害すると ABCA1 は細胞内に特徴的な袋状構造体を形成し、その構造体はコレステロールを豊富に含むことを発見した。さらに HDL 欠損症を招く 3 つの点変異を導入した変異体についても同様の系を用いて解析した。各点変異はそれぞれ 587, 590, 597 番目にアミノ酸置換 R→W, W→S, Q→R をもたらし、それぞれは数アミノ酸しか離れていないにもかかわらず HDL 欠損による病態程度が異なるという際立った特徴をもっている。解析の結果、検討した 3 つの変異体はそれぞれ形質膜への輸送効率の低下を起こしていることが明らかになった。そのうち、比較的細胞膜への輸送が行われている W590S の ATP 結合・加水分解活性は野生型のものとは違いはなく、W590S のコレステロール輸送活性の障害は局在や ATP 結合・加水分解活性以外の要因で起こることが示唆された。

第三章では、長鎖・極長鎖脂肪酸輸送への関与が示唆されるベルオキシソームの ABC タンパク質について解析を行った。

ペルオキシソームに存在する4種のABCタンパク質はちょうどABCA1の半分の構造をしており、ダイマーを形成している。そのうちの一つであるALDPは副腎白質ジストロフィー（ALD）という神経変性疾患の責任遺伝子産物として同定された。ALDPは極長鎖脂肪酸をペルオキシソームへと輸送する輸送体であると考えられている。しかし、その分子メカニズムや4種のABCタンパク質の機能差異などは明らかになっていない。そこで、放射性標識されたATPアナログによる光親和性結合法を用いてペルオキシソームABCタンパク質の性質を検討した。その結果、ペルオキシソームABCタンパク質はダイマーを形成した上で他のタンパク質とも複合体を形成していることが判明した。またALDP及びそのペアのABCタンパク質であるPMP70は、先にリン酸を放出し次にADPを放出する型のATP加水分解機構を持つにもかかわらず、バナジン酸による加水分解阻害を受けないことが明らかになった。このATP加水分解機構は、同じくABCタンパク質ファミリーに属する薬剤排出ポンプMDR1とは大きく異なっている。加えてこれらのタンパク質はリン酸化を受けており、ペルオキシソームABCタンパク質は複雑な調節を受け機能していることを併せて示した。

論文審査の結果の要旨

ヒトの膜タンパク質の中で最大のファミリーを形成するABCタンパク質は生体の質的管理に極めて重要であると考えられており、特に脂質代謝において重要な役割を果たしていることが明らかになっている。しかしながら、その機能の分子機構および細胞内動態は不明な点が多い。本論文は、機能欠損が脂質代謝異常をもたらすABCタンパク質であるABCA1とペルオキシソームABCタンパク質について、生化学的および細胞生物学的な手法を駆使して解析を行ったものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. ヒトABCA1のcDNAを単離し、完全長のABCA1遺伝子の配列を初めて明らかにした。その結果、ABCA1タンパク質は2261アミノ酸の12回膜貫通タンパク質であり、約600アミノ酸にわたる親水性領域がループ状の構造をとっていることを示した。ついで、このループ領域が細胞外に存在することを領域的特異的な抗体による免疫染色実験により示した。さらに、この領域は自己免疫疾患シェーグレン症候群の自己抗原の一つとよく似ていることを見出し、ABCA1のホモログ遺伝子ABCA7と自己免疫疾患シェーグレン症候群との関連性を指摘した。

2. 完全長ABCA1タンパク質およびABCA1とGFPとの融合タンパク質を発現させた哺乳類動物細胞は、apoA-I依存的なコレステロール排出活性を獲得することを示した。次に、細胞外ループ領域中に同定されたHDL欠損症を招く点変異を導入した変異体とGFPとの融合タンパク質を3種作成し、このタンパク質を発現させた細胞はapoA-I依存的なコレステロール排出活性をもたないことを示した。GFP可視化解析により野生型ABCA1と変異型ABCA1を比較した結果、R587WとQ597R変異体はいずれも形質膜へ輸送されておらず、これが機能欠失の原因であることを示した。一方で、形質膜への輸送がみられたW590S変異体に関してはATP結合・加水分解活性についても検討したところ、野生型との活性の差がみられないことを示し、この変異体のさらなる解析がABCA1のコレステロール排出メカニズムに重大な示唆を与えることを指摘した。

3. 放射性ATPアナログを用いた光親和性標識法とペルオキシソームのABCタンパク質特異的な抗体を用いた免疫沈降法を組み合わせ、ラットの肝臓から調製したペルオキシソームをそのまま用いてペルオキシソームABCタンパク質のATP結合・加水分解活性を検出する系を確立した。この系を用いて、ペルオキシソームABCタンパク質は先にリン酸を放出し次にADPを放出する型のATP加水分解機構を持つこと、しかし同じくABCタンパク質ファミリーに属する薬剤排出ポンプMDR1とは大きく異なり、バナジン酸による加水分解阻害を受けないことを明らかにした。

以上のように、本論文は脂質代謝に関与するABCタンパク質の分子メカニズムや機能発現制御機構における重要な新知見を提示したものであり、生化学、細胞生物学、および生理学の分野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16年2月16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。