

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14900

研究課題名（和文）ABCタンパク質を介したペルオキシソームへの極長鎖脂肪酸CoA輸送機構の解明

研究課題名（英文）Transport mechanism of very long chain fatty acyl-CoA into peroxisomes mediated by peroxisomal ABC protein ABCD1

研究代表者

川口 甲介（Kawaguchi, Kosuke）

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：80624866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ペルオキシソーム膜上に存在する膜輸送タンパク質ABCD1の機能不全は、重篤な神経変性疾患である副腎白質ジストロフィーの原因となる。ABCD1は極長鎖脂肪酸CoAのペルオキシソーム内への輸送に関与するが、その輸送機構の詳細は不明であった。ABCD1による極長鎖脂肪酸CoAのペルオキシソーム内への輸送機構について解析を行った結果、ABCD1が極長鎖脂肪酸CoAをアシルCoAチオエステラーゼ活性によって加水分解し、生じた遊離脂肪酸を輸送すること、およびこの輸送課程においてアシルCoAチオエステラーゼ活性が必須であることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトABCD1のもつATPase活性とアシルCoAチオエステラーゼ活性が協調して極長鎖脂肪酸CoAをペルオキシソーム内へと輸送する分子機構について初めて明らかとした。また、蛍光基NBDで標識したNBD-パルミトイルCoAを基質として用いることで、ABCD1が加水分解された遊離脂肪酸を輸送基質とすることを直接検出することに初めて成功した。

研究成果の概要（英文）：Dysfunction of peroxisomal ATP-binding cassette (ABC) protein, ABCD1, causes a severe neurodegenerative disease, X-linked adrenoleukodystrophy. ABCD1 is suggested to be involved in the transport of very long chain fatty acyl-CoA, but the precise mechanism of the transport has yet to be elucidated.

It is demonstrated that ABCD1 transports very long chain fatty acyl-CoA as free very long chain fatty acid into peroxisomes through the hydrolysis of very long chain fatty acyl-CoA mediated by the acyl-CoA thioesterase activity of ABCD1 itself and that acyl-CoA thioesterase activity of ABCD1 is indispensable for this transport system.

研究分野：生化学・分子細胞生物学

キーワード：ABCタンパク質 ペルオキシソーム 極長鎖脂肪酸CoA プロテオリポソーム メタノール資化性酵母

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ATP-binding cassette (ABC) タンパク質は、ATP 結合ドメイン 2 個と膜貫通ドメイン 2 個を基本構造とする膜輸送体である。ATPase 活性による ATP の加水分解エネルギーを駆動力に様々な物質を輸送し、その異常は種々の疾患の原因となる。ペルオキシソーム膜上には ABC タンパク質 D 群に分類される ABCD1-3 が局在し、それぞれ極長鎖・長鎖・分岐鎖脂肪酸 CoA のペルオキシソーム内への輸送に関与している。このうち ABCD1 をコードする *ABCD1* 遺伝子の変異は、中枢神経系における脱髄と副腎不全を伴う重篤な神経変性疾患である ALD の原因となる。ALD 患者では、ABCD1 の機能不全が原因で極長鎖脂肪酸 (VLCFA)-CoA のペルオキシソーム内への輸送障害がおこり、ペルオキシソームでの β 酸化が障害を受けることで血中の VLCFA の増加を認める。

ABC タンパク質を介した脂肪酸 CoA のペルオキシソーム内への輸送については、ヒト、酵母、植物で研究が進められているが、輸送基質が脂肪酸 CoA なのか遊離脂肪酸なのかの結論は出ていない。申請者は、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* にヒト ABCD1 を異種発現させて解析を行い、ヒト ABCD1 が ATPase 活性に加え、アシル CoA チオエステラーゼ (ACOT) 活性を持つことを見出した。このことから、ABCD1 が VLCFA-CoA を加水分解したのちに遊離した VLCFA をペルオキシソーム内に輸送していることが強く示唆された。ABCD1 により VLCFA が輸送されるのであれば、その酸化のためには、ペルオキシソーム内で VLCFA が再 CoA 化される必要がある。

本申請課題では、ABCD1 を介した VLCFA-CoA のペルオキシソーム内への輸送機構から再 CoA 化に至るまでの仕組みを解明し、ALD の有効な治療薬開発に資する分子基盤の確立を目指し解析を行った。

2. 研究の目的

ALD は中枢神経系の脱髄と副腎機能不全を特徴とする重篤な神経変性疾患で、ペルオキシソーム膜上の ABC タンパク質をコードする *ABCD1* 遺伝子はその原因遺伝子である。ABCD1 の機能不全による細胞内への VLCFA の蓄積を引き金に、ミトコンドリア機能障害、酸化ストレスの増加、ミクログリアの活性化と炎症性サイトカインの産生が起こり、これが疾患・病態と関連していることが示唆されている。しかし、発症機序は不明であり、現在までに有効な治療薬は開発されていない。重要なことは ABCD1 を介する VLCFA-CoA のペルオキシソーム内への輸送から β 酸化を受けるまでの一連の分子機構が明らかになっていないことである。本申請課題では、VLCFA-CoA が ABCD1 に加水分解され、遊離脂肪酸としてペルオキシソーム内へ輸送された後に再 CoA 化されること、およびこの輸送には ABCD1 の ACOT 活性が重要であるとことを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ABCD1 の持つアシル CoA チオエステラーゼ活性の解析

本実験では、ABCD1 の ACOT 活性の特性について解析した。*P. pastoris* を用いて発現させたヒト ABCD1 を可溶性・精製し、サイズ由来リン脂質で構成された人口脂質二重膜に組み込んだ。ABCD1 の ACOT 活性の測定は、蛍光基 NBD で標識した NBD-パルミトイル CoA を基質として用い、薄層クロマトグラフィーで NBD-パルミトイル CoA と NBD-パルミチン酸を分離し、NBD-パルミチン酸量の蛍光強度を指標に定量して行った。

活性中心に関与するアミノ酸残基については、ABCD1 の ACOT 活性に対するアミノ酸修飾試薬の効果および ABCD1 と基質の結合様式の解析から同定を試みた。また、ABCD1 の ACOT 活性と ATPase 活性の相互依存について検証するために、ATPase 活性を持たない膜貫通領域領域のみの変異型 ABCD1(aa.1-431) および ATPase 活性に重要な WalkerA モチーフに変異をもつ ABCD1(K513A) を作製し解析を行った。さらに ABCD1 の ACOT 活性の基質認識について解析するため、CoA 部位のリボースの 3'リン酸基を脱リン酸化した NBD-palmitoyl-dephosphoCoA、および炭素鎖の鎖長が短い NBD-ヘキサノイル CoA を調製し、ACOT 活性測定に用いた。

(2) ABCD1 による VLCFA 輸送機構の解析

ABCD1 を介した VLCFA-CoA のペルオキシソーム内への輸送から再 CoA 化に至るまでの分子機構として、(i) ABCD1 による VLCFA-CoA の輸送、(ii) CoA 輸送体による CoA の輸送、(iii) アシル CoA 合成酵素による VLCFA の再 CoA 化の 3 段階を想定した。本実験では、ABCD1 が加水分解した遊離脂肪酸を輸送することを実証する。CoA の輸送と再 CoA 化の影響を除くため、ABCD1 を含む人工脂質二重膜を調製し、蛍光基 NBD で標識した NBD-パルミトイル CoA を基質に用い基質輸送の解析を行った (図 1 左)。

つづいて、で同定した ACOT 活性を阻害するアミノ酸修飾試薬、ATPase 活性を持たない変異型 ABCD1、ABCD1 による加水分解を受けない基質を用いて基質輸送活性測定を行い、基質輸

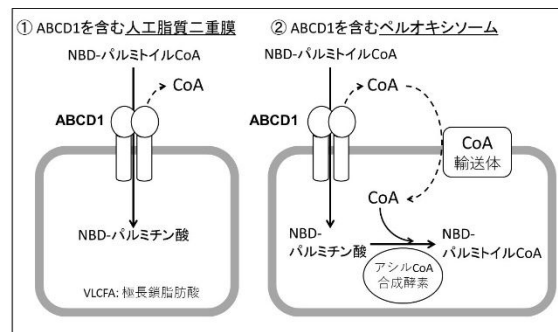


図 1. ABCD1によるVLCFA-CoA輸送を検出する2つの系

送において ACOT 活性と ATPase 活性がどのように基質輸送を制御しているか検証した。

(3) ペルオキシソーム内への CoA 輸送と VLCFA の再 CoA 化機構の解明

P. pastoris のヒト ABCD1 発現株から細胞分画により分離したインタクトなペルオキシソームでは、上記の (i), (ii), (iii) が起こりペルオキシソーム内で NBD-パルミトイル CoA が検出できる (図 1 右)。本実験では、CoA 輸送体およびアシル CoA 合成酵素を同定するため、それぞれの候補遺伝子を破壊したヒト ABCD1 発現株を作製する。ナイコデントを用いた密度勾配遠心により、作製した株からインタクトなペルオキシソームを調製して基質輸送の解析を行った。

4. 研究成果

ABCD1 を介した VLCFA-CoA のペルオキシソーム内への輸送機構について解析を行い、以下に示す成果を得た。

(1) ABCD1 の持つアシル CoA チオエステラーゼ活性の解析

ABCD1 の ACOT 活性が、システインに作用するチオール阻害剤 4-クロロメルクリ安息香酸により阻害され、ABCD1 と基質との中間体形成(アシル化)も阻害された。また、ABCD1 と基質の結合がヒドロキシルアミンによって加水分解を受けることから、この結合がシステインのチオール基を解したチオエステル結合であることを明らかにした。膜貫通領域のみを持つ ABCD1(aa.1-431)も野生型と同等の ACOT 活性を持っていた。これらのことから、ABCD1 の ACOT 活性の活性中心が膜貫通領域に存在するシステイン残基であることを明らかとした。

ATP の有無は ACOT 活性に影響を与えないこと、および ATPase 活性を無くした変異型 ABCD1 でも野生型と同等の ACOT 活性を持つことから、ACOT 活性が ATPase 活性には依存しないことを明らかとした。

CoA の 3'リン酸基を脱リン酸化した NBD-palmitoyl-dephosphoCoA や鎖長の短い NBD-ヘキサノイル-CoA は加水分解されないことから、ABCD1 の ACOT 活性の基質認識に、CoA3'リン酸基や炭素鎖の鎖長が重要であることを明らかにした。

(2) ABCD1 による VLCFA 輸送機構の解析

ABCD1 を含む人工脂質二重膜と基質に NBD-パルミトイル CoA を用いた輸送実験を行ったところ、人工脂質二重膜内へと輸送された NBD-パルミチン酸量が時間依存的増加した。また、この NBD-パルミチン酸の取り込みは、パルミトイル CoA により競合的に阻害された。これらのことから、ABCD1 が NBD-パルミトイル CoA を加水分解し、生じた NBD-パルミチン酸を輸送基質とすることを明らかとした。

ATP の非存在下や、ATPase 活性を無くした変異型 ABCD1(K513A)を用いた場合、取り込まれる NBD-パルミチン酸量が約 30%に低下したことから、ABCD1 の基質輸送活性が ATP および ATPase 活性に依存することを明らかとした。

ABCD1 の ACOT 活性を阻害する 4-クロロメルクリ安息香酸存在下や、加水分解を受けない NBD-palmitoyl-dephosphoCoA を基質に用いた場合、ABCD1 による基質輸送が見られないことから、ACOT 活性が ABCD1 の基質輸送に必須であることを明らかとした。

これらの結果は、ABCD1 が脂肪酸 CoA を加水分解し、生じた遊離脂肪酸を輸送することを直接的に示した初めての例である (図 2)。

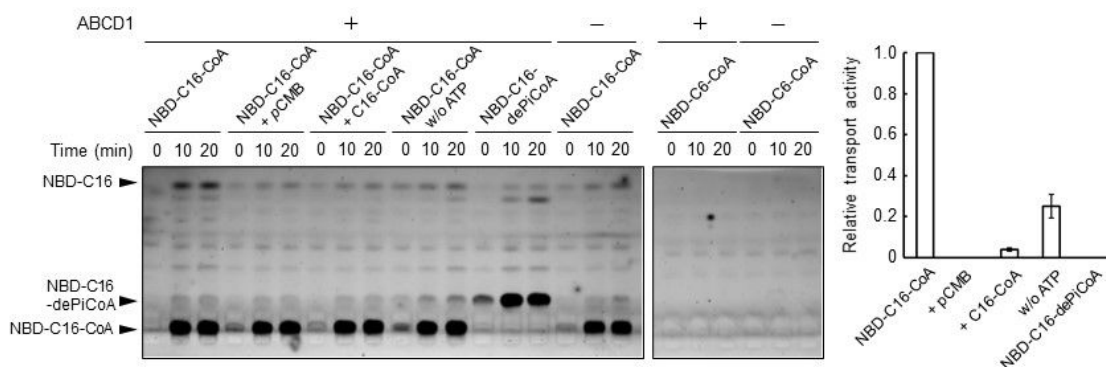


図 2 . ABCD1 による NBD-パルミチン酸の取り込み

(3) ペルオキシソーム内への CoA 輸送と VLCFA の再 CoA 化機構の解明

CoA 輸送体と推定される *Pmp47* 遺伝子およびアシル CoA 合成酵素と推定される *Faa2* 遺伝子をそれぞれ破壊した株を作製し、ABCD1 を導入した。それぞれの株を用いて細胞分画を行い、ペルオキシソーム画分を得た。

ペルオキシソームを用いた輸送実験の結果、野生株から取得したペルオキシソームでは、ペルオキシソーム内に取り込まれた NBD-パルミチン酸量が増加した後減少し、NBD-パルミトイル CoA が増加した。一方、*Pmp47* 破壊株から取得したペルオキシソームでは、NBD-パルミチン酸量が減少しなかったことから、ABCD1 による NBD-パルミトイル CoA の加水分解で生じた CoA はペルオキシソームの外側に放出され、*Pmp47p* によってペルオキシソ-

ム内に輸送されることが示唆された。Faa2 破壊株から取得したペルオキシソームでは、NBD-パルミチン酸の取り込み量が野生株から取得したペルオキシソームに比べ減少したことから、Faa2p がペルオキシソーム内で NBD-パルミチン酸のレセプターとして機能していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川口甲介、守田雅志、今中常雄、宗孝紀
2. 発表標題 ペルオキシソーム膜ABCタンパク質ABCD1による極長鎖脂肪酸CoA輸送機構の解析
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口甲介、向井絵美、守田雅志、今中常雄、宗孝紀
2. 発表標題 ABCタンパク質を介したペルオキシソーム内への極長鎖脂肪酸CoA輸送機構の解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向井絵美、川口甲介、尾崎加代子、守田雅志、今中常雄、宗孝紀
2. 発表標題 ペルオキシソーム膜ABCタンパク質が持つアシルCoAチオエステラーゼ活性の特性
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口甲介
2. 発表標題 ABCD1は極長鎖脂肪酸CoAを加水分解して輸送する
3. 学会等名 第4回ペルオキシソーム病研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川口甲介、守田雅志、今中常雄、宗孝紀
2. 発表標題 ペルオキシソーム膜ABCトランスポーターABCD1がもつアシルCoAチオエステラーゼ活性は基質輸送に必須である
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口甲介、北井克樹、守田雅志、今中常雄、宗孝紀
2. 発表標題 ペルオキシソーム膜ABCトランスポーターABCD1がもつアシルCoAチオエステラーゼ活性の解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口甲介
2. 発表標題 ABCD1がもつアシルCoAチオエステラーゼ活性の極長鎖脂肪酸CoA輸送における役割
3. 学会等名 第3回ペルオキシソーム病研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----