

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2008～2012年度

課題番号：20228001

研究課題名（和文） 脂質輸送に関与する ABC 蛋白質の生理的基質と機能の解明

研究課題名（英文） Physiological substrates and functions of ABC proteins involved in lipid transport

研究代表者

植田 和光 (UEDA KAZUMITSU)

京都大学・物質—細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：10151789

研究成果の概要（和文）：

ABC 蛋白質は、共通の ATP 加水分解ドメインをもち、さまざまな物質を細胞膜を介して輸送する膜蛋白質の総称である。ヒト染色体上には 48 種の ABC 蛋白質遺伝子が存在し、それらの異常はさまざまな疾病と関係している。本研究は、特に脂質恒常性に関わる ABC 蛋白質の輸送基質の同定と機能の解明をめざし、生化学的・細胞生物学的解析と全反射蛍光顕微鏡を用いた 1 分子観察、さらには結晶構造解析を統合して行った。

研究成果の概要（英文）：

Many transporters in the protein family, ATP Binding Cassette (ABC) proteins, have been found to play important physiological roles through transporting lipids, and defects in their functions are related to various diseases. In this project, we tried to reveal their physiological substrates and functions by integrating biochemical/cell biological studies, single molecule tracking and crystal structure analyses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	22,900,000	6,870,000	29,770,000
2009年度	25,800,000	7,740,000	33,540,000
2010年度	25,400,000	7,620,000	33,020,000
2011年度	25,400,000	7,620,000	33,020,000
2012年度	24,400,000	7,320,000	31,720,000
総計	123,900,000	37,170,000	161,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：動物生化学、膜輸送タンパク質

1. 研究開始当初の背景

ABC 蛋白質は、アミノ酸配列がよく保存された ATP 結合領域と 12~17 の膜貫通 α ヘリックスをもつトランスポーターファミリーであり、ATP Binding Cassette を略して名付けられた。大腸菌からヒトまで、地球上のほぼすべての生物で重要な機能を果たしている。ヒト染色体上には 48 種類の ABC 蛋白質遺伝子が存在する。これまでに、多くの ABC 蛋白質

が内在性脂質の体内輸送に関与し、それらの異常がさまざまな疾病と密接に関係していることが分かってきた。しかし、脂溶性物質を基質とする輸送体の直接の基質を同定することは容易ではなく、いまだ輸送基質や生理的役割、制御機構が解明されていない ABC 蛋白質が数多く存在する。特に、コレステロールなど脂質輸送に関わる ABC 蛋白質の異常は、動脈硬化、糖尿病、皮膚障害、精神

障害、老人性の失明など、現在人がかかわる多くの疾病に関係する。ABC 蛋白質の作用機構、制御機構、生理的役割を明らかにすることは、これらの疾病の予防や治療を考える上で重要である。

2. 研究の目的

脂質恒常性に関わることや機能異常が疾病と関係することが報告されているにもかかわらず、基質や機能が解明されていない ABC 蛋白質がまだまだ多く存在する。本研究は、それらの ABC 蛋白質の輸送基質の同定、輸送機構の解明、制御機構の解明を行う。さらに、生理的役割についても新たな知見を得る。これらの知見によって、動脈硬化、糖尿病、精神障害などの疾病の予防や治療に貢献することをめざす。

3. 研究の方法

(1) 生化学的、細胞生物学的解析による ABC 蛋白質の作用機構・制御機構の解明：

ヒト・マウスの生理的に重要な ABC 蛋白質を特異的に発現させた細胞を用いて、作用メカニズムを解析するとともに、制御メカニズムを明らかにする。それぞれの ABC 蛋白質の精製条件の最適化を行い、精製蛋白質を用いた活性測定系を用いて、輸送基質との相互作用を解析する。さらに、阻害剤・活性化剤のスクリーニングを行う。

(2) 蛍光全反射顕微鏡を用いた 1 分子イメージングによる作用機構の解明：

細胞膜上の ABC 蛋白質を、全反射蛍光顕微鏡を用いて一分子レベルでリアルタイムに可視化し、ABC 蛋白質の作用メカニズムを解明する。

(3) 結晶構造解析による ABC 蛋白質の作用機構の解明：

真核単細胞生物から結晶化に適した ABC 蛋白質を見つけ出す。その ABC 蛋白質の大量発現と精製方法を最適化し、高解像度の結晶の取得を試みる。結晶構造解析によって ABC 蛋白質の作用機構を解明する。

4. 研究成果

(1) 生化学的、細胞生物学的解析による ABC 蛋白質の作用機構・制御機構の解明：

善玉コレステロール (HDL) 形成の鍵を握る ABCA1 の機能解明につながる多くの新事実を明らかにした。ABCA1 の 2 つの大きな細胞外ドメインが 2 本の S-S 結合で架橋されていることを明らかにした (J Biol Chem, 2009)。その細胞外ドメイン上のタンジール病変異 W590S が ABCA1 の機能に与える影響を明らかにした (J Lipid Res, 2009)。ABCA1 の大きな細胞外ドメインが ATP 加水分解にともなって構造変化をすることを明らかにした (J Lipid Res, 2012)。さらに、ATP

加水分解にともなった構造変化によって、血中の脂質アクセプターである apoA-I に対する結合部位が細胞外ドメインに形成されること、ABCA1 と apoA-I の結合の第 1 段階が静電相互作用であることを明らかにした (Biochim Biophys Acta, 2012)。また、神経細胞で活発に生産されるコレステロールの代謝物 24-ヒドロキシコレステロールが ABCA1 によって排出され、神経細胞がアポトーシスから保護されていることを明らかにした (J Neuro Chem, 2013)。

ABCA1 に直接結合する阻害剤の探索に成功した (Biochim Biophys Acta, 2013a)。阻害剤の作用機構の比較、および精製蛋白質の生化学的な比較によって、脂質輸送型 ABC 蛋白質と薬剤輸送型 ABC 蛋白質が共通のメカニズムで機能していることを明らかにした (Biochim Biophys Acta, 2013b)。

ABCA1 の転写制御を行う核内転写因子 LXR β が ABCA1 と直接相互作用することを見出した (J. Biol. Chem. 2008)。この制御機構は、マクロファージが死細胞を貪食した時などの急激なコレステロール濃度上昇に、即時に反応するために重要と考えられる (J. Biol. Chem. 2011)。核内受容体として知られる LXR β が、核外において、しかも自らが転写制御する膜蛋白質である ABCA1 と結合し、その活性と分解を制御するという発見は、核内受容体の概念を覆すものである。

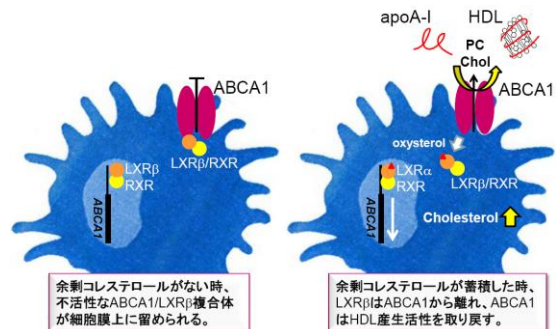


図 1. 核内受容体 LXR β による ABCA1 の翻訳後制御機構

(2) 蛍光全反射顕微鏡を用いた一分子イメージングによる作用機構の解明：

ABCA1 の細胞膜上での動きを、全反射蛍光顕微鏡を用いて一分子レベルで観察した。その結果、不活性な ABCA1 がブラウン運動によって自由拡散するのに対し、野生型 ABCA1 の多くは細胞膜上でまったく動かないこと、apoA-I が結合すると ABCA1 は自由拡散を開始すること、静止した野生型 ABCA1 が二量体であることを明らかにした。これらの結果をもとに、二分子の apoA-I を含む新生 HDL が形成される新規メカニズムを提唱した (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013)。

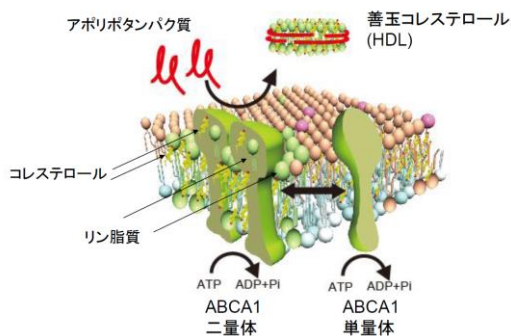


図2. 提唱した ABCA1 による新規 HDL 形成機構

(3) 結晶構造解析による ABC 蛋白質の作用機構の解明:

温泉に生息する真核単細胞生物(紅藻)がもつ ABC 蛋白質を探索した結果、ヒト MDR1 と高いアミノ酸配列相同性を示す ABC 蛋白質が非常によい結晶性を示すことを見出した。精製蛋白質を用いた ATPase 活性解析から、ヒト MDR1 とよく似た基質特異性を示すことが明らかになり、CmMDR1 と命名した。CmMDR1 の *Pichia pastoris* を用いた大量発現系を確立し、結晶条件の検索を繰り返すことによって、真核生物で最高の分解能の結晶の取得に成功した。さらに、構造に基づいたアミノ酸置換導入によって、基質認識と輸送に重要なアミノ酸を同定した(投稿準備中)。今後、ABC 蛋白質の作用機構解明の飛躍的な進展が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 2 件)

①Matsuda, A., Nagao, K., Matsuo, M., Kioka N. and Ueda, K. 24(S)-hydroxycholesterol is actively eliminated from neuronal cells by ABCA1. **J. Neurochem.** in press

10.1111/jnc.12275 査読あり

②Nagata, K., O., Nakada, C., Kasai, R. S., Kusumi, A. and Ueda, K. ABCA1 dimer-monomer interconversion during HDL generation revealed by single-molecule imaging. **Proc Natl Acad Sci USA**, 110, 5034-5039 (2013)
10.1073/pnas.1220703110 査読あり

③Hirayama, H., Kimura, Y., Kioka, N., Matsuo, M. and Ueda, K. ATPase activity of human

ABCG1 is stimulated by cholesterol and sphingomyelin. **J. Lipid Res.** 54, 496-502 (2013)
10.1194/jlr.M033209 査読あり

④Ishigami, M., Tominaga, Y., Nagao, K., Kimura, Y., Matsuo, M., Kioka, N. and Ueda, K. ATPase activity of nucleotide binding domains of human MDR3 in the context of MDR1 **Biochim Biophys Acta-MCBL**, 1831, 683-690 (2013)
10.1016/j.bbaliip.2012.12.016 査読あり

⑤Nagao, K., Maeda, M., Manucat, M. B., and Ueda, K. Cyclosporine A and PSC833 inhibit ABCA1 function via direct binding. **Biochim Biophys Acta-MCBL**, 1831, 398-406 (2013)
10.1016/j.bbaliip.2012.11.002 査読あり

⑥Nagao, K., Takahashi, K., Azuma, Y., Takada, M., Kimura, Y., Matsuo, M., Kioka, N. and Ueda, K. ATP hydrolysis-dependent conformational changes in the extracellular domain of ABCA1 are associated with apoA-I binding. **J Lipid Res** 53, 126-136 (2012)
10.1194/jlr.M019976 査読あり

⑦Hulpke, S., Tomioka, M., Kremmer, E., Ueda, K., Abele, R., Tampé, R. Direct evidence that the N-terminal extensions of the TAP complex act as autonomous interaction scaffolds for the assembly of the MHC I peptide-loading complex. **Cell Mol Life Sci.** 69, 317-3327 (2012)
10.1007/s00018-012-1005-6 査読あり

⑧Hozoji-Inada, M., Munehira, Y., Nagao, K., Kioka, N., and Ueda, K. LXRβ directly interacts with ABCA1 to promote HDL formation during acute cholesterol accumulation. **J Biol Chem.** 286, 20117-24 (2011)
10.1074/jbc.M111.235846 査読あり

⑨Hozoji, M., Kimura, Y., Kioka, N., and Ueda, K. Formation of two intramolecular disulfide bonds is necessary for apoA-I-dependent cholesterol efflux mediated by ABCA1. **J Biol Chem.** 284, 11293 - 11300 (2009)
10.1074/jbc.M900580200 査読あり

⑩Nagao, K. Zhao, Y., Takahashi, K., Kimura, Y., and Ueda, K. Sodium taurocholate-dependent lipid efflux by ABCA1-Effects of W590S mutation on lipid translocation and apoA-I dissociation. **J Lipid Res** 50, 1165-1172 (2009)
10.1194/jlr.M800597-JLR200 査読あり

⑪Hozoji, M, Munehira, Y, Ikeda, Y, Makishima, M, Matsuo, M, Kioka, N, Ueda, K Direct interaction of nuclear receptor LXR β with ABCA1 modulates cholesterol efflux. **J Biol Chem**. 283, 30057-30063 (2008)
10.1074/jbc.M804599200 査読あり

[学会発表] (計 2 1 3 件)

① Ueda, K. Mechanism of function and regulation of ABCA1 in HDL formation. CLS (Peking Univ)-iCeMS (Kyoto Univ) Joint symposium. 2012.4.21. China

② Ueda, K. Nagao, K. Nagata, K. Mechanism of cholesterol efflux by ABCA1. FASEB Meeting: New Frontiers in Transport ATPases. 2012.6.5. USA

③ Ueda, K. Nagao, K. Nagata, K. Mechanism of HDL formation by ABCA1. ASBMB: Frontiers in Lipid Biology. 2012. 9. 22. Canada

④ Ueda, K. Mechanism of ABCA1-mediated HDL formation. 5th SFB symposium: Transmembrane Transporters in Health and Disease. 2012. 9. 24. Austria

⑤ Ueda, K. The nuclear receptor LXR β directly interacts with ABCA1 to promote HDL formation during acute cholesterol accumulation. Gordon Reseach Conferences on Molecular & Cellular Biology of Lipids. 2011.7.19. USA

⑥植田和光 健康をまもる ABC タンパク質-ビタミンとトランスポーター 鈴木梅太郎先生ビタミンB1発見100周年祝典・記念シンポジウム 2011.11.25 東京

⑦Ueda, K. Mechanism and regulation of HDL formation by ABCA1. The 3rd SFB symposium: Transmembrane Transporters in Health and Disease. 2010. 9. 4. Austria

[図書] (計 1 件)

Nagao, K. Hozoji-Inada, M. Azuma, Y. and Ueda, K. The ABC transporters of human physiology and disease. pp29-51. ed by Linton & Holland, World Scientific, 2011

[その他]

ホームページ:

<http://www.biochemistry.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 和光 (UEDA KAZUMITSU)
京都大学・物質—細胞統合システム拠点・教授
研究者番号: 10151789

(2) 研究分担者

赤津 裕康 (AKATSU HIROYASU)
医療法人さわらび会福祉村病院・長寿医学研究所・副所長
研究者番号: 00399734

戸田 好信 (TODA YOSHINOBU)
天理医療大学・医療学部・准教授
研究者番号: 10444465

(3) 連携研究者

加藤 博章 (KATO HIROAKI)
京都大学大学院・薬学研究科・教授
研究者番号: 90204487

上杉 志成 (UESUGI MOTONARI)
京都大学・物質—細胞統合システム拠点・教授
研究者番号: 10402926

楠見 明弘 (KUSUMI AKIHIRO)
京都大学・物質—細胞統合システム拠点・教授
研究者番号: 50169992