

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790091
 研究課題名（和文） 神経軸索における ABCA1 の役割と活性制御機構の解明
 研究課題名（英文） The function and regulation of ABCA1 in neuron
 研究代表者
 奥平 桂一郎（Okuhira Keiichiro）
 国立医薬品食品衛生研究所・機能生化学部・主任研究官
 研究者番号：10425671

研究成果の概要（和文）：

本研究では、マウス神経芽細胞種、初代培養ラット神経細胞を用いて、神経突起伸長及び退縮と膜トランスポーターABCA1の発現との関係について検討した。RNAiによりABCA1発現を抑制したラット脊髄後根神経節細胞において、神経突起伸長はコントロールと差は無かった。しかし、突起切断後の細胞において、ABCA1発現抑制細胞で回復が遅れることが明らかになった。このことは神経細胞の修復反応に、ABCA1が重要な役割を果たしていることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated the role of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) in the neuronal growth and collapse of mouse neuroblastoma or primary rat neuron. In rat dorsal root ganglion (DRG) neurons, there was no clear difference in the neuronal growth between control and ABCA1-silencing cells. However, the repair of the damaged neuron was retarded by suppressing the ABCA1 expression, indicating that ABCA1 may function for the restoration of neuron.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	0	1,800,000
2009年度	1,500,000	0	1,500,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：脂質、神経

1. 研究開始当初の背景

ABCタンパク質は、全生物に普遍的に存在する最も大きなタンパク質スーパーファミリーである。生体膜にあってATP加水分解と

共役し、薬剤・イオン・脂質等の輸送を触媒する。ABCA1はコレステロールやリン脂質の輸送に関わり、plasma membraneに局在し、細胞の脂質をHDL（高密度リポタンパク質）

として細胞外に分泌する機能を持つ。ABCA1によるHDL形成の分子メカニズムについては未だ不明な点が多いが、ABCA1がATP加水分解のエネルギーを利用して細胞膜のフリップ・フロップ（脂質二重層内外を横切る脂質分子の運動）を促進することが確認されていることから、この局所的な膜の『ゆらぎ』が、外からの刺激と共役してHDL形成を惹起すると考えられている。

申請者はABCA1に関する研究において、低分子量Gタンパク質RhoAの活性化因子であるグアニンヌクレオチド交換因子（GEF）がABCA1と相互作用して、RhoAを活性化し、活性化したRhoAはABCA1タンパク質の分解を抑制して、HDL形成を促進することを発見した。ABCA1の機能や発現の制御についてはCdc42やRacの関与を示唆するデータもあり、ABCA1の活性はこれらRhoファミリーG蛋白質（Rho GTPases）によって調節されている可能性が高いと考えられる。これまでRhoファミリーG蛋白質が細胞骨格系（アクチンや微小管など）を制御することにより細胞の形態を維持していることは良く知られていたが、ABCA1のような細胞膜を制御する系との関与を指摘した知見は殆ど無かった。

一方、神経細胞は神経突起（軸索・樹状突起）、シナプス形成、細胞運動といった大きな形態変化を伴いながら複雑な神経回路を形成する。なかでも、神経軸索は伸長と退縮/崩壊を繰り返しながら適切な形態を発達させていくが、この神経軸索形成・伸長の調節にRhoファミリーG蛋白質が重要な役割を果たしており、Rac1/Cdc42は軸索伸長に、RhoAは退縮に関与することが明らかとなってきた。しかし、軸索や成長円錐におけるRhoファミリーGタンパク質の作用はアクチンや微小管の制御に関する知見に集中しており、それら細胞骨格系と連動して変化するはずの細胞膜の制御機構についてはほとんど議論されていない。また、ABCA1は神経細胞、ミクログリアで高発現していることが確認されているが、軸索伸長・退縮に伴う神経ABCA1の発現及び機能については完全に未知であった。

2. 研究の目的

以上の背景より、申請者は「RhoファミリーG蛋白質は、細胞骨格（アクチン・微小管）と細胞膜（ABCA1）の両方を協調的に制御し、神経細胞軸索の伸長と退縮を決定しているのではないかと考え、「RhoファミリーG蛋白質がABCA1の活性を調節して、神経細胞軸索の伸長・退縮に必要な細胞膜の運動を制御している」という仮説を立てた（図1）。そこで本研究では、これを検証する目的で、神経細胞の軸索または成長円錐近辺における、ABCA1の役割について検討した。

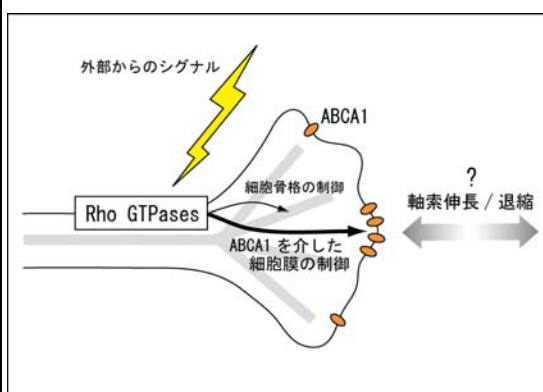


図1 神経軸索における仮説モデル

3. 研究の方法

①Cell lineを用いた実験系の構築と評価
神経細胞のモデルとしてよく使用されるマウス神経芽細胞種 Neuro-2a について、ABCA1の発現、及び神経突起の伸長、退縮反応について検討した。

②初代培養神経細胞を用いた実験系の構築と評価

ラット初代培養胎児脳海馬ニューロン細胞、及び、脊髄後根神経節（dorsal root ganglion (DRG)）ニューロン細胞について、ABCA1の発現、及び神経突起の伸長、退縮反応について検討した。DRG細胞の神経突起は、細胞を固定した後、神経細胞のマーカーである抗β3-tubulin抗体と二次抗体Alexa555を用いて細胞を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。神経細胞の突起の数は、well全体の画像を取得、画像処理を行った後、神経突起を示す細胞体の数をカウントすることで評価した。

4. 研究成果

①Cell lineを用いた実験

Neuro-2a細胞において、核内受容体LXR/RXRのリガンドで処理したところ、高レベルのABCA1発現が確認された。また、cAMPでNeuro-2aを刺激すると、48時間以内に神経突起の形成が確認された。さらに、RhoAを活性化することが知られているリゾフォスファチジン酸(LPA)を、神経突起を形成した細胞に加えたところ、数分以内に突起の退縮とともに、細胞体の収縮が観察された。RhoAの活性化はABCA1のタンパク質分解を抑制することで、発現を増強することが申請者らによって明らかになっている。つまりこの結果は、形成された神経突起の退縮とABCA1の発現の間には、正の関係が存在する可能性を示唆している。以上より、Neuro-2aはABCA1と突起伸長・退縮との関連を観察する上で、良いモデルとなる可能性が示唆された。さらに、細胞の溶解液から免疫沈降したABCA1を解析したところ、グアニンヌクレオチド交換因子

PDZ-RhoGEF の結合が明らかとなり、ABCA1 が PDZ-RhoGEF との結合を介して、エフェクターである RhoA を活性化していることが示唆された。

②初代培養神経細胞を用いた実験

ラット初代培養胎児脳海馬ニューロン細胞、及び、脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion (DRG)) ニューロン細胞を培養し、ABCA1 のモノクローナル抗体と二次抗体 Alexa555 を用いて、蛍光染色を行ったが、検出された蛍光はわずかであった。このことにより、定常状態において、初代培養ニューロンにおける ABCA1 の発現レベルは低いことが予想された。

DRG 細胞の ABCA1 発現量をコントロールする目的で、ABCA1 に対する siRNA を各種トランスフェクション試薬で細胞に導入し、ABCA1 タンパク質発現量を調べたところ、Lipofectamine RNAiMAX を使用した際に、良好なノックダウン効率が得られることが明らかになった。この ABCA1 をノックダウンした DRG 細胞において、細胞を撒種してから6日後の突起伸長した細胞の数をコントロールの細胞と比較したところ、ほとんど差は認められなかった (図2)。このことから、突起伸長反応に ABCA1 はほとんど関与しないことが示唆された。

次に、DRG を突起伸長させた後、メスにより物理的に神経突起を切断して、さらに4時間後から4日後の細胞の状態を観察した。神経細胞においては、切断により神経突起の退縮から、修復・再生が起これと考えられる。コントロールの siRNA で処理した DRG では、4日間で突起伸長した細胞の数が回復する傾向を示した。しかし、ABCA1 をノックダウンした DRG においては、コントロールと比較して、突起伸長した細胞の回復がほとんど観察されず、むしろ減少していた (図3)。このことは ABCA1 の発現抑制により神経細胞の修復が遅れているか、ほとんど起きていないことを示しており、神経の修復・再生に ABCA1 が重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

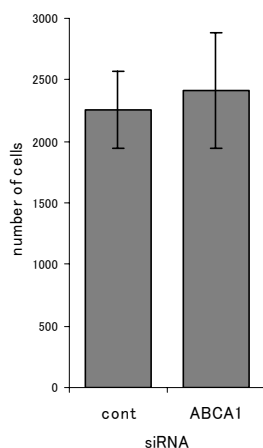


図2 ABCA1 に対する siRNA で処理した DRG 細胞を6日間培養した際の、神経突起が存在する細胞体の数

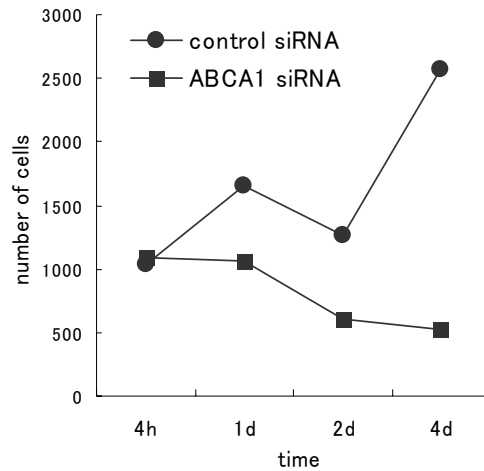


図3 DRG 細胞の突起切断後の培養時間に対する神経突起が存在する細胞体の数

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

Okuhira K*, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Ohoka N, Suzuki K, Sawada J, Naito M, Nishimaki-Mogami T. (*corresponding author)

Binding of PDZ-RhoGEF to ATP-Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) induces cholesterol efflux through RhoA activation and prevention of transporter degradation.

J Biol Chem, 2010; in press

Tamehiro N, Zhou S, Okuhira K, Benita Y, Brown CE, Zhuang DZ, Latz E, Hornemann T, von Eckardstein A, Xavier RJ, Freeman MW, Fitzgerald ML.

SPTLC1 binds ABCA1 to negatively regulate trafficking and cholesterol efflux activity of the transporter.

Biochemistry, 2008; 47(23):6138-47

Nishimaki-Mogami T, Tamehiro N, Sato Y, Okuhira K, Sai K, Kagechika H, Shudo K, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, Ohno Y, Inoue K, Sawada J.

The RXR agonists PA024 and HX630 have different abilities to activate LXR/RXR and to induce ABCA1 expression in macrophage cell lines.

Biochem Pharmacol, 2008; 76(8):1006-13

〔学会発表〕(計3件)

奥平桂一郎, 大岡伸通, 崔紅艶, 澤田純一,
最上(西巻)知子
ABCA1 相互作用タンパク質と RhoA による
HDL 形成制御機構
日本薬学会 129 年会 (2009, 3)

奥平桂一郎, 大岡伸通, 崔紅艶, 内藤幹彦,
最上(西巻)知子
ABCA1 相互作用タンパク質と RhoA による
HDL 形成制御機構
第 51 回日本脂質生化学会 (2009, 7)

奥平桂一郎, 大岡伸通, 崔紅艶, 岩崎香里,
内藤幹彦, 最上(西巻)知子
グアニンヌクレオチド交換因子による
ABCA1 活性制御機構
日本薬学会 130 年会 (2010, 3)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥平桂一郎 (OKUHIRA KEIICHIRO)
国立医薬品食品研究所・機能生化学部・主
任研究官
研究者番号: 10425671