

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02912

研究課題名（和文）脂質輸送型ABC蛋白質の分子構造と役割の解明

研究課題名（英文）Deciphering the Molecular Structure and Functional Role for a Key Lipid Transport ABC protein

研究代表者

小段 篤史（Kodan, Atsushi）

京都大学・高等研究院・特定准教授

研究者番号：80360543

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：脂質排出型ABC蛋白質ABCA1は、過剰コレステロール排出を担う新生HDL（高密度リポタンパク質）の形成に必須であるが、そのメカニズムは不明であった。代表者は、ABCA1による新生HDL形成現象の*in vitro*再現系を構築し、脂質ナノディスク中の機能的なABCA1分子を高速AFMにより再現性よく横向きから観察する系を開発した。ABCA1は、ATP依存的に脂質を自身の細胞外ドメインへ輸送・蓄積し、その後アポA-Iが細胞外ドメインから脂質を引き抜くことで新生HDLが形成される現象を可視化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ABCA1が脂質をATP依存的に自身の細胞外ドメインに輸送・貯蔵し、同時にアポA-Iに対する受容体としての機能も発揮していることを明らかにした。これは、脂質輸送型ABC蛋白質、さらには輸送体の概念に関する従来の常識を覆す、画期的な学術的発見である。この新知見は、HDLを基軸とする動脈硬化症の新しい治療方法の創出に貢献するだけでなく、関連の医学薬学分野にも大きな波及効果をもたらすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：The generation of high-density lipoprotein (HDL) plays a crucial role in removing surplus cholesterol from cells, thereby preventing coronary artery disease. ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1) is key in initiating nascent HDL generation. However, the mechanism behind ABCA1's role remains unclear. This researcher successfully replicated the phenomenon *in vitro* and directly visualized the process of ABCA1-mediated nascent HDL generation by capturing a side view of ABCA1 embedded in a lipid nanodisc using high-speed atomic force microscopy.

研究分野：輸送体膜タンパク質の構造機能生化学

キーワード：脂質輸送型ABC蛋白質 新生HDL 善玉コレステロール 動脈硬化 輸送体 ATP 分子メカニズム 膜タンパク質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ABC 蛋白質は、よく保存された ATP 結合カセットを持つ膜貫通型蛋白質で、ヒトでは 48 種類の ABC 蛋白質分子が確認されている。その遺伝子の欠陥は、疾病と関連しており、ABC 蛋白質は生理学的、医学的に重要な意義を持っている。脂質恒常性の鍵を握る脂質輸送型 ABC 蛋白質の一つである ABCA1 が血中の HDL (いわゆる善玉コレステロール) の形成に必須であることは、HDL が激減する遺伝病タンジール病 (指定難病 261) の解析から 1999 年に明らかにされた。新生 HDL は数百分子のリン脂質とコレステロールの周りを 2~4 分子のアポリポ蛋白質 A-I (アポ A-I) が取り巻いた円盤状構造であり、その産生は HDL 形成の律速となる重要な反応である。しかし、ABCA1 によって産生される新生 HDL 粒子がどのような機構で形成されるかについては、議論が大きく分かれていた。代表者は、ABCA1 がコレステロールとリン脂質をアポ A-I に直接載せることによって HDL を産生する (直接モデル) と主張しているのに対し、海外の研究者たちは、ABCA1 は細胞膜中のリン脂質を動かすことによって形成された曲率の高い特殊な膜ドメインから、アポ A-I が間接的に脂質を引き抜くことによって、HDL が産生される (間接モデル) と提唱している。つまり、ABCA1 がどのようなメカニズムで新生 HDL を産生するかは 20 年以上経った研究開始当初時点において議論が分かれており不明のままであった。この議論に決着をつけるためには、新生 HDL 生合成を *in vitro* で再現し、その過程をリアルタイム観察により捉える必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、脂質輸送型 ABC 蛋白質、特に動脈硬化に関わるヒト ABCA1 に着目し、代表者が提案する仮説モデルを検証し、ABCA1 による未知の新生 HDL 産生機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト ABCA1 の蛋白質生産・調製基盤の確立

ヒト ABCA1 を、ヒト培養細胞 (FreeStyle 293 細胞) に一過性的に発現させ、細胞膜から界面活性剤を用いて抽出し、ヒト ABCA1 の C 末端に付加しておいた FLAG タグを利用したアフィニティー精製により高純度に精製した。精製試料の品質を、ゲル濾過クロマトグラフィーおよび電子顕微鏡ネガティブ染色による単分散性、およびリポソームへの再構成試料の ATP 加水分解活性測定により評価した。それらの結果を各調製過程にフィードバックすることで、ヒト ABCA1 試料の精製条件を最適化した。電子顕微鏡ネガティブ染色は、大阪大学の光岡薫博士と協力して実施した。

(2) ヒト ABCA1 の脂質ナノディスクへの再構成

脂質二重膜に埋まった生理状態に近い ABCA1 試料を調製するため、(1) で精製した ABCA1 を、通常の膜蛋白質再構成に用いられる膜骨格タンパク質 (MSP) の約 2 倍の長さの MSP2N1 を利用し、コレステロールやリン脂質を 600~700 分子含むナノディスクに再構成した。再構成されたナノディスク試料をゲル濾過クロマトグラフィーにより分画し、単量体 ABCA1 が再構成された脂質ナノディスクを分離・精製した。

(3) ABCA1 による新生 HDL の *in vitro* 生合成系の構築

(2) で調製した ABCA1・脂質ナノディスク再構成試料に ATP とアポ A-I を作用させ、高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) で各反応過程の形態変化を可視化した。アポ A-I を作用させない条件でも同様に高速 AFM による観察を行った。尚、高速 AFM による解析は、金沢大学の古寺哲幸博士、Amyot Romain 博士の協力のもとで実施した。

(4) 高速 AFM を利用した ABCA1 による新生 HDL 産生のリアルタイム観察

(3) で構築した ABCA1 による新生 HDL の *in vitro* 生合成系の反応過程を、高速 AFM を利用してリアルタイム観察することで可視化するとともに、ナノディスクおよび ABCA1 細胞外ドメインに生じるサイズ変化を定量化した。

(5) クライオ電子顕微鏡を利用した ABCA1 の単粒子解析

(2) で調製した ABCA1・脂質ナノディスク再構成試料に ATP を作用させる前と後の状態で、凍結グリッドを作製し、それぞれの試料を超高性能クライオ電子顕微鏡 (日本電子製 CRYO ARM™300、Gatan 社製直接検出型 K3 カメラ) を用いて ABCA1 粒子のイメージを撮影した。収集データは cryoSPARC を用いて単粒子解析した。クライオ電子顕微鏡による解析は、大阪大学の難波啓一博士、宮田知子博士の協力のもとで実施した。

4. 研究成果

(1) ヒト ABCA1 の蛋白質生産・調製基盤の確立

ABC 蛋白質は 12 - 17 回膜貫通ヘリックスをもつ蛋白質であり、特にヒト ABCA1 は 2261 アミノ酸残基の大きな膜蛋白質である。そのため、機能を保持したまま大量に精製することは容易ではない。本研究では、培養の装置や条件を丹念に検討することにより、ヒト ABCA1 のヒト由来の FreeStyle 293 細胞を用いた一過性発現系を数十 L 規模にスケールアップし、ヒト ABCA1 発現細胞の安定的な供給体制基盤を構築した。次いで、活性を保ち単分散性の高い状態で精製サンプルを取得できる最適な精製条件を決定し、機能状態に近いヒト ABCA1 蛋白質のミリグラムレベルの生産・調製基盤を構築することに成功した。今回、本研究により確立したヒト ABCA1 の蛋白質生産・調製基盤は、他の ABC 蛋白質および様々な重要な膜タンパク質へも適用することが可能であり、従来は困難であった標的膜タンパク質の生産・調製、さらにはそれらの機能解析や構造解析への応用も期待される。

(2) ヒト ABCA1 の脂質ナノディスクへの再構成

本仮説モデルを実証するためには、他の研究グループが提案する間接モデルで述べられている、曲率の高い特殊な膜ドメインが物理的に生じ得ない条件下において、ABCA1 の機能発現およびアポ A-I 添加による新生 HDL の形成を *in vitro* で再現し、可視化する必要があった。

そこで、精製した ABCA1 を、リポソームに再構成するのではなく、曲率の高い特殊な膜ドメインが生じ得ない脂質ナノディスクに再構成した。また、通常の長さの約 2 倍の MSP を用いることで、新生 HDL 生成に必要な脂質分子の十分な供給が可能となり、新生 HDL の *in vitro* 生合成系の必要条件が確立できた。

脂質ナノディスクに再構成した後、分離・精製した ABCA1 は ATP 加水分解活性を保持しており、脂質ナノディスクが ABCA1 反応の場として正常に機能することが明らかとなった。また、分離・精製した再構成試料は凝集することなく単分散性であり、高速 AFM やクライオ電子顕微鏡による解析に提供できる高品質なレベルにあることが確認された。

(3) ABCA1 による新生 HDL の *in vitro* 生合成系の構築

本仮説モデルを反論の余地なく証明するには、各反応過程における ABCA1 のドメイン変化が明瞭で定量化しやすい膜に水平な角度から ABCA1 横向き分子を観察することが理想的であった。しかし、高速 AFM による市販の観察用基板を用いた初期の観察では、膜に垂直な方向の(細胞外または細胞内から見た) ABCA1 分子しか観察されなかった。

そこで、観察用基板の化学修飾や安定な別のタンパク質の固定化などにより、基板表面の性質や形状を変化させると同時に、バッファー種、塩濃度、温度など様々な条件検討を経て、これまでに報告例のない独自の固定化方法を見出した。これにより、高速 AFM を利用して横向き ABCA1 分子を効率よく観察する系を構築することに成功した。

この観察系を利用し、ABCA1・脂質ナノディスク再構成試料に ATP とアポ A-I を作用させた結果、新生 HDL と考えられる円盤状の構造物が多数観察された。一方、対象実験のアポ A-I を作用させない条件においては、そのような構造物は観察されなかった。すなわち、ABCA1 による新生 HDL の *in vitro* 生合成系が本研究により初めて構築できたと同時に、本仮説モデルの正当性が強く支持された。

(4) 高速 AFM を利用した ABCA1 による新生 HDL 産生のリアルタイム観察

高速 AFM を利用した観察において、 Mg^{2+} -ATP を作用させなかった場合には、ABCA1 分子に特に目立った変化は認められなかった。 Mg^{2+} -ATP を作用させると時間経過に伴い脂質ナノディスクが徐々に収縮していく反面、一方の可溶性ドメインが肥大化していく様子が複数の分子で観察された。肥大化したドメインは、細胞外ドメイン特異的な抗体と結合したため、細胞外ドメインと判明した。各反応過程における脂質ナノディスクと細胞外ドメインの形態変化を定量化した結果から、ABCA1 は Mg^{2+} -ATP 依存的にナノディスクに含まれる脂質を輸送し自身の細胞外ドメインへと蓄積していることが示された。さらに、 Mg^{2+} -ATP 添加 10 分後にアポ A-I を作用させると、ロープ様構造をしたアポ A-I が肥大化した細胞外ドメインと相互作用し、アポ A-I が相互作用していた細胞外ドメインから新生 HDL と考えられる直径約 7-9nm のサイズの円盤状構造物が瞬時に遊離する様子が観察された。これにより、本仮説モデルの正当性が実証されるとともに、ABCA1 は脂質の輸送、貯蔵、およびアポ A-I に対する受容体として機能を発揮することが初めて明らかとなった。すなわち、脂質輸送型 ABC 蛋白質、さらには輸送体全般の作用機構の従来の常識を覆す、新たな学術的発見となった。(論文投稿中)

(5) クライオ電子顕微鏡を利用した ABCA1 の単粒子解析

高速 AFM の実験結果をさらに裏付けるために、クライオ電子顕微鏡を利用した単粒子解析により、細胞外ドメインに脂質を結合した ABCA1 の構造決定を目指した。 Mg^{2+} -ATP 反応前後の各状態の ABCA1 粒子のデータセットを解析した結果、それぞれ低分解能ではあったが、 Mg^{2+} -ATP 反応後では反応前と比べて細胞外ドメインに強い密度が確認された。これは、 Mg^{2+} -ATP 反応により細胞外ドメインへ脂質が輸送・蓄積されたことを示唆しており、高速 AFM の実験結果と整合す

る。但し、これまでのデータ解析結果から、ABCA1は非常にフレキシブルであり、多様なコンフォメーションをとることが強く示唆された。細胞外ドメインに脂質を結合した ABCA1 の構造を決定するためには、さらに分解能を向上させる必要がある。そのためには、試料調製の見直しや様々なデータ解析の工夫が必要であり、これらの課題を解決するための検討を継続している。

尚、研究開始当初に計画していたヒト ABCA7 の研究に関しては、研究開始後すぐに海外の研究グループから立体構造解析の報告がなされたことを受けて、その実施を見送り、代わりにヒト ABCA1 の作用機構に関する研究に集中することとなった。

(6) 今後の展望

本研究では、代表者が提案する仮説モデルの正当性を実証し、ABCA1 のダイナミックな立体構造変化分子を直接可視化することにより、そのメカニズムを当初の予想をはるかに上回るレベルで明らかにすることができた。多くの膜タンパク質が病態生理学およびさまざまな人間の疾患で重要な役割を果たしているが、正確な分子機構が十分に理解されているケースは限られている。本研究で確立した研究基盤を他の生理学的に重要な膜タンパク質に応用することで、それぞれの分子機構解明のより直接的な理解に繋がるだけでなく、新たな病因・病態解明研究、及び画期的な診断・治療・予防法に関わる研究開発に重要な貢献ができると予想され、研究成果は将来の国民の健康維持という形で社会還元できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fumihiko Ogasawara, Atsushi Kodan and Kazumitsu Ueda	4. 巻 594
2. 論文標題 ABC proteins in evolution.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3876-3881
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小段篤史、木村泰久、植田和光	4. 巻 56
2. 論文標題 多剤排出ポンプMDR1の薬剤絞り出し機構	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 519-523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.56.6_519	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小段篤史、植田和光	4. 巻 74(4)
2. 論文標題 脂溶性化合物を“絞り出す”多剤排出ポンプMDR1の分子機構	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 B&I バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 280-283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Atsushi Kodan and Ryota Futamata, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kioka, Toru Nakatsu, Hiroaki Kato and Kazumitsu Ueda	4. 巻 595
2. 論文標題 ABC11/MDR1/P-gp employs an ATP-dependent twist-and-squeeze mechanism to export hydrophobic drugs.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 707-716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小段篤史
2. 発表標題 多剤排出ポンプMDR1の薬剤絞り出しメカニズム
3. 学会等名 「トランスポーターはどこで何をどのようにして何のために運んでいるのか」第15回トランスポーター研究会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小段篤史、光岡薫、木村泰久、木岡紀幸、植田和光
2. 発表標題 Cryo-EM解析を目指した脂質輸送型ABC蛋白質の生産・調製基盤の構築
3. 学会等名 日本農芸化学大会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Kodan, Romain Amyot, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kodera, and Kazumitsu Ueda
2. 発表標題 Direct Visualization of ABCA1 Reconstituted in Nanodisc by High-Speed Atomic Force Microscopy (HS-AFM)
3. 学会等名 ABC2023, the 9th FEBS Special Meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Disease” , Innsbruck, Austria (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中本 佳歩、小段 篤史、Romain Amyot、坂田 和樹、木村 泰久、梅田 健一、植田 和光、古寺 哲幸
2. 発表標題 脂質膜パッチに再構成されたコレステロールトランスポーターABCA1の高速AFM観察
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木村泰久、小段篤史、植田和光	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 624
3. 書名 「膜タンパク質工学ハンドブック」執筆担当：第2編膜タンパク質 医学・薬学への展開、第3章トランスポーター、第1節 多剤輸送体MDR1(ABCB1)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>脊椎動物の進化におけるABCタンパク質「ABCA1」の重要性を解明 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-01-08-0 脂溶性化合物を細胞外へ絞り出す多剤排出ポンプの機構解明 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-01-08-1</p>

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
研究協力者	Amy t R main (Amyot Romain)		
研究協力者	古寺 哲幸 (Kodera Noriyuki)		
研究協力者	宮田 知子 (Miyata Tomoko)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	難波 啓一 (Namba Keiichi)		
研究協力者	光岡 薫 (Mitsuoka Kaoru)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関