

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15449

研究課題名(和文) コレステロール輸送体ABCA1がもつ二つの機能の調節機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanism of two functions of the cholesterol transporter ABCA1

研究代表者

小笠原 史彦 (OGASAWARA, Fumihiko)

京都大学・高等研究院・特定研究員

研究者番号：00847519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脂質輸送体ATP Binding Cassette A1 (ABCA1)は、HDL(善玉コレステロール)を産生する機能と細胞膜内層から外層へコレステロールを輸送(フロップ)する機能の二つの機能をもつが、それらがどのように調節されているのかはまだわかっていない。そこで本研究では、ABCA1の2つの機能を区別して解析を行った。コレステロールフロップ活性のみを発揮させた系では、ABCA1が細胞膜コレステロール非対称性を変化させる様子を経時的にとらえた。また、2つの機能の切り替えにABCA1の二量体化がかかわっている可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜におけるコレステロール非対称性の有無についてはまだ議論が分かれている。本研究では、ABCA1が細胞膜コレステロール非対称性を変化させる様子を初めて経時的にとらえた。この成果は、細胞膜コレステロール非対称性の謎を解き明かす端緒となることが期待される。また、ABCA1によって調節される細胞膜コレステロール非対称性は正常なシグナル伝達に重要であることがわかってきており、ABCA1の機能を詳細に解明することで、将来的にはがんなどのコレステロール異常が見られる疾患の病理的メカニズムの解明につながることを期待している。

研究成果の概要(英文)：The lipid transporter ATP-binding cassette A1 (ABCA1) has two functions: to generate HDL (good cholesterol) and to transport (flop) cholesterol from the inner to outer leaflet of the plasma membrane, but how these functions are regulated is still unknown. In this study, we analyzed the two functions of ABCA1 separately. In a condition in which ABCA1 exerted only cholesterol flop activity, ABCA1 changed cholesterol asymmetry of the plasma membrane in a couple of hours. We also found that dimerization of ABCA1 may be involved in the switching between the two functions.

研究分野：細胞生化学

キーワード：ABCA1 コレステロール 細胞膜

### 1. 研究開始当初の背景

ABCA1は全身の組織に発現しており、余剰なコレステロールをコリンリン脂質とともに血中の脂質アクセプターである apoA-I (apolipoprotein A-I) に受け渡して HDL を産生する(図1)。HDL は善玉コレステロールと呼ばれており、HDL を介したコレステロールの排出は余剰なコレステロールを除去する唯一の経路であるため、ABCA1 は動脈硬化の予防に大きく貢献する蛋白質として、これまで 20 年間研究されてきた。しかし最近、ABCA1 が HDL 産生以外の新たな機能をもつことが報告された(Liu, SL. et al. *Nat. Chem. Biol.* (2017))。細胞膜において、ABCA1 がコレステロールを脂質二重層の内層から外層へ輸送(フロップ)し、細胞膜におけるコレステロール非対称性をつくり出すというはたらきである(図1)。このコレステロール非対称性は増殖シグナルの調節に重要であることが示されており、ABCA1 がコレステロール非対称性を介して細胞の基本的な機能を調節している可能性が考えられる。一見、二つの活性は apoA-I の有無によって変化しているように見えるが、申請者はこれまでの研究から、コレステロールフロップ活性が著しく低下しているにもかかわらず、HDL 産生活性を保持している変異体を見出している。二つの機能はどちらも ATP 依存的事であることから、ABCA1 は二つの機能を使い分けていると考えられるが、その仕組みは全くわかっていない。

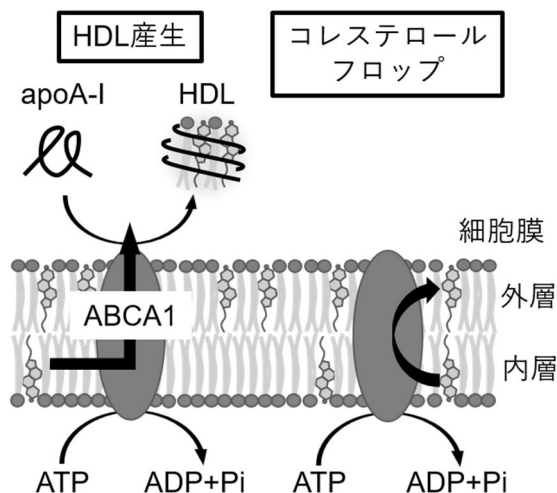


図1. ABCA1がもつ2つの機能

本研究における学術的問いは、ABCA1 が HDL 産生とコレステロールフロップをどのように調節しているかということである。HDL 産生は細胞外へのコレステロール排出、コレステロールフロップは細胞内コレステロール分布の変化、という全く異なる結果をもたらすため、その調節機構の解明は生理的な ABCA1 の役割の解明に役立つことが期待される。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ABCA1 による HDL 産生とコレステロールフロップがそれぞれ独立した機能であることを示し、それらがどのように使い分けられているのかを明らかにすることである。そのために、ABCA1 がもつ二つの機能を区別して解析を行った。

### 3. 研究の方法

本研究では、HEK293 細胞または HeLa 細胞に一過的に ABCA1 を発現させて解析を行った。細胞膜非対称性の解析では、細菌毒素由来のコレステロール結合ドメインをコレステロール結合プローブとして用い、細胞膜外層のコレステロール濃度変化をフローサイトメトリーで解析した。また、ABCA1 二量体化の解析では一細胞レベルでの変化を解析するため、共焦点顕微鏡観察によって解析した。

### 4. 研究成果

#### ・コレステロールフロップ活性の解析

ABCA1 のコレステロールフロップ活性を HDL 産生活性と区別して解析するため、コレステロールフロップ解析手法の改良を行った。前述のように、ABCA1 は血中に含まれる脂質アクセプターである apoA-I にコレステロールとリン脂質を受け渡して HDL を産生するため、ABCA1 は FBS に含まれる脂質アクセプターに対してコレステロールを排出してしまう。そのため、通常の培養条件ではコレステロールフロップ活性のみを発揮させることが難しい。そこでまず、トランスフェクション後の ABCA1 発現量を抗 ABCA1 抗体を用いたフローサイトメトリーで解析したところ、トランスフェクション後 6 時間は細胞膜上に外来 ABCA1 が発現していないことがわかった。そこで、トランスフェクション後 6 時間で FBS 含有培地から無血清培地に交換したところ、コレステロールフロップ活性のみを発揮させることができた。しかし、この手法は HEK293 細胞では機能したが、HeLa 細胞では発現量および発現率を低下させてしまった。そこで次に、ABCA1 を機能停止させた状態で発現させるため、HDL 産生活性を阻害することが知られている ABCA1 阻害剤を検討したところ、HDL 産生活性とコレステロールフロップ活性の両方を阻害する阻害剤を見出した。この阻害剤をトランスフェクションと同時に添加することで、ABCA1 の発現量および発現率を損なうことなく、コレステロールフロップ活性のみを発揮させる実験系を確立した。これまでの手法では、ABCA1 発現細胞と非発現細胞に対するコレステロールプローブ結合量の差は中央値で 2 倍程度であったが、この改良によりその差は 10 倍程

度まで上がった。次に、ABCA1 阻害剤を取り除いてから経時的にフローサイトメトリーで解析したところ、2 時間程度まで徐々に細胞膜外層のコレステロール濃度が上昇することがわかった。反対に、ABCA1 阻害剤を取り除いてから 2 時間後に再び ABCA1 阻害剤を添加したところ、徐々に細胞膜外層のコレステロール濃度は減少したが、2 時間経っても元には戻らなかった。コレステロールはリン脂質と異なり、大きな親水性頭部をもたないため自発的なフリップフロップが速く、それ故脂質二重膜上で対称的に分布していると考えられてきたが、本研究で見られた ABCA1 の活性による緩やかな細胞膜外層のコレステロール濃度の変化は、細胞膜におけるコレステロールの自発的なフリップフロップが予想されていたよりはるかに遅い可能性を示している。

#### ・ ABCA1 二量体化の解析

ABCA1 は細胞膜上において二量体化することがわかっており、HDL 産生活性との関連が示唆されているが、その詳細はまだわかっていない。またコレステロールフロップ活性との関連はまったく不明である。そこで、ABCA1 の二量体化と 2 つの機能の関連を調べるため、ABCA1 二量体化を解析する手法を確立した。これまで ABCA1 の二量体化は一分子観察によって解析してきたが、この手法は解析に時間を要するうえ、観察できる時間が短い。そこで、より簡便に二量体化を解析するため、コイルドコイルラベル法を用いた。この手法では、コイルドコイルを形成して結合する二つの配列の内一つを目的タンパクに挿入し、一つを蛍光を付加した合成ペプチドとして後で加えることにより、目的タンパクを蛍光ラベルする。細胞膜上の ABCA1 の二量体化を解析するため、まず ABCA1 の細胞外ドメインにこの配列を挿入し、発現や機能、ラベル効率の良い場所を探索した。その後、FRET を起こす二つの蛍光をそれぞれ付加した合成ペプチドを同時に加え、ABCA1 野生型および ATP 加水分解活性欠損変異体を発現した細胞の細胞膜における FRET を観察した。その結果、ABCA1 の ATP 加水分解活性依存的な二量体化を観察することに成功した。次に、ABCA1 の 2 つの機能と二量体化の関連を調べるため、コレステロールフロップ活性のみを發揮した条件で解析したところ、ATP 加水分解活性依存的に二量体化率が上昇していた。一方、HDL を産生する際の脂質アクセプターである apoA-I を培地に添加するとただちに二量体化率が減少した。この結果は以前の報告とも一致しており、ABCA1 の二つの機能の切り替えに二量体化がかかわっている可能性を示している。また、細胞膜にコレステロールを添加すると ABCA1 の HDL 産生活性が上昇することがわかっているため、コレステロールを添加して同様の解析を行ったところ、ATP 加水分解活性非依存的に ABCA1 の二量体化率が上昇した。この結果は予想外であり、ABCA1 の二量体化がコレステロールフロップ活性に必要なのか、コレステロールフロップ活性による非対称性の変化が二量体化を引き起こしたのか、今後慎重な検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogasawara Fumihiko, Ueda Kazumitsu	4. 巻 298
2. 論文標題 ABCA1 and cholesterol transfer protein Aster-A promote an asymmetric cholesterol distribution in the plasma membrane	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102702 ~ 102702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 0件）

1. 発表者名 岡本 雄介、小笠原史彦、木村 泰久、木岡 紀幸、植田 和光
2. 発表標題 ABCA1のHDL産生活性およびコレステロールフロップ活性の調節
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小笠原 史彦、岡本 雄介、木村 泰久、木岡 紀幸、植田 和光
2. 発表標題 脂質輸送体ABCA1のHDL産生活性およびコレステロールフロップ活性の調節
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小笠原史彦、植田和光
2. 発表標題 細胞内コレステロール恒常性はABCA1が形成する細胞膜コレステロールの非対称的な分布を介して維持される
3. 学会等名 第64回 日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumihiko Ogasawara, Kazumitsu Ueda
2. 発表標題 ABCA1 causes a transbilayer asymmetric cholesterol distribution for cholesterol homeostasis
3. 学会等名 4th Research Meeting on Cell Dynamics (招待講演)
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------