

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 4 月 11 日現在

機関番号：82601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22790102
 研究課題名（和文） HDL 形成タンパク質 ABCA1 の新しい活性制御機構の解析
 研究課題名（英文） A novel potential mechanism for the transcriptional regulation by ABCA1
 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、HDL 形成タンパク質 ABCA1 の C 末端部位の細胞内ドメインの切断と、切り出された細胞内ドメインの核内移行反応について検討した。dsRNA 刺激によって活性化される TLR3 の下流のシグナルを阻害すると、細胞内の ABCA1 切断産物の量が減少した。また、ABCA1 の細胞内ドメインを発現した HEK293 細胞において、dsRNA 刺激を加えると核に局在する細胞内ドメインの量が増加した。これらの結果は、TLR3 経路が、ABCA1 の細胞内ドメインを切断して核へ移行する反応に重要であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated that the cleavage of C-terminal intracellular domain of ABCA1 and the nuclear translocation of the cleavage product. The inhibition of TLR3 signaling pathway decreased the cleavage of ABCA1. In HEK293 cells expressing the intracellular domain of ABCA1, dsRNA stimulation increased the translocation of intracellular domain into nuclear. These results indicate that TLR3 pathway is critical for the cleavage of ABCA1 and its nuclear translocation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|------|-----------|
| 2010 年度 | 1,000,000 | 0 | 1,000,000 |
| 2011 年度 | 800,000 | 0 | 800,000 |
| 2012 年度 | 600,000 | 0 | 600,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,400,000 | 0 | 2,400,000 |

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、動脈硬化

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膜輸送タンパク質の中でも最大のファミリーを形成し、生体膜にあって ATP 加水分

解と共役して、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 として細胞外に分泌

する機能を持つ。一般的には LDL の「悪玉」に対して、HDL は「善玉」と呼ばれ、抗動脈硬化的に機能することが知られている。また、ABCA1 の機能不全をもたらす遺伝子変異が認められると HDL が著しく低値を示し、ABCA1 ノックアウトマウスで HDL がほぼ消失すること、さらに、ABCA1 過剰発現マウスで HDL 上昇と抗動脈硬化作用を示すこと、などの報告から、HDL 恒常性における ABCA1 の生理的重要性が明らかにされており、動脈硬化性疾患の重要な創薬ターゲットとして位置づけられている。ABCA1 の活性は、遺伝子・タンパク質レベルで、厳密かつ複雑な制御を受けていることが最近の研究で明らかになりつつある。申請者らはこれまで、ABCA1 の機能的役割や、分子レベルでの複雑な発現調節システムについて明らかにしてきた。そして、ABCA1 の発現を制御する因子を調べる過程において、マクロファージ細胞で、Toll-like receptor 3 (TLR3) のリガンドである double-stranded RNA (dsRNA) の刺激により、ABCA1 タンパク質の C 末端部位の細胞内ドメインが切り出され、切断産物が細胞内に蓄積することを発見した。さらに ABCA1 細胞内ドメインの cDNA を作製し発現を確認したところ、細胞内ドメインは細胞質だけでなく、核にも存在することが明らかとなった。多くの膜貫通型タンパク質では、細胞内外のシグナルを引き金として、プロテアーゼによる切断を受け、その断片がシグナルを伝達する分子として機能することが分かっており、分化制御因子 Notch、接着分子 CD44 等では、切断産物が核内に移行して特定の遺伝子の転写を調節することが明らかとなっている。ABCA1 と共通したドメインを持ち、インシュリンの分泌とともに細胞内ドメインが切断される膜タンパク質 IA-2/ICA512 では、切断産物が核に移行し、遺伝子レベルでの制御を介して、インシュリン分泌をさらに活性化するフィードバック制御（促進）メカニズムが働くことが報告されている。また、ABCA1 の C 末端側には、典型的な核移行シグナル (NLS) と、転写制御因子によく見られるロイシンジッパー様のドメインが存在し、さらに最近、ABCA1 の転写を促進する核内受容体 LXR (Liver X Receptor) が、ABCA1 の C 末端側のドメインと直接結合することが確認された。これらの知見は、ABCA1 の切断産物の核内移行と転写制御への関与の可能性を強く示唆している。

2. 研究の目的

申請者は以上の背景より、dsRNA 刺激によって ABCA1 タンパク質の細胞内ドメイン切断が促され、その切断産物が核に移行し、様々な遺伝子の転写レベルの制御に関与しているのではないか、という仮説を立てた (図 1)。

そこで、本研究では ABCA1 切断と核移行に関する解析を行った。

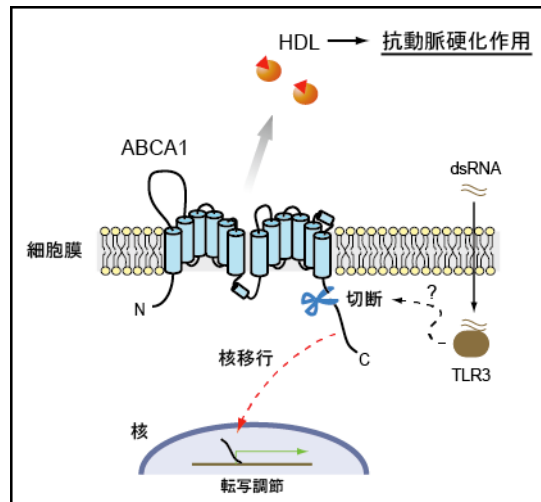


図 1 ABCA1 切断と核移行の仮説モデル

3. 研究の方法

細胞は、ABCA1 を発現している細胞として、ヒト単球性白血病細胞株 THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) でマクロファージ様に分化させた細胞、及び、不死化した mouse embryonic fibroblast (MEF) を用いた。また、ABCA1 の細胞内ドメインをテトラサイクリン (またはドキシサイクリン、dox) 誘導的に発現する HEK293 細胞を作成し、実験に使用した。HEK293 細胞は内在性の ABCA1 を発現していない。

dsRNA である poly(I:C) で細胞を処理した後、細胞を回収して RIPA バッファーで溶解した。SDS-PAGE にて細胞ライセートのタンパク質を分離した後、PVDF メンブレンに転写して、Western blotting を行った。ABCA1 の C 末端部位を認識する抗体で ABCA1 の切断産物を検出した。

細胞の核画分の分画は NE-PER (Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent Kit, Thermo Scientific) を用いた。

4. 研究成果

(1) ABCA1 切断のメカニズムの解析

マクロファージに分化させた THP-1 細胞において、dsRNA (poly(I:C)) 刺激を加えると ABCA1 の C 末端部位の細胞内ドメインが切り出され、切断産物が細胞内に蓄積する。そこで、各種阻害剤によって、この切断産物の産生が阻害されるかどうかを調べた。TLR3 の下流にある TANK-binding kinase 1 (TBK1) の阻害剤 SU6668 は濃度依存的に ABCA1 切断産物の産生を阻害した (図 2)。また、各種 MAPK 阻害剤 PD98059, SB203580, SP600125 は切断産物の産生に影響を及ぼさなかったが、セリンプロテアーゼ阻害剤 AEBSF、マトリックス

メタロプロテアーゼ (MMP) 阻害剤 GM6001 の処理によって切断産物の産生が減少した。そこで、TNF レセプターや CD44 など様々な膜タンパク質の切断に関与していることが知られているメタロプロテアーゼ ADAM17 (TACE) を MEF に強制発現させ、dsRNA 刺激による ABCA1 切断産物の量を調べたところ、切断産物が増加した。以上の結果は、TLR3 の下流のシグナルが活性化され、それによって ADAM17、または、セリンプロテアーゼによる ABCA1 タンパク質の C 末端細胞内ドメインの切断が誘導されている可能性を示唆している。

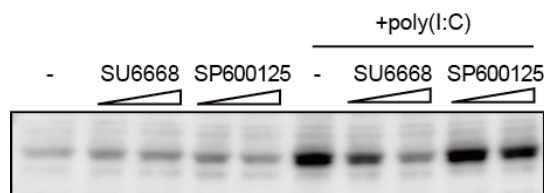


図2 TBK1 阻害剤 SU6668 によって dsRNA 依存的な ABCA1 切断産物の産生が抑制される

(2) 切断産物の核移行

ABCA1 細胞内ドメインの cDNA を作製し、Hela 細胞に導入して発現を確認したところ、細胞内ドメインは細胞質だけでなく、核にも存在していた。さらに別の系で ABCA1 細胞内ドメインの核への局在を確認するために、myc タグを付加した ABCA1 の細胞内ドメインをテトラサイクリン誘導的に発現する HEK293 細胞を作製した。この細胞系において、細胞内ドメインの発現と局在を myc 抗体に結合した蛍光プローブを利用して顕微鏡下で観察した。細胞内ドメインは、主に細胞質全体に発現しており核に局在していることが確認できなかった。そこで、細胞内ドメインの発現を誘導した細胞を分画して、核画分への細胞内ドメインの局在を Western blotting により確認したところ、確かに核にも存在することが明らかとなった。さらに、細胞に dsRNA 刺激を加えて、核画分に存在する細胞内ドメインの量が変化するかどうかについて調べた。また、ABCA1 の細胞内ドメインに核内受容体 LXR が結合することが報告されているので、LXR リガンドを加えた場合の細胞内ドメインの局在についても検討した。細胞に細胞内ドメインの発現を誘導し、その後 dsRNA を加えると、核画分に存在する細胞内ドメインの量が増加した (図3)。しかし、LXR リガンドである T0901317 を加えても、細胞内ドメインの量に変化は無かった。この結果は、dsRNA 刺激が ABCA1 の切断を誘導するだけでなく、切断した細胞内ドメインを核へ移行する反応も促進することを示唆している。現在、細胞内ドメインを発現させた細胞のマイクロアレイ解析結果の精査を行っているが、オントロジー解析の結果から、炎症

関連遺伝子の発現が ABCA1 細胞内ドメインを発現している細胞において減少する傾向が示されている。このことは、TLR3 刺激によって切断された ABCA1 細胞内ドメインが核移行し、炎症に関与する遺伝子の発現を抑制している可能性を示唆している。

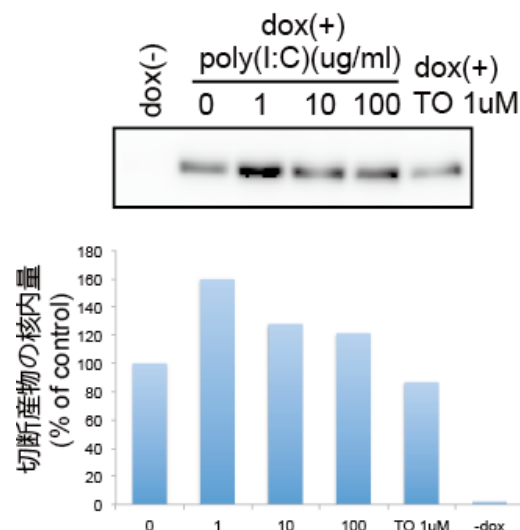


図3 dsRNA 刺激により ABCA1 切断産物の核内移行が促進する

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

① Okuhira K, Fitzgerald ML, Tamehiro N, Ohoka N, Suzuki K, Sawada J, Naito M, Nishimaki-Mogami T.

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; 285(21):16369-77.

DOI: 10.1074/jbc.M109.061424

(査読有)

② Kim S, Ohoka N, Okuhira K, Sai K, Nishimaki-Mogami T, Naito M.

Modulation of RIP1 ubiquitylation and distribution by MeBS to sensitize cancer cells to tumor necrosis factor α -induced apoptosis.

Cancer Sci. 2010; 101(11):2425-9.

DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01697.x.

(査読有)

③ Cui H, Okuhira K, Ohoka N, Naito M, Kagechika H, Hirose A, Nishimaki-Mogami T. Tributyltin chloride induces ABCA1 expression and apolipoprotein A-I-mediated cellular cholesterol efflux by activating LXR α /RXR.

Biochem Pharmacol. 2011; 81(6):819-24.
DOI: 10.1016/j.bcp.2010.12.023.

(査読有)

④ Okuhira K, Ohoka N, Sai K, Nishimaki-Mogami T, Itoh Y, Ishikawa M, Hashimoto Y, Naito M.

Specific degradation of CRABP-II via cIAP1-mediated ubiquitylation induced by hybrid molecules that crosslink cIAP1 and the target protein.

FEBS Lett. 2011; 585(8):1147-52.

DOI: 10.1016/j.febslet.2011.03.019.

(査読有)

⑤ Demizu Y, Okuhira K, Motoi H, Ohno A, Shoda T, Fukuhara K, Okuda H, Naito M, Kurihara M.

Design and synthesis of estrogen receptor degradation inducer based on a protein knockdown strategy.

Bioorg Med Chem Lett. 2012; 22(4):1793-6.

DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.11.086.

(査読有)

⑥ Ohoka N, Okuhira K, Cui H, Wu W, Sato R, Naito M, Nishimaki-Mogami T.

HNF4 α increases liver-specific human ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux to apolipoprotein A-I in response to cholesterol depletion.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012; 32(4):1005-14.

DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.238360.

(査読有)

⑦ Itoh Y, Ishikawa M, Kitaguchi R, Okuhira K, Naito M, Hashimoto Y.

Double protein knockdown of cIAP1 and CRABP-II using a hybrid molecule consisting of ATRA and IAPs antagonist.

Bioorg Med Chem Lett. 2012; 22(13):4453-7.

DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.04.134.

(査読有)

⑧ 奥平桂一郎、HDL 産生における ABC トランスporter-A1 の活性制御機構、*生化学*、84 巻 4 号、2012、285-290 (査読無)

[学会発表] (計 4 件)

① 奥平桂一郎、PDZ-RhoGEF binds ABCA1 and increases transporter expression and cholesterol efflux via RhoA activation.

第 27 回内藤カンファレンス(2010 年 6 月 30 日、札幌)

② 奥平桂一郎、Binding of PDZ-RhoGEF to ABCA1 induces cholesterol efflux through RhoA activation and prevention of transporter degradation.

第 42 回日本動脈硬化学会(2010 年 7 月 16 日、岐阜)

③ 最上知子、奥平桂一郎、ABCA1 相互作用タンパク質と Rho を介した脂質搬出反応の制御
第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(2010 年 11 月 30 日、富山)

④ Okumura-Noji K, Okuhira K, An Anion-Exchange Chromatography Isolated Subfraction of Mouse Apolipoprotein A-I Is Unable to Activate Cellular Cholesterol Release from Mouse Peritoneal Macrophage Foam Cells.

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology (2012 年 4 月 18 日、シカゴ、米国)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: アポトーシス阻害タンパク質リガンド-エストロゲン受容体リガンドハイブリッド化合物並びにそれを利用したエストロゲン受容体分解誘導剤及び乳癌、子宮頸癌又は卵巣癌の予防及び治療剤

発明者: 内藤幹彦、奥平桂一郎、出水庸介、栗原正明

出願人: 財団法人ヒューマンサイエンス財団

種類: 特許

番号: 特願 2011-195081 号

出願年月日: 平成 23 年 9 月 7 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.nihs.go.jp/dfbg/frame.html>

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