

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月1日現在

コレステロール恒常性の鍵をにぎる ABC 蛋白質の作用機構解明

Molecular mechanism of ABC proteins involved
in cholesterol homeostasis

課題番号：25221203

植田 和光 (Ueda Kazumitsu)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授



研究の概要：コレステロール恒常性は、生合成、取り込み、貯蔵だけでなく、細胞からの排出が重要である。複数の ABC 蛋白質がコレステロール輸送および排出に関与しているが、それら ABC 蛋白質の生理的役割や作用機構には多くの謎が残されている。本研究は、代表者が、30 年間にわたって蓄積してきた ABC 蛋白質に関する知識と経験を活かし、①結晶構造解析による 3 次元構造解析②蛍光プローブを用いた 1 分子観察、③生化学的・細胞生物学的解析の知見を統合し、コレステロール恒常性の鍵をにぎる ABC 蛋白質の作用機構を解明する。

研究分野：農芸化学（応用生物化学）

キーワード：ABC 蛋白質、トランスポーター、動脈硬化、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

コレステロール恒常性の破綻は、日本人の死因の 30%を占める血管系の異常を引き起こす。コレステロール恒常性は、生合成、取り込み、貯蔵だけでなく、細胞からの排出が重要である。複数の ABC 蛋白質がコレステロール輸送および排出に関与しているが、それら ABC 蛋白質の生理的役割や作用機構には多くの謎が残されている。

2. 研究の目的

本研究は、代表者がこれまで 30 年間にわたって蓄積してきた ABC 蛋白質に関する知識と経験を活かし、コレステロール恒常性に関与する ABC 蛋白質の作用機構を、①結晶構造解析による 3 次元構造解析②蛍光プローブを用いた 1 分子観察、③生化学的・細胞生物学的解析の知見を統合し、解明することを目的とする。

3. 研究の方法

真核単細胞生物 *C. merolae* の ABC 蛋白質のひとつ CmABCB1 の高解像度の 3 次元結晶構造解析によって、ABC 蛋白質の ATP に依存した輸送に伴う構造変化を解明する。さらに、構造に基づいてアミノ酸変異を導入することによって、脂質輸送型 ABC 蛋白質の基質輸送機構を解明する。

全反射照明蛍光 (TIRF) 顕微鏡を用いて ABC 蛋白質の動きを 1 分子解析することによって、基質輸送過程を可視化する。さらに、生化学的・細胞生物学的知見と統合することによって、作用機構を解明する。

4. これまでの成果

・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 *C. merolae* の ABC 蛋白質のひとつがヒト ABCB1 と非常によく似た基質特異性を示すことをまず明らかにし、CmABCB1 と命名した。CmABCB1 の大量発現系と結晶条件を確立し、さらに CmABCB1 に特異的に結合する環状ペプチドを開発することによって、真核生物の ABC 蛋白質としては世界最高の解像度 2.4Å で 3 次元構造を解明することに成功した (Proc Natl Acad Sci U S A. 2014)。その結果、4 番目の膜貫通 α ヘリックス (TM4) の脂質二重膜内葉部分がほどけており、輸送基質をそこから蛋白質内部へ取り込むことを明らかにした。これまで輸送基質が細胞膜中から取り込まれることが予想されていたが、侵入路が解明されたのは、これが初めてである。ABCB1 と 86%のアミノ酸配列相同性を持ち、肝臓から胆汁中にリン脂質とコレステロールを分泌する ABCB4 に TM4 の α ヘリックス構造を固定する変異を導入すると輸送活性を失ったことから、脂質を輸送する ABC 蛋白質も、ABCB1 と同様に TM4 の α ヘリックス構造のすきまから基質を取り込んでいると考えられる (投稿準備中)。

・1 分子解析による作用機構の解明：ABCA1 と 69%のアミノ酸相同性をもつ ABCA7 が、ABCA1 とは異なり細胞膜上で 2 量体化しないことを明らかにした。また、それらのアミノ酸配列を比較して変異を導入することに

よって、2 量体化しにくい ABCA1 変異体の作成に成功した。さらにその変異体が産生する HDL のサイズが野生型と異なることを細胞生化学的な解析で明らかにした。現在、詳細な機構解析が進行中である（投稿準備中）。

・細胞膜脂質による ABC 蛋白質の活性調節：コレステロール恒常性に関与する ABC 蛋白質である ABCA1、ABCG1、ABCG4 が、それぞれが異なる細胞膜マイクロドメインに局在することを明らかにし、さらにこれらの ABC 蛋白質が細胞膜中で脂質を動かすことによってコレステロール豊富なマイクロドメインの再編を行っていることを明らかにした (PLoS One 2014)。次に、ホルファチジルコリンを輸送基質とする ABCB4 の活性を検討した結果、ABCB4 は細胞膜中のスフィンゴミエリン豊富な膜ドメインに局在し、輸送活性がスフィンゴミエリンに依存していることを明らかにした (J Lipid Res 2015)。この結果によって、ABC 蛋白質の活性が細胞膜脂質によって調節されていることが初めて明らかになった。さらに、ABCA1 は過剰なコレステロールを HDL として細胞外へ排出するだけでなく、コレステロールの細胞膜から小胞体への逆輸送にも関与していることを明らかにした (J Biol Chem 2015)。

・神経細胞における ABC 蛋白質の機能：高度不飽和脂肪酸はヒトの脳に存在する脂質の 25-30% を占め、脳の発達や認知機能に重要である。しかし、高度不飽和脂肪酸がどのような経路で神経細胞へ運ばれるのかは不明であった。本研究では、ラット大脳皮質から単離したグリア細胞に添加した DHA や EPA などの高度不飽和脂肪酸が、まずグリア細胞の細胞膜の膜リン脂質の一部となったのち、アポ E を脂質アクセプターとして形成された HDL(LpE) のリン脂質の脂質部分として（おそらく ABCA1 によって）分泌されることを、質量分析解析によって明らかにした。さらに、LpE が LDL 受容体を介して神経細胞に取り込まれること、高度不飽和脂肪酸を含む LpE が海馬神経細胞の分岐数を増加させることによって、神経突起伸長を促進することを明らかにした (J Lipid Res 2015)。

・iPS 細胞、ES 細胞における ABC 蛋白質：iPS 細胞における ABC 蛋白質遺伝子の発現プロファイルを利用することによって、再生医療の途上で未分化の iPS 細胞を同定し除去するための蛍光プローブと薬剤の開発に成功した (Cell Reports 2014, J Am Chem Soc 2014)。また、小腸上皮から体内へのコレステロール吸収において ABCA1 と協調して働く NPC1L1 の阻害剤の開発にも成功した (PLoS One 2015)。

5. 今後の計画

CmABCB1 の構造中に発見した内向き構造を安定化するアミノ酸側鎖ネットワークに変異を導入することによって、これまで取得が困難であった外向き構造の結晶を取得することに成功した。高解像度での 3 次元構造の解析が進行中であり、本研究期間中に ABC 蛋白質による詳細な輸送機構を世界で初めて明らかにできると期待している。

1 分子解析によって、2 量体化しにくい ABCA1 変異体の取得に成功し、その変異体が産生する HDL のサイズが野生型と異なることを細胞生化学的な解析で明らかにしつつある。さらに、ABCA1 による脂質排出を酵素学的に解析することも可能となった。本研究中に、ABCA1 の 2 量体化の生理的意義を解明できると期待している。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

1. Nakato, M., Matsuo, M., Kono, N., Arita, M., Arai, H., Ogawa, J., Kioka, N., Ueda, K. Neurite outgrowth stimulation by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids of phospholipids in apolipoprotein E-containing lipoproteins secreted from glial cells. *J. Lipid Res.* 56: 1880-1890 (2015)
2. Zhao, Y., Ishigami, M., Nagao, K., Hanada, K., Kono, N., Arai, H., Matsuo, M., Kioka, N., Ueda, K. ABCB4 exports phosphatidylcholine in a sphingomyelin-dependent manner. *J Lipid Res* 56:644-652 (2015)
3. Sano, O., Ito, S., Kato, R., Shimizu, Y., Kobayashi, A., Kimura, Y., Kioka, N., Hanada, K., Ueda, K., Matsuo, M. ABCA1, ABCG1, and ABCG4 are distributed to distinct membrane meso-domains and disturb detergent-resistant domains on the plasma membrane. *PLoS One* 9(10):e109886 (2014)
4. Omura, R., Nagao, K., Kobayashi, N., Ueda, K., Saito, H. Direct detection of ABCA1-dependent HDL formation based on lipidation-induced hydrophobicity change in apoA-I. *J Lipid Res.* 55:2423-2431 (2014)
5. Kodan, A., Yamaguchi, T., Nakatsu, T., Sakiyama, K., Hipolito, C.J., Fujioka, A., Hirokane, R., Ikeguchi, K., Watanabe, B., Hiratake, J., Kimura, Y., Suga, H., Ueda, K., Kato, H. Structural Basis for Gating Mechanisms of a Eukaryotic P-glycoprotein Homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111:4049-4054 (2014)

ホームページ等

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