

平成30年6月26日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221203

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) Molecular mechanism of ABC proteins involved in cholesterol homeostasis

研究代表者

植田 和光 (Ueda, Kazumitsu)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：10151789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 163,900,000円

研究成果の概要(和文)：ABC蛋白質は、共通のATP加水分解ドメインをもつ膜蛋白質の総称で、人の健康維持に重要な役割を果たしている。本研究は、コレステロール恒常性に関わるABC蛋白質の輸送機構と生理的役割の解明を目的とした。その結果、HDL(いわゆる善玉コレステロール)の産生メカニズムに関して、これまで信じられてきた機構とは全く異なる新規機構を提唱するに至った。また、ABCA1が細胞膜中でコレステロールの分布を変化させ増殖シグナルを微調整していることを発見した。さらに、脂溶性化合物排出ポンプABCB1の高分解能での構造解析によって輸送機構を解明し、コレステロール輸送型ABC蛋白質の研究の基盤を構築することに成功した。

研究成果の概要(英文)：ATP Binding Cassette (ABC) proteins play important physiological roles through transporting hydrophobic substances, and defects in their functions are related to various diseases. In this project, we tried to reveal the functional mechanisms and physiological roles of ABC proteins involved in cholesterol homeostasis. By integrating biochemical/cell biological studies, single molecule tracking and crystal structure analyses, we proposed the novel mechanism of HDL (so-called good cholesterol) generation, in which ABCA1 directly loads excess cholesterol onto apolipoprotein A-I. Furthermore, we revealed that ABCA1 is involved in the uneven distribution of cholesterol in the plasma membrane and the modulation of cell growth signaling. We also succeeded in establishing the platform of ABC protein research by revealing the functional mechanism of multidrug exporter ABCB1 based on detailed structure analyses.

研究分野：農学

キーワード：ABC蛋白質 トランスポーター コレステロール 動脈硬化 アルツハイマー病 増殖シグナル 結晶構造解析 iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ABC(ATP Binding Cassette)蛋白質は、共通のATP結合領域と12~17の膜貫通 $\alpha$ ヘリックスをもつ輸送体ファミリーであり、大腸菌からヒトまですべての生物で重要な機能を果たしている。ヒト染色体上には48種類のABC蛋白質遺伝子が存在する。これまでの研究から、いくつかのヒトABC蛋白質が内在性脂質の体内輸送に関与し、それらの異常がさまざまな疾患と密接に関係していることがわかってきた。しかし、脂溶性物質を基質とする輸送体の生化学的解析は容易ではなく、それらのABC蛋白質の輸送基質や生理的役割、制御機構の詳細はいまだ解明されていない。特に、コレステロール恒常性に関わるABC蛋白質の機能に関しては、多くの謎が残されている。

コレステロールは細胞膜の主要成分であり、生体にとって必須な栄養素であるが、現代社会では患者というイメージが定着している。ABC蛋白質のひとつABCA1はコレステロールの恒常性維持の鍵を握るトランスポーターである。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の解析から約20年前に明らかにされた。ABCA1によって産生される新生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)がとり巻いた円盤状構造であり、ABCA1がどのようなメカニズムで新生HDLを産生するかは、現在でも議論が大きく分かれている。

ABCA1を代表とする膜脂質輸送に関わるABC蛋白質の異常は、動脈硬化、糖尿病、皮膚障害、精神障害、老人性の失明など、現在人がかかわる多くの疾患に関係する。ABC蛋白質の作用機構、制御機構、生理的役割を明らかにすることは、これらの疾患の予防や治療を考える上で重要である。

### 2. 研究の目的

本研究は、HDL(善玉コレステロール)産生の鍵を握るABCA1およびコレステロール恒常性維持に関わるその他のABC蛋白質の作用機構、制御機構、生理的役割を、生化学的解析、細胞生物学的解析、蛍光プローブを用いた1分子観察、結晶構造解析などを統合することによって解明し、疾患の予防や治療に資することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 生化学的、細胞生物学的解析によるABC蛋白質の作用機構・制御機構の解明:

ABCA1、ABCA7、ABCB4、ABCG1、ABCG4などコレステロール恒常性維持に関わるABC蛋白質を特異的に発現させた細胞を用いて、作用メカニズムを解析するとともに、制御メカニズムを明らかにする。共同研究者が開発した新規コレステロールプローブを用いて細胞膜中のコレステロール分布を解析する。それ

ぞれのABC蛋白質の精製条件の最適化を行い、精製蛋白質を用いた活性測定系を用いて、輸送基質との相互作用を解析する。さらに、活性測定のための新規蛍光プローブ、阻害剤、活性化剤などのスクリーニングを行う。

(2) 結晶構造解析によるABC蛋白質の作用機構の解明:

真核単細胞生物(紅藻)のABC蛋白質であるCmABCB1の基質輸送前と輸送後の構造を世界最高レベルの高分解能で明らかにする。それによって、ABC蛋白質の基質認識機構およびATP加水分解に伴う構造変化によって基質がどのように輸送されるかを解明し、コレステロール輸送型ABC蛋白質の研究のプラットフォームを構築する。

(3) 全反射照明蛍光顕微鏡を用いた1分子イメージングによるHDL形成機構の解明:

細胞膜上のABC蛋白質を蛍光標識し、全反射蛍光顕微鏡を用いて1分子レベルでリアルタイムに可視化し、ABC蛋白質の作用メカニズムを解明する。

### 4. 研究成果

(1) 生化学的、細胞生物学的解析によるABC蛋白質の作用機構・制御機構の解明:

#### ① ABCA1による新生HDL産生機構の解明

背景で述べたように、ABCA1によるHDL産生に関して議論が大きく分かれている。現在一般に受け入れられているモデル(図1)は、ABCA1がリン脂質を脂質二重層の外層に動かすことによって外に突出した特殊な膜ドメインを形成し、アポA-Iがその特殊な膜ドメインに結合し受動的に脂質を引き抜くことで新生HDLが産生されるというものである。

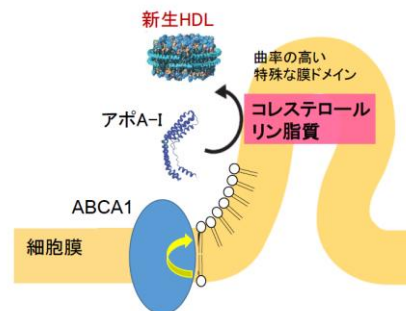


図1. ABCA1がHDL産生に間接的に関わるモデル

本研究では、ABCA1発現細胞を低濃度のトリプシンで処理すると、ABCA1の細胞外ドメインの切断とともに大量のリン脂質とコレステロールが培地中に放出されることを明らかにした。ABCA1と同様にHDL産生に関わるが、大きな細胞外ドメインをもたないABCG1発現細胞からは、トリプシン処理で脂質が放出されないことから、ABCA1が輸送したリン脂質とコレステロールをABCA1の大きな細胞外ドメインに蓄積することを明らか

にした。また、代表者らは、ABCA1 が HDL 産生時に一時的に二量体を形成し、細胞膜上で静止することを報告しており (Nagata K, PNAS 2013)、これらの結果から、ABCA1 が HDL 産生に直接関与する新規 HDL 産生モデルを提唱した (図 2) (Sci Rep 2018①)。

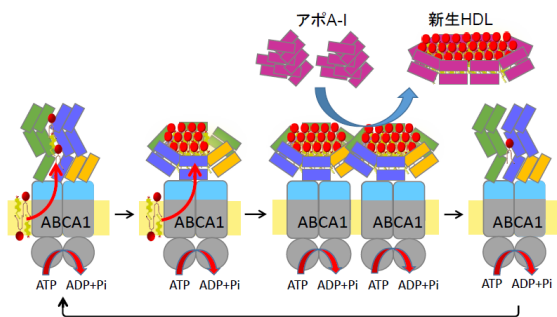


図 2. 本研究で提唱した新規 HDL 産生モデル

### ②ABC 蛋白質による細胞膜脂質環境の制御

ABCA1 が、HDL を産生するだけでなく、細胞膜中のコレステロールを内層から外層へ動かすことによって、脂質二重層外層のコレステロール濃度を内層の 10 倍以上高く保っていることを、新規コレステロールプローブを用いて明らかにした (図 3)。さらに、細胞が増殖シグナルを受け取ると ABCA1 の活性が変化し、コレステロールの分布が変化すること、それによって ABCA1 が増殖シグナルの細胞内への伝達を微調整しているという全く新しい概念を提唱した (Nat Chem Biol 2017③)。

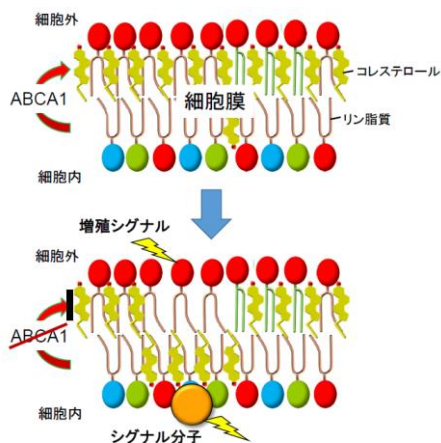


図 3. ABCA1 は細胞膜中のコレステロールの分布を変化させ、増殖シグナル伝達を微調整している

さらに、ABCA1 が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 2015⑥)。また、コレステロール輸送に関わる ABC 蛋白質 ABCA1、ABCG1、ABCG4 などそれぞれ異なる細胞膜マイクロドメインで機能していることを明らかにした (PLoS One 2014④)。この結果は、それぞれの輸送基質が濃縮した膜ド

メインで最も高い活性を発揮することを示していたが、それが輸送基質の濃度に依存しているのか膜環境が重要であるのかは不明であった。次に、毛細胆管膜でホルファチジルコリンとコレステロールを胆汁中に排出する ABCB4 の活性を検討した。その結果、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 2015⑤)。この結果は、ABCB4 がホルファチジルコリンを生理的基質として輸送するにもかかわらず、活性がスフィンゴミエリンに依存していることを示しており、ABC 蛋白質の輸送活性が膜環境に依存していることを初めて明らかにしたものである。ABCB4 が機能する毛細胆管膜はスフィンゴミエリンに富むことから、ABC 蛋白質の機能調節を考えるうえで重要と考えられる。

### ③神経細胞・ES/iPS 細胞における ABC 蛋白質の機能

アルツハイマー病との関連が示唆されている ABCA7 は、ABCA1 と高い相同性をもつにもかかわらずコレステロールは輸送せず、リゾホスファチジルコリンの輸送に関与することを見出した (Biochim Biophys Acta 2017 ②)。また、脳の発達に重要である高度不飽和脂肪酸が脳内の HDL に相当する LpE を介して神経細胞へ運ばれることを明らかにした (J Lipid Res 2015⑤)。さらに、iPS 細胞、ES 細胞における ABC 蛋白質遺伝子の発現プロファイルの解析から、ES/iPS 細胞では ABCA1、ABCB1、ABCG2 の発現が抑制されていることを明らかにした。さらに、再生医療の途上で分化しなかった 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 (J Am Chem Soc 2014⑩, Cell Reports 2014⑫)。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 ⑧)。

### (2)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* のもつ CmABCB1 がヒト ABCB1 と非常によく似た基質特異性を示すことを明らかにするとともに、大量発現系と結晶条件を確立した。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。その結果、4 番目の膜貫通  $\alpha$ -ヘリックス (TM4) の脂質二重膜内層部分がほどけており、ABCB1 は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 (PNAS 2014)。これまで輸送基質が細胞膜中から蛋白質内部へ侵入することが予想されてはいたが、その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を分泌する ABCB4 の TM4 の  $\alpha$ 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  $\alpha$ 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 (図 4)。

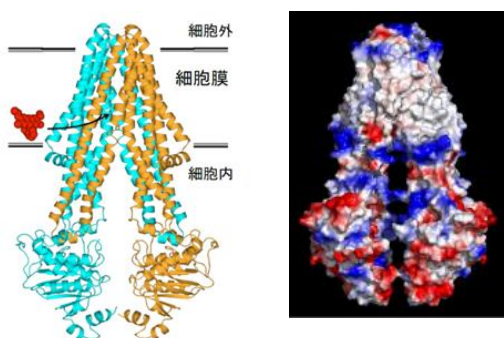


図 4. ABCB1 の構造を高分解能で解明し、脂溶性基質を細胞膜中から取り込むことを明らかにした

さらに、CmABCB1 の構造中に、内向き構造 (輸送前の構造) を安定化するアミノ酸側鎖ネットワークを発見し、その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 (輸送後の構造) の結晶化に成功した。それによって、ATP 結合による構造変化によって、脂溶性基質を細胞外へ絞り出すように排出していることを明らかにした (投稿中)。

### (3) 全反射照明蛍光顕微鏡を用いた 1 分子イメージングによる HDL 形成機構の解明:

ABCA1 と高い相同性を持ち、ABCA1 と同様に HDL 能をもつ ABCA7 の細胞膜上の動きを全反射照明蛍光顕微鏡を用いて解析した結果、ABCA7 は細胞膜上で常にブラウン運動をしており、ABCA1 のような二量体化して細胞膜上で静止するという特異な性質は示さないことが明らかになった。さらに、ABCA1 と ABCA7 のアミノ酸配列の比較から、二量体化に関与すると思われるアミノ酸を同定することに成功した (投稿準備中)。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 2 件)

① Ishigami M, Ogasawara F, Nagao K, Hashimoto H, Kimura Y, Kioka N and Ueda K. Temporary sequestration of cholesterol and phosphatidylcholine within extracellular domains of ABCA1 during nascent HDL generation. **Sci Rep** 8:6170 (2018) 10.1038/s41598-018-24428-6 査読あり

② Tomioka M, Toda Y, Mañucat NB, Akatsu H, Fukumoto M, Kono N, Arai H, Kioka N, Ueda K. Lysophosphatidylcholine export by human ABCA7. **Biochim Biophys Acta** 1862, 658-665 (2017) 10.1016/j.bbalip.2017.03.012 査読あり

③ Liu SL, Sheng R, Jung JH, Wang L, Stec E, O'Connor MJ, Song S, Bikkavilli RK, Winn RA,

Lee D, Baek K, Ueda K, Levitan I, Kim KP, Cho W. Orthogonal lipid sensors identify transbilayer asymmetry of plasma membrane cholesterol. **Nature Chem Biol** 13, 268-274 (2017) 10.1038/nchembio.2268 査読あり

④ Sano O, Tsujita M, Shimizu Y, Kato R, Kobayashi A, Kioka N, Remaley AT, Michikawa M, Ueda K, Matsuo M. ABCG1 and ABCG4 Suppress  $\gamma$ -Secretase Activity and Amyloid  $\beta$  Production. **PLoS One** 11(5):e0155400 (2016) 10.1371/journal.pone.0155400 査読あり

⑤ 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) 10.1194/jlr.M058164 査読あり

⑥ Yamauchi Y, Iwamoto N, Rogers MA, Abe-Dohmae S, Fujimoto T, Chang CC, Ishigami M, Kishimoto T, Kobayashi T, Ueda K, Furukawa K, Chang TY, Yokoyama S. Deficiency in the lipid exporter ABCA1 Impairs retrograde sterol movement and disrupts Sterol Sensing at the endoplasmic reticulum. **J Biol Chem** 290, 23464-23477 (2015) 10.1074/jbc.M115.662668 査読あり

⑦ 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) 10.1194/jlr.M056622 査読あり

⑧ Chiba T, Sakurada T, Watanabe R, Yamaguchi K, Kimura Y, Kioka N, Kawagishi H, Matsuo M, Ueda K. Fomiroid A, a novel compound from the mushroom *Fomitopsis nigra*, inhibits NPC1L1-mediated cholesterol uptake via a mode of action distinct from that of ezetimibe. **PLoS One** 9(12):e116162 (2014) 10.1371/journal.pone.0109886 査読あり

⑨ 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) 10.1371/journal.pone.0109886 査読あり

⑩ Kuo TF, Mao D, Hirata N, Khambu B, Kimura Y, Kawase E, Shimogawa H, Ojika M, Nakatsuji N, Ueda K, Uesugi M. Selective elimination of human pluripotent stem cells by a marine natural product derivative. **J Am Chem Soc** 136, 9798-801 (2014) 10.1021/ja501795c 査読あり

⑪ Kodan A, Yamaguchi T, Nakatsu T, Sakiyama K, Hipolito CJ, 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) 10.1073/pnas.1321562111 査読あり

⑫ Hirata N, Nakagawa M, Fujibayashi Y, Yamauchi K, Murata A, Minami I, Tomioka M, Kondo T, Kuo TF, Endo H, Inoue H, Sato S, Ando S, Kawazoe Y, Aiba K, Nagata K, Kawase E, Chang YT, Suemori H, Eto K, Nakauchi H, Yamanaka S, Nakatsuji N, Ueda K, Uesugi M. A Chemical Probe Selective for Human Pluripotent Stem Cells. **Cell Reports** 6, 1165-1174 (2014) 10.1016/j.celrep.2014.02.006 査読あり

〔学会発表〕 (計 75 件)

① Ueda K. The Mechanism of Multidrug Export by MDR1. NIH Symposium “Celebrating 30 Years of Research on Multidrug Resistance and ABC transporters” Bethesda, USA, 9/22-23, 2016 (招待講演)

② Ueda K. Mechanism of nascent HDL formation by ABCA1 and apoA-I, Conference on the Bioscience of Lipids. Chamonix, France, 9/4-8, 2016 (招待講演)

③ Ueda K. Mechanism of action of ABCA1 and ABCB1. 9th Annual SFB35 Symposium "Transmembrane Transporters in Health and Disease" Vienna, Austria, 8/31-9/2, 2016 (招待講演)

④ 植田和光 第 87 回日本生化学会大会シンポジウム 健康を守るトランスポーター ABC 蛋白質 10/15, 2014 (招待講演)

⑤ Ueda K. Monomer-dimer conversion of ABCA1 during HDL formation. Kyoto-Bordeaux Symposium, Bordeaux, France, 5/5-6, 2014 (招待講演)

⑥ Ueda K. Monomer-dimer conversion of ABCA1 during HDL formation. 5th FEBS special meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases” Innsbruck, Austria, 3/9-14, 2014 (招待講演)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：ABCG2 の薬理シャペロン  
発明者：千場智尋、渡邊理恵、植田和光  
権利者：株式会社ファンケル、国立大学法人京都大学  
種類：特許  
番号：特願 2017-142802  
出願年月日：平成 28 年 7 月 27 日  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：Method for sorting of pluripotent cells  
発明者：Motonari Uesugi, Nao Hirata, Asako Murata, Young-Tae Chang, Norio Nakatsuji, Hirofumi Suemori, Eihachiro Kawase, Kaori Yamauchi, Kazumitsu Ueda, Yuto Fujibayashi, Shinya Yamanaka, Masato Nakagawa  
権利者：Kyoto University  
種類：特許  
番号：W02013103156  
取得年月日：2013 年 7 月 11 日  
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 和光 (UEDA KAZUMITSU)

京都大学大学院・農学研究科・教授

研究者番号：10151789

(2) 研究分担者

赤津 裕康 (AKATSU HIROYASU)

医療法人さわらび会福祉村病院・長寿医学研究所・副所長

研究者番号：00399734

戸田 好信 (TODA YOSHINOBU)

天理医療大学・医療学部・教授

研究者番号：10444465

長尾 耕治郎 (NAGAO KOHJIRO)

京都大学大学院・工学研究科・助教

研究者番号：40587325

田中 亜路 (TANAKA AROWU)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号：60509040

(3) 連携研究者

加藤 博章 (KATO HIROAKI)

京都大学大学院・薬学研究科・教授

研究者番号：90204487

上杉 志成 (UESUGI MOTONARI)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号：10402926

楠見 明弘 (KUSUMI AKIHIRO)

京都大学・沖縄科学技術大学院大学・教授

研究者番号：50169992