

平成 30 年 9 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07390

研究課題名(和文) 高密度リポタンパク質(HDL)形成を担うABCタンパク質の生化学研究

研究課題名(英文) Biochemical analysis of the generation of high density lipoprotein(HDL) by ABC proteins

研究代表者

木村 泰久(Kimura, Yasuhisa)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：10415143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高密度リポタンパク質(HDL)は末梢細胞から肝臓へとコレステロールを輸送する唯一の経路であり、その血中量や産生能力が動脈硬化症の発症と負に相関することから、善玉コレステロールとしても広く認知されている。本研究ではHDLを形成するATP依存的な脂質輸送体ABCA1について生化学的な解析を実施し、ABCA1とapoA-Iの相互作用解析を行った。また、ABCA1が細胞外領域に蓄積した脂質を用いてHDL形成を行うことを明らかにした。さらに脂質を輸送するABCタンパク質の精製を行い、輸送基質特異性の検討を実施した。

研究成果の概要(英文)：High density lipoprotein (HDL) is the sole pathway to remove the excess cholesterol from peripheral tissues. The amounts/production of HDL reversely correlated to atherosclerosis, HDL is also known as "good cholesterol". In this study, we performed biochemical analysis of ATP-dependent lipid transporter, ABCA1. We performed the biochemical analysis for ABCA1 and apoA-I interaction. We also demonstrated that ABCA1 temporarily sequesters phospholipids and cholesterol in large extracellular domain and generates HDL by using these lipid. We also purified several lipid transporting ABC transporters and analyzed their substrate specificity.

研究分野：生化学

キーワード：ABCタンパク質 HDL コレステロール 脂質輸送 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

脂質は生体にとって重要な物質であり、その恒常性は厳密に制御されている。脂質恒常性の破綻は、重篤な疾患に直結し、近代日本においてもコレステロールの過剰摂取に起因する動脈硬化症が大きな社会問題として顕在化している。

高密度リポタンパク質(HDL)は、その血中量や産生活性が動脈硬化症発症と負に相関することから、善玉コレステロールとして広く認知されている。体内のコレステロールは低密度リポタンパク質(LDL:いわゆる悪玉コレステロール)として肝臓から末梢組織に供給され、末梢で過剰となったコレステロールはHDLとなって肝臓へと戻される。HDLは末梢からコレステロールを除去する唯一の機構であり、HDLの形成不全は動脈硬化症の発症を引き起こす。HDLは細胞膜上の脂質輸送体(ABCA1)によって膜中のコレステロールやリン脂質が脂質受容体であるapoA-Iに輸送されることによって形成が開始される。ABCA1はATP依存的な輸送体であるABCタンパク質群に属し、ATP依存的な輸送を行う。ABCA1を発現させた細胞からATP依存的にHDLが形成されることは既に明らかにされていたが、ABCA1が直接apoA-Iに脂質を輸送するのか、どのような機構で脂質を輸送するか等、機能の根幹を成す機構については明らかにされていなかった。ABCA1によって形成されたHDL前駆体は、同じくABCタンパク質群に属するABCG1によってさらにコレステロールとリン脂質を受け渡され、成熟化過程を経て、HDLとなるが、ABCG1による輸送機構もほとんど分かっていなかった。

我々の体にはABCA1、ABCG1以外にも様々な脂質輸送体が存在し、重要な生理機能を担っている。ABCG1と相同性の高いABCG4は神経細胞に発現し、脳内のコレステロール恒常性を維持すると予想されており、アルツハイマー病発症との関連も示唆されている。また、ABCB4は胆管細胞に発現し、胆汁中にホスファチジルコリンを輸送する事で、肝細胞から分泌された胆汁酸によって肝細胞自身が障害を受けるのを防ぐ役割を持つ。ABCB4は薬物輸送体ABCB1と高い相同性を持つが、その機能分化メカニズムも全く分かっていない。

ラフトなどに代表されるように、細胞膜上には細胞増殖など一連のシグナル経路の基点となる特殊なドメインが存在することが近年、明らかとなりつつある。こうした膜ドメインの形成や維持にもABCタンパク質の関与が予想される。細胞は接着斑を介して細胞外マトリックスと結合するが、接着斑周辺の脂質動態やタンパク質動態はいまだ未解明であり、脂質動態などの膜近傍イベントの生化学的解析が進展すれば、細胞機能制御機構の解明の糸口となると期待される。

2. 研究の目的

本研究はHDL形成反応を生化学的に理解することを目的とした。また、脂質恒常性に関与するABCタンパク質の機能を生化学的に明らかにすることや細胞シグナリングに関連する膜近傍でのイベントを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

・ヒトABCタンパク質の大量発現・精製：ヒトABCタンパク質の生化学的解析には高純度の精製標品を大量に取得する方法が必要である。本研究では研究代表者が独自に開発したヒト培養細胞を用いた大量発現、精製手法を用いてタンパク質の生産を行った。浮遊培養に適化されたヒト培養細胞株(FreeStyle 293)を用い、遺伝子を一過的に導入することでタンパク質を発現させた。発現細胞を界面活性剤で可溶化し、抗体を用いたアフィニティー精製により、精製標品を得た。精製純度はタンパク質ごとに異なるが、おおむね80%以上の精製純度を達成可能であった。

・ヒトABCタンパク質のATP加水分解活性測定：ABCタンパク質はATP加水分解依存的に基質を輸送する。またABCタンパク質のATP加水分解活性は輸送基質によって促進されることも多数報告されている。このためABCタンパク質による輸送活性はATP加水分解活性を測定することで評価できる。本研究では研究代表者が開発した高感度のATP加水分解活性測定法(Kimura et al. Anal Biochem. 2004)を用いて精製標品の活性測定を行った。

・HDL形成活性測定：ABCタンパク質を発現させた培養細胞にapoA-Iを添加し、apoA-I依存的に排出されるコレステロールおよびリン脂質を定量し、HDL産生活性を評価した。

4. 研究成果

ヒト培養細胞を用いたヒト膜タンパク質の大量発現、精製系の改良：本研究期間内では申請者が以前に開発を行ったヒト膜タンパク質発現手法について、汎用的に使用できるよう改良を行った。本手法については学会発表を通じて公開し、希望する研究者にはより詳細な情報およびノウハウの提供を行っている。

ABCA1とapoA-Iの相互作用部位および相互作用機構の解析：本研究ではまず表面プラズモン共鳴法(Biacore)を用いて、精製ABCA1とapoA-Iの相互作用様式の検討を行った。しかし、センサーチップ表面とapoA-Iが非特異的に結合する問題が生じ、結合パラメーターなど、有用な情報を得ることが困難であった。そこで、細胞膜表面上でapoA-IとABCA1を相互作用させ、apoA-Iと相互作用したABCA1を特異的に標識する技術の開発

を行った。この方法により ABCA1 上で apoA-I が相互作用する領域を絞り込むことが出来た。現在、論文を執筆中であり、詳細を記述することは出来ないが、近日中に発表を行いたい。

ABCA1 による脂質排出メカニズムの解析：ABCA1 は血中の apoA-I に脂質を直接受け渡すと考えられるがその詳細は不明である。ABCA1 は約 900 アミノ酸からなる巨大な細胞外領域を持ち、ATP 加水分解依存的に細胞外領域の構造を大きく変化させることが我々の先行研究により明らかとなっていた。細胞外領域に脂質が蓄積されることで、構造変化が誘発されたと考え、これを立証する研究を開始した。本研究では ABCA1 発現細胞をプロテアーゼで処理し、脂質を抱合した細胞外領域を単離することを目的とした。ABCA1 発現細胞をトリプシンで処理すると、トリプシンの量および反応時間依存的にコレステロールとリン脂質が培地中に放出された。一方、ABCA1 の ATP 加水分解活性を欠損させた変異体では、脂質の排出は確認できなかった。また、ABCA1 と同様にコレステロールとリン脂質を輸送するが、細胞外領域を持たない ABCG1 ではこのような現象は確認されなかった。以上のことから、ABCA1 の細胞外領域には、ATP 加水分解依存的にコレステロールとリン脂質が蓄積されることが明らかとなった。続いて精製 ABCA1 を基準として細胞膜上の ABCA1 の分子数を推定し、トリプシンによって放出される脂質との化学量論を求めた。その結果、1 分子の ABCA1 には数百分子のコレステロールとリン脂質が蓄積されることが明らかとなった。HDL は 2 分子の apoA-I と 200 分子程度の脂質から形成されるが、ABCA1 の細胞外領域には HDL 形成に十分量の脂質が蓄積されていることが明らかとなった。ABCA1 は十分に脂質を蓄積した状態で apoA-I に脂質を受け渡し、HDL を形成すると考えられる。脂質輸送体および類縁タンパク質の精製、機能解析：本研究では ABCB4(ホスファチジルコリン輸送体)、ABCG4(コレステロール輸送体)、ABCB6(ポルフィリン輸送体)など複数のタンパク質について発現、精製し、機能解析を実施した。また、ABCB4 と相同性の高い薬物輸送体(ABCB1)と比較解析を実施した。それぞれの項目について、詳細は以下のとおりである。ABCG4 は脳に多く局在するコレステロールの輸送体である。ABCG4 の研究では世界で始めて精製を達成し、基質特異性の解析を行った。その結果、ABCG4 がコレステロール認識モチーフを介して選択的にコレステロールを輸送する可能性を示唆する結果を得た。ABCB6 はミトコンドリアに局在し、生体のポルフィリン恒常性に関わると予想されている。本研究では ABCB6 を高純度で精製し、輸送基質特異性の解析を行った。その結果、ABCB6 はポルフィリン環の周辺部に存在する極性基を認識して輸送す

ることを示唆する結果を得た。ABCB4 は胆管に局在し、胆汁中へホスファチジルコリンを輸送することで胆汁酸の界面活性作用から胆管細胞を保護する。ABCB4 は多剤輸送体 ABCB1 と高い相同性を有するが、どの様にしてこれら 2 種のタンパク質が機能分化を達成しているかは不明であった。研究代表者は ABCB1 の解析を通じて、ABCB1 の膜貫通領域の一部が柔軟に動く可能性を示唆する結果を得た(Kodan et al. PNAS. 2014)。本研究では ABCB4 について同様の機構が存在するかを検討した。その結果、ABCB4 も膜の一部を柔軟に動かし、ゲートを形成することで輸送基質を取り込んでいることを示唆する結果を得た。本研究で得られた結果は ABCB1 と ABCB4 がどの様にして機能分化を達成してきたかをタンパク質進化の観点から理解する上で重要な情報となると考えている。

細胞膜裏打ちタンパク質の機能解析：研究代表者は脂質輸送体の生化学解析を通じて、膜タンパク質の発現・精製手法を開発・改良してきた。本研究ではこれらの知識を生かし、細胞膜裏打ちタンパク質の機能解析にも参画した。その結果、細胞外基質の硬さ依存的に細胞の分化や機能を調節する機構において vinculin の役割を生化学的に解析することに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

・ Masato Ishigami, Fumihiko Ogasawara, Kohjiro Nagao, Hidehiko Hashimoto, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kioka, Kazumitsu Ueda “Temporary sequestration of cholesterol and phosphatidylcholine within extracellular domains of ABCA1 during nascent HDL generation.” *Scientific Reports* inpress

・ Tomohiro Omachi, Takafumi Ichikawa, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda, and Noriyuki Kioka. “Vinculin Association with Actin Cytoskeleton is Necessary for Stiffness-dependent Regulation of Vinculin Behavior.” *PLoS One* 12, e0175324, 2017

・ Mito Kuroda, Hiroki Wada, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda Noriyuki Kioka. “Vinculin promotes nuclear localization of TAZ to inhibit ECM stiffness-dependent differentiation into adipocytes.” *Journal of Cell Science* 130, 989-1002, 2017

[学会発表](計 19 件)

・ 小川峻、末永健人、木岡紀幸、木村泰久、植田和光 「ヒト ABCB4 の基質取り込み経路の検討」 日本農芸化学会 関西・中四国・西日本支部 2017 年度 合同大阪大会 2017 年・大阪

・三好里奈、小笠原史彦、石神正登、永田紅、木村泰久、木岡紀幸、植田和光 「定量的アプローチによる ABCA1 と apoA-I による脂質排出メカニズムの解明」 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年・神戸

・西澤奈美、木村泰久、大貫元、木岡紀幸、植田和光 「ポルフィリンのカルボキシル基はヒト ABCB6 によるポルフィリン認識に重要である」 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年・神戸

・小川峻、末永健人、木岡紀幸、木村泰久、植田和光 「ヒト ABCB4 の第 4 膜貫通ヘリックスの機能解析」 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年・神戸

・Shun Ogawa, Kento Suenaga, Noriyuki Kioka, Yasuhisa Kimura, Kazumitsu Ueda “Functional analysis of transmembrane helix 4 of human ABCB4” 7th FEBS special meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases” 2018 Austria Innsbruck

・Yasuhisa Kimura, Shuichi Inoue, Noriyuki Kioka, Kazumitsu Ueda “Substrate entry mechanism of human MDR1” 7th FEBS special meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases” 2018 Austria Innsbruck

・小川峻、末永健人、木岡紀幸、木村泰久、植田和光 「リン脂質輸送体 ABCB4 の 基質取り込みゲートの解析」 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年・愛知

・藤本和希、木村泰久、安部真人、三芳秀人、植田和光 「光反応性ホスファチジルコリンを用いた脂質抱合型 apoA-I の標識手法の確立」 日本農芸化学会 2018 年度大会 2018 年・愛知

・木村泰久 「ヒト培養細胞を用いた哺乳類膜タンパク質複合体の発現・精製」 第 16 回日本蛋白質科学会年会(招待講演)2016 年・福岡

・木村泰久 「ヌクレオチド依存的な KATP チャンネル複合体の構造変化」 第 1 回 イオンチャンネル研究会(招待講演)2016 年・福岡

・見月俊吾、木村泰久、木岡紀幸、松尾道憲、植田和光 「コレステロール認識配列 CRAC は、ヒト ABCG4 のコレステロール輸送において重要である」 2017 年度日本農芸化学会大会 2017 年・京都

・西澤奈美、大貫元、木村泰久、木岡紀幸、植田和光 「ヒト ABCB6 によるポルフィリン認識機構の解析」 2017 年度日本農芸化学会大会 2017 年・京都

・Yilun WANG, Shuichi INOUE, Noriyuki KIOKA, Yasuhisa KIMURA, Kazumitsu UEDA “Analysis of thermostabilizing mechanism of multidrug transporter” 2017 年度日本農芸化学会大会 2017 年・京都

・川野邊峻哲、木村泰久、木岡紀幸、植田和光 “Reconstitution of human ABCA1 in nanodisc for the functional analysis” 6th FEBS special meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases” 2016 Austria Innsbruck

・見月俊吾、木村泰久、木岡紀幸、松尾道憲、植田和光 “Functional analysis of the CRAC domain in TM6 of human ABCG4.” 6th FEBS special meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases” 2016 Austria Innsbruck

・西澤奈美、大貫元、木村泰久、木岡紀幸、植田和光 “Analysis of functional role of TMD0 of human ABCB6” 6th FEBS special meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases” 2016 Austria Innsbruck

・木村泰久、菅野亮、松尾道憲、加藤博章、光岡薫、植田和光 “Nucleotide induces conformational change in the channel subunit of K_{ATP} channel” 6th FEBS special meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases” 2016 Austria Innsbruck

・見月俊吾、木村泰久、木岡紀幸、松尾道憲、植田和光 「ヒト ABCG4 に存在するコレステロール認識配列の機能解析」 2016 年(平成 28 年度)日本農芸化学会大会 2016 年・札幌

木村泰久、菅野亮、松尾道憲、加藤博章、光岡薫、植田和光 「ヌクレオチド依存的な ATP 感受性カリウムチャンネルの構造変化」 2016 年(平成 28 年度)日本農芸化学会大会 2016 年・札幌

・山原一晃、木村泰久、柴田幹大、内橋貴之、安藤敏夫、木岡紀幸、植田和光 「原子間力顕微鏡(AFM)観察に向けた ABC タンパク質サンプルの最適化」 2016 年(平成 28 年度)日本農芸化学会大会 2016 年・札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔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

木村泰久 (Kimura Yasuhisa)

京都大学大学院農学研究科 助教

研究者番号：10415143

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

該当無し