

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18681

研究課題名(和文)HDL産生におけるABCA1ダイマー化機構の1分子イメージングによる解明

研究課題名(英文)Single-molecule analysis of ABCA1 dimerization mechanism during HDL production

研究代表者

永田 紅 (NAGATA, Koh)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特別研究員(RPD)

研究者番号：70401213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：善玉コレステロールとして知られるHDLの産生機構を明らかにすることは、動脈硬化症の予防・治療にとって重要である。本研究では、TIRF顕微鏡を用いた1分子イメージングによって、HDL産生に必須の膜タンパク質ABCA1の挙動を観察し、ABCA1の細胞膜上でのダイマー化にはC末端のロイシンジッパー様モチーフが関与することを明らかにした。このモチーフを欠く変異体の産生するHDLは、野生型のそれと異なる特性を示した。また、ABCA1によるコレステロール排出を阻害する薬剤PSC833存在下では、ABCA1がダイマー化しにくいこと、ABCA1と相同性の高いABCA7は主にモノマーであることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To prevent and treat atherosclerosis, it is important to elucidate the mechanism underlying the production of HDL, also known as good cholesterol. In the present study, we observed ABCA1, a membrane protein which is essential for HDL production, by TIRF microscope. We found that C-terminal leucine zipper-like motif of ABCA1 is involved in its dimerization on the plasma membrane. HDL particles produced by a mutant ABCA1 lacking this motif showed different profiles compared with those by wild type ABCA1. We also clarified that ABCA1 is less likely to dimerize in the presence of PSC833, a drug which inhibits cholesterol efflux by ABCA1. In addition, ABCA7, which is highly homologous to ABCA1, was found to exist mainly as monomers. Recently, it is widely accepted that HDL quality is as important as its quantity to prevent atherosclerosis. Our results suggest that ABCA1 dimerization contributes to controlling HDL quality.

研究分野：細胞生物学、生化学

キーワード：HDL 善玉コレステロール ABCタンパク質 ABCA1 1分子イメージング ダイマー

1. 研究開始当初の背景

(1) ABCA1 による HDL 産生

コレステロールは細胞膜の主要な構成成分として、またホルモンの前駆体として生体にとって重要な成分であり、その細胞内濃度は精密に制御されている。末梢細胞内で過剰となったコレステロールは、善玉コレステロールとして知られる HDL (high-density lipoprotein) の形で肝臓へ戻される。このコレステロール逆転送系は末梢細胞からコレステロールを引き抜く唯一の経路であり(図1) HDL 形成不全は動脈硬化症などの血管疾患を引き起こすリスクを高める。現代日本人の死因の約 25% は心疾患や脳血管疾患をあわせた血管疾患であり(平成 25 年厚生労働省人口動態統計より) HDL 産生機構を解明することは、重要な課題である。

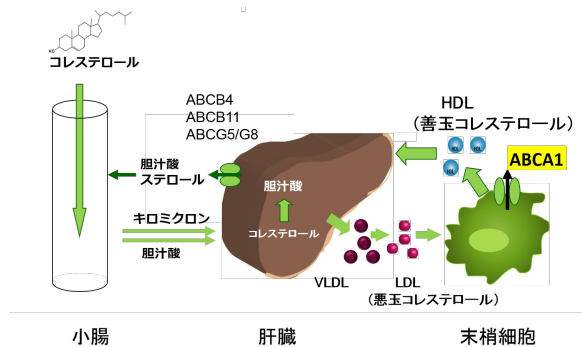


図 1 体内のコレステロール循環と ABCA1 による HDL 産生

末梢細胞から過剰なコレステロールを運び出し、新生 HDL 形成の初発段階を担うのが、ABCA1 (ATP-binding cassette protein A1) である(図 1)。ABCA1 は ATP 加水分解依存的に、細胞内の過剰コレステロールやリン脂質を細胞外へ輸送して、脂質受容体である apoA-I (apolipoprotein A-I) へと受け渡し、脂質と apoA-I からなる新生 HDL を産生するが、そのメカニズムには不明な点が多い。

(2) ABCA1 のダイマー化

従来、HDL 産生を評価するには、血中(培地中)の HDL を酵素化学的に測定するか、超遠心機や HPLC で分離する系が用いられてきたが、HDL 産生時の ABCA1 の挙動を 1 分子レベルでリアルタイムで可視化した例はなかった。我々は、全反射照明蛍光(TIRF)顕微鏡を用いた 1 分子イメージング解析法を初めて ABCA1 に適用し、ABCA1 は細胞膜上でダイマーを形成して細胞膜上で静止すること、コレステロール排出能のない非機能性 ABCA1 変異体はモノマーで細胞膜上を拡散すること、apoA-I の添加により ABCA1 のダイマーが減り、拡散性のモノマーが増加すること、を見出している。

以上の結果より、ABCA1 は細胞膜中の脂質を動かして自身の分子内に蓄積すると

ダイマー化し、apoA-I に脂質を受け渡すとモノマーに解離して再び脂質を集めるといったサイクルがあることが示唆された(図 2)(引用文献)。しかしながら、ABCA1 のダイマー化機構やその生理的意義についての知見は得られていなかった。

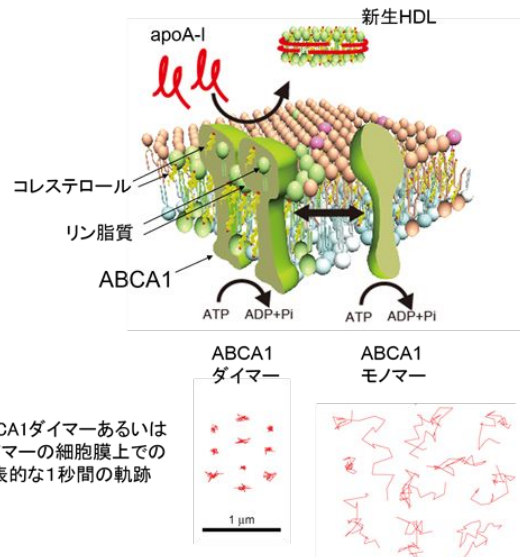


図 2 ABCA1 は細胞膜上でダイマー化して静止し、apoA-I 添加によってモノマーへと解離して拡散する

2. 研究の目的

本研究では、HDL 産生における ABCA1 のダイマー化機構および ABCA1 がダイマー化することの生理的意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

野生型 ABCA1-mEGFP あるいは各種変異型 ABCA1、ABCA7-mEGFP を HeLa 細胞に一過的に発現させ、全反射照明蛍光(TIRF)顕微鏡を用いて 1 分子レベルでタンパク質の動態を観察した(図 3)。EGFP はダイマー化する性質を有するため、本研究ではダイマー化しない mEGFP (monomeric EGFP) を用いた。ビデオレート 30 frames/sec で撮影した映像を処理し、各タンパク質粒子(輝点)の軌跡を追跡して拡散係数を算出した。拡散係数の分布を解析して粒子の運動性(mobile; $\square 0.032 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ 、immobile; $< 0.032 \mu\text{m}^2/\text{sec}$)を明らかにした。

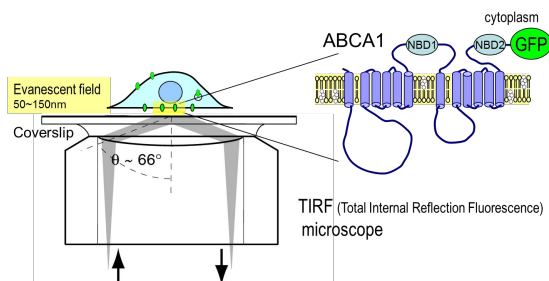


図 3 TIRF 顕微鏡による ABCA1 の 1 分子イメージング

各粒子のダイマー化状態の解析は、mEGFP 蛍光の段階退色を指標に行った (図 4)。

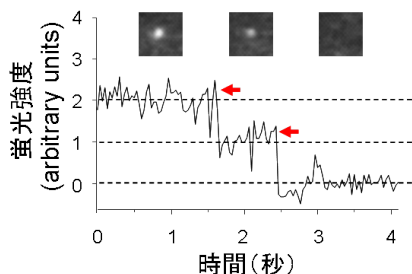


図4 ABCA1-mEGFP ダイマーの段階退色
レーザー照射に伴って蛍光強度が二段階で消失している (矢印部分) ことから、この粒子はダイマーであることが示唆される。写真はそれぞれの時間における粒子の様子。

また、ABCA1、各種変異型 ABCA1 や ABCA7 を過剰発現させた BHK 細胞の培養培地に apoA-I を添加し、新生 HDL の含まれる培地を回収して、蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー (FSEC) や電子顕微鏡によって産生 HDL を評価した。

4. 研究成果

(1) ABCA1 の C 末端ロイシンジッパー様モチーフの解析

ABCA1 は C 末端にロイシンジッパー様モチーフを有している。このモチーフが ABCA1 のダイマー化に関わる可能性を検討するため、モチーフを構成する 3 つのロイシンをアラニンに置換した変異体 (ABCA1-3LA) を作成した。ABCA1-3LA はコレステロール排出活性を保持したが、TIRF 顕微鏡を用いた 1 分子イメージングによって、ABCA1-3LA 分子の拡散性は野生型よりも高いことがわかった。また段階退色解析の結果、ABCA1-3LA はダイマーしにくい変異体であり、ABCA1 の C 末端のロイシンジッパー様モチーフが ABCA1 のダイマー化に関与することが明らかになった。

我々はすでに、ATP 加水分解活性をもたずコレステロール排出能のない非機能性 ABCA1 変異体 (ABCA1-MM) が、ダイマー化せずにモノマーで細胞膜上を拡散することを示しており、ABCA1 のダイマー化には、ABCA1 の正常な機能および C 末端のロイシンジッパー様モチーフなど、複数の因子が関与していることが示唆された。

産生 HDL を評価するため、野生型および変異型 ABCA1 を発現させた BHK 細胞の培養培地に apoA-I を添加し、回収した培地中の HDL 粒子の大きさを蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー (FSEC) によって分離解析した。その結果、野生型 ABCA1 では粒径約 14nm と 11 nm の大小 2 種類の HDL を示

すピークが得られたが、ABCA1-3LA では大きな HDL が減少し、主に小さな HDL を産生することが明らかになった。

また、大小 2 種類の HDL を示すピーク部分を分取し、HDL 粒子を電子顕微鏡観察したところ、それぞれ約 14 nm、10 nm の直径をもつ均一な円盤状の粒子集団であることがわかった。

(2) コレステロール排出阻害剤 PSC833 の影響の検討

免疫抑制剤シクロスポリン A の誘導体である PSC833 は癌の多剤耐性克服薬として開発されたものであり、ABC タンパク質のひとつである MDR1 (ABCB1) の薬剤排出活性を抑える。現在までに、PSC833 が ABCA1 によるコレステロール排出活性も抑えることが示されているが (引用文献) PSC833 が ABCA1 にどのような作用を及ぼしているか、その機序は明らかではなかった。

PSC833 が ABCA1 の分子挙動に与える影響を検討するため、PSC833 存在下で ABCA1 の 1 分子イメージングを行ったところ、ABCA1 の拡散性が上昇し、不動性 (immobile) 画分が 69% から 29% へと減少し、拡散係数の中央値が $0.0034 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ から $0.062 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ へと上昇した (図 5)。このことから、PSC833 存在下では、ABCA1 ダイマーが減少していることが示唆された。

(3) ABCA7 との比較解析

ABCA1 と 69% の相同性をもつ ABCA7 は ABCA1 同様に HDL 産生に寄与するが、ABCA7 の産生する HDL 粒子内のコレステロール含有率は ABCA1 のそれに比べて低いなど、産生 HDL の特性が異なる。

ABCA7 の 1 分子イメージングを行ったところ、ABCA7 分子の拡散性は ABCA1 に比べて高かった (図 5)。また段階退色の結果、ABCA7 はダイマー化しないことが明らかとなり、ABCA7 はモノマー状態で細胞膜上を拡散することが分かった。

産生 HDL を FSEC によって解析した結果、ABCA7 は ABCA1 と異なり、大きな HDL を産生せずに主に小さな HDL を産生した。

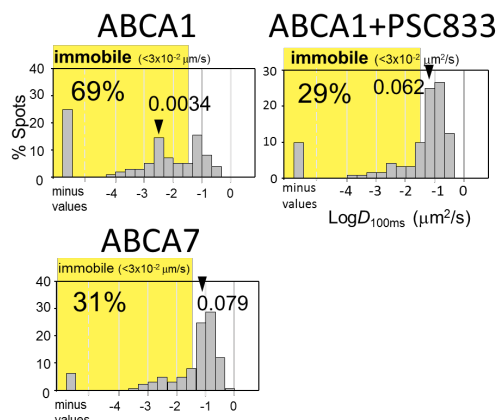


図5 ABCA1 と ABCA7 粒子の拡散係数分布

以前は、血中 HDL の量を増やすことで抗動脈硬化作用が期待できると考えられたこともあったが、近年は“量”とともに、粒子サイズ、形、密度、脂質組成など“質”が重要であるとの認識が広がっている。本研究によって、ABCA1 のダイマー化は HDL の質を制御し、抗動脈硬化作用を発揮するのに有利な HDL の形成に寄与する可能性が示唆された。今後は、ABCA1 ダイマーが「静止すること」の生理的意義を明らかにすることで、HDL 産生のみならずより普遍的な細胞機能における ABCA1 の役割を見出すことを目指している。

<引用文献>

Koh O. Nagata, Chieko Nakada, Rinshi S. Kasai, Akihiro Kusumi, Kazumitsu Ueda “ABCA1 dimer-monomer interconversion during HDL generation revealed by single-molecule imaging” *Proc. Natl. Acad. Sci. US A*, Vol. 110, pp. 5034-5039 (2013)

Kohjiro Nagao, Minami Maeda, Noralyn B. Mañucat, Kazumitsu Ueda “Cyclosporine A and PSC833 inhibit ABCA1 function via direct binding” *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1831, pp. 398-406 (2013)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

永田 紅 「ABCA1 による HDL 産生機構 ~ 1 分子イメージングによる解析」(総説) 『膜』、日本膜学会、査読有、Vol. 41、pp. 221-225 (2016)

[学会発表](計 10 件)

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、
「ABCA1 と apoA-I によるコレステロール排出メカニズム解明への新しい定量的アプローチ」日本農芸化学会 2017 年度大会、口頭発表、2017 年 3 月 17-20 日、京都女子大学(京都市東山区)

Koh Nagata “How to manage your good

cholesterol” Kyoto-ASEAN Forum 2016, 口頭発表、2016.9.8-9, Kuala Lumpur (Malaysia)

永田 紅、石神正登、笠井倫志、中田千枝子、吉村安寿弥、John Heuser、楠見明弘、植田和光「ABCA1 による HDL 産生機構 ~ 1 分子イメージングによる解析」日本膜学会第 38 年会、口頭発表、2016 年 5 月 10-11 日、早稲田大学(東京都新宿区)

永田 紅、石神正登、笠井倫志、吉村安寿弥、永岩耕太、John Heuser、楠見明弘、植田和光「HDL 産生を担う ABCA1 の 1 分子解析」日本農芸化学会 2016 年度大会、ポスター発表、2016 年 3 月 27-30 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

岡本雄介、永田 紅、笠井倫志、楠見明弘、木村泰久、木岡紀幸、植田和光「HDL 産生の鍵を握る ABCA1 の C 末端領域の機能解析」日本農芸化学会 2016 年度大会、ポスター発表、2016 年 3 月 27-30 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Yusuke Okamoto, Koh Nagata, Rinshi Kasai, Akihiro Kusumi, Yasuhisa Kimura, Noriyuki Kioka, Kazumitsu Ueda, “The C-terminal domain of ABCA1 is important for lipid efflux and immobilization on the plasma membrane.” 6th FEBS special meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases” 2016.3.5-11, Innsbruck (Austria)

永田 紅「コレステロールは憎まれ役？」第 5 回 WPI 合同シンポジウム、口頭発表、2015 年 12 月 26 日、京都大学(京都市左京区)

岡本雄介、永田 紅、笠井倫志、楠見明

弘、植田和光「HDL (善玉コレステロール) 産生における ABCA1 の C 末端領域の機能解析」日本農芸化学会中部・関西支部合同大会、口頭発表、2015 年 9 月 19-20 日、富山県立大学 (富山県射水市)
石神正登、永田 紅、永岩耕太、笠井倫志、楠見明弘、長尾耕治郎、斎藤博幸、木村泰久、木岡紀幸、植田和光「HDL 産生過程で ABCA1 が二量体化することの生理的意味の解明」第 57 回日本脂質生化学会、口頭発表、2015 年 5 月 28-29 日、一橋大学 (東京都千代田区)
永田 紅、中田千枝子、笠井倫志、石神正登、楠見明弘、植田和光「1 分子イメージングによる HDL 産生機構の解析」日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 26-29 日、岡山大学 (岡山市北区)

〔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

永田 紅 (NAGATA, Koh)

京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点 (iCeMS)・特定拠点助教

研究者番号： 7 0 4 0 1 2 1 3