

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 5 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度

課題番号：21688007

研究課題名（和文） ABCG タンパク質による脂質排出の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular basis of cholesterol efflux by ABCG1

研究代表者

松尾 道憲 (MATSUO MICHINORI)

京都大学大学院農学研究科・助教

研究者番号：00335308

研究成果の概要（和文）：脂質を輸送するトランスポーターである ABCG1 と ABCG4 が、アルツハイマー病と関連するアミロイド β の分泌を抑制すること、ABCG1 が中枢神経細胞の軸索伸長を促進することを明らかにした。精製タンパク質の解析から、ABCG1 がコレステロールとコリンリン脂質を輸送すること、ABCG4 がコレステロールを輸送することを示唆した。ABCG1 と ABCG4 が細胞膜上の異なる領域に局在し、ABCG1 と ABCG4 がその領域の構造を変化させることが脂質排出に重要であることを示した。

研究成果の概要（英文）：It was demonstrated that ABCG1 and ABCG4, a lipid transporter, suppress amyloid β secretion and that ABCG1 stimulates axonal extension of central nervous neurons. Analysis of purified proteins suggested that ABCG1 transports cholesterol and choline phospholipid, while ABCG4 transports cholesterol. It was also demonstrated that ABCG1 and ABCG4 distribute to distinct domains on the plasma membrane and transport lipid by modulating the domain structures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,500,000	1,950,000	8,450,000
2010 年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
総計	19,700,000	5,910,000	25,610,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：ABC タンパク質・脂質・コレステロール・動脈硬化・アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第一位は癌であり、第二、三位が心疾患、脳血管疾患の「動脈硬化性疾患」である。高脂血症は動脈硬化の危険因子となるため、脂質恒常性維持機構の解明は社会的に強く要請されている。体内の過剰な脂質の排出に、多くの ABC タンパク質が関与することが最近分かってきた。ABCG タンパク質はハーフサイズの ABC タンパク質であり、

ホモ二量体またはヘテロ二量体で機能する。ヒトには 5 種類(ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5, ABCG8)存在し、ABCG1, ABCG4, ABCG5, ABCG8 が脂質を輸送すると考えられている。例えば、マクロファージの ABCG1 ホモ二量体は余剰のコレステロールを排出して高密度リポタンパク質(HDL)形成に関与する。ABCG1 のノックアウトマウスは高脂肪食で肝臓や肺などに脂質を蓄積する。

ABCG5/ABCG8 ヘテロ二量体は、小腸での植物性ステロール（シトステロール）の吸収抑制や胆管へのコレステロール排出に関与する。*ABCG5* 又は *ABCG8* 遺伝子の変異は遺伝性のシトステロール血症を引き起こす。従って、ABCG タンパク質の機能不全は脂質恒常性の破綻（メタボリックシンドローム）につながることから注目を集めている。脳内のコレステロール循環にも、*ABCG1* と *ABCG4* が関与することが予想されている。コレステロール量とアミロイドβ蓄積が関係する事、*ABCG1* の発現がアミロイドβの分泌量を減少させる事から、脳内での脂質恒常性の破綻とアルツハイマー病の関連についても興味を持たれている。

これまでに、末梢細胞の細胞膜に局在する *ABCG1* が HDL にコレステロールとスフィンゴミエリンを排出し、余剰脂質の排出に働くことを示してきた (*J. Lipid Res.*, 47, 1791, 2006)。また、*ABCG5* と *ABCG8* が小腸モデル細胞の頂端膜側に発現し、胆汁酸ミセルへのコレステロールと植物ステロール排出に働くことを示した (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 1886, 2007)。最近、*ABCG1* がスフィンゴミエリンとコレステロールに富んだ細胞膜脂質ラフトと呼ばれる相分離した膜ドメインに局在し、ラフト構造が脂質排出活性に影響することを見出し (*J. Lipid Res.*, 48, 2377, 2007)、*ABCG1* が膜脂質を再編成し、ラフト構造を変化させることで、脂質アクセプター分子が余剰脂質を細胞膜から引き抜くモデルを提唱している (*Membrane*, 32, 240, 2007)。

2. 研究の目的

細胞の余剰脂質を排出する ABCG タンパク質の輸送機構は、直接細胞外へ排出するのか、それとも膜環境を変化させることで脂質がアクセプター分子によって引き抜かれるかも含め、分かっていない。脂質恒常性維持機構の解明には、脂質排出の詳細な分子機構を理解する必要がある。そこで、これまでの研究を進展させ、ABCG タンパク質による脂質排出の分子基盤を明らかにすることで、生体の脂質恒常性維持機構を解明することを本研究課題の目的とする。

3. 研究の方法

ABCG タンパク質による脂質排出の分子基盤を解明するため、主に2つのアプローチをとる。一つは、ABCG タンパク質を精製し、人工脂質膜に再構成し、分子レベルで詳細に解析する。これにより、ATP加水分解と脂質排出のカップリングを含め、分子機械としての ABCG タンパク質の特性を明らかにする。もう一つは、細胞レベルで ABCG タンパク質の脂質排出活性を解析する。これにより、他

のタンパク質や細胞膜脂質による制御も含めた ABCG タンパク質の特性を明らかにする。

(1) 中枢神経系での脂質排出とアミロイドβの分泌の解析

体内の脂質循環とは独立して、脳内では独自の脂質恒常性維持機構が存在する。また、アルツハイマー病に関与するアミロイドβの細胞外への分泌は、細胞のコレステロール含量やラフト構造と関係すると報告されている。さらに、*ABCG1* の過剰発現によりアミロイドβの分泌が変化することが報告されている。そこで、脳内で発現している *ABCG1*、*ABCG4* の役割を調べるため、神経細胞、アストロサイト由来培養細胞の内在性 *ABCG1* と *ABCG4* を誘導又は変異アミロイド前駆タンパク質を安定発現する培養細胞に *ABCG1*、*ABCG4* を導入し、発現量とアミロイドβ分泌への影響を検討する。この研究は、中枢神経系のコレステロール代謝研究の世界的権威であるカナダの Jean Vance 教授との共同研究として行う。

(2) *ABCG1* の ATP 加水分解測定による基質の同定

ABCG1 を動物培養細胞または酵母で大量発現し、可溶化条件（界面活性剤の種類と濃度）を検討する。可溶化したタンパク質をタグを利用して精製する。精製標品の安定化条件を検討し、ホスファチジルコリンやその他のリン脂質、コレステロールを添加したリポソームに希釈法などによって再構成する。精製方法、再構成法を確立した *ABCG1* を大量精製し、様々な組成の脂質リポソームに再構成する。*ABC* タンパク質の ATP 加水分解活性は基質により促進されることが知られ、それによって *ABCA1* の基質がコレステロールとコリンリン脂質であることを既に報告していることから、*ABCG1* の ATP 加水分解活性が、コレステロールやリン脂質添加によって促進されるか調べ、基質を同定する。ATP 加水分解活性のネガティブコントロールとして、既に作成済みの ATP 結合が起こらない *ABCG1* 変異体を用いる。

(3) *ABCG4* の精製と ATP 加水分解測定による基質の同定

ABCG1 で確立した精製法と基質同定法を *ABCG4* に適用する。*ABCG4* を、動物培養細胞または酵母で大量発現させ、精製、リポソームへの再構成を行う。様々な組成の脂質リポソームに再構成した標品の ATP 加水分解活性を測定することで、基質を同定する。ネガティブコントロールとして、ATP 結合が起こらない変異体を作製し、ATP 結合能が実際に失われているか ATP 類似体を用いた光

親和性標識実験で確認した後、使用する。

(4) ラフトドメイン制御の可視化解析

ABCG1 がコレステロールとスフィンゴミエリンに富んだ細胞膜ラフトドメインに局在し細胞膜脂質を再編成することで、ラフト構造を変えることを既に見出している。しかし、ラフト構造がどのような状態になって、脂質排出が起こるのかは不明である。近年、脂質を可視化するための蛍光標識脂質や特定の脂質に結合するプローブの開発が進んでいる。そこでこれらの蛍光標識プローブを用いて ABCG1 の細胞膜上での動きとラフトの構造変化を、共焦点レーザー顕微鏡やバックグラウンド低減のためにエバネッセント顕微鏡で可視化して観察する。

4. 研究成果

(1) 中枢神経系での脂質排出とアミロイドβの分泌の解析

アミロイド前駆タンパク質の変異体を安定発現する HEK293 細胞に、ABCG1, ABCG4 を発現させると、アミロイドβの分泌が低下していた。ABCG1, ABCG4 の ATP 結合能欠損変異体を発現させてもアミロイドβ分泌には変化がなかったことから、ABCG1, ABCG4 の機能依存的にアミロイドβ分泌が抑制されることを明らかにした。このとき、細胞膜 APP 量、CTF β 量が増加していたことから、γセクレターゼの活性低下がアミロイドβ産生の低下原因と予想された。密度勾配超遠心法による分画の結果、ラフトドメインに局在されることが知られるγセクレターゼの各サブユニットのラフトへの局在が、ABCG1, ABCG4 発現細胞で低下していることを見出した。これらの結果から、ABCG1, ABCG4 が脂質を輸送することでラフトドメインが破壊され、ラフトドメインで機能するγセクレターゼ活性が低下し、アミロイドβの産生と分泌が低下することを明らかにした。

アストログリア細胞が分泌するアポリポタンパク質 E 含有リポタンパク質 (LpE) は、ABCG1 が関与して形成される。LpE は中枢神経細胞の軸索伸長を促進し、アストログリア細胞における ABCG1 の過剰発現によって、LpE による軸索伸長がさらに促進された。また、抗体阻害実験とノックダウン実験から、LRP1 が神経細胞における LpE の受容体として働くことを明らかにした。これらのことから、ABCG1 によって排出される脂質成分が、LpE を介した神経細胞軸索伸長に重要であることを明らかにした。

(2) ABCG1 の ATP 加水分解測定による基質の同定

ABCG1 を動物浮遊培養細胞で大量発現し、ドデシルマルトシドで可溶化できることが

分かった。可溶化した ABCG1 を FLAG タグを利用して精製し、精製標品をリポソームに再構成した。コレステロール、スフィンゴミエリン、ホスファチジルコリンを含むリポソームに再構成すると、ATP 加水分解活性が促進されたことから、それらの脂質が輸送基質となることが示唆された。さらに、スフィンゴミエリン存在下でコレステロールの親和性が上昇した。これらのことから、コレステロールとスフィンゴミエリンが協調して輸送されることが示唆された。

(3) ABCG4 の精製と ATP 加水分解測定による基質の同定

ABCG1 と同様に ABCG4 を動物浮遊培養細胞で大量発現し、FLAG タグを利用して精製した。精製標品をリポソームに再構成した実験から、ABCG1 とは異なり、ABCG4 はコレステロールのみが輸送基質となることを示唆する結果が得られた。

(4) ラフトドメイン制御の可視化解析

界面活性剤による可溶化実験と超遠心実験により、ABCG1 が TritonX-100 ラフトに、ABCG4 が Brij96 ラフトに局在し、いずれもラフトドメインに局在するが、そのラフトの性質が異なることを明らかにした。さらに、細胞を用いた実験でも、精製したタンパクを用いた実験と同様に、ABCG1 がコレステロールとコリンリン脂質、ABCG4 がコレステロールのみを排出することを明らかにした。脂質アクセプターとなる HDL 非存在下においてもラフト構造の変化がみられたことから、脂質の細胞膜上での再分配が ABCG1, ABCG4 による脂質排出に重要であることを示唆した。ガングリオシド GM1 に結合するコレラトキシンを用いた染色実験より、ABCG1 発現細胞ではコレラトキシンの染色が薄くなることから、ABCG1 がラフト構造を変えて細胞膜上での GM1 の分布を変えるか存在量を変えることを、可視化により明らかにした。

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 7 件)

1. Hirayama, H., Kimura, Y., Kioka, N., Matsuo, M., and Ueda, K. (2013) ATPase activity of human ABCG1 is stimulated by cholesterol and sphingomyelin. *J. Lipid Res.* 54, 496–502. 査読有 DOI: 10.1194/jlr.M033209.
2. Ishigami, M., Tominaga, Y., Nagao, K., Kimura, Y., Matsuo, M., Kioka, N., and Ueda, K. (2013) ATPase activity of

- nucleotide binding domains of human MDR3 in the context of MDR1. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1831, 683-690. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbalip.2012.12.016.
3. Nagao, K., Takahashi, K., Azuma, Y., Takada, M., Kimura, Y., Matsuo, M., Kioka, N., and Ueda, K. (2012) ATP hydrolysis-dependent conformational change in the extracellular domain of ABCA1 are associated with apoA-I binding. *J. Lipid Res.*, 53, 126-136. 査読有 DOI: 10.1194/jlr.M019976.
 4. Sezaki, T., Inada, K., Sogabe, T., Kakuda, K., Tomiyama, L., Matsuno, Y., Ichikawa, T., Matsuo, M., Ueda, K., and Kioka N. (2012) Role of Dlg5/lp-dlg, a membrane-associated guanylate kinase family protein, in epithelial-mesenchymal transition in LLC-PK1 renal epithelial cells. *PLoS ONE* 7, e35519. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0035519.
 5. Matsuo, M., Campenot, R. B., Vance, D. E., Ueda, K., and Vance J. E. (2011) Involvement of low density lipoprotein receptor-related protein and ABCG1 in stimulation of axonal extension by apo E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1811, 31-38. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbalip.2010.10.004
 6. Matsuo, M. (2010) ABC proteins involved in glucose and lipid homeostasis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74, 899-907. 査読有 DOI: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.90921>
 7. Nagao, K., Kimura, Y., Matsuo, M. and Ueda, K. (2010) Lipid outward translocation by ABC proteins. *FEBS Lett.*, 584, 2717-2723. 査読有 DOI: 10.1016/j.febslet.2010.04.036
- [学会発表] (計 68 件)
1. Michinori Matsuo, Taro Watanabe, Kazumitsu Ueda
Phosphorylation by protein kinase C stabilizes ABCG1
The Fourteenth International Membrane Research Forum, Kyoto, 15-17 March 2013
 2. Michinori Matsuo, Hiromune Ando, Makoto Kiso, and Kazumitsu Ueda
ABC proteins regulate the integrity of membrane meso-domains
iCeMS retreat, Osaka, 31 August 2012
 3. 松尾道憲、江澤美智、植田和光
ABCA1 と ABCG1 によるコレステロール排出のハイスループット測定系の開発
農芸化学会 2011 年度大会 京都 2012 年 3 月 23 日
 4. Michinori Matsuo, Robert B. Campenot, Dennis E. Vance, Kazumitsu Ueda, and Jean E. Vance
ABCG1 is involved in stimulation of axonal extension by apoE-containing lipoproteins
4th FEBS special meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases", Innsbruck, Austria, 3-9 March 2012
 5. 松尾道憲、佐野修、加藤玲子、清水裕二、植田和光
ABC トランスポーターの膜脂質ラフトへの分布と機能の連関
日光シンポジウム—膜輸送体研究の前進を目指して 日光 2011 年 12 月 18 日
 6. Michinori Matsuo, Osamu Sano, Reiko Kato, Yuuji Shimizu and Kazumitsu Ueda
Distribution of ABCG1 and ABCG4 to membrane raft domains
ABC 2011 in Kyoto, Kyoto, 16-17 November 2011
 7. Michinori Matsuo, Robert B. Campenot, Dennis E. Vance, Kazumitsu Ueda, and Jean E. Vance
Mechanisms by which apoE-containing lipoproteins stimulate axonal extension of CNS neurons
ABC 2011 in Kyoto, Kyoto, 16-17 November 2011
 8. 松尾道憲、植田和光
ABC トランスポーターと疾患: ABCA1 と ABCG1 による脂質恒常性維持 ABC transporters and diseases: Lipid homeostasis maintained by ABCA1 and ABCG1
日本生化学会 2011 年度大会シンポジウム「疾患リスクおよび治療バイオマーカーとしての ABC トランスポーターの遺伝子変異と多型」 京都 2011 年 9 月 23 日
 9. 松尾道憲、佐野修、加藤玲子、清水裕二、植田和光
脂質排出 ABC トランスポーターの膜ラフトドメインへの局在
第 5 回 トランスポーター研究会九州部会 宮崎 2011 年 9 月 17 日
 10. 松尾道憲、佐野修、加藤玲子、清水裕二、植田和光
ABCA1 と ABCG1 と ABCG4 は異なる膜ドメインに局在し膜脂質ラフト構造を変え

- る
第6回トランスポーター研究会年会
仙台 2011年6月11日
11. 松尾道憲、佐野修、加藤玲子、清水裕二、植田和光
ABCG1 と ABCG4 がアミロイド前駆体タンパク質のプロセッシングに与える影響
日本農芸化学会 2011 年度大会 京都
2011 年 3 月 26 日
 12. 松尾道憲、Robert B. Campenot、植田和光、Jean E. Vance
アポリポタンパク質E含有リポタンパク質は LRP1 を介して中枢神経細胞の軸索伸長を促進する
BMB2010 神戸 2010 年 12 月 7 日～10 日
 13. 松尾道憲、Robert B. Campenot、植田和光、Jean E. Vance
アポリポタンパク質E含有リポタンパク質が中枢神経細胞の軸索伸長を促進する分子機構
第5回トランスポーター研究会年会
東京医科大学 2010年7月10日～11日
 14. Michinori Matsuo, Osamu Sano, Reiko Kato, Yuuji Shimizu and Kazumitsu Ueda
Expression of ABCG1 or ABCG4 modulates raft domains, which suppresses the production of amyloid beta
The 27th Naito Conference “Membrane Dynamics and Lipid Biology [I]”, Sapporo, 29 June-2 July 2010
 15. 松尾道憲、木村泰久、植田和光
脂質代謝とABCトランスポーター
第130回薬学会130年会記念型シンポジウム トランスポーター: 異物解毒と栄養素供給・利用との境界
Transporter: Boundary of the Membrane Transports Xenobiotics and Nutrients
岡山 2010年3月29日
 16. Michinori Matsuo, Osamu Sano, Reiko Kato, Yuuji Shimizu and Kazumitsu Ueda
Expression of ABCG1 or ABCG4 modulates raft domains, which suppresses the production of amyloid beta
3rd FEBS special meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases”, Austria, 27 February-5 March 2010
 17. Michinori Matsuo
Mechanisms by which glia-derived apoE-containing lipoproteins stimulate axon elongation of CNS neurons
The thirteenth MEMBRANE RESEARCH FORUM, Kyoto, 27-29 January 2010
 18. 松尾道憲、佐野修、加藤玲子、清水裕二、

植田和光
脂質トランスポーターABCG1 と ABCG4 がアミロイド前駆体タンパク質のプロセッシングに与える効果
トランスポーター研究会第3回九州部会
鹿児島 2009年11月21日

〔図書〕(計2件)

1. 松尾道憲、千場智尋、植田和光 (2011) 「脂質のトランスポーター」 竹谷豊、薩秀夫、伊藤美紀子、武田英二編 『栄養・食品機能とトランスポーター』 pp81-103 建帛社
2. 松尾道憲、植田和光 (2011) 「栄養と代謝物のトランスポーター—脂質—」 金井好克、竹島浩、森泰生、久保義弘編 『トランスポートソームの世界—膜輸送研究の源流から未来へ—』 pp191-199 京都廣川書店

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://cseika-1.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

()

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：