

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24年5月30日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880016

研究課題名（和文） ABCA1による高密度リポタンパク質（HDL）の形成機構の研究

研究課題名（英文） Mechanism of high-density lipoprotein (HDL) formation by ABCA1

研究代表者

長尾 耕治郎 (NAGAO KOHJIRO)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：40587325

研究成果の概要（和文）：

ABCA1は血中の apolipoprotein A-I (apoA-I) に細胞の過剰なコレステロールを受け渡すことで善玉コレステロールとして知られる高密度リポタンパク質 (HDL) を形成する。本研究では HDL 形成の第一段階である ABCA1 と apoA-I との結合を解析した。本研究により、ABCA1 の細胞外領域の構造が ATP の加水分解によって変化し、正電荷からなる apoA-I 結合部位が形成されることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

ABCA1 mediates the high-density lipoprotein (HDL) formation by loading cellular cholesterol onto apolipoprotein A-I (apoA-I). In this study, we analyzed the interaction between ABCA1 and apoA-I, which is first step of HDL formation. We showed that conformation of extracellular domain of ABCA1 is changed by ATP hydrolysis in nucleotide domain, and apoA-I binding site is produced by this conformation changes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用生物化学

キーワード：cholesterol、ABCA1、HDL

1. 研究開始当初の背景

末梢組織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高密度リポタンパク質(HDL)として除去される。ABCタンパク質ファミリーに属するABCA1は、細胞膜中のリン脂質と過剰になったコレステロールを、血液中の脂質アクセプターである apolipoprotein A-I (apoA-I) に受け渡すことで HDL を新生する。しかし、ABCA1

がどのような機構で血中の apoA-I と結合するのか不明であった。

2. 研究の目的

本研究では ABCA1 と apoA-I との結合様式を解析することで、ABCA1 による HDL 形成機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ApoA-I 結合実験

ABCA1 発現細胞を Alexa546 で蛍光標識した apoA-I と 37°C でインキュベートし、固定後に共焦点顕微鏡により観察した。

(2) 抗 HA 抗体染色

ABCA1 発現細胞を抗 HA 抗体と 37°C でインキュベートし、固定後に蛍光標識した 2 次抗体と反応させ、共焦点顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) 負電荷のアミノ酸からなる領域が apoA-I 表面に存在することが結晶構造により示されているため、ABCA1 の細胞外領域の正電荷が apoA-I との結合に重要であろうと考えた。一級アミン修飾試薬により ABCA1 のリシン残基を修飾すると、ABCA1 は apoA-I と結合できなくなった。また、リシン残基の修飾により apoA-I へのコレステロール排出活性が阻害された。しかし、リシン残基の修飾は ABCA1 の細胞膜への局在や ATP との結合には影響しなかった。以上の結果より、ABCA1 のリシン残基が apoA-I との結合に必須であることが示唆された。

(2) 次に、ABCA1 と apoA-I との結合における ABCA1 の ATP 加水分解活性の必要性を解析した。ABCA1 発現細胞への蛍光標識した apoA-I の結合は、NaN₃ と 2-deoxy-glucose により細胞の ATP を枯渇させることで消失した。このことから、ABCA1 と apoA-I との結合が ATP 依存であることが示された。次に、ABCA1 の細胞質側に存在する 2 つのヌクレオチド結合ドメイン(NBD)の関与を調べた。2 つの NBD のどちらか一方にリシン-メチオニン変異(K939M, K1952M)を導入すると(図 1)、apoA-I との結合が起こらなくなった(図 2)。

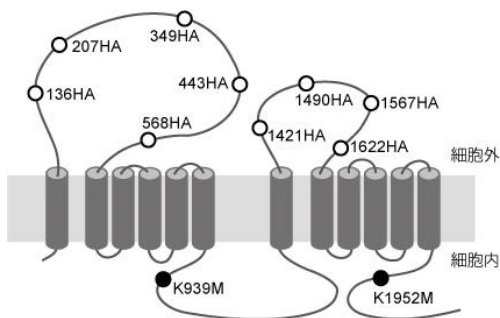


図 1 ABCA1 の二次構造

○; HA タグ挿入部位,

●; リシン-メチオニン変異.

また、放射性同位体標識した ATP アナログを用いた光親和性標識実験により、リシン-

メチオニン変異により、ATP との結合は影響を受けないが、ATP 加水分解が阻害されることが示された。このことから、ABCA1 の両方の NBD での ATP 加水分解が apoA-I との結合に必要であることが明らかになった。

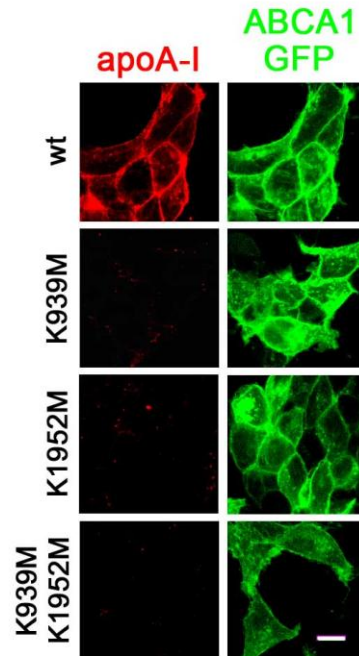


図 2 ABCA1 と apoA-I の結合

野生型 (wt) 及び各変異型 ABCA1 (緑) と蛍光標識した apoA-I (赤) との結合を解析した

(3) そこで、ATP 加水分解により ABCA1 の細胞外領域の構造が変化し、apoA-I との結合部位が形成されるという仮説を立てた。構造変化を検出するために、ABCA1 の細胞外領域の 9 か所に HA タグ (YPYDVPDYA) をそれぞれ挿入した変異体を作製し(図 1)、HEK293 細胞に発現させた。作製した 9 種の変異体のうち、6 種は野生型と同様に機能的に発現した。これらのうち、136、207、349、1421、1490 番目のアミノ酸に挿入した HA タグの抗 HA 抗体による認識は ATP 枯渇処理で変化しなかったが、443 番目のアミノ酸に挿入した HA タグの認識は ATP 枯渇処理により低下した。さらに、443 番目に挿入した HA タグの認識はどちらか一方の NBD にリシン-メチオニン変異を導入することによっても低下した(図 3)。しかし、207 番目に挿入した HA タグの認識はリシン-メチオニン変異を導入しても変化しなかった。以上の結果から、ABCA1 の 2 つの NBD での ATP 加水分解により細胞外領域の 443 番目周辺の構造が変化し、apoA-I 結合部位が形成されることが示唆された。

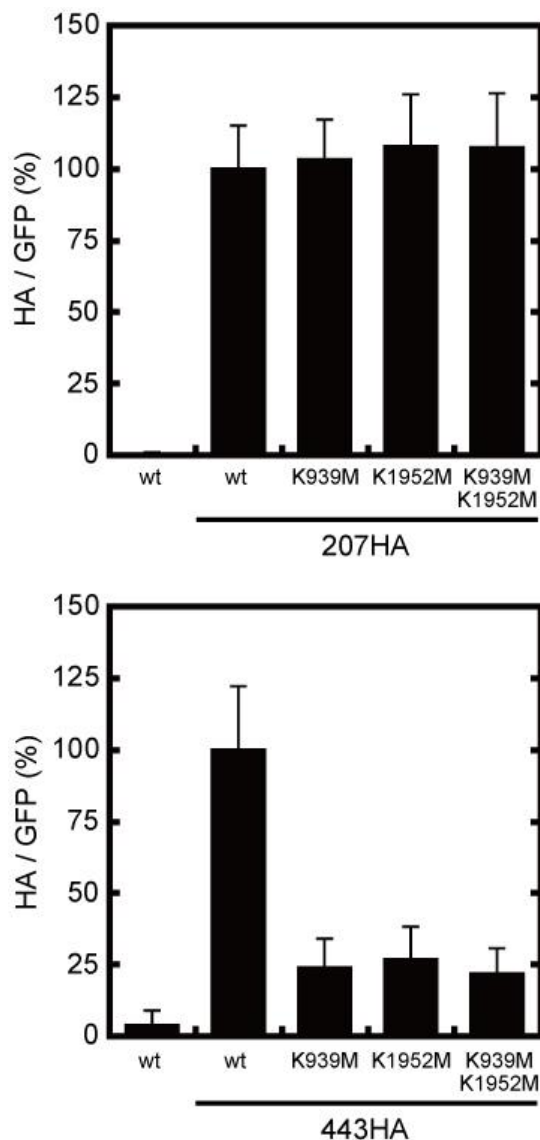


図3 抗HA抗体によるABCA1に挿入したHAタグの認識
207番目または443番目に挿入したHAタグを抗HA抗体により染色した。抗HA抗体による染色の強度とABCA1に付加したGFPの蛍光強度の比を共焦点顕微鏡で撮影した写真より算出した。

以上の結果より、ATP加水分解によって引き起こされる構造変化により、ABCA1の細胞外領域に正電荷のアミノ酸からなるapoA-I結合部位が形成されるのだと考えられる。

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4件)

- ① Kohjiro Nagao, Kei Takahashi, Yuya Azuma, Mie Takada, Yasuhisa Kimura, Michinori Matsuo, Noriyuki Kioka and Kazumitsu Ueda
ATP hydrolysis-dependent conformational changes in the extracellular domain of ABCA1 are associated with apoA-I binding
Journal of Lipid Research、査読有、Vol.53、2012、126-136
10.1194/jlr.M019976
- ② Kohjiro Nagao, Yasuhisa Kimura and Kazumitsu Ueda
Lysine residues of ABCA1 are required for the interaction with apoA-I
Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids、査読有、Vol.1821、2012、530-535
10.1016/j.bbalip.2011.06.024
- ③ Kohjiro Nagao, Maiko Tomioka and Kazumitsu Ueda
Function and regulation of ABCA1--membrane meso-domain organization and reorganization (review)
FEBS Journal、査読有、Vol.278、2011、3190-3203
10.1111/j.1742-4658.2011.08170.x
- ④ Kohjiro Nagao, Yasuhisa Kimura, Michinori Matsuo, Kazumitsu Ueda
Lipid outward translocation by ABC proteins (review)
FEBS letters、査読有、Vol.584、2010、2717-2723
10.1016/j.febslet.2010.04.036

[学会発表] (計5件)

- ① 長尾耕治郎, 前田南, 植田和光
Cyclosporine AによるABCA1の阻害機構の解析
日本農芸化学会2012年度大会
2012/3/22-25、京都女子大学
- ② Kohjiro Nagao, Yasuhisa Kimura, Michinori Matsuo and Kazumitsu Ueda
ATP hydrolysis-dependent conformational changes in the extracellular domain of ABCA1 are associated with apoA-I binding
ABC2012
2012/3/3-9、Innsbruck, Austria

- ③ 長尾耕治郎, 木村泰久, 松尾道憲, 木岡紀幸, 植田和光
高密度リポタンパク質(HDL)産生機構の解析①ABCA1のATPに依存した構造変化と apoA-I 結合
2011年度日本農芸化学会関西・中部支部合同大会
2011/10/1-2、京都大学
- ④ 長尾耕治郎, 高橋圭, 吾妻佑哉, 木村泰久, 松尾道憲, 木岡紀幸, 植田和光
ATP加水分解に依存した ABCA1 の細胞外領域の構造変化が apoA-I との結合に必須である
第 84 回日本生化学会
2011/9/21-24、国立京都国際会館
- ⑤ 長尾耕治郎, 木村泰久, 植田和光
ATP加水分解に依存した ABCA1 の細胞外領域の構造変化
日本農芸化学会 2011 年度大会
2011/3/25-28、京都女子大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 耕治郎 (NAGAO KOHJIRO)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号 : 40587325

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :