

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780101

研究課題名(和文) HDL 形成に関与する ABC タンパク質の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of human ABC transporters involved in HDL generation.

## 研究代表者

木村 泰久 (Kimura, Yasuhisa)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10415143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000 円、(間接経費) 1,080,000 円

研究成果の概要(和文)：コレステロールは生体膜の構成成分であると共に、各種ホルモンの前駆体となる重要な化合物である。しかし過剰なコレステロールは細胞にとって有害であることから、生体のコレステロール恒常性は厳密に保たれている。本研究では善玉コレステロール形成に関与する ABCG1 について大量発現・精製系の開発を行い、ABCG1 が能動的な脂質輸送体であることを明らかにした。また、基質特異性の検討を行い、ABCG1 がコレステロールとスフィンゴミエリンを直接認識し輸送していることを突き止めた。さらに、ABCG1 と高い相同性を持つ ABCG4 がコレステロール選択的な輸送体であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cholesterol is an essential component for our body as a constituent of plasma membrane and precursor of steroid hormones. Since the excess cholesterol is harmful to cells, cholesterol homeostasis in peripheral tissues are tightly regulated. In this research, we purified human ABCG1 and ABCG4, and analyzed its substrate specificity by measuring ATPase activity.

Purified ABCG1 showed the ATPase activity that comparable to those of active transporters. The ATPase activity of ABCG1, reconstituted in phosphatidylserine liposome, was stimulated by cholesterol and choline phospholipids (especially sphingomyelin). The ATPase activity of ABCG4 was stimulated in cholesterol containing liposomes. Unlike ABCG1, choline phospholipids showed no effects on the ATPase activity. Our results suggest that ABCG1 and ABCG4 are active lipid transporters and ABCG1 recognizes cholesterol and sphingomyelin as transport substrates, while ABCG4 is a cholesterol specific transporter.

研究分野：農学

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 ABCG1 コレステロール HDL 膜輸送体 タンパク質精製

### 1. 研究開始当初の背景

体内の脂質恒常性は厳密に制御されており、その破たんはアテローム性動脈硬化症などの重篤な疾患を引き起こす。善玉コレステロールとして知られる HDL は末梢からのコレステロールを除去する唯一の経路であり、血中の HDL 量と心疾患リスクには強い逆相関がみられる。この HDL 形成に関与しているのが ABCA1 と ABCG1 の 2 種類の ABC タンパク質である(図 1 参照)。ABC タンパク質は ATP 加水分解エネルギーによって駆動される能動的なトランスポーターで、ヒトでは 48 種類が同定されている。HDL 形成の初期段階では ABCA1 がまずアポリポタンパク質 A-1(ApoA-1)に脂質を受け渡して HDL 前駆体を形成し、ABCG1 はこの前駆体に脂質をさらに輸送し、より脂質に富んだ形に成熟させると考えられている。しかし、ABCG1 を発現精製し、基質特異性を評価した研究がなかったことから機能の詳細は不明であった。

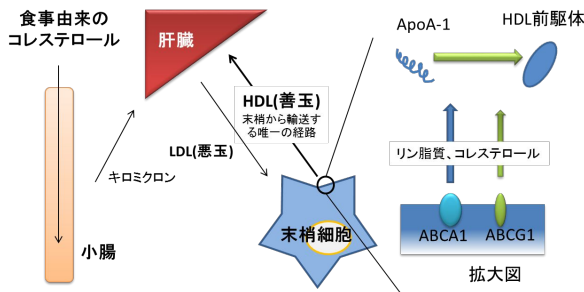


図1 体内のコレステロール恒常性維持

### 2. 研究の目的

本研究の目的は HDL 形成に関与するヒト ABC タンパク質の高純度生産系を確立し、生化学的解析によって基質特異性などの特徴を明らかにすることである。これにより HDL 形成を分子レベルで理解する。

### 3. 研究の方法

上記目的達成のため、ヒト ABCG1 および ABCG4 の 2 遺伝子を動物培養細胞を用いて大量発現させ、高純度精製系を確立した。ABC タンパク質の輸送活性は ATP 加水分解と共役することを利用し、ATP 加水分解活性を指標に輸送基質の探索を行った。

### 4. 研究成果

本研究ではヒト ABCG1 および ABCG4 の生化学的解析により、輸送基質の決定を試みた。その結果 ABCG1 がコレステロールとスフィンゴミエリン(SM)を輸送基質として認識するのに対し、ABCG4 はコレステロール選択的な輸送体であることが明らかとなった。輸送基質の同定は本研究において世界で始めて達成されたものであり、HDL 形成の分子メカニズム解明に重要な知見であるとして高く評価されている。具体的な研究成果は以下のとおりである。

#### ・ヒト ABCG1 の精製手法開発

本研究項目ではヒト ABCG1 の精製系を確立し、基質特異性を評価した。その結果 ABCG1 が脂質の活性な輸送体であり、コレステロールとスフィンゴミエリンを基質とすることを明らかにした。

はじめに精製に用いる界面活性剤の検討を行ったところ、ヒト ABCG1 は多くの界面活性剤中で安定に存在でき、精製に適していることが明らかとなった。そこでヒト培養細胞(FreeStyle 293)を用いたバイオリアクター発現系により大量発現手法の確立を行った。精製はC末端に付加したFlag タグを用いた交代アフィニティークロマトグラフィーによって行い、1段階の精製で純度 80-90%程度の精製標品を得ることに成功した(図 2)。精製 ABCG1 はリポソームに再構成した場合にのみ ATP 加水分解活性を示した。また活性はこれまで報告されている輸送体型の ABC タンパク質の活性と同等であったことから ABCG1 が活性な輸送体タンパク質であることが明らかとなった。一方で ATP 加水分解に重要なリシンをメチオニンに置換した変異体(MM 変異体、図 2)では活性が検出されなかったことから、観察された ATP 加水分解活性は確かに ABCG1 に由来するものであることが確認された。また、リポソームに再構成しない場合には活性がまったく検出されなかったことから、ABCG1 の活性には脂質 2 重膜環境が不可欠であることも明らかとなった。

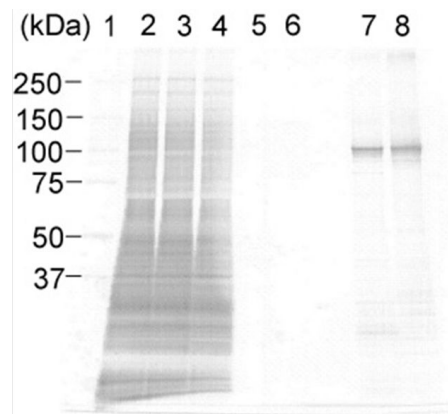


図2 ABCG1の精製。Lane7:ヒトABCG1精製標品。Lane8:ヒトABCG1のATP加水分解活性欠損変異体(MM)

#### ・ヒト ABCG1 の輸送基質解析

ついで精製標品を用いて ABCG1 の機能解析を行った。様々な組成のリポソームに再構成し、ATP 加水分解活性を測定したところ、フォスファチジルセリン(PS)からなるリポソーム中では ABCG1 の活性がほとんど見られないことが明らかとなった。このことから ABCG1 は PS を基質として認識せず、PS リ

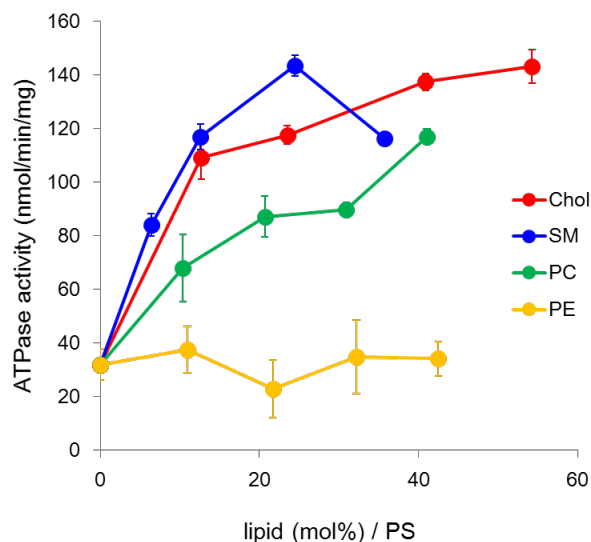


図3 ABCG1のATP加水分解活性はcholesterol(Chol)とsphingomyelin(SM)によって強く促進される

ポソームを用いることで脂質に対する濃度依存性を評価できることが明らかとなった。様々な脂質の濃度依存性を検討したところ、ABCG1はコレステロールやSMを含むリポソーム中で特に高いATP加水分解活性を示した。またフォスファチジルコリン(PC)を含むリポソーム中でも弱い活性誘導が見られた(図3)。以上の結果からABCG1はコレステロールとSMを特に良い基質として認識し、PCも基質として認識することが示唆された。一方、フォスファチジエタノールアミン(PE)では活性の誘導が見られなかった。基質として認識されたSMとPCは親水性頭部の構造としてフォスホコリン基を共通して有することから、ABCG1によるリン脂質の認識には親水性の頭部の構造が重要であることが明らかとなった。またSMがPCよりも良い基質として認識されたことから、疎水性の尾部との連結部分の構造も重要であることが示唆された。さらに詳細に検討を行った結果、SMによってABCG1のコレステロールに対する親和性が上昇することが明らかとなった。ABCG1はコレステロールとSMを異なる部位で認識し、それぞれの結合サイトは協調的に機能すると考えられる(図4)。

先行研究においてABCG1を発現させた細胞からはコレステロールとSMが排出されることが明らかとなっていた。一方、生化学的な分画実験からはABCG1はコレステロールやSMが豊富に存在するラフトと呼ばれる膜領域に局在していることが報告されており、ABCG1が脂質を選択的に認識して輸送しているのか、それとも周囲に存在する脂質を無作為に排出しているのかは不明であった。本研究で行った生化学的解析によりABCG1は選択的に脂質を認識して輸送していること

が明らかとなった。

本研究成果は論文としてJournal of Lipid Research誌に発表した(発表論文)。本研究成果はABCG1が輸送体であることを始めて立証した研究であり、基質特異性も明らかにできたことからHDL形成を分子レベルで明らかにするうえで重要な知見となる。

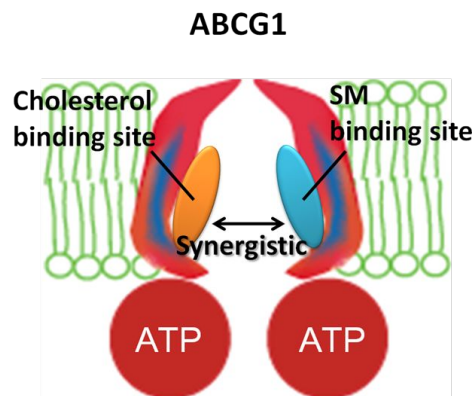


図4. ABCG1は協調的に機能するcholesterol結合サイトとSM結合サイトを持つ。

#### ・ヒトABCG4の機能解析

ABCG4はABCG1と最も高い相同性を有するABCタンパク質であり、ABCG1と同様に脂質の恒常性に寄与することが示唆されていた。しかし、輸送基質等は明らかにされておらず、生理機能は不明であった。本研究ではABCG1で構築した精製・解析手法を応用することでABCG4の機能解明に取り組み、輸送基質がコレステロールであることを示唆する結果を得た。

まず界面活性剤中での安定性を評価したところ、ABCG4はABCG1とは異なり界面活性剤中で立体構造を維持できず、速やかに失活することが明らかとなった。そこで様々な界面活性剤中での安定性を評価し、精製条件を最適化することで活性な精製標品を得る実験系を構築した。

精製ABCG4はABCG1と同様にリポソームに再構成した場合にのみATP加水分解活性を示したことからABCG4の機能にも脂質2重膜環境が必要不可欠であることが明らかとなった。また、ABCG4のATP加水分解活性の酵素化学的な特徴を評価したところ、ATPに対する親和性や安定性など、ほぼすべての項目においてABCG1の活性と非常に良く似た特徴を示した。これはABCG1とABCG4のATP結合ドメインの高い相同性を反映した結果であると考えられる。ついで様々な組成のリポソームに再構成して活性を比較し、輸送基質の同定を試みた。その結果、ABCG4のATP加水分解活性はコレステロールによって濃度依存的に促進されるが、リン脂質による影響は見られないことが明

らかとなった。このことから ABCG4 は ABCG1 とは異なり、リン脂質を基質として認識せず、コレステロール選択的な輸送体として機能すると考えられる。

本研究は ABCG4 が活性化脂質輸送体として機能することを精製タンパク質を用いて明らかにした初めての研究であり、基質特異性も明らかにできたことから国際学会にて口頭発表した(学会発表)。

ABCG1 がマクロファージなどの末梢の細胞に発現が見られるのに対し、ABCG4 は中枢神経系で発現すると予想されている。本研究で明らかとなった基質特異性の違いが組織特異的な機能発現に重要である可能性が考えられる。したがって ABCG1 と ABCG4 の基質特異性を決定する要素を明らかにできれば生体レベルでの脂質恒常性の維持機構の理解がさらに進むと期待される。

#### 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 2 件)

Hirayama H, Kimura Y, Kioka N, Matsuo M, Ueda K. "ATPase activity of human ABCG1 is stimulated by cholesterol and sphingomyelin" **J. Lipid Res.** 54, 496-502. (2013) 査読あり

木村泰久"脂質輸送型 ABC タンパク質の基質認識、輸送機構" **膜** 39(2), 68-73 (2014) 総説

[学会発表](計 10 件)

Hiroshi Hirayama "Functional analysis of purified ABCG1 expressed in human cultured cells" ASBMB: Frontiers in Lipid Biology, Banff Canada, 2012.9.5-8

大貫元 "ヒト ABCB6 の精製と機能解析" 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 2012.12.15

井上修一 "K<sub>ATP</sub> チャネル複合体のサブユニット間相互作用部位の探索" 第 85 回日本生化学会大会, 福岡, 2012.12.15

Hajime Ohnuki "Characterization of the substrate specificity of ABCB6" The 14th International Membrane Research Forum, 京都, 2013.3.15-17

Hajime Ohnuki "Analysis of the substrate specificity of ABCB6" RSC-iCeMS シンポジウム, 京都, 2013.3.18-19

Hiroshi Hirayama "Purification and functional analysis of cholesterol transporter ABCG1" RSC-iCeMS シンポジウム, 京都, 2013.3.18-19

大貫元 "精製タンパク質を用いたヒト

ABCB6 の機能解析" 日本農芸化学会 2013 年度大会, 仙台, 2013.3.24-28

Yasuhisa Kimura "ATPase activity of human ABCG1 is stimulated by cholesterol and choline phospholipids" Benzon Symposium No. 59 - Membrane proteins: Structure, Function and Dynamics, Copenhagen, Denmark, 2013.8.19-22

Yasuhisa Kimura "Substrate recognition of human ABCG1 and ABCG4" 5th FEBS special meeting "ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases", Innsbruck, Austria, 2014.3.9-14

木村泰久 "精製タンパク質を用いたヒト ABC タンパク質の機能解析" 日本農芸化学会 2014 年度大会, 東京, 2014.3.30

[図書](計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村泰久

研究者番号: 10415143