

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460063

研究課題名(和文) ABCタンパク質サブファミリーD：新たな局在化・基質輸送機構と細胞機能制御の解析

研究課題名(英文) ABC protein subfamily D: Mechanisms about subcellular localization and substrate transport, and regulation of cell function

研究代表者

今中 常雄 (Imanaka, Tsuneo)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：50119559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ペルオキシソーム膜に局在するABCD1-3の基質輸送機構ならびにABCD4のリソソーム局在化機構と機能を解析した。

ABCD1がacyl-CoA thioesterase 活性を有し、その活性がacyl-CoAのペルオキシソームへの輸送に必要であることを見出した。ABCD4がLMBD1と小胞体膜上で複合体を形成し、LMBD1のリソソーム移行シグナルに依存してリソソームへの局在化する仕組みを明らかにした。ABCD1-4をプロテオリポソームに組み込むことに成功し、基質輸送機構の詳細な解析が可能になった。

研究成果の概要(英文)： We analyzed mechanism of substrate transport by ABCD1-3 on peroxisomal membrane and mechanism of translocation of ABCD4 to lysosome.

It is revealed that ABCD1 possesses acyl-CoA thioesterase activity and its activity is essential for the transport of acyl-CoA into peroxisome. In addition, it is revealed that ABCD4 makes complex with lysosomal protein LMBD1 on endoplasmic reticulum membranes and translocates from ER to lysosome dependent on lysosomal targeting signal of LMBD1. Furthermore, we succeeded to prepare proteoliposome of ABCD1-4. It becomes possible to characterized precise mechanism of substrate transport by ABCD1-4.

研究分野：生化学・分子細胞生物学

キーワード：ABCトランスポーター ペルオキシソーム リソソーム オルガネラ局在化機構 獄長鎖脂肪酸CoA輸送
ビタミンB12輸送 副腎白質ジストロフィー ビタミンB12欠乏症

1. 研究開始当初の背景

ATP-binding cassette (ABC)タンパク質は、様々な物質の輸送に関与し、その異常は種々の疾患の原因となっている。ヒトでは 49 種の ABC タンパク質が同定され、A-G の 7 群に分類されている。D 群については、ABCD1~3 がペルオキシソーム膜に局在し、acyl-CoA のペルオキシソーム内への輸送に関与しているが、その詳細なメカニズムは不明である。

ABCD1 の機能については、酵母 ABCD1 ホモログ Pxa1p、Pxa2p をノックアウトした酵母にヒト ABCD1 を発現させ、very long chain fatty acid (VLCFA)-CoA の酸化を解析することにより、ABCD1 は VLCFA-CoA を輸送すると考えられてきた。一方、植物ペルオキシソームにおいて、ヒト ABCD1 ホモログである CTS が acyl-CoA thioesterase 活性を持つこと、遺伝的解析からペルオキシソームでの脂肪酸酸化にペルオキシソーム VLCFA-CoA synthetase を必要とすることより、CTS は acyl-CoA を分解し、遊離した脂肪酸を輸送する仮説が提示された。Acyl-CoA が生体膜をどのように輸送されるかは、まだ明らかにされていない課題である。

我々は、ABCD4 はペルオキシソームへの局在化に必須の NH₂ 末端領域に存在する疎水性アミノ酸モチーフを欠くために、ペルオキシソームへは移行せず、Signal recognition particle に認識され小胞体に移行することを明らかにしてきた。一方、ABCD4 遺伝子の異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症患者が発見され、リソソームから細胞質へのビタミン B₁₂ の輸送障害の可能性が指摘された。ビタミン B₁₂ は、エンドサイトーシスによりリソソームに取込まれ、輸送体を介して細胞質に排出され、メチルコバラミン、アデノシルコバラミンに変換されて補酵素として利用される。ABCD4 異常と同様のフェノタイプが、リソソーム膜タンパク質 LMBD1 をコードする遺伝子 *LMBRD1* の異常によっても報告されている。よって、ABCD4 と LMBD1 が協調して ABCD4 の局在化とリソソームから細胞質へのビタミン B₁₂ の輸送に関与していると推測される。

そこで本研究では、ABCD4 のリソソームへの局在化メカニズムと ABCD1-4 の基質輸送メカニズムの詳細な解析を行った。

2. 研究の目的

我々は ABCD1~4 のオルガネラ選択的輸送機構を解析し、ABCD1~3 がペルオキシソーム膜に、ABCD4 が小胞体膜に局在化する仕組みを明らかにしてきた。一方、機能に関しては、ABCD1~3 は、極長鎖・長鎖脂肪酸 CoA の輸送に関与しているが、その輸送メカニズムの詳細は不明である。昨年 ABCD4 遺伝子異常によるビタミン B₁₂ 欠乏症患者が発見され、ABCD4 はリソソームから細胞質へのビタミン B₁₂ 排出に関与することが示唆された。

そこで本研究では、遺伝子疾患に関連する ABCD1, 4 を中心に、ABCD4 の新たなリソソームへの局在化機構、ABCD1, 4 の基質輸送メカニズムと病態との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ABCD1 の基質輸送メカニズム

ヒト ABCD1 をメタノール資化性酵母 *P. pastoris* に発現させた。ABCD1 の ATPase 活性ならびに acyl-CoA thioesterase 活性の測定には、Nycodenz 密度勾配遠心により分離したペルオキシソーム分画を用いた。ATPase 活性はマラカイトグリーン/リン酸モリブデン法により、acyl-CoA thioesterase 活性は NBD-palmitoyl-CoA を基質として、遊離した NBD-palmitic acid を TLC で分離して定量した。ABCD1 の acyl-CoA 輸送は、ペルオキシソーム膜小胞を調製し、NBD 標識した脂肪酸 CoA を基質として ATP 依存的に小胞内にトラップされる acyl-CoA もしくは遊離脂肪酸を蛍光分光計で解析した。ペルオキシソームの外側に吸着した NBD 脂肪酸 CoA は dithionite で消光させた。

ペルオキシソームへの acyl-CoA 輸送における acyl-CoA thioesterase の必要性は、ABCD1 の膜貫通ドメイン周辺の Ser を Ala に置換した変異型 ABCD1 を発現させることにより解析した。また、ATPase 活性欠損体 ABCD1(K553A)を作製し、同様の解析を行った。

ABCD1 の精製は、ABCD1 の N 末端に His タグを付加し、*P. pastoris* に発現させた。His-ABCD1 を含むペルオキシソームを Nycodenz 密度勾配遠心により分離し、His タグアフィニティレジンを用いて精製した。ABCD1 を組み込んだプロテオリポソームは、リポソーム (*E. coli* polar

lipid : egg PC = 3 : 1) を Triton X-100 で不安定化させ、精製した ABCD1 と incubation し、Bio-Beads SM-2 で界面活性剤を除去して作製した。

(2) ABCD2 と ABCD3 の発現と機能解析
ヒト ABCD1 と同様にヒト ABCD2、ABCD3 を *P. pastoris* に発現させた。ABCD2、ABCD3 の ATPase 活性ならびに acyl-CoA thioesterase 活性は、Nycodenz 密度勾配遠心により分離したペルオキシソーム分画を用いて測定した。ABCD1 と同様の方法でプロテオリポソームを作製した。

(3) ABCD4 のリソソーム局在化と基質輸送機構の解析

ABCD4 のリソソーム局在化機構は、ABCD4-HA を安定発現している HuH7 細胞に LMBD1-His を発現させ、蛍光抗体方で解析した。さらに、LMBD1-His を安定発現している CHO 細胞に、変異型 ABCD4-HA を発現させることにより、ABCD4 のリソソーム局在化に必要なドメインを解析した。

ABCD4 の ATPase 活性は、ABCD1 と同様の方法で測定した。

ABCD4 の精製は、N 末端に His タグ並びに His-GFP を付加した ABCD4 を *P. pastoris* に発現させ、界面活性剤 β -DDM で可溶化した後、His タグアフィニティレジンで精製した。プロテオリポソームは、ABCD1 と同様の方法で作製した。

4 . 研究成果

ペルオキシソームに局在する ABCD1-3 の基質輸送機構ならびに ABCD4 のリソソーム局在化機構と機能を解析し、以下に示す成果を得た。

(1) ABCD1-3 の機能解析

ABCD1 の acyl-CoA thioesterase 活性を精度よく測定できる新たな測定系を構築した。His-ABCD1 を精製しプロテオリポソームを作製することにより、直接 ABCD1 の acyl-CoA thioesterase 活性を測定することが可能になった。膜貫通領域の Ser 残基を Ala 置換した変異型 ABCD1 を作製し、Ser149 が活性中心である可能性を示唆した。一方、ABCD1 の Walker A motif に変異を入れ ATPase 活性を消失させた変異型

ABCD1(K513R)は、acyl-CoA thioesterase 活性を保持していた。ABCD1 の脂肪酸 CoA 輸送機構における acyl-CoA thioesterase 活性と ATPase 活性の役割について詳細な解析が可能になった。

ABCD1 は acyl-CoA thioesterase 活性と ATPase 活性に依存して、脂肪酸 CoA をペルオキシソーム内に輸送していることが示唆された。

ヒト ABCD2 ならびに ABCD3 遺伝子を改変することにより、それぞれ *P. pastoris* で発現させ、ATPase 活性を保持した状態で精製することに成功した。ABCD1-3 間の基質輸送の多様性の解析が可能になった。

(2) ABCD4 の局在化機構と機能解析

ABCD4 が LMBD1 と小胞体膜上で複合体を形成し、LMBD1 のリソソーム移行シグナルによりリソソームへの局在化することを明らかにした。

ヒト ABCD4 を *P. pastoris* に発現・精製し、ATPase 活性を保持した状態でプロテオリポソームを作製できた。ヒト LMBD1 も発現が可能になった。ABCD4 単独ならびに ABCD4 と LMBD1 を共発現させることにより、ABCD4 のビタミン B₁₂ 輸送機構と LMBD1 の役割の解明が可能になった。

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)

Morita M, Honda A, Kobayashi A, Watanabe Y, Watanabe S, Kawaguchi K, Takashima S, Shimozawa N, Imanaka T. Effect of Lorenzo's Oil on Hepatic Gene Expression and the Serum Fatty Acid Level in abcd1-Deficient Mice. JIMD Rep. 2017 May 31. doi: 10.1007/8904_2017_32. 査読有

Morita M, Matsumoto S, Okazaki A, Tomita K, Watanabe S, Kawaguchi K, Minato D, Matsuya Y, Shimozawa N, Imanaka T. A novel method for determining peroxisomal fatty acid β -oxidation. J Inherit Metab Dis. 2016 Sep; 39(5): 725-31. doi:

10.1007/s10545-016-9952-y. 査読有
Kawaguchi K, Okamoto T, Morita M, Imanaka T. Translocation of the ABC transporter ABCD4 from the endoplasmic reticulum to lysosomes requires the escort protein LMBD1. *Sci Rep*. 2016 Jul 26; 6: 30183. doi: 10.1038/srep30183. 査読有
Morita M, Kawamichi M, Shimura Y, Kawaguchi K, Watanabe S, Imanaka T. Brain microsomal fatty acid elongation is increased in *abcd1*-deficient mouse during active myelination phase. *Metab Brain Dis*. 2015 Dec; 30(6): 1359-67. doi: 10.1007/s11011-015-9701-1.

査読有

Lee A, Asahina K, Okamoto T, Kawaguchi K, Kostsin DG, Kashiwayama Y, Takanashi K, Yazaki K, Imanaka T, Morita M. Role of NH₂-terminal hydrophobic motif in the subcellular localization of ATP-binding cassette protein subfamily D: common features in eukaryotic organisms. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 453(3): 612-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.133. 査読有

〔学会発表〕(計 28 件)

川口甲介, Kostsin G, Dzymityr, 田原 光, 原田有希, 守田雅志, 今中常雄. メタノール資化性酵母を用いたペルオキシソーム膜 ABC タンパク質の発現と機能解析. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 Nov 30-Dec 4, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

萩原一也, 岡本拓海, 川口甲介, 守田雅志, 今中常雄. メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いたリソソーム膜 ABC タンパク質 ABCD4 の発現と機能解析. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 Nov 30-Dec 4, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

今中常雄. ペルオキシソームの形成・機能と遺伝病: ABC トランスポーターを中心に(日本薬学会学術貢献賞講演). 日本薬学会第 136 年会. 2016 Mar 26-29, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

今中常雄. ABC タンパク質サブファミリー-D: 基質輸送・局在化メカニズムと先天代謝異常症(招待講演). 日本薬学会北陸支部第 127 回例会. 2015 Nov 15, 富山大学杉谷キャンパス講義棟(富山県富山市).

今中常雄. ABC トランスポーターサブファミリー-D 研究の新展開: ABCD1 の基質輸送機構と ABCD4 のリソソームへの局在化機構(招待講演). 第 36 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム. 2014 Nov 20-1, 徳島大学大塚講堂・藤井節郎記念ホール(徳島県徳島市).

〔図書〕(計 2 件)

今中常雄他. 副腎白質ジストロフィー(ALD)診療ガイドライン 2017. 厚生労働省難治性疾患等政策研究事業ライソゾーム病(ファブリー病を含む)に関する調査研究班編. 東京: 診断と治療社; 2017. p. 1-46.

今中常雄他. ライソゾーム病・ペルオキシソーム病 診断の手引き. 厚生労働省難治性疾患等政策研究事業ライソゾーム病(ファブリー病を含む)に関する調査研究班編. 東京: 診断と治療社; 2015. p. 1-73.

〔その他〕

ホームページ等

www.pha.u-toyama.ac.jp/cellbiol/index-j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今中 常雄 (IMANAKA, Tsuneo)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号: 50119559

(2) 研究分担者

川口 甲介 (KAWAGUCHI, Kosuke)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・

助教

研究者番号： 80624866