

平成17年度科学研究費補助金（学術創成研究費）研究進捗状況報告書

ふりがな		いなぎ のぶや			所属研究機関 ・部局・職	京都大学・医学研究科・教授
研究代表者 氏名		稲垣 暢也				
研究課題名	和文	新たな膜輸送機構の分子基盤				
	英文	Molecular Basis of Novel Membrane Transport Mechanism				
研究経費 (直接経費) 18年度以降は内約額 単位:千円	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
	81,200	80,400	70,000	70,000	70,000	371,600
研究組織 (研究代表者及び研究分担者)						
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担 (研究実施計画に対する分担事項)			
稲垣 暢也	京都大学・大学院医学研究科 ・教授	分子細胞生理学	研究の立案・総括、抗体の作成、細胞内局在化機構の解明			
坂 信広	秋田大学・医学部・助手	分子細胞生物学・ 発生工学	遺伝子欠損マウスの作成、基質の同定、基質動態の解析			
山田 勝也	弘前大学・医学部・助教授	生理学	遺伝子欠損マウスの形態、機能、病態解析			
長嶋 一昭	京都大学・大学院医学研究科 ・助手	電気生理学	蛋白質機能の電気生理学的解析			
植田 和光	京都大学・大学院農学研究科 ・教授	生化学・分子生物学	蛋白質の大量調整・in vitro機能解析			
加藤 博章	京都大学・大学院薬学研究科 ・教授	構造生物学	蛋白質の結晶化・構造解析			
<p>当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。)</p> <p>ABC蛋白質はアミノ酸配列のよく保存された膜蛋白質で、ヒトではこれまでに約50種類の遺伝子が同定され、疾患との関連が明らかにされている遺伝子も少なくない。しかし、哺乳動物のABC蛋白質は未だに蛋白構造が不明であるだけでなく、ABC蛋白質の多くは未だに輸送する基質や機能が不明であり、病態との関連についても十分な理解がなされていない。従って、ABC蛋白質の構造、機能、生理的役割、病態における意義を明らかにすることは、膜輸送機構の解明だけでなく、さまざまなヒト疾患の原因の解明や、治療法の開発につながることから、ポストゲノム時代の重要な課題である。ABC蛋白質の機能は、研究分担者の植田らが単離したMDRに代表されるトランスポーターとしての機能と、CFTRに見られるイオンチャネルとしての機能がすでに知られていたが、研究代表者の稲垣はATP感受性カリウムチャネルの構造を世界に先駆けて解明し、ABC蛋白質であるスルホニル尿素受容体 (SUR) がイオンチャネルのレギュレーターとしての第3の機能を有することを明らかにした。最近では、脂質膜輸送という第4の機能を担う可能性が出てきた。本研究では、特にABC蛋白質のなかでも第3の機能 (レギュレーター) と第4の機能 (脂質膜輸送) に焦点を絞り、未だにその機能に関して不明な点が多いSUR (SUR1, SUR2A, SUR2B) とABCAサブファミリー (ABCA1, ABCA2, ABCA3, ABCA7, ABCA17) を中心に、構造、機能、生理的役割、病態における意義を網羅的に解析することにより、共通点と特異性を探り、新たな膜輸送機構の分子基盤を明らかにすることを目的とする。</p>						

これまでの研究経過

本研究は、学術創成研究費の趣旨の3つの観点のうち、どの観点到に主眼を置いて研究を行っているかについてお書きください。

本研究の研究分担者である植田はMDR1を初めて単離し、また研究代表者である稲垣はSURのレギュレーターとしての機能を初めて明らかにするなど、これまでに我が国のチャンネルとトランスポーターの研究領域において独創的な研究を行ってきた。本研究により膜輸送に関する新たな概念がさらに構築される可能性が高いが、この分野は欧米との競争も激しく、我が国が欧米の後塵を排することの無いよう、蛋白質の構造解析に精通した加藤をメンバーに加え「国際的に対応を強く要請される研究」という観点到に主眼を置いて研究を行っている。

研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、研究組織内の連携状況を含め、具体的に記入してください。

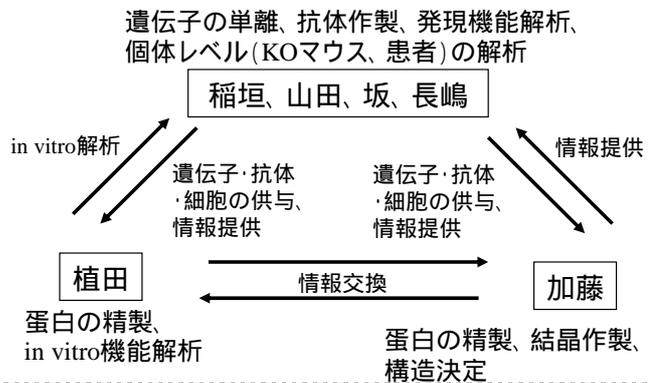
In vitro機能解析 バキュロウイルス-昆虫細胞培養系を用いて、MDR1ならびにATP感受性カリウムチャンネルを構成するSUR1とKir6.2の融合蛋白質の大量発現系を確立した。さらに、宿主としてSf+細胞を用いた無血清液体培養にも成功した。この系により、1リットル当たり数ミリグラムのMDR1精製蛋白質を得ることが可能になった。得られた精製蛋白質は、リボソームへ再構成することにより、物質輸送に依存したATP加水分解反応活性を測定することが可能になった。また、MDR1のATP加水分解活性を従来の方法の約20倍感度が高いマイクロアッセイ系を確立し、少量のサンプルで測定を可能にした。最近、精製MDR1を人工リボソームに埋め込むことによって、MDR1がコレステロールと輸送基質を協調的に結合することを明らかにした。ペルオキシソームにおける極長鎖脂肪酸輸送に関わるPMP70がPex19と複合体を形成することから、無細胞合成によるPMP70・Pex19複合体の調製を試みた結果、Pex19がリボソームで合成された直後のPMP70とのみ複合体を形成することを見出した。

構造解析 大量調製したMDR1の結晶化条件を探索した結果、精製の溶媒条件を検討することにより、ゲルろ過クロマトグラフィーにて、単一かつ凝集した蛋白質を含まない標品の精製が可能になった。また、部位特異的変異導入蛋白質の精製も可能となり、現在その結晶化能を比較するために、動的光散乱を用いた性状把握を検討中である。さらに、精製したMDR1蛋白質の構造を認識する候補モノクローナル抗体を見いだした。

細胞・固体レベルでの解析 PDZドメインを有する1-syntrophinがABCA1のC末端と相互作用することによりABCA1の分解を抑制し、ABCA1の半減期を約5倍長くすることを明らかにした。ABCA2に関しては、ラット脳においてミエリン形成に一致してABCA2陽性オリゴデンドロサイトが出現することを明らかにした。ABCA3に関しては、肺胞II型細胞のラメラ体限界膜に存在すること、ラット胎児肺における発現が出生直前に急速に増加しグルココルチコイド投与によって誘導されること、安定発現哺乳動物細胞株を樹立すると細胞内にラメラ体様の構造体が発現すること、ABCA3がATP加水分解活性を有し、膜画分をmethyl-cyclodextrin等で前処置するとATP加水分解活性が低下することなどを明らかにし、ABCA3が脂質を主成分とするサーファクタント分泌に関与している可能性を示した。これらのデータを基に、2004年にDeanらはABCA3遺伝子異常によってサーファクタント欠損症が発症することを報告した。最近我々はサーファクタント欠損患者に認められる遺伝子変異により、ABCA3の細胞内ソーティングの障害、あるいはATP加水分解活性の低下が認められることを明らかにした。ABCA7に関してはホスファチジルコリンとコレステロールの輸送に関与することを明らかにした。新規単離したABCA17に関しては、精子特異的に発現し、安定発現哺乳動物細胞において細胞内コレステロールや脂肪酸エステル、中性脂肪が低下することを明らかにし、精子受精能獲得に必要なcapacitationに関与する可能性が示唆された。

ノックアウトマウスを用いた解析 SUR1/Kir6.2チャンネル欠損マウスではあえぎ呼吸が起こりにくいこと、SUR2B/Kir6.1チャンネル欠損マウスでは脳における刺激・血流連関が障害されることを見出し、現在そのメカニズムを解析中である。ABCA3欠損マウスはすでにキメラマウスが誕生しており、間もなくヘテロ欠損マウスが得られる予定である。また、ABCA17欠損マウスに関しては、ターゲティングベクターを作成済みである。

ヒトにおける解析 SUR1/Kir6.2異常による新生児糖尿病を日本人で初めて報告した。また、ABCA3遺伝子異常によるサーファクタント欠損患者について、日本人患者だけでなく、欧米人患者についても共同で解析中である。



その他 特になし

特記事項

〔これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入するとともに、推薦者の期待がどの程度達成されつつあるかについて記入してください。〕

1. バキュロウイルス・昆虫細胞培養系を用いて、MDR1(ABCB1)蛋白質の大量発現系を確立した。その際、宿主としてSf+細胞を用いる無血清液体培養を行なうことにより、1リットル当たり数ミリグラムのMDR1精製蛋白質を得ることを達成した。これまで、真核生物由来の膜貫通型蛋白質を遺伝子発現させて調製し、X線結晶構造解析した例は皆無である。これは、翻訳後修飾などが複雑な真核生物の蛋白質の発現に適した系が確立されていなかったことに起因する。Sf+を用いた我々の方法は、簡便にヒトや動物由来の膜蛋白質の大量調製を行い、広範な結晶化条件を探索する優れた方法となることが期待される。
2. MDR1のATP加水分解活性を従来の方法の約20倍感度が高いマイクロアッセイ系を確立し、少量のサンプルで測定を可能にした。この方法ではATP加水分解活性が輸送基質にほぼ完全に依存したため、薬剤が活性に与える影響をより詳細に検討することが可能になると期待できる。
3. 精製MDR1を人工リポソームに埋め込むことによって、MDR1がコレステロールと輸送基質を協調的に結合していることを明らかにした(未発表)。この結果は、MDR1の基質輸送メカニズムの解明につながると共にABC蛋白質の進化を考える上でも重要である。
4. ABCA1と相互作用する細胞内分子を同定し、ABCA1の翻訳後制御、細胞内動態を明らかにした。
5. ABCG1がスフィンゴミエリンを選択的に輸送することを明らかにした(未発表)。コレステロールやホスファチジルコリンを細胞外に輸送するためにはアポA-Iが必要であるが、ABCA1の場合にはこのようなアクセプターは必要でない。スフィンゴ脂質やコレステロールの細胞内動態、恒常性維持の新規機構の解明につながる可能性がある。
6. ABCA3の組織発現、細胞内局在、発現調節機構、活性調節機構などを明らかにし、ABCA3が肺サーファクタントの分泌に関与している可能性を提唱した。我々の提唱に基づき、DeanらのグループはABCA3遺伝子異常によるサーファクタント欠損症を報告し(N. Engl. J. Med. 350: 1296, 2004)、ABCA3がサーファクタント分泌に極めて重要な役割を果たしていることが明らかになった。我々はすでにこれらの遺伝子異常により、細胞内のABCA3のソーティングが障害されるか、あるいはATP加水分解活性が低下することを見出している(未発表)。また、我々の作製した抗体のみがヒトABCA3を特異的に認識することから、我が国のみならず米国や欧州のグループと共同でサーファクタント欠損患者の肺組織の免疫組織化学的研究を行っている。さらに、間もなくABCA3欠損マウスが作製される予定であり、欠損マウスを用いることにより、これまで全く不明であった脂質を主成分とするサーファクタントの分泌機構が明らかになるものと期待される。
7. これまでに神経活動が活性化された大脳皮質領域において脳血流が増加することは知られていたが、その機序に関しては全く不明であった。SUR2B/Kir6.2チャンネル欠損マウスの脳において神経刺激・血流連関が障害されることが明らかになったことから(未発表)、今後大脳皮質における神経刺激・血流連関のメカニズムが明らかになる可能性がある。
8. SUR1/Kir6.2チャンネルのloss of function mutationにより低血糖症が発症することはすでに研究代表者を含め多くのグループがこれまでに報告しているが、2004年になり、activating mutationによる糖尿病の発症がGloynらにより報告された(New Engl. J. Med. 350: 1838, 2004)。我々はSUR1/Kir6.2チャンネル異常による新生児糖尿病の症例を日本人患者で初めて報告し、そのメカニズムについて明らかにした。

以上、これまでの2年間に、概ね順調に研究が進行し、新たな知見が得られた。今後、結晶解析やノックアウトマウスを用いた解析などで新たな膜輸送機構に関するインパクトのある成果が得られるものと期待される。

研究成果の発表状況

(この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文（掲載が確定しているものを含む。）の全著者名、論文名、学協会誌名、巻（号）最初と最後のページ、発表年（西暦）及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。)

1. Yorifuji, T., Nagashima, K., Kurokawa, K., Mamada, M., Kawai, M., Oishi, M., Akazawa, Y., Hosokawa, M., Yamada, Y., Inagaki, N., and Nakahata, T. The C42R mutation in the Kir6.2 (KCNJ11) gene as a cause of transient neonatal diabetes, childhood diabetes, or later-onset, apparently type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocr. Metab.* in press.
2. Ban, N., Sasaki, M., Sakai, H., Ueda, K., and Inagaki, N. Cloning of ABCA17, a novel, rodent sperm-specific ATP-binding cassette (ABC) transporter that regulates intracellular lipid metabolism. *Biochem. J.* 389:577-585,2005.
3. Wang, Y., Yamada, K., Tanaka, Y., Ishikawa, K., and Inagaki, N. Expression of ABCA2 protein in human vestibular schwannoma and peripheral nerve. *J. Neurol. Sci.* 232: 59-63, 2005
4. 寺角香菜子、小段篤史、佐藤友美、柴田洋之、植田和光、加藤博章 昆虫細胞Sf+を用いたヒトP糖タンパク質の大量精製 日本薬学会第125年会（東京）2005年3月
5. Nagata, K., Yamamoto, A., Ban, N., Tamaka, A. R., Matsuo, M., Kioka, N., Inagaki, N., and Ueda, K. ABCA3, a product of a responsible gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324: 262-268, 2004
6. Yoshida, I., Ban, N., and Inagaki, N. Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoid in lung alveolar type II cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323: 547-555, 2004
7. Wulf, G. G., Modlich, S., Inagaki, N., Reinhardt, D., Schroers, R., Griesinger, F., and Trümper, L. ABC transporter ABCA3 is expressed in acute myeloid leukemia blast cells and participates in vesicular transport. *Haematologica* 89: 1395-1397, 2004
8. Munehira, Y., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Furuya, A., Shitara, K., Imamura, M., Yokota, T., Takeda, S.i., Amachi, T., Matsuo, M., Kioka, N. and Ueda, K. α 1-syntrophin modulates turnover of ABCA1. *J. Biol. Chem.* 279: 15091-15095, 2004
9. Kimura, Y., Shibasaki, S., Morisato, K., Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Matsuo, M., Amachi, T., Ueda, M. and Ueda, K. Microanalysis for MDR1 ATPase by high-performance liquid chromatography with a titanium dioxide column. *Anal. Biochem.* 326: 262-266, 2004
10. Kimura, Y., Matsuo, M., Takahashi, K., Saeki, T., Kioka, N., Amachi, T., and Ueda, K. ATP hydrolysis-dependent multidrug efflux transporter, MDR1/P-glycoprotein. *Current Drug Metabolism* 5: 1-10, 2004
11. Shibata, H., Kashiwayama, Y., Imanaka, T., and Kato, H. Domain architecture and activity of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins., *J. Biol. Chem.* 79: 38486-38494, 2004
12. Tanaka, Y., Yamada, K., Zhou, C.-J., Ban, N., Shioda, S., and Inagaki, N. Temporal and spatial profiles of ABCA2-expressing oligodendrocytes in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* 455: 353-367, 2003
13. Ikeda, Y., Abe-Dohmae, S., Munehira, Y., Aoki, R., Kawamoto, S., Furuya, A., Shitara, K., Amachi, T., Kioka, N., Matsuo, M., Yokoyama, S., and Ueda, K. Post-transcriptional regulation of human ABCA7 and its function for the apoA-I-dependent lipid release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311: 313-318, 2003
14. Tanaka, A. R., Abe-Dohmae, S., Ohnishi, T., Aoki, R., Morinaga, G., Okuhira, K. I., Ikeda, Y., Kano, F., Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T., Murata, M., Yokoyama, S., and Ueda, K. Effects of mutations of ABCA1 in the first extracellular domain on subcellular trafficking and ATP binding/hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 278: 8815-8819, 2003