

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔事後評価用〕

平成15年度採択分

平成20年 3月31日現在

研究課題名（和文）新たな膜輸送機構の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular Basis of Novel Membrane Transport Mechanism

研究代表者

稲垣 暢也（INAGAKI NOBUYA）

京都大学・医学研究科・教授



研究の概要：本研究では ABC 蛋白質の機能、生理的役割、病態における意義を解析することにより、ABC 蛋白質の機能について多くの新事実を明らかにし、特に脂質の膜輸送機構の分子基盤に関する理解を深めた。さらに、遺伝子欠損マウスやヒト疾患の病態を明らかにすることにより、その破綻による病態が明らかになった。

研究分野：学術創成研究費

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：チャネル・トランスポーター・能動輸送

1. 研究開始当初の背景

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、そ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、新たな膜輸送機構の解明だけでなく、ヒト疾患の原因の解明や、治療法の開発につながる。ABC 蛋白質の機能は、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に加えて、研究代表者は ATP 感受性カリウム (K_{ATP}) 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。

2. 研究の目的

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 と A サブファミリーを中心に、構造、機能、生理的役割、病態における意義を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。

3. 研究の方法

ABC 蛋白質遺伝子の単離、発現ベクターの作成、特異的抗体を作成する。これらを用いて、蛋白質

の大量発現・精製を行い、*in vitro* 機能解析、結晶化とその X 線解析や極低温電子顕微鏡を用いた単粒子立体構造解析を行う。さらに、これらの ABC 蛋白質遺伝子欠損 (KO) マウスを作成し、その機能や病態における役割を明らかにする。

4. 研究の主な成果

1) ABCA3 の機能と病態における役割の解明
ABCA3 の組織発現、細胞内局在、発現調節機構を明らかにし、ABCA3 が脂質を主成分とするサファクト分泌に関与している可能性を提唱した。また、ヒト致死性のサファクト欠損症に見られる遺伝子変異について機能解析を行った。さらに ABCA3 遺伝子 KO マウスの肺間質由来の脂質の網羅的解析により、ABCA3 が生体内で側鎖にパルミチ酸を有するホスファジリコリンやホスファジリグリセロールの膜輸送に関与し、サファクト代謝やラリ体の形態形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

2) ABCA2 の機能と病態における役割の解明
ABCA2 がオリゴデントロサイトやシュワン細胞に発現し、ミエリン形成に一致して発現が急速に増大することを明らかにした。ABCA2 遺伝子 KO マウスを作成し、KO マウスは神経学的異常を呈するが、細胞やミエリンの構造に異常は認められず、脳の脂質解析により、KO マウスでは野生型マウスと比べてスフィンゴミエリンの減少とガンガラクト GM1 の増加が認められ、ABCA2 がスフィンゴ脂質の代謝に関与している可能性が示唆された。

3) ABCA1 の基質認識機構の解明
HDL 新生をになうヒト ABCA1 を精製し、活性を世界で初めて生化学的に明らかにした。精製 ABCA1 を人工ボソームに再構成した結果、ABCA1 は脂肪酸鎖にレイン酸とパルミチ酸をもつホスファジリコリンを含むリポ

[4. 研究の主な成果 (続き)]

ソームに再構成したときに最も強く ATP 加水分解活性が誘導された。この結果は、ABCA1 によって細胞外へ排出される脂質の質量分析による分析と一致し、ABCA1 がレシチン酸とパルミチン酸をもつホスファチジルコリンを最適な基質として認識し輸送することが明らかになった。さらに、ABCA1 を介した apoA-I へのリン脂質とコレステロールの排出量は細胞膜中のスフィンゴミエリン量と反比例することが明らかになった。

4) ABCG1 の機能解析

ABCG1 がホモ 2 量体として細胞膜に発現すること、ABCG1 は培地中に apoA-I を加えた時でなく、HDL を加えた時にリン脂質とコレステロールを効率よく排出することを明らかにした。さらに培地中に排出された脂質の分子種を質量分析によって解析した結果、ABCA1 がホスファチジルコリンを主に輸送するのに対して、ABCG1 がスフィンゴミエリンを輸送し、両者が協調して HDL 形成に関わっていることが明らかとなった。

5) MDR1 の基質認識におけるコレステロールの影響

MDR1 の大量発現・精製系を確立し、MDR1 の ATPase 活性を従来の約 20 倍の高感度で測定するマイクロアッセイ系を確立した。本方法を用いて、MDR1 の基質認識に与えるコレステロールの影響を解析した。その結果、コレステロールは MDR1 が分子量 500 以下の小さな化合物を認識する場合、輸送基質と同時に基質結合部位に結合し、余剰の空間を充填することでより効率よく基質認識を可能にするというモデルを提唱した。

6) レギュレーター型 SUR の機能と病態における役割

スルホニル尿素受容体 (SUR) と複合体を形成するイオンチャネル Kir6.2 遺伝子の KO マウスを低酸素環境に暴露時の呼吸解析により、Kir6.2 含有チャネルは低酸素により誘発される呼吸応答のうち、徐呼吸ならびにあえぎ呼吸の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、Kir6.1 遺伝子 KO マウスの大脳皮質体性感覚野において、神経活動と局所脳血流変化を同時記録し、KO マウスでは短時間刺激時には野生型と異なり脳血流が増加しないことを明らかにした。現在そのメカニズムについて解析中である。

7) ABC 蛋白質の構造解析

結晶解析に必要な数十 mg レベルのヒト MDR1 蛋白質を、昆虫細胞 SF+ を用いて高純度に精製する系を確立した。さらに、GFP と融合させた ABC 蛋白質遺伝子を適切な宿主を用いて少量発現させて、未精製の ABC 蛋白質の結晶化能を判定する系を確立した。その結果、18 種類の好熱菌と 19 種類のヒトを含む真核生物から結晶化に適した ABC 蛋白質のスクリーニングを行い、3 種類について結晶化に成功した。さらに、 K_{ATP} チャネルすなわち SUR1-Kir6.2 複合体の大量に発現・精製系を確立し、得られた高純度試料を用いて初代染色による複合体像を捉えることができた。現在、極低温電子顕微鏡を用いた画像データ収集して、単粒子解析による高分解能での解析を実行中である。

5. 得られた成果の世界・日本における位置づけとインパクト

得られた成果は以下の点で世界をリードしている。

- 1) 肺サーファクタントの分泌メカニズムが明らかになると同時に、ABCA3 遺伝子 KO マウスのメタボーム解析などにより ABCA3 の基質となる脂質を絞り込むことが可能になった。この研究は、ABC 蛋白質が脂質膜輸送に関与するという概念を普遍化させ、また基質となる脂質を決定する新しい手法の先駆けとなりうる。
- 2) コレステロール恒常性維持に関わるヒト ABCA1 の精製に世界で始めて成功し、*in vitro* で活性測定することができた。さらに HDL 形成における ABCA1 と ABCG1 の作用の違いを明確に示すことに成功した。
- 3) 多剤排出ポンプ MDR1 による基質認識機構について検討し、ABC 蛋白質による基質認識機構として「コレステロール-Fill-in モデル」を提唱した。
- 4) 結晶化に適した ABC 蛋白質を迅速スクリーニングする手法を確立し、2 年間で 3 種類の ABC 蛋白質から X 線回折像を与える結晶を得た。さらに、 K_{ATP} チャネルを構成する SUR1-Kir6.2 の 8 量体を精製し、超低温電子顕微鏡を用いた構造解析を可能にした。

6. 主な発表論文

- 1) Sakai, H., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ban, N., Yamada, K., Matsumura, Y., Kita, T., and Inagaki, N. ABCA2 deficiency causes abnormal sphingolipid metabolism in mouse brain. *J. Biol. Chem.* 282: 19692-19699, 2007.
- 2) Ban, N., Matsumura, Y., Sakai, H., Takanezawa, Y., Sasaki, M., Arai, H., and Inagaki, N. ABCA3 as a lipid transporter in pulmonary surfactant biogenesis. *J. Biol. Chem.* 282: 9628-9634, 2007.
- 3) Nagao, K., Takahashi, K., Hanada, K., Kioka, N., Matsuo, M., and Ueda, K. Enhanced apoA-I-dependent cholesterol efflux by ABCA1 from sphingomyelin-deficient CHO cells. *J. Biol. Chem.* 282: 14868-14874, 2007.
- 4) Kimura, Y., Kioka, N., Kato, H., Matsuo, M., and Ueda, K. Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol. *Biochem. J.* 401: 597-605, 2007.
- 5) Matsumura, Y., Ban, N., Ueda, K., and Inagaki, N. Characterization and classification of ATP-binding cassette transporter ABCA3 mutants in fatal surfactant deficiency. *J. Biol. Chem.* 281: 34503-34514, 2006.
- 6) Takahashi, K., Kimura, Y., Kioka, N., Matsuo, M. and Ueda, K. Purification and ATPase Activity of Human ABCA1. *J. Biol. Chem.* 281: 10760-10768, 2006.
- 7) Nakatsu, T., Ichiyama, S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobashi, N., Sakata, K., and Kato, H. Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence. *Nature* 440: 372-376, 2006.

ホームページ等

<http://metab.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>