

## 脂質輸送型 ABC 蛋白質の謎に迫る

### Uncovering the secrets of lipid-transporting ABC proteins

課題番号：18H05269

植田 和光 (UEDA, KAZUMITSU)

京都大学・高等研究院・特定教授



#### 研究の概要（4行以内）

ABC 蛋白質は ATP 依存的な能動輸送体で、生体の脂質恒常性維持に重要である。本研究では、未解明のまま残されている脂質輸送型 ABC 蛋白質の謎を、動脈硬化症と関連する ABC 蛋白質を中心に、生化学、細胞生物学、構造生物学、個体研究など多方面の解析により統合的に理解し、コレステロールが持つ生理的意義を脂質輸送体の観点から根本的に捉えなおす。

研究分野：農芸化学およびその関連分野（応用生物化学）

キーワード：ABC 蛋白質、コレステロール、トランスポーター、動脈硬化症

#### 1. 研究開始当初の背景

コレステロールは細胞膜の主要成分であり、生体に必須の栄養素である。一方、コレステロール恒常性の破綻は、動脈硬化症の発症など重篤な疾患と関連する。また、哺乳類の細胞膜は内層と外層に脂質が非対称に分布する。脂質輸送型の ABC 蛋白質はこうした脂質の恒常性維持や細胞膜の非対称性に関与すると考えられているが、その生理機能には多くの謎が残されている。

#### 2. 研究の目的

ABCA1 の生理的役割は HDL（いわゆる善玉コレステロール）を産生し動脈硬化を防ぐことだと考えられてきた。しかし、最近代表者らは、ABCA1 はコレステロールを細胞膜脂質二重層間に非対称的に維持していることを明らかにした (*Nat Chem Biol* 2017)。ABCA1 の生理的役割はこれまで信じられてきた役割とは大きく異なる可能性がある。本研究は、脂質輸送型 ABC 蛋白質の真の生理的役割を、ABCA1 を中心に解明する。

#### 3. 研究の方法

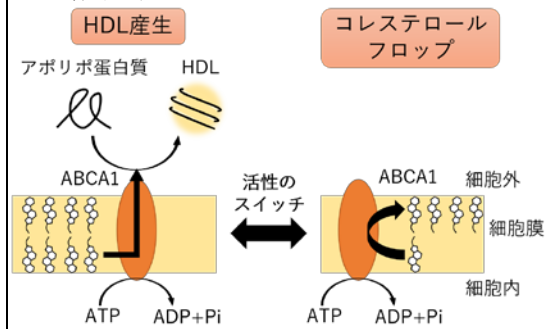
脂質輸送型 ABC 蛋白質の生理的役割と作用機作を細胞生物学解析、生化学解析、クライオ電顕、高速 AFM、1 分子解析、個体解析など様々な切り口で研究し、脂質輸送型 ABC 蛋白質の真の生理的役割を、ABCA1 を中心に解明する。

#### 4. これまでの成果

・細胞膜コレステロール非対称性の検出：哺乳類細胞の細胞膜では、リン脂質だけでなくコレステロールも二重層間で非対称的に分

布することを確かめるため、コレステロール依存性細菌毒素 SLO を用いたコレステロール非対称性の新規検出法を開発した。その方法を用いて、ABCA1 および ABCG1 が細胞膜コレステロールの非対称性を実際に維持していることを明らかにした (*Sci Rep* 2019)。

・ABCA1 の HDL 産生活性とコレステロールフロップ活性のスイッチ：これまで、ABCA1 は血中のアポリポ蛋白質にコレステロールを排出し、HDL を産生する膜蛋白質として知られてきた。この HDL 産生活性とコレステロールフロップ活性がどのように制御されているかを調べるため、さまざまな ABCA1 変異体を用いて二つの活性を解析した。その結果、HDL 産生活性を維持しつつコレステロールフロップ活性を失った ABCA1 変異体を複数得た。それら変異体の解析から、ABCA1 の HDL 産生活性とコレステロールフロップ活性は別々に制御されており、C 末端領域に二つの活性のスイッチが存在することを明らかにした (*Biosci*



*Biotechnol Biochem.* 2020)。

・細胞膜コレステロール濃度に依存した ABCA1 による HDL 産生速度の調節：ABC 蛋白質では輸送基質濃度依存的に輸送活性が上昇する。そこで、細胞膜コレステロール濃度を変化させた際の ABCA1 の活性の変化を解析した。その結果、ABCA1 による HDL 産生速度は細胞膜コレステロール濃度に依存して上昇することが明らかになった。この結果は、コレステロールが ABCA1 の輸送基質であることを初めて報告するものである (投稿準備中)。

・新規細胞内コレステロール濃度維持機構：細胞内において、コレステロールはさまざまな分子によって輸送され、不均一に分布している。しかし、コレステロールの細胞内動態には多くの謎が残されており、どのようにしてその不均一性が保たれているかはまったくわかっていなかった。本研究では、コレステロールの細胞内動態を検討した結果、細胞膜内層のコレステロール濃度を、ABCA1 と協調して低く抑えている分子を発見した。それによって、全く新しい細胞内コレステロール濃度の維持機構を提出する準備が整った。

・細胞膜コレステロール非対称性の変化が細胞に及ぼす影響：細胞膜はシグナル伝達の重要な足場であり、コレステロールとシグナル伝達は密接な関係にある。そこで、細胞の基本的な機能に細胞膜コレステロール非対称性の変化が与える影響を解析した。その結果、ABCA1 によるコレステロールフロップが細胞遊走を調節することを明らかにした (*Biosci Biotechnol Biochem.* 2019i)。また、細胞接着において ABCA1 がフィロポディア先端に局在すること、フィロポディア形成には細胞膜内層のコレステロールを低く抑える必要があることを明らかにした (*FASEB J.* 2020)。

・メダカを用いた ABC 蛋白質の生理的役割の解明：ゲノム編集や繁殖が容易であるメダカは優秀な脊椎動物のモデル動物である。本研究では、メダカを用いて生体レベルでの ABC 蛋白質の生理的な役割を解析している。これまでに、メダカ ABCA1 遺伝子をクローニングし、ヒト ABCA1 と同様な活性をもつことを確認した。また、ABCA1 ノックアウト個体の作製に成功し、現在その表現型を解析中である。

・ABC 蛋白質の作用メカニズムの解明：光標識化アポ A-I を用いて HDL 産生時にアポ A-I が ABCA1 と直接相互作用することを明らかにした (*Biosci Biotechnol Biochem.* 2019k)。さらに、ABC 蛋白質の詳細な構造を明らかにすることによって、排出型 ABC 蛋白質とフロップ型 ABC 蛋白質の違いを明らかにした (*Nat Commun.* 2019)。また、ABC 蛋白質の

構造変化における ATP 結合と加水分解の役割を解明した (*J Biol Chem.* 2020)。高速 AFM を用いた ABCA1 の構造変化の可視化が現在進行している。

## 5. 今後の計画

ABCA1 は HDL 産生活性とコレステロールフロップ活性の二つの活性をスイッチすることによって細胞膜コレステロール非対称性を調節している。今後は、ABCA1 の二つの活性のスイッチ機構と調節メカニズムを高速 AFM およびクライオ電顕を用いて分子レベルで解明していくとともに、細胞内コレステロール濃度の維持機構など、細胞膜コレステロール非対称性の維持の生理的意義を解明し、細胞レベルにおける ABC 蛋白質の役割をより一層明らかにしていく。さらに、メダカを用いた ABC 蛋白質の機能解析を進め、生体レベルにおける ABC 蛋白質の生理的役割の解明を目指す。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Kishimoto, T. (5 人), Ueda, K., Kobayashi, T. Cholesterol asymmetry at the tip of filopodia during cell adhesion. *FASEB J.* in press (2020)
2. Futamata, R., Ogasawara, F. (3 人) Kimura, Y., Ueda, K. In vivo FRET analyses reveal a role of ATP hydrolysis-associated conformational changes in human P-glycoprotein. *J Biol Chem.* in press. (2020)
3. Okamoto, Y. (4 人) Kimura, Y., Ueda, K. C-terminal of ABCA1 separately regulates cholesterol floppase activity and cholesterol efflux activity. *Biosci Biotechnol Biochem.* 84(4):764-773 (2020)
4. Ogasawara, F. (3 人) Kimura, Y., Ueda, K. Changes in the asymmetric distribution of cholesterol in the plasma membrane influence streptolysin O pore formation. *Sci. Rep.* 9(1):4548 (2019)
5. Kodan, A., Yamaguchi, T., Nakatsu, T., Matsuoka, K., Kimura, Y., Ueda, K., Kato H. Inward- and outward-facing X-ray crystal structures of homodimeric P-glycoprotein CmABCB1. *Nat Commun.* 10(1):88 (2019)
6. Kawanobe, T. (2 人) Kimura, Y., Ueda, K. Apolipoprotein A-I directly interacts with extracellular domain 1 of human ABCA1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 83(3):490-497 (2019k)
7. Ito, S., Kioka, N., Ueda, K. Cell migration is negatively modulated by ABCA1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 83(3):463-471 (2019i)

## 7. ホームページ等

<http://www.biochemistry.kais.kyoto-u.ac.jp/>