

塞栓症も認めなかった。ヘパリン無投与では、人工肺の縦糸に沿って、血栓の形成を認めたが (Figure 5A)、導入時のみヘパリン投与すれば、血栓形成は認めなかった (Figure 5B)。また、ヘパリン無投与例の実験より、ヘパリンの溶出は検出限界以下であることが確認され (Figure 6A)、ACT、APTT の延長も認めなかった (Figure 6B)。

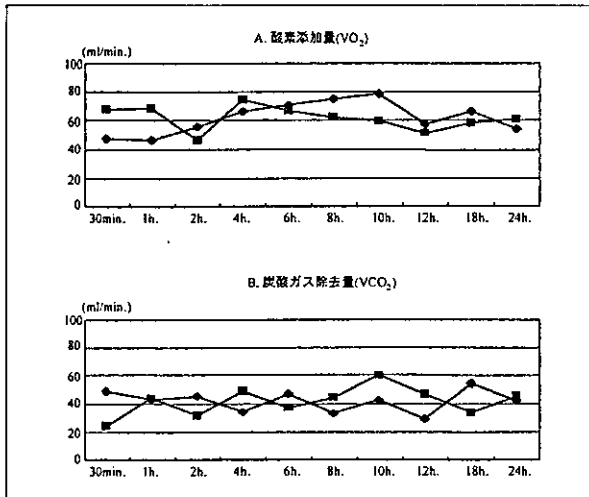


Figure 4

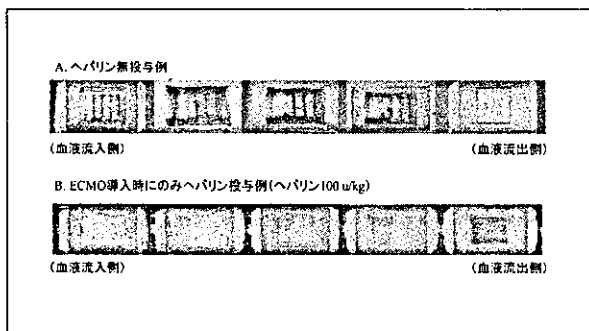


Figure 5 24時間灌流後人工肺

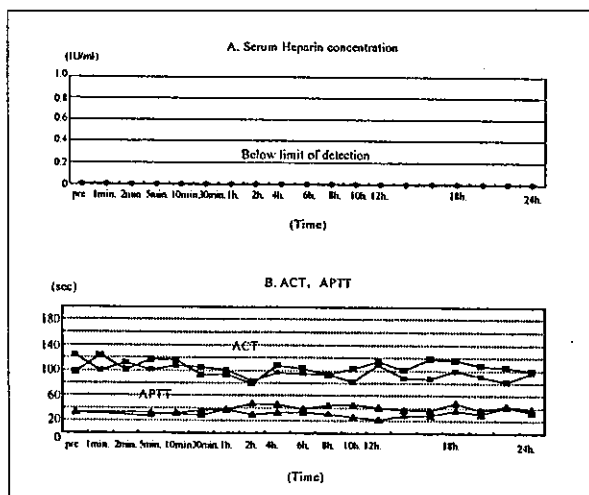


Figure 6

【考察】

小型、低充填量で、高いガス交換性能、抗血栓性をもつT-NCVC coating処理を行った小児用人工肺 (Platinum Cube NCVC 2000) を開発した。この人工肺と、T-NCVC coating 処理を行った、遠心ポンプ、回路、送脱血管を組み合わせた小児用ECMOシステムでは、ヘパリン溶出などの危険性が無く、抗血栓性にも優れ、高いガス交換性能も維持できた。

小児用ECMO適応症例に関して、出血は、ヘパリンを使用する限り長期灌流では容易に発生する最大の合併症である。近年、ヘパリンに変わる抗凝固剤を使用することにより、比較的安全に行うことが可能となってきてはいるものの、まだ、十分ではない。さらに、長期使用に伴い、人工肺の性能低下、血漿リークなどにより、回路交換を余儀なくされ、循環血液量の少ない小児においては、回路交換は大きな侵襲となる。

我々が、東洋紡績株式会社との共同研究により開発した、新しい血液適合化表面処理技術 TOYOBO-NCVC(T-NCVC)コーティングは、イオン結合によるヘパリン固定を基本としながらヘパリン徐放を制御することにより長期耐久性を獲得した、極めて抗血栓性に優れたコーティングであり⁴⁾、このコーティング技術と、特殊ポリオレフィン中空糸を用いて大日本インキ株式会社と共同で開発した、膜型人工肺 (Platinum-Cube NCVC) は、すでに、臨床応用しており、その優れた抗血栓性、抗凝血療法をいわずに使用することも報告している。また、このコーティングを行ったECMO回路では、動物実験ではありますが、2ヶ月以上、抗凝血療法を全く行わずに、良好に維持できることも報告している⁵⁾。

今回開発した、小児用人工肺、ECMO システムは、それらの利点を活かし、小児ECMO 適応症例に対して、合併症を減少させ、救命率を改善させる可能性を有していると考えられる。

【結語】

小型、低充填量で良好なガス交換能を持つ人工肺 (Platinum-Cube NCVC2000) と抗血栓性に優れ、ヘパリンの溶出もない T-NCVC コーティングの組み合わせで、新しい安全で有効な小児用 ECMO システムが出来る可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 久野克也, 岡田昌義: 新生児のECMO治療. 日本外科学会誌 98: 990-995, 1997
- 2) Bartlett RA, Gazzaniga AB, Jefferies MR, et al.: Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) cardiopulmonary support in infancy. Trans Am Soc Artif Inter Organs 22: 80-93, 1976
- 3) 高野久輝, 川島康生, 藤田 毅, 橋本聰一, 大西健二他: 膜型人工肺 (Lande Edwards型) の換気特性の検定. 人工臓器 4: 75-80, 1975
- 4) 佐藤正喜, 柏原 進, 田中秀典, 巽 英介, 妙中義之, 高野久輝: 新しく開発したヘパリン化材料の抗血栓性評価. 人工臓器 28: 502-508, 1999
- 5) Nishinaka T, Tatsumi E, Taenaka Y, et al.: At least thirty-four days of animal continuous perfusion by a newly developed extracorporeal membrane oxygenation system without systemic anticoagulation. Artif Organs 26:548-551, 2002

特集：リポネットワークによる脂質ホメオスタシス

序 「リポネットワーク」

植田和光, 稲垣暢也, 酒井寿郎

「リポネットワーク」とは

脂質は脂肪酸やステロールを前駆体とし水に不溶・難溶性な生体物質である。リン脂質やコレステロールは細胞膜を構成し、コレステロールはステロイドホルモン、脂溶性ビタミン、胆汁酸などの重要な前駆体として細胞の増殖と生存に必須である。また、ある種の脂質はさらにシグナル伝達物質として機能し、生体機能の重要な役割を担っている。しかし一方で、細胞内の過剰な脂質の蓄積は細胞へ重篤な機能障害を招く。現代人は、遺伝子の想定以上の脂質を摂取することによって脂質ホメオスタシス（恒常性）が破綻した結果、肥満、高脂血症、糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病に苦しめられるはめになってしまった。それゆえ、脂質の恒常性維持のメカニズムを理解し、健康な体を維持する方法を見いだすことは現代人にとって極めて重要な課題である。しかし、これまでに脂質代謝酵素についての知見は蓄積されてきたが、脂質恒常性維持のメカニズムに関して十分な理解が得られているとは言いがたい。

近年、脂質恒常性維持に関与する転写因子・核内受容体が明らかにされつつあり、それらが脂質代謝酵素だけでなく、細胞膜や分子集合体を介する脂質輸送（脂質トランスポート）や細胞内における脂質輸送（脂質トランスファー）を転写調節していることが次第に明らかになりつつある。それらの転写因子や核内受容体は細胞内の脂質濃度をセンサーしたり、それら脂質を直接リガンドとして応答し、それらの脂質の細胞内濃度や局在を規定する脂質トランスporterや脂質トランスファータンパク質、代謝酵素、さらには転写因子や核内受容体自身の遺伝子発現を制御する（図1）。それゆえ、脂質恒常性維持のメカニズムを理解するためには、転写因子・核内受容体、脂質トランスポート、脂質トランスファーそれぞれの個別のネットワークを理解するだけでなく、それらの重層的なネットワークを理解する必要がある。

本特集では、それらの重層的なネットワークを「リポネットワーク」と名付け、(1) 脂質恒常性の鍵を握る核内受

容体・転写因子、(2) 脂質輸送の鍵を握る脂質トランスporter、(3) 細胞内脂質動態の鍵を握る脂質トランスファータンパク質の三つの章に大まかに分けて、それぞれの分野の第一線で活躍されている研究者の方々にリポネットワークという観点から論じていただいた。まず序では、リポネットワークを概観してみたい。

(1) 脂質恒常性の鍵を握る核内受容体・転写因子

核内受容体は、レセプター型転写因子であり、リガンド結合領域とDNA結合領域を有し、リガンド化合物が直接結合することで活性が変化し標的遺伝子の転写を調節する感知機構の備わった転写因子である。ヒトにおいて48種類の存在が確認されている。これに対して、転写因子（たとえばSREBP）はシグナルを感知するセンサータンパク質を介して活性が調節される。いずれにせよ細胞内の脂質濃度の微妙な変化を感知し、脂質ホメオスタシスを制御する中心は核内受容体と転写因子である。生活習慣病の治療薬のターゲットとしても有力である。リガンドの不明な核内受容体はまだあり、それらの生理的役割がこれから明らかにされようとしている。核内受容体・転写因子はそれら自身でネットワークが形成されており、それらに組織特異的なコアクチベーターやコプレッサーが関与することによって、さらに複雑な制御系になっている。本特集では、その複雑な核内受容体・転写因子に関して、非常に明快な、そして今後の発展を期待させる総説を楽しんでいただけたらと思う。

(2) 脂質輸送の鍵を握る脂質トランスporter

動物は脂肪酸、リン脂質、コレステロールなどを体内で合成するだけでなく、毎日の食餌によって外界から摂取している。それゆえ、脂質はおもな代謝の場である肝臓からそれぞれの脂質が機能する組織への輸送とそれぞれの組織から肝臓への逆輸送、さらに小腸における外界からの吸収と排泄、肝臓から胆汁中への排泄、腎臓から尿中への排泄などが統合されたネットワークによって保たれている。ヒ

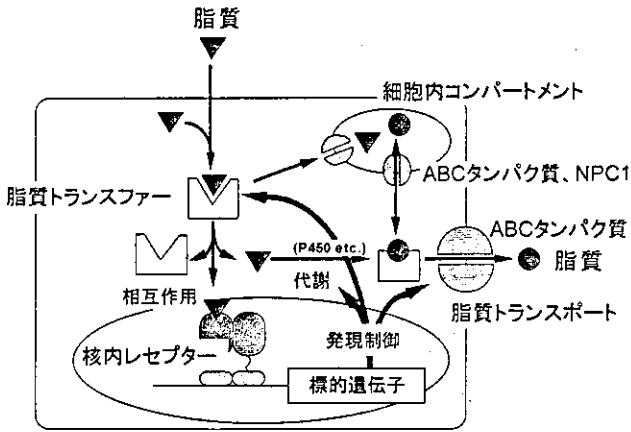


図1 脂質ホメオスタシスは、転写因子・核内受容体、脂質トランスポート、脂質トランスファーの重層的なネットワーク「リポネットワーク」によって調節されている。

トにおける核内受容体遺伝子の数が48であるのに呼応するかのよう、ヒトのABCタンパク質遺伝子の数は49である。核内受容体が発現制御するABCタンパク質が核内受容体のリガンドそのものを細胞から排出し細胞内濃度が低下すると、その核内受容体はfeedback調節を受けることになる。それ故、核内受容体の遺伝子の数とABCタンパク質遺伝子がほぼ同数染色体上に存在するのは因縁以上のものを感じてしまう。

また、ABCタンパク質はATP binding cassette proteinsの略であり、図2に示したようにMDR1やMRP1のようなフルサイズのものには二つのATP結合領域をもつ。また、ALDPやABCG1のようなハーフサイズのものには二量体を形成し機能する。つまり、一機能分子あたり二つのATP結合領域をもち、それらが協調してATPを加水分解することによって基質を輸送すると考えられる。ATPは生物が苦勞して手に入れた糖や脂質を燃やして作り出した基本エネルギーである。脂質の輸送を受け持っているのがABCタンパク質であるということは、脂質を膜から引き抜くという作業や濃縮するという作業が、輸送方向を確率的に決めるだけでなく真にエネルギーを必要とする仕事であり、2次能動輸送体では担うことができない仕事であろうと思われる。また、ATPを消費してでも行わ

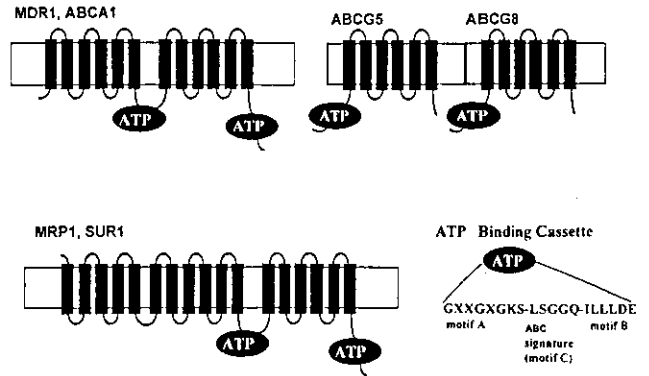


図2 哺乳類の代表的なABCタンパク質の予想2次構造

なければいけない重要な生理的な仕事と言えるかもしれない。本特集では、4人の著者がそれぞれの立場から脂質トランスポーターを論じている。一部重複するところがあるが、それだけにより理解しやすい内容になっていると期待している。

(3) 脂質トランスファーと脂質トランスポートのリポネットワーク

コレステロール、スフィンゴ脂質、リン脂質、脂溶性ビタミンなどの細胞内の脂溶性分子は、細胞内に均一に存在するのではなく、細胞内のさまざまなコンパートメントで合成・代謝をうけながら、それらが機能する場所へと移動する必要がある。さらに細胞膜上で部位特異的に濃縮、拡散あるいは局所的にマイクロドメインを形成することによって細胞増殖、細胞分裂、シグナル伝達に重要な役割を果たしている。しかし、そのような脂質の細胞内トランスファーの分子メカニズム、マイクロドメインの形成・維持機構はまだほとんどわかっていないといっても過言ではないと思われる。それだけに、近年の脂質トランスファータンパク質の研究の進展はすばらしく、それが日本で行われているのはうれしい限りである。

脂質トランスファータンパク質、ABCタンパク質、およびNPCがいかに協調的に機能して脂質の細胞内および体内の輸送に関わっているかは、今まさに進展しつつある分野である。そのような息吹を本特集から感じていただけたらと思う。

特集：リポネットワークによる脂質ホメオスタシス

脂質ホメオスタシスにかかわる ABC タンパク質

植田 和光

コレステロールは細胞膜の構成成分として必須であり、またホルモン、脂溶性ビタミンなどの前駆体として重要である。しかし、コレステロールの摂りすぎはさまざまな生活習慣病と関連することから、現代人にとって大問題である。最近、多くの ABC タンパク質がコレステロールやリン脂質などを内在性の基質として輸送することが示唆され、ABC タンパク質ファミリーが生体異物排出ポンプとしてだけでなく、脂質ホメオスタシスにとって重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。本稿では、ABCA1, ABCA7, ABCG5/ABCG8 を中心にそれらの脂質ホメオスタシスにおける役割を解説する。特に、ABCA1 に関しては、細胞内コレステロール動態との関連、相互作用タンパク質による翻訳後制御についても解説する。

1. はじめに

食物中のコレステロールは小腸から吸収され肝臓に輸送された後、低密度リポタンパク質 (LDL) の形で末梢細胞に輸送される。末梢組織ではコレステロールを異化できず、高密度リポタンパク質 (HDL) として肝臓へ逆輸送される。この経路が末梢細胞中に蓄積したコレステロールを減少させる唯一の経路であり、細胞内に蓄積した過剰なコレステロールが毒性を持ち細胞死を引き起こすことを考えると、HDL 新生は細胞にとって極めて重要な反応であると言える。また、血中 HDL 値と冠動脈疾患の発症率が負の相関関係を持つことが疫学的調査により明らかとなっており、全身のコレステロール恒常性維持にとっても重要である。

ABCA1 は 12 の膜貫通ドメインと二つのヌクレオチド結合領域を持つ ABC タンパク質であり、HDL の形成に必須な役割を果たす。ABCA1 遺伝子の変異によって家族性低 HDL 血症が引き起こされ、また ABCA1 のノックア

ウトマウスでは血中の HDL 量が激減する。ABCA1 遺伝子は細胞内のコレステロール濃度の上昇に応じてその代謝産物であるオキシステロールをリガンドとする転写因子 LXR により転写が活性化される。LXR は、ABCG1, ABCG5, ABCG8 の転写活性化に係わっており、これらの ABC タンパク質が ABCA1 と協調的に働くことによって体内のコレステロールホメオスタシスを保っていると考えられる。また、LXR はリポタンパク質間の脂質トランスファーに関わる CETP, PLTP の発現調節も行っており、転写因子、トランスファータンパク質、トランスポーターがお互いに調節しあう巧妙な「リポネットワーク」によって、脂質ホメオスタシスが成り立っている。しかし、脂質ホメオスタシスに係わる ABC タンパク質の生理的役割や分子メカニズムには未だ不明な部分が多い。本稿では、我々の研究結果も含めて、ABC タンパク質の作用と調節を解説する。

2. ABC タンパク質と脂質ホメオスタシス

序に述べたように、ヒトの染色体上には 49 の ABC タンパク質遺伝子がコードされているが、それらのメンバーの一部が体内の脂質輸送に関係していることは知られていた。がんの多剤耐性に関与するトランスポーターとして同定された MDR1 は、ステロイド骨格をもつエストロールやアルドステロンを輸送する¹⁾。マウスの ABCB4

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻細胞生化学研究室 (〒606-8502 京都市左京区北白川)
ABC proteins involved in lipid homeostasis
Kazumitsu Ueda (Division of Applied Life Sciences,
Graduate School of Agriculture, Kyoto University,
Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan)

(*MDR2*) 遺伝子を欠失させると胆汁中からホスファチジルコリンが消失することが1993年に報告され²⁾, それによって, *MDR2*が胆管中へ放出するホスファチジルコリンによって胆汁酸がミセル状態になり, 胆汁酸の強烈な界面活性作用から胆管が守られていることが明らかになった. さらに, 肝臓中でコレステロールから酵素的に変換され合成された胆汁酸自身もABCタンパク質の一つである*ABCB11* (*BSEP*) によって分泌される³⁾. また, 長鎖および極長鎖脂肪酸はミトコンドリアあるいはペルオキシソーム内で β 酸化されるが, それらをペルオキシソーム内に輸送しているのはハーフサイズのABCタンパク質である*ABCD2* (*ALDP*) や*ABCD3* (*PMP70*) である^{4,5)}. しかし, 体内の脂質ホメオスタシスにおけるABCタンパク質の重要性を決定的にしたのは, 血中の高密度リポタンパク質 (*HDL*) が極端に減少する遺伝病であるタンジール病の原因が*ABCA1* 遺伝子の異常であるという1999年の報告であった⁶⁻⁸⁾. タンジール病の臨床症状としては, オレンジ色の扁桃腫大, 肝脾腫, 角膜混濁, 末梢神経障害がみられ, 虚血性心疾患の頻度が高い. *ABCA1* にヘテロに変異を持つ人は, 年齢とともに冠動脈壁の厚さの増加が正常人と比べて有意に大きいことが疫学調査からわかっている⁹⁾.

3. *ABCA1* タンパク質

当初, ヒト *ABCA1* 遺伝子の全長 cDNA は 6603 塩基 (2201 アミノ酸) のオープンリーディングフレームをもつと報告された¹⁰⁾. しかし, 我々は報告されているヒト *ABCA1* cDNA の第1メチオニンコドンの180塩基上流に新たなメチオニンコドンが存在しており, 実際は2261アミノ酸の膜タンパク質をコードしていることを明らかにした¹¹⁾. 我々の単離した *ABCA1* を培養細胞に導入すると約300 kDaの膜タンパク質として発現し, その大きさはマウスマクロファージ由来の培養細胞 RAW264 で発現している *ABCA1* とほぼ同じ大きさであることがわかった.

ABCA1 は12の膜貫通 α ヘリックスをもつ典型的なABCタンパク質の構造をしていると思われるが, 第1膜貫通 α ヘリックスの次に約600アミノ酸の親水性領域が存在するのが特徴である. この領域は多くの糖鎖付加部位をもつ細胞外ドメインを形成すると予想された¹²⁾. 我々はそれを確かめるため, 257番目と258番目のアミノ酸の間にタグを挿入し蛍光免疫染色を行うとともに, そのドメインに対する抗体も作成し蛍光免疫染色を行った¹³⁾. さらに *N* 結合型糖鎖を切断する *N*-glycosidase F の実験も総合すると, ヒト *ABCA1* のアミノ酸番号45から641の間の領域は, 細胞外に突き出しており多くの *N* 結合型糖鎖付加を受けていると考えられる (図1A).

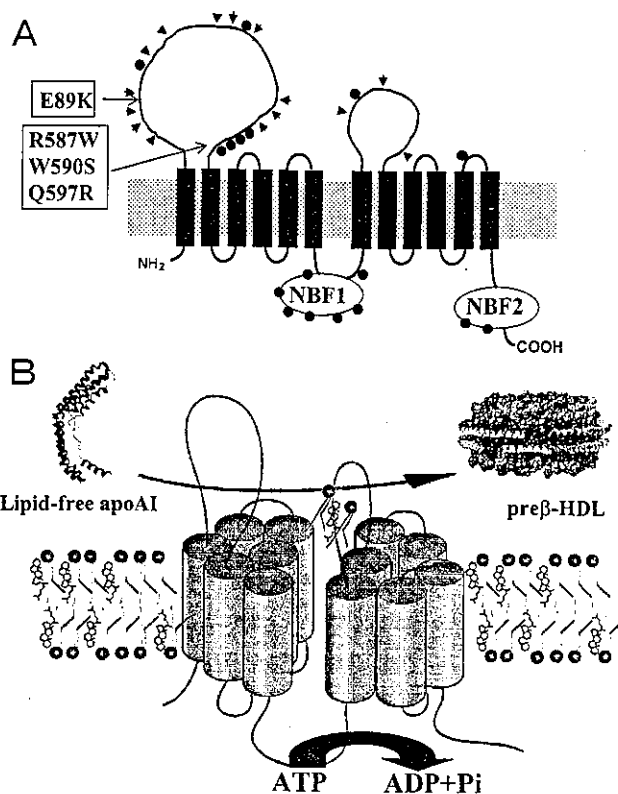


図1 (A) *ABCA1* の予想される2次構造, (B) 機能の模式図.

糖鎖付加予想部位を矢頭で, タンジール病および家族性低*HDL*血症で見つかったミスセンス変異部位を●で示した. 活性への影響を解析した三つの変異R587W, W590S, Q597R およびWHAMニワトリの*ABCA1* 遺伝子の変異E89Kの位置を矢印で示した.

4. 小腸における *ABCA1* の生理的役割

ABCA1 は全身のさまざまな組織で発現しているが, 特に小腸, 肝臓, マクロファージでの発現が顕著である. *ABCA1* が発見されてすぐに *ABCA1* ノックアウトマウスが作成されたが, そのマウスでは小腸からのコレステロールの吸収が増加していると報告された¹⁴⁾. また, 野生型マウスに *LXR* アゴニストを投与すると小腸からのコレステロールの吸収が抑制されることから, *LXR* アゴニストは *ABCA1* の発現誘導を介してコレステロールの吸収を抑制している¹⁵⁾. つまり, *ABCA1* は小腸上皮細胞の管腔側膜に発現し, 食餌中のコレステロールの小腸からの吸収を抑制 (管腔への排出) していると予想された¹⁶⁾. しかし, 細胞膜の必須構成成分であり, さまざまなホルモンの前駆体であるコレステロールは生体にとって極めて重要な物質である. 獲物を捕らえるなどして苦勞をして摂取した動物性コレステロールの吸収を抑制するための機構が小腸上皮に存在するのは意外な気がした.

我々は, ヒトの腸由来の培養細胞である Caco-2 を用い

て ABCA1 の発現場所を検討することにした。Caco-2 を下面がフィルターになったカップに生やし、細胞の上と下の両面から培地と触れることができる Transwell と呼ばれる培養器で3週間培養すると、ちょうど小腸上皮のように極性をもち、上下面が頂端側膜と基底側膜に分化する。免疫染色実験の結果、ABCA1 は細胞の側面と基底側膜に発現していることが明らかになった¹⁷⁾。さらに、細胞膜を通過しない試薬で細胞表面のタンパク質をビオチン化したところ、基底膜側から試薬を加えた時だけ ABCA1 がビオチン化された。大阪大学医学部の平野たちは、極性分化した Caco-2 細胞の基底膜側に apoA-I を加えた時に HDL が産生されることも見いだした¹⁷⁾。これらの結果は、小腸上皮においては ABCA1 は基底側膜に局在し、コレステロールや脂溶性ビタミンを吸収する方向に発現していることを示している。しかし、実際に ABCA1 は小腸からのコレステロールの吸収にも関係しているのだろうか？

5. ニワトリでの ABCA1 の生理的役割

1981 年にウィスコンシン-マディソン大学において白い皮膚とくちばしをもつ一群のニワトリが発見され WHAM (Wisconsin hypoalpha mutant) と名づけられた¹⁸⁾。それは血漿中にカロテノイドが含まれていないのが原因であり、血中にリポタンパク質が存在しないために、カロテノイドが血中に保持されないと予想された。遺伝解析の結果、そのニワトリの ABCA1 の 89 番目のアミノ酸がグルタミン酸からリジンに置換していることが明らかになった。このアミノ酸は第1細胞外ドメインの前半部に位置しており (図 1A)、このアミノ酸を含む第1細胞外ドメインのアミノ酸配列はフグからヒトまでほぼ完全に保存されていることがわかった。このことは、この領域が ABCA1 の機能にとって重要であることを示唆すると同時に、ニワトリにおいても血中にリポタンパク質の形成に ABCA1 が重要な役割を果たしていることを示している。

WHAM ニワトリでは、食餌中のコレステロールが小腸からほとんど吸収されない¹⁹⁾。哺乳類では、食物中の脂質成分はそのほとんどがカイロミクロンとして小腸から吸収され、まずリンパ液にはいり、血液を介して肝臓へ運ばれると考えられている。それに対し、鳥類ではコレステロールは小腸から直接血中に HDL として吸収され、即座に肝臓へと運ばれるのである。以上の結果は、進化的には ABCA1 は小腸からコレステロールを吸収する役割を担ってきており、ヒトにおいてもコレステロールはカイロミクロンを介した経路だけでなく、HDL として血液中に直接吸収される経路が存在する可能性を示唆している。また、ABCA1 欠損マウスでは血中のビタミン E が大幅に減少することから¹⁹⁾、ABCA1 はビタミン E などの脂溶性ビタミンの消化管上皮における吸収にかかわっている可能性がある。

6. 植物ステロール排出ポンプ ABCG5/G8

それでは4章で述べた LXR アゴニストの投与による小腸からのコレステロール吸収抑制はどのように考えればよいのだろうか？ 我々は、毎日動物性コレステロールと同様にシトステロール (図 2) を代表とする植物性ステロールなどの非動物性ステロールを摂取している。その量は 200~400 mg であり、動物性コレステロールとほぼ同量である。しかし、摂取した動物性コレステロールの 50~60% が小腸から吸収されるのとは対照的に、植物性ステロールは 5% 以下 (20 mg 以下) しか吸収されない。植物性や甲殻類のステロールは我々の体には必要ではなく、吸収しすぎると高シトステロール血症という病気になり、腱や皮下に結節性黄色腫を生じる。図 2 に示したように、コレステロールとシトステロールは構造的に非常に似ている。つまり我々の体はその微妙な違いを見分けて、必要とするコレステロールだけを選択的に吸収するような仕組みをもっているのである。

その仕組みの中心は ABCG5、ABCG8 と呼ばれる ABC タンパク質である^{20,21)}。ABCA1 が 12 の膜貫通領域と二つの ATP 結合ドメインをもつのに対して、ABCG5 と ABCG8 はそれぞれ六つの膜貫通領域と一つの ATP 結合ドメインをもち (序章を参照)、ヘテロ二量体を形成して機能しているらしい。植物性ステロールの小腸からの吸収を防ぐとともに、胆汁中に排出している。また、マウスにおいてはコレステロールの胆汁中への排出にも関与しているらしい²²⁾。ABCG5 と ABCG8 の異常は高シトステロール血症を引き起こす。これは遺伝性疾患だが、興味深いことに、日本人からは大部分の変異が ABCG5 遺伝子に見つかり、白人は ABCG8 遺伝子に変異をもつ傾向にある。

ABCG5/G8 ヘテロ二量体は小腸上皮の管腔に面した刷子縁膜に発現している。動物にとって必要なコレステロー

Absorption of sterols in a normal western diet

Sterol	Content	Absorption from intestine
Cholesterol	250-500 mg	50-60%
Non-cholesterol sterols	200-400 mg	<5 %

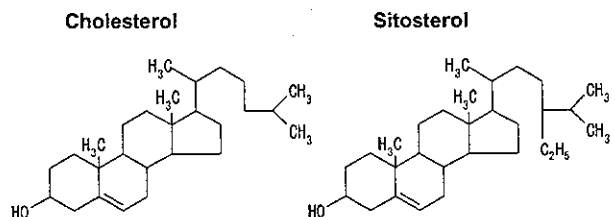


図 2 動物性コレステロールと植物性シトステロールの毎日の摂取量と吸収量

ルも必要でない植物や甲殻類のステロールも胆汁酸によって一緒に可溶化されるため、それらは同じように小腸上皮を通過しようとするだろう。その小腸上皮の管腔側で ABCG5/G8 は必要でない植物や甲殻類のステロールを排出し、血管側に発現した ABCA1 は体にとって必要なコレステロールを吸収するという協調的な役割分担が予想される。しかし、このような役割分担はあくまで予想であり、このシステムがコレステロールの選別吸収に実際にどのように寄与しているのかは、これから実証する必要がある。

7. マクロファージにおける ABCA1 の生理的役割

肝臓では、アセチル CoA を出発物質として 20 段階以上の酵素反応によって毎日約 200~250 mg のコレステロールが生合成されている。しかし、それだけでは足りず、毎日の食事によって摂取している。マクロファージなどの末梢細胞でもコレステロールを合成するが、それと同時に肝臓から低密度リポタンパク質 (LDL) の形で供給される。肝臓では、コレステロールは胆汁酸に変換され消化管へ放出されるが、マクロファージではコレステロールは異化されない。HDL として肝臓へ逆転送される経路が、マクロファージからコレステロールが放出される唯一の経路である (図 3)。

血中 HDL が激減するタンジール病や家族性低 HDL 症の患者の ABCA1 遺伝子に多くの変異が同定され、HDL が形成されない原因が、ABCA1 の異常であることが明らかになった⁶⁻⁸⁾。ABCA1 は発見当初、ホスファチジルセリンを脂質二重層の外層へフリップする活性をもち、アポトーシス細胞の貪食に関与するという説²³⁾、アニオンを輸送する活性をもつという説²⁴⁾が報告されていた。また、それまで、細胞膜から HDL 粒子へのコレステロール流出は細胞膜と HDL 粒子の間に形成された濃度勾配によって非特異的に行われると考えられてきた。それだけに、ATP 依存トランスポーター型タンパク質である ABCA1 が HDL 新生に重要な役割を果たしているという発見は衝撃であった。

ABCA1 を培養細胞に安定発現させ、脂質の結合していない apoA-I を培地中に加えると、apoA-I にコレステロールとリン脂質が結合した HDL が培地中に出現する^{12,25)}。apoA-I は、約 240 アミノ酸からなる水溶性のタンパク質で、その大部分が α ヘリックス構造をとっている。その α ヘリックス構造の片面に疎水性のアミノ酸が並んでおり、リン脂質とコレステロール複合体を apoA-I が疎水面を内側にしてベルトのように巻きつきリン脂質の疎水性部分を隠すことによって血中に溶かすと考えられている。ABCA1 を発現していない細胞に apoA-I を添加してもまったく HDL は形成されないことから、新生 HDL (pre β -

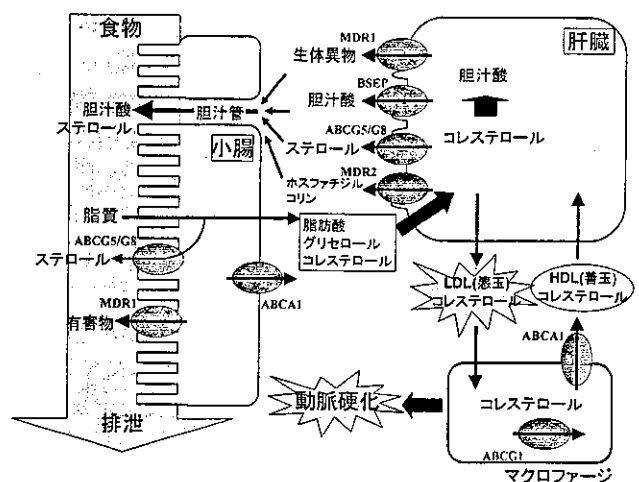


図 3 脂質恒常性維持に関わる ABC タンパク質のネットワーク

HDL と呼ばれる) の形成には ABCA1 が必須であることが明らかになった。

これまでにタンジール病や家族性低 HDL 症の患者の ABCA1 遺伝子に多くの変異が同定されているが、その多くが第 1 細胞外ドメインか ATP 結合領域にマップされている²⁶⁾。ABCA1 の第 1 細胞外ドメインのアミノ酸配列はニワトリからヒトまで非常によく保存されている。それ故、apoA-I との相互作用などへの関与も示唆されている。また、ATP 結合領域の変異によって HDL が形成されなくなる。他のトランスポーター型の ABC タンパク質の研究から、ATP 結合領域の変異によって、トランスポーターとしての活性がなくなることがわかっている。それらの事実から予想される ABCA1 の作用メカニズムは、以下のようなものであろう (模式図を図 1B に示した)。つまり、1) apoA-I が ABCA1 の細胞外ドメインと相互作用する。2) ABCA1 が ATP 加水分解することによって構造変化する。3) 膜中のコレステロールとリン脂質が ABCA1 によって押し出され、apoA-I と複合体を形成する。

しかし、実際に ABCA1 が ATP のエネルギーを用いて、リン脂質とコレステロールを基質として輸送しているのかどうかは議論が分かれており、pre β -HDL 形成のメカニズムはまだまだ混沌としている。そこで我々は、ヒト ABCA1 にタンジール病で見つかったアミノ酸置換を導入し、その影響を調べることによって、ABCA1 の機能を明らかにしようとした。

8. ABCA1 の細胞内動態とタンジール病変異の影響

まず ABCA1 の C 末端に GFP を融合させた ABCA1-GFP に変異を導入し HEK293 細胞に安定発現させた。野

生型 ABCA1-GFP は主に細胞膜に発現し、一部細胞内コンパートメント (early endosome と思われる) に存在した。シクロヘキシミドで新規タンパク質合成を阻害した後、モノニンシンで処理すると時間を追って細胞内コンパートメントに局在する ABCA1 の量が増加した¹⁹⁾。この結果は、ABCA1 は細胞膜とエンドソームの間をすばやくリサイクリングしており、その一部がリソソームへ運ばれて分解されていることを示唆した。

ABCA1 の第 1 細胞外ドメインの後半部分アミノ酸番号 587 から 597 には、三つの変異が集中している。それら三つの変異 R587W, W590S, Q597R (図 1A) の影響を ABCA1 の細胞内局在、コレステロール輸送活性について検討した¹⁹⁾。変異体のうち、R587W あるいは Q597R 変異を持つ ABCA1-GFP は細胞膜には発現せず、小胞体に局在した。一方、W590S 変異体は、若干細胞内コンパートメントに存在する比率が増えるが、野生型と同様に細胞膜上にも局在するように見えた。第 1 細胞外ドメインに対するポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った結果、W590S 変異体は、野生型と同様に第 1 細胞外ドメインを細胞外へ突き出した正しいトポロジーで発現していることが明らかになった。

野生型 ABCA1-GFP を発現した細胞では apoA-I に依存したリン脂質とコレステロール輸送がはっきり検出される。それ故、C 末端への GFP の融合は ABCA1 の活性には影響を与えない。しかし、R587W, W590S, Q597R の 3 種の変異体を発現した細胞では apoA-I に依存したリン脂質とコレステロール輸送がほとんど検出されなかった。以上の結果から、タンジール病患者で見いだされた第 1 細胞外ドメイン上の三つの変異のうち R587W と Q597R は ABCA1 の細胞膜への局在に影響を与えるのに対して、W590S 変異は ABCA1 の活性に影響を与えることが明らかになった。W590S 変異は、ABCA1 の ATP との相互作用にも見かけ上影響を与えなかった¹⁹⁾。ABCA1 の作用メカニズムを解明する上で、W590S 変異は極めて興味深い変異体であると思われる。

9. ABCA1 と細胞内コレステロール動態

このように ABCA1 は後期エンドソームと細胞膜の間を循環している^{19,27)}。ABCA1 の変異によって引き起こされる遺伝病タンジール病では、そのような後期エンドソーム循環が起こらなくなっていることが最近明らかになった²⁸⁾。その結果、後期エンドソームにはコレステロールが蓄積するが、それらは界面活性剤では引き抜かれないため、おそらくスフィンゴミエリンとともにマイクロドメインを形成していると思われる。興味深いことにそのコレステロールが蓄積した後期エンドソームには Niemann-Pick 病の責任遺伝子産物である NPC1 が大量に局在していた。

そのような状態の細胞に ABCA1 発現アデノウイルスを感染させると、後期エンドソーム循環が正常になり、apoA-I 依存コレステロール排出も検出された。正常細胞に発現させた ABCA1-GFP の存在するエンドソームには apoA-I が取り込まれており、NPC1 を含むエンドソームは減少していた。以上の結果から、ABCA1 は、NPC1 を含んだ後期エンドソーム中の脂質をエンドサイトーシスされた apoA-I と相互作用できるように変換し、最終的には新生 HDL として細胞外へ排出しているというモデルを Neufeld らは提出した²⁸⁾。しかし、コレステロールの細胞内動態と ABCA1 の関連はいまだ不明な点が多く、これから解明される必要がある。

10. ABCA1 の翻訳後活性制御への $\alpha 1$ -syntrophin の関与の解明

檜島の項に詳しく述べられているように、ABCA1 の発現は転写レベルで厳密に制御されている。しかし、ABCA1 の活性調節はそれだけではなくさまざまな翻訳後調節を受けている。その結果、発現した ABCA1 は半減期 1~2 時間ですばやく分解される^{29,30)}。ABCA1 は C 末端のアミノ酸配列が -SYV であり、典型的な PDZ 結合モチーフである。PDZ タンパク質は、PDZ 結合モチーフを介して膜タンパク質に結合し、輸送、局在、活性を制御することがよく知られている。そこで ABCA1 の C 末端 120 アミノ酸をベイトとして、それと結合するタンパク質を酵母 two-hybrid 法によりスクリーニングした。その結果、PDZ タンパク質である $\alpha 1$ -syntrophin と Lin-7 が、ABCA1 と相互作用することを見いだした³¹⁾。 $\alpha 1$ -syntrophin は、マウスでは骨格筋、心臓、脳で高発現しており、dystrophin や utrophin を介して細胞骨格および細胞外マトリクスと複合体を形成することが知られている³²⁾。

まずマウス脳を可溶化し抗 $\alpha 1$ -syntrophin 抗体を用いて免疫沈降実験を行った結果、マウス ABCA1 が $\alpha 1$ -syntrophin とともに沈降した。つまり、 $\alpha 1$ -syntrophin と ABCA1 は生理的条件下で実際に相互作用していることが明らかになった。つぎに、培養細胞 HEK293 に両者を発現させることによって、 $\alpha 1$ -syntrophin は ABCA1 の C 末端の数アミノ酸を介して強固に結合していること、両者は細胞膜周辺で共局在していることが明らかになった。ABCA1 は翻訳された後、半減期 2 時間程度で急速に分解される。しかし、HEK293 細胞に ABCA1 と $\alpha 1$ -syntrophin を共発現させると、ABCA1 の分解が抑制され、半減期が約 5 倍長くなることが分かった³¹⁾ (図 4)。そして、それに伴い apoA-I 依存的なコレステロール排出量が増大した。Lin-7 にはこのような効果は見られなかったことから、 $\alpha 1$ -syntrophin は特異的に ABCA1 の分解を抑制していると考えられる。ABCA1 は、apoA-I と相互作用する

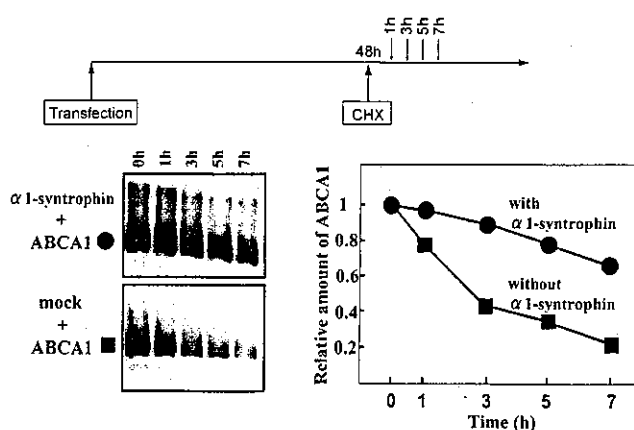


図4 ABCA1の半減期にあたる $\alpha 1$ -syntrophinの影響
ABCA1単独あるいはABCA1と $\alpha 1$ -syntrophinをHEK293細胞に一過的に発現させたのち、シクロヘキシミドを添加し新規タンパク質合成を阻害し、時間を追ってABCA1の量をウェスタンブロットによって検出した(左のパネル)。右のパネルは、ABCA1の量をグラフ化したもの。 $\alpha 1$ -syntrophinとの共発現によって、ABCA1の半減期が5倍以上に伸びていることがわかる。

ことによってリン酸化状態が変化し、カルパインによる分解に対して抵抗性になることを横山らは報告している^{30,33}。ABCA1の安定性を決定する細胞内情報伝達に、我々が見いだした $\alpha 1$ -syntrophinのようなアダプタータンパク質が関与しているかもしれない。

11. ABCA7: 自己免疫疾患シェグレン症候群の自己抗原として発見

興味あることに、これまでに報告されたタンジール病と家族性低HDL血症で見つかったミスセンス変異は第1細胞外ドメインとATP結合ドメインに集中している²⁹。そこで、この細胞外ドメインが重要な機能に関与していると予想し、ホモロジー検索を行った。その結果、アミノ酸番号270から449の間のアミノ酸配列が自己免疫疾患であるシェグレン症候群の自己抗原SS-Nと高い相同性を持つことを見いだした。さらに自己抗原SS-Nをコードしている遺伝子の全長cDNAを単離した結果、それはABCA7であり、その第1細胞外ドメインの一部がシェグレン症候群の自己抗原をコードしていることが明らかになった¹²。ノザン解析を行った結果、ABCA7は胸腺、リンパ節、骨髄、末梢白血球、脾臓、脳などで8-9 kbのpoly(A) RNAとして主に発現しており、免疫系の組織および脳で何らかの機能を果たしていることが示唆された³⁴。また、組織特異的にスプライシングされていることが明らかになった。さらに、培養細胞に安定発現させたところ、ABCA1の場合と同様にapoA-Iに依存してリン脂質とコレステロールを細胞外へ排出することが明らかになった^{34,35}。最近米国の

グループは、マウスのABCA7を単離し細胞に発現させるとリン脂質は排出するが、コレステロールは排出しないと報告した³⁶。ABCA7の機能には種特異性があるのだろうか? ABCA7の生理的役割はいまだまったく不明であり、さらに興味をもって研究を進めている。

12. おわりに

抗がん剤耐性にかかわる生体異物排出ポンプとして哺乳類の最初のABCタンパク質遺伝子MDR1が発見されて以来^{37,38}、白人で最も多い遺伝病嚢胞性線維症の責任遺伝子でありクロライドチャンネルとして機能するCFTRの発見³⁹、インスリン分泌を調節するATP感受性カリウムチャンネルのサブユニットSURがレギュレーターとして機能すること^{40,41}など、ABCタンパク質の生理的重要性だけでなく機能のおもしろさという点で、これまでもABCタンパク質は一部の研究者の興味を引いてきた。しかし、最近コレステロールの体内および細胞内輸送への関与が明らかになるにつれて、ABCタンパク質の研究者は爆発的に増加している。とは言っても、HDL新生のメカニズム、脳内のコレステロールの恒常性維持機構、細胞内のコレステロールの輸送などに関しては、いまだ多くのことが不明である。哺乳類ABCタンパク質の3次元構造解析もいまから勝負の時である。ABCタンパク質研究の一番おもしろい時代に突入したように思う。

最後に、ここで紹介した一連の研究に関わった京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻細胞生化学分野の松尾道憲助手をはじめ多くの学生の皆さん、学外の共同研究者の皆様に感謝いたします。

文 献

- 1) Ueda, K., Okamura, N., Hirai, M., Tanigawara, Y., Saeki, T., Kioka, N., Komano, T., & Hori, R. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 24248-24252
- 2) Smit, J.J.M., Schinkel, A.H., Oude Elferink, R.P.J., Groen, A.K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., A.M., Ottenhoff, R., van der Lugt, N.M.T., van Roon, M. A., van der Valk, M.A., Offerhaus, G.J.A., Berns, A.J.M., & Borst, P. (1993) *Cell* **75**, 451-462
- 3) Strautnieks, S.S., Bull, L.N., Knisely, A.S., Kocoshis, S. A., Dahl, N., Arnell, H., Sokal, E., Dahan, K., Childs, S., Ling, V., Tanner, M.S., Kagalwalla, A.F., Nemeth, A., Pawlowska, J., Baker, A., Mieli-Vergani, G., Freimer, N. B., Gardiner, R.M., & Thompson, R.J. (1998) *Nat. Genet.* **20**, 233-238
- 4) Imanaka, T., Aihara, K., Takano, T., Yamashita, A., Sato, R., Suzuki, Y., Yokota, S., & Osumi, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11968-11976
- 5) Tanaka, A.R., Tanabe, K., Morita, M., Kurisu, M., Kasiwayama, Y., Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T., Imanaka, T., & Ueda, K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 40142-40147

- 6) Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S., Zhang, L., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J., Molhuizen, H., Loubser, O., Ouelette, B., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K., Sensen, C., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J., & Hayden, M. (1999) *Nat. Genet.* **22**, 336-345
- 7) Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobniak, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W., Hahmann, H., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K., & Schmitz, G. (1999) *Nat. Genet.* **22**, 347-351
- 8) Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J., Deleuze, J., Brewer, H., Duverger, N., Deneffe, P., & Assmann, G. (1999) *Nat. Genet.* **22**, 352-355
- 9) van Dam, M.J., de Groot, E., Clee, S.M., Hovingh, G.K., Roelants, R., Brooks-Wilson, A., Zwinderman, A.H., Smit, A.J., Smelt, A.H., Groen, A.K., Hayden, M.R., & Kastelein, J.J. (2002) *Lancet* **359**, 37-42
- 10) Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., Liebisch, G., Luciani, M., Chimini, G., Kaminski, W., & Schmitz, G. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 29-33
- 11) Zhao, L.-X., Zhou, C.-J., Tanaka, A., Nakata, M., Hirabayashi, T., Amachi, T., Shioda, S., Ueda, K., & Inagaki, N. (2000) *Biochem. J.* **350**, 865-872
- 12) Tanaka, A.R., Ikeda, Y., Abe-Dohmae, S., Arakawa, R., Sadanami, K., Kidera, A., Nakagawa, S., Nagase, T., Aoki, R., Kioka, N., Amachi, T., Yokoyama, S., & Ueda, K. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 1019-1025
- 13) 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., & Ueda, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 8815-8819
- 14) Orso, E., Broccardo, C., Kaminski, W.E., Bottcher, A., Liebisch, G., Drobniak, W., Gotz, A., Chambenoit, O., Diederich, W., Langmann, T., Spruss, T., Luciani, M.-F., Rothe, G., Lackner, K.J., Chimini, G., & Schmitz, G. (2000) *Nat. Genet.* **24**, 192-196
- 15) Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.-M.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M., & Mangelsdorf, D.J. (2000) *Science* **289**, 1524-1529
- 16) Allayee, H., Laffitte, B.A., & Lusis, A.J. (2000) *Science* **290**, 1709-1711
- 17) Ohama, T., Hirano, K., Zhang, Z., Aoki, R., Tsujii, K., Nakagawa-Toyama, Y., Tsukamoto, K., Ikegami, C., Matsuyama, A., Ishigami, M., Sakai, N., Hiraoka, H., Ueda, K., Yamashita, S., & Matsuzawa, Y. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 625-630
- 18) Attie, A.D., Hamon, Y., Brooks-Wilson, A.R., Gray-Keller, M.P., MacDonald, M.L., Rigot, V., Tebon, A., Zhang, L.H., Mulligan, J.D., Singaraja, R.R., Bitgood, J. J., Cook, M.E., Kastelein, J.J., Chimini, G., & Hayden, M. R. (2002) *J. Lipid Res.* **43**, 1610-1617
- 19) Mulligan, J.D., Flowers, M.T., Tebon, A., Bitgood, J.J., Wellington, C., Hayden, M.R., & Attie, A.D. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 13356-13366
- 20) Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., & Hobbs, H.H. (2000) *Science* **290**, 1771-1775
- 21) Lee, M.H., Lu, K., Hazard, S., Yu, H., Shulenin, S., Hidaka, H., Kojima, H., Allikmets, R., Sakuma, N., Pegoraro, R., Srivastava, A.K., Salen, G., Dean, M., & Patel, S.B. (2001) *Nat. Genet.* **27**, 79-83
- 22) Yu, L., York, J., von Bergmann, K., Lutjohann, D., Cohen, J.C., & Hobbs, H.H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15565-15570
- 23) Luciani, M.F. & Chimini, G. (1996) *EMBO J.* **15**, 226-235
- 24) Becq, F., Hamon, Y., Bajetto, A., Gola, M., Verrier, B., & Chimini, G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 2695-2699
- 25) Wang, N., Silver, D., Costet, P., & Tall, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 33053-33058
- 26) Singaraja, R.R., Brunham, L.R., Visscher, H., Kastelein, J.J., & Hayden, M.R. (2003) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 1322-1332
- 27) Neufeld, E.B., Remaley, A.T., Demosky, S.J., Stonik, J. A., Cooney, A.M., Comly, M., Dwyer, N.K., Zhang, M., Blanchette-Mackie, J., Santamarina-Fojo, S., & Brewer, H.B., Jr. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 27584-27590
- 28) Neufeld, E.B., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Knapper, C. A., Combs, C.A., Cooney, A., Comly, M., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., Remaley, A.T., Santamarina-Fojo, S., & Brewer, H.B., Jr. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 15571-15578
- 29) Wang, Y. & Oram, J.F. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 5692-5697
- 30) Arakawa, R. & Yokoyama, S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 22426-22429
- 31) Munehira, Y., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Furuya, A., Shitara, K., Imamura, M., Yokota, T., Takeda, S.I., Amachi, T., Matsuo, M., Kioka, N., & Ueda, K. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 15091-15095
- 32) Peters, M.F., Adams, M.E., & Froehner, S.C. (1997) *J. Cell. Biol.* **138**, 81-93
- 33) Yamauchi, Y., Hayashi, M., Abe-Dohmae, S., & Yokoyama, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47890-47897
- 34) Ikeda, Y., Abe-Dohmae, S., Munehira, Y., Aoki, R., Kawamoto, S., Furuya, A., Shitara, K., Amachi, T., Kioka, N., Matsuo, M., Yokoyama, S., & Ueda, K. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 313-318
- 35) Abe-Dohmae, S., Ikeda, Y., Matsuo, M., Hayashi, M., Okuhira, K.I., Ueda, K., & Yokoyama, S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 604-611
- 36) Wang, N., Lan, D., Gerbod-Giannone, M., Linsel-Nitschke, P., Jehle, A.W., Chen, W., Martinez, L.O., & Tall, A.R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 42906-42912
- 37) Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M.M., & Pastan, I. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 3004-3008
- 38) Chen, C., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M., & Roninson, I.B. (1986) *Cell* **47**, 381-389
- 39) Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S., & Tsui, L.-C. (1989) *Science* **245**, 1066-1073
- 40) Inagaki, N., Gono, T., Clement, J.P. 4th, Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S., & Bryan, J. (1995) *Science* **270**, 1166-1170
- 41) Ueda, K., Komine, J., Matsuo, M., Seino, S., & Amachi, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1268-1272

化学 别刷

CHEMISTRY

脂質輸送の分子メカニズム研究の黎明

Takahashi Kei Nagata Koh
高橋 圭 永田 紅
Matsuo Michinori Ueda Kazumitsu
松尾 道憲 植田 和光

Keyword

ABCタンパク質(ABC proteins), コレステロール(cholesterol), サーフアクトン(surfactant),
ビタミンD(vitamin D), セラミド(ceramide), トランスポーター(transporter)

リン脂質やコレステロールは細胞膜を構成し、コレステロールはステロイドホルモン、脂溶性ビタミン、胆汁酸などの重要な前駆体として細胞の増殖と生存に必須である。また、ある種の脂質はシグナル伝達物質として機能し、生体機能の重要な役割を担っている。動物はそれら脂質を体内で合成するだけでなく、毎日の食餌によって外界から摂取しており、小腸から肝臓、肝臓から末端組織、末端組織から肝臓へ、など、脂質はさまざまな組織間を移動する。そのため、脂質はさまざまな組織で細胞膜を越えた輸送が行われなければならない。また、脂質が細胞内で合成される時、いくつものステップを経て行われる。たとえば、セラミドは小胞体膜上で行われるが、それがスフィンゴミエリンに変換されるのはゴルジ体内腔である。そのため、それぞれのステップを担う代謝酵素が局在する部位へ順番に運ばれることが必要である。このような、脂質の細胞内あるいは膜を介した輸送のメカニズムが最近解明されつつある。

膜を介した脂質輸送を司るABCタンパク質

以前から、体内での膜を介した脂質輸送にいくつかのABCタンパク質が関係していることは知られていた。たとえば、がん細胞の多剤耐性に関与するトランスポーターとして同定されたMDR1は、ステロイド骨格をもつエストロールやアルドステロンを輸送する¹⁾。また、マウスの*ABCB4*(*MDR2*)遺伝子を欠失させることにより胆汁中からホスファチジルコリンが消失することが1993年に報告され²⁾、MDR2が胆管中へ放出するホスファチジルコリンによって胆汁酸がミセル状態になり、胆汁酸の強い界面活性作用から胆管が守られていることが明らかになった。さらに、肝臓中でコレステロールから酵素的に変換され生成した胆汁酸は、ABCタンパク質の一つである*ABCB11*(*BSEP*)によって分泌される³⁾。また、長鎖および極長鎖脂肪酸を β 酸化するためにペルオキシソーム内へ輸送しているのも、*ABCD2*(*ALDP*)や*ABCD3*(*PMP70*)である^{4,5)}。

しかし、体内の脂質輸送におけるABCタンパク質の重要性を決定的にしたのは、血中の高密度リポタンパク質(*high-density lipoprotein*; *HDL*)が消失する遺伝病タンジール病の責任遺伝子が*ABCA1*遺伝子であるという、1999年の報告であった⁶⁻⁸⁾。

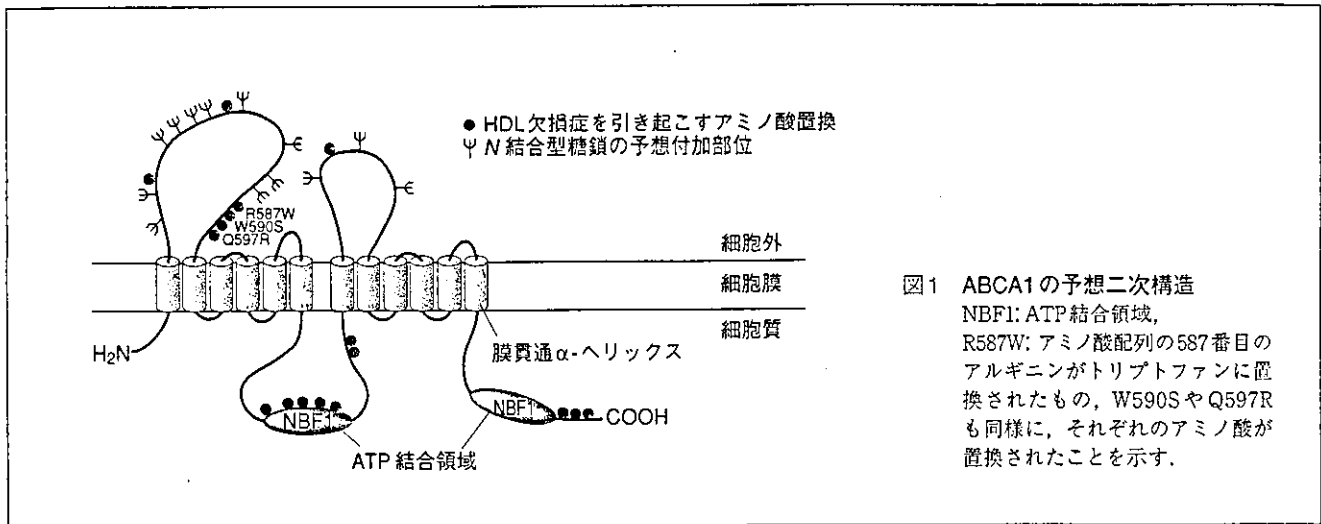
*ABCA1*はABCタンパク質ファミリーに属し、MDR1と同様

に12か所の膜貫通 α -ヘリックスと2か所のATP結合領域をもつ(図1)。*ABC*タンパク質ファミリーは、すでにヒトで49、全生物を合わせると4000以上の遺伝子が報告され、生物界で最も大きな遺伝子ファミリーを形成している。それらはよく保存されたATP結合領域を1機能分子あたり二つもっており、ほとんどのメンバーがATP加水分解に伴った“輸送”を行っていると考えられている。*ABCA1*は2261アミノ酸、約300kDaの大きな膜タンパク質であり、1280アミノ酸のMDR1と比べてはるかに大きい⁹⁾。それは図に示したように、*ABCA1*が約600アミノ酸と約300アミノ酸の大きな細胞外ドメインをもつためであり、そのようなドメインはMDR1にはない。

コレステロール排出トランスポーター*ABCA1*

*ABCA1*は細胞外に添加したapoA-Iにコレステロールとリン脂質を受け渡しHDLを産生する。*ABCA1*とapoA-Iはクロスリンクできることから直接的な結合が示唆されている。また、家族性低HDL血症を引き起こす変異の多くが細胞外ドメインに見いだされており、それらの変異によって、*ABCA1*の細胞内局在や機能が損なわれることがわかっている¹⁰⁾。それゆえ、*ABCA1*の作用メカニズムとしては、1)apoA-Iが*ABCA1*の細胞外ドメインと相互作用する、2)*ABCA1*がATP加水分解することによって構造変化する、3)膜中のコレステロールとリン脂質が*ABCA1*によって押し込まれ、apoA-Iと複合体を形成すると予想される。しかし、*ABCA1*がリン脂質とコレステロールをATPのエネルギーを用いて直接基質として輸送しているのかどうかについては議論が分かれている。われわれはすでに、精製*ABCA1*が十分に高いATPase活性をもつことを見いだしており、精製*ABCA1*をリボソームに再構成することによってメカニズムが判明すると期待される。また、コレステロールは細胞にとって必須な成分であり、それを排出しすぎないように、*ABCA1*は複雑な翻訳後調節を受けることも最近明らかになりつつある¹¹⁾。

さて、*ABCA1*以外にも多くのABCタンパク質が脂質輸送にかかわっていることが明らかになってきた。ハーフサイズのABCタンパク質である*ABCG5*と*ABCG8*は、ヘテロ2量体を形成し植物ステロールを体外へ排出しており、それらの異常に



よって高シトステロール血症が引き起こされる¹²⁾。また、肺胞Ⅱ型細胞に特異的に発現しているABCA3に異常があると、肺サーファクタントが分泌されず、生後すぐに呼吸窮迫症候群を引き起こして死に至ることが明らかにされた¹³⁾。この場合も、脂質が基質として輸送されていると予想される(永田ら、投稿中)。このように、体内で多くのトランスポーターがATPを加水分解することによって脂質を輸送していると考えられるのだが、ATPは生物が苦勞して手に入れた糖や脂質を燃やして作りだした基本エネルギーである。脂質を膜から引き抜く、あるいは膜を介して輸送するという作業が、輸送方向を確率的に決めるだけでなく、真にエネルギーを必要とする仕事であり、二次能動輸送体では担うことができない仕事であろうと思われる。また、ATPを消費してでも行わなければならない、重要な生理的な仕事といえるかもしれない。

細胞内脂質移動を司るトランスファータンパク質の発見

最近、細胞内で脂質の移動にかかわる分子が次々に見つかってきている。α-TTPは肝細胞の細胞質でα-トコフェロールを選択的結合して移送し¹⁴⁾、さらにABCタンパク質と協調して細胞外へ分泌していると考えられている。α-TTPはSec14ファミリーという脂質輸送タンパク質ファミリーに属しているが、それ以外にもFABPファミリー、PITPファミリー、STARTファミリー、ORPファミリーなど多くのタンパク質ファミリーが脂質輸送に関与している。また、最近発見された脂質セラミドの細胞内輸

送にかかわる分子CERTは、STARTファミリーに属している¹⁵⁾。脂質セラミドの一種であるスフィンゴミエリンは乳類細胞のリン脂質の約10%を占めており、形質膜外葉においてコレステロールと結合する。それによって形成された脂質ラフト(コレステロールとスフィンゴ脂質が協調して形成する、界面活性剤難溶性の膜微小ドメイン)は、さまざまな細胞機能の制御に関与していると考えられている。

脂質は水に不溶または難溶な物質であり、その代謝と輸送には水溶性の生体物質とは異なる機構を必要としている。しかし、脂質はその物性によって生体膜を自ら透過し移動するため、そこに特別な機構が存在するとは長いあいだ考えられてこなかった。ようやく、最近になって、遺伝病の解析、変異体の解析から細胞膜を介する脂質輸送(脂質トランスポート)や細胞内における脂質輸送(脂質トランスファー)に関与する分子実体が明らかになりはじめた。そして、さまざまな転写因子や核内レセプターが、内在性脂質をリガンドとし、脂質代謝酵素だけでなく脂質トランスポートや脂質トランスファーを転写調節・制御していること、さらにそれらが互いに調節しあう重層的なネットワークを形成していることが明らかになりつつある。脂質輸送の破綻は生活習慣病をはじめ、さまざまな疾病と関係している。脂質輸送の分子メカニズムの解明は、さまざまな疾病の予防につながるだけでなく、ポストゲノム時代の生命科学に大きなインパクトを与えると期待される。

【京都大学大学院農学研究科】

1) K. Ueda et al., *J. Biol. Chem.*, **267**, 24248 (1992). 2) J.J.M. Smit et al., *Cell*, **75**, 451 (1993). 3) S.S. Strautnieks et al., *Nat. Genet.*, **20**, 233 (1998). 4) T. Imanaka et al., *J. Biol. Chem.*, **274**, 11968 (1999). 5) A.R. Tanaka et al., *ibid.*, **277**, 40142 (2002). 6) A. Brooks-Wilson et al., *Nat. Genet.*, **22**, 336 (1999). 7) M. Bodzioch et al., *ibid.*, **22**, 347 (1999). 8) S. Rust et al., *ibid.*, **22**, 352 (1999). 9) A.R. Tanaka et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **283**, 1019 (2001). 10) A.R. Tanaka et al., *J. Biol. Chem.*, **278**, 8815 (2003). 11) Y. Munehira et al., *ibid.*, in press (2004). 12) K.E. Berge et al., *Science*, **290**, 1771 (2000). 13) S. Shulenin et al., *N. Engl. J. Med.*, **350**, 1296 (2004). 14) M. Horiguchi et al., *Genes Cells*, **8**, 789 (2003). 15) K. Hanada et al., *Nature*, **426**, 803 (2003).

【創薬ターゲットとしてのABC蛋白質】

ABC proteins as molecular targets for drug discovery

植田 和光

Ueda Kazumitsu

Key words

ABC protein, 多剤耐性,
創薬ターゲット

1. ABC蛋白質とは

ABC(ATP-Binding Cassette)蛋白質は、よく保存されたATP結合ドメインを1機能分子あたり2つもつ膜蛋白質ファミリーであり、バクテリアからヒトまで生物界に幅広く存在する。図に示したように、ABC蛋白質はいずれも類似の2次構造をもち、細胞内ATPによって駆動あるいは制御されているが、トランスポーター、チャンネル、レギュレーターに分化し、それぞれの生物で重要な生理機能を果たしている。ヒトの染色体には49のABC蛋白質遺伝子がコードされている。表に示したように、それぞれのABC蛋白質の異常がさまざまな疾病を引き起こすことから、我々の体で重要な生理的役割を果たしていることは明らかである。また、バクテリアからヒトまであらゆる生物において、それぞれ数十から100以上のABC蛋白質が働いている。遺伝子ファミリーとしても最も大きなもののひとつであり、生物界全体にとって重要な役割を果たしている。

ABC蛋白質のATP結合領域は200アミノ酸にわたって配列がよく保存されており、図に示した3つのアミノ酸配列モチーフを含むことが特徴である。真核生物のABC蛋白質においては、ATP結合領域はちょうどカセットのようにペプチド鎖中に2つ挿入されている。また、バクテリアのABC蛋白質においては、2つのATP結合カセットはサブユニットとして膜貫通サブユニットと分子集合している。ABC蛋白質は、このようにアミノ酸配列のよく似たATP結合領域がカセットのようにいろいろな膜蛋白質に挿入あるいはサブユニットとして使われて

いることからATP Binding Cassetteの頭文字をとって名付けられた。ABC蛋白質はATP結合カセットを機能単位内に2つもつことを特徴としている。

2. ABC蛋白質の特徴と 創薬ターゲットとしての重要性

ABC蛋白質の第1の特徴は、それぞれのABC蛋白質の異常がさまざまな疾病と関係していることである。本特集でもとりあげたように、ABC蛋白質は癌の多剤耐性(杉本, 秋山, 吉川の項)、高脂血症(横山, 横島の項)、糖尿病(稲垣の項)、胆汁うっ滞症(鈴木, 横島の項)などと密接に関連するばかりでなく、それらの疾病の治療薬の体内動態を規定する重要な因子(杉本, 鈴木の項)である。特に最近では、多くのABC蛋白質が血糖や脂質恒常性維持に関与していることが明らかになってきた。糖分や脂質の過剰摂取によって恒常性が破綻し、肥満、高脂血症、糖尿病や動脈硬化などの生活習慣病に苦しめられるはめになってしまった現代人にとっては、ABC蛋白質のコントロールは重要な課題である。本特集では、転写因子を介して発現量をコントロールする観点(横山, 橋の項)、蛋白質分解を調節し活性をコントロールするという観点(横山の項)から論じていただいた。

ABC蛋白質はバクテリアからヒトまで、ほとんどすべての生物のすべての細胞で機能している。本特集では取り上げなかったが、真菌類のABC蛋白質は抗生剤耐性を引き起こす原因になっており、その点からも重要な創薬のターゲットである。

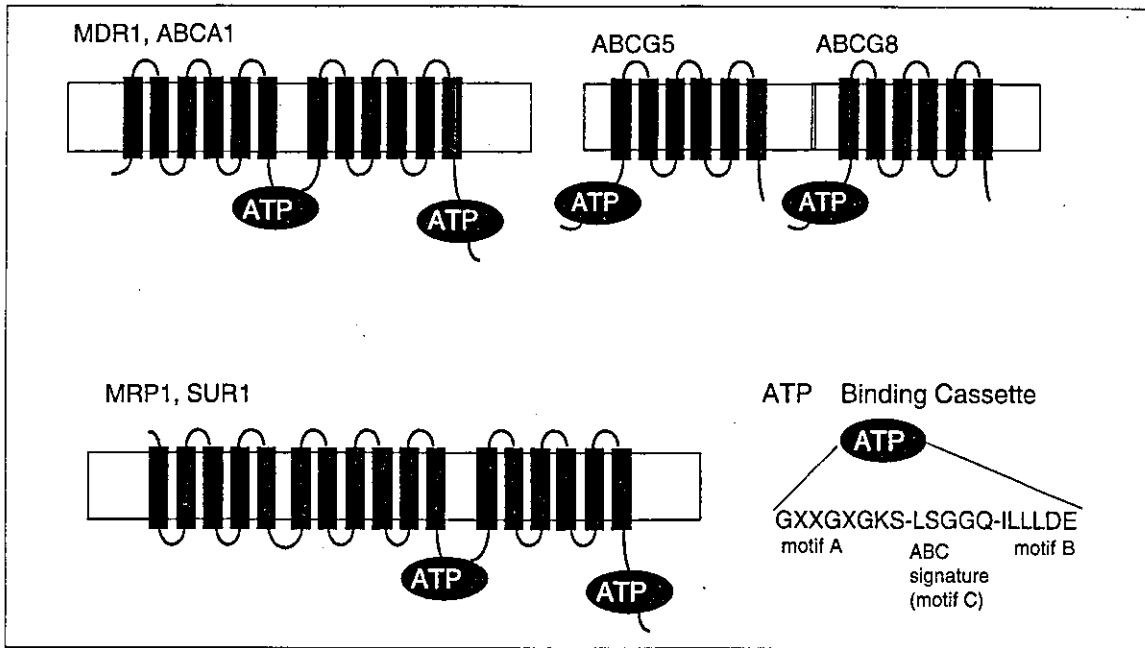


図 ABC (ATP Binding Cassette) proteins

表 主なヒトABC蛋白質遺伝子の分類と関連する疾病

通称遺伝子名	新遺伝子名	アミノ酸数	機能・特徴/過剰発現・異常による表現型
ABCAサブファミリー			
ABC1	ABCA1	2261	コレステロール・リン脂質輸送/HDL欠損症
ABC2	ABCA2	2436	脳オリゴデンドロサイト特異的発現
ABC3	ABCA3	1704	肺サーファクタント産生細胞特異的発現
ABCR	ABCA4	2273	レチノイン酸輸送/黄斑部変性症
ABCA7	ABCA7	2146	コレステロール・リン脂質輸送
ABCA12	ABCA12	2595	?/II型葉状魚鱗癬
ABCBサブファミリー			
MDR1, PGY1	ABCB1	1280	生体異物排出ポンプ/がん細胞の多剤耐性
TAP1	ABCB2	808	抗原ペプチドのER内への輸送
TAP2	ABCB3	653	抗原ペプチドのER内への輸送
MDR2/3	ABCB4	1279	ホスファチジルコリン輸送/肝内胆汁うっ滞症
ABC7	ABCB7	752	鉄イオウ複合体の輸送(ミトコンドリア)
SPGP, BSEP	ABCB11	1321	胆汁酸輸送/肝内胆汁うっ滞症
ABCCサブファミリー			
MRP1	ABCC1	1531	グルタチオン/グルクロン酸抱合体排出/ がん細胞の多剤耐性
MRP2/cMOAT	ABCC2	1545	グルタチオン/グルクロン酸抱合体排出/体質性黄疸
MRP3	ABCC3	1527	グルタチオン/グルクロン酸抱合体排出
MRP4	ABCC4	1325	抗ウイルス核酸誘導体輸送
MRP5	ABCC5	1437	核酸類緑体輸送
MRP6	ABCC6	1503	?/弾性繊維性仮性黄色腫
CFTR	ABCC7	1480	クロライドチャンネル/嚢胞性繊維症
SUR1	ABCC8	1581	ATP感受性Kチャンネルサブユニット/低血糖症
SUR2	ABCC9	1549	ATP感受性Kチャンネルサブユニット
ABCDサブファミリー			
ALDP	ABCD1	745	極長鎖脂肪酸輸送/副腎白質ジストロフィー
ALDR	ABCD2	740	ペルオキシソーム膜に局在
PMP70	ABCD3	659	極長鎖脂肪酸輸送?
P7OR	ABCD4	606	ペルオキシソーム膜に局在
ABCGサブファミリー			
ABCG1	ABCG1	638	コレステロール・リン脂質輸送?
ABCP, BCRP	ABCG2	655	抗がん剤耐性、幹細胞に発現
ABCG5	ABCG5	651	植物ステロール排出/シトステロール血症
ABCG8	ABCG8	673	植物ステロール排出/シトステロール血症

ヒトの染色体上に存在する49種類のABC蛋白質には、いまだに生理的役割や生理的な基質の不明なものも多く存在する。それらをひとつひとつ解明していくことが、これから必要であろう。また、生体膜に存在する機能性蛋白質は、トランスポーター、チャンネル、レギュレーター（レセプター）に大別できるが、ABC蛋白質はよく似たドメイン構造をもちながら、機能はトランスポーター、チャンネル、レギュレーターに分化している。白人でもっとも多い遺伝病である嚢胞性繊維症の原因遺伝子産物cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)は、それ自身がCl⁻チャンネルである。さらに、外向き整流性Cl⁻チャンネル(ORCC)や容積調節性Cl⁻チャンネル(VRCC)、容積調節性ATP放出を制御することが知られており、レギュレーターとしての機能も予想されている。また、糖尿病治療薬スルホニル尿素剤の標的分子であるSURはATP感受性カリウムチャンネルのレギュレーターとして機能する（稲垣の項）。トランスポーターとして機能するABC蛋白質

とこれらはどこが異なるのだろうか⁸⁾。それらのメカニズムを解明することは、創薬の上で重要であるばかりでなく、これら3種類の膜蛋白質の作用原理を理解する上で興味ある研究ターゲットである。

文 献

- 1) 生化学. 特集「リポネットワークによる脂質ホメオスタシス」6月号. 2004.
- 2) 植田和光:体内のコレステロールをコントロールする—脂質トランスポートに関与するABC蛋白質. 化学と生物 42: 6-8, 2004.
- 3) ABC proteins. Holland IB, Cole, SPC, Kuchler, K and Higgins, C ed.: Academic Press. 2003.
- 4) ABCトランスポーター-生体防御のABC-遺伝子から疾患まで. 稲垣暢也, 植田和光, 鈴木洋史: 診断と治療社. 2002.
- 5) 植田和光, 天知輝夫. ABCA1蛋白質の構造と機能. The Lipid. 13: 42-48, 2002.
- 6) 蛋白質核酸酵素. 特集「特集薬物トランスポーター」5号. 2001.
- 7) 生体膜のエネルギー装置. 吉田賢右, 茂木立志編. 共立出版. 2000.
- 8) Ueda K, Matsuo M, Tanabe K, et al.: Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. Biochim Biophys Acta, 1461: 305-313, 1999.

■表紙写真の説明■

ヒトMDR1発現プラスミドを導入したKB/MDR1細胞とその親株のヒト癌細胞KB-3-1の蛍光微分干渉像。MDR1を発現していない親株(KB-3-1)は、培地中にドキシソルピシンあるいはローダミンを添加すると、それぞれ核およびミトコンドリアに蓄積し蛍光を発する。一方、MDR1を発現させた培養細胞(KB/MDR1)では、両薬剤とも細胞外へ排出され蓄積しない。その結果、細胞は構造に類似性のないさまざまな薬剤に対して“多剤耐性”となる¹⁾。

写真提供・説明：植田 和光（京都大学大学院農学研究科）

文 献

- 1) Ueda k, Cardarelli C, Gottesman M M, and Pastan I.: Expression of a full-length cDNA for the human MDR1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. Proc Natl Acad Sci USA, 84: 3004-3008, 1987.

ABC タンパク質とアルカロイド

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 細胞生化学研究室
植田和光

1) ABC タンパク質とアルカロイド

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 細胞生化学研究室
植田和光



多剤排出トランスポーター MDR1

我々は、癌細胞の獲得性多剤耐性を研究中、高度に抗がん剤耐性を獲得した培養細胞で遺伝子増幅している遺伝子を単離し、その遺伝子を多剤耐性 (Multidrug Resistance) の頭文字をとって *MDR1* と名付けた^{1,2)}。MDR1 発現ベクターを薬剤感受性細胞に導入すると細胞はさまざまな抗がん剤に対して耐性になることが明らかになり³⁾、MDR1 がさまざまな構造の脂溶性化合物を ATP 加水分解のエネルギーを利用して細胞内から細胞外へ排出するポンプとして機能することが明らかになった。MDR1 は12の膜貫通 α -ヘリックスと2つの ATP 結合領域をもつ1280アミノ酸からなる膜タンパク質であり、真核生物で最初の ABC タンパク質であった。

ABC タンパク質

ABC タンパク質は ATP 結合あるいは加水分解によって制御され、細胞膜やオルガネラの膜を介したさまざまな物質やイオンの輸送に関与している⁴⁾。典型的な ABC タンパ

ク質は、1分子内に2つの ATP 結合領域と12から17の膜貫通 α -ヘリックスをもつ。真核生物の ABC タンパク質の代表的な2次構造を図1に示してある。ALDP や ABCGx などのようなハーフサイズのものとは2量体となって機能する。ATP 結合領域は200アミノ酸にわたって、細菌からヒトまで非常によく保存され、その中でも図1に示した3つの配列が特に良く保存されている。モチーフ A と B は他のヌクレオチド結合性タンパク質にも存在するのに対して、モチーフ A と B の間にあるモチーフ C は ABC タンパク質にだけ存在するため他のヌクレオチド結合タンパク質ファミリーと見分ける特徴 (ABC signature) となっている。ABC タンパク質は、このような ATP 結合ドメインが、ちょうどカセットのようにいろいろな膜結合ドメインと組み合わさってトランスポーター、チャネル、レギュレーターというさまざまな機能をもつタンパク質に分化したと考えられる⁴⁾。そのため、ATP 結合カセット (ATP Binding Cassette) の頭文字をとって ABC タンパク質と名付けられた。現在、大腸菌からヒトま

ABC (ATP Binding Cassette) proteins

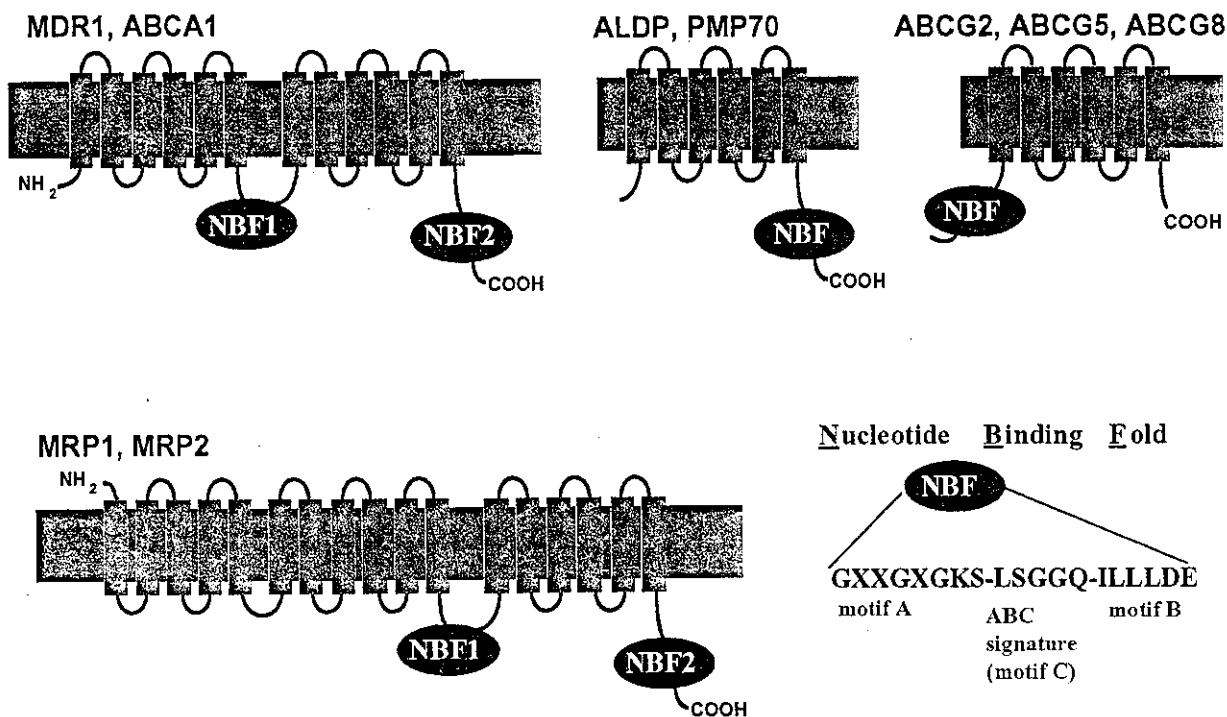


図1 哺乳類の代表的な ABC タンパク質の予想される2次構造

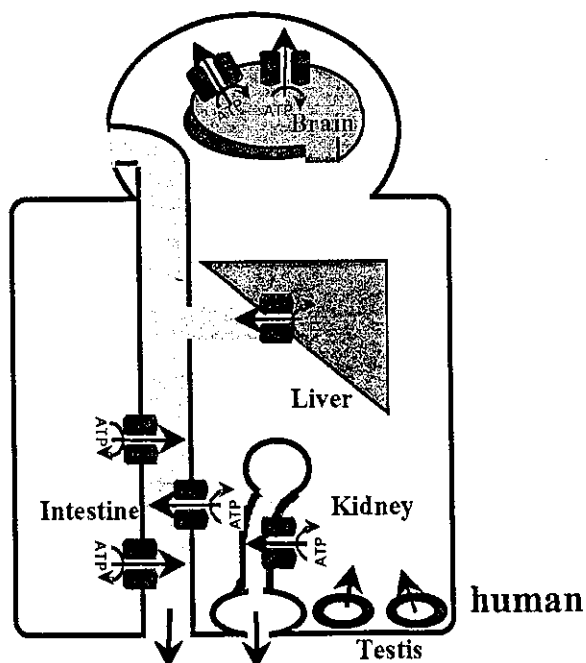


図2 MDR1 は、環境中のさまざまな構造の脂溶性有害物質から我々の体を護っている