

Datar らの試算によると、同じタンパク質を大腸菌と CHO (チャイニーズハムスター卵巣) 細胞とで生産した場合、大腸菌では生産に必要なコストの88%が生産物回収にかかるのに対して、CHO細胞の場合はコストの75%が培養プロセスに必要となる。⁵⁾ また、比増殖速度も微生物に比較して低く、さらに攪拌や通気などの物理的ストレスにもきわめて弱い。⁶⁾ すなわち、物質生産系として考えた場合には微生物を用いるシステムに比較して明らかに不利である。しかし、動物細胞は微生物、下等真核生物、植物などには難しい、よりヒトに近い翻訳後修飾が可能であるという利点がある。したがって、この低い生産性、培養コストをいかに補って物質生産を行うかが細胞培養によるバイオ医薬品生産のポイントとなる。長年にわたる改良の結果、近年では、組換え動物のミルク中での濃度に匹敵する 4 g/l、8000 l 規模の培養が産業的に達成されている。⁷⁾

動物細胞による物質生産において、効率よく目的物質生産を行わせるためには、より生産性の高い細胞を早く効率よく構築する手法が重要となる。そのため、細胞株構築プロセスにおいて、遺伝子増幅現象という宿主ゲノム中に目的遺伝子を多数増幅させるプロセスが汎用されている (図1)。⁸⁾

遺伝子増幅系とは、ある特定の遺伝子増幅を引き起こす遺伝子と目的タンパク質の遺伝子を同時に細胞に導入し、遺伝子増幅を引き起こさせることにより、導入した増幅遺伝子共々、染色体に目的タンパク質遺伝子を多数組込んだ細胞を構築する方法である。このような遺伝子増幅を引き起こす遺伝子と細胞株は一般に限られている。⁸⁾ タンパク質医薬品生産においては、生産性、許認可例の有無などから、宿主細胞として CHO や NSO 細胞、

動物細胞宿主構築・遺伝子増幅を用いてコピー数増加

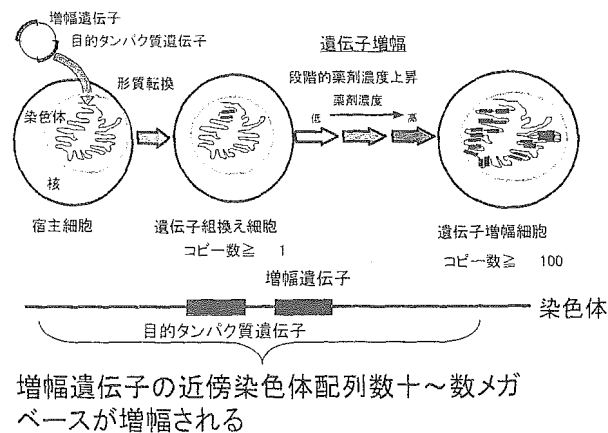


図1. 遺伝子増幅細胞の構築法 (概念図)

増幅遺伝子としてジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) もしくはグルタミン合成酵素 (GS) の組み合わせがよく用いられている。特に、DHFR と CHO 細胞の組み合わせは最も汎用されており、エリスロポエチンや G-CSF など実際の医薬品生産例も多い。そこで、この *dhfr* 遺伝子増幅系を用いた顆粒球-クロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 生産を例として細胞株構築というプロセスについて研究を行った。

薬剤上昇法と構築された細胞株の性質⁹⁾ 遺伝子増幅細胞株の一般的な構築法を図1に示す。遺伝子組換え細胞株の構築は、まず遺伝子組換えを行った後に、段階的にジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤であるメトトレキサート (methotrexate: MTX) 濃度を上昇させ、耐性株を構築する。そして得られた高濃度 MTX 耐性株より、生産性の高い細胞株を選抜する。この MTX 濃度上昇に関してはこれまで経験的かつ試行錯誤を重ねて細胞株を構築するという手法が主として用いられていた。また、構築した細胞株の評価に関しては培地中の生産物濃度で評価されることが多かった。そこで、まず系統だった阻害剤上昇系を構築し、この系における構築した細胞株の性質 (比増殖速度、比生産速度) について検討することにより、まず上昇系と細胞株の性質との関連について検討した。

遺伝子増幅系の宿主としてよく用いられているロンビア大学の Chasin らによって確立された *dhfr* 欠損株 CHO DG44 株を用い、*dhfr* 遺伝子とヒト GM-CSF 遺伝子を組み込んだ pSV2-*dhfr*/hGM-CSF ベクターを用いて遺伝子組換え CHO 細胞株を構築し、遺伝子増幅実験を行った。ここで検討した上昇系の一例を図2に示す。

MTX 濃度の上昇を緩やかに上昇させるパターンから急激に上昇させるパターンまで、5 通りに変化させた上昇系を用いた。この上昇系から得られた 1000 nM MTX 耐性細胞集団の比増殖速度と比生産速度をまとめた結

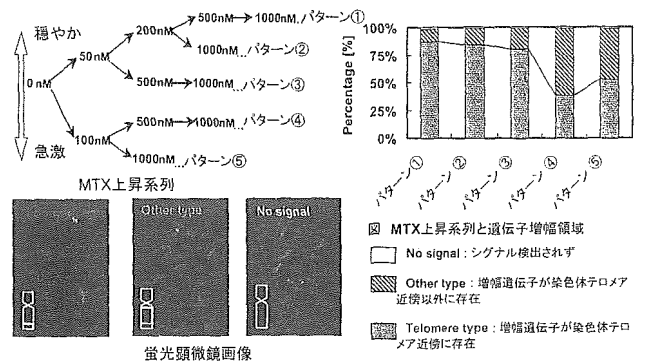


図2. 阻害剤濃度上昇系と FISH 解析結果

果、各細胞集団の平均比生産速度、比増殖速度に明らかな違いがあり、もっとも穏やかな上昇系であるパターン①においてもっとも高い比生産速度、比増殖速度が得られた。同様の結果が初発MTX濃度を10 nMから開始した系においても得られた。また、初発MTX濃度を20 nMに上昇させると耐性細胞は得られなかった。

遺伝子増幅領域のFISHを用いた解析^{9,10)} さて、MTX濃度上昇系に依存して得られた細胞集団の平均の性質が異なることは示されたが、これらの性質の違いはいったい何に起因するのであろうか。そこで、得られた細胞株の染色体上の遺伝子増幅位置の解析を行った。得られた結果をまとめてみると、染色体上の遺伝子増幅領域の分布がMTX上昇系の違いに伴って変化することがわかった。そこで、染色体上の遺伝子増幅領域を(1)テロメアに近い領域に増幅が見られるもの、(2)それ以外の領域に増幅が見られるもの、さらに、(3)増幅がFISH法では観察されないものの3種類に分類してそれぞれの割合とMTX濃度上昇系の関係を検討した(図2)。その結果、比生産速度の低いMTX濃度上昇系においてはテロメア以外の領域で遺伝子増幅をひき起こしている細胞株の割合が上昇していた。以上より、テロメアに近い領域で遺伝子増幅を引き起こした細胞株が高生産性であり、それ以外の領域で遺伝子増幅している細胞株の生産性は低いと推定された。

以上の結果は、すべてヘテロな状態、言い換えればさまざまなクローンの混在する状態における(逆にいえば実際の選択系に即した)実験における結果であるが、これらのクローンを単離した際にも同様の結果が得られるかどうか疑問であった。そこで、得られた細胞株集団より、細胞株化(クローニング)を行い、テロメア近傍に遺伝子増幅している細胞株、それ以外の領域において遺伝子増幅している細胞株を構築し、それぞれの細胞株における*dhfr* 遺伝子およびGM-CSF 遺伝子のコピー数を測定した。¹⁰⁾ テロメア近傍にて遺伝子増幅を引き起こした細胞株においては、*dhfr* 遺伝子のコピー数が高く、それ以外の領域に遺伝子増幅を引き起こした細胞株においてはコピー数が低かった。なお、*dhfr* 遺伝子とGM-CSF 遺伝子のコピー数はほとんど差がなかった。

画像解析を用いたCHO細胞染色体の分類¹¹⁾ 以上の結果より、遺伝子増幅を引き起こしている位置によってその生産性、安定性に大きな違いがあることは解った。しかし、これまで肉眼で観察してきた「テロメア近傍」での遺伝子増幅は、肉眼での観察でははっきり分別できるものの、その定義が明確なものとは言い難い点があっ

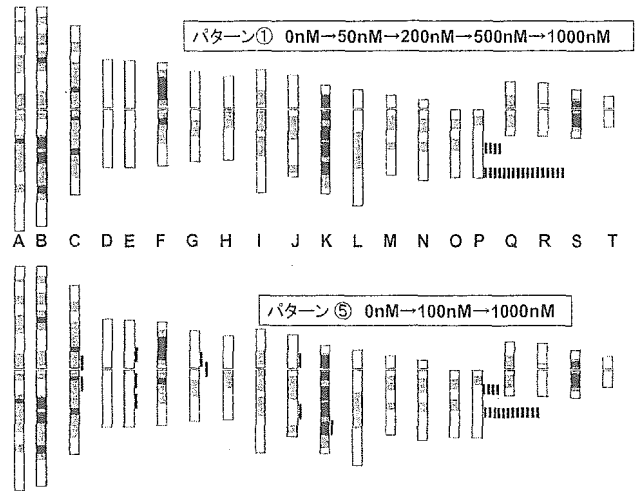


図3. 阻害剤上昇法における遺伝子増幅位置の違い

た。そこで、染色体の分類を画像解析を用いて行い、遺伝子増幅した染色体の分類を試みた。大阪大学福井らによって開発された植物の対比染色した染色体のバンドパターンを解析する画像解析システム、Chromosome Image Analyzing System (CHIAS)¹²⁾を用いて染色体地図を作成し、これをFISHによる遺伝子増幅位置の結果と重ね合わせるにより、染色体の識別を行った。得られた結果を最も長い3本の染色体を指標にしてセントロメアを中心にした核型図式を作成し、FISHによる遺伝子増幅領域解析結果とまとめて図3に示す。その結果、得られた細胞集団中の遺伝子増幅位置は阻害剤濃度上昇法によって異なり、ゆっくりと上昇させたパターン①の場合に特定の染色体領域に遺伝子増幅が集中し、一方、パターン⑤の場合は比較的染色体全般に遺伝子増幅領域が分散していることが示された。

さらに、1000 nM MTX 耐性細胞集団から構築した細胞株について、染色体上の増幅位置とコピー数との関係について検討したところ、より増幅の集中する特定の染色体においてより高頻度で遺伝子増幅が起こっていた。すなわち、この特定染色体に高増幅の鍵があると推定された。現在、特定染色体領域に特異的に目的遺伝子を組み込む系を開発している。¹¹⁾

2. 糖鎖修飾制御法

翻訳後修飾が活性に必要な糖タンパク質バイオ医薬品においては、その糖鎖修飾をいかにうまく制御するかがポイントとなる。糖鎖修飾は遺伝子レベルでその構造が規定されているのではなく、翻訳後30種類以上の酵素反応により、細胞内小器官であるゴルジ体において合成さ

れたタンパク質が修飾される。すなわち、培養中の環境条件の影響を受け変化する。^{13,14)} 目的とする糖鎖構造を得るためには生産プロセスにおいて糖鎖修飾を自在に促進/抑制する技術の開発が必要となる。

著者らは動物細胞による糖タンパク質生産における糖鎖修飾制御法の確立を目指して、対象としてモノクローナル抗体および、血液製剤として多量に用いられている血液凝固剤アンチトロンビンⅢ (ATⅢ) を具体例として培養条件の糖鎖修飾に及ぼす影響について検討した。

まず、抗 RNaseA 抗体¹⁵⁾ を分泌するマウスハイブリドーマ 3A4 株を用いて、グルコースを制限基質とした連続培養において、比増殖速度をさまざまに変化させた定常状態にて生産された抗 RNaseA 抗体の糖鎖構造を解析した。その結果、比増殖速度の変化にともなって、抗体糖鎖の糖鎖構造が変化した。¹⁶⁾ 糖鎖構造の中でも生体内生理活性には末端のガラクトースが補体活性能促進に重要な役割を果たしていることが判っている。比増殖速度を変化させた培養の結果、低い比増殖速度が末端ガラクトース修飾を促進することが示された。¹⁶⁾ そこで、さらなるガラクトース修飾「促進」を目指して、グルコース；マンノース；ガラクトース濃度を変化させた培養を行ったところ、ガラクトース残基を持つ抗体の割合がガラクトース添加に伴って上昇し、糖鎖修飾を促進することが可能であった。¹⁷⁾

血液中の凝固反応に関与する ATⅢ は血液凝固剤としてヒト血液から精製して生産されているが、安全面から、組換え生産が求められている。通常、ヒト血液由来の ATⅢ はフコース修飾されていないが、組換え CHO 細胞を用いて生産させると、糖鎖根元にフコースが修飾される (図 4)。ATⅢ はその生体内活性に糖鎖根元のフコース修飾が大きく影響し、フコース修飾されることにより、生体内活性が低下する。したがって、組換え生産においては、フコース修飾の「抑制」が求められている。

基質である糖源の種類と添加法を変えた回分培養を行い、得られた糖鎖構造の違いについて解析した。その結果、糖比消費速度が変化すると、フコース修飾が変化し、糖比消費速度を増加させることにより、フコース修飾割合を軽減できることが示唆された。^{18,19)} 培養方法以外のフコース修飾抑制法として、フコース修飾を担う $\alpha 1, 6$ -fucosyltransferase (FUT8) 遺伝子をターゲットとしてアンチセンス法によるフコース修飾低減を試みた。まず、FUT8 遺伝子の cDNA を CHO 細胞より RT-PCR 法を用いて単離し、その塩基配列を決定した。²⁰⁾ 決定した配列を既存 4 種 (ヒト、ブタ、マウス、ウシ) の FUT8 遺伝子

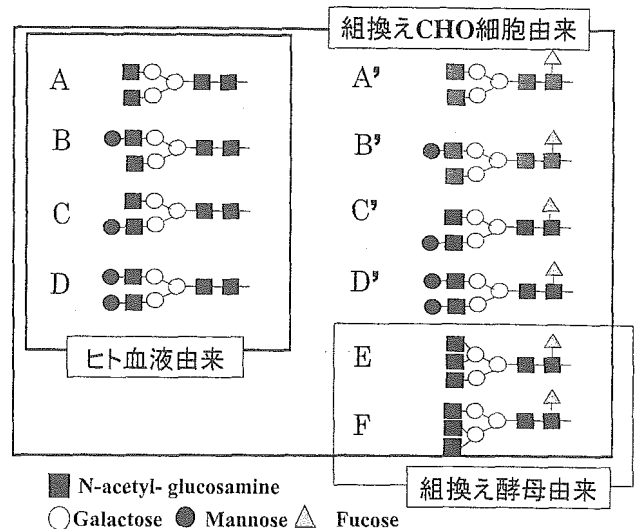


図4. ATⅢの糖鎖構造解析結果

表1. ATⅢの糖鎖構造解析結果

細胞株	(野生株との相対値)	
	FUT8 比活性 (細胞あたり)	ATⅢ あたりのフコース 結合糖鎖量
FUT8 アンチ センス発現株	0.65 ± 0.08	0.90 ± 0.10
FUT8 発現株	1.36 ± 0.14	0.94 ± 0.10

の配列と比較したところ、どの種とも90%以上の相同性があることが明らかとなった。次に、細胞内 FUT8 活性を変化させるため、CHO 細胞に FUT8 および anti-FUT8 遺伝子を導入し、発現させることを試みた。FUT8 および anti-FUT8 遺伝子発現ベクターは、CHO 由来の FUT8 遺伝子を順方向、および逆方向に pTARGET™ Vector に導入することにより構築した。これらのベクターを用いて CHO 細胞を形質転換した。その結果、順方向に FUT8 遺伝子を導入することにより、FUT8 活性が 1.4 倍に、逆方向に FUT8 遺伝子を導入することにより、FUT8 活性を 0.65 倍に減少させることが可能であった (表 1)。これより、FUT8 遺伝子を、向きを変えて細胞に導入することにより、細胞内の FUT8 活性を変化させられることが示された。しかし、得られたアンチセンス発現株のフコース修飾割合は低減されなかった。²¹⁾

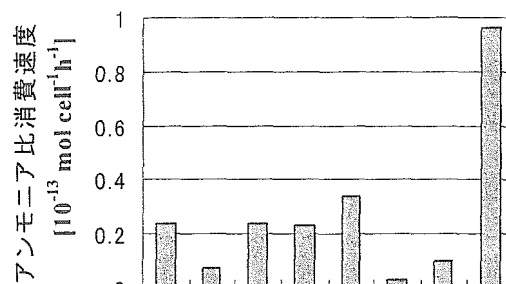
3. バイオ人工臓器への応用

動物細胞の産業応用に関しては、上記で述べた細胞を物質生産の場として利用する手法以外に、近年、細胞自身を利用する手法 (バイオ人工臓器、細胞療法、再生医

療, 細胞を用いた評価系など) が実用化されつつあり, 今後ますますの発展が望まれている. 筆者らは, 細胞療法の一環としてバイオ人工肝臓をとりあげ, 上記の遺伝子増幅の手法をバイオ人工肝を担う細胞株構築に応用し, アンモニア代謝を行える組換えヒト肝細胞を構築し, これを用いたハイブリッド型バイオ人工肝の開発を行った.

肝臓はその大部分が障害されても, 一時的に何らかの方法でその機能を代行して生命を維持できれば, 肝臓自身の再生能力を利用して自身の肝臓が再生し, 患者を救命できる可能性がある.^{22,23)} 現在, 人工肝と呼ばれている人工臓器は, これによって肝臓の完全代替をなすのではなくて, 再生までのbridge-useを目的として開発されている. バイオ人工肝とは, すべて人工物によって機能を代行させるのではなくて, その「化学反応」を担う部分に細胞を用いることにより実際の肝機能の代行を可能とした装置である. 現在開発されているバイオ人工肝は, 細胞と血液透析装置を組み合わせた構造をしている. 人工肝においては, ブタなどの異種由来の初代肝細胞が生物学的素材の細胞として一般的に用いられている. 一方, これに対して, 取り扱いが容易で無限増殖能を持つことから大量調製も可能な, 肝由来の細胞株を人工肝に用いようとする試みも少ないながらも存在する. しかし, 肝由来の細胞株は無限増殖能を得る代わりに肝臓の機能の一部を失っている. そこで, 遺伝子組換えの手法を用いて, 肝臓の機能を持たない, もしくは一部失った細胞株に肝機能を持たせることにより, ハイブリッド型人工肝臓に適した細胞株の開発を試みた.

まず, 肝由来の樹立細胞株31種類について, 肝機能を代表するものとしてP450による第I相代謝を代表する薬物代謝能として7-エトキシマリン代謝活性および解毒活性の代表としてアンモニア代謝能を検証した.²⁴⁾ その結果, 薬物代謝能に関してはその機能は総じて低いものの, ヒト肝由来のHepG2細胞は活性を維持していた. 一方, 検証したすべての細胞株においてアンモニア代謝能が失われていた. 肝臓内でのアンモニア代謝は, 門脈周囲の尿素合成系(総アンモニアの約2/3を代謝)と, 静脈周囲のグルタミン合成酵素(GS)系(総アンモニアの約1/3を代謝)の組み合わせによって代謝されている. そこで, このグルタミン合成酵素を組み込んだアンモニア代謝細胞を構築して人工肝への応用を試みた. まず, 遺伝子組換えの宿主として汎用されているCHOを用いてアンモニア代謝細胞構築を試みたところ, 初代肝の約1/4のアンモニア代謝活性を持つGS-CHO細胞を構築でき



初発アンモニア濃度(mM)	1	0.1	0.1	1	1	0.1	0.1	1
グルタミン添加(7.41mM)			○		○		○	ラット初代肝 ³²⁾
細胞株	GS-CHO		GS-HepG2					

図5. GS-CHO, GS-HepG2細胞株のアンモニア代謝能

た.²⁵⁾ さらにこの手法を応用してHepG2細胞に初代肝の1/3のアンモニア代謝能を持たせたGS-HepG2細胞株を構築した.²⁶⁾ この構築した細胞を用いて高密度培養を達成可能なバイオリクターと組み合わせたバイオ人工肝補助システムを構築してブタ肝不全モデルへの適応を試みた. その結果, 有効生存時間の延長が得られている.²⁷⁻³⁰⁾ 現在, さらに肝機能として薬物代謝を強化した細胞を構築し, これを用いたバイオ血液浄化システム/薬物代謝評価システムについて検討を行っている.³¹⁾

さいごに

動物細胞の産業応用については, 微生物と比較して成熟した技術が確立されたとは言えず, まだまだ解明すべき点も多い. たとえば工業用動物細胞として多用され, 国内バイオ医薬品の約半分を生産しているCHO細胞はモデル生物でも正常細胞でもないために, ゲノムすら明らかになっていない. また, 欧米では日本の発酵技術を取り入れ, ここ10年で急速に培養法が進歩し高生産性が達成されているが, 日本ではやや発展が滞っているのが現状である.

今後, さらに実用化のためには, 単なる機能解析だけではなく, 生物化学工学的な観点からの定量的な解明/手法を踏まえた応用のための基礎研究の充実が必要とされる. また, これらの基礎研究の検証/実践の場としての産学連携が望まれる. 日本生物工学会内には細胞の産業応用の交流の場として, セル&ティッシュエンジニアリング研究部会が活動している. 関連する諸氏の参加を切望します.

上記の研究は, 大阪大学大学院工学研究科応用生物学専攻生物化学工学研究室にて行われたものである. 本研究を遂行す

るにあたり、ご指導を頂いた菅健一大阪大学名誉教授、大竹久夫教授ならびに、共同研究者の皆様にご礼申し上げます。また、糖鎖修飾制御については三菱ウェルファーマ創薬本部研究部門蛋白質医薬研究所・小林薫、應田豊雄、三木秀夫の諸氏との、バイオ人工肝に関しては、国立成育医療センター研究所移植・外科部・実験外科室・絵野澤伸室長との共同研究である。共同研究者の皆様にご礼申し上げます。

文 献

- 1) Harrison, R. G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **4**, 140-143 (1907).
- 2) 日本生物工学会セル&ティッシュエンジニアリング研究部会編: ティッシュエンジニアリングの展望, 三恵社 (2002).
- 3) 日本生物工学会セル&ティッシュエンジニアリング研究部会編: 再生医療実用化にむけた生物工学研究, 三恵社 (2003).
- 4) 日本生物工学会セル&ティッシュエンジニアリング研究部会編: バイオミメティック組織デバイス, 三恵社 (2004).
- 5) Datar, R.V., Cartwright, T., and Rosen, C. G.: *Biotechnology*, **11**, 349-357 (1993).
- 6) 大政健史, 菅 健一: 蛋白質・核酸・酵素, **45**, 2188-2194 (2000).
- 7) Andersen, D. C.: *Abstr. Cell Culture Engineering IX*, p.45 (2003).
- 8) Omasa, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 600-605 (2002).
- 9) Yoshikawa, T., Nakanishi, F., Itami, S., Kameoka, D., Omasa, T., Katakura, Y., Kishimoto, M., and Suga, K.: *Cytotechnology*, **33**, 37-46 (2000).
- 10) Yoshikawa, T., Nakanishi, F., Ogura, Y., Oi, D., Omasa, T., Katakura, Y., Kishimoto, M., and Suga, K.: *Biotechnol. Prog.*, **16**, 710-715 (2000).
- 11) 大政健史, 吉川智啓: 特願2003-317484号
- 12) Kato, S. and Fukui, K.: *Chromosome Res.*, **6**, 473-479 (1998).
- 13) Jenkins, N., Parekh, R. B., and James, D. C.: *Nat. Biotechnol.* **14**, 975-981 (1996).
- 14) 大政健史: 生物工学, **80**, 83 (2002).
- 15) Katakura, Y., Kobayashi, R., Kurokawa, Y., Omasa, T., Fujiyama, K., and Suga, K.: *J. Ferment. Bioeng.*, **82**, 312-314 (1996).
- 16) 田中順也, 網元健詞, 大政健史, 片倉啓雄, 菅 健一: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.83 (1996).
- 17) 田中順也, 網元健詞, 大政健史, 片倉啓雄, 岸本通雅, 菅 健一: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.92 (1997).
- 18) 高橋晶子, 北本友佳, 大政健史, 片倉啓雄, 岸本通雅, 菅 健一, 三木秀夫, 應田豊雄, 小林 薫: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.206 (2000).
- 19) 菅 健一, 大政健史, 岸本通雅, 片倉啓雄, 應田豊雄, 三木秀夫, 小林 薫: WO 02/002793
- 20) 大政健史, 岸本通雅, 片倉啓雄, 菅 健一, 應田豊雄, 小林 薫, 三木秀夫: 特開2003-245079号
- 21) 安藤真之, 高橋晶子, 片倉啓雄, 岸本通雅, 菅 健一, 大政健史, 三木秀夫, 應田豊雄, 小林 薫: 日本生物工学会大会講演要旨集, p.205 (2002).
- 22) 大政健史: ケミカルエンジニアリング, **45**, 33-38 (2000).
- 23) 大政健史, 絵野沢伸: 外科, **63**, 544-549 (2001).
- 24) Enosawa, S., Suzuki, S., Kakefuda, T., and Amemiya, H.: *Cell Transplant.*, **5**, S39-S40 (1996).
- 25) 大政健史, 浦山重雄, 山中 貢, 谷村奈緒子, 片倉啓雄, 岸本通雅, 菅 健一, 絵野澤伸, 雨宮 浩: 化学工学論文集, **24**, 184-189 (1998).
- 26) Omasa, T., Yamanaka, M., Tanimura, N., Katakura, Y., Kishimoto, M., Suga, K., and Enosawa, S.: *Enzyme and Microbial Technol.*, **35**, 519-524 (2004).
- 27) Enosawa, S., Miyashita, T., Suzuki, S., Li, X. K., Tsunoda, M., Amemiya, H., Yamanaka, M., Hiramatsu, S., Tanimura, N., Omasa, T., Suga, K., and Matsumura, T.: *Cell Transplant.*, **9**, 711-715 (2000).
- 28) Miyashita, T., Enosawa, S., Suzuki, S., Tamura, A., Tanaka, H., Amemiya, H., Matsumura, T., Omasa, T., Suga, K., Aoki, T., and Koyanagi, Y.: *Transplant. Proc.*, **32**, 2355-2358 (2000).
- 29) Enosawa, S., Miyashita, T., Tanaka, H., Li, X., Suzuki, S., Amemiya, H., Omasa, T., Suga, K., and Matsumura, T.: *Transplant. Proc.*, **33**, 1945-1947 (2001).
- 30) Enosawa, S., Miyashita, T., Fujita, Y., Suzuki, S., Amemiya, H., Omasa, T., Hiramatsu, S., Suga, K., and Matsumura, T.: *Cell Transplant.*, **10**, 429-433 (2001).
- 31) Omasa, T., Kim, K., Hiramatsu, S., Katakura, Y., Kishimoto, M., Enosawa, S., and Ohtake, H.: *Biotechnol. Prog.*, **21**, 161-167 (2005).
- 32) 井嶋博之, 松下 琢, 船津和守: 人工臓器, **22**, 171-176 (1993).

セル&ティッシュエンジニアリング —細胞から臓器までのネットワーク—

大政 健史

再生医療における生物工学への期待

高等動物は、一個の細胞から細胞分裂、分化を繰り返して、個体を形成する。近年の組織生物学、器官生物学、発生工学などの発展にともない、動物細胞、組織、器官、生体を利用して、医療の分野においてさまざまに応用しようという試みがなされるようになってきた。

セル&ティッシュエンジニアリング研究部会は、動物細胞、組織、器官、生体工学の手法を用いる若手研究者が結集し、生物工学の新規分野である動物細胞、組織、器官、生体を利用した細胞療法、再生医療の実用化および細胞による生物製剤生産、動物実験代替システムなど動物細胞培養に関する工学的課題に対して、生物工学研究者として大きく貢献すると共に、関連する研究、産業の育成、発展を図ることを目的として、2000年5月に発足した研究部会である。

本稿では、研究部会の活動の一端を紹介すると共に、「バイオテクニクス (Biotech-nics and -mix)」関連の研究部会会員研究のいくつかを紹介する。

研究部会の活動として1) 海外調査、2) 会員限定ベンチャーなど産業化勉強会、3) 年次大会、関連学会でのシンポジウム開催、4) 特集企画や、本出版、英文誌特集企画などの出版活動、5) その他、科研費による企画調査や、メーリングリストによる情報交換、専修大学における「バイオ・先端医療講座」共催などを積極的に行っている。ここでは、2001年に科研費調査研究にて行った日本における再生医療産業化に関する調査について簡単に紹介する。本調査は東証一部上場の企業1491社およびバイオベンチャー企業80社に対して、アンケートを実施して行ったものである。以下、有効回答数193件、うち、東証一部上場156件(10%)、ベンチャー企業37件(46%)の回答を集計した結果から、再生医療に関する人材育成に関して抜粋して示す(図1-3)。¹⁾

Q1 将来、再生医療分野で人材が不足するか

本問いに対しては、上場企業とベンチャー企業では意識の大きな違いが見られる。すなわち、より現場に密接に関連しているベンチャー企業では、人材がかなり不足

すると見ている会社が50%に達しているにも関わらず、上場企業ではそれほどの需要を見込んでいないことがわかる(図1)。

大学の再生医療に果たす役割については、研究部会が

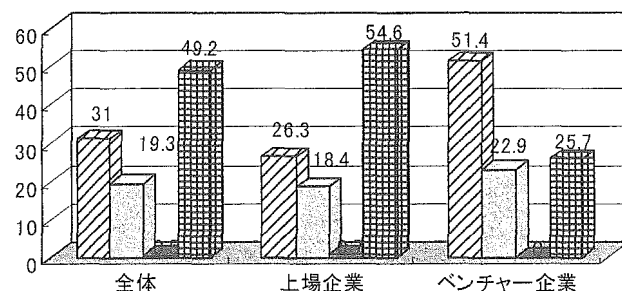


図1. Q1 将来、再生医療分野で人材が不足するか。□ かなり不足する；■ 多少不足する；■ 現状で十分である；■ わからない。

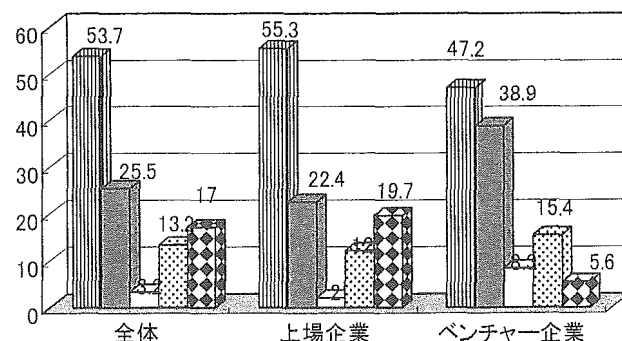


図2. Q2a 人材育成において、大学の役割は大きいか。■ かなり大きい；■ どちらかと言うと大きい；□ 小さい；■ 不必要；■ わからない。

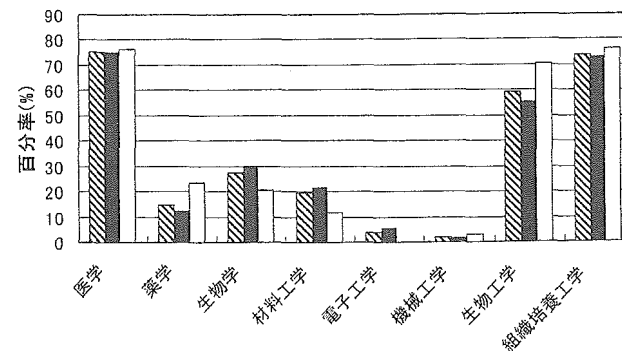


図3. Q2b 人材育成の観点から重要な大学の専攻 (複数回答可)。■ 全体；■ 上場企業；□ ベンチャー企業。

著者紹介 日本生物工学会セル&ティッシュエンジニアリング研究部会 (幹事長), 大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻生
物工学講座 (助教授), 産総研セルエンジニアリング部門 (客員研究員) 〒565-0871 吹田市山田丘2-1
TEL. 06-6879-7437 FAX. 06-6879-7439 E-mail: omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp

行ったアンケートであるために、多少の誇張されている部分があると推定されるが、期待は大きいと考えられる(図2)。また、意外にも、重要な大学の専攻として、医学と並んで生物工学や組織培養工学の果たす役割が重要(材料工学よりも重要視されている)と位置づけられており、再生医療に関する分野での生物工学者の活躍が期待されていると言える(図3)。詳細な回答結果に関しては研究部会出版資料を参考にして頂きたい。¹⁾

会員研究紹介

本特集原稿では、部会会員の中から、生物工学および周辺領域の新しい技術「バイオテクニクス (Biotech-nics and -mix)」関連の研究をいくつか紹介する。

1. 大阪大学大学院基礎工学研究科

紀ノ岡正博, 田谷正仁

本グループは、組織培養における細胞評価系の構築を目指し、下記のような研究を行っている。近年、組織工学の飛躍的な進展により、ヒトの皮膚、軟骨などの細胞を分離・培養し、*in vitro*で組織の再構築を行った後、患者の患部に移植する再生医療技術が開発されてきた。組織工学製品の創出を望む現在では、基礎および実践研究を橋渡しする工学的な展開研究も重要となってきた。特に、培養工学的観点からみると、現状の培養組織作製は、洞察力に長けた熟練オペレータの手作業によるもので、産業規模での生産には不向きとなっている。細胞培養に対するハード・ソフト両面からのシステム構築は、観察および予測する能力を含む洞察力を模倣することを意味し、手工業的に生産している組織工学製品の高品質かつ計画的生産を可能にするものである。特に本グループでは、培養組織の生産における特徴および観察による細胞評価の重要性、細胞観察とデータ解析手法、特に組織培養における準静的評価について精力的に研究を行っている。^{2,3)}

2. 農業生物資源研究所動物細胞機能研究チーム

竹澤 俊明

細胞機能を解析する分子生物学的手法は、ポストゲノム時代に入りますます充実してきている。しかし、動物細胞の潜在能力を検証するための培養技術は1種類の細胞による二次元培養系が主流であり、特に2種類以上の異種細胞による三次元培養は普及していないのが現状である。本研究チームでは、三次元培養を実現可能な手段として、下記の2つの手法を開発している。

支持体付コラーゲンゲル薄膜^{4,5)} 熱変成タンパク質のガラス化技術に注目し、本手法をコラーゲンゲルに応用することにより、強度と透明性が向上したコラーゲンゲル薄膜を再現性よく作製する技術を確立した。さらに、支持体付コラーゲンゲル薄膜を動物細胞の三次元培養担体として活用することにより、薄膜を介した異種細胞間の相互作用モデルをきわめて容易に達成することが可能となった。

切片培養^{6,7)} 生体外での細胞培養系で生体内細胞応答を再現するため、可能な限り生体を反映した培養担体として切片担体を用いた培養技術を開発した。本手法は病理診断に使用される動物組織を薄切した切片には生体組織の微細構造と成分が保持されていることに着眼して、スライドガラスに伸展した組織切片を培養担体として細胞培養を行う技術である。切片担体と培養する細胞の組み合わせを工夫することにより、切片領域に特異的な細胞接着、増殖、分化などに関わる細胞挙動を評価することが可能となった。

3. 大阪大学大学院工学研究科

大政 健史

バイオ人工肝の開発 肝臓はその大部分が障害されても、一時的に何らかの方法でその機能を代行して生命を維持できれば、肝臓自身の再生能力を利用して自身の肝臓が再生し、患者を救命できる可能性がある。バイオ人工肝とは、肝臓機能の「化学反応」を担う部分に細胞を用いることにより実際の肝臓機能の代行を可能とした装置で、細胞培養槽と血液透析装置を組み合わせた構造をしている。本グループでは、遺伝子組換えの手法を用いて、肝臓の機能を持たない、もしくは一部失った細胞株に肝臓機能を持たせることにより、ハイブリッド型人工肝臓に適した細胞株の開発を試みた。

まず、肝由来の樹立細胞株31種類について、肝機能を検証したところ、すべての細胞株においてアンモニア代謝能が失われていた。⁸⁾ 肝臓内でのアンモニア代謝は、門脈周囲の尿素合成系(総アンモニアの約2/3を代謝)と、静脈周囲のグルタミン合成酵素(GS)系(総アンモニアの約1/3を代謝)の組み合わせによって代謝されている。そこで、このグルタミン合成酵素を組み込んだアンモニア代謝細胞を構築して人工肝への応用を試みた。HepG2細胞にグルタミン合成酵素を組み込んで、グルタミン合成酵素阻害剤にて選択したところ、初代肝の約1/4のアンモニア代謝能を持つ細胞株を構築できた。⁹⁾ この構築した細胞を用いて、バイオ人工肝補助システム(図4)を構築し、ブタ肝不全モデルへの適応を試みた。その結果、

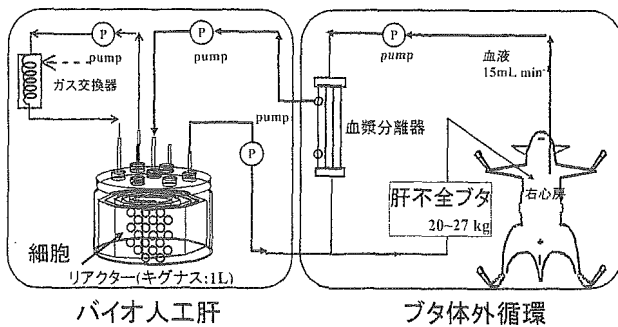


図4. ハイブリッド型バイオ人工肝補助システム¹⁰⁾

有効生存時間の延長が得られている。¹⁰⁻¹³⁾

他細胞、他臓器とのネットワーク：バイオ血液浄化システム さて、肝臓に取り込まれて代謝された毒物老廃物は、肝臓内での第I相、第II相反応を受けて、体内循環を経、最終的には腎臓において排出される。肝不全患者は腎不全を含めた多臓器不全に陥りやすい。人工腎臓はもっとも完成された人工臓器の一つであり、我が国では20万人以上の患者が人工透析治療を受け、長期延命も実現している。しかしながら、人工臓器としての人工腎臓は糸球体のろ過機能、すなわち分子量分画を行う透析装置としての性能のみを実現しているに過ぎない。そこで、近年では、腎由来細胞を用いたバイオ人工腎臓の開発も試みられるようになってきた。たとえば、Wangらは、腎臓の再構築を目指して、腎糸球体上皮細胞とメサンギウム細胞の細胞外マトリックスによる共培養を試みている。^{14,15)} 筆者らは肝臓の第I相反応、第II相反応の再構築を目指し、第I相反応としてCYP3A4、第II相反としてグルクロン酸抱合を担う肝由来代謝強化細胞を遺伝子組換えを用いて構築し、肝臓内代謝再構築を行っている。^{16,17)} また、上記の研究に加え、肝臓と腎臓の細胞を組み合わせて選択的に薬物代謝を行わせる試みも行った。具体的には polytetrafluoroethylene (ePTFE) 膜状の両側を用い、上記の肝由来代謝強化細胞と薬物代謝トランスポーター MDR を組み込んだ近位尿管由来細胞 (PCTL-MDR) を膜面の両側に配向した膜を構築し、薬物代謝が可能なバイオ人工血液ろ過システム (bio-hemofiltration) の構築を試みている。¹⁸⁾

薬物代謝評価システムの開発 創薬において重要とされる薬物代謝は、薬物代謝酵素の誘導・発現が大きく影響する。中でも P450 は、薬物の約 90% の代謝反応に関与する重要な酵素として注目されている。そこで、

P450 をターゲットとした Cell-based Screening System の構築を目的とし、発現誘導および代謝能が同時に検証できる細胞の構築およびマイクロスケールでの細胞培養、薬物代謝反応について検討した。発現誘導および代謝能が同時に検証可能な系として、CYP3A4 プロモーター下流に IRES 配列と GFP 遺伝子、CYP3A4cDNA を組み込んだプラスミドを作製した。¹⁹⁾ このプラスミドを肝由来細胞株 HepG2 にトランスフェクションさせて誘導薬剤を加えたところ、誘導薬剤存在下で蛍光が観察された。さらに、マイクロスケールでの細胞による薬物代謝反応評価系の構築を目指し、GS-3A4-HepG2 細胞を用い、容積約 100 μ l の流路構造を有するリアクターにて培養を行い、薬物代謝活性について検討している。

本特集を執筆するにあたり、ご協力を頂きましたセル&ティッシュエンジニアリング研究会、部会長高木陸先生ならびに会員の皆様、特に研究紹介に協力頂きました大阪大学紀ノ岡正博先生、田谷正仁先生ならびに農業生物資源研究所 竹澤俊明先生に感謝申し上げます。また、筆者執筆分は、国立成育医療センター研究所 絵野沢伸室長ならびに産総研セルエンジニアリング部門、吉川智啓博士、三宅正人先生との共同研究です。共同研究者の皆様に御礼申し上げます。本研究部会への皆様の積極的なご参加、お待ち申し上げております。

文 献

- 1) 日本生物工学会セル&ティッシュエンジニアリング研究会編：ティッシュエンジニアリングの展望—再生医療関連の産業化動向・日米比較、三恵社 (2002)。
- 2) Hata, N. et al.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 233 (2004)。
- 3) 紀ノ岡正博、田谷正仁：最近の化学工学56 (化学工学会関東支部編), p.79, 化学工業社, 東京 (2004)。
- 4) Takezawa, T. et al.: *Cell Transplant.*, **13**, 463 (2004)。
- 5) 竹澤俊明, 二谷 綾：化学と生物, **42**, 713 (2004)。
- 6) Takezawa, T. et al.: *FASEB J.*, **16**, 1847 (2002)。
- 7) 竹澤俊明：再生医療, **4**, 39 (2005)。
- 8) Enosawa, S. et al.: *Cell Transplant.*, **5**, S39 (1996)。
- 9) Omasa, T. et al.: *Enzyme and Microbial Technol.*, **35**, 519 (2004)。
- 10) Enosawa, S. et al.: *Cell Transplant.*, **9**, 711 (2000)。
- 11) Miyashita, T. et al.: *Transplant. Proc.*, **32**, 2355 (2000)。
- 12) Enosawa, S. et al.: *Transplant. Proc.*, **33**, 1945 (2001)。
- 13) Enosawa, S. et al.: *Cell Transplant.*, **10**, 429 (2001)。
- 14) 王 碧昭：生物工学, **78**, 64 (2000)。
- 15) 王 碧昭ら：日本生物工学会大会講演要旨集, p.101 (2000)。
- 16) Omasa, T. et al.: *Biotech. Prog.*, **21**, 161 (2005)。
- 17) Omasa, T. and Enosawa, S.: *Biochemical Engineering XIII*, II-4-1 (2003)。
- 18) Endo, M. et al.: *J. Artificial Organs*, **4**, 336 (2002)。
- 19) 大政健史, 大竹久夫：特願2004-046675号

バイオマスからのキシロースと キシリトールの微生物生産

高見澤一裕*1・河合 啓一²・鈴木 徹³

キシロース (D-キシロース) は木糖とも呼ばれ、文字通り、木に含まれている糖で、かなり苦味がある。構造は5炭糖で、資源量としては6炭糖であるグルコースと同程度である。グルコースは、甘味料として食生活に大量に使用され、さらに、発酵工業や各種の化学工業で原料として使用されているが、キシロースはほとんどが利用されていない。資源量として豊富であるのになぜ利用されないのであろう？ その答えは価格にある。ブドウ糖は、砂糖を加水分解することで簡単にかつ安く手に入るが、キシロースの入手は困難である。その理由は、どの植物にたくさん含まれているかの情報が不十分であることと、取り出し方に良い方法がないからである。

バイオマス・ニッポンが提唱され、地球温暖化防止と循環型社会構築のためにカーボンニュートラルであるバイオマスの利用が叫ばれている。バイオマスは石油に匹敵する資源量があると試算され、新たな産業の創出につながるかと期待されている。バイオマスは再生可能な資源であるため、理屈で考えると再生産量に見合う量を利用すれば、永遠に資源は枯渇しないことになり、理想的な資源である。

しかし、現状はエネルギー利用に主眼が注がれ、新産業が創出できるような状況にはない。その原因は、バイオマスに含まれる化学組成がはっきりせず、個々の研究者がばらばらにデータを取得し、まとまったデータベースがないためと考えられる。日本には、食品分析表という世界に冠たる食品成分のデータベースがあり、これを利用したさまざまな食品や医薬品の開発が行われている。すぐれたデータベースは、産業の隆盛につながる。バイオマスのデータベースが整備されることを望んでいる。

筆者らは、植物残渣として廃棄されるバイオマスの有効利用、特にキシロースの利用を考えて、植物系廃棄物中に含まれる糖質系のデータベースの作成と、それらの廃棄物からのキシロースの抽出方法とキシリトールへの変換方法を検討してきた。その一端を紹介する。

植物系廃棄物の糖質組成¹⁻⁴⁾

植物は一般に、セルロース、ヘミセルロース (主にキ

シラン)、リグニンからなっている。セルロースはグルコースのポリマー、リグニンはポリフェノールの複雑な構造をしている。目的のキシロースはヘミセルロース(キシラン)中にポリマーとして存在し、これらは複雑に絡み合った強固な構造をしており、それゆえ、木や草はまっすぐに立っている。

キシロース量を正確にするには、まず、脱リグニンしてセルロースとヘミセルロースの複合体を得、次に、セルロースをアルカリ分解で除去し、残ったヘミセルロースを加水分解して最終的に糖質成分を分析するという複雑な操作をしなければならない。これらの操作は木材の分析のために発展してきたもので廃棄植物成分のために検討されたものではない。そこで、分析方法の検討から開始し、最適分析条件を求めた。

各種植物の殻や皮など15種類と食品工業廃棄物(具体的にはジュース、清涼飲料水の製造残渣)5種類の分析を行った。選んだ植物は、FAO統計年間を参考にし、世界的にみてその生産量が多く、しかも廃棄率が高いと考えられるものである。なお、トウモロコシの穂軸、サトキビの滓も大量に産出しているが、これらはアルコール・

表1. 各種植物系廃棄物の化学分析による組成¹⁻⁴⁾

	ヘミセル ロース	セルロース	その他	ヘミセル ロース中の キシロース
ピスタチオ殻	49	40	12	36
クルミ殻	34	41	25	19
ヒマワリ種殻	28	47	25	18
ブナ	23	43	35	17
雑草	35	36	29	14
大麦の籾殻	30	44	26	14
クリの殻	30	46	24	13
タケ	34	36	30	13
スギ	21	49	30	11
イネの籾殻	38	35	27	11
ギンナン殻	45	32	23	8.7
イナワラ	31	39	30	8.5
ピーナッツ殻	23	51	26	8.4

単位はすべて、g/100 g 試料

* 著者紹介 ¹ 岐阜大学応用生物科学部 (教授) 〒501-1193 岐阜市柳戸 1-1
TEL. 058-293-2906 FAX. 058-293-2906 E-mail: tak2003@cc.gifu-u.ac.jp

² 岐阜大学応用生物科学部, ³ 岐阜大学生命科学総合実験センター

Case Report

Detection of ABCA7-positive cells in salivary glands from patients with Sjögren's syndrome

Yoshinobu Toda,¹ Ryo Aoki,² Yuika Ikeda,² Yuya Azuma,² Noriyuki Kioka,² Michinori Matsuo,² Maya Sakamoto,³ Shiro Mori,⁴ Manabu Fukumoto⁵ and Kazumitsu Ueda²

¹Center for Anatomical Studies, Graduate School of Medicine, Kyoto University, ²Laboratory of Cellular Biochemistry, Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Departments of ³Oral Diagnosis and ⁴Oral Medicine and Surgery, Tohoku University Graduate School of Dentistry and ⁵Department of Pathology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan

ABCA7 is a member of the subfamily A of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) proteins, and highly homologous to ABCA1, which mediates the release of cellular cholesterol and phospholipid to form high-density lipoprotein. ABCA1 and ABCA7 contain two large extracellular domains, ECD1 and 2, which are thought to be important for their functions. Interestingly, part of ECD1 of ABCA7 is deposited as an autoantigen of Sjögren's syndrome. To determine the relationship between ABCA7 and Sjögren's syndrome, an immunohistochemical study was conducted with salivary gland biopsy samples from patients with Sjögren's syndrome. ECD1 of human ABCA7 (amino acids 45–549) was expressed in *Escherichia coli* as a protein fused with glutathione-S-transferase and a monoclonal antibody, KM3095, was generated. KM3095-immunoreactive cells were observed in salivary glands from 10 of 18 patients with Sjögren's syndrome. Immunostaining of serial sections with the plasma cell marker NCL-PC indicated that most of the plasma cells infiltrating salivary glands of patients with Sjögren's syndrome were KM3095-immunoreactive. Although the pathological or biological significance is not clear, it will be intriguing to further examine the relationship between ABCA7 and Sjögren's syndrome.

Key words: ABC proteins, ABCA7, autoantigen, autoimmune, Sjögren's syndrome

We previously reported that the peptide deposited in the DDBJ/EMBL/GenBank as the autoantigen SS-N (Niwa, A., and Maruyama, I. N. Accession No. AF140342), an epitope of Sjögren's syndrome, is a part of the first extracellular

domain (ECD1) of ABCA7.¹ ABCA7 is a member of the subfamily A of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) proteins, and highly homologous to ABCA1. ABCA1 and ABCA7 mediate the release of cellular cholesterol and phospholipid to form high-density lipoprotein (HDL).^{2–6} However, ABCA7 is expressed in a rather tissue-specific manner compared to ABCA1, and mRNA of ABCA7 is predominantly found in brain and myelo-lymphatic tissues.^{2,7,8} Furthermore, the apolipoprotein A (apoA)-I-dependent release of cholesterol and phospholipids from macrophages isolated from *Abca7*^{-/-} mice is normal.⁸ From these results, it is proposed that ABCA7 has a more specialized function other than the formation of HDL.⁸

The current topological model of ABCA7 predicts 12 integral transmembrane α -helices (TM), two hydrophilic nucleotide-binding folds, and two large extracellular loops between TM1 and TM2 and between TM7 and TM8. Possession of the two large extracellular domains, ECD1 and 2, is unique to the ABCA subfamily.¹ ECD1 of ABCA1 plays a key role in the HDL assembly reaction because many mutations have been identified in the ECD1 in patients with Tangier disease and familial hypoalphalipoproteinemia.^{9–11} Mutations in ECD1 of ABCA1 impaired apoA-I-dependent lipid release when expressed in HEK293 cells.^{4–6}

Sjögren's syndrome is an autoimmune disease that manifests primarily in the salivary and lacrimal glands and is characterized by oral and ocular dryness.¹² Because ECD1 of ABCA7 extrudes outside cells, a section of it might be excised and circulate. However, it is unknown if ABCA7 is linked to autoimmune diseases, or if ABCA7 plays a physiological role in lipid homeostasis in peripheral blood cells, and in cells of the immune system. In the present study we inquired into the relation between ABCA7 and Sjögren's syndrome by examining the expression of ABCA7 in salivary gland biopsy samples from patients with Sjögren's syndrome.

Correspondence: Kazumitsu Ueda, PhD, Laboratory of Cellular Biochemistry, Division of Applied Life Sciences, Kyoto University Graduate School of Agriculture, Kyoto 606-8502, Japan.
Email: uedak@kais.kyoto-u.ac.jp

Received 12 September 2004. Accepted for publication 29 June 2005.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of human ABCA7 ECD1 and generation of a monoclonal antibody

The putative ECD1 of human ABCA7, amino acids 45–549, was cloned into the vector pGEX4T-3 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and expressed as a protein fused with glutathione-S-transferase (GST) in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Expression was induced for 3 h by the addition of 1 mmol/L isopropyl 1-thio- β -D-galactoside (IPTG) at 30°C. The fusion protein was purified by glutathione sepharose 4B chromatography (Amersham Biosciences) according to the manufacturer's instructions. A rat monoclonal antibody KM3095 (IgG2a) was generated by immunizing rats with the purified ECD1-GST fusion protein.

Cell culture and stable transfection

HEK293 was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum. A cell line stably expressing human ABCA7 fused with green fluorescent protein (GFP) at the C-terminus was obtained by transfecting HEK293 with pEGFP(N3)/hABC7 using LipofectAMINE reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Clones were selected with 0.8 mg/mL of G418 sulfate (Wako, Osaka, Japan), and expression of hABCA7GFP was assessed by western blotting using anti-GFP antibody (Santa Cruz Biotechnologies, Delaware, CA, USA) and the antibody KM3095.

Immunohistochemical staining

Paraffin-embedded sections of the salivary gland biopsy from 18 patients with Sjögren's syndrome and those from 20 cases of non-specific sialoadenitis were examined with immunohistochemical staining. Material handling and immunostaining were performed according to methods described previously.¹³ Antigen retrieval was done with the microwave method. Briefly, citrate buffer (pH 6.0) was boiled for 10 min in a pressure-proof rice cooker (Rakuchin Gozen, Daiya, Tokyo, Japan) by microwave. Glass slides were put into a metal rack and boiled for another 20 min in the rice cooker. Endogenous peroxidase activity was blocked by 0.3% H₂O₂ in methyl alcohol for 30 min. The antibody KM3095 (purified IgG) at a dilution of 1:50 was applied overnight at 4°C. Samples were then incubated with biotinylated rabbit antirat IgG (H + L) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluted to 1:300 for 40 min. Avidin–biotin–peroxidase complex (ABC; ABC-Elite, Vector Laboratories) at a dilution of 1:100 was applied for 50 min. The coloring reaction was carried out with

0.3 mg/mL of diaminobenzidine and 0.003% H₂O₂ and nuclei were counterstained with hematoxylin. NCL-PC, plasma cell marker (Novocastra Laboratories, Newcastle, UK), was used according to the manufacturer's protocol.

Ethical considerations

Written informed consent was obtained from each patient, and permission for the research was obtained from the Ethics Committee of Tohoku University Graduate School of Dentistry.

RESULTS

To determine the relationship between ABCA7 and Sjögren's syndrome, we planned to generate an antibody against ECD1 of ABCA7, which can be used for immunostaining. ECD1 (amino acids 45–549) was expressed in *E. coli* as a protein fused with GST and purified by glutathione sepharose 4B chromatography (Fig. 1). A monoclonal antibody, KM3095, was generated by immunizing rats with the purified ECD1. KM3095 strongly reacted with 250–280 kDa proteins in membrane fraction from cells expressing the type I and type II (a splicing variant²) ABCA7 in western blot analyses, but reacted with no proteins in HEK293 host cells (Fig. 2).

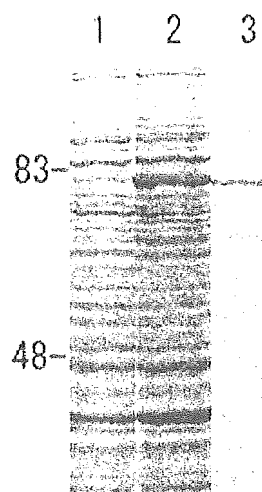


Figure 1 Preparation of the glutathione-S-transferase (GST)-fused extracellular domain (ECD1) of human ABCA7. Lanes 1 and 2, total bacterial extracts of BL21 (DE3) harboring the ECD1-GST expression vector before and 3 h after isopropyl 1-thio- β -D-galactoside (IPTG) induction (1 mmol/L as a final concentration) at 30°C. Lane 3, The GST-fused ECD1 purified using the glutathione-sepharose 4B affinity column. Proteins were separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and visualized by CBB staining. GST-fused ECD1 was recovered with a purity of >90%.

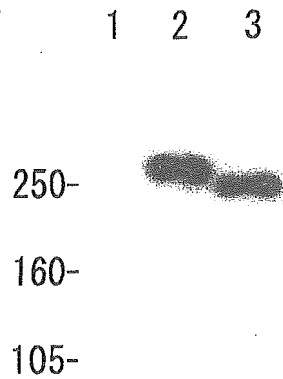


Figure 2 Immunoblot analysis of HEK293 cells stably expressing ABCA7 type I-green fluorescent protein (GFP) and ABCA7 type II-GFP. Membranes (6 µg) were prepared from untransfected HEK293 cells (lane 1) or from HEK293 cells stably expressing ABCA7 type I-GFP (lane 2) and ABCA7 type II-GFP (lane 3). Proteins were separated on a 7% sodium dodecylsulfate (SDS)-polyacrylamide gel and reacted with KM3095. KM3095 specifically reacts with the type I and type II ABCA7 in immunoblotting.

Because KM3095 did not react with ABCA1 expressed in HEK293 cells (data not shown), it does not cross-react with ECD of ABCA1.

HEK293 cells stably expressing ABCA7 fused with GFP at the C-terminus were established. ABCA7-GFP was localized to plasma membrane as well as the intracellular compartments (Fig. 3). When non-permeabilized cells were incubated with KM3095, ABCA7-GFP on the cell surface was clearly visualized. This suggested that ABCA7-GFP resided on the cell surface, exposing ECD1 to the exterior of cells, as well as in intracellular compartments in a similar manner to ABCA1-GFP.¹ KM3095 did not react with ABCA1-GFP stably expressed in HEK293 cells (Fig. 3). These results suggested that KM3095 can be used for immunohistochemical studies of ABCA7.

Sections of formalin-fixed and paraffin-embedded salivary gland from 18 patients with Sjögren's syndrome were examined with KM3095, and KM3095-immunoreactive cells were observed in sections from 10 patients. Immunohistochemical staining of a section of salivary gland of one patient is shown in Fig. 4(a). The positive cells are distributed rather diffusely among inflammatory infiltrates. Morphologically these cells were consistent with plasma cells: they were ovoid in shape and had an eccentrically placed nucleus. KM3095-immunoreactive cells were different from CD3-positive, CD68-positive, or CD-79-positive cells (data not shown), indicating that they were distinct from B or T lymphocytes or macrophages. To confirm that KM3095-immunoreactive cells are plasma cells, immunostaining of a serial section was done with a

plasma cell marker, NCL-PC (Fig. 4b). It was found that almost all of the plasma cells were positive for KM3095 (black arrows), although a small fraction were negative for KM3095 (white arrowhead). Staining was negative using antibody absorbed with the purified ABCA7 ECD1 (data not shown), indicating that the immunostaining in the present study was specific to ABCA7 ECD1.

In order to elucidate the biological relevance of ABCA7, results from immunohistochemical staining were compared with clinicopathological findings. Biopsy sections of salivary glands from 18 patients with Sjögren's syndrome were classified into three grades according to the number of plasma cells positive for ABCA7: ++, more than two clusters composed of more than two positive cells were observed in high-power visual field (four cases); -, positive cells were undetectable (eight cases); +, between ++ and - (six cases). Dry mouth and dry mucosa were found in all the ++ cases, whereas we could not find differences in other clinicopathological findings among these groups including histological grades, serum immunoglobulin level and clinical examinations.

DISCUSSION

We previously reported that the human *ABCA7* gene produces at least two types of splicing variants in a tissue-specific manner.² In lymph node, spleen, thymus, and trachea the type II (a splicing variant) mRNA is more abundant than the type I. While the full-length (type I) ABCA7 mediates the apoA-I-dependent release of cholesterol and phospholipids, the type II mRNA does not produce functional proteins.² We succeeded in detecting KM3095-immunoreactive plasma cells in salivary glands from Sjögren's syndrome patients in the present study, but failed to detect KM3095-immunoreactive cells in human peripheral blood cells, control salivary glands or other reticuloendothelial organs such as lymph nodes, the spleen and the liver (data not shown). Although the type II ABCA7 protein was detected in overexpressed cultured cells (Fig. 2), it might be readily degraded as an abnormal protein *in vivo*. Alternative splicing could be involved in the post-transcriptional regulation of the expression and function of human ABCA7, and the splicing pattern could be changed in plasma cells infiltrating the salivary glands of patients with Sjögren's syndrome.

The cells positive for KM3095 were plasma cells. Therefore, it is possible that the antibody on the cell surface traps a section of ABCA7 including ECD1, and KM3095 reacted to the trapped ABCA7 molecules. It has been reported that cells producing autoantibody to Ro proteins, which circulate in 50–90% of patients with Sjögren's syndrome, were present within the salivary gland.^{14,15} ECD1 of ABCA7, which extrudes outside cells, might be excised and a section of it might circulate

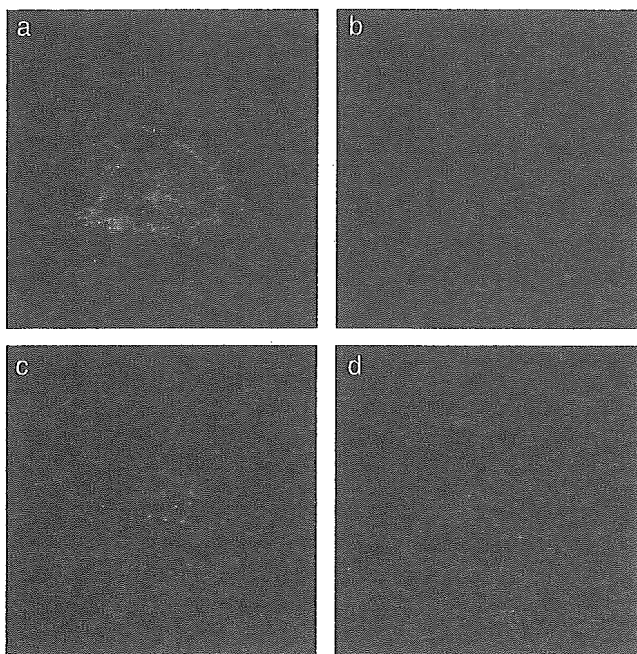


Figure 3 Immunofluorescence confocal microscopy of HEK293 cells stably expressing (a) ABCA7 type I-green fluorescent protein (GFP) or (c) ABCA1-GFP. (a,c) GFP, GFP fluorescence. (b,d) KM3095, immunofluorescent microscopy with the anti-extracellular domain (ECD)1 monoclonal antibody KM3095 and antirat IgG-Alexa594. ABCA7-GFP on the cell surface was clearly visualized when cells stably expressing ABCA7-GFP were incubated with the antibody.

and be present within the salivary gland. Although positive cases for ECD1 were associated with sicca syndrome, we could not find other clinicopathological differences between positive and negative cases. If ECD1 of ABCA7 presents as an antigen within the salivary glands, the cells could be activated to produce autoantibodies, which, in turn, might partly be responsible for the inflammatory changes in salivary glands. This implies the potential involvement of antibodies against ABCA7 ECD1 (SS-N) in the pathogenic process of the autoimmune exocrinopathy of the disease. It would be interesting and help to elucidate the pathogenic mechanism if we could compare immunohistochemical findings in the present study with those for autoantibody from patients with Sjögren's syndrome. Because biopsy specimens were too small to observe global architectural changes in the salivary gland we need to conduct further examination to determine the biological relevance of KM3095-immunopositivity.

In summary, we generated a monoclonal antibody, KM3095, against the first extracellular domain of human ABCA7, and showed that plasma cells infiltrating salivary glands of patients with Sjögren's syndrome were KM3095-immunoreactive. Although the pathological and biological significance of this is not clear, it is worth examining further the relationship between ABCA7 and Sjögren's syndrome.

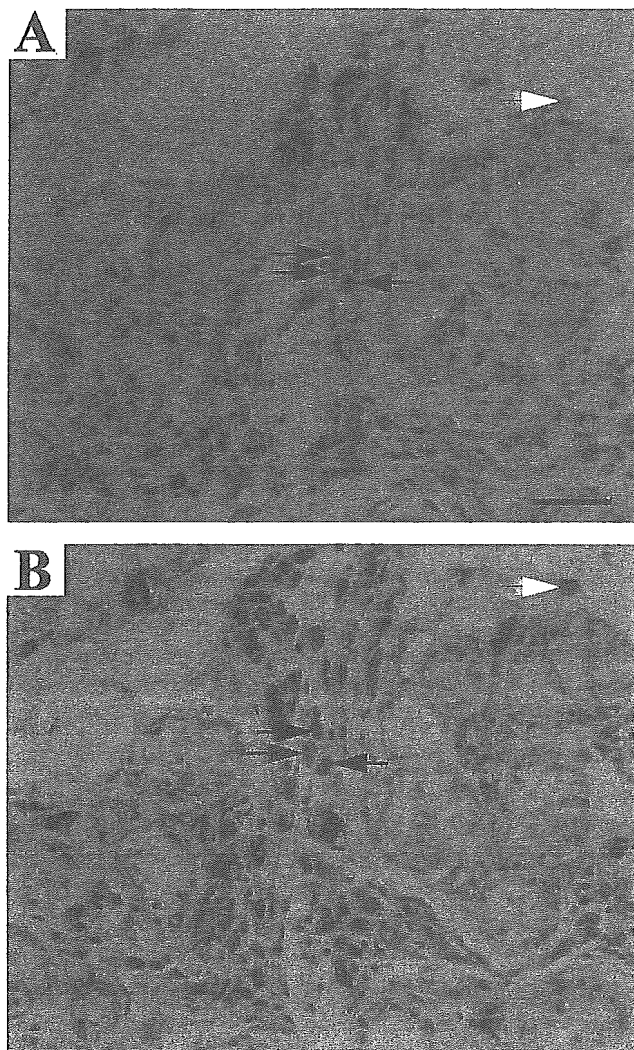


Figure 4 ABCA7-positive cells in salivary glands obtained from patients with Sjögren's syndrome. (A) Serial sections of salivary gland were stained with a monoclonal antibody, KM3095, against the extracellular domain (ECD1) of human ABCA7 or (B) a plasma cell marker, NCL-PC (Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK). Most of the NCL-PC-positive cells were positive for KM3095 (black arrows), while a small fraction were negative (white arrowhead) in this case. Scale bar, 20 μ m.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Kyowa Hakko Kogyo for generating the anti-ECD1 monoclonal antibody KM3095. This work was supported by Grant-in-aid for Scientific Research and Creative Scientific Research 15GS0301 from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, and a grant from the Pharmaceutical and Medical Devices Agency.

REFERENCES

- 1 Tanaka AR, Ikeda Y, Abe-Dohmae S *et al.* Human ABCA1 contains a large amino-terminal extracellular domain homolo-

- gous to an epitope of Sjogren's syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **283**: 1019–25.
- 2 Ikeda Y, Abe-Dohmae S, Munehira Y *et al*. Posttranscriptional regulation of human ABCA7 and its function for the apoA-I-dependent lipid release. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **311**: 313–18.
 - 3 Abe-Dohmae S, Ikeda Y, Matsuo M *et al*. Human ABCA7 supports apolipoprotein-mediated release of cellular cholesterol and phospholipid to generate high density lipoprotein. *J Biol Chem* 2004; **279**: 604–11.
 - 4 Tanaka AR, Abe-Dohmae S, Ohnishi T *et al*. Effects of mutations of ABCA1 in the first extracellular domain on subcellular trafficking and ATP binding/hydrolysis. *J Biol Chem* 2003; **278**: 8815–19.
 - 5 Fitzgerald ML, Morris AL, Rhee JS, Andersson LP, Mendez AJ, Freeman MW. Naturally occurring mutations in ABCA1's largest extracellular loops can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. *J Biol Chem* 2002; **277**: 33 178–87.
 - 6 Rigot V, Hamon Y, Chambenoit O, Alibert M, Duverger N, Chimini G. Distinct sites on ABCA1 control distinct steps required for cellular release of phospholipids. *J Lipid Res* 2002; **43**: 2077–86.
 - 7 Kaminski W, Orso E, Diederich W, Klucken J, Drobnik W, Schmitz G. Identification of a novel human sterol-sensitive ATP-binding cassette transporter (ABCA7). *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; **273**: 532–8.
 - 8 Kim WS, Fitzgerald ML, Kang K *et al*. Abca7 null mice retain normal macrophage phosphatidylcholine and cholesterol efflux activity despite alterations in adipose mass and serum cholesterol levels. *J Biol Chem* 2005; **280**: 3989–95.
 - 9 Remaley AT, Rust S, Rosier M *et al*. Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): Genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 12 685–90.
 - 10 Lawn RM, Wade DP, Garvin MR *et al*. The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest* 1999; **104**: R25–31.
 - 11 Brousseau ME, Schaefer EJ, Dupuis J *et al*. Novel mutations in the gene encoding ATP-binding cassette 1 in four Tangier disease kindreds. *J Lipid Res* 2000; **41**: 433–41.
 - 12 Sood S, Anthony R, Pease CT. Sjogren's syndrome. *Clin Otolaryngol* 2000; **25**: 350–57.
 - 13 Toda Y, Kono K, Abiru H *et al*. Application of tyramide signal amplification system to immunohistochemistry: A potent method to localize antigens that are not detectable by ordinary method. *Pathol Int* 1999; **49**: 479–83.
 - 14 Tan EM. Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 1989; **44**: 93–151.
 - 15 Tengner P, Halse AK, Haga HJ, Jonsson R, Wahren-Herlenius M. Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1998; **41**: 2238–48.

Cloning of ABCA17, a novel rodent sperm-specific ABC (ATP-binding cassette) transporter that regulates intracellular lipid metabolism

Nobuhiro BAN*¹, Mayumi SASAKI*^{†1}, Hiromichi SAKAI*, Kazumitsu UEDA‡ and Nobuya INAGAKI*^{†2}

*Department of Physiology, Akita University School of Medicine, and CREST of Japan Science and Technology Cooperation (JST), 1-1-1, Honjo, Akita 010-8543, Japan, †Department of Diabetes and Clinical Nutrition, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan, and ‡Laboratory of Cellular Biochemistry, Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

The A subclass of the ABC (ATP-binding cassette) transporter superfamily has a structural feature that distinguishes it from other ABC transporters, and is proposed to be involved in the transmembrane transport of endogenous lipids. Here we have cloned mouse and rat full-length cDNAs of ABCA17, a novel ABC transporter belonging to the A subclass. Mouse and rat ABCA17 proteins comprise 1733 and 1773 amino acid residues respectively, having 87.3% amino acid identity; mouse ABCA17 has amino acid identities of 55.3% and 36.7% with mouse ABCA3 and sea urchin ABCA respectively. RNA blot and quantitative real-time PCR analyses showed that ABCA17 mRNA is expressed exclusively in the testis. Examination of testis by *in situ* hybridization showed that ABCA17 mRNA is expressed in germ cells, mainly spermatocytes, in the seminiferous tubule.

Immunoblot analysis using a specific antibody showed that ABCA17 is a protein of 200 kDa, and immunohistochemical analysis demonstrated that the protein is detected in the anterior head of sperm and elongated spermatids. ABCA17 was localized in the endoplasmic reticulum in transiently transfected HEK293 cells. Metabolic labelling analysis showed that intracellular esterified lipids, including cholesteryl esters, fatty acid esters and triacylglycerols, were significantly decreased in HEK293 cells stably expressing ABCA17 compared with untransfected cells. These results suggest that ABCA17 may play a role in regulating lipid composition in sperm.

Key words: acrosomal reaction, capacitation, cholesterol efflux, esterified lipid, sperm, testis.

INTRODUCTION

Capacitation is a functional maturation process of sperm that occurs in the female tract and confers on sperm the ability to fertilize an egg. Capacitation involves changes in both the sperm's ability to undergo acrosomal exocytosis and its acquisition of a hyperactivated pattern of motility [1]. Although the molecular mechanism of capacitation is poorly understood, a decrease in sperm cholesterol is thought to be essential for a series of molecular events in capacitation [2–6]. Serum albumin is an essential component of the media used in *in vitro* experiments mimicking capacitation, functioning as an acceptor of cholesterol under the experimental conditions [4,7–9], but the role of albumin in physiological situations is uncertain.

The ABC (ATP-binding cassette) transporters constitute one of the largest gene families, encoding highly conserved proteins involved in the energy-dependent transport of a variety of substrates across membranes. ABCA1, ABCA3, ABCA4 and ABCA12 have been determined to be the causative genes in Tangier disease [10–12], fatal surfactant deficiency [13], Stargardt's macular dystrophy [14] and lamellar ichthyosis type 2 [15] respectively. ABCA1 functions to promote cellular phospholipid and cholesterol efflux to apoA-I (apolipoprotein A-I), initiating the formation of high-density lipoprotein [10–12,16], and ABCA4 is proposed to be a transmembrane transporter for intracellular *N*-retinylidene-phosphatidylethanolamine [17]. Although the functions of ABCA3 and ABCA12 are not known, pulmonary surfactant is composed mainly of lipids, and disorders in lipid metabolism are

found in the stratum corneum in lamellar ichthyosis, suggesting that ABCA3 and ABCA12 are involved in lipid transport [18]. In addition, ABCA2 and ABCA7 mRNA levels are up-regulated by sustained cholesterol influx mediated by modified low-density lipoproteins [19,20], and ABCA7 has been reported recently to mediate cellular phospholipid efflux through binding to apoA-I [21,22], although the involvement of ABCA7 in cholesterol efflux is controversial [21,22]. Thus the A subclass of ABC transporters, to which 15 functional mammalian genes have been assigned to date (*ABCA11* is a pseudogene), is believed to be involved in the transport of endogenous lipids [23].

In the present study, we cloned mouse and rat full-length cDNAs for a novel ABC transporter, ABCA17, which is expressed exclusively in testis. We generated a specific antibody against mouse ABCA17, and found ABCA17 protein to be expressed exclusively in the anterior head of sperm. Metabolic labelling analysis using [¹⁴C]acetate revealed that intracellular levels of esterified lipids, including cholesteryl esters, fatty acid esters and triacylglycerols, were significantly decreased in HEK293 cells stably expressing ABCA17 compared with untransfected cells, suggesting that ABCA17 may regulate lipid composition in sperm.

EXPERIMENTAL

Cloning of ABCA17 cDNA

The experimental procedures used to obtain full-length mouse and rat ABCA17 cDNAs are described in Supplemental online

Abbreviations used: ABC, ATP-binding cassette; suABCA, sea urchin ABCA; apoA-I, apolipoprotein A-I; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DIG, digoxigenin-11-UTG; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; Endo H, endoglycosidase H; ER, endoplasmic reticulum; FCS, fetal calf serum; HA, haemagglutinin; PNGaseF, peptide N-glycosidase F; RT-PCR, reverse transcription-PCR.

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed (email inagaki@med.akita-u.ac.jp).

The mouse and rat ABCA17 cDNA sequences reported have been submitted to the GenBank®, DDBJ, EMBL and GSDB Nucleotide Sequence Databases under accession numbers AB112584 and AB196699 respectively.

experimental procedure 1 (available at <http://www.BiochemJ.org/bj/389/bj3890577add.htm>).

RNA blot analysis

RNA blot analysis was carried out using a ^{32}P -labelled DNA fragment (corresponding to nucleotides +2479 to +3342) as a probe under high-stringency hybridization conditions as described previously [24,25].

Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time RT-PCR (reverse transcription-PCR) analysis was performed using a TaqMan Core Reagent Kit (Applied Biosystems). PCR primers were designed to amplify DNA between the 29th and 30th exons of the total of 30 exons covering the coding region based on the DNA database. The forward primer was 5'-AGCACCAAAACATGCTTCAATATTAC-3' (corresponding to nucleotides +4883 to +4908 relative to the putative translation start site of the mouse ABCA17 cDNA) and the reverse primer was 5'-GATAGCTGGCTGATGGAGTAGTCTT-3' (corresponding to nucleotides +4982 to +5006). The TaqMan probe was 5'-ACATGTAATCCTTCTTGGCTTGTTC-3' (corresponding to nucleotides +4952 to +4978) for exon 30, labelled with reporter dye (FAM) at the 5'-end and with quencher dye (TAMRA) at the 3'-end. PCR was performed using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), with cDNAs derived from 0.1 μg of total RNA, 250 nM probe and 900 nM primers in a 50 μl final reaction mixture. The PCR conditions were denaturing at 95 °C for 15 s and annealing plus extension at 60 °C for 1 min (40 cycles). Signals were analysed using the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), and the quantity of ABCA17 mRNA was normalized to that of 18 S rRNA.

In situ hybridization analysis

C57BL/6N mice (2 months old) were anaesthetized and killed by decapitation, and the testes and lungs were quickly removed. Paraffin sections of thickness 3.5 μm were pretreated by microwave heating at 95 °C for 3 min and incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K for 5 min at room temperature. The 390 bp 3'-translated and untranslated region of mouse ABCA17 cDNA (corresponding to nucleotides +5024 to +5412) was inserted into a Bluescript SK(-) plasmid. Antisense and sense cRNA probes were synthesized *in vitro* using DIG (digoxigenin-11-UTG) with T7 and T3 RNA polymerases respectively (DIG-labelling system; Boehringer Mannheim), followed by alkaline treatment for 3 min. Hybridization signals were detected using the GenPoint™ Catalyzed Signal Amplification System (DAKO) and horseradish peroxidase-labelled anti-DIG F(ab')₂ (DAKO) according to the manufacturer's instructions.

Cell culture and transfection

The culture and transfection of HEK293 cells and COS-1 cells were carried out as described previously [24,26]. Briefly, 2 μg of mouse ABCA17 expression vector (pCMVmABCA17), pCMVmABCA17-HA [in which DNA encoding the human influenza HA (haemagglutinin) tag (YPYDVPDYA) was introduced into the 3'-end of the coding region of mABCA17 using PCR] or the empty expression vector (pCMV) was transfected into cells in 35 mm culture dishes using Lipofectamine 2000 and Opti-MEM I (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. To establish HEK293 cells stably expressing ABCA17, cells were transfected with mABCA17-HA expression plasmid

(pRESHyg3/mABCA17-HA) containing a hygromycin selection marker as well as mABCA17-HA, and were selected by 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hygromycin for 2 weeks. Single colonies were isolated, and expression of mABCA17-HA was confirmed by immunoblot analysis using high-affinity anti-HA rat monoclonal antibody (Roche). HEK293 cells stably expressing ABCA17 were established as described previously [22]. To observe ER (endoplasmic reticulum) and mitochondria, DsRed2 expression plasmid containing either an ER localization signal (pDsRed2-ER; Clontech) or a mitochondria localization signal (pDsRed2-Mito; Clontech) was transfected.

Preparation of specific antibody

An antibody specific for ABCA17 was raised in rabbits against a synthetic peptide corresponding to 19 C-terminal amino acid residues (SSPTPKPLPSPPPSEPIILL) of mouse ABCA17, which shows no similarity to the other members of the ABCA subfamily or any other proteins in sequence databases. The antibody was purified using affinity chromatography (MabTrap Protein G; Amersham Biosciences).

Immunoblot analysis

Crude membranes were prepared and immunoblot analysis was performed as described previously [25]. After blocking, the PVDF membrane was incubated with 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-HA rat antibody or 1:1000-diluted anti-(mouse ABCA17) rabbit antibody for 2 h at room temperature. As the secondary antibody, 1:5000-diluted horseradish peroxidase-conjugated anti-rat F(ab')₂ (Chemicon) or anti-(rabbit Ig) (Amersham Biosciences) respectively was used. Proteins were detected using an enhanced chemiluminescence system (ECL[®]; Amersham Biosciences).

Immunocytochemistry

HEK293 cells grown on poly(L-lysine)-coated cover glasses were fixed and permeabilized. The cover glasses were incubated overnight at 4 °C with 1:1000-diluted anti-(mouse ABCA17) rabbit antibody and anti-HA rat antibody at a concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS containing 1% (v/v) normal goat serum and 3% (w/v) BSA, and then incubated for 1 h at room temperature with 1:2000-diluted Cy3-conjugated goat anti-rabbit IgG (Amersham Biosciences) and 1:40-diluted FITC-conjugated sheep anti-rat IgG (Chemicon). Nuclear counterstaining was done for 30 min at room temperature with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Cover glasses were mounted with PermaFluor Aqueous Mounting Medium (Immunon). DAPI staining and the fluorescences of Cy3, FITC and DsRed2 were observed as described in Supplemental online experimental procedure 2 (available at <http://www.BiochemJ.org/bj/389/bj3890577add.htm>).

Immunohistochemistry

After the testes had been permeated with 20% (w/v) sucrose for 1 day, they were frozen in an embedding OCT compound (Sakura Finetechnical) and cut into 10 μm -thick sections on a cryostat (Leica). Immunofluorescence analysis was performed as described previously [27]. The sections were incubated overnight at 4 °C with anti-(mouse ABCA17) antibody diluted 1:1000 in PBS containing 1% (v/v) normal goat serum and 3% (w/v) BSA, rinsed, and incubated for 1 h at room temperature with 1:2000-diluted Cy3-conjugated anti-rabbit IgG. Nuclei were counterstained, and Cy3 fluorescence and DAPI were observed as described above.

Cholesterol and choline-phospholipid efflux assay

Untransfected HEK293 cells and HEK293 cells stably expressing ABCA17 or ABCA1 were cultured in six-well plates at a density of 1×10^6 cells per well in a 1:1 (v/v) mixture of DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) and Ham's F12 medium supplemented with 10% (v/v) FCS (fetal calf serum). After incubation for 48 h, the cells were washed with PBS and incubated in the same medium supplemented with 0.1% fatty acid-free BSA (Sigma) and 10 $\mu\text{g/ml}$ apoA-I. The lipid content in the medium was determined after a 24 h incubation as described previously [22].

Metabolic labelling of cellular lipids

Untransfected HEK293 cells and HEK293 cells stably expressing ABCA17 or ABCA1 were grown in 100 mm culture dishes in the presence of 0.25 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{14}C]acetate for 72 h in 10 ml of DMEM supplemented with 10% (v/v) FCS. Lipids in the cells or medium were extracted by the method of Bligh and Dyer [28], and then resuspended in chloroform/methanol (2:1, v/v). For neutral lipid analysis, aliquots of the solubilized lipids were developed by HPTLC on Silica gel 60 HPTLC plates (Merck) with appropriate standards, using hexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:1, by vol.). For phospholipid analysis, aliquots of the solubilized lipids were developed on Silica gel 60 TLC plates (Merck; 20 cm \times 20 cm) using two-dimensional solvent systems; the first and the second chromatographic runs were performed with chloroform/methanol/7 M ammonia (65:30:4, by vol.) and with chloroform/methanol/acetic acid/water (170:25:25:4, by vol.) respectively, with the second run carried out at 90° to the original direction. The HPTLC and two-dimensional TLC plates were dried, and the radiolabelled lipid signals were analysed by autoradiography using FLA-5000 (Fujifilm).

Statistics

Data, normalized with regard to the protein content (for cholesterol and choline-phospholipid efflux) or the number of cells (for metabolic labelling), are represented as means \pm S.D. Statistical analysis was performed by the Bonferroni/Dunn procedure for *post hoc* testing.

RESULTS

Cloning of ABCA17 cDNA

Using a 1455-bp radiolabelled human ABCA3 cDNA fragment corresponding to the first nucleotide-binding domain as a probe, a total of 7.2×10^5 plaques of a mouse genomic library were screened under high-stringency hybridization conditions, and two clones, $\lambda\text{mABCX-1}$ and $\lambda\text{mABCX-2}$, encoding a novel ABC transporter, and four clones encoding the mouse ABCA3 gene, were obtained. As the nucleotide sequence of the putative exons in the novel ABC transporter gene had high similarity with the cDNA sequence of ABCA3, which belongs to the ABCA subclass, we designated the gene ABCA17. To obtain the full-length mouse ABCA17 cDNA, oligonucleotide primers were designed based on the exon sequence, and RT-PCR was carried out using total RNAs extracted from various mouse tissues. Since the RT-PCR products were obtained from testis, a mouse testis cDNA library was screened using the radiolabelled partial cDNAs as probes, and 3 λ clones were isolated from 7.2×10^5 plaques. Two overlapping clones, $\lambda\text{mABCA17-1}$ and $\lambda\text{mABCA17-2}$, were subcloned and sequenced. To obtain the 3'-end of the mouse ABCA17 cDNA, 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) was performed using the total RNA extracted from mouse testis, and an approx. 650 bp

DNA fragment was obtained and sequenced. The sequence of the 3'-end was confirmed by amplification of the mouse testis cDNA library by PCR and by an EST (expressed sequence tag) clone on the database (AI626925).

The composite sequence of 5199 bp contains a single open reading frame beginning with the first ATG conforming to the Kozak consensus sequence in the cDNA sequence, which predicts the amino acid sequence of a 1733-residue protein (with a calculated molecular mass of 195 970.85 Da) (Figure 1). A termination codon was found in the 27 bp of DNA upstream of the first ATG. The predicted amino acid sequence of mouse ABCA17 is most similar to those of mouse ABCA3 (GenBank accession no. AY083616) and suABCA (sea urchin ABCA) (accession no. AF529424), with amino acid identities of 55.3% and 36.7% respectively (Figure 1). Hydrophathy analysis predicts that 12 hydrophobic segments (H1–H12 in Figure 1), six in the first membrane-spanning domain (H1–H6) and six in the second membrane-spanning domain (H7–H12), are well conserved among mouse ABCA17, mouse ABCA3 and suABCA. The amino acid sequences of these proteins are conserved in the nucleotide-binding domains and the membrane-spanning domains, but not in the large extracellular loops between H1 and H2 and between H7 and H8. In addition, an approx. 40-amino-acid sequence at the N-terminus of these proteins is well conserved, further affirming that the first ATG of ABCA17 is a translation start site. Based on the DNA database, a mouse ABCA17 gene containing at least 30 exons covering the coding region is located at chromosome 17A3.3 [29,30], the same locus as the ABCA3 gene.

To obtain the full-length cDNA of rat ABCA17, oligonucleotide primers were designed based on the rat genomic DNA database corresponding to the mouse ABCA17 cDNA sequence. RT-PCR was carried out using total RNAs extracted from rat testis, and the PCR products obtained were subcloned and sequenced. The sequence of 5319 bp contains a single open reading frame, which predicts the amino acid sequence of a 1773-residue protein (with a calculated molecular mass of 199 854.60 Da) with amino acid identity of 87.3% with mouse ABCA17, suggesting a rat orthologue (Figure 1). Based on the rat genomic DNA database, the rat ABCA17 gene also contains at least 30 exons covering the coding region, and is located at chromosome 10q12 [31], the same locus as the ABCA3 gene.

Tissue distribution of ABCA17 mRNA

An RNA blotting study revealed a 5.3 kb transcript expressed exclusively in the testis and not in the other tissues, including lung, indicating that the probe was not cross-hybridized to ABCA3 mRNA (Figure 2A). To confirm specificity of the RNA blotting, a quantitative real-time PCR analysis was conducted using ABCA17-specific primers and TaqMan probe; ABCA17 cDNA was amplified exclusively in the testis, and ABCA17 mRNA levels were much lower in the other tissues (Figure 2B).

Expression of ABCA17 mRNA in testis

To identify the cells that express ABCA17 mRNA in the testis, we performed *in situ* hybridization analysis using a DIG-labelled antisense cRNA probe. Expression of ABCA17 mRNA was clearly detected in spermatocytes in seminiferous tubules (Figure 3A), although the possibility that Sertoli cells were stained cannot be completely excluded by this experiment. Elongated spermatids representing late-stage spermatids as well as sperm appeared not to be stained. ABCA17 mRNA expression was undetectable in peritubular cells, including Leydig cells. No cells in the testis were stained in a negative control using a DIG-labelled

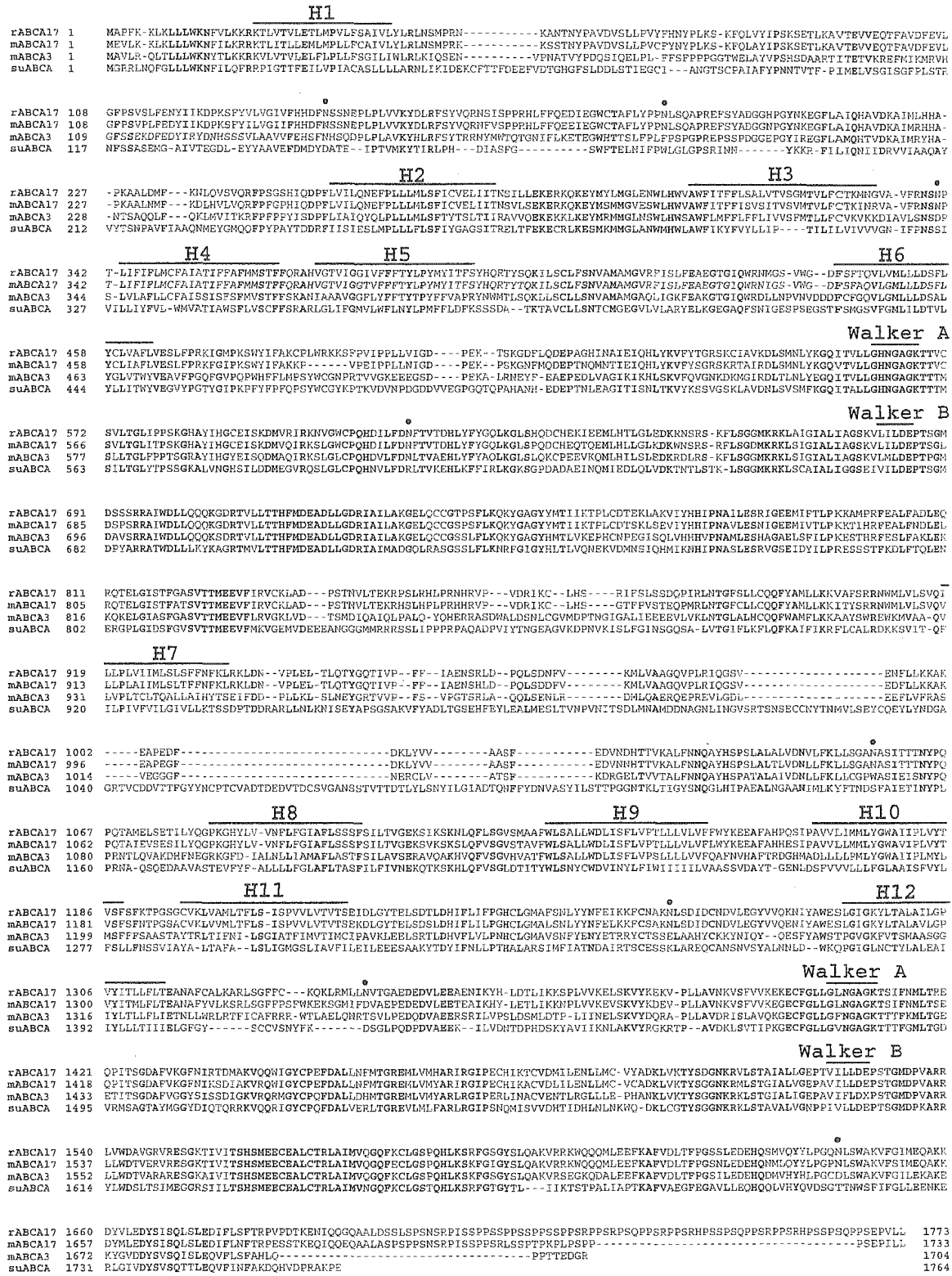


Figure 1 Comparison of the amino acid sequences of rat ABCA17, mouse ABCA17, mouse ABCA3 and suABCA

Amino acids are indicated in single-letter code. Identical amino acid residues among these proteins are shown in bold type. Predicted hydrophobic segments (H1–H12) and consensus Walker A and Walker B motifs conserved among these proteins are indicated. Potential N-linked glycosylation sites in ABCA17 are indicated by dots. The prefixes r and m denote rat and mouse respectively.

sense cRNA probe (Figure 3B). To confirm the specificity of the probe, lung tissue was hybridized with the antisense cRNA probe (Figure 3C), and no signal was detected.

Localization of ABCA17 protein

To characterize the ABCA17 protein, the HA epitope (YPY-DVPDYA) was introduced into the C-terminus of the protein,

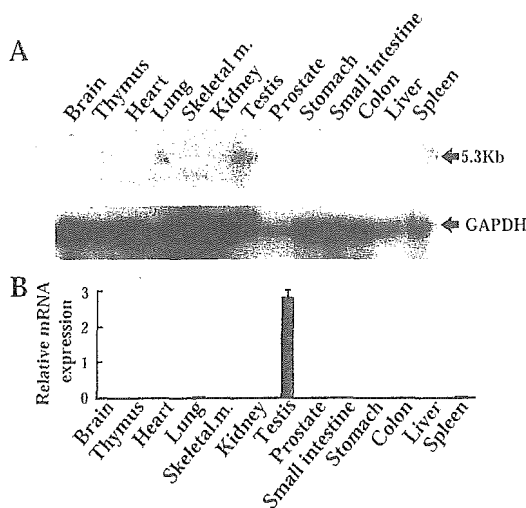


Figure 2 RNA blot and quantitative real-time PCR analyses of ABCA17 mRNA in various mouse tissues

(A) RNA blot analysis of various mouse tissues. Total RNA (20 μ g) was denatured and electrophoresed in a 1% (w/v) agarose gel, blotted on a nylon membrane, and hybridized with a 32 P-labelled mouse ABCA17 cDNA probe. The membrane was exposed to X-ray film with an intensifying screen at -80°C for 4 days. The lower panel shows the same blot probed with GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) as the internal control to evaluate differences among various tissues. (B) Comparison of ABCA17 mRNA levels in various mouse tissues as determined by quantitative real-time PCR analysis of reverse-transcribed total RNA. Data are shown as the RNA expression levels normalized to 18 S rRNA controls, and are means \pm S.D. obtained from four independent experiments.

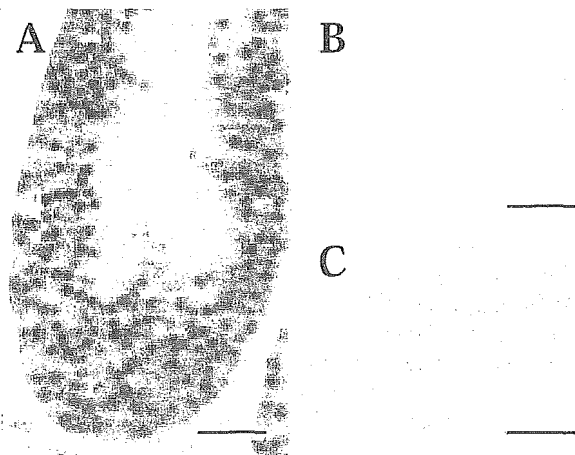


Figure 3 Localization of ABCA17 mRNA by *in situ* hybridization

(A, B) *In situ* hybridization of mouse testis with DIG-labelled antisense (A) and sense (B) cRNA probes. Signals were detected mainly in spermatocytes in testis with the antisense probe (A), but not with the sense probe (B). (C) *In situ* hybridization of mouse lung with a DIG-labelled antisense cRNA probe. No staining was detected in the lung. Scale bar = 50 μm .

and immunoblot analysis was performed using anti-HA antibody. The total membrane fraction of COS-1 cells transfected with the ABCA17-HA fusion protein expression vector (pCMVmABCA17-HA) revealed a band of 200 kDa (Figure 4A, arrow), while that of COS-1 cells mock-transfected with pCMV vector showed no such band (Figure 4A). We then generated a specific antibody against a peptide corresponding to the 19 C-terminal amino acid residues of ABCA17 protein. Using the anti-ABCA17 antibody, the 200 kDa protein was again detected in the total membrane fraction of COS-1 cells transfected with the pCMVmABCA17-HA plasmid (Figure 4B, arrow), affirming the specificity

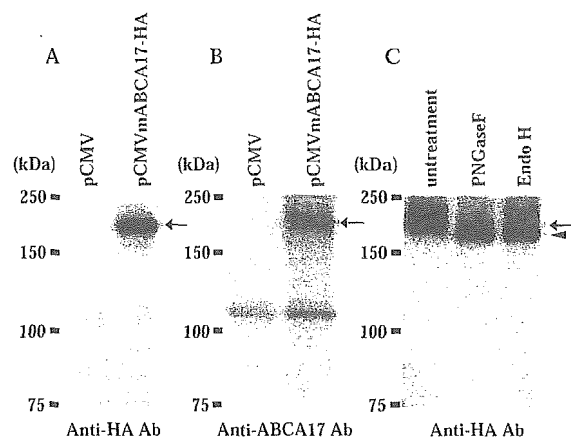


Figure 4 Immunoblot analysis of ABCA17 protein expressed in COS-1 cells

(A, B) Membrane proteins (30 μ g) prepared from COS-1 cells transfected with pCMV vector alone or pCMVmABCA17-HA were electrophoresed on a SDS/8% (w/v)-polyacrylamide gel and immunoblotted with anti-HA antibody (A) and with anti-ABCA17 antibody (B). Both anti-HA and anti-ABCA17 antibodies detected the 200 kDa ABCA17-HA fusion protein. (C) Glycosylation of ABCA17. Membrane proteins (30 μ g) prepared from COS-1 cells transfected with pCMVmABCA17-HA were incubated with 1 unit of PNGaseF (Roche) and 0.005 unit of Endo H (Roche) for 1 h at 37°C , followed by immunoblot analysis with anti-HA antibody. Molecular masses of the marker proteins are indicated on the left, and the detected 200 kDa and 180 kDa bands are indicated by the arrow and arrowhead respectively.

of the antibody. Glycosylation of ABCA17 was examined by treatment with PNGaseF (peptide N-glycosidase F) and Endo H (endoglycosidase H). Endo H cleaves two proximal *N*-acetylglucosamine residues of the high-mannose type but not of the complex type, while PNGaseF cleaves sugar chains of both types. Treatment with either Endo H or PNGaseF increased the electrophoretic mobility of ABCA17 protein from 200 kDa (Figure 4C, arrow) to 180 kDa (Figure 4C, arrowhead), which represents the deglycosylated form, indicating that ABCA17 is modified with high-mannose-type sugar chains.

To further confirm the specificity of the anti-ABCA17 antibody, HEK293 cells were transfected with pCMVmABCA17-HA or pCMV plasmids, and immunolabelled using anti-ABCA17 and anti-HA antibodies. Immunolabelling with anti-ABCA17 and anti-HA antibodies was completely merged (Figures 5A–5D), while no staining was observed with either of the antibodies in cells mock-transfected with pCMV (results not shown), indicating that the anti-ABCA17 antibody specifically stains ABCA17 protein.

To determine the subcellular localization of ABCA17 in HEK293 cells, the cells were co-transfected with pCMVmABCA17-HA and pDsRed2-ER (DsRed2 expression plasmid containing an ER localization signal) or pDsRed2-Mito (DsRed2 expression plasmid containing a mitochondrial localization signal). Immunostaining with anti-HA antibody was merged with the DsRed2 fluorescence of the ER (Figures 5E–5H) but not with that of mitochondria (Figures 5I–5L), suggesting that ABCA17 protein is localized in intracellular organelles, especially the ER, when expressed in HEK293 cells.

To determine the localization of ABCA17 protein in the mouse adult testis, immunohistochemical analysis was performed using the anti-ABCA17 antibody. Immunoreactivity for ABCA17 was detected predominantly in elongated spermatids at the late stage of germ cell development and in sperm (Figures 5M–5O). No signal was detected in immature germ cells such as spermatogonia and spermatocytes, or in somatic cells such as Sertoli cells (Figures 5M–5O) and Leydig cells (results not shown). In the magnified three-dimensional image, subcellular localization of

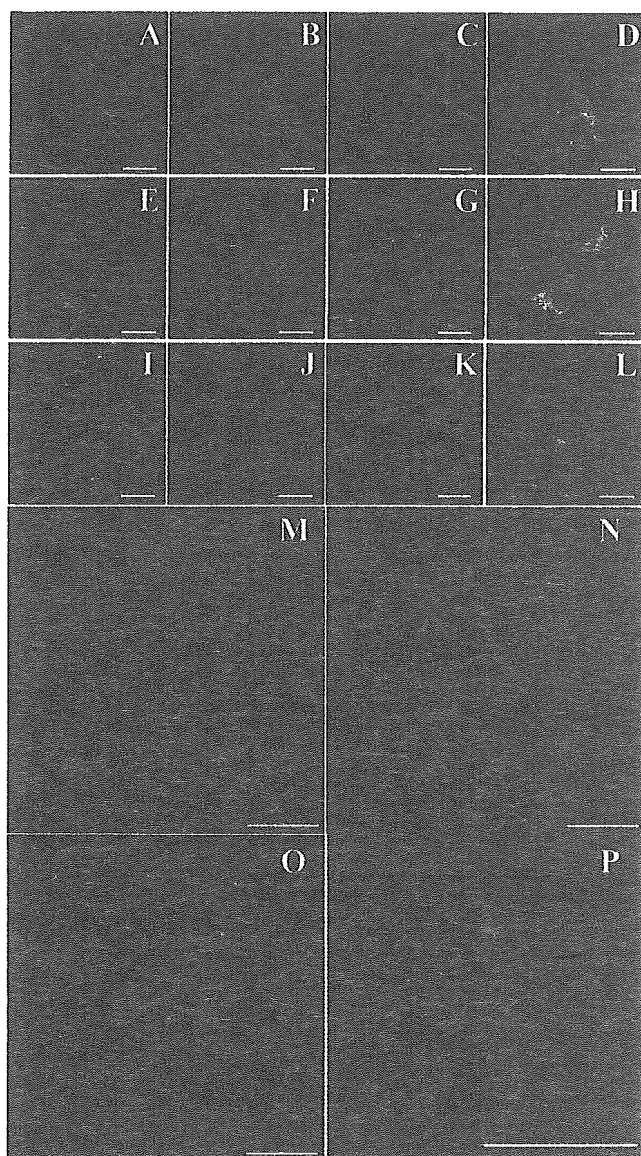


Figure 5 Immunofluorescence labelling of ABCA17 protein in ABCA17-transfected cells and mouse testis

(A–D) Confocal microscopic images of HEK293 cells expressing ABCA17–HA fusion protein. Cells were double-labelled with anti-HA antibody (A; green) and anti-ABCA17 antibody (B; red), and visualized with FITC and Cy3 respectively. Nuclei were counterstained by DAPI (C; blue). A merged picture of (A), (B) and (C) is shown in (D). (E–H) Confocal microscopic images of HEK293 cells co-expressing ABCA17–HA fusion protein and DsRed2-ER. ABCA17–HA fusion protein immunolabelled with anti-HA antibody was visualized with FITC (E; green), and the ER was observed with DsRed2 fluorescence (F; red). Nuclei were counterstained by DAPI (G; blue). A merged picture of (E), (F) and (G) is shown in (H). (I–L) Confocal microscopic images of HEK293 cells co-expressing ABCA17–HA fusion protein and DsRed2-Mito. ABCA17–HA fusion protein immunolabelled with anti-HA antibody was visualized with FITC (I; green) and mitochondria were observed with DsRed2 fluorescence (J; red). Nuclei were counterstained by DAPI (K; blue). A merged picture of (I), (J) and (K) is shown in (L). (M–O) Confocal microscopic images of mouse testis. A frozen mouse testis section immunolabelled with anti-ABCA17 antibody was visualized with Cy3 (M; red). Nuclei were counterstained by DAPI (N; blue). A merged picture of (M) and (N), and its magnified three-dimensional image, are shown in (O) and (P) respectively. The scale bar represents 5 μm (A–L), 50 μm (M–O) and 10 μm (P).

ABCA17 was observed in the anterior head region (Figure 5P). Immunoreactivity for ABCA17 was adsorbed by the synthetic peptide corresponding to 19 C-terminal amino acid residues of ABCA17 in mouse testis (results not shown).

Involvement of ABCA17 in the regulation of cellular neutral lipid content

To determine the functional significance of ABCA17, we examined its involvement in cellular cholesterol and phospholipid efflux. Untransfected control HEK293 cells and cells stably expressing ABCA1 or ABCA17 were cultured in medium supplemented with 0.1% fatty acid-free BSA in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ apoA-I for 24 h, and the lipids in the medium were measured. The amounts of total cholesterol and choline-phospholipids released from ABCA17-expressing cells were not altered compared with control cells, while amounts released from ABCA1-expressing cells were dramatically increased by 11.3-fold and 3.6-fold respectively, as reported previously [10–12,16,22] (Figures 6A and 6B).

To determine if ABCA17 is involved in the regulation of lipid metabolism, untransfected control HEK293 cells and cells stably expressing ABCA1 or ABCA17 were cultured in medium supplemented with 10% (v/v) FCS in the presence of [^{14}C]acetate for 72 h, and the amounts of ^{14}C -labelled intracellular neutral lipids and extracellular lipids in the medium (i.e. released from the cells) were measured. Intracellular ^{14}C -labelled cholesteryl esters in ABCA17-expressing cells were markedly decreased by 77.5% compared with control cells, similar to the situation in ABCA1-expressing cells (Figure 6C and Table 1). In addition, amounts of ^{14}C -labelled fatty acid esters (such as fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters) and triacylglycerols in ABCA17-expressing cells were also decreased by 73.5% and 41.5% respectively, while levels in ABCA1-expressing cells were not altered (Figure 6C and Table 1). On the other hand, the amount of extracellular ^{14}C -labelled cholesteryl esters released from ABCA17-expressing cells was similar to that released from control cells, whereas release from ABCA1-expressing cells was dramatically increased by 14.5-fold, consistent with the results for cholesterol efflux shown in Figure 6(A) (Figure 6C and Table 1). The amounts of ^{14}C -labelled triacylglycerols, non-esterified fatty acids and cholesterol in the medium released from ABCA17-expressing cells were slightly but significantly increased by 1.3-fold, 1.4-fold and 1.3-fold respectively compared with control cells, but the increment in cholesterol was much smaller than in ABCA1-expressing cells. In addition, the amounts of ^{14}C -labelled intracellular phospholipids and extracellular lipids in the medium were measured (Figure 6D and Table 1). The intracellular ^{14}C -labelled phospholipids examined (except for phosphatidylethanolamine, which was slightly decreased) were not altered in ABCA17-expressing cells compared with control cells. The levels of phosphatidylcholine, lyso-phosphatidylcholine and sphingomyelin plus phosphatidylinositol released from ABCA17-expressing cells were similar to those from control cells, while the release of these phospholipids from ABCA1-expressing cells was dramatically increased, consistent with the results for choline-phospholipid efflux shown in Figure 6(B) (Figure 6D and Table 1). These results indicate that ABCA17 plays a distinct role in lipid metabolism by decreasing the levels of intracellular esterified neutral lipids, such as cholesteryl esters, fatty acid esters and triacylglycerols.

DISCUSSION

We have cloned a novel transporter, ABCA17, which belongs to the A subclass of the ABC transporter family. ABCA17 mRNA is expressed exclusively in spermatocytes at the early stage of spermatogenesis, and the protein is expressed predominantly in elongated spermatids at the later stage of spermatogenesis and