

第 55 回日本ウイルス学会学術集会 007 年 10 月

- 1 特許取得  
なし
- 2 実用新案登録  
なし
- 3 その他  
なし

G. 知的所有権の出願・登録状況

## HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部  
研究者 奥平 桂一郎

抗動脈硬化作用を持つHDLの産生をコントロールしている膜トランスポーターABCA1は、相互作用タンパク質によって代謝制御を受ける。本研究はそのメカニズム解明を目的として、新しいABCA1相互作用タンパク質GEF11の機能について検討した。

### A. 研究目的

動脈硬化症に対しては、一般的に予防と進行抑制が主な手段とされ、形成された病変に対して積極的に治療する薬剤は現在のところまだ存在しない。最近、HDL (High-Density Lipoprotein 高密度リポタンパク質) が動脈硬化巣を退縮させることが臨床的に証明され、新しい動脈硬化治療法として、HDL形成責任タンパク質である膜トランスポーターABCA1(ATP binding cassette transporter A1)の活性を上昇させる薬剤の開発が期待されている。

本研究の目的は、ABCA1の発現・機能の促進を標的としたABCA1タンパク質分解抑制メカニズムの解明にある。ABCA1の相互作用タンパク質β1-syntrophinがABCA1の分解を抑制することに着目し、更なる相互作用タンパク質の同定と、ABCA1安定化のメカニズム解明を目指す。本年度は、前年度の相互作用タンパク質の探索において、新たに同定されたABCA1相互作用タンパク質グアニンヌクレオチド交換因子(GEF11,GEF12)についての機能評価を行った。

### B. 研究方法

使用されたcDNAは、ライブラリーよりクローニング、または各種遺伝子バンクから入手し、myc標識ベクター(pCMV-Tag3)、またはHA標識ベクター(pCMV-HA)に導入した。さらにRhoAはT19N(Dominant Negative)、Q63L(Constitutively Active)のコンストラクトを作成した。FLAGが導入されたABCA1のcDNA及びABCA1抗体はハーバード大学医学部Mason W. Freeman博士より供与を受けた。

HEK293細胞を用いて、ABCA1と各種相互作用タンパク質を共発現させた際の、ABCA1のタンパク質発現をウエスタンブロッティングにより評価した。さらに、同様の細胞を用いてHDL形成量を測定した。cDNAを導入した細胞に対して<sup>3</sup>H]cholesterolを含む培地で24時間インキュベートし、細胞をよく洗浄した後、apolipoprotein A-I (apoA-I)を培地に添加した。20時間後、培地中の<sup>3</sup>H]cholesterolの量を測定し、HDL形成を評価した。細胞内相互作用を観察する実験では、ABCA1と相互作用タンパク質を共発現させた細胞より、FLAG抗体を用いて免疫沈降し、myc抗体でウエスタンブロッティングすることで相互作用を観察した。また、同様の細胞を用いて、免疫染色により相互作用を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究で行われた遺伝子組換え実験は「遺伝子組換え生物等の使用の規制による生物の多様性確保に関する法律」(平成15年法律第97号)及びこれに基づく「国立医薬品食品衛生研究所遺伝子組換え実験安全管理規則」(平成16年7月改正)に従い、研究内容につき当研究所の遺伝子組換え実験安全委員会の適正な審査を受け、実施の承認を得た上で行った。また、放射性同位元素を使用した実験は「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」(平成16年法律第69号)及びこれに基づく「国立医薬品食品衛生研究所放射線障害予防規定」(平成9年7月改正)に従い、研究内容につき当研究所の放射線安全委員会の適正な審査を受け、実施の承認を得た上で行った。動物実験に関しては、今年度は実施されなかった。

## C. 研究結果

### 1. ABCA1 と GEF タンパク質の細胞内相互作用の確認

本研究課題一年目（前年度）に、同定された ABCA1 相互作用タンパク質 GEF11、GEF12 の機能について、より詳細に検討し、機能評価を行った。まず、細胞内で相互作用していることを確認するために、myc 標識した GEF11、GEF12、 $\beta$ 1-syntrophin（ポジコン）を、FLAG 標識した ABCA1 と共発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降し、myc 抗体で相互作用を観察したところ、GEF11、GEF12、 $\beta$ 1-syntrophin のいずれも ABCA1 との共沈が確認された。（図 1 A）。また、GFP 標識した ABCA1 と myc-GEF11 を共発現させ、細胞を固定して myc 抗体と Alexa 標識二次抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、ABCA1、GEF11 とともに細胞表面膜近傍に発現が観察された（図 1 B）。この結果は、ABCA1 と GEF が細胞膜付近で相互作用していることを示唆している。

### 2. GEF11 による HDL 形成促進と ABCA1 タンパク質の発現量増加

昨年一部報告したが、HEK293 細胞において、GEF11 を ABCA1 と共発現させると、ABCA1 タンパク質の発現量、及び apoA-I による HDL 産生が増加した（図 2 B, A）。GEF は低分子量 G タンパク質 Rho が不活性化状態の GDP 結合型から活性化状態の GTP 結合型に変換するのを触媒することで知られており、そのためには GEF の PH/DH ドメインが重要な機能を果たしていることが分かっている。そこで、PH/DH ドメインを欠損した GEF11 のコンストラクト(GEF11-D)を作成し、ABCA1 に対する影響を観察したところ、ABCA1 タンパク質、HDL 産生に対する効果が失われた（図 2 B, A）。このことは GEF の機能、つまり RhoA の活性化作用が ABCA1 の発現、HDL 形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

### 3. ABCA1 タンパク質発現と HDL 形成量におよぼす RhoA の効果

GEF11 の発現により、実際に細胞内で RhoA の活性化が起こっていることを確認し（図 3 A）、RhoA 活性化が ABCA1 発現、HDL 形成に及ぼす影響について調べた。野生型 RhoA(WT)を共発現させたときと比較して、常時活性化型 RhoA(Q63L, CA)の共発現により、ABCA1 発現量は増加し（図

3 B）、HDL 形成量（図 3 C）も増大した。逆に、常時不活性化型 RhoA(T19N, DN)の共発現により、ABCA1 発現量（図 3 B）、HDL 形成量（図 3 C）は減少した。この結果は、GEF が RhoA の活性化を介して ABCA1 の発現量を調節していることを示している。また、図 3 D では full-length の ABCA1(WT)と C 末端 4 残基が欠損した型の ABCA1( $\Delta$ 4)を比較している。ABCA1 は C 末端に PDZ 結合モチーフを持ち、このモチーフを介して ABCA1 と GEF が相互作用している。この PDZ モチーフ欠損型( $\Delta$ 4)では野生型(WT)に比べて、GEF11 の共発現、及び GEF11 と RhoA の共発現による HDL 形成量の増加が、野生型に比べて抑えられることが分かった（図 3 D）。すなわち、ABCA1 に対する GEF11 の効果が発揮されるには、RhoA の活性化だけでは必ずしも十分ではなく、PDZ-PDZ 相互作用を介した GEF と ABCA1 の結合が必要であると考えられる。

### 4. ABCA1 タンパク質の分解

GEF を介した RhoA の活性化が ABCA1 の発現を増加するメカニズムについて、ABCA1 タンパク質の分解について調べた。ABCA1 単独、ABCA1 と野生型 RhoA の共発現、または ABCA1 と常時活性化型 RhoA の共発現細胞において、cycloheximide を加えてタンパク質合成を止めた後、時間経過とともに減衰する ABCA1 タンパク質の量について評価したところ、常時活性化型 RhoA の共発現によって、ABCA1 の分解は抑制され、タンパク質の安定化が観察された（図 4）。

## D. 考察

本研究のゴールは、相互作用タンパク質による ABCA1 の分解抑制メカニズムの解明にある。現在までに複数の ABCA1 相互作用タンパク質が報告されており、本主任研究者は、膜の裏打ち構造を支持するタンパク質  $\beta$ 1-syntrophin が ABCA1 に結合して、その分解を抑制し HDL 形成を促進することを報告している（Okuhira et al., *J. Biol. Chem.*, 2005）。本研究課題一年目（前年度）に、ABCA1 相互作用タンパク質の探索を行った結果、13 種の新規相互作用タンパク質（PDZ タンパク質）が同定された。そのうち、GEF11、GEF12、MUPP-1 は ABCA1 の発現を増強し HDL 形成を促進することが明らかになった（平成 18 年度）。そこで今年度は、新たに同定した ABCA1 相互作用

タンパク質 GEF11 と GEF12 について、より詳細に検討し、機能評価を行った。

GEF11 は RhoA を活性化する因子として良く知られているが、GEF11 を共発現させることで ABCA1 タンパク質の発現は増強され、HDL 形成は促進された。また、GEF11 と ABCA1 が細胞内で相互作用していることが確認された。さらに、常時活性化型 RhoA の共発現によって ABCA1 の発現増強が観察され、この効果は ABCA1 の分解阻害によるものであることが明らかになった。つまり、GEF11 は ABCA1 に結合して RhoA を活性化することにより、ABCA1 タンパク質の分解を阻害して、HDL 形成を促進していると考えられる。ヒト繊維芽細胞において、*C. difficile* 由来の毒素 B で Rho の活性を阻害すると、HDL 形成が減少するという報告 (Nofer et al., *J. Biol. Chem.*, 2003) もあり、このモデルを支持する。

GEF11、GEF12 はそれぞれ PDZ-RhoGEF、LARG とも呼ばれ、これまで、神経忌避因子であるセマフォリンの受容体 Plexin-B1、インシュリン様成長因子受容体、LPA 受容体などの膜受容体の細胞内ドメインに結合し、外部からの刺激を RhoA シグナルの活性化として情報を内部に伝達する、transducer 的な役割を担っていることが知られている。今回、初めて ABCA1 との相互作用が示され、ABCA1 発現量の調節、HDL 形成量の制御に関わっていることが示された。ここから ABCA1 には、cholesterol transporter としての役割だけでなく、外部からのシグナルを受け取る受容体としての機能をも併せ持つことが推測される。今回の結果では示していないが、ABCA1 発現細胞において、apoA-I の刺激によって RhoA が活性化されることを示す結果も得ており、また apoA-I の刺激が ABCA1 安定化に繋がることも報告されている (Arakawa et al., *J. Biol. Chem.*, 2002, Wang et al., *J. Clin. Invest.*, 2003) ことから、apoA-I の ABCA1 への結合からはじまる一連の HDL 形成過程において、GEF11/RhoA を介した ABCA1 の安定化が重要な意味を持っていることが強く示唆される。

RhoA を含む Rho GTPase ファミリーでは、Cdc42 と ABCA1 の関係が比較的良く研究されている。Cdc42 も RhoA と同様に、apoA-I の ABCA1 への結合により活性化され、シグナルカスケードの活性化が起こり、アクチンの重合が観察されることが報告されている。さらに常時不活性化型 Cdc42 の導入により、HDL 形成が減少することがわかっている。ただし、ABCA1 の発現量に対する影響に

ついては検討されていない。また、ABCA1 欠損症であるタンジール病患者の繊維芽細胞では、Cdc42 の量が減少していることが報告されており、生理的にも重要な役割を果たしていることが示唆される。対照的に RhoA に関する報告は少ない。

今後は、引き続き ABCA1 の分解抑制メカニズムについての基礎的知見の蓄積を図り、さらに創薬を意識した ABCA1 分解阻害ペプチドの設計について検討する。具体的には以下の通りである。

### 1) GEF/RhoA シグナル経路の検討

GEF/RhoA 経路の活性化が、ABCA1 タンパク質の分解に抑制的に働くことを示したが、引き続きシグナル伝達の経路について検討する。RhoA のエフェクターとして Rho キナーゼ、コフィリンなど多くのシグナル伝達系因子、また PKC $\alpha$ などのリン酸化酵素が報告されている。これらの活性化について特異的リン酸化抗体を用いて評価する。ABCA1 の分解阻害をもたらす、より直接的な因子について明らかにするとともに、アクチン重合やストレスファイバー形成と ABCA1 分解阻害活性の関連について検討する。

### 2) MUPP-1 の機能解析

GEF と同様に MUPP-1 も ABCA1 の発現を増強し HDL 形成を促進することを示したが、そのメカニズムについて詳細に検討する。MUPP-1 は分子内に PDZ ドメインを 13 個持っており、 $\beta$ 1-syntrophin や GEF に無い特徴的な配列を有している。これは、ABCA1 が機能する際に、ホモダイマーあるいは PDZ 結合モチーフを持つ他のタンパク質との複合体を形成する可能性を示唆している。そこで申請者が以前用いたプロテオミクスの手法により、MUPP-1 と相互作用するタンパク質を解析する。

### 3) ABCA1 の切断部位の決定

本研究課題を遂行する過程において、ABCA1 発現細胞の溶解液中に、ABCA1 タンパク質の分解産物と考えられる約 40kDa の低分子量タンパク質を確認している。この分解産物をカラムで大量精製し、シーケンサーで末端部位の配列を決定して切断サイトを同定する。さらに、特定した切断部位をアミノ酸置換した ABCA1 変異体を作成し、野生型と比較して ABCA1 の発現量及び半減期に変化が観察されるかを検討する。また、分解反応

が実際に生理的条件下で起こっているかどうか、マウス肝臓で分解産物の存在を確認する。

#### 4) 分解阻害ペプチドの設計

プロテアーゼが認識する配列をペプチドとして作成し、偽基質として細胞に導入することによって、ABCA1の分解抑制を狙う。ABCA1の切断サイト及びその前後と同じアミノ酸配列を持ち、かつ膜透過のための特異的配列(11個のアルギニン)を付加したペプチドを合成、さらにコントロールとしてスクランブルペプチドも合成する。ABCA1発現細胞にペプチドを付加し、ABCA1タンパク質発現量、HDL形成量について評価する。必要に応じて、ペプチド配列の最適化を行う。ペプチドにFLAGタグを付加して、In vitroでペプチドと細胞溶解液を反応させ、ペプチドの分解をウエスタンブロッティングにより観察し、効率的に分解される配列を決定する。狙い通りABCA1分解阻害効果が得られた場合、マウスへの投与を検討する。

#### E. 結論

ABCA1相互作用タンパク質 GEF11、GEF12の機能について、GEFがABCA1の細胞内ドメインと結合してRhoAを活性化し、活性化したRhoAはABCA1タンパク質の分解を抑制して、HDL形成を促進することを明らかにした。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tamehiro N, Shigemoto-Mogami Y, Takeya T, Okuhira K, Suzuki K, Sato R, Nagao T, Nishimaki-Mogami T.

Sterol regulatory element-binding protein-2- and liver X receptor-driven dual promoter regulation of hepatic ABC transporter A1 gene expression: mechanism underlying the unique response to cellular cholesterol status.

*J Biol Chem.* 2007; 282(29):21090-9

##### 2. 学会発表

Okuhira K, Fitzgerald M.L.\*, Tamehiro N. \*, Freeman M.W.\*, Shigemoto-Mogami Y., Nishimaki-Mogami Y.

The guanine exchange factor 11 PDZ protein binds ABCA1 positively regulating transporter expression and cholesterol efflux via Rho activation.

American Heart Association, scientific sessions 2007 (2007. 11)

\* Massachusetts General Hospital / Harvard Medical School

奥平桂一郎、最上(重本)由香里、澤田純一、最上(西巻)知子  
GEF11によるABCA1安定化機構  
日本薬学会128年会(2008,3)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当なし

##### 2. 実用新案登録

該当なし

##### 3. その他

該当なし

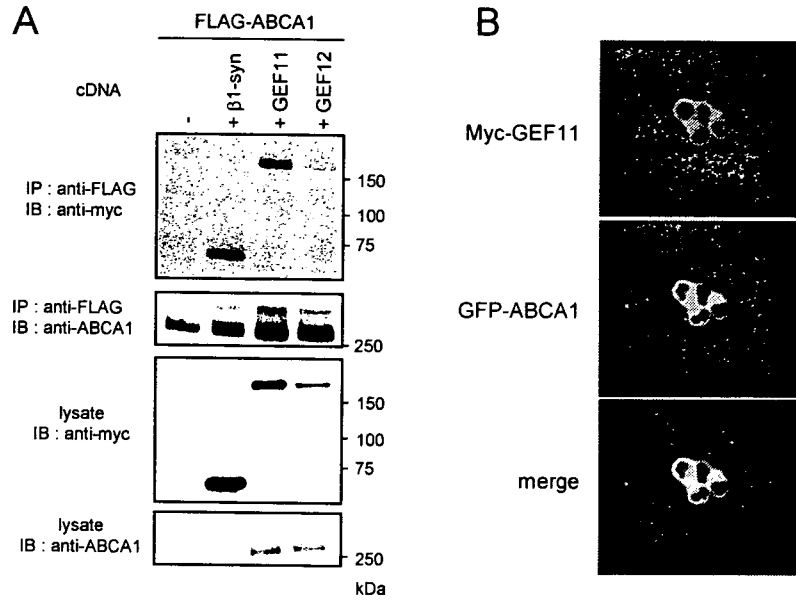


図1 ABCA1 と GEF の細胞内相互作用

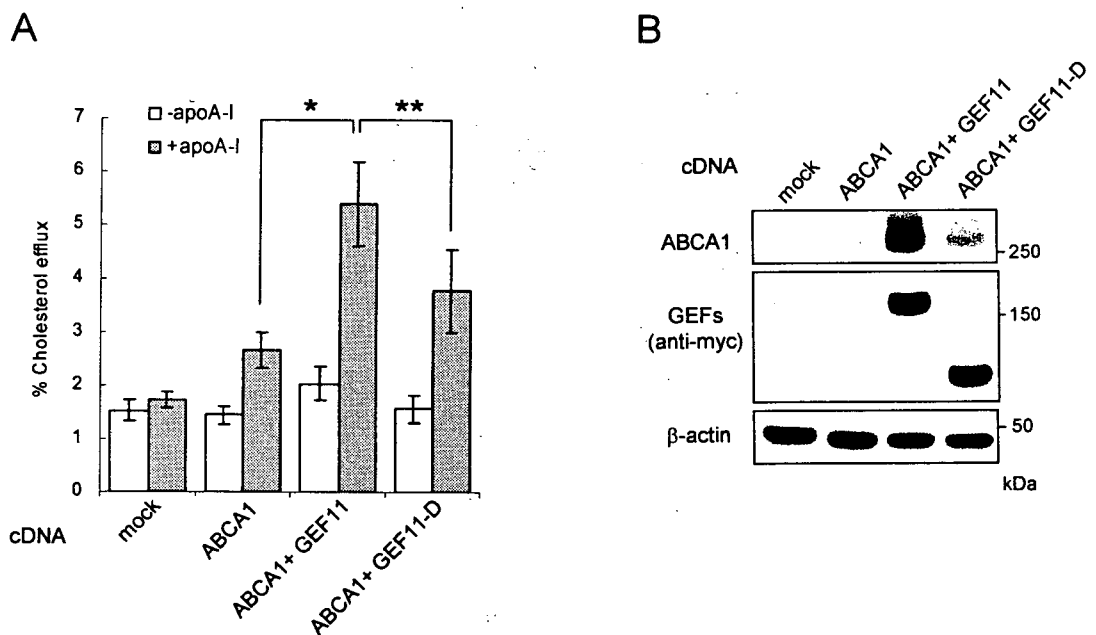


図2 GEF11 による HDL 形成促進と ABCA1 タンパク質の発現量増加

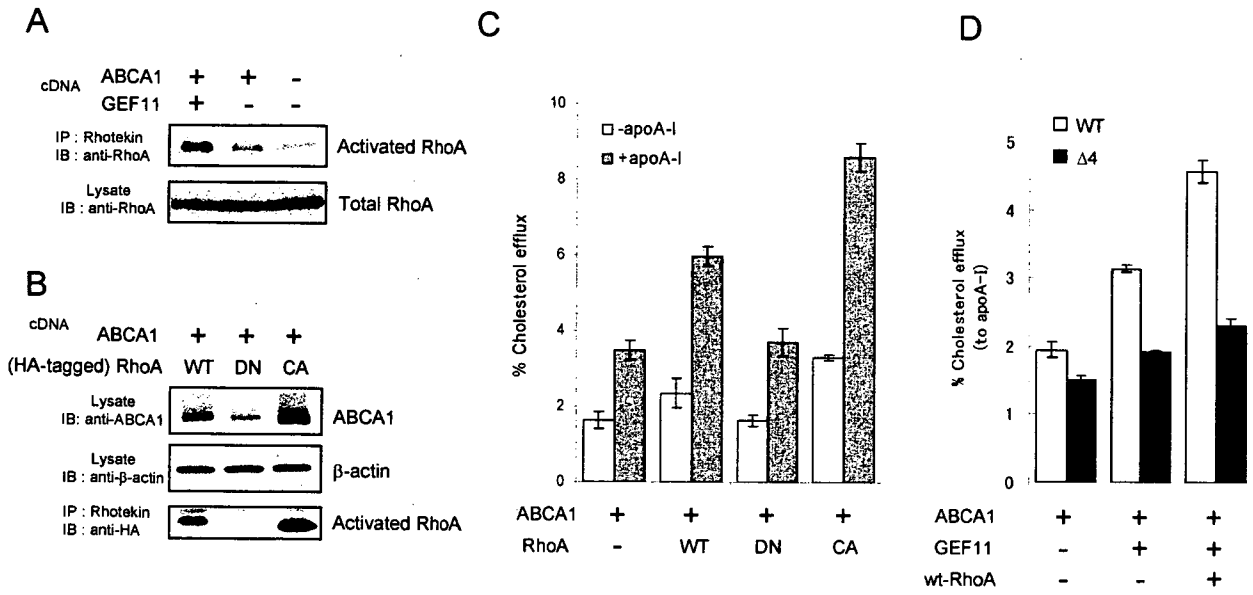


図3 ABCA1 タンパク質発現と HDL 形成量におよぼす RhoA の効果

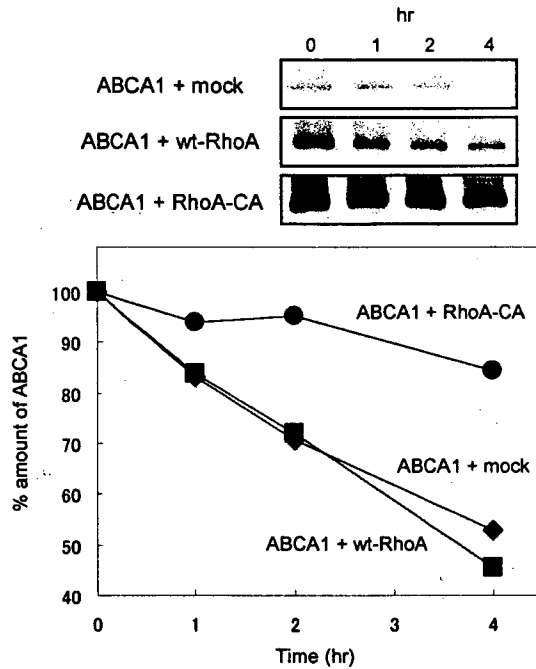


図4 ABCA1 タンパク質の分解

---

平成19年度

政策創薬総合研究事業  
政策創薬総合研究  
研究報告書

平成20年3月

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社