

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 水野 忠快

ATP-binding cassette Transporter A1 (ABCA1)は細胞膜上、および細胞内プールに局在する ABC トランスポーターであり、コレステロール等の脂質分子を apolipoprotein A-I (apoA-I)をアクセプターに細胞外へと排出する機能を担う。本トランスポーターは、マクロファージにおいては細胞内のコレステロール蓄積を防ぎ、泡沫化を抑制すること、肝臓においては HDL コレステロール合成を促進し、動脈硬化進展の抑制に働くことを示すデータが集積されつつあり、種々の研究が精力的に進められている。申請者は修士課程において、細胞膜上 ABCA1 が Ub 化を受けた後に、Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT)系を介して Multi-vesicular Body (MVB)に取り込まれ、最終的にリソソームにて分解を受けることを発見した(Ub-Lysosome 分解経路)。本研究では、さらに、細胞膜上 ABCA1 の Ub-Lysosome 分解経路による分解の生体での重要性および本分子機構の解析を行った。第1章では、脂質蓄積により ABCA1 の Ub-Lysosome 分解経路での分解が上昇すること、第2章では、E3-X が ABCA1 の Ub 化を担う Ubiquitin Ligase (E3)であること、そして第3章では、ABCA1 の脂質蓄積による分解上昇機構は ABCA1 と核内受容体 Liver X Receptor (LXR)β、および E3-X との相互作用によって制御されているということを示唆する結果を得た。研究の概略を以下に示す。

1. 脂質蓄積が与える細胞膜上 ABCA1 の Ub-Lysosome 分解経路による分解への影響

申請者は、ABCA1 が動脈硬化に強く関連している事実から、チオグリコレート誘導マウス腹腔マクロファージ (MPM)に対しアセチル化低密度リポタンパク質 (acLDL)処理を施した泡沫化マクロファージ (Foam cell)における ABCA1 の Ub-Lysosome 分解経路での分解を検討した。共免疫沈降法、およびビオチン化を用いた細胞膜タンパク質の分解評価法により、Foam cell において ABCA1 の Ub 化、細胞膜上 ABCA1 の分解増加が確認された。さらにこの分解増加はリソソーム阻害剤である bafilomycin により抑制された。脂質蓄積の状態をミミックするために核内受容体 LXR の代表的なアゴニスト、GW3965 を MPM およびヒト肝癌由来の培養細胞 HepG2 細胞に作用させたところ、Foam cell で見られた現象と同様の現象が再現された。さらに ESCRT 系において重要な役割を果たす Tumor Susceptibility Gene 101 (TSG101)をノックダウン (KD)した際にも GW3965 による分解増加が抑制されることがわかった。以上の結果から、脂質蓄積時に ABCA1 の Ub 化が増加し、細胞膜上からの Ub-Lysosome 分解経路での分解が亢進すると結論づけた。

2. 細胞膜上 ABCA1 の Ub 化を担う E3 の探索

Ub 化反応において、主に E3 が基質特異性を与え、多様性を付与するものとされる。そ

ここで、細胞膜上に局在する E3、あるいは細胞膜タンパク質を基質とする E3(合計 17 種類)を対象に、細胞膜上 ABCA1 の Ub 化に関与する E3 を探索した。HEK293T 細胞に細胞外領域にエピトープタグを挿入した ABCA1 を発現させ、抗エピトープタグ抗体により細胞膜上 ABCA1 を標識した後に免疫沈降を行い、細胞膜上 ABCA1 の Ub 化を評価した。その結果、3 種類の E3 の過剰発現により細胞膜上 ABCA1 の Ub 化の増加が確認された。GW3965 処理により細胞膜上 ABCA1 の Ub-Lysosome 分解経路が亢進した HepG2 細胞に対し、3 種類の E3 の KD による効果を検討した結果、E3-X の KD 時に細胞膜上 ABCA1 の発現量増加が認められた。同条件下では細胞膜上 ABCA1 の分解が抑制され、ABCA1 の機能上昇も確認された。免疫沈降法より、COS1 細胞において共発現させた ABCA1 と E3-X との相互作用が検出され、さらにピオチン化により精製した細胞膜分画の解析、および免疫染色法より、ABCA1 と E3-X は細胞膜上あるいは細胞膜近傍において共局在することが明らかとなった。以上の結果から、E3-X が細胞膜上 ABCA1 の Ub 化を担っていると結論づけた。

3. 細胞膜上 ABCA1 の Ub-Lysosome 分解経路活性化機構の解析

他のグループの研究より、通常時 LXR β は ABCA1 との相互作用を介して『不活化状態の ABCA1』プールを細胞膜上で増やし、脂質蓄積時に不活化状態を解除することで、機能と分解の即時の亢進を可能とし、脂質蓄積に対する応答を担うとする説が提唱されている。そこで、申請者は脂質蓄積時に細胞膜上 ABCA1 の Ub-Lysosome 分解経路が活性化する機構にこの LXR β との相互作用による効果に関連するものと推測した。COS1 細胞において LXR β の過剰発現により細胞膜上 ABCA1 の Ub 化は減少した。MPM および HepG2 細胞において、内因性 LXR β を KD したところ、リソソーム阻害剤感受性の分解が増加し、この条件下では GW3965 処理による細胞膜上 ABCA1 の分解に対する影響は認められなかった。HepG2 細胞に対し LXR β との相互作用部位を特異的に変異させた ABCA1 変異体を過剰発現させ、LXR β KD の効果を検討したところ、分解への影響は観察されなかった。さらに COS1 細胞において LXR アゴニスト処理により、ABCA1 と LXR β との相互作用は減少し、一方で E3-X との相互作用は上昇することが明らかとなった。以上の結果に基づいて、E3-X による ABCA1 の Ub 化は、LXR β が乖離した活性化状態の ABCA1 に対して行われると結論づけた。

本研究により、Ub-Lysosome 分解経路での細胞膜上 ABCA1 の分解は、通常時 LXR β との相互作用により抑制されているが、脂質蓄積時には LXR β との相互作用が減少し、引き続き E3-X により Ub 化を受けることで亢進されることを明らかとした。申請者が見出した細胞膜上 ABCA1 の Ub-Lysosome 分解経路は、脂質蓄積という病態に応答して機能しており、E3-X を介した ABCA1 の Ub 化阻害によって脂質異常症や動脈硬化症の進行抑制が可能となることから、新たな創薬標的となるものと期待される。以上の理由により、本研究は、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。