

論文の内容の要旨

パルミトイル化修飾による ABCG1 の機能制御機構の解析

氏名 加藤 卓也

【背景】

ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1)は ABC ファミリーに属し、6 回膜貫通領域と 1つの ATP 結合領域を有するタンパク質である。マクロファージ、血管内皮細胞などの末梢細胞に発現し、cholesterol、oxysterol の細胞外排泄に関与することで動脈硬化の防御因子として機能することが遺伝子改変動物等を用いた研究から明らかとなっている。しかしながら、ABCG1 による sterol 類の細胞外排泄メカニズムについては未だ不明な点が多い。通常状態において、ABCG1 はその大部分が細胞内、特にゴルジ体に分布することから、細胞内での sterol 輸送機能を介して、間接的に sterol 類の細胞外排泄に働いていることを支持する報告がある一方で、LXR agonist 処理によりタンパク質の膜移行が促進されるから、細胞膜の sterol 排泄トランスポーターであることを示唆する報告もある。以上の背景から、私は ABCG1 の細胞内局在制御機構の解明が、ABCG1 の機能発現部位の同定、ひいては sterol 類の細胞外排泄機構の解明につながると考え、本研究においてその分子機構を解析することにした。パルミトイル化修飾は、炭素鎖数 16 のパルミチン酸が基質タンパク質の

Cysteine 残基を介してチオエステル結合する可逆的な修飾であり、基質の脂質膜への親和性を高める機能を介して、細胞内局在、タンパク質間相互作用などを動的に制御している。また、パルミトイル化修飾を担う酵素群の多くは、ABCG1 が局在するゴルジ体に存在することが明らかにされている。以上の点から、本研究では特にパルミトイル化修飾に着目し、ABCG1 の細胞内局在制御機構について研究を進めた。

【方法と結果】

1. ABCG1 のパルミトイル化修飾の検出及び、関与する酵素群の同定

ABCG1 安定発現 HEK293 細胞を ^3H palmitic acid 存在下で培養後、細胞を可溶化し、ABCG1 抗体を用いて調製した免疫沈降物を SDS-PAGE によって解析した結果、ABCG1 の発現と共に、ABCG1 と同じ分子量に ^3H に由来するシグナルが検出された。更にそのシグナルはパルミトイル化修飾のチオエステル結合を切断する NH_2OH 処理 (1 M, 1 h) やパルミトイル化阻害剤の 2-bromopalmitic acid (2BP) 処理 (100 μM , 6 h) によって消失したことから、今回検出された ^3H シグナルが ABCG1 へのパルミトイル化修飾によるものであることが示唆された (Figure. 1)。

パルミトイル化修飾はヒトにおいては DHHC ドメインを有する 22 種類の DHHC ファミリーによって担われている。HEK293T 細胞に ABCG1 と DHHC1~22 を各々共発現させ、ABCG1 に由来する ^3H palmitic acid のシグナル強度を指標とすることにより、ABCG1 のパルミトイル化に関与する酵素群の同定を試みた。その結果、DHHC2、3、9 の共発現により、ABCG1 のパルミトイル化は顕著に亢進し、これら酵素が ABCG1 を基質とすることが示唆された (Figure. 2)。

また、ABCG1 を発現させた HEK293T 細胞において、DHHC3 をノックダウン (KD) し

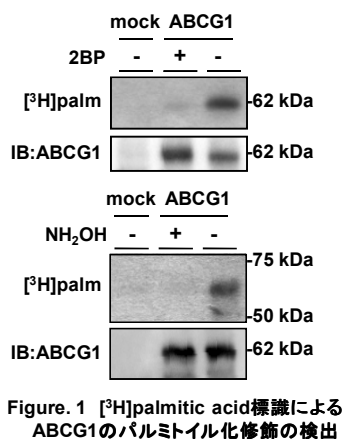


Figure. 1 ^3H palmitic acid 標識による ABCG1 のパルミトイル化修飾の検出

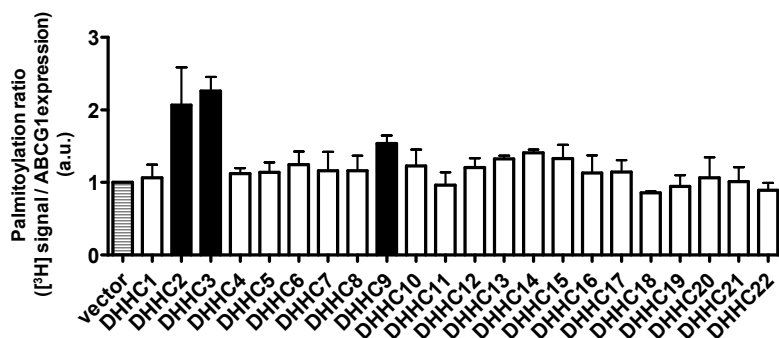


Figure. 2 ABCG1 のパルミトイル化に関与する酵素の同定

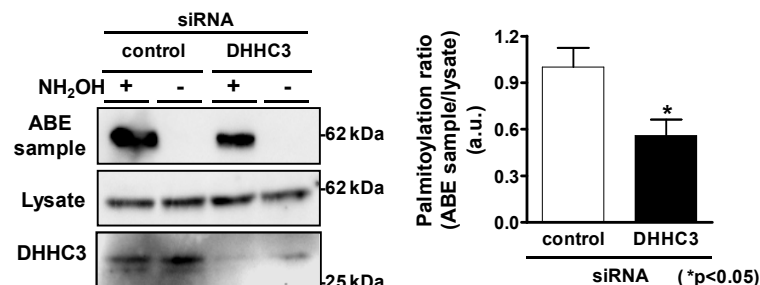


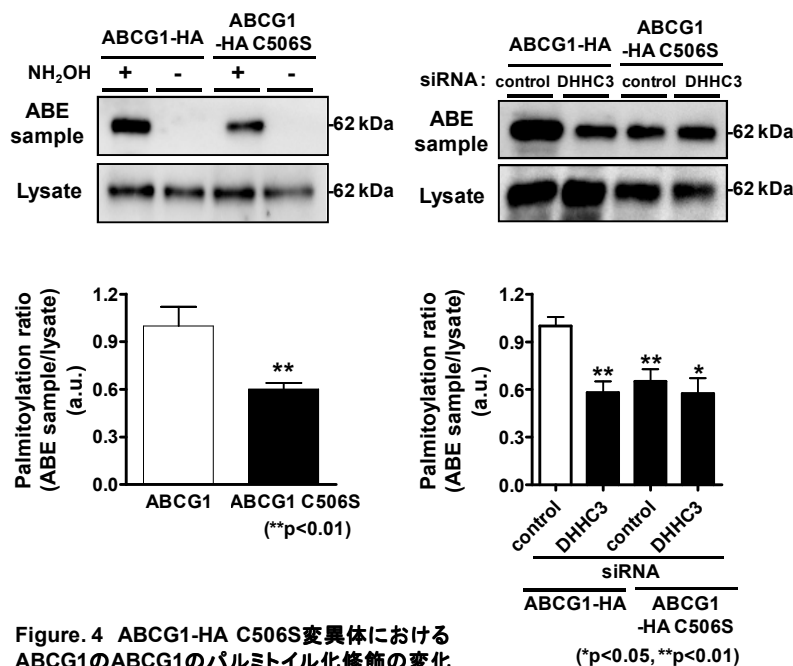
Figure. 3 DHHC3 KD による ABCG1 のパルミトイル化修飾の変化

た所、ABCG1 のパルミトイル化修飾の有意な低下が認められ、DHHC3 が細胞内において ABCG1 のパルミトイル化を担うことが明らかとなった(Figure. 3)。

2. ABCG1 のパルミトイル化部位の同定

ABCG1 の N 末端側の cytosolic 領域を ABCG1 と同じ ABCG ファミリーに属する ABCG2 の N 末端側の cytosolic 領域と置換したキメラタンパク質は、ABCG1 と同様の細胞内局在、輸送機能を示すことが報

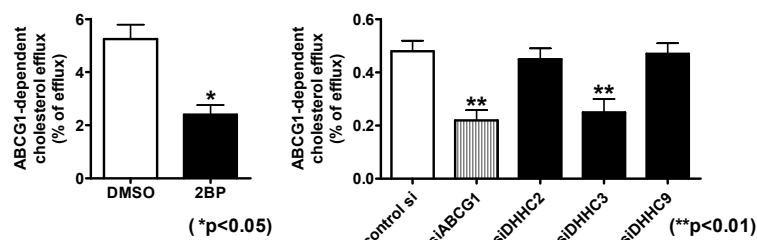
告されている。従って、ABCG1 の N 末端側の cytosolic 領域以降の Cysteine がパルミトイル化されている可能性が高いと考え、該当領域に存在する Cysteine を Serine に置換した CS 置換体を作成し、HEK293T 細胞に発現させた。その結果、506 番目の Cysteine を Serine に置換した変異体 (ABCG1 C506S) に於いて、ABCG1 のパルミトイル



化が有意に減少することが明らかになった。さらに、ABCG1 C506S のパルミトイル化は HEK293T 細胞において、DHHC3 KD の影響を受けないことから、506 番目の Cysteine が DHHC3 による ABCG1 のパルミトイル化部位であることが示された (Figure. 4)。

3. ABCG1 の発現量、機能に対するパルミトイル化修飾の役割

ABCG1 安定発現 HEK293 細胞に対して 2BP 処理 (100 μ M, 6h)、あるいは DHHC2、3、9 を KD し、ABCG1 の機能変化を評価した。ABCG1 の機能は、 $[^3\text{H}]$ cholesterol (2 μ Ci/ml, 12 h) で細胞を標識後、HDL (20 μ g/ml, 2h) (2BP 処理)、BSA (200 μ g/ml, 9 h) (DHHC KD) を acceptor として ABCG1 依存的な細胞外への cholesterol 排泄を測定することにより評価した。その結果、2BP 処理、DHHC3 KD により、ABCG1 依存的な細胞外への cholesterol 排泄活性がそれぞれ 60 %、50 %低下した (Figure. 5)。



次に、細胞膜非透過性の EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin を用いて細胞膜タンパク質を標識し、2BP 処理、DHHC3 KD による ABCG1 の細胞膜上及び、細胞全体での発現量変化を検討したところ、有意な差は認められなかった。ABCG1 を内因性に発現するマクロファージ由来の細胞株である RAW264.7 細胞を用いて、上記と同様の手法により、ABCG1 の発現量、機能に対するパルミトイル化の影響を評価した際にも、HEK293 細胞と同様の結果が得られた。また、HEK293T 細胞を用いて ABCG1-HA C506S 変異体においても発現量、輸送機能変化の観察を行ったところ、ABCG1-HA C506S の発現は細胞膜上、細胞全体のどちらにおいても通常の ABCG1-HA と同様に観察されたが、ABCG1 依存的な cholesterol の排泄は観察されなかった (Figure. 6)。

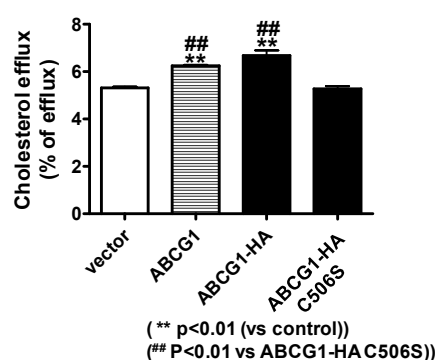


Figure. 6 ABCG1-HA C506S変異体における輸送機能変化の評価

4. ABCG1 の細胞内局在に対するパルミトイル化修飾の役割

ABCG1 の細胞内局在の変化を観察するため、Hela 細胞に ABCG1-HA、ABCG1-HA C506S を発現させ、各種オルガネラマーカーとの共免疫染色を行った。その結果、ABCG1-HA は細胞膜、early endosome (EE)マーカーの EEA1、late endosome/lysosome (LE/LY)マーカーの LAMP1 との共局在が観察され、ABCG1-HA C506S は細胞膜、ゴルジ体マーカーの GM130、TGN46、recycling endosome (RE)マーカーの AcGFP-Rab11 とに共局在することが明らかとなった (Figure. 7)。

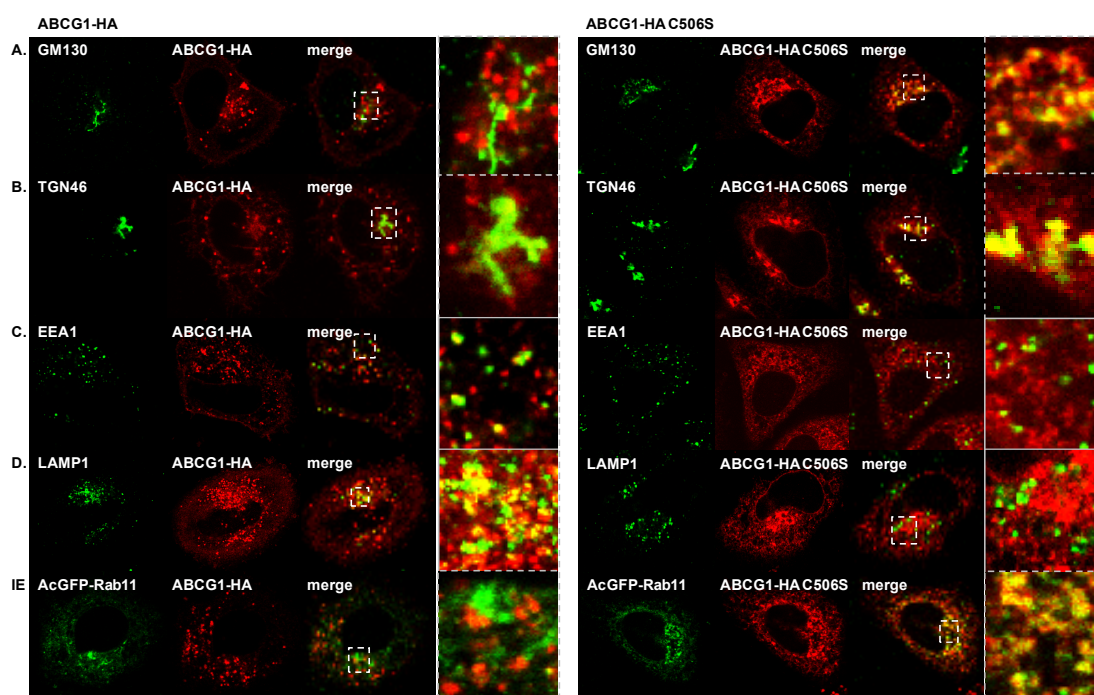


Figure. 7 ABCG1-HA、ABCG1-HA C506Sにおける細胞内局在変化の観察

【総括】

本研究において私は、ABCG1 による cholesterol の細胞外排泄が DHHC3 を介したパルミトイル化修飾によって制御されていることを明らかにした。また、パルミトイル化修飾の阻害が ABCG1 の発現量に対して影響を与えなかったこと、ABCG1-HA C506S では ABCG1-HA で観察される LE/LY への局在が認められないことから、ABCG1 による cholesterol 排泄に於いては、ABCG1 の LE/LY への局在が重要な役割を果たしていることが示唆された。DHHC3 は ABCG1 が局在する細胞膜とゴルジ体に発現していることから、これら細胞内小器官での DHHC3 によるパルミトイル化修飾が、ABCG1 の LE/LY への sorting に関与しているものと考えられる。細胞内への cholesterol の供給経路は細胞内での生合成経路と血液から供給される LDL 由来の取り込み経路の 2 つが存在する。LDL などの形で細胞内に取り込まれた cholesterol ester は酸性の LE/LY で加水分解された後に、free cholesterol として細胞膜や様々な細胞内小器官へと輸送される。LE/LY から細胞内小器官への cholesterol の輸送に関与する NPC1/2 の変異株では細胞全体での cholesterol 量が増加しているにもかかわらず、細胞膜中 cholesterol が低下することが報告されており、LE/LY を介した cholesterol 輸送経路は cholesterol の供給経路として不可欠な経路であると考えられている。現在これらの経路において cholesterol 輸送に関与する分子は NPC1/2 を介した Rab7、9 による輸送以外には明らかにされていないが、今回の研究から、ABCG1 が LE/LY からの cholesterol 輸送に関与している可能性が考えられ、細胞内 cholesterol 輸送機構を解明する一助になるものと期待される。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、パルミトイル化転移酵素 DHHC1~22 の cDNA を供与頂いた自然科学研究機構 生理学研究所 深田正紀 教授、^[3H]palmitic acid を用いたパルミトイル化修飾の検出法をご指導頂いた東京大学 大学院薬学系研究科 生理化学教室 堅田利明 教授、紺谷圈二 准教授に深く感謝致します。