

審査の結果の要旨

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、申請者は 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。

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

初めに申請者は ABCG1 のパルミトイル化修飾の検出を試みた。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を検出した。更にそのシグナルがパルミトイル化修飾のチオエステル結合を切断する NH₂OH 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。

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。そこで、申請者は 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。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。

2. ABCG1 のパルミトイル化部位の同定

次に申請者は ABCG1 のパルミトイル化部位の同定を試みた。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。

3. ABCG1 の発現量、機能に対するパルミトイル化修飾の役割

また、申請者はパルミトイル化修飾による ABCG1 の発現量、機能の変化を評価した。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。

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。

以上のことから、ABCG1 へのパルミトイル化修飾は ABCG1 の発現量変化を介さずに

ABCG1 の機能自体を制御していることが示唆された。

4. ABCG1 の細胞内局在に対するパルミトイル化修飾の役割

申請者は、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ル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。

以上、本研究において申請者は、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。これまでは、ABCG1 は cholesterol の排泄過程において細胞膜を介して cholesterol の排泄に関与しているのか、細胞内の cholesterol 輸送に関与しているのかについては明らかとなっていなかったが、今回の結果から、ABCG1 は細胞膜を介した輸送というよりはむしろ細胞内での cholesterol の輸送に関与していることが示唆され、ABCG1 の機能発現機構及び、生体内での cholesterol の恒常性維持機構を理解する上で非常に重要な知見となるものである。

以上の成果は、生体内における cholesterol の恒常性維持機構の更なる解明に貢献するものと考えており、博士（薬学）の学位を授与するに値するものと認めた。