

《農芸化学奨励賞》

糖と脂質の恒常性維持に關与する ABC タンパク質の研究



京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 助教 松尾道憲

近年、生活習慣病（メタボリックシンドローム）の患者数の増大に伴い、生体の糖と脂質の恒常性維持機構が注目されている。ABC (ATP-binding cassette) タンパク質 (ABC トランスポーター) が体内の糖と脂質の恒常性維持に關与することが徐々にわかってきた。ABC タンパク質はよく保存されたヌクレオチド結合領域 (NBF) を 1 機能分子あたり二つもつ膜タンパク質スーパーファミリーであり、ヒトには 48 または 49 の ABC タンパク質が存在する (図 1)。

膵臓からのインスリンの分泌は血糖調節に主要な役割を果たし、また、脂質の体内循環は体内脂質レベルの調節に必須である。本研究では糖と脂質の恒常性維持機構を分子レベルで理解するために、インスリン分泌と脂質の体内循環の制御にかかわる ABC タンパク質の生化学的研究を行った。

まず最初に、インスリン分泌に關与するスルホニル尿素受容体 (SUR) とヌクレオチドの相互作用を生化学的に解析し、ヌクレオチドによる SUR を介した ATP 感受性カリウムチャンネル (K_{ATP} チャンネル) 制御の分子基盤を初めて明らかにした。さらに、ABCG タンパク質による細胞膜脂質の排出活性と ABCG タンパク質の細胞内局在を解析し、脂質輸送機構と局在調節機構を明らかにした。本研究によって得られた ABC タンパク質による糖と脂質の恒常性維持の分子機構に關する重要な知見を紹介する。

1. 糖の恒常性維持に關与する ABC タンパク質

K_{ATP} チャンネルは、ABC タンパク質に属する SUR とチャンネルポアサブユニット Kir6.2 から構成され、細胞内代謝状態を感知して電気化学的信号に変換する。SUR にはサブタイプが存在し、SUR1/Kir6.2 型 K_{ATP} チャンネルは膵β細胞でインスリン分泌調節に、SUR2A/Kir6.2, SUR2B/Kir6.2 型 K_{ATP} チャンネルはそれぞれ心筋と平滑筋で虚血時の細胞保護に働く。膵β

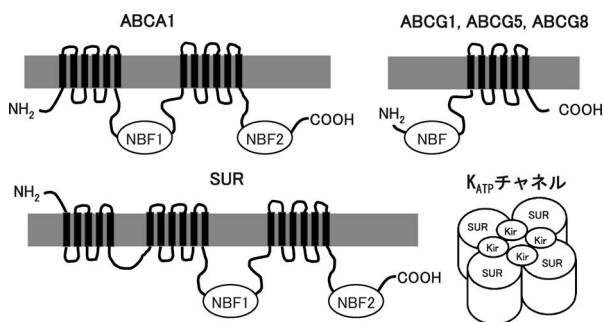


図 1 ABC タンパク質の二次構造と K_{ATP} チャンネルの構造

ABCA1 を含む多くの ABC タンパク質は 12 回膜貫通領域と二つの NBF をもつ。SUR は 17 回膜貫通領域と二つの NBF をもつ。ABCG1, ABCG5, ABCG8 は N 末側に一つの NBF と C 末側に 6 回膜貫通領域をもち二量体で機能する。 K_{ATP} チャンネルは SUR サブユニットと Kir サブユニットから構成され、ヘテロ八量体を形成して機能する。

細胞の K_{ATP} チャンネルは定常状態では開口して膜電位を維持しており、血糖が上昇すると、血中グルコースが細胞内に取り込まれ、代謝されて ATP 濃度の上昇、ADP 濃度の低下をもたらす (図 2)。膵β細胞の K_{ATP} チャンネルはヌクレオチド濃度の変化を感知して閉鎖し、膜が脱分極し、それが最終的にインスリン分泌を引き起こす。SUR1 の遺伝子異常が家族性低血糖症をもたらすこと、最も広く用いられる糖尿病治療薬であるスルホニル尿素剤の標的分子が SUR1 であることから、SUR の解析は関心がもたれている。しかし、電気生理学的解析はされていたが、生化学的解析は進んでおらず、 K_{ATP} チャンネルのヌクレオチドによる制御の分子機構は不明であった。ヌクレオチドによるチャンネル活性の制御機構を明らかにするため、SUR の二つの NBF (NBF1, NBF2) のヌクレオチド結合特性を検討した。

ATP 類似体である 8-azido-ATP を用いた光親和性標識実験から、SUR の NBF1 が高親和性 ATP 結合部位、NBF2 が低親和性ヌクレオチド結合部位であり、NBF2 のみに ATP 水解放活性があること、二つの NBF 間に協調性があることがわかった。さらに、NBF1 のヌクレオチドに対する親和性が SUR2A, SUR2B より SUR1 で高いこと、NBF2 の親和性が SUR2A より SUR2B で高いことを明らかにした。これらの結果から、生理的な細胞内 ATP, ADP 濃度では、SUR の NBF1 に ATP, NBF2 に ADP が結合した形でチャンネルを活性化するモデルを示し、SUR サブタイプ間のヌクレオチド結合性の違いによって K_{ATP} チャンネルサブタイプ間の特性の違いがもたらされる可能性を示した。したがって、SUR が細胞内 ADP 濃度の変化を感知するセンサー分子として機能し、チャンネル開閉を制御することが生理的に重要であることを世界で初めて明らかにした (図 3)。また、SUR1 の変異は家族性低血糖症をもたらすが、その変異体の一つ (R1420C) では、NBF 間の協調性が失われることを明らかにした。

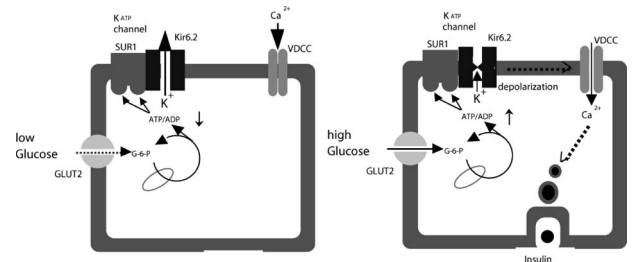


図 2 膵β細胞のインスリン分泌機構

低血糖時には細胞内の ATP/ADP 比が低く、 K_{ATP} チャンネルは開口して膜電位を維持している。高血糖時には糖が取り込まれ代謝されて、細胞内の ATP/ADP 比が高くなり、 K_{ATP} チャンネルは閉鎖する。その結果、細胞膜が脱分極し、電位依存性カルシウムチャンネル (VDCC) が開口し、カルシウムの流入と、インスリン分泌が起る。

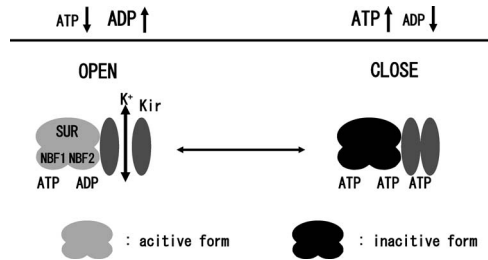


図 3 SUR による K_{ATP} チャンネル制御モデル
SUR の NBF1 に ATP が、NBF2 に ADP が結合したときチャンネルが活性化される。細胞内 ATP、ADP 濃度がそれぞれ増加、減少すると、ADP が NBF2 から解離し ATP が結合し、チャンネルは不活化される。ATP が加水分解されるか、解離して ADP が NBF2 に結合し、再びチャンネルが活性化される。SUR は活性型と不活性型の平衡関係にあり、SUR は細胞内の ADP 濃度センサーとして働く。

2. 脂質の恒常性維持に關する ABC タンパク質

ABCG タンパク質はハーフサイズの ABC タンパク質で、ホモ二量体またはヘテロ二量体を形成して体内の過剰なコレステロールの排出に關する (図 4)。マクロファージを含む末梢細胞の ABCG1 は、ABCA1 と協調して高密度リポタンパク質 (HDL) 形成と肝臓へのコレステロール逆転送に働く。高脂肪食を摂取した ABCG1 ノックアウトマウスは、肝臓や肺のマクロファージにコレステロールを過剰に蓄積することから、ABCG1 の脂質輸送における生理的重要性は明らかである。ABCG5 と ABCG8 は小腸でステロール吸収抑制に働き、肝臓で MDR3 (ABCB4) や BSEP (ABCB11) と協調して胆汁ミセル形成に働く。ABCG5 または ABCG8 をコードする遺伝子の変異によって、植物性ステロールを蓄積する常染色体劣勢の遺伝病シトステロール血症が引き起こされることが知られている。ABCG タンパク質が脂質の恒常性維持に重要な役割を果たすことが予想されたが、ABCG タンパク質の脂質輸送機構と制御機構は不明であったため、ABCG タンパク質の輸送基質と細胞内局在を調べた。

2.1 ABCG タンパク質の脂質輸送機構

ABCG1 を安定発現した動物培養細胞を樹立し、ABCA1 安定発現細胞と比較しながら、培地中に分泌される脂質成分を解析した。ABCA1 がコレステロールとホスファチジルコリンをアポリポタンパク質 A-I に排出するのに対し、ABCG1 は ATP 加水分解依存的にコレステロールとスフィンゴミエリンを HDL に排出することを明らかにした (図 5)。コレステロールとスフィンゴミエリンは細胞膜でラフトと呼ばれるマイクロドメインを形成する。ABCA1 と ABCG1 がそれぞれノンラフト、ラフトに局在すること、ABCA1 と ABCG1 の脂質排出活性は細胞内スフィンゴミエリン量とそれぞれ逆相関、相関することを示し、ABCG1 の脂質排出機構が ABCA1 と異なることを明らかにした。また、ABCG1 の発現によって、細胞膜のコレステロールが再編成されることを示した。これらの結果から、ABCG1 が細胞膜ラフトで脂質を輸送することを見いだした。

2.2 ABCG タンパク質の局在制御機構

ABCG1, ABCG2, ABCG4 のホモ二量体は細胞膜に局在するのにに対し、ABCG5 または ABCG8 のホモ二量体は小胞体に局在し、ヘテロ二量体になって初めて細胞膜に移行することを明らかにした。小腸モデル細胞では、ABCG5 と ABCG8 のヘテ

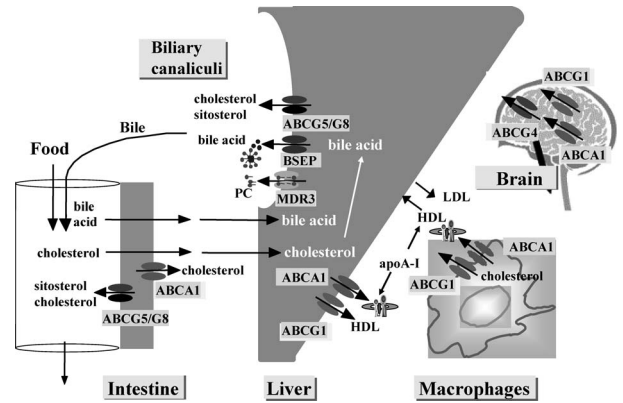


図 4 脂質を輸送する ABC タンパク質
食物中のコレステロールと胆汁酸は小腸から吸収され主にカイロミクロンの形で肝臓へ運ばれる。肝臓から末梢細胞へは LDL としてコレステロールは運ばれ、末梢細胞の過剰なコレステロールは HDL として肝臓へ逆転送される。肝臓からコレステロールあるいは胆汁酸に変換された後、胆管へ排出される。脳内では独立した脂質の循環が見られる。多くの ABC タンパク質が生体内の脂質輸送に關与している。

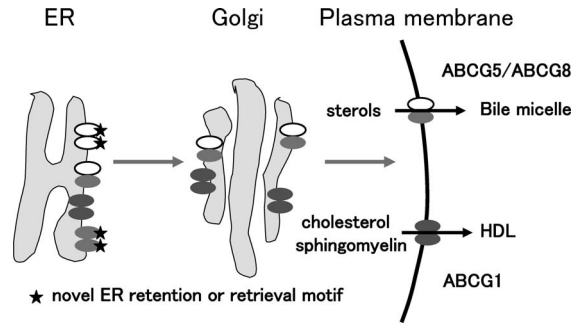


図 5 脂質恒常性維持に働く ABCG タンパク質の機能と局在制御
小腸と肝臓で ABCG5/ABCG8 が体外へのステロール排出に働く。ABCG5 と ABCG8 のホモ二量体は小胞体 (ER) に残留し、ヘテロ二量体のみが細胞膜に移行しステロールを排出する。ABCG5, ABCG8 の細胞質領域に新規 ER 残留・逆送シグナルが存在する可能性がある。末梢細胞では、ABCG1 がホモ二量体を形成して細胞膜に局在し、コレステロールとスフィンゴミエリンを排出する。

ロ二量体が頂端膜側に発現し、胆汁酸ミセルへのコレステロールと植物ステロール排出に働くことを示した。さらに、ABCG1, ABCG2 と ABCG5, ABCG8 のキメラタンパク質を作製し細胞内局在を調べ、ABCG5, ABCG8 の細胞質領域がホモ二量体の小胞体残留に關与し、その領域に新規 ER 残留・逆送シグナル配列が存在する可能性を示した (図 5)。

おわりに

以上、糖の恒常性維持に關する SUR のヌクレオチド結合特性を明らかにし、SUR による K_{ATP} チャンネル活性化機構とそれぞれの SUR サブタイプの制御モデルを提出した。さらに、脂質恒常性維持に關する ABCG タンパク質による輸送基質を同定し、脂質輸送機構と局在制御機構を示した。近年大きな問題となっているメタボリックシンドロームに対する治療薬の開発や病態を予防するための食品の開発に、本研究の成果を今後つなげていきたい。機能不明な ABC タンパク質がまだ多く存在することから、それらの機能解析が進めば、生体内の糖と

脂質の恒常性維持機構に対する理解がますます深まることが今後期待される。

本研究は、京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻細胞生化学研究室で行われたものです。本研究を行う機会を与えてくださり、終始指導していただいた京都大学物質-細胞統合システム拠点および大学院農学研究科教授 植田和光先生に深謝いたします。また、学生時代からの指導教官でありご指導いただいた京都大学名誉教授 天知輝夫先生に心から感謝いたします。京都大学大学院農学研究科准教授 木岡紀幸先生には多くの貴重な助言を賜ったことを感謝いたします。さらに、オックスフォード大学教授 Frances M. Ashcroft 先生、神戸大学大学

院医学系研究科教授 清野 進先生、京都大学大学院医学研究科教授 稲垣暢也先生、東京大学大学院薬学系研究科教授 新井洋由先生、東京大学大学院農学生命科学研究科教授 佐藤隆一郎先生、国立感染症研究所細胞化学部長 花田賢太郎先生、名古屋市立大学大学院医学研究科教授 横山信治先生をはじめとしました多くの共同研究者の皆様に厚く感謝いたします。本研究は細胞生化学研究室の卒業生、在校生の支援があって得られた成果であり、研究室の関係者に深く感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長 山本憲二先生、ならびにご支援賜った諸先生に厚く御礼申し上げます。