

《日本農芸化学会賞》



ヒト ABC タンパク質の生理的役割と分子メカニズムの解明

京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻

京都大学 物質-細胞統合システム拠点 教授 植田 和 光

私は文化人類学に興味をもち、京都大学農学部林学科に入学した。教養課程のときにイラン・アフガニスタンを旅し、未知のものに興味をもち挑戦することの喜びを知った。そして、2回生のときに百万遍の古本屋で購入した「偶然と必然」という本に書かれた生物学はあらゆる科学の中で人間に対して最も意味をもつものであり、生命の秘密は遺伝子とタンパク質の相互作用を解明することによって解き明かすことができるというジャック・モノーの考えに私は魅せられた。そして、農芸化学科に移って遺伝子という未知の世界に挑戦することを決心した。

大学院では、農芸化学分野の諸先輩がカビから発見された抗癌剤と DNA の相互作用を、当時開発された Maxam-Gilbert DNA 配列決定法を応用して研究した。当時臨床では、再発した癌が複数の抗癌剤に同時に耐性になる「多剤耐性」が問題となっていた。私は、1985年に米国国立癌研究所の多剤耐性の研究グループに幸運にも加わることができた。その結果、真核生物で最初の ABC タンパク質 MDR1 にめぐり会い、多剤排出ポンプという興味ある活性をもつことを明らかにした。さらに、約 50 のヒト ABC タンパク質の異常がさまざまな疾病を引き起こすことが明らかになり、ABC タンパク質が主に脂溶性化合物を ATP 依存的に輸送することにより、ヒトの健康維持に重要な役割を果たしているという新しい概念を確立することができた。以下に、私が携わった研究の主な成果を概略する。

1. 真核生物 ABC タンパク質の発見

抗癌剤の発達によって、急性白血病、悪性リンパ腫などは治療可能な病気となった。しかし、多くの固形癌は抗癌剤に対して感受性が低い。また抗癌剤が最初は有効であっても、治療中に効かなくなることがしばしばある。しかも困ったことに、投与した抗癌剤に対してだけでなく治療に用いていない作用機構や構造が異なる抗癌剤も効かなくなる。これらの現象は癌の自然耐性あるいは獲得多剤耐性と呼ばれ、癌による死亡の大半に関係している。

私は、多剤耐性を示す培養細胞で共通して増幅している染色体領域の単離から始め、最後に多剤耐性癌細胞で過剰発現している遺伝子の全長 cDNA の単離に 1986 年に成功した。その遺伝子は多剤耐性 (multidrug resistance) にちなんで *MDR1* と名づけられた。アミノ酸配列の解析から、アミノ酸や糖を取り込むバクテリアのトランスポーターと *MDR1* が似ていることが明らかになり、ATP 加水分解に依存して低分子化合物を輸送する新しいタイプのトランスポーターファミリー (ABC タンパク質: ATP Binding Cassette proteins) が真核生物にも存在することが明らかになった。

後の研究から、ABC タンパク質遺伝子ファミリーは生物界で最も大きなファミリーの一つであり、地球上のほとんどの生

物は 50 種類前後の ABC タンパク質遺伝子をもつこと、ヒトの染色体上にも約 50 の ABC タンパク質遺伝子が存在することが明らかになった。

2. 生体異物から体をまもる MDR1

糖やアミノ酸など水溶性化合物は脂質二重層を自由に通過できない。それゆえ、それらを体内に取り込む膜タンパク質であるトランスポーターが動物の小腸上皮に存在している。それに対して、脂溶性化合物は脂質二重層を比較的自由に通過するため、それらは濃度勾配に従って吸収され、体内を移動すると考えられてきた。しかし、MDR1 の発見は、脂溶性化合物の膜を介した移動にも ATP 依存トランスポーターが関与していることを示した。

MDR1 の主な生理的役割は、食物中のさまざまな脂溶性有害物や薬物が小腸から体内へ移行する際に、管腔中へ能動的に再排出することにより、吸収を防止することである。また肝臓および腎臓では、脂溶性有害物を胆汁中および尿中へ排出し、体外へと排泄している。さらに、脳や精巣の毛細血管で、MDR1 は脳実質中や精巣中に異物が浸入することを防いでいる (図 1)。

MDR1 の特筆すべき特徴は、それまでの酵素-基質特異性の概念をくつがえすほど幅広い構造の化合物を結合し輸送することである。私たちは、部位特異的変異導入法により MDR1 の基質認識に関係するアミノ酸残基を同定するとともに、精製した MDR1 タンパク質を生化学的に解析することによって基質認識メカニズムに関する新規モデルを提案した。さらに、MDR1 とアミノ酸配列が 80% 以上相同な MDR2 が、胆汁酸をアクセプターとして、フォスファチジルコリンとコレステロールを細胞から排出することを明らかにした。つまり、脂溶性生体異物の輸送だけでなく、内在性の脂質の輸送にも ABC タンパク質が関与していることが明らかになった。

3. 脂質恒常性維持に関与する ABC タンパク質: ABCA1

コレステロールは、ホルモンや胆汁酸の前駆体として動物にとって必要であり、さらに膜の構成成分として必須である。しかし、コレステロールの過剰蓄積は細胞にとって逆に有害であり、アポトーシスを引き起こす。細胞が生きていくためには、コレステロールの細胞内濃度をある範囲内に保つ必要がある。遺伝子の解析から、高密度リポタンパク質 (HDL, いわゆる善玉コレステロール) の形成が細胞内の余剰のコレステロールを排出する唯一の経路であり、ABC タンパク質の一つ ABCA1 がその過程に必須であることが明らかにされていたが、そのメカニズムは不明であった。

私たちは、ヒト ABCA1 およびそれと高い相同性をもつ ABCA7 を安定発現する培養細胞株を樹立し、ABCA1 がアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) にホスファチジルコリンとコレス

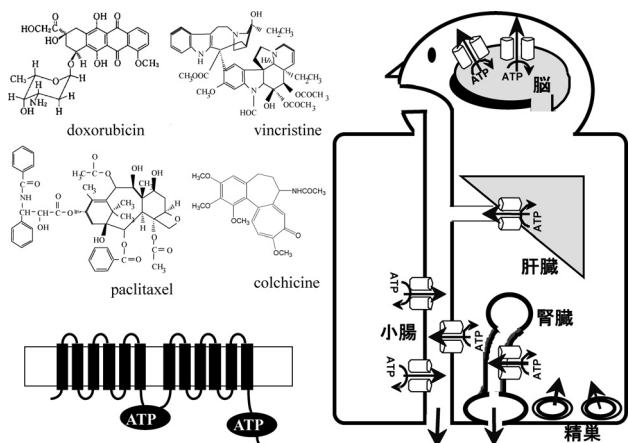


図1 MDR1の二次構造, 代表的な輸送基質と生体内での発現場所

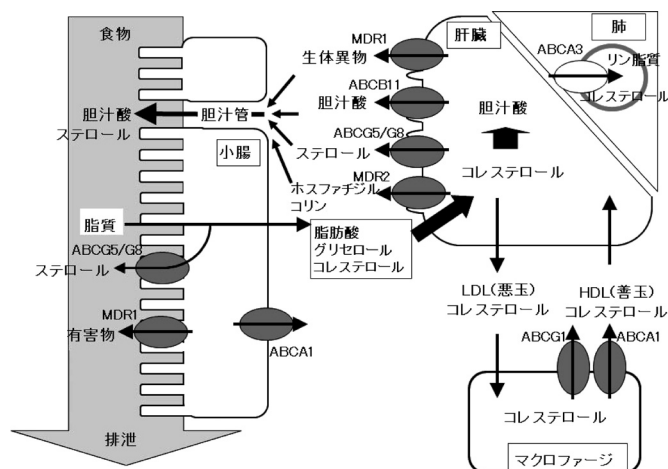


図2 脂質恒常性に関与する主なヒト ABC タンパク質

テロールを受け渡すのに対し ABCA7 が主にホスファチジルコリンだけを apoA-I に渡すことを明らかにした. この結果から, ABCA1 はコレステロールを直接輸送していることが示唆された. さらに, ABCA1 の特徴的な二つの細胞外ドメイン間に 2 本のジスルフィド結合が形成されることが HDL 形成には必要であり, apoA-I が ABCA1 の細胞外構造に結合することが HDL 形成の第一段階であることを明らかにした. また, 胆汁酸が apoA-I と同様に ABCA1 によって運ばれる脂質のアクセプターとして機能すること, HDL が血中からなくなる遺伝病であるタンジール病変異の一つである W590S 変異体では apoA-I の ABCA1 からの遊離が遅れることなどから, ABCA1 による HDL 形成は少なくとも四つのステップに分けられること, ABCA1 はトランスポーターと同時に apoA-I のレセプターとしても機能するユニークなタンパク質であることを明らかにした.

4. 新規な翻訳後制御機構による ABCA1 の活性調節

細胞中に余剰のコレステロールが蓄積すると, オキシステロール濃度が上昇し, 活性化された LXR/RXR ヘテロ二量体によって ABCA1 遺伝子の転写が促進され, 発現した ABCA1 によって細胞外へ排出される. しかし, コレステロールは細胞にとって必須であるため, コレステロール排出の鍵を握る ABCA1 は, 転写レベルだけでなく細胞内局在や分解などのさまざまな翻訳後調節を受ける. そこで, 私たちは翻訳後調節にかかわる細胞内因子の探索を行った. その結果, 見いだした相互作用タンパク質の一つは, 驚いたことに ABCA1 の転写制御を行う核内受容体 LXRβ であった. これまで LXRβ は核内のみ存在すると考えられていたが, 私たちの研究からマクロファージにおいては約 4 割が核外に存在することが明らかになった. LXRβ は細胞膜上の ABCA1 に結合し分解を抑制するとともに ABCA1 を細胞膜上で安定化する. しかし, ABCA1/LXRβ 複合体はコレステロール排出活性をもたず不活性であり, LXRβ にリガンドが結合すると直ちに ABCA1 から遊離し, ABCA1 はコレステロール排出活性を回復することを明らかにした.

LXRβ は ABCA1 に結合し, ABCA1 を細胞膜上で不活性化状態で保持することによりコレステロール濃度の急激な上昇時に備えていると考えられる. ABCA1 は 2,261 アミノ酸の巨大な膜タンパク質であり, 転写活性化から細胞膜上で機能するま

では最低 5~6 時間はかかる予想される. 半減期の短い ABCA1 はすぐに分解されてしまうため, この「LXRβ 相互作用による ABCA1 安定化機構」がなければ, マクロファージは急激なコレステロール濃度上昇に対して, 5 時間以上なすすべがないことになる. この機構は, コレステロール濃度上昇に対する即時反応 (immediate early response) であると考えられる.

ABCA1 はほかにもさまざまな翻訳後制御を受けており, 脳内において PDZ タンパク質 α1-syntrophin が ABCA1 の C 末端と強く結合し, ABCA1 の分解を抑制すること, ABCA1 は常にエンドサイトーシスされており, HDL 形成には, ABCA1 が再び細胞膜へ戻るリサイクリング経路が関与していることを明らかにした.

5. おわりに

約 50 存在するヒト ABC タンパク質の機能異常は, 高脂血症, のう胞性繊維症, 糖尿病, 神経変性疾患, 老人性の失明の原因となる黄斑部変性症, 呼吸窮迫症, 皮膚疾患, 弾性繊維失調症, 免疫異常, 胆汁うっ滞などさまざまな疾病を引き起こす. それは, ABC タンパク質が私たちの体の環境への適応, 生理活性脂質の分泌や, 糖, 脂質などの体内恒常性維持に重要な役割を果たしていることを示している (図 2).

しかし, 疾病に関係することが明らかな ABC タンパク質でも何を直接輸送し, なぜその ABC タンパク質の異常によって疾病が引き起こされるのか不明なものも多く残されている. また, ABC タンパク質の多くは転写制御だけでなく複雑な翻訳後制御を受けており, その詳細は明らかでない. 私たちは現在, ほとんどすべてのヒト ABC タンパク質それぞれを培養細胞に発現させ, 生化学的, 細胞生物学的, 構造生物学的解析によってそれらの作用とメカニズムを解明することを目指して研究を進めている. この研究をさらに発展させ, 農芸化学の応用生命科学分野の発展に貢献したいと考えている.

謝 辞 学生時代から今に至るまで, 多くの先生方からご指導いただきました. 心より感謝いたします. 本研究は, 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻の細胞生化学研究室の在学学生と卒業生の皆さん, また多くの共同研究者のご協力によって成し遂げられた成果です. この誌面をお借りして厚く御礼申し上げます.