

Title	ABC輸送体ABCA5の細胞特異的な発現とその機能
Author(s)	大東, 穂
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49666
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【2】

氏名	おお 大 ひがし 東 めぐみ 穂
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 2 2 8 7 1 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	ABC 輸送体 ABCA5 の細胞特異的な発現とその機能
論文審査委員	(主査) 教 授 山 口 明 人 (副査) 教 授 山 元 弘 教 授 馬 場 明 道 教 授 松 田 敏 夫

論文内容の要旨

脂質は細胞膜の構成成分となるだけではなく、膜機能に重要な機能を果たしている。膜の脂質組成はシグナル伝達や細胞内小胞輸送などに影響を与えることが明らかになりつつあり、またさらに脂質自身が情報伝達物質として機能し、多種多様な生命現象に関与することが知られている。しかしながら、このような重要な物質であるにも関わらず、脂質がどのように膜を介して輸送されているのかについては未知の部分が多岐にわたる。我々は脂質の膜を介した輸送機構を明らかにするべく、輸送の分子実体として ABC (ATP binding cassette) 輸送体群に注目した。

ABC輸送体はATP結合モチーフを含むnucleotide binding domain (NBD)と7回の膜貫通ドメイン二つずつを機能単位とする膜タンパク質であり、ATPの加水分解エネルギーと共役し膜を介して物質を輸送する。近年ABC輸送体の中でも特にABCAサブファミリーが、脂質の

膜を超えた移動や局在に大きな役割を果たしていることが明らかになりつつある。ABCAサブファミリーはそのアミノ酸配列の相同性から、A1, A2, A3, A4, A7, A12~16と、A5, A6, A8a, A8b, A9の二つのサブグループに分類できる。これまでに疾患との関わりが報告され、機能が明らかになりつつあるものは全て前者のサブグループに属している。そのため機能不明の後者のサブグループをABCA5サブグループと名付け、特にABCA5の生理的役割の解明を目指して研究を進めた。

我々はこれまでにABCA5ノックアウトマウスを作成し、このマウスが眼球突出や血中甲状腺ホルモン量の低下など興味深い表現型を示すことをすでに報告している。しかしABCA5タンパク質の発現組織や細胞内局在については明らかになっておらず、生理的機能についても未だ不明な点が多い。そこで本研究ではまず、抗ABCA5モノクローナル抗体を作成し、マウス組織から調製したタンパク質に対してウェスタンブロッティングを行った。その結果、ABCA5は精巣、脳、肺に多く発現し、胸腺、心臓、腎臓、脾臓などにも少量発現していることが明らかとなった。

いくつかのABCA輸送体ファミリーにおいてその機能異常、欠損によって脂質の恒常性が大きく変化することが知られている。そこで、ABCA5の関与を調べるため、ABCA5ノックアウトマウスにおいて組織での脂質量を調べた。しかし、コレステロール、リン脂質共に、野生型とABCA5ノックアウトマウスでは有意な差は見られなかった。またABCA5ノックアウトマウスにおいて、脳での他のABC輸送体の発現量を調べたが、ABCC4遺伝子の発現の上昇が見られる以外発現が亢進している遺伝子はなく、他のABC遺伝子が発現上昇することによって脂質輸送機能を補償している可能性は低いと考えられた。従って、これらの結果からABCA5の脂質輸送に関わる機能を推測することはできなかった。しかしABCA5が組織内部や細胞内での脂質の局在を決定する輸送体である場合や、ABCA5が微量な生理活性脂質の輸送体として働いているような場合は、組織全体の脂質量には変化が見られないことが考えられる。そのため、ABCA5が発現している細胞の種類や細胞内局在など、より詳細な解析が必要であると考へ、ABCA5の発現が多く見られた脳、精巣、肺、腎臓についてABCA5抗体を用いた免疫染色を行った。

脳においては、ABCA5はNissl染色で染色される神経細胞に発現していた。また、ABCA5はアストロサイトやミエリンには発現しておらず、一部のオリゴデンドロサイトの細胞体で発現していた。さらに神経作動性を区別する種々のマーカー抗体を用いて検討した結果、ABCA5の発現する神経はPhenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT) 陽性のアドレナリン作動性神経であることを明らかにした。精巣においては、ABCA5は精細管内部の精原細胞に発現し、ライディッヒ細胞には発現していなかった。また肺においては、ABCA5は肺泡2型細胞のラメラポディのマーカータンパク質であるABCA3と共局在していた。さらに腎臓においては上皮細胞に発現しており、basolateral膜のマーカーであるNaK-ATPaseとは異なった局在を示し、apical膜側に局在していた。これらの組織においてはABCA5が細胞特異的に発現していることを明らかにすることができたが、その機能については未だ今後の解析が必要である。

一方、これまでにABCA5ノックアウトマウスの表現型として血中の甲状腺ホルモン量が低下することを報告している。甲状腺においてABCA5は、甲状腺の濾胞細胞のapical側に局在する小胞に発現しており、さらに甲状腺刺激ホルモン(TSH)刺激に応じて局在がapical側

から細胞内全体へと移行した。甲状腺ホルモンは前駆体であるサイログロブリンから切り出されるが、これは apical 膜からのエンドサイトーシスの過程を経て、最終的に lysosome と融合した phagolysosome の中で起こると考えられている。ABCA5 は培養細胞に発現させると late endosome から lysosome に局在することをこれまでに明らかにしており、これらの結果は ABCA5 がサイログロブリンのエンドサイトーシス以降の過程に関与している可能性を示唆するものであると考えられる。

さらに、脳において ABCA5 はアドレナリン作動性神経に発現していたが、副腎髄質においてもカテコールアミンの産生・放出に関わるクロム親和性細胞に発現していることが確認できた。そこで ABCA5 ノックアウトマウス血中でのカテコールアミン量を定量したところ、野生型に比べてアドレナリン、ノルアドレナリン共に濃度が上昇していた。カテコールアミンは細胞内小胞に蓄えられてエキソサイトーシスによって放出されるため、ABCA5 が放出にどのように関与しているか調べるには ABCA5 の細胞内局在を明らかにすることが必要である。ラット副腎由来の PC12 細胞において、ABCA5 は GM130 で染色されるシスゴルジ体のごく近傍の細胞内膜系に局在し、これは Rab11 で染色される TGN, リサイクルエンドソームと一致した。最近、細胞内膜系の膜の脂質組成の変化と、小胞輸送を関連付ける研究が次々と報告されている。これらを踏まえて、ABCA5 は内膜系で何らかの脂質を輸送し、小胞輸送の過程に関与しているのではないかと考えている。

本研究は機能が全く未知である輸送体 ABCA5 の局在を詳細に解析し、ノックアウトマウスの解析と合わせて、機能に関する重要な示唆を与えた。今後の ABCA 輸送体研究の基礎的な知見になるものと考えている。

論文審査の結果の要旨

大東穂さんの学位論文「ABC輸送体ABCA5の細胞特異的な発現とその機能」について論文審査を行った。

脂溶性情報伝達物質は、高等生物の情報伝達に於いて重要な役割を担っているが、その分泌輸送体については全くわかっていない。大東さんは、脂溶性情報伝達物質排出輸送体の有力な候補としてABCA5輸送体に着目し、その詳しい解析を行った。

ABCA5は脳、精巣、肺、腎臓、甲状腺などに多く発現している。脳では、主にアドレナリン作動性神経細胞に発現しており、副腎皮質でも、同じくカテコールアミンの産生・放出に係わるクロム親和性細胞に多く発現していた。そこで、ABCA5ノックアウトマウスの血中カテコールアミン量を測定したところ、野生型に比べ、アドレナリン、ノルアドレナリン量がともに有意に上昇していた。細胞内局在性を調べると、ABCA5はトランスゴルジネットワーク、リサイクリングエンドソームに局在していた。このことから、ABCA5はカテコールアミン分泌小胞の細胞内輸送に関与しているのではないかと推定される。甲状腺では、ABCA5は濾胞細胞の濾胞側 (apical) 近傍の小胞に局在しているが、甲状腺刺激ホルモンTSHの投与により、細胞内全体に拡散する様子が観察された。ABCA5ノックアウトマウスでは、甲状腺ホルモンの血中濃度が低下しており、ABCA5は濾胞からの甲状腺ホルモンの分泌過程に関与している事が示唆された。

ABCA5の生化学的機能の特定には至らなかったが、大東さんの研究は、これまで全く機能未知のABCA5およびそのファミリーの機能に迫る基礎的研究として重要な知見を数多く得たものであり、本学薬学研究科博士学位論文としてふさわしい内容を備えていると判定した。