

## 脂質輸送関連遺伝子のヒト病態における役割の解析

●稲垣 暢也 ◆山田 勝也 ◆坂 信広

秋田大学医学部

### 〈研究の目的と進め方〉

ABC蛋白質はアミノ酸配列のよく保存されたATP結合領域を有する巨大な膜蛋白質で、ATPの加水分解によるエネルギーを用いて基質を輸送、あるいは輸送を調節している。ABC蛋白質の特徴は、ヒトのさまざまな疾患と密接に関連していることである。ヒトではこれまでに48種類のABC蛋白質遺伝子が同定され、そのうち18の遺伝子において疾患との関連が明らかにされている。その中には、癌の薬剤耐性、糖尿病、動脈硬化、脳虚血、薬物相互作用など現代人にとって緊急な課題が数多く含まれており、ABC蛋白質の機能、生理的役割、病態における意義を明らかにすることは、膜輸送機構の解明だけでなく、その異常に基づくさまざまなヒト疾患の原因の解明や治療法の開発につながる重要な課題である。

なかでも、最近ABC蛋白質の機能として注目されているのが脂質膜輸送との関連である。現在、脂質膜輸送機構に関する研究はきわめて少なく、不明な点が多い。近年、血中の高密度リポ蛋白 (HDL) が欠損するタンジール病の原因遺伝子としてABCA1遺伝子が、遺伝性黄斑部変性症の原因遺伝子としてABCA4が同定され、ABCA1やABCA4がコレステロールやリン脂質などの膜輸送に関与していることが明らかになった。従って、ABC蛋白質のなかでも特にABCA1と構造が類似する遺伝子群で構成されるABCAサブファミリーが脂質膜輸送の機能を担う可能性が高い。我々は、ABCAサブファミリーに属するABCA2の全長cDNAを世界に先駆けて単離し、ABCA2がミエリンの形成に一致してオリゴデンドロサイト特異的に発現すること、ABCA3がサーファクタント分泌に関わる肺胞II型細胞に特異的に発現することを明らかにした。従って、これらの遺伝子はミエリンやサーファクタントの主構成成分である脂質の膜輸送に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。さらに最近、新規にABCA17を単離している。そこで、本研究では、これらの遺伝子の機能解析を行うと同時に、その欠損 (KO) マウスを作成することによって病態との関連を明らかにし、ヒト疾患における役割を明らかにすることを目的とする。

### 〈研究開始時の研究計画〉

- 1) ABCA2 KOマウスのオリゴデンドロサイトやミエリンの形態学的観察を行うと同時に、神経伝導速度の測定などの電気生理学的解析を行う。
- 2) ABCA3とサーファクタント形成との関連を、胎児期や出生後の経時的な発現変化あるいはグルココルチコイドによる発現調節などの観点から検討する。
- 3) ABCA2とミエリン形成の関わり、あるいはABCA3とサーファクタント形成との関わりを、再構築系によるメタボローム解析を用いて検討する。
- 4) 新規に単離したマウスABCA17の組織発現ならびに細胞内局在を明らかにする。
- 5) ヒトABCA17cDNAを単離する。
- 6) ABCA3とABCA17のターゲティングベクターを作成し、KOマウスを樹立する

### 〈研究期間の成果〉

- 1) ABCA2 KOマウスのオリゴデンドロサイトやミエリンの形態学的観察を行ったが、異常は認められなかった。しかし、その後の研究により、ABCA2 KOマウスの全脳やミエリンにおける脂質組成に異常があることが認められた。
- 2) ラット肺におけるABCA3の発現が胎生末期において急激に増大すること、胎児肺におけるABCA3の発現がグルココルチコイドの投与により促進されることを明らかにした。さらにABCA3遺伝子のプロモーターを単離・解析し、グルココルチコイド反応性配列を同定した。このような発現調節がサーファクタントの合成・分泌とよく一致していることから、ABCA3がサーファクタントの合成・分泌に関与している可能性が強く示唆された。
- 3) 新規に単離したマウスABCA17に対する特異的抗体を作製し、精子や精子細胞に特異的に発現していることを明らかにした。さらに、ABCA17を哺乳動物細胞に過剰発現させると、細胞内のコレステロールエステル、脂肪酸エステル、中性脂肪の合成が有意に減少することから、ABCA17が脂質代謝に関与していることが明らかになった。
- 4) ABCA3遺伝子とABCA17遺伝子のターゲティングベクターを作成し、相同組み替えによりABCA3やABCA17を欠失したES細胞を樹立した。ABCA3に関しては、その後さらにABCA3 KOマウスを樹立し、肺組織のメタボローム解析を行っている。

### 〈国内外での研究の位置づけ〉

- 1) ABCA2 KOマウスは未だに世界で報告されておらず、先駆的である。ABCA2の機能や病態における役割は未だに明らかにされていないため、ABCA2 KOマウスを用いた解析は重要である。
- 2) 我々はABCA3が肺胞II型細胞に特異的に発現することを初めて明らかにし、サーファクタント合成・分泌に関与している可能性を示唆してきた。最近Michael Deanらのグループは先天性サーファクタント欠損患者においてABCA3遺伝子の異常を報告し、我々の仮説が実証された (N. Eng. J. Med. 350: 1296, 2004)。さらに、最近我々は世界に先駆けてABCA3 KOマウスの樹立に成功している。
- 3) マウスならびにラットABCA17を新規に単離し、その発現や機能について初めて報告した。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

- 1) ABCA2がどのような基質の輸送に関与しているか未だに同定できていない。その理由の一つとして、ABCA2 KOのフェノタイプの解析が困難である点があげられる。
- 2) ABCA17のKOマウスが未だに樹立されていない。その理由としてES細胞を用いた相同組み替えに時間を要した点があげられる。

- 3) ヒトではABCA17遺伝子は偽遺伝子であることが明らかとなり、ヒトABCA17cDNAを単離することはできなかった。

#### 〈今後の課題〉

- 1) ABCA2 KOマウスの病態を明らかにする。
- 2) ABCA3 KOマウスの肺組織を用いたメタボローム解析により、ABCA3の輸送基質を同定する。
- 3) ABCA17 KOマウスを作成し、病態を解析する

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Tanaka, Y., Yamada, K., Zhou, C.-J., Ban, N., Shioda, S., and Inagaki, N. (2003) Temporal and spatial profiles of ABCA2-expressing oligodendrocytes in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* 455: 353-367.
2. Yoshida, I., Ban, N., and Inagaki, N. (2004) Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoid in lung alveolar type II cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323: 547-555.
3. Nagata, K., Yamamoto, A., Ban, N., Tanaka, A. R., Matsuo, M., Kioka, N., Inagaki, N., and Ueda, K. (2004) Human ABCA3, a product of a responsible gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324: 262-268.
4. Wulf, G. G., Modlich, S., Inagaki, N., Reinhardt, D., Schroers, R., Griesinger, F., and Trümper, L. (2004) ABC transporter ABCA3 is expressed in acute myeloid leukemia blast cells and participates in vesicular transport. *Haematologica* 89: 1395-1397.
5. Wang, Y., Yamada, K., Tanaka, Y., Ishikawa, K., and Inagaki, N. (2005) Expression of ABCA2 protein in human vestibular schwannoma and peripheral nerve. *J. Neurol. Sci.*, 232: 59-63.
6. Ban, N., Sasaki, M., Sakai, H., Ueda, K., and Inagaki, N. (2005) Cloning of ABCA17, a novel, rodent sperm-specific ATP-binding cassette (ABC) transporter that regulates intracellular lipid metabolism. *Biochem. J.* 389: 577-585.
7. Inagaki, N., Yamada, K., Zhao, L.-X., Yamano, G., Tanaka, Y., Funahashi, H., Zhou, C.-J., Shioda, S., Ban, N. (2004) Cloning, tissue distribution and function of ABCA transporters. *Proceeding of XIIIth International Symposium on Atherosclerosis, International Congress Series, Elsevier*, 1262: 578-581.