

ビタミン E 特異的輸送タンパク質 α -TTP による 体内ビタミン E レベルの制御

河野 望, 新井 洋由

ビタミン E は生体にとって最も重要な脂溶性抗酸化物質であり、その欠乏により、不妊、神経筋障害、溶血性貧血などの症状が現れる。天然には 8 種類のビタミン E 同族体が存在しているが、そのうちの α -トコフェロール (α -Toc) のみが選択的に我々の体内に蓄積し機能している。一方、どんなにビタミン E を摂取しても体内のビタミン E レベルが上昇しない先天性ビタミン E 欠乏症という病気が知られていたが、その原因は不明であった。我々は、 α -Toc と特異的に結合し、その膜間輸送を促進する細胞質タンパク質 α -TTP (α -tocopherol transfer protein) を世界で初めて同定し、 α -TTP によりビタミン E 同族体の識別がなされていること、 α -TTP が先天性ビタミン E 欠乏症の原因であることを明らかにした。また最近、 α -TTP による細胞内 α -Toc 輸送においてホスファチジルイノシトールリン酸 (PIPs) のユニークな役割も見いだした。本稿では、 α -TTP の生理機能を概説するとともに、 α -TTP による細胞内ビタミン E 輸送機構について最新の知見を紹介する。

1. はじめに

活性酸素やフリーラジカルにより生じる損傷や障害に対して、生体は非常に複雑かつ巧妙な一連の防御システムを備えている。この中で、ビタミン E は最も重要な脂溶性の抗酸化物質である。生体膜、特にリン脂質の高度不飽和脂肪酸はラジカルの攻撃を受けやすい。いったん脂肪酸ラジカルが形成されると連鎖的に過酸化反応が進行し膜障害を引き起こす。これに対してビタミン E は脂肪酸ラジカルからラジカルを引き抜き、連鎖反応を断ち切るいわゆる「ラジカル捕捉型抗酸化剤」として機能している。

ビタミン E はもともと、合成飼料をネズミに与えたときにみられる不妊症を改善する因子として同定された。ビタミン E は別名トコフェロール (tocopherol) と呼ばれるが、これはギリシャ語で「仔を産む」という *tocos* と「力を与える」という *phero* という言葉に由来する。このビタミンが欠乏すると、不妊症以外に神経筋障害、網膜変性、

溶血性貧血など多くの障害を引き起こされる。

ビタミン E の吸収および体内動態に関して以前から興味深い現象が知られていた。一つには、天然には α , β , γ , δ -トコフェロール (α , β , γ , δ -Toc) とそれに対応するトコトリエノールの 8 種類のビタミン E 同族体が存在しているが (図 1)、我々の体はその中で α -Toc のみを選択的に蓄積しており、その選別は肝臓でなされるという事実である。もう一つは、ビタミン E をどんなに摂取しても生体内に蓄積しない「先天性ビタミン E 欠乏症」という遺伝性の疾患が存在するという事実である。しかしながらこのような現象を説明する分子機構はまったく不明であった。

このような状況において、我々は、ラット肝臓の細胞質から、 α -Toc と結合しその膜間輸送を促進するタンパク質 α -TTP (α -tocopherol transfer protein) の精製・クローニングに世界で初めて成功した。 α -TTP はビタミン E 同族体の中でも α -Toc に選択的に結合し、しかも同族体の識別が行われていると考えられていた肝臓に主に発現していた。さらに、 α -TTP 遺伝子が先天性ビタミン E 欠乏症と同じ遺伝子座に存在することがわかり、最終的に α -TTP が先天性ビタミン E 欠乏症の原因遺伝子産物であることを明らかにした。

α -TTP は主に肝細胞内のオルガネラ間で α -Toc を輸送するタンパク質である。近年、細胞内脂質輸送タンパク質は多数報告されている。細胞内において脂質輸送タンパク質が正常に機能するためには、特定のオルガネラに正しく輸

東京大学大学院薬学系研究科衛生化学 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Regulation of the vitamin E level in the body by α -TTP, α -tocopherol-specific transfer protein

Nozomu Kono and Hiroyuki Arai (Department of Health Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan)

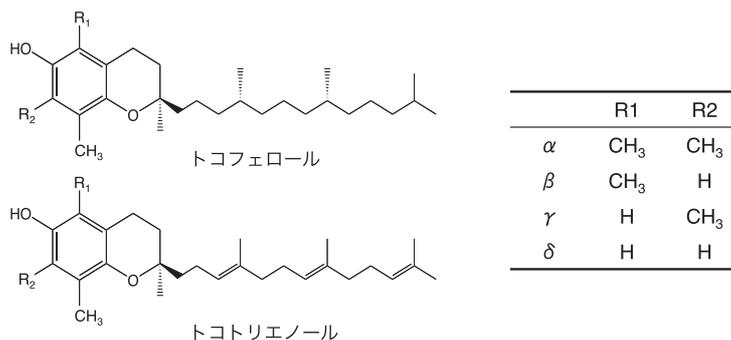


図1 ビタミンEの構造

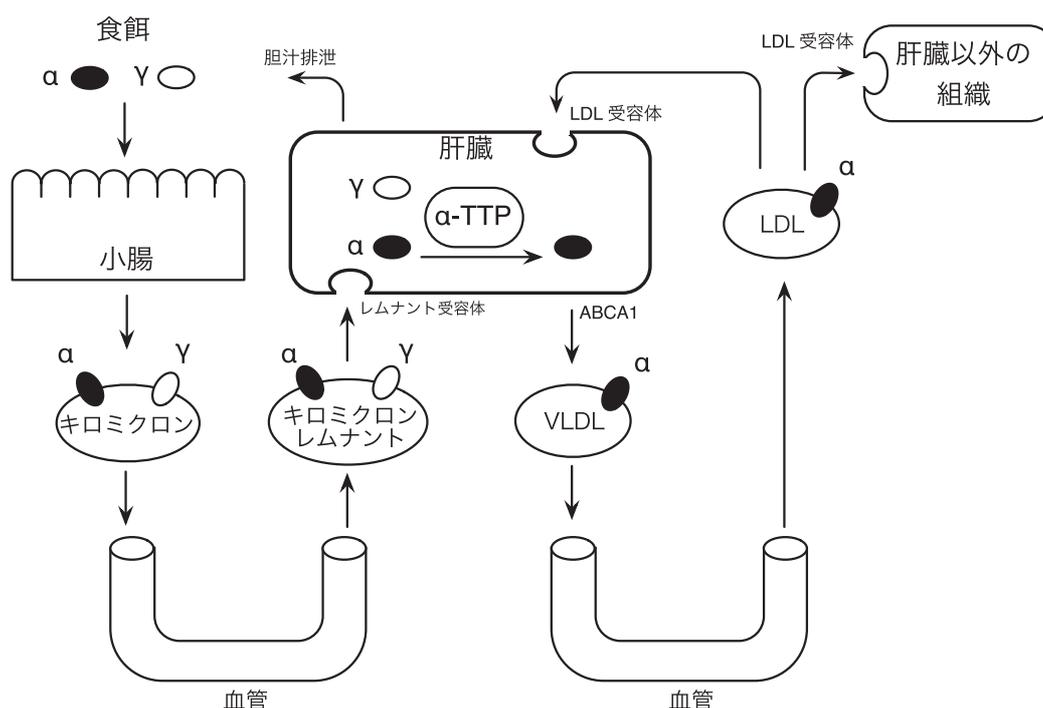


図2 ビタミンEの体内動態

詳細は本文を参照. α : α -トコフェロール, γ : γ -トコフェロール.

送り、標的膜に積み荷の脂質を受け渡さなければならない。ホスファチジルイノシトールリン酸 (PIPs) はさまざまなオルガネラ膜の標識として機能しており、いくつかの脂質輸送タンパク質についてもオルガネラターゲティングに PIPs 認識が利用されている。しかし、標的膜に着いた後の脂質の受け渡しは単なる拡散のメカニズムによっていと考えられていた。最近我々は、 α -TTP による細胞内ビタミンE輸送メカニズムを詳細に解明する過程で、既知のドメインとは異なる PIPs 認識ドメインを α -TTP 上に見いだすと同時に、PIPs がターゲティングの標識として機能するだけでなく、その後の脂質の受け渡しにも重要な役割を担っていることを、結晶構造解析等の手法により証明し、PIPs のユニークな機能を見いだした。

本稿では、 α -TTP の生理機能について概説するとともに、 α -TTP による細胞内ビタミンE輸送機構について最新の知見を交えて紹介したい。

2. ビタミンEの体内動態

我々の体はビタミンEを合成することができず、すべて食餌由来のビタミンEに依存している。動物とは異なり植物はビタミンEを合成できるが、その過程でさまざまなビタミンE同族体が合成される(図1)。一般に植物油などの中には α -Tocよりも γ -Tocの方が多く含まれている¹⁾。しかしこうした植物を我々が摂取しても、生体内には α -Tocが選択的に蓄積する¹⁾。すなわち、生体内にはToc同族体を識別して α -Tocを選択的に保持する機構がある。

ビタミンEの体内動態を図2に示す。食餌として摂取されたビタミンE(主に γ -Tocと α -Toc)は、脂溶性物質であるために胆汁酸によってミセル化された後に小腸で効率よく吸収される。吸収されたビタミンEの体内輸送には特別な結合タンパク質は存在せず、リポタンパク質に結

合した形で体内循環する。これにはリポタンパク質中の脂質の酸化を防ぐ意味もある。吸収されたビタミンEは、まず小腸で合成されるキロミクロンに結合した状態で分泌され、リンパ管に現れる。米国のKaydenおよびカナダのIngoldらは、小腸で吸収されたビタミンE同族体およびキロミクロン上のビタミンE同族体は、摂取したときの組成とほぼ同じ程度であることを報告している^{2,3)}。すなわち、小腸における吸収およびキロミクロンを介しての分泌過程では、ビタミンE同族体の識別はなされていないことになる。キロミクロンは血液中を循環した後、キロミクロンレムナントとなって肝臓に取り込まれるが、それに伴いビタミンEも肝臓に入る。肝臓に取り込まれたビタミンEは、肝臓で合成される超低密度リポタンパク質(VLDL)に組み込まれて再び血液中に放出される。このとき、興味深いことに、肝臓に取り込まれたビタミンEのうち α -TocのみがVLDLに結合しており、ほかの同族体はほとんどVLDLに存在しない²⁾。分泌されたVLDLは血液中を循環しながら代謝されて低密度リポタンパク質(LDL)となっていくが、これらのリポタンパク質を介して α -Tocが各組織に供給される。こうして生体内には α -Tocが選択的に蓄積していく⁴⁾。このように、生体内におけるビタミンEの選別は、小腸からの吸収段階ではなく肝臓からの分泌段階でなされる。

肝臓に取り込まれたビタミンEのうち、 α -TTPに認識されなかったビタミンE同族体はどのように肝臓から消失してしまうのだろうか。以前はこれらが胆汁中に放出されてしまうと考えられていたが、最近では肝臓のシトクロムP450によって代謝されることが示されている。マウスの場合主にcyp4f14によって、ヒトの場合主にCYP4F2によって代謝され、これらのシトクロムP450を阻害すると血中ビタミンEレベルが上昇することも報告されている⁵⁾。

3. α -Toc 輸送タンパク質 α -TTP

上述のように、肝臓には α -Tocを特異的に選別する機構が存在すると予想された。 α -Tocは非常に疎水性の高い物質であり、単なる自由拡散では容易にオルガネラ間を移動できない。1970年代後半から1980年代前半にかけて、我々の研究室を含む複数のグループにより、 α -Tocに選択的な膜間輸送促進活性がラット肝臓の可溶性画分に存在することが見いだされていた⁶⁻¹¹⁾。その活性の実体は、その後10年以上にわたり不明のままであったが、我々は1991年にこの活性を担うタンパク質を完全精製し α -TTP(α -tocopherol transfer protein)と名づけた¹²⁾。さらに1993年に α -TTP遺伝子のcDNAクローニングに成功した^{12,13)}。 α -TTPは278アミノ酸からなる可溶性のタンパク質であり、主に肝臓の実質細胞に発現している。 α -TTPは、Sec14ドメインと呼ばれる、酵母の脂質結合タンパク質Sec14にみられる脂質結合ドメインを有しており、Sec14タンパク質

表1 ビタミンE類縁体の α -TTPに対する親和性

化合物	相対的親和性 (%)
α -トコフェロール	100
β -トコフェロール	38.1 \pm 9.3
γ -トコフェロール	8.9 \pm 0.6
δ -トコフェロール	1.6 \pm 0.3
α -トコフェロール酢酸	1.7 \pm 0.1
SRR- α -トコフェロール	10.5 \pm 0.4
α -トコトリエノール	12.4 \pm 2.3

スーパーファミリーに属する。このファミリーに属するタンパク質の中には、Sec14ドメイン以外の機能ドメインを持つ分子も多く存在するが、 α -TTPはSec14ドメインのみを有する¹⁴⁾。

α -TTPのToc類縁体に対する相対的な結合親和性を表1に示した¹⁵⁾。この結果をみると、 α -TTPは、Toc構造の中でクロマン環に結合する三つのメチル基をすべて認識するが、特に5位のメチル基(図1のR1)が重要であることがわかる。また、クロマン環の水酸基も結合には非常に重要である。一方、フィチル側鎖の構造および配位も α -TTPは認識している。以上のように α -TTPはToc類縁体の中でも、生体内に蓄積される天然型 α -Toc(RRR- α -Toc)に対して最も結合親和性が高い。このような α -TTPによる天然型 α -Tocの特異的認識は、 α -TTP- α -Toc複合体のX線結晶構造解析からも原子レベルで明らかとなっている^{16,17)}。

4. α -TTPと先天性ビタミンE欠乏症

ビタミンEは健常人が普通に生活している上ではほとんど欠乏状態に陥ることはない。しかし、何らかの遺伝的要因が加わると家族性のビタミンE欠乏症が生じる。上述のように、ビタミンEは脂溶性物質なので胆汁酸とミセルを形成することにより効率よく吸収され、また血中ではリポタンパク質を介して輸送される。したがって、肝障害、胆管閉塞、膵機能低下などから二次的に起こる胆汁酸分泌障害による脂肪吸収の低下、およびリポタンパク質成分であるアポBの合成不全による β リポタンパク質欠損症などにおいてビタミンE欠乏症を呈することが知られている。しかし、これらの疾患はいずれもビタミンEのみならずほかの脂質や脂溶性ビタミンの欠乏も伴う¹⁸⁾。一方、胆汁酸分泌やリポタンパク質合成は正常であるにも関わらず、ビタミンEが単独に欠乏する遺伝性の疾患が知られており、先天性単独ビタミンE欠乏症[familial isolated vitamin E deficiency (FIVE)、またはataxia with isolated vitamin E deficiency (AVED)]と呼ばれている^{18,19)}。先天性単独ビタミンE欠乏症の基本的な症状は運動失調と深部感覚障害で、四肢腱反射は消失し症状は特に下肢に強い。主たる病理所見は後索変性と神経細胞(特に後根神経節細胞、脊髄前角細胞)へのceroid-lipofuscin沈着である。また軽度であるが小脳Purkinje細胞の脱落が認められ

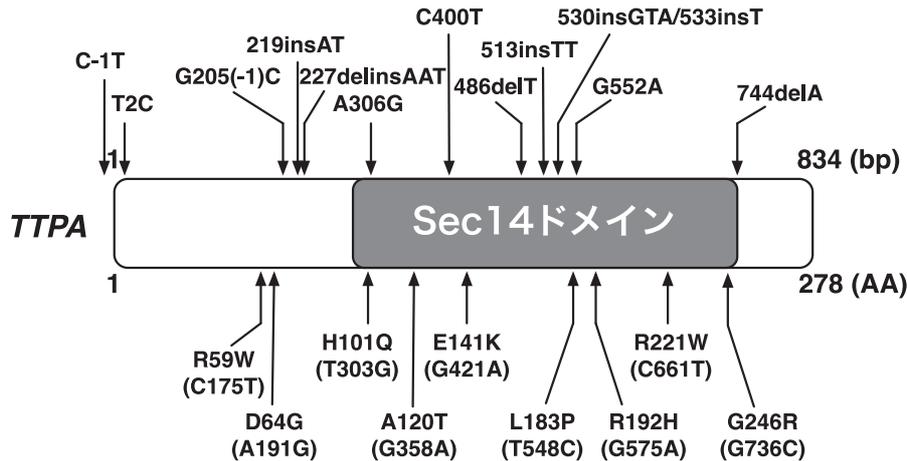


図3 先天性ビタミンE欠乏症にみられる α -TTP遺伝子変異
上段にはフレームシフト変異を、下段にはミスセンス変異を示す。Sec14ドメインは脂質結合ドメインの一つであり、 α -TTPのビタミンE結合部位である。

る^{20,21)}。

1993年にフランスのKoenigらのグループによりチュニジアに存在するビタミンE欠乏症の家系で連鎖解析が進められ、原因遺伝子が第8染色体長腕に位置することが明らかとなった²²⁾。同時期に我々はヒト α -TTP遺伝子が同じく第8染色体長腕に存在することを明らかにした²³⁾。そこでヒト α -TTP遺伝子情報を持っている我々と、ビタミンE欠乏症の家系の情報を持っているフランス、チュニジアのグループとの共同研究が開始され、地中海沿岸のビタミンE欠乏症の家系において α -TTP遺伝子にフレームシフト変異が発見された²⁴⁾。すなわち、それまで未解明であった、先天性単独ビタミンE欠乏症の原因が α -TTP遺伝子の変異であることが初めて明らかになった。一方、東京医科歯科大学の横田らは、網膜変性を来す日本人患者の中で、血中ビタミンEレベルが低下していることを初めて明らかにした²⁵⁾。この患者はチュニジアの患者ほどビタミンEレベルは低下しておらず、また症状もチュニジアの患者より軽度であった。その後、この患者の遺伝子を供与していただき解析した結果、日本のビタミンE欠乏症の家系から α -TTP遺伝子のミスセンス変異(H101Q)を世界で初めて明らかにした²⁶⁾。

我々の報告を含めて現在までに20種類以上の変異が報告されている(図3)¹⁹⁾。最初の報告で見いだされた変異(744delA, 530AG→GTAAGT, 513insTT)はいずれもフレームシフト変異のホモ接合体である。これらの症例の発症は20歳以下で、30歳までに自力歩行不能となるなど症状は重く、血清ビタミンEの濃度は著しく低い(<1.0 mg/L)²¹⁾。一方、日本で見いだされたミスセンス変異(H101Q)の症例の発症は30~50歳台と遅く、症状や血清ビタミンEの濃度低下も比較的軽度である(>1.0 mg/L)²⁵⁾。患者剖検肝にはミスセンス変異 α -TTPが発現しており、またミスセンス変異リコンビナント α TTPには*in vitro*での α -Toc輸送能は10%ほど残存している。これらの結果から α -TTPの機能と症状との相関が示唆される。

安定同位体標識 α -Tocを用いた解析から、先天性単独ビタミンE欠乏症では α -Tocを選択的に体内に蓄積する機構が欠損していることが明らかになっている。すなわち、先天性単独ビタミンE欠乏症では小腸からの吸収段階は正常であるが、肝臓から α -Tocが選択的に分泌される段階に異常を来し、その結果通常は選択的に体内に蓄積されるはずの α -Tocが、ほかのビタミンE同族体と同様に速やかに消失してしまう^{27,28)}。以上のことから、 α -TTPの機能はいったん肝臓に取り込まれたビタミンE同族体のうち α -Tocだけを選択し、これを再び血中に放出することであると考えられた。

α -TTPの機能が障害されると、なぜ血中ビタミンEレベルが低下するのであろうか。ヒトでは血中を循環するLDLのうち3/4は肝臓に取り込まれており、血中リポタンパク質は肝臓を中枢とする循環系をなしている。ビタミンEは血中ではリポタンパク質に結合しているため、ビタミンEが持続的に血中を循環するには、肝臓内において α -TTPにより血中へ再放出(リサイクリング)される過程が鍵段階となる。すなわち、 α -TTPは体内を循環するビタミンEレベルの決定因子であるといえる。

5. α -TTP欠損と不妊

我々は、先天性単独ビタミンE欠乏症のモデル動物となる α -TTPノックアウトマウスを作製した。このマウスではヒトの疾患と同様に血中ビタミンEレベルが非常に低下し、運動失調ならびに網膜変性がみられた²⁹⁾。またこのような神経障害に加え、このノックアウトマウスはメスが不妊であることが判明した³⁰⁾。もともと、ビタミンEはマウスの妊娠に必要なビタミンとして発見されたものであるが、ノックアウトマウスを使うことで、その詳細なメカニズムが明らかとなった。メスの α -TTPノックアウトマウスでは、妊娠9日目まで胎仔は生育するが、10日を越えると急に成長が止まり、いわゆる胎仔吸収という現象が

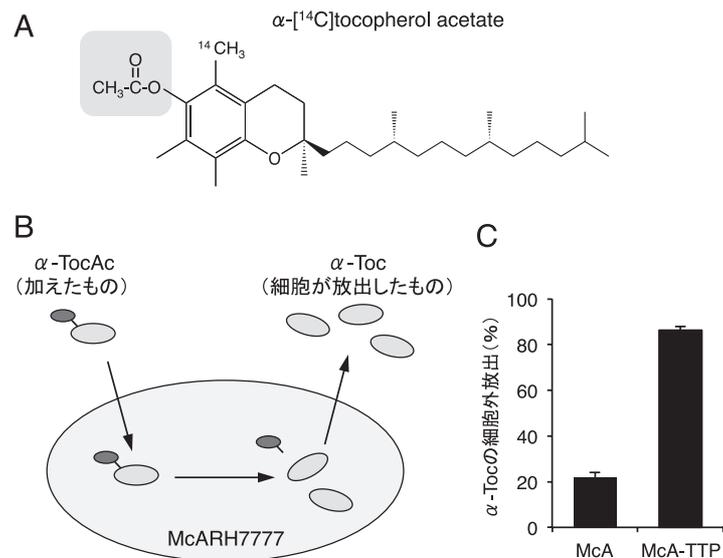


図4 α -Toc 放出アッセイ

(A) α -[^{14}C]tocopherol acetate の構造. (B) α -Toc 放出アッセイの原理.
(C) α -TTP による細胞外への α -Toc 放出の促進. McA: McARH7777 細胞, McA-TTP: α -TTP 安定発現 McARH7777 細胞.

現れる. 妊娠9日ごろはマウスにおいて胎盤が発達する時期であり, 実際ノックアウトマウスの胎盤構造の中で Labyrinthine layer と呼ばれる層構造がほとんど形成されていない. この層は, 母体の血管と胎仔側の血管がまさに「迷路 (Labyrinth)」のように張り巡らされているところであり, この層において母体から胎仔に栄養が供給される. したがって, α -TTP ノックアウトマウスでは, 胎盤の Labyrinthine layer が形成されず, 胎仔に栄養が届かないため胎仔吸収が起こることが示唆されるとともに, ビタミン E は胎盤, 特に Labyrinthine layer の形成に必須の因子であることが示された.

α -TTP は主に肝臓に存在するが, 妊娠期においては着床から胎盤形成に至る部位の周囲の子宮組織にも一過的に α -TTP が発現する. 発現は妊娠5日目をピークにその後減少する. 妊娠していないマウスには発現はみられない. この結果から, ビタミン E 輸送活性を持つ α -TTP が胎盤形成周辺の子宮に一過的に発現し, ビタミン E を効率よく輸送することで, その後の胎盤形成を保障するという機構が考えられる. いい換えれば, 胎盤, 特に Labyrinthine layer の形成にはビタミン E が必須であるといえる. しかしなぜ必須なのか, その機構はまだ不明である.

6. α -TTP による細胞内ビタミン E 輸送機構

1) 肝細胞における α -TTP 機能の培養細胞モデルの確立

上記のような先天性ビタミン E 欠乏症の解析から, α -TTP は肝細胞内に取り込まれた α -Toc を積極的に細胞外へ放出する機能を持つことが予想された. 我々はこのことを実証し, さらに放出機構を明らかにする目的で, 培養細胞において α -TTP の機能を評価できる実験系を構築した (α -Toc 放出アッセイ). 肝細胞はリポタンパク質に結合し

た α -Toc を細胞内に取り込み, 取り込まれた α -Toc を再び細胞外へ放出しているが, このことを培養細胞で再現しようとすると, 取り込ませるために培地に加えた α -Toc と細胞が放出した α -Toc を培地中で区別できないという問題が生じる. 我々は, ^{14}C 標識した α -Toc の酢酸エステル体 (α -TocAc: α -tocopherol acetate) を用いることにより, この点を解決した (図4). α -TocAc をラット肝がん細胞株である McARH7777 細胞の培養系に添加すると, α -TocAc は細胞内でのみ加水分解されて α -Toc 変換される. したがって, もし α -Toc が細胞外で検出されるならば, その α -Toc は細胞内から放出されたものであり, これにより細胞内からの α -Toc の放出を評価できる (図4B). McARH7777 細胞は α -TTP をほとんど発現しておらず, McARH7777 細胞に α -TocAc を添加すると, 生成した α -Toc の7~8割は細胞内にとどまっていた. 一方, α -TTP を安定発現した McARH7777 細胞では α -TocAc から生成した α -Toc の8割以上が培地中に放出された (図4C). 以上の結果から α -TTP は細胞内の α -Toc を積極的に細胞外へ放出する機能を持つことが示された³¹⁾.

α -Toc は肝臓から VLDL に組み込まれて血中に放出されることから, 当初 α -Toc は α -TTP を介して細胞内で VLDL に取り込まれ, VLDL とともに細胞外へ放出されていると考えられていた. 我々がこのことを α -Toc 放出アッセイを用いて検証したところ, ほかの VLDL 構成脂質とは異なり, α -Toc の放出は VLDL の分泌と共役していないことが明らかとなった³¹⁾. 一方, 肝培養細胞からの α -Toc の放出には ATP-binding Cassette A1 (ABCA1) が関与することがわかった^{32,33)}. また蛍光標識された α -Toc を細胞に取り込ませると, いったんエンドソームに局在した後, 形質膜近傍に移行することが報告されている³⁴⁾. 以上のことから, α -TTP は細胞内の α -Toc を形質膜に輸送することで

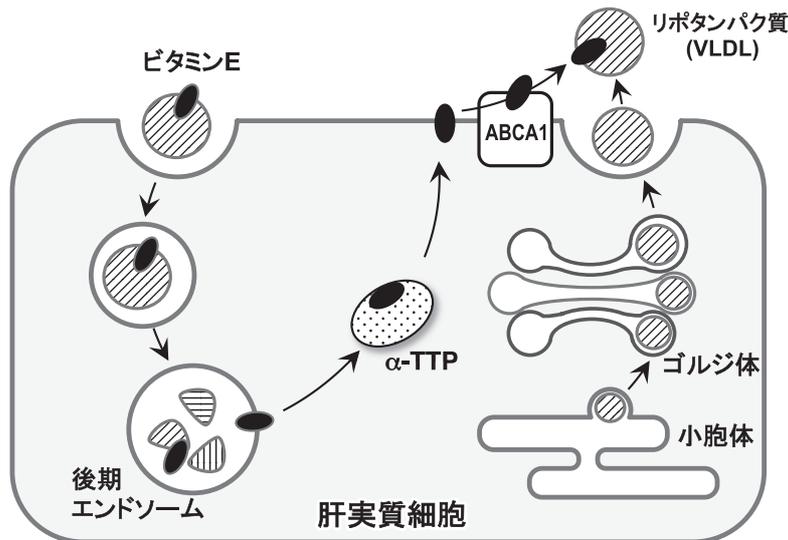


図5 α -TTPによる肝細胞内ビタミンE輸送

肝実質細胞によりエンドサイトーシスされたビタミンEを含むリポタンパク質は、後期エンドソームにて分解される。後期エンドソームにおいて遊離したビタミンEは α -TTPにより形質膜へと輸送される。形質膜においてビタミンEはABCA1により細胞外へ放出され、肝臓から分泌されたVLDLに取り込まれる。

細胞外への放出を促進していると考えられる (図5)。

2) α -TTPとホスファチジルイノシトールリン酸の相互作用とその意義

α -Tocが分泌される場である形質膜は、肝細胞のオルガネラ膜全体の約2%にすぎない。一方、オルガネラ膜全体の約50%を占める小胞体膜では、上述したようにビタミンEがシトクロムP450により分解されることがわかっている^{35,36)}。したがって、もし α -TTPによる α -Tocの輸送が単純拡散の促進機能であるとするれば、多くを小胞体膜に輸送してしまうことになり、積極的に細胞外に放出することはできないと思われる。すなわち、 α -TTPによる α -Tocの輸送は、おそらく α -Tocを受け取る場所と受け渡す場所がきちんと決まった方向性のある(ベクトリアル)輸送であると考えられる。

このような脂質輸送タンパク質によるベクトリアル輸送は、セラミド輸送タンパク質であるCERT (ceramide-transfer protein)においてよく解析がなされている³⁷⁾。CERTは中性脂質であるセラミドを小胞体からゴルジ体へと輸送することで、膜リン脂質の一つであるスフィンゴミエリンの合成に寄与している。CERTは68 kDの細胞質タンパク質であり、C末端側にセラミドの膜間輸送活性を持つSTART [steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer] ドメインを有する。またN末端側にはホスファチジルイノシトール4-モノリン酸 (PI4P) を認識し、ゴルジ体膜への標的を担うPH (pleckstrin homology) ドメイン、PHドメインとSTARTドメインの間には小胞体膜タンパク質VAP [vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein] との相互作用に関わるFFAT

モチーフが存在している。これら三つのドメイン/モチーフが逐次的に機能することにより、小胞体からゴルジ体へのセラミドのベクトリアル輸送を可能にしている。一方、脂質結合ドメイン以外の既知のドメインを持たない脂質輸送タンパク質も数多く存在しており^{14,38)}、これらのタンパク質がどのように脂質のベクトリアル輸送を行っているかはほとんど明らかとなっていない。

α -TTPも同様に脂質結合ドメイン以外の既知のドメインを持たない脂質輸送タンパク質である。 α -TTPによる α -Tocの細胞内ベクトリアル輸送機構を解明するため、我々は先天性ビタミンE欠乏症患者でみられる α -TTPのミスセンス変異に着目した。興味深いことに、先天性ビタミンE欠乏症患者で報告されている九つのミスセンス変異のうち、三つはアルギニン残基の変異であり(R59W, R192H, R221W)、これらの残基はビタミンE結合部位とは異なる α -TTPの表面上で互いに近接している。R59WやR221Wの変異は重篤な臨床症状をもたらすことから²¹⁾、 α -TTPの機能にこれらのアルギニン残基が重要であることが考えられるが、その分子機構は明らかとならなかった。

我々はまずアルギニン変異の一つであるR59W変異 α -TTPの機能を調べた。意外なことに、R59W変異 α -TTPは野生型と同等の α -Toc結合能を有していたが、肝培養細胞にR59W変異 α -TTPを発現させると、野生型とは異なり細胞外への α -Toc放出効果はまったくみられなかった。このことから、R59W変異 α -TTPは α -Toc結合能以外の α -TTPの機能異常により、細胞内ビタミンE輸送が障害されていると考えられた。

ではR59W変異 α -TTPで失われている α -TTPの機能は何であろうか。ホスファチジルイノシトール3,4-ビスリ

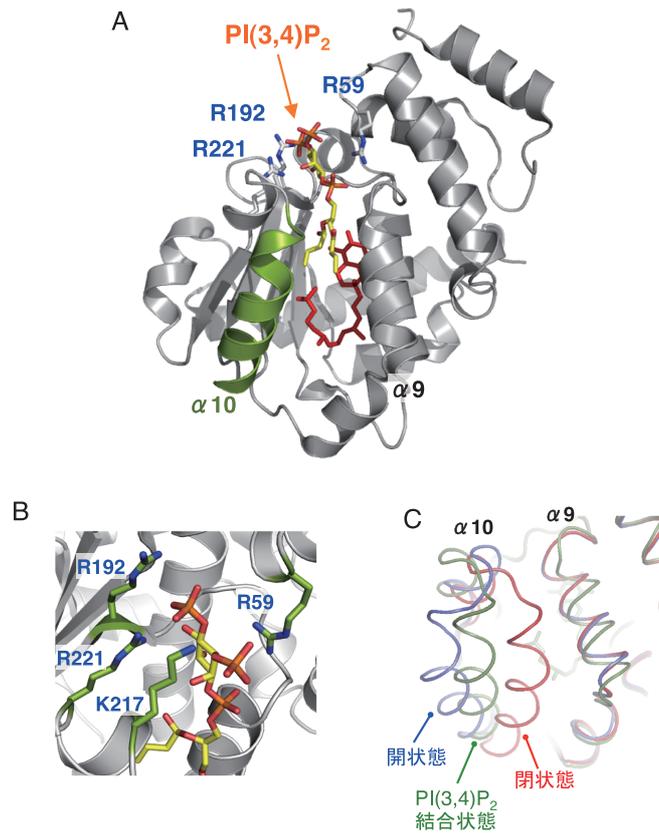


図6 α -TTP-PI(3,4) P_2 複合体の構造

(A) 全体図. (B) R59, R192, K217, R221 の側鎖と PI(3,4) P_2 の極性頭部との相互作用. (C) 閉状態 (PDB ID: 1OIP), PI(3,4) P_2 との結合状態 (PDB ID: 3W67), 開状態 (PDB ID: 1OIZ) における $\alpha 10$ ヘリックスの構造の違い.

ン酸 [PI(3,4) P_2] を固定化したビーズに結合するタンパク質を探索した研究から, α -TTP が PI(3,4) P_2 に結合する候補分子の一つであることが報告されていた³⁹⁾. PI(3,4) P_2 はホスファチジルイノシトールリン酸 (PIPs) の一種である. PIPs は膜リン脂質であるホスファチジルイノシトールのイノシトール環がリン酸化されることで生成し, 生体内にはリン酸化のパターンの違いにより 7 種類の PIPs が存在する. それぞれの PIPs は特徴的な細胞内局在を示し, オルガネラのランドマークとして機能することが知られている^{40,41)}. そこで我々は α -TTP と PIPs の相互作用に着目した. まず α -TTP と PIPs の相互作用を生化学的に調べたところ, 野生型 α -TTP は PI(3,4) P_2 , PI(4,5) P_2 と強く相互作用した. 一方, R59W 変異 α -TTP ではこれら二つの PIPs との相互作用が失われていることを明らかとなった.

α -TTP には既知の PIPs 結合ドメインが存在しない. そこで α -TTP と PIP $_2$ (本稿では PI(3,4) P_2 と PI(4,5) P_2 を示す) の結合様式を明らかにするために, α -TTP-PIP $_2$ 複合体の X 線結晶構造解析を試みた. その結果, α -Toc と PIP $_2$ が両方結合した α -TTP の結晶を得ることに成功し, 分解能 2.0 Å [PI(4,5) P_2], 2.6 Å [PI(3,4) P_2] で構造を決定した. すでに報告されている α -TTP と α -Toc との複合体の結晶構造と同様に^{16,17)}, α -Toc は α -TTP の疎水性ポケットに結合していた. 一方, PIP $_2$ は α -Toc とは異なる部位に結

合しており, その極性頭部は先天性ビタミン E 欠乏症患者においてミスセンス変異のみられる R59, R192, R221 を含む塩基性残基のクラスター領域に結合していた (図 6 A). R59, R192, R221 の側鎖は PIP $_2$ のリン酸基と相互作用しており, これらの残基が α -TTP と PIP $_2$ との結合に重要であることが構造的にも確かめられた (図 6B). 217 番目のリシン残基 (K217) は R59, R192, R221 と同様に PIP $_2$ のリン酸基との相互作用がみられたが, 先天性ビタミン E 欠乏症においてこのリシン残基の変異に関する報告はない. そこで, K217 をアラニンに変異させたところ, この K217A 変異 α -TTP は R59W 変異 α -TTP と同様に, PIP $_2$ との結合能, および細胞外への α -Toc 放出能が失われていた.

これまでに, α -TTP と α -Toc との複合体および α -TTP と Triton X-100 との複合体の構造が明らかになっており, それぞれの構造は α -Toc 結合ポケットの開状態および閉状態を表していると考えられている^{16,17)}. この二つの構造では, lid (ふた) と呼ばれる $\alpha 10$ ヘリックスのコンホメーションが大きく異なっており, それにより閉状態および開状態が規定されている. 興味深いことに, α -TTP と PIP $_2$ との複合体において, PIP $_2$ の脂肪酸鎖はおそらく $\alpha 9$ ヘリックスと lid との間の疎水性の溝に結合しており, lid は閉状態と開状態との中間のコンホメーションをとっている

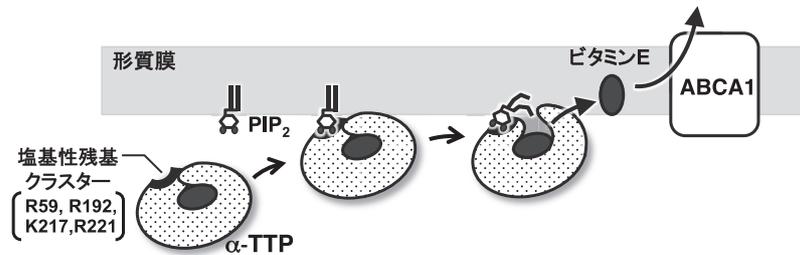


図7 形質膜への α -Toc輸送における PIP_2 の作用モデル
 ビタミンEが結合した α -TTPは、塩基性残基のクラスター領域を介して、形質膜上の PIP_2 [$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ もしくは $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$]を認識し、形質膜へとターゲティングする。さらに PIP_2 の脂肪酸鎖が α -TTPと相互作用すると、ビタミンE結合ポケットが開き、ビタミンEが形質膜へと移行する。

ことがわかった(図6C)。すなわち、 PIP_2 が α -TTPに結合すると、 α -TTPを開状態へと導き、 α -Tocの放出が促進されることが示唆された。

構造解析から得られた仮説を検証するため、 α -TTPによる α -Tocの輸送における PIP_2 の役割を調べた。*in vitro*での α -TTPによる α -Tocの膜間輸送は、受容側のリポソームに PIP_2 を加えることにより顕著に促進された。この効果は、R59W変異 α -TTPあるいはK217A変異 α -TTPを用いたときにはみられなかった。また $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ は α -TTPに対して α -Tocと競合的に結合し、 α -TTPは α -Tocと $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ を交換する活性を持つことがわかった。さらに、 α -TTPによる培養肝細胞からの α -Tocの放出は、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ に強い結合活性を持つネオマイシンの存在下において顕著に阻害された。これらの結果から、受容側の膜に存在する PIP_2 は α -TTPによる α -Tocの輸送を促進することが明らかになった。

$\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ や $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$ は主に形質膜の細胞質側に存在する⁴¹⁾。特に $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ は定常的に存在する主要なPIPsであり、さまざまなタンパク質の形質膜局在を制御している⁴⁰⁾。したがって、 α -TTPがこれらの PIP_2 の極性頭部を認識することにより形質膜へと移行し、さらに PIP_2 の脂肪酸鎖と結合することにより結合ポケットが開き、 α -Tocの形質膜への放出が促進されることが示唆された(図7)。

このように、 PIP_2 は従来のオルガネラのランドマークとしての機能に加えて、その脂肪酸鎖により脂質輸送タンパク質のリガンド脂質を標的膜に追い出す、というもう一つの機能を持つことを我々は提唱している⁴²⁾。最近、 α -TTPとまったく構造が異なる酵母のステロール輸送タンパク質Osh4pにおいても α -TTPの場合と類似したPIPsの役割が報告されている。すなわち、Osh4pは小胞体膜からステロールを引き抜き、ゴルジ体膜上の PI4P と交換することでステロールをゴルジ体膜へと輸送する⁴³⁾。このようなPIPsの二重の機能は、細胞内脂質輸送における共通のメカニズムなのかもしれない。

7. おわりに

α -TTPの同定・解析を通じて、生体内の α -Toc認識機

構、先天性ビタミンE欠乏症の原因が明らかとなり、さらに細胞内脂質輸送機構の一端を解明することができた。 α -TTPはLDLとともに肝細胞内にエンドサイトーシスされた α -Tocを後期エンドソームより受け取り、形質膜へと輸送していると考えられている(図5)。形質膜へのターゲティングは PIP_2 との相互作用によりなされることがわかったが、 α -TTPがいかに後期エンドソーム膜に移行し、 α -Tocを受け取るかは未解決の課題として残されている。

哺乳動物には α -TTPを含めて約30のSec14ファミリータンパク質が存在するが、そのほとんどは脂質リガンド、生理機能が明らかとなっていない。そのような中 α -TTPの研究がここまで進展したのは、解析が難しい細胞内オルガネラ間の脂質輸送を「細胞外への α -Tocの放出」という形で捉えられたことと、 α -TTPの遺伝病が存在したことによるところが大きい。最近、質量分析計の高感度化により、脂質結合タンパク質の内因性の脂質リガンドを同定する技術が発展しつつある。またゲノム編集技術の進歩により、より簡便に遺伝子欠損動物を作製できる時代となった。近い将来、ほかのSec14ファミリータンパク質の脂質リガンドや生理機能が明らかとなり、細胞内脂質輸送および脂質認識の研究がさらに発展することを期待したい。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究成果は東京大学大学院薬学系研究科衛生化学教室で行われたものです。これまで α -TTPの研究に携わったすべての研究室のメンバーならびに共同研究者の方々にこの場を借りて深く感謝致します。

文 献

- 1) Chow, C.K. (1975) *Am. J. Clin. Nutr.*, 28, 756-760.
- 2) Traber, M.G., Burton, G.W., Hughes, L., Ingold, K.U., Hidaka, H., Malloy, M., Kane, J., Hyams, J., & Kayden, H.J. (1992) *J. Lipid Res.*, 33, 1171-1182.
- 3) Traber, M.G. & Kayden, H.J. (1989) *Am. J. Clin. Nutr.*, 49, 517-526.
- 4) Traber, M.G. & Sies, H. (1996) *Annu. Rev. Nutr.*, 16, 321-347.
- 5) Traber, M.G. (2013) *J. Lipid Res.*, 54, 2295-2306.
- 6) Mowri, H., Nakagawa, Y., Inoue, K., & Nojima, S. (1981) *Eur. J. Biochem.*, 117, 537-542.

- 7) Catignani, G.L. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **67**, 66-72.
- 8) Catignani, G.L. & Bieri, J.G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 349-357.
- 9) Murphy, D.J. & Mavis, R.D. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 10464-10468.
- 10) Behrens, W. & Madere, R. (1982) *Nutr. Rep. Int.*, **25**, 107-112.
- 11) Behrens, W. & Madere, R. (1982) *Nutr. Res.*, **2**, 611-618.
- 12) Sato, Y., Hagiwara, K., Arai, H., & Inoue, K. (1991) *FEBS Lett.*, **288**, 41-45.
- 13) Sato, Y., Arai, H., Miyata, A., Tokita, S., Yamamoto, K., Tanabe, T., & Inoue, K. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 17705-17710.
- 14) Saito, K., Tautz, L., & Mustelin, T. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1771**, 719-726.
- 15) Hosomi, A., Arita, M., Sato, Y., Kiyose, C., Ueda, T., Igarashi, O., Arai, H., & Inoue, K. (1997) *FEBS Lett.*, **409**, 105-108.
- 16) Min, K.C., Kovall, R.A., & Hendrickson, W.A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14713-14718.
- 17) Meier, R., Tomizaki, T., Schulze-Briese, C., Baumann, U., & Stocker, A. (2003) *J. Mol. Biol.*, **331**, 725-734.
- 18) Sokol, R.J. (1988) *Annu. Rev. Nutr.*, **8**, 351-373.
- 19) Di Donato, I., Bianchi, S., & Federico, A. (2010) *Neurol. Sci.*, **31**, 511-515.
- 20) Yokota, T., Shiojiri, T., Gotoda, T., Arita, M., Arai, H., Ohga, T., Kanda, T., Suzuki, J., Imai, T., Matsumoto, H., Harino, S., Kiyosawa, M., Mizusawa, H., & Inoue, K. (1997) *Ann. Neurol.*, **41**, 826-832.
- 21) Cavalier, L., Ouahchi, K., Kayden, H.J., Di Donato, S., Reutenauer, L., Mandel, J.L., & Koenig, M. (1998) *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 301-310.
- 22) Ben Hamida, C., Doerflinger, N., Belal, S., Linder, C., Reutenauer, L., Dib, C., Gyapay, G., Vignal, A., Le Paslier, D., Cohen, D., Pandolfo, M., Mokini, V., Novelli, G., Hentati, F., Ben Hamida, M., Mandel, J.L., & Koenig, M. (1993) *Nat. Genet.*, **5**, 195-200.
- 23) Arita, M., Sato, Y., Miyata, A., Tanabe, T., Takahashi, E., Kayden, H.J., Arai, H., & Inoue, K. (1995) *Biochem. J.*, **306**, 437-443.
- 24) Ouahchi, K., Arita, M., Kayden, H., Hentati, F., Ben Hamida, M., Sokol, R., Arai, H., Inoue, K., Mandel, J.L., & Koenig, M. (1995) *Nat. Genet.*, **9**, 141-145.
- 25) Yokota, T., Wada, Y., Furukawa, T., Tsukagoshi, H., Uchihara, T., & Watabiki, S. (1987) *Ann. Neurol.*, **22**, 84-87.
- 26) Gotoda, T., Arita, M., Arai, H., Inoue, K., Yokota, T., Fukuo, Y., Yazaki, Y., & Yamada, N. (1995) *N. Engl. J. Med.*, **333**, 1313-1318.
- 27) Traber, M.G., Sokol, R.J., Burton, G.W., Ingold, K.U., Papas, A.M., Huffaker, J.E., & Kayden, H.J. (1990) *J. Clin. Invest.*, **85**, 397-407.
- 28) Traber, M.G., Sokol, R.J., Kohlschütter, A., Yokota, T., Muller, D.P., Dufour, R., & Kayden, H.J. (1993) *J. Lipid Res.*, **34**, 201-210.
- 29) Yokota, T., Igarashi, K., Uchihara, T., Jishage, K., Tomita, H., Inaba, A., Li, Y., Arita, M., Suzuki, H., Mizusawa, H., & Arai, H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 15185-15190.
- 30) Jishage, K., Arita, M., Igarashi, K., Iwata, T., Watanabe, M., Ogawa, M., Ueda, O., Kamada, N., Inoue, K., Arai, H., & Suzuki, H. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 1669-1672.
- 31) Arita, M., Nomura, K., Arai, H., & Inoue, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 12437-12441.
- 32) Oram, J.F., Vaughan, A.M., & Stocker, R. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 39898-39902.
- 33) Shichiri, M., Takanezawa, Y., Rotzoll, D.E., Yoshida, Y., Kokubu, T., Ueda, K., Tamai, H., & Arai, H. (2010) *J. Nutr. Biochem.*, **21**, 451-456.
- 34) Qian, J., Morley, S., Wilson, K., Nava, P., Atkinson, J., & Manor, D. (2005) *J. Lipid Res.*, **46**, 2072-2082.
- 35) Sontag, T.J. & Parker, R.S. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 25290-25296.
- 36) Bardowell, S.A., Duan, F., Manor, D., Swanson, J.E., & Parker, R.S. (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 26077-26086.
- 37) Hanada, K. (2010) *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **86**, 426-437.
- 38) D'Angelo, G., Vicinanza, M., & De Matteis, M.A. (2008) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 360-370.
- 39) Krugmann, S., Anderson, K.E., Ridley, S.H., Risso, N., McGregor, A., Coadwell, J., Davidson, K., Eguinoa, A., Ellson, C.D., Lipp, P., Manifava, M., Ktistakis, N., Painter, G., Thuring, J.W., Cooper, M.A., Lim, Z.Y., Holmes, A.B., Dove, S.K., Michell, R.H., Grewal, A., Nazarian, A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Stephens, L.R., & Hawkins, P.T. (2002) *Mol. Cell*, **9**, 95-108.
- 40) Lemmon, M.A. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 99-111.
- 41) van Meer, G., Voelker, D., & Feigenson, G. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 112-124.
- 42) Kono, N., Ohto, U., Hiramatsu, T., Urabe, M., Uchida, Y., Satow, Y., & Arai, H. (2013) *Science*, **340**, 1106-1110.
- 43) de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payrastré, B., Bourguet, W., Antonny, B., & Drin, G. (2011) *J. Cell Biol.*, **195**, 965-978.

著者寸描

●河野 望 (こうの のぞむ)



東京大学大学院薬学系研究科助教，博士（薬学）。

■略歴 1979年千葉県に生る。2002年東京大学薬学部卒業。07年同大学院薬学系研究科修了。04～07年日本学術振興会特別研究員。07年より現職。

■研究テーマと抱負 酸化リン脂質による細胞内シグナル制御機構の解析，生体膜脂肪酸環境変化による細胞内シグナル活性化機構の解析。膜リン脂質によるタンパク質の新たな制御機構の解明を目指しています。

■ホームページ <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~eisei/jp/Home.html>

■趣味 サッカー，楽器演奏。