

22PO-am214

ABC タンパク質によるリソソームから細胞質へのビタミン B₁₂ 輸送機構の解析
北井 克樹¹, 〇川口 甲介¹, 守田 雅志¹, 今中 常雄², 宗 孝紀¹ (¹富山大院薬, ²広島国際大薬)

【目的】ABC タンパク質 ABCD4 およびリソソーム膜タンパク質 LMBD1 の機能不全は、リソソーム内へのビタミン B₁₂ の蓄積を表現型とするビタミン B₁₂ 代謝異常の原因となる。これは ABCD4 と LMBD1 が協調してビタミン B₁₂ をリソソームから細胞質へ輸送することを示唆する。我々はこれまでに、ABCD4 は単独では小胞体に留まり、LMBD1 と複合体を形成することでリソソームへと移行することを明らかとした。本研究では、ABCD4 がビタミン B₁₂ 輸送を担う輸送体であると実証し、その分子機構を明らかにするため、ABCD4 をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて異種発現させて解析を行った。

【方法】*P. pastoris* を用いて発現させた His-ABCD4 を可溶化し、His タグアフィニティ精製を行った。精製した ABCD4 はダイズ由来リン脂質で構成されたリポソームに組み込んだ。ATPase 活性の測定はマラカイトグリーン法で行った。ABCD4 を含む反転膜小胞はフレンチプレスを用いて作製した。ビタミン B₁₂ は、ODS カラムを用い HPLC で定量した。

【結果と考察】ABCD4 を含むプロテオリポソームを調製し ATPase 活性を測定したところ、時間依存的、量依存的な ATPase 活性の上昇がみられた。このことから、ABCD4 が活性型酵素としてリポソームに組み込まれていることを確認した。さらに、プロテオリポソーム内にビタミン B₁₂ を封入したところ、ABCD4 の ATPase 活性が上昇したことから、ビタミン B₁₂ が ABCD4 の輸送基質であることが示唆された。現在、ABCD4 を含むオルガネラから、ATP 再生系を封入した反転膜小胞を調製してビタミン B₁₂ の取り込み実験を行い、ABCD4 のビタミン B₁₂ の輸送機構の詳細を解析している。