

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460065

研究課題名(和文) 生体膜の非対称性の維持機構とその破綻による胆汁うっ滞発症の仕組み

研究課題名(英文) Transbilayer lipid asymmetry and cholestasis

研究代表者

申 惠媛 (Shin, Hye-Won)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：10345598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：P4-ATPase (flippase)であるATP8B1は、胆汁うっ滞症(PFIC)の原因遺伝子産物であることが示されていた。ATP8B1はホスファチジルセリンのflippaseと考えられてきたが、ホスファチジルコリンを特異的な基質とすることを新たに見出した。遺伝病由来の様々な点変異体を調べた結果、その多くは発現しないがいくつかの変異体は野生型と同様に発現し、細胞膜に正常に輸送された。これらの変異体は、ホスファチジルコリンに対するflip活性がなくなっていることを発見した。本研究によりPFIC発症の原因の一つがホスファチジルコリンに対するflippase活性の欠損であることが初めて示された。

研究成果の概要(英文)：Progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC) is a severe liver disease caused by impaired bile flow. PFIC type 1 (PFIC1) results from mutations in the ATP8B1 (flippase) protein. Although ATP8B1 has been hypothesized to mediate translocation of phosphatidylserine (PS) at the plasma membrane, it is unclear whether a defect in the phospholipid flippase activity of ATP8B1 is related to cholestasis. In this study, we found that ATP8B1 mediates the translocation of phosphatidylcholine (PC), but not PS, at the plasma membrane. The majority of missense mutations found in progressive familial intrahepatic cholestasis1 (PFIC1) patients reduced expression of ATP8B1 at the plasma membrane. Importantly, however, some missense mutants failed to translocate PC, although they were expressed normally at the plasma membrane. These findings implicate defects in the PC flippase activity of ATP8B1 in cholestasis and provide important insights into the pathophysiological mechanisms of PFIC1.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：生体膜 リン脂質 非対称性 細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ATP8B1 は進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (PFIC, progressive familial intrahepatic cholestasis) の原因遺伝子産物であることが示されていた。乳児期に発症し、年齢が進むと肝機能障害に陥ることで、多くの患者が肝臓移植の対象となる。

(2) PFIC は、I 型 (PFIC1) が P4-ATPase の ATP8B1 (別名 FIC1: familial intrahepatic cholestasis 1)、II 型 (PFIC2) が ABCB11 (別名 BSEP: bile salt exporting pump)、III 型 (PFIC3) が ABCB4 (別名 MDR3: multidrug resistance 3) と、原因遺伝子により 3 つに分類されている。ABCB11 は胆汁酸のトランスポーターとして、ABCB4 はホスファチジルコリン (PC) を細胞膜の内葉から外葉に flop する floppase として機能しており、胆汁の分泌に重要な役割を果たす。

(3) ところが、2008 年に ATP8B1 はホスファチジルセリン (PS) の flippase として機能するという報告がなされたものの、PS の動態制御が胆汁の分泌にどのように関与するのか全く不明であった。

2. 研究の目的

遺伝病由来の ATP8B1 の様々な変異体を用いて flip 活性、発現および細胞膜への局在を総合的に検証することで胆汁うっ滞の発症のメカニズムの解明に迫る。さらに、flippase の ATP8B1 と floppase の ABCB4 による PC の恒常性維持機構およびその破たんによる胆汁うっ滞の発症メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 肝内胆汁うっ滞症由来の ATP8B1 の変異体を作製し、レトロウイルスを用いて各変異体安定発現細胞を樹立した。これらの変異体の細胞内局在を蛍光抗体法を用いて検証した。

(2) ATP8B1 の変異体安定発現細胞の

flippase 活性を測定する。NBD で標識した各リン脂質を細胞に取り込ませ、フローサイトメトリーを用いて測定した。

(3) PC の flippase としての ATP8B1 と floppase としての ABCB4 を共発現する細胞を樹立し、リン脂質取り込み活性を検証した。

4. 研究成果

(1) これまでに ATP8B1 は PS に対する flippase であると報告されていたが、ATP8B1 は PS ではなく PC を特異的に flip することを明らかにした (図 1)。

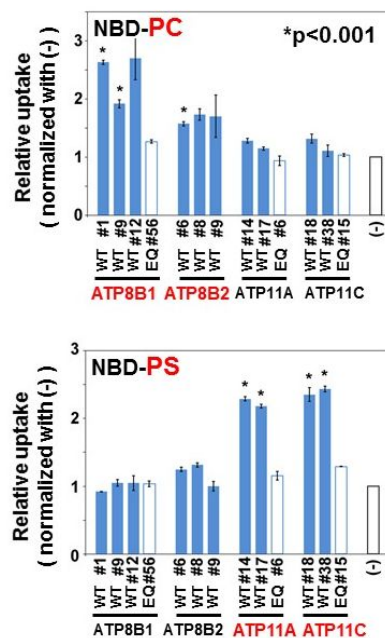


図 1

(2) 胆汁うっ滞症の患者由来の ATP8B1 のミスセンス変異体を作製し安定発現細胞を作製したところ、多くの変異体は発現せず、プロテアソーム経路で分解されることを明らかにした。したがって、これらの変異による胆汁うっ滞症の発症は ATP8B1 の欠損が原因であると考えられた (図 2, a と c)。

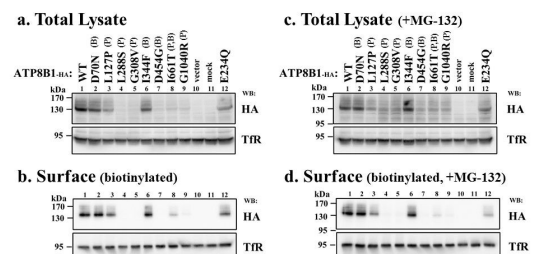


図 2

(3) 一方、L127P と I344F の変異体は野生型の ATP8B1 と同様に発現し、細胞膜に正常に輸送されることを見出した (図 2, b と d)。

(4) この二つの変異体を発現する細胞を用いて、flippase 活性を測定したところ PC に対する flip 活性が欠損していることが分かった。

したがって、胆汁うっ滞症の発症の原因の一つは ATP8B1 の PC-flip 活性の欠損であることを初めて示した (図 3)。

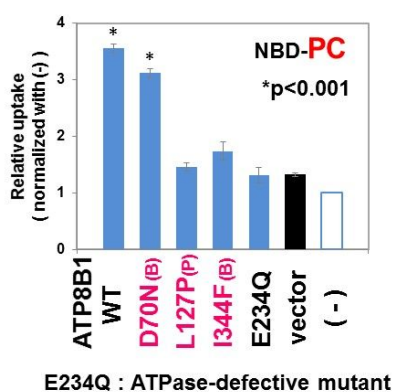


図 3

(5) ATP8B1 と ABCB4 を同時に発現する安定発現細胞を作製し、PC の取り込み活性を測定したところ、ATP8B1 による PC の flip が ABCB4 との共発現により減少することを見出した。したがって、細胞において ATP8B1 と ABCB4 は協調して PC の flip-flop を担っていることが分かった (図 4)。

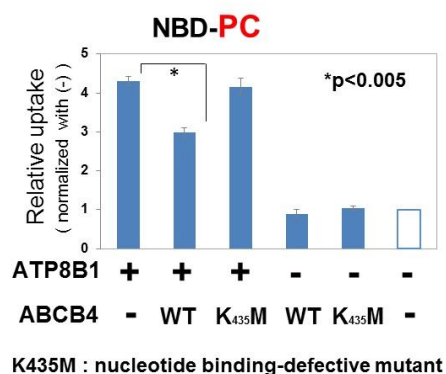


図 4

これらの結果から、胆汁酸の正常な分泌には肝細胞の毛細胆管側の細胞膜の ATP8B1 および ABCB4 による PC の flip-flop の調節が

必須であることが明らかになった。胆汁酸は界面活性剤の役割をするため、排出される時には PC と複合体を形成して排出される。したがって、ATP8B1 による PC の細胞膜の外葉から内葉への供給が正常な胆汁酸の排出に必要なことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

### \*Corresponding author

Tanaka, Y., Ono, N., Shima, T., Tanaka, G., Katoh, Y., Nakayama, K., Takatsu, H., and \*Shin, H.-W. (2016) The phospholipid flippase ATP9A is required for recycling pathway from endosomes to the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* **27**, 3883-3893. Selected for Highlights. 10.1091/mbc.E16-08-0586

Miyano, R., Matsumoto, T., Takatsu, H., Nakayama, K., and \*Shin, H.-W. (2016) Alteration of transbilayer phospholipid compositions is involved in cell adhesion, cell spreading, and focal adhesion formation. *FEBS Lett.* **590**, 2138-2145. 10.1002/1873-3468.12247

Hanai, A., Ohgi, M., Yagi, C., Ueda, T., Shin, H.-W., and \*Nakayama, K. (2016) Class I Arfs (Arf1 and Arf3) and Arf6 are localized to the Flemming body and play important roles in cytokinesis. *J. Biochem.* **159**, 201-208. 10.1093/jb/mvv088

Takada, N., Takatsu, H., Miyano, R., Nakayama, K., and \*Shin, H.-W. (2015) ATP11C mutation is responsible for the defect in phosphatidylserine uptake in UPS-1 cells. *J. Lipid Res.* **56**, 2151-2157. Recommended paper (Faculty of 1000). 10.1194/jlr.M062547

Takashima, K., Saitoh, A., Funabashi, T., Hirose, S., Yagi, C., Nozaki, S., Sato, R., Shin, H.-W., and \*Nakayama, K. (2015) COPI-mediated retrieval of SCAP is critical for regulating lipogenesis under basal and sterol-deficient conditions. *J. Cell Sci.* **128**, 2805-2815. 10.1242/jcs.164137

Naito, T., Takatsu, H., Miyano, R., Takada, N., Nakayama, K., and \*Shin, H.-W. (2015) Phospholipid flippase ATP10A translocates phosphatidylcholine and is involved in plasma membrane dynamics. *J. Biol. Chem.* **290**, 15004-15017. 10.1074/jbc.M115.655191

Kubo, K., Kobayashi, M., Nozaki, S., Yagi, C., Hatsuzawa, K., Katoh, Y., Shin, H.-W., Takahashi, S., and \*Nakayama, K. (2015) SNAP23/25 and VAMP2 mediate exocytic event of transferrin receptor-containing recycling vesicles. *Biol. Open* **4**, 910-920. 10.1242/bio.012146

Takatsu, H., Tanaka, G., Segawa, K., Suzuki, J., Nagata, S., Nakayama, K., and \*Shin, H.-W. (2014) Phospholipid flippase activities and substrate specificities of human type IV P-type ATPases localized to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **289**, 33543-33556. 10.1074/jbc.M114.593012

[学会発表](計 19 件)

高山真裕、高津宏之、中山和久、申 惠媛 (2017) Phorbol ester 処理によるリン脂質フリッパーゼ ATP11C の局在変化. 生体運動合同班会議 2017、神戸、1 月 6 日 ~ 8 日

申 惠媛 (2016) メンブレントラフィックによる P4-ATPase の活性調節機構. 第 89 回日本生化学会大会. シンポジウム. 仙台、9 月 25 日 ~ 27 日 (招待講演)

高津宏之、高山真裕、中山和久、申 惠媛 (2016) リン脂質フリッパーゼ ATP11C の PKC による制御機構. 第 89 回日本生化学会大会. シンポジウム. 仙台、9 月 25 日 ~ 27 日

高田直人、中山和久、申 惠媛 (2016) P4-ATPase によるリン脂質フリップが膜変形に与える影響. 第 89 回日本生化学会大会. シンポジウム. 仙台、9 月 25 日 ~ 27 日 (若手優秀発表賞受賞)

田中祥城、小野夏生、中山和久、申 惠媛 (2016) 細胞内リサイクリング経路におけるリン脂質フリッパーゼの機能解析. 生体運動合同班会議 2016、京都、1 月 8 日 ~ 10 日

田中雅久、高津宏之、中山和久、申 惠媛 (2016) 細胞膜ホスファチジルコリンのフリップ・フロップと胆汁うっ滞症の関係. 生体運動合同班会議 2016、京都、1 月 8 日 ~ 10 日

Naito, T., Takatsu, H., Miyano, R., Takada, N., Nakayama, K., Shin, H.-W. (2016) Phospholipid flippase ATP10A, a member of type IV P-type ATPases, translocates phosphatidylcholine and is involved in plasma membrane dynamics. 2016 ASCB (the American Society for Cell Biology) Annual Meeting. San Francisco, USA, 3-7 December.

申 惠媛 (2015) リン脂質 flippase である P4-ATPase の基質特異性と細胞機能の関係. 第 53 回日本生物物理学会. シンポジウム. 金沢、9 月 13 日 ~ 15 日 (招待講演)

高田直人、高津宏之、宮野吏永、中山和久、申 惠媛 (2015) ホスファチジルセリン取り込み異常の CHO-K1 変異株 (UPS-1)における flippase の発現解析 . 第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会合同大会、神戸、12 月 1 日~4 日 (若手優秀発表賞受賞) 船橋輝記、高島昭平、齋藤明奈、廣瀬祥平、申 惠媛、中山和久 (2015) COPI 被服小胞を介する SCAP-SREBP 複合体のゴルジ体から小胞体への逆行輸送による脂質代謝の調節 . 第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会合同大会、神戸、12 月 1 日~4 日 内藤朋樹、高津宏之、宮野吏永、高田直人、中山和久、申 惠媛 (2015) リン脂質フリッパーゼ ATP10A のフリップ活性及び細胞膜ダイナミクスへの関与 . 第 62 回日本生化学会近畿支部例会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県草津市)、5 月 16 日 内藤朋樹、高津宏之、宮野吏永、高田直人、中山和久、申 惠媛 (2015) リン脂質フリッパーゼ ATP10A の PC フリップ活性及び細胞膜ダイナミクスへの関与 . 第 14 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2015、千葉大学、9 月 12 日~13 日 Naito, T., Takatsu, H., Nakayama, K., Shin, H.-W. (2015) Subcellular localization and phospholipid flippase activity of class 5 P4-ATPases. 18<sup>th</sup> iCeMS International Symposium & 15<sup>th</sup> International Membrane Research Forum. Kyoto, 2-4 March. Takatsu, H., Tanaka, G., Nakayama, K., Shin, H.-W. (2015) ATP8B1 (familial intrahepatic cholestasis 1) translocates phosphatidylcholine at

the plasma membrane. 18<sup>th</sup> iCeMS International Symposium & 15<sup>th</sup> International Membrane Research Forum. Kyoto, 2-4 March.

申惠媛 (2014) P4-ATPase によるリン脂質の量的・質的変容と膜変形を伴う細胞機能の関係 . 第 87 回日本生化学会大会 . シンポジウム . 京都、10 月 15 日~18 日 (招待講演)

高津宏之、田中雅久、中山和久、申 惠媛 (2014) ホスファチジルコリンのフリップ・フロップの相関性の破綻と PFIC (新構成家族性肝内胆汁うっ滞症) . 第 87 回日本生化学会大会シンポジウム、京都、10 月 15 日~18 日 (招待講演)

内藤朋樹、高津宏之、中山和久、申 惠媛 (2014) クラス 5 P4-ATPase の細胞内局在およびリン脂質フリップ活性 . 第 87 回日本生化学会大会、京都、10 月 15 日~18 日

田中雅久、高津宏之、中山和久、申 惠媛 (2014) ATP8B1 と ABCB4 の協調的なリン脂質のフリップ・フロップと新構成家族性肝内胆汁うっ滞症の関係 . 第 87 回日本生化学会大会、京都、10 月 15 日~18 日

宮野吏永、高津宏之、中山和久、申 惠媛 (2014) P4-ATPase による細胞-細胞外マトリックス間接着の調節機構の解明 . 第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2014、富山、9 月 20 日~21 日

〔図書〕(計 1 件)

\*申 惠媛、中山和久 (2016) 8 章 Arf ファミリーによるメンブレントラフィックの調節 . **Dojin BioScience Series 24 メンブレントラフィック** 福田光則・吉森保編 化学同人 pp. 114-129.

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/hshin/ShinIndex.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

申 惠媛 (SHIN, Hye-Won)

京都大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：10345598