

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07325

研究課題名(和文)リン脂質フリッパーゼATP8B2の変異と知的障害の関係性の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the relationship between phospholipid flippase ATP8B2 mutation and intellectual disabilities

研究代表者

高津 宏之 (TAKATSU, Hiroyuki)

京都大学・薬学研究科・研究員

研究者番号：70360576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：重篤な知的障害の患者の網羅的遺伝子解析から、3つのATP8B2の変異が見出された。知的障害患者から見出されたATP8B2の変異は、R549Q、G759S、N817Sの3つであり、いずれの残基も他のP4-ATPaseでもよく保存されていることが判明した。そこで、その発現細胞を作製した。各変異体の細胞膜への局在に異常は見られず、シャペロン様のタンパク質CDC50Aとの結合も野生型とほぼ違いは見られなかった。ATP8B2の変異体発現細胞のうちGS変異およびNS変異では、ホスファチジルコリンに対するフリッパーゼ活性がほとんど欠失していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

知的障害患者の網羅的遺伝子解析から明らかになったATP8B2の変異は、遺伝性の知的障害の原因遺伝子の一つとして新たにATP8B2をクローズアップした。医学的見地からも、細胞生物学的立場からも、全く新しい展開であり、ATP8B2の膜脂質の動態制御と知的障害発症の相関を世界で初めて明らかにするものである。また、本研究により、ATP8B2で見出された変異が、P4-ATPase全般のフリッパーゼ活性に共通の重要な残基を新たに明らかにした。このことは、分子生物学のみならず、構造生物学的にもとても興味深い点であり、今後のフリッパーゼの研究において重要な知見を与えるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：P4-ATPases are lipid flippases that translocate lipids from the exoplasmic (or luminal) to the cytoplasmic leaflet of biological membranes. ATP8B2 is found to be a phosphatidylcholine(PC)-flippase at the plasma membrane but its physiological function is unknown. This time, I found three de novo heterozygous point mutations of ATP8B2 gene in intellectual disabilities patients. The three de novo mutations did not affect the interaction with CDC50A and localization to the plasma membrane. However, two mutations dramatically reduced the phosphatidylcholine flippase activity of ATP8B2. Notably, these amino acids were conserved in all members of the P4-ATPase family. The corresponding mutations in ATP8B1 and ATP11C also decreased PC- and phosphatidylserine-flippase activity, respectively, suggesting that these amino acids are functionally conserved and important in the enzymatic activity of P4-ATPase family.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ATP8B2 知的障害 フリッパーゼ ATP8B1 ATP11C

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重篤な知的障害の患者の網羅的遺伝子解析から、ATP8B2 の変異に起因する可能性の高い患者の存在が複数明らかとなった。マウスで ATP8B2 の発現分布を定量的に調べたところ、トランスクリプトーム解析を基に作製されている既知のデータとは異なり、脳組織での発現が非常に高いことが明らかとなり、知的障害と ATP8B2 変異の相関が強く疑われた。

patient	ATP8B2変異	主な症状
(a) エストニア人	転移・転座による欠損	先天性関節拘縮症・白内障・異形症
(b) フランス男児	c.g2374a; p.Gly792Ser	重篤な知的障害・筋緊張低下・皮質萎縮症・片眼欠損症
(c) イギリス少年	c.a2507g; p.Asn850Ser	重篤な自閉症
(d) 詳細不明	c.g1745a; p.Arg582Gln	軽度の知的障害・体重および脂肪の増加

表 1. ATP8B2 の遺伝的異常が見出された知的障害患者 (未発表)

2. 研究の目的

これまで私は、ATP8B2 がホスファチジルコリン(PC)を細胞膜の外葉から内葉へと特異的にフリップするフリッパーゼであることを細胞生物学レベルで示してきた。そこで、本研究では患者由来の変異を導入した ATP8B2 が PC フリッパーゼとしての機能に異常をきたすのかを検証するとともに、ATP8B2 の脳での分子レベルでの働きを突き止め、知的障害と ATP8B2 の機能の関係性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) マウスの組織・細胞レベルでの ATP8B2 の定量 PCR による解析。
- (2) 知的障害患者由来の変異を導入した P4-ATPase 遺伝子の作製とその安定発現細胞の樹立。
- (3) ATP8B2 変異体のタンパク質レベルでの様々な発現解析。
- (4) フリッパーゼ活性の異常の有無の検証を基本とした酵素学的解析。

4. 研究成果

(1) 組織・細胞レベルでの ATP8B2 の発現分布の把握。定量 PCR により、ATP8B2 がマウス脳で特に高発現していることを突き止めた。これにより、ATP8B2 の変異が知的障害と何らかの関係がある可能性が高いと考えられた。(図 1)

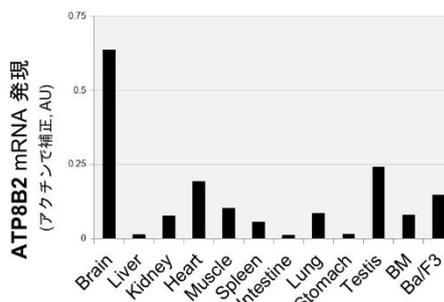


図 1. マウス各組織での発現量の比較 (定量PCR)

(2) 知的障害患者由来の変異を導入した P4-ATPase 遺伝子の作製とその安定発現細胞の樹立。知的障害患者から見出された ATP8B2 の変異は、R549Q (RQ 変異)、G759S (GS 変異)、N817S (NS 変異) の 3 つであり、いずれの残基も他の P4-ATPase でもよく保存されていることが判明した。そこで、ATP8B2 だけでなく、ATP8B1 および ATP11C でも相同の残基に変異を導入し、その発現細胞を作製した。ただし、ATP8B1 の GS 変異体だけは発現が悪く、安定発現細胞を得ることができなかった。

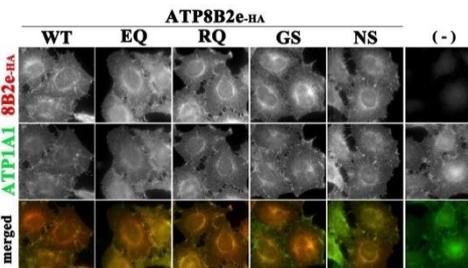


図 2. ATP8B2 の各変異体の細胞内局在 (EQ: ATPase 活性欠損変異体)

(3) ATP8B2 変異体のタンパク質レベルでの様々な発現解析。

ATP8B2 の野生型および各変異体の安定発現細胞を用いて、間接免疫抗体法で細胞内局在を観察したが、いずれも野生型と大きな違いは認められず、細胞膜に局在した(図 2)。

生化学的手法を用いてタンパク質レベルでの発現量を比較するとともに、膜表面にどれくらい局在できているかを表在タンパク質のビオチン化により調べたが、いずれも野生型と遜色なく細胞表面に出てくることを生化学的にも確かめた(図 3)。

一方、P4-ATPase の多くは正常な局在のためにシャペロン様の CDC50 タンパク質との結合が必須であることが知られている。ATP8B2 の変異体において、この CDC50 との関係性に変化がないかどうかを免疫沈降法により検証したところ、いずれも野生型と遜色なく CDC50A および 50B と結合が確かめられた。

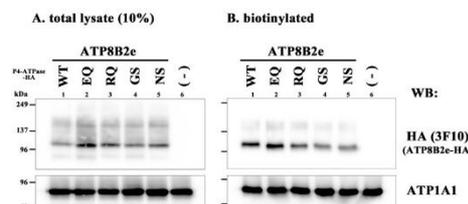


図 3. ビオチン化による細胞膜表在 ATP8B2 の検出

いずれも野生型と遜色なく CDC50A および 50B と結合が確かめられた。

さらに ATP8B1 および ATP11C でも同様に細胞内局在や細胞膜表在、CDC50 との結合を検証したが、いずれも野生型と大きな違いは認められなかった(ただし、ATP8B1 の GS 変異体だけは安定的に発現せず)。これらの研究により、作製した各種の変異体がタンパク質発現レベルで異常がないことが確かめられた。

(4) フリッパーゼ活性の異常の有無の検証を基本とした酵素学的解析。

これまでの研究により、ATP8B2 がホスファチジルコリン(PC)を特異的基質とするフリッパーゼであることを示してきたが、今回新たに ATP8B2 の野生型および各変異体の安定発現細胞を用いて、フリッパーゼ活性を測定した。その結果、GS 変異体および NS 変異体は PC に対するフリッパーゼ活性をほとんど欠失していることが明らかとなった(図4)。

一方、RQ 変異体は野生型よりもやや活性が低いものの普通にフリッパーゼ活性が見られた。したがって、知的障害の発症は、ATP8B2 の PC フリッパーゼ活性の欠損に起因している可能性を強く示唆した。ただし、RQ 変異については、知的障害のレベルが他の変異と比較して軽度である、という点において説明づけられるかもしれない。

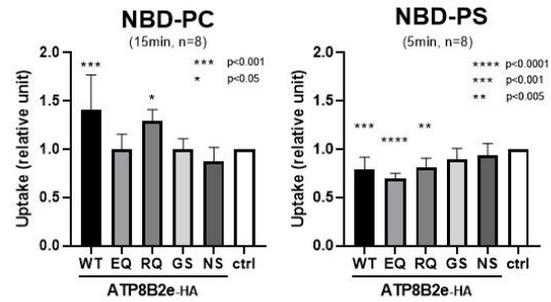


図4. ATP8B2 WTおよび各変異体のフリッパーゼ活性

さらに、ATP8B1 および ATP11C でも同様に、野生型および各変異体の安定発現細胞を用いて、フリッパーゼ活性を測定した。その結果、ATP8B1 の NS 変異体も PC 特異的なフリッパーゼ活性の欠損を示した(GS 変異体は安定発現せず)。

また、基質の異なる ATP11C においても、GS 変異体および NS 変異体が、ホスファチジルセリン(PS)に対するフリッパーゼ活性が顕著に低下していることが明らかとなった(図5)。すなわち、基質の種類に関係なく P4-ATPase 全般に共通して、GS 変異および NS 変異はフリッパーゼとしての分子動態に大きな影響を及ぼす変異であることが強く示唆された。

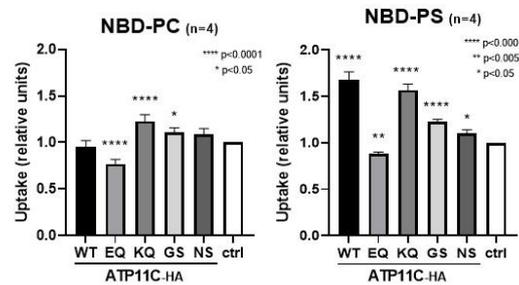


図5. ATP11C WTおよび各変異体のフリッパーゼ活性

(5) 総括。

知的障害患者から見出された ATP8B2 の3つの変異のうち、G759S (GS 変異)と N817S (NS 変異)は、その発現や細胞膜局在は正常にもかかわらず、明確に PC フリッパーゼ活性を欠失していた。すなわち、これらの変異に起因したフリッパーゼ活性の欠損が知的障害の発症と密接に関係していると考えられた。ATP8B2 の立体構造は未だ解明されていないが、他の P-type ATPase の構造を基に、Phyre2 で予想された ATP8B2 の構造を照らし合わせてみると(図6)、G759 も N817 も、その活性中心としてリン酸化を受ける Asp392(D392)残基に、とても近接した所に位置していることが分かる。一方、R549Q (RQ 変異)は野生型よりも少しだけ低いフリッパーゼ活性を示したが、この残基は活性中心よりも少し離れた所に位置する。さらに、今回、見出された ATP8B2 の3つの残基は、P4-ATPase 全般によく保存された残基であることも明らかとなった。特に、GS 変異と NS 変異については、P4-ATPase 全般のフリッパーゼとしての分子動態において重要な残基であることが明確となった。

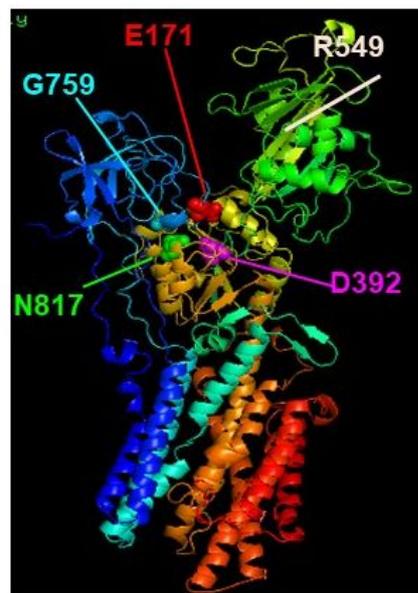


図6. Phyre2によるATP8B2(e)の構造予測

D392 : phosphorylation site
E171Q : ATPase-defective mutation

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue H, Takatsu H, Hamamoto A, Takayama M, Nakabuchi R, Muranaka Y, Yagi T, Nakayama K, Shin HW	4. 巻 134
2. 論文標題 The interaction of ATP11C-b with ezrin contributes to its polarized localization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs258523
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.258523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tone T, Nakayama K, Takatsu H, Shin HW.	4. 巻 594(3)
2. 論文標題 ATPase reaction cycle of P4-ATPases affects their transport from the endoplasmic reticulum.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 412-423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13629.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------