

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790175

研究課題名（和文）

難治性肝疾患の治療を指向した肝毛細胆管側輸送担体群の細胞膜発現量制御機構の解析

研究課題名（英文）Understanding of mechanism underlying intracellular sorting of hepatocanalicular transporters

研究代表者

林 久允 (HAYASHI HISAMITSU)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：10451858

研究成果の概要（和文）：

肝細胞の毛細胆管側膜(canalicular membrane; CM)に発現するトランスポーターである Bile salt export pump(BSEP)の機能低下は、肝内胆汁うっ滞を惹起する。CMからの内在化促進による BSEP の CM 発現量の低下がその一因として報告されているが、BSEP の翻訳後制御に関わる分子機構は不明であり、未だ当該疾患に対する有効な治療法は確立していない。本研究では、①ユビキチン(Ub)化という翻訳後修飾が BSEP の CM からの内在化シグナルとして働くこと、②BSEP は CM で Ub 化を受けた後、AP2 というアダプタータンパク質を介してクラスリン依存的な内在化を受けていることを見出し、上記の分子機構の一端を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Bile salt export pump (BSEP) localizes on canalicular membrane of hepatocytes and mediates biliary excretion of bile salts. BSEP dysfunction attributed to its internalization from hepatocanalicular membrane and subsequent degradation causes intrahepatic cholestasis. At present, no medical therapy for this disease state has been established, because the regulatory mechanism of cell surface expression of BSEP remains to be elucidated. In this study, we explored it focusing on posttranslational machinery and demonstrated that ubiquitination, a posttranslational modification, of BSEP plays a role in its internalization via clathrin-mediated endocytosis involving the AP2 adaptor complex, an adaptor protein required for cargo selection in clathrin-mediated endocytosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：トランスポーター、肝内胆汁うっ滞、細胞内ソーティング、胆汁酸、フェニルブチレート、コレステロール

1. 研究開始当初の背景

BSEP は CM に局在し、肝細胞から胆汁中へ

の胆汁酸排泄を担うトランスポーターであり、胆汁流形成に働いている。遺伝的ならび

に種々の肝疾患に付随して、BSEPはCMから内在化し、CMにおける発現量が減少することが報告されており、その際には胆汁流の低下(肝内胆汁うっ滞)、肝細胞内の胆汁酸蓄積による肝毒性が惹起され、肝疾患が重篤化する。このような肝内胆汁うっ滞を伴う重篤な肝疾患症例は年間5,000~10,000例が報告されているにも関わらず、BSEPのCMからの内在化制御に関わる分子機序が未解明であるため、未だ有効な内科的療法が確立していない。現行の利胆薬を用いて症状の改善が認められない場合には、唯一の治療法は肝移植である。肝移植は生着するかどうかは確実ではなくリスクが高いこと、高額な手術費がかかること、さらに免疫抑制剤を一生服用し続けなくてはならないことなどから、患者に多大な負担を強いる治療法である。また現状では、肝移植の需要に対して施術例数が追いついていない。これらの問題点を解決するために、肝内胆汁うっ滞症治療薬の開発が切望されている。

2. 研究の目的

CMに発現し、胆汁酸の肝細胞から胆汁中への排泄を担うトランスポーターであるBSEPを対象とし、BSEPのCMからの内在化に関わる分子機構を理解することにより、肝内胆汁うっ滞を伴う肝疾患に対する新たな創薬標的を提唱することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)膜タンパク質の細胞膜からの内在化/分解シグナルの1つとして、Ub化が知られている。Ub化された膜タンパク質は、細胞膜から内在化し、初期エンドソームにおいてリソソーム分解経路へと選別を受ける。これまでに我々は、Ubのドミナントネガティブ(dominant negative; DN)体を発現させたHEK293T細胞を用い、ビオチニレーション法を駆使することにより、Ub化がBSEPの細胞膜からの内在化に関与することを見出している。本研究においては、肝細胞由来でCMを形成するMcA-RH7777細胞を宿主細胞として用い、実際にUb化がCMからの内在化に働くか否かについて検討した。

タイトジャンクションが障害となるため、CMに発現する膜タンパク質の内在化をビオチニレーション法を用いて評価することは困難である。本研究では蛍光タンパク質と

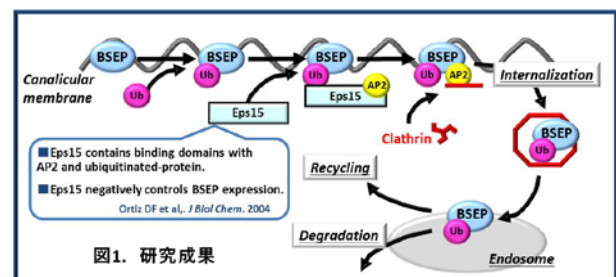
BSEPのキメラタンパク質を発現するMcA-RH7777細胞を構築し、UbのDN体がCMに発現する本キメラタンパク質の消失速度に及ぼす影響をTime lapse imagingを用いて評価することにより、BSEPのCMからの内在化に対するUb化の作用を検討した。

(2)我々はこれまでに、clathrin-mediated endocytosis(CME)のアダプタータンパク質であるAP2 adaptor complex(AP2)がBSEPのC末端に存在するチロシンモチーフと相互作用し、BSEPのCMEを促すことを見出している(Hayashi H, et al., Hepatology. 2012 55(6):1889-900)。本内在化経路と、上述のUb化を介したBSEPの内在化経路の関連性を検討すべく、AP2と相互作用できないBSEP変異体を作成し、UbのDN体が本BSEP変異体のCMからの内在化に及ぼす影響を(1)に記載した方法論を用いて評価した。

4. 研究成果(図1参照)

(1) Ub化がBSEPのCMからの内在化シグナルとして働き、CM発現量を負に制御していることが示唆された。

(2) CMでUb化を受けたBSEPは、Eps15、AP2の働きにより、クラスリン依存的な経路を介してCMから内在化していることが示唆された。



以上の成果は、CMに発現するBSEPの内在化経路に関わる分子機構を初めて明らかにしたものであり、肝臓学領域において重要な研究成果であるとともに、今後の難治性肝疾患の内科的治療法の開発に貢献するものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Misawa T, Hayashi H, Makishima M, Sugiyama Y, Hashimoto Y. E297G mutated bile salt export pump (BSEP) function enhancers derived from GW4064: structural development study and separation from farnesoid X receptor-agonistic activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 22(12):3962-6.
2. Misawa T, Hayashi H, Sugiyama Y, Hashimoto Y. Discovery and structural development of small molecules that enhance transport activity of bile salt export pump mutant associated with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *Bioorg Med Chem*. 2012 20(9):2940-9.
3. *Hayashi H, Naoi S, Nakagawa T, Nishikawa T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Kondo A, Kubo K, Yabuki T, Hattori A, Hirouchi M, Sugiyama Y. Sorting nexin 27 interacts with multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) and mediates internalization of MRP4. *J Biol Chem*. 2012 287(18):15054-65. *:Corresponding author
4. *Hayashi H, Inamura K, Aida K, Naoi S, Horikawa R, Nagasaka H, Takatani T, Fukushima T, Hattori A, Yabuki T, Horii I, Sugiyama Y. AP2 adaptor complex mediates bile salt export pump internalization and modulates its hepatocanicular expression and transport function. *Hepatology*. 2012 55(6):1889-900. *:Corresponding author
5. *Hayashi H, Mizuno T, Horikawa R, Nagasaka H, Yabuki T, Takikawa H, Sugiyama Y. 4-Phenylbutyrate modulates ubiquitination of hepatocanicular MRP2 and reduces serum total bilirubin concentration. *J Hepatol*. 2012 56(5):1136-44. *:Corresponding author
6. Mizuno T, *Hayashi H, Naoi S, Sugiyama Y. Ubiquitination is associated with lysosomal degradation of cell surface-resident ABCA1 through the ESCRT pathway. *Hepatology*. 2011 54(2):631-43. *:Corresponding author

7. Hori N, *Hayashi H, Sugiyama Y. Calpain-mediated cleavage negatively regulates the expression level of ABCG1. *Atherosclerosis*. 2011 215(2):383-91. *: Corresponding author

[学会発表] (計12件)

1. Hisamitsu Hayashi, NEW DRUG DEVELOPMENT FOR LIVER DISORDERS WITH INTRAHEPATIC CHOLESTASIS. 27th JSSX Annual Meeting, 2012/11/20, Tokyo
2. 林 久允, 稲村 香央里, 相田 健佑, 直井 壮太朗, 杉山 雄一 胆汁酸トランスポーターBSEPの内在化モチーフの探索 第20回肝病態生理研究会 2012/6/6 金沢
3. 林 久允, 稲村 香央里, 相田 健佑, 直井 壮太朗, 服部 麻美, 矢吹 崇吏, 杉山 雄一 胆汁酸トランスポーターBSEPの内在化に関わるモチーフの探索 第27年会日本薬剤学会 2012/5/24 神戸
4. 林 久允 胆汁酸トランスポーターBile Salt Export Pump(BSEP)を分子標的とする創薬 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2011/11/24 岡山
5. 林 久允, 稲村 香央里, 相田 健佑, 直井 壮太朗, 杉山 雄一 胆汁酸トランスポーター Bile salt export pump(BSEP/ABCB11) の AP2 adaptor complex(AP2)との相互作用部位の探索 第33回胆汁酸研究会 2011/11/19 大阪
6. Hisamitsu Hayashi, Tadahaya Mizuno, Reiko Horikawa, Hironori Nagasaka, Takashi Yabuki, Hajime Takikawa, and Yuichi Sugiyama. 4-Phenylbutyrate increases the hepatocanicular expression of MRP2/Mrp2 by modulating its ubiquitination and reduces serum total bilirubin concentration. 26th JSSX Annual Meeting, 2011/11/16, Hiroshima
7. Hisamitsu Hayashi, Kaori Inamura, Kensuke Aida, Sotaro Naoi, Asami Hattori, Takashi Yabuki, and Yuichi Sugiyama. AP2 adaptor complex mediates internalization of bile salt export pump and modulates its hepatocanicular expression and transport function. The 62nd Annual Meeting of

- AASLD 2011/11/4-8 San Francisco, USA
8. Hisamitsu Hayashi, Natsuki Hori, and Yuichi Sugiyama. NEGATIVE MODULATION OF ABCG1 EXPRESSION BY CALPAIN-MEDIATED CLEAVAGE. 9th ICCAD 2011/10/23-10/26, Venice, Italy
 9. Hisamitsu Hayashi, Tadahaya Mizuno, Sotaro Naoi, and Yuichi Sugiyama. Ubiquitination Directs Cell Surface-Resident ABCA1 to Lysosomal Degradation via ESCRT Machinery. 2011/8/7-11, Grindelwald, Switzerland
 10. 林 久允、堀 奈津貴、杉山 雄一 脂質トランスポーターABCG1 のcalpain分解経路を介した発現量制御機構の解明 第6回トランスポーター研究会 2011/6/10 仙台
 11. 林 久允、堀 奈津貴、杉山 雄一 脂質トランスポーターATP binding cassette transporter G1(ABCG1)の分解機構の解析 第26年会日本薬剤学会 2011/5/29 東京
 12. Hisamitsu Hayashi, Natsuki Hori, and Yuichi Sugiyama REGULATION OF ABCG1 EXPRESSION BY CALPAIN-MEDIATED CLEAVAGE. 4th IPISSX, 2011/4/22-25, Tainan, Taiwan

〔図書〕(計3件)

1. 水野 忠快、林 久允、杉山 雄一 細胞膜タンパク質のユビキチン化-リソソーム分解経路 生体の科学 63 巻 5 号
2. 林 久允 胆汁酸トランスポーターが関連する疾患と治療 医学のあゆみ 245 巻 1 号-トランスポーターと疾患研究の最前線-
3. 林 久允、杉山 雄一 胆汁酸トランスポーターのトラフィック制御による創薬 細胞工学 Vol.31 No.5-新たな創薬ターゲットとしてのトランスポーター-

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~molpk/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 久允 (HAYASHI HISAMITSU)

東京大学・大学院薬学系研究科・助教

研究者番号：10451858