

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670165

研究課題名(和文) 進行性家族性肝内胆汁うっ滞(PFIC)におけるflippaseの作用機序の解明

研究課題名(英文) Inadequate flip-flop of phosphatidylcholine is responsible for PFIC (progressive familial intrahepatic cholestasis).

研究代表者

高津 宏之(Takatsu, Hiroyuki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：70360576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞ではATP8B1とABCB4の両者は毛細胆管側の細胞膜に局限し、そのどちらか一方でも機能的に欠損するとPFICが発症する。一般的にPCは細胞膜では外葉に偏って存在しているとされている。したがって、正常な肝臓の毛細胆管の膜では、外葉に豊富なPCをATP8B1がフリップして細胞内に取り込み、それに続いてABCB4がABCB1と協調してPCと胆汁酸を排出し、スムーズで持続的な胆汁の分泌がなされている、というモデルを我々は提唱する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established an assay for phospholipid flippase activities of plasma membrane localized P4-ATPases using human cell lines stably expressing ATP8B1, ATP8B2, ATP11A, and ATP11C. ATP8B1 and ATP8B2 exhibited preferential flippase activities towards PC. Some ATP8B1 mutants found in patients of progressive familial intrahepatic cholestasis type 1 (PFIC1), a severe liver disease caused by impaired bile flow, failed to translocate PC in spite of their delivery to the plasma membrane. Moreover, incorporation of PC mediated by ATP8B1 can be reversed by simultaneous expression of ABCB4, a PC floppase mutated in PFIC3 patients. Our findings elucidate the flippase activities and substrate specificities of plasma membrane localized human P4-ATPases and suggest that phenotypes of some PFIC1 patients result from impairment of the PC-flippase activity of ATP8B1.

研究分野：細胞生物学

キーワード：PFIC

1. 研究開始当初の背景

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症(PFIC)は、胆汁の分泌がうまくできずに肝臓の細胞内に蓄積し、その結果として黄疸や強い掻痒感をきたし、加齢とともに肝硬変の危険性が高くなることが知られている遺伝性の疾患であり、10万人に一人が罹患している。PFICの原因遺伝子は3つあることが既に明らかとなっており、I型がATP8B1(別名FIC1)、II型がABCB11、III型がABCB4、と変異遺伝子により分類されている。このうち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)を脂質二重層の内葉から外葉にフロップするfloppaseとして各々機能しており、胆汁の分泌と密接に関わることが示されている。これに対してP4-ATPaseであるATP8B1はホスファチジルセリン(PS)を脂質二重層の外葉から内葉にフリップするflippaseとして知られていたものの、PSの動態制御が胆汁の分泌にいかに関与するのか、全く謎のままであった。

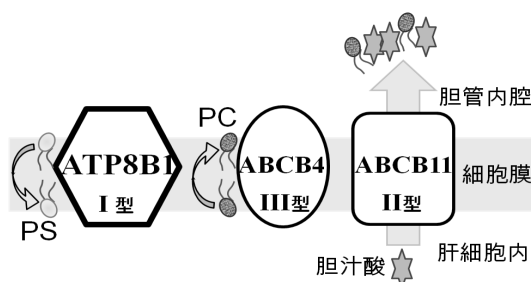


図1: 進行性家族性肝内胆汁うっ滞症(PFIC)の原因因子

私は、メンブレントラフィックの分子機構に関する研究を行ってきた中で、生体膜の動態に興味を持ち、ヒトP4-ATPaseの研究に着手し、これまでに全13種類のflippaseの細胞内局在を決定した。次の段階として、flippaseとしての活性と基質特異性を調べるために、培養細胞を用いたflippase活性測定系を立ち上げ、ATP8B1を含む13種類のP4-ATPaseのflippase

活性を調べた。意外なことに、ATP8B1はこれまでPSに対するflippaseとして報告されていたものの、私の実験結果によるとPCに対するflippase活性を有することが明らかとなった。ATP8B1がPCの動態制御に関わるという新たな事実は、胆汁うっ滞の発症の分子メカニズムをひも解く重大なカギとなるものと確信している。

2. 研究の目的

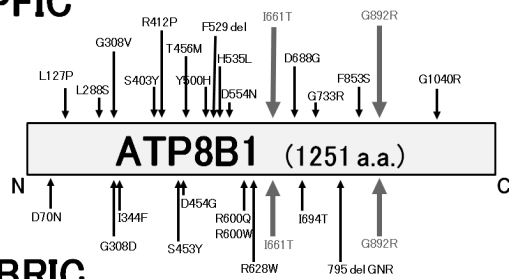
ATP8B1を原因とする進行性家族性肝内胆汁うっ滞症(PFIC)は、より症状の軽い良性反復性肝内胆汁うっ滞(BRIC)と細分される。疾患の原因となるATP8B1の点変異は20か所以上存在し、PFICとBRICの両者において異なることが分かっている。ATP8B1の既知の変異体を導入した培養細胞を用いてflippase活性を測定することで、ATP8B1のPCに対するflippase活性と胆汁うっ滞発症の相関を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ATP8B1のホスファチジルコリン(PC)特異的なflippase活性と、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症(PFIC)の相関を明らかにするために、以下の項目について研究を行った。

- (1) PFICの原因となるATP8B1の変異体を作製し、各々の変異体安定発現細胞株を樹立した。
- (2) ATP8B1の変異体の細胞膜表在化の有無を検証した。
- (3) ATP8B1変異体発現細胞株のPCに対するflippase活性を測定した。
- (4) PCに対するflippaseとしてのATP8B1とfloppaseとしてのABCB4の相互関係を検証した。
- (5) ATP8B1のflippase活性とPFIC発症の関係を考察した。

PFIC



BRIC

図2: PFIC (I型)とBRICの原因となるATP8B1の変異

4. 研究成果

これまでの結果、我々が改良したフリッパーゼ活性測定アッセイで意外なことに ATP8B1 は PS よりも PC に対して特異的なフリッパーゼ活性を示すという結果が得られた。PFIC および、より症状の軽い良性反復性肝内胆汁うっ滞(BRIC)の原因となる ATP8B1 の変異のうち 8 つを選定し、そのウィルス発現ベクターを作製し、HeLa 細胞で発現させた。その結果、多くの変異体は本来、局在すべき細胞膜には局在できずに分解されてしまうことが確かめられた。その中で、L127P、I344F の二つの変異体は、野生型と同程度に細胞膜に局在することが新たに分かった。そこで、これらの変異体のフリッパーゼ活性を測定したところ、野生型で見られた PC に対するフリッパーゼ活性が欠失していることが明らかとなった。

そこで、PC に対する相反する動き、ATP8B1 によるフリップと ABCB4 によるフロップが互いに相関性のあるものか否かを検証するため、両者を共発現させた細胞で PC の取り込みの変化を調べた。その結果、ATP8B1 のフリップにより取り込まれる PC の量が、ABCB4 の共発現によって見かけ上、減少することが明らかとなり、両者のフリップ-フロップに相関性があることが分かった。肝細胞では ATP8B1 と ABCB4 の両者は毛細胆管側の細胞膜に限局し、そのどちらか一方でも機能的に欠損すると PFIC が発症する。一般的に PC は

細胞膜では外葉に偏って存在しているとされている。したがって、正常な肝臓の毛細胆管の膜では、外葉に豊富な PC を ATP8B1 がフリップして細胞内に取り込み、それに続いて ABCB4 が ABCB11 と協調して PC と胆汁酸を排出し、スムーズで持続的な胆汁の分泌がなされている、というモデルを提唱した。

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 1 件)

Takatsu H., Tanaka G., Segawa K., Suzuki J., Nagata S., Nakayama K., Shin HW. (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

[学会発表](計 3 件)

高津宏之、ほか二名

ATP8B1 (FIC1, familial intrahepatic cholestasis 1) はホスファチジルセリンではなく、ホスファチジルコリンのフリッパーゼである。

第 86 回日本生化学会

2013 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜

小野夏生、高津宏之、ほか二名

脂質二重層の非対称性を調節する P4-ATPase のリサイクリング経路における機能解析。

第 86 回日本生化学会

2013 年 9 月 13 日、パシフィコ横浜

高津宏之、ほか三名

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。

第 87 回日本生化学会

2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高津宏之(Takatsu, Hiroyuki)
京都大学・大学院薬学研究科・研究員
研究者番号：70360576

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：