

Title	輸送体を介したスフィンゴシン1リン酸の細胞外放出機構
Author(s)	小林, 直木
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/1365">http://hdl.handle.net/11094/1365</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 小 林 直 木

博士の専攻分野の名称 博士(薬学)

学位記番号 第 21949 号

学位授与年月日 平成 20 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

薬学研究科分子薬科学専攻

学位論文名 輸送体を介したスフィンゴシン 1 リン酸の細胞外放出機構

論文審査委員 (主査)

教授 山口 明人

(副査)

教授 前田 正知 教授 馬場 明道 教授 土井 健史

#### 論文内容の要旨

脂溶性の細胞間情報伝達物質であるスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は、標的細胞の細胞膜に存在する特異的な受容体に結合し、細胞の増殖や分化、遊走などを引き起こす。S1P によって引き起こされる細胞応答は、細胞が正常に機能する上で極めて重要であることから、S1P 産生細胞からの S1P の放出は調節を受けている必要があるが、その放出機構はほとんど明らかになっていない。

S1P 産生細胞の 1 つである血小板において生成した S1P は、血小板に高濃度に蓄積しており、血管内皮細胞の損傷部位においてトロンビンなどの刺激により局所的に放出されることが分かっている。私たちは、刺激依存的な S1P の放出が何らかの輸送体によるもののではないかと考え、血小板からの S1P 放出機構の解析を進めてきた。これまでに、S1P が ATP 及び  $Ca^{2+}$  依存的に細胞外へ放出されることを見出しており、それぞれ ABCA タイプの輸送体とリン脂質スクランブラーゼが関与する可能性を示している。

一方、最近になって赤血球において産生される S1P の役割が明らかになってきた。赤血球から放出される S1P は血漿中に一定濃度存在する S1P の主要な供給源になり、この血漿中の S1P が胸腺、脾臓からのリンパ球の放出に重要だということが報告された。そこで、本研究では、これまで我々が解析してきた血小板からの S1P 放出機構との比較により赤血球からの S1P 放出機構を明らかにすると共に、その輸送体同定のため、S1P 輸送体の酵素化学的性質を解析した。

はじめに、ラット赤血球を用いてスフィンゴシンの細胞内への取り込みと S1P 放出の時間依存性を調べた。スフィンゴシンは赤血球懸濁液に添加すると速やかに取り込まれ、細胞内で S1P に変換された。細胞内で合成された S1P は、時間依存的に細胞外へ放出された。また、血小板において S1P の放出を促進したトロンビンや PKC (protein kinase C) の活性化剤である TPA、 $Ca^{2+}$  を赤血球に対して加えたが、S1P の放出量はほとんど変化しなかった。これらの結果から、血小板とは異なり、赤血球からの S1P の放出は常に活性化されていて、刺激による活性化を必要とせず、刺激によりさらなる活性化も起こらないことが分かった。また、 $Ca^{2+}$  により S1P の放出が促進されないことから、赤血球においては、血小板とは異なり、 $Ca^{2+}$  に依存した S1P の放出機構が存在しないと考えられる。

この赤血球からの S1P の放出に、血小板と同様、ABC 輸送体が関与しているかどうかを調べるため、ABC 輸送体の阻害剤を用いて S1P 放出への阻害効果を調べた。その結果、MRP の阻害剤である MK571 や MDR の阻害剤であ

る Cyclosporine A によっては放出が阻害されず、ABCA1 の阻害剤である Glyburide により放出が阻害された。このことから赤血球からの S1P 放出にも血小板と同様、ABCA タイプの輸送体が関与している可能性が示唆された。

次に、赤血球の反転膜小胞を用いて、S1P の放出が ATP 依存的な輸送体によるものなのかどうかを詳細に解析した。赤血球の反転膜小胞に S1P と ATP を加えると時間依存的な反転膜への S1P の取込みが観察された。一方、ATP を加えない場合や AMP を加えた場合には、S1P の取込みはほとんど起こらなかった。この ATP 依存的な S1P の取り込みは、S1P と ATP の濃度に依存して増加し、S1P の方はおよそ  $50\ \mu\text{M}$ 、ATP の方ではおよそ  $300\ \mu\text{M}$  程度で飽和状態に達し、ミカエリスメンテン型の酵素活性を示した。それぞれのグラフから Km 値を求めると、S1P は  $21\ \mu\text{M}$ 、ATP は  $130\ \mu\text{M}$  と算出された。

ATP 依存的に S1P が輸送されることを明らかにしたが、その輸送が ATPase による直接的なものである可能性と、イオン輸送性 ATPase により形成されるイオンの濃度勾配などに依存した二次的なものである可能性が考えられた。そこで、イオン濃度勾配の S1P 輸送に対する影響を調べるために、イオノフォアや  $\text{H}^+$ -ATPase 及び  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATPase 阻害剤存在下での ATP 依存的な S1P の取り込みを調べたところ、いずれを用いた場合でも取り込みは阻害されなかった。これらの結果から、S1P の取込みは、イオン輸送性 ATPase によって形成されるイオン濃度勾配による二次的な輸送ではないことが分かった。

インタクトの赤血球からの S1P の放出には ABCA タイプの輸送体が関与している可能性が示唆されたことから、赤血球反転膜への ATP 依存的な S1P 取り込みに対する ABC 輸送体阻害剤の影響を調べた。その結果、インタクトの赤血球の場合と同様に、MK571 と Cyclosporine A は S1P の取り込みを阻害せず、ABCA1 の阻害剤である Glyburide により取り込みが阻害された。また、ATPase の阻害剤である Vanadate によっても取り込みが阻害された。赤血球反転膜には ABCC4(MRP4) 及び ABCC5(MRP5) が存在し、ATP 依存的に cGMP を取込むことが知られていることから、cGMP の取込みに対する ABC 輸送体阻害剤の効果を調べた。反転膜への cGMP の取込みに対する Glyburide、MK571、Vanadate の効果を調べたところ、いずれの阻害剤を加えた場合にも輸送の阻害が見られた。これらの結果から、S1P の輸送は、少なくとも MRP4 や MRP5 によるものではなく、Vanadate に感受性の ABCA タイプの輸送体によるものであると考えた。Glyburide と Vanadate については、S1P 取込み阻害の濃度依存性を調べた。Glyburide は高い濃度においても完全な阻害を示さなかったが、最も阻害したときの値を完全な阻害と仮定し、Glyburide 及び Vanadate の  $\text{IC}_{50}$  値を求めると、それぞれ  $72\ \mu\text{M}$ 、 $667\ \mu\text{M}$  と算出された。Vanadate と Glyburide を同時に加えた場合、S1P の取込みは相加的に阻害されないという結果から、赤血球においては Vanadate に感受性の ABCA タイプの輸送体が単独で ATP 依存的に S1P を放出していると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

小林直木君の博士論文「輸送体を介したスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) の細胞外放出機構」に関して審査を行った。スフィンゴシン 1 リン酸は脂質メディエーターの一つで、血小板や赤血球から分泌され、血管新生やリンパ球の放出などに深く関わっている。ところが、その細胞からの分泌機構についてはこれまで全く知見がなかった。申請者の所属する研究室では、血小板からの S1P 分泌について研究し、トロンビンなどの刺激によって放出され、ABCA タンパク質様の膜輸送体に仲介された排出であることを報告していた。S1P は血小板内部に高濃度に蓄積され、刺激により放出されるため、血管障害部位などで局所的に S1P 濃度を高めるのに役立つが、血液中に常時存在する S1P は赤血球から供給されるとされている。本論文では、赤血球での S1P 放出機構を詳しく解析した。血小板とは異なり、S1P は赤血球からは刺激に依存せず、定常的に分泌される。しかしその分泌は血小板同様、分泌小胞からの開口放出ではなく、膜輸送体によるものであることが示された。さらに、分泌は ABCA タンパク阻害剤で阻害された。さらに、赤血球反転膜を用いて、輸送機構の生化学的性質が詳細に解析された。本研究は、分泌輸送仲介型情報伝達という、これまでにない新しい学問分野の確立に向けた確かな一歩であり、大阪大学大学院薬学研究科博士の学位にふさわしいものと認められる。