



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	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1365
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

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

学位申請者

大阪大学大学院薬学研究科・分子薬科学専攻・細胞生物学研究分野
大阪大学産業科学研究所・生体応答科学研究部門・生体情報制御学研究分野
小林直木

2008年3月

主論文目録

本学位論文の内容は下記の論文による

1. Kobayashi, N., Kobayashi, N., Nishi, T. and Yamaguchi, A.
Characterization of ATP-dependent sphingosine-1-phosphate transport in
rat erythrocytes.
In preparation

参考論文

1. Kobayashi, N., Tamura, N., Murakami, S. and Yamaguchi, A.
Essential residues that determine the difference in the substrate
specificity of AcrB and AcrD.
In preparation

目次

略語	5
序論	7
本論	12
第一章 材料と方法	13
1-1 赤血球の調製	13
1-2 赤血球からの S1P 放出の測定	13
1-3 脂質分析法	13
1-4 赤血球反転膜小胞の作製	14
1-5 赤血球反転膜小胞への S1P 取り込み活性の測定	15
1-6 赤血球反転膜小胞への cGMP 取り込み活性の測定	15
第二章 赤血球からの S1P 放出機構の解析	16
2-1 はじめに	17
2-2 赤血球における S1P の合成と、細胞外への放出の時間依存性	18
2-3 赤血球からの S1P 放出の刺激依存性	19
2-4 赤血球からの S1P 放出に対する ABC 輸送体の阻害剤の影響	20
2-5 考察	21
第三章 S1P 輸送体の酵素化学的解析	24
3-1 はじめに	25
3-2 赤血球反転膜小胞への ATP 依存的 S1P 取込み活性の測定	28
3-3 S1P 取込みに対する S1P 及び ATP 濃度の影響	29

3-4	S1P 取込みに対するイオノフォア及び ATPase 阻害剤の影響	30
3-5	S1P 取込みに対する ABC 輸送体の阻害剤の影響	31
3-6	Glyburide と Vanadate による S1P 取込み阻害の 濃度依存性	33
3-7	考察	35
第四章 総括		39
第五章 引用文献		42
謝辞		54

略語

ABC	ATP binding cassette
ABCA1	ATP-binding cassette protein A1
ACD	acid citrate dextrose
ATX	α -toxin
BSA	bovine serum albumin
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid
HDL	high density lipoprotein
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
K _{ATP}	ATP-sensitive K ⁺ channel
LDH	lactate dehydrogenase
LTC ₄	leukotrien C ₄
MAPK	mitogen activated protein kinase
MDR	multidrug resistance protein
MRP	multidrug resistance-associated protein
PAF	platelet activating factor
PC	phosphatidylcholine
PE	phosphatidylethanolamine
PG	prostaglandin
PKC	protein kinase C
PLSCR	phospholipids scramblase
PS	phosphatidylserine
SLO	streptolysin O
SM	sphingomyelin
SUR	sulfonylurea receptor
S1P	sphingosine 1-phosphate
Thr	thrombin
TLC	thin layer chromatography
TPA	12-O-tetradodecanoylphorbol-13-acetate
Tris	tris (hydroxymethyl)aminomethane

TritonX-100 polyethylene glycol mono-p-isoctylphenyl ether
VGLUT vesicular glutamate transporter
VMAT vesicular monoamine transporter

序論

哺乳類を含む多細胞生物は、一群の細胞集団を組織として機能させるため、常に細胞間で情報伝達物質のやりとりを行い、個体の恒常性を維持している。細胞間情報伝達物質は、標的細胞の細胞膜に存在する特異的な受容体に結合し、様々な細胞応答を引き起こすことが知られているが、その細胞応答を制御する上で情報伝達物質の放出機構が非常に重要なポイントになっている。神経伝達物質であるグルタミン酸やカテコールアミンは細胞質で合成され、vesicular glutamate transporter (VGLUT) と vesicular monoamine transporter (VMAT)によりそれぞれシナプス小胞へ蓄積され、活動電位の到達と共に開口放出される(1-3)。また、インスリンなどのペプチド分子は、シグナルシークエンスにより小胞体へ輸送され、ゴルジ体を経て分泌小胞に送られた後に開口放出される(4)。グルタミン酸やカテコールアミン、インスリンなどの水溶性の細胞間情報伝達物質に関しては、細胞外への放出機構が細かく分かってきている。一方、ホルモンや脂溶性ビタミンなどの生理活性脂質は脂溶性であるという性質上、それらの産生細胞から単純拡散により細胞外へ放出されると考えられてきたため(5)、細胞からの放出機構についての解析はあまり行われていない。

スフィンゴシン1リン酸 (S1P) (Fig.1)は、産生細胞からの放出機構がよく分かっていない生理活性脂質の1つである。S1Pは、それを特異的に感知するG蛋白質共役型のS1P受容体が5種類同定されており、S1P受容体を介した細胞内での情報伝達経路に関してはかなり解明されてきている(6)。S1PがS1P受容体に結合すると、G蛋白質を介して、mitogen activated protein kinase (MAPK)やアデニル酸シクラーゼ、ホスホリパーゼCなどの活性が変化する。その結果、細胞の増殖や分化、遊走などが引き起こされる(6)。S1P受容体の1つであるS1P₁のノックアウトマウスでは、血管平滑筋細胞と血管内皮細胞の遊走が正常に起こらないために、血管壁形成不全を引き起こし、胎生13日程度で出血多量のため死に至ることが報告されている(7)。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

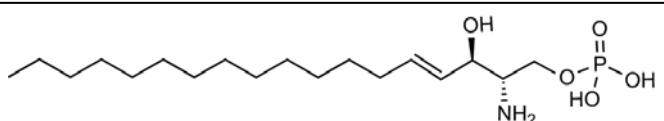
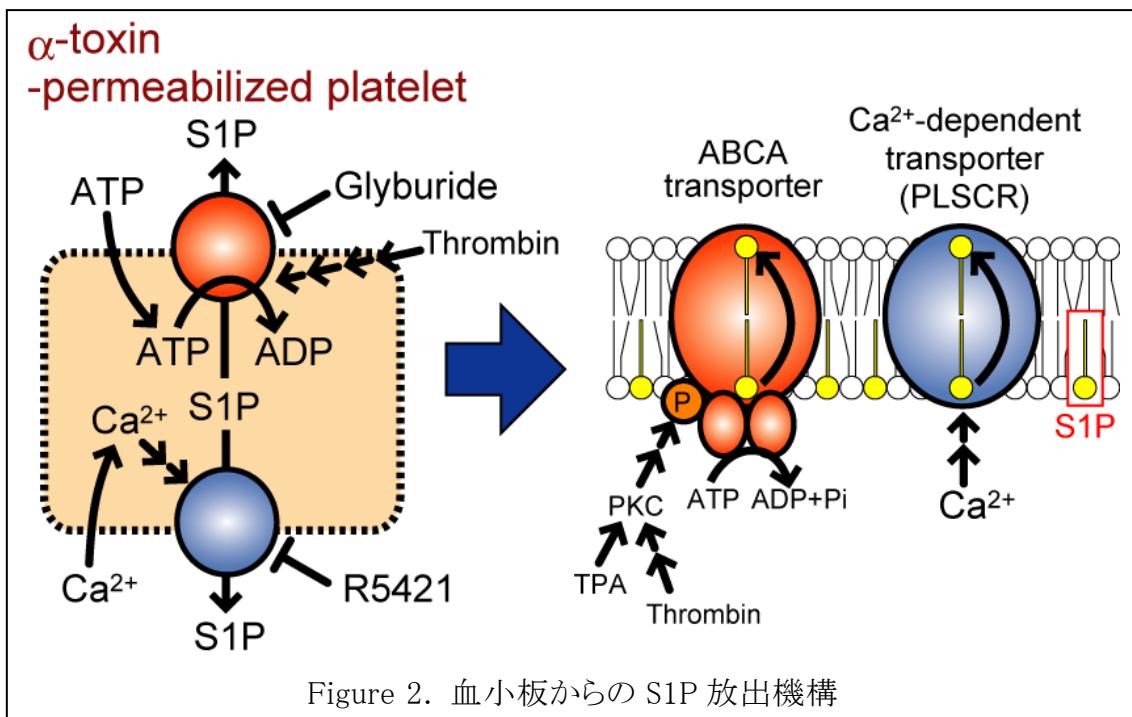


Figure 1. スフィンゴシン1リン酸(S1P)の化学構造

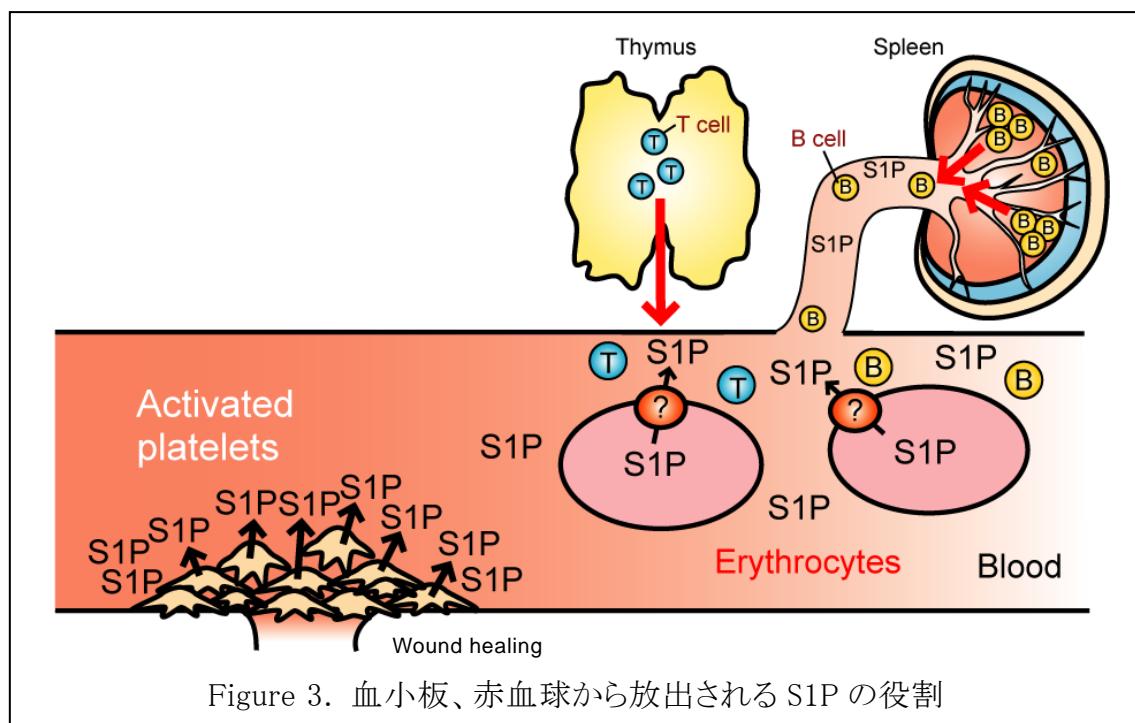
ことから、S1P 産生細胞からの放出機構がどのように調節を受けているかについて解明が待たれていた。

S1P は親水基（リン酸）を持つ生理活性脂質であることから、単純拡散により容易に細胞膜を通過しないと考えられる。細胞膜は、蛋白質とリン脂質、糖脂質、コレステロールを主成分とする脂質二重層であり、脂質分子の一つの層からもう一つの層への移動（フリップフロップ）は高頻度に起こっている。しかし、蛋白質を含まない人工的な脂質膜では、脂質分子のフリップフロップは非常に遅い反応であることが知られている(8)。また、細胞膜を構成する脂質は内葉と外葉において不均一であることが知られており、フォスファチジルコリン（PC）やスフィンゴミエリン（SM）は外葉に、フォスファチジルセリン（PS）やフォスファチジルイノシトール（PI）、フォスファチジルエタノールアミン（PE）は内葉に偏って存在する(9, 10)。この細胞膜における脂質の非対称性は、脂質をフリップフロップする輸送体により作られていることが近年明らかになってきた(11)。脂質は細胞膜を自由に移動するだけではなく、何らかの輸送体により局在が厳密に制御されている。

S1P 産生細胞の一つである血小板において生成した S1P は膜を介して自由に拡散するのではなく、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 S1P を局所的に放出することが分かっている(12)。この血管内皮細胞の損傷部位で放出される S1P は、血管内皮細胞の増殖や遊走に重要であることが示されている(13)。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な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(Fig.2) (14)。これまでに、血小板の細胞膜に異なる大きさの穴を開けたセミインタクト細胞を用いて、S1P の細胞内局在と放出のエネルギー依存性を調べている。SLO を用いて細胞膜に少し大きめの穴を開けると、S1P は細胞質の蛋白質である LDH と同じく細胞外へ漏出するが、分泌顆粒内に存在する物質は漏出しなかった。このことは、S1P が細胞膜の内葉もしくは細胞内膜系の細胞質側に局在していることを示している。さらに、ATX により S1P が漏出しない大きさの穴を開け、ATP 及び Ca^{2+} を枯渇させた血小板を作製した。この血小板に ATP もしくは Ca^{2+} を単独で加えた場合、開口放出は起こらずに、S1P が細胞外へ放出されることを見出した。この ATP 及び Ca^{2+} 依存的な S1P の放出が ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1)の阻害剤 (Glyburide) 及びリン脂質スクランブラー (PLSCR) の阻害剤 (R5421) によりそれぞれ阻害されることを明らかにしている。これらの結果から、血小板においては、ABCA



タイプの輸送体と PLSCR の 2 種類の輸送体により S1P が細胞外へ放出される可能性を示している。

一方、S1P は血小板以外にもマスト細胞や赤血球などの細胞にも存在することが示されていた。しかし、血液中に最も多く存在する赤血球において S1P が合成される生理的意義がこれまで不明であった。最近になって、この赤血球において產生される S1P の役割が明らかになってきた。血小板から刺激依存的に放出される S1P が血管内皮細胞損傷部位で局所的に作用するのに対し、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(Fig.3)(15)。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。

本論
第一章
材料と方法

1-1: 赤血球の調製

10 週齢から 14 週齢の Wistar ST ラットをジエチルエーテルで麻酔し、外頸静脈から採血を行った。採血はテルモ静注針 23G と抗凝固剤として Acid citrate Dextrose (ACD) 溶液(0.8% citric acid, 2.2% sodium citrate, 2.45% glucose)を用いた。血液を 800 μ l 程度採り、1.5 ml のチューブに移してから遠心分離(20°C、500 \times g、15 分、ブレーキオフ)した。2 層に分離したものの中、下層の赤血球を 50 μ l 取り、そこに 1% (w/v) BSA (fatty acid free BSA (sigma))を含む Buffer A (20 mM Hepes-NaOH (pH=7.4), 138 mM NaCl, 3.3 mM NaH₂PO₄, 2.9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mg/ml glucose)を 1 ml 加え、懸濁した後、遠心分離(20°C、500 \times g、10 分、ブレーキオフ)した。上清を取り除き、1% (w/v) BSA を含む Buffer A を 1 ml 加え、懸濁した後同様に遠心分離した。得られた沈殿を 1000 倍希釈し、血球計算盤により赤血球数を計測した。赤血球の懸濁液に適当な量の 1% (w/v) BSA を含む Buffer A を加え、1 \times 10⁷ cells/ml の濃度にした。

1-2: 赤血球からの S1P 放出の測定

赤血球懸濁液(1 \times 10⁷ cells/ml)180 μ l を阻害剤存在下で 37°C, 60 分間保温、もしくは非存在下で 37°C, 5 分間保温した。その後、0.4 μ l の 5 μ M [³H]スフィンゴシン (0.1 μ Ci) と 9.6 μ l の 1% (w/v) BSA を含む Buffer A の混合液を加え、37°C で任意の時間保温した。ラットトロンビン (Sigma, 終濃度 5 NIH Unit/ml), TPA (Sigma, 終濃度 0.16 μ M), A23187 (Sigma, 終濃度 10 μ M), CaCl₂ (ナカライトスク, 終濃度 2 mM)を加える場合には、[³H]スフィンゴシンを添加してから 2 min 後に 10 μ l の溶液を加えた。37°C で保温した後、遠心分離(4°C、12000 \times g、5 秒)を行い、バッファーと赤血球を分離した。沈殿は 200 μ l の 1% (w/v) BSA を含む Buffer A に再懸濁し、それぞれに含まれる脂質を以下の方法に従って解析した。

1-3: 脂質分析法 (16)

1 volume のサンプルへ 3.75 volume の chloroform/MeOH/ conc.HCl (100:200:1)を加え、激しく攪拌した。そこに、chloroform と 1% KCl を 1.25

volume ずつ加え、激しく攪拌した後、遠心分離(常温、1000 x g、10 分)した。下層を別のチューブに取り、遠心エバポレーターで乾燥させた。乾固物を 15 μ l の chloroform/MeOH (2:1)に懸濁した後、Thin layer chromatography (TLC) プレート (MERCK HPTLC plate 1.05641) に全量アプライし、BuOH/acetic acid/water (3:1:1)を展開溶媒として展開した。TLC プレートを乾燥させた後、imaging plate と FLA 3000G fluorescence image analyzer (富士フィルム)を用いて、放射活性を画像化した。

1-4: 赤血球反転膜小胞の作製

赤血球反転膜小胞の作製は、Steck らの方法(17)を改変して行った。10 週齢から 14 週齢の Wistar ST ラットをジエチルエーテルで麻酔し、心臓採血を行った。採血はテルモ翼付静注針 19G と抗凝固剤として Acid citrate Dextrose (ACD) 溶液を用いて行った。採血した血液を 15 ml のプラスティック遠心管に移し遠心分離(20°C、500 x g、10 分、ブレーキオフ)した。上清を取り除き、1 volume の 1% (w/v) BSA を含む Buffer A と 0.4 volume の ACD を加えて再懸濁し、遠心分離(20°C、500 x g、10 分)した。上清を取り除き、再度 1 volume の 1% (w/v) BSA を含む Buffer A と 0.4 volume の ACD を加えて懸濁し、遠心分離(20°C、500 x g、10 分)した。上清を取り除き、5 volume の 1% (w/v) BSA を含む Buffer A と 1.2 volume の ACD を加えて懸濁し、遠心分離(20°C、500 x g、10 分)した。上清を取り除いた後、氷上に置き、20 volume の RBC lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH=7.4), 1mM EDTA)を加え、溶血させた。遠心分離(4°C、28000 x g、10 分)した後、上清を取り除き、同量の RBC lysis buffer により沈殿を 2 回洗浄した。得られた沈殿(ghost)に 40 ml の Vesiculation buffer (0.5 mM Tris-HCl (pH=8.1), 0.1% BSA) /1 ml ghost を加え、懸濁した後、一晩氷上に放置した。それを遠心分離(4°C、30000 x g、30 分)した後、上清を取り除き、1 ml の Vesiculation buffer (0.5 mM Tris-HCl (pH=8.1), 0.1% BSA) /1 ml ghost により沈殿を懸濁し、3/4 inch の 27G 注射針(トップ)を 5 回通過させた。1 ml の Vesiculation buffer /1 ml ghost を加えて懸濁した後、4.5 ml の Dextran barrier solution (0.5 mM Tris-HCl (pH=8.1), 4.46% (w/v)dextran 70) /1 ml ghost に重層し、

遠心分離(4°C、30000 x g、40分、ブレーキオフ)した。上層と下層の界面の層(vesicles)を分取し、40 ml Vesiculation buffer /1ml vesicles を加えて懸濁した後、遠心分離(4°C、30000 x g、30分)した。上清を取り除き、沈殿を同様の操作により洗浄した後、0.1% (w/v) BSA を含む 10 mM Tris-HCl (pH=7.4)を 200 μ l /1 ml ghost 加え、懸濁した後に液体窒素中で凍結させ、使用するまで-80°C で保存した。

1-5: 赤血球反転膜小胞への S1P 取り込み活性の測定

凍結させておいた赤血球反転膜を 37°C で融解し、氷上に置いた。50 μ g の赤血球反転膜と 1 μ M の sphingosine 1-phosphate (Avanti)、66.6 pM の [³³P]sphingosine 1-phosphate (ARC)、10 mM MgCl₂、0.1% (w/v) BSA を含む 90 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH=7.4)溶液を 37°C で 5 分間保温した。10 μ l の 200 mM の MgATP または MgAMP、MgCl₂を加えて反応を開始し、37°C で任意の時間保温した後に 850 μ l の ice-cold buffer (10 mM Tris-HCl (pH=7.4), 10 mM EDTA, 10 mM Vanadate, 1% BSA)を加え、反応を停止した。反応液を遠心分離し(4°C、100000 x g、5分)、上清を取り除いた後に 1 ml の ice-cold buffer (10 mM Tris-HCl (pH=7.4), 10 mM EDTA, 10 mM Vanadate, 1% BSA)で超遠心チューブの内側を 2 回洗浄した。沈殿に 100 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH=7.4), 1% TritonX-100 溶液を加え、溶解した後に、10 ml の Ultima Gold™ XR (Perkin Elmer, Boston, MA, USA)と混合し、10 min 放置した後にカウントを測定した。

1-6: 赤血球反転膜小胞への cGMP 取り込み活性の測定

1-5 の方法で、sphingosine 1-phosphate と [³³P]sphingosine 1-phosphate を 1 μ M の [³H]cGMP に置き換えて行った。

第二章

赤血球からの S1P 放出機構の解析

2-1: はじめに

S1P は血液中に豊富に存在する細胞間情報伝達物質であり、血漿中には 150 nM 程度の S1P が存在している(18)。一定濃度の S1P が存在する血液と、S1P が低濃度に保たれているリンパ球産生組織との間の S1P の濃度勾配がリンパ球産生組織からのリンパ球の放出に重要であることが知られている(19-21)。また、S1P 受容体の 1 つである S1P₁を欠損させたマウスを用いた解析から、S1P₁がリンパ球産生組織からのリンパ球の放出に必要であることが示されている(20, 22, 23)。しかし、血漿中に一定濃度存在する S1P がどの細胞からどれくらい供給されるのかについては、ほとんど明らかになつていなかつた。血小板には高濃度の S1P が蓄積されていることから、かつては血漿中の S1P は血小板から放出されたものであると考えられていた(24)。

最近になって、赤血球から放出される S1P の役割が明らかになつてきた。赤血球は血液中に最も豊富に存在する細胞成分で、全血液量の約 45%を占めている。赤血球は細胞質に大量のヘモグロビンを保持しており、酸素と二酸化炭素の運搬に重要な働きをしているが、細胞間情報伝達物質を豊富に蓄積している血小板などとは違つて、情報伝達物質の放出細胞としてはほとんど注目されることがなかつた。しかし最近、赤血球から放出される S1P が血漿中に存在する S1P の主要な供給源になつており、胸腺や脾臓からのリンパ球の放出に重要なことが報告された(15)。赤血球から放出される S1P の役割が明らかになつてきたのと同時に、私も S1P が赤血球において合成され、細胞外へ放出されることを見出した（本章 2-2）。赤血球からの S1P 放出機構の解析は、血漿中の S1P 濃度を維持する仕組みを理解する上で非常に重要なと考えられる。すでに血小板からの S1P 放出機構に関しては、S1P の放出が刺激依存的であり、ATP 及び Ca^{2+} 依存的な 2 つの輸送体により S1P が放出されることを明らかにしている(14)。このことから、赤血球からの S1P 放出の刺激依存性（本章 2-3）と、S1P 放出機構における輸送体の関与（本章 2-4）について解析を行つた。

2-2: 赤血球における S1P の合成と、細胞外への放出の時間依存性

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 の合成、細胞外への S1P 放出の時間依存性を調べた。すでに、血小板からの S1P の放出には、S1P のキャリアー蛋白質として BSA が必要であることが分かっていることから(14)、赤血球からの S1P 放出もキャリアー蛋白質として BSA を用いた。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(Fig.2-1)。スフィンゴシンを加えてから 4 分後には細胞外のスフィンゴシン量は約半分に減少し、細胞内の S1P 量は最大値に達した。スフィンゴシンを添加してから 2 分後に S1P の細胞外への放出が始まり、時間依存的に放出量が増加した。これらの結果から、スフィンゴシンの取込み後、S1P の合成は非常に速い速度で起こり、また、赤血球に対して特に刺激を与えなくても細胞内の S1P は細胞外に放出されること

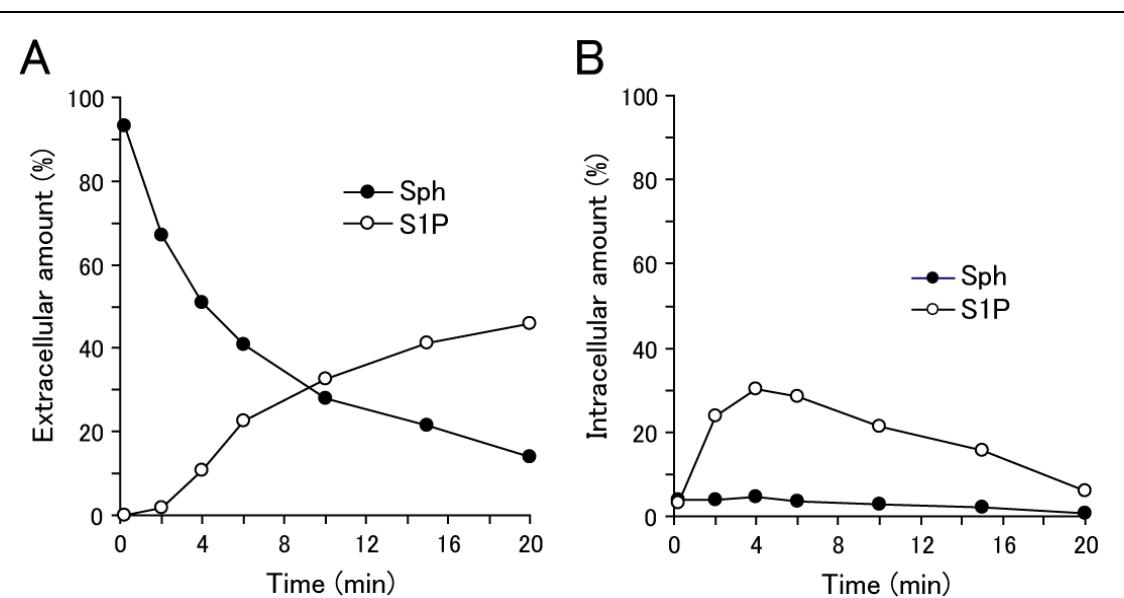


Figure 2-1. 赤血球における S1P 放出の時間依存性

赤血球懸濁液に^{[3]H}スフィンゴシンを添加し、37°C で任意の時間保温した後、遠心分離によりバッファーと赤血球を分離した。バッファー(A)と赤血球(B)から脂質を抽出して TLC により展開し、^{[3]H}スフィンゴシン及び^{[3]H}S1P の放射活性を Imaging plate により画像化し、定量した。黒丸はスフィンゴシンを、白丸は S1P をそれぞれ示している。グラフの縦軸はバッファーまたは赤血球中の活性が全体の活性に占める割合で記した。実験は2回行い、同様の結果が得られた。

が明らかになった。これは、血小板がトロンビンなどの刺激に依存して S1P を放出する(14)という特徴と大きく異なっている。また、血小板にスフィンゴシンを添加した場合には S1P と共にセラミドが合成されるのに対して、赤血球にスフィンゴシンを添加した場合にはセラミドが合成されなかった (data not shown)。したがって血小板とは異なり、赤血球にはスフィンゴシンからセラミドを合成する酵素が存在しないと考えられる。

2-3: 赤血球からの S1P 放出の刺激依存性

本章 2-2 の結果から、血小板とは異なり、赤血球からの S1P の放出にはトロンビンなどの刺激が必要ないことが明らかになった。ここでは、赤血球に対してトロンビンなどの刺激を与えた場合に S1P の放出が促進されるか否かについて解析を行った (Fig.2-2)。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 イオン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。このことから、血小板とは異なり、赤血球からの S1P の放出はすでに活性化されていて、刺激により

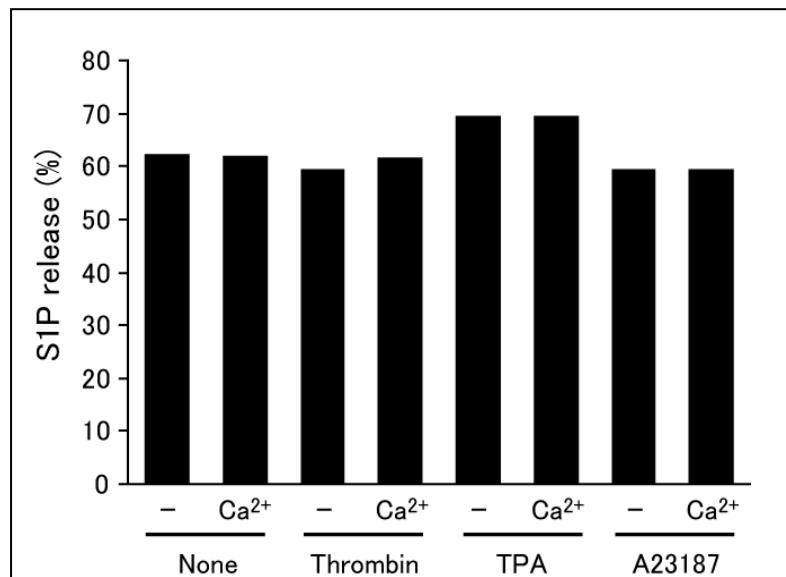


Figure 2-2. 赤血球からの S1P 放出の刺激依存性
赤血球懸濁液に [³H]スフィンゴシンを添加し、37°C で 2 分間保温した後、トロンビン(5 NIH U / ml)、TPA (0.16 μM)、A23187(2 μM)をそれぞれ単独もしくは Ca²⁺ (2 mM)と共に添加し、37°C で 10 分間保温した。遠心分離によりバッファーと赤血球を分離し Fig.2-1 と同じ方法で [³H]S1P 量を定量した。グラフの縦軸は、それぞれの S1P の全体量に占めるバッファー中の量の割合を示す。

さらなる活性化は起こらないことが分かった。また、Ca イオンにより 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、Ca²⁺ に依存した S1P の放出機構が存在しないと考えられる。

2-4: 赤血球からの S1P 放出に対する ABC 輸送体の阻害剤の影響

前述の通り、血小板においては ATP 及び Ca²⁺ 依存的な輸送体が S1P を放出することを明らかにしており、それぞれ ABCA タイプの輸送体とリン脂質スクランブラー (PLSCR) が S1P 輸送体であることを報告している(14)。本章 2-3 の結果より、赤血球においては Ca²⁺ 依存的な S1P 輸送体が存在しないことが示唆されたことから、脂質の輸送体として知られる ATP binding cassette (ABC) 輸送体が血小板と同様、S1P を輸送する可能性が考えられた。

赤血球からの S1P 放出に対する ABC 輸送体阻害剤の影響を調べたところ、multidrug resistance-associated protein (MRP) の阻害剤である MK571(25) や multidrug resistance protein (MDR) の阻害剤である Cyclosporine A(26-28) によっては放出が阻害されず、ABCA1 の阻害剤である Glyburide(29, 30) により放出が約 35% 阻害された (Fig. 2-3)。このことから赤血球においても血小板と同様、ABCA タイプの輸送体が S1P を放出している可能性が示唆された。

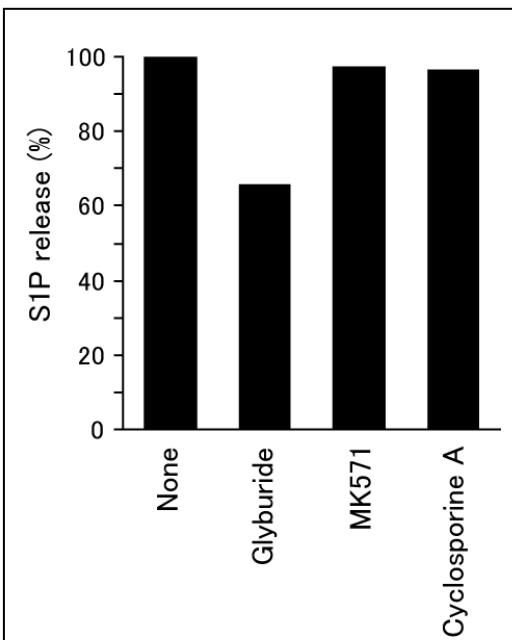


Figure 2-3. 赤血球からの S1P 放出に対する ABC 輸送体の阻害剤の影響
赤血球を阻害剤存在下、37°C、60 分間保温した後、³H]スフィンゴシンを加え 37°C で 20 分間保温した。その後、バッファーと赤血球を遠心分離し、それぞれに含まれる³H]S1P 量を定量した。グラフの縦軸は全体に含まれる³H]S1P 量のうちバッファー中に含まれる量の割合を示す。阻害剤は、500 μM Glyburide もしくは 50 μM MK571、10 μM Cyclosporine A のいずれかを添加した。

2-5: 考察

本章 2-1 の結果より、赤血球にスフィンゴシンを添加すると速やかに細胞内に取り込まれ、直ちに S1P が合成されることが確認された。一方、赤血球からの S1P 放出の時間依存性は、細胞内での S1P 合成の時間依存性とは一致せず、S1P の放出はスフィンゴシンを添加してから少し遅れて 2 分後には開始される。このことから、S1P が単純拡散により細胞外へ放出されるのではなく、何らかの輸送体が介在している可能性が示唆される。また、赤血球の調製は常温で行っており、バッファーにより赤血球を 2 回洗浄していることから、細胞内にもともと存在していた S1P は調製段階で、細胞外にほとんど抜け出てしまっており、この実験での S1P の挙動には影響を与えていないと考えられる。

生理活性脂質である S1P は疎水性が高く、単独では水に溶けないことから実験では BSA などのキャリアー蛋白質により可溶化する必要がある。血漿中に存在する S1P のほとんどが high density lipoprotein (HDL) と血清アルブミンに結合して存在しているが(31)、血小板からの S1P の放出は、HDL の構成成分である apoA-I 依存的には起こらずに、BSA 依存的に起こることをすでに明らかにしている(14)。今回私は赤血球からの S1P の放出実験を BSA 存在下で行った。例えば、ABC 輸送体の 1 つである ABCA1 によるコレステロールの放出には BSA ではなく apoA1 が必要であることが分かっている。一方、ABCG1 からのコレステロール放出には HDL が必要である(32)。このことは、輸送体によってキャリアー蛋白質が異なっていることを示している。このことから、赤血球からの S1P の放出も血小板と同じように BSA をキャリアーとして用いていて、HDL もしくは apoA-I 依存的ではないと考えている。

本章 2-4 において、赤血球からの S1P の放出は、MRP の阻害剤である MK571(25) や MDR の阻害剤である Cyclosporine A(26-28) によっては阻害されず、ABCA1 の阻害剤である Glyburide(29, 30) により阻害されるという結果が得られた(Fig.2-3)。これらの ABC 輸送体阻害剤の効果は、血小板からの ATP 依存的な S1P の放出に対する効果と同様であった(14)。このことから、赤血球においても血小板と同一の ABCA タイプの輸送体が S1P を放

出していると考えられる。一方で、血小板からの放出が刺激依存的であるのに対し、赤血球からの放出は刺激非依存的であるという明確な違いが存在する。この違いは、血小板においては輸送体の活性化が一過性であるのに対し、赤血球においては輸送体が常に活性化された状態にあることから生じると考えている。血小板においては、トロンビンによる血小板の活性化シグナルはプロテインキナーゼ C (PKC) を介しており、また、セミインタクトの細胞からの ATP 依存的な S1P の放出がトロンビン刺激により活性化されることから、ABCA 輸送体のリン酸化により輸送が活性化される可能性を示している(14)。実際、ABC 輸送体の中で、ABCA1 や ABCC2 はそれぞれ PKA と PKC によりリン酸化され、活性化されることが知られている(33, 34)。赤血球においては S1P 輸送体がリン酸化された状態にあり、輸送体が常に活性化されていると考えている。

血小板と赤血球のもう 1 つの大きな違いは、血小板には Ca^{2+} 依存的な S1P の放出機構が存在するのに対して、赤血球には Ca^{2+} 依存的な機構が存在しないことである（本章 2-3）。血小板における Ca^{2+} 依存的な S1P の放出輸送体は、リン脂質スクランブラー（PLSCR）であることを示唆している(14)。PLSCR は、 Ca^{2+} 依存的にリン脂質をランダムに二方向に輸送する蛋白質であり(35)、血小板と赤血球にも発現している。血小板の活性化や赤血球のアポトーシスの際に起こるリン脂質の非対称性の消失との関わりが指摘されているが、まだ不明な点が多く、その機能についてはまだ議論が分かれている(11)。血小板において我々が報告した Ca^{2+} 依存的な S1P の放出は、血小板に対して過剰量の Ca^{2+} をイオノフォアと共に添加したことにより生じた現象である。生理的条件下では、血小板も赤血球も細胞内の Ca^{2+} 濃度は非常に低く保たれており(36, 37)、 Ca^{2+} 依存的な機構が動くことはない。血小板がトロンビンなどの刺激により活性化した際に、一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が起きるが、その条件では、PLSCR は働くことが報告されている(38)。つまり、血小板においても、トロンビンなどの刺激に応じて活性化される S1P の生理的な輸送には ATP に依存した輸送体が働いていると考えている。

本章では、血小板だけではなく、赤血球においても S1P が合成され、細胞外へ放出されることを明らかにした。しかし、血小板と赤血球からの S1P 放

出機構にはいくつかの相違点があることが分かった。Table.2-1 に、血小板と赤血球に含まれる S1P 量と S1P 放出様式の違いについてまとめた。血液を構成する成分の約半分が赤血球であり、血液中の S1P の約半分が赤血球に存在していることが最近明らかになっている(18)。S1P は赤血球から恒常に放出されることから、血漿中の S1P の大部分は赤血球由来であると考えられる。血小板には S1P が高濃度に蓄積されているが、血球数が赤血球よりも圧倒的に少ない。しかも血小板からの S1P 放出は刺激依存的で局所的な現象であり、血小板から放出される S1P は血漿中の S1P 濃度には影響を与えないことも明らかになっている(15)。したがって、血小板と赤血球では同じ S1P 輸送体を用いているにも関わらず、その制御機構が異なることによって、異なる放出様式を実現していると考えられる。

Table.2-1 血小板と赤血球に含まれる S1P 量と S1P 放出様式の違い

	血小板	赤血球
血液中の全血球数に占める割合	約 5%	約 95%
血液中の全 S1P 量への寄与率	約 30%	約 51%
細胞あたりの S1P 量	非常に多い	少ない
血漿中の S1P への寄与	なし	あり (大部分)
S1P 放出の刺激依存性	あり	なし
S1P の放出部位	局所的	限定されない
S1P の放出時間	一過性	恒常的
S1P 輸送体	ABCA タイプ	

第三章

S1P 輸送体の酵素化学的解析

3-1:はじめに

第2章で、赤血球においても血小板と同様、S1Pが合成され細胞外に放出されることを明らかにし、ABC輸送体の阻害剤を用いた解析から、ABCAタイプの輸送体がS1Pを放出する可能性を示唆した。しかし、これらの結果はすべてインタクトの赤血球を用いたものであり、用いた阻害剤は、輸送体以外にも作用する蛋白質が存在するため、輸送体への効果を見る場合には細胞質に存在する蛋白質の影響を無視できないという問題点がある。また、酵素活性を指標とした輸送体本体の同定を目指すためには、膜小胞によるS1P輸送活性の測定により輸送体の酵素化学的性質を明らかにする必要がある。そこで本章では、赤血球反転膜を用いてATP依存的なS1Pの輸送活性を測定する系を構築し、S1P輸送体の酵素化学的性質を解析した。赤血球の反転膜は作製が容易であり(17)、これまでに反転膜を用いて様々なトランスポーターの活性が測定されている(39, 40)。また、赤血球は血小板とは異なり、S1Pの放出に輸送体の活性化を必要としないことから、反転膜を用いてS1Pの取り込みを測定することが可能であると考えた。

赤血球は細胞内小器官を持たない無核の細胞であるが、細胞膜上のglucose transporter 1 (GLUT1)(41)を介してグルコースを細胞内に取り込み、嫌気的解糖により1分子のグルコースから2分子のATPを合成している(42)。細胞内には約1mMのATPが存在しており、膜骨格を構成する蛋白質のリン酸化や、細胞膜に存在するATPaseのエネルギー源として利用される。赤血球の細胞膜には $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPaseや Ca^{2+} -ATPaseなどのATP依存的イオン輸送体が存在しており、それらの輸送活性が赤血球の反転膜を用いて測定されている(43, 44)。

脂質の輸送に関わる輸送体としては、今までにP-type ATPaseとABC輸送体、PLSCRの3種類が知られている(11)。P-type ATPaseとABC輸送体はATP依存的、PLSCRは Ca^{2+} 依存的であるが、赤血球には Ca^{2+} 依存的なS1P輸送体が存在しないことから、P-type ATPaseもしくはABC輸送体がS1Pを輸送する可能性が考えられる。

P-type ATPaseとしてよく知られているものは、 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPaseや Ca^{2+} -ATPase、 $\text{H}^+ \text{-K}^+$ -ATPaseなどのイオン輸送体(45)であるが、脂質輸送

を行う P-type ATPase としては、1996 年、ウシクロマフィン顆粒から ATPase II が精製、クローニングされており、その酵母ホモログである Drs2p を欠損した酵母では、NBD 標識した PS の取込みの阻害が確認されている(46)。現在では、Drs2p はトランシスゴルジネットワークで PS を輸送することが明らかとなっており(47)、形質膜で機能する P-type ATPase としては Dnf1p と Dnf2p が同定されている(48)。しかし、P-type ATPase はいずれも脂質を細胞内に取り込む方向に輸送することから、S1P 輸送体になりうる可能性は低いと考えられる。

ABC 輸送体は、ATP の加水分解と共に基質を輸送する膜蛋白質であり、動物細胞では、ABCA から ABCG までの 7 つのサブファミリーに分類される。現在、脂質輸送に関わるものとして、ABCA1, ABCA3, ABCA4, ABCA7, ABCB1 (MDR1), ABCB4(hMDR3, mMDR2) が報告されている。ABCA1(ABC1) は、Tangier 病という遺伝性疾患の原因遺伝子で(49-51)、ABCA サブファミリーのなかでは、生化学的解析がかなり進んでいる輸送体である。ホモ接合体の Tangier 病患者では HDL が欠損しており、細網内皮系に多量のコレステロールエステルの沈着が認められる。今までに、ABCA1 は細胞内のコレステロールを apoA1 に受け渡すことで HDL 形成に関与することが明らかになっている(52, 53)。その後の解析から、ABCA1 によるリン脂質の輸送を伴ったコレステロールの放出メカニズムが提唱された(54)。それによると、ABCA1 は apoA-I に直接結合すると同時に、リン脂質を細胞膜の外葉へ輸送することにより、細胞外に湾曲した膜ドメインを形成する。さらに、そのドメインに対して apoA-I が高い親和性で結合し、apoA-I によりリン脂質およびコレステロールが可溶化され、HDL が形成される。ABCA4(ABCR) は、Stargardt 病の原因遺伝子である。Stargardt 病は、萎縮性の斑状病変を伴う黄色斑眼底であり、失明に至る重篤な疾病である(55)。ABCA4 は網膜に特異的に発現しており、レチナール誘導体である N-レチニリデンフォスファチジルエタノールアミンを内葉へと取り込むことで、レチナールの再生に関わることが知られている(56)。ABCB1(MDR1) は、多剤耐性の原因となる薬剤排出蛋白である。ABCB1 は基質の特異性が非常に幅広く、PC や PE、SM、グルコシルセラミド、ガラクトシルセラミドなどを輸送することが知られている(57)。また、ABCB4(hMDR3, mMDR2) は、遺伝

性肝内胆汁鬱滯症の原因遺伝子で、主に肝臓の肝細管膜に局在しており、肝臓から胆汁中への PC の分泌に関与している(58)。これらのうち、ABCA4 以外はいずれも脂質を細胞外へと輸送する方向に運ぶ。そこで本章では、赤血球反転膜への ATP 依存的 S1P 取込みに対する、ABC 輸送体の阻害剤の効果を調べることで S1P 輸送体の同定を試みた。

3-2 赤血球反転膜小胞への ATP 依存的 S1P 取込み活性の測定

インタクトの赤血球を用いた実験において、S1P の放出が Glyburide によって阻害されたことから、ABC 輸送体の関与が考えられた。そこでまず、赤血球の反転膜小胞を用いた S1P の ATP 依存的な取込みを調べた。

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(Fig.3-1)。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。ATP を加えたときの値から加えないときの値を差し引くとグラフは Fig.3-1 B のようになり、ATP を添加してから 10 分後までは S1P の直線的な取込みが観察された。

Fig. 3-1 の結果では、赤血球反転膜に S1P を添加し、5 分間 37°C で保温した後に ATP などを加えて反応を開始している。赤血球反転膜に S1P を添加した直後から 5 分間で、ATP の有無に関係なく反転膜の S1P 量が急激に増加することが観察された(data not shown)。その影響で Fig.3-1 A の S1P

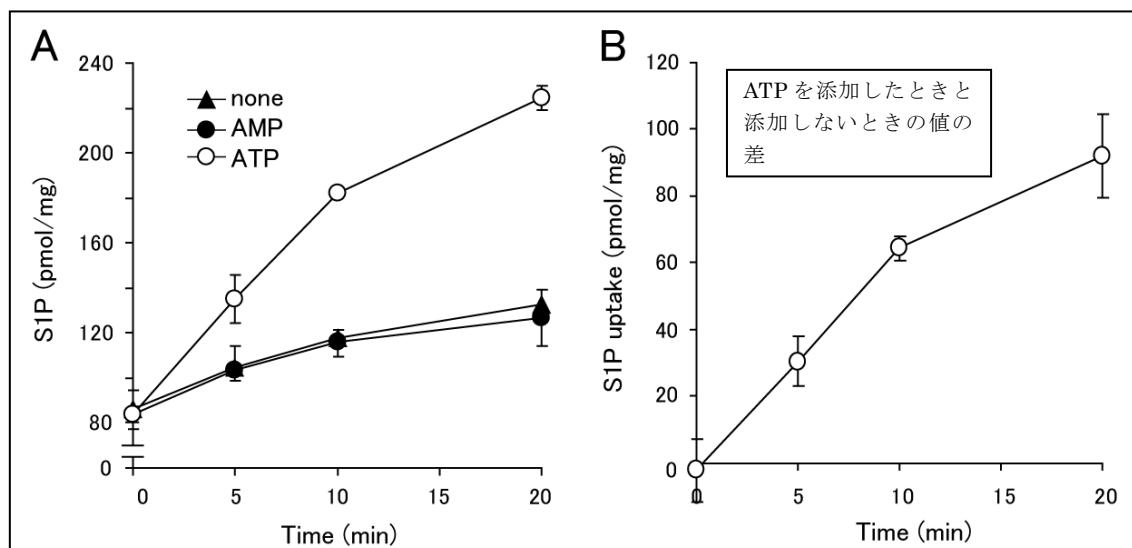


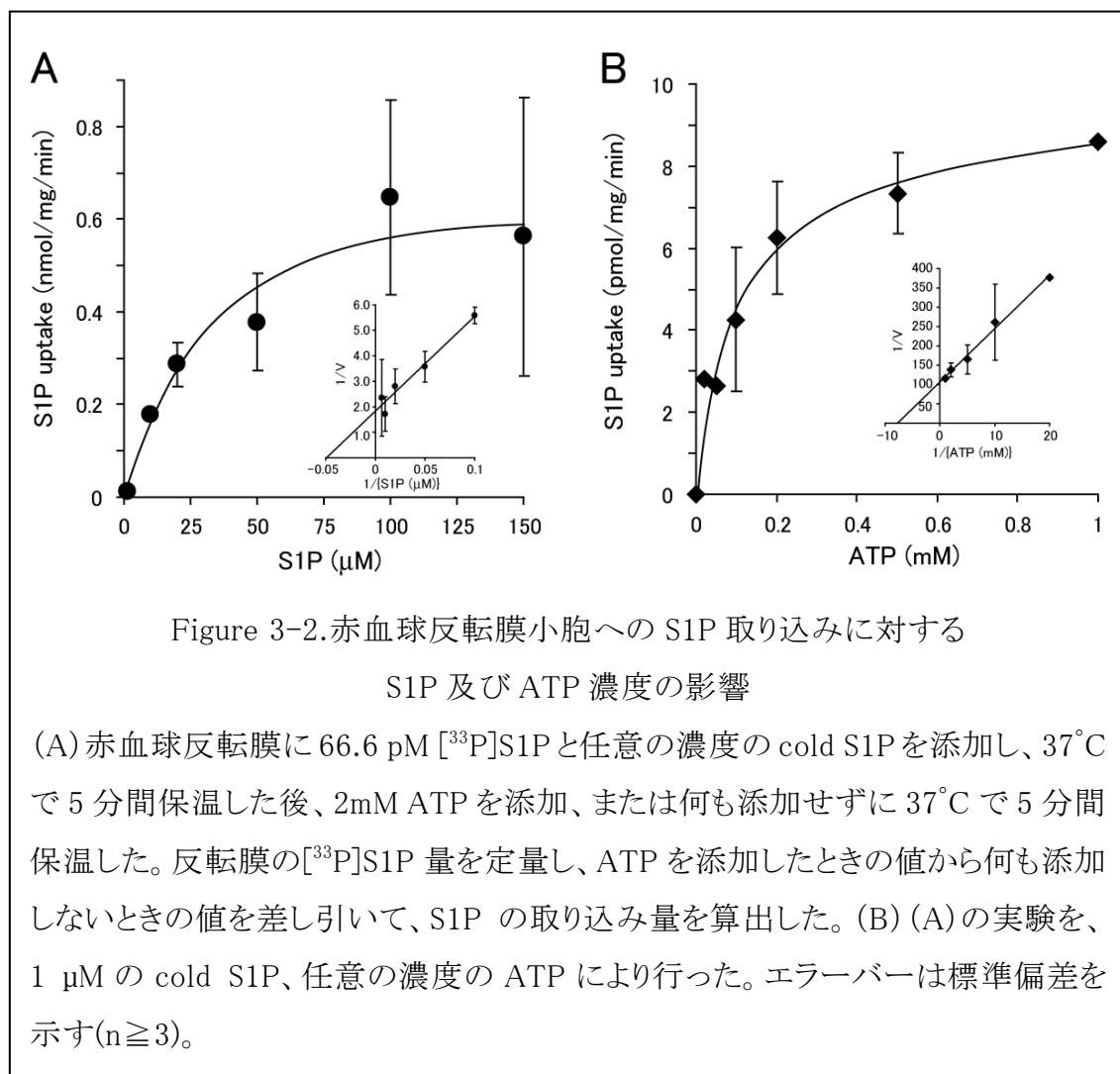
Figure 3-1. 赤血球反転膜小胞への S1P の取り込み

(A) 赤血球反転膜に 66.6 pM ^{33}P S1P と 1 μM の cold S1P を添加し、37°C で 5 分間保温した後、2mM ATP(白丸)または 2mM AMP(黒丸)を添加、もしくは何も添加せずに(黒三角)37°C で任意の時間保温した。反応液を遠心分離し、反転膜の ^{33}P S1P 量を液体シンチレーション法により定量した。(B) (A) の ATP を添加したときの値から何も添加しないときの値を差し引いた値のグラフを示す。エラーバーは標準偏差を示す($n \geq 3$)。

量が 0 min で約 80 pmol/mg と高い値を示している。しかし、この現象は一過性のものであり、反転膜に S1P を添加してから 5 分後以降は取り込みが見られなくなることから、反転膜表面への S1P の非特異的な吸着であると考えた。反転膜を調製する過程で、ほとんどの S1P が取り除かれていると考えられることから、反転膜に S1P を加えた際、S1P が反転膜へ急激に移動して平衡状態に達するまでの反応と考えられる。

3-3: S1P 取り込みに対する S1P 及び ATP 濃度の影響

ATP 依存的な S1P の輸送活性が測定できたことから、S1P の取り込みに対する S1P と ATP の濃度依存性を調べた。Fig.3-2 に示した通り、それぞれ S1P と ATP の濃度に依存して S1P の取り込み量が増加し、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 K_m 値を求めるとき、S1P は $21 \mu\text{M}$ 、ATP は $130 \mu\text{M}$ と算出された。ABCA 輸送体の 1 つである ABCA1 の ATPase 活性から算出された ATP の K_m 値は $112 \mu\text{M}$ であり(30)、S1P が ABC 輸送体により放出されると考えても矛盾しない値である。

3-4: S1P 取込みに対するイオノフォア及び ATPase 阻害剤の影響

ATP 依存的に S1P が輸送されることを示すことができたが、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。赤血球の細胞膜には、 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase や Ca^{2+} ATPase などのイオン輸送性 ATPase が発現しており、ATP をエネルギー源としてイオン濃度勾配を形成することが知られている(43, 44)。これらのイオン濃度勾配をエネルギー源とするグルコース輸送体など様々な二次的輸送体が存在する。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、イオノフォアである Valinomycin(59) と CCCP(60)、 H^+ -ATPase の阻害剤である DCCD(61)、 NaN_3 (60)、Bafilomycin A1(60)、 $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ ATPase の阻害剤である Ouabain(59)、Strophantidin(62) 存在下での ATP 依存的な S1P の取り込みを調べた。しかし、いずれを用いた場合でも S1P の

Table 3-1. Effect of ionophores and ATPase inhibitor on the ATP-dependent uptake of S1P.

Compound	Concentration (μM)	Uptake of S1P (pmol/mg)
None		105.7 ± 11.2
Valinomycin	10	99.6 ± 14.2
CCCP	10	107.1 ± 9.9
DCCD	10	114.4 ± 19.1
NaN_3	100	100.2 ± 9.9
Bafilomycin A1	1	89.6 ± 14.5
Ouabain	100	117.2 ± 11.1
Strophantidin	100	104.6 ± 5.8

赤血球反転膜に 66.6 pM $[^{33}\text{P}]$ S1P と $1 \mu\text{M}$ の cold S1P、阻害剤を添加し、 37°C で 5 分間保温した後、 2mM ATP を添加、もしくは何も添加せずに 37°C で 20 分間保温した。反転膜の $[^{33}\text{P}]$ S1P 量を定量し、ATP を添加したときの値から何も添加しないときの値を差し引いて、S1P の取り込み量を算出した。実験は 2 回以上を行い、標準偏差を算出した。

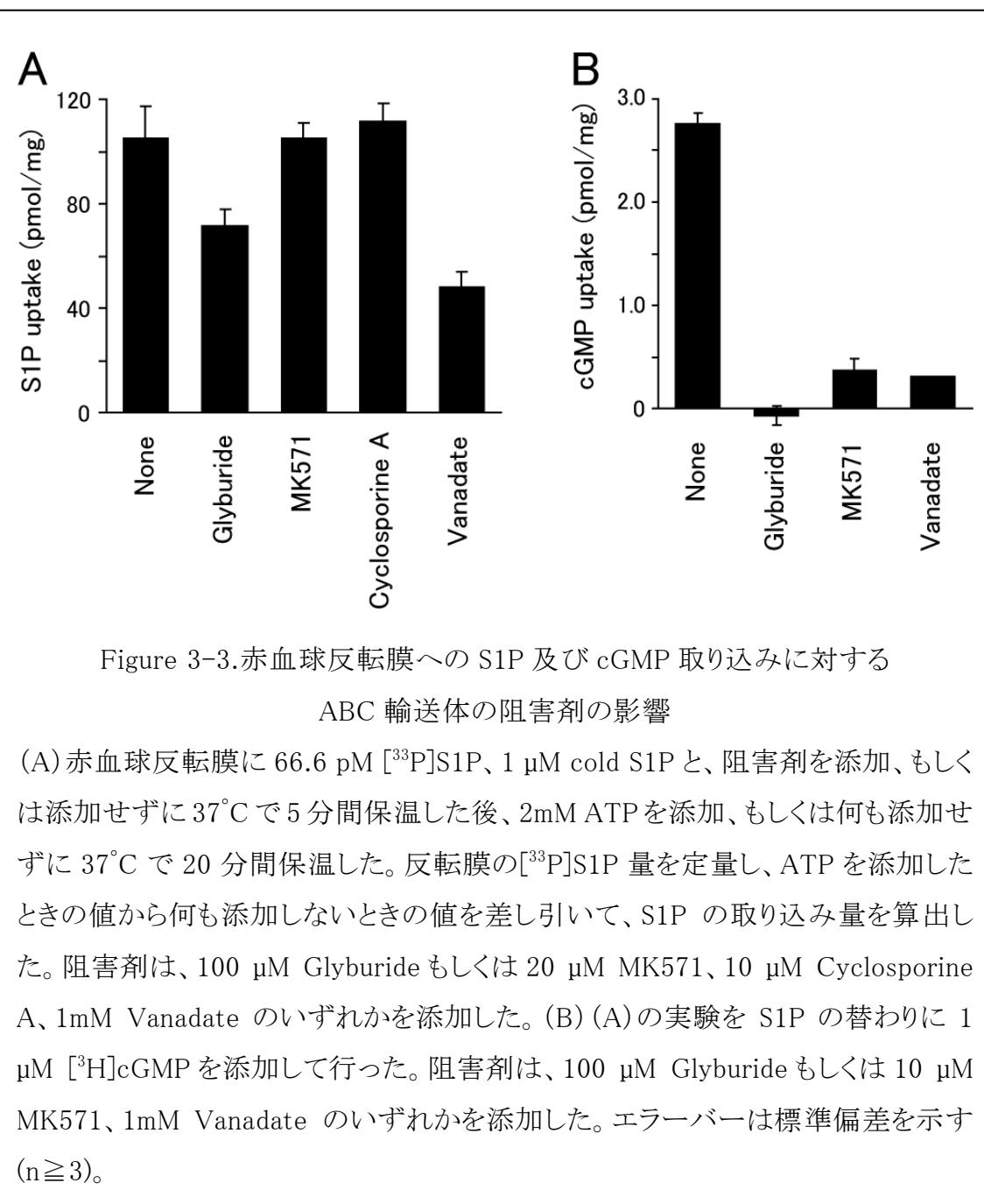
取り込みは阻害されなかった(Table 3-1)。これらの結果から、S1P の取り込みは、イオン輸送性 ATPase によって形成されるイオン濃度勾配による二次的な輸送ではないことが分かった。また、赤血球反転膜の調製時には EDTA により二価カチオンを除去しており、反応液中にも Ca^{2+} を加えていないことから、 Ca^{2+} ATPase によって形成される Ca^{2+} の濃度勾配も関係がない。

3-5: S1P 取り込みに対する ABC 輸送体の阻害剤の影響

第 2 章 2-4 において、インタクトの赤血球からの S1P の放出が、血小板の場合と同様、ABCA1 の阻害剤である Glyburide により阻害されることを示した。つまり、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。前述の通り、ATP 依存的に脂質を輸送する輸送体は P-type ATPase と ABC 輸送体が知られているが、細胞外への物質の放出方向に関与するのは ABC 輸送体である。そこでまず、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 (Fig.3-3. A)。その結果、インタクトの赤血球の場合と同様に、MRP の阻害剤である MK571 と MDR の阻害剤である Cyclosporine A は S1P の取り込みを阻害せず、ABCA1 の阻害剤である Glyburide により取り込みが約 31% 阻害された。また、ATPase の阻害剤である Vanadate(63)によっても取り込みが約 54% 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おり、その酵素化学的解析が進んでいる(40, 64, 65)。そこで、S1P 取り込みを調べた反転膜を用いて cGMP の取り込み活性への ABC 輸送体阻害剤の効果を調べた (Fig.3-3. B)。反転膜への cGMP の取り込みに対する 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、S1P の輸送に対する効果を調べる時に用いたのと同じ阻害剤濃度もしくは低い濃度で、ほぼ完全な輸送の阻害が見られた。これはこれまで報告されている結果(40, 66)と一致する。

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。



3-6: GlyburideとVanadateによるS1P取り込み阻害の濃度依存性

本章 3-5 で示したように、100 μ M の Glyburide と 1mM の Vanadate により、ATP 依存的な cGMP の取り込みはほぼ完全に阻害されたが、ATP 依存的な S1P の取り込みは完全には阻害されなかった。そこで、Glyburide と Vanadate による S1P 取り込み阻害の濃度依存性を調べた(Fig.3-4)。Glyburide は 1mM まで加えた場合でも S1P の取り込みは 50%程度までしか阻害されなかったが、Vanadate を 10 mM まで加えたときにはほぼ 100%取り込みが阻害された。Glyburide では 1mM 存在下での阻害を完全な阻害と仮定し、IC50 値を求めるとき、Glyburide と Vanadate について、それぞれ 72 μ M、667 μ M と算出された。

Glyburide は、ABCC サブファミリーに属する sulfonylurea receptor (SUR1)に結合し、SUR1 から ATP を解離させることで ATP 感受性 K^+ (K_{ATP})

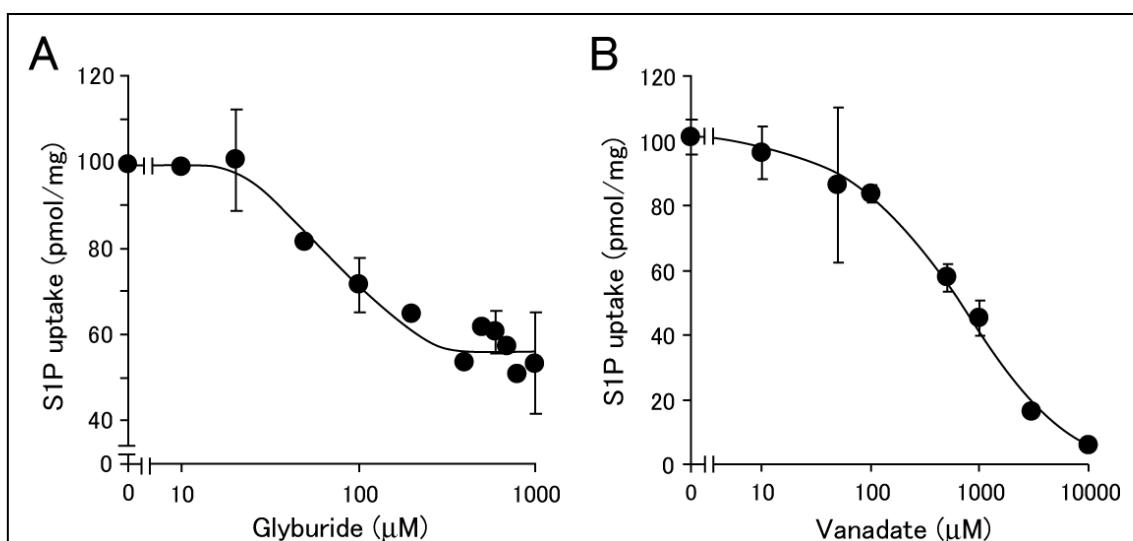


Figure 3-4. 赤血球反転膜への S1P 取り込みに対する

Glyburide 及び Vanadate 濃度の影響

赤血球反転膜に 66.6 pM [33 P]S1P、1 μ M cold S1P と、阻害剤を添加、もしくは添加せずに 37°C で 5 分間保温した後、2mM ATP を添加、または何も添加せずに 37°C で 20 分間保温した。反転膜の [33 P]S1P 量を定量し、ATP を添加したときの値から何も添加しないときの値を差し引いて、S1P の取り込み量を算出した。阻害剤は、任意の濃度の Glyburide (A) もしくは Vanadate (B) を添加した。エラーバーは標準偏差を示す($n \geq 2$)。

チャネルを閉鎖することが知られている(67, 68)。臍 β 細胞の K_{ATP} チャネルが閉鎖されることによりインスリンの分泌が促進されることから、血糖降下剤として使われている。Glyburide による S1P 取込みの阻害効果が限定的であるという結果から、ATP 依存的な S1P 輸送体は、Glyburide により非競合的な阻害を受けている可能性がある。今までに、Glyburide による ABC 輸送体の阻害作用が競合的なのか非競合的なのかについての報告は存在しないが、TXA₂ 受容体が Glyburide により競合的に阻害され(69)、carnitine palmitoyltransferase が非競合的に阻害される(70)という報告がある。

一方、S1P が複数の輸送体により放出される可能性が考えられるが、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を得ていることから (data not shown)、おそらく Glyburide に感受性の輸送体と、非感受性の輸送体が 2 種類存在する可能性は少なく、単独の輸送体であると考えている。

3-7: 考察

本研究で、赤血球においても S1P を合成し、細胞外へと放出する機構が存在することを明らかにし、それが ABCA 輸送体によるものである可能性を示すことができた。この ATP 依存的な S1P の輸送が実際に赤血球からの S1P の放出にどの程度寄与しているかを知るために、赤血球からの S1P の放出量に対する、ATP 依存的な S1P の放出量の寄与を明らかにすることが非常に重要である。残念ながら、第 2 章におけるインタクトの赤血球を用いた実験では、S1P の絶対量を定量していないことから、ATP 依存的な S1P の放出がどの程度寄与しているかを算出することができない。そこで、最近報告されたヒト赤血球から放出される S1P の絶対値から、ATP 依存的な S1P の輸送の寄与を計算してみた。文献(18)より、 10^8 個の細胞を用いた実験系で細胞内の S1P 量が約 38 pmol のとき細胞外の S1P 量は 10 min で約 16 pmol 増加する。ヒトの赤血球の平均的な容積が 90 fl(71)だとすると、赤血球内の S1P 濃度は 4.2 μ M と算出される。また、ラットの赤血球 1 個から調製できる反転膜は 8.56×10^{-11} mg であることから、これをヒトの赤血球に当てはめると、S1P の放出量は 0.19 nmol/min/mg と算出される。10 μ M までの S1P 濃度では、S1P の輸送速度と濃度が比例関係にあることから、赤血球からの S1P の放出速度は、10 μ M S1P のときには、0.45 nmol/min/mg と算出される。赤血球反転膜における 10 μ M S1P での S1P 取込み速度は 0.18 nmol/min/mg であるが、これに調製した反転膜の inside-out の割合(0.50)の逆数を乗じると 0.36 nmol/min/mg となり、赤血球からの S1P 放出速度に近い値になる。このことから、ATP 依存的な S1P の輸送がインタクトの赤血球での S1P 放出を担っていると考えられる。

本研究により、赤血球において S1P が ABC 輸送体により放出されている可能性が示されたが、ABC 輸送体の中には、生理活性脂質を輸送するものがすでに報告されている(72)。1997 年には、ABCC1(MRP1)ノックアウトマウスの骨髄由来肥満細胞からの LTC4 の放出が顕著に減少することや抗ガン剤に対する感受性が著しく増加することが明らかとなった(73)。このことから、ABCC1 は、個体においても LTC4 分泌という役割を担っているものと考えられている。また、PAF は初代培養細胞において ABCB1/MDR1 によって輸

送されうること、培養細胞において PGE1, PGE2 は ABCC4/MRP4 によつて輸送されうることがそれ明らかとなっている(74, 75)。

本章 3-5 の結果より、赤血球反転膜への ATP 依存的な S1P の取込みは、MRP の阻害剤である MK571 と MDR の阻害剤である Cyclosporine A により阻害されず、ABCA1 の阻害剤である Glyburide と ATPase の阻害剤である Vanadate(63)により阻害されることが分かった。ここで、ABC 輸送体の阻害剤と阻害される ABC 輸送体の関係について細かく見てみることにする (Table 3-2)。Glyburide は ABCA1 を阻害することが良く知られているが、ABCA1 特異的な阻害剤ではない。これまでに、MRP1 や MRP5、CFTR(ABCC7)を阻害することが知られており(76-78)、MDR を阻害するという報告もある(79)。また、Vanadate はリン酸アナログであり、ADP を ABC 輸送体にトラップすることで活性を阻害することが知られている(80, 81)。Vanadate は、ABC 輸送体に限らず P-type ATPase や phosphatase など様々な酵素を阻害することが知られている(63, 82, 83)。

Glyburide と Vanadate が、いずれも MRP と MDR を阻害することから、これらが S1P 輸送体であることが考えられるが、MRP 全般を阻害することが知られている MK571(77, 84-88)や MDR 全般の阻害剤としてよく知られている Cyclosporine A や Verapamil (89)(data not shown)によって S1P の取込みが阻害されないことから、それらが S1P 輸送体である可能性は低いと考えられる。一方、ABCA 輸送体に関しては ABCA1 を発現させた細胞からのコレステロールの放出や、精製した ABCA1 の ATPase 活性に対する阻害剤の効果が調べられている(30, 53)。それらの結果から、ABCA1 は Glyburide により阻害されるが、Vanadate によっては阻害されないことが明らかになっている。赤血球反転膜への S1P の輸送は Vanadate により阻害されるという結果から、S1P 輸送体は ABCA1 ではないと考えている。ABCA1 の最も良く知られている基質であるコレステロールの放出には apoA1 が必須であるが(52)、血小板からの S1P の放出は apoAI 依存的には起こらないことを確認している(14)。一方、ABCA タイプの輸送体すべてが、Vanadate によって阻害されないわけではない。ABCA3 では、Vanadate によるヌクレオチドのトラップが報告されており(90)、ABCA4 では、Vanadate による ATPase 活

性の阻害が報告されている(91)。ABCA タイプの輸送体は、その機能さえ明らかになつてないものが多く、機能の分かっているものでも生化学的な解析が行われていないものがほとんどであることから、ABCA タイプの輸送体の中で Vanadate に感受性のものが、S1P を輸送している可能性がある。

赤血球に発現している ABC 輸送体に着目してみると、これまでに発現していることが明らかになっているものに、ABCC1(MRP1)、ABCC4(MRP4)、ABCC5(MRP5) がある(92)。しかし、ABCA 輸送体に関しては発現しているかどうかがまだよく分かっていない。ABCA 輸送体は、今までに ABCA1～9、12～16 の 15 種類が報告されている (Table 3-3)。我々が半定量的 RT-PCR により調べた結果では、血小板には ABCA7 が発現しており(93)、赤血球には ABCA1 と ABCA7 の発現が確認されている(data not shown)。赤血球に発現している ABCA 輸送体を明らかにし、S1P を輸送するかどうかを検討することは十分な価値があると考えられる。

Table 3-2. ABC 輸送体に対する阻害剤の効果

	S1P 輸送体	ABCA	MRP	MDR
Glyburide	阻害	ABCA1 を阻害	阻害	阻害
MK571	阻害しない	unknown	阻害	阻害しない
Cyclosporine A	阻害しない	unknown	阻害するものあり	阻害
Vanadate	阻害	ABCA1 を阻害しない	阻害	阻害

Table 3-3. ABCA 輸送体の発現部位と機能

	mRNA expression	related disease and function
ABCA1	macrophage, liver	Tangier disease, produce HDL
ABCA2	brain	unknown
ABCA3	lung	surfactant deficiency
ABCA4	eye	transport N-retinylidene-PE
ABCA5	testis, brain	unknown
ABCA6	liver	unknown
ABCA7	platelet, brain	unknown
ABCA8a	lung, heart	unknown
ABCA8b	muscle, lung	unknown
ABCA9	heart, kidney	unknown
ABCA12	testis, placenta	lamellar ichthyosis type2
ABCA13	testis	unknown
ABCA14	testis	unknown
ABCA15	testis	unknown
ABCA16	testis	unknown

第四章

總括

S1P は血液中に豊富に存在する脂溶性の細胞間情報伝達物質であり、特異的な受容体である S1P 受容体に結合することにより、細胞の遊走や増殖、分化などに重要な働きをしている(7, 20)。血漿中には一定濃度の S1P が存在しており、リンパ球産生細胞からのリンパ球の放出に重要であることが分かつていたが(19-21)、血漿中の S1P がどこから供給されているのかということは長らく解明されていなかった。血小板には S1P が高濃度に蓄積されていることから、血小板内の S1P が血漿中に存在する S1P の供給源であると考えられていた(24)。

しかし、本研究において、S1P が赤血球で合成され、トロンビンなどの刺激に依存せずに放出されることが明らかになった。赤血球は血液のおよそ半分の容積を占める細胞成分で、血小板などの他の血球の細胞数と比較しても圧倒的に多いことから、赤血球から放出される物質は血液に大きな影響を与えることが予想される。S1P が赤血球から刺激に依存せず放出されるという結果から、血漿中の S1P は赤血球から供給されることが予想されたが、実際に血漿中の S1P の主要な供給源が赤血球であることが最近報告された(15)。

血小板と赤血球は共に S1P を放出する機能を持っているが、その放出様式の違いから、別々の役割を果たしていると考えられる。つまり、血小板は血管内皮細胞の損傷部位においてのみ刺激依存的に活性化され、S1P を局所的に放出する。放出された S1P は血管内皮細胞にのみ作用し、損傷部位の修復を促す。一方赤血球は、刺激が無くとも S1P を恒常に放出しており、これにより血漿中の S1P 濃度を一定に保っている。血漿中の S1P は、血液とリンパ球産生組織との間に S1P の濃度勾配を形成するのに重要であり、これがリンパ球の放出を促す。S1P は、非常に幅広い生理活性を持つ物質であるが、放出される部位を選ぶことによって異なる役割を果たしているのかもしれない。

S1P の放出部位が異なることが重要であるということは、S1P の放出が何らかの機構により制御されていることの必要性を暗示している。私たちは、今までに、血小板からの S1P の放出が ATP 及び Ca 依存的な輸送体により行われることを明らかにしている(14)。S1P は脂溶性の高い物質であることから、細胞膜を単純拡散により通過して放出されると考えられていた為、こ

の発見は大きなインパクトを与えた。

しかし、インタクトの血小板や赤血球からの S1P 放出を見る実験では、細胞質の蛋白質の影響を無視できないという問題点が存在した。S1P が輸送体により放出されることをきちんと証明するためには、膜小胞を用いた輸送活性の測定が必須であった。私は、赤血球の反転膜を用いて、脂溶性の高い物質である S1P の輸送活性を測定することに成功し、輸送体の酵素化学的性質を明らかにした。この測定系を用いて S1P が実際 ATP 依存的に輸送されることが証明され、ABC 輸送体の阻害剤を用いた解析から、ABCA タイプの輸送体が S1P を輸送している可能性が示された。

S1P は幅広い生理活性を持つ物質であることから、S1P の特異的な受容体に対する薬剤(20)が免疫抑制剤として臨床試験に入っている。今後、S1P 輸送体が同定され、膜小胞を用いた S1P 輸送活性が測定できるようになれば、その活性を阻害する物質の探索により、S1P の放出段階を阻害するような薬剤の開発が可能になるかもしれない。S1P の輸送活性測定系は、そのような応用的な場面でも活用される可能性を秘めている。

第五章

引用文献

1. Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2000) Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 407, 189-194
2. Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Prive, G. G., Eisenberg, D., Brecha, N., and Edwards, R. H. (1992) A cDNA that suppresses MPP+ toxicity encodes a vesicular amine transporter. *Cell* 70, 539-551
3. Erickson, J. D., Eiden, L. E., and Hoffman, B. J. (1992) Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10993-10997
4. Burgoyne, R. D., and Morgan, A. (2003) Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83, 581-632
5. Beato, M., and Klug, J. (2000) Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6, 225-236
6. Spiegel, S., and Milstien, S. (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 397-407
7. Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C. X., Hobson, J. P., Rosenfeldt, H. M., Nava, V. E., Chae, S. S., Lee, M. J., Liu, C. H., Hla, T., Spiegel, S., and Proia, R. L. (2000) Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 106, 951-961
8. Op den Kamp, J. A. (1979) Lipid asymmetry in membranes. *Annu Rev Biochem* 48, 47-71
9. Zachowski, A. (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 294 (Pt 1), 1-14
10. Boon, J. M., and Smith, B. D. (2002) Chemical control of phospholipid distribution across bilayer membranes. *Med Res Rev* 22, 251-281
11. Daleke, D. L. (2003) Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 44, 233-242
12. Yatomi, Y., Ozaki, Y., Ohmori, T., and Igarashi, Y. (2001) Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins* 64, 107-122

13. Paik, J. H., Chae, S., Lee, M. J., Thangada, S., and Hla, T. (2001) Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of alpha vbeta3- and beta1-containing integrins. *J Biol Chem* 276, 11830-11837
14. Kobayashi, N., Nishi, T., Hirata, T., Kihara, A., Sano, T., Igarashi, Y., and Yamaguchi, A. (2006) Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner. *J Lipid Res* 47, 614-621
15. Pappu, R., Schwab, S. R., Cornelissen, I., Pereira, J. P., Regard, J. B., Xu, Y., Camerer, E., Zheng, Y. W., Huang, Y., Cyster, J. G., and Coughlin, S. R. (2007) Promotion of lymphocyte egress into blood and lymph by distinct sources of sphingosine-1-phosphate. *Science* 316, 295-298
16. Yatomi, Y., Ohmori, T., Rile, G., Kazama, F., Okamoto, H., Sano, T., Satoh, K., Kume, S., Tigyi, G., Igarashi, Y., and Ozaki, Y. (2000) Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells. *Blood* 96, 3431-3438
17. Steck, T. L., and Kant, J. A. (1974) Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods Enzymol* 31, 172-180
18. Ito, K., Anada, Y., Tani, M., Ikeda, M., Sano, T., Kihara, A., and Igarashi, Y. (2007) Lack of sphingosine 1-phosphate-degrading enzymes in erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 212-217
19. Schwab, S. R., Pereira, J. P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y., and Cyster, J. G. (2005) Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science* 309, 1735-1739
20. Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L., and Cyster, J. G. (2004) Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355-360
21. Brinkmann, V., Cyster, J. G., and Hla, T. (2004) FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial

- barrier function. *Am J Transplant* 4, 1019-1025
22. Allende, M. L., and Proia, R. L. (2002) Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochim Biophys Acta* 1582, 222-227
23. Allende, M. L., Dreier, J. L., Mandala, S., and Proia, R. L. (2004) Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem* 279, 15396-15401
24. Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, L., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Ozaki, Y., and Kume, S. (1997) Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum. *J Biochem* 121, 969-973
25. Jones, T. R., Zamboni, R., Belley, M., Champion, E., Charette, L., Ford-Hutchinson, A. W., Frenette, R., Gauthier, J. Y., Leger, S., Masson, P., and et al. (1989) Pharmacology of L-660,711 (MK-571): a novel potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist. *Can J Physiol Pharmacol* 67, 17-28
26. Slater, L. M., Sweet, P., Stupecky, M., and Gupta, S. (1986) Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro. *J Clin Invest* 77, 1405-1408
27. Twentyman, P. R. (1988) Modification of cytotoxic drug resistance by non-immuno-suppressive cyclosporins. *Br J Cancer* 57, 254-258
28. Tamai, I., and Safa, A. R. (1990) Competitive interaction of cyclosporins with the Vinca alkaloid-binding site of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J Biol Chem* 265, 16509-16513
29. Becq, F., Hamon, Y., Bajetto, A., Gola, M., Verrier, B., and Chimini, G. (1997) ABC1, an ATP binding cassette transporter required for phagocytosis of apoptotic cells, generates a regulated anion flux after expression in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem* 272, 2695-2699
30. Takahashi, K., Kimura, Y., Kioka, N., Matsuo, M., and Ueda, K. (2006) Purification and ATPase activity of human ABCA1. *J Biol Chem* 281,

- 10760-10768
31. Aoki, S., Yatomi, Y., Ohta, M., Osada, M., Kazama, F., Satoh, K., Nakahara, K., and Ozaki, Y. (2005) Sphingosine 1-phosphate-related metabolism in the blood vessel. *J Biochem (Tokyo)* 138, 47-55
 32. Kobayashi, A., Takanezawa, Y., Hirata, T., Shimizu, Y., Misasa, K., Kioka, N., Arai, H., Ueda, K., and Matsuo, M. (2006) Efflux of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine by ABCG1. *J Lipid Res* 47, 1791-1802
 33. See, R. H., Caday-Malcolm, R. A., Singaraja, R. R., Zhou, S., Silverston, A., Huber, M. T., Moran, J., James, E. R., Janoo, R., Savill, J. M., Rigot, V., Zhang, L. H., Wang, M., Chimini, G., Wellington, C. L., Tafuri, S. R., and Hayden, M. R. (2002) Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux. *J Biol Chem* 277, 41835-41842
 34. Ito, K., Wakabayashi, T., and Horie, T. (2005) Mrp2/Abcc2 transport activity is stimulated by protein kinase C α in a baculo virus co-expression system. *Life Sci* 77, 539-550
 35. Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J. G., Luhm, R. A., Wiedmer, T., and Sims, P. J. (1997) Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J Biol Chem* 272, 18240-18244
 36. Waisman, D. M., Gimble, J. M., Goodman, D. B., and Rasmussen, H. (1981) Studies of the Ca $^{2+}$ transport mechanism of human erythrocyte inside-out plasma membrane vesicles. I. Regulation of the Ca $^{2+}$ pump by calmodulin. *J Biol Chem* 256, 409-414
 37. Simons, T. J. (1976) Calcium-dependent potassium exchange in human red cell ghosts. *J Physiol* 256, 227-244
 38. Williamson, P., Bevers, E. M., Smeets, E. F., Comfurius, P., Schlegel, R. A., and Zwaal, R. F. (1995) Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movement in platelets. *Biochemistry* 34, 10448-10455
 39. Kondo, T., Murao, M., and Taniguchi, N. (1982) Glutathione S-conjugate

- transport using inside-out vesicles from human erythrocytes. *Eur J Biochem* 125, 551-554
40. Klokouzas, A., Wu, C. P., van Veen, H. W., Barrand, M. A., and Hladky, S. B. (2003) cGMP and glutathione-conjugate transport in human erythrocytes. *Eur J Biochem* 270, 3696-3708
41. Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S. A., Panico, M., Blench, I., Morris, H. R., Allard, W. J., Lienhard, G. E., and Lodish, H. F. (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-945
42. Holzhutter, H. G. (2004) The principle of flux minimization and its application to estimate stationary fluxes in metabolic networks. *Eur J Biochem* 271, 2905-2922
43. Blostein, R., and Chu, L. (1977) Sidedness of (sodium, potassium)-adenosine triphosphate of inside-out red cell membrane vesicles. Interactions with potassium. *J Biol Chem* 252, 3035-3043
44. Mollman, J. E., and Pleasure, D. E. (1980) Calcium transport in human inside-out erythrocyte vesicles. *J Biol Chem* 255, 569-574
45. Lutsenko, S., and Kaplan, J. H. (1995) Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. *Biochemistry* 34, 15607-15613
46. Tang, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A., and Williamson, P. (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science* 272, 1495-1497
47. Natarajan, P., Wang, J., Hua, Z., and Graham, T. R. (2004) Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast Golgi membranes and relationship to in vivo function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10614-10619
48. Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P. F., van Meer, G., and Holthuis, J. C. (2003) Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol Biol Cell* 14, 1240-1254
49. Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverger, N., Denefle, P., and Assmann, G. (1999) Tangier

- disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 22, 352-355
50. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouelette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Genest, J., Jr., and Hayden, M. R. (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 22, 336-345
51. Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W. E., Hahmann, H. W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K. J., and Schmitz, G. (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 22, 347-351
52. Wang, N., Silver, D. L., Costet, P., and Tall, A. R. (2000) Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem* 275, 33053-33058
53. Wang, N., Silver, D. L., Thiele, C., and Tall, A. R. (2001) ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J Biol Chem* 276, 23742-23747
54. Vedhachalam, C., Duong, P. T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H., Rothblat, G. H., Lund-Katz, S., and Phillips, M. C. (2007) Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 282, 25123-25130
55. Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N. F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K. L., Lewis, R. A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M., and Lupski, J. R. (1997) A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt

- macular dystrophy. *Nat Genet* 15, 236-246
56. Weng, J., Mata, N. L., Azarian, S. M., Tzekov, R. T., Birch, D. G., and Travis, G. H. (1999) Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell* 98, 13-23
57. van Helvoort, A., Smith, A. J., Sprong, H., Fritzsche, I., Schinkel, A. H., Borst, P., and van Meer, G. (1996) MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87, 507-517
58. Elferink, R. P., Tytgat, G. N., and Groen, A. K. (1997) Hepatic canalicular membrane 1: The role of mdr2 P-glycoprotein in hepatobiliary lipid transport. *Faseb J* 11, 19-28
59. Bookchin, R. M., Etzion, Z., Sorette, M., Mohandas, N., Skepper, J. N., and Lew, V. L. (2000) Identification and characterization of a newly recognized population of high-Na⁺, low-K⁺, low-density sickle and normal red cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8045-8050
60. Moriyama, Y., Iwamoto, A., Hanada, H., Maeda, M., and Futai, M. (1991) One-step purification of Escherichia coli H(+)-ATPase (F0F1) and its reconstitution into liposomes with neurotransmitter transporters. *J Biol Chem* 266, 22141-22146
61. Mikkelsen, R. B., Tanabe, K., and Wallach, D. F. (1982) Membrane potential of Plasmodium-infected erythrocytes. *J Cell Biol* 93, 685-689
62. Drapeau, P., and Blostein, R. (1980) Interactions of K⁺ with (Na,K)-ATPase orientation of K⁺-phosphatase sites studied with inside-out red cell membrane vesicles. *J Biol Chem* 255, 7827-7834
63. Cantley, L. C., Jr., Josephson, L., Warner, R., Yanagisawa, M., Lechene, C., and Guidotti, G. (1977) Vanadate is a potent (Na,K)-ATPase inhibitor found in ATP derived from muscle. *J Biol Chem* 252, 7421-7423
64. Chen, Z. S., Lee, K., and Kruh, G. D. (2001) Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4.

- Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* 276, 33747-33754
- 65. Jedlitschky, G., Burchell, B., and Keppler, D. (2000) The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 275, 30069-30074
 - 66. Sauna, Z. E., Nandigama, K., and Ambudkar, S. V. (2004) Multidrug resistance protein 4 (ABCC4)-mediated ATP hydrolysis: effect of transport substrates and characterization of the post-hydrolysis transition state. *J Biol Chem* 279, 48855-48864
 - 67. Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement, J. P. t., Boyd, A. E., 3rd, Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J., and Nelson, D. A. (1995) Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268, 423-426
 - 68. Ashcroft, S. J. (2000) The beta-cell K(ATP) channel. *J Membr Biol* 176, 187-206
 - 69. Cocks, T. M., King, S. J., and Angus, J. A. (1990) Glibenclamide is a competitive antagonist of the thromboxane A2 receptor in dog coronary artery in vitro. *Br J Pharmacol* 100, 375-378
 - 70. Cook, G. A. (1987) The hypoglycemic sulfonylureas glyburide and tolbutamide inhibit fatty acid oxidation by inhibiting carnitine palmitoyltransferase. *J Biol Chem* 262, 4968-4972
 - 71. Bull, B. S., and Hay, K. L. (1985) Are red blood cell indexes international? *Arch Pathol Lab Med* 109, 604-606
 - 72. Borst, P., and Elferink, R. O. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71, 537-592
 - 73. Wijnholds, J., Evers, R., van Leusden, M. R., Mol, C. A., Zaman, G. J., Mayer, U., Beijnen, J. H., van der Valk, M., Krimpenfort, P., and Borst, P. (1997) Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med* 3, 1275-1279

74. Ernest, S., and Bello-Reuss, E. (1999) Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 10, 2306-2313
75. Raggers, R. J., Vogels, I., and van Meer, G. (2001) Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor. *Biochem J* 357, 859-865
76. Payen, L., Delugin, L., Courtois, A., Trinquart, Y., Guillouzo, A., and Fardel, O. (2001) The sulphonylurea glibenclamide inhibits multidrug resistance protein (MRP1) activity in human lung cancer cells. *Br J Pharmacol* 132, 778-784
77. Pratt, S., Shepard, R. L., Kandasamy, R. A., Johnston, P. A., Perry, W., 3rd, and Dantzig, A. H. (2005) The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Mol Cancer Ther* 4, 855-863
78. Schultz, B. D., DeRoos, A. D., Venglarik, C. J., Singh, A. K., Frizzell, R. A., and Bridges, R. J. (1996) Glibenclamide blockade of CFTR chloride channels. *Am J Physiol* 271, L192-200
79. Golstein, P. E., Boom, A., van Geffel, J., Jacobs, P., Masereel, B., and Beauwens, R. (1999) P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflugers Arch* 437, 652-660
80. Nagata, K., Nishitani, M., Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T., and Ueda, K. (2000) Nonequivalent nucleotide trapping in the two nucleotide binding folds of the human multidrug resistance protein MRP1. *J Biol Chem* 275, 17626-17630
81. Urbatsch, I. L., Sankaran, B., Weber, J., and Senior, A. E. (1995) P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site. *J Biol Chem* 270, 19383-19390
82. Swarup, G., Cohen, S., and Garbers, D. L. (1982) Inhibition of membrane phosphotyrosyl-protein phosphatase activity by vanadate. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 1104-1109

83. Bond, G. H., and Hudgins, P. M. (1980) Inhibition of red cell Ca²⁺-ATPase by vanadate. *Biochim Biophys Acta* 600, 781-790
84. Gekeler, V., Ise, W., Sanders, K. H., Ulrich, W. R., and Beck, J. (1995) The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. *Biochem Biophys Res Commun* 208, 345-352
85. Chen, Z. S., Kawabe, T., Ono, M., Aoki, S., Sumizawa, T., Furukawa, T., Uchiumi, T., Wada, M., Kuwano, M., and Akiyama, S. I. (1999) Effect of multidrug resistance-reversing agents on transporting activity of human canalicular multispecific organic anion transporter. *Mol Pharmacol* 56, 1219-1228
86. Chen, Z. S., Lee, K., Walther, S., Raftogianis, R. B., Kuwano, M., Zeng, H., and Kruh, G. D. (2002) Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res* 62, 3144-3150
87. Chen, Z. S., Hopper-Borge, E., Belinsky, M. G., Shchaveleva, I., Kotova, E., and Kruh, G. D. (2003) Characterization of the transport properties of human multidrug resistance protein 7 (MRP7, ABCC10). *Mol Pharmacol* 63, 351-358
88. Chen, Z. S., Guo, Y., Belinsky, M. G., Kotova, E., and Kruh, G. D. (2005) Transport of bile acids, sulfated steroids, estradiol 17-beta-D-glucuronide, and leukotriene C4 by human multidrug resistance protein 8 (ABCC11). *Mol Pharmacol* 67, 545-557
89. Smith, A. J., van Helvoort, A., van Meer, G., Szabo, K., Welker, E., Szakacs, G., Varadi, A., Sarkadi, B., and Borst, P. (2000) MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem* 275, 23530-23539
90. Nagata, K., Yamamoto, A., Ban, N., Tanaka, A. R., Matsuo, M., Kioka, N., Inagaki, N., and Ueda, K. (2004) Human ABCA3, a product of a responsible

- gene for abca3 for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 262-268
91. Sun, H., Molday, R. S., and Nathans, J. (1999) Retinal stimulates ATP hydrolysis by purified and reconstituted ABCR, the photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt disease. *J Biol Chem* 274, 8269-8281
92. Kock, K., Grube, M., Jedlitschky, G., Oevermann, L., Siegmund, W., Ritter, C. A., and Kroemer, H. K. (2007) Expression of adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) drug transporters in peripheral blood cells: relevance for physiology and pharmacotherapy. *Clin Pharmacokinet* 46, 449-470
93. Sasaki, M., Shoji, A., Kubo, Y., Nada, S., and Yamaguchi, A. (2003) Cloning of rat ABCA7 and its preferential expression in platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 777-782

謝辞

本研究を行うにあたり、終始暖かい御指導と御助言を賜りました山口明人教授、西毅助教に心より御礼申し上げます。

小林伸好博士(現ゼリア新薬工業株式会社)には S1P に関する実験操作を教えていただくと共に、数多くの御助言をいただきましたことに深く感謝申し上げます。

田村憲久博士(現武田薬品工業株式会社)には、実験の基礎を教えていただくと共に、数多くの御指導をいただきましたことに心より感謝申し上げます。

R5421 を合成して下さいました加藤修雄教授(大阪大学産業科学研究所)に心より感謝申し上げます。

実験を進める上で数多くの御協力と御助言をいただきました橋本聰文修士、大東穂修士、久野悠修士、尾上麻実子学士、宮田耕資学士をはじめ産業科学研究所山口研究室の皆様に深く感謝いたします。

最後に、5 年間にわたる学生生活に対して理解を示し、御支援いただいた家族と祖父母に厚く御礼申し上げます。

本学位論文の審査は、大阪大学大学院薬学研究科で指名された下記の審査委員により行われた。

主査

大阪大学教授 (薬学研究科・産業科学研究所) 薬学博士 山口明人教授

副査

大阪大学教授 (薬学研究科) 薬学博士 土井健史教授

大阪大学教授 (薬学研究科) 薬学博士 馬場明道教授

大阪大学教授 (薬学研究科) 薬学博士 前田正知教授