

Title	生理活性脂質スフィンゴシン1リン酸分泌機構の解明
Author(s)	小林, 伸好
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46553
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	こばやし のが よし 小林 伸 好
博士の専攻分野の名称	博士 (薬学)
学位記番号	第 20239 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 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	生理活性脂質スフィンゴシン 1 リン酸分泌機構の解明
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人 (副査) 教授 馬場 明道 教授 土井 健史 教授 花岡 文雄

論文内容の要旨

情報伝達物質の放出は、情報を標的細胞へと伝える上で非常に重要な過程であり、多くの神経伝達物質は厳密に制御された開口放出という機構により放出される。しかし、生理活性脂質はその物性が両親媒性であることから膜を単純拡散し細胞外に放出されると考えられてきた。私は、強い生理活性物質が制御されることなく放出されるのではなく、その放出にも制御機構が存在するはずであると考え、生理活性脂質スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) の放出機構の解明を目指した。

S1P は細胞内で合成され、血管内皮細胞や白血球などの形質膜上に存在する 7 回膜貫通型の G 蛋白質共役型受容体である S1P/Endothelial differentiation gene (Edg) ファミリーの受容体に結合することで細胞間情報伝達物質として働く。S1P の生理的役割として、これまでに血管内皮細胞や血管平滑筋細胞の遊走制御による血管新生への関わりや白血球の遊走制御による免疫反応への関わりが明らかとなっている。この反応を引き起こす S1P は、血小板内に多量に蓄積している S1P であると考えられているが、その詳細な放出機構については明らかとなっていない。このような背景から、本研究では特に血小板からの S1P 放出機構の解明を目的とした。

まず、ラット血小板を用い、S1P の細胞外への放出を調べた。無刺激状態の時、スフィンゴシンは血小板内へと取り込まれ、ほぼすべてが内部で S1P として蓄積した。この細胞内の S1P は、トロンビン刺激により上清中へと放出された。この放出は protein kinase C (PKC) の阻害剤であるスタウロスポリンによって完全に阻害された。また、PKC 活性化剤である 12-O-tetradodecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) によっても S1P の放出は起こり、これもスタウロスポリンにより阻害された。これらのことから、トロンビン刺激による血小板からの S1P 放出は PKC シグナルの活性化により引き起こされるものであると考えられる。一方、S1P の放出は A23187 と Ca^{2+} によっても起こるが、この放出はスタウロスポリンによりほとんど阻害されなかった。この Ca^{2+} による S1P の放出反応は、PKC とは別の経路、もしくは、より下流の部位に働くことによって起きていると推定される。トロンビン刺激時において、medium 中に SK の活性は認められず、細胞外でスフィンゴシンから S1P への変換は起きていなかった。つまり、この刺激に応答した上清中の S1P の増加は、細胞内に蓄積している S1P が細胞外へ放出されたためと結論した。

血小板内からは多くの生理活性物質が分泌顆粒内に存在し、開口放出によって分泌されることが明らかとなっている。そこで、S1P の細胞外への放出が開口放出によるものであるか明らかにするため、S1P 放出の時間依存性を細胞内顆粒のものと比較した。その結果、トロンビン刺激による S1P の放出は、分泌顆粒内の物質とは異なる挙動を示し

た。また、S1Pは無刺激条件においても最大20%程度の放出が認められたのに対して、分泌顆粒の内容物は無刺激条件下では全く放出されなかった。これらの結果から、S1Pの放出反応は開口放出とは異なるものであると考えた。

S1Pが開口分泌により放出されないことをより直接的に示すため血小板におけるS1Pの細胞内局在を調べた。SLOを用いて血小板形質膜に特異的に孔をあけた細胞を用いて分泌顆粒内の物質が外部へと漏出しない条件を設定した。この条件下においてS1Pは細胞質に含まれるLDHと共にSLO処理血小板から漏出した。このことから、S1Pは細胞質に存在していることが明らかとなった。

ここで、生理活性脂質であるS1Pは疎水性が高いため、単独では水に溶けず、BSAやTritonX-100がその可溶化に必要である。実際、SLO処理血小板からのS1P漏出もBSAによる可溶化が必要であった。しかし、水溶性蛋白であるLDHの漏出はBSAに依存しなかった。また、血小板膜画分を蛋白分解酵素で処理しても、S1Pの水溶性画分への遊離は認められなかった。これらの結果からS1Pは膜蛋白質を介してではなく、直接、形質膜内葉に存在していると考えた。さらに、私はこれらの結果よりS1Pが形質膜に存在する輸送体によって放出されていると考えた。

そこで、S1P放出を担う輸送体のエネルギー要求性を調べるため、 α 毒素(ヘモリシン)を用いて血小板形質膜に孔を形成させた。 α 毒素は、SLOよりも小さな孔を形成する細菌の溶血毒素である。実際、 α 毒素処理血小板では細胞質に存在するATPの漏出は認められたが、S1Pの漏出は起きなかった。これは、SLO処理血小板と異なり、内部にBSAが流入できないためであると考えた。 α 毒素処理血小板からのセロトニンの放出はATPと Ca^{2+} の両方を必要としたが、S1Pは、 Ca^{2+} 、ATPいずれか単独の添加で、それぞれ60%、10%程度放出された。この結果は、S1Pの放出が開口分泌によるものではなく、ATPと Ca^{2+} に依存する別々の二つの輸送系により担われていることを示唆している。

これらの結果からATPや Ca^{2+} 依存的に脂質を輸送する蛋白として知られるABC輸送体やphospholipid scramblaseがS1Pの放出に関与している可能性が考えられた。 α 毒素処理血小板からのATP依存性のS1P放出は、ABCA1の阻害剤グリブライドによる阻害効果が認められた。無処理血小板からのトロンビン刺激によるS1P放出もグリブライドにより濃度依存的に阻害された。一方、ABCB1の阻害剤Cyclosporin AやABCC1の阻害剤MK571によってS1Pの放出が阻害されることはなかった。これらの事実はATP依存性のS1P放出がABCA1に相同性の高いABC輸送体によって担われている可能性を示唆している。また、CaイオノフォアによるS1Pの放出は、phospholipid scramblaseの阻害剤R5421によって阻害された。

以上の結果より、S1Pは細胞膜の細胞質側に存在し、開口放出ではなく輸送体によって放出されることが明らかとなった。S1P放出は、リン酸化によって活性化されるATP依存的な輸送体、おそらくABC輸送体と、 Ca^{2+} 依存的な輸送体、おそらくphospholipid scramblaseの二つの独立した経路であることを明らかとした。細胞膜内葉のS1Pはこれら輸送体によって形質膜外葉へと運ばれた後、血清中に多量に存在する血清アルブミンによって細胞膜から引き抜かれることで血清中に放出されていると考えられる。

この結果は、脂溶性の高い生理活性脂質であっても単純拡散により膜を透過するのではなく、膜を選択的に透過させる輸送体が存在していることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

血小板はセロトニンやPDGFなど多くの生理活性情報伝達分子の分泌を担っている。その大部分は開口放出(exocytosis)という方法で細胞外に分泌されている。ところが、脂質性情報伝達分子として最近注目されてきているスフィンゴシン1リン酸(S1P)の分泌機構は全くわかっていなかった。S1Pは血小板に高濃度に蓄積され、トロンビン等の刺激により血中に分泌される。小林君はこの分泌機構を詳しく研究し、分泌の時間依存性が開口放出によるものとは大きく異なること、また、開口放出により分泌されるものはストレプトリシンO処理で細胞質膜のみを選択的に透過性にしても漏出してこないが、S1Pは漏出することから、細胞質からの排出輸送体による分泌であると考え、各種阻害剤等を用い、またエネルギー依存性等を調べた結果、ATP加水分解によって駆動されるABCAファミリーの未知の輸送体、およびカルシウムイオン依存性の輸送体と言う、2種類の排出輸送体によって仲介されている

ことを突き止めた。この成果は 2005 年の *J. Lipid Res.* に論文として出版された。本論文は、脂質性情報伝達物質排出輸送体の存在を初めて報告したものであり、大阪大学大学院薬学系研究科博士の学位にふさわしいものと認められる。