



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	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46553
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	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、血小板内に大量に蓄積している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ボ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、これもスタウロスボ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Ca²⁺によって起こるが、この放出はスタウロスボリンによりほとんど阻害されなかった。このCa²⁺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たなかった。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開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 处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 处理血小板からの 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に、 α 毒素（ヘモリシン）を用いて血小板形質膜に孔を開成させた。 α 毒素は、SLO よりも小さな孔を開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 处理血小板と異なり、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い。これらの事実は ATP 依存性の S1P 放出が ABCA1 に相同意の高い 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、膜を選択性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つていなかった。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性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。