



Title	スフィンゴシン1-リン酸(S1P)放出輸送体の探索と新規S1P輸送体Spns2の同定
Author(s)	久野, 悠
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57953
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【3】

氏名	久野 悠
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第23746号
学位授与年月日	平成22年3月23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	スフィンゴシン1-リン酸(S1P)放出輸送体の探索と新規S1P輸送体Spns2の同定
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人 (副査) 教授 馬場 明道 教授 山元 弘 教授 土井 健史

論文内容の要旨

スフィンゴシン1-リン酸(S1P)は細胞膜の主要な構成成分であるスフィンゴミエリンから合成され、細胞の増殖や遊走、アポトーシスの抑制など細胞の基本的なプロセスに関わる生理活性脂質である。また、細胞膜上に発現しているS1P受容体(S1P_{1,5})を介してシグナルを伝える細胞間情報伝達物質として機能するだけでなく、細胞内においてセカンドメッセンジャーとしても働く新しいタイプの生理活性脂質として注目されている。S1P受容体は細胞表面に発現しているため、リガンドであるS1Pは細胞外からアクセスすることになる。S1Pの合成酵素であるスフィンゴシンキナーゼは細胞内に局在しているため、S1Pは一度細胞外へ放出される必要があるが、S1Pの放出機構については不明な点が多い。そこで本研究では、S1Pによる情報伝達経路の調整を担っていると考えられるS1P放出輸送体の同定を目指した。

生体内においてS1Pは主に血液中やリンパ液中に存在している。血液中へS1Pを供給する細胞として血小板と赤血球が知られており、更に血管内皮細胞についてもS1P供給細胞である可能性が指摘されている。我々は、これまでに血小板からのS1Pの放出機構を解析した結果、ABCA1輸送体の阻害剤であるglyburideとphospholipid scramblase(PLSCR)の阻害剤であるR5421によって血小板からのS1Pの放出が阻害されることを明らかとしている。glyburideはABCA型特異的な阻害剤ではなく、多くのABC型輸送体が阻害されるため、血小板におけるS1P輸送体候補としてABC(ATP

binding cassette)輸送体とPLSCRを考え、S1P輸送体の同定を目指したが、血小板は生体に少量しか存在しないため、蛋白質レベルで精製・同定することは困難であった。また、血小板は造血幹細胞由来の巨核球の細胞質がちぎられることによって産生されるため、無核の細胞であり、遺伝子操作が困難な細胞である。慢性骨髓性白血病患者から確立された巨核芽球性の培養細胞であるMEG-01細胞はDNA合成阻害剤であるaphidicolinで処理することで、PLP(Platelet-like particle)という血小板に似た分子を産生し、PLPはトロンビン刺激により血小板同様の形態変化を引き起こすことが報告されている。そこで、本研究ではPLPを血小板のモデルとしてS1P輸送体の同定を目指した。まず、PLPが血小板と同様にトロンビン刺激依存的なS1P放出能を保持しているのか調べたところ、PLPではトロンビン刺激依存的にS1Pが放出された。つまり、MEG-01細胞由来のPLPには血小板と同様のS1P輸送体が発現していることが示唆された。次に、ABC輸送体とPLSCRのMEG-01細胞における発現量を定量RT-PCRにより調べたところ、13遺伝子(*abca3*, *abca7*, *abcb3*, *abcb7*, *abcb10*, *abcc1*, *abcc4*, *abcc10*, *abcd1*, *abcg2*, *plscr1*, *plscr3*, *plscr4*)の発現を確認した。これらの中から、*abca3*, *abcb3*, *abcb7*, *abcb10*, *abcd1*の5遺伝子は形質膜ではなく細胞内膜系に局在するという報告があったため、S1P輸送体候補から除外した。残りの8種類のS1P輸送体候補(*abca7*, *abcc1*, *abcc4*, *abcc10*, *abcg2*, *plscr1*, *plscr3*, *plscr4*)について、siRNAにより発現抑制を行ったMEG-01細胞からPLPを調整し、S1P輸送活性の抑制を引き起こすか検討した。その結果、*abcg2*遺伝子に対するsiRNA処理により、有意にS1P放出活性が減少した。つまり、ABCG2がPLPにおいてS1P放出輸送体として機能している事が示唆された。しかしながら、ABCG2単独でS1P高蓄積細胞に発現させても細胞からのS1Pの放出は見られなかったことから、ABCG2は他の因子と共にS1Pの放出に関与していると考えている。

また、機能未知の輸送体の解析からS1P輸送体の同定を試みていたところ、二又心臓形成ゼブラフィッシュの原因遺伝子としてSpns2が同定された。Spns2に変異を持つゼブラフィッシュはS1P受容体に変異を持つゼブラフィッシュと非常に類似した表現型を示し、アミノ酸配列からバクテリアのMFS(major facilitator superfamily)型輸送体ファミリーに分類されることから、Spns2はS1P輸送体である可能性が考えられた。そこで、Spns2をS1P高蓄積細胞に発現させたところ、細胞外でのS1Pの局在が観察された。これは、Spns2の発現によりS1Pの合成酵素であるスフィンゴシンキナーゼが放出され細胞外でS1Pが合成されたものではないこと、また細胞死によってS1Pが細胞外に漏出したものではないことを示した。つまり、Spns2は単独で細胞外へのS1P放出活性を示すS1P輸送体であることを明らかとした。

Spns2は哺乳類においてもオルソログが存在し、細胞への発現によりヒト及びマウスのSpns2もS1P放出活性を示した。しかし、ゼブラフィッシュと異なり、*spns2*遺伝子欠損マウスは正常に生まれ心臓形成に外見上の異常はなかった。ここで、S1Pの濃度が常に高濃度に維持されている血漿中のS1P濃度を測定したところ、野生型マウスと比較して約半分に減少していたことから、マウスではSpns2は血液中へのS1Pの供給に関与していることが示唆された。しかし、これまでS1Pの主な供給源と考えられてきた血小板や赤血球からのS1P放出能は*spns2*遺伝子欠損マウスと野生型マウスで変化はなかった。つまり、マウスでは血球細胞以外から血中にS1Pを供給していると考えた。そこで、血管内皮細胞においてSpns2が機能しているのかヒト臍帯静脈内皮細胞由來のHUVEC細胞を用いて解析した。siRNAにより*spns2*遺伝子の発現を抑制することで、HUVEC細胞からのS1Pの放出が約1/3に抑制された。つまり、Spns2は血管内皮細胞において恒常に血液中に存在するS1Pを供給していると考えられる。

本研究では血小板からのS1Pの放出に関わる遺伝子としてABCG2を見出した。また、機能未知の輸送体の解析から新規S1P輸送体としてSpns2を同定した。Spns2はS1P輸送活性の測定に成功し、生理的条件下においてもS1P輸送体として機能していることを明らかとした初めてのS1P輸送体である。Spns2は血管内皮細胞からのS1Pの放出輸送体として働いており、血液中のS1Pの新しい維持機構を示すことができた。血液中のS1Pは免疫や骨代謝などに非常に重要な役割を果たしていることから、血液中のS1Pを調節しているSpns2は創薬の新しいターゲットと成り得る可能性を持っていると考えている。

論文審査の結果の要旨

久野悠君の博士論文「スフィンゴシン1リン酸(SIP)放出輸送体の探索と新規SIP輸送体Spns2の同定」に関して審査を行った。細胞間情報伝達は生命にとって必須の機能であり、そのプロセスは情報の発信と受容から成り立っている。近年、受容体の研究は著しく進み、その生理的役割が明らかにされ、それらをターゲットとする薬剤の開発が盛んに行われている。ところが、情報発信機能の研究は著しく遅れている。なかでも、いわゆる開口放出(exocytosis)によって放出されるのではない、脂溶性の情報伝達物質の分泌過程については全くわかっていない。本論文は、その分泌輸送体の探索と、世界で初めての同定に成功した極めて価値の高い論文である。本論文の主要部分はScience323, 524-527(2009)に発表された。

久野君が注目したのは、血液中に放出され、リンパ球の遊走や血管新生と深く関わっている脂質メディエーターであるスフィンゴシン1リン酸である。この受容体の研究は近年著しく進み、SIP₁～SIP₅まで同定され、その生理的役割が着々と解明されてきている。反面、SIPは血小板や赤血球から分泌されているが、その分子機構については全く不明である。国立循環器病センターのグループにより、ゼブラフィッシュから、心臓が2個発生する変異体が分離され、その責任遺伝子としてSpns2が同定された。心臓2個のゼブラフィッシュ変異体はこれまでにも知られており、心臓のSIP受容体に変異が入っていることが報告されていた。ところが、Spns2はSIP受容体遺伝子とは別の部位にある遺伝子だったため、その生化学的性質の解明が私たちの研究室に要請された。久野君はゼブラフィッシュのSpns2培養細胞を用いて、それがSIP分泌輸送体であることを証明した。さらに、2個心臓変異体Spns2はSIP分泌能が欠損していることを証明した。Spns2ホモログはマウスやヒトなどの乳類にも存在する。hSpns2, mSpns2についても同様にクローニングし、培養細胞において同じくSIP分泌輸送体であることを示した。次いで、Spns2ノックアウトマウス（ヘテロ）を変異マウスバンクより購入し、ホモ体を得た。Spns2ノックアウトマウスでは、血中のSIP濃度が半減していることが示された。ところが、ノックアウトマウスから単離した血小板、赤血球は共に正常なSIP分泌能を保持していた。そこで、もう一つのSIPソースである血管内皮細胞を単離し、SIP分泌能を測定したところ、正常マウスからの血管内皮細胞はSIP分泌能を示したが、ノックアウトマウスの血管内皮細胞はSIP分泌能を欠いていることが明らかになった。

本論文により、Spns2は血管内皮細胞のSIP分泌輸送体であることが証明された。これは、生理的に意味のある初めてのSIP特異的な分泌輸送体の発見である。これまでにはABC蛋白に属する異物排出輸送体が情報伝達物質も放出しているという報告はあったが、これらは基質特異性の低い輸送体であり、本当に生理的に機能しているのかどうかには疑念があった。今回同定されたSpns2はABC蛋白群ではなく、SIP特異的な輸送体である。従って、情報伝達物質分泌輸送体の初めての同定と言える。本論文は、分泌輸送介在型情報伝達という新しい分野を切り開く端緒となるものであり、生命体の情報伝達の研究を大きく前進させた。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。