

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2012

課題番号：21570137

研究課題名（和文） スフィンゴシン 1 リン酸輸送体の同定とその多様性の解明

研究課題名（英文） Identification of sphingosine 1-phosphate transporters and their roles in various physiological functions.

研究代表者

西 毅 (NISHI TSUYOSHI)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：60403002

研究成果の概要（和文）：生理活性脂質であるスフィンゴシン 1 リン酸（S1P）の細胞外への放出に関わる輸送体として SPNS2 が哺乳類の血管内皮細胞で機能していることを見いだした。このホモログである SPNS1 と SPNS3 は細胞内膜系に局在するため細胞外への S1P 放出に関与していないことを示した。また S1P の光標識化合物を新たに作成し、その化合物は細胞に発現させた SPNS2 を標識することができ、赤血球の輸送体の探索に用いることができる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a lipid mediator which was secreted from vascular endothelial cells by SPNS2. SPNS2 homologues, SPNS1 and SPNS3, were localized at intracellular compartment and not function as a S1P exporter from the cells. We also develop a novel S1P analogue which functions as a light induced cross-linking to SPNS2. This compound would be useful for identification of erythrocyte S1P transportr(s).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：脂質メディエーター、輸送体、スフィンゴシン 1 リン酸、赤血球、血小板、血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内において脂質は細胞膜の構成成分であり、細胞の恒常性の維持などに重要であると共に、刺激に応答して細胞内外で情報伝達物質としても働いている。しかしながら、細胞でどのようにして脂質メディエーター等の両親媒性情報伝達物質が輸送されるか、特に細胞外への膜を介した放出機構について

ではほとんど分かっていない。我々はこの機構が情報伝達における missing link と考えその全容の解明を目指している。我々はその中でも、血小板に蓄積し血小板の活性化に伴って細胞外へ放出されるスフィンゴシン 1 リン酸（S1P）に着目し解析を進めてきた。

S1P は脂質メディエーターの 1 種であり、細胞移動やアポトーシスの抑制等様々な生

理機能に關与することが明らかとなっている。その中でも最近、血清中に一定濃度存在する S1P のリンパ組織との間の濃度勾配がリンパ球の血液中への移行に必須であることが示され、S1P 受容体のアゴニストである FTY720 が新しい免疫抑制剤として注目されている。

我々はこれまでに、血小板の細胞膜に特異的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ることで、S1P が血小板の細胞膜に局在する ABC 輸送体によって放出されている可能性を見いだした。さらに赤血球においても ABCA1 輸送体の阻害剤 Glycerol によって阻害される ATP 依存的な輸送体が存在することを見いだした。その後、いくつかのグループから異なる細胞、例えばアストロサイトやマスト細胞からはそれぞれ ABC 輸送体である ABCA1 と ABCC1 が S1P の細胞外放出に關与することが培養細胞等を用いて報告された。しかしながらこれらの遺伝子のノックアウトマウスでは血液中の S1P 量は変化せず、実際の個体での血液系の生理機能に係わる S1P 輸送体は未だ明らかになっていない。これまでに S1P 受容体として 5 種類 (S1P1-5) が同定され、それぞれ異なる組織や細胞で特異的な機能を担っていることが分かっている。受容体と同じように輸送体も組織や細胞において異なる輸送体が異なる調節機構で働いている可能性がある。例えば血小板はトロンビン等の血小板活性化刺激に応答して S1P を放出するが、赤血球は刺激を必要とせず常に S1P を細胞外へ放出していることを明らかにしている。本申請ではこれらの結果をもとに、血小板や赤血球の S1P 輸送体の性質の生化学的解明を進めることで、分泌輸送介在型情報伝達を中心とする輸送体の同定とその多様性の解明を目指す。これにより、トランスポーターオリエンティドの創薬のための基盤が確立できると考えている。

(2) 一方我々は、ABC 輸送体以外のオーファン輸送体の機能解析から生体内で生理的に働く S1P 輸送体を同定することに最近成功した。この輸送体は ABC と同じようにバクテリアにおいて多剤排出に關与する MFS 型輸送体と有為な相同性を持っていた。この輸送体は実際に生体内で働くことを明らかとした最初の S1P 輸送体である。この輸送体は哺乳類では 3 種類のホモログを遺伝子上で持つことを明らかにしており、ABC 型の輸送体とともに解析を進めることで S1P 輸送体の組織、細胞における多様性が解明できると考えている。

2. 研究の目的

(1) 本研究期間中に特定の基質に着目した輸送体蛋白質の解析からの手法と、発現細胞

やノックアウトマウスを用いた遺伝子情報からの手法を並行して用いることで、異なる細胞や組織に発現する S1P 輸送体の実態を明らかにし、その多様性をもたらす個体での生理的な役割を明らかにする。これにより、脂質メディエーターの細胞外への放出を担う輸送体の普遍性と多様性を解明し、分泌輸送体介在型情報伝達というべき新しい概念の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 血小板および赤血球からのスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) 放出輸送体の同定

我々は血小板以外にも赤血球からの S1P のも血小板と同じ ABC 輸送体によるものであることを示唆する結果を得ている。赤血球はこれまでに反転膜を用いた各種輸送体の解析に広く用いられており、また、血小板とは異なり輸送体は常に活性されており、さらに多くの膜を得ることが出来るという利点がある。これまでに ATP 依存的な S1P の反転膜小胞への取り込みを測定できる系の構築に成功している。この系を用いて輸送体の酵素科学的な性質を明らかにし、その活性を指標にして細胞膜面分から各種界面活性剤により可溶化、ゲルろ過やアフィニティー精製、再構成により輸送体分子の精製を行う。部分的にでも精製できたところで LC-MS/MS などの質量分析により、輸送体の配列を明らかにできると考えている。

S1P に光架橋剤を結合した化合物を合成し、 α -Toxin 処理したセミインタクト細胞で、ATP もしくは Ca^{2+} によって S1P の放出を誘導した条件で架橋のかかる蛋白質を単離し、MALDI-TOF-MS により配列を同定する。蛋白質の配列が明らかになった後、遺伝子を単離し、培養細胞への発現による輸送活性を測定し、生理的な役割を確定するためにノックアウトマウスを作成する。

(2) オーファン輸送体の網羅的検索による S1P 輸送体の同定

我々は血小板からの S1P 放出の生化学的解析から ABC の A 型輸送体が關与することを示してきた。さらに、実際に S1P を輸送する蛋白質を同定するために、細細胞内に S1P を蓄積する細胞を構築し、そこにオーファン輸送体を発現させることで細胞外への S1P 放出を測定できる系を作った。しかしながらこれまでに ABC 輸送体の A サブファミリーに属するオーファン輸送体の中で活性を持つものを同定できていない。その中にはアストロサイトやマスト細胞で S1P の放出に關与することが報告された ABCA1 と ABCC1 も含まれている。この結果は、これら遺伝子のノックアウトマウスで血液中の S1P 濃度が変化しなかった結果と一致する。すでに述べたように、我々は最近 ABC 型ではないオー

ファン輸送体の中で S1P 輸送体を同定しており、これを構築した細胞を用いた測定系に発現させると刺激非依存的に S1P を放出することが観察できた。このことはこの測定系が S1P 輸送体のスクリーニングに用いることが出来ることを実証している。そこで、本年度は網羅的にこれまで検討していないオーファン ABC 輸送体をしらべることで ATP 依存的な S1P 輸送体の同定を目指す。

(3) 新しく同定した S1P 輸送体分子の機能解析

zebrafish において生理的に機能する S1P 輸送体として SPNS2 を同定した。この輸送体は哺乳類においても相同遺伝子を 3 種類の持つことを明らかとした。そのうち最も相同性の高いもの（ヒト SPNS2）では細胞に発現させることで S1P 放出活性を持つことを明らかにした。そこでそれ以外の 2 種類の相同体の遺伝子を単離し、S1P 輸送体として機能するか細胞を用いた系で調べる。さらにその哺乳類での組織、細胞間での発現を調べることによって哺乳類での生理的役割を明らかにする。輸送体分子の輸送活性の生化学的解析を進めることで S1P 輸送の普遍的機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 赤血球の S1P 輸送体の性質の生化学的な解明を進めた。赤血球の反転膜を用いて S1P の輸送活性を測定できる系を構築することに成功し、S1P は ATP 依存的に輸送されることを明らかにした、しかしこの輸送は ATP の加水分解を必要としないことを見出した。さらに赤血球の輸送体は血小板の輸送体と同じように glyburide で阻害され、さらに vanadate や bafilomycinA1 でも阻害されることが分かった。この S1P 輸送体はこれまで知られている輸送体とは異なる新しいタイプの輸送体であると考えられる。

赤血球の S1P 輸送体の基質認識の特異性を調べたところ、スフィンゴシンやその類似体は輸送せず、リン酸化を受けた S1P とその類似体を輸送することが分かった。この結果は血管内皮細胞の輸送体である SPNS2 の結果と一致し、S1P 輸送体の基質認識機構が異なる分子間で共通である可能性を示唆している。

この赤血球における S1P 輸送体を同定するために、S1P に光架橋基を導入し他化合物を作成した。この分子が実際に輸送されなくても基質結合部位には入り込んで輸送を阻害したりするものであれば輸送体の同定は可能であると考えられる。この分子はすでに S1P 輸送体として同定している SPNS2 を弱く標識できることを明らかにした。この分子で、赤血球の反転膜と反応させたところ、反応性は弱いと特定の分子量のバンドが標識され

る。今後さらに、架橋残基の導入位置や大きさ等を変化させたものを合成し、まず S1P の輸送の阻害を調べる事で、特異性の高い標識効率の良い架橋剤の選択を行なうことで標識タンパク質の同定が可能となった。

(2) マウスの血小板から単離した mRNA を用いて ABCA 型の輸送体の発現を調べ、それらをそれぞれ単独で CHO 細胞を用いて S1P の放出活性を調べたが、いずれも活性がなかった。これまでに ABC 型ではなく MFS 型である SPNS2 でのみ S1P 輸送活性を見いだしていることから、MFS 型（哺乳類では SLC 型）のオーファン輸送体にも対象を広げ、S1P 輸送体の探索を進めた。これまでに SPNS2 とアミノ酸の相同性が比較的近いものと赤血球、血小板に発現する物を細胞を用いた S1P 輸送活性測定系で解析したが、これまでに S1P 輸送体として働く物を見いだせなかった。このことは S1P は他の有機アニオンを基質とする基質認識が甘い輸送体ではなく、比較的特異性の高い輸送体によって輸送されていることを示している。

(3) ゼブラフィッシュにおいて同定した S1P 輸送体 SPNS2 の哺乳動物オルソログやホモログの機能解析を進めた。これまでに我々は S1P の放出活性を持つ血小板や赤血球において、その活性は glyburide 感受性で、ATP が必要であることを明らかにしている。そこで、SPNS2 の生理的役割を明らかにするため、glyburide および ATP 依存性を調べたが、いずれも S1P 輸送活性に影響を与えなかった。このことからこれら血球細胞からの S1P の放出に SPNS2 は関与していないことが明らかとなった。その生化学的な性質を明らかにするため、エネルギー依存性や阻害剤感受性を調べたが、これまでに有力な候補が得られていない。また、その輸送活性は細胞内から細胞外への 1 方向性であり、細胞外の S1P を細胞内へ輸送する活性を見いだせていない。これまでの結果から SPNS2 は膜に形成された S1P の濃度勾配に従って細胞内から外へ S1P を輸送するチャンネル様の活性を持つ輸送体であると考えている。

ヒトには SPNS1 から 3 まで 3 種類のホモログが存在するが、我々が構築した CHO 細胞にスフィンゴシンキナーゼを発現させた細胞を用いた S1P 放出アッセイでは SPNS2 のみが S1P 放出能を持ち、SPNS1 および SPNS3 は細胞膜に局在せず、細胞外へ S1P を放出できなかった。これらの蛋白質は組織での発現部位が異なっており、その組織、細胞において異なる機能を持っていることが推測された。SPNS2 と SPNS1 及び SPNS3 はそのアミノ酸配列が 60% 程度保存されており、SPNS2 における S1P 輸送に必

須と考えられる残基が保存されていた。このことより SPNS1 と SPNS3 も細胞膜に局在させれば S1P の細胞外放出活性を持つ可能性がある。そこで、これらと SPNS2 とのキメラ蛋白質を作り細胞膜に局在させたが、S1P 輸送活性を持たなかった。細胞内オルガネラに局在する SPNS2 ホモログは S1P 輸送体ではなく別の活性を持っている可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Hisano Y., **Nishi T.** and Kawahara A., Functional roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) in immunity, *J. Biochem.*, 査読有、**152**, 2012, 305-311、
- ② Hisano, Y., Kobayashi, N., Yamaguchi, A. and **Nishi T.**, Mouse SPNS2 functions as a sphingosine 1-phosphate transporter in vascular endothelial cells, *PLoS ONE* , 査読有、**7**, 2012, e38941
- ③ Takahashi, M., Kawamura, A., Kato, N., **Nishi T.**, Hamachi, I. and Ohkanda, J., Phosphopeptide-dependent fluorescence labeling of 14-3-3 ζ by fusicoccins, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有、**51**, 2012, 509-512、
- ④ Hisano, Y., Kobayashi, N., Kawahara, A., Yamaguchi, A. and **Nishi, T.**, The sphingosine 1-phosphate transporter, SPNS2 function as an exporter for the phosphorylated form of immunomodulating agent FTY720 from the cells., *J. Biol. Chem.* , 査読有、286, 2011, 1758-1766、
- ⑤ Ye, D., Meurs, I., Ohigashi, M., Zhao, Y., Habets, K.L.L., Calpe-Berdiel, L., Kubo, Y., Yamaguchi A, van Beckel, T.J.C., **Nishi T.** and van Eck, M., Macrophage *Abca5* influences cellular cholesterol efflux and increases susceptibility to atherosclerosis in female Ldlr knockout mice., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 査読有、**395**, 2010, 387- 394 ,
- ⑥ Kobayashi N., Kobayashi N., Yamaguchi A. and **Nishi T.**, Characterization of the ATP-dependent sphingosine-1-phosphate transporter in rat erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, 査読有、**284**, 2009, 21192-21200、
- ⑦ 川原敦雄、**西 毅**、山口明人、望月直樹、スフィンゴシン-1-リン酸の輸送体 Spns2 は心臓前駆細胞の移動を制御する、細胞工学、査読無、**28**、2009、390-391、

[学会発表] (計 3 1 件)

- ① 松山 ゆみ子、久野 悠、山口 明人、**西 毅**、脂質メディエーター輸送体による受容体活性化機構の解析、日本生体エ

- ネルギー研究会 第 38 回討論会、平成 24 年 12 月 23 日、岡山大学 (岡山市)
- ② 眞下 雅貴、村田 真紀、久野 悠、山口 明人、**西 毅**、細胞膜局在に関わる領域の導入による細胞内膜に局在する輸送体の形質膜への局在化と機能解析、第 85 回日本生化学会大会、平成 24 年 12 月 15 日、福岡国際会議場 (福岡市)
 - ③ **西 毅**、久野 悠、山口明人、輸送体による情報伝達物質の局所による量的制御が細胞の動きを調節する、日本生体エネルギー研究会 第37回討論会、平成23年12月22日、京都産業大学 (京都市)
 - ④ 久野 悠、山口 明人、**西 毅**、脂質メディエーター分泌輸送体 SPNS2 ノックアウトマウスの解析と生理的役割の解明、日本生体エネルギー研究会 第37回討論会、平成 23 年 12 月 21 日、京都産業大学 (京都市)
 - ⑤ **西 毅**、久野 悠、山口明人、哺乳類におけるスフィンゴシン1リン酸輸送体の同定と生理機能の解析、第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、平成23年11月25日、岡山大学 (岡山市)
 - ⑥ Kobayashi N., Kobayashi N., Adachi H. Yamaguchi A. and **Nishi T.**, Characterization of the ATP-dependent sphingosine 1-phosphate (S1P) transporter in rat erythrocyte, The 30th Naito conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [II], 平成23年6月30日、シャトーキングダム札幌 (札幌市)
 - ⑦ 久野 悠、山口明人、**西 毅**、哺乳類における新規スフィンゴシン1-リン酸(S1P)輸送体の同定及び解析、第58回日本生化学会近畿支部例会、平成23年5月21日、関西医科大学、守口市、
 - ⑧ Hisano, Y. Yamaguchi, A. **Nishi, T.**, Functional analysis of a novel S1P transporter, SPNS2, BMB2010, 平成22年12月9日、神戸ポートアイランド (神戸市)
 - ⑨ 久野 悠、山口明人、**西 毅**、免疫抑制剤 FTY720 の作用機序における S1P 輸送体 SPNS2 の役割、第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、平成22年11月29日、富山国際会議場 (富山市)
 - ⑩ **西 毅**、久野 悠、山口明人、S1P 輸送体 SPNS2 の生理機能の解析、第36回日本生体エネルギー研究会、平成22年11月19日、大阪大学 (吹田市)
 - ⑪ Hisano, Y., Yamaguchi, A. **Nishi, T.**, The analysis of sphingosine 1-phosphate secretion from cells expressing Spns2., 51st International conference on the Bioscience of Lipids, 平成22年9月10日、Alhondiga Conference Center, Bilbao, Spain、
 - ⑫ **Nishi T.**, Hisano Y., Kobayashi N.

- Yamaguchi A., Analysis of the mammalian sphingosine 1-phosphate transporters, The 27th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [I], 平成22年7月1日、シャトーキングダム札幌(札幌市)
- ⑬ 西 毅、スフィンゴシン1リン酸の細胞外放出機構の解明に向けた取り組み、第3回「情報と細胞機能」研究会、平成22年3月5日、北海道大学(札幌市)
- ⑭ 西 毅、小林直木、久野 悠、川原敦雄、山口明人、フィンゴシン1リン酸輸送体の同定と機能解析、日本生体エネルギー研究会 第35回討論会、平成21年12月19日、旭川大学(旭川市)
- ⑮ 久野 悠、川原敦雄、山口明人、西 毅、新規S1P輸送体SPNS2の機能解析、日本生体エネルギー研究会 第35回討論会、平成21年12月19日、旭川大学(旭川市)
- ⑯ 久野 悠、川原敦雄、山口明人、望月直樹、西 毅、スフィンゴシン1-リン酸(S1P)輸送体Spns2による心臓発生の制御機構、第19回日本循環薬理学会、平成21年11月27日、京都大学(京都市)
- ⑰ 小林直木、西 毅、山口明人、スフィンゴシン1リン酸(S1P)の光反応性アナログを用いたS1P輸送体の探索、第82回日本生化学会大会、平成21年10月22日、神戸ポートアイランド(神戸市)
- ⑱ 久野 悠、山口明人、西 毅、スフィンゴシン1リン酸(S1P)の光反応性アナログを用いたS1P輸送体の探索、第82回日本生化学会大会、平成21年10月22日、神戸ポートアイランド(神戸市)
- ⑲ Kobayashi N., Kobayashi, N., Nishi T. and Yamaguchi A., Characterization of the ATP dependent sphingosine-1-phosphate (S1P) transporter in rat erythrocytes, The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences “Bioactive Lipid Molecules and Transporters”, 平成21年5月25日、グランドプリンスホテル高輪(東京都)
- ⑳ Hisano Y., Nishi T. and Yamaguchi A., Platelet-like particles derived from MEG-01 cells release S1P with thrombin stimulus, The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences “Bioactive Lipid Molecules and Transporters”, 平成21年5月25日、グランドプリンスホテル高輪(東京都)
- ㉑ 久野 悠、西 毅、山口明人、血小板様分子を賛成するMEG-01細胞を用いたS1P輸送体の探索、第4回トランスポーター研究会、平成21年5月23日、東京大学弥生講堂(東京都)
- ㉒ 久野 悠、西 毅、山口明人、血小板様分子を賛成するMEG-01細胞を用いたS1P輸送体の探索、第4回トランスポーター研究会、平成21年5月23日、東京大学弥生講堂(東京都)
- ㉓ 小林直木、小林伸好、西 毅、山口明人、ラット赤血球におけるATP依存的スフィンゴシン1リン酸輸送体の解析、第4回トランスポーター研究会、平成21年5月23日、東京大学弥生講堂(東京都)
- (招待講演)
- ㉔ Tuvoshi Nishi, Analysis of physiological functions of the sphingosine 1-phosphate transporter in mice, Gordon Research Conference “Glycolipid & Sphingolipid Biology”, 平成24年4月24日、Lucca, Italy
- ㉕ 西 毅、久野 悠、山口明人、スフィンゴシン1リン酸輸送体の生理的な役割の解明、日本薬学会 第132年会、平成24年3月29日、札幌
- ㉖ Nishi, T. Hisano, Y. Kobayashi, N. and Yamaguchi, A., Physiological roles of sphingosine 1-phosphate transporters, “Symposium on Bioinspired Materials and Functionalities”, 平成23年6月21日、Hampshire Hotel Plaza, Groningen, Netherland
- ㉗ 西 毅、久野 悠、小林 直木、山口 明人、スフィンゴシン1リン酸輸送体の同定と生理機能の解析、第52回日本脂質生化学会、平成22年6月14日、伊香保、群馬、
- ㉘ 川原敦雄、西 毅、久野 悠、山口明人、望月直樹、Sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 regulates cardiac morphogenesis, 第32回日本分子生化学会年会、平成21年12月11日、パシフィコ横浜(横浜市)
- ㉙ 西 毅、小林 直木、久野 悠、山口 明人、Characterization of the sphingosine 1-phosphate transporter, 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、平成21年11月30日、大阪大学コンベンションセンター(吹田市)
- ㉚ 川原 敦雄、西 毅、久野 悠、山口 明人、望月 直樹、Spns2 functions as a sphingosine-1-phosphate (S1P) transporter, 第82回日本生化学会大会、平成21年10月23日、神戸ポートアイランド(神戸市)
- ㉛ 川原 敦雄、西 毅、山口 明人、望月直樹、心臓前駆細胞の移動を制御するスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)輸送体: Spns2, 第51回日本脂質生化学会、平成21年7月31日、ウィルあいち(名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西 毅 (NISHI TSUYOSHI)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号: 60403002

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし