

令和元年6月11日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08576

研究課題名(和文)スフィンゴシン1リン酸の新規担体分子の同定

研究課題名(英文)A novel carrier protein for sphingosine 1-phosphate

研究代表者

大日方 英 (Obinata, Hideru)

群馬大学・未来先端研究機構・准教授

研究者番号：50332557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン1-リン酸(S1P)は血液中を循環する生理活性脂質であり、正常な血管機能の維持に重要な役割を果たす。S1Pは血液中では高密度リポタンパク上のアポリポタンパクMまたは血清アルブミンに結合して循環しているが、申請者のこれまでの研究から、血液中にはこれらのタンパク質とは別のS1P担体分子が存在する可能性が明らかになってきた。本研究課題では、アポリポタンパクMと血清アルブミンの両者を欠損させたマウスから調製した血漿を出発材料として、第三のS1P担体分子を分離精製し、機能的な役割に関して、アポリポタンパクMおよび血清アルブミンと比較検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

S1Pは正常な免疫系や血管機能の維持において重要な役割を果たす生理活性脂質であり、動脈硬化症など血管の慢性炎症性疾患の発症・進展にも深く関わっている。したがって、S1Pの生理機能の制御機構を解明することは、これら炎症性疾患の治療薬の開発や病因の解明に貢献すると考えられる。S1Pは脂質性の生理活性脂質であるため、血液中の循環には担体分子が必要となり、標的細胞での機能発揮にもS1P担体分子と受容体の相互作用が重要な役割を果たす。本研究は、新たなS1P担体分子を同定し生理機能の検討を行うことで、S1Pの輸送機構に関する新たな知見を提示した。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a lipid mediator found in the circulation, and contributes to the vascular homeostasis. S1P is carried either by Apolipoprotein M on high density lipoprotein or serum albumin, but there are several evidences which indicate the existence of other S1P carriers in the circulation. In this study, I identified a novel S1P carrier in the plasma from Apolipoprotein M/albumin-double knockout mice by the protein fractionation and shot-gun proteomic analysis, and characterized functions of the novel protein as a S1P carrier in comparison with Apolipoprotein M and albumin.

研究分野：脂質生化学

キーワード：生理活性脂質 受容体 リポタンパク質 脂質輸送

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) は高密度リポタンパク (HDL) または血清アルブミンに結合して血液中を循環する生理活性脂質である。S1P は血管内皮細胞の S1P 受容体に作用して、血管の透過性や炎症状態を制御するなど、血管の恒常性維持において重要な役割を果たす。S1P 受容体や S1P 産生の律速酵素を欠損させたマウスは、血管形成に異常をきたし胎生期に致死となる。最近、申請者らのグループは、血管内皮細胞特異的に S1P 受容体欠損を誘導できるマウスの系を作製し、高脂肪食負荷によるマウス動脈硬化モデルを用いて検討を行った。その結果、S1P 受容体欠損で血管内皮細胞の炎症マーカーの発現が上昇し、動脈硬化巣が大幅に増大することを報告した。これらのことから、S1P-S1P 受容体シグナル伝達系は、血管の炎症を制御するのに重要な役割を果たし、動脈硬化症を抑制する働きがあることが分かる。

血液中の S1P の約 65% は HDL に結合して循環しており、HDL がもつ心血管系疾患の低減作用は一部 S1P-S1P 受容体シグナル伝達系によって担われることが示唆されてきた。しかしながら、S1P が HDL 上にどう保持されているのか明らかではなかったこと、また HDL はヘテロな集団で S1P を持つ HDL と持たない HDL を分離する術がなかったことなどから、HDL に結合した S1P が HDL の抗炎症作用に寄与するかどうか詳細は不明であった。申請者らは、S1P が HDL 上に存在するアポリポタンパク M (ApoM) に特異的に結合していることを見出し、報告した。ApoM は全 HDL の約 5% にのみ存在すること、また S1P は ApoM をもつ HDL にのみ担われていることが明らかになった。また、ApoM 欠損マウスでは血管の透過性が上昇し、易炎症傾向にあった。さらに、ApoM をもつ HDL ともたない HDL を分離し血管内皮細胞の培養系で比較したところ、ApoM (S1P) をもつ HDL の方がはるかに強い抗炎症効果を示すことが分かった。これらのことから、ApoM に結合して HDL に担われる S1P は、HDL が抗炎症効果を発揮するのに重要であることが分かる。

血液中の S1P の約 65% は HDL に、約 30% はアルブミンに結合していることが報告されている。二つの S1P 結合タンパク質の役割の相違を *in vivo* で比較検討するため、申請者らのグループは、それぞれの欠損マウスを掛け合わせて二重欠損マウスを作製した (*apoM/alb* KO)。上述の通り、S1P 受容体や S1P 産生の律速酵素を欠損させたマウスは胎生致死となるが、主要な二つの担体タンパク質を欠損させた *apoM/alb* KO マウスは、予想に反してメンデルの法則に従って誕生し、見かけ上大きな異常を示さなかった。また、繁殖も正常であった。

これらのマウスで、血漿中の S1P 濃度を測定すると、ApoM 欠損マウスでは約 60% の S1P 濃度の低下が観察されるが、Alb 欠損マウスでは 17% の低下しか観察されず、さらに二重欠損マウスでも約 25% の S1P が残存することが分かった。アルブミンは血液中に最も多く存在するタンパク質であり、様々な脂質に非特異的に結合するため、タンパク質画分に見出される S1P はアルブミンに結合していると想定されてきた。また、*in vitro* の S1P 受容体研究には、S1P の水溶液中の担体としてアルブミンが用いられてきた。しかしながら、アルブミンは S1P の特異的な結合タンパク質というよりは、脂質全般の非特異的リザーバーという意味合いが強いと考えられる。Alb 欠損マウスでの S1P 濃度の低下が予想に反して小さいこと、また二重欠損マウスでも約 25% の S1P が残存し正常な機能を果たすことから、血液中には ApoM・アルブミンに加えて、第三の S1P 担体分子が存在する可能性が高いと考えられた。

### 2. 研究の目的

以上のような背景をふまえて、本研究では、ApoM とアルブミンの二重欠損マウスから調整した血漿を出発材料として、第三の S1P 担体分子を分離精製し同定することを目的として研究を行った。また同定された S1P 担体分子の機能的な役割に関して、ApoM およびアルブミンと比較検討を行った。

具体的には、研究期間内に以下の三つの項目を達成することを目標として研究を行った。

1. ApoM とアルブミンの二重欠損マウスの血液中を循環する S1P に結合する担体分子の同定  
ゲルろ過、イオン交換法などのタンパク精製の定法にのっとり結合タンパク質の分離を進め、最終的には質量分析計を用いてタンパク質を同定する。
2. 同定されたタンパク質の基礎的キャラクタリゼーション  
同定されたタンパク質について、発現臓器や発現量などの基礎的な性状分析を行う。また、リコンビナントの発現系を確立し、S1P との解離定数の決定や(3)の機能解析に用いる。
3. 同定されたタンパク質と ApoM およびアルブミンとの機能比較  
血管内皮細胞の培養系を用いて、S1P 受容体下流のシグナル伝達系の活性化について ApoM およびアルブミンと機能比較を行う。特に、血管内皮細胞のバリアー機能や炎症性マーカーの発現誘導について詳細に機能比較を行う。

### 3. 研究の方法

ApoM とアルブミンの二重欠損マウスの血液中を循環する S1P に結合する担体分子の分離精製  
S1P 担体分子の分離精製は、各精製画分に含まれる S1P を抽出し、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) により測定することで評価を行った。LC-MS/MS は群馬大学の共同利用機器センターに導入済みのトリプル四重極質量分析計 LCMS-8050 (Shimadzu 社) を用いて行った。また、タンパク質の分離精製には AKTApurifier システム (GEヘルスケア社) を用いた。

(1) ゲルろ過法によるリポタンパク質画分とタンパク質画分の分離

ゲルろ過法により血漿を各リポタンパク質画分 (VLDL、LDL、HDL) およびタンパク質画分に

分離した。ゲルろ過は Superose6 カラムと Superdex200 カラム (ともに内径 16mm 高さ 600mm、GE ヘルスケア社) を連続的に接続したものをを用いた。二重欠損マウスから採取した血漿を分離し、S1P の分布を調べたところ、大部分の S1P はタンパク質画分に回収されたので、この画分をプールし、次のイオン交換カラムを用いた分離に用いた。

#### (2) イオン交換法によるタンパク質画分

イオン交換法によりタンパク質画分のさらなる分離精製を進めた。イオン交換カラムとして、RESOURCE Q カラム (GE ヘルスケア社) を選択し、塩化ナトリウムの濃度勾配を用いてイオン強度によりタンパク質の画分を行った。得られた画分の一部に S1P が集中して検出されたため、この画分をプールして、次のタンパク質同定に用いた。

#### (3) 質量分析計によるタンパク質の同定

(2) で得られた S1P 結合能を持つタンパク質画分を SDS 電気泳動により分離し、サイズにしたがって 12 個のゲル断片に分離した。トリプシンによるゲル内タンパク質消化後にペプチド断片を抽出し、群馬大学大学院医学系研究科の共同利用機器センターにおいて NanoFrontier eLD システム (極微量液体クロマトグラフとイオントラップ-飛行時間型質量分析計の組み合わせ、日立ハイテック社) を用いて、ペプチドの測定を行った。得られたペプチドのデータを元にマスコットサーチを行い、タンパク質の同定を試みた。その結果、S1P 結合タンパク質と有力な候補を 3 つ選定した。

#### (4) 同定されたタンパク質の S1P 結合能の確認

(3) で同定された 3 つの候補タンパク質をそれぞれ 293 細胞で発現させ、培養上清中に回収した。それぞれの組換えタンパク質にはヒスチジンタグを付与し、HisTrapHP カラム (GE ヘルスケア) を用いて精製を行った。精製された組換えタンパク質を用いて S1P 結合能を *in vitro* の結合アッセイで確認したところ、タンパク質 X (論文投稿中であるため名前は伏せる) がアルブミンと同等以上の結合活性を示したため、さらなる機能解析を行うことにした。

### 新規 S1P 担体タンパク質 X の機能解析

同定されたタンパク質 X について、S1P 受容体の活性化能および血管内皮細胞のバリア機能増強作用について、すでに報告されている S1P 担体分子である ApoM およびアルブミンと比較検討を行った。

S1P 受容体の活性化能については、S1P1、S1P2、S1P3 の各受容体を過剰発現させた CHO 細胞を、各担体分子に結合させた S1P を用いて刺激し、ERK および Akt の活性化など受容体下流のシグナル伝達経路について検討を行った。

また、血管内皮細胞のバリア機能増強作用については、各担体分子に結合させた S1P を用いて血管内皮細胞を刺激した際の経内皮細胞電気抵抗値 (Trans-endothelial electric resistance: TEER) の変化を観測することにより評価した。

## 4. 研究成果

本研究では、S1P の主要な担体分子である ApoM およびアルブミンのダブルノックアウトマウス血漿中に存在する S1P の結合タンパク質を、ゲルろ過およびイオン交換法の定法にのっとり分離開製を進め、最終的には質量分析計を用いたショットガンプロテオミクスの手法により、新たな S1P 担体タンパク質の同定にいたった。

同定されたタンパク質を組換えタンパク質として調製し、S1P に対する結合活性を評価したところ、ApoM には及ばないもののアルブミンと同等もしくはそれ以上の結合活性を示すことがわかった。また、受容体活性可能および血管内皮細胞のバリア機能増強作用についても、アルブミンと同等以上の活性を示した。

本研究期間内では、新たな担体分子が ApoM やアルブミンなどの既知の S1P 担体分子と機能面で差異があるかどうかを解明するには至らなかった。ApoM に結合した S1P と、アルブミンに結合した S1P とでは、機能面で様々な差異があることが報告されるようになってきており、今後は S1P 担体分子による差異を踏まえた研究が重要になると考えられる。本研究により新たな S1P 担体分子が明らかになったことにより、S1P の輸送機構および担体分子による活性調節機構の解明に貢献すると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Obinata H and Hla T. Sphingosine 1-phosphate and inflammation. *Int Immunol*. In press (2019) 査読有
2. 大日方英、S1P シャペロンとしての ApoM の機能、*生化学*、Vol. 90 (5): 588-598 (2018) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. Obinata H, Wada Y, Kuo A, Swendeman S, Liu C, Izumi T and Hla T. Novel S1P chaperone activity in the plasma from ApoM/albumin-double knockout mice. 日本分子生物学会年会、2018、横浜
2. 和田優、大日方英、Swendeman S、Catherine L、南雲理恵子、Hla T、和泉孝志. スフィ

ソゴシン 1 リン酸の新規担体分子の探索. 生命科学系学会合同年次大会、2017、神戸

〔図書〕(計 1 件)

1. 大日方英. (分担執筆)第3章3 スフィンゴシン 1 リン酸による生体機能の制御. 実験医学増刊 脂質クオリティ(有田誠編) pp117-pp124、2016、羊土社

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：ティモシー・ラー

ローマ字氏名：Timothy Hla

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。