

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34428

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07059

研究課題名（和文）新規S1P輸送体MFSD2Bの創傷治癒における役割と活性制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation mechanism of the novel S1P transporter MFSD2B activity

研究代表者

小林 直木（Kobayashi, Naoki）

摂南大学・農学部・助教

研究者番号：90532250

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫システムの維持に必須の情報伝達物質スフィンゴシン1リン酸（S1P）を細胞内から細胞外へ輸送するトランスポーターMFSD2Bの活性を制御する機構を解析した。その結果、細胞内でのMFSD2Bのリン酸化がS1P輸送活性に必須であることを見出した。MFSD2Bリン酸化部位の解析により、最終的にMFSD2BのC末端側水溶性ドメインに存在するセリン残基のリン酸化がS1P輸送活性に必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血液中のスフィンゴシン1リン酸（S1P）は、免疫システムに必須の情報伝達物質である。赤血球や血小板、血管内皮細胞は血液中にS1Pを放出している。これらの細胞のうち、赤血球・血小板ではMFSD2BというトランスポーターがS1Pの輸送を担っているが、MFSD2Bの活性制御機構は不明であった。本研究において、MFSD2BのC末端側水溶性ドメインがMFSD2Bの活性を制御することが明らかとなった。血小板から放出されるS1Pは創傷治癒への関与が考えられていることから、MFSD2BのC末端側水溶性ドメインを標的とした創薬により、免疫システムのコントロールや創傷治癒に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism that controls the activity of the membrane transporter MFSD2B, which transports sphingosine 1-phosphate (S1P), a lipid mediator essential for maintaining the immune system. The results showed that phosphorylation of MFSD2B is essential for S1P transport activity. Analysis of MFSD2B phosphorylation sites conclusively revealed that phosphorylation of serine residues in the hydrophilic C-terminal domain of MFSD2B is essential for S1P transport activity.

研究分野：生化学

キーワード：リン酸化 トランスポーター スフィンゴシン1リン酸

### 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は胸腺や二次リンパ組織から血液中へのリンパ球移動や血管新生に必須の細胞間情報伝達物質であり、赤血球や血小板、血管内皮細胞から血漿中へ放出される (図 1)。私たちはこれまでに、これらの細胞からの S1P 放出が細胞膜の輸送体を介することを明らかにしてきた。2012 年に血管内皮細胞の S1P 輸送体が SPNS2 であることを報告し、その後、赤血球前駆細胞株における遺伝子発現解析により、新規 S1P 輸送体 MFSD2B を同定した [Kobayashi et al. *Sci. Res.* 2018]。この論文報告と同時期に、MFSD2B 欠損マウスを用いた解析から、MFSD2B が赤血球・血小板の S1P 輸送体として機能することが裏付けられた。血小板由来の S1P は、創傷部位において血管新生・細胞増殖・細胞遊走などを促進すると考えられている。赤血球と血小板はどちらも MFSD2B を介して細胞外へ S1P を放出するが、赤血球からの S1P 輸送が恒常的であるのに対し、血小板からの S1P 輸送はトロンピン等による細胞の活性化に依存する点が異なっている。

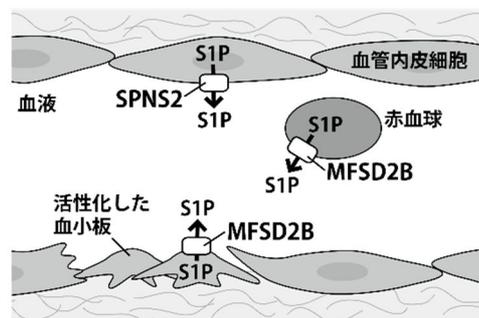


図1. 血漿中に S1P を放出する細胞

### 2. 研究の目的

私たちはこれまでに、血小板の活性化依存的な S1P 放出が分泌小胞によるものではなく、細胞膜の S1P 輸送体を介したものであることを明らかにしており、この事実は、赤血球・血小板の S1P 輸送体 MFSD2B による血小板での S1P 輸送に何らかの活性制御機構が存在することを示唆している。そこで私たちは、MFSD2B の S1P 輸送活性に対するタンパク質リン酸化の影響を解析することにより、MFSD2B の活性制御機構の解明を試みた。

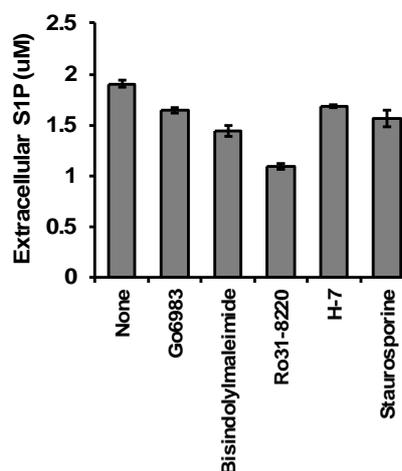


図2. ラット赤血球からの S1P 放出に対するプロテインキナーゼ阻害剤の影響

### 3. 研究の方法

Wistar/ST ラットの血液から赤血球・血小板を調製し、S1P 放出に対するプロテインキナーゼ阻害剤の影響を調べた。また、S1P 合成酵素である Sphingosine kinase 1 を安定発現させた 293A 細胞 (293A/SphK) において MFSD2B を発現させ、プロテインキナーゼ阻害剤の影響を調べた。MFSD2B のリン酸化を解析するため、MFSD2B の N 末端に 3xFLAG タグを融合したタンパク質 (3FLAG-MFSD2B) を CHO 細胞の Sphingosine kinase 1 安定発現株 (CHO/SphK) に発現させ、抗 FLAG 抗体ビーズにより 3FLAG-MFSD2B を細胞のライセートから精製し、SDS-PAGE により泳動後、Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain によりリン酸化タンパク質を染色した。

### 4. 研究成果

ラット赤血球・血小板からの S1P 放出に対するプロテインキナーゼ阻害剤の影響を調べたところ、赤血球からの S1P 放出は Ro31-8220 により部分的に阻害され (図 2)、血小板からの S1P 放出は、Ro31-8220、スタウロスポリン、Go6983、Bisindolylmaleimide により、ほぼ完全に阻害された。そこで、

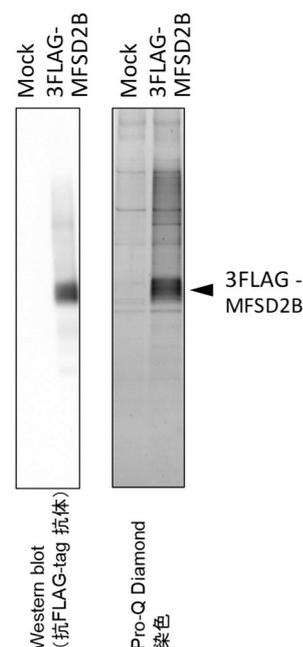


図3. CHO/SphK 細胞から精製した 3FLAG-MFSD2B の Pro-Q Diamond 染色

293A/SphK 細胞に MFSD2B を発現させ、プロテインキナーゼ阻害剤 Ro31-8220 の影響を調べたところ、MFSD2B による S1P 輸送は部分的に阻害された。これらの結果は、赤血球・血小板の MFSD2B による S1P 輸送が MFSD2B のリン酸化により制御されることを示唆している。

MFSD2B のリン酸化を調べるため、3FLAG-MFSD2B を発現させた CHO/SphK 細胞から 3FLAG-MFSD2B を精製し、SDS-PAGE 後にリン酸化タンパク質を検出したところ、MFSD2B がリン酸化されている

ことを見出した(図3)。そこで、タンパク質リン酸化酵素の標的となり得る MFSD2B の 33 個のセリン・スレオニン残基をすべてアラニン残基へ置換すると、MFSD2B のリン酸化とともに S1P 輸送活性も完全に消失することが分かった。MFSD2B を 3 つの領域( Ser26-Thr181, Thr215-Ser348, Thr367-Ser502 ) に分割し、それぞれの領域に存在する推定リン酸化残基をアラニン残基に置換した MFSD2B 変異体をすべての組み合わせで構築したところ、MFSD2B の Ser26-Thr181 または Thr367-Ser502 に存在する推定リン酸化残基のみをアラニン残基に置換しただけで、MFSD2B のリン酸化および S1P 輸送活性は大きく減少した。MFSD2B の C 末端側水溶性ドメインに着目し、そのドメインに存在する 10 個のセリン・スレオニン残基をすべてアラニンへ置換した変異体 (C10ST) を作製したところ、MFSD2B のリン酸化と S1P 輸送活性は大きく減少した(図4)。さらにこれらのセリン・スレオニン残基を単独で Ala 置換した変異体を作成したところ、S500A の変異導入によりほぼ完全に S1P 輸送活性が消失した(図4)。以上の結果は、MFSD2B の Ser500 のリン酸化により、MFSD2B の活性が制御されることを強く示唆している。将来的に MFSD2B のリン酸化を調節するような薬剤の創出が可能になれば、創傷治癒の改善に適応できる可能性がある。

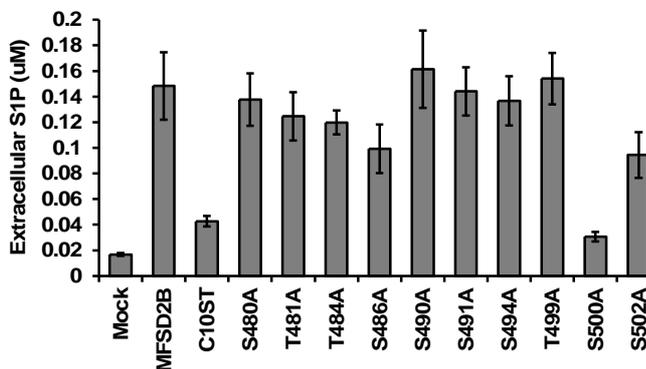


図4. MFSD2B の C 末端セリン・スレオニン残基変異体の S1P 輸送活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Susumu Shinya, Kentaro Kawai, Naoki Kobayashi, Yukiko Karuo, Atsushi Tarui, Kazuyuki Sato, Masato Otsuka, Masaaki Omote	4. 巻 74
2. 論文標題 Fluorophenylalkyl-substituted cyanoguanidine derivatives as bacteria-selective MATE transporter inhibitors for the treatment of antibiotic-resistant infections	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117042
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2022.117042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 直木, 金澤豊, 中村 透唯, 大塚 正人, 西 毅
2. 発表標題 S1P輸送体MFSD2Bの活性制御機構の解析
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 直木, 中村 透唯, 大塚 正人, 西 毅
2. 発表標題 赤血球・血小板S1P輸送体MFSD2Bの活性制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 直木, 中村 透唯, 大塚 正人, 西 毅
2. 発表標題 赤血球・血小板S1P輸送体MFSD2Bの活性制御機構の解析
3. 学会等名 第15回 スフィンゴセラピー研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新屋 進, 河合 健太郎, 小林 直木, 軽尾 友紀子, 樽井 敦, 佐藤 和之, 大塚 正人, 表 雅章
2. 発表標題 シメチジン類縁体を用いたヒトMATE1輸送体阻害作用の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 直木
2. 発表標題 トランスポーターが制御する体内の脂質輸送
3. 学会等名 第10回 摂大農学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関