

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32511

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790093

研究課題名(和文) 赤血球・血小板におけるスフィンゴシン1リン酸輸送機構の解明

研究課題名(英文) Photoaffinity labeling of sphingosine 1-phosphate transporters

研究代表者

小林 直木 (KOBAYASHI, Naoki)

帝京平成大学・薬学部・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、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン1リン酸(S1P)は、血液中存在する細胞間情報伝達物質であり、免疫力の維持や血管の形成に重要な働きをしている。S1Pは赤血球や血小板で作られ、何らかの輸送体によって血液中へ運ばれるが、その輸送体が何か分かっていない。S1Pを血液中へ運ぶ輸送体は新しい薬の標的として期待される。本研究では、タンパク質と強く結合するように分子構造を改変したS1Pを合成し、S1Pを運ぶ機能を持つ輸送体のSPNS2や、S1Pを血液中へ運ぶ輸送体の候補となる赤血球や血小板のタンパク質を標識することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine 1-phosphate (S1P) is a bioactive signal transmitter present in blood. Blood plasma S1P plays important roles in immune system and angiogenesis. Erythrocytes and platelets synthesize and secrete S1P. However, the S1P transporters of erythrocytes and platelets have not been identified. The S1P transporters are attractive candidates for drug target. In this study, we performed photoaffinity labeling of erythrocyte and platelet proteins with photoreactive S1P analogs. We showed that the S1P transporter, SPNS2 is selectively labeled by the photoreactive S1P analog.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：スフィンゴシン1リン酸 輸送体 トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は脂溶性の細胞間情報伝達物質であり、赤血球や血小板から放出され、リンパ球や血管内皮細胞の細胞膜に存在する S1P 受容体に結合し、細胞の遊走や増殖、分化を促進する。S1P 受容体の S1P₁ は、胸腺および二次リンパ組織からのリンパ球の移出に必須であり、S1P₁ ノックアウトマウスは血管成熟不全により死に至ることから、S1P が免疫系および血管系において重要な細胞応答を引き起こすことが明らかである。S1P のような脂溶性の細胞間情報伝達物質は、産生細胞からの細胞外放出機構がほとんど注目されておらず、未解明な部分が多い。S1P のような物質は脂溶性が高いという理由から、多くの場合、単純拡散により細胞膜を透過すると考えられている。しかし、S1P は強い生理活性を持つことから産生細胞からの放出過程は厳密に制御される必要がある。

S1P は血小板において高濃度に蓄積されており、トロンピンなどの刺激に依存して細胞外へ放出される。私たちのグループでは血小板からの S1P 放出が分泌顆粒を介したのではなく、ATP 依存性および Ca²⁺ 依存性の輸送体を介したものであることを明らかにしている。一方、赤血球からの S1P 放出は、血小板とは異なり特定の刺激には依存しない。赤血球から放出される S1P は、血漿中に一定濃度含まれる S1P の主な供給源になっており、胸腺や脾臓からのリンパ球の移出を促進する。私は、赤血球の反転膜小胞を用いた S1P 輸送解析から、S1P が ATP の加水分解を必要としない新しいタイプの ATP 依存性輸送体により輸送されることを明らかにしている。

2. 研究の目的

(1) 光架橋性 S1P-biotin と相互作用する赤血球膜タンパク質の探索による赤血球 S1P 輸送体の同定

(2) 血小板において、光架橋性 S1P-biotin と相互作用するタンパク質の探索による血小板の ATP 依存性および Ca²⁺ 依存性 S1P 輸送体の同定

(3) 血小板と赤血球の細胞質で S1P-biotin と相互作用する因子の同定による、血小板と赤血球における S1P の細胞内局在および細胞内動態の解明

(4) S1P 輸送体を安定発現させた培養細胞から調製した反転膜小胞を用いた S1P 輸送活性測定系の確立と、活性阻害剤のデザイン

3. 研究の方法

(1) S1P-biotin-diazirine と相互作用する赤血球膜タンパク質の同定

S1P-biotin にあらかじめ光架橋基の diazirine を導入したものを合成し、赤血球の反転膜小胞と共にインキュベートした後、UV 照射によりタンパク質をラベルした。ラベルされたタンパク質をアビジンビーズによ

り精製後、質量分析により同定した。アビジン HRP によるウェスタンブロットにより、標識されたタンパク質を検出した。

(2) S1P-biotin-diazirine と相互作用する血小板タンパク質の同定

Sphingosine-biotin に光架橋基の diazirine を導入したものを合成し、血小板と共にインキュベートした後、UV 照射によりタンパク質をラベルした。ラベルされたタンパク質をアビジンビーズにより精製後、質量分析により同定した。アビジン HRP によるウェスタンブロットにより、標識されたタンパク質を検出した。

(3) S1P 輸送活性の測定

方法(1)(2)により同定された遺伝子をクローニングし、Sphingosine kinase を安定発現させた CHO 細胞または HEK293 細胞に発現させた。これらの細胞に Sphingosine を添加すると、Sphingosine は細胞内へ速やかに取り込まれ、Sphingosine kinase によって S1P が合成される。Sphingosine を細胞外に添加し、インキュベートした後に細胞外へ放出される S1P を HPLC により定量した。

4. 研究成果

(1) S1P-biotin-diazirine による BSA および SPNS2 のラベリング

合成した S1P-biotin-diazirine を用いて、S1P のキャリアタンパク質である BSA のラベリングを行った結果、UV 照射依存的に BSA が強くラベルされることを確認した。そこで、S1P-biotin-diazirine により、S1P 輸送体をラベルすることができるのかどうかを検証するため、私たちが S1P 輸送体として同定している SPNS2 を CHO 細胞に発現させ、S1P-biotin-diazirine によるラベリングを行った。その結果、S1P-biotin-diazirine により SPNS2 発現細胞のラベリングを行った場合に限り、アビジンビーズにより SPNS2 が精製された。一方、細胞質局在性のタンパク質であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) を CHO 細胞に発現させ、同様に実験を行ったが、アビジンビーズにより CAT は精製されなかったことから、S1P-biotin-diazirine によるラベリングは SPNS2 特異的であり、S1P-biotin-diazirine が S1P 輸送体の光親和性ラベリング試薬として機能することが明らかになった。S1P-biotin-diazirine による SPNS2 のラベリングにより、SPNS2 の S1P 結合サイトが明らかになれば、SPNS2 阻害剤のデザインも可能になると考えられる。

(2) S1P-biotin-diazirine と相互作用する赤血球膜タンパク質の同定

S1P-biotin-diazirine により赤血球反転膜小胞のタンパク質をラベルし、アビジン HRP を用いたウェスタンブロットングにより検出したところ、約 50, 75, 100kDa のバンドが観察された。これらのバンドは、UV 照射依存的であり、過剰量の S1P を加えること

で、ラベル量が減少したことから、S1P に特異的なラベリングであると考えた。アビジンビーズを用いてラベルされたタンパク質を精製し、質量分析により解析したところ、SLC16A1, SLC43A1, SLC40A1, SLC14A1, RHD, CD36 が同定された。これらの遺伝子をクローニングし、CHO 細胞に発現させたところ、どの遺伝子も S1P 輸送活性を示さなかった。S1P-biotin に対し特異的に結合したタンパク質が微量であった為、質量分析により同定されなかった可能性があると考え、ラベルする赤血球反転膜小胞の量を増やし、アビジンビーズ添加後のビーズの洗浄を念入りに行った。また、アビジン HRP を用いたウェスタンブロットティングにより、S1P-biotin-diazirine によりラベルされるのにも関わらず、アビジンビーズで精製されないタンパク質が複数確認されたことから、ラベル後のタンパク質の可溶化および変性条件の検討を行った。その結果、ラベルされたタンパク質は、Triton X-100 および SDS を含むバッファーにより効率良く可溶化でき、さらに、urea と dithiothreitol によりタンパク質を変性させた後、iodoacetamide によりアルキル化すると、効率良く精製されることが分かった。以上の方法により精製されたタンパク質と、アビジンビーズへ非特異的に吸着する赤血球反転膜小胞のタンパク質をアビジン HRP を用いたウェスタンブロットティングにより比較したところ、約 60, 75, 80, 100kDa のタンパク質が S1P-biotin-diazirine によるラベリング特異的に精製された(図 1)。質量分析により、これらのタンパク質を解析した結果、物質輸送に関係する膜タンパク質として Band3 と CD36 が同定されたが、これらの遺伝子を CHO 細胞および HEK293 細胞に発現させたところ、

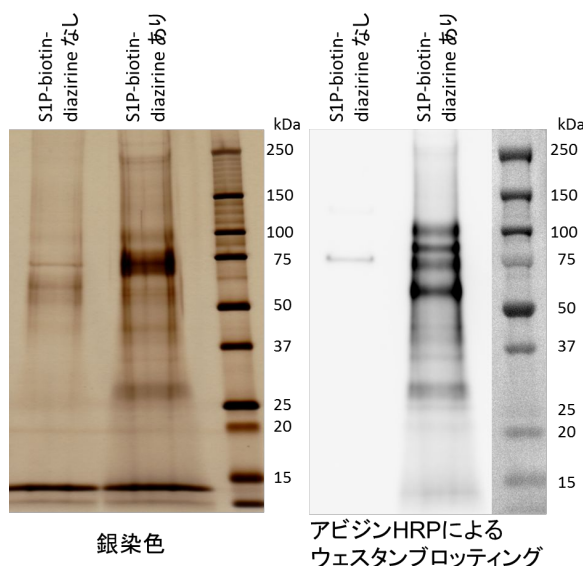


図1. S1P-biotin-diazirine によりラベルされた赤血球膜タンパク質の精製

S1P の輸送活性を示さなかった。CD36 は酸化 LDL 受容体として知られており、S1P が酸化 LDL の取り込みに関与している可能性も考えられることから、今後解析を行う予定である。(3) S1P-biotin-diazirine と相互作用する血小板タンパク質の同定

血小板において、S1P-biotin-diazirine によりラベルされたタンパク質をアビジンビーズにより精製し、アビジン HRP を用いてウェスタンブロットティングを行ったところ、約 100kDa のタンパク質が検出された。このタンパク質を質量分析により解析したところ、Atp2a3 が同定されたことから、今後 S1P 輸送解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計3件)

Kobayashi, N., Tamura, N., van Veen, H. W., Murakami, S. and Yamaguchi, A., -Lactam Selectivity of Multidrug Transporters AcrB and AcrD Resides in the Proximal Binding Pocket. *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 10680-10690 (2014) 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M114.547794.

Nishi, T., **Kobayashi, N.**, Hisano, Y., Kawahara, A. and Yamaguchi, A., Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1841**, 759-765 (2014) 査読有
DOI: 10.1016/j.bbailip.2013.07.012.

Hisano Y., **Kobayashi N.**, Yamaguchi A. and Nishi T., Mouse SPNS2 Functions as a Sphingosine-1-Phosphate Transporter in Vascular Endothelial Cells. *PLoS One*, **7**, e38941 (2012) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0038941.

(学会発表)(計3件)

小林直木, 山口明人, 西毅, 光反応性アナログを用いたスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) 輸送体の探索、日本薬学会第 134 年会(熊本) 2014 年 3 月 28 日

小林直木, 山口明人, 西毅, 光反応性分子を用いたスフィンゴシン 1 リン酸輸送体の探索、第 85 回日本生化学会大会(福岡) 2012 年 12 月 16 日

Kobayashi, N., Kobayashi, N., Adachi, H., Yamaguchi, A. and Nishi, T., Characterization of the ATP-dependent sphingosine 1-phosphate (S1P) transporter in rat erythrocytes, The 30th Naito Conference on Membrane Dynamics and Lipid Biology [II], Domains, Droplets and Diseases (Sapporo) June 29-30, 2011

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 直木 (KOBAYASHI, Naoki)

帝京平成大学・薬学部・助教

研究者番号：90532250