

血管内皮細胞に発現するスフィンゴシン 1-リン酸輸送体 Spns2 によるリンパ球の血管内移動の制御機構

はじめに

セラミド、スフィンゴシン、スフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) などのスフィンゴシン脂質は細胞外あるいは、細胞内で作用する。なかでも S1P は、細胞膜上の G タンパク質共役型受容体である S1P 受容体 (S1P1~S1P5) に作用し、様々な反応を惹起する¹⁾。免疫抑制剤として発見された FTY720 がリンパ球上の S1P 受容体 (S1P1) に結合して免疫抑制作用を発揮することから、従来知られていた血管内皮細胞の機能に加え免疫担当細胞における S1P シグナルの重要性が免疫担当細胞で証明された²⁾。その後の研究によりリンパ球がリンパ組織から血管内に移動するには、リンパ球に発現する S1P1 が必須であることが突き止められた³⁾。本研究では、免疫細胞がいかにして S1P 刺激を受けて血管内へと導かれるのか、また、血管内皮細胞が S1P1 を発現する S1P の受容細胞として機能するだけではなく、S1P を生成・放出する細胞としてリンパ球の血管内への誘導に不可欠であることを紹介する。

1. 生体内での S1P 生成部位と血管内腔側・血管腔外側での S1P 濃度

細胞膜のスフィンゴシン (Sph) がスフィンゴシンキナーゼ (SphK1 あるいは SphK2) によってリン酸化されて S1P が生成される。生成された S1P は、S1P 輸送体によって細胞外に輸送されるか、S1P リアーゼによって分解、または S1P ホスファターゼによって脱リン酸化される。S1P 輸送体の候補の一つとして赤血球の ABC トランスポーターが同定された⁴⁾。赤血球以外の細胞でも S1P 輸送体として ABCA1・ABCG1 (アストロサイト)、ABCC1 (肥満細胞) が機能していることがわかった^{5,6)}。またこれらの ABC トランスポーターが FTY720 によって制御されるという報告もある⁷⁾。S1P が細胞外に輸送されなければならないのは S1P 受容体に作用するためである。S1P による細胞制御機構を知るためには、どこで生成された S1P がどこに輸送され、どの細胞に発現するどの受容体に作用するかを考慮しなければならない。

S1P 受容体ファミリーのなかで初めて同定された S1P1

(EDG1; endothelial differentiation gene1 として発見された) は、名前の由来通りに血管内皮細胞に発現しているだけでなく、リンパ球にも発現している。S1P1 の同定に引き続いて S1P2, S1P3 が血管平滑筋細胞に発現することが明らかにされたために、血管における S1P-S1P 受容体を介した情報伝達が精力的に研究されてきた⁸⁾。S1P の作用部位が内皮細胞あるいは血管平滑筋細胞であることから、血中に存在する S1P が重要である。それでは、血中の S1P を産生している細胞は何であろうか？ ヒト血中 S1P 濃度は赤血球の量と相関するとの報告がある。また血小板は活性化すると S1P を細胞外に放出する。血中・組織間隙それぞれの S1P の濃度は μM , nM と 1000 倍の濃度差があると報告されている。これらの結果より血中の高濃度の S1P 濃度は、血液細胞 (赤血球と血小板) 由来と考えられていた。一方、血管内皮細胞も S1P を生成することが示され、血管内腔に向かった S1P の放出も血中 S1P の濃度維持に寄与すると予想されていた。しかし、血球と血管内皮細胞のどちらが多く S1P を放出しているのかは、明らかになっていない。また、血管内皮細胞のいかなる S1P 輸送体が、血中 S1P の濃度維持に重要であることを示した報告はなかった。

T リンパ球・B リンパ球は、リンパ組織内からリンパ組織内の血管に入って、全身循環に入ることになる。上述したように、このリンパ球の全身循環に血中の S1P とリンパ球に発現する S1P1 が重要であることが明らかにされた。

2. リンパ組織からの血管内への移動における S1P の必要性

リンパ球は、一次リンパ器官 (胸腺・骨髄) と二次リンパ器官 (リンパ節・脾臓) の間を血管・リンパ管を通して循環する。血管から血管外に遊走したリンパ球は、リンパ管からリンパ節に入り、さらに血管に入る。リンパ節にも血管が存在し、リンパ球は血管内からリンパ組織へ移動することにより循環することになる。血管内から血管外リンパ組織への侵入は、リンパ組織で分泌されるケモカインによる。T・B リンパ球はそれぞれケモカイン受容体の CCR7 (CCL19 と CCL21 受容体)、CXCR5 (CXCL13 受容体) を発現し、リンパ組織からのケモカインに反応してリンパ組織に定着する。一方、胸腺組織から T リンパ球の血管内への移動と骨髄組織から B リンパ球の血管内への移動には S1P が必要であることが示された。T リンパ球、B リンパ球は S1P1 受容体を発現し、血管内と組織 (血管外)

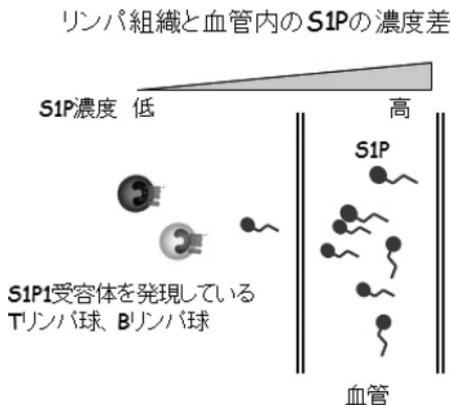


図1 血管内腔と血管腔外では1000倍以上のS1Pの濃度差がある。S1P1受容体を発現するリンパ球はS1Pに反応してリンパ組織内から血管内へと導かれる。

間の濃度差が非常に大きいS1Pを遊走因子として感知して、血管内へ移動すると考えられてきた(図1)^{1,9)}。

それでは、この血管内と血管外組織のS1Pの濃度勾配は、どのように形成されるのであろうか？血管を形成する血管内皮細胞は一層でありこの一層の内皮細胞によって1000倍の濃度差ができていくことになる。前述したように血管内皮細胞はS1Pを生成していると考えられ、血管内腔だけではなく、血管腔外に向けたS1Pの輸送が生じている可能性がある。すなわち、血管内皮細胞に発現するS1P輸送体がS1Pを血管内腔だけでなく腔外に向けて放出して、血管リンパ球をまず血管近傍に遊走させ、さらに血管内の高濃度のS1Pによって血管内へ移動させることが考えられた。

3. 血管内皮細胞に発現するSpns2は、リンパ球の血管内への移動に不可欠である

われわれは、ゼブラフィッシュでSpinster2 (Spns2)がS1P輸送体として機能していることを報告した。Spinsterファミリー分子は、Spns1~3が同定されているが、これら分子の機能は不明であった。ゼブラフィッシュのSpns2の変異体が二股心臓になるのはSpns2の機能が障害されS1Pの細胞外への輸送が障害されるためであることがわかった¹⁰⁾。しかし、哺乳類でのSpns2の機能は証明されていなかった。そこで、哺乳類でSpns2の機能を調べるために完全欠損マウス並びに血管内皮特異的にSpns2を欠損するマウスを作製してその機能を調べることにした¹¹⁾。

Spns2の完全欠損マウスの血中成熟リンパ球(CD4単独陽性細胞, CD8単独陽性細胞)は著しく減少していた。

一方胸腺では、成熟Tリンパ球が増加していた。この結果は成熟リンパ球の胸腺から血管内への移動が阻害されていることを示している。また、血中の成熟Bリンパ球も著減し、骨髄中の成熟リンパ球が減少していた。Bリンパ球もTリンパ球と同様に一次リンパ器官からの血管への移動が阻害されたことを反映している結果と考えられる。二次リンパ組織である脾臓・リンパ節での成熟Tリンパ球、成熟Bリンパ球の減少は、循環成熟リンパ球の減少によると考えて矛盾しない。

血管内皮細胞特異的Spns2欠損マウスでもSpns2完全欠損マウスとほぼ同じ異常を示した。血中成熟Tリンパ球、Bリンパ球の減少、一次リンパ器官での成熟リンパ球の増加、二次リンパ組織での成熟リンパ球の減少を同程度に認めた。以上の結果から、血管内皮細胞に発現するSpns2がリンパ球の血管内への移動に不可欠であることがわかった¹¹⁾。

血中のS1P濃度はSpns2完全欠損マウスでは野生型に比較して半減していた。また血管内皮細胞でSpns2を欠損するマウスでも同様に半減していた。これは、Spns2を介する血管内腔に向けたS1Pの輸送が血中S1Pの濃度の維持に約50%の貢献をしていることを示している。われわれは、Cre/loxPシステムにより血管内皮特異的にSpns2を欠損させるためにTie2-Creマウスを用いた。Tie2プロモーターは血管内皮細胞だけでなく血球系でも機能するので、血球でのSpns2が血中S1Pの濃度維持に関与している可能性を除外するために、血管内皮細胞特異的Spns2欠損マウスに野生型マウスの骨髄を移植したマウスの血中S1Pの濃度を検討した。この骨髄キメラマウスでも血中のS1Pは半減したままであった。したがって、血管内皮細胞のSpns2が血中S1Pの約50%に寄与することが証明できた。

約50%の血中S1Pの濃度低下による血管内腔と血管外組織の濃度勾配でリンパ球の血管内への移動が阻害されるのであろうか？CoughlinらのグループはSphKの欠損マウスの骨髄を野生型マウスに移植すると血中S1Pは、1/10に低下するがリンパ球の血中への移動は阻害されないと報告している。したがって、Spns2の欠損による血中S1Pの濃度低下による濃度勾配の減少だけではこの血管内皮細胞特異的Spns2欠損マウスの血中成熟リンパ球の減少は説明できない。以上の結果からSpns2が血管内腔だけではなく、血管腔外へS1Pを輸送することにより、リンパ組織内で血管外近傍と、血管より離れた部位でのS1Pの濃度勾配を形成している可能性が示唆された(図2)。

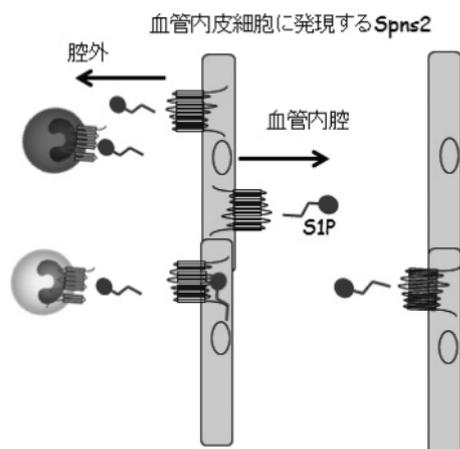


図2 血管内皮細胞に発現する S1P 輸送体 Spns2 が血管内腔だけでなく、S1P を組織側に向けて輸送し腔外直近から組織に向けた S1P の濃度勾配を作っていることが示唆される。

4. 未解明な点と今後

Spns2 がリンパ球の血管内への移動に不可欠であることは他の複数のグループからの報告でも支持されている^{12,13)}。S1P が血管腔外へ輸送されることを示すのは、培養細胞を用いた実験では不可能であり、生体組織での濃度を野生型と Spns2 欠損マウスを *in situ* で調べるしか手はない。

血管内皮細胞に他の S1P 輸送体があることは否定的である。なぜならば、Spns2 以外に輸送体があればリンパ球の血管内への移動は抑制されないことが予想できるからである。血中 S1P の濃度がリンパ球の移動に関係するか否かは、Spns2 の血管内皮細胞特異的欠損マウスで血中の S1P 濃度を野生型と同程度まで回復させてリンパ球を調べることができれば決着がつくと考える。

また、S1P 受容体を発現する免疫担当細胞はリンパ球だけではない。マクロファージは、S1P 受容体を発現していることから、Spns2 が炎症部位での血管と免疫細胞の調節をしている可能性も考えられる。今後慢性炎症等での Spns2 の役割の解明も興味を持たれる。

さらに、本研究では血管全般での Spns2 欠損マウスでリンパ球動態を調べたが、上述したようにリンパ節・リンパ管の Spns2 のリンパ球への影響を調べることも重要な課題である。本稿で記載できなかった S1P と免疫に関する総説があるので一読を勧める^{14,15)}。

謝辞

Spns2 のノックアウトマウスの免疫学的解析は、大阪大学免疫学フロンティア研究センター石井教授、S1P の測定は東北大学薬学系研究科青木教授、組織学的検討は北海道大学人獣共通感染症研究センター澤教授、マウスの作製は理化学研究所発生研究所の清成、阿部両博士にお手伝い頂いた。以上の先生方とその研究室の皆様の援助なくしては本研究を成し遂げることができなかった。心より感謝の意を本稿で再度表したい。

- 1) Anliker, B. & Chun, J. (2004) *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 457–465.
- 2) Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G.J., Card, D., Keohane, C., Rosenbach, M., Hale, J., Lynch, C.L., Rupprecht, K., Parsons, W., & Rosen, H. (2002) *Science* 296, 346–349.
- 3) Pham, T.H., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C.G., & Cyster, J. G. (2008) *Immunity*, 28, 122–133.
- 4) Bouma, H.R., Kroese, F.G., Kok, J.W., Talaei, F., Boerema, A. S., Herwig, A., Draghiciu, O., van Buiten, A., Epema, A.H., van Dam, A., Strijkstra, A.M., & Henning, R.H. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 2052–2057.
- 5) Cavellier, C., Lorenzi, I., Rohrer, L., & von Eckardstein, A. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, 1761, 655–666.
- 6) Sato, K., Malchinkhuu, E., Horiuchi, Y., Mogi, C., Tomura, H., Tosaka, M., Yoshimoto, Y., Kuwabara, A., & Okajima, F. (2007) *J. Neurochem.*, 103, 2610–2619.
- 7) Honig, S.M., Fu, S., Mao, X., Yopp, A., Gunn, M.D., Randolph, G.J., & Bromberg, J.S. (2003) *J. Clin. Invest.*, 111, 627–637.
- 8) Takuwa, Y., Okamoto, Y., Yoshioka, K., & Takuwa, N. (2008) *Biochim. Biophys. Acta*, 1781, 483–488.
- 9) Rivera, J., Proia, R.L., & Olivera, A. (2008) *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 753–763.
- 10) Kawahara, A., Nishi, T., Hisano, Y., Fukui, H., Yamaguchi, A., & Mochizuki, N. (2009) *Science*, 323, 524–527.
- 11) Fukuhara, S., Simmons, S., Kawamura, S., Inoue, A., Orba, Y., Tokudome, T., Sunden, Y., Arai, Y., Moriwaki, K., Ishida, J., Uemura, A., Kiyonari, H., Abe, T., Fukamizu, A., Hirashima, M., Sawa, H., Aoki, J., Ishii, M., & Mochizuki, N. (2012) *J. Clin. Invest.*, 122, 1416–1426.
- 12) Nijnik, A., Clare, S., Hale, C., Chen, J., Raisen, C., Mottram, L., Lucas, M., Estabel, J., Ryder, E., Adissu, H., Adams, N.C., Ramirez-Solis, R., White, J.K., Steel, K.P., Dougan, G., & Hancock, R.E. (2012) *J. Immunol.*, 189, 102–111.
- 13) Nagahashi, M., Kim, E.Y., Yamada, A., Ramachandran, S., Allegood, J.C., Hait, N.C., Maceyka, M., Milstien, S., Takabe, K., & Spiegel, S. (2012) *FASEB J.*, Nov 24. [Epub ahead of print]
- 14) Olivera, A., Allende, M.L., & Proia, R.L. (2013) *Biochim. Biophys. Acta*, 1831, 193–202.
- 15) Cyster, J.G. & Schwab, S.R. (2012) *Annu. Rev. Immunol.*, 30, 69–94.

福原 茂朋, 望月 直樹

(国立循環器病研究センター研究所細胞生物学部)

Lymphocytes mobilization into blood regulated by Spns2, a sphingosine 1-phosphate transporter, expressed on endothelial cells

Shigetomo Fukuhara and Naoki Mochizuki (Department of Structural Analysis, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

細胞中心方向輸送のエンジン：細胞質ダイニンの構造と運動メカニズム

1. はじめに

私たちの体を構成する細胞の中では、分子モーターと呼ばれるタンパク質群—ミオシン、キネシン、ダイニン—が、ATP加水分解で得られた化学エネルギーを力学的運動へと変換することで、生命活動に必要な様々な細胞運動を駆動している。細胞質ダイニンは、そのような分子モーターの主要メンバーの一つで、細胞内では微小管ネットワークのマイナス端方向（一般的には細胞の中心方向）への物質輸送のほぼ全てを担っており、さまざまな膜小胞、細胞内小器官、RNA、タンパク質複合体そしてウイルスの移動・配置に必須な役割を果たす¹⁾。また、細胞質ダイニンの機能は、ゴルジ体、エンドソーム、絨毛・鞭毛などの細胞内小器官の形成・維持管理や、核膜崩壊、紡錘体形成、染色体分離など細胞分裂のキープロセス、あるいは成長円錐の形成や神経細胞の移動など神経ネットワーク形成過程にも重要であることが示されている¹⁾。

このように細胞内プロセスのエンジンとしてはたらくダイニンであるが、どのような分子メカニズムで機能しているのかという根本的な問いについては、分子が同定されてから半世紀近く経つにもかかわらず、多くの未解決問題が残されている。メカニズム研究の進展を阻んできた主要因の一つは、その構造情報が十分ではないことにあった。より小型で単純な分子モーターであるミオシンとキネシンについては、1990年代に結晶構造が決定され、その運動メカニズムを原子レベルで議論することが可能な段階にまで研究が進展している。対照的にダイニンは、その巨大さと複雑さゆえに高分解能構造解析が困難であり、私たちの構

造情報に関する知見は、ごく最近まで主に負染色電子顕微鏡像に依存している状況にあった。

しかし、構造解析技術の進展に伴い、ダイニンの運動メカニズム研究は急展開を迎えている。中核領域であるモータードメインについて、2011年には結晶化と中分解能構造解析が^{2,3)}、2012年にはより高分解能の結晶構造解析が達成され^{4,5)}、ダイニンの構造とメカニズムを原子レベルで議論するための基盤が確立された。また2012年には、力発生前・後の二つの中間状態の電子顕微鏡像3次元構造解析も報告され⁶⁾、ダイニンの力を生み出す構造変化についての知見も蓄積されつつある。本稿ではこれら最近の進展を、筆者らの研究成果を中心に紹介する。

2. ダイニンのサブユニット構成とモータードメイン

細胞質ダイニンは、重鎖2本に中間鎖2本、中間軽鎖2本、3種類の軽鎖がそれぞれ2本結合した約1,200 kDaの巨大なタンパク質複合体である。この複合体の中核をなすダイニン重鎖は、約4,500アミノ酸残基からなる1本の長大なポリペプチド鎖で、輸送エンジンに必要なとされる四つの機能ユニット—尾部、リング、リンカー、ストーク—を含んでいる（図1）。重鎖のN末端側およそ3分の1の領域は、他のサブユニットや積荷などの結合および重鎖の二量体化を担う結合ユニットであり、「尾部」と呼ばれる。残りのC末端側380 kDa領域（約3,300アミノ酸残基）がモーター活性を担うモータードメインで、ATP加水分解

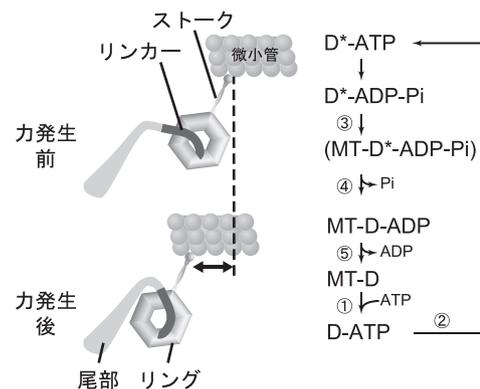


図1 ダイニンの力発生モデル

ダイニンは、次の①～⑤の反応過程を繰り返すことで微小管上をそのマイナス端方向へ直線運動すると考えられている。① ATP結合により微小管から解離する。②力発生前の構造をとる。③ATP加水分解後に微小管に再結合する。④リン酸放出に伴いリンカーをスイングすることで力を発生する。⑤力発生後の構造をとりADPを放出する。D：力発生後のダイニン、D*：力発生前のダイニン、MT：微小管。