

多く残されている。そこで我々は、多重クランプ・ローダー系の細胞内相互作用因子の網羅的検索を行い、各系の共通性や特異性の比較、そして複製フォークにおける新規機能を明らかにするための解析を進めている。また同時に、PCNA修飾によるPolの切り換え機構や、機能がほとんど分かっていないElg1-RFCについても、精製タンパク質を用いた解析を積極的に進めているところである。そして、今後これらの解析が進展して新しい発見が蓄積することにより、クランプとローダーが中心となる複製フォーク進行と多様な染色体維持伝達のしくみについての新たな局面が明らかになっていくと考えている。

- 1) Tsurimoto, T. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 1443, 23-39.
- 2) Indiani, C. & O'Donnell, M. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 751-761.
- 3) Moldovan, G.L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007) *Cell*, 129, 665-679.
- 4) Ulrich, H.D. (2004) *Cell Cycle*, 3, 15-18.
- 5) Nishitani, H., Shiomi, Y., Iida, H., Michishita, M., Takami, T., & Tsurimoto, T. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 29045-29052.
- 6) Shiomi, Y., Usukura, J., Masamura, Y., Takeyasu, K., Nakayama, Y., Obuse, C., Yoshikawa, H., & Tsurimoto, T. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 14127-14132.
- 7) Bowman, G.D., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2004) *Nature*, 429, 724-730.
- 8) Kim, J. & MacNeill, S.A. (2003) *Curr. Biol.*, 13, R873-875.
- 9) Shiomi, Y., Shinozaki, A., Nakada, D., Sugimoto, K., Usukura, J., Obuse, C., & Tsurimoto, T. (2002) *Genes Cells*, 7, 861-868.
- 10) Ellison, V. & Stillman, B. (2003) *PLoS Biol.*, 1, E33.
- 11) Naiki, T., Kondo, T., Nakada, D., Matsumoto, K., & Sugimoto, K. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, 21, 5838-5845.
- 12) Ohta, S., Shiomi, Y., Sugimoto, K., Obuse, C., & Tsurimoto, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 40362-40367.
- 13) Shiomi, Y., Shinozaki, A., Sugimoto, K., Usukura, J., Obuse, C., & Tsurimoto, T. (2004) *Genes Cells*, 9, 279-290.
- 14) Shiomi, Y., Masutani, C., Hanaoka, F., Kimura, H., & Tsurimoto, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 20906-20914.

塩見 泰史\*, 釣本 敏樹

(九州大学大学院理学研究院染色体機能学)

(\*現所属 兵庫県立大学大学院生命科学研究科

生体情報学 II)

Function of multiple clamp and loader systems in eukaryotic chromosome replication

Yasushi Shiomi\* and Toshiki Tsurimoto (Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan; \*Present address: Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Kamigori, Ako-gun, Hyogo 678-1297, Japan)

## 胃酸分泌細胞における $K^+$ - $Cl^-$ 共輸送体と P 型 ATPase の機能連関

### 1. はじめに

$K^+$ - $Cl^-$  共輸送体 (KCC) は、上皮イオン輸送や細胞容積調節機構等に関与し、これまでに四つのアイソフォーム (KCC1-KCC4) が同定されている<sup>1)</sup>。KCC3 には三つのスプライシングバリエーション (KCC3a-KCC3c) が存在する。KCC1 は多くの組織に分布しているが、KCC2 と KCC3b の発現はそれぞれ神経系と腎臓に限られる。KCC3a と KCC4 は主として上皮細胞に発現している。これまでに胃における KCC の発現については報告されていなかった。本稿では、最近我々が胃酸分泌細胞において見出した KCC の発現とその生理機能について紹介したい。特に P 型 ATPase の  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase,  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase と KCC との機能連関について述べる。

### 2. 胃酸分泌細胞基底側膜における KCC3a の発現<sup>2)</sup>

ノーザンブロットおよびウエスタンブロットにより、ラット、ウサギ、ヒト胃酸分泌細胞に KCC3a が発現していることを見出した。そこでラット胃粘膜標本の免疫組織染色により、胃腺における KCC3a の分布を調べた。胃酸分泌細胞は、胃腺の上部 (頸部) から下部 (深部) に至るまで分布しているが、上部の胃酸分泌細胞は酸分泌能が高く (分泌される酸の pH は約 1)、下部の胃酸分泌細胞は酸分泌能が低い (分泌される酸の pH は約 3) ことが知られている。KCC3a は酸分泌能の高い胃腺上部の胃酸分泌細胞に分布しており、胃酸分泌細胞の基底側膜に局在していた。ラット胃粘膜由来の膜標品における免疫沈降で、KCC3a は基底側膜の  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase  $\alpha 1$  サブユニット ( $\alpha 1NaK$ ) と共沈したが、分泌膜の  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPase  $\alpha$  サブユニット (HK $\alpha$ ) とは共沈しなかった。

両性界面活性剤の CHAPS (1%) で処理した胃粘膜標品をスクロース密度勾配遠心にかけて、界面活性剤不溶性画分 (detergent-resistant membrane; DRM) と可溶性画分 (non-DRM) をそれぞれ単離し、各タンパク質の分布を調べた。その結果、KCC3a,  $\alpha 1NaK$  および脂質ラフトマーカーの flotillin-2 はすべて DRM において検出された。DRM はコレステロールとスフィンゴミエリンに富む、脂質ラフトやカベオラに由来するものと考えられている<sup>3)</sup>。

### 3. KCC3a と $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の機能連関<sup>2)</sup>

LLC-PK1 細胞 (ブタ腎臓近位尿管由来の細胞株) に、テトラサイクリン添加の有無で KCC3a の安定発現をオン、オフできる、KCC3a の T-REx システム (tetracycline-regulated expression system) を導入した。KCC3a を発現誘導した LLC-PK1 細胞 (Tet-on 細胞) において、KCC3a と内因性の  $\alpha 1\text{NaK}$  は共に基底側膜に局在していた。Tet-on 細胞由来の膜標品における免疫沈降においてもラット胃粘膜標品の場合と同様に、KCC3a は  $\alpha 1\text{NaK}$  と共沈した。KCC3a の発現していない LLC-PK1 細胞 (Tet-off 細胞) の膜画分から DRM と non-DRM を単離したところ、 $\alpha 1\text{NaK}$  の 33% が DRM に、67% が non-DRM において検出された。一方、KCC3a の発現を誘導した Tet-on 細胞の膜画分の場合、 $\alpha 1\text{NaK}$  の大部分 (77%) が DRM において検出された。これらの結果は、KCC3a の発現が non-DRM の  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase を DRM にリクルートすることを示唆している (図 1)。

興味深いことに、Tet-on 細胞と Tet-off 細胞における内因性  $\alpha 1\text{NaK}$  の発現量には差はなかったが、ウアバイン感受性  $\text{K}^+$ -ATPase 活性 ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性) は、Tet-on 細胞の方が Tet-off 細胞に比べ有意に高かった。 $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase は P 型 ATPase ファミリーに属し、触媒サイクル

においてリン酸化中間体 (EP) を形成することが知られているが、Tet-on と Tet-off 細胞の  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase のリン酸化レベルを測定すると Tet-on 細胞のレベルが有意に高かった。

R-(+)-[(2-*n*-butyl-6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-1-oxo-1*H*-inden-5-yl)oxy]acetic acid (DIOA) は KCC 阻害薬 ( $\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$ ) として知られている。我々は、高濃度 ( $>30 \mu\text{M}$ ) の DIOA は  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase や  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase の活性を阻害するが、 $10 \mu\text{M}$  では阻害しないことを確認した<sup>4)</sup>。DIOA ( $10 \mu\text{M}$ ) は、KCC3a の発現しているウサギ胃腺の  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性を有意に阻害したが、KCC3a が発現せず KCC3b が発現しているウサギ腎臓の  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性には影響を与えなかった。したがって、胃酸分泌細胞において KCC3a が  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性をアップレギュレートしていることが示唆された。さらに DIOA は Tet-on 細胞において上昇した  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性を阻害したが、Tet-off 細胞の  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性には影響を与えなかった。

予め<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>を取り込ませた Tet-on および Tet-off 細胞においてウアバイン感受性の<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>輸送活性を測定すると、Tet-on 細胞の輸送活性が有意に大きく、この増加分は DIOA によって抑制された。DIOA は Tet-off 細胞のウアバイン感受性<sup>22</sup>Na<sup>+</sup>輸送活性に影響を与えなかった。

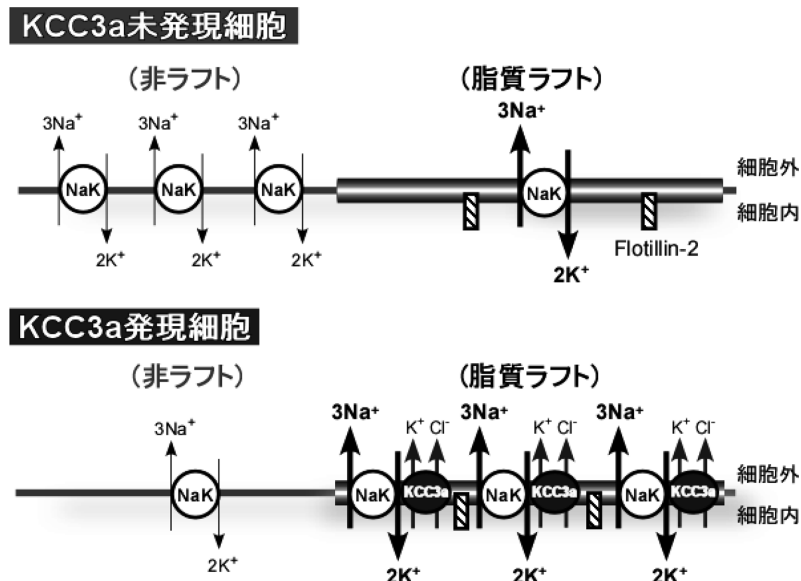


図 1 脂質ラフトにおける  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase 活性のアップレギュレーション  
KCC3a が発現することで、脂質ラフトに分布する  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase (NaK) の数が増大する。その結果、KCC3a と複合体を形成する  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase の活性上昇が引き起こされる。

KCC4はKCC3aと66%のアミノ酸相同性を持つ。LLC-PK1細胞に、KCC4のT-RExシステムを導入し、KCC3aの場合と同様の実験を行ったが、KCC4の発現によって $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性や $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseのDRM/non-DRM分布比などは変化しなかった。

以上の一連の実験結果から、酸分泌能の高い胃酸分泌細胞の基底側膜において、KCC3aは $\alpha 1\text{NaK}$ と機能複合体を形成し、脂質ラフトで $\alpha 1\text{NaK}$ をアップレギュレートしているものと考えられた(図1)。

$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 対向輸送体(anion exchanger 2; AE2)は酸分泌機構に必須であることや、胃酸分泌細胞の分泌細管や細管小胞の形成に寄与していることが報告されており<sup>5,6)</sup>、KCC3aの場合と同じく、胃腺上部の胃酸分泌細胞の基底側膜に発現していることが見出されている<sup>7)</sup>。一方、 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ 共輸送体(NKCC1)およびアクアポリン4(AQP4)は胃腺下部の胃酸分泌細胞の基底側膜に発現していることが見出されており、これらの輸送体のノックアウトマウスの胃酸分泌は正常であることが報告されている<sup>8,9)</sup>。これまで胃酸分泌細胞が上部から下部へ移動していく際に酸分泌能が低下することが知られているが、この分泌能変化の機構には、移動過程における複数の輸送体発現のオンとオフが関わっているものと考えられる。

#### 4. 胃酸分泌細胞頂端側膜におけるKCC4の発現<sup>10)</sup>

ノーザンブロットおよびウエスタンブロットにより、マウス、ラット、ブタ、ヒト胃酸分泌細胞にKCC4が発現していることを見出した。ラット胃粘膜標本の免疫組織染色により、KCC4は、KCC3aの場合と同様に酸分泌能の高い胃腺上部の胃酸分泌細胞に分布していたが、 $\alpha 1\text{NaK}$ とは局在が異なり $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ サブユニット(HK $\alpha$ )の分布と重なった。

胃酸分泌細胞において $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseは細管小胞と頂端側膜に存在する。細管小胞は酸分泌休止時には細胞内に存在し、刺激時に頂端側膜につながる。KCC4が胃酸分泌細胞の細管小胞に存在するのか、頂端側膜に存在するのかを調べるために、ブタ胃粘膜より細管小胞由来ベシクル(tubulovesicles; TV)および頂端側膜由来ベシクル(stimulation-associated vesicles; SAV)を調製した。両ベシクル共にHK $\alpha$ および $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニット(HK $\beta$ )が発現していた。他方、TVにはSAVに比べ $\text{K}^+$ チャネルのKCNQ1/KCNE2および $\text{Cl}^-$ チャネルのCFTRが高発現していた。またRab11も高発現していた。SAVにはTVに比べ $\beta$ -アクチンやエズリンが高発現していた。

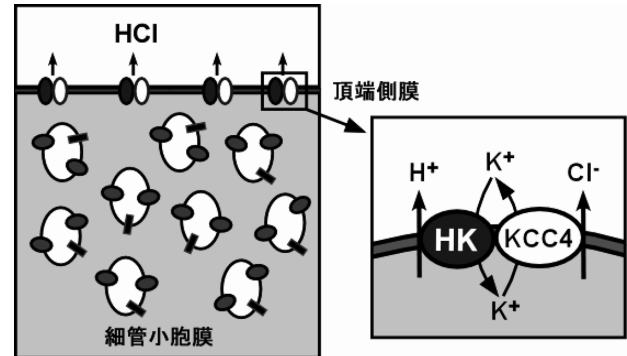


図2 胃酸分泌細胞の頂端側膜におけるKCC4の生理機能  
酸分泌休止状態の胃酸分泌細胞頂端側膜において、KCC4(白楕円)は $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase(黒楕円)と分子会合し、基礎胃酸分泌に関与する。KCC4を阻害すると $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseの酵素活性やイオン輸送活性が阻害された。細管小胞に存在する $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseや $\text{Cl}^-$ チャネル(黒長方形)は細胞内に存在するため、基礎胃酸分泌には関与しない。

たいへんに興味深いことにKCC4は、SAVに高レベルで発現し、TVにおける発現レベルは低かった(図2)。一方、TV、SAVにおいて、KCC1、KCC2およびKCC3の有意な発現は見られなかった。また、SAV由来の膜標品における免疫沈降で、KCC4はHK $\alpha$ と共沈した。

#### 5. 頂端側膜におけるKCC4と $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseの機能連関<sup>10)</sup>

TVおよびSAVにおける $^{36}\text{Cl}^-$ 取込み実験で、SAVにのみDIOA(10  $\mu\text{M}$ )で阻害される $\text{Cl}^-$ 輸送機構が存在することが明らかになった。この成分は $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase特異的阻害薬のSCH28080によりほぼ完全阻害されたことから、SAVのDIOA感受性 $\text{Cl}^-$ 輸送は $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseに依存していることが示唆された。

TVおよびSAVにおいてアクリジンオレンジを使用した $\text{H}^+$ 取込み実験を行ったところ、TV、SAV共にSCH28080感受性の $\text{H}^+$ 取込みが観察された。しかしDIOAはSAVの取込みを抑制する一方で、TVの取込みには影響を与えなかった。したがってKCC4の阻害が、 $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPaseによる $\text{H}^+$ 取込みの阻害を引き起こすことが示唆された。

さらにDIOAがTVおよびSAVのSCH28080感受性 $\text{K}^+$ -ATPase活性( $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性)に及ぼす効果を検討したところ、DIOAはSAVの $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性を抑制したが、TVの $\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase活性には影響を与えなかった。SAVを凍結乾燥しベシクル膜を破壊すると、DIOAの阻害効果は消失した。これら結果から、DIOAが、

KCC4によるイオン輸送を阻害することで、SAVの $H^+$ 、 $K^+$ -ATPase活性を間接的に抑制しているものと考えられた。

## 6. 発現系におけるKCC4と $H^+$ 、 $K^+$ -ATPaseの機能連関<sup>10)</sup>

$H^+$ 、 $K^+$ -ATPase (HK $\alpha$  および HK $\beta$ ) を安定発現した HEK 293 細胞 (ヒト胎児腎臓由来の細胞株) に、KCC4 の T-REx システムを導入した。KCC4 の発現により  $H^+$ 、 $K^+$ -ATPase の発現量は変わらなかった。SAV の場合と同様に、KCC4 発現細胞 (Tet-on 細胞) から調製した膜標品における免疫沈降で、KCC4 は HK $\alpha$  と共沈した。しかしこの膜標品の  $H^+$ 、 $K^+$ -ATPase 活性は DIOA により阻害されなかった。この結果は凍結乾燥した SAV の  $H^+$ 、 $K^+$ -ATPase 活性が DIOA により阻害されなかったことに対応している。

そこで KCC4 発現細胞 (Tet-on 細胞) および KCC4 非発現細胞 (Tet-off 細胞) に対し、アンモニウムパルス法により酸を負荷し、細胞内 pH (pHi) の回復速度を測定した。Tet-on 細胞の pHi の回復速度は、Tet-off 細胞の場合に比べ有意に増大していた。この増大分は DIOA により消失したが、Tet-off 細胞の回復速度は変化しなかった。SCH28080 は Tet-on および Tet-off 細胞の回復速度を共に有意に減少した。したがって KCC4 は Tet-on 細胞において、 $H^+$ 、 $K^+$ -ATPase による  $H^+$  輸送活性をアップレギュレートしていることが示唆された。

以上の一連の実験結果から、酸分泌能の高い胃酸分泌細胞の頂端側膜において、KCC4 は HK $\alpha$  と機能複合体を形成し、KCC4 による  $K^+$ -Cl $^-$  共輸送が、 $H^+$ 、 $K^+$ -ATPase 活性とカップリングしているものと考えられた (図 2)。また胃酸分泌細胞において KCC4 は、 $H^+$ 、 $K^+$ -ATPase のための  $K^+$  供給分子として、また胃酸 (HCl) 分泌のための Cl $^-$  輸送分子として機能していることが示唆された。

胃酸分泌細胞の形態は、酸分泌刺激休止状態と刺激状態では大きく異なる。休止状態の細胞において細管小胞は細胞内に存在しているため大部分の  $H^+$ 、 $K^+$ -ATPase は酸分泌には関わっていない。休止時の分泌 (基礎分泌) は頂端側膜に存在する  $H^+$ 、 $K^+$ -ATPase が担っているものと考えられる。他方、刺激状態では、細管小胞が頂端側膜につながり、大量の胃酸が分泌される<sup>11)</sup>。KCC4 は酸分泌休止状態の頂端側膜において特に重要な役割を果たしているものと考えられる (図 2)。

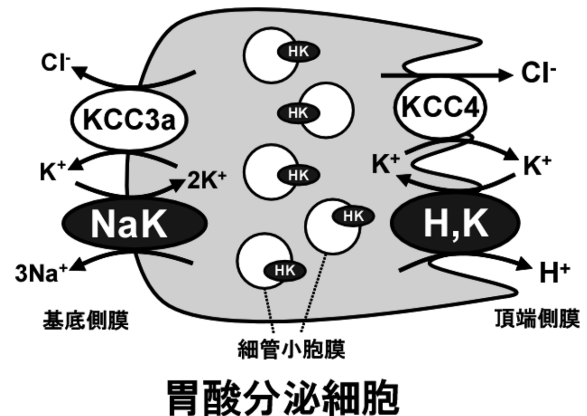


図 3 胃酸分泌細胞における KCC3a と KCC4 の発現と機能のモデル図

胃酸分泌細胞の基底側膜には、KCC3a- $Na^+$ 、 $K^+$ -ATPase (NaK) 複合体が存在し、頂端側膜には KCC4- $H^+$ 、 $K^+$ -ATPase (HK) 複合体が存在する。このモデル図では、胃酸分泌刺激がなく、基礎分泌のみが存在する状態を示す。

## おわりに

我々の研究で胃酸分泌細胞において 2 種の  $K^+$ -Cl $^-$  共輸送体 (KCC3a と KCC4) が、それぞれ異なる P 型 ATPase ( $Na^+$ 、 $K^+$ -ATPase と  $H^+$ 、 $K^+$ -ATPase) と会合し、ポンプ機能を調節するという新規のメカニズムを見出した (図 3)。特に頂端側膜の HCl 分泌の Cl $^-$  輸送体が KCC4 であることが明らかになったことで、夜間の空腹時などの酸分泌刺激休止時の胃酸分泌を選択的に抑制する薬の開発につながる可能性がある。

## 謝辞

本研究にご協力いただいた富山大学の高橋佑司先生、田淵圭章先生、塚田一博先生ならびに薬物生理学研究室の皆様、鈴鹿医療科学大学の森井孫俊先生、立命館大学の浅野真司先生、静岡県立大学の五十里彰先生に厚く御礼申し上げます。

- 1) Gamba, G. (2005) *Physiol. Rev.*, 85, 423-493.
- 2) Fujii, T., Takahashi, Y., Itomi, Y., Fujita, K., Morii, M., Tabuchi, Y., Asano, S., Tsukada, K., Takeguchi, N., & Sakai, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 6869-6877.
- 3) Simons, K. & Vaz, W.L.C. (2004) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33, 269-295.
- 4) Fujii, T., Ohira, Y., Itomi, Y., Takahashi, Y., Asano, S., Morii, M., Takeguchi, N., & Sakai, H. (2007) *Eur. J. Pharmacol.*, 560, 123-126.
- 5) Rossmann, H., Bachmann, O., Wang, Z., Shull, G.E., Ober-

- maier, B., Stuart-Tilley, A., Alper, S.L., & Seidler, U. (2001) *J. Physiol.*, 534, 837–848.
- 6) Gawenis, L.R., Ledoussal, C., Judd, L.M., Prasad, V., Alper, S. L., Stuart-Tilley, A., Woo, A.L., Grisham, C., Sanford, L.P., Doetschman, T., Miller, M.L., & Shull, G.E. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 30531–30539.
- 7) McDaniel, N. & Lytle, C. (1999) *Am. J. Physiol.*, 276, G1273–G1278.
- 8) Flagella, M., Clarke, L.L., Miller, M.L., Erway, L.C., Giannella, R.A., Andringa, A., Gawenis, L.R., Kramer, J., Duffy, J. J., Doetschman, T., Lorenz, J.N., Yamoah, E.N., Cardell, E.L., & Shull, G.E. (1999) *J. Biol. Chem.*, 274, 26946–26955.
- 9) Wang, K.S., Komar, A.R., Ma, T., Filiz, F., McLeroy, J., Hoda, K., Verkman, A.S., & Bastidas, A. (2000) *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 279, G448–G453.
- 10) Fujii, T., Takahashi, Y., Ikari, A., Morii, M., Tabuchi, Y., Tsukada, K., Takeguchi, N., & Sakai, H. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 619–629.
- 11) Yao, X. & Forte, J.G. (2003) *Annu. Rev. Physiol.*, 65, 103–131.

酒井 秀紀, 藤井 拓人, 竹口 紀晃  
(富山大学大学院医学薬学研究部薬物生理学研究室)

Functional relationship between  $K^+$ - $Cl^-$  cotransporters and P-type ATPases in gastric parietal cells  
Hideki Sakai, Takuto Fujii, and Noriaki Takeguchi (Department of Pharmaceutical Physiology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, 2630 Sugitani, Toyama city, Toyama 930-0194, Japan)

## リポタンパク質作用における S1P の役割と そのシグナル伝達機構

### 1. はじめに

スフィンゴ脂質はセリンとパルミチン酸の縮合反応にはじまり、スフィンゴシン、脂肪酸が付加したセラミドを経て合成される細胞膜の主要な構成成分である。おもな細胞膜のスフィンゴ脂質は、セラミドにさらにコリン残基が結合したスフィンゴミエリンである。スフィンゴミエリンは必要に応じてスフィンゴミエリナーゼによってセラミドに分解される。スフィンゴシンがスフィンゴシンキナーゼによってリン酸化されるとスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) が産生される (図 1)。これらスフィンゴシン、セラミド、S1P などのスフィンゴ脂質代謝産物は単なる細胞膜の構成成分としてのみならず、強力な生理活性を有していること

が明らかにされてきた。中でも S1P は受容体が複数同定されており、細胞増殖、運動、形態、アポトーシスなど生命の基本的な活動に関わっていることが明らかにされている。私達のグループは S1P が血漿中ではリポタンパク質などの高分子成分に結合して運搬されていることを見いだした。リポタンパク質は動脈硬化症など心血管疾患と密接に関連しており、その役割に関しては、これまで主にコレステロール代謝との関連で理解されてきた。しかし、最近、コレステロール代謝と直接関連しないリポタンパク質作用も指摘されている。本稿では、リポタンパク質のもつ心血管調節作用のメディエーターとしての S1P の役割について解説する。

### 2. S1P の産生とその受容体

S1P はスフィンゴシンキナーゼによって通常、細胞内で産生される。本酵素はタイプ 1 とタイプ 2 の 2 種類が存在する。本酵素は全身の細胞に存在するが血小板、赤血球では S1P 分解酵素活性が少ないために S1P は高濃度で存在している。血漿中の S1P は赤血球由来と考えられているが、凝集塊の形成による血小板からの S1P 放出は心血管疾患との関連では特に重要であろう。血中の S1P 濃度は 200~900nM 程度と考えられている。S1P 受容体は S1P<sub>1-5</sub> の 5 種が知られている (図 2A)。S1P 受容体サブタイプの中では S1P<sub>1-3</sub> が広く各組織、細胞に発現し、S1P<sub>4</sub> は血液系の細胞、S1P<sub>5</sub> は神経系と発現分布が限局している。S1P<sub>2</sub> はやや特徴的な受容体で、本受容体を発現した細胞では細胞遊走の抑制が観察される。これは G<sub>12/13</sub>-Rho 系との共役が強いため、血管系では血管平滑筋細胞に発現し、細胞遊走を抑制し、収縮を誘導する。がん細胞でもこの受容体の発現の程度で S1P の動きが制御される。

### 3. S1P は細胞外ではリポタンパク質に結合している

私達が S1P に関する研究をはじめた 1990 年代、endothelial cell differentiation gene (Edg) 受容体ファミリーはオーファン受容体であったが、私達はその受容体サブタイプのリガンドが S1P であることを、受容体を過剰に発現した細胞を用いた標識 S1P の結合実験によって確認することができた。私達は、この受容体のリガンド特異性、親和性を利用して S1P の定量法 (ラジオレセプターアッセイ法) を開発した<sup>1)</sup>。S1P は水に溶けにくいことから、生体では高分子に結合していることが想定された。そこで、血漿を密度勾配遠心法によって分離して S1P の分布を調べたところ、S1P はリポタンパク質、特に高密度リポタン