

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		脂質輸送体の 3 次元構造に基づく新しい受容体活性化機構の解明			
研究テーマ (欧文) AZ		Analysis of novel receptor activation mechanism based on the three-dimensional structure of S1P transporter			
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	姓) ニシ	名) ツヨシ	研究期間 B	2013 ~ 2015 年
	漢字 CB	西	毅	報告年度 YR	2015 年
	ローマ字 CZ	NISHI	TSUYOSHI	研究機関名	大阪大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		大阪大学産業科学研究所・准教授			
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめて下さい。)</p> <p>我々はこれまで、細胞内で合成された S1P を細胞外に放出する輸送体として SPNS2 を同定し、その機能解析を進めてきた。研究計画に基づき、昆虫細胞の発現系を用いて蛋白質の精製を試みてきたが、発現量がかなり少なく、精製度の向上やその後の結晶化には充分ではなかった。そこで、大腸菌での発現系を見直すことで、His タグを用いたニッケルカラムによるアフィニティー精製で、CBB 染色で十分確認できる量の蛋白質を得る事に成功した。この段階で、目的の蛋白質(42kDa)のバンド以外に 3 本の余分なバンドが確認できた。そこで、各種カラム処理や、SPNS2 に His タグ以外のタグを導入して、2 段階のアフィニティー精製を試みたが、うまく分離する事ができなかった。</p> <p>一方、部位特異的変異導入により、これまでに Arg200 残基が Ser 置き換わった変異体で S1P の輸送活性が完全に消失することを報告してきた。構造モデリングよりこの Arg200 残基の近傍に位置する Arg 残基に変異を導入したところ、S1P の輸送活性には変化が見られなかったが、基質特異性に変化が見られた。この残基の近傍が基質の認識に関わっている事が示唆された。さらに、S1P 輸送体による受容体活性化機構の解析について、輸送体を GFP で、受容体を RFP などそれぞれ標識したものを発現させた細胞を用いることで、受容体がキャリア蛋白質を介さずに輸送体によって細胞膜の外側に輸送された S1P によって直接活性化される事を見いだした。</p> <p>これらの生理的な意義の解析を進めることで S1P 輸送体による S1P 受容体の直接の活性化機構を照明し、新しいシグナル伝達機構を明らかにすることで個体でのリンパ球遊走制御機構の分子メカニズムの解明につながると考えている。</p>					
キーワード FA	S1P	輸送体	構造解析	シグナル伝達	

(以下は記入しないで下さい。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入して下さい。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 ^{EZ}

Sphingosine 1-phosphate (S1P) is one of the most important lipid mediators that is produced by phosphorylation of sphingosine, degradative product of ceramide. S1P is essential for cell migration such as lymphocyte, preosteoclast cells and endothelial cells in mammalian. Lymphocytes recognized S1P gradient between blood plasma and secondary lymphoid tissues and migrate into blood stream. We identified physiologically functional S1P transporter, SPNS2 in zebrafish, mouse and human. To analyze the structure and S1P transport mechanism, we are trying to express and purify the SPNS2 proteins. Using *E. coli* expression system, we successfully express and purify the SPNS2 protein. Although SPNS2 protein was detected as 42kDa band on SDS-PAGE gel with CBB staining, it containing some additional proteins bands and we could not remove them by further purification methods.

We also performed site-directed mutagenesis in SPNS2 protein to identify the functional mechanism of S1P transport. In addition to Arg200 residue that was identified as an essential residue for S1P transport, we identified the important residues around the Arg 200 for substrate recognition without affecting to the S1P transport activity.

Furthermore, we identified the direct activation of S1P receptor with the S1P that was transported by SPNS2 without carrier proteins in S1P receptor and SPNS2 expressing model cell lines.

These results suggested that further investigation of the function of S1P transporter SPNS2 should be important for identification of novel S1P signaling mechanism which control the cell migration such as lymphocyte and cancer cells.