

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09536

研究課題名(和文)新規Rabタンパク質によるマスト細胞脱顆粒の制御機構解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of mast cell degranulation by the novel Rab protein

研究代表者

門脇 知子(Kadowaki, Tomoko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：70336080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高分子量Rabタンパク質であるRab44がマスト細胞や好塩基球からの化学伝達物質放出を促進することを明らかにした。Rab44ノックアウトマウスでは、抗原刺激した際のアナフィラキシー反応が減弱し、血中ヒスタミン濃度も低下した。分子メカニズムの一つとしてRab44は細胞内小胞輸送に関わるv-SNAREであるVAMP8と相互作用することを見出した。Rab44に存在する非典型的なN末端部分はCa²⁺イオンと結合し、瞬時に細胞内の局在を変化させることから、自ら細胞内の情報を感知することが示された。Rab44は免疫系細胞に限局して存在し、炎症反応に密接に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、環境条件の悪化や生活様式の変化に伴うストレスによりアレルギー疾患に悩む人は増加している。アレルギー疾患の治療法としては「抗アレルギー薬」と呼ばれる一連の薬剤や吸入薬、外用のステロイド剤などが開発されているが、対症療法的が主流を占め、根治的な治療法の確立が期待されている。我々の研究は、アレルギー反応の病態形成に直接関わる化学伝達物質の放出機構について新たな知見を示すものであり、今後の創薬標的としての可能性も秘めている。

研究成果の概要(英文)：Mast cells are responsible for anaphylaxis and allergy. Rab44 is a large Rab GTPase that contains a Rab GTPase domain and some additional N-terminal domains. Here we investigated the role of Rab44 in the physiology of mast cells and in anaphylaxis. Rab44 knockdown impaired degranulation of murine bone-marrow mast cells (BMMCs). Rab44-knockout mice exhibited diminished anaphylaxis, and Rab44-knockout BMMCs showed a decrease in histamine secretion. Confocal microscopic analysis of constitutively active Rab44 mutants showed their partial translocation from lysosomes to the plasma membrane. Treatment with a Ca²⁺ ionophore also induced the translocation of Rab44 from lysosomes into the plasma membrane and cytosol. Mechanistically, Rab44 interacted with VAMP8, which is a v-SNARE protein, to promote degranulation. Immunohistochemical studies indicated that Rab44 was detectable by only cells in the immune-related tissues, suggesting that it is closely involved in the inflammatory response.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アレルギー 細胞内小胞輸送 脱顆粒 ケミカルメディエーター Rabタンパク質 マスト細胞

1. 研究開始当初の背景

Rabタンパク質は小胞輸送や膜輸送を調節することが知られている。ヒトでは66種類のRabタンパク質の存在が示唆されており、それぞれのRab分子が特定のオルガネラに局在して、エフェクターと呼ばれる特異的な結合分子を膜上にリクルートすることで、オルガネラの機能を制御するとされている。

我々は、分化前後のマクロファージと破骨細胞のmRNAを比較することで、破骨細胞の分化成熟過程で一過性に発現増大する新規Rabタンパク質”Rab44”を同定した。それまで、Rab44に関する論文報告はなく、全く未知のタンパクであった。

Rab44を恒常的に過剰発現させた破骨細胞では多核化は見られず、分化が抑制された。しかしながらその分子メカニズムについてはわかっていない。cDNAの解析からRab44タンパクは他のRabアイソフォームとは大きく異なる構造を示すことが予測される。一般的なRabタンパクは210個前後のアミノ酸から構成されるのに対して、Rab44はヒトで1021個、マウスで725個のアミノ酸から成り、非常に大きな分子として存在する。このようなRab44の特異的構造と機能との関連性も全く分かっていなかった。

マスト細胞の細胞外分泌に関与するRabは、いくつか報告されているが (Azouz *et al.* 2012)、我々は、Rab44がマスト細胞にも高発現していることを見出した。そこで本研究ではマスト細胞におけるRab44の機能と炎症反応との関連性を調べることにした。

2. 研究の目的

本研究は、我々が新規に見出したRab44について、その制御機構や生理的役割を解明し、Rab44タンパクの機能異常が細胞や生体の高次機能にどのように影響を及ぼすのか解析することを目的とする。

我々は、Rab44が血球系細胞、特にマスト細胞に高発現していることを見出した。マスト細胞は脱顆粒によって顆粒内に蓄えたメディエーターを放出し、炎症性免疫応答を起こすことが知られている。一般にRabタンパク質は小胞輸送の制御分子であること、Rab44の局在が破骨細胞やマスト細胞に限局していることから、Rab44は、リソソーム酵素や炎症性メディエーターの細胞外分泌を調節する可能性が高いと考えた。

Rab44の機能や制御機構は、これまで全くわかっておらず、本研究の成果は細胞生物学的、免疫学的に新しい知見をもたらすものである。Rab44の機能と、マスト細胞が主体となる疾患の病態形成との関与を解明しようとする研究である。

3. 研究の方法

(1) Rab44 ノックアウトマウスの作製と表現型の解析

ノックアウトマウスの作製

マウスの Rab44 は 13 のエクソンにコードされ、それらは遺伝子上で約 27kb にまたがっている (図 1)。これらすべてを含む 32kb の範囲を CRISPR/Cas9 システムを使って欠失させ、ssODN を使って制限酵素 EcoRI 切断部位を挿入した。図 1 左下に示すように、野生型遺伝子型なら欠失部位の外側の primer で 618bp の産物ができず、ホモ欠失型では欠失領域内部のプライマーによる PCR 産物ができないことで確認される。

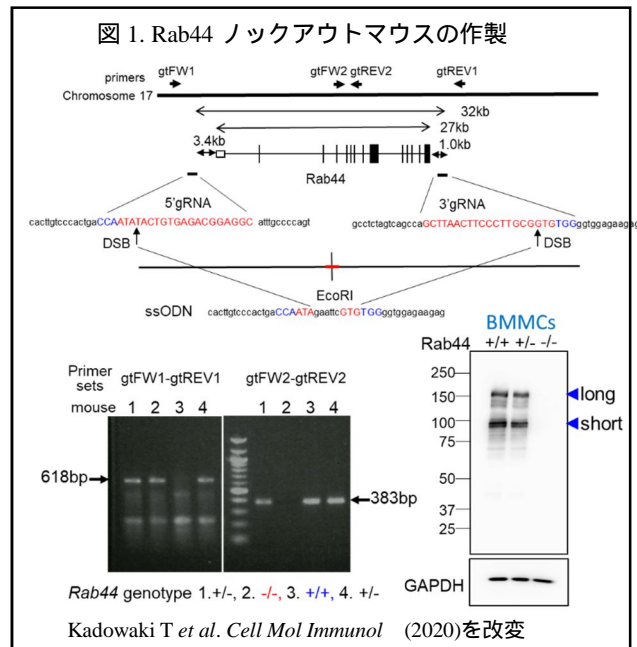
ノックアウトマウスから調製した骨髄由来マスト細胞の western プロットでは、確かに、95kDa および 160kDa の Rab44 に相当するバンドが消失した (図 1 右下)。

受動アナフィラキシー反応

野生型および Rab44^{-/-} マウスに抗 DNP マウスモノクローナル IgE を腹腔内注射して感作した。24 時間後、DNP-ヒト血清アルブミン (HSA) を腹腔内投与し、デジタル体温計を使用して直腸温度を 100 分間測定した。マウスに麻酔をかけ、静脈血サンプルを採取して、ELISA キットにより血漿ヒスタミンレベルを測定した。

能動アナフィラキシー反応

野生型および Rab44^{-/-} マウスを、OVA とアジュバント混合物の腹腔内注射によって感作した。7 日後、OVA を静脈内投与し、注射 45 分後に、デジタル体温計を使用して直腸温度を測定した。



(2) 脱顆粒アッセイ

マウス骨髄マスト細胞 (BMMC) およびラット好塩基性白血病細胞株 RBL-2H3 細胞を抗 DNP IgE 抗体で感作し、DNP-HSA で刺激した。培養上清を採取して、放出された β -ヘキソサミニダーゼおよびヒスタミンの量を測定した。 β -ヘキソサミニダーゼの総細胞内含有量を測定するために、細胞を TritonX-100 含有緩衝液で溶解した。上清および細胞抽出液を *p*-ニトロフェニル-*N*-アセチル- β -D-グルコサミニドとインキュベートし、この分解量をマイクロプレートリーダーの吸光度として測定した。脱顆粒率は、次のように計算した： $(\text{培養上清の吸光度} \times 100) / (\text{細胞抽出液と培養上清の吸光度の合計}) (\%)$ 。

(3) 免疫染色

レトロウイルスベクターを用いた RBL-2H3 細胞における Rab44 の発現

マウスおよびヒト型 Rab44 の野生型および変異型を GFP 融合タンパク質として作製し、レトロウイルスベクターを介して RBL-2H3 細胞に発現させた。安定発現細胞株をピューロマイシンで選択した。

免疫染色

細胞をカバーガラス上で培養し、直接あるいは PFA 固定し、一次抗体および蛍光標識二次抗体で染色した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Airyscan 処理して局在を解析した。マウス由来組織は PFA で固定後、同様に一次・二次抗体で染色して、共焦点レーザー顕微鏡と Airyscan 解析にて観察した。

(4) 定量的 RT-PCR

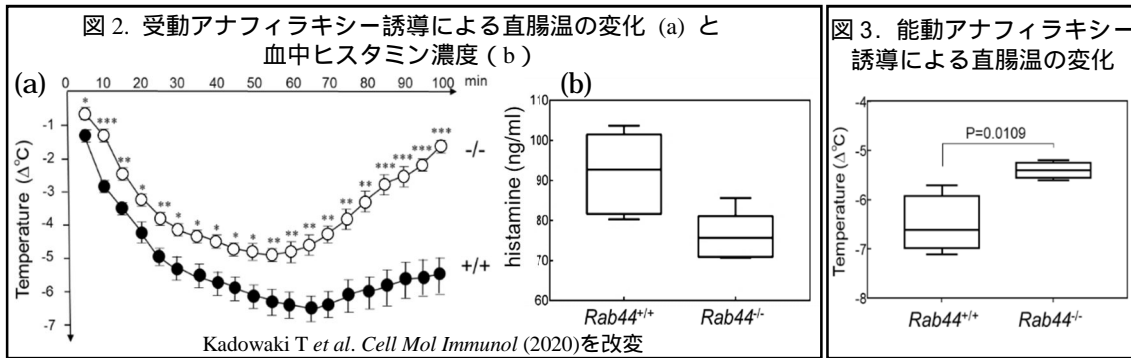
組織あるいは細胞より抽出したトータル RNA を ReverTra Ace qPCR RT マスターミックスを使用して cDNA に転写した。定量的 RT-PCR は、SYBR Green QPCR マスターミックスを用いて Applied Biosystems StepOne Plus リアルタイム PCR システムにて行った。定量 PCR 用のプライマーは、Primer3 ソフトウェア (<http://primer3.sourceforge.net/>) を使用して設計した。各標的遺伝子の発現レベルは、GAPDH 発現に対して定量化した。3 回以上の独立した実験を行い、結果を得た。

4. 研究成果

(1) Rab44 ノックアウトマウスではアナフィラキシー反応が減弱する

受動アナフィラキシー

Rab44 +/+および Rab44 -/-マウスを抗 DNP IgE で感作し、DNP-HSA で刺激した。Rab44 +/+マウスは、アナフィラキシーショックのため、直腸温が約 7 °C という著しい低下を示した(図 2a)。しかしながら、Rab44 -/-マウスは 5 °C と、Rab44 +/+マウスよりも有意に低いレベルの直腸温度変化を示した。しかも、Rab44 -/-マウスにおける直腸温の低下は、60~100 分後に急速に回復した。これらの条件下で、Rab44 -/-マウスの血漿中のヒスタミン濃度は、Rab44 +/+マウスのものよりも有意に低かった(図 2b)。

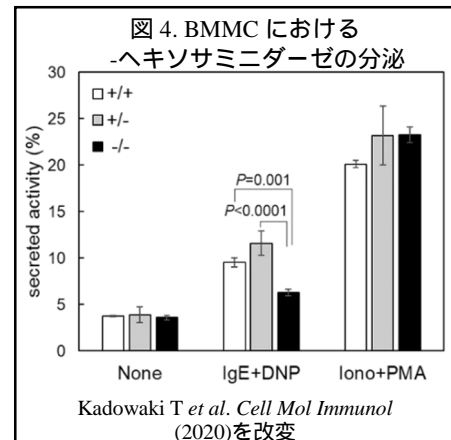


能動アナフィラキシー

Rab44 +/+および Rab44 -/-マウスを用いて卵白アルブミン (OVA) に対する能動アナフィラキシーを調べた。図 3 に示されるように、Rab44 -/-マウスは、Rab44 +/+マウスと比較して、直腸温度変化の有意な減少を示した。

(2) Rab44 欠損は、脱顆粒を抑制する

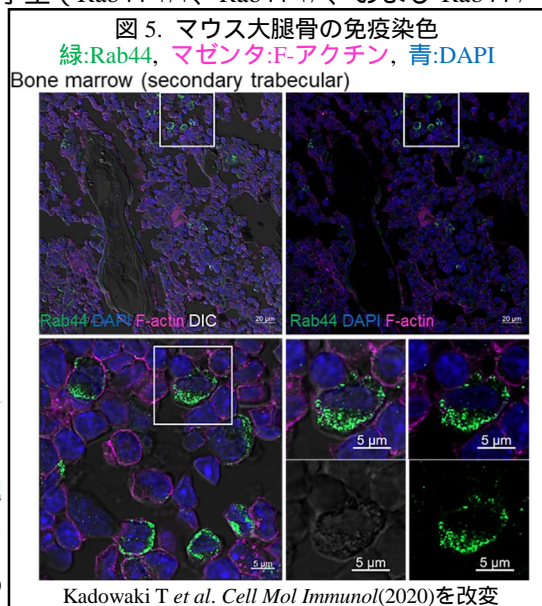
Rab44 +/+, Rab44 +/-、および Rab44 -/-マウスから骨髓由来マスト細胞 (BMMC) を分化培養し、抗 DNP IgE 抗体で感作後、DNP-HSA で刺激した。Rab44 +/+および Rab44 +/- BMMC は、分泌顆粒から中程度量の α -ヘキソサミニダーゼを放出するが、Rab44 -/- BMMC では、 α -ヘキソサミニダーゼの分泌が有意に減少した(図 4)。プロテインキナーゼ (PKC) の活性化と Ca^{2+} の流入を引き起こすホルボール 12-ミリステート 13-アセテート (PMA) /イオノマイシンで刺激すると、 α -ヘキソサミニダーゼ分泌の総量は 3 つの遺伝子型 (Rab44 +/+, Rab44 +/-、および Rab44 -/-) で差がなかった。



これらの結果は、BMMC の分泌小胞内に蓄積される α -ヘキソサミニダーゼ量は Rab44 に関係ないが、Fc γ RI を介した脱顆粒には Rab44 が関与することを示している(図 4)。

(3) Rab44 は骨髓細胞・マスト細胞に存在する

Rab44 に対する特異抗体を用いた免疫染色(図 5)とマウス全身臓器を用いたリアルタイム PCR(図 6)によって Rab44 は骨髓細胞に存在することが明らかとなった。また、骨髓由来マスト細胞の免疫染色によって、Rab44 は主に LAMP1 をマーカーとするリソソーム膜上に存在することがわ

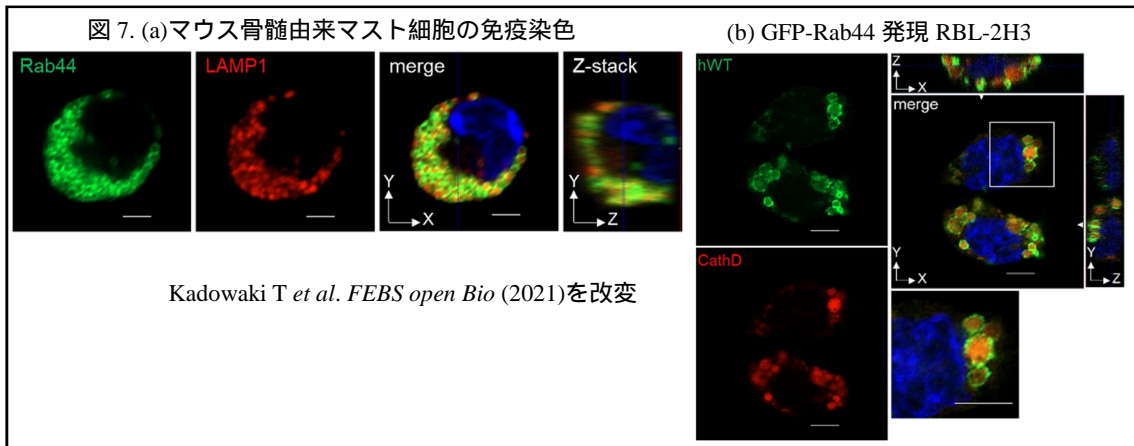
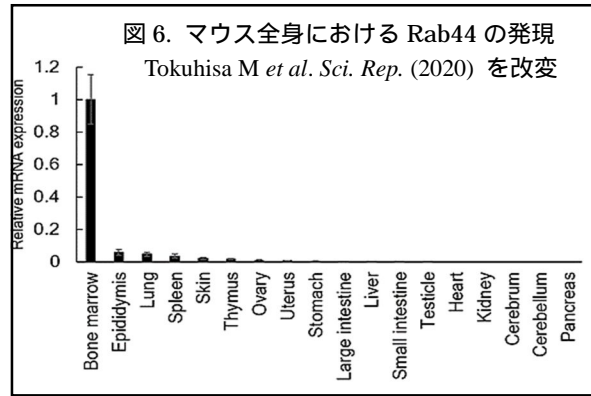


Kadowaki T et al. Cell Mol Immunol(2020)を改変

かった (図 7a)。

ラット好塩基球性白血病細胞 (RBL-2H3) においても、GFP 融合 Rab44 はリソソーム酵素であるカテプシン D の周りを取り囲むようにリング状に存在していることがわかった (図 7b)。

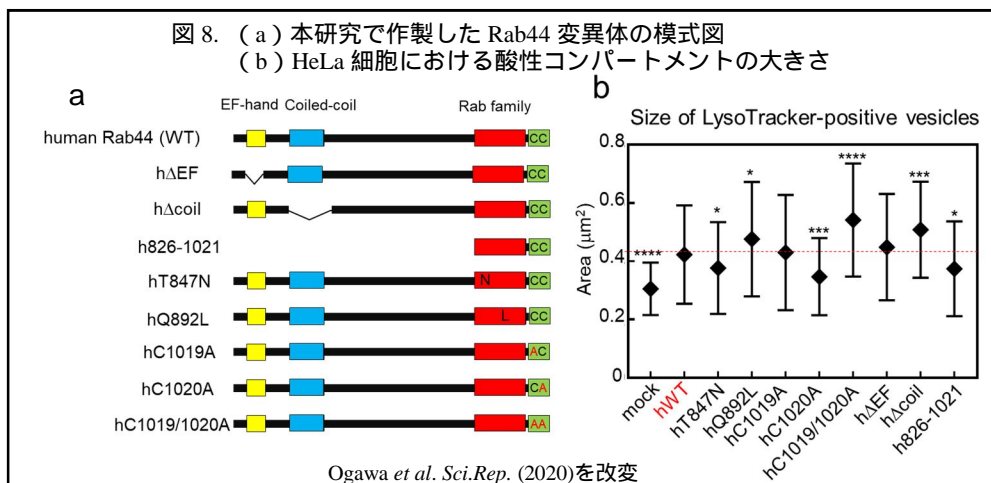
このように、細胞の定常状態では Rab44 はリソソーム膜上に存在するが、GTPase 活性中心に変異を入れた恒常的活性型 (Q892L) はリソソームには局在せず、細胞膜や細胞質に移動していることがわかった。GTP 結合部位に変異を入れたドミナントネガティブ型 (T847N) もリソソーム膜上には存在せず細胞質に拡散していた。Ca²⁺ に対する反応性を調べるためにイオノマイシン処理によって細胞内 Ca²⁺ 上昇させた場合も、野生型 Rab44 は、リソソーム膜上から細胞膜や細胞質に移動するが、EF ハンドの欠失体では、局在の変化は認められなかった。すなわち、Ca²⁺ の Rab44 への結合と、Ca²⁺ に反応した局在変化には EF ハンド部分が必要であることが示された。



さらに細胞内酸性コンパートメントを赤色蛍光に発色させる LysoTracker を使用したライブイメージングにより、LysoTracker 陽性小胞のサイズが Rab44 の分子型によって変化することがわかった (図 8)。

野生型 Rab44 を発現させた細胞では、酸性コンパートメントがコントロール細胞より大きくなった。恒常的活性型 (Q892L) Rab44 を発現させると、さらに酸性コンパートメントは大きくなり、ドミナントネガティブ型 (T847N) を発現させると、野生型の時より小さくなった。すなわち Rab44 は細胞内小胞の形成・融合にも関与することが示唆された。

このように Rab44 は免疫系細胞における細胞内小胞の形成と輸送、分泌を調節して、炎症反応に深く関与することが明らかとなった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Kadowaki T, Yamaguchi Y, Kido MA, Abe T, Ogawa K, Tokuhisa M, Gao W, Okamoto K, Kiyonari H, Tsukuba T.	4. 巻 17
2. 論文標題 The large GTPase Rab44 regulates granule exocytosis in mast cells and IgE-mediated anaphylaxis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell. Mol. Immunol.	6. 最初と最後の頁 1287-1289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-020-0413-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogawa K, Kadowaki T, Tokuhisa M, Yamaguchi Y, Umeda M, Tsukuba T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Role of the EF-hand and coiled-coil domains of human Rab44 in localisation and organelle formation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 19149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75897-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tokuhisa M., Kadowaki T., Ogawa K., Yamaguchi Y., Kido MA., Gao W., Umeda M., Tsukuba T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Expression and localisation of Rab44 in immune-related cells change during cell differentiation and stimulation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 10728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-67638-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okusha Y, Tran MT, Itagaki M, Sogawa C, Eguchi T, Okui T, Kadowaki T, Sakai E, Tsukuba T, Okamoto K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Rab11A Functions as a Negative Regulator of Osteoclastogenesis through Dictating Lysosome-Induced Proteolysis of c-fms and RANK Surface Receptors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9112384	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tran MT, Okusha Y, Feng Y, Morimatsu M, Wei P, Sogawa C, Eguchi T, Kadowaki T, Sakai E, Okamura H, Naruse K, Tsukuba T, Okamoto K	4. 巻 21
2. 論文標題 The Inhibitory Role of Rab11b in Osteoclastogenesis through Triggering Lysosome-Induced Degradation of c-Fms and RANK Surface Receptors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 9352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21249352	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kadowaki T, Yamaguchi Y, Ogawa K, Tokuhisa M, Okamoto K, Tsukuba T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Rab44 isoforms similarly promote lysosomal exocytosis, but exhibit differential localization in mast cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1165-1185
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tran MT, Okusha Y, Feng Y, Sogawa C, Eguchi T, Kadowaki T, Sakai E, Tsukuba T, Okamoto K	4. 巻 1868
2. 論文標題 A novel role of HSP90 in regulating osteoclastogenesis by abrogating Rab11b-driven transport.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.	6. 最初と最後の頁 119096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2021.119096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsukuba T, Yamaguchi Y, Kadowaki T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Novel Membrane Trafficking Regulators with a Calcium Sensor and Functional Domains.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 7691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22147691	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Feng Y, Tran MT, Lu Y, Htike K, Okusha Y, Sogawa C, Eguchi T, Kadowaki T, Sakai E, Tsukuba T, Okamoto K.	4. 巻 40
2. 論文標題 Rab34 plays a critical role as a bi-directional regulator of osteoclastogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Biochem. Func.	6. 最初と最後の頁 263-277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbf.3691	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小川晃平、門脇知子、徳久美都子、山口優、梅田正博、筑波隆幸
2. 発表標題 Rab44タンパク質の細胞内局在とその制御に関する解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 徳久美都子、門脇知子、小川晃平、山口優、梅田正博、筑波隆幸
2. 発表標題 マウスにおけるRab44の組織分布および発現変動の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 門脇知子、山口優、筑波隆幸
2. 発表標題 リソソームとアレルギー制御
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	筑波 隆幸 (Tsukuba Takayuki) (30264055)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授 (17301)	

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
---------	---------