

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790381
 研究課題名（和文）
 亜鉛シグナルによるマスト細胞サイトカイン産生機構の解明
 研究課題名（英文）
 Identification of molecular mechanisms of zinc signal mediated cytokine production in mast cells
 研究代表者
 山崎 哲 (Yamasaki Satoru)
 独立行政法人理化学研究所・サイトカイン制御研究グループ・研究員
 研究者番号：30392161

研究成果の概要（和文）：

申請者は以前の研究において、マスト細胞で抗原刺激依存的に細胞内亜鉛濃度が上昇する現象を発見し、亜鉛ウェーブと名前を付けた。本研究では、膜電位依存性カルシウムチャネル阻害剤が亜鉛ウェーブを抑制している事を見つけ出し、タンパク質のノックダウンでも同様の結果が確認された。さらに、この亜鉛ウェーブの抑制によりサイトカイン産生に関わるシグナル伝達が抑制されていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have reported that FcεRI-mediated signal induced elevation of intracellular zinc level named zinc wave. In this study, we found that antagonist for voltage-gated calcium channel reduced the zinc wave and knockdown of this protein also reduced zinc wave. Furthermore, we revealed that the signal pathway for cytokine mRNA induction was impaired by the reduction of zinc wave.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 ・免疫学

キーワード：サイトカイン産生、亜鉛ウェーブ、マスト細胞、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

亜鉛は必須微量元素の一つで、我々の生存に不可欠であることが知られており、亜鉛の恒常性が破綻することで、免疫不全・炎症性皮膚炎・成長不全・生殖能低下など広範囲に障害が生じ

ることが報告されている。これは亜鉛が酵素の活性部位形成や zinc finger などの転写因子などの立体構造維持に必須であり、亜鉛の恒常性の破綻により種々の生体内反応が阻害された結果と考えられている。

これまで亜鉛はタンパク質の構成因子としての

機能に焦点が当てられていたが、近年、カルシウムと同様に、細胞内シグナル伝達物質としての機能も注目されている(Hirano T et al., *Adv Immunol*, 2008; 97: 149-176)。

我々の研究グループはこれまでに、亜鉛の選択的キレート剤 TPEN がマスト細胞の脱顆粒反応とサイトカイン産生を抑制することを明らかにし、亜鉛がマスト細胞の活性化において重要な役割を果たしていることを報告した (Kabu K et al. *J Immunol*, 2006; 177: 1296-1305)。

さらにこの知見をもとに、マスト細胞内における亜鉛イオン濃度の変化を検討したところ、刺激依存的に上昇することが明らかになり、この現象を亜鉛ウェーブと名付けた。亜鉛ウェーブは細胞内で発生してサイトカイン産生のシグナル伝達を調節する役割を果たしていることから、亜鉛が細胞内セカンドメッセンジャー（亜鉛シグナル）としての機能していることが示唆された(Yamasaki S et al. *J Cell Biol*, 2007; 177(4): 637-645)。しかしながら、亜鉛放出に関わるタンパク質(トランスポーターあるいはチャネル)、亜鉛ウェーブを制御する抗原受容体下流のシグナル伝達、亜鉛ウェーブの標的タンパク質、などの疑問点が明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

骨髄由来の顆粒細胞であるマスト細胞は、全身の皮下組織および粘膜に幅広く分布していることが知られている。マスト細胞の細胞膜上には高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) が発現しており、細胞外からの異物の侵入に伴う FcεRI の架橋により速やかにマスト細胞活性化が誘導されることが明らかになっている。このような活性化を通じて、マスト細胞は感染に対する生体防御において重要な役割を担っていることが知られている。

しかしながら感染防御の役割を果たす一方で、

マスト細胞の慢性的あるいは過剰な活性化がアレルギーや自己免疫疾患の発症・病態形成に深く関与していることが指摘されている。このことから、マスト細胞のサイトカイン産生機構を解明することが、疾患の発症と制御を理解する上で重要であると言える。

マスト細胞におけるサイトカイン産生の制御機構については、抗原受容体からのシグナル伝達経路が明らかにされている。しかしながら、これまでに亜鉛シグナルの観点からサイトカイン産生制御機構の解析を行った研究は報告されていない。細胞内には多数の亜鉛要求性のタンパク質が存在することから、亜鉛ウェーブの作用機序を明らかにすることで、アレルギー反応をはじめ多種の生体反応における亜鉛の新たな役割が明らかになることが期待される。

本研究では、亜鉛シグナル亜鉛ウェーブがマスト細胞におけるサイトカイン産生の制御機構を解析し、アレルギー炎症反応の抑制を目標とする。

3. 研究の方法

申請者は、亜鉛ウェーブの発生を担う亜鉛トランスポーター以外の候補として、亜鉛透過性をもつチャネルの関与を検討した。

- 1) 阻害剤実験から亜鉛ウェーブが抑制されるものを同定する。
- 2) 亜鉛ウェーブが抑制された場合、さらに shRNA を導入した当該タンパク質のノックダウン細胞における亜鉛ウェーブを検討する。
- 3) これらの細胞においてサイトカイン産生が影響を受けたかどうかを検討する。

4. 研究成果

1) 様々な阻害剤が亜鉛ウェーブに及ぼす効果を検討した結果、膜電位依存型カルシウムチャネル阻害剤が亜鉛ウェーブを抑制する事が明らかになった (図 1)。

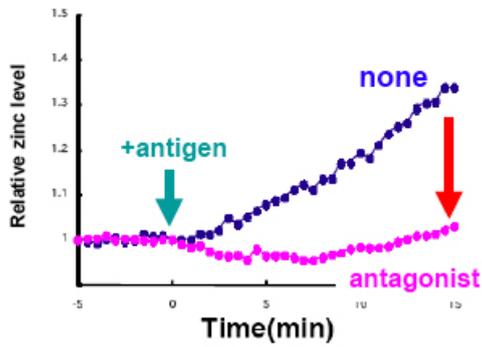


図1 膜電位依存型カルシウムチャンネル拮抗薬は亜鉛ウェーブを抑制する

しかしながらこの膜電位依存型カルシウムチャンネル拮抗薬は抗原刺激依存的なカルシウム流入は阻害していなかった (図2)。

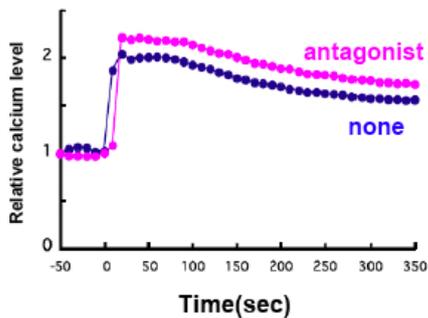


図2 膜電位依存型カルシウムチャンネルの拮抗薬はカルシウム流入を阻害しない

このことからこの膜電位依存性カルシウムチャンネルが亜鉛ウェーブの制御に関与している事が示唆された。

この結果と一致して、このチャンネルの作動薬で刺激すると、抗原刺激無しでも亜鉛ウェーブを誘導する事が確かめられた。この作動薬依存的な亜鉛ウェーブは拮抗薬で前処理している細胞では起こらなかった (図3)。

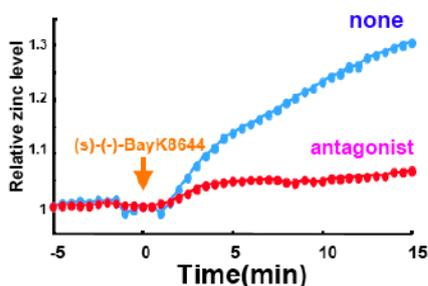


図3 カルシウムチャンネル作動薬は亜鉛ウェーブを誘導する

さらに細胞外カルシウムフリーの条件下においても作動薬は亜鉛ウェーブを誘導できる事が確認された (図4)。この結果から、膜電位依存型カルシウムチャンネルのカルシウム流入依存的ではなく、このチャンネルが直接亜鉛の流入に関与している事が示唆された。

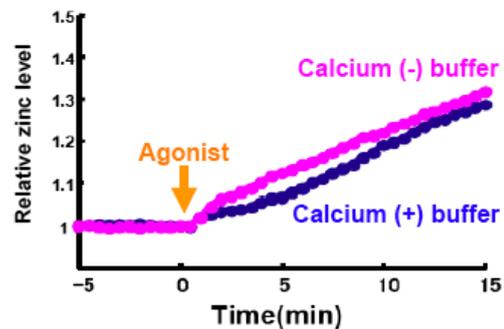


図4 カルシウムフリー条件下においても作動薬は亜鉛ウェーブを誘導できる

2) このカルシウムチャンネルに対する shRNA を設計してレトロウイルスベクター上に構築した。このウイルス上清をマスト細胞株 RBL 細胞に感染させ、ノックダウン細胞を薬剤選択した。このノックダウン細胞にさらに全長のタンパク質を強制発現させたレスキュー細胞も薬剤選択を行い、それぞれの細胞における亜鉛ウェーブを検討した。

その結果、ノックダウン細胞において亜鉛ウェーブが低下しており、一方でレスキュー細胞では亜鉛ウェーブがコントロールと同程度に回復することが示された (図5)。

これらの結果は、膜電位依存性カルシウムチャンネルが直接亜鉛ウェーブに関与している事を示唆していた。

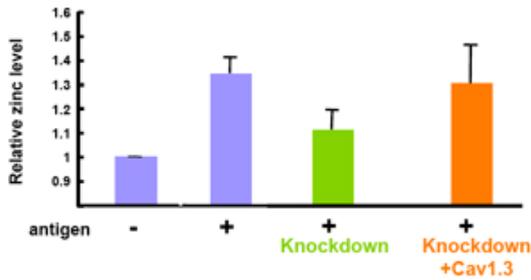


図5 ノックダウン細胞およびレスキュー細胞における亜鉛ウェーブ

3) 次に、膜電位依存型カルシウムチャネルからの亜鉛ウェーブが持つ生理活性を検討する目的で、抗原刺激依存的なサイトカイン産生に対する拮抗薬の効果を検討した。その結果、拮抗薬を処理した細胞では、サイトカイン産生が低下する事が明らかになった (図6)。

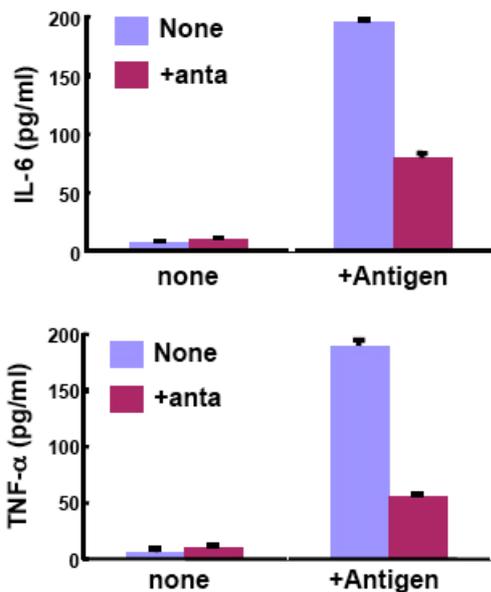


図6 カルシウムチャネル拮抗薬のサイトカイン産生に対する効果

さらに、この拮抗薬の阻害効果を検討する目的で、NF-κB サブユニット p65 の DNA 結合能を検討した。その結果、抗原刺激依存的に上昇した DNA 結合能が拮抗薬処理した細胞では抑制されており、また、亜鉛を添加した細胞ではこ

の拮抗薬の阻害効果がなくなる事が明らかになった (図7)。

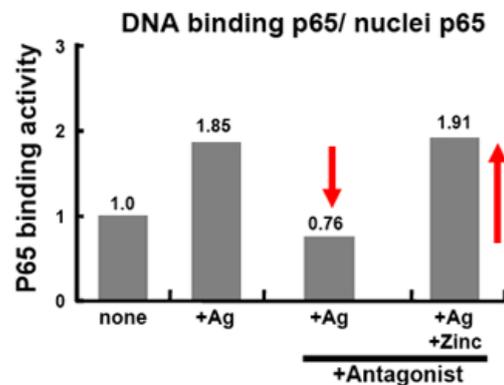


図7 p65NF-κB の DNA 結合能に及ぼすカルシウムチャネル拮抗薬の効果

これらの結果から、マスト細胞における抗原刺激依存的な亜鉛ウェーブはサイトカイン産生のシグナル伝達をポジティブに調節している事が示唆された (図8)。

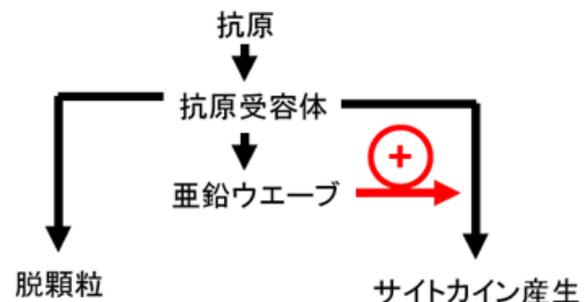


図8 亜鉛ウェーブはサイトカイン産生のシグナル伝達をポジティブに制御している

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山崎 哲 (Yamasaki Satoru)

独立行政法人理化学研究所・サイトカイン制御

研究グループ・研究員

研究者番号：30392161