

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860168

研究課題名(和文)Protein 4.1Rによるマスト細胞の脱顆粒制御機構の解明

研究課題名(英文)Protein 4.1R regulates degranulation of mast cells.

## 研究代表者

田中 正太郎(Tanaka, Shotaro)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90380667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、アレルギー症状のエフェクター細胞であるマスト細胞について、アレルギー物質の貯蔵庫である「分泌顆粒」の脱顆粒制御機構の解明を目指すものである。当初、その制御タンパク質としてProtein 4.1Rに注目していたが、詳細な機能解析には至らなかった。しかし研究の過程で、新たな分泌顆粒観察法を開発することができた。この方法は、マスト細胞の細胞質にGFPを発現させることで、分泌顆粒の陰性造影を行うものである。細胞内のあらゆる分泌顆粒をもれなく観察できる。分泌顆粒の形態を高解像度で観察できる。細胞本体や核も同時に観察できるという利点があるため、この研究分野への大きな貢献が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Mast cells cause various allergic symptoms by releasing inflammatory mediators such as histamine from their intracellular secretory granules (SGs) in response to allergic stimuli (degranulation). It is hoped that the development of treatments that inhibit degranulation will enable the mitigation of allergy symptoms. To do so, it is necessary to observe the intracellular dynamics of these SGs to elucidate the process of their degranulation. In this study, we observed individual SGs by overexpressing green fluorescent protein (GFP) in the cytoplasm of mast cells and using confocal microscopy to photograph the “absence of GFP” representing SGs that arose as a result of GFP not penetrating the granular lumen. This imaging method has notable advantages that provide (i) whole SG images in the cell, (ii) accurate and clear outline of SGs, and (iii) the images of cell body and nucleus simultaneously. We regard that this method will contribute to the development of mast cell SG study.

研究分野：細胞生物学

キーワード：マスト細胞 分泌顆粒 ライブイメージング 共焦点顕微鏡 GFP

1. 研究開始当初の背景

(1) マスト細胞は気管表層や表皮内に広く分布し、I 型アレルギー(花粉症・気管支喘息・じんま疹など)症状の要因となっている。表層レセプター(IgE・Fc RI 複合体)へのアレルギーの結合によって細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇と PKC 活性化が誘導され、分泌顆粒が細胞膜と融合してヒスタミンを放出し(脱顆粒)、数分の内に痒み・浮腫・炎症などのアレルギー症状を引き起こす。脱顆粒を効率よく進めるため、顆粒と細胞膜の融合に先立ち顆粒同士の融合が行われる(多胞性開口放出)。アレルギー症状の治療には、現在のところヒスタミン受容体のアンタゴニストが利用されるが、これはいわゆる対症療法であり、より効果的に症状を抑えるためには、顆粒の融合を直接阻害しヒスタミンの分泌を抑える必要がある。しかし、脱顆粒のシグナル伝達経路の全容は解明されておらず、融合に係わる分子の同定も進んでいない。特に、 $Ca^{2+}$  上昇や PKC 活性上昇が引き金であることが明らかであるにもかかわらず、Rab GTPase を活性化する顆粒特異的な GDI 置換因子(GEF)は未だ特定されておらず、SNARE 複合体を含んだ顆粒融合機構の詳細も明らかでない。このような現状を打破するためには、新たな研究手段を導入し、関連する分子を丁寧に分析してゆく必要があった。

(2) 4.1R は 80kDa の可溶性タンパク質であり、広範な細胞種で普遍的に発現し、細胞骨格の構成や染色体分裂への関与など重要な機能を果たしている。申請者らは 4.1R が赤血球において膜と膜骨格を連結するアンカーとして機能している点に注目し研究を進めている(Takakuwa Y, Int J Hematol 72: 298-309, 2000)。このような状況において申請者らは、マスト細胞の分泌顆粒上に 4.1R が局在し、脱顆粒時の  $Ca^{2+}$  上昇や PKC 活性上昇に伴い離脱するという現象を発見した(図 2: 未発表)。4.1R は  $Ca^{2+}$  カルモジュリンの結合および PKC によるリン酸化によって膜骨格タンパク質との親和性を低下させることが申請者らによって既に明らかにされており(Nunomura W, et al., JBC2000; Manno S, et al., JBC 2004)。4.1R が顆粒上の未知リガンドとも同様の機構で結合していると考えられた。また、4.1R が小胞輸送を制御する Rab GTPase の解離抑制因子(RabGDI)に結合する(Calinisan V, et al., Front Biosci 2006) および 4.1R と同じ FERM タンパク質ファミリーに属する ezrin が、細胞骨格を制御する RhoGTPase の解離抑制因子 RhoGDI に結合し、RhoGTPase の解離を促進する(Wang L, et al., Asian J Androl 2010) という報告に注目し、申請者は、「仮説: 4.1R は脱顆粒において GDF として機能する」という着想に至った。

2. 研究の目的

本申請では、マスト細胞の脱顆粒において『分泌顆粒表層に局在する protein 4.1R (4.1R) が、Fc RI へのアレルギー結合により惹起されるシグナル伝達に応じて RabGTPase を活性化し、SNAREs による顆粒融合を開始させる(図 1)』という仮説を実証する事を目的とした。我々は膜骨格タンパク質として知られていた 4.1R が、顆粒表層へ局在するという新たな機能を発見した。そこで本研究では、新たな顆粒観察方法を確立して 4.1R の機能を明らかにすることで、脱顆粒研究が直面している「シグナル伝達経路の解明」「顆粒融合に関与する分子の同定」という課題を解消する。これによって、I 型アレルギー症状をより直接的に緩和させ、かつ副作用が少ない治療薬の開発に貢献する。

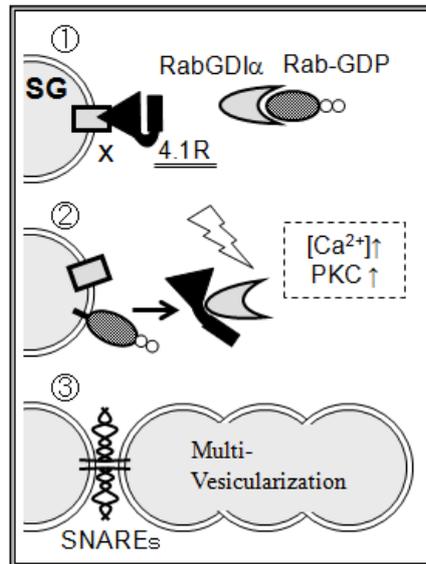


図 1 「仮説: 4.1R は脱顆粒において GEF として機能する」 4.1R は分泌顆粒(SG)表層の未知リガンド(X)に結合している。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇あるいは PKC 活性上昇によるリン酸化を受けて細胞質に移行、RabGDI と結合して Rab-GDP を解離させる(GDF 活性)。その結果 SNARE 複合体が形成され、顆粒・顆粒融合が開始される。4.1R より離脱した X が融合に関与する可能性も考えられる。

3. 研究の方法

「4.1R がマスト細胞の脱顆粒にどのように関わっているか?」を明らかにするために、顆粒表層における 4.1R の結合タンパク質を同定し、アレルギー刺激後のこれらの間の分子間相互作用の推移を観察する。制御する対象(顆粒・顆粒融合か、顆粒・細胞膜融合か)および 4.1R へのシグナル伝達経路を明らかにする。細胞生物学的手法(共焦点顕微鏡、蛍光相関分光法(FCS)、全反射顕微鏡(TIRFM)、マイクロインジェクション)および生化学的手法を駆使し、細胞内の標的分子を直接コントロールすることで、4.1R が係わる顆粒融合複合体の構造・機能・制御機構の全容を解明する。「仮説: 4.1R は脱顆粒において GDF として機能する」を実証し、顆粒融合の阻害を

利用したアレルギー反応抑制剤の開発に貢献する。

#### 4. 研究成果

当初期待していた 4.1R に関する成果の達成はなされなかった(後述)。しかし、次年度の計画であった「新規分泌顆粒イメージング法の開発」という課題に大幅な進捗がなされた。この方法によって、従来の方法では困難であった、生細胞における分泌顆粒の構造情報(体積・表面積・形状・数)を得ることが可能となり、国内外の学会発表において評価を得た(The 2014 ASCB/IFCB meeting で口頭発表に選出)。この成果は現在論文投稿中である。今後はこの技術を基盤として、分泌顆粒形成メカニズムの解明 脱顆粒メカニズムの解明 マスト細胞に対する薬剤作用機序評価システムの構築を進める予定である。

以降は研究期間に行われた研究の詳細である。

##### (1) Protein 4.1R について

本課題の核である「protein 4.1R (4.1R) の分泌顆粒への局在」という形質は、所属機関の前任者により、組織切片の電子顕微鏡撮影によって得られた結果であった。しかし、マスト細胞の培養細胞株(ヒト HMC-1、マウス P-815、ラット RBL-2H3)および他の分泌細胞株(ヒト好塩基球細胞株 Ku812、ヒトメラノーマ細胞株 G-361、ラット神経系細胞 PC-12)という様々な細胞株で試験したにもかかわらず、4.1R の分泌顆粒局在という形質は当初の見込みよりも不明瞭であり、評価に苦慮する状況となった。この結果は、蛍光免疫法および蛍光タンパク質標識によるライブイメージングにおいて確認された。その理由として、樹立されている細胞株の大半が未分化の

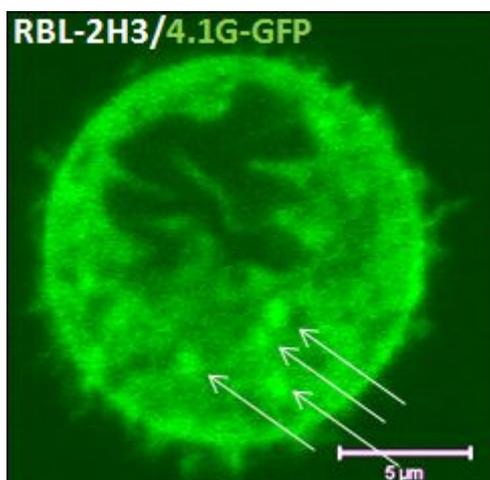


図2 GFP を融合した 4.1G をヒトマスト細胞株 HMC-1 に発現させた。細胞内小器官への GFP シグナルの集積が認められたもの(矢印)、分泌顆粒ではなく、ライソソームあるいはオートファゴソームであると示唆された。

形質を保持しているため、組織内の完全に分化(成熟)した細胞とは異なる結果を提供したのであると推測した。また、成熟マスト細胞株は既製品として流通しておらず、入手は困難であった。この時点で研究開始より一年が経過しており、新たに実験用マウスから初代マスト未分化細胞を回収し分化させるという実験系を確立することは時間的に猶予が無いと判断し、残念ながら以降の計画を断念した。

##### (2) Protein 4.1G について

(1)の試行錯誤の過程で、同じ protein 4.1ファミリーに属する protein 4.1G (4.1G) が 4.1R に比べ明確な細胞内小胞への局在を示す結果を得た(図2)。しかし観察を進めた結果、4.1G の結合している小胞は分泌顆粒ではなく、ライソソームないしはオートファゴソームである事を示唆するデータが得られた。このため、4.1G についても分泌顆粒との関わりを明らかにする事を断念した。

##### (3) 新規分泌顆粒イメージング法の開発

「細胞質への GFP 発現による分泌顆粒のイメージング」は当初次年度(H26年度)に実施予定であったが、(1)の試行錯誤の過程において順調に進展し、かつ方法としての新規性・分野への貢献が見込めたため、研究の主軸をこの課題に移した。

これまで脱顆粒における分泌顆粒の観察は、主に3つの手法によって進められてきた(電子顕微鏡、パッチクランプ法、蛍光顕微鏡)。しかし観察原理の違いから知見の統合が難しく、その全体像を明らかにするには至らずにいた。さらに、従来の顆粒結合タンパク質を利用した蛍光顕微鏡による観察法は、分泌顆粒表層に蛍光シグナルが集約する為、光の散乱と拡散の影響が大きく、解像度が不十分であった。

このような課題を受け、申請者は新しい観察法(GFP ネガティブコントラスト法、以降 GNCI)を開発した(図3)。これは、マスト細胞の細胞質に GFP を過剰に発現させるといったシンプルな方法である。GFP の侵入しない細胞内オルガネラは蛍光を生じないため、GFP の蛍光で充満した細胞質の中に、その輪郭が暗く抜けて見える(図3A)。蛍光ビーズを用いた溶液中および生細胞での実験により、この方法が従来の蛍光顕微鏡観察法に比べ、対象の形状やサイズを忠実に画像化できることを実証した。また、細胞本体・核・オルガネラの輪郭が明瞭に観察できたことから、細胞体の3D像を構築する事ができた(図3B)。これによって、細胞内の分泌顆粒の個数や、個々の顆粒の体積や形状という、従来の方法では得られなかった生細胞の構造情報を得ることができた(図3C:ある細胞における分泌顆粒の体積分布)。この方法を利

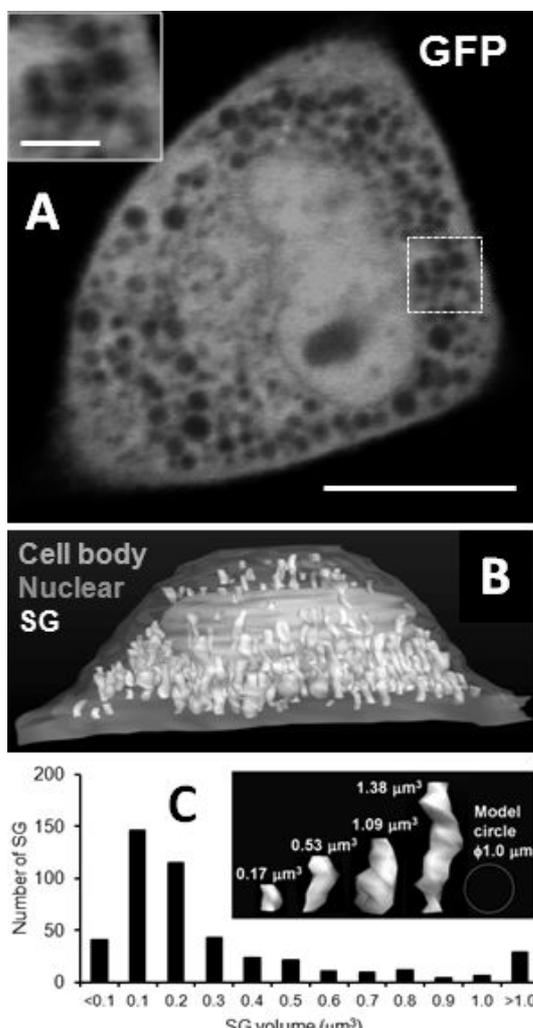


図3 新規分泌顆粒イメージング法  
(A)GFP を発現した RBL-2H3 の共焦点画像。中は破線の拡大。パー:10  $\mu\text{m}$  (B)A より構築した細胞の3D 像 (C)B より算出した個々の分泌顆粒(SG)の体積と数の関係。中は顆粒の代表例と体積

用することで、マスト細胞の成長と分泌顆粒の数の増加に正の相関がある事が分かった(図4)。また、この方法を利用して、脱顆粒時の顆粒同士の融合を観察することに成功した。これらの成果は、2013~2015年に開催された国内・国際学会で発表しており、また現在は論文投稿中である。

#### 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 2件)

田中 正太郎、高桑雄一、マスト細胞における分泌顆粒イメージングの現在、膜(日本膜学会会誌)、査読なし(総説)、40巻1号、2015、29-3

[https://www.jstage.jst.go.jp/browse/membrane/40/1/\\_contents/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/membrane/40/1/_contents/-char/ja/)

田中 正太郎、高桑雄一、蛍光相関分光法FCSを用いた細胞内分子間相互作用解析、細胞(ニューサイエンス社)、査読なし(総説)

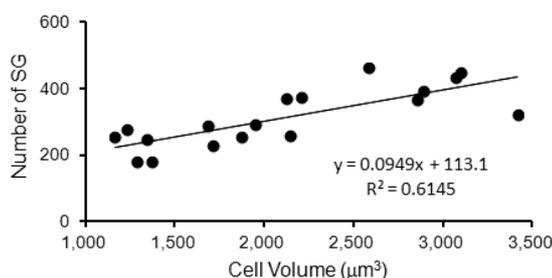


図4 細胞体積と分泌顆粒数の関係

47巻3号、2015、49-52

[http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2015/02/20153\\_4.html](http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2015/02/20153_4.html)

[学会発表](計 5件)

田中 正太郎、高桑雄一、マスト細胞分泌顆粒の分類の試み~構造及び結合タンパク質に基づく~、日本膜学会、2015年5月15日、早稲田大学(東京都新宿区)

Shotaro Tanaka, Yuichi Takakuwa, Observation of individual secretory granules in living cells using confocal microscopy, The 2014 ASCB/IFCB meeting, Philadelphia (USA)

田中 正太郎、高桑雄一、共焦点顕微鏡を用いたマスト細胞分泌顆粒の構造観察法の開発、日本生化学会、2014年10月17日、国際会議場(京都市左京区)

田中 正太郎、高桑雄一、マスト細胞分泌顆粒の新規イメージング方法の開発、日本膜学会、2014年5月21日、早稲田大学(東京都新宿区)

田中 正太郎、高桑雄一、Protein 4.1Rによるマスト細胞の脱顆粒機構の解明、日本生化学会、2013年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 正太郎(TANAKA, Shotaro)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90380667