

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08890

研究課題名(和文) プロテオーム解析とライブセルイメージングによるマスト細胞分泌顆粒の分泌経路の解明

研究課題名(英文) Proteome analysis and living cell imaging of mast cell secretory granules

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの体内に広く分布するマスト細胞は、内部の小器官である『分泌顆粒』にアレルギー症状を引き起こす様々な物質を貯蔵し、アレルギーに反応してそれらを分泌する。しかしその詳しいメカニズムは明らかでなかった。研究代表者は、研究を困難にしている原因は細胞から分泌顆粒を回収するのが難しいことであると考え、効率的な回収技術を開発した。その結果、この技術を利用することで、分泌顆粒に局在しているタンパク質群(200種)を特定することができた。今後それぞれのタンパク質の機能を明らかにしてゆくことで、分泌メカニズムの解明につながるとともに、新たなアレルギー症状治療法の開発に貢献できるだろう。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アレルギー症状誘発物質の分泌メカニズムの詳細が明らかでなかったのは、純度の高い分泌顆粒を十分量調製するのが難しく、それに係るタンパク質の同定が進んでいないことが原因であった。研究代表者は抗体を連結した磁性ビーズを利用することで、効率の良い分泌顆粒調製技術の開発に成功した。これによって、分泌に係るタンパク質を特定するための道筋ができた。これによって、分泌のメカニズムが解明されるとともに、花粉症やハウスダストによる喘息、食品アレルギーのアレルギー症状を抑制する治療法の開発に貢献できるだろう。

研究成果の概要(英文)：Mast cells are immune cell exist in systemic tissues for innate immune response. Mast cells normally maintain about 1000 of small vesicles named secretory granule (SG) in its cytoplasm which contain various allergy symptom-inducible compounds such as histamine. Details of the mechanism of SG secretion are still controversial because of difficulty to prepare SGs in adequate amount/purity for identification of SG-specific functional molecules. To conquer this problem, we developed a novel method utilizing immune-globulin and magnetic micro-beads to prepare pure SGs with enough amount from mast cells. In consequence, we identified 200 of SG specific proteins from the purified SGs by mass spectrometry. Elucidation of the function of each gene in SG secretion may provide alternate idea to treat allergy symptoms effectively in future.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オルガネラ調製 プロテオミクス マスト細胞 分泌顆粒

## 1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は細胞内に非常に多くの分泌顆粒を保持している (~1000 個/細胞)。分泌顆粒にはヒスタミンやプロテアーゼなど 30 種以上の分泌物質が貯蔵されている。これらは様々な刺激に応じて細胞外に放出され、アレルギー症状などの生体反応を制御する。この分泌顆粒がどのように作られ、維持され、放出され、そしてリサイクルされるのか、その詳細は明らかでない。

電子顕微鏡観察を元に、分泌顆粒は大きさや分泌物質構成の違いで分類されている。Raposo ら (Mol.Biol.Cell.,1997) は成熟した顆粒が Type I (カテプシン D 含有)、Type II (TNF $\alpha$  含有)、Type III (I と II の複合) の 3 種に大別されることを明らかにし、顆粒形成過程のモデルを提案した。しかし放出される分泌物質の構成は刺激の種類に応じて変化することから、このモデルでは全てを説明するのは難しく、分泌経路の潜在的な多様性が推測されている。

分泌顆粒の制御機構を明らかにするには、ライブセルイメージングによる追跡観察が必要である。そのためには、顕微鏡下で観察される 1000 個に及ぶ分泌顆粒をその場で区別・分類・判別しなければならない。しかし残念なことに、現在までのところ、分泌顆粒に特異性の高いマーカータンパク質は限定されており、分類や状態を顕微鏡下で解釈できるような関連付けもなされていない。このような技術的な問題から、全容解明に向けた研究は停滞している。

一方、分泌顆粒制御タンパク質に関する研究は、遺伝子ノックアウトの活用によって進展を見ている。現在までに各種 SNARE タンパク質 (VAMP-8 等) や分泌顆粒修飾タンパク質 (Rab27A など) を含め 20 種以上が報告されており、個々の機能に関する報告は充実してきた。しかし、上記と同じ理由で、さまざまな状態の分泌顆粒との関連付けが行われていない為、それぞれが複雑な分泌経路のどこで機能し、どのように分泌を制御しているのかを確定できずにいる。

このように本研究分野は要素研究が先行しているものの、それらを整理統合する研究が遅れている。その進展に必要なのは、分泌経路を確定させる事、つまり生細胞での分泌顆粒の分類と、要素研究の関連付けである。このためには、実際に観察している特定の分泌顆粒が、どの制御タンパク質および分泌タンパク質を備えているのかを逐一明らかにしていかなければならない。これが達成できれば、形成経路や刺激・分泌連携の研究に適した顆粒を選べるようになり、ライブセルイメージングの追跡観察が容易になる。

## 2. 研究の目的

この様な背景から、申請者は既知の分泌顆粒タンパク質 (制御タンパク質および積荷タンパク質) とライブセルイメージングで観察される分泌顆粒の対応付けを目指した。これを達成することで、ある制御タンパク質が局在する顆粒に、どのような分泌タンパク質が内包されているのかが分かり、顆粒の分類を識別することができるようになることを考えた。

この研究計画の実現に向けて、2つの新技術を開発した (図 1)。新技術①では、任意の制御タンパク質を備える分泌顆粒を高純度に回収し、そのタンパク質構成を質量分析及びイムノブロットで明らかにする。これによりどの制御タンパク質がどの分泌タンパク質を制御しているのかを明らかにする。また新技術②は、マーカーを利用することなくすべての分泌顆粒をイメージングする技術 (陰性造影法: Sci. Report 2016) である。この二つの新技術によりライブセルイメージングでの分泌顆粒の識別が達成されるため、これまで報告されている多くの要素研究の成果が整理統合され、マスト細胞の分泌システムの全容が明らかになる。本申請では更にこの成果を基盤として、分泌顆粒の形成経路および様々な刺激に対する分泌連絡を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

モデル細胞として、ラットマスト細胞株 RBL-2H3 を用いた。これより分泌顆粒を回収し、質量分析により局在タンパク質のプロテオーム解析を行い、既知のマーカータンパク質とのひも付けを行うこととした。以下に操作の詳細を述べる。

(1) 任意の分泌顆粒タンパク質の蛍光標識と安定発現株の樹立 分泌顆粒タンパク質の蛍光標識方法として、赤色蛍光タンパク質 (RFP) の分子生物学的融合を採用した。分泌顆粒の細

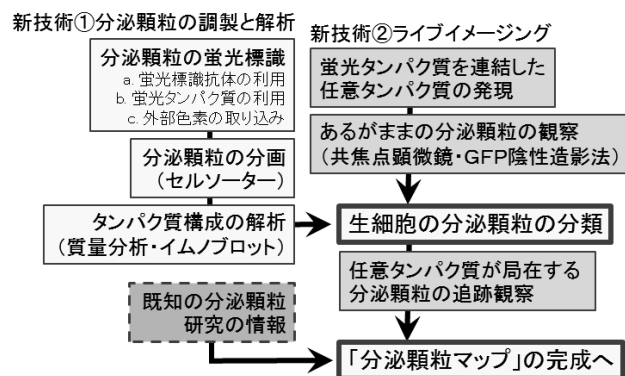


図 1. 当初の研究計画の概要

胞質側に分布するタンパク質（Rab27A や Vamp7 などの制御タンパク質）を標識した。ライブセルイメージングで分泌顆粒への局在を確認した後、薬剤耐性のシングルクローンを回収して安定発現株を調製した。

(2) 分泌顆粒の回収 当初計画では、セルソーターによる分泌顆粒の回収を目指していたが、回収量が悪く質量分析には向かないことから断念した。代案として、蛍光タンパク質に結合する抗体を標識した磁性マイクロビーズによる回収方法を考案した(図2)。十分量の安定発現株細胞を用意し、凍結融解およびシリンジ吸引により温和に細胞膜を破碎、遠心分離によって細胞質画分を調製した。これに抗 RFP 抗体標識磁性マイクロビーズを添加、4℃で一時間維持した後、磁力によってビーズを回収した。得られた画分について①共焦点顕微鏡による分泌顆粒の直接観察②イムノブロット③β-ヘキソサミニダーゼ活性測定を行い、分泌顆粒が適正に回収できていることを確認した。また、タンパク質定量を行い、質量分析可能な量を回収できることを確認した。

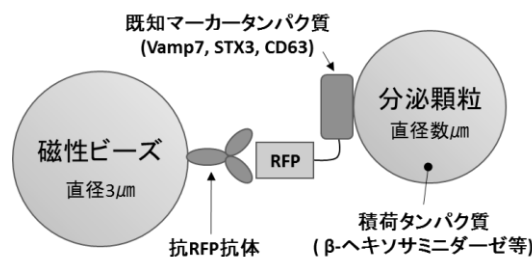


図2. タグ標識組換マーカートンパク質と抗体標識磁性ビーズを利用した分泌顆粒の分離法

(3) プロテオーム解析 回収した画分について質量分析を外部委託した。まず原理実証として、Vamp7 結合分泌顆粒をモデルとして実施した。またコントロールとして、同細胞の野生株 (RFP 融合タンパク質を遺伝子導入していない) を解析した。これにより回収成分の特異性を確認した。

#### 4. 研究成果

上記の方法の結果、Vamp7 局在分泌顆粒サンプルから 1700 あまりの遺伝子翻訳産物を特定した。既知の遺伝子データベースを参照して分類したところ、うち 200 遺伝子が分泌に関係するものと推定された(図3)。このうち驚くべきことに 186 遺伝子が、これまでマスト細胞の分泌顆粒への関与を示されていなかった。その中には酵素が 28 種、キナーゼが 1 種、Small GTPase 関連タンパク質が 15 種、機能未知のタンパク質が 3 種含まれていた(図3)。これら 186 種は、分泌顆粒への関与を指摘した報告は見つけれないもの、小胞輸送や分泌に係る遺伝子が含まれていたことから、機能上重要な遺伝子である可能性が高い。特に酵素やキナーゼは創薬ターゲットとして有望であり、現在鋭意機能の検証をすすめている。これらの成果は 2019 年日本生化学会大会にて報告した(遺伝子名は伏せた)。また、機能検証について 2020 からの科研費(基C)にて予算を得た(課題番号 20K08784)。

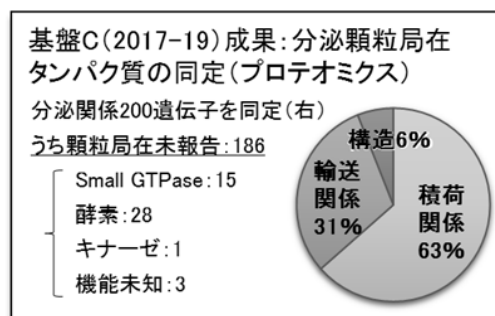


図3. 現受給基盤Cの成果

この成果について言えることとして、第一に『これまで達成されていなかった分泌顆粒のプロテオミクスを実現したこと』が挙げられる。質量分析を基盤技術としたプロテオミクス(タンパク質の網羅的解析)はあるオルガネラの機能解析には不可欠であるが、これまで解析に十分な量・純度的条件を達成できる分泌顆粒回収技術は開発されていなかった。既存の技術は、分泌顆粒をショ糖密度勾配遠心法を利用して回収するもの(Grumberg, J Cell Sci. 2002)であるが、分離度は低く、多様な種類が存在するとされる分泌顆粒を区別して回収することは難しかった。おそらくこれが原因で、分泌顆粒のプロテオミクスは報告されていなかったものと推測している。研究代表者はこの課題の解決のために、磁気ビーズを用いた抗原抗体反応による回収法を考案し(図3)、分泌顆粒の分離度を十分担保することができた。さらに分泌顆粒に局在するタグ付き組換タンパク質の安定発現細胞株を用意することで、プロテオーム解析に十分な量のサンプルを回収することに成功した。このような工夫によって、これまで達成されることのない分泌顆粒のプロテオミクス解析に先鞭をつけたと自負している。

本研究課題の期間では、予算および機関の関係上、モデル遺伝子(Vamp7)についてのみプロテオミクスを実施した。これは当初目的である『分泌経路の確定』には至らなかったものの、解析技術を実証できた点で、以降同様の操作によって目的を達成できることを示すことができた点で意義があったと考える。他の遺伝子についても Vamp7 同様の操作を計画しており、現在予算を申請中である。

第二に、今後の課題として、特定された遺伝子の種類が予想以上に多かったことが挙げられる。その内訳の大多数が、DNA 結合タンパク質であった。これは分泌顆粒の機能上意味のあるものではなく、サンプル調製上もたらされた非特異的な結果であると考えられる。その原因として、分泌顆粒中に正に帯電したヘパリン類似高分子が高濃度含まれていることが挙げられる。本来この高分子は分泌顆粒の中で、ヒスタミンなど負に帯電した分泌成分を貯留させておく機能がある。しかし調製過程で分泌顆粒が部分的に破碎し、この高分子が溶液中に露出したことで、同じく核膜が破碎されたことで溶液中に拡散していた DNA（負に帯電）を電氣的に吸着してしまったのではないか。その結果、回収されたマイクロビーズに DNA を介して DNA 結合タンパク質が吸着されてしまったのだろう。このような望まれないタンパク質の混入は、プロテオミクス研究の結果を曇らせる。そのため、以降の研究では改善が望まれる。

現在検討しているのは、調製時に十分量の DNA 分解酵素を溶液中に添加することである。これによって、分泌顆粒の正に帯電した高分子への DNA の吸着量を減らすことができるだろう。また、Vamp7 とは異なる既知分泌顆粒マーカータンパク質についてのプロテオミクスも有効である。複数のマーカータンパク質についての解析結果を重ねることで、非特異的な結果は除かれ、意味のある結果のみが抽出されるだろう。

総括として、本研究期間における成果として、分泌顆粒のプロテオミクス技術を確立した。この技術は簡便で汎用性があるため、分泌顆粒のみならず、他の細胞内オルガネラの調製にも利用可能であると考えられる。多くの研究者の努力により、我々が利用できる遺伝子データベースは日増しに豊かになっている。このデータベースと個々の研究成果を結びつける方法として、本技術のようなプロテオミクスを促進する方法は今後ますます需要が増してくると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中正太郎
2. 発表標題 マスト細胞分泌顆粒の積荷タンパク質に基づく分類と分取
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中正太郎
2. 発表標題 マスト細胞分泌顆粒の積荷タンパク質に基づく分類と分取
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中正太郎
2. 発表標題 セルソーターを用いたオルガネラ分画の試み：マスト細胞分泌顆粒の調製
3. 学会等名 日本細胞生物学会第69回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田中正太郎
2. 発表標題 マスト細胞分泌顆粒の積荷タンパク質に基づく分類と分取
3. 学会等名 日本生化学会第90回大会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----