

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14495

研究課題名(和文) 分泌顆粒局在型カルシウムチャネルORAI2による新たな分泌制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration by ORAI-2 localized on mast cell secretory granules.

研究代表者

鈴木 亮 (Suzuki, Ryo)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：00344458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞の分泌制御に極めて重要な役割を持つ細胞内カルシウム動態、特に分泌顆粒に局在するカルシウムチャネルORAI-2が制御する分泌メカニズムの解明を試みた。マウス耳介組織を用いた解析からORAI-2は培養細胞の分泌顆粒だけでなく、生体内マスト細胞においても分泌顆粒に同様の局在が観察された。さらに、各種バイオセンサーを用いた画像解析や生化学的な解析から、マスト細胞の抗原刺激に伴い、ORAI-2はSTIMやtubulinと相互作用を強め、ORAI-2が発現する分泌顆粒において脱顆粒を起こしていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the molecular mechanism of ORAI-2 localized on mast cell secretory granules, we tried to observe localization of ORAI isoforms (ORAI-1 and -2) in tissue mast cells. We found that ORAI-2 were localized on secretory granules although ORAI-1 were localized in the plasma membrane in tissue mast cells. Next, we examined the interaction of ORAI-2 proteins with STIM and tubulin. Co-immunoprecipitation experiment revealed that interaction of ORAI-2 with STIM and tubulin were increased after IgE/antigen stimulation. We also found that ORAI-2 localized on mast cell secretory granules played an important role in exocytosis by fluorescent protein-based biosensor analysis.

研究分野：アレルギー

キーワード：開口放出 カルシウムチャネル アレルギー マスト細胞 分泌小胞

## 1. 研究開始当初の背景

花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎に代表されるアレルギー疾患は、世界的にもその患者数は増加の一途をたどっている。日本においても国民の半数以上が、何らかのアレルギー症状を示すと考えられている。ところが、いまだに対処療法が中心で根本的な治療方法が存在せず、解決すべき急務の研究課題となっている。

これらのアレルギー疾患には、マスト細胞が中心的な役割を担っている。マスト細胞は細胞内に炎症性メディエータを含む分泌顆粒を数多く持ち、細胞膜上の IgE 受容体 (FcRI) には、抗原特異的 IgE が結合している。そこにアレルゲン (抗原) が結合し、IgE 受容体を架橋すると、リン酸化反応や細胞内カルシウムイオン濃度の上昇などのシグナル伝達経路の活性化と分泌反応が亢進し、最終的にアレルギー反応が惹起される。

細胞内カルシウムイオン動態はマスト細胞の脱顆粒反応やアレルギー応答において極めて重要な役割を担っている。特に、カルシウム遊離活性化カルシウムチャンネル ORAI は、マスト細胞において細胞内カルシウムイオンホメオスタシスを制御していると考えられている。ORAI には、3 種類のアイソタイプ (ORAI-1, -2, -3) が存在し、主に Orai-1 が細胞内カルシウムイオン濃度調節に関与していると考えられている。一般的に、ORAI ファミリーの 3 つのアイソタイプは、細胞膜に存在しカルシウムシグナルを調節していることが明らかになっている。ところが我々の研究成果から、アイソタイプの 1 つである ORAI-2 が、マスト細胞特異的に分泌顆粒に局在し分泌反応を制御していた (Ikeya M., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 451:62-67. (2014))。分泌顆粒局在型カルシウムチャンネル ORAI-2 は、マスト細胞の活性化に重要な細胞内カルシウムイオンホメオスタシスや開口放出を制御している可能性が示唆されているにもかかわらず、その機能において多くの不明な点が多い。そのため、分泌顆粒局在型カルシウムチャンネル ORAI2 のマスト細胞活性化における詳細な分子メカニズムの解明が求められた。

## 2. 研究の目的

マスト細胞による分泌顆粒内炎症性メディエータの分泌メカニズムの解明は、アレルギー疾患の原因や治療方法を開発する上で重要な情報を提供すると考えられる。

マスト細胞の脱顆粒反応は、カルシウム遊離活性化カルシウムチャンネルによる細胞内カルシウムイオン濃度上昇に続いて起こり、分泌顆粒と細胞膜の膜融合によって炎症性メディエータが細胞外へ放出される。このような開口放出には、分泌顆粒が細胞膜近傍に移動するためのトラフィッキング過程、さらに膜融合メカニズムなど、数多くの解明すべき問題が残されている。本研究では、マスト

細胞特異的に分泌顆粒に局在するカルシウムチャンネル ORAI2 によるアレルギー応答制御機構の実体を明らかにすることを試みた。

## 3. 研究の方法

### 3.1 免疫染色

マスト細胞 (ラット好塩基球白血病細胞 RBL-2H3 細胞株) 及びマウス耳介組織での蛋白質の局在解析には、免疫染色法を用いた。マスト細胞に各種刺激を行った後、パラホルムアルデヒドで固定し、抗体による染色後、顕微鏡で観察した。マウス耳介組織は固定後包埋し、液体窒素を用いて凍結ブロックを作製した。凍結ミクローム用いて凍結切片を作製し、スライドガラスに固定した。その後、抗体で染色後マウンティングメディアで封入し、それらを顕微鏡のサンプルとした。

### 3.2 細胞内オルガネラのカルシウムイオン動態の定量

細胞質のカルシウムイオン濃度変化は、カルシウム蛍光指示薬 Fluo-3 を、カルシウムストア内のカルシウムイオン濃度測定には、小胞体局在カルシウム蛍光プローブの G-CePIR1erw を、分泌顆粒内のカルシウムイオン濃度測定には VAMP8-RCaMP1h を用いた。各オルガネラカルシウムイオン蛍光プローブの蛍光強度を定量し、各オルガネラのカルシウムイオン濃度変化とした。各色素及び蛍光蛋白質の蛍光強度の解析には画像解析ソフト ImageJ を用いた。

### 3.3 共免疫沈降法

マスト細胞内での蛋白質の相互作用の解析には、免疫沈降法を用いた。各刺激条件で活性化させたマスト細胞を細胞可溶化液で処理した。各目的蛋白質の抗体 (STIM1, ORAI, Tubulin など) によって免疫沈降を行い、相互作用蛋白質の検出には Western blotting 法を用いた。

## 4. 研究成果

申請者らのこれまでの研究から、3 種類 (ORAI-1, -2, -3) ある ORAI のアイソタイプのうち、ORAI-2 がマスト細胞特異的に分泌顆粒に局在することが明らかになっている。これら培養細胞を用いて *in vitro* の条件下で観察された ORAI-2 の局在が、生体内の *in vivo* 条件下のマスト細胞についても同様の局在が観察されるかについて検討した。そのためマウス耳介組織を用いた免疫染色法により ORAI-2 の細胞内局在を観察したところ、組織内に存在するマスト細胞の ORAI-2 においても、分泌顆粒膜に局在している様子が観察された。これらの結果から、培養細胞だけでなく生体内のマスト細胞においても、ORAI-2 は分泌顆粒に局在していることが確認された。

次に、分泌顆粒局在 ORAI-2 の開口放出 (膜融合) における機能を追究するため、

ORAI-2-DsRed のキメラ蛋白質及び顆粒局在蛋白質 VAMP と pH センサー蛍光蛋白質 SEpHluorin の 2 種類のキメラ蛋白質をマスト細胞に同時に発現させ、抗原刺激応答に伴う両者の細胞内動態を観察した。その結果、抗原刺激後に、ORAI-2-DsRed が発現している分泌顆粒において SEpHluorin の蛍光が現れることが観察できた。SEpHluorin は開口放出すると pH 環境が変化し蛍光強度が増加する性質を持つことから、これらの結果は、ORAI-2 が発現している分泌顆粒と細胞膜とが膜融合していることが示唆された。

次に我々は、マスト細胞が活性化した際、分泌顆粒に局在する ORAI-2 が、どのような分子と相互作用するのかについて追究した。一般的に ORAI は、細胞活性化後、小胞体膜上に存在する STIM1 や STIM2 と相互作用することが明らかになっている。そこで、抗原刺激を行ったマスト細胞を用いて STIM1 及び STIM2 抗体を用いた共免疫沈降法を行った。その結果、抗原刺激後、STIM1 及び STIM2 は ORAI-1 や ORAI-2 と相互作用していることが確認された。さらに、ORAI-2-DsRed と STIM1-EGFP を共発現しているマスト細胞について、抗原刺激に伴う両者の細胞内動態を観察したところ、ORAI-2-DsRed を発現する分泌顆粒が STIM1-EGFP と共局在しながら移動している様子が観察された。また最近の研究から、STIM1 と細胞骨格蛋白質である Tubulin が共局在をしているという報告がある。そこで、顆粒局在 ORAI-2、ORAI 結合蛋白質 STIM1、細胞骨格蛋白質 Tubulin の 3 者の相互作用について、免疫沈降法を用いて追究した。その結果、刺激依存的に顆粒局在 ORAI-2 と Tubulin の相互作用が増強している様子が観察された。

さらに、分泌顆粒はカルシウムイオン貯蔵部位としての機能も有しているという報告があるため、分泌顆粒局在 ORAI-2 のカルシウムチャンネルとしての機能を追究した。そのため、カルシウムバイオセンサーRCaMP1h を分泌顆粒内に発現させ、抗原刺激に伴う分泌顆粒内のカルシウムイオン動態を観察した。その結果、分泌顆粒内に発現させた RCaMP1h の蛍光が退光とは異なる蛍光強度の減少として観察されたことから、マスト細胞の刺激応答に伴い、分泌顆粒からカルシウムイオンが放出されていることが示唆された。これらの結果より、分泌顆粒に発現する ORAI-2 は、抗原刺激時に STIM1 や STIM2 と相互作用し、分泌顆粒からのカルシウムイオンの放出を誘導し細胞質へのカルシウムイオンの供給を行っている可能性が示唆された。

以上の結果から、本研究の試みにより、マスト細胞特異的に分泌顆粒に局在する ORAI-2 は、培養細胞だけでなく生体組織内のマスト細胞においても分泌顆粒に局在することが確認された。また、ORAI-2-DsRed と VAMP-SEpHluorin を発現させたマスト細胞を用いた解析では、抗原刺激に伴い ORAI-2 が

発現する分泌顆粒で脱顆粒を起こしていることが明らかになった。さらに、マスト細胞の抗原刺激に伴い STIMs、Tubulin と ORAI-2 は相互作用を強め分泌顆粒の開口放出を制御している可能性が示唆された。

#### 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 4 件)

Suzuki R., The Emerging Picture of Mast Cell Activation: The Complex Regulatory Network of High-Affinity Receptor for Immunoglobulin E Signaling., 査読有, Biol. Pharm. Bull., 40:1828-1832 (2017)  
Yokawa S., Suzuki T., Inoue S., Inoh Y., Suzuki R., Kanamori T., Furuno T., Hirashima N., Visualization of glucagon secretion from pancreatic cells by bioluminescence video microscopy: identification of secretion sites in the intercellular contact regions., 査読有, Biochem. Biophys. Res. Commun., 485:725-730 (2017)

Yokawa S., Furuno T., Suzuki T., Inoh Y., Suzuki R., Hirashima N., Effect of Cell Adhesion Molecule 1 Expression on Intracellular Granule Movement in Pancreatic Cells., 査読有, Cell Biochem. Biophys. 74:391-398 (2016)

Hirahara K., Onodera A., Villarino A., Bonelli M., Sciumè G., Laurence A, Sun H.-W., Brooks SR., Vahedi G., Shih H.-Y., Gutierrez-Cruz G., Iwata S., Suzuki R., Mikami Y., Okamoto Y., Nakayama T., Holland S., Hunter C.A., Kanno Y., O' Shea JJ., Asymmetry of STAT action in driving IL-27 and IL-6 transcriptional outputs and cytokine specificity., 査読有, Immunity, 42, 877 -889 (2015)

[学会発表](計 8 件)

草田智之、抗原親和性が制御するマスト細胞の炎症性メディエータ選択的分泌機構の解析、日本薬学会第 138 年会、2018 年  
服部幸希、マスト細胞の分泌顆粒に局在する Ca チャンネル Orai-2 による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度制御日本薬学会第 138 年会、日本薬学会第 138 年会、2018 年

横川 慧、発光イメージング法を用いたグルカゴン分泌の可視化解析系の構築、日本薬学会第 138 年会、2018 年

草田智之、マスト細胞における分泌顆粒内炎症性メディエータの不均質性に関する研究、第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2017 年

溝端沙莉、In vitro 共存培養系によるマスト細胞と好中球の相互作用の追究、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

鈴木 亮、分泌顆粒局在型 Ca<sup>2+</sup>チャネル Orai-2 によるアレルギー制御機構、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年  
稲本 奨平、マスト細胞分泌顆粒における炎症性メディエータ不均質性の研究、第 25 回バイオイメージング学会、2016 年  
鈴木 亮、分泌顆粒局在 Ca<sup>2+</sup>チャネル Orai-2 の機能とアレルギー制御、第 37 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2015 年

研究者番号：10192296

(4)研究協力者  
該当なし ( )

〔図書〕(計 2 件)

鈴木 亮、IgE 受容体による多彩な抗原認識とアレルギー応答制御機構、アレルギー・免疫、27、32-39、2016  
鈴木 亮、アレルギー親和性によるマスト細胞活性化機構、臨床免疫・アレルギー科、64、423-428、2015

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~eisei/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 亮 (SUZUKI RYO)  
金沢大学・薬学系・教授  
研究者番号：00344458

(2)研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

平嶋 尚英 (HIRASHIMA NAOHIDE)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授