

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18370064
 研究課題名（和文） 非興奮性分泌細胞の開口放出におけるモバイルアクティブゾーンの生成機構と機能
 研究課題名（英文） The formation and function of mobile active zone in exocytosis from non-excitabile secretory cells.
 研究代表者
 平嶋 尚英（HIRASHIMA NAOHIDE）
 名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
 研究者番号：10192296

研究成果の概要：

生体では神経伝達物質やホルモンなど様々な細胞から多様な生理活性物質が分泌される。開口放出はその分泌機構の中で最も重要なものである。神経細胞では、神経伝達物質が細胞膜近傍のアクティブゾーンと呼ばれる特殊な構造から分泌されるが、このような構造が神経細胞以外の細胞で、存在しかつ機能するかどうか不明であった。我々はマスト細胞というアレルギー誘発物質を分泌する細胞では、ELKS と呼ばれるタンパク質が刺激後細胞膜付近に移動して、分泌を正に制御することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2007年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2008年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：アレルギー、シグナル伝達、アクティブゾーン、開口放出、マスト細胞、分泌細胞、ラフト、免疫学

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞（肥満細胞）や好塩基球は、近年ますます問題となっている花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎などの難治性アレルギー疾患において中心的な役割を果たしている。これらの細胞は花粉などの外来抗原により活性化され、細胞内の分泌顆粒に含有される炎症性メディエーターが開口放出によって細胞外に放出されることによってアレルギー症状を惹起する。従って、この開口放出機

構の解明はアレルギー疾患の発症機構を明らかにする上で極めて重要な問題である。ところで、神経終末からの神経伝達物質放出も開口放出によっておこるが、神経伝達物質の放出はマスト細胞等からの炎症性メディエーターの放出と大きく異なる。神経終末の場合、刺激は脱分極刺激で、これは神経終末全体に入力される。また、神経伝達物質が放出される場所は、シナプス後細胞に面した細胞膜で、アクティブゾーンと呼ばれる部分に限

定されており、ここには開口放出の直接のトリガーとなるCa流入を担うCaチャンネルおよび分泌小胞であるシナプス小胞が局在している。一方マスト細胞等の場合は、刺激は抗原による受容体刺激であり、細胞膜上の局所でおこる。また、分泌顆粒も細胞全体にランダムに分布しており、神経終末に見られるアクティブゾーン様の特殊な構造はみられず、細胞膜上のあらゆる部位で分泌できるように見える。しかしながら、実際には一旦刺激入力があると、開口放出をトリガーする細胞内のCaイオン濃度上昇が細胞全体に広がっても、入力刺激の入った部位近傍でのみ効率よく分泌がおこる。この点では、神経終末全体にCaイオン濃度上昇が起こっても、アクティブゾーン以外では分泌がほとんど見られないのと似ており、マスト細胞等においても細胞膜上に分泌部位を限定する何らかの構造が出現している可能性がある。実際、我々の最近の研究ではマスト細胞にもアクティブゾーン様の構造がある可能性が示唆され、それは神経細胞のアクティブゾーンとは異なり、不安定で細胞膜上に固定されたものではなく、刺激によって生成し、膜中を移動できるモバイルなアクティブゾーンと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、マスト細胞の様な非興奮性細胞にも、アクティブゾーン様の構造が形成され、分泌を制御している可能性を検証し、その特徴、生成機構、動態、及び機能について追究する。

3. 研究の方法

(1)マスト細胞におけるアクティブゾーンタンパク質の発現を、RT-PCR法およびウエスタンブロット法を用いて網羅的に解析する。

(2)発現が確認されたアクティブゾーンタンパク質を強発現あるいはノックダウンして、マスト細胞のエクソサイトーシスにおける機能を検証する。

(3)マスト細胞のエクソサイトーシスにおける機能が見出されたアクティブゾーンタンパク質の細胞内動態、分子間相互作用を調べることによって、マスト細胞におけるアクティブゾーン様構造の実体、形成機構、エクソサイトーシスの制御機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1)マスト細胞におけるアクティブゾーンタンパク質の発現

マスト細胞において、Munc13-1, RIM1, ELKS, Liprin- α といったアクティブゾーンタンパク質の発現がマスト細胞において確認された(図1)。分子量が400kDを超えるBassoonとPiccoloと呼ばれる巨大なアクティブゾーンタンパク質は検出されなかった。BassoonとPiccoloは安定なアクティブゾーンのために必要なものだとすると、非神経細胞にはなくてもよいのかもしれない。

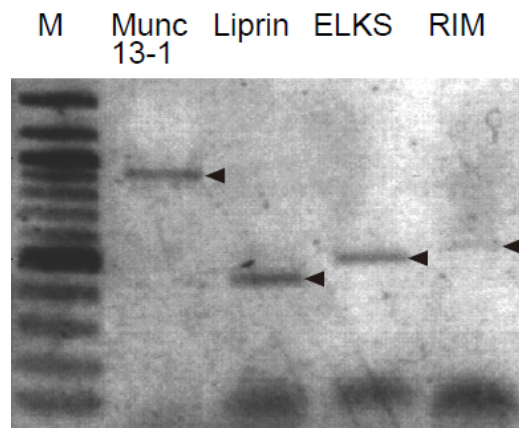


図1 マスト細胞におけるアクティブゾーンタンパク質の発現

Munc13-1とELKSについて、強発現およびノックダウンのエクソサイトーシスへの影響を調べたところ、Munc13-1については、強発現およびノックダウンともにエクソサイトーシスは抑制された。しかしながら、Munc13-1を脂質ラフト特異的にターゲティングする配列を付加して、強発現させるとエクソサイトーシス活性は増大した。また、ELKSについては、強発現によりエクソサイトーシス活性は増大し、ノックダウンによる減少した。これらのことは、マスト細胞におけるアクティブゾーン様構造が、刺激後に細胞膜近傍で形成され、その細胞膜は脂質ラフト様の特徴をもつ領域であることが示唆された。

なお、これらのタンパク質の発現の増減において、細胞内のCa濃度上昇の程度には全く影響はなかった。

(3)マスト細胞におけるアクティブゾーンタンパク質の動態

Munc13-1は細胞質にほぼ均一に存在し、抗原刺激後も特にその局在に変化は見られ

なかった。一方、ELKS は刺激前には細胞質に存在するが、刺激後細部膜付近に移動することが明らかとなった (図2)。

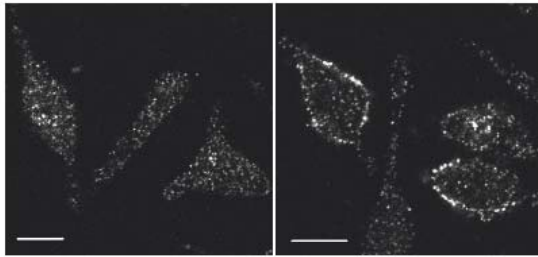


図2. 刺激前(左)と刺激後(右)のELKSの局在変化

分子間相互作用については、現在のところ特に検出されていないが、刺激後ELKSが膜に移動することから、刺激した細胞における分子間相互作用を中心に今後検討を行い、マスト細胞において、抗原刺激に伴い、多様な分子間相互作用が生じ、アクティブゾーン様構造が形成される過程を追究する予定である。

また、ELKSなどのマスト細胞に発現するアクティブゾーンタンパク質を蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現せさせ、その部位で蛍光色素をロードした分泌顆粒が融合するかどうかを、全反射蛍光顕微鏡で観察する。全反射蛍光顕微鏡では、細胞膜近傍でのみの現象を高分解能で観察できるため、マスト細胞のアクティブゾーン様構造で、開口放出が起こっているかどうかを検証することができる。

さらに、アクティブゾーン様構造の形成機構を明らかにするために、相互作用が明らかとなった相互作用分子の、アクティブゾーン様構造への集積過程を全反射顕微鏡を用いて調べる。

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5件)

(1)H. Nomura, T. Ohtsuka, S. Tadokoro, M. Tanaka, N. Hirashima; Involvement of ELKS, an active zone protein, in exocytotic release in RBL-2H3 cells, *Cell. Immunol.* (査読有) in press

(2) H. Sakiyama, S. Tadokoro, M. Nakanishi, N. Hirashima; Membrane fusion between

liposomes containing SNARE proteins involved in mast cell exocytosis, *Inflamm. Res.* (査読有) **58** 139-142 (2009)

(3)K. Miura, H. Nomura, M. Nakanishi, N. Hirashima; Munc13-1, an active zone protein, regulates exocytosis in mast cells, *Bioimages* (査読有) **16**, 11-18 (2008)

(4)S. Tadokoro, T. Kurimoto, M. Nakanishi, N. Hirashima; Munc18-2 regulates exocytotic membrane fusion positively interacting with syntaxin 3 in RBL-2H3 cells, *Mol. Immunol.* (査読有) **44**, 3427-3433 (2007)

(5)N. Kato, M. Nakanishi, N. Hirashima; Flotillin-1 regulates IgE receptor-mediated signaling in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells, *J. Immunol.* (査読有) **177**, 147-154 (2006).

[学会発表] (計17件)

(1)平嶋 尚英、笹井 雅夫、田所 哲; リポソームを用いた人工開口放出系の構築、日本薬学会第129年会 2009年3月27日(京都)

(2)田所 哲、永井 弓子、笹井 雅夫、中西 守、平嶋 尚英; 膜融合を指標にしたマスト細胞の開口放出因子の機能解析、日本薬学会第129年会 2009年3月27日(京都)

(3)H. Nomura, T. Ohtsuka, S. Tadokoro, M. Tanaka, N. Hirashima; Involvement of ELKS, an active zone protein, in exocytotic release in mast cells, 47th The American Society for Cell Biology Annual Meeting, 2008年12月15日(San Francisco, CA, USA)

(4)野村 英宏、大塚 稔久、田所 哲、平嶋 尚英; アクティブゾーンタンパク質ELKSによるマスト細胞の脱顆粒制御とそのメカニズム、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会、2008年12月12日(神戸)

(5)笹井 雅夫、田所 哲、平嶋 尚英; 人工エクソサイトーシス系の開発、日本生物物理学会第46回年会、2008年12月4日(福岡)

(6) 田所 哲、中西 守、平嶋 尚英；
Complexin によるマスト細胞の脱顆粒制御、
第 30 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウ
ム、2008 年 8 月 8 日（札幌）

(7) 野村 英宏、大塚 稔久、平嶋 尚英；
マスト細胞の開口放出におけるアクティブ
ゾーン蛋白質 ELKS の機能解析、日本薬学会
第 128 年会 2008 年 3 月 27 日（横浜）

(8) 田所 哲、中西 守、平嶋 尚英；マ
スト細胞の脱顆粒に関する SNARE 結合分子に
よる分泌制御機構、日本薬学会第 128 年会
2008 年 3 月 28 日（横浜）

(9) 田所 哲、中西 守、平嶋 尚英；マ
スト細胞の脱顆粒における complexin II の制
御機構、日本生物物理学会第 45 回年会、2007
年 12 月 22 日（横浜）

(10) 平松 裕之、中西 守、平嶋 尚英；マ
スト細胞における神経毒ラトトロキシン受
容体によるシグナル伝達、日本生物物理学会
第 45 回年会 2007 年 12 月 22 日（横浜）

(11) 田所 哲、中西 守、平嶋 尚英；マ
スト細胞の脱顆粒に関する SNARE 調節分子に
よる分泌制御機構、第 30 回日本分子生物学
学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大
会 2007 年 12 月 13 日（横浜）

(12) 平松 裕之、中西 守、平嶋 尚英；
 α -ラトトロキシンを用いたマスト細胞脱顆
粒の研究、第 30 回日本分子生物学学会年会・
第 80 回日本生化学会大会 合同大会 2007 年
12 月 12 日（横浜）

(13) N. Hirashima, K. Miura, H. Nomura, M.
Nakanishi; Munc13-1, an Active Zone
Protein, Regulates Exocytosis Positively
in Mast Cells, 47th The American Society
for Cell Biology Annual Meeting.
2007 年 12 月 1-5 日（Washington DC, USA）

(14) S. Tadokoro, H. Sakiyama, M. Sasai, M.
Nakanishi, N. Hirashima; Membrane Fusion
between Liposomes Containing SNARE
Proteins involved in Exocytosis of Mast
Cells, 47th The American Society for Cell

Biology Annual Meeting, 2007 年 12 月 1-5 日
（Washington DC, USA）

(15) 平松 裕之、平嶋 尚英； α -ラトトロ
キシン受容体を用いたマスト細胞脱顆粒の
研究、第 53 回日本薬学会東海支部大会。2007
年 7 月 7 日（名古屋）

(16) 田所 哲、崎山 裕紀、中西 守、平嶋
尚英；リボソーム再構成系によるマスト細胞
の脱顆粒機構の解析、日本薬学会第 127 年会
2007 年 3 月 29 日（富山）

(17) N. Nakagawa, M. Nakanishi, N.
Hirashima; Involvement of Rabs in the
intracellular trafficking of secretory
granules in mast cells, 日本生物物理学会
第 44 回年会 2006 年 11 月 13 日（沖縄）

〔図書〕（計 1 件）
平嶋 尚英（共著）、じほう、薬学分析
科学の最前線、2009 年（pp50-51）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者
平嶋 尚英 (HIRASHIMA NAOHIDE)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: **10192296**

(2) 研究分担者
田中 正彦 (TANAKA MASAHIKO)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・
准教授
研究者番号: **60267953**

田所 哲 (TADOKORO SATOSHI)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号: **20389109**

(3) 連携研究者
なし