

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 7 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590048

研究課題名(和文) 開口放出部位を模した脂質平面膜法を用いた分泌小胞局在CaチャンネルOrai2の解析

研究課題名(英文) Analysis of Ca channel localized on secretory granules by lipid bilayer that mimics exocytotic sites

研究代表者

平嶋 尚英 (Hirashima, Naohide)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10192296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞は炎症性メディエーターを放出して、アレルギー反応において重要な役割を果たしている。このメディエーターの開口放出は細胞内Ca²⁺濃度上昇によって誘導される。Ca²⁺流入は主にCRACチャンネルを介したストア作動性Ca²⁺流入である。CRACチャンネルのひとつであるOraiには3つのアイソフォームがあるが、我々は、Orai-2が主に分泌顆粒に局在することを見出した。Orai-2をノックダウンすると、細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺放出が抑制され、また脱顆粒も抑制された。マスト細胞では、Orai-2は細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺放出に影響して、脱顆粒を制御している。

研究成果の概要(英文)：Mast cells play an essential role in allergic responses by secreting inflammatory mediators. The exocytotic secretion of these mediators (degranulation) is triggered by the increase in intracellular Ca²⁺ concentration. The main pathway for the entry of extracellular Ca²⁺ across the plasma membrane is store-operated Ca²⁺ entry through Ca²⁺ release-activated calcium (CRAC) channels. For Orai, one of CRAC channels, there are three isoforms, Orai, Orai-1, -2 and -3. Orai-1 is responsible for degranulation in mast cells. We found that Orai-2 was mostly localized on secretory granules, while Orai-1 and -3 were localized on the plasma membrane in mast cells. When Orai-2 was knocked down, Ca²⁺ release from Ca²⁺ store was significantly attenuated but that induced by thapsigargin was not affected. When cells were stimulated with antigen, degranulation was significantly inhibited in knockdown cells. These results suggest that Orai-2 regulates degranulation through Ca²⁺ release from Ca²⁺ store.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学 物理系薬学

キーワード：アレルギー カルシウムチャンネル マスト細胞 エクソサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

花粉症や喘息などの型アレルギーは、アレルギー担当細胞であるマスト細胞から分泌されるヒスタミンによって惹起される。ヒスタミンは、マスト細胞の分泌小胞に蓄えられており、この小胞が細胞膜と融合することによって、すなわち開口放出(エクソサイトーシス)によって分泌される。我々はマスト細胞の開口放出に SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) とよばれる蛋白質が関与することを明らかにしてきた。このヒスタミンの開口放出による分泌は、刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によってトリガーされるが、我々はこの Ca^{2+} 濃度上昇を担う細胞膜にある Ca^{2+} チャネルがコレステロールの除去によって阻害されることを見出した。さらに、最近この Ca^{2+} チャネルが同定され、Orai 1 とよばれる、細胞内 Ca^{2+} ストアの枯渇によって活性化されるイオンチャネルであることが明らかとなった。Orai には3つのサブタイプが存在するが、我々は、これら3つのサブタイプ (Orai1, 2, 3) すべてがマスト細胞に発現していることを明らかにし、かつ、Orai1 と Orai3 が細胞膜に局在しているのに対して、Orai2 のみが細胞膜ではなく分泌小胞膜上に局在することを免疫染色法および蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質を用いた可視化解析により見出した。さらに、単離した分泌小胞に Orai2 が存在することをウエスタンブロット法によっても確認した。これまでに Orai は細胞膜に局在し、細胞外からの Ca^{2+} 流入に関与していることしか知られておらず、開口放出のトリガーとなる Ca^{2+} 流入を司る Orai が、開口放出をおこす分泌小胞そのものに局在していることは、開口放出の機構解明に新たな視点をもたらすものである。

2. 研究の目的

本研究では、マスト細胞の分泌小胞膜に局在する Orai2 のマスト細胞における役割とその機能発現メカニズムの解明を、分泌小胞に局在するという特徴を重視して行うこととした。マスト細胞の分泌小胞に局在する Ca^{2+} チャネル Orai2 について次のことを明らかにする。

抗原刺激によるマスト細胞の細胞内及び分泌小胞内の Ca^{2+} 濃度変化への関与を明らかにする。

抗原刺激によるマスト細胞からの開口放出による分泌への関与を明らかにする。

分泌小胞の開口放出部位への融合が、Orai2 の活性化及び電気的特性に与える影響を明らかにする。

Orai2 の機能発現機構を分泌小胞の動態や開口放出と関連付けて明らかにする。

3. 研究の方法

(1) RNAi 法による Orai2 のノックダウンマスト細胞株の構築

複数の Orai2 を特異的にノックダウンするために、オリゴ RNA を設計し、Orai2 の安定低発現株を得る。マスト細胞株としては、これまでに Orai2 の小胞への局在を確認した RBL-2H3 株を用いる。

(2) Orai2 のノックダウンマスト細胞株の細胞内 Ca^{2+} 濃度動態

(1) で得られた Orai2 の低発現株について、生理的的刺激である抗原刺激に対する細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を測定し、野生株と比較検討する。

(3) Orai2 のノックダウンマスト細胞株の開口放出活性評価

Orai2 のノックダウンの影響がヒスタミンの開口放出にどのような影響を与えるかを調べる。分泌活性は、ヒスタミンの ELISA による定量及び、分泌小胞に局在してヒスタミンとともに共分泌される α -hexosaminidase

の定量によって行う。

4. 研究成果

(1) RNAi法によるOrai2のノックダウンマスト細胞株の構築

Orai2を特異的にノックダウンするために、複数のオリゴRNAを設計し、Orai2の安定低発現株を3クローン得た(図1)。



図1 Orai-2のノックダウン

si-RNAによるOrai-2のノックダウン株のウェスタンブロットニング

WT:野生株

#1,2,3:ノックダウンクローン

NC:negative control

(2) Orai2のノックダウンマスト細胞株の細胞内Ca²⁺濃度動態

上述(1)で得られたOrai2のノックダウン株について、抗原刺激に対する細胞内Ca²⁺濃度上昇をFura-2を用いて測定した。外液Ca²⁺非存在下で、細胞内CaストアからのCa²⁺の放出が低下していた。一方、外液にCa²⁺を添加後の濃度上昇には大きな影響はなかった(図2)。

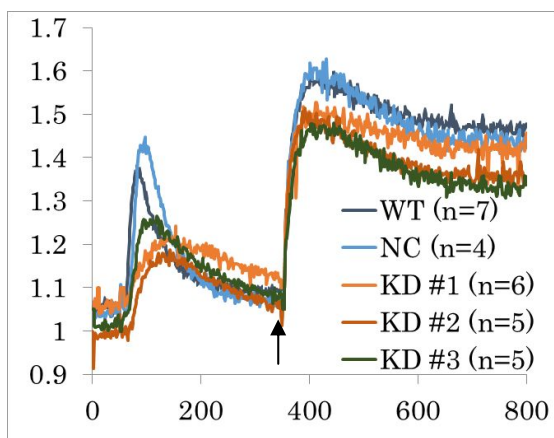


図2 抗原刺激による細胞内Ca濃度変化

外液Caイオン非存在下で抗原刺激した後、の時点で外液にCaイオンを加えた。縦軸は、励起波長340nmと360nmで励起した際の蛍光強度比。横軸は時間(秒)。

また、Ca²⁺ストアのCaポンプを阻害して、Ca²⁺ストアからのCa²⁺を放出させるタブシガルギン刺激では、Orai2のノックダウン株でも細胞内Ca²⁺濃度上昇に違いは見られなかった(図3)。

このことは、Orai-2が抗原刺激による細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺放出を制御することを示唆する。

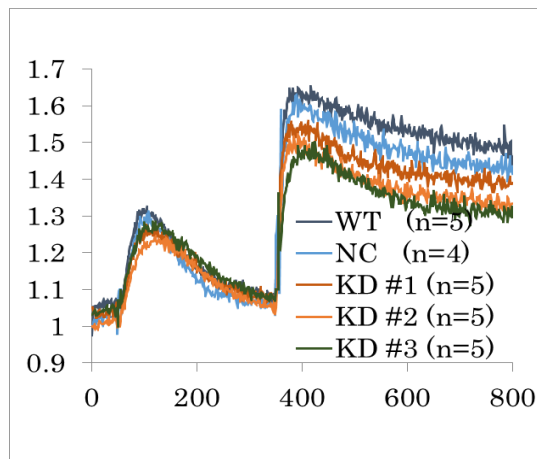


図3 タブシガルギン刺激による細胞内Ca濃度変化

(3) Orai2のノックダウンマスト細胞株の開口放出活性評価

Orai2の低発現株について、抗原刺激に対する開口放出活性を α -ヘキソサミニダーゼの活性を指標に測定したところ、開口放出による分泌が低下していた(図4)。

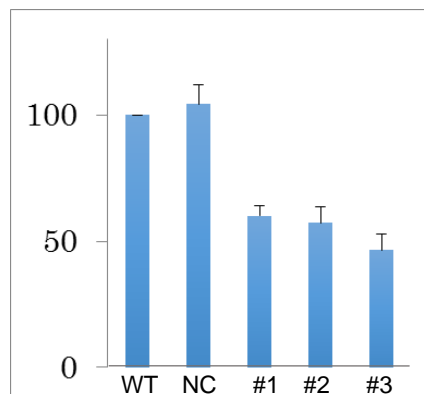


図4 抗原刺激による開口放出

ノックダウン株の開口放出活性の比較
縦軸は、WTを100%とした、相対放出活性(%)。

一方、タブシガルギンとPKCの活性化剤であるPMAの共刺激では、分泌活性に差は認められな

かった(図5)。

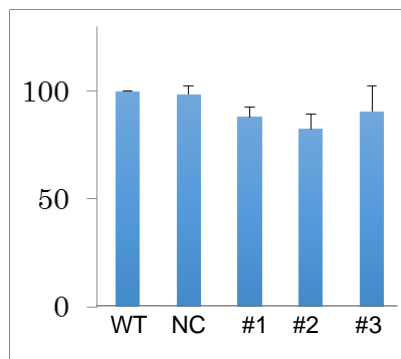


図5 タプシガルギン刺激による開口放出

ノックダウン株の開口放出活性の比較
縦軸は、WTを100%とした、相対放出活性(%)。

Orai2のノックダウンによって、細胞内CaストアからのCa²⁺の放出が抑制されることは全く予期しない結果であった。そこで、如何にして、Orai2が細胞内CaストアからのCa²⁺の放出を制御しうるかについて検討することを試みた。

(4) Orai2によるCaストアからのCa²⁺放出の制御機構

Orai2とTRPCの相互作用

分泌小胞膜に局在するOrai2が、いかにして細胞内CaストアからのCa²⁺の放出を制御するのかを明らかにするために、蛍光蛋白質GFPを結合したOrai2と小胞体(ER)とのOraiと相互作用する事が示唆されている、TRP(transient receptor potential)チャンネルとOrai2の相互作用を検討するために、RBL細胞に発現するTRPC1との相互作用を検討したが、RBL細胞におけるOrai2とTRPCの相互作用は認められなかった。

恒常活性化型Orai2の発現

分泌小胞に発現するOrai2が細胞内CaストアからのCa²⁺の放出機構として、分泌小胞自体がCaストアとして働き、Orai2はその分泌小胞からのCa²⁺の放出に関与している可能性を検討するために、98番目のグリシンをアスパラギン酸に変異させた恒常活性化型のOrai2を発現させ、分泌小胞内にCa²⁺がストアされないようにして、細胞内Ca²⁺の変化を調べた。

しかしながら、恒常活性化型のOrai2をRBL細胞に発現させると、細胞がダメージを受けるか死んでしまうことが明らかとなった。おそらく、Orai2は細胞膜にも一部存在するため、細胞膜のOrai2を介して、細胞外からCa²⁺が流入するためと思われる。

STIMと相互作用できないOrai2の発現

通常、Oraiの活性化にはSTIMが必要であるが、Orai2による細胞内CaストアからのCa²⁺の放出制御にSTIMとの相互作用が必要かどうかを明らかにするために、STIMとの相互作用に必要な箇所に変異をいれ(W113P)、STIMと相互作用できないOrai2を発現させることを試みた。現在、Orai2(W113P)強発現株による解析を行なっている。

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 2件)

望月 雄司、マスト細胞の分泌顆粒に局在するCa²⁺チャンネルOrai-2の機能解析、第60回日本薬学東海支部大会、2014年7月5日、鈴鹿(三重県)

望月 雄司、The function of Orai-2 localized on secretory granules in mast cells、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸(兵庫県)

[図書](計 0件)

[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.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ybu/HP/index/>

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

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：