

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460274

研究課題名(和文) 肥満細胞脱顆粒過程のイメージングと遺伝子機能解析への応用

研究課題名(英文) Live imaging of mast cell degranulation and its application to spatiotemporal analyses of the degranulation-related genes

研究代表者

東尾 浩典(Higashio, Hironori)

岩手医科大学・教養教育センター・講師

研究者番号：50342837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞の分泌顆粒に貯留されたヒスタミン等の化学伝達物質が細胞外に開口放出されること(脱顆粒)が花粉症や気管支喘息などの即時型アレルギーの引き金となる。この脱顆粒の分子メカニズムは大部分が未解明であり、本研究ではその解明を目的として蛍光色素を用いた脱顆粒過程のライブイメージング系を構築した。この実験系は手間がかからず、時間分解能も高く、また形態的情報が得られるという点で、細胞外に放出された生理活性物質の生化学的定量という従来の脱顆粒評価系よりも優れている。さらに、この実験系と遺伝子改変との組み合わせにより、脱顆粒に働く遺伝子産物の時間的・空間的解析が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Allergic responses such as hay fever and asthma are triggered by the release of inflammatory mediators such as histamine stored in secretory granule of mast cells. This antigen-induced exocytosis of secretory granules is called degranulation, which involves granule-granule and granule-plasma membrane fusions referred to as compound exocytosis. To know dynamics of mast cell degranulation, here we constructed a live-cell imaging system using two fluorescent dyes visualising secretory granules or tracks of exocytosis. This system can replace conventional biochemical assays determining the quantity of released mediators with painless work and high time resolution. Moreover, the precise roles of degranulation-related genes can be analysed spatiotemporally when gene manipulations are combined with this system.

研究分野：細胞生物学

キーワード：マスト細胞 調節性分泌 脱顆粒 細胞内小胞輸送 ライブイメージング

1. 研究開始当初の背景

(1) マスト細胞は全身の皮下組織や粘膜に存在する血球系細胞であり、ヒスタミン・セロトニン・各種プロテアーゼ等の生理活性物質を貯留した分泌顆粒を多数有している。この細胞は細胞表面にある高親和性 IgE 受容体が抗原によって架橋されること(抗原刺激)により活性化し、分泌顆粒内容物を開口放出(脱顆粒)する。放出された上記生理活性物質は感染防御に働く一方で、花粉症・気管支喘息・蕁麻疹・アナフィラキシーといった即時型アレルギーの原因ともなっている。それゆえ、マスト細胞脱顆粒の分子メカニズムを解明することは、即時型アレルギーを制御する新規手法の開発に重要である。

(2) 抗原刺激から脱顆粒に至る過程はおおよそ、「抗原刺激を細胞内シグナルに変換する情報伝達」、「微小管を介した分泌顆粒の細胞膜方向への移動」、そして「分泌顆粒の開口放出」の3ステップに分けられる。前者2つについては精力的に解析されてきた一方で、開口放出のステップについては依然、そこで働く分子すら満足に同定されていない状況である。そのため、最も解析が進んでいる神経伝達物質放出の分子メカニズムとの類似性を仮定して脱顆粒関連分子の同定が現在も進められている状況である。

2. 研究の目的

(1) マスト細胞脱顆粒の分子メカニズム解明が進まない大きな理由の一つに、compound exocytosis という複雑な分泌様式が挙げられる。神経細胞における伝達物質放出では単純に a) 分泌顆粒-細胞膜間の融合のみが生じるが、マスト細胞の脱顆粒ではそれに加え、b) 細胞膜と融合した分泌顆粒への他の分泌顆粒の逐次融合、また c) 分泌顆粒同士があらかじめ融合してからの細胞膜への融合が生じている。この分泌様式は、古くから電子顕微鏡観察にて形態的に見出されているにもかかわらず、その実体はほとんど解明されていない。そこで、近年発達した蛍光プローブ数種類を用いてマスト細胞の脱顆粒過程を時間的・空間的に捉えるライブイメージング系を構築し、a)-c)の膜融合の割合、膜融合進展の形態的特徴とタイムコース、および a)-c)の膜融合の分泌刺激との連関などに関する情報を得ることを第一の目的とした。

(2) 脱顆粒度合の評価手法としては、分泌刺激を与えたのち、分泌顆粒内容物の細胞外への放出を生化学的に定量するというのが一般的である。ほとんどの脱顆粒関連分子がこれと遺伝子改変とを組み合わせた解析により同定されてきた。しかし、この評価手法では分泌刺激(インプット)と放出量(アウトプット)との間は全くのブラックボックスなので、その分子が脱顆粒に関与するか否かしか分からず、実際の機能は神経など他の分泌

細胞に存在する相同分子の知見から類推することが多いのが実情であった。そこで本研究において構築したライブイメージング系について、『従来の評価手法を代替するものとなり得るか』、『脱顆粒関連分子の同定に使えるか』、また『compound exocytosis という実際の分泌様式において脱顆粒関連分子が「いつ・どこで・どう働いているか」という情報が得られるか』を検証することを第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、脱顆粒関連遺伝子の同定・機能解析への、脱顆粒イメージング系の適用可否を検討することを目的としていたため、遺伝子操作(過剰発現・ノックダウン)が比較的容易なラット由来マスト細胞株 RBL-2H3 を用いた。ノックダウンは siRNA 発現プラスミドによって行い、遺伝子導入にはエレクトロポレーション法を用いた。RBL-2H3 細胞への形質転換効率はおおよそ 30-40%であったため、エレクトロポレーションして 24 時間後に、0.6 mg/ml Geneticin (G418)を含む培地に置換してさらに 24 時間培養することにより形質転換細胞の濃縮を行った。これにより形質転換細胞の割合を 90%程度として各種解析に供した。なお、遺伝子過剰発現はウエスタンブロットにて、遺伝子ノックダウンはリアルタイム RT-PCR およびウエスタンブロットにて確認した。

(2) マスト細胞の分泌顆粒は酸性オルガネラであり、内部に様々な物質を含んでいる。分泌顆粒の可視化には、「酸性条件下のみで強い蛍光を発する蛍光色素」を用いた。また、脱顆粒の生じた場所・軌跡の可視化には、分泌顆粒中の物質と相互作用すると強い蛍光を発する蛍光色素であるスルホローダミン B を用いた。脱顆粒過程のライブイメージングは、「酸性条件下のみで強い蛍光を発する蛍光色素」を細胞に取り込ませて分泌顆粒を標識したのち、スルホローダミン B を細胞外液に添加し、分泌刺激(抗原刺激・Ca²⁺イオノフォア刺激)を与えて、共焦点レーザー走査型顕微鏡(Zeiss LSM510, 培養機能付)で経時的かつ立体的に観察することにより行った。なお、「酸性条件下のみで強い蛍光を発する蛍光色素」については、類似の性質を有するもの数種類を比較検討した。

(3) 細胞内 Ca²⁺の可視化には、Ca²⁺感受性色素数種類(Fluo-8 など)を用いた。あらかじめ細胞内に色素を取り込ませ、分泌刺激を与えて Ca²⁺濃度変動に伴う蛍光量変化を観察した。これと脱顆粒過程を可視化する上記色素との組み合わせにより、刺激-分泌連関の解析を行った。

(4) 細胞の免疫蛍光染色、分泌顆粒内容物放出量の生化学的定量、免疫沈降法によるタン

パク質間の相互作用の検討などの研究手法については、文献 (Higashio et al., *J. Immunol.* 180, 4774-4784, 2008)に従った。

4. 研究成果

(1) スルホローダミン B を用いると、分泌顆粒の開口放出後そこに存在する物質と相互作用して蛍光を発するため、初めて脱顆粒が生じた場とそこからの脱顆粒の進展を軌跡として可視化することが原理的に可能である。この蛍光色素を細胞外液に添加して抗原刺激を与え共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、細胞膜上の蛍光ラベルされる領域が経時的に増大していく様子、また細胞膜から離れた細胞深部に蛍光ラベルされる領域が経時的に増えていく様子が観察された。細胞深部の蛍光ラベル領域には、細胞膜のラベル領域を連続しているものとそうでないものがあり、後者は共焦点面外で細胞膜上のラベル領域と接続していると考えられた。そこで、Z 軸方向にも画像を取得して三次元構築した結果、予想どおり細胞深部の蛍光ラベル領域は細胞膜のラベル領域と接続しており、ラベル領域が経時的に細胞内へ陥入していくことが分かった。これは compound exocytosis の 3 つの膜融合様式 (研究目的(1)参照)のうち、b) 細胞膜と融合した分泌顆粒への他の分泌顆粒の逐次融合、また c) 分泌顆粒同士があらかじめ融合してからの細胞膜への融合を可視化したものと考えられた。一方で、細胞膜上の蛍光ラベル領域は a) 分泌顆粒-細胞膜間の融合を捉えたものと考えられた。同様の観察を Ca^{2+} イオノフォア刺激を与えて行ったところ、抗原刺激時よりも明るく形態的特徴をより顕著に捉えた蛍光像が得られた。これより、 Ca^{2+} イオノフォア刺激時には抗原刺激時より多くの分泌顆粒の開口放出が生じていることが示唆され、 Ca^{2+} イオノフォア刺激には抗原刺激よりも強く分泌顆粒内容物が放出されるという生化学的定量結果とも合致した。また、(蛍光ラベル領域増大に伴う) 蛍光量増大のタイムコースも生化学的定量結果とおおよそ合致していた。以上の結果から、スルホローダミン B を用いたライブイメージング系は生化学的定量系を代替可能であり、形態的情報も得られる優れた脱顆粒度合評価系となりうることが判明した。しかし現在のところ、短いタイムコースでの高精細な脱顆粒過程のイメージングまでには至っておらず、今後時間分解能や解像度を向上させて、分泌刺激の強さによる各膜融合様式の割合の変化なども含め、形態的特徴を詳細に解析していく予定である。

(2) 酸性 (pH4~5) で強い蛍光を発する pH 感受性色素で分泌顆粒をラベルした場合、脱顆粒が起こると、細胞外液の中性環境に曝されて蛍光が消失する。これを pH 感受性色素数種類を用いて検討し、最も Signal/Noise

比が低いものを用いた。蛍光量減少のタイムコースはスルホローダミン B の蛍光量増大のそれとほぼ一致した。また、蛍光量減少度合もやはり抗原刺激時よりも Ca^{2+} イオノフォア刺激時の方が顕著であった。これよりこの色素を用いたライブイメージング系でも生化学的定量系を代替可能であることが判明した。スルホローダミン B とこの色素を組み合わせるとより精度の高い脱顆粒評価系となる。しかしながら、この分泌顆粒の蛍光消失の瞬間を高精細にイメージングするまでには至っておらず、今後、画像解像度・時間分解能・蛍光検出感度を向上させてこの問題をクリアしたい。スルホローダミン B とこの蛍光色素を組み合わせた高精細なライブイメージングを実現すれば、3 つの膜融合様式 (研究目的(1)参照)のうち b) 細胞膜と融合した分泌顆粒への他の分泌顆粒の逐次融合と c) 分泌顆粒同士があらかじめ融合してからの細胞膜への融合、の峻別も可能となる。スルホローダミン B とこの蛍光色素を組み合わせたライブイメージング系は現状であっても「煩雑な実験操作がない」、「時間分解能に優れる」、「および compound exocytosis の形態的情報が得られる」という点で従来の生化学的定量系よりも優れている。これらの特長は、脱顆粒の分子メカニズム解明への利用だけでなく、抗アレルギー物質の探索系構築にも応用可能であると考えられた。

(3) スルホローダミン B あるいは pH 感受性蛍光色素と Ca^{2+} 感受性蛍光色素との組み合わせにより刺激-分泌連関の検討を試みたが、従来の知見を超える結果は得られなかった。当初の目的である compound exocytosis の 3 つの膜融合様式 (研究目的(1)参照)の Ca^{2+} 依存性を検討するためには、高精細な脱顆粒過程のイメージング系が必要である。

(4) スルホローダミン B および pH 感受性蛍光色素を併用したイメージング系の遺伝子機能解析への適用可否を検討した。細胞膜に存在する膜融合装置 SNARE である SNAP23 のノックダウン細胞で脱顆粒過程を抗原刺激して観察したところ、スルホローダミン B の蛍光ラベル領域の増大幅が、また pH 感受性色素の蛍光量減少幅が著しく小さくなり、分泌顆粒-細胞膜間の膜融合を担う SNAP23 の機能阻害をこのイメージング系が捕捉していることが示唆された。この結果は、生化学的定量結果ともほぼ合致していた。

Munc13-4 を過剰発現させると脱顆粒が亢進することが生化学的定量法により示されている。そこで次に、このイメージング系が脱顆粒亢進を捕捉できるかを検討すべく、Munc13-4 の過剰発現細胞に抗原刺激を与えて観察した。その結果、対照細胞と比較して単位時間当たりのスルホローダミン B 蛍光量増大および pH 感受性色素の蛍光量減少が顕著であり、脱顆粒亢進を捕捉していることが

示唆された。さらにこの観察では、Munc13-4の機能の場を示唆するような、膜融合様式（研究目的(1)参照）の変化を示唆するような結果を得た。これらの結果より、構築したライブイメージング系を脱顆粒関連遺伝子の探索と時空間的機能解析に活用できると考えられた。

(5) 実際にこのライブイメージング系を新規脱顆粒関連遺伝子の同定に用いた（生化学的定量系でも同時に解析した）、マスト細胞に発現する Rab37 は機能未知な Rab GTPase であった。Rab GTPase は哺乳動物細胞では約 60 種類存在し、それぞれが特定区間の細胞内膜輸送を制御していると考えられている。免疫蛍光染色の結果、Rab37 の細胞内局在は分泌顆粒であったことから、脱顆粒への関与を過剰発現・ノックダウンそれぞれで検討した。その結果、過剰発現では影響は出なかったものの、ノックダウンでは著しく脱顆粒が亢進し、Rab37 は脱顆粒を負に制御している分子であることが強く示唆された。そして、その脱顆粒亢進は、即膜融合可能な成熟した分泌顆粒の増加に起因していることが示唆された。また、免疫沈降法により Rab37 が GTP 非依存的に、膜融合可能な分泌顆粒の生成（分泌顆粒の成熟）を促進する Munc13-4 に結合していることが明らかになった。これらの結果より、Rab37 は Munc13-4 に結合し、未知のエフェクタータンパク質を介して Munc13-4 の分泌顆粒の成熟促進に対して拮抗的に働いていると考えられた。Rab37 の機能に係る上記の結果は生化学的定量系のデータを用いて先行して誌上発表（論文）したが、ライブイメージング系によって compound exocytosis における Rab37 の機能の場を示唆する情報も得られており、イメージング系の改良を待って詳細に解析し発表する予定である。

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4件)

Higashio H., Satoh Y., Saino T.: Mast cell degranulation is negatively regulated by the Munc13-4-binding small guanosine triphosphatase Rab37. *Scientific Reports* 6:22539 (2016) (査読有) doi: 10.1038/srep22539
*corresponding author

Okubo M., Satoh Y., Hirakawa M., Sasaki K., Masu K., J. McHonde G., Ikeda-Kurosawa C., Kurosaka D., Saino T.: Different effect of serotonin on intracellular calcium ion dynamics in the smooth muscle cells between rat posterior ciliary artery and

vorticosse vein. *Biomedical Research(Tokyo)* 37, 101-115 (2016)(査読有)

Moriguchi-Mori K., Higashio H., Isobe K., Kumagai M., Sasaki K., Satoh Y., Kuji A., and Saino T.: P2Y purinoceptors mediate ATP-induced changes in intracellular calcium and amylase release in acinar cells of mouse parotid glands. *Biomedical Research(Tokyo)* 37, 37-49 (2016) (査読有)

Kurosawa-Ikeda C., Higashio H., Nakano M., Okubo M., Satoh Y., Kurosaka D., and Saino T.: α 1-adrenoceptors relate Ca^{2+} modulation and protein secretions in rat lacrimal gland. *Biomedical Research(Tokyo)* 36, 357-369 (2015)(査読有)

〔学会発表〕(計8件)

東尾浩典、佐藤洋一、齋野朝幸：低分子量 GTPase Rab37 はマスト細胞の脱顆粒を負に制御する。第 54 回日本薬学会東北支部大会 2015 年 9 月 矢巾

守口-森霞、東尾浩典、磯部可奈子、熊谷美保、佐藤洋一、久慈昭慶、齋野朝幸：ATP 受容体刺激によるマウス耳下腺腺房細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は P2Y 受容体が主である。第 61 回日本解剖学会東北・北海道連合支部学術集会 2015 年 8 月 盛岡

東尾浩典、佐藤洋一、齋野朝幸：低分子量 GTPase Rab37 によるマスト細胞脱顆粒の抑制的制御。第 67 回日本細胞生物学会大会 2015 年 6-7 月 東京

大川祐介、小林幹、東尾浩典、塩野義人、上杉祥太、木村賢一： Ca^{2+} シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母に作用する物質の RBL-2H3 細胞への効果。日本生化学会東北支部第 81 回例会 2015 年 5 月 仙台
黒澤千花、齋野朝幸、東尾浩典、佐藤洋一、黒坂大二郎：ノルアドレナリンは α 1 受容体を介して涙腺腺房細胞からムチン分泌を促す。第 60 回日本解剖学会東

北・北海道連合支部学術集会 2014年9月 福島

東尾浩典、齋野朝幸、佐藤洋一：マスト細胞の脱顆粒における低分子量 GTPase Rab37 の役割. 第66回日本細胞生物学会大会 2014年6月 奈良

小林幹、内田武史、阿部友美、新田久男、東尾浩典、上杉祥太、木村賢一：琥珀に含まれる生物活性物質の抗アレルギー作用 日本農芸化学会 2014年度大会 2014年3月 東京

東尾浩典、佐藤洋一：低分子量 GTPase Rab37 によるマスト細胞脱顆粒の制御 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東尾 浩典 (HIGASHIO Hironori)
岩手医科大学・教養教育センター・講師
研究者番号：50342837

(2) 研究分担者

佐藤 洋一 (SATO Yoh-ichi)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：40118253

(3) 連携研究者

中野 真人 (NAKANO Masato)
岩手医科大学・医学部・助教
研究者番号：50237351