

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860041

研究課題名(和文) マスト細胞におけるリゾホスファチジルセリン(LysoPS) ターゲット分子の同定

研究課題名(英文) Target of lysophosphatidylserine on mast cells

研究代表者

巻出 久美子(Makide, Kumiko)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30519773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルセリン(LysoPS)は、アレルギー反応の主役であるマスト細胞の脱顆粒反応を顕著に促進することが知られていたが、マスト細胞上に想定されるLysoPSターゲット分子の実体は不明であった。本研究では、TPRチャネル分子に着目してLysoPSターゲット分子の探索を行った結果、TRPV1分子がLysoPS反応性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It is well known that lysophosphatidylserine (LysoPS) has stimulating activity on mast cells. Although several studies suggested the presence of specific target for LysoPS on mast cells, the molecule remains to be identified. In this study, we analysed the responses of TRP channels to LysoPS and found that TRPV1 responds to LysoPS.

研究分野：脂質生物学

キーワード：リゾリン脂質 マスト細胞

1. 研究開始当初の背景

リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジルセリン (LysoPS) はアレルギー反応の主要なマスト細胞の脱顆粒反応を顕著に促進することが知られていた。この反応は LysoPS の構造特異的であるため、マスト細胞上には LysoPS ターゲット分子の存在が示唆されているが、その実体は不明であった。我々は LysoPS の構造を有機化学的に修飾した LysoPS 誘導体を多数合成・評価し、LysoPS に対して数十倍強力なマスト細胞脱顆粒誘導能を示すアゴニスト、リゾホスファチジルスレオニン (LysoPT) を同定した。これまでの解析から LysoPS はマスト細胞上のカルシウムチャンネルと共役することが示唆されている。また、最近ある種の TRP (Transient Receptor Potential) チャンネルがリゾリン脂質に反応することが報告された。

2. 研究の目的

本研究では、スーパーアゴニスト LysoPT を利用し、マスト細胞上に想定される LysoPS のターゲット分子の同定を目指す。最近我々が開発した膜受容体活性化測定法である TGF α 切断アッセイを用い、TRP チャンネル分子をスクリーニングし、マスト細胞上の LysoPS ターゲット分子の同定を目指した。また、マスト細胞に TRP チャンネルの siRNA を導入し、脱顆粒反応を評価するアプローチからもターゲットの同定を目指した。

3. 研究の方法

3-1. TGF α 切断アッセイによる TRP ファミリー分子の LysoPS/LysoPT 反応性の評価

ラットの TRP 分子 27 種をクローニングし、TGF α 切断アッセイを用いて LysoPS および LysoPT 反応性を評価した。本アッセイでは、HEK293 細胞にそれぞれの TRP チャンネルとアルカリホスファターゼ融合 TGF α (AP-TGF α) を一過的に発現させ、LysoPS (LysoPT) 刺激により膜型プロテアーゼによって切断される上清中の AP 活性を測定することにより、チャンネルの活性化を評価した。

3-2. ラット腹腔マスト細胞における siRNA による発現抑制と脱顆粒反応性の評価

ラット腹腔細胞から密度勾配遠心法により精製したラット腹腔マスト細胞 (RPMC) から RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法により TRP チャンネルの発現を解析した。RPMC に対して、エレクトロポレーションにより siRNA を導入し、定量 RT-PCR により発現抑制を確認した。siRNA 導入 24 時間後の RPMC に IgE/抗原刺激とともに LysoPS

(もしくは LysoPT) を添加して脱顆粒反応を誘導した後、上清中のヒスタミン濃度を測定することにより、脱顆粒反応性を評価した。

4. 研究成果

4-1. TGF α 切断アッセイによる TRP ファミリー分子の LysoPS/LysoPT 反応性の評価

TGF α 切断アッセイを用いて、ラット TRP ファミリー 27 分子の LysoPS および LysoPT 応答性を評価した。その結果、TRPV1 発現細胞においてのみ、LysoPS/LysoPT 応答性が認められた。ただし、TRPV1 の既知リガンドであるカプサイシンと比較して反応性が低く、また LysoPS と LysoPT の反応性もほぼ同様であった。

4-2. ラット腹腔マスト細胞における siRNA による発現抑制と脱顆粒反応性の評価

定量 RT-PCR による発現解析により、RPMC には TRPC6、M7、V2 が高発現し、TRPC1、C2、M2、M4、V1 が中程度の発現を示すことがわかった (図 1)。

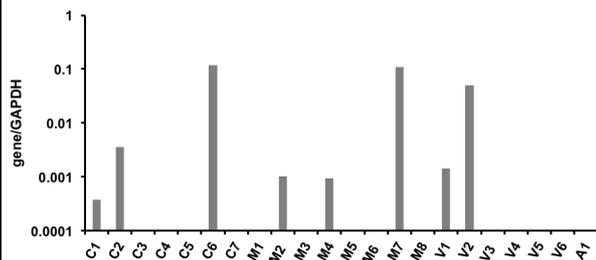


図 1. RPMC における TRP チャンネルの発現

これら発現の高い 8 遺伝子の siRNA をエレクトロポレーション法により RPMC に導入し、発現抑制率と脱顆粒反応性を解析した。その結果、一次スクリーニングで TRPM7 分子の発現抑制により脱顆粒反応の抑制が認められた。複数の TRPM7 siRNA コンストラクトにより脱顆粒抑制効果が認められたことから、TRPM7 が脱顆粒反応に影響を与えることが明らかとなった。また、TRPM7 発現抑制により抗原・LysoPS による脱顆粒反応は抑制されるのに対し、強力な脱顆粒促進剤である compound48/80 による脱顆粒反応にはほとんど影響がなかった。TRPM7 は Ca²⁺に加えて Mg²⁺の流入にも関与することから、脱顆粒反応バッファーの Mg²⁺依存性を調べた結果、LysoPS/抗原による脱顆粒促進作用に Mg²⁺も重要であることがわかった。TRPM7 の重要性を調べるのに、ノックアウト (KO) マウスの腹腔マスト細胞を用いた実験が必要となるが、TRPM7 KO マウスは胎生致死であることから、すぐに実行するのは困難であった。

新たに LysoPS 誘導体の脱顆粒促進活性の評価を行い、LysoPT よりも強力な (LysoPS と比較して約 100 倍) スーパーアゴニストを見出した。この誘導体はカラムアフィニティー精製や発現クローニングに有用と考えられる。

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 3 件)

1. Lysophosphatidylserine analogues differentially activate three LysoPS receptors.

Uwamizu A, Inoue A, Suzuki K, Okudaira M, Shuto A, Shinjo Y, Ishiguro J, Makide K, Ikubo M, Nakamura S, Jung S, Sayama M, Otani Y, Ohwada T, Aoki J.

J Biochem. 2015 157(3):151-60.

doi: 10.1093/jb/mvu060

(査読あり)

2. Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS.

Okudaira M, Inoue A, Shuto A, Nakanaga K, Kano K, Makide K, Saigusa D, Tomioka Y, Aoki J.

J Lipid Res. 2014 55(10):2178-92

doi: 10.1194/jlr.D048439

(査読あり)

3. Novel lysophospholipid receptors: their structure and function.

Makide K, Uwamizu A, Shinjo Y, Ishiguro J, Okutani M, Inoue A, Aoki J.

J Lipid Res. 2014 55(10), 1986-95

doi: 10.1194/jlr.R046920

(査読あり)

[学会発表](計 6 件)

1. Kumiko Makide, Kensuke Suzuki, Michiyo Okudaira, Asuka Inoue, and Junken Aoki

Role of lysophosphatidylserine in concanavalin A-induced hepatitis
6th International Conference on Phospholipase A₂ and Lipid Mediators
2015 年 2 月 11 日
東京

2. 川名裕己、井上飛鳥、巻出久美子、青木淳賢

マスト細胞上のリゾホスファチジルセリン受容体の同定

第 7 回リピッド合同カンファレンス

2014 年 9 月 18 日

札幌

3. 巻出久美子、鈴木健介、奥平倫世、井上飛鳥、青木淳賢

コンカナバリン A 誘発性肝炎におけるリゾホスファチジルセリンの役割

第 56 回日本脂質生化学会

2014 年 6 月 7 日

神戸

4. 川名裕己、井上飛鳥、巻出久美子、青木淳賢

ラット腹腔マスト細胞における TRP チャネルの発現解析

第 52 回日本薬学会東北支部大会

2013 年 10 月 20 日

仙台

5. Michiyo Okudaira, Kensuke Suzuki, Asuka Inoue, Kumiko Makide, Junken Aoki

Profiling of lysophospholipids in mice tissue and plasma using LC-MS/MS

2013 FASEB Science Research Conference

2013 年 8 月 5 日

北海道

6. 奥平倫世、井上飛鳥、三枝大輔、富岡佳久、巻出久美子、青木淳賢

LysoPS の検出系の確立と生体内における LysoPS の検出

第 55 回日本脂質生化学会

2013 年 6 月 7 日

松島

[図書](計 0 件)

[産業財産権] 該当なし

○出願状況(計 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 件)

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

〔その他〕

ホームページ

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H24/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

巻出 久美子 (MAKIDE KUMIKO)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：30519773

(2)研究分担者 該当なし
()

研究者番号：

(3)連携研究者 該当なし
()

研究者番号：