

マスト細胞のミトコンドリア内カルシウムイオン動態とその役割 A role of Ca^{2+} mobilization in mitochondria in mast cells

竹川まり恵、古野忠秀、中西 守*

Marie Takekawa, Tadahide Furuno, and Mamoru Nakanishi

愛知学院大学 薬学部 薬品分析学講座

Laboratory of Analytical Chemistry and Biophysics,

School of Pharmacy, Aichi Gakuin University

1-100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan

マスト細胞は、即時型アレルギー反応において中心的な役割を果たしており、細胞膜上のIgE受容体に結合したIgEが抗原によって架橋されると活性化され、脱顆粒や炎症性サイトカインの産生を引き起こす。マスト細胞の活性化の際には、細胞内でカルシウムイオン濃度が著しく上昇することが知られており、その上昇機構を明らかにするために、これまで精力的な研究が行われてきた。その中で、ミトコンドリアが細胞内カルシウムイオン濃度の調節に深く関与していることが明らかになりつつあるが、その調節機構や役割についてはほとんど解明されていない。そこで本研究では、マスト細胞株であるRBL-2H3細胞の活性化に伴う細胞質内およびミトコンドリア内のカルシウムイオン動態を単一細胞レベルで追究した。その結果、細胞質内のカルシウムイオン濃度は抗原添加後に急激に上昇した後、徐々に減少していくのに対して、ミトコンドリア内のカルシウムイオン濃度上昇は2段階で起こっており、細胞質内のカルシウムイオン濃度上昇に伴う最初の上昇の数十秒後に再び大きく上昇することが分かった。ミトコンドリア内の最初のカルシウムイオン濃度上昇は小胞体からの遊離によるもので、2回目の上昇は細胞外からのカルシウムイオンの流入によるものであると考えられた。さらに、ミトコンドリアの代謝阻害剤であるロテノンとアンチマイシンAでマスト細胞を処理すると、主に細胞外からのカルシウムイオンの流入に伴う2回目のミトコンドリア内カルシウムイオン濃度上昇が抑制され、その後起こる脱顆粒も著しく抑制された。これらの結果は、ミトコンドリアが、カルシウムイオンの取り込みにより細胞質内のカルシウムイオン濃度を特定のレベルに保持し、その濃度調節が脱顆粒反応に影響を及ぼしていることを示唆していた。

Keywords: mast cell; mitochondria, calcium ion; confocal microscopy

はじめに

アレルギーや自己免疫疾患の発症等に関与するマスト細胞は、細胞膜上に高親和性IgE受容体 (FcεRI) を発現しており、FcεRIに結合したIgEが抗原によって架橋されると、マスト細胞の活性化が引き起こされる¹⁾。FcεRIの架橋が起こると、まず、チロシンキナーゼLynが活性化され、FcεRIのβ鎖とγ鎖に存在するimmunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)領域に含まれるチロシン残基をリン酸化する^{2,3)}。そこに、これらのリン酸化チロシン残基と結合するSrc homology 2 (SH2)ドメイン

を持つ別のチロシンキナーゼSykが結合し、Lynは自身の近傍にやってきたこのSykのチロシン残基もリン酸化する⁴⁾。SykはLynによるチロシン残基のリン酸化によって活性化され、phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI3K)や膜蛋白質であるlinker of activated T cells (LAT)のチロシンリン酸化を介して、phospholipase Cγ (PLCγ)の活性化を引き起こす。活性化されたPLCγは、ホスファチジルイノシトール-4,5-2リン酸の加水分解によりジアシルグリセロールとホスファチジル-1,4,5-3リン酸(IP₃)を生じる。ジアシルグリセロールはプロテインキナーゼC

*Corresponding author.

Mamoru Nakanishi

Tel: +81 52 757 6772; Fax: +81 52 757 6799.

*E-mail address: mamoru@dpc.agu.ac.jp

(PKC)を活性化し、 IP_3 は小胞体の IP_3 受容体と結合して、小胞体からのカルシウムイオンの放出を促す⁹⁾。これによって細胞質内のカルシウムイオン濃度上昇と小胞体内のカルシウムイオン濃度の減少が起こる。さらに、小胞体のカルシウムイオン濃度の減少は、小胞体膜に存在する膜蛋白質STIM1によって検知され、STIM1が細胞膜の膜蛋白質Orai1と結合することにより細胞膜のチャネルを介した細胞外からのカルシウムイオン流入が起こる^{6,7)}。これにより、細胞内カルシウムイオン濃度が持続的に上昇し、脱顆粒やサイトカイン産生が誘導される。

このように、細胞質内のカルシウムイオン濃度の上昇には、カルシウムイオンの貯蔵器官である小胞体の IP_3 受容体と細胞膜のカルシウムチャネルが密接に関わっている。一方で、ミトコンドリアも細胞質内のカルシウムイオン濃度調節の一端を担っているとされている⁹⁾。ミトコンドリアには、カルシウムイオンを取り込むユニポーターとカルシウムイオンを放出する Na^+ - Ca^{2+} 交換体と H^+ - Ca^{2+} 交換体が存在しており、ミトコンドリア自身がカルシウムイオンを取り込んだり、放出したりすることによって、細胞質内のカルシウムイオン濃度を調節していると考えられている (Fig. 1)⁹⁾。ところが、細胞の活

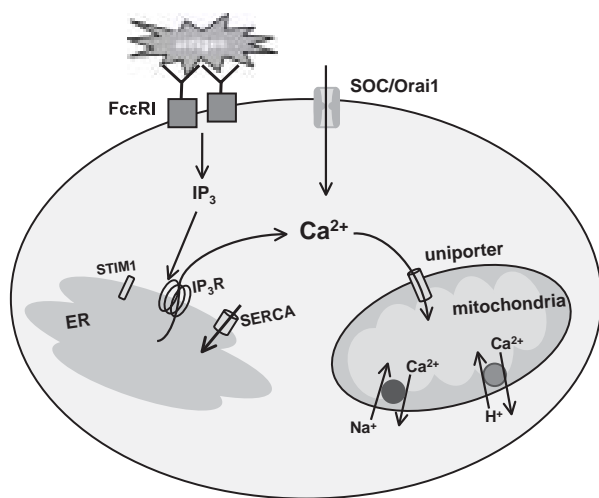


Fig.1 細胞内の小胞体 (endoplasmic reticulum : ER) では、カルシウムイオンポンプ (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA)) によって、カルシウムイオン濃度が高く維持されている。マスト細胞の細胞膜上の $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ に結合したIgEが抗原により架橋されることによって、様々なチロシンキナーゼの活性化を介して IP_3 が産生される。 IP_3 は小胞体の IP_3 受容体と結合して、小胞体からのカルシウムイオンの放出を促す。小胞体のカルシウムイオン濃度の減少は、小胞体膜に存在する膜蛋白質STIM1によって検知され、STIM1が細胞膜の膜蛋白質Orai1と結合することによりstore-operated Ca^{2+} channel (SOC)を介した細胞外からのカルシウムイオン流入が起こる。一方で、ミトコンドリアには、カルシウムイオンを取り込むユニポーターとカルシウムイオンを放出する Na^+ - Ca^{2+} 交換体と H^+ - Ca^{2+} 交換体が存在しており、細胞質内のカルシウムイオン濃度を調節していると考えられている。

性化の際に、ミトコンドリアが実際にカルシウムイオンを取り込み、放出しているのかについては、ほとんど明らかになっていなかった。しかし、カルシウムイオンローブの発達と細胞内カルシウムシグナルの単一細胞レベルでの解析によって、ミトコンドリアが細胞質内のカルシウムイオン濃度を調節し、カルシウムシグナルの時間的、空間的動態に影響を及ぼすことが明らかになりつつある¹⁰⁾。例えば、ミトコンドリアのカルシウムイオンの取り込みが細胞質の局所濃度を低下させることにより、細胞膜のカルシウムチャネルの開閉に影響を及ぼすことも知られている¹¹⁾。一方、ミトコンドリア内で濃度上昇したカルシウムイオンはミトコンドリアの機能にも様々な影響を及ぼす。例えば、クエン酸回路の3つの酵素(ピルビン酸脱水素酵素、イソクエン酸脱水素酵素、 α -ケトグルタル酸脱水素酵素)は、マトリックス内のカルシウムイオン濃度の上昇により活性化され、ATP産生が増大する¹²⁾。また、過度のミトコンドリア内カルシウムイオン濃度の上昇は、ミトコンドリアの膜間スペースからシトクロムCの放出を引き起こし、アポトーシスを誘導することも知られている¹³⁾。

これらのことから、ミトコンドリアは単にATP産生の場としてだけでなく、細胞内カルシウムシグナルを巧妙に調節する器官であると考えられる。マスト細胞の脱顆粒には、細胞外カルシウムイオンの流入を伴う持続的な細胞質内のカルシウムイオン濃度上昇が必要であるが、ミトコンドリアが時間的・空間的にどのように細胞質内のカルシウムイオン濃度を調節しているのか、あるいは、それがどのような分子機構によるものであるのかについては、未だに不明な点が多い。そこで、本研究ではまず、ミトコンドリア内のカルシウムイオン濃度変化を測定する系を確立し、それが細胞質内のカルシウムイオン濃度変化と時間的・空間的にどのように対応しているのかを明らかにすることを試みた。そして、ミトコンドリアの機能がマスト細胞の活性化にどのような影響を与えているのかを検討した。

試薬と方法

マスト細胞には、ラットのマスト細胞の培養株であるRBL-2H3細胞を用い、10%のウシ胎児血清を含むMEM培地を用いて、 CO_2 インキュベーター内で培養した¹⁴⁾。ミトコンドリアのカルシウムイオン濃度の変化の測定には、Rhod 2-AMを用いた¹⁵⁾。

共焦点レーザー顕微鏡によるカルシウムイオン濃度の計測の際には、測定用チャンパーで一晩培養したRBL-2H3細胞を、 $1.7 \mu\text{M}$ Rhod 2-AMで30分間標識した。そして、HEPES緩衝液で洗った後、He-Neレーザー(543 nm)を励起光として、570 nmより長波長側の蛍光を検出した。

Rhod 2は大部分がミトコンドリアに存在しているが、わずかに細胞質にも分布している。この性質を利用して、細胞質とミトコンドリアの単一細胞でのカルシウムイオン濃度変化を計測した。

蛍光光度計によるカルシウムイオン濃度の計測の際には、RBL-2H3細胞 (1×10^6 細胞/1 ml) の懸濁液に、 $1.7 \mu\text{M}$ Rhod 2-AMと $1 \mu\text{M}$ Fura 2-AMを加えて30分間細胞を標識した。HEPES緩衝液で洗った後、Rhod 2は550 nmの励起光を照射して570 nmの蛍光を検出することにより、Fura 2は340 nmの励起光を照射して500 nmの蛍光を検出することにより、それぞれミトコンドリアと細胞質のカルシウムイオン濃度変化の指標にした。

脱顆粒の測定は、RBL-2H3細胞からの β -hexosaminidaseの放出量を指標とした¹⁶⁾。抗原刺激30分後の培養上清に*p*-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (pH 4.5)を加え、1時間37°Cで反応させた。その後、炭酸緩衝液を加え、405 nmの吸光度を測定した。

結果と考察

RBL-2H3細胞にあらかじめジニトロフェニル (DNP) 基に特異的なIgEを感作させておき、DNP基を結合させたウシ血清アルブミン (DNP-BSA) で抗原刺激した。その結果、これまで報告されているように、細胞質内のカルシウムイオン濃度の著しい上昇が起こったが、ミトコンドリア内のカルシウムイオン濃度も上昇することが分かった。細胞質内のカルシウムイオン濃度の上昇は、抗原添加後10~20秒後に急激に上昇するのに対して、ミトコンドリア内のカルシウムイオン濃度は、細胞質内のカルシウムイオン濃度が上昇し始めた後に比較的緩やかに起こり、そのまま持続した。細胞質のカルシウムイオン濃度上昇は、小胞体からの遊離と、続いて起こる細胞外からのカルシウムイオンの流入によって起こっていることが知られているので、次にカルシウムイオンを含まないHEPES緩衝液で同様の測定を行った。すると、抗原刺激後、細胞質内では10~20秒後にカルシウムイオン濃度が上昇したが、その上昇は一過的であり、徐々に元のレベルに戻っていった。一方、ミトコンドリア内のカルシウムイオン濃度は、細胞質内のカルシウムイオン濃度上昇に伴って上昇した後も高い状態で持続されていた。その後、細胞外にカルシウムイオンを添加して細胞膜のカルシウムチャンネルを介するカルシウムイオンの流入を誘導すると、細胞質内のカルシウムイオン濃度は上昇するが、ミトコンドリアでは、さらに大きなカルシウムイオンの取り込みが起こった。これらの結果から、ミトコンドリアは抗原刺激に伴って細胞質内で濃度上昇したカルシウムイオンを取り込んでいることが分かった。

これまでの結果は、蛍光光度計を用いて 10^6 個の細胞

のカルシウムイオン濃度変化を測定したものであり、得られた結果は、多くの細胞の平均値を示したものである。ところで、単一細胞での細胞質とミトコンドリアのカルシウムイオン濃度変化はどのようになっているのだろうか。このことを明らかにするため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて単一細胞における細胞質内とミトコンドリア内のカルシウムイオン濃度の計測を行った。Rhod 2-AMでRBL-2H3細胞を標識すると、ミトコンドリアに集積するが、わずかに細胞質にも分布した (集積部位がミトコンドリアであることは、ミトコンドリアに特異的な蛍光色素Mitotrackerとの二重染色によって確認した)。この細胞を抗原で刺激すると、細胞質内のカルシウムイオン濃度は急激に上昇して、そのまま維持された。それに対して、単一のミトコンドリア内のカルシウムイオン濃度は、抗原刺激後に上昇した数十秒後に再び上昇するという2段階の上昇が起こっていることが明らかになった。最初の上昇は、抗原刺激によるIP₃産生の結果、小胞体が細胞質へ放出したカルシウムイオンを取り込んだことによるもので、2回目の上昇は、小胞体内のカルシウムイオン濃度の減少によって活性化される細胞膜のカルシウムチャンネルを介して細胞外から細胞質内へ流入したカルシウムイオンを取り込むことによるものであると推察された。そこで、小胞体のカルシウムポンプの阻害剤で、小胞体が貯蔵しているカルシウムイオンを放出させ、その後、それに伴うカルシウムイオン流入を引き起こすことが知られているthapsigarginを用いて同様の測定を行った¹⁷⁾。Thapsigarginを細胞に与えると、抗原刺激の場合よりも明瞭なミトコンドリア内の2段階のカルシウムイオン濃度上昇が起こることがわかった。ミトコンドリア内の2段階のカルシウムイオン濃度上昇は、細胞外液にカルシウムイオンが存在せず、カルシウムイオン流入が起こらない条件では全く見られなかった。このことから、2回目の上昇には、細胞外からのカルシウムイオン流入が深く関与していると考えられた。

これまでの結果から、ミトコンドリアはマスト細胞の活性化に伴って細胞質内のカルシウムイオンを取り込んでいることが分かった。次に、ミトコンドリアのカルシウムイオンの取り込みが、マスト細胞の機能に及ぼす影響を追究した。ミトコンドリアには、電子伝達系による内膜を介したプロトンのくみ出しによってプロトン勾配が形成され、これがマトリックスへのカルシウムイオン流入の大きな輸送力となっている。そこで、ロテノンとアンチマイシンAを用いて、膜電位の駆動力となる電子輸送鎖複合体のIとIIIを阻害したときのカルシウムイオン濃度変化と脱顆粒量を測定した^{18,19)}。細胞外液にカルシウムイオンが存在しない状態で抗原刺激を行ったところ、抗原添加直後のカルシウムイオン濃度の変化には、

細胞質とミトコンドリアともにこれら阻害剤による大きな影響は見られなかった。ところが、細胞外液にカルシウムイオンを加えたときのミトコンドリアのカルシウムイオンの取り込みが、ロテノンとアンチマイシンAの前処理によって大きく抑制された。さらに、これら阻害剤を前処理した細胞では、抗原刺激に伴う脱顆粒量が顕著に抑制されていることが分かった。

まとめ

マスト細胞を抗原刺激すると、細胞質内のカルシウムイオン濃度が上昇するが、ミトコンドリアは細胞質のカルシウムイオンを取り込んでいることが分かった。ミトコンドリアのカルシウムイオンの取り込みは2段階で起こっており、最初は小胞体からのカルシウムイオンの遊離によるもので、2回目は細胞外からのカルシウムイオンの流入によるものであると考えられた。ロテノンとアンチマイシンAは、細胞外からのカルシウムイオン流入によるミトコンドリア内のカルシウムイオン濃度上昇とその後起こる脱顆粒量を抑制した。このことから、ミトコンドリアのカルシウムイオンの取り込みは脱顆粒に深く関与していると考えられた。しかし、ミトコンドリアのカルシウムイオン取り込みの分子機構、および、ミトコンドリア内カルシウムイオン濃度と脱顆粒との関係には、未だ不明な点が多い。今後、マスト細胞の活性化制御に果たすミトコンドリアの役割を分子細胞レベルで明らかにしていきたいと考えている。

文献

- 1 Furuno T, Nakanishi M, *Biol Pharm Bull*, **28**, 1551-1559 (2005)
- 2 Yamashita T, Mao SY, Metzger H, *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 11251-11255 (1994)
- 3 Jouvin MH, Adamczewski R, Numerof R, Letourneur O, Valle A, Kinet JP, *J Biol Chem*, **269**, 5918-5925 (1994)
- 4 Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ, Rivera J, *Nat Immunol*, **3**, 741-748 (2002)
- 5 Galli SJ, Costa JJ, *Allergy*, **50**, 851-862 (1995)
- 6 Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Veliçelebi G, Stauderman KA, *J Cell Biol*, **169**, 435-445 (2005)
- 7 Peinelt C, Vig M, Koomoa DL, Beck A, Nadler MJ, Koblan-Huberson M, Lis A, Fleig A, Penner R, Kinet JP, *Nat Cell Biol*, **8**, 771-773 (2006)

- 8 Carafoli E, *Trends Biochem Sci*, **28**, 175-181 (2003)
- 9 Bernardi P, *Physiol Rev*, **79**, 1127-1155 (1999)
- 10 Collins TJ, Lipp P, Berridge MJ, Bootman MD, *J Biol Chem*, **276**, 26411-26420 (2001)
- 11 Parekh AB, *Cell Calcium*, **44**, 6-13 (2008)
- 12 Jouaville LS, Pinton P, Bastianutto C, Rutter GA, Rizzuto R, *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 13807-13812 (1999)
- 13 Scorrano L, Oakes SA, Opferman JT, Cheng EH, Sorcinelli MD, Pozzan T, Korsmeyer SJ, *Science*, **300**, 135-139 (2003)
- 14 Furuno T, Hirashima N, Onizawa S, Sagiya N, Nakanishi M, *J Immunol*, **166**, 4416-4421 (2001)
- 15 Boitier E, Rea R, Duchen MR, *J Cell Biol*, **145**, 795-808 (1999)
- 16 Nakamura R, Furuno T, Nakanishi M, *Biochem Biophys Res Commun*, **347**, 363-368 (2006)
- 17 Okamoto Y, Furuno T, Hamano T, Nakanishi M, *Biochem J*, **305**, 1011-1015 (1995)
- 18 Kotlyar AB, Gutman M, *Biochim Biophys Acta*, **1140**, 169-174 (1992)
- 19 Rich PR, Jeal AE, Madgwick SA, Moody AJ, *Biochim Biophys Acta*, **1018**, 29-40 (1990)

