

マスト細胞ミトコンドリア内のカルシウムイメージング

092A10 竹川 まり恵

免疫細胞情報学講座

【目的】

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、様々なチロシンキナーゼの活性化を介してIP₃が産生される。IP₃は小胞体のIP₃受容体と結合して、小胞体からのCa²⁺の放出を促す。これによる小胞体のCa²⁺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Ca²⁺チャネルを介した細胞外からのCa²⁺流入を引き起こす。このストア作動性Ca²⁺流入 (SOCE : store-operated Ca²⁺ entry)による持続的な細胞内Ca²⁺濃度上昇によって、脱顆粒やサイトカイン産生が誘導される。一方で、細胞質内のCa²⁺濃度調節にミトコンドリアが関与していると言われている。しかし、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Ca²⁺濃度を調節しているのか、また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Ca²⁺濃度変化を測定する系を確立し、それが細胞質内のCa²⁺濃度変化と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、ミトコンドリアがCa²⁺濃度の調節を介して、マスト細胞の機能にどのような影響を及ぼしているのかを追究した。

【方法】

マスト細胞株としてはRBL-2H3細胞を用い、ミトコンドリア内のCa²⁺濃度変化の測定には、Ca²⁺感受性蛍光指示薬であるRhod 2-AMを用いた。RBL-2H3細胞は、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) を用いて、細胞外液に1 mM Ca²⁺が存在する条件下で抗原刺激した。共焦点レーザー顕微鏡によるCa²⁺濃度計測の際には、RBL-2H3細胞をRhod 2-AMで30分間標識し、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するが、わずかに細胞質にも分布する。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Ca²⁺濃度変化を計測した。蛍光光度計によるCa²⁺濃度の計測の際には、RBL-2H3細胞の懸濁液に、Rhod 2-AMとFura 2-AMを加えて30分間細胞を標識した。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Ca²⁺濃度変化の指標にした。

【結果及び考察】

まず、蛍光光度計を用いて、10⁶個のRBL-2H3細胞を対象にCa²⁺濃度変化を測定した。するとこれまで報告されているように、抗原刺激に伴って細胞質内のCa²⁺濃度が上昇したが、ミトコンドリア内でもCa²⁺濃度の上昇が起こっていることが分かった。細胞質内のCa²⁺濃度は、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Ca²⁺濃度は、細胞質内のCa²⁺濃度が上昇し始めた後に比較的緩やかに上昇し、そのまま持続した。次に、細胞外液にCa²⁺を含まない条件で同様の測定を行ったところ、抗原刺激後、細胞質内では10~20秒後にCa²⁺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Ca²⁺濃度は、細胞質内のCa²⁺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。その後細胞外液にCa²⁺を添加し、細胞膜のCa²⁺チャネルを介するCa²⁺の流入を誘導すると、細胞質内のCa²⁺濃度は上昇するが、ミトコンドリアではさらに大きなCa²⁺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Ca²⁺を取り込んでいると考えられた。

次に、単一細胞での細胞質とミトコンドリアのCa²⁺濃度変化を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて計測した。その結果、細胞質内のCa²⁺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Ca²⁺濃度上昇は2段階で起こっていることが分かつ

た。ミトコンドリア内の最初のCa²⁺濃度上昇は、小胞体から遊離したCa²⁺の取り込みによるもので、2回目の上昇は、細胞外から流入したCa²⁺の取り込みによるものであると推察された。実際に、細胞外液にCa²⁺を含まない条件で測定を行ったところ、ミトコンドリア内の2回目のCa²⁺濃度上昇は、全く見られなかった。また、SOCEに必須の分子であるSTIM1のノックダウン細胞を作製し、同様に測定を行ったところ、ミトコンドリア内の2回目のCa²⁺濃度上昇は、ほとんど見られなかった。これらのことから、2回目の上昇には、SOCチャンネルを介した細胞外からのCa²⁺流入が深く関与していると考えられた。そこで次に、細胞外Ca²⁺濃度の異なる条件下で、単一細胞におけるミトコンドリア内のCa²⁺濃度変化を計測した。すると、細胞外Ca²⁺濃度が1 mMの場合は、抗原刺激時にほとんどのミトコンドリアで2段階の上昇が見られていたのに対して、細胞外Ca²⁺濃度が500 μ Mと100 μ Mの場合は、多くのミトコンドリアで2回目の上昇が起らなかった。また、蛍光光度計を用いて、細胞質のCa²⁺濃度変化を測定したところ、細胞外Ca²⁺濃度が1 mMと500 μ Mの場合では、同程度に持続的に上昇したが、100 μ Mの場合では、細胞質のCa²⁺濃度上昇は一過的であり、ほぼ刺激前のレベルに戻った。これらの結果から、ミトコンドリアはCa²⁺を取り込むことで、細胞質のCa²⁺濃度をある一定のレベルに保ち、適切な細胞応答を引き起こしていると考えられた。また、抗原刺激に伴う脱顆粒量を測定したところ、細胞外Ca²⁺濃度が1 mMと500 μ Mの場合は、大きな差は見られなかったが、100 μ Mの場合では、著しく減少していた。このことから、マスト細胞内のミトコンドリアは、Ca²⁺濃度の調節を介して、正常な脱顆粒を導く役割を担っていると考えられた。