

## 原著論文

ラット好塩基球由来白血病細胞 RBL-2H3 の  
Fc  $\epsilon$  RI シグナルにおける Prohibitin-1 の役割

市井貴裕, 谷昇, 蜂谷美礼, 三橋陽平, 荒舘忠, 片桐達雄

## 1. 概 要

一般的にアレルギーと呼ばれる病態をダイレクトに引き起こす細胞は、血中の好塩基球と組織に散在するマスト細胞である。これらの細胞は、細胞表面に IgE Fc レセプター (Immunoglobulin E 結晶化片受容体) と呼ばれる IgE 抗体と結合する受容体を持っている。IgE Fc レセプターは数種類存在し、中でも IgE 高親和性受容体である Fc  $\epsilon$  RI は、IgE を介して抗原 (アレルゲン) と結合することで、細胞活性化シグナルを発信する。このシグナル発信には、Fc  $\epsilon$  RI に会合/離脱する分子群を起点とする分子間相互作用が必須である。この相互作用には精密なルートがあり、細胞膜から細胞内の反応装置にシグナルが雪崩式に増幅されて伝達される。この結果、起動した細胞顆粒の放出と炎症性サイトカインの産生という二つの細胞応答が誘起される。このような好塩基球・マスト細胞のシグナル伝達を詳細に解析し、制御することは、生体過剰反応であるアレルギー症状のコントロールに必須である。

我々は、アレルギーを誘起する Fc  $\epsilon$  RI を起点とする、初期シグナル形成の詳細なメカニズムを解明するために、好塩基球細胞株を用いた一連の解析を行った。近年、この分野の研究は長足の進歩を遂げている。したがって、我々は、特に研究の標的を初期シグナル形成の場である細胞膜近傍に絞った。細胞膜には Raft と呼ばれるシグナル分子集合の場がある。我々は、Raft に集合/解離するタンパク質を集中的に解析する手法である限定シグナルプロテオーム解析を行った。この結果、好塩基球のシグナル伝達起点となる Raft 画分に prohibitin-1 (以下 PHB と略記) を見いだした。PHB は、既知のタンパク質であるが、好塩基球の Fc  $\epsilon$  RI シグナルにおける役割はほとんど明らかにされていない。本研究で、我々は PHB がシグナル制御に関与するのか、また関与するとすればどのようなメカニズムを介するのかを解明しようと試みた。

本実験にはラット好塩基球性白血病細胞株 (rat basophilic leukemia cell line: RBL-2H3) を用いた。PHB の機能解析として、我々は、まず、この細胞株から PHB タンパク質を欠失させ、欠失に伴う細胞機能の変化を親細胞と比較解析することで、PHB 本来の機能を考察しようと研究戦略をとった。このように特定の標的タンパク質を欠失させる手法の一つがノックダウン (KD) 法である。我々は、RBL-2H3 細胞の PHB を KD し、正常細胞 (WT: wild type) と比較した。RBL-2H3 細胞は、通常「抗原+IgE」の刺激により、即時型の反応として、アレルギー誘導物質を包含した顆粒を放出する。これは、すでに細胞内に蓄えられた顆粒を放出するもので、脱顆粒反応と呼ばれる。また、RBL-2H3 細胞は、「抗原+IgE」の刺激によるシグナル伝達の結果、脱顆

粒とは別経路で、特定サイトカインタンパク質の発現が誘導される。アレルギー性炎症を引き起こすサイトカインの一つである TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ ) 産生がその代表である。我々は、PHB-KD によって脱顆粒と TNF- $\alpha$  がどのように変化するかを調べた。実験の結果、興味深いことに、PHB-KD 細胞では WT と比べて脱顆粒反応の亢進する一方で、刺激により誘導される TNF- $\alpha$  産生量は低下した。

PHB は、好塩基球の脱顆粒とサイトカイン産生に逆の影響を与えることが明らかとなったため、それらを引き起こす細胞内シグナル伝達機構の解明を試みた。この解析には、リン酸化シグナル解析戦術を用いた。すなわち、抗原刺激後の細胞内に誘導される種々のシグナルタンパク質のチロシンリン酸化パターンの変化についての解析である。まず、Fc $\epsilon$ RI 刺激に伴う、WT と PHB-KD 細胞内の総タンパク質のチロシンリン酸化パターンを比較解析した。この結果、WT では抗原刺激に伴いチロシンリン酸化が誘導される分子量約 100 kDa 分子のリン酸化亢進が KD では、全く検出されなかった。このようにチロシンリン酸化パターンに違いが見られたことにより、Fc $\epsilon$ RI の直下に存在し、シグナルの開始に重要とされている Src family tyrosine kinase (SFK) の一つである Lyn の活性を WT と KD で比較した。Fc $\epsilon$ RI のシグナルを Lyn が、Fc $\epsilon$ RI シグナル伝達の上流で基質のチロシン残基をリン酸化することが重要であることは、すでに明らかになっている。ところが、WT と KD で Lyn のリン酸化パターンには、差異は認められなかった。したがって、PHB は Lyn 以降のシグナルに作用点を持ち、その標的の一つが、先の約 100 kDa のタンパク質であると考えられた。次に、Fc $\epsilon$ RI シグナルの下流に位置する MAP kinase のリン酸化を WT と KD で比較した。MAP kinase と呼ばれる数種のリン酸化酵素は、転写因子の制御により、細胞の分化・活性化・増殖を制御していることが知られている。ERK1/2、p38、JNK の三種の MAP kinase は、WT において抗原刺激によりリン酸化が誘導された。一方、KD ではいずれもののリン酸化も誘導されなかった。

以上の結果を単純に総合すると、PHB は、シグナルストリームの Lyn 以降、現時点で正体不明の 100 kDa のタンパク質を標的としていて、その下流に MAP kinase 活性化があると考えられる。この仮説に基づけば、PHB-KD で TNF- $\alpha$  産生が阻害されたことが説明出来る。しかし、可能性は種々あると思われ、特に脱顆粒が亢進した背景にある分子メカニズムについては、今後一層の解析が必要である。

今回、本研究で PHB は、好塩基球がアレルギーを引き起こす際に重要な働きをする分子であることが明らかとなった。PHB による Fc $\epsilon$ RI シグナル伝達機構制御の詳細なメカニズム解明は未だ不十分であるが、今後の詳細な研究により、PHB を標的とした新たな抗アレルギー薬の創薬に貢献することが期待される。

## 2. 背景

現在、我が国において、アレルギー疾患を有する患者は、国民のおよそ 30% にものぼると言われており、看過出来ない社会問題となっている<sup>1)</sup>。免疫学的には種々のアレルギーが存在するが、中でも I 型アレルギーは、IgE 抗体によって引き起こされる即時型アレルギーであり、花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎といったクオリティーオブライフ QOL [人生における生活の質] に大きな影響を及ぼすものから、アナフィラキシーショックのように生命を脅かす重篤症例に至るまで多様な臨床像を呈している。最終表現型は、多様であるが、これらの本質的な細胞レベルのアレルギー発症起点は、同一分子メカニズムに由来する。そのメカニズムとは、以下の通りである。I 型アレルギーの原因細胞であるマスト細胞、好塩基球の表面には、

高親和性の IgE 受容体である FcεRI が発現している。この FcεRI に IgE が結合し、さらに抗原(アレルゲン)が IgE / FcεRI 複合体を分子レベル架橋することによって細胞内シグナルが惹起され、ヒスタミンなどの炎症誘因性物質を含む顆粒の放出(脱顆粒)、炎症性サイトカインの産生などが起こり、アレルギー症状が引き起こされる<sup>2, 3, 4)</sup>。この FcεRI シグナルの発信地となるのが、細胞膜 Raft である<sup>5, 6)</sup>。FcεRI タンパク質は、抗原被曝前は、細胞膜上に散在する。そして、IgE が結合した状態 FcεRI タンパク質が Raft に集積するとそこに集合した Fyn / Lyn から Syk という流れで活性化が起こり、以下、図 1 に示すような流れで、脱顆粒(degranulation)と炎症タンパク質発現のための転写(transcription)が誘導される。(図 1)

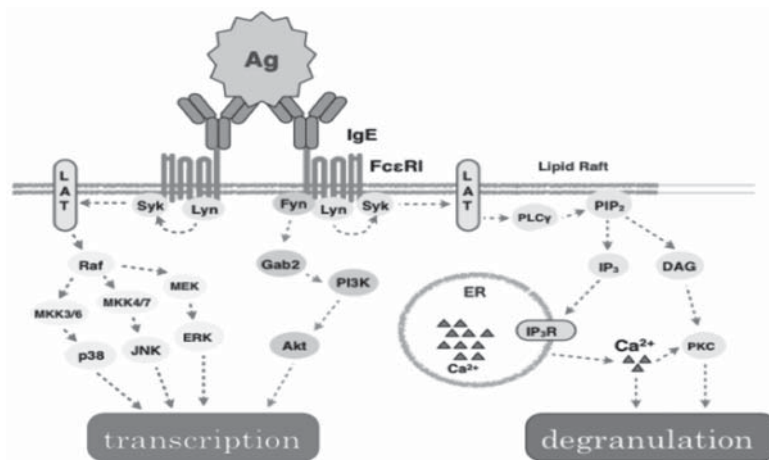


図 1 FcεRI シグナルの伝達経路

抗原刺激により FcεRI が Raft にリクルートされ、Lyn によってリン酸化を受ける。リン酸化した FcεRI に Syk がリクルートされ、LAT をリン酸化する。リン酸化 LAT に会合した PLCγ が Syk により活性化し、小胞体からの Ca<sup>2+</sup> 流入、PKC の活性化を引き起こし、脱顆粒を誘発する。一方、リン酸化 LAT に会合する分子は、Raf を介して p38, JNK, Erk1/2 を含む MAPK を活性化し、シグナル下流の転写因子を活性化し、サイトカイン産生を引き起こす。また、FcεRI のリン酸化によって Fyn が活性化する経路では、PI3K-Akt 経路の活性化を引き起こす。

I 型アレルギーの研究では、長年、マスト細胞に焦点が当てられてきたが、近年、マスト細胞と同じく FcεRI を持つ細胞として、好塩基球が注目されている。以前、好塩基球は、細胞数的には、末梢白血球のうち 0.5% 程度しかない細胞であり、マスト細胞と類似の機能を持つものの、あまり重要性のない血液循環型のマスト細胞などと考えられていた<sup>7)</sup>。しかし、近年、好塩基球はアレルギー反応に重要なサイトカインである IL-4 の主要な産生細胞になることや<sup>8, 9)</sup>、IgE 依存性の慢性アレルギー炎症を引き起こすことが報告されており<sup>10)</sup>、アレルギー炎症における好塩基球の役割について、最近では非常に注目されている。今回実験に用いた細胞はラット好塩基球白血病細胞 (RBL-2H3) である<sup>11, 12, 13)</sup>。この細胞は、厳密に言えば好塩基球であるが、FcεRI シグナル研究においては、マスト細胞のモデルとして実験に広く用いられてきた<sup>5, 14)</sup>。最近では、好塩基球とマスト細胞の IgE Fc 受容体のシグナル伝達の概要については、ほぼ同等であり、誘導された転写因子の活性化以降に差が生じ、免疫系全体での役割分担があるのではないかと考えられている。したがって、マスト細胞シグナル伝達の解析ツールとして用いられてきた RBL-2H3 は、初期シグナルについてはマスト細胞と同様で、

遺伝子発現については、今までの異なる見方が必要であると考えられる。本研究では、IgE Fc受容体の初期シグナルを解析した。

我々は、RBL-2H3のFc  $\epsilon$  RI刺激により、細胞膜上のRaftへの局在が変化するタンパク質をシグナルプロテオーム解析の手法を応用して探索した結果、Raftでの局在が刺激に連動して増加する一連のタンパク質の候補を見いだした。その中の1つがPHBであった<sup>15)</sup>。

PHBは、1991年にがん細胞株HeLa細胞と正常線維芽細胞の増殖を抑制するタンパク質として報告された<sup>16)</sup>。この報告を起点とし、PHBについて多くの研究科報告されている。これらの報告に於いて、PHBは、種を越えて高度に保存されているタンパク質であることが明らかとなっている。分子内にProhibitin domainと呼ばれる特徴的な構造を有している。元来、PHBは、その名が示すように細胞増殖をプロヒビット、増殖阻害を担う因子として命名された。

PHBは、当初、ミトコンドリア局在が報告されたため、ミトコンドリアマーカーとして、一時、有名であった。実際、PHBがミトコンドリアに局在しているという報告は多い<sup>17, 18)</sup>。また、ミトコンドリアに多く存在し、アポトーシスに関与するとする報告もある<sup>19)</sup>。しかし、PHBの細胞内局在については、実際には、研究初期段階より統一の見解は得られていなかった。乳がん細胞では、Estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) と核内で結合し、そのシグナルを抑制的に制御するという報告や、核内での転写抑制因子として働くという報告もある<sup>20)</sup>。さらに、細胞内顆粒中に存在しているという報告もある<sup>21)</sup>。このように、PHBが、細胞内に局在するとする報告と別に細胞膜上に局在とする報告も多数ある。上皮細胞では、上皮成長因子受容体 (EGFR) シグナルにおいてc-Rafと相互作用し、ERK1/2の活性化を制御することで、細胞増殖の抑制を誘導すると報告されている<sup>22, 23)</sup>。これらに加え、PHBがヒトT細胞白血球細胞株Jurkat細胞において細胞膜上のRaftに存在しており、T細胞抗原受容体 (TCR) のシグナル伝達に関わっているという報告<sup>24)</sup>や、マウス骨髄由来単核細胞BMMCにおいて抗原刺激により細胞膜へ移行し、Raftへ移行するという報告もある<sup>24)</sup>。このように、歴史的に、PHB研究の初期段階では、PHBの局在する場について混乱が続いていた。最近になって、多数の研究者の見解では、結局いずれも正しい報告であり、細胞によって、またその細胞の活性化段階によってPHBの所在は異なるようだとされている。そして、このような、細胞内でのPHB局在多様性については、PHB分子の修飾が重要であることが報告されている。PHBドメイン内のシステイン残基のパルミトイル化が細胞膜におけるRaftへの輸送に必要であること、69番目のアミノ酸であるシステインが細胞膜への移行に関わっていることなどが明らかとなっている<sup>25)</sup>。我々もRBL-2H3細胞において、PHBがFc  $\epsilon$  RIシグナルに呼応してRaftへの局在化することは、シグナル制御に重要な意味を持つと考えている。いずれにせよ、RBL-2H3細胞を用いて、Fc  $\epsilon$  RI近傍のシグナルへの関与は調べた報告はない。我々は以前の研究より<sup>15)</sup>、RBL-2H3において、PHBは細胞膜Raftにおいてのみ検出されることをすでに明らかにしている。

本研究では、Fc  $\epsilon$  RI シグナルにおける PHB の機能解明を目指し、その手段として、リボフエクション法を用いたノックダウン法によるロスオブファンクション解析および免疫沈降法による会合タンパク質の検索と解析をおこなった。

### 3. 材料と方法

#### 細胞と培地および試薬

細胞は、ラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 (東京都神経科学総合研究所 矢倉英隆 参事研究員より 恵与)を用いた。RBL-2H3 の培養培地として、RPMI 1640 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., OSAKA, JAPAN, 以下 Wako と略記) に 10 % Fetal Bovine Serum (NICHIREI BIOSCIENCE Inc., TOKYO, JAPAN)、 $10^{-5}$ M 2-Mercaptoethanol (Wako)、10 mg/mL Gentamicin solution (Sigma-Aldrich Inc, St. Louis, MO, USA, 以下 Sigma と略記) と Antibiotic Antimycotic Solution (10,000 units penicillin, 10 mg streptomycin and 25  $\mu$ g amphotericin B per mL 配合, Sigma) を加えたものを用いた。細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。培養 RBL-2H3 細胞の剥離は、0.05 % Trypsin-EDTA (GIBCO, Invitrogen Carlsbad, CA, USA) を用い、5 分間、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で加温することで行った。PBS の調製には、すべて Wako の特級試薬を用いた。

IgE 受容体感作には、Anti-dinitrophenyl (DNP) mouse monoclonal IgE: SPE7 (Sigma)を用いた。SPE7 で感作した RBL-2H3 細胞の刺激には、DNP-HSA (Sigma)を用いた。

ウェスタンブロット法による特定タンパク質の検出には、以下の抗体を用いた。また、抗体の使用濃度は、添付カタログの指示にしたがって希釈した。Anti-Prohibitin antibody (abcam)、Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10®, Biotin Conjugate (Merk Millipore, MA, USA)、Lyn (44): rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、Goat Anti-Rabbit-IgG-HRP (Invitrogen Corporation, NY, USA, 以下 Invitrogen と略記)、High Sensitivity Streptavidin-HRP (Thermo Fisher Scientific K.K., MA, USA)、phospho-Lyn:(Tyr507) Antibody (lot. #2) (cat. #2731S) (Cell Signaling Technology, Int. MA, USA)、Anti-phosphotyrosine (mouse monoclonal IgG<sub>2b</sub>, clone 4G10), (lot. #32577) (cat. #05-321) (Upstate Biotechnology, Inc., IL, USA)、p44/42 MAP Kinase Antibody (lot. #11) (cat. #9102) (Cell Signaling Technology, Int. MA, USA, 以下 Cell Signaling と略記)、phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody (lot. #16, #20) (cat. #9101S) (Cell Signaling)、p38 MAP Kinase Antibody (lot. #8) (cat. #9212) (Cell Signaling)、phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) Antibody (lot: #16) (cat. #9211S) (Cell Signaling)、SAPK/JNK Antibody (lot. #5) (cat. #9252) (Cell Signaling)、phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody (lot. #5) (cat. #9252) (Cell Signaling)、FITC Conjugated Anti-mouse FcεRI Clone: MAR-1 (lot: #E030642) (cat. #11-5898-81) (eBioscience, San Diego, CA, USA)、CF594 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) highly cross-absorbed (lot: #10C0415) (cat. #20113-3-50  $\mu$ L (Biotium, Inc. Hayward, CA, USA)

#### Cell lysate の調製

RBL-2H3 を IgE+DNP で刺激後、PBS-VE で洗浄し、1 % TNE を加えて 30 分間氷上で可溶化し、Cell lysate とした。Cell lysate と Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA, 以下 Bio-Rad と略記) を 1 : 1 で混合して 95°C で 5 分間加熱し、タンパク質を変性させた。

### **SDS-PAGE 及び Western blot**

SDS-PAGE はミニプロテインⅢ (Bio-Rad) を用いて行い、15 % ポリアクリルアミドゲルを使用した。泳動後、ゲルを blotting buffer (25 mM Tris、192 mM グリシン、20 % メタノール (v/v)、pH 8.3) で 30 分間平衡化し、ミニプロテインⅢ ウェスタンブロットモジュールシステム (Bio-Rad) を用いて、タンパク質を nitrocellulose membrane (Bio-Rad) に 100 V、100 分間の条件で transfer した。Transfer 後のメンブレンは、5 % BSA (Sigma) - TBS で 4℃、over night blocking をした。Blocking 後、メンブレンを TTBS で 2 回、TBS で 2 回洗浄し、一次抗体に over night 反応させた。反応後、メンブレンを TTBS で 2 回、TBS で 2 回洗浄し、二次抗体で 4℃ で 1 時間反応させ、メンブレンを TTBS で 2 回、TBS で 2 回洗浄し、ECL 発色キット (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) で処理した後、FUJI MEDICAL X-RAY FILM RX-U (FUJIFILM Corporation, TOKYO, JAPAN) 上に露光させた。

### **Double-strand RNA (dsRNA) の導入**

細胞培養用 6 cm dish 中で、1 mL の Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Invitrogen) 中に PHB dsRNA 166 pmol、Lipofectamine™ RNAi MAX Reagent (Invitrogen) 17  $\mu$ L を加えて穏やかに混合し、室温で 5 分インキュベートした。RBL-2H3 は、RPMI-1640 に 10%FBS、 $10^{-5}$  M 2- mercaptoethanol を加えた medium (以下 RNAi 用 medium とする) で  $2.5 \times 10^5$  cell/5mL medium となるように調製し dsRNA の入った dish に加えて穏やかに混合した後、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> の条件下で 48 時間インキュベートした。dsRNA を導入した細胞は 48 時間以内に以降の実験に用いた。また dsRNA を導入した細胞の初回の継代には RNAi 用 medium を用い、その後は抗生物質を含んだ培養培地を用いて培養した。

### **Fc $\epsilon$ RI 刺激**

1 サンプルにつき  $2.5 \times 10^6$  の細胞に対して、最終濃度 100 ng/mL の SPE-7 を加え、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> で over night 感作した。SPE-7 は、マウス抗 DNP-抗体であり、抗体のクラスは IgE である。マウスおよびラットの Fc  $\epsilon$  RI と良く結合することから、Fc  $\epsilon$  RI シグナルの解析に広く用いられているモノクローナル抗体である。SPE-7 を添加/無添加で各細胞をインキュベートした。この操作により、IgE は細胞表面の Fc  $\epsilon$  RI と抗原結合部位を外側に配した状態で、Fc  $\epsilon$  RI の  $\alpha$  鎖と結合する (図 1)。この状態を「感作」と呼ぶ。感作後、細胞を Siraganian buffer I で 2 回洗浄し、SPE-7 の特異抗原である DNP を最終濃度 20 ng/mL の DNP-Albumin として加え、素速く培養上清を攪拌することで刺激した。

### **Fc $\epsilon$ RI 発現量の測定**

RBL-2H3 の細胞表面に発現する Fc  $\epsilon$  RI の発現量について、WT と PHB KD で差異がないことを以下の方法で確認した。それぞれの細胞を刺激無しあるいは、IgE+DNP で刺激後、PBS-VE で洗浄した。洗浄後、各細胞濃度を再調整し ( $1.0 \times 10^6$  cells/tube)、3.7 % Formaldehyde (Wako) で 15 分間氷上にて固定した。遠心後上清を取り除き、PBS で 1 回洗浄後、RBL-2H3 を 5  $\mu$ g/ml FITC- Fc  $\epsilon$  RI / PBS solution 中に懸濁し、1 時間氷上にて FITC Conjugated Anti-mouse Fc  $\epsilon$  RI (以下 FITC- Fc  $\epsilon$  RI とする) で染色した。PBS で 3



回洗浄後、FITC の蛍光強度を Flow cytometer (FACS Canto™II; BD biosciences) を用いて測定した。測定条件は設けたゲート内の細胞数が 5,000 count とした。解析アプリケーションには、Win MDI を用いた。

#### **β-hexosaminidase release assay**

24 well マルチプレート (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA, 以下 BD と略記) に RBL-2H3 ( $2.0 \times 10^5$  cells/well) を蒔き、IgE 50 ng/mL で over night 感作した。上清を除き、500 μL の Siraganian buffer I (119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM PIPES, NaOH にて pH 7.2 に調整) で細胞を 2 回洗浄後、Siraganian buffer II (Siraganian buffer I に 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 % BSA を添加) 200 μL を加え、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> の条件下で 10 分間インキュベートした。その後、Siraganian buffer II にて希釈した DNP-HSA 100 ng/mL を用いて、細胞を 60 分間刺激した。刺激後、上清 50 μL をトリプレットで 96 well マルチプレート (BD) に移した。また、細胞は 200 μL の 1 % TNE に溶解し、上清同様、50 μL ずつトリプレットで 96 well マルチプレートに移した。これに 50 μL の substrate solution (1 mM p-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (Wako) / 0.1 M sodium citrate buffer, pH 4.5) を加え、37 °C、5 % CO<sub>2</sub> の条件下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、200 μL の Stop solution (0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>, pH 10.0) を加えて反応を停止させた。各最終サンプルの吸光度は、405 nm における吸光をプレートリーダー FilterMax F5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) で測定した。細胞の β-hexosaminidase release (%) は、以下の式で求めた。β-hexosaminidase release (%) = supernatant / (supernatant + cell lysate) × 100

#### **TNF-α 産生量測定**

24 ウェルマルチプレート (BD) に RBL-2H3 ( $2.0 \times 10^5$  cells/well) を蒔き、IgE 50 ng/mL で over night 感作した。その後、DNP-HSA 100 ng/mL でそれぞれの細胞を 4 時間刺激した後、-30°C にて胞を凍結させた。凍結融解したサンプル (細胞溶解液) 中の TNF-α を ELISA 法にて測定した。ELISA 法は READY-SET-GO! Rat TNF-α (eBioscience) を用いた。キット添付述式にしたがい反応停止後にプレートリーダー FilterMax F5 を用いて、サンプルの吸光度を 450 nm で測定した。

## **4. 結 果**

### **I-1. PHB KD RBL-2H3 の樹立**

FcεRI シグナルにおける PHB の機能を解析するために、PHB の mRNA を標的として設計した dsRNA を RBL-2H3 に導入し、PHB の KD を行った。実験に用いた dsRNA の塩基配列を図 2A に示す。この dsRNA をリボフュクシオン法により RBL-2H3 に導入した。ついで、Western blot 法により、タンパク質レベルの PHB の発現を確認した。Wild Type (WT) と KD のタンパク質発現量の差を比較した結果を図 2B に示す。図に示すように、KD で、PHB のタンパク質レベルでの明らかな発現低下が見られた。画像解析の結果、PHB 発現低下は、WT に比べて約 40% であった (図 2B グラフ)。また、PHB の発現量減少による細胞形態の変化を調べた。

位相差顕微鏡による細胞像の観察を行った結果、KDに伴う形態や大きさに変化は観察されなかった(図2C)。さらに、KD操作による副効果として、シグナルの起点であるFcεRIの発現量に影響がでていないことを確認した。KDとWTをそれぞれ抗FcεRI-FITCで染色し、測定した結果、どちらの細胞も同量のFcεRIが発現していることを確認した。(図2D)。

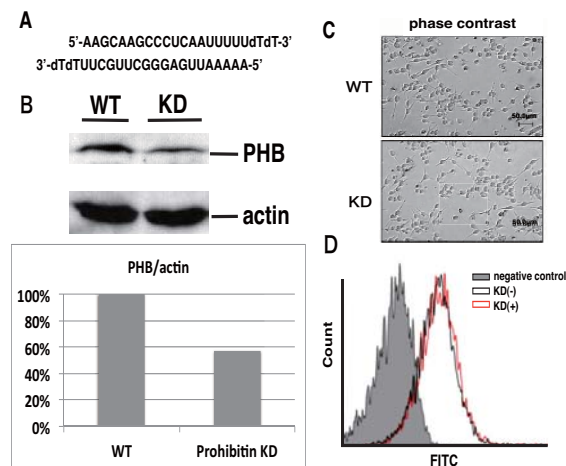


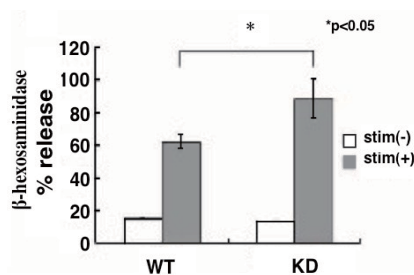
図2 dsRNAの導入によるRBL-2H3のPHB発現低下とそれに伴うFcεRI発現量変化

A. PHB dsRNAの塩基配列を示した。  
B. 材料と方法に示した手法でPHBをKDした細胞とWild typeの細胞を可溶化しWestern blot法にて解析した。バンドの濃さはNIH imageで算出してグラフ化した。縦軸はWTにおけるPHBのactinに対する相対強度を100としてKD sampleにおけるPHBの割合(knockdown rate)を示す。Knockdown rate = (Optical density of the PHB/optical density of the actin) × 100  
C. RBL-2H3を37℃、5% CO<sub>2</sub>でovernightインキュベートし、細胞形態をBiozero BZ-8000(KEYENCE)にて撮影した。  
D. WT及びPHB KD細胞をIgE 50ng/mLで感作し、DNP-HSA 100ng/mLで1時間刺激した。回収した細胞をFcεRI-FITCで染色後、フローサイトメーターで測定を行った。

### I-2. PHBのKDが脱顆粒に及ぼす影響

PHBの発現量低下がRBL-2H3の脱顆粒にどのような影響を与えるか調べる為、β-hexosaminidase Assay (β-hex Assay)を行った。このAssay法は、顆粒含有酵素であるβ-hexの放出量が脱顆粒量に比例することを基盤としたものである。β-hex放出量をこの酵素の基質を加えて、酵素反応に基づく呈色を吸光度計によって測定する方法であり、マスト細胞の脱顆粒反応の指標として広く用いられている(図3)。

抗-DNP IgEでovernight感作したRBL-2H3をDNP HAS(本実験での抗原)で刺激して脱顆粒反応を誘起した。その後、上清中に放出されたβ-hexを測定した(図3)。図3のグラフに示したとおり、PHBをKDしたRBL-2H3において、抗原刺激で誘導される脱顆粒反応がWTと比べて有意に亢進することが明らかとなった。また、この時、それぞれの細胞内に含有された総β-hex量に大きな変化は見られなかった。



I

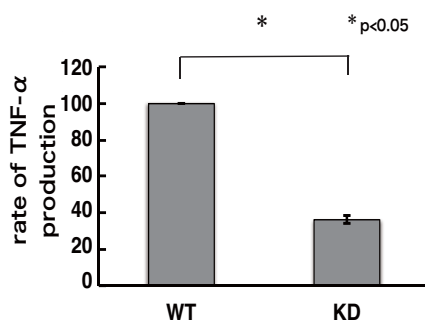
図3 PHB発現低下がRBL-2H3のβ-hexosaminidase放出に与える影響

WTまたはKD RBL-2H3 (2.0 × 10<sup>5</sup> cells/mL)をIgE 50ng/mLでovernight感作した。上清を除き、DNP-HSA 100ng/mLで60分間刺激した。刺激後、上清を回収し、放出されたβ-hexosaminidase(β-hex)量を測定した。また、細胞内のβ-hex量は、上清回収後の細胞を1% TNEで可溶化し測定した。β-hexosaminidase % releaseは、材料と方法に示した算出式に基づいて計算した。\*p < 0.05

### -3. PHBのKDがTNF-α産生に及ぼす影響



マスト細胞及び好塩基球から放出される TNF-α は、細菌感染時の生体防御に重要な役割を果たし、アレルギー性炎症反応の引き金ともなる<sup>26), 27)</sup>。そこで、PHB の KD が RBL-2H3 の TNF-α 産生にどのような影響を及ぼすか調べた(図 4)。棒グラフに示したとおり、抗原刺激により誘発される TNF-α 産生は、WT に比べて KD において約 60%の減少が認められた。



**図 4 PHB の発現低下が RBL-2H3 の TNF-α 産生に与える影響**

WT または KD 細胞を IgE 50ng/mL で over night 感作し、DNP-HSA 100ng/mL で 4 時間刺激した。細胞を培養液と共に凍結融解し、遠心後、上清をサンプルとして、ここに含まれる TNF-α を、ELISA 法を用いて測定した。縦軸は刺激による TNF-α 産生の増加の割合を下記の式で計算し、WT サンプルでの増加の割合を 100%としてグラフに示している。

$$\text{Rate of TNF-}\alpha \text{ production (\%)} = \frac{(\text{stimulation/non-stimulation})}{100} \times 100$$

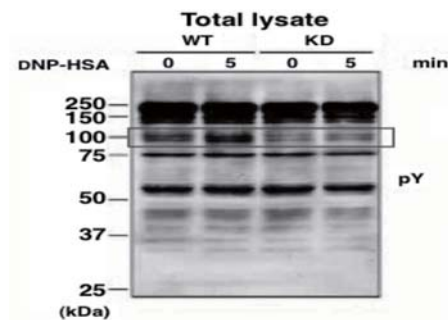
なお、無刺激時の TNF-α 産生量は WT、KD 共に検出限界以下であった。\*p < 0.05

## II-1. PHB の KD が細胞内チロシンリン酸化シグナルへ及ぼす影響

PHB の作用点を探る解析を試みた。第 1 に、抗原刺激によって細胞内に誘導される総タンパク質のチロシンリン酸化シグナルに着目した。このシグナル解析を行うため、総タンパク質のチロシンリン酸化パターンを Western blot 法で検出した(図 5)。第 2 に、FcεRI の直下に位置し(図 1 参照)、シグナルの開始機構に重要な役割を持つことが報告されている SFK の一つである Lyn kinase(Lyn)のチロシンリン酸化状態を調べた(図 6)。

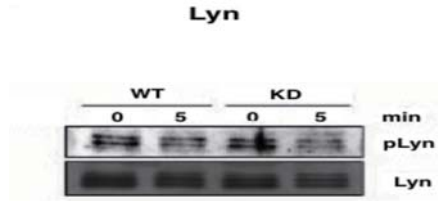
図 5 に示したように、PHB KD では、通常 WT で抗原刺激に伴い誘導される約 100 kDa の分子量に位置するタンパク質のチロシンリン酸化バンドがほとんど認められなかった。

一方、抗原刺激シグナルによって誘導される Lyn の negative regulatory site (Tyr507) のリン酸化の減少は、抗原刺激 5 分の時点で WT と PHB KD の両方において同程度である事が観察された(図 6)。また、この実験条件において、実験に用いた各サンプルで Lyn タンパクの量に差異は見られなかった。



**図 5 抗原刺激に伴う WT RBL-2H3 と PHB KD RBL-2H3 の総タンパク質チロシンリン酸化パターンの違い**

WT または KD 細胞を 100 ng/ml の抗-DNP IgE (SPE-7) で感作した。感作細胞を 20 ng/ml の DNP-HSA で 5 分間刺激、または無刺激状態で、1% Triton X-100-TNE で可溶化し、cell lysate とした。Cell lysate を、SDS-PAGE、Western blot 法によってメンブレンに転写し、anti-pY antibody (clone 4G10) を用いてチロシン残基のリン酸化されたタンパク質のみを検出した。

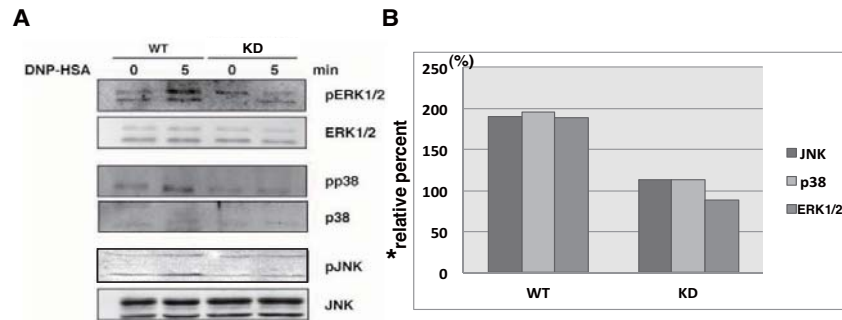


**図 6 抗原刺激に伴う Lyn kinase のチロシンリン酸化パターンは PHB KD に影響されなかった**

図 5 と同様に WT と KD 細胞より sample を調製し anti-Lyn antibody (total の Lyn を検出) と、anti-pLyn (Tyr507) antibody (507 番目のチロシン残基がリン酸化された Lyn を検出) で検出した。

## II-2 . PHB 発現低下が MAP kinase シグナルへ及ぼす影響

FcεRI を起点とするシグナル伝達は上流にチロシンリン酸化、中流にカルシウムシグナル、そして下流には、MAP kinase シグナルが存在する。これらのシグナルは下流に向かうにしたがって複雑に分岐して行く。カルシウムシグナルのさらに下流に脱顆粒反応、MAP kinase シグナルのさらに下流にサイトカイン産生、細胞増殖等といった表現型が誘導される。我々は、次に MAP kinase シグナルに対する PHB の機能解析を行った。PHB を KD した RBL-2H3 と WT で抗原刺激後の MAP kinase のリン酸化についての比較解析を行った(図 7)。



**図 7 PHB の発現減少が MAP kinase シグナルに与える影響**

- A. WT または KD 細胞を anti-DNP IgE (SPE-7) を加えて感作した。感作細胞を 20 ng/ml の DNP-HSA で 5 分間刺激後に可溶化した。Cell lysate を、SDS-PAGE、western blot 法によって、特異抗体で検出を行った。ERK1/2, p38 および JNK 抗体で検出したバンドは、それぞれのタンパク質の総量を示す。また、pERK1/2, pp38 および pJNK 抗体で検出したバンドは、それぞれのタンパク質のリン酸化部位特異抗体であり、リン酸化量を示している。
- B. A の実験で得られたバンドを画像解析して数値化したグラフを B に示した。縦軸は刺激による MAP kinase のリン酸化の増強割合を以下の式で計算して示した。

$$*relative\ percent = \{DNP(5)(pMAPK / MAPK)\} / \{DNP(0)(pMAPK / MAPK)\} \times 100$$

WT において、ERK1/2、p38、JNK の各 MAPK を対比して観察すると、肉眼でも有意なチロシンリン酸化バンドの増強が認められる(図 7A WT)。これに対して KD では、各 MAPK のいずれも、リン酸化がほとんど誘導されないことが、確認された。図 7A で示したウエスタンブロットのバンドでは、リン酸化パターンの比較を正確に出来ないので、図 7B は、各レーンに流れているそれぞれの MAPK タンパク質に対して補正をかけて数値化したリン酸化の亢進率(相対的リン酸化量)を示した。図 7B に示したとおり、WT は算出した相対的リン酸化量の棒グラフで KD は、ERK1/2、p38、そして JNK いずれの MAP kinase においても、ほぼ 200%に近い数値を示しており、無刺激状態に比べて 2 倍のリン酸化が誘導された。一方、KD では、図 7B に示す通り、ERK1/2、p38、そして JNK いずれも 100 パーセントに近い値を示している。これはすなわち、刺激前

後でのリン酸化パターンに変化がなかったという結果を反映している。KDのERK1/2のリン酸化は、むしろ100%よりやや低い値を示したが、WTのリン酸化亢進と比べてわずかな変動であり、実験誤差の範囲である。

## 5. 考 察

我々は、FcεRIシグナル伝達機構の詳細な解明と、これを基盤としたアレルギー制御を目指している。その一環としてFcεRI刺激によってRaftでの局在が増加するタンパク質として、2006年にPHBを同定した<sup>15)</sup>。今回、FcεRIシグナルにおけるPHBの役割を特定するため、ノックダウン法によりPHBの発現を低下させ、その結果から生じる細胞機能変化より、PHB本来の役割を帰納しようと試みた。

我々は、このRBL-2H3より、PHBがRaft画分に存在することをまず生化学的手法で確認した<sup>15)</sup>。また、今回の報告に先行する実験で共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて、PHBの局在を確認した。この結果、やはりRBL-2H3においてRaftに局在するPHBの像を観察した(データは示していない)。Raftは、スフィンゴ脂質とコレステロールに富む細胞膜上のドメインであり、シグナル伝達の発信地として重要な場を形成することが明らかとなっている<sup>28, 29)</sup>。一方、このような画像イメージとは異なるRaft解析も古くから行われている。生化学的に、RaftはDetergent-resistant membranes (DRMs) と呼ばれ、ショ糖密度勾配超遠心法を用いて分画することが出来る<sup>30, 31, 32)</sup>。FcεRIも抗原刺激によってRaftにリクルートされることが報告されており、Raftに移動したFcεRIはLynなどのSFKによるリン酸化を受けてSykをリクルートする。次いで活性化したSykは、LAT/NTALをリン酸化し、そこに集積する酵素がリン酸化脂質の代謝回転やカルシウムシグナルの増員と言った以降のアレルギーシグナルを伝えて行く。このような大まかなシグナルの流れについては、図1に示した。このシグナル伝達の図式については、すでに多くの報告がある<sup>33, 34, 35, 36, 37)</sup>。しかし、我々がRBL-2H3のRaftに局在することを発見したPHBの役割については、未だ不明な点が多い。

我々は、PHBをdsRNAリポフェクション法によるKD操作により、タンパク質レベルでの発現量を約40%減少させることに成功した(図2)。この操作によるPHBの発現低下は、検証した限りの細胞の大きさ・形態、そして増殖には影響を認めなかった(図2, 増殖データは示していない)。この結果は、PHB KDが細胞増殖を含む細胞周期に関わるシグナル系には、影響しなかったことを示す。

KD細胞を用いて、PHBの発現低下がRBL-2H3の脱顆粒反応に与える影響を検討した結果、KD細胞において抗原刺激による脱顆粒放出量が亢進した(図3)。この結果は、PHBはRBL-2H3のFcεRIシグナルにおける脱顆粒反応に対して抑制的に働くことを示唆している。一方、PHBの発現低下がRBL-2H3のTNF-α産生に与える影響を検討した結果、KD細胞では抗原刺激におけるTNF-α産生誘導が抑制された(図4)。したがって、PHBは脱顆粒抑制機能とは異なりFcεRIシグナルで誘導されるTNF-α産生については本来、作動的な役割を担っていると考えられる。好塩基球の産生するサイトカインとしては、TNF-αだけでなく、IL-4、IL-13などが知られている<sup>8, 9, 36, 37)</sup>。今後、これらのサイトカインとPHBの関わりも検討して行く必要がある。

今まで述べた結果が示すように、受容体からのシグナルを正と負の両方に制御するシグナル起点の分子としては、サークファミリーキナーゼ(SFK)の関与が疑われる。例えば、B細胞では、SFKの発するシグナ

ルを介して、細胞死または細胞増殖といった相異なる結果が誘導されるが、これは同一シグナルに端を発するシグナルが、下流で分岐するシグナルによって最終的な遺伝子発現が異なるためであることが報告されている。PHB の  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  シグナル伝達機構における作用点の解析を試みる第一段階として、 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  刺激により誘導される細胞内チロシンリン酸化シグナルが PHB の KD によって影響されるか否かを検討した。PHB を KD した RBL-2H3 では、抗原刺激に伴い誘導される 100 kDa 付近のタンパク質のチロシンリン酸化が誘導されなかった (図 5)。教科書的には、マスト細胞/好塩基球では  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  の刺激によって、細胞が活性化される際に、受容体直下で、まず、SFK の活性化が起こる。RBL-2H3 では、その SFK として Lyn kinase (Lyn) が活性化される<sup>8, 10, 38, 39)</sup>。それを起点とし、様々なシグナル分子のリン酸化を介して細胞内にシグナルが伝達され、結果、細胞内タンパク質のチロシンリン酸化の増強が認められることが知られている<sup>40, 41)</sup>。細胞内タンパク質のチロシンリン酸化に続いて、PHB が Lyn の活性化に与える影響を調べた。Lyn の活性化の指標として、C 末端に存在する negative regulatory site (Tyr507) のチロシンリン酸化を調べた (図 6)。不活性化状態の Lyn は Tyr507 がリン酸化されており、酵素活性部位が隠れた構造をとっているが、CD45 等の脱リン酸化酵素によって Tyr507 のリン酸が脱リン酸化されると活性化状態となり、シグナル分子をリン酸化して下流にシグナルを伝達できるようになることが知られている<sup>42, 43)</sup>。図 6 より WT と PHB KD の両細胞において、抗原刺激後 5 分で Lyn の Tyr507 リン酸化の減弱が検出された。これは刺激により、Lyn が正常に活性化されたことを示している。この結果は PHB の標的となる分子が Lyn の下流に存在し、その標的の一つが PHB KD に伴いリン酸化が誘導されなくなった 100kDa タンパク質である可能性を示している。ここでいう標的とは広義の意味であり、厳密には 100kDa タンパク質のリン酸化に関わるリン酸化酵素が、より直接の標的である可能性もある。いずれにしても、この 100kDa タンパク質が何であるかを決定する事を急がねばならない。

好塩基球とマスト細胞の  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  シグナル伝達の制御に重要とされている SFK として、Lyn の他に Fyn が知られており<sup>44, 45, 46, 47)</sup>、マスト細胞の  $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  シグナル伝達において Lyn よりむしろ Fyn が重要であるとする報告も存在する。しかし、RBL-2H3 には、Fyn は発現していないので、本研究で得られた結果が、Fyn をメインに活用する細胞達でも同様の結果が得られるか否かについては、検討の余地がある。

$\text{Fc}\epsilon\text{RI}$  シグナルにおける PHB の作用点が、Lyn 以降のシグナルであることが示唆されたため、さらに下流のシグナルである MAP kinase のリン酸化について検討した。MAP kinase シグナルはマスト細胞の脱顆粒反応の制御やサイトカイン・ケモカイン遺伝子の転写活性化、生存・増殖に関与するシグナルとして知られており、IgE を介した抗原刺激によって活性化がおこることが知られている<sup>48, 49)</sup>。

図 7 に示したように、PHB を KD した RBL-2H3 では、抗原刺激後 5 分の時点において WT で認められる ERK1/2、p38、JNK のリン酸化の亢進が認められなかった。この結果は PHB が先の PHB 標的分子と目される 100kDa タンパク質でシグナルの流れが遮断されると考える我々のストーリーと矛盾はしない。PHB を KD した HeLa 細胞を用いた研究で、KD 細胞では、EGF 受容体刺激で誘導される ERK1/2 のリン酸化が減弱することが報告されている<sup>22, 23)</sup>。これらの報告では、ERK1/2 の上流に存在する MAPKKK である c-Raf と相互作用することによって、PHB が EGF 受容体刺激で誘導される Ras-Raf-MEK-ERK 経路を制御していると述べている。本研究で観察された RBL-2H3 を用いた我々のデータでは、WT で抗原刺激で誘導される ERK1/2 のリン酸化のが PHB

KDで誘導されないという結果は、彼らの報告に類似している。このことから、我々の実験系でもc-RafがPHBの標的となっている可能性が考えられる。この点については一層の解析が必要であろう。一方、p38やJNKの活性化に関しては、Ras-Raf-MEK-ERK経路とは異なる経路が制御することが知られており<sup>49), 50)</sup>、MAP KinaseシグナルにおけるPHBの作用点が複数存在する可能性についても視野に入れた研究が必要である。

今回ここに示したRBL-2H3の実験により、PHBは好塩基球のIgEレセプターのシグナル伝達に影響を及ぼす事が示された。このメカニズムには、PHB KDのIgEレセプター刺激でチロシンリン酸化の誘導がほとんど認められなかった100 kDaの分子がシグナル制御の鍵となる可能性が示唆された。この100 kDa分子は、チロシンリン酸化が誘導されなかったのではなく、タンパク質そのものの発現が低下した可能性もある。しかし、トータルタンパク質の泳動染色パターンに影響がなかったこと(データは示していない)。そして、我々と同じくPHBのKDをマスト細胞で行ったグループが、図1に示したようなシグナルタンパク質の無刺激状態での発現に対する影響を認めていない<sup>21)</sup> ことなどから、その可能性は低いかもしれない。また、この100kDa以外のシグナル制御により、抗原刺激で誘導されるRBL-2H3の細胞内チロシンリン酸化シグナル及びERK1/2、p38、JNKのリン酸化に影響する別ルート存在する可能性については、まだ多くの実験が必要である。いずれにせよ、今回の実験結果は、様々な可能性の中で、この100 kDa分子がPHB直接または間接の支配下であって、シグナル伝達に関わる可能性を示唆していると思われる。今回はこのタンパク質の実体特定には至らなかったが、大至急この分子の実体を解明することで、PHBの制御する今までに知られていないアレルギー制御の道筋が予想される。

本研究遂行中に発表された論文において、D. K. Kimらは、マウスのマスト細胞において、PHBとSyk(72kDa)が相互作用すると報告した。彼らは、PHBが、FcεRIとLynおよびSykの複合体を安定化し、Raftにおける足場タンパクとして機能すると結論している<sup>21)</sup>。我々の実験では、72kDaタンパクのリン酸化に差異は認められなかったが、彼らの実験結果では、PHB KDに伴い72kDaのSykのチロシンリン酸化が完全に抑制されていた。Kimらは、マウス骨髓由来マスト細胞を実験材料としており、我々の好塩基球細胞株の実験結果と単純に比較は出来ない。しかし、今後我々は、100kDaタンパク質と72kDaのSykの異同とリン酸化パターンを慎重に比較検討する必要がある。しかし、いずれの研究結果においても今まで知られていなかったFcεRIシグナルのPHBによる制御機構が存在する結果が示されたことは重要である。今後、PHB研究のさらなる知見が、FcεRIシグナル伝達機構の詳細な解明に繋がる事は間違いないだろう。今後の研究成果がアレルギー誘発機構を解明し、抗アレルギー新薬の創薬に貢献することに期待したい。

## 謝 辞

本研究の遂行に当たり、本学医学部免疫学教室の村口篤教授と同教室の皆様に学術・物資の両面で多くの御援助をいただきました。皆様に心から感謝いたします。

## 参考文献

1. リウマチ・アレルギー対策委員会報告書, 平成23年8月, 厚生科学審議会疾病対策部会.
2. MacGlashan DW Jr. IgE-dependent signaling as a therapeutic target for allergies. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(9):502-9.
3. Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):773-86.
4. Gilfillan AM, Tkaczek C. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):218-30.
5. Dráber P, Dráberová L. Lipid Rafts in mast cell signaling. *Mol Immunol.* 2002;38(16-18):1247-52.
6. Brown DA, London E. Functions of lipid Rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:111-36.
7. Karasuyama H, Mukai K, Obata K, Tsujimura Y, Wada T. Nonredundant roles of basophils in immunity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:45-69.
8. Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol.* 2008;9(3):310-8.
9. Sawaguchi M, Tanaka S, Nakatani Y, Harada Y, Mukai K, Matsunaga Y, Ishiwata K, Oboki K, Kambayashi T, Watanabe N, Karasuyama H, Nakae S, Inoue H, Kubo M. Role of mast cells and basophils in IgE responses and in allergic airway hyperresponsiveness. *J Immunol.* 2012;188(4):1809-18.
10. Obata K, Mukai K, Tsujimura Y, Ishiwata K, Kawano Y, Minegishi Y, Watanabe N, Karasuyama H. Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood.* 2007;110(3):913-20.
11. Segal DM, Sharrow SO, Jones JF, Siraganian RP. Fc (IgG) receptors on rat basophilic leukemia cells. *J Immunol.* 1981 Jan;126(1):138-45.
12. Morita Y, Siraganian RP. Inhibition of IgE-mediated histamine release from rat basophilic leukemia cells and rat mast cells by inhibitors of transmethylation. *J Immunol.* 1981 Oct;127(4):1339-44.
13. McGivney A, Crews FT, Hirata F, Axelrod J, Siraganian RP. Rat basophilic leukemia cell lines defective in phospholipid methyltransferase enzymes, Ca<sup>2+</sup> influx, and histamine release: reconstitution by hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Oct;78(10):6176-80.
14. Peng Z, Beaven MA. An essential role for phospholipase D in the activation of protein kinase C and degranulation in mast cells. *Journal of Immunology.* 2005;174 (9):5201-8. 16) Beaven MA, Baumgartner RA. Downstream signals initiated in mast cells by Fc epsilon RI and other receptors. *Curr Opin Immunol.* 1996 Dec;8(6):766-72
15. 山野井遊 好塩基球Lipid Raftに局在する新規アレルギーシグナル関連分子の探索 富山大学大学院 修士論文 2007
16. Nuell MJ, Stewart DA, Walker L, Friedman V, Wood CM, Owens GA, Smith JR, Schneider EL, Dell'Orco R, Lumpkin CK, et al. Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells. *Mol Cell Biol.* 1991 Mar;11(3):1372-81.
17. Nijtmans LG, Artal SM, Grivell LA, Coates PJ. The mitochondrial PHB complex: roles in mitochondrial respiratory complex assembly, ageing and degenerative disease. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Jan;59(1):143-55.
18. Merkwirth C, Langer T. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jan;1793(1):27-32. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.05.013. Epub 2008 Jun 17.



19. Osman C, Merkwirth C, Langer T. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci.* 2009 Nov 1;122(Pt 21):3823-30.
20. He B, Feng Q, Mukherjee A, Lonard DM, Demayo FJ, Katzenellenbogen BS, Lydon JP, O'malley BW. A Repressive Role for Prohibitin in Estrogen Signaling. *Mol Endocrinol.* 2008 Feb;22(2):344-60. Epub 2007 Oct 11.
21. D. K. Kim, H. S. Kim, A.-R. Kim, G. H. Jang, H. W. Kim, Y. H. Park, B. Kim, Y. M. Park, M. A. Beaven, Y. M. Kim, W. S. Choi, The scaffold protein prohibitin is required for antigen-stimulated signaling in mast cells. *Sci. Signal.* 2013; 6, ra80.
22. Rajalingam K, Wunder C, Brinkmann V, Churin Y, Hekman M, Sievers C, Rapp UR, Rudel T. Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nature Cell Biology.* 2005;7 (8): 837-43.
23. Rajalingam K, Rudel T. Ras-Raf signaling needs prohibitin. *Cell Cycle.* 2005;4 (11): 1503-5.
24. H. Yurugi, S. Tanida, A. Ishida, K. Akita, M. Toda, M. Inoue, H. Nakada, Expression of prohibitins on the surface of activated T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;420, 275–280.
25. I. C. Morrow, S. Rea, S. Martin, I. A. Prior, R. Prohaska, J. F. Hancock, D. E. James, R. G. Parton, Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface Raft domains via a novel golgi-independent pathway: Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *J. Biol. Chem.* 2002;277, 48834–48841.
26. 秀 和泉 炎症性疾患に関わる腫瘍壊死因子 (TNF) の産生・放出 日本薬理学雑誌, Vol. 121 (2003) No. 3 P 163-173
27. Abraham SN, Arock M. Mast cells and basophils in innate immunity. *Semin Immunol.* 1998;10(5):373-81.
28. Lock JG, Strömblad S. Systems microscopy: an emerging strategy for the life sciences. *Exp Cell Res.* 2010 May 1;316(8):1438-44.
29. Owen DM, Magenau A, Williamson D, Gaus K. The lipid raft hypothesis revisited--new insights on raft composition and function from super-resolution fluorescence microscopy. *Bioessays.* 2012 Sep;34(9):739-47.
30. van der Goot FG, Harder T. Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol.* 2001;13(2):89-97.
31. Radeva G, Sharom FJ. *Biochem J.* Isolation and characterization of lipid Rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. *Biochem J.* 2004;380(Pt 1):219-30.
32. Quinn PJ. A lipid matrix model of membrane Raft structure. *Prog Lipid Res.* 2010;49(4):390-406.
33. Holowka D, Gosse JA, Hammond AT, Han X, Sengupta P, Smith NL, Wagenknecht-Wiesner A, Wu M, Young RM, Baird B. Lipid segregation and IgE receptor signaling: a decade of progress. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1746(3):252-9.
34. Peng Z, Beaven MA. An essential role for phospholipase D in the activation of protein kinase C and degranulation in mast cells. *Journal of Immunology.* 2005;174 (9):5201-8.
35. Bugajev V, Bambousková M, Dráberová L, Dráber P. What precedes the initial tyrosine phosphorylation of the high affinity IgE receptor in antigen-activated mast cell? *FEBS Lett.* 2010;584(24):4949-55.
36. Heneberg P, Dráberová L, Bambousková M, Pompach P, Dráber P. Down-regulation of protein-tyrosine phosphatases activates an immune receptor in the absence of its translocation into lipid Rafts. *J Biol Chem.* 2010;285(17):12787-802.
37. Sanderson MP, Wex E, Kono T, Uto K, Schnapp A. Syk and Lyn mediate distinct Syk phosphorylation events in FcεRI-signal transduction: implications for regulation of IgE-mediated degranulation. *Mol Immunol.* 2010;48(1-3):171-8.

38. Min B, Brown MA, Legros G. Understanding the roles of basophils: breaking dawn. *Immunology*. 2012;135(3):192-7.
39. Wakahara K, Van VQ, Baba N, Bégin P, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Basophils are recruited to inflamed lungs and exacerbate memory Th2 responses in mice and humans. *Allergy*. 2012.
40. Volná P, Lebduska P, Dráberová L, Símová S, Heneberg P, Boubelík M, Bugajev V, Malissen B, Wilson BS, Horejsí V, Malissen M, Dráber P. Negative regulation of mast cell signaling and function by the adaptor LAB/NTAL. *Journal of Experimental Medicine*. 2004;200 (8): 1001-13.
41. 谷昇 マウス骨髄由来マスト細胞の樹立とこれを用いたマスト細胞シグナルの解析 富山大学薬学部卒業論文 2005
42. Shrivastava P, Katagiri T, Ogimoto M, Mizuno K, Yakura H. Dynamic regulation of Src-family kinases by CD45 in B cells. *Blood*. 2004;103 (4): 1425-32.
43. Hermiston ML, Tan AL, Gupta VA, Majeti R, Weiss A. The juxtamembrane wedge negatively regulates CD45 function in B cells. *Immunity*. 2005;23 (6): 635-47.
44. Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ, Rivera J. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nature Immunology*. 2002;3 (8): 741-8.
45. Chan JH, Liao W, Lau HY, Wong WS. Gab2 antisense oligonucleotide blocks rat basophilic leukemic cell functions. *International Immunopharmacology* 2007;7 (7): 937-44.
46. 大島慶子 後飯塚僚(2004)マスト細胞の活性化に関するアダプター分子 アレルギー科 17 (3) : 214-219
47. Xiao W, Nishimoto H, Hong H, Kitaura J, Nunomura S, Maeda-Yamamoto M, Kawakami Y, Lowell CA, Ra C, Kawakami T. Positive and negative regulation of mast cell activation by Lyn via the FcεRI. *Journal of Immunology*. 2005;175(10): 6885-92.
48. Blank U, Rivera J. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunology* 2004;25 (5): 266-73. Review.
49. 山本雅 仙波憲太郎編 シグナル伝達集中マスター 羊土社 2005
50. Fukao T, Yamada T, Tanabe M, Terauchi Y, Ota T, Takayama T, Asano T, Takeuchi T, Kadowaki T, Hata Ji J, Koyasu S. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. *Nature Immunology*. 2002;3(3): 295-304.

市井貴裕

富山大学医学薬学教育部 薬・生物学研究室

谷 昇

富山大学医学薬学教育部 薬・生物学研究室

蜂谷美礼

富山大学医学薬学教育部 薬・生物学研究室

三橋陽平

富山大学医学薬学教育部 薬・生物学研究室

ラット好塩基球由来白血病細胞RBL-2H3のFc $\epsilon$ RIシグナルにおけるProhibitin-1の役割

荒舘 忠

富山大学大学院医学薬学研究部 医・生物学教室

片桐達雄

富山大学大学院医学薬学研究部 薬・生物学研究室