

マスト細胞の Raft を介したシグナル伝達の解析 -RBL-2H3 細胞の Fcε RI raft における Lyn の制御機構-

大島香菜, 片桐達雄

1. 概要

I 型アレルギーの発症に至る最終的なエフェクター細胞はマスト細胞/好塩基球である。これらの細胞が活性化するための主たる経路は Fcε RI シグナルによるものである。このシグナルの起点には Src-family kinase (SFK) である Lyn が位置している。現在、Lyn の活性化メカニズムはほとんど不明であり、この活性化メカニズムを解明することは I 型アレルギーの治療にも大きく貢献しうると考えられる。本研究は Lyn の活性化機構の解析を試みたものである。実験はマスト細胞様ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 を材料として、B 細胞株 WEHI-231 のシグナル伝達と比較解析を行った。これら細胞のシグナル発火前後における Lyn 自身のチロシンリン酸化動態について比較解析を行うことにより、マスト細胞に独自の Lyn の活性化パターンを見出した。

Lyn を含む SFK は、kinase ドメイン中に activating tyrosine、C 末近傍に inhibitory tyrosine が存在し、両者のリン酸化状態のバランスによりその活性が精密に制御されている。Lyn では 397 番目のアミノ酸に activating tyrosine (Y397) が存在し、この部位がリン酸化されると Lyn は活性化する。また、508 番目に inhibitory tyrosine (Y508) が存在し、Y397 が脱リン酸化されて Y508 がリン酸化されると Lyn は不活性化する。これら 2 つのチロシン残基のリン酸化パターンは 4 つの型が考えられる。すなわち、全くリン酸化を受けていないフォーム (I 型)、Y397 のみリン酸化されたフォーム (II 型)、Y508 のみがリン酸化されたフォーム (III 型)、そして Y397 と Y508 の両チロシンがリン酸化されたフォーム (IV 型) である。これら 4 つのフォームの存在は以前から想定されていたが、それぞれがシグナル伝達経路で担う役割は全く不明であった。

Lyn のリン酸化部位を決定するため、Lyn を CNBr で加水分解することにより Y397 を含むフラグメントと Y508 を含むフラグメントに切断し、この 2 つのフラグメントのリン酸化状態を解析した。この結果、RBL-2H3 の Lyn のリン酸化状態は未熟 B 細胞 WEHI-231 の Lyn のリン酸化状態とは異なることが明らかとなった。すなわち、無刺激時に WEHI-231 には存在しないリン酸化パターンの Lyn が存在していた。

Fcε RI signal 系と B cell receptor signal 系では、Lyn、Syk、PLC-γ など多くのシグナル分子が共通している。このような共通性を有しているにも関わらず、この両細胞系における Lyn の異なるリン酸化パターンは WEHI-231 と RBL-2H3 の Lyn は異なった制御を受けていることを示唆している。CNBr マッピングの結果、

興味深い結果が得られたが、この解析法ではⅡ型とⅢ型の混在とⅣ型を区別出来ないという欠点がある。したがって、さらに Lyn のリン酸化フォームをより詳細に分別するために段階的に免疫沈降を行い、4つのフォームを判別する手法を考えた。また、材料に用いる Lyn は Fcε RI シグナルに直接関与する Lyn 分子が局在していると報告されている Raft 画分を調製し、Raft に局在する Lyn を解析の標的とした。この解析の結果、RBL-2H3 には WEHI-231 には存在しないⅣ型の Lyn が存在することが明らかとなり、さらに active form とされているⅡ、Ⅳ型の Lyn が無刺激状態でも若干存在することが明らかとなった。

B 細胞では脱リン酸化酵素である CD45 が Raft で Lyn の活性化/不活性化を制御していることが報告されている^{1),2)}。一方、今回用いた RBL-2H3 では CD45 の発現が確認できなかった。

以上の結果は、マスト細胞において、Lyn の活性化/不活性化の制御が B 細胞の無刺激時にみられる Lyn 活性の抑制制御ほど厳密である必要がないことを示唆していると考えられる。さらに、マスト細胞では 1 分子レベルで Lyn の Y397 と Y508 の両方を同時に制御するシステムが存在することが示された。

2. 背景

アレルギー反応のメディエーターを遊離するマスト細胞/好塩基球の表面には IgE 高親和性レセプター (Fcε RI) が存在する。Fcε RI 複合体は、IgE と直接結合する α 鎖、シグナル伝達の増幅に関わる β 鎖、およびジスルフィド結合した 2 個の γ 鎖から形成されており、これらサブユニットは非共有結合によって会合している。IgE は B 細胞によって産生された後、Fcε RI に結合して感作状態となる。この IgE/Fcε RI 複合体に多価抗原が結合することにより架橋が起こると、マスト細胞/好塩基球は活性化されて細胞内にシグナルが伝達されて炎症性の生理活性物質が放出される。このようなマスト細胞/好塩基球の機能発現の引き金を引く Fcε RI シグナル伝達に Src-family kinase (SFK) である Lyn や Fyn が重要な役割を果たしていることが知られている^{3),4)}。Fcε RI の架橋後、最初に認められるのは、Fcε RI 自身を含む多くのシグナル伝達分子のチロシンリン酸化であるが、この初期のチロシンリン酸化は SFK によって遂行されることが明らかとなっている^{3),4)}。また、SFK 自身もチロシンリン酸化により活性が制御されている。SFK は、その分子構造中に共通して SH3 と SH2 および kinase domain を持ち、SFK の活性制御には kinase domain 中に存在する activating tyrosine と C 末付近に存在する inhibitory tyrosine のリン酸化が重要であることが以前より明らかとなっている⁵⁾。

マスト細胞のシグナル伝達では、Fcε RI 複合体中の β 鎖と γ 鎖の細胞内領域の Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) と呼ばれるアミノ酸配列中のチロシン残基が Fcε RI 架橋により Lyn によってリン酸化される。チロシンリン酸化された γ 鎖の ITAM には Syk/ZAP-70 family tyrosine kinase である Syk が結合する。これに続いて Syk は、ホスホリパーゼ C-γ (PLC-γ)、Vav、Shc といった下流のシグナル伝達分子やアダプター分子をチロシンリン酸化して活性化させる。その結果、細胞内 Ca²⁺ 動員や MAP キナーゼカスケードの活性化を経て、脱顆粒反応、ロイコトリエン・プロスタグランジンの産生、種々のサイトカインの遺伝子の転写が誘起される³⁾。前述したようにこのシグナル伝達発動に重要な役割を担うのが Lyn である。Lyn は、細胞膜上に存在するスフィンゴリピドおよびコレステロールに富む特殊化した形質膜ドメインである lipid rafts (Raft) にその多くが局在していることが最近の研究で明らかとなった^{6),7)}。この Raft がレセプターを介したシグナル伝達に不可欠の環境を提供する可能性が示唆されている^{8),9)}。Fcε RI 複合体そのものも刺

激以前にRaft外に分布し、Fcε RIが架橋されるとこの凝集体はRaftに移動して活性化したLynによってチロシンリン酸化を受けるというモデルが提唱されている^{6),7)}。このモデルは、凝集したレセプターがLipid Raftに局在していること¹⁰⁾、局在したFcε RI β, γサブユニットがチロシンリン酸化を受けるという実験結果⁸⁾から支持されている。LynはRaft中でFcε RI凝集体と直接結合していることがすでに報告されている⁹⁾。このように、Lynが重要な役割を果たしていることは明らかとなったが、種々のシグナル伝達分子の役割解明が日進月歩する一方で、最も上流に位置するLynの活性化メカニズムは依然として不明である。

一方、マスト細胞/好塩基球シグナル伝達は、B細胞シグナル伝達と多くの共通点を有しており、B細胞でもLynが重要であることが明らかとなっている¹¹⁾。片桐らの研究により、脱リン酸化酵素であるCD45がRaftにおけるLynの活性化の分子スイッチとして機能していることが未熟B細胞株WEHI-231を用いて明らかとされている^{11,12)}。今回用いたRBL-2H3はFcε RIシグナル解析によく用いられているが、CD45の発現がFACS解析では認められない¹²⁾ので、マスト細胞においては、Lynの制御機構も全く不明である。

本研究では、RBL-2H3をマスト細胞のモデルとして用い、Raft中におけるLynの活性化メカニズムおよびRaftを介するLynの制御機構を解析した。Lyn自身のチロシンリン酸化パターンをマスト細胞とB細胞で比較しながら解析した結果、マスト細胞/好塩基球独自のLynの活性化パターンと制御パターンを見出した。本研究で得られた知見はI型アレルギー治療において重要な価値があるものと思われる。

3. 材料と方法

試薬および抗体:

マスト細胞のIgE FcR感作に用いたIgE抗体はanti-dinitrophenyl (DNP) mouse monoclonal IgE (Sigma chemical Co. St., St. Louis, MO, USA. 以下SIGMAと略)を用いた。Western blotおよび免疫沈降には以下の抗体を用いた。Lyn44: rabbit polyclonal IgG Cat # sc-15 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), Phospho-Lyn (Tyr507) Antibody (Anti-pLyn) Lot: 1 #2731S (Cell Signaling Technology, Int. MA, USA), Anti-phosphotyrosine, biotin conj. (mouse monoclonal IgG_{2b}, clone 4G10) Cat #16-103 (Upstate Biotechnology USA, Inc. IL, USA), Avidin / HRP: 00001975 (DAKO. A/S. Denmark), Goat Anti-Rabbit-Ig-HRP: (Part: ALI0404) (Biosource International, CA, USA)

抗DNPモノクローナルIgE抗体で感作したマスト細胞の刺激にはDNP-albumin (albumin, human-dinitrophenyl) (SIGMA)を用いた。チロシンリン酸化のポジティブコントロールとしてpervanadate (PV) (5% H₂O₂: 健栄製薬, 日本., 0.5mM Na₃VO₄: SIGMA)刺激を行った。B細胞の抗原受容体刺激にはGoat F(ab')₂ fragments of anti-mouse IgM Ab (ICN Pharmaceuticals, Ind. OH, USA)を用いた。

CNBrマッピングに用いたCNBrと70%ギ酸はWako Pure Chemical industrial, ltd. (OSAKA, JAPAN)より購入した。

免疫沈降に用いた、Protein G Sepharose (ProG)はAmersham Pharmacia Biotech, Ltd., (Buckinghamshire UK)より購入した。

細胞と培養:

マスト細胞様細胞株としてRBL-2H3、およびB細胞株としてWEHI-231を用いた。両細胞株は、東京都神経

科学総合研究所の矢倉英隆博士(参事研究員)より恵与していただいたものを用いた。両細胞株の培養培地として、RPMI-1640 (SIGMA) に 10%ウシ胎仔血清(JRH BIOSCIENCES, A CSL Company KS, USA), 10^{-5} M 2-メルカプトエタノール (Wako) と 2 mg/l Gentamicin solution (SIGMA) を加えたものを用いた (継代 3~20 代までの flesh な細胞を使用した)。培養 RBL-2H3 細胞のシングルセルサスペンションには、0.05% Trypsin-EDTA (GIBCO, invitrogen Corporation, NY, USA) を用いた。

Cyanogen bromide (CNBr) マッピング:

WEHI-231 (4×10^6 cells/mL) と RBL-2H3 (4×10^6 cells/mL) の両細胞を 37°C、3 時間メディウム中で培養した後、370 Mbq ^{32}P -orthophosphate を含む 2 mL のメディウム中で室温、一時間培養してラベルした。次に 8 mL のメディウムを培養に加え、さらに 37°C で 3 時間インキュベートした。ラベルを停止するため、氷冷した PBS-VE (2 mM Na_3VO_4 , 2 mM EDTA) を加えて、細胞を処理した。その後、1% TNE (1% Nonidet P-40, 20mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 2 mM Na_3VO_4 , 2 mM EDTA) で細胞を溶解し、可溶化サンプルを 30 分間、4°C、 $10,000 \times g$ で遠心し、その上清を解析に用いた。それぞれのサンプルから Lyn44 を結合させた ProG で Lyn を免疫沈降した¹³⁾。抗 Lyn 抗体-ProG ビーズ沈降物に SDS-PAGE sample buffer (DW 4.0 mL, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8 1.0 mL, グリセリン 0.8 mL, 10 % SDS 1.6 mL, 2-βメルカプトエタノール 0.4 mL, 0.05 % (w/v) プロモフェノールブルー 0.2 mL) を加えて 90-98 °C で 5 分間加熱し、10 % SDS-PAGE で展開し、nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) に transfer した。Autoradiography および Lyn44 immunoblotting により検出したメンブレン上にある Lyn タンパク質をメンブレンごと切り出した。この切片を CNBr 溶液 (150mg/mL 70%ギ酸中) 250 μL 中にて室温で 2 時間インキュベートしてタンパク分解を行った。溶出したペプチドを凍結乾燥処理によって 3 回洗浄することでギ酸を除去した。洗浄後、分解乾燥産物に SDS-PAGE sample buffer を加えて 5 分間 90-98 °C で加熱後、15-25% gradient gel (第一化学薬品株式会社, Tokyo, JAPAN) で展開、polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad) に transfer し、BAS 2000 system で解析を行った。

Raft 画分の調製:

Cell lysis

- ① WEHI-231 細胞 3.5×10^7 cells/dish (10 cm 径細胞培養ディッシュ) に PV 1 mL, Anti-IgM Ab (2 mg/mL) 150 μL を加えて 3 分間刺激した。氷冷した PBS-VE (1 mM Na_3VO_4 , 1 mM EDTA) で刺激を停止した。3 dish 分の細胞を回収し、3,000 rpm、1 分遠心後、ペレットに 0.5 % Triton-X100-TNEVA (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 , Aprotinin 10 μg/mL) を 1 mL 加えて細胞を可溶化後、氷上で 30 分静置し、B cell lysate とした。
- ② RBL-2H3 細胞 0.53×10^7 cells/dish (10 cm 径細胞培養ディッシュ) に Anti-DNP IgE 2.75 μg を加えて感作、もしくは IgE を加えず 37 °C の CO_2 インキュベータで 24 時間培養した。感作した細胞には DNP-albumin を 200 μL 加え 3 分インキュベートして刺激した。ポジティブコントロールとして、感作していない細胞に PV 1 mL を加え 3 分インキュベートして刺激をした。また、ネガティブコントロールとして感作していない細胞を無刺激で回収した。それぞれ、ディッシュ 4 枚に相当する細胞の上清をアスピレートし、0.5 % Triton-X100-TNEVA を 1 mL 加えて可溶化し、回収したものを Mast cell lysate とした。

シヨ糖密度勾配超遠心

①、②で得た lysate よりシヨ糖密度勾配超遠心法で Raft 画分を調製した。Sucrose (和光純薬)を Rafts buffer (25 mM Tris、150 mM NaCl、2 mM EDTA、1 mM Na₃VO₄)に溶かし、85 % sucrose buffer、35 % sucrose buffer、5 % sucrose buffer を調製した。超遠心チューブ(14×89 mm. UC tube BECKMAN, CA, USA)中で 85 % sucrose buffer と cell lysate をそれぞれ 1mL ずつ混合した。その混合液上に 6 ml の 35 % sucrose buffer を重層し、さらにその上に 2.5 mL の 5 % sucrose buffer を重層して、非連続シヨ糖密度勾配を作製した。密度勾配を調製したチューブを SW41Ti ローターにセットして、超遠心機 (BECKMAN L-70) で 4℃、200,000 × g で約 20 時間遠心した。遠心後、チューブを回収し、gradient の上から 1 mL ずつ、フラクション 2-12 を分画した。

免疫沈降：

180 μL (60 μL/sample) の Pro G ビーズを PBS-VE (1 mM Na₃VO₄、1 mM EDTA) で 3 回洗浄した。洗浄後、Pro G ビーズに各抗体を 6.75 μg (2.25 μg/sample)、PBS-VE 4mL、10 % NP-40 25 μL をそれぞれ加えて 2.5 時間インキュベートして、抗体-ビーズを作製した。抗体-ビーズを PBS-VE で 3 回洗浄し、ip buffer (PBS-VE 600 μL、Aprotinin 500 μg、Leupeptin 500 μg、10%NP-40 30 μL) を加え、1.5 mL チューブ (スクリューキャップ付) に 200 μL ずつ分注した。ここに分画サンプルを加え、over night インキュベートした。沈降物を wash buffer (50 % 0.5 % Triton-X100-TNEVA、50 % PBS-VE) で 5 回洗浄し、この沈降物に SDS-PAGE sample buffer を 100 μL 加えて 90-98℃ で 5 分間加熱した。この上清を SDS-PAGE で展開した。

SDS-PAGE と Western blot：

ラージゲルを用いた SDS-PAGE は、二連リアルスラブ電気泳動装置 (BIO CRAFT) で行った。ミニゲルを用いた SDS-PAGE は、ミニプロティアン III システム (Bio-Rad) で行った。泳動後、アクリルアミドゲルを blotting buffer (25 mM Tris、192 mM グリシン、20 % v/v メタノール、pH 8.3) で平衡化した。平衡化後のゲルを nitrocellulose membrane または PVDF membrane に transfer した。ラージゲルを用いた場合は、トランスブロットセル (Bio-Rad) を用いて 20 V、15 時間 ブロットした。また、ミニゲルを用いた場合はミニプロティアン 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 90 V、180 分ブロットした。ブロット後のメンブレンは 5 % BSA-TBS にて over night ブロッキングした後、TTBS で 2 回、TBS で 2 回洗浄した。洗浄後、メンブレンは一次抗体に over night 反応させた。この後、メンブレンを TTBS で 2 回、TBS で 2 回洗浄後、二次抗体と 1 時間反応させた。反応後、メンブレンを TTBS で 2 回、TBS で 2 回洗浄した後、ECL 発色キット (Amersham) にて Film (Kodak BioMaxMR1) 上に露光した。

4. 結果

Lyn 分子内のリン酸化部位の決定(CNBr マッピング)

Src-family kinase である Lyn にはリン酸化されうる tyrosine が二つ存在し、一つは activating tyrosine (Y397)、もう一つは inhibitory tyrosine (Y508)である。Lyn の分子モデルおよび CNBr マップを Fig. 1A に示した。これら二つの tyrosine のリン酸化パターンには四つのフォームが存在しうる。すなわち、どちらもリン酸化を受けていないフォーム (I 型)、Y397 のみリン酸化されたフォーム (II 型)、Y508 のみがリン酸化されたフォーム (III 型)、そして Y397 と Y508 がリン酸化されたフォーム (IV 型)である。これら 4 つのフォームを Fig. 1B に示した。

マスト細胞の刺激前後における Lyn 分子内のリン酸化部位を決定するために Lyn を CNBr で限定加水分解し、Y397 を含む 8.4kD のフラグメントと、Y508 を含む 4.2kD のフラグメントに切断し、これらフラグメントのリン酸化状態について解析した。この結果、RBL-2H3 では、WEHI-231 (未熟 B 細胞株) のリン酸化パターンとは異なる結果を示した。すなわち、WEHI-231 の無刺激状態では両方のフラグメントでリン酸化チロシンが検出されなかったのに対し、RBL-2H3 の無刺激状態では両方のフラグメントでリン酸化チロシンが検出された (Fig. 1C)。

また、脱リン酸化酵素阻害薬である PV (Pervanadate)、もしくはレセプター刺激により細胞を刺激すると、両細胞系で両方のフラグメントのリン酸化チロシンを検出した (Fig. 1C)。

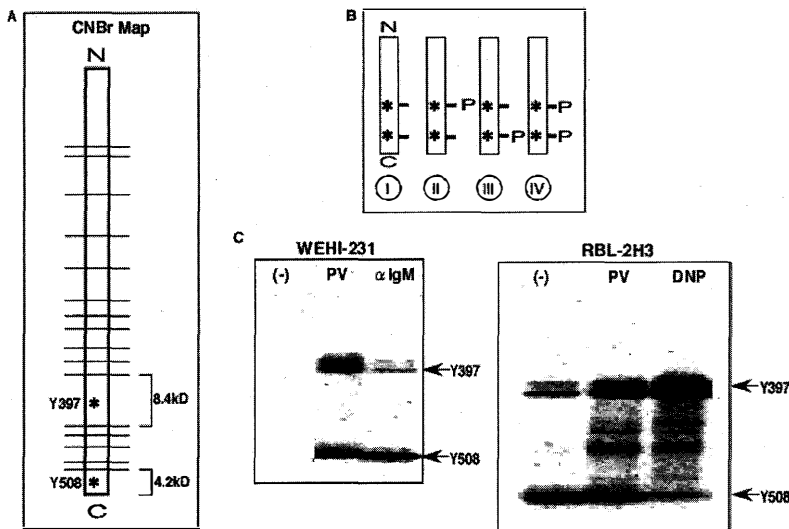


Fig. 1: RBL-2H3 と WEHI-231 における Lyn のリン酸化部位 :

A: CNBr マップ B: Lyn のリン酸化パターンの 4 型

C: RBL-2H3 と WEHI-231 を ^{32}P -orthophosphate でラベルし、方法で示したようにに刺激し、可溶化サンプルを作製した。それぞれのサンプルから Lyn を抗 Lyn 抗体で免疫沈降して SDS-PAGE で展開した。 ^{32}P でラベルされた Lyn を nitrocellulose membrane から溶出し、CNBr で切断した。CNBr 処理したペプチドサンプルを 15-25% gradient gel で展開し、PVDF メンブレンにトランスファーし、BAS 2000 で検出した。

Raft 内もしくはRaft 外に存在する Lyn 分子群のシグナル伝達への関与の検討

Fig. 1 に示した CNBr マッピングの実験結果は、RBL-2H3 および WEHI-231 において total cell lysate 中で Lyn のリン酸化パターンを検討したものであった。一方、total cell lysate を用いた解析の結果、RBL-2H3 では刺激の有無に関わらず Y508 のみがリン酸化された Lyn (pY508 Lyn) のリン酸化量の変化を認めることができなかつた (Fig. 2A)。本来、刺激によって pY508 Lyn は減少するはずであるので、Fig. 2A の結果は Raft 外にある Lyn 分子の影響によると考えられる。すなわち、Fig. 2B に認められるように Raft 画分に認められる Lyn はフラクション 4~6 に局在しているが、この他フラクション 10~12 に相当する Lyn は Raft 外にあり、常に不活性状態 (Y508 のみがリン酸化した状態) であるため、本来 Fcε RI シグナルに関与している Lyn のリン酸化パターンの検出を困難にしていると想定された。そこで、Raft 画分をシヨ糖密度勾配超遠心法を用いて調製し、Fcε RI シグナルに直接関与する Lyn を解析のターゲットとした。

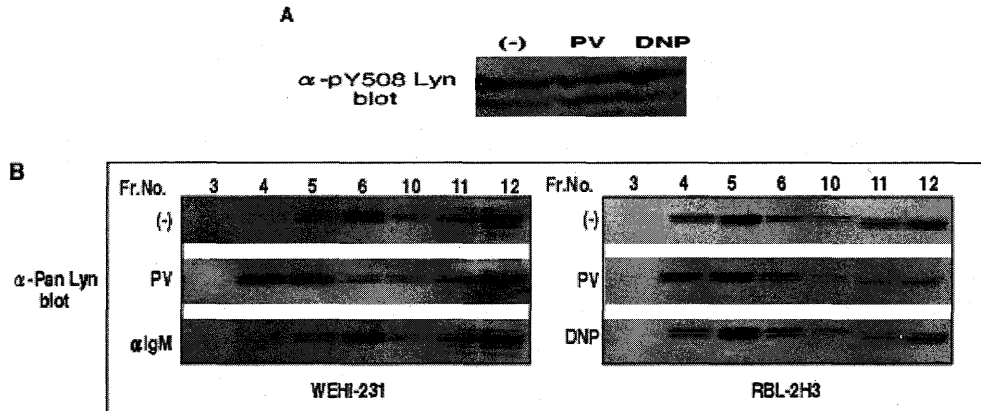


Fig. 2: 刺激前後における Lyn の Raft 内外への分布:

A: RBL-2H3 細胞を 1.0×10^7 cells/dish に調製し、 α -DNP IgE (0.45 μ g/mL) で 37°C で 24 時間感作した後、3 分間抗原刺激した (DNP)。また、感作していない細胞を PV で 3 分刺激した (PV)。感作および刺激しない細胞をサンプルとした場合を (-) とした。それぞれの細胞は 4dish 分を回収して、TNE (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1% NP-40, 1mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4 , Aprotinin 10 μ g/mL) で可溶化し、total cell lysate とした。Total cell lysate を SDS-PAGE で展開し、 α -pY508 Lyn blot を行った。

B: RBL-2H3 および WEHI-231 を刺激して可溶化し、シヨ糖密度勾配超遠心法により Raft と Raft 外面分に分画した (材料と方法参照)。遠心後分画したフラクション 2~12 のうち 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12 フラクションよりサンプルを調製して SDS-PAGE で展開し、Lyn44 で α -Pan Lyn blot を行った。

段階的免疫沈降による Lyn のリン酸化パターン分類

Fig. 3A で示す Lyn のリン酸化パターンの I-IV のうち、CNBr マッピング法は、II 型と III 型の混在によって生じる二つのバンドを検出しているのか、あるいは IV 型が存在することによってこれらのバンドが検出されているのかを区別することができない (Fig. 1C)。そこで、Lyn の四つのフォームを分別することを試みた。今回は、total cell lysate ではなく、シグナル伝達に重要な Lyn 分子が局在する Raft 画分を出発材料として、段階的に異なる抗体で Lyn の免疫沈降を行うことにより分別を行った (Fig. 3A)。それぞれの沈降サンプルに含まれる Lyn を Western blot で比較解析した結果を Fig. 3B に示した。

IV 型の Lyn は、この実験において Fig. 3B-1 で α -pY508 抗体により検出される。Fig. 3B-1 に示すように、WEHI-231 では α -pY508 抗体 blot でバンドが検出できなかった。一方、RBL-2H3 では相当するバンドが検出できたことから、IV 型の Lyn は WEHI-231 には存在せず RBL-2H3 には存在することが示された。

さらに、Fig. 3B-1 に示すように RBL-2H3 サンプルより 4G10 で沈降してきた Lyn (II型とIV型)の量と WEHI-231 サンプルより 4G10 で沈降してきた Lyn (II型)の量は、PV 刺激および抗原刺激により増加した。

4G10 での免疫沈降に続く α -pY508 抗体での免疫沈降によって理論的にIII型の Lyn を沈降させることができると期待された。しかし、Fig. 3B-2 に示したように、この操作の沈降物からはどの型の Lyn も検出されなかった。

最後の α -Pan Lyn 抗体での免疫沈降では、理論的に I 型の Lyn だけが沈降してくると想定されたが、Fig. 3B-3 に示したように沈降物中に pY508 Lyn (III型)が多量に検出され、抗原あるいは PV で刺激した場合にも多量に存在していることがわかった。

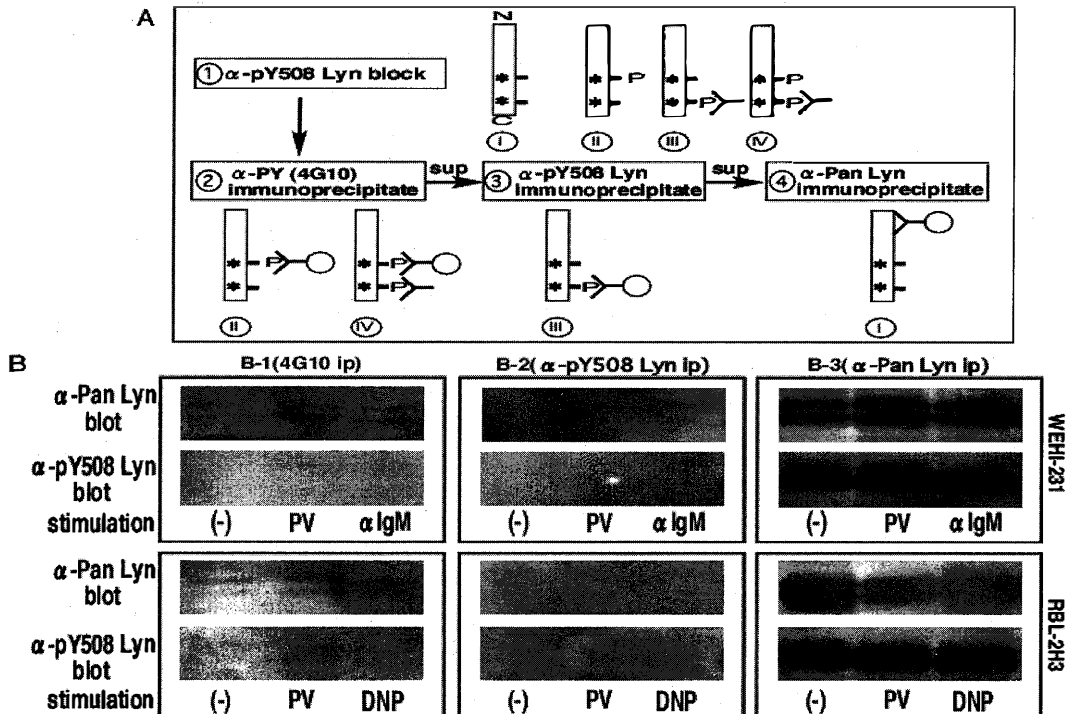


Fig. 3: 段階的免疫沈降による Lyn のリン酸化パターンの決定:

- A:
- ① 最初に、 α -pY508 特異抗体を用いて、Lyn の pY508 をブロックした。
 - ② このサンプル中の Y397 がリン酸化された状態の Lyn (II、IV型)を α -PY 抗体 (4G10) で免疫沈降した。
 - ③ 次にこの上清に ProG を加えて、ブロックに用いた α -pY508 抗体を沈降し、 α -pY508 Lyn (III型)を回収した。
 - ④ さらに上清から α -Pan Lyn 抗体を用いていずれの操作でも沈降されなかった残りの Lyn (I型)を免疫沈降した。
- B:
- ①から④の各段階における沈降物を SDS-PAGE で展開し、膜転写後、それぞれ α -Pan Lyn 抗体、 α -pY508 Lyn 抗体で blot を行った。
- B-1: α -PY 抗体で沈降した Lyn。 B-2: α -pY508 Lyn 抗体で沈降した Lyn。 B-3: α -Pan Lyn 抗体で沈降した Lyn。

5. 考察

Lynは、I型アレルギー発症に至るマスト細胞のFcε RIシグナル伝達の起点に位置し、重要な役割を担っている。Lynの活性化メカニズムを解明することはFcε RIシグナル伝達を解明する上で重要であると考え、Lyn自身のチロシンリン酸化パターンの解析を行った。解析にあたり、マスト細胞のシグナル伝達と多くの共通点を持つB細胞を用いた実験結果と比較解析を行った。

第一の実験では、LynをCNBrで限定加水分解することによりLyn分子内のリン酸化部位を決定した。この結果、無刺激状態において、マスト細胞様細胞株 RBL-2H3と未熟B細胞株 WEHI-231におけるLynのリン酸化パターンに違いが認められた。すなわち、WEHI-231にはY397とY508の両tyrosineでリン酸化が検出できなかったのに対し、RBL-2H3においては、Y397とY508の両方のtyrosineのリン酸化が検出された。この結果から、WEHI-231とRBL-2H3の無刺激状態におけるLynのリン酸化パターンは異なるということが示された。この結果は、マスト細胞のシグナルが無刺激状態でも若干通じており、細胞が活性化しやすい状態にあるということが示唆される。斉藤らの報告によれば、マスト細胞は弱い刺激により増殖状態に入り、より強い刺激によって完全に活性化して炎症性のサイトカインを分泌することを示している^{14), 15)}。今回の結果はマスト細胞であり、かつ、*in vitro*で増殖するRBL-2H3では無刺激時でも弱いシグナルが常に通じた状態であることを示しているのかもしれない。

RBL-2H3あるいはWEHI-231細胞をPVで刺激した場合には、Y397とY508のリン酸化パターンは両細胞系においてほとんど差異は認められなかった。一方、各細胞のレセプター刺激時には、WEHI-231はリン酸化されたY397のバンドが薄く、RBL-2H3ではリン酸化Y508のバンドが薄い結果が得られた。この結果はWEHI-231ではレセプター刺激によってY397のみがリン酸化されたLyn (II型)はわずかにしか増加せず、RBL-2H3ではWEHI-231と比べてより増加した結果であると考えられる。ただし、このCNBrマッピング法はリン酸化の量的変化の厳密な解析には適していない。この方法は、リン酸化の質的な解析に適しているが、量に関しては実験過程での手技的な影響が結果に反映しやすいため、この結果は別の方法で再度確認する必要がある。

Fig. 1の実験はtotal cell lysate中のLynを解析対象としたものであった。しかし、RBL-2H3のtotal cell lysate中のLynを材料として解析を行うとY508のみがリン酸化したLyn (III型)は無刺激時と刺激時で有意な差異を認めることが出来なかった (Fig. 2)。本来、シグナルに関与したLynを実験材料とすれば差があるはずなので、この結果はRaft外にあるLynが定常的に不活性状態にあるため、本来Fcε RIシグナル伝達に関与しているLynのリン酸化パターンに影響をおよぼしたためと考えられる。このため、今後の解析のターゲットとしてシグナル伝達に不可欠の環境を提供するRaft中のLynに注目することにした。実際にRaftを分画したところ、Lynの多くはRaft画分に集積していた (Fig. 2)。

CNBr分解によって無刺激状態のWEHI-231とRBL-2H3におけるLynのリン酸化状態が異なることが示されたが、この実験では、Fig. 3Aに示すII型とIII型の混在サンプルの分解結果とIV型の分解結果を判別することが出来なかった。そこで、Fig. 3Aに示す4つのフォームのLynを判別するために3種類の特異抗体 (α -PY 抗体 (4G10)、 α -pY508 Lyn抗体、 α -Pan Lyn抗体)を用いて段階的に免疫沈降する方法を試みた。

Fig. 3における段階的免疫沈降の α -PY抗体による免疫沈降はII型とIV型のLynの検出を目的としたものである。実験の結果、 α -pY508で検出されるIV型のLynはWEHI-231においては検出されなかった。一方、RBL-2H3

では検出され、このバンドは刺激時のみならず、無刺激状態でもわずかに観察された。この時、 α -Pan Lynで検出されるLynのバンド (RBL-2H3: II型・IV型、WEHI-231: II型)は刺激後増強が見られた。これらの結果は、IV型のLynはWEHI-231には存在せず、RBL-2H3には存在していることを示すものである。今までIV型のLynは、多くの研究者により漠然と存在すると考えられてきた。今回の結果により、少なくともマスト細胞シグナル伝達系においてこのIV型のフォームはなんらかの特別な機能を持つのではないと思われる。

α -PY抗体での免疫沈降上清から α -pY508抗体で免疫沈降することによりIII型のLynを沈降しようと試みたが、どの型のLynも沈降させることが出来なかった (Fig. 3 B-2, C-2)。この結果は、III型のLynが存在しないことを示すものではないと考えられる。すなわち、III型のLynは生細胞内では α -pY508抗体が認識する抗原決定基がSH2との結合により、隠された状態にあるために α -pY508抗体で沈降することができなかったと考えられる。この仮説を裏付けるように、最終的な α -Pan Lyn抗体による免疫沈降ではIII型のLynが多く検出された。また、予備実験において、RBL-2H3 Raft画分より α -pY508抗体がIII型のLynを免疫沈降しうことは確認済みである (data not shown)。

最終的な α -Pan Lyn抗体での免疫沈降ではI型のLynのみが沈降してくるように実験仮説を立てていたが、実際の沈降物中にはIII型が多く検出され、刺激後も多量に検出された (Fig. 3 B-3, C-3)。この結果は、細胞が刺激された状態であっても多くのLyn分子は不活性状態にあり、SH2とpY508が結合した状態のままであり、シグナル発火に関与するLyn分子は全体の一部だけであることを示しているのかもしれない。

α -Pan Lyn抗体での免疫沈降による沈降物中にIII型のLynが含まれていたことは初期の仮説の想定外であり、全くリン酸化されていないLyn (I型)の有無を今回用いた段階的免疫沈降法では確認することが出来なかった。この沈降物のkinase assayの結果、刺激により、自己リン酸化活性の亢進が認められた (data not shown)。III型のLynではY397が立体構造によって隠されているため、分子内の自己リン酸化は不可能と考えられる。したがって、自己リン酸化亢進を示したLynプールは自己リン酸化部位がオープンとなっているI型のLynであり、I型のLynは最終沈降物中に存在していると考えられる。今回の実験では、この点を明確にすることは出来なかったが、I型とIII型のLynを分離し、それぞれのLynのkinase assayを行うことでより詳細なLynのシグナル関与のメカニズムが明らかになるものと期待される。

WEHI-231におけるCNBrマッピングでの無刺激状態ではY397とY508両方のリン酸化が認められなかったのに対し、段階的免疫沈降での無刺激状態ではY508のリン酸化が検出された。これは、 ^{32}P を代謝的にラベルする際、III型のLynは閉じた立体構造をとっているためにこの実験での ^{32}P 処理時間では不十分であったためと思われる。このようなLynのそれぞれのフォームの半減期を調べることも重要である。

RBL-2H3とWEHI-231の無刺激状態においてLynのリン酸化パターンが異なっている原因として2つが考えられる。ひとつは今回用いたRBL-2H3にはCD45の発現が認められないことと関連していると考えられる。RBL-2H3にCD45が発現していないことは以前にFACS解析により報告されており¹²⁾、我々が行ったWestern blot解析でもCD45発現が認められなかった (data not shown)。WEHI-231ではCD45が多量に発現しており、その一部がRaftでLynの活性を制御することにより、無刺激状態ではRaft中にI型のLynのみが存在することが報告されていたが^{11,2)}、今回の実験からIII型のLynも存在する可能性が示された。一方、RBL-2H3においてはCD45が存在しないことからWEHI-231のようにLynは厳密に制御されていないのかもしれない。無刺激状態においても活性型の

Lynがわずかに存在するのはこのためであろう。もう一つの可能性はCD45と異なる脱リン酸化酵素がマスト細胞のLynを厳密に制御していることである。4種類のフォームのLynが無刺激状態でもこの脱リン酸化酵素の制御下でコントロールされた状態で存在しているのかもしれない。最近、マスト細胞系の細胞に限局して発現しているとされるPTP ϵ も脱顆粒反応のシグナルに関与していることが近年明らかとされており¹⁶⁾ マスト細胞シグナル制御における各種PTPの役割解明が期待される。

最近の研究では、Lyn^{-/-}マウス骨髄由来マスト細胞は脱顆粒反応が亢進することが示されている。また同時に、Lynと同じSrc-family kinaseであるFynが欠損したマスト細胞での実験より、脱顆粒反応はFyn非存在下では減少することが示された^{17), 18)}。すなわち、これらの報告の意味するところは、マスト細胞シグナル伝達におけるポジティブレギュレーターはFynであり、Lynはネガティブレギュレーターとして機能しているということである。もしも、この結果が正しいとすれば、今回の実験で示されたRBL-2H3の無刺激状態における微量の活性型Lynの存在は無刺激時においてはシグナルが過剰に伝達されないように沈静化状態を維持することに関与しているのかもしれない。また、刺激による活性型Lynの増加はFynシグナル活性化後にシグナル沈静化のために働くものであるかもしれない。

今後、IV型のLynが生ずるメカニズムや、CD45とは異なる脱リン酸化酵素、また、Lynのネガティブレギュレーターであると報告されているubiquitin-protein ligase^{19), 20)}などによってどのようにLynが制御されるのかを解明することがFcε RIシグナル伝達の発信メカニズムを理解する上で重要であると考えられる。また、今回本研究でその一端を明らかにできたようにRBL-2H3とWEHI-231におけるLynのリン酸化パターンの違いを比較解析することで、マスト細胞とB細胞におけるそれぞれ独自のLyn制御機構が解明できると期待される。このようにマスト細胞独自のシグナル伝達ルートあるいはB細胞独自のシグナル伝達ルートが明らかになれば、マスト細胞あるいはB細胞のみに作用し、副作用の少ない薬物を開発できる可能性は高く、将来的に臨床応用にも寄与できることが期待される。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、貴重な助言と励ましを頂きました富山大学医学部生物学教室 助教 荒館忠先生、解析に用いた研究試薬の一部を分与していただいた同医学部免疫学教室の村口篤教授ならびに FACS 解析技術を指導いただいた同教室員の皆様に心から感謝いたします。

参考文献

1. Katagiri T, Ogimoto M, Hasegawa K, Ariuma Y, Mitomo K, Okada M, Clark MR, Mizuno K & Yakura H. CD45 negatively regulates Lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells. *J Immunol.* 1999. 163;1321-1326
2. Shrivastava P, Katagiri T, Ogimoto M, Mizuno K & Yakura H. Dynamic regulation of Src-family kinases by CD45 in B cells. *Blood.* 2003. 103; 1425-1432

3. Galli SJ, Grimaldeston M and Tsai M. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nature Reviews* 2008. 8:478-48
4. Nadler MJ, Matthews SA, Turner H, Kinet JP. Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. *Adv Immunol.* 2000. 76:325-55.
5. Nicholas D, Huntington, David M, Tarlinton. CD45: direct and indirect government of immune regulation. *Immunology Letters.* 2004. 94; 167-174
6. Juan Rivera, Claudia Gonzalez-Espinosa, Martina Kovarova, & Valentino Parravicini. The Architecture of IgE-Dependent Mast Cell Signaling-A Complex Story. *Allergy and Clinical Immunol Int,* 2002. 14; 25-36
7. Petr Draber, Lubica Draberova. Lipid Raft in mast cell signaling. *Molecular Immunology.* 2002. 38; 1247-1252
8. Erin D. Sheets, David Holowka, and Barbara Baird. Critical Role for Cholesterol in Lyn-mediated Tyrosine phosphorylation of FcεRI and Their Association with Detergent-resistant Membranes. *J. Cell. Biol.* 1999. 145; 4877-4887
9. Ryan M. Young, David Holowka, and Barbara Baird. A Lipid Raft Environment Enhances Lyn Kinase Activity by Protecting the Active Site Tyrosine from Dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 2003. 278; 20746-20752
10. Field, K.A., Holowka, D Baird, B. Compartmentalized activation of the high-affinity immunoglobulin E receptor within membrane domains. *J. Biol. Chem.* 1997. 272; 4276-4280
11. Justement LB. The role of the protein tyrosine phosphatase CD45 in regulation of B lymphocyte activation. *Int Rev Immunol.* 2001. 20(6):713-38.
12. Mark swieter, Elsa H.Berenstein, and Reuben P.Siraganian. Protein Tyrosine Phosphatase Activity Associates with the High Affinity IgE Receptor and Dephosphorylates the Receptor subunits, but not Lyn or Syk. *J Immunol.* 1995. 155; 5330-5336.
13. Katagiri T, Ogimoto M, Mizuno K, and Yakura H. Selective regulation of Lyn tyrosine kinase by CD45 in immature B cells. *J. Biol. Chem.* 1995. 270; 27987-27990
14. Kohno M, Yamasaki S, Tybulewicz VL, Saito T. Rapid and large amount of autocrine IL-3 production is responsible for mast cell survival by IgE in the absence of antigen. *Blood.* 2005 Mar 1;105(5):2059-65.
15. Yamasaki S, Ishikawa E, Kohno M, Saito T. The quantity and duration of Fcγ signals determine mast cell degranulation and survival. *Blood.* 2004. 103; 3093-3101
16. Akimoto M, Mishra K, Lim KT, Tani N, Hisanaga SI, Katagiri T, Elson A, Mizuno K, Yakura H. Protein tyrosine phosphatase epsilon is a negative regulator of FcεRI-mediated mast cell responses. *Scand J Immunol.* 2009. 69(5):401-11
17. Odom S, Gomez G, Kovarova M, Furumoto Y, Ryan JJ, Wright HV, Gonzalez-Espinosa C, Hibbis ML, Harder KW and Rivera J. Negative Regulation of Immunoglobulin E-dependent Allergic Responses by Lyn kinase. *J Exp Med.* 2004. 199; 1491-1502
18. Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, Odom S, Gonzalez-Espinosa C, Furumoto Y, Saitoh S, Samelson LE, O'Shea JJ and Rivera J. Fyn kinase initiates Complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nature Immunol.* 2002. 3; 741-748
19. Kyo S, Sada K, Qu X, Maeno K, Shahjahan Miah, S.M. Kawauchi-Kamata K and Yamamura H. Negative regulation of Lyn protein-tyrosine kinase by c-Cbl ubiquitin-protein ligase in FcεRI-mediated mast cell activation. *Genes to Cells.* 2003. 8; 825-836
20. Qu X, Sada K, Kyo S, Maeno K, Shahjahan Miah S.M and Yamamura H. Negative regulation of FcεRI-mediated mast cell

—RBL-2H3細胞のFcε RI raftにおけるLynの制御機構—

activation by a ubiquitin-protein ligase Cbl-b. *Blood*. 2004. 103; 1779-1786