

IgE 受容体を介するマスト細胞活性化シグナルに及ぼす

PTP-PEST の役割

鈴木望美, 片桐達雄

1. 概要

連続したくしゃみ、止まらない鼻水などやっかいな症状で悪名の高い所謂「アレルギー」を直接引き起こす細胞は、マスト細胞もしくは好塩基球である。マスト細胞は、IgE 受容体 (Fc ϵ R) を介して活性化され、顆粒中に蓄えた炎症物質放出と炎症性サイトカインの合成・放出によりアレルギー性炎症を惹起する。この細胞内シグナル伝達において、種々のタンパク質中のチロシンリン酸化と脱リン酸化制御が重要な働きをしている。我々は、以前、マスト細胞の Fc ϵ R シグナルにおける各種チロシン脱リン酸化酵素 (PTP) の役割を検討したところ、Fc ϵ R 刺激による PTP-PEST の mRNA 量が特異的に増加することを確認した。PTP-PEST は、その構造中に PEST ドメインと呼ばれる特徴的なアミノ酸配列を持つ細胞質型の PTP であり、近年ようやく T 細胞における役割などが報告され始めた。しかし、現在までに PTP-PEST がマスト細胞においてどのような役割を担っているのかについてはほとんど分かっていない。本研究では、Fc ϵ R シグナルに PTP-PEST がどのように関与するかを詳細に解明することを目的とした。

本研究では、Fc ϵ R シグナル解析系として RBL-2H3 細胞系を用いた。PTP-PEST および PTP-PEST の基質トラッピングミュータントである PTP-PEST-DACS をそれぞれ RBL-2H3 に導入して機能解析を行った (遺伝子導入細胞は、以降それぞれ PEST RBL-2H3 と DACS RBL-2H3 と略記する)。各種シグナル分子の発現量とリン酸化状態は特異抗体を用いた Western Blot 法で解析した。また、DACS RBL-2H3 より PTP-PEST (含 PTP-DACS) を免疫沈降して、共沈タンパク質のチロシンリン酸化 (PY 化) 状態の解析を行った。PY 化亢進が確認された共沈分子について同定を試みた。

導入遺伝子 PTP-PEST、PTP-PEST-DACS は、用いた細胞中において、安定に高発現していた。また、各細胞間で Fc ϵ R 発現量は同程度であった。DACS RBL-2H3 では、今までに PLC γ のリン酸化減少、Ca²⁺応答の減弱が報告されており、脱顆粒反応の低下が予想された。しかし、脱顆粒反応を比較した結果、対照 RBL-2H3 との有意差は認められなかった。この結果は予想に反するものであったが、最終的な脱顆粒に至るシグナルへの PTP-PEST の影響は不十分であると考えられた。一方、アレルギー症状の発症に関与するサイトカインである TNF- α 産生に関与する MAP Kinases を解析した結果、DACS RBL-2H3 において Fc ϵ R 刺激で誘導される ERK、

JNK、p38 各分子のリン酸化が対照 RBL-2H3 と比べて、初期に減少、後期に増強という独自のパターンを示した。これらの結果から、PTP-PEST の標的制御部位は MAP Kinases の上流であり、脱顆粒シグナルよりも TNF- α 産生シグナル制御に関与していると考えられた。

以上の結果に加えて、DACS RBL-2H3 の Fc ϵ R 刺激時における PTP-PEST (DACS) 共沈分子の解析より、約 68kDa と 110kDa のタンパク質の PY 化亢進を認めた。TOF-MS 解析の結果、68kDa 分子を Paxillin と同定した。Paxillin は、PTP-PEST との直接結合が既に報告されているが、そのマスト細胞における機能は未解明である。一方、110 kDa の分子種は、同定に至らなかったが、今回得られた情報よりデータベースに照合した結果、Fc ϵ R シグナルで重要なシグナル分子である MAPKKK, Rho GAP2, Ras GAP1, Type I inositol-3, 4-bisphosphate 4-phosphatase が候補として挙げられた。

以上より、本研究により、PTP-PEST のマスト細胞の TNF- α 産生制御への関与とそのメカニズムを担う分子種の情報を明らかにすることができた。今後、これらの情報を基に解析を進めることで炎症性サイトカインの一つ TNF- α 産生制御に応用できるものと考えられる。

。

2. 背景

Fc ϵ RI を介したアレルギー誘導の初期シグナルは PTKs (protein tyrosine kinases) の活性化に発信する事が明らかとなっている¹⁾⁻³⁾。マスト細胞では、抗原を介した IgE-Fc ϵ RI の凝集で、Src-Family Kinase の Lyn もしくは fyn が活性化する¹⁾⁻⁴⁾。このうち Lyn は、Fc ϵ RI 複合体の β -および γ -subunit の ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) をリン酸化し⁵⁾⁻⁷⁾、そこに Syk が結合して活性化される⁸⁾⁻¹¹⁾。これら活性化された PTK は、細胞膜に会合した足場タンパクである LAT¹²⁾ や LAB/NTAL^{13), 14)} をリン酸化する。これらの足場タンパク質は、リン酸化されることでそのリン酸化サイトに会合する Vav¹⁵⁾ や SLP-76¹⁶⁾ などの更なる細胞質型の足場タンパク質を引き寄せて、更なるリン酸化反応を進める Btk (Bruton's tyrosine kinase)^{17), 18)} の活性化やリン脂質を介した二次シグナルを形成する PLC- γ (phospholipase C- γ)^{19), 20)} の活性化して細胞内 Ca²⁺濃度上昇させる。これらの初期のシグナルに誘導されて、後期シグナルが形成され、MAP kinases (mitogen-activated protein kinases) の活性化につながる²¹⁻²³⁾。このように、マスト細胞のシグナル伝達では、タンパク質の構造中に含まれるチロシンの「リン酸化」によるシグナル制御が重要な働きをすることが明らかになっている。しかし、リン酸化酵素による制御が次々と明らかになる一方で、チロシン脱リン酸化酵素による「脱リン酸化」によるシグナル制御に関してはいくつか報告が散在するものの、多くの研究者が賛同する明確なストーリーは描かれていない状況である。リンパ球における抗原シグナル制御機構において Src-Family Kinase の活性制御に重要な役割を担う CD45²⁴⁻²⁶⁾ についてさえ、マスト細胞における役割は、シグナル制御に何らかの関与を示すという報告はある²⁷⁻³¹⁾ もの未だ明確ではない。また、リンパ球シグナルにネガティブな制御をもたらすことが報告されている SHP-1 についても、10 年前に 1 報があるのみである³²⁾。このような状況の中で、我々の共同研究グループは、PTP ϵ がマスト細胞のシグナル制御に重要な役割を担うことを明らかにした³³⁾。本研究では、PTP ϵ とは異なるが、同じくマスト細胞中で発現の認められる PTP-PEST の役割に焦点を絞って解析を行った。

我々は、以前、マスト細胞様細胞株 RBL-2H3 (rat basophilic leukemia) を用いた PTPs の系統的な役割を検討した研究において、Fc ϵ R 刺激による PTP-PEST の mRNA 発現量の増加を確認した^{27)・33)}。PTP-PEST は、1993 年にコールドスプリング・ハーバー研究所のニック・トンクス博士らによって発見された 120kDa の非受容体型の PTP である³⁴⁾。N-末端に触媒ドメインを持ち、C-末端側に高プロリン含有領域や NPLH 配列などのシグナルモチーフを持つという独特な構造をしていることがマギール大学のミシェール・トレンブレーらの研究で次々と明らかにされてきた³⁵⁻³⁷⁾。また、その独自の構造を利用して、様々なシグナル分子と会合することが報告されている。細胞接着分子 p130 Cas (p130 Crk-associated substrate)³⁸⁻⁴⁰⁾、paxillin のホモログである Hic-5⁴¹⁾ および paxillin そのものとの結合⁴²⁾を介して、あるいは VAV2 と Rho GAP シグナルを介して細胞接着に影響することが知られている⁴²⁻⁴⁶⁾。また、大変興味深いことに src ファミリー PTK のネガティブレギュレーターである Csk と会合⁴⁷⁾して種々のリンパ球シグナル負に制御することも明らかとなってきた⁴⁷⁻⁴⁹⁾。さらに、PEP や PTP-HSCF を含むいくつか PTP と PEST-family を形成しており、脱リン酸化により T 細胞や B 細胞の負の制御に関わっている証拠が蓄積してきた^{50)・51)}。しかし、マスト細胞活性化における役割は解明されていない。

そこで我々は、RBL-2H3 に野生型 PTP-PEST (PTP-PEST-WT) および酵素活性のない、substrate-trapping 型 PTP-PEST (PTP-PEST-DACS) を導入して、Fc ϵ R 刺激によるシグナル伝達への PTP-PEST の機能を解析した。以前の研究で、PTP-PEST が Fc ϵ R 刺激によるシグナル伝達の初期には影響を与えないこと、PTP-PEST-DACS 過剰発現 RBL-2H3 における細胞内 Ca²⁺ 流入の減少と TNF- α の mRNA 発現量の減少を確認している。本研究では Fc ϵ R 刺激によるシグナル伝達への影響をさらに詳しく検討した。また、PTP-PEST-DACS 過剰発現 RBL-2H3 の Fc ϵ R 刺激時における PTP-PEST 共沈タンパク質のチロシンリン酸化解析で、リン酸化の亢進が見られた 68kDa と 110kDa のタンパク質を MALDI TOF-MS 解析により同定を試みた。

この結果、PTP-PEST は MAP Kinases の上流に作用点を持ち、TNF- α 産生を制御していることが示唆された。また、MALDI TOF-MS 解析の結果、68kDa のタンパク質は Paxillin であることが明らかとなった。Paxillin は PTP-PEST と直接結合することが報告されている⁴²⁾が、マスト細胞での機能は未解明である。本研究により、Fc ϵ R シグナルにおいて Paxillin と PTP-PEST が結合することで、下流のシグナルを制御し TNF- α 産生に関与している可能性が示唆された。

また、110kDa のチロシンリン酸化タンパク質は、二次元電気泳動での PY 化解析により pI 6.1-6.8 であることが解った。さらに、Swiss-Prot での検索により、約 1,500 種類のタンパク質が候補に挙げられた。その中には MAPKKK \cdot Rho GAP2 \cdot Ras GAP1 \cdot Type I inositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase などの Fc ϵ RI シグナルで重要な役割を果たすシグナル分子も含まれており、PTP-PEST の機能解析にあたって、この 110kDa のタンパク質が重要であることが示唆された。

3. 材料と方法

RBL-2H3 の IgE 受容体感作には anti-dinitro phenyl (DNP) mouse monoclonal IgE: SPE-7 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (以下 SIGMA と略記) を用いた。SPE-7 で感作した RBL-2H3 の刺激には DNP-albumin (human-albumin) (SIGMA) を用いた。

免疫沈降法での抗体結合ビーズの作製には、Protein G Sepharose™ (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd., Buckinghamshire UK) を用いた。

Western Blot および免疫沈降には以下の抗体を用いた。Anti-PTP-PEST Rabbit polyclonal Antibody (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)。以下、各会社から購入した。Anti-Fc ϵ RI (g鎖) Rabbit polyclonal Antibody (cat. #ab34362) (Abcam, Inc., MA, USA)、phospho-Lyn (Tyr507) antibody (lot. #2) (cat. #2731S) (Cell signaling Technology, Int., MA, USA) (以下 Cell Signaling と略記)、Anti-Lyn (44) Rabbit polyclonal IgG (lot. #B170) (cat. #sc-15) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、p42/44 MAP Kinase (ERK1/2) Antibody (lot. #11) (cat. #9102) (Cell Signaling)、phospho-p42/44 MAP Kinase (pERK1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody (lot. #16, #20) (cat. #9101S) (Cell Signaling)、SAPK/JNK Antibody (lot. #5) (cat. #9252) (Cell signaling)、phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody (lot. #5) (cat. #9252) (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)、Anti-phosphotyrosine, biotin conjugate (mouse monoclonal IgG_{2bk}, clone 4G10) (lot. #29794) (cat. #16-103) (Upstate Biotechnology, Int., IL, USA)、Anti-phosphotyrosine (mouse monoclonal IgG_{2bk}, clone 4G10), (lot. #32577) (cat. #05-321) (Upstate Biotechnology USA, Inc., IL, USA)、Anti-Paxillin monoclonal Antibody (lot. #15) (cat. #P13520) (Becton Dickinson and Company, NJ, USA) (以下 BD と略記)、Peroxidase-conjugated Affinipure Goat Anti-mouse-IgG (Goat-Anti-mouse-HRP) (lot. #69453) (cat. #115-035-003) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., PA, USA)、Goat-Anti-mouse Ig' s, Alkaline Phosphatase conjugate (lot. #4801) (cat. #AMI3405) (Biosource Int., CA, USA)、Anti-Rabbit Ig' s HRP (lot. #2501) (cat. #ALI0404) (Biosource Int., CA, USA)、Goat Anti-Rabbit- IgG-AP conjugate (lot. #97248) (cat. #170-6518) (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) (以下 Bio-Rad と略記)

Western blot 後のタンパク質検出に使用した抗体は Can Get Signal® (TOYOBO Co., Ltd., Osaka Japan) で希釈した。

HRP 標識抗体の酵素活性阻害薬として、Sodium azide, Sigma Ultra (SIGMA) を Tris Buffered Saline (TBS) に溶解した、5% 溶液を用いた。

b-hexosaminidase の基質として、*p*-nitrophenyl-2-acetamide-2-deoxy-b- D-glucopyranoside (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., OSAKA, JAPAN) (以下 WAKO と略記) を用いた。

細胞と培地

マスト細胞様細胞株 RBL-2H3 (rat basophilic leukemia) および遺伝子導入 (Vector、PTP-PEST-WT、PTP-PEST-DACS) 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) の培養培地として、RPMI 1640 (WAKO) に 10% Fetal Bovine Serum (SAFC Biosciences, SIGMA)、10⁻⁵M 2-mercaptoethanol (WAKO) と 2mg/mL Gentamicin Solution (SIGMA) を加えたものを用いた。(実験には継代 3 ~ 20 代までの細胞を使用した。)

遺伝子導入

PTP-PEST-WT cDNA は Michel Tremblay 博士 (McGill University, Montreal, Canada) より恵与。PTP-PEST の D199A・C231S 二重変異体 (PTP-PEST-DACS) は PCR を用いて作製された。レトロウイルスベクターには IRES (internal ribosomal entry site) と EGFP (enhanced green fluorescent protein) の cDNA を持つ murine stem cell virus-based MIGR1³⁹⁾ (Warren Pear 博士 (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) より恵与) を使用した。恵与された細胞の遺伝子導入法は、以下の通りである。パッケージング細胞には北村俊雄博士 (東京大学医科学研究所) から恵与された Plat-E 細胞を使用した。Fugene 6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) を用いて Plat-E 細胞へレトロウイルスベクターを導入し、48 時間培養した。この培養上清から PTP-PEST 遺伝子を持つレトロウイルスを回収し、RBL-2H3 に感染させた。PTP-PEST または PTP-PEST-DACS 導入の指標として 48 時間後に EGFP 陽性細胞をフローサイトメーターで選別した。遺伝子導入効率は 99%以上であった。

Western blot 解析

WCL の調製

各細胞 (1.0×10^6 cells/6cm-dish or 4.0×10^6 cells/10cm-dish) に対し最終濃度 100ng/mL の Anti-DNP IgE (SPE-7) を加えて感作した。感作時間は 0 もしくは 15 時間で、5% CO₂ インキュベータで 37°C にてインキュベートした。インキュベートの次に、細胞を Siraganian buffer I (119mM NaCl, 5mM KCl, 4mM MgCl₂, 25mM PIPES, NaOH にて pH 7.2 に調整) で 2 回洗浄し、Siraganian buffer II (Siraganian buffer I に 5.6mM glucose, 1mM CaCl₂, 0.1% BSA を添加) 1mL/6cm-dish or 2mL/10cm-dish を加え、5% CO₂ インキュベータで 37 °C、10 分間インキュベートした。その後、DNP-Albumin (最終濃度 20ng/mL) を加えて、刺激を行った。刺激時間は、各実験ごとに本文中に示した。刺激条件は 5% CO₂ インキュベータで 37°C である。刺激終了後、上清を除き、1% Triton-X100-TNE (150mM NaCl, 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA, Phosphatase inhibitor cocktail 2 (SIGMA), Aprotinin 10mg/mL (SIGMA)) 200 μ L/6cm-dish or 500 μ L /10cm-dish で可溶化した。可溶化サンプルを集めて 10,000rpm、30 秒遠心し、上清を WCL とした。WCL に SDS-PAGE sample buffer (DW 4.0mL, 0.5M Tris-HCl pH 6.8 1.0mL, glycerol 0.8mL, 10% Sodium Dodecylsulfate 1.6mL, 2-melcaptoethanol 0.4mL, 0.05%(w/v) bromophenol blue 0.2mL) を等量加えて 90 ~ 98°C で 5 分間加熱し、タンパク質を変性させた後、SDS-PAGE にて展開した。

SDS-PAGE と Western blot

ミニゲル解析は、ミニプロティアン III (Bio-Rad) で行った。10% または 7.5% アクリルアミドゲルで、ゲル二枚に対して 30mA、約 15 分泳動した後、40mA で 60 分泳動した。泳動後、ゲルを blotting buffer (25mM Tris-HCl, 192mM Glycine, 20%(v/v) Methanol, pH 8.3) で 15 分平衡化した後、ミニプロティアン III ウェスタンブロットモジュール (Bio-Rad) を用いて、90V で 180 分間 nitrocellulose membrane (Bio-Rad) にタンパク質を転写した。

メンブレンを 5% BSA-TBS で over night Blocking した後、TTBS で 2 回、TBS で 2 回洗浄した。洗浄後、

一次抗体に1時間～15時間反応させた。その後、メンブレンをTTBSで2回、TBSで2回洗浄した。洗浄後、二次抗体と約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。洗浄後、AP発色キット (Bio-Rad) で直接メンブレン上に発色、あるいはECL発色キット (Amersham Pharmacia Biotech, Ltd., Buckinghamshire UK) にてFuji Medical X-Ray Film RX-U (Fuji Film, Co., Tokyo, JAPAN) 上に露光した。

β-Hexosaminidase の測定

24 well multi well plate (BD) に各細胞 (2.0×10^5 cells/well) を蒔き、最終濃度 100ng/mL の Anti-DNP IgE (SPE-7) を加え、もしくは加えずに、5% CO₂ インキュベータで 37°C、15 時間インキュベートした。この後、細胞を Siraganian buffer I で 2 回洗浄し、Siraganian buffer II 200 μL を加え、5% CO₂ インキュベータで 37 °C、10 分間インキュベートした。その後、DNP-Albumin (最終濃度 20ng/mL) を加え、もしくは加えずに、5% CO₂ インキュベータで 37°C、1 時間刺激した。刺激後、上清 50 μL を 96 well multi well plate (BD) に回収し、substrate solution (1mM *p*-nitrophenyl-2-acetamide-2-deoxy-β-D-glucopyranoside/ 0.1M sodium citrate buffer) 50 μL を加え、5% CO₂ インキュベータで 37°C、1 時間インキュベートした。Stop solution (0.1M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 10.0) 200 μL で反応を停止し、405nm の吸光度を測定した。吸光度測定には NipponInterMed K.K. の ImmunoReader を用いた。

免疫沈降

Protein G Sepharose™ を PBS-VE (PBS に 1mM Na₃VO₄、1mM EDTA を添加) で 2 回洗浄後、0.1% TNE 5mL を加え、各抗体 (1 ~ 3mg/sample) を加えて over night で回転混和し、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 0.1% TNE で 3 回洗浄し、1.5mL チューブに分注した。ここに WCL を加え、over night インキュベートした。その後、沈降物を回収し、0.1% TNE で 3 回洗浄して免疫沈降サンプルとした。

実験により、SDS-PAGE sample buffer 50 μL を加えて 90~98°C で 5 分間加熱して SDS-PAGE で展開して解析した。二次元電気泳動解析には TCA 沈殿によりタンパク質を沈殿させて実験系に供した。

TCA 沈殿

PTP-PEST 免疫沈降サンプルに 20% TCA を加え、氷中で 30 分インキュベートした。これを 12,000 × *g*、5 分間遠心し、上清を捨て、沈殿を氷冷アセトンで 5 回洗浄し TCA を完全に除去した。沈殿を完全に乾燥させ、2D Lysis buffer (9.5M Urea、2% TritonX-100、2% Ampholine (pH 3.5 ~ 10)、5% 2-melcaptoethnol) 200 μL を加えて二次元電気泳動の実験系に供した。

PTP-PEST 免疫沈降サンプルの二次元電気泳動解析

TCA 沈殿サンプルに 200 μL の 2D Lysis buffer (9.5M Urea、2% TritonX-100、2% Ampholine (pH 3.5 ~ 10)、5% 2-melcaptoethnol) を加えて攪拌し、その上清 40 μL を 2D 用サンプルとした。これを Rehydration buffer 110 μL と混和し、IPG ストリップ (pI 5-8) (Bio-Rad) にアプライして 12 時間膨潤させた。電気泳動は、

Bio-Rad の PROTEAN IEF CELL を用いた。一次元目の泳動後、ストリップ 1 本当たり、平衡化 buffer 1 (6M Urea、0.375M Tris-HCl、2% Sodium Dodecylsulfate (SDS)、20% Glycerol、2%(w/v) dithiothreitol (DTT)、pH 8.8) 約 2mL で 20 分間平衡化し、続いて平衡化 buffer 2 (6M Urea、0.375M Tris-HCl、2% SDS、20% Glycerol、2.5%(w/v) Iodeacetamide、pH 8.8) 約 2mL で 10 分間平衡化させてから、二次元目の泳動を行った。

二次元展開したタンパク質のスポット検出は、ゲルを銀染色キット (2D-Silver stain II” DAIICHI” (DAIICHI Pure Chemical CO., TOKYO, JAPAN) または Silver stain MS kit (cat. #299-58901) (WAKO)) で染色し、得られた泳動像をスキャナーで取り込み、コンピューター画像解析により行った。この実験に用いた試薬、Urea、2-melcaptoethanol、Tris-HCl、SDS、Glycerol、Iodeacetamide は、和光純薬より購入した特級試薬を用いた。また、10% TritonX-100 (Fluka)、40% Ampholyte 3/10 (Bio-Rad)、DTT (SIGMA) をそれぞれの会社より購入した。銀染色の試薬調製のため、Methanol、酢酸は、和光純薬より購入した特級試薬を用いた。

MALDI TOF-MS によるタンパク質の同定

電気泳動により展開し、銀染色により検出されたタンパク質のスポットを切り出し、15mM フェリシアン化カリウム、50mM チオ硫酸ナトリウム溶液 (WAKO) により脱銀処理を行った後、Trypsin (Promega, Madison, WI) により 37°C で約 15 時間消化し、ペプチド断片を得た。このペプチドを用いて MALDI TOF-MS (Bruker Autoflex) により、peptide fingerprinting を行った。タンパク質同定のためのデータベースは NCBI nr を参照した。検索 parameters は以下の通りである。(taxonomy : Rattus norvegicus, Fixed Modifications : Carbamidemethyl, Missing cleavages max : 1, Peptide tolerance ± 150 ppm)

4. 結果

遺伝子導入細胞の性状解析

野生型 PTP-PEST (PTP-PEST-WT) を遺伝子導入した RBL-2H3 (PEST RBL-2H3)、substrate trapping 変異型 PTP-PEST (PTP-PEST-DACS) を導入した RBL-2H3 (DACS RBL-2H3)、Vector のみを導入した RBL-2H3 (Vector RBL-2H3) の形態とシグナル分子の発現を遺伝子導入前の RBL-2H3 と比較した。

遺伝子導入に用いられたレトロウイルスベクターには EGFP (enhanced green fluorescent protein) の遺伝子が組み込まれているため、導入遺伝子の発現を EGFP の発色で確認した。また、遺伝子導入された細胞の形態を明視野位相差像で確認した (Fig. 1)。顕微鏡は蛍光倒立顕微鏡 (キーエンス BZ-8000) を用いた。

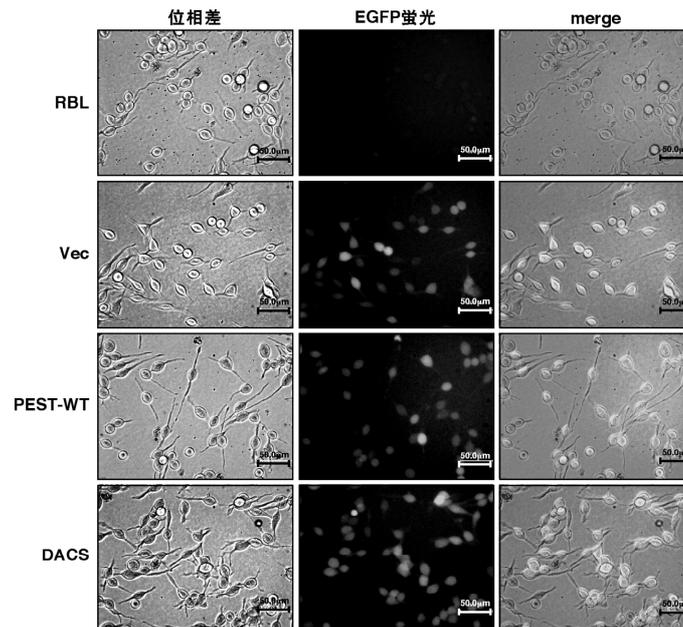


Fig.1 遺伝子導入細胞の形態観察および遺伝子導入の確認

各細胞を 1×10^6 cells/6cm dish の濃度で蒔き、37°Cで 48 時間インキュベートし、蛍光倒立顕微鏡（キーエンス BZ-8000）を用いて、位相差および EGFP 蛍光を観察した。（RBL: RBL-2H3、Vec: Vector RBL-2H3、PEST-WT: PEST RBL-2H3、DACS: DACS RBL-2H3）

Fig. 1 に示したように、各細胞株の EGFP 蛍光の発色パターンと蛍光量から、各細胞に安定に導入遺伝子が発現していることが確認された。

遺伝子導入前後で RBL-2H3 細胞の形態変化は、Vector 導入前後で差異が認められなかった。一方、PEST 遺伝子導入では、長く伸びきった仮足が観察された。また、DACS RBL-2H3 の位相差顕微鏡像では、短く太い仮足が確認された (Fig. 1)。これらは、導入遺伝子が形態に影響を及ぼした者と考えられる。実際、PTP-PEST は細胞運動のシグナルに関与するとの報告があり⁴²⁻⁴⁶⁾、PTP-PEST-WT および PTP-PEST-DACS を過剰発現させることにより、このような形態変化が誘導される結果を得たことは、これらの他のグループの研究報告と矛盾しなかった。

PTP-PEST のタンパク質レベルでの発現と、遺伝子導入操作による $Fc \epsilon RI$ 分子への影響を確認するため、特異抗体を用いた Western blot 法により、PTP-PEST と $Fc \epsilon RI$ γ 鎖の発現量を検出した (Fig. 2)。RBL-2H3 親細胞と Vector RBL-2H3 の PTP-PEST の発現タンパク量に差異は見られなかったが、PEST RBL-2H3 および DACS RBL-2H3 では PTP-PEST がより多く検出された。一方、 $Fc \epsilon RI$ γ 鎖の発現量には各細胞において差は認められなかった。

以上の結果より、PEST RBL-2H3 および DACS RBL-2H3 に、導入遺伝子が過剰発現系が信頼しうるものであることが確認された。また、データには示していないが、これらの細胞は凍結保存、融解を繰り返しても Fig. 2 と同様の結果が得られた。以降、これらの細胞を用いて PTP-PEST の機能解析実験を行った。

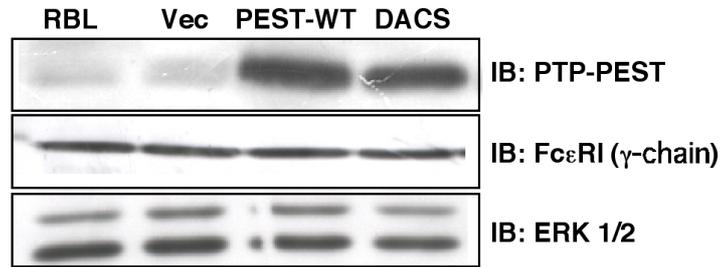


Fig.2 PTP-PEST 過剰発現の確認および FcεRI γ 鎖発現量比較

未刺激の各細胞 (1×10^5 cells) の Whole cell lysate (WCL) を Western blot 法を用いて解析した。PTP-PEST 発現量を PTP-PEST 抗体により、FcεRI 発現量を FcεRI γ 鎖抗体により検出した。ERK はタンパク量の基準として示した。

PTP-PEST 過剰発現による脱顆粒への影響

PTP-PEST のマスト細胞シグナルへの作用点を解析するため、PTP-PEST-WT および PTP-PEST-DACS 過剰発現による脱顆粒反応への影響を検討した。この結果を Fig. 3 に示した。いずれの細胞でも、無刺激ではバックグラウンドの吸光度 0.1 と同程度であり、ここで用いている脱顆粒反応測定系では、無刺激時の自然脱顆粒放出はほとんど認められなかった。一方、各細胞で抗原による FcεR 刺激により、およそ 0.8 ~ 1.2 の吸光度に相当する β-Hexosaminidase 放出が認められた。いずれの細胞でも抗原刺激により吸光度の有意な増強が認められ、各細胞間における違いはわずかであった。また、Ionomycin と PMA による刺激 (Iono + PMA 刺激) および Ionomycin 単独刺激では抗原刺激より高いレベルの β-Hexosaminidase 放出が確認され、吸光度は 1.3 ~ 2.1 であり、RBL-2H3 親細胞と比較して、遺伝子導入細胞群ではやや高値を示す傾向があった。また、細胞中に含まれる β-Hexosaminidase の総量を表す WCL の吸光度は 1.2 ~ 2.1 であった。Vector RBL-2H3 において、WCL の吸光度が 1.2 であり、他の細胞群と比較して低い値を示した。しかし、この数値は Iono + PMA 刺激および Ionomycin 単独刺激で放出される β-Hexosaminidase の吸光度を下回っており、含有量を放出量が上回ることは通常考えられないので、この数値は実験誤差によるものと推察される (Fig. 3A)。

また、各細胞での Iono + PMA 刺激、Ionomycin 単独刺激、WCL の吸光度をそれぞれ 100% 放出量として、抗原刺激時の β-Hexosaminidase の放出量 (% release) を算出したグラフを Fig. 3B, C, D に示した。いずれの場合にも、抗原刺激での β-Hexosaminidase 放出量に、RBL-2H3 親細胞と Vector RBL-2H3、PEST RBL-2H3、DACs RBL-2H3 の間で有意な差が認められなかった。以上より、抗原刺激時の脱顆粒放出に遺伝子導入は影響しないことが示された。

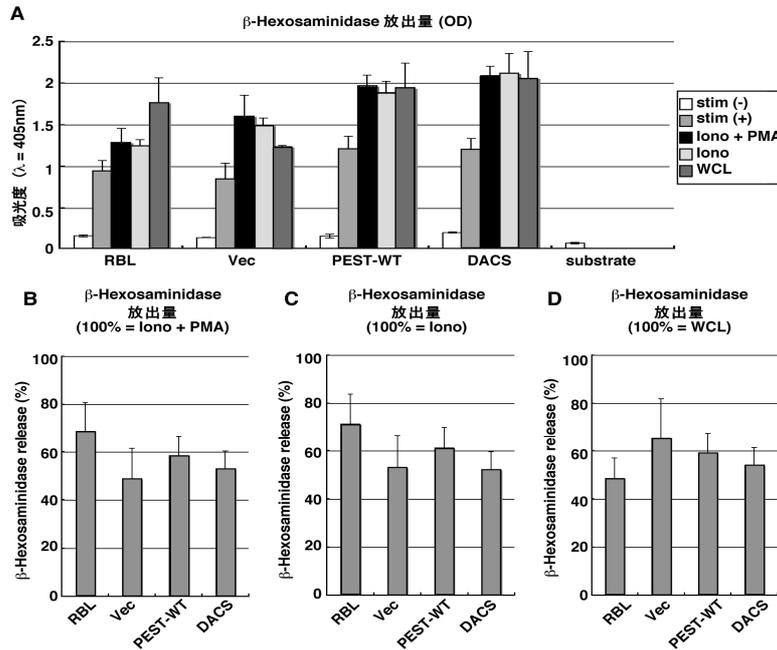


Fig.3 PTP-PEST 過剰発現による β -Hexosaminidase 放出への影響検討

A. 各細胞 (2×10^5 cells) を IgE (100ng/mL) で overnight 感作、その後 DNP-Albumin (20ng/mL) で 1 時間抗原刺激 (stim (+)) 又は無感作・無刺激 (stim (-)) の β -Hexosaminidase 放出量を吸光度で示した。また、無感作の細胞に lonomyacin (最終濃度 1mM) と PMA (最終濃度 10nM) で 1 時間刺激 (lono + PMA) 又は lonomyacin (最終濃度 1mM) 単独で 1 時間刺激 (lono) した細胞の β -Hexosaminidase 放出量と、無感作・無刺激の細胞を 1% TNE で可溶化した WCL の β -Hexosaminidase 含有量を吸光度で示した。

B., C., D. lono + PMA 刺激 (B)、lonomyacin 単独刺激 (C) 時の β -Hexosaminidase 放出量および WCL (D) の β -Hexosaminidase 含有量をそれぞれの細胞での 100%放出量として、 β -Hexosaminidase release (%) = (stim (+) ABS \cdot (stim (-)) ABS) / (100% ABS \cdot (stim (-)) ABS) \times 100 (%) とした。

PTP-PEST-DACS の MAP Kinases への影響検討

RBL-2H3 では、Fc ϵ RI 刺激により、TNF- α の mRNA が増加し、TNF- α の産生が誘導されることが知られている⁵²⁾。我々は、抗原による Fc ϵ R 刺激後 30 分での DACS RBL-2H3 の TNF- α mRNA 発現量を調べた結果、PTP-PEST-DACS 導入では Vector 及び PTP-PEST-WT 導入と比較して TNF- α mRNA が減少していることを確認した (Fig. 4)。この結果は、PTP-PEST-DACS が TNF- α 産生シグナルに関与している可能性を示すものであったので、TNF- α 産生シグナルで重要な機能をする MAP Kinases (extracellular signal-regulated kinase (ERK)、c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)、p38 MAPK (P38)) のリン酸化の経時変化を解析した (Fig. 5)。

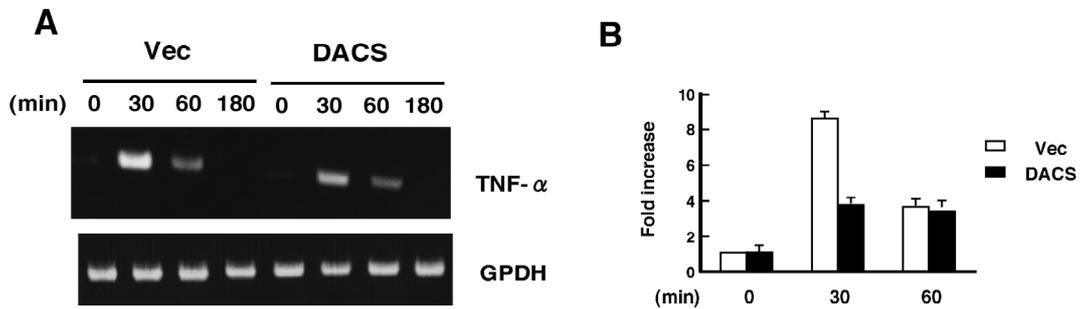


Fig.4 PTP-PEST-DACS の TNF- α 誘導に及ぼす効果

各細胞 (1×10^6 cells) を IgE (100ng/mL) で overnight 感作した後、DNP-Albumin (20ng/mL) で各時間刺激して誘導される TNF- α の mRNA を RT-PCR で増幅して測定した。A は、RT-PCR 産物のアガロースゲル泳動像を示した。B は A の結果をデンストメーターで数値化し、棒グラフで示した。

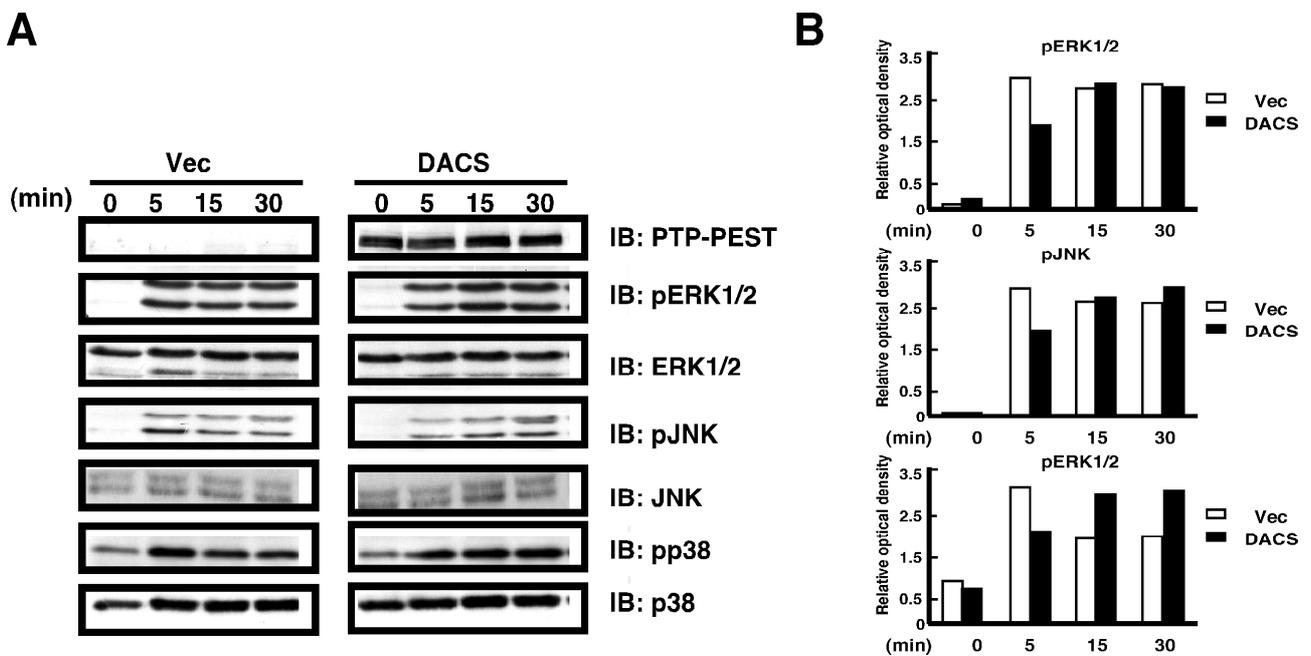


Fig.5 PTP-PEST-DACS の MAP Kinases への影響

各細胞 (1×10^6 cells) を IgE (100ng/mL) で overnight 感作した後、DNP-Albumin (20ng/mL) で各時間抗原刺激した後に可溶化して得た細胞総タンパク質液を電気泳動で分離し、Western blot 法を用いて解析した。

A は、RT-PCR 産物のアガロースゲル泳動像を示した。B は A の結果をデンストメーターで数値化し、棒グラフで示した。

Vector RBL-2H3 の ERK、JNK、p38 各分子のリン酸化は刺激後 5 分で強く誘導され、刺激後 60 分までに暫時減少していった。これに対して、DACs RBL-2H3 では ERK および p38 のリン酸化のピークは 15-30 分に、シフトした。また、JNK のリン酸化のピークは 30 分にシフトした。

以上のように PTP-PEST-DACS 導入により、各 MAP Kinases のリン酸化に遅延が見られることが明らかになった。このとき、それぞれの MAP Kinases のタンパク質の発現量に差はなかった。

PTP-PEST-DACS 分子に共沈降するリン酸化タンパク質の解析

Fc ϵ RI シグナルにおいて PTP-PEST と相互作用する分子の探索のため、DACS RBL-2H3 を Fc ϵ R 刺激した WCL を PTP-PEST 抗体で免疫沈降し、共沈降したタンパク質のチロシンリン酸化を Western blot 法で解析した (Fig. 6A)。

この結果、Vector RBL-2H3 の共沈降タンパク質のチロシンリン酸化パターンと比較して、DACS RBL-2H3 では 110kDa、106kDa、68kDa のタンパク質のチロシンリン酸化に明らかな亢進が見られた。一方、同様に調製したサンプルを銀染色で染色し、総タンパク質を検出した結果では、これら分子種いずれにおいても明確な差異は認められなかった (Fig. 6B)。

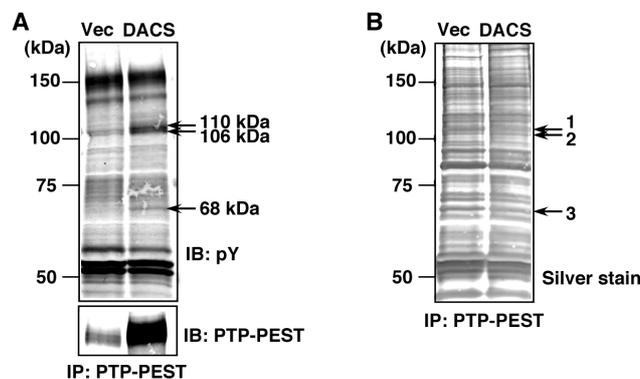


Fig.6 PTP-PEST-DACS に共沈降するリン酸化タンパク質の解析

A. 各細胞 (4×10^6 cell) を IgE (100ng/mL) で overnight 感作、その後 DNP-Albumin (20ng/mL) で 15 分間抗原刺激した後、WCL を PTP-PEST 抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE 泳動で展開して Western blot 法を用いてチロシンリン酸化タンパク質を検出した。B. 各細胞 (1.2×10^7 cell) を IgE (100ng/mL) で overnight 感作、その後 DNP-Albumin (20ng/mL) で 15 分間抗原刺激した後、WCL を PTP-PEST 抗体で免疫沈降し、SDS-PAGE 泳動で展開して銀染色で総タンパク質を検出した。

Fig.6 の結果を基にして、より詳細な共沈タンパク質の分子性状の解析を行った。先の実験で、チロシンリン酸化の亢進が見られた分子量に相当するバンドをブロットメンブレンより切り出し、MALDI TOF-MS による peptide mass fingerprint 解析を行った。

MALDI TOF-MS 解析で得られたデータをデータベースと照合した結果を、それぞれ Table.1, Table.2 に示した。バンド 1 に相当する分子種を Table.1 に、また、バンド 3 に相当する分種の検索結果を Table.2 に示した。(バンド 2 はペプチドのピークが検出されなかったため、データベースからは信頼しうる情報が得られなかった。)

Table.1 バンド 1 の MALDI TOF-MS 解析結果

Score	Mass (Da)	Description
53	33900	Similar to NEDD4-binding protein 1 (N4BP1)
52	35753	Similar to NEDD4-binding protein 1 (N4BP1)
52	171449	Dual oxidase 2
45	2131	Similar to Nucleolar transcription factor 1
45	16464	Similar to H3 histone, family 3B
45	9127	Glucagons-like peptide-2 receptor
41	65469	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3
40	201258	Similar to absent in melanoma 1
40	57425	Similar to Cytochrome P450 2B2
40	56921	Similar to Cytochrome P450 2B2
40	55897	Cytochrome P450 2B2
39	177227	Similar to chromosome 17 open reading frame 27
39	94495	Similar to cytosolic phospholipase A2 delta
39	92865	Similar to cytosolic phospholipase A2 delta
39	57107	Fibroblast growth factor receptor-like 1
39	222741	Myosin, heavy polypeptide 4, skeletal muscle

Table.2 バンド 3 の MALDI TOF-MS 解析結果

Score	Mass (Da)	Description
45	144981	Similar to transcriptional regulator, SIN3A
39	40854	Guanine nucleotide binding protein, alpha z subunit
38	36817	Similar to testis serine protease 2
33	11991	PHTF1 protein
32	187610	Similar to phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain
32	190793	Similar to phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain
32	253875	Similar to bromodomain and WD repeat domain containing 1
32	269306	Similar to bromodomain and WD repeat domain containing 1
32	15177	c-met/hepatocyte growth factor receptor
32	16484	Similar to proteolipid protein 2
31	97212	Similar to HECT domain containing 3
31	89271	Similar to glypican 5
31	171307	Similar to jumonji domain containing 3
31	172838	Similar to jumonji domain containing 3
30	14292	Similar to otoraplin
30	63978	Paxillin
30	148727	Similar to F-box and leucine-rich repeat protein 10 isoform 3
30	88025	Similar to F-box and leucine-rich repeat protein 10 isoform 2

Table. 1 および Table. 2 に示した MALDI TOF-MS の結果から、68kDa のタンパク質は、スコアは 30 であったが、分子量が一致する Paxillin である可能性が示唆された。Paxillin は PTP-PEST と直接結合するとの報告があるタンパク質であり⁴²⁻⁴⁴⁾、焦点接着に関与することが明らかになっている⁴⁶⁾。しかし、マスト細胞での

役割についての詳細は不明である。そこで、PTP-PEST と Paxillin の抗体を用いた免疫沈降法により、共沈降の確認および Paxillin のリン酸化を解析した (Fig. 8)。

この結果、DACS RBL-2H3 で PTP-PEST 抗体による免疫沈降物中に、Paxillin が検出された。さらに、Fc ϵ R 刺激後に共沈降させると Paxillin 量が増加することも確認された (Fig. 6 レーン 3, 4 Paxillin blot)。一方、Vector RBL-2H3 ではこのような共沈降は見られなかった (Fig. 6 レーン 1, 2 Paxillin blot)。また、Paxillin 抗体による免疫沈降でも、PTP-PEST blot でバンドが検出され、刺激時の共沈降タンパク質量の増加も確認された (Fig. 6 レーン 7, 8 PTP-PEST blot)。このとき、Vector RBL-2H3 では DACS RBL-2H3 と同程度の Paxillin が検出されたにもかかわらず、PTP-PEST 抗体で検出されるバンドは認められなかった (Fig. 7 レーン 5, 6 PTP-PEST blot)。

また、DACS RBL-2H3 の PTP-PEST 抗体による免疫沈降では、Fc ϵ R 刺激時に Paxillin と同じ分子量の位置にチロシンリン酸化タンパク質が検出された (Fig. 7 レーン 4 pY blot)。一方、paxillin 抗体による免疫沈降では Vector RBL-2H3 と DACS RBL-2H3 の両方で Paxillin のチロシンリン酸化が刺激時に確認された。興味深いことに、DACS RBL-2H3 よりも Vector RBL-2H3 の方が Paxillin のチロシンリン酸化は強く検出された (Fig. 7 レーン 6, 8 pY blot)。

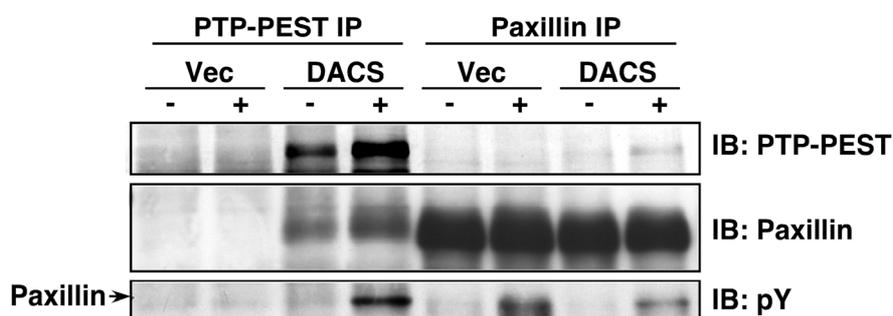


Fig.7 PTP-PEST-DACS の免疫沈降解析

各細胞 (4×10^6 cell) を IgE (100ng/mL) で overnight 感作、その後 DNP-Albumin (20ng/mL) で 15 分間抗原刺激した細胞または無感作・無刺激の細胞の WCL を PTP-PEST 抗体および Paxillin 抗体で免疫沈降し、PTP-PEST、Paxillin、リン酸化チロシン特異抗体を用いた Western blot 法で検出した。

バンド 1 の解析結果は、チロシンリン酸化亢進タンパク質の分子量に近いタンパク質が候補に挙げられたものの (Table. 1)、110kDa 付近にバンドが多数存在し (Fig. 6B)、切り出したバンドに含まれるタンパク質がリン酸化の亢進したタンパク質であるかどうか特定できなかった。そのため、二次元電気泳動の手法を用いて、より精度よくタンパク質の分離を行った。

110kDa リン酸化タンパク質の解析

DACS RBL-2H3 の Fc ϵ R 刺激後の WCL を PTP-PEST 抗体により免疫沈降し、TCA 沈殿法で濃縮後、等電点泳動・

SDS-PAGE による二次元電気泳動を行い、Western blot 法によりチロシンリン酸化タンパク質を検出した (Fig. 8)。

この結果、既に SDS-PAGE のみの泳動像 (Fig. 5A) で確認されていた 110kDa 付近 (pI 6.1 ~ 6.8)、70kDa 付近 (pI 5.0 ~ 5.5) のタンパク質のチロシンリン酸化亢進と、SDS-PAGE のみの泳動像では確認できていなかった 50kDa 付近 (pI 6.0 ~ 6.6) のタンパク質のリン酸化亢進が確認できた。

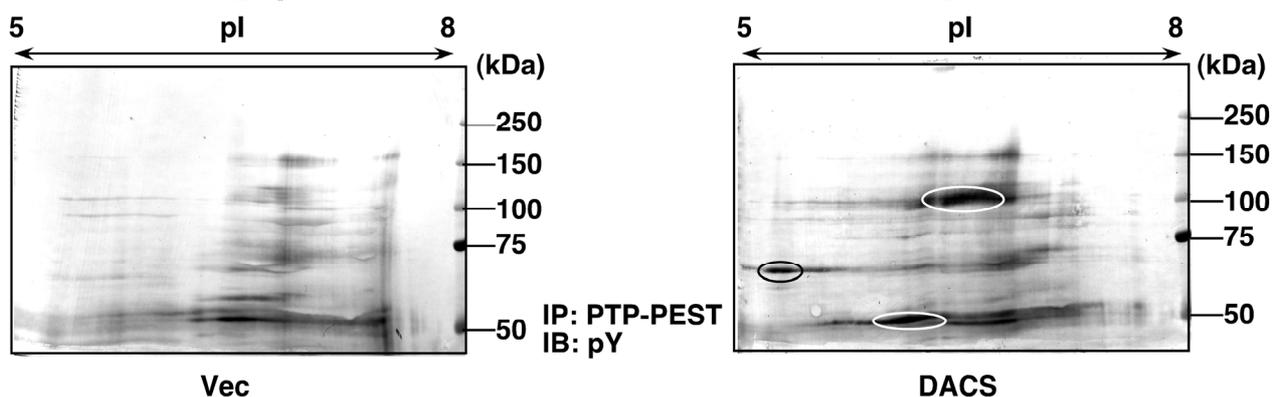


Fig.8 二次元電気泳動による PTP-PEST-DACS に共沈降するリン酸化タンパク質の解析

各細胞 (3.2×10^7 cell) を IgE (100ng/mL) で overnight 感作、その後 DNP-Albumin (20ng/mL) で 15 分間抗原刺激した細胞の lysate を PTP-PEST 抗体で免疫沈降し、二次元電気泳動で展開して、リン酸化チロシン特異抗体を用いた Western blot 法で検出した。

Paxillin の pI は 4.2 ~ 6.7 であるので⁴³⁾、これは 70kDa 付近のチロシンリン酸化亢進タンパク質の pI と一致した。

110kDa 付近のタンパク質に関しては、UniProtKB/Swiss-Prot にて分子量 110 kDa ($\pm 10\%$) ・ pI 6.1 ~ 6.8 の条件で、その候補となるタンパク質を検索した (Table. 3)。

Table.3 110kDa タンパク質の UniProtKB/Swiss-Prot 検索結果

name	Chain	pI	MW (Da)
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10	1-940	6.43	103,187
Rho GTPase-activating protein 2	1-1071	6.21	120,799
Ras GTPase-activating protein 1	1-1038	6.16	115,441
GTPase-activating Rap/Ran-GAP domain-like protein 3	1-1038	6.74	115,437
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	1-959	6.27	106,987
Type I inositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase	1-939	6.65	105,589
他 1514 種類			

検索の結果、1,520 種類のタンパク質が候補に挙がり、その中には MAPKKK (Mitogen-activated protein

kinase kinase kinase)、Rho GAP2 (Rho GTPase-activating protein 2)、Ras GAP1 (Ras GTPase-activating protein 1)、Type I inositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase などの Fc ϵ RI シグナルで重要な役割を果たすシグナル分子が含まれていた。したがって、PTP-PEST の機能解析にあたって、この 110kDa のタンパク質が重要であると考えられる。

5. 考察

マスト細胞のシグナル伝達では、Src Family Kinase^{1-4), 7)}、Syk Family Kinase^{8-11), 30)}、Btk Family Kinase^{17), 18)}等種々チロシンリン酸化酵素 (PTK) が重要な働きをすることが明らかになっている。一方、チロシン脱リン酸化酵素 PTP の役割に関しては未だ不明な点が多い^{2), 5)}。本研究では Fc ϵ R 刺激により mRNA 発現量が増加した PTP-PEST に焦点を絞って、この PTP の機能解析を通じてマスト細胞活性化シグナル伝達機構の解明を目指した。この解析のため、野生型 PTP-PEST (PTP-PEST-WT) または変異型 PTP-PEST (PTP-PEST-DACS) をマスト細胞に遺伝子導入して、それぞれのタンパク質過剰発現細胞の性状を比較解析する実験戦略を選択した。PTP-PEST-DACS は触媒中心に D199A 変異と C231S 変異を含むトラッピング変異体⁵³⁾であり、基質と結合はするが PTP 酵素活性は不活性型となる⁵⁴⁾。遺伝子導入に用いる細胞として、Fc ϵ R シグナルの研究で広く用いられている RBL-2H3 細胞の系を用いた^{9), 20-21), 33)}。RBL-2H3 細胞は、未刺激条件下においても内在性の PTP-PEST がわずかに発現しているが、PTP-PEST-DACS を過剰発現させることにより、競合的に PTP-PEST の常時不活性化する、いわゆるドミナントネガティブ条件での実験を可能にすると考えられた。

RBL-2H3 に導入した PTP-PEST-WT または PTP-PEST-DACS 遺伝子には EGFP を共発現するよう設計を行った。したがって、導入遺伝子の発現は EGFP 蛍光により測定した。また、抗 PTP-PEST 特異抗体を用いたウェスタンブロット法でも確認した。

遺伝子導入に伴う形態変化を観察した結果、PEST RBL-2H3 では細く伸びきった仮足、DACS RBL-2H3 で太く短い仮足が観察された (Fig. 1)。このような形態変化は PTP-PEST が細胞接着分子 Hic-5/paxillin や p130^{Cas} 等と相互作用し、細胞運動に関与するという報告^{41-44), 38-40)}から予想される結果と矛盾しない。しかし、CHOK1 細胞 (ハムスター卵巣細胞) を用いた遺伝子発現系における実際の形態観察によれば、PTP-PEST-WT 遺伝子が導入された細胞で膜状仮足 (lamellipodia) と細胞膜の波打ち (ruffling) の形成不全が生じること、また、同細胞系に PTP-PEST-CS (C231S) 変異体遺伝子を導入すると方向性を欠いた膜状仮足 (lamellipodia) と細胞膜の波打ち (ruffling) 状態が過剰に形成されることが報告されている⁴⁵⁾。また、PTP-PEST をノックアウトした繊維芽細胞では、細胞運動 leading edge が過剰形成されるにも関わらず、tail を収縮できないことという細胞運動に伴う形態的な異常が報告されている⁴⁶⁾。この二つの報告は、PTP-PEST が膜状仮足の形成や細胞運動を抑制していることを示しているが、これは今回得られた我々の RBL-2H3 細胞系での結果とは一致しなかった。このような PTP-PEST 発現に伴う細胞形態へ影響の違いは、PTP-PEST が関与するシグナルへの影響が、RBL-2H3 では CHOK1 細胞や繊維芽細胞と異なり、マスト細胞特異的なものであることを示しているのかもしれない。

Fc ϵ R シグナルへの PTP-PEST の影響を解析するにあたり、まず、今回用いた遺伝子導入操作が Fc ϵ R 発現量への影響していないことを確認した。この結果、少なくとも Fc ϵ RI γ 鎖の発現量はいずれの細胞でも同レ

ベルであり (Fig. 2)、Fc ϵ RI シグナルの発信起点には器質的な差異がないと考えられた。次に、PTP-PEST-WT または PTP-PEST-DACS 過剰発現がマスト細胞の脱顆粒反応に影響をおよぼすか否かを検討した (Fig. 3)。この実験では、Fc ϵ R 刺激から脱顆粒に至るシグナル伝達の流れの中に PTP-PEST の制御ポイントが存在すれば、そのポイントが限定できるように抗原刺激のみならず、Ionomycin と PMA の組み合わせ刺激による脱顆粒レスポンスも同時に比較した。Ionomycin は Fc ϵ R を介さずに、細胞外から細胞内への Ca²⁺の流入を促し、脱顆粒を誘起させる^{54), 55)}。さらに PMA は PKC を直接活性化させることにより、Ionomycin による脱顆粒を増強する働きがあることが報告されている⁵⁵⁾。1% TNE で可溶化した WCL は実験に用いた細胞中の β -Hexosaminidase 総含有量を推計するために用いた。

RBL-2H3 親細胞では、多くの報告にあるように IgE 感作・抗原刺激による β -Hexosaminidase 放出が確認された^{56), 57)}。この、 β -Hexosaminidase 放出は脱顆粒量反応の指標として古くから用いられている。我々もこの系を用いた。この脱顆粒測定計を用いた実験の結果、脱顆粒誘導は親株、今回用いた遺伝子導入細胞実験群細胞のいずれでもほぼ同程度に観察された。これは当初の予想とは異なるものであった。以前の研究で、DACS RBL-2H3 では、Fc ϵ R 刺激による PLC- γ 1/2 のリン酸化減少と Ca²⁺応答減弱が生じることが確認されており、これらのシグナルはいずれも脱顆粒応答に影響を与えているからである。すなわち、一般に受け入れられている脱顆粒誘導シグナルとは、抗原刺激に伴い Fc ϵ RI γ 鎖にリクルートされた Syk により PLC- γ が活性化される。そして、活性化された PLC- γ が PIP2 から PI3 と DAG を生成し、PI3 が細胞内 Ca²⁺濃度を上昇させる⁵⁸⁻⁶⁰⁾。この Ca²⁺濃度の上昇により、PKC が活性化され、脱顆粒が引き起こされるという図式である²⁻⁴⁾。しかし、今回、各細胞実験群で Ionomycin + PMA 刺激、Ionomycin 単独刺激、WCL の吸光度をそれぞれ 100%放出量とした抗原刺激時の β -Hexosaminidase の放出量 (% release) を測定した結果、いずれの場合にも、抗原刺激での β -Hexosaminidase 放出量に、RBL-2H3 親細胞と Vector RBL-2H3、PTP-PEST RBL-2H3、DACS RBL-2H3 の間で有意差が認められなかった (Fig. 1B, C, D)。

以上の結果を総合して考察すると、DACS RBL-2H3 での Ca²⁺応答減弱は Ca²⁺濃度の上昇を完全に抑制していた訳ではないので、PTP-PEST-DACS による Ca²⁺応答減弱は最終的な脱顆粒誘導に関して有意な差を与えないレベルでの影響しかなかったため、このような結果になったものと考えられた。

これらの実験結果より、PTP-PEST-WT あるいは PTP-PEST-DACS 導入が脱顆粒反応に与える影響は、ほとんど誤差の範囲内であり、PTP-PEST 活性が最終的な脱顆粒誘導に及ぼす役割は低い事が示唆されよう。ただし、脱顆粒測定系は決して標準誤差の少ないアッセイ系とは言えないので、厳密なデータ解釈には異なる指標を用いた実験系による補強が必要である。実際、PEST RBL-2H3、DACS RBL-2H3 では Iono + PMA 刺激または Ionomycin 単独刺激による β -Hexosaminidase 放出量が RBL-2H3 親細胞よりも増加している測定値を示した (Fig. 3A)。この結果は、各細胞の細胞増殖速度が異なるため、一晚 IgE 感作を行う間に細胞数に差異が生じたことに起因するかもしれない。しかし、各細胞間で細胞数に差異が生じたとしても、各細胞での Iono + PMA 刺激および Ionomycin 単独刺激、WCL の吸光度をそれぞれ 100%放出量とした抗原刺激時の β -Hexosaminidase の放出量 (% release) で、脱顆粒量を比較検討した結果には有意差がないため (Fig. 1B, C, D)、最終的な結論としては、やはり、PTP-PEST は脱顆粒誘導シグナルへの関与は低いと考えられる。

一方、Fc ϵ レセプターにより誘起される TNF- α 産生誘導は、PTP-PEST の変異体導入により、有意に遅延す

ることが示された (Fig. 4)。この効果が MAP Kinases 活性を標的としているものであるか否かを解析した。この結果、DACS RBL-2H3 において ERK1/2、JNK、p38 各分子のリン酸化は Vector RBL-2H3 と比べて、初期に減少、後期に増強という興味深いパターンを示すことが明らかとなった (Fig. 5)。MAP Kinases は真核細胞に普遍的に存在するセリン/スレオニンキナーゼで、様々な外界刺激を伝達する重要なシグナル分子の一つである⁶¹⁻⁶³⁾。哺乳類においては、ERK1/2、ERK5、JNK、p38 の4つのファミリーが存在し、それぞれが独立したキナーゼカスケードを形成している^{64)、65)}。ERK1/2、ERK5 は細胞増殖、細胞分化、遺伝子発現などに関与し、JNK、p38 はアポトーシス、細胞分化、遺伝子発現などに関与するとされている⁵⁹⁾。特にマスト細胞において Fc ϵ RI 刺激による MAP Kinases の活性化は炎症性サイトカイン生産に重要であると報告されている^{66)、67)}。ただし、MAP Kinases 活性化の制御とサイトカイン生産との関係は単純ではない。MEK1 抑制剤 PD098059 を用いた MEK1-ERK1/2 経路の抑制と p38 抑制剤 SKF86002 を用いた p38 経路抑制はマウスのマスト細胞株 MC9 における TNF- α 産生に影響を与えなかったという報告がある⁶⁸⁾。この一方で、TNF- α プロモーター活性は MEKK2-MEK5-ERK5 経路および MEKK2-MKK7-JNK 経路によって制御されているとの報告もあり^{69)、70)}、両グループの実験結果の違いは、明快な結論に至っていない。我々の以前の研究では、DACS RBL-2H3 における ERK5 のリン酸化は Vector RBL-2H3 と比較して有意差は認められなかった。これらの情報を総合すると、我々の実験系において、PTP-PEST-DACS は JNK のリン酸化を遅延させることにより、TNF- α mRNA 産生量を低下させたという可能性が考えられる。このような PTP-PEST-DACS による TNF- α mRNA の転写過程制御への影響を考えるのがシンプルであるが、まだ、他の可能性も残っている。転写後の mRNA の安定性と翻訳のメカニズムに PTP-PEST が関与するという可能性もあるからである。実際、活性化 ERK1/2 と活性化 p38 が TNF- α mRNA の安定性を制御する Tristetraprolin を抑制することにより、TNF- α mRNA の転写後分解が抑制されるという 2008 年の報告⁷¹⁾ から、PTP-PEST-DACS の ERK1/2、p38 リン酸化抑制により、合成された TNF- α mRNA の転写後分解が進んだ可能性も否めない。いずれの可能性についても、現段階では推定の域を出ないが、このポイントを検証するためには、TNF- α プロモーターのリポーターアッセイ、Tristetraprolin 量の検討などいっそうの解析が必要である。

Ca²⁺シグナルが脱顆粒に影響を与えることについては、多くの報告がある^{4-6)、72)}。ただし、量的な関係においては、必ずしも Ca²⁺応答が脱顆粒を引き起こす訳ではないことを示す報告もあり、こちらも単純ではない。この報告では、Vav-1 欠損マウスの骨髄由来マスト細胞 (BMMCs) で、PLC- γ 1/2 のリン酸化抑制と Ca²⁺応答減弱が確認されたにもかかわらず、脱顆粒にはほぼ影響を与えずに、IL-2 と IFN- γ の遺伝子発現を選択的に抑制したという⁷³⁾。一方、Ca²⁺シグナルの下流に位置する PKC は JNK の活性を制御しているとの報告もあり^{67)、74)}、脱顆粒のみならず、より後期の反応にも初期の Ca²⁺シグナルは関与している。このような背景から考えると、今回我々が用いた実験系では、PTP-PEST-DACS による Ca²⁺応答減弱が、脱顆粒への影響を最小限にしている一方で TNF- α mRNA 産生量の減少と MAP Kinases リン酸化抑制には十分関与しているのかもしれない。この仮説を検証するためには、Ca²⁺応答を厳密にコントロールできる実験系を設定して、対応する脱顆粒量と TNF- α 量をモニターすることが必要であろう。

Fc ϵ RI シグナルにおいて PTP-PEST と相互作用する分子の探索のため、トラッピングミュータントである PTP-PEST-DACS による基質トラッピング解析を行った。Fc ϵ R 刺激時の WCL (総溶解液) 中より PTP-PEST 抗体

でリン酸化チロシンタンパク質を免疫沈降し、解析した結果、Vector RBL-2H3 と比較して、DACS RBL-2H3 で 110kDa、106kDa、68kDa のチロシンリン酸化タンパク質の共沈が認められた (Fig. 5A)。これら共沈したタンパク質を MALDI TOF-MS にて解析した結果、68kDa のタンパク質は Paxillin であることが示唆された (Table. 2)。Paxillin は N-末端に 5 つの LD (leucine-aspartate repeat) モチーフ、C-末端に 4 つの LIM (Lin-11 Isl-1 and Mec-3) ドメインを持つアダプタータンパク質で^{42-43), 75-76)}、actopaxin、ILK (integrin linked kinase)、FAK (focal adhesion kinase)、PKL (paxillin kinase linker)、vinculin、tubulin などの焦点接着関連タンパク質や Pyk2、Src、Crk などのシグナルタンパク質と相互作用することが知られている^{77), 78)}。既に、PTP-PEST とは LIM ドメインでの直接結合が報告されており^{42-43), 77)}、Paxillin の LIM ドメイン変異により PTP-PEST との結合を阻害すると、細胞接着と運動性の低下を示すことが明らかとなっている^{77), 79)}。このように、Paxillin との結合は PTP-PEST の細胞運動シグナル制御に重要である⁸⁰⁾。しかし、PTP-PEST と Paxillin との相互作用がもたらすマスト細胞での役割は未だ不明である。

PTP-PEST 抗体および Paxillin 抗体を用いた免疫沈降により、DACS RBL-2H3 での PTP-PEST と Paxillin の共沈降が確認された。さらに、Fc ϵ R 刺激でそれぞれの共沈降タンパク質量が増加すること、および抗 pY 抗体による検出結果より、Fc ϵ R 刺激によって Paxillin のチロシンリン酸化も亢進することが確認された。興味深いことに、抗 paxillin 抗体による免疫沈降では、Vector コントロールと比較して、DACS 導入 RBL-2H3 では Fc ϵ R 刺激による Paxillin のチロシンリン酸化は減弱していた (Fig. 7)。PTP-PEST が Paxillin を直接脱リン酸化する可能性があるとの報告はある⁸¹⁾が、DACS RBL-2H3 に遺伝子導入した PTP-PEST-DACS は酵素活性を不活性にした変異体である。よって、PTP-PEST-DACS 発現が Paxillin よりも上流のシグナルの制御に影響を与えたため、DACS RBL-2H3 の Fc ϵ R 刺激での Paxillin のチロシンリン酸化の減弱が起こったものと考えられる。

これらの結果から、Fc ϵ R 刺激によるシグナルで、Paxillin のチロシンリン酸化と、PTP-PEST - Paxillin 複合体形成が誘導される可能性が示された。また、Fc ϵ R 刺激によるシグナルでの Paxillin チロシンリン酸化制御に PTP-PEST が関与していることが示された。Paxillin は多くのシグナル分子の足場タンパク質として働いており、PTP-PEST - Paxillin 複合体形成により、効率的な Fc ϵ R シグナル伝達に貢献していることが示唆された。また、PTP-PEST が直接 Paxillin のチロシンリン酸化の制御を行っているか否かは、今回の実験結果からは考察することしかできないが、Paxillin のチロシンリン酸化制御に PTP-PEST が関与することにより、paxillin と他のシグナル分子との複合体形成を PTP-PEST が制御している可能性が示唆されたものと考えている。

110kDa のチロシンリン酸化亢進タンパク質解析では、二次元電気泳動を用いて、詳細にタンパク質の分離を行った。この結果、既にプロファイリングされていた 110kDa 付近 (pI 6.1 ~ 6.8)、70kDa 付近 (pI 5.0 ~ 5.5) のタンパク質のチロシンリン酸化亢進と、新たに 50kDa 付近 (pI 6.0 ~ 6.6) のタンパク質のリン酸化亢進をウェスタンブロッティングにより確認することができた。

110kDa のタンパク質に関して UniProtKB/Swiss-Prot で検索した結果、1,520 種類のタンパク質が候補に挙がり、その中には MAPKKK (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase)、RhoGAP2 (Rho GTPase-activating protein 2)、RasGAP1 (Ras GTPase-activating protein 1)、Type I

inositol-3,4-bisphosphate 4-phosphatase などのシグナル分子が含まれていた (Table. 3)。

MAPKKK は MAP Kinases カスケードの上流で MAPKK のリン酸化を制御しているタンパク質である。Rho GAP family は細胞骨格を制御しており、Rho GAP family の p190RhoGAP は PTP-PEST と直接結合し、脱リン酸化されることが報告されている⁴⁶⁾。p120RasGAP は、PTP-PEST と直接結合する Pyk2⁵¹⁾ と複合体を形成することが報告されている⁸²⁾。

これら Fc ϵ RI シグナルで重要な役割を果たすシグナル分子、あるいはこれに類するシグナル分子と PTP-PEST が相互作用することにより、MAP Kinases のリン酸化や TNF- α mRNA 産生制御に関与することが推察される。110 kDa の分子種は、今回は同定するには至らなかったが、本研究により、その分子性状の一部を明らかとなった。これにより、Fc ϵ RI シグナルにおける PTP-PEST のさらなる機能解明につながる鍵分子として注目されるであろう。

以上より、本研究により、PTP-PEST のマスト細胞のサイトカイン産生制御への関与とそのメカニズムを担う分子種の情報を明らかにすることができた。今後、これらの情報を基に解析を進めることで炎症性サイトカインの産生制御に応用できるものと考えられる。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、東京都神経科学総合研究所・矢倉英隆参事研究員には、貴重なサンプルと研究データを共有させていただきました。また、本学医学部生物学教室の荒舘忠助教に数々の適切な御指導と御助言を賜りました。そして、本学医学部免疫学教室の村口篤教授と同教室の皆様は、学術・物資の両面で多くの御援助をいただきました。加えて、本研究で用いた質量分析装置などの大型研究機器につきましては、使用にあたり恒田則子先生をはじめとする富山大学生命科学先端研究センターの皆様にお世話になりました。ご協力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. Paolini, R., Jouvin, M. H., Kinet, J. P. (1991) Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature* 353: 855-858.
2. Rivera J, Olivera A. (2008) A current understanding of Fc ϵ s RI-dependent mast cell activation. *Curr Allergy Asthma Rep.* 8(1):14-20.
3. Gilfillan AM, Rivera J. (2009) The tyrosine kinase network regulating mast cell activation. *Immunol Rev.* 228(1):149-169
4. Rivera J, Olivera A. (2007) Src family kinases and lipid mediators in control of allergic inflammation. *Immunol Rev.* 17:255-68.

5. Kambayashi T, Koretzky GA. (2007) Proximal signaling events in FcεRI-mediated mast cell activation.
J Allergy Clin Immunol. Mar;119(3):544-52
6. Kawakami, T., Galli, S. J. (2002) Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE.
Nat. Rev. Immunol. 2: 773-786.
7. Yamashita, T., Mao, S. Y., Metzger, H. (1994) Aggregation of the high-affinity IgE receptor and enhanced activity of p53/56 lyn protein-tyrosine kinase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11251-11255.
8. Jouvin, M. H., Adamczewski, M., Numerof, R., Letourneur, O., Valle, A., Kinet, J. P. (1994) Differential control of the tyrosine kinases Lyn and Syk by the two signaling chains of the high affinity immunoglobulin E receptor.
J. Biol. Chem. 269: 5918-5925.
9. Hutchcroft, J. E., Geahlen, R. L., Deanin, G. G., Oliver, J. M. (1992) FcεRI-mediated tyrosine phosphorylation and activation of the 72-kDa protein-tyrosine kinase, PTK72, in RBL-2H3 rat tumor mast cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9107-9111.
10. Benhamou, M., Ryba, N. J., Kihara, H., Nishikata, H., Siraganian, R. P. (1993) Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signaling. Identification as a component of pp72 and association with the receptor g chain after receptor aggregation.
J. Biol. Chem. 268: 23318-23324.
11. Costello, P. S., Turner, M., Walters, A. E., Cunningham, C. N., Bauer, P. H., Downward, J., Tybulewicz, V. L. (1996) Critical role for the tyrosine kinase Syk in signalling through the high affinity IgE receptor of mast cells.
Oncogene 13: 2595-2605.
12. Saitoh, S., Arudchandran, R., Manetz, T. S., Zhang, W., Sommers, C. L., Love, P. E., Rivera, J., Samelson, L. E. (2000) LAT is essential for FcεRI-mediated mast cell activation.
Immunity 12: 525-533.
13. Zhu, M., Liu, Y., Koonpaew, S., Granillo, O., Zhang, W. (2004) Positive and negative regulation of FcεRI-mediated signaling by the adaptor protein LAB/NTAL.
J. Exp. Med. 200: 991-1000.
14. Volna, P., Lebduska, P., Draberova, L., Simova, S., Heneberg, P., Boubelik, M., Bugajev, V., Malissen, B., Wilson, B. S., Horejsi, V., Malissen, M., Draber, P. (2004) Negative regulation of mast cell signaling and function by the adaptor LAB/NTAL.
J. Exp. Med. 200: 1001-1013.
15. Teramoto, H., Salem, P., Robbins, K. C., Bustelo, X. R., Gutkind, J. S. (1997) Tyrosine phosphorylation of the vav proto-oncogene product links FcεRI to the Rac1-JNK pathway.
J. Biol. Chem. 272: 10751-10755.
16. Hendricks-Taylor, L. R., Motto, D. G., Zhang, J., Siraganian, R. P., Koretzky, G. A. (1997) SLP-76 is a substrate of the high affinity IgE receptor-stimulated protein tyrosine kinases in rat basophilic leukemia cells.
J. Biol. Chem. 272: 1363-1367.
17. Kawakami, Y., Yao, L., Miura, T., Tsukada, S., Witte, O. N., Kawakami, T. (1994) Tyrosine phosphorylation and activation of

- Bruton tyrosine kinase upon FcεRI cross-linking.
Mol. Cell. Biol. 14: 5108-5113.
18. Hata, D., Kawakami, Y., Inagaki, N., Lantz, C. S., Kitamura, T., Khan, W. N., Maeda-Yamamoto, M., Miura, T., Han, W., Hartman, S. E., Yao, L., Nagai, H., Goldfeld, A. E., Alt, F. W., Galli, S. J., Witte, O. N., Kawakami, T. (1998) Involvement of Bruton's tyrosine kinase in FcεRI-dependent mast cell degranulation and cytokine production.
J. Exp. Med. 187: 1235-1247.
 19. Park, D. J., Min, H. K., Rhee, S. G. (1991) IgE-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C-g1 in rat basophilic leukemia cells.
J. Biol. Chem. 266: 24237-24240.
 20. Li, W., Deanin, G. G., Margolis, B., Schlessinger, J., Oliver, J. M. (1992) FcεR1-mediated tyrosine phosphorylation of multiple proteins, including phospholipase Cg1 and the receptor b₂ complex, in RBL-2H3 rat basophilic leukemia cells.
Mol. Cell. Biol. 12: 3176-3182.
 21. Santini, F. Beaven, M. A. (1993) Tyrosine phosphorylation of a mitogen-activated protein kinase-like protein occurs at a late step in exocytosis. Studies with tyrosine phosphatase inhibitors and various secretagogues in rat RBL-2H3 cells.
J. Biol. Chem. 268: 22716-22722.
 22. Fukamachi, H., Takei, M., Kawakami, T. (1993) Activation of multiple protein kinases including a MAP kinase upon FcεRI cross-linking.
Int. Arch. Allergy Immunol. 102: 15-25.
 23. Offermanns, S., Jones, S. V., Bombien, E., Schultz, G. (1994) Stimulation of mitogen-activated protein kinase activity by different secretory stimuli in rat basophilic leukemia cells.
J. Immunol. 152:250-261.
 24. Katagiri T, Ogimoto M, Hasegawa K, Ariuma Y, Mitomo K, Okada M, Clark MR, Mizuno K & Yakura H. (1999) CD45 negatively regulates Lyn activity by dephosphorylating both positive and negative regulatory tyrosine residues in immature B cells.
J. Immunol.163;1321-1326
 25. Shrivastava P, Katagiri T, Ogimoto M, Mizuno K & Yakura H. (2003) Dynamic regulation of Src-family kinases by CD45 in B cells.
Blood. 103; 1425-1432
 26. Ooshima K & Katagiri T. (2009) Differential Regulation of Lyn in FcεRI Raft or BCR Raft,
J Liberal arts and Sci (Univ of TOYAMA). 37: 1-13.
 27. Mizuno K, Yakura H. (2005) Regulation of the immune system by protein tyrosine phosphatases.
Seikagaku. 77(10):1281-1290
 28. Hook, W. A., Berenstein, E. H., Zinsser, F. U., Fischler, C., Siraganian, R. P. (1991) Monoclonal antibodies to the leukocyte common antigen (CD45) inhibit IgE-mediated histamine release from human basophils.
J. Immunol. 147: 2670-2676.

29. Berger, S. A., Mak, T. W., Paige, C. J. (1994) Leukocyte common antigen (CD45) is required for immunoglobulin E-mediated degranulation of mast cells.
J. Exp. Med. 180: 471-476.
30. Zhang, J. and Siraganian, R. P. (1999) CD45 is essential for FcεRI signaling by ZAP70, but not Syk, in Syk-negative mast cells.
J. Immunol. 163: 2508-2516.
31. Murakami, K., Sato, S., Nagasawa, S., and Yamashita, T. (2000) Regulation of mast cell signaling through high-affinity IgE receptor by CD45 protein tyrosine phosphatase.
Int. Immunol. 12: 169-176.
32. Xie, Z. H., Zhang, J., Siraganian, R. P. (2000) Positive regulation of c-Jun N-terminal kinase and TNF-α production but not histamine release by SHP-1 in RBL-2H3 mast cells.
J. Immunol. 164: 1521-1528.
33. Akimoto M, Mishra K, Lim KT, Tani N, Hisanaga SI, Katagiri T, Elson A, Mizuno K, Yakura H. (2009) Protein tyrosine phosphatase epsilon is a negative regulator of FcεRI-mediated mast cell responses.
Scand. J. Immunol. 69(5):401-411.
34. Yang, Q., Co, D., Sommercorn, J., Tonks, NK. (1993) Cloning and expression of PTP-PEST. A novel, human, nontransmembrane protein tyrosine phosphatase.
J. Biol. Chem. 268(9): 6622-6628.
35. Habib, T., Herrera, R., Decker, S. J. (1994) Activators of protein kinase C stimulate association of Shc and the PEST tyrosine phosphatase.
J. Biol. Chem. 269: 25243-25246.
36. Charest, A., Wagner, J., Muise, E. S., Heng, H. H., Tremblay, M. L. (1995) Structure of the murine MPTP-PEST gene: genomic organization and chromosomal mapping.
Genomics 28: 501-507.
37. Charest, A., Wagner, J., Jacob, S., McGlade, C. J., Tremblay, M. L. (1996) Phosphotyrosine-independent binding of SHC to the NPLH sequence of murine protein-tyrosine phosphatase-PEST. Evidence for extended phosphotyrosine binding/phosphotyrosine interaction domain recognition specificity.
J. Biol. Chem. 271: 8424-8429.
38. Garton, A. J., Flint, A. J., Tonks, N. K. (1996) Identification of p130^{cas} as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST.
Mol. Cell. Biol. 16: 6408-6418.
39. Garton, A. J., Burnham, M. R., Bouton, A. H., Tonks, N. K. (1997) Association of PTP-PEST with the SH3 domain of p130^{cas}; a novel mechanism of protein tyrosine phosphatase substrate recognition.
Oncogene 15: 877-885.
40. Lin Y, Ceacareanu AC, Hassid A. (2003) Nitric oxide-induced inhibition of aortic smooth muscle cell motility: role of PTP-PEST and adaptor proteins p130cas and Crk.

- Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 285(2): 710-721.
41. Nishiya, N., Iwabuchi, Y., Shibamura, M., Cote, J. F., Tremblay, M. L., Nose, K. (1999) Hic-5, a paxillin homologue, binds to the protein-tyrosine phosphatase PEST (PTP-PEST) through its LIM 3 domain.
J. Biol. Chem. 274: 9847-9853.
 42. Shen, Y., Schneider, G., Cloutier, J. F., Veillette, A., Schaller, M. D. (1998) Direct association of protein-tyrosine phosphatase PTP-PEST with paxillin.
J. Biol. Chem. 273: 6474-6481.
 43. Turner, C. E. (2000) Paxillin interactions.
J. Cell Sci. 113: 4139-4140.
 44. Diagne, I., Hall, S.M., Kogaki, S., Kielty, S.M., Haworth, S. G. (2003) Paxillin-associated focal adhesion involvement in perinatal pulmonary arterial remodelling.
Matrix Biol. 22(2): 193-205.
 45. Angers-Loustau, A., Côté, J.F., Charest, A., Dowbenko, D., Spencer, S., Lasky, L. A., Tremblay, M. L. (1999) Protein Tyrosine Phosphatase-PEST Regulates Focal Adhesion Disassembly, Migration, and Cytokinesis in Fibroblasts.
J. Cell. Biol. 144(5): 1019-1031.
 46. Sastry, S. K., Rajfur, Z., Liu, B. P., Cote, J. F., Tremblay, M. L., Burrridge, K. (2006) PTP-PEST Couples Membrane Protrusion and Tail Retraction via VAV2 and p190 Rho GAP.
J. Biol. Chem. 281(17): 11627-11636.
 47. Davidson, D., Cloutier, J. F., Gregorieff, A., Veillette, A. (1997) Inhibitory tyrosine protein kinase p50^{csk} is associated with protein- tyrosine phosphatase PTP-PEST in hemopoietic and non-hemopoietic cells.
J. Biol. Chem. 272: 23455-23462.
 48. Garton, A. J., Tonks, N.K. (1999) Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST.
J. Biol. Chem. 274(6): 3811-3818.
 49. Davidson, D., Veillette, A. (2001) PTP-PEST, a scaffold protein tyrosine phosphatase, negatively regulates lymphocyte activation by targeting a unique set of substrates.
EMBO J. 20: 3414-3426.
 50. Veillette A, Rhee I, Souza CM, Davidson D. (2009) PEST family phosphatases in immunity, autoimmunity, and autoinflammatory disorders.
Immunol Rev. 228(1):288-311.
 51. Davidson D, Shi X, Zhong MC, Rhee I, Veillette A. (2010) The phosphatase PTP-PEST promotes secondary T cell responses by dephosphorylating the protein tyrosine kinase Pyk2.
Immunity. 27;33(2):167-80.
 52. Hide I, Toriu N, Nuibe T, Inoue A, Hide M, Yamamoto S, Nakata Y. (1997) Suppression of TNF-alpha secretion by azelastine in a rat mast (RBL-2H3) cell line: evidence for differential regulation of TNF-alpha release, transcription, and degranulation.
J Immunol. 15;159(6):2932-40.

53. Tiganis, T., Bennett, A. M. (2007) Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective.
Biochem. J. 15; 402(1): 1-15.
54. Smolewski, P., Grabarek, J., Halicka, H.D., Darzynkiewicz, Z. (2002) Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis.
J. Immunol Methods 265(1-2): 111-121.
55. Bankers-Fulbright, J. L., Kephart, G. M., Bartemes, K. R., Kita, H., O'Grady, S. M. (2004) Platelet-activating factor stimulates cytoplasmic alkalization and granule acidification in human eosinophils.
J. Cell Sci. 117: 5749-5757.
56. Djouder, N., Schmidt, G., Frings, M., Cavalié, A., Thelen, M., Aktories, K. (2001) Rac and phosphatidylinositol 3-kinase regulate the protein kinase B in FcεRI signaling in RBL 2H3 mast cells.
J. Immunol. 166(3): 1627-1634.
57. Ishiwara, M., Aoki, Y., Takagaki, H., Ui, M., Okajima, F. (2003) TA-270 [4-hydroxy-1-methyl-3-octyloxy-7-sinapoylamino-2(1H)-quinolinone], an anti-asthmatic agent, inhibits leukotriene production induced by IgE receptor stimulation in RBL-2H3 cells.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 307(2): 583-588.
58. Rivera, J., Cordero, J.R., Furumoto, Y., Luciano-Montalvo, C., Gonzalez-Espinosa, C., Kovarova, M., Odom, S., Parravicini, V. (2001) Macromolecular protein signaling complexes and mast cell responses: a view of the organization of IgE-dependent mast cell signaling
Molecular Immunol. 38: 1253–1258.
59. Yamasaki S, Saito T. (2008) Progress in allergy signal research on mast cells: signal regulation of multiple mast cell responses through FcεRI.
J Pharmacol Sci. 106(3):336-40.
60. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. (2000) Cellular And Molecular Immunology/Fourth Edition.
 pp. 425-444 W.B. Sanders Company
61. Nishida, E., Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways.
Trends Biochem. Sci. 18(4): 128-131.
62. Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. (1995) How MAP kinases are regulated.
J. Biol. Chem. 270(25): 14843-14846.
63. Pelaia, G., Cuda, G., Vatrella, A., Gallelli, L., Caraglia, M., Marra, M., Abbruzzese, A., Caputi, M., Maselli, R., Costanzo, F. S., Marsico, S. A. (2005) Mitogen-Activated Protein Kinases and Asthma.
J. Cell. Physiol. 202:642–653.
64. Weston. C.R., Davis. R. J. (2007) The JNK signal transduction pathway.
Curr. Opin. Cell Biol. 19(2):142-9
65. Schaeffer, H. J., Weber, M. J. (1999) Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers.
Mol. Cell. Biol. 19(4): 2435-2444.

66. Zhang, C., Baumgartner, R. A., Yamada, K., Beaven, M. A. (1997) Mitogen-activated protein (MAP) kinase regulates production of tumor necrosis factor- α and release of arachidonic acid in mast cells. Indications of communication between p38 and p42 MAP kinases.
J. Biol. Chem. 272: 13397-13402.
67. Kawakami, Y., Hartman, S. E., Holland, P. M., Cooper, J. A., Kawakami, T. (1998) Multiple signaling pathways for the activation of JNK in mast cells: involvement of Bruton's tyrosine kinase, protein kinase C, and JNK kinases, SEK1 and MKK7.
J. Immunol. 161:1795-1802.
68. Ishizuka, T., N. Terada, P. Gerwins, E. Hamelmann, A. Oshiba, G. R. Fanger, G. L. Johnson, E. W. Gelfand. (1997) Mast cell tumor necrosis factor production is regulated by MEK kinases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6358-6363.
69. Chayama, K., Papst, P. J., Garrington, T. P., Pratt, J. C., Ishizuka, T., Webb, S., Ganiatsas, S., Zon, L. I., Sun, W., Johnson, G. L., Gelfand, E. W. (2001) Role of MEKK2-MEK5 in the regulation of TNF- α gene expression and MEKK2-MKK7 in the activation of c-Jun N-terminal kinase in mast cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:4599-4604.
70. Garrington, T. P., Ishizuka, T., Papst, P. J., Chayama, K., Webb, S., Yujiri, T., Sun, W., Sather, S., Russell, D. M., Gibson, S. B., Keller, G., Gelfand, E. W., Johnson, G. L. (2000) MEKK2 gene disruption causes loss of cytokine production in response to IgE and c-Kit ligand stimulation of ES cell-derived mast cells.
EMBO J. 19: 5387-5395.
71. Deleault, K.M., Skinner, S.J., Brooks, S. A. (2008) Tristetraprolin regulates TNF TNF- α mRNA stability via a proteasome dependent mechanism involving the combined action of the ERK and p38 pathways.
Mol. Immunol. 45(1): 13-24.
72. Kato, N., Nakanishi, M., Hirashima, N. (2006) Flotillin-1 regulates IgE receptor-mediated signaling in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells.
J. Immunol. 177(1): 147-154.
73. Manetz, T. S., Gonzalez-Espinosa, C., Arudchandran, R., Xirasagar, S., Tybulewicz, V., Rivera, J. (2001) Vav1 regulates phospholipase C γ activation and calcium responses in mast cells.
Mol. Cell. Biol. 21: 3763-3774.
74. Ishizuka, T., Chayama, K., Takeda, K., Hamelmann, E., Terada, N., Keller, G. M., Johnson, G.L., Gelfand, E. W. (1999) Mitogen-activated protein kinase activation through Fc ϵ s1 receptor I and stem cell factor receptor is differentially regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and calcineurin in mouse bone marrow-derived mast cells.
J. Immunol. 162(4): 2087-2094.
75. Michael C. Brown, M. C., Turner, C. E. (2004) Paxillin: Adapting to Change.
Physiol. Rev. 84: 1315-1339.
76. Playford M. P., Schaller M. D. (2004) The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology.
Oncogene. 23(48): 7928-7946.

77. Brown, M. C., Turner, C. E. (2002) Roles for the tubulin- and PTP-PEST-binding paxillin LIM domains in cell adhesion and motility.
Int. J. Biochem. Cell Biol. 34(7): 855-863.
78. Gleitsmann, G., Zellne, R., Turner, C. E. (1998) Molecules in focus Paxillin
Int. J. Biochem. Cell Biol. 30(9): 955-959.
79. Cote, J. F., Turner, C. E., Tremblay, M. L. (1999) Intact LIM 3 and LIM 4 domains of paxillin are required for the association to a novel polyproline region (Pro 2) of protein-tyrosine phosphatase-PEST.
J. Biol. Chem. 274: 20550–20560.
80. Jamieson, J. S., Tumbarello, D. A., Hallé, M., Brown, M. C., Tremblay, M. L., Turner, C. E. (2005) Paxillin is essential for PTP-PEST-dependent regulation of cell spreading and motility: a role for paxillin kinase linker.
J. Cell Sci. 118(24): 5835-5847.
81. Shen, Y., Lyons, P., Cooley, M., Davidson, D., Veillette, A., Salgia, R., Griffin, J. D., Schaller, M. D. (2000) The noncatalytic domain of protein-tyrosine phosphatase-PEST targets paxillin for dephosphorylation *in vivo*.
J. Biol. Chem. 275: 1405–1413.
82. Shiota, M., Tanihiro, T., Nakagawa, Y., Aoki, N., Ishida, N., Miyazaki, K., Ullrich, A., Miyazaki, H. (2003) Protein Tyrosine Phosphatase PTP20 Induces Actin Cytoskeleton Reorganization by Dephosphorylating p190 RhoGAP in Rat Ovarian Granulosa Cells Stimulated with Follicle-Stimulating Hormone.
Mol. Endocrinol. 17 (4): 534-549.

鈴木望美

医療法人真木会真木病院

片桐達雄

富山大学大学院医学薬学研究部 薬学系 生物学