

マスト細胞依存的なアレルギー応答におけるアダプター分子 Gab2 の役割

西田 圭吾

Role of Adaptor Molecule Gab2 in Mast Cell-mediated Allergy Response

Keigo Nishida

Laboratory for Cytokine Signaling, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology;
1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230-0045, Japan.

(Received July 29, 2012)

Mast cells are major players in allergic responses. IgE-dependent activation through Fc epsilon RI leads to degranulation and cytokine production, both of which require Gab2. To clarify how the signals diverge at Gab2, we established Gab2 knock-in mice that express Gab2 mutated at either the PI-3K- or SHP-2-binding sites. Examination of these mutants showed that both binding sites were required for the degranulation and anaphylaxis response, but not for cytokine production or contact hypersensitivity. Furthermore, the PI-3K- but not the SHP-2-binding site was important for granule translocation during degranulation. We also identified a small GTPase, ARF1, as the downstream target of PI-3K that regulates granule translocation. Fc epsilon RI-stimulation induced ARF1 activation, and this response was dependent on Fyn and the PI-3K-binding site of Gab2. ARF1 activity was required for the Fc epsilon RI-mediated granule translocation. These results indicate that Fyn/Gab2/PI-3K/ARF1-mediated signaling is specifically involved in granule translocation and the anaphylaxis response. In this review, I discussed how Gab2 controls biological events especially for mast cell degranulation and allergy response.

Key words—mast cell; degranulation; anaphylaxis; Gab2; signal transduction

1. はじめに

骨髄由来の顆粒細胞であるマスト細胞は、全身の皮下組織及び粘膜に幅広く分布し、感染防御の役割を担う免疫担当細胞であることが知られている。¹⁾ マスト細胞の細胞膜上に発現している高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) が抗原により架橋されることによりマスト細胞は活性化し、ヒスタミン、セロトニン、種々のプロテアーゼなどを細胞外に放出する脱顆粒反応や、炎症性サイトカインの産生を行う。この活性化は感染防御に役割を果たす一方で、花粉症、喘息、アトピー性皮膚炎などの原因にもなることから、^{2,3)} マスト細胞の活性化機構を明らかにすることが重要である。

脱顆粒反応の最終的なステップは細胞膜と顆粒膜

の融合であり、刺激のない定常状態においては内容物が自然に放出されることがないように厳密に制御されている。⁴⁾ 膜融合は、細胞膜や顆粒膜などの膜上にそれぞれに発現している SNARE タンパク質の複合体形成を介して起こる現象であり、⁵⁾ この機構はマスト細胞にも保存されていることが示されている。⁶⁻⁸⁾ SNARE タンパク質の複合体形成がカルシウム要求性であることから、マスト細胞の脱顆粒反応においても、FcεRI を介したカルシウム制御の分子機構に関する多くの報告がなされてきた。^{9,10)} このカルシウム制御機構に加えて、筆者は顆粒の細胞内移行も脱顆粒反応に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。¹¹⁾ 本総説ではマスト細胞における筆者が見出した顆粒移行と脱顆粒の分子機構について紹介する。

2. FcεRI 依存的なマスト細胞の活性化と顆粒移行

FcεRI を介したマスト細胞の活性化は、時系列の視点から半時間程度で完遂する即時型の脱顆粒反応と数時間後に起こる遅延型のサイトカイン産生による炎症反応とにわけることができる。脱顆粒反応の

The author declares no conflict of interest.

独立行政法人理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センターサイトカイン制御研究グループ (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22)

e-mail: nishida@rcai.riken.jp

本総説は、日本薬学会第 132 年会シンポジウム OS06 で発表したものを中心に記述したものである。

最終的なステップは顆粒膜と細胞膜の融合であるが、細胞膜近傍にある顆粒 (release ready pool) と細胞質内部にある顆粒 (reserve pool) のうち、後者の顆粒内容物が放出されるためには細胞内部の顆粒が細胞膜まで移行して細胞膜と融合する場合と、細胞膜と融合した顆粒に内部の顆粒同士が数珠状につながる場合があると考えられている。^{12,13)} 膜同士が電氣的に反発するため自発的な膜融合が誘導されることはなく、SNARE と呼ばれる一群のタンパク質が結合の足場となることでカルシウム依存的な膜融合が起こることが明らかになっている。¹⁴⁾ マスト細胞の脱顆粒においても同様の分泌制御の機構があると考えられ、FcεRI の下流でカルシウムシグナルに関与している Syk, SLP-76, LAT, 及び PLCγ2 などの遺伝子を欠損したマスト細胞や、顆粒膜に発現している v-SNARE の VAMP-8 欠損マスト細胞においては脱顆粒反応が抑制されていることが報告されている。^{8,15-18)} このような背景から、マスト細胞の脱顆粒反応はカルシウムシグナルの制御で説明されていたが、Fyn や Hck や RasGRP1 欠損マスト細胞においてカルシウムシグナルが正常であるにもかかわらず脱顆粒反応が低下していることが報告され、¹⁹⁻²¹⁾ 脱顆粒反応のカルシウム非依存的な制御機構が存在することが示唆された。

細胞内の物質輸送が細胞骨格構成タンパク質であるアクチンフィラメントや微小管依存的に行われていることはよく知られているが、²²⁾ マスト細胞の脱顆粒反応における役割は詳しくはわかっていなかったため、筆者は細胞骨格による脱顆粒反応の制御について検討を行った。その結果、刺激依存的に細胞膜を裏打ちするアクチンフィラメントの構造破壊と微小管の細胞外方向への伸長が観察された。このような細胞骨格の再構築がマスト細胞の顆粒移行に関与しているのではないかと仮説の下、顆粒膜上に発現する CD63 と GFP の融合タンパク質を導入することでマスト細胞の顆粒を可視化した結果、定常状態では細胞質でみられた顆粒のシグナルが刺激依存的に細胞膜近傍に集積していることが観察されたことから、刺激依存的な顆粒の移行が存在することが示唆された。この結果を裏付けるように、微小管の動的不安定性を抑制する阻害剤 Taxol や Nocodazole を処理したマスト細胞では顆粒の細胞膜への移行と脱顆粒反応が大幅に抑制されていた。¹¹⁾ また、

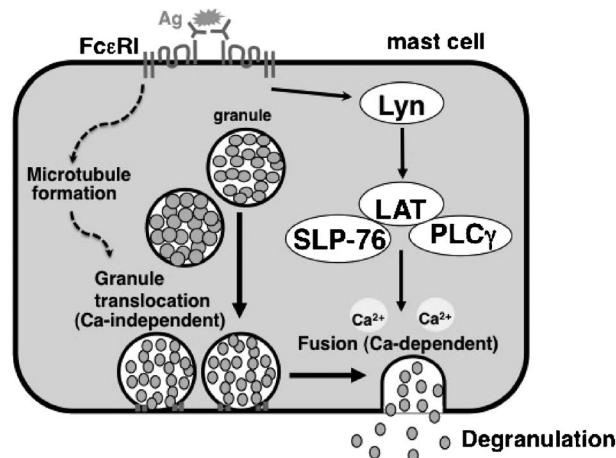


Fig. 1. The Mast Cell Degranulation is Regulated by Granule Translocation and Calcium Signaling Pathway

Calcium mobilization is required for FcεRI-mediated mast cell degranulation and is regulated by Lyn/LAT/SLP-76/PLCγ-mediated signal pathway. Calcium mobilization controls granule-plasma membrane fusion process. In addition to this process, microtubule-dependent granule translocation is important for mast cell degranulation. This step is a calcium-independent manner.

この刺激依存的な顆粒の移行はカルシウム非存在下においてもみられたことから、マスト細胞における脱顆粒反応はカルシウム非依存的で微小管伸長依存的な顆粒の細胞膜への移行のステップと、カルシウム依存的な細胞膜と顆粒膜及び顆粒膜同士の融合のステップで制御されていることが示唆された (Fig. 1)。

3. 顆粒の移行に関与するシグナル伝達分子

抗原刺激により FcεRI の下流で様々なリン酸化酵素やアダプター分子がシグナル伝達に関与していることが報告されている。²³⁻²⁵⁾ 近年チロシンリン酸化酵素である Fyn や Hck を欠損したマスト細胞では、抗原刺激によるカルシウム制御は正常に起こるにもかかわらず脱顆粒反応が抑制されていることが示された。^{19,20)} また Fyn によるアダプター分子 Gab2 のリン酸化が脱顆粒反応に関与していることから、Fyn-Gab2 シグナル経路が微小管の再構築及び顆粒の移行に関与しているのではないかと考えた。Fyn 及び Gab2 欠損マスト細胞の細胞骨格について共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果、野生型と比べて微小管の再構築が抑制されていることが明らかになった。一方、カルシウム制御に関与することが示されているシグナル伝達分子 Lyn 及び SLP-76 の欠損マスト細胞では野生型のマスト細胞と同様の微小管の再構築が観察された。また、多量

体チューブリンをウェスタンブロットで検出したところ、顕微鏡で得られた結果と一致して、Fyn 及び Gab2 欠損マスト細胞では刺激依存的な多量体チューブリンの増加が抑制されていることが示された

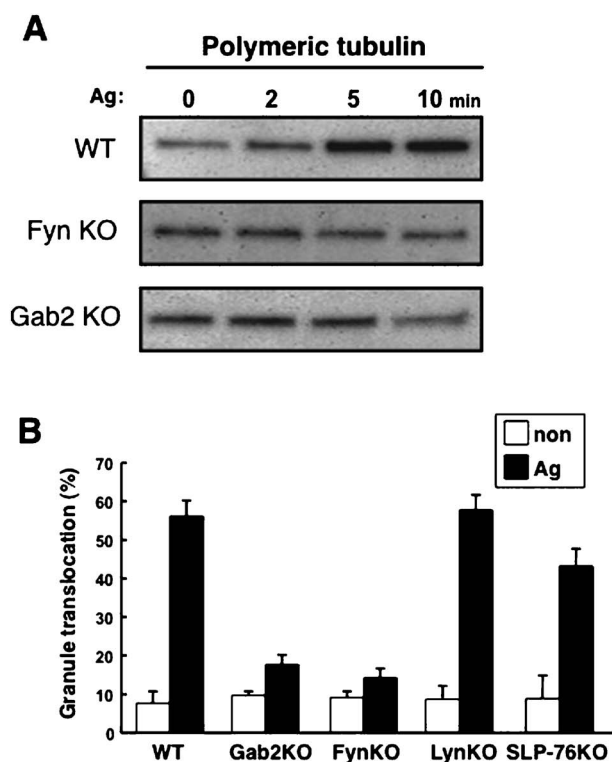


Fig. 2. The Fyn/Gab2-Mediated Pathway is Important for Microtubule Formation and Granule Translocation

(A) Either wild-type, Gab2-, or Fyn-KO BMMCs were sensitized with IgE and stimulated with 100 ng/mL DNP-HSA (Ag) for the times indicated. Stimulated cells were lysed in 0.1% Triton X-100. Triton X-100-insoluble fraction was subjected to Western blot analysis using anti-tubulin antibody. (B) Either wild-type, Gab2-, Fyn-, Lyn-, or SLP-76-KO BMMCs introduced with CD63-GFP were sensitized for 6 h with IgE and stimulated with DNP-HSA (Ag) for 10 min. The frequency of cells showing granule translocation to the plasma membrane was quantified.

[Fig. 2(A)]. さらに CD63GFP をこれらの欠損マスト細胞に発現させることで刺激依存的な顆粒の移行を検討した結果、Fyn 及び Gab2 欠損マスト細胞では抑制されているが、Lyn 及び SLP-76 欠損マスト細胞では抑制されていないことが明らかになった [Fig. 2(B)]. これらの結果から、Fyn-Gab2 シグナル伝達経路が微小管の再構築及び顆粒の細胞膜への移行に役割を果たしていることが示唆された.¹¹⁾ さらに、Gab2 を介する顆粒移行制御機構を明らかにする目的で、Gab2 分子の Δ PI-3K (Gab2 Δ PI-3K: Gab2 と PI-3K との会合を阻害する変異体) や Δ SHP-2 (Gab2 Δ SHP-2: Gab2 と SHP-2 との会合を阻害する変異体) 結合サイトに点変異を導入した Gab2 ノックインマウスを樹立した (Fig. 3). これら Gab2 ノックインマウスの骨髄からマスト細胞を分化誘導させ脱顆粒応答を調べたところ、Gab2 Δ PI-3K マウス及び Gab2 Δ SHP-2 マウス由来マスト細胞ともに、脱顆粒応答が低下していた [Fig. 4(A)].

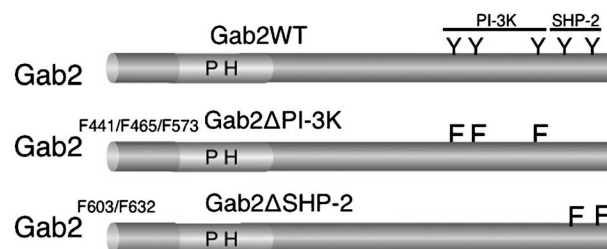


Fig. 3. Establishment of Gab2 Knock-in Mice

Schematic representation of the Gab2 protein showing the pleckstrin homology domain (PH) and the phosphotyrosine residues that bind PI-3K or SHP-2. Y denotes tyrosine residues that are potential phosphorylation sites. Y603 and Y632 are the predicted SHP-2-binding sites. Y441, Y465, and Y573 are the predicted PI-3K-binding sites.

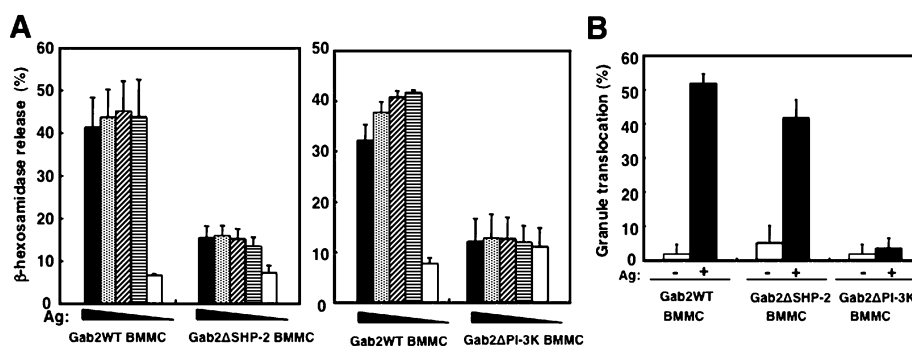


Fig. 4. The Binding Sites of PI-3K is Required for Mast Cell Degranulation and Granule Translocation

(A) IgE-sensitized BMMCs from Gab2 WT, Gab2 Δ SHP-2, or Gab2 Δ PI-3K knock-in mice were treated with DNP-HSA (Ag; 0, 6.25, 12.5, 25, or 50 ng/mL); degranulation was assayed by β -hexosaminidase release after 30 min of Ag stimulation. (B) Gab2 WT, Gab2 Δ SHP-2, or Gab2 Δ PI-3K knock-in-derived BMMCs transfected with CD63-GFP were sensitized for 12 h with IgE and then stimulated with DNP-HSA (Ag; 50 ng/mL) for 10 min. The frequency of cells showing granule translocation to the plasma membrane was quantified.

次に、顆粒移行を調べたところ、**Gab2 Δ PI-3K** マウス由来マスト細胞においてのみ、抗原刺激依存的な顆粒移行の低下が観察された [Fig. 4 (B)]. これらの結果より **Gab2** を介する **PI-3K** が、顆粒移行を制御している可能性が考えられた. **PI-3K** が顆粒移動に関与するかどうか調べる目的で、**PI-3K** の阻害剤であるウォルトマンニンで処理したマスト細胞では抗原刺激依存的な脱顆粒及び、顆粒移行が減弱する結果が得られた. これら培養マスト細胞の結果と一致して、**Gab2 Δ PI-3K** ノックインマウスではアナフィラキシー応答がコントロールマウスに比べて優位に低下していた. 以上の結果より **Gab2-PI-3K** を介するシグナル伝達経路がマスト細胞の顆粒移動及び脱顆粒を制御していることが明らかとなった.

4. 低分子量 G タンパク質 ARF1 の脱顆粒反応への関与

筆者はマスト細胞において **PI-3K** の下流分子の検索を行ったところ、低分子量 G タンパク質の一員である **ARF1** (ADP リボシル化因子 1) の同定に成功した.

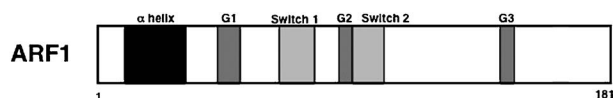


Fig. 5. Structure of ARF1

ARF1 is containing the myristoylated amino-terminal α helix. The consensus GTP-binding motifs conserved among Ras-family GTP-binding proteins are shown in G1–G3. Switch 1 and 2 are important for binding of effector molecules of ARF1.

ARF1 は、コートタンパク質のオルガネラ膜上への集合、リン脂質の代謝、細胞骨格の制御することにより、メンブレントラフィックに関与している (Fig. 5).^{26,27)} 最初に、抗原刺激依存的に **ARF1** の活性化が観察されるかどうか検討したところ、マスト細胞の抗原刺激後、5 分程度で活性化が認められた [Fig. 6 (A)]. 続いて、この **ARF1** の活性化が、上述してきた **Fyn-Gab2** に依存しているかどうか、それぞれの遺伝子欠損マウスよりマスト細胞を調製して **ARF1** の活性化を調べたところ、抗原刺激依存的な **ARF1** 活性化が減弱していた. さらに、上述した **Gab2** ノックインマウス由来マスト細胞を用いて **ARF1** 活性化の依存性を検討した. その結果、**Gab2 Δ PI-3K** 由来マスト細胞において、抗原刺激依存的な **ARF1** の活性化が低下していた. これらのことから **ARF1** の活性化に **PI-3K** が機能している可能性が考えられたので **PI-3K** の阻害剤を用いて検討を行ったところ、ウォルトマンニン処理で抗原刺激依存的な **ARF1** 活性化の抑制が観察された. これらの結果はマスト細胞の抗原受容体シグナル伝達において **Fyn-Gab2-PI-3K-ARF1** 経路が存在し、マスト細胞の機能発現になんらかの役割を担っていることが示唆された. そこで、筆者によって同定された **ARF1** が、脱顆粒・顆粒移行を制御しているか検討を行った. **ARF1** の N 末端領域に存在している配列が、**ARF1** の活性化を抑制することが報告されており、²⁸⁾ この N 末端ペプチドに細胞膜透過ペプチドを結合させた **ARF1** ペプチド阻害剤を作

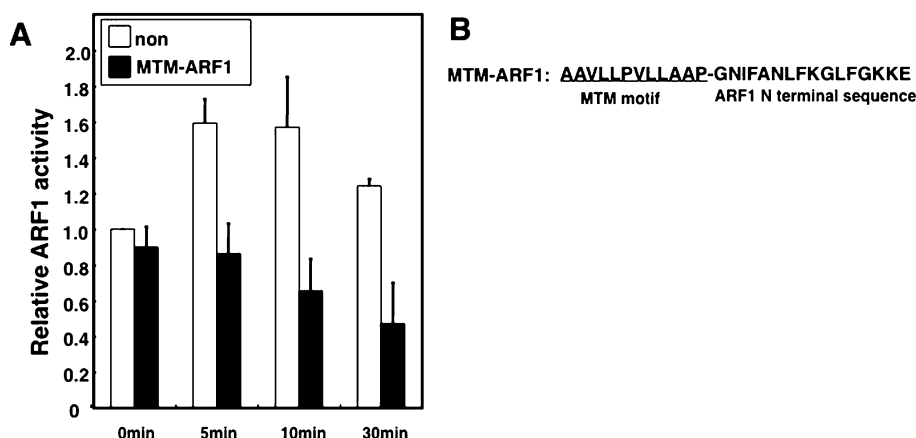


Fig. 6. ARF1 Peptide Inhibitor Blocks Fc ϵ RI-mediated ARF1 Activation

(A) BMMCs were not treated or were treated with ARF1 peptide inhibitor (MTM-ARF1; 100 μ g/mL) for 30 min and stimulated with DNP-HSA (Ag; 50 ng/mL) for the indicated times. The presence of GTP-bound ARF1 was determined by precipitation assay using GST-GGA3. ARF1 activity was quantified densitometrically. (B) The cell-permeable peptide, MTM-ARF1 is containing a membrane-translocating motif (MTM) sequence and the N-terminal portion of ARF1.

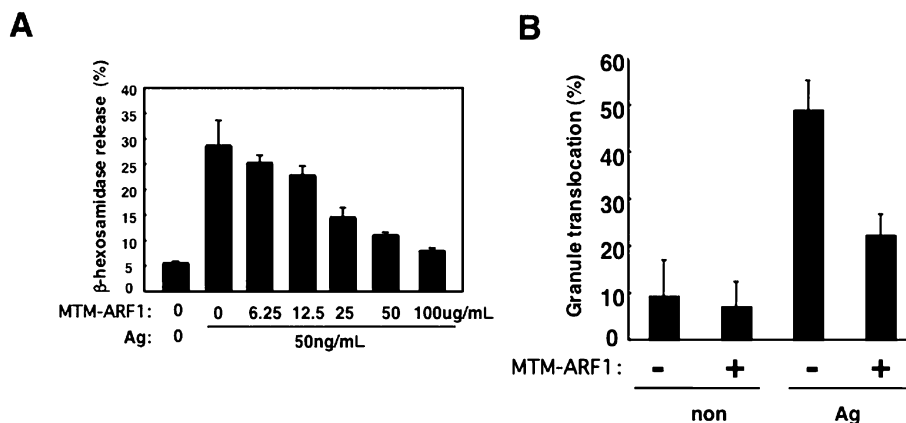


Fig. 7. ARF1 Activation is Involved in FcεRI-mediated Mast Cell Degranulation and Granule Translocation

(A) IgE-sensitized BMMC were treated with MTM-ARF1 for 15 min; after 30 min of Ag stimulation (DNP-HSA; 50 ng/mL), degranulation was assayed by β-hexosaminidase release. (B) BMMCs transfected with CD63-GFP were pretreated with either vehicle (–) or MTM-ARF1 (+) for 15 min and then stimulated with DNP-HSA (Ag; 50 ng/mL) for 10 min. The frequency of cells showing granule translocation to the plasma membrane was quantified.

製した [Fig. 6(B)]. この ARF1 ペプチド阻害剤は期待通り、抗原刺激依存的な ARF1 の活性化を抑制した [Fig. 6(A)]. ARF1 ペプチド阻害剤を用いて、マスト細胞の脱顆粒・顆粒移行について調べたところ、ペプチド処理によって、脱顆粒・顆粒移行とともに減弱することが判明した [Figs. 7(A) and (B)]. 興味深いことに、ARF1 ペプチド阻害剤は *in vivo* のアナフィラキシー応答も抑制した。以上のように、メンブレントラフィックに参与している ARF1 がマスト細胞の機能発現に深く関わっていることを示した。筆者が提唱している FcεRI を介するマスト細胞顆粒移行制御の模式図を示す (Fig. 8)。

5. おわりに

今回、アダプター分子 Gab2 を中心にアナフィラキシー反応における分子機序に関しての解析を行った。Gab2 はイノシトールリン脂質をリン酸化する PI-3K と協調して、下流分子の ARF1 を調節することにより、顆粒移動・脱顆粒、そしてアナフィラキシー反応を制御していることが明らかとなった。さらに、筆者は膜透過性配列を有した ARF1 ペプチド阻害剤を用いて培養マスト細胞の脱顆粒、即時型のアナフィラキシー応答を抑制することを実験的に証明した。将来的には ARF1 ペプチド阻害剤の構造を基に、低分子化合物の検索も可能になるものと思われる。今回の研究成果を基に、戦略的なアレルギー疾患に対する創薬開発が推進されていくことを期待したい。

謝辞 本研究の遂行に当たり終始にわたり多く

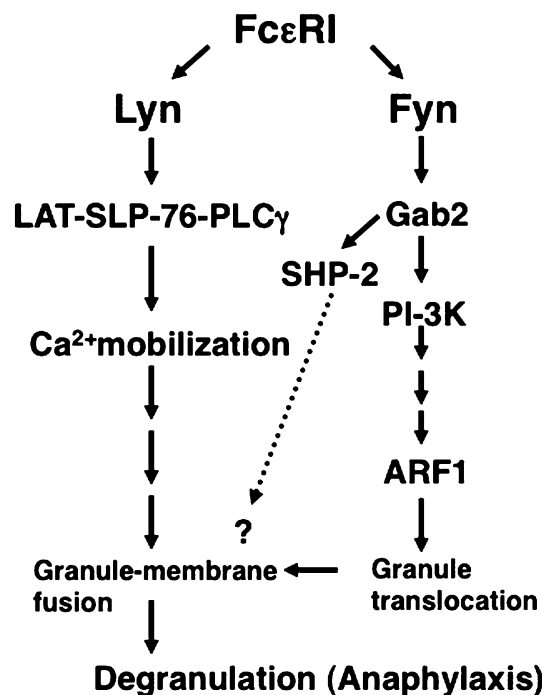


Fig. 8. Model of the FcεRI-mediated Fyn/Gab2/PI-3K/ARF1 Signaling Pathway Involved in Granule Translocation and Mast Cell Degranulation

FcεRI activates the Src family kinase Fyn, which phosphorylates/activates Gab2, and phosphorylated Gab2 then associates the SH2 domain of PI-3K. PI-3K controls granule translocation and degranulation *via* ARF1 activation.

のご指導・ご鞭撻を賜りました平野俊夫教授を始め、独立行政法人理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センターサイトカイン制御研究グループのメンバーに、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Galli S. J., Nakae S., Tsai M., *Nat. Immunol.*, **6**, 135–142 (2005).
- 2) Galli S. J., Tsai M., Piliponsky A. M., *Nature*, **454**, 445–454 (2008).
- 3) Kawakami T., Ando T., Kimura M., Wilson B. S., Kawakami Y., *Curr. Opin. Immunol.*, **21**, 666–678 (2009).
- 4) Parsegian V. A., Rand R. P., Gingell D., *Ciba Found Symp.*, **103**, 9–27 (1984).
- 5) Jahn R., Sudhof T. C., *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 863–911 (1999).
- 6) Guo Z., Turner C., Castle D., *Cell*, **94**, 537–548 (1998).
- 7) Paumet F., Le Mao J., Martin S., Galli T., David B., Blank U., Roa M., *J. Immunol.*, **164**, 5850–5857 (2000).
- 8) Tiwari N., Wang C. C., Brochetta C., Ke G., Vita F., Qi Z., Rivera J., Soranzo M. R., Zabucchi G., Hong W., Blank U., *Blood*, **111**, 3665–3674 (2008).
- 9) Turner H., Kinet J. P., *Nature*, **402**, B24–B30 (1999).
- 10) Baba Y., Kurosaki T., *Immunol. Rev.*, **231**, 174–188 (2009).
- 11) Nishida K., Yamasaki S., Ito Y., Kabu K., Hattori K., Tezuka T., Nishizumi H., Kitamura D., Goitsuka R., Geha R. S., Yamamoto T., Yagi T., Hirano T., *J. Cell Biol.*, **170**, 115–126 (2005).
- 12) Pickett J. A., Edwardson J. M., *Traffic*, **7**, 109–116 (2006).
- 13) Castle J. D., Guo Z., Liu L., *Mol. Immunol.*, **38**, 1337–1340 (2002).
- 14) Hong W., *Biochim. Biophys. Acta*, **1744**, 120–144 (2005).
- 15) Costello P. S., Turner M., Walters A. E., Cunningham C. N., Bauer P. H., Downward J., Tybulewicz V. L., *Oncogene*, **13**, 2595–2605 (1996).
- 16) Pivniouk V. I., Martin T. R., Lu-Kuo J. M., Katz H. R., Oettgen H. C., Geha R. S., *J. Clin. Invest.*, **103**, 1737–1743 (1999).
- 17) Saitoh S., Arudchandran R., Manetz T. S., Zhang W., Sommers C. L., Love P. E., Rivera J., Samelson L. E., *Immunity*, **12**, 525–535 (2000).
- 18) Wen R., Jou S. T., Chen Y., Hoffmeyer A., Wang D., *J. Immunol.*, **169**, 6743–6752 (2002).
- 19) Parravicini V., Gadina M., Kovarova M., Odom S., Gonzalez-Espinosa C., Furumoto Y., Saitoh S., Samelson L. E., O’Shea J. J., Rivera J., *Nat. Immunol.*, **3**, 741–748 (2002).
- 20) Hong H., Kitaura J., Xiao W., Horejsi V., Ra C., Lowell C. A., Kawakami Y., Kawakami T., *Blood*, **110**, 2511–2519 (2007).
- 21) Liu Y., Zhu M., Nishida K., Hirano T., Zhang W., *J. Exp. Med.*, **204**, 93–103 (2007).
- 22) Styers M. L., Kowalczyk A. P., Faundez V., *Traffic*, **6**, 359–365 (2005).
- 23) Siraganian R. P., *Curr. Opin. Immunol.*, **15**, 639–646 (2003).
- 24) Blank U., Rivera J., *Trends Immunol.*, **25**, 266–273 (2004).
- 25) Rivera J., *Curr. Opin. Immunol.*, **14**, 688–693 (2002).
- 26) D’Souza-Schorey C., Chavrier P., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 347–358 (2006).
- 27) Gaynor E. C., Chen C. Y., Emr S. D., Graham T. R., *Mol. Biol. Cell*, **9**, 653–670 (1998).
- 28) Kahn R. A., Randazzo P., Serafini T., Weiss O., Rulka C., Clark J., Amherdt M., Roller P., Orci L., Rothman J. E., *J. Biol. Chem.*, **267**, 13039–13046 (1992).