

特集

マスト細胞活性化機構研究の新しい展開 マスト細胞にアレルギー治療の分子標的を求めて

マスト細胞の活性化に
関与するアダプター分子*大島 慶子**
後飯塚 僚****Key Words** : adaptor, signal transduction, mast cell, Fcε receptor

はじめに

アダプター分子群の共通した機能は、蛋白・蛋白間相互作用に関与する機能ドメインを介してチロシンキナーゼ、酵素、その基質などのシグナル分子を受容体近傍の特定部位に集積させ、キナーゼや酵素による基質のリン酸化や修飾を効率的に促進し、また不要な反応を防ぐことによりシグナル伝達の特異性を高めることなどであり、受容体刺激に伴う多様な細胞反応の発現を組織化・調節するという重要な役割を担っているものと考えられている。

マスト細胞の高親和性IgE受容体(FcεRI)を介した脱顆粒やサイトカイン・ケモカイン産生などの細胞反応においても、アダプター分子群の重要性がノックアウトマウス由来のマスト細胞を用いた解析から明らかにされてきている。最近のもっとも重要な知見としては、アダプター分子でもたとえばLAT(linker for activation of T cells)とGab2(Grb2-associated binder 2)がFcεRIからのシグナル伝達において異なった経路に関与することなど、アダプター分子の研究からFcεRIシグナル伝達が今まで考えられていた以上に複雑に制御されていることが明らかになって

きたということだろう¹⁾。

本稿では、まずマスト細胞に発現し、その活性化に関与する代表的なアダプター分子について概説し、次にLATならびにGab2を介した2つのFcεRIシグナル伝達経路に焦点をあて、それぞれに関与すると考えられる分子の役割について、より詳細に考察する。

マスト細胞の活性化に関与する
アダプター分子

マスト細胞にはT細胞やB細胞同様、類似・共通したアダプター分子、ならびに酵素活性をもつアダプターとしても機能するアダプター類似分子が発現している(表1)。その中でもとくにFcεRIを介したシグナル伝達における役割が明らかになっているアダプター分子について、以下に概説する。

1. LATファミリーアダプター分子(LAT, NTAL/LAB)

LATは、ラフト(raft)と呼ばれる糖脂質に富む特別な膜ドメインに局在する膜型アダプター分子であり、4つのリン酸化されるチロシン残基を介して、Grb2, Gads, PLC-γ1/2, PI3キナーゼ, SLP-76と結合し、Sykキナーゼの下流におけるシグナル伝達に必須である。LAT欠損マスト細胞では、FcεRI刺激に伴うPLC-γのリン酸化、カルシウム反応の低下ならびに脱顆粒反応やサイトカ

* Molecular adaptors involved in mast cell activation.

** Keiko OHSHIMA & Ryo GOITSUKA, Ph.D.: 東京理科大学生命科学研究部分子生物学研究部門(☎278-0022 野田市山崎2669); Division of Molecular Biology, Research Institute for Biological Sciences, Tokyo University of Science, Noda 278-0022, JAPAN

表 1 マスト細胞の活性化に関するアダプター分子

結合分子		機能
3BP2	Syk, Vav1, PLC γ	Sykと基質との相互作用に関与
ADAP	SLP-76, Fyn, SKAP55	インテグリンを介した接着や脱顆粒の増強
MIST/Clnk	PLC γ , Grb2, LAT, Fgr, ADAP	SLP-76と協調して, 脱顆粒を促進
CrkL	Nck	small GTPaseの活性化に関与
Gab2	PI3K, SHP-2, Grb2, Fyn, PLC γ	PI3キナーゼの活性化制御およびFynを介した脱顆粒に関与
Gads	SLP-76, LAT	SLP-76をLATへとリクルート
Grb2	Sos, LAT, Vav1, Shc, Nck, Gab2	Gadsと同様な作用, さまざまな分子と複合体形成
LAT	Gads, Gab2, SLP-76, Vav1, PLC γ 1, PLC γ 2	脱顆粒, サイトカイン産生に必須
Nck	Shc, SLP-76, PAK1	PAKキナーゼの活性化に関与
Shc	Grb2, Nck, Sos	Rasの活性化に関与
SLP-76	Vav1, Cbl, ADAP, Gads	脱顆粒, サイトカイン産生に必須

イン産生の著しい低下が認められる²⁾。

最近, non-T cell activation linker(NTAL)あるいはlinker for activation of B cells(LAB)という構造上LATと類似したアダプターが, B細胞だけでなく, マスト細胞にも発現していることが報告された^{3,4)}。NTAL/LABはLAT同様, 脂質ラフトに局在し, Fc ϵ R1刺激によりチロシンリン酸化され, Grb2, Sos1, Gab1, c-Cblと結合することが明らかになっており, Fc ϵ R1刺激に伴う細胞内カルシウム濃度の上昇に関与している可能性が示唆されている。

2. SLP-76ファミリーアダプター分子(SLP-76, MIST/Clnk)

SLP-76ファミリーアダプター分子は, N末端にSH2ドメインをもつ蛋白との結合に関するリン酸化チロシン残基を複数もち, 中央部にSH3ドメインをもつ蛋白との会合に関するプロリン残基に富んだ領域, そしてC末端にSH2ドメインをもつという基本構造をとっている。SLP-76はそのプロリン残基に富んだ領域とGadsとの結合を介してLATにリクルートされる。SLP-76は, Fc ϵ R1刺激に伴うカルシウム反応, 脱顆粒ならびにIL-6などのサイトカイン産生に必須のアダプター分子であり, Sykの下流で機能していると考えられている⁵⁾。SLP-76欠損マスト細胞にさまざまなSLP-76変異体を導入した解析から, SLP-76のN末端における2~156番目のアミノ酸を含む領域, またGads結合ドメインがFc ϵ R1刺激による脱顆粒およびIL-6産生の両方に必須であるが, SH2ドメインは必須ではないことが明らかにされている。しかしながら, T細胞受容体シグナル伝達に

おいては必須であるN末端の3つのチロシン残基の変異体は, Fc ϵ R1刺激による脱顆粒反応には必要であるが, IL-6産生には必要ないことから, 脱顆粒とIL-6産生に至るシグナルは異なった制御を受けているものと考えられる⁶⁾。

マスト細胞にはSLP-76と構造上類似したMIST/Clnkが発現しており, MISTはSH2ドメインを介して, SLP-76と同様, adhesion and degranulation-promoting adaptor protein(ADAP)と結合し, さらにADAPとSrc kinase associated phosphoprotein of 55kDa(SKAP55)アダプター分子の結合を介して, FynおよびLynにリクルートされることが明らかになっている⁷⁾。また, SLP-76と同様, Grb2との結合を介してLATにリクルートされることが報告されているが, Gadsとの結合は報告されていない。MIST欠損マスト細胞においてはSLP-76欠損マスト細胞ほど顕著ではないが, Fc ϵ R1刺激による脱顆粒反応やサイトカイン産生が低下している(詳細については後述)。

3. Gabファミリーアダプター分子(Gab2, Gab3)

ヒトおよびマウスにおいては, 3つのGabファミリー分子が報告されている。Gab分子は, pleckstrin homology(PH)ドメイン, チロシンリン酸化ドメインならびにSH2やSH3ドメインをもつ蛋白との結合部位をもっており, さまざまな受容体刺激に伴い, PHドメインと膜脂質の結合を介して, 膜近傍にリクルートされる。これらの分子は受容体刺激によりチロシンリン酸化されることにより, PI3キナーゼ, SHP-2, Grb2, PLC- γ , Lyn, Fyn, LATと結合することが明らかになっている。とくにGab2欠損マウスにおいて

は、マスト細胞数が減少しており、骨髄由来マスト細胞のIL-3やstem cell factorによる増殖能が低下していることから、これらマスト細胞増殖因子の受容体シグナル伝達にGab2が関与しているものと考えられる⁸⁾。

さらに、Gab2欠損マスト細胞はFceRI刺激に伴う脱顆粒反応やサイトカイン産生が低下しており、PI3キナーゼの活性化が起こらないことがその原因と考えられている⁹⁾。すなわち、Gab2はFynによって特異的にチロシンリン酸化され、それによりPI3キナーゼを細胞膜近傍に呼び寄せ、PI3キナーゼの活性化をひき起こす。一方、RBL-2H3細胞株にGab2を過剰発現させると、FceRI刺激による受容体のリン酸化、Sykの活性化ならびにカルシウム反応が抑制されるという報告もあり¹⁰⁾、Gab2はマスト細胞の分化段階あるいはサブポピュレーションによって異なった機能を示す可能性がある。

Gab3もGab2同様、マスト細胞に発現しているが、Gab3欠損マウスにおいても正常なアレルギー反応が認められることが報告されている¹¹⁾。しかし、Gab3のより詳細なFceRIシグナル伝達への関与については明らかにされていない。

4. そのほかのアダプター分子

3BP2はFceRI刺激によりチロシンリン酸化され、シャペロン蛋白である14-3-3やLynと結合する。RBL-2H3細胞に変異型3BP2を過剰発現させると、PLC- γ のリン酸化、カルシウム流入ならびに脱顆粒反応が抑制されるが、MAPキナーゼであるJNKやERKの活性化は阻害されないことが報告されている¹²⁾。

ADAPはSLP-76 associated protein of 130kDa (SLAP-130) およびFyn-binding protein (Fyb) と呼ばれていた分子の総称であり、分子量の異なる2つのアイソフォームがあり、SLP-76およびFynとの結合に関与する複数のリン酸化チロシン残基をもつ。さらにN末端にプロリンに富む領域、C末端にEna/VASP結合領域、SH3様ドメインをもっており、Fynによってリン酸化される。ADAPをRBL-2H3細胞に過剰発現させるとFceRI刺激に伴う脱顆粒の増強やインテグリンを介した接着の増強が認められる。しかし、ADAPのSH3ドメインが脱顆粒の増強には必須であるが、接着反

応には関与しないことが報告されている。ADAPはSH3ドメインを介して、SKAP55と結合することから、SKAP55が脱顆粒反応におけるADAPの機能を規定しているものと推定されている¹³⁾。

FceRIを介したマスト細胞活性化に関与する相互に独立しながら協調する2つの経路

1. LATを介したFceRIシグナル伝達経路

FceRI刺激により受容体に会合したLynが、FceRIの γ 鎖に存在するITAMをチロシンリン酸化すると、そこにSH2ドメインを介してSykがリクルートされ、活性化される。活性化Sykにより、LATのリン酸化が起こり、LATのリン酸化されたチロシン残基に直接的にPLC- γ 1/2、またGrb2やGadsを介してSLP-76が会合し、LATを中心としたシグナル分子複合体が形成される。SLP-76がさらにVavやBtk、ItkなどのTecファミリーチロシンキナーゼをLAT複合体にリクルートすることにより、このシグナル分子複合体において効率的なPLC- γ の活性化が起こり、その結果として細胞内へのカルシウムの流入やカルシウム依存性PKCの活性化が起こり、脱顆粒反応やサイトカイン産生が惹起されるものと考えられている。

2. Gab2を介したFceRIシグナル伝達経路

Fyn欠損マスト細胞の解析から、FceRIからのシグナル伝達機構にはSyk/LATを介する経路以外にも、FynおよびGab2を介する経路が存在することが近年明らかにされ、比較的カルシウム反応に関与しない経路を構成しているものと考えられている¹⁴⁾。Lyn欠損マスト細胞ではFceRI刺激によるGab2のリン酸化が増強する。一方、Fyn欠損ではGab2のリン酸化が顕著に減少することから、FceRIに会合したSrcファミリーキナーゼであるLynとFynはGab2のリン酸化に対して相反する機能をもつことが明らかになった。また、マスト細胞上でGab2はFceRIと同じ場所に局在するのに対し、LATはGab2/FceRIとは別の場所に局在を示すことから推測されるように、Gab2のリン酸化にはLATが必要ではない。さらに、Lyn欠損マスト細胞ではFceRI刺激によるカルシウム反応は著しく低下するのに対し、その脱顆粒反応は正常よりも増強する傾向を示し、一方、Fyn

欠損マスト細胞ではカルシウム反応には顕著な変化がないにもかかわらず、脱顆粒反応が著しく低下する。Fyn欠損マスト細胞ではGab2のリン酸化だけでなく、PI3キナーゼの活性化によって制御されているAKTやカルシウム非依存性のPKCであるPKC δ のリン酸化が低下していることから、Fyn欠損による脱顆粒反応の低下はGab2を介したPI3キナーゼの活性化不全に起因するものと考えられている。

たとえば、Fc ϵ RIを少ない抗原で刺激した場合の弱い刺激においては、Fyn/Gab2を介したシグナル伝達経路が、Syk/LATを介した経路よりも優先的に使用され、サイトカイン産生よりもケモカイン産生が誘導されることが報告されている¹⁵⁾。強い刺激においてもLAT欠損マスト細胞ではFc ϵ RI刺激によるサイトカインmRNAの転写は著しく減少するのに対し、ケモカインのひとつであるMCP-1 mRNAの転写には影響が認められない。逆にGab2欠損マスト細胞においてはMCP-1の反応は認められないにもかかわらず、サイトカイン反応はそれほど影響がない。すなわちFc ϵ RI刺激に対するサイトカインとケモカインの反応では、Gab2とLATを介する経路の重要性が異なるということである。

LATおよびGab2を介したシグナル伝達経路にかかわる分子の役割と複雑性

SLP-76、Vav1あるいはPLC- γ 2欠損マスト細胞の表現型をLATまたはGab2欠損マスト細胞と比較すると、Fc ϵ RI刺激によるカルシウム反応の低下やPLC- γ 1/2のリン酸化の著明な低下など、LAT欠損とSLP-76欠損マスト細胞は類似した表現型を示すことから、これらの分子は同一の経路に関与しているものと考えられる。一方、Vav1欠損マスト細胞では、PLC- γ 1/2のリン酸化が起こらないなど、ほとんどの反応はLAT欠損マスト細胞と類似するが、脱顆粒反応やサイトカイン産生の低下はLAT欠損マスト細胞ほど顕著ではなく、また、PI3キナーゼの活性化についてはLAT欠損マスト細胞より、顕著に障害されている¹⁶⁾。したがって、Fc ϵ RIシグナルの多くにおいてVav1はLATと同じ経路に関与するが、一部においてはLATと独立した経路にも関与しているものと推察さ

れる。PI3キナーゼの活性化にはGab2が必要であり、LATは必要でないことから、Vav1はGab2を介した経路にも関与しているものと考えられる。

Gab2欠損やFyn欠損マスト細胞における脱顆粒反応の低下の一因として、PI3キナーゼの活性化の低下が考えられている。一方、PI3キナーゼのp85サブユニット欠損マスト細胞においてはFc ϵ RIを介した脱顆粒反応は正常だが、c-Kitシグナルを介した反応が低下していることが報告されている^{17,18)}。したがって、Gab2欠損に認められるFc ϵ RIシグナル伝達の異常はPI3キナーゼの活性化の低下以外にも、たとえばSHP-2を介したシグナルなども関与していることが考えられる。さらにFyn欠損マスト細胞ではFc ϵ RI刺激によるPKC δ のリン酸化の低下が認められるが、PKC δ 欠損マスト細胞では逆にFc ϵ RI刺激による脱顆粒反応の亢進が報告されており¹⁹⁾、Fyn/Gab2を介したFc ϵ RIシグナル伝達とマスト細胞反応の関連についてはいまだ不明な点が多く残されている。

Fc ϵ RI刺激によるサイトカイン産生に関与するMAPキナーゼの活性化という観点から眺めると、事態はさらに複雑である。LAT欠損マスト細胞においてはFc ϵ RI刺激によるERK1/2、JNKおよびp38、いずれのMAPキナーゼの活性化も顕著に低下しているにもかかわらず、SLP-76欠損マスト細胞ではJNKの活性化は検出できない程度に減少している。一方、ERK1/2の活性化はやや減少が認められるのみで、p38の活性化にはそれほど影響が認められない¹⁶⁾。Gab2欠損では、JNKの活性化がもっとも低下しており、次にp38、そしてERK1/2の活性化は正常である。Vav1欠損マスト細胞では不思議なことにERK2の活性化は正常マスト細胞よりも亢進しているが、JNKの活性化は約2分の1に減少していること、さらにPLC- γ 2欠損ではFc ϵ RI刺激によるカルシウム反応や脱顆粒反応は低下しているにもかかわらず、すべてのMAPキナーゼの活性化には変化がないことが報告されている²⁰⁾。以上のように、Fc ϵ RI刺激によるMAPキナーゼの活性化に関与するシグナル伝達経路は複雑であり、今後、サイトカインやケモカイン産生に至るGab2およびLATを介したシグナル伝達経路の接点、ならびにそれぞ

れの経路にかかわる分子群の相互作用を解明していく必要がある。

おわりに

アダプター分子を含むさまざまなシグナル分子を欠損したマスト細胞を用いた解析により、FcεRIシグナル伝達機構の詳細が明らかになってきたと同時に、その複雑性がより鮮明になってきたともいえる。とくに、同じファミリーに属するシグナル分子が複数発現している場合、1つの分子の欠損に起因するシグナル伝達異常の正確な解釈は困難である。たとえば、PLC-γ1とPLC-γ2、Vav1とVav2やVav3、LATとLAB、SLP-76とMIST/Clnk、Gab2とGab1やGab3には機能的な重複だけでなく、特異性が存在する可能性がある。われわれは現在、SLP-76とMISTの二重欠損マスト細胞を用いて、この2つの分子のFcεRIシグナル伝達における機能的重複と特異性を解析しているが、少なくともFcεRIを介した脱顆粒反応は、この2つの分子間でgene dosage依存性があり、SLP-76単独欠損よりも二重欠損において、より重度に脱顆粒反応が低下することを見出している(データ未発表)。今後、ほかのファミリー分子についても二重欠損や三重欠損マスト細胞を用いて、FcεRIシグナル伝達におけるこれらの分子の機能をより詳細に明らかにする必要があると考えられる。また、同じファミリーに属する分子だけでなく、同じ経路に関与すると考えられる分子、たとえばFynとGab2、の二重欠損マスト細胞におけるFcεRIシグナル伝達を解析することにより、それぞれのシグナル伝達における機能の直列性・並列性が明らかになっていくものと考えられる。

文 献

- 1) Nadler MJ, Kinet JP. Uncovering new complexities in mast cell signaling. *Nat Immunol* 2002 ; 3 : 707.
- 2) Saitoh S, Arudchandran R, Manetz TS, et al. LAT is essential for FcεRI-mediated mast cell activation. *Immunity* 2000 ; 12 : 525.
- 3) Brdicka T, Imrich M, Angelisova P, et al. Non-T cell activation linker (NTAL) a transmembrane adaptor protein involved in immunoreceptor signaling. *J Exp Med* 2002 ; 196 : 1617.
- 4) Janssen E, Zhu M, Zhang W, et al. LAB : a new membrane-associated adaptor molecule in B cell activation. *Nat Immunol* 2003 ; 4 : 117.
- 5) Pivniouk VI, Martin TR, Lu-Kuo JM, et al. SLP-76 deficiency impairs signaling via the high-affinity IgE receptor in mast cells. *J Clin Invest* 1999 ; 103 : 1737.
- 6) Kettner A, Pivniouk V, Kumar L, et al. Structural requirements of SLP-76 in signaling via the high-affinity immunoglobulin E receptor (Fc epsilon RI) in mast cells. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23 : 2395.
- 7) Fujii Y, Wakahara S, Nakao T, et al. Targeting of MIST to Src-family kinases via SKAP55-SLAP-130 adaptor complex in mast cells. *FEBS Lett* 2003 ; 540 : 111.
- 8) Nishida K, Wang L, Morii E, et al. Requirement of Gab2 for mast cell development and KitL/c-Kit signaling. *Blood* 2002 ; 99 : 1866.
- 9) Gu H, Saito K, Klamann LD, et al. Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature* 2001 ; 412 : 186.
- 10) Xie ZH, Ambudkar I, Siraganian RP. The adapter molecule Gab2 regulates FcεRI-mediated signal transduction in mast cells. *J Immunol* 2002 ; 168 : 4682.
- 11) Seiffert M, Custodio JM, Wolf I, et al. Gab3-deficient mice exhibit normal development and hematopoiesis and are immunocompetent. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23 : 2415.
- 12) Sada K, Miah SM, Maeno K, et al. Regulation of FcεRI-mediated degranulation by an adaptor protein 3BP2 in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. *Blood* 2002 ; 100 : 2138.
- 13) Geng L, Pfister S, Kraeft SK, et al. Adaptor FYB (Fyn-binding protein) regulates integrin-mediated adhesion and mediator release : differential involvement of the FYB SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 11527.
- 14) Parravicini V, Gadina M, Kovarova M, et al. Fyn kinase initiates complementary signals required for IgE-dependent mast cell degranulation. *Nat Immunol* 2002 ; 3 : 741.
- 15) Gonzalez-Espinosa C, Odom S, Olivera A, et al. Pref-

- erential signaling and induction of allergy-promoting lymphokines upon weak stimulation of the high affinity IgE receptor on mast cells. *J Exp Med* 2003 ; 197 : 1453.
- 16)Manetz TS, Gonzalez-Espinosa C, Arudchandran R, et al. Vav1 regulates phospholipase cgamma activation and calcium responses in mast cells. *Mol Cell Biol* 2001 ; 21 : 3763.
- 17)Lu-Kuo JM, Fruman DA, Joyal DM, et al. Impaired kit- but not FcεRI -initiated mast cell activation in the absence of phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene products. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 6022.
- 18)Fukao T, Yamada T, Tanabe M, et al. Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. *Nat Immunol* 2002 ; 3 : 295.
- 19)Leitges M, Gimborn K, Elis W, et al. Protein kinase C-δ is a negative regulator of antigen-induced mast cell degranulation. *Mol Cell Biol* 2002 ; 22 : 3970.
- 20)Wen R, Jou ST, Chen Y, et al. Phospholipase C γ2 is essential for specific functions of Fc epsilon R and Fc gamma R. *J Immunol* 2002 ; 169 : 6743.

*

*

*