

ケラチノサイト分化におけるジアシルグリセロールキナーゼの機能解明

神戸大学大学院農学研究科

白井 康仁

It is well-known that keratinocytes differentiation is partly regulated by PKC. However, function of diacylglycerol (DG) kinase (DGK), which can attenuate PKC activity by reducing the amount of DG, in keratinocyte differentiation is fully unknown. Therefore, we tried to identify DGK subtype(s) expressed in the keratinocytes and investigate function(s) of DGK in the skin.

We found that human keratinocytes, HaCaT cells, express almost all DGK subtypes except for DGK κ . At least DGK β , γ , and ι , were up-regulated during the differentiation, while DGK η was down-regulated. mRNA level of the other DGK subtypes did not change. We focused on DGK γ and found that the DGK subtype was expressed in the basal, spinous and granular layers but not in the cornified layer by immunofluorescent staining. To further explore a function of DGK γ in the differentiation, we overexpressed GFP-DGK γ in HaCaT cells and compare the cell shape. However, we could not detect remarkable difference. Therefore, we then tried to produce DGK γ knock out (KO) mouse and succeeded. We checked “allergy level”, “bailer function” and “recovery speed from wounding” using the KO mice. However, there was no significant difference between KO and WT mouse in all tested.

1. 緒 言

表皮は外部環境からの乾燥、外傷、感染などから個体を防御するバリアとなっている。この表皮は、基底細胞層でつくられたケラチノサイトが、有棘細胞層での細胞周期の停止、顆粒細胞層での扁平化および分化マーカー蛋白質の合成を経て、角化細胞へと分化することにより形成されていく。また、魚鱗癬や乾癬等の角化異常症はケラチノサイト分化の異常であるといえる。

ケラチノサイトには、少なくとも5つのプロテインキナーゼC (PKC) サブタイプ (α , ε , δ , η , ζ) が存在し、ケラチノサイトの分化において重要な働きをしていることが知られている。例えば、これまでに、少なくともPKC α や η が重要な働きをしていることが知られている¹⁻³⁾。我々も、独自に活性化したPKC η が、低分子量Gタンパク質のひとつであるRasAに直接結合することでケラチノサイトの扁平化を誘導していることを明らかにした⁴⁾。

一方、本研究の対象であるジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) は、PKCの活性化剤であるジアシルグリセロール (DG) をリン酸化し、ホスファチジン酸 (PA) に変換する脂質キナーゼである。即ち、DGKは、DGを減少させることで間接的にPKC活性を抑制できる。また、このDGKには10種類のサブタイプが存在することが報告されている

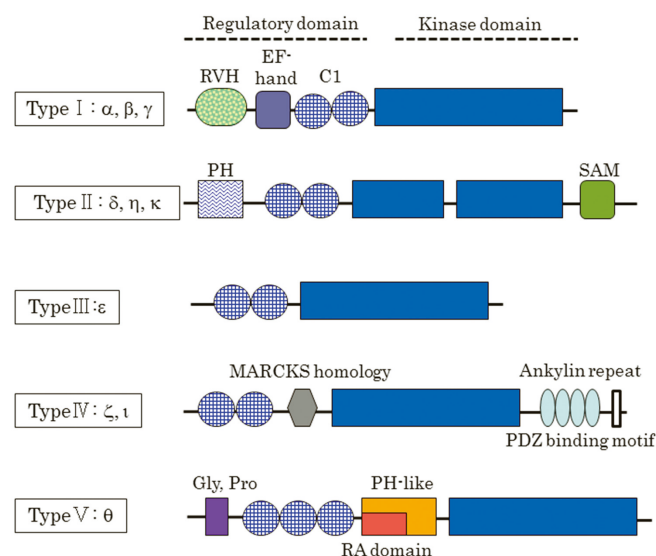


図1 哺乳類の DGK サブタイプとドメイン構造

C1: Conserved region1, RVH: recoverin homology, PH: pleckstrin homology, SAM: sterile a motif, MARCKS: myristinated alanine-rich C-kinase substrate, RA: Ras associating, Gly, Pro: glycine & proline rich domain.

(図1)。各サブタイプは組織発現様式が異なり、異なった機能を有していると考えられている。一方、産生されるPAも、mTORやRaf1キナーゼなどを活性化する脂質シグナルである。さらに、皮膚における脂質組成はバリア機能などに深く関わっている。従ってDGKは、PKCの抑制や、他の酵素の活性化、あるいは皮膚における脂質組成を調節することによって、ケラチノサイトの分化や、皮膚バリア機能に重要な働きをしていると推察される。しかし、未だにケラチノサイトに発現しているDGKサブタイプや、その機能に関しては全く不明である。



Function of diacylglycerol kinase in keratinocyte differentiation

Yasuhito Shirai

Graduate School of Agricultural Science, Kobe University

そこで本研究では、ケラチノサイト分化における DGK の機能を明らかにし、将来的な DGK をターゲットとするスキンケア商品の開発を目指すことを研究の目的とした。

2. 実験

2. 1. 材料

すべてのプライマーは Invitrogen に合成をお願いした。DGK γ 抗体は当研究室で作製したものをを用いた⁵⁾。その他の試薬は、研究に十分たるグレードのものを使用した。

2. 2. HaCaT 細胞の培養

実験には、不死化ヒトケラチノサイトである HaCaT を用いた。培養には 10% FBS、ペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100 μ g/mL) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (Wako) を用いた。尚、培養はすべて 37℃、5% CO₂ の条件下で行った。尚、ケラチノサイトの分化は 1.5 mM カルシウムを用いて 72 時間培養することにより行い、分化したことは分化マーカーであるインボルクイリンとケラチン 1 の発現誘導を Quantative-PCR にて確認した⁴⁾。

2. 3. Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

上述の条件で分化させた HaCaT 及び分化させてない細胞から定法に従い、SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いて mRNA を抽出した。200 ng に相当する mRNA を鋳型にランダムプライマーを用いて逆転写し、最終的に 20 μ L の cDNA 溶液を得た。得られた cDNA 溶液 1 μ L を鋳型に、表 1 に示すプライマーセットを用いて、PCR に供した。尚、ポリメラーゼは KOD plus (TOYOBO) を用い、アニーリング温度及びサイクル数は表 1 に示すように設定した。その他の条件は定法に従った。

2. 4. SDS-PAGE 及びウエスタンブロット

上述の条件で分化させた HaCaT 及び分化させてない細胞を 10 cm シャーレに用意した。全細胞を回収後、それぞれ 300 μ L の homogenate buffer [250 mM sucrose、

10 mM EGTA、2 mM EDTA、1% triton-X 100、20 μ g/mL leupeptin、1 mM PMSF/50 mM Tris-HCl (pH 7.4)] に懸濁し、handy sonic (UR-20P TOMY SEIKO CO., LTD) を用いて氷上で破碎した (output 5、30 秒 2 回)。遠心後 (15000 rpm、4℃、10 分間)、上清のタンパク質量を BCA 法 (Promega) により測定し、10% ゲルを用いた SDS-PAGE に供した。泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。5% スキムミルクでブロッキングしたのち、1 次抗体に DGK γ 抗体を、2 次抗体には HRPO 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。尚、検出には ECLTM Western blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience) を用い、化学発光強度を imager で記録した。

2. 5. マウス皮膚蛍光免疫染色

WT および DGK γ KO マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、心臓より 0.9% NaCl で灌流した後、皮膚を採取した。O.C.T. Compound (Sakura Finetek) で皮膚を包埋し、クリオスタット (Leica CM1850) で 10 μ m にスライスした。スライスした切片をスライドガラスに貼り付け、皮膚凍結切片試料とした。作製した切片を、段階的に濃度を高くしたエタノール溶液に順に浸し脱水した。ついで、エタノール脱水後の切片をアセトンに浸漬し、固定した。水和した後、数分間流水で洗浄を行い、その後蒸留水で洗浄した。洗浄後蒸留水を除き、0.3% Triton X in PBS (-) で 30 分間切片を室温でインキュベートした。洗浄後、2% NGS in PBS (-) で 30 分間切片を室温でインキュベートすることによりブロッキングした。1 次抗体には、DGK γ 抗体または TGase1 抗体を 0.03% Tween 20 in PBS (-) (PBS-Tw) で適当な濃度に希釈し、72 時間、4℃ で反応させた。ついで、anti-rabbit Alexa 546 を PBS-Tw で 1000 倍希釈し、2 次抗体として 1 時間、室温で反応させた。PBS-Tw で洗浄したのち、50% グリセロールで封入し、共焦点レーザー顕微鏡および一体型顕微鏡で観察した。

2. 6. DGK γ ノックアウトマウスの作製

DGK γ KO マウスの作製は、大阪大学微生物研究所に依頼した。飼料は、飼育繁殖固形飼料を自由に摂食させ、自

表 1 PCR に用いたプライマー及びアニーリング温度 (A) とサイクル数 (B)

Sub-type	Forward primer	Reverse primer	A	B
α	AGGAGACCCCATGGGG	GCATGGGCATCTGGTTC	59	35
β	TGATCATGATGGAACCGTGT	CACCAAACACAATGCAGTCC	59	35
γ	CCACATCTTACTGCCC	ATCCAAAATCCAGCCA	59	35
δ	GGAAGATTGGATTGCA	CAGGTCTTGTCGCACA	59	35
ϵ	TTGGGTTGGGGTACAG	CCCATCCCTTCCCATA	59	35
ζ	TCAATCCCCGACAAGT	CAAAGCCCCAGGCTGAA	59	35
η	CTGCCAAGACGCTATG	TCAATGACTTGCCTCA	59	35
ι	CAGGAGGGGAAATGTAAGCA	GCAAGGGTTTCATGAGAGGA	57	35
κ	GCGCTCTTACAGGAAA	CACCTGCACTGGGATA	59	35
θ	CCACCAGGCACGGAAGAGGAGCCTGG	CTGGCCCATGTGCACGAC	59	40

動給水により自由に飲水させた。

温度は18–26℃で保ち、12時間明、12時間暗の光条件で飼育した。また、飼育及び以下の動物実験は本学倫理委員会の規定に基づいて行った。

DGK γ KOマウスは、図2に示すようなinsertionをもっていることから、図2下に示す位置にプライマーを設計し、907bpのバンドが検出されたものを野生型(WT)、523bpのバンドが検出されたものをDGK γ KO、両方のバンドが認められたものをDGK γ ヘテロとした。尚、genotypingには尾部から定法により調製したgenomeとEnocoTaq polymerase (Lucigen)を使用し、アニーリング温度62℃、サイクル数40に設定した。

2. 7. 接触性皮膚炎発症モデルマウスの作製

WT及びDGK γ KOマウスの腹部の毛を除去し、5% TNCB (アセトン：エタノール=1：4) 50 μ Lを2日連続腹部に塗布し、感作した。最後の感作から3日後、右耳の各面に1% TNCBを20 μ Lずつ塗布し、接触性皮膚炎を誘発した。また、ネガティブコントロールとして左耳の各面に溶媒(アセトン：エタノール=1：4)を20 μ Lずつ塗布した。

2. 8. マウス皮膚凍結切片の作製

WTおよびDGK γ KOマウスを頸椎脱臼により安楽死させ、接触性皮膚炎誘導24時間後の両耳の皮膚を採取した。O.C.T. Compound (Sakura Finetek) で皮膚を包埋し、クリオスタット (Leica CM1850) で10 μ mにスライスした。スライスした切片をスライドガラスに貼り付け、皮膚凍結切片試料とした。作製した切片を、段階的に濃度を高くしたエタノール溶液に順に1分間ずつ浸し脱水した。エタノール脱水後の切片をアセトンに浸漬し、固定した。100%から濃度を段階的に低くしたエタノール溶液に順に1分間ずつ浸し水和した後、数分間流水で洗浄を行い、その後蒸留水で洗浄した。

2. 9. HE染色

2. 8. のように処理した切片を、マイヤー・ヘマトキシリン溶液 (武藤化学株式会社) に1分間浸漬した後、数分間流水洗浄を行った後、蒸留水に浸漬した。続いて、1% エオジンY溶液 (武藤化学株式会社) に1分間浸漬し、段階的に濃度を高くしたエタノール溶液に順に1分間ずつ浸し脱水した。その後キシレンに3分間×3回透徹した後、Mount-Quick (大道産業株式会社) にて封入し、一体型顕微鏡の2倍レンズを用いて観察した。

2. 10. トルイジンブルー染色

2. 8. のように処理した切片を、0.3% Triton X in PBS (-) で30分間切片を室温でインキュベートした。0.03% Tween-20 in PBS (-) (PBS-Tw) で5分×3回洗浄した。トルイジンブルー溶液 (pH 2.0) に40分間浸漬した後、PBS-Twで3回洗浄した。さらに95%エタノールに1回、100%エタノールに2回素早く通し、その後キシレンで3分×3回透徹した後、Mount-Quick にて封入し、一体型顕微鏡の20倍レンズを用いて観察した。

2. 11. 経皮吸収試験

DGK γ ヘテロマウス同士のmatingによって生後0日目の新生児を得た。新生児を37℃の0.4w/v% trypan blue solution (Wako) 中で5min振とうした後、1×PBS (-) で2回洗浄し、写真撮影を行った。染色した新生児の背部の皮膚を採取し、2. 3. のように凍結切片を作製した。一体型顕微鏡の20倍レンズを用いて観察した。

2. 12. Wound healing assay

10週齢のWTおよびDGK γ KOマウスの背部の毛をバリカンで除去した。局所麻酔薬としてマーカイン® 0.125% (AstraZeneca) を塗布した後、イヤープンチを用いて背部

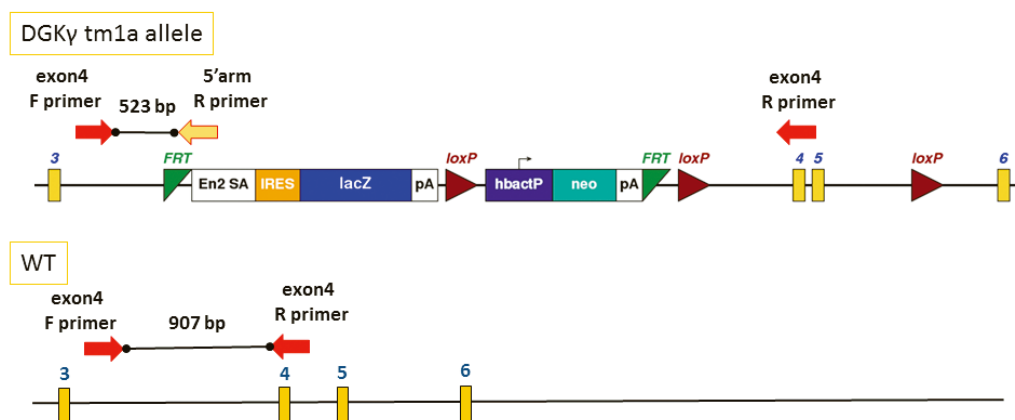


図2 DGK γ KOの作製に用いたインサージョンカセット(上)と野生型DGK γ 遺伝子の一部(下)

の皮膚に直径約2mmの傷を付けた。写真撮影を行って傷の治癒を観察した。

3. 結果

3. 1. HaCaTに発現しているDGKサブタイプの同定

まず、ケラチノサイトに発現しているDGKサブタイプを同定するために、RT-PCRを行った。その結果、ケラチノサイトにはDGK α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η , θ , ι が発現していることが明らかになった(図3)。

3. 2. HaCaTの分化に伴い変動するDGKサブタイプの同定

ついで、どのサブタイプがケラチノサイトの分化に伴って変動するか、PCRで調べた。その結果、少なくとも β , γ , ι が分化に伴い増加していることが明らかとなった(図4)。一方、 η は分化とともに減少する傾向を示し、他のサブタイプには顕著な変動は認められなかった。この中で、 ι は変化量が小さかったこと、また β は神経系における役割が報告されているのに対し⁶⁻⁸⁾、 γ サブタイプは比較的变化量も多く、その機能がほとんど明らかでなかったため、 γ サブタイプに着目することにした。そこで、本当にDGK γ が分化に伴い増加しているのかをタンパク質レベルで確認することとした。その結果、図5に示すように、DGK γ タンパク質量は分化に伴い、顕著に増加した。

3. 3. マウス表皮におけるDGK γ の局在

そこで、実際にDGK γ が分化に伴って増加しているのか、どの細胞層に発現しているのかを蛍光免疫染色で調べた。尚、コントロールとして、顆粒層から有棘層にかけて発現が増加するトランスグルタミナーゼ1 (TGase1) の抗体を用いた。

その結果、図6に示すように、DGK γ はTGase1よりも深い層、即ち基底層から、その発現が認められた。また、基底層から有棘層にかけて、蛍光強度が強くなったことから、分化とともに増加することが確認された。一方、角質層には、その発現は認められなかった。

3. 4. HaCaTにおけるDGK γ の機能解析

分化に伴い、DGK γ の発現量が増加してくることから、DGK γ はケラチノサイトの形態に関係しているのではないかと考え、HaCaTにGFP-DGK γ を強発現させ、細胞の面積及び厚さを測定した。しかし、顕著な差は認められなかった(data not shown)。

3. 5. DGK γ ノックアウト(KO)マウスの作製とその表現型

そこで、DGK γ KOマウスを作製することにした。まず、genotypingによってKOと判断されたマウスについて、本当にDGK γ がノックアウトされているか否か確認するため

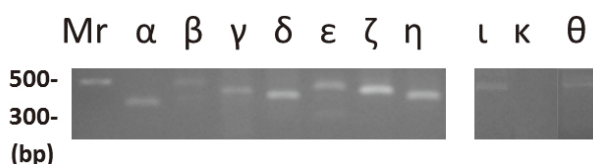


図3 HaCaT細胞に発現しているDGKサブタイプ
Mr: サイズマーカー

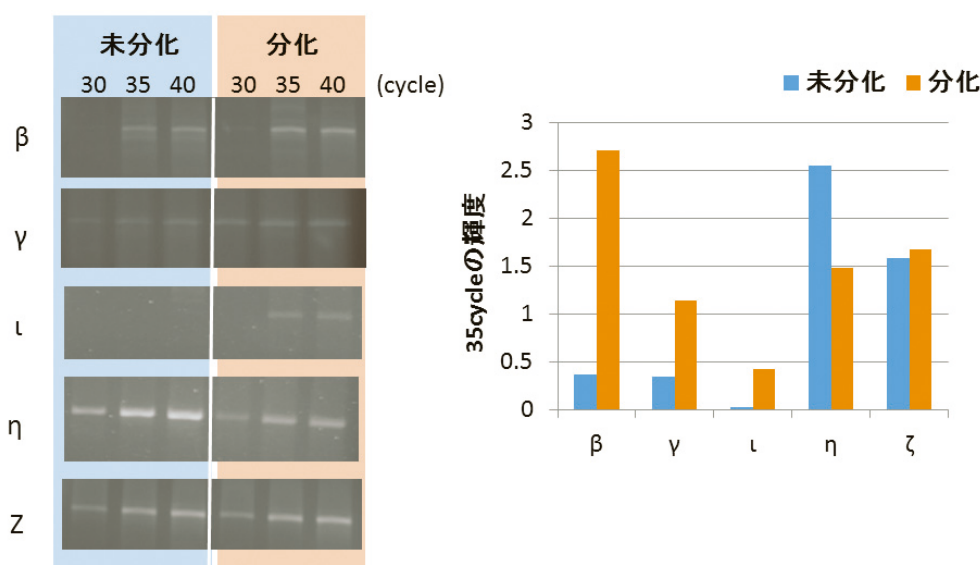


図4 分化・未分化 HaCaT における DGK 発現の確認

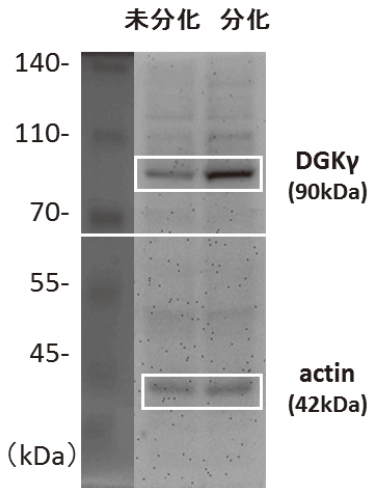


図5 分化に伴うDGK γ タンパク質
量の変化

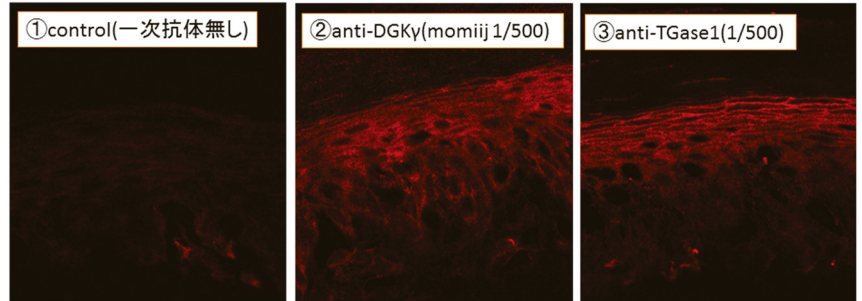


図6 マウス皮膚におけるDGK γ の局在

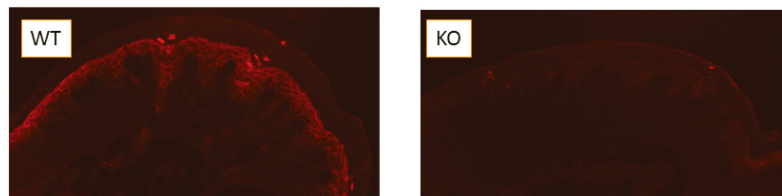


図7 DGK γ KO マウス皮膚におけるDGK γ の消失

に、ウェスタンブロット及び蛍光免疫組織染色を行った(図7)。その結果、脳におけるDGK γ の発現は完全に消失しており(data not shown)、皮膚における免疫反応も消失した(図7)。このことから、作製したマウスはDGK γ がノックアウトされていることが確認された。そこで、得られたWT、DGK γ KO、ヘテロマウスの体重を2週齢目から12週齢まで1週間ごとに測定したが、雌雄ともに顕著な体重の変化も見られず、メンデルの法則にしたがって生まれてきた(data not shown)。さらに、皮膚においても、脱毛やバリア機能障害を示す表現型は今のところ観察されていない。

3. 6. 接触性皮膚炎試験

一方、我々はDGK γ がマスト細胞からのヒスタミン分泌に関与していることを明らかにしている⁹⁾。そこで、DGK γ の接触性皮膚炎への関与を調べるために、KOマウスを用いて接触性皮膚炎試験を行った。

10週齢の雄のWTおよびDGK γ KOマウスに、TNCBを用いて接触性皮膚炎を発症させ、遺伝子型間でその症状を比較した。皮膚炎誘導24時間後の耳切片をHE染色して観察し(図8A)、耳の平均の厚みを算出した。耳の平均の厚みは、耳切片染色図を12分割し、各地点の耳の幅を測定、平均することで算出した。その結果、溶媒のみを塗布した左耳と比較してTNCBを塗布した右耳の方が、WT、KO共に厚みが増していた(図8B)。更に、KOマウスは、WTと比較して耳の厚みの増加率が高い傾向にあった。続いて、

トリジンブルー染色によって各耳切片中の肥満細胞を赤紫色に異染色し、細胞数や脱顆粒率を遺伝子型間で比較した。その結果、KOマウスの方が皮膚炎誘導による1mm²あたりの肥満細胞数の増加が、小さい傾向にあった(図8C)。即ち、浸潤してきているマスト細胞が少ない傾向が認められた。一方、WT、KO共に皮膚炎誘導によって肥満細胞の脱顆粒が促進される傾向が見られたものの、遺伝子型間で有意な差は見られなかった(図8D)。脱顆粒率は、皮膚切片全体の肥満細胞数中の脱顆粒している肥満細胞数から算出した。

3. 7. 経皮吸収試験

経皮吸収試験は皮膚のバリア機能におけるDGK γ の必要性を検討するために行った。DGK γ ヘテロマウス同士のmatingによって得た新生児を、生後間もなく0.4w/v % trypan blue solution (Wako) 中で振とうした。その結果、染色前後で比較するとマウスの皮膚表面に青い染色が見られたが、WTとDGK γ KOマウス間で見た目や染色の濃さに有意な差は見られなかった(data not shown)。さらに組織学的に染色の浸潤度を比較するために、染色後の新生児の背部の皮膚を用いて、凍結切片を作製した。その結果、両遺伝子型で表皮の角質層に青い染色が見られたが、WTとDGK γ KOマウス間で差は見られなかった(data not shown)。

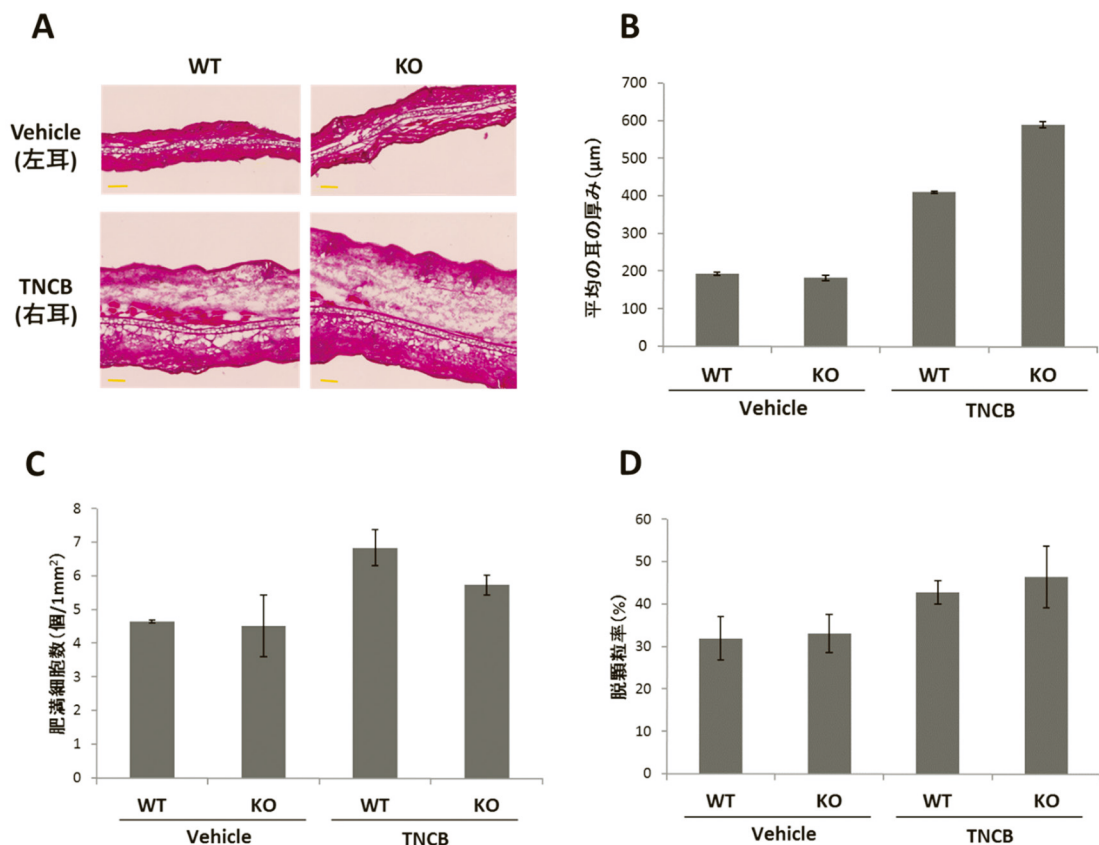


図8 接触性皮膚炎誘導 24 時間後の皮膚炎症状の比較

- (A) 接触性皮膚炎誘導 24 時間後の耳切片を用いて HE 染色を行った。(黄色線 = 300 μm)
 (B) 遺伝子間で、耳の平均の厚みを比較した。図 1A のように HE 染色した耳切片図を 12 分割し、各地点の耳の厚みから平均の耳の厚みを算出した。
 (C) 遺伝子型間で、皮膚切片 1 mm² あたりの肥満細胞数を比較した。
 (D) 遺伝子型間で肥満細胞の脱顆粒率を比較した。脱顆粒率は、皮膚切片全体の肥満細胞数中の脱顆粒している肥満細胞数から算出した。また、トルイジンブルー染色によって染色された肥満細胞が、8 つ以上の顆粒を放出している時、脱顆粒していると判断した。

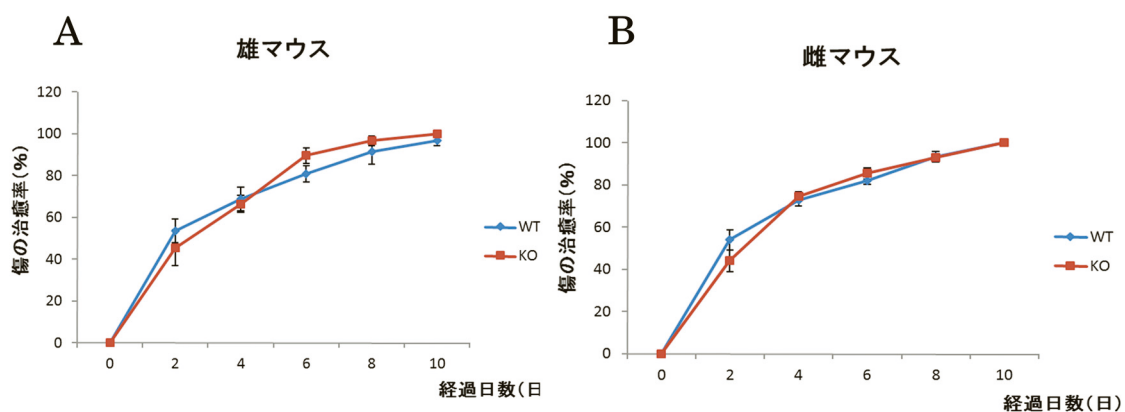


図9 傷の治癒速度の比較

経過日数ごとに 0 日目からの傷の治癒率を雄 (A)、雌 (B) ごとに示した。(雄: n=2、雌: n=3)

3. 8. Wound healing assay

Wound healing assay は傷の治癒に DGK γ が関与しているかどうかを検討するために行った。10 週齢の WT および DGK γ KO マウスの背部の毛を剃り、皮膚に直径約 2 mm の傷を付け、経過日数ごとに測定した傷の面積を元に、

創傷 0 日目からの傷の治癒率を算出した。その結果、WT 及び DGK γ KO マウス共に、創傷 10 日目で傷が完治した。しかし、雌雄共に遺伝子型間で、傷の治癒速度に大きな差は見られなかった(図 9A, B)。

4. 総括及び考察

本研究により、ケラチノサイトには多くのDGKサブタイプが発現していることが明らかになった。例えば、DGK β , γ , ι サブタイプは分化に伴い増加し、 η は減少することが示唆された。しかし、本実験は、それぞれのサブタイプが分化前と分化後と比較してその増減をみたものであるため、各サブタイプ間の発現量を比較することは困難である。また、mRNAの量を調べただけであり、タンパク質レベルの解析を今後行っていく必要がある。このうち、DGK γ は皮膚の蛍光免疫染色において、染色することには成功しているが、皮膚のウエスタンにおいて、そのバンドを確認するにはいたっていない。増減が確認されたサブタイプについても、ウエスタンや蛍光免疫染色を行い、もっともケラチノサイトの分化に寄与していそうなサブタイプを特定し、同様の実験を行っていく予定である。

皮膚に発現していることが明らかになったDGKサブタイプのうち、少なくともDGK γ は基底層から顆粒層まで発現し、分化とともにタンパク質レベルで増加することが明らかとなった。しかし、今のところ、培養細胞においても、KOマウスにおいてもケラチノサイトの分化においてDGK γ の重要性を示唆するような知見は得られていない。一方、我々はDGK γ がマスト細胞からのヒスタミン分泌に必須であることを発見した⁹⁾。そこで、DGK γ KOマウスを用いて接触性皮膚炎試験も行った。その結果、炎症部位へのマスト細胞の浸潤の減少傾向は認められたものの、皮膚の肥厚や脱顆粒を起こしているマスト細胞の数には有意な差は認められなかった。実際DGK γ KOマウスにおいて、ヒスタミン量が減少しているのか、他の炎症性メディエーターの量がどのようになっているのか調べていく必要がある。

さらに、皮膚のバリア機能及び傷に対する治癒速度などを検討したが、有意な差は認められなかった。今後、皮膚におけるDGK γ の新たな機能を検討すべくより詳細な検討が必要と考えられる。一方、皮膚にはDGK γ 以外にもDGK β , ι , η サブタイプは分化に伴い変動していることから、これらのサブタイプの機能についても検討していく必要があろう。そして何よりも、さらに、ヒト皮膚組織を用いて、ケラチノサイトに発現しているDGKサブタイプについて、調べていく必要がある。

(参考文献)

- 1) Koster, M.I. and Roop, D.R. Mechanism regulating epithelial stratification. *Annu. Rev. Cell Biol.* 23, 93-113, 2007.
- 2) Denning, M.F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1141-1146, 2004.
- 3) Nishizuka, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614, 1992.
- 4) Sakuma, M., Shirai, Y., Yoshino K., Kuramasu, M., Nakamura, T., Yanagita, T., Mizuno, K., Hide, I., Nakata, Y. and Saito, N. Novel PKC α -mediated phosphorylation site(s) on cofilin and their potential role in terminating histamine release. *Mol. Biol. Cell* 23: 3707-3721, 2012.
- 5) Adachi N, Oyasu M, Taniguchi T, Yamaguchi Y, Takenaka R, Shirai Y, and Saito N. Immunocytochemical localization of a neuron-specific diacylglycerol kinase β and γ in the developing rat brain. *Mol. Brain Res.* 139, 288-299, 2005.
- 6) Ishisaka M., Tsuruma K., Shimazawa M., Shirai Y., Saito N. and Hara H. Increased seizure susceptibility in a mouse with diacylglycerol kinase β deficiency. *Neuroscience & Medicine*, 4, 117-122, 2013.
- 7) Kakefuda K., Oyagi A., Ishisaka, M., Tsumura, K., Shimazawa M., Yokota, K., Shirai Y., Horie K., Saito N., Takeda J. and Hara H. Diacylglycerol kinase β knockout mice exhibit lithium-sensitive behavioral abnormalities. *PLoS ONE* 5. e13447, 2010.
- 8) Shirai Y., Kouzuki T., Kakefuda K., Moriguchi S., Oyagi A., Horie K., Morita S., Shimazawa M., Fukunaga K., Takeda J., Saito N. and Hara H. Essential role of neuron-enriched diacylglycerol kinase (DGK), DGK β in neurite spine formation, contributing to cognitive function. *PLoS ONE* 5. e11602-, 2010.
- 9) Sakuma M, Shirai Y, Ueyama T, Saito N. Diacylglycerol kinase γ regulates antigen-induced mast cell degranulation by mediating Ca^{2+} influxes. *Biochem Biophys Res Commun.*, 445:340-350, 2014.