

平成22年4月9日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370051
 研究課題名（和文） ショウジョウバエ貪食受容体 Draper を介した変性自己細胞除去の仕組み
 研究課題名（英文） Mechanism of the removal of degenerated own cells by Draper, a phagocytosis receptor of *Drosophila*
 研究代表者
 中西 義信 (NAKANISHI YOSHINOBU)
 金沢大学・薬学系・教授
 研究者番号：40172358

研究成果の概要（和文）：線虫の貪食受容体 CED-1 に相当するショウジョウバエの Draper は、血球細胞及びグリア細胞によるアポトーシス細胞の貪食除去に必要とされる。本研究では、Draper が認識するアポトーシス細胞側の目印分子が探索され、研究代表者らが Pretaporter と名付けた小胞体タンパク質が見いだされた。Pretaporter はアポトーシス時に小胞体から細胞表層に移動して Draper に認識されるようになると考えられた。また、Pretaporter の結合により Draper のチロシンリン酸化が促され、それを契機にして細胞内に貪食誘導性の情報が伝達されると示唆された。

研究成果の概要（英文）：Draper, a *Drosophila* homologue of the *Caenorhabditis elegans* phagocytosis receptor CED-1, plays a role in the phagocytosis of apoptotic cells by hemocytes and glia. In the present study, a ligand(s) for Draper was searched for, and an endoplasmic reticulum protein, which we named Pretaporter, was identified. Pretaporter relocated to the cell surface during apoptosis, and its binding to Draper seemingly activated a signal transduction pathway for phagocytosis by augmenting tyrosine phosphorylation of Draper.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：免疫生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：食食、アポトーシス、自然免疫、ショウジョウバエ、細菌感染、細胞内情報伝達、リン酸化

1. 研究開始当初の背景

線虫食食受容体 CED-1 のショウジョウバエでのホモログである Draper は、細胞外領域に上皮成長因子様繰り返し配列そして細胞内領域にリン酸化され得る複数のチロシン残基を持つ I 型膜タンパク質である。本研究課題に入る前の研究代表者らの研究により、Draper は、ヘモサイト及びグリア細胞によるアポトーシス細胞の食食除去、ならびに変態過程での神経回路再編成における幼虫型神経の軸索除去に必要とされることが示されていた。しかし、このような Draper を介した変性自己組織の食食除去の仕組み、特に Draper が標的細胞表層のどんな分子を認識するのかは不明であった。

哺乳類でのアポトーシス細胞食食においては、膜リン脂質のホスファチジルセリンが食食受容体のリガンドとして働くことが知られている。しかし、以前の研究で、Draper を介したアポトーシス細胞の食食反応にはホスファチジルセリンが関与しないことがわかっていた。そこで、Draper のリガンドとなるタンパク質を探索することにした。

2. 研究の目的

以下に示す Draper を介した変性自己組織の食食反応におけるリガンドを見いだすこと目的として研究が進められた。

- ・ヘモサイトによるアポトーシス細胞の食食
- ・グリア細胞によるアポトーシス細胞の食食
- ・ヘモサイトによる幼虫型神経軸索の食食

3. 研究の方法

(1) Draper リガンド候補の単離

Draper 細胞外領域のほぼ全長を組換え型タンパク質として調製し、それをセファロースに共有結合させてアフィニティークロマトグラフィー担体を作成した。それを用いて、アポトーシスを誘導したショウジョウバエ培養細胞株の抽出液を分画した。担体に吸着したタンパク質を、低い pH のバッファーで溶出して SDS-PAGE で分析した。陰性コントロール実験の結果と比較して、Draper 細胞外領域を使ったアフィニティークロマトグラフィーでのみ検出されるバンドについて、質量分析によりタンパク質を同定した。

(2) リガンド候補と Draper との結合の解析

標識付きの組換え型タンパク質として調製した両タンパク質を混ぜ、一方の標識を利用して沈降させた時に、他方が共沈降するかどうかを調べて結合性を判定した。

(3) 食食反応の解析

ショウジョウバエ胚丸ごとあるいは胚から取り出した細胞集団を免疫組織化学的に解析し、アポトーシス細胞を取り込んだヘモサイト及びグリア細胞の割合を計測して食食程度を算出した。リガンド候補の食食への関与は、対応する遺伝子を欠損させたショウジョウバエを作成し、野生型との間で食食程度を比較して判定した。また、食食誘導性の情報伝達因子とリガンド候補との関係について、ヘテロ欠損体を組み合わせる遺伝子相互作用解析により調べた。

(4) リガンド候補の細胞内局在性の解析

組換え型タンパク質を抗原としてリガンド候補を認識する抗血清を作成し、アポトーシス誘導前後でのショウジョウバエ組織あるいは培養細胞株について免疫組織化学を適用して細胞内局在性を判定した。

4. 研究成果

(1) Draper リガンド候補の単離

アフィニティークロマトグラフィーの手法を利用して、アポトーシスを誘導した培養細胞株の抽出液中に、Draper の細胞外領域に結合するタンパク質をさがした。その結果、分子質量 47 キロダルトンを与えるバンドが見いだされ、質量分析で構造を決定した。その結果、このバンドは機能未知のタンパク質であり、チオレドキシシン様ドメインを 3 つ含む小胞体内のタンパク質だと予想された。抗体を利用して調べると、やはりこのタンパク質は小胞体に存在し、ショウジョウバエの発生過程を通じてほぼ一様な発現程度を示した。また、Draper との結合には、2 つのチオレドキシシン様ドメインを含むアミノ末端側およそ 2/3 の領域で十分であった。

(2) Draper リガンドの同定

このタンパク質は、生細胞では小胞体のみに存在するが、アポトーシス細胞では一部が細胞表層でも検出された。次に、このタンパク質の遺伝子を破壊したショウジョウバエを作成し、アポトーシス細胞貪食の程度を調べた。その結果、胚におけるヘモサイト及びグリア細胞による貪食が、変異型では野生型での場合の半分程度に低下していることがわかった。この変化は胚全体の細胞で正常遺伝子を発現させることで回復し、ヘモサイト特異的に発現させても効果はみられなかった。このことより、このタンパク質はアポトーシス細胞において機能すると考えられた。

さらに、培養細胞株の表層にこのタンパク質を強制的に発現させると、アポトーシスを起こすことなく Draper 依存の貪食を受けるようになった。一方、変態過程での Draper に依存した幼虫型神経軸索の貪食は、変異型ショウジョウバエでも正常に観察された。

これらの結果より、この小胞体タンパク質は、アポトーシス時に細胞表層に出現して食細胞の Draper に結合して働く貪食リガンドであると結論された。私たちは、このタンパク質を Pretaporter と名付けた。

(3) Pretaporter の働き方

さまざまな遺伝子相互作用解析での結果から、Pretaporter は受容体 Draper、アダプター Ced-6、及び G タンパク質 Rac と同一経路で働くことが示唆された。この結果は、Draper のホモログである線虫 CED-1 の働き方と同様であった。

以上の成果は、2009年6月に米国で開催されたゴードン会議において招待講演として発表され、また同年12月に EMBO Journal 誌に掲載された。

(4) 細菌貪食の受容体としての Draper

ショウジョウバエヘモサイトが活発に細菌を貪食することは知られていたが、その際のリガンドは不明であった。私たちは、細胞壁成分の合成が起こらない各種の黄色ブドウ球菌変異体について、ヘモサイトによる被貪食能を調べた。その結果、リポタイコ酸を欠損すると菌の貪食が著しく低下することがわかった。さらに、リポタイコ酸に依存する貪食は、ヘモサイトでの Draper の発現を要求した。そして、リポタイコ酸と Draper が直接に結合することが示された。これらの結果を合わせ、リポタイコ酸が Draper のリガンドとなってヘモサイトによる黄色ブドウ球菌の貪食が行われると結論された。

ショウジョウバエヘモサイトによる細菌

貪食において、リガンドと受容体の組み合わせが示されたのはこの研究が初めてである。この成果は、2009年11月に Journal of Immunology 誌に掲載された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Kuraishi, T, Nakagawa, Y., Nagaosa, K., Hashimoto, Y., Ishimoto, T., Moki, T., Fujita, Y., Nakayama, H., Dohmae, N., Shiratsuchi, A., Yamamoto, N., Ueda, K., Yamaguchi, M., Awasaki, T., and Nakanishi, Y. Pretaporter, a *Drosophila* protein serving as a ligand for Draper in the phagocytosis of apoptotic cells. EMBO J. 28, 3868-3878 (2009)、査読有
2. Hashimoto, Y., Tabuchi, Y., Sakurai, K., Kutsuna, M., Kurokawa, K., Awasaki, T., Sekimizu, K., Nakanishi, Y., and Shiratsuchi, A. Identification of lipoteichoic acid as a ligand for Draper in the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Drosophila* hemocytes. J. Immunol. 183, 7451-7460 (2009)、査読有
3. Kuraishi, T., Manaka, J., Kono, M., Ishii, H., Yamamoto, N., Koizumi, K., Shiratsuchi, A., Lee, B. L., Higashida, H., and Nakanishi, Y. Identification of calreticulin as a marker for phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. Exp. Cell Res. 313, 500-510 (2007)、査読有

[学会発表] (計23件)

1. 橋本優実、田淵幸幾、黒川健児、栗崎健、関水久、中西義信、白土明子、リポタイコ酸と Draper を介したショウジョウバエヘモサイトによる黄色ブドウ球菌の貪食、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 23 日、神

戸国際会議場 (兵庫県)

2. Y. Fujita, Y. Nakagawa, T. Kuraishi, Y. Hashimoto, R. Okada, A. Shiratsuchi, Y. Nakanishi, Role of Pretaporter as a ligand for Draper in phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes, 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage, 2009 年 7 月 3 日、KKR ホテル金沢 (石川県)
3. A. Shiratsuchi, Mechanism and role of Draper-mediated phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by *Drosophila* hemocytes, Gordon Research Conferences: Apoptotic Cell Recognition & Clearance, 2009 年 7 月 2 日、Colby-Sawyer College (米国)
4. T. Kuraishi, Pretaporter, a Draper ligand, Gordon Research Conferences: Apoptotic Cell Recognition & Clearance, 2009 年 6 月 30 日、Colby-Sawyer College (米国)
5. T. Kuraishi, Y. Nakagawa, T. Ishimoto, T. Moki, Y. Fujita, H. Nakayama, N. Dohmae, A. Shiratsuchi, Y. Hashimoto, N. Yamamoto, K. Ueda, M. Yamaguchi, T. Awasaki, Y. Nakanishi, Pretaporter, a *Drosophila* endoplasmic reticulum protein serving as a ligand for Draper in phagocytosis of apoptotic cells, Jacques Monod Conferences, 2009 年 5 月 24 日、Aussois ホール (フランス)
6. 倉石貴透、真中純子、栗崎健、中川祐紀子、荒井國三、岡田亮、白土明子、中西義信、ショウジョウバエ Ced-6 のアポトーシス細胞貪食における役割、第 81 回日本生化学会大会、2008 年 12 月 10 日、神戸国際会議場 (兵庫県)
7. 中西義信、倉石貴透、石本聖、茂木武、

中川祐紀子、中山洋、堂前直、白土明子、橋本優実、山本奈央子、上田晃一、山口政光、栗崎健、シヨウジョウバエ食食受容体が認識するアポトーシス細胞側リガンドの同定、第17回日本アポトーシス研究会学術集会、2008年8月1日、メルパルク京都（京都府）

8. T. Kuraishi, T. Ishimoto, T. Moki, Y. Nakagawa, H. Nakayama, A. Shiratsuchi, Y. Hashimoto, N. Yamamoto, K. Ueda, M. Yamaguchi, T. Awasaki, Y. Nakanishi, Pretaporter, a *Drosophila* endoplasmic reticulum protein serving as a ligand for draper in phagocytosis of apoptotic cells, The Seventh International Cell Death Society Symposium, 2008年6月6日, Shanghai National Accounting Institute (中国)

9. Y. Nakanishi, Phagocytic removal of apoptotic cells in *Drosophila*: identification of a receptor and ligand, 2008 Spring International Convention of the Pharmaceutical Society of Korea, 2008年5月1日、International Convention Center Jeju (韓国)

10. T. Kuraishi, T. Ishimoto, N. Yamamoto, K. Ueda, H. Nakayama, M. Yamaguchi, T. Awasaki, Y. Hashimoto, T. Moki, A. Shiratsuchi, Y. Nakanishi, Characterization of CG1837 protein as a candidate ligand for Draper, a *Drosophila* phagocytosis receptor, 49th Annual *Drosophila* Research Conference, 2008年4月4日、Town and Country Resort & Convention Center (米国)

11. 倉石貴透, 山本奈央子, 上田晃一, 中山洋, 橋本優実, 白土明子, 中西義信, シヨウジョウバエ食食受容体 Draper が認識するアポトーシス細胞表層分子の同定、第80回日本生化学会大会、2007年12月12日、パシフ

ィコ横浜（神奈川県）

12. 中西義信, シヨウジョウバエ感染症モデルを用いた細菌病原性と宿主免疫応答の解析、日本薬学会関東支部第32回学術講演会、2007年10月20日、日本薬学会長井記念会館長井記念ホール（東京都）

13. T. Kuraishi, N. Yamamoto, K. Ueda, Y. Hashimoto, H. Nakayama, A. Shiratsuchi, Y. Nakanishi, Isolation of an endoplasmic reticulum protein as a candidate ligand for Draper, a *Drosophila* phagocytosis receptor, 第8回日本シヨウジョウバエ研究集会、2007年7月2日、淡路夢舞台国際会議場（兵庫県）

14. Y. Nakanishi, Isolation of putative ligand for Draper, *Drosophila* homologue of *C. elegans* CED-1, responsible for apoptotic cell clearance and axonal pruning, Gordon Conference Apoptotic Cell Recognition and Clearance, 2007年6月19日、Bates College (米国)

〔図書〕（計2件）

1. 白土明子, 中西義信, 羊土社、実験医学増刊号、細胞死による多様な生体制御、第3章の2. アポトーシス依存的な細胞食食による生体恒常性の維持、2010年、第28巻、1055頁～1061頁

2. Nakanishi, Y., Henson, P. M., Shiratsuchi, A. Landes Bioscience (USA), Target Pattern Recognition in Innate Immunity, U. Kishore (編), 第9章 (Pattern recognition in phagocytic clearance of altered self), 2009年, 129頁～138頁

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~seibutu/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

中西 義信 (NAKANISHI YOSHINOBU)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号：40172358

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
白土 明子 (SHIRATSUCHI AKIKO)
金沢大学・薬学系・准教授
研究者番号：90303297