

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007-2008

課題番号：19890200

研究課題名（和文） 線虫における、補体系因子 C3 様蛋白の発現及び機能解析

研究課題名（英文） Expression and functional analysis of the complement factor C3-like protein in *Caenorhabditis elegans*

研究代表者

丹治 貴博 (TANJI TAKAHIRO)

岩手医科大学・薬学部・助手

研究者番号：60453320

研究成果の概要:補体系因子 C3 様の蛋白質である無脊椎動物の TEP は、昆虫では病原体の認識・排除に関与する。線虫の TEP (cTEP) は昆虫のそれよりも C3 の構造上の特徴をよく共有しており、その解析から C3 の原初機能の解明が期待された。発現解析から、cTEP が胚後期から成虫期まで発現し、体壁筋や陰門、一部の神経系細胞に局在する事を明らかにした。これは、cTEP が病原体認識とは異なる局面で働く事を示唆している。遺伝子欠損変異体の解析から、通常飼育条件化ではその機能は必須ではないことから、環境ストレス下で機能する可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・生物系薬学

キーワード：線虫、補体、筋肉、神経

1. 研究開始当初の背景

ヒトの自然免疫研究における昨今の著しい進展は周知の事実であるが、その背景に昆虫など無脊椎動物の生体防御の研究が礎として大きく貢献したことは意外と認識されていない。ハエやガ等の昆虫を用いた研究から、感染防御の活性化制御や異物認識の分子メカニズムが解明されてきた。その一方で細胞性の防御応答等、未解明の機構がなお多く残されている。

昆虫よりも単純なモデル多細胞動物であ

る線虫は、遺伝学的解析が可能である他に個体の表現型が容易に観察できるという利点を持ち、昆虫では解析が困難な研究も容易に行うことができるが、その生体防御機構の解明は遅れていた。しかし、今世紀に入ってから細菌感染系の確立や感染防御機構の解析が進み始め、また、その中で病原体のヒト感染時の病原性と線虫感染時の病原性との間に相関性があることが明らかとされてきていることから (Sifri CD *et al.* Trends Microbiol. 13, 119-27 (2004))、自然免疫、

特に貪食のような原始的な免疫反応を解明する上で、線虫が有用なモデル生物となることが期待された。

(1) 補体系は脊椎動物において自然免疫と獲得免疫の両面において働く免疫システムである。その役割は

①感染部位に食細胞を誘導する

②病原体のオプソニン化
とそれに続く

③病原体の破壊を引き起こす

の大きく三つであり、中でも重要なのは異物の認識を貪食・排除へとつなげる過程であるオプソニン化である。補体系は抗体を介した古典経路、直接病原体によって活性化する第二経路、病原体に結合したマンノース結合レクチンを介したレクチン経路の三つの経路によって活性化するが、そのいずれの経路においても活性化して中心的な働きをするのが C3 である。C3 が上流の経路によって C3a と C3b に限定加水分解されると、C3a(anaphylatoxin) が免疫細胞に対する走化性ペプチドとして機能する一方、C3b は分子内の thioester motif が病原体表面分子と共有結合し、オプソニンとして食細胞上の C3b 受容体を介した病原体の貪食を促進する。C3 自体は古くから知られよく解析されているが、その分子の活性化メカニズムが複雑かつ極めて巧妙であること、ヒトで C3 を含めた補体系の欠損が原因の免疫疾患が数多く知られていることから、生物学的にも医学的見地からも現在もなお注目を浴びている因子である。

補体系を構成する因子が有するドメイン構造の多くは、脊椎動物のみならず広く無脊椎動物にも認められる。C3 同様 α 2-macroglobulin(α 2M)/C3 ファミリーに属するタンパク質は昆虫においても TEP として見いだされ (Lagueux M *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97, 11427-32(2000), Lavashina EA *et al.* Cell 104, 709-718 (2001))、特にマラリア感染蚊において、腸内に感染したマラリア原虫に TEP が結合して感染防御に関与することが示されたことから (Blandin S *et al.* Cell 116, 661-670 (2004))、進化的に補体系が確立する以前から、このファミリー分子が病原体の認識・排除に関わる感染防御因子として機能することが示唆された。

(2) 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) にはゲノム上このファミリーに属するタンパク質をコードする遺伝子はただ一つ (cTEP) 存在する。これはホモロジーの上では昆虫の TEP と共に TEP サブファミリーを構成する。cTEP、

昆虫の TEP 共に、病原体との結合に必須な thioester motif 及びその結合に触媒的に働くと考えられるヒスチジン残基を保存しているが、これらのアミノ酸配列を具に比較すると以下の相違点がある。

① C3 には clear-cut site と呼ばれる配列 (RRRR/RKKR) があり、翻訳後即座にその部位で切断された後、その産物である二つの断片がジスルフィド結合した形で分泌される。cTEP には clear-cut site が認められ、C3 と同様のプロセッシングを受ける可能性があるが、昆虫の TEP にはそれがなく、一本のポリペプチドとして分泌されると考えられた。

② 昆虫の TEP の C 末端には特徴的なシステイン残基の配置 (cysteine cluster) が認められるという点で C3 や cTEP とは異なる。

以上の点から、昆虫の TEP と比較して cTEP はより C3 に類似しており、C3 のプロトタイプと考えられた。従って、cTEP の機能の解明が C3 の原初機能の解明に寄与するものと期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、線虫における TEP (cTEP) の発現及び機能を解明することである。TEP はヒトの補体系における中心的な因子である C3 と同様 α 2M/C3 ファミリーに属するタンパク質であり、C3 のプロトタイプと考えられる。モデル生物である線虫の TEP の機能の解明が、C3 の機能とその進化の解明に寄与するものと考えられる。

(1) cTEP 遺伝子のスプライシングアイソフォームの解析

昆虫等の他の無脊椎動物とは異なり、線虫のゲノムには TEP をコードしている遺伝子はただ一つしか存在しない。しかし、cTEP 遺伝子には、少なくとも 3 種類のスプライシングアイソフォームの存在が知られており、さらに、その遺伝子構造から理論上 6 種類のアイスフォームの存在が予想されることから、複数のアイソフォーム間の機能的差異により、多様な機能を担う可能性がある。どのようなスプライシングアイソフォームが発現しているか調べる。

(2) cTEP の発現部位の解析

cTEP の発現組織に関しては限られたデータしか得られていない。cTEP の機能を類推する目的でその発現部位を調べる。

(3) 生体内で発現した cTEP の構造解析

補体系因子 C3 は翻訳後 clear-cut site で限定加水分解を受けて生じた 2 本のポリペプチド鎖がジスルフィド結合で繋がった形で分泌される。その一方で昆虫の TEP は clear-cut site を有さず、一本のポリペプチド鎖として分泌される。線虫の TEP には C3 と相同の部位に clear-cut site を有するため、C3 同様に 2 つの断片に分解されてから分泌される可能性がある。生体内における cTEP の構造を解析する。

(4) リコンビナント cTEP の調製

抗 cTEP 抗体の作成及び生化学的解析に供する目的で、リコンビナント cTEP を調製する。

(5) cTEP 欠損変異線虫の表現型の解析

cTEP の生体内における機能を知る為に、cTEP 遺伝子の欠損変異線虫を得、その表現型を解析する。

3. 研究の方法

(1) cTEP 遺伝子のスプライシングアイソフォームの解析

成虫より RNA を調製、RT-PCR 法により、各種スプライシングアイソフォームの発現を検出した。

(2) cTEP の発現組織の解析

cTEP 遺伝子のプロモーターに GFP 遺伝子をつないだコンストラクトを作成し、線虫に遺伝子導入した。また、タンパク質の局在を明らかにする為に、cTEP 遺伝子に in frame で GFP 遺伝子をつないだコンストラクトを作成し、線虫に遺伝子導入することで、own promoter の制御下に GFP 融合型 cTEP 発現させた。

これらのトランスジェニック線虫における GFP の蛍光を顕微鏡下で解析することにより、cTEP の発現・局在組織を同定した。

(3) 生体内で発現した cTEP の構造解析

(2) で作成した、GFP 融合型 cTEP を発現させた個体の抽出液を用いて、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロットによって cTEP の分子量を分析した。また、C3 では 2 本のポリペプチド鎖間でジスルフィド結合していることから、還元状態と非還元状態での比較を行った。

(4) リコンビナント cTEP の調製

C 末端にヒスチジンタグをつけた cTEP の発現ベクターを作成し、昆虫由来培養細胞である Schneider-2 cell にトランスフェクションすることにより、cTEP を安定的に発現する stable cell line を得る。

(5) cTEP 欠損変異線虫の表現型の解析

cTEP のノックアウト線虫である可能性のある系統として、cTEP 遺伝子中にトランスポゾンが挿入されている線虫を入手して、ファンクショナルな TEP が発現しているか否かを RT-PCR 法により調べる。cTEP 遺伝子中にトランスポゾンが挿入されている入手可能な系統は 3 系統あるが、そのうち 2 系統はイントロンにトランスポゾンが挿入されており、もう 1 つの系統はエクソン中に挿入されているもののその挿入部位は C 末端に近く、thioester motif を含めた多くのドメインはそのまま維持されていると考えられることから、ファンクショナルな TEP として発現している可能性がある。その場合は新たに、ノックアウト線虫を作出する。

得られた cTEP 欠損変異線虫の表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) RT-PCR 解析により、cTEP 遺伝子から少なくとも 6 種類のスプライシングアイソフォームが発現していることを明らかにした。これらのアイソフォームは量的には全て同程度発現していると考えられた。また、TEP 遺伝子における alternative splice site は近縁種の線虫 (*C. briggsae*, *C. remanei*) でも保存されている。昆虫等の他の無脊椎動物種とは異なり、線虫は TEP 遺伝子を一種類しか有さないが、複数のアイソフォーム間の機能的差異により、多様な機能を担う可能性がある。

(2) cTEP の発現組織の解析

発生過程では、胚発生後期 (遅くとも 1.5-fold stage) から成虫期にかけて、発現組織としては、体壁筋、陰門及び一部の神経細胞とその支持細胞 (sheath cells, socket cells) で GFP の発現が検出された。また、GFP 融合型 cTEP を発現させてタンパク質の局在を解析した結果から、筋肉では dense body もしくはその近傍に局在していると考えられた。神経系における発現に関しては、Dil 等の神経細胞染色試薬を用いた共染色の結果から、labial neurons 等の一部の感覚神経に発現していることが示唆された。以上の結果は、cTEP

が感染防御における異物認識とは異なる局面で機能している事を示唆している。病原体認識への関与が知られている昆虫のTEP遺伝子は転写因子STATによって発現制御されるが、cTEPの発現は線虫の唯一のSTAT遺伝子 (*sta-1*) の欠損変異体でも影響を受けないことから、昆虫のTEPとは異なる転写因子によって発現制御を受けていると考えられる。

哺乳類においても筋肉細胞や神経系からのC3の発現はいくつか報告されているものの、その生理的意義の解明はあまり進んでいない。cTEPの筋肉・神経細胞における機能を明らかにすることが、C3の原初機能の解明に繋がると期待される。

(3) 生体内で発現したcTEPの構造解析

分泌前のプロセッシングにより2本のポリペプチド鎖に分かれるC3とは異なり、cTEPは主に一本のポリペプチドとして存在することが明らかとなった。この構造は、昆虫のTEPに近い。

(4) リコンビナント cTEP の調製

発現ベクターのトランスフェクションにより stable cell line を得た。しかし、cTEPの発現が mRNA レベルでは検出されるものの、タンパクレベルでは、SDS-PAGE 後の銀染色や抗ヒスチジンタグ抗体によるウェスタンブロットで検出されなかった。昆虫細胞ではcTEPの翻訳効率が低いか、翻訳後cTEPが分解を受けやすい可能性があり、昆虫細胞を用いたリコンビナント cTEP の調製は困難と考えられた。

(5) cTEP 欠損変異線虫の表現型の解析

cTEP 遺伝子中にトランスポゾンが挿入されている線虫はいずれも、正常に cTEP 遺伝子が発現しているか、もしくは変異の挿入部位から、未だファンクショナルである公算が高いものであった。そこで、National BioResource Project に変異体の単離を依頼、deletion mutant を得た (*tm3720*)。RT-PCR 及びシーケンス解析の結果から、その変異体ではマクログロブリンドメイン中 67 アミノ酸残基を欠失した変異蛋白を発現すると考えられる。その変異個体において、生存や成長・産卵、また解析した限りではその他の行動に顕著な異常は認められなかった。cTEP の機能が通常飼育条件下では必須ではない可能性、もしくは欠失した 67 アミノ酸残基が cTEP の機能に必須ではない可能性が考えられる。

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 2 件)

(1) H. Kawai, T. Tanji, H. Shiraishi (以上共筆頭著者) 他 12 名

Normal formation of *Caenorhabditis elegans* intestinal granules requires ATP-binding cassette transporters HAF-4 and HAF-9, which are highly homologous to human lysosomal peptide transporter TAPL (TAP-like).

Mol. Biol. Cell 査読有 in press

(2) T. Tanji, H. Shiraishi, S. Natori, A. Ohashi-Kobayashi

Differential activation of the lectin and antimicrobial peptide genes in *Sarcophaga peregrina* (the flesh fly)

Arch. Insect Biochem. Physiol. 査読有
Vol. 69 (2008) pp. 189-198

[学会発表] (計 5 件)

(1) 丹治貴博 他

線虫の補体系因子 C3 様蛋白 thioester-containing protein (TEP) の発現解析

BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会 合同大会)

2008 年 12 月 9 日 神戸

(2) 白石博久 他

線虫腸細胞のリソソーム関連オルガネラ形成における ABC 輸送体 HAF-4、HAF-9 の役割

BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会 合同大会)

2008 年 12 月 9 日 神戸

(3) 白石博久 他

線虫リソソーム関連輸送体の変異体に見られる腸内オルガネラ異常の解析～透過型電子顕微鏡を用いた超微細構造の観察～

第 47 回日本薬学会東北支部大会

2008 年 10 月 26 日 矢巾

(4) Takahiro Tanji et al.

Role of the *Caenorhabditis elegans* ABC transporter genes in the biogenesis of intestinal lysosome-related organelle

2008 East Asia *C. elegans* Meeting

2008 年 4 月 18-21 日 上海、中国

(5) 白石博久 他
線虫におけるリソソーム関連 ABC トランス
ポーターの役割
トランスポーター研究会第1回東北部会
2007年11月25日 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹治 貴博 (TANJI TAKAHIRO)
岩手医科大学・薬学部・助手
研究者番号：60453320

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者