

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890014

研究課題名（和文）自然免疫を調節する受容体型グアニル酸シクラーゼ Gyc76C のリガンド探索

研究課題名（英文）Searching for a ligand that activates Gyc76C, a receptor-type guanylate cyclase which mediates innate immunity

研究代表者

倉石 貴透 (KURAIISHI TAKAYUKI)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90613167

研究成果の概要（和文）：

私たちは受容体型グアニル酸シクラーゼ Gyc76C が自然免疫を調節する新規受容体であることを明らかにしてきた。

本研究では、Gyc76C のリガンドを同定することを目標として研究を進めた。ショウジョウバエ幼虫抽出液中に抗菌ペプチド発現を誘導する活性を見いだし、単離・精製し、新規自然免疫活性化因子を同定した。今後は、この因子が Gyc76C のリガンドであるか詳細な解析を進める。

研究成果の概要（英文）：

We have revealed that Gyc76C, a receptor-type guanylate cyclase, mediates innate immunity. In this study, we sought to identify a ligand for Gyc76C.

We found that Drosophila larval extract has an activity that induces the expression of antimicrobial peptides in Drosophila cell line. The activity was purified to homogeneity and the amino acid sequence was determined, resulting in the identification of a new protein that activates innate immune system in Drosophila. Further analysis should be done to validate that whether the identified protein would be a ligand for Gyc76C.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：自然免疫学

1. 研究開始当初の背景

自然免疫は、すべての多細胞生物が普遍的に有している感染防御の最前線で機能する免疫系であり、抗菌ペプチド産生等の液性因子に依存した体液性免疫、および血球細胞に

よる貪食作用などの細胞性免疫から構成される。しかし、これら二つのがどのように協調して病原微生物の排除に働いているかまだよくわかっていない。

ショウジョウバエの自然免疫を制御する

Toll 受容体の研究を契機に、哺乳類の Toll 様受容体 TLR が同定された (Nature 1997)。これが自然免疫研究におけるブレイクスルーとなり、その後の研究に大きな広がりを見せていることから、当該分野におけるショウジョウバエの有用性が強く示唆されている。

申請者が所属する研究室では、ショウジョウバエにおける新たな自然免疫制御因子を同定するために抗菌ペプチド発現を指標とした機能獲得型スクリーニングが行われ、受容体型グアニル酸シクラーゼ Gyc76C を発見した。興味深いことに、Gyc76C はショウジョウバエの細胞性免疫を担当するヘモサイトの増殖も制御していることが判明した。すなわち、体液性免疫と細胞性免疫の両反応に関与するこれまでにない新しいタイプの自然免疫受容体であることが明らかとなった。また、Gyc76C を介した抗菌ペプチド発現は dMyD88 依存であり、活性化した受容体により産生される細胞内 cGMP が必要であることも明らかになっている。

この研究を進展させることで自然免疫機構の理解がさらに深まると期待できる。そこで本研究では、Gyc76C が細菌感染時にどのようにして活性化するのかを明らかにする。

2. 研究の目的

Gyc76C の哺乳類ホモログはナトリウム利尿ペプチド受容体と呼ばれる。自然免疫への関与はまだ解析がなされていないものの、血圧調節に関与する受容体としての詳細な研究が進んでいる。そのリガンドは心臓が産生する心房性ナトリウム利尿ペプチドであり、二量体として存在する受容体がこれを認識する。したがって、Gyc76C にも内因性のリガンドが存在する可能性が高いと予想される。そこで、Gyc76C のリガンド同定を第一目標として研究を遂行する。

以下の条件を満たす分子を Gyc76C のリガンドであるとした。

1. 候補分子が Gyc76C の細胞外領域と物理的に結合すること
2. 候補分子の機能欠失ショウジョウバエにおいて、細菌感染時の抗菌ペプチド発現が低下していること
3. 候補分子の機能欠失ショウジョウバエにおいて、細菌感染時に誘導されるヘモサイトの増殖が低下すること
4. 候補分子の機能欠失ショウジョウバエにおいて、グラム陽性菌に対する感染抵抗性が低下すること
5. 候補分子が、Gyc76C 依存の細胞内 cGMP 上昇を誘導すること

3. 研究の方法

1) 細胞外領域 Gyc76C の発現・精製

Gyc76C の細胞外領域を GST との融合タンパ

ク質として発現し精製する。Gyc76C の細胞外領域にはどのような翻訳後修飾があるかわかっていない。そこで、正常な構造を持つ融合タンパク質が得られることを期待して、バキュロウイルス-昆虫細胞の系で細胞外領域を発現して精製する。そして、得られた融合タンパク質のゲル濾過クロマトグラフィーを行い、二量体化しているか調べる。Gyc76C の哺乳類ホモログは二量体として機能することが知られているため、精製した融合タンパク質が正常な構造を維持しているかの確認となりうるからである。

また、GST は通常二量体として存在するので、Gyc76C が正しい立体構造を保つ助けとなると考え、GST との融合タンパク質とすることを選んだ。

2) 細胞外領域 Gyc76C 結合タンパク質の同定

精製した融合タンパク質を結合させたアフィニティーレジンを作成し、細菌感染時の幼虫体液を回収してレジンとインキュベートし、結合したものを溶出する。溶出液を SDS-PAGE して、レジンに特異的に結合したバンドについて質量分析でアミノ酸配列を決定する。GST のみを結合させたレジンおよび非感染時の幼虫体液を陰性コントロールとして用いることで、結合の特異性を判定する。

結合分子同定の別手段として、タグをつけた細胞外領域 Gyc76C を過剰発現するショウジョウバエ幼虫の作成を平行して行う。過剰発現幼虫から感染時の体液を回収して、タグを用いてリガンドとの共精製を試みる。この方法では、タグ付き細胞外領域 Gyc76C がドミナントネガティブ体として働くことで、過剰発現幼虫は Gyc76C 欠損体と同様な表現型を示すと期待されるので、発現したタンパクが正常な構造をとっていることの確認ができる。

表現型が見られない時は、そもそも感染液中にリガンドが存在しない可能性が出てくる。その場合は、Gyc76C はリガンドを持つ他の受容体の共受容体として働いていることが推察されるので、Gyc76C 全長にタグをつけて S2 細胞あるいはショウジョウバエ幼虫に発現し、タグに対する免疫沈降法にて共沈する分子を見つける。

3) 細胞外領域 Gyc76C に結合する分子を欠損するショウジョウバエの解析

細胞外領域 Gyc76C に結合する分子を欠損するショウジョウバエを、RNAi 法もしくは遺伝子ノックアウト法にて作成する。そして、グラム陽性菌感染時の幼虫生存率、抗菌ペプチド発現量 (定量的 PCR 法にて定量)、ヘモサイト増殖 (PH3 抗体染色にて定量) を観察する。

以上は Gyc76C 欠損変異体において野生型

と比べて低下が見られたものであるので、候補分子が Gyc76C リガンドであるならば同じ表現型を示すと考えられるため本解析を行う。

4) 細胞内 cGMP 濃度を定量する実験系の確立
すでに申請者の所属する研究室において、ヘモサイト由来のショウジョウバエ株細胞 S2 に Gyc76C を定常的に発現させた株が作成されている。この Gyc76C 発現 S2 細胞と細菌感染幼虫体液とを共培養したときの細胞内 cGMP 濃度を測定し、その変化を検出できる培養条件を確立する。

また本実験系により、感染幼虫体液を分画して cGMP 誘導活性測定することで、Gyc76C リガンドの性状についての手がかりを得ることが可能になる。結合分子の同定が不調に終わった場合、リガンド分子がタンパク質でないかもしくは細菌由来のものであった場合、本実験系によりリガンドを精製することとする。

5) リガンド候補分子による Gyc76C を介した細胞内シグナル伝達

これまでの解析で得られたリガンド候補を、大腸菌もしくは昆虫細胞にて発現、精製する。その精製リガンド候補が細胞内 cGMP 濃度の上昇を導くか調べる。上昇が見られた場合、それが Gyc76C 依存か知るため、Gyc76C を発現しない S2 細胞をコントロールとして用いて比較する。また *in vivo* の実験として、精製リガンド候補を幼虫個体に直接注入して抗菌ペプチド発現を誘導するか観察する。

以上の解析により、研究目的の項目で定義した Gyc76C リガンドの条件を満たす分子が同定される。

4. 研究成果

1) 細胞外領域 Gyc76C の発現・精製

バキュロウイルス-昆虫細胞の系で Gyc76C 細胞外領域の発現を試みたが、結合実験を行うために十分な量が得られなかった。そこで、ショウジョウバエ培養細胞に Gyc76C の細胞内領域を発現させて精製したところ、結合するタンパク質を同定するために充分と考えられる量を得た。

2) 細胞外領域 Gyc76C 結合タンパク質の同定
ショウジョウバエ培養細胞で作成した細胞外領域 Gyc76C に結合するタンパク質の同定は現在進行中である。

並行して進めた、タグをつけた細胞外領域 Gyc76C を過剰発現するショウジョウバエ幼虫の作成については、タグ付き細胞外領域 Gyc76C がドミナントネガティブ体として働くことが確認できなかったため、中断することとした。

3) 細胞外領域 Gyc76C に結合する分子を欠損するショウジョウバエの解析

次項目 4. で記載する、新規 Toll 経路活性化因子のショウジョウバエ個体での解析が現在進行中である。

4) 細胞内 cGMP 濃度を定量する実験系の確立
まず、Gyc76C 発現 S2 細胞と細菌感染幼虫体液とを共培養したときの細胞内 cGMP 濃度を測定し、その変化を検出できる培養条件を確立した。

次に、ショウジョウバエ幼虫よりペプチド画分を調製する方法を確立し、そのペプチド画分に細胞内 cGMP 濃度を上昇させる活性を見いだした。

さらに、幼虫ペプチド画分がショウジョウバエ培養細胞株において抗菌ペプチド Drosomycin の発現を誘導する活性があることを見いだした。この活性は、細胞内 cGMP 濃度を上昇させる活性より明瞭であるため、アッセイを行う際に有用であることがわかった。

Gyc76C の過剰発現ショウジョウバエも同様に Drosomycin の発現を強く誘導することから、幼虫ペプチド画分を、Drosomycin 発現誘導活性を指標に精製することで Gyc76C リガンド候補を同定できると考え、逆相クロマトグラフィーを中心とした HPLC を行うことでその活性を単離することに成功した。

その単離品のアミノ酸配列をプロテインシーケンサーで決定した。その分子は、Drosomycin 発現誘導活性をもつことが知られていない分子であったため、新規の免疫活性化因子を同定することができた。

本因子の解析をすすめることで、新たな自然免疫制御機構の解明につながることを期待できる。

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 4 件)

①倉石貴透、倉田祥一郎

ショウジョウバエ腸管での免疫応答と制御化学と生物

査読無

50 巻

2012 年

435-440

総説

②Okada R, Nagaosa K, Kuraishi T, Nakayama H, Yamamoto N, Nakagawa Y, Dohmae N, Shiratsuchi A, Nakanishi Y.

Apoptosis-dependent Externalization and Involvement in Apoptotic Cell Clearance of

DmCaBP1, an Endoplasmic Reticulum Protein of *Drosophila*.

J Biol Chem.

査読有

287 巻

2012 年

3138-3146

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158613>

③ Kuraishi T, Binggeli O, Opota O, Buchon N, Lemaitre B.

Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*.

Proc Natl Acad Sci U S A.

査読有

108 巻

2011 年

15966-15971

<http://www.pnas.org/content/early/2011/09/02/1105994108.abstract>

④ Alattia JR, Kuraishi T, Dimitrov M, Chang I, Lemaitre B, Fraering PC

Mercury is a direct and potent γ -secretase inhibitor affecting Notch processing and development in *Drosophila*. FASEB J.

査読有

25 巻、2011 年、2287-2295

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415381>

[学会発表] (計 8 件)

① 鈴木弘章、倉石貴透、倉田祥一郎

ショウジョウバエ受容体型グアニル酸シクラーゼによる血球細胞増殖を介した自然免疫制御機構の解明

第 85 回生化学会大会

2012 年 12 月 14 日~2012 年 12 月 16 日

福岡

② 鈴木弘章、岩下真三、倉石貴透、後藤彰、倉田祥一郎

ショウジョウバエ受容体型グアニル酸シクラーゼによる血球細胞増殖を介した自然免疫制御機構の解明

第 23 回日本生体防御学会学術総会

2012 年 07 月 09 日~2012 年 07 月 11 日

東京

③ 狩野裕考、石川裕規、倉石貴透、倉田祥一郎

ショウジョウバエ自然免疫における cGMP 依存免疫応答活性化機構の解析

第 78 回日本生化学会東北支部会例会

2012 年 5 月 26 日 (土)

山形大学

④ 狩野裕考、石川裕規、倉石貴透、倉田祥一郎

自然免疫応答を活性化するショウジョウバエ受容体型グアニル酸シクラーゼ下流のシグナル伝達分子の機能解析

2012 年 3 月

日本薬学会第 132 年会、札幌

⑤ 狩野裕考、石川裕規、後藤彰、倉石貴透、倉田祥一郎

自然免疫応答を活性化するショウジョウバエ受容体型グアニル酸シクラーゼ下流におけるシグナル伝達分子の同定

第 34 回日本分子生物学会年会

2011 年 12 月 16 日 (金)

パシフィコ横浜

⑥ 倉石貴透, Olivier Binggeli, Onya Opota, Nicolas Buchon, Bruno Lemaitre

Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*

第 34 回日本分子生物学会年会

December 13 (Tue) - 16 (Fri), 2011 (発表 2011 年 12 月 14 日)

パシフィコ横浜

⑦ 倉石貴透, Olivier Binggeli, Onya Opota, Nicolas Buchon, Bruno Lemaitre

ショウジョウバエ腸管免疫における囲食膜の役割

昆虫ワークショップ 2011 東北

2011 年 10 月 12-14 日 (14 日発表)

ZA0 センタープラザ 山形県山形市蔵王温泉 903-2

⑧ 狩野裕考、石川裕規、倉石貴透、倉田祥一郎

ショウジョウバエ自然免疫応答を活性化する受容体型グアニル酸シクラーゼ下流のシグナル伝達分子の同定

2011 年 10 月 9 日

第 10 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2011, 仙台

[その他]

ホームページ等

http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei_original.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉石 貴透 (KURAIISHI TAKAYUKI)

東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：90613167

(2)研究分担者
該当無し ()

研究者番号：

(3)連携研究者
該当無し ()

研究者番号：