

Apoptosis-dependent externalization and involvement in apoptotic cell clearance of DmCaBP1, an endoplasmic reticulum protein of *Drosophila*

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/32433

【総説】

第10回 高安賞優秀論文賞受賞

論文 「Apoptosis-dependent externalization and involvement in apoptotic cell clearance of DmCaBP1, an endoplasmic reticulum protein of *Drosophila*」
 The Journal of Biological Chemistry
 Vol. 287, No. 5, Page 3138-3146 2012年1月掲載
 Ryo Okada, Kaz Nagaosa, Takayuki Kuraishi, Hiroshi Nakayama,
 Naoko Yamamoto, Yukiko Nakagawa, Naoshi Dohmae,
 Akiko Shiratsuchi and Yoshinobu Nakanishi

ショウジョウバエの小胞体タンパク質DmCaBP1のアポトーシス細胞に依存した細胞外放出とアポトーシス細胞貪食への関与

岡田 亮 (おかだ りょう)

背景

多くの生物の体内において、発生時の形態形成や病原微生物の感染に伴いアポトーシスを起こして死んでしまった細胞は、食細胞に取り込まれた後に分解され、速やかに体内から取り除かれる。こうした現象は貪食(どんしょく)と呼ばれ、昆虫から哺乳類まで広く保存されており、発生過程における形態形成や生体の恒常性維持に必須であると考えられている。食細胞はアポトーシス細胞を特異的に認識しており、このような認識は食細胞の受容体とアポトーシス細胞表層にだけ存在するリガンド分子の結合に規定されている。しかし、どのような分子がリガンドとして働くのか、完全には解明されていない。そこで本研究では遺伝学を駆使できるショウジョウバエをモデル生物として使い、このような課題に取り組んだ。ショウジョウバエの食細胞では一回膜貫通型のタンパク質Draperが受容体として働くことが知られているが²⁾、Draperと結合するはずのアポトーシス細胞特異的なリガンドは不明である。そこで、Draperリガンドを同定することを目的として解析を開始した。

結果

まず、アポトーシス細胞中に存在するDraper結合分子の探索を行った。Draper細胞外領域とGSTとの融合タンパク質あるいはGSTのみを結合させたレジンを用いたアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、GSTだけを結合させたレジンでは回収されないが、Draper-GST融合タンパク質を結合させたレジンに回収されるものとして約50 kDaの分子が見出され(図1)、質量分析の結果、DmCaBP1と呼ばれる機能未知のタンパク質であることが分かった。

DmCaBP1がDraperと結合してリガンドとして働いているならばアポトーシス細胞貪食反応においてDmCaBP1が重要な働きを行っているはずである。この点について検証を行うため、DmCaBP1を発現しない変異ショウジョウバエを樹立し、このようなハエの食細胞によるアポトーシス細胞貪食程度を調べた。すると、DmCaBP1欠損ショウジョウバエでは、このタンパク質が発現しているハエよりも貪食程度が有意に低下することが分かった(図2)。

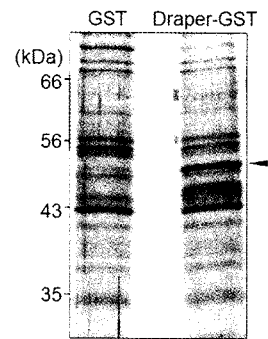


図1. アフィニティークロマトグラフィーによるDraper結合分子DmCaBP1の同定
 Draper細胞外領域とGSTとの融合タンパク質あるいはGSTのみを結合させたレジンを用いてショウジョウバエ株細胞抽出液中のDraper結合分子を回収した。回収した分子をSDS-PAGEにて分離後、銀染色を行い可視化した。矢頭はDmCaBP1検出バンドを示す。

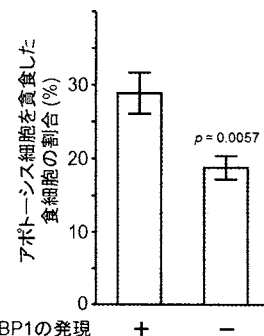


図2. DmCaBP1欠損ショウジョウバエにおける食細胞によるアポトーシス細胞貪食程度の低下
 DmCaBP1欠損ショウジョウバエおよびDmCaBP1を発現するハエより全細胞を取り出し、食細胞とアポトーシス細胞を同時に検出した。アポトーシス細胞を取り込んだ食細胞の割合を求め、貪食程度として評価した。

DmCaBP1は細胞外でDraperと結合して貪食を促していると考えられたが、cDNA塩基配列より予想されたDmCaBP1のドメイン構造に着目すると、このタンパク質がアミノ末端側からシグナルペプチド、ジスルフィド結合生成に関与すると言われるチオレドキシ様ドメインを持つと同時に、意外にも小胞体留め置き配列を持つことから、小胞体に局在するのではないかと予想された

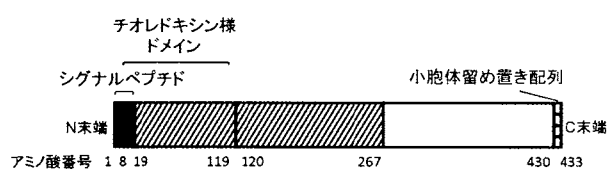


図3. DmCaBP1 cDNA塩基配列から予想されたドメイン構造
DmCaBP1のcDNA塩基配列より予想されたドメイン構造の模式図。数字はアミノ末端を1とした時のアミノ酸番号を示す。このタンパク質はアミノ末端側からシグナルペプチド(灰色部分)、ジスルフィド結合の生成に関与すると考えられるチオレドキシソドメイン(斜線部分)、および小胞体留め置き配列(横線部分)を持つと予想された。

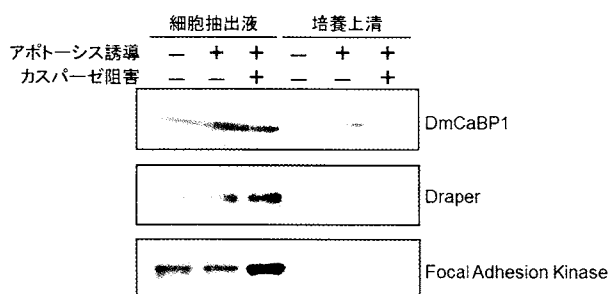


図4. アポトーシス依存的なDmCaBP1の細胞外放出
アポトーシス細胞培養上清を回収し、DmCaBP1、細胞膜貫通型タンパク質のDraper、そして細胞質局在性タンパク質のFocal Adhesion Kinaseに対する特異抗体をそれぞれ用いたウエスタンブロットングを行った。ここには各タンパク質の検出シグナルが観察された部分だけを示す。

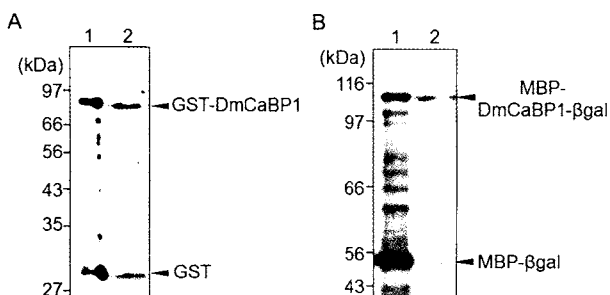


図5. アポトーシス細胞と食細胞へのDmCaBP1の結合
(A) 等モル量のGST-DmCaBP1融合タンパク質とGSTをアポトーシス細胞と混合し、遠心分離により細胞を回収した後、抽出液を調製し、抽出液中のGST-DmCaBP1融合タンパク質とGSTをウエスタンブロットングで検出した。抽出液中の各タンパク質をアポトーシス細胞と結合して回収されたものとみなし、その回収量を比較した。(B) 食細胞とDmCaBP1の結合をMBP-DmCaBP1-βgal融合タンパク質とMBP-βgalタンパク質を用いて解析した。各結果の1番のレーンでは解析に用いた各種タンパク質のみを泳動し、2番のレーンではタンパク質と混合した後に調製した細胞抽出液を泳動している。

(図3)。実際にショウジョウバエ細胞を観察すると、DmCaBP1が小胞体に局在している様子が確認された。

しかし、DmCaBP1はDraperの細胞外領域と結合するので、細胞外にも存在するはずである。小胞体に局在する分子の中には、アポトーシスの誘導に伴い細胞外へ移行するものが知られている³⁾。そこで、DmCaBP1もこのような分子と同様にアポトーシスの誘導に伴って細胞外へ移行するのではないかと考えた。アポトーシスを誘導した細胞の培養上清を回収し、DmCaBP1に対する特異抗体を使ったウエスタンブロットングを行うと、アポトーシスを誘導しない場合にはDmCaBP1は培養上清中で検出されないが、アポトーシス誘導に伴い検出されるようになった(図4)。膜貫通型タンパク質および細胞

質局在性の分子について、それぞれの特異抗体を使ったウエスタンブロットングで同様に解析したが、これらタンパク質はアポトーシス誘導時にも上清中で検出されなかったことから(図4)、DmCaBP1が特異的に細胞外へ放出されている可能性が考えられた。また、アポトーシス誘導において重要な働きを担う酵素であるカスパーゼの活性を阻害するとDmCaBP1が上清中で検出されなかったことから(図4)、カスパーゼ活性に依存して細胞外へ放出されることが分かった。

最後に、細胞外へ放出されたDmCaBP1による貪食促進の分子機構を検討した。細胞外へ放出されて貪食反応を促進する分子の例として、アポトーシス細胞と食細胞の両方に結合し、両者の橋渡しとなって貪食反応を促す橋渡し分子がよく知られている。そこで、DmCaBP1も橋渡し分子として働くのではないかと予想し、このタンパク質がアポトーシス細胞と食細胞の両方に結合するかどうか調べた。等モル量のGST-DmCaBP1融合タンパク質とGSTをアポトーシス細胞と混合した後、アポトーシス細胞を回収した。この時、細胞と共に回収されたGST-DmCaBP1融合タンパク質の量とGSTの量を比較すると、GST-DmCaBP1融合タンパク質の方が多く回収されていた(図5A)。また、maltose-binding protein (MBP)-DmCaBP1-βgal融合タンパク質とMBP-βgalタンパク質を用い、食細胞とDmCaBP1の結合を同様に検証したところ、MBP-DmCaBP1-βgal融合タンパク質の方が多く回収された(図5B)。よって、DmCaBP1が両方の細胞と結合して橋渡し分子として働くと考えられた。

まとめ

以上の結果より、Draperと結合するタンパク質として見出されたDmCaBP1は、普段は小胞体に局在しているものの、アポトーシスの誘導に伴い細胞外へ放出され、Draperを介して食細胞と結合すると同時にアポトーシス細胞にも結合し、橋渡し分子として両者の接着を促して貪食反応を促進すると考えられる。アポトーシス細胞より放出され、橋渡し分子として貪食反応を促す分子はあまり知られておらず、本研究により食細胞によるアポトーシス細胞貪食反応の仕組みを理解する上で重要な知見が得られたと考えている。今後はDmCaBP1がアポトーシス依存性に細胞外へ放出される分子機構を解明する等、より詳細な解析が必要と思われる。

文献

- 1) Nakanishi Y, Nagaosa K, Shiratsuchi A. Phagocytic removal of cells that have become unwanted. Implications for animal development and tissue homeostasis. *Dev Growth Differ* 53: 149-60, 2011
- 2) Manaka J, Kuraishi T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Higashida H, Henson P, Nakanishi Y. Draper-mediated and phosphatidylserine independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J Biol Chem* 279: 48466-76, 2004
- 3) 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, Nakanishi Y. Pretaporter, a *Drosophila* protein serving as a ligand for Draper in the phagocytosis of apoptotic cells. *EMBO J* 28: 3868-78, 2009



Profile

所 属：九州大学大学院 歯学研究院 口腔機能分子科学分野 (助教)
2008年3月：金沢大学大学院 自然科学研究科 博士前期課程 修了
2012年3月：金沢大学大学院 医学系研究科 博士課程 修了