

## 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26日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22370049

研究課題名（和文） ショウジョウバエのマルチリガンド受容体 Draper による貪食機構の解析

研究課題名（英文） Study on the mode of action of Draper, a multi-ligand engulfment 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）：本研究では、アポトーシス細胞除去に働くショウジョウバエの貪食受容体 Draper の働き方が調べられ、以下の成果が得られた。まず、Draper の働きには細胞内領域にある NPxY モチーフ中のチロシン残基が必要であり、これがリン酸化を受けて貪食誘導性の情報が伝達されると示唆された。次に、Draper のリガンドとして小胞体タンパク質 CaBP1 とホスファチジルセリンが新たに見いだされた。さらに、Draper とは別経路で働く第二の受容体としてインテグリン  $\alpha$ PS3- $\beta$ v が同定された。

研究成果の概要（英文）：The modes of action of Draper, an engulfment receptor responsible for the phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*, were investigated. Draper underwent tyrosine phosphorylation at the motif NPxY when phagocytes recognized apoptotic cells. This tyrosine residue was required for Draper to transmit signals for the induction of phagocytosis. The endoplasmic reticulum protein CaBP1 and the membrane phospholipid phosphatidylserine were found to serve as ligands for Draper. In addition, integrin  $\alpha$ PS3- $\beta$ v was identified as another engulfment receptor that functions independent of Draper.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：貪食、アポトーシス、細菌感染症、自然免疫、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

生体内で不要あるいは有害となった細胞はアポトーシスを起こし、食細胞による貪食を受けて消失する。この“変性自己細胞の貪食除去”という現象は、多細胞生物の形態形成と生体恒常性維持に必須である (Dev. Growth Differ. 53:149)。変性自己細胞はアポトーシス過程で表層に特異構造を獲得し、食細胞はその構造をリガンドとする受容体を使って標的細胞を認識して貪食する。よって、この現象の仕組みを理解するためには、受容体とリガンドを同定し、それらの働き方を知る必要がある。

Draper は最初に見いだされた線虫の貪食受容体 CED-1 のショウジョウバエオルソログである (J. Biol. Chem. 279:48466)。マウスの Jedi-1 とヒトの MEGF10 を合わせて、CED-1/Draper/Jedi-1/MEGF10 はアポトーシス細胞貪食に働く進化的に保存された受容体である。しかし、これらが結合するリガンドの同定は進んでおらず、また存在が予想されるもう一つの貪食受容体は明らかにされていない。Draper はアポトーシス過程で小胞体から細胞表層に移動するタンパク質 Pretaporter をリガンドとし、このリガンドが結合すると細胞内領域のチロシン残基がリン酸化を受ける (EMBO J. 28:3868)。しかし、(1) Draper 細胞内領域のどのチロシン残基がリン酸化されるのか、(2) チロシンリン酸化が Draper の働きに必要なのか、(3) Pretaporter とは異なる Draper リガンドは存在するのか、そして (4) Draper に次ぐ第二の貪食受容体は何なのか、が不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は以下の3点を目的として行われた。

(1) アポトーシス細胞認識の際にリン酸化される Draper 細胞内領域のチロシン残基を同定してリン酸化の意義を明らかにする。

(2) Pretaporter とは異なる Draper リガ

ドを見つける。

(3) Draper とは独立して働く第二の貪食受容体を見いだす。

## 3. 研究の方法

リン酸化を受けるチロシン残基の同定のため、Draper の細胞内領域に二カ所存在するチロシン残基をフェニルアラニンに置き換え、さらに末端に HA タグを付加させた変異型 Draper をコードする遺伝子を発現するためのベクターを作製した。それらを培養細胞に導入して Draper タンパク質を発現させ、その細胞抽出液について抗 HA 抗体による免疫沈降と抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロッティングを行って Draper のリン酸化状態を解析した。一方、これらと同じ変異型 Draper を Draper 欠損ショウジョウバエに発現させ、アポトーシス細胞貪食の回復程度を調べた。

Draper の新しいリガンド探しのため、Draper 細胞外領域を固相化したクロマトグラフィーを行って結合タンパク質の探索を行った。また、Draper 細胞外領域とホスファチジルセリンとの結合を無細胞実験で調べた。さらに、インテグリンが貪食受容体として働く可能性を追求するため、ショウジョウバエインテグリンの5種類の $\alpha$ サブユニット及び2種類の $\beta$ サブユニットの各欠損変異ショウジョウバエについて、アポトーシス細胞貪食の程度を調べた。

## 4. 研究成果

(1) Draper 細胞内領域の NPxY モチーフのリン酸化と貪食誘導性情報の伝達 (Drug Discov. Ther. 6:291)

Draper を発現する食細胞にリガンドの Pretaporter を作用させると、Draper 分子内のチロシン残基のリン酸化程度が増大する (EMBO J. 28:3868)。Draper の細胞内領域に

は、リン酸化を受ける可能性のあるチロシン残基を含む二つのモチーフ、NPxY と YxxL (アミノ酸一文字表記、Y がチロシン残基、x はどのアミノ酸でも可)、が存在する。そこで、どちらのモチーフのチロシン残基がリン酸化を受けまた食食誘導性の情報伝達に必要なとされるか、を明らかにするための実験を行った。チロシンをフェニルアラニンに置換した変異型 Draper を培養細胞に発現させてリン酸化程度を調べると、どちらのチロシンを置換してもリン酸化は観察されたものの、NPxY を変化させた Draper のリン酸化程度は他方より低かった。次に、Draper 欠損ショウジョウバエの食細胞に完全型 Draper と二種類のフェニルアラニン置換型 Draper を発現させ、アポトーシス細胞食食の回復程度を調べた。その結果、完全型 Draper と YxxL 置換型 Draper は食食を増大させたが、NPxY 置換型 Draper はそのような効果を示さなかった。以上より、Draper はリガンド結合により NPxY モチーフのチロシン残基がリン酸化されることで活性化されて食食誘導性の情報伝達を行うと考えられた。以前の研究で情報伝達経路における Draper の下流には Ced-6 が位置することがわかっていた (Neuron 50:855、EMBO J. 28:3868)。Ced-6 はリン酸化された NPxY モチーフに結合する性質を持つことより、今回得られた結果は「Draper へのリガンドの結合→NPxY モチーフのリン酸化→Ced-6 の Draper への結合」という情報の流れを裏付けるものとなった。

(2) 新しい Draper リガンドとしての CaBP1 とホスファチジルセリンの同定 (J. Biol. Chem. 287:3138、J. Biochem. 153:483)

Draper リガンドの Pretaporter は、Draper の細胞外領域に結合するタンパク質として生化学的な実験で見いだされた (EMBO J. 28:3868)。その際に Pretaporter 以外のタン

パク質シグナルも検出されており、今回はそれを解析した。質量分析を行うと、そのタンパク質はカルシウムへの結合性を持つ *Drosophila melanogaster* calcium-binding protein 1 (DmCaBP1) であった。特異抗体を作成して細胞内局在性を調べると、DmCaBP1 は通常は小胞体内に存在するが、アポトーシス時に細胞外に放出されることがわかった。DmCaBP1 を表面に付加させたビーズや強制的に表層発現させた細胞は、ショウジョウバエ食細胞に食食された。さらに、DmCaBP1 を欠損させたショウジョウバエではアポトーシス細胞食食の程度が低下した。また、DmCaBP1 は Pretaporter と協調して働くわけではなかった。以上の結果より、DmCaBP1 は Pretaporter とは独立に Draper リガンドとしてアポトーシス細胞食食に関与すると結論された。

膜リン脂質のホスファチジルセリン (PS) はもっとも解析の進んだ食食目印分子である。PS は通常は大部分が細胞膜二重層の内側層に限定して存在するが、アポトーシス時には外側層にも出現するようになり、細胞がアポトーシスを起こしたことの目印となる。これまで、PS を目印分子とするアポトーシス細胞食食は、線虫と哺乳類 (マウス、ヒト) で起こることがわかっていたが、ショウジョウバエでは不明であった。そこでまず、PS 依存食食を阻害するタンパク質の MFG-E8 をショウジョウバエに強制発現させて、アポトーシス細胞食食の程度を調べた。その結果、MFG-E8 発現により食食が 7 割以下となり、ショウジョウバエでも PS がアポトーシス細胞食食の目印分子として働くことが明らかになった。次に、ショウジョウバエの PS 結合性食食受容体を探した。哺乳類の PS 受容体のひとつに stabilin-2 があり、これは細胞外領域に EGF 様配列を持つ。Draper もこの配

列を有することから Draper を候補とした。まず、Draper 細胞外領域の PS 結合性を調べると、EGF 様配列ではなく EMI 及び NIM と呼ばれるモチーフ部分で PS に結合することがわかった。次に、Draper 欠損ショウジョウバエの食細胞に完全型 Draper と EMI/NIM を欠いた変異型 Draper を発現させ、アポトーシス細胞貪食の回復程度を調べた。その結果、完全型 Draper は貪食を回復させたが変異型 Draper はそのような働きを示さなかった。さらに、食細胞に PS を含むリポソームを作用させると Draper のチロシンリン酸化が促進された。以上の結果より、PS が Draper のリガンドとしてアポトーシス細胞貪食に関わると結論された。

(3) 第二の受容体インテグリン $\alpha$ PS3- $\beta$ vの同定 (J. Biol. Chem. 286:25770, J. Biol. Chem. 287:21663, J. Biol. Chem. 288:10374)

2002 年にノーベル生理学医学賞の授賞対象となった線虫を用いた細胞死の研究は、食細胞によるアポトーシス細胞貪食を誘導する情報伝達経路は二通り存在することを示した。貪食受容体も二種類あると予想され、そのうちのひとつは CED-1 でありショウジョウバエでは Draper がこれに相当する。CED-1 類似の受容体は哺乳類にも存在し (マウスの Jedi-1、ヒトの MEGF10)、CED-1 とそのオルソログは多細胞生物に共通した貪食受容体だと考えられている。しかし、存在が予想されるもう一つの受容体の実体は不明であった。

研究代表者らはインテグリンをその候補として解析した。インテグリンは $\alpha$ 、 $\beta$ とよばれる二種類のサブユニットのヘテロダイマーとして機能する膜一回貫通タンパク質である。ショウジョウバエのインテグリンには 5 種類の $\alpha$ サブユニットと 2 種類の $\beta$ サブユニットが存在する。まず、これらのサブユニッ

トを欠損したショウジョウバエでのアポトーシス細胞貪食の程度を調べることにより、 $\alpha$ サブユニットでは $\alpha$ PS3、 $\beta$ サブユニットでは $\beta$ vが貪食に必要であることがわかった。さらに、これら二つのサブユニットが結合した状態で食細胞に存在することが、化学架橋実験で示唆された。以上より、ショウジョウバエではインテグリン $\alpha$ PS3- $\beta$ vがアポトーシス細胞貪食を担う第二の受容体であると結論された。以前から哺乳類ではインテグリンがアポトーシス細胞貪食における受容体であることが知られており、また、ショウジョウバエでの解析の直前に線虫におけるインテグリンの役割も報告されていた。これらを総合すると、インテグリンは進化的に保存された第二の貪食受容体であると考えられる。また、 $\alpha$ PS3- $\beta$ vがショウジョウバエ食細胞による細菌の貪食にも関わることがわかり、先に同様の働きが示されていた Draper とともに、ショウジョウバエ食細胞によるアポトーシス細胞と細菌の貪食が同じ受容体に担われていると考えられた。

#### 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 10 件)

①Tung, T. T., Nagaosa, K., Fujita, Y., Kita, A., Mori, H., Okada, R., Nonaka, S., Nakanishi, Y., Phosphatidylserine recognition and induction of apoptotic cell clearance by *Drosophila* engulfment receptor Draper, J. Biochem., 査読有, 153, 2013, 483-491

DOI:10.1093/jb/mvt014

② Nonaka, S., Nagaosa, K., Mori, T., Shiratsuchi, A., Nakanishi, Y., Integrin  $\alpha$ PS3/ $\beta$ v-mediated phagocytosis of apoptotic cells and bacteria in

- Drosophila*, J. Biol. Chem., 査読有, 288, 2013, 10374-10380  
DOI:10.1074/jbc.M113.451427
- ③Fujita, Y., Nagaosa, K., Shiratsuchi, A., Nakanishi, Y., Role of NPxY motif in Draper-mediated apoptotic cell clearance in *Drosophila*. Drug Discov. Ther., 査読有, 6, 2012, 291-297  
DOI: 10.5582/ddt.2012.v6.6.291
- ④Shiratsuchi, A., Mori, T., Sakurai, K., Nagaosa, K., Sekimizu, K., Lee, B. L., Nakanishi, Y., Independent recognition of *Staphylococcus aureus* by two receptors for phagocytosis in *Drosophila*, J. Biol. Chem., 査読有, 287, 2012, 21663-21672  
DOI:10.1074/jbc.M111.333807
- ⑤Okada, 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, 2012, 3138-3146  
DOI:10.1074/jbc.M111.277921
- ⑥Nagaosa, K., Okada, R., Nonaka, S., Takeuchi, K., Fujita, Y., Miyasaka, T., Manaka, J., Ando, I., Nakanishi, Y., Integrin  $\beta v$ -mediated phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila* embryos, J. Biol. Chem., 査読有, 286, 2011, 25770-25777  
DOI:10.1074/jbc.M110.204503
- ⑦Nakanishi, Y., Nagaosa, K., Shiratsuchi, A., Phagocytic removal of cells that have become unwanted: implications for animal development and tissue homeostasis, Dev. Growth Differ., 査読有, 53, 2011, 149-160  
DOI:10.1111/j.1440-169X.2010.01224.x
- ⑧Tabuchi, Y., Shiratsuchi, A., Kurokawa, K., Gong, J. H., Sekimizu, K., Lee, B. L., Nakanishi, Y., Inhibitory role for D-alanylation of wall teichoic acid in activation of insect Toll pathway by peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*, J. Immunol., 査読有, 185, 2010, 2424-2431  
DOI:10.4049/jimmunol.1000625
- [学会発表] (計 28 件)
- ①藤田融、中西義信、白土明子、永長一茂, ショウジョウバエ貪食受容体 Draper のチロシンリン酸化による活性化, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 16 日, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県)
- ② Nakanishi, Y., Identification of bacterial genes expressed upon infection to control pathogenicity in *Drosophila*, XXIV International Congress of Entomology, 2012 年 8 月 20 日, EXCO テグ国際会議場 (韓国)
- ③Nagaosa, K., Nonaka, S., Okada, R., Nakanishi, Y., Identification of integrin  $\alpha PS3\beta v$  as a receptor for phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*, Joint Meeting of the 45<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & the 64<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, 2012 年 5 月 31 日, 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ④中西義信, 宿主免疫応答を変動させる黄色ブドウ球菌の細胞壁成分の同定, 第 54 回日本感染症学会中日本地方会学術集会& 第 59 回日本化学療法学会西日本支部総会,

2011年11月26日、奈良県新公会堂（奈良県）

⑤岡田亮、永長一茂、倉石貴透、中山洋、中川祐紀子、上田晃一、堂前直、白土明子、中西義信、ショウジョウバエ小胞体タンパク質 CaBP1 のアポトーシス依存的な細胞外放出とアポトーシス細胞貪食反応への関与、第84回日本生化学会大会、2011年9月24日、京都国際会議場（京都府）

⑥Nakanishi, Y., Shiratsuchi, A., Genetic analysis of host-pathogen interaction in *Drosophila*, International Union of Microbiologist Societies 2011 Congress, 2011年9月7日、札幌コンベンションセンター（北海道）

⑦野中さおり、岡田亮、竹内一貴、中西義信、永長一茂、ショウジョウバエにおけるインテグリンを介したアポトーシス細胞の貪食、日本分子生物学会第11回春期シンポジウム、2011年5月25日、石川県立音楽堂交流ホール（石川県）

⑧野中さおり、中西義信、永長一茂、ショウジョウバエにおける  $\alpha$ PS3 インテグリンを介したアポトーシス細胞の貪食、第83回日本生化学会大会&第33回日本分子生物学会年会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド（兵庫県）

⑨中西義信、ショウジョウバエにおける要除去細胞貪食の仕組み、第50回日本リンパ網内系学会総会、2010年6月18日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター（新潟県）

〔図書〕（計4件）

①白土明子、中西義信、羊土社、実験医学別冊「細胞死実験プロトコール」、アポトーシス細胞の *in vitro* 貪食反応、2011年、154頁～161頁

②白土明子、中西義信、羊土社、増刊「細胞

死研究総集編」、アポトーシス依存的な細胞貪食による生体恒常性の維持、2010年、1055頁～1061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

( )

研究者番号：

### (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