

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570127

研究課題名（和文） 微生物および変性自己細胞の食細胞による貪食機構と意義

研究課題名（英文） Mechanisms and roles on phagocytosis of microbes and altered self cells

研究代表者

白土 明子 (SHIRATSUCHI AKIKO)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：90303297

研究成果の概要（和文）：

食細胞による要除去細胞の貪食は、細胞性自然免疫であり、この貪食機構と意義を明らかにすることが求められていた。本研究では、哺乳動物とショウジョウバエの食細胞について、貪食受容体を介する細胞内情報経路を同定した。また貪食誘導性受容体のリガンドを同定し、微生物と自己変性細胞とでそれぞれ異なる分子を認識するマルチリガンド受容体であると考えられた。さらに、宿主の液性および細胞性免疫応答に作用する、細菌の細胞壁成分を同定し、その働きから、細菌が宿主免疫を回避する抵抗機構の存在がわかった。

研究成果の概要（英文）：

Elimination of unwanted cells by phagocytosis is the cellular innate immunity, and its molecular mechanism and role have remained to be elucidated. In this study, we found out the intracellular signaling through Draper, a phagocytic receptor we have detected. We also identified Draper ligand in *Drosophila* apoptotic cells and bacteria, and suggested that the phagocytic receptor in innate immunity acts as a multi ligand-receptor. On the other hand, we identified bacterial factors that influenced with host cellular and humoral immunity, and examined bacterial strategy to escape from the host immune responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物学・免疫生化学

キーワード：細胞貪食・微生物・自然免疫・*Drosophila*・マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

生体内に存在する不要あるいは有害な

微生物や自己変性細胞は、食細胞により貪食されて処理され、個体恒常性が維持されている。この

反応は、リンパ球受容体や抗体を必要とせず、無脊椎動物からヒトを含む哺乳類まで保存されており、細胞性自然免疫応答と位置づけられる。本研究では、細菌および自己変性細胞の貪食除去機構と、その生理学的意義を明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

細胞性自然免疫を担う貪食誘導性受容体の多くは、マルチリガンド性であり、細菌表面のリガンドや自己変性細胞表面のリガンドを認識して、貪食を誘導する。また、このような受容体の多くは、生物種を超えて保存されていることが多い。これより、本研究では、貪食受容体 Draper の細菌および宿主生物のリガンドを同定し、貪食反応の分子機構を明らかにするとともに、感染および発生過程における生理学的意義を知ることを目的とした。

一方で、細菌には貪食排除を回避して、宿主免疫に抵抗する機構が存在する。そこで、貪食殺菌抵抗性の細菌因子を同定し、その働きを明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

哺乳類およびモデル動物キイロショウジョウバエの食細胞による、蛍光標識細菌およびアポトーシス細胞の *in vitro* 貪食アッセイでは、取り込まれた標的を蛍光顕微鏡下に検出し、数値化した。ショウジョウバエ胚組織の貪食解析では、食細胞の指標タンパク質発現、アポトーシス細胞に特徴的反応を利用して、胚丸ごとを試料としてそれぞれ検出し、明視野顕微鏡下に貪食を検出した。また、胚組織より単個細胞を調製し、これを材料として同様に食細胞とアポトーシス細胞とを検出した。

一方、標的細胞上のリガンド同定は、自

己変性細胞と細菌とで異なる方針により同定を目指した。ショウジョウバエ細胞抽出液より、Draper への親和性を指標としてリガンド分子を生化学的に分離精製し、その構造決定を行った。当該分子をコードする遺伝子の欠損体を作成し、貪食リガンドとしての働きを解析した。また、細菌リガンド探索では、細菌変異菌株ライブラリーを用いて、細胞壁成分に変異のある菌株を貪食アッセイにてスクリーニングし、候補遺伝子を選択した。そして、その遺伝子産物の働きにより作られる細胞壁成分をリガンド候補として、貪食リガンドとしての機能を解析した。

貪食受容体またはリガンドの欠損による、発生過程の進行、あるいは感染時の細菌増殖と宿主への病原性を調べることで、当該貪食反応の生理学的意義の考察を行った。

## 4. 研究成果

### 4-1 ショウジョウバエ食細胞による変性自己細胞の貪食機構と意義

#### 4-1-1 ヘモサイトによる胚アポトーシス細胞の貪食リガンドの同定：

ショウジョウバエ血球系食細胞のヘモサイトの貪食受容体として、Draper を報告している。そこで、ハエ細胞より Draper 結合分子をアフィニティクロマトグラフィーにより分離精製したところ、二種類のタンパク質が得られその一次構造を決定した。このうち、プレタポルテと名付けたタンパク質は、小胞体に存在するシャペロン様構造を持ち、アポトーシス細胞では細胞表層に局在した。プレタポルテは食細胞に Draper の存在依存性に結合し、また、プレタポルテの存在によりアポトーシス細胞が昆虫食細胞のヘモサイトに貪食されることがわかった。以上より、ヘモサイトの受容体 Draper とアポトーシス細胞のプレタポルテにより、貪食が規定されると考えられた。

4-1-2 ショウジョウバエグリア細胞による幼虫型神経軸索除去機構：

完全変態するショウジョウバエでは、幼虫脳の神経軸索は、蛹化時期にその一部が刈り取られ、新たに成虫型の軸索が形成される。この反応には、グリア細胞に発現する膜タンパク質 Draper が必要であることが報告されていた。胚アポトーシス細胞が Draper 依存にヘモサイトで貪食される際の貪食リガンドのプレタポルテが、幼虫型軸索除去にも必要であるか否かを解析した。その結果、プレタポルテ null 欠損体ハエの軸索刈り取り反応は、野生型ハエと同様に進行するとわかった。これより、Draper リガンドのプレタポルテは、神経軸索除去反応には必須ではないと考えられた。

4-2 ショウジョウバエ食細胞による細菌貪食の機構と意義

黄色ブドウ球菌細胞壁成分の変異菌株ライブラリーのスクリーニングにより、昆虫ヘモサイトによる貪食が親菌株よりも低下する株を得た。当該株の変異遺伝子の解析より、細胞壁成分のリポタイコ酸がヘモサイトによる貪食に必要であると判明した。リポタイコ酸の貪食への必要性を知るために、リポタイコ酸依存の貪食に必要なショウジョウバエ遺伝子を、変異体群の解析により探索した。その結果、膜受容体として知られていた Draper が本反応に必要であるとわかった。

次に、Draper とリポタイコ酸を介する貪食の生理学的意義を知るために、黄色ブドウ球菌を感染させたショウジョウバエでの細菌増殖とハエの生き死にを解析した。その結果、この貪食反応が抑制され

ることにより、ハエ体内で感染した細菌の増殖が亢進し、一方で宿主のハエは早く死ぬとわかった。

これより、黄色ブドウ球菌のヘモサイトによる貪食は、細菌感染への宿主防御に働き、この反応は細菌細胞壁のリポタイコ酸とヘモサイトの Draper により規定されるとわかった。

4-3 宿主免疫を回避する細菌因子の解析

4-3-1 ショウジョウバエの免疫応答を回避する細菌因子とその機構：

黄色ブドウ球菌変異菌株のショウジョウバエ感染モデルでは、親菌株よりも顕著に病原性の低い菌株が得られた。この変異菌株は細胞壁タイコ酸への D-アラニン付加を行う酵素遺伝子を欠損することから、D-アラニン修飾の宿主免疫への抑制効果が予想された。そこで、細菌感染時の宿主の細胞性および液性免疫応答の程度を解析した。ヘモサイトによる細菌の貪食程度に D-アラニン化修飾は影響を与えなかったが、ハエ体内での特定の抗菌ペプチドの産生程度が D-アラニン化修飾により抑制されることがわかった。そこで、抗菌ペプチドの産生を促すハエ細胞内経路の欠損体群を利用して探索したところ、ショウジョウバエ液性免疫応答の一経路を担う、Toll 経路による細菌感知が、細菌細胞壁の D-アラニン化修飾により抑制されることが判明した。Toll 経路の細菌リガンドはペプチドグリカンであることから、D-アラニン化修飾は、リガンド活性の抑制に働くと考えられた。

4-3-2 哺乳類マクロファージによる貪食殺菌に抑制的に働く細菌因子：

黄色ブドウ球菌細胞壁成分の変異菌株の中から、哺乳類 TLR2 経路活性化が亢進する菌株を複数見いだした。これらの欠損遺伝子が作り出す細胞壁成分として、D-アラニン化タイコ酸が挙げられた。TLR2 は細菌細胞壁のリポタンパク質をリガ

ンドとして細胞内経路の JNK 経路を活性化すると知られている。今回の解析により、D-アラニン化タイコ酸は、TLR2 を介する JNK のリン酸化に抑制的に働くこと、マクロファージによる活性酸素の産生に抑制的に働くことがわかった。以上の結果より、黄色ブドウ球菌細胞壁の D-アラニン化タイコ酸は、哺乳類 TLR2 を介する JNK 経路の活性化を抑制し、このことがマクロファージによる活性酸素産生レベルを抑制し、その結果として貪食された黄色ブドウ球菌の食細胞内での殺菌の低下を導くと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1 Nakanishi, Y., Nagaosa, K., and Shiratsuchi, A. (review) Phagocytic removal of cells that have become unwanted: implications for animal development and tissue homeostasis. *Develop. Growth Differ.* 149-160 (2011) 査読有
- 2 Tabuchi, Y., Shiratsuchi, A., Kurokawa, K., Gong, J. H., Sekimizu, K., Lee, B. L., and Nakanishi, Y. Inhibitory role for D-alanylation of wall teichoic acid in activation of insect Toll pathway by peptidoglycan of *Staphylococcus aureus*. *J. Immunol.* 185, 2424-2431 (2010) 査読有
- 3 Shiratsuchi, A., Shimizu, K., Watanabe, I., Hashimoto, Y., Kurokawa, K., Razanajatovo, I. M., Park, K. H., Park H. K., Lee, B. L., Sekimizu, K., and Nakanishi, Y. Auxiliary role for D-alanylated wall teichoic acid in Toll-like receptor 2-mediated survival of *Staphylococcus aureus* in macrophages. *Immunology* 129, 268-277 (2010) 査読有
- 4 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

5 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, 3668-3878 (2009) 査読有

6 Osada, Y., Sunatani, T., Kim, I.-S., Nakanishi, Y., and Shiratsuchi, A. Signaling pathway involving GULP, MAPK, and Rac1 for SR-BI-induced phagocytosis of apoptotic cells. *J. Biochem.* 145, 387-394 (2009) 査読有

7 Shiratsuchi, A., Ichiki, M., Okamoto, Y., Ueda, N., Sugimoto, N., Takuwa, Y., and Nakanishi, Y. Inhibitory effect of N-palmitoylphosphatidylethanolamine on macrophage phagocytosis through inhibition of Rac1 and Cdc42. *J. Biochem.* 145, 43-50 (2009) 査読有

8 Shiratsuchi, A., Watanabe, I., Ju, J.-S., Lee, B.-L., and Nakanishi, Y. Bridging effect of recombinant human mannose-binding lectin in macrophage phagocytosis of *Escherichia coli*. *Immunology* 124, 575-583 (2008) 査読有

9 Shiratsuchi, A., Watanabe, I., Yoshida, H., and Nakanishi, Y. Involvement of cannabinoid receptor CB2 in dectin-1-mediated macrophage phagocytosis. *Immunol. Cell Biol.* 86, 179-184 (2008) 査読有

[学会発表] (計 16 件)

1. 白土明子, 桜井健次, 森俊暢, 中西義信; ショウジョウバエヘモサイトによるインテグリンを介する黄色ブドウ球菌の貪食機構. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回分子生物学会年会合同大会, 神戸ポートアイランド (兵庫県) 2010 年 12 月 7-10 日
2. 桜井健次, 中西義信, 白土明子; ショウジョウバエインテグリンによる黄色ブドウ球菌の貪食. 日本生化学会北陸支部会第 27 回大会, 福井大学 (福井県) 2010 年 5 月 29 日
3. 橋本優美, 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, 神戸ポートアイランド (兵庫県)

2009年10月21-24日

4. 田淵幸幾, 櫻井健次, 久綱真由美, 黒川健児, Lee, BL., 関水和久, 中西義信, 白土明子:黄色ブドウ球菌のD-アラニン化壁タイコ酸によるショウジョウバエでの抗菌ペプチド産生の抑制. 第82回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド(兵庫県)2009年10月21-24日
5. 白土明子, 一木万奈美, 岡本安雄, 上田夏生, 杉本直俊, 多久和陽, 中西義信; N-パルミトイルホスファチジルエタノールアミンのマクロファージ食抑制効果. 第82回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド(兵庫県)2009年10月21-24日
6. Hashimoto, Y., Shiratsuchi, A., Tabuchi, Y., Sakurai, K., Kurokawa, K., Sekimizu, K., Nakanishi, Y.: Draper-mediated phagocytosis of Staphylococcus aureus by Drosophila hemocytes. 17th International Symposium on Molecular Biology of Macrophages, KKR 金沢(石川県)2009年7月3日
7. Shiratsuchi, A., Hashimoto, Y., Tabuchi, Y., Kurokawa, K., Sekimizu, K., Nakanishi, Y.: Mechanism and role of phagocytosis of Staphylococcus aureus by Drosophila hemocytes. Gordon Research Conference: Apoptotic Cell Recognition & Clearance, Colby-Sawyer College(USA)2009年6月29日
8. 橋本優実, 田淵幸幾, 黒川健児, 関水和久, 中西義信, 白土明子:ショウジョウバエヘモサイトによる黄色ブドウ球菌の食機構. 日本生化学会北陸支部会第26回大会, 福井大学(福井県)2009年5月23日
9. 白土明子, 田淵幸幾, 橋本優実, 黒川健児, 関水和久, 中西義信;ショウジョウバエ自然免疫応答を調節する黄色ブドウ球菌遺伝子の探索. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸国際会議場(兵庫県)2008年12月9-12日
10. 長田洋一, 砂谷俊郎, 白土明子, 中西義信;スカベンジャー受容体クラスBタイプIを介するアポトーシス細胞食へのGULPとRac1の関与. 第31回日

本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸国際会議場(兵庫県)2008年12月9-12日

11. 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食における役割. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸国際会議場(兵庫県)2008年12月9-12日
12. 橋本優実, 田淵幸幾, 黒川健児, 栗崎健, 関水和久, 中西義信, 白土明子;ショウジョウバエにおける Draper を介した黄色ブドウ球菌の食機構. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸国際会議場(兵庫県)2008年12月9-12日
13. 中西義信, 渡辺郁子, Lee, BL., 白土明子;ヒト組換え型マンノース結合レクチンの橋渡し効果による大腸菌食の促進. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸国際会議場(兵庫県)2008年12月9-12日
14. 白土明子;哺乳類精巣でのアポトーシス細胞食の機構と意義. 第17回アポトーシス研究会学術集会:シンポジウム:生殖・内分泌系のアポトーシス, 京都めるばるく(京都府)2008年8月1日(招待講演)
15. Kuraishi, T., Ishimoto, T., Moki, T., Nakagawa, Y., Nakayama, H., Shiratsuchi, A., Hashimoto, Y., Yamamoto, N., Ueda, K., Yamaguchi, M., Awasaki, T., and Nakanishi, Y.; Pretaporter, a Drosophila endoplasmic reticulum protein serving as a ligand for Draper in phagocytosis of apoptotic cells. 7th International Cell Death Society Symposium, Shanghai National Accounting Institute (China) 2008年6月6-9日
16. Kuraishi, T., Ishimoto, Y., Yamamoto, N., Ueda, K., Nakayama, H., Yamaguchi, M., Awasaki, Y., Hashimoto, Y., Moki, T., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y.; Characterization of CG1837 protein as a candidate ligand for Draper, a Drosophila phagocytosis receptor. 49th Annual Drosophila Research Conference, Town & Country Resort and Convention Center(USA) 2008年4月2-6日

〔その他〕  
ホームページ等  
ウェブサイト  
<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし