

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440044

研究課題名(和文) 死細胞貪食による動物個体の成長期間調節機構の解析

研究課題名(英文) Research of phagocytosis-mediated regulation of growth rate in Drosophila

研究代表者

永長 一茂 (NAGAOSA, Kaz)

弘前大学・食料科学研究所・准教授

研究者番号：70401891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)： 生体内の不要な細胞は細胞死が誘導され、食細胞により速やかに貪食される。貪食受容体の Draper と integrin を欠いたショウジョウバエでは成長が遅れることから、貪食受容体を介した死細胞貪食が個体の成長期間を調節すると仮定し、その仕組みを検証した。食細胞を用いた実験により、死細胞貪食後の細胞では成長促進に関する遺伝子Bの発現が増加すること、Bの転写抑制因子Cの発現が低下すること、およびCの転写抑制因子Aが活性化することがわかった。よって、貪食後の細胞ではAが活性化してCの発現量が低下することで、Cに発現を抑えられていたBの発現量が増加し、個体の成長が促される仕組みが予想された。

研究成果の概要(英文)： Unwanted cells are induced cell death, then phagocytes recognize them using phagocytosis receptor(s) and engulfed. Our previous experiments showed that a Drosophila lacking phagocytosis receptors, Draper and integrin beta-nu, took longer time to develop into adults. This results hypothesized that phagocytosis receptor-mediated phagocytosis controlled ontogenetic growth. To be clear that, phagocytosing phagocyte was subjected to DNA microarray analysis and gel-shift assay. I found; 1) expression level of growth-related gene B was up-regulated, 2) amount of a repressor C which suppresses transcription of the gene B was decreased, and 3) another repressor A which suppresses transcription of the gene C was activated. These findings support the hypothesis.

研究分野：分子生物学、生化学、細胞生物学、発生生物学、免疫学

キーワード：貪食 成長調節 ショウジョウバエ 転写 アポトーシス 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

生体内の不要な細胞は細胞死を引き起こして食細胞に貪食除去される。この反応に必要なのが、死細胞を特異的に認識する貪食受容体である。実際、線虫や昆虫、哺乳類に至る幅広い生物種で多くの貪食受容体が見出されている。一方、これらの貪食受容体を介した貪食を誘導する情報伝達は、種を超えて共通な2経路に集約されることが示されつつある。このことから、貪食受容体には多細胞生物に共通かつ必須な役割があると予想される (Nakanishi et al. *Dev. Growth Differ.*, 53, 2011, 149-160)。

研究代表者らはこれまでに、独立した経路で働く貪食受容体の Draper および integrin を見出している (Nagaosa et al. *J. Biol. Chem.*, 286, 2011, 25770-25777)。両受容体を持たないショウジョウバエでは貪食が著しく抑制されるだけではなく、胚から成虫になるまでに要する期間が長くなることから、成長期間の調節が貪食受容体の役割のひとつだと予想し、その仕組みを明らかにするための研究を重ねている。

2. 研究の目的

本研究は、「死細胞を貪食した食細胞が成長促進因子を産生する」と仮定し、貪食依存に発現が誘導される遺伝子群を見出し、その発現誘導機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

死細胞貪食依存に発現が誘導される遺伝子群の探索のため、死細胞と一定時間共培養した食細胞から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイによりおよそ 18500 遺伝子の発現量変化を調べた。食細胞には低血清培地で前培養したショウジョウバエ胚ヘモサイト由来株 S2 を、死細胞にはシクロヘキシミド処理により細胞死を誘導した後に遠心分離により得られた細胞断片をそれぞれ用いた。

貪食依存に活性の変化する転写因子の探索のため、死細胞と一定時間共培養した食細胞から核抽出液を調製し、解析対象転写因子との結合能を持つ DNA プローブを混合して、電気泳動での易動度を比較する、ゲルシフトアッセイを行った。貪食受容体や転写因子の必要性の検証では、RNA 干渉でそれらの遺伝子の発現を抑制した S2 細胞を用いて、貪食反応およびゲルシフトアッセイを行った。

貪食受容体依存の成長期間の解析のため、ヘモサイト特異的な RNA 干渉により Draper および integrin の発現を抑制したショウジョウバエを作製し、胚から成虫にまで成長する期間を調べた。

4. 研究成果

はじめに、貪食反応に用いる食細胞および死細胞を決定した。食細胞は、ショウジョウバエ胚ヘモサイト (体液細胞) 由来株の S2

細胞とした。この細胞は Draper 経路、integrin 経路の両情報伝達経路を介した貪食能を獲得する特徴を持つ。死細胞は、シクロヘキシミド処理により得た S2 細胞とした。同細胞は、アポトーシスの特徴を示す細胞死が誘導され、細胞死依存に被貪食能を獲得する。死細胞由来 mRNA、および核の混入を防ぐために、貪食反応にはこれらを含まない死細胞断片を用いた。

次に、貪食依存に発現が誘導される遺伝子群、およびそれらを誘導する転写因子群を探索した。死細胞貪食前と後の食細胞から RNA を抽出して DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、337 遺伝子で貪食依存の発現量増加が見られ、そのうち延べ 89 遺伝子が成長促進に関係すると予想される遺伝子であった。貪食依存に発現が誘導される可能性がより高い 50 遺伝子について、それらの転写を調節する分子を文献検索などにより調べたところ、12 の転写因子が見出された。そのすべてについて、貪食依存に転写因子が活性化するかをゲルシフトアッセイで調べたところ、転写因子 A が活性化することがわかった。Draper および integrin の発現を RNA 干渉で抑制した食細胞を用いて同様の実験を行ったところ、A の活性化は見られなかった。A が転写を調節する遺伝子 B (DNA マイクロアレイ解析で同定) は発生への関与が知られていることから、「Draper または integrin を介して死細胞を貪食した食細胞は、転写因子 A を活性化して遺伝子 B の発現を誘導し個体の成長を促す」仕組みの存在が示唆された。

A はリプレッサーであることから、A が B の発現を正に制御するには仲介分子の存在が必要となる。そこで、B のリプレッサーとして知られる C がそれにあたるかを検証した。その結果、貪食反応後の食細胞では C の発現が減少することがわかった。そして、食細胞内の A の発現を RNA 干渉で抑制すると、貪食依存の C の発現抑制が起こらなくなった。以上より、死細胞を認識した食細胞では「貪食受容体を介して A が活性化し、A が C の発現を抑制することで B の発現が促進」する、貪食依存の B 発現誘導機構の存在が示唆された。現在、貪食受容体による A の活性機構を調べている。

貪食受容体による成長期間調節への A の関与を知るには、A を発現しないショウジョウバエを作製して成長期間を調べればよい。しかし、A は劣性致死遺伝子なため、そのような実験は行えない。そこで、ヘモサイトでのみ遺伝子発現を抑えたショウジョウバエを観察することにした。まずは Draper および integrin の発現を抑えたショウジョウバエを作製して、胚から成虫にまで成長する期間を調べた。その結果、両貪食受容体を持たないショウジョウバエでみられた成長期間の延長は観察されなかった。よって、死細胞貪食による成長期間の調節はヘモサイト以外の貪食受容体が制御している可能性が

高いことがわかった。これに伴い、A の発現をヘモサイトで抑制したショウジョウバエの解析は中止した。

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1件)

永長一茂, 発生および生体防御における変性自己細胞の貪食の役割, 化学と生物, 査読有, 53, 2015, 115-119

<https://katosei.jsbba.or.jp/download/pdf.php?aid=333>

[学会発表](計17件)

永長一茂, 前多隼人, ショウジョウバエを用いた新規ながん予防食品探索法の開発, 日本農芸化学会 2016 年度札幌大会, 2016 年 3 月 28 日. 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

永長一茂, ショウジョウバエによるリンゴの癌予防効果の解析, 赤い果肉リンゴを核とした地域活性化シンポジウム, 2015 年 12 月 22 日, ホテルニューキャッスル(青森県・弘前市)

中井雄治, 永長一茂, 紅の夢投与がショウジョウバエ遺伝子発現に及ぼす影響, 赤い果肉リンゴを核とした地域活性化シンポジウム, 2015 年 12 月 22 日, ホテルニューキャッスル(青森県・弘前市)

永長一茂, 変異細胞の除去を促す食材を見出すための動物実験法の開発, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

野中さおり, 永長一茂, 中井雄治, 金谷匠人, 星ちはる, 中西義信. アポトーシス細胞貪食による食細胞で活性化する転写因子 Tailless の同定. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 1 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

孔慶権, 中井雄治, 黒田奈々恵, 白土明子, 永長一茂, 中西義信, ショウジョウバエのペプチドグリカン認識タンパク質 PGRP-LC による大腸菌遺伝子の発現誘導, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会, 2015 年 12 月 1 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Nagaosa, K., Identification of the ligand-receptor system that governs tumor-suppressive cell competition, 1st International Symposium on Cell Competition, 2015 年 9 月 10 日, 芝蘭会館(京都府・京都市)

野中さおり, 中井雄治, 中西義信, 永長一茂, アポトーシス細胞貪食による食細胞での遺伝子発現の変化, 第 87 回日本生

学大会, 2014 年 10 月 18 日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

Nonaka, S., Nakai, Y., Nakanishi, Y., and Nagaosa, K., Possible role for phagocytosis receptors in transcription control during larval development of *Drosophila*. 11th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2014 年 6 月 4 日, 金沢歌劇座(石川県・金沢市)

永長一茂, ショウジョウバエの個体成長における貪食受容体の役割, 第 18 回日本生化学会北陸支部奨励賞受賞講演, 日本生化学会北陸支部第 32 回大会, 2014 年 5 月 24 日, 富山大学(富山県・富山市)

Nainu, F., Shiratsuchi, A., Nagaosa, K., Nakanishi, Y., Inhibition of virus growth by apoptosis-dependent phagocytosis of virus-infected cells in *Drosophila*, 1st Asian Invertebrate Immunology Meeting. 2014 年 2 月 14 - 15 日, プサン(韓国)

Kou, Q., Nagaosa, K., Shiratsuchi, A., Nakanishi, Y., Altered gene expression in *Escherichia coli* after exposure to immune proteins of *Drosophila melanogaster*, 1st Asian Invertebrate Immunology Meeting. 2014 年 2 月 14 - 15 日, プサン(韓国)

Nonaka, S., Nakanishi, Y., Nagaosa, K., Identification of integrin PS3/ as the second receptor for the phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. 2013 International Joint Symposium on Pharmacy, 2013 年 10 月 29 日, プサン(韓国)

Tran Thanh Tung, 永長一茂, 藤田融, 喜多朝菜, 森大樹, 岡田亮, 野中さおり, 中西義信, ショウジョウバエにおけるホスファチジルセリンを介したアポトーシス細胞貪食の解析, 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 13 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

安藤友貴, 野中さおり, 中西義信, 永長一茂, インテグリン PS3 の下流でショウジョウバエのアポトーシス細胞貪食を誘導するシグナル伝達経路の解明, 日本生化学会第 86 回大会, 2013 年 9 月 12-13 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

永長一茂, 喜多朝菜, 野中さおり, 中西義信, 貧栄養下でのショウジョウバエの個体成長における貪食受容体の役割, 日本生化学会北陸支部第 31 回大会, 2013 年 5 月 25 日, 金沢大学(石川県・金沢市)

孔慶権, Zhen, Y., 永長一茂, 中西義信, ショウジョウバエ *N*-ethylmaleimide-sensitive factor のアポトーシス細胞貪食への関与, 日本生化学会北陸支部第 31 回大会, 2013 年 5 月 25 日, 金沢大学(石

川島・金沢市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ifs.hirosaki-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永長 一茂 (NAGAOSA KAZUSHIGE)

弘前大学・食料科学研究所・准教授

研究者番号：70401891

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：