

氏名	デン カイユアン 鄧 開元
学 位 の 種 類	博士（薬科学）
学 位 記 番 号	博士甲 第 号
学位授与の日付	2025 年 3 月 10 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	マクロファージ食作用における親電子性脂質代謝物の標的同定及び機能解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 有田 誠 (博士 (薬学)) (副査) 教授 多胡 めぐみ (博士 (薬学)) 准教授 松崎 潤太郎 (博士 (医学))
慶應義塾大学学位規程第 11 条に基づく審査委員会実施日： 2025 年 1 月 31 日	

論文内容の要旨

1. 研究の背景

マクロファージ (M ϕ) は貪食によって病原体やアポトーシス細胞を除去し、組織の恒常性維持において重要な役割を果たしている。貪食時には、膜脂質からアラキドン酸をはじめとする多価不飽和脂肪酸 (Poly-Unsaturated Fatty Acid: PUFA) が切り出され、リポキシゲナーゼ (Lipoxygenase: LOX) やシクロオキシゲナーゼ (Cyclo-oxygenase: COX) などの脂肪酸酸化酵素によって様々な酸化脂肪酸に変換される。産生された酸化脂肪酸は、一般的にメディエーターとして G タンパク質共役型受容体 (GPCR) 等と相互作用して生理活性を発揮する。一方で、酸化脂肪酸の中には高い求電子性を持つ代謝物が存在し、これらは親電子性脂質代謝物 (Lipid-derived electrophile: LDE) と呼ばれ、細胞内タンパク質の求核性アミノ酸残基 (システイン、リジン、ヒスチジンなど) に共有結合することで標的タンパク質の機能を制御する。当研究室では、アラキドン酸アルキン (alkynylated arachidonic acid: aAA) とクリックケミストリーを活用し、マウス腹腔 M ϕ に高発現する 12/15-LOX が生成する LDE による修飾タンパク質の候補を 200 種以上同定した。しかし、LDE が修飾するアミノ酸残基やその生理的意義については、未解明の点が多く存在する。

LDE による修飾をアミノ酸レベルで定量的かつ包括的に同定する技術として、Activity-Based Protein Profiling (ABPP) 法が挙げられる。この手法では、求核性・反応性が高いシステインに結合するヨードアセタミド構造を持つプローブを使用する。LDE によりシステインが修飾を受けるとプローブとの反応性が変化し、結合が阻害されることから、プローブ結合ペプチドを精製・濃縮し、LC-MS/MS で分析することでプローブの反応性変化を定量し、プロテオーム中の修飾システインを間接的に同定できる。本研究では、M ϕ の貪食時に 12/15-LOX 依存的なシステイン反応性変動を示したタンパク質の中から Cofilin-1 に着目し、LDE 修飾の様式および機能解析を行った。

2. 結果と考察、展望

2-1. 貪食時マクロファージの細胞内システイン反応性変動を包括的に捉えた

システイン反応性変動を包括的に捉える ABPP 法で貪食時の M ϕ を調べた結果、計 1657 種のタンパク質から 2844 のシステインが検出された。その中で、130 種のタンパク質における 149 のシステインが貪食時に特徴的な反応性の変動を示した。UniProt タンパク質データベースとの照合により、その内 59 のシステインがレドックス制御を受ける部位や酵素の活性中心など、タンパク質の機能的に重要な部位であることが分かった。さらに、これら 130 種のタンパク質を用いた KEGG パスウェイ解析の結果、FcR-mediated phagocytosis や efferocytosis など貪食に関連するタンパク質が濃縮された。

2-2. マクロファージ貪食時に 12/15-LOX 由来代謝物が特徴的に上昇する

次に、貪食時の M ϕ における酸化脂肪酸の変動を網羅的に捉えるため、LC-MS/MS によるリピドミクス解析を行った。その結果、12-HETE や 15-HETE といった 12/15-LOX 由来代謝物は、他の代謝物と比較して定常状態で生成量が高く、貪食によりさらに増加していた。さらに、12/15-LOX の下流で生成する LDE である 12-oxo-EETE 及び 15-oxo-EETE の産生量も貪食依存的に上昇していた。そのため、ABPP にて貪食依存的に反応性が変化したシステインの中に、12/15-LOX 由来の LDE 修飾を受けるものが含まれていることが考えられた。

2-3. アクチン制御分子である Cofilin-1 のシステインが 12/15-LOX 由来 LDE に修飾される

12/15-LOX 由来 LDE の標的を探索するため、ABPP にて貪食時にシステイン反応性の変動を示したタンパク質と、先行研究にて aAA とクリックケミストリーにより同定された 12/15-LOX 由来 LDE の標的候補とを比較した。その結果、Rac2 や Cofilin-1 など貪食に重要なアクチン細胞骨格を制御する分子が含まれていた。この内、アクチン脱重合因子である Cofilin-1 に着目して研究を進めた。

Cofilin-1 のリコンビナントタンパク質に対して、12/15-LOX 由来 LDE である 12-oxo-EETE またはその前駆体である 12-HETE を処理し、蛍光が付加されたヨードアセタミドプローブを用いてシステイン反応性をゲルレベルで評価した結果、Cofilin-1 へのプローブ標識が 12-oxo-EETE の濃度依存的に抑制された。一方、12-HETE ではこの抑制がほとんど確認されなかった。また、野生型または 12/15-LOX 欠損 (Alox15 KO) マウスの腹腔 M ϕ に aAA 処理を処理し、クリックケミストリーによりビオチン標識させた後、Cofilin-1 の免疫沈降を行い、avidin blot にて可視化した。その結果、野生型サンプルでは aAA 標識が確認された一方、Alox15 KO サンプルでは aAA 標識が完全に消失した。ABPP にて Cofilin-1 の C139/147 が貪食依存的なシステイン反応性変動を示したため、野生型の Cofilin-1、または標的部位である C139/147 を求核性の低いセリンに置換した C139/147S 変異体の Cofilin-1 と 12/15-LOX とを共発現させた HEK293T 細胞に対して aAA を処理した。その後、クリックケミストリーを介してビオチン標識し、avidin blot を行った結果、野生型 Cofilin-1 では 12/15-LOX 依存的な aAA 標識が確認された一方、C139/147S 変異体では aAA 標識が完全に消失した。

さらに、12-oxo-ETE のアルキン類縁体 (12-oxo-ETE-alkyne) を合成し、Cofilin-1 リコンビナントタンパク質に添加した。その結果、野生型では 12-oxo-ETE-alkyne の共有結合が確認された一方、単一変異体である C139S, C147S では 12-oxo-ETE-alkyne の結合量が減弱し、さらに C139/147S 変異体では 12-oxo-ETE-alkyne の結合が消失した。

2-4. 12-oxo-ETE 修飾 Cofilin-1 ペプチドの同定

今まで用いてきた評価系では、ヨードアセタミドプローブや脂肪酸アルキンプローブを使用しており、生体内に存在する構造の LDE が Cofilin-1 を修飾するかは検証できていない。そこで、12/15-LOX 由来の LDE が Cofilin-1 のシステインに直接に修飾するペプチドの同定を試みた。Cofilin-1 のリコンビナントタンパク質に対して、12-oxo-ETE を処理した後、ペプチド消化し、LC-MS/MS によりプロテオミクス解析を行った。その結果、アノテーションされたペプチドの中に 12-oxo-ETE による修飾 ($\Delta\text{mass} = 318.2195 \text{ Da}$) がついた C147 含有ペプチドが確認された。一方、C139 の修飾ペプチドについては検出限界以下であった。

2-5. Cofilin-1 のアクチン脱重合活性が 12-oxo-ETE により抑制された

Cofilin-1 はアクチン繊維 (F-actin) を脱重合するタンパク質である。LDE 修飾による Cofilin-1 の機能変化を検証するため、in vitro の Cofilin-1 活性評価系を構築した。蛍光分子ピレンで標識した F-actin を Cofilin-1 のリコンビナントタンパク質と共培養し、アクチン脱重合に伴う経時的な蛍光減弱を定量した。その結果、12-oxo-ETE 処理により蛍光減弱の抑制が認められ、この抑制が C139/147S 変異体ではキャンセルされた。さらに、Alox15 KO M ϕ を 12-oxo-ETE で処理し、F-actin に結合する phalloidin を用いて細胞内 F-actin レベルを評価した。その結果、12-oxo-ETE 処理により、細胞内 F-actin の有意な上昇が認められた。

2-6. 12/15-LOX 由来 LDE 処理により、腹腔マクロファージの貪食能が上昇する

細胞内のアクチンダイナミクスは、M ϕ の貪食をはじめとする様々な生理機能に重要である。そこで、12/15-LOX 由来 LDE が M ϕ の貪食を制御するのか検証した。腹腔 M ϕ を蛍光標識した死細胞と共培養し、フローサイトメトリーにて死細胞を取り込んだ M ϕ の割合を定量した。その結果、野生型と比較して、Alox15 KO M ϕ では貪食細胞の割合が有意に低下していた。一方で、12-oxo-ETE または 15-oxo-ETE を処理した Alox15 KO M ϕ では貪食細胞の割合が上昇していた。これに対して、ROS などによっても生成する LDE である 4-hydroxynonenal (HNE) を同濃度処理した際には、貪食細胞の割合上昇は認められなかった。最後に、12/15-LOX 由来 LDE によるマクロファージの貪食促進効果が Cofilin-1 の C139/147 依存的であるか検証した。マクロファージに対する遺伝子導入が困難であったため、膜透過性ペプチドを用いて、Cofilin-1 タンパク質を細胞内へ送達する実験系を構築した。Cofilin-1 を siRNA でノックダウンした RAW264.7 マクロファージに対して、野生型 Cofilin-1 または C139/147S 変異体の His-tag 付きタ

ンパク質を導入し、その後、蛍光標識した PS リボソームの取り込みをフローサイトメトリーにて定量した。その結果、野生型 Cofilin-1 を送達した M ϕ では 12-oxo-ETE 処理により貪食細胞の割合が上昇した一方、C139/147S 変異体を送達した M ϕ では 12-oxo-ETE 処理による貪食細胞の割合の上昇が有意に減弱していた。

2-7. 考察と展望

M ϕ の貪食能は組織によって異なり、マウスの腹腔 M ϕ は死細胞を貪食する能力が特に高いことが知られている。貪食過程において、細胞内で酸化還元状態や代謝プロセスが変化し、それに伴いシステインの求核性・反応性が変動すると推測される。本研究では、ABPP を用いてマウス腹腔 M ϕ の貪食過程におけるシステイン反応性の変動を包括的に解析した。特徴的な反応性変動を示したシステインの中には、レドックス制御を受ける部位や酵素の活性中心など、タンパク質の機能的に重要な部位が多く含まれていた。また、機能未知なシステインの反応性変動も複数認められ、今後の検証により貪食依存的なタンパク質反応性変化とその生理的意義の解明が期待される。

腹腔 M ϕ は脂質代謝にも特徴があり、その一つとして脂肪酸酸化酵素 12/15-LOX を高発現することが挙げられる。本酵素を欠損することで腹腔 M ϕ の貪食能が低下したことから、12/15-LOX は腹腔 M ϕ の高い貪食能を規定する分子の一つであるものと考えられる。12/15-LOX は PUFA を酸化することで、メディエーターを含む多様な生理活性代謝物を生成するだけでなく、LDE の生成にも関わり、タンパク質中の求核性アミノ酸残基を修飾する。本研究では、ABPP にて貪食依存的にシステイン反応性が変化したタンパク質と先行研究にて同定された LDE の候補タンパク質とを比較し、貪食時に 12/15-LOX 由来 LDE により修飾を受ける標的として、アクチン脱重合因子である Cofilin-1 の C139/147 を見出した。また、LDE が Cofilin-1 の C139/147 に共有結合することでそのアクチン脱重合活性を抑制することを示した。クライオ電子顕微鏡による構造解析から、C139/147 が Cofilin-1 とアクチンが結合する界面に位置することが示されており、LDE による修飾が両分子の相互作用を阻害することで、F-actin を安定化する可能性が考えられる。さらに、LDE で処理した腹腔 M ϕ では、細胞内 F-actin レベルの上昇やアポトーシス細胞に対する貪食能の上昇が認められた。12/15-LOX は通常、細胞質全体に局在するが、貪食時にはアクチン骨格制御が盛んに行われる phagocytic cup 近傍に偏在することが知られている。また、貪食時の M ϕ では細胞内の F-actin レベルが増加し、この現象が 12/15-LOX 欠損により顕著に抑制されることが報告されているが、その分子機構は不明である。本研究の結果から、12/15-LOX が LDE を局所的に生成し、Cofilin-1 などのアクチン骨格制御因子を修飾することで、F-actin の安定化及び貪食の促進に寄与する可能性が考えられた。今後は TMT-ABPP を脂肪酸酸化に関わる他のバイオロジーにも展開することで、LDE によるタンパク質修飾とその機能的役割の更なる解明が期待される。

論文審査結果の要旨

本審査会では、申請者が約 25 分間の研究発表を行った後、約 1 時間の質疑応答を行った。最後に申請者が退室し、審査委員による協議を行った。

審査委員より、ABPP プロテオミクスで同定された LDE 修飾タンパク質と先行研究で認められた 12/15-LOX 由来 LDE の修飾タンパク質とのオーバーラップが低い理由について質問を受け、以下の通り回答した。12/15-LOX 由来 LDE はシステイン、ヒスチジン、リジンなどの求核性の高いアミノ酸残基に共有結合することが知られている。今回の ABPP 手法で用いたヨードアセタミドプローブは、それらのアミノ酸の中でもシステインに特異的に結合する性質を有し、LDE によるシステイン修飾を定量的に捉えることができるが、それ以外のアミノ酸残基に対する修飾は評価できない。また、先行研究では定常状態のマクロファージで産生される 12/15-LOX 由来 LDE の標的タンパク質を捉えていたが、今回の ABPP プロテオミクスでは定常状態と比較し、貪食する際のシステイン修飾状態の変動に着目しているため、両者のプロテオミクスにおいてある程度異なるターゲットが捉えられた可能性が考えられる。審査委員より、今後本研究を発表する際には、聴衆が理解できるよう、二つの実験における LDE の修飾部位の違いをきちんと説明するよう助言を受けた。

審査委員より、LDE の修飾タンパク質として、Cofilin-1 にまず着目する理由について質問を受け、下記の通り回答した。本研究で用いた ABPP プロテオミクス法で同定された貪食依存的に修飾を受けるタンパク質候補と、先行研究で同定された 12/15-LOX 依存的に LDE 修飾されるタンパク質との比較により、Cofilin-1 以外にも、Itgb2 や Rac2 が貪食関連タンパク質が候補として認められた。その中、Itgb2 はマクロファージと死細胞の認識や結合を担うことが報告されている。また、Rac2 は small GTPase として、Cofilin-1 の活性を制御することが報告されており、これらの分子も LDE 修飾の標的として興味深い対象である。一方で、死細胞を貪食する際のマウス腹腔マクロファージにおいては、細胞骨格のダイナミクスが 12/15-LOX の有無で影響を受けるという過去の知見があることから、本研究では見出された候補分子の中でも細胞骨格の制御経路の一番下流に位置する Cofilin-1 にまず着目した。

審査委員より、貪食された死細胞由来の PS が 12/15-LOX に代謝されて、LDE に変換されるのかについて質問を受けた。マクロファージの表面に発現する受容体は死細胞など外来的刺激に応じて、下流のホスホリパーゼ A2 を活性化させ、マクロファージの細胞膜を構成するリン脂質の sn-2 位から多価不飽和脂肪酸を切り出す。切り出された多価不飽和脂肪酸は 12/15-LOX に代謝され、酸化脂肪酸に変換することが一般的に知られている。死細胞由来の PS の脂肪酸鎖がホスホリパーゼ A2 によって切り出される可能性は考えられるが、一般的に PS はアポトーシス時にリン脂質二重膜の外層に露出し、それ自身が eat-me シグナルとなりマクロファージの認識受容体のリガンドとして働くことが想定されると回答した。

審査委員より、12-oxo-ETE 処理したマクロファージでは細胞形態が丸くなり、細胞死が誘導されていないかについて質問を受け、下記の通り回答した。親電子性脂質代謝物が特定のタンパク質に共有結合し、細胞のアポトーシスを誘導する可能性を検証するため、12-oxo-ETE、及びアポトーシスを誘導することが知られている過酸化水素で処

理した腹腔マクロファージに対して、Annexin V-PI 染色により細胞死を評価した。その結果、12-oxo-ETE では細胞死を誘導しないことが分かり、細胞形態の変化が細胞死と関連しないことが想定された。

審査委員より、12-oxo-ETE で処理した腹腔マクロファージでは F-actin シグナル上昇や細胞形態が丸くなる現象と、貪食促進効果と関連性があるかについて質問を受けた。これまでに、定常時のマクロファージに 12-oxo-ETE を処理し、免疫染色にて F-actin 蛍光強度や細胞形態を観察したが、死細胞を貪食する際のマクロファージは観察できておらず、審査委員の指摘はもっともだと回答した。審査委員からは、貪食する際に 12/15-LOX は phagocytic cup に移行し、局所的に 12-oxo-ETE など LDE を産生し、Cofilin-1 を修飾する可能性について言及するべきとの助言を受けた。

審査委員より、12-oxo-ETE による貪食促進効果が小さいという指摘を受け、下記の通り回答した。本研究の結果から、12-oxo-ETE などの LDE が複数の貪食関連タンパク質に共有結合することが分かり、それぞれのタンパク質が異なる方向でマクロファージの貪食を制御することが予想される。一方、野生型及び 12/15-LOX 欠損マウス由来マクロファージに対する死細胞貪食の定量結果では 10%の貪食能低下が認められたが、12-oxo-ETE などの LDE で処理した 12/15-LOX 欠損マクロファージでも 10%程度の貪食能上昇が観察され、LDE は 12/15-LOX の遺伝子欠損と同程度マクロファージの貪食に寄与することが想定される。また、本研究で用いられたマクロファージの貪食評価系はプレートに接着させたマクロファージを対象にしたが、生体内のマクロファージは死細胞から放出された「Find-me」シグナルを受け、死細胞の方に遊走することが知られている。細胞遊走も細胞骨格の動態が大きく影響する現象であり、実際に 12/15-LOX 欠損マクロファージでは走化性因子に向けた遊走能が低下することが報告されている。従って、マクロファージの細胞遊走においても LDE による制御を受ける可能性が想定される。

審査委員より、マクロファージの貪食能力をパーセンテージで表記することは不適切ではないかという質問を受け、下記の通り回答した。既報で行われている蛍光標識した死細胞に対するマクロファージの貪食アッセイでは、貪食群と、非貪食群に分けることが少なく、死細胞を貪食したサンプルで蛍光シグナルが全体的に上昇する（プロットでは右にシフトする）ことが多い。本研究で行ったフローサイトメトリーに基づいたマクロファージ貪食アッセイは、死細胞を加えないサンプルをコントロール群として、蛍光シグナルがコントロール群より高いものをゲーティングの対象として設定したため、パーセンテージの結果が得られた。審査委員からは、マクロファージ全体的な蛍光強度の変動も比較するべきとの助言を受けた。

審査委員より、炎症誘導した腹腔マクロファージを使用しないのかについて質問を受け、下記の通り回答した。チオグリコレートをマウスの腹腔内に注射し、炎症を誘導する際に集まった単球から分化したマクロファージを対象とした先行研究は多いが、そのようなマクロファージ集団は 12/15-LOX を基本的に発現しないことが報告されている。本研究は 12/15-LOX を高発現する常在性の腹腔マクロファージに着目したことで、LDE 修飾と貪食の関連が見出されたものと考えられる。

審査委員より、マクロファージに対する遺伝子導入が難しい理由について質問を受けた。マクロファージは組織恒常性を維持するため、外来性の遺伝子を受容体を介して認

識し、エンドサイトーシスで取り込み、リソソームで分解する活性が高いことが知られている。細胞への遺伝子導入で用いたプラスミド DNA や DNA ウイルスなどがマクロファージにおいては素早く除去されるため、遺伝子導入が難しいと予想される。一方で本研究で用いた膜透過性ペプチドは正電荷の持つアミノ酸残基を豊富に持ち、細胞膜の構成成分であるリン脂質と直接的に相互作用することで細胞膜のポアを形成し、タンパク質などを細胞内に送達できると回答した。審査委員より、リコンビナントタンパク質は膜透過性ペプチドを用いて細胞内に導入したが、プラスミドも適用可能かについて質問を受け、下記の通り回答した。膜透過性ペプチドは一般的に塩基性のリジンやアルギニンを豊富に含有するため、正に帯電することが多い。負電荷を持つプラスミドなどの核酸分子は膜透過性ペプチドとの間に静電相互作用が起これ、ペプチドの膜透過能力に影響することが報告されているため、当該実験は難しいと想定される。

審査委員より、腹腔マクロファージと RAW264.7 細胞の貪食能の差について質問を受けた。腹腔マクロファージは死細胞に対して高い貪食能を有する一方、RAW264.7 細胞は死細胞に対する貪食能が低いことが知られている。そのため、一般的に用いられている蛍光標識した死細胞による貪食アッセイは難しく、本研究では蛍光標識した PS リポソームを用いて RAW264.7 細胞の貪食能を定量した。本研究で用いた死細胞は胸腺細胞で、細胞の直径が 5 μm 前後であることに對し、PS リポソームは 1 μm になり、マクロファージにより取り込みやすいと回答した。審査委員からは、リポソームは受容体を介した貪食以外に、細胞膜と直接的に融合することで細胞内に取り込まれる可能性があるとの助言を受けた。

審査委員より、12/15-LOX はマクロファージが貪食する際に、細胞内局在以外の制御について質問を受け、下記の通り回答した。マクロファージは死細胞を貪食する際に、12/15-LOX は phagocytic cup に移行することが報告されている以外に、死細胞との共培養により 12/15-LOX のタンパク質発現も上昇することが報告されている。本研究でマクロファージと死細胞の共培養時間は 1 時間に設定したが、既報の 3 時間の培養時間と比較してかなり短く、タンパク質の発現制御よりは 12/15-LOX の細胞内局在による LDE 修飾タンパク質の変動であることが予想される。

審査委員より、HEK293T 細胞を用いた LDE 修飾の可視化は Cofilin-1 の免疫沈降を行っているのかについて質問を受けた。HEK293T 細胞を用いた実験系では Cofilin-1 を強制発現させ、アルキン脂肪酸を処理した whole cell lysate に対して click chemistry によってビオチンを付加して検出を行ったが、Cofilin-1 かつ 12/15-LOX の発現依存的に Cofilin-1 の分子量付近に修飾体のバンドが検出されたため、HEK293T 細胞の whole cell lysate で観察された LDE 修飾は Cofilin-1 由来である可能性が高いことが想定される。また、Cofilin-1 のリコンビナントタンパク質を用いた LDE 修飾体の可視化の結果、12-oxo-ETE が Cofilin-1 を修飾することが示され、Cofilin-1 が 12/15-LOX 由来 LDE に修飾されることが強く示唆されると回答した。

審査委員より、LDE の修飾部位である Cofilin-1 のシステイン 139、147 番目を同時にセリン残基に置換した変異体のみ活性を評価したかについて質問を受け、下記の通り回答した。本研究で HEK293T 細胞や Cofilin-1 のリコンビナントタンパク質を用いた強制発現系の実験では、ABPP プロテオミクスで同定されたシステイン 139、147 を単独で求核性の低いセリンに置換した単一変異体では LDE 修飾が半分程度残存すること

から、二つのシステイン部位が同時に LDE 修飾に必要であることが想定される。そのため、Cofilin-1 に対する活性測定も二つのシステインを同時にセリンに置換した変異体で評価した。また、システインの 147 番目については単独のセリン変異体を用いた活性測定を行ったが、野生型との差は認められなかった。従って、二つの修飾部位が同時に修飾されることが Cofilin-1 のアクチン脱重合活性を制御する可能性が想定される。

審査委員より、Cofilin-1 の LDE 以外の翻訳後修飾について質問を受け、下記の通り回答した。Cofilin-1 の 3 番目のセリン残基がリン酸化を受けることで、そのアクチン骨格脱重合活性が抑制されることが知られている。本研究でも、12-oxo-ETE がマクロファージの細胞内で Cofilin-1 のリン酸化に与える影響について検証した。その結果、12-oxo-ETE 処理による Cofilin-1 のリン酸化の変動は認められなかった。審査委員からは、本研究で見出した Cofilin-1 のシステイン 139、147 が過酸化水素による酸化修飾を受ける先行研究の結果も言及するべきとの助言を受けた。

公聴会では、アルキン脂肪酸プローブを用いる意義について質問を受けた。外から加えたアルキンアラキドン酸プローブが細胞内に取り込まれ、内因性のアラキドン酸と同様に 12/15-LOX により LDE に変換され、共有結合した細胞内タンパク質をクリックケミストリーで検出するための戦略であると回答した。また、LDE が Cofilin-1 と共有結合することに特異性があるのかとの質問を受けた。LDE 自身の構造特異性というより、12/15-LOX により LDE が局所的に産生される場所に依存した標的タンパク質選択性がある可能性について言及した。関連して、Phagocytosis のどの段階で LDE がタンパク質を修飾するかについて質問を受け、内因性の Cofilin 修飾について経時的な検証は行っていないと回答した。加えて、LDE 修飾が Cofilin-1 のアクチン脱重合活性を抑制するメカニズムを問われ、LDE の修飾部位である Cys 139/147 はアクチンと Cofilin-1 が相互作用する界面に位置すると回答した。腹腔マクロファージ以外のマクロファージでも LDE による貪食制御を受けるかについて質問を受け、下記の通り回答した。腹腔マクロファージ以外に小腸や大腸の組織マクロファージでも 12/15-LOX を発現し、LDE による貪食制御を受ける可能性がある一方、他の組織マクロファージや RAW264.7 細胞には 12/15-LOX が発現していないと回答した。システインのチオールに対する 12-oxo-ETE の付加様式について、1,4 付加だけでなく 1,6 付加で共有結合する可能性を指摘され、その可能性はあると回答した。

本研究では、マウス腹腔マクロファージに高発現する 12/15-lipoxygenase が死細胞の貪食作用を促進する細胞内メカニズムとして、Cofilin-1 の親電子性脂質代謝物 (LDE) 修飾によるアクチン骨格制御の可能性が示された。アルキン脂肪酸を用いたクリックケミストリーや Activity-Based Protein Profiling (ABPP) などのケミカルバイオロジー手法とプロテオミクス解析を駆使することで得られた成果であり、高度な技術基盤に基づく研究の独自性・挑戦性が高く評価できる。一方で、Cofilin-1 の LDE 修飾がマクロファージ貪食能促進につながる分子メカニズムや、その寄与度については不明な点が残されている。また、検出感度の限界から、マクロファージの貪食時に内因性に生成する LDE 修飾ペプチドの構造を実際に捉えることは叶わなかったが、ケミカルプローブを用いた一つ一つの実験が丁寧に行われ、結果の解釈についても生化学的に十分な考察がなされ

ていた。審査委員の質問に対しても適切に答えており、本研究及びその関連領域に対して十分な知識と理解を有していると判断された。今後、生命科学領域の研究者としてさらに活躍されることを期待したい。

以上より、申請者は博士（薬科学）の学位に十分値するものと評価された。

【主論文に関する原著論文】

Kaiyuan Deng, Yosuke Isobe, Kazuya Tsumagari, Taiga Kato, Hiroyuki Arai, Koshi Imami, Makoto Arita. 12/15-lipoxygenase-derived electrophilic lipid modifications in phagocytic macrophages. *ACS Chem. Biol.* in press
DOI: 10.1021/acscchembio.4c00624