

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	鄧 開元
主 論 文 題 名： 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				
(内容の要旨) 【背景・目的】 マクロファージ (Mφ)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 (Cyclooxygenase: 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 Mφ 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 によるタンパク質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、タンパク質中の求核性・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、Mφ 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 修飾の様式及び機能解析を行った。 【方法・結果】 システイン反応性変動を包括的に捉える ABPP 手法で貪食時の Mφ を調べた結果、合計 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明らかになった。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ていた。

次に、貪食時の Mφ 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、LDE 修飾を受けるものが含まれていることが考えられた。そこで、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 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 Mφ に aAA 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。

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-EETE 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 Mφ を 12-oxo-EETE 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-EETE 処理により、細胞内 F-actin の有意な上昇が認められた。

細胞内のアクチンダイナミクスは、Mφ 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。

【考察】

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。