

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22641

研究課題名(和文) 反応性脂肪酸代謝物によるマクロファージの恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms underlying maintaining macrophage homeostasis with lipid-derived electrophiles

研究代表者

磯部 洋輔 (Isobe, Yosuke)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：80724335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪酸酸化酵素12/15-LOXによるマウス腹腔マクロファージの制御機構の解明を目指し、貪食や細胞遊走等と深く関わるアクチン重合経路に対する本酵素の役割についてその一端を明らかにした。さらに、本酵素が産生する親電子性代謝物(lipid-derived electrophile: LDE)によるタンパク質修飾に着目し、ケミカルバイオロジーの手法によってアクチン重合関連分子を含むマクロファージ細胞内タンパク質に対する修飾の分子基盤を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内では様々なタンパク質が脂質修飾による機能調節を受けると考えられているが、その分子実体は不明な点が多く残されている。本研究で親電子性脂質による修飾タンパク質、及びその修飾部位が明らかになったことで、これまでほとんど未開拓であったタンパク質脂質修飾の生理的意義解明が飛躍的に進展する可能性がある。また、生体防御に重要なマクロファージの制御機構の一端が明らかになったことで、炎症や免疫を制御する新たなアプローチの提供につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to understand the regulatory mechanisms of mouse peritoneal macrophages by a fatty acid oxygenase 12/15-LOX, and uncovered the roles of this enzyme in regulating the actin remodeling pathway which is important for phagocytosis and cell migration. In addition, this study focused on protein modification with lipid-derived electrophiles (LDE), and uncovered the molecular basis of protein modification of macrophage cellular proteins including molecules related to actin remodeling.

研究分野：脂質生物学

キーワード：マクロファージ 親電子性代謝物 タンパク質修飾 ケミカルバイオロジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

アラキドン酸 (AA) などの多価不飽和脂肪酸 (Polyunsaturated Fatty Acid: PUFA) は、リボキシゲナーゼ (LOX) をはじめとする脂質酸化酵素によって代謝され、様々な代謝物に変換される。研究代表者らはこれまでに、腹腔マクロファージが高い 12/15-LOX 活性を有すること、12/15-LOX 欠損マウス由来の腹腔マクロファージはアポトーシス細胞の貪食能が野生型マウスの細胞と比べて有意に低下していることを見出しているが、その分子メカニズムは不明である。一般に LOX から生成する PUFA 代謝物は、生体内においてタンパク質に作用して機能を発揮するため、代謝物の標的特定は LOX の生理機能の解明に重要である。特に、12/15-LOX から生成する PUFA 代謝物の中には lipid-derived electrophile (LDE) として標的タンパク質を非可逆的に修飾して機能を発揮するものも存在するが、その標的タンパク質はほとんど不明であり、その分子基盤を明らかにすることで 12/15-LOX の生理機能の解明が飛躍的に進むことが期待される。

LDE を含む脂質修飾の標的タンパク質同定のツールとして、脂肪酸のオメガ末端がアルキン修飾されたアルキン脂肪酸の有用性が注目されている。アルキンは本来の脂肪酸に対してほぼ最小限の分子修飾である上、アルキン-アジド環化付加反応 (通称クリック反応) によって後から蛍光分子やビオチンといったタグを付加することができるため、脂肪酸の細胞内代謝動態を追跡するツールとして有用である。研究代表者らはこれまでに、アラキドン酸のケミカルプローブとして AA-alkyne を用い、PUFA から生成する LDE の標的タンパク質を高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) にて同定するケミカルプロテオミクスの系を構築した。さらにその系をマウス腹腔マクロファージに適用し、細胞に内在に発現する 12/15-LOX によって生成する LDE の標的タンパク質候補を数百種類同定することに成功した。それらの中にはエネルギー代謝や細胞接着・貪食のパスウェイに関わる分子群が有意に濃縮されており、マクロファージの恒常性維持に対するこれらの分子の関与が考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、12/15-LOX による腹腔マクロファージの恒常性維持機構の解明のため、研究代表者らがこれまでに見出してきた 12/15-LOX 由来 LDE による修飾タンパク質候補に着目し、最先端のケミカルプロテオミクス解析技術を適用することで LDE の標的タンパク質における修飾の分子実体の解明を目指した。さらに、12/15-LOX 欠損マクロファージを用いた解析により、12/15-LOX による LDE の標的タンパク質及びその関連シグナルの機能制御について検証を行った。

### 3. 研究の方法

研究代表者らがこれまでに行ってきた AA-alkyne を用いたケミカルプロテオミクスにより見出された LDE の標的候補について、HEK293 細胞に 12/15-LOX と共発現させ、LDE の前駆体となる脂質プローブとして AA-alkyne を加えて培養後、クリック反応によって標的候補のタンパク質へのプローブの結合を検出した。

また、タンパク質中の反応性の高いアミノ酸を捉えるケミカルプローブ (reactivity-based probe) を活用し、LDE の標的分子及び修飾部位の検証と網羅的解析を行った。「反応性の高いアミノ酸」とは、タンパク質内の局所環境において低い pKa を持ち、高い求核性を獲得したシステイン等であり、レドックス制御、金属配位、酵素活性など様々なタンパク質機能に関わっている。Reactivity-based probe はそのような反応性の高いアミノ酸に選択的かつ非可逆的に共有結合する性質を有する。本研究では、システイン反応性の reactivity-based probe を用い、目的のタンパク質に対するプローブの結合が LDE によって阻害されるかを指標に LDE がそのタンパク質を修飾するかを検証した。また、12/15-LOX を発現する腹腔マクロファージに AA をあらかじめ代謝させ、生成した LDE を標的タンパク質に結合させた上で reactivity-based probe を処理し、LC-MS/MS でプローブ修飾ペプチドの解析を行うことでプローブの結合部位 (アミノ酸) を網羅的に同定すると共に、AA 処理サンプルとのプローブ修飾ペプチドの相対定量比較を行うことで LDE の標的タンパク質、及び結合部位のアミノ酸の網羅的解析を行った。

さらに、LDE の標的タンパク質が腹腔マクロファージにおいて 12/15-LOX による制御を受けるか、12/15-LOX 欠損マウス由来の腹腔マクロファージを用いた解析を行った。具体的には、野生型及び 12/15-LOX 欠損マクロファージにおける標的タンパク質の細胞内局在や活性の評価を行うと共に、関連シグナル経路の評価を行った。

### 4. 研究成果

HEK293 細胞に 12/15-LOX と標的タンパク質の候補を共発現させ、AA-alkyne を用いてタンパク質修飾を検出した。その結果、細胞の貪食に深く関わる Rho GTPase (Cdc42 や Rac2) をはじめとする複数のタンパク質へのプローブのラベルが確認され、アルキン脂肪酸を用いたケミカ

ルプロテオミクスの結果が支持された(図1A)

アルキン脂肪酸は本来の脂肪酸と構造が非常に近いものの、全く同一では無い。そこで、標的候補の中で Rho GTPase に着目し、reactivity-based probe と Rho GTPase のリコンビナントタンパク質を用いて 12/15-LOX によって産生される LDE が標的に結合するか検証を行なった。その結果、システイン反応性の reactivity-based probe による Rho GTPase のラベルが、12/15-LOX 由来の LDE として知られる 12-oxoETE (12-

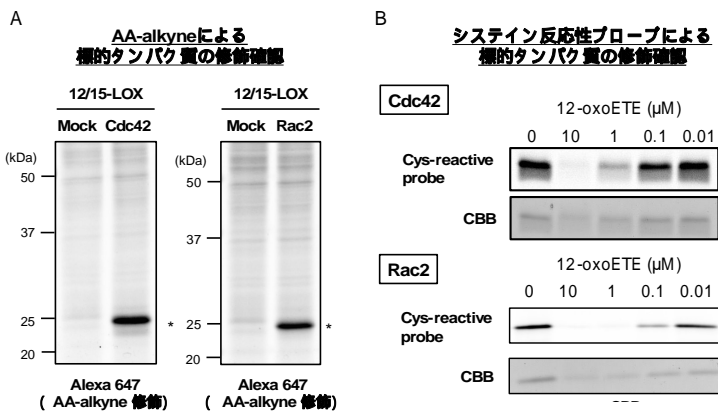


図1 標的タンパク質候補のLDE修飾の検証

oxoeicosatetraenoic acid) によって濃度依存的に阻害されたことから、Rho GTPase のシステインが LDE により修飾されることが示唆された(図1B)。また、reactivity-based probe の結合阻害は、12/15-LOX から生成する非反応性の代謝物である 12-HETE (12-hydroxyeicosatetraenoic acid) には認められず、代謝物の親電子性が標的への結合に重要であることが示唆された。

また、反応性の高いアミノ酸をラベルするケミカルプロテオミクスの手法を用い、腹腔マクロファージにおける LDE 修飾タンパク質や修飾部位となるシステイン残基を網羅的に同定した。AA 処理/非処理の腹腔マクロファージの細胞ライセートにシステイン反応性の reactivity-based probe を処理し、タンパク質をペプチドに消化、バーコード (Tandem Mass Tag: TMT) によってラベルした。その後全サンプルを混合し、プローブ修飾ペプチドを濃縮した上で LC-MS/MS 解析、プローブ修飾ペプチドの同定とバーコードを用いた多群間の相対定量を行った(図2)。その結果、3000 以上のプローブ修飾ペプチド及び修飾部位のシステインが同定され、それら全てについて AA 添加によるシグナルの変動を網羅的に相対定量することに成功した(図2)。その中には Rho GTPase 由来のペプチドも複数含まれており、さらにその中で AA の濃度依存的にシグナルが減少するものが認められ(図2)、それらのプローブ修飾部位のシステインが 12/15-LOX 由来 LDE により修飾されている可能性が考えられた。

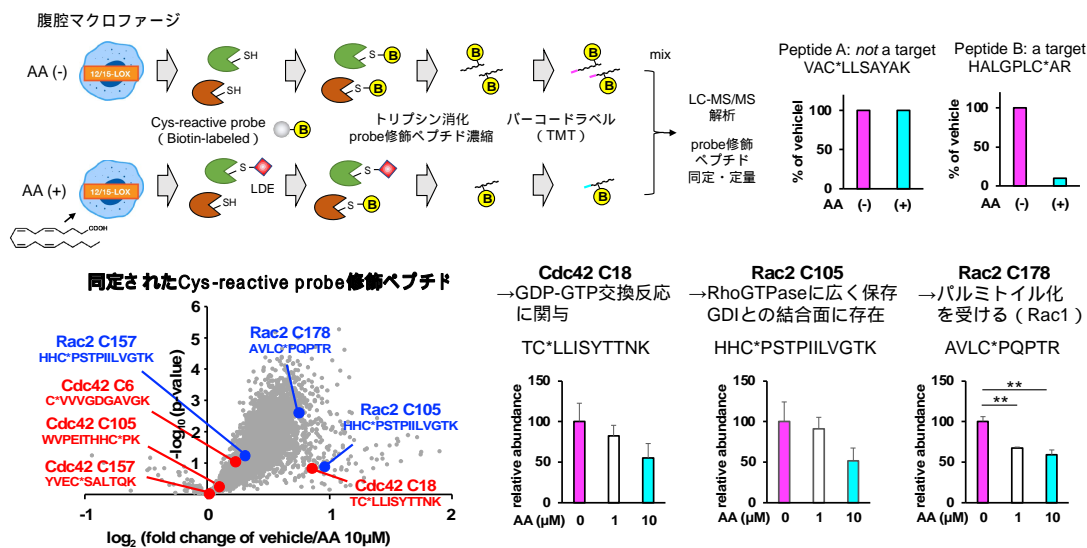


図2 Cys-reactive probe を用いたケミカルプロテオミクスによるLDE修飾部位の網羅的解析

ケミカルプロテオミクスにより LDE の標的タンパク質として見出された Rho GTPase、及びその代表的な下流シグナルとしてアクチン重合経路について、12/15-LOX による機能制御の検討を行った。野生型、あるいは 12/15-LOX 欠損マクロファージに Rho GTPase 経路を活性化する GPCR リガンドを処理し、その下流の細胞内イベントを解析した。その結果、GPCR リガンド刺激によるアクチン重合を伴う細胞膜の形態変化が、12/15-LOX 欠損マクロファージでは有意に抑制されていた。さらに、野生型のマクロファージにおいて Rho GTPase は細胞質中に存在したが、12/15-LOX 欠損マクロファージにおいては核近傍に局在する様子が認められ、12/15-LOX が腹腔マクロファージにおいて Rho GTPase 及びその下流のシグナル経路を制御している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>磯部洋輔、Daniel K. Nomura、有田誠       |
| 2. 発表標題<br>代謝物の標的タンパク質を同定するケミカルプロテオミクスの新技術 |
| 3. 学会等名<br>日本プロテオーム学会2021年大会（招待講演）         |
| 4. 発表年<br>2021年                            |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|