

非定型カドヘリン Fat3 はプリン代謝と連携してミクログリアを制御する

上田 健太郎 (筑波大学 生物学類)

指導教員：鶴田 文憲 (筑波大学 生命環境系)

【背景と目的】

脳は、多くの神経細胞とグリア細胞によって構成されている。グリア細胞はオリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアの3つに大別される。中でもミクログリアは、脳内における免疫機能を担う常在型マクロファージとして知られている。近年、ミクログリアはシナプスの形成や刈り込み、神経細胞のアポトーシス誘導など、脳の発達に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。脳の発達過程においてミクログリアは著しく増殖し、その形態や機能を変化させていく。そして、互いに重なり合わないようにテリトリーを形成し、脳の恒常性維持に寄与している。これまで、所属研究室では、ミクログリア様細胞 BV2 において、プリン代謝産物であるヒポキサンチン刺激が細胞突起を安定化させることを発見し、その制御因子として非定型カドヘリンタンパク質 Fat3 を同定している。また、Fat3 ノックアウトマウスでは、ミクログリアの細胞突起が過剰形成されることも見出している。しかし、Fat3 がプリン代謝を介して成体ミクログリアを制御する分子メカニズムは不明であった。本研究では、Fat3 がプリン代謝と連携して、成体ミクログリアの状態変化に寄与する分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】

1. 免疫組織染色

野生型 (WT) マウスと Fat3 の C 末端に HA タグを挿入した Fat3-HA マウスをそれぞれ PBS で灌流し、脳を摘出した後に、4 % PFA/PBS 溶液で浸透固定した。その後、30 % Sucrose/PBS 溶液で置換し、凍結サンプルを作製した。凍結させた脳を、クライオスタットを用いて厚さ 50 μ m の凍結切片を作製した。作製した切片に 5 % BSA/0.25 % Triton X-100/PBS 溶液を添加し、室温で 4 時間、透過処理を行った。その後、抗 IBA1 抗体 (1:200) と抗 HA 抗体 (1:500) を用い、4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。一次抗体反応後、蛍光色素が結合した二次抗体と核を染色する Hoechst (1:1000) を添加した。染色画像は、共焦点レーザー顕微鏡 (ZEISS, LSM710) を用いて取得した。

2. 共免疫沈降 (Co-IP)

HEK293T 細胞に Flag-Fat3 ICD と HA-HPRT の発現プラスミドを導入した。導入後、48 時間後に細胞を回収し、Lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.5 % NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) で溶解した。その後、十分に洗浄した Flag ビーズを加え、4 $^{\circ}$ C で 3 時間混和した。混和後、Flag ビーズを Lysis buffer で洗浄し、タンパク質をウエスタンブロットで検出した。

3. ウエスタンブロット

SDS-PAGE により、作製したサンプル中のタンパク質を分離し、PVDF 膜に転写した。その後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク/TBS-T を用いて blocking し、5 % BSA/TBS-T で希釈した抗 HA

抗体 (1:1000)、抗 Flag 抗体 (1:1000) を用いて 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。一次抗体反応後、TBS-T で洗浄し、5 % スキムミルク/TBS-T で希釈した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。二次抗体反応後、化学発光検出試薬を用いて検出した。

【結果・考察】

Fat3 の細胞内ドメインは切断される

はじめに、Fat3-HA マウスを用いて、ミクログリアマーカーである IBA1 と HA の免疫組織染色を行った。その結果、Fat3 の C 末端はミクログリアの核近傍に局在していた。以上の結果から、脳内において Fat3 はミクログリア内で発現しており、細胞膜ではなく、切断されることで核近傍に局在する可能性が示唆された。

先行研究では、特定の膜タンパク質は切断されて断片化し、その断片が本来の機能とは異なる機能を持つことが報告されている。そこで、Fat3 も細胞内ドメイン (ICD) が切断されることで核近傍への局在が見られるのではないかと仮説を立てた。Fat3 ICD が切断されているかを検証するために、Fat3-HA マウス脳のウエスタンブロットを行った。その結果、Fat3 の完全長のバンドだけでなく、さらに分子量の小さいバンドが 3 つ検出された。最も分子量が小さいバンドは ICD よりも小さく、HA が ICD 側 (C 末端側) に存在していることから、Fat3 ICD は切断されることが推察された。

Fat3 ICD は HPRT と相互作用する

タンパク質間相互作用のデータベースにおいて、膜タンパク質である Fat3 が細胞質に存在している Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) と相互作用することが報告されている。HPRT はプリン代謝においてヒポキサンチン代謝反応を触媒する酵素である。また、所属研究室の先行研究で、ヒポキサンチン刺激によって Fat3 の発現量が上昇することを見出している。そこで、Fat3 は切断され、ICD は HPRT と相互作用すると仮説を立てた。これを検証するため、Co-IP を行ったところ、HA 抗体でブロットした Co-IP サンプルで HPRT のバンドが検出された。このことから、Fat3 ICD と HPRT が相互作用していることが示唆された。

本研究では、Fat3 がマウス脳内で切断され、断片化されることを見出した。さらに、Fat3 ICD がプリン代謝関連酵素である HPRT と相互作用することを見出した。これらの結果は、Fat3 断片が HPRT と複合体を形成し、ミクログリアの状態変化に寄与していることを示唆するものである。

【展望】

今後は、成体ミクログリアのテリトリー形成において、Fat3 の断片化がどのように関わるかについて検証を進めていく。また、以上の現象がプリン代謝を介して成体ミクログリアの維持に関与しているかについて明らかにしていく。