

# 死細胞貪食におけるフォスファチジルセリン結合タンパク質の機能解析

松本 生成 (筑波大学生物学類) 指導教員: 渋谷 和子 (筑波大学医学医療系)

## [背景]

動物の体内では組織のターンオーバーにより恒常的に細胞死が生じており、それらの死細胞は炎症性サイトカインや免疫の活性化を誘導するダメージ関連分子パターン (DAMPs) を放出する。したがって、組織の恒常性を維持するためには、貪食細胞による死細胞の適切なクリアランスが重要である。そのクリアランス過程において重要な役割を担っているのが、フォスファチジルセリン (Phosphatidylserine; PS) とその受容体である PS 受容体、あるいは PS と結合するアダプタータンパク質である[1]。PS は本来、形質膜の内側を裏うちし、細胞死に伴って死細胞表面に露出するようになるリン脂質であり、死細胞のマーカーとして機能する。本研究では、PS アダプタータンパク質として知られている MFG-E8 の変異型タンパク質を利用し、PS とその受容体の相互作用による死細胞貪食への関与を解析した。

## [目的]

PS 結合タンパク質である MFG-E8 の変異型タンパク質を精製し、死細胞貪食に与える影響を解析する。

## [方法]

### (1) 変異型 MFG-E8 の精製

MFG-E8 は PS と貪食細胞上のインテグリンを架橋するアダプタータンパク質であるが、PS との結合部位を保ったまま、インテグリン結合ドメインの 1 アミノ酸置換によりインテグリンへの結合性を失った変異タンパク質を MFG-E8 D89E、PS 結合ドメインとインテグリン結合ドメインの両方に変異を持つタンパク質を MFG-E8 EPT と呼ぶ(図 1)、

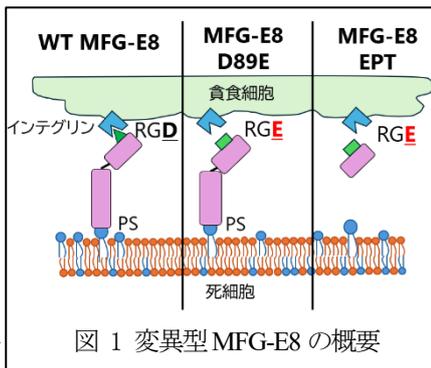


図 1 変異型 MFG-E8 の概要

本研究ではこの二つの変異型 MFG-E8 をそれぞれ含むベクターを用いタンパク質を精製した。Large Prep 法により目的のプラスミドを増幅し、それを 293F 細胞に導入し、培養上清を回収した。今回精製した D89E および EPT は N 末端末端に FLAG タグが融合しているため、抗 FLAG タグ抗体を用いたアフィニティゲルクロマトグラフィーによって培養上清から目的のタンパク質の精製を行い、目的のタンパク質が精製されていることを SDS-PAGE で確認した。

### (2) MFG-E8-D89E の PS 結合能力の確認

Annexin V は死細胞上の PS と結合するタンパク質であり、MFG-E8 は PS との結合において競合することが明らかにされている[2]。Jurkat 細胞にスタウロスポリンを用いて細胞死を誘導し、細胞表面上の PS の発現を Annexin V によりフローサイトメトリー法で解析した。また、同時に D89E と PS の結合を、Annexin V との競合試験および抗 Flag タグ抗体による染色により解析した。

### (3) MFG-E8-D89E が死細胞貪食に与える効果の検証

マウス骨髄由来マクロファージに Jurkat 細胞から誘導した死細胞を加え、死細胞貪食を共焦点顕微鏡、およびフローサイトメトリー法で解析した。死細胞貪食は、死細胞を pH 依存性に蛍光を発する色素 pHrodo で染色することで、死細胞が、貪食により細胞内に取り込まれたのち、ファゴサイト内の pH の低下によって蛍光を発するようになることを利用し、Phagocytic index 
$$\left( \frac{\text{死細胞を貪食したマクロファージの数} \times \text{貪食された死細胞の数}}{(\text{マクロファージの総数})^2} \times 100 \right)$$
 [3] を指標として解析した。

### (4) 統計解析

GraphPad Prism software を用い、有意水準を 5% として両側 Student-t 検定を行った。

## [結果・考察]

### (1) PS と MFG-E8 D89E の結合

精製した MFG-E8 D89E は生細胞には結合せず、死細胞に結合する一方で、PS 結合領域を欠損している MFG-E8 EPT は死細胞に結合しないことを認めた(図 2)。また、MFG-E8 D89E は Annexin V と死細胞への結合において競合することから、PS に結合することが明らかとなった。

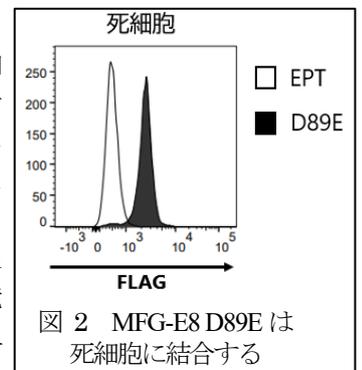


図 2 MFG-E8 D89E は死細胞に結合する

### (2) MFG-E8 D89E によるマクロファージの死細胞貪食阻害

MFG-E8 D89E を与えた死細胞をマクロファージに貪食させた群は、MFG-E8 EPT を与えた群と比較して死細胞の貪食が有意に低下し(図 3)、Phagocytic index も MFG-E8 D89E を与えた群で有意に低下した。したがって、MFG-E8 D89E はマクロファージによる死細胞貪食を阻害することが明らかになった。これらの結果は、MFG-E8 D89E は PS と結合し、更に、PS をマスクすることによって、PS と PS 受容体を介した死細胞貪食シグナルを機能的に阻害していることを示唆する。

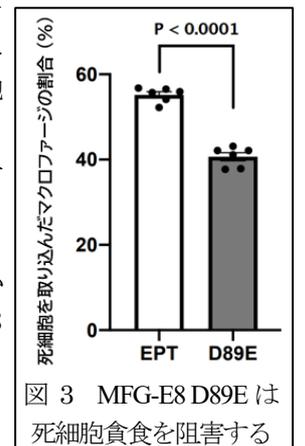


図 3 MFG-E8 D89E は死細胞貪食を阻害する

また、野生型 MFG-E8 は PS アダプタータンパク質として死細胞貪食を促進するという報告[4]から、MFG-E8 D89E で変異しているインテグリン結合部位が、本来の MFG-E8 のアダプター機能を介した死細胞貪食においてやはり重要であることを確認できた。

## [参考文献]

- [1] Byeongjin Moon et al. (2023) *Exp Mol Med* 55, 1644-1651
- [2] Rikinari Hanayama et al. (2002) *Nature* 417, 182-187
- [3] Hideki Sano et al. (2003) *J. Clin. Invest* 112(3), 389-397
- [4] Michael Miksa et al. (2009) *J. Immunol. Method* 342 (1-2), 71-77