

学位論文（博士）

免疫細胞特異的アクチン結合タンパク質 Coronin-1 の
食作用に関与するリン酸化とその制御機構の解析

2021年9月

星薬科大学大学院 薬学研究科

総合薬科学専攻

微生物学研究室

金子 豊

目次

| | |
|--|----|
| 論文目録..... | 1 |
| 略号リスト..... | 3 |
| 第一章 緒論..... | 4 |
| 第二章 Coronin-1 のリン酸化とアクチン細胞骨格への結合性 | 6 |
| 第三章 Coronin-1 のリン酸化を制御する PKC アイソフォームの特定..... | 31 |
| 第四章 総括..... | 45 |
| 謝辞..... | 48 |
| 参考文献..... | 49 |

論文目録

本論文は、学術雑誌に掲載された以下の主論文に基づき構成されている。

○主論文

1) Oku T*, **Kaneko Y***, Ishii R, Hitomi Y, Tsuiji M, Toyoshima S, Tsuji T.

Coronin-1 is phosphorylated at Thr-412 by protein kinase C α in human phagocytic cells.

*These authors contributed equally

Biochem. Biophys. Rep., **27**;101041 (2021).

2) Oku T, **Kaneko Y**, Murofushi K, Seyama Y, Toyoshima S, Tsuji T.

Phorbol ester-dependent phosphorylation regulates the association of p57/Coronin-1 with the actin cytoskeleton.

J. Biol. Chem., **43**, 28918-28925 (2008).

上記の論文のうち、1) を第三章、2) を第二章に使用している。

○参考論文

1) 金子 豊,

がん細胞は CD24 によりマクロファージの貪食機構から回避する
ファルマシア, **56**, 442-442 (2020)

2) Oku T, Nakano M, **Kaneko Y**, Ando Y, Kenmotsu H, Itoh S, Tsuiji M, Seyama Y,
Toyoshima S, Tsuji T.

Constitutive turnover of phosphorylation at Thr-412 of human p57/Coronin-1 regulates the
interaction with actin.

J. Biol. Chem., **287**, 42910-42920 (2012)

略号リスト

| | |
|--------------|--|
| AP | Alkaline phosphatase, アルカリホスファターゼ |
| Arp 2/3 | Actin-related protein 2/3 complex |
| ATP | Adenosine triphosphate, アデノシン三リン酸 |
| BSA | Bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン |
| DAG | Diacylglycerol, ジアシルグリセロール |
| DIC | Differential interference contrast, 微分干渉観察 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide, ジメチルスルホキシド |
| ECL | Enhanced chemiluminescence, 増強化学発光 |
| EGFP | Enhanced green fluorescent protein, 緑色蛍光タンパク質 |
| FCS | Fetal calf serum, ウシ胎児血清 |
| FL | Full length, 完全長 |
| LZ | Leucine zipper, ロイシンジッパー構造 |
| MALDI-TOF-MS | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 |
| OpZ | Opsonized zymosan, オプソニン化ザイモサン |
| PBS | Phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水 |
| PKC | Protein kinase C, プロテインキナーゼ C |
| PMA | Phorbol 12-myristate 13-acetate, ホルボールエステル |
| PS | Phosphatidylserine, ホスファチジルセリン |
| SDS | Sodium dodecyl sulphate, ドデシル硫酸ナトリウム |
| PAGE | Poly acrylamide gel electrophoresis |
| siRNA | Small interfering RNA, 低分子干渉 RNA |

第一章 緒論

好中球やマクロファージに代表される食細胞は、侵入した異物や死細胞の排除などの生体防御・維持に関与し、自然免疫の中心的な担当細胞として重要な役割を担っている^{1,2)}。これらの細胞は異物を細胞内に取り込み、排除する過程においてファゴソーム（食胞）と呼ばれる小胞を形成する。このファゴソームにさまざまな消化酵素を内包するリソソームが融合することで、ファゴソーム内の物質を分解・消化する。このような異物を排除する働きは、食作用または貪食と呼ばれ、細胞の複雑な形態変化を伴うことが知られている³⁾。細胞の形態変化には、細胞膜直下に存在するアクチン細胞骨格の再構成が必須であり、この動的な構造変化は多種のアクチン結合タンパク質によって制御されていることが知られている^{4,5)}。このアクチン結合タンパク質も、キナーゼによるリン酸化やホスファターゼによる脱リン酸化、他の分子との相互作用や水素イオン指数（pH）による構造変化など多岐にわたる制御を受けおり、アクチン細胞骨格の再構成は、多数の分子が複雑に作用し制御されていると考えられている^{6,7)}。

当研究グループは、ウシ胸腺より分子量約 57,000 のタンパク質を単離し、p57 と命名した⁸⁾。このタンパク質は、*Dictyostelium discoideum*（粘菌）のアクチン結合タンパク質である Coronin⁹⁾ と相同性を有する真核生物で初めて発見された Coronin 様タンパク質であった。Coronin は粘菌の運動性や走化性、貪食、細胞質分裂に関与することが知られている^{10, 11)}。マウスにおける p57 の発現分布を調べたところ、胸腺、脾臓、骨髄などの免疫担当組織に強く発現していたことより、免疫細胞の機能制御に関与するアクチン結合タンパク質であることが推測された⁸⁾。その後、次々と Coronin 様タンパク質が発見され、現在ヒトでは組織分布の異なる 7 種類のファミリータンパク質の存在が明らかにされている¹²⁾。

そのため、その名称は報告年次により異なり p57, TACO, CLABP, CLIPINA, Coronin-1, Coronin 1, p57/coronin-1 など多様な記載があるが、現在では Coronin-1 が最も一般的であるため、本論文ではこの名称に統一し、図表の記載も原著から変更している。Coronin ファミリータンパク質の多くは、約 450-500 のアミノ酸残基より構成されおり、トリプトファン残基 (W) とアスパラギン酸残基 (D) のリピート構造である WD repeat を有している。Coronin-1 は、N 末端側に 5 つの WD repeat を含む 7 枚羽根の β -プロペラ構造¹³⁾、C 末端にロイシンジッパーを含む Coiled-coil 構造⁸⁾より成る 461 のアミノ酸残基で構成されている。これまでに当研究室では、本分子の機能ドメインの解析を行っており、 β -プロペラ構造を構成する N 末端領域に 2 か所のアクチンとの結合部位が存在すること¹⁴⁾、C 末端のロイシンジッパーがホモ二量体形成に寄与することを報告している¹⁵⁾。また、本分子の機能解析も行っており、食細胞の貪食において特徴的な機能を示すことを報告している。実際には、好中球の貪食時に Coronin-1 は一過性にファゴソームに集積すること¹⁶⁾、ファゴソームから解離した後、ファゴソームーリソソーム融合が起こることを報告している¹⁷⁾。本分子は、結核菌の細胞内寄生性にも関与することが報告されている。*Mycobacterium tuberculosis* (ヒト型結核菌) や *Mycobacterium bovis* BCG (ウシ型結核菌) は、マクロファージに貪食された後もファゴソーム内で生存することが知られており、これら結核菌を内包するファゴソームにはリソソームの融合が起こらないことが報告されている¹⁸⁾。このリソソームが融合しない結核菌を内包したファゴソームには Coronin-1 の持続的な局在が観察されることより¹⁹⁻²¹⁾、本分子の細胞内局在はファゴソームの成熟に重要な役割を担っていると考えられた。

本論文では、食細胞における Coronin-1 の機能制御機構に注目し、その細胞内分布の制御に関わると推測される Coronin-1 のリン酸化について解析を行った。

第二章 Coronin-1 のリン酸化とアクチン細胞骨格への結合性

第一節 緒言

前章で述べたように、Coronin-1 は食細胞の貪食過程において重要な役割を担うと推察される。これまでに当研究グループでは食細胞における Coronin-1 の機能解析を行い、1) 異物の貪食の際に F-アクチンと共に一過性にファゴソームに局在すること、2) ファゴソームから解離する時間帯にリン酸化されること、3) *in vitro* においてプロテインキナーゼ C (PKC) によってリン酸化されること、4) 貪食の際に PKC 阻害薬処理を行うとファゴソームから解離しなくなることを報告している¹⁷⁾。また、5) Coronin-1 が F-アクチンに結合することから^{8,14)}、PKC による Coronin-1 のリン酸化がファゴソーム膜に存在する F-アクチンとの結合性を制御し、ファゴソームの成熟に関与している可能性が考えられた。

本章では、Coronin-1 のリン酸化とアクチン細胞骨格への結合性の関係を明らかにするため、PKC 活性化薬である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) およびホスファターゼ阻害薬である calyculin A を HL60 細胞に処理し解析を行った。

第二節 試薬および方法

・試薬

制限酵素, 修飾酵素およびアルカリホスファターゼ (仔ウシ腸由来) は TaKaRa Bio (Osaka, Japan) および Toyobo (Osaka, Japan) より購入した. CHAPS, PMA およびヨードアセトアミドは Wako Pure Chemical (Osaka, Japan) より購入した. Hybond-ECL ニトロセルロース膜, Immobiline DryStrip および IPG バッファーは GE Healthcare (Piscataway, NJ, USA) より購入した. ATP 二ナトリウム水和物, 1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane, calyculin A, chelerythrine chloride, Triton X-100, ヒト IgG, ヒト血清 (Blood group AB), ローダミン標識ファロイジンおよびアクチン (ウサギ骨格筋由来) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した. Nonidet P-40 および dithiothreitol は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) および Roche Diagnostics (Risch-Rotkreuz, Switzerland) よりそれぞれ購入した. Latrunculin B は Biomol (Plymouth meeting, PA, USA) より購入した. オリゴヌクレオチドは Hokkaido System Science (Sapporo, Japan) より購入した.

・抗体

抗ヒト Coronin-1 モノクローナル抗体 (N7, IgG1/ κ) は当研究グループが樹立したハイブリドーマより精製した¹⁶⁾. 抗アクチン抗体は Sigma-Aldrich より購入した. Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体および HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体は Kirkegaard & Perry Laboratories (Gaithersburg, MD, USA) および Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA) よりそれぞれ購入した. Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体は Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) より購入した.

・EGFP 融合タンパク質発現プラスミドの構築

緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) と完全長の Coronin-1 (FL) の融合タンパク質の発現プラスミドを構築した. 完全長の Coronin-1 は, プライマー (センス鎖, 5'-GGG GAA TTC AGA ATG AGC CGG CAG GTG G-3'; アンチセンス鎖, 5'-GGG GAA TTC AAG CTT GGG GCT CTA CTT GGC CTG G03') を用いて polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅後, *EcoR*I による制限酵素消化を行い, pEGFP-C2 vector (BD Bioscience Clontech) に組み込んだ. また, Coronin-1 の欠失変異体遺伝子 (372-461 番目のアミノ酸領域をコード) を pEGFP-C2 vector 組み込んだ発現プラスミド (pEGFP-LZ) は, 既に報告している¹⁵⁾. これらの塩基配列は, ABI PRISM 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた Dye-terminator 法により確認した.

・細胞培養およびプラスミドの導入

HL60 (ヒト前骨髄性白血病由来), COS-1 (アフリカミドリザル腎由来) および HEK293T (ヒト胎児腎由来) 細胞は, ウシ胎児血清 (FCS, HyClone, Logan, UT, USA) を 10% 添加した RPMI-1640 培地 (Invitrogen) で 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した. これらの細胞への発現プラスミドの導入にはエレクトロポレーション法 (Gene Pulsar Xcell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いた²¹⁾. リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて懸濁した HEK293T または COS-1 細胞 (3.5 x 10⁶ cells/0.7 ml), 10% FCS を含む RPMI-1640 培地にて懸濁した HL60 細胞 (5 x 10⁶ cells/0.2 ml) に, プラスミド DNA (30 µg) を添加し, 専用キュベット (0.4 cm ギャップ幅) に移した後, 300 V, 975 µF の条件下でエレクトロポレーションを行った. その後, 細胞は 10% FCS を含む RPMI-1640 培地 10 ml で 24-48 時間培養した. HEK293T 細胞の導入遺伝子安定発現株は, 限界希釈法にて得た.

・ Cytoskeleton-rich 画分の分離

Cytoskeleton-rich 画分を分離する手法は、Gatfield らの報告²²⁾ に準じた。細胞 (1 x 10⁶ cells) を氷冷した 0.3 ml の細胞骨格単離バッファー (80 mM PIPES, pH 6.8, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 1% Triton X-100) にて可溶化処理を行い、直ちに 5,000 x g の条件で 3 分間遠心分離し、不溶性の細胞骨格を含む画分と可溶性の細胞質を含む画分を分取した。細胞は、PMA (150 nM) および calyculin A (100 nM), chelerythrine (30 μM) または latrunculin B (5 μM) による前処理を行った。

・ 蛍光電子顕微鏡による細胞の観察

HL60 細胞を細胞骨格単離バッファーで処理 (4°C, 3 分) した後、PBS にて洗浄および 3.8% ホルムアルデヒド処理 (4°C, 10 分) を行った。その後、3% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS で希釈した抗 Coronin-1 抗体 (5 μg/ml) を 60 分間処理した。PBS で 3 回洗浄後、先程と同様に希釈した Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (1:200) およびローダミン標識ファロイジン (15 units/ml) を 30 分間処理した。その後、細胞を PBS で 3 回洗浄後、90% グリセロールを含む 2.3% 1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane にて封入した。

EGFP 遺伝子を含むプラスミドを導入した COS-1 および HEK293T 細胞を Lab-Tek II Chamber Slide (Nalge Nunc, Rochester, NY, USA) に培養した (48 時間)。

これらの細胞は、共焦点レーザー顕微鏡 Radiance 2100 (Bio-Rad) または LSM5 Exciter (Carl Zeiss MicroImaging, Oberkochen, Germany) にて観察した。緑色および赤色の蛍光波長には、それぞれ 488 nm (アルゴンレーザー) および 543 nm (ヘリウム/ネオンレーザー) を用いた。

- ・電気泳動およびウエスタンブロット

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) およびウエスタンブロットは、以前の報告に準じた¹⁵⁾。

- ・2次元ゲル電気泳動

HL60 細胞 (1×10^6 cells) は、氷冷した PBS で洗浄した後、0.3 ml の TNE バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 nM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40) で溶解した (4°C, 10 分間)。遠心分離 (15,000 x g, 15 分) により得られた可溶性画分に 9 等量の膨潤バッファー (7 M 尿素, 2 M チオ尿素, 4% CHAPS, 40 mM dithiothreitol, 0.5% IPG バッファー (pH 4-7 または 5.5-6.7), 0.002% bromophenol blue) を加えた。この溶液にて Immobiline DryStrip (7 cm, pH 4-7 または 5.3-6.5) を膨潤処理 (20°C, 12 時間) した。その後, CoolPhoreStar IPG-IEF Type-P (Anatech, Tokyo, Japan) にて, 500 V の条件で 1 時間, 700 V で 15 分, 1,000 V で 15 分, 1,500 V で 15 分, 2,000 V で 15 分, 2,500 V で 15 分, 3,000 V で 15 分, 3,500 V で 4 時間の等電点電気泳動を行った。続いて, 0.25% dithiothreitol を含む平衡化バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M 尿素, 1% SDS, 30% グリセロール, 0.002% bromophenol blue) で 10 分間処理した後, 4.5% ヨードアセトアミドを含む平衡化バッファーで 10 分間処理し, さらに SDS-PAGE および抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

・F-アクチン共沈降実験

HL60 細胞 (3×10^6 cells) を氷冷した G-アクチンバッファー (5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mM CaCl_2 , 0.2 mM ATP, 1 mM dithiothreitol) で懸濁し, ダウンス型ホモジナイザー (tight-fitting) を用いてホモジナイズした (30 ストローク). 細胞破砕液を超遠心分離し (200,000 x g, 60 分), 回収した上清に 1/9 等量の 10 倍アクチン重合用溶液 (最終濃度 : 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM ATP) および G-アクチン (5 μg) を添加し, F-アクチンへの重合を促進させた (25°C, 120 分). 反応液を再度, 超遠心分離し (200,000 x g, 60 分), 上清および沈殿について SDS-PAGE およびウエスタンブロットにより解析した.

・アフィニティークロマトグラフィー

HL60 細胞 (2.5×10^8 cells) を PMA (150 nM) および calyculin A (100 nM) で処理 (37°C, 30 分) した後, TNE バッファーにて可溶化し (4°C, 10 分), 遠心分離 (18,000 x g, 15 分) により細胞溶解液を回収した. この細胞溶解液を抗 Coronin-1 抗体固相化カラム¹⁵⁾に供し, PBS で洗浄後, 0.1 M glycine-HCl バッファー (pH 2.7) にて結合物を溶出した. 溶出物は直ちに 1/9 等量の 1 M Tris-HCl バッファー (pH 9.0) を加えて中和した. 試料は SDS-PAGE および銀染色 (Two-dimensional silver stain II kit, Daiichi Pure Chemical, Tokyo, Japan) またはウエスタンブロットにより解析した.

・ IgG 結合磁気ビーズによる食細胞の抽出

Dynabeads M-270 carboxylic acid (3.0 μm ; Invitrogen) は, ヒト IgG を結合させた後, ヒト血清 (Blood group AB) にてオプソニン化した (37°C, 30 分). HL60 細胞は 1.25% ジメチルスルホキシド (DMSO) を添加した 10% FCS を含む RPMI-1640 培地で 5 日間培養し, 好中球様に分化させた. 分化型 HL60 細胞 (4×10^6 cells) にオプソニン化した Dynabeads を添加し, 37°C の条件で 5-30 分間培養した. Dynabeads を取り込んだ細胞を磁氣的に回収し, 前述の方法で細胞骨格を含む不溶性画分を回収した.

第三節 実験結果

Coronin-1 のアクチン細胞骨格への分布

HL60 細胞を細胞質を含む画分と細胞骨格を含む画分に分画し、Coronin-1 の分布量についてウエスタンブロットおよび免疫蛍光顕微鏡法により解析した。その結果、Coronin-1 はアクチン細胞骨格を含む不溶性画分に多く含まれていることが明らかになった (Fig. 1-1A)。また、細胞骨格単離バッファーで処理した細胞では、細胞皮質において Coronin-1 と F-アクチンの共局在が観察された (Fig. 1-1B)。HL60 細胞にアクチン重合阻害薬である latrunculin B を処理すると、細胞骨格を含む不溶性画分への F-アクチンの分布が減少し、同時に Coronin-1 の分布量も減少した (Fig. 1-1C)。以上のことより、Coronin-1 はアクチン細胞骨格に結合していることが示された。

次に、Coronin-1 を発現していない HEK293T 細胞に、N 末端に EGFP を融合させた完全長の Coronin-1 (EGFP-FL) またはアクチン結合部位を含まない Coronin-1 の 372-461 番目のアミノ酸領域をコードした欠失変異体 (EGFP-LZ) を強制発現させた細胞を作製し、その細胞内分布を解析した (Fig. 1-2A)。これらの細胞に細胞骨格単離バッファーを処理し EGFP の蛍光を観察したところ、EGFP-FL は細胞皮質に認められたが、EGFP-LZ は認められなかった (Fig. 1-2B)。また、これらの細胞より細胞質を含む画分および細胞骨格を含む画分を調製し抗 Coronin-1 抗体および抗アクチン抗体を用いたウエスタンブロットを行ったところ、EGFP-FL は細胞骨格を含む画分から検出されたのに対して、EGFP-LZ は検出されなかった (Fig. 1-2C)。以上の結果より、Coronin-1 はアクチン結合部位を介してアクチン細胞骨格に結合していることが示された。

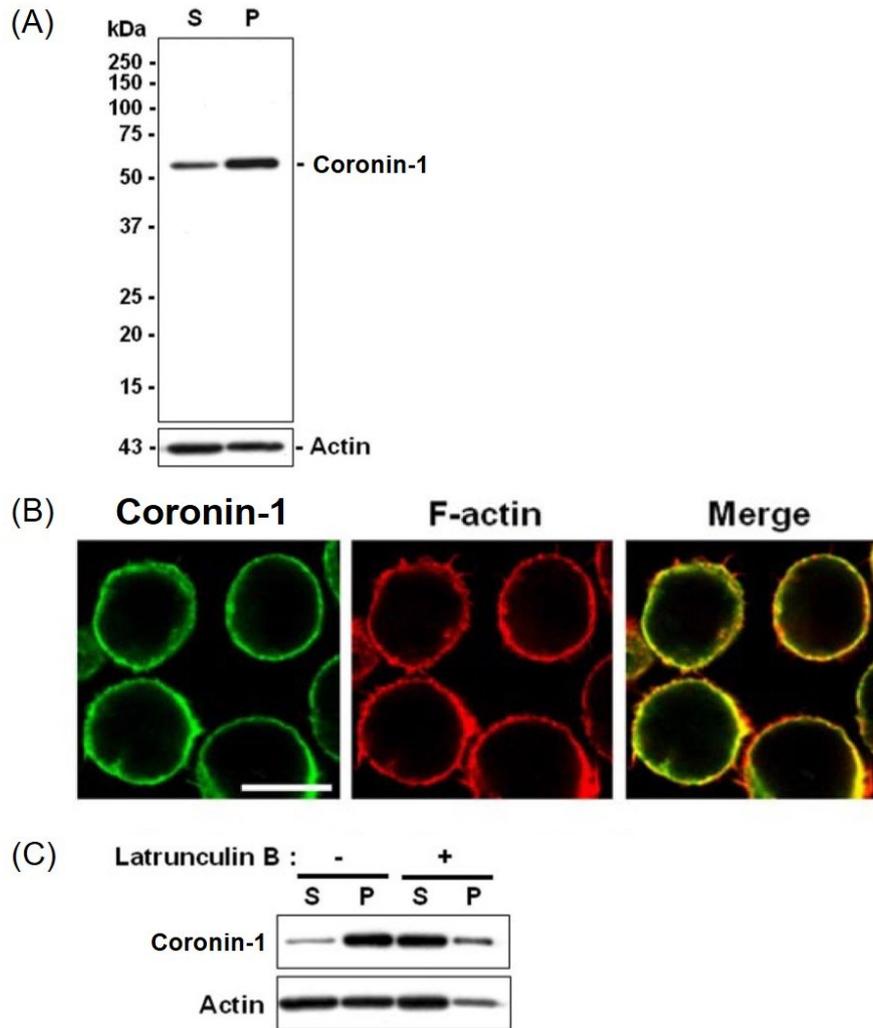


Fig. 1-1 HL60 細胞における Coronin-1 のアクチン細胞骨格への分布

(A) HL60 細胞を細胞骨格単離バッファーで溶解し、遠心分離により、細胞質を含む不溶性画分（上清，S）および細胞骨格を含む可溶性画分（沈殿，P）を回収し、SDS-PAGE およびウエスタンブロットを行った。(B) HL60 細胞を細胞骨格単離バッファーで処理した後、免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により観察した (Scale bar = 5 μ m). (C) HL60 細胞を latrunculin B (5 μ M) で処理 (37°C, 30 分) した後、細胞骨格単離バッファーで溶解し、遠心分離により細胞質を含む不溶性画分 (S) と細胞骨格を含む可溶性画分 (P) に分離した。これらの画分について SDS-PAGE およびウエスタンブロットを行った。

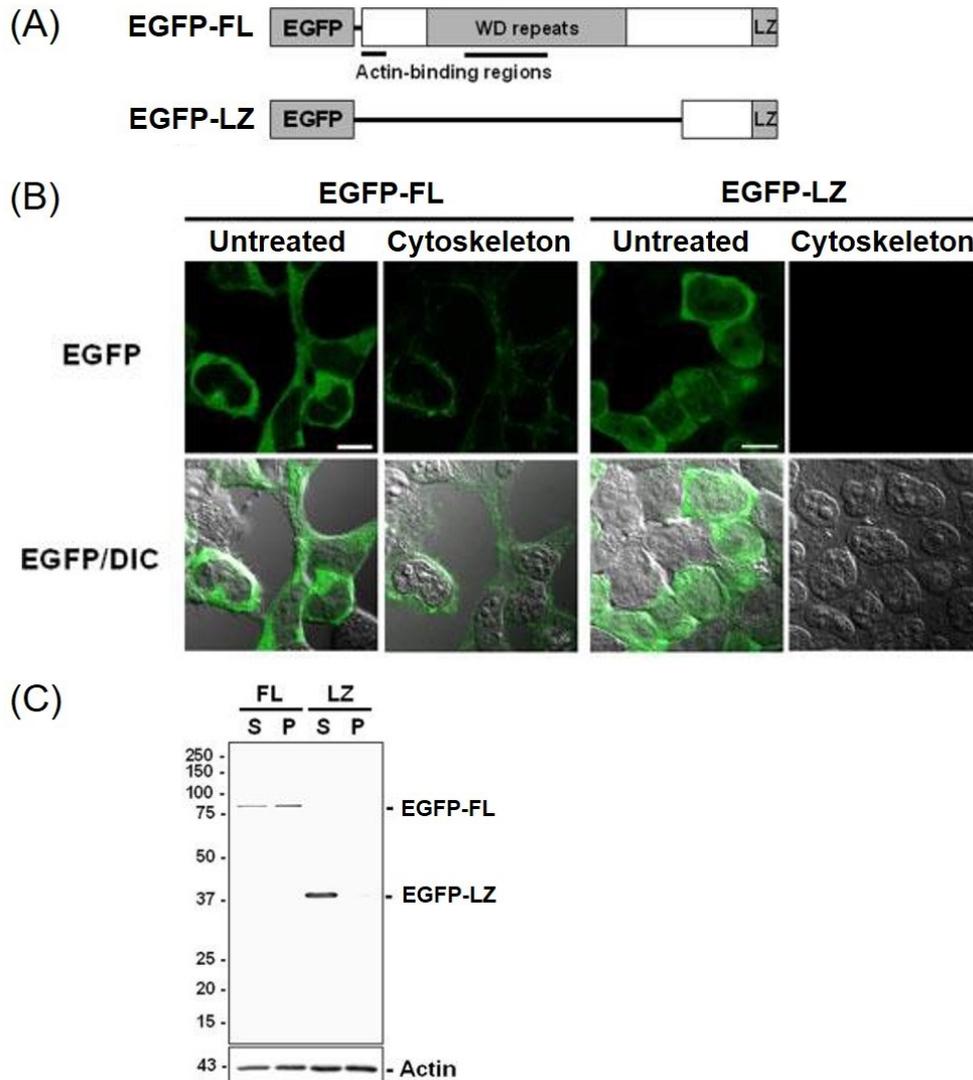


Fig. 1-2 GFP 融合 Coronin-1 および変異体のアクチン細胞骨格への分布

(A) N 末端に EGFP を融合した完全長の Coronin-1 (EGFP-FL) および欠失変異体 (EGFP-LZ) の模式図を示した. (B) HEK293T 細胞に EGFP-FL または EGFP-LZ を発現させた. 細胞骨格単離バッファーを処理し, 蛍光 (EGFP, 上), 蛍光と微分干渉像 (DIC) と蛍光を合わせた図 (EGFP/DIC, 下) を記した (Scale bars = 10 μ m). (C) EGFP 融合タンパクを発現させた HEK293T 細胞を細胞骨格単離バッファーで溶解し, 遠心分離により細胞質を含む可溶性画分 (S) と細胞骨格を含む不溶性画分 (P) に分離した. その後, SDS-PAGE および抗 Coronin-1 抗体, 抗アクチン抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した.

PMA 処理 HL60 細胞における Coronin-1 の細胞内分布

これまでに、白血球の貪食時に Coronin-1 がファゴソームに一過性に局在することや、この細胞内分布が PKC 阻害薬処理により阻害されることを報告している¹⁷⁾。そこで、細胞に PKC 活性化薬である PMA や PKC 阻害薬を処理した際の Coronin-1 のアクチン細胞骨格への結合性について解析した。また、PMA による効果を顕著に観察するために脱リン酸化酵素阻害薬である calyculin A を同時に添加している。HL60 細胞に PKC 阻害薬である chelerythrine (30 μ M) を前処理 (4°C, 30 分) し、PMA (150 nM) および calyculin A (100 nM) を処理 (37°C, 30 分) 後、細胞骨格単離バッファーを用いて細胞質を含む可溶性画分 (S) および細胞骨格を含む不溶性画分 (P) に分画した後、SDS-PAGE および抗 Coronin-1 抗体、抗アクチン抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果、Coronin-1 の細胞骨格を含む不溶性画分への分布は PMA/calyculin A 処理により減少することが明らかになった。また、この細胞内分布の変化は、chelerythrine の前処理により抑制された (Fig. 1-3A)。PMA/calyculin A 処理した HL60 細胞を細胞骨格単離バッファーで処理し、免疫蛍光染色を行ったところ、無処理と比較して細胞皮質への Coronin-1 の分布量が減少した (Fig. 1-3B 上図)。また、この細胞の断面における蛍光強度について解析した (Fig. 1-3B 下図)。その結果、細胞皮質において Coronin-1 と F-アクチンが共局在すること、PMA 処理により F-アクチンの分布量は大きく変化しないが、Coronin-1 は減少したことが定量的に示された。以上の結果より、HL60 細胞を PMA/calyculin A 処理することで Coronin-1 はアクチン細胞骨格から細胞質へ移行することが示唆された。

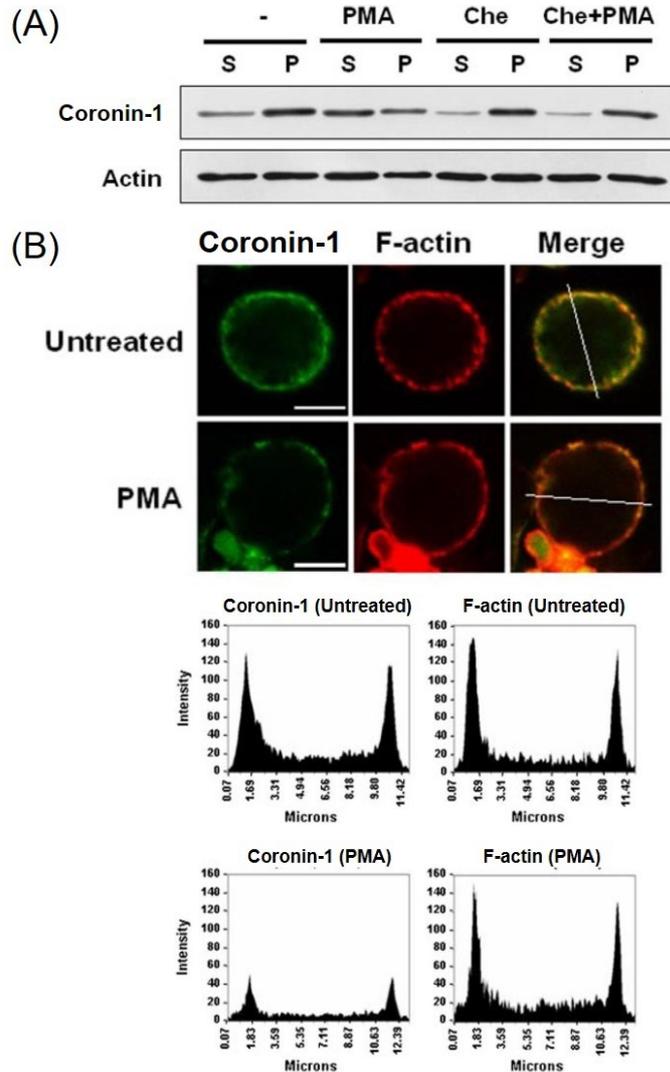


Fig. 1-3 PMA 処理 HL60 細胞における Coronin-1 の細胞内分布

(A) PMA (150 nM) および calyculin A (100 nM), chelerythrine (Che, 30 μ M) または chelerythrine, PMA および calyculin A を処理 (37°C, 30 分) した HL60 細胞について細胞骨格単離バッファーを用いて細胞質を含む可溶性画分 (S) および細胞骨格を含む不溶性画分 (P) を調製した. その後, SDS-PAGE およびウエスタンブロットを行った. (B) 未処理または PMA 処理した HL60 細胞を細胞骨格単離バッファーで処理した後, 免疫蛍光染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡により観察した (Scale bars = 5 μ m). 細胞断面の蛍光強度は LaserSharp software (Bio-Rad) にて解析した.

Coronin-1 の細胞内分布の経時的変化

PMA/calyculin A 処理した細胞における Coronin-1 の細胞内分布の変化を観察するため、HL60 細胞に EGFP-FL を強制発現させ、共焦点レーザー顕微鏡にて同一細胞を経時的に観察した。PMA/calyculin A 処理により、EGFP-FL は細胞皮質から徐々に減少することが明らかになった (Fig. 1-4A)。また、COS-1 細胞に発現させた EGFP-FL においても同様に、細胞皮質からの減少が観察された (Fig. 1-4B I-III)。一方で、chelerythrine を処理した COS-1 細胞では、EGFP-FL の細胞皮質への経時的な集積が観察された (Fig. 1-4C)。

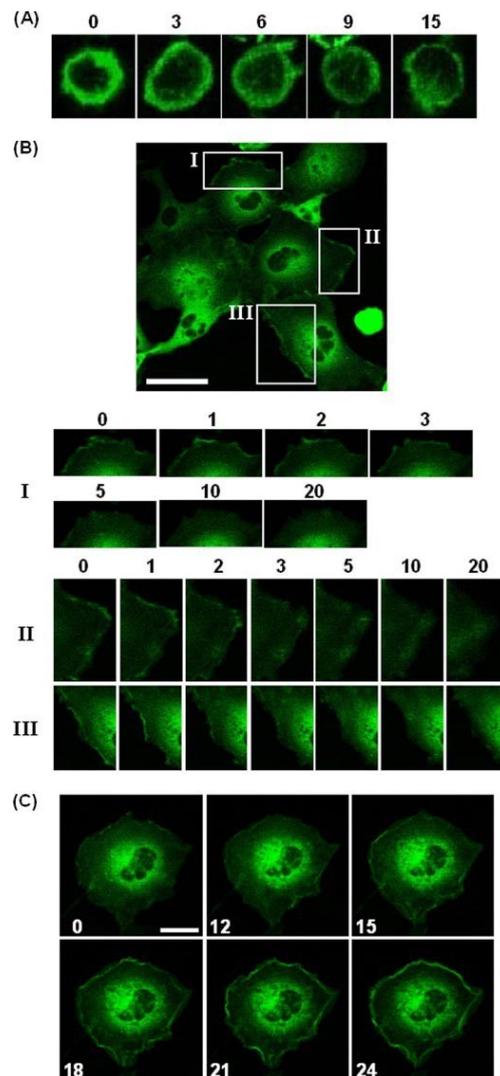


Fig. 1-4 Coronin-1 の細胞内分布の経時的変化

EGFP-FL を強制発現させた HL60 細胞および COS-1 細胞を用いて共焦点レーザー顕微鏡により Coronin-1 の細胞内分布の変化を経時的に観察した. 図中の数字は PMA または chelerythrine 処理の経過時間 (分) を示している. (A) EGFP-FL を発現させた HL60 細胞に PMA (150 nM) および calyculin A (100 nM) を処理した. (B) EGFP-FL を発現させた COS-1 細胞に PMA/calyculin A を処理した (Scale bar = 50 μ m). 図中白線で囲んだ領域の拡大図を I-III に示した. (C) EGFP-FL を発現させた COS-1 細胞に chelerythrine (30 μ M) を処理した (Scale bar = 20 μ m).

2次元ゲル電気泳動による Coronin-1 のリン酸化解析

細胞の PMA/calyculin A 処理により Coronin-1 の細胞内分布が変化することが示されたが、Coronin-1 のリン酸化状態については明らかにされていない。そこで、等電点電気泳動および SDS-PAGE の 2 次元電気泳動を行うことにより Coronin-1 のリン酸化状態について解析を行った。PMA (150 nM) および calyculin A (100 nM) を処理した HL60 細胞の溶解液を用いて 2 次元ゲル電気泳動後、抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。無処理の細胞では、pH 6.3 付近に一つの主要なスポットと一つの小さなスポットが検出された。PMA 処理した細胞では、酸性側にさらに 3 つのスポットが検出された。PKC 阻害薬である chelerythrine を処理した細胞では、無処理と同様のスポットが検出された (Fig. 1-5A)。また、chelerythrine を前処理 (30 μ M) した細胞では、PMA/calyculin A 処理によって出現する酸性側のスポットが検出されなかった (Fig. 1-5B)。PMA/calyculin A 処理 HL60 細胞から得られた溶解液をアルカリホスファターゼ (AP) にて処理することで酸性側のスポットが消失した (Fig. 1-5C)。以上の結果より、PMA/calyculin A 処理により活性化した PKC が Coronin-1 をリン酸化し、2 次元ゲル電気泳動による酸性側のスポットとして検出されたと考えられた。

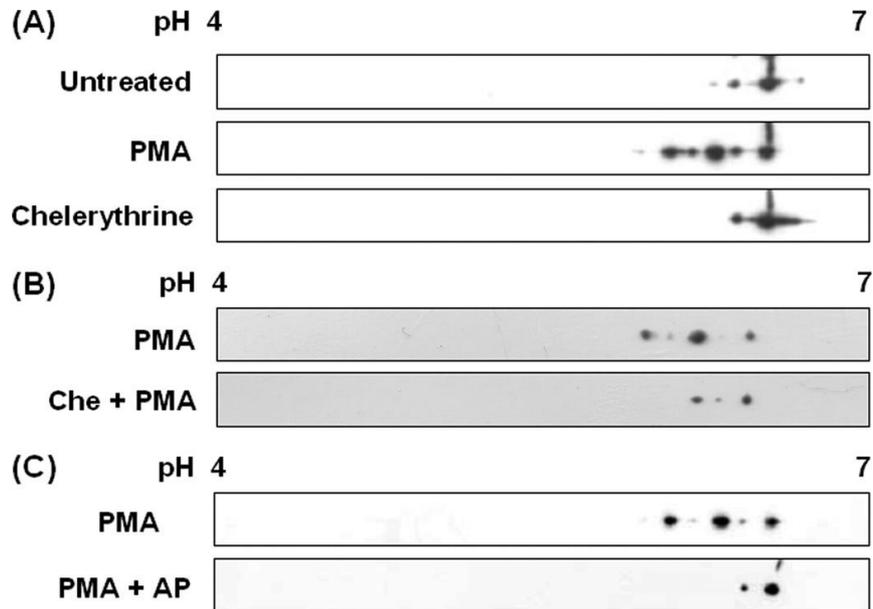


Fig. 1-5 2次元ゲル電気泳動による Coronin-1 のリン酸化解析

HL60 細胞の溶解液を用いて 2 次元ゲル電気泳動後を行い，抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットにより Coronin-1 のリン酸化状態を解析した．(A) 無処理，PMA (150 nM) および calyculin A (100 nM) または chelerythrine (Che, 30 μ M) 処理した HL60 細胞を用いた．(B) chelerythrine を前処理後 PMA 処理した HL60 細胞を用いた．(C) PMA/calyculin A 処理した HL60 細胞の溶解液を AP (50 units/ml, 37°C, 120 分) 処理した．

細胞質画分および細胞骨格画分における Coronin-1 のリン酸化

HL60 細胞を PMA/calyculin A 処理することで、1) Coronin-1 が細胞骨格から解離すること (Fig. 1-3, 1-4), 2) Coronin-1 がリン酸化されること (Fig. 1-5) より、これらの関係性について解析を行った。PMA/calyculin A 処理した HL60 細胞を細胞骨格単離バッファーで溶解し、細胞質を含む可溶性画分と細胞骨格を含む不溶性画分に分画した。それぞれの画分について 2 次元ゲル電気泳動を行った後、抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットにより Coronin-1 のリン酸化状態について解析した。その結果、可溶性画分に含まれる Coronin-1 のスポットは、不溶性画分に含まれるものと比較してより酸性側から検出されたことより、細胞質には高度なリン酸化体が含まれることが示された (Fig. 1-6)。

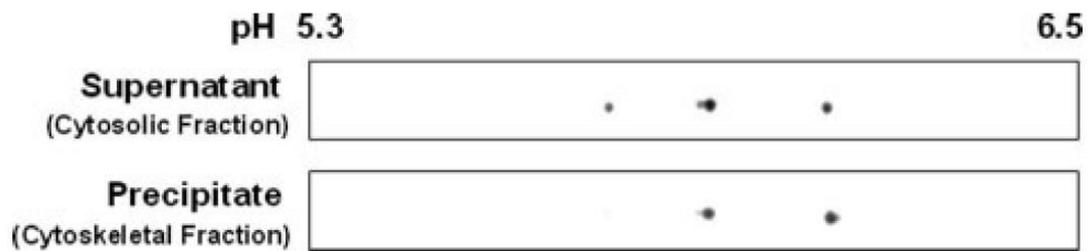


Fig. 1-6 細胞質画分および細胞骨格画分における Coronin-1 のリン酸化

PMA/calyculin A を処理した HL60 細胞を細胞骨格単離バッファーで溶解し、細胞質を含む可溶性画分および細胞骨格を含む不溶性画分を分画した。それぞれの画分について 2 次元ゲル電気泳動および抗 Coronin-1 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。

Coronin-1 のリン酸化と F-アクチンとの結合の関係

Coronin-1 のリン酸化とアクチン細胞骨格への結合に関係性が示されたため、本分子のリン酸化と F-アクチンへの結合との関係性について解析を行った。無処理または PMA/calyculin A 処理した HL60 細胞の細胞破碎液を調製した後、G-アクチンおよびアクチン重合溶液を加えて反応 (25°C, 120 分) させることでアクチン重合 (F-アクチンの形成) を促した。その後、超遠心分離 (200,000 x g, 60 分) を行うことで、F-アクチンおよびその結合物を沈殿 (P) より回収した。また、上清 (S) も回収し、これらを試料として SDS-PAGE および抗 Coronin-1 抗体、抗アクチン抗体を用いたウエスタンブロットを行った。G-アクチンを添加していない試料では、沈殿画分にいずれの分子も検出されなかった。一方で、G-アクチンを添加した試料では沈殿画分よりアクチン (形成した F-アクチン) および Coronin-1 が検出された (Fig. 1-7A)。さらに、上清および沈殿物について、2次元ゲル電気泳動およびウエスタンブロットを行ったところ、細胞骨格への結合と同様に、F-アクチンと共沈降した Coronin-1 には最も酸性側のスポットが検出されなかった (Fig. 1-7B)。

次に、抗 Coronin-1 抗体を固相化したカラムを作製し、PMA/calyculin A 処理した HL60 細胞の溶解液を供し、Coronin-1 の精製を行った。精製画分について SDS-PAGE および抗アクチン抗体を用いたウエスタンブロットを行い共精製されたアクチンの量について解析した。また、精製された Coronin-1 の量は SDS-PAGE 後、ゲルを銀染色することにより確認した。その結果、PMA/calyculin A 処理した HL60 細胞の溶解液から精製した Coronin-1 と共精製されるアクチンの量は、無処理の場合と比較して少なかった (Fig. 1-8)。以上より、リン酸化 Coronin-1 は、F-アクチンへの結合性が減弱していることが明らかになった。

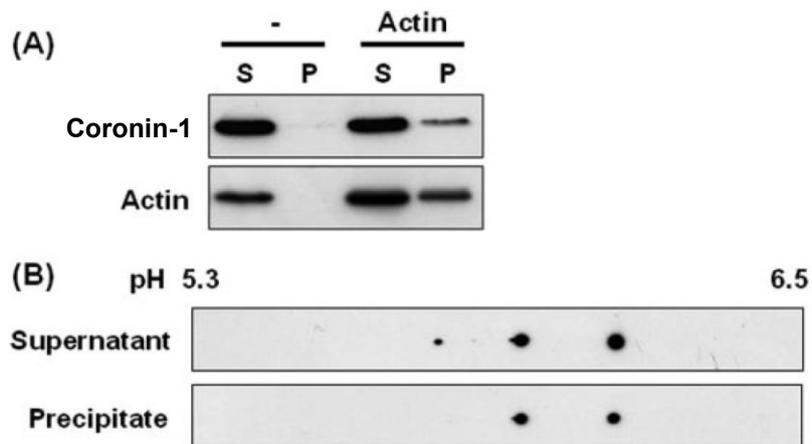


Fig. 1-7 Coronin-1 と F-アクチンの共沈降実験

PMA/calyculin A 処理した HL60 細胞の破碎液に G-アクチン (5 μg) およびアクチン重合溶液を添加し, 反応 (25 $^{\circ}\text{C}$, 120 分) させた後, 超遠心分離 (200,000 x g, 60 分) によって F-アクチンとの共沈降実験を行った. (A) 超遠心分離後に回収した上清 (S) と沈殿 (P) について, SDS-PAGE および抗 Coronin-1 抗体または抗アクチン抗体を用いたウエスタンブロットを行った. (B) 同様に作製した試料について, 2次元ゲル電気泳動および抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った.

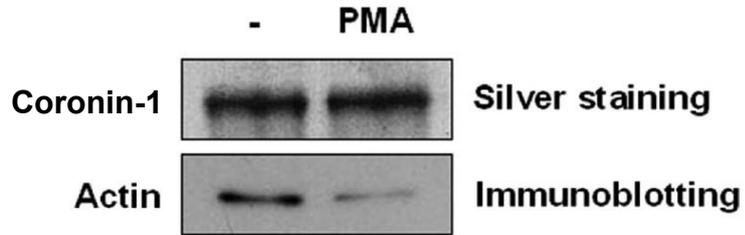


Fig. 1-8 Coronin-1 と共精製されるアクチンの解析

抗 Coronin-1 抗体固相化カラムを用いて, PMA/calyculin A 処理した HL60 細胞の溶解液より Coronin-1 を精製した. 精製物について SDS-PAGE および銀染色または抗アクチン抗体を用いたウエスタンブロットを行った.

貪食時における Coronin-1 の細胞内分布とリン酸化

貪食時における Coronin-1 の細胞内局在の変化およびリン酸化について解析した。分化型 HL60 細胞にヒト血清でオプソニン化した Dynabeads を貪食させ (5 ~ 30 分), 磁性により Dynabeads を取り込んだ細胞のみを回収した。この細胞に細胞骨格単離バッファーを処理することで細胞質を含む可溶性画分 (S) および細胞骨格を含む不溶性画分 (P) を調製し, SDS-PAGE および抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果, Coronin-1 は Dynabeads の添加時間の増加と共に細胞質への分布量が増加し, 相対的に細胞骨格への分布量が減少した (Fig. 1-9A)。また, Dynabeads の未添加または添加 15 分後の Coronin-1 のリン酸化状態について 2 次元ゲル電気泳動および抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析したところ, 未添加では非リン酸化体のスポットのみが検出されたのに対して, 15 分後ではリン酸化体のスポットが検出された (Fig. 1-9B)。以上のことより, 白血球の貪食時に Coronin-1 は細胞骨格から解離し, またその際にリン酸化修飾を受けていることが明らかになった。

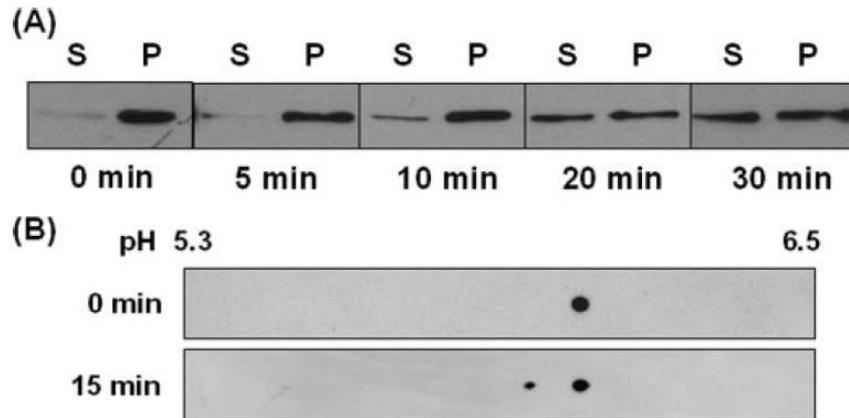


Fig.1-9 食食過程における Coronin-1 の細胞内分布とリン酸化

分化型 HL60 細胞にヒト血清オプソニン化 Dynabeads を添加した (37°C, 5-30 分). Dynabeads を取り込んだ細胞は磁性により回収した. (A) 各時間の細胞を細胞骨格単離バッファーで溶解後, 細胞質を含む可溶性画分 (S) と細胞骨格を含む不溶性画分 (P) に分離した. これらについて SDS-PAGE および抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った. (B) Dynabeads を未添加または添加 15 分後の細胞の溶解液について 2 次元ゲル電気泳動および抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った.

第四節 考察

本章では、白血球における Coronin-1 のリン酸化とアクチン細胞骨格への結合性について解析を行い、以下のことが明らかになった。

- 1) アクチン細胞骨格画分への Coronin-1 の分布量は、細胞の PMA/calyculin A 処理にて減少した。一方、細胞の PKC 阻害薬処理にて増加した (Fig. 1-1 ~ 1-4)。
- 2) PMA/calyculin A 処理した HL60 細胞の Coronin-1 はリン酸化されていた。また、アクチン細胞骨格画分に分布する Coronin-1 や F-アクチンに結合している Coronin-1 は、細胞質画分に分布する Coronin-1 と比較してリン酸化レベルが低かった (Fig. 1-5 ~ 1-7)。
- 3) PMA/calyculin A 処理した HL60 細胞では、Coronin-1 と共精製されるアクチンの量が減少した (Fig. 1-8)。
- 4) HL60 細胞の貪食過程において、Coronin-1 はアクチン細胞骨格より細胞質へと移行した。また、この際に本分子のリン酸化レベルは亢進した (Fig. 1-9)。

アクチン結合タンパク質の制御によりアクチン細胞骨格の再構成が生じることから、Coronin-1 の細胞内分布の変化はこの再構成に寄与していることが考えられる。白血球の貪食において著しい形態変化が認められるため、本分子のリン酸化による細胞骨格からの解離は細胞形態の変化を促している可能性が示唆された。また、Coronin-1 はファゴソームにおいて F-アクチンと共局在することから、ファゴソーム膜上においても重要な働きをしていることが考えられる。実際に、本分子がファゴソームから解離する際にリン酸化されるため、その際にファゴソーム上の F-アクチンとの結合性が減弱していることが示唆された。

Coronin ファミリータンパク質の一つで、ユビキタスな発現分布を示す

Coronin-2 (Coronin-1B としても知られる) は, Coronin-1 と同様に PKC によりリン酸化されることが報告されている²³⁾. Coronin-2 のリン酸化部位は一カ所であり, 2 番目のセリン残基のリン酸化がアクチンフィラメントのネットワーク構築に重要な分子の一つである actin-related protein 2/3 complex (Arp2/3) との結合性に関与することが明らかになっている. このように PKC によるリン酸化は Coronin ファミリータンパク質に共通する重要な機能制御機構なのかもしれない.

今回, 2 次元電気泳動の結果より Coronin-1 の複数のリン酸化体スポットが検出されたことより, 本分子は細胞内において複雑な機能制御が行われていることが示唆された. Coronin-1 のリン酸化部位およびリン酸化制御機構の詳細な解明が必要であると考えられた.

第三章 Coronin-1 のリン酸化を制御する PKC アイソフォームの特定

第一節 緒言

前章の結果から、Coronin-1 とアクチンとの結合はリン酸化によって制御されることが示された。また、当研究室では、Coronin-1 のリン酸化部位について解析を行い、下記のことを報告した²⁴⁾。

- 1) リン酸化部位は、2 番目のセリン残基 (Ser-2) および 412 番目のトレオニン残基 (Thr-412) である。
- 2) Thr-412 では、恒常的なリン酸化・脱リン酸化の代謝回転が起こっている。
- 3) Thr-412 のリン酸化は、アクチンとの結合性に関与する。
- 4) 白血球の貪食の際、Thr-412 の一過性のリン酸化が起こる。

また、第二章第一節に記したように、Coronin-1 のファゴソームからの解離が PKC 阻害薬処理で抑えられることより、本分子のファゴソームにおけるリン酸化は貪食過程において非常に重要であると考えられた。

PKC はセリン・トレオニンキナーゼの一つであり、少なくとも 10 種類のアイソフォームが存在し、構造や触媒機構の違いに基づき 3 つのグループに分類される²⁵⁾。Conventional PKC には、PKC α , PKC β / β II (スプライシングバリエント) および PKC γ が含まれ、ジアシルグリセロール (DAG) およびホスファチジルセリン (PS) の結合による Ca²⁺依存的な活性化機構を示す。Novel PKC には、PKC δ , PKC ϵ , PKC η および PKC θ が含まれ、Ca²⁺非依存的に DAG によって活性化される。さらに、これらとは異なる活性化機構を示す PKC ζ , PKC ι / λ が Atypical PKC として知られている。白血球による貪食作用は、これらの複数の PKC アイソフォームによって厳密に制御されていることが報告されているため²⁶⁻²⁸⁾、Coronin-1 の Thr-412 のリン酸化に関与する PKC アイソフォームの特定を行った。

第二節 試薬および方法

・試薬

ATP ニナトリウム水和物, 1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane, Ficoll PM400, ヒト血清 (Blood group AB), PS, poly-L-lysine, ローダミン標識ファロイジン, Triton X-100, zymosan A は Sigma-Aldrich より購入した. Calphostin C, chelerythrine, Gö6976 および Gö6983 は Calbiochem (San Diego, GA, USA) より購入した. Hybound-ECL ニトロセルロース膜および ECL Select は GE Healthcare より購入した. BSA, calyculin A および RPMI-1640 培地は FUJIFILM Wako Pure Chemical (Osaka, Japan) より購入した. Alexa Fluor 647 protein labeling kit, Dynabeads protein G および Lipofectamine RNAiMAX は Invitrogen より購入した. 精製 PKC α は Sigma-Aldrich より, 精製 PKC β I および PKC ϵ は Cyclex (Nagano, Japan) より購入した. Nonidet P-40 および Opti-MEM 培地は Nacalai Tesque および Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA) よりそれぞれ購入した.

・抗体

抗 Coronin-1 抗体 (N7, IgG1/ κ), ヒト Coronin-1 のリン酸化 Thr-412 特異的モノクローナル (pT412) 抗体 (2B4, IgG1/ κ) および非リン酸化抗体 (412pep, IgG1/ κ) は, これまでに作製している^{16,24}. 抗 PKC α 抗体 (C-20), 抗 PKC δ 抗体 (C-17) は Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) により購入した. 抗 PKC β 抗体 (Clone 36/PKCb) は BD transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ, USA) より購入した. HRP 標識抗マウス IgG 抗体および抗ウサギ IgG 抗体は Kirkegaard & Perry Laboratories より購入した. Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体は Invitrogen より購入した.

・細胞培養および RNA 干渉法

HL60 細胞および HEK293T 細胞は、10% FCS (Thermo Fisher Scientific) を添加した RPMI-1640 培地により、37°C で 5% CO₂ の条件下で培養した。HL60 細胞は 1.25% DMSO を含む培地で 4 日間培養した後、好中球様に分化した細胞は Ficoll PM400 を用いた密度勾配遠心法によって回収した。HEK293T 細胞にヒト Coronin-1 を安定発現させた細胞株 (HEK-hCoro1) は、以前に報告した²⁴⁾。ヒト PKC α に対する合成 small interfering RNA (siRNA) duplexes (センス鎖, CACAUUCAGCAAGUAGGAA), ヒト PKC β に対する siRNA duplexes (センス鎖, GAGAGUAAGGGCAUCAUUU) およびヒト PKC δ に対する siRNA duplexes (センス鎖, GUUGAUGUCUGUUCAGUAU) は Sigma-Aldrich より購入した。HEK-hCoro1 への siRNA の導入には Lipofectamine RNAiMAX を用いた。siRNA (25 pmol) を Opti-MEM 培地 (125 μ l) で希釈し、Opti-MEM 培地 (125 μ l) で希釈した RNAiMAX (7.5 μ l) と混和し、静置 (室温, 5 分) 後、この混合液を HEK-hCoro1 (6 穴プレート, 5 x 10⁵ cells) に添加し、40 時間培養した。

・ウエスタンブロットによるリン酸化状態の解析

HL60 細胞 (1 x 10⁶ cells) に PKC 阻害剤 (chelerythrine, calphostin C, Gö6983 および Gö6976) を前処理 (4°C, 30 分) 後、calyculin A (100 nM) を処理 (37°C, 20 分) した。細胞は TNE バッファー (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40) で溶解し、遠心分離 (15,000 x g, 20 分) 後、上清を回収し、SDS-PAGE および pT412 抗体, 抗 Coronin-1 抗体 (412pep) を用いたウエスタンブロットを行った。

・ *In vitro* キナーゼ法

HL60 細胞 (5×10^6 cells) を TNE バッファーで溶解し, 抗 Coronin-1 抗体 (N7) および Dynabeads protein G (10 μ l) による免疫沈降を行った. 沈降物は, 反応バッファー (20 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂, 50 μ M ATP, 100 μ g/ml PS) 中で, 精製品 PKC α , PKC β I または PKC ϵ (200 ng) と反応 (30°C, 3 時間) させた. その後, 免疫沈降物を PBS で洗浄した後, SDS-PAGE およびウエスタンブロットによる解析を行った.

・ 貪食実験

ヒト血清 (Blood group AB) を処理 (37°C, 30 分) してオプソニン化したザイモサン (OpZ) を Alexa Fluor 647 labeling kit で蛍光標識した. 貪食実験はこれまでの方法に準じた¹⁷⁾. 分化した HL60 細胞は, poly-L-lysine (20 μ g/ml) にてコートしたスライドガラスに播種し, 標識化 OpZ を添加し氷上で 30 分間静置した. 細胞を加熱 (37°C, 2 分) した後, 急冷して PKC 阻害薬 (chelerythrine, Gö6976) 処理 (4°C, 30 分) を行った. その後, 加熱 (37°C, 30 分間) することで, 貪食作用を再開させた後, ホルムアルデヒド (3.8%) にて細胞を固定した. 0.2% Triton X-100/ PBS で膜透過処理 (室温, 10 分) を行った後, 抗 Coronin-1 抗体 (N7, 3 μ g/ml) を反応 (室温, 1 時間) させた後, Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (1:200) およびローダミン標識ファロイジン (15 units/ml) を加え蛍光染色 (室温, 30 分) をした. 蛍光標識した細胞は, 90% グリセロールを含む 2.3% 1,4-diazabicyclo-2,2,2-octane にて封入した.

第三節 実験結果

Thr-412 のリン酸化における PKC 阻害薬の効果

Coronin-1 の Thr-412 における，恒常的なリン酸化・脱リン酸化の代謝回転を確認するため，HL60 細胞を calyculin A 処理し，Thr-412 のリン酸化について pT412 抗体を用いたウエスタンブロットを行った．その結果，処理時間の経過に伴い Thr-412 のリン酸化体の増加が認められた (Fig. 2-1A)．次に，このリン酸化に関与する PKC アイソフォームについて解析するために，複数の阻害スペクトルの異なる PKC 阻害薬を用いた．各 PKC 阻害薬が抑制するアイソフォームについては，下の表に示した (Table 2-1)．いずれの阻害薬を HL60 細胞に前処理した際に，calyculin A 処理による Thr-412 のリン酸化は阻害された (Fig. 2-1B)．使用した全ての阻害薬において阻害作用の示される PKC α / β I の関与が示唆された．そこで PKC α / β I 阻害薬 Gö6976 の濃度依存的な効果を明らかにした (Fig. 2-1C)．

Table 2-1 各 PKC 阻害薬の作用

| PKC 阻害薬 | 阻害する PKC アイソフォーム |
|---------------|---|
| Chelerythrine | α , β I/II, γ , δ , ϵ , θ , η , ζ , ι/λ |
| Calphostin C | α , β I/ β II, γ , δ , ϵ , θ , η |
| Gö6983 | α , β I/ β II, γ , δ , ζ |
| Gö6976 | α , β I |

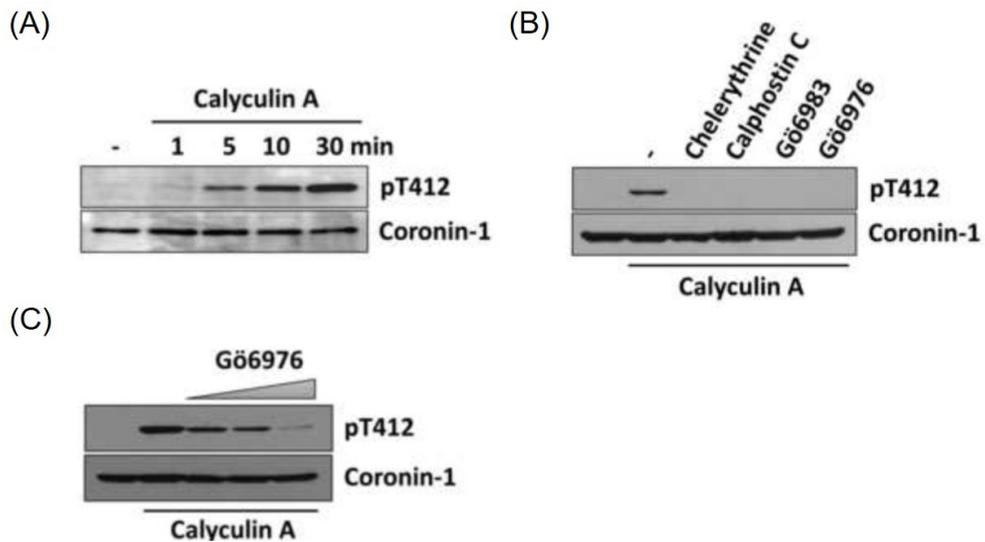


Fig. 2-1 Thr-412 のリン酸化における PKC 阻害薬の効果

HL60 細胞に, (A) calyculin A (100 nM) を処理した (0, 1, 5, 10, 30 分). (B) chelerythrine (30 μM), calphostin C (15 μM), Gö6983 (15 μM), Gö6976 (1 μM) を前処理後, calyculin A (100 nM) を処理した (30 分). (C) Gö6976 (0, 0.1, 0.3, 1 μM) を前処理後, calyculin A (100 nM) を処理し (30 分), SDS-PAGE および pT412 抗体または抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った.

RNA 干渉法による Thr-412 のリン酸化に関わる PKC アイソフォームの探索

阻害薬を用いた実験より, Thr-412 のリン酸化に PKC α または PKC β I が関与することが明らかになったため, RNA 干渉法によりこれらアイソフォームの寄与について解析した. HEK293T 細胞の Coronin-1 安定発現株 (HEK-hCoro1) に, PKC α , PKC β または PKC δ に対する siRNA を導入し, それぞれのノックダウン細胞を作製した. ノックダウン効果は SDS-PAGE およびウエスタンブロットにより解析した. その結果, それぞれの siRNA による PKC アイソフォームの発現低下が認められた (Fig. 2-2A). 次に, これらの細胞に calyculin A 処理を行い, SDS-PAGE およびウエスタンブロットにより, Thr-412 のリン酸化について調べた. その結果, PKC α をノックダウンした細胞においてのみ, Thr-412 のリン酸化体が検出されなかった (Fig. 2-2B). 以上の結果より, Thr-412 のリン酸化に関わる PKC アイソフォームは PKC α であることが示唆された.

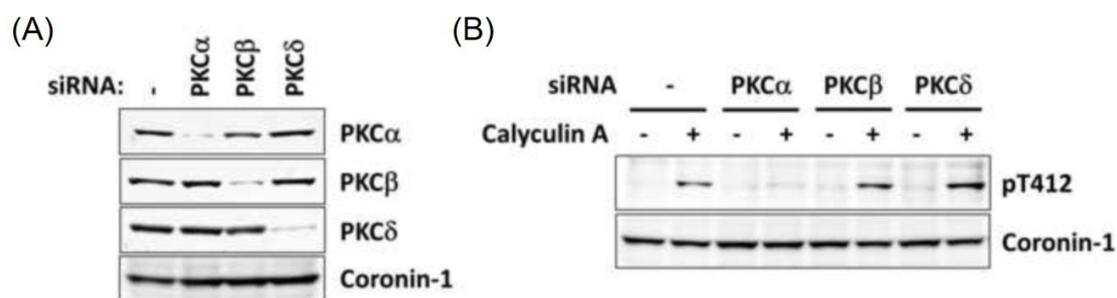


Fig. 2-2 RNA 干渉法による Thr-412 のリン酸化に関わる PKC アイソフォーム

HEK-hCoro1 細胞に, PKC α , PKC β または PKC δ に対する siRNA を導入した. (A) これらの細胞を SDS-PAGE 後, 抗 PKC α 抗体 (1:400), 抗 PKC β 抗体 (1 μ g/ml), 抗 PKC δ 抗体 (1:400) または抗 Coronin-1 抗体 (1 μ g/ml) を用いたウエスタンブロットを行った. (B) これらの細胞を calyculin A (50 nM) で処理した後, SDS-PAGE および pT412 抗体および抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った.

PKC α による Thr-412 の直接的なリン酸化

siRNA を利用した検討より, Thr-412 のリン酸化に PKC α の関与が示唆された。そこで PKC α が Thr-412 をリン酸化するかについて *in vitro* キナーゼ法により解析した。HL60 細胞溶解液から抗 Coronin-1 抗体を用いた免疫沈降法により, 本分子を精製した。その後, 免疫沈降物に精製品 PKC (PKC α , β I, ϵ), PS および ATP を加えてリン酸化反応を惹起させた。SDS-PAGE およびウエスタンブロットにより, Thr-412 のリン酸化を解析した。その結果, PKC α の添加により Thr-412 のリン酸化体が検出され (Fig. 2-3A), 一方で, PKC β I または PKC ϵ の添加ではリン酸化体が検出されなかった (Fig. 2-3B)。以上の結果より, PKC α は Thr-412 を直接リン酸化していることが明らかになった。

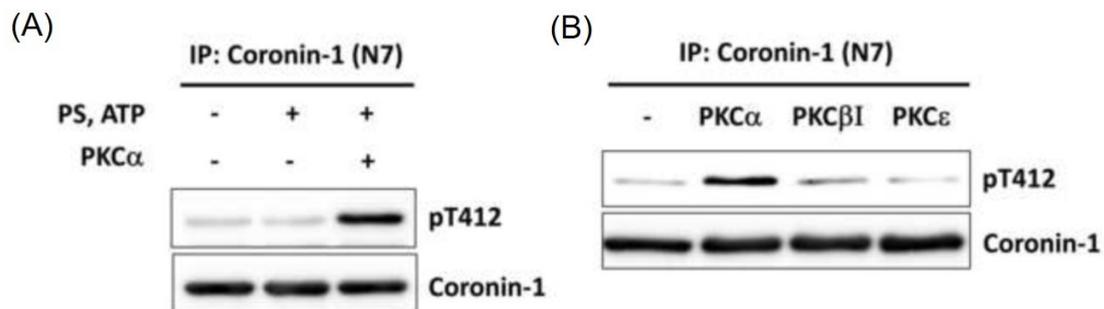


Fig. 2-3 Thr-412 のリン酸化における PKC α の直接的な関与

HL60 細胞の溶解液より，Dynabeads Protein G および抗 Coronin-1 抗体を用いて Coronin-1 の免疫沈降法を行った．免疫沈降物に (A) 精製品 PKC α を添加し反応させた．(B) 精製品 PKC α ，PKC β I または PKC ϵ を添加し反応させた．その後，SDS-PAGE および pT412 抗体および抗 Coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った．

Coronin-1 のファゴソームからの解離に関する PKC アイソフォームの解析

Coronin-1 のファゴソームからの解離はリン酸化によって制御されていることが示唆されているため¹⁷⁾, この現象における Thr-412 のリン酸化の関与について検討した. これまでの解析より, Thr-412 のリン酸化が Gö6976 によって阻害されることが明らかになったため, 本阻害薬を用いて貪食実験を行った. 好中球様に分化した HL60 細胞をオプソニン化ザイモサン (OpZ) と混合し, 細胞がザイモサンを取り込んだ際に, PKC 阻害薬 (Chelerythrine, Gö6976) 処理を行った. その後, 貪食作用を再開させ, Coronin-1 のファゴソームへの局在を免疫染色法により観察した. その結果, Gö6976 で処理した細胞では, chelerythrine 処理した場合と同様に本分子のファゴソームからの解離が抑制されていた (Fig. 2-4). 以上の結果より, Coronin-1 の貪食時のファゴソームからの解離は, PKC α による Thr-412 のリン酸化が制御していると考えられた.

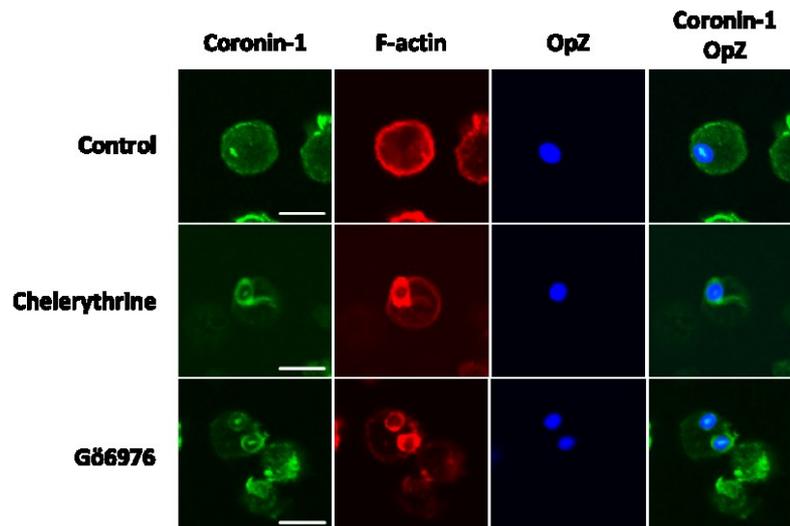


Fig. 2-4 Coronin-1 のファゴソームからの解離に対する Gö6976 の効果

好中球様に分化した HL60 細胞と Alexa Fluor 647 標識化 OpZ を混合し，細胞が OpZ を取り込んだ時点 (37°C, 2 分) で貪食を中断させ，chelerythrine または Gö6976 を処理 (4°C, 20 分) した．その後，貪食を再開 (37°C, 30 分) させた後，固定し，抗 Coronin-1 抗体およびファロイジンを用いた免疫染色を行った (Scale bars = 10 μm) ．

第四節 考察

Coronin-1 の細胞内分布の制御に Thr-412 のリン酸化が関与していることが明らかであるため、本章では、Thr-412 のリン酸化に関与する PKC アイソフォームの特定および貪食時におけるその役割について解析した。

- 1) HL60 細胞を calyculin A 処理することにより、経時的な Thr-412 のリン酸化が認められた (Fig. 2-1A)。また、このリン酸化は複数の PKC 阻害薬で抑制され (Fig. 2-1B)、実際には、PKC α および β の選択的阻害薬 (Gö6976) 処理にて十分な効果が得られた (Fig. 2-1C)。
- 2) HEK-hCoro1 細胞より、PKC α , β または δ をノックダウンし、Thr-412 のリン酸化について解析したところ、PKC α のノックダウン細胞においてのみ Thr-412 のリン酸化が抑制されていた (Fig. 2-2)。
- 3) *In vitro* キナーゼ法により、PKC α が直接的に Thr-412 をリン酸化していることが明らかになった (Fig. 2-3)。
- 4) Gö6976 処理により、Coronin-1 のファゴソームからの解離が抑えられた (Fig. 2-4)。

以上の結果より、Coronin-1 の Thr-412 は PKC α によってリン酸化されることが明らかになった。また、このリン酸化はファゴソーム-リソソーム融合の引き金とされるファゴソームからの本分子および F-アクチンの解離に関与すると考えられた。

本研究では、PKC 阻害薬、RNA 干渉法、*in vitro* キナーゼ法を用いて Coronin-1 の Thr-412 のリン酸化に関与する PKC アイソフォームが PKC α であることを特定した。貪食実験について、PKC α のノックダウン細胞を作製し解析を試みたが、

ザイモサンの取り込みが抑制され、ファゴソームへの Coronin-1 の局在を観察することが出来なかった。実際に、PKC α は細胞内の多様なシグナル伝達機構への関与が知られており、異物の取り込みにも必須であることが報告されている²⁹⁻³¹⁾。そのため、貪食中の細胞に PKC α/β 阻害薬を処理することで、Coronin-1 のリン酸化とファゴソームからの解離について解析を行った。ファゴソーム成熟における Thr-412 のリン酸化の重要性を示すためには、Thr-412 の変異体発現細胞を作製し、貪食実験を行う必要があると考えられた。

第四章 総括

本研究により以下のことが明らかとなった。

- 1) HL60 細胞において Coronin-1 はアクチン細胞骨格に結合しており, PKC 活性化薬 PMA およびホスファターゼ阻害薬 calyculin A 処理することで細胞骨格から解離することおよびリン酸化されることを明らかにした. この細胞内分布の変化は, PKC 阻害薬 Chelethrine の前処理で抑制されたことから, PKC 依存的な現象であることが示された. HL60 細胞から細胞骨格を含む不溶性画分および細胞質を含む可溶性画分を調製し, 含まれる Coronin-1 のリン酸化状態を解析したところ, 上記の結果を支持した. また, 本分子のアクチン細胞骨格への結合性が F-アクチンへの直接的な結合であるかを調べるために, F-アクチンとの共沈降実験や Coronin-1 と共精製されるアクチン量の比較を行い, 同様の機序でアクチンに結合性していることが示された. また, 好中球様に分化した HL60 細胞にオプソニン化 Dynabeads を貪食させ, 本分子のリン酸化と細胞内分布を解析した. 貪食の進行に伴い, 本分子の細胞骨格への分布量は相対的に減少すること, リン酸化体が増加することが明らかになった. 以上より, 白血球の貪食の際に Coronin-1 は細胞骨格から解離し, その際にリン酸化修飾を受けていることが明らかとなった.
- 2) Coronin-1 の 2 か所のリン酸化部位 (Ser-2 および Thr-412) を特定し, 作製した抗リン酸化 Thr-412 抗体を用いて, 貪食の際に Thr-412 が一過性にリン酸化されることをこれまでに報告している²¹⁾. そこで, Thr-412 のリン酸化機序を明らかにするため, Thr-412 のリン酸化に関与する PKC アイソフォームの特定を行った. Thr-412 において恒常的なリン酸化・脱リン酸化の代謝回転が認められたことから, calyculin A 処理した HL60 細胞では Thr-412 のリ

ン酸化体が経時的に増加することを示した。また、このリン酸化における PKC 阻害薬の影響について、阻害スペクトルの異なる複数の阻害薬を用いて評価したところ、Thr-412 のリン酸化には PKC α または PKC β I が関与していることが明らかになった。さらに、RNA 干渉法や *in vitro* キナーゼ法により、Thr-412 のリン酸化には PKC α が関与していることが示された。また、好中球様 HL60 細胞を用いた貪食実験では、PKC α / β I 阻害薬によって、本分子と F-アクチンのファゴソームからの解離が抑制されることを明らかにした。以上より、Thr-412 は PKC α によってリン酸化され、このリン酸化機構がファゴソームの成熟に重要であることが示唆された。

当研究室では、様々な視点より Coronin-1 の機能解析を行っており、リン酸化部位のみならず、アクチン結合部位や二量体形成部位についても報告している^{14, 15)}。本分子は二量体を形成しアクチンに結合することで F-アクチンを束化することを明らかにしており、ファゴソーム上においても同様にして大きな構造体を造りファゴソームを F-アクチンで包み込んでいると考えられる。Coronin-1 の Thr-412 リン酸化は F-アクチンとの結合性を減弱させるため、束化されていた F-アクチンが解かれ両分子ともファゴソームから解離すると考えられた。また、緒論に記したように、結核菌は細胞内寄生細菌であり宿主マクロファージに取り込まれた後も、そのファゴソーム内で生存していることが知られている¹⁸⁾。結核菌を取り込んだファゴソームには Coronin-1 の持続的集積が認められ、リソソーム融合が起こらないことより、本分子のファゴソームからの解離を結核菌が制御し貪食抵抗性を獲得していると考えられている。本研究により、Coronin-1 の細胞内局在の制御には PKC α による Thr-412 のリン酸化が大きく関わっていることが明らかになった。

結核菌がファゴソーム内において分泌する物質が本分子のリン酸化に影響していることが推測された。ファゴソームーリソソーム融合を阻害する因子として、結核菌の産生する Protein kinase G (PknG) や Lipoamide dehydrogenase C (LpdC) が報告されている^{29, 33-35)}。これら両分子の相互関係については不明であるが、それぞれの遺伝子を欠損させることにより結核菌の細胞内寄生性が消失することが示されている。結核菌由来物質と Coronin-1 の機能制御を中心に、その細胞内生存性について考察する。

- 1) PknG は、感染細胞の PKC α の発現や活性を抑制することが報告されており、Coronin-1 の Thr-412 のリン酸化を抑制することで、ファゴソームからの解離を抑制していると考えられた。
- 2) LpdC の細胞内生存に関連する分子機序は不明であるが、Coronin-1 と結合することが明らかにされている。この結合により Coronin-1 の Thr-412 のリン酸化が抑制されると推察された。
- 3) 結核菌は多くのホスファターゼを産生することが知られている³⁶⁻⁴⁰⁾。secreted acid phosphatase M (SapM) や protein-tyrosine phosphatase A (PtpA) および PtpB は Coronin-1 との関連性は不明であるが、病原性に関与することが報告されている。このようなホスファターゼが本分子の Thr-412 の脱リン酸化に関与しているかもしれない。

今後、これらの知見および仮説を証明し、本分子の白血球の貪食過程における制御機構を解明することで、結核菌などの細胞内寄生性菌感染症の治療法や予防法の開発に貢献できるものと考えられた。

謝辞

本研究に際して，終始温かく御指導御鞭撻を賜り，本論文の御校閲を頂きました星薬科大学微生物学研究室講師 奥 輝明 先生に謹んで厚く御礼申し上げます．

また，本研究の遂行にあたり御指導頂き，数多くの御助言・御支援を頂きました星薬科大学名誉教授 辻 勉 先生に心より厚く御礼申し上げます．

最後に，研究生活において数々の御協力ならびに御助言を頂きました星薬科大学微生物学研究室准教授 築地 信 先生をはじめ星薬科大学微生物学研究室員の皆様に心より御礼申し上げます．

参考文献

1. Weiss, G., Schaible, U. E. (2015) Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* **264**, 182-203
2. Kaufmann, S. H. E., Dorhoi, A. (2016) Molecular determinants in phagocyte-bacteria interactions. *Immunity.* **44**, 476-491
3. Lee, H. J., Woo, Y., Hahn, T. W., Jung, Y. M., Jung, Y. J. (2020) Formation and maturation of the phagosome: a key mechanism in innate immunity against intracellular bacterial infection. *Microorganisms.* **8**, 1298. Doi: 10.3990/microorganisms8091298
4. May, R. C., Machesky, L. M. (2001) Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **114**, 1061-1077
5. Freeman, S. A., Grinstein, S. (2014) Phagocytosis: receptors, signal integration, and the cytoskeleton. *Immunol. Rev.* **262**, 193-215
6. Yamazaki, D., Kurisu, S., Takenawa, T. (2005) Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci.* **96**, 379-386
7. Paavilainen, V. O., Bertling, E., Flack, S., Lappalainen, P. (2004) Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* **14**, 386-394
8. Suzuki, K., Nishihata, J., Arai, Y., Honma, N., Yamamoto, K., Irimura, T., Toyoshima, S. (1999) Molecular cloning of a novel actin-binding protein, p57, with a WD repeat and a leucine zipper motif. *FEBS Lett.* **364**, 283-288
9. de Hostos, E. L., Bradtke, B., Fottspeich, F., Guggenheim, R., Gerisch, G. (1991) Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell

- surface projections, has sequence similarities to G protein β subunits. *EMBO J.* **10**, 4097-4104
10. Vinet, A. F., Fiedler, T., Studer, V., Froquet, R., Dardel, A., Cosson, P., Pieters, J. (2014) Initiation of multicellular differentiation in *Dictyostelium discoideum* is regulated by coronin A. *Mol. Biol. Cell.* **25**, 688-701
 11. Fabrice, T. N., Fiedler, T., Studer, V., Vinet, A., Brogna, F., Schmidt, A., Pieters, J. (2020) Interactome and F-actin interaction analysis of *Dictyostelium discoideum* Coronin A. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1469; <https://doi.org/10.3390/ijms21041469>
 12. de Hostos, E. L. (1999) The coronin family of actin-associated proteins. *Trends Cell Biol.* **9**, 345-350
 13. Appleton, B. A., Wu, P., Wiesmann, C. (2006) The crystal structure of murine coronin-1: a regulator of actin cytoskeleton dynamics in lymphocytes. *Structure.* **14**, 87-96
 14. Oku, T., Itoh, S., Okano, M., Suzuki, A., Suzuki, K., Nakajin, S., Tsuji, T., Nauseef, W. M., Toyoshima, S. (2003) Two regions responsible for the actin binding of p57, a mammalian coronin family actin-binding protein. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 409-416
 15. Oku, T., Itoh, S., Ishii, R., Suzuki, K., Nauseef, W. M., Toyoshima, S., Tsuji, T. (2005) Homotypic dimerization of the actin-binding protein p57/coronin-1 mediated by a leucine zipper motif in the C-terminal region. *Biochem. J.* **387**, 325-331
 16. Allen, L. A., DeLeo, F. R., Gallois, A., Toyoshima, S., Suzuki, K., Nauseef, W. M. (1999) Transient association of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

- oxidase subunits p47*phox* and p67*phox* with phagosomes in neutrophils from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood*. **93**, 3521-3530
17. Itoh, S., Suzuki, K., Nishihata, J., Iwasa, M., Oku, T., Nakajin, S., Nauseef, W. M., Toyoshima, S. (2002) The role of protein kinase C in the transient association of p57, a coronin family actin-binding protein, with phagosomes. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 837-844
18. Rohde, K., Yates, R. M., Purdy, G. E., Russell, D. G. (2007) *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunol. Rev.* **219**, 37-54
19. Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., Pieters, J. (1999) A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*. **97**, 435-447
20. Tailleux, L., Neyrolles, O., Honoré-Bouakline, S., Perret, E., Sanchez, F., Abastado, J. P., Lagrange, P. H., Gluckman, J. C., Rosenzweig, M., Herrmann, J. L. (2003) Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J. Immunol.* **170**, 1939-1948
21. Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., Combaluzier, B., Mueller, P., Korf, H., Huygen, K., Miyazaki, T., Albrecht, I., Massner, J., Pieters, J. (2007) Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell*. **130**, 37-50
22. Gatfield, J., Albrecht, I., Zanolari, B., Steinmetz, M. O., Pieters, J. (2005) Association of the leukocyte plasma membrane with the actin cytoskeleton through coiled coil-mediated trimeric coronin 1 molecules. *Mol. Biol. Cell*. **16**, 2786-2798
23. Cai, L., Holoweckyj, N., Schaller, M. D., Bear, J. E. (2005) Phosphorylation of coronin 1B by protein kinase C regulates interaction with Arp2/3 and cell motility. *J. Biol. Chem.* **280**, 31913-31923

24. Oku, T., Nakano, M., Kaneko, Y., Ando, Y., Kenmotsu, H., Itoh, S., Tsuiji, M., Seyama, Y., Toyoshima, S., Tsuji, T. (2012) Constitutive turnover of phosphorylation at Thr-412 of human p57/coronin-1 regulates the interaction with actin. *J. Biol. Chem.* **287**, 42910-42920
25. Larsson, C. (2006) Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell. Signal.* **18**, 276-284
26. Poli, A., Mongiorgi, S., Cocco, L., Follo, M. (2014) Protein kinase C involvement in cell cycle modulation. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 1471-1476
27. Bertram, A., Ley, K. (2011) Protein kinase C isoforms in neutrophil adhesion and activation. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Waraz)* . **59**, 79-87
28. Swanson, J. A., Hoppe, A. D. (2004) The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 1093-1103
29. Chaurasiya, S., Srivastava, K. (2009) Downregulation of protein kinase C- α enhances intracellular survival of Mycobacteria: role of PknG. *BMC Microbiol.* **9**, doi: 10.1186/1471-2180-9-271.
30. Holm, Å., Gunnarsoon, K. T., Magnusson, K-E., Descoteaux, A., Rasmusson, B. (2003) Role of protein kinase C α for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 653-658
31. Breton, A., Descoteaux, A. (2000) Protein kinase C- α participates in Fc γ R-mediated phagocytosis in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 472-476
32. Chao, J., Wong, D., Zheng, X., Poirier, V., Bach, H., Hmama, Z., Av-gay, Y. (2010) Protein kinase and phosphatase signaling in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1804**, 620-627

33. Walburger, A., Koul, A., Ferrari, G., Nguyen, L., Prescianotto-Baschong, C., Huygen, K., Klebl, B., Thompson, C., Bacher, G., Pieters, J. (2004) Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science*. **304**, 1800-1804
34. Chaurasiya, S. K., Srivastava, K. K. (2008) Differential regulation of protein kinase C isoforms of macrophages by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Mol. Cell Biochem*. **318**, 167-174
35. Deghmane, A-E., Soualhine, H., Bach, H., Sendide, K., Ito, S., Tam, A., Noubir, S., Talal, A., Lo, R., Toyoshima, S., Av-Gay, Y., Hmama, Z. (2007) Lipoamide dehydrogenase mediates retention of coronin-1 on BCG vacuoles, leading to arrest in phagosome maturation. *J. Cell Sci*. **120**, 2796-2806
36. Bach, H., Papavinasasundaram, K. G., Wong, D., Hmama, Z., Av-Gay, Y. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe*. **3**, 316-322
37. Wong, D., Bach, H., Sun, J., Hmama, Z., Av-Gay, Y. (2011) *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 19371-19376
38. Zhou, B., He, Y., Zhang, X., Xu, J., Luo, Y., Wang, Y., Franzblau, S. G., Yang, Z., Chan, R. J., Liu, Y., Zheng, J., Zhang, ZY. (2010) Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4573-4578

39. Verge, I., Chua, J., Lee, H. L., Lucas, M., Belisle, J., Deretic, V. (2005) Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 4033-4038
40. Gannoun-Zaki, L., Pätzold, L., Huc-Brandt, S., Baronian, G., Elhawy, M. I., Gaupp, R., Martin, M., Blanc-Portad, AB., Letourneur, F., Bischoff, M., Molle, V. (2018) PtpA, a secreted tyrosine phosphatase from *Staphylococcus aureus*, contributes to virulence and interacts with coronin-1A during infection. *J. Biol. Chem.* **293**, 15569-15580