

アクチン結合タンパク質 p57/coronin-1 の機能ドメインの解析

( Functional domains of the actin-binding protein p57/coronin-1 )

奥 輝明

## 目次

論文リスト.....	1
略号リスト.....	2
第一章 緒論.....	4
第二章 p57/coronin-1 のアクチン結合部位の特定.....	10
第三章 C末端領域に存在するロイシンジッパー構造による二量体形成...29	
第四章 総括および結論.....	47
謝辞.....	52
参考文献.....	53

論文リスト

1. Oku, T., Itoh, S., Okano, M., Suzuki, A., Suzuki, K., Nakajin, S., Tsuji, T., Nauseef, W. M. and Toyoshima, S.  
Two regions responsible for the actin binding of p57, a mammalian coronin family actin-binding protein., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 409-416 (2003).
2. Oku, T., Itoh, S., Ishii, R., Suzuki, K., Nauseef, W. M., Toyoshima, S. and Tsuji, T.  
Homotypic dimerization of the actin-binding protein p57/coronin-1 mediated by a leucine zipper motif in the C-terminal region., *Biochem. J.*, **386**, (2005) in press.

## 略号リスト

ARP	actin related protein, アクチン結合タンパク質
ATP	adenosine triphosphate, アデノシン三リン酸
CBB	Coomassie brilliant blue, タンパク質染色試薬
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid, エチレンジアミン四酢酸
EGFP	enhanced green fluorescence protein, 蛍光タンパク質
FBS	fetal bovine serum, ウシ血清
FITC	fluorescein isothiocyanate, 蛍光色素
FL	full-length, 全長
F-アクチン	fibrous actin, 繊維状アクチン
GST	glutathione-S-transferase, グルタチオン-S-トランスフェラーゼ
G-アクチン	globular actin, 単量体アクチン
IPTG	isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside, ラクトース誘導體
LAMP	lysosome-associated membrane protein, リソソームのマーカータンパク質
LB	Luria-Bertani, 大腸菌用培地
LPS	lymphocyte-specific phosphoprotein, リンパ球特異的リン酸化タンパク質
LZ	leucine zipper, タンパク質構造
MARCKS	myristoylated alanine-rich C kinase substrate, アクチン結合タンパク質
NEMO	NF- $\kappa$ B essential modulator, NF- $\kappa$ B 調節因子

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis, ポリアクリルアミドゲル電気泳動
PBS	phosphate buffered saline, リン酸緩衝液
PCR	polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応
PKC	protein kinase C, タンパク質リン酸化酵素
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate, ホルボールエステル
PMSF	phenylmethane sulfonyl fluoride, プロテアーゼ阻害薬
SDS	sodium dodecyl sulfate, ドデシル硫酸ナトリウム
TACO	tryptophane-aspartate containing coat protein, マウス p57/coronin-1
TB	Terrific Broth, 大腸菌用培地
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane, 緩衝液用試薬
TRITC	tetramethylrhodamine B isothocyanate, 蛍光色素
WD	WD-repeat, タンパク質構造

## 第一章 緒論

真核細胞には細胞質全体に張り巡らされたタンパクフィラメント構造である細胞骨格があり、細胞の様々な形状を支え統一のとれた方向性のある運動を可能にしている。細胞骨格とはアクチンにより成るアクチンフィラメント、チューブリンにより成る微小管、ビメンチンやデスミンなどから成る中間径フィラメントによって構成される三次元構造体の総称である。この細胞骨格の一つであるアクチンフィラメントは、単量体アクチン (G-アクチン) が重合した繊維状アクチン (F-アクチン) が多数集合して束状あるいは網目構造となっている。細胞膜下にある F-アクチンの網目構造は細胞皮層を形成しており、細胞の運動や形状変化、細胞質分裂等に関与している<sup>1,2)</sup>。このアクチンネットワークは細胞の「骨格」という言葉で呼ばれているが非常に動的な存在であり、必要に応じてダイナミックに構造を変え再構築される<sup>3-5)</sup>。このような F-アクチンの動態を制御しているのが種々のアクチン結合タンパク質である。アクチンフィラメントの安定化を起こすもの (Tropomyosin<sup>6)</sup>) や、フィラメント間を架橋しストレスファイバーなど種々の集合構造を形成する束形成タンパク質 ( $\alpha$ -actinin<sup>7)</sup> や filamin<sup>8)</sup>, MARCKS<sup>9)</sup>), 末端因子 ( $\beta$ -actinin<sup>10)</sup>, CapZ<sup>11)</sup>), 切断因子 (gelsolin<sup>12)</sup>, fragmin<sup>13)</sup>), 重合阻害因子 (cofilin<sup>14)</sup>, profilin<sup>15)</sup>), 重合核形成因子 (ARP2/3 complex<sup>16)</sup>) など様々な性質を示すアクチン結合タンパク質が存在することが知られている。

好中球やマクロファージなどの食細胞は、生体に侵入した病原体や異物、さらには老化や傷害を受けた細胞を捕捉・貪食し、それらをファゴソームと呼ばれる小胞に内包する。その後、ファゴソームには各種消化酵素を含むリソソームが融合し、その結果、ファゴソーム内の物質が消化・分解されることにより生体の恒常性が維持されている<sup>17)</sup>。この食作用は非常に複雑な過程によって遂

行されている動的な現象である。異物が食細胞によって認識されると、細胞膜の嵌入が起こり、くびれ込むような形で異物を細胞内に取り込みファゴソームを形成する。ファゴソーム形成の際には、細胞膜内側での細胞骨格の再構成が必須である。食作用は食細胞に見られる特徴的な作用であることより、特異的なアクチン結合タンパク質の存在が推測される。

p57 は、1995 年に Suzuki らによってクローニングされた分子量約 57,000 のタンパク質で、免疫系組織に特異的に発現している<sup>18)</sup>。また、p57 は粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) のアクチン結合タンパク質 coronin<sup>19-21)</sup> と一次構造上の相同性を有していることや、F-アクチンとの結合能を有することが示されており、哺乳類において初めて発見された coronin 様タンパク質であり<sup>18)</sup>、p57/coronin-1 と呼ばれるようになった。現在では、coronin と相同性を有するタンパク質は酵母から高等生物に至るまで幅広く存在し、哺乳動物では組織分布の異なる相同性タンパク質の存在も明らかとなっている<sup>22)</sup> (Table 1-1)。粘菌は高等動物の食細胞と酷似した性質を示すことが知られており、coronin は粘菌の貪食<sup>23,24)</sup>、走化性<sup>25)</sup>、細胞質分裂<sup>26)</sup>などに重要な役割を担っていることが報告されている。p57/coronin-1 が好中球やマクロファージといった食細胞をはじめとする免疫系細胞に特異的に発現していることから、免疫系細胞の貪食や走化性に関与するタンパク質であることが推測された。私たちのグループは、食細胞の貪食時における p57/coronin-1 の役割に注目し研究を行い、好中球の貪食時に p57/coronin-1 がファゴソームに一過性に局在することや<sup>27)</sup>、p57/coronin-1 のファゴソームからの解離にはプロテインキナーゼ C (PKC) によるリン酸化が関与していることなどを明らかにしてきた<sup>28)</sup>。また、p57/coronin-1 のファゴソームからの解離阻害はファゴソーム-リソソーム融合などのファゴソームの成熟を阻害することを報告している<sup>28)</sup> (Fig. 1-1)。Ferrari らは、マウスマクロファージが結核菌を貪食した際に、p57/coronin-1 (TACO) がファゴソームに持続

的に局在し、その後のリソソームとの融合が起こらないことを発見し<sup>29)</sup>、このことが、結核菌への細胞内寄生性を支持する要因の一つと考えられ注目されている。

coronin ファミリーのタンパク質には2つの特徴的な分子内構造が保存されている。1つはN末端領域から中央へと広がるWD-repeat<sup>30-33)</sup>と呼ばれる5回の繰り返し配列であり、もう1つはC末端に存在するcoiled-coil構造である。p57/coronin-1 および一部の高等動物の coronin 相同性タンパク質においては、coiled-coil 構造中に4残基のロイシンからなるロイシンジッパー構造<sup>34)</sup>が認められる (Fig. 1-2)。WD-repeat は三量体 G タンパク質の $\beta$ サブユニット ( $G\beta$ ) にみられる構造<sup>33, 35-37)</sup>で、タンパク質間相互作用に関与していると考えられているが、結合する特定の構造は未だ明らかになっていない。しかしながら、酵母の転写リプレッサーである Tup1 に存在する7回繰り返しのWD-repeat によって形成されるプロペラ様構造が DNA 結合タンパク質  $\alpha 2$  との結合に重要であることが示されている<sup>38)</sup>。また、7回繰り返しのWD-repeat からなる活性化プロテインキナーゼ C のレセプターである Rack1 は7つのWD-repeat のうち3つのWD-repeat を介して細胞接着分子 integrin  $\beta$ サブユニットの細胞質内ドメインと結合することが知られている<sup>39)</sup>。p57/coronin-1 のWD-repeat も他のタンパク質との相互作用に関与することが推測されている。一方、ロイシンジッパー構造はロイシン残基が7アミノ酸残基ごとに規則的に繰り返される配列で、 $\alpha$ -ヘリックスの2回転ごとにその一側面にロイシン残基がらせん軸方向に並ぶように位置する。このようなタンパク質が2個存在すると側面に並んだロイシン残基同士が疎水結合により互いにジッパーのように相対し二量体が形成される。ロイシンジッパー構造はある種の DNA 結合タンパク質に共通の高次構造であり、酵母の転写因子 GCN4<sup>34, 40)</sup>や核に局在するがん遺伝子産物として知られる Myc や Fos, Jun などのタンパク質に特徴的な構造である<sup>34)</sup>。Fos-Jun の



ヘテロ二量体<sup>34)</sup>や NF- $\kappa$ B essential modulator として知られる NEMO のホモ三量体形成<sup>41)</sup>にはロイシンジッパー構造が関与していることが知られており、p57/coronin-1 のロイシンジッパー構造もタンパク質間結合に関与する可能性がある。

このように p57/coronin-1 は特徴的なドメイン構造を有しているが、分子機能との関連については不明である。そこで、本研究においては、WD-repeat およびロイシンジッパー構造に注目し、これらの分子内ドメイン構造とアクチン結合能および多量体形成能の関連について解析した。

Table 1-1 哺乳類の coronin ファミリータンパク質

	original name	animal	size (aa)*	ref.
coronin-1	p57, TACO	human, calf, mouse	461	18, 29)
coronin-2		mouse, rat	484	42)
	coronin <sub>se</sub> (pp66)	rabbit	486	43)
coronin-3		human, mouse	474	42, 44)
coronin-4	IR10	human	480	32)
coronin-5	ClipinC	human	475	22)
coronin-6		human		NM_032854**
	ClipinE	mouse	471	NM_139128**
coronin-7		human	924	45)

\* アミノ酸残基数, \*\*GenBank accession number

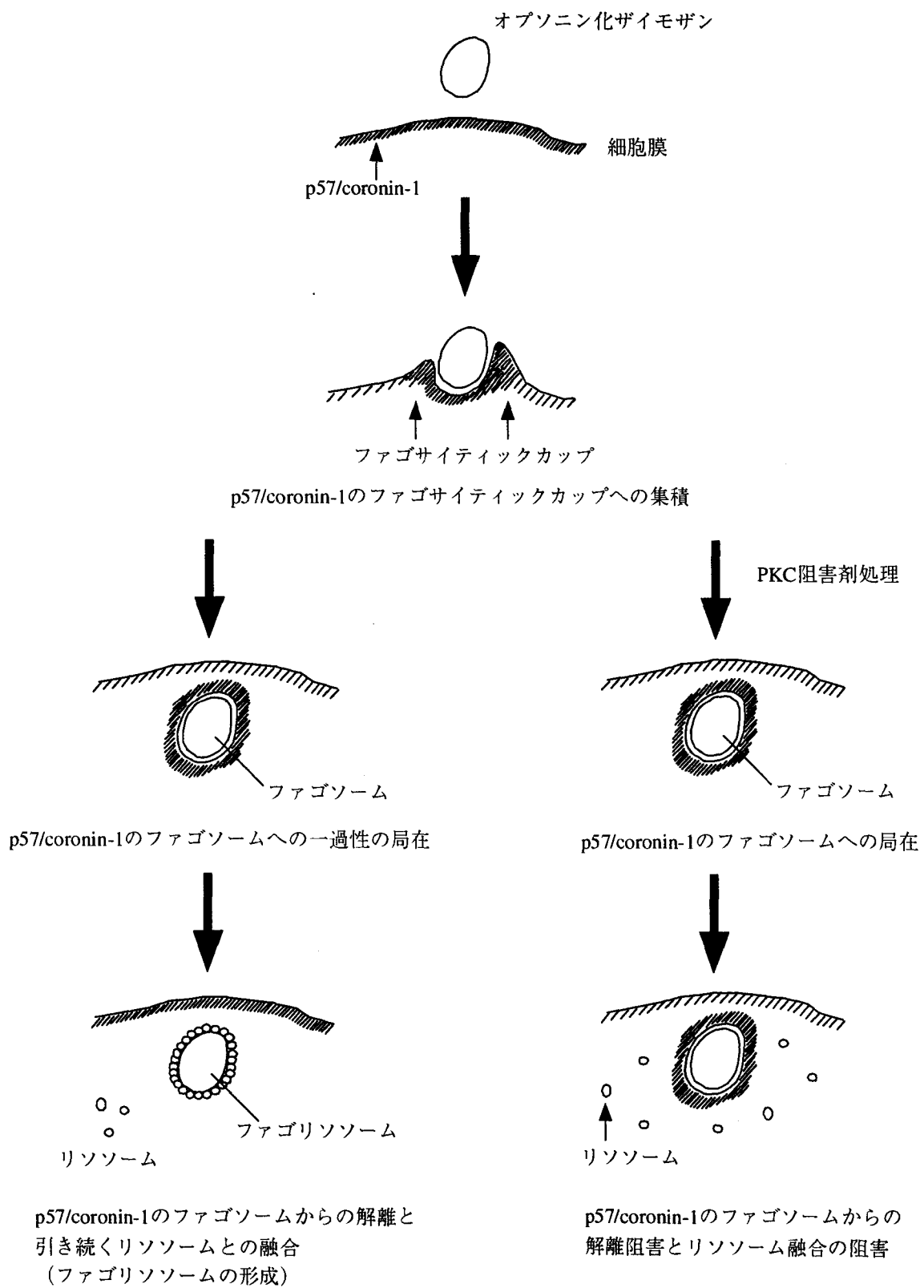


Fig. 1-1 貪食時における p57/coronin-1 の細胞内挙動

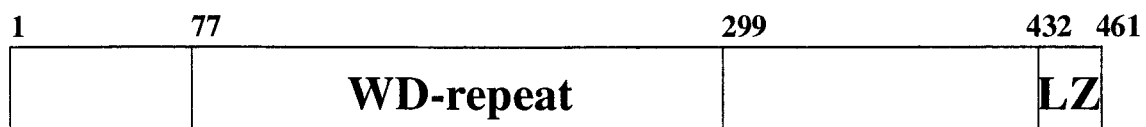


Fig. 1-2 p57/coronin-1 の構造

p57/coronin-1 には N 末端領域から中央へと広がる 5 回の繰り返し配列である WD-repeat, および C 末端に存在する 4 残基のロイシンを含むロイシンジッパー構造 (LZ) が存在する.

## 第二章 p57/coronin-1 のアクチン結合部位の特定

### 第一節 緒言

前章で述べたように、p57/coronin-1 は粘菌のアクチン結合タンパク質 coronin との相同性が認められていることから、p57/coronin-1 のアクチン結合活性を検討したところ、p57/coronin-1 がアクチンに結合することが私たちのグループにより明らかにされた<sup>18)</sup>。

p57/coronin-1 は免疫系組織に特異的に発現しており、好中球やマクロファージの貪食や走化性などの細胞運動に関与していると考えられている<sup>28)</sup>。しかしながら、p57/coronin-1 がこのような細胞運動にどのように機能しているか、その分子的な制御機構は明らかとなっていない。p57/coronin-1 とアクチンの結合様式やその調節機構を明らかにすることは細胞内における p57/coronin-1 の役割を考える上で極めて重要である。また、p57/coronin-1 の一次配列中には、既知のアクチン結合タンパク質に認められるアクチンとの結合に関与するアミノ酸配列が存在しないため、p57/coronin-1 のアクチン結合部位の同定することはアクチン結合タンパク質や細胞骨格の研究分野においても重要であると考えられた。

そこで本章では、p57/coronin-1 のアクチン結合部位を同定することを目的とした。様々な GST 融合型 p57/coronin-1 の欠失変異体のプラスミド DNA を作製し、精製した欠失変異体タンパク質とアクチンとの共沈殿実験、および p57/coronin-1 の欠失変異体タンパク質を細胞に強制発現させ、その細胞内局在を観察することにより p57/coronin-1 の F-アクチン結合活性を検討した。

## 第二節 試薬および方法

### ・ GST 融合タンパク質発現プラスミド

組換え型 p57coronin-1 および p57/coronin-1 欠失変異体を調製するために、タグとなる GST タンパク質を融合させ、GST 融合タンパク質を精製した。発現ベクターとして pGEX-5X-1 (Amersham) プラスミドを使用した。完全長の p57/coronin-1 発現プラスミド (pGEX-p57<sup>1-461</sup>) は *PmaC I-Sac I* を用いて制限酵素消化した p57/coronin-1 の cDNA 断片および adaptor I (Table 2-1), adaptor II (Table 2-1) 断片をライゲーションし構築した。N 末端領域および WD-repeat を含む欠失変異体の発現プラスミド (pGEX-p57<sup>1-371</sup>) は *PmaC I-Bgl I* を用いて制限酵素消化した p57/coronin-1 の cDNA 断片および adaptor I, adaptor III (Table 2-1) 断片をライゲーションし構築した。C 末端領域およびロイシンジッパー構造を含む欠失変異体の発現プラスミド (pGEX-p57<sup>372-461</sup>) は *Bgl I-Sac I* を用いて制限酵素消化した p57/coronin-1 の cDNA 断片および adaptor IV (Table 2-1), adaptor II 断片をライゲーションし構築した。pGEX-5X-1 のマルチクローニングサイトの *BamH I* および *Sal I* を使用し、これらの酵素で消化した後、ライゲーションし調製した。

pGEX-p57<sup>1-34</sup> および pGEX-p57<sup>1-71</sup> の発現プラスミドは QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて pGEX-p57<sup>1-371</sup> に終止コドンを導入し作製した。使用したプライマー (W35Z および K72Z) は以下に示す (Table 2-1)。pGEX-p57<sup>1-34;Δ10-15</sup> の発現プラスミドは QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて pGEX-p57<sup>1-34</sup> より作製した。プライマー (Δ10-15) は以下に示す (Table 2-1)。

pGEX-p57<sup>63-461</sup>, pGEX-p57<sup>63-127</sup>, pGEX-p57<sup>111-204</sup>, pGEX-p57<sup>205-296</sup> および pGEX-p57<sup>297-429</sup> は、制限酵素消化部位 (*BamH I* および *EcoR I*) を付加したプライマーを用い、polymerase chain reaction (PCR) により増幅させた p57/coronin-1

の DNA 断片を pGEX-5X-1 (Amersham) にライゲーションし、これらの発現プラスミドを構築した。使用したプライマーは以下に示す (Table 2-2)。

pGEX-p57<sup>63-299</sup> の発現プラスミドは QuikChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて pGEX-p57<sup>63-461</sup> に終止コドンを導入し作製した。使用したプライマー (E300Z) を以下に示す (Table 2-3)。

また、全ての発現プラスミドの塩基配列は DNA シーケンサー (ABI PRISM 377) により確認した。

Table 2-1 使用したオリゴヌクレオチド①

---

adaptor I

upper strand : 5'-GAT CCG AAT GAG CCG GCA GGT GGT CCG CTC CAG  
CAA GTT CCG CCA C-3'

lower strand : 5'-GTG GCG GAA CTT GCT GGA GCG GAC CAC CTG CCG  
GCT CAT TCG-3'

---

adaptor II

upper strand : 5'-CCA GAA GCG CTT GGA CAG GCT GGA GGA GAC AGT  
CCA GGC CAA GTA GG-3'

lower strand : 5'-TCG ACC TAC TTG GCC TGG ACT GTC TCC TCC AGC CTG  
TCC AAG CGC TTC TGG AGC T-3'

---

adaptor III

upper strand : 5'-CGG CTG AGG AGT GGC TGG CTG GGG GGT CGG GAT  
GCT GGG TAG G-3'

lower strand : 5'-AGT GCC GAC TCC TCA CCG ACC CCC CAG CCC TAC GAC  
CCA TCC AGC T-3'

---

---

adaptor IV

upper strand : 5'-GAT CCC TGC CCT CA-3'

lower strand : 5'-GGA CGG G-3'

---

W35Z

sense primer : 5'-CGT CTC ACA GAC CAC CTA GGA CAG TGG CTT CTG  
TGC-3'

anti-sense primer : 5'-GCA CAG AAG CCA CTG TCC TAG GTG GTC TGT GAG  
ACG-3'

---

K72Z

sense primer : 5'-GGC AAG ACT GGA CGT GTG GAC TAG AAT GCG CCC  
ACG GTC TGT GG-3'

anti-sense primer : 5'-CCA CAG ACC GTG GGC GCA TTC TAG TCC ACA CGT  
CCA GTC TTG CC-3'

---

Δ 10-15

sense primer : 5'-G GTG GTC CGC TCC AGC GGA CAG CCG GCC AAG G-3'

anti-sense primer : 5'-C CTT GGC CGG CTG TCC GCT GGA GCG GAC CAC  
C-3'

---

---

Table 2-2 使用したオリゴヌクレオチド②

---

*Bam*H I-p57<sup>63-</sup> : 5'-GG GGG ATC CCC CTG GGC AAG ACT GGA CGT GTG  
G-3'

---

*Eco*R I-*Hind* III-p57<sup>461-</sup> reverse : 5'-GGG GAA TTC AAG CTT GGG GCT CTA  
CTT GGC CTG G-3'

---

---

<i>EcoR</i> I-p57 <sup>127</sup> - reverse : 5'-GGG GAA TTC CAG GGT GAC GAC GGG CTC CCG CAG C-3'
<i>Bam</i> H I-p57 <sup>111</sup> - : 5'-GGG GGG ATC CCC ATC CCG GAT GGG GGC CTG AT-3'
<i>EcoR</i> I-p57 <sup>204</sup> - reverse : 5'-GGG GAA TTC CTC GAT GAT GCG CAC GCG CT-3'
<i>Bam</i> H I-p57 <sup>205</sup> - : 5'-GGG GGG ATC CCC CCC CGC AAA GGC ACT GTC GT-3'
<i>EcoR</i> I-p57 <sup>296</sup> - reverse : 5'-GGG GAA TTC CTC AAA GTA CCG GAT TGA GC-3'
<i>Bam</i> H I-p57 <sup>297</sup> - : 5'-GGG GGG ATC CCC ATC ACT TCC GAG GCC CCT TT-3'
<i>EcoR</i> I-p57 <sup>429</sup> - reverse : 5'-GGG GAA TTC CCT CCT CCA GCC GAG ACA CG-3'

---

Table 2-3 使用したオリゴヌクレオチド③

E300Z

sense primer : 5'-GGT ACT TTG AGA TCA CTT CCT AGG CCC CTT TCC TGC  
ACT ATC-3'

anti-sense primer : 5'-GAT AGT GCA GGA AAG GGG CCT AGG AAG TGA TCT  
CAA AGT ACC-3'

---

・哺乳類細胞用発現プラスミド

細胞内における p57/coronin-1 と F-アクチンの局在の異同を検討するために、哺乳類細胞用発現プラスミドを作製した。発現ベクターとして pcDNA3.1/V5HisA および pcDNA3.1/HisA (Invitrogen) を使用した。完全長の p57/coronin-1 発現プラスミド (pcDNA3.1-p57<sup>1-461</sup>/V5HisA), N 末端領域および



WD-repeat を含む欠失変異体の発現プラスミド (pcDNA3.1-p57<sup>1-371</sup>/V5HisA), および C 末端領域およびロイシンジッパー構造を含む欠失変異体の発現プラスミド (pcDNA3.1-p57<sup>372-461</sup>/V5HisA) は, それぞれ pGEX-p57<sup>1-461</sup>, pGEX-p57<sup>1-371</sup>, pGEX-p57<sup>372-461</sup> より *EcoR* I および *Not* I を用いて制限酵素消化し得られたインサートを pcDNA3.1/V5HisA にライゲーションした. また, N 末端アミノ酸残基を含む欠失変異体の哺乳類用発現プラスミド (pcDNA3.1-p57<sup>1-71</sup>/V5HisA および pcDNA3.1-p57<sup>1-34</sup>/V5HisA) は, pcDNA3.1-p57<sup>1-461</sup>/V5HisA をテンプレートとして, Table 2-1 (K72Z および W35Z) に示したプライマーを用い, 点変異導入により終止コドンを入れることにより作製した. N 末端アミノ酸残基を含まない欠失変異体の発現プラスミド (pcDNA3.1-p57<sup>111-204</sup>HisA) は, pGEX-p57<sup>111-204</sup> より *BamH* I および *EcoR* I により制限酵素消化し得られたインサートを pcDNA3.1/HisA にライゲーションした.

#### ・大腸菌による GST 融合 p57/coronin-1 および変異体の発現と精製

作製した発現プラスミドで大腸菌 (JM109) を形質転換し, 50 µg/ml のアンピシリンを含む 6 ml の Luria-Bertani (LB; 10 g/l tryptone peptone, 5 g/l yeast extract, 10 g/l NaCl, pH 7.0) 培地中に 37°C で 16 時間前培養した後, その菌液を同濃度のアンピシリンを含む 500 ml の Terrific Broth (TB; 12 g/l tryptone peptone, 24 g/l yeast extract, 0.4% glycerol, 0.17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 培地に移した. 20°C で 2 日間振盪培養した後, 最終濃度 0.5 mM の isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) を加え 16 時間培養を続けた. 遠心分離により集菌し, 30 ml の sonication buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に再懸濁した後, 最終濃度 1.0 mg/ml のリゾチームを加え, 氷中で 20 分間インキュベートした.

この懸濁液を超音波処理した後、4℃、15,000 x g で 30 分間の遠心分離を行い、不溶性画分を除去した。得られた可溶性画分に 0.5 ml の glutathione-Sepharose 4B ビーズ (Amersham) を加え氷中で 30 分間インキュベートした。このビーズを sonication buffer で 3 回洗浄した後、5 mM 還元型グルタチオンを含む溶出バッファー (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) でビーズに結合した GST 融合タンパク質を溶出した。

これらの精製タンパク質は抗 p57/coronin-1 抗体 (mouse, rabbit) や抗 GST 抗体を用いたウエスタンブロットにより、目的とした GST 融合 p57 タンパク質であることを確認した (data not shown)。

#### ・ GST 融合タンパク質および F-アクチンの共沈殿実験

GST 融合タンパク質および G-アクチン (15 μg)、または GST 融合タンパク質のみを 0.1 ml の F-アクチン緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 160 mM KCl, 0.2 mM ATP, pH 8.0) に溶解し、25℃、90 分間インキュベートした。その後、反応混合液を 4℃下、198,000 x g で 90 分間超遠心した。上清 (S)、沈殿 (P) および超遠心前の GST 融合タンパク質と G-アクチンの反応混合液 (T) について SDS-PAGE を行った。その後、メタノールおよび酢酸でゲルを固定し Coomassie brilliant blue-R250 (CBB) によりタンパク質の染色を行った。

#### ・ COS-1 細胞の細胞培養と遺伝子導入

COS-1 細胞 (monkey kidney cell line; American Type Culture Collection) は 10% FBS を含む RPMI-1640 培地で, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した. 対数増殖期の COS-1 細胞を 0.025%トリプシンを含む EDTA/PBS ではがし, PBS で洗浄した後, 細胞濃度を 5 x 10<sup>6</sup> cell/ml に調製した. この細胞懸濁液 0.7 ml に対し 40 µg のプラスミドを加え, エレクトロポレーション用キュベット (ギャップ 0.4 cm) に移し, Gene Pulser II (Bio-Rad) を用い 300 V, 975 µF の条件でエレクトロポレーションを行った. 細胞を 10 ml の培地に懸濁し 48 時間培養し実験に用いた.

#### ・免疫染色

細胞を 3.5% formaldehyde を含む PBS で 10 分間固定した後, 0.2% Triton X-100 を含む PBS により膜透過処理を行った. その後, C 末端を認識する抗 p57/coronin-1 モノクローナル抗体 (N7)<sup>27)</sup>, N 末端を認識する抗 p57/coronin-1 ポリクローナル抗体, 抗 Xpress 抗体 (Invitrogen) およびそれぞれの FITC 標識 2 次抗体により, p57/coronin-1 欠失変異体を染色した. また TRITC 標識ファロイジン (15 U/ml, SIGMA) により F-アクチンを染色し, その細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡 (Radiance 2100, Bio-Rad Laboratories) により観察した.

### 第三節 実験結果

p57/coronin-1 のアクチン結合部位が, WD-repeat を含む領域に存在するか, ロイシンジッパー構造を含む領域に存在するか調べた. GST 融合型の p57/coronin-1 全長 (GST-p57), N 末端から 371 番目のアミノ酸までの WD-repeat を含む領域 (GST-p57<sup>1-371</sup>), 372 番目から C 末端のアミノ酸でロイシンジッパー構造を含む領域 (GST-p57<sup>372-461</sup>) の発現プラスミドを作製し (Fig. 2-1), これらの GST 融合タンパク質を精製し, F-アクチンとの共沈殿実験を行った. その超遠心後の上清 (S), 沈殿 (P) および超遠心前の F-アクチンと GST 融合タンパク質の混合液 (T) を SDS-PAGE により解析した. その結果, GST-p57 および GST-p57<sup>1-371</sup> にアクチン結合活性が認められ, GST-p57<sup>372-461</sup> にアクチン結合活性が認められなかった (Fig. 2-2). したがって p57/coronin-1 のアクチン結合部位は WD-repeat を含む N 末端領域に存在することが示唆された.

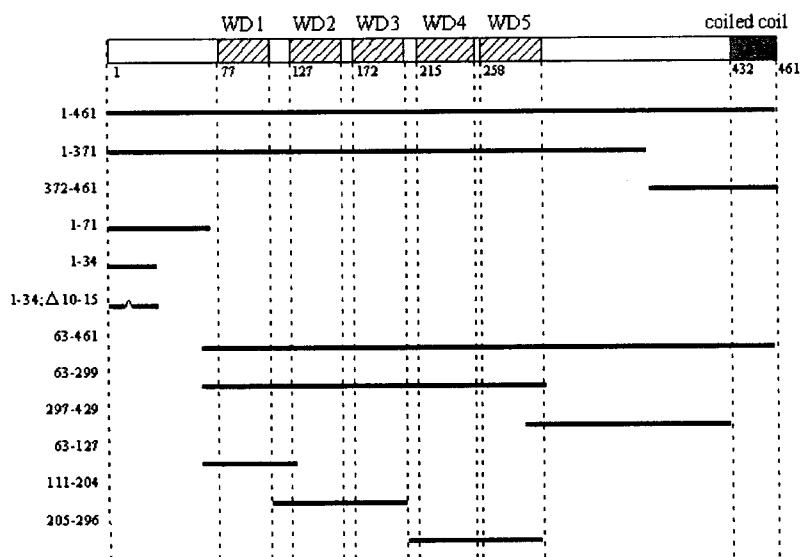


Fig. 2-1 GST 融合 p57/coronin-1 の欠失変異体

p57/coronin-1 の一次配列より予想される模式図および作製した欠失変異体を図示した. 全ての欠失変異体は N 末端に GST を融合している.

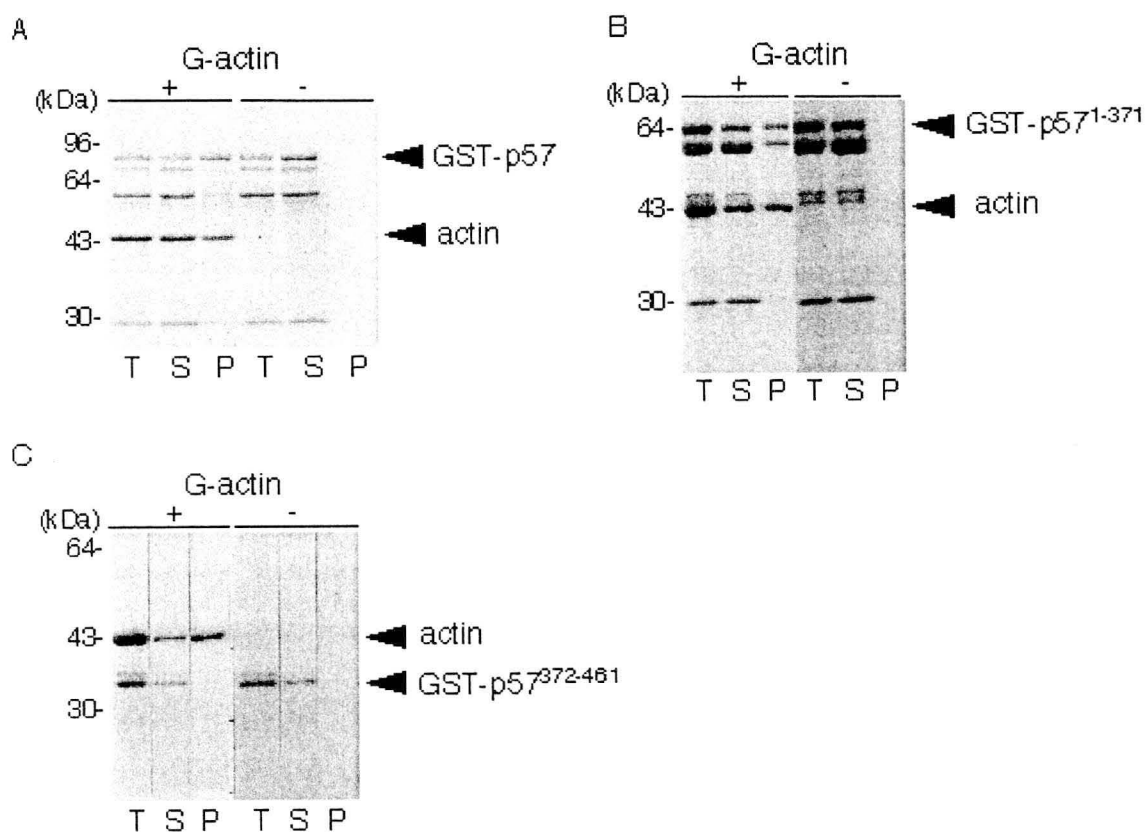


Fig. 2-2 GST 融合 p57/coronin-1 変異体と F-アクチン結合活性の検討①

(A) GST 融合 p57/coronin-1, (B) N 末端領域および WD-repeat を含む GST 融合 p57/coronin-1 欠失変異体 p57<sup>1-371</sup>, (C) C 末端領域およびロイシンジッパー構造を含む p57/coronin-1 欠失変異体 p57<sup>372-461</sup>. それぞれについてアクチン存在下 (+) および非存在下 (-) での結果を示す. いずれも反応後, 超遠心分離した上清 (S) および沈殿 (P) を, 遠心分離前の混合物 (T) とともに SDS-PAGE で分析し CBB で染色した. 矢印は GST 融合タンパク質およびアクチンの泳動位置を示す.

続いて、アクチン結合活性の認められた GST-p57<sup>1-371</sup> に存在するアクチン結合部位を調べるため、C 末端側から WD-repeat を一つずつ欠失させた GST 融合 p57 欠失変異体である GST-p57<sup>1-261</sup>, GST-p57<sup>1-212</sup>, GST-p57<sup>1-171</sup> および GST-p57<sup>1-127</sup> の発現プラスミドを作製した。大腸菌に発現させた組換えタンパク質を精製し、F-アクチンとの共沈殿実験を行った。その結果、これらの欠失変異体全てにおいてアクチン結合活性が認められた (data not shown)。

さらに、WD-repeat を含まない欠失変異体 GST-p57<sup>1-71</sup> および GST-p57<sup>1-34</sup> (Fig. 2-1) を精製し共沈殿実験を行ったところ、そのどちらにもアクチン結合活性が認められた (Fig. 2-3B and C)。このことより、p57/coronin-1 のアクチン結合活性は N 末端 34 アミノ酸中に存在することが示された。cofilin や villin, LPS-1 (lymphocyte-specific phosphoprotein) など、coronin ファミリー以外のアクチン結合タンパク質において、配列中の塩基性アミノ酸領域がアクチンの酸性アミノ酸領域と相互作用し、アクチンに結合するという報告があることより<sup>46-49)</sup>、アクチン結合活性が認められた p57/coronin-1 の N 末端 34 残基中に塩基性アミノ酸に富んだ領域が存在しているか調べた。その結果、塩基性に富んだアミノ酸配列が存在したため、そのアミノ酸残基を含む領域である 10-15 番目の 6 アミノ酸 (KFRHVF) を欠失させた変異体 GST-p57<sup>1-34;Δ10-15</sup> (Fig. 2-1, 2-3A) を精製し、同様に F-アクチンとの共沈殿実験を行った。その結果、この欠失変異体にはアクチン結合活性が認められず (Fig. 2-3D)、p57/coronin-1 のアクチン結合には、10-15 番目の 6 アミノ酸 (KFRHVF) 残基が重要であることが示唆された。

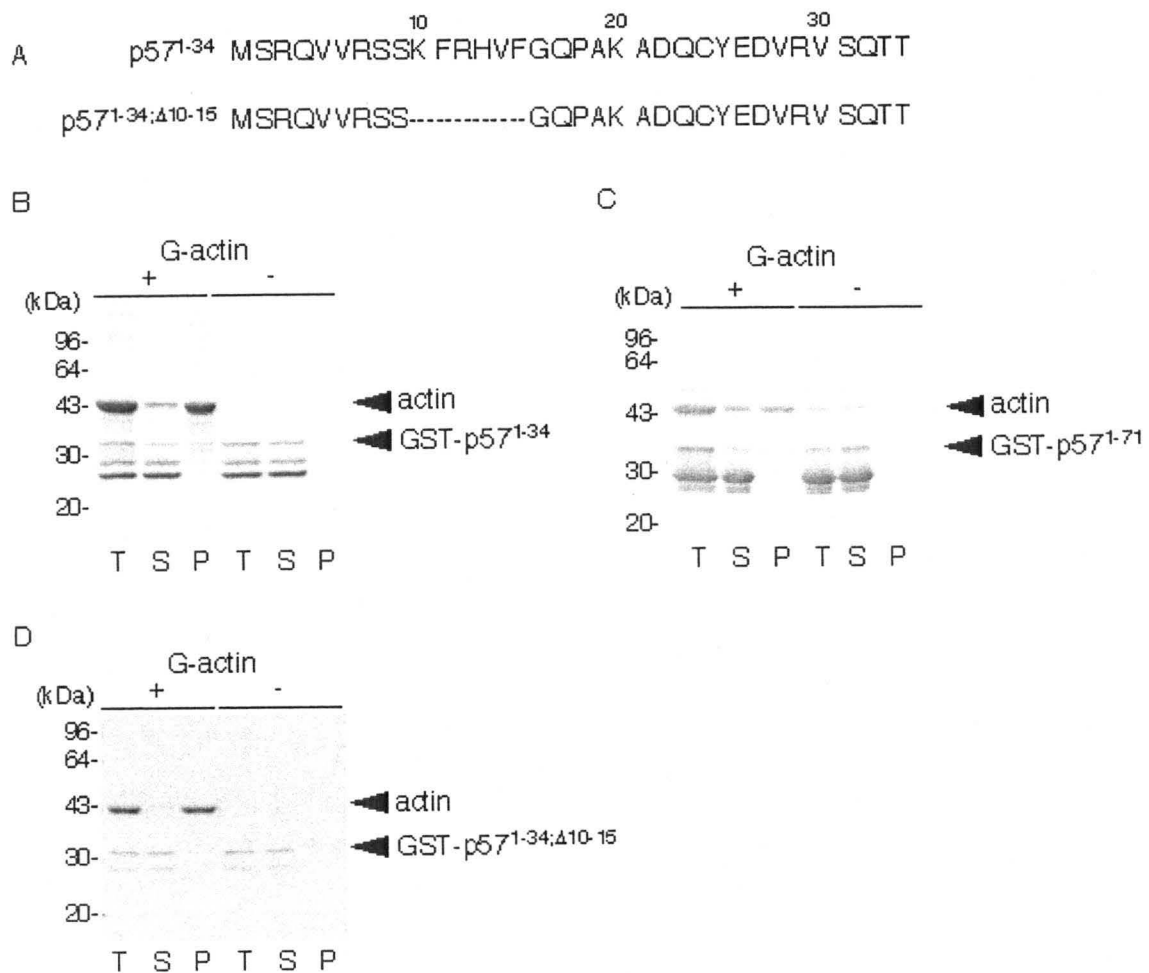


Fig. 2-3 GST 融合 p57/coronin-1 変異体と F-アクチン結合活性の検討②

(A) p57<sup>1-34</sup> および p57<sup>1-34;Δ10-15</sup> のアミノ酸配列, (B) p57/coronin-1 の N 末端 34 アミノ酸のみの GST 融合欠失変異体 p57<sup>1-34</sup>, (C) p57/coronin-1 の N 末端 71 アミノ酸のみの GST 融合欠失変異体 p57<sup>1-71</sup>, (D) p57/coronin-1 の N 末端 34 アミノ酸 から 10-15 番目のアミノ酸を欠失させた GST 融合欠失変異体 p57<sup>1-34;Δ10-15</sup>. それぞれについてアクチン存在下 (+) および非存在下 (-) での結果を示す. いずれも反応後, 超遠心分離した上清 (S) および沈殿 (P) を, 遠心分離前の混合物 (T) を示す. 矢印は GST 融合タンパク質およびアクチンの泳動位置を示す.

上述の p57/coronin-1 欠失変異体と F-アクチンの共沈殿実験において結合活性が認められた欠失変異体は、アクチン結合活性の認められた p57<sup>1-371</sup> 欠失変異体を C 末端側から欠失させたものであり、全ての欠失変異体が N 末端 34 アミノ酸配列を含んでいる。これまでの実験では、この N 末端領域が p57/coronin-1 の唯一のアクチン結合部位であることは証明できない。つまり、N 末端領域を含まない欠失変異体についてアクチン結合活性の有無を検討する必要がある。そこで N 末端領域を欠失させた p57/coronin-1 の変異体を作製し、そのアクチン結合活性について検討した。N 末端領域を欠失させた GST-p57<sup>63-461</sup> (Fig. 2-1) について同様に実験を行ったところ、F-アクチンとの結合活性が認められた (Fig. 2-4A)。この欠失変異体 (GST-p57<sup>63-461</sup>) を WD-repeat を含む領域 (GST-p57<sup>63-299</sup>) と含まない領域 (GST-p57<sup>297-429</sup>) (Fig. 2-1) に分け、それぞれについて同様調べたところ、WD-repeat を含む GST-p57<sup>63-299</sup> にアクチン結合活性が認められた (Fig. 2-4B and F)。さらに、この GST-p57<sup>63-299</sup> を、WD1 を含む GST-p57<sup>63-127</sup>、WD2 および 3 を含む GST-p57<sup>111-204</sup>、WD4 および 5 を含む GST-p57<sup>205-296</sup> に分け (Fig. 2-1)、それぞれについて同様に調べたところ、WD2 および 3 を含む GST-p57<sup>111-204</sup> のみにアクチン結合活性が認められた (Fig. 2-4C, D and E)。

以上より、p57/coronin-1 には、N 末端 34 アミノ酸領域に加えて、WD2 および WD3 を含む領域にもアクチン結合部位が存在することが示された。



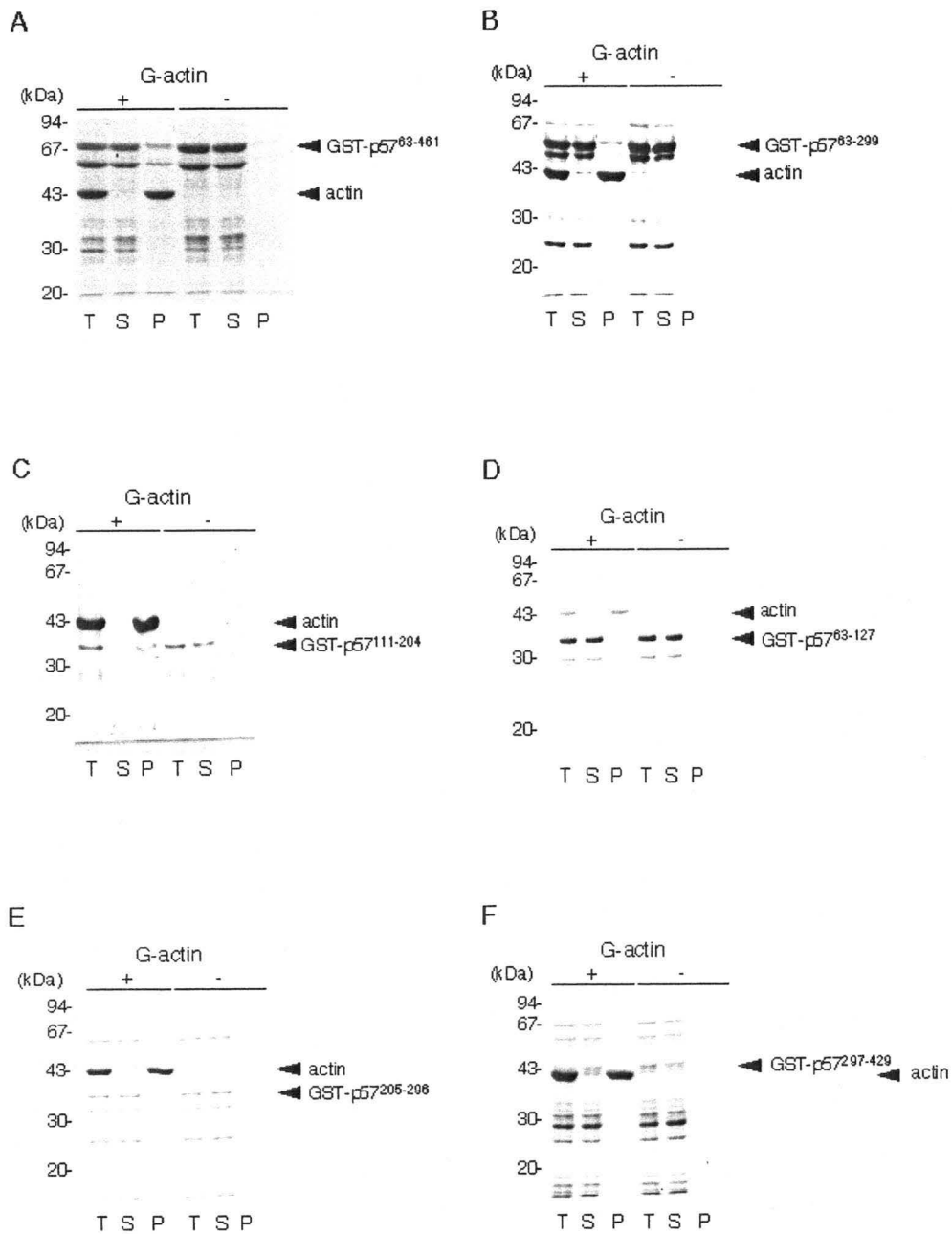


Fig. 2-4 GST 融合 p57/coronin-1 変異体と F-アクチン結合活性の検討③

(A) GST-p57<sup>63-461</sup>, (B) GST-p57<sup>63-299</sup>, (C) GST-p57<sup>111-204</sup>, (D) GST-p57<sup>63-127</sup>,  
 (E) GST-p57<sup>205-296</sup> および (F) GST-p57<sup>297-429</sup>. それぞれについてアクチン  
 存在下 (+) および非存在下 (-) での結果を示す. いずれも反応後, 超  
 遠心分離した上清 (S) および沈殿 (P) を, 遠心分離前の混合物 (T) を  
 示す. 矢印は GST 融合タンパク質およびアクチンの泳動位置を示す.

次に、細胞内における p57/coronin-1 と F-アクチンの局在を検討した。p57/coronin-1 を発現していない COS-1 細胞に p57/coronin-1 およびその欠失変異体の発現プラスミドを導入し、免疫染色により p57/coronin-1 欠失変異体および F-アクチンの細胞内分布を調べた。完全長の p57/coronin-1 (p57<sup>1-461</sup>) をはじめ、共沈殿実験により F-アクチンとの結合活性が示された p57<sup>1-371</sup>, p57<sup>1-71</sup>, p57<sup>1-34</sup> および p57<sup>111-204</sup> は細胞膜下の F-アクチンが豊富な領域において共局在が認められた (Fig. 2-5)。一方、共沈殿実験によりアクチン結合活性が認められなかった p57<sup>372-461</sup> は細胞質にのみに分布し、細胞膜下の F-アクチンの豊富な領域における局在は認められなかった (Fig. 2-5)。これらの結果は、共沈殿実験の結果とよく一致していた。さらに、p57<sup>1-34;Δ10-15</sup> を COS-1 細胞に発現させ同様に免疫染色を行ったところ細胞質のみに分布し、p57<sup>1-34</sup> とは異なり細胞膜下の局在は認められなかった (data not shown)。この結果からも、N 末端 34 アミノ酸残基中の 10-15 番目のアミノ酸配列である “KFRHVF” の 6 アミノ酸残基が p57/coronin-1 と F-アクチンの結合に重要であることが支持された。

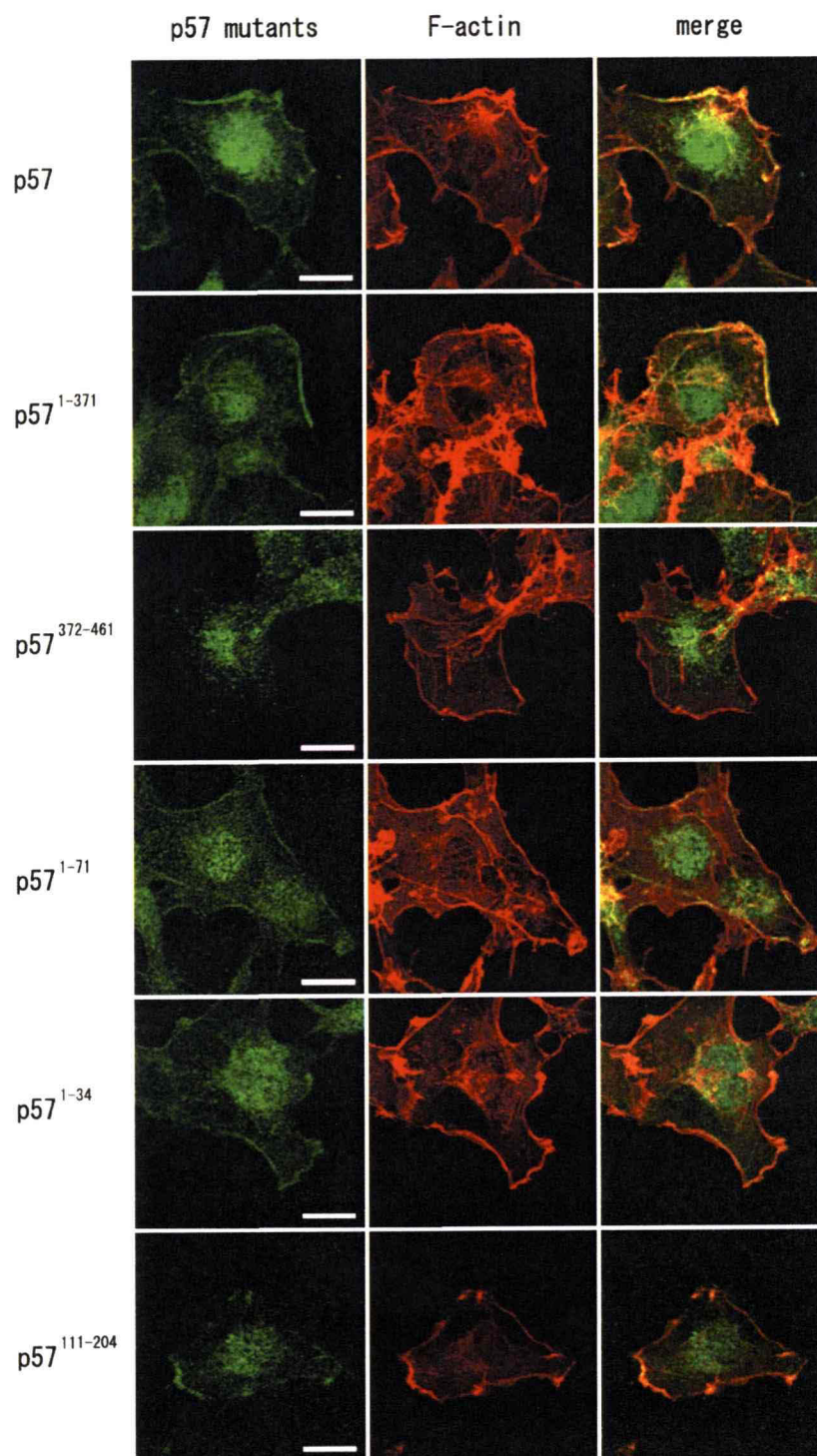


Fig. 2-5 COS-1細胞における p57/coronin-1 欠失変異体およびF-アクチンの分布

図左は、p57, p57<sup>1-371</sup>, p57<sup>372-461</sup>, p57<sup>1-71</sup>, p57<sup>1-34</sup> および p57<sup>111-204</sup>, 図中央は F-アクチンの細胞内分布, 図右はそれらの重ね合わせを示している.

Scale bars, 20  $\mu$ m.

#### 第四節 考察

白血球の貪食過程で p57/coronin-1 はファゴサイティックカップに集積し、その後ファゴソームを覆うように局在する。p57/coronin-1 のファゴソームへの局在は一過性であり、時間経過と共にファゴソームから解離し、細胞質および細胞膜下に分布することが私たちのグループにより明らかにされている<sup>28)</sup>。また、マウスマクロファージの p57/coronin-1 (TACO) のファゴソームへの局在が結核菌の細胞内寄生性に強く関与していることが示唆されており<sup>29)</sup>、白血球のファゴソーム形成および成熟における p57/coronin-1 の役割が注目されている。貪食時におけるファゴソームなど細胞内小胞のダイナミックな形態変化は、アクチン細胞骨格の再構築と密接に関連する現象であると考えられる。p57/coronin-1 の細胞内分布が上述のように特徴的な変化をすることを考えると、このアクチン結合タンパク質がアクチン細胞骨格の再構成を通じてファゴソームの形成・成熟を制御していることが考えられる。したがって、p57/coronin-1 と F-アクチンの結合様式、特にアクチン結合部位を特定することは貪食などの細胞運動の分子メカニズムを解明するために重要であると考えられる。

本章の結果より、p57/coronin-1 のアクチン結合領域は 2 カ所存在し、N 末端 34 アミノ酸残基、特にそのうちの 10-15 番目の塩基性アミノ酸に富んだ 6 残基 “KFRHVF” が結合に関与していること、および 111-204 番目のアミノ酸残基を含む領域に結合部位が存在することが明らかとなった。今回、アクチン結合部位として同定された N 末端 34 アミノ酸残基のうち、アクチンとの結合に重要であると考えられた 6 残基 (KFRHVF) について、他の coronin ファミリータンパク質と比較した。その結果、この 6 残基の配列は比較的保存されており (コンセンサス配列は K-F/Y-R-H/N-V-F/Y) (Fig. 2-6)、他の coronin ファミリーメンバーにおいても、この配列がアクチンとの結合に関与している可能性が示唆された。アクチン結合タンパク質とアクチンとの結合には、このような塩基性ア

ミノ酸を含む配列とアクチン分子中の酸性アミノ酸クラスターの相互作用によるものが coronin ファミリー以外のアクチン結合タンパク質である cofilin や villin の例で知られているため<sup>46-49)</sup>, 111-204 番目のアミノ酸残基を含む領域中の塩基性アミノ酸に富んだ領域を検索した。その結果, 129-134 番目の “GHTKRV” 配列と, 196-201 番目の “RDKRVR” 配列が存在した。そこで完全長の p57/coronin-1 より, アクチン結合活性の認められた 10-15 番目のアミノ酸残基に加えて 129-134 または 196-201 番目のアミノ酸残基を欠失させた変異体 (p57 $\Delta$ 10-15, 129-134 または p57 $\Delta$ 10-15, 196-201) を作製し, 同様に共沈殿実験を行った。その結果, p57 $\Delta$ 10-15, 196-201 には結合活性が認められたのに対して, p57 $\Delta$ 10-15, 129-134 では結合活性が消失していた (unpublished observation)。p57/coronin-1 のアクチンへの結合には 10-15 および 129-134 番目に存在する塩基性アミノ酸が深く関与していることが示唆された。

coronin ファミリーのタンパク質では WD-repeat 構造が F-アクチンとの結合に関与していると推測されていたが, 本研究より, WD-repeat を含まない N 末端領域に F-アクチン結合部位が発見された。また, WD-repeat 構造中にもアクチン結合部位の存在が認められ, この位置は 2 番目および 3 番目の WD-repeat 配列に対応している。この領域から 6 アミノ酸残基を欠失することにより結合性が失われた。この 6 アミノ酸残基が直接アクチンとの結合に関与するのか, あるいは 5 つの WD-repeat で構成されるプロペラ構造の保持に重要であるかは明らかではない。

p57/coronin-1 には 2 カ所のアクチン結合部位が存在していることが明らかとなった。coronin ファミリーのタンパク質において, 複数のアクチン結合部位の存在が示されているメンバーはアフリカツメガエルの Xcoronin が知られているが<sup>50)</sup>, アクチン結合部位は特定されていない。coronin ファミリー以外のアクチン結合タンパク質については, MARCKS<sup>9)</sup> および gelsolin<sup>51)</sup> が 2 カ所のアク

チン結合部位を有することが知られている。また、CapZ<sup>52)</sup>のように1カ所のアクチン結合部位を有するサブユニットが二量体を形成し機能するアクチン結合タンパク質も報告されている。p57/coronin-1の2カ所のアクチン結合部位に対するアクチン側の結合部位、あるいはアクチンと複数箇所では結合することと本分子の機能との関連性およびその生物学的意義についてはこれからの課題である。

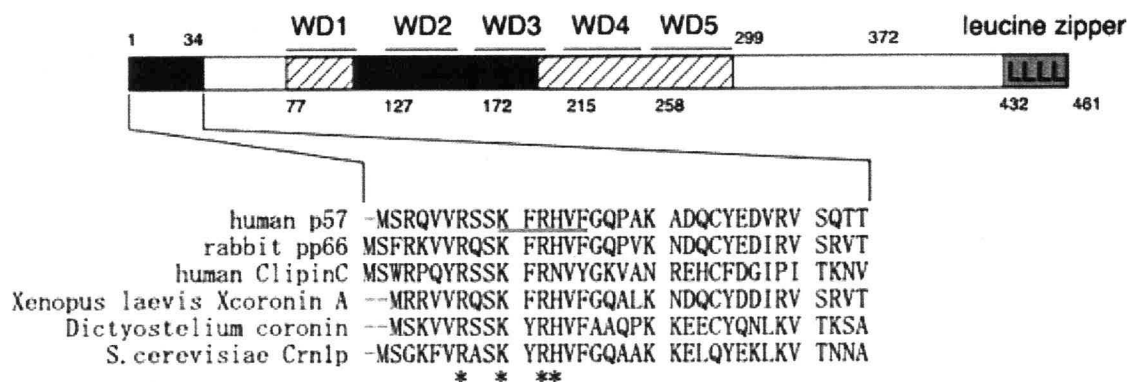


Fig. 2-6 p57/coronin-1 および相同性タンパク質のN末端配列

アクチン結合活性の認められた p57/coronin-1 の N 末端 34 アミノ酸配列および他の coronin ファミリータンパク質の N 末端配列を示した。配列中の下線は今回欠失させた6残基を示し、\*は保存されている塩基性アミノ酸を示している。

### 第三章 C末端領域に存在するロイシンジッパー構造による二量体形成

#### 第一節 緒言

coronin ファミリーのタンパク質の C 末端領域には  $\alpha$ -ヘリックス構造が保存されており<sup>19)</sup>, 二次構造予測では coiled-coil 構造をとると考えられている<sup>21)</sup>. p57/coronin-1 の C 末端領域の  $\alpha$ -ヘリックスにはロイシンジッパー構造が存在し<sup>18)</sup>, この構造はウシおよびマウスのなど哺乳類の p57/coronin-1 において保存されている<sup>18, 29)</sup>.  $\alpha$ -ヘリックスはアミノ酸 3.6 残基ごとに 1 回転するらせん構造をとり,  $i$  残基目のカルボニル基と  $(i+4)$  残基目のアミド基との間の水素結合により安定な構造をとっている. 2 本の  $\alpha$ -ヘリックスが互いに巻きついた超らせん構造は coiled-coil と呼ばれ, ホモ二量体やヘテロ二量体または多量体形成に関与すると考えられている構造である<sup>53)</sup>. coiled-coil 構造を形成する場合,  $\alpha$ -ヘリックスの 1 巻きあたりの残基数が 3.6 から 3.5 に減少し,  $\alpha$ -ヘリックスの 2 巻きごと, つまり 7 残基ごとに 2 本の  $\alpha$ -ヘリックスが密着する<sup>54)</sup> (Fig. 3-1A). この 7 残基でひとまとまりの配列は, 7 残基反復 (heptad repeat) と呼ばれており, 通常 a-g の記号をつけて表す<sup>55-57)</sup>. ロイシンジッパー構造はこの heptad repeat の d 残基にロイシン残基が位置する構造で, 7 アミノ酸残基ごとのロイシンの繰り返し配列である. p57/coronin-1 の C 末端領域は d の位置にロイシン, a の位置に疎水性アミノ酸残基 (Val, Met, Leu) が位置する規則的な 7 残基反復配列が存在しており (Fig. 3-1B), これらのアミノ酸残基が疎水性領域を形成していることが考えられる<sup>18)</sup> (Fig. 3-1C). 本章では, p57/coronin-1 の C 末端に存在する特徴的なロイシンジッパー構造に注目し, 本分子が多量体を形成している可能性について検討した.

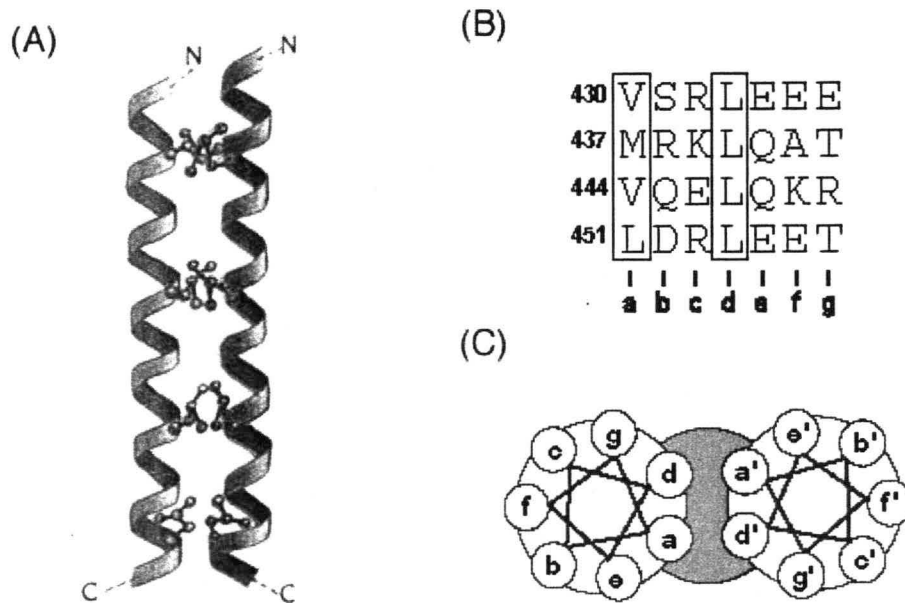


Fig. 3-1 coiled-coil 構造

(A) 二本の  $\alpha$ -ヘリックスの模式図.  $\alpha$ -ヘリックス 2 巻き, 7 アミノ酸残基ごとに向き合う面を有する. (B) p57/coronin-1 の heptad repeat. d 位置はロイシン, a 位置は疎水性アミノ酸残基 (Val, Met, Leu) である. (C) coiled-coil 構造において, a および d 位置のアミノ酸残基で作る疎水性領域を示す.



## 第二節 試薬および方法

### ・ GST 融合タンパク質発現プラスミド

pGEX-p57FL (pGEX-p57<sup>1-461</sup>), pGEX-p57WD (pGEX-p57<sup>1-371</sup>), pGEX-p57LZ (pGEX-p57<sup>372-461</sup>) の構築については第 2 章に記した. pGEX-p57LZ[AALL]および pGEX-p57FL[AALL]は pGEX-p57LZ および pGEX-p57FL をテンプレートにし QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて作製した. 使用したプライマー (L433A, L440A) を以下に示す (Table 3-1). pGEX-p57LZ[AAAA]は pGEX-p57LZ[AALL]をテンプレートにし QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて作製した. 使用したプライマー (L447A, L454A) を以下に示す (Table 3-1). また, これらの発現プラスミドの塩基配列は DNA シーケンサー (ABI PRISM 377) により確認した.

Table 3-1 使用したオリゴヌクレオチド①

---

---

#### L433A, L440A

sense primer : 5'-C GTG TCT CGG GCG GAG GAG GAG ATG CGG AAG GCC  
CAG GCC ACG GTG CAG G-3'

anti-sense primer : 5'-C CGT GGC CTG GGC CTT CCG CAT CTC CTC CTC  
CGC CCG AGA CAC GGC ATC C-3'

---

#### L447A, L454A

sense primer : 5'-CG GTG CAG GAG GCC CAG AAG CGC TTG GAC AGG  
GCG GAG GAG ACA GTC CAG-3'

anti-sense primer : 5'-C TGT CTC CTC CGC CCT GTC CAA GCG CTT CTG  
GGC CTC CTG CAC CGT GGC-3'

---

---

・ His 融合タンパク質発現プラスミド

組換え型 p57coronin-1 および p57/coronin-1 欠失変異体を調製するために、タグとなる 6 x ヒスチジンを融合させ、His 融合タンパク質を精製した。発現ベクターとして pQE-32 (Qiagen) プラスミドを使用した。完全長の p57/coronin-1 発現プラスミド (pQE-p57FL[LLLL]) は、pGEX-p57<sup>1-461</sup> より *Bam*H I-*Sal* I を用いて制限酵素消化した p57/coronin-1 の cDNA 断片を pQE-32 へ組み込んだ。pQE-p57FL[AALL] は pQE-p57FL[LLLL] をテンプレートにし QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて作製した。使用したプライマー (L433A, L440A) は Table 3-1 に示した。また、これらの発現プラスミドの塩基配列は DNA シーケンサー (ABI PRISM 377) により確認した。

・ 哺乳類細胞用タンパク質発現プラスミド

細胞内における p57/coronin-1 の C 末端領域を介した多量体形成能を検討するために、哺乳類細胞用発現プラスミドを作製した。発現ベクターとして pEGFP-C2 vector (BD Bioscience Clontech) を使用し、p57/coronin-1 の欠失変異体を enhanced green fluorescence protein (EGFP) との融合タンパク質として発現させた。テンプレートに pGEX-p57<sup>1-461</sup> を用い、制限酵素消化部位 (*Eco*R I および *Bam*H I) を付加したプライマー (Table 3-2) を用い、polymerase chain reaction (PCR) により増幅させた cDNA 断片を pEGFP-C2 にライゲーションし発現プラスミドを構築した。pcDNA3.1-p57/V5HisA および pcDNA3.1-p57<sup>372-461</sup>/V5HisA については第 2 章に記した。この発現プラスミドの塩基配列は DNA シーケンサー (ABI PRISM 377) により確認した。

Table 3-2 使用したオリゴヌクレオチド②

<i>EcoR</i> I-p57 <sup>372</sup> - : 5'-GGG GAA TTC CCT GCC CTC ACG GCT GA-3'
<i>Bam</i> H I-p57 <sup>461</sup> - reverse : 5'-GGG GGA TCC CTA CTT GGC CTG GAC TGT CT-3'

・大腸菌による組換え p57/coronin-1 および変異体の発現と精製

作製した発現プラスミド (pGEX-p57FL, pGEX-p57WD, pGEX-p57LZ, pGEX-p57LZ[AALL] および pGEX-p57LZ[AAAA]) で大腸菌 (JM109 または DH5  $\alpha$ ) を形質転換し, 50  $\mu$ g/ml のアンピシリンを含む 6 ml の LB 培地中に 37°C で 16 時間前培養した後, その菌液を同濃度のアンピシリンを含む 1 l の TB 培地に移した. 20°C で 2 日間振盪培養した後, 最終濃度 0.5 mM の IPTG を加え 16 時間培養を続けた. 遠心分離により集菌し, 30 ml の sonication buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) に再懸濁した後, 最終濃度 1.0 mg/ml のリゾチームを加え, 氷中で 20 分間インキュベートした. この懸濁液を超音波処理した後, 4°C, 15,000 x g で 30 分間の遠心分離を行い, 不溶性画分を除去した. 得られた可溶性画分に 0.5 ml の glutathione-Sepharose 4B ビーズ (Amersham) を加え氷中で 30 分間インキュベートした. このビーズを sonication buffer で 3 回洗浄した後, 0.5 ml の Factor Xa buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5) に再懸濁し, 20 U の Factor Xa プロテアーゼを加え 22°C で 16 時間インキュベートし, p57FL および p57WD, p57LZ, p57LZ[AAAA], p57LZ[AALL]を得た.

作製した発現プラスミド (pQE-p57FL[LLLL] および pQE-p57FL[AALL]) で

大腸菌 (DH5  $\alpha$ ) を形質転換し, 50  $\mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを含む 3 ml の LB 培地中に 37°C で 16 時間前培養した. その菌液 1 ml を同濃度のアンピシリンを含む 300 ml の LB 培地に移し, 4 時間培養した後, 終濃度 0.5 mM の IPTG を加え 3 時間培養した. 遠心分離により集菌し, 15 ml の sonication buffer に再懸濁した後, 最終濃度 1.0 mg/ml のリゾチームを加え, 氷中で 20 分間インキュベートした. この懸濁液を超音波処理した後, 4°C, 15,000  $\times g$  で 30 分間の遠心分離を行い, 不溶性画分を除去した. 得られた可溶性画分より, HiTrap<sup>TM</sup> NHS-activated HP (Amersham) に抗 p57/coronin-1 抗体 (N7)<sup>27)</sup> を固相化した抗体カラムを用い, アフィニティー精製した.

#### ・ゲル濾過法

Superose 12 10/300 GL (Amersham) を用いてゲル濾過を行った. 精製したタンパク質 (p57FL, p57WD, p57LZ, p57LZ[AAAA], p57[AALL], p57FL[LLLL] および p57FL[AALL]) 0.1 ml を緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7.5) で平衡化したカラムに供した. 流速は 0.5 ml/min で行い, 0.5 ml ずつフラクションを回収した. それぞれのフラクションについて SDS-PAGE および抗 p57/coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った. また, p57LZ[AAAA] については CBB 染色を行った.

#### ・COS-1 細胞の細胞培養と遺伝子導入

COS-1 細胞は 10% FBS を含む RPMI-1640 培地で, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件下で

培養した。対数増殖期の COS-1 細胞を 0.025%トリプシンを含む EDTA/PBS ではがし、PBS で洗浄した後、細胞濃度を  $5 \times 10^6$  cell/ml に調製した。この細胞懸濁液 0.7 ml に対し 40  $\mu$ g のプラスミドを加え、エレクトロポレーション用キュベット（ギャップ 0.4 cm）に移し、Gene Pulser Xcell（Bio-Rad）を用い 300 V、975  $\mu$ F の条件でエレクトロポレーションを行った。細胞を 10 ml の培地に懸濁し 48 時間培養し実験に用いた。

・免疫沈降

① pcDNA3.1-p57/V5HisA のみ、② pcDNA3.1-p57<sup>372-461</sup>/V5HisA のみ、③ pcDNA3.1-p57/V5HisA および pcDNA3.1-p57<sup>372-461</sup>/V5HisA の両者の発現プラスミドをトランスフェクトした COS-1 細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 48 時間培養した。その後、TNE buffer（50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1 mM PMSF）により 4°C、30 分間細胞を可溶化処理した後、15,000 x g, 4°C、10 分間の遠心分離により可溶性の画分を回収した。この可溶性画分に 50  $\mu$ l の protein G-Sepharose（Amersham）を加え、4°C で 1 時間穏やかに攪拌した後、遠心分離により沈殿を除いた。得られた上清に N 末端認識抗 p57/coronin-1 抗体および 20  $\mu$ l の protein G-Sepharose を加え、4°C で 16 時間穏やかに攪拌した。遠心分離して得られた免疫沈降物を TNE buffer で 5 回洗浄した後、SDS-PAGE 用サンプルバッファーに可溶化し試料とした。

・免疫染色

細胞を 3.5% formaldehyde を含む PBS で 10 分間固定した後, 0.2% Triton X-100 を含む PBS により膜透過処理を行った. その後, TRITC 標識ファロイジン (15 U/ml, SIGMA) により F-アクチンを染色し, その細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡 (Radiance 2100, Bio-Rad Laboratories) により観察した.

・シヨ糖密度遠心法

5-20%のシヨ糖を含む緩衝液(40 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 M NaCl, 0.2M EDTA, 0.02% Nonidet P-40, 全量 12 ml) の密度勾配を作製し, その上に精製した p57FL[LLLL]および p57FL[AALL]を 0.2 ml 重層し, 35,000 rpm, 4℃で 18 時間超遠心した. ローターは Hitachi P40ST を用いた. 遠心後, 1.0 ml ずつフラクションを取り, それぞれのフラクションについて SDS-PAGE および抗 p57/coronin-1 抗体を用いたウエスタンブロットを行った.

### 第三節 実験結果

完全長の p57/coronin-1 (p57FL), N 末端領域および WD-repeat を含む欠失変異体 (p57WD) および C 末端ロイシンジッパー構造を含む欠失変異体 (p57LZ) を精製し (Fig. 3-2A), Superose 12 カラムを用いてゲル濾過を行った. 得られた各フラクションについて SDS-PAGE, ウェスタンブロットを行い, これら精製タンパク質の分子量を測定した. p57FL は分子量 90-110 kDa のフラクションに溶出され, 単量体の分子量 57 kDa の約 2 倍の大きさであった (Fig. 3-2B). p57WD について同様に実験を行うと分子量 35-45 kDa に溶出され, 単量体の分子量 46 kDa とほぼ一致した (Fig. 3-2B). p57LZ は分子量 20-25 kDa に溶出され, 単量体の分子量 11 kDa の約 2 倍の分子量であった (Fig. 3-2B). これらのことから p57/coronin-1 がホモ二量体を形成していること, およびその二量体形成に関わる部位はロイシンジッパー構造を含む 90 アミノ酸残基からなる p57LZ に存在することが示された.

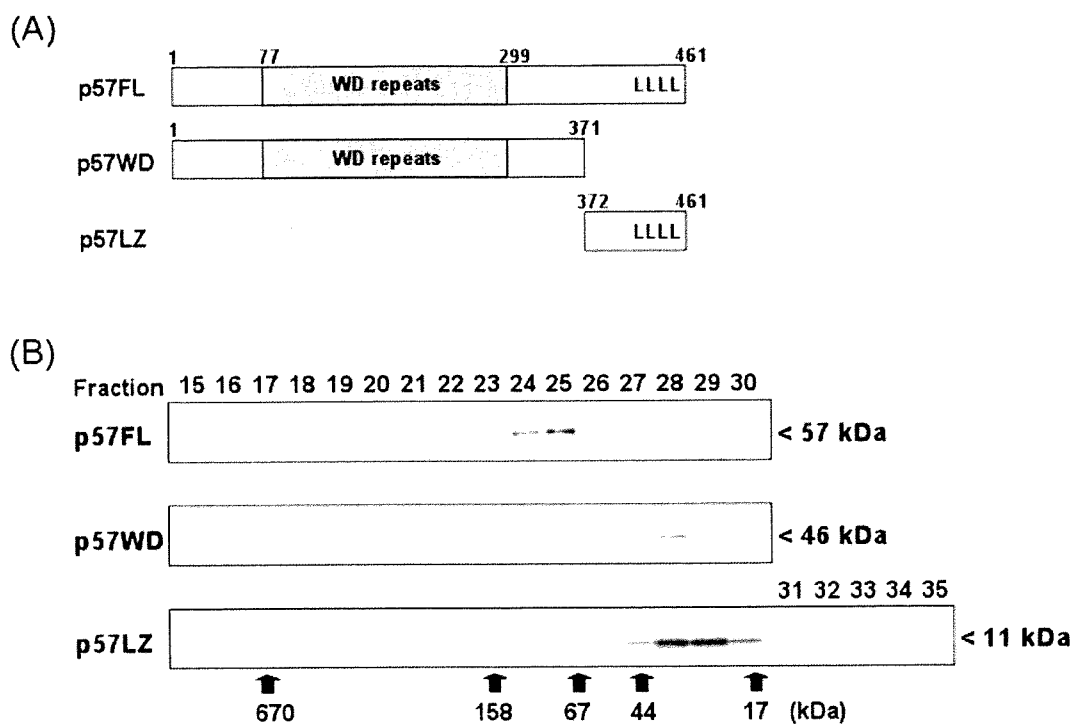


Fig. 3-2 p57FL, p57WD および p57LZ のゲル濾過による分子量測定

(A) 完全長の p57/coronin-1 (p57FL) および欠失変異体 (p57WD および p57LZ) の構造模式図. (B) p57FL, p57WD および p57LZ について, ゲル濾過カラム Superose 12 10/300 GL を用いて分離し, フラクションを分取した. 各フラクションについて SDS-PAGE, ウェスタンブロットを行い抗 p57/coronin-1 抗体により検出した.

細胞内において p57FL と p57LZ とが結合するか調べた. p57/coronin-1 を発現していない COS-1 細胞に p57FL および p57LZ を強制発現させ, p57FL のみに結合する N 末端認識抗体を用いて免疫沈降を行い, p57LZ が共沈降されるか調べることにより, p57FL と p57LZ の結合を評価した. p57FL のみを発現させた COS-1 細胞の免疫沈降物からは p57FL のみが検出され (Fig. 3-3 left panel, left



lane), p57LZ のみを発現させた COS-1 細胞の免疫沈降物からは p57LZ が検出されなかった (Fig. 3-3 left panel, middle lane). 以上のことより, この方法において, p57FL のみが免疫沈降され, p57LZ は免疫沈降されないことを確認した. 一方, p57FL および p57LZ の両者を発現させた COS-1 細胞の免疫沈降物からは p57FL のみならず p57LZ も検出された (Fig. 3-3 left panel, right lane). また, これらの細胞における組換えタンパク質の発現については p57FL のみの発現 (Fig. 3-3 right panel, left lane), p57LZ のみの発現 (Fig. 3-3 right panel, middle lane), p57FL および p57LZ 両者の発現 (Fig. 3-3 right panel, right lane) を確認している.

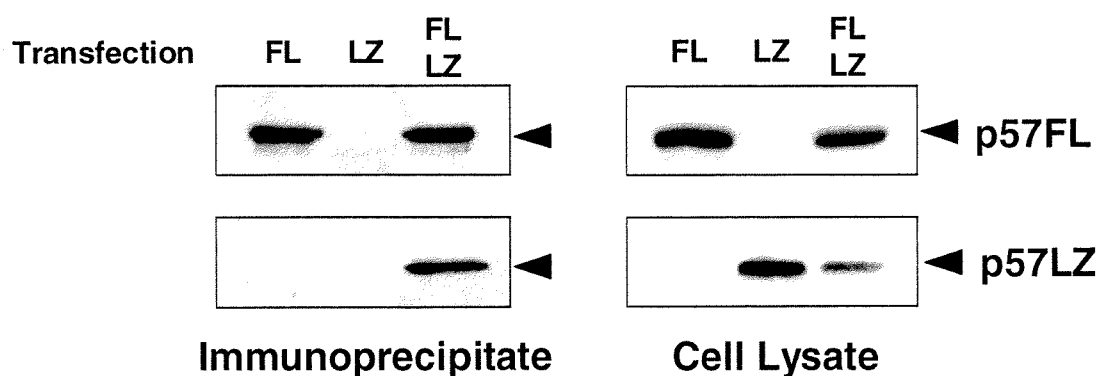


Fig. 3-3 p57/coronin-1 の C 末端領域を介した多量体形成能

(left panel) COS-1 細胞に, ① p57FL のみ, ② p57LZ のみ, ③ p57FL および p57LZ の両者をそれぞれ発現させ, N 末端に対する抗体を用いて免疫沈降を行い, SDS-PAGE, ウェスタンブロット後, C 末端に対する抗体で染色した. (right panel) ①~③の各トランスフェクタントの細胞溶解液について SDS-PAGE およびウェスタンブロットを行い, 組換えタンパク質の発現を確認した.

第2章で示したように、p57/coronin-1のF-アクチン結合部位はN末端およびWD-repeat内部に存在し、p57LZには存在しない。そこで、オワンクラゲ由来蛍光タンパク質のenhanced green fluorescence protein (EGFP)とp57LZの融合キメラタンパク質(EGFP-p57LZ)の発現プラスミドを作製し、COS-1細胞にp57FLおよびEGFP-p57LZの両者を強制発現させ、その細胞内分布を観察した。EGFP-p57LZのみを発現させた場合、アクチン結合部位を持たないEGFP-p57LZは細胞質に分布した(Fig. 3-4)。しかしながら、p57FLおよびEGFP-p57LZを同時に発現させた場合、EGFP-p57LZはアクチン結合部位が存在しないにも拘わらず、細胞膜下のF-アクチンの豊富な領域における局在が観察された(Fig. 3-4)。このことは、細胞膜下のF-アクチンが豊富な領域にアクチン結合部位を有しているp57FLが結合し、そのp57FLにEGFP-p57LZが結合したために起こった現象であると考えられた。

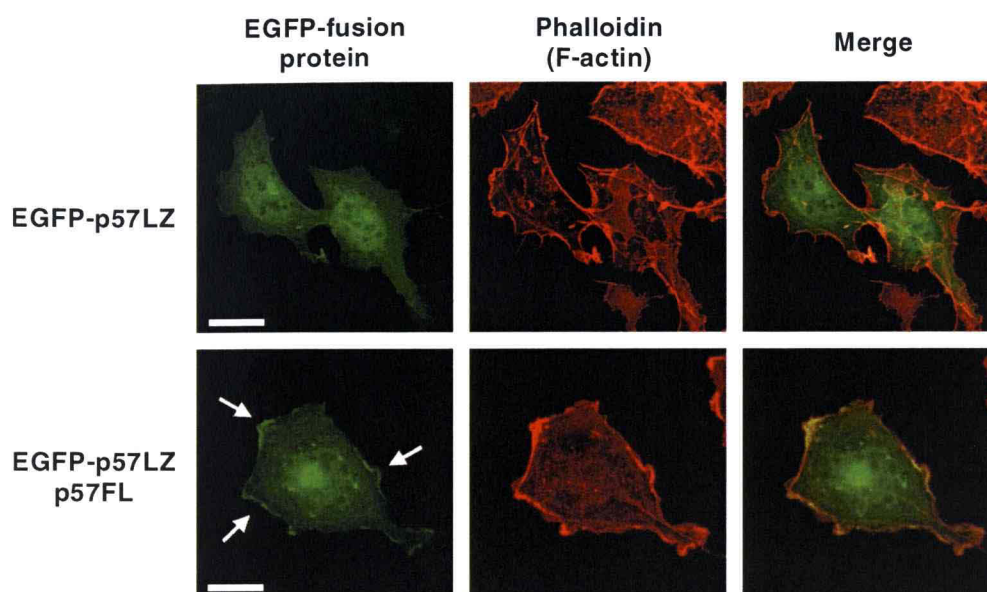


Fig. 3-4 COS-1 細胞における EGFP-p57LZ の細胞内分布

(upper panel) EGFP-p57LZ のみを発現させた COS-1 細胞. EGFP 融合タンパク質, F-アクチンおよびそれぞれの重ね合わせを示す. (lower panel) EGFP-p57LZ および p57FL の両者を発現させた COS-1 細胞. EGFP 融合タンパク質, F-アクチンおよびそれぞれの重ね合わせを示す. 矢印は細胞膜下の EGFP-p57LZ を示す. Scale bars, 20  $\mu$ m.

以上のことより, p57/coronin-1 のロイシンジッパー構造を含んだ領域である p57LZ に二量体形成能が存在することが明らかとなった. この二量体形成にロイシンジッパーが直接関与しているか調べるために, ロイシン残基をアラニン残基に置換し, その影響を調べた. p57/coronin-1 のロイシンジッパー構造は 4 残基のロイシンから構成されており (Fig. 3-1B), 完全なロイシンジッパーを有している p57LZ[LLLL], ロイシンを全てアラニンに置換した p57LZ[AAAA] および 2 残基のロイシンをアラニンに置換した p57LZ[AALL] の発現プラスミドを

作製し、大腸菌に発現させこれらのタンパク質を精製した後、ゲル濾過によりそれらの分子量を分析した。p57LZ[LLLL]は分子量 20-25 kDa に溶出され、単量体の分子量 11 kDa の約 2 倍の分子量であったのに対し (Fig. 3-5), p57LZ[AAAA]および p57LZ[AALL]は分子量 10 kDa 付近に溶出され、単量体の予想分子量 11 kDa とほぼ一致した (Fig. 3-5)。これらのことより、p57LZ の二量体形成は少なくとも 2 残基のロイシンをアラニンに置換することにより妨げられ、ロイシンジッパー構造を介して形成していることが推定された。

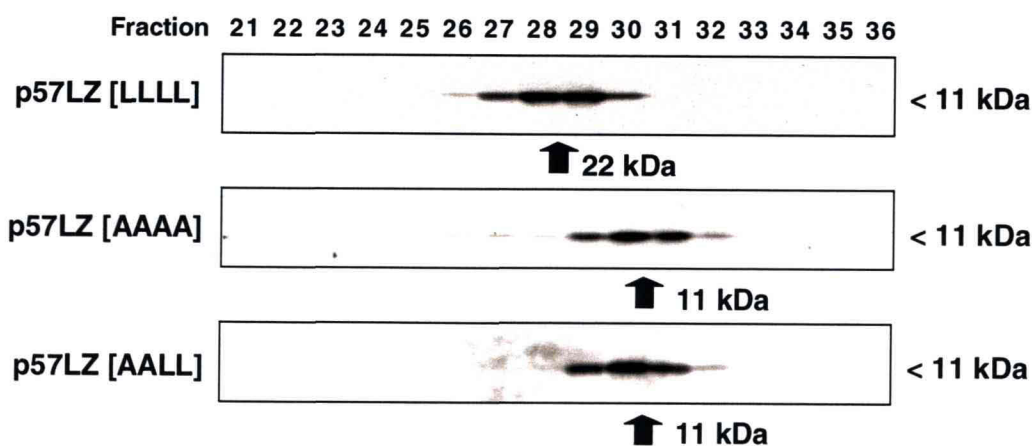


Fig. 3-5 ロイシンジッパー構造を介した p57LZ のホモ二量体形成

p57LZ[LLLL] および、ロイシンジッパー構造に変異を導入した p57LZ[AAAA] および p57LZ[AALL] についてゲル濾過、SDS-PAGE、ウエスタンブロットを行った。

完全長の p57/coronin-1 の二量体形成においても、ロイシンジッパー構造の関

与を確認するために、p57FL[LLLL]およびp57FL[AALL]の発現プラスミドを作製し、それぞれを大腸菌で発現させ組換えタンパク質を精製し検討した。p57FL[AALL]はp57FL[LLLL]とは異なったフラクションに溶出され (Fig. 3-6A), 280 nm の吸光度でモニターしたところ, p57FL[AALL] は 25.58 分に, p57FL[LLLL]は 23.85 分にそれぞれ溶出された。標準タンパク質の溶出位置より作製した検量線より, p57FL[LLLL]の推定分子量は約 110 kDa であるのに対し, p57FL[AALL]の推定分子量は約 55 kDa であった (Fig. 3-6B)。このことは, p57FL[LLLL]は二量体, p57FL[AALL]は単量体であることを強く示唆した。

さらに, p57FL[LLLL] と p57FL[AALL]の分子量の違いを, ショ糖密度遠心法でも確認した。その結果, p57FL[LLLL]は HL60 細胞由来の p57/coronin-1 と同じフラクションから, また p57FL[AALL]はそれよりも低密度のフラクションからそれぞれ検出され (Fig. 3-6C), ゲル濾過の結果と一致した。

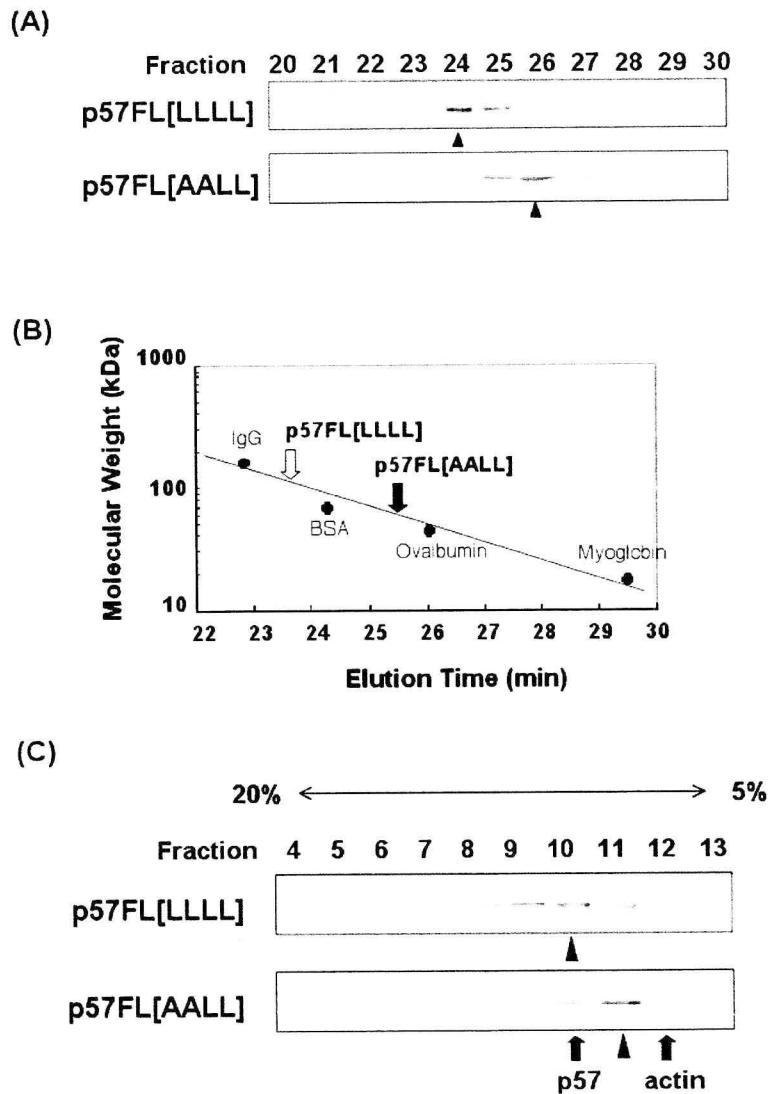


Fig. 3-6 ロイシンジッパー構造を介した p57/coronin-1 の二量体形成

(A) p57FL[LLLL]および p57FL[AALL]のゲル濾過, SDS-PAGE, ウェスタンブロットの結果を示した. (B) 標準タンパク質の溶出位置により作製した検量線を示した. 矢印は p57FL[LLLL]および p57FL[AALL]の溶出時間を示した. (C) ショ糖密度遠心法により p57FL[LLLL]および p57FL[AALL]を分離した. SDS-PAGE およびウェスタンブロットにより検出した. ▲は p57FL[LLLL]および p57FL[AALL]を含むフラクションを示し, 矢印は HL60 細胞由来の p57/coronin-1 および G-actin (43 kDa) を含むフラクションを示す.

#### 第四節 考察

p57/coronin-1 の C 末端領域には 7 残基ごとにロイシンの繰り返し配列が存在し<sup>18)</sup>, 第一節で述べた heptad repeat<sup>55-57)</sup>の規則に一致していた (Fig. 3-1B). heptad repeat の d 残基でロイシンジッパーを形成し, a 残基も疎水性アミノ酸で形成されていたため, C 末端領域が coiled-coil 構造である可能性が容易に考えられた. coiled-coil 構造やロイシンジッパー構造は疎水性相互作用を介してホモ二量体やヘテロ二量体など多量体形成に関与していると考えられている<sup>34, 40, 41)</sup> (Fig. 3-1C). そこで, p57/coronin-1 の C 末端領域はなんらかのタンパク質と疎水性の結合が存在すると考えられた. しかしながら, p57/coronin-1 を免疫沈降した際, 他のタンパク質の共沈殿が検出できなかったことは, p57/coronin-1 同士の結合, つまりホモ多量体形成を示唆した. 本章の結果より, p57/coronin-1 は C 末端領域のロイシンジッパー構造を含む領域を介して二量体を形成していると考えられた. また, ロイシンジッパーを構成しているロイシン 4 残基のうち, 2 残基のアラニンへの置換により二量体形成能が失われたことは, p57/coronin-1 の二量体形成におけるロイシンジッパーの関与を強く示唆した.

近年, coronin ファミリーのタンパク質である, ヒトの coronin-3 は C 末端領域を介して三量体を<sup>44)</sup>, アフリカツメガエルの Xcoronin や出芽酵母の Crn1p は C 末端領域を介して二量体を形成することが報告され<sup>58, 59)</sup>, coronin ファミリーのタンパク質は C 末端領域を介して多量体を形成する可能性が考えられた. しかしながら, これらの相同性タンパク質にはロイシンジッパー構造が存在しないことより<sup>44, 50, 58, 59)</sup>, p57/coronin-1 とは異なった様式で多量体を形成していると考えられる. 多量体の形成様式は個々異なっている可能性はあるが, coronin ファミリータンパク質は二量体または多量体を形成しアクチン細胞骨格に作用していることが考えられる. また, 線虫の coronin 様タンパク質である POD-1<sup>60)</sup>, ショウジョウバエの dPOD-1<sup>61)</sup>やヒトの coronin-7<sup>45)</sup>は多くの

coronin ファミリータンパク質の分子量（約 60 kDa）の約 2 倍の分子量を持つ。これらの coronin メンバーは分子内に WD-repeat が 2 カ所存在し、他の coronin が 2 分子連なっているような構造を示す。しかし、coiled-coil 構造はもたないことから多量体構造を取らないことが予想されるが、単量体でありながらあたかも二量体を形成しているようなタンパク質であることが報告されている。このことは、通常の coronin ファミリーのタンパク質が二量体または多量体を形成し機能的な役割を果たしていることを強く示唆した。



#### 第四章 総括および結論

- ① p57/coronin-1 にはアクチン結合領域が少なくとも 2 カ所存在し、一つは N 末端の 34 アミノ酸残基 (Met1~Thr34) であり、もう一つは 2 番目および 3 番目の WD-repeat を含む領域 (Ile111~Glu204) であることが明らかとなった。また、N 末端 34 アミノ酸残基中、塩基性に富むアミノ酸配列 (10-KFRHVF-15) が、アクチンとの結合に重要であった。
- ② p57/coronin-1 は C 末端領域を介して二量体を形成しており、この二量体形成にはロイシンジッパー構造が関与していることが明らかにされた。

p57/coronin-1 は N 末端側にアクチン結合部位を有し、C 末端部分で二量体を形成し、Fig. 4-1 の模式図に示すような構造を取ることが示唆された。このような構造はアクチン繊維を架橋・束化するために適した構造であり、アクチン繊維の再構成を通じて貪食や走化性などの細胞運動に関与している可能性が考えられる。

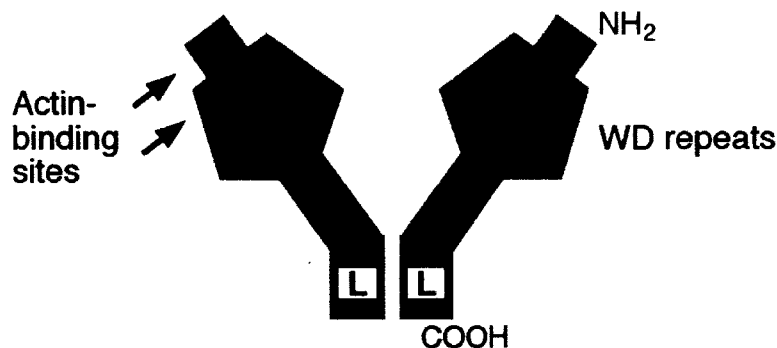


Fig. 4-1 p57/coronin-1 の二量体モデル

N 末端領域にアクチン結合部位を有し、C 末端領域のロイシンジッパー構造を介して二量体を形成している p57/coronin-1 の構造模式図を示した。

今回明らかとなった p57/coronin-1 の構造，すなわち N 末端領域にアクチン結合部位，そして C 末端領域に二量体形成部位を有する構造は，filamin と呼ばれるアクチン結合タンパク質の構造と類似している．filamin はアクチン繊維を架橋することによりゲル化を起こすことが報告されており<sup>8)</sup>，p57/coronin-1 も同様の活性を有することが推測された．

p57/coronin-1 は白血球に特異的に発現しているアクチン結合タンパク質であり，貪食や走化性などアクチン細胞骨格の再構成を伴った白血球応答に関与していると考えられている．そこで私たちのグループは，白血球の貪食過程での p57/coronin-1 の細胞内分布を調べ，このアクチン結合タンパク質が F-アクチンと共に初期ファゴソームに一過性に集積し，その後ファゴソームから解離することを見出した．このような p57/coronin-1 の細胞内挙動と本研究結果とを考慮合わせ，ファゴソームの形成・成熟過程における本アクチン結合タンパク質の役割について以下に考察する．

ファゴソーム形成時に，p57/coronin-1 の二量体が F-アクチンに結合およびアクチン繊維を架橋・束化することによりアクチンの網目状構造体が構築され，この構造体がファゴソームを包み込むことでファゴソームの形成が促進され，またファゴソーム膜が安定化されることが考えられる．その後，リソソームとの融合に至るまでには，このアクチン繊維からなる構造体のファゴソームからの解離あるいは分解が起こる必要があると思われる．この過程では，p57/coronin-1 のアクチン結合能が低下し，アクチン繊維の架橋が弱まることが考えられる．このような p57/coronin-1 の機能変化は，以下に示す実験結果より，本分子のリン酸化によって調節されている可能性が推測される．

- ① PKC 阻害剤 chelerythrine 処理により p57/coronin-1 のファゴソームからの解離が妨げられ，p57/coronin-1 の細胞内挙動に PKC による p57/coronin-1 のリン酸化が関与していると考えられた<sup>28)</sup>．

- ② p57/coronin-1 は PKC によるリン酸化を受けるコンセンサス配列 (S/T-X-R/K) を有し, 実際に *in vitro* の実験において PKC によりリン酸化されることが示された<sup>28)</sup>.
- ③ HL60 細胞内の p57/coronin-1 を 2 次元電気泳動により分析した結果, 等電点の異なる複数のアイソフォームが検出され, 異なるリン酸化状態の p57/coronin-1 の存在が示唆された (未発表データ).
- ④ PKC 阻害剤処理により p57/coronin-1 の解離が抑制されたファゴソームにはリソソームマーカーである LAMP-1 の移行が起こらず, リソソームとの融合が妨げられると考えられた<sup>28)</sup>.
- ⑤ 貪食過程における p57/coronin-1 および F-アクチンの細胞内局在を経時的に調べた結果, p57/coronin-1 がファゴソームに局在するときは常に F-アクチンも共に局在した.

上記の仮説は, p57/coronin-1 のアクチン結合能が PKC による p57/coronin-1 のリン酸化により制御されるという仮定に基づくものである. これについては実証されていないが, 現在までに以下に述べるような状況証拠が得られている.

- ① F-アクチンと p57/coronin-1 の相互作用を調べるために, 蛍光タンパク質である EGFP と p57/coronin-1 を融合させたキメラタンパク質 (EGFP-p57/coronin-1) を cDNA トランスフェクション法で COS-1 細胞に発現させた. この融合タンパク質の細胞内分布に対する PKC 活性化因子である PMA あるいは PKC 阻害剤である chelerythrine の影響を調べた. その結果, chelerythrine 処理により EGFP-p57/coronin-1 は細胞膜下の F-アクチンの豊富な領域に集積する傾向が見られたが, 反対に PMA 処理ではこの領域からの分布量の減少が認められた (未発表データ).
- ② HL60 細胞に PMA および chelerythrine 処理した場合における Triton X-100 不溶性の細胞骨格への p57/coronin-1 の分布量がどのように変化するか調

べたところ、PMA 処理により減少したのに対し、chelerythrine 処理では増加した（未発表データ）。

これらの結果は、PKC によるリン酸化が p57/coronin-1 と F-アクチンとの相互作用に影響を与え、リン酸化を亢進させるような処理により p57/coronin-1 の F-アクチンからの解離が促進されることを示唆した。前述のように、PKC 阻害剤 chelerythrine 処理により、p57/coronin-1 のファゴソームからの解離が阻害されるとともにファゴソーム-リソソーム融合の抑制が起こるが、このメカニズムとして、p57/coronin-1 の架橋によって形成されたファゴソームを包み込む網目状のアクチン繊維が分解されず、引き続くリソソームとの融合が妨害されることが考えられる。PKC 阻害剤の存在しない、通常の貪食過程においては、p57/coronin-1 のリン酸化により、架橋・束化している F-アクチンが分解され、ファゴソーム-リソソーム融合が誘導されるというモデルが考えられる（Fig. 4-2）。

ファゴソーム形成・成熟におけるこのような p57/coronin-1 の役割と結核菌の細胞内寄生性の関連性について以下に考察する。Ferrari らの報告により、結核菌の生菌あるいは死菌を貪食したマウスマクロファージのファゴソームが異なった運命を辿ることが明らかにされた<sup>29)</sup>。生菌を含むファゴソームには p57/coronin-1 が持続的に集積し、リソソームとの融合が起こらないのに対し、死菌を含むファゴソームへの p57/coronin-1 の局在は一過性であり、時間経過とともに解離が見られ、その後のリソソーム融合が認められた。この現象は、結核菌の生菌が何らかの機序でファゴソームからの p57/coronin-1 の解離を妨害するように働いていることを示唆している。一つの可能性としては、結核菌が宿主細胞の PKC 活性を阻害する物質を放出していることが考えられる。今後、本分子のリン酸化とアクチン結合との関係、さらにはファゴソームの形成・成熟との関連について詳細に検討していくことが必要であり、これらの成果は、結

核菌やレジオネラ属菌などの細胞内寄生細菌の感染に対する防御や治療に貢献できる重要な知見となると考えられる。

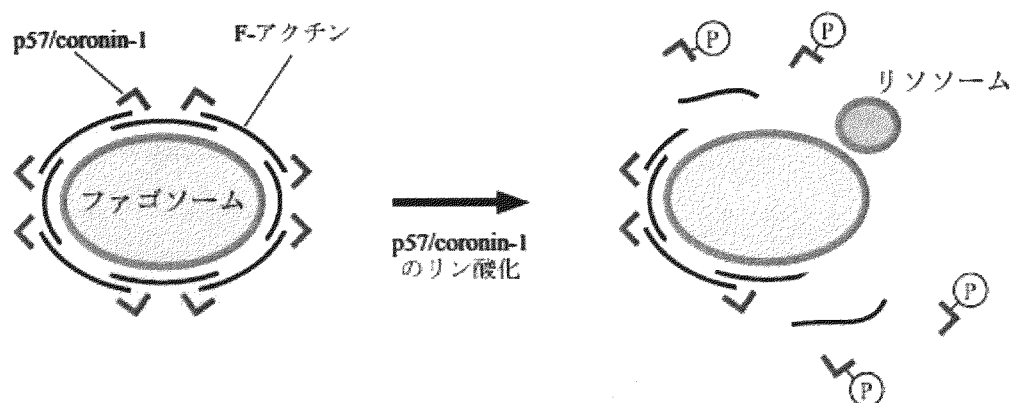


Fig. 4-2 p57/coronin-1 のリン酸化とファゴソーム成熟のモデル図

## 謝辞

本研究に際し、始終御懇意なる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教室教授 辻勉先生に謹んで厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行の当たり御指導いただき、的確なる御助言を賜りました独立行政法人医薬品医療機器総合機構 豊島聰先生、星薬科大学学生化学教室教授 中陳静男先生、アイオワ州立大学 W. M. Nauseef 教授に心より深く感謝致します。

本研究の遂行に当たり御協力ならびに御助言を頂きました星薬科大学学生化学教室元助手 鈴木亜紀子様、星薬科大学学生化学教室元教室員 岡野雅充様、日本たばこ産業株式会社医薬品探索研究所 鈴木健介博士に心より深く感謝致します。

最後に、数々の御協力を頂いた伊藤佐生智博士をはじめ星薬科大学微生物学教室員の皆様に御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) May R. C., Machesky L. M., Phagocytosis and the actin cytoskeleton., *J. Cell Sci.*, **114**, 1061-1077 (2001).
- 2) Noegel A. A., Schleicher M., The actin cytoskeleton of Dictyostelium: a story told by mutants., *J. Cell Sci.*, **113**, 759-766 (2000).
- 3) Carlier, M. F., Ressay, F., Pantaloni, D., Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin., *J. Biol. Chem.*, **274**, 33827-33830 (1999).
- 4) Goode, B. L., Drubin, D. G., Barnes, G., Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons., *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 63-71 (2000).
- 5) Chen, H., Bernstein, B. W., Bamburg, J. R., Regulating actin-filament dynamics in vivo., *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 19-23 (2000).
- 6) Hitchcock-DeGregori, S. E., Sampath, P., Pollard, T. D., Tropomyosin inhibits the rate of actin polymerization by stabilizing actin filaments., *Biochemistry*, **27**, 9182-9185 (1988).
- 7) Janmey, P. A., Hvidt, S., Lamb, J., Stossel, T. P., Resemblance of actin-binding protein/actin gels to covalently crosslinked networks., *Nature*, **345**, 89-92 (1990).
- 8) Gorlin, J. B., Yamin, R., Egan, S., Stewart, M., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J., Hartwig, J. H., Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring., *J. Cell Biol.*, **111**, 1089-1105 (1990).
- 9) Yarmola, E. G., Edison, A. S., Lenox, R. H., Bubb, M. R., Actin filament cross-linking by MARCKS: characterization of two actin-binding sites within the phosphorylation site domain., *J. Biol. Chem.*, **276**, 22351-22358 (2001).
- 10) Maruyama, K., Yamada, N., Mabuchi, I., Capping one end of an actin filament affects elongation at the other end., *J. Biochem.*, **96**, 613-620 (1984).

- 11) Xu, J., Casella, J. F., Pollard, T. D., Effect of capping protein, CapZ, on the length of actin filaments and mechanical properties of actin filament networks., *Cell Motil. Cytoskeleton*, **42**, 73-81 (1999).
- 12) Janmey, P. A., Chaponnier, C., Lind, S. E., Zaner, K. S., Stossel, T. P., Yin, H. L., Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin, Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking., *Biochemistry*, **24**, 3714-37123 (1985).
- 13) Yamashiro, S., Kameyama, K., Kanzawa, N., Tamiya, T., Mabuchi, I., Tsuchiya, T., The gelsolin/fragmin family protein identified in the higher plant *Mimosa pudica*., *J. Biochem.*, **130**, 243-249 (2001).
- 14) Nishida, E., Maekawa, S., Sakai, H., Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin., *Biochemistry*, **23**, 5307-5313 (1984).
- 15) Tobacman, L. S., Korn, E. D., The regulation of actin polymerization and the inhibition of monomeric actin ATPase activity by *Acanthamoeba* profilin., *J. Biol. Chem.*, **257**, 4166-4170 (1982).
- 16) Mullins, R. D., Heuser, J. A., Pollard, T. D., Arp2/3 The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 6181-6186 (1998).
- 17) Nauseef, W. M., Clark, R. A., "Principles and Practice of Infectious Diseases", 5<sup>th</sup> ed., Chap. 8, eds. by Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R., Churchill Livingstone, Philadelphia, pp.89-111 (2000).
- 18) Suzuki, K., Nishihata, J., Arai, Y., Honma, N., Yamamoto, K., Irimura, T., Toyoshima, S., Molecular cloning of a novel actin-binding protein, p57, with a WD repeat and a leucine zipper motif., *FEBS Lett.*, **364**, 283-288 (1995).



- 19) de Hostos, E. L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R., Gerisch, G., Coronin, an actin binding protein of *Dictyostelium discoideum* localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits., *EMBO J.*, **10**, 4097-4104 (1991).
- 20) David, V., Gouin, E., Van Troys, M., Grogan, A., Segal, A. W., Ampe, C., Cossart, P., Identification of cofilin, coronin, Rac and capZ in actin tails using a *Listeria* affinity approach., *J. Cell Sci.*, **111**, 2877-2884 (1998).
- 21) de Hostos, E. L., The coronin family of actin-associated proteins., *Trends Cell Biol.*, **9**, 345-350 (1999).
- 22) Nakamura, T., Takeuchi, K., Muraoka, S., Takezoe, H., Takahashi, N., Mori, N., A neurally enriched coronin-like protein, ClipinC, is a novel candidate for an actin cytoskeleton-cortical membrane-linking protein., *J. Biol. Chem.*, **274**, 13322-13327 (1999).
- 23) Maniak, M., Rauchenberger, R., Albrecht, R., Murphy, J., Gerisch, G., Coronin involved in phagocytosis: dynamics of particle-induced relocalization visualized by a green fluorescent protein Tag., *Cell*, **83**, 915-924 (1995).
- 24) Rauchenberger, R., Hacker, U., Murphy, J., Niewohner, J., Maniak, M., Coronin and vacuolin identify consecutive stages of a late, actin-coated endocytic compartment in *Dictyostelium*., *Curr. Biol.*, **7**, 215-218 (1997).
- 25) Gerisch, G., Albrecht, R., Heizer, C., Hodgkinson, S., Maniak, M., Chemoattractant-controlled accumulation of coronin at the leading edge of *Dictyostelium* cells monitored using a green fluorescent protein-coronin fusion protein., *Curr. Biol.*, **5**, 1280-1285 (1995).
- 26) de Hostos, E. L., Rehfueb, C., Bradtke, B., Wddell, D., Albrecht, R., Murphy, J., Gerisch, G., *Dictyostelium* mutants lacking the cytoskeletal protein coronin are defective in cytokinesis and cell motility., *J. Cell Biol.*, **120**, 163-173 (1993).

- 27) Allen, L. A., DeLeo, F. R., Gallois, A., Toyoshima, S., Suzuki, K., Nauseef, W. M., Transient association of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunits p47phox and p67phox with phagosomes in neutrophils from patients with X-linked chronic granulomatous disease., *Blood*, **93**, 3521-1530 (1999).
- 28) Itoh, S., Suzuki, K., Nishihata, J., Iwasa, M., Oku, T., Nakajin, S., Nauseef, W. M., Toyoshima, S., 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 (2002).
- 29) Ferrari, G, Langen, H., Naito, M., Pieters, J., A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria., *Cell*, **97**, 435-447 (1999).
- 30) Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., Smith, T. F., The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins., *Nature*, **371**, 297-300 (1994).
- 31) Van der Voorn, L., Ploegh, H. L., The WD-40 repeat., *FEBS Lett.*, **307**, 131-134 (1992).
- 32) Zaphiropoulos, P. G., Toftgard, R., cDNA cloning of a novel WD repeat protein mapping to the 9q22.3 chromosomal region., *DNA Cell Biol.*, **15**, 1049-1059 (1996).
- 33) Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., Neer, E. J., The WD repeat: a common architecture for diverse functions., *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 181-185 (1999).
- 34) Landschulz, W. H., Johnson, P. F., Mcknight, S. L., The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins., *Science*, **240**, 1759-1764 (1988).
- 35) Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J. A., Gilman, A. G., Sprang, S. R., The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2., *Cell*, **83**, 1047-1058 (1995).
- 36) Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E. and Sigler, P. B., Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution., *Nature*, **379**, 369-374 (1996).

- 37) Garcia-Higuera, I., Gaitatzes, C., Smith, T. F., Neer, E. J., Folding a WD repeat propeller. Role of highly conserved aspartic acid residues in the G protein beta subunit and Sec13., *J. Biol. Chem.*, **273**, 9041-9049 (1998).
- 38) Komachi, K., Johnson, A. D., Residues in the WD repeats of Tup1 required for interaction with alpha2., *Mol. Cell Biol.*, **17**, 6023-6028 (1997).
- 39) Liliental, J., Chang, D. D., Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit., *J. Biol. Chem.*, **273**, 2379-2383 (1998).
- 40) Shu, W., Ji, H., Lu, M., Trimerization specificity in HIV-1 gp41: analysis with a GCN4 leucine zipper model., *Biochemistry*, **38**, 5378-5385 (1999).
- 41) Agou, F., Traincard, F., Vinolo, E., Courtois, G., Yamaoka, S., Israel, A., Veron, M., The trimerization domain of NEMO is composed of the interacting C-terminal CC2 and LZ coiled-coil subdomains., *J. Biol. Chem.*, **279**, 27861-27869 (2004).
- 42) Okumura, M., Kung, C., Wong, S., Rodgers, M., Thomas, M. L., Definition of family of coronin-related proteins conserved between humans and mice: close genetic linkage between coronin-2 and CD45-associated protein., *Dev Cell Biol.*, **17**, 779-787 (1998).
- 43) Parente, J. A. Jr., Chen, X., Zhou, C., Petropoulos, A. C., Chew, C. S., Isolation, cloning, and characterization of a new mammalian coronin family member, coroninse, which is regulated within the protein kinase C signaling pathway., *J. Biol. Chem.*, **274**, 3017-3025 (1999).
- 44) Spoerl, Z., Stumpf, M., Noegel, A. A., Hasse, A., Oligomerization, F-actin interaction, and membrane association of the ubiquitous mammalian coronin 3 are mediated by its carboxyl terminus., *J. Biol. Chem.*, **277**, 48858-48867 (2002).
- 45) Rybakin, V., Stumpf, M., Schulze, A., Majoul, I. V., Noegel, A. A., Hasse, A., Coronin 7, the mammalian POD-1 homologue, localizes to the Golgi apparatus., *FEBS Lett.*, **573**, 161-167 (2004).

- 46) Lappalainen, P., Fedorov, E. V., Fedorov, A. A., Almo, S. C., Drubin, D. G., Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin revealed by systematic mutagenesis., *EMBO J.*, **16**, 5520-5530 (1997).
- 47) Yao, L., Janmey, P., Frigeri, L. G., Han, W., Fujita, J., Kawakami, Y., Apgar, J. R., Kawakami, T., Pleckstrin homology domains interact with filamentous actin., *J Biol Chem.*, **274**, 19752-19761 (1999).
- 48) de Arruda, M. V., Bazari, H., Wallek, M., Matsudaira, P., An actin footprint on villin. Single site substitutions in a cluster of basic residues inhibit the actin severing but not capping activity of villin., *J. Biol. Chem.*, **267**, 13079-13085 (1992).
- 49) Jongstra-Bilen, J., Janmey, P. A., Hartwig, J. H., Galea, S., Jongstra, J., The lymphocyte-specific protein LSP1 binds to F-actin and to the cytoskeleton through its COOH-terminal basic domain., *J. Cell Biol.*, **118**, 1443-1453 (1992).
- 50) Mishima, M., Nishida, E., Coronin localizes to leading edges and is involved in cell spreading and lamellipodium extension in vertebrate cells., *J. Cell Sci.*, **112**, 2833-2842 (1999).
- 51) Weber, A., Pring, M., Lin, S. L., Bryan, J., Role of the N- and C-terminal actin-binding domains of gelsolin in barbed filament end capping., *Biochemistry*, **30**, 9327-9334 (1991).
- 52) Yamashita, A., Maeda, K., Maeda, Y., Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping., *EMBO J.*, **22**, 1529-1538 (2003).
- 53) Hurst, H. C., Transcription factors. 1: bZIP proteins., *Protein Profile*, **1**, 123-168 (1994).
- 54) CRICK, F. H., Is alpha-keratin a coiled coil?, *Nature*, **170**, 882-883 (1952).
- 55) Acharya, A., Ruvinov, S. B., Gal, J., Moll, J. R., Vinson, C., A heterodimerizing leucine zipper coiled coil system for examining the specificity of a position interactions: amino acids I, V, L, N, A, and K., *Biochemistry*, **41**, 14122-14131 (2002).

- 56) Chakrabarty, T., Yengo, C., Baldacchino, C., Chen, L. Q., Sweeney, H. L., Selvin, P. R., Does the S2 rod of myosin II uncoil upon two-headed binding to actin? A leucine-zippered HMM study., *Biochemistry*, **42**, 12886-12892 (2003).
- 57) Trybus, K. M., Freyzon, Y., Faust, L. Z., Sweeney, H. L., Spare the rod, spoil the regulation: necessity for a myosin rod., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 48-52 (1997).
- 58) Asano, S., Mishima, M., Nishida, E., Coronin forms a stable dimer through its C-terminal coiled coil region: an implicated role in its localization to cell periphery., *Genes Cells*, **6**, 225-235 (2001).
- 59) Goode, B. L., Wong, J. J., Butty, A. C., Peter, M., McCormack, A. L., Yates, J. R., Drubin, D. G., Barnes, G., Coronin promotes the rapid assembly and cross-linking of actin filaments and may link the actin and microtubule cytoskeletons in yeast., *J. Cell Biol.*, **144**, 83-98 (1999).
- 60) Rappleye, C. A., Paredes, A. R., Smith, C. W., McDonald, K. L., Aroian, R. V., The coronin-like protein POD-1 is required for anterior-posterior axis formation and cellular architecture in the nematode *Caenorhabditis elegans*., *Genes Dev.*, **13**, 2838-2851 (1991).
- 61) Rothenberg, M. E., Rogers, S. L., Vale, R. D., Jan, L. Y., Jan, Y. N., *Drosophila* pod-1 crosslinks both actin and microtubules and controls the targeting of axons., *Neuron*, **39**, 779-791 (2003).