

氏名（本籍）	奥 輝 明	（和歌山県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲 第100号	
学位授与年月日	平成17年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	アクチン結合タンパク質p57/coronin-1の機能ドメインの解析	

論文審査委員	主 査	教 授	辻	勉
	副 査	教 授	瀬 山	義 幸
	副 査	教 授	福 井	哲 也

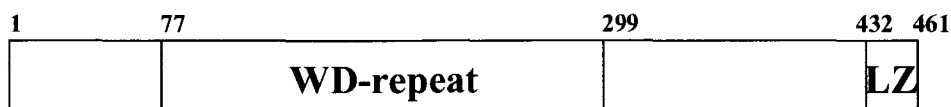
## 論文内容の要旨

### 序

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。この分子は粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) のアクチン結合タンパク質 coronin と相同性を有していることがわかり、その後類似のタンパク質が相次いで発見されファミリーを形成していると考えられた。p57 は哺乳類において初めて発見された coronin 様タンパク質で p57/coronin-1 と呼ばれるようになった。coronin は粘菌の食食、走化性、細胞質分裂などに重要な役割を担っていることが報告されており、p57/coronin-1 も動物の白血球において同様の役割を持つことが推測され、特に食食過程での本分子の機能が注目されている。現在までに、異物を食食した好中球に形成されるファゴソームに p57/coronin-1 が一過性に局在すること、p57/coronin-1 のファゴソームへの局在が結核菌の細胞内寄生に関与していること、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、PKC 阻害剤処理によりこの解離が阻害されるとともに、ファゴソーム-リソソーム融合が起こらないことが報告されている。これらの知見および p57/coronin-1 がアクチン結合能を有することから、本分子がアクチンフィラメントなどの細胞骨格系との相互作用を介してファゴソームの形成・成熟に積極的に関与していることが予想される。

p57/coronin-1 は 2 つの特徴的な分子内ドメイン構造を有しており、一つは N 末端から中央にかけて存在する WD-repeat と呼ばれる 5 回の繰り返し配列であ

り、もう一つは C 末端領域に存在するロイシンジッパー構造である（図 1）。これらの構造はいずれもタンパク質間相互作用を媒介していることが知られている。しかしながら、p57/coronin-1 のドメイン構造と分子機能の関係についてはほとんど解明されていない。そこで本研究では、本分子の機能ドメインについて、特にアクチンとの結合に関わる領域および多量体形成に関わる領域に焦点をあて解析した。



（図 1） p57/coronin-1 の構造

#### p57/coronin-1 のアクチン結合部位の特定

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結合配列が存在しないため、本分子のアクチン結合部位の同定を試みた。まず、p57/coronin-1 の種々の欠失変異体を大腸菌に発現させ、組換えタンパク質を精製した。これらを用いて F-アクチンとの共沈殿実験を行うことによりアクチンとの結合能を評価した。次いで、動物細胞に同様の欠失変異体を発現させ、その細胞内局在を観察しアクチンフィラメントとの相互作用を調べた。

はじめに WD-repeat を含む N 末端 1-371 番目のアミノ酸からなる欠失変異体および C 末端のロイシンジッパーを含む 372-461 番目のアミノ酸からなる欠失変異体を作製し、両者について共沈殿実験を行った。その結果 WD-repeat を含む変異体にはアクチン結合活性が認められたのに対し、ロイシンジッパーを含む変異体では認められなかった。次に、アクチン結合活性の認められた 1-371 番目のアミノ酸領域を、さらに C 末端側より順次欠失させた変異体を作製しアクチン共沈殿実験を行った結果、アクチン結合活性は WD-repeat を含まない N 末端 34 アミノ酸残基中に存在することが明らかとなった。またその結合活性は 10-15 番目の 6 アミノ酸残基 (KFRHVF) を欠失させると消失したことから、この配列がアクチンとの結合に関与すると考えられた。しかし、この N 末端 34 アミノ酸残基を含まない変異体にもアクチン結合活性が存在することがわかりアクチン結合領域は複数存在することが示唆された。そこで、欠失変異体を用いた同様な実験を行ったところ、WD-repeat 本体である 63-299 番目のアミノ酸を含む領域にアクチン結合活性が認められた。この欠失変異体についてさらに

詳しく解析したところ、111-204 番目のアミノ酸を含む領域（2 番目および 3 番目の WD-repeat が含まれている領域）にアクチン結合活性が認められた。

p57/coronin-1 の各種欠失変異体の発現プラスミドを構築し COS-1 細胞に強制発現させ、変異体および F-アクチンを免疫染色し、それらの細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果、共沈殿実験においてアクチン結合活性の認められた欠失変異体は COS-1 細胞内においても F-アクチンとの共局在が認められ、*in vitro* のアクチン結合実験と一致した結果が得られた。

以上のことより、p57/coronin-1 には N 末端領域と WD-repeat 部分に少なくとも 2 カ所のアクチン結合領域が存在することが明らかとなった。N 末端領域の結合部位については、塩基性アミノ酸に富む配列（KFRHVF）が重要であり、この配列がアクチン分子に含まれる酸性アミノ酸のクラスター部位に結合する可能性がある。

#### 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

p57/coronin-1 の C 末端には、他の coronin ファミリータンパク質には見られないロイシンジッパー構造が存在している。ロイシンジッパーはタンパク質相互作用に関与し、同一分子内での結合やサブユニット間結合に関与することが報告されている。アクチン結合タンパク質の中には、ホモ多量体を形成する分子が報告されていることから、p57/coronin-1 の C 末端領域に存在する特徴的なロイシンジッパーに注目し、この分子が多量体を形成している可能性について検討した。

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) をそれぞれ大腸菌で発現させ、組換えタンパク質を精製し、Superose 12 カラムを用いたゲル濾過を行った。得られた分画について SDS-PAGE/immunoblotting を行い、これら精製タンパク質の分子量を推定した。p57FL の分子量は 90-110 kDa と推定され、単量体の分子量 57 kDa の約 2 倍の大きさであった。p57WD の分子量は 35-45 kDa と推定され、単量体の分子量 46 kDa とほぼ一致したが、p57LZ の分子量は 20-25 kDa と推定され、単量体の分子量 11 kDa の約 2 倍の分子量であった。これらの結果から、p57/coronin-1 はホモ二量体を形成し、ロイシンジッパーを含む領域が二量体形成を担うことが示唆された。

次に、細胞内におけるロイシンジッパーを介した相互作用について検討した。

p57/coronin-1 を発現していない COS-1 細胞に p57FL および p57LZ の両者を cDNA トランスフェクション法により強制発現させ、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った。その結果、抗体結合部位の存在しない p57LZ が p57FL とともに沈降した。また、COS-1 細胞に蛍光タンパク質 (EGFP) と p57LZ の融合タンパク質 (EGFP-p57LZ) を発現させ細胞内での局在性を観察した。アクチン結合部位が存在しない EGFP-p57LZ を単独で発現させた場合には細胞質全体に分布したが、完全長の p57FL を共に発現させた場合には細胞膜下の F-アクチンとの共局在が観察された。これらの結果は、溶液中ばかりではなく細胞内においてもロイシンジッパー領域を介した分子間での相互作用が存在することを示している。

p57/coronin-1 の二量体形成におけるロイシン残基の関与を明らかにするため、ロイシン残基をアラニン残基に置換した変異体を調製した。4 残基存在するロイシンをすべてアラニンに置換した変異体および 2 残基のみをアラニンに置換した変異体を大腸菌で発現させ、ゲル濾過により分析した。その結果、いずれの変異体も二量体形成能が消失していることが判明した。

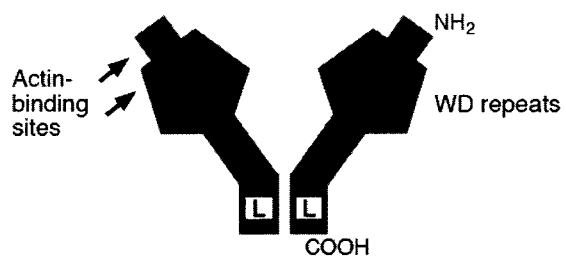
以上の結果より、p57 は C 末端領域に存在するロイシンジッパー構造を介して二量体を形成していることが明らかとなった。

#### まとめ

- 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~Glu-204) 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 末端領域に存在するロイシンジッパー構造を介して二量体を形成することが明らかとなった。

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、図 2 の模式図に示すような構造をとることが推測される。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ある。今後、本分子が PKC 依存的にリン酸化されることと PKC 阻害剤によりファゴ

ソームからの解離が阻害されることとの関連について明らかにし, p57/coronin-1  
のファゴソーム形成・成熟過程での役割を解明していきたい.



(図 2) p57/coronin-1 の二量体モデル

## 論文審査の結果の要旨

白血球による異物貪食作用は、外界より侵入した病原性微生物からの生体防御反応の第一段階であり、感染防御に重要な役割を果たしている。貪食作用は、異物の認識、細胞内への取込み、ファゴソーム（食胞）の形成、ファゴソームとリソソームの融合による異物の消化・分解などの複雑な過程を経て行われる。このような過程の個々のステップのメカニズムについては未知の部分が多い。学位申請者は、白血球に特異的に発現しファゴソームの成熟に関わるアクチン結合タンパク質である p57/coronin-1 の機能ドメインを解析することにより、貪食作用の分子メカニズムの一端を解明しようと試みた。

本研究では、p57/coronin-1がもつ2つの特徴的なドメイン構造に着目し研究を進めた。その第一は、本分子のN末端から中央にかけて存在する5回繰返しのWDリピート構造であり、立体的にはいわゆる $\beta$ プロペラ構造をとることが推定されている。第二は、C末端領域に存在するロイシンジッパー構造である。これらの構造はいずれもタンパク質間相互作用を媒介することが知られているが、分子機能との関係についてはほとんど解明されていない。このような背景から本研究では、p57/coronin-1のアクチンとの結合に関わる領域および多量体形成に関わる領域に焦点を当て解析した。

p57/coronin-1のアクチン結合部位についての研究結果は、本論文第二章にまとめられている。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結合配列が存在しないため、p57/coronin-1の欠失変異体を多数作製し、F-アクチンとの共沈殿実験およびCOS-1細胞に発現させた欠失変異体の細胞内局在を観察することにより、アクチンとの結合能を評価した。これらの実験結果より、アクチン結合活性はN末端34アミノ酸残基中に存在することが明らかとなった。また、このN末端34アミノ酸残基を含まない111-204番目のアミノ酸を含む領域にもアクチン結合活性が認められ、p57/coronin-1には少なくとも2カ所のアクチン結合領域が存在することが明らかとなった。この第二のアクチン結合領域は、2番目から3番目のWDリピート構造に対応していると推定される。さらに、N末端領域の結合部位については、10-15番目の6アミノ酸残基(KFRHVF)の欠失によりアクチンとの結合能が消失したことから、この塩基性アミノ酸に富む配列がアクチン分子に含まれる酸性アミノ酸のクラスター部位に結合する可能性が提示された。

第三章においては、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

形成についての研究結果がまとめられている。p57/coronin-1のC末端に存在するロイシンジッパー構造に注目し、本分子の多量体形成能について検討した。完全長のp57/coronin-1 (p57FL)、N末端領域およびWDリピートを含む欠失変異体 (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) を作製し、Superose 12カラムを用いたゲル濾過を行い、その分子量を推定した。その結果、p57FL および p57LZ は二量体を形成し、p57WD は単量体であることが推定された。次いで、p57/coronin-1 を発現していない COS-1 細胞に p57FL および p57LZ を発現させ、免疫沈降法により解析したところ、ロイシンジッパー構造を介した分子間相互作用が認められた。また、COS-1 細胞に蛍光タンパク質 (EGFP) と p57LZ の融合タンパク質 (EGFP-p57LZ) を発現させ、その細胞内局在を観察した。アクチン結合部位が存在しないEGFP-p57LZは細胞質全体に分布したが、p57FL を共に発現させると細胞膜近傍のF-アクチンとの共局在が観察され、p57LZ がロイシンジッパー領域を介してF-アクチン結合能をもつ p57FL と結合したことが示された。続いて、二量体形成におけるロイシンジッパー構造の直接の関与を明らかにするため、ロイシン残基をアラニン残基に置換した変異体を作製しゲル濾過法およびシヨ糖密度勾配遠心法により分析した。その結果、変異体は二量体形成能を消失しており、p57/coronin-1 の二量体形成にはC末端領域に存在するロイシンジッパー構造が必須であることが明らかとなった。

以上の研究結果より、p57/coronin-1の分子機能を司る2つのドメイン、すなわちN末端領域のアクチン結合ドメインおよびC末端領域の二量体形成に関わるドメインが同定された。さらに、本研究によって提唱されたp57/coronin-1の構造は、本分子がアクチン繊維を架橋・束化するために適したものであることを推測させ、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深く関与していることが考えられた。

本研究で得られた成果は、白血球による貪食のメカニズム、特にファゴソーム成熟の分子機序を理解するための重要な情報を提供し、病原微生物からの生体防御機構の解明に大きく貢献するものと考え、博士(薬学)の学位に十分値するものと判断した。