

論文の内容の要旨

論文題目 アクチン結合蛋白質 p57 の生物学的機能の解析

～ファゴソーム形成及びファゴソーム - ライソゾーム融合時の挙動～

氏 名 鈴木 健介

緒言

貪食（食作用）は細胞が異物を認識した後に起こす行動であり、外部からの栄養の取り込みや異物からの防御反応の最初のステップとして非常に重要な現象である。また、これは下等生物から高等生物までに保存された極めて本質的な生物の行動である。特に高等生物の免疫機構においては免疫応答の最初のステップであり、細胞性免疫及び液性免疫を誘導するために重要なステップである。貪食は多段階を経て進む現象であり、最初は異物の認識に始まり、認識された異物は細胞への吸着反応を介し、ファゴソーム形成を経て細胞内へと取り込まれる。細胞内に取り込まれた異物はファゴソーム内に存在し、その後ファゴソーム-ライソゾーム融合を介して異物の消化へと導かれる。この多段階反応の最初の認識、吸着及び異物消化のステップに関しては、これまでの研究で分子機構が明らかになってきている。一方、この異物吸着後、消化に至るステップは明らかになっていない部分が多い。このステップを明らかにすることは貪食機構全体の解明に繋がる可能性があり、更に、この機構の解明により病態を改善する医薬品が開発できる可能性も開けると考えられる。

私は、低分子量Phosphatidylinositol-specific phospholipase Cを仔牛胸腺細胞質画分より精製する過程において、細胞の運動性や貪食能に関係する可能性を持つ蛋白質を発見した。この遺伝子は粘菌のアクチン結合蛋白質、粘菌の走化性、細胞分裂及び貪食能等の動

的な制御に参与し、細胞のリーディングエッジや王冠様構造部分に発現される coronin と相同性を持つことが明らかになった。この相同性から、得られた新規蛋白質の機能を解析にすることにより、哺乳動物細胞において明らかになっていない貪食の分子機構を明らかに出来る可能性が考えられた。そこで、この新規蛋白質をその分子量より p57 と名付け、以下の解析を行った。

第 1 章 p57 の遺伝子クローニングによる構造決定

精製された p57 を酵素消化により得たペプチド断片の部分アミノ酸配列を決定した。この結果を基にプローブをデザインし、ウシ p57 cDNA を得た。以降の解析をヒト由来のサンプルを用いて行うためにウシ p57 cDNA 配列をプローブとして用い、HL60 細胞より調製した cDNA ライブラリーをスクリーニングし、ヒト p57 cDNA を得た。ウシとヒト p57 の 1 次構造には非常に高い相同性があり、また粘菌の coronin と 40% の高い相同性が認められた。これらの 1 次構造中の WD repeat 構造はウシ、ヒト及び粘菌 coronin において完全に保存されており、leucine zipper motif はウシ及びヒトのみに見られた。

第 2 章 p57 の発現部位の抗体検出による決定

p57 の発現を蛋白質レベルで確認することを目的とし、p57 1 次構造 C 末端ペプチドをウサギに免疫し、ペプチドに対するポリクローナル抗体を作製した。

抗 p57 C 末端ペプチドポリクローナル抗体はウシ、マウス及びヒトで反応性が確認された。マウスの各臓器より調製した細胞質画分を用いて Western blot を行ったところ、脳、胸腺、腸、脾臓及び骨髄にて強い発現が見られ、肺において弱い発現が見られた。これら以外の臓器において発現は見られなかった。

これらの結果から p57 は免疫担当組織で強い発現が見られ、免疫担当細胞を含むと思われる臓器（腸及び肺）においても発現が見られた。この発現パターンにより p57 は粘菌の coronin と同様に免疫担当細胞の貪食能や運動制御に関わることが示唆された。

第 3 章 p57 の in vitro における蛋白質活性の決定

Coronin との相同性からアクチン結合活性の有無の判断を目的として、F-アクチンとの共沈実験を行った。その結果、F-アクチンの共存下において p57 は沈澱し、アクチン結合活性を有することが明らかになった。

以上の結果から新規アクチン結合蛋白質 p57 は粘菌の coronin と同様にアクチン結合活性を有することが示された。

第 4 章 p57 の貪食機構における機能決定及び推定

ヒト多核白血球における貪食能と p57 の関係を調べることを目的とした。貪食能を持つ多核白血球において、オプソニン化されたターゲットは貪食され、ファゴソームを形成し、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase(NADPH)等を~~周囲~~要求し、ファゴソーム - ライソゾーム融合を経て、最終的にライソゾームにて消化を受ける。この際に形成されたファゴソーム周囲の p57 及び F-アクチンの挙動を抗ヒト p57 モノクローナル抗体を用いて解析した。オプソニン化ゼイモザンを用い、ヒト多核白血球による貪食を評価する方法を用いた。その結果、ヒト多核白血球が貪食する際に、そのファゴソーム周囲に p57 及び F-アクチンが集積することが示された。ファゴソームが形成された後は、速やかに p57 及び F-アクチンはファゴソームから解離した。また、オプソニン化されていないゼイモザンの貪食において、少量の F-アクチンはファゴソーム周囲に集積したが、p57 は集積しなかった。

これらのことから p57 は貪食時のファゴソーム形成の初期段階でファゴソーム周囲に F-アクチンと共に集積し、形成後、すぐにファゴソームから解離することが示された。また、p57 はオプソニン化ゼイモザンの貪食時にファゴソーム周囲に集積し、貪食細胞によるターゲットの貪食及びそのファゴソーム形成に関与している可能性が示唆された。

これまでの解析において p57 が一過性にファゴソームに集積することが示されたが、その挙動を制御する情報伝達機構は不明であった。ファゴソーム形成後のファゴソーム - ライソゾーム融合時に、マウス p57 ホモログがファゴソームから解離することが示されていた。このため、p57 がファゴソームから解離する際に必須とされる情報伝達機構の解析を目的とした。最初に p57 を特異的に検出するツールを得るために、リコンビナントヒト p57 蛋白質をマウスに免疫し、抗ヒト p57 モノクローナル抗体の作製を行い、これに成功した。調製した抗ヒト p57 モノクローナル抗体を使用して、以下の解析を行った。

p57 の 1 次構造に着目し、潜在的な Protein kinase C (以下 PKC と略す) によるリン酸化サイトが多数あることから、in vitro において p57 のリン酸化が PKC による可能性が考えられた。そこで、HL60 細胞を 1.25%DMSO で処理し、好中球様に分化させた後、オプソニン化ゼイモザン貪食時の p57 のリン酸化及び挙動を調べた。貪食後、15 分をピーク

として p57 はリン酸化を受け、これは p57 のファゴソームからの解離の時間とほぼ一致する結果となった。また、PKC 特異的阻害剤による p57 のリン酸化阻害によりファゴソームから p57 の解離が阻害された。更に、p57 のリン酸化阻害によりライソゾームマーカーである LAMP-1 のライソゾームへの集積が阻害され、ファゴソーム - ライソゾーム融合阻害が示された。これらのことから、p57 の PKC によるリン酸化はこの分子がファゴソームから解離するためのシグナルであると考えられた。さらに、ファゴソーム - ライソゾーム融合が起こるためには p57 のリン酸化が必要であることが示された。

総括

新規アクチン結合蛋白質 p57 を同定し、その 1 次構造が 5 回の WD-repeat 及び leucine zipper motif を有していることを示した。また、粘菌のアクチン結合蛋白質 Coronin と 40% の相同性があることを明らかにし、Coronin 様の蛋白質がほ乳類にも存在することを示した。更に p57 の発現部位は免疫応答に関与する組織に特異的であることを示した。貪食能を持つ貪食細胞において、p57 はファゴソーム形成の初期にファゴソーム周囲に F-アクチンと共に一過性に集積し、ファゴソーム形成後はファゴソームから解離することが示された。ファゴソーム - ライソゾーム融合には p57 のファゴソームからの解離が重要であり、この解離には PKC が関与しており、PKC による p57 のセリン残基のリン酸化により p57 がファゴソームから解離することが示唆された。これらの知見から、新たに発見した p57 がファゴソーム形成からファゴソーム - ライソゾームに融合に到る過程を制御する分子である可能性が高いことが明らかにされた。