

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870796

研究課題名(和文)結核菌による宿主免疫回避機構の解析

研究課題名(英文)Molecular analysis of immune evasion mechanisms by mycobacteria

研究代表者

奥 輝明 (Oku, Teruaki)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20409361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究より、p57/coronin-1のThr-412はPKC によってリン酸化されていることが明らかになった。また、結核菌の細胞内寄生性因子であるLipoamide dehydrogenase C (LpdC) のp57/coronin-1への結合は、Thr-412をアスパラギン酸に置換したリン酸化模倣体(T412D)では著しく減弱した。これらの結果より、結核菌の産生するLpdCはp57/coronin-1に結合することでPKC によるThr-412のリン酸化を抑制し、ファゴソーム成熟を抑制している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined which PKC isoforms have influence on phosphorylation of p57/coronin-1 at Thr-412 using isotype-specific PKC inhibitors and short interfering RNAs (siRNAs). The results indicate that p57/coronin-1 at Thr-412 is phosphorylated by PKC $\alpha$ . Next we prepared mutant of p57/coronin-1 at Thr-412, an Asp mutant (T412D), that mimic the phosphorylated form. To examine whether Thr-412 phosphorylation affects the interaction of p57/coronin-1 with mycobacterial lipoamide dehydrogenase C (LpdC), we conducted co-purification of LpdC with p57/coronin-1 (wild-type or T412D mutant). We observed the LpdC was associated with wild-type of p57/coronin-1 but not with T412D mutant. These results suggest that the mechanism of immune evasion by mycobacteria is inhibition of phosphorylation with PKC $\alpha$  of p57/coronin-1 at Thr-412 by binding with LpdC

研究分野：生化学

キーワード：Coronin リン酸化 結核 細胞内寄生 LpdC PKC ファゴソーム

### 1. 研究開始当初の背景

結核は最も古くから知られているヒトの感染症の1つであり、抗酸菌群に属する結核菌群 (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* 等) によって引き起こされる。罹患者・死亡者の大部分は発展途上国であるが、先進国においても、免疫抑制剤の使用患者・後天性免疫不全症 (AIDS) 患者や高齢社会などに起因し増大傾向にあることが知られている。また、交通手段の高速化・大量化・効率化によって感染者の移動も容易なことや、AIDS の世界的蔓延によってヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者が増加する中で、結核との重感染者の重症化が懸念され、「再興感染症」として注目すべき疾患となっている。抗生物質による化学療法の普及などにより、世界的な発症者・死亡者数は減少しているが、日本においては、近年横ばい状態にあり、先進国の中でも高い水準である。結核治療には薬剤の長期投与が原則とされることや、薬剤耐性結核菌の出現・蔓延などにより、新薬の開発は切望されている。

結核菌は肺胞マクロファージによって貪食されるが、マクロファージの殺菌作用に抵抗し、細胞内で生存あるいは増殖する細胞内寄生細菌である。そのため結核菌の細胞内寄生機構の解明は、結核の新規治療法の開発に必須であると考えられた。

### 2. 研究の目的

結核菌は、宿主マクロファージに貪食されるにも拘わらず、ファゴソーム内で生存することにより宿主免疫機構を回避している。この現象には、宿主マクロファージに発現する p57/coronin-1 の関与が報告されている。マクロファージは異物をファゴソーム (食胞) と呼ばれる小胞に取り込むことが知られている。ファゴソームは p57/coronin-1 により包み込まれており、通常の食作用では、この p57/coronin-1 がファゴソームから解離した後、リソソームとの融合が起こり、異物が消化・分解される。しかしながら、結核菌を取り込んだファゴソームでは p57/coronin-1 の解離が認められず、リソソーム融合が起こらないことが報告された。これらのことより、結核菌は p57/coronin-1 の機能を阻害することにより細胞内寄生性を獲得していると考えられた。

本研究では、p57/coronin-1 の制御機構を明らかにし、結核菌の細胞内寄生機構を解明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

これまでに、ヒト白血球の貪食過程において、p57/coronin-1 が一過性にリン酸化されることによりファゴソームから解離すること、p57/coronin-1 が解離した後リソソーム融合が起きること、412 番目のトレオニン残

基 (Thr-412) のリン酸化が起こることなどを報告している。また、Thr-412 のリン酸化は細胞内の脱リン酸化酵素を阻害することで検出できることを明らかにしている。さらに p57/coronin-1 はプロテインキナーゼ C (PKC) の基質になることを報告している。

#### (1) p57/coronin-1 のリン酸化に関与する PKC アイソフォームの特定【PKC 阻害薬】

ヒト骨髄球性白血病細胞株 HL60 を用いて、p57/coronin-1 の Thr-412 のリン酸化についてリン酸化 Thr-412 特異的抗体を用いたウエスタンブロットにより検討を行った。リン酸化は Calyculin A により誘導し、PKC アイソフォーム選択的阻害薬 (Chelerythrine, Calphostin C, Go6983, Go6976) による影響について解析した。

#### (2) p57/coronin-1 のリン酸化に関与する PKC アイソフォームの特定【RNA 干渉法】

p57/coronin-1 の発現プラスミドを作製し、ヒト胎児腎細胞株 HEK293T の p57/coronin-1 安定発現細胞を樹立した。この細胞に対し、PKC $\alpha$  または PKC $\beta$ 、PKC $\delta$  の small interfering RNA (siRNA) を処理した後、Calyculin A による Thr-412 のリン酸化をウエスタンブロットにより解析した。

#### (3) *in vitro* キナーゼアッセイによる p57/coronin-1 のリン酸化

抗 p57/coronin-1 抗体および Dynabeads protein G を用いて、HL60 細胞より p57/coronin-1 を精製した。アデノシン三リン酸およびホスファチジルセリン、精製 PKC $\alpha$  または PKC $\beta$ 、PKC $\epsilon$  を加え、*in vitro* における p57/coronin-1 のリン酸化解析を行った。

次に、結核菌の産生する Lipoamide dehydrogenase C (LpdC) が p57/coronin-1 に結合すること、結核菌の細胞内寄生性に関連することが報告されたので、LpdC が p57/coronin-1 のリン酸化に与える影響について検討した。

#### (4) 組換え型 LpdC と p57/coronin-1 の結合

*M. bovis* BCG のゲノム DNA より polymerase chain reaction (PCR) 法にて LpdC の遺伝子をクローニングし、Glutathione-S-transferase (GST) 融合型 LpdC (GST-LpdC) の発現プラスミドを構築した。p57/coronin-1 および GST または GST-LpdC を HEK293T 細胞に共発現させ、グルタチオンセファロースを用いたプルダウン法により、両タンパク質の結合を評価した。

#### (5) 組換え型 LpdC と変異体 p57/coronin-1 (T412D) の結合

p57/coronin-1 の Thr-412 のリン酸化模倣

体（アスパラギン酸残基置換体, T412D）の発現プラスミドを作製し, HEK293T 細胞に GST-LpdC と共に発現させた. 細胞を溶解した後, グルタチオンセファロースを用いたプルダウン法により, 両タンパク質の結合を評価した.

#### 4. 研究成果

##### (1) p57/coronin-1 のリン酸化に関与する PKC アイソフォームの特定

Calyculin A による p57/coronin-1 の Thr-412 のリン酸化に PKC アイソフォーム選択的阻害薬 (Chelerythrine, Calphostin C, Go6983, Go6976) の与える影響について解析した. 各阻害薬の効果は Table 1 に示した. 実験の結果, 今回用いた全ての PKC 阻害薬にて p57/coronin-1 のリン酸化は抑制された (Fig. 1). 使用した全ての PKC 阻害薬は PKC $\alpha$ および PKC $\beta$ を阻害するため, これら PKC アイソフォームの関与が示唆された.

	Inhibition
Chelerythrine	panPKC
Calphostin C	$\alpha, \beta/\text{II}, \gamma, \delta, \epsilon, \theta, \eta$
Go6983	$\alpha, \beta/\text{II}, \gamma, \delta, (\zeta)$
Go6976	$\alpha, \beta$

Table 1 各種 PKC 阻害薬の阻害効果

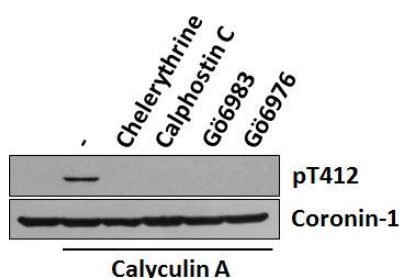
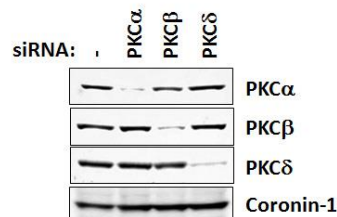


Fig. 1 PKC 阻害薬による p57/coronin-1 のリン酸化抑制効果

p57/coronin-1 のリン酸化において PKC $\alpha$  または PKC $\beta$  の関与が示唆されたため, これら PKC アイソフォームをノックダウンした細胞を用いて p57/coronin-1 のリン酸化について検討を行った. siRNA を用いた RNA 干渉を行ったが, 上述の HL60 細胞への導入効率が悪く, 効果が認められなかったため, HEK293T 細胞に p57/coronin-1 を予め発現させた細胞を使用し, PKC $\alpha$  または PKC $\beta$ , PKC $\delta$  をノックダウンした. 両細胞における PKC アイソフォームの発現は, Reverse transcription (RT)-PCR にて, 同様であることを確認した (Data not shown). これらの細胞において, siRNA 標的タンパク質の発現が抑えられていることを抗 PKC $\alpha$ , 抗 PKC $\beta$ , 抗 PKC $\delta$  抗体を用いたウエスタンブロットにより確認した (Fig. 2A). Calyculin A による p57/coronin-1 のリン酸化は, PKC $\alpha$  をノ

ックダウンした細胞においてのみ抑制された (Fig. 2B). 以上より, p57/coronin-1 の Thr-412 のリン酸化には PKC $\alpha$  の関与が強く示唆された.

##### (A)



##### (B)

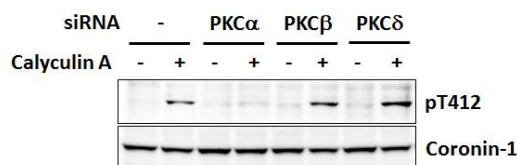
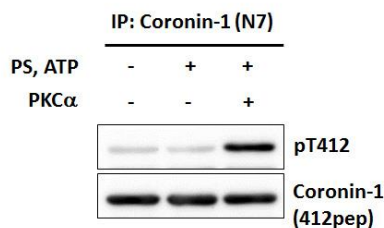


Fig. 2 PKC アイソフォームノックダウン細胞における p57/coronin-1 のリン酸化

これまでの結果より, p57/coronin-1 のリン酸化は, PKC $\alpha$  の阻害または発現抑制によって減弱することが明らかになった. そこで HL60 細胞より免疫沈降した p57/coronin-1 と PKC の標品を混合し, PKC $\alpha$  が直接 p57/coronin-1 をリン酸化するか, *in vitro* キナーゼアッセイにより解析した. その結果, p57/coronin-1 は PKC $\alpha$  によってリン酸化されることが明らかになった (Fig. 3A). また, このリン酸化は, PKC $\beta$ I や PKC $\epsilon$  では起こらないことが示された (Fig. 3B).

##### (A)



##### (B)

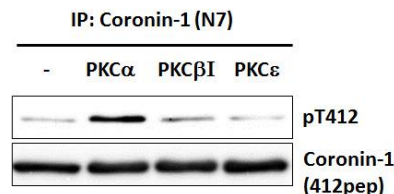


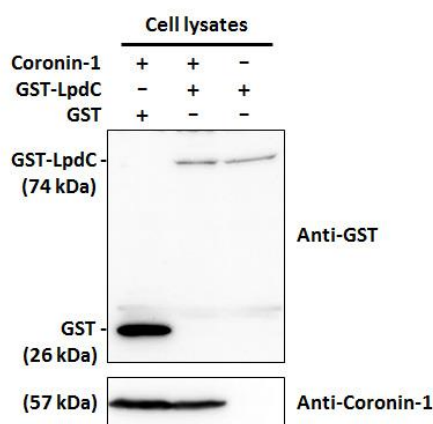
Fig. 3 *in vitro* キナーゼアッセイによる p57/coronin-1 のリン酸化

次に, p57/coronin-1 に影響する結核菌の産生する因子についての解析を行った. Daghmane *et al.* は, *M. bovis* BCG の産生する Lipoamide dehydrogenase C (LpdC) が, 結核菌の細胞内寄生性に必須であること

や p57/coronin-1 に結合することなどを報告した。しかしながら、LpdC が p57/coronin-1 のリン酸化にどのように関連しているかは不明である。そこで、*M. bovis* BCG のゲノム DNA より LpdC の遺伝子をクローニングし、組換え体の LpdC と p57/coronin-1 の相互作用について解析を行った。

GST および p57/coronin-1、GST-LpdC および p57/coronin-1、GST-LpdC のみの三種類を HEK293T 細胞に発現させた (Fig. 4A)。細胞を溶解後、グルタチオンセファロースを用いて GST および GST-LpdC を精製し、共精製される p57/coronin-1 をウエスタンブロットにより解析した。その結果、組換え型 LpdC は p57/coronin-1 に結合することが示された (Fig. 4B)。

(A)



(B)

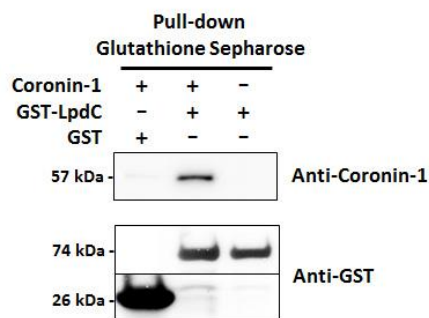


Fig. 4 GST-LpdC と p57/coronin-1 の結合

p57/coronin-1 と LpdC の結合における p57/coronin-1 の Thr-412 のリン酸化の影響について検討するため、Thr-412 をアスパラギン酸残基に置換したリン酸化模倣体 (T412D) の発現プラスミドを作製し、LpdC との結合性について野生型 p57/coronin-1 (Wt) と比較した。その結果、LpdC に結合する p57/coronin-1 の量は、Wt と比べ T412D では著しく減少していた (Fig. 5)。以上のことより、Thr-412 がリン酸化した p57/coronin-1 には、LpdC が結合できない可能性が示唆された。

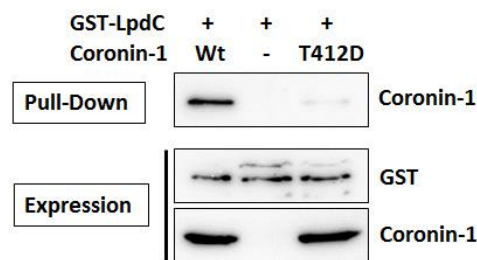


Fig. 5 変異体 p57/coronin-1 と LpdC の結合

本研究より、p57/coronin-1 の Thr-412 は PKC $\alpha$  によってリン酸化されること、結核菌の細胞内寄生性因子である LpdC は p57/coronin-1 に結合するが、Thr-412 をアスパラギン酸残基に置換したリン酸化模倣体では結合が著しく減弱することが明らかになった。これらのことより、白血球の食食過程において、PKC $\alpha$  による Thr-412 のリン酸化がファゴソームからの p57/coronin-1 の解離を引き起こすこと、結核菌の産生する LpdC は p57/coronin-1 に結合し Thr-412 のリン酸化を抑制することで、ファゴソームからの p57/coronin-1 解離およびリソソーム融合を阻害し、細胞内寄生性を獲得している可能性が考えられた。今後は、LpdC の結合した p57/coronin-1 がリン酸化されるか等の検討が必要になる。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- ① T. Oku, Y. Kaneko, R. Ishii, S. Toyoshima and T. Tsuji. Thr-412 of human coronin-1 is phosphorylated by protein kinase  $\alpha$ , 第 87 回 日本生化学会大会, 2014 年 10 月 15-18 日, 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都)
- ② T. Oku, Y. Kaneko, R. Ishii, S. Toyoshima and T. Tsuji. Thr-412 of Coronin-1 is phosphorylated by protein kinase  $\alpha$ , Experimental Biology 2014, 2014 年 4 月 26-30 日, サンディエゴ (米国)
- ③ T. Oku, Y. Ando, M. Tsuiji, S. Toyoshima and T. Tsuji, Regulation of actin-binding activity of p57/coronin-1 via its phosphorylation at Thr-412 during phagocytosis, 第 86 回 日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11-13 日, パシフィコ横浜 (神奈川)
- ④ T. Oku, Y. Ando, M. Tsuiji, S. Toyoshima and T. Tsuji, Phosphorylation of p57/coronin-1 regulates phagocytosis through the modulation of actin-binding activity, Experimental Biology 2013, 2013 年 4 月 20-24 日, ボストン (米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥 輝明 (OKU, Teruaki)  
星薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：20409361