

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06557

研究課題名(和文) GTPase活性化タンパク質ArfGAPは「出荷審査」を行うか？

研究課題名(英文) Do GTPase activating protein ArfGAPs perform "shipping inspection"?

研究代表者

芝 陽子 (shiba, yoko)

岩手大学・理工学部・准教授

研究者番号：50755866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：vWFは血管内皮細胞に発現する止血因子で、vWFの過剰分泌は血栓症を誘発するが、分泌阻害は出血傾向になる。vWFはWPBという分泌顆粒に蓄積され、外部刺激に応じてWPBは細胞膜と融合し、vWFは血液中へ分泌され、血小板と結合して血栓を作る。vWFの輸送は厳密に調節される必要があるが、輸送の機構はまだ不明である。申請者らはSMAP1とAGFG2をvWF輸送に関与する新規分子として同定した。SMAP1はWPBの分解を阻害し、AGFG2はWPBの細胞膜との融合を促進することを見出した(biology open, Sep, 9, (10), 2021)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SMAP1とAGFG2がvWFの輸送に関与するという報告は新規の発見である。特にAGFG2についてはこれまで機能がわかっておらず、vWFの分泌に関与するという本研究の報告が最初の機能に関する報告である。またSMAP1がWPBの分解を阻害するという発見はSMAP1がオートファジーを阻害して長いWPBを維持している可能性があり、分泌顆粒を維持する新規の機構である。本研究成果は血栓止血分野に貢献するとともに、分泌のメカニズムの解明に貢献した。

研究成果の概要(英文)：vWF is blood clotting factor expressed in endothelial cells. Too much secretion of vWF causes thrombosis, whereas less secretion of vWF causes bleeding tendency. Strict regulation is needed for vWF transport but its regulation has been poorly understood. We identified SMAP1 and AGFG2 as novel regulators of vWF transport. SMAP1 inhibits WPB degradation whereas AGFG2 promotes fusion of WPBs and the plasma membrane. (Biology open, Sep, 9, (10), 2021)

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ArfGAP vWF WPB 分泌顆粒 Arf

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核細胞には膜によって区画化された細胞内小器官(オルガネラ)が存在し、オルガネラ間は小胞によってタンパク質や脂質が輸送されている。積荷の選別には極めて精緻な仕組みがあることがわかってきた。積荷受容体をコートタンパク質が輸送小胞へ詰め込む過程において、申請者は ArfGAP1 が積荷受容体とコートタンパク質の組み合わせをチェックする「出荷審査」を行っていることを見出した(1-3)。ArfGAP ファミリーはヒトでは 31 遺伝子存在するが、ArfGAP1 以外の ArfGAP が「出荷審査」を行なっているかはわかっていない。

(2) von Willebrand Factor (vWF) は血管内皮細胞に発現する止血因子で、Weibel-Palade Body (WPB) という分泌顆粒に蓄積され、WPB は長い葉巻型の分泌顆粒として成熟する。その後外部刺激に応じて WPB は細胞膜と融合し、vWF は血液中へ分泌され、血小板をトラップして血栓を作る。vWF の過剰分泌は血栓症を誘発するが、分泌障害は出血傾向になるため、その輸送は厳密に調節される必要があるが、分泌調節がどのように行われているかはまだ不明である。

2. 研究の目的

AP-1 はポストゴルジでクラスリンコート小胞の形成に関与するコートタンパク質で、ArfGAP の基質である Arf によって制御される。AP-1 は vWF のゴルジ体から分泌顆粒への輸送にも関与する(4)。vWF は WPB への詰め込み過程で多量体化し、螺旋状に折り畳まれるが、どのように積荷の選別が行われているかよくわかっていない。本研究では vWF の輸送に関与する ArfGAP を同定し、vWF の選別過程を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

(1) vWF は本来血管内皮細胞に発現するが、遺伝子導入しやすい HEK293 に発現させても例外的に WPB 様構造を形成できる(5)。本研究では vWF 遺伝子を HEK293 細胞に導入し、全ての ArfGAP の siRNA を導入して WPB 様構造の形態を観察し、形態に影響を与える ArfGAP を探索した。また 2nd スクリーニングとして、1st スクリーニングで拾われた ArfGAP の siRNA を内在的に vWF を発現するヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に導入し、内在性の WPB の形態を観察して内在性の WPB に影響する ArfGAP を同定した。

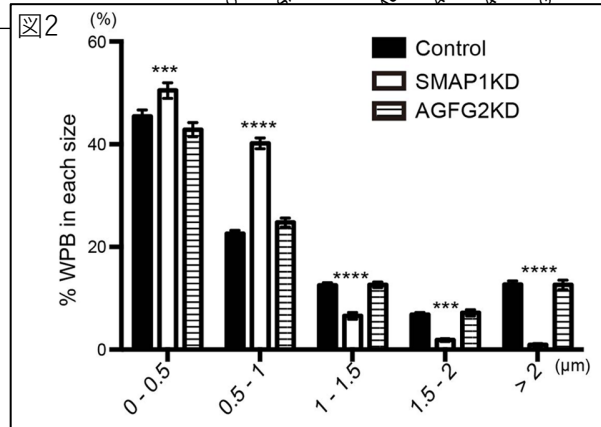
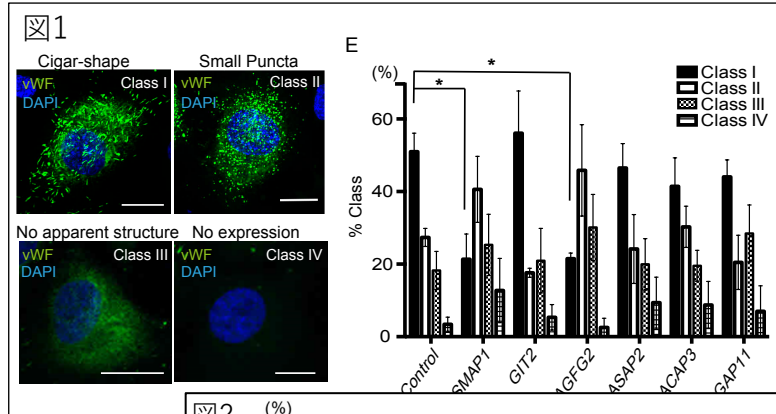
(2) 同定した ArfGAP の HUVEC における knockdown (KD) 及び HEK293 細胞で作成した knockout (KO) 細胞株について、免疫蛍光染色、透過型電子顕微鏡(TEM)で WPB の形態を観察した。また ELISA により vWF の分泌に影響があるか調べた。さらにマルチマー解析及び vWF のプロセッシングを調べることにより vWF の成熟のどの段階が阻害されているかを調べた。WPB の分解に影響しているのではないかを調べるため、リソソームの酵素の阻害剤である Leupeptin を用いて WPB の分解を調べた。

4. 研究成果

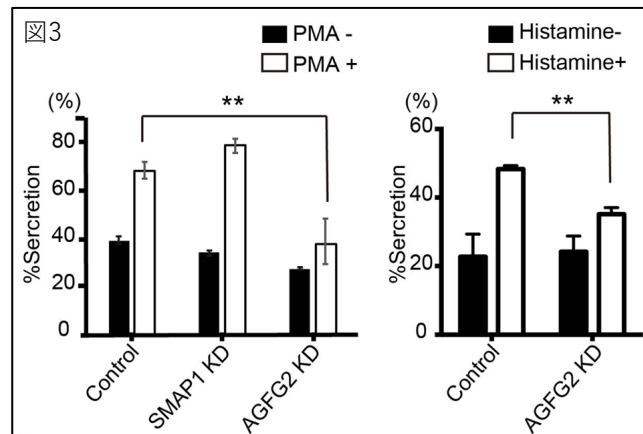
(1) 1st スクリーニングでは SMAP1、GIT2、AGFG2、ASAP2、ACAP3、AGAP11 の 6 つの ArfGAP を同定した。これら 6 つの ArfGAP の siRNA を HUVEC へ導入し、WPB の形態を観察したところ、SMAP1 と AGFG2 を同定した (図 1)。

(2) SMAP1 及び AGFG2KD 細胞で WPB の形態を免疫蛍光染色で観察し、WPB のサイズを定量した。SMAP1knockdown (KD) 細胞についてはやはり WPB のサイズが小さくなっていった。

一方 AGFG2KD 細胞では、一次抗体のインキュベーション時間を少し長くすると長い WPB を観察でき、長さを定量しても control と比べて差がなかった (図 2)。透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察したが、SMAP1KD 細胞では小さい WPB が観察され、AGFG2 では長い WPB が観察された。SMAP1 については HEK293 で KO 細胞株も作製したが、WPB が小さくなる表現型が観察されたため、siRNA のオフターゲット効果ではないことが確認できた。



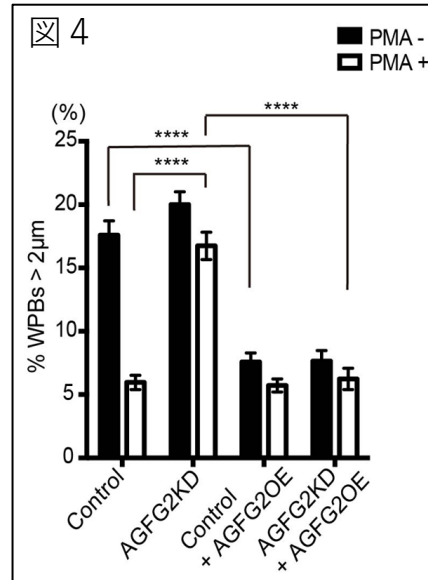
(3) HUVEC を PMA で刺激し vWF 分泌を ELISA で定量したが、SMAP1KD では変化がなく、AGFG2KD 細胞では刺激依存性の vWF 分泌が阻害されていた (図 3)。また PMA と同様ヒスタミンでも AGFG2KD 細胞の分泌が阻害されていたことから、内在的な刺激でも vWF の分泌が阻害されることが明らかとなった。



(4) SMAP1KD 細胞では vWF のマルチマー化もプロセッシングも変化がなく、WPB は成熟分泌顆粒マーカーである Rab27 もリクルートされていたため、WPB の形態は小さくなるものの、WPB の成熟は阻害されていない可能性が示唆された。

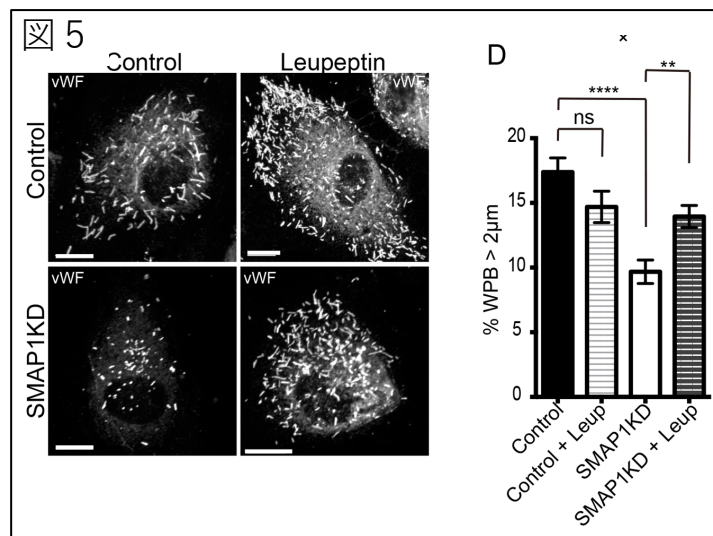
(5) AGFG2KD 細胞では、免疫染色で PMA で刺激しても WPB が細胞内に残留したままになる表現型が観察された。AGFG2 を過剰発現させると WPB が細胞内に観察されなくなるため、表現型がレスキューされたと考えられた(図4)。

(6) SMAP1KD 細胞では、vWF や WPB の成熟に影響がないのに WPB の形態が小さくなることから、WPB のリソソームにおける分解が阻害されているのではないかと考え、Leupeptin でリソソームの消化酵素を阻害したところ、SMAP1KD 及び KO 細胞の WPB の長さが回復した(図6)。このことから、SMAP1 欠損では WPB の成熟は阻害されていないが、WPB の分解が促進されていることがわかった。



<引用文献>

1. Shiba et al, Cellular Logist, 4, 139-154, 2011
2. Shiba and Randazzo, Histol and Histopath, 9, 1143-1153, 2012
3. Shiba et al, Curr Biol, 23, 1945, 2013
4. Lui-Roberts, et al, JCB, 170, 627, 2005
5. Michaux et al, BLOOD, 102, 2452, 2003



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asano Watanabe, Hikari Hataida, Naoya Inoue, Kosuke Kamon, Keigo Baba, Kuniaki Sasaki, Rika Kimura, Honoka Sasaki, Yuka Eura, Wei-Fen Ni, Yuji Shibasaki, Satoshi Waguri, Koichi Kokame and Yoko Shiba	4. 巻 10
2. 論文標題 Arf GTPase-Activating proteins SMAP1 and AGFG2 regulate the size of Weibel-Palade bodies and exocytosis of von Willebrand factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.058789	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Rika Kajiwara, Ayaka Seto, Hisayoshi Kofujita, Yoko Shiba, Yoshiyuki Oishi, and Yuji Shibasaki	4. 巻 138
2. 論文標題 Enhanced antimicrobial activities of polymerized arbutin and its derivatives prepared by oxidative polymerization of arbutin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Reactive and Functional Polymers	6. 最初と最後の頁 39, 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.02.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芝 陽子
2. 発表標題 vWFの細胞内輸送に関する 新規ArfGAPファミリータンパク質の機能解析
3. 学会等名 第43回日本血栓止血学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬場 圭吾, 芝 陽子
2. 発表標題 von Willebrand Factorの細胞内輸送におけるArfGAPの機能の解明
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kosuke Kamon, Keigo Baba, Asano Watanabe, Hikari Hataida, Naoya Inoue, Rika Kimura, Honoka Sasaki, Kuniaki Sasaki, Yuka Higuchi, Koichi Kokame, Yoko Shiba
2. 発表標題 Identification of ArfGAPs involved in formation of Weibel-Palade Bodies
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoko Shiba
2. 発表標題 How do ArfGAPs regulate cargo sorting?
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asano Watanabe, Hikari Hataida, Naoya Inoue, Rika Kimura, Honoka Sasaki, Kuniaki Sasaki, Senri Ushida, Eiji Morita, Yoko Shiba
2. 発表標題 vWF分泌顆粒形成に関するArfGAPの同定
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hataida H, Watanabe A, Sasaki K. and Shiba Y
2. 発表標題 ArfGAPs regulate the formation of secretory granules of von Willebrand factor
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 芝 陽子
2. 発表標題 ArfGAPs regulate the formation of secretory granules of von Willebrand Factor
3. 学会等名 第43回峠の会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
その他の国・地域 台湾	台湾国立高雄師範大学		