

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591230

研究課題名（和文）血小板および巨核球系ドック180ファミリーの生理的意義の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the physiological roles of DOCK180 family proteins in platelets and megakaryocytes.

研究代表者

小田 淳 (ODA ATSUSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50255436

研究成果の概要（和文）：

血小板は正常止血のみならず、病的血栓症にも関連する。血小板の機能は複雑なシグナル伝達系により制御され、これは、抗血小板薬の標的となっている。従って、血小板シグナル伝達系の研究は臨床医学上も重要である。低分子量Gタンパクの一つ rac は血小板の機能制御に深く関与する。Rac は GTP 型が活性型で GDP 型が非活性化型である。Rac を活性化型に変換するのが、rac-GDP-GTP 交換因子(rac-GEF)である。ところが、血小板の rac-GEF に関しては、極めて知見に乏しい。報告者は特異抗体を用いて、rac-GEF である DOCK180 も血小板に存在することを発見した。さらに DOCK180 と相同性の高い、DOCK5 に関しても検討を加えて、ヒト DOCK5 の二つのアイソフォームのうち、Hela 細胞に存在するタイプが血小板に存在し、A549 細胞に存在するタイプではないこと、さらに、伸展血小板では細胞質内全体に点状にこれが局在することを発見した。DOCK5 に関しても、COS7 細胞などへの強制発現実験などを通じて、これが rac-GEF であり、かつ crk や ELMO1 などと結合することなどを確認した。血小板タンパクのほとんどは巨核球由来である。従って、本研究は全く手つかずであった、血小板の DOCK180 ファミリーに関してのさらなる研究の基礎作りに寄与するものと思われる。

研究成果の概要（英文）：

Platelets play a critical role in normal hemostasis and pathological thrombosis like myocardial infarction. Their functions are regulated by complex signal transduction pathways, which, in turn, are targets of anti-platelet drugs. Thus, the studies on signal transduction in platelets are important for clinical medicine. Rac, a small molecular G-protein, is essential for several platelet functions. GTP-bound rac is functionally active, while GDP-bound one is inactive. Rac-Guanine nucleotide exchange factor (rac-GEF) is responsible for "activation" of rac. Surprisingly, little is known of rac-GEF in platelets. In this study, we found that platelets express two rac-GEFs, DOCK180 and DOCK5, in addition to previously identified Vav1. DOCK180 is a well characterized prototype of DOCK180 family GEF proteins and a bona fide rac-GEF. DOCK5 is closely related to DOCK180, but has been poorly characterized. Using specific antibodies, we found that there are two different isoforms of human DOCK5. One is expressed in platelets and Hela cells. The other is expressed in A549 cells and not in platelets. When forcedly expressed, in COS7 cells, DOCK5 is indeed a specific rac-GEF. Immunofluorescent studies revealed dot-like distribution of DOCK5 in the cytoplasm of spreading platelets. DOCK180 is known to bind to several proteins like crk and ELMO1. We found that the same is true for DOCK5. Thus, I have set the basis for further studies for DOCK180 family rac-GEF in platelets and megakaryocytes, since platelets proteins are mostly carried over from the precursor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000

年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：platelet, actin, rac, G-protein

### 1. 研究開始当初の背景

所謂メタボリック症候群が問題となるのは、主として病的血栓症の誘因となるためであり、その予防にわが国の多くの医療関係者の力が注がれている。血小板は正常止血および病的血栓症発症において決定的に重要な細胞であり、病的血栓症治療や2次予防には、広く抗血小板薬が用いられる。アスピリンに代表される既存および開発中の抗血小板薬の作用および副作用機序を理解するには血小板生物学の知識が不可欠である。従って、病的血栓症の予防および治療のためにも血小板研究の発展は大いに望まれるところである。しかし、わが国には、血小板を専門とする研究者は数少ない。血小板研究者の著しい減少は当然血小板研究の衰退に直結し、大いに憂慮される場所である。報告者はこのような現状を鑑み、わが国では数少ない血小板生物学者として一貫して研究を続けている。さて、rhoファミリー低分子量G蛋白のうち、rac1はコンディショナルノックアウトマウスの解析結果から血小板の伸展や安定な血栓形成に重要であり、rhoは巨核球の多倍体化に関与することが示唆されている。rhoファミリー低分子量G蛋白は他の多くのG蛋白と同様、GTP結合型が活性化型、GDP結合型が不活性化型である。このGTP結合型⇄GDP結合型の変換は、GTP交換因子(以下GEF)やGTPase活性化タンパク質(以下GAP)などにより制御される。驚くべきことに、Rhoファミリー低分子量G蛋白の血小板/巨核球系における重要性にも関わらず、血小板においてはVav(1~3がある)に関して研究が若干進行した以外はほとんど不明である。しかも、ノックアウトマウスの検討から、Vav2は血小板ではさほど重要ではなく、Vav1とVav3の片方ではなく、両者を欠損する血小板のみコラーゲンなどに対する応答に異常が報告されている。Vav1はracのGEFではあるが、Vav3はそうではないから、血小板においてVavが重要なracのGEFとして、コラーゲン凝集に作用しているとは結論できない。では、何がrac1のGEFとして作用するのであるか?驚くべきことに、前述のように血小板のracGEFの研究はvavファミリーに限定しており、しかもvav3はracのGEF以外の作用で血小板活性化に作用し、vav1はこれと

冗長性を有することがノックアウトマウスの系から示唆されている。即ち、racのGEFとして作用しないものと冗長性を有するということはvav1もracのGEF以外の、例えばアダプタータンパクとして機能しているのかもしれない。一方、DOCK180ファミリーも低分子量Gタンパク質の活性化因子GEFである。ファミリーメンバーはほ乳類で10種を超えているが、いずれも様々な系において極めて重要である。特に最近そのプロトタイプDOCK180(=DOCK1)はracのGEFであり、マウスで骨格筋の細胞融合に必須で、そのノックアウトマウスは骨格筋量の不足のために致死形質を有することが報告された(Laurin et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2008)。一方、申請時は、ヒトDOCK5の全長cDNAのクローニングが報告されておらず(データベースにあるものは複数の配列の張り合わせであった)、最近、ヒトでは2アイソフォームが存在することが明らかにされクローニングされた。しかし、生化学的な検討は不十分であり、極めて類似性の高いDOCK180同様racのGEFであるか否かすらも確認されていない。報告者らはヒトDOCK5の1アイソフォーム全長cDNAのクローニングに成功し、かつ特異抗体も有している(Gordon Research Conference: Cell Biology Of Megakaryocytes & Platelets, Buellton, USA, 2005で発表)。なお、このcDNAクローニングには、現札幌医科大学学生医化学講座助教、西谷千明博士のが報告者と同じ所属の大学院博士課程時の貢献が多であることを明記する。

### 2. 研究の目的

(1)DOCK5結合分子に関してヒト血小板をや細胞株を用いて検討し、その結果をDOCK180に関するそれと比較する。血小板において生化学的に検討できることはすべてなし、また、細胞染色で両者の局在を検討する。最近、Srotting Nexin5(SNX5)とDOCK180が結合することが松田道行博士の教室から報告された(2008)。報告者らは基礎実験で血小板にSNX5が極めて豊富に存在することを確認している。そこで、血小板・巨核球系で同時にDOCK5を発現することを確認済みの、A549(ヒト)、HeLa(ヒト)、C2C12(マウス)、MDCK(イヌ)

細胞で DOCK5 を RNAi を用いてノックダウンし、その細胞形態、マトリジェルなどへの浸潤能、呑食能、細胞移動能さらに SNX5 の関与する細胞内輸送などへの影響を検討する。これらの細胞は細胞生物学において汎用されているため、上記のパラメータを観察することの方法論が確立している。従って、全長の cDNA や抗体さえあれば機能的に研究が進められるが、報告者らはいずれも有している。平成 22 年度以降はさらに進んでマウス ES 細胞由来巨核球を応用した検討も加えたい。これは、既に WAVE タンパクにおいて、報告者らが用いた実績のあるアプローチである (Eto K. et al. Blood 誌 2007)。また、心筋細胞様に分化するラット H9c2 細胞や骨格筋系に分化する C2C12 細胞を用いた検討によって DOCK5 が哺乳動物の心筋細胞融合などへの関与が検討できる。骨格筋と心筋の分化において、DOCK5 に関連して、決定的な違いがあるのであるか？このような問題にも報告者らはアプローチできる。さらに、その分子的基盤を明確にするために Vav3-RhoG-ELMO 系を検討する、DOCK180 は、根岸学博士の研究室から Vav3-RhoG-ELMO 系の下流に位置し、Rac を活性化させることが報告されている。報告者らは ELMO 1 および 2 と DOCK5 が結合することも確認済みであるから、ドミナントネガティブ型の ELMO 1・2 などを用いて、H9c2 や C2C12 細胞分化において、DOCK180 および DOCK5 の関与するシグナルが明確になる。全長のヒト DOCK5cDNA を他のグループが有していないため、実に ELMO と DOCK5 が結合することすら、直接的に検討されてきていなかったのである。また、ELMO の RhoG 結合部位を GST 融合タンパクとして作成済みであり、RhoG の GTP 型を検出できる。このことにより、普遍的に発現する Vav3-RhoG-ELMO 系が H9c2 細胞の系で如何に Rac 活性化に関与するかが明らかになる。

### 3. 研究の方法

DOCK5 の結合タンパクの検出 DOCK180 同様 Crk, CrkL, ELMO1 と結合することは確認済みである。松田道行博士の研究室などから、ELMO2, SNX5, ankyrin repeat domain 28 (ANKRD28) などが DOCK180 の結合タンパクであることが報告されている。これらの cDNA を報告者らは Open Biosystems 社などから購入し所有している。そこで、報告者らは容易に ELMO2, SNX5, ANKRD28 などが DOCK5 の結合タンパクであるか、その結合による DOCK5 の変化はどうか、DOCK5 との異同があるかなどを容易に検討できる。DOCK180 報告者らは DOCK5 も DOCK180 同様ユビキチン化することをすでに確認している。既報では、ELMO1 の結合は DOCK180 のユビキチン化を抑制するというが、HA-標識ユビキチンと共同

発現させた DOCK5 のユビキチン化が ELMO1/ELMO2, などによりどのように影響されるかも容易に検出できる。また、これらのタンパクとの結合において DOCK5 と DOCK180 は競合関係にあることが予想されるがこの点も、細胞株にそれぞれのタンパクを様々な組み合わせで発現させることで容易に検討できる。このような検討が、なぜ必要であるか？報告者の抗 DOCK5 抗体および市販の抗 DOCK180 抗体を用いて、A549 (ヒト), HeLa (ヒト), C2C12 (マウス), MDCK (イヌ) 細胞は DOCK180 と DOCK5 を共に発現していることが確認されている。様々の細胞株でドミナントネガティブ型の DOCK180 の発現によりその機能が推測されている。ところが DOCK5 が DOCK180 とそのほとんどのリガンドを共有するとすれば、ドミナントネガティブ型の DOCK180 の発現により DOCK5 の機能も抑制されることが予想されるから、既報の研究の解釈に相当影響があることがこれも容易に予想される。また、既に、HeLa 細胞などでは「内因性」CrkL と DOCK5 が共沈出来ることも確認している、DOCK5 の特異抗体を有するから、このように「内因性」タンパク同士の結合も容易に検討できる。さらに、このような検討を通じて、仮に、DOCK5 と DOCK180 のリガンドに相違があれば、それこそ、この相同性の高い Rac-GEF 同士の相違を示唆するものであり、大変興味深い知見となる。これは、DOCK180 ノックアウトマウスは致死的形質を有するが、DOCK5 はそうではないという、両 GEF の相違の原因に迫る本質的研究である。従って、このような単純で地道な検討は DOCK5・DOCK180 の生理的意義の解明のためには必須であり、しかも報告者らのみが体系的検討をすることが出来る。ちなみに、マウスの単球系細胞では、RNAi を利用して DOCK5 のノックダウンが報告されていて、その RNAi の配列も公開されている。従って、C2C12 (マウス) 細胞などでは確実に同様の戦術で DOCK5 のノックダウンが出来よう。細胞の形態はどうなるか、アクチン細胞骨格への影響は？報告者らは共焦点顕微鏡などを日常的に使用しているから、容易に検討が出来る。C2C12 は 2% ウマ血清存在したでは骨格筋様に分化する、心筋同様に DOCK5 は、本系における分化にどう影響するのであるか？また、例えば、プロメガ社の P-STRIKE の系では、RNAi とコントロールのスクランブル RNAi をそれぞれは発現させた細胞を EGFP をマーカーに検出できる。蛍光顕微鏡下に Movie をとると、DOCK5 特異的 RNAi とスクランブル RNAi を発現させた細胞の移動能も簡単に比較できよう。なお、報告者らは北海道大学ニコンイメージングセンターにもアクセスでき、このような細胞培養下 Movie の記録も容易である。Rac は細胞移動能と密接に関連づ

けられてきたが、最近では異論も報告されている。このように単純に考えただけで、このC2C12細胞のみだけで、多くの実験系が組める。言うまでもないが、RNAi配列など別に既報のものを利用しなくて無数のデータベースからいくらかでも候補配列が得られるから、A549 (ヒト), HeLa (ヒト), MDCK (イヌ)の各細胞でも同様にDOCK5はノックダウンできよう。DOCK5をこれらの細胞のマトリジェルなどへの浸潤能はどうか? DOCK5とDOCK180とのこれらの細胞機能冗長性はどうか? これらの細胞は細胞生物学で汎用される細胞で、無数の系で様々な細胞機能が検討され、その方法論も確立され公開されている。どれだけの実験系が組めるのか予想がたいほどである。DOCK180はポリイノシトール燐脂質とDHR1を介して、結合する。報告者らはDOCK5のDHR1の哺乳動物および大腸菌における発現コンストラクトも作成済みであるので適当な市販のアッセイ系(各種イノシトールポリ燐脂質を固相化したメンブレンなど)を用いて、DOCK5はどのポリイノシトール燐脂質に結合して、DOCK180と比較することが出来る上に、細胞刺激時にDOCK5-DHR1がどのように細胞内移動するかも検討できる。実験全般の遂行は代表者が行い、連携研究者はコンストラクト作製を補助する。

大変興味深いことに、基礎的検討から、血小板のDOCK180やDOCK5はエンドソームに局在するばかりか、レトロマーに重要な構成要素でありDOCK180と結合するSNX5も豊富に存在することも確認している。血小板ばかりでは無く巨核球系ではにおいても全くといっていいほど小胞体輸送などは研究されていない。これらのタンパクの存在は、血小板・巨核球におけるその重要性を示唆するものかもしれない。血小板・巨核球活性化前後のDOCK5/DOCK180やSNX5の局在変化などを詳細に検討し、また、血小板SNX5の生化学的解析をWAVEタンパクなどで駆使した検討を(Oda et al., BLOOD, 2005)進め、全くの新知見をうる。

以上をまとめると、報告者らは①血小板で出きる限りの生化学的および形態的検討をおこない(Oda et al., Blood 2005), ②核の無い血小板では出来ない検討は細胞株で行い(Suetsugu et al., J. Cell Biol. 2006), ③マウスES細胞由来巨核球を用いた検討でさらに研究成果を拡大する(Eto et al., 2007)といったシステムの構築している。これはWAVE2のように、そのノックアウトマウスが致死の形質を有し、その血小板の検討が出来ない場合も有効である。

#### 4. 研究成果

(1) Rac 活性化分子 DOCK5 の C 末端に対する抗体の特徴づけをした。この抗体は血小板や様々な細胞を用いた結果から、人、マウス、犬など、様々な種の内因性 DOCK5 を認識する。伸展血小板では内因性の DOCK5 はやはり報告者がはじめて血小板に存在することを発見した DOCK180 同様、細胞質全体に点状に存在することを見出した。ところが、大変興味深いことに、全長型の FLAG 標識 DOCK5 を Cos7 細胞に発現させると、この抗体は cortical actin の共局在する DOCK5 を認識することが判明した。DOCK180 では actin 結合タンパク ERM ファミリーとの間接的結合が言われている。DOCK5 でも同様でしかも局在化に関連することが強く示唆された。すなわち、この種を超えた新規 DOCK5 抗体は、ERM ファミリー結合 DOCK5 のみ細胞染色では認識する可能性があり、当該分野の研究発展に寄与することが期待される。

(2) DOCK5 では二つの N 末端の異なるアイソフォームが存在することがデータベース上知られている。しかし、その両者がどのような組織や細胞で発現しているかについては簡便に検討する手段がこれまで知られていなかった。このことは、この二つのアイソフォームの生理的相異を検討する上で重大な障害である。報告者はその両者に共通する C 末端配列に対して作製した特異抗体を用いて、ヒト血小板、A549 (ヒト), HeLa (ヒト), C2C12 (マウス), MDCK (イヌ) 細胞の細胞溶解液を免疫プロット法でスクリーニングしたところ分子量 180kDa のバンドがいずれにも認められた。しかし、A549 に発現している、DOCK5 の cDNA から予想された N 末端の配列に対する抗体を用いたところ、A549, C2C12, MDCK 細胞の細胞溶解液では C 末端に対する抗体同様に 180kDa のバンドが認められたが、血小板および HeLa 細胞では、全くバンドが認められなかった。即ち、血小板や HeLa 細胞には A549 細胞からクローニングされた DOCK5 アイソフォームは全く発現せず、もう一方のアイソフォームのみ発現することが明らかとなった。一方、C2C12 や MDCK には、A549 細胞からクローニングされた DOCK5 アイソフォームに対応するものが発現していることが示唆された。この両抗体に認識されたバンドは、低 Mg<sup>2+</sup>存在下で、グルタチオンセファロースに固相化された GST-rac-1 により pull down され、rac の GEF である、DOCK5 を正しく認識していることが確かめられた。このように血小板や HeLa 細胞などは単一の DOCK5 アイソフォームのみ発現しており、このアイソフォームを検討するのに有用な系であることが示唆されていると同時に、DOCK5 の二つのアイソフォームのタンパクレベルの発現の簡便なスクリーニングが可能であることも示唆された。

(3) DOCK5 に関して、COS7 細胞などへの強制発現実験などを通じて、これが rac-GEF であり、かつ crk や ELM01 などと結合することなどを確認した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

①小田 淳、血小板活性化機構、脈管学、査読無、51 巻、2011、283-286

②小田 淳、ジピリダモールの抗血栓作用の機序について教えてください、血栓と循環、査読無、19 巻、2011、207-209

③小田 淳、トロンビン受容体の役割とその阻害薬への期待、循環器内科、査読無、69 巻、2011、141-146

④小田 淳、直接的 P 2 Y 1 2 阻害薬によるクロピドグレルレジスタンスの克服の可能性、血栓と循環、査読無、18 巻、2010、64-68

⑤小田 淳、佐々木 知幸、血小板の活性化と血栓形成、治療学、査読無、18 巻、2010、633-636

⑥Takizawa H, Nishimura S, Takayama N, Oda A, Nishikii H, Morita Y, Kakinuma S, Yamazaki S, Okamura S, Tamura N, Goto S, Sawaguchi A, Manabe I, Takatsu K, Nakauchi H, Takaki S, Eto K, Lnk regulates integrin alphaIIb beta3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo. J Clin Invest., 査読有, Vol.120, No.1, 2010, pp 179-190,

DOI: 10.1172/JCI39503

⑦Urushibara N, Mitsuhashi S, Sasaki T, Kasai H, Yoshimizu M, Fujita H, Oda A, JNK and p38 MAPK are independently involved in tributyltin-mediated cell death in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) RTG-2 cells. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 査読有, Vol.149, No. 4, 2009, pp 468-475,

DOI: 10.1016/j.cbpc.2008.10.109

[図書] (計 2 件)

①小田 淳、他、メディカルトリビューン、そこが知りたい抗血栓療法、2011、260

②小田 淳、他、メディカルトリビューン、脈管専門医のための臨床脈管学、2010、317

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

小田 淳 (ODA ATSUSHI)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50255436

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：