

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440071

研究課題名(和文)糖脂質マイクロドメインにおけるシグナル伝達機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of signal transduction in glycolipid microdomains

研究代表者

笠原 浩二 (KASAHARA, Kohji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・副室長

研究者番号：60250213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：SDF-1 による血小板膜を介するシグナル伝達機構の解明を目的として、脂質マイクロドメインである脂質ラフトの関与について解析を行った。SDF-1 はAkt活性化と血小板凝集を惹起した。Akt活性化はCXCR4アンタゴニストAMD3100およびAkt阻害剤 MK-2206で抑制された。SDF-1 によるAkt活性化および血小板凝集は、メチル-β-シクロデキストリン前処理でラフトを破壊すると阻害された。ショ糖密度勾配遠心法によりCXCR4は脂質ラフト画分に存在することがわかった。以上のことから、SDF-1 は脂質ラフトを介してPI3キナーゼ/Akt経路を活性化し血小板凝集を引き起こしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：SDF-1 -induced platelet aggregation is mediated through its G protein-coupled receptor CXCR4 and PI3K. Here, we demonstrate that SDF-1 induces phosphorylation of Akt at Thr308 and Ser473 in platelets. SDF-1 -induced platelet aggregation and Akt phosphorylation are inhibited by the CXCR4 antagonist AMD3100 or the PI3K inhibitor LY294002. SDF-1 -induced platelet aggregation is inhibited by pretreatment with the Akt inhibitor MK-2206 in a dose-dependent manner. Furthermore, SDF-1 -induced platelet aggregation and Akt phosphorylation are inhibited by pretreatment with the raft-disrupting agent methyl-β-cyclodextrin. Sucrose density gradient analysis shows that 35% of CXCR4, 93% of the heterotrimeric G proteins G_i-1, 91% of G_i-2, 50% of G_{βγ} and 4.0% of PI3K, and 4.5% of Akt2 are localized in the detergent-resistant membrane raft fraction. These findings suggest that SDF-1 /CXCR4 signaling in lipid rafts induces platelet aggregation via PI3K-dependent Akt phosphorylation.

研究分野：生化学

キーワード：脂質ラフト 糖脂質マイクロドメイン シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

スフィンゴ糖脂質がコレステロールとともに細胞膜上で集合して脂質ラフトと呼ばれるミクロドメインを形成し、様々な生命現象における膜を介するシグナル伝達の中継点として働いていることが明らかになり、世界的に注目を集めている[笠原浩二ら 蛋白質核酸酵素 43,2522 (1998)]。私は、脂質ラフトを介する細胞内シグナル伝達におけるスフィンゴ糖脂質機能の解明を中心に研究を進めてきた。

血液凝固時に血栓が収縮する血餅退縮という現象が知られ、フィブリン線維が血小板表面上の受容体インテグリンに結合し、その細胞質側にアクトミオシンが連結し、収縮することによって起こると考えられている。私は、フィブリン線維とアクトミオシンの連結が血小板膜上で一様におこるのではなく、限局した微小領域である脂質ラフトで起こることにより収縮に必要な細胞内シグナル伝達を可能にし、効率よく血餅退縮をおこしていることを明らかにした[Kasahara et al. Blood 122, 3340 (2013)]。しかし、その分子メカニズムをはじめ血小板脂質ラフトの機能についてはよく分かっていない。

2. 研究の目的

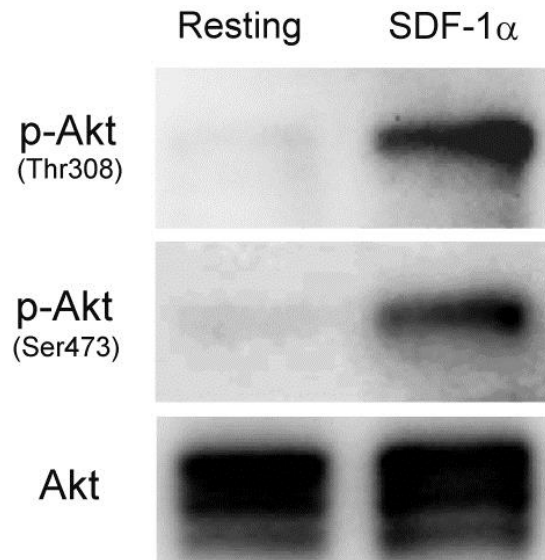
ケモカイン SDF-1 α は血小板 α 顆粒中に貯蔵され血小板の活性化に伴い放出されると、SDF-1 α 受容体 CXCR4 を発現している血管内皮や平滑筋などの前駆細胞が遊走され、血管修復が促されることが知られている。また血小板表面にも CXCR4 が発現し、血小板活性化の促進にも働いている。私は SDF-1 α による血小板膜を介する細胞内シグナル伝達機構の解明を目的として、スフィンゴ脂質ミクロドメインである脂質ラフトの関与について解析を行った。

3. 研究の方法

血小板凝集は血小板凝集能測定装置 (NBS HEMA TRACER 601) を用いて測定した。ここでは、platelet-poor plasma (PPP) の光透過率を 100% として血小板の凝集によって生じた光透過率の変化を継時的に記録した。血小板を SDF-1 α で刺激したのちにライセートを調製し、プロテインキナーゼの活性化特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法によりシグナル伝達の解析を行った。2% Methyl-beta-cyclodextrin で前処理後、37°C で 15min インキュベーションし、ラフト破壊を行った。また、ショ糖密度勾配遠心法により血小板の脂質ラフト画分および非脂質ラフト画分を調製し、CXCR4、三量体 G タンパク質およびその下流シグナル伝達分子である phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) とプロテインキナーゼ Akt の局在を調べた。さらに免疫蛍光抗体染色法により血小板表面における CXCR4 の局在を調べ、SDF-1 α によるシグナル伝達の場合について解析した。

4. 研究成果

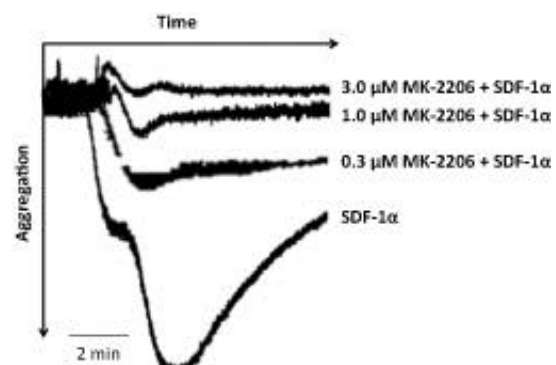
(1) SDF-1 α は濃度に依存して Akt (Thr308, Ser473) の一過性リン酸化と血小板凝集を惹起した。



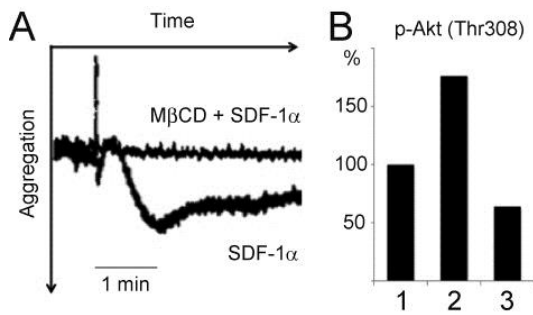
(2) SDF-1 α による Akt 活性化および血小板凝集は、CXCR4 アンタゴニスト AMD3100 および PI3K 阻害剤 LY294002 で抑制された。

(3) SDF-1 α は、Akt 上流活性化因子である phosphoinositide-dependent kinase-1 (Ser241) (PDK1 (Ser241))、Akt 基質である glycogen synthase kinase 3 beta (Ser9) (GSK3 β (Ser9)) のリン酸化を惹起した。

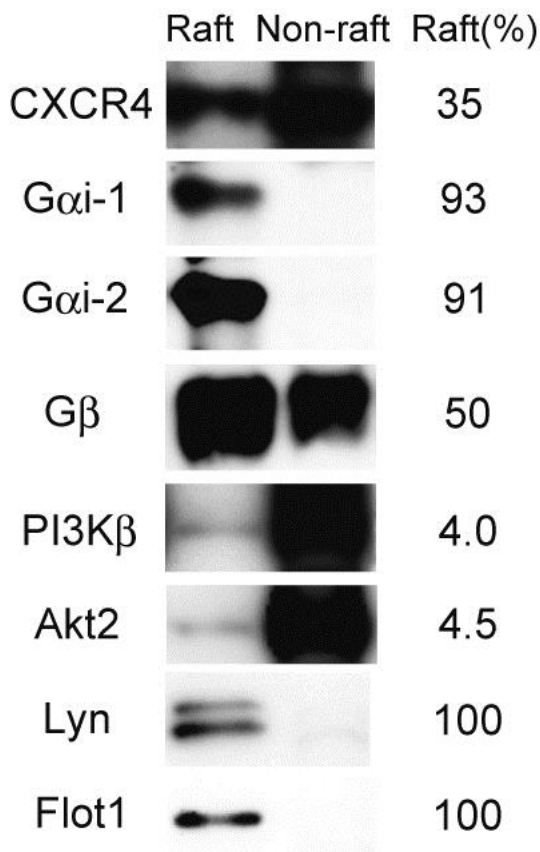
(4) SDF-1 α による血小板凝集は、Akt 阻害剤 MK-2206 により濃度に依存して抑制された。



(5) SDF-1 α による Akt 活性化および血小板凝集は、Methyl-beta-cyclodextrin (M β CD) 前処理で脂質ラフトを破壊すると阻害されたことから (下図 B, lane 3)、脂質ラフトの関与が示唆された。



(6) ショ糖密度勾配遠心法により、CXCR4 (35%) と三量体 G タンパク質 $G\alpha i1$ (93%), $G\alpha i2$ (91%), $G\beta$ (50%) および PI3 キナーゼ $p110\beta$ (4.0%), Akt2 (4.5%) が血小板の脂質ラフト画分に存在することが確認された。



SDF-1 α による血小板凝集と Akt のリン酸化が CXCR4 アンタゴニスト AMD3100 および PI3K 阻害剤により抑制されたことより、SDF-1 α による血小板凝集のシグナル伝達は SDF-1 α 受容体 CXCR4、PI3K を介して起こっていると考えられる。また、Akt の阻害剤 MK-2206 によっても血小板凝集が抑制され、Akt 上流活性因子である PDK1 (Ser241) のリン酸も抑制した。これより SDF-1 α による血小板凝集が Akt を介して起こっていると考えられる。これまで血小板凝集において Akt は間接的な役割をしていると考えられてきた。今回の結果より、SDF-1 α が Akt の活性化と Akt の基質である GSK3 β のリン酸化を引き起こすことが示唆される。Akt を介した GSK3 β (Ser9) のリン酸化は恒常的なキナーゼ活性を抑制する。GSK3 β 対立遺伝子欠損マウスの血小板では、アゴニスト誘発の凝集や分泌に特異的であることより、GSK3 β は血小板凝集調節において負の役割をしている。よって、SDF-1 α による GSK3 β (Ser9) のリン酸化は血小板の凝集に関与していると考えられるが、Akt を介した SDF-1 α による血小板のメカニズムはまだ明らかになっていない。

SDF-1 α は脂質ラフトに局在する CXCR4/三量体 G タンパク質を介して PI3 キナーゼ/Akt 経路を活性化し血小板凝集を引き起こしていることがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

①Ohtsuka H, Iguchi T, Hayashi M, Kaneda M, Iida K, Shimonaka M, Hara T, Arai M, Koike Y, Yamamoto N, Kasahara K. (2017) SDF-1 α /CXCR4 signaling in lipid rafts induces platelet aggregation via PI3 kinase-dependent Akt phosphorylation.

doi: 10.1371/journal.pone.0169609
PLoS One 12(1): e0169609 (査読あり)

②Iguchi T, Kasahara K. (2017) G alpha o Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd Edition Springer Sangdun Choi Eds. doi: 10.1007/978-1-4614-6438-9_101497-1 (査読あり)

③Kawaguchi M, Kitajima K, Kanokoda M, Suzuki H, Miyashita K, Nakajima M, Nuriya H, Kasahara K., Hara T. (2016) Efficient production of platelets from mouse embryonic stem cells by enforced expression of Gata2 in late hemogenic endothelial cells.

doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.140

Biochem Biophys Res Commun. 474(3):462-8.

(査読あり)

④ Murate, M., Abe, M., Kasahara, K., Iwabuchi, K., Umeda, M., Kobayashi, T. : Transbilayer lipid distribution in nano scale. *J Cell Sci* 128(8):1627-1638, 2015 doi:10.1242/jcs.163105 (査読あり)

⑤ Kasahara K. : Raft signaling. *Glycoscience: Biology and Medicine* Springer Endo T, Seeberger PH, Hart GW, Wong CH, Taniguchi T. Eds. pp1185-1190, 2015 doi: 10.1007/978-4-431-54836-2_81-1 (査読あり)

⑥ Hayashi M, Kasahara K : Blood Coagulation Factor XIII : A Multifunctional Transglutaminase Transglutaminases Chapter 15(Editor; Kiyotaka Hitomi and Soichi Kojima) Springer pp333-346 2015 doi: 10.1007/978-4-431-55825-5_15 (査読あり)

⑦ 笠原浩二 : 「NMDA 型グルタミン酸受容体の生理機能」 *Clinical Neuroscience 臨床神経科学* 中外医学社 33(1) 22-24, 2015 <https://www.fujisan.co.jp/product/1281683673/b/1232749/> (査読あり)

[学会発表] (計 11 件)

① 小松谷啓介、井口智弘、川島育夫、武田泰生、霜田靖、杉浦信夫、前田信明、笠原浩二 : TAG-1 リガンド/ホスファカンのコンドロイチン硫酸 CSC による小脳顆粒細胞反発作用 第 90 回日本生化学会大会 2017.

② Iguchi T, Komatsuya K, Kawashima I, Takeda Y, Shimoda Y, Sugiura N, Maeda N, Kasahara K. : Repulsive effect on cerebellar granule cells by chondroitin sulfate (CS)-C of phosphacan, a TAG-1 ligand 理研国際シンポジウム Internatinal Symposium System Glycobiology and Beyond. 2017.

③ Kasahara K. : Fibrin Clot Retraction is Mediated by Platelet Membrane Rafts 1st Korea-Japan Bioactive Lipid Joint Symposium, 2016.

④ 笠原浩二、本家孝一 : 血小板スフィンゴ脂質ドメイン/脂質ラフトを介する血餅退縮メカニズム タイムシグナルと制御シンポジウム 2016.

⑤ 林もゆる、兼田瑞穂、大塚拓子、下仲基之、山本正雅、笠原浩二 血餅退縮における硫酸

化スフィンゴ糖脂質スルファチドの機能 第 38 回日本血栓止血学会 2016.

⑥ 井口智弘、林もゆる、兼田瑞穂、大塚拓子、下仲基之、山本正雅、山下竜幸、本家孝一、笠原浩二 血餅退縮における硫酸化スフィンゴ糖脂質スルファチドの機能解析 第 89 回日本生化学会大会 2016.

⑦ 笠原浩二 : フィブリンの血小板脂質ラフト移行と血餅退縮 首都大バイオコンファレンス 2015

⑧ 大塚拓子、林もゆる、下仲基之、山本正雅、笠原浩二 : ケモカイン SDF-1 α の血小板スルファチドラフトを介するシグナル伝達の可能性 第 34 回日本糖質学会年会 2015.

⑨ 大塚拓子、兼田瑞穂、下仲基之、山本正雅、笠原浩二 : ケモカイン SDF-1 α の血小板脂質ラフトを介するシグナル伝達 第 37 回日本血栓止血学会学術集会 2015.

⑩ Kasahara K : Clot retraction is mediated by factor XIII-dependent fibrin- α II β 3-myosin axis in platelet sphingomyelin-rich membrane rafts. BIT' s 5th World Gene Convention, 2014. (invited)

⑪ 笠原浩二 : フィブリンの血小板脂質ラフト移行と血餅退縮 第 19 回 近畿血栓症研究会 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 浩二 (KASAHARA, Kohji)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・副室長

研究者番号 : 60250213