

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19591092
 研究課題名 (和文) 血小板低分子量 G タンパク調節因子研究の創生
 研究課題名 (英文) Mechanisms of the regulation of small G-proteins in platelets.
 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
 50255436

研究成果の概要：現在，日本国民の関心の高い生活習慣病がなぜ問題であるかという点，心筋梗塞などの病的血栓症の原因になるからである．病的血栓症の発症に中心的な役割を果たすのが，血小板である．そこで，血栓症の治療に血小板の機能を抑制する薬物（抗血小板薬）が使用される．しかし，その効果は限定的である．血小板の機能は複雑なシグナル伝達によって制御されている．この複雑なシグナル伝達の解明は新たな抗血小板薬の候補探しに有用であることが期待される．本研究の理念はこのようにわが国の病的血栓症治療に基礎的に貢献することである．具体的には，どの細胞でも重要な低分子量 G タンパクとその調節因子に関する研究を進め，低分子量 G タンパク rac の下流に位置するタンパク WAVE が血小板の伸展に重要なことを明らかにし，また，別の低分子量 G タンパク arf の調節因子 GIT1 の Nck による新たなリン酸化機構を明らかにするなど，研究目的に沿った研究成果を挙げた．

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
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：内科臨床医学・血液内科学

キーワード：血栓・止血学

1. 研究開始当初の背景

血小板は正常止血および病的血栓症において決定的に重要な細胞であり，最近，特に注目されるメタボリック症候群は主として病的血栓症の原因となるため，その予防に多くの医療関係者の力が注がれている．また，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．代表申請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継続している．血小板機能制御

には低分子量 G タンパク質 (以下 LMGP) の rap1b, rac, rho や Arf などが重要であることが判って来ている。即ち, rac は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, Arf に関しては最近, ようやく Arf6 がコラーゲン惹起血小板活性化に関与するという報告がなされているが (Choi et al., Blood, 2006), 血小板における Arf GAP に関する論文を発表したのは寡聞にして申請者ら以外に知らない。LMGP は 3 量体 G タンパク質と同様, 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が, 血小板においては rac の GEF である Vav に関して研究が若干進化した以外はほとんど不明である。Arf (ADP-ribosylation factor) は細胞内輸送, 細胞増殖因子受容体のサイクリング, アクチン細胞骨格改変などに決定的な役割を果たしている。Arf は単独では GTPase 活性を欠き, その制御には GTPase 活性化タンパク質 (Arf-GAP) が必須である。前述のごとく, これまで, 血小板の Arf-GAP 存在を唯一論文発表したのが申請者らである (J. Biol. Chem. 2003)。申請者は複数の血小板の Arf-GAP の存在を確認し, さらに特異抗体や cDNA など独自の試薬を多く有している。本研究の目的は血小板生化学の分野に Vav 以外の Rac の GEF や Arf-GAP 研究を創生することである。

Arf-GAP 関連事項。細胞生物学全体からみた低分子量 G タンパク質 Arf (ADP-ribosylation factor) および Arf GAP (GTPase 活性化タンパク質) の重要性を鑑みると, 血小板における Arf-GAP 研究のほとんど完璧なまでの, 「欠如」は実に驚くべきことである。申請者は質量分析と特異抗体を用いて ASAP1 (Oda et al., 2003), ASAP2, ARAP1 さらに GIT1 という 4 者の Arf-GAP の存在を確認済みである。後 3 者に関しては血小板分野に一切, 論文発表された既往研究が存在しない。しかも ASAP2 および ARAP1 に関しては市販の抗体も存在しないが, 申請者は特別注文抗体を有している。申請者らは, 血小板生化学で用いられる各手技に通暁している。従って, 1) 細胞染色による血小板内の当該タンパク質の局在の検討や, 2) リン酸化, 3) 他のタンパク質との相互作用, 4) カルパインによる切断, 5) Triton X-100 不溶性画分 (所謂, 細胞骨格) への移行など可能な限りの実験をする。勿論, これらの cDNA も有している。従って, 核の無い血小板を用いては, 再現できない実験は細胞株にタンパク質を発現させ, 検討することもできる。

GIT1 は血小板において細胞接着班にある

ことを見出している, 上記内容 1) - 5) はすでに検証済みである。GIT1 は血小板でも細胞株でもチロシンリン酸化酵素 FAK によりリン酸化され, しかもこれがアダプタータンパク Nck の SH (src homology) 2 ドメイン結合サイトを形成し, Nck を介してリン酸化酵素 PAK 2 と結合するという全く報告のない知見を得ている。Nck 結合タンパク質 N-WASP との GIT1 の関連性のなども検討することにより, 細胞接着班にある重要シグナル分子 GIT1 さらにはがん遺伝子 Nck の細胞形質転換機構に関する新規知見の集積が期待される。このようにして, 正常細胞である血小板は本研究の基盤であるが, それを用いてしがたい研究は自在に他の細胞に組み換え型遺伝子を導入・目的のタンパクを発現させ, その生理的意義を追求するという本研究の一特徴がここにもある。

全長 ARAP1 の結合タンパク質の 1 つは CD2AP (ヒトの腎臓疾患にも関与する重要分子である) である。ARAP1 のほとんど唯一の論文は Miura らの Mol. Cell (2003) 誌に掲載されたものである。この報告で用いられた cDNA は N 末端の富プロリン領域を欠き, CD2AP (の SH3 を介している) にも結合できない部分長の ARAP1 をコードするものである。申請者は全長 cDNA を有し, Cos 7 細胞の発現実験で, 全長の ARAP1 は CD2AP に結合するが, 既報の部分長のものとは予想通りしない。しかも, 血小板 lysate から内因性 ARAP1 と CD2AP が共沈する。その上, やはりアダプタータンパク質 CrkL も全長の ARAP1 には結合するが, 既報の部分長のものには結合しない。全く報告のない ARAP1 の血小板に関する検討と, やはり報告のない ARAP1 の新規タンパク質相互作用の生理的意義の検討を行い, 新知見を得る。

ASAP1 についての研究も, そのパキシリンとの結合が全てが FAK・Pyk2 を媒介する間接的なものであるなどの新知見を得て, 深化させつつある (本年 6 月の国際生化学・分子生物学会 (於 京都) 発表

新規 Rac GEF である DOCK5 関連事項。

低分子量 G タンパク質 Rac を活性化させる作用を有する DOCK180 類似分子である DOCK5 の cDNA のクローニングに成功し, しかも既に特異抗体の作製にまで成功して報告している (小田 淳ら。平成 16 年 10 月 生化学会大会ワークショップおよび Gordon Research Conference: Cell Biology Of Megakaryocytes & Platelets, Buellton, USA, 2005 で発表)。Mg²⁺イオン非存在下で Rac に結合し, CDC42 や Rho とは結合しない (特異的 Rac GEF の特徴) こと, DOCK180 同様 EKMO1 に結合することなど, 既に確認済みである。DOCK180 は最近, 細胞生物学全体でも

注目の的である非典型的 Rac GEF ファミリーのプロトタイプである。DOCK5 は実にアミノ酸レベルで DOCK180 と 60%以上の一致を認めているうえに、このように EKMO 1 に結合する結合する性質も共通していることから、これまで、ドミナントネガティブ型 DOCK180 として使用されてきた組み換えタンパクは DOCK5 も抑制することが予想され、これまでの研究解釈の一部は再検討が必要であろう。さらに、申請者らは多くの細胞株をスクリーニングするうちに Hela 細胞に DOCK5 が豊富に発現していることを見出した。大変興味深いことに、DOCK5 の一部は、Hela 細胞の adherens junction に密に存在している。近年、rac が abi タンパク・WAVE タンパク系を介して adherens junction のアクチン細胞骨格制御に重要であることが示唆されているが (Grove M, et al., Mol Cell Biol. 2004;24:10905), その際、Rac を制御する Rac GEF は不明である。adherens junction に密に存在している DOCK5 こそ、そのような Rac GEF の候補であり、Hela 細胞に DOCK5 を過剰発現させたり、RNAi で発現低下させることにより、この仮説は比較的容易に検証可能である。勿論、このような実験は全長 cDNA および特異抗体を有している申請者だけが検証できる。また、東大医科学研究所 江藤浩之 博士らとの共同でマウスの ES 細胞由来巨核球にて WAVE タンパクを RNAi の手法で発現を減弱させ、その意義を発表している (日本血液学会総会, 2006, 於 福岡)。この系を用いて、より血小板に近い系で DOCK5 の生理的意義が検討できよう。

2. 研究の目的

独自試薬を駆使して、血小板、細胞株、マウス ES 細胞由来巨核球を使用して、単に血小板で最初のということだけでなく、広く、細胞生物学全体にも波及できるような ARAP1, ASAP1, 2, GIT1 や DOCK5 などの LMGP の制御分子に関する独創的知見を得る。

3. 研究の方法

低分子量 G タンパク Arf 調節因子 GIT1 は血小板において細胞接着班にあることを見出している、1)細胞染色による血小板内の当該タンパク質の局在の検討や、2)リン酸化、3)他のタンパク質との相互作用、4)カルパインによる切断、5) Triton X-100 不溶性画分(所謂、細胞骨格)への移行などの検討はすでに検証済みである。GIT1 は血小板でも細胞株でもチロシンリン酸化酵素 FAK によりリン酸化され、しかもこれがアダプタータンパク Nck の SH(src homology)2 ドメイン結合サイトを形成し、Nck を介してリン酸化酵素 PAK 2 と結合するという全く報告の

ない知見を得ている。しかもそのチロシンリン酸化部位の変異体を哺乳動物で発現できるコンストラクトも作成済みであり、Nck 結合タンパク質 N-WASP との GIT1 の関連性のなども検討することにより、細胞接着班にある重要シグナル分子 GIT1 さらにはがん遺伝子 Nck の細胞形質転換機構に関する新規知見の集積が期待される。

4. 研究成果

①細胞の葉状仮足の形成には低分子量 G 蛋白 Rac に加え、Arf については Arf-GAP も関係が深い。研究代表者らは以前から科学研究費補助金を有効に活用し、血小板葉状仮足に WAVE2 や abi-1 などがあることを報告した (Blood 誌 2005)。これらのノックアウトマウスは胎生期に死亡するため、その血小板について研究することは困難である。今回は、研究代表者ら東大医科学研究所 江藤浩之 博士らと、血小板の Rac の生理的意義を検討するために、マウス ES 細胞由来巨核球の WAVE2 や abi-1 をノックダウンし、Rac と関係が深い葉状仮足の形成に両者が必須の役割を果たしていることを証明した (Blood 誌 2007)。しかも、これらの蛋白は巨核球系造血にも関係が深いことが観察された。

②GIT1 は Arf-GAP であると同時に、様々の足場の蛋白として作用する重要な蛋白である。研究代表者らは、この GIT1 が血小板においてインテグリン刺激などで第 392 チロシン残基がリン酸化され、しかも、このリン酸化により、がん遺伝子産物 Nck の結合サイトが GIT1 上に形成されることを明らかにした上に、Rac の活性化因子 DOCK5 のクローニングに関して報告した (2007, 日本医学会総会にて発表)。この GIT1 が血小板においてインテグリン刺激などで第 392 チロシン残基がリン酸化され、しかも、このリン酸化により、がん遺伝子産物 Nck の結合サイトが GIT1 上に形成されることを明らかにした上に、これが類似する GIT2 にも共通する減少であることを証明した (2008, 日本生化学会大会にて発表)。

このように申請代表者は本研究課題の申請書に忠実に則り、血小板の低分子量 G タンパクおよびその調節因子に関して一定の成果を挙げた。

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 5 件)

1. Urushibara 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.*,2009 (印刷中) (査読あり)

2. Nogami W, Yoshida H, Koizumi K, Yamada H, Abe K, Arimura A, Yamane N, Takahashi K, Yamane A, Oda A, Tanaka Y, Takemoto H, Ohnishi Y, Ikeda Y, Miyakawa Y. The effect of a novel, small non-peptidyl molecule butyzamide on human thrombopoietin receptor and megakaryopoiesis. *Haematologica.* 93:1495-504, 2008 (査読あり)

3. Wakao H, Wakao R, Sakata S, Iwabuchi K, Oda A, Fujita H. In vitro induction of natural killer T cells from embryonic stem cells prepared using somatic cell nuclear transfer. Wakao H, Wakao R, Sakata S, Iwabuchi K, Oda A, Fujita H. *FASEB J.* 22:2223-2231, 2008 (査読あり)

4. Eto K, Nishikii H, Ogaeri T, Suetsugu S, Kamiya A, Kobayashi T, Yamazaki D, Oda A, Takenawa T, Nakauchi H. The WAVE2/Abi1 complex differentially regulates megakaryocyte development and spreading: implications for platelet biogenesis and spreading machinery. *Blood.* 110:3637-3647, 2007 (査読あり)

5. Wakao H, Kawamoto H, Sakata S, Inoue K, Ogura A, Wakao R, Oda A, Fujita H. A novel mouse model for invariant NKT cell study. *J Immunol.* 179:3888-3895, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計 3件)

1. 佐々木知幸, 小田淳 (2/7) : Adaptor Nck1 induces increased tyrosine phosphorylation of GIT2. 第81回日本生化学会大会 (2008, 12, 14, 神戸国際会議場)

2. 小田淳ら (1/2) : 血小板シグナル分子の同定と特徴づけの戦略. 日本血栓止血学会第30回学術集会, 学術推進 SPC シンポジウム (2007, 11, 16 志摩)

3. 小田淳ら (1/6) : 有望な標的分子 日本医学会総会 ひとP-23 (2007, 4, 7 大阪)

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

なし

(3) 連携研究者

漆原 範子 (URUSHIBARA NORIKO)

北海道大学・大学院水産科学研究院・博士
研究員

研究者番号: 80396308