

機関番号： 24402

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2008～2010

課題番号： 20590544

研究課題名 (和文) 血小板造血シグナル伝達経路のプロテオミクス解析

研究課題名 (英文) Proteomic analysis of thrombopoietin signaling

研究代表者

中尾 隆文 (NAKAO TAKAFUMI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号： 50326261

研究成果の概要 (和文)：血小板造血において最も重要な役割を果たすトロンボポエチンシグナル伝達経路において重要な役割を果たす分子を探索するため、セリン・スレオニンキナーゼ Akt にタグを付加した分子を開発し、トロンボポエチン刺激によって巨核球内で Akt と相互作用を行う分子を質量分析の手法を用いて解析する系を樹立した。この系を用いて Akt と相互作用する分子を単離することには成功したが、巨核球内でトロンボポエチン依存性に Akt と結合する未知の蛋白を見いだすには至らなかった。

研究成果の概要 (英文)：

Thrombopoietin is the most important cytokine for thrombopoiesis. The importance of thrombopoietin signaling is immediately apparent; morbidity and mortality from bleeding due to moderate to severe thrombocytopenia is a major problem of a wide range of patients. The aim of this study is to find the molecules that interact with Akt, serine-threonine kinase which plays a crucial role for megakaryocytopoiesis, in human hematopoietic cells. To this end, we established the affinity purification and proteomic analysis to elucidate the role of Akt signaling in megakaryocytopoiesis. However, we could not detect Akt-binding protein under thrombopoietin-dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 境界医学・応用薬理学

キーワード： ファーマコゲノミクス、プロテオーム、細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

血小板の前駆細胞である巨核球は多倍体化(細胞分裂を伴わずに核が成熟し、8~128倍体の細胞になる)の末にその細胞質を血小板として放出するという特徴的な分化・成熟過程をたどる。現在までに巨核球中の Jak/STAT 経路、MAP キナーゼ経路、

PI3K/Akt 経路などが血小板造血に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。その中でもセリン/スレオニンキナーゼ Akt とその下流に位置する分子群が巨核球の増殖において極めて重要であり (*J Biol Chem* 2001;276:34473-9)、抗癌剤治療との関わりにおいても、血小板の前駆細胞である

巨核球の Akt を活性化することにより、抗癌剤による巨核球のアポトーシス誘導を阻止できることが示されている (*Cancer Res* 2007;67:4767-4773)。我々も近年、ノックアウトマウスを用いた解析で、巨核球の増殖、分化には Akt とその下流に位置する転写因子 FOXO3a が重要な役割を果たしていることを見いだした (*Cell Cycle* 2008;15:257-266)。このように血小板造血における Akt の重要性は次第に明らかとなってきたが、巨核球において Akt と相互作用する分子群のネットワークは未だ完全に解明されているとは言えないのが現状で、これらシグナル伝達分子をターゲットとした治療薬の開発は未だ実現に至っていない。

2. 研究の目的

巨核球の細胞内シグナル伝達をより詳細に解明するべく、そのキー分子である Akt に結合する分子を網羅的に同定する系を樹立する。最終的な目的は、樹立した系を用いてトロンボポエチン刺激時の Akt のインターラクトーム解析 (包括的な相互作用解析) を行い、Akt 活性化時に結合する分子群を包括的に同定することで血小板造血に寄与する巨核球内分子ネットワークを明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1) 分子タグを付加した遺伝子組換え型 Akt の作製

大腸菌を用いた遺伝子組み換え技術によって野生型 Akt および、酵素活性欠失型変異体 Akt を作製し、N 末端に Strep tag を付加した。

(2) 組換え型 Akt を安定発現した巨核球系細胞株の樹立

ヒト巨核球系細胞株 UT-7/TPO は急性巨核球性白血病 (AML M7) の患者検体より樹立されたトロンボポエチン依存性細胞株で、巨核球としての性質を強く持っており、巨核球の研究に最もよく用いられる細胞株の一つである。このヒト巨核球系細胞株 UT-7/TPO に (1) で作製した遺伝子組換え型 Akt をリポフェクション法にて導入し、ネオマイシン下にて培養することにより、遺伝子組換え型 Akt を安定的に発現している細胞株 (UT-7/TPO/Akt-Strep) を樹立した。発現していることの確認はウエスタンブロット法で行った。

(3) 遺伝子組換え型 Akt と結合した分子群の精製

遺伝子組換え型 Akt を安定的に発現した巨核球系細胞株である UT-7/TPO/Akt-Strep を 100ng/ml の組換え型ヒトトロンボポエチン (TPO) にて刺激した。刺激後および未刺激

の細胞よりタンパクを抽出し、Strep-tag に対して特異的に結合する Strep-Tactin が充填されたカラム (Gravity flow Strep-Tactin Superflow column 5 ml bed volume) にてカラム精製を行い、2.5 mM desthiobiotin を用いることで Akt および、Akt に結合している蛋白群を溶出した。得られた蛋白群は 2-メルカプトエタノールを含有したサンプルバッファーで処理することにより蛋白間の結合を解消した。

(4) 精製された分子群の展開

精製後、結合を解消された蛋白群を二次元電気泳動ゲル (pH3-11) に展開し、Akt に結合している蛋白群を個々の蛋白に分離し、このゲルを銀染色することにより、蛋白を可視化した。トロンボポエチン刺激により特異的に出現した蛋白を確認する。

(5) Akt 結合分子の質量分析計による同定

銀染色を行ったゲルより、目標の蛋白のスポットを抜き出した後、脱色液 (15 mM フェリシアン化カリウム、50 mM チオ硫酸ナトリウム) にて脱色した。ゲル片をアセトニトリルにて脱水した後、還元液 (10 mM DTT、25 mM 炭酸水素アンモニウム) にて 56°C で 1 時間振とうすることで還元した。さらに洗浄用バッファー (25 mM 炭酸水素アンモニウム) にて洗浄した後、アルキル化液 (55 mM ヨードアセトアミド、25 mM 炭酸水素アンモニウム) 中で 45 分間振とうしてアルキル化を行った。洗浄用バッファーにて洗浄した後、50% アセトニトリルにて脱水を繰り返し、減圧濃縮遠心エバポレーターにてゲルを乾燥させた。10 µg/ml トリプシン/25 mM 炭酸水素アンモニウムを乾燥したゲルにしみ込ませた後、37°C で 12 時間、ゲル内消化を行った。抽出液 (50% アセトニトリル 5% トリフルオロ酢酸) を加えて振とうを繰り返し、消化ペプチド断片を溶出後、減圧濃縮遠心エバポレーターにて濃縮した。濃縮したペプチド溶液を Zip Tip C18 (Millipore) にて精製した後 0.1% トリフルオロ酢酸 /50% アセトニトリルにて溶出した。ターゲットは AnchorChip™ 600 (BRUKER DALTONICS) を、マトリックスは HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) を使用し、ペプチドサンプル、HCCA の順に乗せた後、風乾させた。さらにエタノール、アセトン、0.1% トリフルオロ酢酸混合液を添加して再結晶化を行った後、質量分析計 Ultraflex TOF/TOF (BRUKER DALTONICS) にて解析した。キャリブレーションスタンダードは peptide calibration standard (BRUKER DALTONICS) を使用した。

研究の大きな流れを下図に示す。

2009 査読有

- ④ Izumi Y, Shiota M, Kusakabe H, Hikita Y, Nakao T, Nakamura Y, Muro T, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H. Pravastatin accelerates ischemia-induced angiogenesis through AMP-activated protein kinase. Hypertens Res. 32 :675-679 2009 査読有
- ⑤ Izumi Y, Okatani H, Shiota M, Nakao T, Ise R, Kito G, Miura K, Iwao H. Effects of metoprolol on epinephrine-induced takotsubo-like left ventricular dysfunction in non-human primates. Hypertens Res. 32:339-346 2009 査読有
- ⑥ Shiota M, Kusakabe H, Hikita Y, Nakao T, Izumi Y and Iwao H. Pharmacogenomics of cardiovascular pharmacology: Molecular network analysis in pleiotropic effects of statin – an experimental elucidation of the pharmacologic action from protein-protein interaction analysis. J Pharmacol Sci. 107:15-19 2008 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 隆文 (NAKAO TAKAFUMI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：50326261

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし