

## 血小板生化学における質量分析応用の試み

## 学位論文内容の要旨

研究目的：血小板は、インテグリン $\alpha 2b\beta 3$ などを介し、凝集及び障害血管壁に粘着する。また、血小板は、比較的容易に生体から取り出し純化できることから、環境因子に対する応答を細胞レベルで検討するための良い実験モデルであるという見方ができる。一方、近年、細胞内情報伝達系研究においてタンパク相互作用に注目が集まっている。しかし、無核の血小板では、従来の cDNA を基盤とする手法を応用するのは困難である。そこで、質量分析に基づき血小板を用いてタンパク相互作用のスクリーニングを行う系を確立した(J Biol Chem. 2003;278:6456-6460)。今回、本手法を応用し、アダプタータンパク CrkL に結合するタンパクの同定を試みる。また、CrkL は、インテグリンにより惹起されるシグナル伝達過程で重要な働きを担うことから、得られたタンパクが、インテグリン依存的に CrkL と結合するか否か検討する。さらに、この結合の生理的意義の解明を目指す。

材料と方法：血小板は、健常ボランティアの静脈血から調整した。CrkL の N 末端側 Src ホモロジドメイン 3 (CrkL-nSH3)をグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパクとして発現させ、グルタチオンセファロースビーズ表面に固相化し、これに結合するタンパクを血小板可溶化液より分離した。その後、結合タンパクを SDS-PAGE で分離し、クマシー染色後、分子量 180kDa のバンドを切り出し、ゲル内消化後、質量分析を行った。血小板における DOCK の発現は、抗 DOCK 抗体を用いて検出した。さらに、血小板 Lysate と抗 CrkL 抗体を用いて免疫沈降後、抗 DOCK 抗体を用いて DOCK を検出した。血小板の活性化はトロンビン受容体活性化ペプチドを、凝集抑制は RGDS ペプチドを用いた。また、FuGENE 6 を用いて各遺伝子 (野生型 DOCK, 変異型 DOCK, Dominant Negative(DN)型 Rac, CrkL, CrkII) を Cos7 細胞に導入した。さらに、Cos7 細胞をガラス板上で培養し、固定後、膜を透過性にし、細胞染色に供した。

結果： GST 融合 CrkL-nSH3 と血小板 Lysate を用いてプルダウンアッセイを行った結果、CrkL-nSH3 に結合する、分子量約 180kDa のタンパクを得た。これを質量分析で解析した結果、低分子量 G タンパク Rac の、活性化を惹起する guanine nucleotide exchange factor (GEF) である、DOCK 由来と考えられるペプチド断片が得られた。さらに、血小板における DOCK の存在を免疫プロットにて確認した。また、血小板凝集を抑制した条件下で免疫沈降を行った結果、DOCK と CrkL の結合はインテグリン非依存的であることが示唆された。血小板活性化実験から、この両者は血小板凝集依存性に細胞骨格に取り込まれた。一方、血小板では、タンパクの発現実験が困難なことから、CrkL-DOCK 複合体形成の生理的意義を解明するため、Cos7 細胞を用いた発現実験を以下のように行った。CrkL と DOCK を Cos7 細胞に強制発現させ、抗 CrkL 抗体により免疫沈降したところ、インテグリン依存性接着の有無にかかわらず、CrkL と DOCK が沈降された。ファーウェスタンブロッティングを試行した結果、

DOCK の proline rich domain (PRD) と CrkL-nSH3 が結合を媒介していることが示唆された。また、CrkII と DOCK の結合についても検討したが、CrkL と DOCK の結合同様、インテグリン依存性接着の有無にかかわらず結合することが示唆された。さらに、Cos7 細胞における DOCK と CrkL/CrkII の細胞内局在を検討した。野生型および変異型の DOCK を Cos7 細胞で発現させた場合、これらは、細胞質に分布した。一方、CrkL は核、細胞辺縁部など分布した。ところが、野生型 DOCK は CrkL と共発現すると接着斑に局在化し、小葉様の構造を発達させた。このような DOCK の局在変化や細胞の形態変化は CrkL と結合し得ない変異型 DOCK では認められなかった。Rac の DN 型を DOCK と CrkL と共に発現させると、小葉状の細胞分岐および DOCK と CrkL の細胞辺縁部の集積も認められなくなった。Cos7 細胞において、CrkII と DOCK に関しても同様な実験を行った結果、これらの結合も、インテグリン非依存性であり、CrkL 同様に DOCK の接着斑への局在化を惹起した。

考察：本研究により、血液細胞に発現されないとされた DOCK が血小板に存在する事が初めて示された。血小板の形態変化や伸展などの多彩な機能とアクチン細胞骨格系の改変は表裏一体の関係にある。血小板のアクチン細胞骨格系の改変において、Rac の重要性が確立している。それ故、Rac の GEF は血小板機能調節において極めて重要な役割を担うことが予想される。これまで、血小板の Rac GEF として Vav1, Vav2, Vav3 の存在が報告されてきた。ところが、ノックアウトマウス由来の成績から、VAV1 も VAV2 も血小板の Rac の活性化には必須ではないことが示唆されている。従って、DOCK は VAV3 と共に血小板の機能調節に重要な Rac GEF の有力候補の一つと推察される。一般に、タンパク相互作用において、タンパク間の結合が恒常的であるか刺激誘導性であるかは重要な問題である。CrkL は、CrkII や CrkI にアミノ酸配列上の比較でも極めて類似している。これまで、CrkI/II と DOCK の結合はインテグリン依存性である事が示唆されてきた。一方、今回の血小板を用いた検討から、DOCK と CrkL の結合はインテグリン非依存性であることが示唆された。そこで、筆者は、この既報の結果との相違は、本研究では血小板を対象としたためである可能性と、Crk と CrkL の相違を反映している可能性によるものと考えた。ところが、Cos7 細胞に CrkL と DOCK を共発現した実験から、Cos7 細胞においても CrkL と DOCK の結合にはインテグリンの関与が認められなかった。また、DOCK は、単独発現ではび漫性に細胞質に分布するが、CrkL との共発現下では、接着斑に局在するようになるという結果から、CrkL と DOCK の結合は局在決定に重要であることが示唆された。さらに、DOCK の局在変化に伴い著しい細胞形態の変化が認められ、両者を発現する細胞は著しい小葉状の分岐を示した。この細胞形態の変化は DN 型の Rac により消失した。以上より、Cos7 細胞では CrkL は DOCK を接着斑に局在化させ、Rac 依存性の細胞形態の変化を惹起した。興味深い事に、Cos7 細胞では DOCK と CrkII の結合は、インテグリン非依存性であることを示唆する成績が得られた。この成績は以前の報告結果と異なるが、これは実験条件の違いなどによるものと考えられる。今後、本手法を用いて血小板におけるタンパク相互作用を検討することにより、血小板の環境応答における情報伝達系制御機構の解析に有用であるものと期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 博 美  
副 査 教 授 三 輪 聡 一  
副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

## 血小板生化学における質量分析応用の試み

血小板は、様々な環境因子に対し、細胞内情報伝達系を介し、凝集や顆粒の放出など多様な機能を引き起こす。また、血小板は、比較的容易に生体から取り出し純化できることから、環境因子に対する応答を細胞レベルで検討するための良い実験モデルであるという見方ができる。そこで、近年、注目が集まっているタンパク相互作用を血小板を用いて明らかにしようと考えた。しかし、無核の血小板では、従来の cDNA を基盤とする手法を応用するのは困難である。そこで、質量分析に基づき、血小板を用いてタンパク相互作用のスクリーニングを行うことを目的として確立した実験系 ( J Biol Chem., 2003; 278: 6456-6460 ) を応用し、アダプタータンパク CrkL の N 末端側 Src ホモロジドメイン 3 (CrkL-nSH3) に結合するタンパクの同定を試みた。CrkL-nSH3 に結合する血小板由来タンパクのうち、分子量約 180kDa のタンパクを質量分析にて解析した。その結果、低分子量 G タンパク Rac の活性化を惹起する guanine nucleotide exchange factor (GEF) である、DOCK 由来と考えられるペプチド断片が得られた。免疫沈降法などの生化学的手法を用いた解析の結果、DOCK は、CrkL 結合タンパクとして血小板に存在することが明らかとなった。一方、血小板は、タンパクの発現実験が困難なことから、CrkL-DOCK 複合体形成の生理的意義を解明するため、Cos7 細胞を用いた発現実験を行った。その結果、CrkL と DOCK の結合はインテグリン非依存性であることが示唆された。さらに、アミノ酸配列上の比較で CrkL と極めて類似しているアダプタータンパク CrkII と DOCK との結合も、既報とは異なり、インテグリン非依存性であることが示唆された。また、Cos7 細胞における DOCK と CrkL/CrkII の細胞内局在を検討した。野生型および変異型の DOCK をそれぞれ Cos7 細胞で発現させた場合、いずれも細胞質に分布した。一方、CrkL は核、細胞辺縁部などに分布した。ところが、野生型 DOCK は CrkL と共発現すると接着域である focal adhesion (FA) に局在化し、小葉様の構造を発達させた。このような DOCK の局在変化や細胞の形態変化は CrkL と結合し得ない変異型 DOCK では認められなかった。Rac のドミナントネガティブ型を DOCK と CrkL と共に発現させると、小葉状の細胞分岐および DOCK と CrkL の細胞辺縁部への集積も認められなくなった。以上の結果から、血液細胞に発現されないとされた DOCK が血小板に存在する事が初めて明らかとなった。さらに、Rac 活性依存的に CrkL が DOCK

を FA へ局在化させることが示唆された。発表後、副査田中教授より、CrkII と DOCK の結合様式が既報と異なりインテグリン非依存性であった理由についての質疑があった。申請者は、結合様式の違いは、主に実験系の違いによるもの、殊に申請者の実験系は、DOCK 及び CrkII の発現をトランスフェクション法を用いて行ったが、既報では、マイクロインジェクション法を用いたという違いによるものと考えられると回答した。また、Rac の活性化が DOCK を介したポジティブフィードバック調節を受けているかについての質疑があったが、CrkL が Rac の存在する FA に DOCK、即ち Rac の GEF を局在化させることを例にあげ、ポジティブフィードバックを受けていると考えられると回答した。次いで、副査三輪教授から、細胞への刺激がなくとも、DOCK は Rac の GEF として機能し得るか否かについての質疑があった。申請者は、詳細な機序は不明だが、DOCK が有する、DOCK Homology Region 2 ドメインに Rac が直接結合し、刺激が存在せずとも Rac を活性化するという論文が報告されていると回答した。また、CrkL に結合するタンパクをスクリーニングする上で、血小板を用いる意義についての質疑があった。申請者は、細胞株ではない Primary の細胞で、かつ比較的容易に生体から取り出し純化することができる血小板は、環境因子に対する応答を細胞レベルで検討するための良い実験モデルであるという見方ができることから、本実験系に血小板を用いる意義が存在すると回答した。引き続き主査藤田教授から、この研究を遂行する過程で何を強く感じ考えたかとの質疑があった。申請者は、免疫沈降法などで得られたデータが、細胞溶解液を用いた結果によることから、実際の細胞内においては、どのような時間・空間的制御機構を介して、タンパク相互作用が調節されているのかについて疑問を持ち、この点を明らかにすべく、細胞内輸送系についても今後の課題としたいと回答した。

本論文は、質量分析を応用し、DOCK が血小板に存在することを初めて証明した。さらに、CrkL-DOCK 複合体形成の生理的意義の一端を解明するものとして高く評価された。今後、本手法を応用し、タンパク相互作用を検討することにより、血小板の環境応答における情報伝達系制御機構の解析に有用であるものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。