

新規蛋白DOCK5の生理的意義の解析

西谷 千明 [札幌医科大学医学部／助手]
(前 北海道大学大学院医学研究科／博士課程)

背景・目的

近年、シグナル分子間の会合による細胞機能制御を修飾することにより、効果を発揮する薬物の開発が極めて有望視されている。一方、止血及び病態血栓形成に重要な役割を有する、血小板の機能を制御する細胞内情報伝達系の解明は臨床的にも重要である。それ故、血小板に発現する細胞骨格およびシグナル分子の同定とその機能の解析が重要となる。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り、血小板の蛋白同定は、抗体の存在する一部の既知蛋白を中心であった。そこで、この問題を解決すべく、質量分析に基づき血小板を用いて蛋白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に結合する蛋白の同定を試みると共に、得られた蛋白の血小板における生理的意義の解明を目的とした。

内容・方法

A. アダプタータンパクCrkLの新規リガンドの同定

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ホモジードメイン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、これに結合する蛋白を血小板可溶化液より分離し、SDS-PAGE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。

B. 血小板におけるDOCKタンパク発現の検討

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。

C. Cos-7細胞におけるDOCKとCrkLの結合様式及び細胞内局在の同定

FuGENE6を用いて各遺伝子(野生型DOCK、変異型DOCK、Dominant Negative(DN)型Rac、CrkL)をCos-7細胞に導入した。さらに、Cos-7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・成果

A. アダプタータンパクCrkLの新規リガンドの同定

マトリクス支援イオン化-飛行時間型質量分析機を利用し、pull down assay法などにより得られた蛋白をトリプシンな

どで消化し、部分ペプチドの厳密な質量分析データを得た。質量分析による解析から、低分子量GタンパクであるRacの活性化を惹起するguanine nucleotide exchange factor(GEF)の1つであるDOCK(DOCK1とも呼ばれる)及びDOCK類似蛋白であるDOCK5が血小板に存在することを見いたした。

B. 血小板におけるDOCKタンパク発現の検討

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。

C. Cos-7細胞におけるDOCKとCrkLの結合様式及び細胞内局在の同定

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、Cos-7細胞を用いた発現実験を以下のように行った。CrkLとDOCKをCos-7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。ファーウェスタンプ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。さらに、Cos-7細胞におけるDOCKとCrkLの細胞内局在を検討した。野生型および変異型のDOCKをCos-7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と共に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つた。

今後の展望

本研究により、血液細胞に発現されないとされたDOCK及びDOCK5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。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、これまでの手法では不可能であった血小板に発現する蛋白の体系的な同定が可能になると期待される。