

# 研究成果報告書

事業名（補助金名）	基盤的研究開発育成事業（若手研究補助金）
研究開発テーマ名	Arf-GAP 蛋白 ASAP1 の細胞接着班形成における生理的意義の解明
研究代表者名	中山 章【 北海道医療大学薬学部／講師 】
	（前 北海道大学大学院医学研究科 ／ 助手）

## 事業の背景・目的

細胞接着班はフィブリノゲン、フィブロネクチンなどの粘着性糖タンパク質と結合するインテグリン裏打ち構造であり、血小板粘着、炎症性細胞のホーミング、血管細胞の増殖転写制御、すり応力認識、ガン細胞の浸潤などに関与する。本構造の分子レベルでの理解の深化は、将来的に血栓や動脈硬化症さらに悪性腫瘍治療のための新規治療薬の開発に寄与することが期待される。

我々は質量分析、血小板生化学、細胞株を用いた分子細胞生物学を駆使し Arf-GAP タンパク ASAP1 や WASP ファミリータンパク WAVE/SCAR などが血小板に存在することを明らかにし、それらがアダプタータンパク質 CrkL や Abi-1 との分子間相互作用によって、その局在化に決定的な役割を担っていることを報告してきた。

ASAP1 は、これまでインテグリン裏打ちタンパクである Paxillin や、そのファミリーである Hic-5 と直接的に結合されるとされてきたが、その結合様態についての詳細な検討はなされていない。

そこで本研究では、ヒト血小板および培養細胞への強制発現実験から ASAP1 と、Paxillin/Hic-5 との結合様態の検討と、その結合における生理的意義の解明を目的とした。

## 内容・方法

### 血小板の調整

血小板は以下の方法に従い調整した。健常ボランティアより静脈採血を採取し、1/10 量の 3.14% Trisodium Citrate を加えた。この全血より遠心法にて多血小板血漿を調整した。多血小板血漿にプロスタグランдин E<sub>1</sub>(終濃度 1  $\mu$ M)を加え、遠心法にて血小板ペレットを得て、これから血小板を改変 Hepes-Tyrode 緩衝液(129 mM NaCl, 8.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM KCl, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 5.6 mM dextrose 含有 10 mM Hepes 溶液, pH 7.4)に再浮遊させた。再洗浄後に、改変 Hepes-Tyrode 緩衝液中に洗浄血小板は約 3  $\times$  10<sup>8</sup> 個/ml の濃度になるように調整した。

### 細胞染色

洗浄血小板はカバーガラス上に伸展させた後、または、Cos-7 細胞はカバーガラス上に培養後、PBS で洗浄し、3.7% パラホルムアルデヒドにて 20 分間固定し、再び洗浄後に 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) にて処理した。その後、0.15 % Triton X-100 により膜を透過性にし、ブロックエース（雪印）、1 次抗体、次いで Alexa 標識 2 次抗体((Molecular Probes)による処理後に、さらに洗浄し、鏡検に供した (BioRad, Model 1024 共焦点顕微鏡)。

### SDS-PAGE、免疫沈降および免疫プロッティング

10cm ディッシュ上に培養、種々遺伝子の導入を行った培養細胞を PBS で洗浄後、1ml の lysis buffer (15 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 mM EGTA, 1 mM sodium orthovanadate, 5  $\mu$ g/ml leupeptin, 2% Triton X-100 (V/W), pH 7.4)を加えて可溶化した。細胞溶解液は 2 倍濃度の SDS-PAGE sample buffer を等量加えて SDS-PAGE に供した。なおタンパク濃度の測定にはウシ血清アルブミンを標準とする Micro BSA Protein Assay Kit (Pierce)を用いた。1回の免疫沈降およびGST 融合タンパクの結合実験には 500  $\mu$ g/ml の濃度の細胞溶解液を 800  $\mu$ l 使用した。

## 細胞伸展経時的観察

6cm ディッシュ上に培養した NIH3T3 細胞に各種遺伝子の導入を行い、24 時間後にトリプシン処理によって細胞を剥がし、それらの細胞をフィブロネクチン処理カバーガラス上にて培養し、一定時間ごとに固定処理し鏡検に供した。遺伝子導入された細胞の面積を NIH Image 1.62 を用いて測定した。

## プラスミド

野生型 FLAG 標識 ASAP1 は Paul A. Randazzo 博士（米国 NCI）より、myc 標識 FAK は佐々木 輝捷 博士（札幌医科大学）より、myc 標識 CD2AP は Andrey S. Shaw 博士（米国ワシントン大学）より供与された。変異体および各種標識体等は野生型を鑄型に PCR 法により伸張し、pFLAG6 (Sigma)、pEGFPC (クロンテック)、pGEX-5X (GE ヘルスケア) に導入することにより作成した。

## 培養細胞におけるタンパク発現

COS-7 および NIH3T3 細胞は 10% 胎仔ウシ血清添加 Dulbecco's modified Eagle's 培地(DMEM) 中で培養し、遺伝子導入は COS-7 細胞については FuGENE 6 (Roche Diagnostics)、NIH3T3 細胞についてはリポフェクトアミン 2000 (インビトロジェン) を製造元の指示通り用いて施行した。

## 結果・成果

### A. 伸展血小板における ASAP1 と Hic-5 の局在の検討

無核である血小板においては、タンパク相互作用の解析において一般的である cDNA を基盤とした、イーストツーハイブリッドなどの手法を用いた解析が困難であるため、これまで我々は、質量分析法を用いたタンパク相互作用のスクリーニング法を確立し、ヒト血小板において、アダプタータンパク CrKL の新規リガンドとして ASAP1 を同定してきた。

この ASAP1 は低分子量 G タンパク ADP-ribosylation factor の GTPase activating protein (以下 Arf-GAP) であるが、そもそも血小板においては、ASAP1 をはじめ、いかなる Arf-GAP の存在も報告されておらず、今回の検討から我々は、ヒト伸展血小板において、ASAP1 と Hic-5 が細胞接着班に存在することを見いだした。しかし、両者は完全な一致では無く、ASAP1 はわずかに Hic-5 より辺縁部に位置することから、両者が直接では無く間接的に結合する可能性を示唆するものであった。(図 1) また、血小板溶解液から ASAP1 または Hic-5 を免疫沈降させた際に、それぞれ Hic-5 および ASAP1 との共沈は認められなかった。

### B. Cos-7 細胞における ASAP1 と Paxillin/Hic-5 結合様態の検討

血小板では、タンパクの発現実験が困難なことから、Cos-7 細胞を用いた発現実験から、ASAP1 と Hic-5 結合様態の解明を行うこととした。なお、Hic-5 は、細胞接着班タンパク質として有名な paxillin と、相同意性の高いタンパクで、細胞接着や細胞骨格制御等に関与する事が知られており、血小板においては、paxillin の代わりとして Hic-5 が存在し、その機能を担っていると考えられている。本検討においては、Hic-5 と相同意性が高く、Cos-7 細胞に豊富に存在する paxillin との結合様態を検討することとした。

Hic-5 や paxillin には、いくつかのタンパク相互作用部位が存在し、多種のシグナル分子と、相互作用することが知られており、いくつかの Arf-GAP が Paxillin と相互作用することが報告されている。しかし、その詳細な検討は無く、我々の血小板を用いた免疫沈降の結果からは両者の結合は認められなかった。

そこで、paxillin とも ASAP1 とも結合することが知られており、細胞接着班に豊富に存在する FAK の関与を検討するために、3 者間の免疫沈降により検討した。

図2Aに示すように、ASAP1のみを発現した場合、またASAP1とFAKを発現させたもの免疫沈降したところ、ASAP1を単独で発現させたときに比べ、FAKを共発現させた場合の方が、Paxillinをより多く共沈させる事をみいだした。そこで、FAKと結合することの出来ないSH3ドメインを欠損させたASAP1を作成し、野生株と同様の実験を行ったところ、Paxillinを全く共沈出来ることを見いだした。これは、両者は直接結合せず、ASAP1がSH3ドメインを介してFAKに結合し、そのためPaxillin/Hic-5に結合できることが示唆された。しかし、FAKを強制発現していないものでも、Paxillinの共沈僅かに観察されるため、これは内因性FAKによるものであると考察し、図2Bに示すような、実験にて確認した。ASAP1の野生株強制発現時では、抗FAK抗体によって内因性FAKの共沈が確認されると同時にPaxillinの共沈も確認された。しかし、SH3ドメイン欠損株においてはFAK、Paxillin共に共沈は観察されなかつた。さらに、この現象がASAP1のSH3ドメインを介した結合であることを確認するため、ASAP1のSH3ドメインGST融合タンパクを作成し、FAKを強制発現させたCos7細胞、または、発現させていないCos7細胞融解液でpull-down実験を行ったところ、先ほどの結果と同様に、FAKを発現させた場合の方が、より多くPaxillinを共沈してくることを観察した。(図3)

今回、我々の検討から考察すると、ASAP1とPaxillin/Hic-5との結合はFAKを介した間接的なものであることが示唆された。

#### C. NIH3T3細胞におけるASAP1とPaxillin結合の生理的意義の検討

このFAKを介したASAP1とPaxillinとの結合に、どのような意義が有るかを検証するため、ASAP1とFAKの結合を競合的に阻害すると報告の有る分子CD2APを用いて、その生理的意義について検討行った。まず、CD2APがASAP1とFAKの結合を競合的に阻害し、その結果、Paxillinの共沈も抑制している事を見いだした。(図4)

ASAP1は細胞の伸展に重要で有ることが、これまでの報告により示唆されている。そこで、CD2APをNIH3T3細胞にトランスフェクトし、ファイブロネクチンコートカバーガラス上に培養し観察したところ、CD2APが発現している細胞では、細胞の伸展が悪くなっている事が観察された。(図5A)さらに、NIH3T3細胞において、GFP標識CD2APとGFPのみを、それぞれにトランスフェクトし、細胞の伸展を経時的に観察したものでは、CD2APが発現することによって、細胞の伸展が悪くなっている事が確認された。(図5B)これらの結果より、以前にパーソンらの研究グループが、ASAP1のSH3デリーションミュータント株およびArf-GAPミュータント株を、REF52細胞に過剰発現させると、細胞の伸展が悪くなるとの報告や、トーマスらの研究グループによる、Paxillinの欠損によって、細胞の伸展が悪くなるとの報告のメカニズムの一端を解明するものであり、すなわち、ASAP1とPaxillinが結合できなくなる事によって、Paxillin下流におけるArf-GAP活性の低下が細胞の伸展に大きく関与するものであることを示唆するものであった。

#### 今後の展望

今回の検討から、ASAP1とPaxillinとの結合はFAKを介した間接的なものであることが示唆され、その結合が細胞の伸展能に大きく関与することを見いだした。現在、我々はFAKのチロシンキナーゼ部位を欠損したバイアントであるFRNKが、FAKと競合的に、この結合を制御している可能性を見いだし、より詳細な検討を行っている。細胞接着班は、フィブリノゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックス分子と結合すると、インテグリンの集積とともに、インテグリンの細胞内ドメインに多数のシグナル伝達分子が集合し、その結果、巨大な接着構造体が形成される。血栓症、動脈硬化症成立やガン細胞の浸潤などに深く関与しているため、その分子機構の解明は極めて重要であると思われる。

## 参考文献

1. ASAP1, a phospholipid-dependent arf GTPase-activating protein that associates with and is phosphorylated by Src. Brown MT, Andrade J, Radhakrishna H, Donaldson JG, Cooper JA, Randazzo PA. *Mol Cell Biol*. 1998 Dec;18(12):7038-51.
2. The Arf GTPase-activating protein ASAP1 regulates the actin cytoskeleton. Randazzo PA, Andrade J, Miura K, Brown MT, Long YQ, Stauffer S, Roller P, Cooper JA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Apr 11;97(8):4011-6.
3. Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-GAP activity. Andreev J, Simon JP, Sabatini DD, Kam J, Plowman G, Randazzo PA, Schlessinger J. *Mol Cell Biol*. 1999 Mar;19(3):2338-50.
4. A new paxillin-binding protein, PAG3/Papalpalpha/KIAA0400, bearing an ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein activity, is involved in paxillin recruitment to focal adhesions and cell migration. Kondo A, Hashimoto S, Yano H, Nagayama K, Mazaki Y, Sabe H. *Mol Biol Cell*. 2000 Apr;11(4):1315-27.
5. Interaction of POB1, a downstream molecule of small G protein Ral, with PAG2, a paxillin-binding protein, is involved in cell migration. Oshiro T, Koyama S, Sugiyama S, Kondo A, Onodera Y, Asahara T, Sabe H, Kikuchi A. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):38618-26.
6. PAG3/Papalpalpha/KIAA0400, a GTPase-activating protein for ADP-ribosylation factor (ARF), regulates ARF6 in Fcgamma receptor-mediated phagocytosis of macrophages. Uchida H, Kondo A, Yoshimura Y, Mazaki Y, Sabe H. *J Exp Med*. 2001 Apr 16;193(8):955-66.
7. CrkL directs ASAP1 to peripheral focal adhesions. Oda A, Wada I, Miura K, Okawa K, Kadoya T, Kato T, Nishihara H, Maeda M, Tanaka S, Nagashima K, Nishitani C, Matsuno K, Ishino M, Machesky LM, Fujita H, Randazzo P. *J Biol Chem*. 2003 Feb 21;278(8):6456-60.
8. Hic-5-reduced cell spreading on fibronectin: competitive effects between paxillin and Hic-5 through interaction with focal adhesion kinase. Nishiya N, Tachibana K, Shibanuma M, Mashimo JI, Nose K. *Mol Cell Biol*. 2001 Aug;21(16):5332-45.
9. Phosphorylation of Hic-5 at tyrosine 60 by CAKbeta and Fyn. Ishino M, Aoto H, Sasaki H, Suzuki R, Sasaki T. *FEBS Lett*. 2000 Jun 2;474(2-3):179-83.

## 図の説明

### 図 1. 伸展血小板における ASAP1 と Hic-5 の局在の検討

洗浄血小板はカバーガラス上に伸展させた後、PBS で洗浄し、3.7% パラホルムアルデヒドにて 20 分間固定、再び洗浄後に 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) にて処理し、その後、0.15 % Triton X-100 により膜を透過性にし、ブロックエース（雪印）、1 次抗体（抗 ASAP1 抗体、抗 Paxillin 抗体）、次いで Alexa 標識 2 次抗体（Molecular Probes）による処理後に、さらに洗浄し、レーザー共焦点顕微鏡で観察を行っている。パネル左上は ASAP1、パネル右上は Hic-5、パネル左下は ASAP1、Hic-5 の Merge 画像を示している。

### 図 2. ASAP1SH3 ドメインおよび FAK を介した paxillin の共沈

（パネル A）COS-7 細胞を細胞培養用シャーレに培養し、①FLAG 標識野生型 ASAP1 のみ、②FLAG 標識野生型 ASAP1 および myc 標識 FAK、③FLAG 標識 SH3 ドメイン欠損型 ASAP1 のみ、④FLAG 標識 SH3 ドメイン欠損型 ASAP1 および myc 標識 FAK を、それぞれ 1 ディッシュあたり 2mg を FuGENE6 を用いて導入し発現させた。細胞を可溶化し、抗 FLAG M2 ビーズにて免疫沈降を行い、または、全 lysate を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜への転写後、抗 FLAG M2 抗体、抗 myc 抗体、抗 Paxillin 抗体を用いて免疫プロッティングに供した。（パネル B）では、上記と同様の方法で、①FLAG 標識野生型 ASAP1 のみ、③FLAG 標識 SH3 ドメイン欠損型 ASAP1 のみの発現を行い、抗 FLAG M2 抗体、抗 FAK 抗体、抗 Paxillin 抗体を用いて免疫プロッティングに供した。

### 図 3. ASAP1SH3 ドメインによる pull-down アッセイ

大腸菌で作製した GST 融合 ASAP1 SH3 ドメイン、あるいは、GST 単独をグルタチオンセファロースビーズに固定した後、COS-7 細胞に myc 標識 FAK を発現させたもの、または、発現させていないものの細胞溶解液にて pull-down を行い、前記と同様の方法にて抗 myc 抗体、抗 Paxillin 抗体を用いて用いて免疫プロッティングに供した。

### 図 4. CD2AP が ASAP1 と FAK の結合を競合的に阻害

COS-7 細胞に①FLAG 標識野生型 ASAP1 および myc 標識 FAK、②FLAG 標識野生型 ASAP1、myc 標識 FAK および myc 標識 CD2AP を発現させ、図 2 と同様の方法により、抗 FLAG M2 抗体、抗 FAK 抗体、抗 Paxillin 抗体を用いて免疫プロッティングに供した。

### 図 5. NIH3T3 細胞伸展における強制発現 CD2AP の影響

（パネル A）NIH3T3 細胞を細胞培養用シャーレに培養し、myc 標識 CD2AP を 1 ディッシュあたり 2 mg をリポフェクトアミン 2000 を用いて導入し、24 時間後にトリプシン処理により細胞を剥がし、フィブロネクチンコートカバーガラス上にて 4 時間培養した。PBS で洗浄後、3.7% パラホルムアルデヒドにて 20 分間固定、再び洗浄し 100 mM Tris-HCl (pH 7.4) にて処理し、その後、0.15 % Triton X-100 により膜を透過性にし、ブロックエース（雪印）、1 次抗体（抗 ASAP1 抗体、抗 myc 抗体、抗 Paxillin 抗体）、次いで Alexa 標識 2 次抗体（Molecular Probes）による処理後に、さらに洗浄し、レーザー共焦点顕微鏡で観察を行っている。パネル左上は ASAP1、パネル右上は Paxillin、パネル左下は myc 標識 CD2AP、パネル右下は ASAP1、Paxillin、myc 標識 CD2AP の Merge 画像を示している。

（パネル B）NIH3T3 細胞を細胞培養用シャーレに培養し、GFP 標識 CD2AP または、GFP ベクターのみを 1 ディッシュあたり 2 mg をリポフェクトアミン 2000 を用いて導入し、24 時間後にトリプシン処理により細胞を剥がし、フィブロネクチンコートカバーガラス上にて培養し、一定時間ごとに、PBS で洗浄後、3.7% パラホルムアルデヒドにて 20 分間固定し、再び洗浄後、レーザー共焦点顕微鏡で観察を行った。遺伝子が導入された細胞の面積を NIH Image 1.62 を用いて測定し、各時間ごと 4 サンプルを 2 回、計 8 サンプルの平均を算出した。なお、誤差線は標準誤差である。

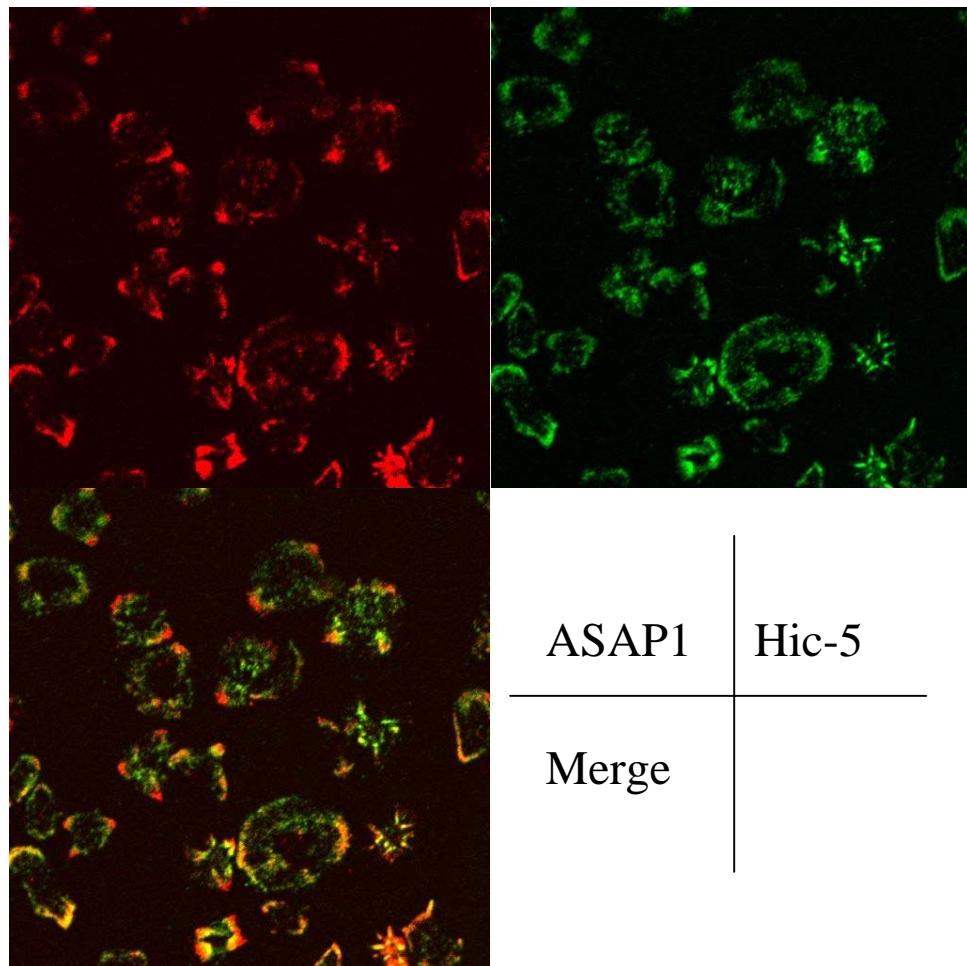
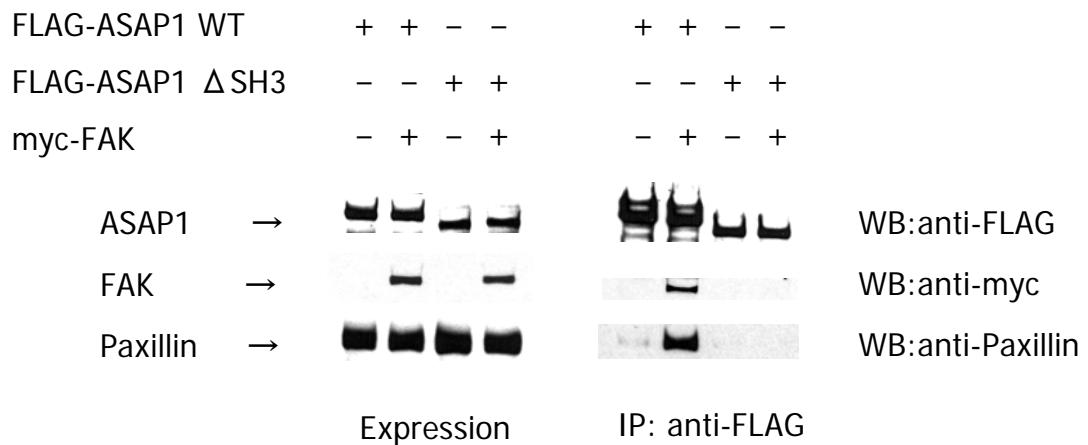


図1. 間接蛍光抗体法によるASAP1とHic-5の伸展血小板における局在

# A.

Plasmids



# B.

Plasmids

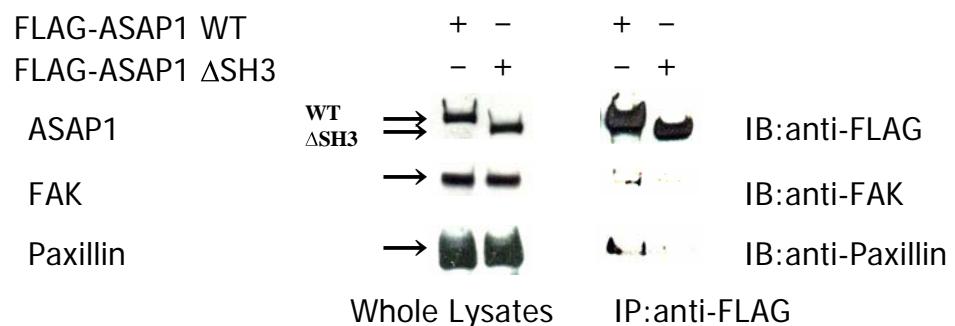


図2. ASAP1SH3ドメインおよびFAKを介したpaxillinの共沈

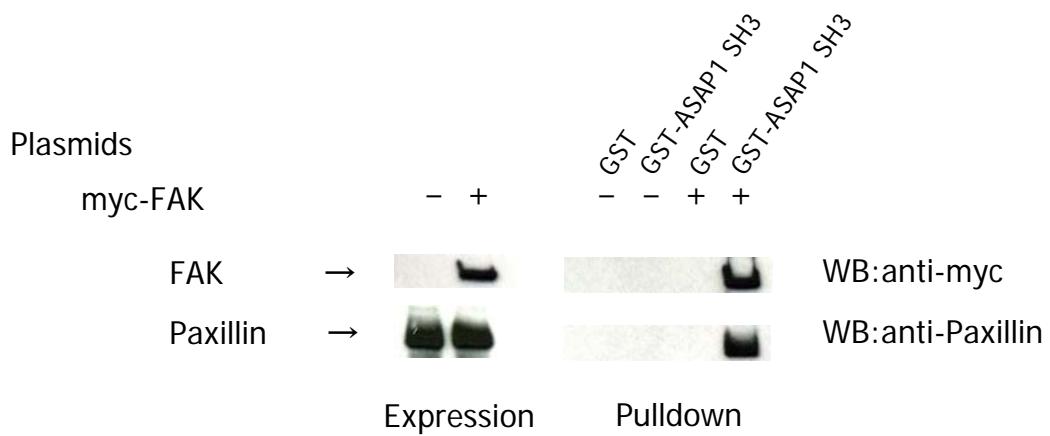


図3. ASAP1SH3ドメインによるpull-downアッセイ

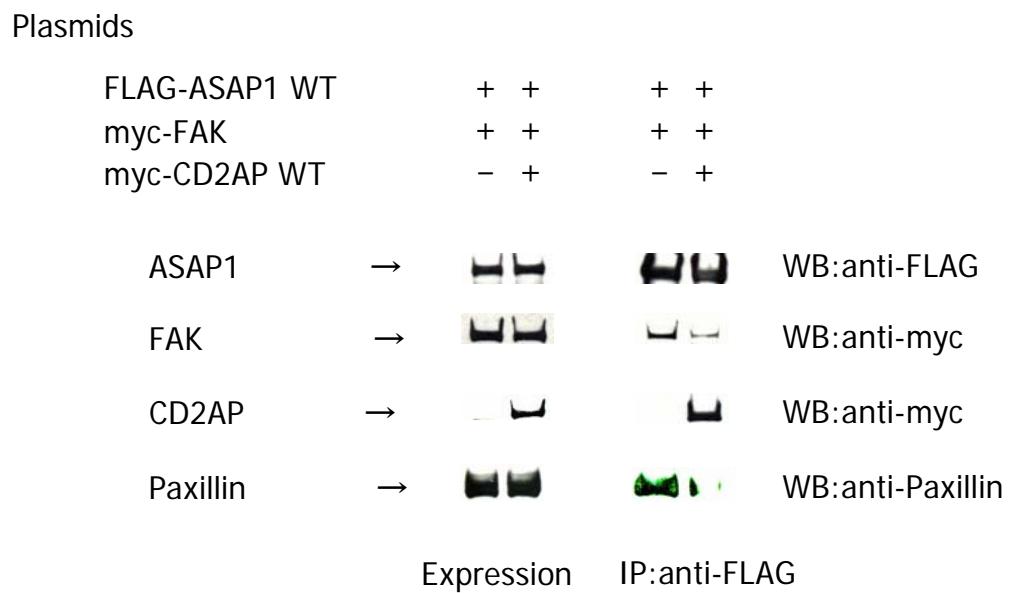
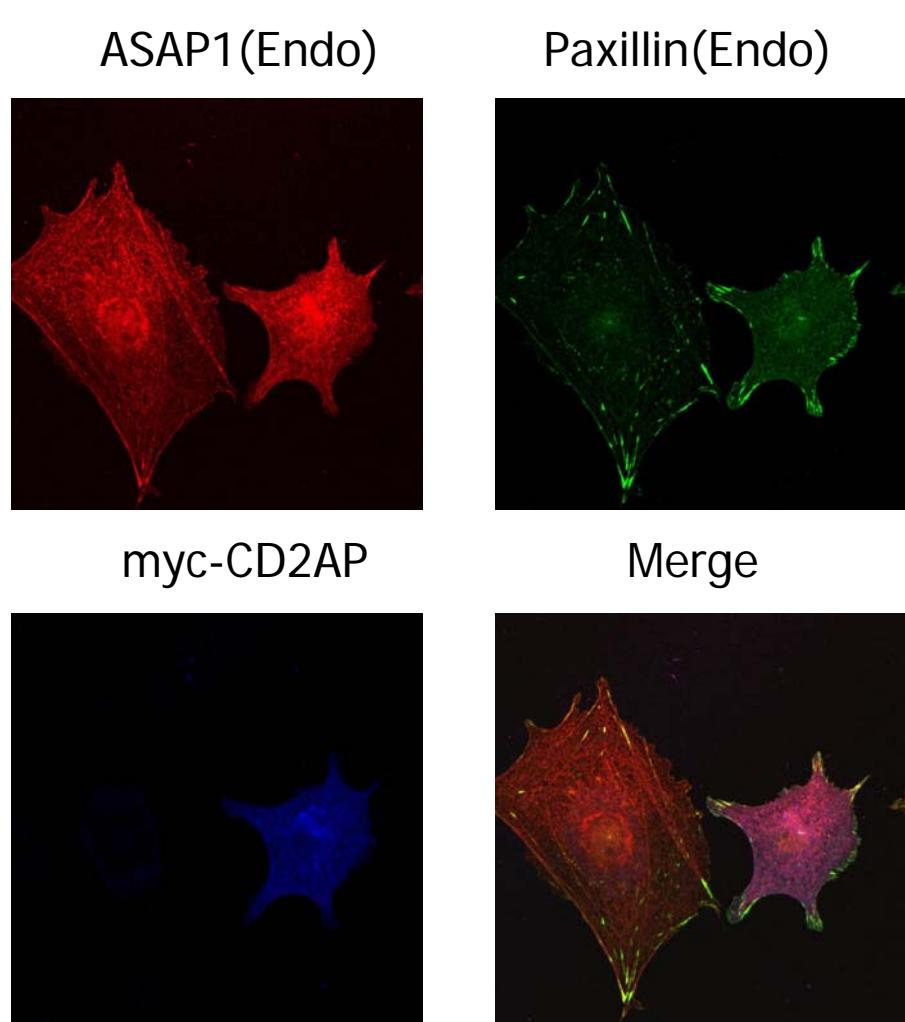


図4. CD2APがASAP1とFAKの結合を競合的に阻害

A.



B.

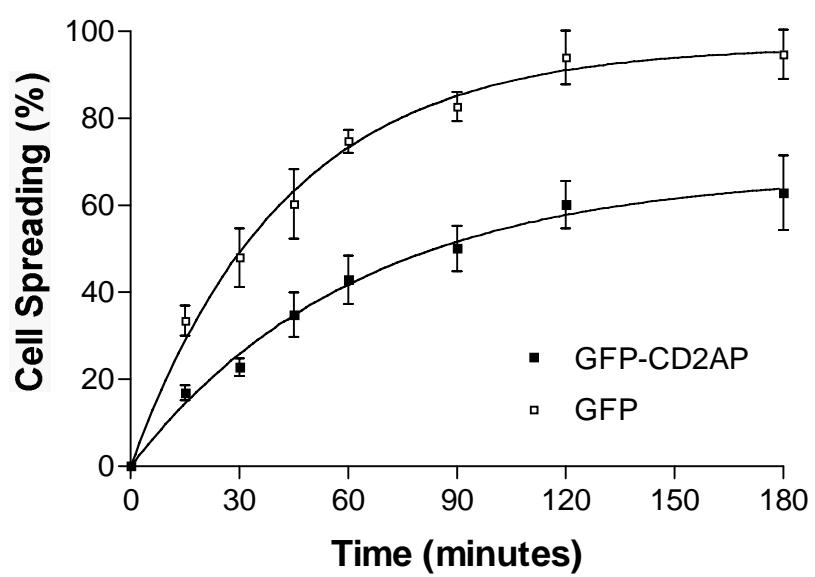


図5. NIH3T3細胞伸展における強制発現CD2APの影響