

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

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)

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、ずり応力認識、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

A. 伸展血小板におけるASAP1とHic-5の局在の検討

Hic-5は、細胞接着班タンパク質として有名なPaxillinと相同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いる。ヒト血小板においては、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る。そこで、健常ボランティアの静脈血から調整した血小板を用いて、カバーグラスに伸展させ、固定後、膜を透過性にし、細胞染色を行い観察に供した。

B. Cos-7細胞におけるASAP1とPaxillin結合様態の検討

FuGENE 6 を用いて各遺伝子（野生型ASAP1、変異型ASAP1、FAK、CD2AP）をCos-7細胞に導入し免疫沈降を用いて、これらの結合様態に関する検討を行った。

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

ASAP1とFAKの結合を競合的に阻害すると報告のある分子CD2APをLipofectamine 2000を用いて NIH3T3細胞に導入し、免疫沈降および細胞染色を用いて、ASAP1とPaxillinの結合の生理的意義の検討を行った。

結果・成果

A. 伸展血小板におけるASAP1とHic-5の局在の検討

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たした。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。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事からも間接的な結合を示唆するものであった。

B. Cos-7細胞におけるASAP1とPaxillin結合様態の検討

伸展血小板における局在の検討から、ASAP1とHic-5の結合は、間接的なものであることが示唆されたことから、ASAP1ともPaxillin（以下の検討では、Hic-5と相同性の高いタンパクでCos-7細胞に豊富に存在するPaxillinを対象とする事とした。）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の両者への関与を検討するため、3者間の免疫沈降を行った。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たした。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に結合できる可能性が示唆された。

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たした。

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グ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。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してい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たしました。現在、我々はFAKのチロシンキナーゼ部位を欠損したバリエントである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。