



# Relocation of Syk to the actin filament network and subsequent association with Fak

Sada, Kiyonao

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1997-10-15

(Date of Publication)

2008-03-28

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2168

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.11501/3141213>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002168>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	定 清 直 (福井県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博ろ第1591号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成9年10月15日
学位論文題目	Relocation of Syk to the actin filament network and subsequent association with Fak (Sykのアクチン細胞骨格への再分布と、続くFakとの会合)
審査委員	主査 教授 山村 博 平 教授 片岡 徹 教授 中村 俊 一

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

当研究室において脾臓より精製・cDNAクローニングされた非受容体型蛋白質チロシンキナーゼ Syk (spleen tyrosine kinase) は、血液系細胞全体に発現が認められる。血小板において、Sykはトロンビンやコラーゲンなどの刺激により早期に活性化することが報告されている。一方、別の非受容体型キナーゼである Fak (focal adhesion kinase) はインテグリンを介した経路において活性化し、接着斑複合体の形成や細胞の形態変化に関与していると考えられている。

本論文で私は、トロンビン刺激により活性化したSykの細胞内分布の変化、特にアクチン細胞骨格への再分布とそのユニークなメカニズムを解明した。また細胞骨格を制御しているチロシンキナーゼ FakとSykとの会合を見だし、血小板活性化過程におけるSYKの新しい役割、細胞形態の制御機構へ関与を示唆した。

### 【方法】

血小板は健康なボランティアの静脈血から遠心法により調整した。細胞内分画として、細胞骨格を可溶化剤であるTriton X-100不溶分画として調整した。更にその細胞骨格分画よりアクチン細胞骨格(F-アクチンとアクチン結合蛋白質を含む)を*in vitro*で再重合させることにより精製した。トロンビン刺激前後の血小板より得られたそれぞれの分画より、SykとFakの局在変化やリン酸化状態などを明らかにする目的で免疫沈降とイムノブロットによる解析を行った。

免疫沈降は同一蛋白量の細胞抽出物や細胞骨格等の分画より、SykまたはFakの特異的抗体を加えて免疫複合体を形成させ、Protein A-Sepharoseにて沈降・精製した。沈降させた免疫複合体はSDS/PAGEで分離し、リン酸化チロシン・Syk・Fakの抗体を用いてイムノブロットを行った。

Sykの局在変化やFakとの会合様式について解析するために、アクチン重合の阻害剤であるサイトカラシンDや、インテグリンの阻害剤であるArg-Gly-Asp-Ser (RGDS) ペプチドを用いて血小板を前処理し、それらの影響について解析した。

また、Sykの持つ機能と構造との関連を調べる目的で、ブタ野生型のSykとその変位体をCOS細胞に発現させた再構成系を用いた。変位体としては酵素活性を欠いたSyk (ATP結合部位にあるLysをArgに置換したもの)、キナーゼ領域を欠いたSyk, 更に2つのSH2領域を欠いたSykを作成し、それぞれ発現させた。血小板と同様の方法でCOS細胞よりアクチン細胞骨格を精製し、イムノブロットによる解析を行った。これらブタ由来の遺伝子から発現させた各変異体の解析にはブタSyk特異的抗体を用いた。

### 【結果と考察】

1. ヒト血小板をトロンビンにより活性化させるとSykは細胞骨格分画へと移行する。イムノブロットにより、細胞骨格に移行したSykは移行前に比して電気泳動上の移動度の変化を示した。それぞれの分画からSykを免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体にてイムノブロットを行った結果、細胞骨格から精製したSykは強くチロシンリン酸化されていたことから、Sykの移動度の変化はチロシンリン酸化によると考えられる。以上のことから、トロンビン刺激により活性化したSykは、細胞骨格に移行して何らかの役割を果たしているものと考えられる。なおトロンビン受容体を介したSykのチロシンリン酸化機序はまだ明らかではない。リンパ球の抗原受容体で見られるような、ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activating motif) を持つ別の分子が介在しSykを活性化させた可能性もある。なお、分子量76kDaのチロシンリン酸化された蛋白質がSykと共沈しており、詳細については不明である。

2. 血小板においてSykはトロンビン添加後早期に活性化するが、その時点で血小板では形態変化 (shape change) が生じている。Sykが移行し作用する部位として、形態変化に関わるアクチン細胞骨格に焦点を当てて解析を行った。その結果、トロンビン刺激後にSykがアクチン細胞骨格へと再分布することが明らかとなった。アクチン凝集阻害剤であるサイトカラシンDにて血小板を前処理することにより、この再分布は部分的に血小板活性化早期において抑制された。サイトカラシンDはSykのチロシンリン酸化を抑制することが報告されており、アクチン細胞骨格への移行もそれが反映されたものと考えられる。後期では抑制が認められなかったが、これは血小板凝集に伴った細胞骨格の再編成に伴っているためと考えられる。

3. 続いて、再分布後にSykが相互作用する分子を明らかにするために、接着斑に存在し細胞骨格の制御に関わっている分子群に焦点を当てて解析を進めたところ、非受容体型の蛋白質チロシンキナーゼFakを免疫沈降した際にSykの共沈が認められた。両者はトロンビン刺激後90秒を経て会合していた。また両者の会合は細胞骨格分画中にて認められた。以上のことから、リガンド刺激後のアクチンフィラメントの再編成と、インテグリンによる接着斑形成とを結びつけるSykの新しい役割が示唆された。

アクチン重合とインテグリンの阻害剤をそれぞれ作用させて、両者の会合への影響について検討したところ、アクチン重合の阻害剤であるサイトカラシンDにより、SykとFakの会合の抑制がみられた。これは、Sykのアクチン細胞骨格への再分布、ひいてはチロシンリン酸化されたSykの量が抑制されているためと考えられる。またインテグリンの阻害剤であるRGDSペプチドによる前処理ではほんのわずかの抑制が見られただけであった。これらのことから、両者の会合にはSykのチロシンリン酸化が重要であると言えるが、同時にそれだけでは十分ではないといえる。2つのキナーゼはともにヒト血小板においてチロシンリン酸化されていることから、両者の会合はリン酸化チロシンとSH2領域との相互作用に基づく分子機構と考えられる。しかし実際にSykがFakをチロシンリン酸化しうる

か否かは依然不明である。

4. 最後に、Sykの構造とアクチン細胞骨格への会合能との連関をCOS細胞を用いた再構成系にて解析した。それぞれのSyk変異体を発現した細胞からアクチン細胞骨格を精製し、イムノブロットにより解析したところ、キナーゼ領域を欠いたSykのみがアクチン細胞骨格と会合できなかった。この実験結果はSykのSH2領域ではなくキナーゼ領域がその会合に必要なことを示した。さらにキナーゼ活性を欠いた変異体も会合しており、会合自体にはSykのキナーゼ活性も必要でないことが明らかとなった。血小板とCOS細胞では細胞が異なるが、アクチン細胞骨格への会合に関するSykのユニークな特徴が示唆された。

#### 【結 論】

1. トロンピンはヒト血小板においてSykの細胞骨格への移行を誘導し、その際Sykはチロシンリン酸化されている。
2. トロンピン刺激によりSYKはアクチン細胞骨格へ再分布する。
3. 細胞骨格にてSykはFakと会合し、両者の会合にはSykのチロシンリン酸化が重要な役割を持つ。
4. 再構成実験からSykと細胞骨格との相互作用にはSykのキナーゼ領域が必須であるが、その酵素活性自体は必要ないことが示唆される。
5. これらのことから、SykとFakはアクチン細胞骨格において協調していると考えられ、おそらく血小板活性化過程での細胞形態の制御機構において重要な役割を担っているものと推察された。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者らの研究室にて脾臓より精製・cDNAクローニングされた非受容体型蛋白質チロシンキナーゼSyk (spleen tyrosine kinase) は、血液系細胞全体に発現が認められ、とくに免疫系細胞における抗原受容体やストレス刺激に呼応したSykの活性化や、血小板でのG蛋白共役型受容体を介した活性化が報告されている。

本論文で申請者は、トロンピン刺激により活性化したSykの細胞内分布の変化、特にアクチン細胞骨格への再分布とそのユニークなメカニズムを解明した。また細胞骨格を制御しているチロシンキナーゼFakとSykとの会合を見だし、血小板活性化過程におけるSykの新しい役割、細胞形態の制御機構へ関与を示唆した。

#### 【方 法】

血小板はヒト静脈血から調整した。細胞内分画として、細胞骨格を可溶化剤であるTritonX-100不溶分画として調整した。更にアクチン細胞骨格(F-アクチンとアクチン結合蛋白質を含む)を細胞骨格より*in vitro*で再重合させて精製した。トロンピン刺激前後の血小板より得られたそれぞれの分画より、SykとFakの局在変化やリン酸化状態などを明らかにする目的で免疫沈降とイムノブロットによる解析を行った。

免疫沈降は同一蛋白量の細胞抽出物や細胞骨格等の分画より、SykまたはFakの特異的抗体を加えて免疫複合体を形成させ、Protein A-Sepharoseにて沈降・精製した。沈降させた免疫複合体はSDS-PAGEで分離し、リン酸化チロシン・Syk・Fakの各抗体を用いてイムノブロットを行った。

Sykの局在変化やFakとの会合様式について解析するために、アクチン重合の阻害剤であるサイトカラシンDや、インテグリンの阻害剤であるArg-Gly-Asp-Ser (RGDS) ペプチドを用いて血小板を前処理し、それらの影響について解析した。

また、Sykの持つ機能と構造との連関を調べる目的で、ブタ野生型のSykとその変異体をCOS細胞に発現させた再構成系を用いた。変異体としては酵素活性を欠いたSyk (ATP結合部位にあるLysをArgに置換したもの)、キナーゼ領域を欠いたSyk、更に2つのSH2領域を欠いたSykを作製し、それぞれ発現させた。血小板と同様の方法でCOS細胞よりアクチン細胞骨格を精製した。これらブタ由来の遺伝子から発現させた各変異体はブタSyk特異的抗体によりイムノプロットを行った。

### 【結果と考察】

ヒト血小板をトロンビンにより活性化させるとSykは細胞骨格分画へと移行する。イムノプロットにより、細胞骨格に移行したSykは移行前に比して電気泳動上の移動の変化を示し、強くチロシンリン酸化されていた。よって、Sykの移動度の変化はチロシンリン酸化によると考えられる。以上のことからトロンビン刺激により活性化したSykは細胞骨格に移行し何らかの役割を果たしているものと考えられる。

血小板においてSykはトロンビン添加後早期に活性化するが、その時点で血小板では形態化 (shape change) が生じている。Sykが再分布し作用する部位として、形態変化に関わるアクチン細胞骨格に焦点を当てて解析を行った結果、トロンビン刺激後にSykがアクチン細胞骨格へと再分布することが明らかとなった。アクチン凝集阻害剤であるサイトカラシンDにて血小板を前処理することにより、この再分布は部分的に血小板活性化早期において抑制された。サイトカラシンDはSykのチロシンリン酸化を抑制することが報告されており、アクチン細胞骨格への再分布もそれが反映されたものと考えられる。

続いて、再分布後にSykが相互作用する分子を明かにするために、接着斑に存在し細胞骨格の制御に関わっている分子群に焦点を当てて解析したところ、非受容体型のチロシンキナーゼFakとSykとの会合が認められた。経時的解析によりSykはアクチン細胞骨格に再分布した後Fakと会合すると考えられ、アクチンフィラメントの再編成とインテグリンによる接着斑形成とを結びつけるSykの新しい役割が示唆された。また両者の会合のメカニズムについて阻害剤を用いて解析した結果、両者の会合にSykのチロシンリン酸化は重要であるが、同時にそれだけでは十分ではないことも示唆された。

最後に、Sykの構造とアクチン細胞骨格との会合能との連関をCOS細胞を用いた再構成系にて解析した。それぞれのブタSyk変異体を発現した細胞からアクチン細胞骨格を解析したところ、キナーゼ領域を欠いたSykのみがアクチン細胞骨格と会合できなかった。この実験結果はSykのSH2領域ではなくキナーゼ領域がその会合に必要なことを示した。さらにキナーゼ活性を欠いた変異体も会合していることから、会合自体にはSykのキナーゼ活性も必要でないことが示唆された。

本研究は、トロンビン受容体を経て活性化したSykがアクチン細胞骨格へユニークな機構により移行することを明らかにし、引き続きインテグリンを介して活性化したFakと会合することにより、血小板活性化過程での細胞形態の制御機構へ関与していることを示唆した。大変優れた内容である。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。