



Title	Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for α IIb β 3 activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK
Author(s)	中澤, 剛士
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59758
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

[目的(Purpose)]

血小板インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ はアゴニスト刺激により活性化型に変化するが、その分子機構の詳細は不明である。従来遺伝子操作可能な有核細胞として CHO 細胞が用いられているが、異所性に発現させた $\alpha_{IIb}\beta_3$ はアゴニスト刺激に反応しない。アゴニスト刺激による $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化を評価できる新しい実験系を確立し、遺伝子改変をおこないインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化の分子機構を明らかにすることを目的とした。

[方法ならびに成績(Methods/Results)]

巨核球の成熟マーカーである GPIb と $\alpha_{IIb}\beta_3$ を内因性に発現することからヒト巨核球系細胞株 CMK に注目した。CMK の $\alpha_{IIb}\beta_3$ は GP-Ib を強発現する細胞群において、生理的アゴニスト刺激により一過性に活性化した。そこで talin-1 と kindlin-3 の発現をレンチウイルスベクターによる RNAi によってノックダウンし、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化への影響を検討した。それぞれの安定クローニングでは $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化はそれぞれの発現レベルに一致して障害された。それぞれのノックダウンクローニングに外因性に talin-1 あるいは kindlin-3 を発現すると、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化はレスキューされた。一方 talin head domain (THD) 、 talin-1 全長、 kindlin-3 の過剰発現により $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化は増加したが、活性化にはアゴニスト刺激が必要であり、 THD の過剰発現でもアゴニスト刺激なしでは $\alpha_{IIb}\beta_3$ は活性化しなかった。以上から CMK では血小板と同様にアゴニスト刺激、 talin-1 および kindlin-3 が $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化に必要不可欠であることが示された。

このような CMK を用いて、 talin-1 の $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化の分子機構を様々な変異体を用いた過剰発現にて検討した。結晶構造の解析から、全長 talin-1 の自己抑制を解除し、活性化に重要な THD を露出させると考えられる残基の変異体では K318、M319 の変異体が有意に活性化を増強したが、 Y377 の変異体では活性化は増強されなかった。また THD の細胞膜と結合する残基、 β インテグリンの共通配列である NPLY モチーフに結合する残基および β インテグリンの近位部に結合する残基のそれぞれの変異体の過剰発現では、いずれも野生型に比較すると活性化の増強は低下したが、膜近位部に結合する残基の変異体では、全く活性化を増強しなかった。以上から talin-1 の自己抑制モデルが示されるとともに、 β の膜近位部への THD への結合が $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化に必須であると考えられた。最後に talin-1 と kindlin-3 の相互の $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化の影響と検討した。Talin-1 あるいは kindlin-3 それぞれのノックダウンクローニングに THD を過剰発現すると、いずれにおいても低下していた $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化はレスキューされた。また、 THD と kindlin-3 を共発現させると、それぞれのみ過剰発現に比較し、相乗的に $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化を増強したことから、 talin-1 と kindlin-3 は協調的に $\alpha_{IIb}\beta_3$ 活性化に関わることが示された。

[総括(Conclusion)]

生理的なインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化を評価できる新しい実験系を確立した。Talin-1 によるインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化の分子機構を解析し、重要な残基を明らかにし、 talin-1 と kindlin-3 の協調的な役割が示された。

論文審査の結果の要旨

血小板インテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ はアゴニスト刺激により活性化し、リガンドへの親和性増加させ血小板凝集をもたらす。従来遺伝子操作可能な有核細胞として CHO 細胞が用いられているが、異所性に発現させた $\alpha_{IIb}\beta_3$ はアゴニスト刺激により活性化しない。本研究では、より生理的な解析を行うためアゴニストにより内因性 $\alpha_{IIb}\beta_3$ が活性化するヒト巨核球系細胞株 CMK に、 RNAi と過剰発現を用いて talin-1 と kindlin-3 の遺伝子改変を行い、その影響を検討した。ノックダウン実験により $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化は talin-1 および kindlin-3 に依存することを示した。また、 Talin head domain 、 talin-1 全長および kindlin-3 の過剰発現にて $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化にはアゴニスト刺激が必須であることを示した。さらに、 Talin-1 の様々な変異体により、 Talin-1 の自己抑制に重要な残基、活性化に重要な残基を明らかにするとともに、 talin-1 と

【72】

氏名	中澤剛士
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 25898 号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
医学系研究科内科系臨床医学専攻	
学位論文名	Agonist stimulation, talin-1, and kindlin-3 are crucial for $\alpha_{IIb}\beta_3$ activation in a human megakaryoblastic cell line, CMK (アゴニスト刺激、タリン-1 そして キンドリン-3 がヒト巨核球系細胞株 CMK における $\alpha_{IIb}\beta_3$ の活性化に重要である)
論文審査委員 (主査)	教授 金倉 譲
教 授 (副査)	教授 下村 伊一郎 教授 高倉 伸幸

kindlin-3の $\alpha_{11b}\beta_3$ の活性化への協調的な役割を示した。

この実験系はインテグリン $\alpha_{11b}\beta_3$ の活性化メカニズムを解析するうえで有用なシステムである。よって学位に値する。