◆総説◆

血小板糖タンパク質 GPVI の構造と機能

三 浦 芳 樹*

Structure, Function and Signal Transduction of the
Platelet Membrane Glycoprotein VI

Yoshiki MIURA*

Key words : GPVI, collagen receptor, cDNA, genome, immunoglobulin superfamily

はじめに

GPVI 欠損症患者血小板はコラーゲンによる血小板の活性化を起こさないという諸井らの報告¹⁾から 10 年目にして GPVI のクローニングが Clemetson ら²⁾, 筆者ら³⁾, 京都大・高山先生⁴⁾のグループにより相次いで報告された。GPVI はコラーゲン受容体として既に良く知られているインテグリン $\alpha_2\beta_1$ とは異なるコラーゲン三重螺旋構造を特異的に認識する分子量 62 k の糖タンパク質であるが、その構造は不明であった。今回の cDNA クローニングにより GPVI-FcR γ 鎖複合体が、T 細胞受容体や B 細胞受容体とよく似た分子複合体であることが明らかになった。GPVI のシグナル伝達については既に本誌 97 年 6 月号で高山先生が解説されているのでなるべく重複を避けつつ、GPVI のクローニングとその遺伝子構造、最近明らかにされた GPVI を介したシグナル伝達に焦点を絞らせていただく。

1. GPVI のクローニング

GPVI のクローニングは昨年相次いで報告されたが、いずれも GPVI 特異的なヘビ毒である convulxin (Cvx)⁵⁾を用いたアフィニティカラムにより GPVI を精製し、部分アミノ酸配列を決定することにより、cDNA クローニングを行っている。

筆者らのグループは血小板膜画分より WGA カラム, Cvx アフィニティカラムと逆相系カラムにより部分精製し、SDS-PAGE 後 GPVI に相応するバンドよりトリプシン消化ペプチドを得、アミノ酸配列を決定した。得られたアミノ酸配列情報より PCR プライマーを作成し、TPO 依存性巨核球由来細胞 UT-7/TPO⁶⁾ cDNA ライブラリーに対して PCR を行い、その cDNA 配列を決定した。

GPVI は 20 残基のシグナル配列を持ち、2 個の Ig (immunoglobulin) 様ドメインを持つ免疫グロブリンスーパーファミリーに属する 319 残基の I 型膜貫通タンパク質である。このファミリーの中でも KIR (killer cell inhibitory receptor) に属する受容体と相同性が高い。KIR

* 久留米大学分子生命科学研究所高分子化学部門 [〒 839-0861 福岡県久留米市合川町 2432-3, リサーチセンタービル]

Institute of Life Science, Kurume University [2432-3 Aikawa, Kurume, Fukuoka 839-0861, Japan.]

Tel. 0942-37-6315, Fax. 0942-37-6319, e-mail : miura@lsi.kurume-u.ac.jp

GGCTGAGGAACCATGTCTCCATCCCGACCGCCCTCTCTGTCTGGGCTGTGTCTGGGG 60
 M S P S P T A L F C L G L C L G -5
 CGTGTGCCAGCGCAGATGGACCGCTCCCAAGCCCTCCCTCCAGGCTCTGCCAGCTCC 120
 R V P A Q S G P L P K P S L Q A L P S S 16
 CTGTGTGCCCTGGAGAAGCCATGCCCTCGGTGCCAGGACCTCCGGCGTGGACCTG 180
 L V P L E K P V T L R C Q G P P F G V D L 36
 TACCGCTCGGAGAAGCTGAGTTCAGCAGGTACAGGATCAGGACGTCTCTTCATCCCG 240
 Y R L E K L S S S R Y Q D Q A V L F I P 56
 GCCATGAAGAGAAGTCTGGCTGGACGCTACCGCTGCTCTACCAGAACCGAAGCCCTCGG 300
 A M K R S L A G F Y R C S Y Q N G S L W 76
 TCCCTGCCAGCGACAGCTGGAGCTCGTTGCCACGGAGTTTTCGCAACCCCTCGCTC 360
 S L P S D Q L E L V A T G V F A K P S L 96
 TCAGCCACCGCCCGCGGTCTGTCTCAGGAGGGGACGTAAACCTACAGTGTACAGT 420
 S A K P G P A V S S G D V T L Q C Q T 116
 CGGTATGGCTTTGACCAATTTCCTGTGTAAGAAGGGGACCTCGGCCCTACAAGAAT 480
 R Y G F D Q F A L Y K E G D P A P Y K N 136
 CCGAGAGATGTATCCGGGCTAGTTTCCCATCATCAGGTGACCGCGCCACAGCGGA 540
 P E R Y R A S F P I T V T A A H S G 156
 ACCTACCGATGTCTACAGCTTCTCCAGCAGGACCCATCACTGTGGTGGCCCGCCAGCAG 600
 T Y R C Y S F S S R D P Y L W S A P S D 176
 CCCCTGGAGTGTGTGTACAGGAACCTCTGTGACCCCGCCGGTTACCAACAGAACCA 660
 P L E L V V T G T S P R L P T E P 196
 CCTTCTCGGTAGCAGAAATTCAGAGCCACCGCTGAACGCTCATTCACAAAC 720
 P S S V A E F S E A T A E L T V S F T N 216
 AAAGTCTTCACAACTGAGACTTCTAGGAGTATCACCACAGTCCAAAGGAGTACAGTCT 780
 K V F T T E T S R S I T C Q S P K E S D S 236
 CCAGCTGTCTCTGCCCGCAGTACTACCAAGGGCAACCTGGTCCGGATATGCCTCGGG 840
 P A G P A R Q Y Y T K G N L V R I C L G 256
 GCTGTGATCTTAATACTCTGGCGGGTTTCTGGCAGGAGCTGGCACAGCCGAGGAAG 900
 A V I L I I L A G F L A E D W H S R R K 276
 CGCTTCGGGCACAGGGCAGGGTGTGTGACAGGGCGCTTCCGCCCTCGCCGCCCTCCCG 960
 R L R H R G R A V Q R P L P P L P P L P 296
 CAGACCCGGAATACACCGGGGTGAGATGGAGCCGACAGGATGTTACAGCCGCGGG 1020
 Q T R K S H G G Q D G R G D V H S R G 316
 TTATGTTCATGACCGCTGAACCCAGGCACGGTGTATCCAAAGGAGGGATCATGGCATG 1080
 L C S * 319

図1 GPVI の cDNA 配列と予想されるアミノ酸配列

シグナル配列切断部位を▲で、Asn 型糖鎖付加部位は◆で、四角で囲った部分は膜貫通領域を示している。太文字で示した膜貫通領域内の Arg は Fc γ 鎖との結合に関わると言われている。下線で示した配列はアミノ酸シーケンサーで同定した配列を示す。2重下線は SH3 ドメインと結合する Pro-rich 配列を示す。

ファミリーに属する受容体は NK 細胞による自己非自己の識別機構を担う KIR や Fc 受容体が知られているが、リガンド、生理機能ともに不明なものも多い。図2に最も相同性の高かった KIR cl 42 とのアミノ酸配列比較を示す。細胞外領域で約 40% の相同性がある。cDNA から予想される分子量は 34,836 であり、Asn 型糖鎖が付加すると考えられる部位は 1 カ所である。これは GPVI 欠損症患者由来の抗 GPVI 抗

体等を用いて明らかにされている分子量 62 k に対し小さいが、細胞外領域の膜近傍には Ser/Thr に富む領域が存在し、この部分に糖鎖が付加しているためと考えられる。Fc α 受容体等に於いて、 γ 鎖との複合体形成に膜貫通領域の正に荷電した Arg 残基が必要と言われているが⁷⁾、GPVI にも同様の Arg 残基が存在する。抗 GPVI 抗体や Cvx により GPVI と Fc 受容体 γ 鎖が共沈されることより、この膜貫通領域の Arg 残基が γ 鎖との結合に関与していると考えられる。細胞内領域は 51 残基からなり、チロシン残基は存在せず、ITAM/ITIM (immunoreceptor tyrosine-based activate/inhibitory motif) 等のモチーフはない。興味深いことに GPVI は細胞内領域に pro-rich 領域を持ち、Src キナーゼの SH 3 (src homology 3) と結合すると報告されている RPLPPLP という配列が存在する⁸⁾。また、ノーザンブロッティングを行うと約 1.9 kb に GPVI のシグナルが末梢血および胎児肝細胞で見られ、血球系細胞に特異的な発現をしていることが示唆された。

上に述べたように cDNA から推定される分子量は 35 k と小さく還元条件下 SDS-PAGE においても GPVI の分子量 62 k と 27 k の開きがある。筆者らはまず GPVIcDNA を COS 7 細胞に発現を試みたがその分子量は 37 k と小さい分子量を示した。そこで GPVI を cDNA にクローニングしたもとの細胞である UT-7/TPO で発現を行った。内在性の GPVI と見分けるために導入した GPVI には COOH 末端に Flag-tag をつけ区別出来るようにした。その結果、大腸菌で発現させた GPVI を抗原として作成したウサギ抗 GPVI 抗体、抗 Flag 抗体ともに 61 k のバンドを認識し、この分子が UT-7/TPO 細胞では血小板での分子量とほぼ同等の分子量で発現されることが明らかとなった (図3)。このことより Thr/Ser rich 領域には糖鎖の付加が起こると考えられた。また、このウサギ抗 GPVI 抗体を用い、GPVI 欠損症患者血小板に対しウェスタンブロッティングを行うと反応

GPVI	-20	MSP SPTALF C LG-- LCL GRVPAQ S GPL K PSLQ AL PSSLVPLEK P VT L R Q GGPPGVDLYR	38
KIRc142	-22	MS LLVV S MAC V G F FL L Q G AWP H E-- GV HR K PS L L A HP G PL V K S E E T V IL Q MSDVMFEHFL	37
GPVI	39	LEKLSS-----SRYQ D AVLF I PAMKR S LAGRY R CSYQ N GSLW----- SL PSD	81
KIRc142	38	LHREGMFNDTLRLIGEHDGVSK A N F S I S R MTQ D LAGTY R CY---GSVTHSPYQ V S A PSD	94
GPVI	82	QLELVATGVFA K PSLS A Q G PAVSSGGDV T L Q QTRYG F DQFALY K EGDPAPY K NP----	137
KIRc142	95	PLD I V I I G LY E K P SL S AQ G P T VL A GEN V TLS C SS R SSYDMYHL S REGE A HERR L PAGPK	154
GPVI	138	-ERWYRA S FP I ITVT A A H SGTY R CY S FS S RD P YL S AP S D P LELV T GT S VT P S R L P TE P	196
KIRc142	155	VNGTFQ A D F PL--GP A TH G GTY R CY S FS F HDS P Y E WS K SS D PL L VS V T G NP S NS W PS P TE P	212
GPVI	197	PSSVAEFSEATAELTVSFTNKVFTTETSRSITTS P KESD S PAGPARQY T T K GN L V R IC L G	256
KIRc142	213	-SSKTGNPRHLHILIGTS----- V V I IL F I	236
GPVI	257	AVIL I ILAGFLAED W HSRR K RLRHRGRA V Q R PL P PL P LE Q TRKSHGGQDGGRQDVHSRG	316
KIRc142	237	LL F FL L -----HR W C S N K K N AAVMD Q ESAGNRTANSEDSDEQDPQEV T Y T QLNHC V FT Q	290
GPVI	317	LCS	319
KIRc142	291	RKITRPRKITRPSQRPKTPPTDIIVYTELPNAESRSKVVSCP	332

図 2 GPVI と KIR c142 とのアミノ酸配列の比較

シグナル配列を斜字体, 相同なアミノ酸を太字で示した. 下線は膜貫通領域, Pro-rich 領域は四角で囲った. ◆は Asn 型糖鎖付加部位を示す. GPVI には第 2 Ig ドメインと膜貫通領域の間に Ser/Thr 残基に富む領域が存在する.

図 3 UT-7 細胞で発現させた GPVI-Flag 融合タンパク質

レーン 1: 血小板抽出液 1 μg, レーン 2, 3: GPVI-Flag を発現させた UT-7/TPO 抽出液 10, 20 μg を泳動後, 抗 GPVI 家兎抗体でプロットを行った. レーン 4-6, 同サンプルを抗 Flag 抗体でプロットを行った³⁾.

しないことよりこの cDNA の産物が GPVI であることが確認された. 一方, Clemetson らは Cvx アフィニティカラムを用い精製した分子量 62 k の分子がコラーゲンとのプレインキュベーションにより血小板の活性化を阻害するこ

と, クローニングした分子を少量だが GPVI を発現している巨核球系細胞である Dami 細胞に発現させると, mock の細胞に比べて Cvx およびコラーゲンによる Ca^{2+} の流入が上昇すると報告している²⁾. なお, GPVI の NH_2 末端は筆者ら, Clemetson らのグループ共にアミノ酸シーケンサーで読めなかったため不明であるが, 筆者らはシグナル配列の予測より 20 残基をシグナル配列としているが Clemetson らは 23 残基をシグナル配列としている.

2. GPVI の遺伝子構造

GPVI の cDNA 配列を元にゲノムデータベースを検索すると 19 番染色体由来のシーケンスデータ上に存在していた. この 19 番染色体には免疫グロブリン受容体ファミリーに属する受容体が数多く存在し, GPVI も同様にこの染色体上に存在することはこのファミリーの進化を考える上でも興味深い. 現在, 公開されているゲノムデータ (2000 年 3 月) から考えると GPVI 遺伝子は 8 つの exon よりなり, 全長 26 Kbp 程度と考えられる (図 4).

A

B

Exon I	-TGTCTTGgtgagtc--- (intron A)---	gtccctttcttcttctcagGGCTGTGTC-	Exon II
Exon II	-CAGAGTGgtgagtc--- (intron B)---	ccagccctgctcctctccagGACCGCTCC-	Exon III
Exon III	-GCCACGGtaagga--- (intron C)---	cagactttcttttctccagGAGTTTGTG-	Exon IV
Exon IV	-GTCACAGgtaggggt--- (intron D)---	tctcattttctgatttccagGAACCTCTG-	Exon V
Exon V	-GTAGCAGgtaggttc--- (intron E)---	aacattgttttgctttcttagAATCTCAG-	Exon VI
Exon VI	-ACAAGTgtgagtaa--- (intron F)---	tagcctttgtttggttccagAGACTTCTA-	Exon VII
Exon VII	-CCAGCTGgtgagtaa--- (intron G)---	ctgcctctctcattctcagGTCCTGCC-	Exon VIII

図4 GPVIのゲノム構造の概略図 (A) と exon-intron 接合部 (B)

太文字で示した塩基は5'スプライス供与部位, 3'スプライス受容部位を示す。

表1 B細胞, T細胞, 血小板の活性化に関わるチロシンキナーゼ, アダプターおよびエフェクター分子

		B cells	T cells	platelets
PTKs	Syk/ZAP-70 family Tec family	Syk Btk	Zap-70, Syk Itk, Rlk	Syk Btk, Tec
Adaptors	SH3/SH2/SH3 Y-P Y-P/SH2	Grb2/Grap BLNK	Grb2/Grap LAT SLP-76	Grb2/Grap LAT SLP-76
Effector	PLC- γ	PLC- γ 2	PLC- γ 1	PLC- γ 2

exon I, II はシグナル配列を exon III は第1 Ig 様ドメイン, exon IV は第2 Ig 様ドメインをコードしている。mucin 型糖鎖付加部位を多く持つ Ser/Thr rich ドメインは exon V, VI VII に別れてコードされている。exon VIII はもっとも大きく膜貫通領域と細胞内領域そして約1 kbp にわたる 3' non-coding 領域を含む。第1 exon 上流には GATA-1 および PU-1 が結合すると考えられる配列が存在する。また GPIIb のプロモータ領域に存在する発現調節に関わるといわれている RIIb 様の配列も存在する。GPIIb, GP V ではこれらの転写因子の働きにより血小板系特異的な発現が行われていると考えられることより⁹⁾¹⁰⁾, GPVI の発現も同様

にコントロールされていると考えられる。

また, 興味深いことに筆者らが GPVI のクローニングを行うにあたり巨核球の CMK 細胞由来の cDNA シーケンスも行ったところ, 正常と考えられる cDNA 以外に exon V のスプライス部位に4残基の挿入を持ち膜貫通領域前で終止コドンが生じる変異が認められた (未発表データ)。

3. GPVI を介したシグナル伝達経路

GPVI・FcR γ chain 複合体によるシグナル伝達を考えるに当たって T 細胞受容体, B 細胞受容体のシグナル伝達系との共通点が見いだし

図 5 GPVI を介した血小板活性化シグナル伝達

LAT (linker for activation of T cells), PLC γ 2 (phospholipase C), Btk (Bruton's tyrosine kinase), PI 3-kinase (phosphatidylinositol 3-kinase), PIP3 (PI 3, 4, 5 triphosphate), PIP2 (PI 4, 5 diphosphate), IP3 (inositol 1, 4, 5 triphosphate), SH (src homology), PH (Pleckstrin homology) コラーゲン, Cvx, CRP は GPVI に結合し, GPVI のクラスターリングをおこす. FcR γ 鎖の ITAM の Tyr 残基を Fyn/Lyn がリン酸化し, Syk をリクルートする. Syk により LAT がリン酸化を受け, PI 3-kinase が膜へ移行し, PIP3 を生成する. この PIP3 と PLC γ 2 の PH ドメインが結合し PLC γ 2 が膜へ移行し, PLC γ 2 により IP3 が生成され, Ca^{2+} 上昇が起こると考えられる. また, PI 3-kinase により生じた PIP3 と Btk の PH ドメインが結合し, Btk, SLP-76 が直接, またはアダプター分子を介して PLC γ 2 と結合し, 活性化を起こす経路も存在すると考えられる.

れる. 表 1 に T 細胞, B 細胞シグナル伝達に関わる分子と GPVI のシグナル伝達に関わる分子を並べた.

先に述べたが, GPVI の細胞内領域には Tyr 残基は存在しないため ITAM や ITIM といったシグナルモチーフは使われてはいない. 細胞内領域も 51 残基と短く, ほかの KIR ファミリーの細胞質領域とも有為な相同性は見られないものの SH3 ドメインと結合すると考えられる I 型の pro-rich 配列が存在する. 実際, 筆者らはこの pro-rich 配列を介してアダプター分子である Grb2 が GPVI と結合することを確認している. そのため, GPVI の細胞内領域を介したシグナル伝達も重要な働きをしていると考えられる. さて, 現在考えられる GPVI-FcR γ 鎖複合体を介したシグナル伝達経路を図 5 にまとめた. コラーゲンおよび, GPVI 特異的なリガ

ドである CRP (collagen related peptide), Cvx の刺激により src ファミリーのキナーゼである Fyn・Lyn が γ 鎖のチロシン残基をリン酸化し, ITAM に Syk が結合する¹¹⁾¹²⁾. Syk はそのノックアウトマウス血小板がコラーゲン刺激に応答しないこと¹³⁾, Syk 阻害剤である peacemetal を加えることにより PLC γ 2 のチロシンリン酸化および凝集反応が阻害されることより, GPVI を介したシグナル伝達において重要な役割を果たしていると考えられる¹⁴⁾. また, PI 3 キナーゼ阻害剤である wortmannin や LY 294002 により PLC γ 2 のチロシンリン酸化は阻害されないが PLC γ 2 活性化は阻害される¹⁵⁾. PI 3 キナーゼの働きは, 膜に移行した PI 3 キナーゼにより生じた PIP3 (phosphatidylinositol 3, 4, 5 triphosphate) が PLC γ 2 の PH (pleckstrin homology) ドメインと

結合し、PLC γ 2 を膜ヘリクルートすることであると考えられる¹⁶⁾。興味深いことに PIP3 は PLC γ 1 の PH ドメインだけではなく SH2 ドメインと結合し PLC γ 1 の活性化をするとの報告¹⁷⁾もあり、PLC γ 2 も同様の機構で活性化される可能性がある。B 細胞受容体の活性化反応で重要な役割を果たしている Btk (Bruton's tyrosine kinase) は伴性劣性無 γ グロブリン血症 (XLA, X-linked agammaglobulinemia) の原因遺伝子として同定されたキナーゼである。XLA 患者血液中には成熟 B 細胞は存在しないものの T 細胞、血小板は正常に存在し、出血傾向も示さない。しかしながら患者血小板はトロンビン刺激に対しては健常者由来の血小板と変わらないもののコラーゲン刺激に対し、凝集・放出反応が減弱し、PLC γ 2 のリン酸化、 Ca^{2+} 流入が減衰する¹⁸⁾。この Btk も PH ドメインを持ちこの PH ドメインを介して PIP3 と結合し、膜への移行を行うと考えられている。T 細胞受容体のシグナルで重要な役割を果たしているチロシンリン酸化蛋白質である p38, LAT (linker for activation of T cells) はコラーゲン刺激により短い時間で強くチロシンリン酸化をうける膜タンパク質であるが、このノックアウトマウス血小板では PLC γ 2 のリン酸化および活性化が著しく阻害される¹⁹⁾。このリン酸化された LAT が PI3 キナーゼの SH2 と結合し、膜へ移行させると考えられる²⁰⁾。LAT 同様に T 細胞のシグナルで重要な役割を果たしている SLP-76 (SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kD) ノックアウトマウス血小板ではコラーゲンによる凝集、放出反応、PLC γ 2 リン酸化が阻害される²¹⁾。また、Watson らは PLC γ 2 の各ドメインと GST 融合タンパクによる共沈実験で PLC γ 2 の SH2 ドメインを介して SLP-76, LAT, Lyn, Syk, Grb2 と結合しうると報告している²²⁾。

終わりに

GPVI を介するシグナルは GPVI 本体のクローニングを待たずしてかなりの部分が明らかにされてきたが、今後クローニングによって全体像が明かにされると考えられる。また、本稿執筆中に Monnet らはタイプ III コラーゲン由来の 8 残基のペプチド KP*GEP*GPK (P*: hydroxyproline) と結合する 68, 72 k のタンパク質, THICBP (type III collagen-binding protein) が血小板に存在し、これが GPVI, p65, GPIa と異なることを示している²³⁾。今後、THICBP とインテグリン $\alpha_2\beta_1$ や GPVI との生理的な関わりなど興味深い。

文 献

- 1) Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K: A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* 84: 1440-1445, 1989.
- 2) Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TNC, Clemetson KJ: The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and the natural killer receptors. *J Biol Chem* 274: 29019-29024, 1999.
- 3) Miura Y, Ohnuma M, Jung SM, Moroi M: Cloning and expression of the platelet-specific collagen receptor glycoprotein VI. *Thromb Res* 98: 301-309, 2000.
- 4) 江角泰治, 高山博史, 内山 卓: 第 22 回日本血栓止血学会学術集会
- 5) Polgar J, Clemetson JM, Kehrel BE, Wiedemann M, Magnenat EM, Wells TNC, Clemetson KJ: Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J Biol Chem* 272: 13576-13583, 1997.
- 6) Komatsu N, Kunitama M, Yamada M, Hagiwara T, Miurazaki H, Eguchi M, Yamamoto M, Miura

- Y: Establishment and characterization of the thrombopoietin-dependent megakaryocytic cell line, UT-7/TPO. *Blood* **87**: 4552-4560, 1996.
- 7) Morton HC, van den Herik-Oudijk IE, Vossebeld P, Snijders A, Verhoeven AJ, Capel PJ, van de Winkel JG: Functional association between the human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR γ chain. Molecular basis for CD89/FcR γ chain association. *J Biol Chem* **270**: 29781-29787, 1995.
 - 8) Alexandropoulos K, Cheng G, Baltimore: Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domain with individual specificities. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3110-3114, 1995.
 - 9) Parandini M-H, Martin F, Thevenon D, Uzan G: The tissue specific transcriptional regulation of megakaryocytic glycoprotein IIb gene is controlled by interactions between a repressor and positive cis-acting elements. *Blood* **88**: 2062-2070, 1996.
 - 10) Lepage A, Uzan G, Touche N, Morales M, Cazenave JP, Lanza F, de La Salle C: Functional characterization of the human platelet glycoprotein V gene promoter: A specific marker of late megakaryocytic differentiation. *Blood* **94**: 3366-3380, 1999.
 - 11) Ezumi Y, Shindoh K, Tsuji M, Takayama H: Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor γ chain complex on human platelets. *J Exp Med* **188**: 267-276, 1998.
 - 12) Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP: Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor γ -chain. *FEBS Lett* **413**: 255-259, 1997.
 - 13) Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL, Watson SP: The Fc receptor γ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J* **16**: 2333-23341, 1997.
 - 14) Keely PJ, Parise LV: The $\alpha_2\beta_1$ integrin is a necessary co-receptor for collagen-induced activation of Syk and the subsequent phosphorylation of phospholipase $C\gamma_2$ in platelets. *J Biol Chem* **271**: 26668-26676, 1996.
 - 15) Pasquet JM, Bobe R, Gross B, Gratacap MP, Tomlinson MG, Payraastre B, Watson SP: A collagen-related peptide regulates phospholipase $C\gamma_2$ via phosphatidylinositol 3-kinase in human platelets. *Biochem J* **342**: 171-177, 1999.
 - 16) Gibbins JM, Briddon S, Shutes A, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Watson SP: The p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase associates with the Fc receptor γ -chain and linker for activator of T cells (LAT) in platelets stimulated by collagen and convulxin. *J Biol Chem* **273**: 34437-34443, 1998.
 - 17) Bae YS, Cantley LG, Chen CS, Kim SR, Kwon KS, Rhee SG: Activation of phospholipase C- γ by phosphatidylinositol 3, 4, 5-triphosphate. *J Biochem* **273**: 4465-4469
 - 18) Quek LS, Bolen J, Watson SP: A role for Bruton's tyrosine kinase (Btk) in platelet activation by collagen. *Curr Biol* **8**: 1137-1140, 1998.
 - 19) Pasquet JM, Gross B, Quek L, Asazuma N, Zhang W, Sommers CL, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Judd B, Lee JR, Koretzky G, Love PE, Samelson LE, Watson SP: LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase $C\gamma_2$ and platelet activation by the collagen receptor GPVI. *Mol Cell Biol* **19**: 8326-8334, 1999.
 - 20) Gibbins JM, Briddon S, Shutes A, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Watson SP: The p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase associates with the Fc receptor γ -chain and linker for activator of T cells (LAT) in platelets stimulated by collagen and convulxin. *J Biol Chem* **273**: 34437-34443, 1998.
 - 21) Clements JL, Lee JR, Gross B, Yang B, Olson JD, Sandra A, Watson SP, Lentz SR, Koretzky GA: Fetal hemorrhage and platelet dysfunction in SLP-76-deficient mice. *J Clin Invest* **103**: 19-25, 1999.
 - 22) Gross BS, Melford SK, Watson SP: Evidence that phospholipase C- γ_2 interacts with SLP-76,

Syk, Lyn, LAT and the Fc receptor γ -chain after stimulation of the collagen receptor glycoprotein VI in human platelets. *Eur J Biochem* **263** : 612-623, 1999.

23) Monnet E, Fauvel-Lafeve F : A new platelet receptor specific to type III collagen. *J Bio Chem* **275** : 10912-10917, 2000.