

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03229

研究課題名(和文) 一分子計測によるインテグリン接着の動的制御の解明

研究課題名(英文) The single-molecule analysis of dynamic regulation of integrin-dependent adhesion processes

研究代表者

木梨 達雄 (KINASHI, Tatsuo)

関西医科大学・医学部・教授

研究者番号：30202039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞接着分子インテグリンは細胞接着・移動・集積、増殖等に重要な影響を与えています。本研究では白血球インテグリンLFA1とICAM1による接着を制御するインテグリン結合分子talin1およびkindlin-3の一分子計測法を開発しました。それによって(1)talin1とLFA1の結合動態がLFA1とICAM1の結合動態と一致すること、(2)kindlin3はLFA1の構造が進展・開型(高親和性)に変化するときに必要であること、(3)ICAM1に結合して進展・開型LFA1になるとRap1が活性化し、talin1, kindlin3がさらに動員され接着が増強されることを明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ球は全身を循環しながら生体防御を行っています。その過程で、LFA1はICAM1という接着分子に結合しますが、その結合の強さを変化させることによって、リンパ球の停止や移動を調節します。この調節過程にはインテグリン結合分子talin1とkindlin-3が関与すると考えられていますが詳細は不明でした。本研究では、一分子計測法という新たな測定方法を用いて、talin1とkindlin-3およびその調節分子であるRap1との連携による作用機序を明らかにしました。この成果はインテグリンの接着を変化させることにつながり、白血球の異常な集積を伴う免疫疾患の新たな治療戦略に役立つと考えられます。

研究成果の概要(英文)：Integrins are cell adhesion molecules, which play important roles in cell attachment, migration and accumulation, and also influence cell growth. In this study, we have established single-molecule measurements of integrin binding proteins talin1 and kindlin-3 and thereby revealing the following points: (1) The binding kinetics of talin1 and LFA1 corresponded to that of LFA1 and ICAM1. (2) Kindlin-3 is required for LFA1 to undergo structural changes to an extended/open (high affinity) conformation. (3) When bound to ICAM1, the extended/open conformers activate small GTPase Rap1, which in turn recruits talin1 and kindlin-3 to LFA1 leading to amplification of cell attachment by LFA1. This study has demonstrated the precise adhesion mechanism of LFA1 and would contribute development of therapeutics for immune diseases in which leukocytes adhesion is abnormally accelerated.

研究分野：免疫学、分子生物学、細胞生物学

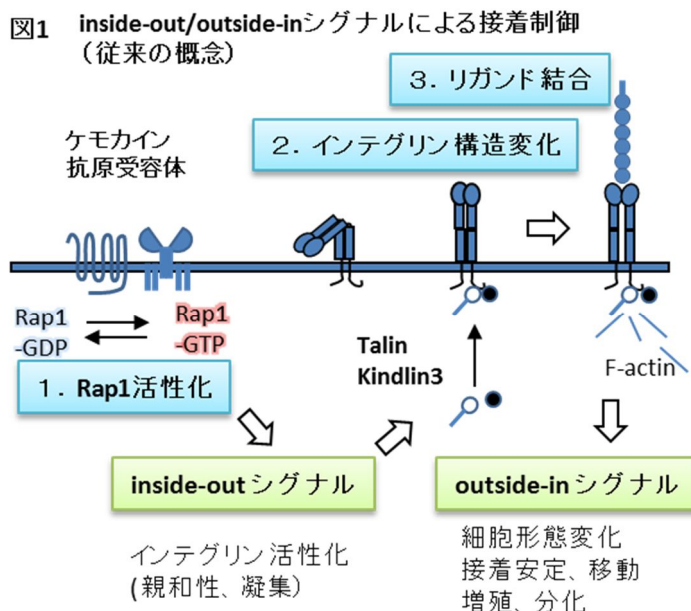
キーワード：細胞接着 インテグリン Rap1 talin kindlin3

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インテグリンは細胞外環境に応じて細胞接着を動的に制御し細胞移動や増殖等に重要な影響を与えている。しかし、従来の研究手法では動的な調節機構の解明に限界があり、いまだその制御には至っていない。インテグリンは細胞間、細胞外マトリックスとの接着を媒介する分子として組織形成や細胞増殖・分化、生体防御、創傷治癒、癌浸潤・転移に重要な役割をはたしている。

インテグリン接着の生理的過程は生体防御の局面で精力的に解析されており、白血球の血管内皮接着過程、抗原認識過程の接着(免疫シナプス)組織内移動、エフェクター機能においてケモカインや抗原受容体等によるインテグリンの秒単位の制御の重要性が明らかになっている。従来からインテグリン接着は接着性を亢進させる **inside-out** シグナルとリガンド結合による **outside-in** シグナルの逐次的制御により接着が誘導されると考えられている(図1)。構造解析からはインテグリンが細胞外領域のコンフォメーションを屈曲型から伸展/closed型、伸展/open型にダイナミックに変化させ、



リガンドに対する親和性を変化させる分子であることが明らかにされた。インテグリン接着制御に関しては低分子量 G 蛋白質 Rap1 が inside-out シグナルとして必須の機能をしていること、また FERM ドメインを持つ 2 種類のインテグリン制御分子 Talin および Kindlin が最終的にインテグリンβ鎖細胞内領域に結合しインテグリン接着性を亢進させることが明らかになった。リガンドに結合したインテグリンは細胞形態変化、安定した接着・移動、増殖・分化などの outside-in シグナルを伝達する。しかし、inside-out シグナルから outside-in シグナルの逐次的制御の妥当性の検証、および細胞内シグナル過程からインテグリンを介する接着がどのように制御されているかはいまだ解明が不十分である。私たちはこれまで世界に先駆けて **Rap1** シグナルがインテグリン接着を制御していることを明らかにしてきた。さらに **LFA-1/ICAM-1** 結合の一分子計測法を開発し、**Rap1** シグナルによるインテグリン制御分子 **Kindlin3** の局所的制御が安定した結合を誘導していることを初めて見出した。インテグリン接着の一分子計測によって従来の接着概念が大きく変化する可能性が出てきた。一分子計測による予備的実験から **Talin**、**Kindlin3** と **LFA-1** 細胞内領域との結合には **inside-out** シグナルでは不十分であり、**ICAM-1** 結合と **Rap1** 活性化の増強の双方シグナルが必要であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では接着を介した双方向シグナルによるインテグリン接着制御を明らかにする。具体的には、インテグリンとインテグリン制御分子 **tal1n1** および **kindlin3** の結合過程とリガンド結合過程を一分子計測し、**Rap1** 活性化の増幅メカニズム、それによるインテグリン制御分子、インテグリンリガンド結合の調節を明らかにする。本研究では接着の動的調節の解明のために、細胞内過程の一分子計測を行い、重要な素過程を同定し、その生理的機能や癌浸潤・転移への効

果を明らかにする。

3 . 研究の方法

(1) $\beta 2$ インテグリン LFA-1 と talin1 および kindlin-3 の会合を計測し、Rap1 活性化及び ICAM-1 結合との間の双方向制御を明らかにする。そのため、マウス proB 細胞 (BAF 細胞株) を用いてヒト LFA-1/ICAM-1 の一分子イメージングをもとに、halotag(HT)を融合させたインテグリン制御分子 talin1 および kindlin-3 による一分子イメージングを行う。内在性 talin1 および kindlin-3 を欠損させて HT-Talin1, HT-Kindlin3 を導入し、内在性に発現しているインテグリン ($\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 7$)を欠損させているため、高効率で導入した LFA-1 との相互作用が観察可能になる。talin1 および kindlin-3 の一分子イメージングによる拡散係数、結合時間から解離速度(K_{off})を算出し、inside-out シグナル刺激、ICAM-1 接着による効果を比較する。

(2) リガンド結合による Rap1 活性増幅の制御機序の解明

蛍光分子融合 Rap1-GTP affinity probe を発現させ、Rap1 活性化の局在・活性化レベルと talin1 および kindlin-3 の会合動態との関連を 2 波長計測によって調べる。Rap1 を活性化する GDP/GTP 交換因子(GEF)および不活化する GTPase 活性化蛋白質(GAP)の局在を可視化し、インテグリン結合との時空間的關係およびその分子機構を明らかにする。BAF 細胞では交換因子として主に RapGEF1 (C3G) が発現していること、LFA-1 のエピトープ抗体を用いて伸張/open 型を誘導し、上記の GEF と GAP の局在変化を誘導する上流シグナル分子、Talin、Kindlin3、細胞骨格分子の関与を阻害剤、生化学的会合、knockout/knockdown による効果等によって調べる。

(3) 1 インテグリンとインテグリン制御分子の一分子イメージング系を樹立し、リガンド会合の特性および **Rap1** 活性化の双方向制御を解析する。

(4) リンパ球および癌細胞を用いた動態測定

上記で明らかになった Rap1 活性化から Talin, Kindlin3 の結合動態に影響を与える素過程に着目し、その改変による効果を検証する。

4 . 研究成果

(1) $\beta 2$ インテグリン LFA-1 と talin1 および kindlin-3 の会合計測

マウス proB 細胞株 (Ba/F3) の $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 7$ のインテグリン遺伝子を Crspr/Cas9 法によって欠失変異を導入し、さらに talin1 および kindlin-3 をそれぞれ欠失させたうえでヒト LFA-1 ($\alpha L/\beta 2$)、halotag-talin1 (HT-Tln1)、halotag-kindlin-3 (HT-Kin3) を導入し BAF/LFA1/HT-Tln1、BAF/LFA1/HT-Kin3 を作成した。これらの細胞は正常リンパ球と同様にケモカインや PMA 刺激依存的に ICAM-1 に接着し、talin1 および kindlin-3 を欠損すると接着が阻害された。これらの細胞を用いて、LFA-1 と ICAM-1 結合、LFA-1 と talin1 および kindlin-3 について一分子イメージングによる結合動態を測定した。その結果、ICAM-1 に接着することによって talin1 および kindlin-3 は細胞膜に移行した。talin1 は $\beta 2$ 鎖細胞内領域 ($\beta 2$ -CT) の Trp747, NPxF754 に依存し、kindlin-3 は TTT760, NPxF766 に依存していたことから、ICAM-1 接着に伴う膜への移行は LFA-1 結合によるものであることがわかった。また、ICAM-1 の代わりに進展型 LFA-1 を認識する抗体 KIM127、および open 型 LFA-1 の認識する抗体 mAb24 を用いて測定した結果、mAb24 抗体によって talin1、kindlin-3 の結合頻度および結合時間が増加した。LFA-1/ICAM-1 の結合動態と LFA-1/talin1 の結合動態を比較したところ、両者はほぼ同じであること、また talin1 欠損で ICAM-1 結合が消失

することから、**taln1** は基本的に **ICAM-1** の結合動態を決定していることが示された。**taln1** の安定した結合について解離速度定数 (K_{off}) を求めたところ、高親和性 I ドメイン変異体と **ICAM-1** 結合のそれと一致した。結合の大部分は低・中親和性結合であり、高親和性結合は比較的少数で全体の 10% 程度であった。一方、**taln1** と比較して **kindlin-3** の結合は短く、 K_{off} 値は 2 倍であった。したがって **taln1** および **kindlin-3**, **LFA-1** の安定した結合体形成は困難と予想された。

(2) **Kindlin-3** の新たな機能

α L 鎖の膜直下の細胞内領域に **GFFKR** 配列があり、 β 2 鎖 **Asp731** 等と会合して α/β 鎖間の結合を安定化し (α/β clasp) **LFA-1** を低親和性の屈曲型に維持していることが知られている。実際、 α L 鎖の **GFFKR** 配列を欠失した **BAF/LFA1** **GFFKR** は細胞外領域が進展・開型 (高親和性) になり、未刺激で **ICAM1** に接着し、**HT-taln1** の結合頻度および結合時間が増加したが、その結合には **kindlin3** は必要ではなかった。また、 β 2 鎖 **Asp731** 変異体では刺激依存性接着が亢進し、**taln1** の結合が増加したが、意外なことに **kindlin-3** の結合が著しく低下した。解析の結果、**kindlin-3** は **F0** ドメインを介して β 2**D731** に結合し、 α/β clasp を阻害して **taln1** の結合の安定化を促進していることが判明した。**Kindlin-3** は高親和性 **LFA-1** が形成されたのちは、機能的に必要でないことが示唆された。

(3) **taln1** の結合機序

taln1 は **FERM** ドメインと **Rod** ドメインをもち、**FERM** ドメイン内の **F3** がインテグリン細胞内領域に結合するドメイン (**IBS1**) である。また **Rod** ドメインはアクチン、ピンキュリン、**RIAM** などが結合し、第 2 のインテグリン結合部位 (**IBS2**) もつ。**taln1** の高親和性結合について解析したところ、**FERM** ドメインは低親和性であり、接着レベルも低かった。高親和性結合には **IBS2** が必要であり、**IBS2** は β 2-CT の **Glu734/G741** に結合することが明らかになった。一方、**RIAM**, ピンキュリンは必要ないが、**F-actin**, **myosinII** が高親和性結合の形成に必要であった。

(4) 双方向性シグナルによる **LFA-1** 活性化のメカニズム

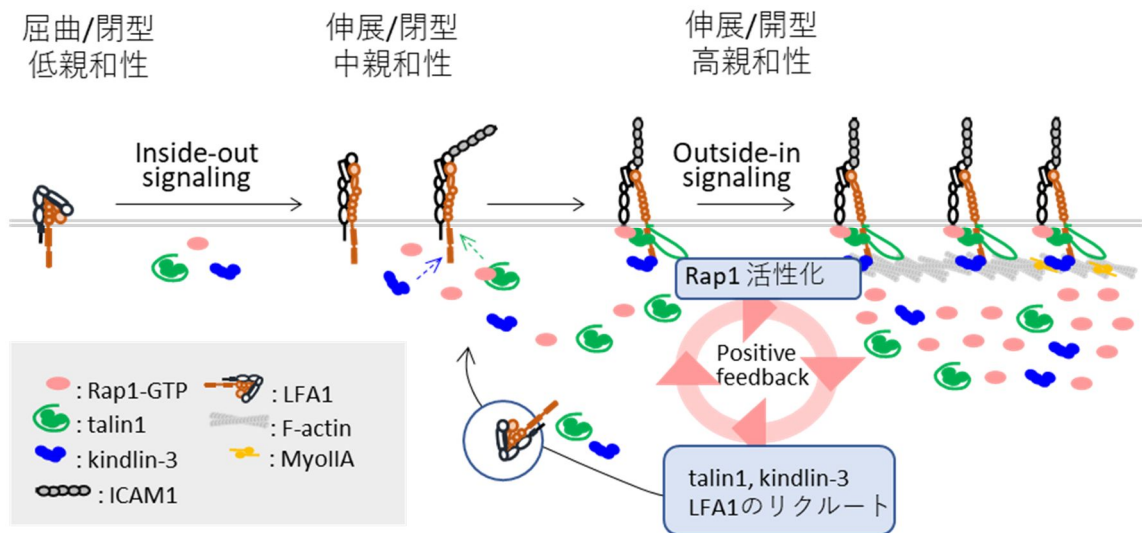
刺激依存的 **ICAM1** 接着過程において、**taln1**, **kindlin-3** と **LFA-1** の結合は **Rap1** 活性化が必要であった。しかし、**Rap1** 活性化のみでは結合頻度および時間は有意に増加せず、**ICAM-1** 結合によってはじめて増加し高親和性 **LFA-1** が形成された。さらに、高親和性 **LFA-1** 形成は **C3G (RapGEF1)** による **Rap1** の著しい活性化を誘導し、**taln1**, **kindlin-3** の結合頻度・時間の増加をもたらすと同時に、接着面における **LFA-1** の密度を増加させた。これらの結果、**LFA-1** と **ICAM-1**, **taln1**, **kindlin-3** の同時結合が一過性に生じる可能性が高まり、まれに形成された高親和性結合の増加によって接着が進行することが予想された。

<まとめと展望>

一分子計測によって **LFA-1** の活性化過程の詳細が初めて明らかになった。これまで蛋白質構造、生化学的解析、細胞生物学的解析が中心であったが、一分子計測によって定量的に活性化のメカニズムを細胞を用いて検証することが可能になった意義は大きい。これらの結果から **inside-out/outside-in** シグナルによる従来の逐次モデルではなく、双方向性の制御が支持される。すなわち、未刺激の状態では **LFA-1** は屈曲型である低親和性がほとんどである。ケモカインや **PMA** などの刺激では **taln1**, **kindlin-3** の結合時間は 1 秒以下の結合頻度は上昇傾向にあるが、安定した結合は形成されない。**LFA-1** に対して **ICAM-1** をよび **taln1**, **kindlin3** が同時に結合して初めて **LFA1** が進展・開型 (高親和性) に変化する。**kindlin-3** は α/β 鎖間の結合を緩めることに

よって、膜近傍領域で **talin** の結合が促進され、高親和性の結合が **actomyosin** 依存的な張力の発生で維持される。この高親和性結合の頻度はまれであるが、一度形成されると、**Rap1** が活性化され、**talin1**、**kindlin3**、および **LFA-1** が接着面にリクルートされる。この **positive feedback** によって高親和性結合が増強され、接着が安定化する（図2）。

図2 双方向シグナルによるLFA1活性化



以上の研究成果から LFA-1 は双方向性シグナルによる厳密に制御された接着分子であることが明らかになってきた。この双方向性制御について他のインテグリン、特に主要なインテグリンではある $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 7$ と比較する実験が進行している。インテグリン間でその作用機序を比較し、様々な免疫組織における作動様式を検証中である。特に、免疫疾患に関連のあるリンパ球 血管内皮、抗原提示細胞間の接着やグリオーマなどのがん細胞と細胞外マトリックス間の接着などの研究を進めているが、多様な組織空間での接着様式について talin1 および kindlin-3 の関与するメカニズムについて明らかになれば、創薬戦略の新たな視点が生まれると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kondo N, Ueda Y, Kinashi T.	4. 巻 Vol 14, Issue 686.
2. 論文標題 Kindlin-3 disrupts an intersubunit association in the integrin LFA1 to trigger positive feedback activation by Rap1 and talin1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Signal.	6. 最初と最後の頁 eabf2184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.abf2184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawai K., Tomonou M., Machida Y., Karuo Y., Tarui A. Sato K., Ikeda Y., Kinashi T., Omote M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of Learning Dataset for Identification of Active Molecules: A Case Study of Integrin IIb 3 Inhibitors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Inform.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/minf.202060040.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 木梨達雄	4. 巻 26(3)
2. 論文標題 【ジーンハンティングによる炎症・免疫研究の発展】IL-4およびIL-5の遺伝子クローニング	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 炎症と免疫	6. 最初と最後の頁 175-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 池田幸樹、木梨達雄	4. 巻 39
2. 論文標題 インテグリン創薬から考える一回膜貫通型タンパク質における創薬ストラテジー	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 SAR News	6. 最初と最後の頁 17-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihiro Ueda, Naoyuki Kondo, Tatsuo Kinashi	4. 巻 -
2. 論文標題 MST1/2 balance immune activation and tolerance by orchestrating adhesion, transcription, and organelle dynamics in lymphocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontier Immunology.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 木梨達雄	4. 巻 30(4)
2. 論文標題 白血球インテグリンによる接着の制御機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本血栓止血学会誌	6. 最初と最後の頁 586-595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 N. Kondo, Y. Ueda, T. Kinashi.
2. 発表標題 Kindlin-3 breaks of integrin LFA-1 inhibitory clasp to promote positive feedback activation of LFA-1 by talin1 and Rap1
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Ueda, K. Higasa, Y. Kamioka, N. Kondo, T. Kinashi.
2. 発表標題 Rap1 facilitates T cell polarity via spatial regulation of MLC and ARAP1
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Kamioka, Y. Ueda, N. Kondo, T. Kinashi.
2. 発表標題 Differential requirement of Rap1 and integrin adaptors for distinct modalities of T cell adhesion under shear flow,
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Baba, Y. Nagashima, R. Takeuchi, M. Sakai, Y. Higashiguchi, H. Katsuno-Kambe, Y. Ueda, Y. Kamioka, T. Kinashi, N. Inagaki
2. 発表標題 Shootin1b as a clutch molecule for dendritic cell chemotaxis,
3. 学会等名 CELL BIO virtual 2020(Web Meeting) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤直幸、植田祥啓、木梨達雄
2. 発表標題 Rap1/Talin-1/Kindlin-3を内包する新規ポジティブフィードバック回路によるインテグリン活性化の離散的制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会、2P-0195、オンライン学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Kamioka, Y. Ueda, N. Kondo, T. Kinashi
2. 発表標題 Roles of Rap1 signaling in lymphocyte homing to peripheral and mucosal lymph nodes
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2019 (第48回 日本免疫学会学術集会2019) Hamamatsu
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y Ueda, K Higasa, Y Kamioka, N Kondo, T Kinashi,
2. 発表標題 Rap1 accelerates T cell polarity formation via the enhancement of Rho-Rock pathways
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2019 (第48回 日本免疫学会学術集会2019) Hamamatsu
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y Ikeda, N Kondo, H Takeda, Y Makita, Y Fukunishi, Y Ueda, K Sato, M Murayama, B Ma, Y Isaka, K Kawai, T Mashimo, Y Kamioka, M Araki, M Omote and T Kinashi
2. 発表標題 インテグリン関連疾患治療薬開発に向けた薬剤スクリーニング法の開発,
3. 学会等名 第10回スクリーニング学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木梨達雄
2. 発表標題 白血球インテグリン接着のメカニズムと炎症性腸疾患への応用
3. 学会等名 第56回日本消化器免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>関西医科大学附属生命医学研究所 分子遺伝学部門 http://www3.kmu.ac.jp/molgent/posts/post4.html</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	植田 祥啓 (UEDA Yoshiohiro)		
研究協力者	上岡 裕治 (KAMIOKA Yuji)		
研究協力者	近藤 直幸 (KONDO Naoyuki)		
研究協力者	池田 幸樹 (IKEDA Yoshiki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関