

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370046

研究課題名(和文) インテグリンによる基底膜識別機構とそれに共役した細胞内情報伝達機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of basement membrane recognition by integrins

研究代表者

関口 清俊 (SEKIGUCHI KIYOTOSHI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：50187845

研究成果の概要(和文): 多くの細胞の直近の足場となっている基底膜に着目し、細胞が基底膜をどのように識別しているかを、基底膜の接着分子とその細胞表面受容体との相互作用に注目して解析した。ラミニン、ネフロネクチン等の接着分子のインテグリン結合部位の構造を明らかにするとともに、組織におけるインテグリンリガンドの発現部位を網羅的に検出する *in situ overlay* アッセイを開発した。

研究成果の概要(英文): Affinity and specificity of interactions between the integrin family of cell adhesion receptors and their ligands of basement membranes are quantitatively explored with an emphasis on laminins, nephronectin, and other Arg-Gly-Asp motif-containing proteins. A novel protocol for collectively visualizing integrin ligands on tissue specimens has also been developed.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
年度			
年度			
総計	15,500,000	4,650,000	20,150,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：基底膜、細胞外マトリックス、インテグリン、ラミニン、ネフロネクチン、テトラスパニン

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の周囲に構築される細胞外マトリックス(以下、ECM)は、組織構築のための単なる物理的な足場ではなく、細胞直近の微小環境として、細胞の生存維持と増殖・分化の制御に不可欠な役割を担っている。細胞表面にはインテグリンに代表される様々なECM受容体が発現しており、細胞はこれら受容体を

総動員してECMの分子組成を解読し、その情報に基づいて細胞内シグナル伝達系や細胞内骨格系の制御を行っている。しかし、ECMは極めて多様な分子で構成された複雑系であり、その分子組成は細胞ごと、組織ごとに大きく異なる。細胞がECM環境の違いをどのように識別し、それによって細胞内シグナル伝達や細胞内骨格系をどのように制御して

いるかは、フィブロネクチンなど一部の ECM 分子を除いて、多くの点が不明であった。

## 2. 研究の目的

ECM は間質と基底膜に大別される。基底膜は上皮と結合組織の境界に形成されるシート状の ECM で、これまでに 50 種を超える基底膜蛋白質が同定されている。本研究では、ECM のプロトタイプと考えられているこの基底膜に着目して、細胞が基底膜をどのように識別し、その情報をどのように細胞内に伝達するかを、インテグリンによる基底膜蛋白質の分子認識機構とそれに共役した細胞内シグナル伝達に注目して解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) インテグリンとそのリガンドの分子間相互作用の解析： 12 種のラミニンイソフォーム、ネフロネクチン等の Arg-Gly-Asp (RGD) 配列含有基底膜蛋白質、および各種インテグリンは、すべてヒト 293F 細胞を用いた発現系を構築し、組換え蛋白質として精製した。インテグリンは高木らの方法

(Takagi et al. Nature Struct. Biol., 8:412-416, 2001) に従い、細胞外領域だけを組換え蛋白質として発現させた。インテグリンとそのリガンドの結合は、固相結合アッセイにより定量した。また、必要に応じて表面プラズモン共鳴法による測定も行った。

(2) *in situ* インテグリン結合アッセイ： 特定のインテグリンと結合するリガンド分子を総体として可視化するため、マウス凍結組織切片を用いる *in situ* インテグリン結合アッセイを開発した。組織切片に結合した組換えインテグリンは、C 末端部に付加した ACID-BASE ペプチドに対する抗体を利用して検出した。

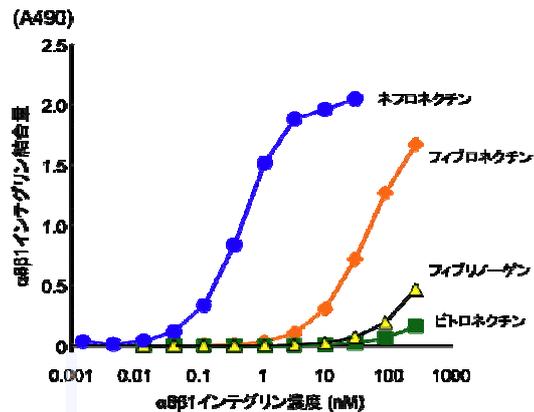
(3) インテグリンを介するシグナル伝達複合体の解析： ラミニン結合型インテグリンが CD151 等のテトラスパニンと複合体を形成することに着目し、CD151 をはじめとする様々なテトラスパニンの発現を RNAi 法により人為的に抑制することにより、ラミニン上での細胞の接着応答がどのように修飾されるかを検索した。また、基質に接着した細胞を EGTA 処理で脱着させる際、基質上に残る細胞残渣 (substrate-attached material; SAM と略す) を回収し、その分子組成を質量分析により解析した。

## 4. 研究成果

(1) インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  のリガンド結合特異性の解明： RGD 配列を認識するインテグリンの一つである  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンのリガンド結合特異性を精製インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  と様々な RGD 型インテグリンリガンドを用い

て検索し、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  がネフロネクチンに対して高い特異性を有することを明らかにした (発表論文)。また、(i) ネフロネクチンの分子中央部の “リンカー領域” がインタクトなネフロネクチンとほぼ同等の高い結合親和性と特異性を示すこと、(ii) この領域の RGD 配列を含む 23 アミノ酸残基だけでその高い結合活性が発現することを見いだした。さらに、この高い活性は RGD 配列の約 10 アミノ酸残基下流にある LFEIFEIER 配列により規定されていることを明らかにした。LFEIFEIER 配列は RGD 配列と協調的に  $\alpha 5 \beta 1$  により認識される ‘synergy site’ として機能していると考えられる。

図 1  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンのリガンド結合活性



(2)  $\alpha 5$  インテグリンのリガンド結合特異性の解明：  $\alpha 5$  鎖を含むインテグリンとしては  $\alpha 5 v 1$ 、 $\alpha 5 v 3$ 、 $\alpha 5 v 5$ 、 $\alpha 5 v 6$ 、 $\alpha 5 v 8$  の 5 種類が知られている。これら 5 種類の  $\alpha 5$  インテグリンをすべて可溶性の組換え蛋白質と発現させ、様々な RGD 含有リガンドに対する結合活性を固相結合アッセイにより検索した。なお、 $\alpha 5 v 1$  インテグリンの組換え蛋白質はほとんど発現・分泌されないことから、この組み合わせは生体内ではほとんど発現しないものと考えられる。フィブロネクチン、ビトロネクチン、フィブリノーゲン、ネフロネクチンに対するこれら  $\alpha 5$  インテグリンの結合活性を測定したところ、 $\alpha 5 v 3$  はどのリガンドにも幅広く結合したが、 $\alpha 5 v 5$  はビトロネクチンにより選択的に結合し、 $\alpha 5 v 6$  はフィブロネクチンに高い親和性を示した。 $\alpha 5 v 8$  はいずれのリガンドに対しても低い結合活性しか示さなかった。これらの結果は、どの鎖とヘテロ 2 量体を組み合わせによって、 $\alpha 5$  インテグリンのリガンド結合特異性が規定されていることを示しており、 $\alpha 5 v 8$  の場合はこれら 4 種類以外の RGD 含有リガンドが生理的なりガンドとなっている可能性が高い。

(3) ラミニンのインテグリン結合部位の同定： ラミニンは鎖、鎖、鎖が互いに coiled-coil ドメインを介して会合したヘテ

口3量体分子で、そのインテグリン結合部位は‘E8フラグメント’と呼ばれる領域に存在する。我々はラミニン-511(511)のE8フラグメントの組換え蛋白質発現系を構築し、様々な欠失変異体やスワップ変異体のインテグリン結合活性を測定することにより、インテグリン結合活性には5鎖のインタクトなLG1~LG3領域と1鎖のC末端から3番目のグルタミン酸残基が必須であることをこれまでに報告している。この結論をさらに検証するため、活性に必要なC末端領域のグルタミン酸残基を欠失している3鎖を含むラミニン-213のインテグリン結合活性を測定したところ、ラミニン-213はインテグリン結合活性を持たないことを確認した(発表論文)。一方、3鎖のC末端領域を1鎖のC末端領域とスワップしたところ、ラミニン-213は211とほぼ同等のインテグリン結合活性を獲得することがわかった。これらの結果は、1鎖と2鎖のC末端領域に保存されているグルタミン酸残基がインテグリン結合に必須であることを再確認するとともに、このグルタミン酸残基がインテグリン鎖の活性中心を構成する二価金属イオンに直接配位するリガンド側の活性残基であることを強く示唆している。

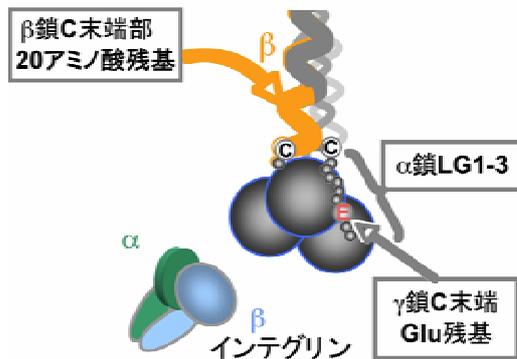


図2 ラミニンのインテグリン結合部位の構造

(4)ラミニン結合性インテグリンのリガンド結合活性の制御機構：基底膜の主要なインテグリンリガンドであるラミニンには、サブユニット組成が異なる12種のアイソフォームの存在が知られている。これら12種類のラミニンアイソフォームをすべて組換え蛋白質として発現・精製し、5種類のラミニン結合性インテグリン(31、61、64、7X11、7X21)との結合活性を調べたところ、2鎖を含むラミニン-521が1鎖を含むラミニン-511よりもインテグリン31に対して高い結合親和性を示すことを見いだした(発表論文)。同様の結果は、ラミニン-111/121とラミニン-211/221を用いた解析でも得られた。2鎖ラミニン

に対する結合選択性が他のインテグリンでも認められるかを調べたところ、7X21では同様の2鎖ラミニンへの選択性が観察されたものの、61や7X11ではそのような選択性は認められなかった。2鎖ラミニンに選択性を示す31は、7X21と同様、“X2型可変領域”をもつインテグリンであり、選択性を示さない61は7X11と同様“X1型可変領域”をもつインテグリンであることから、X2型可変領域をもつインテグリンだけが2鎖ラミニンに対して高い結合親和性を示すと予想された。この可能性を検証するため、天然には存在しない6X21を作製し、そのリガンド結合活性を検討したところ、予想通り2鎖ラミニンに対して高い結合親和性を示すことが確認された。また、1鎖と2鎖の間でC末端領域をスワップした様々な変異ラミニン-511/521E8フラグメントを作製し、C末端20アミノ酸残基が2鎖依存的な高いインテグリン結合活性に必要なことを明らかにした(図2参照)。

(5)in situ インテグリン結合アッセイ法の開発：インテグリンは鎖と鎖の組み合わせにより、多様なリガンド結合特異性を示す。51のように特定のリガンドに対して高い特異性を示すインテグリンもあれば、v3のように多数のリガンドと幅広く結合するインテグリンも存在する。インテグリンとそのリガンドの相互作用は相互に重複している場合がほとんどである。そのため、特定のインテグリンと結合するインテグリンリガンドの生体内分布を検索する場合、特定のリガンド分子の局在を調べるだけでは不十分であり、当該インテグリンと結合するリガンド分子を総体として検出する必要がある。この問題を解決するため、可溶性の組換えインテグリンを組織凍結切片と直接反応させ、インテグリン結合分子の総体を可視化する方法を開発した。この方法では、組換えインテグリンのC末端に付加したACID-BASEペプチドを利用して、組織切片に結合したインテグリンを検出する。実際に、ラミニン結合性の31と64は基底膜に選択的に結合し、一方、フィブロネクチン受容体の51は間質に選択的に結合する。この方法を用いて81リガンドの分布を調べたところ、腎臓、皮膚、脈絡叢の基底膜に結合が認められ、この結合パターンはネフロネクチンの分布と非常によく重なっていた。この結果は、81がネフロネクチンと特異的に結合するという固相結合アッセイの結果とも一致している。また、QBRICKノックアウトマウスでは、これら基底膜での81結合活性が著明の低下しており、これがQBRICKノックアウトマウスが腎臓形成不全を起こす原因であると考えられる。

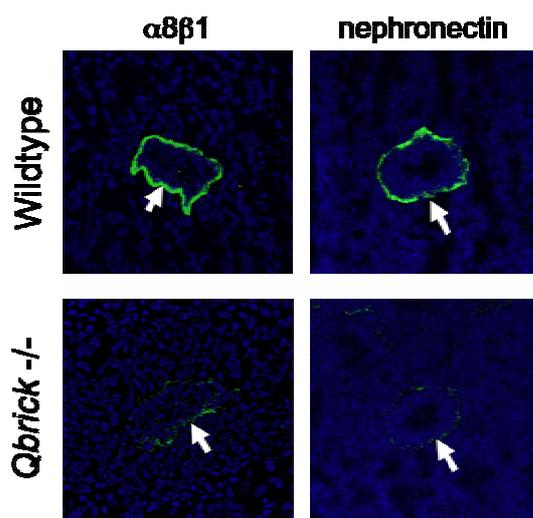


図3 インテグリン  $\alpha 8 \beta 1$  を用いる in situ インテグリン結合アッセイ  
胎生 11.5 日の正常マウス (上段) および QBRICK ノックアウトマウス (下段) の胎児の腎臓をインテグリン  $\alpha 8 \beta 1$  (左) およびネフロネクチン抗体 (右) で染色した結果を示す。インテグリン  $\alpha 8 \beta 1$  は尿管芽の基底膜に選択的に結合する。QBRICK ノックアウトマウスでは、尿管芽の基底膜は  $\alpha 8 \beta 1$  との結合活性をほとんど失っている。

(6) 細胞・基質間接着におけるテトラスパニン・インテグリン  $\alpha 3 \beta 1$  複合体の役割: ラミニン結合性インテグリンである  $\alpha 3 \beta 1$  は、テトラスパニンの一つである CD151 と安定な複合体を形成することが知られている。この CD151 とインテグリン  $\alpha 3 \beta 1$  の複合体形成の意義を明らかにするため、細胞を基質から EGTA 処理により脱着させる際、基質に残る細胞残渣 (SAM) を回収し、その分子組成を質量分析により解析した。その結果、SAM には CD151 をはじめとして、CD9、CD81 等のテトラスパニンが有意の濃縮されることを見いだした。SAM 画分へのテトラスパニンの濃縮は、ラミニン-511 上だけでなく、フィブロネクチン上でも認められた。また、EGTA で細胞を脱着させた後、基質を CD151 の抗体で染色すると、細胞の辺縁部に仮足様の構造物が染色され、SAM が細胞を基質から脱着する際に一過的に形成される“細胞の足”の一部であることを強く示唆している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 16 件)

Fujiwara, H., Ferreira, M., Donati, G., Marciano, D. K., Linton, J. M., Sato, Y., Hartner, A., Sekiguchi, K., Reichardt, L. F., and Watt, F. M. (2011) The basement membrane of hair follicle stem cells is a muscle cell niche. *Cell*, 144:577-589.

Li, S., Shimono, C., Norioka, N., Nakano, I., Okubo, T., Yagi, Y., Hayashi, M., Sato, Y., Fujisaki, H., Hattori, S., Sugiura, N., Kimata, K., and Sekiguchi, K. (2010) Activin A binds to perlecan through its pro-region that has heparin/heparan sulfate-binding activity. *J. Biol. Chem.*, 285:36645-36655.

Kiyozumi, D., Osada, A., Sugimoto, N., Weber, C. N., Ono, Y., Imai, T., Okada, A., and Sekiguchi, K. (2010) Identification of genes expressed during hair follicle induction. *J. Dermatol.*, 10:1346-8138.

Ieguchi, K., Fujita, M., Ma, Z., Davari, P., Taniguchi, Y., Sekiguchi, K., Wang, B., Takada, Y., and Takada, Y. (2010) Direct binding of the EGF-like domain of neuregulin-1 to integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha 6 \beta 4$  is involved in neuregulin-1/ErbB signaling. *J. Biol. Chem.*, 285:31388-31398.

Uchiyama, Y., Sakaguchi, M., Terabayashi, T., Inenaga, T., Inoue, S., Kobayashi, C., Oshima, N., Kiyonari, H., Nakagata, N., Sato, Y., Sekiguchi, K., Miki, H., Fujimura, S., Tanaka, S., and Nishinakamura, R. (2010) Kif26b, a kinesin family gene, regulates adhesion of the embryonic kidney mesenchyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107:9240-9245.

Shimono, C., Manabe, R., Yamada, T., Fukuda, S., Kawai, J., Furutani, Y., Tsutsui, K., Ikenaka, K., Hayashizaki, Y., and Sekiguchi, K. (2010) Identification and characterization of nCLP2, a novel Clq family protein expressed in the central nervous system. *J. Biochem.*, 151: 565-579.

Tsutsui, K., Manabe, R., Yamada, T., Nakano, I., Oguri, Y., Keene, D. R., Sengle G., Sakai, L. Y., and Sekiguchi, K. (2010) ADAMTSL-6 is a novel extracellular matrix protein that binds to fibrillin-1 and promotes fibrillin-1 fibril formation. *J. Biol. Chem.*, 285: 4870-4882.

Sato, Y., Uemura, T., Morimitsu, K., Sato-Nishiuchi, R., Manabe, R., Takagi, J., Yamada, M. and Sekiguchi, K. (2009) Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin  $\alpha 8 \beta 1$ . *J. Biol. Chem.* 284: 14524-14536.

Taniguchi, Y., Ido, H., Sanzen, N., Hayashi, M., Sato-Nishiuchi, R., Futaki, S., and Sekiguchi, K. (2009) The carboxyl-terminal region of laminin  $\beta$  chains modulates the integrin-binding affinities of laminins. *J. Biol. Chem.* 284: 7820-7831.

Dainichi, T., Kurono, S., Ohyama, B., Ishii, N., Sanzen, N., Hayashi, M., Shimono, C., Taniguchi, Y., Koga, H., Karashima, T., Yasumoto, S., Zillikens, D., Sekiguchi, K., and Hashimoto, T. (2009) Anti-laminin gamma-1 pemphigoid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 106:2800-2805.

Miyazaki, T., Futaki, S., Hasegawa, K., Kawasaki, M., Sanzen, N., Hayashi, M., Kawase, E., Sekiguchi, K., Nakatsuji, N., and Suemori, H. (2008) Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 375:27-32.

Yamada, M., Tamura Y., Sanzen, N., Sato-Nishiuchi, R., Hasegawa, H., Ashman, L. K., Rubinstein, E., Yanez-Mo, M., Sanchez-Madrid, F., and Sekiguchi, K. (2008) Probing the interaction of tetraspanin CD151 with integrin  $\alpha 3\beta 1$  using a panel of monoclonal antibodies with distinct reactivities toward the CD151-integrin  $\alpha 3\beta 1$  complex. Biochem. J., 415:417-427.

Yamada, M., Sumida, Y., Fujibayashi, A., Fukaguchi, K., Sanzen, N., Sato-Nishiuchi, R., and Sekiguchi, K. (2008) The tetraspanin CD151 regulates cell morphology and intracellular signaling on laminin-511. FEBS J., 275:3335-3351.

Ido, H., Ito, S., Taniguchi, Y., Hayashi, M., Sato-Nishiuchi, R., Sanzen, N., Hayashi, Y., Futaki, S. and Sekiguchi, K. (2008) Laminin isoforms containing the  $\alpha 3$  chain are unable to bind to integrins due to the absence of the glutamic acid residue conserved in the C-terminal regions of the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  chains. J. Biol. Chem. 283: 28149-28157.

Gao, J., DeRouen, M. C., Chen, C. H., Nguyen, M., Nguyen, N. T., Ido, H., Harada, K., Sekiguchi, K., Morgan, B. A., Miner, J. H., Oro, A. E., and Marinkovich, M. P. (2008) Laminin-511 is an epithelial message promoting dermal papilla development and function during early hair morphogenesis. Genes Dev., 22:2111-2124.

Manabe, R., Tsutsui, K., Fukuda, T., Yamada, T., Kimura, M., Nakano, I., Shimono, C., Sanzen, N., Furutani Y., Fukuda T., Oguri, Y., Shimamoto, K., Kiyozumi, D., Sato, Y., Sado, Y., Senoo, H., Yamashina, S., Fukuda, S., Kawai, J., Sugiura, N., Kimata, K., Hayashizaki, Y., and Sekiguchi, K. (2008) Transcriptome-

based systematic identification of extracellular matrix proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 105:12849-12854.

[学会発表](計12件)

Sekiguchi, K. Activin A binds to perlecan through its pro-region that has heparin/heparan sulfate-binding activity. Biennial Meeting of the American Society for Matrix Biology; Charleston, SC, USA; October 26, 2010.

Sekiguchi, K. Untangling the complexities of basement membranes. Shriners Research Center Seminar, Oregon Health & Science University, Portland, OR, USA; October 22, 2010.

Sekiguchi, K. Molecular dissection of the integrin binding sites of laminins. International Symposium on Basement Membranes in Tissue Development and Regeneration, Nashville, TN, USA; July 8, 2010.

Sekiguchi, K. Customization of the basement membrane during embryonic development. 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Yokosuka, Japan; June 4, 2009.

Sekiguchi, K. Customization of the basement membrane during embryonic development. Gordon Research Conference on Fibronectin, Integrins and Related Molecules, Ventura, CA, USA; February 4, 2009.

Sato, Y., Uemura, T., Morimitsu, K., Sato-Nishiuchi, R., Manabe, R., Takagi, J., Yamada, M., and Sekiguchi, K. Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin  $\alpha 8\beta 1$ . Gordon Research Conference on Fibronectin, Integrins and Related Molecules, Ventura, CA, USA; February 1-6, 2009.

Sekiguchi, K. Customization of the basement membrane during embryonic development. 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Yokosuka, Japan; June 4-7, 2009.

Taniguchi, Y., Ido, H., Sanzen, N., Hayashi, M., Nishiuchi, R., Futaki, S., and Sekiguchi, K. The carboxyl-terminal region of laminin b chains modulates the integrin-binding affinities of laminins. 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Yokosuka, Japan; June 4-7, 2009.

Sekiguchi, K. Molecular basis of basement membrane recognition by integrins. Gordon Research Conference on

Basement Membranes, Biddeford, ME, USA; June 23, 2008.

Taniguchi, Y., Ido, H., Sanzen, N., Hayashi, M., Nakano, I., Nishiuchi, R., Futaki, S., and Sekiguchi, K. The carboxyl-terminal region of laminin  $\alpha$  chains modulates the integrin binding activity of laminins. Gordon Research Conference on Basement Membranes, Biddeford, ME, USA; June 22-27, 2008.

Futaki, S., Nakano, I., Manabe, R., Tsutsui, K., Sanzen, N., Sado, Y., and Sekiguchi, K. Diversification of the basement membrane composition during early stages of mouse embryogenesis. Gordon Research Conference on Basement Membranes, Biddeford, ME, USA; June 22-27, 2008.

Tsutsui, K., Manabe, R., Sanzen, N., Nakano, I., Sado, Y., Futaki, S., and Sekiguchi, K. Construction of Mouse Basement Membrane Bodymap, an immunohistochemical image database of basement membrane proteins in mouse embryos. Gordon Research Conference on Basement Membranes, Biddeford, ME, USA; June 22-27, 2008.

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：ヒト多能性幹細胞用培養基材およびその応用

発明者：関口清俊、二木杉子、谿口征雅、中辻憲夫、宮崎隆道、末盛博文、川瀬栄八郎

権利者：国立大学法人大阪大学・国立大学法人京都大学

種類：特許

番号：特願 2009-235348

出願年月日：2009年10月8日

国内外の別：国内

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/chemistry/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関口 清俊 (SEKIGUCHI KIYOTOSHI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：50187845

(2) 研究分担者

山田 雅司 (YAMADA MASASHI)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：90304055