

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号： 14401

研究種目： 基盤研究（C）

研究期間： 2010～2012

課題番号： 22570141

研究課題名（和文） 基底膜ラミニン特異的な情報発信を担う細胞接着装置の解明

研究課題名（英文） Cell adhesion machineries on basement membrane laminins

研究代表者

山田 雅司（YAMADA MASASHI）

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号： 90304055

研究成果の概要（和文）：基底膜の主要構成蛋白質であるラミニンがどのような分子機構で細胞の機能（増殖・分化・生存・遊走等）を制御しているかを明らかにするため、ラミニン受容体であるインテグリンを基盤とする接着装置に着目した。本研究では、この接着装置を構成する蛋白質の同定をプロテオミクス解析により行った。その結果、テトラスパニンを主要構成成分とする新たな接着構造体を明らかにした。この構造体のさらなる解析は、特にラミニン上における細胞遊走の分子機構の解明につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanisms by which basement membrane laminins regulate various cellular functions such as growth, differentiation, survival and migration, we focused on cell adhesion complexes based on laminin-binding integrins. As a result of the proteomic analyses of the complexes, we found the possibility that tetraspanin-enriched structures are involved in the regulation of the rear-end retraction in migrating cells on laminins.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2012年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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：細胞外マトリックス、基底膜、ラミニン、インテグリン、テトラスパニン、細胞遊走、細胞極性、細胞内シグナル

### 1. 研究開始当初の背景

生体の内側と外側を隔てている上皮細胞は、外界とのインターフェースとして生体の恒常性維持に重要な働きをしている。基底膜は上皮細胞の基底面に存在する薄い膜状の構造体で、上皮細胞の単なる支持体として働くだけでなく積極的に細胞に働きかけ、上皮細胞

の増殖や分化、生存、移動等の制御に働いている。インテグリン $\alpha 3\beta 1$ は上皮細胞において多く発現し、基底膜の主要構成成分であるラミニンの受容体として機能している。この時、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ は様々な蛋白質と結合し複合体を形成することにより細胞接着装置を形成する。このインテグリン $\alpha 3\beta 1$ を基盤とする

細胞接着装置は、基底膜ラミニンから上皮細胞への制御シグナルの発信基地として働くと考えられるが、その実体についてはほとんどわかっていない。

研究代表者が所属する研究室では、ラミニンの作用機構について、間質に存在する細胞外マトリックス (ECM) 蛋白質と比較することにより研究を進めてきた。その結果、ラミニンが間質のECM 蛋白質とは異なる生物活性や細胞内シグナルを引き起こすことを見出し報告している。このことは、インテグリン $\alpha 3\beta 1$  を基盤とする細胞接着装置が、基底膜ラミニンからの情報を独自の機構により処理・発信していることを意味する。それ故、「インテグリン $\alpha 3\beta 1$  が、どのような蛋白質を構成因子とする細胞接着装置を形成するのか？」を明らかにすることは、ラミニン特異的な作用分子機序を見出す上で非常に重要である。

## 2. 研究の目的

基底膜ラミニンの受容体であるインテグリン $\alpha 3\beta 1$  を基盤とする細胞接着装置の全容解明を目的とし、“細胞の足”であるSAM

(substrate-attached material)、およびインテグリン $\alpha 3\beta 1$  と高い特異性を持って結合しているテトラスパニンCD151 に着目し研究を行う。本研究では、これらの解析で得られた結果をもとに、ラミニン特異的な細胞接着装置構成蛋白質を見出し、その細胞接着応答における機能を明らかにする。本研究を通して、基底膜と上皮細胞間の情報伝達機構を理解し、基底膜がどのような分子機序により上皮細胞の機能を制御しているかを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) “細胞の足”であるSAM

(substrate-attached material) のプロテオミクス解析をLC-MS/MS (liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry) により行い、ラミニン特異的なものを探索し解析を行う。

(2) ラミニン受容体インテグリン $\alpha 3\beta 1$  と特異的に会合することが知られているCD151の結合蛋白質を、ラミニン特異的構成蛋白質として解析する。

## 4. 研究成果

(1) インテグリン $\alpha 3\beta 1$  を基盤とする細胞接着装置のプロテオミクス解析を、LC-MS/MSを用いて行った。その際、単にインテグリン $\alpha 3$  抗体を用いてアフィニティー精製を行うのではなく、ラミニン上に接着させた細胞よりSAMを調製し解析に用いた。SAMとはイ

ンテグリンを介して基質に接着している細胞の接着点“細胞の足”のことであり、培養基質に接着した細胞をEGTA処理により剥がすことで得られる。SAMについては1970年代から1980年代にかけて生化学的な解析が進められてきたが、現在その解析はほとんど行われていない。そこで、プロテオミクス解析が進歩した今、再び“細胞の足”SAMに着目することにより、接着基質ラミニンに結合した、即ち活性化し機能しているインテグリン $\alpha 3\beta 1$  接着複合体を選択的に集め解析を行った。独立に三回の解析を行った結果、共通に検出される蛋白質を2,265種類見出した。さらに、ラミニンおよび間質ECMであるI型コラーゲン上からSAMを調製し、一部のSAM蛋白質についてウエスタンブロット解析を行った。その結果、インテグリン $\alpha 3$ 、およびその結合蛋白質として知られるテトラスパニンウエップ蛋白質(CD9, CD81, CD151, CD98, CD44, ADAM10等)がラミニン特異的にSAM画分で検出されることを見出した。また、細胞を剥がした後の基質を、テトラスパニン(CD9, CD81, CD151)抗体を用いて免疫染色した結果、基質に残されたSAMにテトラスパニンが局在することを確認した。

上述の通り、SAMにはインテグリンに加えてテトラスパニンウエップ蛋白質が多く含まれることを見出した。それに対し、接着斑関連蛋白質はほとんど検出されなかった。また、EGTA処理によるSAMの形成は、Rhoキナーゼ阻害剤Y-27632およびミオシンII阻害剤blebbistatin添加により遅延することがわかった。さらには、エンドサイトーシスを抑制するdynamin阻害剤dynasoreによっても阻害が観察された。これらのことから、SAMは、遊走細胞の尾部において観察されるretraction tailに類似していることがわかった。また、軸索ガイダンスの際に成長円錐の退縮制御関わる膜受容体であるNeuropilin-1およびPTPRFも多く検出された。これらの受容体は、上皮細胞の接着・移動の制御にも関与すると考えられている。これらの受容体を介して、ラミニン上における細胞接着および遊走が制御されている可能性が示唆された。

(2) テトラスパニンファミリー蛋白質は、ファミリー蛋白質間および他の様々な細胞膜蛋白質と結合した上でラミニン結合性インテグリンと強く相互作用していることが知られている。我々は、テトラスパニンに対する抗体が、ラミニン上において、非常に強い細胞退縮を誘導することを見いだした。さらに、CD151に結合する蛋白質のプロテオミクス解析を行った結果、細胞内小胞輸送に関わるSyntaxin-6、Scamp-3がCD151と結合するこ

とを見いだした。また、ラミニン上を遊走している細胞の後方端においてテトラスパニン陽性の細胞内小胞が非常に多く観察されることを見いだした。移動細胞の尾部におけるエンドサイトーシスが後方端におけるECMからの脱着や退縮に関与することから、テトラスパニンがこの制御に関与する可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

① Yamada, M., Mugnai, G., Serada, S., Yagi, Y., Naka, T., and Sekiguchi K. (2013) Substrate-attached materials are enriched with tetraspanins and are analogous to the structures associated with rear-end retraction in migrating cells. *Cell Adh. Migr.*, in press. (査読有り)

② Sato, Y., Shimono, C., Li, S., Nakano, I., Norioka, N., Sugiura, N., Kimata, K., Yamada, M., and Sekiguchi, K. (2013) Nephronectin binds to heparan sulfate proteoglycans via its MAM domain. *Matrix Biol.*, **32**, 188-195. (査読有り)

③ Miyazaki, T., Futaki, S., Suemori, H., Taniguchi, T., Yamada, M., Kawasaki, M., Hayashi, M., Kumagai, H., Nakatsuji, N., Sekiguchi, K., and Kawase, E. (2012) Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.*, **3**, 1236. (査読有り)

④ Koshimizu, H., Suzuki, S., Araki, T., Yamada, M., Kojima, M., and Hatanaka, H. (2011) BIT/SHPS-1 promotes antiapoptotic effect of BDNF on low potassium-induced cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **31**, 1027-1032. (査読有り)

[学会発表] (計8件)

① 宮崎隆道、二木杉子、末盛博文、谿口征雅、山田雅司、川崎美和、林麻利亜、熊谷英明、中辻憲夫、関口清俊、川瀬栄一郎：ラミニン E8 フラグメントを用いたヒト ES/iPS 細胞の単一分散培養法、第 12 回日本再生医療学会、横浜、2013 年 3 月 23 日

② Miyazaki, T., Futaki, S., Suemori, H., Taniguchi, Y., Yamada, M., Kawasaki, M., Hayashi, M., Kumagai, H., Nakatsuji, N., Sekiguchi, K., and Kawase, E. Recombinant human laminin E8 fragments (LM-E8s) support the efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells under defined and xeno-free condition. World Stem Cell Summit 2012, West Palm Beach, Florida, USA; December 3-5, 2012.

③ Miyazaki, T., Futaki, S., Suemori, H., Taniguchi, Y., Yamada, M., Kawasaki, M., Hayashi, M., Kumagai, H., Nakatsuji, N., Sekiguchi, K., and Kawase, E. Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. 10th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research, Yokohama, Japan; June 13-16, 2012.

④ 山田雅司、ムニャーニ・ガブリエル、世良田聡、仲哲治、関口清俊：Reexamination of substrate-attached materials in relation to rear retraction of migrating cells、第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会、神戸、2012 年 5 月 30 日

⑤ 亀村和昌、山田雅司、八木芳子、関口清俊：ラミニン結合性インテグリンを基盤とする接着複合体構成蛋白質の解析、第 34 回日本分子生物学会、横浜、2011 年 12 月 15 日。

⑥ 山田雅司、ムニャーニ・ガブリエル、世良田聡、仲哲治、関口清俊：Substrate-attached material において多く検出されるテトラスパニン CD151 の細胞遊走制御における役割、第 84 回日本生化学会大会、京都、2011 年 9 月 24 日。

⑦ 佐藤祐哉、下野知性、李紹良、中野伊津子、乗岡尚子、大窪哲郎、林麻利亜、杉浦信夫、木全弘治、山田雅司、関口清俊：ネフロネクチンは MAM ドメインを介してヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合する、第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010 年 12 月 7 日。

⑧山田雅司、Gabriele Mugnai、川村桂太、世良田聡、仲哲治、関口清俊：Proteomic analysis of substrate-attached materials, SAM, based on interaction of integrin  $\alpha 3 \beta 1$  with laminin-511、第62回日本細胞生物学会大会、大阪、2010年5月19-21日。

[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

山田 雅司 (YAMADA MASASHI)  
大阪大学・蛋白質研究所・助教  
研究者番号：90304055

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

関口 清俊 (SEKIGUCHI KIYOTOSHI)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授  
研究者番号：50187845