

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17082005

研究課題名（和文）細胞外マトリックスのカスタマイゼーションとその細胞識別機構

研究課題名（英文） Customization and cellular recognition of the extracellular matrix

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): ラミニン鎖のC末端部に存在するグルタミン酸残基がインテグリンとの結合に必須であり、この残基がインテグリンの活性部位に存在する2価金属イオンに配位するラミニン側の活性部位であることを明らかにした。基底膜のRGD型リガンドであるネフロネクチンがインテグリン $\alpha 8 \beta 1$ と選択的に結合することを見いだした。もう一つのRGD型リガンドであるQBRICKのノックアウトマウスを作製し、このマウスが腎臓形成不全、合指等のFraser症候群と類似した表現形質を示すことを見いだした。

研究成果の概要(英文): The critical amino acid residue defining the integrin binding site of laminins has been identified within the C-terminal region of the gamma chains. Integrin $\alpha 8 \beta 1$ was found to specifically bind to nephronectin, a basement membrane protein containing the RGD cell-adhesive motif. Mice deficient in QBRICK, another basement membrane protein containing the RGD motif, were produced. The mice exhibit the phenotypes similar to those of Fraser syndrome, including fused eyelids and fingers, skin blisters, and kidney malformation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	13,000,000	0	13,000,000
2006年度	13,000,000	0	13,000,000
2007年度	13,000,000	0	13,000,000
2008年度	13,000,000	0	13,000,000
2009年度	13,000,000	0	13,000,000
総計	65,000,000	0	65,000,000

研究分野：生化学、細胞生物学

科研費の分科・細目：構造生物化学・機能生物化学

キーワード：細胞外マトリックス、細胞接着、基底膜

1. 研究開始当初の背景

細胞周囲に構築される細胞外マトリックスは、単に組織構築に必要な物理的な足場ではなく、インテグリン等の細胞表面受容体と

の相互作用を通じて細胞の生存を保障すると同時に、増殖・分化の制御にも積極的に関わっている。しかし、細胞外マトリックスの分子組成が細胞ごとにどのようにカスタマ

イズされており、その違いを細胞はどのようにして識別しているかは、多くの点が不明であった。細胞外マトリックスは解剖学的に結合組織の主体である間質と上皮と結合組織の境界に形成される基底膜に大別される。細胞外マトリックスに関するこれまでの研究は、多くが間質の研究、特にその主成分であるコラーゲンの研究であり、基底膜の分子組成や細胞による基底膜の識別機構に関しては研究が大きく遅れていた。

2. 研究の目的

本研究では、多くの臓器実質細胞の直近の足場となっている基底膜に注目し、その構成分子と細胞側受容体であるインテグリンとの相互作用に焦点を絞って、細胞ごとにカスタマイズされた基底膜の分子組成と細胞によるその識別機構の分子的基盤の解明を目的とした。特に、基底膜の主要構成分子であり、強力なインテグリンリガンドであるラミニンと、組織特異的に発現する基底膜蛋白質ネフロネクチンと QBRICK を主な対象として、インテグリンによるこれら基底膜分子の識別機構とその生理的意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) インテグリンによる基底膜リガンドの分子識別機構の解析： ヒト組織で発現している 12 種類のラミニンアイソフォームおよびネフロネクチン等の基底膜分子は、完全長 cDNA をヒト 293F 細胞に導入し、細胞外に分泌された組換え蛋白質を特異抗体 (ラミニンの場合)あるいは C 末端に付加した FLAG タグ、6xHis タグを利用して精製した。ラミニン結合型インテグリン 5 種 (3 1、6 1、7X1 1、7X2 1、6 4) と Arg-Gly-Asp (RGD) 配列結合型インテグリン 7 種 (5 1、8 1、IIb 3、v 3、v 5、v 6、v 8) は、その細胞外領域に ACID-FLAG タグ (鎖) と BASE-6xHis タグ (鎖) を付加したものを 293F 細胞に発現させ、これらタグを利用して培養上清より精製した。基底膜蛋白質とインテグリンとの結合は固相結合アッセイにより測定した。

(2) 基底膜蛋白質の発現を改変したノックアウトマウスの作製とその表現形質の解析： インテグリンによる基底膜分子の認識機構とその生物学的意義を探索するため、3 種類の遺伝子改変マウス (QBRICK ノックアウトマウス、QBRICK ノックインマウス、ラミニン 鎖ノックインマウス) を作製した。二つのノックインマウスは、どちらも RGD 配列を不活性型の RGE 配列に置換したものを作製した。

4. 研究成果

(1) ラミニン結合型インテグリンのリガンド結合特異性の解明： 鎖の組成が異なる 5 種類のラミニン (ラミニン-111, 211, 332, 411, 511) と 5 種類のラミニン結合型インテグリンの間の結合を網羅的に解析した。その結果、ラミニン結合型インテグリンは、ラミニン-332 および 511 に選択性を示すグループ (3 1、6 1、6 4) とラミニン-211 に選択性を示すグループ (7X1 1、7X2 1) に大別されることがわかった。また、6 1 と 7X1 1 は、比較的緩やかな結合特異性を示し、他のインテグリンが結合できないラミニン 411 とも結合活性を示した。6 1 は、7X1 1 と同様、プロペラドメイン内に X1 ペプチド領域を含むことから、この領域の有無がリガンド結合特異性の幅広さを規定している可能性が示唆された。また、各アイソフォームのインテグリン結合親和性を比較すると、ラミニン-111 に対しては 7X2 1 (Kd: 1.0 nM)、211 に対しては 7X1 1 (Kd: 0.6 nM)、332 に対しては 6 1 (Kd: 7.5 nM)、411 に対しては 6 1 / 7X1 1 (Kd: > 50 nM)、511 に対しては 6 1 (Kd: 0.7 nM) が最も高い親和性を示すことがわかった (発表論文)。これらの結果は、細胞が 5 種類のラミニン結合型インテグリンを組み合わせ、基底膜のラミニン組成の違いを識別していることを示している。

(2) ラミニン分子上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ロ 3 量体分子で、そのインテグリン結合部位は E 8 フラグメントと呼ばれる領域に存在する。E 8 フラグメントはエラストラーゼ処理により得られるフラグメントの一つで、ヘテロ 3 量体の coiled-coil ドメインの一部と 鎖 C 末端領域にある 3 個の LG ドメイン (LG1~LG3) からなる。我々は、ラミニン-511 (5 1 1) の E 8 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、インタクトな LG1~LG3 の領域がインテグリン結合活性に必要であることを既に明らかにしている。しかし、LG1~LG3 を含む 鎖フラグメントだけではインテグリン結合活性を持たず、coiled-coil ドメインで 鎖および 鎖とヘテロ 3 量体を形成することが活性発現に必要であると考えられた (発表論文)。我々は、鎖および 鎖の C 末端領域のアミノ酸残基を欠失あるいは置換した一連のラミニン-511 変異体を作製し、1 鎖の C 末端から 3 番目のグルタミン酸残基がインテグリン結合活性に必要であることを突きとめた (発表論文)。このグルタミン酸残基は 1 鎖と 2 鎖の間で保存されており、ラミニン-332 (3 3 2) の 2 鎖の当該グルタミン酸残

基をグルタミンに置換すると、インテグリン結合活性は消失した(発表論文)。鎖には、1、2の他に3鎖が存在するが、3鎖には1と2の間で保存されたグルタミン酸残基が存在しない。我々は3鎖を含むラミニン-213(213)の組換え蛋白質を調製し、このラミニンがインテグリン結合活性を持たないことを確認している(発表論文)。以上の結果は、インテグリン結合活性に必須な酸性アミノ酸残基が従来予想されていた鎖LG1~LG3領域ではなく、鎖C末端領域にあることを示している。インテグリン結合部位の同定はラミニン研究における未解決の大きな課題であるが、その中核となる酸性アミノ酸残基が同定されたことの意義は大きい。

(3)ラミニン鎖によるインテグリン結合親和性の調節機構： これまでに知られている12種のラミニンアイソフォームは、1鎖を含む1ラミニン(ラミニン-111, 211, 311, 411, 511)と2鎖を含む2ラミニン(ラミニン-121, 221, 321, 421, 521)に大別される。我々は1ラミニンと2ラミニンのインテグリン結合活性を詳細に比較し、2ラミニンが1ラミニンよりもインテグリン31に対する結合親和性が高いことを見いだした(発表論文)。このような鎖依存的な結合親和性の違いはインテグリン61や64では観察されなかった。一方、インテグリン7X11と7X21で同様の解析を行ったところ、7X21がやはり2ラミニンに対して高い結合活性を示すことが判明した。2ラミニンに対して高親和性を示すインテグリン31と7X21はどちらもX2型可変領域を鎖の細胞外領域に含むことから、我々は「X2可変領域を含むインテグリンだけが2ラミニンに対して高親和性を示す」という作業仮説をたて、実際に天然には存在しないX2型可変領域を持つ6X21インテグリンを作製し、そのリガンド結合活性を検討した。その結果、予想通り、6X21は2ラミニンに対して高親和性を示すことが明らかとなった(発表論文)。また、我々は1鎖と2鎖の間で様々な領域を交換したスワップ鎖を人工的に調製し、2鎖のC末端側22残基がX2型インテグリンに対する高親和性に必要であることを明らかにした(発表論文)。以上の結果から、ラミニンのインテグリン結合部位は(1)鎖C末端領域のLG1~LG3の領域、(2)グルタミン酸残基を含む鎖C末端領域、(3)鎖C末端側20アミノ酸残基で構成されていると推定される(図1)。

(4)インテグリン81のリガンド結合特異性の解明： インテグリン81は7種類あるRGD結合型インテグリンの中でも発現が

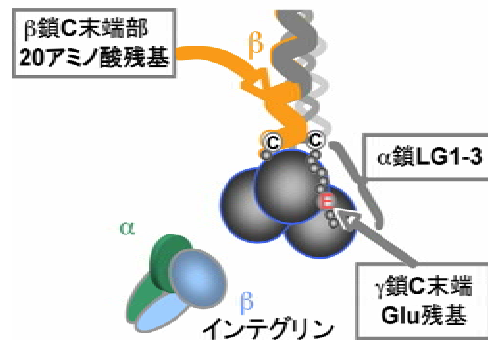


図1 ラミニンのインテグリン結合部位の構造

時空間的に制御されていることが知られている。これまでフィブロネクチンやネフロネクチンと結合することが報告されているが、そのリガンド結合特異性の詳細は不明であった。我々は、組換えインテグリン81と様々なRGDリガンド蛋白質の結合を網羅的に解析し、81がネフロネクチンに極めて高い特異性を示すことを明らかにした(発表論文)。ネフロネクチンはN末端側の5つのEGFリピートからなる領域、分子中央部のRGD配列を含むリンカー領域、C末端側のMAMドメインから構成されている。我々は、分子中央部のリンカー領域に存在するRGD配列を含む23アミノ酸残基だけでインタクトなネフロネクチンとほぼ同等の結合親和性が見られることを見だし、この23アミノ酸残基の中でもRGD配列から約10アミノ酸残基下流のLFEIFEIER配列がインテグリン81への高親和性結合に必須であることを明らかにした(発表論文)。このLFEIFEIER配列はRGD配列と協調的に81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。

(5)RGD配列を含む新規基底膜蛋白質QBRICKの同定とその機能解明：我々は、毛包形成を器官形成の一つのモデルとして、毛包形成の場で一過的に発現が誘導される細胞外マトリックス蛋白質を検索し、QBRICKと我々が命名した新規基底膜蛋白質を同定した(Kiyozumi et al. Exp. Cell Res, 306:9-23, 2005)。QBRICKはインテグリン認識配列として知られるRGD配列を含み、RGD配列依存的な細胞接着活性を示す。構造的には、分子中央部に12個のCSPGリピートとそれに続くCalx-ドメインを含み、これらの点で最近同定されたFras1およびFrem2と呼ばれる蛋白質と類似性を示す。我々は、これら3つの蛋白質(QBRICK, Fras1, Frem2)がいずれも基底膜に局在すること、さらに毛包を含む複数の器官で基底膜の同じ部位に共発現することを見出した(発表論文)。また、Qbrickのノックアウトマウスを作製し、このマウス

が表皮の水疱形成、合指、潜在眼球症、腎臓形成異常といった、ヒトの Fraser 症候群と同じ表現形質を示すことを明らかにした（発表論文）。Fras1 と Frem2 の遺伝子も Fraser 症候群の原因遺伝子であることが最近報告されており、これら 3 つの蛋白質は機能的にも互いに密接に関連している可能性が高い。Qbrick ノックアウトマウスでは、QBRICK だけでなく、Fras1 および Frem2 の発現も同時に消失（あるいは著明に減少）しており（図 2）、これらの蛋白質は協調的に（おそらくは複合体を形成して）基底膜に組み込まれるものと推定される。実際、in vitro で発現させたこれら 3 つの QBRICK ファミリー蛋白質は複合体を形成して共免疫沈降されることを我々は確認している（発表論文）。興味深いことに、QBRICK が間充細胞から分泌されるのに対して、Fras1 と Frem2 は上皮細胞から分泌される。従って、これらの蛋白質が複合体を形成するためには、上皮細胞と間充細胞の協同作用が必要である。QBRICK ファミリー蛋白質の機能の解明は、器官形成における上皮-間充細胞相互作用の分子機構の解明に新たな手がかりを与えるものと期待される。

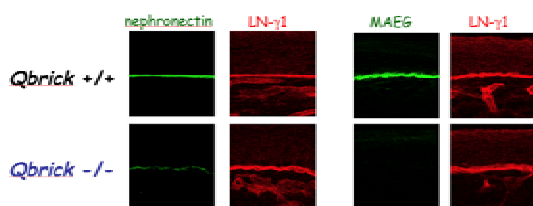


図 2 QBRICK ノックアウトマウスでは Fras1 と Frem2 の発現も消失する

（6）基底膜による中胚葉分化の制御機構：基底膜がどのように細胞の挙動や運命を制御しているかをより直截的に検証するため、我々はマウス ES 細胞から調製した胚様体を利用して、初期胚の中胚葉分化における基底膜の役割を解析した。具体的には、Edgar ら（英国・Liverpool 大学）が確立したラミニン 1 鎖欠失 ES 細胞を利用し、胚様体が基底膜を構築出来ないときに、3 胚葉分化がどのように影響されるかを cDNA microarray を用いて解析した。その結果、基底膜ができない胚様体では、上皮-間充細胞転換（epithelial-mesenchymal transition: EMT）に関連した遺伝子および間充細胞マーカー遺伝子の発現が胚様体形成の初期から亢進することを見いだした（発表論文）。EMT のマスターレギュレーターとしては Snai1 ファミリーおよび Twist ファミリーの転写因子が知られているが、基底膜ができない胚様体では、Snai2 および Twist2 遺伝子の発現が著明に増

加していた。また、基底膜を形成する対照の胚様体に Snai2 遺伝子を過剰発現させると、原始外胚葉の上皮化が抑制され、基底膜を形成できない胚様体と同様の表現形質が観察された。さらに、対照の胚様体を 10 日間培養すると、Brachyury 陽性の中胚葉細胞が原始外胚葉と原始内胚葉の間に出現するが、これらの中胚葉細胞は原始外胚葉直下の基底膜が断片化した部位に限局して観察された（発表論文）。これらの結果は、基底膜に接着した原始外胚葉細胞では Snai2 や Twist2 のような EMT のマスター制御因子の発現が抑制され、中胚葉への分化誘導が抑制されると同時に上皮化が進行すること、また、原腸形成時には原始外胚葉直下の基底膜が積極的に分解（あるいは断片化）され、その結果として基底膜の拘束から解放された細胞で EMT がおこり、中胚葉分化が誘導されることを示唆している。実際、胎生 6.5 日のマウス胚では、原腸形成がおこる原始線条の部位で原始外胚葉直下の基底膜が断片化し、不連続になることを我々は確認している。

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 9 件）

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 alpha8beta1. *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.

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 gamma3 chain are unable to bind to integrins due to the absence of the glutamic acid residue conserved in the C-terminal regions of the gamma1 and gamma2 chains. *J. Biol. Chem.* 283: 28149-28157.

Fujiwara, H., Hayashi, Y., Sanzen, N.,

Kobayashi, R., Weber, C. N., Emoto, T., Futaki, S., Niwa, H., Murray, P., Edgar, D., and Sekiguchi, K. (2007) Regulation of mesodermal differentiation of mouse embryonic stem cells by basement membranes. *J. Biol. Chem.* 282: 29701-29711.

Ido, H., Nakamura, A., Kobayashi, R., Ito, S., Li, S., Futaki, S. and Sekiguchi, K. (2007) The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin gamma chains in integrin binding by laminins. *J. Biol. Chem.* 282: 11144-11154.

Kiyozumi, D., Sugimoto, N. and Sekiguchi, K. (2006) Breakdown of the reciprocal stabilization of QBRICK/Frem1, Fras1, and Frem2 at the basement membrane provokes Fraser syndrome-like defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11981-11986.

Ido, H., Harada, K., Yagi, Y., and Sekiguchi, K. (2006) Probing the integrin-binding site within the globular domain of laminin-511 with the function-blocking monoclonal antibody 4C7. *Matrix Biol.*, 25:112-117.

Nishiuchi, R., Takagi, J., Hayashi, M., Ido, H., Yagi, Y., Sanzen, N., Tsuji, T., Yamada, M., and Sekiguchi, K. (2006) Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrins. *Matrix Biol.*, 25:189-197.

〔学会発表〕(計 11 件)

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

Sato, Y., Uemura, T., Morimitsu, K., Sato-Nishiuchi, R., Manabe, R., Takagi, J., Yamada, M., 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. Gordon Research Conference on Fibronectin, Integrins and Related Molecules, Ventura, CA, USA; February 1-6, 2009.

Taniguchi, Y., Ido, H., Sanzen, N., Hayashi, M., Nakano, I., Nishiuchi, R., Futaki, S., Sekiguchi, K. The carboxyl-terminal region of laminin beta 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., 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., 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.

Sekiguchi, K. Molecular basis of basement membrane recognition by integrins. Gordon Research Conference on Basement Membranes. Biddeford, ME, USA; June 22-27, 2008.

Sekiguchi, K. Diversity and specificity of the adhesive interactions of cells with the basement membrane. XIIIth International Symposium on Basement Membranes. Cologne, Germany; September 19-22, 2007.

Sekiguchi, K. Molecular basis of adhesive interactions of cells with the basement membrane. Glycobiology and Sphingobiology 2007. Tokushima, Japan; March 1, 2007.

Kiyozumi, D., Sugimoto, N. and Sekiguchi, K. Reciprocal stabilization of Fraser syndrome-associated proteins. American Society for Matrix Biology Biennial National Meeting. Nashville, TN, USA; November 1-4, 2006.

Yamada, M., Sumida, Y., Fujibayashi, A. and Sekiguchi, K. CD151 regulates cell morphology and migration of human lung adenocarcinoma. FASEB Summer Research Conference on Membrane Organisation by Tetraspanins and Small Multi-transmembrane Proteins. Tucson, AZ, USA; July 22-27, 2006.

〔図書〕(計 3 件)

関口清俊：再生医療・細胞組織工学のためのマトリックス生物学入門。再生医療のための細胞生物学、コロナ社、pp.1-25、2007。

山田雅司、関口清俊：細胞外マトリックスと増殖因子：細胞を制御するシグナル伝達の

分子機構. 再生医療のための細胞生物学、コロナ社、pp.76-98、2007.

眞鍋理一郎、関口清俊：マトリックス組込型増殖因子とマトリックス工学. 再生医療のための細胞生物学、コロナ社、pp.158-172、2007.

〔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利用

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

権利者：国立大学法人 大阪大学および国立大学法人 京都大学

種類：特許

番号：2009-234583

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

二木 杉子 (FUTAKI SUGIKO)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：00403014

浄住 大慈 (KIYOZUMI DAIJI)

大阪大学・蛋白質研究所・特任研究員

研究者番号：70452430