

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 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791728

研究課題名（和文）ヘミデスモゾーム構成タンパクのリクルートおよびリサイクルの解明

研究課題名（英文）Elucidation of recruitment and recycling of hemidesmosome structural proteins

研究代表者

小澤 俊幸（OZAWA TOSHIYUKI）

大阪市立大学・大学院医学研究科形成外科・病院講師

研究者番号：50570602

研究成果の概要（和文）：表皮角化細胞が運動する際に、運動方向に assemble される Hemidesmosom 構成タンパクは近位よりスライドしないことがわかった。また、新たに生成されたタンパクではないこともわかった。つまり、細胞が運動する際に、その leading edge に、新たに assemble される $\beta 4$ integrin は endocytosis によってリサイクルされたタンパクであることがわかった。またリサイクルまでの時間を考慮すれば、short loop の endocytosis である可能性が高く、今後 Rab4 などのタンパクとの関係を中心に研究を行っていく必要があると考えた。

研究成果の概要（英文）：We found that when epidermal keratinocytes move, the hemidesmosome structural proteins assembled in the direction of movement do not slide from the proximal portion. We also found that these are not newly synthesized proteins. In other words, when cells move $\beta 4$ -integrin newly assembled in the leading edge comprises proteins newly recycled through endocytosis. If we consider the time taken to recycle, it is likely that this represents short loop endocytosis, indicating the need for further studies examining the relationship with proteins such as Rab4.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科学・創傷治癒学

キーワード：Hemidesmosome、リクルート、リサイクル、 $\beta 4$ integrin

1. 研究開始当初の背景
皮膚が何らかの作用により欠損した場合、表皮細胞は速やかに創閉鎖方向に運動を開始

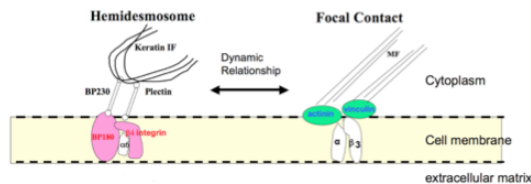
する。その運動は基底膜および周囲の細胞との接着を保ちながら、1つ1つの細胞がばらばらにはがれないようにシート状に行われ

る。この運動は間葉系細胞の運動とは異なり非常に緻密で制御された運動であり、これを制御するのは細胞-細胞接着および細胞-細胞外マトリクス接着である。

上皮系細胞と基底膜（細胞外マトリクス）の間で行われる接着は主に、Hemidesmosomeと呼ばれる接着機構により行われている。Hemidesmosomeの分子構築としては $\alpha 6 \beta 4$ integrin が構造およびシグナルトランスダクションの中心的な分子であり、 $\alpha 6 \beta 4$ integrin を核としてプレクチン、BP180、BP230などの分子と巨大な分子複合体を形成している。Hemidesmosomeは巨大な分子複合体であるため、近年まで静的で強固な物 Stable anchoring device と呼ばれ、ダイナミックな構造とは考えられていなかった。しかし、我々はLive cell imagingの手法を用いて Hemidesmosome 構成タンパクがダイナミックな構造であり、比較的短い時間内にターンオーバーを繰り返し運動することを証明した。

また、表皮角化細胞の基底膜を結合する接着機構は Hemidesmosome だけでなく、Focal contact (Focal adhesion)も存在する。Focal contact は間葉系細胞の主な接着機構であり、非常にダイナミックな構造であることが知られている。一方、近年まで表皮角化細胞の Focal contact はあまり注目されず、報告も Hemidesmosome と比較し少なかった。しかし、上皮系細胞の Focal contact が癌の転移に重要なことや、難病である水疱症の発生機序に関与することが報告されるにともない報告もふえてきた。

我々は、表皮角化細胞に存在する2つの細胞-細胞外マトリクス接着機構 (Hemidesmosome と Focal contact) が共にダイナミックなことに注目し、Live cell imaging 法を用いて両者の間に動的相互作用が存在することを報告した(Fig 1a,b)。(Fig1a)



(Fig1b)

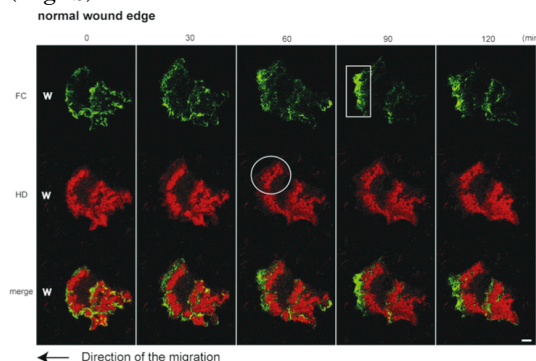


Fig 1. a) Hemidesmosome と Focal contact の構成タンパクの模式図。各々が細胞外マトリクスに結合している。 b) ケラチノサイト不死化株である HaCat 細胞に、Hemidesmosome (HD) 構成タンパクである $\beta 4$ integrin を YFP 標識した plasmid と Focal contact (FC) の構成タンパクである α -actinin を CFP 標識した plasmid を dual transfection した。色は各々、赤色と緑色に変換している。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、両者が transfection されている典型的な細胞を 120 分間観察した。細胞は右から左に移動する。Normal 条件では、細胞が運動する時は leading edge に FC が必ず最初に assemble し、FC の生成された部位を追いかけると HD が assemble する。Leading edge の反対側では、HD が disassemble することにより、細胞の運動を補助している。

表皮角化細胞における Hemidesmosome は上記のごとく、Focal contact と同様にダイナミックな構造であり(Fig2)、また、両者の間には相互作用が存在することが解明された。

一方、Focal contact は、p53などを介したリサイクルおよびリクルートの研究がなされ、癌転移のメカニズムを解明する多くの報告がなされている。

以上より、我々は Hemidesmosome のダイナミック、リサイクルおよびリクルートの詳細を解明することができれば、Focal contact の研究と同様に癌転移のメカニズムの解明につながるのではと考えた。しかし、現在の報告されている動画の解析および FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)では解明に限界があると考えた(Fig 3)。

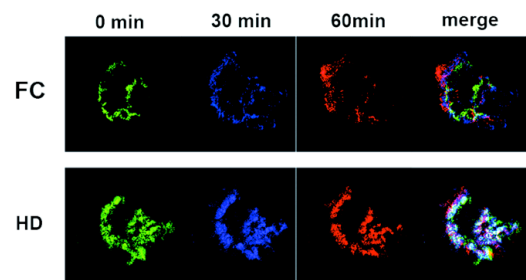
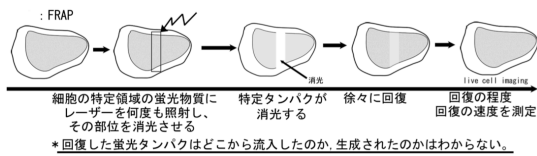


Fig2. 同一の細胞が右から左へ運動する時の、Focal contact (FC) および Hemidesmosome(HD)を0分、30分、60分で緑、青、赤で色分けた。右端の写真は、各々を重ね合わせた。FCは非常にダイナミックな構造であり、HDもダイナミックな構造であることがわかる。

動いていないタンパク部分は重ね合わせで白になる。ダイナミックな部分は色が重ならない。



(Fig3)

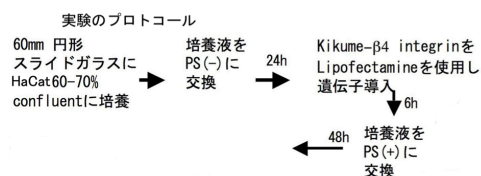
2. 研究の目的

Hemidesmosome 構成タンパクである $\beta 4$ integrin のダイナミクス、リクルートおよびリサイクルを解明することを目的とする。具体的には、紫外線による変色機能（紫外線照射部位のみ緑から赤に変色する）を持った vector (Kikume Green-Red) に $\beta 4$ integrin の遺伝子コードを導入した plasmid を作成する。それを表皮角化細胞に遺伝子導入し発現させ、発現している一部を緑から赤に変化させタンパクのダイナミクスを Live cell imaging methods を用いて共焦点レーザー顕微鏡下に観察する。

3. 研究の方法

- 1, Hemidesmosome の構成タンパクである $\beta 4$ integrin の遺伝子コードを紫外線による変色機能を持った kikume Green-Red vector に導入し plasmid を作成する。
- 2, その plasmid を HaCat に遺伝子導入し、kikume Green-Red $\beta 4$ integrin を発現させる。
- 3, 発現したタンパクに共焦点レーザー顕微鏡下に紫外線を一部照射し、kikume Green-Red $\beta 4$ integrin タンパクを変色させる。
- 4, その後 Live cell imaging method でその細胞を観察し、緑色と赤色各々の $\beta 4$ integrin を同時に観察する。

下記に実験の手順を示す (Fig4)



発現が確認できている YFP- $\beta 4$ integrin plasmid (Ozawa T et al. J Invest Dermatol. 2010 Jun;130 (6):1624-35.) から、制限酵素 Kpn1 および Nhe1 を用いて $\beta 4$ integrin の遺伝子コード部位を切断しゲルにて抽出。同様に Kikume Green-Red (MBL) を Kpn1 および Nhe1 を用いて切断および抽出。各々を DNA

Ligation Kit (Takara) を用いて ligation を行った。Ligation 後シーケンスを行い塩基配列を確認し、HaCat 細胞に lipofectamin 2000 (invitrogen) を使用し遺伝子導入を行った。遺伝子導入後、共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP5 (Leica) を用いて GFP 観察条件で発現を確認した (Fig5)。

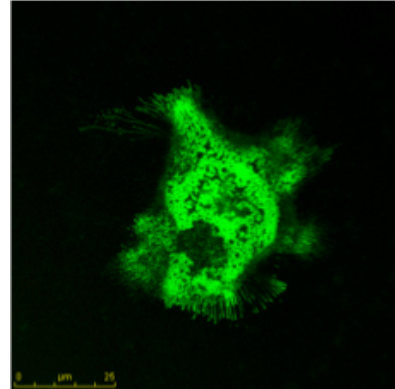


Fig5) ガラス平面上に、緑色の三日月状の Kikume Green-Red- $\beta 4$ integrin (Hemidesmosome) の発現を認める。Cat paw パターンも認める。

その後、この細胞全体に紫外線領域の波長 (405nm) を 5.24 秒 \times 2 回を照射し色調の変化を観察した (Fig6)。

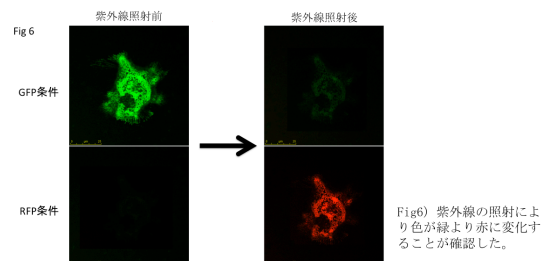


Fig6) 紫外線の照射により色が緑より赤に変化することが確認した。

次に、Kikume Green-Red- $\beta 4$ integrin を HaCat に遺伝子導入後、紫外線の部分照射を行った。照射部分のみが赤色に変化したのを確認の後、120 分間 Live cell imaging を行った (Fig7)。赤色 Kikume Green-Red- $\beta 4$ integrin の disassemble は観察できるが、赤色の $\beta 4$ integrin の近位への移動 (スライド) は観察されなかった。

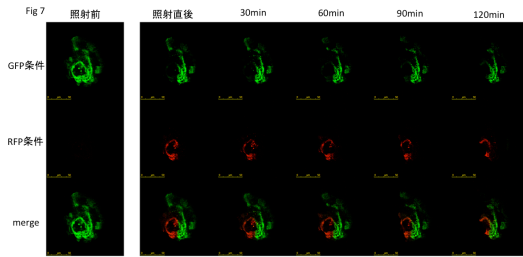
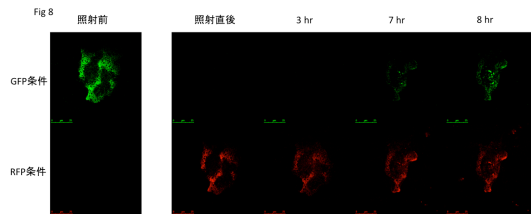


Fig 7) 紫外線の部分照射で $\beta 4$ integrin の局在を標識することが可能であった。緑と赤の $\beta 4$ integrin は、紫外線照射後 2 時間も混じり合うことはなかった

最後に、Kikume Green-Red- $\beta 4$ integrin を同様に HaCat に遺伝子導入後、紫外線の全照射を行い、8 時間の Live cell imaging を行った。約 7 時間後より、再度緑色 $\beta 4$ integrin の発現を認めた。



Hemidesmosome はダイナミックな構造であることは明らかであるが、これまでの研究では可視化の方法が GFP 単色の vector によるものであったため、運動の方向、時間などを解析には限界があった。

そこで我々は kikume Green-Red vector を使用して、1 つの細胞内の $\beta 4$ integrin を紫外線による色の変化により部位を区別する方法を考案した。

4. 研究成果

この方法を用いて今回の実験で解明できたことは

$\beta 4$ integrin は膜内移動 (スライド) は行わない。

$\beta 4$ integrin の新たな生成には 7 時間必要である。
ということである。

上記の結果と Fig2 の結果より、上皮細胞が運動する際に運動方向に assemble される Hemidesmosom は近位よりスライドしたものでもなく、また、新たに生成されたものではないことがわかる。つまり、leading edge に近傍に新たに assemble された $\beta 4$ integrin は endocytosis によってリサイクルされたも

のと考えられる。またリサイクルまでの時間を考慮すれば、short loop の endocytosis である可能性が高く、今後 Rab4 などのタンパクとの関係を中心に研究を行っていく必要があると考えている。

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 1 件)

① Ozawa T, Tsuruta D. Comparative study of the dynamics of focal contacts in live epithelial and mesenchymal cells. Med Mol Morphol. 2011 Mar;44(1):27-33.

[学会発表] (計 1 件)

①小澤俊幸、鶴田大輔、小林裕美、石井正光、原田輝一. Hemidesmosome 構成タンパクのリクルートおよびリサイクルの検討. 第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会. 2010. 9. 16. 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 俊幸 (OZAWA TOSHIYUKI)

大阪市立大学 大学院医学研究科・病院講師

研究者番号 : 50570602

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者