

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501316

研究課題名(和文) インテグリンのエンドサイトーシス機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of integrin endocytosis

研究代表者

梅田 一彰 (Umeda, Kazuaki)

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：80444876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：インテグリンは、主に細胞基質間接着を担う膜タンパク質で、細胞増殖、細胞分化、細胞運動等に関与していることが知られている。よって、膜上に局在するインテグリンの量を決定する機構の解明は重要である。しかしながら、詳細は不明である。そこで、本研究では、インテグリンの細胞内領域がユビキチン化されることで、細胞膜上から細胞内へエンドサイトーシスされるという想定のもと、各種解析を行った。インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ が、エンドサイトーシスされる時に、ユビキチン化されること、およびそのユビキチン化はNedd4Lによって行われることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Integrin heterodimers, consisting of alpha- and beta- chains, are cell surface receptors involved in adhesion between cells and extracellular matrix. They play important roles in various cellular events such as cell cytokinesis, differentiation and migration. Therefore it is important to elucidate the molecular mechanisms by which the amount of integrins on the cell surface are regulated. However the mechanisms remains unknown precisely. We identified that integrin $\alpha 5 \beta 1$ are ubiquitinated by Nedd4L, an E3 ubiquitin ligase, during endocytosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：インテグリン エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

インテグリンは α 鎖と β 鎖のヘテロ 2 量体から構成されており、ヒトでは、 α 鎖は 18 種類、 β 鎖は 8 種類あり、少なくとも 24 種類の組合せが存在する。インテグリンは細胞外では細胞外基質と結合し、細胞内ではタリンやパキシリンを介して主にアクチン系細胞骨格と結合している。インテグリンは、細胞外基質に対する接着分子として機能するのみならず、受容体として細胞外基質からのシグナルを細胞骨格に伝達し、細胞運動や増殖などの様々な機能に積極的に関与していると考えられている。これら機能の遂行のために、インテグリンは細胞内プールから細胞の先端部などの必要な場所へトランスポートされるとともに、細胞表面から速やかにエンドサイトーシスされることで、細胞表面のインテグリンは時間的・空間的に厳密に調節されている (図 1)

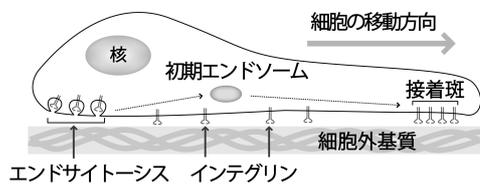


図 1. インテグリンのエンドサイトーシス

2. 研究の目的

私共は、新しいリン脂質結合タンパク質 SGIP1 α を発見し、SGIP1 α がクラスリン依存性のエンドサイトーシスを制御していることを明らかにしている (J. Biol. Chem., 282: 26481-9, 2007)。さらに SGIP1 α と相溶性が高い分子 FCHO2 タンパク質の機能解析も行っている。FCHO2 は、その N 末端に F-BAR ドメインと呼ばれるリン脂質結合ドメインを有する。このドメインは細胞膜リン脂質に結合するだけでなく、細胞膜を屈曲、陥入させる活性をもち、エンドサイトーシス過程の細胞膜の陥入に重要な役割を担っていると考えられている。私共は、FCHO2 をノックダウンすると (1) 接着斑の拡大、(2) インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ のエンドサイトーシスが抑制されることを見出している。そこでインテグリン $\alpha 5\beta 1$ のエンドサイトーシスの分子機構の解明を目的に、各種解析を行った。

3. 研究の方法

(1) インテグリンのユビキチン化

HeLa 細胞に発現しているインテグリン $\alpha 5\beta 1$ の中で、細胞膜上の画分のみをラベルするため、インテグリン $\alpha 5$ または $\beta 1$ の抗体と細胞をインキュベートした。免疫沈降法により、膜上の画分を精製、電気泳動後、ウェスタンブロットを行った。ユビキチン抗体で検出した。

(2) インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 変異体の作製と解析

ユビキチンは酵素反応によって標的タンパク質のリジン残基に共有結合される。そこで、インテグリン $\alpha 5$ および $\beta 1$ の細胞内領域のリジンをすべてアルギニンに置換した変異遺伝子を作製し、ユビキチン化されない $\alpha 5$ と $\beta 1$ の変異体を作製した。4 種類の安定発現細胞株 (野生型 $\alpha 5$ 野生型 $\beta 1$ 、野生型 $\alpha 5$ 変異型 $\beta 1$ 、変異型 $\alpha 5$ 野生型 $\beta 1$ 、変異型 $\alpha 5$ 変異型 $\beta 1$) を作製し、それぞれのユビキチン化の有無とエンドサイトーシス量を測定した。また、インテグリンのエンドサイトーシス量の測定は、細胞表面と細胞内に存在するインテグリンを区別するため、細胞表面のインテグリンを抗体ラベルする方法を用いた。細胞表面のインテグリンを抗体ラベルした後、一定時間培養し、細胞内に取り込まれたインテグリンのエンドサイトーシス量を測定した。インテグリンの定量は、ウェスタンブロットティング法を用いた。

(3) インテグリンをユビキチン化する酵素の探索

インテグリン $\alpha 5\beta 1$ をユビキチン化する酵素を、RNAi 法を用いて探索した。各種既知のユビキチン化酵素をノックダウンして、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ のエンドサイトーシス量が減少するか否かを指標に、スクリーニングした。

(4) ユビキチン化酵素の解析

インテグリン $\alpha 5\beta 1$ をユビキチン化する酵素が、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ と直接または間接的に結合するかどうか、免疫沈降法により調べた。

(5) インテグリンとユビキチン化酵素の結合を仲介するタンパク質の探索

上記タンパク質を、データベースで検索し、免疫沈降法により同定した。

(6) RNAi 法を用いた各種解析

同定したユビキチン化酵素および結合を仲介するタンパク質を RNAi 法によりノックダウンした時に、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ のユビキチン化、エンドサイトーシスおよび細胞運動が抑制されるかどうかを調べた。

4. 研究成果

(1) インテグリンのユビキチン化

多くの膜タンパク質において、ユビキチン化修飾されることで、エンドサイトーシスが惹起され、細胞内に取り込まれることが知られている。そこで、細胞膜上のインテグリン $\alpha 5\beta 1$ がエンドサイトーシスされる際にユビキチン化されるかどうかを調べた。インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 共に、ユビキチン化されていることが確認できた。

(2) インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 変異体の作製と解析

ユビキチン化がインテグリンのエンドサイトーシスに必要であるか否かを確認するため、研究方法で述べた4種類の安定発現細胞株(野生型 $\alpha 5$ 野生型 $\beta 1$ 、野生型 $\alpha 5$ 変異型 $\beta 1$ 、変異型 $\alpha 5$ 野生型 $\beta 1$ 、変異型 $\alpha 5$ 変異型 $\beta 1$)を作製し、エンドサイトーシス量を測定した

その結果、変異型 $\alpha 5$ 変異型 $\beta 1$ の組み合わせのみが、エンドサイトーシス量が減少した。一方、野生型 $\alpha 5$ 変異型 $\beta 1$ 、変異型 $\alpha 5$ 野生型 $\beta 1$ は、いずれも、エンドサイトーシス量が野生型 $\alpha 5$ 野生型 $\beta 1$ と同等であった。よって、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ のエンドサイトーシスには、 $\alpha 5$ または $\beta 1$ のどちらか一方がユビキチン化されることが必要であると考えられた。

(3) インテグリンをユビキチン化する酵素の探索および機能解析

調べたユビキチン化酵素の中で、HECT型ユビキチン化酵素であるNedd4Lをノックダウンした細胞において、顕著にインテグリン $\alpha 5\beta 1$ のエンドサイトーシス量が減少した。そこで、Nedd4Lをノックダウンした時に、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ のユビキチン化が減少するか否かを、ウェスタンブロットティング法を用いて調べたところ、コントロールと比較して、ユビキチン化量が減少していた。インテグリン $\alpha 5\beta 1$ はエンドサイトーシスされる際に、Nedd4Lによりユビキチン化されることが示唆された。

(4) インテグリンとユビキチン化酵素の結合を仲介するタンパク質の探索

インテグリン $\alpha 5\beta 1$ とNedd4Lが直接結合するか否かを免疫沈降法で検証した。しかし、直接結合するとの結果は得られなかった。

そこで、Nedd4Lとインテグリンの結合を仲介するタンパク質をデータベースより検索した。哺乳類Nedd4Lの酵母ホモログRsp5がARRDCと結合し、細胞膜タンパクのエンドサイトーシスに関与しているという報告を参考に、結合実験を行った。その結果、哺乳類に発現している4種類のARRDCファミリー分子の中で、ARRDC1のみが、インテグリン $\alpha 5$ に結合した(図1)。さらに、Nedd4Lにも結合した。よって、Nedd4LはARRDC1を介してインテグリンと間接的に結合し、インテグリンをユビキチン化すると考えられた。

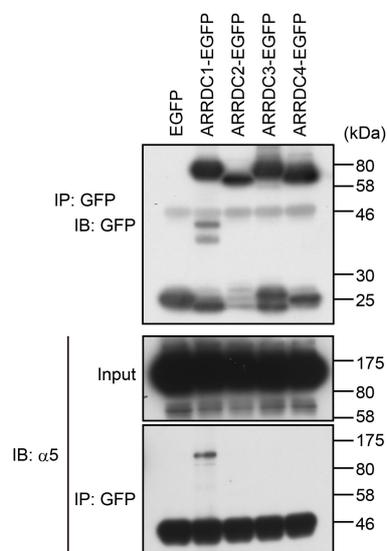


図1 インテグリン $\alpha 5$ とARRDC1の結合

(5) RNAi法を用いた各種解析

1 ユビキチン化とエンドサイトーシス

Nedd4Lは、ARRDC1を介してインテグリン $\alpha 5\beta 1$ と間接的に結合することで、インテグリンをユビキチン化し、インテグリンのエンドサイトーシスを惹起すると考えられる。そこで、RNAi法によりNedd4LおよびARRDC1をノックダウンした時にインテグリンのユビキチン化量およびエンドサイトーシス量が減少するか否かを調べた。予想通り、 $\alpha 5\beta 1$ のユビキチン化量およびエンドサイトーシス量が減少した(図2)。

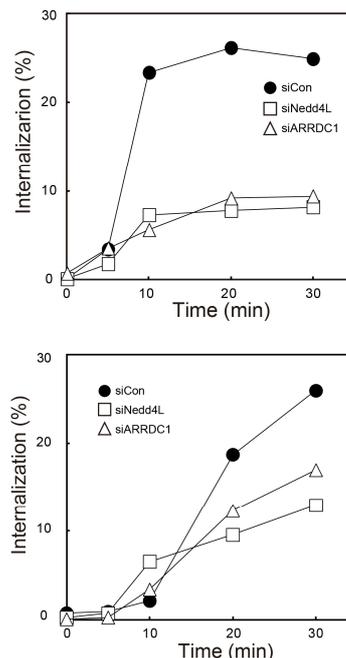


図2 インテグリン $\alpha 5\beta 1$ のエンドサイトーシス量(上段: $\alpha 5$ 、下段: $\beta 1$)

2 細胞運動能の解析

Nedd4LおよびARRDC1をノックダウンした時に、細胞運動能が減弱するか否かを調べた。細胞運動の際には、インテグリンは細胞内プールから細胞の先端部などの必要な場所へトランスポートされるとともに、細胞表面から速やかにエンドサイトーシスされる必要があると考えられている。

Nedd4L および ARRDC1 をノックダウンした HeLa 細胞を用い、wound-healing アッセイを行った。両タンパク質をノックダウンした時には、細胞運動能が減弱した(図3)。

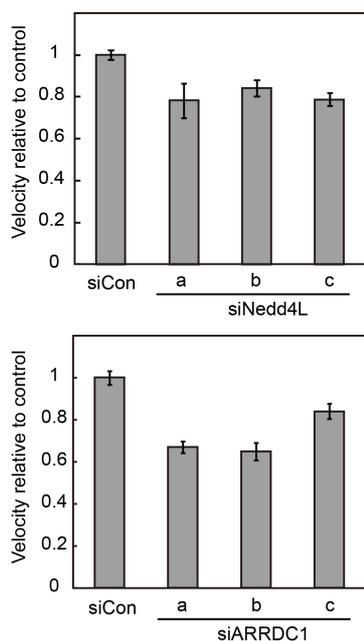


図3 wound-healing assay

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)

[その他]

ホームページ等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep t/pharma1/pharma1.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

梅田 一彰 (UMEDA, Kazuaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：80444876

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし