

平成21年5月22日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570104
 研究課題名（和文）基底膜ラミニンからの情報発信基地となるインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ 蛋白質複合体の解析
 研究課題名（英文）Molecular mechanisms underlying regulation of epithelial cell functions by laminins through integrin $\alpha 3 \beta 1$ -based protein complex
 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：インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ と強固に結合しているテトラスパニン CD151 が、インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ を介するラミニン 511 接着により惹起される p130Cas, FAK およびパキシリンのチロシンリン酸化シグナルを正に制御することを明らかにした。さらに、CD151 は、細胞内シグナルの調節に加え、インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ を介した接着強度を増強することにより上皮細胞の形態や遊走の制御に関与することを見出した。CD151 は EC1, EC2 と呼ばれる 2 つの細胞外領域を持ち、その内、EC2 がインテグリン $\alpha 3$ との相互作用に働いていることがわかっている。我々は、10 種類の抗 CD151 モノクローナル抗体のエピトープ・マッピングを行うことにより CD151 とインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ の結合様式の解明を目指した。その結果、CD151 の EC2 上に存在する 6 アミノ酸残基からなる配列がインテグリン $\alpha 3 \beta 1$ との結合に関与していることを新たに見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

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・細胞内シグナル

1. 研究開始当初の背景

インテグリン $\alpha 3 \beta 1$ の作用機構について、当研究室は間質の主要な細胞外マトリック

ス蛋白質であるフィブロネクチンの受容体インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ と比較することにより研究を進めてきた。その結果、両インテグリン

間において生物活性や細胞内シグナルに違いがあることを見出し報告している。このことは、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ が基底膜からの情報を独自の機構により発信・処理していることを意味する。申請者は、この原因がシグナルの発信源となる受容体、即ちインテグリンの直下に存在すると考えた。それ故、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ がどのような蛋白質と複合体を形成するかを調べることは、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ 特異的な作用機序を見出す上で非常に重要となる。一方、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ と非常に高い特異性を持って結合するものとしてテトラスパニンファミリーに属する四回膜貫通型蛋白質 CD151 が知られている。ノックアウトマウスを用いた解析から CD151 が腎機能、血管新生、創傷治癒に関与することがわかっている。また、ヒトにおいては CD151 遺伝子に変異が入ると腎臓、皮膚等において重篤な疾患をおこす事が報告されている。生体において CD151 が重要な役割を果たすことはこの様に明らかになりつつあるが、CD151 がどのような分子機構により細胞ひいては生体の機能を制御しているかは未だ不明であった。

2. 研究の目的

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は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基底膜から上皮細胞への情報伝達の起点として働くと考えられるが、その複合体の実体についてはほとんどわかっていない。本研究では、ラミニンとの結合により形成されるインテグリン $\alpha 3\beta 1$ 複合体の総体と機能を解析することにより、基底膜がどのような作用分子機構により上皮細胞の機能を制御しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) インテグリン $\alpha 3\beta 1$ と特異的かつ強固に結合している CD151 の機能解析：ヒト肺腺上皮癌細胞株 A549 において、siRNA を用いて CD151 のノックダウンを行う。この細胞を、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ のリガンドであるラミニン 511 でコートした培養皿に接着させ、その

細胞形態、遊走、増殖およびそれに共役する細胞内シグナルの観察を行う。

(2) 抗 CD151 モノクローナル抗体を用いた CD151-インテグリン $\alpha 3\beta 1$ の複合体形成機構の解析：CD151 は EC1, EC2 と呼ばれる 2 つの細胞外領域を持ち、その内、EC2 がインテグリン $\alpha 3$ との相互作用に働いていることがわかっている。この EC2 を認識する 10 種類の抗 CD151 モノクローナル抗体 (8C3, TS151r, 14A2.H1, LIA1/1, VJ1/16, 11B1, SFA1.2B4, 11G5, TS151, 14B5) の反応特性の評価およびエピトープマッピングを行うことにより CD151 とインテグリン $\alpha 3\beta 1$ の結合様式の解明を行う。

4. 研究成果

(1) インテグリン $\alpha 3\beta 1$ と特異的かつ強固に結合している CD151 の機能解析：CD151 をノックダウンした A549 細胞をラミニン 511 上に接着させた際、突起様の構造物を伸展させることを見出した。また、このノックダウン細胞においては、ラミニン 511 接着により誘導される FAK, Src, p130Cas および paxillin のチロシンリン酸化が低下していることがわかった。ノックダウン細胞で観察された突起形成は、コートするラミニン 511 の濃度を高くする、あるいは、インテグリン $\beta 1$ 活性化抗体を用いることにより抑制されることを見出した。一方、ノックダウン細胞で観察されたチロシンリン酸化シグナルの減弱は、これらの処置によっては回復しなかった。以上の結果は、CD151 のノックダウンにより、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ を介するラミニン 511 上への接着強度が弱まり、その結果、細胞突起の伸展が起こることを示している。しかしながら、この接着強度の低下は、チロシンリン酸化シグナル減少の直接の原因ではないと考えられた。本研究により、CD151 はインテグリン $\alpha 3\beta 1$ を介した接着強度およびチロシンリン酸化細胞内シグナルをそれぞれ独立に制御していることが明らかとなった。

(2) 抗 CD151 モノクローナル抗体を用いた CD151-インテグリン $\alpha 3\beta 1$ の複合体形成機構の解析：10 種類の抗ヒト CD151 抗体を、インテグリン $\alpha 3$ の共免疫沈降活性を指標に 3 つのグループに分けることができた：グループ 1 は、細胞抽出液中の界面活性剤の強弱に関わらずインテグリン $\alpha 3$ を十分に共免疫沈降できない；グループ 2 は弱い界面活性剤の存在下でのみインテグリン $\alpha 3$ を共免疫沈降できる；グループ 3 は界面活性剤の強弱に関わらずインテグリン $\alpha 3$ を共免疫沈降できる。インテグリン $\alpha 3$ を強制発現あるいはノック

ダウンした細胞を用いて、フローサイトメトリ解析を行った結果、グループ1に属する抗体は、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ と会合していない CD151 に好んで結合することがわかった。この結果は、グループ1抗体のエピトープがインテグリン $\alpha 3$ の結合部位あるいはその近傍に存在することを示している。次に、EC2領域のアミノ酸置換変異体を用いて、抗 CD151 モノクローナル抗体のエピトープマッピングを行った。その結果、Gly176/Gly177, Leu191, Gln194 が、グループ1抗体に共通のエピトープとなっていることを見出した。さらに、これらの残基の周辺部位を、インテグリン $\alpha 3$ に対して結合活性を示さない他のテトラスパニンの相当部位に置換した変異体を作製した。これらの変異体を用いてインテグリン $\alpha 3$ との結合実験を行ったところ、Gln194-Asp196 配列に加え、Lys186-Leu191 配列がインテグリン $\alpha 3$ との結合に必要であることがわかった。本研究により、CD151 のインテグリン $\alpha 3\beta 1$ 結合における分子機構解明の重要な手がかりが明らかになると共に、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ と安定な結合を示さない新たな CD151 変異体の作製に成功した。

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 Sato, Y., Uemura, T., Morimitsu, K., Sato-Nishiuchi, R., Manabe, R. I., Takagi, J., Yamada, M., and Sekiguchi, K., Molecular basis of the recognition of nephronectin by integrin $\alpha 8\beta 1$. *J. Biol. Chem.*, 2009, in press. 査読有り
- ② Yamada, M., Tamura, Y., Sanzen, N., Sato-Nishiuchi, R., Hasegawa, H., Ashman, L.K., Rubinstein, E., Yáñez-Mó, M., Sánchez-Madrid, F., and Sekiguchi, K., 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, 2008. 査読有り
- ③ Yamada, M., Sumida, Y., Fujibayashi, A., Fukaguchi, K., Sanzen, N., Nishiuchi, R., and Sekiguchi, K., The tetraspanin CD151 regulates cell morphology and intracellular signaling on laminin-511. *FEBS J.*, 275, 3335-3351, 2008. 査読有り
- ④ Fujibayashi A., Taguchi, T., Misaki, R., Ohtani, M., Dohmae, N., Takio, K., Yamada,

M., Gu, J., Yamakami, M., Fukuda, M., Waguri, S., Uchiyama, Y., Yoshimori, T., and Sekiguchi, K., Human RME-8 is involved in membrane trafficking through early endosomes. *Cell Struct. Funct.*, 33, 35-50, 2008. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① Masashi Yamada, Yasuhiro Sumida, Akemi Fujibayashi, Kiyomitsu Fukaguchi, Noriko Sanzen, Ryoko Nishiuchi and Kiyotoshi Sekiguchi, Tetraspanin CD151 regulates cell morphology, motility and signaling on laminin-511, 日本細胞生物学会大会、2008年7月1日、横浜
- ② Masashi Yamada, Yumiko Tamura, Noriko Sanzen, Ryoko Nishiuchi, Hitoshi Hasegawa, Leonie K. Ashman, Eric Rubinstein, María Yáñez-Mó, Francisco Sánchez-Madrid, and Kiyotoshi Sekiguchi, Probing the interaction of tetraspanin CD151 with integrin $\alpha 3\beta 1$ through epitope mapping of anti-CD151 monoclonal antibodies. FASEB Summer Research Conferences, 2008 月 6 月 23 日, New Haven, CT, USA.
- ③ Masashi Yamada, Yumiko Tamura, Noriko Sanzen, Ryoko Nishiuchi and Kiyotoshi Sekiguchi, Classification of anti-tetraspanin CD151 monoclonal antibodies based on their ability to dissociate the CD151-integrin $\alpha 3\beta 1$ complex and their epitope mapping. 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、2007年12月12日、横浜
- ④ 佐藤祐哉、上村俊人、盛満圭介、杉浦信夫、木全弘治、長田亜樹、眞鍋理一郎、高木淳一、山田雅司、関口清俊、ネフロネクチンのドメイン機能の解析、日本分子生物学会・日本生化学会合同大会、2007年12月12日、横浜
- ⑤ Masashi Yamada, Yasuhiro Sumida, Akemi Fujibayashi, Kiyomitsu Fukaguchi, Noriko Sanzen, Ryoko Nishiuchi and Kiyotoshi Sekiguchi, Tetraspanin CD151 regulates morphology, motility, and intracellular signaling of A549 human lung adenocarcinoma cells on laminin-10. The American Society for Cell Biology, 2007年12月3日, Washington, D.C., USA.

[図書] (計 1 件)

- ① 山田雅司、関口清俊、コロナ社、再生医療のための細胞生物学、2007年、ページ76-99

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

関口 清俊 (SEKIGUCHI KIYOTOSHI)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：50187845