

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440047

研究課題名(和文) 基底膜ラミニンによる接着制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying cell adhesion to basement membrane laminins

研究代表者

山田 雅司 (Yamada, Masashi)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：90304055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの疾患原因となるLN結合性インテグリン $\alpha 3$ の変異解析：インテグリン $\alpha 3$ において見つかったヒト疾患の原因となる1アミノ酸置換変異の解析を行った。その結果、この変異によりドメイン構造の限局的な乱れが生じ、プロセッシングや細胞表面発現の異常が起こることがわかった。さらに、 $\alpha 3$ のこのドメインがテトラスパニンCD151との結合に関わることを見出した。

基底膜ラミニンによる上皮極性形成機構：ラミニン(LN)結合性インテグリンの発現が低い癌細胞に、LN結合性インテグリンを強制発現させると、三次元培養下における上皮極性形成が亢進することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Analysis of a disease-associated mutation of the laminin-binding integrin $\alpha 3$: A missense mutation that causes substitution of Arg628 with Pro (R628P) in the calf-1 domain of human $\alpha 3$ was shown to be associated with disorders of the lung, kidney, and skin. We found that the R628P mutation leads to aberrations in the posttranslational processing of $\alpha 3$. This mutation abolished the interaction of $\alpha 3$ with the tetraspanin CD151 but not integrin $\alpha 1$.

The role of laminin-binding integrins in epithelial polarity: To elucidate the mechanism underlying epithelial polarity formation, we employed and compared tumor and non-tumor cell lines with distinct abilities to develop epithelial polarity. We found that expression levels of laminin-binding integrins were quite low in some cancer cells compared with non-tumor cells. Furthermore, the exogenous expression of the laminin-binding integrin in these cells promoted the formation of epithelial polarity in 3D culture.

研究分野：分子細胞生物学

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

1. 研究開始当初の背景

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。ラミニンは基底膜の主要構成成分であり、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 4$ 、 $\alpha 7\beta 1$ といったラミニン結合性インテグリンを介して細胞に作用し、細胞内シグナルを発信することで機能を発揮している。しかし、ラミニン結合性インテグリンによる基底膜ラミニンからの接着制御の分子機構は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

ラミニン結合性インテグリンにおいて発見されたヒトの疾患原因となる遺伝子変異、およびラミニン結合性インテグリンによる上皮極性制御の分子機構の解析を通して、基底膜ラミニンによる接着制御機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

ヒトの疾患原因となる LN 結合性インテグリン $\alpha 3$ の変異解析: インテグリン $\alpha 3\beta 1$ はラミニンの受容体であり、 $\alpha 3$ のノックアウトマウスは腎臓、肺、皮膚において異常を示す。最近、 $\alpha 3$ ノックアウトマウスの表現系とよく似た異常を呈するヒト $\alpha 3$ の変異が複数報告された。我々は、その中でも、calf-1 ドメインに存在する Arg628 が Pro に置換される変異 (R628P) に着目した。この Arg を含む周辺領域は、テトラスパニン CD151 との結合に関与することが示唆されている。そこで、 $\alpha 3$ の野生型および R628P 変異体をヒト肺癌由来の A549 細胞に強制発現させ解析を行った。基底膜ラミニンによる上皮極性形成機構: 基底膜成分を含む培地中で上皮細胞を 3 次元培養すると、シストと呼ばれる単層の上皮細胞シートからなる中空の構造体が形成される。このシストは周囲を基底膜で覆われており、生体内の上皮組織と非常に似た構造および性質を示す。ヒト乳腺上皮細胞株である MCF-10A は、上皮極性形成のモデルとしてよく用いられており、3 次元培養下において極性化したシストを形成する。一方、ヒト乳癌細胞株である MCF-7 は、その様なシスト形成能を示さない。我々は、この違いの原因を明らかにするために、ラミニン結合性インテグリンに着目し解析を行った。

4. 研究成果

ヒトの疾患原因となる LN 結合性インテグリン $\alpha 3$ の変異解析: $\alpha 3$ の R628P 変異体では正常なプロセッシングが起こらないことがわかった。また、インテグリン $\beta 1$ との結合は見

られたが、結合している $\beta 1$ は、糖鎖が十分に付加していない未成熟型であった。さらに、細胞表面における発現量を調べた結果、R628P 変異体では著しく低下していることがわかった。また、この変異体は CD151 との結合能を失っており、変異体で見られる異常にこのことが寄与する可能性が考えられた。一方、作成したホモロジーモデルにおいて、Arg628 は calf-1 ドメインの β シート上に存在し、これを Pro に置換することで、このシート構造が乱れることが予測された。しかし、R628P 変異体においては、 $\beta 1$ との結合は保持されたままであり、しかも小胞体関連分解の促進が観察されなかったことから、この構造の乱れは限定的なものであると考えられた。以上のことから、R628P 変異により calf-1 ドメインの限局的な構造の乱れが生じ、その結果、プロセッシングや細胞表面発現の異常が起こることがわかった。さらには、 $\alpha 3$ の calf-1 ドメインが CD151 との結合に寄与することが示された。

基底膜ラミニンによる上皮極性形成機構: MCF-7 細胞では LN 結合性インテグリンの発現が著しく低いことがわかった。さらに、MCF-7 細胞に、LN 結合性インテグリンであるインテグリン $\alpha 6$ を強制発現させたところ、極性化したシストの形成が観察された。次に、 $\alpha 6$ のどの領域が極性化の誘導に働くかを調べるために、細胞内領域を欠失させた $\alpha 6$ 変異体を MCF-7 細胞に強制発現させた。ただし、この $\alpha 6$ 変異体は不活性型であるため、変異体の評価はインテグリン活性化抗体存在下で 3 次元培養することにより行った。その結果、変異体発現細胞では、基底膜の形成は見られたが、極性化したシストの形成は観察されなかった。以上の結果から、MCF-7 細胞において、LN 結合性インテグリン $\alpha 6$ は、その細胞内領域を介して上皮極性を誘導しうることが示された。

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 5 件)

- Fujimoto, I., Hasegawa, K., Fujiwara, K., Yamada, M., and Yoshikawa, K. (2016) Necdin controls EGFR signaling linked to astrocyte differentiation in primary cortical progenitor cells. *Cell Signal.*, 28, 94-107.
- Yamada, M., and Sekiguchi, K. (2015) Molecular basis of laminin-integrin interactions. *Curr. Top. Membr.*, 76, 197-229.
- Yamada, M., and Sekiguchi, K. (2013) Disease-associated single amino acid mutation in the calf-1 domain of integrin $\alpha 3$

leads to defects in its processing and cell surface expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 441, 988-993.

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.*, 7, 304-314.

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.

〔学会発表〕(計10件)

二木杉子、筒井仰、眞鍋理一郎、山田雅司、関口清俊、大槻勝紀：「マウス基底膜ボディマップ」データベース、第56回日本組織細胞化学会総会・学術集会ワークショップ「デジタル画像の処理・解析・保存」、大阪、2015年10月。

山田雅司、永野雄大、富本千晶、宇佐美晶子、佐藤(西内)涼子、関口清俊：上皮細胞の頂底極性形成におけるラミニン結合性インテグリンの役割、第67回日本細胞生物学会大会シンポジウム「細胞から器官へ：細胞接着システムによる器官構築の制御」、東京、2015年6月。

藤崎ひとみ、二木杉子、山田雅司、関口清俊、服部俊治：型コラーゲン線維上培養ヒト肺ガン細胞株、A549細胞の上皮-間葉転換(EMT)と2次元遊走制御について、第67回日本細胞生物学会大会、東京、2015年6月。

Yamada, M., Shitamichi, H., Sato-Nishiuchi, R., Kusumoto, K., Morooka, N., Tamai, K., Ezoe, S., Futaki, S. and Sekiguchi, K. The involvement of the extracellular matrix protein polydom in the regulation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells. International Society for Stem Cell Research 2015, Stockholm, Sweden, June, 2015.

山田雅司、永野雄大、宇佐美晶子、富本千晶、佐藤(西内)涼子、関口清俊：ヒト乳癌 MCF-7 細胞におけるラミニン結合性インテグリン依存的な上皮極性形成、第47回日本結合組織学会学術大会、東京、2015年5月。

藤崎ひとみ、二木杉子、山田雅司、関口清俊、服部俊治：型コラーゲン線維上培養ヒト肺ガン細胞株、A549細胞の上皮-間葉転換(EMT)と2次元遊走制御について、第

47回日本結合組織学会学術大会、東京、2015年5月。

藤崎ひとみ、二木杉子、池島喬、林利彦、山田雅司、関口清俊、服部俊治：2種のヒト皮膚表皮角化細胞株、HaCat細胞とFEPE1L-8細胞によるI型コラーゲンへの接着感受性比較検討。第37回日本分子生物学会、横浜、2014年11月。

山田雅司、関口清俊：基底膜ラミニンによるインテグリンおよびテトラスパンンを介した上皮細胞機能制御。第87回日本生化学会大会シンポジウム「細胞外マトリックスのダイナミクスから見た器官の形成・機能・疾患」、京都、2014年10月。

山田雅司、関口清俊：ヒトの疾患原因となるインテグリン $\alpha 3$ のR628P変異はそのプロセッシングと細胞表面発現の異常をもたらす。第86回日本生化学会大会、横浜、2013年9月。

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、川瀬栄八郎：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。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/matrixome/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者

山田 雅司 (YAMADA, Masashi)
大阪大学・たんぱく質研究所・助教
研究者番号：90304055

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

関口 清俊 (SEKIGUCHI, Kiyotoshi)
大阪大学・たんぱく質研究所・教授
研究者番号：50187845