

Title	Recombinant Expression and Characterization of the Basement Membrane Protein Nephronectin
Author(s)	佐藤, 祐哉
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/1998
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【14】

氏名	佐藤 祐哉
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 23441 号
学位授与年月日	平成21年12月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	Recombinant Expression and Characterization of the Basement Membrane Protein Nephronectin (基底膜蛋白質ネフロネクチンの機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 関口 清俊 (副査) 教授 田嶋 正二 教授 高木 淳一

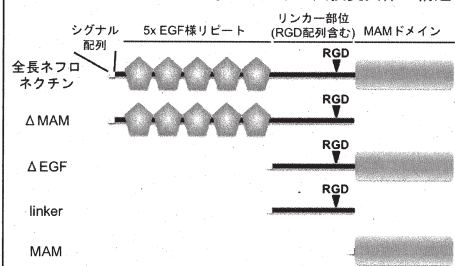
論文内容の要旨

【背景及び目的】

多細胞生物の上皮と結合組織の境界には、基底膜と呼ばれる薄いシート状の細胞外マトリックスが存在する。基底膜は上皮細胞の足場となり、細胞の生存、増殖、分化など様々な細胞の機能を調節している。ネフロネクチンは5つのEGF様リピート、細胞接着モチーフであるArg-Gly-Asp (RGD) 配列を含むリンカー部位、及びMAMドメインからなる基底膜蛋白質である(図1)。ネフロネクチンは主に発生期に、組織・部位特異的に存在し、特に発生期腎臓の尿管芽基底膜において顕著に発現が認められる。ネフロネクチンをノックアウトしたマウスは腎臓形成不全により新生児致死となる。また、ネフロネクチンの受容体として報告されている $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンのノックアウトマウスも腎臓形成不全を呈することから、両者の生体内での相互作用が腎臓の形態形成に必須であると考えられている。しかしながら、これまでに全長のネフロネクチンを精製した例はなく、その分子レベルでの機能は不明であった。本研究では、ネフロネクチンの生理機能を分子レベルで解明するため、全長ネフロネクチンや各ドメイン欠損変異体(図1)を発現・精製し、その特性を分子レベルで解析した。

【結果及び考察】

図1) ネフロネクチンとそのドメイン欠損変異体の構造



① ネフロネクチンの各ドメインが有する機能の解析

ネフロネクチンと相互作用する分子、およびその相互作用ドメインを探索するため、全長ネフロネクチンや各ドメイン欠損変異体とグリコサミノグリカン (GAG) 鎖との結合、および $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンとの結合を固相結合アッセイにより解析した。GAG 鎖との結合解析の結果、ネフロネクチンはコンドロイチン硫酸-E、ヘパラン硫酸、ヘパリンに結合活性を示した。各ドメイン欠損変異体を用いて結合を解析した結果、 Δ MAM は全長ネフロネクチンと同等のコンドロイチン硫酸-E 結合活性を示したが、ヘパリンへの結合活性は低下していた。一方、 Δ EGF や MAM はヘパリンへの結合活性は全長ネフロネクチンと同等であったが、コンドロイチン硫酸-E への結合活性は有意に減少していた。linker がどの GAG とも結合しなかったことを考慮すると、ネフロネクチンは EGF 様リピートを介してコンドロイチン硫酸-E に、MAM ドメインを介してヘパリン/ヘパラン硫酸に結合すると考えられる。また、 $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンとの結合解析の結果、全長ネフロネクチン、linker とともに同等の $\alpha 8 \beta 1$ インテグリン結合活性を示した。このことは、ネフロネクチンのリンカー部位が $\alpha 8 \beta 1$ インテグリン結合部位であることを示している。以上の結果から、ネフロネクチンは生体内で 5 x EGF 様リピートを介してコンドロイチン硫酸プロテオグリカンに結合し、MAM ドメインを介してヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合すること、及びリンカー部位が細胞表面の $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンと結合していることが示唆された。コンドロイチン硫酸は発生期の腎臓において特に豊富な GAG 鎖であること、またヘパラン硫酸は腎発生に必要な不可欠であることを鑑みると、ネフロネクチンはこれらの GAG 鎖を含む細胞外マトリックスのプロテオグリカンと相互作用することで基底膜に集積していると考えられる。さらに、リンカー部位が $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンを介して細胞と相互作用し、EGF 様リピートや MAM ドメインが細胞表面のプロテオグリカンと相互作用することで、細胞に何らかの情報を伝達している可能性も考えられる。

② $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンによるネフロネクチン選択的認識機構の解析

過去の知見から、 $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンは RGD 配列に結合するインテグリンであり、そのリガンドとしてネフロネクチン以外にも、フィブロネクチン、ビトロネクチンなど、RGD 配列を有する様々な細胞外マトリックス蛋白質が報告されている。しかしながら、全長ネフロネクチンやそのリンカー部位と $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンの結合親和性を固相結合アッセイにより解析したところ、ネフロネクチンの $\alpha 8 \beta 1$ に対する親和性はフィブロネクチンなどの他のリガンドと比べて 100 倍以上強固なものであることが判明した。この結果は、 $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンが単純に RGD 配列だけを認識しているのではなく、他のネフロネクチン上の配列も補助的な結合部位として関わっている可能性を惹起する。そこで、ネフロネクチンのリンカー部位の部分欠損変異体を用いて、RGD 配列以外に $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンとの結合に必要な領域を探索した。その結果、RGD 配列から 11 残基 C 末端側に存在する LFEIFEIER 配列を欠失すると $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンの結合活性が顕著に減少することが判明した。この領域の Ala 置換変異体を作製し、 $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンの結合活性を解析したところ、EIE 配列が $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンとの結合に必要な不可欠であることが明らかとなった。LFEIFEIER 配列に由来するペプチドは $\alpha 8 \beta 1$ インテグリン結合阻害活性を持たなかったが、RGD 配列と LFEIFEIER 配列の両者を有するペプチドは強力な阻害活性を有しており、RGD 配列だけを持つペプチドと比べて 2000 倍も高い阻害活性を示した。さらに、RGD 配列、LFEIFEIER 配列それぞれを含むフラグメントでトランス相補性を検証したところ、LFEIFEIER 配列の濃度依存的に $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンの RGD 配列を含むフラグメントに対する結合活性が上昇した。また、この活性上昇は EIE 配列を AIA 配列に置換した変異体では観察されなかった。以上の結果から、 $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンはネフロネクチンの RGD 配列だけでなく、LFEIFEIER 配列も認識していることが明らかとなった。LFEIFEIER 配列は補助結合部位として $\alpha 8$ インテグリンと相互作用し、ネフロネクチンに対する $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンの結合親和性を相乗的に高めることで、 $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンのネフロネクチン選択的認識がもたらされていると考えられる。また、本研究で用いた RGD 配列と LFEIFEIER 配列を含む 23 残基からなるペプチドは、 $\alpha 8 \beta 1$ インテグリン特異的な阻害ペプチドとして、今後の $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンの研究への応用が期待される。

これまでに、リガンド結合における RGD 配列と補助結合部位の必要性はフィブロネクチンと $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンだけで報告されていたが、ネフロネクチンと $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンでも同様であることが明らかとなった。本研究で得られた知見は、ネフロネクチンの生体内における機能を考える上で有用だけでなく、RGD 配列を認識するインテグリンのリガンド認識機構に関しても新たな知見をもたらすと考えられる。

【発表論文】

1. Manabe, R., Tsutsui, K., Yamada, T., Kimura, M., Nakano, I., Shimono, C., Sanzen, N., Furutani, Y., Fukuda, T., Oguri, Y., Shimamoto, K., Kiyozumi, D., **Sato, Y.**, Sado, Y., Senoo, H., Yamashina, S., Fukuda, S., Kawai, J., Sugiura, N., Kimata, K., Hayashizaki, Y., and Sekiguchi, K. 2008. Transcriptome-based systematic identification of extracellular matrix proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:12849-54.
2. **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 $\alpha 8 \beta 1$. *J. Biol. Chem.* 284:14524-36.

論文審査の結果の要旨

組織特異的に基底膜に発現するネフロネクチンは、N末端側の EGF 様リピート領域、細胞接着モチーフである Arg-Gly-Asp (RGD) 配列を含むリンカー領域、及びC末端に位置する MAM ドメインから構成される糖タンパク質である。学位申請者は、ネフロネクチンの生理機能を分子レベルで解明するため、全長ネフロネクチンおよび各ドメイン欠損変異体を発現・精製し、他のマトリックス分子や細胞表面受容体との相互作用を詳細に解析した。ネフロネクチンとグリコサミングリカン鎖との相互作用を解析した結果、ネフロネクチンは EGF 様リピートを介してコンドロイチン硫酸-E に、MAM ドメインを介してヘパリンに結合することを明らかにした。また、 $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンへの結合親和性の解析から、ネフロネクチンがこれまで報告されている他の $\alpha 8 \beta 1$ リガンドと比べて二桁以上強い $\alpha 8 \beta 1$ 結合活性を有していることを示した。さらに、ネフロネクチンの様々な変異体を用いて、強い $\alpha 8 \beta 1$ 結合活性を発揮するアミノ酸配列を探索した結果、ネフロネクチンのリンカー部位に存在する RGD 配列と、その 11 残基 C 末端側に存在する LFEIFEIER 配列が $\alpha 8 \beta 1$ との高親和性結合に必須であることが明らかとなった。また、LFEIFEIER 配列の中でも EIE 配列が特に重要であることを見いだした。RGD 配列と LFEIFEIER 配列の両者を有するペプチドは、RGD 配列だけを持つペプチドと比べて 2000 倍も高い $\alpha 8 \beta 1$ に対する親和性を示した。さらに、RGD 配列、LFEIFEIER 配列それぞれを含むフラグメントでトランス相補性を検証したところ、LFEIFEIER 配列の濃度依存的に $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンの RGD 配列を含むフラグメントに対する結合活性が上昇した。以上から、LFEIFEIER 配列は補助結合部位として $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンと相互作用し、ネフロネクチンに対する $\alpha 8 \beta 1$ インテグリンの結合親和性を相乗的に高めていると考えられる。

本研究で得られた知見は、ネフロネクチンの生体内における機能を考える上で有用だけでなく、RGD 配列を認識するインテグリンのリガンド認識機構に関しても新たな知見をもたらすと考えられ、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。