

立教大学学術推進特別重点資金(立教SFR)

個人研究

2024年度研究成果報告書

研究代表者	所属部局・職名	氏名
	理学部・助教	佐藤 健
研究課題	接着分子インテグリン $\alpha 4\beta 7$ の活性制御メカニズムの解明	
研究期間	2024年度	
研究経費 (1円単位)	(支出金額) 960,194円 / (採択金額) 1,000,000円	
研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフは使用しないこと。)		
当該研究の研究目的を含むこと。 【以下、報告書全体について】他の研究分野の委員が評価することも想定し、わかりやすく記載すること。		
<p>血中を循環するリンパ球はインテグリン$\alpha 4\beta 7$を介して血管壁に接着し、血管外に遊走することで腸管粘膜へと移動する。ほとんどの$\alpha 4\beta 7$はリガンドに低親和性の不活性型構造であるが、Rap1欠損は$\alpha 4\beta 7$の不活性型構造を解除することでリンパ球の過剰な接着を誘導することが明らかとなっている。本研究では、$\alpha 4\beta 7$の不活性型構造の維持・解除機構を明らかにするためにRap1欠損によるFilamin A (FlnA)への影響、FlnAによる$\alpha 4\beta 7$の抑制機構、およびN型糖鎖修飾による$\alpha 4\beta 7$の構造への影響について検討した。また、リンパ球の血管壁への接着をin vitroで検証するための実験系の立ち上げを行った。</p>		

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)
{ インテグリン } { 細胞接着 } { 大腸炎 }

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

以下の視点を含めて記載のこと。

- ・当該研究は何をどこまで明らかにできたのか (できなかったのか)。
- ・何をもって研究成果 (経過) を達成できた (できなかった) と考えられるのか
自身が設定した研究目的・目標に照らして、その根拠がわかるよう記載のこと。
- ・どのような点において、当該研究分野の学術研究推進の高度化に寄与できたのか。

$\alpha 4\beta 7$ はリンパ球表面に発現し、血管内皮上でのローリングと停止(アレスト)における接着分子としての役割を担う。ローリング時のリンパ球は血管内皮細胞が発現するケモカインによって $\alpha 4\beta 7$ の活性化シグナル(inside-out シグナル)が開始される。 $\alpha 4\beta 7$ の活性化は FlnA と Talin が $\alpha 4\beta 7$ 細胞内領域に競合して結合することで制御され、inside-out シグナルによって Talin が $\alpha 4\beta 7$ 細胞内領域に結合することで、 $\alpha 4\beta 7$ 細胞外領域を高親和性の活性型構造に変化させる。

T 細胞特異的 Rap1 欠損マウスは、生後間もなく激しい大腸炎を自然発症する。以前の研究では、その原因の一つとして $\alpha 4\beta 7$ の活性型構造が誘導され、T 細胞の腸管への移行が増加することを明らかにした。Rap1-GTP は inside-out シグナルを誘導するため $\alpha 4\beta 7$ は活性化されないと考えられたが、Rap1 欠損時には $\alpha 4\beta 7$ の不活性型構造が解除されることで通常とは異なる活性型構造が誘導されることが分かった。これらの構造は、 $\alpha 4\beta 7$ の通常の活性型構造を認識する H3 抗体と、Rap1 欠損時に誘導される活性型構造を認識する G3 抗体を使用することで明らかにされた。本研究では、 $\alpha 4\beta 7$ の不活性型構造の解除機構を明らかにするために Rap1 欠損による FlnA への影響、FlnA による $\alpha 4\beta 7$ の抑制機構、および N 型糖鎖修飾による $\alpha 4\beta 7$ の構造への影響について検討した。

① Rap1 欠損による FlnA への影響

FlnA の S2152 のリン酸化はよく研究されており、インテグリン細胞内領域から解離することでインテグリンの接着活性を上昇させることが知られている。そこで、Rap1 欠損細胞において抗 FlnA リン酸化 S2152 抗体を用いたウエスタンブロットティングを行った。その結果、Rap1 欠損細胞とコントロール細胞では S2152 のリン酸化に差がないことが明らかとなった。

次に、Rap1 欠損細胞の可溶化液中の FlnA と $\beta 7$ の結合を調べるために、GST および MBP タグと $\beta 7$ 細胞内領域の融合タンパクを作製し、プルダウンアッセイを用いて検討を行った。MBP- $\beta 7$ は大腸菌 BL21 での発現が上手くいかず、GST- $\beta 7$ では培養温度を検討することで発現させることに成功した。しかしながら、コントロールおよび Rap1 欠損細胞の両方ともプルダウン後の溶出画分から、FlnA を検出することができなかった。

コントロール、Rap1 欠損および活性型 Rap1V12 発現細胞に高親和性のアフィニティータグである PA タグを挿入した $\beta 7$ を発現させた各種細胞を保有していたため、抗 PA タグ抗体を用いた共免疫沈降法による FlnA の検出についても試みた。抗 PA タグ抗体による PA- $\beta 7$ の沈降は上手くいったものの、同画分から FlnA を検出することはできなかった。

② FlnA による $\alpha 4\beta 7$ の抑制機構

FlnA は N 末端のアクチン結合ドメインの後ろに 24 個の Fln Ig リピートが続く。インテグリン細胞内領域との結合には FlnA の Ig21 が相互作用することが明らかとなっているが、その制御機構はほとんど明らかになっていない。そこで、PhosphoSitePlus データベース中の FlnA のリン酸化部位の中から、Ig19-22 に位置するリン酸化部位を 7 個ピックアップし、それぞれのリン酸化候補残基をグルタミン酸に置換した疑似リン酸化変異体を作製して、GST- $\beta 7$ との結合を調べた。FlnA のリン酸化によって $\beta 7$ との結合が低下するという予想に反して、今回検討した 7 個の中に $\beta 7$ との結合が低下するものは見られなかった。逆に、疑似リン酸化変異体の中の 1 つに $\beta 7$ との結合が増加する変異体が見られた。この部位をアラニンに置換した疑似脱リン酸化変異体の $\beta 7$ への結合は野生型の

研究成果の概要 (つづき)

FlnA と差がなかった。これらの結果により、FlnA のリン酸化が $\alpha 4\beta 7$ の活性を制御する可能性が示唆された。今後の課題として、生理的刺激や Rap1 欠損とこのリン酸化部位との関連について明らかにしていきたい。

③ $\beta 7$ 細胞内領域による $\alpha 4\beta 7$ 制御機構

インテグリン細胞内領域の NPXY モチーフと TTT モチーフのリン酸化制御は、Talin や FlnA などのアダプター分子の結合様式を変化させることでインテグリン活性を調節すると考えられている。本研究では FlnA の結合が $\alpha 4\beta 7$ の構造変化に与える影響を調べるために、FlnA の解離が促進される $\beta 7$ -Y758A (NPXY モチーフ) および TTT/EEE (TTT モチーフ) 変異体による検証を行った。まず始めに、GST- $\beta 7$ と FlnA の結合をプルダウンアッセイを用いて検討した。その結果、Y758A および TTT/EEE 変異体では、FlnA の結合低下が確認された。次に、これらの変異を導入した $\beta 7$ を安定発現させた細胞を作製し、G3 および H3 の結合をフローサイトメトリーで調べたところ、予想に反して両抗体の結合は低下していた。これらの変異体は、FlnA の結合様式を変化させる一方で、他の分子の結合にも影響を与える可能性が考えられる。今後は FlnA だけでなく $\beta 7$ の細胞内領域結合分子を包括的に解析することで、細胞内領域のリン酸化による制御機構を解明していきたい。

④ Flow adhesion assay の構築

血中を循環する免疫細胞は $\alpha 4\beta 7$ を介して、腸管内皮細胞特異的に発現する MAdCAM-1 に結合することで腸管静脈の血管壁に接着する。層流によるせん断応力 (shear stress) はリンパ球の灌流下での内皮細胞への接着において重要な要素の一つであるため、in vitro 試験でも再現される必要がある。本試験では、Bioptechs 社の FCS2 クローズドシステムを用いて、灌流下におけるリンパ球の血管内皮細胞 LS12/MAdCAM-1 への接着頻度の計測系を確立した。マウスプロ B 細胞株である Ba/F3 細胞を用いて、 $\alpha 4\beta 7$ の活性条件下である Mn^{2+} の存在下での接着増加、および $\beta 7$ ノックアウト細胞での接着能の喪失を確認した。今後はこの実験系と抗活性型 $\alpha 4\beta 7$ 抗体などを組み合わせて、インテグリンの活性化と細胞接着の関連を明らかにしていきたい。

⑤ $\beta 7$ の N 型糖鎖付加部位変異体の解析

小胞体とゴルジ体でのインテグリンの糖鎖修飾プロセッシングは、フォールディングや二量体化、細胞膜発現において重要である。Rap1 欠損細胞ではインテグリンの細胞表面発現の低下が見られたため、糖鎖修飾に関連している可能性が考えられる。そこで、N 型糖鎖のコンセンサス配列 [Asn-X-Ser/Thr] は $\beta 7$ 鎖に 8 か所存在するため、それらの Asn を Gln に置換して糖鎖修飾を受けない変異体をそれぞれ作製した。各変異体を発現させた Ba/F3 細胞を用いて、G3 および H3 抗体の結合をフローサイトメトリーで検討した。その結果、N49Q, N512Q, N571Q, N655Q で G3 の結合増加が見られ、N231Q, N260Q, N512Q で H3 の結合増加が見られた。これらの結果の懸念点として、 $\beta 7$ の発現量にばらつきがあったことが挙げられるため、今後はできる限り発現量を揃えた状態での測定を試みたい。現時点での推考では、 $\beta 7$ 細胞外領域の先端部分の N/Q 変異は H3 の結合を増加させ、根元部分の変異では G3 の結合を増加させる傾向が見られたため、N 型糖鎖が付加されないことによって立体障害の回避や $\beta 7$ の柔軟性向上などが G3 と H3 の結合に寄与したと考えられる。

※この(様式2)に記入の、成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差控え期間等を記入した調書(A4縦型横書き1枚・自由様式)を添付すること。

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

第97回 日本生化学会大会 2024年11月6日～8日

演題名: 「Rap1によるインテグリン $\alpha 4 \beta 7$ の構造制御: $\alpha 4 \beta 7$ 活性型構造特異的抗体を用いた構造評価」

著者: 佐藤健、石原沙耶花、丸井僚也、高木淳一、矢代慧、眞島恵介、片桐晃子

- 発表形式: ポスター発表
- ポスター番号: 2P-374
- 発表日: 11月7日(木)
- 発表時間: 14:45～16:45
- 会場: ポスター会場 (G1-G4) パシフィコ横浜ノース1F