

$\alpha 4$ インテグリンの膜近傍細胞内ドメインにおける salt bridge 形成部位の遺伝子改変マウスでみられたインテグリンの恒常的活性化

東京大学 今井 陽一

派遣期間 2004年3月10日～2008年1月4日

研究機関 Immune Disease Institute, Harvard Medical School, Boston, MA
02115, USA

研究指導者 Assistant Professor Motomu Shimaoka

Professor Timothy A. Springer

The ability of integrin extracellular domain to bind ligand is dynamically regulated by activation-dependent conformational changes triggered in the cytoplasmic domain. A solution structure of the cytoplasmic domain defined a putative membrane-proximal salt bridge that, by stabilizing the association between the α and β subunits, is thought to help restrain integrins in their inactive state. However, the physiological importance of this salt bridge in integrin regulation remains to be elucidated. To address this question, we knocked into murine $\alpha 4$ integrins an alanine mutation of the conserved arginine (R^{GFFKR}), which is required for salt bridge formation. In lymphocytes from knock-in mice ($\alpha 4$ R/A^{GFFKR}), $\alpha 4$ integrins exhibited constitutively upregulated ligand binding. However, transmigration of

these cells across ligand-coated Transwell chambers, or across endothelial monolayers in the presence of shear flow, was significantly reduced due to the perturbed de-adhesion. Homing assays revealed a similar situation *in vivo*, whereby $\alpha 4$ R/A^{GFFKR} lymphocytes exhibited reduced migration to the gut, compared with wild-type cells. Our results demonstrate that the membrane-proximal salt bridge plays a critical role in supporting proper integrin adhesive dynamics. Loss of this interaction destabilizes the non-adhesive conformation, and thereby perturbs the properly balanced cycles of adhesion and de-adhesion required for efficient cell migration.

接着分子インテグリンは $\alpha \cdot \beta$ 鎖の 2 種類の糖タンパク質のヘテロダイマーによって形成され、細胞—細胞間、細胞—間質間の相互作用を制御し、発達・免疫能の制御・生体におけるホメオスターシスの維持・創傷治癒などの様々な生理機能において重要な役割を果たしている。また、その機能異常は多発性硬化症・気管支喘息などの炎症性疾患をはじめとする多くの疾患の発症に関わることが示唆されている。

インテグリンには様々なサブタイプが存在し、それぞれに固有のリガンドが結合することにより細胞内のシグナル伝達が活性化され、種々の生理活性が誘導される。インテグリンのリガンドへの結合性はダイナミックな高次構造の変化によって調節され、白血球の遊走などにおいて調和のとれた動態を維持する

ことが可能となっている。

インテグリンの α 及び β 鎖の膜近傍細胞内ドメインの間には電気的結合である salt bridge が形成され、特に α 鎖に高度に保存された GFFKR モチーフの Arginine 基がこの結合に必須であることがタンパク質の結晶解析などの構造解析により明らかにされた。

構造解析や in vitro の解析では、Arginine 基の変異体では、salt bridge が阻害され、 α 及び β 鎖が解離し、細胞外ドメインが活性化状態へ構造変化を起こし、リガンドへの結合性が上昇することが示された。今回、生体内においてこの salt bridge 結合がどのような生理的意義を有するのかを明らかにするため、 α 鎖インテグリンの GFFKR モチーフの Arginine 基を Alanine 基に置換した(GFFKA 変異)遺伝子改変マウスを作製することを試みた。

$\alpha 4$ インテグリンは幹細胞から成熟リンパ球にいたる広範囲の血液細胞に発現し、白血球の遊走能・造血幹細胞の体内分布など多くの生理機能の制御に深く関与している。そこで、 $\alpha 4$ インテグリンの GFFKA の Arginine 基を Alanine 基に置換した変異導入マウス($\alpha 4$ R/A^{GFFKR})を相同遺伝子組み換え法にて作製した ES 細胞から樹立し解析した。

$\alpha 4$ インテグリンは $\beta 1$ および $\beta 7$ インテグリンとヘテロダイマーを形成し、それぞれ、VCAM-1 や MAdCAM-1 などの固有リガンドと結合する。 $\alpha 4$ R/A^{GFFKR} マウス由来のリンパ球では、 $\alpha 4 \beta 1 \cdot \alpha 4 \beta 7$ いずれも細胞表面における発現が低下していたが、それにも関わらず、Flow chamber assay においてリガンドである VCAM-1 や MAdCAM-1 への接着性が亢進し、 $\alpha 4$ R/A^{GFFKR} が恒常的活性化状態にあることが示された。次に、VCAM-1 や MAdCAM-1 でコーティングした Transwell chamber や shear flow 下での単層化血管内皮細胞を利用した transmigration アッセイによって $\alpha 4$ R/A^{GFFKR} マウス由来のリンパ球の

migration 能を解析した。その結果、 $\alpha 4 R/A^{GFFKR}$ マウス由来のリンパ球では VCAM-1 や MAdCAM-1 などのリガンドを介した migration 能の低下がみられた。さらに、血管内皮細胞を介する migration 能も低下していた。これらの結果は、遺伝子変異マウス由来のリンパ球はリガンドへの結合性が亢進していると同時に、リガンドからの遊離能が低下していることを示唆した。

そこで、CXCL12 サイトカイン共存下での VCAM-1 及び MAdCAM-1 リガンド上での遺伝子変異マウス由来のリンパ球の遊走能をプレート上での生細胞イメージングにより解析した。その結果、変異型では野生型と比較してリガンドをコーティングしたプレートからの遊離が著しく障害され、リガンドからの遊離能が低下していることが明らかになった。

次に、経静脈的に投与したリンパ球の各リンパ組織への遊走能を解析する *in vivo homing* アッセイにより、生体内でのリンパ球の遊走能を評価した。その結果、 $\alpha 4 R/A^{GFFKR}$ マウス由来のリンパ球は末梢リンパ節や脾臓などのリンパ組織への遊走能は正常であったが、Peyer Patch・腸管への遊走能が低下していた。さらに、*in vivo homing* アッセイの結果を裏付けるように、 $\alpha 4 R/A^{GFFKR}$ マウスにおいては Peyer Patch の著明な縮小化が見られた。

以上の結果から、インテグリンの膜近傍細胞内ドメインで形成される salt bridge はリガンドへの結合性のダイナミックな調節を介して生体内でのリンパ球の動態のホメオスターシスの維持に必須の役割を果たすことが示された。