

報告番号	甲第	3681	号
------	----	------	---

変異遺伝子発現によるラミニン鎖の 細胞内会合機構の解析

名古屋大学図書	
和	1250587

1996年

名古屋大学大学院農学研究科
生化学制御専攻

新美 友章

目次

目次	頁
略語	
第1章 緒論	1
引用文献	17
第2章 マウス・ラミニン鎖のサル細胞内発現による種間会合体の形成	
序論	22
実験材料および実験方法	23
結果	27
考察	35
引用文献	36
第3章 ラミニン鎖会合における $\beta 1$ 鎖長腕のN-末端とC-末端の異なる役割 - ドミナントネガティブ法によるラミニン機能解析の予備実験 -	
序論	38
実験材料および実験方法	39
結果	41
考察	46
引用文献	48
第4章 マウス3T3-L1細胞におけるラミニン $\alpha 4$ 鎖の発現および ラミニン-8($\alpha 4\beta 1\gamma 1$)の同定	
序論	50
実験材料および実験方法	52
結果	55
考察	61
引用文献	64
謝辞	
報文目録	
報文	
参考論文目録	
参考論文	

略語

BAEC	: bovine aortic endothelial cell
bp	: base pair
BPB	: bromophenol blue
cAMP	: adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate
DMEM	: Dulbecco's modified eagle's medium
dNTP	: deoxynucleotide triphosphate
DTT	: dithiothreitol
EDTA	: ethylenediamine tetraacetic acid
EF-1 α	: elongation factor-1 α
EGF	: epidermal growth factor
EHS	: Engelbreth-Holm-Swarm
EPO-R	: erythropoietin receptor
FCS	: fetal calf serum
GAG	: glycosaminoglycan
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
kb	: kilobase
kDa	: kilodalton
PBS	: phosphate buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PMSF	: phenylmethylsulfonyl fluoride
RT	: reverse transcription
SDS	: sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SSC	: standard saline citrate
SSPE	: standard saline phosphate EDTA
SV40	: simian virus 40
Tris	: tris (hydroxymethyl) aminomethane
TCA	: trichloroacetic acid

第 1 章

緒 論

多細胞生物を形成している細胞の大半は、協調的な相互作用によって組織と呼ばれる集団を形成し、これが集合してより大きな機能単位である器官を形成している。しかし、組織や器官は細胞だけでできているのではなく、その体積の相当部分は細胞外空間で占められており、その大部分は細胞外マトリックス(Extracellular matrix)と呼ばれる巨大分子の網目構造によって満たされている。このマトリックスは、周囲の細胞が分泌した多糖類とタンパク質が集合して複雑な網状構造を形成したものである。これらは、細胞の分化や増殖、あるいは遊走を制御して組織形成を助けるだけでなく、細胞間の情報交換の場としても重要な働きをしている(1)。

細胞外マトリックスを構成する巨大分子としては、大きく分けて次の3種類が挙げられる。第1群の分子はグリコサミノグリカン類(GAG)と呼ばれる多糖類で、二糖からなる基本単位が分岐なしに数千回も繰り返したもので、二糖のひとつがアミノ糖であるためにこの総称がある。これらは、コア・タンパク質と結合してプロテオグリカンの形で存在することが多い。ともに多量の水を保持してゲル状になり、栄養分、代謝産物、ホルモンを血液から組織中に拡散させるために重要である。第2群はコラーゲンやエラスチンなどの繊維性タンパク質で、細胞外マトリックスの骨格構造を形成し、組織の物理的強度を生み出すために重要である。コラーゲンは細胞外マトリックスの中で量的に最も多い成分であり、19種類の型からなるコラーゲン・ファミリーを形成して各種組織の物理的および機能的な特徴を生み出している。何れの型も基本的には強固な三重鎖構造を持つ基本分子を形成するが、それらが型ごとに独自の会合様式で高次の会合体を形成し、特徴的な機能を果たしている。ゴム状の伸縮特性を持つエラスチン繊維は、コラーゲン繊維に混在して組織に弾性を与える働きをしている。第3群はフィブロネクチンやラミニンなどの接着性糖タンパク質で、コラーゲンが形成するマトリックス骨格に結合するとともに、細胞表面の受容体(インテグリン)と相互作用して、細胞と細胞外マトリックスとのインターフェイスの役割を果たしている。

動物組織は、細胞外マトリックス成分の種類、およびそれらと構成細胞の相互作

用の観点から、結合組織(間充織)と上皮(内皮)組織の二つに大別できる。結合組織は脊椎動物の体の枠組みを作っており、その含量は器官によって大きく異なる。例えば、皮膚や骨のほとんどは結合組織から成るが、脳や脊髄には少量しかない。結合組織には細胞外マトリックスが豊富に存在し、細胞はその海の中に浮かんでいる島に例えられる(Fig.1-1)。一般的に、結合組織にはI型コラーゲンなどの繊維状ポリマーが多く、これが物理的ストレスから組織細胞を保護している。この細胞外マトリックス分子の種類、量および存在様式は結合組織の機能に応じて著しく異なっており、驚くほどの多様性を持っている。骨や歯のように石灰化して石のように固い物性を構築している場合もあれば、角膜のように透明な細胞外マトリックスを形成している場合もあり、腱では強い張力に耐えられる構造を作っている。一方、上皮(内皮)組織では細胞同士が側面で密に結合したシート状構造を形成している。結合組織と比較して細胞外マトリックス含量は少ないが、上皮(内皮)細胞が形成しているシート状構造を裏打ちするとともに、結合組織と上皮(内皮)組織を隔てている膜状の細胞外マトリックスが存在している。この細胞外マトリックスの特殊型は基底膜(basal lamina)と呼ばれている(2)。

基底膜は上皮細胞や内皮細胞を裏打ちし、筋繊維、脂肪細胞や末梢神経細胞などを取り囲んでいるタンパク質の丈夫なシートであり、これらの細胞を隣接細胞から隔てるためのバリアーとしても働いている(Fig.1-2)。基底膜の機能は非常に多岐にわたっている。例えば、発生過程や腫瘍形成過程のように細胞が急激に増加する時には、基底膜も組織再構築に連動して新たに再形成される。また、基底膜は細胞遊走に対する選択的な障壁として働くことが知られている。例えば、上皮(内皮)細胞は基底膜の存在のために結合組織に侵入できないが、マクロファージや白血球は基底膜を貫通して遊走したり伸展することができる(3)。腎糸球体基底膜のように、血漿中の水や低分子を選択的に濾過して尿としてボーマン嚢腔から尿細管へ送り出す積極的な生理機能を持っている場合もある(4)。さらに、基底膜は傷害を受けた組織の修復にも重要な役割を果たしている。筋肉、神経あるいは上皮組織が傷害を受けた場合には、残った基底膜が新規に遊走してくる細胞に足場を提供し、組織修復の案内役として働くことがある。このような基底膜を介した修復機構の例として、筋肉細胞に刺激伝達を行う運動神経細胞の神経-筋肉接合部位の再生機構が挙げられる(5,6)。運動神経軸索と筋肉の接合部位であるシナプスには基底膜が存在し、これがシナプスを介して周辺構造の空間的配置を規定する能力を持っている。例えば、筋肉細胞の再生過程では損傷後に残った基底膜を基礎に再生が起こり、細胞膜上のア

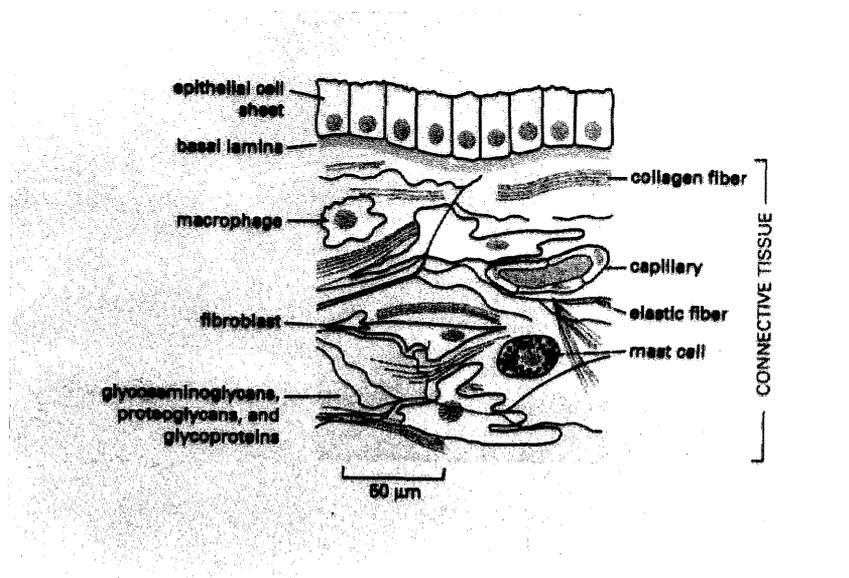


Fig. 1-1 The connective tissue underlying an epithelial cell sheet. It consists largely of extracellular matrix that is secreted by the fibroblasts.

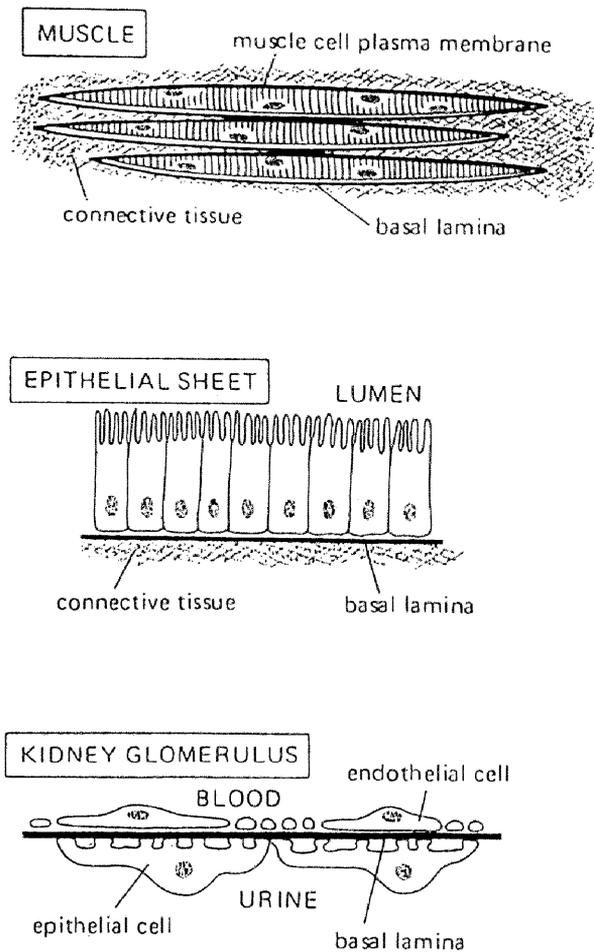


Fig. 1-2 Three ways in which basal laminae (black lines) are organized. They surround certain cells (such as muscle cells), underlie epithelial cell sheets, and are interposed between two cell sheets (as in the kidney glomerulus). Note that in the kidney glomerulus both cell sheets have gaps in them, so that the basal lamina serves as the permeability barrier determining which molecules will pass into the urine from the blood.

セチルコリンレセプターも、基底膜中でアセチルコリンエステラーゼが濃縮されていた部位に再生される。一方、神経軸索の筋肉細胞への伸展とシナプス再生の場合にも、残った基底膜上のアセチルコリンエステラーゼの濃縮部位に向けて軸索が伸展してシナプスが再生される。この他にも、基底膜は細胞の表裏極性の決定や細胞分化促進などの広い意味での遺伝子発現制御に重要な働きをしている(7-12)。

基底膜の構成タンパク質は組織の種類やそれらの体内部位によって大きく異なるが、主成分としてラミニン、IV型コラーゲン、ナイドジェン/エンタクチン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどが挙げられる。ラミニンは上皮(内皮)細胞の基底膜への接着を促す糖タンパク質であり、上皮(内皮)細胞の機能形成とその制御に最も重要な基底膜成分である(13-16)。ラミニン分子は α 、 β および γ 鎖の三本のサブユニットからなり、各鎖はジスルフィド結合して三量体を形成する(Fig.1-3)。現在までに、ヒトとマウスで合わせて5種類の α 鎖($\alpha 1 \sim \alpha 5$)、3種類の β 鎖($\beta 1 \sim \beta 3$)および2種類の γ 鎖($\gamma 1 \sim \gamma 2$)がクローニングされており、それらが様々に組み合わされた7種類の会合体(ラミニン-1から-7)の存在が確認されている(Fig.1-4) (17)。これらが特定の発生時期に組織特異的に発現して独自の機能を果たしていると考えられる (18-20)。ニワトリ(21,22)、カエル(23,24)、ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*) (25-27)、ヒドラ(*Hydra vulgaris*) (28)、ヒル(*Hirudo medicinalis*) (29)、ウニ(30)およびクラゲ(30)でもラミニンがクローニングされており、ラミニンの構造が機能進化の過程で大切に保存されてきたことを示唆している。

マウス Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)腫瘍の基底膜成分として大量に入手できるために最もよく研究されているラミニン-1は、 $\alpha 1$ (400kDa)、 $\beta 1$ (220kDa)および $\gamma 1$ (210kDa)鎖の三種類のサブユニットが各鎖の α -ヘリカルドメイン(長腕部位)で三本鎖コイルドコイル構造を形成して会合し、全体で一本の長腕と三本の短腕からなる十字架構造をした分子量約900kDaの巨大分子である(Fig.1-3)(31-33)。各鎖は15~30%の主としてN結合型糖鎖を持ち、その含量は $\alpha 1$ 鎖に比較的多い。各鎖にはIからVIのドメインが共通にあり、 $\beta 1$ 鎖にはドメインIとIIの間に α -ループが、 $\alpha 1$ 鎖ではドメインIIIとIVが二度繰り返されているとともにC末端にはG1からG5からなるドメインGが付け加わっている。ドメインIVとVIはアミノ酸配列からも電顕像からも球状構造をとることが判っている。ドメインIIIとVには8個のシステインが6残基ごとに並ぶEGF(epidermal growth factor)に似た50残基からなる繰り返し配列があり、折り畳まれたペプチドがジ

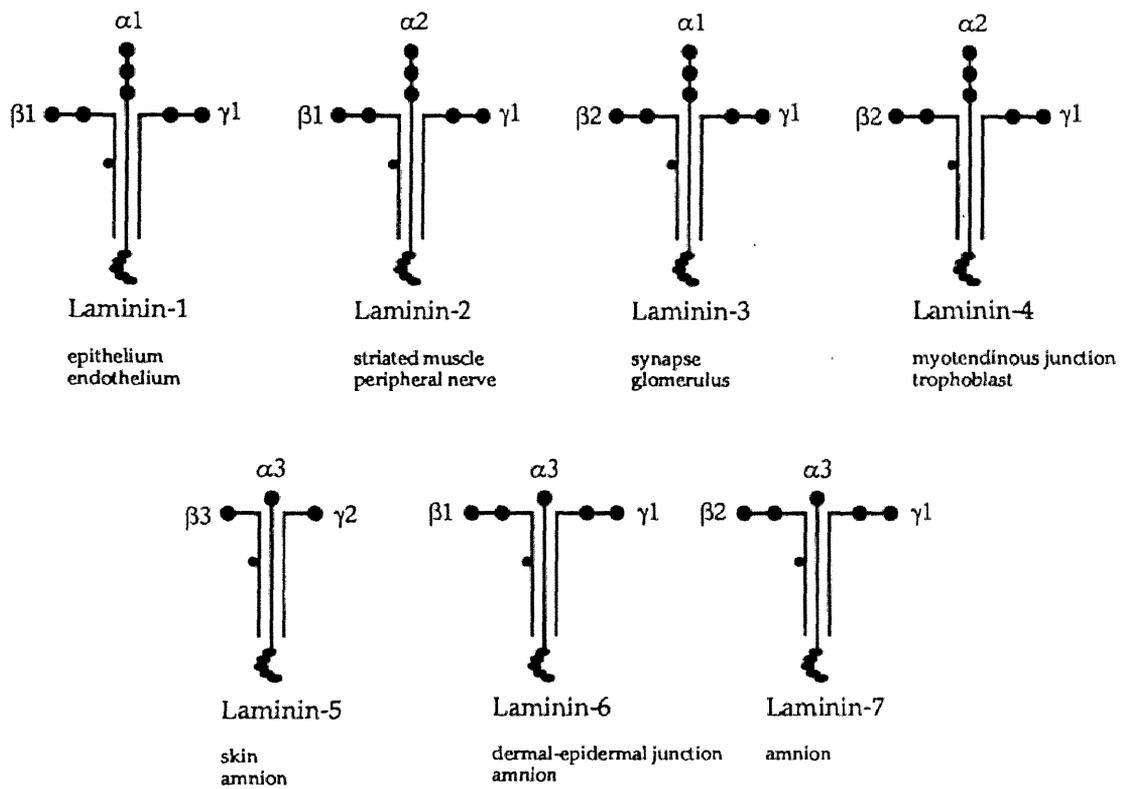


Fig. 1-4 Schematic structures and chain compositions of seven different isoforms of laminin with their respective tissue localization. Those laminins which contain a complete complement of domains for all three chains are shown in the upper row. Those laminins which are truncated, lacking one or more domains in the short arms, are shown in the lower row.

スルフィド結合で安定化された棒状構造を作っている。各鎖の会合部位であるドメインIとIIには、その配列を α -ヘリックスに見たててC末端から見ると、7残基ごとのアミノ酸からなるヘプタドリピート(heptad repeat)が豊富にある(Fig.1-5)。この配列には(a.b.c.d.e.f.g.)_nと表せる規則性があり、aとdの位置には疎水性アミノ酸が、bとcおよびfの位置には親水性アミノ酸が、eとgの位置には荷電アミノ酸が頻出して、疎水性結合とイオン結合で各鎖が会合する三重コイルドコイル構造を作りやすい。また、各鎖には全体で100残基を越えるシステインがあるにもかかわらず、ドメインIとIIには合わせて各鎖3個のシステインしかない。これらのシステインは各鎖のドメインIのC末端に各1個、ドメインIIのN末端に各2個が鎖間で互いに近傍にあり、ジスルフィド結合による正しい鎖間会合の確定と安定化に重要な働きをしていると考えられる。 β 1鎖のドメインIとIIの間にある α -ループは、コイルドコイル構造からループアウトしてジスルフィド結合で折り畳まれている。 α 1鎖のC末端にあるドメインGにあるG1からG5の単位は相同性の高い繰り返しで、電顕像では十字架構造の長腕端に全体で大きな球状構造を作っている。各鎖のN末端のドメインVIの領域ではラミニン分子間の会合が起こり、これらが重合してラミニン・ネットワークを形成する(Fig.1-6)(34-39)。このラミニン・ネットワークは γ 1鎖のドメインIIIの領域でナイドジェン/エンタクチンを介してIV型コラーゲン・ネットワークに連結されている(40,41)。

ラミニンやコラーゲンなどの細胞外マトリックスを構成するタンパク質の多くは、数個のサブユニットが選択的に会合して構造的に安定な巨大分子単位を形成している。これらのタンパク質はそれら自身、あるいは様々な細胞外マトリックスタンパク質と会合して超分子ネットワークを形成し、細胞外マトリックス骨格を形成している。これら細胞外マトリックスタンパク質のサブユニット会合は、この段階的会合過程の最初の重要なステップであるといえる。ラミニンのサブユニットの会合に関しては、当研究室において、ラミニン-1を大量に合成・分泌する胎児性癌細胞F9を用いて以下に要約される機構を世界に先駆けて明らかにした(Fig.1-7)(42)。1)翻訳と同時にN結合型の糖鎖修飾を受けた各鎖は粗面小胞体内で折り畳まれるとともに鎖内ジスルフィド結合をつくるが、ドメインIとIIのシステインは未反応のまま残る。2)各鎖がヘプタドリピートに導かれてランダムな鎖間会合を行うが、正しい鎖間ジスルフィド結合ができない会合は解離する。3)最初の鎖間ジスルフィド結合は β 1と γ 1鎖のドメインIのC末端のシステイン間で形成される。4)正しい β 1- γ 1二量体が形成さ

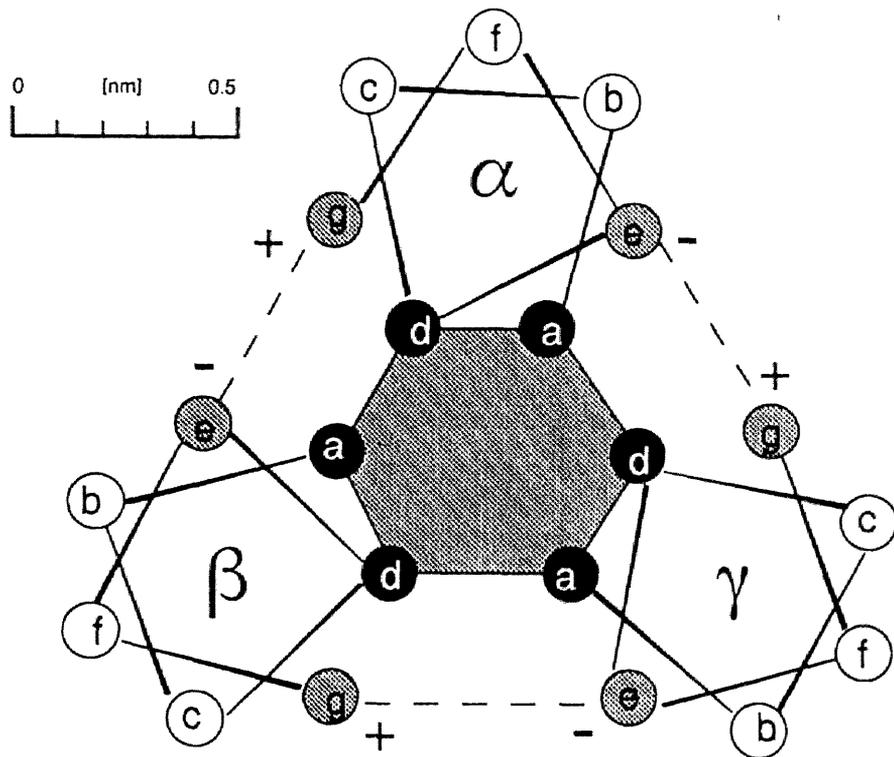


Fig. 1-5 Projection of a three-stranded α -helical coiled-coil, one heptad each, viewed from the COOH terminus.

A distance of 1.0 nm is assumed between the helix axes. The clustering of hydrophobic side chains (filled circles) and electrostatic interactions (dashed circles) are schematically indicated. Side chain in positions b, c and f are located at the surface and are normally polar or charged (open circles).

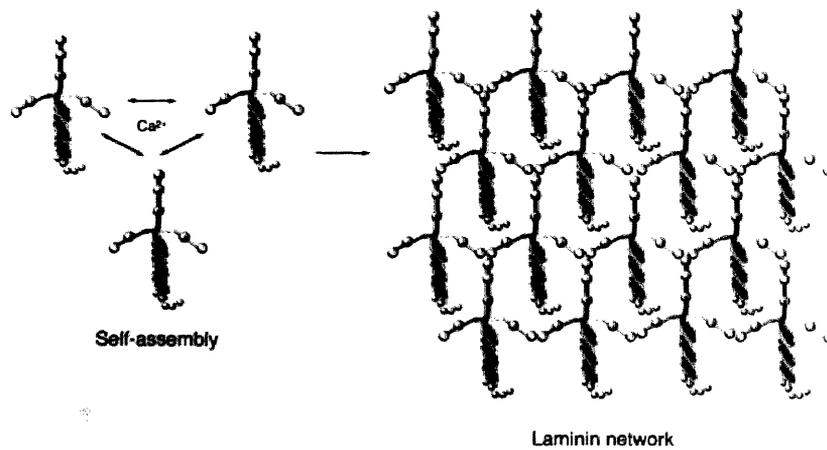


Fig. 1-6 Three-arm interaction hypothesis for laminin self-assembly.

The N-terminal regions of all three short arms participate to form a calcium-dependent polymer bond. With such a polymerization mechanism, the free ends would be free to join their respective partners, forming a polymer with complete and equimolar consumption of free arms. The long arm would normally be free then to participate in cell and glycosaminoglycan interactions.

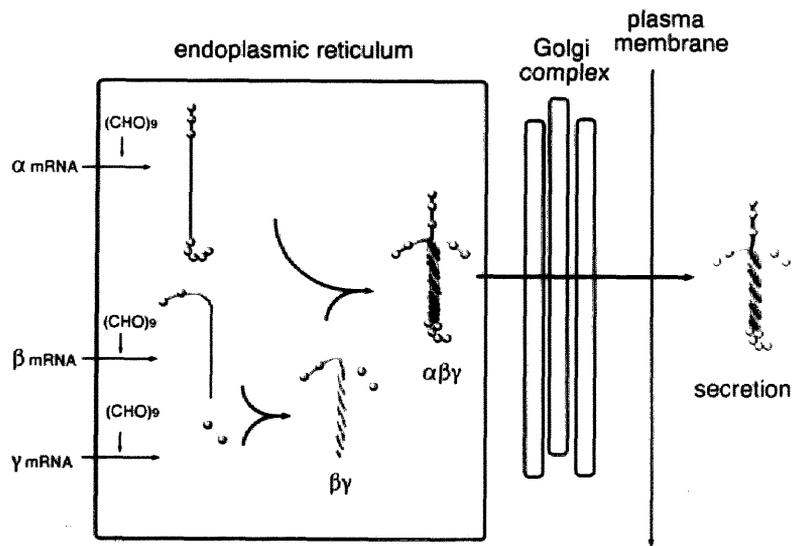


Fig. 1-7 Model of post-translational assembly and glycosylation of laminin subunits.

Laminin chain mRNAs are translated into individual chain unglycosylated monomers, which are then glycosylated. Heterodimers ($\beta\gamma$) assemble before the addition of the α chain. Only heterotrimers are secreted. (CHO)₉; core oligosaccharide side chain.

れると、ヘプタドリピート含量の少ない $\alpha 1$ 鎖の会合が促進され、三重コイルドコイル構造がドメインIIのN末端まで伸長し、ここで各鎖二個のシステインが正しく配向して、 $\alpha 1$ - $\beta 1$ 、 $\beta 1$ - $\gamma 1$ と $\gamma 1$ - $\alpha 1$ 鎖間のジスルフィド結合が形成される。5)会合を完了した複合体だけが選択的にゴルジ体に輸送され、側鎖の修飾を受けて細胞外に分泌される。他方、Engelらはラミニン-1のプロテアーゼ消化断片(E8;ドメインIのC末端より約60%を含む)を用いた*in vitro*の再構成実験で、3.5~4.0Mの尿素存在下で失われるE8断片部分のコイルドコイル構造は、尿素を除去することによって完全に復元することを示した(43,44)。これはE8断片領域のみでラミニン鎖の会合が行われたことを示している。また、この時にシステイン残基をアルキル化しても会合が進むことを示し、ジスルフィド結合は鎖間会合の駆動力ではなく会合体を安定化する作用を持つことを示唆した。またBeckらは、各鎖のドメインIとIIのヘプタドリピート配列を詳細に解析し、鎖間の疎水性結合とイオン結合をスコア化することにより、1) $\beta 1$ - $\gamma 1$ 鎖間の会合が最も起こりやすいこと、2)会合の駆動力としては鎖間の疎水性結合が機能しており、会合の選択性を決めているのはイオン性結合であることを示した(45)。さらにYamadaらは、組み換え体タンパク質や合成ペプチドを用いた実験から、 $\alpha 2$ と $\beta 1$ および $\gamma 1$ 鎖の長腕のC末端に $\beta 1$ - $\gamma 1$ 二量体形成に必須なアミノ酸配列、 $\alpha 2$ - $\beta 1$ - $\gamma 1$ 三量体形成に必須なアミノ酸配列を同定するとともに、長腕のC末端配列の中で極性アミノ酸が重要な働きをしていることをアミノ酸置換実験によって示した(46-48)。また、以下のような三本鎖コイルドコイル構造の二段階形成モデルも提唱している(Fig.1-8)(49)。1) γ 鎖の構造的不安定さが原動力となって γ 鎖が選択的に β 鎖を攻撃し、 β - γ の二本鎖コイルドコイル構造がまず形成される。この時、 β - γ の二本鎖内に酸性アミノ酸残基が局在した酸性ポケットが形成されるため、この β - γ の二本鎖構造にはある程度“ゆらぎ”を持っている。2)次に α 鎖の構造的不安定さが原動力となって α 鎖の塩基性基が β - γ の酸性ポケットを攻撃し、 α - β - γ の三本鎖コイルドコイル構造が選択的に形成される。以上のようなメカニズムで三本鎖コイルドコイル構造が形成され、ラミニン・サブユニットの会合が進行していくと考えられるが、10種類ものラミニン鎖が発見され、これらが特定の組み合わせで会合したラミニン複合体が形成されることを考えると、三本のラミニン鎖会合の選択性がどのように決定されているかの疑問が今後の課題になる。

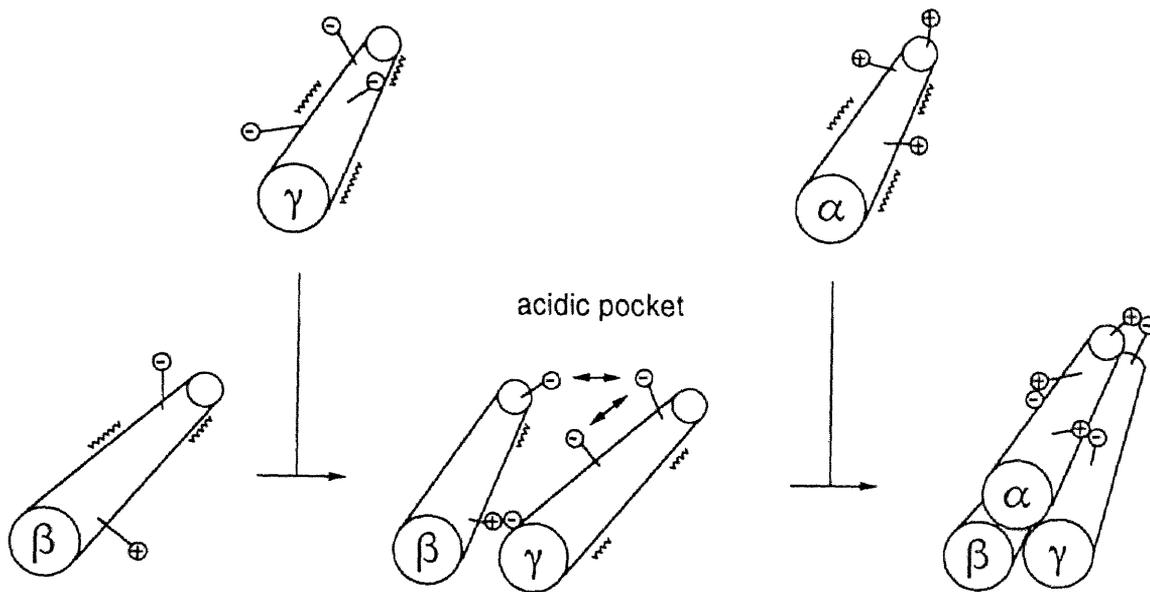


Fig.1-8 Proposed mechanism of laminin peptide assembly into a double- and triple-stranded coiled-coil structure.

Dashed arrows show ionic repulsions. Wavy lines show conformational instability. The side chains of the basic amino acids (arginine and lysine) and acidic residues (aspartic acid and glutamic acid) are represented by + and -, respectively.

ラミニンは、細胞の接着、伸展、移動、分化、増殖などの細胞生理への作用に加えて、器官形成、神経網再生、血管新生、創傷治癒や癌細胞などの細胞集団の組織化にも重要な役割を果たしている。その機能ドメインの解析には、ラミニンの部分構造を持つプロテアーゼ消化断片や合成ペプチドが用いられてきた(Fig.1-9)。例えば、先に述べたE8断片領域には神経突起伸展作用が(50)、ラミニンの十字架構造の交差している部分(P-Lam/E1-4)には神経突起伸展作用に加えてEGF様細胞成長作用があることが示された(51,52)。また、 β 1鎖のドメインIIIのペプチドYIGSR(53,54)およびPDGSR(55)には細胞接着・移動活性や癌細胞転移阻止作用が、 β 1鎖のドメインIVのF-9ペプチド(RYVVLPVPVCFEKGMNYTVR) (56) には細胞接着活性とヘパリン結合作用が、 γ 1鎖のドメインIのC末端のP-20ペプチド(RNIAEIIKDI) (57) には神経突起伸展作用が、 α 1鎖のドメインIのC末端のIKVAVには細胞接着作用と神経突起伸展作用がそれぞれ示されている(58)。さらに、 α 1鎖のドメインIIIbにはインテグリン結合配列として有名なRGD(アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)配列が同定されている。RGDはフィブロネクチンやビトロネクチンなどの各種細胞外マトリックスタンパク質にも見られる細胞接着配列である(59)。ラミニン α 1鎖のRGD配列は内皮細胞の管腔形成に関与していることが示されている(60)。近年、組み換え体タンパク質技術による新たな活性部位が次々に同定されている(61-63)。また、部位特異的な抗体を用いる技術も適用され、ラミニンの部分構造が腎臓上皮細胞の極性決定、腎臓や肺の形態形成および上皮細胞における β -カゼイン遺伝子の発現制御に関与していることも示されている(64-68)。マウスやヒトで見られる既知の疾患とラミニン遺伝子変異との対応も明らかにされつつあり、例えば、 α 2鎖の遺伝子変異と筋ジストロフィー症の関連や(69-72)、ラミニン-5(α 3 β 3 γ 2)と接合部型先天性表皮水泡症(Junctional epidermolysis bullosa) の関与が示された(73,74)。ラミニンの部分構造の中に多数の機能領域がこのように同定された次の段階として、これらがどのように総合されて発生過程で働いているのかが問題となるであろう。

ラミニン研究の今一つのトピックスとして、次々に発見されるラミニン異型体の構造と機能が挙げられる。各種の組織で発見されていたラミニン複合体を整理・分類するために、1994年にBurgessonらはラミニン鎖とラミニン複合体の命名法を整理した(Fig.1-4)(17)。しかし、その後にも α 4鎖と α 5鎖が発見され、これらの複合体形成

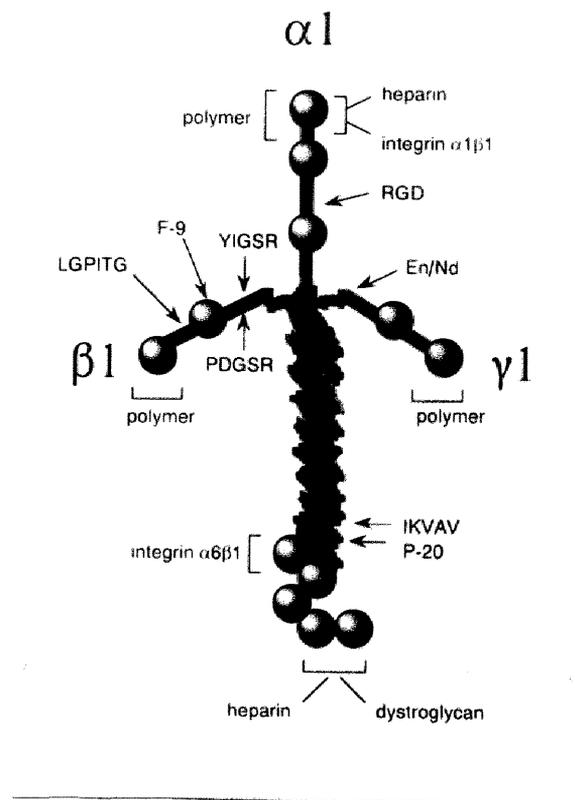


Fig. 1-9 Function map of laminin-1.

The locations of cell binding sites are indicated by arrows. Also recorded are the heparin, $\alpha1\beta1$ integrin, the $\alpha6\beta1$ integrin, dystroglycan, polymer-forming and entactin/nidogen (En/Nd) binding sites.

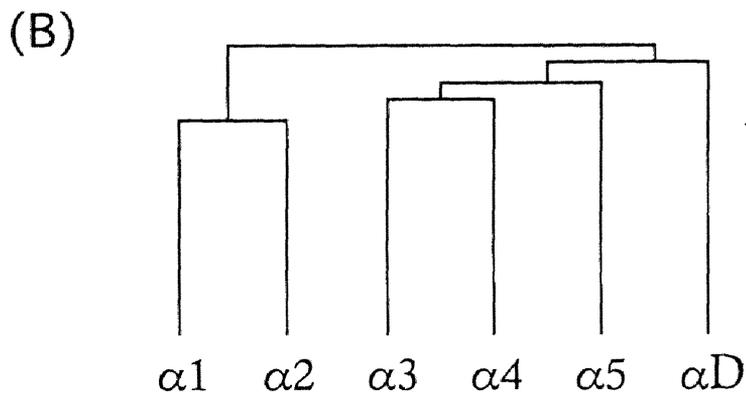
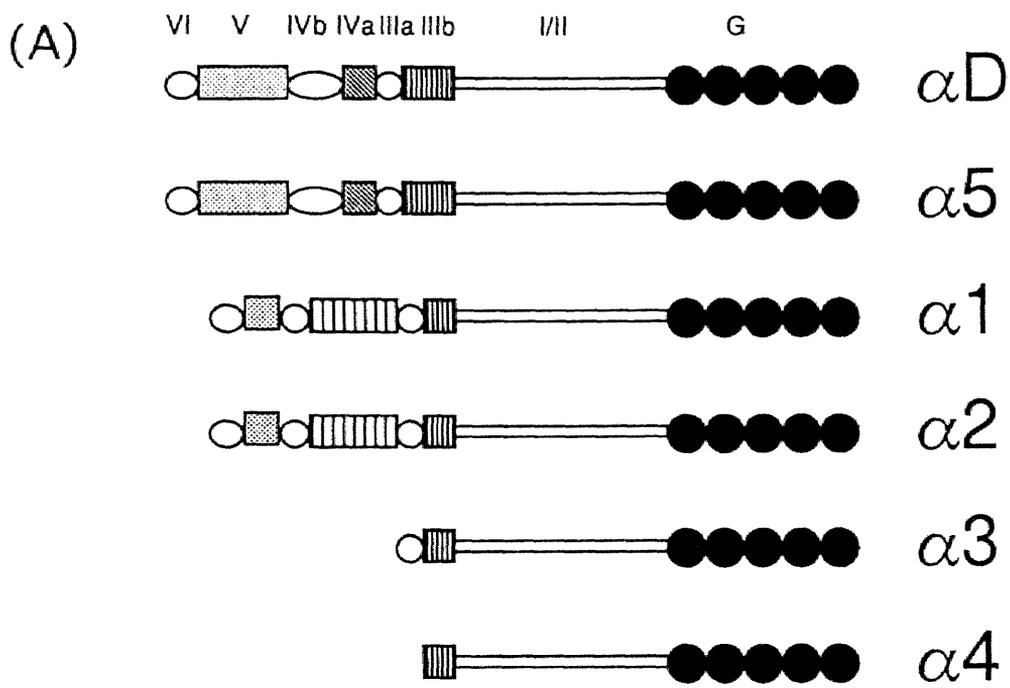


Fig. 1-10 Comparison of domain organization of laminin $\alpha 1$ - $\alpha 5$.

(A) Domain structure of the known laminin α chains. The names of the domains are above $\alpha 5$. Five internal repeats of domain G are indicated by filled circles, and cystein-rich EGF modules of domain IIIa, IIIb and V are depicted by dark boxes. αD indicates the drosophila α chain. (B) Relationships among mammalian and drosophila α chains, based on sequence alignment.

能の解析は始まったばかりである(75-77)。特に、 $\alpha 5$ 鎖は既知の $\alpha 1 \sim \alpha 4$ 鎖に比べてシ
ョウジョウバエの α 鎖により近いドメイン構造を持っており、進化的に最も古い α 鎖
であることが最近になって判明した(Fig.1-10) (77)。さらに、限定された領域でしか
発現していない $\alpha 1 \sim \alpha 4$ 鎖に比べて、 $\alpha 5$ 鎖のmRNAは広範囲の成体組織で検出される
最も主要な α 鎖であることも推測されるようになった(77)。このように、ラミニン異
型体の発見ラッシュは終息の兆しを見せていない。事実、脂肪細胞(78)、筋肉細胞
(79)、上皮細胞(80)やグリア細胞(81)などの培養細胞系、およびヒト軟骨(82)、ウシ腎
臓(83)などの組織で、新しいラミニン異型体の存在が示唆されている。

本研究では、基底膜成分の中で最も興味深い構造と機能を持つラミニンに焦点を
絞って、その構成鎖の会合機構を分子生物学的手法で解析した。第2章では、マウ
スのラミニン各鎖の変異遺伝子をサルの培養細胞で発現させて異種動物由来のラミ
ニン鎖会合が可能であることを示すとともに、鎖間会合に必要な部分構造を*in vivo*実
験系で解析した。その結果、従来の*in vitro* 実験では問題にならなかった細胞内の微
少環境が重要であることを明らかにした。第3章では、*in vitro* 実験では解析できな
かった非常に長い $\beta 1$ 鎖配列を培養細胞内で発現させ、長腕の部分構造が会合過程で
異なる機能を果たすことを明らかにした。第4章では、マウス3T3-L1細胞の異型体
ラミニンを解析し、これが $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ の組み合わせを持つ第8番目のラミニン (ラミニン
-8)であることを発見した。

引用文献

1. McDonald, J. A. (1988) *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 183-208
2. Martin, G. R. and Timpl, R. (1987) *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, 57-85
3. Reist, N. E., Magill, C. and McMahan, U. J. (1987) *J. Cell Biol.* 105, 2457-2469
4. McGowan, S. E. (1992) *FASEB J.* 6, 2895-2904
5. Burden, S. J., Sargent, P. B. and McMahan, U. J. (1979) *J. Cell Biol.* 82, 412-425
6. Sanes, J. R. and Hall, Z. W. (1979) *J. Cell Biol.* 83, 357-370
7. Madri, J. A. and Williams, S. K. (1983) *J. Cell Biol.* 97, 153-165

8. Form, D. M., Pratt, B. M. and Madri, J. A. (1986) *Lab. Invest.* 55, 521-530
9. Macarak, J. A. and Howard, P. S. (1983) *J. Cell Physiol.* 116, 76-86
10. Madri, J. A. and Stenn, K. (1982) *Am. J. Pathol.* 106, 180-186
11. Herbst, T. J., McCarthy, J. B., Tsilibary, E. C. and Furcht, L. T. (1988) *J. Cell Biol.* 106, 1365-1373
12. Schuger, L. O., Shea, S., Rheinheimer, J. and Varani, J. (1990) *Dev. Biol.* 137, 26-32
13. Martin, G. R., Timpl, R. and Kuhn, K. (1988) *Adv. Protein Chem.* 39, 1-50
14. Timpl, R. (1989) *Eur. J. Biochem.* 180, 487-502
15. Engel, J. (1992) *Biochemistry* 31, 10633-10651
16. Beck, K., Hunter, I. and Engel, J. (1990) *FASEB J.* 4, 148-160
17. Burgeson, R. E., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ekblom, P., Engel, J., Kleinman, H., Martin, G. R., Meneguzzi, G., Paulsson, M., Sanes, J., Timpl, R., Tryggvason, K., Yamada, Y. and Yurchenco, P. D. (1994) *Matrix Biol.* 14, 209-211
18. Engvall, E. (1993) *Kidney Int.* 43, 2-6
19. Tryggvason, K. (1993) *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 877-882
20. Timpl, R. and Brown, J. D. (1994) *Matrix Biol.* 14, 275-281
21. Brubacher, D., Wehrle-Haller, B. and Chiquet, M. (1991) *Exp. Cell Res.* 197, 290-299
22. O'Rear, J. J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 20555-20557
23. Wedlich, D., Hacke, H. and Klein, G. (1989) *Differentiation* 40, 77-83
24. Fey, J. and Hausen, P. (1990) *Differentiation* 42, 144-152
25. Montell, D. J. and Goodman, C. S. (1988) *Cell* 53, 463-473
26. Montell, D. J. and Goodman, C. S. (1989) *J. Cell Biol.* 109, 2441-2453
27. Kusche-Gullberg, M., Garrison, K., Mackrell, A. J., Fessler, L. I. and Fessler, J. H. (1992) *EMBO J.* 11, 4519-4527
28. Sarras Jr., M. P., Yan, L., Grens, A., Zhang, X., Agbas, A., Huff, J. K., ST. John, P. L. and Abrahamson, D. R. (1994) *Dev. Biol.* 164, 312-324
29. Chiquet, M., Masuda-Nakagawam L. and Beck, K. (1988) *J. Cell Biol.* 107, 1189-1198
30. Beck, K., McCarthy, R. A., Chiquet, M., Masuda-Nakagawa, L. and Schlage, W. K. (1989) In *Cytoskeletal and Extracellular Proteins: Structure, Interactions and Assembly* (Aebi, U. and Engel, J., eds) pp. 102-105, Springer-Verlag, Berlin

31. Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J. A., Furthmayr, H., Rhode, H. and Timpl, R. (1981) *J. Mol. Biol.* 150, 97-120
32. Engel, J. (1993) in *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes* (Rohrbach, D. H., and Timpl, R., eds) pp. 147-176, Academic Press, San Diego, CA
33. Paulsson, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Dalzoppo, D., Odermatt, E. and Engel, J. (1985) *EMBO J.* 4, 309-316
34. Schittny, J. C. and Yurchenco, P. D. (1990) *J. Cell Biol.* 110, 825-832
35. Yurchenco, P. D. and Cheng, Y.-S. and Colognato, H. (1992) *J. Cell Biol.* 117, 1119-1133
36. Yurchenco, P. D. and Cheng, Y.-S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 17286-17299
37. Schittny, J. C. and Schittny, C. M. (1993) *Eur. J. Biochem.* 216, 437-441
38. Yurchenco, P. D. and Schittny, J. C. (1990) *FASEB J.* 4, 1577-1590
39. Yurchenco, P. D. and O'Rear, J. J. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 674-681
40. Mayer, U., Nischt, R., Poschl, E., Mann, K., Fukuda, K., Gerl, M., Yamada, Y. and Timpl, R. (1993) *EMBO J.* 12, 1879-1885
41. Poschl, E., Fox, J. W., Block, D., Mayer, U. and Timpl, R. (1994) *EMBO J.* 13, 3741-3747
42. Morita, A., Sugimoto, E. and Kitagawa, Y. (1985) *Biochem. J.* 229, 259-264
43. Hunter, I., Schulthess, T., Bruch, M., Beck, K. and Engel, J. (1990) *Eur. J. Biochem.* 188, 205-211
44. Hunter, I., Schulthess, T. and Engel, J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 6006-6011
45. Beck, K., Dixon, T. W., Engel, J. and Parry, D. A. D. (1993) *J. Mol. Biol.* 31, 311-323
46. Utani, A., Nomizu, M., Timpl, R., Roller, P. P. and Yamada, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19167-19175
47. Utani, A., Nomizu, M., Sugiyama, S., Miyamoto, S., Roller, P. P. and Yamada, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 3292-3298
48. Nomizu, M., Otaka, A., Utani, A., Roller, P. P. and Yamada, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 30386-30392
49. Nomizu, M., Utani, A., Beck, K., Otaka, A., Utani, A., Roller, P. P. and Yamada, Y. (1996) *Biochemistry* 35, 2885-2893
50. Edgar, D., Timpl, R. and Thoenen, H. (1984) *EMBO J.* 3, 1463-1468

51. Sephel, G. C., Tashiro, K., Kandel, S., Kleinman, H. K., Martin, G. R., Ogawa, K., Sasaki, M. and Yamada, Y. (1989) *Dev. Biol.* 135, 172-181
52. Panayotou, G., End, P., Aumailley, M., Timpl, R. and Engel, J. (1989) *Cell* 56, 93-101
53. Graf, J., Iwamoto, Y., Sasaki, M., Martin, G. R., Kleinman, H. K., Robey, F. A. and Yamada, Y. (1987) *Cell* 48, 989-996
54. Iwamoto, Y., Robey, F. A., Graf, J., Sasaki, M., Kleinman, H. K., Yamada, Y. and Martin, G. R. (1987) *Science* 238, 1132-1134
55. Kleinman, H. K., Graf, J., Iwamoto, Y., Sasaki, M., Schasteen, C. S., Yamada, Y., Martin, G. R. and Robey, F. A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 272, 39-45
56. Charonis, A. S., Skubitz, A. P., Kolialos, G. G., Reger, L. A., Dege, J., Vogel, A. M., Wohlhueter, R. and Furcht, L. T. (1988) *J. Cell Biol.* 107, 1253-1260
57. Liesi, P., Narvanen, A., Soos, J., Sariola, H. and Snounou, G. (1989) *FEBS Lett.* 244, 141-148
58. Tashiro, K., Sephel, G. C., Weeks, B., Sasaki, M., Martin, G. R., Kleinman, H. K. and Yamada, Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 16174-16182
59. Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M. (1987) *Science* 238, 491-497
60. Grant, D. S., Tashiro, K., Sequi-Real, B., Yamada, Y., Martin, G. R. and Kleinman, H. K. (1989) *Cell* 58, 933-943
61. Yurchenco, P. D., Sung, U., Ward, M. D., Yamada, Y. and O'Rear, J. J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 8356-8365
62. Matter, M. L. and Laurie, G. W. (1994) *J. Cell Biol.* 124, 1083-1090
63. Colonato-Pyke, H., O'Rear, J. J., Yamada, Y., Carbonetto, S., Cheng, Y.-S. and Yurchenco, P. D. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 9398-9406
64. Klein, G., Langegger, M., Timpl, R. and Ekblom, P. (1988) *Cell* 55, 331-341
65. Ekblom, M., Klein, G., Mugrauer, G., Fecker, L., Deutzmann, R., Timpl, R. and Ekblom, P. (1990) *Cell* 60, 337-346
66. Kadoya, Y., Kadoya, K., Durbeej, M., Holmvall, K., Sorokin, L. and Ekblom, P. (1995) *J. Cell Biol.* 129, 521-534
67. Schuger, L., Skubitz, A. P. N., Des las Morenas, A. and Gilbride, K. (1995) *Dev. Biol.* 169, 520-532
68. Streuli, C. H., Schmidhauser, C., Bailey, N., Yurchenco, P., Skubitz, A. P. N., Roskelley, C. and Bissell, M. J. (1995) *J. Cell Biol.* 129, 591-603

69. Xu, H., Christmas, P., Wu, X.-R., Wewer, U. M. and Engvall, E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5572-5576
70. Xu, H., Wu, X.-R., Wewer, U. M. and Engvall, E. (1994) *Nature Genet.* 8, 297-302
71. Helbling-Leclerc, A., Zhang, X., Topaloglu, H., Cruaud, C., Tesson, F., Weissenbach, J., Tome, F. M. S., Schwartz, K., Fardeau, M., Tryggvason, K. and Guicheney, P. (1995) *Nature Genet.* 11, 216-218
72. Sunada, Y., Bernier, S. M., Kozak, C. A., Yamada, Y. and Campbell, K. P. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 13729-13732
73. Pulkkinen, L., Christiano, A. M., Airene, T., Haakana, H., Tryggvason, K. and Uitto, J. (1994) *Nature Genet.* 6, 293-298
74. Aberdam, D., Galliano, M.-F., Vailly, J., Pulkkinen, L., Bonifas, J., Christiano, A. M., Tryggvason, K., Uitto, J., Epstein Jr, E. H., Ortonne, J.-P. and Meneguzzi, G. (1994) *Nature Genet.* 6, 299-304
75. Iivanainen, A., Sainio, K., Sariola, H. and Tryggvason, K. (1995) *FEBS Lett.* 365, 183-188
76. Richards, A., Al-Imara, L. and Pope, F. M. (1996) *Eur. J. Biochem.* 238, 813-821
77. Miner, J. H., Lewis, R. M. and Sanes J. R., (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 28523-28526
78. Aratani, Y. and Kitagawa, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16163-16169
79. Kroll, T. G., Peters, B. P., Hustad, C. M., Jones, P. A., Killen, P. D. and Ruddon, R. W. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 9270-9277
80. Lindblom, A., Marsh, T., Fauser, C., Engel, J. and Paulsson, M. (1994) *Eur. J. Biochem.* 219, 383-392
81. Lemosy, E. K., Lightner, V. A. and Erickson, H. P. (1996) *Exp. Cell Res.* 227, 80-88
82. Durr, J., Lammi, P., Goodman, S. L., Aigner, T. and Von der Mark, K. (1996) *Exp. Cell Res.* 222, 225-233
83. Sorokin, L., Girg, W., Gopfert, T., Hallman, R. and Deutzmann, R. (1994) *Eur. J. Biochem.* 223, 603-610

第2章

マウス・ラミニン鎖遺伝子のサル細胞内発現による種間会合体の形成

序 論

細胞外マトリックスは、組織細胞集団の間隙を埋める単なる充填物や保水成分、あるいは組織の機械的強度を与える外枠のようなものとして考えられ、細胞の増殖や分化などの細胞機能の調節とは無縁のものと考えられてきた。この観点からすると、細胞外マトリックス成分は細胞活性をコントロールする分子群の下位に位置づけられる。酵素などの生理活性を持つタンパク質群、それらの生合成に関与するRNA群、遺伝情報を担うDNAの順に支配系列をたどると、細胞外マトリックスはDNA-RNA-酵素の次の第四次生物構成成分として位置づけられる。しかし、現在では細胞外マトリックスが静的な成分ではなく、その中に包埋している細胞のあらゆる行動、すなわち、発生、遊走、増殖、形態変化あるいは分化などを調節する動的な役割を果たしていることが解明されてきている。これらの機能の完全な理解のためには、各組織を構成している細胞外マトリックス成分の構造を分子レベルで解明することが不可欠である。

細胞外マトリックスは、1)複数の構成サブユニットの会合による単位分子の形成、2)分泌のための細胞内輸送過程におけるジスルフィド結合や糖鎖付加などの修飾反応、3)細胞外での二次的会合などの多段階の反応を経て超分子ネットワーク形成に至る点で酵素などの生理活性タンパク質とは異なっている。細胞外マトリックスの機能はこのような超分子ネットワーク形成によってはじめて発揮される。細胞外マトリックスのこのような特性を考えると、最初のステップである複数の構成サブユニットの会合の解析は重要である。第1章でも述べたように、ラミニンのサブユニット会合はプロテアーゼ消化断片や合成ペプチドを用いた*in vitro* 実験系で解析されてきた(1-6)。これらの*in vitro* の実験結果は細胞内の微小環境を十分に反映していたのだろうか。*in vitro*の実験はラミニンサブユニットの会合が長腕のC末端のE8断片領域だけで起こることを示したが、細胞内での実際の会合にはそれだけで十分なのだろうか。コイルドコイル構造形成に寄与しない短腕領域は会合体形成に全く関与しないのだろうか。現在10種類知られているラミニンサブユニットが細胞内でどの

ように選択的に会合しているのだろうか。このような疑問を解明するためには、*in vivo*でラミニンサブユニットの会合過程を解析することが重要である。本章では、様々な種類および長さのマウス・ラミニン鎖の断片をサル由来培養細胞に発現させて形成されるラミニン会合体について解析することにより、ラミニンの細胞内サブユニット会合についての新たな知見を得ようとした。

実験材料および実験方法

[1] 実験材料

抗ラミニン-1ポリクローナル抗体はマウスEHS肉腫由来のラミニン (Bethesda Reserch Laboratories)を家兎に免疫して調製した(7,8)。DMEM培地は日水製薬から、メチオニン不含イーグルMEM培地はSigmaから、ウシ胎児血清(FCS) はGIBCO BRL から、細胞培養用の培養皿はNUNCから、プロテインA-セファロースCL-4BはPharmaciaから、L-[³⁵S]メチオニン (Pro-Mix™ L-[³⁵S] cell labelling mix) はAmershamから、抗c-mycモノクローナル抗体はOncogene Scienceから各々購入した。その他の試薬は市販の特級のものをを用いた。

[2] 細胞培養、および細胞への遺伝子導入

アフリカミドリザル腎臓由来COS-1細胞は10%ウシ胎児血清(FCS)、50units/mlのペニシリン、25μg/mlのストレプトマイシンを含むDMEM培地中で、5%CO₂/95%気相下、37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。

細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム法(9)で行った。すべての実験は60mm培養皿上の細胞に対して行い、20μgのプラスミドDNAを使用した。遺伝子導入の前日に 1×10^4 cells/cm²の密度で移植した細胞を、DNAとリン酸カルシウムの共沈殿とともに、約4時間培養した。その後、細胞をPBSで3回洗浄し、通常の培地で24時間培養した。その後、35mm培養皿に移植し、さらに24時間培養した後に放射性アミノ酸により標識した。

[3] 放射性アミノ酸による細胞の標識、および免疫沈降

細胞の放射性アミノ酸による標識は35mm培養皿上の細胞に対して、0.1mCi/mlの $[^{35}\text{S}]$ メチオニンを含むメチオニン不含MEM培地(Sigma)で5% CO_2 /95%気相下、37°Cの CO_2 インキュベーター内で4時間培養することにより行った。放射性アミノ酸により標識された培地を回収した後に、細胞に1mlの免疫沈降用緩衝液A{10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM NaCl、5mM EDTA(ethylenediamine tetraacetic acid)、0.1%(w/v) コール酸ナトリウム、0.1%(w/v) SDS(sodium dodecyl sulfate)、1mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)}、または免疫沈降用緩衝液NP-40 lysis(10mM Tris-HCl (pH7.4)、150mM NaCl、5mM EDTA、1%(v/v) NP-40(Nonidet P-40)、1mM PMSF)を加え、細胞溶解液を調製した。標識培地と細胞溶解液のTCA不溶画分に取り込まれた放射活性をRobertsとPetersonのペーパーディスク法(10)により測定した。各々の実験には、 1.5×10^7 cpmに相当する細胞溶解液に免疫沈降用緩衝液を加えて500 μl とし、抗ラミニン-1抗血清を1 μl 、または抗c-mycモノクローナル抗体(Oncogene Science)を5 μl 添加し、4°Cで一晩放置した。その後、プロテインAセファロース(Pharmacia)の10%懸濁液を30 μl 加えて、室温で1時間振とうした。遠心分離でセファロース樹脂を回収し、免疫沈降用緩衝液で3回洗浄した後に、非還元条件では3倍濃度のSDS緩衝液{200mM Tris-HCl (pH6.8)、9% SDS、15% グリセロール、0.006% BPB(bromophenol blue)}、還元条件では6% 2-メルカプトエタノールを含む3倍濃度のSDS緩衝液を20 μl 加えて、5分間煮沸し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動(PAGE)に供した。SDS-PAGEはLaemmliの不連続緩衝系を用い(11)、濃縮用ゲルには3%のポリアクリルアミドを、分離用ゲルには3-10%のグラジエントのポリアクリルアミドを含むゲルを用いた。二次元電気泳動は二次元目に非還元条件の4%のディスクゲルを、二次元目には還元条件の3-10%のグラジエントゲルを用いた。泳動後のゲルを30% メタノール、10% 酢酸、10% TCA(Trichloroacetic acid)を組成とする固定液に30分間浸し、タンパク質を固定した後、ゲルドライヤーで乾燥した。乾燥したゲルはイメージングプレートに露光し、BAS2000 イメージアナライザー(Fuji Film)で解析した。

[4] プラスミド構築

すべてのプラスミドはペプチド伸長因子(EF-1 α ; Elongation factor-1 α)プロモーターの制御下でマウス・エリスロポエチン受容体(EPO-R; erythropoietin receptor) cDNA を発現するプラスミドpEFneoER(12)をもとに作製した。ラミニンの部分配列を培養細胞に発現・分泌させるために、pEFneoERのエリスロポエチンレセプターcDNAのシ

グナル配列を利用し、その下流にラミニン部分配列cDNAを挿入した。発現させた変異ラミニン産物をヒトc-myc抗体で特異的に認識する目的で、変異ラミニン遺伝子の下流にはヒトc-myc配列を挿入した(13)。すなわち、エピトープタギング(Epitope tagging)である。終止コドンはc-myc配列の下流に配置した。ヒトc-myc配列と3'末端の終止コドンを作るために

5'-ATCGAACAAAAGCTTATTTCTGAAGAAGACTTGTAGATGCA-3'と

5'-TCTACAAGTCTTCTTCAGAAATAAGCTTTTGTTCGAT-3'の二本のオリゴヌクレオチドを70℃で10分間、加熱処理した後、3時間かけて25℃にし、さらに25℃で10分間保温して、アニールさせた。この二本鎖DNA断片を発現ベクターpcDNA1の制限酵素*Bam*HIと*Nsi*I部位に挿入した。マウス・ラミニンβ1鎖のE8断片領域(アミノ酸残基1540-1765)に相当するcDNA断片を得るために、

5'-GCTGGATCCGCTTGCAGCAGAGTGCAGCTGA-3'と

5'-CGCGAATTCGCTAAGCAGGTGCTGTAAAACCG-3'の二本のオリゴヌクレオチドプライマーに用い、マウス・ラミニンβ1鎖遺伝子のドメインIからIIIを含むプラスミドpLAM(14)を鋳型としてPCR(Polymerase chain reaction)法によりcDNA断片を増幅した。増幅断片に*Bam*HI部位と*Eco*RI部位ができるようにプライマーにそれぞれの配列を入れてあるので、*Bam*HIと*Eco*RIで切断し、先程のc-myc配列を挿入したpcDNA1の*Bam*HI-*Eco*RI部位に挿入した。このラミニンβ1鎖E8断片とc-myc配列を含む*Sma*I-*Not*I断片をpEFneoERの*Sma*I-*Not*I部位に挿入し、マウス・ラミニンβ1鎖のE8断片(アミノ酸残基1540-1765)を発現するプラスミドpEFβ1ΔN1を構築した。pEFβ1ΔN2はマウス・ラミニンβ1鎖のドメインIの96%(アミノ酸残基1424-1765)を発現するプラスミドで、pLAMの*Nco*I部位に*Bam*HIリンカーを接続し、*Bam*HI-*Cla*I断片をpEFβ1ΔN1の*Bam*HI-*Cla*I部位に挿入して構築した。pEFβ1ΔN3はマウス・ラミニンβ1鎖のドメインIとドメインIIの18%(アミノ酸残基1337-1765)を発現するプラスミドで、pLAMの*Bgl*II部位に*Bam*HIリンカーを接続し、*Bam*HI-*Cla*I断片をpEFβ1ΔN1の*Bam*HI-*Cla*I部位に挿入して構築した。pEFβ1ΔN4はマウス・ラミニンβ1鎖のドメインIとII(アミノ酸残基1157-1765)を発現するプラスミドで、

5'-GCTGGATCCCACCCTGCCACCAGTGCTTTGC-3'と

5'-CGCGAATTCGCTAAGCAGGTGCTGTAAAACCG-3'の二本のオリゴヌクレオチドを

プライマーに用い、pLAMを鋳型としてPCR法により、ドメインIとIIに相当するcDNA断片を得た。プライマーに挿入した*Bam*HI、*Eco*RI部位を利用して、これをpEF β 1 Δ N1の*Bam*HI-*Eco*RI部位に挿入して構築した。pEF β 1 Δ N5はマウス・ラミニン β 1鎖のドメインIとII、およびドメインIIIの50%(アミノ酸残基953-1765)を発現するプラスミドで、pLAMの*Hinc*II-*Cla*I断片をpEF β 1 Δ N1の*Sma*I-*Cla*I部位に挿入して構築した。pEF β 1 Δ NC1はマウス・ラミニン β 1鎖のドメインIの53%とドメインII、およびドメインIIIの50%(アミノ酸残基953-1699)を発現するプラスミドで、pEF β 1 Δ N5の*Eco*RV断片を欠失させることによって構築した。pEF γ 1 Δ N1はマウス・ラミニン γ 1鎖のE8断片(アミノ酸残基1329-1575)を発現するプラスミドで、

5'-GCGGGATCCCCAATGACATTCTCAACAAC-3'と

5'-GCAGATATCGGGCTTCTCGATAGACGGGG-3'の二本のオリゴヌクレオチドをプライマーに用い、マウス胎児性癌細胞F9の内臓内胚葉様細胞(15)の全RNAから、RT(reverse transcription)-PCR法によってラミニン γ 1鎖のE8断片に相当するcDNA断片を得た。プライマーに挿入した*Bam*HI、*Eco*RV部位を利用して、これをpEF β 1 Δ N1の*Bam*HI-*Eco*RV部位に挿入して構築した。pEF γ 1 Δ N2はマウス・ラミニン γ 1鎖のドメインIとII(アミノ酸残基996-1575)を発現するプラスミドで、

5'-GCAGGATCCAGGAGTGTCCGGCTTGTTAC-3'と

5'-GCAGATATCGGGCTTCTCGATAGACGGGG-3'の二本のプラスミドをプライマーに用い、マウス胎児性癌細胞F9の内臓内胚葉様細胞の全RNAから、RT-PCR法によってラミニン γ 1鎖のドメインIとIIに相当するcDNA断片を得た。プライマーに挿入した*Bam*HI、*Eco*RV部位を利用して、これをpEF β 1 Δ N1の*Bam*HI-*Eco*RV部位に挿入して構築した。pEF α 1 Δ NC1はマウス・ラミニン α 1鎖のドメインI/IIの42%、ドメインIIIa、ドメインIVaの10%(アミノ酸残基1323-1777)を発現するプラスミドで、マウス・ラミニン α 1鎖cDNA断片(塩基3944-5444)を含むプラスミドp1284(16)の挿入断片の5'末端に*Bam*HIリンカーをつなぎ、*Bam*HI-*Eco*RI断片をpEF β 1 Δ N1の*Bam*HI-*Eco*RI部位に挿入して構築した。pEF α 1 Δ NC2はマウス・ラミニン α 1鎖のドメインI/II、ドメインIIIa、ドメインIVaの10%、ドメインGの7%(アミノ酸残基1323-2175)を発現するプラスミド

で、まずpEF α 1 Δ NC1のEcoRI部位にマウス・ラミニン α 1鎖cDNA断片(塩基5444-6641)を含むプラスミドp1238 (16)のEcoRI断片をつなぎ、欠失している部分を、5'-GCGCGTAAAGATTCCAGCC-3'と5'-GTCTCTGTCCAAAGCTCCTG-3'の二本のオリゴヌクレオチドを用い、マウス胎児性癌細胞F9の内臓内胚葉様細胞の全RNAから、RT-PCR法により得た塩基配列5158-5696に相当するSphI断片で埋めることにより構築した。

結 果

Fig.2-1に本実験で使用したプラスミドの模式図を示した。まず、*in vivo* において、E8断片のみでラミニンサブユニットの会合が起こるのかどうかを調べるために、マウス・ラミニン β 1鎖、 γ 1鎖のE8断片を発現するプラスミドpEF β 1 Δ N1、pEF γ 1 Δ N1を作製した。さらに、 β 1鎖の α -ループを含む、各領域の役割を解析する目的で、E8断片より少し長い領域を発現するpEF β 1 Δ N2、 α -ループまで含むpEF β 1 Δ N3、ドメインIとIIの長腕領域を完全にカバーするpEF β 1 Δ N4、短腕のドメインIIIの一部を含むpEF β 1 Δ N5、pEF β 1 Δ N5からE8断片領域を完全に欠失しているpEF β 1 Δ NC1を作製した。 γ 1鎖はE8断片領域を発現するプラスミドpEF γ 1 Δ N1に加え、ドメインIとIIの長腕領域を完全にカバーするpEF γ 1 Δ N2を作製した。 α 1鎖はドメインI/IIからE8断片領域を欠失するpEF α 1 Δ NC1、ドメインI/IIを完全にカバーし、ドメインGの一部を含むpEF α 1 Δ NC2の二種類のプラスミドを作製した。各プラスミドのラミニンの配列には、ジスルフィド結合に必要なシステイン残基が少なくとも一つ含まれている。Fig.2-2にはこれらのプラスミドの基本骨格となる発現ベクターpEFneoERとラミニンの部分配列を発現させるための戦略を示した。pEFneoERはEF-1 α プロモーターの制御下でマウス・エリスロポエチン受容体遺伝子が発現するプラスミドで、ベクター内にSV40の複製開始配列を含むため、SV40のラージT抗原を構成的に発現するサル腎臓由来COS-1細胞に導入された場合、プラスミドの細胞内コピー数が一過的に増大す

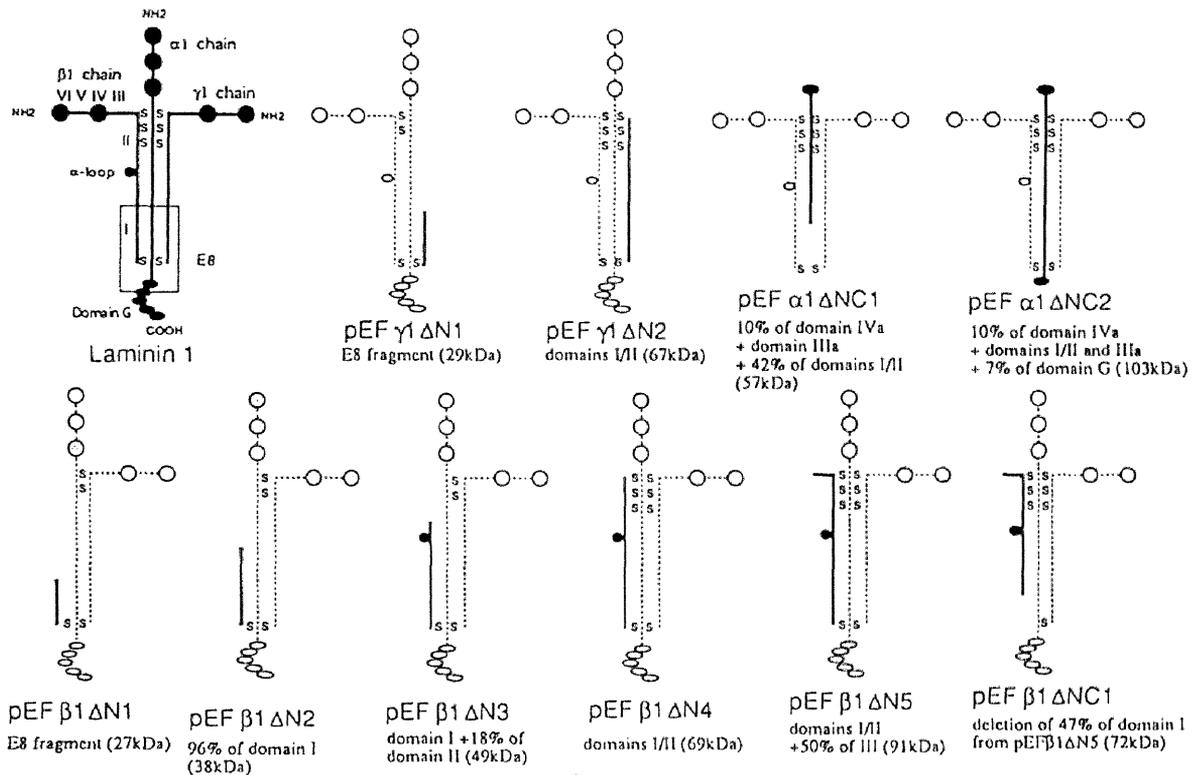


Fig. 2-1 Plasmids encoding long arm regions of mouse laminin $\alpha 1$, $\beta 1$ and $\gamma 1$ chain.

Simplified mouse laminin structure, its major domains and cysteine residues for interchain disulfide-bonding (S) are shown at *left top* of the panel. The long arm sequences encoded by each plasmids is shown by thick line with other parts by dotted lines. Under the name of each plasmid, encoded sequences are briefly explained together with calculated molecular mass of the products.

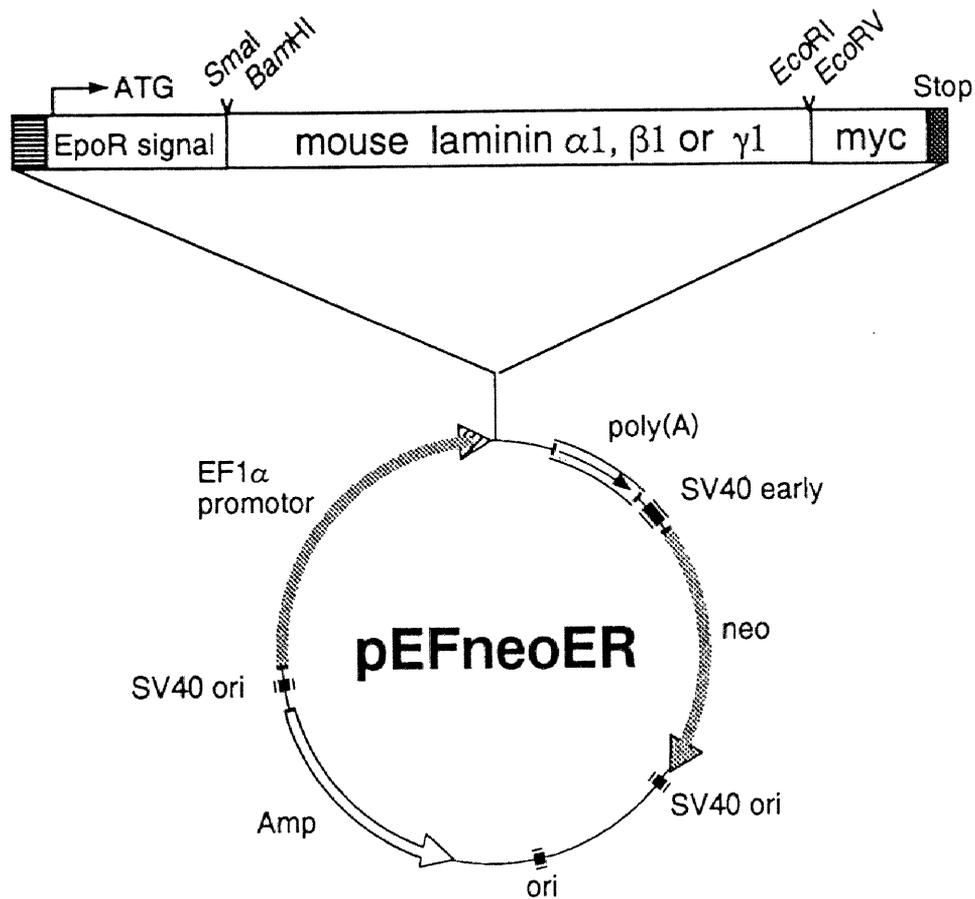


Fig. 2-2 Construct for eucaryotic expression of mouse laminin $\alpha 1$, $\beta 1$ and $\gamma 1$ chain.

Partial fragment of $\alpha 1$, $\beta 1$ and $\gamma 1$ cDNA was cloned into the *SmaI* or *BamHI* and *EcoRI* or *EcoRV* site of the pEFneoER expression vector. pEFneoER requires for optimal expression the SV40 large T antigen which is expressed by the COS-1 cells used in this study.

る(10^5 /細胞)。したがって、本実験ではマウス・ラミニン鎖をサルCOS-1細胞に一過性発現させて、ラミニン鎖の会合を解析することにした。ラミニンのヒト-マウス間のアミノ酸配列の相同性は $\alpha 1$ 鎖で約80%、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 鎖では約90%であるので、サル-マウス間でも同程度であると思われる。ラミニンの部分配列は細胞外に分泌されるのに必要なシグナル配列を欠失しているので、pEFneoERのエリスロポエチン受容体遺伝子のシグナル配列をそのまま利用した。また、エピトープタグgingのために、ラミニン部分配列のC末端にはヒトc-myc配列を挿入した。

まず、実際に組み換え体ラミニンが発現するかどうかを調べるために、これらのプラスミドをCOS-1細胞に遺伝子導入して2日後、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで放射標識した細胞溶解液を抗c-mycモノクローナル抗体で免疫沈降して、還元条件のSDS-PAGEで解析した(Fig.2-3)。pEF $\alpha 1\Delta\text{NC}1$ 、pEF $\alpha 1\Delta\text{NC}2$ を除くすべてのプラスミドは、アミノ酸配列から推定される分子量の位置に数本ずつバンドが検出された。これは、N結合型の糖鎖修飾阻害剤であるツニカマイシン存在下で放射標識を行うことによって、一本のバンドになることから(結果省略)、おそらく糖鎖修飾の有無によるものであると考えられる。pEF $\alpha 1\Delta\text{NC}1$ 、pEF $\alpha 1\Delta\text{NC}2$ はFig.2-4で示すように、抗ラミニン-1($\alpha 1\beta 1\gamma 1$)抗体で免疫沈降されることから、おそらくc-mycエピトープがミスフォールディングによって隠れてしまっているか、プロテアーゼによって分解されていると考えられた。また、pEF $\gamma 1\Delta\text{N}1$ 、pEF $\beta 1\Delta\text{N}5$ はそれぞれ、内在するサル・ラミニン $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 鎖のバンドが検出できた(Fig.2-3 図中矢印)。これは、マウス・ラミニン部分配列とジスルフィド結合していたサル・ラミニン鎖がc-myc抗体で共沈してきたことを示している。Fig.2-4で示すように、E8断片領域を欠失しているものを除けば、すべてのプラスミドで内在するサル・ラミニン鎖と会合したバンドが検出されたが、Fig.2-3でpEF $\gamma 1\Delta\text{N}1$ とpEF $\beta 1\Delta\text{N}5$ 以外で共沈するバンドが検出できないのは、pEF $\gamma 1\Delta\text{N}1$ とpEF $\beta 1\Delta\text{N}5$ の会合能力の高さを示している。pEF $\beta 1\Delta\text{N}5$ に比べてpEF $\gamma 1\Delta\text{N}1$ の方がシグナルが強いのは、 γ 鎖が β 鎖を攻撃するという、Fig.1-8の二本鎖コイルドコイル構造の形成機構のモデルを反映しているといえる。また、内在するサル・ラミニン($\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 鎖)がマウスEHS腫瘍由来のラミニン-1抗体で免疫沈降されることも確認された(Fig.2-3 レーン左端)。

Fig.2-4にはFig.2-3と同じ細胞溶解液を抗ラミニン-1抗体で免疫沈降して、非還元

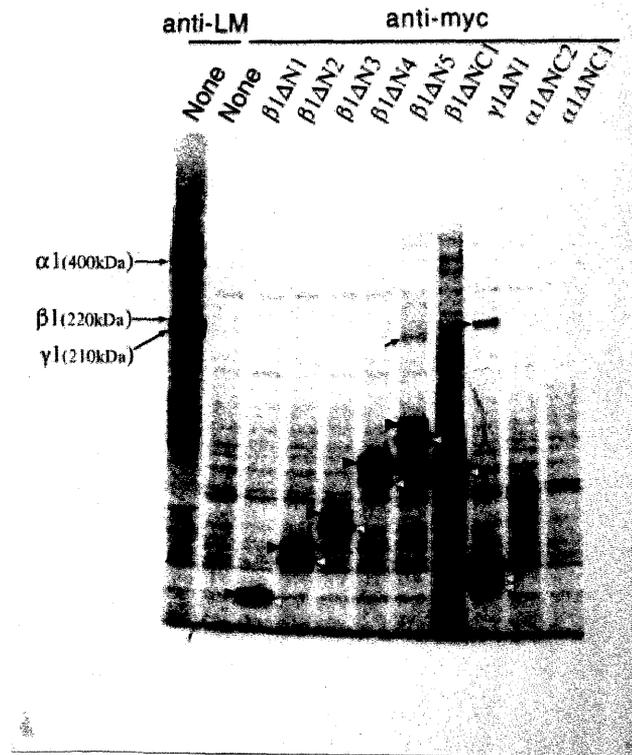


Fig. 2-3 Reducing SDS-PAGE of immunoprecipitates with anti-myc antibody from COS-1 cells expressing mouse laminin chains.

COS-1 cells transfected with indicated plasmids ("pEF" is omitted) were labeled with $[^{35}\text{S}]$ methionine/cysteine, cell lysate was immunoprecipitated with anti-myc antibody and precipitates were separated by SDS-PAGE under reducing condition. Mock transfected cells were also labeled and immunoprecipitated with anti-myc (lane under anti-myc/None) or with anti-mouse laminin-1 (lane under anti-LM/None) antibody. Arrows indicate the migration positions of endogenous monkey α 1, β 1 and γ 1 chain, respectively. Filled and open arrowheads indicate the migration positions of ectopically expressed mouse laminin chains. In this electrophoresis, lysate from pEF γ 1 Δ N2 transfected cells is not analyzed but separated electrophoresis showed comparable results as pEF γ 1 Δ N1 transfected cells in terms of the migration distance consistent with calculated molecular mass, the doublet bands and the density of specific bands.

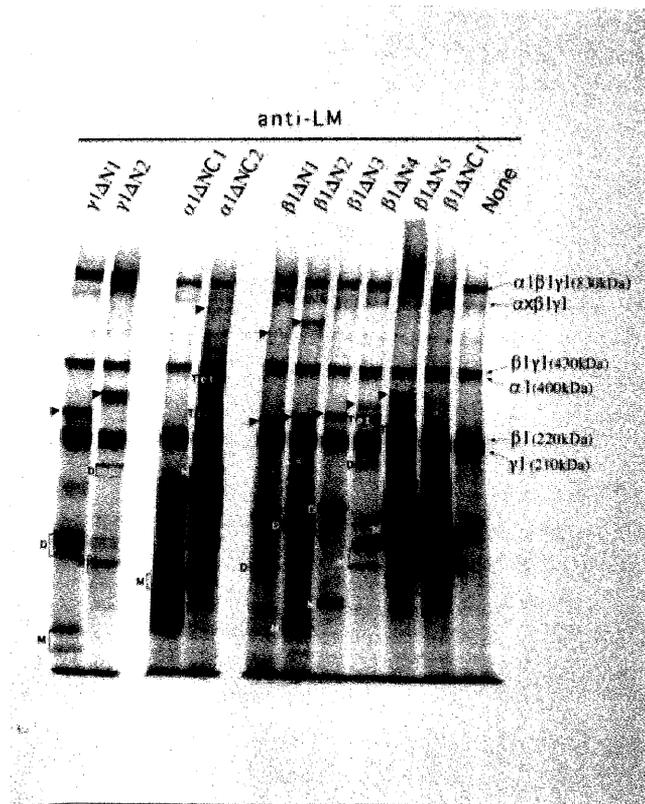


Fig. 2-4 Non-reducing SDS-PAGE of immunoprecipitates with anti-mouse laminin-1 antibody from COS-1 cells expressing mouse laminin chains. COS-1 cells transfected with indicated plasmids were labeled with $[^{35}\text{S}]$ methionine/cysteine, cell lysate was immunoprecipitated with anti-mouse laminin-1 antibody and precipitates were separated by SDS-PAGE under non-reducing condition. Mock transfected cells were also labeled and immunoprecipitated with the same antibody (None). Arrowheads indicate the migration positions of monkey-mouse hybrids. M, D, Tri and Tet indicate the migration positions of the monomer, homodimer, homotrimer and homotrimer of mouse chains, respectively. The migration distance of indicated homopolymers was consistent with calculated molecular mass. Other detail was same as in Fig. 2-3.

条件のSDS-PAGEでラミニン鎖の会合を解析した結果を示した。非還元条件では、細胞内のラミニンは $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ の三量体に加え、会合途中である $\beta 1\gamma 1$ の二量体と $\alpha 1$ の単量体、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ の単量体が存在し、電気泳動上で上からこの順番に並ぶ。しかし、COS-1細胞では $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ の三量体に加え、それよりサイズの小さい $\alpha x\beta 1\gamma 1$ で表される三量体が合成されていることが示された(Fig.2-4 レーン右端)。ウシ血管内皮細胞でラミニン-1に加えて、それよりサイズの小さいラミニン異型体が発現することは、当研究室で過去に明らかにしており(7)、COS-1細胞の場合も、これと同じ異型体であると思われる。しかし量的には少なく、 αx 鎖とマウス・ラミニン鎖との会合は観察されなかった。pEF $\gamma 1\Delta N1$ 、およびpEF $\gamma 1\Delta N2$ では対照のレーンに比べて、三カ所に特異的なバンドが検出された。推定される分子量と二次元電気泳動による解析(Fig.2-5)から、図中MとDで示したのがそれぞれ、組み換え体ラミニンの単量体、二量体であると結論した。通常はラミニン鎖のホモ二量体やホモ三量体などは形成されないので、これらは特定の鎖を過剰発現させたことによるものか、短腕領域を欠失していることによるものであるのかもしれない。一方、図中黒三角で示したバンドは、組み換え体ラミニン $\beta 1$ 鎖と内在性のサル・ラミニン $\gamma 1$ 鎖のヘテロ二量体で、二次元電気泳動による解析でも $\beta 1\Delta\gamma 1$ のヘテロ二量体が確認できた(Fig.2-5)。二次元電気泳動は一次元目に非還元条件、二次元目に還元条件で泳動を行っているので、ジスルフィド結合していない $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 鎖の単量体は対角線上に並び、ジスルフィド結合していた $\beta 1\gamma 1$ 二量体と $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ 三量体は対角線から外れて縦に並ぶ。以上の結果より、サル-マウスの種を越えたラミニン鎖会合のメカニズムが存在することが示された。しかし、 $\beta 1\Delta\gamma 1$ ヘテロ二量体に $\alpha 1$ 鎖が会合した三量体は観察されなかった。

pEF $\alpha 1\Delta NC1$ 、およびpEF $\alpha 1\Delta NC2$ は抗c-myc抗体では免疫沈降されなかったが(Fig.2-3)、抗ラミニン-1抗体では組み換え体ラミニンに特異的なバンドが複数観察された。これはドメインIIIa、IVa、およびドメインGに多数含まれるシステイン残基によって多量体を形成したものと、プロテアーゼの攻撃を受けやすいドメインGが一部含まれていることによるものかもしれない。しかし、ドメインI/IIの全体をカバーするpEF $\alpha 1\Delta NC2$ は内在する $\beta 1\gamma 1$ 二量体と会合して、 $\Delta\alpha 1\beta 1\gamma 1$ ヘテロ三量体を形成した。これは二次元電気泳動でも確認された(Fig.2-5)。

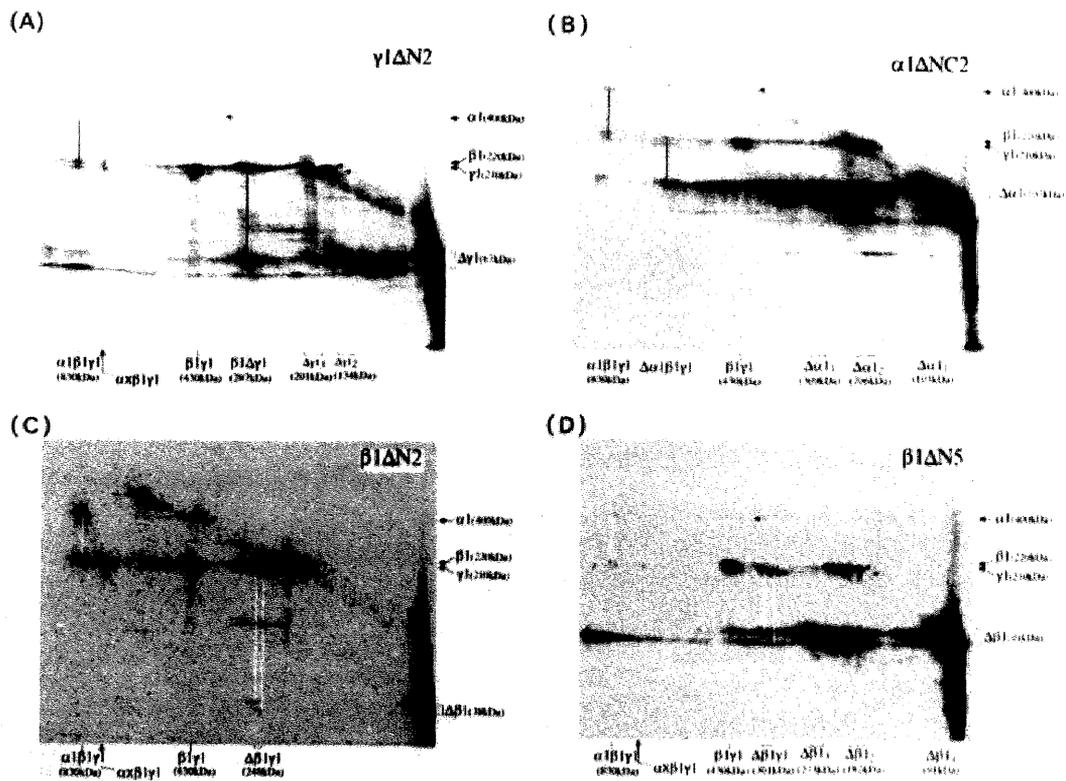


Fig. 2-5 Two-dimensional electrophoresis of immunoprecipitates with anti-mouse laminin-1 antibody from COS-1 cells expressing mouse laminin chains. COS-1 cells transfected with indicated plasmids were labeled with [³⁵S]methionine/cysteine, cell lysate was immunoprecipitated with anti-mouse laminin-1 antibody and precipitates were separated by SDS-PAGE under non-reducing condition in the first dimension (*from left to right*) followed by reducing condition in the second dimension (*from top to bottom*). Migration positions of disulfide-bonded complexes in the first dimension and monomers in the second dimension are indicated at the bottom and right margins of each panel, respectively. $\Delta\alpha1$, $\Delta\beta1$ and $\Delta\gamma1$ implies truncated mouse laminin chains. Vertical lines are drawn to connects spots which co-migrated in the first dimension due to disulfide-bonding to each other. (A); pEF $\gamma1\Delta N2$, (B); pEF $\alpha1\Delta NC2$, (C); pEF $\beta1\Delta N2$, (D); pEF $\beta1\Delta N5$

pEFβ1ΔN1からpEFβ1ΔN5までの5種もpEFγ1ΔN1らと同様に、内在するγ1鎖とヘテロ二量体を形成した(Fig.2-4,2-5)。さらに、pEFβ1ΔN1、pEFβ1ΔN2のみが、α1Δβ1γ1ヘテロ三量体を形成した。二次元電気泳動ではα1Δβ1γ1ヘテロ三量体の形成は確認できなかったが(Fig.2-5)、pEFβ1ΔN1とpEFβ1ΔN2には無く、pEFβ1ΔN3からpEFβ1ΔN5までに存在するα-ループがラミニン三量体形成に何らかの役割を果たしていることが示唆された。pEFβ1ΔNC1はE8断片領域を欠失しているため、どの鎖とも二量体を形成しなかった(Fig.2-4)。この結果は、ラミニンサブユニットの会合において、E8断片領域が必要であるという*in vitro*の結果と一致した。

考 察

タンパク質の構造や機能を *in vivo* で解析するために、目的のタンパク質のcDNAクローンを発現ベクターに組み込んで、適当な宿主細胞に発現させる手法がよく用いられる。ラミニンのサブユニット会合機構の解析においても、この手法は強力な解析手段となる。本章ではラミニンのサブユニット会合を*in vivo* で解析するために、マウス・ラミニンα1、β1、γ1鎖の欠失変異体をサルCOS-1細胞に発現させた。本実験では安定形質発現ではなく、一過性発現で遺伝子導入を行ったので、すべての細胞が変異ラミニンを発現していたわけではない。したがってFig.2-4、2-5で示したラミニン鎖の会合は、ごく一部の細胞のラミニン鎖が変異ラミニンと会合していたものである。また、サルのラミニン鎖とマウスのラミニン鎖の会合を解析したにもかかわらず、β1-Δγ1、Δβ1-γ1、Δα1-β1-γ1などの正しい組み合わせで会合が行われたことが確認された。すなわちΔα1-β1、Δα1-Δγ1などのヘテロ二量体は形成されなかった。これは、*in vivo*におけるラミニンサブユニットの会合が*in vitro*で明らかにされたのと同じ過程で行われることを示している。その一方でΔα1-Δα1、Δβ1-Δβ1などのホモ多量体が大量に形成された。通常の細胞内では、これらのホモ多量体は形成されないため、これは明らかにラミニンのプロセシングの異常によるものと思われる。

この理由として次のようなことが考えられる。1)短腕がないために、正しい会合が行われない。これはラミニン β 1鎖の全長を発現させた場合、ホモ多量体の形成がほとんど見られなくなることからいえる(結果省略)。2)特定の鎖を過剰発現させているために、パートナーを見つけられなかった変異ラミニン鎖が異常な会合をしてしまう。本実験で使用したCOS-1細胞はラミニンの発現量はさほど多くなく、いかなればラミニン発現の専門家ではないといえる。例えば、ラミニンの発現量が多いといわれるマウス胎児性癌細胞株F9で同様の実験をすれば、マウス-マウス間での会合を解析できる点からもホモ多量体の形成量は減るかもしれない。また、HSP47のようなコラーゲンに特異的な分子シャペロン(17-21)が、ラミニンサブユニットの会合にも存在すると仮定すると、ラミニン発現の専門細胞であるF9では、このような分子シャペロンが豊富に存在し、ラミニンサブユニットの会合がCOS-1細胞より潤滑に行われることも推測される。分子シャペロンとはタンパク質に結合して、正常なプロセッシングや分泌を助けるタンパク質のことで、ラミニンサブユニットの会合に分子シャペロンが関与していることは十分に考えられる。

また、*in vivo* でもE8断片領域のみでラミニン鎖の会合が起こることが明らかになった。これはE8断片領域を欠失すると全く会合が行われないことからわかる。 α 1- $\Delta\beta$ 1- γ 1ヘテロ三量体形成においては、 α -ループの関与が示唆された。 α -ループにはシステインが6個存在しており、ジスルフィド結合で折り畳まれ、コイルドコイル構造からループアウトしていると考えられるが、その機能は詳しくわかっておらず(22)、今後の解析が待たれるところである。

引用文献

1. Hunter, I., Schulthess, T., Bruch, M., Beck, K. and Engel, J. (1990) *Eur. J. Biochem.* 188, 205-211
2. Hunter, I., Schulthess, T. and Engel, J. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 6006-6011
3. Utani, A., Nomizu, M., Timpl, R., Roller, P. P. and Yamada, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19167-19175
4. Utani, A., Nomizu, M., Sugiyama, S., Miyamoto, S., Roller, P. P. and Yamada,

- Y. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 3292-3298
5. Nomizu, M., Otaka, A., Utani, A., Roller, P. P. and Yamada, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 30386-30392
 6. Nomizu, M., Utani, A., Beck, K., Otaka, A., Utani, A., Roller, P. P. and Yamada, Y. (1996) *Biochemistry* 35, 2885-2893
 7. Aratani, Y. and Kitagawa, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16163-16169
 8. Tokida, Y., Aratani, Y., Morita, A. and Kitagawa, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 18123-18129
 9. Gorman, C. (1985) in *DNA Cloning*, Vol. II, pp. 143-190, IRL Press, Oxford.
 10. Roberts, B. E. and Peterson, B. M. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 2330-2334
 11. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* 227, 680-685
 12. Ohashi, H., Maruyama, K., Liu, Y.-C. and Yoshimura, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 158-162
 13. Egan, E. S., Giddings, B. W., Brooks, M. W., Buday, L., Sizeland, A. M. and Weinberg, R. A. (1993) *Nature* 363, 45-51
 14. Miki, K., Sugimoto, E. and Kitagawa, Y. (1987) *J. Biochem.* 102, 385-392
 15. Martin, G. R., Wiley, L. M. and Damjanov, I. (1977) *Dev. Biol.* 61, 230-244
 16. Sasaki, M., Kleinman, H. K., Huber, H., Deutzmann, R. and Yamada, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16536-16544
 17. Kurkinen, M., Taylor, A., Garrels, J. I. and Hogan, B. L. M. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 5915-5922
 18. Nagata, K., Saga, S. and Yamada, K. M. (1986) *J. Cell Biol.* 103, 223-229
 19. Hirayoshi, K., Kudo, H., Takechi, H., Nakai, A., Iwamatsu, A., Yamada, K. M. and Nagata, K. (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 4036-4044
 20. Nakai, A., Satoh, S., Hirayoshi, K. and Nagata, K. (1992) *J. Cell Biol.* 117, 903-914
 21. Takechi, H., Hirayoshi, K., Nakai, A., Kudo, H., Saga, S. and Nagata, K. (1992) *Eur. J. Biochem.* 206, 323-329
 22. Engvall, E. and Wewer, U. M. (1996) *J. Cell Biochem.* 61, 493-501

第 3 章

ラミニン鎖会合における β 1鎖長腕のN-末端とC-末端の異なる役割

—ドミナントネガティブ法によるラミニン機能解析の予備実験—

序 論

高等動物の臓器や組織は、細胞の集団およびその周囲を埋めている多様な細胞外マトリックス分子の会合体から構成されている。細胞は細胞外マトリックスなくしては本来の機能を果たし得ない。成体では細胞外マトリックスが組織や器官の形態や機能を決定しており、創傷治癒、炎症などの個体の危機に際しては細胞外マトリックスが大きく変動することが知られている。また、発生過程では多様な細胞外マトリックスが動的に変化するだけでなく、これが組織特異的な細胞分化の方向を決定することが明らかになりつつある。近年、多種類の細胞外マトリックスが同定され、その分子多様性が明らかになってきて、これらの分子がどのように相互作用し合って機能しているのかが問題になってきた。細胞外マトリックスの機能を解明するための手段のひとつとして、個々の構成成分の特性を分子レベルで調べていく方法があり、これまでに多くの知見が得られてきた。しかし、非常に複雑な系である細胞外マトリックスの全容を明らかにするには、これらの蓄積されたデータをもとに、生体内における個々の成分の機能を明確にするような研究手法が必要である。そのような方法として遺伝子標的破壊法（ジーンターゲットイング）による遺伝子欠損マウスの作製が、近年、精力的に行われている。細胞外マトリックスタンパク質においても、コラーゲン(1)やフィブロネクチン(2)の機能の解明などで成果を上げている。しかし、この方法は遺伝子の破壊による影響が大きすぎて遺伝子欠損マウスが胎児の段階で死んでしまったり、同じく細胞外マトリックスタンパク質であるテネシンの例で知られるように、類似の遺伝子はその遺伝子の機能を代償してしまっていて全く異常が現れないことがある(3)。本研究の対象としているラミニンは発生過程ではダイナミックに発現が変動しているし、7種類のラミニン分子が同定されていることから、上述のどちらの可能性も考えられて、遺伝子標的破壊マウスの作製では機能解析ができない恐れがある。実際、ラミニン β 2鎖の遺伝子欠損マウスで

はラミニン β 1鎖が β 2鎖の機能を代償するとの報告がある(4)。そこで本研究では、ラミニンの三量体を形成する能力、さらにはその三量体が単位になって超分子ネットワークを形成する能力を利用したドミナント・ネガティブ法を採用する可能性を探った。ドミナント・ネガティブとは、目的遺伝子の変異体の発現による個体の形質変化を観察して、目的遺伝子の機能を推定する方法である。ここでは、ラミニン β 1鎖の遺伝子を破壊する代わりに、 β 1鎖の欠損変異体をマウス胎児性癌細胞株であるF9細胞に発現させ、これをダミーに“欠損型ラミニン三量体”を形成させることによって、細胞内の α 鎖と γ 鎖を枯渇させ、 β 鎖ファミリー間の代償機構を根こそぎ妨害するという戦略を考えた。この欠損型ラミニン三量体は、おそらくラミニン分子間のネットワーク形成にも異常をきたすと思われ、F9細胞の分化の過程で何らかの異常が現れることが期待される(Fig.3-1)。さらにこれを発展させて、分化全能性を持つマウス胚幹細胞(embryonic stem cell; ES cell)に欠損変異体を遺伝子導入した細胞株を確立し、これを受精卵に注入して誕生するキメラマウスの器官形成の異常を探ることにより、個体レベルでの機能解析を行うことも可能である。

本章ではその手始めとして、マウス β 1鎖の長腕のC末端部分と長腕領域全体を安定に発現する2種のF9細胞株を確立し、これらのラミニン鎖会合と鎖間ジスルフィド結合の形成を解析した結果を述べる。ラミニンの鎖会合に関する実験は第1章で述べたように、これまでほとんどが*in vitro*で行われてきた。第2章では*in vivo*におけるサル-マウス間の会合を解析したが、本章では*in vivo*におけるマウス・ラミニンどうしの会合を解析した。また、組み換え体ラミニンを用いたラミニンの鎖間ジスルフィド結合の解析は本実験が初めてである。

実験材料および実験方法

[1] 実験材料

G418(geneticin)はGIBCO BRL より購入した。その他の試薬は第2章と同じものおよび市販の特級のものを用いた。

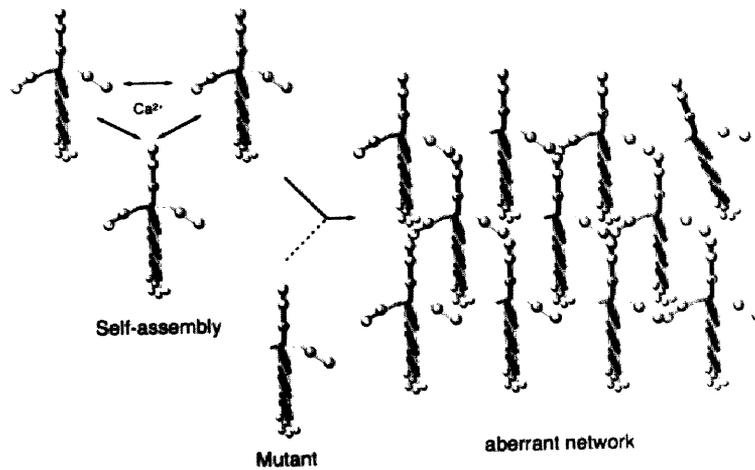


Fig. 3-1 Model for aberrant polymerization of laminin by expression of dominant negative form of $\beta 1$ chain. Hybrid heterotrimer consisting of the recombinant short arm-less $\beta 1$ subunit is expected to compete with endogenous heterotimer for laminin self-assembly.

[2] 細胞培養、および細胞への遺伝子導入

マウス胎児性癌細胞であるF9細胞は15%ウシ胎児血清(FCS)、50units/mlのペニシリン、25 μ g/mlのストレプトマイシンを含むDMEM培地中で、5%CO₂/95%気相下、37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。遺伝子導入は第2章と同様の方法で行った。F9細胞の安定形質導入株の単離は、0.25mg/mlのG418(GIBCO BRL)を含む培地中で、約3週間培養することにより行った。

[3] 放射性アミノ酸による細胞の標識、および免疫沈降

細胞の放射性アミノ酸による標識は35mm培養皿上の細胞に対して、0.3mCi/mlの[³⁵S]メチオニンを含むメチオニン不含MEM培地(Sigma)で5% CO₂/95%気相下、37℃のCO₂インキュベーター内で4時間培養することにより行った。放射性アミノ酸により標識された培地を回収した後に、細胞に1mlの免疫沈降用緩衝液Aを加え、細胞溶解液を調製した。その他の方法は第2章と同様の方法で行った。

[4] プラスミド構築

マウス・ラミニン β 1鎖のE8断片領域を発現するプラスミドpEF β 1 Δ N1、およびラミニン β 1鎖のドメインIとII、ドメインIIIの50%を発現するプラスミドpEF β 1 Δ N5は第2章で使用したのと同じものを用いたが、本章ではそのサイズから、それぞれpEF Δ β 1S、pEF Δ β 1Lと呼ぶことにした。これらのプラスミドはベクター上にネオマイシン耐性遺伝子をコードしているので、G418を含む培地で培養することにより、安定形質導入株を単離することができる(Fig.2-2)。

結 果

ドミナントネガティブ法によるラミニンの機能解析

マウス由来胎児性癌細胞F9は、Bernsteinらによって129系統マウスの奇形癌種(teratocarcinoma)から株化された細胞(5)で、レチノイン酸処理により始原内胚葉様細胞に分化し(6)、これにdibutyryl cAMP を添加すると壁側内胚葉(parietal endoderm) 様細

胞に分化する(7)。また、始原内胚葉(primitive endoderm)様F9細胞を懸濁培養すると胚様体(embryoid body)を形成して、その表面の上皮細胞層は内臓内胚葉(visceral endoderm)様細胞に分化する(8)。未分化な幹(stem)細胞から、始原内胚葉様細胞への分化に伴って、ラミニンなどの基底膜成分の合成・分泌が上昇し、壁側内胚葉様細胞への分化でさらに旺盛になる。F9細胞の分化に伴う基底膜成分の分泌は、マウス初期胚における各種内胚葉の上皮構造への組織化を反映しており、基底膜の機能を解明するのに有用である。

本研究ではまず、変異ラミニン鎖を安定に発現するF9細胞のクローンを確立し、そのクローンの性質を調べることにより、ドミナントネガティブ法が可能であるかどうかを調べた。Fig.3-2には本章で用いたマウス・ラミニン β 1鎖のE8断片領域を発現するプラスミドpEF $\Delta\beta$ 1Sおよびラミニン β 1鎖のドメインIとII、ドメインIIIの50%を発現するプラスミドpEF $\Delta\beta$ 1Lの模式図を示した。この二つのプラスミドは第2章で用いたプラスミドを改名したもので、pEF $\Delta\beta$ 1Sはラミニンサブユニットの会合に必要な最小限の領域(E8)を含むこと、pEF $\Delta\beta$ 1Lは欠損型 β 1鎖の中で一番長い領域を含むことから採用した。これらをF9幹細胞に遺伝子導入し、G418で選択することにより安定形質導入株を得た。 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで放射標識した細胞溶解液と培養上清を抗ラミニン-1抗体で免疫沈降して、非還元条件のSDS-PAGE、および二次元電気泳動によってラミニンサブユニットの会合を解析した(Fig.3-3,3-4)。pEF $\Delta\beta$ 1S、pEF $\Delta\beta$ 1Lはともに内在する γ 1鎖と会合して、 $\Delta\beta$ 1- γ 1ヘテロ二量体を形成した。さらに、pEF $\Delta\beta$ 1Lでは α 1鎖が付加して α 1- $\Delta\beta$ 1- γ 1ヘテロ三量体を形成し、この欠損型ラミニンは細胞外にも分泌されていた(Fig.3-3B)。シグナルの強度から、細胞内の内在性ラミニン三量体と欠損型ラミニンの量比は約1:1、細胞外に分泌されている量比は約1:2であると推測された。一方、pEF $\Delta\beta$ 1Sでは変異ラミニン鎖発現によって、明らかに通常のラミニン三量体の形成量が対照のレーンに比べて減少していた(Fig.3-3)。しかし、これらの欠損型ラミニンが細胞に及ぼす影響は、通常の培養条件下での顕微鏡による形態観察では検出されなかった(結果省略)。したがって、この条件でのドミナントネガティブ法によるラミニンの機能解析は困難であると考えられた。

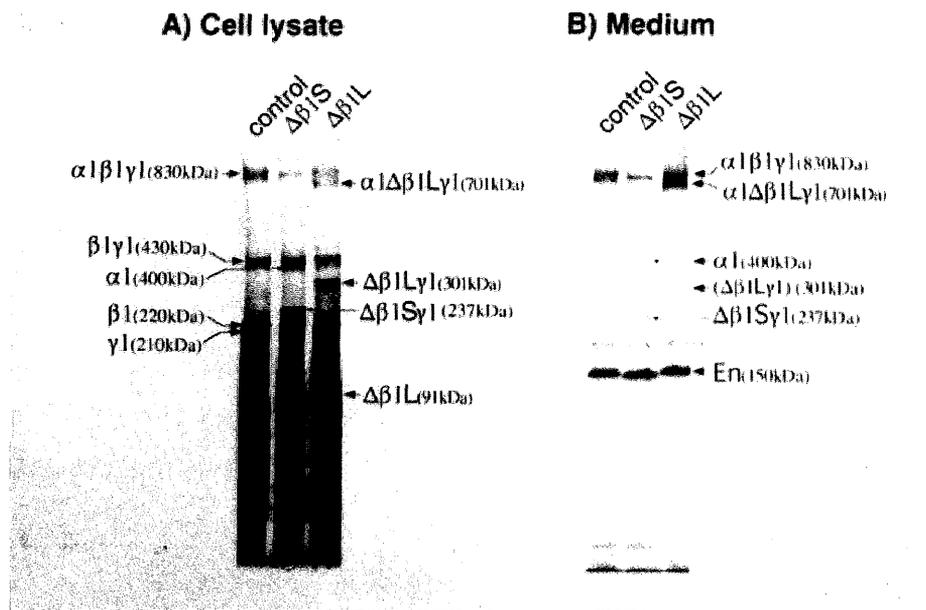


Fig. 3-3 Non-reducing SDS-PAGE of immunoprecipitates with anti-mouse laminin-1 antibody from F9 cells expressing partial mouse laminin $\beta 1$ chain. F9 cells expressing none (control), $\Delta\beta 1S$ or $\Delta\beta 1L$ were labeled with $[^{35}S]$ methionine/cysteine, the cell lysate (A) and medium (B) were immunoprecipitated with anti-mouse laminin-1 antiserum. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE under non-reducing condition. Identification of laminin bands is indicated by arrows together with their calculated molecular mass in parentheses. "En" indicates entactin/nidogen (150 kDa) which has strong affinity to the short arm of $\gamma 1$ in $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ trimer. The band indicated by open arrowhead is an unidentified protein immunoprecipitated even from the control cells.

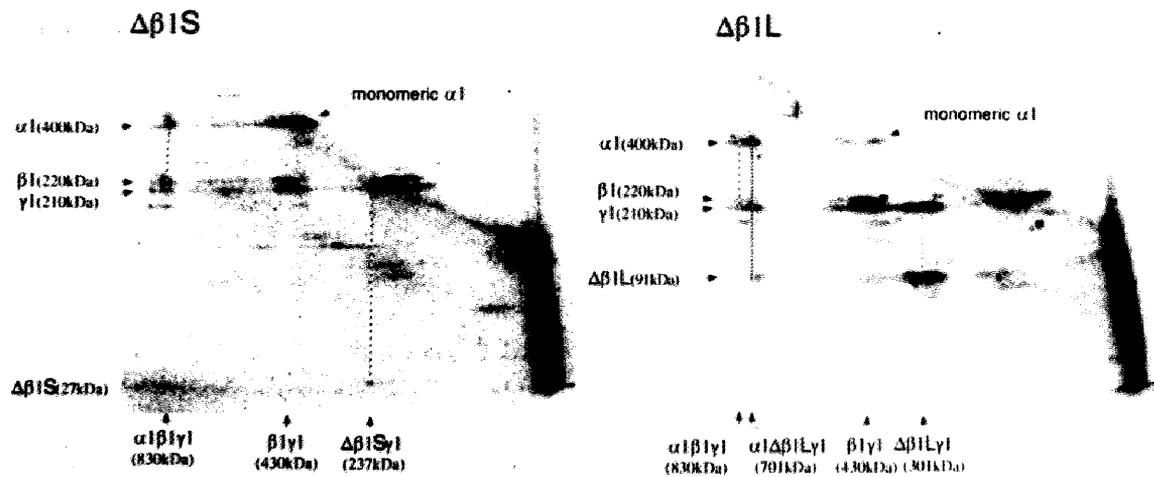


Fig. 3-4 Two-dimensional electrophoresis of immunoprecipitates with anti-mouse laminin-1 antibody from F9 cells expressing partial mouse laminin $\beta 1$ chain.

Immunoprecipitates from cell lysate prepared as in Fig. 3-3 were separated by SDS-PAGE under non-reducing condition in the first dimension (from left to right) followed by reducing condition in the second dimension (from top to bottom). Migration positions of disulfide-bonded complexes in the first dimension and monomers in the second dimension are indicated at the bottom and left margins of each panel together with their calculated molecular mass in parentheses, respectively. Vertical dotted lines are to show proteins which are assumed to be disulfide-bonded to each other. *Left panel; pEF $\beta\Delta 1S$, Right panel; pEF $\Delta\beta 1L$*

ラミニン鎖会合における $\beta 1$ 鎖長腕のN-末端とC-末端の異なる役割

上述の2種のクローンを比較することにより、ラミニンサブユニットの会合における新たな知見が得られた。ラミニンサブユニットは長腕のC末端で1カ所 $\beta 1$ 鎖と $\gamma 1$ 鎖が、長腕のN末端で3カ所 $\alpha 1$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ 鎖がそれぞれジスルフィド結合で安定化されている(Fig.1-3)。このジスルフィド結合に寄与するシステインをすべて含んでいるpEF $\Delta\beta 1L$ では、明確な欠損型ラミニン三量体のバンドが観察され(Fig.3-3)、二次元電気泳動でも確認された(Fig.3-4)。これは $\beta 1$ 鎖の短腕領域を欠失していても、ラミニン鎖会合が完成し、細胞外に分泌される経路に乗ることができることを示している。一方、長腕のN末端側のシステインが無いpEF $\Delta\beta 1S$ では、ヘテロ二量体のバンドは確認できたが、欠損型ラミニン三量体のバンドは観察されなかった(Fig.3-3A,3-4)。しかし、1)内在性のラミニン三量体の形成量が対照のレーンに比べて減少していること、2)単量体の $\alpha 1$ 鎖の量が対照のレーンに比べて増加していること(Fig.3-4で顕著)、3)培養上清に単量体の $\alpha 1$ 鎖と $\Delta\beta 1S$ - $\gamma 1$ ヘテロ二量体が分泌されていることから、pEF $\Delta\beta 1S$ でも欠損型ラミニン三量体を形成していると考えられた。ラミニンは三量体を形成してはじめて細胞外に分泌され、単量体や二量体では分泌されない(9)。したがって、pEF $\Delta\beta 1S$ では $\alpha 1$ 鎖と $\Delta\beta 1S$ - $\gamma 1$ ヘテロ二量体がヘテロ三量体を形成して細胞外に分泌されているが、 $\beta 1$ 鎖長腕のN末端側のシステインが存在しないので、 $\alpha 1$ - $\gamma 1$ 鎖間で正しいジスルフィド結合ができずに、SDS-PAGEを行うと $\alpha 1$ 鎖と $\Delta\beta 1S$ - $\gamma 1$ 二量体に解離してしまうと考えられる。この結果は、 $\alpha 1$ - $\gamma 1$ 鎖間のジスルフィド結合に、 $\beta 1$ 鎖のN末端領域が寄与するコイルドコイル構造と $\alpha 1$ - $\beta 1$ 、 $\beta 1$ - $\gamma 1$ 鎖間ジスルフィド結合も重要な役割を果たしていることを示している。

考 察

本章では細胞外マトリックスがダイナミックに変化している発生や細胞分化の過

程に注目し、その過程において細胞外マトリックスをコードする遺伝子を変異させることによって、その影響を観察し、細胞外マトリックスの機能を同定しようとした。まず、ラミニン β 1鎖の欠損変異体を安定に発現するF9細胞を単離し、その表現型を解析した。 β 1鎖の短腕領域には、細胞接着や細胞伸展活性をもつ領域が多数同定されている(10-14)。また、短腕の最もN末端側のドメインVIはラミニン分子間の会合に必要なドメインであると考えられており(15-17)、 β 1鎖の短腕を欠失したラミニン三量体では、ラミニン・ネットワークの形成に異常が現れることが予想された。しかし、欠損型ラミニン三量体が細胞外に分泌されているにもかかわらず、顕微鏡観察では細胞の形態異常は見られなかった。この原因には次のようなことが考えられた。1)欠損型ラミニンの発現量が少なかった。これは欠損型ラミニンの高発現クローンを単離したり、内在性ラミニンの発現量が少ない細胞株を採用するなどの解決策が考えられる。2)異常はあったが検出できなかった。これは顕微鏡観察で形態的に異常はなかったが、例えば細胞の接着能や伸展能を調べれば異常が観察されるかもしれない。また、電子顕微鏡で微細構造を調べる方法もある。一方、この系ではドミナントネガティブ効果は検出されないのかもしれない。 β 1鎖の短腕領域に同定されているいくつかの機能領域は、他の鎖でも同定されている。また、短腕領域を欠失したラミニン複合体(ラミニン-5の α 3、 β 3、 γ 2鎖、ラミニン-6、およびラミニン-7の α 3鎖)が存在することからも、ラミニン・ネットワーク形成はそれほど厳格ではなく、すべての鎖が規則正しく配置されなくても行われるのかもしれない。逆に、細胞外に分泌された欠損型ラミニン三量体は、ラミニン・ネットワーク形成に全く参加せずに分解され、正常なラミニン三量体だけで機能するネットワークが形成されてしまったのかもしれない。時間的制約で以上の問題は解決できてはいないが、個体レベルでの機能解析を見据えた本実験は意義深く、今後さらなる改良が望まれる。

その一方で、ラミニン三量体形成において、ラミニン β 1鎖長腕のN末端とC末端で異なる役割をもつことが示された。ラミニンサブユニット会合の解析は、ほとんどE8断片領域を含む長腕のC末端領域で行われており、組み換え体タンパク質や合成ペプチドを用いた実験では β 1- γ 1二量体形成、 α 2- β 1- γ 1三量体形成に必要な10~20アミノ酸がそれぞれ同定されている(18,19)。また、長腕のC末端側のシステインによる

$\beta 1$ - $\gamma 1$ 鎖間のジスルフィド結合がコイルドコイル構造の安定化に寄与しているとの報告もある(20)。一方、N末端領域はC末端側から始まるコイルドコイル構造形成に寄与するものの、会合の駆動力にはなっていないことがわかっていた。本研究では、短腕のみならず長腕のN末端側を欠失している $\beta 1$ 鎖が $\gamma 1$ 鎖、 $\alpha 1$ 鎖と会合して三量体を形成し、細胞外にも分泌されていることが示された。これはラミニンが単量体、二量体では細胞外に分泌されないということを考え合わせると、長腕のC末端側のコイルドコイル構造形成が、細胞外分泌のシグナルとなっていることを示唆している。しかし、この欠損型ラミニン三量体が $\alpha 1$ - $\beta 1$ 、 $\beta 1$ - $\gamma 1$ 鎖間だけでなく $\alpha 1$ - $\gamma 1$ 鎖間もジスルフィド結合されていないことも明らかになった。これは、長腕のN末端側で三本の鎖がコイルドコイル構造を形成してはじめて、 $\alpha 1$ - $\beta 1$ 、 $\beta 1$ - $\gamma 1$ 、 $\gamma 1$ - $\alpha 1$ 鎖間のジスルフィド結合形成が可能となることを意味する。このように、本研究はラミニンサブユニットの会合における長腕領域のC末端側とN末端側の役割をはじめて示した。さらに、*in vivo*でのラミニンサブユニットの会合の解析が可能であることを示した点で重要であると思われる。

引用文献

1. Andrikopoulos, K., Liu, X., Keene, D. R., Jaenish, R. and Ramirez, F. (1995) *Nature Genet.* 9, 31-36
2. George, E. L., Georges-Labouesse, E. N., Patel-King, R. S., Rayburn, H. and O'Hynes, R. (1993) *Development* 119, 1079-1091
3. Saga, Y., Yagi, T., Ikawa, Yoji., Sakakura, T. and Aizawa, S. (1992) *Genes & Dev.* 6, 1821-1831
4. Noakes, P. G., Miner, J. H., Gautam, M., Cunningham, J. M., Sanes, J. R. and Merlie, J. P. (1995) *Nature Genet.* 10, 400-406
5. Bernstein, E. G., Hooper, M. L., Grandchap, S. and Ephrussi, B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3899-3903
6. Strickland, S. and Mahdavi, V. (1978) *Cell* 15, 393-403
7. Strickland, S., Smith, K. K. and Marotti, K. R. (1980) *Cell* 21, 347-355

8. Hogan, B. L. M., Taylor, A. and Adamson, E. (1981) *Nature* 291, 235-237
9. Morita, A., Sugimoto, E. and Kitagawa, Y. (1985) *Biochem. J.* 229, 259-264
10. Graf, J., Iwamoto, Y., Sasaki, M., Martin, G. R., Kleinman, H. K., Robey, F. A. and Yamada, Y. (1987) *Cell* 48, 989-996
11. Charonis, A. S., Skubitz, A. P., Kolialos, G. G., Reger, L. A., Dege, J., Vogel, A. M., Wohlhueter, R. and Furcht, L. T. (1988) *J. Cell Biol.* 107, 1253-1260
12. Iwamoto, Y., Robey, F. A., Graf, J., Sasaki, M., Kleinman, H. K., Yamada, Y. and Martin, G. R. (1987) *Science* 238, 1132-1134
13. Kleinman, H. K., Graf, J., Iwamoto, Y., Sasaki, M., Schasteen, C. S., Yamada, Y., Martin, G. R. and Robey, F. A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 272, 39-45
14. Skubitz, A. P. M., McCarthy, J. B., Zhao, Q., Yi, X.-Y. and Furcht, L. T. (1990) *Cancer Res.* 50, 7612-7622
15. Yurchenco, P. D. and Cheng, Y.-S. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 17286-17299
16. Schittny, J. C. and Schittny, C. M. (1993) *Eur. J. Biochem.* 216, 437-441
17. Yurchenco, P. D. and O'Rear, J. J. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 674-681
18. Utani, A., Nomizu, M., Timpl, R., Roller, P. P. and Yamada, Y. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19167-19175.
19. Utani, A., Nomizu, M., Sugiyama, S., Miyamoto, S., Roller, P. P. and Yamada, Y. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 3292-3298.
20. Antonsson, P., Kammerer, R. A., Schulthess, T., Hanisch, G. and Engel, J. (1995) *J. Mol. Biol.* 250, 74-79

第 4 章

マウス3T3-L1細胞におけるラミニン α 4鎖の発現および ラミニン-8(α 4 β 1 γ 1)の同定

序 論

1970年代末の発見以来、ラミニンの分子レベルの研究はEngelbreth-Holm-Swarm (EHS)腫瘍、あるいは遠位内胚葉様F9細胞などの基底膜合成能が旺盛な培養細胞を用いて集中的に行われてきたため、これらの成分であるラミニン-1が“典型的”ラミニンであるかのような印象を与えてきた。しかし、ラミニンの分子多様性は発見の当初から示唆されていた(1,2)。例えば、ノーザン解析では各鎖(α 1、 β 1、 γ 1)のmRNAの発現量が組織ごとに異なっており、これは組織ごとに異なる組成のラミニン複合体が形成されていることを示唆する(3)。この多様性は胚発生過程でも見られ、マウスの受精卵は2~4細胞期では β 1、 γ 1鎖しか発現せず、 α 1鎖は基底膜が形成される16細胞期になって初めて発現する(4)。これは β 1と γ 1鎖が単量体あるいは二量体で機能する可能性も残しているが、胚発生初期では α 1鎖とは異なる α 鎖が β 1および γ 1鎖と複合体を形成して機能する可能性を示唆している。その後、ヒト胎盤から α 2 β 1 γ 1の組み合わせを持つラミニン-2 (5) が、神経筋接合部より α 1 β 2 γ 1の組み合わせを持つラミニン-3 (6) が、上皮細胞から α 3 β 3 γ 2の組み合わせを持つラミニン-5 (7)が発見されるなど、各鎖の異型体が続々と発見され、現在では α 鎖が5種類(α 1~ α 5)、 β 鎖が3種類(β 1~ β 3)、 γ 鎖が2種類(γ 1~ γ 2)の計10種類が同定されている(8)。さらに、これらが選択的に会合したラミニン複合体7種類(ラミニン-1~ラミニン-7)の存在が確認されているほかに、ラミニン-8からラミニン-11までの存在が示唆されているに至っている(Table 4-1) (9)。

当研究室においても、いち早く間充織に基底膜のものとは異なる α 鎖が合成され、異なるラミニン複合体が存在することが1988年の時点で明らかにされていた(10)。マ

Table 4-1 New nomenclature for established heterotrimeric assembly forms of laminins.

New	Chain composition	Previous
laminin-1	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	EHS (classical) laminin
laminin-2	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	merosin
laminin-3	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	S-laminin
laminin-4	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	S-merosin
laminin-5	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	kalinin/nicein/ epiligrin
laminin-6	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$	K-laminin
laminin-7	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$	KS-laminin
<i>laminin-8</i>	<i>$\alpha 4\beta 1\gamma 1$</i>	
<i>laminin-9</i>	<i>$\alpha 4\beta 2\gamma 1$</i>	
<i>laminin-10</i>	<i>$\alpha 5\beta 1\gamma 1$</i>	
<i>laminin-11</i>	<i>$\alpha 5\beta 2\gamma 1$</i>	

Laminins in italics are anticipated but await confirmation as proteins.

ウス繊維芽細胞株である3T3-L1細胞は、培養下で高頻度に脂肪細胞に分化するが、これに伴ってIV型コラーゲン、ナイドジェン/エンタクチンやラミニンなどの基底膜成分の合成も増加する。この細胞におけるラミニンの発現をラミニン-1の抗体で調べたところ、基底膜のものよりサイズの小さい α 鎖が検出され、これが β 1および γ 1鎖と複合体を形成していることが示唆された。しかし、この α 鎖異型体のcDNAの単離・同定には至っていなかった。本章では、3T3-L1細胞が合成するラミニン α 鎖異型体のcDNAを単離しこれが α 4をコードすることを解明した結果を述べる。

実験材料および実験方法

[1] 実験材料

マウス・ラミニン α 4鎖のドメインG4のLDESFNIGLKFEIAとHGHSVNGEYLのペプチドを認識するポリクローナル抗体は、委託合成したペプチドを家兎に免疫して調製した。逆転写酵素(SuperScript II RNase H⁻ reverse transcriptase)はGIBCO BRLから、EX Taq DNA ポリメラーゼとランダムプライマーはTakaraから、シーケンスキット(Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit)、Hybond N+ ナイロンメンブラン、³²P-dCTPおよびAmershamから購入した。その他の試薬は第2章と同じもの、および市販の特級のものを用いた。

[2] 細胞培養

マウス繊維芽細胞である3T3-L1細胞は10%ウシ胎児血清(FCS)、50units/mlのペニシリン、25 μ g/mlのストレプトマイシンを含むDMEM培地中で、5%CO₂/95%気相下、37℃のCO₂インキュベーター内で培養した。

[3] RNAの単離

全RNAはacid guanidinium thiocyanate-phenol-chloform(AGPC)法(11)によって単離した。すなわち150 mmの培養皿1枚の3T3-L1細胞に対し、3mlのsolution D(4M グアニジンチ

オシアネート、25mM クエン酸ナトリウム、0.5% サルコシル(N-ラウリルサルコシンナトリウム塩)、0.1M 2-メルカプトエタノール)を加え、ポリトロンホモゲナイザーでホモゲナイズした。これに0.3mlの2M 酢酸ナトリウム(pH4.0)、3mlの水飽和フェノール、0.6mlのクロロホルム-イソアミルアルコール(49:1)を順次加え、10秒間激しく攪拌した後、4℃で20分間、10,000gで遠心した。水相を別の遠心管に移し、等量のイソプロパノールを加え、-20℃で1時間放置した。その後、4℃で20分間、10,000gで遠心し、上清を捨て、RNAの沈殿に600mlのsolution Dを加えて溶解し、等量のイソプロパノールを加えて-20℃で1時間放置した。その後、4℃で20分間、10,000gで遠心し、上清を捨て、RNAの沈殿を水で溶解して、吸光度を測定した。

[4] RT-PCR解析

逆転写反応は以下のように行った。まず、2μgの全RNAを70℃で10分間加熱し、氷上で急冷した。この溶液に4μlの5 x first strand 緩衝液、1μlの25mM dNTP mix、2μlの0.1M DTT、100ngのランダムプライマー(Takara)を加え、42℃で2分間インキュベートした。200unitsのSuperScript II RNase H⁻ reverse transcriptase(GIBCO BRL)を加え、42℃で60分間インキュベートした。PCR反応は0.1μlのRT産物を鋳型として、EX Taq DNAポリメラーゼ(Takara)を用い、94℃, 30s、60℃, 1min、72℃, 1minで30サイクル行った。PCR産物は1.0%のアガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色した。マウス・ラミニンα1鎖(12)の増幅には5'-GCGCGTAAAGATTTCCAGCC-3'と

5'-GTCTCTGTCCAAAGCTCCTG-3'をプライマーに用いた。これは塩基配列 5113-5736の領域で、626-bpの断片が増幅される。α2鎖(13)の増幅には

5'-GGGTCGGATCAATCATGCTG-3'と 5'-CGTGGAACATAAGCTTCTCG-3'(塩基 8457-9043; 589-bp)を、α3鎖(14)の増幅には5'-AAAGGTGCACCTGGTGGTGG-3'と

5'-TTCGGTGGGAAGGAAAGCTG-3' (塩基 6944-7528; 587-bp)を、α4鎖の増幅には

5'-CATGGGATCCTATTGGCCTG-3'と 5'-CACATAGCCGCCTTCTGTGG-3'(塩基 197-858; 664-bp)を、α5鎖(15)の増幅には5'-ACGGCTCAGAAGGTTTCCCG-3'と

5'-CTTCAGCGGGTATGACTTCC-3'(塩基 9673-10221; 551-bp)をプライマーに用いた。

マウス・ラミニンβ1鎖(16)の増幅には

5'-GCTGGATCCGCTTGCAGCAGAGTGCAGCTGA-3'と

5'-CGCGAATTCGCTAAGCAGGTGCTGTAAACCG-3' (塩基 4858-5535; 702-bp)を、 β 2鎖(17)の増幅には5'-CTGCAGCGGGTATGACTTCC-3'と

5'-GGCTTGTGCAGCCAGAACAC-3'(塩基 4475-5022; 550-bp)を、 β 3鎖(18)の増幅には5'-CAGGTAGATGATGTGGTCGG-3'と

5'-ACTGCGGATCTGCTCCACAC-3'(塩基 3079-3621; 545-bp)をプライマーに用いた。

マウス・ラミニン γ 1鎖(19)の増幅には

5'-GCGGGATCCCCAATGACATTCTCAACAAC-3'と

5'-GCAGATATCGGGCTTCTCGATAGACGGGG-3'(塩基 4331-5067; 760-bp)を、 γ 2鎖(20)の増幅には5'-TATTAGCCAGAAGGTTGCGG-3'と

5'-TAGTCTCCAGCAGATGGAGG-3'(塩基 2973-3520; 549-bp)をプライマーに用いた。

[5] cDNAクローンの単離

マウス・ラミニン α 4鎖cDNAの単離は、すでに単離されているヒト・ラミニン α 4鎖のcDNA配列(21,22)をもとに設計した縮重オリゴヌクレオチド、

5'-TATGCTAATTT(C/T)AC(A/T)GG(A/C)TG-3' と

5'-CTGTGCCATCT(G/C)CC(A/G)TC(A/G)CA-3'をプライマーとして、RT-PCR法により行った。すなわち3T3-L1細胞の全RNAのRT産物に対してEX Taq DNAポリメラーゼを用い、94℃, 30s、45℃, 1min、72℃, 2minで5サイクル、94℃, 30s、50℃, min、72℃, 2minで25サイクル行った。増幅産物はクローニングベクターBluescript II (Stratagene)にサブクローニングし、Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、モデル4000 DNAシーケンサー (LI-COR)にて塩基配列を決定した。

[6] ノーザン解析

マウス3T3-L1細胞より単離した全RNA10 μ gを、ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで電気泳動し、Hybond N+ ナイロンメンブラン(Amersham)に20 x SSCを用いて、3時間キャピラリー法によってプロットした。ハイブリダイゼーションに用いたプローブは、ラミニン α 4鎖遺伝子は本実験で単離した1062-bpの断片を、 β 1鎖遺伝子(16)はドメインIII/IV(塩基 1698-3496)の1799-bpの断片を、 γ 1鎖遺伝子(19)はドメイン

I/II(塩基3328-5067)の1740-bpの断片を、ヒトGAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)遺伝子(23)はIafmid BAベクター(24)のNotI-HindIIIで消化した920-bpの断片(塩基1911-2830)をMultiprime DNA labelling system (Amersham) で³²P-dCTP(Amersham)を用いて放射標識した。ハイブリダイゼーションは50%ホルムアミドを含む5 x SSPE、5xデンハート溶液、0.5% SDS と熱変性処理した0.1mg/mlサケ精子DNAを組成とする溶液中でプレハイブリダイゼーションを42℃で1時間行った後、プローブを100ng加えて、さらに16時間ハイブリダイゼーションを行った。0.1% SDSを含む2 x SSCで10分間、室温で2回、さらに0.1% SDSを含む0.1 x SSCで30分間、50℃で2回メンブランを洗浄した後、イメージングプレートに露光し、BAS2000 イメージアナライザー(Fuji Film)で解析した。

[7] 細胞の放射標識、および免疫沈降

細胞の放射標識は、第3章と同様の方法で行った。細胞溶解液は、細胞にNP-40 lysis緩衝液を加えて調製した。3.0 x 10⁷cpmに相当する細胞溶解液に抗マウス・ラミニン α 4鎖抗血清を10 μ l添加して免疫沈降を行った。SDS-PAGEは濃縮用ゲルに3%のポリアクリルアミドを、分離用ゲルに4%のポリアクリルアミドを含むゲルを用いた。その他の方法は、第2章と同様の方法で行った。

結 果

マウス・ラミニン α 4鎖cDNA断片のクローニング

マウス胎児性癌細胞F9と3T3-L1細胞を[³⁵S]メチオニンで放射標識し、ラミニン-1(α 1 β 1 γ 1)の抗体で免疫沈降を行い、非還元 SDS-PAGEで比較すると、3T3-L1細胞ではF9細胞よりもサイズの小さい三量体が、またサイズの小さい α 鎖と思われるバンドが観察される(Fig.4-2) (10)。この α 鎖異型体を同定するために、ヒト・ラミニン α 1~ α 4鎖のドメインGに共通して存在するアミノ酸配列(22)をもとに設計した縮重オリゴヌクレオチドプライマー(degenerate primer) を用い、3T3-L1細胞の全RNAからRT-

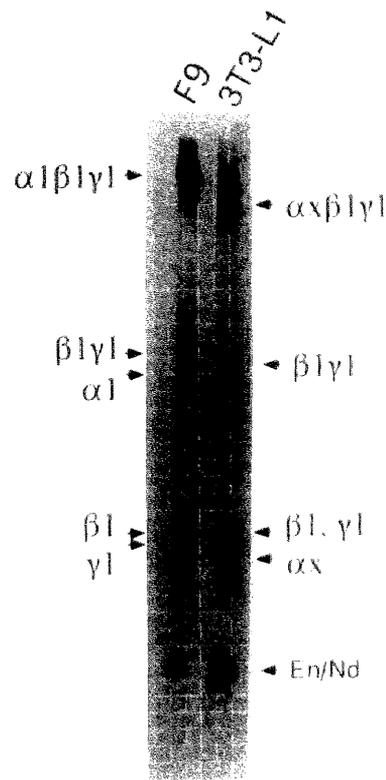


Fig. 4-2 Mobility of large laminin complex in 3T3-L1 cells compared to laminin complex of F9 cells on SDS-PAGE under nonreducing conditions. Radiolabeled cell lysates from 3T3-L1 cells or from F9 stem cells were immunoprecipitated with anti-mouse laminin-1 antiserum and separated on SDS-PAGE under nonreducing conditions. En/Nd indicates entactin/nidogen.

PCRを行った。増幅された約1.1kbの断片をクローン化し、塩基配列を決定した結果、ヒト・ラミニン α 4鎖遺伝子のドメインG3からG5の約1.1kbの領域と塩基配列で約84%、推定アミノ酸配列で約86%の相同性があり、このクローンがマウスのラミニン α 4鎖断片をコードすると結論した(Fig.4-3)。ラミニン α 4鎖はヒトでは単離されているが、マウスでは単離されておらず、本研究ではじめてマウス α 4鎖遺伝子断片を単離したことになる。

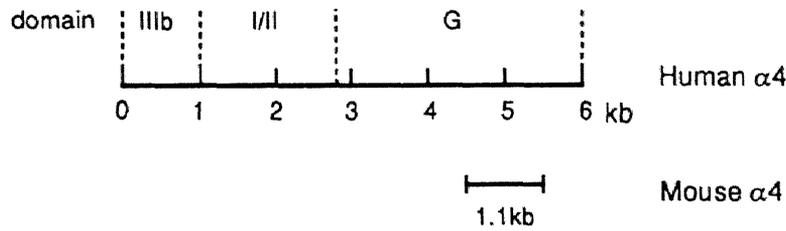
マウス3T3-L1細胞におけるラミニン鎖mRNAの発現

RT-PCR法によりマウス α 4鎖遺伝子断片が単離されたことによって、3T3-L1細胞が α 4鎖mRNAを発現していることが確認された。しかし、RT-PCR法は非常に高感度で、微量産物も検出してしまうことから、3T3-L1細胞が α 4鎖とは別に、複数の α 鎖を発現している可能性も否定できない。そこで、 β 鎖と γ 鎖も含めて現在マウスで単離されているすべてのラミニン鎖のmRNAの発現を、同じくRT-PCR法によって調べた(Fig.4-4)。PCRを30サイクル行った結果、増幅されたのは α 4、 β 1と γ 1鎖のみであった。RT-PCR法は定量的ではないので、次に α 4、 β 1と γ 1の三つの鎖について、ノーザンハイブリダイゼーションによりmRNAの発現量を定量的に解析した(Fig.4-5)。その結果、 α 4、 β 1と γ 1鎖のシグナルの強度は同程度で、mRNAの発現量もほぼ等しいことが示された。以上の結果より、マウス3T3-L1細胞は α 4、 β 1、 γ 1鎖のみを発現しており、この組み合わせで三量体を形成することが示唆された。

免疫沈降による α 4鎖会合の解析

ヒトでのみ単離されているラミニン α 4鎖は、どの β 鎖および γ 鎖と会合するのかは未解明である。3T3-L1細胞において、mRNAレベルで α 4、 β 1と γ 1鎖が会合していることが予想されたが、タンパク質レベルでこれを確認する必要がある。そこで、Fig.4-3で示した2カ所のマウス α 4鎖の10~14個のペプチドに対するポリクローナル抗体(α 4-1、 α 4-2)を調製し、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで放射標識した3T3-L1細胞の細胞溶解液に

(A)



(B)

```
1 ATAAGCAATGCCTACTTTACCAGGTGGATAGAGATGTGGAAGTCGAAGATT CAGGCCCTATTCTGAAAAAGTCCACACTTCACTCTAT
1 I S N A Y F T R L D R D V E V E D S G R Y S E K V H T S L Y
1364 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - F Q - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

91 GAGTGTCCGATGAGTCGTCACCTCTGTTTCTCCTTCACAAAAAGGAAAGAATTCTCAAAGCCTAAAACAAACAACAGGGAGAGAAG
31 E C P I E S S P L F L L H K K G K N S S K P K T N K O G E K
1394 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - L - - - - - ASQ - - - - - K - - - - - G -

181 AGTAAGGATGCGCCTTCATGGGATCCTATTGGCCTGAAGTTTCTGGAACAGAAAGCTCCAAGAGATTCCCCTGCCACCTCTCCAGCAGC
61 S K D A P S W D P I G L K P L E Q K A P R D S H C H L S S S
1426 - - - - - - - - - - - - - - - - V A - - - - L P - - R N T - - - - - - - - - - - - - - - - N -

271 CCCAGGGCAATAGAACATGCCTATCAATATGGCGGCACGGCCAACAGTCGCCAGGAGTTTGAACACGAACAAGGAGATTTTGGTGAAAAA
91 P R A I E H A Y Q Y G G T A N S R Q E F E H E Q G D F G E K
1456 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - L K - - - - - A -

361 TCCAGTTTGGCATTCTGCTGAAGACCCGTTCCCTCACATGGGATGATTTTCTATGTCTCAGACCAAGAAGAGAATGATTTTCATGACCTG
121 S Q F A I R L K T R S S H G M I F Y V S D Q E E N D F M T L
1486 - - - - - S - - - - - R - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

451 TTCTGGCCCATGGTCGCTTGGTCTTTATGTTAATGTGGCCATAAGAACTGAAGATTAGAAGCCAGGAGAAAATACAATGATGGATTG
151 P L A H G R L V P M F N V G H K K L K I R S Q E K Y N D G L
1516 - - - - - - - - - - - - - - - - Y - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

541 TGCCATGATGTGATATTTATTCGGGAAAAGAGCAGTGGTCGACTGGTCATTGATGGTCTACGAGTCTAGAGAAAGGCTTCCCCTAGT
181 W H D V I F I R E K S S G R L V I D G L R V L E E R L P P S
1546 - - - - - - - - - - - - - - - - R - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S - - - - - T -

631 GCGCCTGCCTGGAAAAATCAAGGGTCCCATTTATCTGGGAGGAGTGGCTCCCGGAAGAGCCGTGAAAAATGTCCAGATTACCTCCGTCTAC
211 G A A W K I K G P I Y L G G V A P G R A V K N V Q I T S V Y
1576 E - T - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - K - - - - - - - - - - - - - - - - N - I -

721 AGCTTCAGTGGCTGCCTTGGCAATCTCCAGCTCAATGGTGCCTCCATCACCTCCGCTTCTCAAACGTTTAGCGTGACCCCTTGCTTTGAA
241 S P S G C L G N L O L N G A S I T S A S Q T F S V T P C P E
1606 - - - - - S - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -

811 GGCCTAATGGAACAGGAACTATTTTCCACAGAAGCGGCTATGTGGTTCTAGATGAGTCTTTCAATATTTGGGTTAAAAATTTGAAATT
271 G P M E T G T Y F S T E G G Y V V L D E S F N I G L K F E I
1636 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 1

901 GCCTTTGAAGTCGGCCCCGGAGCAGTTCTGGAACCCCTGTCCATGGCCACAGCGTCAACGGGGAATACCTGAACGTGCACATGAGAAAC
301 A F E V R P R S S S G T L V H G H S V N G E Y L N V H M R N
1666 - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 2- - - - - K -

991 GGACAGGTCTATGTGAAGGTCAACAACGGGTGTCAGAGACTTTTCTACCTCAGTAACTCCCAAGCAGAATCTC
331 G Q V I V K V N N G V R D F S T S V T P K Q N L
1696 - - - - - - - - - - - - - - - - I - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - S -
```

Fig. 4-3 Partial nucleotide sequence of mouse laminin α 4 chain cDNA and its deduced amino acid sequence.

(A) Representation of clone used to determine the mouse laminin α 4 cDNA sequence. (B) *First line*, nucleotide sequence of the cDNA for mouse laminin α 4 chain; *second line*, deduced amino acid sequence of mouse laminin α 4 chain; *third line*, amino acid residues of the human laminin α 4 chain which differ from the mouse sequence. Peptide sequences for antigen are boxed.

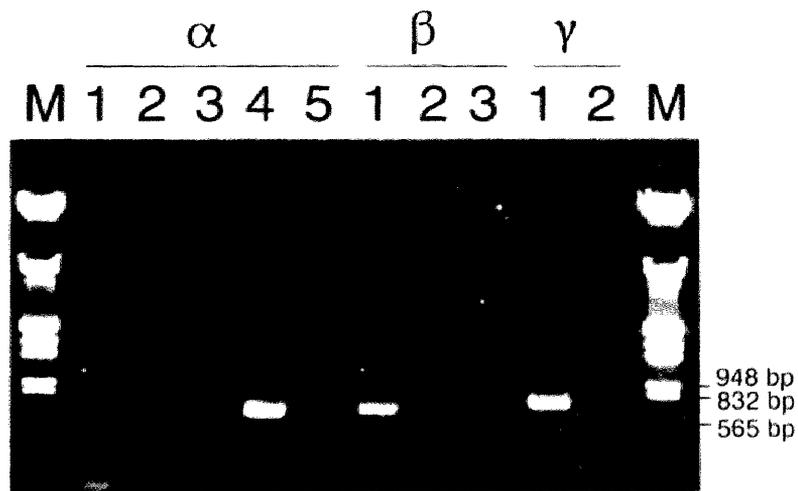


Fig. 4-4 Amplification of only α_4 , β_1 and γ_1 cDNA fragments by RT-PCR of total RNA from 3T3-L1 cells.

RT-PCR of total RNA extracted from 3T3-L1 cells was carried out using ten pairs of primers designed based on cDNA sequences of mouse α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_5 , β_1 , β_2 , β_3 , γ_1 and γ_2 . The products were electrophoresed on a 1.0 % agarose gel with λ -DNA fragments digested with *Hind*III and *Eco*RI as size marker (M). The result after 30 cycles of RT-PCR is presented.

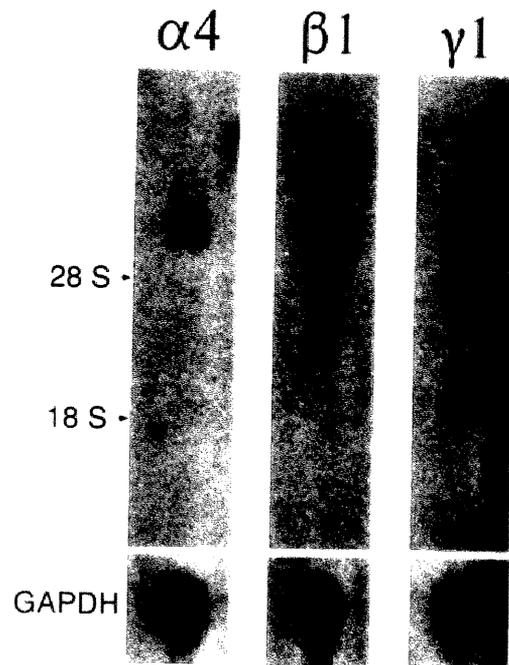


Fig. 4-5 Northern analysis of laminin $\alpha 4$, $\beta 1$ and $\gamma 1$ mRNAs in 3T3-L1 cells. *Upper panel*: 10 mg of total RNA from 3T3-L1 cells was loaded to each lane. Individual strips of transblotted filter were hybridized to [α - 32 P]dCTP-labeled mouse laminin $\alpha 4$, $\beta 1$ and $\gamma 1$ cDNAs. The migration positions of 18 S and 28 S rRNAs are indicated at the left margin. *Lower panel*: The same strips were re-hybridized to [α - 32 P]dCTP-labeled glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA as controls.

対して免疫沈降を行った。還元条件のSDS-PAGEで解析した結果、 $\alpha 4$ -1、 $\alpha 4$ -2抗体では $\alpha 4$ 鎖とともに、 $\alpha 4$ 鎖と共沈してきたと思われる $\beta 1$ と $\gamma 1$ 鎖のバンドがわずかに検出された(Fig.4-6)。この結果より、タンパク質レベルでも $\alpha 4$ 鎖が $\beta 1$ および $\gamma 1$ 鎖と会合していることが示され、はじめて $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ の組み合わせを持つラミニン複合体(ラミニン-8)の存在が確認された。

考 察

マウス3T3-L1細胞からRT-PCR法によってラミニン $\alpha 4$ 鎖遺伝子断片を単離し、部分塩基配列を解明した。ラミニン $\alpha 4$ 鎖遺伝子は最初にヒトで発見され、心臓、肺などで発現量が多いことが示されているが(21,22)、マウスではまだ報告はない。3T3-L1細胞はGreenらがマウス胎児間充織由来のSwiss 3T3 細胞から確立した細胞株で、*in vitro*で高頻度に脂肪細胞に分化することから、脂肪分化の培養モデル系として最もよく研究されている細胞株である(25-29)。おそらく、ラミニン $\alpha 4$ 鎖は間充織に特異的なラミニンの構成鎖であり、基底膜に豊富に存在するラミニン-1の構成鎖である $\alpha 1$ 鎖とは異なる役割を果たしていることが推測される。

本章では、RT-PCRとノーザン解析によるmRNAレベルでの解析および抗マウス $\alpha 4$ 鎖ペプチド抗体による免疫沈降解析によって、ラミニン $\alpha 4$ 鎖が $\beta 1$ 鎖および $\gamma 1$ 鎖と会合することを示した。ヒト $\alpha 4$ 鎖およびマウス $\alpha 5$ 鎖は単離されたばかりで、どの β および γ 鎖と会合しているのかは解明されていない。しかし、これまでに同定されているラミニン複合体の組み合わせから、 $\alpha 4$ 鎖はラミニン-8($\alpha 4\beta 1\gamma 1$)およびラミニン-9($\alpha 4\beta 2\gamma 1$)を、 $\alpha 5$ 鎖はラミニン-10($\alpha 5\beta 1\gamma 1$)およびラミニン-11($\alpha 5\beta 2\gamma 1$)を形成していると推定されきた(Table 4-1) (9) 。すなわち、 $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ の組み合わせをもつラミニン-8の存在は本研究ではじめて確認されたものである。当研究室では、以前にウシ大動脈内皮細胞(BAEC)や肺動脈内皮細胞が、ラミニン-1とともに、このラミニン-8に類

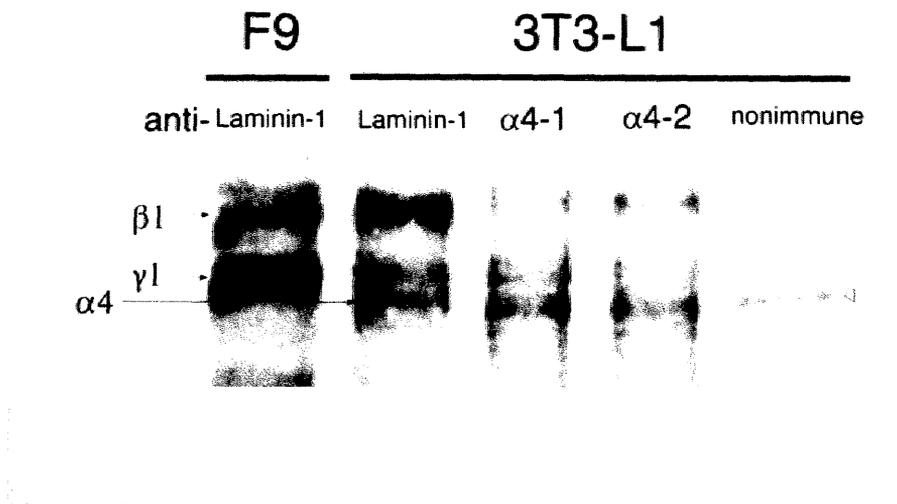


Fig. 4-6 Trimer formation with $\alpha 4$ chains in 3T3-L1 cells.

3T3-L1 cells were labeled with [^{35}S]methionine/cysteine, the cell lysate was immunoprecipitated with anti-mouse laminin-1 antiserum, anti-mouse $\alpha 4$ peptide antiserum ($\alpha 4-1$, $\alpha 4-2$) or nonimmune serum. Immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE under reducing condition. F9 cells were also labeled and immunoprecipitated with anti-mouse laminin-1 antibody.

似したラミニン異型体を合成・分泌することを示した(30)。内皮細胞が血管新生過程に転じると、外側の既成の基底膜を消化して間充織に侵入しようとする。このとき、内皮細胞は基底膜に与えられていた表裏極性を自ら破壊するとともに、間充織に適した新しいラミニン複合体を合成しなければならないと考えられる。BAECに血管新生抑制活性をもつメドロキシプロジェステロンを添加すると、ラミニン異型体の合成が抑制され、ラミニン-1の合成が増加することも明らかにされている。この結果は、BAECが通常の培養条件では血管新生の状態に活性化されており、メドロキシプロジェステロンがこれを休止状態に戻したと解釈できる。すなわち、二種類のラミニン複合体の切り換えが血管新生と連動していることを意味している。二種類のラミニン複合体の切り換え現象は、筋形成におけるラミニン-1とラミニン-2でも示されている(31)。BAECで見られるラミニン異型体も、おそらく本研究で明らかにしたラミニン-8であると思われ、ラミニン-8の血管新生における役割がこの実験と併せて推定できる。すなわち、脂肪組織形成の際には活発な微小血管新生が行われていることが知られており(32)、3T3-L1細胞の脂肪分化におけるラミニン-8の合成は、血管新生に必要な基底膜成分を供給するためであると考えられる。

ラミニン α 4鎖はドメインIIIからN末端側の短腕領域を欠失している点で、 α 1から α 5鎖の中では α 3鎖と最も相同性が高い(Fig.1-10)。 α 3鎖は表皮に特異的な α 鎖で、 β 3 γ 2と会合してラミニン-5(α 3 β 3 γ 2)、 β 1 γ 1と会合してラミニン-6(α 3 β 1 γ 1)、 β 2 γ 1と会合してラミニン-7(α 3 β 2 γ 1)を形成する(8)。また、ヒト α 3、 β 3および γ 2鎖の変異は表皮水泡症と連鎖していることが知られている(33-36)。 α 4鎖はラミニン-8(α 4 β 1 γ 1)に加えて、 β 2 γ 1と会合してラミニン-9(α 4 β 2 γ 1)を形成することも推測されているが、今後その発現組織の同定さらに遺伝病との関連などの解明が待たれる。

ラミニン各鎖の短腕領域の最先端にあるドメインVIは、ラミニン分子間の会合による超分子ネットワーク形成に必要なドメインで、この領域を欠失しているラミニン複合体は別のラミニン・ネットワーク形成の方法があると考えられている。例えばヒト胎児羊膜(amnion)では、ラミニン-5はラミニン-6およびラミニン-7を介して基底膜に結合しているとの報告がある(37)。ドメインVIの重要性を示すもうひとつの証拠は、点突然変異によってドメインVIの一部を欠損した α 2鎖を発現するマウスが筋ジストロフィーの症状を示すことである(38-40)。筋肉膜に特異的なラミニンである

ラミニン-2($\alpha 2\beta 1\gamma 1$)を構成する $\alpha 2$ 鎖遺伝子は、筋ジストロフィーの原因遺伝子のひとつであることが知られている(41,42)。短腕領域をもたない $\alpha 3$ 鎖によって構成されるラミニン-5、6および7が何の異常もなく機能することを考えると、これらのラミニンが形成するネットワーク形成が既知のものとのように異なるのかが今後の焦点である。ラミニン-8を多量に合成・分泌している3T3-L1細胞が、これらの疑問を解決する格好の実験系となることは明白で、今後の解析が待たれる。

引用文献

1. Chung, A., Freeman, I. L. and Braginski, J. E. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 859-868
2. Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M. and Martin, G. R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9933-9937
3. Kleinman, H. K., Ebihara, I., Killen, P. D., Sasaki, M., Cannon, F. B., Yamada, Y. and Martin, G. R. (1987) *Dev. Biol.* 122, 373-378
4. Klein, G., Ekblom, M., Fecker, L., Timpl, R. and Ekblom, P. (1990) *Development* 110, 823-837
5. Ehrig, K., Leivo, I., Argraves, W. S., Ruoslahti, E. and Engvall, E. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3264-3268
6. Hunter, D. D., Shah, V., Merlie, J. P. and Sanes, J. R. (1989) *Nature* 338, 229-234
7. Rousselle, P., Lunstrum, G. P., Keene, D. R. and Burgeson, R. E. (1991) *J. Cell Biol.* 114, 567-576
8. Burgeson, R. E., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ekblom, P., Engel, J., Kleinman, H., Martin, G. R., Meneguzzi, G., Paulsson, M., Sanes, J., Timpl, R., Tryggvason, K., Yamada, Y. and Yurchenco, P. D. (1994) *Matrix Biol.* 14, 209-211
9. Engvall, E. and Wewer, U. M. (1996) *J. Cell Biochem.* 61, 493-501
10. Aratani, Y. and Kitagawa, Y. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16163-16169
11. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156-159
12. Sasaki, M., Kleinman, H. K., Huber, H., Deutzmann, R. and Yamada, Y. (1988)

- J. Biol. Chem.* 263, 16536-16544
13. Bernier, S. M., Utani, A., Sugiyama, S., Doi, T., Polistina, C. and Yamada, Y. (1994) *Matrix Biol.* 14, 447-455
 14. Galliano, M.-F., Aberdam, D., Aguzzi, A., Ortonne, J.-P. and Meneguzzi, G. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 21820-21826
 15. Miner, J. H., Lewis, R. M. and Sanes, J. R. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 28523-28526
 16. Sasaki, M., Kato, S., Kohno, K., Martin, G. R. and Yamada, Y. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84, 935-939
 17. Durkin, M. E., Gautam, M., Loechel, F., Sanes, J. R., Merlie, J. P., Albrechtsen, R. and Wewer, U. M. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 13407-13416
 18. Utani, A., Kopp, J. B., Kozak, C. A., Matsuki, Y., Amizuka, N., Sugiyama, S. and Yamada, Y. (1995) *Lab. Invest.* 72, 300-310
 19. Sasaki, M. and Yamada, Y. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 17111-17117
 20. Sugiyama, S., Utani, A., Yamada, S., Kozak, C. A. and Yamada, Y. (1995) *Eur. J. Biochem.* 228, 120-128
 21. Iivaninen, A., Sainio, K., Sariola, H. and Tryggvason, K. (1995) *FEBS Lett.* 365, 183-188
 22. Richards, A., Al-Imara, L. and Pope, F. M. (1996) *Eur. J. Biochem.* 238, 813-821
 23. Ercolan, L., Florence, B., Denaro, M. and Alexander, M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 15335-15341
 24. Khan, A. S., Wilcox, A. S., Polymeropoulos, M. H., Hopkins, J. A., Stevens, T. J., Robinson, M., Orpana, A. K. and Sikela, J. M. (1992) *Nature Genet.* 2, 180-185
 25. Todaro, G. J. and Green, H. (1963) *J. Cell Biol.* 17, 299-313
 26. Green, H. and Kehinde, O. (1974) *Cell* 1, 113-116
 27. Green, H. and Meuth, M. (1974) *Cell* 3, 127-133
 28. Green, H. and Kehinde, O. (1975) *Cell* 5, 19-27
 29. Green, H. and Kehinde, O. (1976) *Cell* 7, 105-113
 30. Tokida, Y., Aratani, Y., Morita, A. and Kitagawa, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 18123-18129
 31. Vachon, P., Loechel, F., Xu, H., Wewer, U. M. and Engvall, E. (1996) *J. Cell Biol.* 134, 1483-1497
 32. Napolitano, L. (1963) *J. Cell Biol.* 18, 663-679

33. Pulkkinen, L., Christiano, A. M., Airenne, T., Haakana, H., Tryggvason, K. and Uitto, J. (1994) *Nature Genet.* 6, 293-298
34. Aberdam, D., Galliano, M.-F., Vailly, J., Pulkkinen, L., Bonifas, J., Christiano, A. M., Tryggvason, K., Uitto, J., Epstein Jr, E. H., Ortonne, J.-P. and Meneguzzi, G. (1994) *Nature Genet.* 6, 299-304
35. Pulkkinen, L., Christiano, A. M., Gerecke, D., Eagman, D. W. and Burgeson, R. E. (1994) *Genomics* 24, 357-360
36. Kivirikko, S., McGrath, J. A., Baudoin, C., Aberdam, D., Ciatti, S., Giles, M., Dunhill, S., Mcmillan, J. R., Eady, R. A. J., Ortonne, J.-P., Meneguzzi, G., Uitto, J. and Christiano, A. M. (1995) *Hum. Mol. Genet.* 4, 959-962
37. Champlaud, M.-F., Lunstrum, G. P., Rousselle, P., Nishiyama, T., Keene, D. R. and Burgeson, R. E. (1996) *J. Cell Biol.* 132, 1189-1198
38. Xu, H., Christmas, P., Wu, X.-R., Wewer, U. M. and Engvall, E. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5572-5576
39. Xu, H., Wu, X.-R., Wewer, U. M. and Engvall, E. (1994) *Nature Genet.* 8, 297-302
40. Helbling-Leclerc, A., Zhang, X., Topaloglu, H., Cruaud, C., Tesson, F., Weissenbach, J., Tome, F. M. S., Schwartz, K., Fardeau, M., Tryggvason, K. and Guicheney, P. (1995) *Nature Genet.* 11, 216-218
41. Worton, R. (1995) *Science* 270, 755-756
42. Campbell, K. P. (1995) *Cell* 80, 675-679

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導賜りました名古屋大学生物分子応答研究センターの北川泰雄教授に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。また、適切な御助言をくださいました三木清史博士、門脇辰彦博士に心から感謝致します。

本研究室に在学中のみならず、卒業後もお世話になりました現京都大学の谷口幸雄先生、現名古屋工業技術研究所の稲垣英利博士、学術振興会特別研究員で、本研究の前段階の実験をして頂きました岡野正樹博士に深く感謝致します。

各種プラスミドを御供与頂いた米国国立衛生研究所(NIH)の山田吉彦博士、京都大学の永尾雅哉博士、久留米大学の吉村昭彦博士に厚く御礼申し上げます。

最後に実験を行うにあたり、お世話になりました器官形成研究室の皆様感謝致します。

報文目録

1) Tomoaki Niimi and Yasuo Kitagawa

Distinct roles of mouse laminin β 1 long arm domains for α 1 β 1 γ 1 trimer formation.

FEBS Lett. 400, 71-74 (1997)

2) Tomoaki Niimi, Kiyoshi Miki and Yasuo Kitagawa

Expression of the long arm sequence of mouse laminin α 1, β 1 or γ 1 chain in COS1 cells and assembly of monkey-mouse hybrid laminin.

J. Biochem. in press

3) Tomoaki Niimi and Yasuo Kitagawa

Expression of laminin α 4 mRNA in mouse 3T3-L1 cells.

submitted to *Matrix Biol.*