

Title	Molecular Dissection of the α -Dystroglycan- and Integrin binding Sites within the Globular Domain of Human Laminin-10
Author(s)	Ido, Hiroyuki
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/2179
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	井 戸 寛 之
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 8 9 2 8 号
学位授与年月日	平成 16 年 6 月 17 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	Molecular Dissection of the α -Dystroglycan- and Intengrin binding Sites within the Globular Domain of Human Laminin-10 (ラミニン-10 の球状ドメインに存在する α -ジストログリカンおよびインテグリン結合部位の解析)
論文審査委員	(主査) 教授 関口 清俊 (副査) 教授 高木 淳一 教授 中川 淳史

論 文 内 容 の 要 旨

基底膜の主要成分であるラミニンは、非常に強い細胞接着活性、遊走活性を示し、上皮細胞の増殖や分化・生存などを制御している。この活性はラミニンが細胞側レセプターであるインテグリンや α -ジストログリカン (α -DG) と結合することで発揮される。これまでラミニンにおけるインテグリンおよび α -DG の認識部位は、細胞の接着活性を指標として解析されてきた。しかし細胞を用いると複数のレセプターが接着に関与するため、詳細な解析は困難である。そこで本研究ではインテグリンと α -DG をそれぞれ精製し、これらレセプターとラミニンとの結合を直接解析した。ラミニンは生体内に幅広く分布し、ラミニンの中でも最も強い細胞接着活性を持つラミニン-10 を用いた。

ラミニン-10 は $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ の 3 つのサブユニットからなり、 $\alpha 5$ 鎖 C 末端に存在する G ドメインがレセプターとの結合に必要である。G ドメインは一次構造上 5 つのモジュール (LG1~LG5) に分けられるので、このモジュールを C 末端から順次欠失させた変異ラミニン-10 を培養細胞を用いて発現・精製した。次に変異ラミニン-10 と精製したインテグリンおよび α -DG との結合を ELISA により定量化した。

インテグリンおよび α -DG は LG5 モジュールを欠失したラミニン-10 に対してどちらも結合したが、LG4-5 モジュールを欠失したラミニン-10 に α -DG は結合しなかった (インテグリンは結合活性を示した)。また LG3-5 モジュールを欠失した場合は、インテグリンの結合が見られなくなった。したがって LG4 モジュールが α -DG との結合に、LG3 モジュールがインテグリンとの結合に必要であると考えられた。

次に各 LG モジュールを個別に GST との融合蛋白質として大腸菌で発現・精製した。精製した各 LG モジュールについて α -DG との結合アッセイを行った。結果、LG4 モジュールが単独で α -DG 結合活性を示したので、LG4 モジュールが α -DG の結合部位であることが明らかとなった。そこで LG4 モジュールに部位特異的な変異を導入し、 α -DG の認識部位についてさらに詳細な解析を行った。その結果、いくつかの変異体において α -DG 結合活性の減少が観察されたことから、LG4 モジュールにおいて α -DG の認識に関わる部位の同定に成功した。

また各 LG モジュールについてインテグリンとの結合アッセイを行った。結果、LG3 モジュールあるいはその他のモジュールに有意なインテグリン結合活性が見られなかった。そこで LG3 モジュールに部位特異的な変異を直接導入したラミニン-10 を作製し、インテグリン結合活性を調べた。その結果、ある一つの変異体においてインテグリン

結合活性の減少が観察された。この結果は LG3 モジュールがインテグリンとの結合に関わっていることを示している。

以上よりラミニン-10 において LG4 モジュールが α -DG の結合部位であることが分かった。またラミニン-10 におけるインテグリンの認識部位は、LG3 モジュールが重要な役割を果たしていると考えられる。しかし LG3 モジュール単独ではインテグリン結合活性が現れないことから、インテグリンの認識には LG1 や LG2 モジュールの関与が考えられる。ラミニン-10 は上記のような機構を介して細胞側レセプターと結合し、その生理活性を発揮していると推定される。

論文審査の結果の要旨

基底膜の主要な構成分子であるラミニンは、基底膜構造の構築において中心的な役割を果たすとともに、インテグリンや α -ジストログリカン等の細胞表面受容体との相互作用を通じて、細胞の様々な機能を制御するシグナルを細胞内に伝達することが知られている。しかし、これらの受容体がラミニン分子のどのような部位を認識しているかについては、これまで不明の点が多く残されていた。井戸寛之君は、生体において最も広範に発現しているラミニン-10 に着目し、その組換え蛋白質の発現系を構築するとともに、部位特異的変異導入法を駆使して、 α -ジストログリカン結合部位が α 5 鎖の C 末端球状ドメインの中の LG4 モジュールに存在することを突き止めることに成功した。また、 α 5 鎖の C 末端領域を順次欠失させた組換え蛋白質を調製し、インテグリンとの結合に球状ドメインを構成する LG3 モジュールが不可欠であることを明らかにした。さらに、LG3 および LG4 モジュールの特定のアミノ酸残基を置換した変異ラミニン-10 を多数調製し、インテグリンおよび α -ジストログリカンとの結合に関与するアミノ酸残基の特定にも成功している。これらの成果は、ラミニンとその受容体間の分子間相互作用の解明に大きく貢献するものであり、博士（理学）の学位に値するものと認める。