

Title	Mechanistic basis for the recognition of laminin-511 by $\alpha 6 \beta 1$ integrin
Author(s)	瀧沢, 士
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/69372">https://doi.org/10.18910/69372</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 (瀧沢 士)

論文題名

Mechanistic basis for the recognition of laminin-511 by  $\alpha 6 \beta 1$  integrin  
( $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンによるラミニン-511の認識機構)

## 論文内容の要旨

基底膜への細胞接着は、多細胞体を構成する細胞の挙動と運命を制御する重要なプロセスの一つである。基底膜の主成分であるラミニンは、 $\alpha/\beta/\gamma$  鎖がcoiled-coilドメインで会合した十字架様の形をした細胞外マトリックス蛋白質であり、細胞表面受容体インテグリンとの相互作用を介して細胞の様々な挙動を制御する。ラミニンのインテグリン結合部位はE8領域に存在し、 $\alpha$ 鎖C末端部の3つの球状ドメイン (LG1-3)、および  $\gamma$ 鎖C末端9残基からなるtail領域 ( $\gamma$ -tail) がインテグリンとの結合に関与する。特に、 $\gamma$ -tailはインテグリンとの結合に必須のGlu残基を含む。 $\gamma$ -tailのGlu残基の役割については、“直接インテグリンと結合する可能性”と“LG1-3の活性型コンフォメーションを保つことにより間接的にインテグリンとの結合に関与する可能性”が提唱されているが、インテグリンによるラミニンの認識機構は未だ不明である。本研究ではインテグリンによるラミニンの認識機構の実体解明を目的とし、X線結晶構造解析によりLG1-3と $\gamma$ -tailを含むラミニンのインテグリン結合領域の構造を決定するとともに、生化学的手法を駆使して $\gamma$ -tailの機能の同定に取り組んだ。

哺乳動物の発生初期から成体に至るまで発現が認められるラミニン-511 ( $\alpha 5/\beta 1/\gamma 1$ ) を鋳型とし、結晶化スクリーニング用に最適化したE8領域の組換え断片 (tLM511E8) を作製した。tLM511E8は特定の条件において非常に結晶化しやすい性質をもち、その結晶構造を1.8Å分解能で決定することに成功した。tLM511E8は、“三葉 (cloverleaf)”状に会合したLG1-3を底面とする“おたま (ladle)”形の構造を呈する (図1)。9残基からなる $\gamma 1$ -tailのうち、インテグリン結合活性に必須のGlu残基を含むC末端5残基はdisorderしていたことから、 $\gamma$ -tailのGlu残基はLG1-3の活性型コンフォメーションの維持に寄与するのではなく、“直接インテグリンと結合する可能性”が高いことが示唆された。

インテグリンは $\alpha/\beta$  鎖からなる膜貫通型蛋白質であり、頭部同士が会合してリガンド結合部位を形成する。インテグリン $\beta$  鎖の頭部ドメインには2価金属イオン結合部位 (metal-ion-dependent-adhesion-site: MIDAS) が存在し、リガンドに存在する酸性残基がMIDAS 2価金属イオンに配位することがリガンドとインテグリンの結合に共通する分子基盤となっている。ラミニン-511とその受容体である $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンの結合における $\gamma 1$ -tailの空間配置を解析するために、 $\gamma 1$ -tailにCys残基を導入したラミニン-511変異体と、MIDAS近傍のアミノ酸をCys残基に置換導入した $\alpha 6 \beta 1$ インテグリン変異体を用いて分子間架橋形成実験を実施したところ、Cys残基を導入した $\gamma 1$ -tailはMIDAS近傍

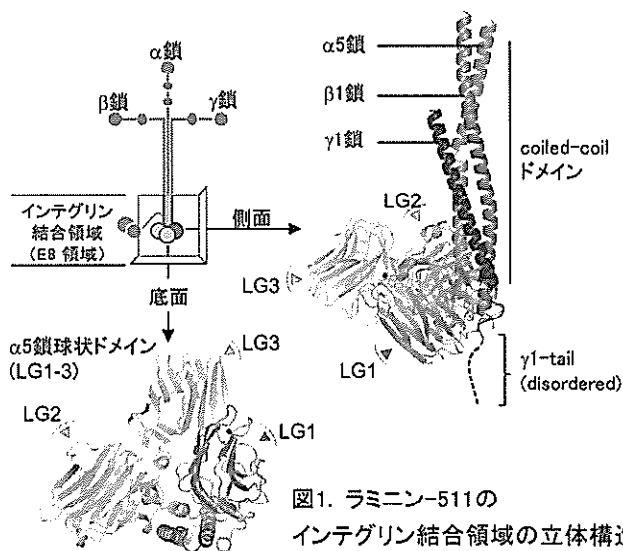


図1. ラミニン-511のインテグリン結合領域の立体構造

に導入したCys残基とジスルフィド結合を形成した。これは、ラミニン-511が $\alpha6\beta1$ インテグリンと結合する際、 $\gamma1$ -tailをMIDAS近傍に配置することを示唆する（図2）。 $\gamma1$ -tailがGlu残基を介して $\alpha6\beta1$ インテグリンのMIDASと直接相互作用することを裏付けるために、 $\gamma1$ -tail由来の合成ペプチドを用いた競合阻害アッセイを実施したところ、合成ペプチドはGlu残基依存的にラミニン-インテグリン相互作用を阻害した。以上までの結果は、 $\gamma$ -tailがラミニンのインテグリン結合部位として機能し、Glu残基を介してMIDASの2価金属イオンと相互作用することを強く示唆するものである。

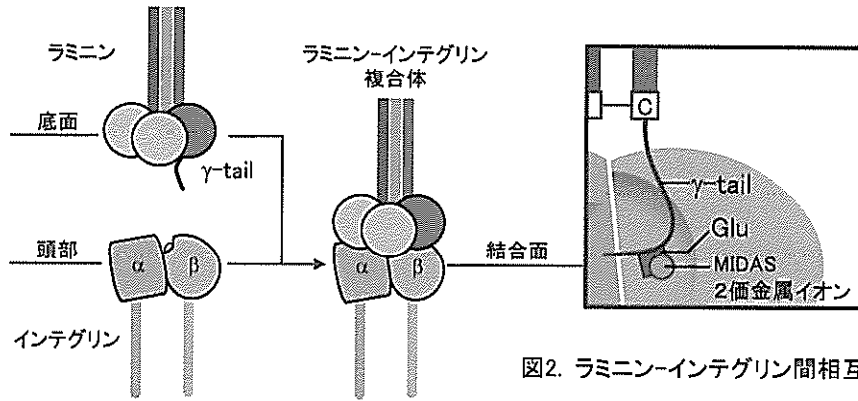


図2. ラミニン-インテグリン間相互作用の模式図

本研究成果は長い間不明であったラミニンのインテグリン結合部位の実体解明につながる重要なマイルストーンであり、インテグリンを介した基底膜への細胞接着の分子メカニズムの理解に貢献する成果である。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 瀧 沢 士 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 高 木 淳 一
	副 査 教 授 栗 栖 源 嗣
	副 査 教 授 岡 田 雅 人
	副 査 招へい教授 関 口 清 俊
<b>論文審査の結果の要旨</b>	
<p>本論文 (Mechanistic basis for the recognition of laminin-511 by <math>\alpha 6 \beta 1</math> integrin) は、細胞の足場である基底膜の接着分子ラミニンに着目し、細胞表面受容体であるインテグリンがどのようにラミニンを識別するかを、構造生物学的手法と様々な生化学的手法を組み合わせで解明しようとしたものである。これまでの研究からラミニンがインテグリンと結合するためには、ラミニン<math>\alpha</math>鎖の3つの球状ドメイン (LG1-3) と<math>\gamma</math>鎖の C 末端領域 (<math>\gamma</math>-tail) が必要であることが知られていた。しかし、これらがどのようにインテグリンとの結合に関わっているか、特に活性に必要なグルタミン酸残基を含む<math>\gamma</math>-tail がインテグリンとの結合に直接関与するかについては不明の点が多く残されていた。</p> <p>本論文では、多能性幹細胞が足場とするラミニン-511 を具体的な研究対象として、LG1-3 と<math>\gamma</math>-tail を含む領域の組換え断片を結晶化し、その構造を 1.8Å 分解能で決定するとともに、ラミニン組換え断片と<math>\alpha 6 \beta 1</math>インテグリンとの間の分子間架橋形成実験や合成ペプチドを用いるインテグリン結合阻害実験などの生化学的手法を駆使して、<math>\gamma</math>-tail がインテグリンと直接相互作用すること、そして<math>\gamma</math>-tail のグルタミン酸残基がインテグリン<math>\beta</math>鎖リガンド結合部位 (MIDAS) の2価金属イオンに配位することを実証した。これらの研究成果は長い間不明であったラミニンのインテグリン結合部位の実体解明につながる重要なマイルストーンであり、インテグリンによるリガンド認識機構の全体像の理解にも貢献する成果であると評価できる。よって、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。</p>	