The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular Basis of the Ligand-binding Specificity of αvβ8 integrin
Author(s)	小澤, 明央
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72177
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式3

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　小澤　明央　）	
論文題名	Molecular Basis of the Ligand-binding Specificity of αvβ8 integrin (αvβ8インテグリンのリガンド結合特異性の分子基盤)

論文内容の要旨

細胞の周囲には細胞外マトリックス(ECM)と呼ばれる繊維状、網目状の構造体や液性因子が存在し、細胞表面のインテグリンを介して細胞の運命を制御している。Arg-Gly-Asp (RGD)結合型インテグリンの一つであるαvβ8インテグリンは、RGDモチーフを介してフィブロネクチン、ビトロネクチン、TGF-β1といったECMタンパク質と結合することが報告されている。しかし、他のRGDモチーフを含むタンパク質（以下、RGDリガンド）に対して、αvβ8インテグリンがどのような結合特異性を有するか、これまでに網羅的な検証はされていない。本研究では、αvβ8インテグリンのリガンド結合特異性を精査するために、in silicoスクリーニングにより抽出してきた25種のRGDリガンド（①RGDモチーフを含む、②細胞外に分泌される、③RGDモチーフが脊椎動物間で高度に保存されてある）に対するαvβ8インテグリンの結合活性を、生化学的手法を用いて比較検討した。その結果、αvβ8インテグリンはTGF-β1と強く結合し（2.3±0.2 nM）、一方で他のRGDリガンドに対しては低い結合活性を示した。また、同じRGD結合型インテグリンであるαvβ3インテグリンは、25種のRGDリガンドに対して広範な結合特異性を示し、かつTGF-β1に対しては低い結合活性を示した。以上の結果から、αvβ8インテグリンはTGF-β1に高い特異性を示すことがわかった。TGF-β1はαvβ8インテグリンの生理的リガンドであり、両間の結合は発生初期の血管新生に重要であることが報告されている。本アッセイで示されたαvβ8インテグリンのTGF-β1に対する高い特異性は、両間の相互作用の生理的重要性を支持する。

αvβ8インテグリン-TGF-β1の高親和性結合のメカニズムを明らかにするため、TGF-β1のアミノ酸の部位特異的変異導入による検証を行ったところ、RGDモチーフのすぐ後に続くLeu-218が、αvβ8インテグリンに対する高親和性結合に要求されることがわかった。ペプチドを用いた阻害アッセイの結果、αvβ8インテグリンはLeu-218を認識するが、αvβ3インテグリンは認識しないことから、β鎖の違いがTGF-β1に対する特異性を決定することが示された。TGF-β1に対する高親和性結合に寄与するβ8鎖の領域を特定するために、αvβ8インテグリンとαvβ3インテグリン間のβ鎖のスワップ実験を行った。その結果、β8 I-like domainがTGF-β1に対する高親和性結合に必要であることがわかった。しかし、これまでにリガンド結合特異性に関わると報告されていた、β I-like domain中に存在するDisulfide-linked loop領域は、TGF-β1に対する高親和性結合に寄与しないことが示された。最後に、αvβ8インテグリンとTGF-β1由来のペプチドの複合体の構造予測を試みたところ、TGF-β1由来のペプチド中のLeu-218の周囲にβ8鎖由来の複数の疎水性アミノ酸がポケットを形成しており、疎水性相互作用している可能性が示唆された。以上より、αvβ8インテグリンはTGF-β1に対する高い結合特異性を有し、TGF-β1に対する高親和性結合は、Leu-218とβ8 I-like domainの相互作用により決定されることが明らかとなった。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　小澤　明央　）		
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主査	教　授	高木淳一
	副査	教　授	三木裕明
	副査	教　授	岡田雅人
	副査	招へい教授	関口清俊

論文審査の結果の要旨

本論文（Molecular basis of the ligand-binding specificity of αvβ8 integrin）は、多細胞生物の主要な接着受容体であるインテグリンファミリーの中で、比較的研究が進んでいないαvβ8 インテグリンに着目し、主にそのリガンド認識特異性という観点から生化学的な結合メカニズムの解明に取り組んだものである。αvβ8 インテグリンは RGD 配列を含むリガンドを認識する、いわゆる RGD 依存性インテグリンとして知られていたが、膨大な数存在する RGD 配列含有タンパク質に対して網羅的な解析はされていなかった。

本論文では、ヒトタンパク質配列データベースから実質的にリガンド候補となり得る RGD タンパク質をインシリコで 29 種類ピックアップし、それらをすべて組み換え発現により精製、組み換え可溶性αvβ8 インテグリンとの結合アッセイを実施して、TGF-β1がαvβ8 インテグリンに対する極めて特異性の高いリガンドであることを証明した。続いて、同じアッセイ系を利用し、様々な変異体を用いた実験から、αvβ8 インテグリンによる TGF-β1の認識には RGD 配列の直後の Leu 残基が必須であること、インテグリン側ではβ鎖の Disulfide-linked loop(DLL)と呼ばれる領域が TGF-β1 特異的な認識を制御していること、などを解明した。これらの研究成果は、これまで一般に promiscuous であると認識されてきた RGD 依存性インテグリンの中でも、αvβ8 インテグリンが TGF-β1特異的受容体というユニークな性質を獲得できた構造的基盤を、緻密な生化学的分析で明確にした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。