

学 位 論 文 題 名

Studies on Biologically Active Sites
in the Laminin α Chains

（ラミニン α 鎖の生物活性部位に関する研究）

学位論文内容の要旨

基底膜の主要糖タンパク質であるラミニンは、 α 、 β 、 γ の3種類のサブユニットから成り、細胞接着や神経突起伸長をはじめ様々な生物活性を有している。現在までに5種類の α 鎖、3種類の β 鎖、3種類の γ 鎖が同定されており、それらの組み合わせにより15種類のアイソフォーム（ラミニン-1～15）が知られている。これらのアイソフォームは組織特異的あるいは発生時の各段階で特異的に発現し、様々な生命現象に関与している。このラミニンアイソフォームの発現の特異性は、 α 鎖の発現の様式に起因している。また、 α 鎖のC末端には5つのLGモジュール（LG1-5）から成るGドメインが存在し、細胞との相互作用に重要な部位であることがわかっている。これまでに当研究室ではラミニン-1（ $\alpha1\beta1\gamma1$ ）を網羅した673種類の合成ペプチドを用いて細胞接着活性のスクリーニングを行い、約20種類の活性ペプチドを同定した。この中にはインテグリンやシンデカン（ヘパラン硫酸プロテオグリカン）をレセプターとするものが存在した。細胞外マトリックスのレセプターとしてはインテグリンの研究が主流であるが、近年急速にシンデカンが注目されつつある。本研究ではラミニンのレセプターとして特にシンデカンに注目し、プロテオグリカンの糖鎖と相互作用するラミニン機能部位の解析とその生物活性メカニズムの解明を目的に研究を行った。

はじめにマウスラミニン $\alpha1$ 鎖Gドメインとシンデカンとの相互作用に注目し、 $\alpha1$ 鎖Gドメインのシンデカン結合部位の同定を目的に $\alpha1$ 鎖Gドメインの組換えタンパク（rec- $\alpha1$ G）とそのアミノ酸配列を網羅する113種類の合成ペプチドを用いて研究を行った。 $\alpha1$ 鎖Gドメインの組換えタンパクはヘパリン依存性のヒト線維芽細胞の接着活性を有し、ヘパリン結合の解離定数（ K_D ）は19 nMであった。また、ヒト線維芽細胞はシンデカン-4を発現していることから、ヒト線維芽細胞のcell lysateを用いてrec- $\alpha1$ Gとシンデカン-4との結合をELISAで調べたところ、rec- $\alpha1$ Gはシンデカン-4結合活性を有することがわかった。次に $\alpha1$ 鎖Gドメイン由来の可溶性の110種類のペプチドを用いてrec- $\alpha1$ Gのヘパリン結合に対する影響を調べ、ヘパリン結合部位の同定を行ったところ、2種類のペプチドAG73とAG75が阻害活性を示した。これらのペプチドのヘパリン結合をELISAによって調べたところ、両者ともヘパリン結合活性を有す

ることがわかった。次に rec- α 1G への細胞接着に対するペプチドの影響を調べたところ、AG73 が rec- α 1G へのヒト線維芽細胞の接着を阻害した。また、AG73 と AG75 はヘパリン依存性のヒト線維芽細胞の接着活性を示した。さらに AG73 と AG75 は rec- α 1G のシンデカン-4 結合を阻害することがわかった。これらの結果より AG73 部位と AG75 部位がラミニン α 1鎖 G ドメインのシンデカン結合部位として機能している可能性が示された。また、マウスの顎下腺原基を用いた組織培養系において、AG73 はその正常な分化の進行を阻害した。この結果より、顎下腺の分化にはシンデカンとラミニン α 1鎖 G ドメインの相互作用が重要であり、その結合部位として AG73 部位が重要な働きをしていることが示された。

近年、当研究室のラミニン α 3、 α 4鎖のGドメインの機能部位の解析により、ヒトラミニン α 3鎖GドメインのA3G75部位、マウスラミニン α 4鎖GドメインのA4G82部位がシンデカンを介する細胞接着部位として同定された。また、A3G75部位とA4G82部位は、いずれもGドメインのLG4モジュール内の相同部位（EF部位）に位置することがわかった。次に、本研究ではこのEF部位の生物活性に注目し、5種類のマウスラミニン α 鎖のLG4モジュールのEF部位由来の5種類の相同ペプチド（EF-1～EF-5）の生物活性を調べた。様々な種類の細胞を用いて細胞接着活性と神経突起伸長促進活性を調べたところ、EF-2とEF-4は用いた全ての細胞で強い細胞接着活性を示した。EF-1はヒト線維芽細胞とHT-1080ヒト線維肉腫細胞で、EF-5はヒト線維芽細胞のみで細胞接着活性が見られた。EF-3とEF-4はPC12ラット副腎髄質細胞での神経突起促進活性を示した。さらにEF-2とEF-4はヘパリン依存的な細胞接着活性を示し、シンデカン-2をトランスフェクトしたヒト尿細管上皮細胞（293T細胞）を用いたアッセイにおいてシンデカン-2を過剰発現させることにより細胞接着活性が増強した。これらの結果より、ラミニン α 2鎖、 α 4鎖LG4モジュールのEF部位がシンデカンとの相互作用に重要な部位であることが示された。また、EF-1への細胞接着では接着斑とアクチンストレスファイバーが観察され、抗 α 2、抗 β 1インテグリン抗体により細胞接着が阻害された。これらの結果より、ラミニン α 1鎖LG4モジュールのEF部位が α 2 β 1インテグリンとの相互作用に重要な部位であることが示された。また、EF部位は2つの β シート（ β シートEとF）間のループ部位に位置するため、ループ構造を模倣してEF-1を環化したサイクリックペプチド（cyc-EF-1Xm）を作成しその生物活性を調べたところ、 α 2 β 1インテグリンとの特異的な相互作用が増強することがわかった。このことよりラミニン α 1鎖LG4モジュールのEF部位と α 2 β 1インテグリンとの相互作用には、ループ構造が重要な働きをしていることが示された。

これらの解析結果より、シンデカンやインテグリン等のレセプターとの相互作用に寄与するラミニン α 鎖の新たな活性配列が明らかになった。これらの活性ペプチドを用いることで細胞-細胞外マトリックス間相互作用のより詳細な作用メカニズムの解明が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 則 雄

副 査 教 授 坂 入 信 夫

副 査 教 授 荒 木 義 雄

副 査 教 授 野 水 基 義 (東京薬科大学薬学部)

学 位 論 文 題 名

Studies on Biologically Active Sites in the Laminin α Chains

(ラミニン α 鎖の生物活性部位に関する研究)

生態環境科学研究にとって生物個体の複雑な生命現象のしくみに関する基礎研究は必要不可欠である。細胞外マトリックスである基底膜は、細胞の環境的機能を有し、且つ大気汚染による肺胞組織の損傷と再生のしくみと密接な関わりを持っている。基底膜と細胞との詳細な相互作用の解析は、環境問題の生体へ及ぼす影響を考える上で重要である。基底膜は、組織の形成・維持において必須の存在であり、基底膜の構成成分であるラミニンと細胞との相互作用が重要である。

このように細胞の環境的機能を有し、大気汚染等の環境問題と密接な関わりを持つ基底膜の主要糖タンパク質であるラミニンは、 α 、 β 、 γ の3種類のサブユニットから成り、様々な生物活性を有している。現在までに5種類の α 鎖が同定されており、組織特異的・各発生段階で特異的に発現している。 α 鎖のC末端には5つのLGモジュール(LG1-5)から成るGドメインが存在し、細胞との相互作用に重要な働きをしている。

はじめにラミニン α_1 鎖Gドメインのシンデカン結合部位の同定を目的に、Gドメインの組換えタンパク(rec- α_1 G)とそのアミノ酸配列を網羅する113種類の合成ペプチドを用いて研究を行った。rec- α_1 Gのヘパリン結合に対するペプチドの影響を調べたところ、2種類のペプチド(AG73とAG75)が阻害活性を示した。さらにAG73とAG75はrec- α_1 Gのシンデカン-4との結合を阻害した。これらの結果よりAG73部位とAG75部位がラミニン α_1 鎖Gドメインのシンデカン結合部位として機能していることが示された。

以前の当研究室の解析により、複数の活性部位が α 鎖LG4モジュール内の活性相同部位(EF部位)に位置していたため、このEF部位に注目し、5種類の

ラミニン α 鎖の LG4 モジュール EF 部位由来の相同ペプチド (EF-1~EF-5) の生物活性を調べた。これらのペプチドは細胞種特異的な生物活性を示し、EF-2 と EF-4 はシンデカン-2 と、EF-1 は $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンと相互作用することが示された。また、EF 部位は 2 つの β シート間のループ部位に位置するため、ループ構造を模倣した EF-1 サイクリックペプチドを作成したところ、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンとの特異的な相互作用が増強した。これらの結果より、ラミニン α 鎖 LG4 モジュールの EF 部位は α 鎖特異的な生物活性に重要であることが示された。

これらの解析結果より、シンデカンやインテグリン等のレセプターとの相互作用に寄与するラミニン α 鎖の新たな活性配列が明らかになった。これらの活性ペプチドを用いた解析によって、細胞-細胞外マトリックス間相互作用のより詳細な作用メカニズムの解明が可能となり、大気汚染の生体へ及ぼす影響のしくみが解明されるものと期待される。またラミニンは大部分の多細胞動物に存在しており、進化の過程における高度な保存性や多様性を有している。本研究は、環境問題と関わりを持ち、且つ生物学的保存性・多様性を有する機能性生体分子の基礎研究であり、生態環境科学研究に大きく寄与できるものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。