

博士（地球環境科学） 横山 史晴

学位論文題名

Studies on Receptor-Specific Cellular Behaviors
by Functional Sequences in Laminins

（レセプター特異的なラミニン機能部位の生物活性に関する研究）

学位論文内容の要旨

生物個体は、外部環境からの多種多様な刺激に応じながら生命活動を営んでいる。本申請者の行った研究は、外界からの様々な環境因子が及ぼす影響を細胞レベルで解析を目指す基礎的研究である。

細胞は生体内では、細胞外マトリックスと呼ばれる外部環境と接し、環境の変化にダイナミックに対応しながら生命活動を行っている。したがって、代表的な細胞外マトリックスである基底膜と細胞との詳細な相互作用の解析は、環境因子が生体へ及ぼす影響を考える上で重要である。

基底膜は、組織特異的な細胞の発生や維持に必要不可欠である。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、細胞接着を代表とする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、細胞と相互作用することで様々な生命現象に関与している。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特に重要な部位であることがわかっている。さらに、Gドメイン内の機能部位と細胞膜レセプターの関係も明らかになってきている。

細胞外マトリックス分子の細胞膜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、近年ではヘパラン硫酸プロテオグリカンであるシンデカンが注目されている。本研究では、これらのレセプターと特異的に相互作用するラミニン機能部位に着目し、細胞との相互作用メカニズムの解明を目的としている。

第1章ではレセプターとの相互作用におけるラミニン機能部位の立体構造の重要性を検討した。ラミニン α 4鎖Gドメインのペプチドスクリーニングにより同定された活性ペプチドであるA4G82は、立体構造中ではループ部位に位置することがわかった。そこで本申請者は、このA4G82部位のループ構造が生物活性に重要ではないかと考え、ループ構造をミックしたサイクリックペプチド（cyc-A4G82）を合成し、その生物活性を測定した。まず、 α 4鎖Gドメインの組換えタンパク（rec- α 4G）のヘ

パリン結合に対する cyc-A4G82 の阻害効果は、A4G82 に比べて非常に強かった。ヘパリン結合においても cyc-A4G82 のほうが強い活性を示した。次に、ヒト繊維肉腫細胞 (HT-1080) を用いてアッセイを行った。rec- α 4G の細胞接着活性に対する cyc-A4G82 の阻害活性を測定したところ、A4G82 よりも強い阻害が認められた。また、ペプチドの細胞接着活性を調べたところ、cyc-A4G82 のほうが強く細胞に接着し、その活性はヘパリン依存性であることがわかった。さらに、cyc-A4G82 の細胞接着に関与している細胞膜レセプターを同定するために、シンデカン-2 を細胞表面上に過剰発現させたヒト尿細管上皮細胞 (293T 細胞) を用いてアッセイを行ったところ、シンデカン-2 の過剰発現により細胞接着活性が増強した。これらの結果より、ループ構造をミミックした cyc-A4G82 の活性が強められたことから、A4G82 部位のループ構造がシンデカン-2 を介した生物活性に重要であることが示された。

第 2 章では、5 種類の α 鎖 G ドメインの相同部位における生物活性を比較・検討した。これまでの研究で同定されてきたラミニン α 鎖 LG4 モジュールの活性部位を詳細に解析した結果、LG4 モジュール内の β ストランド E と F の間の相同部位 (EF 部位) から複数の活性配列が見出された。そこで、本申請者はこの EF 部位に着目し、5 種類のヒトラミニン α 鎖 LG4 モジュールの EF 部位由来の相同ペプチド (hEF-1～hEF-5) を合成し、生物活性の解析を行った。5 種類の hEF ペプチドは細胞種特異的な活性を示し、接着したヒト繊維芽細胞の形態にも特徴がみられた。hEF-1 の上では接着斑とアクチнстレスファイバーの形成がみられ、hEF-3 と hEF-4 の上ではラフリング膜の形成がみられた。細胞接着に関するレセプターにも特異性がみられ、hEF-1 は α 2 β 1 インテグリンを介して細胞と相互作用することが示され、また、hEF-3 はヒト繊維芽細胞の細胞表面でシンデカン-2 と相互作用することが示された。次に、レセプターが同定された hEF-1 と hEF-3 のアミノ酸配列を融合したキメラペプチド (cEF13A～EF13E) を合成し、ヒト繊維芽細胞への接着活性を調べたところ、インテグリンとシンデカンの両方のレセプターに作用することで特徴的な細胞形態を促す新規ペプチドが同定され、各々のレセプターからの特異的な細胞内シグナルのクロス・トークが示唆された。

これらの解析結果から、特異的なレセプターを介したラミニン機能部位と細胞との相互作用の詳細が明らかとなった。このように特異的なレセプターに対応する活性ペプチドを利用することで、細胞が外界から受ける様々な影響をシンプルに解析することができる。本研究は、多様な外部環境からの刺激を細胞レベルで解析するために有益なアプローチを提示し、環境科学の分野に新たな知見をもたらすものと期待される。

学位論文審査の要旨

主査 助教授 春木雅寛
副査 教授 坂入信夫
副査 教授 森川正章
副査 名誉教授 西則雄（北海道大学）
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 Receptor-Specific Cellular Behaviors by Functional Sequences in Laminins

（レセプター特異的なラミニン機能部位の生物活性に関する研究）

細胞にとっての環境的機能を果たす基底膜は、組織特異的な細胞の発生や維持に必要不可欠である。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、細胞接着を代表とする様々な生物活性を有している。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特に重要な部位であることが知られており、Gドメイン内の機能部位と細胞膜レセプターの関係も明らかになってきている。本申請者はこれらの細胞膜レセプターと特異的に相互作用するラミニン機能部位に着目し、これまでよくわかつていなかった細胞レベルでの相互作用メカニズムの解明を目的として研究を行った。

第1章では、細胞膜レセプターとの相互作用におけるラミニン機能部位の立体構造の重要性を検討した。ラミニン α 4鎖Gドメインのペプチドスクリーニングにより同定された活性ペプチドであるA4G82は、立体構造中ではループ部位に位置する。本申請者はこのA4G82部位のループ構造が生物活性に重要ではないかと考え、ループ構造をミミックしたサイクリックペプチド(cyc-A4G82)を合成し、その生物活性を測定した。まず、 α 4鎖Gドメインの組換えタンパク(rec- α 4G)のヘパリン結合に対するcyc-A4G82の阻害効果は、A4G82に比べて非常に強かった。ヘパリン結合においてもcyc-A4G82のほうが強い活性を示した。次に、ヒト緜維肉腫細胞(HT-1080)を用いてアッセイを行い、rec- α 4Gの細胞接着活性に対するcyc-A4G82の阻害活性を測定したところ、A4G82よりも強い阻害が認められた。また、ペプチドの細胞接着活性を調べたところ、cyc-A4G82のほうが強く細胞に接着し、その活性はヘパリン依存性であることがわかった。さらに、cyc-A4G82の細胞接着に関与している細胞膜レセプターを同定するために、シンデカン-2を細胞表面上に過剰発現させたヒト尿細管上皮細胞(293T細胞)を用いてアッセイを行ったところ、シンデカン-2の過剰発現により細胞接着活性が増強した。以上のように、ループ構造をミミックしたcyc-A4G82

の活性が強められたことから、A4G82 部位のループ構造がシンデカン-2 を介した生物活性に重要であることが明らかになった。

第2章では、5種類の α 鎖Gドメインの相同部位における生物活性を比較・検討した。これまでの研究で同定されてきたラミニン α 鎖 LG4 モジュールの活性部位を詳細に解析した結果、LG4 モジュール内の β ストランド E と F の間の相同部位 (EF 部位) から複数の活性配列を見出した。本申請者はこの EF 部位に着目し、5種類のヒトラミニン α 鎖 LG4 モジュールの EF 部位由来の相同ペプチド (hEF-1～hEF-5) を合成し、生物活性の解析を行った。5種類の hEF ペプチドは細胞種特異的な活性を示し、接着したヒト纖維芽細胞の形態にも特徴がみられた。hEF-1 の上では接着斑とアクチントレスファイバーの形成がみられ、hEF-3 と hEF-4 の上ではラフリング膜の形成がみられた。細胞接着に関するレセプターにも特異性がみられ、hEF-1 は $\alpha 2\beta 1$ インテグリンを介して細胞と相互作用することが示され、また、hEF-3 はヒト纖維芽細胞の細胞表面でシンデカン-2 と相互作用することが示された。次に、レセプターが同定された hEF-1 と hEF-3 のアミノ酸配列を融合したキメラペプチド (cEF13A～EF13E) を合成し、ヒト纖維芽細胞への接着活性を調べたところ、インテグリンとシンデカンの両方のレセプターに作用することで特徴的な細胞形態を促す新規ペプチドが同定され、各々のレセプターからの特異的な細胞内シグナルのクロス・トークが示唆された。

これらの解析結果から、特異的な細胞レセプターを介したラミニン機能部位と細胞との相互作用の詳細が明らかになった。また、このように特異的なレセプターに対応する活性ペプチドを利用することで、細胞が外界から受ける様々な影響をシンプルに解析することができる示した。

本研究とその成果は、ラミニン機能部位の構造が生物細胞活性にとって重要であること、レセプター特異的な活性ペプチドとラミニン機能部位、細胞との相互作用を明らかにし、多様な外部環境からの刺激を細胞レベルで解析するために有益なアプローチを提示したものであり、組織細胞新生など医薬用分野への応用など、地球環境科学ならびに生態環境科学研究に大きく寄与するものであると確信する。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、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）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。