

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02389

研究課題名(和文) インテグリン-ラミニン複合体の結晶構造解析による分子認識機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the laminin recognition mechanism by integrin

研究代表者

有森 貴夫 (Arimori, Takao)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号：80582064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 8,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、基底膜の主要な構成分子であるラミニンとその受容体であるインテグリンの複合体の3次元構造を決定し、その分子認識機構を解明することを目指した。独自に開発した小型抗体をツールとして使うことで安定な複合体試料の調製に成功し、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析により、3.9 Å分解能でその構造を決定した。さらに、複合体構造から明らかになった結合インターフェースのアミノ酸残基について、変異体を用いた結合親和性解析を行うことで、各アミノ酸残基の結合への寄与を定量的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インテグリンとラミニンの結合は細胞接着の足場として働くだけでなく、細胞の増殖や分化、生存などをコントロールしており、癌細胞においては浸潤や転移にも関与している。また、ES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞ではインテグリンが高発現しており、これらを培養する際には、ラミニンが接着培養の土台(培養基質)として実際に応用されている。本研究で詳細に明らかにしたインテグリンとラミニンの相互作用機構は、単なる生命現象の理解にとどまらず、創薬や再生医療にも大きく貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Recognition of laminin, a major component of the basement membrane, by integrin receptors plays a central role in the adhesion of epithelial cells to basement membrane, but the structural background of this molecular interaction has been unclear. In this study, we determined the three-dimensional structure of the laminin-integrin complex and elucidated its molecular recognition mechanism. By using the previously developed antibody fragment, Fv-clasp, we succeeded in preparing a stable laminin-integrin complex sample and determined its structure at 3.9 Å-resolution by single particle cryo-electron microscopy. In addition, binding analysis using mutants of amino acid residues found at the binding interface revealed by the complex structure quantitatively clarified the contribution of each amino acid residue to the binding.

研究分野：構造生物学

キーワード：結晶構造解析 クライオ電子顕微鏡 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

インテグリンは細胞膜上に存在し、細胞と細胞外マトリックス、あるいは細胞同士の接着を担う主要な受容体分子である。その機能は単に細胞の接着を行う足場として働くだけでなく、細胞の外から中へ (outside-in signal)、そして中から外へ (inside-out signal) と細胞の内外の情報を双方向に伝達し、細胞の増殖、遊走、組織形成、さらにはがんの転移など、多岐にわたって細胞の活動に関与する。中でも、インテグリンによるラミニンの認識は、上皮細胞が基底膜に接着する際に中心的な役割を果たしているが、この分子相互作用機構については不明な点が多かった。その主な要因は、インテグリンもラミニンもともに構造解析が困難な分子であり、立体構造情報がほとんどなかったためである。

基底膜を構成する主要な分子の1つであるラミニンは、 α 、 β 、 γ という3つのポリペプチド鎖から構成される 800 kDa にもおよぶ巨大分子であり、ヒトでは 16 種類のアイソフォームの存在が知られている。このうち $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\gamma 1$ から構成されるラミニン 511 は、成人の上皮組織に最も多く存在し、幹細胞の選択的分化にも関与している重要なアイソフォームである。実際、ラミニン 511 は、ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞を培養する際の培養基質としても利用されている。巨大分子であるラミニンの立体構造を決定するのは極めて困難であるが、我々はこれまでに、インテグリン結合能を保持する 90 kDa 程度のラミニン 511 断片を創製することに成功し、その結晶構造も 1.8 Å 分解能で決定して 2017 年に発表している (図 1, *Sci. Adv.* 2017)。

一方のインテグリンは、 α と β の 2 つのサブユニットから構成されるヘテロ 2 量体分子である。大きさは 200 kDa 程度で、その大半を占める細胞外領域の先端で特異的にリガンドと結合し、情報を伝達する。ヒトでは 24 種類のインテグリン分子が存在し、そのうち 4 種がラミニンに結合するラミニン受容体サブファミリーに分類される。インテグリンの細胞外領域は複数のドメインから構成される糖タンパク質であるため結晶化は容易ではないが、2001 年に RGD 受容体サブファミリーに分類されるインテグリン $\alpha v \beta 3$ の結晶構造が発表されたのを皮切りに、多数の結晶構造が報告されている。しかしながら、ラミニン受容体インテグリンについてはこれまで全く立体構造が報告されておらず、インテグリンがラミニンを如何に認識して情報を伝達しているのかの詳細は不明であった。我々も、インテグリンによるラミニン認識機構の解明を目指し、長年にわたりラミニン受容体の 1 つであるインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ の結晶構造解析に取り組んできたが、その結晶の取得は困難を極めていた。その状況を打開したのは、我々が開発した Fv-clasp という構造解析に非常に有用なフラグメント抗体フォーマットである抗インテグリン抗体の Fv-clasp を結晶化を促進させるための“結晶化シャペロン”として用いることで、ようやく世界初となるラミニン受容体インテグリンの結晶構造を 2.9 Å 分解能で決定することに成功した (図 1)。

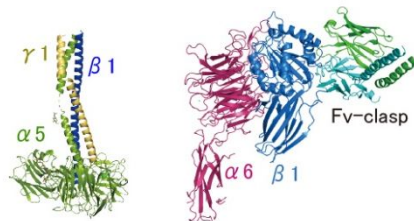


図 1 ラミニン 511 (左) およびインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ (右) の結晶構造

このように、本課題を開始した 2018 年時点で、我々はラミニン 511 とインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ のそれぞれの結晶構造の決定に成功していたが、ラミニン受容体インテグリンの構造については、我々のこの未発表データのみしかなく、ラミニンについても我々の構造以外にはマウスのラミニン 111 の結晶構造が報告されているのみである。しかも、インテグリンファミリーの中で最も研究が進んでいる RGD 受容体インテグリンが、リガンド分子に含まれる Arg-Gly-Asp (RGD) という配列に対してペプチドレベルでも高い親和性を示すのに対して、ラミニンにはそのようなインテグリンに高親和性を示す配列の存在は知られておらず、むしろ広い範囲でインテグリンと相互作用することが示唆されている。したがって、アミノ酸残基レベルで分子認識機構を理解するためには、両者の複合体の構造情報がどうしても必要であると言える。

2. 研究の目的

前述のように、インテグリンとラミニンはともに多数のアイソフォームを持つが、その中で、基底膜への細胞接着において中心的な役割を担うインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ とラミニン 511 が、どのようにして互いを特異的に認識し、情報を伝達するのかを詳細に解明することを本研究の目的とした。そこで、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ とラミニン 511 の複合体の立体構造を決定することを第一の目標とし、さらに、構造情報をベースにした変異体実験により、アミノ酸残基レベルで結合への寄与を詳細に解析することを目指した。

3. 研究の方法

(1) インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ -ラミニン 511 複合体試料の調製方法の探索

インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ -ラミニン 511 複合体の構造解析を行うにあたり、安定な複合体試料が得られる条件の探索を行った。インテグリンおよびラミニンの試料については、それぞれの結晶構造を決定する際にコンストラクトのデザインの最適化を行ったため、複合体の構造解析におい

でも同じものを用いることにした。構造解析に適した均質な試料が得られるかどうかを判断するため、ゲルろ過カラムを用いて複合体の形成効率を分析した。インテグリンを活性化する Mn イオンの有無や、インテグリンの活性や構造安定化に寄与と思われる抗体断片の有無で複合体のピークの挙動がどのように変化するかを網羅的に調べた。

(2) インテグリン 6 1-ラミニン 511 複合体の構造解析

(1)で決定した複合体試料の調製条件を用いて、試料の大量調製を行った。当初は、X 線結晶構造解析による複合体の構造決定を目指し、結晶化を行っていたが、構造解析を行えるような回折能を示す結晶が得られなかったため、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析を行った。Titan Krios で 8,000 枚近いクライオ電子顕微鏡画像を取得し、そこから得られた 260 万以上の粒子を用いて解析した結果、3.9 Å 分解能の電顕マップが得られた。各分子の結晶構造を初期構造として用い、電顕マップに合うようにモデルの修正および精密化を行い、目的の複合体の原子モデルを構築した。

(3) 変異体を用いたインテグリン 6 1 とラミニン 511 の結合親和性の測定

(2)で得られた複合体構造において、インテグリンとラミニンの結合に重要であることが示唆されたアミノ酸残基について変異を導入し、結合能の変化を調べた。インテグリンとラミニンの結合能の測定法として、インテグリン 6 1 細胞外領域とラミニン 511 (断片)を用いたプルダウンアッセイの系を確立した。しかし、この実験系では結合能の変化を定量的に測定することが難しいため、膜発現インテグリン 6 1 (全長)と GFP 融合ラミニン 511 (断片)の結合をフローサイトメトリーにより調べる実験系も確立した。この測定法においては、より定量的に親和性の変化を調べることが可能で、 K_D 値を算出することもできる。

4. 研究成果

(1) インテグリン 6 1-ラミニン 511 複合体試料の調製方法の探索

多くのインテグリン分子は、Mn イオンの存在下でリガンドへの親和性が向上することが知られている。これは、インテグリンのサブユニットに存在する金属配位部位に結合している Mg イオンが、Mn イオンに置き換わることで局所的な構造変化を起こし、リガンド親和性が向上するためと考えられている。そこで、Mn 非存在下と Mn 存在下でゲルろ過を行い、インテグリンとラミニンの複合体形成を分析した。その結果、Mn 非存在下では、インテグリン 6 1 とラミニン 511 の混合試料において、それぞれの単独試料の溶出位置 (図 2, 青のラインと上部の矢頭の位置を参照) とほぼ同じ位置にピークが見られたのに対し、Mn 存在下では高分子量側へのピークシフトが見られ、インテグリン 6 1 においても Mn イオンの存在下でリガンド親和性が向上することが示された。

次に、インテグリンの活性化抗体である TS2/16、および活性化型インテグリンにのみ結合し、その構造を安定化することが期待できる HUTS4 という 2 種類の抗体について、それぞれの Fv-clasp 化試料を調製し、これらの抗体存在下での複合体の形成も同様に調べた。その結果、活性化抗体である TS2/16 はインテグリンとラミニンの複合体形成を促進し (図 2, 緑のライン)、HUTS4 は、インテグリンとラミニンの複合体の形成効率に依存して結合しやすくなることが確認できた (図 2, オレンジのライン)。さらに、インテグリン、ラミニン、TS2/16、HUTS4 の 4 者混合試料では、Mn 存在下で高分子量側に非常にシャープなピークが得られ (図 2 右, ピンクのライン)、このピークの試料の電気泳動の結果、添加したすべてのコンポーネントのバンドが確認された (図 3)。ゲルろ過のピークの形状および電気泳動の結果から、この条件において安定な 4 者複合体が形成されていると考えられ、この試料が構造解析に適していると判断した。

(2) インテグリン 6 1-ラミニン 511 複合体の構造解析

(1)で得られた 4 者複合体試料について結晶化を実施したところ、結晶は得られたものの、構造解析を行えるような X 線回折能を示さなかった。そこで、クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析による構造解析を試みた。その結果、3.9 Å 分解能のクライオ電顕マップを取得することができた。精度の高い原子モデルを構築するため、最初に、各分子の結晶構造をドメイン単位に分割して電顕マップに当てはめ、その後、モデルの修正と精密化を行った。なお、HUTS4 Fv-clasp については結晶構造がなかったため、モデル構築に先立って、本研究において新たに結晶構造を

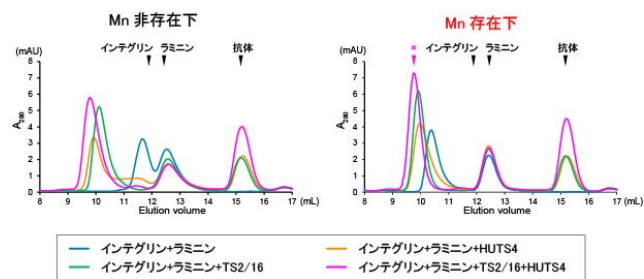


図 2 ゲルろ過によるインテグリン 6 1 とラミニン 511 の複合体形成の確認

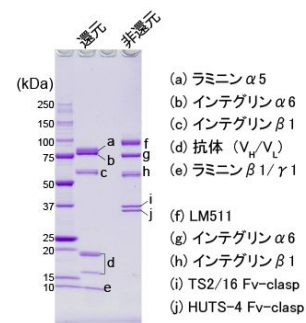


図 3 ゲルろ過で分取したインテグリン 6 1-ラミニン 511-TS2/16-HUTS4 複合体試料の電気泳動

決定した(2.6 Å分解能).最終的に,図4に示すように電顕マップによくフィットした原子モデルを構築することに成功した.

(3) 変異体を用いたインテグリン 6 1 とラミニン 511 の結合親和性の測定

インテグリン 6 1-ラミニン 511 複合体の構造から,これまでの予想通り,多くのアミノ酸残基が結合に関与していることが分かった.特に,インテグリン 6 の2か所のループ領域と,ラミニン 5 の底面には極性残基が多く存在し,これらを介した静電相互作用が両者を引き付ける上で重要な働きをしていることが示唆された.そこで,これらのアミノ

酸残基に変異を導入し,各残基の結合への寄与を解析した.まずは,インターフェースに見られた複数の酸性残基または塩基性残基について,それぞれの極性が逆になるような変異を導入し,プルダウンアッセイにより結合を調べたところ,ほとんどの変異体において,結合能が失われることが確認できた.さらに,より詳細に解析するため,インテグリン 6 上の極性残基をアラニンに置換した全長インテグリン 6 1 の変異体を複数作製し,これらを細胞膜上に発現させ,フローサイトメトリーにより GFP 融合ラミニンとの結合を測定した.各変異体についてラミニン濃度を変えて結合量を測定することで K_D 値を算出し,インテグリンとラミニンの結合インターフェースに見られる各極性残基の結合への寄与を,定量的に明らかにした.

以上のように,本研究では構造解析および変異体実験により,インテグリンとラミニンの分子認識機構を極めて詳細に明らかにすることに成功した.本研究課題の最大の目標であったインテグリン-ラミニン複合体の構造解析については,研究課題名にもあるように当初は結晶構造解析を行う予定であったが,結晶化が難航したことに加え,研究代表者の所属機関のクライオ電子顕微鏡の環境が整ったこともあり,クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析に変更したことで目標を達成した.この構造は,ラミニン受容体インテグリン-ラミニン複合体の立体構造として世界初のものであるのはもちろんのこと,タンパク質リガンドとの複合体で決定されたインテグリンの立体構造としても,RGD 受容体インテグリン以外では初めての例であり,インテグリン受容体ファミリー全般の研究においても重要な成果であると言える.また,本研究で明らかにしたインテグリンとラミニンの相互作用機構は,ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞の培養に用いる培養基質の開発においても有益な情報であり,再生医療をはじめとした応用研究に貢献することが期待できる.これらの研究成果は,先に決定していたインテグリン 6 1 の結晶構造と合わせて論文にまとめ,投稿した.

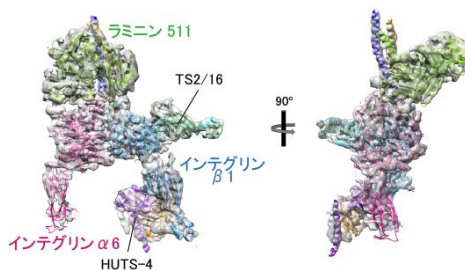


図4 インテグリン 6 1-ラミニン 511-TS2/16-HUTS4 複合体のクライオ電顕マップ(グレー)と原子モデルのリボン図(カラー)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mihara Emiko, Watanabe Satoshi, Bashiruddin Nasir K., Nakamura Nozomi, Matoba Kyoko, Sano Yumi, Maini Rumit, Yin Yizhen, Sakai Katsuya, Arimori Takao, Matsumoto Kunio, Suga Hiroaki, Takagi Junichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Lasso-grafting of macrocyclic peptide pharmacophores yields multi-functional proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21875-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato Nobuhiro, Yogo Rina, Yanaka Saeko, Martel Anne, Porcar Lionel, Morishima Ken, Inoue Rintaro, Tominaga Taiki, Arimori Takao, Takagi Junichi, Sugiyama Masaaki, Kato Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 A feasibility study of inverse contrast-matching small-angle neutron scattering method combined with size exclusion chromatography using antibody interactions as model systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higuchi Yusuke, Suzuki Tatsuya, Arimori Takao, Ikemura Nariko, Mihara Emiko, Kirita Yuhei, Ohgitani Eriko, Mazda Osam, Motooka Daisuke, Nakamura Shota, Sakai Yusuke, Itoh Yumi, Sugihara Fuminori, Matsuura Yoshiharu, Matoba Satoaki, Okamoto Toru, Takagi Junichi, Hoshino Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 High affinity modified ACE2 receptors protect from SARS-CoV-2 infection in hamsters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.09.16.299891	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Wakasa Ayami, Kaneko Mika K, Kato Yukinari, Takagi Junichi, Arimori Takao	4. 巻 168
2. 論文標題 Site-specific epitope insertion into recombinant proteins using the MAP tag system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 375 ~ 384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa054	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirai Hidenori, Matoba Kyoko, Mihara Emiko, Arimori Takao, Takagi Junichi	4. 巻 26
2. 論文標題 Crystal structure of a mammalian Wnt/frizzled complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 372 ~ 379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41594-019-0216-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Teruya, Hirata Keisuke, Fujimiya Kana, Chirifu Mami, Arimori Takao, Tamada Taro, Ikemizu Shinji, Yamagata Yuriko	4. 巻 36
2. 論文標題 X-ray Structure Analysis of Human Oxidized Nucleotide Hydrolase MTH1 using Crystals Obtained under Microgravity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Microgravity Science and Application	6. 最初と最後の頁 360103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15011//jasma.36.360103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計15件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takao Arimori, Naoyuki Miyazaki, and Junichi Takagi
2. 発表標題 Stable antibody fragment format 'Fv-clasp': Application to challenging structural studies
3. 学会等名 第20回 日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有森 貴夫
2. 発表標題 タンパク質結晶化に応用可能な新規小型抗体フォーマットFv-claspの開発
3. 学会等名 令和2年日本結晶学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有森 貴夫, 若狭 彩美, 金子 美華, 加藤 幸成, 高木 淳一
2. 発表標題 抗MAPタグ抗体の結晶構造とMAPタグシステムの新たな応用法
3. 学会等名 第19回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有森 貴夫
2. 発表標題 HGF-Metシグナル伝達経路におけるHGF活性変換機構の構造基盤
3. 学会等名 蛋白研セミナー：がん研究の新機軸（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takao Arimori
2. 発表標題 Development of an artificially designed antibody fragment “Fv-clasp”
3. 学会等名 分子研研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 有森 貴夫, 小山 知晃, 高木 淳一
2. 発表標題 IdeSプロテアーゼによるエキソサイトを介したIgG切断反応機構の構造基盤
3. 学会等名 第18回 日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------