◆ 総 説 ◆

シグナル伝達におけるインテグリンの構造変化

高 木 淳 一*

Global Conformational Rearrangements in Integrin Extracellular Domains in Outside-in and Inside-out Signaling

Junichi TAKAGI*

Key words : platelet, integrin, inside-out signaling, fibrinogen, thrombosis

1. はじめに

インテグリンは細胞—細胞あるいは細胞—基質間の接着をつかさどる主要な細胞上レセプターのファミリーで、特にダイナミックな細胞の接着—脱着機構で中心的な役割を果たす。そのため、インテグリン細胞外領域のリガンド結合能は、細胞が受ける種々の刺激に応じて細胞の内側から極めてよくコントロールされている (inside-out signaling と呼ばれる)¹⁾。また、インテグリンを介して細胞がリガンドに接着すると、その情報は細胞内に伝えられ、最終的には細胞の次の行動 (生存, 増殖, 遺伝子発現など) を引き起こすことになる (outside-in signaling)²⁾。インテグリンが「双方向性のシグナリング分子」と言われるゆえんである。血小板上のインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) はフィブリノーゲン受容体として血栓形成に中心的な役割を果たす分子であり、抗血栓薬の主要なターゲットとなっている³⁾。 $\alpha_{IIb}\beta_3$ はトロンビンや ADP などの血小板の生理的刺激にともなってその構造を変え、高親和性となってフィ

ブリノーゲンを結合するが、この過程が inside-out シグナル伝達のプロトタイプとして種々のインテグリンの中でもっとも良く研究されている⁴⁾。しかしながら、いったい細胞内からの刺激がどうやって細胞外ドメインにあるリガンド結合部位の構造を変えるのか、そしてどのような構造変化がインテグリンのリガンド結合活性上昇を引き起こすのか、謎に包まれていた。

2. インテグリンの細胞外ドメインの一次構造

インテグリンは α , β の二つのサブユニットが非共有結合で会合したヘテロダイマーであり、約 1000 アミノ酸の α 鎖と約 700 アミノ酸の β 鎖はともに一回の膜貫通ヘリクスと短い細胞内ドメインをもつ (図 1)。細胞外部分の構造は、 α 鎖の N 末端約 400 残基の部分で 7 枚の β シートを羽根として持つ β プロペラーと呼ばれるドメインを構成し、それより C 末端側には thigh, calf-1, calf-2 と名付けられた

* ハーバード大学医学部血液研究センター

Center for Blood Research, Harvard Medical School [200 Longwood Ave. Rm 238, Boston, MA 02446, USA]

e-mail : takagi@cbr.med.harvard.edu

図1 典型的なインテグリン α および β 鎖の一次構造

これまでに知られていたドメイン構造を濃く、Xiong らの論文で初めて明らかになったドメインを薄い灰色で着色してある。各ブロックの下の実線はジスルフィド結合を示す。

3つの β サンドイッチ構造が続く。 β 鎖の方は、最も N 末端に PSI ドメイン、それに続いて hybrid ドメインと呼ばれる β サンドイッチ構造、そして hybrid ドメインの中に挿入される形で I-like ドメインというモジュールが存在し、ここまでが N 末端側半分を構成する。残りの C 末端側半分は、EGF リピートと相同性のある I-EGF モジュールが4つと一つの β tail ドメインより構成される。リガンド結合のためには α 、 β 両サブユニットが必須であり、 α の β プロペラードメインと β の I-like ドメインが一つの球状の“頭部”を構成し、ここにリガンド結合部位が存在することが知られていた⁵⁾。そして各サブユニットの C 末端側が棒状の「ストーク (茎)」と呼ばれる構造を構成してあたかも2本の足の様にこの頭部を支え、細胞膜から立ち上がる。

3. インテグリンの構造変換モデル

CHO 細胞などに発現させたインテグリンを使って種々の変異体のリガンド結合活性を測定することが出来るが、Ginsberg らは α 鎖の細胞内ドメインの保存された配列を変異させると、発現させた $\alpha_{11b}\beta_3$ は活性化型となっていることを発見した⁶⁾。wild type の $\alpha_{11b}\beta_3$ では CHO 細胞に発現させてもその活性は低く抑えられているため、彼らは「刺激のない状態ではインテグリンの両サブユニットの細胞内ドメイ

A. “ヒンジ”モデル

B. 改訂 “ヒンジ”モデル

C. “ジャックナイフ”モデル

図2 インテグリンの活性化における3つの構造変化モデル

ンが相互作用して分子全体を“閉じた”形に保っており、細胞刺激によって細胞内ドメインの相互作用が壊されると膜貫通ドメインをてこの支点にして細胞外部位が開き、インテグリンが活性化するという構造変換モデルを提唱した。いわゆる「ヒンジモデル」である (図2A)。細胞内ドメインの相互作用がインテグリンを OFF に保つことを示唆する結果が数多く報告されたためこの仮説は広く受け入れられ、いまだにこれを支持する者も多い⁷⁾。しかし細胞外ドメインの構造変化が「頭部でのサブユニット解離」であるという実験的証拠は存在せず、膜貫通部位に強固な“ヒンジ”があるという点すら単なる予想に過ぎなかった。我々は、組み替え可溶性 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンを用い、ストークの根元でサブユニット間を架橋したイン

テグリンはリガンドに低親和性を示し、この架橋部位を切断してやると頭部はそのままストークが開き、高親和性へと変換することを示した。そしてこれにもとづいて「改訂ヒンジモデル」とでも言うべきものを提唱した(図 2B)⁸⁾。すなわち、ヒンジの支点は細胞膜ではなく、頭部そのものであって、構造変換は“また割り”様の動きであるとする説である。しかしこの説をもってしても、細胞内ドメインの構造の変化が膜をはさんで 200 Å も離れた頭部の構造変化にどうやって結びつくのかという大きな謎は説明出来ないでいた。そんなとき発表されたのが $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの細胞外ドメインの X 線結晶構造である。

4. $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの折れ曲がり構造

長らく待たれていたインテグリン細胞外ドメインの結晶構造が Arnaout らのグループから発表されたとき、その構造は驚きと賛嘆といくぶんの懐疑の目をもって迎えられた⁹⁾。なぜならばそれまでインテグリン研究者の間で受け入れられていた背の高いアーチ型の構造と違い、結晶構造は分子の途中でぽっきり折れ曲がり、リガンド結合部位である N 末端の“頭部”が細胞膜の方を向いていたからである(図 3B)。これでは細胞上で、リガンドである巨大なマトリックス蛋白質や、向き合った細胞上に発現したカウンターレセプターに近づくことすらできない。当初はこの折れ曲がり構造は、結晶格子パッキングによるアーティファクトであろうと考える研究者が多かった。筆者らはこの折れ曲がり構造を見た瞬間、これこそがインテグリンを“低親和性”に保つ鍵となる構造であると直感した。もし折れ曲がり型が低親和性で、起き上がった構造が高親和性であるなら、ばね仕掛けで飛び出す“ジャックナイフ”のような動きでインテグリンの活性化を説明できる。 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの細胞外ドメインの X 線結晶構造と前後して、我々は β_2 サブユニッ

トのストーク領域の中心に有る EGF 様ドメイン($\alpha_v\beta_3$ 結晶構造では見えていなかった)の構造を NMR で解いた¹⁰⁾。この部分には活性化やリガンド結合にともなって露出するエピトープが存在し、NMR 構造を結晶構造と組み合わせると、それらのエピトープが折れ曲がりの内側深く隠れていることが明らかとなった。この結果をもとに我々は「改訂ヒンジモデル」の更なる改訂版である「ジャックナイフモデル」(図 2C)を提唱した。しかしモデルはモデルである。これが確かに血小板の活性化などのおりにインテグリンを活性化するメカニズムであることを証明するためには実験的証拠が必要である。

5. 電子顕微鏡で見た $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの構造

筆者らはまず折れ曲がり構造が生理的条件下に存在することを証明するため、結晶解析に使われたのと同様な組み替え可溶性 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを調製してこれを電子顕微鏡で観察した¹¹⁾。両サブユニットの細胞外ドメインを含み、膜貫通ヘリクス以降を可溶性の α ヘリクスペプチドに置き換えたコンストラクトを作成し、CHO 細胞で発現させて精製 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを得た。この試料をカーボンフィルムの上に静電的に吸着させ通常のネガティブ染色をほどこし、電子顕微鏡で観察した。こうして得られた画像は解像度が粗く、とても分子の形を議論できない。しかし撮影した画像から粒子をより分け、クラス分けした後に何百という似た形の画像をコンピュータで平均化すると、驚くほど鮮明な形が浮かび上がってくる。その結果、結晶化に使われたのと同じ 5 mM Ca^{2+} の存在下では、インテグリンはまさに結晶構造とそっくりな折れ曲がり構造をしていることが明らかになった(図 3A, Ca^{2+})。 Ca^{2+} 存在下で $\alpha_v\beta_3$ インテグリンのリガンド結合活性を表面プラズモン共鳴によって調べると、リガンド結

図3 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの異なる二つのコンフォーメーション

A) ネガティブ染色後の電子顕微鏡像。5 mM Ca^{2+} 、1 mM Mn^{2+} 、および 5 mM Ca^{2+} +1 μM cyclo-RGD ペプチド存在下での代表的な平均化画像を示す。 Ca^{2+} 存在下での形が B の折れ曲がり型と良く一致することに注意。B) 折れ曲がりおよび起き上がり型のインテグリンの構造。折れ曲がり型は Xiong et al の結晶構造 (PDB コード 1JV2)、起き上がり型は 1JV2 の原子座標を元に分子の上半分 (点線から上) を約 130 度起き上がらせたものを α 鎖を赤で、 β 鎖を青のリボンモデルで現した。システインに変異させてジスルフィド結合を調べた残基 (α_v の Gly 307 と β_3 の Arg 563) の位置を金色の球で示してある。

合活性はほとんど検出できないが、1 mM の Mn^{2+} 存在下では生理的なリガンドであるフィブリノーゲンやビトロネクチンに対し数十 nM の親和性を示すようになる (図 4)。つまり Mn^{2+} は $\alpha_v\beta_3$ を活性化するわけであるが、この活性化した試料を再び電子顕微鏡で観察すると、折れ曲がり構造とは似ても似つかぬ、古くから信じられてきたような背の高いアーチ型の構造をしていたのである (図 3A, Mn^{2+})。 Ca^{2+} あるいは Mn^{2+} を含む溶液中でゲルろ過

によって求めた Stoke's 半径を比べると、確かに分子の形が大きく変化していることが確認され、観察された構造変化がカーボンの表面に吸着した際のアーティファクトではないことが明らかとなった。この分子の“起き上がり”は、インテグリンを活性化したときのみ観察される訳ではない。 Ca^{2+} 存在下では低親和性型であるインテグリンも、低分子のリガンドミメティックである cyclo-RGDfV ペプチドをくわえるところとこれを結合する。そしてこのリガンド結合型

図 4 表面プラズモン共鳴による $\alpha_v\beta_3$ インテグリンのリガンド結合活性測定
 フィブリノーゲンとビトロネクチンを固定化したセンサーチップ上に組み替え可溶性 $\alpha_v\beta_3$ を種々の濃度 (50, 100, 150 nM) でインジェクトした (二つの矢印の間), 生理的なバッファー (1 mM Ca^{2+} と Mg^{2+} を含む, 上段) ではほとんど結合が見られず, 1 mM Mn^{2+} の存在下 (下段) で初めて強い結合が観察される。

のインテグリンも起き上がり構造をとっていることがわかった (図 3A, Ca^{2+} +cRGD)。以上の結果は, 少なくとも $\alpha_v\beta_3$ インテグリンにおいて活性化もしくはリガンド結合にともなう構造変化が先に挙げたようなジャックナイフ様の動き (つまり “起き上がり”) であることを強く示唆するものであった。

6. 細胞表面インテグリンの折れ曲がり構造とその活性

上の結果はあくまでも可溶性レセプターで観察された構造であるため, 実際の細胞上のレセプターが同様な構造変化をするかは定かでない。もちろん細胞上のレセプターの形状を観察することは不可能である。そこで一計を案じ

た。図 3B に示すように結晶構造ではきつい折れ曲がりのためレセプターの頭部と足元が非常に近くなっている。中でも α_v 鎖の Gly-307 (α_{IIB} 鎖では Arg-320) と β_3 鎖の Arg-563 は約 5 Å の距離にあり, もしシステインに変異させると十分にジスルフィド結合を形成する可能性がある。これらの残基は起き上がった構造では 100 Å も離れているため, もしジスルフィド結合が確認されればとりもなおさず細胞上での折れ曲がり構造の存在が証明される。インテグリンの $\alpha\beta$ 両鎖は非共有結合的にヘテロダイマーを構成しているので, サブユニット間のジスルフィド結合は容易に非還元下の SDS-PAGE で確認できる。上のシステイン変異体を 293 T 細胞に一過性に発現させ, 代謝標識したのちに抗 β_3 鎖抗体で免疫沈降してそのジスルフィド

図5 細胞表面上での折れ曲がり構造の存在

野生型のサブユニット (α , β) あるいはシステイン変異体 (αC , βC) を種々の組み合わせで 293 T 細胞に発現させ、免疫沈降した。細胞表面で α_V の Gly 307 と β_3 の Arg 563, あるいは α_{IIb} の Arg 320 と β_3 の Arg 563 がジスルフィド結合を形成できるほど近いことがわかる。

図6 折れ曲がり型に固定されたインテグリンは非活性である

野生型の $\alpha_{IIb}\beta_3$ (左パネル) あるいは α_{IIb} (R 320 C) β_3 (R 563 C) (右パネル) を発現する細胞に対する PAC-1 抗体の結合。変異体の $\alpha_{IIb}\beta_3$ では Mn^{2+} と活性化抗体 PT 25-2 による PAC-1 結合の誘導が見られないが (影のついたヒストグラム), 2 mM DTT 処理によって野生型と同様な、活性化依存性のリガンド結合が見られる (太実線)。

結合生成を調べた (図 5)。結果は極めて明快、両方の残基をシステインに変えたときのみ 2 本のバンドは一本の高分子量のバンドへとシフト

し、ジスルフィド結合の形成、すなわち折れ曲がり型の存在を確認することが出来た。ジスルフィドの形成が 100%であったことから、細胞

表面ですべてのインテグリンが折れ曲がり構造を安定にとることが証明された。 $\alpha_v\beta_3$ のみならず $\alpha_{IIb}\beta_3$ においても同じ結果が得られ、折れ曲がり構造は β_3 インテグリンに共通な基底状態であることがわかった。さて先の「ジャックナイフ」型の活性化モデルによれば、折れ曲がったままのレセプターは低親和性を示すはずである。そこで先のシステイン変異体を発現した細胞を使って、可溶性のリガンド結合親和性を調べてみた。リガンドミメティック抗体である PAC-1 の結合は、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ を活性化試薬である Mn^{2+} と活性化抗体 PT 25-2¹²⁾ で活性化して初めて観察されるが、ジスルフィドによって折れ曲がり構造に“固定された”レセプターは、活性化に抵抗性で、PAC-1 の結合が見られなかった (図 6)。ところが DTT などのマイルドな還元剤処理でジスルフィドを解裂してやると、野生型と同じく活性化に依存した PAC-1 の結合が回復した (図 6)。これらの結果は、導入したジスルフィドによってリガンド結合活性が抑制されていること、すなわち折れ曲がり型のままではリガンド結合は起こらず、血小板活性化などの際の血漿フィブリノーゲン結合にはインテグリンが“起き上がる”ことが必要であることを示している。

7. シグナル伝達時のインテグリンの構造変化モデル

“非活性 (あるいは低親和性) 型”が折れ曲がり構造を、“活性化型”と“リガンド結合型”が起き上がり構造をとることは、先のジャックナイフ様の構造変化がインテグリンのリガンド親和性を制御するという仮説を強く支持している。しかし折れ曲がりと起き上がりの二つのコンフォメーション以外にも、それらの中間的な構造を持つ分子も電子顕微鏡で観察されており、生理的な条件ではインテグリンの構造は“揺れ動いて”いると考えるのが妥当であろう。inside-out シグナルを受け取ったときにはこの

平衡が起き上がり構造の方へシフトし、リガンド結合によってさらに起き上がり構造が安定化される。未刺激の細胞上ではインテグリン両サブユニットの細胞内ドメインは相互作用しており¹³⁾、この相互作用がインテグリンを低親和性に保っておくのに重要であることがわかっている¹⁴⁾¹⁵⁾。どうやら inside-out シグナルによって細胞膜貫通ドメイン/細胞内ドメインの構造が乱され、それが細胞外ドメインの構造変化 (つまり起き上がり) を引き起こすというシナリオが、現在のところ最も確からしい。細胞内でのインテグリンのサブユニット間相互作用を乱すトリガーとしては、アクチン結合蛋白質の一種であるテーリンがその第一の候補である。Calderwood らはテーリンの N 末端側ドメインが β_3 の細胞内ドメインの NPXY モチーフに結合し、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ を活性化することを報告した¹⁶⁾。テーリンの N 末端側ドメインは通常は自分自身の C 末端ドメインで隠されているが、カルパインなどのプロテアーゼで切断されると β_3 のテールと相互作用できるようになる¹⁷⁾。切断がなくともフォスファチジルイノシトール 4,5 ビスリン酸の結合によってもインテグリンとの結合が促進される¹⁸⁾。このドメインはリン酸化チロシン結合 (PTB) ドメインと呼ばれる構造をしており、その名前に反してリン酸化非依存的に NPXY モチーフに結合する¹⁹⁾。さらに Vinogradova らは、テーリンの β_3 への結合が α_{IIb} と β_3 の細胞内ドメインの間の結合を解離させることを報告している²⁰⁾。血小板中での異常に高いテーリンの存在量 (総蛋白質の約 1%) を考慮すると、inside-out シグナルを受け取った後の、秒単位でのインテグリンの活性化にテーリンが中心的な役割を果たしている可能性が極めて高い。

8. おわりに

ここで紹介したインテグリン活性化の構造変化モデルは、膜レセプターを介したシグナル伝

達の全く新しい作動原理であると同時に、血栓症や自己免疫疾患に深くかわるインテグリンに対する薬剤開発にあらたなヒントを与えるものである。RGD ペプチドによってインテグリンが起き上がり型に変換されることは、リガンドミメティックの投与が自己抗体の出現をもたらしてしまうという報告²¹⁾と呼応し、抗インテグリン薬としてのリガンドミメティックの深刻な限界を示唆している。リガンドミメティックにより生理的なリガンドとの結合を競合しようという考えとは全く別のアプローチ、たとえばリガンド結合部位以外に結合して非活性型である折れ曲がり構造を安定化するような化合物は、インテグリンの活性をブロックするのみならず、それを介した outside-in シグナルをも抑制するはずで、より望ましい。今後そのような次世代の抗インテグリン薬が開発されていくことを願いたい。

謝辞：稿を終えるにあたり、執筆の機会をお与えくださった大阪大学大学院分子制御内科、富山佳昭先生に深謝致します。

文 献

- Ginsberg MH, Du X, Plow EF: Inside-out integrin signalling. *Current Opinion in Cell Biology* **4**: 766-771, 1992.
- Giancotti FG, Ruoslahti E: Integrin signaling. *Science* **285**: 1028-1032, 1999.
- Scarborough RM, Gretler DD: Platelet glycoprotein IIb-IIIa antagonists as prototypical integrin blockers: novel parenteral and potential oral antithrombotic agents. *J Med Chem* **43**: 3453-3473, 2000.
- Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N: Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* **91**: 2645-57, 1998.
- Kamata T, Takada Y: Platelet integrin α IIb β 3-ligand interactions: what can we learn from the structure? *Int J Hematol* **74**: 382-9, 2001.
- O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH: Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* **124**: 1047-1059, 1994.
- Liddington RC, Ginsberg MH: Integrin activation takes shape. *J Cell Biol* **158**: 833-9, 2002.
- Takagi J, Erickson HP, Springer TA: C-terminal opening mimics "inside-out" activation of integrin α 5 β 1. *Nature Struct Biol* **8**: 412-416, 2001.
- Xiong J-P, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, Joachimiak A, Goodman SL, Arnaout MA: Crystal structure of the extracellular segment of integrin α V β 3. *Science* **294**: 339-345, 2001.
- Beglova N, Blacklow SC, Takagi J, Springer TA: Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct Biol* **9**: 282-287, 2002.
- Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA: Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* **110**: 599-611, 2002.
- Tokuhira M, Handa M, Kamata T, Oda A, Katayama M, Tomiyama Y, Murata M, Kawai Y, Watanabe K, Ikeda Y: A novel regulatory epitope defined by a murine monoclonal antibody to the platelet GPIIb-IIIa complex (α IIb β 3 integrin). *Thromb Haemost* **76**: 1038-46, 1996.
- Briesewitz R, Kern A, Marcantonio EE: Assembly and function of integrin receptors is dependent on opposing α and β cytoplasmic domains. *Mol Biol Cell* **6**: 997-1010, 1995.
- Hughes PE, Diaz-Gonzalez F, Leong L, Wu C, McDonald JA, Shattil SJ, Ginsberg MH: Breaking the integrin hinge. *J Biol Chem* **271**: 6571-6574, 1996.
- Lu C, Takagi J, Springer TA: Association of the membrane-proximal regions of the α and β subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J Biol Chem* **276**: 14642-14648, 2001.
- Calderwood DA, Zent R, Grant R, Rees DJ, Hynes RO, Ginsberg MH: The talin head domain binds to integrin β subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem* **274**: 28071-74, 1999.
- Yan B, Calderwood DA, Yaspan B, Ginsberg MH: Calpain cleavage promotes talin binding to the β 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **276**: 28164-70, 2001.
- Martel V, Racaud-Sultan C, Dupe S, Marie C, Paulhe F, Galmiche A, Block MR, Albiges-Rizo C: Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem* **276**: 21217-21227, 2001.
- Calderwood DA, Yan B, de Pereda JM, Garcia-Alvarez B, Fujioka Y, Liddington RC, Ginsberg MH: The phosphotyrosine binding (PTB)-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem* **277**: 21749-21758, 2002.
- Vinogradova O, Velyvis A, Velyviene A, Hu B, Haas TA, Plow EF, Qin J: A structural mechanism of integrin α IIb β 3 "inside-out" activation as regulated by its cytoplasmic face. *Cell* **110**: 587-597, 2002.
- Billheimer JT, Dicker IB, Wynn R, Bradley JD, Cromley DA, Godonis HE, Grimminger LC, He B, Kieras CJ, Pedicord DL, Spitz SM, Thomas BE, Zolotarjova NI, Gorko MA, Hollis GF, Daly RN, Stern AM, Seifert D: Evidence that thrombocytopenia observed in humans treated with orally bioavailable glycoprotein IIb/IIIa antagonists is immune mediated. *Blood* **99**: 1-7, 2002.